

伏媛,李迅,余雪梅,等.耐钒微生物的分离鉴定及其去钒能力分析[J].江苏农业科学,2020,48(10):287-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.10.053

耐钒微生物的分离鉴定及其去钒能力分析

伏媛,李迅,余雪梅,王洪婷,贺敏捷,张杰,彭书明

(成都理工大学环境学院/国家环境保护水土污染协同控制与联合修复重点实验室,四川成都 610059)

摘要:随着经济的发展,重金属污染越来越严重。微生物修复技术作为一种新型的修复方法,越来越受到世界各国的重视,因此寻找可降解重金属的微生物至关重要。从四川省攀枝花尾矿堆淤泥浸提液和水样中筛选获得 2 株耐钒菌株,分别命名为 PFWT01 和 PFYN01。通过菌落形态观察以及 16S rDNA 分子鉴定表明,菌株 PFWT01 为微杆菌 *Exiguobacterium* sp.; 菌株 PFYN01 为芽孢杆菌 *Bacillus* sp.。在 V^{5+} 浓度为 0.1 mg/L 条件下,高耐钒微生物 PFWT01 和 PFYN01 对钒的去除率分别为 84.5% 和 76.9%。试验结果表明,2 株菌株在钒污染土壤的处理中具有良好的应用前景。

关键词:钒污染;耐钒细菌;形态观察;16S rDNA;系统发育树;去除率

中图分类号:S182

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2020)10-0287-06

随着经济的发展,人类活动的日益增强,不可避免地加剧了环境污染^[1]。钒钛磁铁矿是含有铁、钒、钛、铬等多种重金属的共生矿,有很高的综合利用价值。我国 67.56% 的钒资源来自钒钛磁铁矿^[2]。钒的冶炼是环境中金属钒污染的重要来源,它作为人体必需的微量元素,具有多方面的生理作用,然而钒同时具有多方面的毒性和危害性^[3]。据报道,钒的毒性作用与金属钒的价态、溶解度、摄取的途径等有关,价态越高,毒性越大^[4]。除明显的急性中毒外,它还对人体有生殖毒性、胚胎毒性,可能还有致突变、致畸、致癌等毒性^[5-6]。

由于微生物对重金属具有积累和解毒作用,近年来以净化有毒金属污染为目的的生物修复技术兴起^[7]。微生物修复技术因其处理费用低、效率高、对环境影响小等优点,受到广泛的关注^[8-11]。在过去的几十年里,国内外一些研究机构在金属钒的生物效应及其环境地球化学行为等方面开展了大量研究工作,并取得了一系列的成果^[12-13]。这些研究成果是确定钒的环境行为以及客观评价钒的

生物可利用性和毒性不可或缺的基础数据,为人们有效地控制钒污染提供了科学依据。但有关钒污染生物修复方面的报道并不多见。

四川省攀枝花市巴关河矿区堆矿渣区位于攀枝花市西部,该矿区在开采期间,产生大量粉尘、废水和废渣,这些废弃物中含有大量的钒,可通过扬尘、雨水冲刷等途径扩散到周围环境中,致使毗邻的水资源、农田土壤受到严重的重金属污染。为此,本试验从四川省攀枝花市巴关河尾矿堆淤泥浸提液和水样中筛选高耐钒细菌,并结合形态学特征、生理生化以及分子鉴定等方法,对所筛选到的菌株进行初步鉴定,通过钒去除能力试验来研究它们对钒的去除效果,以期对矿区钒污染的生态修复提供菌种储备,为耐钒细菌在金属钒污水处理中的应用提供一定技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集、主要试剂和培养基

以采自攀枝花市巴关河西渣场堆渣区旁的池塘水样和淤泥本试验样品。水样和淤泥样品采集完后立即密封保存,储存于实验室 4℃ 冰箱中。LB 液体(固体)培养基:蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g,加蒸馏水至 1 000 mL,用 NaOH 调节 pH 值至 7.0(配置 LB 固体培养基时再加一定量的琼脂粉),于 121℃ 下高压灭菌 20 min。在无菌条件下向 LB 培养基中加入一定体积偏钒酸铵(NH_4VO_3)母液,配置成含有一定浓度 V^{5+} 的培养基。

收稿日期:2019-05-09

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:3137070605);四川省科技计划(编号:2017SZ0185);科技部国际科技合作计划专项(编号:2013DFA21690)。

作者简介:伏媛(1992—),女,四川成都人,硕士研究生,主要从事矿山环境生态治理研究。E-mail:307593291@qq.com。

通信作者:彭书明,博士,副教授,主要从事水土介质污染恢复与治理、退化生态系统恢复与治理研究。E-mail:pengshuming06@cdut.cn。

1.2 方法

1.2.1 耐钒菌株的筛选 将培养基的含钒浓度分别设置为 5、10、20、30 mmol/L, 分别吸取 2 mL 水样和淤泥上清液, 加入到 50 mL 上述培养基中, 对耐受性菌种进行驯化。将分别混有水样和淤泥的液体培养基置于 30 ℃、120 r/min 恒温摇床上培养 4 d 后, 吸取 0.5 ~ 2.0 mL 培养物在新配制的液体培养基中接种, 于 30 ℃、120 r/min 恒温摇床上继续培养 4 d。在培养箱中培养一段时间后, 观察 LB 固体培养基上菌落出现的形态特征并做好记录, 用接种环挑取单菌落, 以平板划线法接种到新的培养平板中, 置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养。多次重复上述步骤直到获得纯培养物为止。

1.2.2 菌株的理化性质测定 取对数生长期的所筛选到的菌种做革兰氏染色试验, 在生物显微镜下观察细菌形态学特征。理化性质测定的试验方法借鉴《常见细菌系统鉴定手册》^[14]。

1.2.3 耐钒菌株的鉴定 以十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取的细菌基因组 DNA 片段为模板, 选用细菌通用引物进行 PCR 扩增, 其中正向引物为 27F, 反向引物为 1492R, 它们的序列分别为 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R: CGGTTACCTTGTACGACTTC。反应体系: 25 μL 2X Mix (PCR 预混液); 1 μL 27F (正向引物, 10 μmol/L); 1 μL 1492R (反向引物, 10 μmol/L); 2 μL DNA 模板; 加双蒸水 (ddH₂O) 至 50 μL。反应步骤: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 54 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 35 次循环; 72 ℃ 延伸 10 min。将清洁纯化回收后的 PCR 产物送往北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司进行测序。将测得的 16S rDNA 序列结果提交到 GenBank 数据库, 并利用基本局域联配搜寻工具 (Blastn) 将菌种的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中已登录的序列进行同源性比对, 对菌株进行分子鉴定。采用软件 MEGA 7.0 构建 16S rDNA 系统发育树。

1.3 耐钒菌株在不同钒浓度下的生长情况

从 -70 ℃ 冰箱中取出保藏好的菌株将其活化, 将菌株接种于已配置好的灭菌的培养基, 于 30 ℃、120 r/min 恒温摇床上振荡培养 24 h, 作为种子液备用。取一定量的种子液转入盛有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角锥形瓶中, 加入一定量的钒溶液, 使培养基中最终钒浓度为 20 mg/L, 每个处理 3 个重复, 于 30 ℃ 恒温摇床上振荡培养 (每隔 4 h 取

次样) 0、4、8、12、16、…、56、60 h 后取样, 使用紫外分光光度计在波长为 600 nm 处测定吸光值 $D_{600\text{ nm}}$, 并记录。以不加钒为对照。

1.4 攀枝花巴关河西渣场区采样样品钒含量的测定

样品的 pH 值测定: 配制 pH 值分别为 4.00、6.86、9.18 的 3 种不同 pH 值标准缓冲液, 使用 pH 计测量样品的 pH 值。

样品消解: 取水样 2 mL, 加入 6 mL 浓 HNO₃, 10 min 后加入 2 mL 的过氧化氢溶液, 利用高温高压消解泵进行消解, 将消解后的溶液稀释到一定倍数。最后用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 检测样品钒含量。

1.5 耐钒菌株在不同钒浓度下对钒的去除能力

将 90 mL 液体培养基装入 250 mL 培养瓶中, 高温高压灭菌后冷却至不烫手时, 在超净工作台里取经过液体培养基过夜活化的菌液 200 μL 接入到冷却的培养瓶中, 加入 10 mL 已过滤灭菌的偏钒酸铵溶液母液 (钒离子浓度为 1、10、100 mg/L), 使得培养基钒离子最终浓度分别为 0.1、1.0、10.0 mg/L, 这些浓度的设置是根据渣场实地钒含量的大概范围来设定的。2 种菌液各取 2 μL, 依次加入到浓度为 0.1、1.0、10.0 mg/L 的液体培养基中, 每个浓度做 3 个重复, 用等体积液体培养基不接菌的空白样作对照。培养 8 d 后, 吸取 5 mL 菌液于离心管中, 在高速冷冻离心机上 10 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上层清液, 用 HNO₃ 和 H₂O₂ 进行消解, 用 ICP-MS 测定消解液中钒离子含量。按照上述方法进一步检测菌株在不同钒浓度下的去钒率。菌体对钒的去除率 (R) 按如下公式计算:

$$R = (C_0 - C) / C_0 \times 100\%$$

式中: C_0 为空白培养液钒浓度, mg/L; C 为去钒后培养液钒浓度, mg/L。

1.6 数据处理

采用 Excel 2016 处理试验数据并进行误差分析; 采用 Origin 9.0 软件对数据进行拟合。

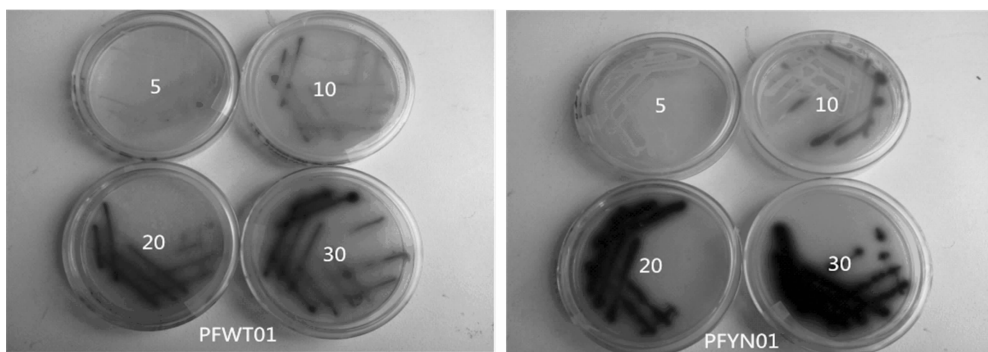
2 结果与分析

2.1 菌落形态观察及生长情况

2.1.1 耐钒菌株的筛选 通过采用含钒 LB 固体和液体培养基进行驯化培养, 从水样和池塘淤泥中各筛选出 1 种对钒具有高耐受性的菌株, 分别标记为 PFWT01 和 PFYN01。它们能在含钒固体培养

基上生长,若继续增加培养基含钒浓度,平板不冷凝,2 种菌株能在较高浓度的钒固体平板上生长,说明 2 种菌株具有高耐钒抗钒性能。培养 2 d 后,2 种菌株在固体培养基上的菌落和菌苔出现不同程度的颜色变化(图 1)。在液体培养基中同样出现变色

的现象(图 2)。菌株 PFYN01 和 PFWT01 具有降低钒的价态从而还原钒的能力,在高浓度钒培养基中,菌株 PFWT01 同菌株 PFYN01 所观察到的现象一致,说明菌株 PFWT01、PFYN01 均具有还原钒的能力。



平板上数字表示钒浓度,单位为 mmol/L

图1 培养 2 d 后,耐钒菌株在不同钒浓度平板上的生长情况

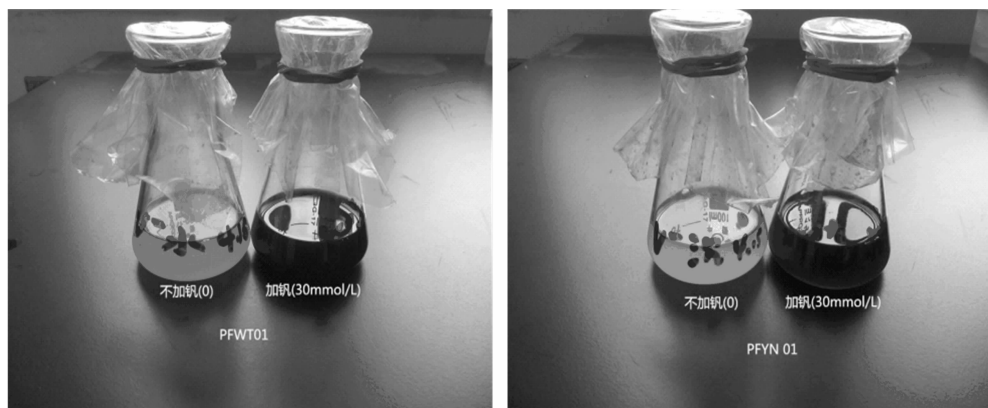


图2 培养 2 d 后,耐钒菌株在不加钒和加钒液体培养基中的生长情况

2.1.2 菌株 PFWT01 的形态学特征 在 LB 培养基上,30 ℃ 下培养 24 h 后,菌株 PFWT01 形成不规则圆形,表面光滑湿润,菌落中央稍有凸起,边缘不整齐,质地软,橙黄色,色素不扩散的菌落(图 3-a)。革兰氏染色后,在显微镜下呈紫色,为革兰氏阳性。在显微镜下观察发现,PFWT01 为短杆菌,两端钝圆(图 3-b)。

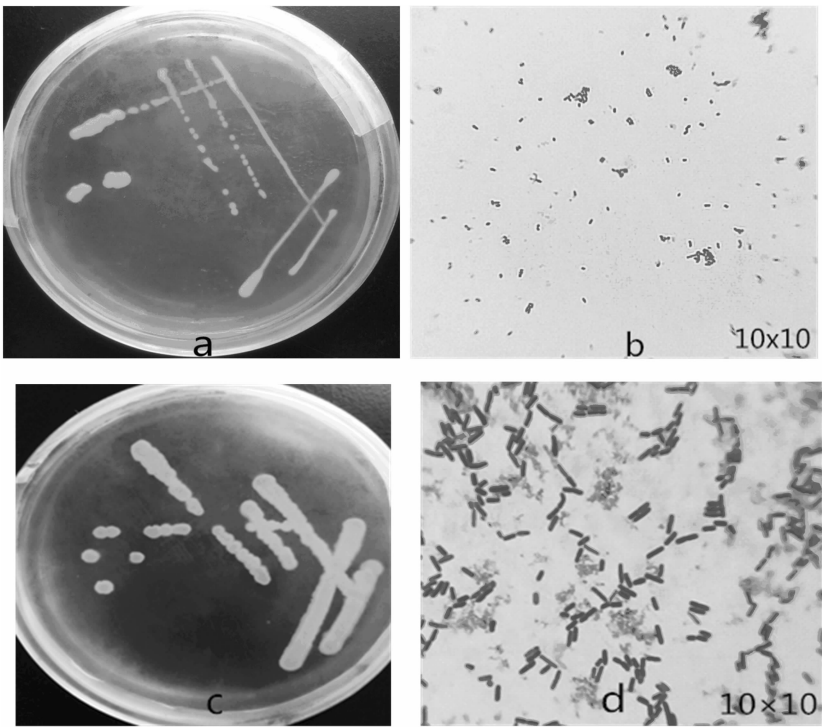
2.1.3 菌株 PFYN01 的形态学特征 在 LB 培养基上,30 ℃ 下培养 24 h 后,菌株 PFYN01 形成近似圆形,表面光滑湿润,边缘不整齐,质地软,乳白色,色素不扩散的菌落(图 3-c)。革兰氏染色后,在显微镜下呈紫色,为革兰氏阳性。在显微镜下观察发现,细胞呈杆状,两端钝圆(图 3-d)。

2.1.4 耐钒菌株的生理生化鉴定 通过对 2 种菌株生理生化试验得出,在淀粉水解试验中,菌株 PFWT01、PFYN01 都能使淀粉水解;在甲基红试验

中,菌株 PFWT01 显阴性,菌株 PFYN01 显阳性;在 H_2S 试验中,菌株 PFWT01 能使培养基产生黑色硫化铅,而菌株 PFYN01 不能;2 种菌株都不能水解明胶和油脂;在糖类发酵试验中,菌株 PFWT01 显阴性,菌株 PFYN01 显阳性(表 1)。

2.1.5 耐钒菌株的分子鉴定 经北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司测序,获得 2 菌株的 16S rDNA 序列。采用序列局部相似性查询系统(BLAST)进行序列比对分析,利用生物分析软件 MEGA 7.0 构建 2 株菌株的系统发育树,结果(图 4、图 5)表明,菌株 PFWT01 与 *Exiguobacterium profundum* strain B09 的亲缘关系较近,同源性的 99%,在进化树中与微小杆菌在同一类群中,它们的亲缘关系最近;菌株 PFYN01 与 *Bacillus* sp. L25 亲缘关系较近,同源性为 99%。

根据以上形态学观察、16S rDNA 序列及系统进



a、b 分别为菌株 PFWT01 的菌落和显微形态；c、d 分别为菌株 PFYN01 的菌落和显微形态
图3 菌株 PFWT01 的菌落和显微形态

表 1 菌株 PFWT01、PFYN01 的生理生化特性

试验	PFWT01	PFYN01
淀粉	+	+
油脂	-	-
甲基红	-	+
H ₂ S	+	-
明胶	-	-
葡萄糖	-	+
蔗糖	-	+

注：“+”为阳性或产酸，“-”为阴性或不产酸。

化发育树分析结果可得出,从攀枝花巴关河西渣场堆渣区旁池塘水样中得到的微生物 PFWT01 可鉴定为微小杆菌 *Exiguobacterium* sp.;从渣场堆渣区旁池塘淤泥中得到的微生物 PFYN01 可鉴定为芽孢杆菌 *Bacillus* sp.。

2.2 耐钒菌株在 20 mg/L 钒浓度下的生长情况

2.2.1 菌株 PFWT01 的生长曲线测定 由图 6 可知,从对数期一直到生长稳定期前期,菌株 PFWT01 在有钒条件下 $D_{600\text{ nm}}$ 大于无钒条件下。菌株在有钒条件下培养 44 h 时 $D_{600\text{ nm}}$ 最大。菌株在无钒条件下培养 48 h 时 $D_{600\text{ nm}}$ 最大。说明一定量的重金属钒对细菌的生长可能有一定的促进作用的;另外可能是

由于 5 价钒转化为 4 价钒,引起了菌液颜色变化,使得在有钒条件下菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 偏大。

2.2.2 菌株 PFYN01 的生长曲线测定 从图 7 可得出,从对数期一直到生长稳定期开始,菌株 PFYN01 在有钒条件下 $D_{600\text{ nm}}$ 值大于无钒条件下。菌株在有钒条件下培养 36 h 时 $D_{600\text{ nm}}$ 最大。菌株在无钒条件下培养 42 h 时 $D_{600\text{ nm}}$ 最大。说明一定量的重金属钒对细菌的生长可能有一定的促进作用的;另外可能是由于 5 价钒转化为 4 价钒,引起了菌液颜色变化,使得在有钒条件下菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 偏大。

2.3 耐钒微生物的钒去除能力

2.3.1 样品钒含量 水样的 pH 值为 8.61,呈碱性,这说明前述培养的菌株适合在碱性条件下生长。如表 2 所示,渣场淤泥处的钒浓度为 0.499 mg/L,渣场边的池塘水钒浓度为 0.106 mg/L。

2.3.2 耐钒菌株在不同钒浓度下对钒的去除能力

如图 8 所示,在培养液的钒浓度为 0.1 mg/L 时,2 种菌株 PFWT01、PFYN01 对钒去除率最高,分别为 84.5%、76.9%;随着培养液中钒浓度的升高,菌株对钒去除率逐渐降低;在培养液的钒浓度为 1.0 mg/L 时,2 菌株对钒的去除率差异不大,分别为 32.8%、31.7%;当培养液中钒离子浓度为 10 mg/L 时,菌株 PFWT01 对钒的去除率要比 PFYN01 低,菌

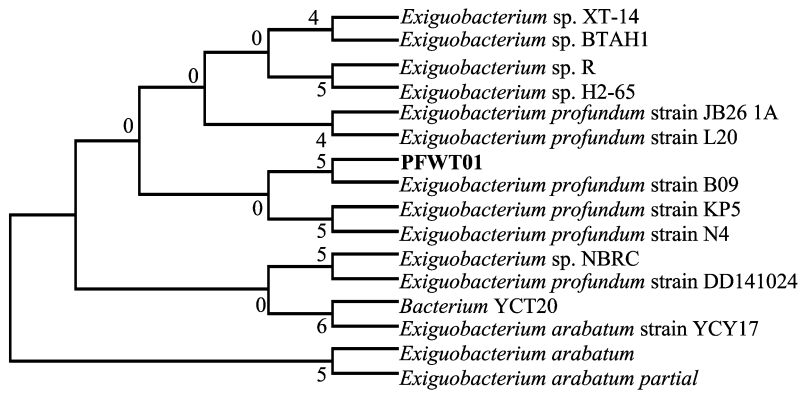


图4 菌株 PFWT01 的系统发育树

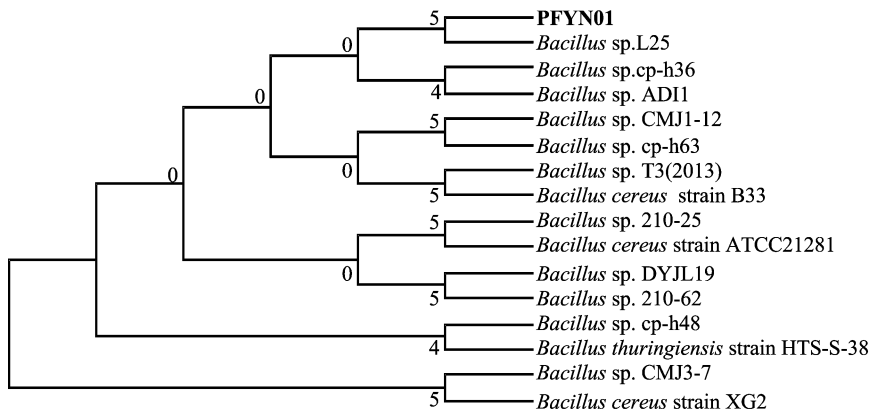


图5 菌株 PFYN01 的系统发育树

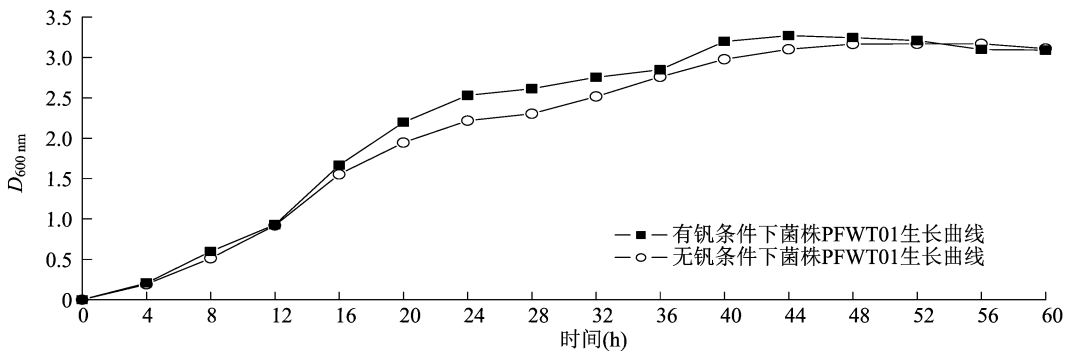


图6 20 mg/L 钕浓度条件下 PFWT01 的生长曲线

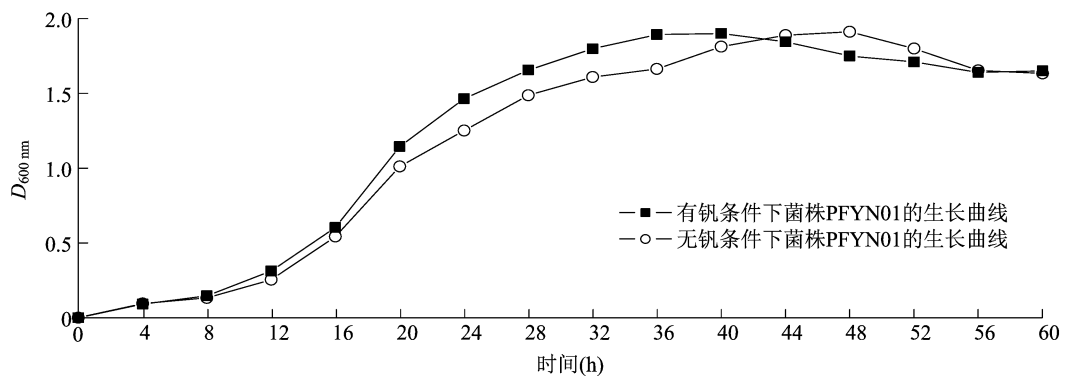


图7 20 mg/L 钕浓度条件下 PFYN01 的生长曲线

表 2 样品中的钒浓度

采样处	钒浓度 (mg/L)
渣场淤泥	0.499
池塘水样	0.106

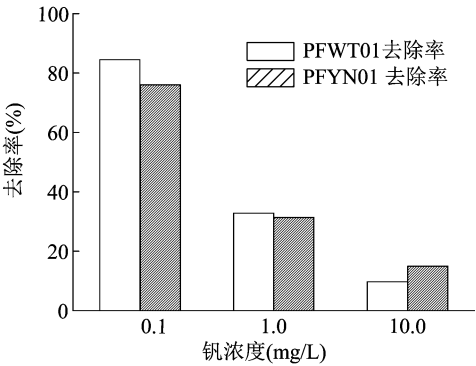


图8 耐钒菌株对不同浓度 V⁵⁺ 的去除率

株 PFWT01、PFYN01 对钒的去除率分别为 9.7%、15.0%。

筛选的 2 种菌株通过间接或直接的氧化作用，在厌氧条件下与乳酸盐、甲酸盐和丙酮酸盐等共同作用，将 V⁵⁺ 还原成 V⁴⁺，并最终形成含 V⁴⁺ 的固体沉淀，这与 Carpentier 等的研究结果^[15]一致。

3 讨论与结论

本试验从污染水样和淤泥中筛选出对钒具有较高抗性的菌株 PFWT01 和菌株 PFYN01，分别对其进行了形态观察、16S rDNA 测序及系统进化树分析，确定了菌株 PFWT01 为微小杆菌，菌株 PFYN01 为芽孢杆菌。微小杆菌在分解有机污染物，如农药、石油和偶氮染料等，转化重金属，根际促生，工业污水处理等领域有很大的应用潜力^[16]。研究发现，芽孢杆菌通过使 Cu、Cd 和 Pb 等以硅酸盐或氢氧化物形式结合在其细胞表面来吸附重金属^[17]。结合这 2 种菌在已报道中的研究成果，它们有望用于对土壤和水体的重金属修复。

2 种菌株在培养基钒含量为 0.1 mg/L 时对钒的去除率最高，达到 80% 左右，随着培养基钒浓度的升高，去除率逐渐下降；在钒浓度为 1.0 mg/L 时，2 菌株对钒的去除率无明显差异，分别为 32.8%、31.7%；在钒离子浓度为 10.0 mg/L 时，菌株 PFWT01、PFYN01 对钒的去除率最低，分别为

9.7%、15.0%。试验结果说明，不同菌株对钒的去除能力有其适应的钒离子浓度范围，筛选的菌株在钒污染土壤处理中具有良好的应用前景。

参考文献：

[1] Haibo C, Ayamba E C, Agyemang A O, et al. Economic development and environmental sustainability the caseof foreign direct investment effect on environmental pollution in China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(7): 7228 – 7242.

[2] 滕彦国, 徐争启, 王金生, 等. 钒的环境生物地球化学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 34 – 36.

[3] 王 夔. 生命科学中的微量元素[M]. 北京: 中国计量出版社, 1996: 45 – 48.

[4] 国法成. 元素医学(二)[J]. 护士进修杂志, 1989(11): 9 – 11.

[5] Harrison J J, Ceri H, Turner R J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms [J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(12): 928 – 938.

[6] 文香兰, 沈桂月, 文永植. 钒毒性的研究进展[J]. 广东微量元素科学, 1997, 4(10): 9 – 11.

[7] 任海彦, 胡 健, 胡毅飞. 重金属污染土壤植物修复研究现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 5 – 11.

[8] 刘玉燕, 刘 敏, 刘浩峰. 城市土壤重金属污染特征分析[J]. 土壤通报, 2006, 37(1): 184 – 188.

[9] 罗 强, 任永波, 郑传刚. 土壤重金属污染及防治措施[J]. 世界科技研究与发展, 2004, 26(2): 42 – 46.

[10] 王 旭, 张 豪, 张松林, 等. 土壤重金属污染及修复技术的研究进展[J]. 甘肃农业, 2011(3): 60 – 62.

[11] 杨金燕, 唐 亚, 李廷强, 等. 我国钒资源现状及土壤中钒的生物效应[J]. 土壤通报, 2010, 41(6): 1511 – 1517.

[12] 杨金燕, 杨 锴, 李廷强, 等. 环境样品中总钒、钒(V)和钒(IV)分离测定方法探讨[J]. 生态环境学报, 2010, 19(3): 518 – 527.

[13] Jianzhou H, Yang J, Tian L. Bioaccessibility of vanadium from soil and mineral measured by *in vitro* model [J]. Agricultural Science and Technology, 2012, 13(10): 2142 – 2146.

[14] 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: 18 – 20.

[15] Carpentier W, Sandra K, de Smet I, et al. Microbial reduction and precipitation of vanadium by shewanella oneidensis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3636 – 3639.

[16] 张 莹, 石 萍, 马 炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 898 – 904.

[17] Urrutia M M, Beveridge T J. Remobilization of heavy metals retained as oxyhydroxides or silicates by *Bacillus subtilis* cells [J]. Applied and Environmental MicroBiology, 1993, 59: 4323 – 4329.