

掷孢酵母吸附去除铬的性能研究¹⁾

尹 华 叶锦韶 彭 辉 张 娜 余莉萍

(暨南大学环境工程系, 广州, 510632)

摘 要 通过菌种培养、分离与筛选, 获得一株对铬具有很强还原与吸附性能的掷孢酵母 (*Sporobolomycetaceae* sp.). 该菌株适宜的吸附 pH 值是 6—9, 1g 培养 60h 的菌体在 20ml pH 7 的 $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铬液中, 吸附 8h 后, 对铬的去除率最高达到 100%. 在浓度分别为 15, 30, 50, 100, $300\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铬液中, 每克菌体对铬的吸附量与对数曲线 $y = 172.58\ln(x) - 209.49$ 相吻合, 相关系数为 0.9889, 对吸附后菌体破壁测得细胞质内含铬量最高, 达 65.5%. 通过扫描电子显微镜发现, 处理 $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铬液 8h 后, 菌体细胞壁的表面结构不发生形态变化.

关键词 掷孢酵母, 生物吸附, 铬.

如何利用微生物对重金属的解毒与吸附积累性能, 实现重金属的趋利避害已是重金属微生物治理与应用领域的研究热点. 如重金属废水生物处理领域中对重金属生物吸附剂的开发、改良与基因重组等的研究^[1]; 采矿业利用某些微生物如假单胞菌对贵重金属 Co, Ni, Cu, As, Cd, Hg, Pb, U 等的抗性进行贵重金属的生物选矿^[2, 3]. 在重金属废水的生物去除研究方面, 现阶段国内科研工作者主要进行了吸附菌株的筛选、驯化等工作, 并利用透射电镜和 X 射线等先进工具与手段进行吸附位点的分析; 在国外主要集中于生化作用与基因水平的毒理研究^[4].

本研究在被重金属污染的地点进行了废水、污泥采样, 通过微生物培养、分离及吸附, 筛选出一株对铬具有良好解毒与吸附性能的掷孢酵母, 并对该菌株进行了吸附性能的研究与细胞壁、细胞质吸附量的定量分析, 初步探讨了铬对该菌株的形态影响.

1 实验部分

1.1 菌种培养、分离、纯化与鉴定

采集多家电镀厂的含铬废水与污泥进行微生物培养、分离、纯化、筛选与鉴定, 方法参见文献 [5]. 通过菌种筛选与鉴定得到一株对铬具有很强还原及吸附去除性能的掷孢酵母 (*Sporobolomycetaceae* sp.).

1.2 吸附实验

取培养 56h 的菌体 1g, 投加于 pH 分别为 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 的 20ml $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铬液中, 于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $150\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床中振荡吸附 8h, 然后取吸附液在 $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离

1) 国家自然科学基金 (50278040) 和广东省自然科学基金 (980897) 资助项目.

心 5min，用二苯碳酰二肼法测定上清液中总铬与六价铬的含量。

分别取培养时间为 24，48，60，62，72，96，120h 的菌体置于 20ml pH 7 的 15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 铬液中，吸附 8h 后，测定总铬的去除率与六价铬的还原率。

分别用电子天平准确称取培养 60h 的菌体 1g，投加于 pH 7 的含铬浓度分别为 15，30，50，100，300 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 的 20ml 吸附液中，于 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡吸附 8h，测定每克菌体的总铬吸附量。

1.3 菌体破壁实验

取吸附 15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 铬 8h 后的菌体 1g，悬浮于 pH7.3 的 Tris-HCl 缓冲液中，分别用研磨法和超声波法破壁。以 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速分离未破碎菌体，取上清液于 8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心，收集细胞壁。测定未破碎菌体、细胞壁与上清液的总铬含量。

1.4 扫描电子显微镜实验

取培养 60h 后提取的菌体及吸附 15 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 铬 8h 后的菌体进行扫描电镜实验。

2 结果与讨论

2.1 pH 值对掷孢酵母还原与吸附铬的影响

pH 值对铬生物吸附的影响如图 1 所示。培养 56h 的掷孢酵母菌体对铬的还原曲线出现两个高峰，在 pH 1 处还原率达 94.2%，在 pH 5—9 出现第二个峰，最高还原率为 100%。对总铬的去除受 pH 值的影响也很大，pH 值过小（pH 1—4）或过大（pH 10—13）均不利于铬的去除，而在 pH 6—9 时处理效果比较好，去除率最高达 93.8%。当 pH= 13 时，菌体被严重破坏，细胞内含物流失，吸附液变混浊，此时菌体的除铬能力急剧下降，去除率仅为 1.2%。

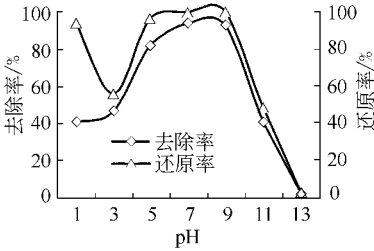


图 1 pH 值对掷孢酵母吸附铬的影响
Fig 1 Effect of pH on *S. sp.* adsorption of chromium

2.2 不同培养时间对吸附铬的影响

掷孢酵母对铬的还原解毒与吸附去除能力因培养时间的不同差异很大（图 2），当培养时间小于 24h 时，培养液的菌体密度较小，提取出的菌体对铬的去除能力也比较弱，这可能是由于处于生长期与对数期的菌体细胞，需要吸取并积累大量营养物质进行体内大分子的合成与能量贮备，此时铬的吸附积累抑制了菌体大分子物质（如金属硫蛋白等）的合成，降低了细胞对铬毒性的抗性，使菌体代谢活动减弱的同时也降低了细胞对铬的还原与吸附能力；而处于稳定期（48—75h）时，培养液营养物质减少，代谢产物增加，菌体分裂速度减慢，对不利的生长环境的适应性强，把处于这一生长周期的菌体投加到含铬水样中，有利于对铬的积累。此时细胞对六价铬的还原能力很强，还原率高达 98.8%—100%；培养时间为 56—72h 时，菌体对总铬的去除率达 90.7%—100%；处于衰老期的菌体，对六价铬的还原能力与总铬去除能力接近。当培养时间为 96h 时，菌体几乎丧失对铬的解毒与积累能力，此时还原与去除率仅为 2.9% 和 1.6%。

2.3 菌体在不同浓度吸附液中的吸附量

菌体在不同浓度吸附液中对总铬的吸附量如图 3 所示，菌体对铬的吸附积累量随吸附液浓度的增加而增加。当铬浓度为 15—80mg·l⁻¹时，生物积累量增长速率大；而当铬浓度增加至 80—300mg·l⁻¹时，吸附积累增长率减少。对吸附积累曲线变化趋势进行对数分析，得到图中虚点曲线，与图中实验曲线相吻合，相关系数为 0.9889。因此，可以预测在一定浓度范围内，掷孢酵母对铬的生物积累量以类似 $y = 172.58 \ln(x) - 209.49$ 的对数趋势增长，直至吸附饱和。

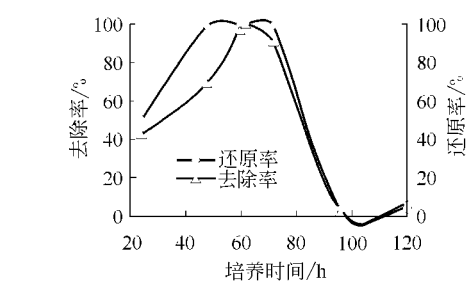


图 2 培养时间对菌体除铬的影响

Fig. 2 Effect of cultivated time on *S. sp* adsorption of chromium

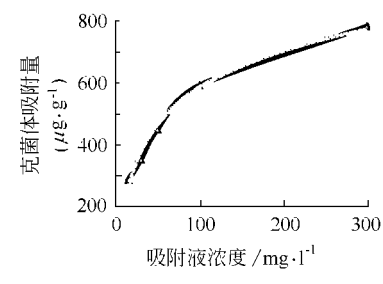


图 3 吸附液浓度对菌体吸附铬的影响

Fig. 3 Effect of chromium concentration on *S. sp* adsorption

2.4 菌体破壁与各成分的吸附率

破壁后细胞各成分的含铬率如表 1 所示，其中含铬率由各成分积累的铬量除以细胞吸附铬总量得到。结果表明，对掷孢酵母进行研磨破壁与超声波破壁的破碎效果接近，分别为 35.7% 和 30.6%。但这两种方法破壁后，测得的各成分的含铬比率相差较大，其中研磨法未破壁细胞的含铬率较高，达 43.1%；而超声波法破壁后，上清液含铬率最高，达 65.5%，未破壁细胞占原吸附后总菌重的 69.4%，但含铬量仅为 9.3%。这可能是由于研磨法对未破壁细胞影响不大，因而菌体内积累的铬仍保存于细胞内；利用超声波法破壁时，虽然破碎细胞只有 30.6%，但是大部分菌体的细胞壁被击穿，并导致细胞内铬的外流。同时破壁过程中产生大量的热能进一步刺激了铬的外流。

表 1 菌体破壁后各成分的含铬量

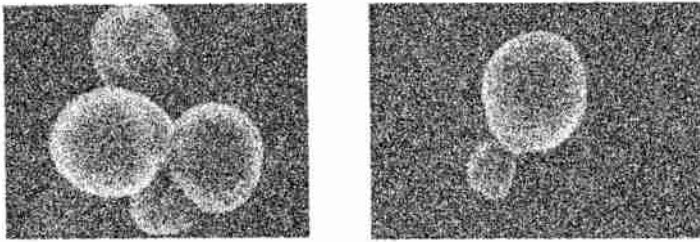
Table 1 The content of chromium of each segment of the broken cell

菌重/mg	总铬 去除率/%	研磨破壁后各成分的湿重/mg		破壁后各成分的含铬率/%			
		细胞壁	未破碎细胞	壁(总 Cr)	未破细胞(总 Cr)	上清液(总 Cr)	上清液(Cr ⁶⁺)
1002.2	97.3	98	644.5	3.1	43.1	25.6	3.5

菌重/mg	总铬 去除率/%	超声波破壁后各成分的湿重/mg		破壁后各成分的含铬率/%			
		细胞壁	未破碎细胞	壁(总 Cr)	未破细胞(总 Cr)	上清液(总 Cr)	上清液(Cr ⁶⁺)
972.6	94.6	68	675	6.6	9.3	65.5	4.2

2.5 扫描电镜实验

扫描电镜观察到掷孢酵母细胞的大小为 $1.4-4.2 \times 1.2-3.7 \mu\text{m}$ ，比光学显微镜观察的结果稍为偏小，这是因为在进行电镜拍照前对菌体进行了脱水的缘故。从图 4(右)可以看出，菌体表面光滑完整，并可观察到芽殖后留下的一个芽痕，没有出现可观察的细胞壁破坏。因此， $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的铬液不能诱发掷孢酵母细胞壁出现可观察的通透性变化，在 8h 内也不会导致菌体发生形态改变。



未进行吸附实验的对照菌体细胞($\times 10000$) 吸附 $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 铬 8h 后菌体细胞($\times 10000$)

图 4 掷孢酵母菌体细胞 ($\times 10000$)

Fig. 4 Cells of *S. sp* ($\times 10000$)

3 结论

掷孢酵母具有降低重金属铬毒性的性能特别是在适宜的生长周期(如扩大培养 48—75h)与吸附环境中，能使吸附液与细胞内的铬以低毒性的三价铬存在。用研磨法和超声波法破壁后，测得上清液六价铬的含量分别为 3.5% 和 4.2%。上清液所含的铬由破碎细胞的细胞质与破壁过程中细胞壁的脱附部分组成，其中细胞质含铬占主要部分。所以，铬在细胞质内主要以低毒性的三价铬存在，这有利于菌体抵抗铬的毒性。

当 pH 适宜时，铬的还原与吸附效果都非常理想；但是当 $\text{pH} = 1$ 时，还原率高达 94.2%，而去除率仅为 40.8%。这可能是由于细胞内的部分酶促反应受到影响，在体内还原后的铬被大量运输到细胞外。

扫描电镜实验的结果证明， $15\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 铬液不足以对本菌株产生形态变化的毒性危害，这可能与铬的还原及体内存在可结合铬离子及铬微粒的大分子有关。

参 考 文 献

- [1] Alicia H, Rafael P, José L M et al., Metal Accumulation and Vanadium Induced Multidrug Resistance by Environmental Isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64** (11) : 4317—4320
- [2] Mark D, Börje L, Potential Role of *Thiobacillus caldus* in Arsenopyrite Bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65** (1) : 36—40
- [3] Frank C, Protein-Mediated, Adhesion of the Dissimilatory Fe(III) -Reducing Bacterium *Shewanella alga* BrY to Hydrous Ferric Oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65** (11) : 5017—5022
- [4] Sylvia F, Gregor G, Dietrich H N, The Product of the *ybdE* Gene of the *Escherichia coli* Chromosome Is Involved in Detoxification of Silver Ions. *Microbiology*, 2000, **147** (4) : 965—972
- [5] 张纪忠, 黄静娟, 盛宗斗等, 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, 368—428

STUDY ON THE ADSORPTION CAPABILITY OF *SPOROBOLOMYCETACEAE* SP. ON CHROMIUM

YIN Hua YE Jir-shao PENG Hui ZHANG Na YULi-ping

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

ABSTRACT

A strain of *Sporobolomycetaceae* sp. was obtained by cultivation and separation from some plating plants. Its capability of the detoxification and adsorption was notable in pH 6—9. The ration of removal was 100% after adsorbing 20ml $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ chromium for 8 hours with 1 gram of 60 hour-cultivated cell in pH7. The curve of adsorbing capacity in different chromium correlation concentration (15, 30, 50, 100 and $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) was accorded with the $y = 172.58 \ln(x) - 209.49$ equation, and the coefficient was 0.9889. It was found that after adsorption the chromium content in cytoplasm was larger than that in cell wall by breaking cell, the intracellular chromium was 65.5%. Any damage in the cell wall was not observed by using scanning electronic microscope to the samples of the strain that had been treated with $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ chromium for 8 hours.

Keywords: *Sporobolomycetaceae* sp., bioadsorption, chromium.