

融合酵母对重金属 Cr 的富集机理

李 森 尹 华* 何宝燕 叶锦韶 彭 辉 龙 焰 张 娜

(暨南大学环境工程系 广东 广州 510632)

摘 要: 研究了 1 株高效融合酵母对 Cr 的富集机理及其微观结构变化。研究表明, 融合酵母对 Cr^{6+} 的还原、吸附过程伴随着溶液 H^+ 离子的消耗。菌体表面的络合基团主要有氨基、羟基、磷酸基等, 其中磷酸基团对吸附的影响最大, 该基团屏蔽后总 Cr 去除率及 Cr^{6+} 还原率分别降低了 70% 和 46%; 吸附过程趋向于将表面络合的 Cr 运输至细胞内并和细胞内物质形成更稳定的结合态, 该过程可在吸附 90 min 内达到平衡; Cr 在细胞表面的吸附及还原作用会改变细胞微观结构, 使细胞通透性增强。

关键词: 融合酵母, 富集机理, Cr

Mechanism of Chromium Accumulation by Fused Yeast

LI Sen YIN Hua* HE Bao-Yan YE Jin-Shao PENG Hui LONG Yan ZHANG Na

(Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: The mechanism of chromium accumulation and microstructure transformation of the fused yeast were studied in this paper. The result showed that the process of Cr^{6+} reduction and adsorption was accompanied by the H^+ consumption. The main adsorptive groups on the strain surface included amino, hydroxyl, phosphate group and amide, among which phosphate group played vital role in the chromium accumulation. The removal rate of chromium and reduction rate of hexavalent chromium declined 70% and 46%, respectively, when phosphate group was masked. During the adsorption process the chromium ions complexed on the surface of fused yeast was transported into the cell wall and combined with inclusion to form steady species and this took 90 min to reach the equilibrium. The biosorption and reduction of Cr on the cell surface would alter microstructure of cell surface, reduce cell membrane potential and increase cell membrane permeability.

Keywords: Fused yeast, Accumulation mechanism, Chromium

随着冶炼、电镀、印染等工业的不断发展, 水中的 Cr 等重金属污染日趋严重, 对人类健康和生态环境的危害越来越大。重金属生物吸附法因具有二次污染低, 对低浓度废水处理效果好等优点^[1], 受到众多研究者的广泛关注。现有的研究表明酵母

菌、霉菌、细菌、藻类等微生物对 Cr 都具有一定的吸附能力^[2,3]。在生物吸附机理方面也已开展了不少研究, 如已有研究者用电位滴定、红外光谱等方法研究了绿藻、球衣菌、木霉等生物体在吸附过程中的离子交换机制和吸附后生物表面基团的变化^[4,5],

基金项目: 广州市科技局科技攻关项目(No. 2007Z3-E0171); 广东省科技计划项目(No. 2008B030302038)

* 通讯作者: Tel: 86-20-85220564; E-mail: thyin@jnu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-22; 接受日期: 2009-07-21

然而对特定基团在吸附过程中的作用大小及细胞内外的富集机理研究较少。本文通过化学屏蔽、选择性荧光染色、红外光谱分析、流式细胞仪、扫描电镜及 X 射线衍射能谱分析等手段,探讨了融合酵母对 Cr 的富集机理及细胞的微观形态变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

融合酵母菌 R32: 由本课题组通过电场诱导融合构建, 亲本菌株是解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 和热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)^[6]。

培养基成分: 葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 2 g/L, 蛋白胨 2 g/L, MgSO_4 0.05 g/L, 自来水配制, pH 为 5.5~6.5。

含 Cr 溶液: 由分析纯 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶于双蒸水配制, 浓度为 $30 \text{ mg/L} \pm 1 \text{ mg/L}$, 用 HCl 调节 pH 值至 3.0。

1.2 实验方法

1.2.1 吸附过程中 Cr^{6+} 的还原及 H^+ 的消耗测定: 将 20 g/L (含水率 85.7%) 融合酵母菌投加到含 Cr 溶液中, 120 r/min 振荡吸附, 在不同的吸附时间取样测定溶液 pH、 Cr^{6+} 浓度和总 Cr 浓度。

1.2.2 菌体表面主要基团屏蔽及对 Cr 的吸附实验: 利用化学方法屏蔽融合酵母表面的不同作用基团, 以研究各基团在吸附中的贡献。化学屏蔽实验借鉴 Katarzyna 等^[7]用于螺旋藻的研究方法。将菌体浸泡于无水甲醇和浓盐酸(1:1, V/V)的混合液中 30 min, 脂化羧基。将菌体浸泡于甲醛和甲酸(1:1, V/V)混合溶液中 30 min, 甲基化胺基和羟基。将菌体浸泡于磷酸三乙酯和硝基甲烷(1:1, V/V)混合溶液中 30 min, 脂化磷酸基团。菌体不经任何处理直接用于吸附, 作为对照。掩蔽反应完成后, 菌体用蒸馏水洗 2 次, 按 15 g/L 的投加量在 30 mg/L Cr 液中吸附 8 h。

1.2.3 吸附过程中 Cr 在菌体表面和内部的分布及稳定结合量的变化测定: 在分别装有 100 mL 30 mg/L Cr 液的锥形瓶中加入 1.5 g 融合酵母菌体, 摇床中 120 r/min 振荡吸附, 不同时间分别取出 1 个锥形瓶, 将锥形瓶中的溶液 4000 r/min 离心分离 20 min, 得到菌体和上清液, 分别测定上清液的总 Cr 浓度和 Cr^{6+} 浓度。在收集得到的菌体中加入 30 mL 洗脱液(0.1 mol/L 的 $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$)振荡洗脱 30 min 后, 离心收集洗脱液, 测定其 Cr 的含量作为细胞表面 Cr 吸附量。离心后的菌体再加入 30 mL 洗脱液于细

胞破碎仪中超声破壁, 然后振荡洗脱 30 min, 测量其 Cr 的含量即为胞内吸附量。剩余的细胞残体消解后测定其 Cr 含量作为菌体对 Cr 的稳定结合量, 实验做 3 个平行。

1.2.4 吸附前后菌体表面基团红外光谱分析: 将吸附 Cr 前后菌体于 -40°C 左右真空冷冻干燥过夜。完后于 40°C 烘箱中烘干 4 h, 得到分析样品。样品经 KBr 稀释压片后用傅立叶红外光谱扫描分析, 每个样品重复压片扫描 3 次。

1.2.5 吸附前后细胞结构及主要元素能谱分析: 处理 Cr 液前后的细胞经清洗、固定、脱水、干燥、镀膜后于扫描电镜(SEM)下观察细胞形貌, 同时利用 X 射线衍射能谱(EDX)对细胞主要元素进行分析。

1.2.6 吸附后细胞膜通透性的变化测定: 荧光染色剂碘化丙啶(PI)是一种排斥性染料, 当菌体细胞膜受到破坏, 细胞通透性增强时 PI 能通过细胞膜对菌体内的 DNA 进行染色^[8]。利用 PI 的这种原理, 可以通过测定融合酵母吸附 Cr 前后与荧光染料结合的荧光强度考察吸附前后细胞通透性的变化。将吸附前、后的菌体用荧光染色剂 PI 染色后, 在流式细胞仪下测定荧光强度, 分析细胞膜通透性的变化。

1.2.7 各价态 Cr 的测定方法: 总 Cr 采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP)测定; Cr^{6+} 采用二苯碳酰二肼分光光度法测定。

2 结果与讨论

2.1 吸附过程中 Cr^{6+} 的还原解毒及 H^+ 的消耗

实验考察了融合酵母吸附过程中溶液体系 Cr 去除、 Cr^{6+} 还原和 pH 的变化, 以探讨菌体在还原和吸附过程中的离子变化情况。结果如图 1 所示。由图 1 可见, 总 Cr 去除率和 Cr^{6+} 还原率都随着吸附时间的增加而增加, 且在数值上十分接近, 说明溶液体系中的 Cr 均以 Cr^{6+} 的形式存在, 而 Cr^{6+} 在菌体表面被还原后基本被菌体捕获, 很少扩散回溶液体系。溶液的 pH 值随吸附时间不断增加, 从初始 pH 3.0 增加到最终的 pH 7.35, 说明融合酵母在还原、吸附 Cr^{6+} 的过程伴随着 H^+ 离子的消耗。Kishore K 等^[9]对稻壳吸附 Cr^{6+} 的机理研究中也得到了相同结论, Cr^{6+} 的主要存在形式 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 的还原反应可表示为 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 14\text{H}^+ + 6\text{e}^- = 2\text{Cr}^{3+} + 7\text{H}_2\text{O}$, 而融合酵母表面的羟基、羧基等基团是很好的电子供体。

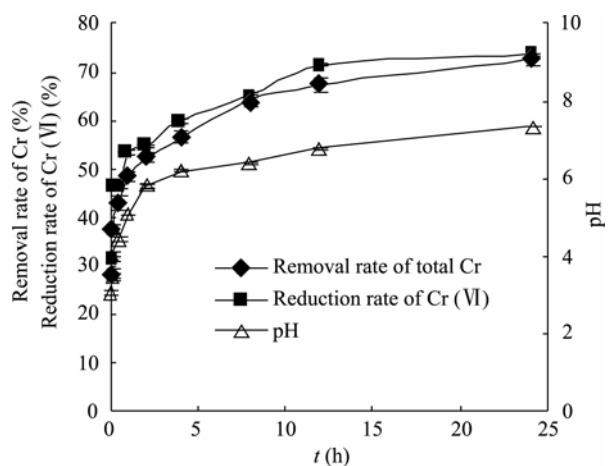


图1 吸附过程中总 Cr 去除、 Cr^{6+} 还原及 pH 的变化关系
Fig. 1 Total Cr removal rate, Cr^{6+} reduction rate and pH with biosorption time

2.2 菌体表面主要基团屏蔽后对 Cr 吸附能力的变化

生物吸附剂对重金属的富集过程首先是细胞表面的吸附, 因此受表面基团和吸附位点的影响较大。大量研究表明, 氨基、羟基、羧基、磷酸基是起吸附作用的主要基团^[10-12]。本研究利用化学屏蔽方法研究了各基团在吸附中的贡献, 结果如图 2 所示。由图可知对 Cr 吸附和还原作用影响最大的基团是磷酸基, 该基团屏蔽后菌体对 Cr 的去除率下降了 70%, Cr^{6+} 还原率降低了 46%。氨基和羟基的影响也较为明显, 两基团屏蔽后 Cr 的去除率和还原率分别降低了 10%和 7%。羧基对 Cr 的去除和还原率影响很小。分析原因, 酵母细胞壁的最外层是磷酸化甘

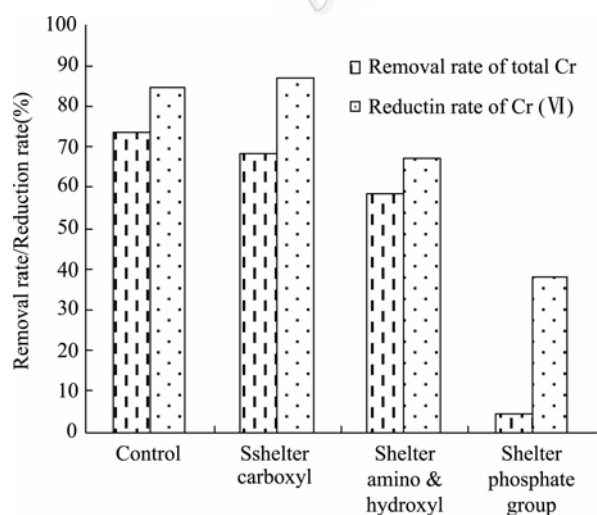


图2 不同基团屏蔽后对菌体吸附能力的影响
Fig. 2 Effect of functional group sheltering on chromium accumulation capacity

露聚糖, 细胞膜主要由磷脂双分子层和嵌在双分子层中的蛋白构成, Cr^{6+} 在菌体表面还原后与磷酸基团结合, 并通过磷酸水解酶(ATP 酶)的泵作用主动运输进入细胞内部。磷酸基团的脂化反应屏蔽了这两种作用, 降低了 Cr^{6+} 的吸附和还原能力。Volesky 等通过能谱仪的分析证实实用活性啤酒酵母 *S. cerevisiae* 吸附 Cd^{2+} , Cd^{2+} 在细胞内的液泡中以磷酸盐的形式沉淀下来, 说明磷酸基团对 Cd^{2+} 的吸附和运输起到重要作用^[13], 这与本研究的结果类似。

2.3 Cr 在菌体表面及内部的富集过程

为了考察融合酵母细胞的吸附过程, 实验研究了吸附过程中 Cr 在菌体表面和内部的分布及稳定结合量的变化情况, 结果如图 3 所示。由图可见, 吸附在 90 min 达到平衡, 总吸附量为 10.6 mg/g; 在吸附 90 min 内, Cr 与胞内物质大量结合, 稳定结合量迅速增加, 在吸附 90 min 时 Cr 在细胞内的稳定结合量达到 6.5 mg/g, 占吸附总量的 61.3%; 在整个吸附过程中细胞内部吸附量缓慢上升, 90 min 时内部吸附占总吸附量的 32.1%; Cr 在细胞表面的吸附很快达到平衡(15 min 内), 且平衡吸附量较低, 保持在 0.5 mg/g 左右; 通过以上分析可知大部分 Cr 被富集至融合菌细胞内部。另外, 细胞内部未检测到 Cr^{6+} 说明强毒性的 Cr^{6+} 无法被运输至细胞内, 因此 Cr^{6+} 还原作用依赖于胞外分泌物和细胞表面基团作用。

2.4 吸附前后菌体表面基团的变化

对吸附重金属前后的细胞进行了红外光谱分析 ($4000\text{ cm}^{-1}\sim 450\text{ cm}^{-1}$)。结果如图 4 所示, 由于酵母

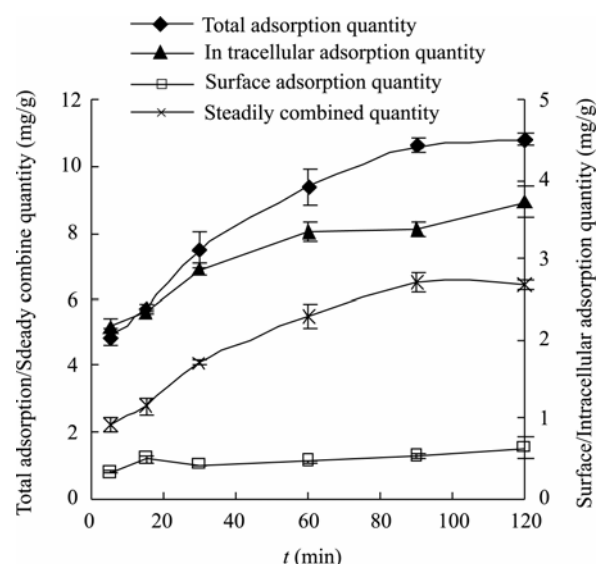


图3 吸附过程中 Cr 在细胞各处的分布情况
Fig. 3 Cr distribution in cell during biosorption

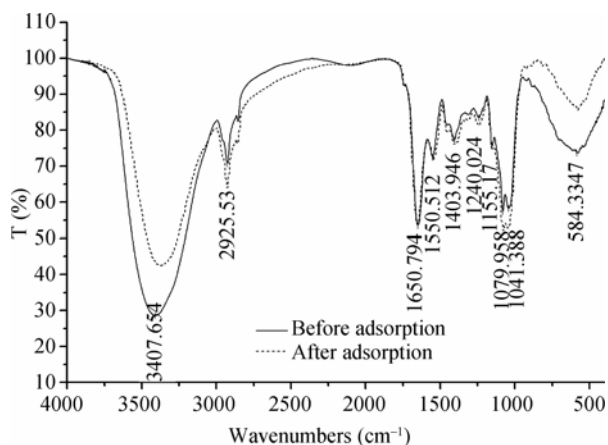


图4 吸附前后细胞 FTIR 图

Fig. 4 IR spectra of biomass before and after sorption with chromium

菌所含组分复杂,在整个吸收波数范围内均有明显的吸收。3407 cm^{-1} 处的钝峰是醇缔合羟基的特征峰; 2925 cm^{-1} 为 CH_2 的不对称伸缩振动; 1650 cm^{-1} 处为酰胺 ($\text{O}=\text{N}-\text{H}$) 带, 是 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动; 1550 cm^{-1} 为酰胺带, 是 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动和 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动; 1404 cm^{-1} 为酰胺带, 是 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动; 1259 cm^{-1} 是磷酸二酯基团 PO_2^- 的不对称伸缩振动; 1079 cm^{-1} 是磷酸二酯基团 PO_2^- 的对称伸缩振动; 1153 cm^{-1} 处为蛋白的 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动; 1039 cm^{-1} 是吡啶类的面内

弯曲振动; 888 cm^{-1} 是硝基化合物中 $\text{C}-\text{N}$ 的伸缩振动。表 1 列出了吸附前后各基团振动波数的变化。由表 1 可见: 吸附后缔合羟基振动峰、酰胺伸缩振动峰、磷酸二酯基团的对称及反对称伸缩振动峰、蛋白 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰均向低波数方向偏移, 说明吸附过程中 Cr 会与菌体的羟基、氨基、磷酸基团、蛋白类物质等络合, 使这些基团的活性降低, 这与 2.2 中的分析结果相吻合; 此外, 吡啶类的面内弯曲振动峰向高波数方向偏移基本和磷酸二酯基团的反对称伸缩振动峰重合形成一个钝峰, 说明重金属的吸附对融合酵母的核酸也具有一定影响。

2.5 吸附前后细胞结构及元素含量变化

对细胞吸附前后的微观结构观察和元素组成分析结果见图 5 及图 6。吸附前细胞表面光滑饱满, 细胞生长状态良好, 出现芽殖; 吸附后, 细胞表面凹凸不平并出现很多小颗粒物质。这是因为 Cr 与酵母细胞壁的多聚糖, 细胞体外分泌出的蛋白质、酰胺等生物大分子等物质结合, 形成颗粒物, 附着于细胞表面, 同时, 在 Cr 的毒性刺激作用下, 细胞会分泌一些胞外酶进行解毒, 这在胞外分泌物的紫外检测中得到了证实^[14,15]。X 射线衍射能谱分析可知, 吸附后细胞表面出现 Cr 的 2 个吸收峰, 结合能为

表 1 吸附前后主要基团波数的变换(cm^{-1})
Table 1 IR spectra analysis of biomass before and after sorption with chromium

基团 Groups	缔合 -OH	CH_2 Vas($\text{O}-\text{H}$)	酰胺 $\nu(\text{C}=\text{O})$	酰胺 $\text{B}(\text{N}-\text{H})$ $+\nu(\text{C}-\text{N})$	酰胺 $\nu(\text{C}-\text{N})$	PO_2^- Vas (PO_2^-)	蛋白 $\text{C}-\text{O}$ $\nu(\text{C}-\text{O})$	PO_2^- Vs(PO_2^-)	吡啶类 $\text{B}(\text{C}-\text{H})$
Before adsorption	3407.6	2925.5	1650.8	1550.5	1403.9	1240.0	1155.2	1079.9	1042.4
After adsorption	3377.9	2925.6	1652.6	1545.8	1405.4	1237.3	—	1077.1	—

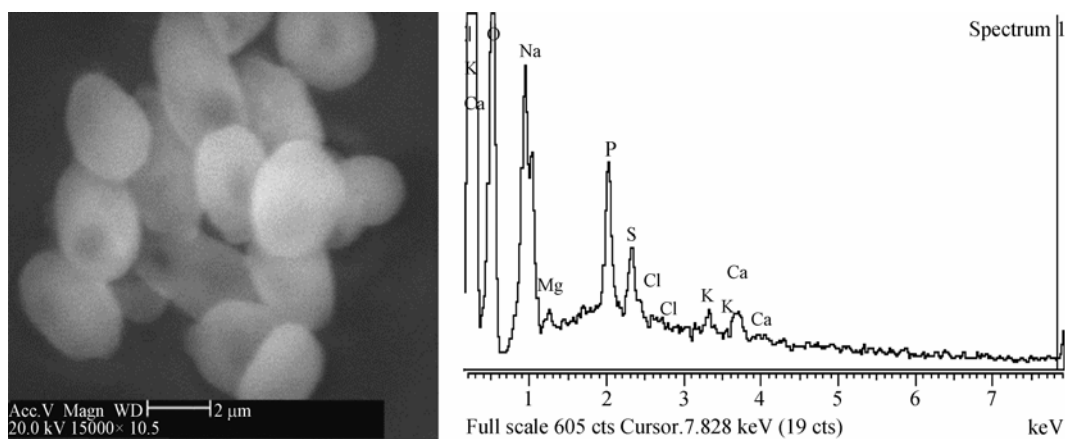


图5 吸附前细胞 SEM 和 EDX 图

Fig. 5 SEM and EDX spectra of biomass before biosorption

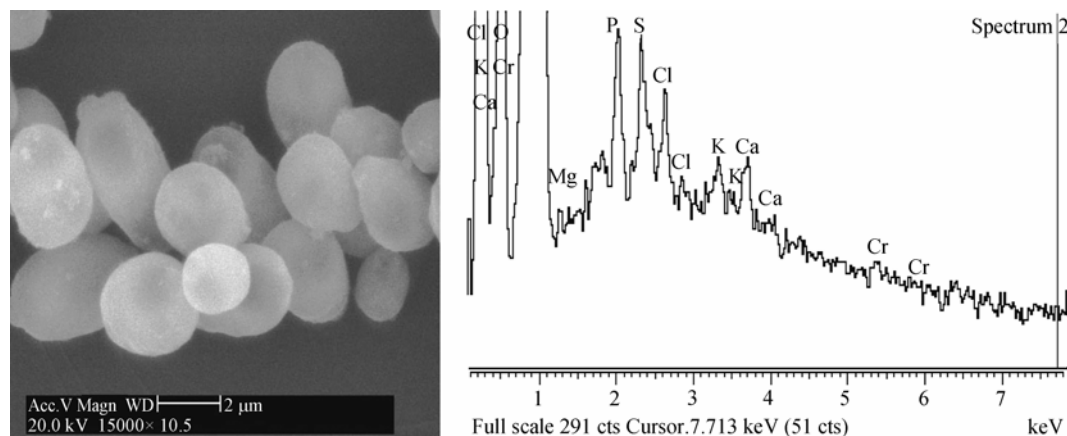


图 6 吸附后细胞 SEM 和 EDX 图
Fig. 6 SEM and EDX spectra of biomass after biosorption

5 keV~6 keV, 其含量占细胞重量比的 0.93%, 原子比的 0.32%, 表明 Cr 与细胞表面基团稳定络合; 且吸附后峰型较吸附前复杂, 这也反映了在细胞的解毒机制下, 酶物质的分泌使细胞表面的物质丰富度增加。

2.6 Cr 吸附对细胞膜通透性的影响

流式细胞仪的测定结果如图 7 所示。吸附前绝大部分细胞活性良好, 细胞膜完整, 细胞无法与 PI 结合产生荧光。只有 4.9% 的凋亡细胞受染发荧光。吸附后受染细胞的比例增加到 25.1%, 增加了约 5 倍。说明由于细胞表面对 Cr 的强吸附作用, 及 Cr^{6+} 在细胞膜上的还原反应, 促使细胞膜的表面电位降低, 膜的通透性大大增强, 从而有利于 PI 进入胞内; 另一方面, Cr 的毒性作用也会造成部分细胞的死亡,

Avery 等通过铜、镉诱导啤酒酵母的生物抗性, 也发现这两种重金属均会导致细胞膜的不饱和脂肪酸成分的增加和通透性的增大^[16]。

3 结论

1) 融合酵母菌体表面与 Cr 络合的基团有羟基、氨基、磷酸基及蛋白类基团等, 其中磷酸基团贡献最大, 该基团屏蔽后总 Cr 去除率及 Cr^{6+} 还原率分别降低了 70% 和 46%, 其次是氨基和羟基, 羧基影响较小。 Cr^{6+} 的还原、吸附过程伴随着溶液 H^+ 离子的消耗。

2) Cr 在融合酵母表面经吸附及还原后向内运输。吸附前 90 min, 运输至内部的 Cr 与胞内物质大

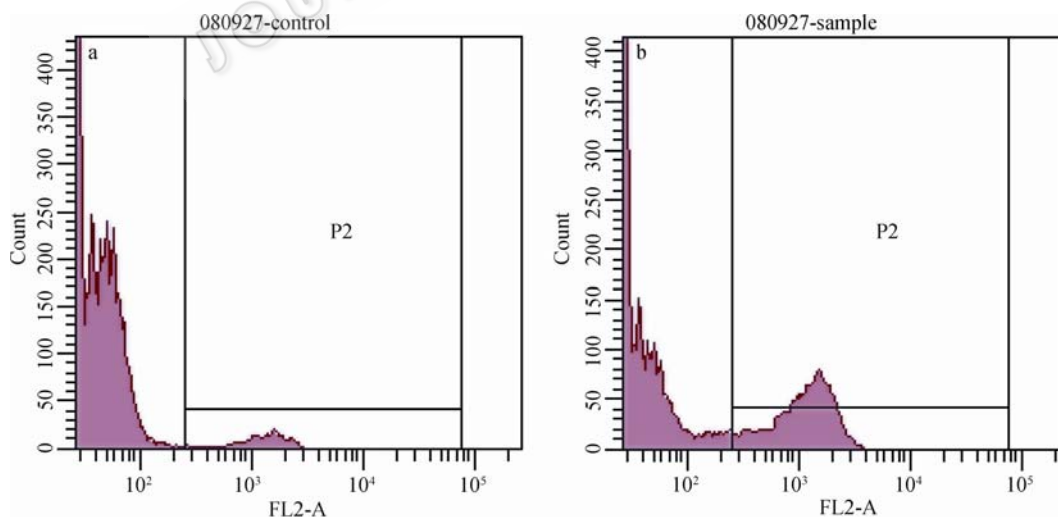


图 7 酵母流式细胞仪检测图
Fig. 7 FCM spectrum of biomass

注: a: 吸附前; b: 吸附后。

Note: a: Before biosorption; b: After biosorption.

量结合, 形成更稳定的结合态, 平衡稳定结合量达 6.5 mg/g, 占吸附总量的 61.3%。

3) 扫描电镜、X 射线衍射、流式细胞仪检测证实, Cr 与融合酵母表面的大分子物质络合形成颗粒物附着于细胞表面, Cr 在细胞表面的吸附及还原作用改变了细胞微观结构, 降低了细胞膜电位, 从而使细胞通透性增强。

参 考 文 献

- [1] 李 强, 陈 明, 催富昌, 等. 生物吸附剂 ZL5-2 对 Cr() 的吸附机理. 环境科学, 2006, 27(2): 343–346.
- [2] Kononova VV, Dmytrenko GM, Nigmatullin RR. Chromium(VI) reduction in a membrane bioreactor with immobilized *Pseudomonas* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(7): 899–907.
- [3] Bai RS, Abraham TE. Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. *Water Research*, 2002, 36(5): 1224–1236.
- [4] Han X, Wong YS, Tam NFY. Surface complexation mechanism and modeling in Cr() biosorption by a microalgal isolate: *Chlorella miniata*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, 303(2): 365–371.
- [5] 沈 薇, 杨树林, 李校堃, 等. 木霉(*Trichoderma* sp.) HR-1 活细胞吸附 Pb() 的机理. 中国环境科学, 2006, 26(1): 101–105.
- [6] 卢显妍, 尹 华, 彭 辉, 等. 原生质体电诱导融合构建去除重金属的高效菌. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 78–81.
- [7] Katarzyna C, Andrzej C, Helena G. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*, 2005, 59(1): 75–84.
- [8] 方曙光, 黄 立, 储 炬. 流式细胞仪检测毕赤酵母发酵过程中的细胞活性. 华东理工大学学报, 2006, 32(9): 1046–1049.
- [9] Krichnani KK, Meng XG, Christodoulatos C, et al. Biosorption mechanism of nine different heavy metals onto biomatrix from rice husk. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153(3): 1222–1234.
- [10] Pagnanelli F, Mainelli S, Bornoroni L, et al. Mechanisms of heavy-metal removal by activated sludge. *Chemosphere*, 2009, 75(8): 1028–1034.
- [11] Amini L, Younesi H, Bahramifar N. Biosorption of nickel(II) from aqueous solution by *Aspergillus niger*: Response surface methodology and isotherm study. *Chemosphere*, 2009, 75(11): 1483–1491.
- [12] 秦玉春, 关晓辉, 王海涛, 等. 浮游球衣菌对 Cu²⁺ 的吸附及生物吸附机理初探. 环境科学学报, 2008, 28(5): 892–896.
- [13] Volesky E, May-Phillips HA. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 42(5): 797–806.
- [14] 何宝燕, 尹 华, 彭 辉. 酵母菌吸附重金属铬的生理代谢机理及细胞形貌分析. 环境科学, 2007, 28(1): 194–198.
- [15] Yin H, He BY, Peng H, et al. Removal of Cr(VI) and Ni() from aqueous solution by fused yeast: Study of cations release and biosorption mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 158(2-3): 568–576.
- [16] Avery S. Caesium accumulation by microorganisms: uptake mechanisms, cation competition, compartmentalization and toxicity. *J Ind Microbiol*, 1995, 14(2): 76–84.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名：菌株的属名、种名（包括亚种、变种）用拉丁文斜体。属的首字母大写，其余小写，属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体，首字母大写。

限制性内切酶：前 3 个字母用斜体，后面的字母和编码正体平排，例如：*Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写：氨基酸缩写用 3 个字母表示时，仅第一个字母大写，其余小写，正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体，蛋白质符号首字母大写，用正体。