

# PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 法包埋固定氧化亚铁硫杆菌研究

王玉建<sup>1,2</sup>, 李红玉<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

(<sup>2</sup>兰州交通大学化学与生物工程学院 兰州 730070)

**摘 要** :首次报道了把聚乙烯醇(PVA)、海藻酸钠混合水溶液和氧化亚铁硫杆菌混合后滴入 1%~5%(W/V)的 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶液中凝固成型,并把成型后的颗粒置 -20℃ 条件下冷冻 1d,从而形成固定化颗粒,将该颗粒在摇瓶中进行分批培养,对 Fe<sup>2+</sup> 最大氧化速率可达 2.45g/(L·h),而且整个固定化操作简单,颗粒不粘连、强度高、稳定性好,可以同时消除 PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 法中 PVA 颗粒的粘连膨胀和 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 对微生物的毒性,具有很好的应用价值。

**关键词** :固定化;氧化亚铁硫杆菌;聚乙烯醇(PVA);Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

中图分类号:Q814.2 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)03-0456-04

固定化氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*,简称 *A.f*)作为一种化能自养细菌,在酸性矿坑废水<sup>[1]</sup>和 H<sub>2</sub>S<sup>[2]</sup>等废气的治理中具有广泛的应用。国内外学者采用了大量不同的方法开展了对氧化亚铁硫杆菌固定化的研究。如用离子交换树脂和活性炭<sup>[3]</sup>、聚亚安酯泡沫<sup>[4]</sup>、多孔的合金纤维<sup>[5]</sup>、沙粒<sup>[6]</sup>等载体吸附固定氧化亚铁硫杆菌,其中,Fe<sup>2+</sup> 最高氧化速率为 3.3g/(L·h)<sup>[3]</sup>,然而由于细菌和载体结合的不够牢固,长期运行会导致不同程度的菌体流失,稳定性下降。Lancy 等<sup>[7]</sup>用海藻酸钠、Lancy 等<sup>[8]</sup>用琼脂和卡拉胶等载体包埋固定氧化亚铁硫杆菌,但 Fe<sup>2+</sup> 最高氧化速率 1.3g/(L·h)和稳定性仍然无法达到工业应用的要求。

相比之下,PVA 具有强度高、化学稳定性好、抗微生物分解性能强、对微生物无毒、价格低廉等一系列优点,是一种具有实用潜力的包埋材料。目前应用的较为广泛 PVA 的固定化方法主要是硼酸法、冷冻法。冷冻法需冷冻、解冻多次,最后再切块成形,操作过程比较复杂;硼酸法是一种制备容易且价格低廉的固定化方法,但是这种方法凝胶球容易发生粘联膨胀,并且硼酸对生物毒性大,细胞活性会受到较大影响。Wu 等<sup>[9]</sup>在 PVA 中引入少量的海藻酸钠,以解决了 PVA 颗粒的粘连问题,增强了 PVA 凝胶的成球能力。王建龙等<sup>[10]</sup>采用延时包埋法与加入化学药剂法对 PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 法进行了改进以降低颗粒的水溶膨胀性。然而这些方法并没有完全解决

PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 法的上述局限性。

在本文的研究中,作者首次把一定比例的 PVA 和海藻酸钠混合加热待完全溶解,并室温下密封存放 24h 后,以 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶液来代替饱和硼酸溶液和传统的 CaCl<sub>2</sub> 溶液凝固 PVA 复合材料,形成球形固定化颗粒,之后把颗粒低温环境下冷冻,以进一步改善颗粒性能。并首次以此方法固定氧化亚铁硫杆菌,通过平行实验对照,研究了这种固定化技术的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** :氧化亚铁硫杆菌(*A.f*),兰州大学生物技术开发实验室提供。

**1.1.2 培养基** :9K 液体培养基:(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3g, KCl 0.1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.01g, 蒸馏水 1000mL, pH1.8, 121℃ 灭菌 15min。加入经过滤除菌的 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液(质量浓度为 30%, pH1.8),最终 Fe<sup>2+</sup> 浓度 8g/L。

**1.1.3 主要试剂和仪器** :PVA(化学纯,聚合度 1750±50,醇解度大于等于 99%,北京新光化学试剂厂);海藻酸钠(化学纯,中国医药集团上海化学试剂公司);Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(分析纯,北京益利精细化学品有限公司);CaCl<sub>2</sub>(分析纯,北京益利精细化学品有限公司)。

PHBJ2260 型便携式酸度计(上海雷磁科学仪器

基金项目:甘肃省科技攻关项目(GS035-A52-008-01);兰州市科技攻关项目(03-02-24)

\* 通讯作者。Tel 86-931-8910109, Fax 86-931-8912561, E-mail lihongyu@lzu.edu.cn

作者简介:王玉建(1980-)男,山东金乡人,助教,硕士研究生,主要从事生物固定化研究。E-mail:open2000cn@163.com

收稿日期:2005-07-06 接受日期:2005-07-28 修回日期:2005-08-16

厂);HYG2 II型回转式恒温调速摇瓶柜(上海欣蕊自动化设备有限公司)。

## 1.2 细胞的培养及收集

将氧化亚铁硫杆菌分别接种(10%接种量)到3份装有9K培养基的三角瓶中,31℃下回转式恒温调速摇瓶柜培养2~3d,将培养液1500r/min离心5min,弃去沉淀,之后12000r/min离心15min,收集细胞,用去离子水溶解细胞,收集细胞悬液。

## 1.3 细胞固定化

称量PVA27g,海藻酸钠2.7g,放入200mL的去离子水中沸水浴加热溶解,并室温下密封存放24h后加入细胞悬液100mL,最终混合液中PVA9.0%(W/V),海藻酸钠0.9%(W/V),细胞浓度 $1.5 \times 10^9$ 个/mL,将上述混合液分别滴加到以下4种溶液中:1%~5%(W/V)的Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、1%~5%(W/V)CaCl<sub>2</sub>、40%~60%(W/V)的Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>和饱和H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>溶液,浸泡45min,形成的颗粒分别记为C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>,将成型的C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>颗粒(直径约4mm)用去离子水多次冲洗后,置-20℃的冰箱保存1d,其间,约冷冻12h后,-1℃~3℃温度范围内解冻风干一次,最后室温解冻,备用。

## 1.4 颗粒强度测试

挑选50个颗粒均匀的固定化小球,放于500mL的烧杯中,加水100mL,以500~3000r/min的速率搅拌5min,观察小球的直径变化和破损情况,以此来描述小球的强度。

## 1.5 生物活性测试

取4个三角瓶中,各自加入200mL 9K培养液(Fe<sup>2+</sup> 8g/L)将4种固定化颗粒(每种约300粒,大小均匀,各自总重量偏差不超过1%)分别接种到培养液中,31℃摇瓶培养,通过检测Fe<sup>2+</sup>的浓度和培养液pH变化,来判断各自的生物活性。

## 1.6 颗粒膨胀性测定

取数粒大小均匀的固定化小球在4℃的去离子水中浸泡24h,用游标卡尺测量浸泡前后的颗粒平均直径的变化计算各自的膨胀性。

## 1.7 分析方法

亚铁离子浓度采用重铬酸钾容量法<sup>[11]</sup>分析。

# 2 结果和讨论

## 2.1 PVA颗粒的强度

图1为机械强度测试结果,结果表明PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>颗粒比PVA-CaCl<sub>2</sub>和PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>颗粒具更

高的强度,转速在1500r/min时,两种PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>颗粒都没有破碎,而此时PVA-CaCl<sub>2</sub>和PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>颗粒破碎率已分别达到8%和20%,转速达到2500r/min时,PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>颗粒几乎全部破碎,表明其机械强度较弱。Wu等<sup>[11]</sup>认为,PVA和饱和H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>交联的不充分是造成颗粒强度不够的主要原因。转速达到3000r/min时,PVA-CaCl<sub>2</sub>颗粒也有90%以上的颗粒破碎,两种PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>颗粒破碎率为50%~60%。同时实验过程中可以看出两组PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>颗粒曲线极为接近,说明Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>的浓度对颗粒的强度影响不大。

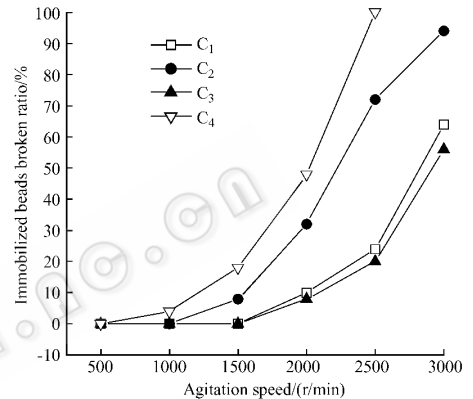


图1 PVA颗粒的机械强度

Fig.1 Relative mechanical strengths of PVA beads.

## 2.2 颗粒的生物活性

颗粒经过24h摇床活化培养后,投放C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>两种固定颗粒的培养液颜色已变为浅红色,C<sub>4</sub>颗粒的培养液也有轻微的颜色变化,说明其固定的微生物已经度过延滞期,而C<sub>3</sub>固定颗粒颜色变化不明显。此时将4组颗粒转接到新的9K培养基中,并定时测量Fe<sup>2+</sup>的浓度变化,结果如图2所示。4种PVA颗粒中,C<sub>1</sub>颗粒氧化活性最好,最大氧化速率则为2.45g(L·h),C<sub>2</sub>次之,C<sub>3</sub>颗粒氧化活性较低,其原因可能是高浓度的Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>的渗透压作用,引起细胞脱水,致使微生物细胞活性大量丧失;而PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>颗粒在出现轻微的活力后,几乎再无活力显示,可能是饱和H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>对氧化亚铁硫杆菌有较大的毒害作用,同时载体交联的不充分也可能导致颗粒吸水膨胀、部分菌体流失,致使活力下降,各自固定颗粒的相对生物活性比较列表1。在Fe<sup>2+</sup>浓度变化的同时,各自培养液的pH值也呈不同的变化趋势,如图3所示。C<sub>1</sub>和C<sub>2</sub>培养液pH上升较快,C<sub>4</sub>培养液pH上升至2左右后几乎不再变化,C<sub>3</sub>培

养液的 pH 值变化不是很明显。

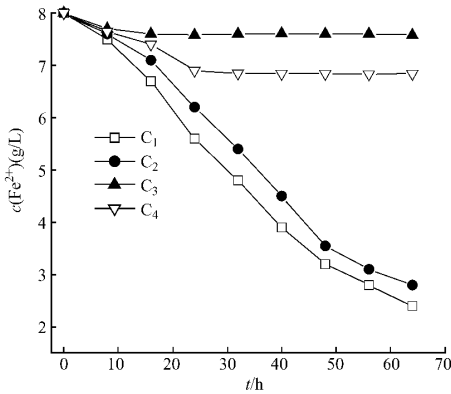


图2 PVA 颗粒的氧化活性

Fig.2 Oxidation activities of PVA-beads.

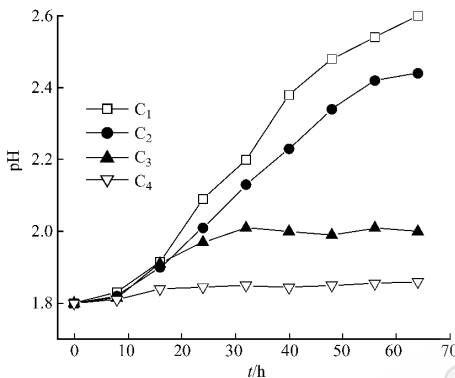


图3 各种固定化颗粒培养过程中的 pH

Fig.3 Diversification of pH with culture of various immobilized beads.

表1 固定化方法的比较

Table 1 Comparisons of the way of immobilization

Immobilized beads	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
Relative activity	59.1%	53.9%	6.2%	19.1%

Relative activity = ( Activity of immobilized cells/ Activity of suspending cells ) × 100% .

2.3 PVA 颗粒的稳定性

实验表明,用 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 法可以快速成球,且颗粒圆润饱满、成型好、不粘连、强度高,但饱和 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 溶液中形成的颗粒出现了不同程度的粘连现象,并且交联速度慢,形成的颗粒强度不够,要达到较高的强度需要较长的交联时间。同时,由于 PVA 分子中

含有大量的亲水性羟基,因而具有一定的吸水膨胀性,PVA 和海藻酸钠通常是在沸水浴且搅拌的条件下溶解,水溶液中含有大量的微气泡,如果在短时间的冷却后,直接滴入盐溶液中,形成的固定颗粒往往包含一定量的气泡,增加了颗粒的吸水膨胀性。另据文献 [12] 报道,PVA 分子中的羟基具有自动凝聚倾向,因而 PVA 水溶液的粘度会随时间发生变化。当 PVA 刚溶解时,PVA 分子中的羟基相对活跃,其水溶液易于搅动,而静置几个小时后,溶液就变得相对粘稠。因此,当 PVA 溶液冷却后,而先室温下密封存放 24h 后,再与微生物混合并滴入 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶液,颗粒成形后的冷藏可以进一步改善颗粒的性能。试验表明,可以在一定程度上抑制颗粒的吸水膨胀性,4 组颗粒在 4℃ 的去离子水中浸泡 24h 后,PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 颗粒直径变化较小,PVA-CaCl<sub>2</sub> 颗粒直径变化稍大,而 PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 颗粒直径则由原来平均不足 4mm,膨胀到 6mm,强度有所下降。表 2 为颗粒性能比较。

另外,将 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>4</sub> 3 种颗粒从活化培养开始,每隔两天转移到新鲜的培养基中,继续反应,以各自固定化细胞的最高活力为基准,考察其活力下降状况,来比较固定化细胞的操作稳定性,结果见图 4。在连续的 5 批次反应过程中,C<sub>1</sub> 颗粒的操作稳定性明显优于 C<sub>2</sub> 颗粒,且凝胶仍保持完整的珠粒状态,机

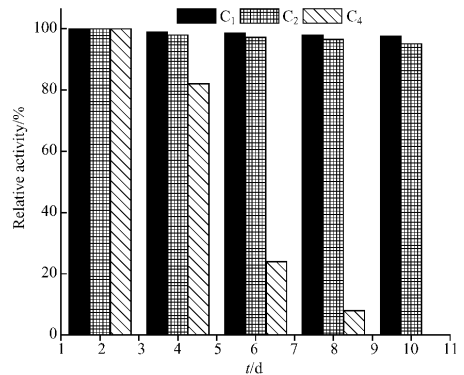


图4 固定化细胞的稳定性

Fig.4 Stability of the immobilized cells.

表2 各种固定化颗粒性能比较

Table 2 Comparisons of the immobilized beads in capability

Immobilized beads	Mechanical strength	Shape of beads	Formation speed	Expanding coefficient
C <sub>1</sub>	++	Regular sphere	Fast	1.23
C <sub>2</sub>	+	Irregular sphere	Fast	1.30
C <sub>3</sub>	++	Regular sphere	Fast	1.20
C <sub>4</sub>	-	Irregular sphere	Slow	1.69

“+” means high mechanical strength “-” means low mechanical strength. ; Expanding coefficient = ( Diameter of beads after being immersed in distilled water for 24h/ Original diameter of beads ) × 100% .

械强度稳定,而C<sub>4</sub>颗粒,即PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>颗粒活性下降显著,连续培养到第10d,几乎完全丧失活性。

### 3 讨论

聚乙烯醇是一种化学稳定性好、无毒、价格低廉的包埋材料,具有较好的应用前景。但在和饱和H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>交联过程中的粘连膨胀、特别是硼酸对微生物的毒性致使其应用受到很大限制。作者首次把一定比例的PVA和海藻酸钠混合加热待完全溶解,并在室温下密封存放24h后,以Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>溶液来代替饱和硼酸溶液和传统的CaCl<sub>2</sub>溶液凝固PVA复合材料,之后把成型的颗粒低温环境下冷冻,形成球形固定化颗粒。结果表明,整个固定化过程迅速,操作简单,颗粒不粘连,颗粒强度大大高于传统的PVA-CaCl<sub>2</sub>颗粒和PVA-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>颗粒,颗粒生物活性和稳定性也有一定的优势。进一步推动了PVA作为一种新型的微生物包埋固定化载体在实际中的应用。

以此方法固定氧化亚铁硫杆菌,经过一系列的摇瓶培养后,对Fe<sup>2+</sup>最大氧化速率可达2.45g(L·h),并且连续运行10d,生物催化剂的稳定性良好,活力下降不超过4.0%,取得了较为满意的结果,具有较好的应用前景。

### 参 考 文 献

[1] Magota H, Shiratori Y, Inoue C, et al. Waste water purification with bacterial oxidized ferric sulphate solution. Japan: 0121539. 1989.

- [2] Magota H, Shiratori Y. Treatment of sour natural gas containing hydrogen sulphide. Japan: 63205124. 1988.
- [3] Grishin S, Tuovinen OH. Fast kinetics of Fe<sup>2+</sup> oxidation in packed-bed reactors. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 3092-3100.
- [4] Armentia H, Webb C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cell immobilized in polyurethane foam support particles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, **36**(6): 697-700.
- [5] Gomez JM, Cantero D, Webb C. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* cells on nickel alloy fibre for ferrous sulfate oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**(3): 335-340.
- [6] Wood TA, Murray KR, Burgess JG. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilized on sand for the purpose of treating acid mine-drainage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**(4): 560-566.
- [7] Lancy ED, Tuovinen OH. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilized in calcium alginate. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **20**(1): 94-99.
- [8] Wakao N, Endo K, Mino K, et al. Immobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* using various polymers as matrix. *J Gen Appl Microbiol*, 1994, **40**(3): 349-358.
- [9] Kuo-Ying Amanda Wu, Keith D Wisecarver. Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, **39**(4): 447-449.
- [10] 李花子, 王建龙, 文湘华, 等. 聚乙烯醇-硼酸固定化方法的改进. *环境科学研究*, 2002, **15**(5): 25-27.
- [11] 王 彤, 姜言权. 分析化学试验. 北京: 高等教育出版社, 2002: 94-96.
- [12] Tacx JCJF, Schoffeleers HM, Brands AGM. Dissolution behavior and solution properties of polyvinylalcohol as determined by viscometry and light scattering in DMSO. *Ethylene glycol and Water Polymer*, 2000, **41**(3): 947-957.

## Study on immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* using PVA-Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> method

WANG Yu-jian<sup>1,2</sup>, LI Hong-yu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

(<sup>2</sup> School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** A new cell immobilization technique utilizing the complex of PVA solution and sodium alginate solution as entrapment medium is reported. The mixture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* suspension and the entrapment complex were extruded into the solution of Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1% ~ 5%) to form beads, then the beads were frozen at -20°C for 1d and thawed at room temperature. This method can simultaneously eliminate the agglomeration of PVA beads and the biological toxicity of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. A maximum oxidation rate of 2.45g Fe<sup>2+</sup> (L·h) was achieved in batch cultures by this immobilized cells. In addition, the operation of this new technique is very simple, and the gelation solution (calcium nitrate) used is of low toxicity and very cheap. Moreover, the mechanical strength and the oxidation activity of the beads obtained by this technique are better than those obtained by the other methods. So its application on an industrial scale would be more practicable.

**Keywords:** Immobilization; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; Poly vinyl alcohol (PVA); Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

\* Corresponding author. Tel: 86-931-8910109; Fax: 86-931-8912561; E-mail: lihy@lzu.edu.cn

Received: 6 July 2005/ Accepted: 28 July 2005/ Revised: 16 August 2005