

# 基于光谱学分析探讨磷的释放促进酿酒酵母菌生物矿化铀的研究

张 伟<sup>1,2</sup>, 董发勤<sup>3\*</sup>, 贺小春<sup>3</sup>, 宋怀庆<sup>4</sup>, 覃贻琳<sup>5</sup>, 熊 鑫<sup>5</sup>, 唐子涵<sup>5</sup>

1. 西南科技大学分析测试中心, 四川 绵阳 621010
2. 中国工程物理研究院激光聚变研究中心, 四川 绵阳 621900
3. 西南科技大学固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 四川 绵阳 621010
4. 西南科技大学环境与资源学院, 四川 绵阳 621010
5. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010

**摘 要** 磷作为生物体必需的化学元素之一, 在微生物矿化铀的过程中发挥重要作用。以酿酒酵母菌为吸附剂, 利用等离子体发射光谱仪和等离子体发射光谱-质谱仪考察了铀酰离子、pH 值和磷的释放在生物吸附铀过程中的相互作用和影响; 结合光谱学和介观分析手段探讨了酿酒酵母菌与铀作用过程中生物体释放磷的行为与铀生物矿化的关系, 进而推测出酿酒酵母菌生物矿化铀的机理。结果表明: 酿酒酵母菌可以有效去除水体的 U(VI), 且生物体在与 U(VI) 作用过程中释放的磷有效促进了酿酒酵母菌生物矿化铀。在溶液初始 pH 3.0 时, 酿酒酵母菌对 U(VI) 的去除效果最好; 随着吸附体系中 U(VI) 浓度的降低, 溶液 pH 值升高, 磷的消耗量增大, 说明溶液中的 H<sup>+</sup> 和酿酒酵母菌释放的磷参与了酿酒酵母菌去除 U(VI) 的过程。酿酒酵母菌对 U(VI) 的吸附不受反应温度的影响, 是自发的、吸热行为。通过 FTIR, SEM, XPS 和 XRD 测试分析, 推测酿酒酵母菌生物矿化铀的机理为: 最初在静电引力作用下, U(VI) 被迅速吸附到酿酒酵母菌细胞表面, 随后以配位的形式被菌体表面的磷酸盐、羟基和酰胺等官能团络合; 溶液中的 H<sup>+</sup> 和酿酒酵母菌释放的无机磷酸盐可作为菌体与 U(VI) 结合的沉淀配体, 继续矿化形成鳞片状的晶体物质 H<sub>2</sub>(UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O 而被固定在酿酒酵母菌细胞外表面。此外, 还有少量的 U(VI) 被菌体释放的物质还原成 U(IV) 形成 CaU(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 沉降下来。综上所述, 磷是引起酿酒酵母菌生物矿化铀的主要功能元素。开展磷参与的铀的生物矿化机制研究对于铀污染的生物原位修复和深入理解放射性核素铀在自然界中的活化和固定化具有重要的意义。

**关键词** 酿酒酵母菌; 铀; 生物矿化; 磷; 光谱分析

**中图分类号:** Q89   **文献标识码:** A   **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)01-0025-07

## 引 言

随着核技术和核电工业的快速发展, 越来越多的含铀废水进入到生态环境中。国家规定, 对于无接纳水体时含铀废水的排放标准是铀的浓度应  $< 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而目前含铀废水中铀的浓度均高于这个数值。水体中对环境危害较大的铀主要以 U(VI) 存在, 具备可溶性和易迁移性。U(VI) 可通过水体流动和食物链的迁移进入到生态圈, 进而严重威胁人类健康和自然环境。因此, 妥善处理含 U(VI) 废水势在必行。目前, 常用的含铀废水处理技术包括化学沉淀法、离子

交换法、溶剂萃取法、蒸发浓缩法和膜分离法等, 但上述方法在运行过程中存在成本高、效率低、二次污染物明显等问题, 且难以有效处理大量低浓度的含铀废水<sup>[1-2]</sup>。

近年来蓬勃发展的微生物修复技术因其具有成本低、效率高、环境友好、且能同时处理多种污染物等特点, 而在核废处理领域受到广泛的关注与研究。目前, 大量关于微生物与 U(VI) 相互作用的文献报道集中在微生物对铀的吸附行为和结合铀的机制探讨两方面。微生物可以通过不同的机制与 U(VI) 作用, 如生物表面吸附、生物体内富集、生物还原和生物矿化。其中, 生物矿化机制尤为重要。铀的生物矿化研究可以追溯到 1992 年 Macaskie 等发现柠檬酸杆菌在生理条

收稿日期: 2019-12-12, 修订日期: 2020-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(41802037, 41572025), 西南科技大学大学生创新基金项目(CX19-014)资助

作者简介: 张 伟, 女, 1981 年生, 西南科技大学分析测试中心讲师   e-mail: weiwei\_ln@126.com

\* 通讯作者   e-mail: fqdong@swust.edu.cn

件下将铀以多晶  $\text{HUO}_2\text{PO}_4$  形式沉淀<sup>[3]</sup>。此后,许多微生物开始被用于研究 U(VI)的矿化。如苏云金杆菌可将 U(VI)以  $(\text{NH}_4)(\text{UO}_2)_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  纳米晶体的形式固定在胞内<sup>[4]</sup>。海洋细菌 *Idiomarina loihiensis* MAH1 可通过有机磷酸基与铀作用形成  $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  沉淀<sup>[5]</sup>。芽孢杆菌 *B. subtilis* 矿化铀的过程中其细胞壁上羧基和磷酸基是铀的主要配体<sup>[6]</sup>。*Kocuria sp.* 可与铀形成  $\text{CaU}(\text{PO}_4)_2$ , 并且矿化进行的程度可能取决于细胞中磷酸盐的释放<sup>[7]</sup>。综上所述可以看出,研究人员已经关注并通过 FTIR、EDS 等测试手段间接推测出磷酸基团或磷酸盐可能在生物体矿化铀的过程中发挥重要作用。但磷作为生物体必需的化学元素之一,微生物在与铀作用过程中自身释放磷的能力及磷的消耗与 U(VI)量变化的相互关系却缺乏直接、系统的研究数据;磷在生物矿化体中的表征和磷参与的铀生物矿化机制也鲜有探讨。

因此,本文选取发酵工业的副产物、模式微生物——酿酒酵母菌为研究对象,基于近年来国内外的研究成果和自身的研究工作,探究磷参与的酿酒酵母菌生物矿化铀的行为及机制。通过静态批次吸附实验,考察铀酰离子、pH 值和磷的释放在生物吸附过程中的相互作用和影响。结合介观分析和光谱学表征手段,深入探讨了微生物与铀作用过程中酿酒酵母菌释放磷的行为与铀生物矿化的关系。这一研究可为后续开展铀污染的微生物原位修复应用提供基础实验数据及参考,并有助于深入理解放射性核素铀在自然界中的活化和固定化过程。

## 1 实验部分

### 1.1 材料与仪器

微生物预处理:实验所用微生物为市售的酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*, 购自安琪酵母股份有限公司)。称取一定量的干酵母粉加入到锥形瓶中盖上塞子,共同放入手提式压力蒸汽灭菌器(0.15 MPa, 125 °C)中灭活 20 min,灭活完成后将其放在干燥箱中 40 °C 干燥 24 h,取出后放入干燥皿中备用。

U(VI)储备液配置:准确称取 2.109 2 g 硝酸氧铀酰  $[\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  溶解于 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的硝酸溶液中,再转移至 1 000 mL 棕色容量瓶中稀释至刻度定容,摇匀,即得 1 000 mg · L<sup>-1</sup> 的 U(VI)储备液。实验时根据需要将 U(VI)储备液稀释至不同浓度,其 pH 值用 0.10 mol · L<sup>-1</sup> 的 NaOH 和 HCl 调节。实验用化学试剂均为分析纯。

主要仪器:电感耦合等离子体发射光谱质谱仪(Agilent7700x 型,美国安捷伦公司)、电感耦合等离子体发射光谱仪(iCAP6500,美国 ThermoFisher 公司)、红外光谱仪(Spectrum One 型,美国铂金埃尔默公司)、X 射线光电子能谱仪(K-Al-PHA+型,美国 ThermoFisher 公司)、高分辨冷场发射扫描电子显微镜(Ultra 55 型,德国卡尔蔡司公司)、X 射线衍射仪(X'Pert PRO 型,荷兰帕纳科公司)。

### 1.2 静态批次吸附实验

根据不同实验目的,分别向 100 mL 的锥形瓶中加入 20 mL 实验设定浓度的铀溶液和实验设定量的酿酒酵母菌,混

合均匀后共同放置在恒温水浴振荡器中振荡吸附一定时间后,取样离心(10 000 r · min<sup>-1</sup>, 15 min),利用电感耦合等离子体发射光谱质谱仪测定离心后上清液中剩余的 U(VI)离子浓度。离心得到的菌体沉淀经冷冻干燥后分别进行 FTIR、XPS 和 XRD 测试。用移液器汲取反应前后的菌悬液滴于盖玻片上,自然风干后用 2.5% 的戊二醛溶液浸泡过夜,再用乙醇梯度脱水,自然干燥后待测 SEM。酿酒酵母菌对 U(VI)的吸附量  $q$  (mg · g<sup>-1</sup>) 和去除率  $R$  (%) 的计算公式如式(1)和式(2)

$$q = \frac{(c_0 - c_t) \times V}{m} \quad (1)$$

$$R = \frac{(c_0 - c_t)}{c_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中,  $c_0$  为溶液中 U(VI)初始浓度(mg · L<sup>-1</sup>),  $c_t$  为反应进行到  $t$  时刻溶液中 U(VI)的浓度(mg · L<sup>-1</sup>),  $V$  为锥形瓶中的溶液体积(L),  $m$  为吸附剂用量(g)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 吸附过程中溶液初始 pH 值与磷的溶出、U(VI)去除的关系

图 1(a)考察了溶液初始 pH 值在 1.0~7.0 范围内酿酒酵母菌对铀的去除情况。由图可知,酿酒酵母菌对 U(VI)的去除效率与溶液初始 pH 值密切相关。当  $\text{pH} \leq 3.0$  时,酿酒酵母对 U(VI)的去除率和吸附量随 pH 值的升高而增大。当  $\text{pH} \geq 3.0$  时,去除率和吸附量则出现下降趋势。 $\text{pH} 3.0$  时,酿酒酵母菌对 U(VI)的去除率和吸附量均达到最大值,分别为 93.2% 和 15.7 mg · g<sup>-1</sup>。

在实验过程中,吸附体系 pH 值会影响细胞表面官能团的质子化程度和溶液中铀的存在形态,进而影响到铀的生物利用度<sup>[8]</sup>。我们利用 Visual Minteq 3.1 软件模拟了不同 pH 值下 U(VI)在溶液中的分布形态,如图 1(b)所示。当  $\text{pH} \leq 3.0$  时,U(VI)主要以带正电的  $\text{UO}_2^{2+}$  存在。这时溶液中的  $\text{H}^+$  会和  $\text{UO}_2^{2+}$  竞争酿酒酵母菌上有限的活性吸附位点,并且使得菌体细胞表面活性基团质子化,由此产生的斥力会抑制菌体对 U(VI)的吸附。因此酿酒酵母菌对 U(VI)吸附量较低。随着 pH 值逐渐升高并接近酿酒酵母菌的等电点( $\text{pH} = 3.0$  左右<sup>[9]</sup>)时, $\text{UO}_2^{2+}$  在静电引力作用下被迅速吸附到菌体表面,吸附量明显增加。当 pH 在 3.0~5.0 时, $\text{UO}_2^{2+}$  逐渐水解形成  $[(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2]^{2+}$ ,  $[(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5]^{+}$ ,  $[(\text{UO}_2)_4(\text{OH})_7]^{+}$  和  $[\text{UO}_2\text{OH}]^{+}$  等络阳离子。这些络阳离子半径较大,在与菌体作用时会占据更多的吸附位点,导致 U(VI)去除率下降。当  $5.0 < \text{pH} < 7.0$  时,  $[(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5]^{+}$ ,  $[(\text{UO}_2)_4(\text{OH})_7]^{+}$  和  $[(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_7]^{-}$ ,  $[\text{UO}_2(\text{OH})_3]^{-}$  则成为溶液中 U(VI)的主要物种。菌体细胞与这些阴离子之间产生的静电排斥作用会抑制吸附,进而酿酒酵母菌对 U(VI)的去除率下降。

此外,我们还对反应前后溶液 pH 值的变化及磷的释放量进行了测试,结果见表 1 和图 2。可以看出,吸附实验进行 60 min 后,溶液 pH 值较反应前均明显升高,说明酿酒酵母

菌在与 U(VI) 作用过程中可能释放了羟基离子或者已有的氢离子参与了反应。考察不同 pH 值下吸附体系中磷的释放量(图 2)可知:与对照组相比,酿酒酵母菌与 U(VI) 作用后溶液中磷的含量明显低于对照组;且当 U(VI) 的去除量最大时(pH=3.0),磷的消耗量也最大。

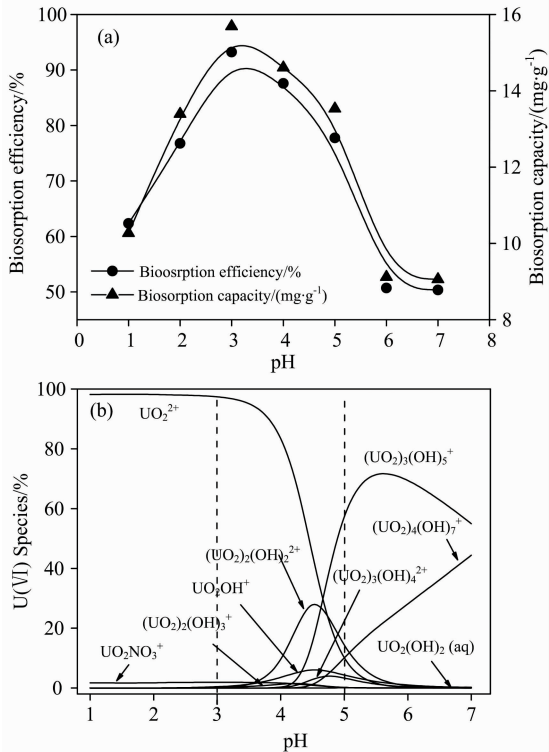


图 1 (a) 溶液初始 pH 值对酿酒酵母菌去除 U(VI) 的影响; (b) 不同 pH 下 100 mg·L<sup>-1</sup> 铀的物种分布

Fig. 1 (a) Effect of initial pH on biosorption of uranium by *S. cerevisiae*. (b) The relative species distribution of 100 mg·L<sup>-1</sup> U(VI) at different pH calculated by Visual MINTEQ 3.1 ( $c_0 = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $M = 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $t = 60 \text{ min}$ )

表 1 酿酒酵母菌吸附 U(VI) 反应前后溶液 pH 值的变化  
Table 1 Changes of pH value in the solution before and after biosorption of uranium on *S. cerevisiae*

吸附反应前溶液 pH 值	吸附反应后溶液 pH 值
1.00	0.95
2.00	2.16
3.00	4.56
4.00	5.86
5.00	6.80
6.00	7.04
7.00	7.14

综合以上分析发现,酿酒酵母菌与 U(VI) 作用后, U(VI) 的浓度降低,溶液 pH 值升高,磷的浓度降低,说明溶液中的 H<sup>+</sup> 和酿酒酵母菌在溶液中释放的磷参与了酿酒酵母菌去除铀的过程。因此,推测溶液中酿酒酵母菌去除 U(VI)

的化学作用方程可能为

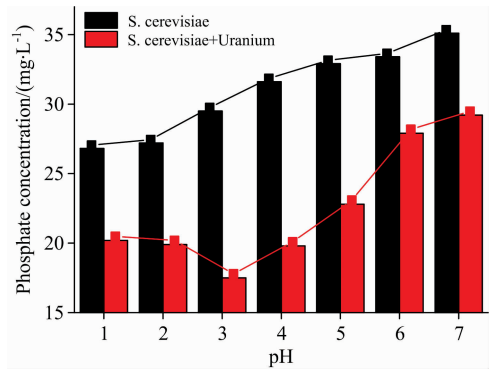


图 2 不同 pH 值下酿酒酵母菌与 U(VI) 作用后溶液中磷含量的变化

Fig. 2 The changes of phosphorus content after biosorption under different pH

### 2.2 吸附动力学分析

图 3 考察了酿酒酵母菌在 0~180 min 内对 U(VI) 的去除情况。结果表明,酿酒酵母菌对 U(VI) 的去除过程包括快速去除(0~5 min)和慢速去除(5~180 min)两个阶段。当 t=5 min 时,酿酒酵母菌对 U(VI) 的去除率和吸附量分别为

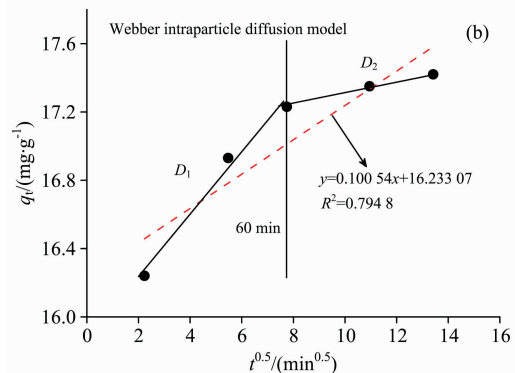
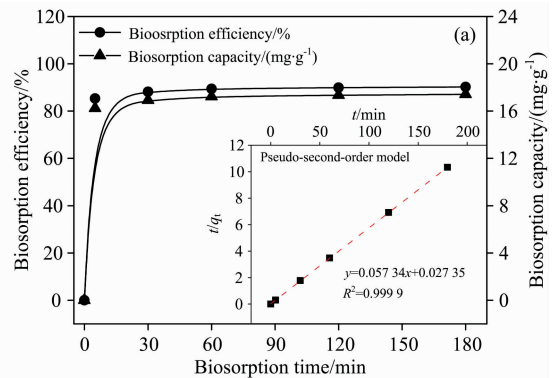


图 3 (a) 作用时间对酿酒酵母菌吸附 U(VI) 的影响和准二级动力学模型; (b) Webber 内扩散模型

Fig. 3 (a) Effect of reaction time on biosorption of uranium by *S. cerevisiae* and the pseudo-second-order kinetic model, (b) Webber intraparticle diffusion model ( $c_0 = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 3.0$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $M = 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

85.3%和  $16.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 吸附量已达整个平衡吸附总量的 93%左右。结合前文分析推测快速去除过程应该是静电引力起主导作用。 $5 \text{ min} \leq t \leq 60 \text{ min}$ , 酿酒酵母菌对 U(VI) 的去除增长 4%左右;  $t$  在  $60 \sim 180 \text{ min}$  时, 酿酒酵母菌对 U(VI) 的去除仅增长 1%左右。

为了探讨吸附过程中 U(VI) 在酿酒酵母菌上的吸附速率和机理, 我们采用准二级动力学方程和 Webber 内扩散模型来拟合上述实验数据。由图 3(a)可知, 准二级动力学模型拟合方程为  $y = 0.02735 + 0.05734x$ ,  $R^2 = 0.9999$ 。计算获得的平衡吸附量  $q_{e, \text{cal}} = 17.44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  与实验得到的  $q_{e, \text{exp}} = 17.42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  相接近, 说明准二级动力学吸附模型适合描述酿酒酵母菌对 U(VI) 的吸附过程, 揭示化学吸附是此过程的控速步骤。以  $q_t$  对  $t^{0.5}$  作图, 得到 Webber 内扩散模型拟合图。由图 3(b)可知 Webber 内扩散模型拟合的相关系数较低, 且拟合线不过原点, 说明吸附受多个过程的影响。将实验数据分段拟合后可看出此吸附过程分为两部分,  $t \leq 60 \text{ min}$  是膜扩散部分( $D_1$  段), 即 U(VI) 在菌体细胞表面的快速吸附阶段;  $t > 60 \text{ min}$  后则是吸附剂内扩散部分( $D_2$  段), 即细胞内扩散速率控制的过程。

综上可知, 酿酒酵母菌对 U(VI) 的吸附存在物理和化学吸附行为, 且限速步骤可能是膜扩散和细胞内扩散共同作用的结果。

### 2.3 吸附热力学分析

反应温度对酿酒酵母菌吸附 U(VI) 的影响见图 4。选取 288, 298 和 308 K 三个温度点进行了实验, 结果表明反应温度对酿酒酵母菌吸附 U(VI) 基本没有影响。对不同反应温度下的实验数据进行吸附反应热力学参数计算(表 2), 可以看出: 在 288, 298 和 308 K 时, 吸附反应的吉布斯自由能  $\Delta G^0 < 0$ , 说明酿酒酵母菌对 U(VI) 的吸附可以自发进行, 且温度越高, 自发进行的程度增大。反应的熵值  $\Delta S^0 > 0$ , 说明溶液中 U(VI) 与酿酒酵母菌具有较高的亲和力, 系统混乱度增加。反应的焓值  $\Delta H^0 > 0$ , 说明此吸附为吸热反应且存在化学吸附<sup>[10]</sup>。

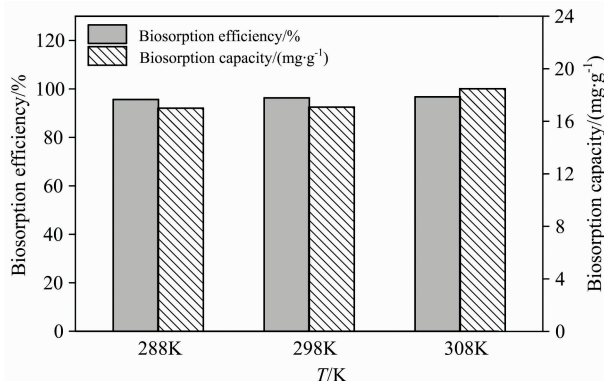


图 4 反应温度对酿酒酵母菌吸附 U(VI) 的影响 ( $c_0 = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 3.0$ ,  $t = 60 \text{ min}$ ,  $M = 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Fig. 4 Effect of temperature on the biosorption of U(VI) by *S. cerevisiae*

表 2 酿酒酵母菌吸附 U(VI) 的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters for the biosorption of uranium by *S. cerevisiae*

T/K	$\Delta G^0 /$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	$\Delta S^0 /$ ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )	$\Delta H^0 /$ ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
288	-10.3		
298	-12.8	239.5	58.6
308	-15.2		

### 2.4 与 U(VI) 作用前后菌体沉淀的 FTIR 分析

酿酒酵母菌与 U(VI) 作用前后的红外光谱如图 5(a)所示, 按文献[11-12]对主要谱带归属分析如下: 酿酒酵母菌与 U(VI) 作用前后吸收峰的变化主要集中在  $3400 \text{ cm}^{-1}$  附近和  $900 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$  范围内。 $3400 \text{ cm}^{-1}$  附近较宽的特征峰是 O—H 伸缩振动和 N—H 伸缩振动耦合峰。与 U(VI) 作用后, 该处峰位从  $3434 \text{ cm}^{-1}$  红移到  $3410 \text{ cm}^{-1}$ , 且峰形更宽, 说明酿酒酵母菌与 U(VI) 作用时, —OH 中的 O 原子因参与了络合铀酰离子而导致其键长改变、吸收峰红移; N—H 键也因与 U(VI) 发生了反应而引起振动频率和吸收强度的改变。

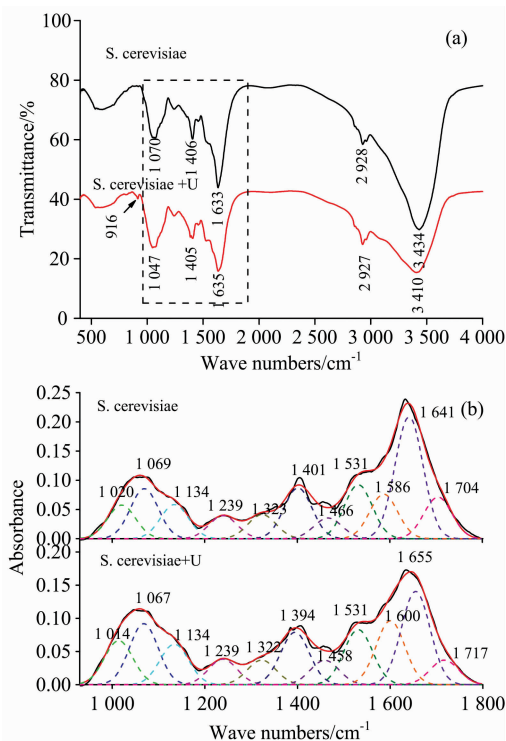


图 5 (a) 酿酒酵母菌与 U(VI) 作用前后的 FTIR 图; (b)  $900 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$  范围的红外分峰拟合图

Fig. 5 (a) FTIR of *S. cerevisiae* before and after reaction with uranium, (b) FTIR-peak-differentiating analysis in  $900 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$  range

由于  $900 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$  范围内特征峰较多, 利用 PeakFit 软件对其进行分峰, 结果见图 5(b)。 $1704$  和  $1401 \text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰归属于 COOH 的对称伸缩振动。与 U(VI) 作用后,

这两处峰分别横移到  $1\ 717$  和  $1\ 394\ \text{cm}^{-1}$  处, 说明羧基上的氧原子与  $\text{U(VI)}$  发生了配位作用, 并且这种配位作用会随  $\text{U(VI)}$  浓度的增大而增强。 $1\ 641$  和  $1\ 586\ \text{cm}^{-1}$  处的特征峰分别归属于蛋白质酰胺 I 带  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动和  $\text{N}-\text{H}$  的剪切振动。 $1\ 531$  和  $1\ 239\ \text{cm}^{-1}$  处的峰则归属于酰胺 II 带, 是由  $\text{N}-\text{H}$  键的面外弯曲振动和  $\text{C}-\text{N}$  键的伸缩振动耦合形成。与  $\text{U(VI)}$  作用后, 酰胺 I 带特征峰出现移动, 推测除了形成  $\text{N}-\text{U}$  键外, 蛋白质肽链上的羰基氧也与铀形成了配位键, 其配位的增加改变了振动频率。 $1\ 069\ \text{cm}^{-1}$  附近为磷酸盐 ( $-\text{PO}_4^{3-}$ ) 基团的伸缩振动峰。与  $\text{U(VI)}$  作用后, 该峰红移到  $1\ 067\ \text{cm}^{-1}$ , 说明磷酸盐基团与  $\text{U(VI)}$  发生了配位作用。 $1\ 466\ \text{cm}^{-1}$  处特征峰属于  $-\text{CH}_3$  反对称弯曲振动,  $1\ 020\ \text{cm}^{-1}$  处特征峰属于多糖骨架的振动吸收带。与  $\text{U(VI)}$  作用后, 这两处峰也出现了红移, 说明菌体细胞上的多糖组分也参与了对  $\text{U(VI)}$  的吸附。此外, 与对照组相比, 酿酒酵母菌与  $\text{U(VI)}$  作用后, 在  $916\ \text{cm}^{-1}$  处出现一个新峰, 查阅文献可

知此峰为  $\text{UO}_2^{2+}$  的反对称伸缩振动峰<sup>[13]</sup>。

综上所述推测, 酿酒酵母菌与  $\text{U(VI)}$  作用过程中, 菌体细胞壁保持完整且是主要的作用场所, 细胞壁上的磷酸基团、氨基、羟基、羧基和羰基等是主要的活性吸附基团。

## 2.5 与 $\text{U(VI)}$ 作用前后菌体的 SEM-EDS 分析

酿酒酵母菌与  $\text{U(VI)}$  作用的 SEM-EDS 分析见图 6。可以看出, 酿酒酵母菌细胞呈椭圆形, 宽度约  $2\sim 4\ \mu\text{m}$ , 长度约  $3\sim 6\ \mu\text{m}$ 。与  $\text{U(VI)}$  作用前, 菌体细胞完整, 表面饱满且光滑。与  $\text{U(VI)}$  作用后, 菌体细胞表面褶皱增多, 部分纳米级鳞片状物质沉积在表面。对这些鳞片状沉积物进行 EDS 分析发现: 与  $\text{U(VI)}$  作用后的样品在结合能  $2.5\sim 4.5\ \text{keV}$  范围内出现 U 的特征峰, 其质量分数为  $2.44\%$ , 原子百分比为  $0.16\%$ 。且作用后的 EDS 图显示菌体表面沉积物中磷的峰强明显增加, 由此推测酿酒酵母菌细胞表面沉积的鳞片状沉淀可能是铀和磷形成的络合物。

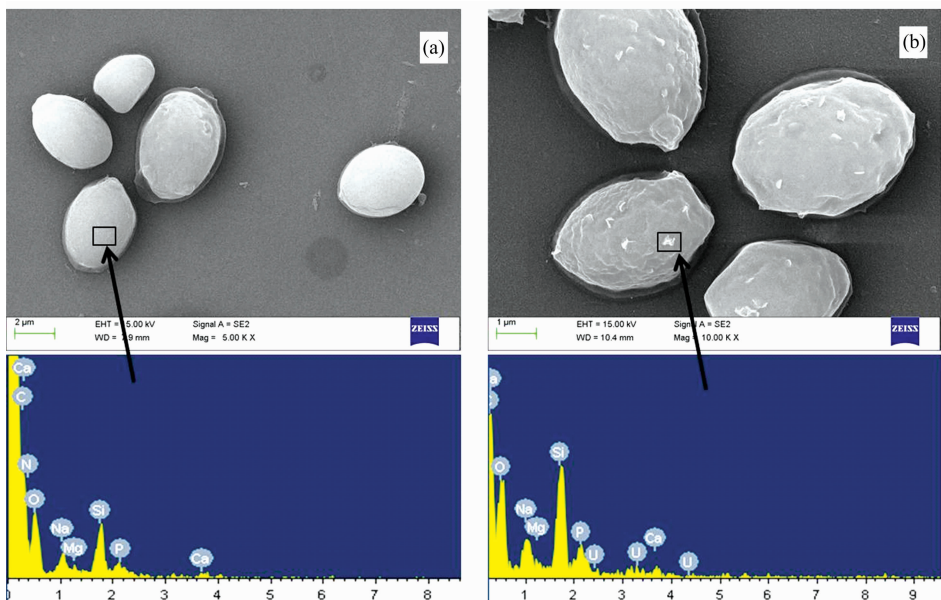


图 6 酿酒酵母菌与  $\text{U(VI)}$  作用前后的 SEM-EDS 图

(a): 吸附前; (b): 吸附后

Fig. 6 SEM-EDS of *S. cerevisiae* before and after reaction with uranium

(a): Control; (b): After reaction

## 2.6 与 $\text{U(VI)}$ 作用前后菌体的 XPS 分析

为了深入分析磷在酿酒酵母菌吸附铀中的作用, 对反应前后的菌体沉淀进行了 XPS 光谱测试, 结果见图 7。与对照组相比, 作用后的全谱[图 7(a)]中出现了  $\text{U}4f$  和  $\text{U}4d$  特征峰, 说明酿酒酵母菌与  $\text{U(VI)}$  作用过程中可以将铀固定在菌体表面。利用 XPSpeak 软件对  $\text{U}4f$  峰分峰拟合[图 7(b)]后发现: 在结合能为  $380.2$ ,  $382.2\ \text{eV}$  和  $391.3$ ,  $393.1\ \text{eV}$  分别出现了  $\text{U}4f_{7/2}$  和  $\text{U}4f_{5/2}$  特征峰。其中,  $382.2$  和  $393.1\ \text{eV}$  对应  $\text{U(VI)}$  的特征峰,  $380.2$  和  $391.3\ \text{eV}$  对应  $\text{U(IV)}$  的特征峰<sup>[14]</sup>。说明菌体在与  $\text{U(VI)}$  作用时胞内释放的具有还原性的物质可将一部分  $\text{U(VI)}$  还原成  $\text{U(IV)}$ 。

观察  $\text{P}(2p)$  的特征峰[图 7(c)]发现: 酿酒酵母菌对照组

在  $133.4\ \text{eV}$  出现  $\text{P}(2p)$  的特征峰。与铀作用后,  $\text{P}(2p)$  特征峰蓝移到  $133.8\ \text{eV}$ , 且对应的峰面积增加。此外, 通过计算 XPS 谱图中  $\text{P}(2p)$  峰面积与  $\text{C}(1s)$  峰面积的比值, 可以间接反映磷的相对含量。因此作者又考察了  $\text{U(VI)}$  不同吸附容量下菌体表面  $\text{Sp}/\text{Sc}$  比值, 结果见图 7(d)。随着  $\text{U(VI)}$  吸附量的增加, 菌体表面  $\text{Sp}/\text{Sc}$  的比值逐渐增大。当吸附量为  $66.9\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  时, 其  $\text{Sp}/\text{Sc}$  比值是对照组的 2.2 倍, 说明菌体表面沉积的物质中含有磷元素, 磷确实参与并促进了酿酒酵母菌对  $\text{U(VI)}$  的吸附。磷的来源可能是酿酒酵母菌胞内磷酸酶释放的无机磷酸盐生成, 然后成为与  $\text{U(VI)}$  结合的沉淀配体, 进而增强了生物体对  $\text{U(VI)}$  的吸附<sup>[15]</sup>。

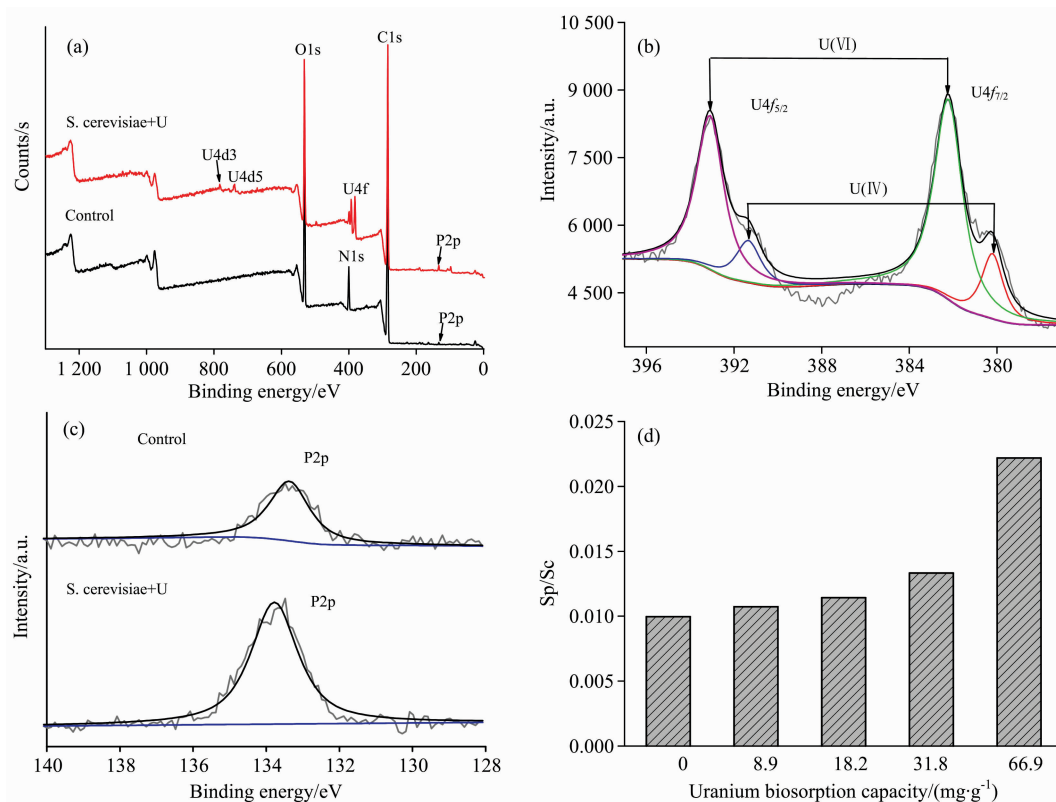


图 7 酿酒酵母菌与 U(VI)作用前后的 XPS 谱图

(a): 全谱; (b): U(4f) 高分辨谱; (c): P(2p) 高分辨谱; (d): P(2p) 峰面积与 C(1s) 峰面积的比值

Fig. 7 X-ray photoelectron binding energy curves of *S. cerevisiae* before and after biosorption

(a): Full spectrum; (b): U(4f) spectra; (c): P(2p) spectra; (d): The ratio of Sp/Sc under different uranium adsorption capacity

## 2.7 与 U(VI)作用前后菌体的 XRD 分析

图 8 为酿酒酵母菌与 U(VI)作用前后的 XRD 图谱。可以看出,与 U(VI)作用前的图谱没有晶体特征峰出现。与 U(VI)作用后,菌体沉淀出现明显的晶体衍射峰。经与 ICDD 数据库比对可知,出现的晶体衍射峰与编号 PDF-86-0687 和 PDF-08-0296 的特征峰基本相吻合,说明 U(VI)与酿酒酵母菌作用后,可在其细胞外表面形成  $H_2(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  和  $CaU(PO_4)_2$  晶体。这一结果与前文 2.1 节中酿酒酵母菌去除 U(VI)的化学作用分析相吻合,同时也说明磷是引起酿酒酵母菌生物矿化铀的主要功能元素。

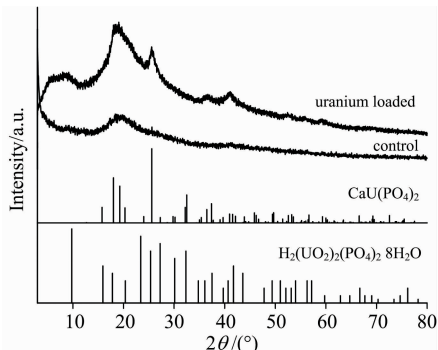


图 8 酿酒酵母菌与 U(VI)作用前后的 XRD 分析

Fig. 8 XRD patterns of *S. cerevisiae* before and after biosorption of uranium

## 3 结 论

(1)通过 ICP-OES, FTIR 和 XPS 等一系列光谱学手段分析发现,酿酒酵母菌可以有效去除水体的 U(VI),且生物体在与 U(VI)作用过程中释放的磷是引起其生物矿化铀的主要功能元素。

(2)在溶液初始 pH 3.0 时,酿酒酵母菌对 U(VI)的去除效果最好。溶液中的  $H^+$  和酿酒酵母菌释放的磷参与了去除 U(VI)的过程。酿酒酵母菌对 U(VI)的吸附不受反应温度的影响,是自发的、吸热行为。

(3)酿酒酵母菌与 U(VI)的作用是一个复杂的相互作用过程。推测酿酒酵母菌生物矿化铀的机理为:最初在静电引力作用下,U(VI)被迅速吸附到菌体细胞表面,随后以配位的形式被菌体表面的磷酸盐、羟基和酰胺等官能团络合;溶液中的  $H^+$  和酿酒酵母菌释放的无机磷酸盐可作为与 U(VI)结合的沉淀配体,继续矿化形成鳞片状的晶体物质  $H_2(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  后被固定在细胞外表面。此外,少部分的 U(VI)被菌体胞内释放的物质还原成 U(IV)形成  $CaU(PO_4)_2$  沉降下来。因此,酿酒酵母菌细胞释放的磷参与并促进了其生物矿化铀。研究微生物与铀相互作用的微观机理对铀污染的微生物原位修复和认识铀的地球化学循环具有重要的意义。

## References

- [ 1 ] Li X L, Ding C C, Liao J L, et al. *Journal of Environmental Science*, 2016, 41: 162.
- [ 2 ] Zou C, Sha Y H, Ding D X, et al. *Chemosphere*, 2019, 224: 316.
- [ 3 ] Macaskie L E, Empson R M, Cheetham A K, et al. *Science*, 1992, 257: 782.
- [ 4 ] Pan X, Chen Z, Chen F, et al. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 297: 313.
- [ 5 ] Morcillo F, González-Muoz Maria T, Reitz T, et al. *PLoS One*, 2014, 9: eq1305.
- [ 6 ] Fowle D A, Fein J B, Martin A M. *Environmental Science & Technology*, 2000, 34: 3737.
- [ 7 ] Wang Y Q, Nie X Q, Cheng W C, et al. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 275: 215.
- [ 8 ] Zhang Z X, Liu H B, Song W C, et al. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2018, 192: 219.
- [ 9 ] Song R, Bai B, Jing D W. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, 90(5): 930.
- [10] He J S, Chen J P. *Bioresource Technology*, 2014, 160: 67.
- [11] Vieira L C, de Araujo L G, de Padua Ferreira R V, et al. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2019, 203: 179.
- [12] Wang T S, Zheng X Y, Wang X Y, et al. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2017, 167: 92.
- [13] Sun Y B, Lu S H, Wang X X, et al. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51: 12274.
- [14] Dickinson M, Scott T B. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 178: 171.
- [15] Nie X Q, Dong F Q, Liu M X, et al. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2017, 17: 6771.

## Release of Phosphorus to Promote Biomineralization of Uranium by *Saccharomyces Cerevisiae* Based on Spectroscopy Analysis

ZHANG Wei<sup>1,2</sup>, DONG Fa-qin<sup>3\*</sup>, HE Xiao-chun<sup>3</sup>, SONG Huai-qing<sup>4</sup>, QIN Yi-lin<sup>5</sup>, XIONG Xin<sup>5</sup>, TANG Zi-han<sup>5</sup>

1. Analytical and Testing Center, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. Research Center of Laser Fusion, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900, China

3. Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle, Ministry of Education, Mianyang 621010, China

4. School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

5. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

**Abstract** Phosphorus, as one of the necessary chemical elements for organisms, plays an important role in the process of uranium mineralization by microorganisms. The adsorption characteristics of U(VI) on *Saccharomyces cerevisiae* were investigated in this study. The relationship among the pH value of the adsorption solution, the concentration of U(VI) and phosphorus released in the process of biosorption were investigated by ICP-OES and ICP-MS. The mechanism of biomineralization of uranium by *S. cerevisiae* is speculated combined with spectroscopy and mesoscopic analysis. The results show that *S. cerevisiae* could effectively remove U(VI) from wastewater, and the phosphorus released by cells in the biosorption effectively promotes the biomineralization of uranium. The removal efficiency of U(VI) by *S. cerevisiae* is best at the initial solution pH is 3.0. The H<sup>+</sup> in solution and phosphorus released by cells were involved in the removal of U(VI) by *S. cerevisiae*. The adsorption process was independent of temperature. Combined with FTIR, SEM, XPS and XRD analysis, it is speculated that the mechanism of biomineralization of uranium by *S. cerevisiae* as follows; firstly, U(VI) was rapidly adsorbed on the cell surface of *S. cerevisiae* by electrostatic attraction, then it was complex with phosphorus groups, hydroxyl groups, amide and other functional groups on the cell surface. Hydrogen ions in the solution and inorganic phosphorus released by *S. cerevisiae* could be combined with uranium as precipitation ligands, and continue to mineralize to form crystal on the extracellular surface of the cell. During this process, a part of hexavalent uranium was reduced to tetravalent uranium and then settled. In conclusion, phosphorus is the main functional element that caused the biomineralization of uranium by *S. cerevisiae*. It is of great significance to study the biomineralization mechanism of uranium in which phosphorus is involved in the bioremediation of uranium pollution and to understand the activation and immobilization of uranium in nature.

**Keywords** *Saccharomyces cerevisiae*; Uranium; Biomineralization; Phosphorus; Spectral analysis

\* Corresponding author

(Received Dec. 12, 2019; accepted May 6, 2020)