

酵母菌吸附重金属铬的生理代谢机理及细胞形貌分析

何宝燕, 尹华*, 彭辉, 叶锦韶, 杨峰, 秦华明, 张娜

(暨南大学环境工程系, 广州 510632)

摘要:从细胞的生理代谢及微观形貌方面研究了 1 株酵母菌富集废水中铬的机理. 阳离子运输实验表明: 酵母菌在吸附铬的过程中, 伴随着 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等阳离子的大量释放, 铬离子和质子的跨膜运输与胞内阳离子释放相耦合; 反应 30 min, 细胞对铬的吸附接近饱和, 阳离子与铬的交换达到平衡. 同时细胞分泌酰胺和蛋白等有机分子, 作为 $Cr(VI)$ 的还原性物质及离子主动运输的载体, 促进了铬的胞内积累. 原子力显微镜、扫描电镜、X 射线衍射能谱分析吸附铬前后细胞微观形貌、元素含量变化; 细胞表面高毒性铬的沉积、细胞膜通透性的增强、铬与细胞内有机大分子的螯合作用, 及胞内大量维持细胞结构的阳离子向体外扩散等行为破坏了细胞的微观结构, 致使细胞产生空壳、内陷甚至裂解等现象.

关键词: 铬; 酵母菌; 离子运输; 吸附机理; 细胞形貌

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)01-0194-05

Cell Physiology Metabolism and Morphology Study of Chromium Biosorption by Yeast

HE Bao-yan, YIN Hua, PENG Hui, YE Jin-shao, YANG Feng, QIN Hua-ming, ZHANG Na

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

Abstract: Physiology metabolism and micro morphology were studied to reveal mechanism of chromium accumulation in wastewater by yeast. Cation transportation experiment showed that the transportation of Cr, H ion coupled with release of intracellular K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} in the process of biosorption and in 30 min the biosorption approached saturation and the exchange between Cr and cations reached balance. Meanwhile the cell secreted amide and protein which acted as reduction products of chromium (VI) and carriers of ion transportation to accelerate the intracellular accumulation of chromium. Atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectra analysis certificated that the microstructure of cells were destroyed and the retraction, empty and fission of cells appeared because of microprecipitation of chromium on cell surface, increasing permeability of cell membrane, chelation of Cr and organic high molecule in cells and release of cations from cells.

Key words: chromium; yeast; ion transportation; biosorption mechanism; cell morphology

铬广泛存在于电镀、皮革、木材防腐、染料、橡胶、陶瓷等工业所排出的废水中, 严重危害生态系统^[1~3]. 利用酵母、细菌、藻类等生物材料累积重金属是目前的研究热点之一^[4,5]. 生物对重金属的吸附作用取决于吸附剂本身的特性和金属自身对生物体的亲合性, 包括: 络合、配位、离子交换、无机微沉淀、氧化还原、静电吸附等物理化学过程^[6~8]. 从细胞的离子代谢看主要包括简单扩散、载体跨膜运输、离子泵运输、离子通道等. 从细胞结构看主要有细胞外积累/沉淀、细胞表面吸附/沉淀和细胞内积累^[9~11]. 目前对吸附机理的研究^[12~14]多侧重于吸附位点和细胞形态变化, 对吸附过程中的离子代谢、物质代谢及其与细胞形貌变化关系的研究较少, 对于微生物作为生命体, 其细胞内外生理生化反应在生物吸附中的作用机制还不甚了解.

本研究以 1 株高效的酵母融合菌富集废水中铬为例, 利用电感耦合等离子体发射光谱、扫描电镜、X 射线衍射能谱、原子力显微镜、紫外吸收光谱等多

种分析手段, 从细胞的离子代谢、物质代谢、微观形貌及三者间的关系等方面对微生物富铬过程中的生理生化机理进行了较为深入的讨论.

1 材料与方法

1.1 实验材料

酵母融合菌: 亲本菌分别为热带假丝酵母和解脂假丝酵母; 培养基成分: 葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 2 g/L, 蛋白胨 2 g/L, $MgSO_4$ 0.05 g/L, 自来水配制, pH 为 5.5~6.5, 产菌量为 7 g/L, 含水率 85.71%.

1.2 实验方法

1.2.1 阳离子运输实验

接种菌体于培养基中, 摇床 30℃ 恒温振荡培养

收稿日期: 2006-01-20; 修订日期: 2006-04-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(50278040); 广东省科技厅科技计划重大专项(2004A30308002)

作者简介: 何宝燕(1980~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染的生物治理技术研究, E-mail: hebaoyan.student@163.com

* 通讯联系人, E-mail: thyin@jnu.edu.cn

30 h 后,离心,取上清液.用电感耦合等离子体发射光谱法(ICP-AES)测定上清液及原培养基中 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 离子浓度.

投加 25 g/L 菌,分别于去离子水和 20 mg/L $Cr(VI)$ 中,调节 pH 1~9, 30℃ 恒温振荡 4 h,离心取上清液,ICP-AES 测定上清液中 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 离子浓度及剩余总铬浓度;调节 pH 2, 30℃ 恒温振荡,测定离子释放量随时间的变化.

1.2.2 细胞主要元素能谱分析

处理 20 mg/L 铬液前后的细胞经清洗、固定、脱水、干燥、镀膜后于扫描电镜下观察细胞形貌,同时利用 X 射线衍射能谱对细胞主要元素进行分析.

1.2.3 细胞分泌物紫外光谱分析及分泌物对 $Cr(VI)$ 的还原性

接种菌体于培养基中,摇床 30℃ 恒温振荡培养 30 h 后,离心,取上清液即为酵母发酵液,离心后的菌体于去离子水中摇床振荡 4 h,离心后的上清液即为细胞分泌液.

分别取酵母发酵液、新鲜菌体分泌液、冰箱保藏 2 周菌体的分泌液,加入铬液至终浓度为 20 mg/L, 30℃ 恒温振荡 4 h,分光光度法测定 $Cr(VI)$ 的含量,计算还原率.

取新鲜菌体于去离子水及 20 mg/L 铬液中摇床振荡 4 h 后的分泌液,在紫外分光光度计下进行全波长扫描分析.

1.2.4 AFM、SEM 观察细胞显微结构

吸附反应(处理高浓度铬液 250 mg/L, pH 2)后,无菌水重悬细胞.吸取吸附前后各 1 滴菌液于盖玻片上涂匀,自然晾干,原子力显微镜下观察.

处理 250 mg/L 铬液前后的细胞经清洗、固定、脱水、干燥,在喷金和不喷金 2 种状态下于扫描电镜下观察.

2 结果与讨论

2.1 细胞在除铬过程中的阳离子运输情况

K 、 Na 、 Ca 、 Mg 是细胞内的大量元素^[15]. K 以离子状态存在,是许多酶的活化剂,参与物质运输和能量代谢,且电荷密度低,具有扩散通过细胞膜的能力. Na 是细胞内交换很快的阳离子,主要调节渗透压,保持细胞内合适的水活度及酸碱平衡. Mg 在整个细胞的新陈代谢过程中起着各种重要的催化作用. Ca 是形成细胞壁的必要结构成分,可作为细胞外酶的辅因子.由表 1 知,在酵母培养基中生长 30 h 后,细胞内金属离子的含量为 $K^+ > Mg^{2+} > Na^+ > Ca^{2+}$; 菌体的 K 含量为 $0.171\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$, Na 为 $0.037\text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$,细胞内为高 K^+ 、低 Na^+ ,细胞外环境为高 Na^+ 、低 K^+ ,这显然是主动运输的结果,执行这种主动运输功能的复合物为 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶离子泵,促使离子逆浓度梯度定向运送,需要 ATP 和其他方式的能量供给. Na^+ 、 K^+ -ATP 酶有 2 种构象,1 种构象与 Na^+ 亲和力大,酶与 ATP 结合后,促进对 ATP 的水解,并使酶分子本身磷酸化,转变为第 2 种构象,在这一构象转变的过程中将 Na^+ 从膜内侧运到膜的外侧,释放 Na^+ 到细胞膜外.以第 2 种构象存在的酶对 K^+ 亲和力大,从膜外侧结合 K^+ , K^+ 与酶结合后,促进酶去磷酸基,脱去磷酸基的酶又转变为第 1 种构象,在这一构象转变过程中细胞内的 Na^+ 不断运出,胞外的 K^+ 不断运进.

表 1 培养基中阳离子变化及细胞中离子含量

Table 1 Cations varying in culture and amount in cell

金属元素	初始培养基/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	培养菌后的上清液/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	菌体离子含量/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$
K^+	2.151	0.954	0.171
Na^+	4.870	4.163	0.037
Ca^{2+}	0.280	0.184	0.019
Mg^{2+}	3.613	2.896	0.102

图 1 表明,在 pH 为 1~5 时,细胞在去离子水中的离子释放量大小依次为 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} ;这是由于 H^+ 是微生物主要的质子动力来源,体外大量存在的 H^+ 被运输到体内时与二磷酸腺苷(ADP)形成大量三磷酸腺苷(ATP),从而保证酵母细胞在没有营养的去离子水中,仍具有保持正常生理生化状态的能量. H^+ 的体内运输与体内阳离子的向外运

输相耦合,形成 H^+ 运输的 Na 泵和 K 泵,也避免了体内的渗透压过高.

铬液处理后, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 离子释放量均有所增加,其中尤以 K^+ 最为明显.当 pH 2 时,铬的吸附效果较好,去除率达到 81.79%,此时,总离子净释放量达到 $1.99\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,铬的吸附量为 $0.31\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.这表明细胞在富集铬的同时,伴随

着细胞中常见离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 的大量释放.综合考虑本研究结果,酵母在运输铬时,需先把体内作为能量贮备源的糖类和蛋白质等生物大分子分解为小分子.此过程与体外 H^+ 的运输和体内阳

离子的释放相耦合,产生能量并向体外运输小分子蛋白或其他小分子生物物质,作为 $Cr(VI)$ 的还原物和结合物,降低铬的毒性,使铬-生物物质附着于细胞表面,并进一步把铬运输进体内.

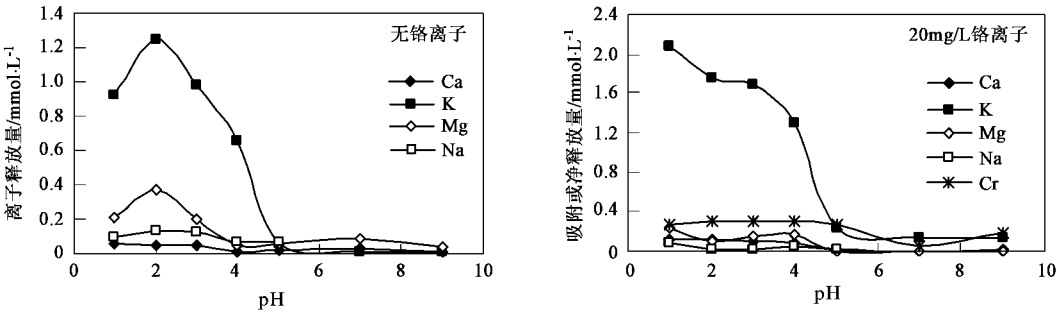


图 1 细胞内金属离子的释放随 pH 值变化趋势

Fig.1 Effect of pH on release of cations from biomass without Cr and with 20 mg/L Cr exposed cell

图 2 表明,细胞内阳离子的向外运输与 Cr 、 H 离子的向内运输是 1 个动态的平衡过程.在细胞与溶液接触的前 30 min 内,细胞内的渗透压远高于胞外的去离子水,且 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 易溶于水,迅速向胞外扩散,直至细胞内外离子强度达到平衡.而在铬液之中,由于细胞表面对铬的强吸附作用,及 $Cr(VI)$ 在细胞膜上的还原反应,促使细胞膜的表面

电位发生改变,膜的通透性大大增强,促进了细胞内阳离子进一步向外运输.同时细胞对铬的吸附作用也在这段时间内接近饱和,说明胞内阳离子与铬存在一定的离子交换作用.

2.2 处理铬前后细胞形态及元素含量变化

由 SEM(图 3)和 AFM(图 4)观察,吸附前细胞表面光滑饱满,细胞生长状态良好,出现芽殖;吸附后,

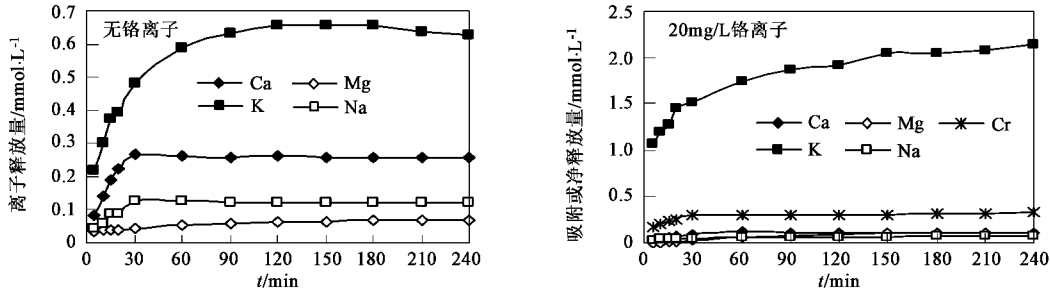


图 2 细胞内金属离子释放随时间的变化趋势

Fig.2 Effect of time on release of cations from biomass without Cr and with 20 mg/L Cr exposed cell

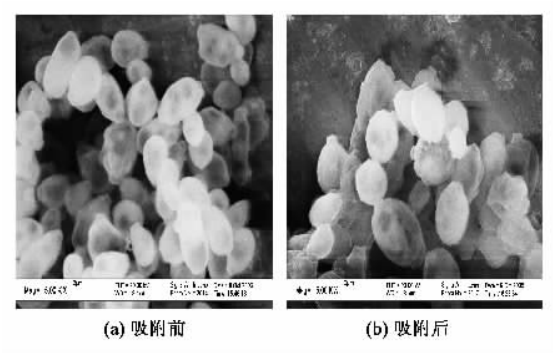


图 3 吸附铬前后细胞的 SEM 图

Fig.3 SEM photograph of biomass before (a) and after (b) biosorption

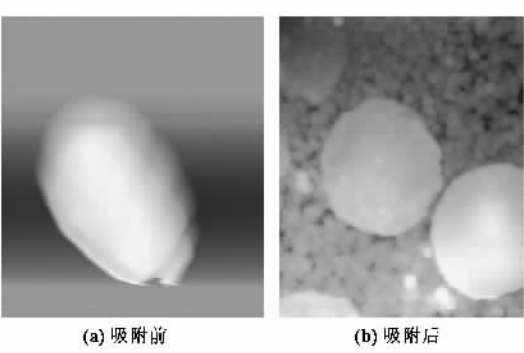


图 4 吸附铬前后细胞的 AFM 图

Fig.4 AFM photograph of biomass before (a) and after (b) biosorption

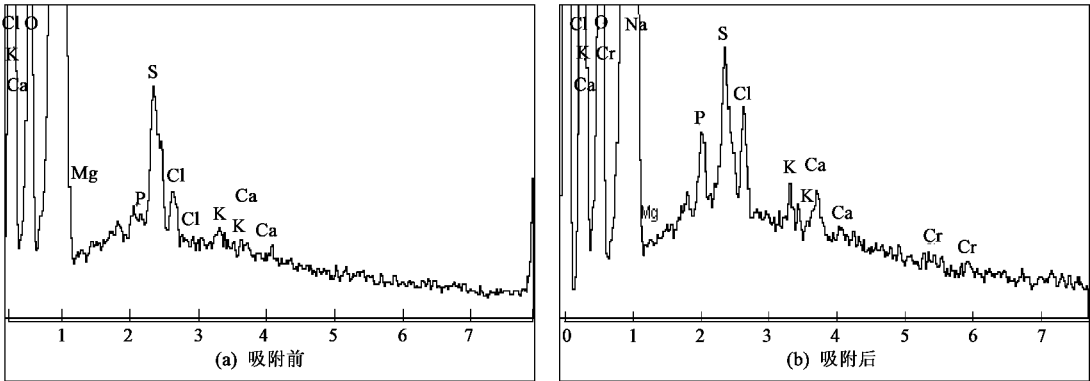


图 5 吸附铬前后细胞能谱图

Fig.5 Energy-dispersive X-ray spectra of biomass before (a) and after (b) biosorption

铬与酵母细胞壁的多聚糖,细胞体外分泌出的蛋白质、酰胺等生物大分子等物质结合,形成颗粒物,附着于细胞表面,出现很多小颗粒物质;同时大量高毒性价态的重金属进入了细胞内部,对胞内的大分子产生了大规模的破坏,且体内大量维持细胞结构的阳离子向体外扩散,细胞结构被破坏,产生空壳、内

陷甚至裂解等现象^[16].X 射线衍射能谱分析(图 5)知,吸附后细胞表面出现 Cr 的 2 个吸收峰,结合能为 5~6 keV,其含量(表 2)占细胞重量比的 0.57%,原子比的 0.2%;K、Na、Mg 元素的含量明显下降,这与 ICP-AES 检测结果吻合.

2.3 细胞分泌物的紫外光谱图及对铬的还原性能

表 2 吸附前后细胞元素比例变化/%

Table 2 Varying percent of cell elements before and after biosorption/%		O	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Cr
吸附前	重量比	75.93	5.72	3.38	2.35	3.94	4.00	2.28	2.39	0
	原子比	85.31	4.47	2.5	1.37	2.21	2.03	1.05	1.07	0
吸附后	重量比	76.78	1.53	2.31	4.32	3.16	6.81	1.79	2.73	0.57
	原子比	87.01	1.20	1.72	2.53	1.79	3.48	0.83	1.24	0.2

由图 6 可知,细胞分泌物在 213 nm 和 260 nm 有吸收峰,证明其中含酰胺和蛋白.在铬处理后,酰胺与铬结合,形成有机配体,213 nm 处的吸收峰右移至 223 nm 处.由图 7 可知,细胞分泌物可还原高毒性状态的 Cr(VI)为 Cr(III),增强其生物可利用性,且蛋白可作为离子主动运输的载体,协助细胞内外的离子交换,促进铬的生物富集.酵母发酵液对 Cr(VI)的还原率为 60.55%,新鲜菌体和保藏菌体分泌液的

铬还原率各为 35.76% 和 33.99%,说明菌体长时间保存活性良好.

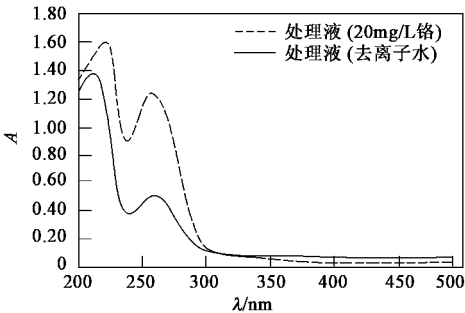


图 6 细胞分泌物的紫外光谱图

Fig.6 Ultraviolet spectrum of cell secretions

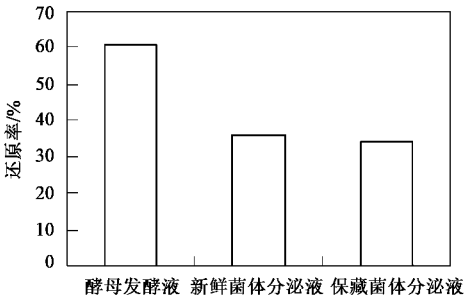


图 7 细胞分泌物对 Cr(VI)的还原性能

Fig.7 Reducibility of cell secretions on Cr(VI)

2.4 SEM 观察吸附前后细胞表面形态

为防止导电膜掩盖细胞表面的形貌细节、充分利用细胞表面金属离子的导电性,在喷金和不喷金 2 种状态下观察细胞形态,从图 8 知,在处理铬的过程中,铬液中的离子不断与细胞内的阳离子发生交

换,使大量金属离子聚集在细胞表面,其导电作用使吸附后的细胞明显比吸附前明亮,清晰;且观察到胞外粘结了细胞分泌的大分子物质.从图 9 可知,在高浓度铬液的作用下,铬晶体在细胞表面不断沉积及细胞内外离子的快速交换过程,细胞结构被破坏,细胞表面出现剧烈皱变.

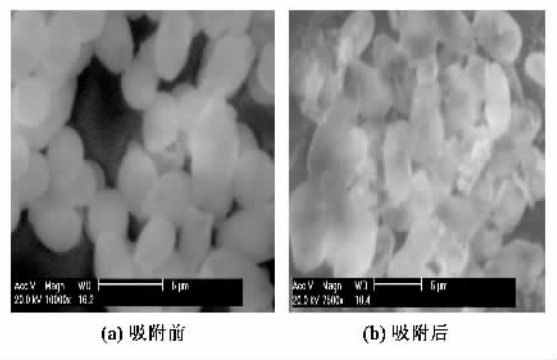


图 8 未喷金细胞的 SEM 图

Fig.8 SEM photograph of biomass before metal spraying

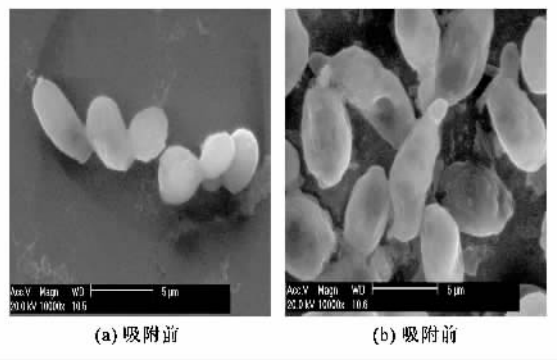


图 9 喷金后细胞的 SEM 图

Fig.9 SEM photograph of biomass after metal spraying

3 结论

酵母菌在吸附铬的过程中,伴随着 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等阳离子的大量释放,铬离子和质子的跨膜运输与阳离子释放相耦合.在吸附反应的前 30 min 内,细胞内外的离子运输达到平衡,细胞对铬的吸附接近饱和,说明胞内阳离子与铬存在一定的离子交换作用.同时细胞能分泌酰胺和蛋白等大分子物质,还原高毒性状态的 $Cr(VI)$ 为 $Cr(III)$,增强其生物可利用性,且蛋白可作为离子主动运输的载体,协助细胞内外的离子交换,促进铬的生物富集.在高铬的作用下,高毒性的铬与细胞壁结合,在细胞膜上的还原作用及与细胞内的大分子的有机螯合作

用,改变了细胞的微观结构,且体内大量维持细胞结构的阳离子向体外扩散,打破了细胞内的离子平衡,致使细胞产生空壳、内陷甚至裂解等现象.

参考文献:

[1] 杨俊香,兰叶香. 硫化物还原 $Cr(VI)$ 的反应动力学研究[J]. 环境科学学报, 2005, **25**(3): 356 ~ 360.

[2] Ferraz A L, Tavares T, Teixeira J A. $Cr(III)$ removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Chemical Engineering Journal, 2004, **105**(1-2): 11 ~ 20.

[3] 李强,陈明,崔富昌,等. 生物吸附剂 ZLS-2 对 $Cr(VI)$ 的吸附机理[J]. 环境科学, 2006, **27**(2): 343 ~ 346.

[4] Wei M, Tobin J M. Determination and modeling of effects of pH on peat biosorption of chromium, copper and cadmium[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, **18**(1): 33 ~ 40.

[5] Anita L, Kalpana M, Bhavanath J. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium[J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, **50**(3): 340 ~ 343.

[6] Kapoor Anoop, Viraraghavan T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger* [J]. Bioresource Technology, 1997, **61**(3): 221 ~ 227.

[7] Zouboulis A L, Loukidou M X, Matis K A. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils[J]. Process Biochemistry, 2004, **39**(8): 909 ~ 916.

[8] Hawari Alaa H, Mulligan Catherine N. Heavy metals uptake mechanisms in a fixed-bed column by calcium-treated anaerobic biomass[J]. Process Biochemistry, 2006, **41**(1): 187 ~ 198.

[9] Saiano Filippo, Ciofalo Maurizio, Olga Cacciola Santa, et al. Metal ion adsorption by *Phomopsis* sp. biomaterial in laboratory experiments and real wastewater treatments[J]. Water Research, 2005, **39**(11): 2273 ~ 2280.

[10] Tewari Neetu, Vasudevan P, Guha B K. Study on biosorption of $Cr(VI)$ by *Mucor hialeis* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, **23**(2): 185 ~ 192.

[11] Gupta V K, Rastogi Arshi, Saini V K, et al. Biosorption of copper (II) from aqueous by *Spirogyra* species[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, **296**(1): 59 ~ 63.

[12] Tangaromsuk J, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, et al. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass[J]. Bioresource Technology, 2002, **85**(1): 103 ~ 105.

[13] Verma T, Ramteke T, Garg S K. Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria[J]. Chemosphere, 2002, **48**(4): 427 ~ 435.

[14] Padmavathy V, Vasudevan P, Dhingras C. Biosorption of nickel (II) ions on Baker's yeast process[J]. Biochemistry, 2003, **38**(10): 1389 ~ 1395.

[15] 杨频,高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 72 ~ 80.

[16] 尹华,卢显妍,彭辉,等. 复合诱变原生质体选育重金属去除菌[J]. 环境科学, 2005, **26**(4): 147 ~ 151.