

环境条件对极大螺旋藻金属元素吸收的影响

李建宏* 曾昭琪

薛宇鸣 邵子厚

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

(南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

提要 研究了不同微量元素浓度和不同 EDTA 加入量对极大螺旋藻金属元素吸收的影响。结果显示, 增加培养基中的微量元素含量有利于藻细胞对金属元素的吸收。少量 EDTA 的加入, 有助于部分金属元素的吸收, 较大量的 EDTA 可阻碍金属元素的吸收。藻细胞的吸附实验表明, 极大螺旋藻对 Co、Ni、Cu、Zn、Pb 有很强的吸附能力, 死细胞与活细胞的吸附能力相近, 表明这一吸附过程不依赖于生理活动。

关键词 螺旋藻 金属元素 环境条件 吸收作用 吸附作用

浮游藻类在生长过程中, 有一个重要的特点是能吸收和富积环境中的重金属元素。在水体中, 由于藻类是水生动物食物链的基础, 藻类对环境中的金属吸收将影响金属元素在水生动物体中的流动^[1]; 藻类对重金属富积的特性, 可用于处理含有重金属元素的废水^[2]; 利用藻类的生物浓缩作用, 来提高对水体中微量重金属检测的灵敏度, 也是环境水化学分析的一种有效手段^[3]。因此, 研究藻类对环境中的金属元素的吸收有重要的意义。

螺旋藻是一种丝状蓝藻, 可用作保健食品、珍贵水产品的饵料以及提取多糖、藻胆蛋白等多种生物活性物质。利用螺旋藻处理污水既可减少环境污染, 又可获得有用的藻体^[4]。已有研究表明, 螺旋藻对 Cu、Mn 均有极强的富积能力^①。但关于环境条件与金属离子的吸收关系研究较少。本文主要研究了不同微量元素混合液加入量和不同 EDTA 加入量对藻体中金属含量的影响, 并讨论了藻体对几种重金属的物理吸附作用。

1 材料及方法

1.1 藻种

极大螺旋藻(*Spirulina maxima*)由南京大学生物科学与技术系藻类培养室提供。

1.2 培养条件

所用培养基为 Zarrouk 培养基^[5], 其中 NaHCO₃ 减半, 即 8.4g/L。培养液中的 A₅ 和 B₆ 微量元素混合液的组成见表 1, 每升培养基中加入 A₅ 和 B₆ 各 1mL。培养温度为 30±1℃, 用电磁加热搅拌器联接触点式温度计控温。光照强度为 3000 lx, 通气搅拌。5L 玻璃烧瓶中加入 3L 培养液培养藻。

* 现在工作单位: 南京师范大学生物系, 邮政编码 210024。

收稿日期: 1995-03-29; 接受日期: 1995-06-30。

作者简介: 李建宏, 男, 1963 年生。1995 年南京大学生物系植物学专业毕业, 获博士学位。主要从事藻类生理生化及藻类培养的研究。发表论文有“极大螺旋藻藻蓝蛋白的性质研究”等。

① 李鹏富、刘志礼。藻类参与铜矿和锰矿形成过程的模拟研究。南京大学生物系硕士论文, 1994。

表 1 Zarrouk 培养基所用的 A₅、B₆ 微量元素混合液
Tab. 1 A₅ and B₆ trace element solutions for Zarrouk medium

| A ₅ 混合液组成 | | B ₆ 混合液组成 | |
|---------------------------------------|-----------|---|------------|
| H ₃ BO ₃ | 2.86 g/L | NH ₄ VO ₃ | 22.96 mg/L |
| MnCl ₂ | 1.18 g/L | NiSO ₄ · 7H ₂ O | 47.85 mg/L |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.22 g/L | NaWO ₄ · 2H ₂ O | 17.94 mg/L |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.079 g/L | Ti(SO ₄) ₃ | 40.00 mg/L |
| MoO ₃ | 0.015 g/L | Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O | 43.98 mg/L |
| | | K ₂ Cr(SO ₄) ₄ · 24H ₂ O | 96.00 mg/L |

1.3 培养方法

1.3.1 不同微量元素浓度对藻细胞中金属元素含量影响的测定 向培养基中加入不同量的 A₅、B₆ 微量元素混合液,加入量分别为 3mL/L 和 5mL/L,以 Zarrouk 培养基作对照(A₅、B₆ 微量元素混合液的加入量为 1mL/L)。培养 15d 后,过滤收获藻细胞,用酸水(pH≈3.0)和重蒸馏水充分洗涤,冷冻干燥后测金属元素含量。元素测定用电感耦合等离子直读光谱法(ICP),样品预处理用湿消化法(下同)。

1.3.2 不同 EDTA 量对藻细胞中金属元素含量影响的测定 改变培养基中的 EDTA 的量,使 EDTA 的量分别为 0.08mg/L 和 0.24mg/L,以不加 EDTA 为对照,培养液中均加入 10mg/L 的 Pb 离子,培养 25d 后收获藻细胞,测定细胞中的金属元素含量。

1.3.3 藻细胞对重金属元素的吸附作用的测定 用 CoCl₂、NiSO₄、CuSO₄、ZnSO₄、Pb(Ac)₂ 配制成金属离子混合液(pH=4.5),各金属离子浓度为 5mg/L 左右。取对数生长期的藻液两份,其中一份加入 4% 甲醛杀死藻细胞,两份藻液同时过滤出藻细胞,用重蒸馏水洗涤 5 次,沥干水分。称取鲜藻 3g 置于 50mL 金属离子混合液中,25℃ 下搅拌 30min,用定量滤纸滤去藻细胞,过滤前滤纸用 1% HCl 和重蒸馏水洗涤。收集滤液,分别测定金属离子浓度的变化。以未经藻细胞吸附处理的金属离子混合液通过滤纸作对照。

2 结果及讨论

2.1 不同微量元素浓度对藻细胞中金属元素含量的影响

本实验中,采用加入微量元素混合液的方法增加培养基中的微量元素量,其目的是为了 防止单一增加某种金属离子可能引起的单盐毒害。实验中,虽然培养基中增加了 A₅ 和 B₆ 的 加入量,但未见对藻细胞生长产生明显的影响。

表 2 所列为在培养基中加入不同量的微量元素混合液所培养的极大螺旋藻中金属元素 的含量(以藻干重计)。从结果可见,当培养基中 A₅ 和 B₆ 加入量增加到 3 倍时,藻细胞中各 种元素均有不同程度地增加,其中 Al、Cd、Co、Cr、Fe、Mg、Ti 增加幅度较大。当 A₅、B₆ 增加 到 5 倍时,除了 K、Pb、Zn 有进一步提高外,其余元素含量却有不同程度的下降。

从这一实验结果可见,随着培养基中微量元素含量的增加,细胞中大部分金属元素的含 量都呈增加的趋势。以前的研究也表明,螺旋藻细胞中 Zn 的含量可随培养基中 Zn 含量的 增加而升高^[6]。但对于其它元素,当由 3 倍量增加至 5 倍量时,它们的含量并未继续升高。这 可能是由于多种微量元素共存时,藻细胞对各种元素的吸收存在着相互影响。虽然 A₅ 和 B₆

的组成中并无 Pb,藻细胞中 Pb 含量却随着 A_5 和 B_6 的量增加而提高,这可能是组成 A_5 和 B_6 的营养盐中含有的杂质所致。

重金属离子对藻类会有不同程度的毒害作用,本文只讨论了在低于毒害浓度的情况下,藻对微量元素的吸收,关于高浓度下金属离子对藻的毒害作用将在另文报道。

在本实验中,虽然 3 组培养液中的 Ca、Mg、K、Na 等元素的浓度并未改变,但它们在藻细胞中的含量却随 A_5 、 B_6 的加入量不同而发生变化,这可能是不同量的微量元素加入后使藻的生理代谢发生了变化所致。如 Mg 含量的增加可能与叶绿素的含量改变有关,这一机制有待进一步研究。

表 2 不同微量元素加入量对藻细胞中金属元素含量的影响* 单位:mg/kg
Tab. 2 Effect of different quantities of trace elements in medium
on the contents of metal elements in algal cells

| 元素 | 对照 | $(A_5, B_6) \times 3$ 含量 | $(A_5, B_6) \times 5$ 含量 |
|----|--------|--------------------------|--------------------------|
| Al | 9.74 | 13.40 | 9.78 |
| Ba | 2.38 | 3.44 | 1.50 |
| Ca | 256.00 | 322.00 | 210.00 |
| Cd | 0.041 | 0.141 | 0.045 |
| Co | 0.36 | 1.04 | 0.54 |
| Cr | 4.61 | 15.00 | 12.00 |
| Fe | 407.00 | 881.00 | 706.00 |
| K | 338.00 | 501.00 | 540.00 |
| Mg | 766.00 | 1100 | 1000 |
| Mn | 19.10 | 27.40 | 23.70 |
| Na | 222.00 | 365.00 | — |
| Pb | 0.93 | 1.34 | 2.45 |
| Sr | 0.37 | 0.51 | 0.28 |
| Ti | 5.82 | 15.80 | 15.00 |
| Zn | 18.80 | 19.30 | 22.00 |

* $(A_5, B_6) \times 3$ 、 $(A_5, B_6) \times 5$ 分别表示每升培养基中加入 3mL 和 5mL A_5 、 B_6 微量元素混合液;对照为 Zarrouk 培养基,其中 A_5 和 B_6 的加入量各为 1mL/L。

2.2 不同 EDTA 量对藻细胞中金属元素含量的影响

络合剂 EDTA 的加入对藻细胞中金属元素含量也有一定的影响(表 3)。当 EDTA 加入量为 0.08g/L(EDTA $\times 1$)时与不加 EDTA 相比,Co、Mn、Zn 含量明显下降,而 Cr、Fe、Sr、Ti 含量却明显上升,当 EDTA 量增加到 0.24g/L(EDTA $\times 3$)时,除 K 外,其余所有金属元素含量均有不同程度的下降,其中 Al、Ba、Ca、Co、Mn、Pb、Sr、Zn 与不加 EDTA 相比有较大程度的下降。

从这一实验结果来看,加入较大量的 EDTA 可明显降低藻细胞中金属元素的含量。产生这一结果的原因可能是由于 EDTA 是一种强络合剂,它与金属离子络合后降低了藻细胞环境中的金属离子活度,从而使细胞对金属离子的吸收减少。同时 EDTA 也和藻细胞竞争络合,阻碍了细胞对环境中金属元素的吸附(参见下文讨论)。当 EDTA 加入量较少时(0.08g/L)Fe、Cr 等金属含量却有所升高,这可能是由于 EDTA 增加了它们在培养基中的溶解度。因为在碱性的 Zarrouk 培养基中($pH \geq 8.0$,随着培养时间的增加,pH 可上升至

11.0 以上),这些金属的氢氧化物溶解度很小。因此,EDTA 在溶液中有减小离子活度和增溶的双重作用。对于藻细胞吸收金属离子这一过程而言,EDTA 在较高浓度时,减小活度的作用是主要的。EDTA 在较低浓度时,增溶作用影响较大。结果对藻细胞中金属元素的含量产生了不同的影响。

表 3 不同的 EDTA 加入量对藻细胞中金属元素含量的影响

单位:mg/kg

Tab.3 Effect of different quantities of EDTA in medium
on the contents of metal elements in algal cells

| 元素 | 无 EDTA 含量 | EDTA×1 含量 | EDTA×3 含量 |
|----|-----------|-----------|-----------|
| Al | 27.40 | 26.70 | 6.69 |
| Ba | 13.80 | 13.10 | 0.86 |
| Ca | 1200 | 1200 | 326.00 |
| Co | 1.24 | 0.68 | 0.35 |
| Cr | 5.70 | 10.10 | 3.49 |
| Fe | 813.00 | 1000 | 457.00 |
| K | 17600 | 14200 | 15600 |
| Mg | 4600 | 4500 | 3500 |
| Mn | 66.80 | 47.20 | 31.20 |
| Na | 1700 | 2900 | 1300 |
| Pb | 1100 | 1200 | 5.45 |
| Sr | 2.60 | 3.96 | 1.08 |
| Ti | 3.71 | 8.11 | 2.41 |
| Zn | 26.90 | 15.60 | 10.30 |

本实验结果也显示,在培养基中加入 10mg/L Pb 后,藻细胞中 Pb 可累积达 1200mg/kg (干重),表明螺旋藻对 Pb 有强富积作用,EDTA 可显著地减少 Pb 在藻中的积累。因此,在培养螺旋藻用于食品和饲料时,可通过增加 EDTA 的量减少 Pb 的含量。本实验藻细胞中的金属离子含量与前一组实验有一定的差异,可能是与藻的培养时间有关。关于培养时间与藻体金属含量的关系有待进一步研究。

2.3 藻细胞对重金属元素的吸附作用

藻细胞对重金属离子的吸附实验表明,经藻细胞吸附后,溶液中的离子浓度明显下降,说明螺旋藻细胞对 Co、Ni、Cu、Zn、Pb 离子都具有较强的吸附作用,这一作用可在较短时间内完成。藻细胞被杀死后仍具有相似的吸附作用(表 4)。结果也显示死细胞和活细胞对不同离子具有不同的吸附能力,死细胞对 Co、Zn 的吸附高于活细胞,而对 Pb 的吸附却低于活细胞。溶液中的 Na、K 增高是细胞中 Na、K 溶出所致,死细胞的溶出量明显高于活细胞。

微生物对环境中的金属元素的累积一般有两个过程:简单的物理吸附过程和与生理活动代谢相关的主动吸收过程^[7]。对单细胞绿藻研究已发现,它们对重金属元素有较强的选择吸收^[8,9]。用同位素方法对螺旋藻 Zn 吸收的研究也表明,在 Zn 加入培养基后,螺旋藻对 Zn 有吸附作用^[6]。本实验结果也显示了在 30min 内,藻细胞对几种重金属离子有明显的吸附作用。藻细胞被杀死后,这种吸附能力依然存在,表明藻细胞的这种吸附与生理活动无关。蓝藻的细胞壁是由多糖和蛋白质等物质组成,这些分子中的 -NH₂、-OH、-CO-NH-、-SH 等基团,在水溶液中均可与过渡金属离子络合^[10],使细胞表面形成较高的离子浓度,这些离子

在以后的细胞生长过程中可能被进一步转移到细胞内部,使细胞内元素含量升高。这一过程对于金属元素在藻细胞中的累积可能是关键的步骤^[11]。有 EDTA 存在时,除了与金属离子络合降低离子活度外,另一个重要的作用是与藻细胞竞争络合金属元素,使吸附于细胞表面的金属量减少,最终使细胞对金属元素的吸收减少。

表 4 死藻和活藻细胞吸附后溶液中金属元素浓度的变化

Tab. 4 Concentrations of metal elements in the solution after adsorbed by living and killed cells

| 元素 | 对照(mg/L) | 活细胞吸附 | | 死细胞吸附 | |
|----|----------|-----------|--------|-----------|--------|
| | | 剩余量(mg/L) | 吸附率(%) | 剩余量(mg/L) | 吸附率(%) |
| Co | 5.78 | 0.093 | 98.4 | 0.062 | 98.9 |
| Ni | 5.57 | 0.116 | 97.9 | 0.119 | 97.9 |
| Cu | 5.71 | 0.605 | 89.4 | 0.599 | 89.5 |
| Zn | 6.22 | 0.165 | 97.5 | 0.097 | 98.4 |
| Pb | 4.04 | 0.124 | 96.9 | 0.200 | 95.1 |
| Na | 1.96 | 14.6 | | 25.6 | |
| K | 0.726 | 3.49 | | 25.8 | |

活细胞与死细胞对不同离子的吸附能力不同,可能是甲醛使细胞的生物大分子构象发生改变,从而导致对金属离子的络合能力发生改变。

3 结语

本文的实验从两方面研究了螺旋藻对金属离子的累积作用,一方面,在藻能够正常生长的金属离子浓度下,相对高的金属离子浓度更利于藻对金属元素吸收。低浓度的络合剂对部分金属元素的吸收是有利的,但高浓度的络合剂对金属离子的吸收不利。在培养利用螺旋藻处理污水时,可通过调节环境条件提高藻对金属离子的吸收量,减少重金属对环境的污染。但对于培养藻用于食品和饲料,可选择适当的培养条件,降低藻体中金属的含量;另一方面,螺旋藻细胞对重金属元素有较强的吸附作用,而对 Na、K 等离子的吸附较弱,这一过程可在短时间内完成。与离子交换树脂等化学吸附相比,藻细胞对重金属的吸附更具有选择性,因而可有更高的净化效率。利用这一特性,对于螺旋藻难以生长的污水,也可将大量培养获得的藻体用作生物吸剂,用来减少污水中重金属的含量或回收一些有高价值的重金属元素。这一结果也显示,蓝藻也和单细胞绿藻一样可用作预浓缩剂,用以浓缩水样中的重金属元素,提高检测的灵敏度。

致谢 本文中元素含量由南京大学现代分析中心 ICP 室协助测定。

参 考 文 献

1 Fisher N S. Accumulation of metals by marine picoplankton. *Marine Bio.* 1985. 87:137~143
2 Green B. M Hosea, R McPherson, et al. Interaction of gold(I) and gold (I) complexes with algal biomass. *Environ Sci Technol.* 1986. 20:627~632
3 汤又文, 莫胜钧. 生物藻分离富积法在痕量元素分析中的应用进展. 化学通报. 1994. (1):1~4
4 Shelef G, Y Azov, R Moraine, et al. Algal mass production as an integral part of a wastewater treatment and reclamation system. *Algae Biomass.* 1988: 97~113

- 5 Soong P. Production and development of *chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. *Algae Biomass*. 1980; 97~113
- 6 Chao-Tsi T, L Jian-Hong. A preliminary study of the effect of Zinc on *Spirulina plantensis*. Proceedings of the fifth MICE symposium for Asia and the Pacific: Ecosystem and environment of tide flat coast effected by human being's activities. Nanjing: Nanjing University Press, 1990. 303~308
- 7 黄淑惠. 细菌固定金属的作用机制. 微生物学通报. 1992, 19(3):171~173
- 8 Manhan G A, V Majidi & J A Holcombe. Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry. *Anal Chem*. 1989. 61:624~627
- 9 Mo Shengjun & J A Holcombe. Preconcentration of copper on algae and determination by slury graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal Chem*. 1990. 62:1994~1997
- 10 计亮年, 莫焕庭等. 生物无机化学导论. 广州: 中山大学出版社, 1992
- 11 Romeo M and M Gnassia-Barelli. Metal uptake by different species of phytoplankton in culture. *Hydrobio*. 1985. 123: 205~209

EFFECTS OF DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON THE ABSORPTION OF METAL ELEMENTS IN *SPIRULINA MAXIMA*

Li Jianhong¹ Zeng Zhaoqi¹ Xue Yuming² Tai Zihou²

(1: Department of Biology Science and Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093;

2: State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract

The effects of different concentrations of trace element solutions (A_5 and B_6) and different quantites of EDTA in media on the contents of metal elements in *Spirulina maxima* were studied. The results show that by increasing the concentrations of A_5 and B_6 trace elements from 1mL/L (Zarrouk medium) to 3mL/L in medium, the contents of most metal ions in algae increased. However, if A_5 and B_6 were increased to 5mL/L, no more increase of metal contents was observed except for K, Zn and Pb. The metal contents of algae were decreased when increasing EDTA in medium, while the contents of Cr, Fe, Sr and Ti in algae were, when EDTA was 0.08g/L in medium, higher than those in the algae cultured without EDTA. The results suggest that higher concentrations of metal ions in medium increased algae absorbing metal ions and EDTA can make algae absorbing metal ions decreased.

The experiment on the adsorption of heavy metal elements on intact algal cells shows that *S. maxima* strongly adsorbed Co, Ni, Cu, Zn and Pb ions in 30 minutes. The adsorption capacity of cells killed by formol was comparable to living cells, strongly suggesting that the adsorption was independent of physiological reactions.

Key Words *Spirulina maxima*, metal elements, environment, adsorption, absorption