

# 几种固定化细胞载体的比较\*

蒋宇红 黄霞 俞毓馨

(清华大学环境工程系,北京 100084)

**摘要** 以琼脂、明胶、海藻酸钙、聚乙烯醇和丙烯酰胺凝胶为固定化细胞的包埋固定载体,对其主要包埋条件和性能进行了初步的研究比较。其结果表明,海藻酸钙和聚乙烯醇与琼脂、明胶和丙烯酰胺凝胶相比较,具机械强度高、传质性能较好,生物毒性较低和固定操作容易等优点,为较好的固定化细胞载体,值得进一步深入研究。

**关键词** 固定化细胞,载体,海藻酸钙,聚乙烯醇。

用固定化细胞处理废水是近年发展起来的废水处理新技术。由于该法具有废水处理效率高,处理装置占地面积小,剩余污泥产量低等优点<sup>[1]</sup>,在废水处理中显示出独特的优越性。但目前固定化细胞技术大多处在实验室研究水平,其主要问题之一是尚未研究出合适的固定化细胞载体。适用于废水处理的固定化细胞载体应对生物无毒,传质性能良好,强度高,不易被微生物分解,细胞的固定操作容易,寿命长且价格低廉。在固定化细胞载体方面,国外学者研究得较多的是用高分子凝胶,如琼脂、海藻酸钙、聚乙烯醇凝胶等作为载体,在凝胶形成过程中,将细胞包埋在其内部,加以固定<sup>[2-6]</sup>。国内学者对这种细胞的包埋固定化方法也作过一些探讨<sup>[7]</sup>,但尚缺乏较深入的研究和评价。

本研究以琼脂、明胶、海藻酸钙、聚乙烯醇和丙烯酰胺凝胶分别作为包埋固定细胞的载体,研究适宜的包埋条件,并比较各载体的性能,在此基础上初步筛选出较为合适的固定化细胞载体。

## 1 实验材料及方法

### 1.1 试剂

制备固定化细胞所用试剂有:琼脂,甲苯、明胶,戊二醛(电子显微镜用)、海藻酸钠(工业用),氯化钙,聚乙烯醇(工业用)、饱和硼酸、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、二甲氨基丙腈和过硫酸铵。上述试剂中未注明等级的均为化

学纯。

### 1.2 固定化细胞小球的制备方法

按图 1 所示,将作为固定化细胞载体材料的包埋剂溶液与细菌悬浮液混合,然后用注射器将其注入交联剂溶液中,在包埋剂与交联剂交联、聚合形成凝胶的过程中,将细菌包埋在其内部,即可得到固定化细胞小球。实验所用各包埋剂及相应的交联剂见表 1。

细菌悬浮液为活性污泥经离心分离浓缩后,再加入适量的蒸馏水配制而成。

### 1.3 固定化细胞小球性能测试方法

用大流速水流连续冲击固定化细胞小球 15 min,观察其破碎程度来判断其相对机械强度。

将制备的固定化细胞小球放入营养液中培养,按一定时间间隔从营养液中取出称重,以其

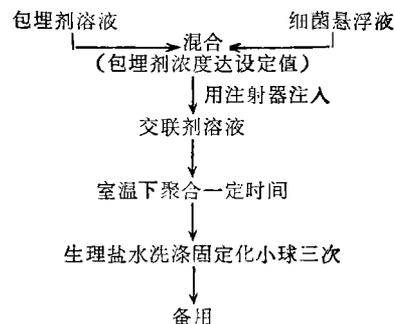


图 1 固定化细胞小球的制备方法

\* 国家自然科学基金项目  
1992 年 10 月 24 日收到修改稿

表 1 包埋剂及相应交联剂的种类

包埋剂	交 联 剂	包埋剂-细菌 混合液温度
琼脂	甲苯	50℃左右
明胶 <sup>1)</sup>	0.5%戊二醛	32°-33℃
海藻酸钠	2% CaCl <sub>2</sub>	室温
聚乙烯醇	饱和硼酸	室温
丙烯酰胺 <sup>2)</sup>	N, N'-甲叉双丙烯酰胺	室温

- 1) 先将明胶与细菌的混合液注入冰水浴中的液体石蜡里,使之成为小球后,再放入交联剂中聚合.
- 2) 包埋剂与交联剂混合的同时加入 2.5%过硫酸铵(聚合开始剂)和 5%二甲氨基丙腈(聚合加速剂).

重量变化来间接表示固定化细胞小球内部微生物的增殖情况。

用扫描电镜观察比较各种固定化细胞小球表面及内部的微细结构。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 包埋条件

在固定化细胞的包埋法制备中,包埋条件,主要有包埋剂浓度和交联时间直接影响所得固定化细胞的性能。以下就表 1 所示 5 种包埋剂的相应适宜包埋条件进行探讨。

对每种包埋剂包埋制备的固定化小球,改变其包埋剂浓度,比较在不包菌条件下机械强度的变化。结果表明包埋剂浓度越高,固定化小球的强度越大,但包埋剂浓度过高时,包埋剂溶液的粘性增加,给固定操作带来不便,较为适宜的包埋剂浓度见表 2。在丙烯酰胺凝胶包埋中,有升温现象,包埋剂浓度和交联剂浓度的比值对固定化小球的机械强度无明显影响,但却影响升温温度,其适宜比值是同时参考升温温度较低时的比值选定的。琼脂在任何包埋剂浓度条件下强度都极差,实际工程应用价值不大,故未作进一步研究。

包埋剂在交联剂溶液中聚合、交联时间的长短也会对固定化细胞的性能产生影响。交联时间较长,所得固定化小球的强度越高,但小球内部结构更为密实,不利于基质的传递,同时细菌失活可能会越大。比较各种包埋法在不同交联时间下包埋细菌所得的固定化细胞小球的机

械强度及在营养液中的重量变化情况,选择固定化小球机械强度适当且细菌增殖情况良好的交联时间为其适宜值。如海藻酸钙固定化小球,交联时间越长,机械强度越高,交联时间为 18h 和 20h 时,强度均良好,而固定化小球的增重在交联时间 18h 之前,随交联时间的增加而增加,18h 之后则开始减少,故选择 18h 为其适宜交联时间。同样其它包埋法的交联时间见表 2。丙烯酰胺凝胶的聚合在极短时间(约 5min)

表 2 各包埋法的包埋条件

固定化载体	包埋剂浓度	交联时间	备注
琼脂	—	—	强度极差
明胶	10%—14%	2.0h	
海藻酸钙	1.5%—2%	18h	
聚乙烯醇	8%—10%	20h	
丙烯酰胺	包埋剂/交联剂=18—20	5min	出现升温,单体有毒

械强度及在营养液中的重量变化情况,选择固定化小球机械强度适当且细菌增殖情况良好的交联时间为其适宜值。这可能是因为凝胶形成时,温度升高,同时未聚合的丙烯酰胺单体对生物有毒,使细菌在包埋固定过程中大量失活。理想的固定化载体应对生物无毒,因此认为单一的丙烯酰胺凝胶不宜作为固定化细胞载体,需对此包埋方法进行适当的改进以减轻毒性和升温对细菌的杀伤,以提高固定化细胞的成活率。

### 2.2 各种固定化细胞小球的性能比较

从以上研究可知,琼脂强度极低,丙烯酰胺凝胶对生物有毒性,不宜作为固定化细胞载体。以下仅对明胶、海藻酸钙和聚乙烯醇凝胶在各自适宜包埋条件下所得的固定化细胞小球,就机械强度及其稳定性、增殖情况、微细结构进行比较。

(1) 机械强度及其稳定性 3 种固定化细胞小球在营养液中不同培养时期的机械强度变化见表 3。实验进行到第 8 天时,明胶小球开始破碎,强度降低,到第 10 天时,完全溶化。可见明胶小球强度较差且不稳定,其原因是固定在凝胶小球内部的细菌在消耗完营养液中的营养

表 3 3 种固定化细胞小球的机械强度比较

实验时间 (d)	海藻酸钙	明胶	聚乙烯醇
1—6	++	++	++
8	++	—	++
10	++	--	++
12	+	--	++

++ 良好 + 稍低 — 破碎 -- 溶化

物后,便开始以明胶为食,导致明胶破碎,最后溶化。海藻酸钙凝胶在实验到 12 天时,机械强度稍稍有所变低。聚乙烯醇凝胶固定化细胞小球在整个实验期间机械强度均保持良好。

(2) 细胞增殖情况 3 种固定化小球在营养液中培养时的重量变化见图 2。图中曲线在培养时间为 2d 之前呈增加趋势,之后开始下降,这是由于随着营养液中基质的消耗,细菌生长从对数增长期逐渐向内源呼吸期过渡。从图中可见,明胶小球的重量增加、即细胞增殖情况较差,海藻酸钙和聚乙烯醇凝胶小球的细胞增殖较为良好,其中以海藻酸钙小球为最好。造成细胞增殖差别的主要原因之一是各固定化细胞小球的传质性能不同,即小球内部微细结构存在差异,详见后述。

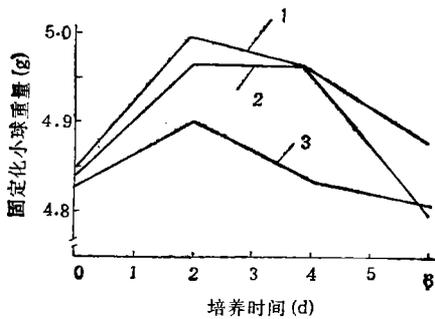


图 2 3 种固定化细胞小球的重量变化  
1.海藻酸钙 2.聚乙烯醇 3.明胶

(3) 微细结构 未包菌时的明胶小球内部的微细结构的扫描电镜照片见图 3。由此可见,其内部结构非常密实,不利于基质的传递,导致包菌后固定化细胞增殖不良。

包菌后的固定化细胞小球在营养液中培养 2 天后的表面扫描电镜照片见图 4。可见明胶

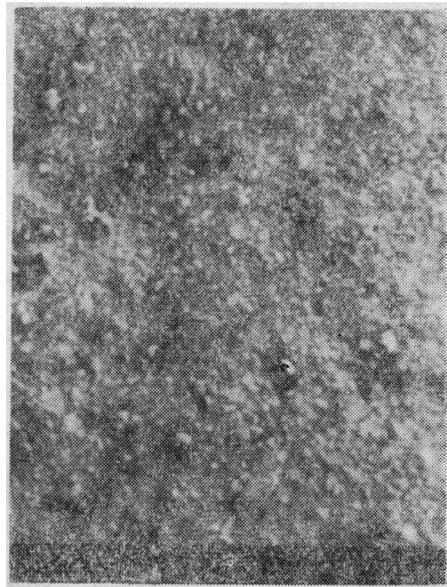


图 3 未包菌明胶小球内部结构  
放大倍数:  $10 \times 10^3$

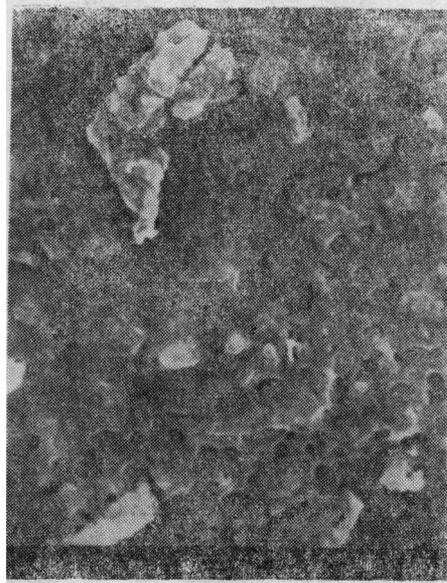


图 4 包菌培养 2d 后明胶小球表面  
放大倍数: 6000

小球表面有许多“环形山”,这可能是由于包埋在其下的细胞对明胶的降解所造成的。由此可很好地解释明胶在营养液中逐渐破碎、消失的现象。

海藻酸钙凝胶小球的表面及内部结构的扫描电镜照片见图 5。由此可见凝胶小球表面有层极薄的球壳,小球内部呈多孔结构,包埋了许多细菌。在其内部还有一些不深的孔洞,填满

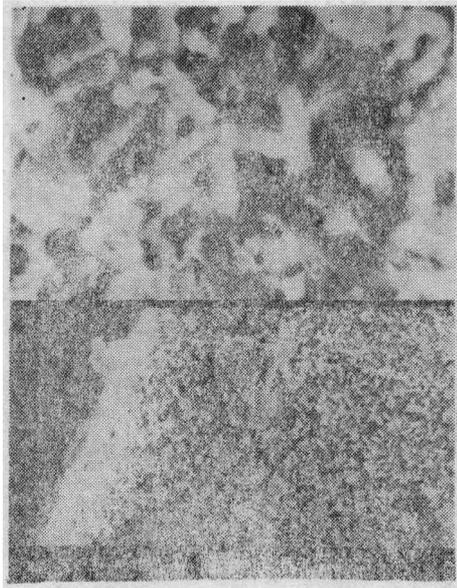


图 5 海藻酸钙凝胶小球表面及内部结构  
放大倍数: 上图 8000, 下图 800

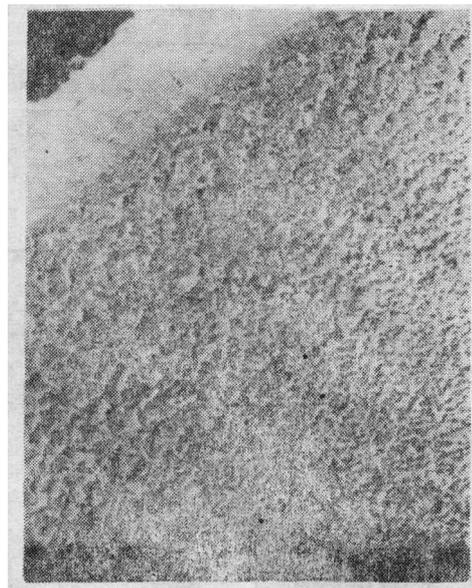


图 7 聚乙烯醇凝胶小球表面  
放大倍数: 500



图 6 海藻酸钙凝胶小球的内部孔洞  
放大倍数: 上图 6000, 下图 600

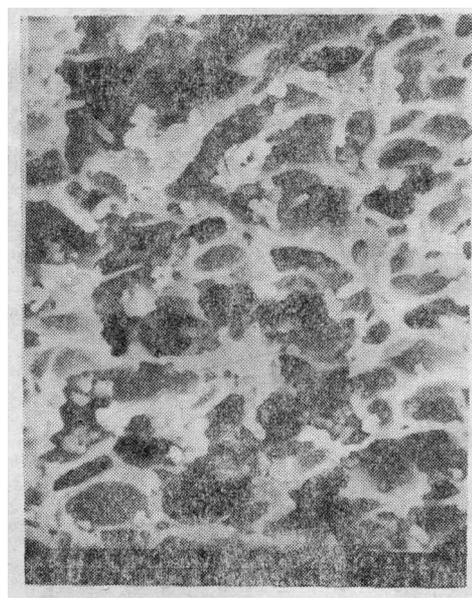


图 8 聚乙烯醇凝胶小球内部结构  
放大倍数: 4000

了细菌, 见图 6。这种多孔结构有利于细菌的包埋、基质及降解产物的传递, 凝胶表面的球壳还可阻止细菌从小球内泄出。从微细结构来看, 海藻酸钙凝胶是较为理想的固定化细胞载体。

聚乙烯醇凝胶小球的表面及内部结构见图 7 和图 8。由此可见, 凝胶小球有一个均匀的

球壳, 其结构为外密内疏, 内部呈蜂窝状。此外凝胶小球内部还有许多孔洞 (见图 9), 经观察发现大部分细菌包埋在孔洞内 (见图 10), 仅有少量细菌在小球表层。从微细结构来看, 聚乙烯醇凝胶与海藻酸钙凝胶一样同样是细菌包埋和生长的理想载体, 但其球壳较厚, 从而其传质性能不及海藻酸钙。

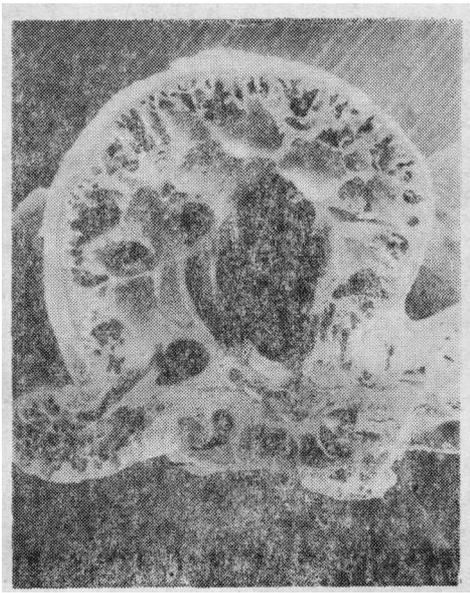


图9 聚乙烯醇凝胶小球纵剖面图  
放大倍数: 25

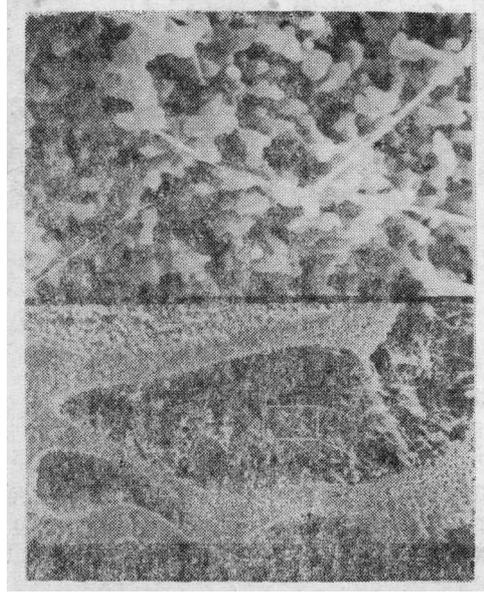


图10 聚乙烯醇凝胶小球的内部孔洞  
放大倍数: 上图 4000, 下图 400

### 3 结论

综上所述,琼脂、明胶、海藻酸钙、聚乙烯醇和丙烯酰胺凝胶 5 种固定化细胞载体的性能比较见表 4。可见,琼脂强度极差,丙烯酰胺凝胶对生物有毒性,明胶内部结构密实,传质性能差,相比之下,海藻酸钙和聚乙烯醇凝胶机械强

度和传质性能均较好;对生物无毒;耐生物分解性良好且固定操作容易,是其中较为合适的固定化细胞载体。在此初步筛选的基础上,今后将对海藻酸钙和聚乙烯醇作进一步的深入研究,并开发更为合适的固定化细胞载体。

表 4 各固定化细胞载体的性能比较

固定化载体	固定难易	机械强度	对生物 毒性	耐生物 分解性	传质性能
琼脂	难	极差	无毒	差	—
明胶	一般	差	无毒	差	差
海藻酸钙	易	较好	无毒	好	好
聚乙烯醇	易	好	无毒	好	好
丙烯酰胺	难	好	有毒	好	—

### 参 考 文 献

- 1 滨宏等. 下水道协会誌. 1988,25(293): 32
- 2 中岛等. 月刊下水道. 1985,8(8): 64
- 3 角野等. 用水と廃水. 1985,27(10): 52
- 4 桥本等. 下水道协会誌. 1986,23(262): 41
- 5 Yang P Y et al. *Wat. Sci. Tech.* 1990, 22(3/4): 343
- 6 Hashimoto S et al. *Biotechnol. & Bioeng.* 1987, 30:52
- 7 李彤,俞毓馥,胡纪萃. 环境科学. 1990,11(5): 41

## • 环境信息 •

## 世界人口趋势

在过去 40 年,世界人口翻了一番,由 1950 年的 25.16 亿上升到 1990 年的 52.92 亿。下个世纪世界人口可能还要翻一番,到 2100 年也许会稳定在 110 亿左右。到 1990 年,世界 77% 的人口 (41 亿) 居住在发展中国家,工业化国家人口为 12 亿,占世界 23%。在 1970—1990 年间,工业化国家人口增长趋缓,只增长 15%; 同期,发展中国家人口增长 55%, 由 26.5 亿增至 41 亿。预计到 2025 年,工业国家人口为 13.5 亿,

发展中国家将达到 71.5 亿。80 年代中期,发展中国家每年死亡约 3.7 亿人,近 37% 是孩子。而发达国家的儿童死亡率仅占 3%, 这表明发展中国家与发达国家健康卫生方面差距甚大。

文明 摘译自 *World Resources*. 1992—1993:75—76

**Study of Furfural Residue Carbon for Eliminating and Recovering Sulphur Dioxide from Flue Gases.** Cai Guangyu et al. (Dalian Institute of Chemical Physics, Academia Sinica, Dalian 116023): *Chin. J. Environ. Sci.*, 14(2), 1993, pp. 2—6

A new type of modified active carbon, furfural residue carbon was manufactured with residues in the production of furfural. Its physical and chemical properties were characterized with TPDE, GC-MS, BET, steady and flowstate adsorption, oxidation of SO<sub>2</sub>, and compared with those of other commercial active carbons. It was found that the furfural residue carbon possesses a better desulphurization property without the need of adding any active components, and is applicable to the process of desulphurization from flue gas to prepare sulphuric acid. It was supposed that the surface groups composed of hydroxyl and carbonyl are the active centers of SO<sub>2</sub> uptake, and the abundant middle pores are favourable to the diffusion of reactants. The furfural residue carbon made on an industrial scale was examined successfully on a pilot plant capable of treating 5000 Nm<sup>3</sup>/h flue gas from a coal-combustion power plant, at an inlet temperature of about 70°C and 1500—2500 ppm of SO<sub>2</sub> concentration of flue gas and with a space velocity of 500 h. Stability test was carried out for more than 6000 hours, and it was found that the conversion of SO<sub>2</sub> reached about 70%, the concentration of by-product H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was about 30%wt and no apparent deactivation of the furfural residue carbon was observed. In addition, production cost of the furfural residue carbon is about 40% lower than the commercial active carbon containing iodine component.

**Key words:** active carbon, flue gas, sulphur dioxide, desulphurization.

**Studies on the "Yichang" Synthetic Sorbent for Sulfur Dioxide removal in Fluidized Bed Combustion of Coal.** Li Zhijiang et al. (Thermal Engineering Department Tsinghua University, Beijing 100084):

*Chin. J. Environ. Sci.*, 14(2), 1993, pp.

7—10

As an alternative to natural limestone for sulfur dioxide removal in fluidized bed combustion of coal, an advanced synthetic sorbent was developed in Tsinghua University and a pilot manufacture with output of 5000 tons per year has been set up in Yichang city, Hubei province, China. Plant tests were conducted on 3 fluidized bed boilers with steam capacities of 6, 10 and 10t/h under 7 operating conditions. The technique for the production of "Yichang" sorbent is described; the characteristics of "Yichang" sorbent, such as composition, pore size distribution, microstructure, strength, water-tolerance and sulfur capture capacity are demonstrated; and results of plant tests are presented and discussed. Finally, the technology is economically analyzed and compared with other sulfur removal methods.

**Key words:** sulfur dioxide, limestone, desulfurization, fluidized bed combustion.

**Study on Entrapping Agents for Immobilizing Microbial Cell.** Jiang Yuhong, Huang Xia and Yu Yuxin (Dept. of Environmental Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084): *Chin. J. Environ. Sci.*, 14(2), 1993, pp. 11—15

Entrapping methods with agar, gelatine, calcium alginate, polyvinyl alcohol and acrylamide gels as entrapping agents for immobilizing microbial cell were studied. By comparing their characteristics, calcium alginate and polyvinyl alcohol gels were found to be the most suitable entrapping agents for their high mechanical stability, good mass diffusivity, less toxicity and easiness in entrapping operation.

**Key words:** immobilized microbial cell, entrapping agent, calcium alginate, polyvinyl alcohol.

**Prediction of One-Dimension Distribution of Traffic Noise among Road-Side Buildings with Grey System Model.** Zhang Bangjun, Pan Zhonglin et al. (Dept. of Physics, Hangzhou University, Hangzhou 310028):