



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106282154 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610825353.4

*C02F 103/28*(2006.01)

(22)申请日 2016.09.14

*C02F 101/30*(2006.01)

(71)申请人 哈尔滨理工大学

地址 150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路52号

(72)发明人 燕红 国巍 杜霞 李琳

(74)专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109

代理人 侯静

(51)Int.Cl.

*C12N 11/16*(2006.01)

*C02F 3/34*(2006.01)

*C12R 1/085*(2006.01)

*C12R 1/68*(2006.01)

*C02F 103/16*(2006.01)

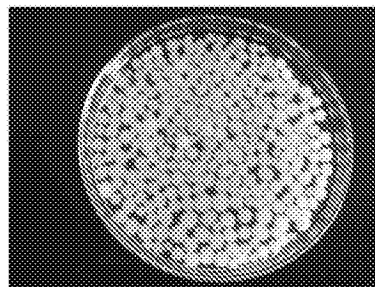
权利要求书1页 说明书10页 附图4页

### (54)发明名称

一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法及其应用

### (57)摘要

一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法及其应用,涉及一种共固定化菌丝球的制备方法及其应用。本发明是要解决现有菌丝球的降解功能较为单一,降解效果不佳的问题。方法:一、制备烟曲霉菌孢子悬液和蜡样芽孢杆菌菌悬液;二、取烟曲霉菌孢子悬液和蜡样芽孢杆菌菌悬液,一起接入到菌丝球成球培养基中,摇床培养,即得到复合菌菌丝球。共固定化菌丝球用于降解木质素、纤维素、半纤维素、染料和重金属离子。该复合菌菌丝球不仅能处理造纸废水,还可用于处理染料废水和重金属离子废水,且在碱性和温度较高的体系中,仍具有较好的处理效果。本发明用于废水处理领域。



1. 一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

一、菌悬液的制备:

烟曲霉菌孢子悬液:将保藏于4℃环境下的烟曲霉菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL~ $9 \times 10^6$ 个/mL的烟曲霉菌孢子悬液;

蜡样芽孢杆菌菌悬液:将保藏于4℃环境下的蜡样芽孢杆菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL~ $5 \times 10^6$ 个/mL的蜡样芽孢杆菌菌悬液;

二、复合菌菌丝球的制备方法:

取步骤一制备的烟曲霉菌孢子悬液和步骤一制备的蜡样芽孢杆菌菌悬液,一起接入到100mL菌丝球成球培养基中,于转速为120~200r/min,温度为24~37℃的摇床中震荡培养2~5d,即得到复合菌菌丝球;

其中步骤一中所述烟曲霉菌为烟曲霉YSITBI,

步骤一中所述蜡样芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌X-10-1-2。

2. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤一中烟曲霉菌孢子悬液的浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL~ $7 \times 10^6$ 个/mL。

3. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤一中蜡样芽孢杆菌菌悬液的浓度为 $2 \times 10^6$ 个/mL~ $4 \times 10^6$ 个/mL。

4. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤二中烟曲霉菌孢子悬液与蜡样芽孢杆菌菌悬液的体积比为1:(1~8)。

5. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤二中烟曲霉菌孢子悬液与蜡样芽孢杆菌菌悬液的体积比为1:(3~5)。

6. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤二中转速为160r/min。

7. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤二在温度为28℃的摇床中震荡培养3d。

8. 根据权利要求1所述的一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,其特征在于步骤二所述菌丝球成球培养基是由18g/L蔗糖、2.5g/L酒石酸铵、2g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和蒸馏水制成,pH值调至5,120℃灭菌20min。

9. 如权利要求1所述的方法制备的共固定化菌丝球的应用,其特征在于共固定化菌丝球用于降解木质素、纤维素、半纤维素、染料和重金属离子。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于所述染料为刚果红、孔雀蓝或结晶紫。

## 一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种共固定化菌丝球的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 制浆造纸工业每年要从植物中分离出大约14亿吨纤维素,同时产生含有5000万吨左右木质素的污水。在木质纤维素中,木质素与半纤维素以共价键形式结合在一起,形成天然的屏障,使纤维素酶无法与纤维素接触,利用纤维素的关键在于破坏其屏障作用,而半纤维素容易除去,所以木质素的降解成为了关键。我国造纸废水的排放量占总工业废水排放量的19%,而废水排放达标率只有92%,造纸业已成为我国工业的重点环境污染源之一。印染废水属于难降解的工业废水,具有成分复杂、水质水量变化大、污染物浓度高、色度深、可生化性差等特点,若不经处理直接排放,将严重污染环境。各种染料的使用、对染料脱除率的高要求都给印染废水厂带来了很大的困难和高额的处理成本。重金属污染对生态环境和人类健康的影响日趋严重,含重金属废水的治理受到越来越多的重视。铜和铅在工业上具有非常重要的作用,其应用极为广泛,水体含铜、铅化合物的污染已成为一种严重的重金属污染。对人体及其它生物具有强烈的“三致”效应,对含铜、铅废水的处理已成为一个重点课题。

[0003] 目前对各种废水的处理方法主要有物理方法、化学方法和生物法。物理和化学处理方法耗能高,在处理过程中产生的废渣或副产品对环境会造成二次污染。国内外从20世纪80年代末开始进行固定化微生物技术处理工业废水的研究,固定化微生物技术是通过化学或物理的手段,将游离细胞或酶定位于限定的空间区域内,使其保持活性并可反复利用。具有微生物密度高,反应迅速,微生物不易流失,产物易分离等优点,是一种低耗能高效率的新技术。这种技术应用于废水处理,有利于提高生物在反应器内的密度,利于反应后的固液分离,缩短处理所需的时间。菌丝球是由菌丝相互缠绕而成的球体,一般为真菌,它的生存能力强,沉降速度快,易于固液分离,可重复利用,具有多孔表面积大的特点。而且形成菌丝球的微生物还能正常生长,具有生物吸附和生物降解等功能。

[0004] 目前,国内外对于菌丝球的研究还处于探索其发酵工业和对单一废水的处理阶段。菌丝球的降解功能较为单一,而且降解效果不佳。

### 发明内容

[0005] 本发明是要解决现有菌丝球的降解功能较为单一,降解效果不佳的问题,提供一种具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法及其应用。

[0006] 本发明具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,按以下步骤进行:

[0007] 一、菌悬液的制备:

[0008] 烟曲霉菌孢子悬液:将保藏于4℃环境下的烟曲霉菌固体斜面取出,用接种环将其

刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL $\sim 9 \times 10^6$ 个/mL的烟曲霉菌孢子悬液;

[0009] 蜡样芽孢杆菌菌悬液:将保藏于4℃环境下的蜡样芽孢杆菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL $\sim 5 \times 10^6$ 个/mL的蜡样芽孢杆菌菌悬液;

[0010] 二、复合菌菌丝球的制备方法:

[0011] 取步骤一制备的烟曲霉菌孢子悬液和步骤一制备的蜡样芽孢杆菌菌悬液,一起接入到100mL菌丝球成球培养基中,于转速为120 $\sim$ 200r/min,温度为24 $\sim$ 37℃的摇床中震荡培养2 $\sim$ 5d。其中烟曲霉菌孢子悬液与蜡样芽孢杆菌菌悬液的体积比为1:(1 $\sim$ 8)。

[0012] 步骤一中所述烟曲霉菌为烟曲霉YSITBI。烟曲霉YSITBI已于2015年在《烟曲霉YSITBI菌株筛选及其降解木质纤维中木质素研究》(袁俊超,吕宝,屈敦妮等.湖北农业科学.2015,54(17))文章中公开。

[0013] 步骤一中所述蜡样芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌X-10-1-2。蜡样芽孢杆菌X-10-1-2已于2006年在《两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究》(燕红,杨谦,王希国.林产化学与工业.2006,26(2))文章中公开。

[0014] 步骤二所述菌丝球成球培养基是由18g/L蔗糖、2.5g/L酒石酸铵、2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和蒸馏水制成,pH值调至5,120℃灭菌20min。

[0015] 上述共固定化菌丝球用于降解木质素、纤维素、半纤维素和染料和重金属离子,所述染料为刚果红、孔雀蓝或结晶紫。

[0016] 本发明的有益效果:

[0017] 本方法将能降解木质素的烟曲霉菌培养成菌丝球作为生物质载体,固定具有降解纤维素能力的蜡样芽孢杆菌,形成兼具木质素和纤维素降解能力以及菌丝球的吸附能力的复合菌菌丝球,二者共同培养,互相影响,协同发挥作用。经研究发现,由烟曲霉菌和蜡样芽孢杆菌共固定形成的复合菌菌丝球,较单一烟曲霉菌形成的菌丝球对于木质纤维素的降解、重金属离子的吸附和染料的吸附分别高出10%、15%和20%以上,另外复合菌菌丝球与蜡样芽孢杆菌相比,纤维素、半纤维素和木质素的降解率也显著提高。而且由于复合菌菌丝球固定了可降解纤维素的蜡样芽孢杆菌,又赋予了复合菌菌丝球可降解纤维素和半纤维素的能力。研究发现,复合菌丝球对刚果红、孔雀蓝和结晶紫这三种染料的最高脱色率分别可达97.92%、95.61%和88.63%;对 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 的最高吸附率分别为76.96%和61.32%;对木质素、纤维素和半纤维素的降解率分别为63.61%、47.65%和63.36%。且在pH值为9的体系下,木质素的降解率仍能达到31.47%,纤维素和半纤维素的降解率超过40%;对刚果红、孔雀蓝和结晶紫的脱色率可以分别达到79.73%、70.22%和76.35%;对 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 的吸附率为50%和38.67%。而当温度达到40℃时,菌丝球对木质素、纤维素和半纤维素的降解率仍可分别达到37.86%、32.09%和37.91%。这表明该复合菌丝菌丝球不仅能处理造纸废水,还可用于处理染料废水和重金属离子废水,且在碱性和温度较高的体系中,仍具有较好的处理效果。

## 附图说明

[0018] 图1为不同温度下复合菌菌丝球降解造纸废水;

[0019] 图2为不同pH下复合菌菌丝球降解造纸废水;

- [0020] 图3为培养时间对复合菌菌丝球降解造纸废水的影响；  
[0021] 图4为不同温度下复合菌菌丝球吸附重金属离子；  
[0022] 图5为不同pH下复合菌菌丝球吸附重金属离子；  
[0023] 图6为培养时间对复合菌菌丝球吸附重金属离子的影响；  
[0024] 图7为不同温度下复合菌菌丝球吸附染料；  
[0025] 图8为不同pH下复合菌菌丝球吸附结晶紫染料；  
[0026] 图9为培养时间对复合菌菌丝球吸附染料的影响；  
[0027] 图10为复合菌菌丝球照片；  
[0028] 图11为复合菌菌丝球内部扫描电镜照片；  
[0029] 图12为复合菌发酵液中菌密度随时间变化的曲线。

### 具体实施方式

[0030] 本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式,还包括各具体实施方式间的任意组合。

[0031] 具体实施方式一:本实施方式具有清除多种污染物功能的共固定化菌丝球的制备方法,按以下步骤进行:

[0032] 一、菌悬液的制备:

[0033] 烟曲霉菌孢子悬液:将保藏于4℃环境下的烟曲霉菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL~ $9 \times 10^6$ 个/mL的烟曲霉菌孢子悬液;

[0034] 蜡样芽孢杆菌菌悬液:将保藏于4℃环境下的蜡样芽孢杆菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL~ $5 \times 10^6$ 个/mL的蜡样芽孢杆菌菌悬液;

[0035] 二、复合菌菌丝球的制备方法:

[0036] 取步骤一制备的烟曲霉菌孢子悬液和步骤一制备的蜡样芽孢杆菌菌悬液,一起接入到100mL菌丝球成球培养基中,于转速为120~200r/min,温度为24~37℃的摇床中震荡培养2~5d,即得到复合菌菌丝球。

[0037] 其中步骤一中所述烟曲霉菌为烟曲霉YSITBI,烟曲霉YSITBI已于2015年在《烟曲霉YSITBI菌株筛选及其降解木质纤维中木质素研究》(袁俊超,吕宝,屈敦妮等.湖北农业科学.2015,54(17))文章中公开。

[0038] 步骤一中所述蜡样芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌X-10-1-2。所述蜡样芽孢杆菌X-10-1-2已于2006年在《两株芽孢杆菌产纤维素酶的研究》(燕红,杨谦,王希国.林产化学与工业.2006,26(2))文章中公开。

[0039] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同的是:步骤一中烟曲霉菌孢子悬液的浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL~ $7 \times 10^6$ 个/mL。其它与具体实施方式一相同。

[0040] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一不同的是:步骤一中烟曲霉菌孢子悬液的浓度为 $5 \times 10^6$ 个/mL。其它与具体实施方式一相同。

[0041] 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是:步骤一中蜡样芽孢杆菌菌悬液的浓度为 $2 \times 10^6$ 个/mL~ $4 \times 10^6$ 个/mL。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0042] 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同的是:步骤一中蜡样芽孢杆菌菌悬液的浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL。其它与具体实施方式一至三之一相同。

[0043] 具体实施方式六:本实施方式与具体实施方式一至五之一不同的是:步骤二中烟曲霉菌孢子悬液与蜡样芽孢杆菌菌悬液的体积比为1:(1~8)。其它与具体实施方式一至五之一相同。

[0044] 具体实施方式七:本实施方式与具体实施方式一至五之一不同的是:步骤二中烟曲霉菌孢子悬液与蜡样芽孢杆菌菌悬液的体积比为1:(3~5)。其它与具体实施方式一至五之一相同。

[0045] 具体实施方式八:本实施方式与具体实施方式一至七之一不同的是:步骤二中转速为160r/min。其它与具体实施方式一至七之一相同。

[0046] 具体实施方式九:本实施方式与具体实施方式一至八之一不同的是:步骤二中在温度为28℃的摇床中震荡培养3d。其它与具体实施方式一至八之一相同。

[0047] 具体实施方式十:本实施方式与具体实施方式一至九之一不同的是:步骤二所述菌丝球成球培养基是由18g/L蔗糖、2.5g/L酒石酸铵、2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和蒸馏水制成,pH值调至5,120℃灭菌20min。其它与具体实施方式一至九之一相同。

[0048] 具体实施方式十一:本实施方式共固定化菌丝球用于降解木质素、纤维素、半纤维素、染料和重金属离子,所述染料为刚果红、孔雀蓝或结晶紫。

[0049] 下面对本发明的实施例做详细说明,以下实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方案和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0050] 实施例:

[0051] 本实施例所用培养基如下:

[0052] 菌丝球成球培养基:蔗糖18g/L,酒石酸铵2.5g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2g/L,加蒸馏水配成1000mL,pH值调至5,120℃灭菌20min。

[0053] 菌种保存培养基:去皮马铃薯200g,葡萄糖20g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g/L,琼脂20g/L,微量 $\text{VB}_1$ ,加蒸馏水配成1000mL,pH值自然,120℃灭菌20min。该培养基用于保存烟曲霉菌和蜡样芽孢杆菌。

[0054] 一、菌悬液的制备:

[0055] 烟曲霉菌菌悬液:将保藏于4℃环境下的烟曲霉菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $1 \times 10^6$ 个/mL(血球计数法测定)的孢子悬液,4℃冰箱保存备用。

[0056] 蜡样芽孢杆菌菌悬液:将保藏于4℃环境下的蜡样芽孢杆菌固体斜面取出,用接种环将其刮下,接入到无菌水中,制成浓度为 $5 \times 10^6$ 个/mL(血球计数法测定)的孢子悬液,4℃冰箱保存备用。

[0057] 其中步骤一中所述烟曲霉菌为烟曲霉YSITBI,烟曲霉YSITBI已于2015年在《烟曲霉YSITBI菌株筛选及其降解木质纤维中木质素研究》(袁俊超,吕宝,屈敦妮等.湖北农业科学.2015,54(17))文章中公开。

[0058] 步骤一中所述蜡样芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌X-10-1-2。蜡样芽孢杆菌X-10-1-2已于2006年在《两株芽胞杆菌产纤维素酶的研究》(燕红,杨谦,王希国.林产化学与工业

.2006,26(2))文章中公开。

[0059] 二、菌丝球的制备方法：

[0060] 真菌菌丝球：取5mL烟曲霉菌菌悬液，接入到含100mL菌丝球成球培养液的250mL锥形瓶中，于转速为160r/min，温度为30℃的摇床中震荡培养3d。

[0061] 复合菌丝球：取5mL烟曲霉菌菌悬液和20mL蜡样芽孢杆菌菌悬液，一起接入到含100mL菌丝球成球培养液的250mL锥形瓶中，于转速为160r/min，温度为28℃的摇床中震荡培养3d。制备的复合菌丝球照片如图10所示。复合菌丝球内部扫描电镜图如图11所示。烟曲霉菌和蜡样芽孢杆菌加入菌丝球成球培养液中发酵后，复合菌发酵液中菌密度随时间变化的曲线如图12所示。由图12可以看出，随着时间的延长，发酵液中的菌量不断下降，原因是菌体均附载到菌丝球中了，所以菌量不断下降。

[0062] 三、菌丝球对造纸废水的降解

[0063] 造纸废水培养基由100g稻草(绝干量)、20gNaOH、0.5g蒽醌、0.795g硫化钠和580mL蒸馏水组成，升温至125℃，保温2h。

[0064] 将造纸废水培养基以1:4的比例稀释，移取100mL加入到250mL的锥形瓶中，灭菌后加入5g湿菌丝球，置于恒温震荡培养箱中，28℃，160r/min的条件下培养，以不加菌丝球处理的培养基为空白对照，在相同条件下处理，定时取样，测定溶液中木质素的含量。所述湿菌丝球为步骤二中的真菌菌丝球或复合菌丝球。

[0065] 酸不溶木质素：将溶液过滤，用3%的硫酸溶液调节pH至3-4，将沉降物烘干至恒重，即为溶液中酸不溶木质素的含量。

[0066] 酸溶木质素：用3%的硫酸溶液调节pH至3-4，放置过夜，在205nm下测定上清液中木质素的含量。

[0067] 其中溶液中木质素的质量为酸不溶木质素和酸溶木质素之和。

[0068] 四、纤维素和半纤维素的测定

[0069] 取0.1g木质素样品，加入5mL醋酸-硝酸混合液，沸水浴中加热20min，冷却后过滤。取1mL滤液，加入4mL地衣酚试剂，100℃保温15min，于660nm处测OD值。由木糖标准曲线求出糖量，乘上系数0.9即为半纤维素的含量。滤渣用丙酮洗涤两次，60℃干燥至恒重，置于烧杯中加入5mL72%硫酸，20℃水解3h，加水45mL，室温过夜，次日过滤，取2mL滤液加入5mL蒽酮试剂，100℃保温10min，于620nm处测OD值，由葡萄糖标准曲线求出糖量，乘上系数0.9即为纤维素的含量。

[0070] 降解率计算：降解率(DR)=(接种前某成分含量-接种后某成分含量)/接种前某成分含量×100%

[0071] 步骤四中所述醋酸-硝酸混合液是由10mL浓硝酸与100mL80%醋酸(v/v)组成的混合液。

[0072] 五、菌丝球对染料吸附能力的测定

[0073] 染料培养液包括刚果红染料培养基、孔雀石绿染料培养基和结晶紫染料培养基，

[0074] 刚果红染料培养基：刚果红100mg，加蒸馏水配成1000mL，pH值自然，120℃灭菌20min。

[0075] 孔雀石绿染料培养基：孔雀石绿100mg，加蒸馏水配成1000mL，pH值自然，120℃灭菌20min。

[0076] 结晶紫染料培养基：结晶紫100mg，加蒸馏水配成1000mL，pH值自然，120℃灭菌20min。

[0077] 取5g湿菌丝球，加入到含有100mL的染料培养液的250mL锥形瓶中，染料的浓度为100mg/L，染料的种类为刚果红、孔雀石绿、结晶紫。置于恒温振荡培养箱中，28℃，160r/min的条件下培养。定时取样，取离心过滤后的上清液，于最大吸收波长处用紫外可见分光光度计测其吸光度 $A_1$ ，以不接种菌丝球的染料培养基的吸光度 $A_0$ 为对照，计算脱色率。其中刚果红、孔雀石绿、结晶紫的最大吸收波长分别为506nm、617.4nm和586nm。所述湿菌丝球为步骤二中的真菌菌丝球或复合菌丝球。

[0078] 脱色率的计算公式如下：

[0079] 脱色率(%) =  $[(A_0 - A_1) / A_1] \times 100\%$

[0080] 实验结果如下：

[0081] 1、单一真菌菌丝球和复合菌丝球处理多种废水的性能比较

[0082] 造纸废水培养基由100g稻草(绝干量)、20gNaOH、0.5g蒽醌、0.795g硫化钠和580mL蒸馏水组成，升温至125℃，保温2h

[0083] 将5g真菌菌丝球和5g复合菌丝球分别接种于造纸废水培养基、重金属离子培养基和染料培养基中，三种培养基的装液量均为100mL(250mL锥形瓶)，于温度为28℃，转速为160r/min的摇床中震荡培养3d，取样，测定两种菌丝球对造纸废水的降解率、对重金属离子的吸附率和对染料的脱色率。两种菌丝球对废水的处理结果见表1。

[0084] 表1真菌菌丝球和复合菌丝球处理各种废水的性能比较

[0085]

	复合菌丝球	真菌菌丝球
纤维素降解率/%	39.05	2.38
半纤维素降解率/%	50.9	4.16
木质素降解率/%	51.61	34.05
Cu吸附率/%	65.96	38.27
Pb吸附率/%	52.33	34.06
刚果红脱色率/%	92.74	69.51
孔雀蓝脱色率/%	91.61	71.13
结晶紫脱色率/%	84.23	62.33

[0086] 由表1可以看出，对于造纸废水的降解，真菌菌丝球对木质素、纤维素、半纤维素的降解率分别为34.05%，2.38%，4.16%。复合菌丝球对其降解率分别为51.61%、50.9%、39.05%。由此可以看出，真菌菌丝球对纤维素和半纤维素几乎没有降解能力，复合菌丝球较真菌菌丝球对于木质素的降解，降解率高出10%以上。对于重金属离子的吸附，真菌菌丝球对 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 的吸附率分别为38.27%和34.06%。复合菌丝球对 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 的吸附率分别为65.96%和52.33%。复合菌丝球较单一真菌菌丝球对重金属离子的吸附，吸附率提高了15%左右。对于染料废水的处理，真菌菌丝球对刚果红、孔雀蓝、结晶紫的脱色率分别为69.51%、71.13%、62.33%。复合菌丝球对以上三种染料的脱色率分别为92.74%、91.16%、84.23%。脱色率高于真菌菌丝球20%以上。

[0087] 另外，将蜡样芽孢杆菌X10-1-2和复合菌丝球按相同的接种量接种到麦麸培养



基和稻草培养基中,于30℃,转速为160r/min的摇床中震荡培养5d,测定蜡样芽孢杆菌X10-1-2和复合菌菌丝球对麦麸和稻草中纤维素、半纤维素、木质素的降解率,结果见表2。

[0088] 麦麸培养基由3.0g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5g尿素、0.5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g  $\text{CaCl}_2$ 、7.5mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和2.0mg  $\text{ZnSO}_4$ 配成1000mL,再加入2%麸皮,0.1%蛋白胨,1%酵母粉,调pH值为7.0~7.2。

[0089] 稻草培养基由3.0g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.5g尿素、0.5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g  $\text{CaCl}_2$ 、7.5mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和2.0mg  $\text{ZnSO}_4$ 配成1000mL,再加入2%稻草,0.1%蛋白胨,1%酵母粉,调pH值为7.0~7.2。

[0090] 表2蜡样芽孢杆菌X10-1-2和复合菌菌丝球处理各种废水的性能比较

		纤维素	半纤维素	木质素
[0091]	X10-1-2			
	麦麸	2.72%	25.61%	1.09%
	稻草	3.35%	0.91%	2.81%
[0091]	复合菌菌			
	麦麸	41.20%	55.37%	57.03%
	稻草	38.89%	53.21%	55.45%

[0092] 由以上数据可知,复合菌菌丝球的性能均优于单一真菌菌丝球,同时也优于单一的蜡样芽孢杆菌X10-1-2。复合菌菌丝球是一种双菌种固定化体系,同时含有降解木质素的真菌和降解纤维素的细菌,两菌种具有互补的性能,起到了相互促进的作用,既具有木质素降解能力又有纤维素降解活力。

[0093] 2、复合菌菌丝球处理各种废水的性能研究

[0094] ①处理造纸废水

[0095] 不同温度下复合菌菌丝球降解造纸废水的性能:

[0096] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL造纸废水培养基的250mL锥形瓶中,于转速为160r/min,温度分别为24℃、28℃、30℃、34℃、37℃和40℃的摇床中震荡培养,每隔2d取样,测定木质纤维素的降解率。测得各温度下木质纤维素降解率的最大值见图1,图中◆表示木质素的降解率,■表示纤维素的降解率,▲表示半纤维素的降解率。

[0097] 由图1可知,菌丝球降解木质素的适宜温度为28℃~34℃,当温度为28℃时木质素的降解率最高,可达58.01%。在30℃和34℃时,纤维素和半纤维素的降解率达到最高,分别为45.39%和57.45%。当温度为40℃时,半纤维素的降解率仍能达到37.91%,说明在高温的环境下,菌丝球对造纸废水仍有很好的降解。

[0098] 不同pH下复合菌菌丝球降解造纸废水的性能:

[0099] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL造纸废水培养基的250mL锥形瓶中,调节培养基的pH分别为2、3、5、7、9、11和12,于转速为160r/min,温度为28℃的摇床中震荡培养,每隔2d取样,测定木质纤维素的降解率,测得各pH值下木质纤维素降解率的最大值见图2,图中◆表示木质素的降解率,■表示纤维素的降解率,▲表示半纤维素的降解率。

[0100] 由图2可知,当pH值小于5时,木质素的降解率均小于20%,说明偏酸的环境会抑制木质素降解酶的产生,不利于造纸废液中木质素的降解。pH为5时木质素降解率最高,可达到61.38%。随着pH的增加,木质素降解率有所降低,pH为9的体系下,木质素的降解率仍能

达到31.47%，纤维素和半纤维素降解率在5~11的体系下均能维持在40%以上，说明在偏酸性和碱性的环境下，复合菌菌丝球对造纸废液仍能进行很好的降解。

[0101] 不同时间下复合菌菌丝球降解造纸废水的性能：

[0102] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL造纸废水培养基的250mL锥形瓶中，于转速为160r/min，温度为28℃的摇床中震荡培养，每天取样，测定木质纤维素的降解率，结果见图3，图中◆表示木质素的降解率，■表示纤维素的降解率，×表示半纤维素的降解率。

[0103] 由图3可以看出，随着培养时间的延长，菌丝球对木质素的降解率呈现先升高后降低的趋势，这是因为木质素主要是由酸溶木质素和酸不溶木质素组成的，开始时体系中大分子木质素片段逐渐减少，降解率逐渐升高，当培养到144h时，降解率达到最高为63.61%。然而，在降解过程中，菌丝球会将酸溶木质素中的大分子片段降解为小分子片段，因此酸不溶木质素的含量会增加，木质素的彻底去除含量减少，总的木质素降解率减少。由于菌丝球具有很强的降解能力，随着小分子木质素片段的降解，木质素降解率又逐渐升高。复合菌菌丝球对纤维素和半纤维素也有着很高的降解能力，在72h和60h时，最高降解率分别为49.05%和63.36%。

[0104] 菌丝球循环使用处理造纸废水：

[0105] 考察复合菌菌丝球的稳定性和重复利用效果，将5g复合菌菌丝球接种于含100mL造纸废水培养基的250mL锥形瓶中，于转速为160r/min，温度为28℃的摇床中震荡培养5d，完成第一次循环后，将此复合菌菌丝球接入到新的废水培养基中，在相同的条件下处理5d。如此循环4次，结果见表3。

[0106] 表3复合菌菌丝球循环使用处理造纸废水结果

循环次数	木质素降解率/%	纤维素降解率/%	半纤维素降解率/%
1	51.27	41.58	57.1
2	44.96	37.15	39.06
3	27.04	20.75	27.43
4	菌体自溶		

[0107] 由表2可知，在第一次的循环中，菌丝球对木质纤维素的降解效果很好，木质素、纤维素、半纤维素的降解率分别为51.27%、41.58%、57.1%，在第二次到第三次的循环中，菌丝球对木质纤维素的降解率有所下降，菌丝球表面变的不光滑，球体颜色变成深棕色，但对三种木质纤维素的降解率仍能达到20%以上。直到循环到第四次的时候，菌丝球才开始出现自溶的现象。这表明菌丝球可长时间的维持活性，能够持续的处理废水。

[0108] ②复合菌菌丝球对重金属离子废水的处理

[0109] 不同温度下复合菌菌丝球吸附重金属离子的性能：

[0110] 重金属离子培养基包括Cu<sup>2+</sup>培养基和Pb<sup>2+</sup>培养基，

[0111] Cu<sup>2+</sup>培养基：硝酸铅79.93mg，加蒸馏水配成1000mL，pH值自然，120℃灭菌20min。

[0112] Pb<sup>2+</sup>培养基：硫酸铜195.32mg，加蒸馏水配成1000mL，pH值自然，120℃灭菌20min。

[0113] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL重金属离子培养基的250mL锥形瓶中，于转速为160r/min，温度分别为20℃、24℃、28℃、30℃、34℃、37℃和40℃的摇床中震荡培养，每隔1d取样，测定重金属离子吸附率。测得各温度下重金属离子吸附率的最大值见图4，图中◆表示Cu，■表示Pb。

[0115] 由图4可知,考察范围内的温度对重金属离子的吸附有一定的影响。在28℃~34℃范围内的吸附效果都很好,复合菌菌丝球对Cu<sup>2+</sup>的吸附率在28℃时达到最高,对Pb<sup>2+</sup>的吸附率在30℃时达到最高,分别为63.73%和57.83%。温度为20℃和40℃时,复合菌菌丝球的吸附效果最差,说明温度过高或过低都会影响复合菌菌丝球对重金属离子的吸附。

[0116] 不同pH下复合菌菌丝球吸附重金属离子的性能:

[0117] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL重金属离子培养基的250mL锥形瓶中,调节培养基的pH分别为2、3、5、7、9、11和12,于转速为160r/min,温度为28℃的摇床中震荡培养,每隔1d取样,测定重金属离子吸附率。测得各pH值下重金属离子吸附率的最大值见图5,图中◆表示Cu,■表示Pb。

[0118] 溶液的pH值会同时影响金属离子和菌丝球细胞表面的化学状态,研究pH值对菌丝球吸附重金属离子的影响具有十分重要的意义。由图5可知,当pH值小于5时,复合菌菌丝球对Cu<sup>2+</sup>和Pb<sup>2+</sup>的吸附率都很低,这是因为当pH较小时,质子占据了菌丝球表面的大部分吸附位点,使重金属离子的吸附效率降低。pH值在5~9的范围内的吸附效果都很好,当pH值为5时,Cu<sup>2+</sup>和Pb<sup>2+</sup>的吸附率达到最大,分别为73.21%和59.29%。当pH值大于9时,溶液中的OH<sup>-</sup>离子会与菌丝球表面上的官能团结合,与金属离子发生竞争作用,继而导致吸附率降低。结果表明复合菌菌丝球在偏酸和碱性环境下对重金属离子均有很好的吸附效果。

[0119] 不同时间下复合菌菌丝球吸附重金属离子的性能:

[0120] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL重金属离子培养基的250mL锥形瓶中,于转速为160r/min,温度为28℃的摇床中震荡培养。开始测定时,每隔30min取样,测定重金属离子的吸附率,结果见图6,图中◆表示Cu,■表示Pb。

[0121] 由图6可知,复合菌菌丝球对Cu<sup>2+</sup>和Pb<sup>2+</sup>的吸附在10个小时内就分别达到了63.99%和37.53%,在短时间内溶液中重金属离子的浓度下降很快,这是因为此吸附阶段为表面快速吸附阶段,菌丝球细胞壁上的各种活性基团与重金属离子配位络合吸附。在随后的吸附时间里,溶液中的重金属离子浓度缓慢下降直至吸附平衡,这是因为随着吸附量的增加,菌丝球细胞壁对重金属离子的吸附达到了饱和,游离的重金属离子若要进入到细胞内,所受的阻力就会增大,因此达到吸附饱和的时间就会很长。在48h和72h时,复合菌菌丝球对Cu<sup>2+</sup>和Pb<sup>2+</sup>的吸附率达到最大,分别为76.96%和61.32%。

[0122] ③对多种染料废水的处理

[0123] 不同温度下复合菌菌丝球吸附染料的性能:

[0124] 染料培养液包括刚果红染料培养基、孔雀石绿染料培养基和结晶紫染料培养基,

[0125] 刚果红染料培养基:刚果红100mg,加蒸馏水配成1000mL,pH值自然,120℃灭菌20min。

[0126] 孔雀石绿染料培养基:孔雀石绿100mg,加蒸馏水配成1000mL,pH值自然,120℃灭菌20min。

[0127] 结晶紫染料培养基:结晶紫100mg,加蒸馏水配成1000mL,pH值自然,120℃灭菌20min。

[0128] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL染料培养基的250mL锥形瓶中,于转速为160r/min,温度分别为20℃、24℃、28℃、30℃、34℃和40℃的摇床中震荡培养,每隔12h取样,测定染料的脱色率,测得各温度下染料脱色率的最大值见图7,图中◆表示刚果红,■表示孔雀

蓝,▲表示结晶紫。

[0129] 由图7可知,温度对复合菌菌丝球吸附染料有很大的影响,当温度在20℃~40℃时,脱色率随着温度的增加会有一个先增大后减小的趋势。在28℃~34℃的温度范围内,复合菌菌丝球对三种染料的脱色效果都很好。当温度达到28℃时,复合菌菌丝球对孔雀蓝和刚果红的吸附效果最好,脱色率高达94.75%和96.43%;当温度30℃时,复合菌菌丝球对结晶紫的吸附效果最好,脱色率可达到81.63%。当温度达到40℃时,复合菌菌丝球对三种染料的脱色率都在30%左右。由此可以推断,温度的变化会影响木质纤维素酶的分泌并且改变酶的结构和性质,温度过高会降低复合菌菌丝球对染料的脱色率。

[0130] 不同pH下复合菌菌丝球吸附染料的性能:

[0131] 将5g复合菌菌丝球接种于100mL(250mL锥形瓶)染料培养基中,调节培养基的pH分别为2、3、5、7、9、11和12,于转速为160r/min,温度为28℃的摇床中震荡培养,每隔12h取样,测定染料的脱色率,测得各PH下染料脱色率的最大值见图8,图中◆表示刚果红,■表示孔雀蓝,▲表示结晶紫。

[0132] 复合菌菌丝球对染料的脱色与降解主要是依靠酶系统的催化氧化、还原等方式破坏染料的不饱和共轭键与发色体系,pH对酶促反应速率有很大的影响,只有在最佳pH条件下,酶才能表现出最好的催化活性。由图8可知,pH在5~9的范围内,复合菌菌丝球对三种染料的脱色率都高达70%以上。当pH为5时,复合菌菌丝球对刚果红和孔雀蓝的脱色效果最好,脱色率可达到97.87%和94.55%;当pH为7时,复合菌菌丝球对结晶紫的脱色效果最好,脱色率为83.67%。结果表明复合菌菌丝球在偏酸和碱性的环境下对染料均有很好的吸附效果。

[0133] 不同时间下复合菌菌丝球吸附染料的性能:

[0134] 将5g复合菌菌丝球接种于含100mL染料培养基的250mL锥形瓶中,于转速为160r/min,温度为28℃的摇床中震荡培养,开始测定时,每隔30min取样,测定染料的脱色率,结果见图9,图中◆表示刚果红,■表示孔雀蓝,▲表示结晶紫。

[0135] 由图9可知,复合菌菌丝球对三种染料的吸附量在最初的一段时间内增加十分迅速,随后逐渐减缓直至吸附平衡。对于刚果红、孔雀蓝和结晶紫这三种染料,在最初12h之内的脱色率就可达到70%以上,脱色速率比较高。在6h时,复合菌菌丝球对刚果红的脱色率最高,可达到97.92%。培养到48h时,复合菌菌丝球对孔雀蓝,结晶紫的吸附效果最好,最高脱色率分别为95.61%和88.63%。结果表明复合菌菌丝球对三种染料的脱色均取得了很好的效果。

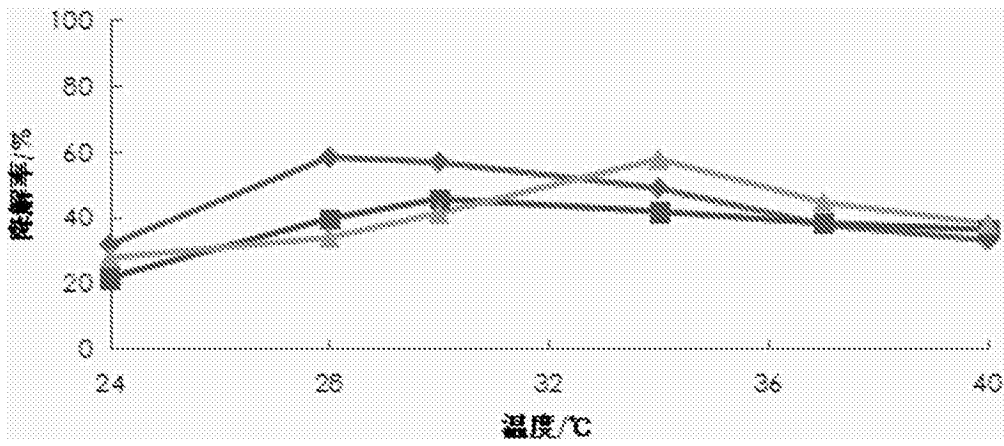


图1

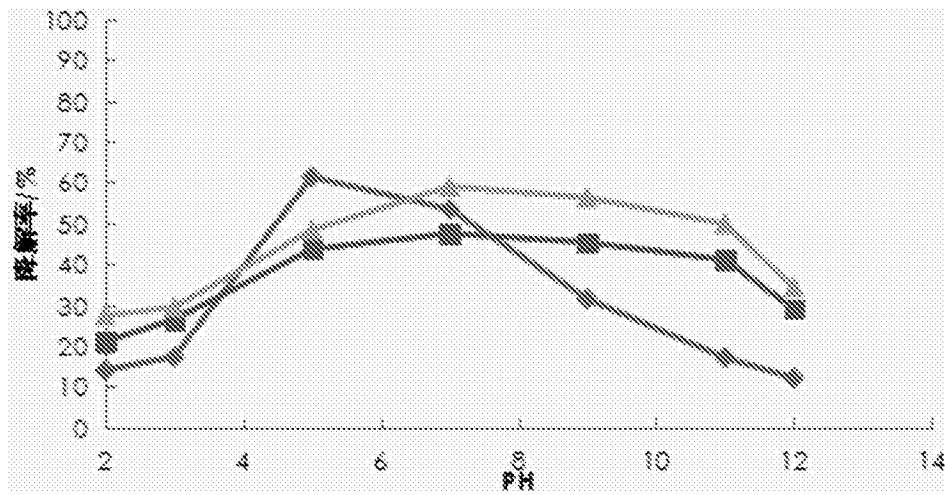


图2

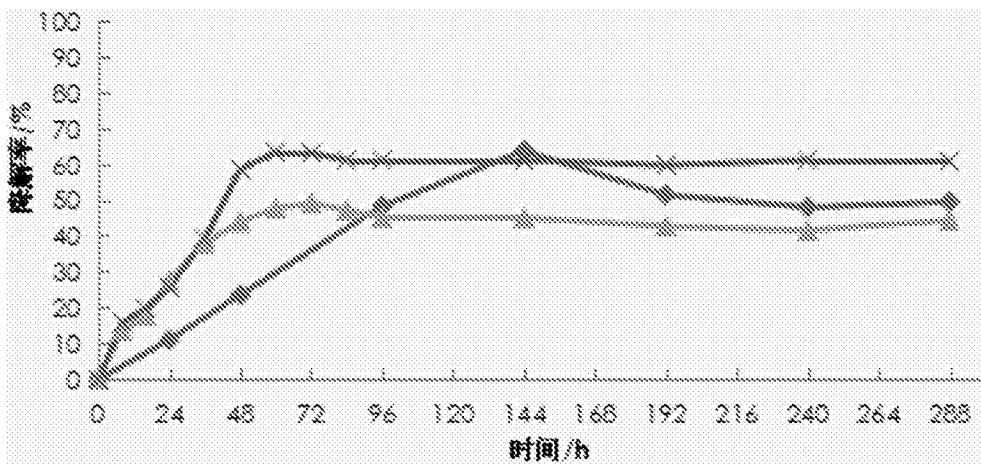


图3

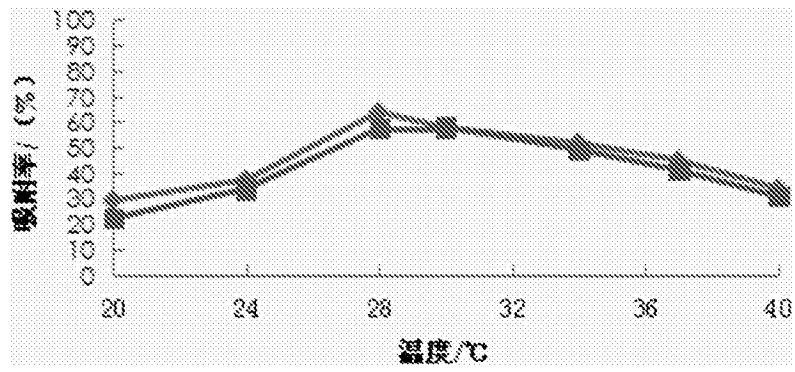


图4

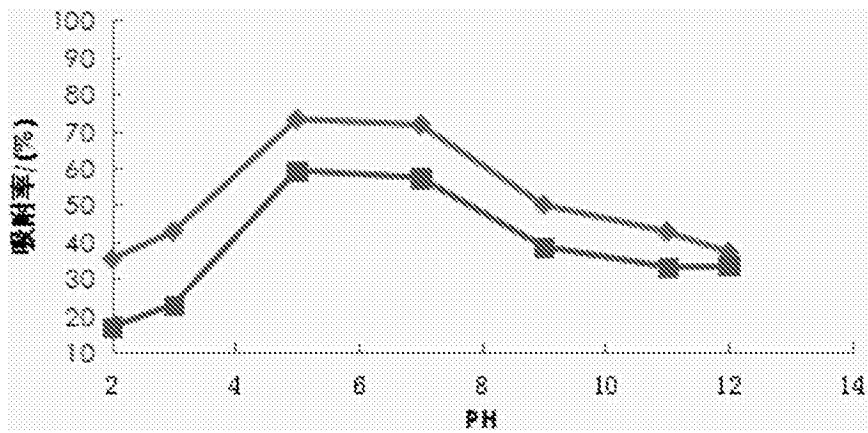


图5

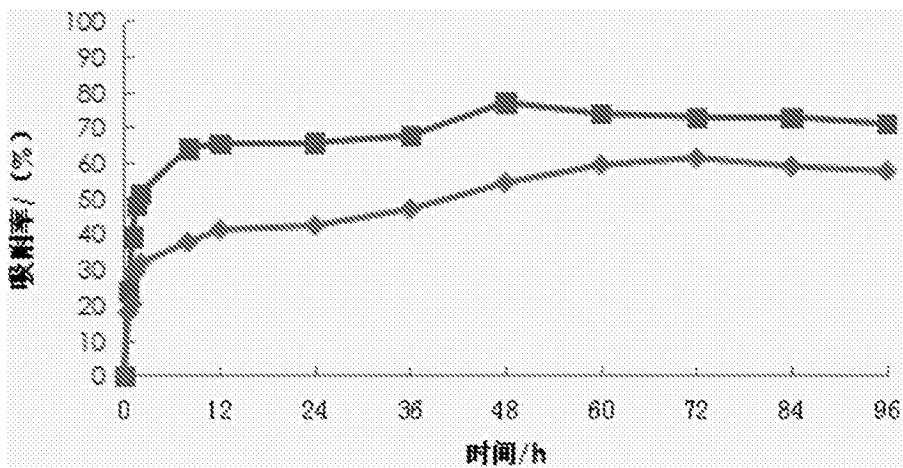


图6

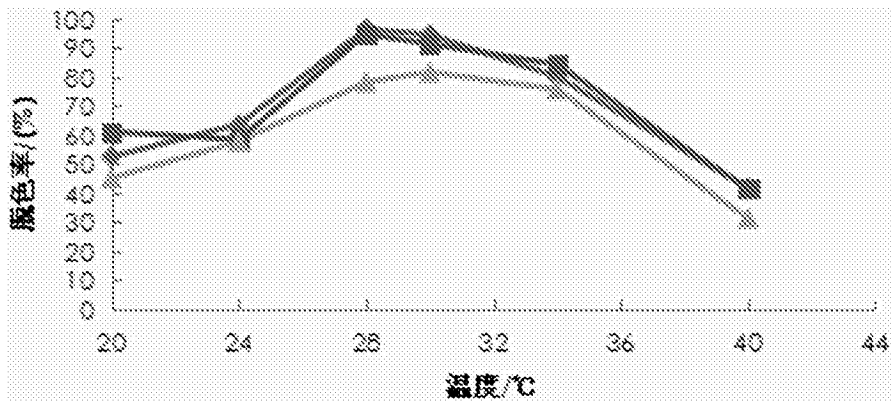


图7

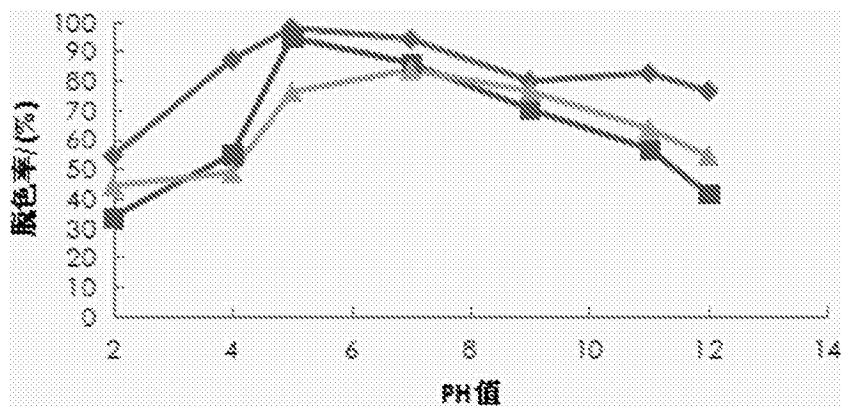


图8

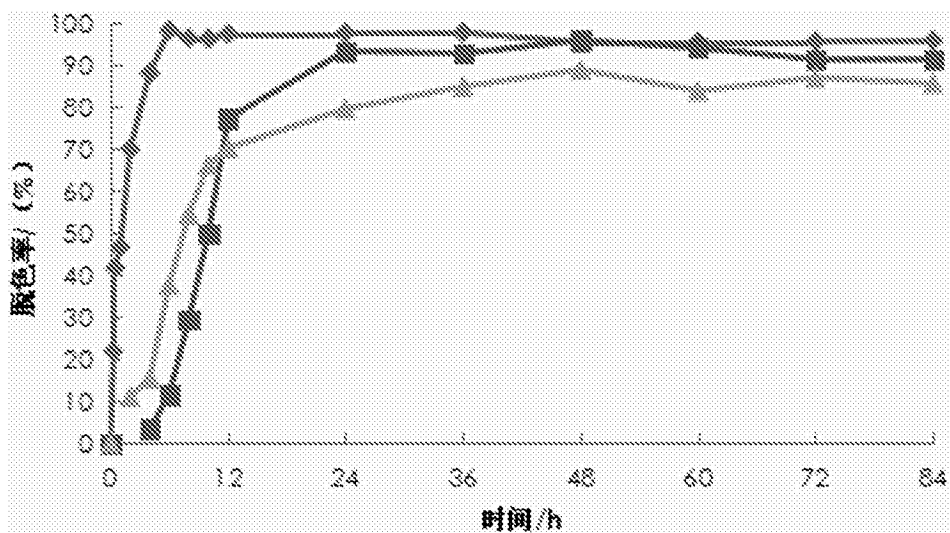


图9

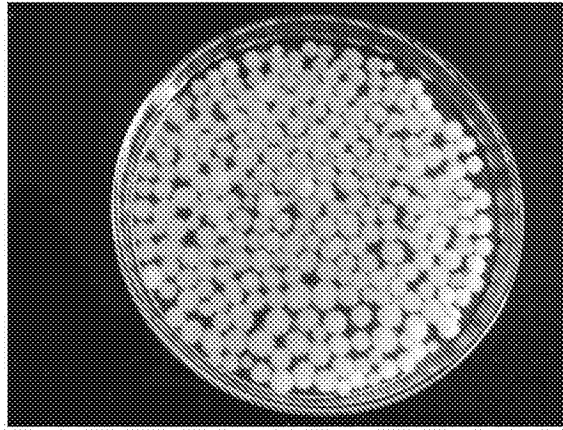


图10

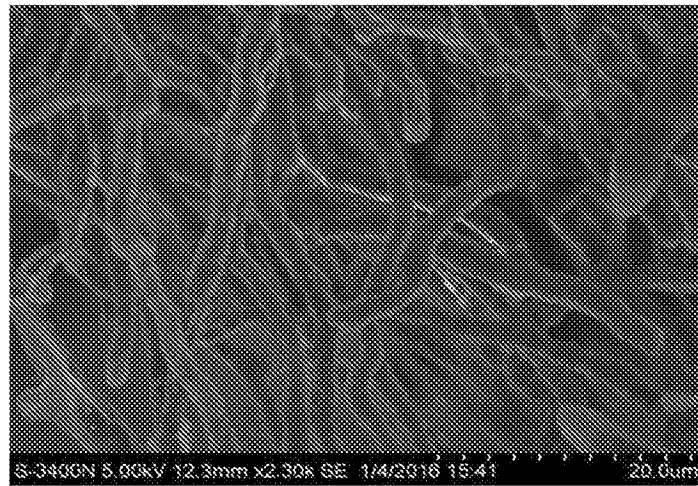


图11

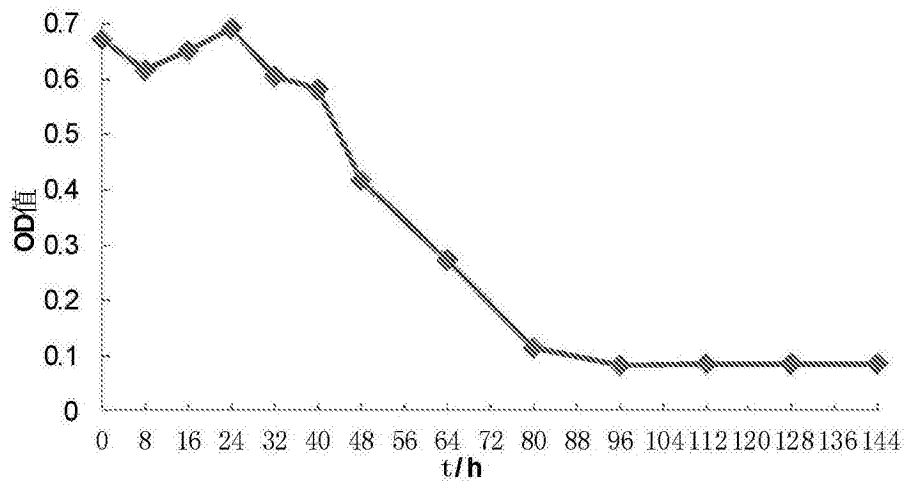


图12