

一株 *Brevibacillus* sp. 的原生质球的制备及其对 Cr(VI) 的还原吸附效果分析

许燕滨 邓映霞 黄绍松 孙水裕

(广东工业大学环境科学与工程学院, 广州 510006)

摘要 利用优势菌生物系统的还原吸附作用去除水环境中的 Cr(VI) 是一种有前景的处理方法。为了进一步探究优势菌 *Brevibacillus* sp. 还原去除 Cr(VI) 的机理, 利用正交试验得到酶法制备优势菌原生质球的最佳条件, 分析原生质球对 Cr(VI) 的还原吸附效果。结果表明: 酶解最佳条件为酶浓度 0.1 mg/L, 酶解时间 30 min, 酶解温度 30℃。高渗环境下的优势菌原生质球对 Cr(VI) 和总 Cr 的去除效率分别为 75.90% 和 63.82%, 均高于完整菌株, 而相对低渗环境下的原生质球, 由于质膜破裂, 对 Cr(VI) 和总 Cr 的还原吸附去除效率最低。结合 Cr(VI) 去除率高于总 Cr 去除率的现象可以推测, 可再生原生质球对 Cr(VI) 的还原吸附过程是一个与其生理活性(透膜机制和代谢活性)相关的过程, 且 Cr(VI) 的还原与吸附是两个联系非常紧密的反应。研究成果为进一步提高 Cr(VI) 还原去除效率奠定了理论基础。

关键词 原生质球 Cr(VI) 生物吸附 生物还原

中图分类号 X703.1 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2009)12-2138-05

Preparation of a strain's (*Brevibacillus* sp.) sphaeroplast and its effect on reduction and adsorption of chromium(VI)

Xu Yanbin Deng Yingxia Huang Shaosong Sun Shuiyu

(Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract Cr(VI) removal by the reduction and absorption of the predominated strains-containing bio-system is one of the most prospective methods. Based on the screening and optimizing of the predominated strain-*Brevibacillus* sp., the sphaeroplast was obtained by the enzymic method and the tests on the Cr(VI) reduction-adsorption contribution of the predominated strain's sphaeroplast illuminated that the Cr(VI) and total Cr removal rates of the sphaeroplasts in the liquid with the high osmotic pressure were 75.90% and 63.82%, respectively, which were exceeded those of the intact strains, and the removal rates of the sphaeroplasts in the liquid with the relative low osmotic pressure were the least for the break of the plasma membrane. Which may conclude that the process of Cr(VI) reduction and adsorption by the regenerable sphaeroplasts is relative to the permeation principle and metabolic activity of the plasma membrane, combined with the phenomenon that the removal rates of Cr(VI) are more than those of the total Cr. The results will be benefit for the further study on the application of Cr(VI) bio-reduction and removal by the predominated strains.

Key words sphaeroplast; Cr(VI); biosorption; bioreduction

目前针对含 Cr 废水的处理方法有化学还原法、磁分离铁氧体法、沉淀法、电解化学法和离子交换法等。从 20 世纪 90 年代开始, 国内外学者致力于研究微生物絮凝剂处理含 Cr 废水, 并取得了一定的成果。目前, 国内外生物去除重金属(包括 Cr(VI) 在内)的研究聚焦于优势菌种的选育、生物吸附剂的设计、吸附特点分析、吸附容量测定以及吸附机理探索等方面^[1~3]。生物活体强大的自体繁殖能力是其倍受关注的主要原因之一, 目前研究人员选用的活

体吸附材料主要是细菌^[4]、酵母菌^[5]、霉菌^[6]、藻类^[7]和植物等, 已经发现 *Neurospora crassa*、*Ecklonia* sp.、*Pseudomonas dechromaticans* 和 *Aeromonas dechromatica*、*Bacillus cereus* 等菌种具有还原吸附 Cr(VI)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40801194); 广东省自然科学基金资助项目(0500823)

收稿日期: 2008-12-29; **修订日期:** 2009-02-20

作者简介: 许燕滨(1975~), 女, 博士, 副教授, 从事环境生物技术的研究和教学工作。E-mail: hopeybxu@tom.com

的能力,其还原吸附 Cr(VI) 的原理复杂,胞外多聚物(extracellular polymeric substances, EPS)、细胞壁甚至原生质体都可能是作用主体。对于 EPS 的特性研究^[8,9]及其对 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} ^[10]、 Pb^{2+} ^[11]、 Cr^{6+} ^[12]、 Cd^{2+} ^[13]及 Cu^{2+} ^[14]等金属离子的吸附特点和动力模型的研究受到了广泛的关注。Beveridge^[15]在 1978 年做了关于 *Bacillus subtilis* 离体细胞壁生物吸附金属的经典研究,研究表明生物吸附过程中,金属分子首先与位于细胞壁聚合物上的活性反应位点结合,并以这些结合金属为核,不断结晶,形成金属晶体颗粒。一些微生物种类还原 Cr(VI) 的能力与环境的氧化还原电位(ORP)有关^[16],而且微生物种类不同,决定 Cr(VI) 还原反应的生理机理差异很大,有时 Cr(VI) 的生物转化由胞内酶催化,有时 Cr(VI) 的还原发生在胞外^[17]。另外,不同微生物在还原 Cr(VI) 时,对碳源和电子供体数量的需求也不同^[18]。然而,鉴于 Cr(VI) 的毒性,核对待测生物材料对 Cr(VI) 的还原贡献是非常重要的,非常遗憾的是,在最近的文献中都没有关于优势菌 EPS、细胞壁、原生质体/球等主要细胞结构/形态对 Cr(VI) 还原去除的贡献分析的完整报道。

本文拟针对前期筛选得到的优势菌(*Brevibacillus* sp.),展开原生质球对 Cr(VI) 还原去除贡献的分析研究,以此为推动优势菌还原去除 Cr(VI) 机理的进一步探究,为 Cr(VI) 还原去除效率的进一步提高奠定理论基础。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 优势菌及其主要特征

优势菌为一株短芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.),革兰氏阴性,中生芽孢,椭圆形,孢囊膨大,有鞭毛。本学院微生物实验室保存。

1.1.2 废水来源

模拟废水:以重铬酸钾配置,其中 Cr(VI) 浓度约为 100 mg/L,用于除 Cr 效率试验。

1.1.3 培养基

(1) 基础液体培养基。 KH_2PO_4 0.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, NH_4Cl 0.1 g/L, Na_2SO_4 0.5 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, NaHCO_3 0.5 g/L, MgSO_4 0.1 g/L, 酵母膏 2.0 g/L, 乳酸钠 3.0 g/L, 维生素 B2 0.02 g/L, 维生素 C 0.02 g/L, 微量金属补充液 6 mL。培养基 pH 6.8~7.2,用于优势菌菌悬液制备。

(2) 基础固体培养基。基础液体培养基中加琼脂 15 g/L。用于优势菌菌落计数。

(3) 高渗再生培养基(HCM)。基础固体培养基中加入 0.5 mol/L 蔗糖,0.02 mol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

1.1.4 分析及测量方法

试验过程中 Cr(VI) 浓度采用二苯碳酰二肼光度法测定,总 Cr 采用原子吸收光谱法测定,菌落计数采用十倍系列稀释计数法计数。

1.2 试验方法

1.2.1 正交试验设计

微生物原生质球的形成和再生受诸如酶浓度、酶解温度及时间、制备液的 pH 和渗透压稳定剂等因素的影响,因此要制备特定菌种的原生质球,必须探索适宜于该菌原生质球的形成和再生条件。本实验主要考虑溶菌酶浓度、酶解时间和酶解温度对原生质球形成率和再生率的影响,故正交试验为 3 因素 3 水平试验。依照随机化原则,确定选用 $L_9(3^4)$ 正交表和实际试验过程中的顺序,如表 1 所示。

1.2.2 原生质球制备

首先,取菌悬液($>10^9$ CFU/mL) 10 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用生理盐水洗涤 2 次后,再用 SMM 缓冲液(即原生质体稳定液,由 0.5 mol/L 蔗糖、20 mol/L MgCl 、0.02 mol/L 顺丁烯二酸,调 pH 6.5 配置而成)洗涤 1 次,最后用 100 mL 的 SMM 液悬浮,活菌计数,此数为 A。然后,取上述 SMM 液悬浮的菌悬液 5 mL,放入小三角瓶(50 mL)中,再加入溶菌酶,置于水浴中保温酶解。最后,取上述酶解后的原生质球液,3 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液,用 SMM 液洗涤 1 次,最后悬浮于 SMM 液中(5 mL),即制成原生质球高渗溶液。

1.2.3 原生质球再生

首先,取原生质球高渗溶液各 0.5 mL,分别用无菌水和 SMM 液进行系列稀释至 10^{-1} ~ 10^{-7} ,用最后 3 个稀释浓度涂布平板,无菌水稀释液涂基础固体培养基平板,SMM 液稀释液涂高渗再生培养基平板,每皿涂 0.1 mL,每浓度涂 3 皿。35℃ 下培养 36~48 h,计算菌落数,无菌水稀释后涂布平板所计数得到的菌落数为未被酶解的细菌数,此数为 B。SMM 液稀释后涂布平板所计数得到的菌落数为再生原生质球数和未被酶解的细菌数之和,此数为 C。最后,根据以下公式,计算得到原生质球的形成率和原生质球的再生率。

$$\text{原生质球形成率}(\%)=(A-B)/A$$
$$\text{原生质球再生率}(\%)=(C-B)/(A-B)$$

1.2.4 原生质球除 Cr 效率测定

取等量优势菌菌悬液 6 份,对 4 份进行酶法脱除细胞壁,得到原生质球高渗溶液 4 份。分别按照菌悬液:重铬酸钾溶液(含 10 mg Cr(VI))体积比为 1:10、原生质球溶液:重铬酸钾溶液(含 10 mg Cr(VI))体积比为 10:1(高渗环境)和 1:1(相对低渗环境)的比例获得吸附体系,保证各吸附体系中细胞总数(包括完整菌株、可再生原生质球和不可再生原生质球)和 Cr(VI)总量一致。按照快速搅拌 1 min,慢速搅拌 45 min,3 000 r/m 离心 10 min,完成吸附试验,取上清液测定 Cr(VI)和总 Cr 浓度,得到完整菌株悬液的 Cr 去除率、高渗环境下原生质球的 Cr 去除率以及相对低渗环境下原生质球的 Cr 去除率,同时做平行试验,减少误差。分析原生质球对 Cr(VI)和总 Cr 的去除能力。

2 结果与讨论

2.1 优势菌的原生质球最佳形成条件

根据正交试验结果(表 1),原生质球形成的最优条件是 A3B3C3,即溶菌酶浓度 0.4 mg/L,酶解时间 60 min,酶解温度 40 ℃,此时的原生质球形成率不低于 99%。极差比较可以看出,溶菌酶的浓度对原生质球的形成影响最大,其次是酶解时间,再次是酶解温度。

2.2 优势菌的原生质球最佳再生条件

根据正交试验结果(见表 2),原生质球再生的最优条件是 A1B1C1,即溶菌酶浓度 0.1 mg/L,酶解时间 30 min,酶解温度 30 ℃,此时的原生质球再生率为 60%。极差比较可以看出,溶菌酶的浓度对原生质球的再生影响最大,其次是酶解时间,再次是酶解温度。

表 1 不同酶解条件下的原生质球形成率
Table 1 Sphaeroplast forming rates under different enzymic reaction conditions

试验号	因 素			原生质球形成 B (10 ⁷ 个/mL)	原生质球再生 C (108 个/mL)	原生质球形成率 (%) (A-B)/A
	A	B	C			
	溶菌酶浓度 (mg/L)	酶解时间 (min)	酶解温度 (℃)			
1	0.1	30	30	3.3	1.3	84
2	0.1	45	37	2.8	1.2	86
3	0.1	60	40	2.4	1.1	88
4	0.2	30	37	1.2	0.80	94
5	0.2	45	40	1.0	0.78	95
6	0.2	60	30	1.3	0.80	94
7	0.4	30	40	0.6	0.42	97
8	0.4	45	30	0.5	0.39	98
9	0.4	60	37	0.2	0.21	99
T ₁	258	275	275			
T ₂	283	279	279			
T ₃	294	280.5	280			
t _{1/3}	85.8	91.5	91.5			
t _{2/3}	94.2	92.8	93			
t _{3/3}	97.8	93.5	93.3			
R ₁	12	2	1.8			

注:A 为溶菌酶处理前菌悬液的菌密度=2.0×10⁸ CFU/mL

2.3 优势菌的原生质球最佳分离条件

尽管溶菌酶的浓度越高,原生质球形成率就越高,但高浓度溶菌酶作用下所形成的可再生原生质球比例大大降低,因此,综合考虑原生质球的形成率和再生率,选取优势菌的最佳原生质球分离条件为

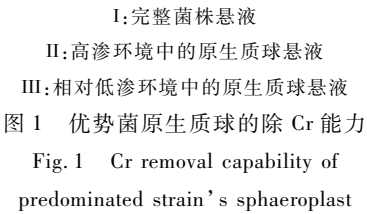
A1B1C1,即酶浓度 0.1 mg/L,酶解时间 30 min,酶解温度 30 ℃,此时的可再生原生质球形成率达到 50%。后续试验采用此分离条件制备优势菌原生质球高渗溶液。

表 2 不同酶解条件下的原生质球再生率
Table 2 Sphaeroplast regeneration rates under different enzymic reaction conditions

试验号	因 素			原生质体再生率 (%) (C-B)/(A-B)
	A	B	C	
	溶菌酶浓度 (mg/L)	酶解时间 (min)	酶解温度 (℃)	
1	0.1	30	30	60
2	0.1	45	37	51
3	0.1	60	40	47
4	0.2	30	37	36
5	0.2	45	40	36
6	0.2	60	30	36
7	0.3	30	40	17
8	0.3	45	30	17
9	0.3	60	37	9.6
T_{11}	158	113	113	
T_{22}	108	104	96.6	
T_{33}	43.6	92.6	100	
$t_{1/3}$	52.7	37.7	37.7	
$t_{2/3}$	36	34.7	32.2	
$t_{3/3}$	14.5	30.9	33.3	
R_2	38.2	6.8	5.5	

2.4 优势菌的原生质球 Cr 吸附效率

原生质球由于缺少细胞壁的保护,在相对低渗环境中会出现吸水破裂,因此,试验考察了相对低渗环境和高渗环境中原生质球的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率,并将原生质球和完整菌株的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率进行比较(见图 1)。



与优势菌的完整菌株相比,高渗环境中的原生质球 Cr(VI) 和总 Cr 去除率最高,其次是完整菌株 Cr(VI) 和总 Cr 去除率,相对低渗环境中的原生质球 Cr(VI) 和总 Cr 去除率最差。其中高渗环境中的原生质球的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率和完整菌株 Cr(VI) 和总 Cr 去除率相比,分别提高了 37.58 和 32.2 个百分点,去除率均提高了约 1 倍。

按 A1B1C1 分离条件得到的原生质球高渗溶液中实际含有约 50% 的可再生原生质球,约 34% 的不可再生原生质球和约 16% 的完整菌株,由于高渗环境下的原生质球悬液具有高于完整菌株悬液的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率,相对低渗环境下的原生质球具有低于完整菌株悬液的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率,由此可见,可再生原生质球具有比完整菌株和不可再生原生质球更高的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率。分析原因可能是由于优势菌作为 G⁻ 细菌,其形成的原生质球为不完全缺壁细胞,细胞膜上的磷脂和蛋白质等基团裸露出来,质膜上的大量酶系促进了 Cr(VI) 的吸附和还原过程,同时除去细胞壁后, Cr(VI) 阴离子或还原生成的 Cr(III) 阳离子可能借助质膜上的阴离子或阳离子通道进入细胞内,从而实现胞内富集。在稀释了 1 倍的缓冲液中,由于原生质球大部分破裂, Cr(VI) 和总 Cr 的去除率分别降为 16.14% 和 15.94%, 和高渗环境中的原生质球相比, Cr(VI) 和总 Cr 的去除率分别下降了 59.76% 和 47.88%。

无论是高渗环境中的原生质球悬液、完整菌株悬液还是相对低渗环境中的原生质球悬液所去除的 Cr(VI) 的量均大于总 Cr 的量,因此 Cr(VI) 的去除实际包含了部分因为被还原而减少的 Cr(VI),这部分 Cr 主要以 Cr(III) 的形式被吸附去除或仍存在于水相中,高渗环境中的原生质球悬液同时具有最高的 Cr(VI) 还原去除效率和总 Cr 去除效率。但一般完整菌株由于胞外聚合物及细胞壁的空间阻隔和物理化学作用,使得原生质球对 Cr(VI) 的还原吸附贡献不明显,也容易被忽视。

3 结 论

- (1) 经过正交试验得出除 Cr(VI) 优势菌 *Brevibacillus* sp. 的最佳原生质球分离条件为:酶浓度为 0.1 mg/L,酶解 30 min,酶解温度 30℃,此时的可再生原生质球形成率达到 50%。
- (2) 高渗环境下的优势菌原生质球对 Cr(VI)

和总 Cr 的去除效率分别为 75.90% 和 63.82%, 均高于完整菌株, 而相对低渗环境下的原生质球由于质膜破裂, 对 Cr(VI) 和总 Cr 的还原吸附去除效率最低, 其中高渗环境中的原生质球的 Cr(VI) 和总 Cr 去除率和完整菌株 Cr(VI) 和总 Cr 去除率相比, 分别提高了 37.58 和 32.2 个百分点, 去除率均提高了约 1 倍。

(3) 高渗环境中的原生质球悬液同时具有最高的 Cr(VI) 还原去除效率和总 Cr 去除效率, 结合 Cr(VI) 还原去除率和总 Cr 的去除率同步变化以及两者之间的差值分析, 可以推测可再生原生质球对 Cr(VI) 的还原吸附过程是一个与其生理活性(透膜机制和代谢活性)相关的过程, 且 Cr(VI) 的还原与吸附是两个联系非常紧密的反应。

参考文献

- [1] Chojnacki K., Chojnacki A., Górecka H. Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: Kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*, **2005**, (59): 75 ~ 84
- [2] Moon S. H., Park C. S., Kim Y. J., *et al.* Biosorption isotherms of Pb(II) and Zn(II) on Pestan, an extracellular polysaccharide of *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. *Process Biochemistry*, **2006**, (41): 312 ~ 316
- [3] Bayramoğlu G., Arica M. Y. Removal of heavy mercury(II), cadmium(II) and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets. *Chemistry Engineering Journal*, **2008**, 143(1 ~ 3): 133 ~ 140
- [4] Kang S. Y., Lee J. U., Kim K. W. Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, 36(1): 54 ~ 58
- [5] Seki H., Suzuki A., Maruyama H. Biosorption of chromium(VI) and arsenic(V) onto methylated yeast biomass. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2005**, 281(2): 261 ~ 266
- [6] Kumar R., Bishnoi N. R., Garima K. B. Biosorption of chromium(VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chemical Engineering Journals*, **2008**, 135(2): 202 ~ 208
- [7] Park D., Yun Y. S., Park J. M. Studies on hexavalent chromium biosorption by chemically-treated biomass of *Ecklonia* sp. *Chemosphere*, **2005**, 60(10): 1356 ~ 1364
- [8] Garnie C., Görner T., Lartiges B. S., *et al.* Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research*, **2005**, 39(13): 3044 ~ 3054
- [9] 刘静, 王君, 白新宇, 等. 一株高温产粘菌株的筛选及其产胞外聚合物分析. *微生物学报*, **2008**, 48(2): 153 ~ 156
- [10] 杜伟, 孙宝盛, 吕英. 胞外聚合物对 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 和 Ni^{2+} 的吸附性能研究. *中国给水排水*, **2007**, 23(13): 98 ~ 101
- [11] 苏春彦, 康春莉, 郭平, 等. 天然水中优势菌胞外聚合物及其中主要成分对铅的吸附. *应用化学*, **2008**, 25(1): 1 ~ 4
- [12] 李强, 张玉臻, 陈明. 生物吸附剂 ZL5-2 对六价铬离子吸附作用的红外光谱分析. *光谱学与光谱分析*, **2005**, 25(5): 705 ~ 711
- [13] Guibaud G., Comte S., Bordas F., *et al.* Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere*, **2005**, 59(5): 629 ~ 638
- [14] Zhang Y., Fang X. L., Ye Z. L., *et al.* Biosorption of Cu(II) on extracellular polymers from *Bacillus* sp. F19. *Journal of Environmental Sciences*, **2008**, 20(11): 1288 ~ 1293
- [15] Beveridge T. J. The response of cell walls of *Bacillus subtilis* to metals and to electron-microscopic stains. *Canadian Journal of Microbiology*, **1978**, 24(2): 89 ~ 104
- [16] Shen H., Wang Y. T. Hexavalent chromium removal in two-stage bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, **1995**, 121(11): 798 ~ 804
- [17] Lovely D. R., Phillips E. J. P. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c_3 cytochrome. *Applied Environmental Microbiology*, **1994**, 60(2): 726 ~ 728
- [18] Smith W. A., Apel W. A., Petersen J. N., *et al.* Effect of carbon and energy source on bacterial chromate reduction. *Bioremediation Journal*, **2002**, 6(3): 205 ~ 215