

## 沼泽红假单胞菌去除镉的研究\*

白红娟<sup>1,2</sup> 张肇铭<sup>1\*\*</sup> 俞妮<sup>2</sup> 杨官娥<sup>1</sup> 王玉芬<sup>3</sup>

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)(中北大学环境与安全工程系 太原 030051)

(东北大学环境与土木工程学院 沈阳 110004)

**摘要** 研究了沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) S菌株的生长、Cd<sup>2+</sup>的去除与供氧光照、碳源、pH及温度的关系。结果表明,在好氧黑暗、苹果酸为碳源、pH7.0和30℃条件下,S菌株对初始浓度为25mg/L的Cd<sup>2+</sup>去除率最大,达到85%。在最佳条件下,Cd<sup>2+</sup>初始浓度为10mg/L~25mg/L时,去除率达85%,Cd<sup>2+</sup>浓度增加到150mg/L时,去除率仅为23%。测定Cd<sup>2+</sup>在菌体不同部位的分布发现菌体中富集的Cd<sup>2+</sup>63.5%在细胞壁上,33.5%在细胞原生质体内。同时,结合该菌体细胞超薄切片透射电镜观察证明了S菌株对Cd<sup>2+</sup>的去除主要在细胞壁上。

**关键词** 沼泽红假单胞菌, 镉, 去除

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)04-0659-04

### Study on Removal of Cadmium by *Rhodopseudomonas palustris*\*

BAI Hong-Juan<sup>1,2</sup> ZHANG Zhao-Ming<sup>1\*\*</sup> YUN Ni<sup>2</sup> YANG Guan-E<sup>1</sup> WANG Yu-Fen<sup>3</sup>

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

(Chemical Industry and Ecology Institute, North University of China, Taiyuan 030051)

(School of Resource Environment & Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110004)

**Abstract** The influences of oxygen supply and illumination, carbon sources, pH and temperature on the growth of *Rhodopseudomonas palustris* S stain and removal for cadmium were studied. The results showed that the removal rate in presence of 25mg/L of cadmium was the highest, reaching 85%, under oxygen supply and dark, carbon source with malic acid, pH = 7.0 and temperature at 30℃. Under the optimal condition, the removal rate reached 85% in presence of 10mg/L~25mg/L of cadmium, while it was only 23% in presence of 150mg/L of cadmium. The distribution analysis of Cd<sup>2+</sup> in different fractions of cell showed that 63.5% of Cd<sup>2+</sup> was on cell wall and 33.5% of Cd<sup>2+</sup> was in protoplast. Simultaneity, transmission electron microscopy photos of cell ultra thin section revealed that the removal of cadmium ions was mainly completed on cell wall.

**Key words**: *Rhodopseudomonas palustris*, Cadmium, Removal

近年来,利用生物来修复Cd<sup>2+</sup>污染受到国内外科学工作者极大关注。许多微生物能抗Cd<sup>2+</sup>并富集Cd<sup>2+</sup>,尤其是微生物胞外基因和代谢产物对Cd<sup>2+</sup>具有极强的富集能力。王能飞等<sup>[1]</sup>从矿区分离获得一株酵母菌Y11,菌体在细胞壁上能富集90%以上的Cd<sup>2+</sup>。曹德菊等<sup>[2]</sup>利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、酵母菌(*Saccharomyces* sp.)对Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>进行生物修复试验,当环境中Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>为5mg/L时,去除率可达25%~60%。郭平等<sup>[3]</sup>分离得到富集Pb<sup>2+</sup>和Cd<sup>2+</sup>的优势细菌,其最大吸附量分别为4.3231μg/g和

1.0816μg/g。潘园园等<sup>[4]</sup>分离到一株抗铜和镉的产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),该菌株可以单抗4.5 mmol/L的铜和2 mmol/L的镉。White等<sup>[5]</sup>利用厌氧菌硫酸盐还原菌产生的S<sup>2-</sup>与Cd<sup>2+</sup>形成硫化镉沉淀而去除水中的镉。Bang等<sup>[6]</sup>研究了好的细菌*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella typhimurium*和*Treponema denticola*生长细胞对镉的吸收转化,其去除率达90%以上,并将乙酰基转移酶和半胱氨酸脱巯基酶基因构建在大肠杆菌中,成为基因工程菌,大大提高了重金属镉的去除效率。因此,利用微生物活性细胞吸收金属离子的特性,将其构建成基因

\* 国家科技攻关计划项目(No. 2001BA540C)

\*\* 通讯作者 Tel: 0351-7011409, E-mail: zhangzhm@sxu.edu.cn

收稿日期: 2006-10-26, 修回日期: 2007-01-15

工程菌,较死细胞的生物吸附具有较大的优越性。

光合细菌(Photosynthetic Bacteria,简称PSB)是具有原始光能合成体系的原核生物。特别是紫色非硫细菌不仅能在厌氧光照条件下进行光能异养生长,而且能在好氧黑暗条件下进行好气异养生长。沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)属于光合细菌紫色非硫菌群的红假单胞菌属,对重金属具有极强的耐受能力<sup>[7]</sup>,与其它微生物材料相比具有优越性。目前利用沼泽红假单胞菌生活细胞去除镉的研究国内外尚未见报道。为此,本文研究了光合细菌沼泽红假单胞菌S菌株对镉的去除条件,探讨了S菌株对不同浓度Cd<sup>2+</sup>的去除,测定了Cd<sup>2+</sup>在细胞不同部位的分布,为含Cd<sup>2+</sup>废水的微生物处理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

主要仪器:AA-6300原子吸收分光光度计(日本岛津公司),LXJ-III型低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂)。

试剂:浓硝酸、高氯酸均为优级纯,其余所用试剂均为分析纯。Cd<sup>2+</sup>标准储备液(国家环保局标准物质中心购买)。溶菌酶(Sigma公司)。

菌种:光合细菌S菌株系紫色非硫菌群红假单胞菌属的沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*),由山西大学光合细菌研究室分离鉴定保藏<sup>[8]</sup>。

培养基:基础培养基采用光合细菌液体培养基<sup>[8]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 Cd<sup>2+</sup>的浓度与菌体生物量的测定:在含Cd<sup>2+</sup>初始浓度为25mg/L的培养基接种5%菌种液(OD值为0.125)在不同供氧光照、碳源、pH值、温度条件下,培养48h后,取样、离心(10000r/min,20min),取10mL上清液在电热板上蒸干,用浓HNO<sub>3</sub>、HClO<sub>4</sub>消解,然后用0.2%硝酸定容。用AA-6300原子吸收分光光度计测定Cd<sup>2+</sup>的浓度,以确定去除率<sup>[9]</sup>。 $\eta = (C_0 - C) / C_0 \times 100\%$  (1)其中 $\eta$ —去除率, $C_0$ —初始浓度, $C$ —剩余浓度。离心后的细胞沉淀用等量蒸馏水制备菌体悬浮液,于波长680nm处测定OD值,以确定其生物量。

1.2.2 S菌株对不同浓度Cd<sup>2+</sup>的去除:配制含有不同浓度(10mg/L,25mg/L,50mg/L,100mg/L,150mg/L)Cd<sup>2+</sup>的培养液,在最佳条件下,分别培养6h,12h,18h,24h,30h,36h,42h,48h,54h后。离心(10000r/min,30min),测定上清液中剩余Cd<sup>2+</sup>的浓度<sup>[9]</sup>。

1.2.3 Cd<sup>2+</sup>在菌体细胞不同部位的分布:参照Kumar的方法<sup>[10]</sup>,稍加修改,取在Cd<sup>2+</sup>浓度为25mg/L的液体培养基中生长36h的菌体细胞,离心(10000r/min,15min),收集菌体细胞,测上清液Cd<sup>2+</sup>含量。再将菌体均分成两部分,其中一份用含2.5mmol/L EDTA(pH 8.1)的50mmol/L Tris缓冲液冲洗两次,重悬。然后加入200 $\mu$ g/mL溶菌酶在25℃温育30min,离心15min(15000r/min,4℃),收集悬浮液即为含肽聚糖的细胞壁成分,离心的沉淀物为原生质体。Cd<sup>2+</sup>浓度的测定采用原子吸收分光光度法<sup>[9]</sup>。

1.2.4 菌体细胞上镉沉淀物分析:分别取在Cd<sup>2+</sup>浓度为25mg/L的液体培养基中生长36h的菌体细胞和空白对照样品,通过透射电镜(JEM-2010型,日立公司)观察菌体细胞超薄切片,确定是否有镉沉积及其位置。

## 2 结果与讨论

### 2.1 供氧光照和碳源对S菌株生长及镉去除影响

苹果酸为碳源、30℃、pH7.0时,S菌株在好氧黑暗、好氧光照、微好氧光照、厌氧光照4种不同供氧光照条件下去除Cd<sup>2+</sup>。30℃、pH7.0、好氧黑暗时,S菌株分别以甲醇、乙酸钠、苹果酸、废糖蜜、葡萄糖作碳源去除Cd<sup>2+</sup>。供氧光照、碳源对S菌株生长及镉去除的影响见图1、2。沼泽红假单胞菌是一种兼性厌氧细菌,由图1可知,S菌株在好氧黑暗条件下生长最好,对镉的去除率最大,为85.3%。在培养基成分中,碳源是构成细胞和代谢产物的主要元

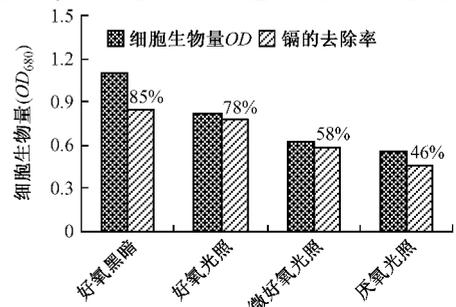


图1 供氧光照对S菌株生长及镉去除的影响

素,又是提供微生物生命活动所需能源,它是关系到细胞能否生长及菌体生长量的关键因素,由图2可知,分别用甲醇、乙酸钠、苹果酸为碳源,菌株均能较好地生长,镉的去除率较高;用废糖蜜、葡萄糖为碳源,菌株生长较差,去除率较低;实验结果表明,菌株在好氧黑暗条件下能很好的利用小分子有机物进行新陈代谢,并且对镉的去除率较高。

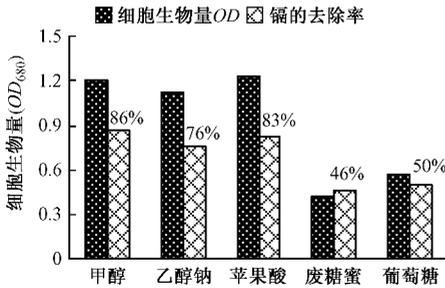


图2 碳源对S菌株生长及镉去除的影响

### 2.2 pH值和温度对S菌株生长及镉去除的影响

苹果酸为碳源、好氧黑暗、30℃时,S菌株在pH值分别为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0条件下去除Cd<sup>2+</sup>;苹果酸为碳源、好氧黑暗、pH值为7.0时,S菌株在温度分别为20、25、30、35、40℃条件下去除Cd<sup>2+</sup>。pH值、温度对S菌株生长及镉去除的影响见图3、4。由图3可见,pH为5.0和9.0时,菌体生长较差,pH为6.0和8.0时,菌体生长较好;pH为7.0时,菌体生长最好,表明菌体在中性略偏碱条件下比酸性条件下生长好。溶液pH直接影响Cd<sup>2+</sup>的去除,pH低时,如pH为5.0,溶液中的H<sup>+</sup>与Cd<sup>2+</sup>竞争细胞表面的活性位点,并使菌体细胞壁质子化,增加细胞表面的静电斥力,因而造成金属离子的去除率低,随着pH的增大,超过细菌表面的等电点,细胞表面负电荷量增加,同时细胞内的大多数酶活性增加,在pH6.0~8.0时,去除率较高,达70%以上。

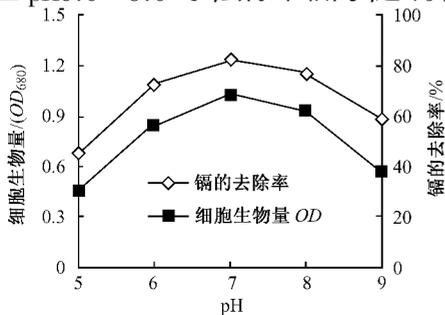


图3 pH值对S菌株生长及镉去除的影响

但当pH超过一定值时,细胞表面的金属离子易生成氢氧化物微沉淀沉积于细胞表面,影响细胞酶等载体的协助运输作用,造成金属离子去除率下降。由于微生物的膜运输具有催化过程的特性,通过环境温度的改变影响菌体生长,从而影响Cd<sup>2+</sup>在菌体细胞内的积累。由图4可知,菌体对温度的要求较宽泛,温度为25℃和35℃时,菌体均能生长,去除率大于60%;温度为20℃和40℃时,菌体几乎不能生长,去除率小于20%;温度为30℃,菌体生长最佳,去除率最高,为80.5%。

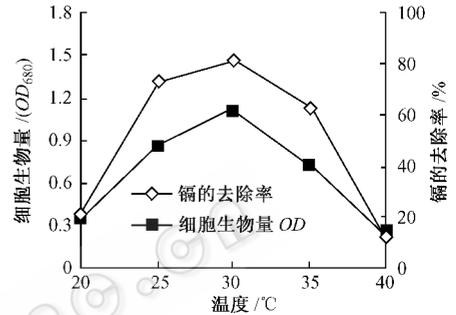


图4 温度对S菌株生长及镉去除的影响

### 2.3 S菌株对不同浓度Cd<sup>2+</sup>的去除

在最佳条件下,S菌株对不同浓度Cd<sup>2+</sup>的去除如图5所示。可以看出,菌株至少可以耐受150mg/L的Cd<sup>2+</sup>。Cd<sup>2+</sup>初始浓度为10mg/L~25mg/L时,去除率达85%以上;Cd<sup>2+</sup>浓度为50mg/L时,去除率70%;Cd<sup>2+</sup>浓度为100mg/L时,去除率为40%,Cd<sup>2+</sup>浓度增加到150mg/L时,去除率仅为23%。可见,Cd<sup>2+</sup>初始浓度增加的越大,其去除率下降的越明显。

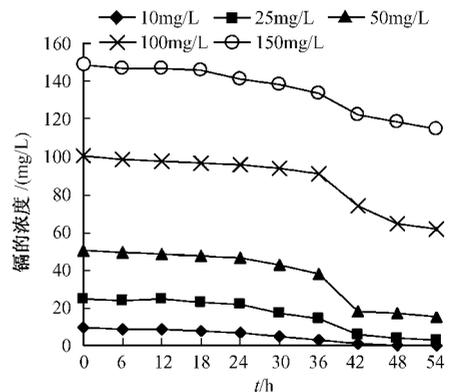


图5 S菌株对不同浓度Cd<sup>2+</sup>的去除

### 2.4 Cd在菌体细胞不同部位的分布

Cd在菌体细胞不同部位的分布见表1。从表中可知,菌体生活细胞从溶液中富集的Cd<sup>2+</sup>主要集中在细胞壁上,占66.5%,原生质体中占33.5%。

这可能是细胞在生长过程中,一部分  $\text{Cd}^{2+}$  通过  $\text{Mn}^{2+}$  或  $\text{Zn}^{2+}$  的运输路径进入细胞<sup>[11]</sup>。结果表明,S菌株对  $\text{Cd}^{2+}$  的去除主要在细胞壁上。

表1 Cd在菌体细胞不同部位的分布

菌体	上清液中 Cd的含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	细胞壁上 Cd的含量 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	原生质体 中Cd的 含量/ ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	细胞壁上 Cd的 百分比	原生质体 中Cd的 百分比
25mg/L的 $\text{Cd}^{2+}$ 培养	10.41	9715.7	4894.4	66.5%	33.5%

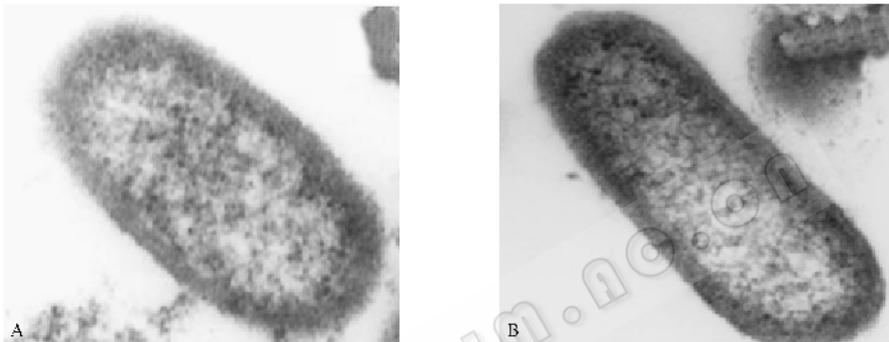


图6 S菌体细胞超薄切片透射电镜照片(60000×)

胞内外沉积作用可能是该菌对高浓度镉的抗性和集富作用的重要途径,而且因为该菌生长过程中,尤其是高镉浓度下pH值大幅度上升,沉积过程可能与该菌在生长过程中产生碱性物质有关。目前,S菌株对镉的抗性和去除机理有待进一步研究。

### 3 结论

(1)不同供氧光照、碳源、pH值和温度对S菌株生长及镉去除的影响结果表明,沼泽红假单胞菌S菌株生长和对镉去除的最佳条件为好氧黑暗,苹果酸为碳源,pH7.0和温度为30℃。

(2)S菌株至少可以耐受150mg/L的 $\text{Cd}^{2+}$ ; $\text{Cd}^{2+}$ 初始浓度为10mg/L~25mg/L时,去除率可达85%以上。

(3) $\text{Cd}^{2+}$ 在菌体细胞不同部位的分布结果和细胞超薄切片透射电镜照片显示,S菌株对 $\text{Cd}^{2+}$ 的去除主要在细胞壁上。

### 2.5 透射电子显微镜观察

将空白对照样品和含镉培养液中生长的菌体细胞制成超薄切片,在透射电镜下观察。比较发现,含镉培养液中生长的菌体细胞存在大量的高电子密集颗粒物(图6,B),空白对照中生长的菌体细胞未见这些颗粒物(图6,A),推测高电子密集层为镉沉积物。由此可知,镉离子与细胞发生结合。应娇妍等<sup>[15]</sup>报道了茎点霉菌在 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度为100mg/L的培养基中生长,在细胞壁及周围区域存在大量颗粒状镉沉积物,而在菌体表面也有沉淀物附着。细

### 参考文献

- [1] 王能飞,袁红莉,应娇妍,等.农业环境科学学报,2004,23(4): 674 ~ 677.
- [2] 曹德菊,程培.农业环境科学学报,2004,23(3):471 ~ 474.
- [3] 郭平,康春莉,李军,等.微生物学通报,2004,31(6):62 ~ 67.
- [4] 潘园园,陈雯莉,黄巧云.微生物学通报,2005,32(3):68 ~ 72.
- [5] White C, Gadd G M. Microbiology, 1998, 144: 1407 ~ 1415.
- [6] Bang W, Clark D S, Keasling J D. Biotechnology Letters, 2000, 22: 1331 ~ 1335.
- [7] 周茂洪,赵肖为,周峙苗.生态学杂志,2002,21(4):6 ~ 11.
- [8] 姚竹云,张肇铭.应用与环境生物学报,1996,2(1):84 ~ 89.
- [9] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会编.北京:中国环境科学出版社,2006. pp.323 ~ 326.
- [10] Kumar M, Upreti. K K. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000, 47: 246 ~ 252.
- [11] Hao Z Q, Heinz R R, David B W. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11):4741 ~ 4745.