



耐镉甲基营养芽胞杆菌吸附条件的优化及其抗逆性

张冬雪^{1,2,3,4}, 文亚雄^{1,2,3,4}, 罗志威^{1,2,3,4}, 李雪玲^{1,2,3,4}, 郑双凤^{1,2,3,4}, 谭石勇^{1,2,3,4*}

¹农业部植物营养与生物肥料重点实验室, 湖南 长沙 410205

²重金属污染耕地安全高效利用湖南省工程研究中心, 湖南 长沙 410205

³湖南省生物肥料工程技术研究中心, 湖南 长沙 410205

⁴泰谷生态科技集团股份有限公司, 湖南 长沙 410205

摘要:【目的】对所筛选的1株耐镉甲基营养芽胞杆菌 NTGB29 进行了环境抗逆性的研究, 及影响菌株吸附镉离子效率的条件优化。【方法】以发酵液活菌数为指标, 研究其对不同 NaCl 浓度、酸碱度、镉离子浓度的耐受情况; 进一步通过单因素实验和响应面法优化影响菌株镉离子吸附效率的发酵条件; 以有效镉离子含量为指标, 验证菌株在镉污染土壤中的吸附效果。【结果】结果表明, 菌株 NTGB29 对 NaCl 浓度、酸碱度、Cd²⁺浓度的最大耐受值分别为 10%、pH 11.0、50 mg/L; 菌株在发酵液初始 Cd²⁺浓度 10 mg/L、起始 pH 6.4、培养温度 37 °C、NaCl 浓度 4.2%、装液量 50 mL/250 mL、培养时间 24 h 时, 对 Cd²⁺的吸附率达到 79.70%; 菌株能有效降低镉污染土壤中的有效镉离子含量, 吸附率为 29.65%。【结论】菌株 NTGB29 在较高浓度 Cd²⁺浓度、NaCl 浓度及强碱环境条件下仍然能够生长, 具有良好的环境抗逆性及 Cd²⁺吸附能力, 在镉污染土壤调理剂及微生物功能菌剂的研制方面能够提供有价值的菌种资源。

关键词: 甲基营养芽胞杆菌, 抗逆性, 镉离子吸附率

随着我国工业化及农业的快速发展, 导致土壤污染情况日趋严重^[1]。目前, 土壤污染类型大致分为无机型、有机型及复合型污染, 调查数据显示, 其中无机污染物(重金属)超标点位数高达 82.8%^[2]。镉作为生活环境中常见的有害污染物, 由于其不良影响, 如导致氧化应激、多种酶活性

的变化、与 DNA 和 RNA 等生物分子的相互作用等, 由此产生的潜在风险而成为人类健康的一个重要风险^[3-6]。目前, 针对重金属污染土壤的修复方法, 主要利用物理、化学、生物修复等方法原理, 具体包括电动修复、电化学修复、微生物修复、植物-微生物联合修复、农艺调控等技术措

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200806-4); 湖南省重点研发计划(2017NK2144)

*通信作者。E-mail: tanshiyong@taigubio.com

收稿日期: 2018-06-22; 修回日期: 2018-10-31; 网络出版日期: 2018-11-29

施^[7-10], 其中生物修复因其安全、环保、低耗的优势, 已成为各种修复方法中的研究热点之一。

甲基营养芽胞杆菌(*Bacillus methylotrophicus*), 为产芽胞的革兰氏阳性菌。相关研究表明甲基营养芽胞杆菌对重金属具有还原或吸附的作用。如, Mala 等^[11]从制革污泥中分离出一株新型甲基营养芽胞杆菌, 经酶和代谢物介导能将铬酸盐还原, 即将有毒的 6 价铬还原成无毒或低毒的 3 价铬。陈佳亮等^[12]从电子废弃物拆解区污染土壤中分离鉴定出了 1 株甲基营养芽胞杆菌 JY-04, 该细菌对 Cd^{2+} 具有生物吸附效果。总体而言, 甲基营养芽胞杆菌在土壤重金属镉污染治理中的研究较少, 大多集中在菌体生长及代谢产物的培养基或发酵条件优化^[13-14], 以及生防效果等^[15-16]方面。

基于以上背景, 本文以 1 株耐镉离子甲基营养芽胞杆菌 NTGB29 为研究对象, 通过研究不同浓度范围的 NaCl、酸碱度、镉离子条件下菌株的生长情况, 探讨其生长环境抗逆性能力。利用响应面优化法研究了菌株的镉离子吸附条件, 并验证了菌株 NTGB29 优化前后的菌悬液在镉污染土壤中的吸附效果, 为土壤重金属污染微生物修复技术提供了有价值的菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 甲基营养芽胞杆菌 NTGB29, 保藏于农业部植物营养与生物肥料重点实验室生防菌种资源库, 系 2016 年由长沙县辣椒田采集的健康辣椒植株根际土壤中筛选、鉴定的 1 株对辣椒疫霉菌具有拮抗作用的菌株, 经验证其具有耐镉及镉吸附能力。

1.1.2 培养基: 种子培养基: 酵母浸出粉胨葡萄

糖培养基(YPD), 发酵培养基: LB 培养基。

1.1.3 主要仪器设备: 原子吸收分光光度计 WYS2200 (安徽皖仪科技股份有限公司); 实验室纯水系统 Basic-Q15 (上海和泰仪器有限公司); 自动平衡离心机 KC-60X (湖南迈克实验仪器有限公司); 冷冻大容量恒温振荡器 DHZ-D (苏州市培英实验设备有限公司)。

1.2 菌株培养方法

种子液制备: 将活化的甲基营养芽胞杆菌斜面菌种在无菌条件下挑取 1 环接种于已灭菌的种子培养基中, 置于恒温摇床 30 °C、160 r/min 条件下振荡培养 12–16 h。

液体发酵培养: 将甲基营养芽胞杆菌种子液接种于无菌液体基础发酵培养基中振荡培养。初始发酵条件为: 培养温度 30 °C, 初始 pH 7.0, NaCl 浓度 0.5%, 初始镉浓度 10 mg/L (由氯化镉 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 配制而成), 接种量(V/V) 2%, 装液量 50 mL/250 mL 三角瓶, 培养时间 24–48 h。

1.3 菌株抗逆性研究

1.3.1 耐盐能力: 分别配制 NaCl 浓度为 0.5%、5%、10%、15%、20% 的 LB 液体发酵培养基, 其他培养方法及培养条件同 1.2, 每个处理设置 3 个重复, 比较不同盐浓度条件下菌株的生长情况。

1.3.2 耐酸碱能力: 用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 分别调节 LB 发酵液 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 其他培养方法及培养条件同 1.2, 每个处理设置 3 个重复, 以 pH 7.0 的基础培养基为对照, 比较不同酸碱度条件下菌株的生长情况。

1.3.3 耐重金属 Cd^{2+} 能力: 用浓度为 20 mg/mL 的 Cd^{2+} 母液添加于 LB 发酵培养基, 使发酵培养基中 Cd^{2+} 浓度分别为 0、10、20、30 和 50 mg/L。其他培养方法及培养条件同 1.2, 每个处理设 3 个

重复,以 Cd^{2+} 浓度为 0 mg/L 的基础培养基为对照,比较不同 Cd^{2+} 浓度条件下菌株的生长情况。

1.4 单因素试验

1.4.1 培养液初始 pH: 分别调节发酵培养基的初始 pH 至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,在初始条件下培养,以接种等量无菌水作为对照。发酵结束后,采用比色皿法测定菌株悬浮液的 OD_{600} 值;同时取适量发酵液离心,测定上清液中的 Cd^{2+} 含量,计算 Cd^{2+} 去除率。

1.4.2 培养温度($^{\circ}\text{C}$): 将接种后的培养基分别置于 30、32、35、37、40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中,其他方法同 1.4.1。

1.4.3 NaCl 浓度(%): 分别将发酵培养基 NaCl 浓度调节为 0%、2%、5%、7%、10%,其它方法同 1.4.1。

1.4.4 装液量(V/V): 250 mL 三角瓶中分别装入培养基 30、50、70、90 mL。其他方法同 1.4.1。

1.4.5 培养时间(h): 在上述单因素实验所得适宜条件下,将空白对照与发酵培养基分别培养 8、16、24、32、40、48、52 h 后,随机取样,其他方法同 1.4.1。

1.5 响应面法优化

在单因素试验基础上,利用 Design-expert 7.0 软件,采用 Box-Behnken 设计原理,选取对甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率影响较大的 3 个因素,即初始 pH、培养温度、NaCl 浓度,建立镉离子吸附率与三因素之间的数学模型,并对主效因素进行分析,得到二阶响应面模型,确定最佳镉离子吸附条件并验证^[17]。

1.6 镉离子含量测定及计算方法

镉元素的测定按 GB/T 5009.15-2003《食品中镉的测定》中火焰原子吸收分光光谱法测定。菌

株 NTGB29 培养中镉离子吸附率的计算方法,参照王小波等^[18]的方法稍作修改。将种子液按 2% 的接种量接种至 50 mL/250 mL 含 Cd^{2+} LB 发酵培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 摇瓶培养,发酵结束后,取样,5000 r/min (离心力:3666.7 \times g),离心 10 min,取适量上清液,过 0.22 μm 水系滤膜,用原子吸收分光光度计测定上清液中 Cd^{2+} 浓度(公式 1)。

发酵液中菌株 Cd^{2+} 吸附率=(Cd^{2+} 初浓度- Cd^{2+} 终浓度)/ Cd^{2+} 初浓度 \times 100% 公式(1)

1.7 菌株对重金属 Cd 污染土中的 Cd^{2+} 吸附效果试验

1.7.1 Cd 污染土来源及处理: 供试土壤取于湖南省长沙县水稻田,为重金属镉污染土壤,全镉(总镉量): (2.26 \pm 0.07) mg/kg; 土壤 pH 6.51,将土壤自然风干,去除植物根茎等杂物,碾碎,过 80 目筛备用。

1.7.2 Cd 污染土吸附实验方法: 具体实验方法为: (1) 发酵液制备,将菌株分别在初始条件、优化条件下进行发酵培养,制得发酵液; (2) 菌悬液制备,将发酵液在 5000 r/min (离心力: 3666.7 \times g),离心 10 min,弃去上清液,菌体沉淀使用去离子水清洗、离心,重复 3 次,收集菌体备用,称取 5 g 湿菌体溶于 50 mL 去离子水中得到菌悬液; (3) 土壤培育,分别称取 50 g 镉污染土于 200 mL 于干净烧杯中,初始条件菌悬液(CJX)、优化条件菌悬液(YJX) 50 mL 于污染土中,以添加 50 mL 去离子水作为对照组(CK),不同处理土壤常温下培育 7 d,期间每天用玻璃棒均匀搅拌,自然风干后研磨过筛备用; (4) 有效镉提取,参照刘铭等^[19]的方法略作修改。准确称取 5 g 对照组及处理组土壤于 25 mL 三角瓶中,加入 25 mL DTPA 提取剂,25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡处理 2 h,5000 r/min (离心力: 3666.7 \times g),离

心 10 min, 取适量上清液, 过 0.22 μm 水系滤膜, 用原子吸收分光光度计测定各处理镉污染土中的有效镉(可被作物吸收的离子态镉)含量(mg/kg)。计算吸附率(公式 2)。实验中共 3 个处理, 每个处理设置 3 个平行试验。

菌株镉吸附率=(对照组有效镉含量-处理组有效镉含量)/对照组有效镉含量 \times 100% 公式(2)

2 结果和分析

2.1 菌株抗逆性结果

2.1.1 盐耐受性分析: 供试菌株在不同 NaCl 浓度下的存活情况见表 1。菌株在 0.5% (微生物正常生长所需 NaCl 浓度)和 2%时, 生长良好, 活菌数相差不多, 随着浓度的不断增加, 活菌数也随之下降, 在高于 12%时, 菌落数显著减少, 即在高盐度的情况下, 菌株生长受限, 但仍有部分菌株存活。

2.1.2 酸碱耐受性分析: 由表 2 可看出, 菌株在偏酸性条件下生长良好, 在 pH 4.0–10.0 范围内菌落数单位达到 10^8 级别, 在 pH 3.0 及 pH 11.0 时, 菌落数急剧减少, 生长受抑制, 总体来看, 该菌的 pH 适应范围较大。

表 1. 甲基营养芽胞杆菌菌株在不同浓度 NaCl 培养基中的生长

Table 1. The growth of *Bacillus methylotrophicus* strain at different concentrations of NaCl

c(NaCl)/%	Colony forming units/(CFU/mL)
0.5	(8.6 \pm 0.10) $\times 10^8$ a
2.0	(8.5 \pm 0.10) $\times 10^8$ ae
5.0	(1.6 \pm 0.11) $\times 10^8$ b
10.0	(2.6 \pm 0.20) $\times 10^7$ c
12.0	(5.0 \pm 0.50) $\times 10^4$ d
15.0	(1.5 \pm 0.11) $\times 10^4$ b
20.0	(9.5 \pm 1.15) $\times 10^3$ e

Data with different lowercase letters indicated significant difference at the 0.05 level.

表 2. 甲基营养芽胞杆菌菌株对酸碱度的耐受性

Table 2. The tolerance of *Bacillus methylotrophicus* strain to pH

pH	Colony forming units/(CFU/mL)
3.0	(1.4 \pm 0.29) $\times 10^4$ g
4.0	(1.5 \pm 0.65) $\times 10^8$ e
5.0	(5.5 \pm 1.12) $\times 10^8$ b
6.0	(11.3 \pm 0.25) $\times 10^8$ a
7.0	(8.6 \pm 0.10) $\times 10^8$ c
8.0	(7.3 \pm 0.06) $\times 10^8$ d
9.0	(5.4 \pm 0.06) $\times 10^8$ e
10.0	(3.4 \pm 0.06) $\times 10^8$ f
11.0	(1.4 \pm 0.10) $\times 10^4$ g

Data with different lowercase letters indicated significant difference at the 0.05 level.

2.1.3 菌株对 Cd²⁺的耐受性分析: 菌株对 Cd²⁺浓度的耐受性见表 3。菌落数随着 Cd²⁺浓度的升高而显著减少, 在 10 mg/L 时, 相对于 0 mg/L, 菌株的存活率为 20.93%, 20–50 mg/L 菌株生长受到抑制, 但仍有菌体细胞存活, 可认为该菌株对 Cd²⁺的最高耐受浓度为 50 mg/L。因此, 后续实验中将发酵培养基的初始 Cd²⁺浓度设置为 10 mg/L。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 初始 pH 对菌株生长及镉离子吸附率的影响: 培养基初始 pH 对菌株生长及镉离子吸附性能的影响如图 1 所示。在培养基初始 pH 小于 6.5

表 3. 甲基营养型芽胞杆菌菌株对 Cd²⁺的耐受性

Table 3. The tolerance of *Bacillus methylotrophicus* strain to Cd²⁺

c(Cd ²⁺)/(mg/L)	Colony forming units/(CFU/mL)
0	(8.6 \pm 0.11) $\times 10^8$ a
10	(1.8 \pm 0.03) $\times 10^8$ b
20	(7.4 \pm 0.12) $\times 10^5$ c
30	(3.4 \pm 0.48) $\times 10^4$ d
50	(1.5 \pm 0.06) $\times 10^4$ bd

Data with different lowercase letters indicated significant difference at the 0.05 level.

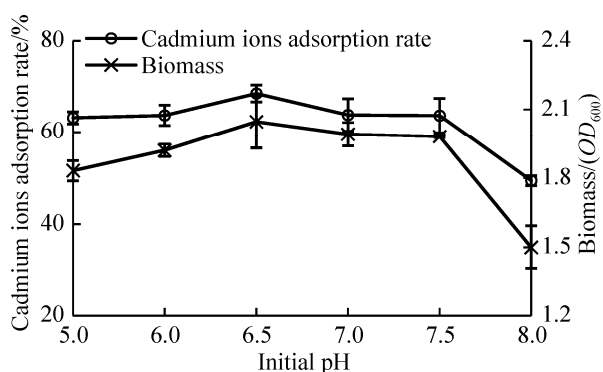


图 1. 初始 pH 对菌株生物量及吸附 Cd^{2+} 的影响
Figure 1. Effects of initial pH on growth and cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain. $P < 0.05$.

时, 菌株的 OD_{600} 值及 Cd^{2+} 的吸附率随 pH 值的增加而增加; 在初始 pH 6.5 时, 菌株的 OD_{600} 值和 Cd^{2+} 吸附率达到最大值, 分别为 2.047 和 68.51%; 初始 pH 继续增大, 2 个指标均有所下降。

2.2.2 培养温度对菌株生长及镉离子吸附率的影响: 培养温度对菌株生长及镉离子吸附性能的影响如图 2 所示。菌株的生长及 Cd^{2+} 的吸附率受温度的影响较大, 在 30–37 °C 范围内呈上升趋势, 并在 37 °C 达到最大值 1.970 和 78.31%, 温度继续升高, 吸附率及生物量急剧下降。

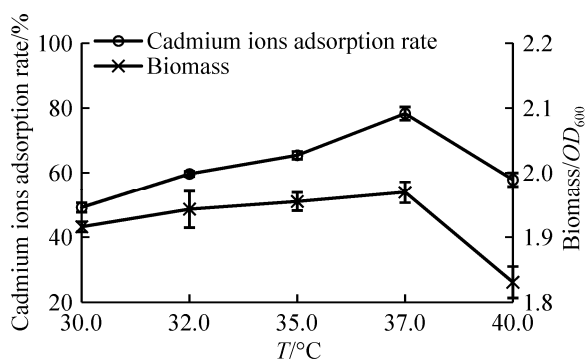


图 2. 培养温度对菌株生物量及吸附 Cd^{2+} 的影响
Figure 2. Effects of culture temperature on growth and cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain. $P < 0.05$.

2.2.3 培养基 NaCl 浓度对菌株生长及镉离子吸附率的影响: 如图 3 所示, NaCl 浓度为 0.5%–5.0% 时, 菌株 Cd^{2+} 吸附率逐渐增加, 在浓度为 5% 时, 吸附率达到最大值 68.51%; 菌株 OD_{600} 值随着 NaCl 浓度的升高而逐渐降低, 但当浓度为 0.5%–5.0% 时, 变化不大; 超过 5.0% 的 NaCl 浓度明显抑制菌株的生长及对 Cd^{2+} 的吸附效率。因此, 本实验中确定菌株的适宜 NaCl 浓度为 5.0%。

2.2.4 装液量对菌株生长及镉离子吸附率的影响: 如图 4 所示, 菌株生物量 OD_{600} 随装液量增加

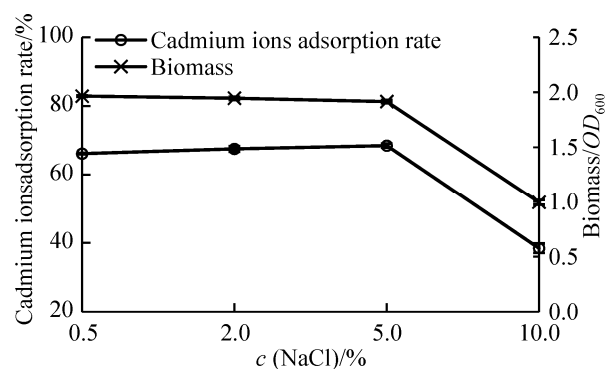


图 3. NaCl 浓度对菌株生物量及吸附 Cd^{2+} 的影响
Figure 3. Effects of concentration of NaCl on growth and cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain.

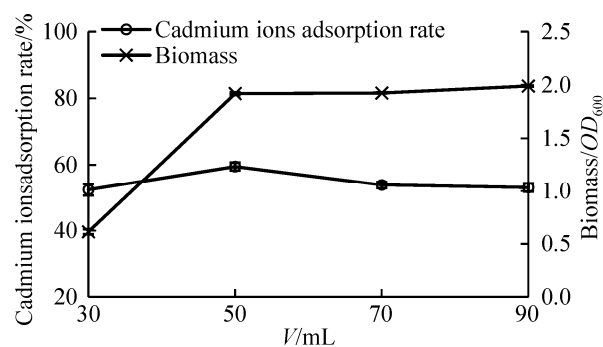


图 4. 装液量对菌株生物量及吸附 Cd^{2+} 的影响
Figure 4. Effects of liquid volume on growth and cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain.

而逐渐上升；菌株对镉离子的吸附率呈先升后降趋势，在装液量为 50 mL/250 mL 达到最大值，装液量为(50–90) mL/250 mL 时， OD_{600} 值相差不大，故选择 50 mL/250 mL 为最适宜装液量。

2.2.5 培养时间对菌株生长及镉离子吸附率的影响：如图 5 所示，菌体对 Cd^{2+} 的吸附率及 OD_{600} 值在 0–16 h 阶段显著上升，在此阶段菌体繁殖处于对数期，菌株生物量增加较快，提供了更多的 Cd^{2+} 的吸附位点；在 24 h 时吸附率和生物量 OD_{600} 达到最大值，分别为 68.23%、1.999；随着培养时间的延长，菌体对 Cd^{2+} 的吸附率及生物量逐渐下降，说明 Cd^{2+} 出现了脱附现象。本实验中，菌株在培养至 24 h 左右时处于对数期或稳定期，此时菌株具有较强的代谢及繁殖能力，对 Cd^{2+} 的吸附量越多，吸附率越高。因此，确定较适宜的培养时间为 24 h。

2.3 响应面设计试验结果

2.3.1 Box-Behnken 试验设计：上述单因素试验结果表明，初始 pH、培养温度及 NaCl 浓度对甲基营养芽胞杆菌的镉离子吸附率影响较为显著，因此对此三因素进一步分析，即采用 Box-Behnken

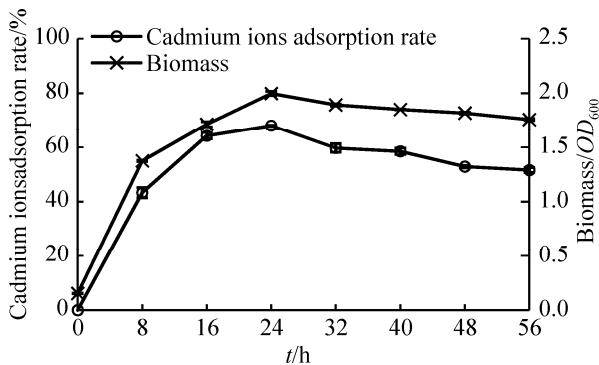


图 5. 培养时间对菌株生物量及吸附 Cd^{2+} 的影响
Figure 5. Effects of culture time on growth and cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain.

试验设计，以菌株的镉离子吸附率为响应值，采取三因素三水平试验设计，以优化得到各参数的最佳值。各因素及水平见表 4。采用试验设计软件 Design-Expert.V8.0.6 对实验数据结果进行二次多项式拟合及方差分析，结果如表 5。

由上述回归拟合及检验分析得到多元回归方程(公式 3)。

$$Y=79.07-0.75A-0.64B-4.76C-0.43AB+0.15AC+0.087BC-5.47A^2-10.00B^2-9.07C^2 \quad \text{公式(3)}$$

如表 5, $P(\text{Pr}>F)<0.0001$, 表明模型效应极显著，拟合度良好。本试验所建立的模型中一次项起始 pH (A)、培养温度(B)和 NaCl 浓度(C)分别达到显著、显著、极显著水平；交互项 AB、AC、BC 不显著；平方项 A^2 、 B^2 、 C^2 均达到极显著水平；模型 $R^2=99.77\%$, 说明该模型可解释绝大部分实验数据。此外，失拟项 F 值相对于绝对误差并不显著，综合考虑该回归模型是合理的，可用此方程预测不同发酵培养条件下的甲基营养芽胞杆菌对镉的吸附率。

2.3.2 响应面模型拟合：A、B、C 三因素之间的交互作用对甲基营养芽胞杆菌镉吸附率影响的三维响应面图及等高线图见图 6–8。其分别表示起始 pH、培养温度、NaCl 浓度为优化值时，另外 2 个因素与响应值之间关系的三维坐标图，反映了各因素对响应值大小影响的关系。等高线的形状可以反映各因素间交互作用的强弱，越接近圆形表示交互作用越不显著，椭圆则表示交互作用显著。

表 4. Box-Behnken 因素水平设计

Table 4. Factors and levels design in BBD

Coded levels	A: Initial pH	B: Culture temperature/ $^{\circ}C$	C: Concentration of NaCl/%
-1	5.5	34	2
0	6.5	37	5
1	7.5	40	8

表 5. 方差分析表

Table 5. Analysis of variance for quadric regression model

Source	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F-Value	Pr>P
Model	9	1177.19	130.80	331.32	<0.0001**
A	1	4.52	4.52	11.44	0.0117*
B	1	3.26	3.26	8.27	0.0238*
C	1	178.61	178.61	452.41	<0.0001**
AB	1	0.72	0.72	1.83	0.2182
AC	1	0.093	0.093	0.24	0.6422
BC	1	0.031	0.031	0.078	0.7887
A ²	1	125.84	125.84	318.77	<0.0001**
B ²	1	420.80	420.80	1065.90	<0.0001**
C ²	1	346.34	346.34	877.29	<0.0001**
Residual	7	2.76	0.39		
Lack of fit	3	0.84	0.28	0.58	0.6577
Pure error	4	1.92	0.48		
Cor total	16	1179.95			
R ²		99.77%			
AdjR ²		99.46%			
PredR ²		98.61%			
Coefficient of variation/%		50.514			

* $P < 0.05$, significant; ** $P < 0.01$, very significant.

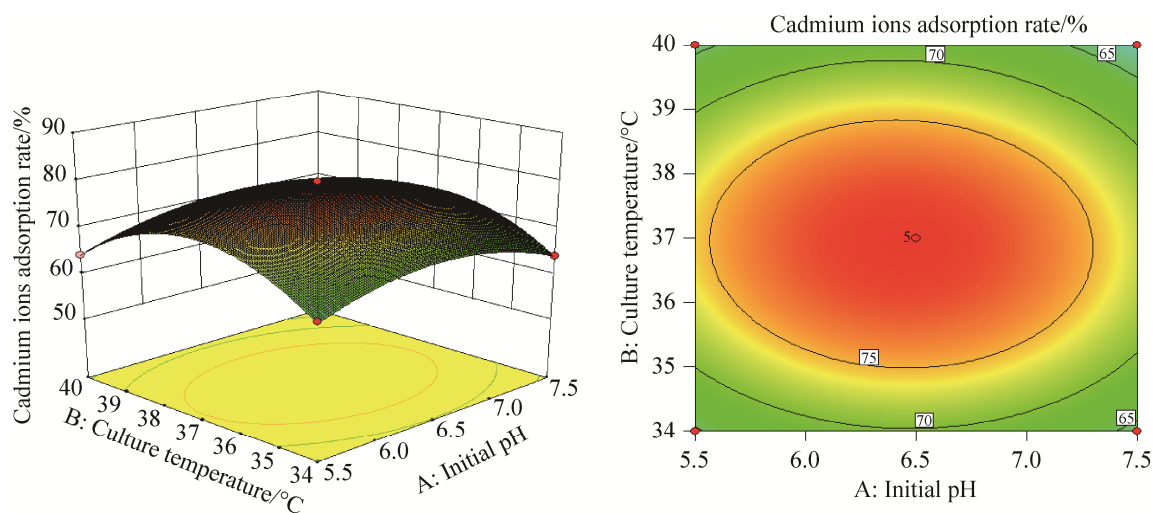


图 6. 初始 pH 与培养温度的交互作用对甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率影响的响应面图和等高线图

Figure 6. Response surface diagram and contour plot of correlative effects of initial pH and culture temperature on the cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain.

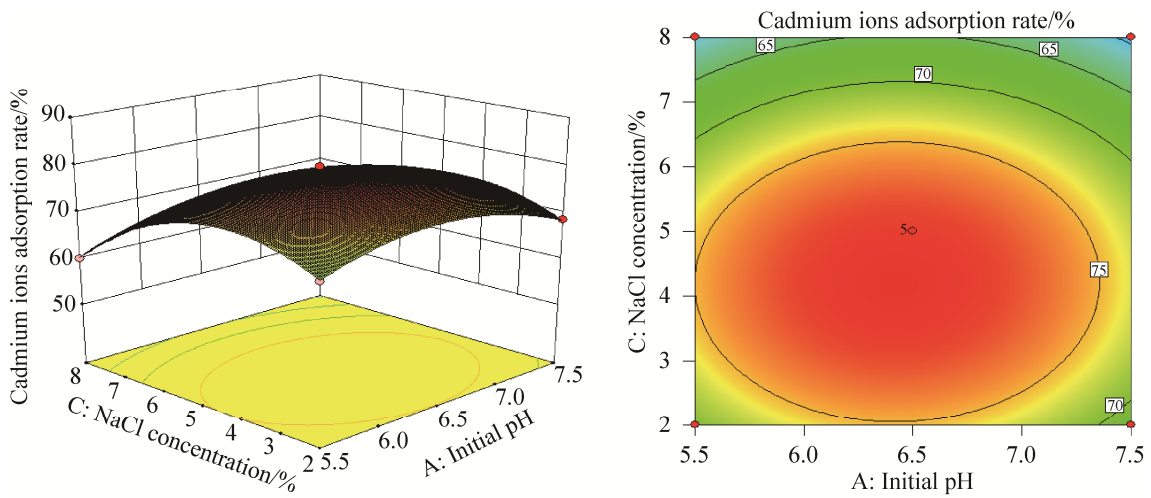


图 7. 初始 pH 与 NaCl 浓度的交互作用对甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率影响的响应面图和等高线图

Figure 7. Response surface diagram and contour plot of correlative effects of initial pH and NaCl concentration on the cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain.

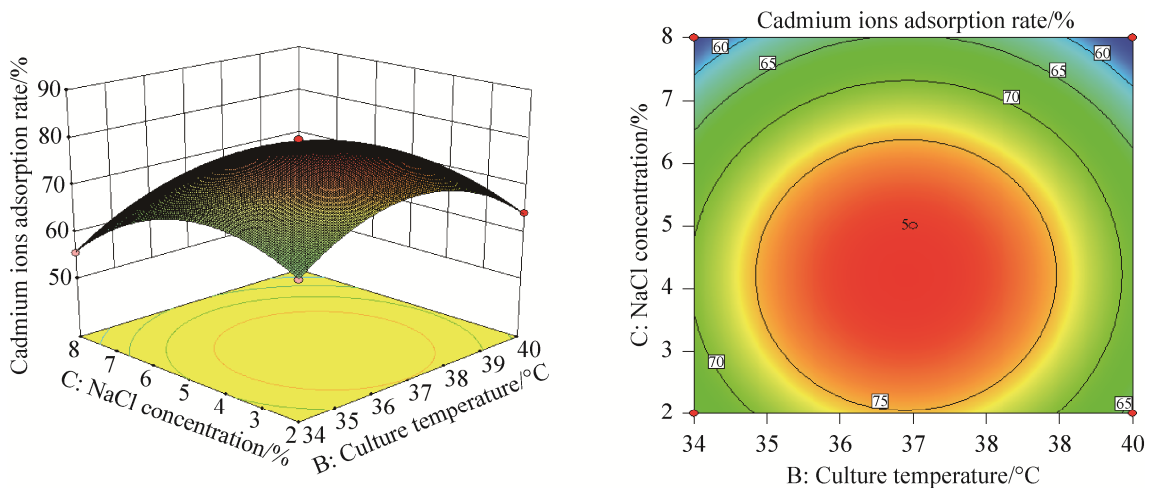


图 8. 培养温度与 NaCl 浓度的交互作用对甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率影响的响应面图和等高线图

Figure 8. Response surface diagram and contour plot of correlative effects of culture temperature and NaCl concentration on the cadmium ions adsorption rate of *Bacillus methylotrophicus* strain.

由图 6-8 可知, 交互因素的三维响应面图存在最高点, 即该模型的稳定点是甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率极值点, 此时, 甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率预测值为 79.73%, 根据各因素对应值以及模型进行最优参数分析, 3 个因素的最佳水平为: 初始 pH 6.4, 培养温度 37 °C, NaCl 浓度 4.2%。

2.3.3 模型验证: 由模型可得初始 pH 6.4、培养温度 37 °C、NaCl 浓度 4.2% 时, 预测的甲基营养芽胞杆菌镉吸附率的最大响应值为 79.73%。为证实模型预测结果, 分别在初始条件及该优化条件下, 进行镉吸附重复实验, 试验设计 3 个平行实验, 初始条件下得到的镉离子吸附率分别为

59.78%、63.26%、61.43%，均值为(61.49±1.74)%；优化条件下结果分别为 79.55%、79.69%、79.86%，平均值为(79.70±0.16)%，与预测值相当接近，说明该模型可很好地反映试验结果。相比于初始条件，优化后镉吸附提高了 29.61%。

优化后得到甲基营养芽胞杆菌镉吸附率的吸附条件为：起始 pH 6.4、培养温度 37 °C、NaCl 浓度 4.2%、装液量 50 mL/250 mL 三角瓶、培养时间 24 h。

2.4 菌株在 Cd 污染土中的吸附效果

以添加去离子水的镉污染土壤为对照组(CK)，以分别添加初始条件菌悬液(CJX)、优化条件菌悬液(YJX)于污染土中，培育稳定 7 d 后，测定不同处理土壤中的有效镉含量，比较菌株 NTGB29 优化前后的菌悬液在镉污染土中的吸附效果。如图 9 所示，CK、CJX、YJX 的土壤有效镉含量分别为 (0.317±0.015) mg/kg、(0.246±0.005) mg/kg、(0.223±0.007) mg/kg。土壤中添加菌悬液处理与对

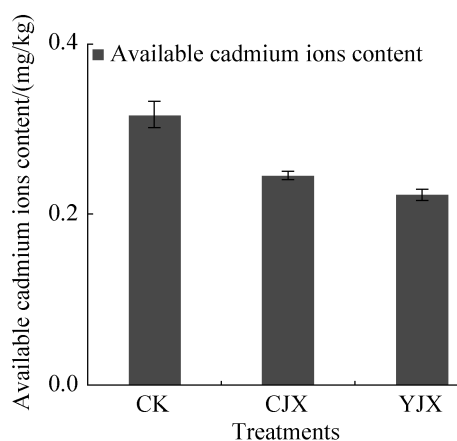


图 9. 甲基营养芽胞杆菌 NTGB29 在镉污染土中的吸附效果

Figure 9. Absorption effects of *Bacillus methylotrophicus* strain NTGB29 in the cadmium contaminated soil CK, control check; CJX, bacterial suspension under initial condition; YJX, bacterial suspension under optimizational condition ($P < 0.05$).

照组相比，均能降低土壤中的有效镉含量；CJX 组与 YJX 组的镉吸附率分别为 22.40%、29.65%，相比于初始条件下的菌悬液处理组，优化条件下菌悬液处理组的镉吸附率提高了 32.37%；相比于菌株在发酵液中的 Cd^{2+} 吸附率(79.70%)，在污染土中吸附效率有所降低。在发酵液吸附实验中，菌体细胞生长代谢营养成分充足，在土壤中营养物质相对不足，进而影响了菌株吸附效率，在培育土壤 7 d 后能够相对降低镉污染土壤中有效镉的含量。

3 讨论和结论

芽胞杆菌属细菌是国内外研究人员筛选、研究耐重金属、富集重金属(Cd、Cr 等)的土壤微生物菌种资源之一^[20]。Li 等^[21]研究发现，在高浓度镉污染的土壤条件下，耐重金属巨大芽胞杆菌 H3 菌株能够降低 79%–96%的水溶性镉，并能增加水稻产量。Manikandan 等^[22]在铬超富集植物大叶合欢根际分离筛选了 4 组内生菌，分别为假单胞菌属、根瘤菌属、芽胞杆菌属和盐水球菌属，分别将其应用于大叶合欢植物修复，结果显示芽胞杆菌属作用效果良好，不仅具有显著的铬积累能力，同时具有较高铬还原酶活性。可见芽胞杆菌属细菌在重金属污染微生物修复具有重要作用。夏娟娟等^[23]筛选得到镉耐性菌株 JL-4，经鉴定为芽胞杆菌属，该菌株能够在 18–38 °C、pH 4–10、1%–5% NaCl 条件下生长。本文对 1 株具有镉离子吸附功能的甲基营养芽胞杆菌的生长环境抗逆性进行了研究，结果显示，该菌可在 NaCl 浓度 0.5%–12.0%、pH 4.0–11.0、 Cd^{2+} 浓度 10–50 mg/L 条件下生长，抗逆性较好，可作为较好的试验材料之一应用于重金属镉污染环境的微生物修复研究中。

培养条件对菌株的生长繁殖具有重要作用, 从而影响菌株对重金属离子的吸附。溶液 pH 主要通过影响微生物表面官能团所带电荷及重金属离子在溶液中的存在形态来干扰吸附过程, 且大多数微生物对重金属的吸附发生在细胞表面, 速度快且依赖于环境^[24-25]。燕传明等^[26]的研究表明, 菌株 *Bacillus* sp. H3 对镉离子的吸附主要以胞外吸附为主, 最适生长 pH 在 6-7 范围内。本文的初始 pH 单因素优化研究表明, 在初始 pH 6.5 时, 菌株 NTGB29 生物量及对 Cd²⁺ 的吸附率达到最大值, 菌株在偏酸性条件下对 Cd²⁺ 仍具有良好的吸附效果, 对镉污染土壤修复具有一定的应用价值。好氧微生物的培养需要适量的溶氧量来维持其正常繁殖代谢及次生代谢产物的合成, 溶氧不足时, 会造成微生物代谢异常。摇瓶培养时, 装液量是影响发酵培养基中溶氧量的重要因素, 装液量越大, 溶氧量越小, 反之, 装液量过小时, 由于营养成分不足而影响菌体生长, 进而影响菌体生长及对 Cd²⁺ 的吸附性能。孙静等^[27]研究了通气量及培养时间对地衣芽胞杆菌富集 Cd²⁺ 效果的影响, 结果表明, 菌体对 Cd²⁺ 吸附率随装液量增加而降低, 最适的装瓶量为(40-50) mL/100 mL 三角瓶; 溶液中 Cd²⁺ 浓度在 6-24 h 范围内逐渐降低, 超过 24 h 后, 溶液中残留 Cd²⁺ 有所增加, 出现了脱附现象。本文中的适宜装液量为 50 mL/250 mL 三角瓶, 培养时间为 24 h, 超过 24 h 后, 菌株的生物量及 Cd²⁺ 吸附率均逐渐降低, 这是由于细菌对重金属的吸附很大程度上依赖于细胞表面吸附, 快速且不需要能量, 但缺点是具有可逆性, 即在生长后期, 菌体出现自溶现象后, 则 Cd²⁺ 再次释放出来^[28]。培养温度与 NaCl 浓度主要影响菌株的生物量, Na⁺ 是维持微生物细胞渗透压平衡的关键离子, 通常会通过影响微生物的正常生理代谢功能、

细胞形态等, 来影响菌体的生长及菌体对 Cd²⁺ 的吸附情况。相关研究表明^[28], 耐镉蜡状芽胞杆菌随培养温度的升高, 吸附量先上升后下降, 最优温度为 40 °C, 与其他温度相比, 吸附量相差较大; 对渗透压的研究表明, 最适的 NaCl 浓度为 0.5%。本文中温度及 NaCl 浓度单因素实验表明, 菌株对 Cd²⁺ 的吸附率与菌株的生物量呈现相关性, 在一定范围内, 菌株生物量越高, 可提供的重金属离子吸附位点越多, 进而吸附率越大, 因此对微生物培养条件的优化具有重要意义。

微生物的生长代谢与其生长环境因素密切相关, 在一个高度非线性、非结构化的复杂系统中获取最佳工艺, 试验优化技术异常重要^[29]。Tarangini 等^[30]采用响应面法(RSM)研究了不同条件对铜绿假单胞菌和枯草芽胞杆菌混合培养物去除六价铬[Cr(VI)]的影响, 采用响应面法设计(BBD)对生物吸附工艺进行了优化, 并评价了生物质浓度、pH 值、温度和接触时间等工艺参数对去除 Cr(VI) 的影响和相互作用。本研究采用 Box-Behnken 设计及响应面分析法获得了甲基营养芽胞杆菌镉离子吸附率的预测模型, 并得到了菌株吸附镉离子的最适条件为: 初始 pH 6.4、培养温度 37 °C、NaCl 浓度 4.2%、装液量 50 mL/250 mL 三角瓶、培养时间 24 h。经验证试验, 在初始 Cd²⁺ 浓度为 10 mg/L 条件下, 菌株 NTGB29 的镉离子吸附率为 79.70%, 与预测值(79.73%)非常接近, 表明模型合理、可靠, 相比于初始条件镉吸附率(61.49%)提高了 29.61%。

重金属污染土壤微生物修复菌种资源的有效性评价应建立在菌株在土壤中的吸附或活化效果的基础上。Kim 等^[31]发现的链状芽胞杆菌(*Bacillus catenulatus*) JB-022 在镉离子浓度 150 mg/L 时的去

除率为 66%。Kumar 等^[32]分离的兼性厌氧产碱杆菌在初始 Cd²⁺浓度 25 mg/L 时, 吸附率为 69%。以上研究均未涉及到菌株在污染土壤中的应用效果。本文的菌株镉吸附实验研究表明, 在初始 Cd²⁺浓度为 10 mg/L, 优化条件下的菌株 NTGB29 的镉吸附率为 79.70%, 同时对镉污染土中的有效镉吸附率为 29.65%。由于在不同的培养条件下, 不同菌株对 Cd²⁺的吸附效果不同, 对于重金属污染土壤微生物修复技术来讲, 菌种资源的开发具有重要意义。本文的实验菌株 NTGB29 具有良好的环境抗逆性及吸附镉性能, 在重金属污染修复方面具有研究价值, 为该领域研究增加了可利用的菌种资源。

参考文献

- [1] Cai MF, Li KM, Xie DP, Wu RR. The status and protection strategy of farmland soils polluted by heavy metals. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(S2): 223–230. (in Chinese)
蔡美芳, 李开明, 谢丹平, 吴仁人. 我国耕地土壤重金属污染现状与防治对策研究. *环境科学与技术*, 2014, 37(S2): 223–230.
- [2] Yang QL, Wu ZZ, Chen JL, Liu XG, Wang WH, Liu YW. Research status of phytoremediation of heavy metals contaminated soil and prospects of water and fertilizer regulating technology. *Ecology and Environmental Sciences*, 2015, 24(6): 1075–1084. (in Chinese)
杨启良, 武振中, 陈金陵, 刘小刚, 王卫华, 刘艳伟. 植物修复重金属污染土壤的研究现状及其水肥调控技术展望. *生态环境学报*, 2015, 24(6): 1075–1084.
- [3] Sochor J, Zitka O, Hynek D, Jilkova D, Krejcová L, Trnkova L, Adam V, Hubalek J, Kynicky J, Vrba R, Kizek R. Bio-sensing of cadmium(II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors*, 2011, 11(11): 10638–10663.
- [4] El-Habit OH, Moneim AEA. Testing the genotoxicity, cytotoxicity, and oxidative stress of cadmium and nickel and their additive effect in male mice. *Biological Trace Element Research*, 2014, 159(1/3): 364–372.
- [5] Li JH, Li WX, Yin H, Zhang B, Zhu W. Effect of cadmium on TET enzymes and DNA methylation changes in human embryonic kidney cell. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2015, 49(9): 822–827. (in Chinese)
李金慧, 李文学, 殷花, 张波, 朱伟. 镉暴露对人胚肾细胞 TET 酶表达及 DNA 甲基化水平的影响. *中华预防医学杂志*, 2015, 49(9): 822–827.
- [6] Skowerski M, Jasik K, Konecki J. Effects of interaction between cadmium and selenium on heart metabolism in mice: the study of RNA, protein, ANP synthesis activities and ultrastructure in mouse heart. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental & Clinical Research*, 2000, 6(2): 258–265.
- [7] Wu YM. Patent bibliometric analysis on the remediation techniques of soil heavy metal pollution. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(5): 901–904. (in Chinese)
吴耀楣. 中国土壤重金属污染修复技术的专利文献计量分析. *生态环境学报*, 2013, 22(5): 901–904.
- [8] Zhang DX, Wen SL, Huang WB, Cai ZP, Li SH, Qian W, Yuan LH, Yang WJ. Effects of electrode material on the electrokinetic remediation of cadmium-contaminated soil. *Guangdong Chemical Industry*, 2017, 44(7): 205–207. (in Chinese)
张大鑫, 温思玲, 黄伟斌, 蔡宗平, 黎森辉, 钱伟, 苑丽红, 杨伟杰. 电极材料对电动修复重金属镉污染土壤效果的影响. *广东化工*, 2017, 44(7): 205–207.
- [9] Gao Y, Cheng Q, Zhang MJ, Zhu ZY, Hu TT, Yang Y. Research advance on remediation technology of cadmium contaminated soil. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10): 103–110. (in Chinese)
高宇, 程潜, 张梦君, 朱振宇, 胡婷婷, 杨宇. 镉污染土壤修复技术研究. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 103–110.
- [10] Ni ZY, Xie GX, Zhang MK. Research progress on remediation technology of cadmium-contaminated agricultural soils. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2017, 23(6): 115–120. (in Chinese)
倪中应, 谢国雄, 章明奎. 镉污染农田土壤修复技术研究进展. *安徽农学通报*, 2017, 23(6): 115–120.
- [11] Mala JGS, Sujatha D, Rose C. Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiological Research*, 2015, 170: 235–241.
- [12] Chen JL, Liu XW, Zhang YJ, Fang XH. Identification of four tolerance bacteria and the preliminary study for pollution remediation of heavy metals. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 23(7): 1199–1204. (in Chinese)
陈佳亮, 刘晓文, 张雅静, 方晓航. 耐性细菌的分离鉴定及重金属污染修复初步研究. *生态环境学报*, 2014, 23(7): 1199–1204.
- [13] Li T, Wang J, Wei XL, Zhao HY, Zhao ZX, Liu HB. Identification and characterization of a *Bacillus methylotrophicus* strain with high flocculating activity. *RSC Advances*, 2015, 5(111): 91766–91775.

- [14] Sharma P, Sharma N, Pathania S, Handa S. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2017, 15(2): 369–377.
- [15] Frikha-Gargouri O, Ben Abdallah D, Ghorbel I, Charfeddine I, Jlaiel L, Triki MA, Tounsi S. Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Pest Management Science*, 2016, 73(3): 568–574.
- [16] Jemil N, Ayed H B, Manresa A, Nasri M, Hmidet N. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 144.
- [17] Rajendiran T, Gopakumaran N, Bhuyan U, Kumari S, Ramesh KV. Optimization and immobilization of lipase from *Bacillus subterraneus* TNUS15: comparison between response surface methodology and artificial neural network. *Der Pharma Chemica*, 2017, 9(12): 83–91.
- [18] Wang XB, Li XR, Mao CQ, Jiang NP, Guo TL. The characteristics of cadmium adsorption by Cd-resisting *Kluyveromyces marxianus* YS-K1. *Mycosystema*, 2013, 32(5): 868–875. (in Chinese)
王小波, 李学如, 茆灿泉, 江南屏, 郭泰林. 耐镉马克思克鲁维酵母重金属镉吸附特性的研究. *菌物学报*, 2013, 32(5): 868–875.
- [19] Liu M, Liu FZ, Liu BF. Determination of available lead and cadmium in soil. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(S1): 300–302. (in Chinese)
刘铭, 刘凤枝, 刘保锋. 土壤中有效态铅和镉的测定. *农业环境科学学报*, 2007, 26(S1): 300–302.
- [20] Fu J, Xie XH, Qian L, Liu JS. Cadmium tolerance and bio-accumulation mechanisms of *Ralstonia pickettii* strain DX-T3-01. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(5): 717–721. (in Chinese)
付瑾, 谢学辉, 钱林, 柳建设. 皮氏罗尔斯通氏菌株 DX-T3-01 的耐镉性能及镉富集机理. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(5): 717–721.
- [21] Li Y, Pang HD, He LY, Wang Q, Sheng XF. Cd immobilization and reduced tissue Cd accumulation of rice (*Oryza sativa* wuyun-23) in the presence of heavy metal-resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 2017, 138: 56–63.
- [22] Manikandan M, Gopal J, Kumaran RS, Kannan V, Chun S. Purification and characterization of a highly active chromate reductase from endophytic *Bacillus* sp. DGV19 of *Albizbia lebbek* (L.) Benth. actively involved in phytoremediation of tannery effluent-contaminated sites. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, 2016, 46(2): 192–199.
- [23] Xia JJ, Sheng XF, Jiang CY. Screening of cadmium-resistant strains and their effects on cadmium activation. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(11): 1357–1360. (in Chinese)
夏娟娟, 盛下放, 江春玉. 重金属镉抗性菌株的筛选及其对镉活化作用的研究. *生态学杂志*, 2005, 24(11): 1357–1360.
- [24] Xia BB, Zhong CB, Wei DZ, Cheng J, Wang XB. Biosorption of Zn^{2+} , Cd^{2+} by *Bacillus mucilaginosus*. *Biotechnology*, 2008, 18(3): 80–84. (in Chinese)
夏彬彬, 仲崇斌, 魏德州, 程静, 王秀兵. 胶质芽孢杆菌对 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 的生物吸附. *生物技术*, 2008, 18(3): 80–84.
- [25] Shen QY, Cao ZQ, Zhu YF, Shi WL. Isolation of a Cd-resistant bacterium and optimization of its bio-accumulation condition. *Soils*, 2016, 48(3): 615–620. (in Chinese)
沈秋悦, 曹志强, 朱月芳, 施维林. 一株耐镉细菌的分离鉴定及其吸附条件的优化. *土壤*, 2016, 48(3): 615–620.
- [26] Yan CM, He Z, Ge ZB, Sheng XF, He LY. Comparative study on adsorption characteristics of lead and cadmium by two heavy metal resistant bacteria. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(9): 3597–3604. (in Chinese)
燕传明, 贺卓, 葛占标, 盛下放, 何琳燕. 两株重金属抗性细菌对铅镉吸附特性的比较研究. *环境科学学报*, 2018, 38(9): 3597–3604.
- [27] Sun J, Li H, Liu LG, Zhan PP, Zhang CD, Su XR. Bioaccumulation capacity and mechanisms of cadmium by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Nuclear Agricultural Science*, 2013, 27(11): 1644–1651. (in Chinese)
孙静, 李晔, 刘联国, 詹萍萍, 张春丹, 苏秀榕. 地衣芽孢杆菌富集镉的特性及机理研究. *核农学报*, 2013, 27(11): 1644–1651.
- [28] Li H, Zhang GF, Shi L, Gong CJ. Isolation and identification of cadmium resistance *Bacillus cereus* SY and its culture conditions optimization. *Hubei Agricultural Sciences*, 2010, 49(6): 1353–1355. (in Chinese)
李辉, 张国芳, 石璐, 巩常军. 耐镉蜡状芽孢杆菌 SY 的筛选鉴定及其培养条件优化. *湖北农业科学*, 2010, 49(6): 1353–1355.
- [29] Xiao HQ, Li YZ. Research progress in the optimization of microbial culture medium. *Liquor-making Science & Technology*, 2010, (1): 90–94. (in Chinese)
肖怀秋, 李玉珍. 微生物培养基优化方法研究进展. *酿酒科技*, 2010, (1): 90–94.
- [30] Tarangini K, Kumar A, Satpathy GR, Sangal VK. Statistical optimization of process parameters for Cr(VI) biosorption onto mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 2010, 37(4/5): 319–327.
- [31] Kim SY, Jin MR, Chung CH, Yun YS, Jahng KY, Yu KY. Biosorption of cationic basic dye and cadmium by the novel

biosorbent *Bacillus catenulatus* JB-022 strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(4): 433–439.
[32] Kumar A, Cameotra SS, Gupta S. Screening and

characterization of potential cadmium biosorbent *Alcaligenes* strain from industrial effluent. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 52(2): 160–166.

Optimization of cadmium adsorption conditions and anti-stress characteristics of a cadmium-tolerant *Bacillus methylotrophicus* strain

Dongxue Zhang^{1,2,3,4}, Yaxiong Wen^{1,2,3,4}, Zhiwei Luo^{1,2,3,4}, Xueling Li^{1,2,3,4},
Shuangfeng Zheng^{1,2,3,4}, Shiyong Tan^{1,2,3,4*}

¹ Key Laboratory of Plant Nutrition and Biological Fertilizer, Ministry of Agriculture, Changsha 410205, Hunan Province, China

² Efficient Utilization of Heavy Metal Contaminated Farmland, Engineering Research Center in Hunan Province, Changsha 410205, Hunan Province, China

³ Biofertilizer Engineering & Technology Research Center in Hunan Province, Changsha 410205, Hunan Province, China

⁴ Taigu Ecological Biotechnology Group Limited Company, Changsha 410205, Hunan Province, China

Abstract: [Objective] To assess the anti-stress characteristics and to optimize the conditions affecting its cadmium ions adsorption efficiency of a cadmium-tolerant *Bacillus methylotrophicus* strain NTGB29. **[Methods]** The anti-stress characteristics were studied by plate colony-counting method. In addition, we used single factor experiment and response surface methodology to optimize the fermentation conditions of cadmium ions adsorption of the strain. Moreover, the available cadmium ions contents were used to verify the cadmium ions adsorption ability of the strain in the cadmium contaminated soils. **[Results]** The maximum tolerance of NTGB29 to NaCl, pH and concentration of Cd²⁺ was 10%, 11.0 and 50 mg/L, respectively. The optimum cadmium adsorption conditions were as follows: initial pH 6.4, culture temperature 37 °C, NaCl concentration 4.2%, liquid volume 50 mL in the 250 mL flask, and culture time 24 h. Under the conditions, the cadmium ions adsorption percentage reached to 79.70%. In addition, the available cadmium ions of the cadmium contaminated soils was decreased significantly by adding strain NTGB29, and the adsorption percentage was 29.65%. **[Conclusion]** Strain NTGB29 has good environmental resistance and Cd²⁺ adsorption capacity, and it could be a kind of valuable strain source to develop the heavy metal contaminated soil conditioners and microbial functional agents.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, anti-stress characteristics, cadmium ions adsorption percentage

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program-China (2017YFD0200806-4) and by the Key Research and Development of Hunan Province (2017NK2144)

*Corresponding author. E-mail: tanshiyong@taigubio.com

Received: 22 June 2018; Revised: 31 October 2018; Published online: 29 November 2018