

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.05.010

磁性灭藻剂对蛋白核小球藻和四尾栅藻的去除*

魏燕芳** 郭沛涌 李万全

(华侨大学化工学院环境科学与工程系, 厦门, 361021)

摘 要 将自制的磁性灭藻剂——载铜磁性壳聚糖微球(Copper magnetic chitosan microsphere, CMCM), 分别用于蛋白核小球藻和四尾栅藻的对数期和迟缓期的灭藻效应。研究表明, 磁性灭藻剂对处于迟缓期的蛋白核小球藻和四尾栅藻的抑藻效果较好, 而且对四尾栅藻的去除效果更好。该时期灭藻剂的最佳用量为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 灭藻率在 2 d 之后可达 80%, 4 d 之后可达 90%, 灭藻过程中藻液的 pH 逐渐下降, 残余铜离子浓度逐渐升高并趋于稳定。该灭藻剂主要是通过缓释铜离子和改变藻液的 pH 来对藻类生长进行抑制。灭藻剂药效期可持续 10 d 以上, 回收再利用效果良好。

关键词 磁性灭藻剂, 蛋白核小球藻, 四尾栅藻。

Removal of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda* by magnetic algaecide

WEI Yanfang** GUO Peiyong LI Wanquan

(Department of Environmental Science and Engineering, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, 361021, China)

Abstract: In this paper, self-made magnetic algaecides (CMCM) were used for the removal of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda* in logarithmic phase and lag phase. The results showed that the optimal application time of algaecide was in lag phase, and it had better removal effect for *Scenedesmus quadricauda*. In this phase, the optimal dosage was $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and algae removal rate attained 80% after 2 days, 90% after 4 days. During algae removal process, pH gradually decreased, while the residual Cu^{2+} concentration first increased gradually, and then stabilized. The release of Cu^{2+} and change in water pH associated with CMCM application were the main algae removal mechanisms. Effective period of CMCM last 10 days, and it had a good ability of repeated utilization.

Keywords: magnetic algaecide, *chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*.

目前湖泊水作为供给水已占全国城市供水量的 26%, 而水体中藻类的大量繁殖给饮用水生产带来诸多危害。因此, 去除水中藻类是给水工程中亟待解决的问题。硫酸铜以其广谱、高效而被广泛用作化学灭藻剂^[1], 但若直接投放到水体中会导致水中局部铜离子浓度上升, 危害水生生物及人体健康^[2]。所以, 缓释载铜灭藻剂的研发与应用成为该领域的研究热点^[3-6]。

壳聚糖作为天然高分子化合物容易生物降解, 含有羟基、氨基等功能团, 具有较好的吸附性能。将其改性制备的磁性壳聚糖微球具有磁响应性, 可在外加磁场的作用下方便地分离, 其在细胞分离、固定化微生物、水处理等领域都有着广泛的应用^[7-9]。因此磁性壳聚糖微球是载铜灭藻剂的理想载体。

本文在前文研究的基础上^[10], 探讨自制灭藻剂——载铜磁性壳聚糖微球(Copper magnetic chitosan microsphere, CMCM)对蛋白核小球藻和四尾栅藻在迟缓期和对数期的抑藻性能, 同时考察了灭藻剂的药

2013 年 8 月 10 日收稿。

* 福建省自然科学基金(2014J01049, 2012J01177)资助。

** 通讯联系人, Tel: 0592-6166037; E-mail: weiyangfang@hqu.edu.cn.

效期和重复使用性能,最后对灭藻机理进行了初探.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和四尾栅藻(*Scenedesmus quadricauda*)购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库,分别采用 SE 培养基和 BG 培养基在光照强度为 4000 lx,光暗比为 12 h:12 h 的条件下进行培养.

磁性灭藻剂——载铜磁性壳聚糖微球为实验室自制^[10].

1.2 实验方法

1.2.1 磁性灭藻剂使用时期的确定

在各自的培养基和培养条件下,分别培养小球藻 8 d,四尾栅藻 10 d.每天监测藻液光密度及对藻液进行计数,以绘制生长曲线,确定迟缓期和对数期.

1.2.2 磁性灭藻剂不同时期的灭藻效应

称取一定量的磁性灭藻剂分别加入到处于对数期和迟缓期的藻液中,每天观测 1 次,持续 6 d,以灭藻率为响应指标,观察磁性灭藻剂的灭藻效应.

$$\text{灭藻率} = \frac{\text{OD}_{\text{CK}} - \text{OD}_t}{\text{OD}_{\text{CK}}} \times 100\%$$

其中,OD_{CK}为对照光密度值,OD_t为处理光密度值.

铜离子的测定参考文献[11]进行测定.

1.2.3 磁性灭藻剂药效期的确定

在实验 1.2.2 的基础上,确定灭藻剂最佳的使用时期和最佳使用水平.向迟缓期的小球藻和四尾栅藻藻液中加入 150 mg·L⁻¹的磁性灭藻剂,连续监测 10 d,确定药效周期.

2 结果与讨论

2.1 磁性灭藻剂施用时期的确定

通过每天定期测定蛋白核小球藻和四尾栅藻藻液的吸光度,绘制出蛋白核小球藻和四尾栅藻生长周期曲线.由图 1 可以看出,在本实验条件下,蛋白核小球藻生长周期为 7 d,前 2 d 藻细胞增殖缓慢,为迟缓期;第 2 天至第 5 天藻细胞以几何级数增长,这一阶段为对数期,第 5 天以后,藻类繁殖速度趋于减慢,进入稳定期.四尾栅藻生长周期为 9 d,迟缓期为前 2 d,对数期为第 3 天到第 7 天,第 7 天后进入稳定期.

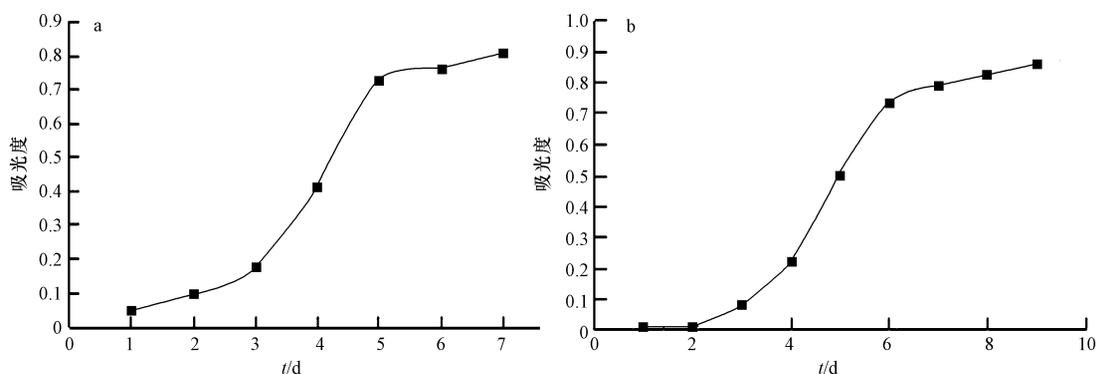


图 1 蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)生长周期曲线

Fig.1 Growth cycle curves of *Chlorella pyrenoidosa*(a)and *Scenedesmus quadricauda*(b)

取一定量的小球藻和四尾栅藻藻液,将藻液稀释至不同倍数,摇匀,利用分光光度计测定吸光度值,

利用血球计数板测定藻细胞数量,从而得到吸光度与藻细胞数量之间的相关曲线,小球藻: $y=0.0060x$, $R^2=0.9989$;四尾栅藻: $y=0.0085x$, $R^2=0.9976$,如图2所示。

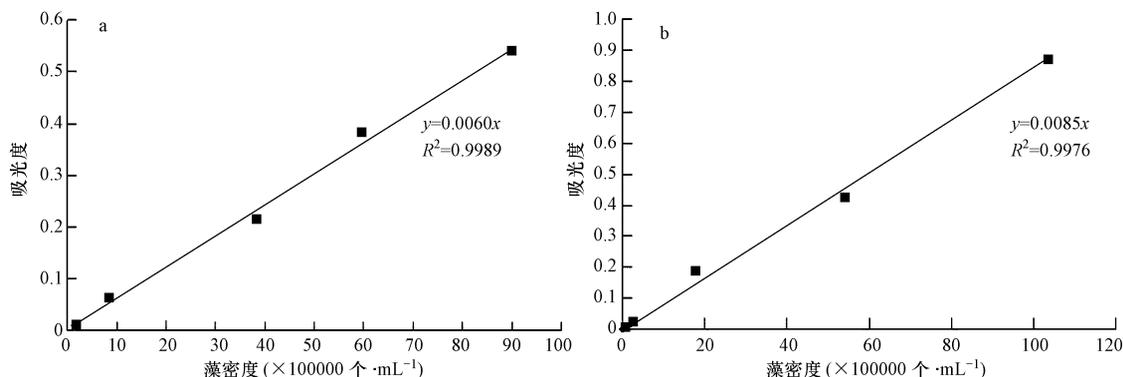


图2 蛋白核小球藻藻液(a)和四尾栅藻藻液(b)吸光度与藻细胞数量的相关曲线

Fig.2 Relation between OD and biomass of *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda* (b)

上述结果与文献的[12]的结论较为一致,因此在后面的实验中以藻液光密度作为藻细胞浓度的指示值。

2.2 磁性灭藻剂在藻类不同生长时期的灭藻效应

2.2.1 迟缓期

分别将小球藻、四尾栅藻培养至迟缓期,按照浓度梯度为 60、150、300 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 加入磁性灭藻剂,每天定期测量藻液吸光度、铜离子浓度、pH 值。

由图3(a)可知,当蛋白核小球藻处在迟缓期时灭藻效率随使用水平的提高而增加。当灭藻剂浓度为 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,灭藻率在前 2 d 随着时间的增加而增加,在第 2 天达到最大的 35%,在第 2 天后呈现下降趋势并趋于稳定,不能有效地杀灭藻细胞。而将用量提高到 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,灭藻率迅速提高,2 d 内灭藻率即可达到 85%左右,在第 5 天左右,灭藻率可达到 90%。此后,进一步提高灭藻剂浓度,灭藻率没有明显的变化。

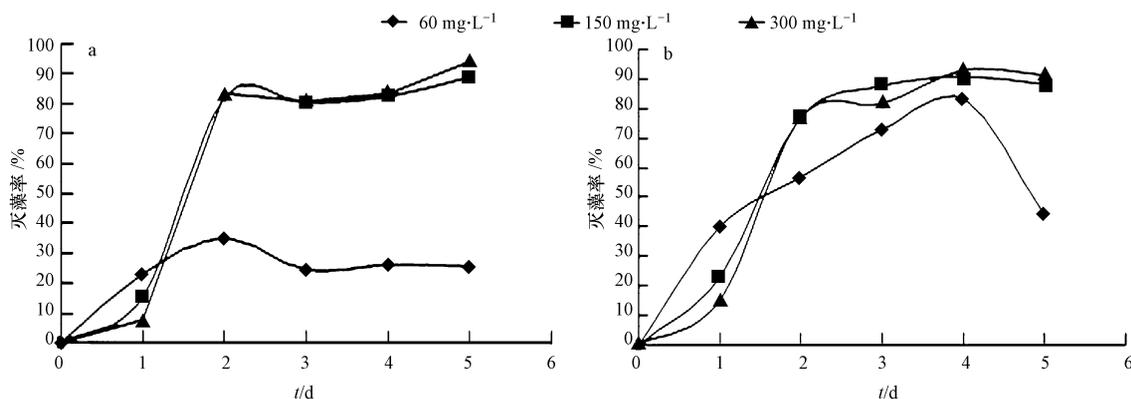


图3 灭藻剂不同使用水平下蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)迟缓期的灭藻效应

Fig.3 Removal efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda* (b) by different CMCM dosage in lag phase

由图3(b)可知,在迟缓期四尾栅藻的灭藻率总体随使用水平的提高而增加。当加入灭藻剂浓度为 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,灭藻率在前 4 d 逐渐增加,在第 4 天达到 80%左右,第 4 天之后,灭藻率逐渐下降,在第 5 天降到约 40%,不能持续有效地灭藻。当灭藻剂浓度上升为 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在第 2 天,灭藻率就可达到 80%左右,到第 4 天,灭藻率达到 90%。进一步提高灭藻剂用量,没有显著提高灭藻率。对照图 3(a)可以发现,该灭藻剂在藻类生长迟缓期对四尾栅藻有更强的作用。文献[13]中报道铜对藻类生长的毒性主要取决于藻类的比表面积和细胞壁表面含硫基团的多少。藻细胞的比表面积越大,细胞壁表面含硫基团越

多,铜离子在细胞表面的沉积量就越多,毒性也越大.尽管与四尾栅藻相比,小球藻有更大的比表面积,但四尾栅藻的细胞壁可能存在更多的基团,这样使更多的铜与含硫基团结合后沉淀于细胞表面,产生了更强的毒性.这可能是造成四尾栅藻比小球藻对铜更敏感的重要原因.

由于该磁性灭藻剂主要是通过缓慢释放铜离子达到灭藻效果,因此,考察了不同灭藻剂用量下,铜离子释放随时间的变化,见图 4.

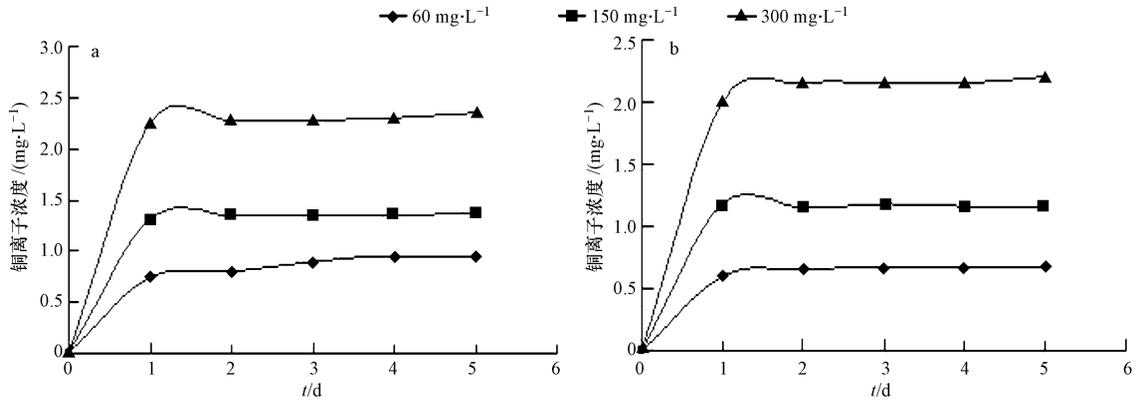


图 4 不同灭藻剂使用水平下蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)迟缓期铜离子释放随时间的变化

Fig.4 Variation of Cu²⁺ release by different CMCM dosage to *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda*(b) in lag phase

由图 4 可知,灭藻第 1 天,残留铜离子随灭藻剂用量的增加而增加,1 d 以后,各用量下的残留铜离子随时间延长无明显变化.对照图 3(a)可以得出,在该实验藻液浓度下,蛋白核小球藻藻液中的铜离子浓度要达到 1.33 mg·L⁻¹,并持续才能有效灭藻.对照图 3(b)可以得出,在该实验藻液浓度下,四尾栅藻藻液中的铜离子浓度达到 1.12 mg·L⁻¹左右,并持续才能有效灭藻.从图 4 可知,在同样用量灭藻剂条件下,四尾栅藻的藻液中铜离子浓度更小,从另一方面说明该灭藻剂对四尾栅藻的灭藻率更高.

实验过程中还测定了磁性灭藻剂不同使用水平下藻液 pH 随时间的变化,实验结果如图 5 所示.

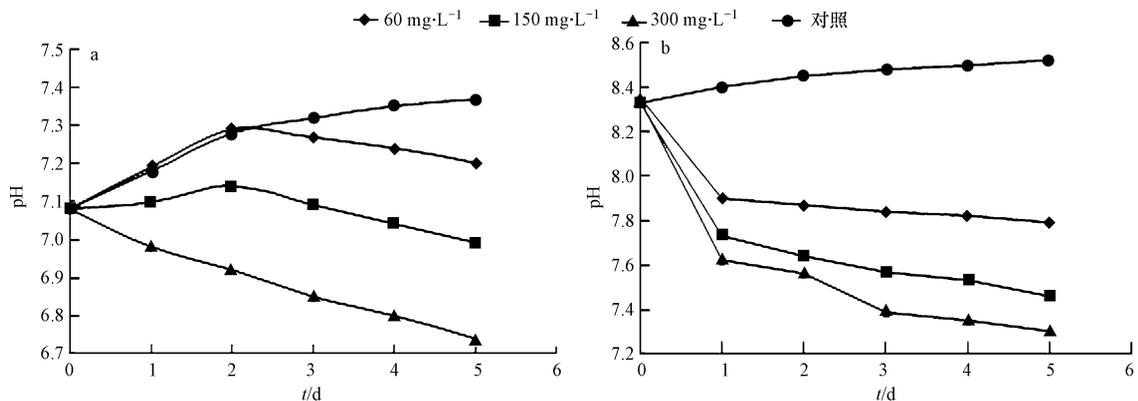


图 5 灭藻剂不同使用水平下蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)迟缓期 pH 值随时间的变化

Fig.5 pH variation of *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda*(b) by different CMCM dosage in lag phase

由图 5 可以看出,跟对照相比,藻液中加入灭藻剂以后,pH 明显降低.且降低的幅度跟灭藻剂的用量相关,灭藻剂用量越多,下降量也越大.由于灭藻过程中,藻液中的铜离子量逐渐增多,因此相应发生水解的铜离子也增多,导致藻液的 pH 下降.

2.2.2 对数期磁性灭藻剂的灭藻效应

分别将蛋白核小球藻、四尾栅藻培养至对数期,按照浓度梯度为 60、150、300 mg·L⁻¹加入磁性灭藻剂,每天定期测量藻液吸光度、铜离子浓度、pH 值,实验结果见图 6.

由图 6 可知,在对数期,蛋白核小球藻和四尾栅藻的灭藻率总体随灭藻剂用量的增加而增加.对蛋

白核小球藻来说,在加入灭藻剂后的第 1 天,3 种浓度的灭藻剂灭藻率都小于 0,可能是因为缓释出的较低浓度铜离子对较高浓度的藻液没有起到抑制作用,反而产生了促进作用.当灭藻剂浓度较低,为 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,灭藻率在第 1 天至第 4 天逐渐增加,在第 4 天达到最高的 30% 和 50% 左右,此后又有下降的趋势,不能保证有效地灭藻.当灭藻剂浓度升高到 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,灭藻率呈持续上升,在第 5 天可达到 60%.对照蛋白核小球藻前面迟缓期,可知迟缓期投加灭藻剂的灭藻效果大大优于对数期.对四尾栅藻来说,最高灭藻率只有达到 70% 左右,跟四尾栅藻迟缓期灭藻率相比,灭藻效果大大降低;但灭藻效果明显优于对数期的蛋白核小球藻.

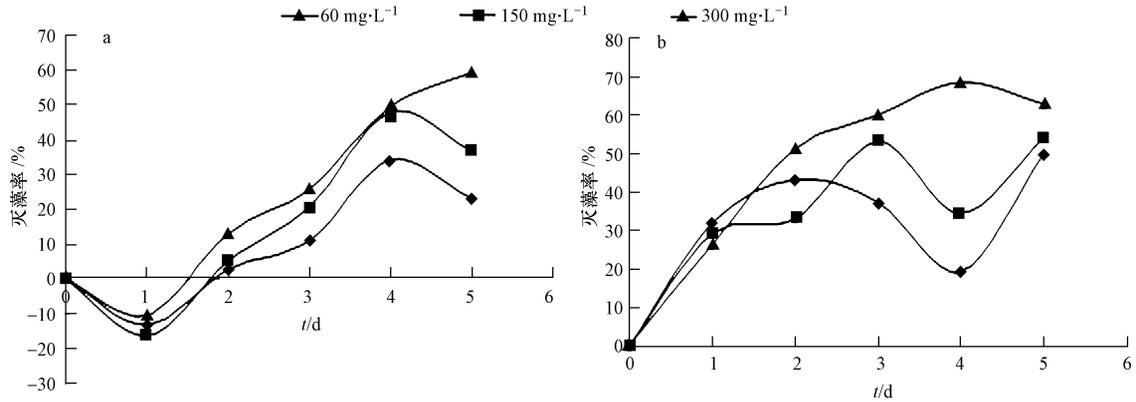


图 6 灭藻剂不同使用水平下蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)对数期的灭藻效应

Fig.6 Removal efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda* (b) by different CMCM dosage in logarithm phase

图 7 的结果表明,灭藻第 1 天,残留铜离子随灭藻剂用量的增加而增加,1 d 以后,各用量下的残留铜离子随时间延长无明显变化.该现象与迟缓期一致.

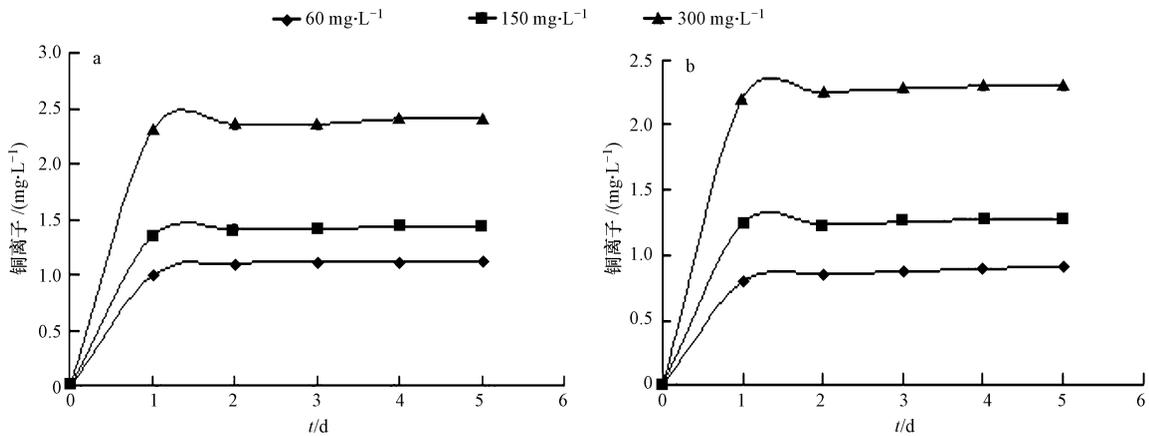


图 7 灭藻剂不同使用水平下蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)对数期铜离子释放随时间的变化

Fig.7 Variation of Cu^{2+} release by different CMCM dosage to *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda* (b) in logarithm phase

由图 8 的结果可知,跟对照相比,藻液中加入灭藻剂以后,pH 明显降低.且降低的幅度跟灭藻剂的用量相关,加入量越多,下降幅度越大.该现象与迟缓期一致.

2.3 磁性灭藻剂的药效期

通过对迟缓期、对数期蛋白核小球藻和四尾栅藻灭藻效应的实验,发现磁性灭藻剂对两种藻抑藻作用的最佳时期都在迟缓期,并且最佳浓度都为 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.为了确定磁性灭藻剂的药效周期,分别将处于迟缓期的蛋白核小球藻和四尾栅藻加入浓度为 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磁性灭藻剂,在培养箱中培养,每天定期测量藻液吸光度,连续测量 10 d,计算灭藻率,得到药效期蛋白核小球藻和四尾栅藻灭藻率曲线,结果见图 9.

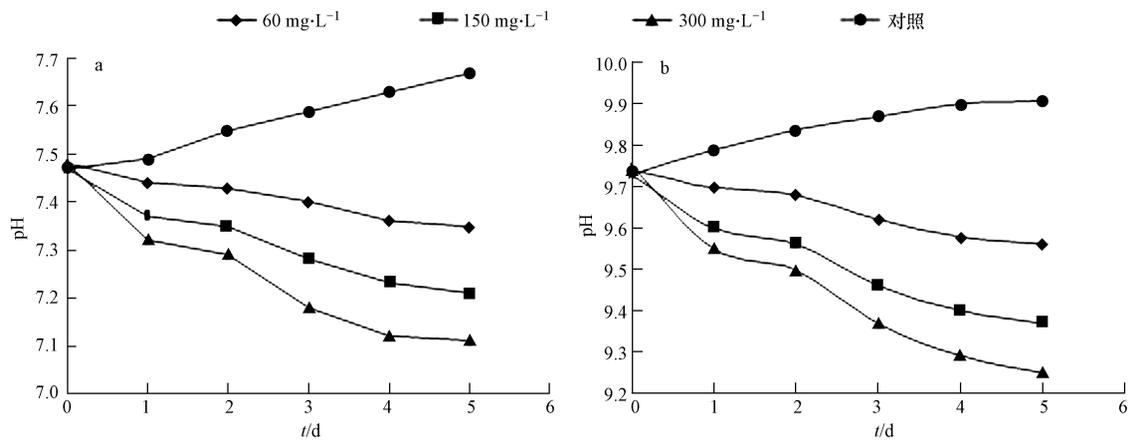


图 8 灭藻剂不同使用水平下蛋白核小球藻(a)和四尾栅藻(b)对数期 pH 值随时间的变化

Fig.8 pH variation of *Chlorella pyrenoidosa* (a) and *Scenedesmus quadricauda* (b) by different CMCM dosage in logarithm phase

由图 9 可知,磁性灭藻剂对蛋白核小球藻和四尾栅藻均有比较好的药效期.对蛋白核小球藻,在第 2 天灭藻率能达到 83%,连续观察到第 10 天,灭藻率仍保持 80%.四尾栅藻的灭藻率,在第 2 天就能达到 80%,此后几天稳中有升,最高能达到 90%以上.说明在该使用条件下,磁性灭藻剂能短时间内达到较高的灭藻效果,并长时间灭藻.

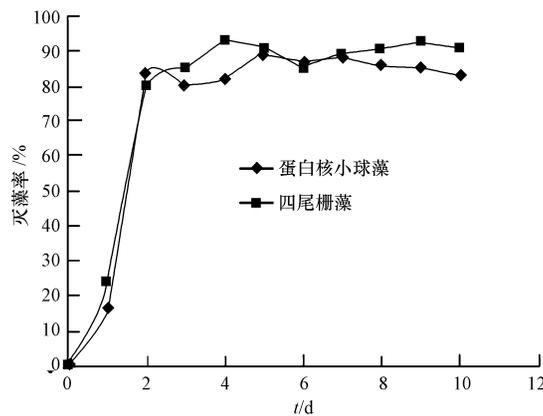


图 9 磁性灭藻剂对蛋白核小球藻和四尾栅藻的药效期

Fig.9 Effective duration of CMCM on *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*

2.4 磁性灭藻剂的回收再利用

150 mg 的磁性灭藻剂用于迟缓期的小球藻和四尾栅藻抑藻实验后,用磁铁将灭藻剂收集,用无菌水洗涤 3 次,并在酸性介质中洗脱,然后按照文献[10]制备再生载铜磁性灭藻剂.再将制备完的灭藻剂用于小球藻和四尾栅藻迟缓期的抑藻实验,测定灭藻率和回收率.磁性灭藻剂回收利用 2 次,实验结果如表 1 所示.

表 1 磁性灭藻率回收利用情况

Table 1 Repeated utilization of magnetic algacide

回收利用次数	蛋白核小球藻 灭藻率/%	四尾栅藻 灭藻率/%	磁性灭藻剂的 回收率/%
0	90.05	91.25	98.55
1	88.85	88.68	97.25
2	87.30	85.76	96.20

从表1数据看到,该磁性灭藻剂回收利用两次以后,对蛋白核小球藻和四尾栅藻的灭藻率仍然可以达到87.30%和85.76%,且回收率较高,说明该磁性灭藻剂回收再利用效果良好。

2.5 灭藻机理初探

实验过程中,在显微镜下观察加入磁性灭藻剂前后藻细胞的结构和形态.发现未加入灭藻剂之前,藻细胞外形完整,加入灭藻剂后,很多藻细胞畸变,并且内含物颗粒粗大,与文献[14]描述结论相近.有文献表明^[15-16],铜离子对藻类的毒性表现为,一方面铜离子可影响藻类的生长代谢,抑制光合作用,影响原生质膜的渗透性;另一方面,藻类对铜离子有很强的吸附能力,这也是铜离子除藻的重要原因.实验中还发现,加了灭藻剂后的藻液pH跟对照相比有一定的下降.pH是影响藻类生长代谢等许多生理过程的重要因子.它会影响到光合作用中CO₂的可用性,在呼吸作用中影响藻类对有机碳的利用效率,并影响培养基中藻细胞对离子的吸收和利用以及代谢产物的再利用和毒性^[17].综上,认为灭藻过程主要是通过铜离子的缓释和藻液pH的改变来实现的。

3 结论

(1)磁性灭藻剂对蛋白核小球藻和四尾栅藻的最佳灭藻时期为迟缓期,灭藻剂的最佳用量为150 mg·L⁻¹,在该用量下灭藻率在2 d之后可达80%,4 d之后可达90%.在灭藻过程中藻液的pH逐渐下降,而残余铜离子浓度逐渐升高最后趋于稳定。

(2)磁性灭藻剂对不同藻类的抑藻效果有差异,同样的用量下对四尾栅藻的抑藻效果比小球藻的抑藻效果好。

(3)该磁性灭藻剂主要通过释放铜离子和改变pH灭藻,药效期较长,可持续10 d;回收再利用性能良好,回收方便;高效、无毒,是一种环境友好型灭藻剂。

参 考 文 献

- [1] 周律,邢丽贞,陈华东,等.利用络合铜控制水华优势藻的试验研究[J].环境科学与技术,2009,32(8):13-15
- [2] Oliveira-Filho Cyrino, Lopes R M, Paumgarten F J R. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides[J].Chemosphere, 2004,56(4):369-374
- [3] 李洪亮.壳聚糖载铜灭藻剂的研制及其效应研究[D].重庆:西南大学硕士学位论文,2007
- [4] 梁想,尹平河,赵玲,等.生物载体除藻剂去除海洋赤潮藻[J].中国环境科学,2001,21(1):15-17
- [5] 赵玲,洪爱华,尹平河,等.沸石载铜除藻剂的探讨[J].中国环境科学,2002,22(3):207-209
- [6] 尹平河,赵玲,李坤平,等.缓释铜离子法去除海洋原甲藻赤潮生物的研究[J].环境科学,2000,21(5):12-16
- [7] Liu X W, Hu Q Y, Fang Z, et al. Magnetic chitosan nanocomposites: A useful recyclable tool for heavy metal ion removal[J].Langmuir, 2009,25(1):3-8
- [8] Elwakeel K Z. Removal of reactive black 5 from aqueous solutions using magnetic chitosan resins[J].Journal of Hazardous Materials, 2009,167(1/2/3):383-392
- [9] Fang H, Huang J, Ding L Y, et al. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles and immobilization of laccase[J].Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition,2009,24(1):42-47
- [10] 魏燕芳,刘鸿辉.磁性灭藻剂的制备及性能分析[J].华侨大学学报(自然科学版),2012,33(5):547-551
- [11] 孙盛玲.壳聚糖及其单糖对金属离子的吸附配位研究[D].兰州:兰州大学硕士学位论文,2003
- [12] 沈萍萍,王朝晖,齐雨藻.光密度法测定微藻生物量[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2001,22(3):115-119
- [13] 张伟,阎海,吴之丽.铜抑制单细胞绿藻生长的毒性效应[J].中国环境科学,2001,21(1):4-7
- [14] Christian B, Raynald C. Effect of Cu on the ultrastructural of *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*[J].Int Revue ges Hydrobiol, 1989,74(1):51-71
- [15] Hawins P R, Grffiths D J. Copper as an algicide in a tropical reservoir[J].Water Research,1987,17(2):8-11
- [16] Yin P H, Yu Q M, Jin B, et al.Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch water[J].Water Research,1999,33(8):1960-1963
- [17] 周华伟,林炜铁,陈涛.小球藻的异养培养及应用前景[J].氨基酸和生物资源,2005,27(4):69-73