

刘 标,尹红梅,陈 薇,等. 高效镉吸附菌株的筛选及生物学特性[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):316-318.

高效镉吸附菌株的筛选及生物学特性

刘 标,尹红梅,陈 薇,王 震,吴迎奔,贺月林

(湖南省微生物研究所,湖南长沙 410009)

摘要:为了获得高效镉吸附微生物,从重金属污染土壤中分离筛选到 4 株耐镉能力较强的细菌菌株 2-1、2-2、4-1、7-1,并对这 4 株菌株的镉吸附能力进行研究。结果表明,菌株 4-1 的吸附效果最好,达到 90.0%,根据形态学观察、生理生化特征鉴定及 16S rDNA 序列分析结果,将其鉴定为金黄杆菌。同时,本研究还分析了通气量及其他常见重金属离子对菌株 4-1 生长的影响,结果显示,500 mL 锥形瓶中装液量为 100~150 mL 时,有利于菌株的生长,培养液中加入 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对菌株生长无明显影响,但加入 100 mg/L Pb^{2+} 会抑制其生长。

关键词:镉;吸附能力;通气量;金黄杆菌

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0316-03

湖南省株洲市清水塘工业区是全国主要的重化工基地之一,自 20 世纪 50 年代以来,工业区的工业企业大多超标排放“三废”(废水、废气、废渣)，“三废”中的重金属对周围土壤、地表水和地下水等环境造成了严重污染。2006 年 1 月 6 日湘江镉污染,造成湖南株洲、湘潭和长沙段湘江水质镉超标,严重威胁人们的身体健康^[1]。镉是一种毒性很强的重金属元素,镉离子对生态环境和人类的毒害引起了世界各国的高度重视,1974 年联合国环境规划署和国际劳动卫生重金属委员会就将其定为重点污染物,美国毒物管理委员会(ATSDR)也将其列为第 6 位危及人类健康的毒害物质^[2],被国际癌症研究机构确定为人类和试验动物的肺癌和前列腺癌的确切致癌物^[3]。随着重金属污染日趋严重,污染治理已成为备受关注的焦点。传统重金属污染土壤的治理方法主要是物理和化学法,如工程修复法(换土法)、活性炭吸附法、离子交换法、化学沉淀法、氧化还原法等。这些方法虽各有特点,但也有一定的局限性,或是不同程度地存在成本高、选择性低、能耗高,并可能产生二次污染等问题^[4-5],现正逐渐被生物吸附法所代替。微生物特别是细菌数量多、比表面积大、代谢活性旺盛,可通过多种方式对重金属进行生物吸附^[6-8]。生物修复是颇具潜力的治理方法,从污染土壤中分离筛选的本土微生物能有效提高生物修复效率。因此,研究本土抗重金属微生物对修复重金属污染具有重要意义。本试验从株洲市清水塘工业污染区采集土壤样品,并从中筛选到 1 株镉吸附能力强的细菌,对其进行了种属鉴定,以期获得修复重金属镉污染的高效菌株,为工业化生产应用提供重要的菌种。

1 材料与方法

收稿日期:2013-07-18

基金项目:湖南省生猪产业技术体系生猪产业规模养殖与环境岗项目。

作者简介:刘 标(1986—),男,湖南浏阳人,硕士,助理研究员,从事环境微生物方面研究。E-mail:liubiao280@126.com。

通信作者:贺月林,硕士,教授级工程师,从事环境微生物研究。E-mail:hyl200866@yeah.net。

1.1 材料

1.1.1 样品来源 从株洲清水塘工业区采集土壤样品。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0~7.2,121 ℃ 高温灭菌 20 min。

PDA 培养基:20% 马铃薯煮汁 100 mL,葡萄糖 2 g,琼脂 1.5~2.0 g,pH 值自然,121 ℃ 高温灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 耐镉微生物的分离及纯化 取 10 g 采集的土样加入到盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,振荡混匀 10 min,采用 10 倍系列梯度稀释法进行稀释,然后取 0.1 mL 10^{-6} 稀释液加入到含 100、200、400、600、800 mg/L 镉的牛肉膏蛋白胨平板(或 PDA 平板)中,涂布均匀,倒置于 30 ℃ 培养箱中。以不加镉的培养基为对照,将各培养基上获得的单菌落利用平板划线法获得纯培养。

1.2.2 耐镉微生物对镉的吸附能力 将所获得的 4 株耐镉菌株菌悬液 1 mL(浓度约为 1 亿 CFU/mL)分别培养于含镉 $[\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}]$ 浓度为 100 mg/L 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,30 ℃ 下振荡培养 72 h,设 3 个重复,以接种等量无菌水的处理为对照。培养后,各菌株菌悬液 5 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用,对照采用同样方法进行处理。利用电感耦合等离子体发射光谱法测定各处理上清液中镉的浓度。各菌株对培养液中镉的吸附率 = $(C_0 - C_t)/C_0 \times 100\%$ 。其中, C_0 为对照上清液中镉的浓度(mg/L); C_t 为吸附后的上清液中镉的浓度(mg/L)。

1.2.3 高效镉吸附菌株 4-1 的菌种鉴定

1.2.3.1 菌株 4-1 的形态特征和生理生化试验 观察菌株 4-1 的菌落形态特征,并取对数生长期的细菌进行简单染色、革兰氏染色,在显微镜下观察细菌的形态特征。参考文献[9],对菌株进行生理生化试验。

1.2.3.2 细菌 16S rDNA 序列鉴定 将细菌培养至对数期,用 DNA 提取试剂盒提取细菌的基因组 DNA,PCR 扩增采用 16S rDNA 通用引物:27F,5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R,5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应条件:95 ℃ 3 min;94 ℃ 1 min,56 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循

环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 终止。将 PCR 产物利用回收试剂盒纯化后交由上海生物工程有限公司测序。测得的序列通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 比对分析,利用 Clustal X 和 Phylip 软件构建 16S rDNA 系统发育树。

1.2.4 通气量对菌株 4-1 生长的影响 在 500 mL 的摇瓶中分别装入 50、100、150、200、250 mL 的牛肉膏蛋白胨培养基,按体积比为 1% 的接种量接入对数生长期的 4-1 菌液。30 ℃ 恒温振荡培养 24 h 后,测定菌液在 600 nm 处的吸光度。

1.2.5 其他重金属离子对菌株 4-1 生长的影响 在牛肉膏蛋白胨培养基中分别加入 Cu²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺,使这些离子的终浓度为 100 mg/L,按体积比为 1% 的接种量接入对数生长期的 4-1 菌液。于 30 ℃ 下恒温振荡培养 24 h,再测定菌液在 600 nm 处的吸光度。

2 结果与分析

2.1 耐镉微生物的分离纯化

在 30 ℃ 恒温条件下培养 2.7 d,在不含镉的平板上共分离纯化得到 22 株优势菌株,其中细菌菌株 21 株,霉菌菌株 1 株。在含镉浓度为 100 mg/L 的平板上有 14 株菌株生长较好;当镉浓度提高到 800 mg/L 时,仍有 4 株菌株可以生长,结果如表 1 所示。

表 1 高耐镉微生物在不同浓度含镉培养基中生长情况

菌株	微生物在不同镉浓度下的生长情况				
	100 mg/L	200 mg/L	400 mg/L	600 mg/L	800 mg/L
2-1	++	++	++	++	++
2-2	++	++	++	++	++
4-1	++	++	++	++	+
7-1	++	++	++	++	+

注:“++”表示生长较好,“+”表示可以生长。

2.2 高耐镉菌株对镉的吸附作用

经过 3 d 振荡培养后,各菌株对镉的吸附率如图 1 所示。由图 1 可知,4 个菌株对液体中的 Cd²⁺ 均有吸附作用,但吸附能力具有显著差异,其中菌株 4-1 对镉的吸附率达到 90.0%。说明耐镉能力相对较弱的菌株却表现出较强的镉吸附能力。

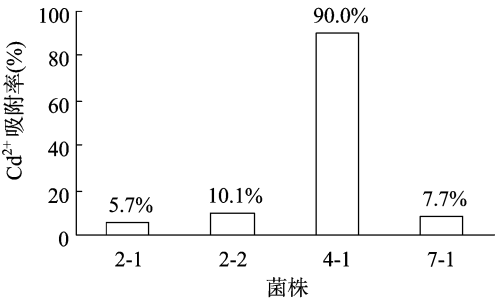


图1 不同菌株对培养液中Cd²⁺ 的吸附能力

2.3 菌株 4-1 的菌种鉴定

2.3.1 形态学及生理生化鉴定结果 在牛肉膏蛋白胨平板上培养 3 d,菌株 4-1 菌落及菌体的显微形态如图 2 所示。菌落为圆形边缘规则整齐,表面光滑湿润,不产生色素;菌体为杆状,不产生芽孢,革兰氏染色阴性。菌株的生理生化鉴定结果如表 2 所示。

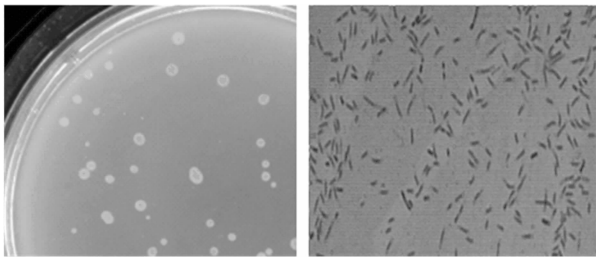


图2 菌株 4-1 菌落及菌体形态特征

表 2 菌株 4-1 的生理生化特征

试验名称	试验结果
淀粉水解试验	-
过氧化氢酶试验	+
明胶水解试验	+
MR 试验	-
VP 试验	-
木糖发酵试验	-
蔗糖发酵试验	-
乳糖发酵试验	-

注:“+”表示反应呈阳性;“-”表示反应呈阴性。

2.3.2 菌株 4-1 系统发育分析 利用 16S rDNA 通用引物扩增菌株 4-1 的 16S rDNA,琼脂糖凝胶电泳结果显示片段大小约为 1 500 bp(图 3)。将 PCR 产物纯化回收,测序结果显示,片段长为 1 424 bp,将获得的序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,结果表明该菌与金黄杆菌属 (Chryseobacterium sp.) 同源性最高,达 98%。将获得的序列与 Genbank 中已报道的 16S rDNA 序列用 ClustalX 和 Phylip 软件进行比对分析并构建系统发育树,结合形态和生理生化特征将该菌鉴定为金黄杆菌,其系统发育树如图 4 所示。

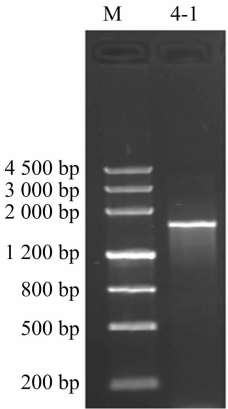


图3 菌株 4-1 的 16S rDNA 电泳结果

2.4 通气量对菌株 4-1 生长的影响

好氧微生物生长时需要适量的溶解氧来维持其正常的生长代谢。在摇瓶培养中,用装液量来代表培养液中的溶氧通气量。从表 3 可知,摇瓶中装液量不同,菌液的 D_{600 nm} 有区别,说明溶解氧能够影响菌株的生长。在装液量为 100 mL 时,菌液中生物量达到最大值;装液量增大到 150 mL 时,生物量没有显著变化;继续提高装液量后,生物量显著下降。因此,摇瓶发酵时,500 mL 摇瓶中适宜的装液量是 100~150 mL。

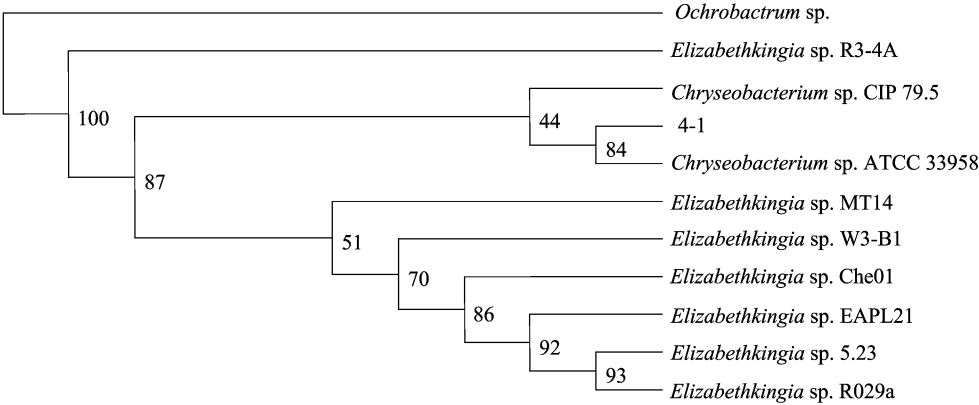


图4 菌株 4-1 的分子进化遗传分析

表 3 通气量对菌株 4-1 生长的影响

装液量 (mL)	$D_{600\text{ nm}}$
50	2.105 ± 0.024a
100	2.258 ± 0.030b
150	2.234 ± 0.017b
200	1.892 ± 0.029a
250	1.796 ± 0.012a

注:同列数据后标有不同小写字母者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 重金属离子对菌株 4-1 生长的影响

在重金属污染环境中,往往含有其他重金属离子,了解其他重金属离子对菌株 4-1 的影响,有助于掌握菌株的生物特性。从图 5 可知,在培养液中加入 100 mg/L Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 对菌株生长没有明显影响,但加入 100 mg/L Pb^{2+} ,菌液的吸光度明显下降,说明 Pb^{2+} 能抑制菌株的生长。

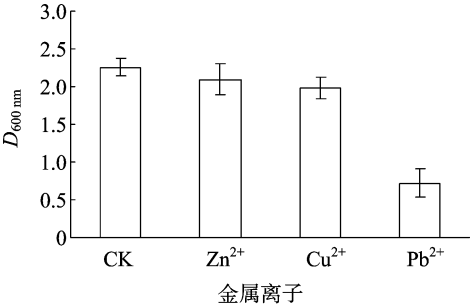


图5 重金属离子对菌株 4-1 生长的影响

3 结论与讨论

本研究从重金属污染环境中分离筛选到 4 株耐镉微生物,镉吸附试验结果表明,菌株 4-1 对镉吸附能力最强,吸附率达到 90.0%。经过形态学、生理生化及 16S rDNA 序列分析,将菌株 4-1 鉴定为金黄杆菌。微生物在生长过程中受多种环境因素如温度、pH 值、溶氧量、营养物质等的影响。本试验研究了通气量及金属离子对菌株 4-1 生长的影响,结果表明菌株 4-1 的生长受培养液中溶氧量的影响,且培养液中加入一定量的 Pb^{2+} 后会明显抑制菌株 4-1 的生长。

4 株耐镉微生物的镉吸附试验结果表明,耐镉性较强的菌株 2-1、2-2 对镉的吸附能力一般,而相对耐镉能力弱的

菌株 4-1 却表现出较强的镉吸附能力,造成这种现象可能与吸附试验中培养液的 pH 值^[8,10]、有效镉浓度^[8]、溶质类型^[11]等因素有关。

利用吸附能力强的微生物修复重金属污染的土壤,可以克服物理化学方法易造成二次污染的缺点,具有良好的应用前景。但在实际应用中,获得的微生物要达到最大程度的生物修复作用,还必须考虑其他因素,如作物类型、土壤理化性质(有机质含量、碱解氮含量、速效氮含量、速效钾含量、pH 值)等。因此,菌株 4-1 对镉的吸附机理及其影响因素等仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 洪克非. 湘江镉污染事件内幕追踪[J]. 湖南安全与防灾,2006,9(2):18-21.

[2] 叶寒青,杨祥良,周井炎,等. 环境污染物镉毒性作用机理研究进展[J]. 广东微量元素科学,2001,8(3):9-12.

[3] 裴秀丛,徐兆发. 镉的慢性毒作用及其远期效应[J]. 环境与职业医学,2003,20(1):58-59,61.

[4] 陈红,叶兆杰,方士,等. 不同状态下 MnO_2 对废水中 As(Ⅲ) 的吸附研究[J]. 中国环境科学,1998,18(2):126-130.

[5] 苏海佳,贺小进,谭天伟. 球形壳聚糖树脂对含重金属离子废水的吸附性能研究[J]. 北京化工大学学报:自然科学版,2003,30(2):19-22.

[6] 周志峰,张进忠,魏世强,等. 1 株芽孢杆菌吸附镉和铜的研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(3):396-401.

[7] Hassan S A, Kim S J, Jung A Y, et al. Biosorptive capacity of Cd(Ⅱ) and Cu(Ⅱ) by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*[J]. J Gen Appl Microbiol,2009,55(1):27-34.

[8] 刘爱民,黄为一. 抗 Cd 细菌 J5 的筛选和抗 Cd^{2+} 特性[J]. 农业环境科学学报,2005,24(增刊):223-227.

[9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:25-105.

[10] López A, Lázaro N, Priego J M, et al. Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39[J]. J Ind Microbiol and Biotechnol,2000,24(2):146-151.

[11] El-Helow E R, Sabry S A, Amer R M. cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations[J]. Biometals, 2000,13(4):273-280.