



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103952393 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410205107.X

*C02F 3/34*(2006.01)

(22)申请日 2014.05.15

*C12R 1/01*(2006.01)

(73)专利权人 郑州大学

审查员 马俊凯

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发  
区科学大道100号

(72)发明人 于鲁冀 章显 陈涛 范铮  
李廷梅 刘攀龙 梁亦欣

(74)专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通  
合伙) 41113

代理人 王逢伍

(51)Int.Cl.

*C12N 11/12*(2006.01)

*C12N 11/10*(2006.01)

*C12N 11/08*(2006.01)

*C12N 11/04*(2006.01)

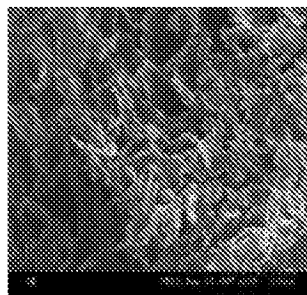
权利要求书3页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

用于微污染河流原位修复的微生物复合固  
定化颗粒的制备方法

### (57)摘要

本发明涉及用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法,可有效解决将固定化微生物技术应用于修复微污染河流水体的问题,其解决的技术方案是,包括以下步骤:a.载体材料筛分与改性;b.细菌斜面培养;c.细菌菌液制备;d.生物基质制备;e.包埋剂与交联剂制备;f.微生物复合固定化颗粒制备;g.扩增培养;本发明材料丰富,成本低廉,环境友好对生物无毒性,不会造成二次污染,不会造成基质床堵塞,是修复微污染河流水体方法上的创新。



1. 一种用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a. 载体材料筛分与改性:先将载体材料玉米芯粉碎成粒径为0.3~1.6mm的颗粒,然后浸泡在浓度为1mol/L的磷酸溶液中进行改性,再用蒸馏水冲洗干净,蒸汽灭菌,干燥,得改性载体材料;

b. 细菌斜面培养:在基础培养基中接入菌种,接种量为0.01~0.5%,在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 温度时,置于生化培养箱中斜面培养30小时;所述的基础培养基由以下重量百分比计的:牛肉膏0.3%、蛋白胨0.5%、NaCl 0.5%、琼脂1.5~2.0%和pH 7.0~7.5的蒸馏水96.7~97.2%制成;所述的菌种为*Paracoccus pantotrophus*、*Bacillus subtilis*、*Photosynthetic bacteria*、*Psdeuomnoda fluoerncnet*的一种或两种以上的混合;

c. 细菌菌液制备:用接种环在上述基础培养基上挑取菌种,接入到选择性培养基,接种量为0.01~0.5%,放入摇床温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、转速150r/min下培养30小时,得细菌菌液,所述的细菌菌液的密度为 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL;所述的选择性培养基由以下重量百分比计的:( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%、琥珀酸钠0.595%、维氏盐溶液5%和pH为7.5~8.0的蒸馏水94.355%制成,维氏盐溶液的组分重量百分比为:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25%、NaCl 0.25%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005%、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.005%、蒸馏水98.99%;

d. 生物基质制备:将细菌菌液与改性载体材料按重量比100:3~15的比例混合,在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、150r/min条件下培养,定期检测培养液污染物变化,污染物稳定时取出改性载体材料,用无菌生理盐水清洗干净,添加至新的细菌菌液中,连续培养三个周期,使微生物在载体表面和内部增殖得到生物基质;

e. 包埋剂与交联剂制备:包埋剂由重量百分比计的:海藻酸钠2%、聚乙烯醇8%和蒸馏水90%制成,其中,先将海藻酸钠和聚乙烯醇混合,加入到蒸馏水中,加热溶解,灭菌,冷却至室温,得包埋剂;交联剂由重量百分比计的:氯化钙2%和饱和硼酸溶液98%制成;

f. 微生物复合固定化颗粒制备:将上述生物基质与包埋剂混匀后滴加入交联剂中,使其形成粒状小球,反应24小时,用无菌生理盐水冲洗,得3~4mm的微生物复合固定化颗粒,于4℃无菌生理盐水中保存备用;

g. 扩增培养:将上述微生物复合固定化颗粒取出接入扩增培养基中,接种量为0.01~0.5%,放入摇床温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、转速150r/min下培养30小时,然后重复扩增培养步骤即可;所述扩增培养基由以下重量百分比计的:葡萄糖4.0%、酵母膏0.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025%、( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%和pH 7.0~7.5的蒸馏水95.425%制成。

2. 根据权利要求1所述的用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

a. 载体材料筛分与改性:

将整根的玉米芯切碎,筛分出粒径为0.3~0.45mm的颗粒,比表面积1320~2045m<sup>2</sup>/g,孔隙体积1.13~1.56cm<sup>3</sup>/g,颗粒浸泡在1mol/L的磷酸溶液进行改性,然后用蒸馏水冲洗干净,去除游离的改性剂,使其洗液为中性,在50℃下烘干备用;

b. 细菌斜面培养:

在基础培养基的试管中接入*Paracoccus pantotrophus*,置于30℃培养箱中斜面培养30小时,接种量为0.1%;所述的基础培养基由以下重量百分比计的:牛肉膏0.3%、蛋白胨

0.5%、NaCl 0.5%、琼脂1.5%和pH 7.0~7.5的蒸馏水97.2%制成；

c. 细菌菌液制备：

用接种环在所述基础培养基上挑取2环菌种，接入到选择性培养基中，接种量为0.2%，在摇床温度30℃、转速130~150r/min条件下培养30小时，制得细菌菌液，所述的细菌菌液的密度为 $10^5\sim 10^7$ 个/mL；所述的选择性培养基由以下重量百分比计的： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05%、琥珀酸钠0.595%、维氏盐溶液5%和 pH为7.5~8.0的蒸馏水94.355%制成，维氏盐溶液的组分重量百分比为： $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25%、NaCl 0.25%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.005%、蒸馏水98.99%；

d. 生物基质制备：将细菌菌液与改性载体材料按重量比100:5的比例混合，在30℃、150r/min条件下培养，定期检测培养液污染物变化，污染物稳定时取出改性载体材料，用无菌生理盐水清洗干净，添加至新的细菌菌液中，连续培养三个周期，使微生物在载体表面和内部增殖得到生物基质；

e. 包埋剂与交联剂制备：按照总重量1000g，称取20g海藻酸钠、80g聚乙烯醇，加入到蒸馏水中，加热使其融化、灭菌并冷却至室温，得包埋剂；按照总重量1000g，称取20gCaCl<sub>2</sub>，溶于饱和硼酸溶液中，制得交联剂；

f. 微生物复合固定化颗粒制备：

将所述生物基质与所述包埋剂混匀后滴加入交联剂中，使其形成粒状小球，反应 24小时，用无菌生理盐水冲洗，得3~4mm的微生物复合固定化颗粒，于4℃无菌生理盐水中保存备用；

g. 扩增培养：

将上述微生物复合固定化颗粒接入扩增培养基中，接种量为0.5%，放入摇床温度30℃、转速150r/min条件下培养30小时，然后重复扩增培养步骤即可；所述扩增培养基由以下重量百分比计的：葡萄糖4.0%、酵母膏0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.2%和pH 7.0~7.5的蒸馏水95.425%制成。

3. 根据权利要求1所述的用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

a. 载体材料筛分与改性：

将整根的玉米芯切碎，筛分出粒径为1.4~1.6mm的颗粒，比表面积450~875m<sup>2</sup>/g，孔隙体积0.46~0.73cm<sup>3</sup>/g，颗粒浸泡在1mol/L的磷酸溶液进行改性，然后用蒸馏水冲洗干净，去除游离的改性剂，使其洗液为中性，在50℃下烘干备用；

b. 细菌斜面培养：

在基础培养基的试管中接入Bacillus subtilis，置于30℃培养箱中斜面培养30小时，接种量为0.4%；所述的基础培养基由以下重量百分比计的：牛肉膏0.3%、蛋白胨0.5%、NaCl 0.5%、琼脂2.0%和pH 7.0~7.5的蒸馏水96.7%制成；

c. 细菌菌液制备：

用接种环在所述基础培养基上挑取2环菌种，接入到选择性培养基中，接种量为0.1%，在摇床温度30℃、转速150r/min条件下培养30小时，制得细菌菌液，所述的细菌菌液的密度为 $10^5\sim 10^7$ 个/mL；所述的选择性培养基由以下重量百分比计的： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05%、琥珀酸钠0.595%、维氏盐溶液5%和 pH为7.5~8.0的蒸馏水94.355%制成，维氏盐溶液的组分重量

百分比为： $K_2HPO_4$  0.5%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25%、 $NaCl$  0.25%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005%、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.005 %、蒸馏水98.99%；

d. 生物基质制备：将细菌菌液与改性载体材料按重量比100:10的比例混合，在30℃、150r/min条件下培养，定期检测培养液污染物变化，污染物稳定时取出改性载体材料，用无菌生理盐水清洗干净，添加至新的细菌菌液中，连续培养三个周期，使微生物在载体表面和内部增殖得到生物基质；

e. 包埋剂与交联剂制备：按照总重量1000g，称取20g海藻酸钠、80g聚乙烯醇，加入到蒸馏水中，加热使其融化、灭菌并冷却至室温，得包埋剂；按照总重量1000g，称取20g $CaCl_2$ ，溶于饱和硼酸溶液中，制得交联剂；

f. 微生物复合固定化颗粒制备：

将所述生物基质与所述包埋剂混匀后滴加入交联剂中，使其形成粒状小球，反应 24小时，用无菌生理盐水冲洗，得3~4mm的微生物复合固定化颗粒，于4℃无菌生理盐水中保存备用；

g. 扩增培养：

将上述微生物复合固定化颗粒接入扩增培养基中，接种量为0.3%，放入摇床温度30℃、转速150r/min条件下培养30小时，然后重复扩增培养步骤即可；所述扩增培养基由以下重量百分比计的：葡萄糖4.0%、酵母膏0.3%、 $KH_2PO_4$  0.05%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.025%、 $(NH_4)_2HPO_4$  0.2%和pH 7.0~7.5的蒸馏水95.425%制成。

## 用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微污染河流的原位修复,特别是一种用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法。

### 背景技术

[0002] 我国是世界上水资源严重短缺的国家之一,人均水资源占有量少,而水污染却很严重。近年来,由于不断加强污水处理厂建设,使污水直接排放的问题得到一定程度遏制,但是污水处理厂出水即使满足一级A标准,其出水水质与地表水环境质量标准仍存在一定的差距,河流作为各种处理后废水的收纳水体,经常受到无机物及氮磷的污染,但相对污染较轻,被称为微污染水体,虽然此类水体污染并不严重,但大多数河流生态环境质量较差,无法满足水环境功能要求,尤其在北方,由于大部分地区水资源严重短缺,此类问题更为严重,天然水体纳污能力非常有限,保障及维持地表水环境功能区划要求具有相当大难度。以河南省为例,根据河南省2013年河流水质监测数据,83个省控地表水环境质量监控断面中,I~III类水质断面36个,占监测断面总数的43.4%;IV类水质断面16个,占19.3%;V与劣V类的断面31个,占37.3%;全省地表水水质总体为中度污染,主要污染因子为化学需氧量和氨氮。

[0003] 目前针对微污染河流水体的水质净化方法主要有物理法、化学法和生物法。物理净化方法主要有底泥疏浚、环境调水和河道曝气等,见效比较快,但往往治标不治本,成本较高,不适用于河道长期的治理;化学净化方法主要有混凝沉淀、投加化学灭藻剂和沉磷剂等,操作简单、见效快、效率高,但成本较为昂贵,容易引发二次污染,持续性较差,因此不适用于长期治理模式,通常作为解决突发问题的一种应急方案;生物净化技术则主要依靠河流微生物的代谢活动实现对水中污染物的降解,因其具有经济有效的优点受到广泛研究。

[0004] 微生物修复技术具有能耗少、费用低、效果好、易操作、持续时间长、无二次污染等优点,是最具发展前景的主体修复技术。国内外的科研工作者分离筛选出了大量降解性微生物。目前已经分离得到一批能降解和转化河流污染物的微生物有:细菌、真菌、放线菌、藻类等,大多数来自河流底泥。然而,微生物对环境污染物的修复能否最终实现不仅仅依赖于其降解能力本身,而且依赖于污染物的可生化性以及细菌与土著微生物之间的竞争能力等其他因素。传统意义的微生物修复的特点是利用游离菌的降解作用,随着污染物逐渐趋向成分更复杂、易积累、难降解,游离微生物修复技术的不足逐渐呈现。如:单位体积内有效降解菌浓度低、反应启动慢、菌体易流失、与土著菌竞争处于劣势、对恶劣的环境条件变化敏感等。

[0005] 固定化微生物技术是从20世纪70年代后期兴起的一项新技术,它是通过采用物理或化学手段,将游离的细胞或微生物定位于限定的空间区域内,使其保持活性并反复利用的一种基本技术。固定化微生物技术具有微生物密度高、反应速度快、耐毒害能力强、微生物流失少等优点。因而该技术被广泛应用于废水处理和土壤修复中。但将固定化微生物技

术应用于修复微污染河流水体的研究,国内外报道较少。因此,将固定化微生物技术应用于修复微污染河流水体是本领域技术人员所关心的技术问题。

### 发明内容

[0006] 针对上述情况,为解决现有技术之缺陷,本发明之目的就是提供一种用于微污染河流原位修复的微生物复合固定化颗粒的制备方法,可有效解决将固定化微生物技术应用于修复微污染河流水体的问题。

[0007] 本发明解决的技术方案是,包括以下步骤:a.载体材料筛分与改性;b.细菌斜面培养;c.细菌菌液制备;d.生物基质制备;e.包埋剂与交联剂制备;f.微生物复合固定化颗粒制备;g.扩增培养。

[0008] 本发明材料丰富,成本低廉,环境友好对生物无毒性,不会造成二次污染,不会造成基质床堵塞,是修复微污染河流水体方法上的创新。

### 附图说明

[0009] 图1为本发明玉米芯颗粒断面 $\times 300$ 环境扫描电子显微镜照片。

[0010] 图2为本发明*Paracoccus pantotrophus*  $\times 500$ 环境扫描电子显微镜照片。

[0011] 图3为本发明微生物复合固定化颗粒 $\times 3000$ 环境扫描电子显微镜照片。

[0012] 图4为本发明微生物复合固定化颗粒成品照片。

### 具体实施方式

[0013] 以下结合附图和实施例对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0014] 本发明包括以下步骤:

[0015] a.载体材料筛分与改性:先将载体材料玉米芯粉碎成粒径为0.3~1.6mm的颗粒,然后浸泡在浓度为1mol/L的磷酸溶液中进行改性,再用蒸馏水冲洗干净,蒸汽灭菌,干燥,得改性载体材料;

[0016] b.细菌斜面培养:在基础培养基中接入菌种,接种量为0.01-0.5%,在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 温度时,置于生化培养箱中斜面培养30小时;所述的基础培养基由以下重量百分比计的:牛肉膏0.3%、蛋白胨0.5%、NaCl 0.5%、琼脂1.5~2.0%和pH 7.0~7.5的蒸馏水96.7~97.2%制成;所述的菌种为*Paracoccus pantotrophus*(异养硝化-好氧反硝化菌)、*Bacillus subtilis*(枯草芽孢杆菌)、*Photosynthetic bacteria*(光合作用细菌)、*Psdeuomnoda fluoerncnet*(荧光性假单胞菌)的一种或两种以上的混合;

[0017] c.细菌菌液制备:用接种环在上述基础培养基上挑取菌种,接入到选择性培养基,接种量为0.01-0.5%,放入摇床温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、转速150r/min下培养30小时,得细菌菌液,所述的细菌菌液的密度为 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL;所述的选择性培养基由以下重量百分比计的:( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%、琥珀酸钠0.595%、维氏盐溶液5%和pH为7.5~8.0的蒸馏水94.355%制成,维氏盐溶液的组分重量百分比为:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25%、NaCl 0.25%、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005%、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.005%、蒸馏水98.99%;

[0018] d.生物基质制备:将细菌菌液与改性载体材料按重量比100:3~15的比例混合,在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、150r/min条件下培养,定期检测培养液污染物变化,污染物稳定时取出改性载体

材料,用无菌生理盐水清洗干净,添加至新的细菌菌液中,连续培养三个周期,使微生物在载体表面和内部增殖得到生物基质;

[0019] e.包埋剂与交联剂制备:包埋剂由重量百分计的:海藻酸钠2%、聚乙烯醇8%和蒸馏水90%制成,其中,先将海藻酸钠和聚乙烯醇混合,加入到蒸馏水中,加热溶解,灭菌,冷却至室温,得包埋剂;交联剂由重量百分计的:氯化钙2%和饱和硼酸溶液98%制成;

[0020] f.微生物复合固定化颗粒制备:将上述生物基质与包埋剂混匀后滴加入交联剂中,形成粒状小球,反应 24小时,用无菌生理盐水(盐浓度0.9%)冲洗,得3~4mm的微生物复合固定化颗粒,于4℃无菌生理盐水中保存备用;

[0021] g.扩增培养:将上述微生物复合固定化颗粒取出接入扩增培养基中,接种量为0.01-0.5%,放入摇床温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 、转速150r/min下培养30小时,然后重复扩增培养步骤即可;所述扩增培养基由以下重量百分比计的:葡萄糖4.0%、酵母膏0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.2%和pH 7.0~7.5的蒸馏水95.425%制成。

[0022] 实施例1

[0023] 本发明在具体实施时,由图1-4给出,

[0024] a.载体材料筛分与改性:

[0025] 将整根的玉米芯切碎,筛分出直径为0.3~0.45mm的颗粒,比表面积 $1320 \sim 2045\text{m}^2/\text{g}$ ,孔隙体积 $1.13 \sim 1.56\text{cm}^3/\text{g}$ ,颗粒浸泡在1mol/L的磷酸溶液进行改性,然后用蒸馏水冲洗干净,去除游离的改性剂,使其洗液为中性,在 $50^\circ\text{C}$ 下烘干备用;图1是所述玉米芯颗粒断面 $\times 300$ 环境扫描电子显微镜照片;

[0026] b.细菌斜面培养:

[0027] 在基础培养基的试管中接入*Paracoccus pantotrophus*,置于 $30^\circ\text{C}$ 培养箱中斜面培养30小时,接种量为0.1%;所述的基础培养基由以下重量百分比计的:牛肉膏0.3%、蛋白胨0.5%、NaCl 0.5%、琼脂1.5%和pH 7.0~7.5的蒸馏水97.2%制成;图2 是所述*Paracoccus pantotrophus* $\times 500$ 环境扫描电子显微镜照片;

[0028] c.细菌菌液制备:

[0029] 用接种环在所述基础培养基上挑取2环菌种,接入到选择性培养基中,接种量为0.2%,在摇床温度 $30^\circ\text{C}$ 、转速130~150r/min条件下培养30小时,制得细菌菌液,所述的细菌菌液的密度为 $10^5 \sim 10^7$ 个/mL;所述的选择性培养基由以下重量百分比计的: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05%、琥珀酸钠0.595%、维氏盐溶液5%和 pH为7.5~8.0的蒸馏水94.355%制成,维氏盐溶液的组分重量百分比为: $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25%、NaCl 0.25%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.005%、蒸馏水98.99%;

[0030] d.生物基质制备:将细菌菌液与改性载体材料按重量比100:5的比例混合,在 $30^\circ\text{C}$ 、150r/min条件下培养,定期检测培养液污染物变化,污染物稳定时取出改性载体材料,用无菌生理盐水清洗干净,添加至新的细菌菌液中,连续培养三个周期,使微生物在载体表面和内部增殖得到生物基质;

[0031] e.包埋剂与交联剂制备:按照总重量1000g,称取20g海藻酸钠、80g聚乙烯醇,加入到蒸馏水中,加热使其融化、灭菌并冷却至室温,得包埋剂;按照总重量1000g,称取20gCaCl<sub>2</sub>,溶于饱和硼酸溶液中,制得交联剂;

[0032] f.微生物复合固定化颗粒制备:

[0033] 将所述生物基质与所述包埋剂混匀后滴加入交联剂中,使其形成粒状小球,反应24小时,用无菌生理盐水冲洗,得3~4mm的微生物复合固定化颗粒,于4℃无菌生理盐水中保存备用;图3、图4分别是微生物复合固定化颗粒×3000环境扫描电子显微镜照片和成品照片;

[0034] g. 扩增培养:

[0035] 将上述微生物复合固定化颗粒接入扩增培养基中,接种量为0.5%,放入摇床温度30℃、转速150r/min条件下培养30小时,然后重复扩增培养步骤即可;所述扩增培养基由以下重量百分比计的:葡萄糖4.0%、酵母膏0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.2%和pH 7.0~7.5的蒸馏水95.425%制成。

[0036] 实施例2:

[0037] 本发明在具体实施时,包括以下步骤:

[0038] a. 载体材料筛分与改性:

[0039] 将整根的玉米芯切碎,筛分出直径为粒径在1.4~1.6mm的颗粒,比表面积 $450\sim 875\text{m}^2/\text{g}$ ,孔隙体积 $0.46\sim 0.73\text{cm}^3/\text{g}$ ,颗粒浸泡在1mol/L的磷酸溶液进行改性,然后用蒸馏水冲洗干净,去除游离的改性剂,使其洗液为中性,在50℃下烘干备用;

[0040] b. 细菌斜面培养:

[0041] 在基础培养基的试管中接入*Bacillus subtilis*,置于31℃培养箱中斜面培养30小时,接种量为0.4%,;所述的基础培养基由以下重量百分比计的:牛肉膏0.3%、蛋白胨0.5%、NaCl 0.5%、琼脂2.0%和pH 7.0~7.5的蒸馏水96.7%制成;

[0042] c. 细菌菌液制备:

[0043] 用接种环在所述基础培养基上挑取2环菌种,接入到选择性培养基中,接种量为0.1%,在摇床温度30℃、转速150r/min条件下培养30小时,制得细菌菌液,所述的细菌菌液的密度为 $10^5\sim 10^7$ 个/mL;所述的选择性培养基由以下重量百分比计的: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.05%、琥珀酸钠0.595%、维氏盐溶液5%和 pH为7.5~8.0的蒸馏水94.355%制成,维氏盐溶液的组分重量百分比为: $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25%、NaCl 0.25%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.005%、蒸馏水98.99%;

[0044] d. 生物基质制备:将细菌菌液与改性载体材料按重量比100:10的比例混合,在30℃、150r/min条件下培养,定期检测培养液污染物变化,污染物稳定时取出改性载体材料,用无菌生理盐水清洗干净,添加至新的细菌菌液中,连续培养三个周期,使微生物在载体表面和内部增殖得到生物基质;

[0045] e. 包埋剂与交联剂制备:按照总重量1000g,称取20g海藻酸钠、80g聚乙烯醇,加入到蒸馏水中,加热使其融化、灭菌并冷却至室温,得包埋剂;按照总重量1000g,称取20g $\text{CaCl}_2$ ,溶于饱和硼酸溶液中,制得交联剂;

[0046] f. 微生物复合固定化颗粒制备:

[0047] 将所述生物基质与所述包埋剂混匀后滴加入交联剂中,使其形成粒状小球,反应24小时,用无菌生理盐水冲洗,得3~4mm的微生物复合固定化颗粒,于4℃无菌生理盐水中保存备用;

[0048] g. 扩增培养:

[0049] 将上述微生物复合固定化颗粒接入扩增培养基中,接种量为0.3%,放入摇床温度



30℃、转速150r/min条件下培养30小时,然后重复扩增培养步骤即可;所述扩增培养基由以下重量百分比计的:葡萄糖4.0%、酵母膏0.3%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%和pH 7.0~7.5的蒸馏水95.425%制成。

[0050] 本发明微生物复合固定化颗粒的应用方式为:随砾石床基质铺设按每立方米均匀撒施1.0kg微生物复合固定化颗粒。

[0051] 本发明微生物复合固定化颗粒对污染河流水体修复效果:

[0052] 固定化颗粒投粒比5%,当河水中氨氮初始浓度为20mg/L时,修复1天,氨氮去除率为99.2%。

[0053] 固定化颗粒投粒比5%,当河水中COD初始浓度为60mg/L时,修复1天,COD去除率为40%。

[0054] 本发明微生物复合固定化颗粒对氨氮的去除效率明显高于传统的生物吸附剂和载体材料吸附剂,结果见下表1:

[0055] 表1 不同吸附剂对氨氮的去除效率对比

[0056]

序号	吸附剂	去除效率
1	改性玉米芯	45.23%
2	游离P. pantotrophus	93.15%
3	改性玉米芯微球颗粒	62.46%
4	本发明微生物复合固定化颗粒	99.20%

[0057] 本发明与现有技术相比,具有以下优点:

[0058] 1.本发明所用载体材料玉米芯表面粗糙,空隙率高,来源广泛,价格低,可持续提供碳源,环境友好对生物无毒性,不会造成二次污染;

[0059] 2.该载体及其固定化工艺可用于Paracoccus pantotrophus、Bacillus subtilis、Photosynthetic bacteria、Psdeuomnoda fluoerncnet等多菌种微生物的固定化,具有一定的广谱适用性;Paracoccus pantotrophus可达到100亿个/克以上;

[0060] 3.与其他固定方法相比,该微生物复合固定化颗粒制备简单,不需要单独的制作步骤和专用装置;对于微污染河流而言,将微生物复合固定化颗粒直接混合基质铺设于砾石床内,不会造成基质床堵塞;

[0061] 4.微生物复合固定化颗粒的特点是:一、利用玉米芯表面粗糙、巨大比表面积,为微生物创造一个优良的生长环境;二、充分利用载体的吸附作用,对水体中的污染物进行富集,然后附着在载体颗粒上的微生物对污染物进行降解;三、利用载体的可生化性,玉米芯富含大量能被微生物降解的纤维素,可缓解微污染河流水体碳氮比失衡导致的脱氮效果不佳的问题。这种载体可通过负载不同的优势菌种,用于多种污染河流的修复。

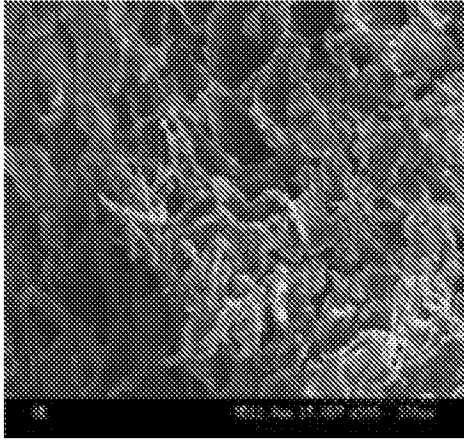


图1

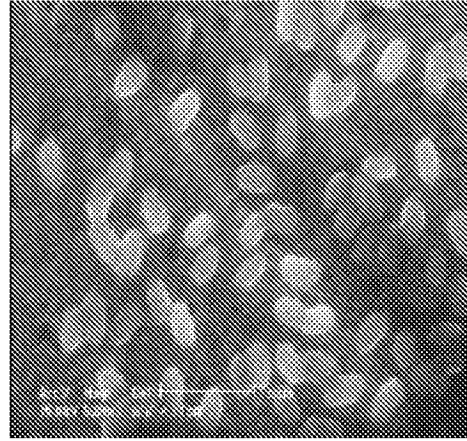


图2

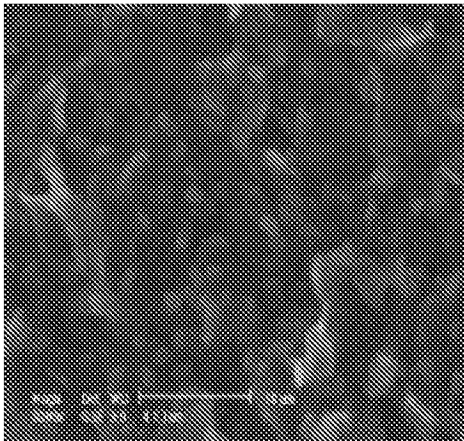


图3

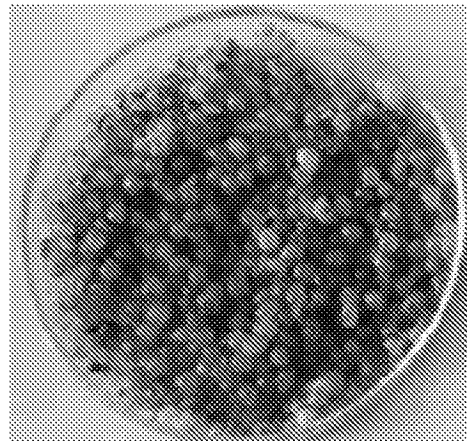


图4