

低温生物膜及其微生物特性的研究

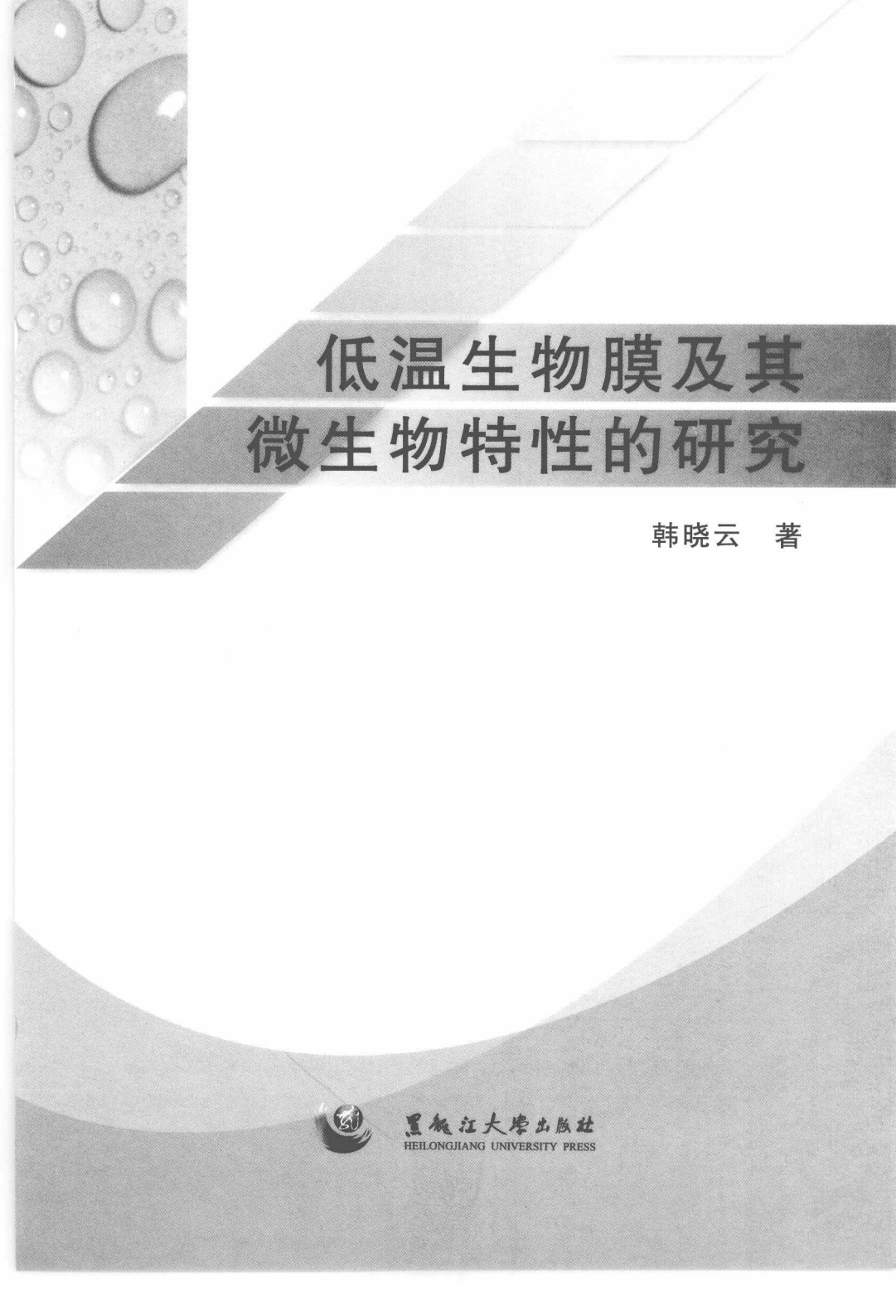
低温生物膜及其 微生物特性的研究

韩晓云 著

V729



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS



低温生物膜及其 微生物特性的研究

韩晓云 著



黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

低温生物膜及其微生物特性的研究/韩晓云著. —哈尔滨:黑龙江大学出版社, 2008. 8

(黑龙江大学学术文库)

ISBN 978 - 7 - 81129 - 072 - 1

I. 低… II. 韩… III. 低温材料 - 生物膜(污水处理) - 微生物 - 特性 - 研究 IV. X703

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 131135 号

责任编辑 赵丽华

封面设计 乐然纸尚

低温生物膜及其微生物特性的研究

DIWEN SHENGWUMO JIQI WEISHENGWU TEXING DE YANJIU

韩晓云 著

出版发行 黑龙江大学出版社

地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号 邮编 150080

电 话 0451 - 86608666

经 销 新华书店

印 刷 黑龙江省委党校印刷厂

版 次 2009 年 7 月 第 1 版

印 次 2009 年 7 月 第 1 次印刷

开 本 880 × 1 230 毫米 1/32

印 张 5.25

字 数 112 千字

书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 072 - 1

定 价 18.00 元

凡购买黑龙江大学出版社图书,如有质量问题请与本社发行部联系调换
版权所有 侵权必究

前 言

低温是造成寒冷地区冬季生活污水生化处理效果差的主要原因。当温度降至 4℃ 左右时,活性污泥中大多数微生物的生长活性受到抑制,只有少数的耐冷微生物可以存活下来并保持一定的活性。研究表明,在我国北方地区,完全可以分离到在低温下高效降解污水中有机物的耐冷细菌。通过投加耐冷菌可使污水的去除效率大大提高。但由于投加的耐冷菌的流失等原因,必须间隔一定时间再次投菌,既费时费力,又增加投资。

本书是在我的博士论文的基础上加工整理而成的。在课题研究过程中从活性污泥中分离到六株耐冷细菌,经鉴定,它们分别属于无色杆菌属、丛毛单胞菌属、黄杆菌属、微球菌属、芽孢杆菌属和假单胞杆菌属。这些耐冷细菌均能在 2℃ 条件下生长,在 4℃ 时仍具有水解淀粉、蛋白质、纤维素和脂肪的能力,产生的淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶的适合 pH 在中性和偏碱性范围内。经过低温优化组合得到低温生活污水高效降解菌群。

为了应用耐冷细菌固定化膜技术增加低温污水处理系统中的微生物数量,提高低温污水处理效率,本试验采用连续流固定化载体选择装置和配套的静态试验,在聚氨酯泡沫、破碎陶粒、柱状活性炭等载体上固定耐冷细菌,形成固定化生物载体。为了达到工程应用的目的,研究过程中设计了复合式低温污水生物处理反应器,在活性污泥处理基础上增加了生物接触氧化单

元,并将固定化载体投入到其中,在系统稳定运行时监测各项参数的影响。从耐冷菌群落生态学角度,探讨了生物接触氧化单元低温生物膜上的微生物特性。

研究表明,采用固定化耐冷菌的方法能够有效克服低温污水生物处理系统中微生物的流失,从而使低温污水处理效率大大提高;同时,固定在生物膜系统中的耐冷菌完全可以耐受季节变换过程中温度升高和降低的冲击,即同时在低温和中温污水处理中起到重要作用。

本课题的研究得到了导师姜安玺教授的悉心指导。感谢导师的严格要求、精心培养、亲切关怀。导师的言传身教将使我受益终生。在此谨向尊敬的导师致以最真挚的敬意和由衷的感谢。

由于作者能力和时间有限,缺点和错误在所难免,请广大读者和同行专家批评指正。

韩晓云
2008 年 12 月

目 录

1	绪 论	1
1.1	寒冷地区生活污水处理概况	1
1.2	低温对生物处理法的影响	3
1.3	国内外对冷适应微生物的研究现状	7
1.4	生物膜技术发展过程	13
2	试验方法	29
2.1	试验装置及流程	29
2.2	反应器中活性污泥的接种、驯化及耐冷细菌的 固定化	33
2.3	试验分析项目和方法	34
2.4	耐冷细菌的分离纯化和鉴定	35
2.5	细菌计数法	40
2.6	脱氢酶活性分析方法	41
2.7	有机物分解酶的定性分析方法	43
3	耐冷菌固定化的试验研究	46
3.1	耐冷细菌的分离及鉴定	46
3.2	冷活性酶对有机污染物的降解	52
3.3	载体的优化及固定化方法的选择	58

3.4	固定化生物载体对污水中有机物的去除	62
3.5	固定化生物载体表面观察	64
4	低温生物膜的形成及其污水处理效果	66
4.1	低温生物膜的形成	66
4.2	生物膜量及其在载体上的分布	76
4.3	低温生物膜的脱氢酶活性分析	81
4.4	生物膜对反应器处理效果的改善	87
5	低温生物膜中群落生态学的研究	96
5.1	群落的生态特征	96
5.2	环境因子的作用规律	108
5.3	低温生物膜中微生物群落演替	117
5.4	分子生物学技术在污水处理微生物检测中的 应用	131
	参 考 文 献	144

1 绪 论

水是人类赖以生存和社会发展的宝贵自然资源。没有水就没有生命,也就没有我们生活的世界。我国更是一个水资源匮乏的国家,人均占有量仅为 $2\,200\text{ m}^3$,仅相当于世界人均占有量的 $1/4$,居世界第 88 位。随着经济发展和城市化进程的加快,城市缺水问题尤为突出。

水资源的短缺一方面源于用水量的迅猛增加,另一方面是因为大量污水排放造成水环境大面积污染而产生的水质性缺水。城市污水是近年来我国城市经济社会高速发展、人口数量急剧增加所带来的副产品。据统计,2002 年全国工业和城镇生活废水排放总量为 $439.5 \times 10^8\text{ t}$,比去年同期增长 1.5%;废水中化学需氧量 (Chemical Oxygen Demand, COD) 排放总量为 $1\,366.9 \times 10^5\text{ t}$ 。据专家预测,若按我国经济增长保持 6%~9% 的高、中速率稳定发展,同期生活污水按 5% 的速率增长,那么到 2020 年,生活污水将达到 $30 \times 10^8\text{ m}^3$ ^[1]。

1.1 寒冷地区生活污水处理概况

我国华北、东北、西北地区冬季气候寒冷,冰冻期长达 3~6 个月,而北部边陲地区(北纬 40° 以北),最低气温一般在

-30℃以下。严酷的气候条件对污水生物净化极为不利。根据有关资料^[2],在表1-1中列举了我国西北、东北、华北的几个城市的平均气温和水温。

表1-1 一些寒冷城市的气温和水温变化

城市	地理位置	气温/℃			水温/℃
	纬度(北纬)	最低月平均	极端最低	年平均	冬季平均
沈阳	41°61'	-12.7	-30.5	—	7~9
吉林	43°47'	-17.8	-40.2	4.5	6~8
哈尔滨	45°45'	-20.0	-38.1	4.3	5~7
大庆	45°47'	-25.5	-37.4	3.5	5~7
包头	40°49'	-17.0	-30.4	6.6	6~8
乌鲁木齐	43°45'	-16.9	-41.5	6.9	7~9

从所列数据可见,这些地区冬季城市污水水温一般为4~7℃。目前,在我国寒冷地区,工程中一般采用降低污泥负荷、增加污泥回流量、增加污水停留时间、将一些构筑物建于室内采取保温或升温等措施来保证冬季污水处理出水达标。这些措施不仅会增加工程投资和运行费用,而且污水处理的效果也很难得到保证,还常会引起污泥膨胀等问题。表1-2是一些寒冷地区城市实验和推荐的低温城市污水活性污泥处理法的设计参数^[3]。

表 1-2 低温污水曝气池主要设计运行参数

项目	沈 阳	吉 林	哈 尔 滨	大 庆	规 范
	中 试	中 试	中 试	生 产 厂	GBJ14—87
曝气池水温/℃	7~9	6~8	5~7	5~7	—
污泥负荷/(kgBOD/ kg·MLSS·d)	0.14~0.18	0.13~0.23	0.15~0.25	0.24	0.20~0.40
混合液污泥浓度/ (MLSS/g·L ⁻¹)	1.5~2.6	2.0~3.0	2.0~4.0	2.5	1.5~2.5
污泥回流比/%	50	50~75	50~100	50~100	25~75
曝气时间/h	4.2	4.0~5.0	5.0~6.0	8.0	—

1.2 低温对生物处理法的影响

活性污泥法是污水处理,特别是城市污水处理中应用最为广泛的技术之一。活性污泥的结构和功能中心是由能起到絮凝作用的细菌形成的细菌团块,称菌胶团。在其上生长着其他微生物,如酵母菌、霉菌、放线菌、藻类、原生动物和某些微型后生动物。活性污泥中的优势细菌能迅速吸附废水中的有机污染物,有良好的自我凝聚能力和沉降性能。表 1-3 列出的是 Dias 等确证的活性污泥中的微生物种群。活性污泥中的各种细菌最适生长温度在 30℃ 左右,菌胶团细菌如动胶菌属的最适生长温度是 28~30℃,在 10℃ 生长缓慢。

构成活性污泥的微生物种群相对稳定,但当营养条件、温度、供氧、pH 值等环境条件改变时,会导致主要细菌种群(优势菌)改变,其中温度是一个非常关键的因素。国外一些专家和学者在 20 世纪 40 年代开始对这一问题进行研究,我国研究温

度对活性污泥法生物处理的影响始于 70 年代初。大量研究结果表明:温度的下降对活性污泥的吸附性能、沉降性能、微生物生长发育、种群组成及曝气池中氧转移效率等有显著的影响^[2~8]。

表 1-3 活性污泥中的微生物种群

细菌名称	拉丁名	细菌名称	拉丁名
动胶菌属	<i>Zoogloea</i>	短杆菌属	<i>Brevibacterium</i>
丛毛单胞菌属	<i>Comamonas</i>	固氮菌属	<i>Azotobacter</i>
产碱杆菌属	<i>Alcaligenes</i>	浮游球衣菌	<i>Sphaerotilus natans</i>
微球菌属	<i>Micrococcus</i>	微丝菌属	<i>Microthrix</i>
棒状杆菌属	<i>Corynebacterium</i>	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>
黄杆菌属	<i>Flavobacterium</i>	产气杆菌属	<i>Aerobacter</i>
无色杆菌属	<i>Achromobacter</i>	诺卡氏菌属	<i>Nocardia</i>
芽孢杆菌属	<i>Bacillus</i>	节杆菌属	<i>Arthrobacter</i>
假单胞菌属	<i>Pseudomonas</i>	螺菌属	<i>Spirillum</i>
亚硝化单胞菌属	<i>Nitrosomonas</i>	酵母菌	<i>Saccharomyces</i>

1.2.1 低温对活性污泥性能的影响

20 世纪 70 年代末到 80 年代初,张自杰、戴爱临等人曾对低温下活性污泥的性能进行了详细的研究。他们认为冬季低温污水生物处理效果差的主要原因是低温影响了活性污泥的性能,具体而言是指低温影响了活性污泥的吸附性能、沉降性能,并使微生物群落发生了变化。

1.2.1.1 对活性污泥吸附性能的影响

活性污泥对有机物的去除是通过吸附和氧化分解两个阶段来完成的。充分再生的活性污泥和污水短时间接触(5 ~ 30 min),通过附聚、吸附和凝集作用,可以去除污水中大部分有机物,这个作用发生在净化过程的初期,称为初期去除效应。初期去除效应在整个净化过程中起着十分重要的作用。

活性污泥的初期吸附作用与温度有密切的关系。常温条件下,经过充分再生的活性污泥具有良好的吸附性能。当温度变化时,吸附能力随温度的降低而减弱。低温影响活性污泥初期吸附作用的主要原因是:活性污泥的微生物量和活性随着温度的降低而降低,微生物的代谢能力下降,生化反应速度随之降低,吸附在活性污泥表面的有机物被水解和摄入微生物体内的速度减慢,在一定程度上导致活性污泥的生物吸附性能下降。

1.2.2.2 对活性污泥沉降性能的影响

温度对活性污泥的沉降性能有一定的影响。吴成强等^[4]对比研究了低温($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)和常温($20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下运行的活性污泥系统处理生活污水的污泥特性,发现不同的运行温度会对活性污泥的粒度、密度、表面电荷以及微生物组成产生影响,从而导致活性污泥的沉降性能和脱水性能的差异。与常温运行活性污泥相比,低温运行活性污泥所携带的负电荷少且具有更高的亲水性;活性污泥的胞外分泌物中含有更多的黏性物质,使污泥比阻和沉降指数增大而难于沉降。此外,冬季活性污泥中不易形成菌胶团的细菌占一定比重,导致污泥颗粒细碎,不易形成大颗粒絮状体,常常是细小泥粒的等速共沉,沉速很小。

1.2.2 低温对活性污泥微生物数量及组成的影响

温度对活性污泥法生物处理影响的大多数研究都是从宏观角度出发,并未从微观角度深入研究温度对微生物种群组成的影响。从本质上说,活性污泥法是基于微生物能够以污水中有机底物为碳源或能源的机理建立的,因此从微观角度详细分析低温对活性污泥中微生物组成及生长发育的影响,可以从根本上解决这一问题。

微生物的生长发育是一个极其复杂的生物化学反应,这个反应需要在一定的温度范围内进行。随着温度的降低,细菌的增殖速度减慢。当温度降至微生物的最低生长温度时,细菌的新陈代谢活动将减弱到极低的程度,呈休眠状态。这时细菌的生命活动虽然基本停止,但菌体并未死亡,当温度升高时,仍能恢复活性。在中温($20 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下细菌总数最高,可以比低温($6 \sim 9\text{ }^{\circ}\text{C}$)时高出 $5.7 \sim 6.5$ 倍^[3]。随着温度的降低,活性污泥中优势菌属的数目将逐渐减少。一些试验结果表明^[2],在同一处理系统中的活性污泥,在常温条件下由 $8 \sim 9$ 种优势菌属组成,而在 $5 \sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,优势菌属仅为五种(见表 1-4)。

尽管活性污泥中细菌的种属和数量随温度降低而减少,但存活下来的微生物的生物活性较好,保证低温活性污泥仍存在一定的净化能力^[3]。

表 1-4 常温与低温活性污泥中优势菌属的对比

顺序	21 ~ 22 ℃	7 ~ 8 ℃
1	动胶菌属	动胶菌属
2	假单胞菌属	微球菌属
3	棒状杆菌属	假单胞菌属
4	无色杆菌属	黄杆菌属
5	微球菌属	产碱杆菌属
6	节细菌属	—
7	芽孢杆菌属	—
8	黄杆菌属	—

1.3 国内外对冷适应微生物的研究现状

耐冷微生物(cold-adapted microorganism)也称低温微生物。最早的耐冷微生物是由 Foster 发现的,他于 1887 年报道了在冷冻保存的鱼中分离到能在 0 ℃ 下生长的细菌。人们已经从许多淡水、海水、极地和高山上的土壤、水、冰川、冷冻食物等低温环境中分离到了各种类型的耐冷微生物。1902 年, Schmidt-Nielso 首先将能在 0 ℃ 下生长的微生物命名为嗜冷微生物(psychrophiles)。1962 年, Ingraham 和 Stokes 给出一个更为准确的定义,他们将在一周或两周内在 0 ℃ 下能够生长出肉眼可见的菌落的微生物,称为嗜冷微生物。Morita 于 1975 年重新给出了一个耐冷微生物的定义,他将这类微生物分为两类^[9]:一类是必须生活在低温条件下且最高生长温度不超过 20 ℃,最适生长温度在 15 ℃ 以下,在 0 ℃ 可以生长繁殖的微生物称为嗜冷菌(psychrophiles);另一类是最高生长温度高于 20 ℃,最适生长温度高于

15℃,在0~5℃可以生长繁殖的微生物称为耐冷菌(psychrotrophs)。耐冷菌在0~5℃时仍然可以生长,并代谢外源物质,适合用于低温污水的生物处理。

由于地球生物圈中80%的环境温度都在5℃以下,因此耐冷微生物在地球上分布广泛。各国科学家对低温环境下耐冷微生物的多样性、分离培养、生理特征等进行了广泛的研究。

1.3.1 低温微生物多样性

嗜冷菌主要分布于常冷的环境中,耐冷菌分布范围则较广,从常冷到不稳定的低温环境中均可分离到。已发现的低温微生物有真细菌、蓝细菌、酵母菌、真菌及藻类^[10]。表1-5中给出了已发现的耐冷微生物。从各种环境中分离培养的结果来看,细菌的数量最大,种类也最多^[11,12],其次是酵母菌和丝状真菌。其中假单胞菌属、黄杆菌属、不动杆菌属、色杆菌属、芽孢杆菌属等是活性污泥中的常见菌。

表1-5 已发现的耐冷微生物

类群	微生物名称
细菌	假单胞菌属,弧菌属,不动杆菌属,气单胞菌属,色杆菌属,耶尔森氏菌属,节杆菌属,棒杆菌属,短杆菌属,黄杆菌属,沙雷氏菌属,纤维单胞菌属,乳杆菌属,利斯特氏菌属,芽孢杆菌属,梭菌属,嗜纤维菌属
蓝细菌	念珠藻属
硅藻	脆杆菌属
绿藻	短壳缝属,绿球藻属,柱孢藻属
酵母	假丝酵母属,隐球酵母属,红酵母属,有孢汉逊酵母属,类酵母属
丝状真菌	核线菌属,水节霉属,毛霉属,青霉菌属,交链孢霉属,芽枝霉属

1.3.2 低温微生物的适冷机制

1.3.2.1 细胞膜和养分摄取

Morton 等研究了嗜冷、中温和嗜热的 *Torulopsis* 菌株,发现只有嗜冷菌能在 2 ℃ 条件下运转葡萄糖^[13]。中温微生物在低于 5 ℃ 时不能代谢外源物质。微生物能否在低温条件下生长的限制因素之一是在低温时细胞是否具有转运外源营养物质进入细胞的能力。细胞膜中脂类的组成提供了膜流动和相结构改变的前提条件,从而保证了膜中镶嵌的蛋白质能够发挥正常的功能,如离子和营养的吸收、电子转移等。因此,当温度改变时,微生物必须调节脂类的组成,从而调节膜的流动性和相结构以适应环境温度的变化。最重要的膜脂质的改变是脂肪酸组成的改变,这种改变包括含有不饱和脂肪酸的比例增加;生长温度的降低有助于短链形成;脂肪酸甲基分支增加;增加支链脂肪酸的比例和减少环状脂肪酸的比例^[14]。

在 37 ℃ 生长的 *E. coli* 的酰基脂中有 15%~20% 的脂肪酸是不饱和的,并且当温度降低时这个百分比将增加。耐冷菌 *Micrococcus cryophilus* 的膜的脂相在温度低至 -30 ℃ 时还能保持流体状态。Murata 在日本的研究组提出蓝细菌 *Anacystis nidulans* 对低温敏感程度可以通过引入克隆 C₁₂ 去饱和酶基因提高它的合成不饱和脂肪酸的能力而得到增加^[15]。因此,当温度突然下降时,膜脂质通过大比例改变脂肪酸组成以恢复它的流动特性。例如,对一些杆菌随温度变化的反应的研究说明:随着温度的降低,最早发生的变化是去饱和酶的引入改变了膜脂的不饱和性;随后有一个更漫长的反应是改变了脂肪酸合成产物模式,使脂肪酸的链长和甲基支链发生变化。这些变化对于维持

低温时膜的流动性具有重要意义。革兰氏阴性菌倾向于改变脂质的饱和度和甲基链长度,而革兰氏阳性菌更多的是改变甲基键的类型和数目^[16,17]。

1.3.2.2 冷活性酶

研究冷活性酶最早的是 Morita,他报道了海产弧菌苹果酸脱氢酶在低于 20 ℃ 时具有催化活性,温度超过 20 ℃ 时则很快失活^[18]。中国科学院从南极的嗜冷酵母中分离纯化的琥珀酸脱氢酶的最适反应温度为 20 ℃,在 0 ℃ 能保持最大活性的 60%,但当温度升高时,冷活性酶即表现出对热的敏感性。如海洋弧菌细胞中的苹果酸脱氢酶于 30 ℃ 处理 10 min 酶活力完全丧失,丙酮酸脱羧酶在 35 ℃ 处理 30 min,酶活力损失 90%^[19]。

现在,一系列来源于嗜冷和耐冷微生物的冷适应酶,包括淀粉酶、乳糖脱氢酶、脂酶和枯草杆菌蛋白酶等,在功能特性、基因蛋白序列、初级结构和三维构象等方面的信息逐渐为人们所了解^[20]。将冷活性酶的空间结构与来自中温菌的相应酶进行比较,发现冷活性酶的分子适应机制似乎是氨基酸残基之间相互作用较弱,从而形成较伸展的分子结构,这种结构可在低耗能的情况下发挥催化作用^[21]。Zuber 及其同事从耐冷菌 *Bacillus psychrosaccharolyticus* 中分离出乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH),随后对其进行了克隆及序列分析,并将耐冷乳酸脱氢酶基因序列同中温菌、嗜热菌比较,证明耐冷 LDH 具有更多的极性、带电残基,以及更多的疏水表面、离子配对残基,这些变化使酶的活性中心更具柔韧性,并且在低温下更稳定^[22-24]。Gerday^[25] 的课题组对耐冷淀粉酶、蛋白酶和脂酶进行了分析,并与中温菌的相应酶的序列进行比较,得到了相同的结果。

同嗜热菌相比较,对嗜冷菌的基因研究很少。 α -淀粉酶、