

电氧化杀藻过程中藻细胞活性变化的研究

梁文艳, 王珂, 阮铃铃, 隋丽丽

(北京林业大学环境科学与工程学院, 北京 100083)

摘要:由 Ti/RuO₂ 棒为阳极、不锈钢管为阴极组成电氧化管式反应装置, 采用 TTC-脱氢酶活性和中性红染色的活性测定方法, 研究了电氧化杀藻中藻活性变化以及影响因素. 结果显示, 在 8 mA/cm² 下处理 30 min 后, 以藻细胞密度计的杀藻率仅为 45%, 而此时 TTC-脱氢酶活性下降了 94%, 中性红染色率为 100%, 藻细胞已无法再生长, 已全部失活, 表明活性指标比细胞密度更能准确反映杀藻处理效果. 电解液种类对杀藻存在明显影响, 常用电解液 Na₂SO₄ 和 NaNO₃ 的杀藻效果相近, Na₂SO₄ 浓度对杀藻效果影响不大. 但当电解液中含有 0.1 mmol/L NaCl 时, 杀藻效果明显提高, 5 min 后的脱氢酶下降了 87%, 中性红染色率达到 82%. 藻样初始浓度对杀藻效果影响较大, 细胞密度增大, 杀藻效果急剧下降, 以天然水为电解液, 细胞密度达到水华时的 4.4 × 10⁷ 个/L, 只需处理 1 min 可将藻细胞全部灭活.

关键词:电氧化; 藻; 细胞活性; 灭活; 影响因素

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)06-1464-06

Study on the Variation of Algal Activity During the Electrochemical Oxidation as Inactivation Method

LIANG Wen-yan, WANG Ke, RUAN Ling-ling, SUI Li-li

(College of Environmental Science & Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The paper studied the variation of algal activity during the electrochemical inactivation and the influence factors by the use of TTC-dehydrogenase activity and neutral red staining assays. The treatment reactor was consisted of Ti/RuO₂ rod as anode and stainless steel pipe as cathode. The results showed that algal inactivation rate was 45% in cell density after 30 min treatment at 8 mA/cm². Whereas the decrease of TTC-dehydrogenase activity was 94% and neutral red staining percentage was 100%. The algae after treatment was unable to regrow and it revealed that the algal activity assays can reflect the inactivation effect more correctly than cell density. The electrolytes could influence the inactivation efficiency. The electrolytes of Na₂SO₄ and NaNO₃ had similar effects on algal inactivation and Na₂SO₄ concentration had small influence on the treatment. However, when the electrolyte contained 0.1 mmol/L NaCl, the algal inactivation was improved obviously with the 87% for TTC-dehydrogenase activity decrease and 82% for neutral red staining ratio. The initial algal concentration also influenced the treatment efficiency. If cell density increased, the inactivation efficiency decreased significantly. All algal cells in samples with cell density of 4.4 × 10⁷ cells/L were completely inactivated by the use of natural water as electrolyte within 1 minute.

Key words: electrochemical oxidation; algae; cell activity; inactivation; influence factors

水体中藻类的大量繁殖不仅使水体水质状况恶化, 而且对饮用水的处理和安全也带来影响. 具有鞭毛的藻细胞易穿透絮凝体, 从而破坏絮凝过程, 导致出水存在藻细胞; 藻细胞在滤床中的生长又会致滤床产生堵塞; 部分藻类在代谢过程中或死亡后释放出的藻毒素, 对生物体造成毒性和危害; 所分泌的臭味物质导致饮用水出现异味. 由于存在这些问题, 饮用水处理中不能忽视藻类的影响.

电化学氧化法在消毒方面表现了很好的杀菌效果, 可以杀死多种微生物, 如大肠杆菌、军团菌和绿脓杆菌等^[1-3], 所以不仅用于废水排放前的消毒处理^[4], 也可以运用于饮用水的消毒^[5]. 但电氧化在杀藻方面的研究较少, 有研究采用 Ti/RuO₂ 电极杀藻表明, 电氧化也具有很好的杀藻效果^[6,7]. 电氧化

法不仅杀菌灭藻效率高, 而且还能去除水中的溴化物和三卤甲烷^[8], 表现出运行管理简单、安全、可靠的特点.

在电氧化杀藻的研究过程中, 通常使用藻细胞密度这个生物量指标来表明杀藻效果, 但这个指标并不能准确反映杀藻效果, 与杀菌不同, 电氧化处理后的细菌数量下降很大, 有时能下降几个数量级, 但藻细胞密度下降的数量级并不大, 水样中仍存在大量细胞, 这些细胞是否具有活性, 只有通过再次培养才能确定, 而再培养所需要的时间较长. 本研究通过

收稿日期: 2009-08-10; 修订日期: 2009-12-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50678024); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2007AA06Z301); 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07314-006)

作者简介: 梁文艳 (1969~), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为水资源保护与水污染控制, E-mail: lwybjfu@126.com

测定电氧化处理过程中藻细胞活性的变化来表达处理效果,所选用的活性指标为 TTC-脱氢酶活性和中性红染色率,并通过藻细胞活性研究电解质和藻液初始浓度对电氧化的杀藻影响,分析电氧化的杀藻机制.

1 材料与方法

1.1 实验装置

电氧化杀藻装置如图 1 所示,阴极为不锈钢管,内径为 20 mm,阳极为 Ti/RuO₂ 棒,两极间距为 7.5 mm,阴极区和阳极区没有分隔,所组成电化学反应器容积为 65 cm³. 电源为 30 V/5 A 直流电源,外接电流表显示精度为 1 mA.

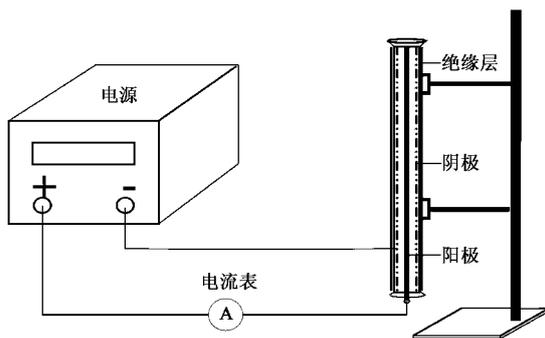


图 1 电化学氧化法杀藻实验

Fig. 1 Electrochemical oxidation system for algal inactivation

1.2 藻的培养

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*, FACHB 905) 购自中国科学院武汉水生生物研究所,藻体为球状,属于蓝绿藻(也称蓝细菌),是引起水华的常见藻种. 将藻细胞接种于 MA 培养基中,于 30℃、2000 lx 和 14 h:10 h(L:D) 光暗条件下培养,培养至稳定期后开始实验.

1.3 TTC-脱氢酶活性的测试

称取 0.2 g 氯化三苯基四氮唑(TTC)溶于 100 mL 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl 缓冲溶液中, pH 为 7.5,棕色试剂瓶保存,1 周内用完.

取藻样 4 mL,离心,并用蒸馏水清洗 2 次,加入 0.2% TTC 溶液 5 mL,置于 35℃ 恒温振荡器中,在 100 r/min 下振荡培养 8 h. 培养后的藻样离心,并用蒸馏水清洗 2 次,于离心后的细胞沉淀中加入 50% 乙醇 5 mL,在室温下放置 30 min. 然后加入 3 mL 正己烷,用旋涡混合器处理 1 min,静置提取反应产物三苯基甲腈(TPF),测定正己烷萃取液在 485 nm 下的吸光度值 A_{485} .

1.4 中性红染色

称取 0.5 g 中性红粉末溶于 50 mL Ringer 溶液中,配成 1% 中性红溶液. 使用时用 Ringer 溶液将 1% 中性红溶液稀释至 0.02%.

取藻样 4 mL,离心,加入 4 mL 中性红溶液,摇匀,染色 15 min 时间后,用显微镜(Olympus, BX51TF)进行观测,用 CCD 显微摄影系统(大恒, DH-HV2002UC)拍摄染色情况,并计数. 每个样品计数 20 个视野,死亡细胞会被中性红染成红色,染色率为染色细胞占总细胞数的百分比.

1.5 细胞计数

藻细胞密度采用 0.1 mL 浮游植物计数板进行计数,计算公式为:

$$N = \frac{A}{B \times C} \cdot \frac{D}{E} \cdot F$$

式中, N 为每升水样中藻细胞的个数; A 为计数框面积(mm²); B 为一个视野的面积(mm²); C 为计数时的视野数(个); D 为 1L 水浓缩后体积(mL); E 为计数框的容积(mL); F 为每片所测藻类数.

1.6 实验操作

将培养至对数增长期的藻细胞悬液离心,去除培养基,用 2.5 mmol/L Na₂SO₄ 电解液配制藻液至细胞密度为 4 × 10⁹ ~ 6 × 10⁹ 个/L,水样置于杀藻系统中进行处理. 在电流密度为 8 mA/cm² 下,处理一定时间后,测定样品的藻细胞密度和 TTC-脱氢酶活性,并对藻细胞进行中性红染色. 通过改变电解液种类、电解液浓度、初始藻样浓度等条件研究这些条件对电氧化杀藻的影响. 对照样为接种于一定电解液中而不进行电氧化处理的藻样. 所有实验均重复 3 次.

1.7 扫描电镜(SEM)对藻细胞形貌的观测

藻样离心后,先用 2% 戊二醛固定 4 h,用 0.1 mol/L pH = 7.0 磷酸钠缓冲溶液冲洗 4 h;再用 1% 锇酸固定 2 ~ 4 h,用同样的磷酸缓冲液清洗 1 h. 用浓度从 30% ~ 100% 的乙醇溶液逐级脱水,使用乙酸异戊脂进行 2 次置换. 样品在二氧化碳临界点干燥后,进行离子溅射镀金. 最后用扫描电子显微镜(S-570,日本日立公司)观察照相.

2 结果与讨论

2.1 电氧化处理中藻细胞活性与细胞密度的变化

脱氢酶能酶促脱氢反应,即酶促有机物质脱氢. 有机物脱氢是细胞能量代谢的关键,在反应中传递给氧的氢越多,说明脱氢酶活性越高. 由于脱氢酶只

有活细胞体才能产生,因此,常用脱氢酶活性表达细胞体的活性.在 TTC-脱氢酶活性测定中,无色的 TTC 作为人为受氢体,与活细胞接触,被还原生成红色的三苯基甲腈(TPF).通过测定 TPF 产生量,可判定脱氢酶活性水平的高低. TTC-脱氢酶法最早运用于植物种子活性的鉴定,后来逐步用于植物的根系、茎叶和花粉等部位的活性检测^[9-11].在藻活性研究方面,Chang 等^[12]用 TTC-脱氢酶法测定过大型海藻带石莼 (*Ulva fasciata*) 在不同盐度环境下的活力状况.

在细胞中性红染色中,当细胞失去活性并死亡后,中性红会进入细胞中并充满整个细胞.因此,中性红染色常用于细胞活性的检测,即可用在动物体活性的检测上^[13],也可以用在植物细胞活性的鉴定上^[14].细胞被中性红染色后,不仅说明细胞已经死亡,而且也说明细胞的细胞膜或细胞壁已被破坏.

采用以上 2 种细胞活性的检测方法,对电氧化杀藻细胞过程中藻细胞活性的变化进行了研究,结果如图 2~4 所示.从图 2 中可以看出,在电氧化处理过程中,TPF 产生的吸光度值 A_{485} 随着处理时间不断下降.初始藻液的 A_{485} 为 1.13,处理 10 min 后,下降至 0.37,处理 30 min 后,下降至 0.07,降低了 94%,正己烷提取液颜色已不是红色,而是藻细胞色素所带来的背景黄色.根据脱氢酶活性测定原理,处理 30 min 后,藻细胞已完全失去了活性.从图 3 中也可以看出,当电氧化处理 10 min 后,藻细胞中性红染色率达到 90%,处理 30 min 后,染色率达到 100%,说明此时藻细胞已全部死亡.从图 2 还可以看出,随着时间的延长,对照样的藻细胞活性也在逐步降低,说明藻细胞脱离所生长的培养基后,在 Na_2SO_4 电解液中,细胞活性受到了电解液的影响.

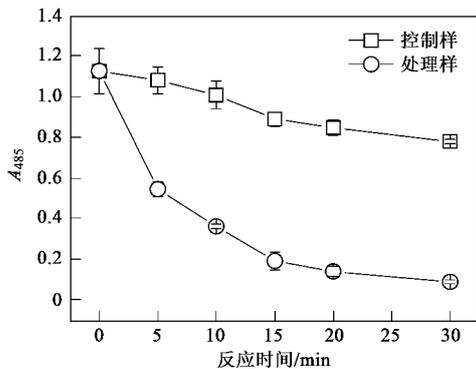


图 2 电氧化中藻细胞脱氢酶活性的变化
Fig.2 Variation of algal dehydrogenase activity in the electrochemical inactivation

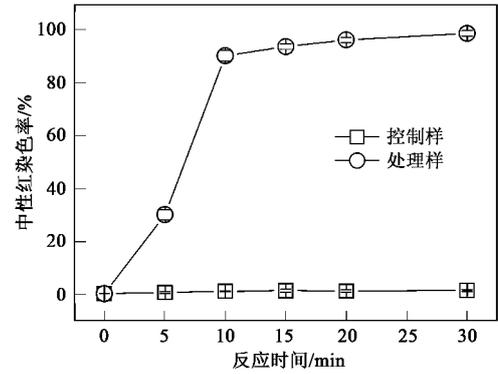


图 3 电氧化下藻细胞染色率的变化
Fig.3 Variation of neutral red staining in the electrochemical inactivation

但图 4 却显示,处理 10 min 后的细胞密度从 6.4×10^9 个/L 下降至 4.3×10^9 个/L,处理 30 min 后也只下降至 3.5×10^9 个/L,如果以细胞密度的减少作为电氧化杀藻效果的评价指标,处理 30 min 后的杀藻率为 45%,这与细胞活性结果不一致.将处理 30 min 后的藻样浓缩后接种于 MA 培养基中,培养 7 d 后发现藻细胞没有任何生长,溶液也是黄色,说明藻细胞确实已全部死亡.在电氧化杀菌中,细菌数量的下降是以数量级进行计算,有时可以高达 6 个数量级^[4].但是在电氧化杀藻中,如果想达到藻细胞下降几个数量级,需要处理非常长的时间,而此时,细胞早已失去活性,所以用细胞密度来评价杀藻效果并不非常准确,而藻细胞脱氢酶活性和中性红染色率更能准确反映出处理过程中藻的活性状态,并说明杀藻效果.

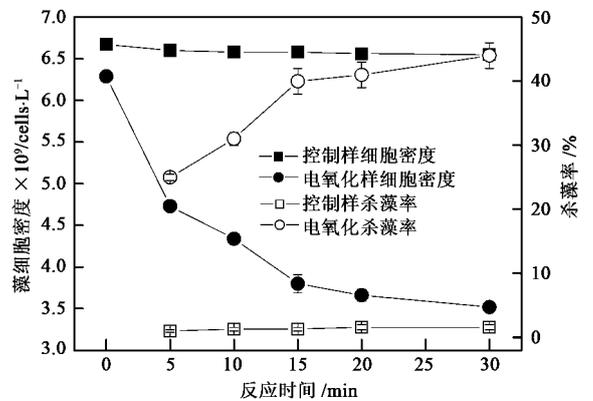


图 4 电氧化下藻细胞密度的变化
Fig.4 Variation of algal cell density in the treatment

2.2 电解质种类对电氧化杀藻的影响

从前面结果可以看出,当藻细胞接种于 Na_2SO_4

电解液中后,细胞脱氢酶活性有所下降,表明电解液对藻细胞活性存在影响.为了解电解液对电氧化杀藻的影响,选择了常用的电解液进行研究,结果见图5和图6.从图5可以看出,2.5 mmol/L Na_2SO_4 和 2.5 mmol/L NaNO_3 对电氧化杀藻效果影响不大,但当 Na_2SO_4 溶液中含有 0.1 mmol/L NaCl 后,电氧化杀藻效果急剧提高,只需处理 5 min, A_{485} 就下降到 0.19.当藻细胞接种于含氯化物 2.2 mmol/L 的天然水中时,电氧化的杀藻效果最好,5 min 后的 A_{485} 下降至 0.03.对于控制样,藻细胞接种于电解液 Na_2SO_4 、 NaNO_3 和 $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$ 时,30 min 后的 A_{485} 下降了 0.2~0.3,而藻细胞接种于天然水中,脱氢酶活性反而有所上升,增加了 0.3,这是由于天然水的组成中含有藻细胞生长所需的物质和各种微量元素,所以藻细胞活性不仅没有受到影响,反而有所增加,同时也说明电氧化处理中藻细胞脱氢酶活性的降低完全是由于电氧化的作用所致.从图6可以看出,中性红染色的结果与脱氢酶活性变化的结果相似,当 Na_2SO_4 电解液中含有 NaCl 时,中性红染色率大大提高,5 min 后的染色率达到 82%,使用天然水做电解液时,5 min 后的染色率达到 96%.

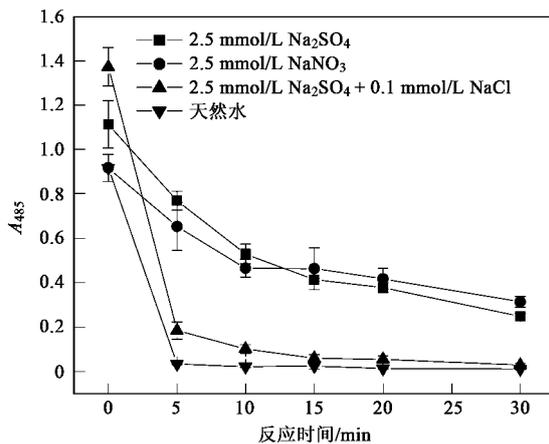


图5 不同电解质对脱氢酶活性的影响

Fig. 5 Effects of electrolyte on the dehydrogenase activity

2.3 电解质浓度对电氧化杀藻的影响

图7为 Na_2SO_4 电解质浓度对电氧化杀藻效果的影响,结果显示,电解液浓度对杀藻效果存在一定的影响,但当电解液浓度上升至 10 mmol/L 以上,电解液的浓度对杀藻效果影响很小.对于控制样,不同浓度电解质条件下的中性红染色率变化很小,但是脱氢酶活性却有所变化,随电解质浓度升高而降低,但当电解质浓度升高至 10 mmol/L 时,脱氢酶活性

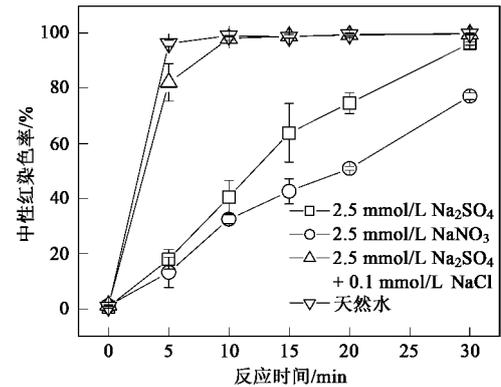


图6 不同电解质对中性红染色率的影响

Fig. 6 Effects of electrolyte on the neutral red staining

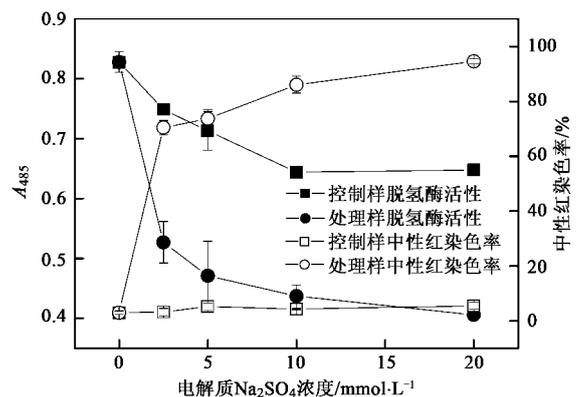


图7 电解质浓度对电氧化杀藻效果的影响

Fig. 7 Effects of electrolyte concentration on the algal inactivation

不再下降.由于酶活性对环境变化非常敏感,所以比中性红染色率更能反映出藻细胞活性的细微变化.

电氧化消毒的机制主要包括 2 个方面,一个是电极表面的直接氧化作用,即细胞与电极直接接触而发生的细胞与电极之间的电子交换,导致细胞失去活性;另一个是电化学反应过程中产生的氧化性物质,如自由氯、二氧化氯、双氧水、臭氧和其他寿命很短的自由基等起的作用^[2].可以看出,溶液中的氯化物,即使只有 0.1 mmol/L,也能极大地提高电氧化杀藻效果.氯化物是自然水体中常见的物质,即使在普通的石墨电极下了也能生成自由氯和活性氯^[15],而且研究也发现电氧化氯消毒比普通氯消毒的效果要好 10%~20%^[1].硫酸盐、碳酸盐和磷酸盐会在电化学反应中生成过氧化物,也可以起到氧化消毒作用^[5],但从本研究中可以看出,虽然溶液中硫酸盐浓度不断增加,但杀藻效果并没有随之增大,说明生成的过硫酸盐的消毒能力有限,当溶液中不含氯化物时,此时的杀藻效果主要源于电氧化中

生成的自由基和其他氧化性物质,研究表明,以 Ti/RuO_2 作为阳极能够产生大量的自由基^[16].

2.4 藻液初始浓度对电氧化杀藻的影响

一般认为水体中藻的细胞密度达到 10^7 个/L 时,是水华出现的阈值,水华暴发时局部区域细胞密度可高达 $10^8 \sim 10^9$ 个/L. 为了解初始藻样细胞密度对电氧化处理效果的影响,将 $4.4 \times 10^7 \sim 3.2 \times 10^9$ 个/L 的 7 个藻样配置于天然水中,电氧化处理 1 min, 然后测定脱氢酶活性降低率和中性红染色率. 脱氢酶活性降低率是指处理后藻样的脱氢酶活性相比处理前所降低的百分比例.

结果如图 8 所示,中性红染色率和脱氢酶活性降低率的变化趋势非常相似,当初始藻细胞密度升高后,电氧化杀藻效果急剧下降. 当初始细胞密度为 4.4×10^7 个/L 时,脱氢酶活性降低率和中性红染色率分别为 76% 和 98%,说明绝大部分藻细胞已完成被灭活. 在细胞密度 $< 7.4 \times 10^8$ 个/L 时,电氧化都能获得较好地杀藻效果,中性红染色率在 64% 以上,脱氢酶降低率在 68% 以上,但当细胞密度增大到 1.8×10^9 个/L 时,杀藻效果明显降低,脱氢酶降低率和中性红染色率分别为 39% 和 28%. 实验结果表明初始藻细胞密度对电氧化杀藻影响较大,不过当水中藻细胞密度处于水华的 10^7 个/L 时,电氧化可以在短时间内取得很好的杀藻效果.

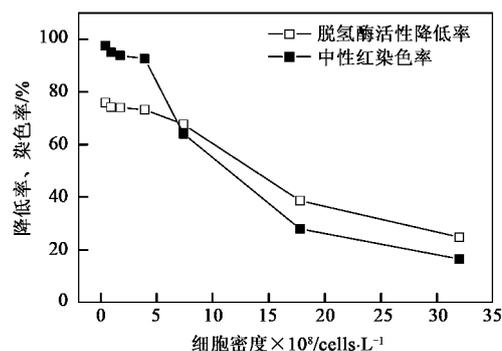


图 8 初始藻细胞密度对电氧化杀藻的影响

Fig. 8 Effects of initial cell density on the algal inactivation

2.5 电氧化处理前后藻细胞 SEM 形貌观察

采用 SEM, 对 2.1 中在 $2.5 \text{ mmol/L Na}_2\text{SO}_4$ 电解液中处理前后的藻样进行形貌观察. 结果如图 9 所示. 可以看出, 处理前的藻细胞饱满, 细胞壁完整, 细胞外有一些细胞分泌物, 由于所培养藻样不是很纯, 其中还杂有少量细菌. 处理 10 min 后, 藻细胞已出现明显破损, 虽然有的细胞膜或细胞壁还保留着, 但细胞内的物质已经流失, 正因为细胞的破损, 才使中性红染色剂能进入细胞并充满整个细胞. 处理 30 min 后, 藻细胞破损非常严重, 有的细胞已经破裂成为碎片, 由此说明电氧化破坏了藻细胞的外形和结构, 这是导致藻细胞失去活性并死亡的重要原因.

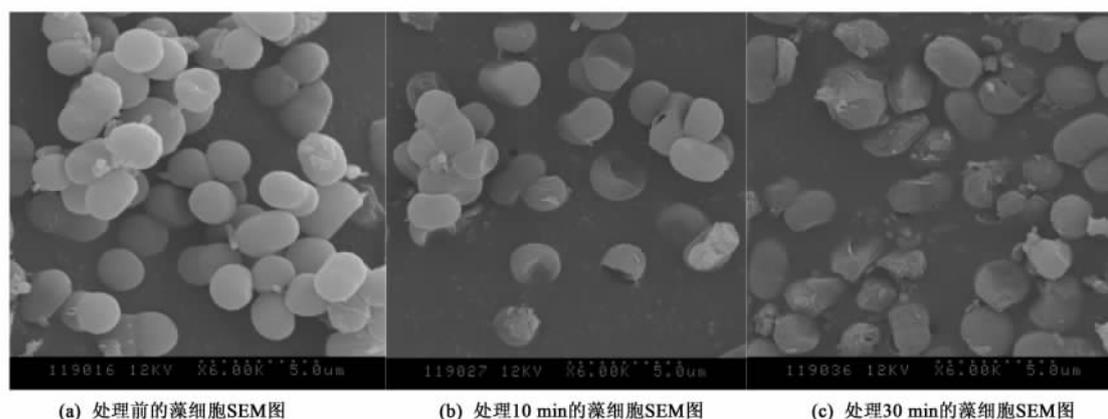


图 9 电氧化处理前后藻细胞的 SEM 图

Fig. 9 SEM for algae before and after electrochemical treatment

3 结论

(1) 在杀藻研究中, 藻细胞活性指标比藻细胞密度生物量的指标更能准确反映出杀藻效果. 藻细胞 TTC-脱氢酶活性和中性红染色率这 2 个活性检测指标均能很好地用于电氧化杀藻效果的评价.

(2) 电氧化杀藻中, 电解液种类对杀藻影响较大, 当水中含有少量氯化物时, 能迅速将藻细胞灭活. 对于含有氯化物的天然水样, 无需加入其他物质, 就可以将藻细胞全部杀死. 硫酸钠作为电解质, 其浓度对杀藻效果影响较小.

(3) 藻样初始浓度对电氧化杀藻影响较大, 当

藻细胞密度接近水华阈值,即为 10^7 个/L 时,采用天然水作为电解液,只需 1 min 就可以完全灭活藻细胞. 采用 Ti/RuO₂ 阳极和不锈钢阴极的电氧化系统可以实现很好的杀藻效果.

参考文献:

- [1] Li X Y, Diao H F, Fan F X J, *et al.* Electrochemical wastewater disinfection: Identification of its principal germicidal actions [J]. *J Environl Eng*,2004,**130**(10):1217-1221.
- [2] Delaet Y, Daneels A, Declerck P, *et al.* The impact of electrochemical disinfection on *Escherichia coli* and *Legionella pneumophila* in tap water [J]. *Microbiol Res*,2008,**163**(2):192-199.
- [3] Abderrahmane S, Himour A, Ponsonnet L. Inactivation of *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by electrochlorination under bipolar pulsed polarization [J]. *Mater Sci Eng C*,2008,**28**(5-6):901-905.
- [4] Särkkä H, Vepsäläinen M, Pulliainen M, *et al.* Electrochemical inactivation of paper mill bacteria with mixed metal oxide electrode [J]. *J Hazard Mater*, 2008, **156**(1-3): 208-213.
- [5] Martínez-Huitle C A, Brillas E. Electrochemical alternatives for drinking water disinfection [J]. *Angew Chem Int Ed*,2008,**47**(11):1998-2005.
- [6] Liang W, Qu J, Chen L, *et al.* Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by continuous electrochemical cycling process in tube using Ti/RuO₂ electrodes [J]. *Environ Sci Technol*,2005,**39**(12):4633-4639.
- [7] Xu Y, Yang J, Qu M, *et al.* Study of *Microcystis aeruginosa* inhibition by electrochemical method [J]. *Biochem Eng J*,2007,**36**(3):215-220.
- [8] Kimbrough D E, Suffet I H. Electrochemical removal of bromide and reduction of THM formation potential in drinking water [J]. *Water Res*,2002,**36**(19):4902-4906.
- [9] Duncan D R, Widholm J M. Osmotic induced stimulation of the reduction of the viability dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by maize roots and callus cultures [J]. *J Plant Physiol*,2004,**161**(4):397-403.
- [10] Steponkus P L, Lanphear F. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury [J]. *Plant Physiol*,1967,**42**:1423-1426.
- [11] Towill L E, Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures [J]. *Can J Bot*,1974,**53**:1097-1102.
- [12] Chang W C, Chen M H, Lee T M. 2,3,5-triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulsa fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress [J]. *Bot Bull Acad Sinica*,1999,**40**:207-212.
- [13] 沈玉娟,常正山,张永年. 旋毛虫死活快速鉴别的实验研究 [J]. *中国兽医寄生虫病*,2003,**11**(4):21-22.
- [14] 刘华. 悬浮培养红豆杉细胞活力及存活率与生长周期的关系 [J]. *生物学杂志*,2002,**18**(1):19-20.
- [15] Palmas S, Polcaro A M, Vacca A, *et al.* Influence of the operating conditions on the electrochemical disinfection process of natural waters at BDD electrodes [J]. *J Appl Electrochem*, 2007,**37**(11):1357-1365.
- [16] Diao H F, Li X Y, Gu J D, *et al.* Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction [J]. *Process Biochem*,2004,**39**(11):1-6.