

耐铅微生物的筛选及其吸附性

李同灵^{1,2}, 黄寒娟², 彭漪^{1,3}, 王芳², 张硕²,
祁伟亮², 唐赞^{1*}, 刘松青^{2*}

(1. 西华师范大学生命科学学院, 南充 637002; 2. 成都师范学院化学与生命科学学院, 成都 611130;
3. 四川农业大学资源学院, 成都 611130)

摘要: 为从重金属污染的土壤中筛选出耐铅微生物, 为土壤重金属生物修复提供参考, 用 Pb^{2+} 浓度梯度筛选培养法得到耐铅菌株, 16S rRNA 测序以及系统发育树初步鉴定菌株。在不同温度、盐浓度、pH 梯度下研究耐铅菌株的耐受性。多个 Pb^{2+} 浓度探究菌株在不同 Pb^{2+} 浓度下的吸附性。结果表明, 通过牛肉膏蛋白胨培养基培养, 得到一株能够耐铅离子浓度在 $1\ 200\ mg\cdot L^{-1}$ 的菌株。16S rRNA 基因序列系统发育树显示, 菌株 P15 属于大肠杆菌属 (*Escherichia*)。该菌株在铅离子浓度为 $200\ mg\cdot L^{-1}$ 下的去除铅离子能力最强, 达到 80%。经过测定菌株 P15 的各项生理指标表明, 菌株适宜的环境条件分别为温度 $30\ ^\circ C$, pH6, 盐浓度 $0.005\ mg\cdot L^{-1}$ 。该铅耐受性菌株 P15 在生物修复重金属污染的土壤上有较高的潜在应用价值。

关键词: 土壤; 重金属; 铅污染; 吸附; 耐铅细菌

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0696-07

Lead resistance of microbial screening and preliminary determination of its adsorption

LI Tongling^{1,2}, HUANG hanjuan², PENG Yi^{1,3}, WANG Fang²,

ZHANG Shuo², QI Weiliang², TANG Yun¹, LIU Songqing²

(1. College of Life Science, China West Normal University, Nanchong 637002;

2. College of Chemistry and Life Sciences, Chengdu Normal University, Chengdu 611130;

3. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130)

Abstract: In order to screen lead-tolerant microorganisms from heavy metal contaminated soils for providing a reference for soil heavy metal bioremediation, using Pb^{2+} concentration gradient cultivation, a lead-tolerant strain was obtained, and further identified by 16S rRNA sequencing and phylogenetic tree. The tolerance of the lead-tolerant strain P15 was studied at different temperatures, salt concentrations and pH gradients, to explore the adsorbability of bacterial strain P15 in different lead concentrations. As results, the strain accordingly originating from lead $1\ 200\ mg\cdot L^{-1}$ was isolated with a series of beef peptone mediums of different lead concentrations. And 16S rRNA gene sequence phylogenetic tree showed that strain P15 belongs to *Escherichia*. The result showed that the Pb^{2+} adsorption rate of P15 was 80% in lead $200\ mg\cdot L^{-1}$. After the determination of the physiological indexes of strain P15, it was shown that the optimum environmental conditions were $30\ ^\circ C$, pH6, and the best salt concentration of $0.005\ mg\cdot L^{-1}$. In conclusion, it is expected that P15 is a suitable bio-sorbent for lead in the soil.

Key words: soil; heavy metal; lead pollution; adsorption; lead tolerant bacteria

随着科技进步, 生产步入工业化阶段, 但重金属污染却日益严重。因此治理重金属污染问题被提上了日程^[1-2]。其中土壤重金属污染治理也是其中一部分, 土壤重金属污染是由于人类在生活生产中

产生的有害物质投入到泥土中, 而且这些有害物质在土壤中含量过度, 使得土壤无法进行自我净化, 从而造成土壤质地恶化导致植物病变、水源恶化, 再通过食物链和食物网, 造成人类健康受损甚至死

收稿日期: 2017-09-24

基金项目: 四川省科技厅科研项目 (2016NFP0091) 资助。

作者简介: 李同灵, 硕士研究生。E-mail: 1186399622@qq.com

* 通信作者: 唐赞, 副教授。E-mail: tangyun_502@cwnu.edu.cn; 刘松青, 教授。E-mail: biosq@126.com

亡等各项危害^[3-4]。我国工矿用地面积平均每年都在增加^[5]。土壤重金属铅离子污染对人体的危害极大, 摄入铅含量过多会引起人体急性中毒甚至死亡^[6], 影响植物生长^[7], 土壤中铅离子污染无法通过一些化学的、物理的手段或者自然界自我修复, 铅离子具有富集性^[8], 只能通过人为的方式去除^[9]。从最先发现工业化导致重金属排放入土壤的事件^[10]到今天, 全球每一年都有成千上万篇对于重金属土壤污染的有关研究, 显然城市土壤重金属污染已是全球环境科学等领域的研究热点, 近年来重金属污染事件越来越多^[11], 土壤重金属污染治理是目前研究所要解决的关键科学问题。

去除重金属污染的方法有化学方法与生物方法, 化学方法包括化学沉淀、化学氧化还原、离子交换、过滤以及电化学处理等。诸如这类的方法快捷方便, 但是都有一些不可避免的缺陷, 例如, 成本高, 重金属处理不彻底, 以及一些因素的高需求(如能量)、将会在处理重金属污染中产生其他的二次污染等^[12-15]。目前需要处理的重点是怎么更好地根治重金属污染^[14]。生物技术去除重金属污染则是利用微生物对重金属的吸附^[16]、转化^[17]和代谢^[18]。目前, 国内外有关重金属耐受性微生物的分离修复应用研究较常见, 如 Park 等^[19]发现细菌可以固定土壤中的铅; Zhang 等^[20]发现一种微生物能够将 As^{+3} 氧化为 As^{+5} , 并且可以使用自身产生的能量同化二氧化碳, 以满足自身生长所需碳源; 同时, 分离自铅污染水中的耐性菌株还可有效修复污染水体^[21]。生物技术处理重金属污染具有广阔前景^[22-23]。目前大多数关于重金属铅污染的治理研究都是以治理重金属水污染为主的, 而对于土壤的重金属铅污染治理研究则相对较少。对于耐重金属铅的菌株目前筛选出的基本集中于耐铅离子浓度为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。现在有少数菌株能够耐铅离子浓度为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 极少数的菌株能够在含铅离子浓度为 $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的环境下生存。只有耐铅离子浓度越高的菌株, 才有治理高浓度铅污染的研究价值。因此, 本实验从被重金属污染的土样筛选出耐铅离子浓度在 $1\ 000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上的菌株, 测定该菌株对铅离子的吸附性并初步鉴定与研究其生理特性。基于对菌株特性的了解, 进一步诱导菌株, 增加菌株对铅离子的吸附能力, 为将来更好地治理土壤铅污染提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

含铅土样来自四川重金属污染的耕地土壤。耐

铅菌株筛选与纯化培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基^[24]。

1.2 菌株筛选

称取过筛的土样各 5 g 放入三角瓶中, 30°C 、 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 12 h 后静置澄清, 取稀释至 10^2 、 10^3 和 10^4 的上清液各 0.1 mL , 分别涂布于含有 200 、 400 、 600 和 $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} 培养基的平板上, 30°C 培养 24 h 后观察细菌的种类及生长情况。挑取单菌落进行平板划线纯化培养, 即进行多次平板划线培养, 直到培养基上出现单个菌落为止^[25]。初筛得到的耐铅能力相对较强的菌株进行增加铅离子浓度梯度的设置, 进行培养。再次通过复筛选取耐铅性强的菌株, 进行纯化、驯化培养。

1.3 耐铅菌株的鉴定

1.3.1 耐铅菌株的形态特征观察 观察筛选菌株的大小, 菌落表面、边缘及其颜色等形态特征。

1.3.2 耐铅菌株的生理生化试验 革兰氏染色、糖醇发酵试验蔗糖、麦芽糖、D-果糖、丙三醇、甘露醇、D-山梨醇、肌醇、乳糖、产 H_2S 试验、氧化酶、过氧化氢酶、明胶液化、MR、VR 和淀粉水解。

1.3.3 细菌的分子生物鉴定 采用 $16S \text{ rRNA}$ 序列测定法, 委托成都擎科梓熙生物科技有限公司进 $16S \text{ rRNA}$ 测定。将所得序列与 NCBI 数据库中已有的 $16S \text{ rRNA}$ 序列进行 BLAST 分析, 分析其同源性, 通过 MEGA 5.0 软件生成系统发育树。

1.4 各因素对菌株生长的影响

1.4.1 不同温度下菌株的生长情况 将驯化后的分离菌株接入牛肉膏蛋白胨液体培养基, 分别在 20 、 25 、 30 、 35 和 40°C , $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h 。在 $OD_{600 \text{ nm}}$ 下测定各管菌液的吸光度, 绘出吸光度与温度之间的曲线图。

1.4.2 不同 pH 值下菌株的生长情况 将驯化后的分离菌株分别接入 pH 值为 3 、 4 、 5 、 6 、 7 和 8 牛肉膏蛋白胨液体培养基。 30°C 、 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h , 在 OD_{600} 下测定各管菌液的吸光度值, 制出吸光度与 pH 值之间的曲线。

1.4.3 不同盐浓度下菌株的生长情况 将驯化后的分离菌株分别接入 NaCl 浓度至 0.005 、 0.01 、 0.015 、 0.02 、 0.025 和 $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 无菌牛肉膏蛋白胨液体培养基, 30°C 、 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h , 在 OD_{600} 下测定各管菌液的吸光度值, 绘制吸光度与盐浓度的关系曲线。

1.4.4 菌株生长曲线的绘制 取菌液液体牛肉膏蛋白胨培养基, 30°C , $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温培养 12 h 。设未接种抗铅细菌的培养基为对照样品, 每隔 2 h 取样。

在 OD_{600} 波长下测吸光度。

1.5 菌株对铅的吸附能力

1.5.1 绘制 Pb^{2+} 标准曲线 用硝酸铅配制含 Pb^{2+} 浓度分别为 1、2、3、4 和 $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 采用紫外可见分光光度计, 以二甲酚橙做显色剂, 在 580 nm 波长测定不同铅离子浓度的吸光度, 绘制铅离子浓度标准曲线^[26]。

1.5.2 吸附铅离子含量计算 配制含 Pb^{2+} 浓度为 200、400、600、800、1 000 和 1 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基, 称取一定量的湿菌体加入到液体培养基, 按不同的试验要求振荡吸附后, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进行铅浓度测定。浓度的测定采用紫外分光光度计, 以二甲酚橙做显色剂, 在 580 nm 波长测定浓度, 计算公式如下:

$$\text{去除率} = \frac{Pb^{2+}\text{初始浓度} - Pb^{2+}\text{终浓度}}{Pb^{2+}\text{初始浓度}} \times 100\%$$

1.5.3 Pb^{2+} 的初始浓度对菌株吸附性的影响

在 30

mL 离心管中, 加入 Pb^{2+} 浓度分别为 0、200、400、600、800、1 000 和 1 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 15 mL 牛肉膏蛋白胨培养基 (液体), 加入菌悬液 0.3 mL。在 pH 为 6 的条件下, 30°C 、 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 恒温振荡吸附 24 h, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液测定 Pb^{2+} 浓度^[27]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

经过对菌株的初筛分离纯化及对菌株的复筛纯化驯化培养, 得到 15 株菌株, 一次命名为 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9、P10、P11、P12、P13、P14 和 P15。

2.2 菌株的耐铅性

将筛选出的 15 株菌株进行置于有一定铅离子浓度梯度的培养基进行培养, 得到了这 15 株菌株对铅离子的耐受情况, 如表 1。

表 1 筛选出的菌株对铅离子含量的耐受情况
Table 1 Tolerance of selected strains to lead ion contents

细菌 Bacteria	铅离子浓度 Lead ion concentration $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$									
	0	200	250	300	400	500	600	800	1000	1 200
P1	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
P3	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
P4	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P5	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P6	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
P7	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
P8	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P9	+++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
P10	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P11	+++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P12	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
P13	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
P14	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
P15	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+

注: “+”表示菌株的生长状况, “-”表示菌株不生长。

Note: “+” indicates the growth status of the strain, “-” indicates that the strain does not grow.

由表 1 可知, 根据菌落形态, Pb^{2+} 浓度为 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 有 8 株不同类型的细菌能良好生长, 7 株生长状况较差; Pb^{2+} 浓度为 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 有 8 株能良好生长, 5 株生长状况较差; Pb^{2+} 浓度为 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 有 3 株能良好生长, 8 株生长状况较差; Pb^{2+} 浓度为 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 到时, 有 1 株能良好生长, 6 株生长状况较差; Pb^{2+} 浓度为 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 到时, 有 1 株能良好生长, 2 株生长状况较差; Pb^{2+} 浓度为

600~1 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 只有 P15 良好生长, 其他菌株均不能生存。故选择 P15 进行下一步研究。

2.3 菌株的初步鉴定

2.3.1 菌落特征 通过对菌株 P15 进行培养, 观察得到该菌株的形态特征, 如表 2。

由表 2 可知, 无铅离子培养基上, P15 菌落比较粘稠, 易挑取, 菌落较小 (2~3 mm), 且颜色乳白色。在含有铅离子的培养基中该菌落为棕褐

色, 边缘凸起有褶皱。原因可能是菌株吸附铅离子后造成自身代谢物改变, 从而变成棕褐色。

2.3.2 耐铅菌株的生理生化特性分析 运用生理

生化管, 测定得到菌株 P15 的一些生理生化特征, 如表 3。

表 2 P15 菌株的形态特征

Table 2 Morphological characteristics of P15 strain

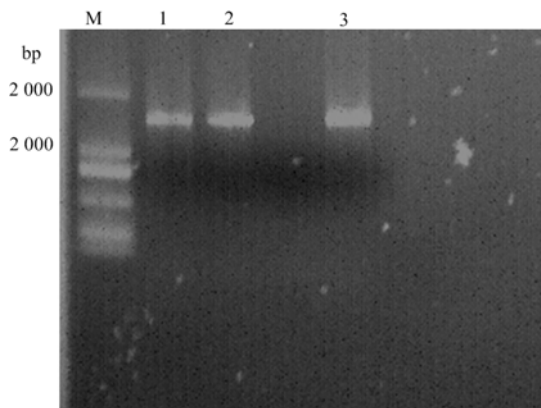
菌落特征 Colony characteristics	菌株 P15 strain
颜色 Color	在无铅离子的培养基上菌落为乳白色, 在含铅离子的培养基上菌落为棕褐色, 且随铅离子浓度的加深, 菌落颜色越深
挑取难易程度 Peeling off status	易挑取
菌落大小 Size	2~3 mm
表面 Surface	光滑
边缘 Rim	边缘凸起, 有褶皱

表 3 P15 菌株的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of P15 strain

实验项目 Experimental project	菌株 Strain P15	实验项目 Experimental project	菌株 Strain P15
甲基红反应 Methyl red reaction	-	甘露糖 Mannose	+
V-P 反应 V-P reaction	-	果糖 Fructose	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	乳糖 Lactose	+
葡萄糖 Glucose	+	山梨醇 Sorbitol	+
蔗糖 Saccharose	-	肌醇 Inositol	-
甘露醇 Mannitol	-	麦芽糖 Maltose	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	-	氧化酶 Oxidase	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	过氧化氢酶 Catalase	-

注: “+” 阳性反应, “-” 阴性反应。Note: “+” positive reaction, “-” negative reaction.



M. Marker 2000; 1、2 和 3 条带均为 P15 菌株 PCR 扩增凝胶电泳图 1,2 and 3. Target gene fragment

图 1 P15 提取 DNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from P15

从表 3 中可以了解到该菌株的生理生化特性, 该菌株不能分解淀粉、明胶、蔗糖、肌醇, 能分解甘露糖、果糖、乳糖、麦芽糖、山梨醇, 能分解葡萄糖产酸, 不产氧化酶和过氧化氢酶。

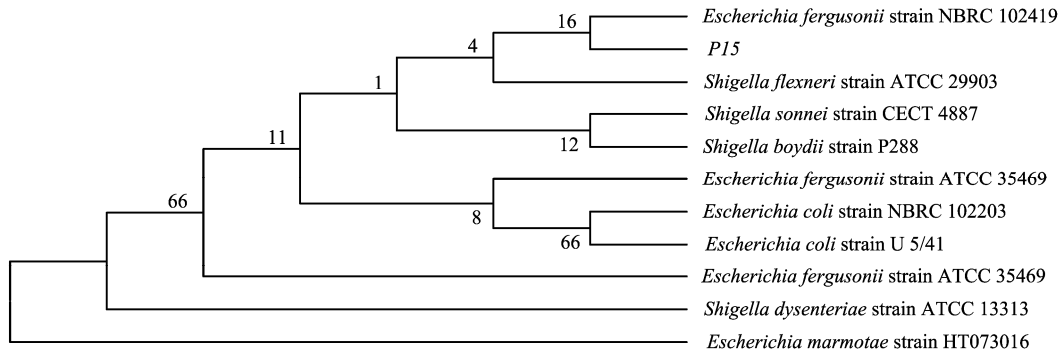
2.3.3 系统发育分析 为进一步认识耐铅细菌以及对耐铅细菌进行鉴定, 用试剂盒采用通用引物对

P15 菌株的基因组进行 PCR 扩增, 结果见图 1。基于 PCR 扩增凝胶电泳图, 对菌株 P15 进行 16S rRNA 基因片段进行测序, 通过 BLAST 对比分析, 利用 MEGA5.0 软件构建系统发育树, 结果见图 2。

由图 1 可知, P15 的保守片段为 1500 bp 左右, 测序结果表明, 所扩增的 P15 保守片段为 1600bp, 通过 BLAST 对比分析, 按照匹配度最高原则, 鉴定细菌系统发育特征。可以分析得出细菌 P15 与 *Escherichia fergusonii* strain NBRC 102419 的相似性最高为 99%。通过用 MEGA5.0 软件进行多序列对比以及构建系统发育树, 且革兰氏染色后鉴定出菌株 P15 为革兰氏阴性菌, 杆状。归纳表 2 中 P15 菌落的形态学特性以及表 3 该菌株的生理生化特征, 并参考《伯杰细菌鉴定手册》^[28], 《常见细菌系统鉴定手册》^[29], 《微生物分类学》^[30]初步鉴定该菌为大肠杆菌属 (*Escherichia*)。

2.4 各因素对菌株生长的影响

2.4.1 不同 pH 值下菌株的生长情况 为了解菌株对 pH 的耐受性, 测定得到 pH 变化对菌株生长的影响情况, 结果如图 3。



Escherichia fergusonii strain ATCC 35469 为埃希氏菌属菌株 ATCC 35469; *Shigella flexneri* strain ATCC 29903 为福氏志贺菌菌株 ATCC 29903 分序列; *Escherichia coli* strain NBRC 102203 为大肠杆菌菌株 NBRC 102203; *Shigella sonnei* strain CECT 4887 为志贺氏菌志贺菌株 CECT 4887; *Shigella dysenteriae* strain ATCC 13313 为志贺氏痢疾杆菌菌株 ATCC 13313; *Escherichia fergusonii* strain ATCC 35469 为埃希氏菌菌株 ATCC 35469; *Escherichia fergusonii* strain NBRC 102419 为埃希氏菌 (*Escherichia fergusonii*) 菌株 NBRC 102419; *Shigella boydii* strain P288 为志贺氏菌菌株 P288; *Escherichia coli* strain U 5/41 为大肠杆菌菌株 U 5/41; *Escherichia marmotae* strain HT073016 为大肠杆菌菌株 HT073016

图 2 基于 16S rRNA 序列的菌株 P15 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain P15 based on 16S rRNA sequences

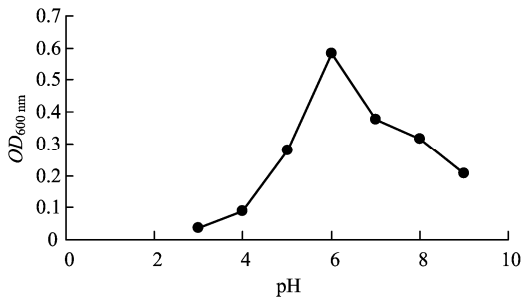


图 3 pH 对菌株生长的影响

Figure 3 Effect of pH on the growth of strain P15

从图 3 可以看出, 细菌 P15 在 pH=3 时, 其吸光度十分低, 几乎没有生长; 在 pH=6 时, 菌株的吸光度达到最大值, 菌株生长得最佳。菌株 P15 在 pH>7 时, 即在碱性环境下, 菌株生长状况虽不如在 pH=6 时的生长状况, 但是长势还是相对于在极酸环境下较好。综上分析, 该菌应该属于酸性偏碱性的菌株。

2.4.2 不同温度下菌株的生长情况 为了解菌株对温度的耐受性, 测定得到温度变化对菌株生长的影响情况, 如表 4。

表 4 温度对菌株生长的影响

Table 4 Effect of temperature on the growth of strain P15

温度/°C Temperature	OD ₆₀₀
20	0.386
25	0.550
30	1.622
35	0.786
40	0.686

从表 4 可以看出, 细菌 P15 在温度为 20°C 时吸光度最小, 即含菌量最小, 生长状况最差。在温度为 30°C 时, 吸光度最高, 细菌的生长状况最好。在温度为 20~30°C 时, 吸光度随着温度的上升而增加, 在温度为 30~40°C 时, 该菌的吸光度随温度的升高而减少, 但其减小率相对低于其在温度为 20~30°C 时的增加率。由此可见, 该菌虽然在低温与高温下生长情况均不太好, 但是该菌更耐高温。

表 5 盐浓度对菌株生长的影响

Table 5 Effect of salt concentration on the growth of strain P15

盐浓度/mg·mL ⁻¹ Salt concentration	OD ₆₀₀
0.005	0.315
0.010	0.310
0.015	0.305
0.020	0.296
0.025	0.267
0.030	0.220

2.4.3 不同盐浓度下菌株的生长情况 为了解菌株对盐浓度的耐受性, 测定得到盐浓度变化对菌株生长的影响情况, 结果 (表 5) 表明各个盐浓度下菌株的吸光度虽然不同, 但是各个吸光度的值无显著差异。随着盐浓度的增加, 菌株的吸光度在逐渐降低。说明随着盐浓度的增加, 菌株的生长情况逐渐变差。但是各个盐浓度下菌株的生长状况还是接近于最适盐浓度的生长状况。可能是因为盐浓度梯度变化不大, 因此在这一系列盐浓度梯度下菌株的生长情况差别不大。另外的原因可能是菌株的耐盐能

力比较强, 因而造成在各个盐浓度梯度下吸光度差值不大的现象。

2.5 菌株生长曲线

为了解菌株 P15 的生长情况, 在 pH 为 6, 30 °C 下, 150 r·min⁻¹ 恒温培养菌株, 利用紫外分光光度计每隔 2 h 测定菌株的吸光度, 测定得到该菌株在 24 h 的生长状况, 结果如图 4。

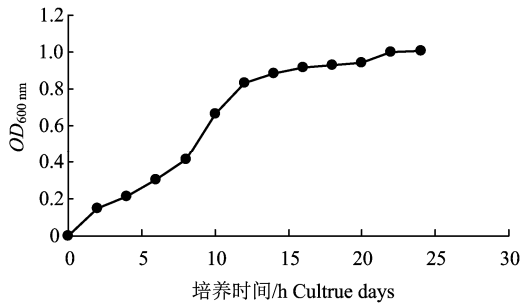


图 4 P15 的生长曲线

Figure 4 Growth curve of P15

由图 4 可以看出, 在 0 到 15 h 期间测得菌株的吸光度在不断上升, 说明菌株在这段时间生长状态十分好。P15 菌株在生长 9 h 左右生长速率最快, 为其生长对数期。在生长了 20 h 左右时, 其生长曲线趋于平稳。如若要取得最佳的菌悬液, 在该菌生长了 15 h 左右最好, 在 15 h 后菌株生长趋于平稳, 死菌也相对较多。

2.6 铅离子浓度标准曲线绘制

为测定菌株对铅离子的吸附效率, 运用紫外分光光度计, 通过配制含铅离子浓度梯度的溶液进行吸光度的测定, 得到铅离子浓度标准曲线(如图 5)。

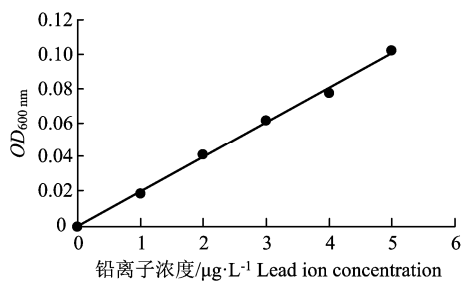


图 5 铅离子浓度标准曲线

Figure 5 Standard curve of lead ion concentration

线性回归方程为: $y=0.0203x+0.0002$, $R^2=0.9974$ 。铅含量在 0~5 μg·L⁻¹ 范围内与紫外吸光度值有良好的线型关系。

2.7 铅离子浓度对细菌吸附铅的影响

将菌株 P15 置于一系列铅离子浓度梯度的培养液下培养 24 h 后, 利用紫外分光光度测定其培养

液中的铅离子含量, 从而计算得到该菌株对铅离子的吸附效率, 结果(表 6)表明细菌 P15 在铅离子含量为 200 mg·L⁻¹ 时吸附能力最高, 为 80%, 随着铅离子浓度的提高, 细菌对铅离子的吸附能力逐渐减小, 最低的吸附率仅有 15%, 随着铅离子浓度的升高, 细菌的生长状况可能受到影响, 降低其繁殖能力以及其对铅离子的吸附能力, 从而导致在铅离子含量越高的培养液里, 细菌对铅离子的吸附率越低。说明该菌株虽然耐铅能力较强, 但是对于铅离子的吸附性却不高。虽然该菌株对铅离子有一定的吸附性, 但是在铅离子浓度提高时, 菌株的生长也随着铅离子浓度的提高而降低。

表 6 铅离子浓度对细菌吸附铅的影响

Table 6 Effect of lead ion concentration on adsorption of lead by bacteria

初始铅离子浓度/mg·L ⁻¹ Initial lead ion concentration	P15 对铅离子的吸附率/% P15 adsorption rate of lead ions
200	80.00
400	52.50
600	48.30
800	37.50
1 000	32.00
1 200	15.00

3 讨论与结论

对被重金属污染的土壤中微生物的初筛与复筛, 得到了一株细菌的耐铅离子浓度为 1 200 mg·L⁻¹, 该菌株能在 1 200 mg·L⁻¹ 的铅离子浓度固体培养基下虽然能够生长, 但是其长势明显低于该菌株在 500 mg·L⁻¹ 的铅离子浓度下的长势, 其菌落大小明显变小, 菌落数也减少。证明该菌株虽然有一定的耐铅能力, 但是铅离子的含量过高依然会使细菌的生长受到阻碍, 降低细菌的生长繁殖能力。

对该菌株进行生长曲线的绘制, 可以看出该菌株的生长对数期在生长 9 h 左右。在取生长状况最好的菌株最好在菌株培养 9 h 后。从温度对细菌生长的影响, 可以分析出该菌是比较耐高温的菌, 最适的生长温度是在 30 °C, 耐高温可以将该菌作用于温度较高的被铅污染的地区。通过 pH 对细菌生长的影响以及细菌的耐盐性, 可以看出该菌对于碱性环境的适应能力还是比较强, 虽然该菌的最适 pH 为 6, 但是对于在 pH 为 7~9 时, 其生长活性虽然降低, 但是减少值不大。在盐浓度梯度变化的情况下, 菌株的生长状况变化不大。综合这两项, 可以将该菌应用于被铅离子污染的盐碱地进行土壤修复。

对该菌的吸附性的初步测定,发现该菌对铅离子的吸附性还有待提高,在含铅离子浓度为 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,该菌株对铅离子的吸附率有 80%,在铅离子含量为 $1\ 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对铅离子的吸附率仅有 15%。吸附铅离子的能力属于一般性,不突出。

目前通过被重金属污染的土壤筛选出了耐铅离子浓度在 $1\ 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的菌株为 P15,本研究是以筛选出的抗铅细菌为主要研究对象,对 P15 的生长条件,对重金属的抗性特征、吸附能力和对环境的耐受性等做了一系列的初步研究,但是由于时间、仪器、实验室条件等方面的限制,本研究对生物吸附某些方面的探讨还不够完善、详细。

虽然经过初步测定,发现其吸附铅离子的能力不高,但是其耐铅离子能力却十分高,只有在高铅离子浓度下生长的菌,对于处理铅污染才更具价值,如果在高浓度铅离子含量下都无法生长,则不能够用于高浓度铅污染的治理。目前已经测出该菌株的各项生理特性,为了能将该菌应用于实际的土壤修复中,可以以此为依据,对该菌株进行后续的诱导,使其突变,以及进行正交试验,探究细菌对铅离子的高吸附性需要的条件,从而提高该菌株对铅离子的吸附率。该菌株在修复铅离子污染的土壤上具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] JI A L, WANG F, LUO W J, et al. Lead poisoning in China: a nightmare from industrialisation[J]. *The Lancet*, 2011, 377(9776): 1474-1476.
- [2] CHENG H X, LI M, ZHAO C D, et al. Overview of trace metals in the urban soil of 31 metropolises in China[J]. *J Geochem Explor*, 2014, 139: 31-52.
- [3] WANG X Y. Characteristic and environmental risk assessment of heavy metals in farmland soil of based on speciation analysis[C]/*Informatics and management science I*. London: Springer, 2013: 213-220.
- [4] 石扬, 陈沅江. 我国污染土壤生物修复技术研究现状及发展展望[J]. *世界科技研究与发展*, 2017, 39(1): 24-32.
- [5] 国家统计局能源司. 中国环境统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2011.
- [6] 毛跟年, 许牡丹, 黄建文. 环境中有毒有害物质与分析检测[M]. 化学工业出版社, 2004.
- [7] 陈亮, 王超, 廖思红, 等. 土壤铅污染的微生物修复研究进展[J]. *农村经济与科技*, 2015, 26(9): 27-29.
- [8] 徐长林. 涉铅污染土壤重金属地球化学形态、风险及其微生物修复基础 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2015.
- [9] 陈宝. 耐铅细菌对铅污染土壤生物修复作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [10] WAGNER K H, SIDDIQI I. Gefährliche stoffe in bodenverbesserungsmitteln[J]. *Naturwissenschaften*, 1973, 60(3): 161-161.
- [11] 杨亮, 郝瑞霞, 吴泮, 等. 耐铅微生物筛选及其铅去除能力的初步研究[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2012, 48(6): 965-970.
- [12] 滕应, 骆永明, 李振高. 污染土壤的微生物修复原理与技术进展 [J]. *土壤*, 2007, 39(4): 497-502.
- [13] 高文谦, 陈玉福. 铅污染土壤修复技术研究进展及发展趋势[J]. *有色金属*, 2011, 63(1): 131-136.
- [14] CLEMENS S, AARTS M G M, THOMINE S, et al. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning[J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18(2): 92-99.
- [15] WANG J L, CHEN C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review[J]. *Biotechnol Adv*, 2006, 24(5): 427-451.
- [16] SRIVASTAVA S, THAKUR I S. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm[J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, 38(7): 1904-1911.
- [17] SUN H F, LI Y H, JI Y F, et al. Environmental contamination and health hazard of lead and cadmium around Chatian mercury mining deposit in western Hunan Province, China[J]. *T Nonferrous Metal Soc*, 2010, 20(2): 308-314.
- [18] SUN Y B, LI Y, XU Y M, et al. In situ stabilization remediation of cadmium (Cd) and lead (Pb) co-contaminated paddy soil using bentonite[J]. *Appl Clay Sci*, 2015, 105: 200-206.
- [19] PARK J H, BOLAN N, MEGHARAJ M, et al. Bacterial-assisted immobilization of lead in soils: implications for remediation[J]. *Pedologist*, 2011, 54(3): 162-174.
- [20] ZHANG J, ZHOU W X, LIU B B, et al. Anaerobic arsenite oxidation by an autotrophic arsenite-oxidizing bacterium from an arsenic-contaminated paddy soil[J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(10): 5956-5964.
- [21] CHATTERJEE S, MUKHERJEE A, SARKAR A, et al. Bioremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolated from industrial sample[J]. *Adv Biosci Biotech*, 2012, 3(3): 290-295.
- [22] 周少奇. 环境生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 252-285.
- [23] 段昌群. 环境生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 294-311.
- [24] 李太元, 许广波. 微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [25] 罗雅, 蒋代华, 夏颖, 等. 一株耐铅细菌 J3 的筛选分离及其生物学特性[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(9): 1041-1044.
- [26] 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.
- [27] 刘洁. 涉铅污染土壤抗铅细菌分离, 鉴定及其热力学研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2015.
- [28] 霍尔特. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 刘复今, 等译. 济南: 山东大学出版社, 1988.
- [29] 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.
- [30] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.