

铬对重金属去除菌影响的研究*

卢显妍 尹 华** 彭 辉 叶锦韶 张 娜

(暨南大学环境工程系 广州 510632)

摘要: 考察了 Cr^{6+} 浓度和培养时间对 4 株重金属去除菌致死率的影响、重金属去除菌除铬性能的稳定性、吸附铬前后胞内外的变化、 Cr^{6+} 对胞内可溶性还原糖含量的影响以及多种因素对重金属去除菌毒性, 初步探讨了重金属去除菌的抗 Cr^{6+} 机理。实验结果表明, 4 株实验菌的致死率随培养时间的变化趋势都是先升高后降低, 最后再升高; 假丝酵母的可驯化性较好; 掷孢酵母 7-3 对高浓度 Cr^{6+} 的耐受性最好; Cr^{6+} 对 4 株实验菌的各种代谢过程有一定影响; 扫描电镜、透射电镜及原子力显微镜等实验结果表明: 产朊假丝酵母的除铬机理是表面吸附和胞内积累并存; 在正交实验中, Cr^{6+} 浓度、pH、培养时间、N 源、C 源、吸附时间等 6 个因素对 4 株实验菌的影响各不相同。

关键词: 重金属, 铬, 抗性, 酵母

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0015-05

Study on Effects of Chromium on Heavy Metal Removing Strains*

LU Xian-Yan YIN Hua** PENG Hui YE Jin-Shao ZHANG Na

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

Abstract: Effects of Cr^{6+} concentration and culture time on four heavy metal removing strains, stability of these four strains removing Cr^{6+} , configuration changes inside or outside their cells, effects of Cr^{6+} on soluble reductive sugar inside their cells, and effect of several factors on these strains had been studied, and the Cr^{6+} resistance mechanisms of these strains have been discussed elementarily. The results showed that the lethality of these strains caused by Cr^{6+} was similar with one another, namely, increasing at first, then decreasing, and finally increasing again as culture time passed. Acclimatization of *Candida* sp. was better than *Sporobolomycetaceae* sp., and the Cr^{6+} resistance of *Sporobolomycetaceae* sp. 7-3 was the best of the four. The research also demonstrated that the metabolic activity of these strains had been influenced by Cr^{6+} in a certain extent. Scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and atomic force microscopy observations approved that removal of Cr^{6+} by *Candida* sp. was depended on both surface adsorption and intracellular accumulation. Effects of Cr^{6+} concentration, pH, culture time, nitrogen source, carbon source and adsorption time on these strains are not the same.

Key words: Heavy metal, Chromium, Resistance, Yeast

随着工业的迅速发展, 环境中的重金属污染越来越严重。微生物是重金属生物治理中最受关注的生物类群。而了解微生物能否耐受重金属不仅是利用微生物处理重金属废水的必要前提^[1], 还是对此类微生物进行筛选、保种和工业发酵的必要条件。但目前应用酵母菌进行此类研究的报道并不多见。铬是中国环境保护优先控制污染物,

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 50278040)

广东省科技计划项目 (No. 2003C32103)

广东省科技计划重大专项资助 (No. 2004A30308002)

** 通讯作者 Tel: (020) 85220564, E-mail: suphylou@163.com

收稿日期: 2004-05-19, 修回日期: 2004-08-19

对人体及其它生物具有很强的毒性。所以,对铬的吸附的研究在重金属生物吸附处理研究中具有很好的代表性。本文初步探讨了 4 株重金属去除菌——掷孢酵母 7-3 (*Sporobolomyetaceae* sp. 7-3)、玫瑰掷孢酵母 (*Sporobolomyetaceae roseus*)、解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 和产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 的抗铬机理及 Cr^{6+} 对它们的毒性影响,为上述 4 株重金属去除菌的实际应用提供参考。该 4 株菌均由暨南大学环境工程系实验室筛选鉴定保存,并证实具有良好的吸附去除重金属的性能^[12]。

1 实验方法

1.1 Cr^{6+} 浓度对重金属去除菌菌落数的影响

分别取处于快速生长期的 4 株实验菌菌液,离心去除培养基后制成菌悬液,取 1 mL 菌悬液投加于重铬酸钾溶液中,30℃ 150 r/min 振荡处理 24 h,稀释后涂平板计数^[3]。

1.2 培养时间对重金属去除菌致死率的影响

分别取不同培养时间的 4 株实验菌接入 99 mL 无菌水和 300 mg/L 的铬液中,振荡处理 24 h 后涂平板计数,计算致死率^[4]。

1.3 重金属去除菌除铬性能的可驯化性研究

别取 1 mL 4 株实验菌的菌悬液注入一定浓度的铬液中,处理 24 h 后涂平板,从平板中挑取一个生长良好的菌落重复上述步骤,所得群落为第 1 次接种菌落。采用同样的方法连续处理 20 次。

1.4 吸附铬前后胞内外的变化情况

分别取在蒸馏水和 250 mg/L 的铬液中处理 24 h 的菌体,利用扫描电镜 (SEM),透射电镜 (TEM) 和原子力显微镜 (AFM) 等仪器观察其表面和内部发生的变化。

1.5 菌体可溶性糖含量的测定

取铬液处理前后的菌液,离心后称量菌体湿重,然后用蒽酮比色法测定可溶性糖的含量^[5,6]。

1.6 多种因素对重金属去除菌影响的正交实验

选取 pH 值 (3, 5, 7, 9, 11), 培养时间 (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h), Cr^{6+} 浓度 (50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L), 吸附时间 (4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h), 葡萄糖浓度 (0.5 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L, 7.5 mg/L, 10.0 mg/L) 和尿素浓度 (0, 1.5 mg/L, 3.0 mg/L, 4.5 mg/L, 7.5 mg/L) 等 6 个因素 5 个水平,按正交表 $L_{25}(5^6)$ 进行正交实验。确定 6 个因素对 4 株实验菌的联合影响及效应值。

2 结果与讨论

2.1 Cr^{6+} 浓度对重金属去除菌菌落数的影响

随着 Cr^{6+} 浓度的增大,4 株实验菌存活的菌落数大致呈下降趋势,如图 1 所示。浓度较低时,4 条曲线均有一个平台,说明 Cr^{6+} 浓度较低时,对实验菌的生长繁殖影响不大。浓度继续升高,当到达一个临界值时, Cr^{6+} 对菌体细胞产生较为严重的毒害,菌体的生长繁殖受到明显抑制,甚至大量死亡,菌落数急剧下降。不同的菌株,其临界浓度有所不同:解脂假丝酵母和产朊假丝酵母的临界浓度约为 100 mg/L;玫瑰掷孢酵母约为 200 mg/L;掷孢酵母 7-3 的临界浓度最大,约为 400 mg/L。其中掷孢酵母 7-3

对 Cr^{6+} 的耐受性最好, 浓度为 1,000 mg/L 时, 其存活率仍有约 3%, 其余 3 株实验菌的存活率小于 0.1%。随着 Cr^{6+} 浓度的进一步增大, 下降趋势趋于平缓, 原因是: 随着 Cr^{6+} 浓度的增加, 菌群中的大部分敏感细胞相继被 Cr^{6+} 抑制, 仅有少数耐受性好的细胞能存活, 菌体数量变化趋于稳定。

2.2 培养时间对重金属去除菌致死率的影响

从实验结果可见, 4 株实验菌的致死率随培养时间的变化趋势大致相同: 在初始阶段致死率随处理时间的延长而上升, 继而出现较为明显的下降, 随后又重新上升。这是

因为在培养初期, 从培养液中提取出来的菌体正处于生长适应期与快速生长期, 迫切需要吸收并积累大量的营养物质以满足自身的生长繁殖, 将其投入铬液后, 营养严重不足, 且 Cr^{6+} 的吸附积累抑制了大分子物质的合成, 使细胞的代谢活动受限, 对 Cr^{6+} 的抗性降低, 死亡率升高。但进入快速生长期后期和稳定期初期后的大部分菌体的各种抗性机制趋于成熟, 此时将菌体投入铬液, 其死亡率的变化趋于平缓。随后, 菌体进入体内物质积累、代谢产物增加的阶段, 培养液中营养物减少, 细胞分裂速度减慢, 处于该阶段的菌体对不利环境的适应性增强, 在铬液中的死亡率下降。当菌体进入衰亡期, 细胞开始衰老, 对 Cr^{6+} 的抗性降低, 死亡率重新升高。但掷孢酵母 7-3 的死亡率未出现回升, 原因是掷孢酵母 7-3 生长周期较长, 在实验所设计的时间内菌体未进入衰亡期, 但其死亡率的下降趋势已趋于平缓, 可见即将进入衰亡期。

2.3 重金属去除菌除铬性能的稳定性研究

在实际废水处理中, 吸附处理后的菌体必须不断从体系中排除, 并补充经过工业发酵的新菌体, 因此菌体去除重金属的性能能否通过自身调节稳定遗传, 并通过优胜劣汰使整个菌群去除重金属的性能得到改善, 对其实际应用具有非常现实的意义。重金属去除菌除铬性能的稳定性研究结果显示: 随着接种次数的增加, 两个假丝酵母菌群对 Cr^{6+} 的抗性明显增强, 菌群的致死率降低一半。而接种次数的增加对两个掷孢酵母菌群抗铬性能的影响不大, 菌体的致死率变化较小。这说明假丝酵母的可驯化性较好, 经过驯化可在一定程度上提高其菌群的抗性; 而两个掷孢酵母菌群的除铬性能相对比较稳定, 外界条件对其影响不大, 这些都有利于实验菌株的实际应用。

2.4 吸附铬前后胞内外的变化情况

为了研究 Cr^{6+} 对实验菌菌体细胞内外产生的影响, 选取产朊假丝酵母为例, 对蒸馏水和高浓度铬液中生长的菌体进行细胞内外 SEM, TEM 和 AFM 观察。SEM 结果 (图 2) 和 AFM 的结果 (图 3) 均显示: 高浓度铬液中生长的菌体表面较为粗糙, 而无铬的菌体表面比较光滑。原因可能有以下几个: ①细胞预处理时需用乙醇脱水, 会导致细胞轻微发皱; ②细胞在不良环境中生长, 壁膜间的周质空间变大, 脱水后细胞变皱; ③铬对细胞内部结构的毒害作用, 使胞内生物大分子遭破坏, 细胞内产生空壳结构, 脱水后细胞壁内陷; ④ Cr^{6+} 可能通过沉淀或晶体化作用沉积于细胞表面, 或 Cr^{6+} 被胞外分泌物或细胞壁的腔洞捕获而沉积。从 TEM 结果 (图 4、图 5-1 和图 5-2) 可以看到, 在吸附铬前, 菌体的细胞壁和膜之间也有一些小空隙, 应该是由乙醇脱水而

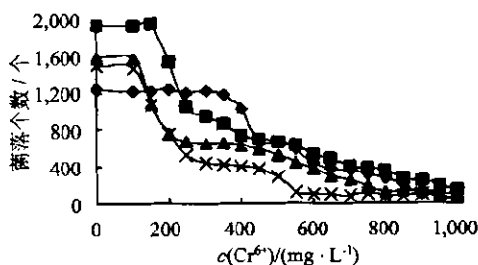


图 1 Cr^{6+} 浓度对重金属去除菌菌落数的影响

◆ 掷孢酵母 7-3, ■ 玫瑰掷孢酵母,
▲ 解脂假丝酵母, × 产朊假丝酵母

导致细胞发生轻微的质壁分离,但这些空隙很小,对细胞表面形态影响不大,因此在 SEM 和 AFM 图中没有表现出来,与推测①吻合;图 5-1 中,高浓度铬液中生长的菌体细胞则出现较为明显的凹陷和质壁分离,与推测②、③一致;但处理高浓度的铬液后,大部分细胞仍保持完整,细胞核及其它细胞器清晰可见(见图 5-2),说明高浓度铬液对产朊假丝酵母的影响并不是很大。

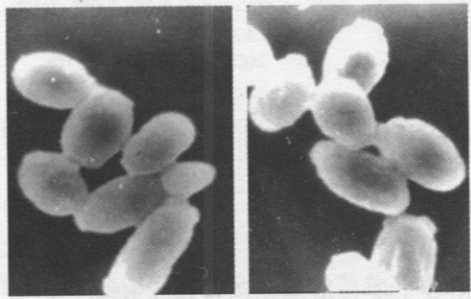


图 2 无铬(左)及高浓度铬液中(右)的菌体细胞的 SEM 图($\times 5,000$)

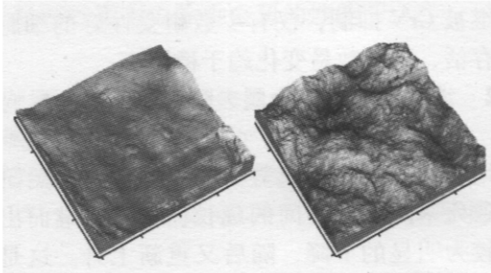


图 3 无铬(左)及高浓度铬液中(右)的菌体细胞表面的 AFM 三维图($2\mu\text{m}$)

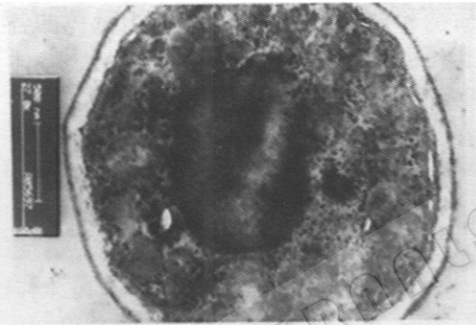


图 4 无铬菌体细胞的 TEM 图($\times 27,000$)

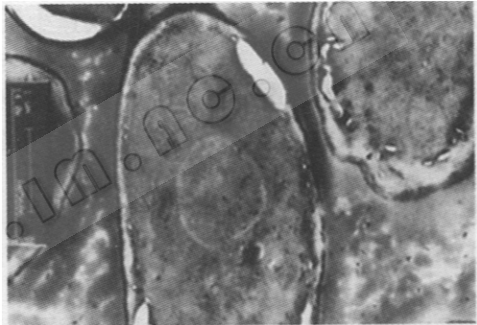


图 5-1 高浓度铬液中菌体细胞的 TEM 图($\times 14,000$)

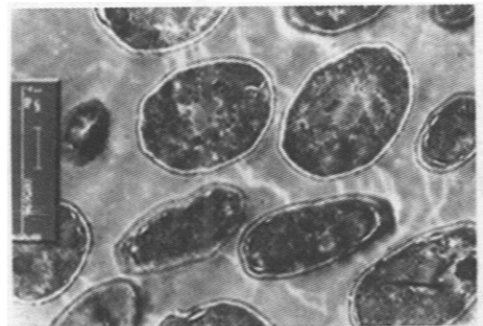


图 5-2 高浓度铬液中菌体细胞的 TEM 图($\times 7,000$)

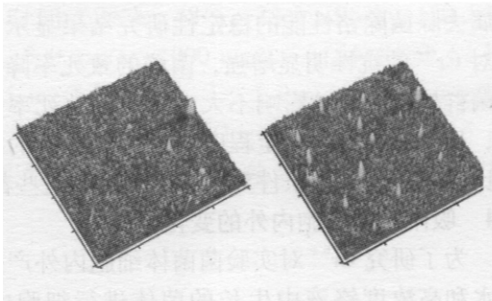


图 6 无铬(左)及高浓度铬液中(右)菌体细胞内部 AFM 三维图($2\mu\text{m}$)

图 6 为在无铬和高浓度铬液中生长的菌体的内含物的 AFM 三维图。从图中可以看到,无铬的菌体细胞内有一些直径约为 $0.05\mu\text{m} \sim 0.20\mu\text{m}$ 的白色颗粒,这些颗粒可能是菌体内部的一些大分子物质,如蛋白质、酶等;经过高浓度铬液处理后,菌体内部直径约 $0.1\mu\text{m} \sim 0.2\mu\text{m}$ 的颗粒数量大大增加,这可能是因为 Cr^{6+} 进入细胞后,会与细

胞内的大分子物质发生螯合作用, 为这些物质提供螯合中心, 使这些物质聚集在一起形成许多较大的颗粒; 也可能是 Cr^{6+} 在菌体的氧化还原作用下, 形成的一些晶体物质。如 Strandberg 等在研究酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞对铀的吸附时指出, 铀沉积在细胞内部会形成针状纤维层, 大约 $0.2\mu\text{m}$ ^[7]。

综上所述, 产朊假丝酵母的抗铬机理可能是: ① Cr^{6+} 可能通过沉淀或晶体化作用沉积于细胞表面; ② Cr^{6+} 被胞外分泌物或细胞壁的腔洞捕获, 被吸附后的重金属离子被不断地运输进细胞质内; ③ 部分被运输进体内的 Cr^{6+} 会形成微结晶体沉积于细胞内; ④ 在细胞的各种代谢机制的调节下, 部分被运输进体内的 Cr^{6+} 与菌体内的大分子物质形成结合态的类金属离子。

2.5 Cr^{6+} 对菌体可溶性还原糖含量的影响

实验结果显示: 随着 Cr^{6+} 浓度的升高, 4 株实验菌的可溶性糖含量都出现了下降, 其中解脂假丝酵母和产朊假丝酵母的下降十分明显。原因可能有两个: ① Cr^{6+} 影响了实验菌的各种代谢过程, 使其代谢机制受阻, 因此在菌体内代谢最旺盛的可溶性糖含量的变化上表现出来^[8]; ② 胞内的糖类的某些基团能与 Cr^{6+} 反应, Cr^{6+} 的导入使糖类转化或合成为其它物质, 如微结晶体^[7] 和类金属硫蛋白^[6] 等。对于不同的菌体, 起主要作用的代谢途径各不相同, 因此对细胞内可溶性糖含量的影响各不相同。

2.6 多种因素对重金属去除菌毒性的正交实验

正交实验的结果显示: 6 个因素对于掷孢酵母 7-3 的毒性影响顺序为 Cr^{6+} 浓度 > pH > 培养时间 > 尿素浓度 > 葡萄糖浓度 > 吸附时间。其中, pH 和 Cr^{6+} 浓度两个因素的影响达到了显著水平。对于玫瑰掷孢酵母, 顺序为 pH > 培养时间 > 葡萄糖浓度 > Cr^{6+} 浓度 > 尿素浓度 > 吸附时间, 6 个因素均未达到显著水平。对于解脂假丝酵母, 顺序为 Cr^{6+} 浓度 > pH > 吸附时间 > 培养时间 > 尿素浓度 > 葡萄糖浓度, 6 个因素均未达到显著水平。对于产朊假丝酵母, 则为 Cr^{6+} 浓度 > 培养时间 > pH > 尿素浓度 > 吸附时间 > 葡萄糖浓度。其中, Cr^{6+} 浓度的影响达到显著水平。在实际处理废水时, 能否控制好显著性因素的条件对处理效果影响很大, 此实验为确定 4 株实验菌在实际应用中取得比较理想的处理效果提供了参考。

3 结论

实验结果表明, 掷孢酵母 7-3 对高浓度 Cr^{6+} 的耐受性最好; 4 株实验菌的致死率随处理时间的变化趋势都是先升高后降低, 然后再升高; 假丝酵母的可驯化性较好; Cr^{6+} 对 4 株实验菌的各种代谢过程有一定影响。SEM, TEM 及 AFM 等实验结果表明: 产朊假丝酵母的除铬机理是表面吸附和胞内积累并存; 在正交实验中, Cr^{6+} 浓度、pH、培养时间、N 源、C 源、吸附时间等 6 个因素对 4 株实验菌的影响各不相同, 其中, Cr^{6+} 浓度和 pH 对掷孢酵母 7-3 的影响, 及 Cr^{6+} 浓度对产朊假丝酵母的影响均达到了显著水平。

参考文献

- [1] 陈剑虹, 曾光明, 莫建炎. 湖南有色金属, 2002, 18 (3): 35 ~ 36.
- [2] 尹 华, 叶锦韶, 彭 辉, 等. 环境化学, 2003, 22 (5): 469 ~ 473.
- [3] Valix M, Loon L O. Minerals Engineering, 2003, 16 (3): 193 ~ 198.
- [4] Yilmaz E I. Research in Microbiology, 2003, 154 (6): 409 ~ 415.
- [5] 周茂洪, 张学俊, 赵肖为. 微生物学通报, 2003, 30 (3): 64 ~ 68.
- [6] 林稚兰, 黄秀梨. 现代微生物学与实验技术. 北京: 科学出版社, 2000. 289 ~ 327.
- [7] 陈玉成. 污染环境生物修复工程. 北京: 化学工业出版社, 2003. 26 ~ 30.
- [8] 张建民, 王转斌. 微生物学通报, 1999, 26 (1): 18 ~ 20.