

改进的 PVA-硫酸盐法固定蛋白核小球藻除磷研究

薛 嵘,黄国兰*,毛宇翔 (南开大学环境科学与工程学院,天津 300071)

摘要: 首次报道采用改进后的 PVA-硫酸盐固定化方法,包埋固定蛋白核小球藻.该方法克服了现有的几种 PVA 固定化包埋过程的缺点.其操作过程简单,形成的凝胶小球不黏连,透光性好,对生物毒性小,机械强度高.经固定的蛋白核小球藻在光照条件下对磷的去除率达 95%,3 个周期后,磷去除率仍可达到 75%以上,凝胶小球强度没有明显降低.实验证明,光照是影响固定化蛋白核小球藻除磷的主要因素,光暗比 12:12 与 24h 全光照的两组对磷的最高去除率没有明显差别,但光暗比 12:12 的一组去除率有波动.透射电镜观察结果表明,PVA 与细胞壁紧密粘附,蛋白核小球藻生长没有停止.

关键词: 聚乙烯醇; 固定化; 蛋白核小球藻

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1000-6923(2002)04-0351-04

Studies on phosphorus removal by *Chlorella pyrenoidosa* with modified PVA-sulfate immobilization method. XUE Rong, HUANG Guo-lan, MAO Yu-xiang (College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China). *China Environmental Science*. 2002,22(4): 351~354

Abstract: In this study it is reported for the first time that the method of modified PVA-sulfate immobilization has been adopted with entrapping of immobilized *Chlorella pyrenoidosa*. The operation of this method is simple, and the gel beads formed are not adhesive, with less biological toxicity, higher mechanical strength and good transparency. Some disadvantages of the existing PVA immobilization entrapping are avoided. Phosphorus removal rate can reach 95% with immobilized *Chlorella pyrenoidosa* under illumination. After 3 circles, the removal rate is still more than 75% and the strength of the gel beads does not decrease evidently. The two illumination periods, light:dark=24:0 and 12:12, show no significant difference in the maximum phosphorus removal rate. However, there is a fluctuation of the removal rate in 12 hours' light period. Transmission electron microscope (TEM) observation result demonstrates that PVA adheres closely to the cell wall, and the growth of *Chlorella pyrenoidosa* continues.

Key words: PVA; immobilization; *Chlorella pyrenoidosa*

将微藻固定于载体材料上处理废水,不仅有效地防止藻细胞流失,而且可增强细胞对水质变化的耐受性,保证微藻在废水处理过程中维持足够的生物量.目前固定化微藻处理废水的载体材料多见卡拉胶^[1,2]与海藻酸钙^[3,4]的报道,而这两种材料可生物降解,如果长期浸在其中,会出现凝胶小球解体^[3],细胞流失,导致处理失败.因而这两种载体材料无法长期浸在废水中.

PVA 作为固定化材料具有强度高,不易生物降解,对生物无毒^[5]等优点,被认为是很有应用前景的固定化材料.但还未见有利用其包埋微藻处理废水的报道.PVA 的固定化方法主要有硼酸法,冷冻法,硫酸盐法等.其中硼酸法交联固定需要在 pH=4 的酸性条件下进行,对生物毒性大,细胞活

性会受较大影响,此外形成的凝胶球容易发生黏连,不透明,不利于藻类进行光合作用;冷冻法操作过程比较复杂,需冷冻、解冻多次,最后再切块成形;硫酸盐法^[6]操作简便,固定过程温和,但经实验发现凝胶球黏连现象严重,无法得到形状均一的凝胶小球,不便于应用.

经研究,改进了 PVA-硫酸盐固定化方法,在 PVA 中添加少量海藻酸钠,分两步固定,克服了原有方法中凝胶小球易发生黏连的缺点,成功地固定了蛋白核小球藻,并用其去除模拟废水中的磷,达到了很好的效果.

收稿日期: 2001-11-19

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(013608011)

* 通讯联系人

1 材料与方法

1.1 材料

藻种为蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*),购自中国科学院水生生物研究所藻种库;聚乙烯醇(PVA),天津市天大化工实验厂,聚合度 1750 ± 50 ; CaCl_2 , Na_2SO_4 , 均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 固定化方法 改进的 PVA-硫酸盐法,将 PVA、海藻酸钠在 100°C 恒温水浴中溶解后冷却至室温,与离心分离的藻细胞混合搅拌形成溶有 10%~12%PVA 及 0.2%~0.5%海藻酸钠的含藻水凝胶,用注射器滴入 2% CaCl_2 溶液,室温下搅拌 2h,分离出凝胶球,蒸馏水冲洗 2 次,加入 10% Na_2SO_4 溶液,室温下搅拌 7h 后在蒸馏水中脱盐 2h,最终得到藻细胞/PVA=1:9(V/V),直径 4~5mm 的凝胶小球。

1.2.2 实验方法 藻种培养采用 Bold 培养基^[7],在 25°C 恒温箱中培养,光照强度 4000lux.将经培养后的藻液置于离心管,4000r/min 离心 10min,弃去上清液,用蒸馏水冲洗 2 次,以洗去留在细胞表面的残留无机盐.因城市污水中磷的浓度上限

约为 30mg/L,所以模拟废水采用将磷浓度调整为 30mg/L 的 Bold 培养基.取 9 个 250mL 三角瓶,每个瓶中加入经过灭菌的 100mL Bold 培养基,并加入 500 个固定化凝胶小球(培养液与凝胶小球体积比约为 10:3).每 3 瓶为 1 组,分为 3 组,每组采用不同光照时间,即全光照(24h 光照)、半光照(光暗时间比为 12:12)、无光照.在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养,每 12h 取样分析,测定水样中磷的含量,以每组 3 个水样的平均值作为该组磷的浓度.实验共进行了 3 个周期,每个周期 72h.每个周期末将剩余废水倒出,并再次加入 100mL 模拟废水。

2 结果

图 1 为不同光照时间,固定化蛋白核小球藻对磷的去除效果,从图 1 可看出,第 1 周期:全光照与半光照的两组固定化藻对磷的去除效果无明显差别,对磷的最高去除率达到 92%~93%;对磷的去除率在开始的 12h 内直线上升,24h 达到最高去除率,以后去除速度减慢,趋于平稳.而无光照的一组明显与其他两组不同,该组对磷的去除率最高为 66.5%,而且去除速度也明显小于其他两组,前 48h 持续上升,之后逐渐平稳。

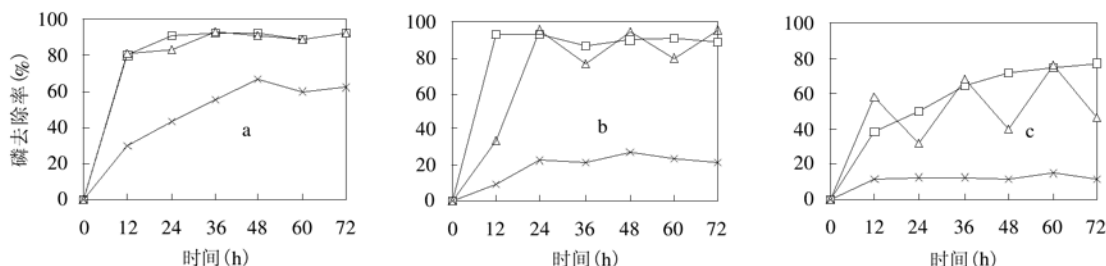


图 1 不同光照时间,固定化蛋白核小球藻对磷的去除率

Fig.1 Removal rate of phosphorus by immobilized *Chlorella pyrenoidosa* at different illumination period

—□— 全光照 —△— 半光照 —×— 无光照

a.第1周期 b.第2周期 c.第3周期

第 2 周期:从这一周期开始,无光照的一组除磷效果明显下降,48h 之后达到最高去除率仅为 26.5%,而且与另外两组相比,去除速度缓慢;全光

照的一组,对磷的去除效果与前一周期基本一样,最高去除率为 95%,其去除曲线形状与前一周期类似;半光照的一组在这一周期与前一周期有明

显的不同,对磷的去除有一个规律的波动,其中去除率升高的时候正处于光照时段,去除率下降的时候处于无光照时段,但其最高去除率与全光照一组相当,达到 95.8%.

第 3 周期:无光照的一组凝胶小球中几乎看不到绿色,同时对磷的去除率低于 15%,说明其中的生物细胞活性已经很低;全光照的一组对磷的去除率在整个周期内缓慢上升,最终达到 76.7%,与前两个周期相比去除速度变慢,最高去除率也明显下降;半光照的一组对磷的去除依然存在波动,其规律同第二周期,去除率最高达 75.6%,与全光照一组无明显差别.

3 讨论

对比 3 组实验在 3 个周期的去除效果(图 1),光照是固定化蛋白核小球藻除磷的主要影响因素.无光照一组在第 1 周期相对较高的去除率是因为在藻细胞收集过程中,营养缺乏,导致了在第 1 周期细胞对磷的强烈吸收.虽然没有光照,但其细胞仍然存在一定的活性,所以在前 48h,对磷的去除依然可以达到 66.5%;之后由于没有光照,光合作用停止,其活性不断下降,细胞除磷的效果随之迅速下降.同理,半光照的一组在第 1 周期没有出现后 2 个周期存在的波动,也是由于藻细胞对磷的强烈吸收,此时光照还不是影响细胞生长的限制因素,但从第 2 周期开始,光照影响逐渐显现,出现了规律性的波动,这时光照成为限制其生理活性的主要因素;由于每一周期开始都重新加入营养,所以营养不是限制因素,因而在第 3 周期,光照的影响更加明显,对磷的去除波动幅度进一步加大.全光照的一组由于有充足的光照,在前两个周期磷的去除曲线没有明显差别,但第 3 周期,去除速度变慢,主要是细胞吸收磷开始出现饱和,减缓了去除速度,因而需再延长处理时间提高除磷效果.

透射电镜照片显示,PVA 与藻细胞壁发生粘附,细胞周围存在大量 PVA,因而可以有效地控制细胞的流失,保证有足够的生物量.同时可以观察

到小球藻在 PVA 载体上有细胞分裂,说明其生长没有停止.这与实验过程中观察到的凝胶小球颜色逐渐加深的结果相一致.

经过 3 个周期的实验,凝胶小球没有出现破碎,也未发生粘连.证明在磷浓度较高的环境中,PVA 凝胶小球不易发生溶解与破碎.在大约 150r/min 的强度搅拌实验中,90 粒凝胶小球经 3h 后没有发现破碎现象.可以断定,这一改进后的固定化方法所形成的 PVA 凝胶小球强度很高,完全能应用于实际.

4 结论

4.1 采用改进的 PVA-硫酸盐固定法固定蛋白核小球藻,操作简便,对藻的毒害作用小,细胞活性恢复快,形成的半透明凝胶小球透光性好,强度高,不易破碎,不发生黏连,对磷去除率最高达 95%,经过 3 个周期,对磷的最高去除率依然达到 75%以上,而且凝胶小球没有发生破碎.电镜观察结果表明,PVA 紧密粘贴在小球藻的细胞表面,有效防止了细胞流失,而且没有阻止细胞生长.证明改进的 PVA-硫酸盐固定法可以用于包埋微藻,处理废水.

4.2 光照是影响固定化藻除磷效果的主要因素,光照时藻对磷的去除率高.固定化藻对磷的最高去除率,在全光照与半光照两种不同实验条件下没有明显差别.说明在保证 12h 光照的条件下,经固定化的蛋白核小球藻就可以达到良好的除磷效果.这对于实际工程应用是很有前途的.

参考文献:

- [1] Lau P S, Tam N F Y, Wong Y S. Operational optimization of batchwise nutrient removal from wastewater by carrageenan immobilized *Chlorella vulgaris* [J]. Water Science and Technology, 1998, 38(1):185-192.
- [2] Lau P S, Tam N F Y, Wong Y S. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris* [J]. Bioresource Technology, 1998, 63:115-121.
- [3] Robinson P K, Goulding K H, Mak A L, et al. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella* [J]. Enzyme Microb. Technol., 1986, 8:729-733.

- [4] Tam N F Y, Lau P S, Wong Y S. Wasterwater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris* [J]. Water Science and Technology, 1994, 30(6):369-374.
- [5] Emily J T M Leenen, Vitor A P Dos santos, Kajia C F Grolle, *et al.* Characteristics of and selection criteria for support material for cell immobilization in wastewater treatment [J]. Water Research. 1996, 30(12):2985-2996.
- [6] 贾师英,许建和,俞俊棠.固定化根霉细胞催化拆分(R,S)-环氧丙醇丁酸酯的研究 [J]. 分子催化,1999,13(50):339-344.
- [7] Janet R Stein. Handbook of phycological methods: Culture methods & growth measurements [M]. The United States of America: Cambridge University Press, 1973.
- [8] 鲁光四,周怀东,李怡庭.水质分析方法 [M]. 北京:学术书刊出版社,1989.
- 作者简介:** 薛 嵘(1974-),男,山西太原人,南开大学环境科学与工程在读博士生,主要从事污水处理方面的研究.发表论文 1 篇.