

赖 颖,赵锦慧,杨同文,等. 发酵性结合酵母菌对重金属吸附能力的研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):398-400.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.141

发酵性结合酵母菌对重金属吸附能力的研究

赖 颖,赵锦慧,杨同文,潘明君

(周口师范学院生命科学与农学院,河南周口 466001)

摘要:以海藻酸钠和聚乙烯醇作为包埋剂对发酵性结合酵母菌进行固定化,采用单一变量法研究溶液的 pH 值、金属离子初始浓度、菌体浓度、吸附时间、吸附温度 5 种因素对固定化酵母菌吸附 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 离子的影响。结果表明,发酵性结合酵母菌对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 吸附的最佳条件是:pH 值 4.0,金属离子初始浓度 $0.25 \mu\text{g/mL}$,酵母菌浓度 2.0 g/L ,吸附时间 15 min,吸附温度 30°C 。发酵性结合酵母菌对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 有较好的吸附能力,是良好的生物吸附剂。

关键词:发酵性结合酵母菌;吸附;重金属; Pb^{2+} ; Zn^{2+}

中图分类号: X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0398-03

重金属是造成水体污染的一类有毒物质^[1]。由于含重金属的工业废水的排放量不断增加,这些废水被排入水体和土壤中,会对环境和人类的健康造成极大的威胁,因此,必须处理后再进行排放^[2]。生物吸附法有利于解决这一难题,利用微生物吸附废水中的重金属在投资、运行、操作管理和重金属回收、水回用等方面优越于传统的治理方法^[3]。目前,能够作为生物吸附剂的微生物有细菌,真菌,藻类^[4],由于酵母菌广泛应用于食品饮料工业,廉价易得且安全,有利于生物吸附的工业化应用^[5],所以酵母菌是生物吸附剂的首选。但有关发酵性结合酵母菌对重金属吸收能力的研究未见报道。本试验以从宋河酒曲中筛选出来的发酵性结合酵母菌为试验菌种,研究固定化发酵性结合酵母菌对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子吸附的最佳条件,为利用该吸附工业废水中重金属菌种的开发和应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 发酵性结合酵母菌菌种 A27,周口师范学院发酵工程实验室提供。

1.1.2 主要仪器 恒温振荡器 HZQ-X300,上海一恒科学仪器有限公司产品;型电热鼓风干燥箱 101-1,北京科伟永兴仪器有限公司产品;电子天平 AL204,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司产品;pH 值计 EL20,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司产品;系列生化培养箱 THZ-98AB,昆山一恒仪器有限公司产品;超净工作台 JJ2010-04-108,苏州市金净净化设备科技有限公司;紫外可见分光光度计 UV-5100,上海元析仪器有限公司。

1.1.3 主要试剂 硝酸铅、氯化锌、氯化钙、硼酸、海藻酸钠、聚乙烯醇(PVA)、双硫脲、四氯化碳、硫代硫酸钠、甲基红、氨水、乙酸、四氯化碳、酚红、三氯甲烷均为分析纯。

1.1.4 溶液的配制 锌标准溶液:称取 0.2092 g 氯化锌移入 100 mL 的容量瓶,加水稀释至刻度,每 1 mL 相当于 1 mg Zn^{2+} 。

锌标准使用液^[6]:取 1.0 mL 的锌标准溶液于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,每 1 mL 溶液相当于 $10 \mu\text{g Zn}^{2+}$ 。

铅标准溶液:称取 0.1598 g 硝酸铅移入 100 mL 的容量瓶,加水稀释至刻度,每 1 mL 相当于 1 mg Pb^{2+} 。

铅标准使用液:取 1.0 mL 的铅标准溶液于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,每 1 mL 溶液相当于 $10 \mu\text{g Pb}^{2+}$ 。

25% 硫代硫酸钠:称取 25 g 硫代硫酸钠,溶解于 100 mL 蒸馏水中。

0.1% 甲基红:称取 0.1 g 甲基红,用 60 mL 95% 乙醇溶解,加蒸馏水定容至 100 mL 。

乙酸溶液:取 10 mL 冰乙酸溶于 70 mL 蒸馏水中。

0.1% 双硫脲四氯化碳溶液:称取 0.10 g 双硫脲,用四氯化碳溶解至 100 mL ,倒入棕色瓶,置于冰箱中保存。临用前,吸取适量双硫脲四氯化碳溶液,加四氯化碳稀释 30 倍,即可使用。

双硫脲三氯甲烷溶液:称取 100 mg 双硫脲,溶于 1000 mL 三氯甲烷中,此溶液每 1 mL 含 $100 \mu\text{g}$ 双硫脲,保存于冰箱备用。临用前取适量上述双硫脲三氯甲烷溶液,置 50 mL 容量瓶中,用三氯甲烷稀释定容。

0.1% 酚红指示剂:取酚红 0.1 g ,加入氢氧化钠溶液 2.82 mL 使其溶解,再加入蒸馏水至 100 mL 。

乙酸-乙酸钠缓冲溶液:称取 68 g 乙酸钠,用蒸馏水溶解至 250 mL 。冰乙酸取 31 mL ,加蒸馏水至 250 mL ,以上二者混合。

1.1.5 培养基 马铃薯培养基^[7]:将马铃薯洗净去皮,切块,称取 600 g 于干净的大烧杯中,加入 1000 mL 蒸馏水煮 30 min ,经 $8 \sim 12$ 层纱布过滤,取马铃薯过滤液,加入 60 g 葡萄糖,溶解后用蒸馏水稀释至 1200 mL ,分装于 250 mL 三角瓶中,在 121°C 条件下灭菌 20 min ,保存备用。

1.2 方法

1.2.1 酵母菌干粉的制备 在无菌操作台中,挑取 3 环平板培养基中的发酵性结合酵母菌 A10,接种到灭菌的马铃薯培

收稿日期:2014-01-10

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:14B416008)

作者简介:赖 颖(1981—),女,蒙古族,硕士,讲师,微生物发酵与食品科学方向的研究。E-mail:lydia2050@126.com。

培养基中,在振荡培养箱中温度为 28 ℃、转速为 150 r/min 条件下振荡培养 24 h。将该培养液作为种子液,放入冰箱保存,备用。在无菌操作台中,移取种子液 15 mL,加入到已灭菌的马铃薯培养基中,在温度为 28 ℃、转速为 150 r/min 的条件下,在振荡培养箱中振荡培养 20 h。将培养液在离心机中以转速为 4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,在鼓风干燥箱中以 50 ℃ 下烘干,用研钵研磨成粉末状,干燥保存。

1.2.2 酵母菌的固定化方法 海藻酸钠-聚乙烯醇包埋法:称取 1 g 海藻酸钠和 2 g 聚乙烯醇于干净无菌的小烧杯中,加入少许的蒸馏水,调成糊状,再加水至 20 mL,将小烧杯在电炉上加热溶解,然后冷却至室温,再加入一定量的酵母菌干粉混合均匀,用 20 mL 医用注射器吸取混合物,以恒定的速度滴到 4% 的氯化钙饱和硼酸溶液中,浸泡约 4 h 后,将固定化的酵母菌小球移入三角瓶中,用无菌去离子水洗涤 4 次后,加入已配制好的溶液中^[8]。

1.2.3 金属离子浓度的测定 铅测定方法^[9]:取待测溶液 1 mL 于 60 mL 的分液漏斗中,各加蒸馏水稀释至 10 mL。各加 2 滴酚红指示剂,用 1:1 氨水调至红色,加 10 mL 双硫脲三氯甲烷溶液,振荡,静置分层后将三氯甲烷层经脱脂棉滤入 1 cm 比色杯中,以三氯甲烷调节零点,于波长 510 nm 处测得吸光度。锌测定方法^[10]:取 1 mL 待测溶液置于 60 mL 分液漏斗中,各加蒸馏水稀释至 10 mL,滴加甲基红,摇匀,用 1:1 氨水调至刚显黄色,再滴加乙酸至红色,再向分液漏斗中加 5 mL 四氯化碳,振摇萃取甲基红,弃去下层的有机相。向各分液漏斗中加入 5 mL 乙酸钠缓冲溶液及 1 mL 硫代硫酸钠溶液,混匀后再加 10 mL 双硫脲四氯化碳溶液,振摇 4 min,静置分层后,将四氯化碳层通过少许洁净脱脂棉过滤入比色皿中,在 535 nm 的最大吸光波长处测量溶液的吸光度。

1.2.4 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的吸附 将固定化小球分别加入需要进行吸附的 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 溶液中,用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节溶液的 pH 值^[11],于室温下吸附一定的时间,然后取上清液,用双硫脲可见分光光度法测定上清液中的 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 的浓度,计算吸附率:吸附率 = 吸附量/总量 $\times 100\%$ = (总量 - 吸附后的量)/总量 $\times 100\%$ 。

1.2.5 pH 值对吸附率的影响 分别取 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子溶液 100 mL,浓度均为 0.30 $\mu\text{g/mL}$ (分别取 3.0 mL 锌标准使用液和铅标准使用液于容量瓶中,加蒸馏水定容到 100 mL),用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5,再分别加入菌体浓度为 1.0 g/L 的固定化酵母菌小球,室温下吸附 20 min,取上清液,用可见分光光度计测吸光度,计算吸附率^[12]。

1.2.6 金属离子初始浓度对吸附率的影响 将固定化酵母菌置于不同浓度的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子溶液中。其中, Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子浓度各自分别为 0.1、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 $\mu\text{g/mL}$ 。调节 pH 值为 4.0,各加入菌体浓度为 1.0 g/L 固定化酵母菌小球,室温下吸附 20 min,取上清液,用可见分光光度计测吸光度,计算吸附率。

1.2.7 菌体浓度对吸附率的影响 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子初始浓度均为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 溶液(分别取 2.5 mL 锌标准使用液和铅标准使用液于容量瓶中,加蒸馏水定容到 100 mL),pH 值为 4.0,菌体浓度分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L,室温

下,吸附 20 min,吸附后取上清液,用可见分光光度法测吸光度,计算吸附率。

1.2.8 吸附时间对吸附率的影响 取 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子初始浓度均为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 溶液(分别取 2.5 mL 锌标准使用液和铅标准使用液于容量瓶中,加蒸馏水定容到 100 mL),pH 值为 4.0,加入菌体浓度 2.0 g/L 固定化酵母菌小球,在室温下,分别吸附 5、10、15、20、30、40 min,取上清液用可见分光光度计测吸光度,计算吸附率。

1.2.9 温度对吸附率的影响 取 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子初始浓度均为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 溶液(分别取 2.5 mL 锌标准使用液和铅标准使用液于容量瓶中,加蒸馏水定容到 100 mL),pH 值为 4.0,加入菌体浓度 2.0 g/L 固定化酵母菌小球,分别在 20、25、30、35、40、45 ℃ 下吸附 15 min,吸附后取上清液,用可见分光光度法测吸光度,计算吸附率。

2 结果与分析

2.1 pH 值对发酵性结合酵母菌吸附重金属能力的影响

由图 1 可知,在 pH 值 3.0~5.5,固定化酵母菌对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的吸附率都超过了 80%。随着溶液 pH 值增大,吸附率呈先升高后降低的趋势。固定化酵母菌对 Pb^{2+} 的吸附:当 pH 值 <4.0 时,固定化酵母菌对 Pb^{2+} 的吸附率随 pH 值升高而升高,当 pH 值为 4.0 时,达到最大吸附率(86.5%),当 pH 值大于 4.0 时,固定化酵母菌的吸附率随 pH 值的升高而降低;固定化酵母菌对 Zn^{2+} 的吸附:当 pH 值从 3.0 升至 5.5 时,固定化酵母菌对 Zn^{2+} 的吸附率随 pH 值增大而先增大后减小,在 pH 值为 4.0 时,吸附率达到最大(85.7%)。其原因有可能是 pH 值低时,细胞表面基团被 H_3O^+ 占据,阻碍了金属离子对细胞的靠近和活性基团的解离,致使吸附率低;在高 pH 值条件下, H^+ 浓度降低,使细胞表面暴露更多的吸附位点,但重金属离子会以不溶解的氧化物、氢氧化物微粒的形式存在,从而使吸附过程无法进行。由此可见,酵母菌对重金属离子吸附的最佳 pH 值为 4.0。

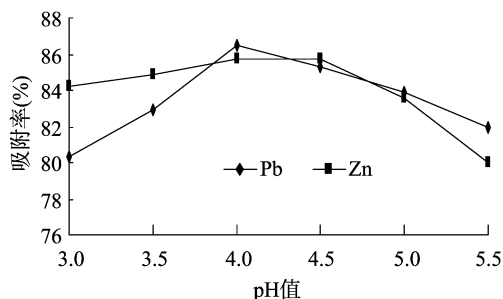


图1 pH 值对发酵性结合酵母菌吸附能力的影响

2.2 重金属离子初始浓度对发酵性结合酵母菌吸附性能的影响

由图 2 看出,当菌体浓度一定时,固定化酵母菌对重金属离子的吸附率总体上是随着初始浓度的升高呈先升高后降低的趋势,其原因有可能是当重金属离子达到一定浓度时,菌体上的金属离子结合位点已被饱和,固定化酵母菌对金属离子的吸附量就不再增加,同时当重金属离子达到一定浓度时,重金属对酵母菌有毒害作用。

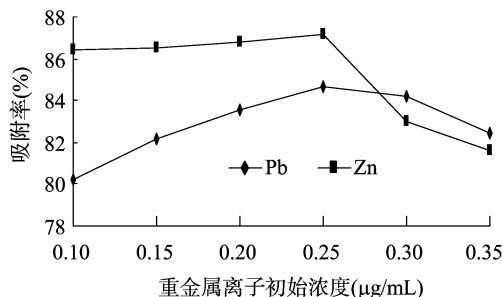


图2 重金属离子初始浓度对发酵性结合酵母菌吸附能力的影响

Pb^{2+} 的初始浓度在 0.10 ~ 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时吸附率随着浓度的升高而升高,当初始浓度大于 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,吸附率缓慢降低;但 Zn^{2+} 初始浓度由 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 增加到 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,酵母菌对 Zn^{2+} 的吸附率变化不大,当初始浓度大于 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,吸附率降低幅度较大。

2.3 菌体浓度对发酵性结合酵母菌吸附性能的影响

在重金属离子初始浓度一定的条件下,随着菌体浓度的增加,酵母菌对重金属离子 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的吸附率先增大然后减小,当菌体浓度为 2.0 g/L 时吸附率最大(图 3)。其原因可能是在一定范围内增加生物量,可以使吸附位点增加,从而使吸附率增加;当生物量超过一定值时,导致了吸附位点间的相互作用,从而减少了一部分有效的吸附位点。

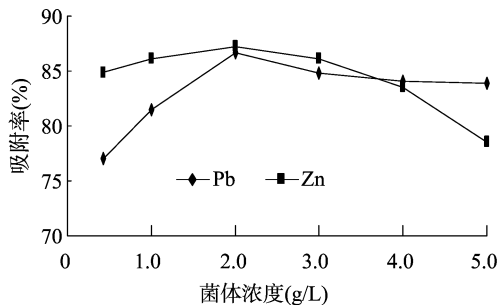


图3 菌体浓度对发酵性结合酵母菌吸附性能的影响

2.4 时间对发酵性结合酵母菌吸附性能的影响

结果(图 4)表明,随着吸附时间的增加,酵母菌菌体对 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 离子的吸附率逐渐增加,当吸附时间大于 15 min 时,菌体对重金属离子的吸附率趋于稳定。这可能因为随着时间的增加,菌体上的重金属离子吸附位点逐渐饱和。

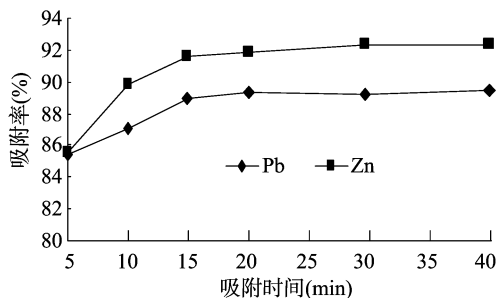


图4 吸附时间对发酵性结合酵母菌吸附能力的影响

2.5 温度对发酵性结合酵母菌吸附性能的影响

结果(图 5)表明,随着温度的升高,固定化酵母菌对 Pb^{2+} 的吸附率并无明显规律,但当温度在 30 $^{\circ}\text{C}$ 左右时,固定

化酵母菌对 Pb^{2+} 的吸附效果比较好,而固定化酵母菌对 Zn^{2+} 的吸附率在 20 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 时随着温度的升高而上升。这是由于生物吸附 Zn^{2+} 的过程是个放热的过程。

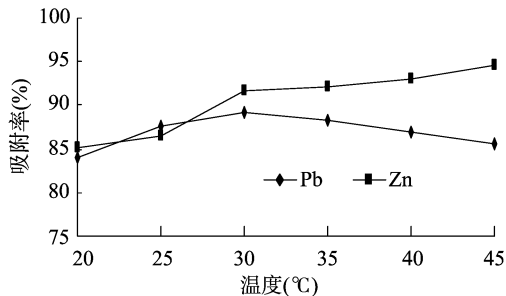


图5 温度对发酵性结合酵母菌吸附能力的影响

3 结论

以海藻酸钠和聚乙烯醇作为包埋剂固定化的发酵性结合酵母菌 A27 对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 重金属离子具有较强的吸附能力。在相同的条件下,固定化发酵性结合酵母菌 A27 对 Zn^{2+} 的吸附率比对 Pb^{2+} 的吸附率大。发酵性结合酵母菌对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 重金属离子的吸附率受溶液 pH 值、菌体浓度和重金属离子的初始浓度这 3 个因素影响较大。本试验结果表明,发酵性结合酵母菌对重金属的最佳吸附条件是:pH 值 4.0, Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 离子的初始浓度均为 0.25 $\mu\text{g/mL}$,酵母菌浓度 2.0 g/L,吸附时间 15 min,吸附温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

参考文献:

- [1] 赵瑞雪,薛丹,高达,等. 固定化酵母菌吸附混合重金属离子的研究[J]. 长春理工大学学报:自然科学版,2010,33(4):161-163.
- [2] 王立娜,赵瑞雪,郑笑秋,等. 固定化啤酒酵母菌吸附 Pb^{2+} 的研究[J]. 长春理工大学学报:自然科学版,2009,32(1):160-164.
- [3] 武运,张子莹,周建中,等. 固定化啤酒酵母菌吸附 Ni^{2+} 的研究[J]. 新疆农业大学学报,2009,32(5):67-71.
- [4] 杨静静,栾兴社. 用酵母菌吸附处理废水中重金属离子研究现状[J]. 化工科技,2011,19(4):58-61.
- [5] 代群威,董发勤,张伟,等. 酵母菌对不同液相体系中锌离子的吸附行为[J]. 环境工程学报,2010,4(2):453-457.
- [6] 武运,杨海燕,任娟,等. 固定化啤酒酵母菌吸附 Pb^{2+} 研究[J]. 新疆农业大学学报,2008,31(3):78-81.
- [7] 吴会军. 啤酒酵母菌对重金属污水吸附性能研究[J]. 长春理工大学学报:自然科学版,2012,35(1):149-152.
- [8] 梁峙,赵孝华. 海藻酸钠固定化酵母菌的应用研究[J]. 食品工业科技,2002,23(12):34-35.
- [9] 肖娜,黄兵,敖勇,等. 生物吸附法处理重金属废水的研究进展[J]. 玉溪师范学院学报,2006,22(3):34-38.
- [10] 陈佩林,詹文毅,叶辉. 含锌酵母的培养试验研究[J]. 动物医学进展,2003,24(3):62-64.
- [11] 浦剑,李莹,孙红文,等. 固定化啤酒酵母菌制剂去除水中重金属离子[J]. 城市环境与城市生态,2007,20(2):39-42.
- [12] 王会霞,尹华,彭辉. 解脂假丝酵母对铜的吸附[J]. 生态科学,2004,23(4):305-309.