

抗锶放线菌的分子鉴定及对 Sr^{2+} 的吸附效果和初步吸附机理分析

龙建友¹, 周舒蕙¹, 陈迪云², 夏建荣¹, 罗定贵^{1,2}, 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.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; 3.珠江三角洲水质安全与保护协同创新中心, 广东 广州 510006)

摘要: 从大亚湾核电站附近水体中分离筛选出一株抗锶放线菌(编号YF-64), 研究了该菌株在不同环境参数条件下对锶的吸附效果和初步机理, 通过形态和16S rDNA序列相结合的方法对菌株进行了分类鉴定, 采用红外光谱(FT-IR)分析技术对菌株吸附前后进行表征, 探讨其吸附机制。结果表明, 抗锶菌株隶属于天蓝黄链霉菌(基因序列登录号: JF901702), 菌株对 Sr^{2+} 具有较强的吸附效果, 根据数据显示, 当接触时间为50 min, pH值为6, Sr^{2+} 初始浓度为50 mg/L, 摇床转速为120 r/min时, 该菌株的吸附效果达到最佳为44.29 mg/g; FT-IR结果显示, JF901702菌株对 Sr^{2+} 的吸附主要是由细胞壁上的羟基, 次甲基, 羰基起主要吸附作用。由此可知, JF901702菌株可作为经济、高效、环境友好的生物吸附材料进行废水重金属处理。

关键词: 抗锶放线菌; 分子鉴定; 吸附效果; 吸附机理

中图分类号: X703

文献标志码: A

DOI:10.16803/j.cnki.issn.1004-6216.2017.02.013

Molecular Identification, Adsorption Effect and Preliminary Adsorption Mechanism of Strontium Resistant Actinomycetes

Long Jianyou¹, Zhou Shuyi¹, Chen Diyun², Xia Jianrong¹, Luo Dinggui^{1,2}, Chen Yongheng^{2,3}

(1.College of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2.Key Laboratory of Radionuclides Pollution Control and Resources of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China;

3.Coordination and Innovation Center of Waters Safety and Protection in the Pearl River Delta, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this paper, a strontium resistant actinomycetes (numbered YF-64) was isolated from water area near Daya Bay nuclear power station, and adsorption effects and preliminary mechanism of the strain on Sr at different environmental parameters were studied. The strain was identified on the basis of morphology combined 16S rDNA sequence analysis. Infrared spectral analysis technology was used to characterize the stain before and after the biosorption and the adsorption mechanism was discussed. The results indicated that the strain YF-64, identified as Streptomyces coelicoflavus (Gene sequence registration number: JF901702) had a comparatively strong biosorption ability against strontium. The experimental data revealed that under the optimum conditions that pH was 6.0, with contact time of 50 min, initial Sr^{2+} concentration of 50 mg/L and rotation rate at 120 r/min, the biosorption capacity reached to the best as 44.29 mg/g. The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis showed that the main functional groups responsible for biosorption of strontium were hydroxyl, methylene and carbonyl on the cell walls. Thus, it was concluded that JF901702 strain could be used as an economic, efficient, environment-friendly material for removal of heavy metals such as strontium from wastewater.

Keywords: Strontium Resistant Actinomycetes; Molecular Identification; Biosorption Effect; Biosorption Mechanism

CLC number: X703

收稿日期: 2016-10-29

基金项目: 国家自然科学基金(U1501231, 4137264, 41573119, 41273100, 41376156, 41372248); 广州市教育局项目(2012A033); 广东省自然科学基金项目(S2013010016540); 环保部公益科研专项(201509051)资助

作者简介: 龙建友(1977-), 男, 副教授。研究方向: 环境污染生物处理。E-mail: longjiyou@gzhu.edu.cn

随着核能和核科学技术的飞速发展,放射性废料也逐渐增加,放射性废料的处置费用已成为各国重要的财政负担,放射性废物处置的研究越来越受到有关国家的重视^[1-4]。锶作为放射性元素的一种,近年来,被广泛用于电力、医学方面,锶同其它放射性核素一样在环境中的释放使我们生存的环境受到核污染,而这些放射性核素由于无法被生物降解,会在生物体内累积,最后通过食物链的富集作用,将危害到食物链顶层人类的身体健康,因此放射性污染修复问题已成为全球最关注的问题之一,也是当前资源和环境领域的研究热点^[5-8]。传统处理放射性核素的方法如离子交换、还原沉淀、凝结、电渗析、膜过滤等,但这些方法在处理时存在能耗高、成本高、去除效率低、对核素离子的选择性低、会产生大量的二次有毒泥浆等缺点^[9-11]。微生物近年来已经被证明对重金属具有成本低,离子选择性高,吸附率高,耗能少,金属离子可以回收,且没有二次污染等优点,因此利用微生物处理放射性废物正日益引起人们的关注,是对现有放射性废水处理方法和核素固化方法的补充及探索,有极大应用前景^[12-13]。

文章以锶为研究对象,不同的环境条件下研究微生物菌株对 Sr^{2+} 的吸附特性,利用电镜、红外光谱分析等方法研究菌株吸附放射性核素锶的初步机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 JF901702菌株由广州大学环境科学与工程学院环境生物学实验室保藏提供。

1.1.2 实验试剂 无水乙醇、稀HCl、硝酸、NaOH溶液、Sr标准溶液1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2 方法

1.2.1 吸附剂的制备 用8层纱布过滤收集培养好的JF901702菌株,把收集的菌丝体用去离子水洗涤3次,自然晾干,置于60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至恒重,冷却后将菌体研磨成细粉,筛分,备用。

1.2.2 菌株16S rDNA基因序列分析 16S rDNA基因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')。扩增程序是: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s, 进行32个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min。基因扩增产物纯化后经上海生工测序,将所得序列与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^[14]。

1.2.3 吸附试验方法 取40 mL不同质量浓度的Sr标准溶液置于100 mL的锥形瓶中,用0.1 mol/L HNO_3 或NaOH将Sr标准溶液的pH (2~9)调至一系列列值, Sr^{2+} 初始浓度 (10~100 mg/L),接触时间 (1~120 min),温度 (20~40 $^{\circ}\text{C}$),摇床转速 (30~180 r/min),每组试验加入一定量的菌株粉末,然后置于摇床中,在不同温度,不同的吸附时间后,测定菌株对 Sr^{2+} 的吸附效果^[15]。

1.2.4 红外光谱 (FT-IR) 分析FT-IR 表征 取适量干燥的菌株粉末与KBr一起研磨、压片,然后在TENSOR 27型傅立叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司)上在400~4000 cm^{-1} 范围内扫描^[16]。

1.2.5 扫描电镜分析 将充分干燥的菌株粉末制备电镜样品,置于FEI Quanta400 FEG型环境扫描电子显微镜(捷克FEI公司)下室温扫描,观察样品形貌^[17]。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株菌落的颜色为黑褐色,细胞呈杆状,在培养基中不形成荚膜,不运动,无鞭毛,孢子椭圆形或球形,表面光滑,不产生可溶性色素,见图1。

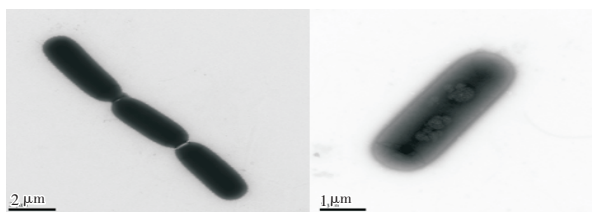
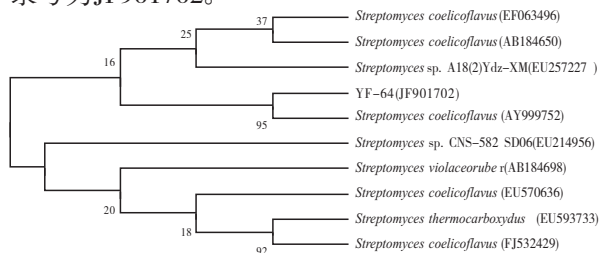


图1 YF-64菌株扫描电镜特征

对菌株的16S rDNA序列进行PCR扩增,得到

一条1441 bp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，该菌株与天蓝黄链霉菌 *Streptomyces coelicoflavus* 隶属同一分支，因而将其命名为 *Streptomyces coelicoflavus* YF-64，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JF901702。



注：*Streptomyces coelicoflavus*为天蓝黄链霉菌，*Streptomyces violaceoruber*为紫红链霉菌，*Streptomyces thermocarboxydus*为链霉菌属菌株。

图2 YF-64菌株与相关种16S rDNA序列的系统发育树

2.2 pH对 Sr^{2+} 吸附的影响

pH值是影响菌株吸附 Sr^{2+} 的重要因素之一，见图3。

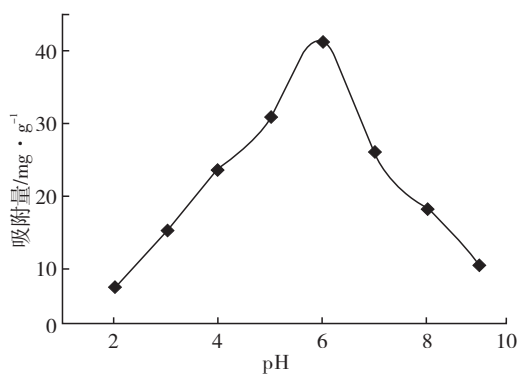


图3 pH对 Sr^{2+} 吸附的影响

由图3可见，在pH较低时，吸附剂表面会被很多 H^+ 离子包围，从而增强了吸附剂和 Sr^{2+} 表面的吸引力，其次也有可能当液相pH较低时，吸附剂的表面细胞被质子化，增强了吸附剂和 Sr^{2+} 表面的吸引力。在研究中，当pH为6时，吸附量达到最大，为41.27 mg/g，此时将pH升高至7或更高时，溶液中出现少量沉淀，随着pH不断增加，吸附剂整个表面逐渐呈现负电性，吸附率降低。由此可以推断，在碱性环境中， Sr^{2+} 和 OH^- 发生反应生成沉淀，影响了菌株对 Sr^{2+} 的吸附。

2.3 Sr^{2+} 初始浓度对吸附的影响

在不同 Sr^{2+} 初始浓度下，菌株的吸附效果是有差异的，见图4。

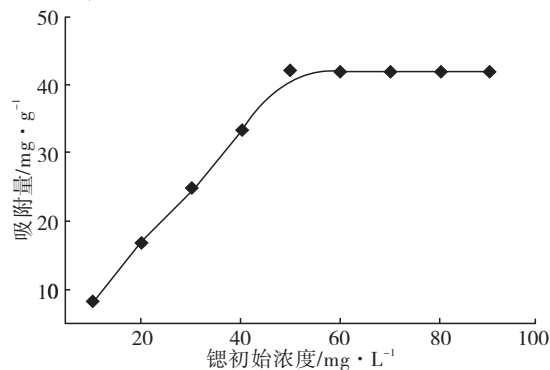


图4 Sr^{2+} 初始浓度对吸附的影响

由图4可见，初始浓度小于30 mg/L，吸附量随着 Sr^{2+} 初始浓度的增大而增大，这是因为菌株表面活性位点的总数多于金属离子占据的活性位点的数量，被占据的位点越多，吸附效果越好。浓度在50 mg/L左右时，吸附效果达到最好为42.08 mg/g，而随着吸附的进行，吸附活性位点不断被占据，故对于一定量的吸附剂来说，尽管随着重金属离子浓度的增加，在达到饱和状态前总吸附量会有所增加，但其吸附量会下降。所以，菌株吸附 Sr^{2+} 的最佳初始浓度为50 mg/L。

2.4 接触时间对 Sr^{2+} 吸附的影响

菌株对 Sr^{2+} 的吸附量随着接触时间的延长呈递增的趋势，见图5。

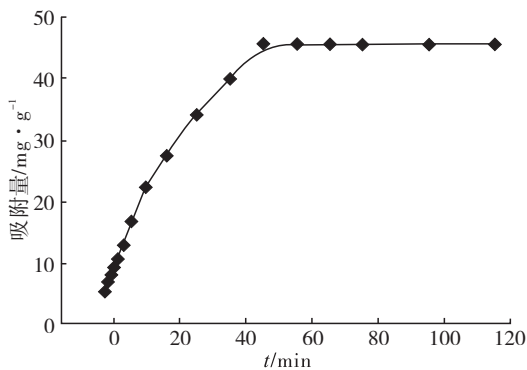


图5 接触时间对 Sr^{2+} 吸附的影响

由图5可见，在时间为50 min左右时，吸附效果为44.29 mg/g，之后随着接触时间的增加，菌株对 Sr^{2+} 的吸附效果没有明显变化，吸附率基本保持稳定。有可能是吸附达到一定程度后，吸附和解吸附的达到动态平衡，菌株不再对 Sr^{2+} 进

行吸附。有学者认为,微生物对重金属离子的吸附可以分成二个阶段:第一阶段是快速吸附阶段,通常在几十分钟内便可达到最终吸附量的70%左右;第二个阶段是慢速吸附阶段,在这一阶段常常需要几个小时才能达到最终吸附量。所以综合考虑经济效益考虑, Sr^{2+} 的最佳吸附时间为50 min。

2.5 温度对 Sr^{2+} 吸附的影响

在不同温度条件下,细菌对 Sr^{2+} 吸附量有所不同,见图6。

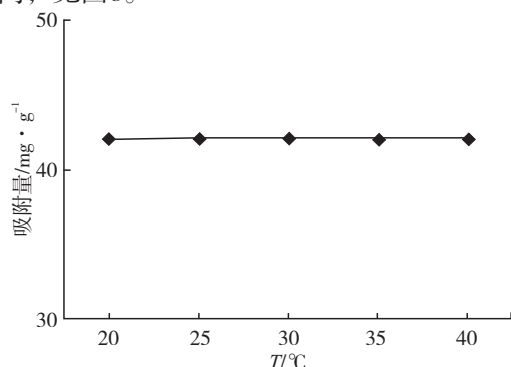


图6 温度对 Sr^{2+} 吸附的影响

由图6可知,温度在20 $^{\circ}\text{C}$ 时,吸附量是42.03 mg/g ,上升到30 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值42.68 mg/g ,随着温度的上升,吸附量又下降。但是随着温度变化吸附量的变化不是特别明显,所以,温度对吸附效果的影响不大。

2.6 摇床转速对 Sr^{2+} 吸附的影响

在不同摇床转速下,菌株对 Sr^{2+} 的吸附效果是不同的,见图7。

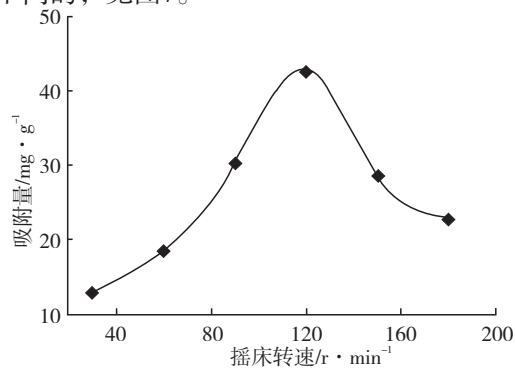


图7 摇床转速对 Sr^{2+} 吸附的影响

由图7可知,转速从30 r/min 增加到120 r/min 的过程中, Sr^{2+} 的吸附量随转速的加快逐渐增大;当摇床转速为120 r/min 时, Sr^{2+} 的吸附量达到最大,为42.68 mg/g 。之后随着转速的上升,

Sr^{2+} 吸附量下降。转速从30 r/min 增加到120 r/min 的过程中, Sr^{2+} 吸附量随转速的加快逐渐增大,这可能是因为振荡器速度增加,菌株运转速度加快,提高了菌株与 Sr^{2+} 的接触概率,使菌株分散性提高进而增大了比表面积。但当摇床转速大于120 r/min 时,虽然运转速度加快了,但大部分菌株旋转聚拢在烧杯中央,与烧杯内侧溶液接触机会减少,减少了菌株对 Sr^{2+} 的吸附,导致吸附量降低。也有可能是由于溶液中的菌体细胞壁在外界巨大离心力的作用下,细胞发生损伤或破坏,从而导致 Sr^{2+} 不能与菌体结合。另外,当吸附达到一定程度后,会有吸附和解吸附的动态平衡,过高的转速反而会加快解吸附速度,平衡偏向解吸,造成整个体系的吸附速率下降。所以在菌株对 Sr^{2+} 的吸附效果实验中,摇床转速设定为120 r/min 最合理。

2.7 菌株红外图谱分析

通过红外图谱分析发现菌株吸附 Sr^{2+} 前后图谱发生明显的变化,见图8。

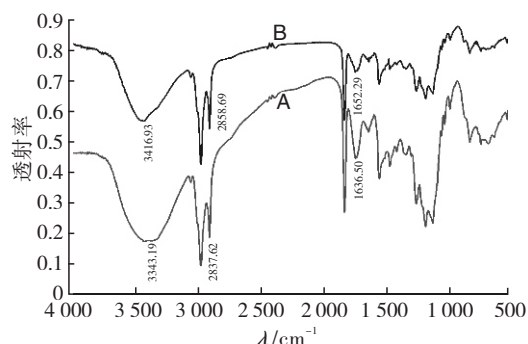


图8 YF-64菌株吸附 Sr^{2+} 前(A)后(B)红外光谱分析

由图8可见,红外光谱在3 500 cm^{-1} 附近,吸附前特征峰是3 343.19,吸附后特征峰变成3 416.93,这可能是由于细胞壁上的羟基($-\text{OH}$)吸附了 Sr^{2+} 所致。在2 900 cm^{-1} 附近吸附前特征峰是2 837.62,吸附后特征峰变成2 858.69,这可能是由于细胞壁细胞壁上甲基($-\text{CH}_3$)对吸附所做的贡献。在1 750 cm^{-1} 附近,吸附前后特征峰发生了明显的变化峰值由1 636.50变为1 652.29,这可能是细胞壁上的羰基($-\text{C}=\text{O}$)吸附 Sr^{2+} 的结果。综上所述,该菌株对 Sr^{2+} 吸附所做贡献的官能团主要是羟基、次甲基、羰基。

3 讨论

(1) 微生物表面存在大量的活性分子和活性基团, 微生物生物吸附提供了丰富的作用位点和作用方式。与常规的离子交换介质的单一作用基团相比较, 微生物表面的作用基团丰富, 可为不同的金属离子提供不同类型的作用基团, 同时在相同质量情况下, 微生物表面的活性基团的作用容量更大, 近年来的文献报道已被证明微生物对重金属离子具有很强的吸附性能, 这为微生物的高效吸附效率奠定了基础, 而在生物吸附的报道中, 大多是关于微生物吸附普通重金属, 关于微生物吸附放射性核素重金属的文献较少, 这也是该研究的一个亮点。

(2) 该研究只是在实验室条件下 Sr^{2+} 溶液进行去除和机理研究, 同时探索了处理条件对处理效果的影响。实际环境中的重金属和有机污染物复合污染废水组分复杂, 必然影响到微生物的处理效率, 这些是必须要考虑和面对的问题。下一步研究借助分子生物技术和基因工程技术, 找出菌株抗性基因, 构建基因工程菌; 对含低浓度的重金属实际废水开展应用研究, 并确定相关工程应用参数。

4 结论

(1) 对分离得到的抗锶放线菌YF-64菌株, 进行显微观察和16S rDNA序列分析, 鉴定为天蓝黄链霉菌*Streptomyces coelicoflavus*。

(2) 在不同的环境变量下, 研究了菌株对 Sr^{2+} 的吸附条件, 当接触时间为50 min, pH值为6, Sr^{2+} 初始浓度为50 mg/L以及摇床转速为120 r/min时, 菌株的吸附量达到最大值, 为44.29 mg/g;

(3) FT-IR分析结果表明, 通过对比吸附

前后的光谱的峰值变化, 得出JF901702菌株对 Sr^{2+} 的吸附有贡献的官能团主要有羟基, 次甲基, 羰基。

参考文献

- [1]王建龙, 陈 灿. 微生物还原放射性核素研究进展[J]. 核技术, 2006, 29(4): 286-290.
- [2]Helton J C, Sallaberry C J. Conceptual basis for the definition and calculation of expected dose in performance assessments for the proposed high-level radioactive waste repository at Yucca Mountain, Nevada[J]. Reliab Eng Syst Saf, 2009, 94(3): 677-698.
- [3]金 羽, 曲娟娟, 李 影. 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.
- [4]廖 佳, 冯冲凌, 李科林. 等耐性真菌 HA 吸附铅、锌的影响因素及吸附机理研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 254-263.
- [5]龙建友, 罗定贵, 陈永亨. 一株T⁺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]Abdel-Aty A M, Ammar N S, Abdel Ghafar H H. Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass[J]. Journal of Advanced Research, 2013, 4(4): 367-374.
- [7]杨 亮, 郝瑞霞, 吴 洋, 等. 耐受铅真菌的筛选及其对铅离子吸附的初步研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(10): 2366-2374.
- [8]林 海, 许晓芳, 董颖博, 等. 克雷伯氏杆菌用于 BAF 吸附矿山酸性废水中 Cu^{2+} [J]. 中南大学学报, 2014, 45(9): 3322-3328.
- [9]白洁琼, 尹 华, 叶锦韶. 嗜麦芽窄食单胞菌对铜镉的吸附特性与离子交换[J]. 环境科学, 2013, 34(1): 217-225.
- [10]Bulgariu D, Bulgariu L. Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass[J]. Bioresource Technology, 2012, 103(1): 489-493.
- [11]曹玉娟, 张扬, 夏 军, 等. β -聚赖氨酸生产废菌体对六价铬吸附影响的研究[J]. 环境科学, 2012, 33(2): 499-504.
- [12]Ramrakhiani L, Majumder R, Khawala S. Removal of hexavalent chromium by heat inactivated fungal biomass of *Termitomyces clypeatus*: surface characterization and mechanism of biosorption[J]. Chemical Engineering Journal, 2011, 171(3): 1060-1068.
- [13]藏婷婷, 胡晓娟, 顾海东. 黑木耳菌糠对 Cu^{2+} 的生物吸附及其机理[J]. 环境科学学报, 2014, 34(6): 1421-1428.
- [14]Blázquez G, Martín-Lara M A, Dionisio-Ruiz E, et al. Copper biosorption by pine cone shell and thermal decomposition study of the exhausted biosorbent[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2012, 18(5): 1741-1750.
- [15]Robalds A, Klavins M, Dreijalte L. Sorption of thallium (I) ions by peat[J]. Water Sci Technol, 2013, 68(10): 2208-2213.
- [16]Pu Y, Yang X, Zheng H, et al. Adsorption and desorption of thallium (I) on multiwalled carbon nanotubes[J]. Chem Eng J, 2013, 219: 403-410.
- [17]Turner A, Furniss O. An evaluation of the toxicity and bioaccumulation of thallium in the coastal marine environment using the macroalgae, *Ulva lactuca*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(12): 2720-2724.