

# 固定化微生物技术及其在污染土壤修复中的应用<sup>①</sup>

司友斌, 彭 军

(安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 固定化微生物技术是一种新的生物处理技术, 与普通生物处理法相比有许多优点。本文对固定化微生物的制备方法、固定化微生物的载体、固定化微生物的反应特性以及固定化微生物技术在污染土壤治理中的应用和研究进展状况进行了综述, 并对其今后的发展方向作了探讨。

**关键词:** 固定化微生物; 载体; 土壤修复

**中图分类号:** S154.3

固定化微生物技术是 20 世纪 60 年代由生物化工中的固定化酶技术发展起来的生物处理技术<sup>[1, 2]</sup>。所谓固定化技术, 是指利用物理或化学手段将游离的微生物或酶, 定位于限定的空间区域并使其保持活性和可反复使用的一种基本技术<sup>[3]</sup>。与其他应用游离微生物的过程相比, 固定化微生物技术可以使微生物在某一固定区域具有较高的密度, 减轻或消除微生物的流失, 提高反应速度, 同时便于培养优势微生物种群, 提高处理过程的稳定性, 减少或消除副反应的发生, 便于控制处理过程<sup>[4-6]</sup>。目前, 固定化微生物技术已成为国内外生物科学、环境科学及其相关学科的研究重点。

## 1 固定化微生物的制备方法

固定化微生物的制备方法多种多样, 任何一种限制细胞自由流动的技术, 都可以用于制备固定化细胞。一般来说, 大致可以分成吸附法、包埋法、共价结合法和交联法等 4 大类<sup>[7-10]</sup>, 其中吸附法与包埋法最为常用。

### 1.1 吸附法

吸附法是利用微生物所具有的可吸附到固体物质表面或其他细胞表面的能力, 将微生物吸附在附加剂表面的方法, 这是一种非常廉价和有效的微生物固定化方法。吸附法可分为物理吸附和离子吸附。物理吸附是使用具有高吸附能力的物质, 如硅胶、活性炭、多孔玻璃、石英砂、纤维素、硅藻土、多孔砖等吸附剂, 将微生物吸附在表面使其固定化。离子吸附是利用微生物在解离状态下离子键合作用而固定于带有相反电荷的离子交换剂上, 常见的离子交换剂有 DEAE-纤维素、CM-纤维素等。

吸附法实现简单, 操作容易, 反应条件温和, 对微生物活性影响小, 载体可重复使用, 但微生物与载体的结合力较弱, 稳定性差, 微生物菌体易脱落。

### 1.2 包埋法

包埋法是使微生物细胞扩散进入多孔性载体内部, 或利用高聚物在形成凝胶时将细胞包裹在网格结构中或半透性聚合薄膜内, 小分子的底物和产物可以自由扩散, 而细胞却不会扩散到周围介质中去。包埋法又可分为高分子合成包埋、离子网络包埋及沉淀包埋, 是目前研究最广泛的固定化方法。

包埋法操作简单, 对微生物活性影响小, 制作的固定化微生物小球的强度高, 但包埋材料会一定程度阻碍底物和氧扩散, 并对大分子底物不适用。

### 1.3 共价结合法

共价结合法是微生物细胞表面上的功能团和固相支持物表面的反应基团之间形成化学共价键连接, 从而形成固定化微生物。

该法细胞与载体之间的连接键很牢固, 使用过程中不会发生脱落, 稳定性好, 但反应条件激烈, 操作复杂, 控制条件苛刻。利用此法制备的固定化微生物, 细胞大多死亡。

### 1.4 交联法

交联法是利用两个功能团以上的试剂直接与微生物细胞表面的反应基团如氨基、羟基等进行交联, 形成共价键来固定微生物。常用的交联剂有戊二醛、甲苯二异氰酸酯等。

此法化学反应条件剧烈, 对细胞活性影响大, 实际常与其他方法结合。聚集-交联固定法是使用凝聚剂

<sup>①</sup>基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA06Z356)、安徽省科技攻关计划项目 (07010302212) 和安徽省优秀青年科技基金项目 (06041082) 资助。

作者简介: 司友斌 (1968—), 男, 安徽巢湖人, 博士, 教授, 主要从事环境污染生物修复方面的研究。E-mail: ybsi2002@yahoo.com.cn

将菌体细胞形成细胞聚集体,再利用双功能或多功能交联剂与细胞表面的活性基团发生反应,使细胞彼此交联形成稳定的立体网状结构。这样,高效菌体不易流失,生物浓度高,从而提高了处理效果。

## 2 固定化微生物的载体

理想的固定化微生物细胞载体应该具有以下特征:对微生物细胞无毒性,传质性能好,透气性和透光性良好,性质稳定,不易被微生物分解,机械强度高,使用寿命长,价格低廉等。目前常用的微生物固定化载体材料大致可分为有机载体、无机载体和复合载体 3 大类<sup>[11-13]</sup>。

### 2.1 有机高分子载体材料

有机高分子载体材料又分为天然高分子凝胶载体和合成有机高分子凝胶载体。

天然高分子凝胶载体一般对生物无毒性,传质性能好,但强度较低,在厌氧条件下易被微生物分解,寿命短。常见的此类载体有琼脂、角叉菜胶、海藻酸钠等。在这几种天然载体中,琼脂强度最差。天然角叉菜胶在分离出影响其强度的 $\lambda$ -角叉菜胶成分后,强度和稳定性有所提高,但价格较贵。相比之下,海藻酸钠具有价格低廉、制备容易、传质性能好等优点,应用最为广泛。

合成有机高分子凝胶载体一般强度较大,但传质性能较差,在进行细胞固定时对细胞活性有影响。常见的此类载体有聚丙烯酰胺(简称 ACAM)、聚乙烯醇(简称 PVA)、光硬化树脂、聚丙烯酸凝胶等。聚丙烯酰胺(ACAM)凝胶在包埋细胞时,由于交联过程中的放热以及交联试剂本身的毒性,细胞在固定化过程中往往失活。对此,可采取先用天然高分子凝胶琼脂包埋细胞后,再用 ACAM 进行包埋的二次包埋固定化方法,以克服此弱点。

固定化有机载体的制备方法主要采用包埋法。此法是利用高聚物在形成凝胶时将细胞包埋在其内部,从而达到固定细胞的目的<sup>[14]</sup>。

### 2.2 无机载体材料

无机载体如多孔陶珠、活性炭、硅藻土、红砖碎粒、砂粒等,具有机械强度大、对微生物无毒性、不易被微生物分解、耐酸碱、成本低、寿命长等特性,因而是一类重要的载体材料<sup>[15-16]</sup>。

无机载体大多具有多孔结构,在与微生物接触时,利用吸附作用和电荷效应,从而把微生物固定。无机载体内部有较大的孔隙度,可以容纳不断增殖的微生物,使得载体内细胞浓度增大,提高了处理效率。

无机载体的固定化方法简单易行,只需把载体放入含有微生物一定浓度的溶液中,固定一段时间(一般为 24 h 左右)即可。

常见的几种无机载体中,多孔陶珠的吸附能力强,孔径可调控。针对不同大小的微生物,可选用相应规格的陶珠作载体,灵活度大。但在现有条件下,大规模制造陶珠仍有一定困难,成本较高。活性炭是一种来源广、成本低、易制造的细胞固定化载体材料,在吸附性能、酸碱耐受性、细胞的增殖速度及处理效果方面,具有实用性,具备了载体材料的基本条件,有较大的应用前景。

### 2.3 复合载体材料

由于有机载体材料和无机载体材料各有优缺点,而两类材料在许多性能方面互补,因此,可将这两类载体材料结合,组成复合载体材料,以改进材料的性能<sup>[17]</sup>。

Lin 等人<sup>[18]</sup>在这方面进行了尝试,他们利用海藻酸钙凝胶联合包埋固定 *Phanerochaete chrysosporium* 和粉末活性炭,用于降解五氯酚(PCP)。他们所用复合固定化体系包括 3 个组分:生物催化剂、吸附剂和固态底物;其中,吸附剂主要用于富集有毒污染物,提供给微生物进一步生物降解,并能减轻其对生物催化剂的抑制作用;固态底物用于支持降解并减少其他生物的干扰。结果表明:复合固定化体系能更加有效地降解 PCP,显示出复合载体材料的优越性。

## 3 固定化微生物的反应特性

微生物经过固定化后,其中主要包括微生物稳定性、微生物活性、氧和底物传质速率等反应特性都发生了变化,这些变化决定了固定化微生物与游离微生物在处理过程以及工艺上的差异<sup>[19-20]</sup>。

### 3.1 微生物稳定性的变化

微生物从本质上讲也是一种含有多种官能团的蛋白质结构,因此,经固定化后的微生物其官能团与载体之间发生了共价键或范德华力等形式的作用,主链结构得到加固,不易流失,不易被破坏,能耐 pH 变化、有机物浓度的变化、生物毒性物质等的冲击,不易失活。

### 3.2 微生物活性的变化

微生物固定化后,由于官能团稳定性的增加,其生物活性有所减弱,但由于微生物在一定区域空间内具有高密度,因此单个微生物活性降低的缺陷可以得到弥补。

### 3.3 氧和底物传质速率的变化

由于载体的作用,使得反应系统中主体与微生物所处区域的底物及氧浓度有差异,固定化后氧传质受到的阻碍更为明显,所以好氧条件下,受氧传质的限制,固定化微生物处理的污染物浓度不宜过高,以免限制了高密度微生物活性的发挥;厌氧下由于不受氧传质的影响,污染物浓度可大大高于好氧条件,固定化微生物的处理能力可以得到充分体现,并且可长时间保持较高的生物量和活性,充分显示出固定化微生物的优越性。

#### 4 固定化微生物技术在污染土壤治理中的应用

固定化微生物技术已在某些水相污染物处理中显示了一定的技术优势,如难降解的有机废水、含高浓度重金属离子的废水、生活污水和高浓度有机废水以及毒性检验和生物检测等<sup>[21-24]</sup>,但在污染土壤治理中的应用则刚刚起步。

王新等<sup>[25-27]</sup>采用莲藕状聚乙烯醇复合载体对镰刀菌固定化包埋,分别进行了不同接种量的固定化真菌对菲、芘的降解;固定化真菌对不同系列浓度菲、芘的降解试验;以及对固定化真菌在自然土壤中对菲、芘降解的各项参数作了测定,同时用电镜观察研究了镰刀菌在固定化载体中的分布形态。结果表明:固定化真菌具有较好的降解效果,固定化真菌在360 h时,对菲、芘的降解效率分别为76.96%和20.69%,而自然土壤中土著菌仅达到33.37%和15.28%。徐容等<sup>[28]</sup>研究了固定化产黄青霉废菌体对 $Pb^{2+}$ 的吸附与脱附平衡,结果表明:固定化产黄青霉废菌体对 $Pb^{2+}$ 的吸附受pH的影响较大,在pH值为2~5时,吸附量随pH值的增大而呈线性增加;在pH值>5以后,逐渐趋于最大值,固定化产黄青霉废菌体对 $Pb^{2+}$ 的最佳pH值为5.0~5.5;温度对其吸附的影响不大,表明固定化废菌体对 $Pb^{2+}$ 的吸附可能与离子交换有关; $Pb^{2+}$ 初始浓度与吸附剂量之比对吸附的影响很大,随比值的增加,吸附量增大,所以吸附液的最初浓度不宜太大。徐容等<sup>[28]</sup>还选择了硝酸、硝酸铵、硝酸钠、氯化钙、醋酸钾和乙二胺四乙酸(EDTA)对洗脱剂进行比较,结果表明:EDTA是脱附固定化产黄青霉废菌体颗粒上所吸附 $Pb^{2+}$ 的较为理想的脱附剂。在保持其脱附率为100%的条件下,用0.1 mol/L的EDTA做脱附液时, $Pb^{2+}$ 终浓度最高可达20700 mg/L,最大固液比可达到295,浓缩因子可达113,对废水中的 $Pb^{2+}$ 有很好的回收作用。

#### 5 结语

固定化微生物技术在环境工程中的应用前景是不

可估量的,但目前此类技术还存在许多问题有待于研究,相应地就形成了今后一段时间里固定化技术的研究方向:

(1) 载体是固定化技术重要的组成部分,进一步开发新型性能优良的固定化载体、提高固定化微生物的活性及浓度、改善固定化技术的处理效果及使用性能,对固定化技术的发展至关重要。

(2) 实际污染物是一个十分复杂的混合体系,用单一菌种处理一般很难达到要求,因此对于复杂的污染物体系,是采用混合菌还是单一高效菌分级处理,有待于进一步研究。

(3) 固定化技术目前应用的范围还比较小,如何把基因工程菌和固定化技术结合起来,拓宽可处理污染物的种类,从而使固定化技术可以更加广泛地运用,应是今后研究的重点。

总之,固定化技术为充分发挥高效菌种或遗传工程菌在污染物治理中的降解潜力,防止其泄露而引起生态问题提供了一个十分重要的手段。可以预见,随着固定化技术的不断研究和发展,该技术在土壤污染控制中的应用将首先在有机污染物的治理方面迈出实用化步伐。

#### 参考文献:

- [1] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制. 北京: 科学出版社, 2002: 294-295
- [2] 沈耀良, 黄勇, 赵丹, 宋吟玲, 李勇. 固定化微生物污水处理技术. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [3] 王洪祥, 刘世勇. 酶和细胞的固定化. 化学通报, 1997 (2): 22-27
- [4] 陈铭, 周晓云. 固定化细胞技术在有机废水处理中的应用与前景. 水处理技术, 1997, 23(2): 98-104
- [5] Pai SL, Hsu YL, Chong NM, Sheu CS, Chen CH. Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technology*, 1995, 51: 37-42
- [6] 武淑文, 黄兵, 孙珮石, 曹桂萍, 廖雄稳. 固定化细胞技术在环境工程中的应用. 环境科学动态, 2003 (4): 32-34
- [7] 王新, 李培军, 巩宗强, 张海荣. 固定化细胞技术的研究与进展. 农业环境保护, 2001, 20(2): 120-122
- [8] 齐水冰, 罗建中, 乔庆霞. 固定化微生物技术处理废水. 上海环境科学, 2002, 21(3): 185-188
- [9] 胡庆昊, 朱亮, 朱智清. 固定化细胞技术应用于废水处理的研究进展. 环境污染与防治, 2003, 25(1): 35-38
- [10] 曹亚莉, 田沈, 赵军, 钱城, 杨秀山. 固定化微生物细胞技术在废水处理中的应用. 微生物学通报, 2003, 30(3): 77-81
- [11] 何延青, 刘俊良, 杨平, 高永. 微生物固定化技术与载体结构

- 的研究. 环境科学, 2004, 25(增刊): 101-104
- [12] 朱柱, 李和平, 郑泽根. 固定化细胞技术中的载体材料及其在环境治理中的应用. 重庆建筑大学学报, 2000, 22(5): 95-101
- [13] 蒋宇红, 黄霞, 俞毓馨. 几种固定化细胞载体的比较. 环境科学, 1993, 14(2): 11-15
- [14] Stormo KE, Crawford RL. Preparation of encapsulated microbial-cells for environmental applications. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58: 727-730
- [15] Durham DR, Marshall LC, Miller JG, Chmurny AB. Characterization of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment processes. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 3329-3335
- [16] Durham DR, Marshall LC, Miller JG, Chmurny A B. New composite biocarriers engineered to contain adsorptive and ion-exchange properties improve immobilized-cell bioreactor process dependability. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 4178-4181
- [17] 陈敏, 罗启芳. 聚乙烯醇包埋活性炭与微生物的固定化技术及对水胺硫磷降解的研究. 环境科学, 1994, 15(3): 11-14
- [18] Lin JE, Wang HY, Hickey RF. Use of coimmobilized biological-systems to degrade toxic organic compounds. Biotechnology and Bioengineering, 1991, 38(2): 273-279
- [19] 王建龙. 固定化对微生物生理变化的影响. 中国生物工程杂志, 2003, 23(7): 62-66
- [20] 黄霞, 俞毓馨, 王蕾. 固定化细胞技术在废水处理中的应用. 环境科学, 1993, 14(1): 41-48
- [21] 刘宏斌, 刘转年, 金奇庭. 固定化微生物在废水处理中的应用. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(5): 61-65
- [22] 罗建中, 张新霞, 乔庆霞, 徐丰果. 固定化细胞技术用于废水深度处理. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(6): 70-71
- [23] 林青山, 刘超, 傅柳松. 固定化细胞技术在废水处理中的应用. 上海环境科学, 2000, 19(10): 469-472
- [24] 王建龙, 施汉昌, 钱易. 固定化微生物技术在难降解有机污染物治理中的研究进展. 环境科学研究, 1999, 12(1): 60-64
- [25] 王新, 李培军, 巩宗强, 李彬, 鞠京丽, 何秀良, 台培东. 固定化微生物降解土壤中菲和芘的研究. 应用生态学报, 2001, 12(4): 636-638
- [26] 王新, 李培军, 巩宗强, 鞠京丽; 曲向荣. 莲藕状固定化真菌(镰刀菌)对土壤中菲、芘的降解. 中国环境科学, 2002, 22(1): 44-47
- [27] 王新, 李培军, 巩宗强, 曲向荣, 王兵. 采用固定化技术处理土壤中菲、芘污染物. 环境科学, 2002, 23(3): 84-88
- [28] 徐容, 汤岳琴, 王建华, 杨红. 固定化产黄青霉废菌体吸附铅与脱附平衡. 环境科学, 1998, 19(4): 72-75

## Advances in Immobilized Microorganism and Its Application in Contaminated Soil Remediation

SI You-bin, PENG Jun

(College of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** Immobilized microorganism is a new biotechnique, which has a lot of advantages comparing with normal biological treatment. The paper introduces the methods of microorganism immobilized, immobilized carries, the characteristics of immobilized cell, its application and study status in contaminated soil remediation. The problem and development in the future are also presented.

**Key words:** Immobilized microorganism, Carrier, Soil remediation