

抗铯细菌对¹³⁷Cs的吸附特性及分子鉴定*

龙建友^{1,2} 罗定贵^{1,3} 黄雪夏¹ 陈永亨^{2,3#}

(1.广州大学环境科学与工程学院,广东 广州 510006;

2.珠江三角洲水质安全与保护协同创新中心暨省部共建教育部重点实验室,广东 广州 510006;

3.广东省放射性核素污染控制与资源化重点实验室,广东 广州 510006)

摘要 以大亚湾核电站周围土壤中分离得到的BAT-221菌株为研究对象,探讨了该菌株的种属分类地位及菌株在不同条件下对铯-137(¹³⁷Cs,以下简称Cs)的吸附特性及分子鉴定。16S rDNA序列分析结果表明,BAT-221菌株应为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),将其命名为*Bacillus cereus* BAT-221(基因序列登录号:JF901707)。它对Cs²⁺的最佳吸附条件为:pH=5,Cs²⁺初始质量浓度80 mg/L,反应时间30 min,摇床转速120 r/min,该条件下吸附率达到86.39%。傅立叶变换红外光谱(FTIR)分析结果显示:菌株吸附前后的区域峰发生了明显变化,说明其为细胞上的亚氨基(=NH)、羟基(-OH)、羧基(-COOH)、次甲基(=CH)、醇类和酚类等结构和物质参与了对Cs的吸附。可见,该菌株可作为环保、经济的生物材料对Cs进行处理。

关键词 抗铯细菌 铯 吸附特性 分子鉴定

DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2016.08.001

Adsorption characteristics and molecular identification of ¹³⁷Cs resistant bacteria on ¹³⁷Cs LONG Jianyou^{1,2}, LUO Dinggui^{1,3}, HUANG Xuexia¹, CHEN Yongheng^{2,3}. (1.College of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou Guangdong 510006; 2.Innovation Center and Key Laboratory of Waters Safety & Protection in the Pearl River Delta, Ministry of Education, Guangzhou Guangdong 510006; 3.Guangdong Provincial Key Laboratory of Radionuclides Pollution Control and Resources, Guangzhou Guangdong 510006)

Abstract: This study was investigated to evaluate the taxonomy characterization, cesium-137 (¹³⁷Cs) adsorption characteristics and molecular identification of the ¹³⁷Cs resistant bacteria BAT-221 which isolated from the soil around the Daya Bay Nuclear Power Station. The 16S rDNA sequence analysis revealed that the strain belonged to *Bacillus cereus* (gene accession number JF901707), therefore named as *Bacillus cereus* BAT-221. The optimum condition was pH 5, initial ¹³⁷Cs²⁺ concentration of 80 mg/L, reaction time of 30 min and rotation of 120 r/min. Under such conditions, the adsorption rate could reach 86.39%. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis indicated that the main functional groups responsible for adsorption of ¹³⁷Cs were imino group, hydroxyl, carboxyl, methenyl, alcohols and phenolics. With the preferable adsorption capacity, BAT-221 strain is considered to have good prospects in biological adsorbent, which is feasible to adsorb ¹³⁷Cs, and it has high adsorption efficiency and short adsorption time.

Keywords: ¹³⁷Cs resistant bacteria; cesium; adsorption characteristics; molecular identification

随着核工业的发展、核技术的广泛应用及核能的需求日趋增大,尤其是人类活动使得放射性核素不可避免地进入环境,这些放射性核素进入大气、水体和土壤后,对生态环境和人类健康造成潜在的危害,铯-137(¹³⁷Cs,以下简称Cs)作为最危险放射性核素之一,1860年由德国化学家BUNSEN等首先发现,因其具有优良的光电特性和强烈的化学活性,在材料制造、航空航天、医药卫生领域发挥着重

要的作用,一旦Cs被释放到环境中,其可通过食物链转移危害人类健康,因而如何去除这些进入环境中的放射性核素已成为环境修复与治理的重要内容^[1]。目前,放射性核素治理的方法有物理和化学方法,如沸石吸附、离子交换、溶剂萃取等,但这些方法成本高,难以用于治理环境中的大面积污染,且易造成二次污染^[2]。随着现代生物技术的发展,生物修复技术尤其是微生物修复技术引起了人们的关

第一作者:龙建友,男,1977年生,博士,副教授,主要从事环境污染物的微生物处理研究。# 通讯作者。

* 国家自然科学基金资助项目(No.41573119、No.41372248、No.41301348);广州市教育局资助项目(No.2012A033);广东省自然科学基金资助项目(No.S2013010016540)。

注,生物修复技术与传统的物理、化学方法相比,具有可操作性强、经济实惠、环境美化的作用。同时,生物修复本身用的就是自然资源,不会造成二次污染,是一种生态友好的技术^[3]。作为生物资源中的一种,微生物个体小、比表面积大、繁殖快,可以分解、转化、吸附很多污染物,其对放射性核素的净化起着重要作用^[4]。开发经济实用的微生物修复技术来治理环境放射性污染,愈来愈受到科学家的关注,微生物虽然不能降解放射性核素,但微生物表面结合有许多表面蛋白质等大分子物质,这些生物大分子与细胞膜结合蛋白富含多种活性基团,这些活性基团可以吸附放射性核素运入液泡并与蛋白质整合起到脱毒、解毒的效果,即微生物把放射性核素运入胞内,就不容易运出;同时,微生物在代谢的过程中产生的次生代谢产物与放射性核素结合后可以改变其化学或物理特性,从而影响其在环境中的迁移与转化,从而使得放射性核素数量和活度减至合理或达到尽量低的水平^[5]。基于上述情况,笔者以微生物培养物制成的生物吸附剂进行了其对Cs吸附特性的研究,这是在对重金属污染进一步改善的同时获得良好生物吸附剂新途径的探讨,为今后实践提供理论基础^[6]。

1 材料与方法

1.1 试验菌株、培养基与吸附剂制备

BAT-221菌株:由广州大学环境科学与工程学院环境生物学实验室提供,分离大亚湾核电站周围土壤。

培养基:牛肉膏3g,蛋白胨10g,NaCl5g,蒸馏水1000mL,琼脂粉15g,pH7.0,121℃灭菌30min^[7]。

吸附剂的制备:将培养好的BAT-221菌株洗涤后进行离心得到菌体,将菌体置于60℃烘箱中烘8h,最后将烘干的菌体用研钵研磨成粉末用于吸附。

1.2 仪器与试剂

仪器:JK08Q-THZ-C恒温振荡器;Perkin-Elmer 6000电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS);VERTEX 70傅立叶变换红外光谱(FTIR)仪;LDZX-40BI立式自动电热压力蒸汽灭菌器;TL-18M台式高速冷冻离心机;SP-01生化培养箱;FEI Quanta400 FEG扫描电子显微镜(SEM)。

试剂:无水乙醇、HCl、 NH_4NO_3 、NaOH、 Cs^{2+} 标准储备溶液(1000 $\mu\text{g/mL}$),均为分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 形态鉴定

将BAT-221菌株接种于培养基上,置于培养箱中于25℃恒温条件下培养48h,用于SEM分析。

1.3.2 分子鉴定

16S rDNA基因聚合酶链式反应(PCR)扩增引物为:16F(5'-GGA TGA GCC CGC GGC CTA-3')和16R(5'-CGG CCG CGG CTG CTG GCA CGT A-3')。扩增程序为:94℃预变性3min,94℃变性50s,55℃退火30s,72℃延伸30s,进行32个循环,72℃延伸3min。基因扩增产物纯化后测序,将所得序列与NCBI的GenBank中已有的16S rDNA序列进行BLAST对比分析,用MEGA5.2进行多重序列比对,采用Kimura-2模型建NJ(Neighbor-joining)系统进化树^[8]。

1.3.3 吸附试验

取一定体积不同质量浓度的 Cs^{2+} 溶液置于100mL的锥形瓶中,用0.1mol/L HNO_3 或NaOH将Cs溶液的pH调至一系列值,每组试验加入一定量的菌株粉末,然后置于恒温振荡器中,控制温度30℃,振荡吸附一定时间后,测定菌株对 Cs^{2+} 的吸附效果。

(1) pH的影响试验

将含80mg/L Cs^{2+} 溶液pH分别调节至3、4、5、6、7、8,菌体粉末加入量为2.0g/L,120r/min振荡吸附30min,8000r/min下离心10min,取上清液测定 Cs^{2+} 浓度。

(2) Cs^{2+} 初始浓度的影响试验

菌体粉末加入量为2.0g/L,pH=5、摇床转速为120r/min时,分别调节 Cs^{2+} 质量浓度为20、40、60、80、100、120mg/L,振荡吸附30min,8000r/min下离心10min,取上清液测定 Cs^{2+} 浓度。

(3) 反应时间的影响试验

在 Cs^{2+} 初始质量浓度为80mg/L,pH=5、摇床转速为120r/min、菌体粉末加入量为2.0g/L的条件下,振荡吸附50min,每5min取一次样,8000r/min下离心10min,取上清液测定 Cs^{2+} 浓度。

(4) 摇床转速的影响试验

菌体粉末加入量为2.0g/L,pH=5, Cs^{2+} 初始质量浓度为80mg/L,摇床转速分别设为30、60、90、120、150、180r/min,振荡吸附30min,8000r/min下离心10min,取上清液测定 Cs^{2+} 的浓度^[9]。

1.3.4 SEM及FTIR分析

SEM分析:将充分干燥的菌株粉末制备SEM样品,置于室温下扫描,观察样品形貌^[10]。

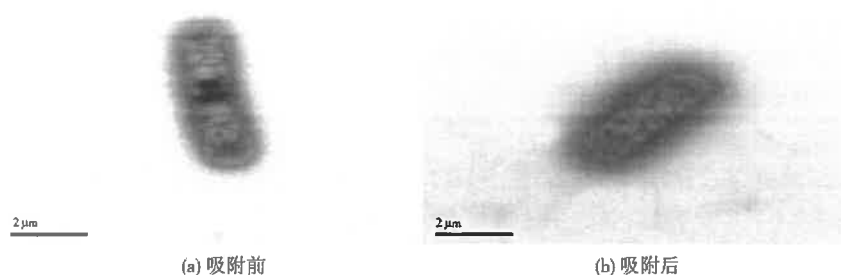


图1 吸附前后菌株 SEM 图

Fig.1 The scanning electron microscopy (SEM) of strain BAT-221 before and after adsorption

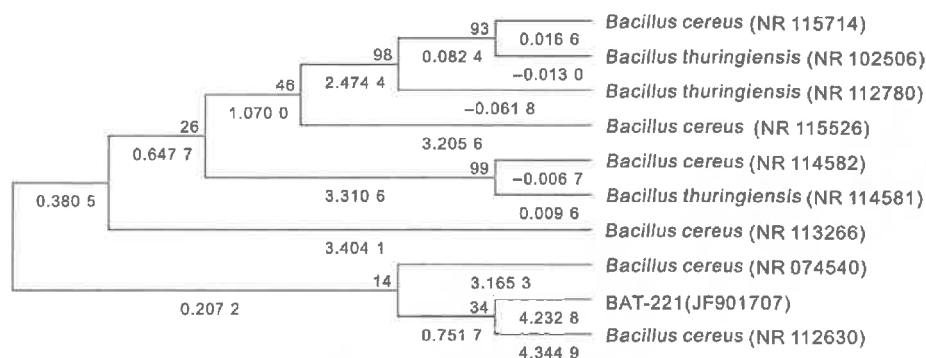


图2 JF901707 菌株的 16S rDNA 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of the 16S rDNA genes of strain JF901707

FTIR分析:收集菌体沉渣,利用去离子水反复洗涤3次,然后置于60℃恒温烘箱中烘干。取烘干的菌体2mg,加入200mg光谱纯溴化钾(质量比1:100)在玛瑙研钵中研磨,压成均匀透明的薄片,利用FTIR仪对样品进行分析^[11]。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

菌株菌落的颜色为淡黄色,细胞呈柱状,在培养基中不形成荚膜,不运动,周生鞭毛,孢子椭圆形或球形(见图1),表面光滑,不产生可溶性色素。

将培养好的菌株进行DNA提取,并对菌株的16S rDNA序列进行PCR扩增,得到一条1381bp的条带,将其基因序列与NCBI数据库中的相关菌株序列进行BLAST对比。结果显示,该菌株与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)隶属同一分支,因而将其命名为*Bacillus cereus* BAT-221,并与相关种的16S rDNA序列构建系统发育树(见图2),序列已提交NCBI的GenBank数据库,菌株基因序列登录号为JF901707。

2.2 pH对吸附的影响

菌株在不同pH下对Cs²⁺的吸附率如图3所示。由图3可见,菌株对Cs²⁺的吸附率随pH的增

大先升高后降低。在pH=5时,吸附率达到最大(86.26%)。当pH超过5时,吸附率开始下降。在低pH区域,吸附率较低的原因可能有两个:一是吸附位点存在两种离子的竞争,分别是H⁺和Cs²⁺,低pH环境中高浓度H⁺具有更高迁移率,更容易占据吸附位点。也就是说,菌株的大多数吸附位点被H⁺所占据,由此使得Cs²⁺与吸附位点结合的可能性降低。二是在低pH下溶液呈酸性,盐类金属的溶解性和电离作用更活跃。相反,当pH不断增大,此环境下菌株吸附位点附近存在带负电的离子,金属离子带正电,彼此间存在吸引力,对金属离子的吸附有促进作用^[12]。

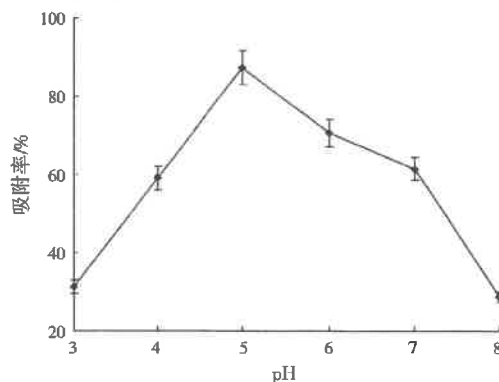


图3 pH对吸附的影响

Fig.3 Effect of different pH on adsorption of Cs²⁺

2.3 Cs^{2+} 初始浓度对吸附的影响

如图4所示,吸附率随 Cs^{2+} 初始浓度的变化而发生较大的变化,呈先增大后减小的态势。80 mg/L时吸附率最大,达86.00%。在20~80 mg/L时,吸附率上升明显,很可能是存在于细菌表面的活性位点还没有被全部利用,仍然存在可用位点,所以当 Cs^{2+} 浓度增加时, Cs^{2+} 与活性位点的接触机会增加,吸附率增大。但当 Cs^{2+} 质量浓度大于80 mg/L时,吸附率明显下降,下降的原因可能包括:(1) Cs^{2+} 浓度进一步增加时,溶液中的离子彼此间竞争吸附活性位点,从而降低了菌体对 Cs^{2+} 的吸附率;(2)对一定量的吸附剂而言,其吸附的位点是一定的,当溶液中金属离子达到一定浓度后,其吸附能力达到饱和,吸附就会受到限制,导致吸附率降低;(3)对于活性菌株而言,当金属离子浓度增加时,严重影响了微生物细胞的生长和繁殖,甚至细胞会发生死亡现象,最后导致吸附率下降^[13]。本研究与文献[7]报道的结果一致,溶液中金属离子浓度过高或过低都不利于菌株对其的吸附,因此确定80 mg/L为最佳初始浓度。

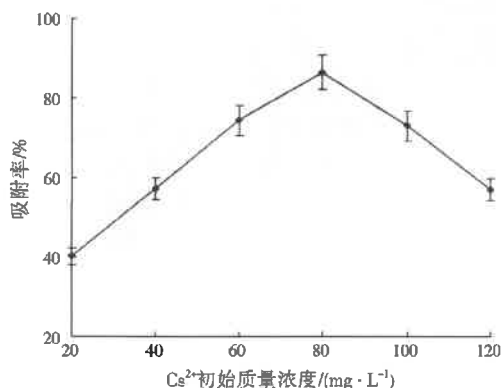


图4 Cs^{2+} 初始质量浓度对吸附的影响

Fig.4 Effect of initial Cs^{2+} concentration on its adsorption

2.4 反应时间对吸附的影响

如图5所示,吸附率随反应时间的延长先增加后趋于稳定。在30 min时达到最大吸附率(为86.39%);30 min以后,菌株对 Cs^{2+} 的吸附趋于平衡。可能是由于吸附开始时,菌株表面存在大量可利用的吸附位点,经过一段时间,菌株表面的可利用吸附位点由于固相与液相之间溶质的分子间斥力而难以被利用,所以吸附率的增长速度有所减缓。如果反应时间较长,菌株对 Cs^{2+} 的吸附趋于平衡,其吸附主要是通过细胞的代谢和扩张来实现,被吸附的 Cs^{2+} 会被解吸到溶液中。综上所述,确定最佳反应时间为30 min^[14]。

• 4 •

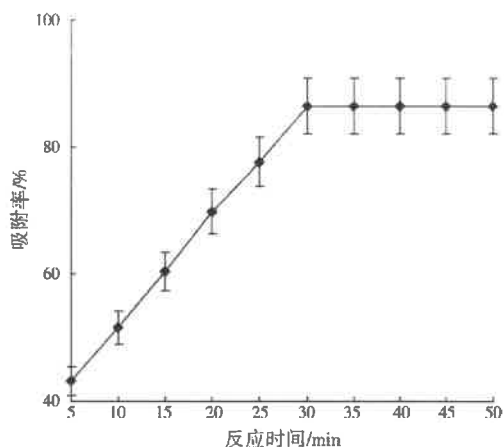


图5 反应时间对吸附的影响

Fig.5 Effect of reaction time on adsorption of Cs^{2+}

2.5 摇床转速对吸附的影响

如图6所示,菌株对 Cs^{2+} 的吸附率随着转速升高而先增大后减小。随着转速的升高,菌株与溶液中的 Cs^{2+} 更容易接触,吸附率增大。120 r/min时,吸附率达到最大(86.33%)。当转速升高到120 r/min后,吸附率开始逐渐下降,可能与 Cs^{2+} 吸附传质速度、吸附液湍流度及外扩散阻力有关。 Cs^{2+} 吸附传质速度因吸附液湍流度的增大、外扩散阻力减小而加快;但当吸附液湍流度过大时, Cs^{2+} 传质速度过快,严重影响了微生物细胞的生长速度从而造成微生物生物量严重下降,而生物量降低后,细胞表面的吸附位点也会减少,最终导致其吸附率也下降;另外,作为吸附剂的菌体其细胞壁受到外界的离心力过大,导致细胞破损,致使菌株与 Cs^{2+} 接触不良,影响了菌株对 Cs^{2+} 的吸附效果。

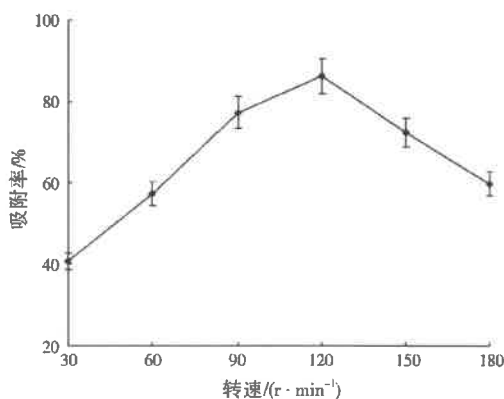


图6 转速对吸附的影响

Fig.6 Effect of rotation on adsorption of Cs^{2+}

2.6 菌株吸附 Cs^{2+} 的FTIR分析

菌株吸附 Cs^{2+} 前后的FTIR分析如图7所示。从图7可知,菌株对 Cs^{2+} 吸附前后的特征峰发生了变化,主要在3 400、2 900、1 600、1 000 cm^{-1} 附近。

在 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了一个宽峰,吸附前该特征峰为 $3\,408.83\text{ cm}^{-1}$,吸附后下降到 $3\,399.09\text{ cm}^{-1}$,这一变化很可能是由于菌株细胞壁上负责吸附的基团羟基($-\text{OH}$)或者亚氨基($=\text{NH}$)在起作用。在 $2\,900\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了一个尖峰,吸附前特征峰为 $2\,926.02\text{ cm}^{-1}$,吸附后则平移到 $2\,915.31\text{ cm}^{-1}$ 。该位置特征峰的平移,多是因为菌株吸附的主要功能基团为次甲基($=\text{CH}$)。在 $1\,600\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了一个尖峰,吸附前该特征峰为 $1\,639.20\text{ cm}^{-1}$,吸附后下降到 $1\,628.01\text{ cm}^{-1}$,很可能是细胞壁上羧基($-\text{COOH}$)的作用。特别是在 $1\,000\text{ cm}^{-1}$ 附近,特征峰属于双峰形态,吸附前后分别为 $1\,036.16$ 、 $1\,027.90\text{ cm}^{-1}$,很可能是因为菌株吸附的主要物质为醇类和酚类。由上述可知,JF901707菌株细胞壁中吸附 Cs^{2+} 的主要官能团可能为 $=\text{NH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $=\text{CH}$ 、醇类和酚类物质^[15-16]。

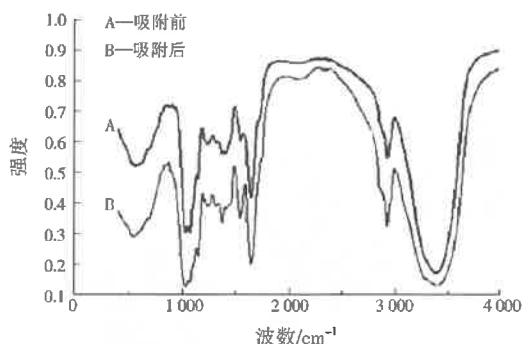


图7 菌株吸附 Cs^{2+} 前后FTIR分析
Fig.7 FTIR analysis of the strain before and after adsorbing Cs^{2+}

3 结论

(1) 通过SEM和16S rDNA序列分析,经鉴定菌株为蜡状芽孢杆菌,并命名为*Bacillus cereus* BAT-221(基因序列登录号:JF901707)。

(2) 该菌株吸附 Cs^{2+} 最佳条件为:pH=5,初始质量浓度 80 mg/L ,反应时间 30 min ,摇床转速 120 r/min 。在该条件下,菌株对 Cs^{2+} 吸附率可达 86.39% 。

(3) FTIR分析结果表明,菌株细胞壁上的 $=\text{NH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $=\text{CH}$ 、醇类和酚类物质对 Cs^{2+} 的吸附起主要贡献作用。

参考文献:

[1] 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.
[2] 卢靖,王颖松,蒋育澄.金属铯的生物化学研究进展[J].稀有金

属,2006,34(10):682-687.
[3] 廖上强,郭军康,王芳丽.美洲商陆和籽粒苋接种伯克氏菌的生理生化响应及其对富集铯的影响[J].环境科学学报,2011,32(1):213-223.
[4] 韩非,顾平,张光辉.去除放射性废水中铯的研究进展[J].工业水处理,2012,32(1):10-14.
[5] 龙建友,罗定贵,陈永亨.一株 Tl^{+} 抗性菌株的鉴定及吸附特性[J].应用与环境生物学报,2014,20(3):426-430.
[6] 王海雷,郑绵平,黄晓星.菌株*Thermus* sp.TibetanG7对铯的吸附:热泉铯硅华形成过程中生物成矿作用的征兆[J].科学通报,2007,52(9):2043-2048.
[7] 金羽,曲娟娟,李影,等.一株耐铅细菌的分离鉴定及其吸附特性研究[J].环境科学学报,2013,33(8):2248-2255.
[8] PU Yubing, YANG Xiaofang, ZHENG Hong, et al. Adsorption and desorption of thallium (I) on multiwalled carbon nanotubes[J]. Chem. Eng. J., 2013, 21(9):403-410.
[9] OVES M S, KHAN M, ZAIDI A. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2013, 20(2):121-129.
[10] BIRUNGI Z S, CHIRWA E M N. The adsorption potential and recovery of thallium using green micro-algae from eutrophic water sources[J]. J. Hazard. Mater., 2015, 299:67-77.
[11] VINCENT T, TAULEMESSE J, DAUVERGNE A, et al. Thallium (I) sorption using PRUSSIAN blue immobilized in alginate capsules[J]. Carbohydr. Polym., 2014, 99(2):517-526.
[12] NJIKAM E, SCHIEWER S. Optimization and kinetic modeling of cadmium desorption from citrus peels: a process for biosorbent regeneration[J]. J. Hazard. Mater., 2012, 213/214:242-248.
[13] ARECO M M, HANELA S, DURAN J, et al. Biosorption of $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$, and $\text{Pb}(\text{II})$ by dead biomasses of green alga *Ulva lactuca* and the development of a sustainable matrix for adsorption implementation[J]. J. Hazard. Mater., 2012, 213/214:123-132.
[14] LIU Wen, WANG Ting, BORTHWICK A G L, et al. Adsorption of Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} onto Titanate nanotubes: competition and effect of inorganic ions[J]. Sci. Total Environ., 2013, 456/457:171-180.
[15] HA J, GÉLABERT A, SPORMANN A M, et al. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study[J]. Geochim. Cosmochim. Acta, 2010, 74(1):1-15.
[16] PHUENGPRASOP T, SITTIWONG J, UNOB F. Removal of heavy metal ions by iron oxide coated sewage sludge[J]. J. Hazard. Mater., 2011, 186(1):502-507.

编辑:陈泽军 (收稿日期:2015-11-10)

