

文章编号:2095-0411(2018)01-0015-07

碳酸盐矿化菌固结重金属离子 Cu^{2+} 的研究

赵兴青, 成 艳, 孙秀云, 王莲莲

(常州大学 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164)

摘要:选取一株从南京栖霞山矿山周边土壤中筛选出来的耐 Cu 菌株 Cu_{11} , 对其进行了酶化实验和菌种鉴定, 并利用其生长代谢过程中产生的酶化作用来分解底物尿素, 产生 CO_3^{2-} , 与溶液中的 Cu^{2+} 结合产生沉淀, 利用 EDS、XRD、SEM 等分析手段对其进行了分析。结果表明: 菌株 Cu_{11} 是碳酸盐矿化菌, 并鉴定其为 *Cupriavidus necator*; 矿化产物主要为碳酸盐 CuCO_3 和 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ 。对影响 Cu^{2+} 固结率的不同因素的分析表明, 随着 pH 的升高, Cu^{2+} 固结率也随之上升, 当 pH 为 13 时, Cu^{2+} 固结率可达到 97%; 接种量对 Cu^{2+} 固结率的影响差异很小, 维持在 85%~90%; 当 Cu^{2+} 浓度较低(0.005 mol/L 和 0.01 mol/L)时, Cu^{2+} 固结率可达到 97.7%, 而当 Cu^{2+} 浓度较高(0.03~0.09 mol/L)时, Cu^{2+} 固结率稳定在 80%左右; 随着底物浓度的增加, Cu^{2+} 固结率先上升后下降, 在 25 g/L 时可达到最高值 96%。

关键词:碳酸盐矿化菌; 酶化作用; 微生物修复; 固结率

中图分类号: X 15

文献标志码: A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2018.01.003

Study on Heavy Metal Ion Cu^{2+} Mineralized by Carbonate Mineralization Bacteria

ZHAO Xingqing, CHENG Yan, SUN Xiuyun, WANG Lianlian

(School of Environmental & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: A Cu-tolerant strain, isolated from the soil of Mountain Qixia in Nanjing, was selected and used for enzyme digestion and identification. The was decomposited urea by enzymatic process during its growth and metabolism to produce CO_3^{2-} , and combined with Cu^{2+} in solution to turned to precipitation, which were analyzed using EDS, XRD, SEM and other analytical methods. The results showed that the strain Cu_{11} is a carbonate mineralization microbe and identified as *Cupriavidus necator*, the main products are CuCO_3 and $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$. The analysis of different influence on the rate of consolidation of Cu^{2+} showed that the Cu^{2+} consolidation rate increased with the increase of pH, and it reached 97% when pH was 13, the difference of inoculation amount of Cu^{2+} on Cu^{2+} consolidation rate was small, which was maintained at 85%—90%, the Cu^{2+} consolidation rate could reach 97.7% when

收稿日期: 2017-04-14。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41302025, 41541016)。

作者简介: 赵兴青(1974—), 女, 江苏高邮人, 博士, 副教授。E-mail: zhaoxq@cczu.edu.cn

the Cu^{2+} concentration being lower (0.005, 0.01mol/L), while the Cu^{2+} concentration was high (0.03—0.09mol/L), the Cu^{2+} concentration rate was only stable at about 80%, With the increase of substrate concentration, the Cu^{2+} consolidation rate increased first and then decreased, reaching a maximum of 96% at 25g/L.

Key words: carbonate mineralization microbe; enzymatic process; microbial remediation; consolidation rate

随着工农业和经济的迅速发展,重金属污染对生态、环境和人体健康造成的危害越来越大,也受到了人们越来越多的关注,特别是水体中的游离态重金属离子和土壤中的可交换态重金属^[1-3]。近年来,重金属污染的修复技术逐渐兴起,与传统的物理化学修复技术相比,微生物修复技术因其成本低、效率高、操作简单和对环境影响小等优势而被广泛研究^[4-5]。

目前国内外对微生物修复重金属的主要研究方向是利用微生物对重金属的吸附作用^[6-7]。另外,也有利用微生物使重金属产生沉淀,BARTON 等^[8]从含有 Cr(VI) 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 的土壤中分离出来的菌种 *Pseudomonas mesophilica* 和 *P.maltophilia*,能将硒酸盐、亚硒酸盐以及二价铅转化为不具毒性且结构稳定的胶态硒和胶态铅。CHEN 等^[9]从 Pb-Zn 尾矿中分离出 *Bacillus cereus* 12-2,可以诱导 Pb^{2+} 阶段性地生物矿化成棒状 $\text{Ca}_{2.5}\text{Pb}_{7.5}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ 纳米晶体。

前人研究成果^[10-12]证实,碳酸盐矿化菌能够在生长过程中产生特定酶,并通过酶化作用产生 CO_3^{2-} ,从而固结污染体系中的重金属离子。所以,选取了一株耐 Cu 的菌株 Cu_{11} ,经酶化实验证实为碳酸盐矿化菌,并鉴定为 *Cupriavidus necator*。利用菌株 Cu_{11} 在底物诱导下的酶化作用,矿化固结 Cu^{2+} ,探索了不同因素对 Cu^{2+} 固结率的影响,旨在寻找微生物矿化固结 Cu^{2+} 的最佳条件,为微生物矿化修复重金属污染提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 菌液培养

液体培养基的成分为牛肉膏 3g/L,蛋白胨 5g/L,NaCl 10g/L,并用 1mol/L NaOH 调节初始 pH 为 7.2 左右,然后将配制好的液体培养基分装 100mL 于 250mL 锥形瓶中,在 121℃,0.1MPa 下灭菌 25min,冷却到 50℃ 后加入底物尿素 2.5g,并接种菌液 5mL,于摇床中振荡培养(30℃,130r/min),24h 后取出待用。

本研究选用的菌种为课题组前期从南京栖霞山的矿山土壤中分离出来的一株耐 Cu 的菌株,编号为 Cu_{11} 。对活化的菌株 Cu_{11} 的 16S rDNA 进行扩增和测序。菌种测序工作由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 酶化实验

检测所选用菌株是否具有碳酸盐矿化菌所需的特定酶化特性。配制液体培养基,调 pH 为 7.2 左右,高温灭菌 25min 后加入底物尿素 2.5g 和菌液 5mL,最后加入酚红指示剂,在 37℃ 的震荡培养箱中震荡培养,24h 后取出观察培养基的颜色变化。

1.3 矿化实验

按上述试验方法,向液体培养基中缓慢加入 0.2mol/L 的 CuSO_4 溶液,分别改变体系的 pH、培养时

间、细菌接种量、离子浓度和尿素浓度。30℃ 下静置培养 24h 后取出,取样离心后获得沉淀物,60℃ 下烘干研碎制得矿化产物。

Cu^{2+} 的固结率 p 计算方法为

$$p = (c_0 - c) / c_0 \times 100\%$$

式中: p 为固结率,%,表示被矿化为固相的 Cu^{2+} 的质量分数; c_0 为矿化前的 Cu^{2+} 浓度, mol/L; c 为矿化后的 Cu^{2+} 浓度, mol/L。

1.4 样品分析

利用 JSM-6360 LA 型扫描电子显微镜 & 能谱仪 (SEM & EDS, 日本电子株式会社) 观察生成矿物沉淀的结构形态。制样过程:将离心 (8 000 r/min, 5 min) 收集到的沉淀物先用 2.5% 戊二醛固定液固定 1.5 h, 再用乙醇按 30%, 50%, 70%, 90%, 100% 的梯度分别脱水 15~20 min, 然后在 60℃ 下烘干 24 h, 喷金后即可上机^[13]。

利用 D-MAX 2500 型 X-射线衍射仪 (XRD, 日本理学株式会社) 对沉淀物成分进行测定。制样方法同上, 样品充分干燥后研磨至 48 μm, 即可上机测定^[14]。试验条件:额定功率为 18 kW, 扫描角度 (2θ) 为 $0.7^\circ \sim 138^\circ$, 误差 < 0.02 。所得结果用 MDI Jade 6.5 和 Origin 8.0 分析软件进行编辑处理。

利用原子吸收分光光度计 (novAA 300, analytikjena) 测试矿化前后的 Cu^{2+} 浓度。测试对象为取样离心后得到的上清液。

2 结果分析

2.1 菌种测定结果

2.1.1 酶化特征

碳酸盐矿化菌是指其能在生长繁殖过程中产生某一特定酶, 分解底物, 将周围环境中的金属离子以碳酸盐的形式沉积矿化出来的一类菌种。因此, 是否具有矿化所需要的酶化特性是此类菌种的关键^[15]。

配制该酶检测液体培养基, 灭菌后调 pH 至 6.8~6.9 时培养基呈橘黄色为宜, 培养基中含有底物尿素, 碳酸盐矿化菌能够在生长繁殖过程中产生特定酶来分解底物, 所产生的某一分解产物呈碱性, 致使培养基的 pH 上升, 从而培养基中加入的酚红指示剂使培养基呈桃红色, 为阳性, 如果培养基颜色不变则为阴性^[16]。

实验结果表明 (文中未显示相关结果), 菌株 Cu_{11} 接种入培养基中 37℃ 培养 24 h 后, 培养基颜色明显变为桃红色, 证明菌株 Cu_{11} 的酶化反应为阳性, 符合碳酸盐矿化菌的关键酶化特性要求。

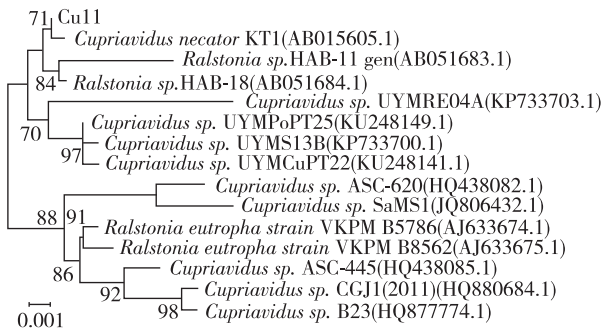
2.1.2 菌种鉴定结果

对获得的 Cu_{11} 株菌的 16S rDNA 进行了扩增和测序。菌株的序列长度为 1 436 bp, 将该菌株的序列输入生物技术信息库 (www.ncbi.nlm.gov/blast), 获得登录号为 LC137681, 将序列与 Genbank 中的核酸序列进行比对, 发现其与数据库中已经序列相似性可达到 99% 以上。将 Cu_{11} 的 16S rDNA 与已知相关序列比对后构建了系统发育树 (图 1), 菌株 Cu_{11} 与 *Cupriavidus necator* KT1 (AB015605.1) 的 16S rDNA 序列相似性可达 99%, 所以可以认为 Cu_{11} 是 *Cupriavidus necator* 属。

2.2 Cu^{2+} 矿化产物分析

生物矿化是最重要的矿物质和微生物的相互作用之一。采用扫描电子显微镜对所得矿化产物形貌

进行观测,由图 2 可知,微生物矿化后的产物过滤干燥后的矿物态沉淀以颗粒状球形团聚,矿化粒径大小混杂、表面凹凸不平。颗粒间紧密结合,团聚状态好。推测这可能是由于该碳酸盐矿化菌在不同时间内的生长速率不同,酶活性不同,诱导结晶速率不同^[17]。这与徐凤琴等^[18]对 Sr^{2+} 矿化的研究现象类似。游离态的离子在微生物作用下成为团聚态产物,初步实现从环境介质中去除其的可行性。



说明:标尺,0.001 表示进化距离。

图 1 Cu₁₁ 的系统发育树

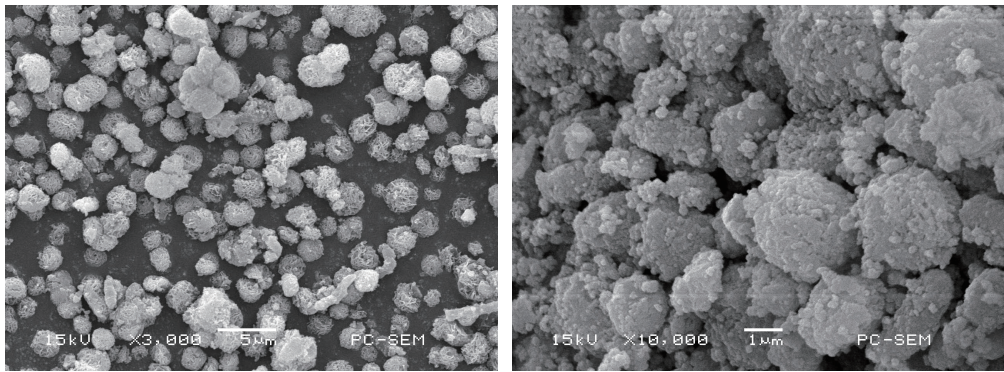


图 2 矿化产物的 SEM 图像

生物矿物可以是碳酸盐、磷酸盐、硅酸盐、硫酸盐、硫化物、氧化物或氢氧化物,并涉及到多样化的阳离子^[19-20]。由矿化产物的 X 射线能谱结果(图 3)可知,矿化产物主要含有 Cu,C,O 3 种元素。同时对矿化产物进行更准确的 XRD 分析,定性分析的实验图谱如图 4 所示。样品主要为 CuCO_3 和 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$, $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ 俗称孔雀石,由于 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ 是一种铜的矿物态,可以稳定存在于自然界中,所以相对于 CuCO_3 而言,生成 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ 能让矿化产物更加稳定^[21]。因而本实验模拟的微生物矿化体系中的 CuCO_3 不能稳定存在,而 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ 能保持稳定的矿化状态。

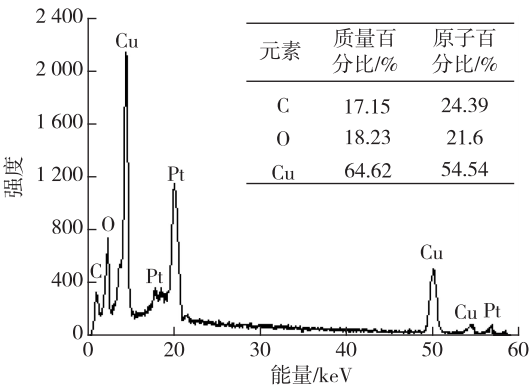


图 3 矿化产物的 X 射线能谱图

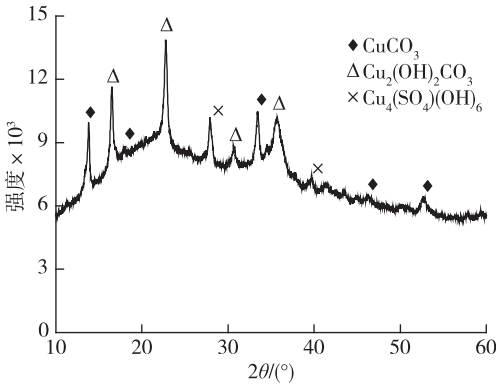


图 4 矿化产物的 XRD 谱图

2.3 Cu^{2+} 矿化影响因素分析

pH 会影响化合物和矿物的形成与分解,对重金属元素的迁移与富集有一定的影响^[22]。实验中,将体系的 pH 分别调整至 3,5,7,9,11,13,在实验中的第 2,6,18,24,30,42,48,72 h 取样并测试其上清液中的离子浓度变化,即 Cu^{2+} 固结率的变化趋势(以下几组实验的取样时间同上)。图 5 为不同 pH 下 Cu^{2+} 固结率的情况。由图 5 可知,pH 为 3~11 时的 Cu^{2+} 固结率差异不显著,且随时间的变化趋势几乎是一致的上升,由开始反应 2 h 的 65% 左右增加到 48 h 的 83% 左右并趋于稳定,而当 pH 为 13 时,固结率远远高于其它组,由开始反应 2 h 的 90% 上升到 48 h 的 97% 并趋于平衡。这可能是由于强碱性条件下产生的 CO_3^{2-} 较多,与重金属离子反应迅速,有利于矿化产物的形成^[23]。

实验中,将体系的细菌接种量值分别调整至 2,4,6,8,10,12 mL。细菌接种量对 Cu^{2+} 固结率的影响见图 6,不同细菌接种量差异不大显著,且随着时间的推移保持着相对稳定的固结率 85%~90%,这可能是由于所选菌株 Cu_{11} 的生长代谢速度比较快,接种量的多少对 Cu^{2+} 固结率的影响都不大。事实上,如果接种量过大,随菌液加入的代谢产物也增多,代谢产物对细菌的生长产生了抑制作用,不但不经济,而且不能提高细菌的繁殖速度。在许朝阳等^[24]对铁细菌 A 修复铅铜污染的研究中,采用了二次修复,即等第一次修复完成后再加入菌液进行二次修复,结果表明二次修复成效比一次修复更好,所以后期实验可以考虑用多次加菌液修复来代替一次性多加菌液修复污染。

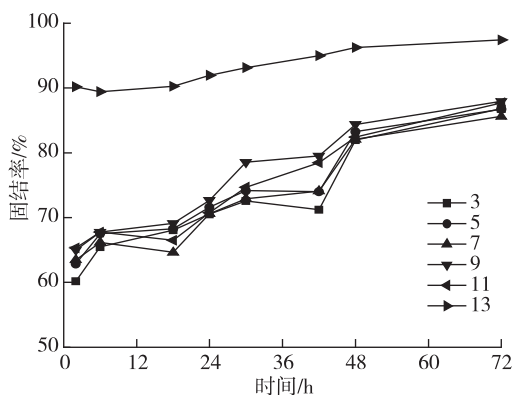


图 5 不同 pH 对 Cu^{2+} 固结率的影响

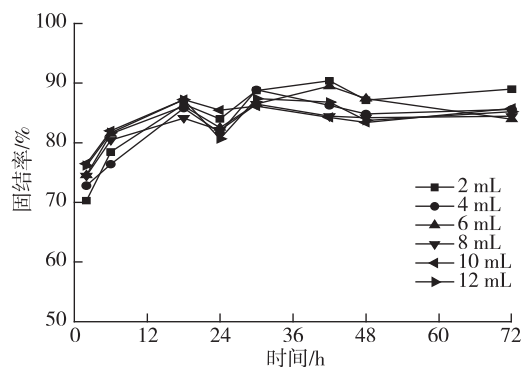


图 6 不同接种量对 Cu^{2+} 固结率的影响

不同离子浓度对体系的反应有不同的影响。实验中,将体系的离子浓度分别调整为 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09 mol/L。由图 7 可知,不同 Cu^{2+} 浓度对 Cu^{2+} 固结率的影响较大,大致分为两种趋势:当 Cu^{2+} 浓度较低(0.005 mol/L 和 0.01 mol/L)时, Cu^{2+} 固结率总体处于缓慢上升的趋势,最高可达到 97.7%,值得深入研究的是,48 h 左右出现的 Cu^{2+} 固结率下降可能是由于期间某种原因出现了离子解吸的现象;当 Cu^{2+} 浓度(0.03~0.09 mol/L)较高时, Cu^{2+} 固结率上下波动,但总体处于平衡期,固结率为 80% 左右。出现这一现象的原因可能是浓度较高的重金属溶液会对细菌有毒害作用,从而抑制了菌体的生长,不利于微生物矿化的进行。在竹文坤等^[25]对 Sr^{2+} 的矿化研究也得到了类似的结论。

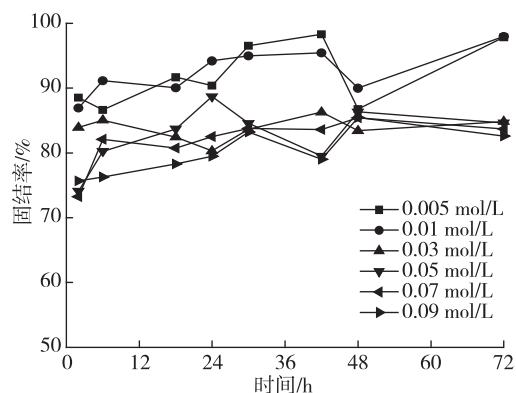


图 7 不同 Cu^{2+} 浓度对 Cu^{2+} 固结率的影响

不同底物尿素浓度对 Cu^{2+} 固结率的影响如图 8 所示。实验中,将底物质量浓度分别调整为 5, 10, 15, 20, 25, 30 g/L。由图 8 可见,随着底物尿素浓度的增加, Cu^{2+} 固结率处于先上升后趋于相对稳定的趋势。这是因为在实验前期,培养液中的微生物数量富足且酶活性较强,所以适当的添加底物会快速被分解得到更多的 CO_3^{2-} ,与 Cu^{2+} 结合产生更多的沉淀,固结率随之升高,但是当底物浓度过度增加时则会超过细菌的分解能力,固结率也不会持续升高,而且 Cu^{2+} 浓度也是有限的,所以此时固结率会相对稳定。值得注意的是,当底物尿素质量浓度为 25 g/L 时,24 h 前 Cu^{2+} 固结率相对平衡,但从 24 h 到 72 h, Cu^{2+} 固结率有一个很大跃升,远高于其他组, Cu^{2+} 固结率由 85% 升至 96%。在 LI L^[26] 等对微生物诱导 CdCO_3 矿化研究的分析中也提及到适当的尿素补充对 Cd^{2+} 处理有更好的效果。

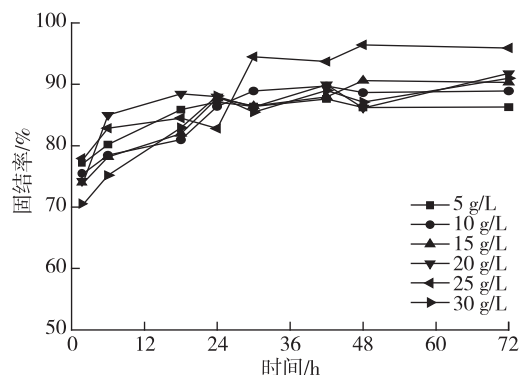
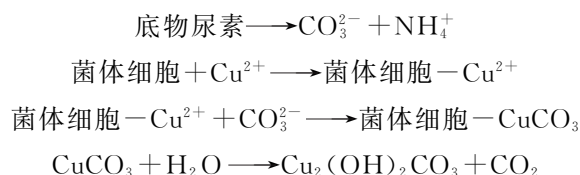


图 8 不同尿素浓度对 Cu^{2+} 固结率的影响

2.4 矿化机理分析

生物矿化作用是很普遍的一种自然现象,几乎每一种生物都能合成矿物。生物体在其细胞和特定组织位置,经过生物有机质的影响控制,从而可以将溶液中的离子固结为沉积矿物。

将菌种接种到液体培养基中,在细菌的生长代谢过程中会产生酶化作用,不断分解底物尿素,使得 CO_3^{2-} 浓度不断增加,此时再引入 Cu^{2+} ,菌体细胞膜界面处带负电荷的可溶有机质会立即整合 Cu^{2+} ,导致局部晶体阴离子 CO_3^{2-} 的浓度进一步上升,从而吸引更多的 Cu^{2+} 。晶体前驱物的浓度不断增大达到过饱和,进而沉积出碳酸盐 CuCO_3 ,但由于其自身的不稳定性,会部分地向 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ 转变,反应过程如下:



3 结 论

1) 16S rDNA 测序结果表明,该研究选取的菌株 Cu_{11} 鉴定为 *Cupriavidus necator* 属;酶化实验结果证实菌株 Cu_{11} 是碳酸盐矿化菌,可利用其生长繁殖过程中产生的酶化作用来诱导分解底物产生 CO_3^{2-} ,使游离态的重金属离子矿化固结为颗粒状球形团聚态的碳酸盐沉淀。

2) 采用尿素作为底物,在酶化作用下分解产生 CO_3^{2-} ,与重金属离子 Cu^{2+} 结合产生沉淀,其主要为结晶态的碳酸铜(CuCO_3),同时由于碳酸铜自身不稳定,会向碱式碳酸铜($\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$)转变。

3) 对影响 Cu^{2+} 固结率的不同因素进行分析的结果显示, Cu^{2+} 固结率随着 pH 的上升而升高,且当 pH 为 13 时,固结率远高于其他值,可达 97%;当 Cu^{2+} 浓度较低(0.005 mol/L 和 0.01 mol/L)时, Cu^{2+} 固结率缓慢上升,最高可达到 97.7%;而当 Cu^{2+} 浓度较高(0.03~0.09 mol/L)时, Cu^{2+} 固结率上下波动,相对稳定在 80% 左右。

4) 接种量对 Cu^{2+} 固结率的影响差异很小,维持在 85%~90%;随着底物浓度的增加, Cu^{2+} 固结率先升后降,在 25 g/L 时可达到最高值 96%。

参考文献:

- [1] TESSIER A, CAMPBELL P G C, BISSON M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals[J]. Analytical Chemistry, 1979, 51(7): 844-851.
- [2] 刘玉荣, 党志, 尚爱安. 污染土壤中重金属生物有效性的植物指示法研究[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(4): 215-217.
- [3] 潘新星, 高琪, 杨柳, 等. 常州市城乡道路两侧住宅灰尘重金属的健康风险[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2015, 27(4): 79-84.
- [4] MORGAN J A W, BENDING G D, WHITE P J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(417): 1729-1739.
- [5] 赵庆龄, 张乃弟, 路文如. 土壤重金属污染研究回顾与展望 II: 基于三大学科的研究热点与前沿分析[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(7): 102-106.
- [6] 王敏, 徐甜甜, 李强, 等. 重金属污染土壤的微生物修复机理与技术[J]. 唐山学院学报, 2011, 24(3): 43-45.
- [7] 滕应, 黄昌勇. 重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展[J]. 土壤与环境, 2002, 11(1): 85-89.
- [8] BARTAN L L, DAVID A S. Transport and remediation of subsurface contaminants[M]. Washington D C: American Chemical Society, 1992.
- [9] CHEN Z, PAN X H, CHEN H. Biomineralization of $\text{Pb}(\text{II})$ into Pb -hydroxyapatite induced by *Bacillus cereus* 12-2 isolated from lead-zinc mine tailings[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 301(15): 531-537.
- [10] LI M, CHENG X H, GUO H X. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 76: 81-85.
- [11] FUJITA Y, REDDEN G D, INGRAM J C, et al. Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2004, 68(15): 3261-3270.
- [12] 成亮, 钱春香, 王瑞兴, 等. 碳酸盐矿化菌株 A 固结土壤 Cd^{2+} 的生物矿化过程[J]. 硅酸盐学报, 2008, 36(S1): 215-221.
- [13] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 440.
- [14] 周胜波, 李庚飞, 侯新凯. 矿渣水泥浆体中结晶矿物的 XRD 分析[J]. 中国矿业, 2008, 17(12): 88-93.
- [15] GOVARTHANAN M, LEE K J, CHO M, et al. Significance of autochthonous *Bacillus sp* KK1 on biomineralization of lead in mine tailings[J]. Chemosphere, 2013, 90(8): 2267-2272.
- [16] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [17] ACHAL V, PAN X L, ZHANG D Y. Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp[J]. Chemosphere, 2012, 89(6): 764-768.
- [18] 徐凤琴, 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.
- [19] LOWENSTAM H A. Minerals formed by organisms[J]. Science, 1981, 211(4487): 1126-1131.
- [20] WEINER B S, DOVE P M. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect[J]. Review in Mineralogy & Geochemistry, 2003, 54(1): 1-29.
- [21] 钱春香, 许燕波, 胡黎明, 等. 一种微生物固结污染体系中 Cu^{2+} 的研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(12): 33-36.
- [22] 路永正, 阎百兴. 重金属在松花江沉积物中的竞争吸附行为及 pH 的影响[J]. 环境科学研究, 2010, 23(1): 20-25.
- [23] 王明明, 钱春香. 磷酸盐矿化菌矿化重金属离子 Zn^{2+} 的研究[J]. 功能材料, 2013, 44(3): 393-395.
- [24] 许朝阳, 柏庭春, 孟涛, 等. 铁细菌 A 生物修复铅铜污染土壤[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2015, 43(6): 569-573.
- [25] 竹文坤, 牟涛, 段涛, 等. 碳酸盐矿化菌对模拟放射性 Sr^{2+} 的成矿作用[J]. 环境科学研究, 2015, 28(1): 157-162.
- [26] LI L, QIAN C X, CHENG L, et al. A laboratory investigation of microbe-inducing CdCO_3 precipitate treatment in Cd^{2+} contaminated soil[J]. Journal of Soils & Sediments, 2010, 10(2): 248-254.

(责任编辑:李艳)