

恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 5-x 细胞壁膜系统的 Cu^{2+} 吸附性能

康铸慧, 王磊*, 郑广宏, 周琪

(同济大学环境科学与工程学院污染控制与资源化国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 对 1 株从电镀废水中分离出的革兰氏阴性菌恶臭假单胞菌 *P. putida* 5-x 的细胞表面组分对 Cu^{2+} 的吸附性能进行了分析研究. 结果表明, 分离的 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附容量是完整细胞的 5 倍之多. 细胞表面组分如肽聚糖层、细胞外膜和细胞内膜在 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附过程中都发挥了作用. 肽聚糖层、细胞外膜和内膜在 *P. putida* 5-x 细胞壁膜中的含量依次为细胞内膜 > 外膜 > 肽聚糖层, 而它们的 Cu^{2+} 吸附容量的大小依次为肽聚糖层 > 外膜 > 内膜. 在 *P. putida* 5-x 细胞壁膜对 Cu^{2+} 的吸附过程中, 肽聚糖层贡献了不到 15% 的吸附容量, 而细胞外膜和内膜分别贡献了 30% ~ 35% 和 25% ~ 30%. *P. putida* 5-x 细胞外膜中的磷脂含量明显比其它报道的革兰氏阴性细菌的细胞外膜高, 这可能是 *P. putida* 5-x 细胞外膜具有较高 Cu^{2+} 吸附容量的主要原因, 并由此导致 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的高 Cu^{2+} 吸附容量.

关键词: 细胞壁膜; Cu^{2+} 吸附容量; 细胞外膜; 细胞内膜; 肽聚糖层 (PEG)

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)05-0965-07

Capability of Cu^{2+} Adsorption on Cell Surface of *Pseudomonas putida* 5-x

KANG Zhu-hui, WANG Lei, ZHENG Guang-hong, ZHOU Qi

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Analysis of Cu^{2+} adsorption on cell surface of a Gram-negative bacterium *P. putida* 5-x was carried out. Isolated cell envelopes possess fivefold more Cu^{2+} adsorption capacity than that of the fresh intact cells. Experimental results also indicate that the content of the peptidoglycan layer, the outer membrane and inner membrane in the cell envelope is in order of inner membrane > outer membrane > PEG layer, while their Cu^{2+} adsorption capacity is in order of PEG layer > outer membrane > inner membrane. The total contribution of the separated PEG layer material to Cu^{2+} adsorption is no more than 15% part, and the cell outer membrane and inner membrane contribute about 30% ~ 35% and 25% ~ 30% part, respectively, to Cu^{2+} adsorption by the cell envelope. The relatively high phospholipid content in the outer wall might result in its higher adsorption capacity to Cu^{2+} , and leads to a higher adsorption capacity of the cell envelope of *P. putida* 5-x.

Key words: cell envelope; Cu^{2+} adsorption capacity; outer membrane; inner membrane; peptidoglycan layer (PEG)

微生物细胞表面通常都呈负电性, 因此它们可以结合金属阳离子^[1]. 许多研究表明细胞壁构造中的一些活性部位可以捕获环境中的溶解态金属离子^[2,3]. 在过去 20a 中, 细菌、藻类、真菌以及它们的某些组分作为生物吸附剂已成功应用于环境中重金属离子的去除与回收, 而且其吸附机理也得到了初步的阐明. 在这些微生物中, 细菌由于其较高的比表面积而受到人们格外的关注^[4~10].

革兰氏阳性细菌的细胞壁中有一层较厚的肽聚糖层 (Peptidoglycan, PEG) (占细胞壁干重的 40% ~ 90%), 并且其中包埋有较多的磷壁酸 (Teichoic Acid, TA) 和糖醛酸磷壁酸 (Teichuronic Acid, TUA)^[11]. PEG、TA 和 TUA 都含有大量的负电荷基团, 如羧基、氨基和磷酸二酯键等^[12,13]. 因此, 革兰氏阳性细菌通常对金属阳离子有较强的吸附作

用^[14,15]. 相对而言, 革兰氏阴性细菌的细胞壁膜系统中肽聚糖层较薄 (通常仅占细胞壁干重的 10%) 且不含 TA 和 TUA, 因此其金属离子结合能力较革兰氏阳性细菌弱^[11,15]. Beveridge^[16], Hoyle 和 Beveridge^[17], Falla 和 Block^[18], 以及 Macaskie 等^[19]初步探索了革兰氏阴性细菌的细胞壁膜在重金属离子吸附中所起的作用. 研究表明革兰氏阴性细菌, 如假单胞菌 *Pseudomonas* sp., 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 柠檬酸杆菌 *Citrobacter* sp. 的细胞壁膜的金属离子吸附容量为 0.01 ~ 0.4 mmol/g, 仅为革兰氏阳性细菌细胞壁的吸附容量的 10% ~

收稿日期: 2005-04-22; 修订日期: 2005-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50222204)

作者简介: 康铸慧 (1981~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染控制.

* 通讯联系人, E-mail: celwang@yahoo.com

20%^[14, 15, 17, 20]. 但总体来说, 由于革兰氏阴性细菌细胞表面结构和成分的复杂性, 对其细胞表面组分, 如细胞外膜、内膜和肽聚糖层在重金属离子吸附过程中的作用尚缺乏详细的研究, 对具有较高重金属吸附容量的革兰氏阴性细菌的细胞表面组分在吸附过程中的作用与功能则更鲜有报道.

铜离子是工业废水中普遍存在的重金属污染源. 在以前的研究中, 从电镀废水中分离到了 1 株铜离子吸附能力较强的假单胞菌 *P. putida* 5-x, 并研究了该菌铜离子吸附的最佳条件、吸附特性、细胞固定化以及分批和连续生物吸附反应器的运行特性等^[4, 21~23]. 研究结果表明铜离子主要聚积在 *P. putida* 5-x 菌体的细胞表面, 而且由于荚膜的空间构造阻碍了铜离子向细胞壁内部的扩散, 因此去除荚膜的细胞显示出更高的 Cu^{2+} 吸附能力^[21~23]. 但是, 对荚膜内的 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的铜离子吸附能力和性质、细胞壁膜的主要组分在铜离子吸附中所起的作用及其吸附性质等方面尚缺乏深入的研究. 了解各种细胞表面组分在 *P. putida* 5-x 细胞铜离子吸附中所起的作用, 将有助于通过代谢调节或 DNA 重组技术改造细胞表面的结构和组分, 从而进一步提高 *P. putida* 5-x 细胞的金属离子吸附能力.

本研究分离了 *P. putida* 5-x 的细胞壁膜及其主要组分, 测定并分析了 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的铜离子吸附容量, 并对其主要组分, 如细胞外膜、肽聚糖层和细胞内膜在细胞壁膜对铜离子吸附过程中的作用及它们的吸附性质进行了研究和讨论.

1 材料与方法

1.1 微生物培养

实验中使用的 *P. putida* 5-x 菌株是从本地电镀工业废水中分离到的. 培养过程参考文献^[22]进行. 首先将 *P. putida* 5-x 的单菌落接种于 100 mL 硫酸盐限制性培养基 (Sulphate Limiting Medium, SLM) 中, 在 30℃下, 200 r/min 振荡培养 24 h. 随后接入含 10 L SLM 培养基的 16 L 的发酵罐 (Bioengineering Co.) 中, 在 30℃、搅拌转速 400 r/min、通气量 3.0 L/min 的条件下培养 34~36 h 后, 离心收集菌体细胞, 并用 10 mmol/L pH 6.5 的 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸 [2-(*N*-morpholino)-ethanesulphonic acid, MES] 缓冲液洗涤 2 次后用于随后的实验.

1.2 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的制备

将 0.1 mol/L HCl 预处理过的细胞悬浮于 10

mmol/L pH 6.5 的 MES 缓冲液中, 然后以高压匀浆泵在 1.58×10^8 Pa 压力下破碎细胞. 破碎的细胞悬浮液经 4 000 r/min 离心 10 min 以除去残留的完整细胞. 上清液用 5 mg/L 的 DNA 酶和 10 mg/L 的 RNA 酶在 25℃下处理 45 min, 然后 15 000 r/min 离心 60 min 分离出细胞壁膜物质^[16]. 收获的细胞壁膜物质用 0.05 mol/L, pH 7.2 的 *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸 (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, HEPES) 缓冲液洗涤 5 次, 再用去离子水洗涤 2 次.

1.3 *P. putida* 5-x 原生质膜的制备

根据 Schnaitman^[24]的方法, 并作一定的修改后用于原生质膜的分离. 将已分离的细胞壁膜重新悬浮于含 15 mg/L 溶菌酶的 0.1 mol/L pH 7.0 Tris 缓冲液中, 并将此悬浮液在 25℃下振荡培养 60 min 以破坏并除去细胞壁膜中的肽聚糖层, 然后 18 000 r/min 离心 60 min 收集原生质膜, 最后用 0.05 mol/L pH 7.2 HEPES 缓冲液和去离子水各洗涤 2 次. 最终获得的原生质膜物质悬浮于少量去离子水, 并冷冻干燥以用于进一步的实验.

1.4 *P. putida* 5-x 细胞外膜的制备

根据 Kropinski 等^[25]的方法, 并作一定的修改后用于细胞外膜的分离. 将已分离的细胞壁膜重新悬浮于含 15 mg/L 溶菌酶的 0.05 mol/L pH 7.0 的 Tris 缓冲液中, 此悬浮液在 25℃下振荡培养 60 min 以破坏除去细胞肽聚糖层, 然后 18 000 r/min 离心 60 min 收集沉淀. 将收集的沉淀物质用含 0.5% Triton X-100 和 20 mmol/L Mg^{2+} 的 0.1 mol/L pH 6.5 的 HEPES 缓冲液洗涤 30 min, 再 18 000 r/min 离心 60 min 回收沉淀, 最后用 0.05 mol/L pH 7.2 的 HEPES 缓冲液和去离子水各洗涤 2 次. 最终获得的细胞外膜物质悬浮于少量去离子水中, 并冷冻干燥以用于进一步的实验.

1.5 *P. putida* 5-x 肽聚糖层的制备

将已分离的细胞壁膜用 2% 的十二烷基硫酸钠 (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) 溶液在 25℃下萃取 30 min, 然后将悬浮液以 30 000 r/min 离心 60 min 以分离肽聚糖层物质, 最后将收集的肽聚糖层物质用 0.5% SDS 洗涤, 再用 1 mol/L NaCl 洗涤 3 次、去离子水洗涤 5 次^[26, 27].

1.6 Cu^{2+} 吸附容量的确定

将干重 25 mg 的菌体细胞 (或干重 10 mg 的细胞壁膜、肽聚糖层、外膜和内膜物质) 加入含 50 mL 10 mmol/L pH 6.5 的 MES 缓冲溶液的烧杯中, 溶

液中 Cu^{2+} 浓度为 50 mg/L. 对照组烧杯中不加吸附剂. 在 25 °C 下以 200 r/min 振荡吸附 20 min 后, 15 000r/min 离心 30 min 除去吸附剂. 上清液中的 Cu^{2+} 浓度用原子吸收分光光度计 (Perkin Elmer 3300) 测定. Cu^{2+} 吸附容量 (Q) 可由下式计算得到:

$$Q = (c_e - c_e) V / W,$$

式中, Q 为 Cu^{2+} 吸附容量 (mg/g), c_e 为对照组溶液中的最终 Cu^{2+} 浓度 (mg/L), c_e 为吸附完成后上清液中的残余 Cu^{2+} 浓度 (mg/L), W 为菌体细胞或分离的细胞组分的干重 (g), V 为含 Cu^{2+} 的缓冲溶液的体积 (L).

1.7 吸附等温线的确定

将恒定浓度的生物吸附剂分别加入铜离子初始浓度依次为 10, 20, 30, 50, 100 mg/L 的 pH 6.5 的 MES 缓冲溶液中, 吸附后, 根据不同浓度条件下上清液中残留的铜离子浓度和生物吸附剂的吸附容量作图确定该生物吸附剂的吸附等温线.

1.8 扫描电子显微镜分析

将分离的细胞壁膜、肽聚糖层、原生质膜和外膜等悬浮于含涂有碳-聚乙烯甲醛膜的微小尼龙网栅 (400 目) (Pelco International, Redding, CA, USA) 的水溶液中 30 s, 收集后用吸水纸吸干, 经喷金后扫描电镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) (Stereoscan 440, Leica) 观察并照相.

1.9 细胞表面组分的成分分析

蛋白质含量根据 Folin 酚法确定: 样品首先用

表 1 10g 新鲜细胞中提取的细胞壁膜和各种细胞表面组分的含量及 Cu^{2+} 吸附容量和吸附总量¹⁾

Table 1 Recovery of different cell components from 10 g fresh cells and their Cu^{2+} adsorption capacities, total Cu^{2+} binding yields

项目	新鲜细胞	细胞壁膜	原生质膜	外膜	肽聚糖层	内膜 ²⁾
干重/g	10	2.41	1.85	0.85	0.25	1.01
吸附容量/mg·g ⁻¹	67.4 ± 5.2	337 ± 31	258 ± 17.6	307 ± 23	386 ± 22	217 ± 19.8
结合总量/mg	674	812	477	258	97.3	219

1) 吸附实验数据以 3 次实验的均值 ± 标准差表示; Cu^{2+} 吸附总量是指从 10 g 新鲜细胞中分离得到的各种组分对 Cu^{2+} 的吸附总量, 实验数据以 3 次实验的均值表示. 2) 此列中的数值由公式 (1) 和 (2) 计算得到, 公式见 2.4

这一结果显示完整细胞表面的部分金属吸附位点由于空间障碍而不能有效结合重金属离子, 而在分离的细胞壁膜中, 由于分离过程中的各种化学和物理因子的处理, 其内部空间中有更多的金属结合位点被释放出来, 从而可以有效地结合重金属离子. Hu 等^[33] 的研究也发现分离的细菌细胞壁显示出比完整细胞更高的重金属离子结合能力, 他们认为这是由于相对于分离的细胞壁, 重金属离子渗透进入完整细胞的细胞壁内部要困难得多.

一系列吸附实验表明, 分离的 *P. putida* 5-x 细

90% 二氯甲烷溶液萃取, 以牛血清蛋白为标准在 595 nm 波长下比色测定 D 值^[28].

磷脂含量根据细胞表面组分中的总磷含量计算得到, 计算时假定磷脂的平均分子量为 700^[29]. 总磷含量采用 ANSA 法测定^[30].

肽聚糖含量根据肽聚糖层中二氨基庚二酸 (DPA) 含量计算得到, 因为肽聚糖中平均 DPA 含量为 18.3%. DPA 含量根据 Work^[31] 的方法测定.

脂多糖含量根据 Karkhanis 等^[32] 的方法由测定 2-酮 3-脱氧辛糖酸 (KDO) 的含量计算得到.

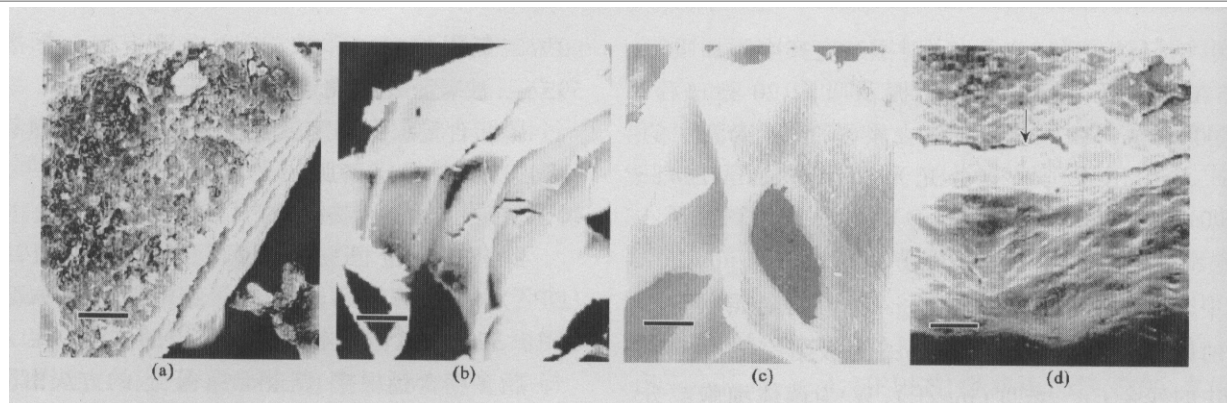
2 结果与讨论

2.1 分离 *P. putida* 5-x 细胞壁膜对 Cu^{2+} 的吸附

许多关于细菌金属离子吸附的研究都表明革兰氏阳性细菌的细胞壁对金属离子的吸附能力要比革兰氏阴性细菌的细胞壁膜高 (通常为 5 ~ 10 倍)^[14, 15]. 这是因为两者的细胞表面组分和结构有所不同. 本实验中, 从干重 10 g 的 *P. putida* 5-x 新鲜细胞中获得了干重 2.41 g 细胞壁膜物质 (表 1). 图 1(a) 是获得的层状结构的细胞壁膜材料的扫描电镜分析结果, 这表明采用本研究中使用的生化分离技术能获得良好的细胞壁膜材料. 由表 1 可见, 在 pH 6.5 Cu^{2+} 初始浓度为 50 mg/L 的溶液中, 分离的细胞壁膜对 Cu^{2+} 的吸附容量约为 337 mg/g, 是完整细胞吸附量的 5 倍以上, 而且 2.41g 细胞壁膜对 Cu^{2+} 的吸附总量为 10g 新鲜细胞的 1.2 ~ 1.3 倍.

细胞壁膜对 Cu^{2+} 的吸附过程可以用方程式 $Q = 129c_e^{0.232}$ 表示 (见图 2). 这表明细胞壁膜对 Cu^{2+} 的吸附过程符合 Freundlich 吸附等温线 $Q = K_f c_e^n$, 因此是一个物理吸附过程. 其中 K_f 值可以衡量生物吸附剂的吸附能力^[34]. 从图 2 可见, *P. putida* 5-x 细胞壁膜对 Cu^{2+} 吸附的 K_f 值为 129, 比其完整细胞的 K_f 值要高得多^[22]. 这也意味着 *P. putida* 5-x 的细胞壁膜较完整细胞更适合作为生物吸附剂用于铜离子的去除.

与生物吸附剂的生产成本相比, 吸附剂的再生、



(a) 层状结构的细胞壁膜; (b) 单层结构的肽聚糖层; (c) 外膜; (d) 中间带间隙(箭头所示)的原生质膜
(a) Structure complex stratified cell envelope (Bar= 0.16 μ m), (b) Structure simple monolayer PEG layer material (Bar= 0.35 μ m);
(c) Thick outer membrane (Bar= 0.16 μ m); (d) Biflayer spheroplast envelop with interspace (arrow indicate) (Bar= 0.03 μ m)

图 1 分离出的 *P. putida* 5-x 细胞壁膜、肽聚糖层、外膜和原生质膜的扫描电镜图

Fig. 1 SEM graph of cell envelopes, PEG layer, outer membrane and spheroplast envelopes of *P. putida* 5-x

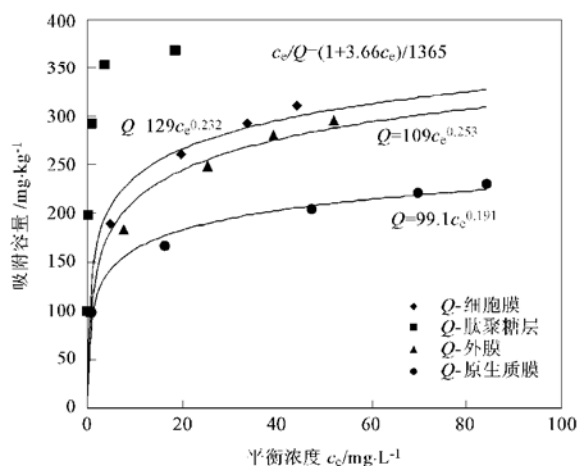


图 2 分离的 *P. putida* 5-x 细胞表面组分对 Cu^{2+} 的吸附等温线

Fig. 2 Adsorption isotherms of cell components isolated from *P. putida* 5-x cell

处置和运输费用占了整个吸附处理费用的很大部分^[35]. 要使生物吸附技术较之现有的吸附技术更具竞争力, 生物吸附剂的吸附容量须达到 150 mg/g 以上, 以减少生物吸附剂的使用量从而减少相应的污泥再生、处置和运输费用^[36]. 因此从整个吸附过程的成本考虑, 分离的 *P. putida* 5-x 细胞壁膜较之其完整细胞而言可能是一种更具发展前景的铜离子生物吸附剂.

本实验中 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附容量达到甚至超过了典型的革兰氏阳性细菌细胞壁的吸附水平^[14, 15]. 近年来, Yee 和 Fein^[37] 的研究也同样认为革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌对镉离子的吸附有相似的吸附特性和吸附能力. 这些新的研究结果似乎显示革兰氏阴性细菌的细胞壁膜由于

其结构的复杂性和多样性, 同样有可能对金属离子具有较高的吸附能力. 这就促使我们进一步探索究竟 *P. putida* 5-x 细胞表面的何种组分导致了其如此之高的 Cu^{2+} 吸附容量.

2.2 肽聚糖层对 *P. putida* 5-x 细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附的贡献

革兰氏阴性细菌的细胞壁膜由 3 种主要组分构成: ①由脂多糖、蛋白质和磷脂组成的细胞外膜; ②由肽聚糖组成的肽聚糖层^[38]; ③由磷脂和蛋白质组成的细胞内膜. 外膜和内膜中的磷脂、蛋白质和脂多糖很容易被 SDS 溶液溶解, 而肽聚糖层对 SDS 溶液萃取有较强的抵抗力^[26]. 由表 1 和图 1(b) 可见, 本实验从 10 g *P. putida* 5-x 新鲜细胞中有效分离出约 0.25 g 单层结构的肽聚糖层物质(约占细胞壁膜干重的 10.3%).

对肽聚糖层的成分分析表明(表 2), 分离的肽聚糖层仅含极少量的蛋白质和磷脂, 约 95% 都是大分子的肽聚糖. 而由表 1 的结果可知, 在 Cu^{2+} 初始浓度为 50 mg/L 时, 肽聚糖层对 Cu^{2+} 的吸附容量约为 386 mg/g, 只略高于细胞壁膜的吸附容量. 尽管在分离过程中肽聚糖层物质的损失不可避免, 但 0.25 g 肽聚糖层物质对 Cu^{2+} 的吸附总量仅为 97.3mg, 只占细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附总量的 15%, 这一结果显示, 在 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附过程中, 其它细胞表面组分如外膜和内膜同样起了重要的作用.

从图 2 结果可见, 分离的肽聚糖层物质对 Cu^{2+} 的吸附过程似乎更符合 Langmuir 吸附等温线, 其吸附方程为 $Q = 1365c_e / (1 + 3.66c_e)$. 这一结果暗示

肽聚糖层物质的 Cu^{2+} 吸附特性与完整细胞和细胞壁膜有所不同。

表 2 *P. putida* 5-x 细胞的各种细胞表面组分的成分含量¹⁾ / %

Table 2 Ingredients content in separated cell surface components isolated from fresh cell / %

成分	蛋白质	磷脂	肽聚糖	脂多糖
肽聚糖层	1.2	0.8	94.8	
细胞外膜	31.2	39.3		7.8
原生质膜	37.9	28.1		3.7
细胞内膜 ²⁾	43.5	18.4		

1) 实验数据以 3 次实验的均值表示。2) 此行中的数值由公式 (3) 和 (4) 计算得到, 公式见 2.4

2.3 细胞外膜对 *P. putida* 5-x 细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附的贡献

本实验从干重 10 g *P. putida* 5-x 的新鲜细胞中获得了约干重 0.84g 细胞外膜物质(见表 1)。图 1 (c) 的扫描电镜结果说明采用本分离技术从新鲜细胞中分离外膜物质是成功的。由表 1 可见, 外膜物质同样显示出相当高的 Cu^{2+} 吸附容量, 约为 300 mg/g, 尽管仍比肽聚糖层物质要低。然而, 外膜物质的含量占细胞壁膜总量的 35% 左右, 0.84 g 外膜物质的 Cu^{2+} 吸附总量为 258 mg, 占细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附总量的 31% 以上。这一结果表明外膜物质对 *P. putida* 5-x 细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附的贡献超过了肽聚糖层物质。由图 4 可见, 外膜对 Cu^{2+} 的吸附过程可用公式 $Q = 109c_e^{0.253}$ 表示, 显然外膜对 Cu^{2+} 的吸附过程符合 Freundlich 吸附等温线, 因此也是一个物理吸附过程。

P. putida 5-x 细胞外膜的 Cu^{2+} 吸附容量较之以前报导的其它革兰氏阴性细菌外膜的吸附容量有显著的提高^[11, 17]。这可能也是 *P. putida* 5-x 细胞壁膜具有较高 Cu^{2+} 吸附容量的主要原因。表 2 中的分析结果表明, *P. putida* 5-x 的细胞外膜物质中约含 39.3% 磷脂 31.2% 蛋白质及 7.8% 脂多糖。和一般的革兰氏阴性细菌相比, *P. putida* 5-x 细胞外膜中的磷脂含量相对较高^[39, 40]。而磷脂中含有大量的带负电荷基团, 这可能是 *P. putida* 5-x 细胞外膜具有较高 Cu^{2+} 吸附容量的主要原因。此外, 尽管 *P. putida* 5-x 细胞外膜中的脂多糖含量相对磷脂含量低很多, 但附着于其上的高密度的羰基和羧基同样为重金属离子的结合提供了更多的负电荷基团, 因此也是外膜吸附 Cu^{2+} 的主要成分^[41, 42]。

2.4 细胞内膜在细胞壁膜吸附 Cu^{2+} 过程中的作用

由于细胞内膜分离比较困难, 本研究中没有有效获得分离的细胞内膜物质, 但是通过溶菌酶处理

细胞壁膜获得了原生质膜物质, 它是由细胞外膜和内膜组成。因此, 如果原生质膜和外膜的干重和其 Cu^{2+} 吸附容量被确定, 那么细胞内膜物质的干重和 Cu^{2+} 吸附容量就可以由公式 (1) 和 (2) 计算得到:

$$W_{\text{inner}} = W_{\text{spheroplast}} - W_{\text{outer}} \quad (1)$$

$$Q_{\text{inner}} = (Q_{\text{spheroplast}} W_{\text{spheroplast}} - Q_{\text{outer}} W_{\text{outer}}) / W_{\text{inner}} \quad (2)$$

式 (1) 中, W_{inner} , $W_{\text{spheroplast}}$ 和 W_{outer} 分别为细胞内膜、原生质膜和外膜的干重 (g); 式 (2) 中, Q_{inner} , $Q_{\text{spheroplast}}$ 和 Q_{outer} 分别为细胞内膜、原生质膜和外膜的 Cu^{2+} 吸附容量 (mg/g)。此外, 如果确定了原生质膜和外膜中蛋白质和磷脂的含量, 那么细胞内膜中蛋白质和磷脂的含量可由公式 (3) 和 (4) 计算得到:

$$C_{\text{pror inner}} = (C_{\text{pror spheroplast}} W_{\text{spheroplast}} - C_{\text{pror outer}} W_{\text{outer}}) / W_{\text{inner}} \quad (3)$$

$$C_{\text{P-lipid inner}} = (C_{\text{P-lipid spheroplast}} W_{\text{spheroplast}} - C_{\text{P-lipid outer}} W_{\text{outer}}) / W_{\text{inner}} \quad (4)$$

式 (3) 中, $C_{\text{pror inner}}$, $C_{\text{pror spheroplast}}$ 和 $C_{\text{pror outer}}$ 分别为细胞内膜、原生质膜和外膜中的蛋白质含量 (%); 式 (4) 中, $C_{\text{P-lipid inner}}$, $C_{\text{P-lipid spheroplast}}$ 和 $C_{\text{P-lipid outer}}$ 分别为细胞内膜、原生质膜和外膜中的磷脂含量 (%). 当然, 根据这些计算公式获得的数据只是理论值, 它们和实际值之间的误差是不可避免的。尽管如此, 这些计算得到的数据还是有助于初步阐明细胞内膜对 *P. putida* 5-x 细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附的作用。

本实验采用溶菌酶处理细胞壁膜物质来制备细胞原生质膜, 最后从 10 g 新鲜的 *P. putida* 5-x 细胞中获得了 1.85 g 原生质膜物质(见表 1)。从图 1 (d) 的扫描电镜照片中可清晰地看到, 原生质膜为双层结构, 包括细胞外膜和内膜, 外膜和内膜间的间隙是由于位于两者之间的肽聚糖层被溶菌酶溶解所致。由表 1 和图 2 结果可见, 原生质膜物质的 Cu^{2+} 吸附容量约为 258 mg/g, 其吸附过程也符合 Freundlich 吸附等温线, 为 $Q = 99.1c_e^{0.191}$ 。根据原生质膜和外膜的干重和其 Cu^{2+} 吸附容量, 由式 (1) 和 (2) 得到细胞内膜的干重和 Cu^{2+} 吸附容量分别为 1.01 g 和 216 mg/g。这表明细胞壁膜系统中的细胞内膜物质的含量比外膜物质高, 但细胞内膜的 Cu^{2+} 吸附容量比外膜低。1.01g 细胞内膜物质的 Cu^{2+} 吸附总量为约 219 mg, 占细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附总量的 25% 以上。因此, 在 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附过程中, 细胞内膜所贡献的比例较外膜要低, 但比肽聚糖层要高。

由表 2 可见,细胞内膜中的磷脂和蛋白质含量分别为 18.7% 和 43.5%。显然,*P. putida* 5-x 细胞内膜中的磷脂含量远比外膜中的低,而蛋白质含量却比外膜高。由此可以推断,较低的磷脂含量,以及缺乏脂多糖是 *P. putida* 5-x 细胞内膜 Cu^{2+} 吸附容量较外膜低的主要原因。而蛋白质在细胞内膜和外膜吸附 Cu^{2+} 的过程中起了较为次要的作用。

3 结论

(1) 分离的 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附容量是完整细胞的 5 倍之多,这是由于在分离过程中,经过化学和物理因子的处理,细胞壁膜上有更多的金属离子结合位点被释放出来。

(2) 细胞壁膜的主要组分,如肽聚糖层、细胞外膜和内膜都在 *P. putida* 5-x 细胞壁膜的 Cu^{2+} 吸附过程中发挥了作用。它们的 Cu^{2+} 吸附容量的大小顺序为肽聚糖层> 外膜> 内膜,而细胞壁膜中这些组分的含量高低顺序为细胞内膜> 外膜> 肽聚糖层。综合来看,这些细胞表面组分对细胞壁膜 Cu^{2+} 吸附的贡献依次为外膜> 内膜> 肽聚糖层。

(3) *P. putida* 5-x 细胞外膜中的磷脂含量明显比之前报道过的其它革兰氏阴性细菌细胞外膜中的要高,这可能是 *P. putida* 5-x 细胞外膜具有较高 Cu^{2+} 吸附容量的主要原因,并因此导致 *P. putida* 5-x 细胞壁膜具有较高的 Cu^{2+} 吸附容量。

(4) 分离的细胞壁膜、外膜和原生质膜对 Cu^{2+} 的吸附过程符合 Freundlich 吸附等温线,而分离的肽聚糖层物质对 Cu^{2+} 的吸附似乎更符合 Langmuir 吸附等温线,这表明肽聚糖层的吸附性质与其它细胞表面组分有所不同。

参考文献:

- [1] James A M. The electrical properties and topochemistry of bacterial cells[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1982, **15**: 171~ 221.
- [2] Doyle R J, Matthews T H, Streips U N. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall[J]. *Journal of Bacteriology*, 1980, **143**: 471~ 480.
- [3] Beveridge T J, Jack T. Binding of an inert, cationic osmium probe to walls of *B. subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, **149**: 1120~ 1123.
- [4] Wong P K, So C M. Cu^{2+} accumulation by a strain of *Pseudomonas putida*[J]. *Microbiology*, 1993, **73**: 113~ 121.
- [5] 葛小鹏,潘建华,刘瑞霞,等. 重金属生物吸附研究中蜡状芽孢杆菌菌体微观形貌的原子力显微镜观察与表征[J]. *环境科学学报*, 2004, **24**(5): 753~ 760.
- [6] 胡志钰,张秀丽,李仁忠,等. 细菌吸附 Pd^{2+} 的研究[J]. *微生物学报*, 2000, **40**(5): 535~ 539.
- [7] Warren L A, Ferris F G. Continuum between sorption and precipitation of Fe (III) on microbial surfaces [J]. *Environmental Science Technology*, 1998, **32**: 2331~ 2337.
- [8] Yetis U E, Oezcengiz G, Dilek F B, *et al.* Heavy metal biosorption by white rot fungi[J]. *Water Science Technology*, 1998, **38**: 323~ 330.
- [9] Mameri N, Boudries N, Addour L. Batch Zinc biosorption by a bacterial nonliving *streptomyces rimosus* biomass [J]. *Water Research*, 1999, **33**: 1347~ 1354.
- [10] Gutnick D L, Bach H. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2000, **54**: 451~ 460.
- [11] Remacle J. The cell wall and metal binding [A]. In: Volesky B (eds). *Biosorption of Heavy Metals* [M]. Boca Raton: CRC Press Inc., 1990. 83~ 92.
- [12] Beveridge T J. The immobilization of soluble metals by bacterial walls [A]. In: Ehrlich H L, Holmes D S (eds). *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 16, Biotechnology for the Mining, Metal Refining, and Fossil Fuel Processing Industries* [C]. New York: Wiley Interscience, 1986. 127~ 140.
- [13] McLean R J, Beveridge T J. Metal-binding capacity of bacterial surfaces and their ability to form mineralized aggregates [A]. In: Ehrlich H L, Brierley C L (eds). *Microbial Mineral Recovery* [M]. New York: McGraw-Hill, 1990. 303~ 324.
- [14] Beveridge T J, Fyfe W S. Metal fixation by bacterial cell walls [J]. *Canadian Journal of Earth Science*, 1985, **22**: 1893~ 1898.
- [15] Brierley C L. Metal immobilization using bacteria [A]. In: Ehrlich H L, Brierley C L (eds). *Microbial Mineral Recovery* [M]. New York: McGraw-Hill, 1990. 325~ 340.
- [16] Beveridge T J, Koval S F. Binding of metal to cell envelopes of *E. coli* K-12 [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1981, **42**: 325~ 335.
- [17] Hoyle B, Beveridge T J. Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1983, **46**: 749~ 751.
- [18] Falla J, Block J C. Binding of Cd^{2+} , Ni, Cu, Zn by isolated envelopes of *P. fluorescens* [J]. *FEMS Microbiological Letters*, 1993, **108**: 347~ 352.
- [19] Macaskie L E, Bonthron, K M, Yong P, *et al.* Enzymically mediated bioprecipitation by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for extracellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation [J]. *Microbiology*, 2000, **146**: 1855~ 1867.
- [20] Ferris F G, Beveridge T J. Binding of a paramagnetic metal cation to *E. coli* K-12 outer membrane [J]. *FEMS Microbiological Letter*, 1984, **24**: 43~ 51.
- [21] Sze K F, Lu Y J, Wong P K. Removal and recovery of copper ion from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5-x [J]. *Resources, Conservation and Recycling*, 1996, **18**: 175~ 193.

- [22] Wang L, Chua H, Wong P K, *et al.* An optimal magnetite immobilized *P. putida* 5-x cell system for Cu^{2+} removal from Industrial Waste effluent [J]. Water Science Technology, 2000, **41**: 241~ 246.
- [23] 吴小林, 王磊, 高燕, 等. 吸附-降解组合生物系统处理含铜离子城市污水. 环境科学, 2004, **26**(2): 131~ 136.
- [24] Schnaitman C A. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *E. coli* [J]. Journal of Bacteriology, 1970, **104**: 890~ 901.
- [25] Kropinski A M B, Lewis V, Berry D. Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane, proteins and lipopolysaccharides of *P. aeruginosa* PAO [J]. Journal of Bacteriology, 1987, **169**: 1960~ 1966.
- [26] Weidel W, Peltzer H. Bagshaped macromolecule—a new outlook on bacterial cell walls [J]. Advanced Enzymology, 1964, **26**: 193~ 232.
- [27] Beveridge T J, Forsberg C W, Doyle R J. Major sites of metal binding in *B. licheniformis* walls [J]. Journal of Bacteriology, 1982, **150**: 1438~ 1448.
- [28] Lowry O H, Rosebrough X J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Analytical Biochemistry, 1951, **59**: 265~ 275.
- [29] Osborn M J, Gander J E, Parisi E, *et al.* Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, **247**: 3962~ 3972.
- [30] Hanahan D J. A guide to phospholipid chemistry [M]. New York: Oxford University Press Inc. , 1996.
- [31] Work E. Reaction of ninhydrin in acid solution with straight-chain amino acid containing two amino groups and its application to the estimation of diaminopimelic acid [J]. Biochemistry Journal, 1957, **67**: 417~ 423.
- [32] Karkhanis Y D, Zeltner J K, Jackson J J. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria [J]. Analytical Biochemistry, 1978, **85**: 595~ 601.
- [33] Hu Z C, Norman J M, Faison B D, *et al.* Biosorption of uranium by *P. aeruginosa* strain CSO: Characterization and comparison studies [J]. Biotechnology Bioengineering, 1996, **51**: 237~ 247.
- [34] Sag Y, Kutsal T. Biosorption of heavy metals by *Zoogloea ramigera*: use of adsorption isotherms and a comparison of biosorption characteristics [J]. Chemical Engineering Journal, 1995, **60**: 181~ 188.
- [35] Atkinson B W, Bux F, Kusan H C. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents [J]. Water SA, 1998, **24**: 129~ 135.
- [36] Gadd G M. Accumulation of metals by microorganisms and algae [A]. In: Rehm H J, Reed G (eds). Biotechnology [M]. Weinheim : VCH Publishers, 1988. 401~ 433.
- [37] Yee N, Fein J. Cd adsorption onto bacterial surface: A universal adsorption edge [J]. Geochim Cosmochim Acta, 2001, **65**: 2037~ 2042.
- [38] Schiewer S, Volesky B. Biosorption process for heavy metal removal [A]. In: Derek R L (eds). Environmental Microbe-Metal Interactions [M]. Washington D C: ASM Press Inc. , 2000. 329~ 362.
- [39] Bhakoo M, Herbert R A. Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. growth at different temperature [J]. Arch Microbiol, 1980, **126**: 51~ 55.
- [40] Bobo R A, Eagon R G. Lipids of cell wall of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brucella abortus* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1968, **14**: 503~ 513.
- [41] Rogers S W, Gilleland H E, Eagon R G. Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of *P. aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1969, **15**: 743~ 748.
- [42] Wilkinson S G, Galbraith L, Lightfoot G A. Cell walls, lipids and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species [J]. Eur. Journal Biochem. , 1973, **33**: 158~ 174.