

丝状真菌 F54 的分离鉴定及其对铯的吸附特性

张丽娟^{1,2}, 王 玮^{1,2,*}, 张志东^{1,2}, 谢玉清^{1,2}, 顾美英^{1,2},
朱 静^{1,2}, 唐琦勇^{1,2}, 王 博^{1,2}, 宋素琴^{1,2}, 黄 伟^{1,2}

1. 新疆农业科学院 微生物应用研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091; 2. 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091

摘要: 从新疆放射性污染土壤样本中, 采用微生物分离方法, 结合压力试验及吸附实验, 获得一株对放射性核素污染具有修复能力的土著丝状真菌 F54。通过形态学、分子生物学鉴定及 Biolog 碳源利用实验, F54 为镰刀霉菌属真菌, 与 *Fusarium oxysporum* strain ATCC MYA-3931 同源性最高。最适宜生长条件是: 马铃薯葡萄糖培养基, 30 ℃, pH=7.0。菌株 F54 吸附 Cs⁺ 的最佳条件是: pH=7.0, 30 ℃, 伴随生长进行吸附约 3~4 d, 吸附率最高能达到约 84%, 常见金属阳离子 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Fe³⁺ 对其吸附均有一定的抑制作用。菌株 F54 能够耐受 10 kGy 的钴源照射, 对重金属离子 Ni²⁺、Cr³⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Pb²⁺、Hg²⁺ 均有较高耐受性, 对放射性¹³⁷Cs 的吸附率为 62%。菌株 F54 在有较高的重金属离子混合污染的放射性环境中具有一定的修复应用潜能。

关键词: 铯; 丝状真菌; 生物吸附

中图分类号: TL732 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2018)03-0175-08

doi: 10.7538/hhx.2017.YX.2017019

Isolation and Identification of Filamentous Fungi F54 and Its Biosorption and Enrichment Characteristics of Cesium

ZHANG Li-juan^{1,2}, WANG Wei^{1,2,*}, ZHANG Zhi-dong^{1,2}, XIE Yu-qing^{1,2}, GU Mei-ying^{1,2},
ZHU Jing^{1,2}, TANG Qi-yong^{1,2}, WANG Bo^{1,2}, SONG Su-qin^{1,2}, HUANG Wei^{1,2}

1. Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China;

2. Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, China

Abstract: In order to obtain indigenous strains with radionuclide remediation ability in radioactive pollution area in Xinjiang, soil samples were collected for separation of microorganisms. After the pressure tests and adsorption experiments, a filamentous fungus F54 was finally obtained. Through the traditional morphology and molecular biology identification, strain F54 belongs to *Fusarium sp.*, exhibits the highest homology with *Fusarium oxysporum* strain ATCC MYA-3931. The optimum growth condition is: potato dextrose medium,

收稿日期: 2017-03-11; **修订日期:** 2017-05-27

基金项目: 国家“863”项目(No. 2012AA063503); 国家自然科学基金资助项目(No. 31560034, No. 31560023); 新疆维吾尔自治区“万人计划”后备人选培养项目(No. wr2015cx07); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No. 2016D01A050)

作者简介: 张丽娟(1986—), 女, 山东德州人, 助理研究员, 环境微生物与微生物资源专业, E-mail: kindzhanglijuan@aliyun.com

*** 通信联系人:** 王 玮(1973—), 女, 河南舞阳人, 副研究员, 环境微生物专业, E-mail: mypony926@163.com

网络出版时间: 2018-01-19; **网络出版地址:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2045.TL.20180118.0921.002.html>

pH=7.0. The optimum absorption conditions of Cs^+ for F54 strain are: pH=7.0, 30 °C, 3-4 d associated with the growth. The Cs^+ adsorption efficiency of F54 can up to be about 84% tested by ICP-MS. Common cations such as K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} can inhibit the adsorption of Cs^+ . The F54 strain can tolerate 10 kGy dose irradiation of radioactive cobalt, and also has high tolerance of heavy metal ions Ni^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} . The adsorption efficiency of radioactive ^{137}Cs can up to be 62% tested by liquid scintillator. Strain F54 has high potential to repair radioactive pollution in heavy metal contaminated environment.

Key words: cesium; filamentous fungi; biosorption

随着核技术和核工业的发展,越来越多的放射性核素被人为的暴露于环境中。迄今为止,无论是核试验还是核事故,释放的放射性物质大部分是 ^{137}Cs 和 ^{90}Sr 。1986年切尔诺贝利核电站事故和2011年日本福岛核电站泄漏,是近代以来影响范围最大、危害最持久的两次核事故,其中福岛核事故泄露的辐射物质的活度高达 $6.3 \times 10^{17} \text{ Bq}$ ^[1]。放射性 ^{137}Cs 的半衰期约为30 a,具有生物亲和力高,能够与环境中的其它阳离子竞争进入细胞内、可以经生物富集通过食物链传递、生物放大和累积,对生态系统乃至人类健康产生长期不良影响的特点^[2-4]。

传统的治理核素污染的方法有物理方法和化学方法,如填埋、铲除表层土、沸石吸附、离子交换、溶剂萃取等。然而这些方法成本高、不适宜大面积原位修复,会造成环境的二次污染^[5-6]。值得关注的是,自然界中已知有很多微生物可以在高放射性的环境中生存,并且许多微藻类、细菌和真菌可以与放射性核素发生生物化学作用,对污染环境的放射性核素具有相当稳定的去除作用^[7-15]。利用微生物治理环境成本低、能耗小、可以原位进行并且不会造成二次污染,是一种极具前景的方法。

目前,具有放射性污染修复潜能的菌种主要为细菌和真菌,其中研究比较多的是酿酒酵母,大部分是研究酿酒酵母菌体对放射性铯的吸附作用。张凯等^[16]研究了酿酒酵母菌体对 Cs^+ 的生物吸附,在30 °C、 Cs^+ 初始质量浓度为2 mg/L条件下,最高吸附率为45%左右。龙建友等^[17]研究抗铯细菌*Bacillus cereus* BAT-221菌体对 ^{137}Cs 的吸附特征,在pH=5.0、 Cs^+ 初始质量浓度为80 mg/L条件下,振荡吸附30 min,吸附率达到86.39%。陈灿等^[18]分析了酿酒酵母菌体对放射性铯的吸附动力学曲线,菌体吸附率在

20 min时已经接近平衡,达到最高91.4%,吸附量为7.29 mg/g。

本研究拟从新疆放射性污染土壤中分离纯化真菌F54,研究该菌的耐辐射、抗重金属特性,以确定该菌对溶液中 Cs^+ 的去除能力,以为筛选微生物修复的土著菌株做基础。

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):马铃薯200 g,葡萄糖20 g,去离子水1 000 mL,115 °C灭菌30 min。

分析纯 CsCl 配制成 Cs^+ 质量浓度为2 000 mg/L的储备液,置于100 mL试剂瓶中((25±1) °C)备用。

其余试剂皆为市售分析纯。Xseries II型电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS),美国Thermo公司。分析用水为超纯水。

1.2 菌株F54的分离、纯化与鉴定

1.2.1 菌株F54的分离、纯化 于新疆某放射性污染地区采集土样,以不同的培养温度、pH值、培养基为富集条件,利用传统的平板培养法筛选出一批生长良好的微生物菌株,平板划线法纯化菌株。从中优选出一株编号为F54的真菌。通过水压片和插片法观察其菌落和产孢形态,参照《真菌鉴定手册》^[19](菌种初步鉴定依据的参考书)对F54菌株进行形态学初步鉴定和生长实验。将纯化后的菌株接种到PDA固体培养基斜面上,30 °C培养箱培养6 d,于4 °C冰箱中保存备用。

1.2.2 菌株F54的分子鉴定 用试剂盒Gen-view® GV-Filamentous Fungi Genomic DNA Extraction Kit提取菌株F54基因组DNA。用通用引物扩增ITS序列:正向引物ITS1-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG,反向引物ITS4-TCCTC-CGCTTATTGATATGC。PCR扩增反应体系为50 μL,反应条件为:94 °C,5 min;94 °C,30 s;

54 ℃, 30 s; 72 ℃, 50 s; 循环 35 次; 72 ℃, 10 min。PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 对扩增 PCR 产物进行测序。将测序结果, 通过 Blast 软件在 GenBank、EMBL 等数据库中进行同源比较, 选取相似性较高的标准菌株的 ITS rDNA 基因序列, 利用 ClustalX 软件进行多序列比对, 并采用 Saitou 和 Nei 的邻接法(Neighbor Joining)用 MEGA 5.0 软件进行系统进化树的构建。

1.2.3 菌株 F54 BIOLOG 碳源利用实验 菌株 F54 BIOLOG 碳源利用实验, 参照姚粟等^[20]方法进行, 采用 75% T/FF-IF 的浊度标准液, 利用菌株 F54 的纯培养物, 制成菌悬液。将制备好的菌悬液倒入加样槽中, 使用八道电动移液器, 将其接种于 FF 鉴定微平板的 96 孔中, 接种量为每孔 100 μ L。接种后的 FF 鉴定微平板在 30 ℃, 微平板培养后 24、48、76、96 h, 读取微平板。

1.3 菌株 F54 生长过程中对 Cs⁺ 的吸附特性研究

1.3.1 菌株 F54 生长过程中对 Cs⁺ 的吸附能力测定 移取 100 mL PDA 培养基溶液于 500 mL 锥形瓶中, 加入 Cs⁺ 溶液, 终质量浓度为 20 mg/L。湿热灭菌。接入 0.3 mL F54 菌种悬浊液(20 mL 无菌水与斜面上的菌种均匀混合), 180 r/min、30 ℃振荡培养, 进入对数期后每隔 12 h 取样。实验设置 3 个重复, 以只添加 CsCl 而不接菌 PDA 液体培养基作为对照, 同样定期取样。将收集的样品离心, 上清液用 ICP-MS 测定 Cs⁺ 浓度, 所得菌体真空抽滤, 用于计算生物量。用单位吸附量(q_e)和吸附率(R)表征微生物对铯的吸附, 其计算方法如下:

$$q_e = \frac{(\rho_0 - \rho_t)V}{m} \quad (1)$$

$$R = \frac{\rho_0 - \rho_t}{\rho_0} \quad (2)$$

式中: ρ_0 为溶液中 Cs⁺ 的初始质量浓度, mg/L; ρ_t 为吸附 t 时间后溶液中 Cs⁺ 的质量浓度, mg/L; V 为吸附溶液体积, L; m 为 F54 的菌体质量, g。

1.3.2 pH、金属阳离子对菌株 F54 吸附 Cs⁺ 的影响 分别选择 pH=4.0~8.0 作为 PDA 培养基初始的 pH, 接种 F54 菌株, 180 r/min、30 ℃摇床培养。培养至 60 h 取菌悬液离心去除菌体, 收集上清液, 用 ICP-MS 测定上清液的 Cs⁺ 浓度。选取常见的金属离子 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Fe³⁺ 加入含有 20 mg/L Cs⁺ 的 PDA 培养基, 金属离子的终质量浓度分别为 5、10、20 mg/L,

接种菌种 F54, 以含 20 mg/L Cs⁺ 且不含其他阳离子的接种菌株 F54 的培养基作为对照, 所有试验均设置 3 个重复。180 r/min、30 ℃摇床培养, 培养至对数期后, 通过 ICP-MS 测定样品上清液中剩余的 Cs⁺ 浓度, 以观察常见阳离子对菌株吸附 Cs⁺ 的影响。

1.4 菌体量、温度和吸附时间对 F54 菌体直接吸附 Cs⁺ 的影响

通过 PDA 液体培养基培养 F54, 真空抽滤收集湿菌体。分别称取不同质量的菌体(0、0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 g)置于 15 mL Cs⁺ 质量浓度为 20 mg/L 的溶液体系内, 吸附过夜, 取菌悬液离心, 收集上清液, 经 ICP-MS 测定最终 Cs⁺ 浓度。

称取 0.5 g 菌体, 分别振荡悬浮于 Cs⁺ 质量浓度为 20 mg/L 的 10 mL 溶液体系内, 置于 10~70 ℃不同温度的水浴中, 吸附 1 h 后取菌悬液离心, 收集上清液, 经 ICP-MS 测定最终 Cs⁺ 浓度。称取 0.5 g 菌体, 分别振荡悬浮于 Cs⁺ 质量浓度为 20 mg/L 的 10 mL 溶液体系内, 间隔 1 h 取样。样品离心去除菌体, 收集上清液, 经 ICP-MS 测定最终 Cs⁺ 浓度。

所有试验均设置 3 个重复。

1.5 菌株 F54 耐辐射、耐受重金属及放射性¹³⁷Cs 的吸附能力测定

菌株 F54 培养物 γ 辐射耐受特性以 Ferreira 等^[21]已建立的方法做验证: 菌株 F54 培养物, 接种于液体 PDA 培养基内培养至稳定期, 4 ℃离心后以生理盐水洗涤后, 在生理盐水里重新悬浮, 以 0.167 kGy/min 的 ⁶⁰Co 在室温下进行照射。照射剂量以 2.0 kGy 的幅度从 0 kGy 升到 16.0 kGy。照射过的样品经稀释后涂布至 PDA 平板上在 28 ℃培养 3~5 d 后观察是否生长, 以检测 F54 对于 γ 辐射的耐受特性。每个辐照剂量做 3 个重复。

真菌 F54 对重金属离子的耐受能力通过液体培养法验证。将 F54 接种于装有 5 mL PDA 液体培养基的种子试管中, 于 30 ℃培养, 180 r/min 振荡培养 36 h 后, 按 2% 接种量接种于分别含有不同浓度(200、500、1 000 mg/L)的 Ni²⁺、Cr³⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Pb²⁺、Hg²⁺ 六种离子液体培养基中, 500 mL 三角瓶中装填量为 80 mL。30 ℃、180 r/min 振荡培养 72 h, 观察真菌 F54 的生长情况。每个离子浓度设置 3 个重复。

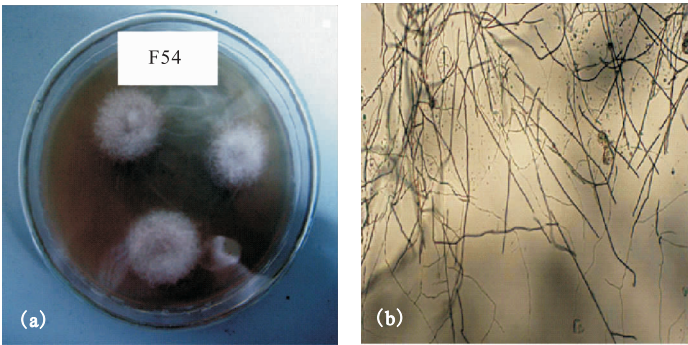
为测定菌株 F54 对于放射性¹³⁷Cs 的吸附,分别在 PDA 培养基中加入 1 mL(6 772.95 Bq)¹³⁷Cs 母液和 2 mL(13 545.9 Bq)¹³⁷Cs 母液,接种真菌 F54,培养至最适宜的生长时间,收集样品,离心去除菌体,收集上清液。采用液闪检测仪测定上清液中¹³⁷Cs 的放射性活度。试验设置 3 个重复。

2 结果与讨论

2.1 菌株 F54 的分离纯化及鉴定结果

菌株 F54 的最适宜培养温度 30 ℃;最适宜 pH 为 7.0;最适宜培养基为 PDA 培养基。图 1

为菌株 F54 的菌落形态图。如图 1 所示,在 PDA 平板上,培养初期 F54 菌落白色,绒毛状,生长繁茂。4 天后表面呈荔枝肉白色,背面蚌肉白色。在培养基表面逐渐形成丝束交织的厚膜,高低不平呈点片状,用接种针不易挑下。显微镜下菌丝分隔,产生大量球形孢子。6 d 后气生菌丝顶端开始膨大成形状不规整的孢囊,囊内有许多大小不一的孢子,孢囊无囊轴,无外壁及囊被。根据以上形态特征,参照《真菌鉴定手册》^[19]进行鉴定,初步鉴定该菌株为半知菌纲丛梗孢目瘤座孢科鲜色多孢族镰刀霉属的一个种,属于镰刀霉属(*Fusarium sp.*)。



(b):放大倍数 10×40

图 1 菌株 F54 菌落形态(a)和显微镜下形态(b)

Fig. 1 Colony morphology(a) and micromorphology(b) of strain F54

根据扩增测序结果,从 GenBank、EMBL 等数据库中调出与 F54 菌株的 ITS 序列相似性较高的相关序列,用 ClustalX 2.0 进行多序列比对,用 MEGA 5.0 软件选取 Saitou 和 Nei 的邻接法(Neighbor Joining)进行系统进化树的构建示于图 2,经测定菌株 F54 的 ITS 基因序列长度为 442 bp,通过 ITS 基因同源分析、系统发育分析结果,F54 与 *Fusarium oxysporum* strain ATCC MYA-3931 同源性最高,菌株 F54 为镰刀属真菌(*Fusarium sp.*)。

传统的真菌鉴定主要是通过形态学鉴定,目前世界上使用最广泛的真菌分类系统为 Ainsworth 分类系统,是按照真菌孢子的类型和性态的有无,把真菌分为鞭毛菌、结合菌、子囊菌、担子菌和半知菌 5 个亚门。形态学分类方法直接快速、但是由于真菌形态结构多变,生长周期不一,给形态学鉴定带来极大困难。随着细菌多相分类鉴定方法的建立和肯定,分子鉴定也逐渐引入到真菌的分类鉴定。真菌 DNA 碱基组成分类鉴

定、DNA 分子杂交、真菌 rDNA 限制性片段长度分析以及随机扩增多态性 DNA 分析等方法均被引入作为真菌的分类鉴定。在 rDNA 基因中,5.8S rDNA 和 28S rDNA 基因间隔序列称为 ITS,它的长度和序列变化较大,将其扩增物进行 RFLP 或序列分析,可用于对真菌的不同生物型、菌株、种、属进行分类鉴定。本研究不仅采取了传统的形态学鉴定还使用了现代的分子鉴定方法对真菌 F54 进行鉴定,两种方法均证明在放射性污染土壤中分离纯化得到的土著真菌 F54 属于镰刀霉菌。

Biolog 试验表明,真菌 F54 可利用 96 种碳源中的 79 种,分别为:N-乙酰基-β-D-葡萄糖胺、核糖醇、杏苷、L-阿拉伯糖、D-阿拉伯醇、熊果苷、D-纤维二糖、糊精、D 果糖、D-半乳糖、龙胆二糖、D-葡萄糖胺、α-D-葡萄糖、α-D-葡萄糖-1-磷酸盐、D-葡萄糖醛酸、丙三醇、肝糖、m 纤维醇、2-酮-D-葡萄糖酸、α-D-乳糖、麦芽糖醇、麦芽糖、麦芽三糖、D-甘露醇、D-甘露糖、D-松三糖、D-蜜二糖、α-甲基-

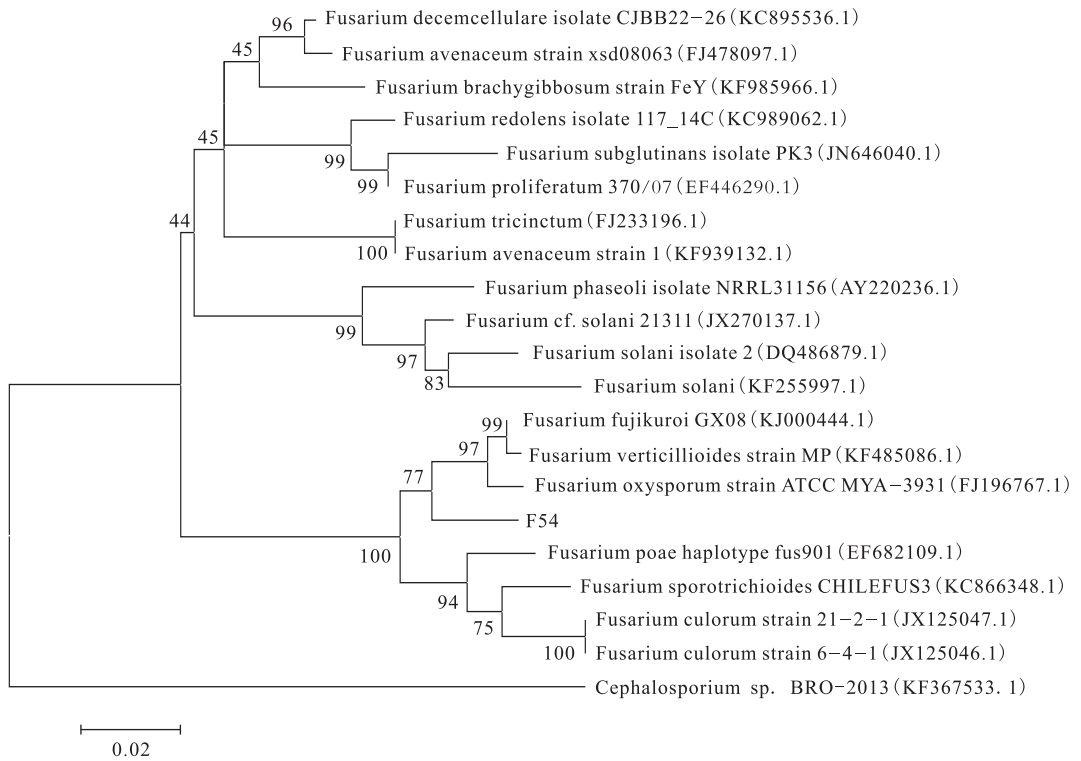


图 2 耐辐射镰刀霉菌(*Fusarium* sp.)F54 菌株的系统发育树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree of radiation resistant *Fusarium* sp. F54 based on rDNA ITS sequence cluster analysis

D-半乳糖苷、β-甲基-D-半乳糖苷、α-甲基-D-葡萄糖苷、β-甲基-D-葡萄糖苷、6-O-D-吡喃葡萄糖酰-D-呋喃果糖、D-蜜三糖、L-鼠李糖、D-核糖、水杨苷、D-山梨醇、L-山梨糖、水苏糖、蔗糖、K-海藻糖、松二糖、木糖醇、D-木糖、γ-氨基丁酸、溴代琥珀酸、反丁烯二酸、β-羟基丁酸、γ-羟基丁酸、2-羟苯乙酸、α-酮戊二酸、D-乳酸甲基酯、L-乳酸、D-苹果酸、苹果酸、奎尼酸、D-葡萄糖二酸、琥珀酸、琥珀酸甲基酯、L-丙氨酸酰胺、L-丙氨酸、L-丙胺酰氨基乙酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸-L-谷氨酸、鸟氨酸、L-苯基丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、2-氨基乙醇、腐苷、腺苷、尿苷、腺苷-5'-磷酸盐。菌株 F54 碳源利用实验的结果与镰刀菌属真菌一致,进一步佐证了 F54 属于镰刀霉菌。

2.2 菌株 F54 生长过程中对 Cs⁺ 的吸附特性

在吸附温度为 30 ℃、pH=7.0、Cs⁺ 质量浓度为 20 mg/L 的条件下,F54 对于 Cs⁺ 吸附率示于图 3。由图 3 可见,F54 对于 Cs⁺ 吸附率随着菌体生长而急速增长,在 60 h 左右时菌的生长进入稳定期,此时吸附率也达到最大值 84.12%,之后吸附率随时间变化不大。

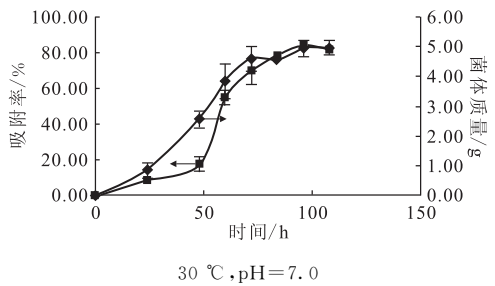


图 3 菌株 F54 在 20 mg/L Cs⁺ 下的生长曲线及吸附特性

Fig. 3 Growth and adsorption characteristics curves of strain F54 under 20 mg/L Cs⁺

这表明菌体的生长与 Cs⁺ 吸附是一个极其相关的过程,随着微生物对 Cs⁺ 吸附增加,细胞表面对 Cs⁺ 的吸附逐渐达到饱和,细胞壁上对其产生的斥力增强,造成金属离子进一步进入到细胞表面的阻力增大,最后达到相对平衡阶段。随着培养时间的延长,微生物对 Cs⁺ 的吸附率略有降低,表明随着营养物质消耗殆尽,菌体开始死亡,甚至出现自溶现象,打破固液吸附平衡,引起菌体吸附率下降。

分别选择 pH=4.0~8.0 作为培养基初始的 pH,接种后 180 r/min、30 ℃ 摇床培养。培养至

最适宜时间, 取样经 ICP-MS 检测, 结果示于图 4。由图 4 发现, 在 pH=5.0~8.0 时, 菌株对 Cs⁺ 的吸附率比较高。生命体的生存生长等所有的细胞代谢活动与环境 pH 息息相关。酸性环境虽然有利于金属阳离子的溶出和交换吸附, 但是过低的环境 pH 会产生细胞毒性, 影响最终的菌体量^[18]。同理虽然 F54 可以耐受一定的碱性环境, 但碱性环境下细胞表面的活性官能基团减少, 吸附率也会受到影响。因此, 如图 4 所示, F54 菌株在 pH=4.0~8.0 范围内均能吸附 Cs⁺, 最适宜 pH 为 7.0。

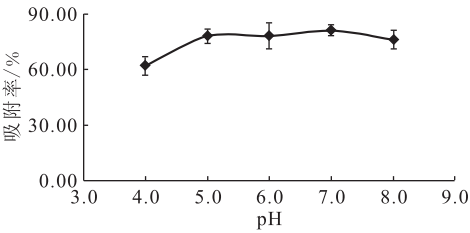


图 4 30 °C 培养下 pH 对 F54 生长吸附 Cs⁺ 的影响
Fig. 4 Effects of pH on adsorption efficiency of strain F54 at 30 °C

金属阳离子对镰刀霉菌(*Fusarium sp.*) F54 吸附 Cs⁺ 的影响示于图 5。如图 5 所示: 选取常见的金属离子 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Fe³⁺, 其中 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Fe³⁺ 对菌株吸附 Cs⁺ 均有抑制作用, K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Al³⁺ 浓度越高影响越大, 而 Mg²⁺ 的抑制作用随着浓度的增加有所缓解。自然环境中铯多以一价阳离子形式存在, 与 K⁺ 的化学性质相似, K⁺ 是细胞维持内环境稳态、信号传导甚至生长运动必不可少的元素。其它阳离子 Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、

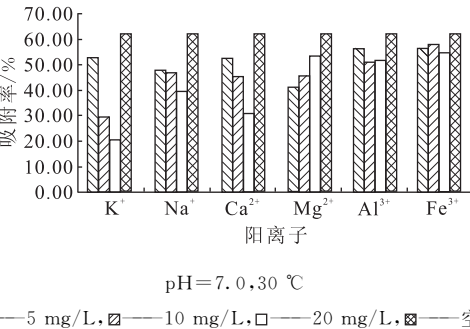
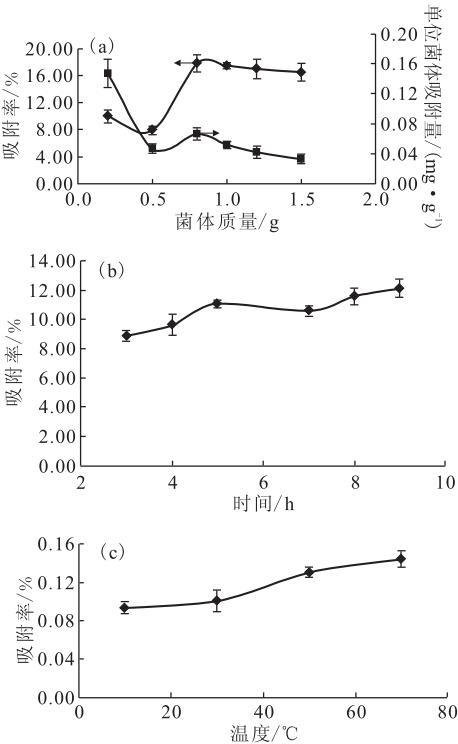


图 5 不同金属离子对 F54 生长吸附 Cs⁺ 的影响
Fig. 5 Effects of different cations on adsorption efficiency of strain F54

Fe³⁺、Al³⁺ 也都是生命体必须的元素, 可以推测 Cs⁺ 由于低细胞毒性及类 K⁺ 化学特性, 与其它金属元素存在竞争性的吸附和吸收关系^[22]。

2.3 菌体量、温度和吸附时间对 F54 菌体吸附稳定 Cs⁺ 的影响结果

菌体量、温度和吸附时间对 F54 菌体吸附稳定 Cs⁺ 的影响结果示于图 6。由图 6(a)看出, 随着菌体量增加, 吸附率也缓慢增加, 当达到一定量时, 吸附率不再有变化, 即达到平衡。随着菌体量的增加, 在固定金属离子浓度状态下, 单位菌体的吸附量是降低的。随着时间的增加, 菌体的吸附率并没有显著增加, 只是在一定值的范围上下波动, 因此菌体对 Cs⁺ 的吸附很可能是个瞬间过程(图 6(b))。



(a)、(b): 30 °C, pH=7.0
图 6 菌体添加量(a)、吸附时间(b)、温度(c)对 F54 菌体吸附 Cs⁺ 的影响
Fig. 6 Effects of biomass(a), reaction time(b), and temperature(c) on Cs⁺ adsorption efficiency of strain F54

称取 0.5 g 菌体, 分别振荡悬浮于 Cs⁺ 质量浓度为 20 mg/L 的 10 mL 溶液体系内, 置于 10~70 °C 不同温度的水浴中, 随着温度的增加吸附率增加, 温度的增加促进了吸附的进行(图 6(c))。

然而无论如何,直接利用 F54 菌体的吸附率均远远小于 F54 的生长过程中对 Cs⁺ 的最大吸附率(即吸附平衡时的吸附率)。这可能是因为一方面细胞在生长初期和对数期细胞表面有效的活性基团表现较为活跃;另一方面 F54 的生长过程中的吸附过程不仅依靠细胞表面的官能基团进行表面吸附,还存在其它的吸附方式。由于 Cs⁺ 的低细胞毒性和类 K⁺ 生物学特性,可能存在着代谢依赖性吸附^[23]。

2.4 菌株 F54 对重金属、辐照的耐受能力及对¹³⁷Cs的吸附能力

F54 菌株对 Ni²⁺、Cr³⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Pb²⁺、Hg²⁺ 六种离子的耐受实验结果表明,F54 菌株对这 6 种离子均具有耐受特性,其中对 Pb²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺ 的耐受浓度最大,分别可达 1 000 mg/L、500 mg/L和 500 mg/L;对 Co²⁺、Cr³⁺、Hg²⁺ 的耐受性次之,均可达 200 mg/L。

微生物治理环境放射性污染需满足两个条件,即在辐射环境中能够生存并对污染核素具有较高的吸附选择性。所用真菌镰刀霉菌 F54 是放射性核素污染土壤中提取,斜面培养后,经⁶⁰Co放射源 γ 射线辐照,辐照剂量累积为 10 kGy。通过辐照样品和非辐照样品培养比对,发现其生长不受辐照的影响,即镰刀霉菌 F54 具有很强的抗辐射能力。

表 1 列出了真菌 F54 对¹³⁷Cs 的吸附结果,由表 1 看出,F54 对¹³⁷Cs 的吸附率分别达到(62.12±2.23)%和(62.53±0.89)% (n=3),表明 F54 对¹³⁷Cs 同样具有较好的吸附率。

表 1 真菌 F54 对放射性¹³⁷Cs 的吸附结果
Table 1 Adsorption efficiency of radioactive cesium by strain F54

¹³⁷ Cs 添加量/mL	¹³⁷ Cs 的吸附率/%
1(6 772.95 Bq)	62.12±2.23(n=3)
2(13 545.9 Bq)	62.53±0.89(n=3)

3 结 论

(1) 在放射性污染土壤中分离纯化得到土著真菌 F54,属于镰刀霉菌属。该菌的最适宜培养基为 PDA 培养基,最适宜生长温度为 30 ℃,最佳 pH=7.0。F54 能够耐受 10 kGy 的辐射剂量,同时对多种重金属离子(Ni²⁺、Cr³⁺、Zn²⁺、Co²⁺、

Pb²⁺、Hg²⁺)具有很好的耐受性。

(2) 在初始 Cs⁺ 质量浓度为 20 mg/L、30 ℃、pH=7.0、振荡培养条件下,F54 菌株在生长过程中,随着菌体量的不断增加,对 Cs⁺ 的吸附率也逐渐增加,二者几乎同时达到平衡,而后随着菌体的衰老吸附率略有下降,最高吸附率约达到 84%。F54 菌株在 pH=4.0~8.0 范围均能对 Cs⁺ 吸附,最佳 pH=7.0。培养基中的 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Al³⁺、Fe³⁺ 抑制 F54 对 Cs⁺ 的吸附,与 Cs⁺ 存在一定的竞争吸附关系。

(3) F54 菌体对 Cs⁺ 的吸附是一个瞬时过程,不会随着吸附时间的延长而增加。温度的增加能够一定程度提高菌体的吸附效率。直接利用新鲜 F54 菌体吸附溶液中 Cs⁺ 的吸附率远低于 F54 生长过程中对 Cs⁺ 的吸收吸附,表明生长过程中可能存在其它的吸附方式。F54 对稳定¹³⁴Cs 的吸附效果同样适用于放射性¹³⁷Cs。本研究结果预示着 F54 不仅可以在高辐射环境发挥作用,在有较高的重金属离子混合污染的放射性环境中仍然具有一定的修复应用潜能。

参考文献:

[1] Yamaguchi K. Investigations on radioactive substances released from the Fukushima Daiichi nuclear power plant[J]. Fukushima J Med Sci, 2011, 57 (2): 75-80.

[2] Zhu Y G, Shaw G. Soil contamination with radionuclides and potential remediation[J]. Chemosphere, 2000, 41(1-2): 121-128.

[3] Wiesel L, Dubchak S, Turnau K. Caesium inhibits the colonization of Medicago truncatula by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. J Environ Radioact, 2015, 141: 57-61.

[4] Sato I, Okada K, Sasaki J, et al. Distribution of radioactive cesium and stable cesium in cattle kept on a highly contaminated area of Fukushima nuclear accident[J]. Anim Sci J, 2015, 86(7): 716-720.

[5] 刘忠义,杨川,黄子涛,等.放射性污染土壤危害及其防治对策的探讨[J]. 环境与可持续发展,2010 (6):33-37.

[6] 张琼,陈金融,张春明.土壤放射性核素铯污染修复研究进展[J]. 核农学报,2014,28(10):1924-1931.

[7] Ashraf M A, Khan A M, Ahmad M, et al. Release, deposition and elimination of radiocesium (¹³⁷) Cs in the terrestrial environment[J]. Environ Geochem Health, 2014, 36(6): 1165-1190.

- [8] Diene O, Sakagami N, Narisawa K, et al. The role of dark septate endophytic fungal isolates in the accumulation of cesium by Chinese cabbage and tomato plants under contaminated environments[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109233.
- [9] Niedrée B, Berns A E, Vereecken H. Do Chernobyl-like contaminations with (137) Cs and (90) Sr affect the microbial community, the fungal biomass and the composition of soil organic matter in soil[J]. J Environ Radioact, 2013, 118: 21-29.
- [10] Fukuda S Y, Iwamoto K, Atsumi M, et al. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy[J]. J Plant Res, 2014, 127 (1): 79-89.
- [11] Lloyd J R, Renshaw J C. Bioremediation of radioactive waste: radionuclide-microbe interactions in laboratory and field-scale studies[J]. Curr Opin Biotechnol, 2005, 16(3): 254-260.
- [12] Istok J D, Senko J M, Krumholz L R. In situ bioreduction of technetium and uranium in a nitrate-contaminated aquifer[J]. Environ Sci Technol, 2004, 38 (2): 468-475.
- [13] Bonaventura C, Johnson F M. Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105 (Suppl 1): 5-20.
- [14] 王卫宪,王耀芹,张瑞荣,等. 真菌曲霉 F77 对水中 Cs^+ 的吸附[J]. 核化学与放射化学, 2014, 36 (6): 346-351.
- [15] 廖上强,郭军康,宋正国,等. 一株富集铯的微生物及其在植物修复中的应用[J]. 生态环境学报, 2011, 20(4): 686-690.
- [16] 张凯,张建国,杨翊方,等. 酿酒酵母对铯离子的生物吸附研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2013, 31: 050701(5).
- [17] 龙建友,罗定贵,黄雪夏,等. 抗铯细菌对 ^{137}Cs 的吸附特性及分子鉴定[J]. 环境污染与防治, 2016, 38 (8): 1-5.
- [18] 陈灿,王建龙. 酿酒酵母对放射性核素铯的生物吸附[J]. 原子能科学技术, 2008, 42(4): 308-313.
- [19] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [20] 姚粟,程池,李金霞,等. Biolog 微生物自动分析系统: 丝状真菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 8: 63-67.
- [21] Ferreira A C, Nobre M F, Rainey F A, et al. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(4): 939-947.
- [22] Parab H, Joshi S, Shenoy N, et al. Uranium removal from aqueous solution by coir pith: equilibrium and kinetic studies[J]. Bioresour Technol, 2005, 96(11): 1241-1248.
- [23] 王建龙. 微生物与铯的相互作用及其在放射性核素污染环境修复中的应用潜力[J]. 核技术, 2003, 26 (12): 949-955.