

土壤中耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 微生物的分离及吸附特性的研究

王芳,李章磊,陈婷婷,吴奇,周宜君

(中央民族大学生命与环境科学学院,北京 100081)

摘要:为了研究重金属污染的生物治理措施,采用马铃薯培养基从土壤中分离筛选获得了具有耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 菌株,对该目标菌株进行了形态学观察和生长特性的测定,采用原子吸收法测定了该菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的吸附能力。结果表明:初步确定所获得的目标菌株属于酵母菌类,最适生长 pH 为 8.5,最适生长温度为 28℃。该目标菌株对 Cd^{2+} 的最高耐受浓度为 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 Cu^{2+} 的最高耐受浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的最大吸附率和最佳吸附时间不同。

关键词:微生物; Cd^{2+} ; Cu^{2+} ;分离;吸附;重金属污染

中图分类号:S154

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)03-0048-05

在重金属污染中,镉(Cd)是生物毒性最强、迁移性最大的重金属元素之一。已有研究表明,镉能够引起植物体内氧化酶系统紊乱,削弱植物的光合作用,进而影响植物生长^[1]。镉不是人体的必要元素,其毒性很大,主要积蓄在人体的肾脏,引起泌尿系统的功能变化。铜(Cu)虽然是动植物必需的营养元素,但当铜浓度过量时,将严重影响动植物的生长。随着现代工农业的发展,镉、铜皆已成为我国重金属污染土壤中主要的污染元素^[2]。

近几十年来,由于矿产资源的开发所带来的水体和土壤的重金属污染,影响到人类的健康,受到广泛的关注。要解决土壤和水体的重金属污染问题,一方面应从源头出发——控制污染的发生,另一方面需要寻找治理污染的技术。与物理修复和化学修复等处理重金属污染的方法相比,生物修复方法因其具有处理费用低、对环境影响小和效率高等优点受到人们的青睐。而利用微生物进行重金属污染的修复成为现今研究中的热点

之一^[3-4]。

重金属污染的微生物修复是通过微生物与重金属之间的相互作用减轻重金属对环境的危害。其修复机理主要包括对重金属的生物吸附和生物转化^[4]。由于不同微生物类群对各种重金属表现的吸附和转化特性的差别,进行重金属污染的微生物修复首先需要进行目标微生物的分离和筛选。

该研究拟从土壤中分离对镉和铜具有抗性的菌株,鉴定其菌株特征以及对镉和铜的耐受力和吸附力,旨在为生物修复中微生物菌种的筛选提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

用于筛选目标菌种的土样 2012 年 7 月取自北京市朝阳区高安屯生活垃圾焚烧厂附近,取样点距离烟囱的直线距离约为 150 m,采集深度为地表下 3~5 cm 处。

筛选培养基有牛肉膏蛋白胨培养基,马铃薯培养基,高氏 1 号培养基。 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 和 CuSO_4 为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目标菌株的分离 称取 10 g 土样加入到 90 mL 加有玻璃珠的无菌水中,制备成土样原液。配制高氏 1 号、马铃薯和牛肉膏蛋白胨培养基,制备含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 和 Cu^{2+} 的培养基。取制备的土样原液 0.1 mL,采用涂布法接种于各培养基

收稿日期:2013-10-09

基金项目:北京市基础性学科专业人才培养模式改革资助项目(2011);中央民族大学精品课程建设资助项目(2011);生物技术专业综合建设资助项目(2011);中央民族大学本科生研究训练计划资助项目(URTP2012110032)

第一作者简介:王芳(1991-),女,云南省红河哈尼族彝族自治州人,在读学士,从事环境微生物资源开发研究。E-mail:wf396756596@163.com。

通讯作者:周宜君(1964-),女,博士,教授,从事生物资源开发教学与科研工作。E-mail:zhouyijun@muc.edu.cn。

内,37℃倒置培养。对于培养基上生长的菌落,通过不断提高培养基中 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 含量以驯化筛选出耐重金属的菌株。将筛选得到的菌株在含重金属离子的平板上划线分离纯化,观察菌落的特点,并在光学显微镜下观察目标菌株的形态。

1.2.2 目标菌株的生长特性 活化目标菌株,配制菌悬液浓度为 10⁷ cfu·L⁻¹,取 0.1 mL 分别加入不同 pH(5.00、5.50、6.00、6.50、7.00、7.50、8.00、8.50 和 9.00)的马铃薯液体培养基中,28℃培养24 h后,用分光光度计测定培养液的 OD₆₀₀ 值,以获得菌株生长的最适 pH。

在目标菌株生长的最适 pH 条件下,取 0.1 mL目标菌株的菌悬液加入马铃薯液体培养基中,分别在 4、20、24、27、28、29、33 和 38℃下培养 24 h,测定培养液的 OD₆₀₀ 值,以获得菌株的最适生长温度。

取 0.1 mL 目标菌株的菌悬液加入马铃薯液体培养基(自然 pH)中,28℃培养,每隔 12 h 测定培养液的 OD₆₀₀ 值,绘制目标菌株的生长曲线。

将目标菌株分别加入含不同浓度重金属离子的马铃薯液体培养基中(自然 pH),初始 Cd²⁺ 浓度分别为:0、2、4、6、8、10、12、14 和16 mmol·L⁻¹,初始 Cu²⁺ 浓度分别为:0、1、2、3、4、5、6、7 和 8 mmol·L⁻¹;并设置未接入目标菌株和无 Cd²⁺ 和

Cu²⁺ 培养基作为对照。28℃培养 60 h,测定培养液的 OD₆₀₀ 值,以获得目标菌株对 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 的最高耐受浓度。

将目标菌株加入到含不同金属离子的液体培养基中,Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 初始浓度分别为 2、1 mmol·L⁻¹。28℃培养,每 12 h 测定一次培养液的 OD₆₀₀ 值,以相应无菌培养基和无重金属离子的培养目标菌株的培养基作为空白对照和试验对照。将培养液 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液采用原子吸收法测定金属离子的浓度,计算吸附率 A,其中 Cd²⁺ 的吸收波长为 228.8 nm,Cu²⁺ 的吸收波长为 324.7 nm。

计算公式:吸附率 A(%)=(Co-Ce)/Co×100,式中,Co、Ce 分别为重金属离子初始和平衡浓度。

2 结果与分析

2.1 土壤中耐重金属微生物的分离

采用 3 种培养基对选取的土壤进行耐 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 菌株的分离筛选。在含 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 的牛肉膏蛋白胨培养基和马铃薯培养基中有菌株生长,但高氏 1 号培养基中没有菌株生长(见表 1)。继续在含有不同浓度 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 的平板上驯化筛选,从中挑取在马铃薯培养基中生长状况良好、个体较大的单菌落作为目标菌株。

表 1 3 种培养基分离土壤中耐 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 菌株的比较

Table 1 Comparison on three types of culture medium for separation of Cd²⁺ and Cu²⁺ tolerant microbe in the soil

培养基 Mediums	培养时间/h Culture time			
	24	48	72	96
牛肉膏蛋白胨培养基 Medium of beef extract peptone agar	—	—	+	+
马铃薯培养基 Medium of potato dextrose agar	—	+	+++	+++
高氏 1 号培养基 Gauze's medium 1	—	—	—	—

注:+++为生长良好;+为微生长;—为不生长。

Note:+++ means grow well;+ means grow a little; — means failure to grow.

将目标菌株接种于含 1 mmol·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 的马铃薯培养基上,28℃培养 24、48、72 h,菌落形态见图 1。从中可以看出,所获得的目标菌株在马铃薯培养基上所形成的菌落大而凸起,表面湿滑、边缘整齐、粘稠、易挑起,菌落质地均

匀。在含 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 的培养基中生长,随着培养时间的延长,其菌落颜色由乳白色变为黄色,且逐渐加深(见图 1-A,B,C)。采用吕氏碱性美蓝染液对该目标菌株染色后,置于普通光学显微镜下观察,细胞为球形或椭圆形(见图 1-D)。根据

其生长状态初步确定该目标菌株属于酵母菌类。

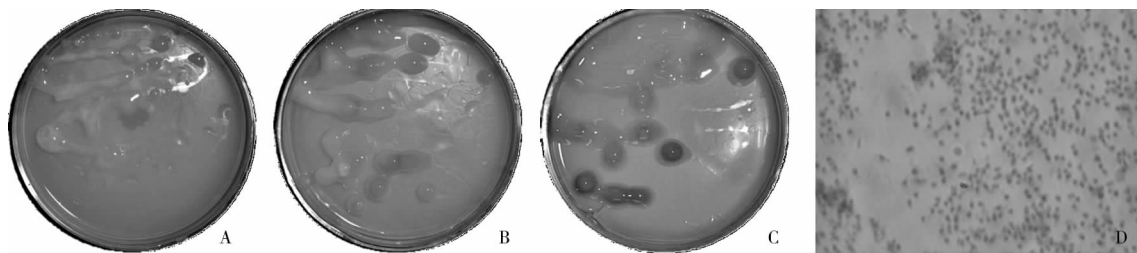


图1 分离的耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 菌株的菌落和菌体形态

A,B,C为菌株在含量分别为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的培养基中培养 24、48 和 72 h 的生长状况;D 为菌体形态($1000\times$)

Fig. 1 The colony morphology and the character of individual form of the screening Cd^{2+} and Cu^{2+} tolerant strains

A,B,C respectively showed the target strains growth under $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} and Cu^{2+} medium for 24, 48 and 72 h; D was the character of individual form($1000\times$)

2.2 耐重金属微生物的生长特性

对菌株生长影响最主要的因素包括温度和 pH, 不同菌株对其生长的温度和 pH 要求不同。分别测定了不同温度下该目标菌株生长的 OD 值, 28°C 为最适生长温度; 分别测定了不同 pH 对菌株生长的影响, 确定 pH 8.5 为最适生长 pH。

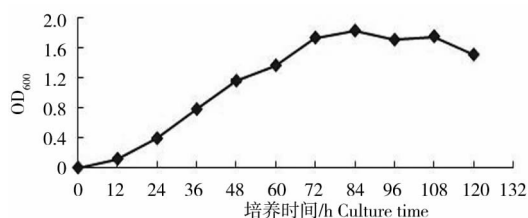


图2 目标菌株的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of the target strain

在最适生长温度(28°C)下采用马铃薯培养基进行目标菌株的培养, 每隔 12 h 测定培养液的 OD_{600} 值, 绘制生长曲线(见图 2)。经过 72 h 培养后, 菌株进入到了稳定期, 在 108 h 以后进入衰亡期。

2.3 耐重金属微生物对重金属离子的吸附特征

2.3.1 耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 菌株对重金属离子的最大耐受能力测定 分别在培养基中增加 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} , 测定 OD_{600} 值, 从图 3 中可以看出, 随着重金属离子浓度的增大, 培养基中目标菌株的生长受到影响, OD_{600} 值呈急剧下降趋势。 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 浓度的增大对菌株生长的抑制极为明显, 当 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 浓度继续升高, 对菌体产生较为严重的毒害, 致使菌株无法继续生长。结果表明, 该目标菌株对 Cd^{2+} 最高耐受浓度为 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 对 Cu^{2+} 的最高耐受浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。

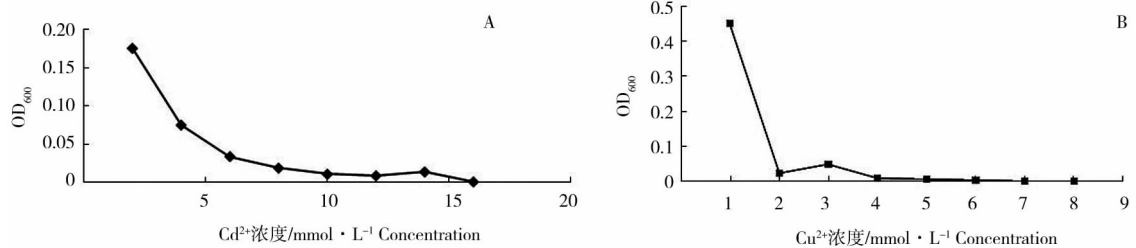


图3 目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 最大耐受浓度

A. 含 Cd^{2+} 培养基; B. 含 Cu^{2+} 的培养基

Fig. 3 The highest concentration of tolerance to Cd^{2+} and Cu^{2+} of the target strain

A. The medium contained Cd^{2+} ; B. The medium contained Cu^{2+}

2.3.2 耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 菌株对重金属离子的吸附能力测定 在含有 Cd^{2+} ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Cu^{2+} ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的液体培养基中加入目标菌株,培养一定时间后,经离心取上清液,采用火焰原子吸收光谱法测定 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的浓度,进而测定所筛选的目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的吸附能

力。结果表明,所筛选的目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 都有明显的吸附作用,其中目标菌株在培养 48 h 时对 Cd^{2+} 的吸收率达到最大,为 16.81% (见图 4-A);目标菌株在培养 60 h 时对 Cu^{2+} 的吸收率达到最大,为 8.31% (见图 4-B)。

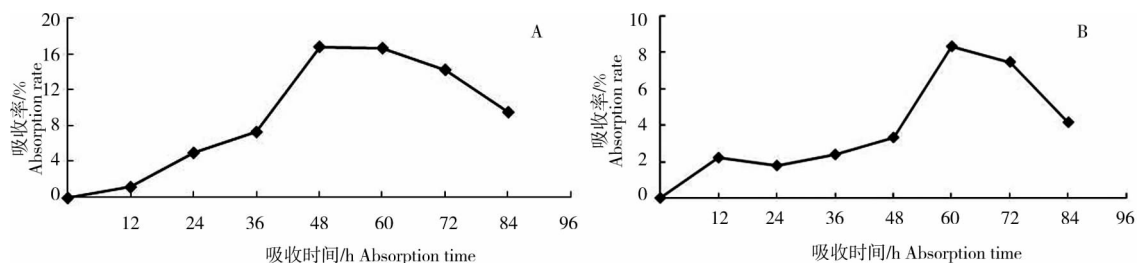


图 4 目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 吸附能力测定

A. 含 Cd^{2+} 培养基; B. 含 Cu^{2+} 的培养基

Fig. 4 The absorption to Cd^{2+} and Cu^{2+} of the target strain

A. The medium contained Cd^{2+} ; B. The medium contained Cu^{2+}

该研究分别测定了目标菌株在含有 Cd^{2+} ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 Cu^{2+} ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 OD_{600} 值,所绘制生长曲线见图 5,可看出在培养初期,菌株处于快速生长期,其代谢生长较快,易于结合溶液中的重金属离子,随着时间的推移,溶液中有部分菌体停止生长甚至死亡,进而吸附重金属能力降低。

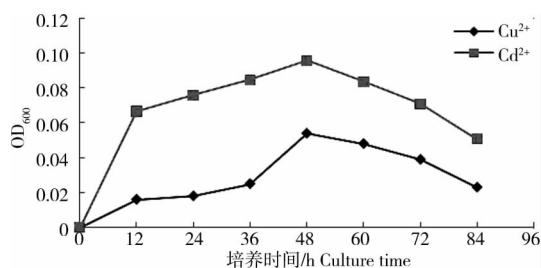


图 5 菌株在含 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 培养基中的生长曲线

Fig. 5 The growth curve of the target strain

in the medium contained Cd^{2+} or Cu^{2+}

3 结论与讨论

近年来,因采矿、废气排放、污水灌溉和使用重金属制品等人类活动,导致环境中的重金属含量超出正常范围,环境质量恶化日趋严重,为此,我国首个“十二五”专项规划——《重金属污染综合防治“十二五”规划》于 2011 年获得国务院正式批复,并将砷、铅、汞、铬和镉等重金属污染作为主要的防控对象。重金属污染的主要危害对象是农

作物和人,其主要原因在于重金属被排入环境后具有永久性,且有明显的累积效应^[4]。

进行重金属污染的生物治理主要利用生物的某些习性来适应、抑制和改良重金属污染,包括动物治理、植物治理和微生物治理。其中利用土壤中的某些微生物对重金属具有吸收、沉淀、氧化和还原等作用,进而降低土壤中重金属的毒性成为人们研究生物治理重金属污染的主要研究课题。

众所周知,土壤是微生物生存的大本营,不同类型的土壤生存的微生物种类不同,而受污染的土壤中可能存在具有特殊抗性的微生物类群。垃圾焚烧厂附近的土壤可能因垃圾焚烧受到污染,因此该研究选择垃圾焚烧厂附近的土壤进行耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的菌株的分离。

曹斌等探究了重金属胁迫对微生物生长的影响,分别以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、啤酒酵母菌和链霉菌作为试验菌种,用于检测对不同浓度重金属离子 (Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+}) 的耐受性,研究结果表明,4 种微生物对重金属离子的敏感性表现为链霉菌 > 枯草芽孢杆菌 > 大肠杆菌 > 啤酒酵母菌^[5],说明酵母菌具有较强的耐受性。该文研究采用了 3 种培养基进行土壤中耐 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的菌株的分离筛选,在含有 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的马铃薯培养基中驯化,对获得的菌株进行了形态学鉴定,初步确定所获得菌株属于酵母菌。该菌

株能够在含有一定浓度的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的培养基中生长,但对 2 种重金属离子的耐受能力不同,对 Cd^{2+} 的耐受能力 ($16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 明显高于对 Cu^{2+} ($4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的耐受能力。

此外,该研究结果表明,所分离的目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 具有一定的吸附能力,随着培养时间的延长,使菌落因吸附重金属离子增加而呈现黄色。微生物对重金属的耐受和吸附的机理非常复杂。一般认为,真菌对重金属的吸附方式主要有 2 种,其一为细胞壁上的活性基团与重金属离子发生定量化合反应而达到吸收的目的;其二是物理吸附或形成无机沉淀而将重金属污染物沉积在自身细胞壁上。研究表明,细胞通过螯合作用吸附重金属和真菌细胞壁结构有关。该研究表明,获得的目标菌株对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 耐受力 and 吸附力表现不同,可能和该菌株细胞壁的多孔结构能与金属离子形成不同的化学配位体有关,表明微生物对重金属元素的吸附具有选择性^[6]。该研究也

说明,作为微生物生存的大本营,土壤中蕴藏着丰富的微生物资源,可以作为筛选目标菌株的对象。

参考文献:

- [1] 冯世静,杨途熙,张艳军,等. 镉胁迫对杨树光合特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 539-547.
- [2] 金勇,付庆灵,郑进,等. 超积累植物修复铜污染土壤的研究现状[J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(4): 93-100.
- [3] 孙嘉龙,李梅,曾德华. 微生物对重金属的吸附、转化作用[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(5): 147-150.
- [4] 陈范燕. 重金属污染的微生物修复技术[J]. 现代农业科技, 2008(24): 297, 299.
- [5] 曹斌,何松杰,夏建新. 重金属污染现状分析及其对策研究[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2009, 18(1): 29-33.
- [6] 李淑英,马玉琪,苏亚丽,等. 重金属胁迫培养对微生物生长的影响[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(2): 90-94.
- [7] 周东琴,朱一民,魏德洲. 沟戈登氏菌吸附 Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} 的重金属抗性研究[J]. 东北大学学报: 自然科学版, 2005(3): 304-306.

Study on Screening Cd^{2+} and Cu^{2+} Tolerant Microbe and its Adsorption Characteristics

WANG Fang, LI Zhang-lei, CHEN Ting-ting, WU Qi, ZHOU Yi-jun

(College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081)

Abstract: In order to study the biological treatment measures of heavy metal pollution, the resistance strain for Cd^{2+} and Cu^{2+} was separated from soil by using potato medium, and its characteristics, including the colony morphology, growth, adsorption to Cd^{2+} , Cu^{2+} , were measured. The results showed that the target strain was identified as the yeast, the optimum growth pH was 8.5, the optimum growth temperature was 28°C . For the aim strain, the highest concentration of tolerance to Cd^{2+} and Cu^{2+} was at about $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The target strain was different between the maximum adsorption rate and adsorption time for Cd^{2+} and Cu^{2+} .

Key words: microbe; Cd^{2+} ; Cu^{2+} ; screening; adsorption; heavy metal pollution

欢迎加盟理事会、协办单位