

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201606012



磁性微球的改性及其固定化 铁还原菌的性能

刘凡, 周作明, 荆国华

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以油酸、聚乙二醇、柠檬酸钠和 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)为改性剂,采用化学共沉淀法制备 4 种改性磁性微球.通过粒度测定(PSD)、X 射线衍射分析(XRD)、傅里叶红外光谱分析(FTIR)、热重分析(TGA)、磁强度测定(VSM)对各种磁性微球进行表征,并对比各微球固定化铁还原菌后还原 Fe(Ⅲ)EDTA 的性能,最终确定最佳的磁性微球改性条件.结果表明:APTES 改性的 Fe_3O_4 磁性微球固定化铁还原菌效果优于其他改性微球,其最佳条件为 APTES 投加量 8 mL,1 mg 铁还原菌需 1.5 g 磁性微球进行固定化;APTES- Fe_3O_4 固定化铁还原菌后连续使用 5 次,其 Fe(Ⅲ)EDTA 还原效率仍可保持在 90% 以上.

关键词: 磁性微球; 改性; 3-氨丙基三乙氧基硅烷; 铁还原菌; 固定化

中图分类号: O 647

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2016)06-0720-05

Modification of Magnetic Microspheres and Its Performance of Immobilized Iron Reducing Bacteria

LIU Fan, ZHOU Zuoming, JING Guohua

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The modifiers of oleic acid, polyethylene glycol, sodium citrate and 3-ammonia propyl triethoxy silane (APTES) were applied to modify the Fe_3O_4 magnetic microspheres by chemical co-precipitation method. The magnetic microspheres were characterized by PSD, XRD, FTIR, TGA and VSM, and reduction rates of Fe(Ⅲ)EDTA by different magnetic microsphere immobilized iron reducing bacteria were compared, to determine the optimal preparation conditions. The results showed that the Fe(Ⅲ)EDTA reduction rate of the iron-reducing bacterium immobilized on the APTES- Fe_3O_4 microspheres was higher than that of the other microspheres. The optimal preparation conditions for the APTES- Fe_3O_4 microspheres were determined as follows: 8 mL of APTES, and 1.5 g magnetic microspheres for immobilization of 1 mg iron-reducing bacteria. More importantly, the reduction efficiency still maintained 90% of its initial reduction ability after the 5th reused cycle.

Keywords: magnetic microsphere; modify; 3-ammonia propyl triethoxy silane; iron reducing bacteria; immobilized

磁性微球在外加磁场的作用下具有定位、导向和分离功能,能通过共聚、表面改性等方法调节其表面亲水性(或疏水性)及生物兼容性,可作为较好的固定化载体^[1],广泛地应用于废水废气处理^[2-4]、吸附剂材料开发^[5-6]及环境检测^[7-8]等领域.在此基础上,通过磁性微球表面改性,再采用化学或物理方法,可将微生物固定在磁性微球上.微生物经固定后,其活性和稳定性有所提高,在外加磁场的作用下,便于分

收稿日期: 2015-10-10

通信作者: 荆国华(1975-),女,教授,博士,主要从事大气污染控制方向的研究. E-mail: zhoujing@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21077035, NCET-11-0851)

离回收,有利于其连续循环反应的运用^[9-11]. 铁还原菌是生物还原耦合络合吸收法(BioDeNO_x)脱除烟气中 NO_x 的工艺中一种重要的还原菌,它可将 Fe(Ⅲ)EDTA 还原为 Fe(Ⅱ)EDTA,实现吸收剂再生循环利用. 本文分别以油酸、聚乙二醇(PEG)、柠檬酸钠和 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)为改性剂,采用化学共沉淀法合成不同的磁性 Fe₃O₄ 微球,从中确定最佳固定化载体,并优化其制备和固定化条件.

1 试验材料

1.1 药品与试剂

APTES(质量分数为 98%)购自上海阿拉丁化学公司;柠檬酸钠、PEG、油酸、氨水(质量分数为 25%)均购自广东省西陇化工公司;六水合氯化铁、七水合硫酸亚铁均购自上海国药集团化学试剂公司(以上试剂均为分析纯,用前未经预处理).

1.2 实验仪器

KQ-300VDE 型三频数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器公司);RW20 型机械搅拌器(德国 IKA 公司);H-2050R 型高速冷冻离心机(湖南省长沙市湘仪公司);UV-4802H 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯公司).

2 试验方法

2.1 改性磁性微球的制备

参考文献[12-16]的方法,将适量 FeCl₃ · 6H₂O 溶于蒸馏水,转移至三口烧瓶,搅拌加热至 70 ℃,氮气保护下,将 Fe²⁺ 和 Fe³⁺ (摩尔比为 2 : 1)加入 FeSO₄ · 7H₂O. 1 000 r · min⁻¹ 机械搅拌,快速加入适量氨水,超声处理 1 h,得到黑色溶胶状产物,利用外加磁场将其分离. 用蒸馏水洗涤 3~5 次,加入 150 mL 乙醇和蒸馏水(体积比为 1 : 1),50 ℃ 水浴中超声处理 30 min 后,加入适量改性剂,超声处理,4 h 后磁分离,蒸馏水洗涤 3~5 次,-80 ℃ 冷冻干燥,得到黑色粉末样品,置于样品袋中密封保存,备用.

2.2 改性磁性微球的表征

1) 粒径分析仪(PSD,测试波长范围为 0.04~2 000.00 μm);2) X 射线衍射分析(XRD,衍射条件: Cu 靶 Kα(γ=0.154 2),管电压为 40 kV,管电流为 40 mA,速度为 4° · min⁻¹,测量范围为 20°~70°);3) 傅里叶红外光谱分析(FTIR,测试波长范围为 500~4 000 cm⁻¹);4) 热重分析(TGA,N₂ 氛围,以 10 ℃ · min⁻¹ 的升温速度加热至 800 ℃);5) 磁强度测定(VSM 分析).

2.3 改性磁性微球固定化铁还原菌

称取磁性微球 1.5 g,置于 100 mL 血清瓶,加入 50 mL 含 Fe(Ⅲ)EDTA(10 mmol · L⁻¹)的培养基,接种 1.0 mg(湿质量)铁还原菌菌液,N₂ 驱氧后密封,于恒温摇床(40 ℃,140 r · min⁻¹)培养 24 h.

2.4 分析方法

Fe(Ⅱ)质量浓度的测定采用邻菲罗啉分光光度法,细胞质量浓度的测定是通过 610 nm 下光密度与细胞干质量的关系,读取菌悬液在 610 nm 下的吸光度,得到细胞的干质量. 采用 Fe(Ⅲ)EDTA 的还原率评估固定化铁还原菌的还原性能,还原率 $R = [(c_0 - c_t) / c_0] \times 100\%$. 其中: c_0 为 Fe(Ⅲ)EDTA 的初始浓度; c_t 为 Fe(Ⅲ)EDTA 在某时刻的浓度.

3 结果与讨论

3.1 磁性微球的制备与条件优化

3.1.1 磁性微球改性剂的选择 考察不同磁性微球固定化铁还原菌后还原 Fe(Ⅲ)EDTA 的性能,反应 12 h 后的还原率(η),如图 1 所示. 由图 1 可知:经固定化后的铁还原菌还原性能均优于游离菌,APTES-Fe₃O₄ 固定化铁还原菌对 Fe(Ⅲ)EDTA 的还原率最高;改性的磁性微球有效地抑制了因微球团聚导致的粒径增大现象. 改性后微球分散性增强,从而使铁还原菌可以较好地固定在磁性微球上,且固定化过程采用的吸附法对微生物活力影响较小^[17],能有效保证体系还原 Fe(Ⅲ)EDTA 的能力.

3.1.2 APTES-Fe₃O₄ 微球改性条件优化 考察不同 APTES 加入量对磁性微球固定化铁还原菌的还

原效果的影响,结果如图 2 所示.由图 2 可知:APTES 投加量小于 8 mL 时,Fe(Ⅲ)EDTA 还原率随着加入量增加而增加;投加量大于 8 mL 时,还原率随着加入量的增加而减少.因此,在制备 APTES-Fe₃O₄ 过程中,改性剂 APTES 的最佳投加量为 8 mL,固定化铁还原菌最终的还原率达到 97.71%.

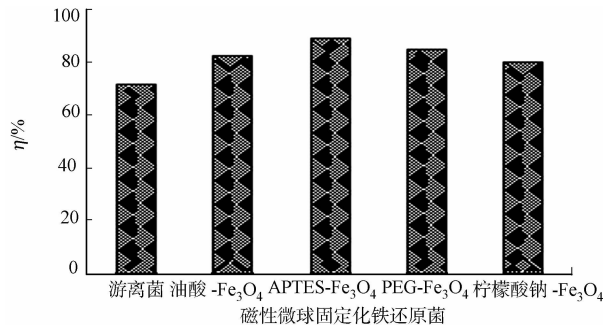


图 1 改性磁性微球固定化铁还原菌还原率

Fig.1 Reduction rate of modified magnetic microspheres immobilized iron reducing bacteria

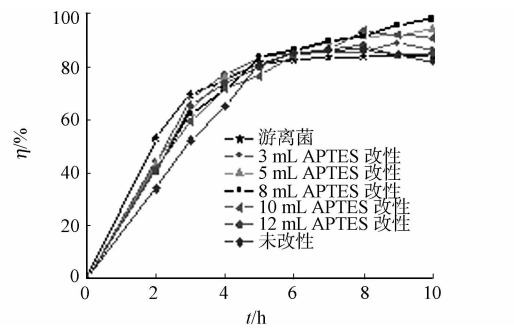


图 2 APTES 对固定化铁还原菌还原率的影响

Fig.2 Reduction rates of immobilized iron reducing bacteria effected by different APTES dosage

3.1.3 APTES-Fe₃O₄ 固定化铁还原菌优化 在确定 8 mL 为最佳投加量的基础上,考察不同质量的 APTES 改性磁性微球固定化铁还原菌的还原效果,如图 3 所示.图 3 中: $c(\text{Fe(Ⅲ)EDTA})$ 为 Fe(Ⅲ)EDTA 浓度.由图 3 可知:当时间为 6 h 时,1.5 g 的 APTES-Fe₃O₄ 固定化铁还原菌的 Fe(Ⅲ)EDTA 还原率最高.因此,最佳的固定化比例为:1 mg 铁还原菌需 1.5 g 磁性微球进行固定化.

3.2 改性磁性微球的表征

3.2.1 粒径分析 通过粒径分析仪分析 APTES-Fe₃O₄ 磁性微球固定铁还原菌前后的粒径(D),结果如表 1,图 4 所示.图 4 中: φ 为对应粒径的微球体积所占的百分数.由表 1 和图 4 可知:固定化铁还原菌后的磁性微球粒径较固定前大.这是因为铁还原菌固定在磁性微球上形成包覆层,增大其粒径.

3.2.2 XRD 分析 通过 XRD 分析几种磁性微球的晶体结构,如图 5 所示.实验制备的磁性微球在 XRD 图谱中 30.3°,35.6°,43.3°,53.6°,57.2°,62.9°等 6 处出现特征衍射峰,且峰的宽度与强度与 Fe₃O₄ 标准图谱(JCPDS-75-1609)一致.由此可以确定,磁性微球含有 Fe₃O₄,纯度高且为反式尖晶石结构^[18].几种改性微球中,APTES 改性后的 Fe₃O₄ 吸收强度最强,说明其成分中 Fe₃O₄ 的质量分数较高^[19];而柠檬酸钠-Fe₃O₄ 和油酸-Fe₃O₄ 吸收强度明显较弱.

表 1 APTES-Fe₃O₄ 固定化铁还原菌前后的粒径对比

Tab.1 Comparison of particle size of APTES-Fe₃O₄ microspheres before and after immobilization

$D/\mu\text{m}$	D_{ave}	D_{10}	D_{50}	D_{90}
固定前	23.65	2.84	18.88	52.58
固定后	26.00	3.77	22.14	55.04

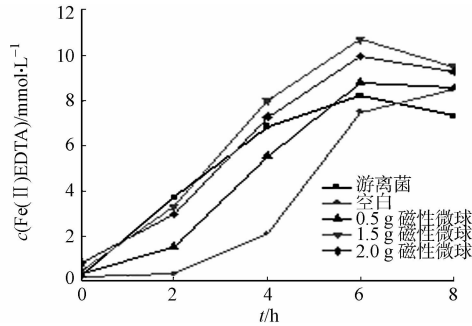


图 3 不同质量的 APTES-Fe₃O₄ 固定化铁还原菌还原率

Fig.3 Reduction rates of immobilized iron reducing bacteria with different APTES-Fe₃O₄ qualities

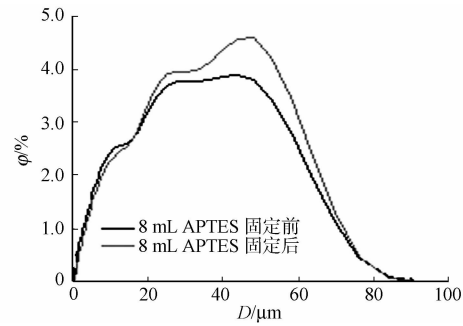


图 4 APTES-Fe₃O₄ 固定化前后粒径分析

Fig.4 PSD of APTES-Fe₃O₄ before and after immobilization

3.2.3 FTIR 分析 通过 FTIR 分析磁性微球的表面官能团,结果如图 6 所示.由图 6 可知:所有的磁性微球都在 584 cm⁻¹处出现 Fe—O 键产生的吸收峰,在 3 433 cm⁻¹出现 O—H 伸缩振动峰.柠檬酸钠、油酸改性的磁性微球都在 1 630 cm⁻¹附近出现典型的—COO⁻吸收峰,说明柠檬酸及油酸成功包覆在 Fe₃O₄ 表面^[14].而 APTES 改性的磁性微球在 1 132,1 044 cm⁻¹处出现 Si—O—Si 与 Fe—O—Si 振动

峰, APTES 成功连接到磁性微球表面^[12], 便于表面进一步改性, 或偶联其他生物大分子.

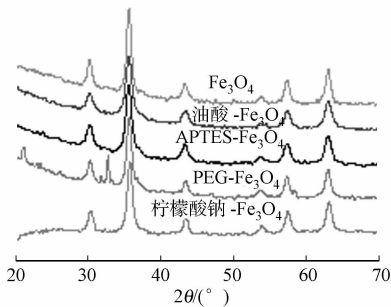


图 5 改性磁性微球的 XRD 谱图

Fig. 5 XRD spectra of modified magnetic microspheres Fig. 6 FTIR spectra of modified magnetic microspheres

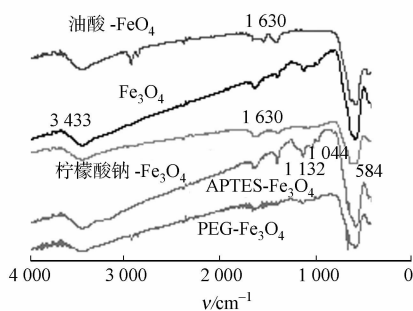


图 6 改性磁性微球的 FTIR 图

3.2.4 TGA 分析 通过 TGA 分析不同 APTES 投加量改性下 Fe_3O_4 磁性微球在 $0\sim 750\text{ }^\circ\text{C}$ 的失重情况(w), 结果如图 7 所示. 几种磁性微球的失重大概可分为 2 个阶段: 第一阶段为 $0\sim 200\text{ }^\circ\text{C}$, 是磁性微球中水分的蒸发; 第二阶段为 $200\sim 600\text{ }^\circ\text{C}$, 是磁性微球中有机成分及杂质的分解^[20]; $600\text{ }^\circ\text{C}$ 以后为磁性微球中剩余的 Fe_3O_4 . 由图 7 可知: 不同 APTES 投加量改性的磁性微球磁物质质量分数不同. 8 mL APTES 改性的磁性微球中有机成分质量分数相对较高, 说明其表面附着大量的氨基, 有利于微生物的固定化, 这也是该投加量情况下, 磁性微球固定化铁还原菌还原性能最佳的重要原因.

3.2.5 VSM 分析 通过 VSM 分析磁性微球的饱和磁强度, 如图 8 所示. 图 8 中: M 为磁化强度; H 为磁场强度. 各磁性微球的矫顽力和剩磁都几乎为 0, 说明实验制备的磁性微球具有超顺磁性^[21], 可通过外加磁场实现磁性微球的分离和回收. 未改性磁性微球的饱和磁强度为 $0.076\text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 而实验室制得的改性磁性微球的饱和磁强度弱于未改性的磁性微球, 但均在 $0.068\text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ 以上, 相差较小, 且改性剂投加量对于磁性微球的磁响应强度无显著影响. 综合考虑其他表征结果, 确定 8 mL APTES 改性的磁性微球为最佳固定化载体.

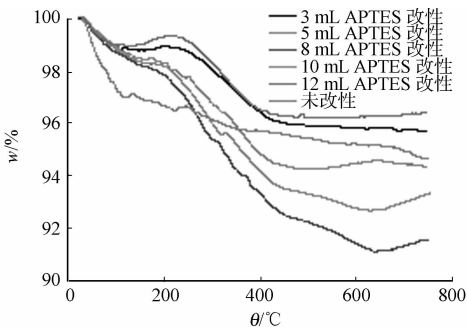


图 7 改性磁性微球的 TGA

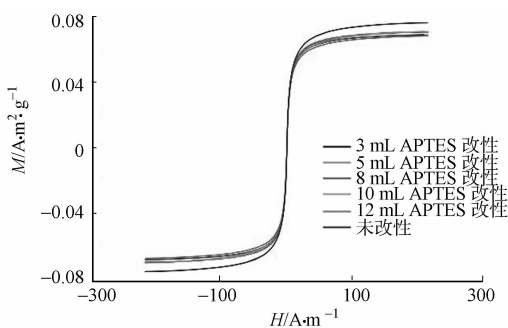


图 8 改性磁性微球的 VSM

Fig. 7 TGA curves of modified magnetic microspheres Fig. 8 VSM curves of modified magnetic microspheres

3.3 磁性微球固定化铁还原菌重复性实验

铁还原菌还原 Fe(III)EDTA 重复性实验, 结果如图 9 所示. 由图 9 可知: 1.5 g , 8 mL 的 APTES 改性的磁性微球固定化铁还原菌连续使用 5 次后, Fe(III)EDTA 的还原效率仍可以保持在 90% 以上. 由此可见, APTES 改性的磁性微球固定化铁还原菌具有良好的重复使用性.

4 结束语

采用化学共沉淀法, 利用不同的改性剂制备改性磁性微球, 通过其固定化铁还原菌还原性能的对比, 确定了 APTES- Fe_3O_4 为 4 种改性微球中最好的固定化载体. 考察

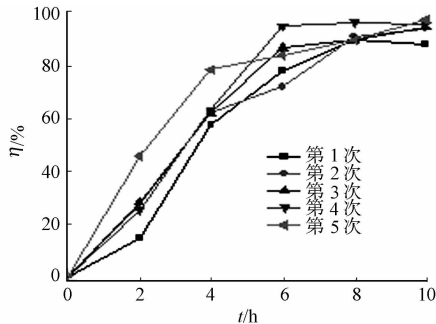


图 9 铁还原菌还原 Fe(III)EDTA 重复性实验
Fig. 9 Repeated reduction of Fe(III)EDTA experiment of iron reducing bacteria

改性剂投加量和磁性微球质量对铁还原菌固定化的影响,确定 APTES 最佳投加量为 8 mL,1 mg 铁还原菌需 1.5 g 磁性微球进行固定化.在最佳制备和固定化条件下,APTES- Fe_3O_4 固定化铁还原菌连续使用 5 次后,对 $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA 的还原效率仍可以保持在 90% 以上.

参考文献:

- [1] 俞洋,吴翠玲,王震,等.磁性钨催化剂对 Suzuki-Miyaura 偶联反应的催化作用[J].华侨大学学报(自然科学版),2015,7(4):459-454.
- [2] BAYRAMOĞLU G,ARICA M Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads[J]. Journal of Hazardous Materials,2008,156(1/2/3):148-155.
- [3] YING Chun,UMETSU K,IHARA I,et al. Simultaneous removal of organic matter and nitrogen from milking parlor wastewater by a magnetic activated sludge (MAS) process[J]. Bioresource Technology,2010,101(12):4349-4353.
- [4] LIN Tianming,ZHOU Zuoming,LIU Yixuan,et al. Evaluation of $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA and $\text{Fe}(\text{II})$ EDTA-NO reduction in a NO_x scrubber solution by magnetic Fe_3O_4 -chitosan microspheres immobilized microorganisms[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering,2014,19(1):175-182.
- [5] MONIER M,SARHAN A A,AYAD D M,et al. Preparation and characterization of magnetic chelating resin based on chitosan for adsorption of $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Co}(\text{II})$, and $\text{Ni}(\text{II})$ ions[J]. Reactive and Functional Polymers,2010,70(4):257-266.
- [6] OZMEN M,CAN K,ARSLAN G,et al. Adsorption of $\text{Cu}(\text{II})$ from aqueous solution by using modified Fe_3O_4 magnetic nanoparticles[J]. Desalination,2010,254(1/2/3):162-169.
- [7] YANG Ming,LI Huling. Determination of trace hydrazine by differential pulse voltammetry using magnetic microspheres[J]. Talanta,2001,55(3):479-484.
- [8] BUSHON R N,LIKIRDOPULOS C A,BRADY A M G. Comparison of immunomagnetic separation/adenosine triphosphate rapid method to traditional culture-based method for *E. coli* and enterococci enumeration in wastewater[J]. Water Research,2009,43(19):4940-4946.
- [9] 周瑾,周作明,荆国华. 磁性固定化技术在环境工程领域的研究和应用进展[J]. 化工进展,2011(5):1106-1111.
- [10] KOURKOUTAS Y,BEKATOROU A,BANAT I M,et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review[J]. Food Microbiology,2004,21(4):377-397.
- [11] 朱丽英,晏晓琴,凌敏洁,等. 磁性微球固定化啤酒废酵母吸附重金属铅[J]. 化学与生物工程,2015(7):18-21.
- [12] LONG Jie,LI Xingfei,WU Zhengzong,et al. Immobilization of pullulanase onto activated magnetic chitosan/ Fe_3O_4 nanoparticles prepared by in situ mineralization and effect of surface functional groups on the stability[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,2015,472:69-77.
- [13] 李杨,江连洲,李丹丹,等. 氨基硅烷修饰的磁性纳米粒子固定化碱性蛋白酶[J]. 食品科学,2012(9):202-205.
- [14] 苏鹏飞,陈国,赵珺. 表面羧基化 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的快捷制备及表征[J]. 高等学校化学学报,2011(7):1472-1477.
- [15] 邓勇辉. 功能性磁性聚合物微球的制备、表征及其初步应用[D]. 上海:复旦大学,2005:34-35.
- [16] 张峰,朱宏. 聚乙二醇包覆纳米 Fe_3O_4 颗粒的制备及表征[J]. 磁性材料及器件,2009(4):27-30.
- [17] CHEN Dongzhi,CHEN Jianmeng,ZHONG Weihong,et al. Degradation of methyl tert-butyl ether by gel immobilized *Methylobium petroleiphilum* PM1[J]. Bioresource Technology,2008,99(11):4702-4708.
- [18] 马晓利,尚宏周,赵艳琴,等. 纳米四氧化三铁的制备及表面修饰研究[J]. 精细与专用化学品,2012,20(2):26-31.
- [19] RASHDAN S,BOUOUDINA M,AI-SAIDE A. Effect of the preparation route, PEG and annealing on the phase stability of Fe_3O_4 nanoparticles and their magnetic properties[J]. Journal of Experimental Nanoscience,2013,8(2):210-222.
- [20] 冯斌,任志强,屈晶苗,等. 3-氨丙基三乙氧基硅烷表面修饰的磁性 Fe_3O_4 纳米粒子合成与表征[J]. 化工新型材料,2008(12):26-29.
- [21] YANTASEE W,WARNER C L,SANGVANICH T,et al. Removal of heavy metals from aqueous systems with thiol functionalized superparamagnetic nanoparticles[J]. Environmental Science Technology,2007,41(14):5114-5119.