

## 氯化铁和聚丙烯酰胺絮凝剂 WT652 对三角褐指藻的絮凝作用

陈春艳<sup>1,2</sup> 胡晗华<sup>2</sup> 王煜<sup>1,2</sup> 徐旭东<sup>2</sup>

(1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### FLOCCULATION OF *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* INDUCED BY FERRIC CHLORIDE AND POLYACRYLAMIDE FLOCCULANT WT652

CHEN Chun-Yan<sup>1,2</sup>, HU Han-Hua<sup>2</sup>, WANG Yu<sup>1,2</sup> and XU Xu-Dong<sup>2</sup>

(1. Life Science College, Huazhong Normal University, Wuhan 430079; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 三角褐指藻; 铁; AGEFLOC WT652; 絮凝

**Key words:** *Phaeodactylum tricornutum*; Ferric Chloride; AGEFLOC WT652; Flocculation

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0669-04

生物柴油是清洁的可再生能源, 是优质的石油柴油代用品, 但生物柴油产业受原料供给和成本的制约。硅藻富含油(占细胞干重 40%—60%)<sup>[1]</sup>, 且短链脂肪酸(C14 和 C16)占细胞中总脂肪酸的 67%—70%左右<sup>[2, 3]</sup>。三角褐指藻作为硅藻研究的模式种类之一, 细胞壁含硅较少, 利于破碎, 可作为优良的生物柴油生产原料。而且, 在世界许多地区已实现了对三角褐指藻的大规模开放养殖<sup>[4]</sup>。

然而, 藻细胞的采收技术是制约产业化规模的因素之一。目前常用的采收方法包括离心法、超滤法<sup>[5]</sup>、气浮法<sup>[6, 7]</sup>以及絮凝法<sup>[8, 9]</sup>等。离心法是实验室中常用的方法, 它能耗高, 且在离心过程中可引起细胞破碎, 造成产品损失; 超滤法的投资大, 操作费用高; 而气浮法需要的设备多、操作复杂。絮凝沉降分离法是指水溶液中的粒子在絮凝剂的作用下, 经由物理化学作用凝集形成较大颗粒从而从水中分离, 它是化工过程及废水处理操作中常用的分离悬浮物的方法。该法设备投资较少, 分离工艺较简单。絮凝技术的应用成功关键在于能否合理选用絮凝剂。通常絮凝剂按成分分为无机絮凝剂和有机絮凝剂。氯化铝、硫酸铜、硫酸锌、硫酸镁和氯化铁等已被应用到微藻的絮凝采收中<sup>[8, 9]</sup>, 这些无机低分子絮凝剂通常聚合速度慢、形成的絮状物小。有机高分子絮凝剂主要依靠架桥作

用使粒子快速沉降, 并可形成较大的絮凝团。本文研究了几种无机低分子絮凝剂在不同条件下对三角褐指藻的絮凝效率, 并最终优化了使用氯化铁和聚丙烯酰胺絮凝剂 AGEFLOC WT652 相结合对硅藻进行絮凝采收的条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种与培养

三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)由中国科学院海洋研究所提供。将少量对数生长期的藻细胞接入盛有 1.5 L f/2AW 液体培养基<sup>[10]</sup>的 2 L 三角瓶中, 通入过滤空气, 置于温度为 20°C、光强为 50  $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ 、连续光照的植物培养箱中培养。大量培养时, 将海水素(中国海洋大学通用海水素厂)按 33.3 g/L 加入自来水中配置 50 L 人工海水, 然后按 f/2 配方补加  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ 。

### 1.2 无机盐及 AGEFLOC WT652 诱导的絮凝

取 200 mL 生长至对数中期的藻液(约  $10^7$  cells/mL)置于 250 mL 烧杯中, 加入硫酸铜、硫酸锌、硫酸镁或氯化铁溶液, 使终浓度分别为 250、625 和 6250  $\mu\text{mol/L}$ , 或 0.05% 迈力清(AGEFLOC WT652, 上海友巴奥科环保科技有限公司)溶液, 使终浓度分别为 0.05、0.5 和 10 mg/L,

收稿日期: 2009-03-05; 修订日期: 2010-01-26

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(编号: KSCX2-YW-G-060)资助

作者简介: 陈春艳(1985—)女, 山西人; 研究生; 主要从事硅藻生产生物柴油的研究。E-mail: chunyanchen2008@yahoo.cn

通讯作者: 徐旭东, E-mail: xux@ihb.ac.cn

混匀, 静置 30min 后测定 5 种絮凝剂对藻液的絮凝效率。每组实验设定 3 个重复。

### 1.3 $\text{FeCl}_3$ 与 AGEFLOC WT652 共同诱导的絮凝

取 200 mL 对数生长中期的藻液(约  $10^7$  cells/mL)置于 250 mL 烧杯中, 设置两组实验, 一组只加入不同体积 0.01 mol/L 的  $\text{FeCl}_3$  溶液, 另一组加入不同体积 0.01 mol/L 的  $\text{FeCl}_3$  溶液与 0.05% 的 AGEFLOC WT652, 使得藻液中  $\text{Fe}^{3+}$  的终浓度为 40、62.5、125、250 和 500  $\mu\text{mol/L}$ , AGEFLOC WT652 的终浓度为 0.5 mg/L, 混匀, 静置 30min 后测定絮凝效率。实验重复 3 次, 照相时使用 200 mL 的细胞培养瓶。

### 1.4 絮凝条件的优化

为进一步确定絮凝所需的最适  $\text{FeCl}_3$  浓度, 取 200 mL 对数生长中期的藻液置于 250 mL 烧杯中, 在  $\text{FeCl}_3$  终浓度为 0—1 mmol/L 范围设定 9 个梯度, 加入  $\text{FeCl}_3$ , 再加入 0.05% 的 AGEFLOC WT652 至终浓度为 0.5 mg/L, 混匀, 静置 30min 后测定絮凝效率。实验重复 3 次。

将  $\text{FeCl}_3$  和 AGEFLOC WT652 加入不同细胞浓度 ( $10^6$ — $10^7$  cells/mL) 或预先调整好 pH (5—10) 的藻液中, 使终浓度分别为 250  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5 mg/L, 按以上方法测定絮凝效率, 以观察细胞密度和 pH 值对由  $\text{FeCl}_3$  和 AGEFLOC WT652 诱导的絮凝效率的影响。

### 1.5 絮凝效率的计算

取藻液各 200 mL, 加入絮凝剂后混匀, 自然沉降 30min; 吸取上清液, 6000 r/min 离心 10min, 收集藻细胞并转移到 1.5 mL 离心管, 进一步以 12000 r/min 离心 3 min, 去净上清液, 加入 1 mL 90% 的丙酮溶液, 超声 1min, 避光置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中 24h, 离心取上清液按照 Jeffrey 和 Humphrey<sup>[11]</sup> 的方法测定叶绿素 *a* 的含量, 得到未被絮凝的藻细胞叶绿素 *a* 含量。用同样的方法测定絮凝前藻液的叶绿素 *a* 含量。絮凝效率为被絮凝的藻细胞叶绿素 *a* 占絮凝前藻细胞叶绿素 *a* 的百分数。

## 2 结果

### 2.1 无机盐及 AGEFLOC WT652 的絮凝实验

用硫酸铜、硫酸锌、硫酸镁和氯化铁分别对三角褐指藻进行絮凝实验, 结果表明加入硫酸镁并没有导致藻液产生明显的絮凝现象, 其他 3 种试剂对藻液的絮凝效率(图 1A)。随着加入剂量的增加, 絮凝效率均有不同程度的提高。终浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$  时, 氯化铁导致的藻细胞絮凝效率超过了 92%, 而硫酸锌和硫酸铜导致的藻细胞絮凝效率分别为 53% 和 75%。图 1B 显示加入 5 mg/L 以下 AGEFLOC WT652 并没有导致三角褐指藻细胞絮凝, 即使将 AGEFLOC WT652 的浓度加大到 10 mg/L, 絮凝效率也较低。

### 2.2 $\text{FeCl}_3$ 与 AGEFLOC WT652 共同诱导的絮凝

图 2 显示只加  $\text{FeCl}_3$  与加入  $\text{FeCl}_3$  和高分子絮凝剂

WT652 结合所诱导的絮凝效率比较。在 40—250  $\mu\text{mol/L}$  范围内, 藻细胞絮凝效率随着  $\text{FeCl}_3$  浓度增加而提高, 至  $\text{FeCl}_3$  浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$  时不再增加。与不加 WT652 相比, 同时加入  $\text{FeCl}_3$  和 WT652 时藻细胞的絮凝效率略有增加; 并且当  $\text{FeCl}_3$  浓度超过 62.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 这种差异不明显。然而, 加入 WT652 可以使絮凝团明显增大。图 3 显示, 在加入 250  $\mu\text{mol/L}$  氯化铁的同时加入 0.5 mg/L WT652 即可促进提高沉降效率, 藻细胞将聚集成更大的团, 利于收集。

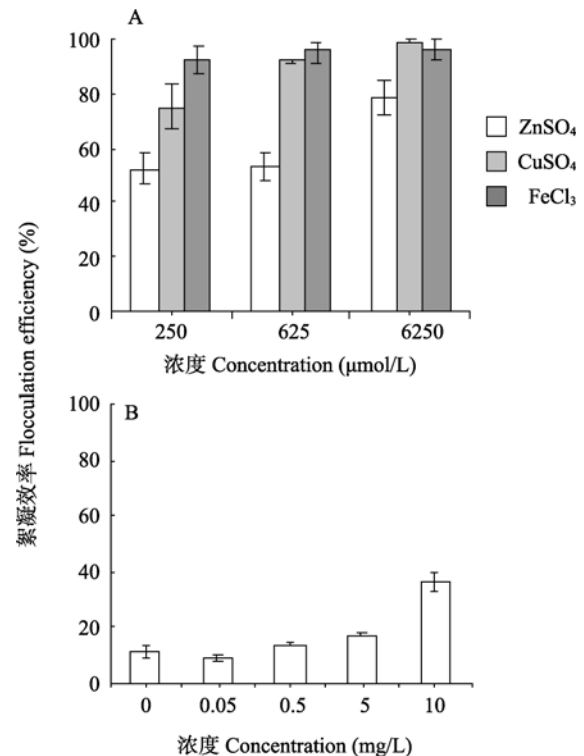


图 1 硫酸锌、硫酸铜、氯化铁(A)及 AGEFLOC WT652(B)对三角褐指藻的絮凝效率

Fig. 1 Flocculation efficiency of *Phaeodactylum tricornutum* induced by different concentrations of  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  (A) or AGEFLOC WT652 (B)

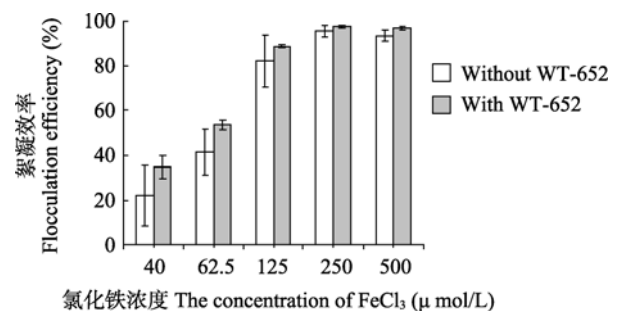


图 2 加或不加 AGEFLOC WT652(0.5 mg/L)时不同  $\text{FeCl}_3$  浓度诱导的三角褐指藻絮凝效率

Fig. 2 Flocculation efficiency of *Phaeodactylum tricornutum* induced by different concentrations of  $\text{FeCl}_3$  with or without AGEFLOC WT652 (0.5 mg/L)

### 2.3 藻液 pH 和细胞密度对絮凝的影响

图 4 显示絮凝前藻液的 pH 值对由  $\text{FeCl}_3$  和 WT652 诱导的藻细胞絮凝效率的影响。结果表明, 藻液的 pH 对絮凝效率影响不显著。即使在藻液 pH 为 5 时, 絮凝效率平均值也超过了 95%。

图 5 显示, 藻细胞密度在  $2.4 \times 10^6$  cells/mL 以下时, 随着细胞密度增加, 絮凝效率有显著升高的趋势, 超过该密度时, 絮凝效率基本达到饱和。

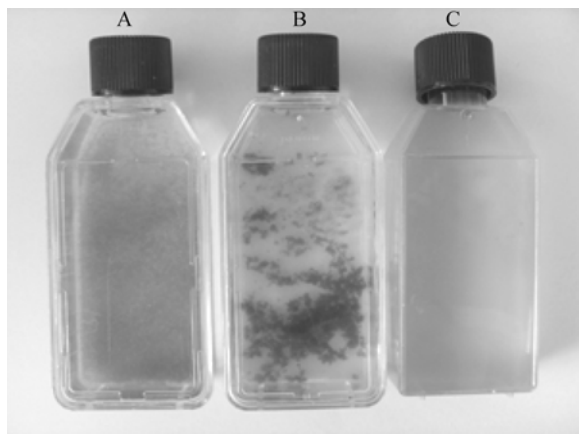


图 3 加入氯化铁(250  $\mu\text{mol/L}$ , A)、AGEFLOC WT652(0.5 mg/L, C)或氯化铁与 AGEFLOC WT652(B)后对三角褐指藻的絮凝效果比较

Fig. 3 Flocculation of *Phaeodactylum tricornutum* with 250  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  (A), 0.5 mg/L AGEFLOC WT652 (C) or both  $\text{FeCl}_3$  and AGEFLOC WT652 (B)

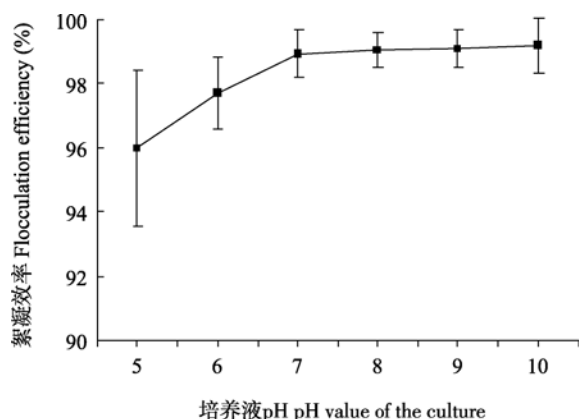


图 4 加氯化铁(250  $\mu\text{mol/L}$ )和 WT652(0.5 mg/L)之前的藻液 pH 对藻细胞絮凝的影响

Fig. 4 Effects of pH value before addition of ferric chloride (250  $\mu\text{mol/L}$ ) and WT652 (0.5 mg/L) on the flocculation of algal cells

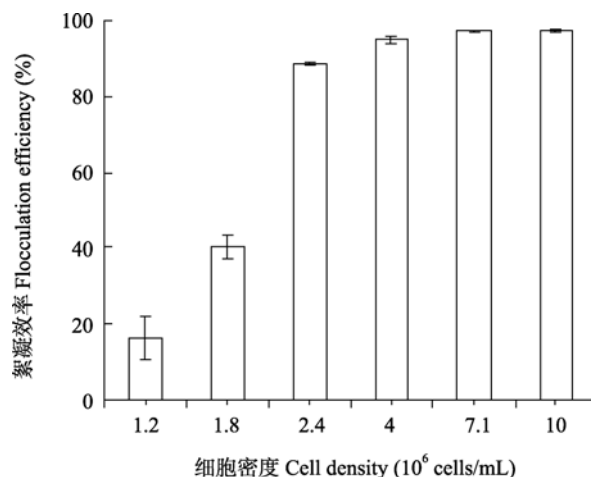


图 5 不同藻细胞密度下氯化铁和 WT652 诱导的藻细胞絮凝效率  
Fig. 5 Flocculation efficiency of *Phaeodactylum tricornutum* induced by ferric chloride and WT652 at different cell densities

### 3 讨论

在絮凝发生时, 絮凝剂与表面带电荷的悬浮粒子相互作用形成较大的颗粒, 然后这些颗粒共价结合形成大的絮状物沉淀下来。藻类细胞由于在外壁具有羟基、羧基、氨基、巯基和磷酸根等, 可看成是带负电荷的胶粒<sup>[12]</sup>。金属离子可以中和细胞表面的负电荷, 进而引起颗粒之间发生凝聚。本研究结果显示, 不同的无机盐对三角褐指藻的絮凝效率有明显的差异, 其中氯化铁是一种较为理想的絮凝剂, 而硫酸镁对三角褐指藻没有絮凝效果。向藻液中加入少量的氯化铁(250  $\mu\text{mol/L}$ )即可达到约 95% 的浓缩效率, 这一结果与 Sukenik, *et al.*<sup>[13]</sup>和 Knuckey, *et al.*<sup>[9]</sup>的报道相似。季高华等<sup>[8]</sup>的研究则发现  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  或  $\text{CuSO}_4$  也适合三角褐指藻的絮凝。不同类型无机盐对藻细胞絮凝效率的差异可能与细胞表面的带负电基团对金属离子的选择性结合有关。

聚丙烯酰胺是应用得最为广泛的一种有机高分子絮凝剂。与无机絮凝剂主要依靠中和粒子上的电荷而引起凝聚不同, 有机絮凝剂主要是依靠架桥作用使粒子沉降。利用有机高分子絮凝剂对淡水微藻进行浓缩有很好的效果, 然而, 当体系中的盐度超过 5 g/L 时有机高分子絮凝剂的絮凝效率会受到显著抑制<sup>[9]</sup>。本文的实验结果表明, 仅仅加入聚丙烯酰胺絮凝剂 WT652 后, 并没有观察到用人工海水培养的三角褐指藻有明显的絮凝现象出现, 而 WT652 与氯化铁复配则显著强化絮凝效果, 推测加入的铁离子与藻细胞表面的阴离子基团结合引起藻细胞凝结, 这些凝结颗粒在有机高分子絮凝剂作用下进一步聚集, 从而形成大的絮凝团沉淀下来。

生长后期海洋微藻培养液的 pH 通常较高, 在絮凝前我们测定的三角褐指藻培养液 pH 为 9 以上。一般认为, 在偏碱性条件下对藻细胞进行絮凝有更高的效率, 而事实上即使在低 pH 条件下, 絮凝效率也几乎不会受到影响。相反, 三角褐指藻浓度对絮凝的作用有较大影响。在较低的细胞浓度下, 絮凝剂与藻细胞以及藻细胞相互之间的碰撞几率相对减少, 从而影响絮凝效果。

本研究结果显示使用 250  $\mu\text{mol/L}$  氯化铁(14 mg/L)与 0.5mg/L WT652 对处于对数生长中期(约  $10^7$  cells/mL)的三角褐指藻进行絮凝, 其效率超过 95%。我们将同一条件应用于室内较大培养体积(50 L)的三角褐指藻培养液, 也得到了同样的浓缩效果, 可见利用该技术有望对硅藻进行大规模的絮凝采收。

#### 参考文献:

- [1] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, *et al.* A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae [M]. The National Renewable Energy Laboratory, Colorado. 1998, 248—249
- [2] Dunstan G A, Volkman J K, Barrett S M, *et al.* Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) [J]. *Phytochemistry*. 1994, **35**(1): 155—161
- [3] Jiang H, Gao K. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (bacillariophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 2004, **40**(4): 651—654
- [4] Lebeau T, Robert J-M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **60**(6): 612—623
- [5] Gong Q L, Cui J Z, Pan K H, *et al.* Ultra-filtration application in condensing chlorella cultured solution [J]. *Marine Sciences*, 2004, **28**(1): 5—8 [宫庆礼, 崔建洲, 潘克厚, 等. 超滤技术在单胞藻浓缩中的应用. 海洋科学, 2004, **28**(1): 5—8]
- [6] Zeng W L, Li B H, Cai Z L, *et al.* Harvesting microalgal cells by continuous dissolve air flotation [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(5): 507—511 [曾文炉, 李宝华, 蔡昭铃, 等. 微藻细胞的连续气浮法采收. 水生生物学报, 2003, **27**(5): 507—511]
- [7] Cui J Q, Zheng Y, Cong W, *et al.* Recovery of *Dunallia salina* cells by dissolved air flotation [J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2003, **3**(2): 151—155 [崔景芹, 郑毅, 丛威, 等. 溶气气浮法采收盐藻(*Dunallia salina*)细胞. 过程工程学报, 2003, **3**(2): 151—155]
- [8] Ji G H, Wang L Q, Zhang R L, *et al.* Experiments on Four Chemicals in the Concentration of Three kinds of Microalgal Liquid [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2006, **33**(4): 157—160 [季高华, 王丽卿, 张瑞雷, 等. 四种化学试剂对三种藻液的浓缩试验. 水产科技情报, 2006, **33**(4): 157—160]
- [9] Knuckey R M, Brown M R, Robert René, *et al.* Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds [J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, **35**(3): 300—313
- [10] Harrison P J, Waters R E, Taylor F J R. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton [J]. *Journal of Phycology*, 1980, **16**(1): 28—35
- [11] Jeffrey S W, Humphrey G F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton [J]. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 1975, **167**(25): 191—194
- [12] Xue H, Sigg L. Binding of Cu (II) to algae in a metal buffer [J]. *Water Research*, 1990, **24**(9): 1129—1136
- [13] Sukenik A, Bilanovic D, Shelef G. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters [J]. *Biomass*, 1988, **15**(3): 187—199