

肖欢,翟建青,韩燕,等.富集钴元素的菌株筛选、鉴定及富集条件[J].江苏农业科学,2015,43(5):341-343.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.111

富集钴元素的菌株筛选、鉴定及富集条件

肖欢¹,翟建青¹,韩燕¹,曹宏¹,王志东²,高美须²,陈浩³,黄敏³,陈秀兰¹

(1. 江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;

3. 四川省原子能研究院,四川成都 610101)

摘要:从电池厂废水处理反应池的活性污泥中筛选分离出 1 株能富集液体中钴元素的菌株 CWT1,从 26S rDNA 基因序列比对和墨汁染色显微鉴定两方面对菌株进行鉴定,确定菌株 CWT1 为隐球菌属,研究菌株对 Co^{2+} 的富集条件,确定最终较佳条件为:温度 30 ℃,初始 pH 值 6.0,盐浓度 2 g/L。当钴元素浓度为 1 mg/L 时,菌株 CWT1 的富集率可以达到 7.26% ± 0.63%。最终得到的菌株在实验室规模下富集钴元素的条件,可作为应用于实地处理放射性 ^{60}Co 污染土壤修复的理论依据,对今后进一步研究用生物方法处理放射性元素污染土壤修复起积极作用。

关键词:活性污泥;富集;菌株;筛选;鉴定;土壤修复;隐球菌; ^{60}Co

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0341-03

伴随着经济发展的快速增长,我国核工业与核技术在工业、农业、能源、军事、交通、医疗卫生等领域内也得到了广泛的应用,同时放射性核素污染成为当今难以治理的重要环境问题之一。放射性核素泄漏污染环境后,不仅能够通过食物链对人类自身的健康产生严重的危害,也给人们清除这些核素造成困难^[1-3],放射性污染及其治理已成为世界科学研究的一个热点。经过对现有的多种放射性污染修复方法进行比较发现^[4-5],微生物修复方法以其投资少、占用空间小、不易出现化学治理所导致的环境中土壤和水体 pH 值变化和土壤板结的二次污染等优点成为重点研究的方向^[6-7]。微生物细胞壁主要由多糖、几丁质、类脂等组成,上面结合许多表面蛋白质等大分子物质,这些大分子物质与细胞膜结合蛋白含有多种活性基团,其中的羧基、羟基、氨基等是结合重金属离子的重要结合位点,可以与重金属发生共价结合、络合等反应。同时,微生物在代谢过程中也会通过氧化还原反应改变变价金属的化合价,将金属变为自身代谢过程中可以利用的元素,最终影响金属在环境中的迁移与转化^[8]。 ^{60}Co 是核技术在农产品辐照加工和医疗器械辐照灭菌应用中最典型的放射性核素,其半衰期为 5.27 年,对生态环境的危害较大。微生物修复放射性核素 ^{137}Cs ^[9] 和 ^{235}U ^[10] 污染的应用常见报道,但关于微生物修复 ^{60}Co 放射性污染环境的研究并不多,因此本试验采用微生物修复的办法从环境中筛选出能够对钴元素有特异富集的菌株,并研究菌株在不同培养条件下对钴元素的富集情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

电池厂废水处理反应池活性污泥。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂的配制 以超纯水作为溶剂,分别配制硫酸(浓硫酸与水的体积之比为 1:3,下同)、20% 无水乙酸钠溶液、10% 柠檬酸铵溶液,氨水(氯气与水的体积之比为 1:4,下同)。0.05% 4-[(5-氯-吡啶)偶氮]-1,3-二氨基苯(5-CL-PADAB)溶液,即用 95% 乙醇溶液溶解 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

1.2.2 培养基的配制

1.2.2.1 驯化培养基 主要包括牛肉膏 4 g/L、蛋白胨 5 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、 NaH_2PO_4 500 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L、 CaCl_2 20 mg/L, pH 值 7.0。

1.2.2.2 Co^{2+} 培养基 主要包括牛肉膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、 NaCl 2.5 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (根据所需的 Co^{2+} 浓度加入不同质量), pH 值 7.0。

1.2.3 菌株的筛选

1.2.3.1 活性污泥的处理 将从江苏省扬州市润扬电池厂的废水处理池中采集到的活性污泥去除杂质,用玻璃珠充分振摇,使活性污泥中的微生物呈游离状态,将污泥和无菌生理盐水以 50 mg:1 mL 的比例在无菌瓶中充分混合,作为驯化的种子液。

1.2.3.2 菌株的驯化 吸取 5 mL 经过预处理的种子液,加入 50 mL 的驯化培养基中,在 37 ℃ 恒温培养箱中培养,2 d 后更换培养基,吸取 5 mL 第 1 代培养基驯化培养液,加入 50 mL 新鲜的驯化培养基中进行第 2 代驯化,如此驯化 5 代。

1.2.3.3 定向筛选及分离纯化 将驯化得到的菌液加入浓度为 100 mg/L 的 Co^{2+} 培养基中培养 48 h,吸取菌液,稀释涂布于固体 Co^{2+} 培养基上,将得到的单菌落制成菌悬液,分别配制成终浓度为 1、10、100 mg/L 的 Co^{2+} 培养基,构成第 1、第

收稿日期:2014-05-27

基金项目:国家“863”计划(编号:2012AA063503)。

作者简介:肖欢(1985—),男,江苏扬州人,硕士,助理研究员,主要从事农副产品辐照加工研究。Tel:(0514) 87300569;E-mail:zygyzrxh@163.com。

通信作者:陈秀兰,研究员,主要从事稻麦辐射诱变育种研究和科研管理工作。E-mail:yzchxl@163.com。

2、第 3 代选择培养基;吸取菌悬液以 1:100 的体积比加入到第 1 代选择培养基中,重复前面的步骤,经过 3 代定向培养在培养基中挑选菌株,测量菌株的 Co^{2+} 富集率,挑选出其中有较高 Co^{2+} 富集率的菌株。

1.2.4 检测方法 Co^{2+} 的检测方法参照 GB/T 223.21—1994《钢铁及合金化学分析方法:5-Cl-PADAB 分光光度法测定钴量》。

1.2.4.1 Co^{2+} 浓度标准曲线的绘制 (1)配制 5 mg/L Co^{2+} 溶液,作为 Co^{2+} 标准液。(2)显色液的配制。取 5 个 50 mL 的容量瓶,依次加入 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL Co^{2+} 标准液。每个容量瓶内各加入 5 mL 10% 柠檬酸铵溶液,以 200 μL 氨水调节各溶液 pH 值至 7~8,加入 5 mL 20% 无水乙酸钠溶液,再加入 2 mL 5-Cl-PADAB,各容量瓶于沸水浴中保温 5 min 取出,冷却至室温后,各加 20 mL 硫酸,再用超纯水稀释至刻度,混匀。(3)参比液的配制。取 1 个 50 mL 的容量瓶,不加 Co^{2+} 标准液,加入 5 mL 10% 柠檬酸铵溶液,加入 200 μL 氨水,加入 5 mL 20% 无水乙酸钠溶液,加入 20 mL 硫酸,轻轻混匀,再加入 2 mL 5-Cl-PADAB,用超纯水稀释至刻度,混匀。(4)工作曲线的绘制。将部分显色液移入吸收皿中,以参比液为参比,在分光光度计上于波长 570 nm 处测量吸光度。以所得各显色液的吸光度为纵坐标,以相应的钴量为横坐标,绘制工作曲线。

1.2.4.2 Co^{2+} 富集率的测定与计算 将菌株接入未加入 Co^{2+} 的营养培养基中(pH 值调为 6.0),于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、50 r/min 下培养 12 h,取培养液按 1:100 的体积比加入 Co^{2+} 培养基中,再于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、50 r/min 下培养 24 h。

吸取 5 mL 培养液在 11 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液作为样品,配制成显色液,将部分显色液移入吸收皿中,以参比液为参比,在分光光度计上于波长 570 nm 处测量吸光度,按公式(1)计算 Co^{2+} 富集率:

$$\text{Co}^{2+} \text{ 富集率} = \frac{D_0 - D_t}{D_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: D_0 为加入菌株前 Co^{2+} 的吸光度; D_t 为加入菌株 t 时间后 Co^{2+} 的吸光度。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选和鉴定

活性污泥经过预处理后,将菌液驯化,再于 Co^{2+} 培养基中通过 3 代定向筛选得到 1 株可以降低 Co^{2+} 培养基中 Co^{2+} 浓度的菌株,并命名为 CWT1,通过计算得到这株菌株培养 15 h 后的 Co^{2+} 富集率为 $7.26\% \pm 0.63\%$ 。将菌株 CWT1 送到宝生物工程(大连)有限公司测定 26S rDNA ITS 区核苷酸序列,将序列在 GeneBank 数据库中进行比对,发现菌株 CWT1 的近似菌种为 *Cryptococcus* sp. CBS 8355,可以看出菌株 CWT1 属于隐球菌属。

在富集培养基中接种 CWT1 菌株,并于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、50 r/min 下培养 12 h 后吸取 1 mL 菌液,再于 12 000 r/min 下离心 2 min,弃上清液,并用无菌水溶解细菌沉淀,振荡混匀,取 1 滴菌液在洁净载玻片上,再滴加 1 滴墨汁,用吸管混匀,盖上盖玻片,置于显微镜下观察,结果显示有明显的圆形透明菌体,内有 1 个较大的反光颗粒,外部包围 1 圈透明的荚膜,与

有关研究结果^[11]一致。

2.2 CWT1 生长的最佳条件筛选

2.2.1 温度对 CWT1 菌株生长的影响 将 CWT1 菌株加入到驯化培养基中,在不同温度条件下培养 15 h,测定菌体的干质量。从图 1 可以看出,CWT1 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下生长 15 h 后的菌体干质量最大。温度是影响微生物生长最重要的因素之一,随着温度的升高,隐球菌(CWT1)的生长速度也在加快,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 达到最大,温度再升高则会抑制生长,所以隐球菌 CWT1 的最适宜生长温度是 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

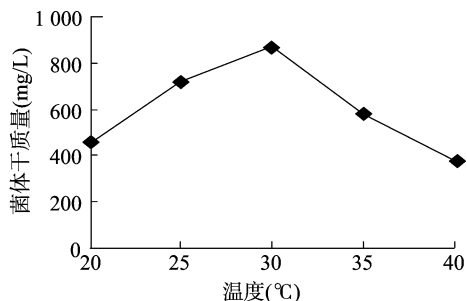


图1 温度对菌株生长的影响

2.2.2 pH 值对 CWT1 菌株生长的影响 为研究 pH 值对菌株生长状态的影响,在图 2 中共设置 6 个 pH 值梯度,将菌株 CWT1 加入到不同 pH 值的驯化培养基中,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 15 h 后,测定各个样品的菌体干质量。从图 2 可以看出,pH 值对隐球菌 CWT1 菌株的影响较大,在 pH 值为 6.0 的条件下生长 15 h 后,菌株干质量最大,高于其他 pH 值条件下的菌体干质量。可见,6.0 是隐球菌 CWT1 菌株最适宜生长的 pH 值,pH 值在 4~7 之间时适宜其生长。

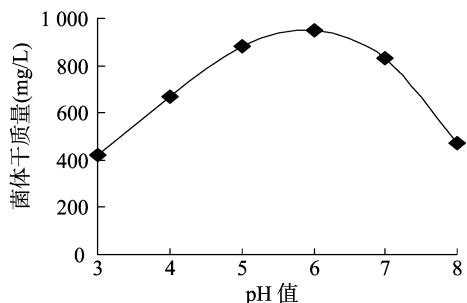


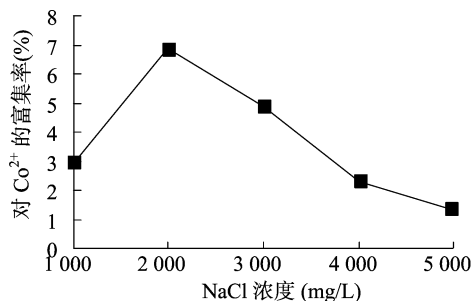
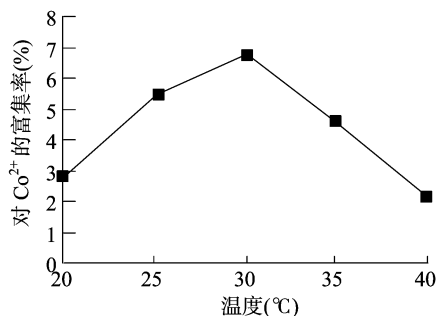
图2 pH 值对菌株生长的影响

2.3 影响菌株 Co^{2+} 富集条件筛选

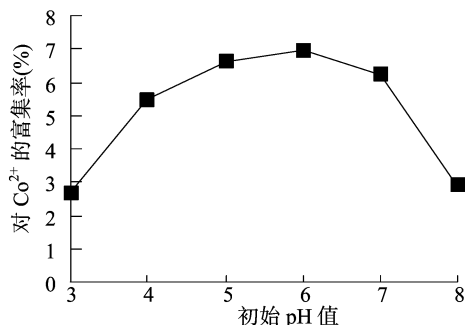
2.3.1 盐浓度 将 CWT1 菌株加入到 Co^{2+} 培养基中,在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 6.0、不同 NaCl 浓度的条件下培养 15 h,测定 Co^{2+} 富集率,其结果见图 3。从图 3 可以看出,盐浓度对隐球菌 CWT1 菌株的生长有很大的影响。当盐浓度为 2 g/L 时, Co^{2+} 富集率达到最高;当盐浓度超过 2 g/L 时, Co^{2+} 富集率逐渐降低。

2.3.2 温度 从图 4 可知,菌株 CWT1 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 15 h 后, Co^{2+} 的富集率比较低;但是当温度达到 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, Co^{2+} 的富集率达到最高,且明显高于其他温度。此外,菌株 CWT1 在 25~30 $^{\circ}\text{C}$ 之间时有较高的 Co^{2+} 富集率,因此,菌株 CWT1 富集 Co^{2+} 的最佳温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.3 初始 pH 值 从图 5 可以看出,当富集培养基的 pH 值为 6 时,菌株 CWT1 培养 15 h 后对 Co^{2+} 的富集率最高,达

图3 盐浓度对 *Cryptococcus* sp. CWT1 富集 Co²⁺ 的影响图4 温度对 *Cryptococcus* sp. CWT1 Co²⁺ 富集的影响

到 6.96%, 高于其他 pH 值条件下的 Co²⁺ 富集率, 这可能是因为菌株 CWT1 在这个 pH 值下最适宜生长, 此外, 偏酸环境下 (pH 值为 4~7) 的 Co²⁺ 富集率比偏碱环境 (pH 值 >7) 高。

图5 初始 pH 值对 *Cryptococcus* sp. CWT1 Co²⁺ 富集的影响

3 结论与讨论

活性污泥经过处理、菌液经过驯化、再通过 3 代定向筛选得到 1 株 Co²⁺ 富集率为 (7.26 ± 0.63)% 的菌株, 并命名为 CWT1。对菌株 CWT1 26S rDNA ITS 区域测试核苷酸序列, 并在 GenBank 数据库中进行比对, 结果发现菌株 CWT1 为隐球菌属。对菌株 CWT1 进行墨汁染色显微鉴定, 结果显示菌株 CWT1 呈现隐球菌属特有显微特性 (圆形透明菌体, 内有 1 个较大的反光颗粒, 外部包围 1 圈透明的荚膜)。分子鉴定与墨汁染色显微鉴定结果均显示, 菌株 CWT1 属于隐球菌属。

隐球菌 CWT1 的干质量随着温度的升高而变大, 且在 30 °C 达到最大, 此后温度再升高则会抑制其生长, 降低干质量。隐球菌 CWT1 的干质量在 pH 值为 6.0 的培养条件下最大, 明显高于 pH 值小于 6 和 pH 值大于 6 培养条件下的菌体

干质量, 可以看出隐球菌 CWT1 的较佳生长条件为: 温度 30 °C, pH 值 6.0。

当盐浓度在 1~5 g/L 之间时, 菌株 CWT1 对 Co²⁺ 富集率呈现先升高后降低的趋势, 当盐浓度为 2 g/L 时, Co²⁺ 富集率达到最高。菌株 CWT1 对 Co²⁺ 富集率随着温度的升高而变大, 在 25~30 °C 之间时有较高的 Co²⁺ 富集率, 温度达到 30 °C 时, Co²⁺ 富集率达到最高, 温度继续升高, 则会抑制菌株 CWT1 对 Co²⁺ 的富集。当初始 pH 值为 6 时, 菌株 CWT1 对 Co²⁺ 富集率最高, 达到 6.96%, 高于其他初始 pH 值条件下的 Co²⁺ 富集率, 菌株在偏酸 (初始 pH 值为 4~7) 环境下的 Co²⁺ 富集率比偏碱环境 (初始 pH 值 >7) 更高。综合不同盐浓度、温度及初始 pH 值培养条件下菌株 CWT1 对 Co²⁺ 富集率的影响可以看出, 菌株 CWT1 在盐浓度为 2 g/L、温度为 30 °C、初始 pH 值为 6 的条件下最适合菌株 CWT1 对 Co²⁺ 富集。

微生物对重金属有多种富集作用, 主要包括胞外沉积、胞内富集、胞外络合和静电吸引等。菌株 CWT1 在对 Co²⁺ 进行富集的过程中可能存在以上 1 种作用方式, 也有可能是几种作用机理同时作用的结果。试验中得到的菌株对 Co²⁺ 富集的条件可以作为进一步研究菌株 CWT1 对 Co²⁺ 富集机理的数据参考, 也可以对微生物实地处理放射性 ⁶⁰Co 污染土壤修复提供理论依据。

参考文献:

- [1] 石晓亮, 钱公望. 放射性污染的危害及防护措施[J]. 工业安全与环保, 2004, 30(1): 6-9.
- [2] 胡遵素. 切尔诺贝利事故及其影响与教训[J]. 辐射防护, 1994, 14(5): 321-335.
- [3] 李冰, 陈莹莹, 余少青, 等. 福岛第一核电站事故后放射性废水的泄漏/排放及辐射影响评估[J]. 辐射防护, 2012, 32(6): 336-347.
- [4] 黄剑文, 杨力强, 张冬利. 国内核污染清洗技术进展[J]. 广州化工, 2010, 38(10): 63-65.
- [5] 陈思, 安莲英. 土壤放射性污染主要来源及修复方法研究进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(1): 174-177.
- [6] 孙赛玉, 周青. 土壤放射性污染的生态效应及生物修复[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(2): 523-528.
- [7] 陈玉娟, 符海文, 温琰茂. 淋洗法去除土壤重金属研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2001, 40(增刊): 111-113.
- [8] 李琼芳, 刘明学, 康晋梅, 等. 微生物与放射性核素相互作用的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(10): 67-70.
- [9] Russell R A, Holden P J, Payne T E, et al. The effect of sulfate-reducing bacteria on adsorption of Cs-137 by soils from arid and tropical regions[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2004, 74(1/2/3): 151-158.
- [10] Bayramoglu G, Celik G, Arica M Y. Studies on accumulation of uranium by fungus *Lentinus sajor-caju* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 136(2): 345-353.
- [11] 葛国兴, 冯一, 王灿蔚. 21 例 CNM 脑脊液新生隐球菌的实验检测分析[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(11): 181-183.