

复合诱变原生质体选育重金属去除菌

尹华, 卢显妍, 彭辉, 叶锦韶, 黄报远, 张娜

(暨南大学环境工程系, 广州 510632)

摘要: 选用紫外线和亚硝酸对产朊假丝酵母 *CR-001* 进行单因子和多因子诱变处理, 通过复合诱变得到了 6 株具有高重金属抗性的高效重金属去除菌. 经过传代后 *CRC2811-1* 和 *CRC7-2* 的抑菌圈直径减至 1.7 mm 和 1.2 mm; 对 Cr^{6+} 的去除率分别从 80.2% 和 81.2% 提高到了 95.2% 和 94.7%. 其余 4 株突变株的抗性和除铬性能均可保持稳定. 此外, 利用扫描电镜、透射电镜和原子力显微镜等仪器对吸附铬前后细胞内外的变化情况进行分析, 探讨了突变菌株除铬性能改善的机理.

关键词: 酵母; 重金属; 铬; 复合诱变

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)04-0147-05

Improvement of Heavy Metal Removing Strain by Protoplast Combination Mutant

YIN Hua, LU Xian-yan, PENG Hui, YE Jin-shao, HUANG Bao-yuan, ZHANG Na

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

Abstract: Ultraviolet and HNO_2 were selected as the mutagens to perform the single factor and multi-factor induction mutation towards *Candida utilis* CR-001. Six mutant strains which possessed high heavy metal removal efficiency and high resistance to Cr^{6+} were obtained through combined induction with UV and HNO_2 . After they were subcultured for 10 generations, the diameter of bacteriostatic circle of *CRC2811-1* and *CRC7-2* was reduced to 1.7 mm and 1.2 mm respectively, while the Cr^{6+} removal efficiency of *CRC2811-1* was increased from 80.2% to 95.2%, and that of *CRC7-2* was from 81.2% to 94.7%. The stability of the other 4 mutant strains was rather stable. Furthermore, precipitation of chromium outside or inside the cell was studied by using combined technique of scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and atomic force microscopy (AFM), and the mechanism of chromium removal improvement by the mutant strains was discussed.

Key words: yeast; heavy metal; chromium; combined induction

自然界中某些微生物对重金属具有一定的积累作用. 但由于不同吸附菌株在生理生化特性上, 如对生长、处理条件的耐受性, 对重金属的抗性和解毒能力等均具有一些不足, 这就限制了生物法在重金属废水处理中的应用. 通过诱导育种构建具有良好的生长性能和重金属处理性能, 并且对环境无害的工程菌是实现该工艺实际应用的关键因素之一. 通过紫外线与其它化学诱变剂共同诱变的手段已被广泛应用于选育各类高产菌株, 但以此类方法选育重金属去除菌的研究目前国内尚未见报道. 铬是中国环境优先控制污染物, 对人体及其它生物具有很强的毒性. 对铬的生物吸附的研究在重金属生物吸附研究中具有很好的代表性. 本文通过紫外线、亚硝酸等诱变剂对产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 进行选育, 获得具有高抗性的突变体, 并通过扫描电镜、透射电镜和原子力显微镜等仪器对该菌株在吸附铬前后细胞内外的变化情况进行分析, 探讨突变菌株除铬性能改善的机理, 为进一步通过原生质体诱变选育重金属去除菌奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌种

产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) CR-001, 由暨南大学环境工程系实验室筛选鉴定保存, 并证实具有较好的吸附去除重金属的性能^[1].

1.2 菌株诱变

1.2.1 原生质体悬液的制备

取活化后的 CR-001 接种于 YEPD 培养基 (葡萄糖 20g/L, 蛋白胨 10g/L, 酵母粉 10g/L, 琼脂 20g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.0, 0.1 MPa 灭菌 20 min) 中, 30℃, 200 r/min 培养 14 h, 离心收集菌体, 用 PB 液 (0.2 mol/L 磷酸缓冲液, 0.8 mol/L 山梨醇, pH 6.0) 洗涤 3 次, 加入浓度为 5 u/mL 的 Lyticase 酶, pH 6.0, 30℃ 振荡处理 2 h, 离心, 用 pH 6.0 高渗

收稿日期: 2004-10-16; 修订日期: 2004-12-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50278040); 广东省科技计划项目 (2003C32103); 广东省科技计划重大专项 (2004A30308002)

作者简介: 尹华 (1960~), 女, 博士, 教授, 主要从事水污染控制研究.
E-mail: ohjgc@jnu.edu.cn

缓冲液洗涤 3 次,除酶,制成原生质体悬液。

1.2.2 诱变剂量的确定

紫外线诱变剂量的确定^[2]:制备细胞浓度为 100~200 个/mL 的原生质体悬液,取 5 mL 置于无菌培养皿中,将培养皿置于磁力搅拌器上,调整距离为 30 cm,用 15 W 紫外灯分别照射 0、0.5、1、2、3、4、5 min,吸取菌液加入 50 mL YEPD 培养基中,使培养基与菌液混合均匀,30℃振荡培养 1 h,涂布计数,计算存活率并确定剂量。

亚硝酸诱变剂量的确定^[3]:制备细胞浓度为 100~200 个/mL 的原生质体悬液,取 5 mL 置于无菌培养皿中,加入 1 mL 0.1 mol/L 亚硝酸,分别处理 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 min,吸取菌液加入 50 mL YEPD 培养基中,30℃恒温培养 1 h,涂布计数,计算存活率并确定剂量。

1.2.3 诱变处理

制备 CR-001 的原生质体悬液,对其进行 UV 诱变,亚硝酸诱变,以及 UV 和亚硝酸复合诱变。

1.2.4 原生质体的再生

采用双层平板法避光培养。

1.3 筛选方法

1.3.1 初筛

采用浓度梯度法和摇瓶发酵法相结合的方法进行筛选^[4]。

1.3.2 复筛

提取一定培养时间的菌体细胞 25 g/L (湿重),投加于 pH 7.0 的 20 mg/L 铬吸附液中,30℃150 r/min 振荡处理 2 h,取吸附液离心,测定上清液总铬和六价铬的含量,筛选对铬具有较好吸附性能的菌株。

1.4 突变株除铬性能的考察

1.4.1 吸附铬前后胞内外变化情况的分析^[5]

利用扫描电镜 (SEM) 和原子力显微镜 (AFM) 观察在蒸馏水和浓度为 20 mg/L、250 mg/L 的铬液中处理 8 h 的 CRC2811-1 菌体的表面特征,通过透射电镜 (TEM) 和 AFM 观察菌体内的变化。

1.4.2 突变株的稳定性考察

将筛选所得的 6 株高抗性菌株在筛选培养基中连续接种 10 次,每次记录抑菌圈的直径大小,并提取 10 g/L (湿重) 的菌体考察其处理 20 mg/L 铬液能力的稳定性。

2 结果与讨论

2.1 高抗性重金属去除菌突变株的诱变

CR-001 的原生质体悬液经紫外线和亚硝酸诱变处理后,菌体存活率均随诱变剂剂量的增加而降低,由于菌体在诱变剂剂量偏低时多出现正突变,剂量偏高时多出现负突变,因此选择致死率为 70%~80% 的剂量,即紫外线处理时间为 2 min,亚硝酸处理时间为 20~25 min。

在进行诱变时,选择了 2 种诱变剂——紫外线和 HNO₂ 对 CR-001 进行单因子和复合因子交替诱变,经过几轮交替处理后,筛选获得 6 株高抗性的菌株,分别为 CRU132-26, CRC7-2, CRC2811-1, CRC2811-2, CRC2814-8 和 CRY182-1。

2.2 突变株与产朊假丝酵母特征比较

在实验中发现,高抗性菌株在菌落的颜色、直径、形状、表面形态、生长速度和抑菌圈的平均直径等 6 项指标中,均有一项到几项与 CR-001 有所差别,其中,形态指标发生明显变化的菌株,虽然对铬的抗性有一定的提高,但其除铬性能呈现下降趋势。这是因为菌落形态突变是由菌体的多个基因决定的,如控制表观形态的基因、新陈代谢途径上的结构基因、调节基因,以及渗透基因、辅助基因等,这些基因如果在一次诱变中大规模改变,那么菌体 DNA 由于一次性改变太大,细胞代谢严重失调,菌体除铬能力相应会受到抑制,甚至失去生存的能力,高抗性菌株除铬性能的提高,是通过多代诱发突变逐渐积累的结果,只有在每次诱变后仅有 1~2 个基因发生突变,使抗性逐渐增加,又能维持其最起码代谢平衡的菌株才能存活并被筛选出来^[6],如上面提到的 6 株高抗性突变株。另外,诱变刺激了菌株的抗性机制,菌体表面结构发生变化,使细胞表面的金属结合位点和壁膜金属通道很容易被吸附在菌体表面的铬屏蔽,从而一定程度上抑制环境中的铬继续向细胞内运输^[7]。

选取 CR-001 作为对照,通过 SEM 和 AFM 观察 CRC2811-1 细胞表面特征的变化,结果如图 1、图 2。由图 1 可以看到,在扫描电镜下 CR-001 的表面比较光滑,没有明显的凹凸感;而 CRC2811-1 的表面能看到一些波纹,AFM 结果则显示:CR-001 的表面比较平坦见图 2(a);但 CRC2811-1 的表面出现许多 Y 形小颗粒,见图 2(b),这就是扫描电镜下看到波纹的原因。

为了考察 CRC2811-1 表面出现的颗粒是否有助于提高其除铬性能,以 CR-001 和 CRC2811-1 分别处理 250 mg/L 的铬液,然后通过 SEM 和 AFM 考察 2 种细胞表面特征的变化,结果见图 3、图 4。从

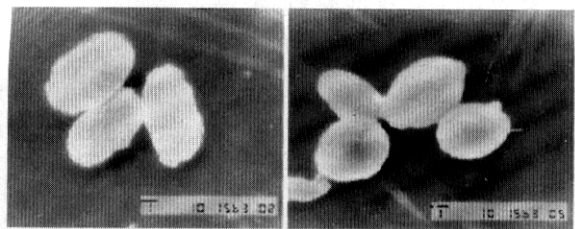


图 1 无铬的 CR-001(a)与 CRC2811-1(b)表面的 SEM 图
Fig.1 SEM photograph of the surface of CR-001(a) and CRC2811-1(b) without Cr(×7 500)

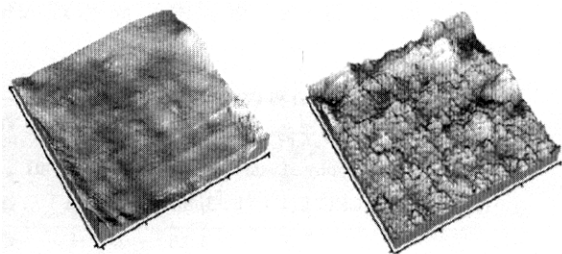


图 2 无铬的 CR-001(a)与 CRC2811-1(b)表面的 AFM 图
Fig.2 AFM photograph of the surface of CR-001(a) and CRC2811-1(b) without Cr(2μm)

图 3 可以看到,处理 250 mg/L 的铬液后,大量 CR-001 细胞出现了表面破裂、细胞变形等情况,说明细胞受到了严重的破坏;而 CRC2811-1 的细胞只有个别出现破裂,有部分细胞表面出现裂痕,但细胞仍保持完整,有部分细胞正在出芽生殖,说明 250 mg/L 的铬液对细胞的破坏有限,并未完全抑制其生长.通过 AFM 观察可见,吸附铬后的 CR-001 表面出现了皱褶(见图 4),原因有以下 2 个:①细胞在不良环境中生长时,细胞膜和细胞壁的周质空间变大,脱水后导致细胞变皱;②铬对细胞的毒害作用,使细胞质生物大分子遭破坏,细胞内产生空壳结构,因而导致脱水时细胞壁内陷.而 CRC2811-1 细胞表面则出现了许多球形的小颗粒,与其吸附前细胞表面的 Y 形小颗粒对应.推测经过诱导后, CRC2811-1 的壁、膜成分改变,在细胞表面产生能与铬形成晶体的大分子物质,即为 Y 形的小颗粒;吸附铬时,这些大分子物质与铬螯合,形成许多有机铬晶体,使细胞表面颗粒的空间构型发生变化, Y 形小颗粒转变为球形小颗粒(见图 4b).

2.3 突变株除铬性能的考察

2.3.1 不同初始浓度下 CR-001 和 CRC2811-1 的

生长情况^[8]

图 5、图 6 分别是 CR-001 和 CRC2811-1 在初始浓度为 0、20、50、100、200 和 300 mg/L 的铬液中生长 19d 的生长曲线.由图 5 可见,浓度为 20 mg/L 以下的铬对 CR-001 的菌体生长影响不大,浓度超过 50 mg/L 的铬对其影响较大.由图 6 可见, CRC2811-1 正常生长的浓度上限为 50 mg/L,只有在浓度超过 300 mg/L 时,才会对 CRC2811-1 的生长产生明显的抑制,但不能完全抑制其生长,证明 CRC2811-1 对铬的抗性更为显著.

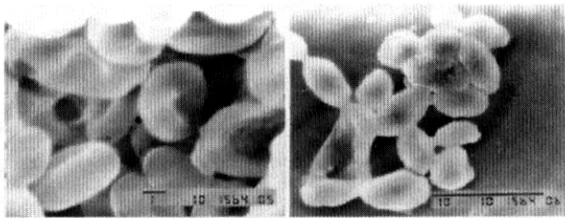


图 3 高铬的 CR-001(a)和 CRC2811-1(b)表面的 SEM 图
Fig.3 SEM photograph of the surface of CR-001(a) and CRC2811-1(b) with 250 mg·L⁻¹ Cr(×10 000)

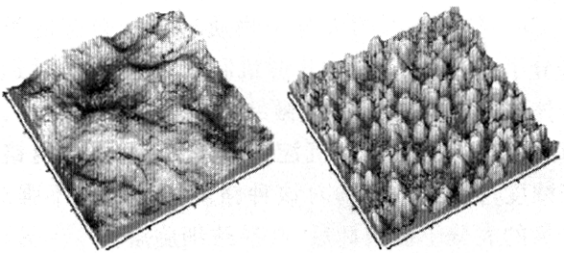


图 4 高铬 CR-001(a)和 CRC2811-1(b)表面的 AFM 图
Fig.4 AFM photograph of the surface of CR-001(a) and CRC2811-1(b) with 250 mg·L⁻¹ Cr(2μm)

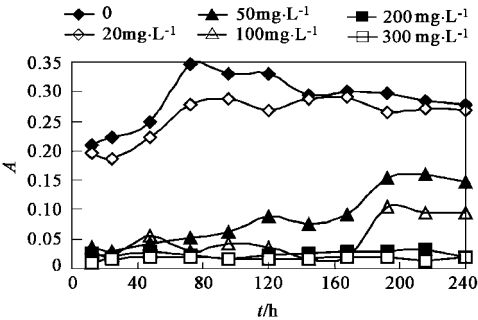


图 5 CR-001 在不同浓度铬液中的生长曲线
Fig.5 Growth curve of CR-001 in Cr solution

2.3.2 铬在 CR-001 和 CRC2811-1 细胞内部的分

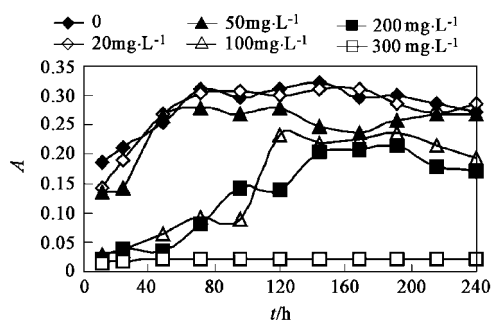


图6 CRC2811-1在不同浓度铬液中的生长曲线

Fig.6 Growth curve of CRC2811-1 in Cr solution

布情况

为考察铬在 CR-001 和 CRC2811-1 内部的分布情况,对 CR-001 和 CRC2811-1 的细胞进行超声波破壁后,用原子力显微镜观察细胞内部的变化情况,结果如图 7 和图 8.比较图 7(a)和图 8(a)可以看到,CR-001 在处理高浓度的铬液后,细胞内出现大量直径为 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$ 的白色颗粒,这可能是 Cr^{6+} 进入细胞后,与细胞内的大分子物质发生螯合作用,使这些物质聚集形成颗粒;也可能是一些 Cr^{3+} 的微晶体.因此 CR-001 的吸附机理主要有以下 2 个方面:① Cr^{6+} 与菌体内的大分子物质形成结合态的类金属分子;②在细胞各种代谢机制调节下,部分被运输进体内的 Cr^{6+} 被还原成微晶体沉积于细胞内,即重金属离子的无机微沉淀作用^[9].但是当体内铬离子浓度过高或微生物对该种铬离子的抗性不强时,过量的大分子被破坏后,会导致细胞解体^[10].另外,从图 7(b)可以看到,吸附铬前 CRC2811-1 的细胞内含物中出现了大量直径约为 $0.3 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物,这些颗粒物在 CRC2811-1 吸附高浓度的铬后,体积明显变大,见图 8(b),直径约为 $0.5 \sim 0.7 \mu\text{m}$.这可能是诱变后,调动了菌体内的抗性基因,在细胞内形成能大量容纳铬离子的生物大分子,如金属硫蛋白、操纵子、金属运输酶和透性酶等.这些物质与铬结合,形成稳定的铬-生物大分子的结合态,从而降低了铬对菌体内其它生物物质的破坏,增强了突变株对铬的抗性和吸附能力.从图 8(b)中还可以看到,CRC2811-1 吸附高浓度的铬后菌体内直径 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$ 的颗粒明显增加,说明 CRC2811-1 内部同样存在铬的无机微沉淀作用及螯合作用.

图 9、图 10 分别是吸附重金属后 CR-001 和 CRC2811-1 的 TEM 图.从图中可以看到,CR-001 仅在细胞壁及其周围区域出现少量高电子密度的颗粒,但 CRC2811-1 细胞壁及其内部大量且均匀地存

在这些高电子密度的颗粒,推测这些颗粒即为含铬的大分子物质,与前面吸附机理的推论相符.从图中还可以看到,CR-001 的细胞周围轮廓凹凸不平,而 CRC2811-1 细胞外围轮廓比较圆滑,与 2.2 的实验结果相符.

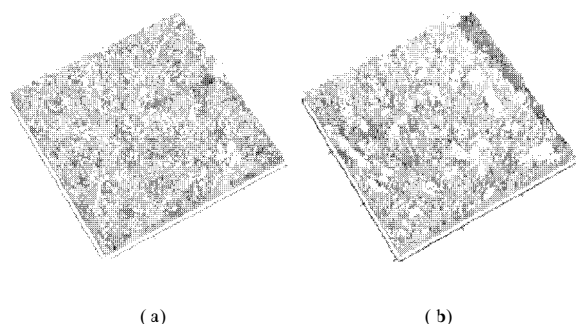


图7 无铬的 CR-001(a)和 CRC2811-1(b)细胞内部大分子的 AFM 图

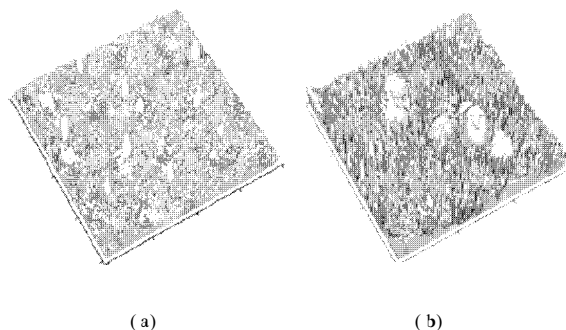
Fig.7 AFM photography of macromolecule inside CR-001 (a, $2 \mu\text{m}$) and CRC2811-1 (b, $3 \mu\text{m}$) without Cr

图8 高铬的 CR-001(a)及 CRC2811-1(b)细胞内部大分子的 AFM 图

Fig.8 AFM photography of macromolecule inside CR-001 (a, $2 \mu\text{m}$) and CRC2811-1 (b, $3 \mu\text{m}$) with $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}$ 图9 高铬 CR-001 细胞的 TEM 图
Fig.9 TEM photography of CR-001 with $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}$ ($\times 20\,000$)

2.4 突变株的稳定性考察

从表 1 可以看到,突变株 CRC2811-1 和 CRC7-2 经过 10 次传代后,对 Cr^{6+} 的抑菌圈直径分别从 2.7 mm 和 2.1 mm 减少到 1.7 mm 和 1.2 mm ,说明



图 10 高铬 CRC2811-1 细胞的 TEM 图
Fig.10 TEM photograph of CRC2811-1 with
250 mg·L⁻¹ Cr(× 20 000)

这 2 个菌株对 Cr⁶⁺ 的抗性逐渐增强 . 这是因为菌群中的敏感细胞相继被 Cr⁶⁺ 抑制 , 而那些具有良好

耐受性的细胞通过优胜劣汰存活下来并不断繁殖 , 使整个菌群的总体抗性不断增强 . 在实际废水处理中 , 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 , 对其实际应用具有重要的现实意义 . 而突变株 CRU132-26 , CRC2811-2 , CRC2814-8 和 CRY182-1 的抑菌圈直径变化不大 , 表明这 4 个突变株对 Cr⁶⁺ 的抗性在遗传上是相对比较稳定的 . 而在除铬性能方面 , 出现了与此相同的趋势 , CRC2811-1 和 CRC7-2 的去除率分别从 80.2 % 和 81.2 % 提高到了 95.2 % 和 94.7 % , 其余 4 株突变株的除铬性能变化不大 .

表 1 突变株对 Cr⁶⁺ 的抗性和除铬性能的稳定性

Table 1 The stability of Cr-resistance and Cr-removal of mutants												
传代次数	CRU132-26		CRC2811-1		CRC2811-2		CRC2814-8		CRC7-2		CRY182-1	
	抑菌圈直径 / mm	去除率 / %	抑菌圈直径 / mm	去除率 / %	抑菌圈直径 / mm	去除率 / %	抑菌圈直径 / mm	去除率 / %	抑菌圈直径 / mm	去除率 / %	抑菌圈直径 / mm	去除率 / %
0	2.5	85.6	2.7	80.2	1.4	87.1	1.9	82.9	2.1	81.2	1.1	82.2
1	2.6	85.7	2.7	80.5	1.4	86.9	1.9	82.7	2.0	81.6	1.2	82.5
2	2.5	85.3	2.5	80.4	1.3	86.8	1.7	81.9	2.0	80.5	1.2	82.4
3	2.4	86.2	2.4	81.3	1.4	87.2	1.8	82.4	2.0	85.3	1.0	82.5
4	2.3	86.3	2.2	87.6	1.3	87.1	1.7	81.6	1.9	86.6	1.1	82.4
5	2.3	86.3	2.1	87.4	1.2	87.3	1.6	82.2	1.9	86.8	1.0	82.6
6	2.4	86.2	1.9	88.1	1.2	86.9	1.6	82.5	1.8	87.6	0.9	82.4
7	2.3	86.5	1.9	88.0	1.3	86.8	1.7	81.8	1.5	90.1	1.0	82.3
8	2.2	86.6	1.8	91.9	1.1	87.2	1.6	82.7	1.5	90.8	0.9	82.7
9	2.2	86.5	1.9	95.1	1.1	87.1	1.5	82.5	1.3	94.5	0.9	82.1
10	2.2	86.5	1.7	95.2	1.0	87.0	1.6	82.3	1.2	94.7	1.0	82.7

3 结论

经过紫外线和 HNO₂ 2 种因子交替诱变 , 筛选获得 6 株高抗性的菌株 . 扫描电镜 , 透射电镜和原子力显微镜等手段对细胞内外变化情况的分析结果表明 : CR-001 对铬的吸附作用主要表现为细胞内积累 , CRC2811-1 则是细胞内积累和细胞壁吸附同时并存 , 这是突变株除铬性能提高的重要原因之一 . 在传代实验的过程中 , 突变株 CRC2811-1 和 CRC7-2 的抗性明显提高 , 抑菌圈直径分别从 2.7 mm 和 2.1 mm 减少到 1.7 mm 和 1.2 mm , 除铬性能也得到了较为明显的改善 , 对 Cr⁶⁺ 的去除率分别从 80.2 % 和 81.2 % 提高到了 95.2 % 和 94.7 % . 其余 4 株突变株对 Cr⁶⁺ 的抗性以及除铬性能均保持稳定 .

参考文献 :

[1] 尹华 , 叶锦韶 , 彭辉 , 等 . 酵母菌-活性污泥法吸附处理含铬电镀废水的性能[J] . 环境科学 , 2004 , 25(3) : 61 ~ 64 .
[2] 王康义 , 徐开成 , 夏培禹 , 等 . 产酯酵母诱变育种[J] . 酿酒科技 , 1999 , (3) : 26 ~ 27 .
[3] Reinecke S A , Prinsloo M W , Reinecke A J . Resistance of *Eise-*

nia fetida (*Oligochaeta*) to cadmium after long-term exposure [J] . Ecotoxicol . Environ . Saf . , 1999 , 42(1) : 75 ~ 80 .
[4] 施巧琴 , 吴松刚 . 工业微生物育种学[M] . 第二版 . 北京 : 科学出版社 , 2003 : 68 ~ 98 .
[5] Provash C S , Ghosh S , Chaudhuri J , *et al* . Mercury and organomercurial resistance in bacteria isolate from freshwater fish of wetland fisheries around calcutta[J] . Environmental Pollution . 1997 , 97(1 ~ 2) : 71 ~ 78 .
[6] Nikolle S R , Marc E F , Patricia A S . Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities [J] . FEMS Microbiology Ecology , 1999 , 30(3) : 273 ~ 284 .
[7] Rani G , Prerna A , Seema K , *et al* . Microbial biosorbents : Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions[J] . Current Science , 2003 , 78(8) : 967 ~ 973 .
[8] Valix M , Loon L O . Adaptive tolerance behaviour of fungi in heavy metals[J] . Mineral Engineering , 2003 , 16(3) : 193 ~ 198 .
[9] 刘建军 , 姜鲁燕 , 李丕武 , 等 . 发酵法生产衣康酸技术的研究——衣康酸生产菌株的选育(I) [J] . 食品与发酵工业 , 2003 , 29(2) : 17 ~ 21 .
[10] Mark R B , Sanjay K , Frederick W O . Microbial resistance to metals in the environment[J] . Ecotoxicol . Environ . Saf . , 2000 , 45(3) : 198 ~ 207 .