

酵母菌 Y17 吸附 Cu^{2+} 的影响因素及吸附机理研究

肖宁 陈强* 裴浩言 蒋玮

(四川农业大学资源环境学院 雅安 625014)

摘要: 以高效吸附 Cu^{2+} 的酵母菌 Y17 为材料, 对其吸附 Cu^{2+} 过程中的主要影响因素, 包括溶液 pH、 Cu^{2+} 初始浓度、菌体添加量、吸附时间和温度以及吸附机理进行了探讨。结果表明, 对吸附过程影响较大的因素依次为吸附液 pH 值、 Cu^{2+} 初始浓度、菌体添加量和吸附时间。正交试验得到最佳吸附条件为溶液 pH 5.0, 吸附时间 40 min, 加菌量 5.0 g 湿菌/L 时, 对初始浓度为 8 mmol/L 的 Cu^{2+} 达到最佳吸附率为 82.7%。通过对 Y17 菌体不同处理及解吸实验, 初步确定 Y17 吸附 Cu^{2+} 的位点在细胞壁, 细胞壁表面的 $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ 基团在其吸附过程中起着重要作用。

关键词: 酵母菌, 微生物吸附, 铜离子, 正交试验

Influence Factors and Absorbing Mechanics of Copper Ion by Yeast Strain Y17

XIAO Ning CHEN Qiang* PEI Hao-Yan JIANG Wei

(College of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014)

Abstract: Using the high efficient copper-adsorbing yeast strain Y17 as absorbing material, the major affect factors including pH, original concentration of Cu^{2+} , cell biomass, adsorption time and temperature were examined, and then the absorbing sites of the Y17 was determined. The results showed that the solution pH was the most dominate factor which affected the biosorption of Cu^{2+} , the other affecting factors were the initial concentration of Cu^{2+} , the cell biomass added, and adsorption time, respectively; the temperature had little effect on the rate of biosorption. The orthogonal experiment showed that the optimal absorption condition was as follow: the solution pH was 5.0, the absorption time was 40 min, the cell biomass of Y17 added was 5.0 g/L, and the concentration of Cu^{2+} was 8 mmol/L; the highest adsorbing rate was up to 82.7% at this condition. Based on the results of different pretreatments and the desorption of Cu^{2+} , the cell wall of Y17 was identified as the main place occurring boisorption process, and the $-\text{NH}_2$ group, $-\text{COOH}$ group on the surface of the yeast cells played an important role on the boisorption process.

Keywords: Yeast, Biosorption, Cu^{2+} , Orthogonal experiment

铜离子是对生态环境危害较大的重金属污染物^[1], 随着集约化养猪场建设规模的扩大, 饲料中铜离子进入水中, 造成的面源污染越来越普遍, 因

此亟需对养殖废水中的铜离子进行处理, 传统的物理化学处理方法成本高, 容易引起二次污染, 因此有必要寻求一种经济有效的处理方法。近年来, 利

用微生物细胞去除废水中重金属污染的方法, 以其经济有效, 不引入二次污染的优势受到人们广泛关注^[2,3]。尽管目前对于铜离子的微生物吸附研究报道较多, 但大多为影响吸附效率的理化条件等方面^[4-8], 而微生物吸附机理的研究相对较少。

本研究中, 从四川省不同地区的土壤分离获得了 21 株酵母菌, 通过初筛、复筛获得了一株对 Cu^{2+} 具有较高吸附能力的酵母菌 Y17, 在探讨影响酵母菌 Y17 吸附 Cu^{2+} 的各种理化因素的基础上, 探索了其吸附机理, 以期对酵母菌 Y17 在废水处理中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株及培养基

从本实验室分离获得的 21 株酵母菌中, 筛选出对 Cu^{2+} 有高效吸附能力的菌株 Y17 为试验用菌株。培养基配方为: 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL, 调节 pH7.0。置于 28 ℃、150 r/min 振荡培养 30 h。菌体的计量采用离心洗涤后细胞的湿重。

1.2 影响酵母菌 Y17 吸附 Cu^{2+} 的因素

1.2.1 不同因素对 Y17 吸附 Cu^{2+} 的影响: 在探索实验中, 确定酵母菌浓度 5 g/L, 初始 Cu^{2+} 浓度 5 mmol/L, 置于 28 ℃、150 r/min 振荡 60 min。为了考查不同因素对酵母菌吸附 Cu^{2+} 的影响, 在保持以上参数不变的情况下, 分别改变下列参数: (1) 测定 pH 对吸附的影响采用 $\text{HNO}_3\text{-NH}_3\text{-H}_2\text{O}$ 缓冲体系分别调至 2、3、4、5、6、7 和 8; (2) 探索 Cu^{2+} 初始浓度则分别调 2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L 和 12 mmol/L; (3) 吸附时间分别设定 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 和 120 min; (4) 酵母菌浓度分别选取 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L 和 12 g/L; (5) 吸附温度分别设定为 20 ℃、30 ℃ 和 40 ℃。在火焰原子吸收光谱仪上设定波长 324.8 nm, 测定吸附前后上清液中 Cu^{2+} 含量^[9]。

1.2.2 最佳吸附条件正交试验: 根据单因素实验结果, 确定了菌体浓度、吸附时间、 Cu^{2+} 初浓度和 pH 值为正交试验的因素, 设定了 3 个水平, 选择 $L_9(3^4)$ 正交试验表, 以 Cu^{2+} 吸附率为指标进行考查。

表 1 正交试验表头 $L_9(3^4)$
Table 1 Sheet of orthogonal test $L_9(3^4)$

因素 (Factor)	A	B	C	D
水平 (Level)	菌体浓度(g/L) (Biomass concentration)	吸附时间(min) (Absorption time)	Cu^{2+} 初浓度(mmol/L) (Cu^{2+} concentration)	pH 值 (pH value)
1	5	20	4	4
2	7	40	6	5
3	9	60	8	6

1.3 吸附机理初步研究

1.3.1 菌体处理: 采用了 5 种方式对细胞进行了处理。(1) 非活性细胞: 取 5 g 湿菌体于 80 ℃ 杀死细胞, 烘干备用。(2) 甲醛-甲酸处理: 取 5 g 湿菌体, 加入 20 mL 无水甲醛、40 mL 甲酸, 于通风橱中磁力搅拌反应 120 min 后, 用去离子水洗涤 3 次, 高速离心收集菌体。(3) 碱处理: 5 g 湿菌体, 在 100 mL、1.0 mol/L 的 NaOH 中作用 30 min 后, 去离子水洗涤 3 次至 pH 中性, 高速离心后收集菌体。(4) 酯化处理: 取 5 g 湿菌体, 于 20 mL 无水甲醇, 1 mL 浓盐酸中作用 120 min, 去离子水洗涤 3 次至 pH7, 高速离心收集菌体。(5) 破壁处理: 将收集的湿菌体中加

入 5 mol/L EDTA 反应, 致破壁^[10]。

1.3.2 菌体对 Cu^{2+} 的吸附与解吸^[11]: 收集吸附后的菌体细胞, 用蒸馏水清洗 3 次, 各取 5 g 湿菌体, 分别置于 40 mL、浓度均为 0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 , EDTA, HNO_3 溶液中, 振荡 60 min, 10000 r/min 离心分离 5 min, 移取一定量上清液, 测试解吸后 Cu^{2+} 浓度, 计算解吸率。

1.4 数据处理

实验过程中, 菌体对 Cu^{2+} 的吸附率(Q)和解吸率(K)计算公式分别为^[11,12]: $Q=(C_0-C)/C_0(\%)$ 。其中, C_0 为初始浓度(mg/L), C 为终浓度(mg/L); $K=$ 解吸剂中的 Cu^{2+} 质量/吸附剂中的 Cu^{2+} 总质量(%)。

2 结果与分析

2.1 不同吸附条件对 Cu^{2+} 吸附率的影响

2.1.1 吸附时间对 Cu^{2+} 吸附率的影响: 微生物吸附重金属是一个复杂的过程, 受很多条件的影响和限制。由图 1 可见, 吸附发生 40 min 时, Y17 对 Cu^{2+} 的吸附基本达到平衡。表明酵母菌 Y17 对 Cu^{2+} 的吸附作用在短时间完成, 由此推测 Y17 的细胞表面应该起主要吸附作用, 这种吸附作用的特点是快速、可逆、不依赖细胞的能量代谢^[13]。

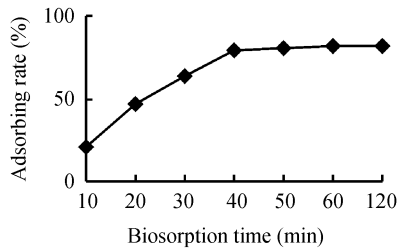


图 1 吸附时间对吸附的影响

Fig. 1 Effect of time on biosorption

2.1.2 初始 Cu^{2+} 浓度对吸附率的影响: 在图 2 中, 随着初始 Cu^{2+} 浓度的增加, 其吸附率逐渐下降, 在浓度为 5 mmol/L~6 mmol/L 时吸附率能保持较高水平, 说明 Y17 对低浓度 Cu^{2+} 有较好的吸附作用。这可能是由于酵母菌表面吸附金属的位点是一定的, 当溶液中 Cu^{2+} 较低时, 吸附率较高; 当溶液中 Cu^{2+} 浓度较高时, Y17 细胞表面的金属吸附位点逐渐达到饱和, 因而对 Cu^{2+} 的吸附率逐渐降低。

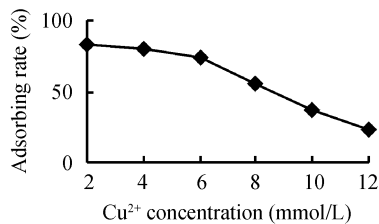


图 2 Cu^{2+} 初始浓度对吸附的影响

Fig. 2 Effect of Cu^{2+} concentration on biosorption

2.1.3 温度对 Cu^{2+} 吸附率的影响: 图 3 结果显示了不同温度对吸附率的影响, 随着温度逐渐升高, Y17 对 Cu^{2+} 吸附率略有增加, 说明温度对 Y17 吸附 Cu^{2+} 影响不大, 有利于实际应用中在常温下进行废水处理。

2.1.4 菌体添加量对 Cu^{2+} 吸附率的影响: 如图 4 所

示, 当溶液中 Cu^{2+} 保持一定时, 随着 Y17 浓度的增加, Cu^{2+} 吸附率逐渐增加, 当菌体添加量为 6.5 g/L~7.5 g/L 时, 吸附率达到最大值。

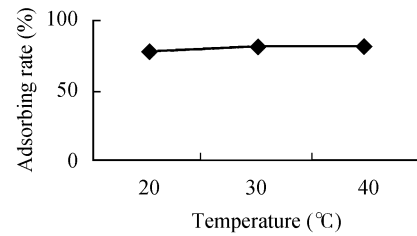


图 3 温度对吸附的影响

Fig. 3 Effect of temperature on biosorption

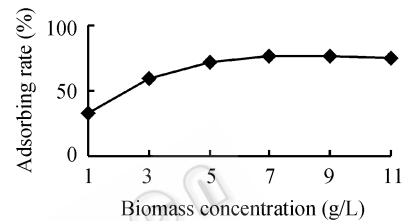


图 4 菌体浓度对吸附的影响

Fig. 4 Effect of biomass concentration on biosorption

2.1.5 pH 对 Cu^{2+} 吸附率的影响: 图 5 反映了 pH 值对 Cu^{2+} 吸附的影响, 结果表明, 在 pH 值为 2~5 时, Y17 对 Cu^{2+} 的吸附率逐渐增大, 在 pH5 时最高; 当 pH > 8 后, Cu^{2+} 吸附率回升, 是由于 Cu^{2+} 在碱性环境形成了 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀的缘故。

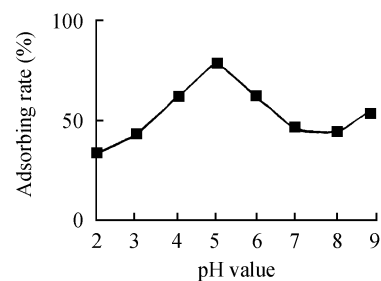


图 5 pH 值对吸附的影响

Fig. 5 Effect of pH on biosorption

2.2 最佳吸附条件正交试验结果

根据单因素实验, 确定以吸附时间、 Cu^{2+} 初始浓度、菌剂浓度和 pH 值 4 因素进行正交试验, 以 Cu^{2+} 吸附率作为考查指标, 试验设计及结果如表 2 所示。

正交试验中, 根据极差 R 大小, 对 Y17 吸附 Cu^{2+} 影响最大的理化因素是 pH 值, 其次为 Cu^{2+} 初始浓度、吸附时间和菌体浓度。根据 K 值大小, 可以

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test $L_9(3^4)$

试验号 (No.)	试验因素(Experimental factor)				Cu^{2+} 吸附率(%) (Biosorption rate)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	63.1
2	1	2	2	2	81.1
3	1	3	3	3	70.3
4	2	1	2	3	57.9
5	2	2	3	1	72.4
6	2	3	1	2	66.3
7	3	1	3	2	79.1
8	3	2	1	3	60.8
9	3	3	2	1	68.4
K1	214.5	200.1	190.2	203.9	
K2	196.6	214.3	207.4	226.5	最佳组合
K3	208.3	205.0	221.8	189.0	A1B2C3D2
极差 R	6.0	4.7	10.5	12.5	

确定出正交试验的最佳组合为 A1B2C3D2, 即最佳吸附条件为 pH 值 5, Cu^{2+} 初始浓度 8 mmol/L, 吸附时间为 40 min, 菌体浓度为 5 g/L, 在此最佳吸附条件下进行证实实验, 得到吸附率为 82.7%。

2.3 酵母 Y17 吸附机理探讨

2.3.1 不同处理对酵母吸附性能的影响对比: 通过生物化学处理影响或破坏微生物细胞的细胞壁以及其上的一些基团, 通过对比吸附 Cu^{2+} 前后吸附率的变化情况, 可以初步确定该微生物的吸附主导作用与基团^[14]。图 6 结果表明, 不经过处理的 Y17 活菌体吸附率略微大于未经表面处理的死菌, 但两者差别不大, 这可能是由于活菌分泌的酶在细胞壁外起到一定作用, 但并不是生物吸附发生的主要原因; 经过 EDTA 破壁处理后, 菌体的吸附率大大降低, 说明细胞壁在吸附过程中起到很重要的作用。通过甲醛-甲酸处理和酯化处理破坏 Y17 细胞壁上的 $-\text{NH}_2$ 基团和 $-\text{COOH}$ 基团后, 菌体的吸附率明显降低, 由此可见 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{COOH}$ 在吸附过程中是重要的功能基团^[15,16]。经过 NaOH 处理, Y17 吸附率明显增加, 这可能是由于 NaOH 中和细胞壁上 H^+ , 让 Y17 暴露更多吸附位点, 增加了带负电的官能团^[17], 更有利于 Y17 结合 Cu^{2+} , 促进吸附过程的发生。

2.3.2 解吸实验: 在对水溶液中重金属的修复中, 吸附重金属后材料的后处理工作也是一个关键问题^[18]。由于表面吸附是可逆的, 所以从理论上讲, 通过降低溶液 pH 或有机配位试剂可以解吸附剂上的金属离子(胥逢宇. 啤酒酵母对重金属的吸附特性及应用研究. 西南农业大学硕士学位论文, 2004)。添加适量的化学药剂是将吸附在微生物上的重金属

解吸下来的常用方法之一。

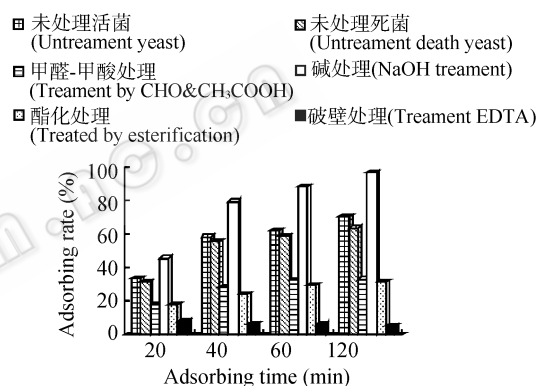


图 6 不同处理对 Y17 吸附 Cu^{2+} 的影响

Fig. 6 Effect of different pretreatments on adsorption

由图 7 结果可知, 3 种解吸附剂中, EDTA 的解吸效果最好, 经过 3 次洗涤后的解吸率达到 98.1%, 而硝酸处理为其次, 解吸率为 78.6%, 碳酸钠处理效果最差, 解吸率为 62.5%。这是由于 EDTA 是有机配体, 与 Cu^{2+} 发生络合作用, 将吸附在细胞壁上的 Cu^{2+} 置换下来, 因而解吸效果较好。而硝酸和碳酸钠溶液中, 是通过 H^+ 和 Na^+ 与被吸附在细胞上的 Cu^{2+} 竞争吸附位点实现解吸, 其效果较差。根据解吸实

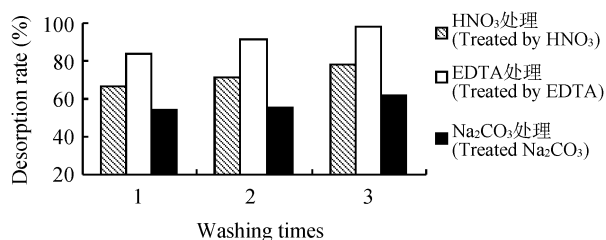


图 7 Y17 的解吸结果

Fig. 7 Desorption results of Y17

验结果,初步可以判定确定 Y17 对 Cu^{2+} 的吸附是一个以细胞表面吸附为主的过程。

3 讨论

微生物吸附的机理往往因菌种、金属离子的不同而异。本实验中,酵母菌 Y17 对 Cu^{2+} 有明显吸附能力,通过单因素以及正交试验得到其最佳吸附条件 pH 为 5.0, 吸附时间 40 min, 加菌量 5.0 g/L, Cu^{2+} 初始浓度 8.0 mmol/L, 此时吸附率达到 82.7%。菌株 Y17 对 Cu^{2+} 的吸附过程在 40 min 时基本达到吸附平衡,再利用化学解吸剂进行解吸,解吸率能达到 98.1%,由此推测 Y17 对 Cu^{2+} 的生物吸附可能是一个由细胞壁起主要作用的表面快速吸附过程。同时通过解吸实验,可以回收被污染水体环境中的 Cu^{2+} , 减少其对环境的危害提供了一条科学有效的途径,作为吸附剂的酵母菌 Y17 可以被循环使用,降低了实际生产成本。在经过酯化、修饰-NH₂ 处理后的 Y17, 吸附率明显降低,说明细胞壁表面的-NH₂ 和 -COOH 基团在吸附过程中有重要作用。经过 NaOH 处理后的 Y17, 吸附率明显增加。

本实验中,EDTA 破壁处理后,菌体 Y17 的吸附率大大降低,在 Heng 等的实验中^[10],采用该方法提取酵母菌的 DNA,因此本实验没有进一步对细胞进行显微观察,在研究 EDTA 处理酵母菌 Y17 菌体后细胞壁的变化情况时尚需采用显微进一步观察。

参 考 文 献

[1] 廖自基. 环境中微量重金属元素的污染危害与迁移转化. 北京: 科学出版社, 1989, pp.163-189.
 [2] Vasudevan P, Padmavathy V, Dhingra SC, *et al.* Biosorption of monovalent and divalent ions on bakers yeast. *Bioresource Tech*, 2002, **82**: 285-289.
 [3] Valdman E, Leite SGF. Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. waste biomass. *Bioprocess Engineering*,

1999, **22**: 171-173.
 [4] 赵晓红, 张敏, 李福德, 等. SRV 菌去除电镀废水中铜的研究. *中国环境科学*, 1996, **16**(4): 288-292.
 [5] 吴乾菁, 李昕, 李福德, 等. SR_4 菌株处理电镀废水中 Ni^{2+} 的研究. *上海环境科学*, 1995, **14**(12): 10-12.
 [6] 吴乾菁, 李昕, 李福德, 等. 固定化酵母菌细胞去除 Cd^{2+} 的研究. *重庆环境科学*, 1996, **18**(3): 16-19.
 [7] 曹德菊, 程培. 3 种微生物对 Cu、Cd 生物吸附效应的研究. *农业环境科学学报*, 2004, **23**(3): 471-474.
 [8] 石杰, 张敬华, 朱路, 等. 火焰原子吸收法研究酵母菌对 Cu^{2+} 的吸附作用. *工程学院学报*, 2004, **25**(3): 49-54.
 [9] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法. 第三版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989, p. 488.
 [10] 黄民生, 郑乐平, 朱莉. 微生物对重金属的吸附与解吸. *化工装备技术*, 2000, **2**(21): 17-22.
 [11] Heng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**: 55-59.
 [12] 苏秀娟, 朱一民, 沈岩柏, 等. 悬浮酵母菌对重金属的吸附机理. *安全与环境学报*, 2006, **6**(6): 67-70.
 [13] 甘尉棠. 精细石油化工. 现代化工分离技术讲座, 2005, **2**(3): 59-62.
 [14] 韩润平, 李建军, 杨贯羽, 等. 郑州大学学报(自然科学版), 2002, **32**(2): 72-75.
 [15] 赵修华, 王文杰, 胡茂盛, 等. 产朊假丝酵母生物吸附 Cu^{2+} 影响因素及吸附机理的研究. *环境科学学报*, 2006, **26**(5): 808-814.
 [16] 刘月英, 傅锦坤, 陈平, 等. 巨大芽孢杆菌 D01 吸附金的研究. *微生物学报*, 2000, **40**(4): 425-429.
 [17] 李峰, 张西平, 黄昆, 等. 产朊假丝酵母细胞和细胞壁对铜离子吸附条件研究. *常德高等专科学校学报*, 1999, **11**(2): 62-64.
 [18] 宋安东, 吴坤, 陈红歌, 等. 酿酒酵母 220 菌株对铅的生物吸附研究. *微生物学通报*, 2004, **32**(3): 6-10.