# 强化固定化 Methylibium petroleiphilum PM1 细胞降解 MTBE 及动力学特性分析

成卓韦<sup>1</sup>,傅凌霄<sup>1</sup>,蒋轶锋<sup>1\*</sup>,陈建孟<sup>1</sup>,张荣<sup>2</sup>

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院,杭州 310032;2. 浙江天蓝环保技术有限公司,杭州 311202)

摘要:采用海藻酸钙包埋固定化高效降解菌 Methylobium petroleiphilum PM1 降解水相中的甲基叔丁基醚(MTBE),考察了不同 强化方法对凝胶颗粒机械强度和降解活性的影响. 响应面结果表明,交联剂和培养基中 Ca<sup>2+</sup>浓度分别为 0.2 mol·L<sup>-1</sup>和 1.38 mmol·L<sup>-1</sup>,化学交联剂聚乙烯亚胺(PEI)浓度为 0.1%时,强化固定化细胞具有较高的降解活性. 在此条件下,凝胶颗粒在 24 h 内机械破碎率仅为 5.98%,并能连续使用 400 h 以上,未出现颗粒溶解破碎现象,降解速率较为稳定. 扫描电镜观察, PEI 处 理后的凝胶颗粒表面形成一层薄膜,能有效防止细胞泄漏,并能维持 PM1 细胞良好的生长繁殖. 动力学分析表明,降解的限 速步骤为生化反应,直径 3 mm 凝胶颗粒对底物的扩散限制最弱;而高浓度的 PEI 能引起严重的扩散限制现象.

关键词:MTBE;强化固定化细胞;响应面;使用批次;降解动力学

中图分类号:X703.1 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)05-1511-07

# Biodegradation of Methyl *tert*-Butyl Ether by Stabilized Immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1 Cells and Its Biodegradation Kinetics Analysis

CHENG Zhuo-wei<sup>1</sup>, FU Ling-xiao<sup>1</sup>, JIANG Yi-feng<sup>1</sup>, CHEN Jian-meng<sup>1</sup>, ZHANG Rong<sup>2</sup>

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China; 2. Zhejiang Tianlan Environmental Protection Technology Co. Ltd., Hangzhou 311202, China)

Abstract: *Methylibium petroleiphilum* PM1, which is capable of degrading methyl *tert*-butyl ether (MTBE), was immobilized in calcium alginate gel beads. Several methods were explored to increase the strength of these gel beads. The central composite design analysis indicated that the introduction of  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  into the crosslinking solution, 1. 38 mmol $\cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$  into the growth medium and 0. 1% polyethyleneimine (PEI) as the chemical crosslinking agent could increase the stability of the Ca-alginate gel beads with no loss of biodegradation activity. The stabilized immobilized cells could be used 400 h continuously with no breakage and no bioactivity loss. Examination of scanning electron microscope demonstrated that a membrane surrounding the gel beads was formed and the cells could grow and breed well in the stabilized calcium alginate gel beads. Kinetic analysis of the gel bead-degradation indicated that the rate-limiting step was biochemical process instead of intraparticle diffusion process. The diameter of 3 mm affected the biodegradability less while high concentration of PEI induced much more serious mass transfer restraint.

Key words: methyl tert-butyl ether (MTBE); stabilized immobilized cells; response surface methodology; batches; biodegradation kinetics

微生物固定化技术是 20 世纪 80 年代兴起的一 项生物技术,与传统的生物技术相比,具有单位空间 微生物浓度高、抗环境冲击能力强(pH、温度、有机 溶剂、有毒物质等)、启动迅速等特点,目前广泛应 用于废水处理领域<sup>[1-3]</sup>.海藻酸钙低毒、价格低廉、 成球过程简便,因此常被选为包埋剂固定化细 胞<sup>[4,5]</sup>.由于一般废水或培养基中含有大量的 NH<sup>4</sup><sub>4</sub>、Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>等阳离子,这些离子会和海藻酸钙 凝胶颗粒表面的 Ca<sup>2+</sup>发生离子交换,从而使凝胶颗 粒机械强度下降引起颗粒破碎,细胞流失等现象,制 约了 这项技术在实际中的应用<sup>[6]</sup>. Wang<sup>[7]</sup>和 Calik<sup>[8]</sup>等运用化学交联、添加 Ca<sup>2+</sup>浓度等方法提高 了海藻酸钙凝胶颗粒的机械强度,从而使固定化细 胞的使用寿命得到了延长.

笔者在海藻酸钙固定化 Methylibium petroleiphilum PM1 降解 MTBE 的研究基础上<sup>[9,10]</sup>, 针对凝胶颗粒机械强度较差、使用寿命较短等问题, 利用改变交联剂和培养基中 Ca<sup>2+</sup>浓度、化学交联剂 处理等方法对凝胶颗粒的机械强度进行改善,采用 响应面法得出最佳强化条件;通过扫描电镜观察凝 胶颗粒的微观结构,同时对降解过程进行动力学分 析,以期为工程应用提供理论基础.

- 基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAE58B07);浙江省重点创新团队项目(R5090230)
- 作者简介:成卓韦(1982~),男,博士研究生,主要研究方向为大气 污染控制和典型污染物的生物处理技术, E-mail: c82z09w12@126.com
  - \* 通讯联系人, E-mail:jyf@ zjut. edu. cn

收稿日期:2010-05-13;修订日期:2010-09-28

#### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种和培养基

采用的菌种是 Methylibium petroleiphilum PM1, 由美国加州大学戴维斯分校的研究者从洛杉矶污水 处理厂的堆肥床上筛选而来. 生长培养基(MM)参 照文献[11]并加以改良,其组成为(g·L<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.7, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.85, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.23, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.46, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.03, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001.5 mL 微量元素母液(mg·L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 60, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 40, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 6, NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 6, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 4, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2, pH 7.0. 培养基灭菌后,接种生物量(cells)为 0.2 g· L<sup>-1</sup>的菌液, MTBE 的初始浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup>.

1.2 固定化细胞制备及化学交联剂强化处理

将 PM1 菌液在 4℃条件下以9 000 r·min<sup>-1</sup>离 心,用生理盐水洗涤 2 次,获得的细菌细胞悬浮液 (2.628 g·L<sup>-1</sup>)按 1:1 的比例加入到 4% 的海藻酸 钠溶液中,充分搅拌混匀,将其滴入到 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 CaCl<sub>2</sub>溶液中,静置固化 2 h 后,形成大小均匀的 固定化凝胶小球,用生理盐水洗净后 4℃保存备用.

分别称取制得的海藻酸钙固定化细胞若干份, 每份湿重4g.采用聚乙烯亚胺(PEI)单独处理、戊 二醛(GA)单独处理和 PEI-GA 联合处理3种方式 对其进行化学交联处理.将处理后的固定化凝胶颗 粒分别置于50 mg·L<sup>-1</sup> MTBE 的模拟废水中,密封, 在 30℃、摇床转速为160 r·min<sup>-1</sup>的条件下,振荡培 养 0、2、4、6、8、10 h,检测液相中 MTBE 的残留量.

1.3 响应面法确定最佳强化条件

以培养液中 Ca<sup>2+</sup>浓度、交联剂中 Ca<sup>2+</sup>的浓度和 PEI 浓度三因素为自变量, MTBE 的降解速率为响应 值进行三因素三水平的 Box-Behnken 响应面方法设 计(表1).具体操作为:将不同条件下(交联剂中 Ca<sup>2+</sup>为0.1、0.3和0.5 mol·L<sup>-1</sup>; PEI 浓度为0.0%、 0.2%和0.4%)制备的海藻酸钙固定化细胞(生物 量相同)分别置于 50 mg·L<sup>-1</sup> MTBE 的模拟废水中 (其中 Ca<sup>2+</sup>为0,2和4 mmol·L<sup>-1</sup>),密封,在 30°C、 摇床转速为 160 r·min<sup>-1</sup>的条件下,振荡培养6h,检 测液相中 MTBE 的残留量.根据响应值,利用 SAS 软件进行分析,得到二次多元回归方程,求解方程得 到响应值最大时所对应的各因素最优组合,从而获 得最佳强化条件.

#### 1.4 强化固定化细胞使用批次考察

将含相同生物量的未强化固定化细胞和经最优

条件强化的固定化细胞分别置于 50 mg·L<sup>-1</sup>MTBE 的模拟废水中,密封,在 30℃、摇床转速为 160 r·min<sup>-1</sup>的条件下,振荡培养 6 h,检测液相中 MTBE 的残留量.之后更换新鲜的模拟废水,重复上述操 作.分别以平均降解速率和使用批次为衡量指标, 验证二次模型的可靠性及最佳强化条件的准确性.

表 1 Box-Behnken 实验设计因素及水平

Table 1 Experimental factors and	levels of Box-Behnken design
----------------------------------	------------------------------

田妻	佐旦	水平		
四条	11.2	- 1	0	+ 1
培养液中 Ca <sup>2+</sup> /mmol·L <sup>-1</sup>	X <sub>1</sub>	0	2	4
交联剂中 Ca <sup>2+</sup> /mol·L <sup>-1</sup>	$\mathbf{X}_2$	0.1	0.3	0.5
PEI浓度/%	X <sub>3</sub>	0.0	0.2	0.4

#### 1.5 固定化细胞降解动力学分析

#### 1.5.1 模型描述

有机物的生物降解包括 2 个基本过程:质量传 递和生化反应.在海藻酸钙凝胶颗粒中,这 2 种现 象同时存在,生物降解的总速率主要取决于控速步 骤的速率.基于下列假设,进行降解动力学模型推 导<sup>[12]</sup>:①微生物平均分布在球形凝胶颗粒中;②体 系中不存在自由细胞;③凝胶颗粒内外不存在基质 的分界面;④整个过程处于稳态.

根据 Fick 定理, 假设扩散速率和降解速率相等, 得到:

$$\frac{3\ 600}{1\ 000} \frac{D_{\rm e}}{\rho_{\rm p}} \left[ \frac{d^2c}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dc}{dr} \right] = v \tag{1}$$

式中,v 为实际的生物降解速率[MTBE/(细胞干重・ 时间), mg·(g·h)<sup>-1</sup>];c 为 MTBE 在凝胶颗粒中的 浓度(mg·L<sup>-1</sup>);r 为凝胶颗粒半径(cm); $D_e$  为 MTBE 在凝胶颗粒中的有效扩散率(cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>); $\rho_p$  为 细胞浓度(g·cm<sup>-3</sup>).

在底物浓度较低时生物降解遵循动力学第一定 律,即:

$$v = kc \tag{2}$$

式中,*k*为生物降解第一速率常数[底物/(细胞干重 •时间),cm<sup>3</sup>·(g·h)<sup>-1</sup>].将方程(2)代入方程(1), 并利用边界条件,解析得到:

$$\frac{c}{c_{\rm s}} = \frac{\sinh(\Phi r/R)}{(r/R)\sinh\Phi}$$
(3)

其中 
$$\Phi = R \sqrt{\frac{k'}{D_e}}$$
 (4)

$$k' = k\rho_{\rm p} \frac{1\,000}{3\,600} \tag{5}$$

式中, $\phi$ 为无量纲常数(Thiele 系数),k'为反应速率

常数(s<sup>-1</sup>).

最后引入有效因数(η,Thiele 系数的函数),它是 衡量扩散作用的因子,为实际反应速率(存在扩散限 制)与理想反应速率(不存在扩散限制)的比值:

$$\eta = \frac{3}{\Phi} \left( \frac{1}{\tanh \Phi} - \frac{1}{\Phi} \right) \tag{6}$$

当 Φ 值趋于 0 时,η 趋于 1.0,此时扩散限制对 于降解速率没有影响,控速步骤是生化反应;当 Φ 值很大时,扩散限制对于降解速率有较大的影响,控 速步骤是扩散限制<sup>[13,14]</sup>.

1.5.2 实验方法

将含相同生物量但颗粒直径不同的固定化细胞 (*d*分别为 0.2、0.3、0.4 和 0.5 cm),或经不同 PEI 浓度处理(0%、0.2% 和 0.4%)的强化固定化细胞 分别置于 50 mg·L<sup>-1</sup> MTBE 的模拟废水中,密封,在 30℃、摇床转速为 160 r·min<sup>-1</sup> 的条件下,振荡不同 的时间,检测液相中 MTBE 的残留量.同时以含有 相同生物量的自由细胞为对照,测得无扩散作用下 的降解速率.实验过程中每组考察因素做 3 个平行 样,其降解速率取三者平均值.

1.6 分析方法

1.6.1 MTBE 分析

采用气相色谱(Agilent 6890N)对水相中残留的 MTBE 进行分析. 色谱柱为 HP-Innowax 毛细管柱 (30 m×0.32 mm×0.5  $\mu$ m),程序升温:80℃保留 4 min,30 ℃·min<sup>-1</sup>升高到 160℃. 载气为氮气,柱流 速1 mL·min<sup>-1</sup>,分流比 1:2. 汽化室和检测器(FID) 温度分别为 250℃和 300℃.

1.6.2 环境扫描电镜分析

将包埋强化固定化细胞用生理盐水洗涤 3 次后,用 2.5%的戊二醛浸泡交联 10 min.将颗粒浸泡 在 40%、60%、80%、100%的乙醇溶液中各脱水 20 min,脱水后迅速液氮冷冻干燥,放入真空喷镀仪,抽 真空 2 h,再喷镀金 5 min,在荷兰 Philips 公司的 XL30 型环境扫描电镜下观察.

1.6.3 载体结构特性分析

将强化固定化凝胶颗粒用生理盐水洗涤 3 次后,真空干燥(SALVIS,瑞士)24 h 去除水分后,采用 全 自 动 比 表 面 分 析 仪 (Micromeritics ASAP2020M + C,美国)测定凝胶颗粒的比表面积和 孔径.

#### 2 结果与讨论

2.1 最佳强化条件考察

#### 2.1.1 化学交联剂处理

图 1 是化学交联处理后的固定化细胞降解 50 mg·L<sup>-1</sup> MTBE 的过程曲线. 经 PEI 处理后的固定化 细胞平均降解速率稍慢于未处理的固定化细胞,但 经 GA 单独处理或是 GA-PEI 联合处理的固定化细胞,其降解过程受到了严重的抑制,在 10 h 内几乎 无法降解液相中的 MTBE. Calik 等<sup>[8]</sup>利用 PEI-GA 联合处理海藻酸钙固定化细胞,凝胶颗粒在保持生物活性的前提下具有更高的机械强度. 在本研究中,固定化细胞经过 GA 单独或 GA-PEI 交联处理后,细胞几乎没有生物降解活性,这可能是由于 GA 对 PM1 细胞产生毒性或在降解过程中引起的严重 传质问题. 与未经强化的固定化细胞相比,PEI 单 独处理的方法在本研究中是可行的,平均降解速率 只下降了 11.82%.



treated with different chemical agents

#### 2.1.2 响应面法优化强化条件

以平均降解速率为目标响应值,因素优化实验 结果和模型预测值如表2所示.利用 SAS 软件对实 验数据进行多元回归拟合,所得的回归方程为:

 $lg(Y) = 0.814125 + 0.027149 \times X_1$ 

+ 0. 327 472 × 
$$X_2$$
 + 0. 284 411 ×  $X_3$   
- 0. 006 97 ×  $X_1$  ×  $X_1$  - 0. 036 34 ×  $X_3$ 

 $\times X_2 - 0.080098 \times X_1 \times X_3$ 

$$-0.705434 \times X_2 \times X_2 - 0.516952$$

 $\times X_2 \times X_3 - 3.241523 \times X_3 \times X_3$ 

式中,Y为降解速率[mg·(L·h)<sup>-1</sup>]; $X_1$ 为培养基中 Ca<sup>2+</sup>浓度(mmol·L<sup>-1</sup>); $X_2$ 为交联剂中 Ca<sup>2+</sup>浓度 (mol·L<sup>-1</sup>); $X_3$ 为化学交联剂 PEI 的浓度(%).模 型相关系数  $R^2 = 99.75\%$ ,说明该模型预测值与实验值具有很好的相关性. 根据 p < 0.05 时,影响效应显著;p < 0.01 时,影响效应非常显著,对响应面误差分析表中(表3)的数据进行判定,可以得出,单独因素  $A \setminus B$  和  $C \setminus mm$ 因素  $A \subset BC$  和 CC 对平均降解速率非常显著,其余因素为一般显著. 对上述多元回归方程作响应曲面,可以直观地得到各个因素对于降解速率的影响(图 2).

表 2 设计实验响应值及预测值

Table 2	2 Actual and predicted degradation rate by RSM				
灾心护旦	因素水平		实测值	预测值	
头涎痈 与 -	$X_1$	$X_2$	$X_3$	/mg·(L·h) $^{-1}$	/mg·(L·h) <sup>-1</sup>
1	0	0.1	0	7.01	6.92
2	0	0.1	0.4	2.46	2.60
3	0	0.5	0	6.06	6.33
4	0	0.5	0.4	1.98	1.96
5	4	0.1	0	6.38	6.64
6	4	0.1	0.4	1.88	1.86
7	4	0.5	0	5.43	5.32
8	4	0.5	0.4	1.18	1.23
9	0	0.3	0.2	5.47	5.56
10	4	0.3	0.2	4.19	4.31
11	2	0.1	0.2	5.41	5.54
12	2	0.5	0.2	4.23	4.32
13	2	0.3	0	6.65	7.14
14	2	0.3	0.4	2.17	2.10
15 ~ 20	2	0.3	0.2	5.07 ~ 5.1	7 5.22

表 3 响应面误差分析

Table 3	Anarysi	s of variance	or response surfac	e
影响因素	自由度	均方差	F	р
A 培养液中 Ca <sup>2+</sup>	1	0.158	132. 238 7	0.0001
B 交联剂中 Ca <sup>2+</sup>	1	0.153	127.8024	0.0001
C PEI 浓度	1	3.640916	3 047. 23	0.0001
$A \times A$	1	0.0110	9.241 52	0.012463
$A \times B$	1	0.008 731	7.30767	0.022188
$A \times C$	1	0.042 418	35. 501 26	0.00014
$B \times B$	1	0.01131	9.46575	0.0117
$B \times C$	1	0.0176 69	14.78766	0.003 296
$C \times C$	1	0.238 806	199.8666	0.0001
模型	9	4.74508	441.2612	0.0001

交联剂中 Ca<sup>2+</sup>浓度对于凝胶颗粒的降解速率 和机械强度影响很大,这是由于 Ca<sup>2+</sup>浓度越大,所 形成的凝胶颗粒层一方面会限制 MTBE 扩散进入凝 胶颗粒内部,而另一方面又会使凝胶颗粒的机械强 度大幅提高,两者之间势必会存在一个平衡点.值 得注意的是,当 Ca<sup>2+</sup>浓度过大时,凝胶颗粒会随着 使用时间的增加迅速膨胀而破碎(Ca<sup>2+</sup>浓度为 0.1、 0.3 和 0.5 mol·L<sup>-1</sup>时,破碎率分别为 20%、5% 和 52.5%),这对于凝胶颗粒的实际应用是不利的.



(a) 交联剂和培养基中Ca2+



(b) PEI和交联剂中Ca<sup>2+</sup>



图 2 三因素交互影响降解效率的三维响应面图 Fig. 2 Three-dimensional curved surfaces of the effect of three variables on the MTBE biodegradation rate

Wang 等<sup>[7]</sup>研究指出,增加外界培养基中  $Ca^{2+}$ 浓度,可以阻止凝胶颗粒表面的  $Ca^{2+}$ 和外界体系中的金属离子或  $PO_4^{3-}$ 等离子交换结合,从而提高固定化 细胞的稳定性.图 2(a)是溶液和交联剂中  $Ca^{2+}$ 浓

度对平均降解速率的响应曲面图.两者对于降解速 率共同的影响是随着 Ca<sup>2+</sup>浓度的增大而先增大后 减小,这种趋势与 Ca<sup>2+</sup>浓度对于破碎率的影响趋势 是一致的(数据略).图2(b)和图2(c)分别是交联 剂中 Ca<sup>2+</sup>和 PEI 浓度、培养基中 Ca<sup>2+</sup>和 PEI 浓度对 于平均降解速率的响应曲面图.当 PEI 浓度从0增 加至 0.1%时,降解速率变化程度不大,提高 Ca<sup>2+</sup>浓 度可以部分抵消 PEI 对于降解速率的影响;但当 PEI 浓度增加至 0.4%,降解速率变化程度很大,即 使提高 Ca<sup>2+</sup>也无法弥补 PEI 带来的影响.因此,PEI 浓度适当,不仅不会对细胞活性造成很大的影响,而 且还会改善固定化凝胶颗粒的机械强度.

对多元回归方程进行偏导求解,得出最佳强化 条件为:交联剂 Ca<sup>2+</sup>浓度 0.2 mol·L<sup>-1</sup>,培养基 Ca<sup>2+</sup> 浓度 1.38 mmol·L<sup>-1</sup>和 PEI 浓度为 0.1%. 对回归方 程进行实验验证,设计及结果如表 4 所示. 可以看 出,实际测定的降解速率与预测的降解速率的误差 均在 2% 内,说明多元回归方程能较准确地预测平 均降解速率.

Table 4 Experiment design and results of validation of model							
实验		因素水平		实测值	预测值		
编号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$/\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$	/mg $\boldsymbol{\cdot}(L \boldsymbol{\cdot}h)^{-1}$		
1	1.38	0.2	0.1	$7.01 \pm 0.02$	6.92		
2	1.5	0.2	0.1	6.75 $\pm 0.04$	6.81		
3	1.4	0.4	0	$6.90 \pm 0.02$	6.86		
4	1.4	0	0.2	$5.62 \pm 0.02$	5.54		

#### 2.2 强化固定化细胞稳定性考察

实验选择了机械强度和使用寿命作为衡量固定 化细胞瞬时稳定性和长期稳定性的指标. 机械强度 采用 Mosbach 等<sup>[15]</sup>提出的方法并加以改良,利用颗 粒之间的摩擦撞击作用来测试凝胶颗粒对瞬时外力 的抵抗能力,定量表征了外力冲击(如水力剪切力 等) 对凝胶颗粒的影响. 分别取 100 颗 PEI 处理前 后的固定化凝胶颗粒与50颗相同直径的玻璃珠混 合均匀,置于 170 r·min<sup>-1</sup>的摇床振荡,每隔 12 h 测 定破碎率,测试结果以百分数表示(表5). 经 PEI 处理后固定化凝胶颗粒的机械强度明显得到提高, 36 h 时破碎率只有 20.27%, 而此时普通的凝胶颗 粒几乎完全破碎.使用寿命实验表明(图3),经PEI 强化后,凝胶颗粒的使用时间达到400h以上(约50 批),并且未出现破碎现象,而未强化的凝胶颗粒, 使用23批后就出现颗粒破碎,生物降解活性大幅下 降,当使用批次达到 29 批时,降解速率只有 0.44 mg·(L·h)<sup>-1</sup>,表明通过改变交联剂和培养基中的 Ca<sup>2+</sup>浓度,并结合 PEI 处理是切实可行的. PEI 分子 能和藻酸盐交联形成一层碱性膜,PEI 分子中的氨 基能与蛋白质分子中的羧基形成肽键,把细胞牢固 地结合在 PEI 分子周围,提高了凝胶颗粒对瞬时外 力的抵抗能力,机械强度和使用寿命均得以改善. 实验室设计了上流式固定床反应器,并采用强化的 固定化细胞作为载体填料,处理低浓度的 MTBE 模 拟废水,反应器能稳定运行 50 d 以上,并未出现凝 胶颗粒破碎现象<sup>[16]</sup>.因此,本强化方法可以较好地 长期保持颗粒完整性,具有一定实际应用价值.

表 5 凝胶颗粒破碎率测试

Table 5 Breakage test of the gel beads						
田宁化海脑颗粒	破碎率/%					
回足化炭放积粒	12 h	24 h	36 h	48 h		
未经强化处理	19.24	50.94	100	100		
经强化处理	1.14	5.98	20. 27	43.78		



and stabilized gel beads

#### 2.3 PEI 处理前后微观结构分析

利用环境扫描电镜对 PEI 处理前后的固定化凝 胶颗粒表面进行结构分析,结果如图 4 所示. 经过 PEI 处理后,凝胶颗粒表面形成了一层由带正电的 氨基基团和带负电的藻酸盐基团交联形成的薄 膜<sup>[17]</sup>,这层薄膜能够使颗粒表面的 Ca<sup>2+</sup>更加紧密 地互相结合在一起,降低了其与培养基中的 K<sup>+</sup>、 Mg<sup>2+</sup>等阳离子的交换或者与 PO<sub>4</sub><sup>-</sup>等阴离子结合的 几率,提高了固定化凝胶颗粒的机械强度. 在未经 处理的固定化凝胶颗粒表面,Ca<sup>2+</sup>松散地分布,虽然 它们之间的空隙能够增强溶解氧、底物向凝胶颗粒 内部传递的几率,但同时也增加了细胞向外泄漏的 机会,同时 Ca<sup>2+</sup>也较容易和培养基中相应的离子进 行交换或结合,从而使得固定化凝胶颗粒的机械强 度下降.采用平板菌落计数法对降解前后固定化颗 粒中细胞增殖情况进行考察.计数平板 30℃培养 72 h 后,降解前后的细胞数目分别是 8.0×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>和 1.7×10°CFU·mL<sup>-1</sup>,增加了 1 倍,说 明了 PM1 能在 PEI 处理过的固定化颗粒内部生长 良好.凝胶颗粒比表面分析表明,普通凝胶颗粒和 强化凝胶颗粒的比表面积和孔径分别为1.89 cm<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>、430 nm和1.53 cm<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>、270 nm,降解10 批次后两者的平均孔径分别上升至2000 nm和500 nm. 一般单个微生物的大小为1~5 μm,凝胶颗粒 的孔径越大表明微生物越易泄漏.孔径测试结果说 明,强化凝胶颗粒在降解过程中能有效地防止自身 溶胀,平均孔径增大幅度有限,有利于维持凝胶颗粒 内生物量.因此以上实验数据表明,PEI在改善凝 胶颗粒机械强度的同时,能有效防止细胞泄漏,同时 对细胞生物降解活性的影响并不明显.



(a) PEI处理

(b) PEI未处理

图 4 凝胶颗粒表面结构电镜扫描图 Fig. 4 SEM of the surface of the gel beads

### 2.4 降解动力学分析

## 2.4.1 颗粒直径影响

细胞对底物的降解速率主要有两部分:物质扩 散速率和生化反应速率,两者中较小值将决定最终 的降解速率.在固定化细胞降解过程中,物质的扩 散分为外扩散(底物从液相扩散至凝胶颗粒表面) 和内扩散(底物通过载体结构扩散至细胞表面).由 于降解实验是在摇床上进行,液相中良好的湍动抵 消了外扩散限制,因此可以只考虑底物的内扩散限 制.为了使固定化细胞表现出良好的生物活性,从 一定程度上"削弱"化学交联剂 PEI 引起的扩散抑 制效应,因此必须采取相应的措施从本质上控制内 扩散带来的影响. Cassidy 等<sup>[18]</sup>研究指出,通过改变 固定化颗粒直径可以改善溶解氧和底物的内扩散限 制.因此,分别制备了不同直径的固定化凝胶颗粒, 测定相应降解速率,并通过1.5.1节所描述的模型 进行计算拟合,得到相应动力学参数,结果如表6所 示. 直径为 0.2 cm 和 0.5 cm 的凝胶颗粒有效因数 (η)分别为0.888 和0.711,证实了颗粒直径对扩散 限制存在一定的影响;直径为 0.3 cm 的凝胶颗粒, 有效扩散率最大,表明溶解氧、底物和降解产物能够 最大限度地自由进出凝胶层,宏观表现为生物降解 速率较大.表6的数据还表明,不同颗粒直径的 Φ 值均小于5,扩散限制对于生物降解几乎没有影响, 控速步骤应是生物降解反应.

表6 不同颗粒直径对动力学参数的影响

Table 6	5 Effects of diamet	er on the v	alues of kinet	ic parameters
$d_{\rm p}/{ m cm}$	$V/mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$	η	Φ	$D_{\rm e} \times 10^4$ /cm <sup>2</sup> · s <sup>-1</sup>
0.2	7.16	0.888	1.41	2.00
0.3	6.97	0.872	1.53	3.72
0.4	6.18	0.773	2.23	2.76
0.5	5.69	0.711	2.69	2.73

#### 2.4.2 强化处理影响

2.4.1 节分析表明,直径为 0.3 cm 的凝胶颗粒 对底物的扩散限制作用最小,因此采用不同浓度的 PEI 处理直径为 0.3 cm 的凝胶颗粒,并和未处理的 凝胶颗粒进行比较,所得的计算结果如表 7 所示. PEI 的浓度对于有效因数 η、Thiele 系数 Φ 和有效扩 散率 *D*。的影响非常大,特别当 PEI 浓度较大(> 0.4%)时,Φ 值达到 11.02,大于临界值(5),从而使 扩散限制成为控速步骤.由于高浓度的 PEI 和藻酸 盐形成的碱膜十分缜密,严重限制了溶解氧、底物的 扩散,抑或高浓度的 PEI 抑制了细胞的活性,因此表 观降解速率下降了 72.3%.当 PEI 浓度为 0.2% 时,虽然扩散限制现象不可避免,但是颗粒直径却从 一定程度上"削弱"了这种限制效应,相应的Φ 值也 仅为 2.25(<5),表明此时的控速步骤仍为生化反 应.因此,结合实验结果和理论分析,该强化方法在 实际应用中是切实可行的.

表 7 PEI浓度对动力学参数的影响

 Table 7
 Effects of PEI concentrations on the values

of kinetic parameters						
PEI 浓度	V		đ	$D_e \times 10^4$		
/%	/mg $\boldsymbol{\cdot}$ ( L $\boldsymbol{\cdot}$ h ) $^{-1}$	η	Ψ	$/\mathrm{cm}^2$ · s <sup>-1</sup>		
0	7.16	0.888	1.41	2.00		
0.2	6.16	0.646	2.25	0.568		
0.4	1.98	0.248	11.02	0.094		

#### 3 结论

(1) 化学交联剂 PEI 能有效改善固定化凝胶颗 粒的机械强度,细胞活性没有大幅下降.通过响应面 实验设计分析得出最佳强化条件为:交联剂  $Ca^{2+}$ 浓度 0.2 mol·L<sup>-1</sup>,培养基  $Ca^{2+}$ 浓度 1.38 mmol·L<sup>-1</sup>, PEI 浓度为 0.1%.最佳强化条件下,固定化凝胶颗 粒的使用寿命达到 400 h 以上(约 50 批),未出现颗 粒破碎现象,平均降解速率为 6.85 mg·(L·h)<sup>-1</sup>.

(2)环境扫描电镜观察表明,经 PEI 处理后凝胶 颗粒表面形成一层能够使表面 Ca<sup>2+</sup>更加紧密地相互 结合在一起的薄膜,提高了固定化凝胶颗粒的机械强 度.PM1 细胞在凝胶颗粒内部生长情况良好,形成的 薄膜对细胞降解底物没有造成很大的影响.

(3)不同直径的固定化凝胶颗粒 Φ 值均小于 5,说明生化反应是降解过程的控速步骤,颗粒直径 为 0.3 cm 时扩散限制作用最小. PEI 浓度对 Φ 和 有效扩散系数影响较大,当 PEI 浓度 > 0.2% 时,扩 散限制现象严重.

#### 参考文献:

- [1] 余冬冬,金勇威,迟莉娜,等.包埋固定化微生物处理微污染原水的试验研究[J].中国给水排水,2008,24(13):85-88.
- [2] López A, Lázaro N, Morales S, et al. Nickel biosorption by free and immobilized cells of *Pseudomonas fluorescens* 4F39: A comparative study [J]. Water Air and Soil Pollution, 2002, 135(1-4): 157-172.
- [3] Suzuki T, Yamaguchi T, Ishida M, et al. Immobilization of

Prototheca zopfii in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons [J]. Process Biochemistry, 1998, **33**(5): 541-546.

- [4] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制 [M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [5] Naito M, Kawamoto T, Fujino K, et al. Long-term repeated biodesulfurization by immobilized Rhodococcus erythropolis KA2-5-1 cells [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(3): 374-378.
- [6] 郭建博,周集体,王栋,等.固定化蒽醌对偶氮染料生物降解 促进作用研究 [J].环境科学,2006,27(10):2071-2075.
- [7] Wang J L, Han L P, Shi H C, et al. Biodegradation of quinoline by gel immobilized Burkhol-deria sp. [J]. Chemosphere, 2001, 44(5): 1041-1046.
- [8] Calik G, Savasci H, Calik P, et al. Growth and κ-carrageenan immobilization of Pseudomonas dacunhae cells for L-alanine production [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24 (1-2): 67-74.
- [9] 成卓韦,陈东之,章晶晓,等.固定化优势菌 PM1 降解甲基 叔丁基醚 [J].中国环境科学,2007,27(6):781-785.
- [10] Chen D Z, Chen J M, Zhong W H, et al. Degradation of methyl tert-butyl ether by gel immobilized Methylibium petroleiphilum PM1 [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4702-4708.
- [11] Mu D Y, Scow K M. Effect of trichloroethylene (TCE) and toluene concentrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(7): 2661-2665.
- [12] Dursun A Y, Tepe O. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, **126**(1-3): 105-111.
- [13] Dursun A Y, Asku Z. Effect of internal diffusivity of ferrous
   (II) cyanide complex ions in Ca-alginate immobilized
   Pseudomonas fluorescens gel beads on biodegradation rate [J].
   Process Biochemistry, 2002, 37(7): 747-752.
- [14] Chung T P, Tseng H Y, Juang R S. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems [J]. Process Biochemistry, 2003, 38(10): 1497-1507.
- [15] Mosbach K. Immobilized enzymes and cells-Part B, Methods in enzymology [M]. New York: Academic Press, 1987.
- [16] Cheng Z W, Chen J M, Chen D Z, et al. Biodegradation of methyl tert-butyl ether in a bioreactor using immobilized Methylibium petroleiphilum PM1 cells [J]. Water Air and Soil Pollution, 2011, 214(1-4): 59-72.
- [17] Bahulekar R, Ayyangar N R, Ponrathnam S, et al. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1991, 13(11): 858-868.
- [18] Cassidy M B, Lee H, Trevors J T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1996, 16(1): 79-101.