

土壤耐锶细菌的筛选及其吸附效果

王 岩,代群威*,赵玉连

西南科技大学 环境与资源学院,四川 绵阳 621010

摘要:为了从土壤中筛选出具有耐锶性的细菌,利用牛肉膏蛋白胨固体培养基采用平板涂布的方法从土壤中分离出了 12 株菌株,通过其对 Sr^{2+} 的吸附效果对比分析,筛选出了其中 4 株对 Sr^{2+} 具有较好吸附效果的细菌进行了驯化,并对驯化前、后细菌生长速率(v_A)及对 Sr^{2+} 的吸附效果进行了分析。结果显示:在含 Sr^{2+} 培养液中驯化后的细菌生长能力有明显提高,生长速率 v_A 的峰值 $v_{A,\max}$ 的位置由驯化前的 1.0 d 提前到 0.5 d;同时驯化后的细菌对 Sr^{2+} 吸附效率均有所提高,筛选出的 4 株细菌在 30 °C、转速 120 r/min、pH=7、培养时间 5.0 d 的条件下对 Sr^{2+} 的最佳吸附效率均可达到 90% 以上。

关键词:耐锶性细菌;筛选;驯化;吸附 Sr^{2+}

中图分类号:X591 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-9950(2017)04-0284-06

doi:10.7538/hhx.2017.39.04.0284

Screening and Adsorption Effect Analysis of Strontium Tolerant Bacteria in Soil

WANG Yan, DAI Qun-wei*, ZHAO Yu-lian

School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

Abstract: In order to screen bacteria with strontium tolerance from soil, using flat coating method in beef peptone culture medium to isolate 12 strains from soil. Through the comparative analysis of the Sr^{2+} adsorption effect, 4 strains of bacteria which have good adsorption effect on Sr^{2+} to domestication was selected, and the bacterial growth rate(v_A) before and after acclimation as well as the Sr^{2+} adsorption effect was analysed. The results show that the growth ability of acclimated bacteria in the culture medium containing Sr^{2+} is obviously improved, the peak position($v_{A,\max}$) of growth rate (v_A) increases from 1.0 d to 0.5 d. At the same time, the adsorption efficiency of Sr^{2+} is improved after the domestication bacteria. The best adsorption efficiency of screened 4 strains of bacteria on Sr^{2+} can reach more than 90% in the condition of temperature is 30 °C, rotational speed is 120 r/min, pH is 7 and incubation time is 5 d.

Key words: bacteria resistant to strontium; screening; domestication; adsorption on Sr^{2+}

收稿日期:2017-03-31;**修订日期:**2017-05-15

基金项目:国家自然科学基金重点项目(41130746);四川省科技厅应用基础研究重点项目(2016JY0213)

作者简介:王 岩(1990—),男,吉林长春人,硕士研究生,环境科学与工程专业,从事新生污染的安全与调控研究,E-mail: 741372147@qq.com

* **通信联系人:**代群威(1978—),男,河南漯河人,教授,从事新生污染的安全与调控研究,E-mail: qw_dai@163.com

随着工业与科学技术的发展和创新,核技术越来越广泛地应用于工农业、交通运输、军事能源和医疗卫生等方面^[1-2],但核能的开发利用在给人类带来巨大经济社会效益的同时,不可避免的会产生放射性废气、废液,对环境造成一定的危害^[3-4]。放射性污染物有致畸、致癌、致突变的作用,可以通过食物链富集到人体,对人体健康造成极大危害^[5]。土壤放射性污染物质主要来自天然放射性污染、人工放射性核素污染和技术激活型污染^[6],其中锶作为常见的污染物,主要来源于核爆炸沉降物和核工业废物的排放,锶是水溶性金属核素,其半衰期长且与 Ca^{2+} 性质相似,摄入体内的锶可以置换 Ca^{2+} 沉淀在骨骼上,可以诱导白血病和多种肿瘤疾病的发生,对人体健康造成严重威胁^[1,7]。

目前受到放射性污染的土壤,可以根据放射性核素浓度的强弱、环境化学特性、沉积特性以及放射性半衰期的长短等特点,采用不同的方法去除其中的放射性核素^[8]。主要采用的修复方法有螯合剂浸取、反渗透超滤技术、离子交换技术和土壤清洗等,但是这些方法成本较高,与传统的物理和化学方法相比,微生物修复及联合修复法具有成本低、效果好、无二次污染等优点,适用于大面积土壤的修复,是真正意义上的“绿色修复技术”^[9-10]。已有研究表明细菌、酵母菌、真菌和藻类对 Sr^{2+} 均有较好的吸附效果,Chen 等^[11]利用酿酒酵母菌对 Sr^{2+} 进行吸附实验,并对其吸附效果进行 Langmuir 拟合,结果显示其最大吸附量为 0.091 mmol/g;Chakraborty 等^[12]利用高碘酸钠溶液对 *Ocimum basilicum* 进行修饰处理后,其对 ^{90}Sr 的最大吸附量可以达到 247 mg/g。生物修复主要依靠细菌、真菌甚至高等植物以及细胞游离酶的自然代谢过程降解去除环境中的污染物,微生物吸附放射性核素后可以通过交换吸收作用将放射性核素固定在微生物体内;或可诱导碳酸/磷酸/硫酸盐等矿物沉积,生成无机矿物使其由活化态转变为稳定态;也可通过微生物的作用促进放射性核素自土壤中溶出至液相,这样达标的土壤就可原地回填,含有较高浓度放射性物质的液相则可转至其它生物反应器^[13-15]。放射性核素与微生物相互作用研究已取得了一些重要的进展,但是寻找和筛选对目标放射性核素有抗性并具有较强吸附能力的微生物仍是一个热点问题^[16-18]。

本研究直接从自然界的土壤中分离菌株、筛

选出对 Sr^{2+} 有较好吸附效果的细菌对其进行驯化,并对 Sr^{2+} 的吸附效果进行研究,能为放射性核素离子以及重金属离子在土壤中迁移过程受微生物因素影响机制提供理论依据,对土壤放射性核素污染的原位生物修复技术的发展和实际应用也具有一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土壤样品 土壤选用四川省绵阳市北部地区的草坪土壤,该土壤是四川盆地具有代表性的紫色土壤,采样深度为 0~20 cm。按照五点法取样,采样后各土壤样品混合。

1.1.2 供试培养基 细菌分离用牛肉膏蛋白胨固体培养基;牛肉膏(北京奥博星生物技术有限责任公司)3.0 g,蛋白胨(成都长寿生物制剂有限公司)5.0 g,NaCl(成都金山化学试剂有限公司)5.0 g,琼脂(成都市科龙化工试剂厂)15.0~20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH=7.0~7.6。灭菌条件为:0.1 MPa,121 °C 下灭菌 30 min。

1.1.3 主要仪器 AA700 型原子吸收光谱仪,美国 AAS 公司;SHY-2 进口大型振荡器,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;TGL-16C 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂制造;UV-1600 型分光光度计,上海美谱达仪器公司;BSA224S 型分析天平(精度万分之一),德国赛多利斯公司;DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验步骤

1.2.1 细菌的分离 将所采土壤样品 10 g 左右置于装有 50 mL 无菌生理盐水的 250 mL 锥形瓶中,150 r/min、30 °C 下震荡 1.0 h,将土壤中的微生物洗脱出来,静置 30 min 备用。用接种针取一小部分上层清液用牛肉膏蛋白胨培养基平板划线,并对土壤样品液体梯度稀释后进行平板涂布,根据菌落情况利用牛肉膏蛋白胨培养基培养 2.0 d,获得较纯细菌菌株后;同时制备斜面在 4 °C 条件下保存备用。

1.2.2 耐锶细菌的筛选与驯化 将含有 100 mg/L Sr^{2+} 的液体培养基,分装于 50 mL 锥形瓶中,每瓶装 25 mL。取 0.2 mL 菌液接种于对应编号锥形瓶中,在 120 r/min、30 °C 的条件下震荡培养 5.0 d。各取 1.0 mL 菌液,10 000 r/min 下离心 10 min,取 0.5 mL 上清液稀释后作为样品测试其中 Sr^{2+} 浓度。根据 Sr^{2+} 测试结果,筛选出实验

条件下对 Sr^{2+} 具有较好吸附效果的细菌菌株。在已筛选的对 Sr^{2+} 具有较好吸附效果的土壤细菌的基础上,将其分别接种于含 100 mg/L 的 Sr^{2+} 液体培养基中,在 30 ℃、120 r/min 下培养 5.0 d。取出后转种于同样浓度含 Sr^{2+} 液体培养基中继续培养,反复胁迫诱导驯化 3 个月左右。

1.2.3 驯化前、后细菌生长速率分析 将细菌的生长速率定义为:单位时间(1.0 h)内菌液吸光度(A)的净增加值。根据各菌株对 Sr^{2+} 吸附培养过程中的 $A_{540\text{ nm}}$ 变化情况,获得某个时间区间 Δt 内的 ΔA 值,可利用式(1)计算获得各菌株不同生长时期相应的生长速率。

$$v_A = \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{A_{t_2} - A_{t_1}}{t_2 - t_1} \tag{1}$$

其中, v_A , 实验菌株的生长速率; t_1 、 t_2 , 实验菌株在含 Sr^{2+} 培养液中生长时间; A_{t_1} 、 A_{t_2} , 实验菌株在 t_1 、 t_2 时刻对应吸光度值。

1.2.4 驯化后的细菌对 Sr^{2+} 吸附效果分析 配制含有 300 mg/L Sr^{2+} 的液体培养基,将驯化好的细菌菌液取 0.5 mL 接种于对应编号锥形瓶中,在 30 ℃、120 r/min、pH=7 的条件下震荡培养 5.0 d 后取 1.0 mL 菌液,10 000 r/min 下离心 10 min,取 0.5 mL 上清液稀释后,作为样品用原子吸收法测试其中 Sr^{2+} 浓度,根据公式(2)由吸附前、后 Sr^{2+} 浓度计算吸附效率 η :

$$\eta = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \tag{2}$$

式中: C_0 、 C_t 分别为吸附前、后 Sr^{2+} 浓度。

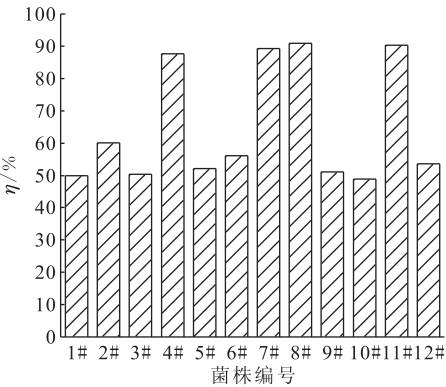
1.2.5 细菌形态分析 采用革兰氏染色法对细菌进行染色:取一张洁净载玻片,在载玻片上放置一滴生理盐水,用无菌操作方法从菌种斜面挑取少量菌体与水滴充分混合,涂成 1 cm×1 cm 大小的区域。待涂片自然干燥后在酒精灯火焰上缓慢烘干,最后通过火焰烘干 3 次,以使细菌固定在玻片之上;在制作好的细菌涂片上滴加少许结晶紫染色液,染色 1 min 后水洗;在制作好的细菌涂片上滴加少许卢戈碘液,染色 1 min 后水洗;在制作好的细菌涂片上滴加番红染液后进行水洗,待自然干燥后以作镜检。

2 结果与讨论

2.1 细菌菌株的筛选

将土壤液体平板涂布后经过分离,最后确定了生长较好的 12 株细菌进行耐锶菌株的筛选,将

以上菌株分别接种到含有 Sr^{2+} 培养基中进行吸附培养分析,对比各株土壤分离菌在生长过程中对 Sr^{2+} 的吸附效率,其结果示于图 1。由图 1 可以看出,12 株细菌对 Sr^{2+} 的吸附效率达到 80% 以上的为 4#、7#、8# 和 11# 菌株,其吸附效率分别为 87.61%、89.27%、90.91%和 90.25%,其余各株细菌对 Sr^{2+} 的吸附效率集中在 49%~60%,由此确定选择 4#、7#、8# 和 11# 菌株作为驯化菌株。



$r=120\text{ r/min}, \theta=30\text{ }^{\circ}\text{C}, t=5.0\text{ d}$

图1 土壤细菌对 Sr^{2+} 的吸附效果

Fig.1 Adsorption effect of soil bacteria on Sr^{2+}

2.2 细菌菌株驯化前、后生长情况

驯化前、后各菌株的生长过程变化情况示于图 2。由图 2 可以看出,驯化后各株细菌在含 Sr^{2+} 培养液中的生长能力有明显提高,特别是在各菌株对 Sr^{2+} 吸附过程中出现明显拐点的 2.0~3.0 d 时间范围内,驯化后的各株细菌对应的吸光度均比驯化前有明显的提高。如:4# 细菌在 2.0 d 时未驯化的吸光度为 1.042,而驯化后变为 1.314;7# 细菌在 2.5 d 时未驯化的吸光度为 1.236,而驯化后变为 1.610;8# 细菌在 3.0 d 时未驯化的吸光度为 1.204,而驯化后变为 1.470;11# 细菌在 3.0 d 时未驯化的吸光度为 1.484,而驯化后变为 1.607。由此可以说明经过含 Sr^{2+} 培养液的驯化后各菌株的适应能力增强,同期生长量提高。

2.3 细菌菌株驯化前、后生长速率分析

驯化前、后的各细菌菌株的 v_A 分析结果示于图 3。由图 3 所示,对于驯化后的细菌其生长速率 v_A 的峰值 $v_{A,\text{max}}$ 的位置由驯化前的 1.0 d 提前到 0.5 d 时出现,整体提前了 0.5 d。这是由于细

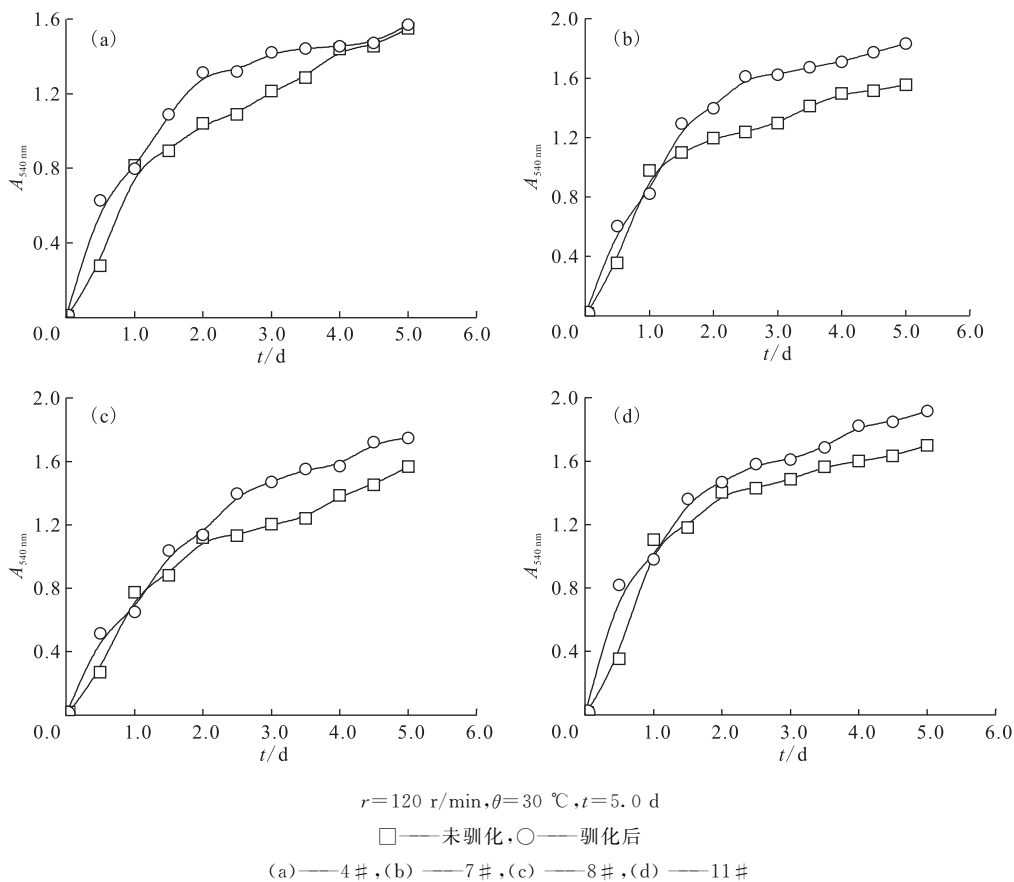


图 2 驯化前、后细菌的生长曲线
Fig. 2 Bacterial growth curves before and after domestication

菌的生长周期一般为 1.0 d 左右,在驯化前,由于液体培养基中含有 Sr^{2+} 对细菌有一定抑制生长的负面作用。经过长时间在含 Sr^{2+} 环境下的多代反复驯化处理,驯化后的各细菌的稳定生长期提前到了 0.5 d 附近。这表明各细菌菌株在外界 Sr^{2+} 环境胁迫下,逐渐适应了该离子液相环境,能够基本恢复到原有的生长状态,菌量的提高也相应增加了各菌株对 Sr^{2+} 的吸附效率。图 3 中除了 $v_{A,\max}$ 的最大峰外,驯化前、后生长速率曲线中都有几个其他峰出现,且同菌株各峰间隔基本为 1.0 d,说明各株细菌的生长周期为 1.0 d。

2.4 驯化前、后对 Sr^{2+} 的吸附效果分析

驯化前、后各细菌菌株对 Sr^{2+} 的吸附情况示于图 4。从图 4 可以看出,驯化后各菌株对 Sr^{2+} 的吸附能力明显提高,如:驯化后 4# 细菌达到平衡的时间为 3.5 d,此时吸附效率为 93.65%,而驯化前仅为 66.38%;驯化后 7# 细菌达到平衡的时间为 3 d,此时吸附效率为 94.40%,而驯化前仅为 47.37%;驯化后 8# 细菌达到平衡的时间为 3 d,此时吸附效率为 93.65%,而驯化前仅为

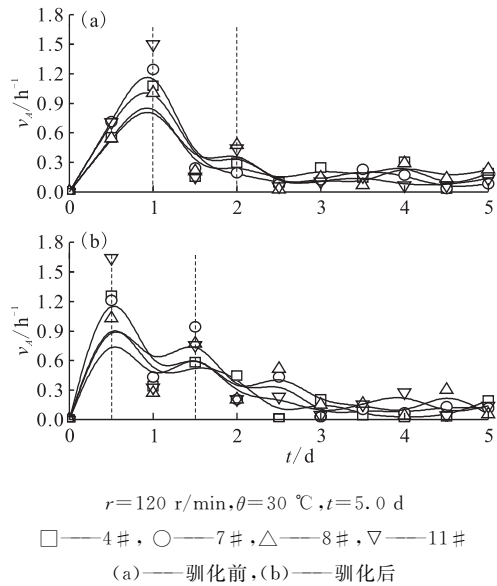
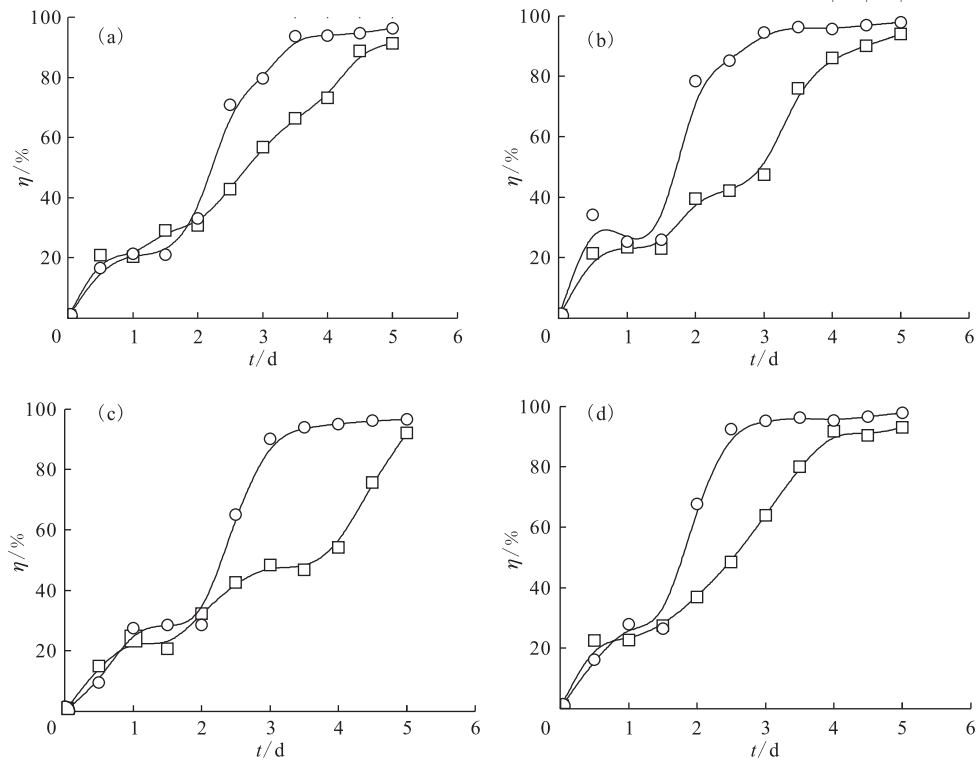


图 3 驯化前、后细菌生长速率分析
Fig. 3 Bacterial growth rate before and after domestication

48.25%;驯化后11#细菌达到平衡的时间为3 d,此时吸附效率为95.26%,而驯化前仅为63.88%。



$r=120\text{ r/min}, \theta=30\text{ }^{\circ}\text{C}, t=5.0\text{ d}$

□——未驯化, ○——驯化后

(a)——4#, (b)——7#, (c)——8#, (d)——11#

图 4 驯化前、后细菌对 Sr^{2+} 的吸附效果

Fig. 4 Adsorption effect of bacteria on Sr^{2+} before and after domestication

从图 4 还可以看出, 尽管吸附开始的阶段, 驯化后各菌株的吸附能力并未具有明显优势, 但在 2.0 d 的时候有了很大提高, 就其整体吸附效果来讲, 驯化后各细菌的吸附效率都有所提高, 而且吸附平衡点明显提前。驯化后, 不同细菌对 Sr^{2+} 的吸附效率不近相同的原因可能是不同的细菌具有自己独特的生长环境, 不同的生长条件下会影响其生物活性, 因此在相同的吸附条件下显现不同的吸附效果; 而驯化后细菌对 Sr^{2+} 吸附效率都有所提高, 原因可能是由于经过实验过程中在含 Sr^{2+} 液相环境下的胁迫诱导驯化处理, 菌体对 Sr^{2+} 抗性有一定减弱, 使得 Sr^{2+} 与菌体基团结合, 进入活性点位的难度降低, 也一定程度上提高了各菌株对 Sr^{2+} 的吸附速率。

2.5 细菌形态分析

经过显微镜观察染色后各株细菌的形态示于图 5。由图 5 可知, 所筛选的 4 株耐铯细菌均为杆状结构。7#、8# 为长杆状结构, 4#、11# 为短杆状结构, 8#、11# 菌株形态大小较 4#、7# 菌株更加均匀而且分布的更加密集, 4 株细菌具体

的菌属下一步实验将会继续研究确定。

3 结 论

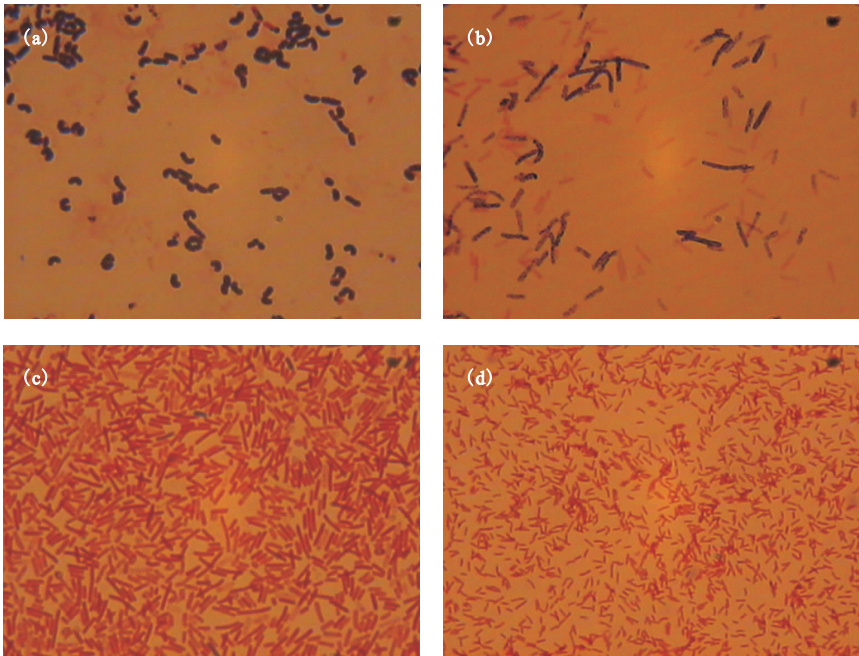
(1) 从土壤中经过分离、纯化及筛选出了 4 株对铯有较好吸附效果的细菌: 4#、7#、8#、11#;

(2) 在外界 Sr^{2+} 环境胁迫下, 细菌逐渐适应了液相环境, 其生长能力有明显提高, 生长速率 v_A 的峰值 $v_{A, \max}$ 的位置由驯化前的 1.0 d 提前到 0.5 d;

(3) 驯化后的细菌对 Sr^{2+} 吸附效率均有所提高, 筛选出 4 株细菌在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 120 r/min 、 $\text{pH}=7$ 、培养时间 5.0 d 条件下的最佳吸附效率均达到 90% 以上。

参考文献:

[1] 王晓涛, 周启甫, 陈栋梁. 我国核技术利用发展现状及存在的问题探讨[J]. 中国辐射卫生, 2012, 21(4): 468-469.
[2] 杨波, 沈海滨. 中国核电发展现状及趋势[J]. 世界环境, 2013(3): 16-17.



(a)——4#, (b) ——7#, (c) ——8#, (d) ——11#

图 5 细菌显微照片(×1 600)

Fig. 5 Bacterial micrograph (×1 600)

[3] 王岩,代群威,韩林宝. 酵母菌吸附锶离子后沉淀物的减量化处理[J]. 核化学与放射化学,2016,38(4): 232-237.

[4] 宋均轲,王静,高波. 放射性废水处理技术研究进展[J]. 能源环境保护,2013,27(2):4-8.

[5] Osmanlioglu A E. Treatment of radioactive liquid waste by sorption on natural zeolite in Turkey[J]. J Hazard Mater, 2006, 37(1): 332-335.

[6] 廖自基. 环境中微量元素的污染危害与迁移转化[M]. 北京:科学出版社,1989:75-78.

[7] von Fircks Y, Rosén K, Sennerby-Forsse L. Uptake and distribution of ^{137}Cs and ^{90}Sr in *salix viminalis* plants[J]. J Environ Radioact, 2002, 63(1): 1-14.

[8] 喻名德,杨春才. 核试验场及其治理[M]. 北京:国防工业出版社,2007.

[9] Soudek P, Valenová Š, Vavříková Z, et al. ^{137}Cs and ^{90}Sr uptake by sunflower cultivated under hydroponic conditions[J]. J Environ Radioact, 2006, 88(3): 236-250.

[10] 袁世斌,周婷. 硫杆菌对污染土壤中锶-90 溶出的影响[J]. 湿法冶金,2010,29(3):203-205.

[11] Chen C, Wang J L. Removal of Pb^{2+} , Ag^{+} , Cs^{+} and Sr^{2+} from aqueous solution by brewery's waste biomass[J]. J Hazard Mater, 2008, 151(1): 65-70.

[12] Chakraborty D, Maji S, Bandyopadhyay A, et al. Biosorption of cesium-137 and strontium-90 by mucilaginous seeds of *Ocimum basilicum*[J]. Bioresour Technol, 2007, 98(15): 2949-2952.

[13] 刘志培,刘双江. 我国污染土壤生物修复技术的发展及现状[J]. 生物工程学报,2015,31(6):901-916.

[14] 孙赛玉,周青. 土壤放射性污染的生态效应及生物修复[J]. 中国生态农业学报,2008,16(2):523-528.

[15] 许凤琴,代群威,侯丽华,等. 碳酸盐矿化菌的分纯及其对 Sr^{2+} 的矿化特性研究[J]. 高校地质学报,2015,21(3):376-381.

[16] Das N. Remediation of radionuclide pollutants through biosorption: an overview[J]. Clean-Soil, Air, Water, 2012, 40(1): 16-23.

[17] Mohapatra B R, Dinardo O, Gould W D, et al. Biochemical and genomic facets on the dissimilatory reduction of radionuclides by microorganisms: a review[J]. Miner Eng, 2010, 23(8): 591-599.

[18] 赵雅平,张生栋,陈晓明,等. 锶污染土壤中耐锶菌株的筛选[J]. 核化学与放射化学,2016,38(6):371-377.