

固定化硝化细菌耐低温机理的研究

郑 平 徐向阳 冯孝善

(浙江农业大学环保系 杭州 310029)

氨随污水排入水体,不但能诱发“富营养化”,造成水生生态系统紊乱,而且还有如下危害:(1)消耗溶解氧,导致水体缺氧;(2)影响鱼鳃的氧传递,严重时使鱼类死亡;(3)与氯气作用生成氯胺,妨碍氯化消毒处理^[1]。

对于氨污染的控制,目前国内外主要采用生物脱氮技术,即硝化-反硝化工艺^[2]。由于硝化细菌生长缓慢(在低温下则生长更慢),一些学者作了固定化细胞的尝试,以期滞留足量的生物体,改善生物反应器的运作性能^[3,4]。研究发现,固定化硝化细菌具有较强的耐低温能力^[4]。这对含氨废水的冬季生物处理十分有益。本文拟就固定化细胞的耐低温机理作一探讨。

1 材料与方 法

1.1 硝化细菌及其培养条件

供试硝化细菌(*Nitrosomonas europaea*)和(*Nitrobacter agilis*)菌株分别由英国阿伯丁大学 Prosser 博士和荷兰格罗宁根大学 Harder 教授惠赠。*Ns. europaea* 培养基的组成为:19.0 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.21 mmol/L MgSO_4 , 5 mmol/L NaH_2PO_4 , 5 mmol/L Na_2HPO_4 , 9 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 , 0.6 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , 5 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 , 100 ml H_2O 。*Nb. agilis* 培养基的组成为:14.5 mmol/L NaNO_2 , 0.21 mmol/L MgSO_4 , 5 mmol/L NaH_2PO_4 , 5 mmol/L Na_2HPO_4 , 1 $\mu\text{mol/L}$ Na_2MoO_4 , 0.015 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 , 0.016 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , 5 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 , 100 ml H_2O 。两菌株均用恒化器连续培养,接种量为 10%,培养温度为 30℃,稀释率为 0.01 h⁻¹,恒化器 pH 用 1.8 mol/L NaHCO_3 调节至 7.8。培养 10d 后收获细胞。

1.2 硝化细菌的固定

先对细胞培养液进行离心(10 000 g, 4℃, 20 min)浓缩。弃上清液后用生理盐水冲洗。再离心 10 min, 弃上清液。尔后用生理盐水重新悬浮细胞,并测定细胞浓度(Beckman 915-B 型分析仪测定 TOC 含量)。

浓缩细胞用角叉胶(Carrageenin)固定。将 3g 角叉胶溶于 100 ml 蒸馏水中(70℃),待其冷却至 30℃ 后,与 15 ml 细胞浓缩液混合。混合液用针头挤入缓慢搅拌的 0.2 mol/L CaCl_2 溶液中。20 min 后,将成形的固定化细胞颗粒转移至 0.2 mol/L KCl 溶液内,并放置 30 min。制好的固定化细胞颗粒转至 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8)中贮存。颗粒的平均直径为 4.06 mm,细胞含量 40.43 mg TOC/L 颗粒(*Ns. europaea*)和 38.65 mg TOC/L 颗粒(*Nb. agilis*)。

1.3 细胞活性测定

悬浮细胞和固定化细胞的活性均放置于 4 ml 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8)中测定。试验温度为 5~30℃。根据所试温度的不同,分别加入 5~20 μL 悬浮细胞或 60~300 粒固定化细胞。*Ns. europaea* 和 *Nb. agilis* 的基质分别为 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 20 mmol/L KNO_2 。将上述基质注入测定小

国家自然科学基金资助项目。

本文于 1996 年 6 月 4 日收到。

室后,连续搅拌,用溶解氧探头(氧电极 为 YSI 5331,美国 Yellow Spring 仪器公司制造)密封小室,并测定溶解氧浓度。根据溶解氧-时间曲线,计算溶解氧消耗速率,再用 Monod 方程作非线性拟合,确定悬浮细胞和固定化细胞的最大比活性和饱和常数。

1.4 氧扩散系数测定

在初始溶质浓度为 S_0 的溶液中,迅速放入一定量固定化细胞颗粒,由于浓度梯度的作用,溶质会沿细胞颗粒由外向内传递,直至达到物质平衡。如果搅拌充分,可消除颗粒外部传质阻力的影响,此时的传质过程可用如下数学模型表达^[5]:

$$S_b = \frac{\alpha S_0}{1 + \alpha} \left[1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1 + \alpha) e^{-[D_{N_2}/r_p^2] q_n^2}}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \right] \tag{1}$$

式中 q_n 为下列方程中的非零正根:

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} \tag{2}$$

氧扩散系数的测定放置于 5ml 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8)内进行。供试固定化细胞颗粒为 60 粒,平均粒径为 4.06mm,相应于式(1)的 α 值为 2.38。将固定化细胞颗粒和磷酸缓冲液加入测定小室后,先用纯氧置换其中的氧气 20min,然后安上溶解氧探头,密封小室并测定溶解氧浓度。待溶解氧记录仪上的基线稳定后,迅速向测定小室内注入 0.1ml 纯氧饱和的磷酸盐缓冲液,测定并记录溶解氧随时间的变化。根据多面体最优化原理,用式(1)关联实验数据,计算固定化细胞颗粒内的氧有效扩散系数。

2 结果与讨论

2.1 悬浮细胞的活性

在温度为 5~30℃ 的条件下,分别对悬浮 *Ns. europaea* 和 *Nb. agilis* 的最大比活性和饱和常数进行了测定,结果见表 1。

表 1 悬浮 *Ns. europaea* 和 *Nb. agilis* 的最大比活性和饱和常数

$t / (^\circ\text{C})$	5	10	15	20	25	30
$V_i^{N_s} (10^{-3} \text{ mol/kg TOC}\cdot\text{s})$	3.887	7.581	14.220	26.300	47.640	84.650
$K_{i,i}^{N_s} (10^{-3} \text{ mol/m}^3)$	2.577	3.798	5.523	6.392	11.250	15.770
$V_i^{N_b} (10^{-3} \text{ mol/kg TOC}\cdot\text{s})$	0.630	0.984	1.514	2.294	3.428	5.058
$K_{i,i}^{N_b} (10^{-3} \text{ mol/m}^3)$	2.366	3.527	5.186	7.526	10.790	15.270

用 Arrhenius 公式拟合表 1 数据得:
对于悬浮 *Ns. europaea*

$$V_i^{N_s} = 5.48 \times 10^{16} e^{-\frac{85.97 \times 10^3}{RT}} \tag{3}$$

$$K_{i,i}^{N_s} = 6.52 \times 10^6 e^{-\frac{50.01 \times 10^3}{RT}} \tag{4}$$

对于悬浮 *Nb. agilis*

$$V_i^{N_b} = 5.40 \times 10^{10} e^{-\frac{58.20 \times 10^3}{RT}} \tag{5}$$

$$K_{i,i}^{N_b} = 7.03 \times 10^6 e^{-\frac{50.32 \times 10^3}{RT}} \tag{6}$$

本试验测得的悬浮 *Ns. europaea* 和 *Nb. agilis* 最大比活性的活化能分别为 85.97 和 58.20 kJ/mol,与有关的文献报道 (*Nitrosomonas* 54.5~86.5 kJ/mol; *Nitrobacter* 36.4~56.3 kJ/mol)^[6]相吻合。比较

两菌株最大比活性的活化能,则可发现 *Ns. europaea* 对温度变化的敏感性高于 *Nb. agilis*。

两菌株饱和常数的活化能依次为 50.01 和 50.32 kJ/mol,对温度变化的响应基本相同。该活化能值与其他研究者的报道值 (52 kJ/mol)^[7]很接近。

2.2 固定化细胞的活性

不同温度下固定化 *Ns. europaea* 和 *Nb. agilis* 的最大比活性和饱和常数的测定值见表 2。

表 2 固定化 *Ns. europaea* 和 *Nb. agilis* 的最大比活性和饱和常数

<i>t</i> /℃	5	10	15	20	25	30
$V_i^{Ns} (10^{-3} \text{ mol/kg TOC} \cdot \text{s})$	3.498	6.014	9.953	15.780	23.820	42.330
$K_{s,i}^{Ns} (10^{-3} \text{ mol / m}^3)$	5.402	9.710	17.100	29.320	49.310	81.160
$V_i^{Nb} (10^{-3} \text{ mol/kg TOC} \cdot \text{s})$	0.570	0.788	1.060	1.370	1.885	2.520
$K_{s,i}^{Nb} (10^{-3} \text{ mol / m}^3)$	4.607	8.394	14.970	26.050	44.610	75.010

用 Arrhenius 公式拟合表 2 数据得:

对于固定化 *Ns. europaea*

$$V_i^{Ns} = 5.01 \times 10^{13} e^{-\frac{70.08 \times 10^3}{RT}}$$
 (7)

$$K_{s,i}^{Ns} = 8.43 \times 10^{11} e^{-\frac{75.55 \times 10^3}{RT}}$$
 (8)

对于固定化 *Nb. agilis*

$$V_i^{Nb} = 3.62 \times 10^7 e^{-\frac{41.55 \times 10^3}{RT}}$$
 (9)

$$K_{s,i}^{Nb} = 1.80 \times 10^{12} e^{-\frac{77.66 \times 10^3}{RT}}$$
 (10)

比较表 1 和表 2 数据可知,固定化硝化细菌的最大比活性要比相应的悬浮细胞低,说明固定化过程可导致部分细胞活性的损失。比较式(3),(6)和式(7),(9)则可进一步发现,固定化细胞最大比活性的活化能(分别为 70.08 和 41.55 kJ/mol)也低于相应的悬浮细胞,表明其对温度变化的敏感程度下降。

与上述情况相反,固定化硝化细菌的饱和常数(见表 1 和表 2)及其活化能(见式(4),(6),(8)和(10))都相应增大,表明固定化细胞对基质的亲和力降低,对温度变化的敏感性提高。但值得一提的是,降低温度可相对增强固定化细胞对基质的亲和力。

2.3 固定化细胞的过程反应特性

2.3.1 氧的有效扩散系数:图 1 为测定氧在固定化细胞颗粒内的有扩散系数的一个试验记录。向测定小室注入 0.1 ml 纯氧饱和的磷酸盐缓冲液后,由于不能迅速混匀,溶解氧的响应有滞后现象。为了取得可靠的氧有效扩散系数,计算中略去前 60s 试验数据。

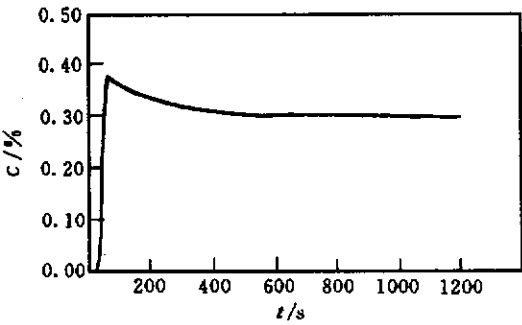


图 1 溶解氧浓度随时间的变化
固定化细胞颗粒的直径为 4.06mm,α 值为 2.38

搅拌速度可影响氧在固定化细胞颗粒外部的扩散,为了消除颗粒外部的传质阻力,测定了搅拌速度对扩散系数的影响。在 250 ~ 1500r/min 范围内,初期提高搅拌速度,会提高氧的扩散系数;至 850r/min 时,氧的扩散系数达到最大;此后维持稳定(图 2)。因此,所有其它测定均采用 850r/min。

将温度从 5℃ 提高到 30℃,可提高氧的有效扩散系数(图 3)。用 Arrhenius 公式拟合有

效扩散系数与温度间的关系,可得:

$$D = 1.87 \times 10^{-6} e^{-\frac{16.9 \times 10^3}{RT}} \quad (11)$$

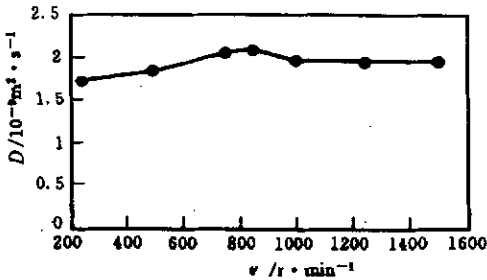


图2 搅拌速度对扩散系数的影响(30℃)

化能高达 70.50 kJ/mol。由于扩散对温度变化的敏感程度明显低于生化反应,所以在过程反应受扩散控制的条件下,固定化硝化细菌具有较强的耐低温性能。

3 小结

固定化硝化细菌的耐低温性能优于相应的悬浮细胞。通过对氧有效扩散系数,饱和常数和最大比活性活化能的测定,以及对过程反应特性的分析,作者认为固定化硝化细菌较耐低温的主要机理是:低温相对提高了硝化细菌对基质的亲和力;过程反应受扩散控制,扩散对温度变化的敏感程度较低。

致谢 本研究承蒙荷兰代尔夫特技术大学 Kuenen J G 教授和 Jetten M S M 博士的悉心指导,特此致谢。

符号说明

- | | |
|---|--|
| S_b 溶液中溶质的主体浓度/%(空气饱和度) | R 气体常数(8.314 J/mol.K) |
| S_0 溶液中溶质的初始主体浓度/%(空气饱和度) | T 绝对温度/K |
| α 溶液容积与固定化细胞颗粒容积之比 | t 时间/s |
| r_p 固定化细胞颗粒半径/m | V_i 固定化细胞的最大比活性(mol/kgTOC·s) |
| D 有效扩散系数/ $m^2 \cdot s^{-1}$ | $K_{s,i}$ 固定化细胞的饱和常数/ $mol \cdot m^{-3}$ (以氧作基质) |
| V_f 悬浮细胞的最大比活性(mol/kgTOC·s) | TOC 总有机碳/mg·L ⁻¹ |
| $K_{s,f}$ 悬浮细胞的饱和常数/ $mol \cdot m^{-3}$ (以溶解氧作基质) | |

本试验测得的氧有效扩散系数的活化能为 16.90 kJ/mol,与氧在水中扩散的活化能(18.3~20.7 kJ/mol)^[6]相当。然而,与固定化细胞最大比活性及饱和常数的活化能相比,氧有效扩散系数的活化能明显较低。也即它受温度变化的影响相对较小。

2.3.2 过程反应特性:在溶解氧浓度很低(0.001 mmol/L)的情况下,过程反应受扩散控制,求得的 *Ns. europaea* 最大比活性的活化能为 14.62 kJ/mol。与氧有效扩散系数的活化能相当。而在溶解氧浓度很高(1 mmol/L)的情况下,过程反应受生化反应控制,求得的 *Ns. europaea* 最大比活性的活

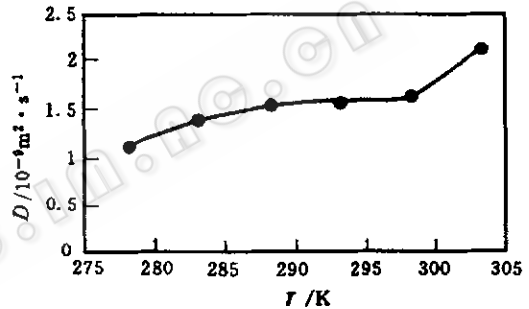


图3 温度与氧有效扩散系数的关系

参 考 文 献

- [1] 章非娟编著, 顾国维审校. 生物脱氮技术, 北京: 中国环境科学出版社, 1992.
- [2] Mateju V, Janoch T. *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14: 171~188.
- [3] Van Ginkel C G, Tramper J, Luyben K *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1983, 5: 297~303.
- [4] Tramper J, Grootjen D R J. *Enzyme Microb technol*, 1986, 8: 472~476.
- [5] Itamunala G F. *Biotechnol Bioeng*, 1988, 31: 714~717.
- [6] EPA. Process design manual for nitrogen control. U S Environmental Protection Agency, Washington, D C 1975.
- [7] Boon B, Landelout H. *Biochem J*, 1962, 85: 440~447.
- [8] Wise, D L *et al.* *Chem Eng Sci*, 1966, 22: 999~1010.

Mechanism Study of Tolerance of Immobilized Nitrifying Bacteria Towards Low Temperature

Zheng Ping Xu Xiangyang Feng Xiaoshan

(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract Immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* were found to be less sensitive to low temperature than their suspended cells. In order to explore its mechanism, activation energies for the maximum specific respiration activity, for the Monod constant and for the oxygen diffusion in carrageenin were determined and compared. It was shown that both the effect of diffusion limitation and the effect of temperature on the Monod constant were responsible for the better tolerance towards low temperature.

Key words Nitrification, immobilized cells, activation energy, temperature