

固定化微生物技术在海洋溢油生物修复中的应用

Microorganism immobilized technique and its application in the bioremediation of marine oil spill

王绍良¹, 郑立², 崔志松², 高伟², 李倩²

(1. 青岛科技大学 化工学院, 山东青岛 266042; 2. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生态研究中心, 山东青岛 266061)

中图分类号: X55

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)12-0127-05

海洋石油的勘探开发, 石油加工产品的生产、使用及排放, 海上溢油事故等, 使石油成为海洋环境的主要污染物之一。据估计, 全世界每年约有 1.0×10^{10} kg 的石油进入海洋环境中, 中国每年排入海洋的石油达 1.15×10^8 kg, 并且呈逐年增长的趋势^[1-2]。2010年4月和7月先后发生的墨西哥湾钻井平台漏油事故和大连新港储油码头输油管道爆炸事故给当地旅游业、水产养殖业及海洋生态环境造成了灾难性的损害。这两次事故将会像历次溢油事故一样, 对环境和人类健康产生长期负面影响, 其危害可长达十几年甚至几十年^[3]。

目前, 消除海洋石油污染的方法主要包括物理修复、化学修复和生物修复。其中, 生物修复 (bioremediation) 是指通过生物催化降解环境污染物, 减少或最终消除环境污染的受控或自发过程^[4]。该领域的研究目前多集中在石油污染土壤和城市污水的生物修复方面, 针对海洋石油污染的生物修复研究相对较少^[5-6]。

海洋不同于相对静止的土壤环境和相对封闭的废水体系, 它是一个运动、开放的系统。海水的流动性、海洋环境的多变性给受污染水体和岸滩的生物修复造成了很大的困难。例如, 海水的流动很容易造成投加的生物修复剂流失, 使区域内降解菌的浓度降低; 外源微生物往往由于对环境变化适应能力弱而在与土著微生物的竞争中处于劣势。这迫使我们寻求使外源微生物在受污染区域长期稳定存在的有效方法。

微生物固定化技术是采用化学或物理方法, 将游离细胞定位于限定的区域内, 使其保持活性并可反复利用的技术^[7]。这种技术具有微生物密度高、作

用时间长、抗不良环境能力强、微生物流失少等优点。将石油降解微生物利用固定化技术进行处理制备成固定化石油污染修复菌剂, 可以在一定程度上克服海洋石油污染生物修复方面遇到的困难, 已成为海洋石油污染应急处置中很有前景的研究方向。

目前, 固定化微生物技术已广泛应用于有机废水及重金属废水污染的治理, 同时研究还涉及大气和土壤的污染治理^[8]。近几年, 微生物固定化技术也逐渐应用到石油污染的生物修复中, 并展示出良好的治理效果。作者针对该技术及其应用实例进行了介绍, 并提出今后的研究重点, 以期为研究改进海洋溢油生物修复技术提供新的启示。

1 固定化细胞的制备方法

固定化细胞制备方法按照固定化载体与作用方式的不同, 主要可分为吸附法、包埋法、交联法和共价结合法等。

1.1 吸附法

吸附法是依靠带电的微生物细胞和载体之间的静电、表面张力和黏附力的作用, 使微生物细胞固定在载体表面和内部形成生物膜的方法, 可分为物理吸附法和离子吸附法。此法较为简便, 活力损失小,

收稿日期: 2011-02-17; 修回日期: 2011-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(41076108; 40906062); 公益性行业科研专项经费项目(200705011); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室基金项目(201008); 国家海洋局第一海洋研究所基本科研业务费专项资金项目(2010G23)

作者简介: 王绍良(1983-), 男, 山东莱西人, 硕士研究生, 主要从事海洋溢油污染的生物修复技术研究, E-mail: wshlyx@sina.com; 郑立, 通信作者, E-mail: zhengli@fio.org.cn

但细胞与载体作用力小,易脱落^[9]。

1.2 包埋法

包埋法是将微生物细胞包埋在凝胶的微小空格内或埋于半透膜聚合物的超滤膜内。可分为凝胶包埋法和半透膜包埋法两种。凝胶包埋法是将细胞包埋在各种凝胶内部的微孔中而使细胞固定的方法;而半透膜包埋法是将细胞包埋在由各种高分子聚合物制成的小球内而使细胞固定的方法。此法简单,条件温和,稳定性好,包埋细胞容量高^[10]。

1.3 交联法

交联法是利用双功能或多功能试剂,直接与细胞表面的反应基团(如氨基、羟基、巯基、咪唑基)发生反应,使其彼此交联形成网状结构的固定化细胞,其结合力是共价键。此法制备麻烦,活力损失较大,但细胞与载体结合较紧^[11]。

1.4 共价结合法

共价结合法使细胞表面上功能团和固相支持物表面的反应基团之间以化学共价键的形式连接,从而制成固定化细胞的方法。此法的优点是细胞与

载体结合紧密,不易脱落,但制备较难,且活力损失较大^[11]。

对用于海洋石油污染生物修复的微生物固定化方法的选择,需要考虑的主要因素是:

(1) 固定化方法要对微生物细胞破坏程度小,尽可能保留微生物的活性,最好能对微生物适应不利环境的能力有所提高;

(2) 固定化方法要有良好的稳定性,微生物细胞不易脱落;

(3) 固定化方法要有较小的空间位阻,有利于微生物与石油中各种组分的结合;

(4) 固定化方法要尽量降低成本,简化流程,以利于大范围应用。

以上4种方法各有优缺点:其中,共价结合法和交联法由于制备较难,活性保留低,成本高,细胞无存活力,空间位阻较大等缺点,不太适合于海洋石油降解菌的固定化。而吸附法和包埋法由于具有制备较易,成本低,活性保留高,细胞有存活力等特点,其应用潜力较大。然而,吸附法需克服与微生物结合力低,细胞易脱落的缺点;而包埋法则需要解决空间位阻较大的问题。

表1 4种固定化方法的比较^[12]

指标	吸附法	包埋法	交联法	共价结合法
制备的难易	易	适中	适中	难
结合力	弱	适中	强	强
活性保留	高	适中	低	低
固定化成本	低	低	适中	高
存活力	有	有	无	无
稳定性	低	高	高	高
空间位阻	小	大	较大	较大

2 固定化细胞常用载体

固定化细胞常用载体主要包括有机高分子载体、无机载体和复合载体,其中有机高分子载体又分为天然有机高分子载体和合成高分子载体。

2.1 有机高分子载体

2.1.1 天然有机高分子载体

天然高分子载体包括海藻酸盐、明胶、卡拉胶、海绵、琼脂等,一般对生物无毒性,传质性能好,但强度较低^[13]。

其中海藻酸盐具有化学稳定性好、无毒、包埋

效率高且价格低廉等优点,是一种广泛应用的固定化介质^[11]。但是海藻酸钙包埋细胞时,凝胶颗粒的稳定性和机械强度较差,需要对其固定化工艺进行改进(如组合固定化技术)后才能最终应用于海洋溢油环境修复。

2.1.2 合成有机高分子载体

合成有机高分子载体材料一般强度较大,但传质性能差,在进行固定化时,由于聚合物网络的形成条件比较剧烈,对微生物细胞的损害较大^[14]。常见的载体有聚乙烯醇、聚丙烯酰胺等。聚丙烯酰胺凝胶在包埋细胞时,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^[15]。

聚乙烯醇凝胶具有机械强度高、化学稳定性好、抗微生物分解、对细胞毒性小、廉价易得等一系列优点,因而具有较大的利用价值^[11]。

2.2 无机载体

无机载体如硅藻土、高岭土、多孔陶珠、多孔玻璃、氧化铝、活性炭等,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,因而也是一类重要的载体材料^[15]。

2.3 复合载体

由有机载体和无机载体相结合,以实现性能互补^[16]。

对用于海洋石油污染修复的微生物固定化载体的选择,主要应该考虑的是:

(1)固定化载体机械强度高,能在一定时间内抵御波浪的冲刷,沙石的碰撞摩擦等破坏作用;

(2)固定化载体要无毒无害,本身对环境不造成污染,最好是经过较长时期之后能够自然分解;

(3)固定化载体还要廉价易得,以利于降低成本。

以上几种固定化载体中,比较有应用潜力的是用作包埋法载体的海藻酸盐、卡拉胶、聚乙烯醇等和用作吸附法载体的硅藻土等。

另外,随着研究的深入,国内外的学者还开发出了一些新型固定化方法用于生物催化剂(包括酶和微生物)的固定化,如溶胶-凝胶固定化法、膜固定化法、超微载体固定化法、无载体固定化法、亲和配基固定化法、絮凝吸附固定化法、组合固定化技术等。其中,组合固定化技术可以克服单一固定化技术本身所固有的缺点,扬长避短,代表了固定化技术的最新方向^[17]。但同时也要看到,组合固定化技术工艺流程较长,技术要求较高,又对其广泛应用会造成一定影响。在实际应用中,需要根据不同应用环境要求,综合考虑所用微生物的特点设计方案。

3 固定化技术在石油污染生物修复方面的应用研究

在石油污染微生物修复方面,国内外专家已经取得了很多成果,在实际应用中也取得了一定的功效。但将微生物与固定化技术相结合,制备固定化微生物修复剂并用于海洋溢油污染修复的研究并不多见。在土壤、废水等的石油烃(包括多环芳烃)污染生物修复方面,已经有一些专家开展了将降解菌制备

成固定化制剂的研究,取得的成果和经验值得借鉴。鉴于微生物环境修复科学内涵的一致性,其中对土壤石油污染的修复技术可以研究应用于岸滩石油污染的生物修复,而对废水石油污染的修复技术可以研究应用于海洋水体石油污染的修复。

张秀霞等^[18]采用 PVA—H₃BO₃ 法固定化芽孢杆菌属石油降解菌 Y-13,并制备成微球制剂。产品具有良好的机械强度、弹性和渗透性、较高的比表面积和孔容,致密的孔隙结构。实验证明球形固定化细菌制剂的降解率比游离细菌、片状的固定化细菌制剂都要高;固定化细菌对 pH 值的适应性也比游离菌更强^[18]。该方法选择包埋法,使用对环境无毒的聚乙烯醇为载体材料,采用改良的工艺对石油降解菌进行固定化,并综合考虑了固定化制剂的机械强度和制备成本。通过加入活性炭来增加载体孔径,提高通透性,减小了传质阻力,利用了活性炭本身的吸附作用,提高了降解效率。

张秀霞等^[19]将高效石油降解菌株通过表面吸附固定化方法固定在生物大分子仿生合成得到的纳米多孔氧化硅载体上,构建出固定化微生物制剂,并进行了土壤污染的模拟实验。发现固定化微生物对石油污染物的降解率明显提高。重复降解实验证明,该方法构建的固定化微生物对石油污染物的降解率保持稳定^[19]。该实验采用的是吸附法固定化技术,载体与微生物的结合并不牢固,容易脱落,但其载体材料无毒无害,微生物活力损失小,有应用于海洋环境的潜力。

邵娟等^[20]用秸秆做载体固定嗜碱芽孢杆菌降解原油,其原油去除率高于单纯投加菌液或者菌液与秸秆混合物的原油去除率。实验中还发现加入无机盐离子能够促进嗜碱芽孢杆菌更好地固定于秸秆而生长,从而提高了其原油去除率。该方法采用了廉价易得的农作物秸秆作为载体,成本低廉,无毒无污染,微生物活力损失小,而且秸秆具有密度小,可以漂浮的特点,用于海面浮油的微生物降解将具有十分明显的优势;同时秸秆可以有效吸附油污,对微生物与石油污染物的有效接触有很大帮助。

王坤等^[21]利用海藻酸钠包埋法固定化酚类有机物降解优势菌,并用于处理焦化废水,得到了很好的有机物降解效果,在特定实验条件下,原水样中的 COD 降解率达到 62%。该方法制得的固定化颗粒机械强度完全能够满足污水处理工艺长时间运行的需要^[21],并且采用了多菌株共固定化的方法,制得

了复合微生物固定化菌剂,可以有效利用不同优势菌之间的协同降解效应^[22],提高降解有机污染物的范围和效率。

朱文芳等^[23]将高效除油工程菌固定于颗粒活性炭上,组装成固定化微生物反应柱,研究发现该反应柱对含油废水的降解效果比游离细胞有明显提高,并发现微生物经过固定化后,对 pH 变化的耐受力显著增强。该方法在处理含油废水时同时利用了活性炭的吸附作用和微生物的降解作用,提高了整体的降解效率,但因需要特殊的废水处理设备,在应用于海水石油污染的修复时会有一定的局限性。

许振文等^[24]利用海藻酸钠包埋法固定化铜绿假单胞菌 ZW8 制成固定化微生物菌剂,在实验室条件下进行多环芳烃的降解实验。实验结果表明,与未固定化的菌株相比,固定化菌株对萘有更好的降解效果。同时实验还采用在制备固定化菌剂过程中加入硅藻土作为吸附剂的方法,提高了固定化细胞降解性能。许振文等^[24]认为加入硅藻土细粉,可以降低固定化细胞的疏漏,增加细胞在载体中的分散性,还可使固定化颗粒表面吸附更多的底物,利于菌种分解底物,从而提高萘降解率。这一现象也有可能是因为硅藻土的存在增大了载体的孔径,提高了通透性,减小了传质阻力。

王新^[25]等采用聚乙烯醇、海藻酸钠和活性炭分别对 3 种降解菌进行单独固定和混合固定,并用于降解有机污染土壤中的多环芳烃萘及苯并[α]芘,结果显示,固定化微生物对污染物的降解效果明显好于游离菌,同时混合固定菌的降解效率普遍高于单菌固定的降解效率。该方法采用了混合菌群进行固定化,利用了微生物之间的协同效应^[22],得到了很好的效果。

王新^[26]等同样采用聚乙烯醇、海藻酸钠和活性炭对真菌进行了固定化,并采用莲藕型载体成功解决了真菌菌丝体较大,需要一定的生存空间和相对大的好氧空间,而球形和片形的载体无法满足的问题。

Quek 等^[27]利用聚氨酯泡沫塑料(PUF)吸附法固定化 *Rhodococcus* sp. F92 制成微生物固定化菌剂,并进行了原油和成品油的降解实验,结果表明固定化微生物和游离微生物对烷烃的降解效果都能接近 90%,表明该固定化方法对降解菌的降解能力并未造成影响,同时作者认为聚氨酯泡沫对溢油具有吸附作用,可以阻止浮油向海滩和海岸线的迁移。

Oh 等^[28]利用能吸附石油的聚氨酯塑料作为载

体固定化石油降解酵母细胞,并制成可漂浮的泡沫材料,用来清除溢油污染后的海面油膜。该方法同时利用了聚氨酯的吸附作用和微生物的降解作用。Oh 等测定了不同固定化技术条件下微生物降解石油的能力,包括聚氨酯直接固定化、几丁质包埋-聚氨酯固定化、缓释肥包埋-聚氨酯固定化技术。结果表明,各种技术条件下固定化微生物都有着与游离细胞一样好的石油降解能力,并发现几丁质-聚氨酯固定化方法的降解能力可以在较长时间内保持较高水平。该技术结合了几丁质、缓释肥、聚氨酯等多种材料,在延长微生物作用时间、提高效率和稳定性等方面取得了较好的效果,在海面溢油生物修复方面有较强的应用潜力。

Gentili 等^[29]利用虾的废料中的几丁质和脱乙酰壳多糖薄片分别作为烃类降解菌的固定化载体,制备固定化制剂。实验结果表明,几丁质和脱乙酰壳多糖可以提高固定化细菌的存活力和降解活性,用几丁质构建的菌剂在储存和生物降解方面都有着很好的表现。该方法所用材料廉价易得,无污染,但吸附法结合力较弱,其应用效果可能会受影响。

Rahman 等^[30]利用海藻酸钙包埋法固定化石油降解菌群,实验结果表明,固定化过程并未显著影响微生物的生物降解能力,并且在 150 天的重复使用实验中固定化生物降解菌群的降解能力也未显著衰退。该实验采用多种石油降解菌,并对固定化菌剂进行了重复使用实验,证明了该方法的有效性和稳定性。

Díaz 等^[31]利用聚丙烯纤维作为载体吸附固定化石油降解微生物菌群 MPD-M。结果表明,固定化显著提高了微生物菌群对石油的降解率,并且与游离微生物菌群相比,固定化微生物菌群在不同盐度环境中表现得更加稳定。在 180 g/L 的高盐环境下,固定化微生物菌群的降解效果比游离微生物菌群高 4~7 倍。亲油性载体的使用也提高了微生物对石油的利用效率。该技术使石油降解菌群可以在极宽的盐度范围内使用,大大扩展了石油降解菌群的使用范围和环境适应能力。

4 小结和展望

固定化微生物技术将高效石油降解微生物定位于限定的区域内,有效克服游离的微生物在海洋溢油污染生物修复过程中容易流失等问题,提高微生

物适应海洋复杂环境的能力, 进而提高溢油修复效果, 其应用前景广阔。

今后的研究方向主要集中在 3 个方面:

(1) 寻找合适的固定化载体

应用于海洋溢油污染的固定化载体首先应是环境友好型载体, 其本身对环境无污染; 同时还要具有一定的机械强度; 与微生物结合紧密; 传质阻力小并且廉价易得。

(2) 开发新的固定化技术

微生物固定化技术要尽可能保持微生物的活性, 对微生物细胞破坏程度较小; 还要降低成本, 简化工艺流程, 以利于大范围应用; 另外要向复合菌群和组合载体固定化方面开展研究, 充分利用多种微生物之间的协同降解效应和多种载体的优点。

(3) 海洋溢油微生物固定化的应用技术研究

积极开展中试实验和污染现场实验, 根据不同海洋环境开发具有针对性的固定化微生物菌剂。例如针对海面溢油的修复开发可以漂浮的固定化菌剂技术, 针对海洋环境中营养盐缺乏的情况开发固定化菌体-缓释营养盐复合制剂等, 最终开发出一整套系统化针对溢油污染的高效生物修复工艺体系, 为溢油污染的治理修复提供有效的技术保障。

参考文献:

[1] 曲维政, 邓声贵. 灾难性的海洋石油污染[J]. 自然灾害学报, 2001(1): 69-74.
 [2] 陈建秋. 中国近海石油污染现状、影响和防治[J]. 节能与环保. 2002(3): 15-17.
 [3] 高峰. 墨西哥湾石油污染, 谁是最大受害者[J]. 中国石化, 2010(9): 30-32.
 [4] Madsen E L. Determining in situ biodegradation: Facts and Challenges[J]. Environmental Science and Technology(United States), 1991, 25(10): 1663-1672.
 [5] Camphuysen C J, Heubeck M. Marine oil pollution and beached bird surveys: the development of a sensitive monitoring instrument[J]. Environmental Pollution, 2001, 112(3): 443-461.
 [6] 赵荫薇, 王世明, 张建法. 微生物处理地下水石油污染的应用研究[J]. 应用生态学报. 1998, 9(2): 209-212.
 [7] 朱启忠. 生物固定化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 273.
 [8] 王新, 李培军, 宋守志, 等. 固定化微生物技术在环境工程中的应用研究进展[J]. 环境污染与防治, 2005, 27(7): 535-537.
 [9] 王洁, 孙珮石, 孙学习. 固定化微生物技术及其应用研究的进展[J]. 广州环境科学, 2004(1): 1-4.
 [10] 肖美燕, 徐尔尼, 陈志文. 包埋法固定化细胞技术的研究进展[J]. 食品科学, 2003(4): 158-161.
 [11] 渠文霞, 岳宣峰. 细胞固定化技术及其研究进展[J]. 陕

西农业科学, 2007(6): 121-123.
 [12] 何延青, 刘俊良, 杨平, 等. 微生物固定化技术与载体结构的研究[J]. 环境科学, 2004(S1): 101-104.
 [13] 陈娜丽, 冯辉霞, 王冰, 等. 固定化细胞载体材料的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009(10): 13-17.
 [14] 白燕, 王士斌, 刘源岗. 细胞固定化载体材料的研究进展及应用[J]. 广东化工, 2010(4): 11-12.
 [15] 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[J]. 重庆建筑大学学报, 2000(5): 95-101.
 [16] 郭剑光. 固定化微生物技术及其在水产养殖中的应用[J]. 北京水产, 2005(5): 36-38.
 [17] 沈宏宇, 胡永红, 沈树宝, 等. 生物催化剂固定化技术的研究进展[J]. 化工进展, 2003(1): 18-21.
 [18] 张秀霞, 秦丽姣, 吴伟林, 等. 固定化原油降解菌的制备及其性能研究[J]. 环境工程学报, 2010(3): 659-664.
 [19] 张秀霞, 耿春香, 房苗苗, 等. 固定化微生物应用于生物修复石油污染土壤[J]. 石油学报(石油加工), 2008(4): 409-414.
 [20] 邵娟, 尹华, 彭辉, 等. 秸秆固定化石油降解菌降解原油的初步研究[J]. 环境污染与防治, 2006(8): 565-568.
 [21] 王坤, 刘永军. 活细胞固定化技术在焦化废水生物处理中的应用试验[J]. 环境科技, 2009(4): 25-27.
 [22] 崔志松, 郑立, 杨佰娟, 等. 两种海洋专性解烃菌降解石油的协同效应[J]. 微生物学报, 2010(3): 350-359.
 [23] 朱文芳, 李伟光. 微生物固定化技术处理含油废水的研究[J]. 工业水处理, 2007(10): 44-47.
 [24] 许振文, 张甲耀, 陈兰洲, 等. 固定化外源降解菌强化生物降解作用研究[J]. 环境科学与技术, 2007(3): 19-21.
 [25] 王新, 李培军, 宋守志, 等. 固定化微生物对土壤中多环芳烃的降解[J]. 东北大学学报, 2006(10): 1154-1156.
 [26] 王新, 李培军, 巩宗强, 等. 固定化微生物降解土壤中菲和芘的研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(4): 636-638.
 [27] Quek E, Ting Y, Tan H M. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(1): 32-38.
 [28] Oh Y S, Maeng J, Kim S J. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface[M]. Berlin / Heidelberg: Springer, 2000: 54: 418-423.
 [29] Gentili A R, Cubitto M A, Ferrero M, et al. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006, 57(4): 222-228.
 [30] Rahman R N Z A, Ghazali F M, Salleh A B, et al. Biodegradation of hydrocarbon contamination by immobilized bacterial cells[J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(3): 354-359.
 [31] Díaz M P, Boyd K G, Grigson S J W, et al. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002: 79: 145-153.

(本文编辑: 张培新)