

李勇超, 杨晓燕, 李艳苓, 等. 微藻为营养源固定化硫酸盐还原菌对含铜废水动态去除试验研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(2): 332–339.

LI Yong-chao, YANG Xiao-yan, LI Yan-ling, et al. Immobilized sulfate reducing bacteria beads using microalgae as nutrient source for effective biotreatment of copper-containing wastewater in an upflow anaerobic reactor[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(2): 332–339.

微藻为营养源固定化硫酸盐还原菌 对含铜废水动态去除试验研究

李勇超¹, 杨晓燕², 李艳苓², 耿兵^{2*}

(1.湖南科技大学土木工程学院, 湖南 湘潭 411201; 2.中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 农业清洁领域团队, 北京 100081)

摘要:从底泥中筛选了一株脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)硫酸盐还原菌(SRB), 选取易分解的普通小球藻、斜生栅藻、羊角月牙藻、螺旋鱼腥藻作为其营养源, 以聚乙烯醇和海藻酸钠为主要包埋材料制备固定化 SRB 微球, 并采用正交实验对包埋条件进行优化, 然后通过上流式厌氧反应器考察了固定化 SRB 微球对含铜废水的长期处理效果。结果表明: 微藻经过 5 d 发酵可分解为丙酸、丁酸、戊酸等脂肪酸, 其中斜生栅藻由于发酵产物最佳被选为 SRB 营养源。制备微球最优配比为聚乙烯醇用量 2%、海藻酸钠 1%、氯化钙 6%、二氧化硅 1%、菌液 50 mL, 而且二氧化硅与聚乙烯醇用量对硫酸盐去除率影响最大。上流式厌氧反应器在反应初期对污染物的去除以微球的吸附作用为主, 5 d 后 SRB 菌发挥作用, 在反应器运行 0~36 d 期间 Cu^{2+} 的去除率可达到 98% 以上, 运行 45 d 基本失效。每克微藻对 Cu^{2+} 、 SO_4^{2-} 去除能力分别为 45.28、182.17 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

关键词:硫酸盐还原菌; 固定化; 微藻; 含铜废水

中图分类号: X52 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)02-0332-08 doi:10.11654/jaes.2017-1075

Immobilized sulfate reducing bacteria beads using microalgae as nutrient source for effective biotreatment of copper-containing wastewater in an upflow anaerobic reactor

LI Yong-chao¹, YANG Xiao-yan², LI Yan-ling², GENG Bing^{2*}

(1.School of Civil Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China; 2.Agricultural Clear Watershed Group, Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Genus *Desulfovibrio* sp., belonging to the sulfate-reducing bacteria (SRB) strain, was isolated from a sludge sample. Degradable microalgae (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Selenastrum capricornutum*, and *Anabaena spiroides*) were first selected as carbon sources for SRB. Then, immobilized SRB beads were prepared using polyvinyl alcohol and sodium alginate as a conventional gel matrix, and the embedding condition was optimized through an orthogonal experiment. These beads were used for the treatment of copper-containing wastewater in an upflow anaerobic reactor. Results showed that under the action of co-existing fermentative bacteria, the microalgae were first degraded to fatty acids, which could serve as a carbon source for SRB. In particular, *Scenedesmus obliquus* was adopted as the carbon source because its fermentation products were better. The optimal parameters for preparing immobilized beads with higher sulfate reduction rate are as follows: polyvinyl alcohol 2%, sodium alginate 1%, calcium chloride 6%, silica sand 1%, and 50 mL volume of SRB suspension.

收稿日期: 2017-08-08 录用日期: 2017-10-16

作者简介: 李勇超(1985—), 女, 山东菏泽人, 副教授, 主要从事矿山废水治理研究。E-mail: nkliyongchao@163.com

* 通信作者: 耿兵 E-mail: gengbing2000@126.com

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项课题(2015ZX07103-007, 2014ZX07510-001); 国家自然科学基金项目(41471399, 41101474, 51504094)

Project supported: National Water Pollution Control and Treatment Science and Technology Major Project in China(2015ZX07103-007, 2014ZX07510-001); The National Natural Science Foundation of China(41471399, 41101474, 51504094)

During the initial stage of the reaction, pollutant removal in the upflow anaerobic reactor was mainly due to the adsorption of immobilized SRB beads. Five days later, biological sulfate reduction played a dominant role, and Cu^{2+} removal rate reached more than 98% during 0~36 days of reaction. After 45 days, the reactor ran out. In particular, the Cu^{2+} removal ability for microalgae was $45.28 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ and the SO_4^{2-} removal ability was about $182.17 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Keywords: sulfate reducing bacteria; immobilization; microalgae; copper-containing wastewater

随着铜矿的开发利用,酸性铜矿废水的产生量逐年增加。铜矿废水 pH 值较低,含有 Cu、Cd、As 等多种金属离子,且硫酸盐浓度较高,对矿区及附近的水体、土壤等造成严重的污染^[1]。传统的处理方法主要是化学中和法,通过提高水体 pH 值,沉淀重金属,然而实际操作和维持运行的费用昂贵^[2]。

利用硫酸盐还原菌(Sulfate-reducing bacteria, SRB)去除酸性矿山废水中的重金属受到环境工作者的广泛关注。SRB 是唯一能够以 SO_4^{2-} 作为最终电子受体进行无氧呼吸的微生物。SRB 利用有机物作为电子供体,通过对有机物的分解代谢、电子传递、氧化等作用而获取生存所需的能量,同时将 SO_4^{2-} 还原为 S^{2-} ,而 S^{2-} 可以与 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 等多种金属离子作用生成 CdS 和 CuS 沉淀从而将其除去^[3]。有机物不仅是 SRB 的碳源,也是其能量来源,是 SRB 生长和代谢必需的物质^[4-5]。但是酸性矿山废水中溶解性有机碳含量通常较低,不利于进行生物修复^[6]。因此,需要向废水中投加有机物作为 SRB 生长的营养源。

目前学者认为乙醇^[7]、乳酸^[8]、葡萄糖^[9]作为营养源成本较高。最近研究使用污水^[10]、牲畜粪便^[11]和蜜饯残渣^[12]等有机废物作为外加有机物,但是它们很难被 SRB 全部利用,导致出水 COD 偏高,形成二次污染。同时金属离子会对 SRB,尤其是游离的 SRB 产生一定的毒害作用^[13],影响处理效果。总之,营养源及重金属离子的毒害作用成为抑制 SRB 去除重金属的主要因素。

微藻是自养型生物,以光能作为能源,可利用无机物质合成复杂的有机质,供自身需要,它是水体的初级生产者^[14]。Oswald 等^[15]研究表明,高负荷氧化塘中的微藻经过发酵会产生硫化氢气体。而在其他水体和沉积物中微藻的分解同样导致了硫化物的释放,既微藻是硫酸盐还原过程中的营养源^[16]。此外,Boshoff 等^[17]发现,*Spirulina* spp.(螺旋藻)可以作为 SRB 的营养源,每克螺旋藻对硫酸盐的还原能力在 $150 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。另外,微藻能在光合作用的同时分泌细胞外聚合物,其主要成分是多聚糖(占胞外聚合物的 40%~95%),与微藻本身相比这些物质更容易被 SRB 所利

用^[15,18]。

基于此,本研究以微藻为 SRB 的营养源,并用特定材料将活性 SRB 与微藻包埋固定制备成小球,该微环境既有利于 SRB 对营养物质的利用,减少二次污染,又能降低重金属离子对 SRB 的毒害作用。然后在上流式厌氧反应器操作条件下进行含铜废水动态去除实验,为水体重金属污染 SRB 修复提供一定的借鉴。

1 材料与方法

1.1 硫酸盐还原菌的富集、分离与鉴定

将取自延庆某牛场底泥按 2% 的接种量分装到含有 Postgate's C 培养基^[19]的厌氧瓶中,通 36 min 氮气,加塞放置在 30 °C 的生化培养箱内黑暗培养,约 7 d 后,厌氧瓶内呈现极浓的黑色,并散发出臭鸡蛋气味,表明硫酸盐还原菌已经大量繁殖。然后重新按 2% 的接种量接入另一厌氧瓶中继续培养,如此反复操作 5 次。

利用 Hungate 滚管技术^[20]完成 SRB 菌的分离。滚管前,先将各厌氧试管中 4.5 mL $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 的固体培养基在沸水浴中融化。用移液枪吸取 0.5 mL 菌液,注入第 1 支试管内,快速混匀后,再从第 1 支试管吸取 0.5 mL 菌液注入第 2 支试管,同时将第 1 支试管水平放置在冰浴中均匀滚动 30 s。重复以上操作,将富集培养后的菌液稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 共 7 个梯度,30 °C 遮光培养,直到管内长出黑色菌落。从中挑取长势良好、浓黑色的单菌落,接种于液体培养基中,将变黑的菌液继续平板划线,挑取单菌落,作进一步的纯化。如此交替纯化直至平板菌落形态一致。

分别从 2 组平行实验中取对数生长期的新鲜 SRB 菌液,离心收集菌体,按试剂盒(北京普博欣生物)说明书提取菌株 DNA,采用通用引物进行 PCR 扩增,16S rDNA 序列的引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。委托北京三博远志生物技术有限责任公司进行 16S rDNA 测序。

1.2 微藻的培育与水解发酵

普通小球藻、斜生栅藻、羊角月牙藻、螺旋鱼腥藻从中国科学院武汉水生植物所购得,采用含有 BG-11 培养基^[21]的营养液进行培养。

取出一定量的培养 3 d 后微藻溶液,多次离心分离,洗涤。将富集后的微藻放置 500 mL 厌氧瓶中,投加一定量的土壤上清液,通氮气 20 min 后,密封放入恒温培养箱进行发酵,测定溶液 COD 值和脂肪酸的含量。

1.3 以微藻为营养源固定化 SRB 微球的制备

取 1.342 g 培养至对数期的微藻,灭活、离心后,与聚乙烯醇(PVA)投入到 100 mL 去离子水,加热至 80 ℃,然后加入海藻酸钠、二氧化硅,形成凝胶溶液。待其冷却至 30 ℃时,取一定体积的 SRB 菌液(1×10^8 cfu·mL⁻¹),弃去上清液与凝胶溶液混合均匀。将凝胶菌藻溶液用胶头滴管滴入到含有 2%~8%氯化钙的饱和硼酸溶液中,在室温下硬化 24 h 后取出,用 7%生理盐水洗 2~3 次,冷藏备用。同时制备未投加微藻的固定化 SRB 微球作为对照实验。

设计一个五因素四水平正交实验,见表 1,以硫酸盐的去除率为主要指标,以微球的成球情况、质量传递、机械强度为辅助指标,对正交实验结果进行分析,确定固定化 SRB 微球的最佳制备条件。具体方法如下,机械强度测试:将固定化 SRB 小球放入 100 mL 注射器中,加一定的压力,观察小球的破损情况,其中小球外型完整记为机械强度极好,小球破裂数小于 5 个记为机械强度好,小球破裂数大于 5 个记为机械强度差。传质性能的测定:取数粒 SRB 固定化小球投入盛有 200 mL 自来水的锥形瓶中,滴加两滴亚甲蓝,定时观察亚甲蓝进入小球的情况,5 min 内球心被染为蓝色传质性能记为极好,10 min 内浸入球心传质性能记为好,20 min 及以上传质性能记为差。硫酸根还原能力的测定:将固定化小球在 500 mL 锥形瓶底部铺匀,约 2~3 cm 厚,加满 Na₂SO₄ 溶液,密封静置,测定 SO₄²⁻去除率。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 The level and value range of different factors

序号	聚乙烯醇 A/%	海藻酸钠 B/%	氯化钙 C/%	二氧化硅 D/%	SRB 包埋 量 E/mL
1	2	0.5	2	0.5	20
2	4	1.0	4	1	30
3	6	1.5	6	2	40
4	8	2.0	8	4	50

1.4 动态实验

采用上流式厌氧生化反应器进行微藻为营养源固定化 SRB 微球处理含铜废水。上流式厌氧生化反应器为有机玻璃制成的圆柱,高 420 mm,内径 70 mm,径高比为 1:6,净空体积约为 750 mL,反应器设有直径为 5 mm 的进出水口。使用纯水配制 SO₄²⁻浓度为 1000 mg·L⁻¹、Cu²⁺浓度为 100 mg·L⁻¹ 的模拟废水作为实验进水,调节初始 pH 为 5.5,氮气除氧 30 min。首先将微藻为营养源固定化 SRB 微球填充到整个反应器中,然后使用蠕动泵自下而上泵入含铜废水,以 0.5 mL·min⁻¹ 速度均匀通过反应器,水力停留时间为 25 h,按照一定的时间间隔取样,测定出水中 SO₄²⁻、Cu²⁺浓度以及 COD 值。两组反应器同时运行,各装置使用聚四氟乙烯管连接,见图 1。此外将未投加微藻的固定化 SRB 微球投入反应器,相同条件下运行,作为对照实验。

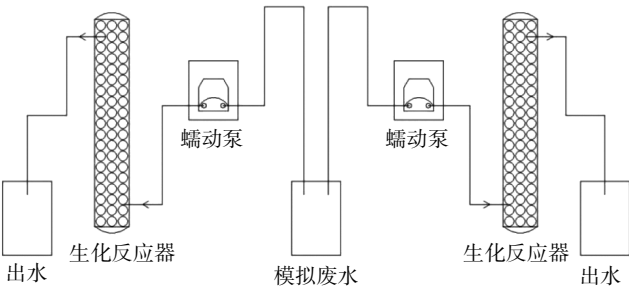


图 1 含铜废水动态去除实验装置图

Figure 1 The experimental setup diagram for wastewater treatment in the bench-scale continuous runs

1.5 测定方法

SO₄²⁻采用铬酸钡分光光度法测定,COD 采用重铬酸钾法测定^[22]。溶液 pH 值使用 pH 计(Mettler Toledo FE 20)测定,Cu²⁺使用 ICP-OES 仪(Leeman Labs Prodigy 7)测定。微藻发酵产物使用 GC-MS(Shimadzu QP 2010)测定。

2 结果与讨论

2.1 分离硫酸盐还原菌株的形态及 16S rDNA 序列分析

经过富集分离,得到一株硫酸盐还原菌,命名为 GSRB,含铁固体培养基上呈凸起黑色,菌落直径 1~3 mm,该菌株革兰氏染色呈阳性,无芽孢,菌株为弧形,做波浪式运动,大小为(0.4~0.5)μm×(2.0~2.3)μm。

菌株 GSRB 的 16S rDNA 序列分析所得到的碱基序列在 GenBank 上登录,登录号为 MF521825。利用 GenBank 数据库进行同源序列搜索,并将细菌 GSRB

的 16S rDNA 序列与最接近的种系群体的 16S rDNA 序列进行对比,通过邻接法构建了它和同源性较高的 6 个菌株的系统发育树(图 2)。据此初步断定, GSRB 为脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)的一个分支,它与 *Desulfovibrio* sp. Strain KRS1 的同源性达到 83%,但系统发育树显示两者并不在种群的同一个分支。

2.2 微藻发酵产物的测定

图 3 为微藻在发酵过程中每天溶液 COD 值的变化。可以看出,由于发酵前投加了一定的土壤上清液,第 1 d 溶液 COD 值为 1480~1620 mg·L⁻¹,第 2 d,除了普通小球藻,其他微藻溶液中的 COD 值开始增加。这表明在共存水解发酵菌的作用下发酵开始进行,随着反应的进行,虽然溶液 COD 值出现了波动,但总体来说,经过 6 d 发酵,发酵液 COD 值都有所增加。因为各微藻的成分不同,所以发酵容易程度和产物不尽相同,COD 值也各不相同。尽管本研究没有对水解发酵细菌进行分离鉴定,但是实验现象表明了微藻的水解发酵确实存在。同时 Zhang 等^[23]也指明,SRB 与发酵细菌之间的协同作用可能是影响高效利用复杂有机质作为 SRB 碳源的关键。

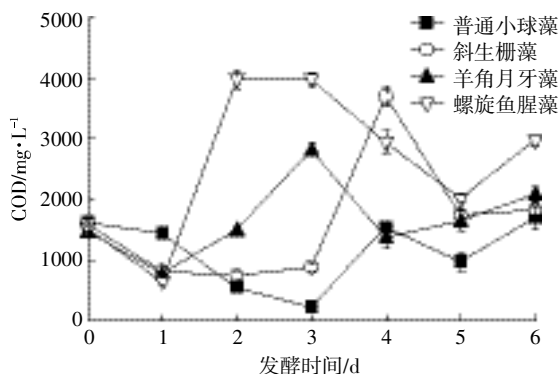


图 3 普通小球藻、斜生栅藻、羊角月牙藻、螺旋鱼腥藻发酵 6 d 后溶液 COD 值

Figure 3 COD value of solution after six days fermentation of microalgae(*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Selenastrum capricornutum*, *Anabaena spiroides*)

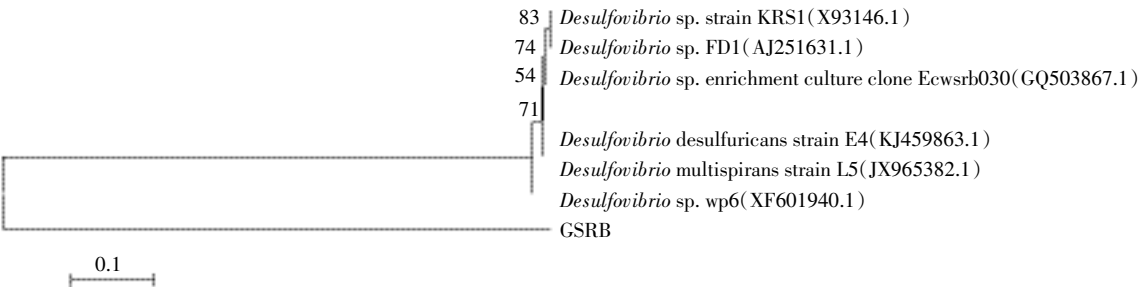


图 2 以 16S rDNA 为基础的菌株 GSRB 的系统发育树

Figure 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences

表 2 四种微藻五日发酵产物

Table 2 Fermentation product measured in the reaction solution

微藻种类	挥发性脂肪酸					碳酸	乳酸
	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	戊酸		
普通小球藻	—	—	47.7%	19.6%	—	—	—
斜生栅藻	—	—	47.7%	37%	3.4%	—	—
羊角月牙藻	—	—	—	12.6%	—	56.1%	—
螺旋鱼腥藻	—	—	52.6%	—	23.8%	—	—

表 2 为发酵 5 d 后,各微藻溶液中的发酵产物。可以看出,普通小球藻的发酵产物 67%为丙酸、丁酸等短链脂肪酸;斜生栅藻经过分解后 88%为丙酸、丁酸、戊酸等;羊角月牙藻经过发酵,大部分分解产物为丁酸和碳酸;螺旋鱼腥藻 76%以上分解产物为丙酸和戊酸。这说明各微藻在发酵菌的作用下易分解形成小分子脂肪酸。Cao 等^[24]考察了乙醇、挥发性脂肪酸、碳水化合物分别作为电子供体时,SRB 生长情况及活性,结果表明小分子脂肪酸作为电子供体时,硫酸盐还原能力最强,其中以甲酸条件下,硫酸盐去除率最大,且最为经济。虽然本研究各微藻发酵产物几乎都不含甲酸和乙酸,但是丙酸、丁酸、戊酸同为小分子挥发性脂肪酸,所以最终选用发酵产物中挥发性脂肪酸比例最高的斜生栅藻作为 SRB 的包埋营养源。

2.3 微藻为营养源固定化 SRB 微球体系优化

以硫酸盐转化率为主要指标,以机械强度、传质性能、成球难易为辅助性指标,考察微藻为营养源固定化 SRB 小球体系最佳制备条件。表 3 为正交实验结果与极差分析,其中 k1、k2、k3 和 k4 代表硫酸盐去除率的平均值,R 代表该列的极差^[25]。结果表明,实验 2 和 15 硫酸盐去除效果最好,硫酸盐去除率分别达 93.4%和 98.6%。各因素对硫酸盐去除率的影响由主到次排列为 D>A>C>E>B(即二氧化硅用量>PVA 用量>氯化钙用量>SRB 包埋量>海藻酸钠用量)。可见,二氧化硅用量、PVA 用量对硫酸盐去除能力的影响较大。通过对表 3 中的 k1、k2、k3 和 k4 值进行比较,

表 3 正交实验结果和分析
Table 3 Analysis and results of Orthogonal experimental design for immobilized beads

实验	影响因素					成球性	机械强度	质量传递	硫酸盐还原率%
	A/%	B/%	C/%	D/%	E/mL				
1	2	0.5	6	0.5	50	+	+	++	90.5
2	2	1.0	8	1	40	+++	+	+++	93.4
3	2	1.5	4	4	20	++	++	+++	81.1
4	2	2.0	2	2	30	+	++	++	88.5
5	4	0.5	4	1	30	+++	+	+	82.7
6	4	1.0	2	0.5	20	+++	++	+	84.3
7	4	1.5	6	2	40	++	+	+	88.0
8	4	2.0	8	4	50	++	+++	+++	81.8
9	6	0.5	2	4	40	+++	++	+	74.3
10	6	1.0	4	2	50	++	+++	++	78.4
11	6	1.5	8	0.5	30	+	++	+	71.5
12	6	2.0	6	1	20	+	++	++	91.8
13	8	0.5	8	2	20	+++	++	+	73.3
14	8	1.0	6	4	30	++	+++	+	85.4
15	8	1.5	2	1	50	++	+++	+	98.6
16	8	2.0	4	0.5	40	+	++	++	79.2
硫酸盐还原率	k1	88.4%	80.2%	86.4%	81.4%	82.6%			
	k2	84.2%	85.4%	80.4%	91.6%	82.0%			
	k3	79.0%	84.8%	89%	82.1%	83.7%			
	k4	84.1%	85.3%	80%	80.6%	87.3%			
	R	9.38	5.18	8.94	10.98	5.29			
主次因素		D>A>C>E>B							
最优组合		A1	B2	C3	D2	E4			

注:+++ 极好,++ 好,+,+ 差。

可知固定化 SRB 微球最优制备方案为A1B2C3D2E4,即 PVA 用量 2%、海藻酸钠 1%、CaCl₂ 6%、二氧化硅 1%、SRB 包埋量 50 mL。

各因素水平对硫酸盐去除效应曲线见图 4。首先 CaCl₂ 中的 Ca²⁺在包埋固定化过程中可与海藻酸根离子螯合形成不溶于水的海藻酸钙凝胶,从而将细胞固定,当 CaCl₂ 浓度较低时,会出现溶胀现象,不利于 SO₄²⁻的还原,当 CaCl₂ 浓度过大又会影响小球的传质性,降低 SRB 菌的活性。其次是 PVA 的用量,当 PVA

的用量由 2%到 6%逐渐增加时,SO₄²⁻还原率不断降低,这是因为微球网络结构中交联点过多,结构致密,降低了微球的传质性能,从而影响到污染物的去除^[26],当 PVA 含量达到 8%时,SO₄²⁻还原率稍微增加,可能是 PVA 增加到一定程度,小球对 SO₄²⁻的吸附作用增强。当二氧化硅含量为 1%时,小球对 SO₄²⁻还原率最高。SRB 包埋量越大,SO₄²⁻的还原效果越好,但微生物包埋量不可过大,否则其在微球内部大量繁殖,可能导致细胞泄露,对水体造成二次污染^[27]。海藻酸钠可改善使用 PVA 造成的成球困难和传质阻力大的不足,防止粘结,但它对 SO₄²⁻的还原影响最小。

2.4 微藻为营养源固定化 SRB 微球的形态结构

以斜生栅藻为营养源在最优制备条件下制备固定化 SRB 微球。图 5(a)和图 5(b)分别为新鲜制备的微藻为营养源固定化 SRB 微球和浸泡 14 d 后固定化微球的数码照片,图 5(c)为未投加微藻的 SRB 微球数码照片。可以看出,新鲜制备的微藻为营养源固定

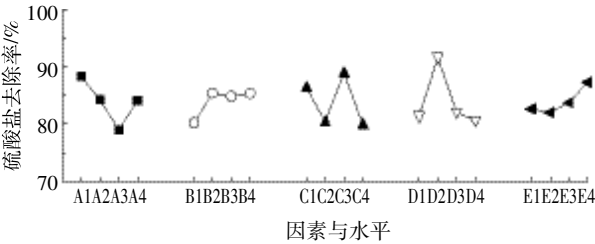


图 4 5 种因素对硫酸盐去除率的影响趋势
Figure 4 Effect of five factors on sulfate reduction rate

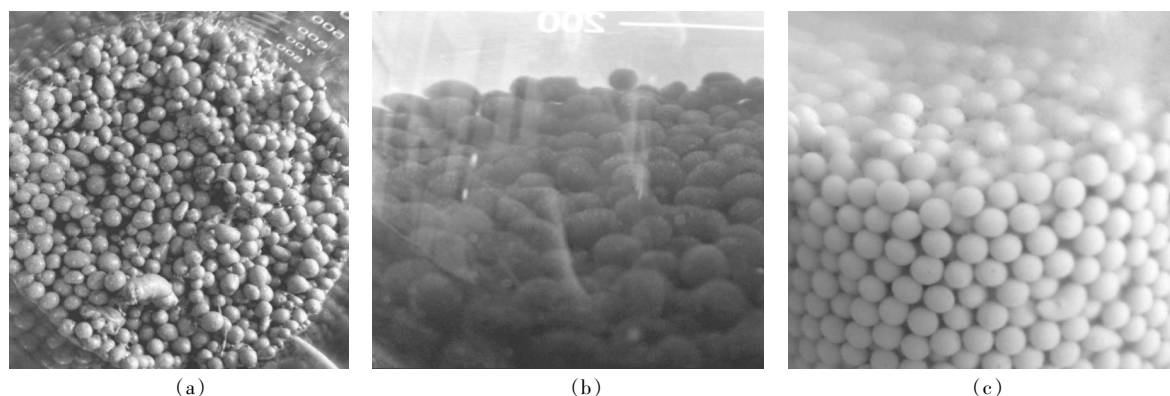


图 5 新鲜制备的微藻为营养源固定化 SRB 微球(a)、水中浸泡 14 d 后的微藻为营养源固定化 SRB 微球(b)和新鲜制备的空白 SRB 微球(c)的数码照片

Figure 5 Digital photograph of fresh prepared immobilized SRB bead with microalgae as nutrient source(a), soaked in the water for 14 day(b), and immobilized SRB beads without microalgae as nutrient source(c)

化 SRB 微球表面光滑,成球性好,无拖尾,粒径为 2~3 mm,相对均匀。在水溶液中浸泡 14 d 后,微藻为营养源固定化 SRB 微球虽然出现了溶胀现象,但是整体来说微球没有发生破裂,机械强度较好,微生物细胞不会发生泄漏。然而空白微球因不含微藻,颜色较浅,呈规则球形。

2.5 微藻为营养源固定化 SRB 微球对含铜废水的动态去除

按照正交实验最优配比制备 SRB 微球,其中斜生栅藻的用量为 1.432 g,硬化 24 h,生理盐水洗涤 3 次后,装入上流式厌氧生化反应器内,监测出水 COD 值、 SO_4^{2-} 、 Cu^{2+} 离子浓度,结果见图 6、图 7、图 8。从图 6 可以看出,第 1 d,由于海藻酸钠微粒表面吸附作用导致对照实验和微藻为营养源固定化 SRB 微球填充反应器中出水硫酸盐浓度从 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 迅速降低至

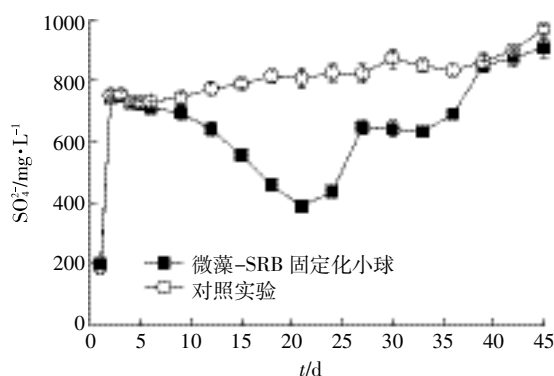


图 6 微藻为营养源固定化 SRB 微球连续化处理含铜废水 SO_4^{2-} 变化

Figure 6 Sulfate content in the effluent from anaerobic reactor filled with immobilized SRB beads with microalgae as nutrient source

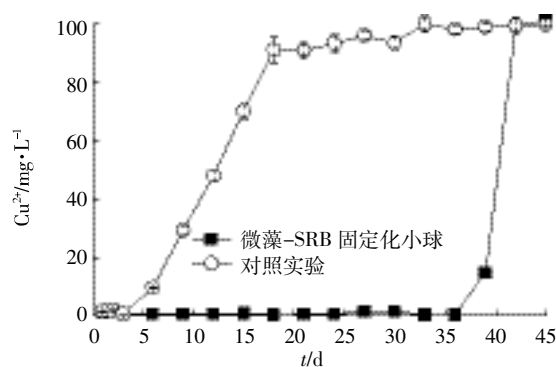


图 7 微藻为营养源固定化 SRB 微球连续化处理含铜废水 Cu^{2+} 变化

Figure 7 Copper ion content in the effluent from anaerobic reactor filled with immobilized SRB beads with microalgae as nutrient source

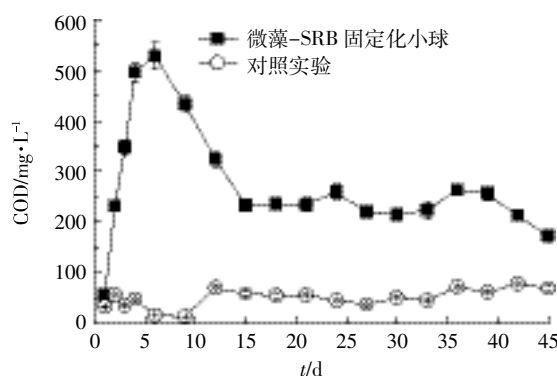


图 8 微藻为营养源固定化 SRB 微球连续化处理含铜废水出水 COD 值

Figure 8 COD value of the effluent from anaerobic reactor filled with immobilized SRB beads with microalgae as nutrient source

$200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着含铜高硫酸盐废水连续进入反应器,对照组出水 SO_4^{2-} 含量在第 2 d 迅速上升到 $751.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,随后呈现出平稳增加的趋势,第 45 d 出水 SO_4^{2-} 浓

度为 $967.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 接近进水 SO_4^{2-} 浓度。对于微藻为营养源固定化 SRB 微球来说, 经过第 1 d 吸附饱和后, 第 2 d 出水中 SO_4^{2-} 含量又重新升高, 但是第 5 d 过后开始下降, 第 21 d 最低至 $389.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 后又缓慢上升, 至第 39 d 出水 SO_4^{2-} 含量同对照组相差不多。这主要是微藻为营养源固定化 SRB 微球中 SRB 经过 5 d 适应了环境, 同时微藻易在共存发酵菌的作用下水解发酵, 产生的小分子脂肪酸可被 SRB 菌作为营养源, 将废水中 SO_4^{2-} 经过代谢转换为 S^{2-} 。经过 20 d 后大部分可降解微藻已被利用, 再加上 Cu^{2+} 不断累积造成对 SRB 菌的毒害, 致使 SRB 菌的活性逐渐降低, 还原能力下降, SO_4^{2-} 浓度开始逐渐上升, 经过 40 d 左右的时间, 上流式厌氧反应器中的固定化 SRB 微球彻底失效, 出水 SO_4^{2-} 浓度上升至对照水平。整体来说, 在此运行条件下每克微藻作为营养源对 SO_4^{2-} 的平均去除能力为 $182.17 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

从图 7 可得, 出水中 Cu^{2+} 浓度变化趋势和 SO_4^{2-} 并不同步, 相对来说微球对 Cu^{2+} 吸附作用更强, 一方面是由于海藻酸钠微粒表面具有的羧基、羟基等化学基团与重金属离子发生络合作用^[28]; 另一方面由于模拟废水中 Cu^{2+} 浓度较 SO_4^{2-} 低, 海藻酸钠微粒表面与 Cu^{2+} 螯合位点更多, 从而反应前 3 d 对照组及固定化微球体系出水中 Cu^{2+} 的含量均很低。反应 5 d 后吸附作用减弱, 再加上营养物质匮乏, SRB 活性很低, 从而导致对照组出水 Cu^{2+} 浓度迅速升高, 18 d 后 Cu^{2+} 浓度为 $91.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 33 d 后接近进水中 Cu^{2+} 含量。对于固定化 SRB 微球来说, 前 3 d 反应器并没有明显的臭鸡蛋味和黑褐色沉淀, 这说明 Cu^{2+} 的去除以微球的吸附作用为主。此后, SRB 活性被激发, 硫酸盐还原作用明显, 生成的大量 S^{2-} 可与 Cu^{2+} 形成 CuS 沉淀, 污染物去除率达到 98% 以上, 出水 Cu^{2+} 含量维持在 $0.29 \sim 1.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 达到《污水综合排放标准》(GB 8978—1996) 对总铜的排放要求。反应 36 d 后, SRB 的硫酸盐还原能力减弱, 出水 Cu^{2+} 浓度快速上升, 反应第 42 d 出水 Cu^{2+} 达到 $99.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 系统完全失效。总之, 在此运行条件下每克微藻对 Cu^{2+} 的平均去除能力为 $45.28 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

图 8 显示, 固定化微球填充厌氧反应器运行 1 d 后出水的 COD 值为 $56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 从第 2 d 开始 COD 的值开始增加, 这再次证明了共生的发酵细菌对微藻降解生成了有机物, 但是前期 SRB 仍然处于停滞期, 对营养物质的利用率小于微藻的降解速率。随着反应的进行, SRB 适应了环境, 硫酸盐还原能力大幅增强, 对有机物的需求量增加, 从而导致出水 COD 值在第 6 d

达到最大值, 随后开始降低。第 15 d 以后, 出水 COD 值为 $173 \sim 263 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 对照组 SRB 由于缺乏营养物质, 出水 COD 值一直较低。Boshoff 等^[17]通过实验室规模的上流式厌氧反应器研究表明 31% 的 *Spirulina* spp. (螺旋藻属) 干固体可以作为 SRB 的碳源, 当进水 COD: SO_4^{2-} 为 8:1 时, 最高的硫酸盐去除率达到 90.3%, 出水 COD 的值高达 $3000 \sim 5600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。虽然固定化 SRB 微球对硫酸盐的去除率不如文献^[17]高, 但是 Boshoff 等^[17]在进水中投加了一定量的无机营养物可促进 SRB 的生长, 其次, 从其出水中较高的 COD 值可以看出此研究投加了大量的 *Spirulina* spp. (螺旋藻属) 干固体。尽管斜生栅藻水解后的脂肪酸并没有被 SRB 全部利用, 但是它既保证了较高的硫酸盐还原力, 而且出水 COD 值相对较低。综上, 以微藻为营养源固定化 SRB 微球的形成, 不仅可以减少含铜废水对 SRB 的毒害作用以得到满意的处理效果, 而且可保证出水中含有较低的有机物, 减少二次污染。

3 结论

(1) 从牛场底泥中筛选分离出一株硫酸盐还原菌菌株, 经 16S rDNA 测序, 发现该菌株为脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 的一个分支。

(2) 普通小球藻、斜生栅藻、羊角月牙藻、螺旋鱼腥藻在发酵细菌作用下能够生成丙酸、丁酸、戊酸等小分子有机酸, 可为 SRB 代谢提供碳源和能源, 其中斜生栅藻发酵产物最佳, 选为包埋微藻。

(3) 以硫酸盐转化率为主要指标, 正交实验表明微藻为营养源固定化 SRB 微球的最佳制备条件为 PVA 用量 2%、海藻酸钠 1%、 CaCl_2 6%、二氧化硅 1%、SRB 包埋量 50 mL。在该条件下, 固定化 SRB 微球成球性好、粒径 ($2 \sim 3 \text{ mm}$) 相对均匀、水中浸泡 14 d 无破裂。

(4) 将新鲜制备的固定化微球填充到上流式厌氧反应器, 在进水 SO_4^{2-} 浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 Cu^{2+} 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 为 5.5、水力停留时间为 25 h 的条件下, 运行 36 d 之前出水 Cu^{2+} 含量维持在 $0.29 \sim 1.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 达到《污水综合排放标准》对总铜的要求; 而且出水 COD 值较低, 大幅降低了二次污染。

参考文献:

- [1] Cai L M, Xu Z C, Qi J Y, et al. Assessment of exposure to heavy metals and health risks among residents near Tonglushan mine in Hubei, China [J]. *Chemosphere*, 2015, 127: 127–135.
- [2] Hlabe P, Maree J, Bruinsma D, et al. Barium carbonate process for sul-

- phate and metal removal from mine water[J]. *Mine Water and the Environment*, 2007, 26(1):14–22.
- [3] McCauley C A, O'Sullivan A D, Milke M W, et al. Sulfate and metal removal in bioreactors treating acid mine drainage dominated with iron and aluminum[J]. *Water Research*, 2009, 43(4):961–970.
- [4] Zagury G J, Kulnieks V I, Neculita C M. Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate-reducing bacteria in acid mine drainage treatment[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(6):944–954.
- [5] Martins M, Faleiro M L, Barros R J, et al. Biological sulphate reduction using food industry wastes as carbon sources[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(4):559–567.
- [6] Li Y C, Hu X X, Ren B R. Treatment of antimony mine drainage: Challenges and opportunities with special emphasis on mineral adsorption and sulfate reducing bacteria[J]. *Water Science & Technology*, 2016, 73(9):2039–2051.
- [7] Pagnanelli F, Cruz Viggi C, Cibati A, et al. Biotreatment of Cr(VI) contaminated waters by sulphate reducing bacteria fed with ethanol[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 199/200(2):186–192.
- [8] Najib T, Solgi M, Farazmand A, et al. Optimization of sulfate removal by sulfate reducing bacteria using response surface methodology and heavy metal removal in a sulfidogenic UASB reactor[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017, 5(4):3256–3265.
- [9] Singh R, Kumar A, Kirrolia A, et al. Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2):677–682.
- [10] McCullough C D, Lund M A, May J M. Field-scale demonstration of the potential for sewage to remediate acidic mine waters[J]. *Mine Water & the Environment*, 2008, 27(1):31–39.
- [11] Zhang M L, Wang H X. Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage[J]. *Minerals Engineering*, 2014, 69(69):81–90.
- [12] Das B K, Roy S, Dev S, et al. Improvement of the degradation of sulfate rich wastewater using sweetmeat waste(SMW) as nutrient supplement[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 300:796–807.
- [13] Hao T W, Xiang P Y, Mackey H R, et al. A review of biological sulfate conversions in wastewater treatment[J]. *Water Research*, 2014, 65:1–21.
- [14] 刘林林, 黄旭雄, 危立坤, 等. 15株微藻对猪场养殖污水中氮磷的净化及其细胞营养分析[J]. *环境科学学报*, 2014, 34(8):1986–1994.
- LIU Lin-lin, HUANG Xu-xiong, WEI Li-kun, et al. Removal of nitrogen and phosphorus by 15 strains of microalgae and their nutritional values in piggery sewage[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(8):1986–1994.
- [15] Oswald W J, Golueke C G, Cooper R C, et al. Water reclamation, algal production and methane fermentation in waste ponds[J]. *Advances in Water Pollution Research*, 1964, 7(3):119–157.
- [16] Nedergaard R I, Risgaard-Petersen N, Finster K. The importance of sulfate reduction associated with *Ulva lactuca thalli* during decomposition: a mesocosm experiment[J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 2002, 275(1):15–29.
- [17] Boshoff G, Duncan J, Rose P D. The use of micro-algal biomass as a carbon source for biological sulfate reducing systems[J]. *Water Research*, 2004, 38(11):2659–2666.
- [18] Kalin M, Wheeler W N, Meinrath G. The removal of uranium from mining wastewater using algal microbial biomass[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2005, 78(2):151–177.
- [19] Postgate J R. The sulfate-reducing bacteria[M]. 2nd Edition. UK Cambridge: Cambridge University Press, 1984.
- [20] Hungate R E, Macy J. The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes[J]. *Bulletins from the Ecological Research Committee*, 1973, 3(17):123–126.
- [21] 沈丹丹. 富油及富淀粉微藻培养与奶牛场废水处理相结合的效果研究[D]. 广州:暨南大学, 2013.
- SHEN Dan-dan. Integrated the biomass production of oleaginous and starch-rich microalgae and dairy wastewater treatment[D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.
- [22] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 四版. 北京:中国环境科学出版社, 2002:211–212.
- State Environmental Protection Administration. Methods for monitoring and analysis of water and wastewater[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002:211–212.
- [23] Zhang M L, Wang H X, Han X M, et al. Preparation of metal-resistant immobilized sulfate reducing bacteria beads for acid mine drainage treatment[J]. *Chemosphere*, 2016, 154:215–223.
- [24] Cao J Y, Zhang G J, Mao Z S, et al. Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria[J]. *International Journal of Mineral Processing*, 2012, 106–109:58–64.
- [25] 张鸿郭, 李 猛, 罗海玲, 等. 固定化硫酸盐还原菌除铅包埋条件优化研究[J]. *环境科学与技术*, 2017, 40(2):9–12.
- ZHANG Hong-guo, LI Meng, LUO Hai-ling, et al. Optimizing embedding conditions of immobilized sulfate reducing bacteria for lead removal[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 40(2):9–12.
- [26] 郑 佩, 陈芳艳, 唐玉斌. 固定化菌藻微球的制备、表征及其对富营养化湖水的修复[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(5):1999–2005.
- ZHANG Pei, CHEN Fang-yan, TANG Yu-bin. Preparation, characterization of immobilized bacteria-algae microspheres and bioremediation of eutrophic lake water[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(5):1999–2005.
- [27] Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa L G, Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(1):58–64.
- [28] Bayramoglu G, Arica M Y. Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1):186–193.