

研究论文

共价接枝蛋白分子改善聚苯乙烯 生物填料表面性能

毕 源¹, 季 民¹, 尉家鑫², 张 亮³

(¹ 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072; ² 中国建筑发展公司,
北京 100037; ³ 伟信 (天津) 工程咨询有限公司, 天津 300050)

摘要: 采用氧化和接枝蛋白分子的方法, 在聚苯乙烯生物填料表面提高了原有亲水性基团的比例, 同时引入了新的亲水基团和细胞识别位点. 对比氧化、未氧化直接接枝、氧化后接枝 3 种处理方法, 发现表面能分别从 $42 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 提高到 74.77 、 119.5 、 $172.3 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$; C—C 键比例分别下降了 26.56% 、 18.64% 和 32.21% , C—O 键比例分别提高了 17.78% 、 16.35% 和 25.56% , 并且新增加了 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$ 等有亲水性质的化学键; 利用配制模拟废水对氧化后接枝蛋白分子填料进行动态培养生物挂膜试验, 结果表明改性后的填料生物膜初期附着速率和增长量明显高于未经改性的生物填料.

关键词: 生物膜; 填料; 表面改性; 废水

中图分类号: X 783.2

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2006) 12-2914-06

Covalent grafting of protein molecule for improving surface performance of polystyrene biofilm media

BI Yuan¹, JI Min¹, YU Jiaxin², ZHANG Liang³

(¹ School of Environment Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² China State Construction Development Co., Ltd., Beijing 100037, China;

³ Scott Wilson (Tianjin) Engineering Consultants Co., Ltd., Tianjin 300050, China)

Abstract: The proportions of hydrophilic groups were increased through an oxidation and grafting protein method on its surface for improving the performance of polystyrene as a kind of biofilm media, and some new hydrophilic groups and identifying point were introduced at the same time. The media surface energy was increased from $42 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ to $74.77 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ through oxidation, to $119.5 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ through grafting protein without oxidation and to $172.3 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$ through grafting protein after oxidation respectively. The proportion of C—C bond on the corresponding surface of the media was decreased in the above three cases by 26.56% , 18.64% , 32.21% respectively. C—O bond was increased in the above three cases by 17.78% , 16.35% , 25.56% respectively. The new hydrophilic groups were identified as $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ and $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$ bonds. The result of the lab-scale test using synthetic wastewater showed that the amount and early adhesion rate of biofilm on the grafted protein media after surface modification increased evidently.

Key words: biofilm; media; surface modification; wastewater

2005-10-28 收到初稿, 2006-04-13 收到修改稿.

联系人: 季民. 第一作者: 毕源 (1977—), 男, 硕士研究生.

基金项目: 教育部天津大联合研究院资助项目.

Received date: 2005-10-28.

Corresponding author: Prof. JI Min. E-mail: jimin@tju.edu.cn

Foundation item: supported by the Ministry of Education and Unity Academy of Tianjin University-Nankai University.

引 言

曝气生物滤池是一种新型高效的污水处理工艺, 其最大特点是集生物氧化和截留悬浮固体于一体, 节省了后续二沉池, 在保证处理效果的前提下使处理工艺简化^[1], 采用聚苯乙烯小球填料的 BIOSTYR 型曝气生物滤池具有处理效率高、能耗低的特点。但是由于聚苯乙烯材料本身极性小, 表面能低, 润湿性能差, 不具备良好的生物亲和性能, 因此微生物在填料表面的初期附着速率(挂膜)较慢, 反应器启动需时较长, 且在正常运行时, 填料表面生物膜也不够压实, 影响了处理效果^[2]。目前对塑料填料进行改性的方法很多, 主要有表面糙化、表面极化、表面接枝以及等离子体表面处理等。在这些方法中, 表面糙化和表面极化对填料表面润湿性能的改善有限, 一般只能提高 20%~30% 左右; 等离子体表面处理技术需要的投资较大, 这限制了该技术的推广使用; 表面接枝是使主干聚合物与具有极性基团的单体在侧链上发生聚合反应, 形成接枝共聚物, 这种技术方法简单, 聚合反应周期短, 反应区域易控制, 表面极性基团能长久保留, 因此可以广泛应用^[3]。本试验通过在经高锰酸钾溶液氧化处理的聚苯乙烯小球生物填料上接枝蛋白分子, 研究填料改性技术对生物膜附着速率和生物量保持的影响。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

试验采用的聚苯乙烯小球生物填料是由聚苯乙烯树脂颗粒料经高温两次发泡制成的白色球状滤料, 粒径 3~5 mm, 吸水率 $\leq 5\%$, 堆密度 $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, 孔隙率 50%。明胶蛋白(gelatin)为市购, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 明胶蛋白溶液自配: 准确称量 1 g 明胶蛋白溶解于 1 L PBS 缓冲溶液中。PBS 磷酸盐缓冲溶液自配: 称量氯化钠(NaCl) 9 g, 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 6 g, 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4 g, 溶解于 950 ml 去离子水中, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.2~7.4, 最后用 1000 ml 容量瓶定容, 制得 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲溶液。高锰酸钾溶液自配: 准确称量 0.5 g 高锰酸钾, 溶解于硫酸溶液(1 ml 浓硫酸+9 ml 去离子水)中。5%戊二醛溶液自配: 将市购 50%戊二醛溶液用 PBS 缓冲溶

液稀释 10 倍即得。挂膜用模拟废水的配制方法为: 每 1 L 自来水中加入 400 mg 葡萄糖、160 mg 碳酸氢铵、26 mg KH_2PO_4 、20 mg KHCO_3 、20 mg MnSO_4 、0.4 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、34 mg Na_2HPO_4 ; 此配制水的 COD(化学需氧量)为 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氨氮为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总氮为 $26.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 改性试验

在连续曝气的条件下将聚苯乙烯小球生物填料浸泡在 50°C 的高锰酸钾酸溶液中 4 h 后取出, 用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液洗涤 3 次, 以洗去填料表面的褐色层, 然后用 PBS 磷酸盐缓冲溶液充分洗涤直至填料表面呈中性, 自然晾干备用。取出经上述方法处理的一部分填料浸泡在 37°C 的 5%戊二醛溶液中 24 h 后取出, 再浸泡于 37°C 的 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 明胶蛋白溶液中 24 h, 取出后用水充分洗涤, 自然晾干备用; 同时以同样方法处理未经氧化处理的填料, 用以进行对比测试。

1.3 测定方法

1.3.1 光电子能谱(XPS)测试 材料表面的性质可以通过 X 射线光电子能谱来表征。本试验采用 PHI-1600 型 X 射线光电子能谱仪(美国产)对生物填料表面进行元素分析, 测试条件: X 射线源 $\text{Al K}\alpha$ ($h\nu = 1486.6 \text{ eV}$)/ $\text{Mg K}\alpha$ ($h\nu = 1486.6 \text{ eV}$) 双阳极靶, 电压 15 kV, 功率 400 W, 分辨率 0.7 eV, 真空度小于 $266.644 \times 10^{-10} \text{ Pa}$, 扫描时间 1~2 min。

1.3.2 静态接触角测试 将一定量聚苯乙烯小球生物填料溶解于氯仿溶液, 待溶解均匀后, 倒入玻璃皿中, 于通风橱内室温晾干, 控制膜的厚度为 0.1~0.2 mm。成膜后, 剪成 $1.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 长方形, 浸泡在含 50%乙醇的去离子水中, 超声清洗 5 min 后取出自然干燥, 采用上述试验方法接枝高蛋白分子。DSA10MK2 型静态接触角测量仪(德国产)测定膜与蒸馏水的接触角。测试时需保持湿度不变, 温度稳定在 20°C , 接触角的测定原理如图 1 所示, 接触角由式(1)计算得出^[4]

$$\theta = \frac{\pi}{2} - \tan^{-1} \left(\frac{r^2 - 1}{2r} \right) \quad (1)$$

其中, $r = a/b$ 。

查聚合物表面张力值表^[5]可知, 未经处理的聚苯乙烯膜表面张力值为 $42 \text{ mJ} \cdot \text{m}^{-2}$, 在测定了经表面改性处理膜的表面接触角后, 可以通过

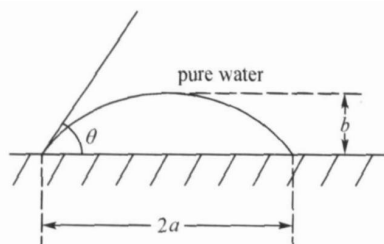


Fig. 1 Schematic diagram for measurement of contact angle

Young 方程和式 (2) 计算其表面张力值

$$\gamma'_s = \frac{(1 + \cos\theta)\gamma_s^2}{(1 + \cos\theta)^2} \gamma_s \quad (2)$$

式中 γ_s 为改性处理前膜的表面张力； γ'_s 为改性处理后膜的表面张力； θ 为改性处理前液体与膜接触角； θ' 为改性处理后液体与膜接触角。

1.3.3 挂膜试验与生物量测试 试验装置如图 2 所示，采用直径为 100 mm 的有机玻璃柱，柱高 2500 mm，底部配水区高 100 mm，顶部清水区高 400 mm，中间填料区内填料高度为 1300 mm。

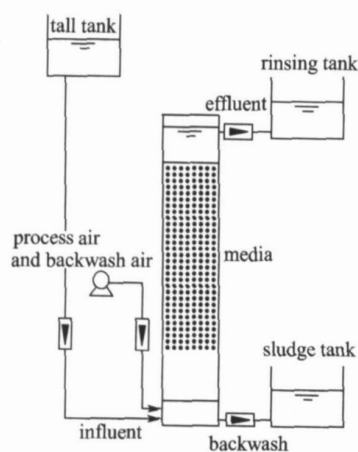


Fig. 2 Schematic diagram for equipment of biofilm attaching

根据 XPS 光电子能谱和静态接触角测试结果选取经上述其中一种方法处理后的聚苯乙烯小球生物填料置于此装置内进行挂膜试验，同时将未经处理的生物填料置于另一相同的反应器内进行对比试验。采用快速排泥挂膜法进行挂膜^[6]，接种污泥取自天津东郊污水处理厂好氧曝气池回流污泥，在接种污泥浸泡生物填料 8 h 后排空污泥，然后引入配制的模拟废水，前 5 d 控制滤池 COD 负荷为 $3.0 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 左右，5 d 后控制滤池 COD 负荷为 $5.5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 左右，至 14 d 左右稳定运行后负荷控制为 $3.5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 左右。在此期间水温位于 $25 \sim 28^\circ\text{C}$ 之间。生物填料表面生物量的测

定采用卵磷脂法，测定结果以单位滤料体积内总磷的含量 $[\text{nmol P} \cdot (\text{cm} \text{ 填料})^{-3}]$ 来表示生物量大小^[7]。

2 结果与分析

2.1 光电子能谱 (XPS) 测试结果与分析

图 3 显示了聚苯乙烯小球生物填料经不同处理前后的表面 C1s 分峰解析图谱；表 1 和表 2 则分别显示了处理前后填料表面各种主要元素含量和 C 原子键连接关系变化情况。

Table 1 Proportion of most element for various polystyrene samples/ %

Sample	C	O	N
unsettled	82.4	17.6	—
oxygenation	82.6	15.6	1.8
grafted with un-oxygenation	77.3	19.3	3.4
grafted with oxygenation	75.1	21.5	3.4

从图 3 和表 1 中可以看出，未处理的填料表面主要为 C、O 两种元素，而经过处理的填料表面都引入了 N 元素。分析 N 元素的来源，其中氧化处理填料表面 N 元素应该为空气中的 N 元素在特定的条件下被固定在了填料表面，而接枝处理的填料表面 N 元素应该为固定在填料表面的明胶蛋白分子中的 N 元素。

从 C 原子的键连接关系中可以清楚地看到，氧化填料表面新出现了 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 和 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$ 键 (288.8 eV)，这说明在填料表面进行了氧化反应。如图 4 所示，表面氧化反应的原理为：由于高锰酸钾硫酸溶液的强氧化作用，使得聚苯乙烯 Ca 和 $\text{C}\beta$ 键断裂，在 β 位形成羧基，在 α 位形成羰基^[8]。

从 C1s 的键连接关系及其所占比例可以看出，对于两种接枝处理的填料，表面出现的 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 和 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$ 键表明了蛋白分子是通过共价化学键作用而不是依靠物理作用吸附连接到填料表面的，这使得蛋白分子可以牢固地键合在填料表面而不脱落。对于未氧化直接接枝处理的填料，其表面出现的 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 和 $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$ 键 (288.4 eV) 主要是由于填料表面原有的羟基与戊二醛和蛋白分子进行共价偶联后出现的，戊二醛是一种含双官能团的偶联剂，其与羟基反应共价接枝蛋白分子的原

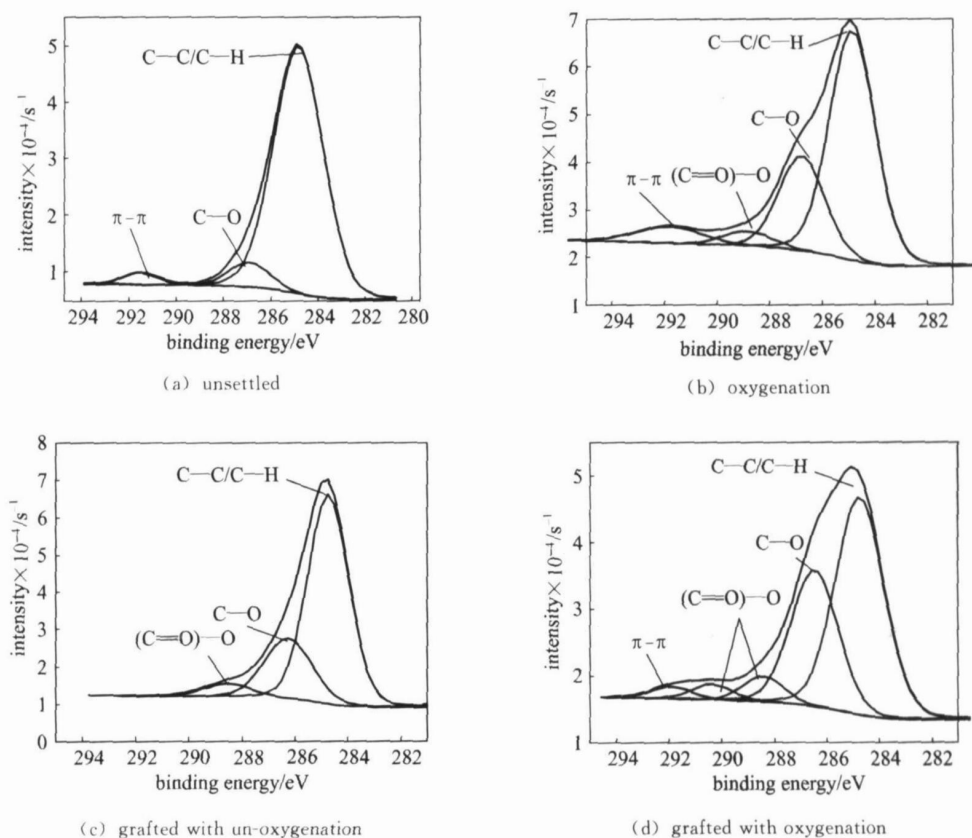


Fig. 3 XPS spectra of C1s peak for various polystyrene samples

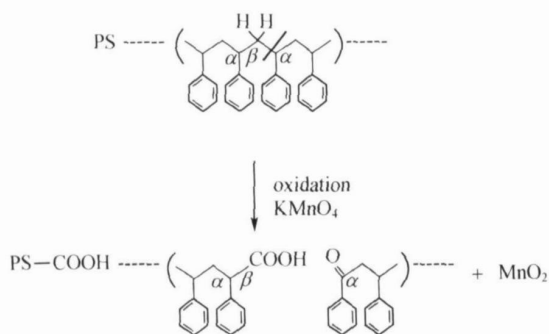
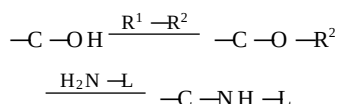


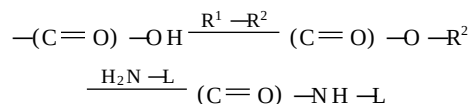
Fig. 4 Schematic presentation of one possible reaction occurring during permanganate oxidation of PS

理可表示为^[9]



对于经氧化后接枝处理的填料, 其表面除羟基与戊二醛和蛋白分子进行偶联外, 经氧化反应产生的羧基也与戊二醛和蛋白分子进行共价偶联反应, 从两种接枝填料的 C1s 分峰解析图谱的比较中也可以清楚地看到, 在氧化接枝填料表面, 除了在 288.4 eV 出现的由羟基与戊二醛和蛋白分子反应生成的

—(C=O)—O—和 —(C=O)—NH 键外, 还有在 290.4 eV 处出现的由羧基与戊二醛和蛋白分子反应生成的 —(C=O)—O—和 —(C=O)—NH 键 (两种结合能出现差异主要是由于 —(C=O)—O—键中右侧 O 原子连接的元素不同所造成), 因此在 3 种改性处理填料中氧化接枝蛋白分子填料表面的 —(C=O)—O—和 —(C=O)—NH 键的比例最高, 表面性能改善得也最好. 戊二醛与羧基反应偶联蛋白分子的原理可表示为^[10]



对比 4 种填料, 经处理填料表面的具有亲水性的 C—O、—(C=O)—NH、—(C=O)—O—键均有明显的增加, 这也说明了氧化和接枝处理可以有效地改善填料表面的亲水性能, 而这 3 种处理方法中又以氧化后接枝法最为有效.

2.2 静态接触角测试结果与分析

表 3 显示了经过不同处理的聚苯乙烯膜表面静态接触角和张力学变化情况.

Table 2 Ration analysis of bonds for C1s

Bond	Unsettled	Oxygenation	Grafted with unroxygenation	Grafted with oxygenation
—C—C—, —C—H	89.71 %	63.15 %	71.07 %	57.5 %
—(C—O)—	7.33 %	25.11 %	23.68 %	32.89 %
—(C=O)—NH, —(C=O)—O—	—	4.94 %	5.25 %	7.31 %
shake up (π - π)	2.96 %	6.8 %	—	2.3 %

Table 3 Contact angle and tension for various polystyrene samples

Sample	Contact angle / (°)	Surface tension / $\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$
unsettled	96.1	42
oxygenation	78.9	74.77
grafted with unroxygenation	59.5	119.5
grafted with oxygenation	35.9	172.3

根据氧化反应原理, 经氧化处理膜表面出现了羧基和羰基, 而羧基是亲水基团, 因此氧化处理后聚苯乙烯膜表面的亲水性能大大提高; 对于经两种方法接枝处理的聚苯乙烯膜, 其亲水性能提高得更多, 这主要是因为填料接枝蛋白分子后表面的亲水类基团比例提高更多, 其中经氧化后接枝膜的亲水性能最好, 这也与 C1s 分峰解析测试结果相吻合. 通过肉眼观察也可以清楚地发现, 水分在 3 种经过处理膜的表面可以很均匀地铺展开, 其中氧化后接枝膜表面水分铺展得最好, 而未处理膜表面的水分则呈现团聚状态.

2.3 生物挂膜试验结果与分析

根据 XPS 光电子能谱和静态接触角测试结果, 生物挂膜试验选取了经氧化后接枝蛋白分子处理的填料. 图 5 和图 6 分别对比显示了挂膜期间经氧化接枝改性处理填料和未处理填料表面生长的微生物量和 COD 去除率.

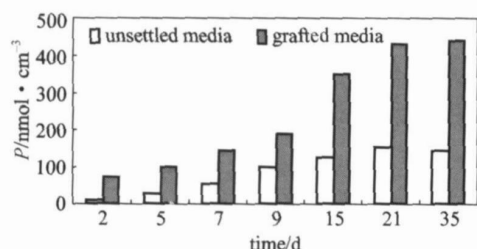


Fig 5 Biofilm concentration for various polystyrene samples

从图中可以清楚地看出, 经处理的填料无论是在挂膜速率还是在生物量上都明显优于未处理填

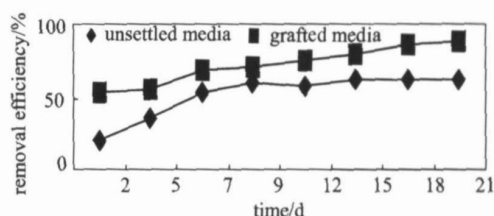


Fig 6 COD removal for various polystyrene samples

料. 这主要是因为填料表面键合的蛋白分子是由氨基酸多肽序列组成, 这些多肽序列一方面提供了大量的细胞识别位点, 使得细胞黏附速率大大增加, 另一方面这些多肽序列含有大量对细胞增殖和分化有促进作用的物质, 这使得改性填料在挂膜 2 d 后其表面生物量已经达到了较高的数量, 装有该种填料的反应器对 COD 的去除率也达到了 52%. 此后生物量增殖速率有所下降, 说明填料表面键合的蛋白分子大部分已经被细胞所消耗, 但此时填料仍表现出了较好的表面特性, 生物量的增长并没有停止. 这主要是由于填料表面仍有较高的表面能, 亲水性较好, 细胞与填料的黏附紧密, 细胞能继续在填料表面生长增殖. 相比之下, 未处理填料表面的生物量在达到一定数量后即不再增加, 这是因为未处理填料表面特性差, 表面能很低, 不具备良好的生物相容性, 同时其疏水性质使得细胞不易于黏附, 细胞与填料表面结合的紧密度不高, 在受到外界作用影响后其表面生物膜容易脱落, 因此生物膜在生长到一定厚度后由于自身质量和外界的影响而无法继续黏附在填料表面.

改性后的填料其表面初期挂膜速率较未改性填料相比有了很大的提高, 运行稳定后改性填料表面的生物量更是达到了 $400 \text{ nmol P} \cdot (\text{cm}^2 \text{ 填料})^{-1}$, 是未改性填料表面生物量的 3~4 倍.

2.4 改性成本初步分析

改性 1 m^3 填料在处理过程中所需的每种处理溶液体积大约为 0.3 m^3 左右. 洗涤氧化滤料表面用的盐酸溶液可以反复使用多次, 成本分析按其使用 10 次来计算, 而偶联剂由于其在反应中只起架

桥作用, 本身并不消耗, 理论上可以无限次重复使用, 因此其用量不好估计, 考虑到实际使用时有所损耗, 故按循环使用 10 次来进行计算。按此计算经过改性的填料其成本大约比未改性填料高 1 倍, 这是实验室小试的数据, 在实际生产应用过程中, 经过工艺优化以及规模化生产, 填料改性的费用将会低于实验室成本。

3 结 论

(1) 蛋白分子通过戊二醛键合反应接枝到聚苯乙烯生物填料的表面, 在填料表面引入了新的亲水性官能团, 同时提高了填料表面亲水性的 $-(C-O)-$ 键、 $-(C=O)-NH$ 键 和 $-(C=O)-O-$ 键的比例, 提高了聚苯乙烯的表面能, 改善了填料的亲水性能和生物相容性, 使得微生物的黏附和增殖速率都得到了提高。

(2) 共价接枝蛋白分子方法依靠化学键力固定蛋白分子, 这使得蛋白分子可以牢固地连接在填料表面而不脱落, 因此这种改性填料可以应用在生物膜法水处理技术中。

(3) 表面氧化、未氧化直接接枝蛋白分子和氧化后接枝蛋白分子这 3 种方法都能改善聚苯乙烯生物填料的表面特性, 其中氧化后接枝蛋白分子的方法效果最好, 而未氧化直接接枝蛋白分子法的效果要优于表面氧化法。

References

- [1] Qi Bingqiang (齐兵强), Wang Zhansheng (王占生). Application of BAF in wastewater treatment. *Water & Wastewater Engineering (China)* (给水排水), 2000, 26 (10): 4-8
- [2] Zhang Fan (张凡), Cheng Jiang (程江). Research progress in biofilm carrier for wastewater treatment. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control (China)* (环境污染治理技术与设备), 2004, 5 (4): 8-12
- [3] Zhang Jin (张近). The surface modification progress of plastics tower media. *Modern Plastics Processing and Applications (China)* (现代塑料加工应用), 1999, 11 (2): 51-55
- [4] Tsuji H, Satoh H, et al. Contact angle lowering of polystyrene surface by silver-negative ion implantation for improving biocompatibility and introduced atomic bond evaluation by XPS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 1998, 141 (1-4): 197-201
- [5] VanKrevelen D W. Properties of Polymers: Their Estimation and Correlation with Chemical Structure (聚合物的性质). Xu Yuanze (许元泽), Zhao Delu (赵得禄), Wu Dacheng (吴大诚), trans Beijing: Science Press, 1981: 125
- [6] Yu Hanqing (俞汉青), Gu Guowei (顾国维). Study on method of biofilm attachment in biofilm reactor. *China Water & Wastewater (China)* (中国给水排水), 1992, 8 (3): 13-17
- [7] Yu Xin (于鑫), Zhang Xiaojian (张晓健), Wang Zhansheng (王占生). Mensuration of biomass in drinking water biofilm treatment by lecithoid method. *Water & Wastewater Engineering (China)* (给水排水), 2002, 28 (5): 1-5
- [8] Nathalie Z, Christophe G. Amination of polystyrene microwells: application to the covalent grafting of DNA probes for hybridization assays. *Analytical Biochemistry*, 1996, 236 (1): 85-94
- [9] Kobayashi H, Ikada Y. Covalent immobilization of proteins on to the surface of poly (vinyl alcohol) hydrogel. *Biomaterials*, 1991, 12 (8): 747-751
- [10] Liu S Q, Ito Y, Imanishi Y. Cell growth on immobilized cell growth factor (9): Covalent immobilization of insulin, transferrin, and collagen to enhance growth of bovine endothelial cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1993, 27 (7): 909-915