



一株耐 Cd 菌株的分离、鉴定及基本特性

李倩, 张平*, 廖柏寒, 彭佩钦, 梅金星, 徐继敏

中南林业科技大学环境科学与工程学院, 中南林业科技大学稻米品质安全控制湖南省工程实验室, 湖南 长沙 410004

摘要:【目的】从活性污泥中筛选耐镉(Cd)菌株, 并研究其生长特性及对溶液中 Cd^{2+} 吸附的最佳条件, 以期为重金属 Cd 污染水体的微生物修复提供菌株资源和应用技术参考。【方法】采用平板划线法, 从活性污泥中分离、筛选、驯化出耐 Cd 菌株, 通过 16S rRNA 基因序列分析及溶血试验、蛋白质毒素结晶试验进行初步鉴定, 并采用单因素实验优化菌株的培养条件, 通过正交实验确定菌粉吸附溶液中 Cd^{2+} 的最佳条件, 同时利用 SEM-EDS 及 FTIR 分析探讨菌粉吸附 Cd^{2+} 的机理。【结果】经分离、驯化得到 1 株耐 Cd 细菌菌株, 命名为 H6, 初步鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 最大 Cd^{2+} 耐受浓度为 350 mg/L。菌株 H6 的最佳生长条件为: pH 6.0–8.0, 温度 28 °C, 转速 120–210 r/min, 接种量 1%–5%; 菌株 H6 在生长过程中, 培养液 pH 值先稍微下降然后不断上升。菌粉吸附 Cd^{2+} 的正交优化条件为: 菌粉用量 0.125 g/L, 吸附时间 2 h, pH 5.0, 温度 30 °C, 此条件下吸附量为 205 mg/g。SEM-EDS 分析和红外光谱 (FTIR) 分析表明, 在吸附过程中主要作用基团有羟基、羧基、羰基、酰胺基和烷基, 此外, Ca^{2+} 与 Cd^{2+} 发生了离子交换。【结论】从活性污泥中分离出的菌株 H6, 初步鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 是 1 株具有较强 Cd^{2+} 吸附能力的细菌菌株。

关键词: 镉, 蜡样芽孢杆菌, 筛选与鉴定, 生长条件, 吸附

重金属污染是世界各国尤其是发展中国家所面临的一个严重的环境问题。重金属镉(Cd)作为采矿、金属冶炼、电镀等行业所产生的工业废水中的主要污染物质, 被大量排放于环境中, 导致环境中 Cd 污染严重^[1]。近年来我国水体 Cd 污染

事件频发, 如 2012 年 1 月 15 日发生的龙江河 Cd 污染事件, 造成下游部分河段水体 Cd 浓度超过《地表水环境质量标准》III 类水质标准 80 倍^[2]; 2016 年 4 月, 江西新余仙女湖因为中安公司的生产废水仅用石灰中和处理, 并铺设暗管将废水直

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0800705-02); 农业部与财政部科研专项[农办财函〔2016〕6号]; 湖南省教育厅科研项目(15C1408); 湖南省重点学科建设项目(2006180)

*通信作者。E-mail: zhyp2008@163.com

收稿日期: 2017-12-29; 修回日期: 2018-03-28; 网络出版日期: 2018-04-08

接排入河流,导致废水池中残存废水 Cd 浓度达 5980 mg/L^[3]。以上事件说明当前我国水体 Cd 污染形势不容乐观。在 Cd 暴露条件下,人类的肝脏、肾脏、骨骼均会受到一定程度损害^[4-5]。当前,用于含 Cd 废水的治理方法有化学沉淀法、离子交换法、膜滤法、浮选法、吸附法和生物法等^[6-7]。微生物吸附法^[8]是指利用微生物细胞作为吸附剂,经过一系列生物化学作用吸附溶液中的污染物质。相比于传统物理化学法,微生物吸附法具有来源广、成本低、处理效果好、易于管理与操作、无二次污染等优点,近年来愈来愈受到人们的重视,成为 Cd 污染生物修复研究的热点^[9-12]。

环境中占主导地位的细菌、真菌和微藻类均可被制成各种类型吸附剂用于吸附去除重金属^[13]。Loukidou 等^[14]利用 *Aeromonas caviae* 作为生物吸附剂吸附溶液中的 Cd^{2+} ,其最大吸附量可达 155 mg/g; Ziagova 等^[15]利用菌种 *Pseudomonas* sp. 和 *Staphylococcus xylosus* 对 Cd^{2+} 溶液进行生物吸附,最大吸附量分别可达 278 mg/g 和 250 mg/g。上述研究表明,微生物吸附法能够有效地去除溶液中的 Cd^{2+} ,但菌种不同,其对 Cd^{2+} 的吸附能力不同。另外,Flouty 等^[16]分别研究了藻类 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 的活细胞和死细胞对 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 的吸附能力,结果表明,活细胞和死细胞对 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 的去除率分别为 8%、40%和 28%、55%,死细胞表现出更好的吸附性能; Kaduková 等^[17]的研究结果表明藻类 (*Chlorella kessleri*) 活细胞对铜的结合能力明显低于死细胞。这些说明,微生物的活细胞和死细胞对重金属均有一定的吸附能力。在实际情况下,重金属离子往往会对活细胞产生毒害作用从而影响吸附效果。相比较于活细胞,死细胞虽然少了

生物积累作用,但在吸附过程中,不需要营养物质且不易受外界环境因素影响,吸附性能较稳定,且因热处理破坏了细胞结构的完整性,暴露出更多内部官能团,为吸附提供更多的吸附位点,使其吸附能力得到显著提高^[18-19]。

生物吸附主要是利用细胞表面的一些具有配位、络合能力的基团(如氨基、羧基、羟基等)与重金属离子相结合,该吸附过程主要涉及的机制包括物理吸附、离子交换作用、表面络合与螯合作用、化学沉淀等^[20]。另外,生物吸附材料是否有稳定的吸附效果还与反应条件如 pH、温度、吸附时间等密切相关。其中,pH 是影响生物吸附效果的一个重要因素,pH 的改变不仅会影响重金属溶液的化学性质,还会改变吸附剂表面电荷与电离度等;温度在一定范围内对吸附产生影响相对较小;而吸附过程中另一个重要的影响因素是吸附平衡时间,吸附时间过短可能会导致吸附不完全,吸附时间过长可能会使被吸附的金属离子发生解析,这两者均会导致重金属离子的吸附量下降,因而吸附过程中需综合考虑吸附时间。

基于上述考虑,本文报道从活性污泥中分离得到 1 株耐 Cd 细菌菌株,通过分子生物学及溶血试验和蛋白质毒素结晶试验对该菌株进行了初步鉴定,并研究了该菌株的最佳生长条件及死细胞对溶液中 Cd^{2+} 吸附的优化条件和机理分析,以期能为后续的重金属污染水体的微生物修复提供菌株资源和应用技术参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 分离自长沙洋湖污水处理厂所采集的活性污泥。该污水处理厂于 2012 年 8 月建

成投入运行, 活性污泥中总 Cd、总 Pb 和总 Cr 含量分别为 0.9、70.8、54.0 mg/kg。

1.1.2 培养基: (1) 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 去离子水 1000 mL, pH 7.0–7.2; (2) 固体培养基: 在上述牛肉膏蛋白胨培养基中加入 18 g 琼脂。

1.2 耐 Cd 菌株的筛选及鉴定

1.2.1 纯种分离: 在 Cd^{2+} 含量为 50 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 投加一定量活性污泥, 于温度为 28 °C、转速为 150 r/min 的恒温摇床中连续培养 3 d 后, 取 1 mL 污泥悬液样品进行 10 倍梯度稀释至 10^{-5} 。从稀释倍数为 10^{-4} 与 10^{-5} 样品中吸取 0.1 mL 涂布到 Cd^{2+} 浓度为 50 mg/L 的固体培养基上, 28 °C 恒温培养箱倒置培养 2 d。挑取培养基上不同的典型单个菌落, 再进行平板划线与培养, 观察是否为单一菌落, 如不纯继续进行划线培养, 直至菌落形态单一。

1.2.2 耐 Cd 菌株的驯化: 将经过反复划线、分离、纯化所得到的菌株, 用接种环挑取少量菌于 Cd^{2+} 浓度为 150 mg/L 的牛肉膏蛋白胨固体培养基上划线, 28 °C 下倒置培养 2 d, 观察菌株在培养基上是否生长及生长程度。若生长, 则依次逐步提高 Cd^{2+} 浓度为 250、300、350、400 mg/L, 直至无菌生长并得到菌株的最大 Cd^{2+} 耐受浓度。

1.2.3 耐 Cd 菌株的鉴定: (1) 分子生物学鉴定: 16S rRNA 基因 PCR 扩增测序, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。由泰和永昌(长沙)生物技术有限公司完成菌株 H6 的分子生物学鉴定部分。所得的序列结果在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 获得与该菌的 16S rRNA 序列同源性最高的已知序列, 并从 GenBank 数据库中

调取出相似性较高的相关菌株的基因序列构建系统发育树。

(2) 溶血试验: 将分离菌株接种至胰酪胨大豆羊血琼脂(TBBS)平板上, 30 °C 恒温培养箱中培养 (24±2) h, 观察是否产生溶血现象。

(3) 蛋白质毒素结晶试验: 取经 (30±1) °C 培养 (24±2) h 并于室温放置 3–4 d 的营养琼脂培养物少许于载玻片上, 滴加蒸馏水混匀并涂成薄膜。经自然干燥, 微火固定后, 加甲醇作用 30 s 后倾去, 再通过火焰干燥, 之后于载玻片上滴满 0.5% 碱性复红, 放火焰上加热(微见蒸气, 勿使染液沸腾)持续 1–2 min, 移去火焰, 更换染色液再次加温染色 30 s, 倾去染液用洁净自来水彻底清洗、晾干后镜检。观察有无游离芽孢(浅红色)和染成深红色的菱形、正方形或其他形状的蛋白结晶体。如发现游离芽孢形成不丰富, 应再将培养物置室温 2–3 d 后进行检查。除苏云金芽孢杆菌外其他芽孢杆菌不产生蛋白结晶体。

1.3 菌株 H6 的培养条件优化

将筛选、纯化的菌株 H6 用牛肉膏蛋白胨培养基培养, 主要考察初始 pH 值、培养时间、培养温度、接种量及转速对其生长量的影响。

1.3.1 菌悬液的制备: 将经酒精灯灼烧灭菌的接种环从牛肉膏蛋白胨培养基上挑取已分离、纯化好的纯种菌落, 接种到种子培养基中, 180 r/min、28 °C 条件下培养 18 h, 6000 r/min 条件下离心 10 min, 弃去上清液, 无菌水洗涤菌体, 离心, 再次弃去上清液, 如此重复洗涤 3 次, 收集菌体, 加入适量无菌 0.85% NaCl (W/V) 溶液, 制成菌悬液, 使菌浓度为 7×10^8 cells/mL, 4 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 培养基初始 pH 对分离菌株 H6 生长的影

响: 在 6 组 100 mL 三角瓶中, 分别加入 40 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 各组初始 pH 值分别调节为 4.00、4.25、4.50、4.75、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00, 然后按 5% (*V/V*, 下同) 的接种量接种, 于 28 °C、120 r/min 条件下培养, 测定不同时间下光密度值 OD_{600} 。实验设 3 个重复, 各 pH 条件下设不加菌的培养液作为对照(下同)。

1.3.3 培养时间和培养温度对分离菌株 H6 生长的影响: 在 3 组 100 mL 三角瓶中, 分别加入 40 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 各组初始 pH 值均调节为 7.0, 摇床转速为 120 r/min, 按 5% 的接种量接种, 分别于 20、28、37 °C 条件下培养。分别测定不同温度、不同时间下的光密度值 OD_{600} 、培养液 pH 值。

1.3.4 接种量与转速对 H6 生长的影响: 取 5 组 100 mL 锥形瓶, 分别加入 40 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 各组初始 pH 均调节为 7.0, 培养温度为 28 °C, 分别于 90、120、150、180、210 r/min 条件下培养 60 h, 测定光密度值 OD_{600} 。

实验设计时, 为考虑同一转速、不同接种量的影响, 在上述 5 个转速条件下, 分别设计不同接种量(1%、2%、3%、4%、5%), 培养 60 h, 测定光密度值 OD_{600} 。

1.4 分离菌株 H6 菌粉对 Cd^{2+} 吸附条件的正交优化

1.4.1 分离菌株 H6 菌粉的制备: 将经 1.3.1 离心收集到的菌体, 于 80 °C 下烘干 24 h 后, 在研钵中粉碎, 将粉末于 121 °C 下高压蒸汽灭菌锅中灭菌 20 min, 80 °C 下烘干, 置于干燥器中备用。

1.4.2 菌株 H6 的吸附特性研究: 采用正交实验优化吸附条件, 以确定分离菌株 H6 菌粉对 Cd^{2+} 的最佳吸附条件。选择菌粉用量(g/L)、吸附时间(h)、体系 pH 和温度 4 个因素, 每个因素各设计 3 个水平进行正交实验 $L_9(3^4)$, 具体设计见表 1。

表 1. 正交实验各因素水平表

Table 1. Scope of the factors

Level	Biosorbent dose/(g/L)	<i>t</i> /h	pH	<i>T</i> /°C
1	0.125	1	4.0	20
2	0.250	2	5.0	30
3	0.375	3	6.0	40

实验时, 按表 1 的正交实验条件进行吸附。将吸附后的溶液于 5000 r/min 下离心 10 min, 上清液过滤, 用火焰原子吸收分光光度法测定滤液中 Cd^{2+} 浓度。实验设 3 个重复, 并以不加菌的 Cd^{2+} 溶液作为对照。

吸附量(*q*)按照计算公式(1)计算。

$$q = (C_0 - C_e) \times V / m \quad \text{公式(1)}$$

式中: C_0 、 C_e 分别为 Cd^{2+} 初始浓度、平衡时 Cd^{2+} 浓度(mg/L); q 为吸附容量(mg/g); V 为吸附溶液体积(L); m 为吸附剂质量(g)。

1.5 菌株 H6 对 Cd^{2+} 吸附机理分析

取 H6 菌粉(0.5 g/L), 加入 Cd^{2+} 浓度为 0、50 mg/L 的水溶液中, 于 28 °C、150 r/min 条件下吸附 2 h, 吸附后溶液于 5000 r/min 下离心 10 min, 收集菌粉于 80 °C 下烘干 24 h, 用研钵充分研磨样品, 再将样品进行 SEM-EDS 分析和 FTIR 分析。

2 结果和分析

2.1 耐 Cd 菌株的筛选与鉴定

通过对活性污泥中的微生物进行耐 Cd 筛选, 得到 1 株耐 Cd 细菌菌株, 命名为 H6, 该菌株的最大 Cd^{2+} 耐受浓度为 350 mg/L。菌株 H6 在固体培养基上的菌落颜色为乳白色, 近圆形, 表面湿润, 有光泽, 边缘不整齐, 容易挑起(图 1)。经电泳观察, 分离菌株 H6 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱如图 2 所示; 将菌株 H6 的测序结果在 NCBI 数据库(NCBI 登录号为 MG386505)中与已



图 1. 分离菌株 H6 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上形态

Figure 1. Morphology of strain H6 on the solid culture medium of beef extract.

知核酸序列进行 BLAST 相似性比对, 结果表明, 菌种所测得的 16S rRNA 基因序列与芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列有 99%以上的同源性, 可确定菌属为芽孢杆菌属, 与已知菌种的匹配中, 与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 16S rRNA 序列有 99%以上的同源性。选取同源性相近的菌株, 用软件 MEGA5.05 采用邻接法(Neighbour-Joining)构建菌株 H6 的系统进化发育树, 如图 3。

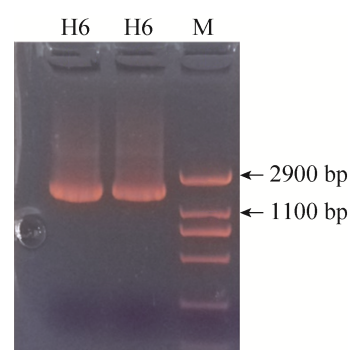


图 2. 分离菌株 H6 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱
Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of strain H6.

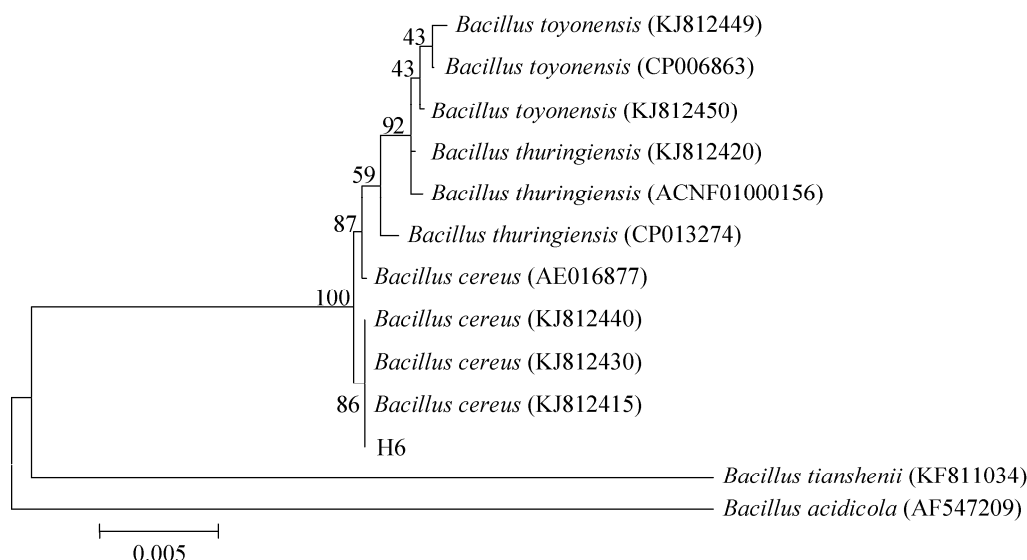


图 3. 分离菌株 H6 系统进化发育树

Figure 3. Phylogenetic tree of strain H6. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap (1000 re-samplings). Bar: 0.5% sequence divergence.

为进一步确定菌株 H6 是蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 还是苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*), 进行了溶血试验和蛋白质毒素结晶试验。图 4 表明, 分离菌株 H6 在 TBBS 培养基上菌落周围呈现明显的溶血现象, 有草绿色溶血环, 为阳性反应; 图 5 表明, 分离菌株 H6 不产生蛋白结晶体, 染色后没有染成深红色的菱形蛋白结晶体出现, 为阴性反应。综合上述分子生物学鉴定结果及溶血试验、蛋白质毒素结晶试验结果, 可将分离的耐 Cd 菌株初步鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。



图 4. 分离菌株 H6 在 TBBS 培养基上的溶血现象
Figure 4. The hemolysis of strain H6 on TBBS medium.

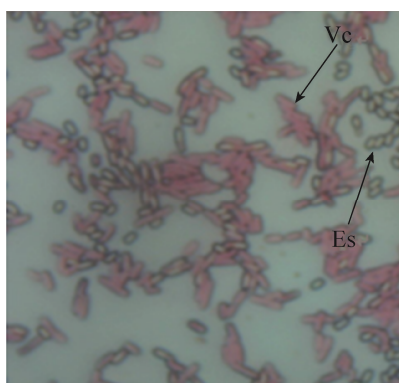


图 5. 分离菌株 H6 的蛋白质毒素结晶染色现象(1000×)
Figure 5. Protein crystallization dying experiment of strain H6(1000×). Vc: Vegetative cell s; Es: Spores.

2.2 菌株 H6 的培养条件优化结果

2.2.1 培养基初始 pH 对菌株生长的影响: 微生物的生命活动、物质代谢与 pH 有着密切关系, 不同初始 pH 对菌株 H6 生长的影响结果如图 6。当初始 pH 为 4.00、4.25、4.50、4.75 时, 菌株 H6 生长明显受到抑制, 基本未生长; 当初始 pH 为 5.0 时, 菌株 H6 在前 18 h 生长缓慢, 18 h 后, 其进入对数生长期; 当初始 pH 为 6.0、7.0、8.0 时, 菌株 H6 在 0–6 h 生长量变化微小, 在 6 h 后进入对数生长期; 当初始 pH 为 9.0 时, 菌株 H6 在 10 h 后进入对数生长期。在初始 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 时, 菌株 H6 的最大比生长速率分别为 0.187、0.134、0.128、0.132、0.171 h⁻¹。综上所述可知, 菌株 H6 在初始 pH 为 5.0–9.0 时均能较好生长, 但不同 pH 条件下其达到对数生长期时间不同。因此, 分离菌株 H6 的最佳生长初始 pH 值为 6.0–8.0。

2.2.2 培养时间和培养温度对菌株生长的影响: 温度是微生物的重要生存因子, 在不同温度条件下, 菌株 H6 的生长曲线如图 7 所示。当温度为 20 °C 时, 菌株对环境适应时间相对较长, 生长缓

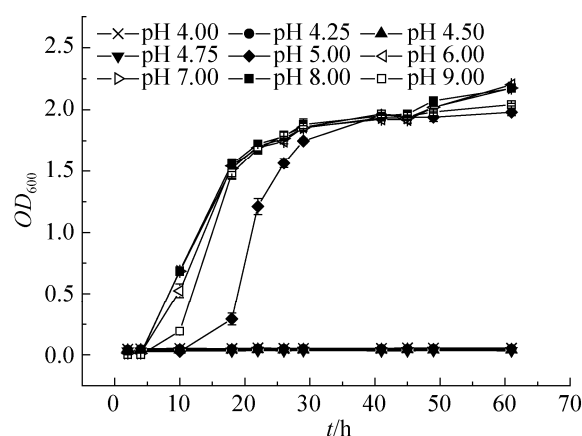


图 6. 培养基初始 pH 对菌株 H6 生长的影响
Figure 6. Effect of initial pH on growth of strain H6. Error bars in figure represent standard deviation.

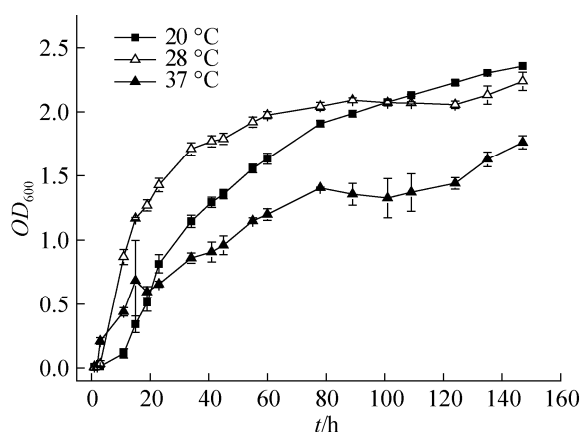


图 7. 各温度条件下菌株 H6 的生长曲线

Figure 7. The growth curve of strain H6 at different temperatures. Error bars in figure represent standard deviation.

慢, 11 h 后才开始进入对数生长期, 但进入对数期后其生长情况较好; 当培养温度为 28 °C 时, 菌株 H6 在 0–3 h 时处于迟缓期, 此阶段为菌株 H6 对环境的适应过程, 3 h 后, 菌株 H6 开始进入对数生长期, 培养至 60 h 左右, 菌株 H6 生长进入稳定期; 当温度为 37 °C 时, 菌株在较短时间内进入对数生长期, 但 23 h 后, 其生长量反而低于 20 °C 和 28 °C 的生长量, 说明温度相对过高, 会抑制菌株的生长与繁殖。由上述分析可知, 温度相对过高会抑制菌株 H6 的生长与繁殖, 温度相对过低, 菌株 H6 在培养初期对环境的适应能力较慢。因此, 在实验设定的温度条件下, 分离菌株 H6 的最适生长温度为 28 °C。

由图 8 可知, 在不同温度条件下, 菌株 H6 在培养过程中, 培养液的 pH 值均是变化的, 均呈现先稍微下降然后不断上升的趋势, 但温度不同, 其 pH 值的变化幅度也不同, 这可能是在不同温度条件下, 菌株 H6 所产生的代谢产物不同所致。在不同温度条件下, 菌株在培养初期, 培养液 pH 值下降, 此时菌株可能处于适应时期, 是一个产酸

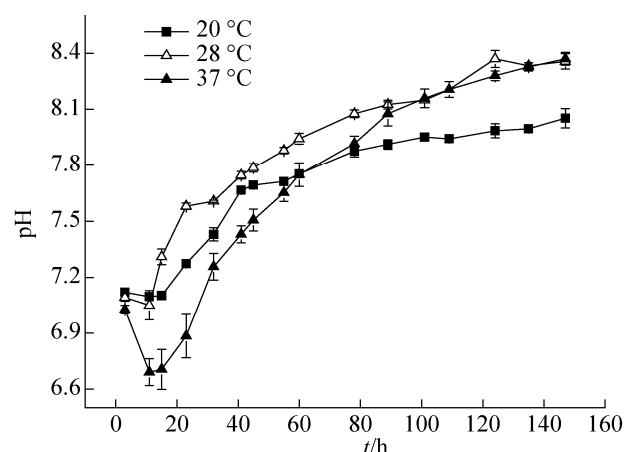


图 8. 各温度条件下菌株 H6 的培养液 pH 值变化

Figure 8. The trend of pH change during the growth of strain H6 at different temperatures. Error bars in figure represent standard deviation.

的过程, 生长量较少; 当培养至一定时期, 菌株进入对数生长期, 生长、代谢速度加快, 随着生长量及代谢产物量的增加, 培养液 pH 也不断上升, 说明菌株在培养过程中产生了碱性代谢产物, 这可能是微生物对培养基中的中性物质蛋白胨和牛肉膏的利用与分解, 发生脱氨基作用所致。唐珂心等^[21]研究也表明, 蜡样芽孢杆菌对蛋白胨的分解利用是培养液 pH 上升的主要原因, 与本研究结果相一致。

2.2.3 接种量与摇床转速对菌株生长的影响: 接种量与摇床转速对菌株 H6 生长的影响如图 9。在摇床转速为 90 r/min 条件下, 不同接种量下 H6 菌株的生长量均明显低于其他转速下的接种量, 在此转速条件下, 1% 的接种量时 OD_{600} 值最大, 这可能是因为菌株为好氧菌, 当接种量为 1% 时, 菌株生长良好, 而当通气量一定, 接种量较多时, 因为通气量的不足, 反而不利于菌株的生长繁殖。但当通气量达到一定程度(摇床转速为 120–210 r/min)时, 随接种量的增加, 菌株生长量变化不明显, 这可能是培养液的营养成分有限所致。

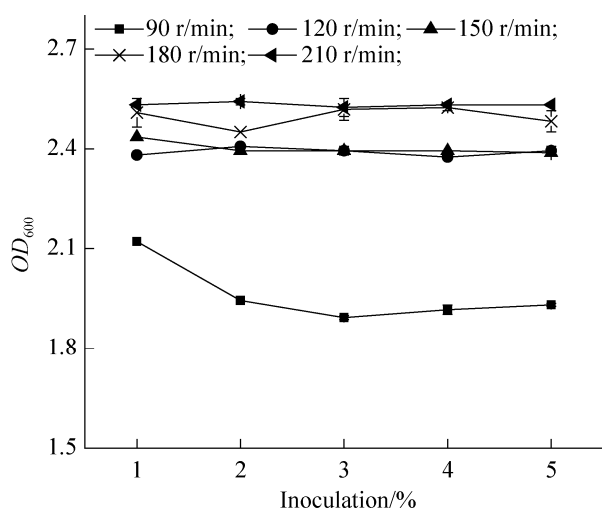


图 9. 摇床转速及接种量对菌株 H6 生长的影响

Figure 9. Effect of speed and inoculation on growth of strain H6. Error bars in figure represent standard deviation.

2.3 分离菌株 H6 菌粉对 Cd^{2+} 吸附条件的正交实验优化结果

正交实验结果及分析见表 2。据表 2 可知, 各因素不同水平间的变化趋势分别为 $I_A > II_A > III_A$ 、 $II_B > III_B > I_B$ 、 $II_C > III_C > I_C$ 、 $II_D > I_D > III_D$, 表明在各因素所选定的范围内, H6 菌粉吸附溶液中 Cd^{2+} 的最佳条件为 $A_1B_2C_2D_2$, 即最佳吸附条件为菌粉用量 0.125 g/L, 吸附时间为 2 h, pH 为 5.0, 温度为 30 °C。

由极差分析可知, 4 个影响菌粉吸附溶液中 Cd^{2+} 的因素的主次顺序为 $A > B > C > D$, 即菌粉的用量对溶液中 Cd^{2+} 吸附的影响最大, 吸附时间的影响次之, 温度影响最小。

表 2. 正交试验设计及结果

Table 2. Orthogonal experimental design and results

Experiment number	Biosorbent dose/(g/L) (A)	t/h (B)	pH (C)	T/°C (D)	Biosorption capacity/(mg/g)
1	0.125	1	4.0	20	64
2	0.125	2	5.0	30	205
3	0.125	3	6.0	40	135
4	0.250	1	5.0	40	35
5	0.250	2	6.0	20	85
6	0.250	3	4.0	30	27
7	0.375	1	6.0	30	16
8	0.375	2	4.0	40	40
9	0.375	3	5.0	20	69
Ij	404	115	131	218	
IIj	147	330	309	248	
IIIj	125	231	236	210	
kj	3	3	3	3	
Ij/Kj	135	38	44	73	
IIj/Kj	490	110	103	83	
IIIj/Kj	42	77	79	70	
Range	93	72	59	13	

2.4 分离菌株 H6 菌粉对 Cd^{2+} 吸附机理的分析

2.4.1 分离菌株 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 的 SEM 观察:

分离菌株 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 前后的 SEM 照片如图 10 所示, 从图中可以看出菌粉吸附前表面较为光滑, 吸附 Cd^{2+} 后表面出现明显褶皱且形成凸起, 表明菌株 H6 菌粉可有效吸附 Cd^{2+} 。

2.4.2 分离菌株 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 的 EDS 分析:

对分离菌株 H6 菌粉进行能谱 EDS 分析结果见图 11。在菌粉吸附 Cd^{2+} 之前, 表面存在 C、O、P、S 和 Ca 峰, 而吸附 50 mg/L Cd^{2+} 后, 出现了 Cd 的吸收峰, Ca 的吸收峰消失, 说明菌粉表面 Ca^{2+} 位点被 Cd^{2+} 所取代, 即 Cd^{2+} 和 Ca^{2+} 发生了离子交换; 同时, P 的吸收峰有所减弱, 说明 Cd^{2+} 可能与菌粉表面含 P 基团结合形成螯合物。

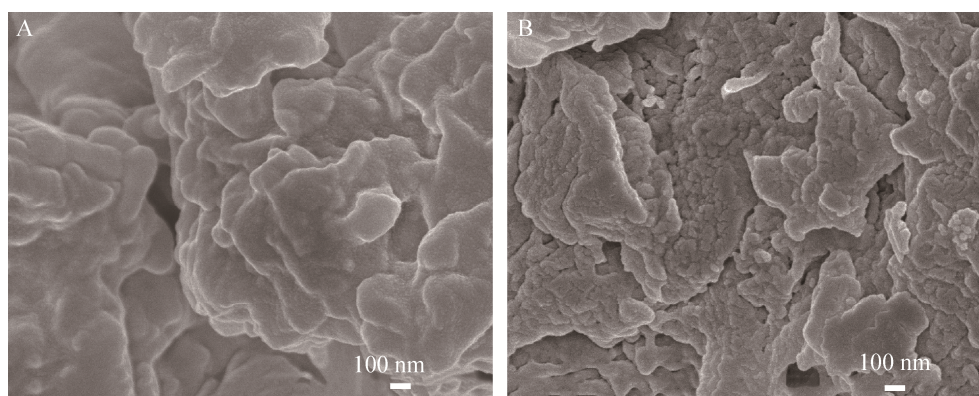


图 10. 菌株 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 前后的扫描电镜照片(50000 \times)

Figure 10. SEM images of bacteria powder loaded with and without Cd(II) (50000 \times). A: 0 mg/L Cd^{2+} ; B: 50 mg/L Cd^{2+} .

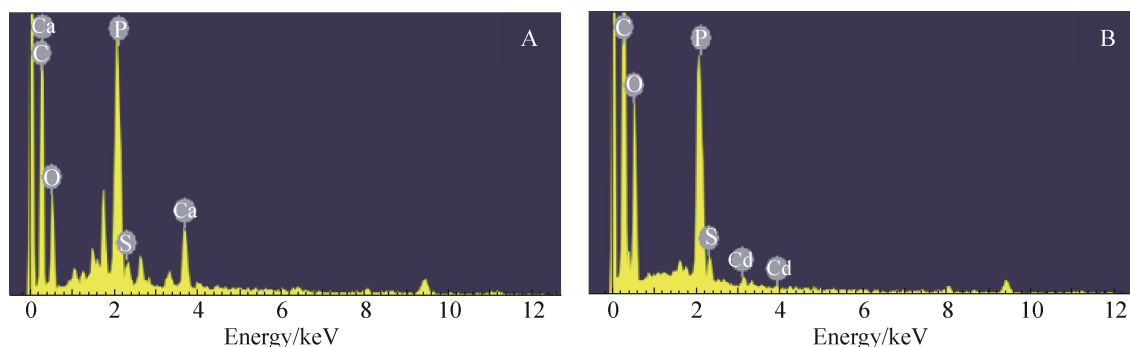


图 11. H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 前后的 EDS 能谱图

Figure 11. EDX spectra of bacteria powder before and after Cd(II) loading. A: 0 mg/L Cd^{2+} ; B: 50 mg/L Cd^{2+} .

2.4.3 分离菌株 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 的 FTIR 分析:

分离菌株 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 前后的红外光谱图见图 12。根据相关文献^[22-24], 对比图中 H6 吸附 Cd^{2+} 前后的红外谱图可知, 吸附 Cd^{2+} 后, 位于 3302.13 cm^{-1} 处的 -OH(伸缩振动)的最大吸收峰峰型变窄, 且位

置迁移至 3300.20 cm^{-1} ; 在 1728.21 cm^{-1} (-COOH 吸收带)处, 吸收峰强度增加; 在 1649.13 cm^{-1} 处, 是细胞蛋白质酰胺 I 带, 是酰胺基的 C=O 的伸缩振动, 1537.26 cm^{-1} 处为蛋白质酰胺 II 带, 主要是 -NH 的弯曲振动和 -CN 伸展振动引起, 吸附后吸收峰强度

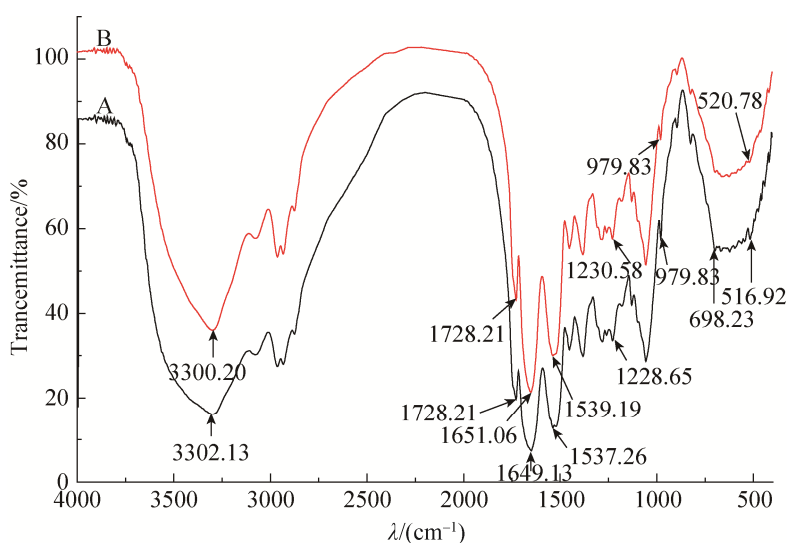


图 12. H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 前后的红外光谱图

Figure 12. FTIR spectrum of bacteria powder before and after biosorption of Cd^{2+} . A: 0 mg/L Cd^{2+} ; B: 50 mg/L Cd^{2+} .

均增加且分别迁移至 1651.06 cm^{-1} 和 1539.19 cm^{-1} ；在 1228.65 cm^{-1} 处,可能是因为细胞壁主要成分多糖中的 C-O-C 伸缩振动引起的,吸附后吸收峰迁移至 1230.58 cm^{-1} 处; 979.83 cm^{-1} 处的 C-O-P 伸缩振动引起的吸收峰较吸附前减弱;此外,在吸附后 698.23 cm^{-1} 处的 C-H 的弯曲振动吸收峰几乎消失;位于 516.92 cm^{-1} 处的吸收峰是由 C-N-S 的剪式弯曲振动引起,吸附后迁移至 520.78 cm^{-1} 处且峰强度减弱。

以上分析表明,菌株 H6 菌粉的官能团羟基、羧基、羰基、酰胺基和烷基等基团都参与了吸附 Cd^{2+} 的过程,吸附后其特征峰强度和位置均发生了不同程度的变化。

3 讨论

近年来,有关微生物处理重金属污染废水的研究很多,但菌种不同,其生长特性不同。例如,陈美标等^[25]从 Cd 污染土壤中分离的强耐 Cd 菌株 YN-8(*Cupriavidus*)和 YN-19(*Leifsonia*),最适生长

pH 分别为 4.0 和 6.0;耿印印等^[26]从 Cd 污染土壤中分离出的耐 Cd 菌株 Z11 和 Z13,均为 *Pseudomonas aeruginosa*,最适生长 pH 分别为 5.0–7.0 和 7.0–9.0,2 株菌在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下均生长良好,但高温会抑制其生长。刘艳等^[27]从内循环厌氧反应器颗粒污泥中分离、纯化得到一株对 Cd^{2+} 具有一定耐受能力的硫酸盐还原菌 DSRBa (*Desulfovibrio* sp.),其最适生长温度和最适生长 pH 分别为 $30\text{--}35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、7.0。本研究从活性污泥中分离出 1 株蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)菌株 H6,其在 LB 培养基中培养时,可在初始 pH 为 5.0–9.0 时均生长良好,而当初始 pH<5.0 时,其生长明显受到抑制。说明菌株适宜在偏酸性、中性和偏碱性条件下生长,即菌株 H6 对 pH 变化的适应能力较强,这有利于其在实际废水处理中的应用。

菌粉对溶液中 Cd^{2+} 吸附的正交实验优化结果表明,在最佳吸附条件下,吸附量为 205 mg/g ,Huang 等^[28]研究了蜡样芽孢杆菌死细胞对溶液中 Cd^{2+} 的吸附能力,其经朗格缪尔等温吸附线拟合

得到死细胞的最大吸附量为 32 mg/g, 本实验分离菌株在最佳吸附条件下的 Cd^{2+} 吸附量远高于这一数值, 其中 2 个实验的吸附条件如溶液 pH、温度及接触时间基本一致, 本实验菌株的吸附量与其存在差异的原因可能是: (1) 投加量的差异。本实验的投加量为 0.125 g/L, 而 Huang 的实验投加量为 1 g/L。投加量与吸附过程中吸附位点相关, 当投加量在一定范围时, 随着投加量增加吸附量会增加, 但当投加量过多时, 吸附剂单位吸附量反而可能会降低; (2) 不同菌株的死细胞吸附能力本身存在差异。因此, 不同菌株死细胞的吸附量不相同, 一方面可能与其本身吸附能力有关, 另一方面还与吸附条件密切相关。

黄飞^[18]的研究阐明了 *B. cereus* RC-1 死细胞吸附 Cd^{2+} 主要与死细胞表面展示了更多负电荷量和吸附位点有关。周赓^[29]研究表明耐镉链霉 *Cd* TB01 的干菌粉主要靠细胞壁和代谢产物上的活性基团对 Cd^{2+} 进行吸附。孙永亮等^[30]通过对吸附 Cd^{2+} 前后的菌粉进行红外扫描, 结果表明, 菌粉吸附主要是利用细胞表面的醇羟基 O-H 键、氨基和酰胺基团与 Cd^{2+} 结合。以上研究表明死细胞去除重金属离子主要与细胞壁上的官能团密切相关。本实验通过对 H6 菌粉吸附 Cd^{2+} 前后的 SEM-EDS 和 FTIR 分析, 表明 H6 菌粉主要通过表面的官能团羟基、羧基、羰基、酰胺基和烷基等基团与 Cd^{2+} 发生络合, 此外, 菌粉表面的 Ca^{2+} 位点被 Cd^{2+} 取代, 发生了离子交换作用, 这与相关研究提出的 Cd^{2+} 可与羟基、酰胺基、羧基和羰基等相互作用及 Ca^{2+} 和 Cd^{2+} 发生离子交换作用的结论相似^[18, 31-32]。

本实验分离得到的菌株 H6 的吸附实验结果表明, 菌粉对 Cd^{2+} 具有较好去除效果, 最高吸附

量可达 205 mg/g, 可为后续重金属微生物修复试验与应用提供指导作用, 但在实际应用中可能还会面临许多困难和挑战, 将其运用于实际废水处理还需进一步深入探索与研究。

4 结论

(1) 本研究从活性污泥中分离出 1 株耐 Cd 细菌菌株, 该菌株的最大 Cd^{2+} 耐受浓度 350 mg/L, 经 16S rRNA 基因序列分析及溶血试验、蛋白质毒素结晶试验, 得到该菌株属于芽孢杆菌属, 鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 暂命名为 H6。

(2) 通过单因素实验对菌株 H6 的培养条件进行优化, 得到其在牛肉膏蛋白胨培养基中最佳培养条件为初始 pH 6.0–8.0, 温度 28 °C, 转速 120–210 r/min, 接种量 1%–5%。菌株 H6 在培养过程中, 培养液 pH 值呈现先稍微下降然后上升的趋势。

(3) 分离菌株 H6 菌粉对溶液中 Cd^{2+} 吸附的正交优化条件为: 菌粉用量 0.125 g/L, 吸附时间 2 h, pH 5.0, 温度 30 °C, 此条件下吸附量为 205 mg/g。

(4) 机理研究表明, 菌株 H6 菌粉对 Cd^{2+} 的吸附主要是通过 Ca^{2+} 与 Cd^{2+} 发生离子交换作用, 及菌粉表面官能团羟基、羧基、羰基、酰胺基和烷基等基团与 Cd^{2+} 发生络合作用。

参考文献

- [1] Wen XF, Du CY, Yuan HY, Zhang JF, Chen H, Yu GL, Hu XY, Peng XX. Adsorption of Cd^{2+} in wastewater through modified magnetic nanoparticles immobilizing endogenous bacterium *Bacillus nealsonii*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(12): 4376–4383. (in Chinese)
文晓凤, 杜春艳, 袁瀚宇, 张金帆, 陈宏, 余关龙, 胡旭跃, 彭向训. 改性磁性纳米颗粒固定内生菌 *Bacillus nealsonii* 吸附废水中 Cd^{2+} 的特性研究. 环境科学学报,

- 2016, 36(12): 4376–4383.
- [2] Dong JQ, Zhang HZ, Wang JN, Zhang TZ. Modeling of cadmium speciation in Longjiang River during an emergent environmental incident. *China Environmental Science*, 2015, 35(10): 3046–3052. (in Chinese)
董璟琦, 张红振, 王金南, 张天柱. 龙江河突发环境事件河流镉污染化学形态模拟. *中国环境科学*, 2015, 35(10): 3046–3052.
- [3] Zhang XJ, Lin PF, Chen C. Emergent water supply in environmental accident of cadmium, hallium and arsenic in Xiannvhu Lake in Xinyu City. *China Water & Wastewater*, 2017, 33(9): 1–10. (in Chinese)
张晓健, 林朋飞, 陈超. 江西新余仙女湖镉砷突发环境事件应急供水. *中国给水排水*, 2017, 33(9): 1–10.
- [4] Tran TA, Popova LP. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, 2013, 37(1): 1–13.
- [5] Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2006, 1: 22.
- [6] Cao Z, Luo SL, Zeng GM, Xiao X, Wan Y, Su F. Removal of Cd^{2+} by an endophytic bacteria SDE06 obtained from *Solanum Nigrum* L.. *Microbiology China*, 2009, 36(3): 328–333. (in Chinese)
曹喆, 罗胜联, 曾光明, 肖潇, 万勇, 苏峰. 一株龙葵内生细菌 SDE06 去除 Cd^{2+} 的实验. *微生物学通报*, 2009, 36(3): 328–333.
- [7] Fu FL, Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of Environmental Management*, 2011, 92(3): 407–418.
- [8] Ye JJ, Xiao HL, Xiao BL, Xu WS, Gao LX, Lin G. Bioremediation of heavy metal contaminated aqueous solution by using red algae *Porphyra leucosticta*. *Water Science & Technology*, 2015, 72(9): 1662–1666.
- [9] Xiao CW, Luo XY, Tian Y, Lu XY. Research progress of bioremediation of heavy metal cadmium pollution. *Chemistry & Bioengineering*, 2013, 30(8): 1–4. (in Chinese)
肖春文, 罗秀云, 田云, 卢向阳. 重金属镉污染生物修复的研究进展. *化学与生物工程*, 2013, 30(8): 1–4.
- [10] Lin XY, Mou RX, Cao ZY, Zhu ZW, Chen MX. Isolation and cadmium adsorption mechanisms of cadmium-resistant bacteria strains. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(9): 1700–1706. (in Chinese)
林晓燕, 牟仁祥, 曹赵云, 朱智伟, 陈铭学. 耐镉细菌菌株的分离及其吸附镉机理研究. *农业环境科学学报*, 2015, 34(9): 1700–1706.
- [11] Wang JL, Chen C. Research advances in heavy metal removal by biosorption. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(4): 673–701. (in Chinese)
王建龙, 陈灿. 生物吸附法去除重金属离子的研究进展. *环境科学学报*, 2010, 30(4): 673–701.
- [12] Xiao W, Zhang SY, Zhao Q, Wang YX, Lai YH, Li ZY, Cui XL. Diversity and heavy-metal tolerance of bacteria isolated from Gejiu tin mining area of Yunnan. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1158–1165. (in Chinese)
肖炜, 张仕颖, 赵琴, 王永霞, 赖泳红, 李治滢, 崔晓龙. 云南个旧锡矿区可培养细菌多样性及其重金属抗性. *微生物学报*, 2013, 53(11): 1158–1165.
- [13] Igwe JC, Abia AA. A bioseparation process for removing heavy metals from waste water using biosorbents. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(12): 1167–1179.
- [14] Loukidou MX, Karapantsios TD, Zouboulis AI, Matis KA. Diffusion kinetic study of cadmium(II) biosorption by *Aeromonas caviae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2004, 79(7): 711–719.
- [15] Ziagova M, Dimitriadis G, Aslanidou D, Papaioannou X, Litopoulou E, Liakopoulou-Kyriakides M. Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas* sp. in single and binary mixtures. *Bioresource Technology*, 2007, 98(15): 2859–2865.
- [16] Flouty R, Estephane G. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: a comparative study. *Journal of Environmental Management*, 2012, 111: 106–114.
- [17] Kaduková J, Virčíková E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environment International*, 2005, 31(2): 227–232.
- [18] 黄飞. 蜡状芽孢杆菌对水体中镉的吸附特性与机理研究. 华南理工大学博士学位论文, 2013.
- [19] Li HF, Lin YB, Guan WM, Chang JL, Xu L, Guo JK, Wei GH. Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 179(1/3): 151–159.
- [20] Limcharoensuk T, Sooksawat N, Sumarnrote A, Awutpet T,

- Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Auesukaree C. Bioaccumulation and biosorption of Cd^{2+} and Zn^{2+} by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 122: 322–330.
- [21] Tang KX, Niu ZX, Sun CX, Pang X. Research on growth characteristics of *Bacillus cereus*. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2000(1): 6–7. (in Chinese)
唐珂心, 牛钟相, 孙存孝, 庞昕. 蜡样芽胞杆菌生长特性的研究. 山东畜牧兽医, 2000(1): 6–7.
- [22] Meseguer VF, Ortuño JF, Aguilar MI, Pinzón-Bedoya ML, Lloréns M, Sáez J, Pérez-Marín AB. Biosorption of cadmium(II) from aqueous solutions by natural and modified non-living leaves of *Posidonia oceanica*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(23): 24032–24046.
- [23] Zheng HS, Guo WQ, Li S, Wu QL, Yin RL, Feng XC, Du JS, Ren NQ, Chang JS. Biosorption of cadmium by a lipid extraction residue of lipid-rich microalgae. *RSC Advances*, 2016, 6(24): 20051–20057.
- [24] Jin Y, Qu JJ, Li Y, Gu HD, Yan LL, Sun XB. Isolation, identification and Pb(II) biosorption characterization of a lead-resistant strain. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(8): 2248–2255. (in Chinese)
金羽, 曲娟娟, 李影, 顾海东, 闫立龙, 孙兴滨. 一株耐铅细菌的分离鉴定及其吸附特性研究. 环境科学学报, 2013, 33(8): 2248–2255.
- [25] Chen MB, Guo JH, Yao Q, Duan JM, Feng GD, Cai ZP, Zhu HH. Isolation and identification, and biological characteristics of cadmium-tolerant bacteria from the Dabao Mine. *Microbiology China*, 2012, 39(12): 1720–1733. (in Chinese)
陈美标, 郭建华, 姚青, 段锦梅, 冯广达, 蔡卓平, 朱红惠. 大宝山矿区耐 Cd^{2+} 细菌的分离鉴定及其生物学特性. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1720–1733.
- [26] Geng YY, Wang XM, Wang HQ, Tong XC. Screening and identification of cadmium-tolerant bacteria in polluted soil and characteristics. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(11): 59–65. (in Chinese)
耿印印, 王旭梅, 王红旗, 佟秀春. 污染土壤中耐镉菌株的筛选、鉴定及吸附试验研究. 东北农业大学学报, 2010, 41(11): 59–65.
- [27] Liu Y, Dang Z, Liu Y, Yi XY, Guo CL, Lu GN, Zhou XQ. Isolation and identification of a sulfate-reducing bacteria DSRBa and its characterization. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(1): 176–182. (in Chinese)
刘艳, 党志, 刘云, 易筱筠, 郭楚玲, 卢桂宁, 周兴求. 一株硫酸盐还原菌 DSRBa 的分离鉴定及特性分析. 农业环境科学学报, 2011, 30(1): 176–182.
- [28] Huang F, Dang Z, Guo CL, Lu GN, Gu RR, Liu HJ, Zhang H. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 107: 11–18.
- [29] 周赓. 耐镉放线菌的筛选及特性研究. 湖南农业大学硕士学位论文, 2016.
- [30] Sun YL, Li X, Wang J, Wang JF, Li WJ, Wang YB. Screening of a Cd^{2+} -resistant bacterium and its biosorption. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(3): 1235–1242. (in Chinese)
孙永亮, 李欣, 王洁, 王菊芳, 李文建, 王弋博. 一株抗 Cd^{2+} 菌株的筛选及其吸附性能. 环境工程学报, 2014, 8(3): 1235–1242.
- [31] Hokkanen S, Bhatnagar A, Sillanpää M. A review on modification methods to cellulose-based adsorbents to improve adsorption capacity. *Water Research*, 2016, 91: 156–173.
- [32] Goswami S, Syiem MB, Pakshirajan K. Cadmium removal by *Anabaena doliolum* Ind1 isolated from a coal mining area in Meghalaya, India: associated structural and physiological alterations. *Environmental Engineering Research*, 2015, 20(1): 41–50.

Isolation, identification and characterization of a Cd resistant bacterium

Qian Li, Ping Zhang^{*}, Bohan Liao, Peiqin Peng, Jinxing Mei, Jimin Xu

College of Environmental Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology; Hunan Engineering Laboratory for Control of Rice Quality and Safety, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan Province, China

Abstract: [Objective] We isolated and identified a cadmium resistant bacterium from activated sludge. Furthermore, we studied its growth characteristics and optimal biosorption conditions of Cd^{2+} . This study was expected to provide strain resources and applied reference for microbial remediation of cadmium contaminated water. [Methods] The bacterium was isolated by streak plate and identified based on its 16S rRNA analysis, hemolysis testing and protein crystallization dying experiment. The growth conditions of the strain were determined by single factor test. The optimal biosorption conditions of bacterial powder were investigated by designed orthogonal experiment. Besides, the biosorption mechanisms were discussed by Scanning electron microscope (SEM), Energy Dispersive X-ray Scanning (EDS) and Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR) analysis. [Results] The strain was identified as *Bacillus cereus* and named as H6. The maximum cadmium tolerance concentration of strain H6 was 350 mg/L. Its culture conditions were: initial pH 6.0 to 8.0 at 28 °C, shaking speed of 120 to 210 r/min, inoculation 1% to 5%. During the growth of strain H6, the pH of culture medium first decreased slightly and then increased gradually. The optimal biosorption conditions of bacterial powder were: dosage of 0.125 g/L, contact time of 2 h, pH 5.0 and 30 °C, the biosorption capacity reached 205 mg/g. SEM-EDS and FTIR results revealed that ion exchange between Ca^{2+} and Cd^{2+} occurred and the functional group of hydroxyl, carboxyl, carbonyl, amido and alkyl played a principal role during the biosorption process. [Conclusion] Strain H6, isolated from the activated sludge, was identified as *Bacillus cereus* with good adsorption property for Cd^{2+} .

Keywords: cadmium, *Bacillus cereus*, isolation and identification, growth condition, biosorption

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0800705-02), by the Special Funds for Scientific Research of Ministry of Agriculture and Ministry of Finance [Ministry of Agriculture Union Letter No.6 (2016)], by the Research Foundation of Education Bureau of Hunan Province (15C1408) and by the Key Discipline Construction Projects in Hunan Province (2006180)

^{*}Corresponding author. E-mail: zhyp2008@163.com

Received: 29 December 2017, Revised: 28 March 2018; Published online: 8 April 2018