

# 极大螺旋藻富积重金属机理的研究\*

李建宏 曾昭琪<sup>†</sup> 薛宇鸣<sup>††</sup> 郇子厚<sup>††</sup>

(南京师范大学生物系 <sup>†</sup>南京大学生物科学与技术系 <sup>††</sup>配位化学国家重点实验室 南京 210008)

**摘要** 于1993年5月由南京大学藻类培养室提供极大螺旋藻藻种,用 Zarrouk 培养基培养后,用活藻体和甲醛杀死的藻体分别进行吸附实验;过滤出的藻体置于  $6 \times 10^{-3} \text{g/L}$  左右浓度的  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  离子混合液中。结果显示,死、活藻体都具有相似的吸附能力,对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  的富积大于 203 倍,对  $\text{Cu}^{2+}$  的富积大于 185 倍;用热水提取、DEAE-纤维素 D-23 柱和 Sephadex G-200 柱纯化后,获得了纯细胞外壁多糖,其分子量为 52kD。将该糖溶液盛在透析袋内,并置于 4 种离子混合液中进行吸附实验,结果显示,该糖对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  的富积倍数分别达 1 744, 1 644, 1 340, 1 750。藻体和多糖对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  的吸附都高于对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附。比较藻体与多糖对 4 种离子的吸附结果可见,藻体对离子的吸附主要是多糖的作用;多糖的红外光谱显示,金属离子改变 OH 和 CO-NH 的吸收峰,表明这两种基团与金属离子发生了络合作用;对  $\text{Cu}^{2+}$  的络合滴定测定表明,  $\text{Cu}^{2+}$  与多糖的结合度为 0.40。

**关键词** 极大螺旋藻 多糖 重金属离子 吸附作用

**学科分类号** X171

研究微藻对重金属元素的富积作用对了解重金属元素在水生态中的流动具有重要意义 (Fisher *et al*, 1984; 秦松等, 1993)。对藻类富积环境中重金属的研究发现,微藻对重金属有吸附作用 (Greene *et al*, 1986; Harris *et al*, 1990; Johnson, 1987),这一吸附过程可在短时间内完成,这一过程对藻类富积重金属可能是很重要的。但对于这一过程的机理尚未见报道。本文报告螺旋藻及其胞外壁多糖对重金属离子吸附作用,探讨蓝藻累积重金属的机理,以期研究微藻对重金属元素在水环境中流动所起的作用提供科学依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 藻体对金属元素的吸附测定

极大螺旋藻 (*Spirulina maxima*) 于 1993 年 5 月由南京大学藻类培养室提供。接种于 Zarrouk 培养基中 (Zarrouk, 1966)<sup>1)</sup> 培养。用  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  配制成  $6 \times 10^{-3} \text{g/L}$

\* 博士论文部分工作。李建宏,男,出生于1963年9月,博士, Fax:0086-025-7718174

1) Zarrouk C, 1966. Influence de diverse facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de (*Spirulina maxima* Setch et Gardner) Geitler Ph D Thesis, University of Paris (Paris)

收稿日期:1996-07-10日, 收修改稿日期:1997-06-21

左右的金属离子混合液 (pH=5.0), 4 种金属离子在溶液中的实测浓度见结果中。取对数生长期的藻液两份, 其中一份加入 4% 甲醛用以杀死藻体, 两份藻液同时过滤出藻体, 用重蒸水洗 5 次, 沥干水分。从两份过滤出的藻中各取鲜藻体 3g, 分别放入两只盛有 50ml 金属离子混合液的烧杯中, 25℃ 下搅拌 30 min, 用定量滤纸滤去藻体, 过滤前滤纸用 1% HCl 和重蒸水洗。收集滤液, 分别测定金属离子浓度。以未经藻体处理的金属离子混合液通过滤纸作对照。另从上述两份过滤出的藻体中各取 1g 鲜藻, 烘干后算出含水率。测得结果后, 通过溶液中金属离子的减少量, 计算出单位重量藻(干重)对金属离子的吸附量和富积倍数。吸附量 = 溶液中离子减少总量 / 藻重量(干重); 浓缩倍数 = 吸附量 / 原始浓度(对照)。

## 1.2 胞壁多糖的提取和纯化

**1.2.1 提取纯化** 用热水提取法直接提取细胞外壁多糖 (Ps, 简称多糖) (Mehta *et al.*, 1978)。粗提液用氯仿脱蛋白后, 乙醇沉淀出粗多糖。粗多糖参照张惟杰 (1987) 的方法, 先用 2 × 50cm DEAE-纤维素 D-23 (Pharmacia) 柱纯化, 柱用蒸馏水平衡, 上样后用 10—500 mmol/L NaCl 梯度洗脱, 分部收集, 用硫酸-苯酚法检测多糖。合并主要峰的收集液, 用水透析除去 NaCl。于 80℃ 水浴加热浓缩后, 进一步用 2 × 60 cm Sephadex G-200 (Pharmacia) 柱纯化。样品用 100 mmol/L NaCl 透析至平衡, 上样后用 100 mmol/L NaCl 洗脱, 收集多糖峰, 用水透析除去 NaCl 后, 冷冻保存备用, 此时糖浓度为  $526 \times 10^{-3}$  g/L。经柱层析纯化后的多糖分别用纸层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定纯度。

**1.2.2 多糖的分子量测定** 胞壁多糖分子量用高压液相色谱法测定。所用层析柱为 Tskgel G 3000 SWXL 柱。标准多糖为 T-40, T-50 和 T-70 (Pharmacia)。

## 1.3 多糖对金属离子的吸附

多糖溶液置于透析袋中, 用 1% EDTA 溶液 (重蒸馏水配制) 透析过夜; 再用重蒸馏水透析三次 (每次大于 4h)。取 10 ml 透析过的多糖溶液置于干净的透析袋中, 将此透析袋放入 100 ml  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  混合溶液中 (pH = 5.0)。室温下放置过夜约 12h 后, 用电感耦合离子光谱法 (ICP) 测定金属离子混合液中各离子浓度的变化。用重蒸馏水取代多糖溶液, 同样处理作对照。测定多糖浓度, 算出多糖对各离子的吸附量和富积倍数。

## 1.4 多糖与 $\text{Cu}^{2+}$ 结合度的测定

用离子选择电极法测定结合度, 以甘汞电极 (南京土壤研究所产) 为参比电极,  $\text{Cu}^{2+}$  选择电极 (江苏电分析仪器厂产) 为工作电极, 测定各离子浓度下的电势值。以  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的对数值为横坐标, 电势值为纵坐标, 作标准曲线。取 5 ml 多糖溶液与 5 ml  $10^{-3}$  mol/L 的  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  混合后, 再用  $10^{-3}$  mol/L 的  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  室温下滴定。测出随滴定体积不同时电势的变化。滴定至电位无明显改变, 按下式算出  $\text{Cu}^{2+}$  与多糖的结合度 (郇子厚等, 1983)。

$$X = \frac{C_0 V_0 - C' (V_0 + V)}{CV}$$

式中,  $C_0$ ,  $V_0$  分别是滴定所用  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度和体积;  $C'$  是滴定平衡时的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度;  $C$ ,  $V$  分别为多糖的浓度和体积。多糖的浓度用葡萄糖溶液标定, 校正系数为 0.9。

## 1.5 金属离子对多糖红外光谱影响的测定

取 5 支试管, 各加多糖溶液 2 ml, 再分别加入均为 0.2 ml 的  $10^{-3}$  mol/L  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,

$\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ 。取两滴多糖与金属离子的混合液滴加到  $\text{KBr}$  晶体中, 红外灯下烘干、压片后, 用 NICOLET 170 FT-IR 红外光谱仪(美国)测定傅立叶变换红外光谱的变化。扫描次数为 100 次。

## 2 结果及讨论

### 2.1 极大螺旋藻藻体对金属离子的吸附结果

吸附实验表明, 经极大螺旋藻体吸附后, 金属离子混合溶液中各离子的浓度明显下降, 藻体对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  的富集倍数均大于 200 倍, 而对  $\text{Cu}^{2+}$  的富集倍数大于 186 倍, 藻体对  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  的吸附能力大于  $\text{Cu}^{2+}$ 。这说明藻体对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  都具有较强的吸附作用, 这一作用可在较短时间内完成。藻体被甲醛杀死后仍具有相似的吸附作用。见表 1。

微生物对环境中金属元素的累积一般有两个过程, 一是简单的物理吸附过程, 二是与

表 1 藻吸附后混合溶液中金属离子含量的变化

Tab.1 Concentrations change of metal ions in the  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  mixed solution after adsorbed by living and dead algae, *S. maxima*

离子	对 照 ( $\times 10^{-3}$ g/L)	活 藻 吸 附			死 藻 吸 附		
		剩余量 ( $\times 10^{-3}$ g/L)	吸附量 (mg/kg)	富集倍数	剩余量 ( $\times 10^{-3}$ g/L)	吸附量 (mg/kg)	富集倍数
$\text{Co}^{2+}$	5.78	0.093	1 184.8	205	0.062	1 191.3	206
$\text{Ni}^{2+}$	5.57	0.116	1 136.3	204	0.119	1 135.6	203
$\text{Cu}^{2+}$	5.71	0.605	1 063.5	186	0.599	1 064.8	187
$\text{Zn}^{2+}$	6.22	0.165	1 261.5	203	0.097	1 275.6	205

生理活动代谢相关的主动吸收过程(黄淑惠, 1992)。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(Majidi *et al*, 1988, 1990; Shengjun *et al*, 1990)。Tseng 等(1990)用同位素的方法对钝顶螺旋藻(*S. platensis*)  $\text{Zn}^{2+}$  吸收的研究也表明, 在  $\text{Zn}^{2+}$  加入培养基后, 钝顶螺旋藻对  $\text{Zn}^{2+}$  有吸附作用。本实验结果也显示了在 30 min 内, 藻细胞对几种重金属离子均有明显的吸附作用。藻细胞被杀死后, 这种吸附能力依然存在, 这表明藻细胞的这种吸附作用是和生理活动无关的。多糖是蓝藻细胞外壁的主要组成成分, 也是藻与水体直接接触的部分, 因此极大螺旋藻的细胞外壁多糖可与溶液中的金属离子发生直接作用。

### 2.2 极大螺旋藻多糖对金属离子的吸附结果

从极大螺旋藻中分离纯化出纯的细胞外壁多糖, 电泳和纸层析结果显示均为均一组分。经测定分子量为 52 kD。用该多糖对金属离子进行吸附实验的结果可见, 多糖对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  均有较强的吸附能力, 富集倍数分别为 1 744, 1 644, 1 340 和 1 750 倍。比较对 4 种金属离子的吸附能力为:  $\text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ , 其中对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附明显低于其它 3 种离子, 这与藻体对 4 种离子的吸附结果相一致。见表 2。

多糖在螺旋藻中的含量一般占 1/8 到 1/5(Henrikson, 1989), 比较藻体与多糖对 4 种离子的吸附量可见, 多糖的吸附量为藻体的 8 倍左右, 从这一结果推断, 藻体对 4 种离子的吸附主要多糖对 4 种离子的吸附。

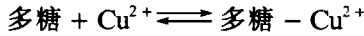
表2 多糖对溶液中金属离子的吸附结果

Tab.2 The result of metal ions adsorbed by polysaccharide of *S. maxima*

项目	溶液金属离子浓度 ( $\times 10^{-3}$ g/L)				项目	溶液金属离子浓度 ( $\times 10^{-3}$ g/L)			
	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>		Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
对 照	5.35	5.30	4.00	5.39	吸 附 量	9 330	8 711	5 360	9 433
剩 余 量	3.54	3.61	2.96	3.56	富 积 倍 数	1 744	1 644	1 340	1 750

2.3 多糖与 Cu<sup>2+</sup> 的结合度

在多糖与 Cu<sup>2+</sup> 的混合溶液中,存在着多糖与 Cu<sup>2+</sup> 的结合解离平衡,如下式所示:



离子选择电极电势反映的是 Cu<sup>2+</sup> 的活度,即游离 Cu<sup>2+</sup> 的浓度。多糖 Cu<sup>2+</sup> 的滴定曲线见图 1,可见,随 Cu<sup>2+</sup> 的量增加,电势也上升,最终接近平衡,表明此时多糖与 Cu<sup>2+</sup> 的结合达到饱和。经计算此时多糖与 Cu<sup>2+</sup> 的结合度为 0.40,即多糖中每摩尔单糖平均可结合 0.40 摩尔 Cu<sup>2+</sup>,相当于  $142\ 222 \times 10^{-3}$  g/kg 糖。可见该多糖与重金属有很强的结合能力。

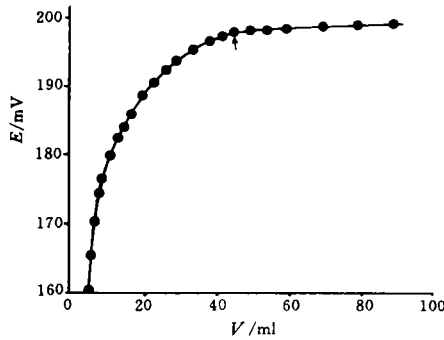


图 1 多糖 Cu<sup>2+</sup> 滴定曲线

Fig.1 The curve of Cu<sup>2+</sup> titrating polysaccharide of *S. maxima*

2.4 金属离子对多糖红外光谱的影响结果

多糖的红外吸收光谱及多糖同 4 种金属离子结合后光谱各主要吸收峰的变化见表 3。吸收峰的指认参照荆煦瑛等 (1992)、吴东儒 (1987) 等的工作。1 620 cm<sup>-1</sup> 吸收峰的出现说明可能有 N-乙酰氨基葡萄糖残基存在。结果表明: Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 与多糖结合后,红外吸收光谱无明显峰变化,但酰氨基 (1 622 cm<sup>-1</sup>)、羟基 (3 422 cm<sup>-1</sup>, 1 416 cm<sup>-1</sup>, 1 230 cm<sup>-1</sup>) 之间的吸收峰出现微小的移动,这说明酰氨基和羟基参与了与金属的结合作用; Cu<sup>2+</sup> 与多糖结合后,酰氨基 (1 622 cm<sup>-1</sup>)、羟基 (1 230 cm<sup>-1</sup>) 的吸收峰均发生明显的改变,说明酰氨基及羟基与 Cu<sup>2+</sup> 发生了较强的络合作用。

表3 金属离子对多糖(Ps)红外光谱(cm<sup>-1</sup>)的影响

Tab.3 Effects of metal ions on the infrared spectra of extracelullar polysaccharide of *S. maxima*

Ps	Ps+Cu <sup>2+</sup>	Ps+Co <sup>2+</sup>	Ps+Ni <sup>2+</sup>	Ps+Zn <sup>2+</sup>	主振动
3 422	3 419	3 419	3 419	3 419	O—H
1 622	1 656, 1 625	1 625	1 625	1 625	CO—NH
1 416	1 419	1 419	1 419	1 419	O—H
1 230	1 325	1 225	1 225	1 225	O—H
1 138	1 138	1 138	1 138	1 138	C—O
1 057	1 056	1 056	1 056	1 056	C—O

### 3 结语

本研究显示了死活两种藻体对  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  4 种离子具有相似的高吸附能力,从细胞外壁多糖对 4 种离子的吸附能力来看藻细胞对金属离子的吸附,主要是多糖的吸附作用。多糖与金属离子的结合主要是通过多糖的 OH 和 CO—NH 与金属离子进行络合的。胞外壁多糖的这种吸附作用,可先在藻细胞表面迅速形成高浓度区,然后再进一步转移到细胞内,这对于藻类对金属元素的吸收和累积可能是关键的步骤。

### 参 考 文 献

- 邵子厚 吴铁军 袁玉荪, 1983. 硫酸软骨素 A 与  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  结合度的测定. 生物化学与生物物理进展, 2: 38—41
- 吴东儒, 1978. 糖类的生物化学. 北京: 高等教育出版社. 855—861
- 张惟杰, 1987. 复合多糖生化研究技术. 上海: 上海科学技术出版社. 209—216
- 荆煦瑛 陈式棣 么恩云, 1992. 红外光谱实用指南. 天津: 天津科学技术出版社. 25—43
- 秦松 林光恒, 1993. 化学诱变剂在实验海洋食物链中的流动以及遗传毒性的检测. 海洋与湖沼, 24(5): 542—546
- 黄淑惠, 1992. 细菌固定金属的机制. 微生物学通报, 19(3): 171—173
- Fisher N S, Bohe M, Teyssie J L, 1984. Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag and Hg in four marine phytoplankters. Mar Ecol Prog Ser, 18: 201—203
- Greene B, Hosea M, McPherson R *et al*, 1986. Interaction of gold(I) and gold(II) with algae biomass. Environ Sci Technol, 20: 627—632
- Harris P O, Ramelow G J, 1990. Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. Environ Sci Technol, 24(2): 220—228
- Henrikson R, 1989. Earth Food *Spirulina*. California, U S A: Ronore Enterprises, Inc., Laguna Beach. 25—42
- Johnson P E, 1987. Accumulation of mercury and other elements by *Spirulina* (Cyanophyceae). Nutr Rept Inter, 34(6): 1 063—1 069
- Majidi V, Holcombe J A, 1988. Separation and preconcentration of cadmium by biological organisms and analysis by graphite furnace atomic absorption. Spectrochimica Acta, 43B(12): 1 423—1 429
- Majidi V, Laude D A, Holcombe J A, 1990. Investigation of the metal-algae binding site with  $^{113}\text{Cd}$  nuclear magnetic resonance. Environ Sci Technol, 24(9): 1 039—1 312
- Mehta V B, Vaidya B S, 1978. Cellular and extracellular polysaccharides of the blue-green algae *Nostoc*. J Expt Bot, 29: 1 423—1 430
- Shengjun M, Holcombe J A, 1990. Preconcentration of copper on algae and determination by slurry graphite furnace atomic absorption spectrometry. Anal Chem, 62: 1 994—1 997
- Tseng C Q, Li Jian-Hong, 1990. A preliminary study of the effect of zinc on *Spirulina platensis*. Proceedings of the Fifth MICE Symposium for Asia and the Pacific. Nanjing: Nanjing University Press. 303—308

## STUDY ON MECHANISM OF HEAVY METAL ACCUMULATION IN *SPIRULINA MAXIMA*, CYANOPHYTA

LI Jian-hong, ZENG Zhao-qi<sup>†</sup>, XUE Yu-ming<sup>††</sup>, TAI Zi-hou<sup>††</sup>

(Department of Biology, Nanjing Normal University; <sup>†</sup>Department of Biological Science and Technology,  
Nanjing University; <sup>††</sup>Statekey Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing, 210008)

**Abstract** The accumulation of heavy metals by an intact alga, *Spirulina maxima*, and its extracellular polysaccharide (EPS) was studied. The alga was supplied by Algae Culture Laboratory of Nanjing University in May 1995. The culture medium was Zarrouk medium. Living algae and dead algae killed by formalin were obtained by filtration and mixed with a  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  complex solution (pH = 5.0), which was  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ , and  $\text{ZnSO}_4$  salts. Every metal ion content in the solution was around  $6 \times 10^{-3}$  g/L. After mixing with the metal ion solution for 30 min, the algae were filtered out and the concentrations of the four ions in the solution were measured. The results show that *S. maxima* strongly adsorb the four ions; the quantities of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  adsorbed in the algae were more than 203 times higher than in the initial solution, with that of  $\text{Cu}^{2+}$  being more than 185 times. The abilities of the algae adsorbing  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  were higher than  $\text{Cu}^{2+}$ . There is no significant difference between the living and the dead EPS of *S. maxima* was extracted by hot water and separated by a DEAE-cellulose D-23 column and a Sephadex G-200 column. Its molecular weight was 52kD, measured by high liquid chromatogram. To measure the ability of EPS adsorbing metal ions, an EPS solution placed in a dialyzer was put into  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ions complex solution. Each of the four ions in the solution had a concentration of around  $6 \times 10^{-3}$  g/L. The results show that the EPS strongly adsorbs the ions; it concentrated  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ions for 1 774, 1 644, 1 340 and 1 750 times respectively (Tab.2). The EPS and the intact algae adsorbed more  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  than  $\text{Cu}^{2+}$ . Comparing the adsorption of intact algae with the EPS, it is suggested that the adsorption of intact algae is mainly caused by the adsorption of EPS.

Infrared spectra of EPS and the EPS combined with different metal ions show that metal ions can change the key vibration of OH (3 422, 1 416, 1 230) and CO—NH (1 622) (Tab.3). Thus, the adsorption of metal ions by the EPS is due to OH and CO—NH coordinating the metals.

The capacity of EPS combining  $\text{Cu}^{2+}$  was measured using the method of ion-selective electrode. A curve of  $\text{Cu}^{2+}$  titrating EPS was obtained (Fig.1). At the equilibrium point, the titrate was 0.40. This observation means that each single sugar molecular of EPS can combine 0.40 molecular  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Key words** *Spirulina maxima* Polysaccharide Heavy metal ions Adsorption

**Subject classification number** X171