

• 环境生物技术 •

## 耐铅镉菌株的分离鉴定及其吸附能力

王建才<sup>1,2,3</sup>, 刘兴华<sup>1,2,3</sup>, 王怀中<sup>1,2,3</sup>, 呼红梅<sup>1,2,3</sup>, 庞丽丽<sup>4</sup>, 黄保华<sup>1,2,3</sup>, 朱荣生<sup>1,2,3</sup>

1 山东省农业科学院 畜牧兽医研究所, 山东 济南 250100

2 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100

3 山东省畜禽健康养殖工程技术中心, 山东 济南 250100

4 青岛农业大学 动物医学院, 山东 青岛 266109

王建才, 刘兴华, 王怀中, 等. 耐铅镉菌株的分离鉴定及其吸附能力. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1600–1609.

Wang JC, Liu XH, Wang HZ, et al. Isolation, identification and heavy metals biosorption of a lead and cadmium-tolerant strain. Chin J Biotech, 2020, 36(8): 1600–1609.

**摘要:**堆肥中添加生物钝化剂是当前降低粪便中重金属生物毒性最为有效的方式之一, 为了进一步提高其钝化重金属的能力, 文中获得了复合重金属高耐性的钝化剂菌株, 并探究其生物学特性和吸附特征。采集猪粪堆肥样品并在改良的牛肉膏培养基中分离和筛选耐铅又耐镉的高耐性菌株, 通过形态结合分子生物学鉴定该菌株。该菌株分别在不同 pH、温度和盐浓度条件下培养获得其最适的生长条件, 进而在该条件下分析其对铅镉吸附的特性。结果获得一株耐铅浓度为 600 mg/L、镉浓度为 120 mg/L 的铅镉复合耐性菌株 SC19, 该菌株为西地西菌属, 其最适生长环境为 pH 值 7.0、温度 37 °C、盐浓度 0.5%。培养 36 h 的稳定期 SC19 菌株在吸附时间 30 min 时铅的去除率最高, 对铅的最大去除率和吸附量分别为 60.7% 和 329.13 mg/g; 培养 8 h 的对数期在吸附时间 30 min 时镉的去除率最高, 对镉的最大去除率和吸附量分别为 51.0% 和 126.19 mg/g。红外光谱分析显示, SC19 菌株对铅镉离子的吸附主要是细胞表面的多种活性基团与金属离子发生络合作用。该研究揭示了 SC19 菌株有较好的二价态铅镉离子吸附能力, 可为生物钝化重金属提供重要的微生物种质资源。

**关键词:** 西地西菌属, 分离鉴定, 生物学特性, 铅, 镉, 生物吸附

**Received:** December 3, 2019; **Accepted:** February 27, 2020

**Supported by:** China Postdoctoral Science Foundation (No. 2017M612316), Agricultural Scientific and Technological Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (No. CXGC2016B13), the Key R & D Project of Shandong Province, China (No. 2017CXGC0309).

**Corresponding author:** Rongsheng Zhu. Tel: +86-531-88978476; E-mail: zrschevy@163.com

中国博士后科学基金 (No. 2017M612316), 山东省农业科学院农业科技创新工程项目 (No. CXGC2016B13), 山东省重点研发计划 (No. 2017CXGC0309) 资助。

网络出版时间: 2020-03-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200310.1140.004.html>

# Isolation, identification and heavy metals biosorption of a lead and cadmium-tolerant strain

Jiancai Wang<sup>1,2,3</sup>, Xinghua Liu<sup>1,2,3</sup>, Huaizhong Wang<sup>1,2,3</sup>, Hongmei Hu<sup>1,2,3</sup>, Lili Pang<sup>4</sup>, Baohua Huang<sup>1,2,3</sup>, and Rongsheng Zhu<sup>1,2,3</sup>

1 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong, China

2 Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Jinan 250100, Shandong, China

3 Shandong Provincial Engineering Technology Center of Animal Healthy Breeding, Jinan 250100, Shandong, China

4 College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

**Abstract:** Adding biological passivation agent during composting is one of the most effective ways to reduce the toxicity of heavy metals in contaminated livestock manure. To further improve biological passivation, we obtained a strain with high-heavy metal compounds tolerance to passivate heavy-metal contaminated manure and to characterize heavy-metal biosorption. High-tolerance microorganisms for lead and cadmium were isolated and screened from swine manure composting samples. The strain was identified by its morphology and molecular biology. After the influence of different pH, temperature and salt concentrations on growth of the strain were investigated, the optimal growth conditions were obtained for further analysis of its biosorption characteristics of lead and cadmium. The bacterium with tolerance to lead and cadmium termed SC19 was obtained, whose lead resistance was 600 mg/L and cadmium resistance was 120 mg/L. The isolate was further identified as *Cedecea* sp., and then its optimum pH was 7.0, temperature was 37 °C, and salt concentration was 0.5%. Lead removal was highest after 30 min of adsorption by the SC19 strain cultured for the stationary phase 36 h, and the maximum removal rate and biosorption capacity of lead were 60.7% and 329.13 mg/g, respectively. Meanwhile, cadmium removal was highest after 30 min of adsorption by the strain cultured for the logarithmic phase 8 h, and the maximum removal rate and biosorption capacity of cadmium were 51.0% and 126.19 mg/g, respectively. Fourier Transform InfraRed (FT-IR) results revealed that the biosorption process mainly happened on the surface of SC19 cell and many active groups on the cell surface could chelate the  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$ . By comprehensive comparison, it was showed that strain SC19 shared a certain capacity of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  biosorption, and the bacterium provided precious microbial germplasm resources for biological passivation of heavy metal contaminated manure.

**Keywords:** *Cedecea* sp., isolation and identification, biological characteristics, lead, cadmium, biosorption

随着我国养殖业的快速发展,以及微量元素添加剂在饲料中广泛使用,导致畜禽粪便中重金属含量较高,造成了严重的重金属污染<sup>[1-2]</sup>。铅和镉是常见的重金属污染元素,其污染危害具有隐蔽性、滞后性、长期性和不可逆转等特点。同时,重金属可通过污染农作物的可食用部分进入人体,对人体造成严重的伤害<sup>[3-4]</sup>。在畜禽粪便堆肥过程中添加钝化剂是治理重金属污染的有效途径。常用的钝化剂种类有物理钝化剂、化学钝化剂和生物钝化剂<sup>[5]</sup>。相对其他钝化方式,生物钝化是微生物通过生物吸附、重金属还原、胞外沉淀、生物矿化等作用实现,最终产物大都是无害的、稳定的,并且具

有处理时间短、投资少、不会产生二次污染等特点<sup>[6]</sup>。因此,生物钝化成为畜禽粪便重金属钝化应用的优选技术。虽然生物钝化是当前钝化重金属污染最有效、最方便的方式之一,但是仍存在菌株不能耐复合重金属、耐重金属浓度低以及吸附效率低等问题。

耐重金属微生物是生物钝化重金属的基础,因而从环境中筛选抗性菌株,研究其生物学特性及对重金属的作用效果是非常必要的。有研究发现,在铅镉污染的土壤中分离的40株抗铅镉的菌株中,对铅和镉的最高耐受浓度为450 mg/L和40 mg/L<sup>[7]</sup>。Ansari等<sup>[8]</sup>从污灌土壤中分离一株大肠

杆菌 *Escherichia coli*, 通过镉的吸附试验表明当  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 50–400  $\mu\text{g/mL}$  时, 在 2 h 内对 Cd 的吸附量从 4.96 mg/g 增加到 45.37 mg/g 细胞干重。从广西某地铅锌复合重金属污染土壤中分离得到一株 K7 细菌, 能在  $\text{Pb}^{2+}$  浓度为 1 200 mg/L 和  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 30 mg/L 培养基中生长良好<sup>[9]</sup>。目前研究发现在广西省桂西北尾矿区重金属污染的土壤中分离得到一株耐铅镉的真菌 K3, 其对铅和镉的最大耐受浓度分别为 1 200 mg/L 和 120 mg/L<sup>[10]</sup>。金忠民等<sup>[11]</sup>从黑龙江省扎龙湿地土壤中筛选一株抗铅镉的菌株阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*, 该菌对  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  的去除率分别达到了 44.39% 和 25.14%。然而, 可以同时耐受多种高浓度金属离子, 并且具有较高去除效率的菌株尚不多见。因此想要筛选高耐复合重金属的菌株, 还有待于进一步的探索和研究。

因此, 本研究采集了猪粪堆肥高温期的样品, 从中分离和筛选得到耐受铅镉复合抗性菌株, 鉴定了其种属, 检测了其重金属耐受性和生物学特性, 并研究了其对铅镉的吸附效果和机制, 以期为生物钝化重金属污染的应用提供重要的资源材料和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源与培养基

筛选菌株的样品采自猪粪秸秆堆肥高温期的样品。

耐铅镉菌株筛选与纯化培养基采用含一定浓度的铅镉离子的改良牛肉膏培养基。其成分如下: 牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0–7.4, 上述培养基灭菌后加入无菌的  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  水溶液, 使重金属离子达到设计的浓度。固体培养基是在液体培养基中加入 20 g/L 琼脂。

### 1.2 菌株分离与筛选

称取新鲜堆肥样品 10 g, 加入 90 mL 无菌水、

适量玻璃珠, 于 37 °C、180 r/min 振荡培养 30 min 后静置澄清 10 min, 将上清液稀释后取 0.2 mL, 涂布于含有重金属  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  浓度分别为 100 mg/L 和 20 mg/L 固体培养基上, 培养在 37 °C 条件下 48 h, 待菌落长出以后选取生长较好的划线纯化后逐步在培养基上提高  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  的浓度, 对相对较强的菌株进行耐性驯化培养。同时, 将分离所得菌株接种在含有不同浓度的  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  的液体培养基中, 进一步验证其生长情况。最终通过复筛选取耐铅镉能力强的菌株。

### 1.3 耐铅镉菌株的鉴定

#### 1.3.1 菌株菌落及细胞形态

对筛选出的耐性菌株观察其菌落外观形态、颜色及透明度、菌落直径、是否易于挑起、边缘及表面等, 并采用革兰氏染色法在光学显微镜下观察菌体的形态和大小。

#### 1.3.2 系统发育学分析

采用引物对 27F 和 1492R 经 PCR 扩增 16S rDNA 基因片段。扩增条件为: 首先 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。基因扩增产物经纯化后由上海美吉生物公司测序, 将所得的序列与 GenBank 中核酸数据库中已有的 16S rDNA 序列进行相似性比对分析, 并上传到 GenBank 数据库中。

### 1.4 培养条件对菌株生长的影响实验

#### 1.4.1 pH 对菌株生长的影响

菌株在液体培养基中 37 °C 预培养 48 h, 然后取一定体积种子液分别接种于 pH 为 5、6、7、8、9 的 25 mL 液体培养基中, 使其接种的起始  $OD_{600}$  值为 0.2, 200 r/min 振荡培养 144 h, 每隔 12 h 取样测定  $OD_{600}$  值, 选取不同 pH 条件下的最大值作图。

#### 1.4.2 温度对菌株生长的影响

菌株在液体培养基中 37 °C 预培养 48 h, 然后取一定体积种子液接种于 25 mL 的液体培养基中, 使其接种的起始  $OD_{600}$  值为 0.2, 培养液的起始 pH

为 7, 分别置于 25 °C、30 °C、37 °C、45 °C 和 55 °C 温度下 200 r/min 振荡培养 144 h, 每隔 12 h 取样测定  $OD_{600}$  值, 选取不同温度条件下的最大值作图。

#### 1.4.3 盐浓度对菌株生长的影响

菌株在液体培养基中 37 °C 预培养 48 h, 然后取一定体积种子液接种于 NaCl 浓度分别为 0.5%、1%、2%、4% 和 6% 的 25 mL 液体培养基中, 使其接种的起始  $OD_{600}$  值为 0.2, 并在 pH 7、37 °C、200 r/min 条件下振荡培养 144 h, 每隔 12 h 取样测定  $OD_{600}$  值, 选取不同盐浓度条件下的最大值作图。

#### 1.4.4 菌株的生长曲线

菌株在液体培养基中 37 °C 预培养 48 h, 然后取一定体积种子液接种于 NaCl 浓度为 0.5% 的 25 mL 液体培养基中, 使其接种的起始  $OD_{600}$  值为 0.2, 并在 pH 7、37 °C、200 r/min 条件下振荡培养 144 h, 前 24 h 每隔 4 h 取样测定菌液  $OD_{600}$  值, 之后每隔 12 h 取样测定。以培养时间为横坐标, 以  $OD_{600}$  值为纵坐标, 绘制菌株生长曲线。

### 1.5 菌株对铅镉的吸附实验

#### 1.5.1 吸附时间对菌株吸附的影响

根据生长曲线, 取 5 mL 培养 8 h 的湿菌体离心后加入到含  $Pb^{2+}$  浓度为 200 mg/L 的水溶液中, 在 37 °C、pH 值自然的条件下, 分别振荡 5、15、30、45、60、80、120 min, 而后离心收集上清液测定铅浓度。同样的方法测定菌体对镉的吸附率, 其中  $Cd^{2+}$  的浓度为 100 mg/L。

#### 1.5.2 生长时期对菌株吸附的影响

将培养至对数期 (培养 4 h 和 8 h) 和稳定期 (培养 36 h 和 60 h) 的四个不同培养时间的菌体取等量湿重 (0.051 2 g) 分别接种到含  $Pb^{2+}$  浓度为 200 mg/L 的水溶液中, 在 37 °C、pH 值自然的条件下, 分别振荡 30 min 和 120 min, 而后离心收集上清液测定铅浓度。同样的方法测定菌体对镉的吸附率, 其中  $Cd^{2+}$  的浓度为 100 mg/L, 分别振荡 30 min 和 60 min。

#### 1.5.3 铅镉共存对菌株吸附的影响

将培养至稳定期 36 h 的菌体取湿重 (0.051 2 g) 接种到  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  浓度分别为 200 mg/L 和 100 mg/L 的水溶液中, 在 37 °C、pH 值自然的条件下振荡 30 min, 而后离心收集上清液测定铅浓度。同样的方法测定菌体对镉的吸附率, 其中接种的为对数期 8 h 的菌体。

#### 1.5.4 分析方法

用原子吸收分光光度计法测定铅和镉的含量<sup>[12]</sup>。去除率和吸附量  $q$  按以下公式计算:

$$\text{去除率}(\%) = (C_i - C_f) / C_i \times 100\% \quad (1)$$

$$q \text{ (mg/g)} = (C_i - C_f) v / m \quad (2)$$

式中,  $C_i$  为吸附前溶液中的  $Pb^{2+}$  ( $Cd^{2+}$ ) 浓度 (mg/L);  $C_f$  为吸附后溶液中的  $Pb^{2+}$  ( $Cd^{2+}$ ) 浓度 (mg/L);  $v$  为样品溶液的体积 (L);  $m$  为添加的菌株的干重 (g)。

### 1.6 红外光谱吸收分析

将吸附  $Pb^{2+}$  (200 mg/L) 和  $Cd^{2+}$  (100 mg/L) 后的菌体与空白实验的菌体高速离心后收集, 用蒸馏水清洗 1 次后烘干, 将适量菌体样品和 KBr 混匀, 取样品压片后用傅里叶变换红外光谱分析仪对空白实验的菌体和吸附后的菌体进行分析。

### 1.7 数据统计分析

利用 MEGA 5.0 软件生成系统发育树。所有试验均设 3 个重复, 所获数据利用 Excel 和 SPSS 21.0 软件进行统计分析及其差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐铅镉菌株的筛选

从新鲜的猪粪堆肥样品中富集培养、平板涂布和划线培养法分离纯化耐铅镉菌株, 通过菌落不同生长形态特征, 初步筛选出 8 株菌株, 分别编号为 SC12、SC13、SC14、SC15、SC16、SC17、SC18 和 SC19。再经过在不同铅镉离子浓度下的生长复筛耐铅镉的优势菌株, 如表 1 所示。

由表 1 可知, 除了 SC19 菌株外, 其他菌株随

表 1 菌株在不同铅镉离子浓度下的生长状况

Table 1 The growth status of the strains in different lead and cadmium ion concentrations

Strain	Pb <sup>2+</sup> /Cd <sup>2+</sup> (mg/L)							
	0	100	200	300	400	500	600	700
SC12	+	+	-	-	-	-	-	-
SC13	+	+	+	+	+	-	-	-
SC14	+	+	+	+	+	-	-	-
SC15	+	+	-	-	-	-	-	-
SC16	+	+	-	-	-	-	-	-
SC17	+	+	+	-	-	-	-	-
SC18	+	+	+	+	-	-	-	-
SC19	+	+	+	+	+	+	+	+

+: growth; -: no growth.

随着铅镉离子浓度的增加,生长形势逐渐变差直至停止生长。最终 SC19 菌株能够在 Pb<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>浓度分别为 600 mg/L 和 120 mg/L 的培养基上生长,同时也发现该菌株在铅镉离子浓度分别为 700 mg/L 和 140 mg/L 的条件下生长,但生长明显受到抑制。因此,SC19 菌株是筛选的耐铅镉特性最强的菌株。

## 2.2 菌株的初步鉴定

### 2.2.1 菌株的形态特征

在固体培养基上菌落呈乳白色,圆形,较小,表面湿润光滑,不透明,边缘不整齐,粘稠,易

挑取。菌体细胞在光学显微镜下呈短杆状,革兰氏阴性。

### 2.2.2 菌株 16S rDNA 序列分析

对菌株的 16S rDNA 序列进行扩增,得到基因序列全长 1 501 bp,通过与 GenBank 的序列进行比对的结果表明,菌株 SC19 与奈氏西地西菌 *Cedecea neteri* YS 序列具有 99%的相似性,故该菌株为西地西菌属 *Cedecea* sp.。该序列已提交至 GenBank 数据库,获得的登录号为 MN133936,并通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树(图 1)。结果显示,SC19 菌株与奈氏西地西菌 YS 的亲缘关系很近,由此进一步鉴定出该菌株的种属分类。

## 2.3 环境因子对菌株生长的影响

### 2.3.1 不同 pH 值下菌株的生长情况

pH 值会影响微生物的物质代谢、生命活动等,是最为重要的因素。SC19 菌株在不同 pH 值下进行培养,结果如图 2A 所示,SC19 菌株在 pH 为 5-7 时,OD<sub>600</sub> 值随 pH 的增加而上升,在 pH 为 7-9 时,OD<sub>600</sub> 值随 pH 值增加而降低,因此,在培养基 pH 为 7 时,该菌株的长势最佳。综上分析,该菌株属于偏中性的菌株,但一定程度上能耐酸碱。

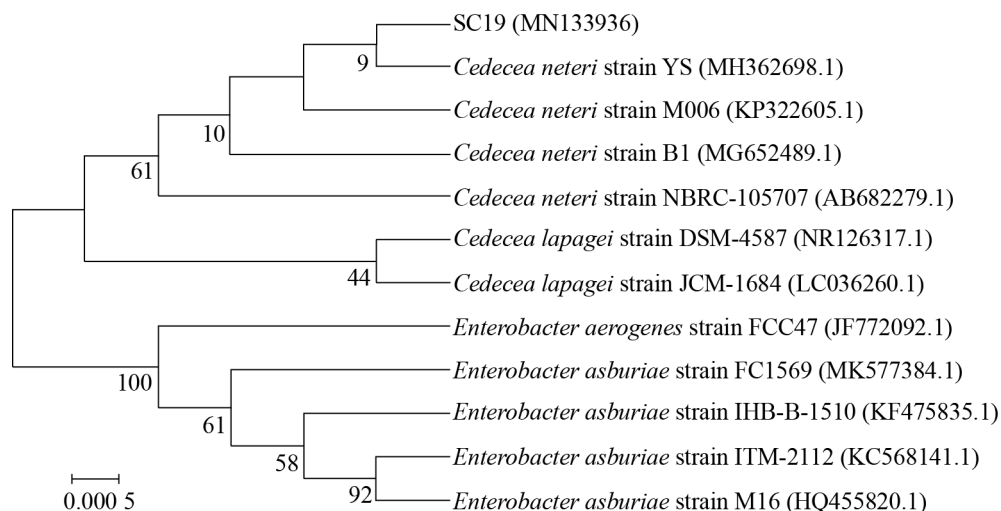


图 1 SC19 菌株与相关种的 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees, based on 16S rDNA gene sequences, showing relationships between strain SC19 with other strains.

### 2.3.2 不同温度下菌株的生长情况

除了 pH 值影响细菌生长外, 温度对 SC19 菌株的生长也有很大影响。由图 2B 可知, 在 25–37 °C 范围内, SC19 的生长会随着温度的上升呈现增长趋势, 但温度持续升高时, 菌体生物量出现急剧下降的现象, 不利于菌株的生长繁殖。这是因为温度会影响与菌株代谢相关的酶活性, 在适宜温度范围内, 温度升高会增强酶活性, 加快菌株生长; 温度过高酶失去活性, 催化功能减弱。因此, SC19 菌株在温度为 37 °C 左右时, 菌株的生长状况最好。

### 2.3.3 不同盐浓度下菌株的生长情况

培养基中的盐浓度会影响菌株的渗透压, 太高的渗透压会造成细菌失水, 进而影响菌株的正常活动。图 2C 显示 SC19 菌株在不同盐浓度的生长情况, 在不同盐浓度下, 生长情况差别很大。菌株在盐浓度 0.5% 时, 菌株的生长最佳, 随着盐浓度增加至 4% 时, 菌株仍能正常生长。因此, 该菌的耐渗透压能力很强。

### 2.3.4 菌株的生长曲线

综合分析表明, SC19 菌株的最适生长 pH、温度和盐浓度分别为 7、37 °C 和 0.5%, 其生长曲线图如图 3 所示。由图 3 可以看出 SC19 菌株的生长曲线并没有明显的适应期, 说明菌株的适应性很强。在 0–12 h 期间, 菌株经过对数期的快速生长, 之后一直到 60 h, 其生长曲线趋于稳定, 在 60 h 后进入衰亡期。

## 2.4 菌株对铅镉离子的吸附

### 2.4.1 吸附时间对吸附的影响

图 4 显示 SC19 菌株随时间变化分别对铅、镉离子的去除率和吸附量  $q$  的变化曲线。由图 4A 和 4B 可知, SC19 在 120 min 时对  $Pb^{2+}$  去除率最大为 58.0%, 此时吸附量为 287.01 mg/g。而且在吸附 5 min 时, 去除率为 56.7%, 与最大去除率并无显著差异。因此, SC19 菌株在 5 min 时的吸附即达到平衡, 之后处在吸附和解析的动态过程中。同时,

图 4A 和 4B 显示对  $Cd^{2+}$  的吸附, 在 5 min 时达到饱和, 此时去除率为 49.7%, 吸附量为 122.97 mg/g, 之后在吸附时间为 30 min 时去除率最大为 51.0%, 吸附量为 126.19 mg/g, 随后在吸附 60 min 后, 去除率和吸附量有所下降, 出现解析现象, 此过程与

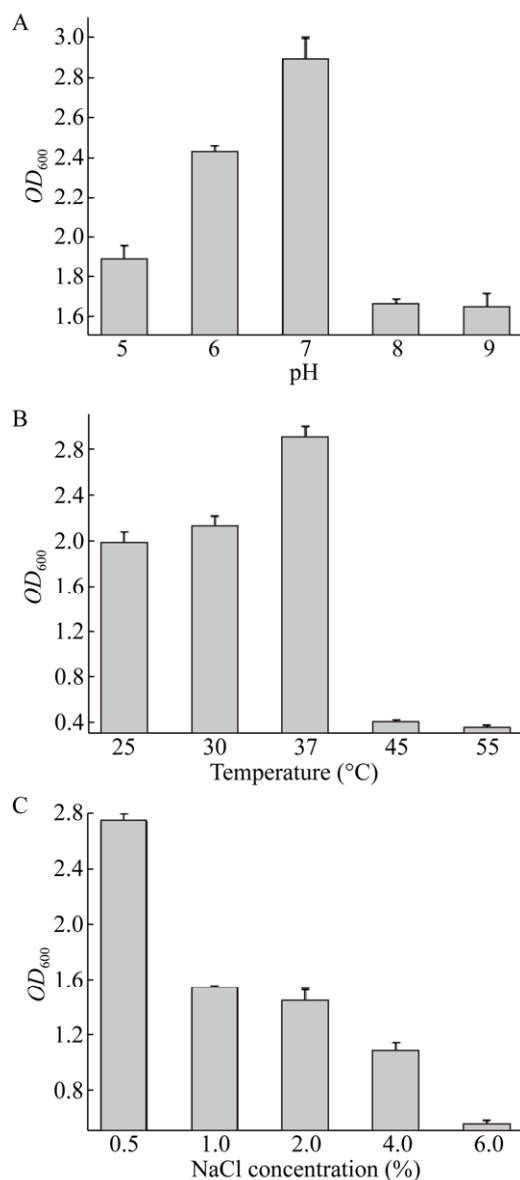


图 2 SC19 菌株在不同培养条件下  $OD_{600}$  的变化  
Fig. 2 Changes of  $OD_{600}$  during cell growth of strain SC19 cultured under different culture conditions. (A) Various initial pH. (B) Various temperature. (C) Various NaCl concentration.

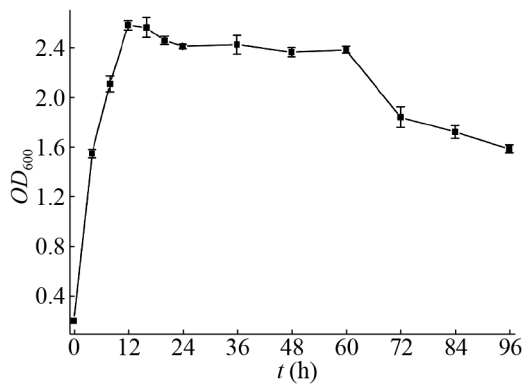


图3 SC19菌株的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of strain SC19.

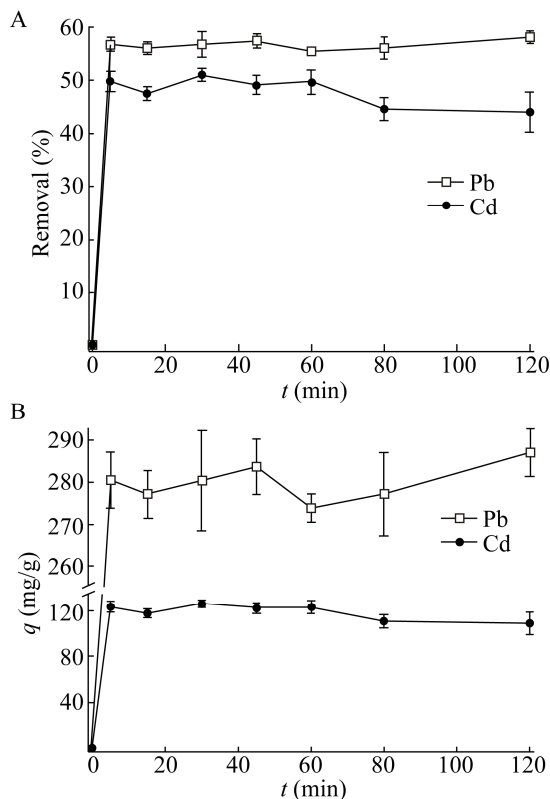


图4 在不同吸附时间 SC19 菌株对铅镉吸附影响

Fig. 4 Effect of different reaction time on biosorption of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> by strain SC19. (A) Removal (%) of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. (B)  $q$  (mg/g dry weight) of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>.

以前的研究结果相似<sup>[13]</sup>。可见, 菌株对不同重金属的吸附过程变化是不同的, 且对铅的吸附能力远远大于对镉的吸附。

#### 2.4.2 不同时期的菌株对吸附的影响

不同生长时期的菌株对重金属的吸附能力是

有差异的<sup>[14]</sup>。为了了解 SC19 菌株的不同生长时期与重金属铅镉离子的吸附关系, 由图 5A 和 5B 可知, 在对数期 8 h 时, SC19 菌株对 Pb<sup>2+</sup> 的去除率和吸附量分别为 57%、275.12 mg/g, 稳定期 36 h 时去除率和吸附量分别为 60.7%、329.13 mg/g。但是两者之间并没有显著差异, 可见不同菌龄的 SC19 对铅的吸附影响不明显。由图 5 可知, 在对数期 8 h 时, SC19 菌株对 Cd<sup>2+</sup> 的去除率最高为 48.2%, 吸附量为 120.50 mg/g; 当菌龄为 36 h 时, 其去除率仅为 35.7%, 此时吸附量为 90.46 mg/g, 对数期的去除率显著高于稳定期。因而不同生长时期的 SC19 菌株对 Cd<sup>2+</sup> 的吸附能力是有差异的。

#### 2.4.3 铅镉离子共存时对吸附的影响

为了研究铅镉离子共存时对 SC19 菌株吸附能力的影响, 将该菌株培养在含有 Pb<sup>2+</sup> 和 Cd<sup>2+</sup> 浓度分别为 200 mg/L 和 100 mg/L 的溶液中。结果发现

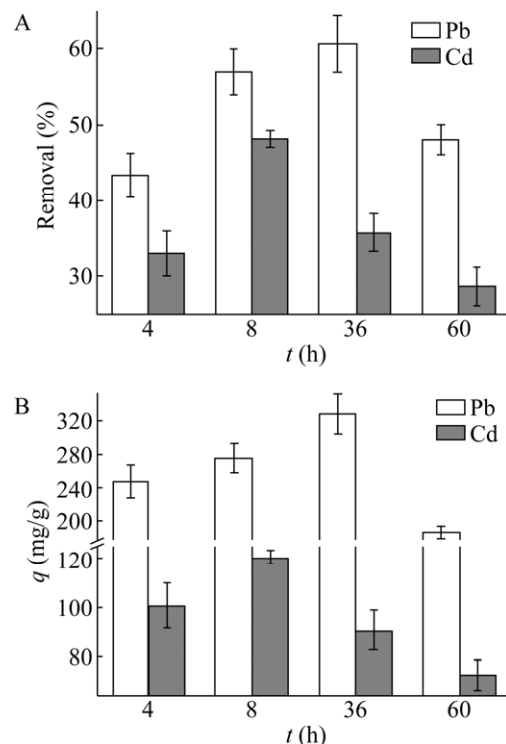


图5 在不同生长时期 SC19 菌株对铅镉吸附影响

Fig. 5 Effect of different growth stage on biosorption of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> by strain SC19. (A) Removal (%) of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. (B)  $q$  (mg/g dry weight) of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>.

当  $\text{Cd}^{2+}$  存在时, 菌株对  $\text{Pb}^{2+}$  的吸附量仅为 200.79 mg/g; 而当  $\text{Pb}^{2+}$  存在时, 菌株对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量为 91.60 mg/g。由此可知, 当铅镉离子共存时会竞争菌株表面的吸附位点, 故而使得两种重金属离子的吸附量都下降, 但相对而言, 菌株对镉的吸附更有偏好性。

### 2.5 菌株吸附重金属前后的红外光谱分析

根据已有文献报道<sup>[15]</sup>, 对 SC19 菌株吸附铅镉离子前后的红外光谱的主要吸收峰进行分析。而从吸附前后红外光谱图的变化发现 (图 6), 吸附  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  后, 羟基的最大吸收位置从 3 413.90  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 3 413.36  $\text{cm}^{-1}$ ; 烷基  $\text{CH}_2$  的反对称伸缩吸收峰从 2 924.71  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 2 924.41  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\text{C}=\text{O}$  的对称伸缩振动最大吸收峰从 1 653.23  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 1 652.77  $\text{cm}^{-1}$ ; 胺基 (NH) 吸收峰从 1 534.27  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 1 530.05  $\text{cm}^{-1}$ ; 羧基-COOH 中 C-O 伸缩振动最大吸收峰从 1 450.79  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 1 450.41  $\text{cm}^{-1}$ ; 磷酸基 P-O 的吸收峰从 1 153.78  $\text{cm}^{-1}$  迁移至

1 154.26  $\text{cm}^{-1}$ ; C-O-C 的伸缩振动吸收峰从 1 233.67  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 1 228.81  $\text{cm}^{-1}$ ; 位于 1 000–1 100  $\text{cm}^{-1}$  间的糖类 C—OH 伸缩振动吸收峰从 1 069.97  $\text{cm}^{-1}$  迁移至 1 065.41  $\text{cm}^{-1}$ ; 低于 600  $\text{cm}^{-1}$  的 M-O 和 O-M-O (M-金属离子) 的振动吸收峰从原来的单峰 (546.08  $\text{cm}^{-1}$ ) 变成双峰 (594.24  $\text{cm}^{-1}$  和 518.74  $\text{cm}^{-1}$ ), 且吸收峰增强。

### 3 讨论

随着饲料添加剂的普遍使用, 粪便中存在严重的重金属污染。在堆肥中添加生物钝化剂是解决污染的重要途径, 但目前筛选的钝化剂菌株大部分是耐单一重金属铅或镉的菌株, 很少有筛选耐复合高浓度铅镉的报道<sup>[16]</sup>。本研究从猪粪堆肥样品中筛选出一株耐铅和镉浓度分别为 600 mg/L 和 120 mg/L 的菌株, 经分子生物学鉴定为西地西菌属。而 SC19 菌株对不同重金属的耐受机制是不同的, 且其对铅镉的耐受性是高于陈月芳等<sup>[17]</sup>、刘彧<sup>[18]</sup>对其他菌株耐铅镉浓度的研究结果。

生物钝化剂菌株通过生物吸附、重金属还原、胞外沉淀、生物矿化等作用对重金属吸附沉淀而实现重金属钝化<sup>[19]</sup>, 而适应环境能力强的菌株是作为生物钝化剂的前提。对 SC19 菌株的生物学特性研究表明, 该菌株能在 pH 值 5–9 的范围内生长, 耐酸碱能力强, 同时, 在盐浓度达到 4% 时仍可以繁殖, 说明其耐渗透压的能力也很强。虽然 SC19 菌株耐高温的性能不是很优良, 但是菌株的繁殖速度快, 能在接种堆肥物料升温期的短时间内快速繁殖从而发挥其重金属吸附的作用。

典型的重金属吸附过程可分为两个阶段, 第一阶段与代谢无关, 发生在细胞壁表面, 主要以吸附和离子交换过程为主, 为快速吸附过程 (在 5–15 min 左右); 第二阶段需要能量的缓慢吸附, 即吸附在细胞表面的金属离子进一步转移到细胞内部, 主要以化学吸附为主<sup>[20]</sup>。SC19 菌株对铅镉的吸附在 5 min 内快速吸附达到饱和, 此过程中对铅的去除率为 58.0%, 吸附量为 287.01 mg/g;

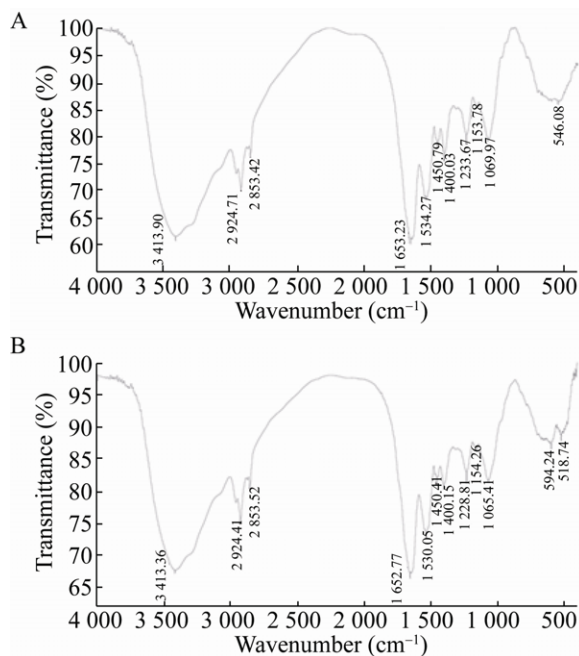


图 6 SC19 菌株吸附铅镉前后的红外光谱图  
Fig. 6 IR spectrogram of strain SC19 before and after biosorption of  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ . (A) Before contacted with  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ . (B) After contacted with  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ .



对镉的去除率为 51.0%，吸附量为 126.19 mg/g。但是在缓慢吸附阶段，菌株对铅的主动吸附能力更强，因为在 60 min 之后对镉的吸附明显下降，可能是由于该菌株对铅镉的化学吸附机制不同造成的。对不同生长阶段的 SC19 菌株对铅镉吸附研究发现，虽然在稳定期时菌株对铅的去除率和吸附量稍高分别为 60.7% 和 329.13 mg/g，但对数期和稳定期对铅的吸附并没有显著差异；而对数期的菌株对镉的吸附能力是明显强于稳定期的，其原因可能是不同时期的菌株与重金属吸附相关组分的含量差别引起的<sup>[21]</sup>。同时，研究发现当铅镉离子共存时，菌株对两种重金属的吸附量都发生显著降低。此外，与其他报道中菌株粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*<sup>[22]</sup> 和大肠杆菌<sup>[8]</sup> 等相比较，该菌株具有更高的铅镉吸附效率。

菌株可通过细胞表面带负电的化学基团与重金属离子进行快速吸附。对 SC19 菌株红外光谱分析的结果表明，细胞中羟基、羰基、羧基、胺基、磷酸基等与  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  之间发生了相互作用，使特征峰吸收强度和位置都出现不同程度的变化，是菌株细胞表面吸附重金属离子的主要活性基团，这与其他学者对汞离子和铅离子的研究结论是相似的<sup>[20,23]</sup>。

总之，本研究通过富集培养和平板分离，从猪粪堆肥样品中筛选了一株西地西菌属 SC19 菌株。该菌株耐复合重金属铅镉浓度高，环境适应能力强，生长繁殖快速，而且有很强的二价态铅镉离子吸附能力，能通过细胞成分中的羟基、羧基、胺基等活性基团与铅镉离子发生络合作用。SC19 菌株是开发高效生物钝化剂的优质微生物资源，但对于该菌株通过生物钝化转化重金属形态从而达到降低其生物有效性效率的研究，还需要在重金属耐性机理以及在堆肥中的添加试验方面进行深入探索。

## REFERENCES

[1] Li R, Zhao LX, Meng HB, et al. Research progress of heavy metal immobilization and its mechanism during

composting. *J Agric Sci Technol*, 2018, 20(1): 121–129 (in Chinese).

李冉, 赵立欣, 孟海波, 等. 有机废弃物堆肥过程重金属钝化研究进展. *中国农业科技导报*, 2018, 20(1): 121–129.

[2] Wang JC, Zhu RS, Wang HZ, et al. Present status of heavy metal pollution from livestock manure and research progress of its biological passivation. *Shandong Agric Sci*, 2018, 50(10): 156–161 (in Chinese).

王建才, 朱荣生, 王怀中, 等. 畜禽粪便重金属污染现状及生物钝化研究进展. *山东农业科学*, 2018, 50(10): 156–161.

[3] Miranda J, Krishnakumar G, D'Silva A. Removal of  $Pb^{2+}$  from aqueous system by live *Oscillatoria laete-virens* (Crouan and Crouan) Gomont isolated from industrial effluents. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(10): 3053–3065.

[4] Xu H, Chen M. Research progress of soil lead, cadmium pollution and microbial remediation. *J Anhui Agric Sci*, 2015, 43(1): 65–67 (in Chinese).

徐慧, 陈明. 土壤铅、镉污染及其微生物修复研究进展. *安徽农业科学*, 2015, 43(1): 65–67.

[5] Hou YQ, Shen YJ, Liu SQ. Present status of heavy metal pollution from livestock waste and progress on passivation measures. *J Agric Sci Technol*, 2014, 16(3): 112–118 (in Chinese).

侯月卿, 沈玉君, 刘树庆. 我国畜禽粪便重金属污染现状及其钝化措施研究进展. *中国农业科技导报*, 2014, 16(3): 112–118.

[6] Shi Y, Huang ZB, Liu XJ, et al. Environmental materials for remediation of soils contaminated with lead and cadmium using maize (*Zea mays* L.) growth as a bioindicator. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23(7): 6168–6178.

[7] Li H. Isolation and identification of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  tolerance microorganism and screening of strains with high efficient  $Pb^{2+}$  absorbing ability[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2006 (in Chinese).

李辉. 耐铅、镉微生物的分离鉴定及高效吸附铅菌株的筛选[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.

[8] Ansari MI, Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresour Technol*, 2007, 98(16): 3149–3153.

- [9] Shi JN, Huang WQ, Jiang DH. Screening lead and cadmium-resistant strain and its physiological characteristics. *Southwest China J Agric Sci*, 2015, 28(5): 2022–2024 (in Chinese).  
史进纳, 黄位权, 蒋代华. 一株耐铅镉细菌的筛选及其生理特性. *西南农业学报*, 2015, 28(5): 2022–2024.
- [10] Xu SH, Jiang DH, Shi DD, et al. Screening and identification of lead and cadmium resistant microorganisms from combined heavy metal pollution soil. *Chin J Appl Environ Biol*, 2019, 25(1): 532–538 (in Chinese).  
徐少慧, 蒋代华, 史鼎鼎, 等. 重金属复合污染土壤中耐铅镉微生物的筛选及鉴定. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(1): 532–538.
- [11] Jin ZM, Hao Y, Liu LJ, et al. Isolation and identification of a lead and cadmium-resistant strain and its biological characteristics. *Chin J Environ Eng*, 2015, 9(7): 3551–3557 (in Chinese).  
金忠民, 郝宇, 刘丽杰, 等. 一株铅镉抗性菌株的分离鉴定及其生物学特性. *环境工程学报*, 2015, 9(7): 3551–3557.
- [12] Khan S, Cao Q, Zheng YM, et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environ Pollut*, 2008, 152(3): 686–692.
- [13] Chen XC, Wang YP, Lin Q, et al. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2005, 46(2): 101–107.
- [14] Fan JJ, Onal Okyay T, Frigi Rodrigues D. The synergism of temperature, pH and growth phases on heavy metal biosorption by two environmental isolates. *J Hazard Mater*, 2014, 279: 236–243.
- [15] Ye SH, Zhang MP, Yang H, et al. Biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter* ps-5. *Carbohydr Polym*, 2014, 101: 50–56.
- [16] Cao X. Screening of lead and cadmium-resistant microorganisma and their effect on chemical form of Pb and Cd in contaminated soil[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009 (in Chinese).  
曹霞. 耐铅镉微生物的筛选及其对污染土壤铅镉化学形态的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [17] Chen YF, Gao K, Lin H, et al. Adsorption properties of microbe resistant to lead and zinc on  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  in acid mine drainage (AMD). *J Central South Univ: Sci Technol*, 2013, 44(4): 1741–1746 (in Chinese).  
陈月芳, 高琨, 林海, 等. 耐铅锌微生物对矿山酸性废水中  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  吸附性能分析. *中南大学学报: 自然科学版*, 2013, 44(4): 1741–1746.
- [18] Liu Y. Screening and identification of cadmium tolerant microorganism from sludge[D]. Chongqing: Southwest University, 2007 (in Chinese).  
刘彧. 污泥中耐镉微生物的筛选与鉴定[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [19] Cai JL, Huang Y, Li X. Cytological mechanisms of pollutants adsorption by biosorbent. *Chin J Ecol*, 2008, 27(6): 1005–1011 (in Chinese).  
蔡佳亮, 黄艺, 礼晓. 生物吸附剂对污染物吸附的细胞学机理. *生态学杂志*, 2008, 27(6): 1005–1011.
- [20] Xu XP, Shen XX, Chen HJ. Study on biosorption mechanism and physiochemical conditions of  $\text{Hg}^{2+}$  by *Sphaerotilus natans*. *Acta Sci Circumst*, 2006, 26(3): 453–458 (in Chinese).  
许旭萍, 沈雪贤, 陈宏靖. 球衣菌吸附重金属  $\text{Hg}^{2+}$  的理化条件及其机理研究. *环境科学学报*, 2006, 26(3): 453–458.
- [21] Cai QY. Screening of lead and cadmium-resistant bacterium and research of their adsorption[D]. Ganzhou: Jiangxi University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).  
蔡青云. 耐铅镉菌株的分离筛选及其吸附特性研究[D]. 赣州: 江西理工大学, 2015.
- [22] Qin SJ, Li J, Wang YH, et al. Identification of PGPR strain S160 on cucumber and its adsorption for lead ions. *Chin J Biol Control*, 2016, 32(1): 129–134 (in Chinese).  
秦士娇, 李娟, 王远宏, 等. 黄瓜 PGPR 菌株 S160 的鉴定及其对重金属铅的吸附研究. *中国生物防治学报*, 2016, 32(1): 129–134.
- [23] Chen YH, Xiang J, Wu XF, et al. Isolation, identification and biosorption ability of three  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  tolerant bacterial strains. *Chin J Ecol*, 2015, 34(9): 2665–2672 (in Chinese).  
陈永华, 向捷, 吴晓芙, 等. 三株耐铅锌菌的分离、鉴定及其吸附能力. *生态学杂志*, 2015, 34(9): 2665–2672.

(本文责编 郝丽芳)