

摘 要

我国土壤重金属污染相当严重。目前全国受 Cd、Cr、Pb 等重金属污染的耕地面积近 2000 万 hm^2 ，约占全国耕地的 1/5。全国每年因重金属污染而减产粮食，直接经济损失超过 200 亿元。由土壤重金属污染引发的农产品安全和人体健康事件也时有发生，成为影响人类健康和社会稳定的重要因素。土壤重金属污染问题已经引起了全世界的关注。世界各国都非常重视污染土壤修复技术的研究，有关微生物修复技术的研究更是备受关注。利用微生物作为治理重金属污染的吸附剂，需要筛选和获得高吸附能力，并且兼具吸附选择性的菌株。对菌株吸附性能和机理的研究，为化学和遗传学方法改造生物吸附剂提供了理论依据，也为工程菌的构建提供了宝贵的原料。

本研究主要是从西昌矿区土壤中分离出对 Cd^{2+} 有高耐受和高富集作用的 8 株菌株，通过生理、生化实验，16S rDNA 分子生物学技术对其进行菌种的分类鉴定。对菌株吸附重金属 Cd^{2+} 吸附能力做定量测定，同时测定菌株对其他金属的耐受能力。最后对筛选所得的细菌进行质粒提取、酶切鉴定和质粒消除实验，目的对其耐受和吸附重金属的机理有所研究。

主要研究结果：

- ◆ 从四川西昌某矿区土壤中筛选得到 8 株能够在液体培养基中耐 Cd^{2+} 浓度在 400mg/L 以上，琼脂平板上耐 Cd^{2+} 浓度为 800~1500mg/L 的细菌。
- ◆ 对 8 株菌株进行生理、生化实验和 16S rDNA 鉴定，菌株确定均为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。
- ◆ 菌株在含有少量 Cd^{2+} 条件下长势好于不含 Cd^{2+} 的条件下生长。在 Cd^{2+} 浓度为 25mg/L 的培养基中培养，10h 开始进入稳定期，在而不含 Cd^{2+} 的培养基中培养，14h 开始进入稳定期。
- ◆ 8 株菌对 Cd^{2+} 吸附能力不同，CD5 对 Cd^{2+} 的吸附率最高，为 90.04%。吸附总量 2.70mg (30ml)。对照菌的吸附重量、吸附量和吸附率均为最低。
- ◆ 菌株除了对 Cd^{2+} 有耐受性外，对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 也有一定的耐受能力，但普遍不高。低于对 Cd^{2+} 的耐受性。
- ◆ 在 8 株菌株中均提取到质粒，仍需进行进一步的研究。

关键词： Cd^{2+} ，恶臭假单胞菌，生物吸附，16SrDNA，重金属

Abstract

Heavy metal pollution is a serious problem in China. At present, the area of cultivated land polluted by Cd, Cr, Pb and other heavy metal is nearly 20 million hm^2 , about 1 / 5 arable land. Decreased harvest of crops by heavy metal pollution happens each year, the direct economic loss is more than 20 billion yuan. Agricultural safety and health events caused by the heavy metal pollution often occur, it has become the most important factor of human health and the social stability. Heavy metal pollution has been the worldwide concern. Every country attach great importance to study contaminated soil remediation and microbial remediation has been taken more notice. There is great need to screen and find microbial strains with high adsorption capacity and selective adsorption for microbial adsorbent development for controlling heavy metal pollution. The study on ability and mechanism of adsorption provides important theory evidence for the chemical and genetic manipulations of biological adsorbent, as well materials for the construction of engineered microbes.

8 high tolerance and high accumulation bacterial strains was screened and isolated from the soils of mines in Xichang, Sichuan province, In addition to using physiological and biochemical methods, 16S rDNA molecular biology techniques had been used to identify the classification and strains of bacteria. Quantitative analysis of adsorption of the strains for heavy metals Cd^{2+} had been done, as well the determination of the tolerance to other heavy metals. Finally, plasmid preparation, restriction enzyme digestion and plasmid elimination experiments was used to study the tolerance and adsorption mechanism of heavy metals by these Cd^{2+} resistant strains.

Main results:

1. The 8 screened strains was able to grow at Cd^{2+} concentration of above 400mg / L in liquid nutrient medium and 800 ~ 1200mg / L on agar plate.

2. The 8 strains had all been identified to be *Pseudomonas putida*.

3. The strains could grow well at low concentration of Cd^{2+} . Stationary phase starts on 10h on 25mg/L of Cd^{2+} and 14h on 0mg/L of Cd^{2+} .

4. The 8 strains had different adsorption abilities on Cd^{2+} . CD5 was the highest with adsorption rate of 90.04% and adsorbance of 2.70mg (30ml) ,the control strains was the

lowest.

5. The Strains was also tolerant for Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} , however lower than Cd^{2+} .

6. Plasmid could be extracted from all the 8 strains, the further study was needed .

Key words: Cd^{2+} ; *Pseudomonas putida*; biosorption; 16SrDNA; heavy metal

西南交通大学

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南交通大学可以将本论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1. 保密□，在 年解密后适用本授权书；
2. 不保密，使用本授权书。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者签名：

曹晓燕

指导老师签名：

白

日期：6-8/2010

日期：

6-8/2010

西南交通大学硕士学位论文主要工作（贡献）声明

本人在学位论文中所做的主要工作或贡献如下：

1.从西昌矿区土壤中筛选出 8 株对重金属 Cd^{2+} 有高耐受性的菌株。分别可在 Cd^{2+} 浓度为 800、1000、1500mg/L 的 LB 固体培养基上生长。

2.通过生理生化实验测定以及 16S rDNA 分子生物学技术对 8 株高耐 Cd^{2+} 的菌株进行菌种分类鉴定。结论得出 8 株菌株均为恶臭假单胞菌。

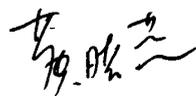
3.利用 AAS 原子吸收方法对高耐 Cd^{2+} 菌株的金属吸附能力进行定量测定，8 株菌株对 Cd^{2+} 的吸附性均较高。其中菌株 CD5 吸附率达到 90%。

4.在 8 株高耐 Cd^{2+} 的菌株中均提取到了质粒，为进一步的细菌耐受重金属的机理研究提供了重要基础。

本研究所筛选获得的重金属 Cd^{2+} 高耐受和高富集恶臭假单胞菌，可望作为环境重金属污染的细菌生物吸附剂，同时也可作为工程菌的改造提供宝贵的材料。

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师指导下独立进行研究工作所得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明。本人完全了解违反上述声明所引起的一切法律责任将由本人承担。

学位论文作者签名：



日期：

2010.6.8.

第 1 章 绪 论

1.1 课题的研究背景和目的

1.1.1 课题研究背景

金属 Cd 在自然界中与 Zn 大量共存在各种天然矿藏中, 其污染主要是由于矿业开采和磷酸盐的化肥开发与使用造成的。目前农业中采用的 Cd 磷酸盐施肥以及工业中 Cd 的开采和使用, 将 Cd 从自然环境中纯化出来, 并通过农业和工业的废水进入人类的生存环境中。重金属由于在土壤中移动性差, 而且很难被自然降解, 造成土壤质量下降, 水环境恶化。长期滞留在土壤中的后果就是被植物吸收, 通过食物链的积累损害人类健康^[1]。Cd 是公认的三大有毒金属之一, Cd 在自然界中以化合物形式存在, 其中有有毒的化合物种类繁多, 例如 CdS , $CdCl_2$, $Cd(OH)_2$, $(CH_3COO)_2Cd \cdot 3H_2O$, $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, C_2CdN_2 , $CdBr_2$, CdI_2 , $CdSe$ 等。而大多数的 Cd 化合物都溶于水, 这使得金属 Cd 可以非常容易混入人的吸收途径从而对人体造成危害^[2]。由于 Cd 并不是人体需要的元素, 而摄入定量或者过量的 Cd 金属对身体损害很大: 低剂量的 Cd 可以引起肾衰竭、骨矿密度降低、钙排泄增加及生殖等毒性, 高剂量的 Cd 可引起肾、肺、肝、骨、生殖效应及癌症等严重疾病^[3]。首次的临床 Cd 中毒报道见 1858 年一接触碳酸 Cd 粉末的工人出现急性的肠胃和呼吸症状^[4], Alsberg 和 Schwartze 通过对动物的药代动力学实验确定了多种 Cd 中毒的临床特征, 并报道了不同脊椎动物如鸟类和狗的 Cd 中毒后形态变化, Prodan 将猫暴露在 Cd 毒性气体中 24 小时后发现猫的肝、肺和肾中均出现严重的损伤。类似的症状在后面的研究中不被发现。1940 年报道食物和饮水中的 Cd 中毒, 导致中毒者出现急性的肠胃症状, Friberg 于 1948 年详细的报道了 Cd 重污染环境工人出现的中毒症状, 报告中详细的描述了尿蛋白和肺气肿症状特征, 其在后期的研究中将兔子暴露在 Cd 毒性化合物气体和金属粉尘中发现了动物体内出现严重的肺气肿和尿道炎, 通过每天注射放射性的 Cd 硫酸盐发现, 在 2 个月的时间中仅有微量的 Cd 被自然排泄出体外, 同时蛋白尿症状在此期间增长了 50 倍。日本典型的痛痛病就是由于 Cd 金属中毒引起的一种骨疼病, x 光扫描发现患者的长骨具有明显的骨软化特征而其他部位的骨头如脊柱等也有问题, 生物化学方法检测出骨软化会导致血清中碱性磷酸酶和 Cd 磷酸盐浓度增加。如此可见金属 Cd 对人体具有非常严重的危害, 必须对 Cd 污染进行治理。

重金属污染的危害越来越得到世界各国的重视, 目前治理主要可分为三类: 工程治理、物理化学治理和生物治理^[5]。工程处理本质是将重金属集中起来, 或将其从一个介质转移到另一介质, 稀释或者固化。通过客土、换土和深耕翻土与污土混合, 可以降

低土壤中重金属的浓度,减少重金属对动植物产生的毒害^[6]。工程处理重金属可以缓解污染并在短时间内降低重金属污染的危害,但是并没有减少在土壤中重金属的总量,属于治标不治本,即使经过治理但仍然具有潜在的危害,而且工程处理工程量非常大、处理费用也很昂贵^[7]。另外处理后的土壤土质和肥力容易下降,并且很容易受 pH 值等环境因素的影响导致残留的重金属活性增大。所以并不是一种经济,高效,永久性的处理方法^[8]。

美国是最早进行化学物理治理重金属污染并成功产业化的国家,早期的方法都要用到螯合剂,通过添加合成的螯合剂如EDTA可以增加重金属的溶解度和生物利用度。螯合剂的分子结构能与特定的重金属形成多种配位键提高重金属在土壤中液相浓度从而增强其流动性^[9]。由于有些金属离子能与土壤形成很强的键,因此必须使用如EDTA钠盐这样的强力螯合剂,然而这样的处理方法不仅需要大量昂贵的化学螯合剂以及设备,而且对技术的要求很高。经物理化学治理后也很容易产生化学污染,从而间接的影响地下水和土壤的质量。例如土壤中铁和钙元素在喷洒EDTA后由于其在土壤中的浓度要远远高于目标重金属,使之很容易与EDTA结合从而越弱螯合剂结合重金属的作用^[10]。据报道EDTA使用后螯合剂对土壤中Cu、Pb和Zn的结合量要远远大于植物在土壤中的吸收量,这使螯合剂的使用得不偿失。因此采用对环境有毒,选择性不高而且昂贵的物理化学处理方法不如考虑更为环保经济措施,这样可以避免采用的螯合剂对人体造成新的损害^[11]。

由于化学和物理在重金属的实际处理中存在种种的缺点,绿色的生物治理也越来越多的被人们采用。动物治理方面主要是利用蚯蚓,蚯蚓是重要的土壤有机生物之一,在提高土壤质量方面具有不可替代的地位。它们通过进食、挖洞、排泄以及新陈代谢等作用使得土质和营养成分都得到提高。带有COOH和CO等官能团化学物质的产生和析出有利于酸化土壤并激活种重金属,几种胶状物质能软化土壤并与重金属离子发生螯合作用。然而相对微生物来说由于其针对性较弱作用面较小,其处理金属离子的效果既不显著也不稳定。根据Baker等人的研究,经过蚯蚓在土壤中的活动后pH值降低了0.7-0.9,如果土壤是酸性的红土pH值仅降低0.03-0.18,而砂土经过处理后其pH的降低幅度很大^[12]。这样来说蚯蚓对土壤中金属的效果过于依赖土壤的条件,而不能对其中的重金属进行迅速而彻底的清除。

植物修复是通过植物吸收累积某种重金属,利用植物以及相关的微生物共存体系作用来清理土壤中重金属的方法。根据其作用机理可以将植物修复分三类:植物吸收、植物挥发和植物稳定。植物的吸收是通过特定的植物吸收对应的重金属减少土壤的重金属含量从而达到重金属的去除和回收;植物的稳定利用特殊植物将重金属钝化一般是络合螯合等作用,降低其生物利用性及流动性,使其不能为其他的植物所利用。可通过植物的根内部的吸收和富集、根表面的吸附、根附近土壤中钝化沉淀三种方式进行,

无论何种方法都是通过激活或者降低土壤中重金属来实现。植物对重金属的作用有以下几个方面：与重金属发生螯合作用，形成重金属螯合物分子；植物根部通过专性原生质膜结合重金属，使之发生还原反应；根部释放质子来酸化土壤激活重金属。现在使用最为广泛的植物超富集吸附就是植物能通过土壤的中的根系对重金属产生富集作用，几种特殊的质子从根部放出使得土壤酸化，激活重金属并提高其生物吸收的活性^[13]。整个作用过程最关键有三个因素：a.传递蛋白，带有特殊结合位点的蛋白质能将金属离子从胞外转移到包内，Lasat发现一种植物中的Zn转移蛋白能特异吸附Zn离子将其转移到细胞内^[14]。b.生物螯合剂，作用机理同螯合剂EDTA，有些植物能排放出物质与重金属产生螯合作用。c.有机酸，同生物螯合剂几种植物产生的有机酸能加速根部对重金属的吸收作用。

微生物虽然不能直接的降解和破坏重金属，但微生物种类繁多具有多种特异的生物活性和生物功能：如细胞代谢、表面生物大分子吸收转运、生物吸附、空泡吞饮、沉淀和氧化还原反应等，这些功能能针对不同的重金属化学或物理特性与重金属发生反应，影响重金属形态改变其在环境中的迁移与转化方式达到除去重金属的作用^[15]。真菌如曲霉、毛霉、青霉、根霉等对重金属都具有良好的吸附作用^[16]。一些藻类如动物胶菌、蓝细菌、硫酸还原菌等，能够在胞外产生聚合物与重金属离子形成络合物，使重金属失去活性^[17]。细菌如氧化硫硫杆菌、硫酸盐还原菌、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌等对重金属都有很好的吸附作用，表1-1列出了一些细菌对不同金属的吸附能力。微生物在修复被重金属污染的土壤方面具有独特作用例如微生物可以改变根部周围的微环境,根据不同的机理提高植物对重金属的吸收,挥发或固定效率^[18]。不同微生物活性及机理不同使得微生物治理重金属手段灵活多变，工程菌的改造更为此类方法提供了产业化的前景。

化学物理治理和动植物治理在除去重金属上均有着各自的不足，化学物理治理成本过高且容易形成二次污染、动植物治理受制与环境的条件而且周期长治理也不彻底。相比较而言微生物治理不但能达到较好的效果而且克服了化学物理治理和动植物治理的不足，具有很好的前景。

表 1-1 对金属有吸附作用的细菌

Table 1-1 Bacterial biomass used for metal removal

微生物	金属	吸附能力(mg/g)	参考文献
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Th,U	15,6	Tsezos and Volesky (1981) ^[19]
<i>Pseudomonas sp.</i>	U	NA	Pons and Fuste (1993) ^[20]
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Cr,Cd,Cu	NA	Ozdemir et al. (2003) ^[21]
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Zn	82	Baillet et al. (1998) ^[22]
	Cr	NA	Celaya et al. (2000) ^[23]

微生物	金属	吸附能力 (mg/g)	参考文献
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Cd,Zn	NA	Plette et al. (1996) ^[24]
<i>Ocimum basilicium</i>	Cr	NA	Melo and D'Souza (2004) ^[25]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Cd	NA	Tangaromsuk et al. (2002) ^[26]
<i>Bacillus firmus</i>	Pb,Cu,Zn	467,381,418	Salehizadeh et al. (2003) ^[27]
<i>B. coagulans</i>	Cr(VI)	39.9	Srinath et al. (2002) ^[28]
<i>B. megaterium</i>	Cr(VI)	30.7	Srinath et al. (2002)
<i>Zoogloea ramigera</i>	Cr(VI)	2	Nourbakhsh et al. (1994) ^[29]
	Cu	29	Aksu et al. (1992) ^[30]
<i>Streptomyces noursei</i>	Cd,Cu,Ni	3,4,9,0.8	Mattuschka and Straube ^[31]
	Pb,Zn,Ag,	36,1.6,38	Mattuschka and Straube (1993)
	Cr,Pb	1.8,55	Mattuschka and Straube (1993)
<i>S. longwoodensis</i>	Pb,U	100,440	Friis and Myers-Keith ^[32]
<i>S. rimosus</i>	Zn	30	Mameri et al. (1999) ^[33]

1.1.2 课题研究目的

从西昌矿区周边土壤中采集土样, 筛选高耐 Cd^{2+} 细菌, 利用原子吸收分光光度法测定耐 Cd^{2+} 菌株的 Cd^{2+} 吸附能力, 对筛选得到的细菌通过生理生化实验以及 16SrDNA 的方法鉴定菌种种属分类地位。通过对筛选出的耐受菌进行质粒提取, 以及质粒消除实验, 目的明确其耐 Cd^{2+} 机理。期望得到若干株 Cd^{2+} 高耐受、高富集细菌, 以用于环境重金属污染治理以及工程菌的构建等, 并为进一步的基因工程改造提供理论依据。

1.2 课题的研究内容和意义

1.2.1 课题研究内容

本研究通过 Cd^{2+} 浓度梯度培养基, 从西昌矿区土壤中筛选得到对 Cd^{2+} 高耐受的菌株。利用生理、生化试验检验和 16SrDNA 分子生物学方法鉴定菌株的种属。并利用原子吸收分光光度计测定其对 Cd^{2+} 的吸附能力。检测微生物是否还有耐 Cd^{2+} 质粒, 并通过质粒消除实验确定质粒对该微生物耐 Cd^{2+} 性的影响。本研究为构建基因工程菌提供宿主菌, 生物吸附剂工业化发展提供了材料和理论依据。主要研究内容包括: 高耐 Cd^{2+} 细菌的筛选, 生理生化鉴定, 16SrDNA 鉴定, 对 Cd^{2+} 吸附性的定量测定, 质粒提取、酶切、消除, 初步确定耐 Cd^{2+} 机理等。

1.2.2 课题研究意义

随着世界各国城市发展以及对各种工业化产品的需求增加导致矿产开发、污染类工业快速扩张以及农业生产中采用的化肥等化学品种类和数量的增加，重金属污染日益严峻，特别是通过各种渠道进入土壤后，为人类社会造成了巨大的危害和隐患。本研究从西昌矿区周边的土壤中筛选出了具有对 Cd^{2+} 高耐受、高富集的菌株，能为今后构建特定和高效的基因工程微生物奠定良好基础，为利用微生物进行 Cd^{2+} 污染的修复奠定基础。

1.3 论文主要内容和组织

本文分为三章，按如下的结构组织

第一章为绪论，介绍了论文的研究背景、研究目的和论文的主要内容以及重金属污染治理的国内外研究现状。

第二、三章分别为重金属 Cd^{2+} 高耐受细菌的分离和筛选、生理生化鉴定和 16SrDNA 鉴定，以及重金属吸附能力的定量和定性检测。对菌株质粒的提取、消除实验以及酶切鉴定。并对结果进行分析与讨论，得出初步结论。

第 2 章 土壤耐 Cd²⁺细菌分离、鉴定及吸附研究

2.1 实验材料

2.1.1 主要仪器

- ◆ 超低温 (-70℃) 冰箱: 基因公司
- ◆ 普通冰箱: 海尔公司
- ◆ WP700(21)型微波炉: GALANZ 公司
- ◆ D-3520 中型低温离心机: Kendro 公司
- ◆ 大型低温离心机: Himac CR 22G High-speed Refrigerated centrifuge, 日本东芝株式会社出品
- ◆ DNP-9082 型恒温培养箱: 上海精宏实验设备有限公司
- ◆ ZDP-150 型恒温摇床: 上海精宏实验设备有限公司
- ◆ SIM-F124 型制冰机: SANYO 公司
- ◆ HH-S4 型数显恒温水浴锅: 江苏金坛金城国胜实验仪器厂
- ◆ DSX-280A 不锈钢手提式灭菌锅: 上海申安医疗器械厂
- ◆ Eppendorf 移液器: Finnpiptette 公司
- ◆ DYC-31A 型琼脂糖凝胶电泳仪: 北京市六一仪器厂
- ◆ 凝胶成像系统 (Bio imaging system): 基因公司
- ◆ SW-CJ-2F 型洁净工作台: 苏州安泰空气技术有限公司
- ◆ 0.2mlPCR 管、1.5mlEP 管、1ml 蓝色枪头、200 μ l 黄色枪头、10 μ l 白色枪头, 均无 RNA 酶: 购自 Axygen
- ◆ 电子天平: 成都倍赛克仪器仪表研究所
- ◆ PCR 仪: BIO-RAD
- ◆ 分光光度仪: 型号 731 型, 上海精密

2.1.2 主要试剂

- ◆ 蜡状芽孢杆菌: 购自微生物菌种保藏中心
 - ◆ PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成
 - ◆ 测序由上海生物工程技术有限公司完成
 - ◆ 酵母提取物 (Yeast extract)、胰蛋白胨 (Trytone): 购自 Oxiod 公司
 - ◆ Tris Base: 购自 Sigma 公司
 - ◆ 限制性内切酶: 购自 TaKaRa 公司
-

- ◆ Taq 酶、dNTP: 购自 TaKaRa 公司
- ◆ 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒: 购自 omega
- ◆ Goldview、Greenview 核酸染料: 购自赛百盛基因技术有限公司
- ◆ 其他所用化学试剂为国产分析纯

2.1.3 主要试剂配制

- ◆ LB 液体培养基 (1L):
蛋白胨 10.0g、酵母提取物 5.0g、NaCl 10.0g, 溶于 800ml 超纯水中, 定容至 1000ml, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 高压蒸汽灭菌, 4℃ 保存。
- ◆ LB 固体培养基 (1L):
蛋白胨 10.0g、酵母提取物 5.0g、NaCl 10.0g, 溶于 800ml 超纯水中, 定容至 1000ml, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 分装成 100ml, 每 100ml 添加 1.5g 琼脂粉, 高压蒸汽灭菌, 4℃ 保存。
- ◆ 牛肉膏-蛋白胨培养基
蛋白胨 10.0、牛肉膏 3.0g、NaCl 5.0g, 溶于 800ml 超纯水中, 定容至 1000ml, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 高压蒸气灭菌, 4℃ 保存。
- ◆ 硝酸盐还原培养基
蛋白胨 10.0g、NaCl 5.0g、KNO₃ 1-2g、溶于 800ml 超纯水中, 定容至 1000ml, 用 NaOH 调 pH 至 7.4, 高压蒸气灭菌, 4℃ 保存。
- ◆ Ni²⁺ 储存液(10g/L):
称取 NiSO₄·6H₂O 4.479g, 溶于 80ml 超纯水中, 定容至 100ml, 过滤除菌, 室温保存。
- ◆ Cu²⁺ 储存液(10g/L):
称取 CuSO₄·5H₂O 3.929g, 溶于 80ml 超纯水中, 定容至 100ml, 过滤除菌, 室温保存。
- ◆ Zn²⁺ 储存液(10g/L):
称取 ZnSO₄·6H₂O 4.398g, 溶于 80ml 超纯水中, 定容至 100ml, 过滤除菌, 室温保存。
- ◆ Mn²⁺ 储存液(10g/L):
称取 MnCl₂·4H₂O 3.602g, 溶于 80ml 超纯水中, 定容至 100ml, 过滤除菌, 室温保存。
- ◆ Cd²⁺ 储存液(40g/L):
称取 3CdSO₄·8H₂O 9.129g, 溶于 80ml 超纯水中, 定容至 100ml, 过滤除菌, 室温保存。

- ◆ LB/ Cd²⁺平板:
蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、NaCl 10g, 溶于 800ml 超纯水中, 定容至 1000ml, 用 NaOH 调 pH 至 7.0, 分装成 100ml, 每 100ml 添加 1.5g 琼脂粉, 高压蒸汽灭菌, 当温度降至 70℃ 每 100ml 加入适当体积的 Cd²⁺储存液 (50g/L), 使其终浓度达到目的浓度, 倒平板, 4℃ 保存。
- ◆ 5×TBE 储存液:
445mM Tris 碱 (pH7.5)、445mM 硼酸和 10mM EDTA, 超纯水定容, 室温保存。
- ◆ 加样缓冲液 (6×):
甘油 30%, 溴酚蓝 0.12%, 二甲苯青蓝 0.12%, 室温保存。
- ◆ 10%SDS:
在 90ml 超纯水总溶解 10g 电泳级 SDS, 加热至 68℃ 助溶, 加入几滴浓盐酸调节 pH 至 7.2, 定容至 100ml, 分装备用。
- ◆ NaCl 溶液(5mol/L):
称取 NaCl 29.22g, 溶于 80mL 超纯水中, 定容至 100mL, 高压蒸汽灭菌, 室温保存。
- ◆ 溶菌酶 (50mg/mL):
称取 50mg 溶菌酶粉剂溶于 1ml 10mM Tris-Cl (pH8.0), 得到 50mg/mL 溶菌酶溶液。
- ◆ 1M Tris 碱 (pH8.0):
12.11g Tris 碱溶于 80ml 超存水, HCl 调 pH 至 8.0, 超纯水定容至 100ml, 高压蒸汽灭菌, 室温保存。
- ◆ 0.5M EDTA (pH8.0):
18.61g EDTA 溶于 80ml 超纯水, NaOH 调 pH 至 8.0 (约需 1g NaOH 颗粒), 超纯水定容至 100ml, 高压蒸汽灭菌, 室温保存。
- ◆ TE (pH8.0):
10mM Tris 碱 (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0), 超纯水定容, 高压蒸汽灭菌, 室温保存。

2.2 实验方法

2.2.1 Cd²⁺高耐受菌株的筛选

2.2.1.1 耐 Cd²⁺菌株的分离

1、从四川省西昌市某矿区采取土壤样品，称取10g加入到100mL的LB培养基中，剧烈震荡以打散土壤。

2、吸取上述土壤混悬液100 μ l，在不同重金属Cd²⁺浓度的培养基平板上涂布，倒置平板于30℃培养箱中培养，至单菌落长出。

3、挑选在高浓度 Cd²⁺平板上长势较好的单菌落，在 100mg/L Cd²⁺的 LB 平板上划线纯化，将纯化的菌种放入 4℃冰箱中保存备用。

2.2.1.2 耐 Cd²⁺菌株的筛选

1、从分离得到的菌种平板上挑取单克隆于 3ml 30mg/L Cd²⁺的 LB 液体培养基中，30℃，200rpm 震荡过夜培养。

2、依次按 2%的接种量，接种到 Cd²⁺浓度递增的 LB 液体培养基中 30℃，200rpm 震荡培养。

3、选取能够在 400mg/L 以上 Cd²⁺浓度的 LB 培养基中生长的菌株，在 100mg/L Cd²⁺的 LB 平板上划线纯化，将纯化的菌种放入 4℃冰箱中保存备用。

2.2.1.3 耐 Cd²⁺菌株的保存

1、在 30mg/L Cd²⁺的 LB 平板上挑取单克隆于 3mL 100mg/L Cd²⁺的 LB 液体培养基中，30℃，200rpm 震荡培养。

2、当 OD₆₀₀ 达到 0.4-0.6 时，吸取 500 μ l 菌液加入到 1.5ml EP 管中。

3、加入等体积的 30%甘油，混匀。

4、在液氮中速冻 2-3min，-70℃保存。

2.2.2 高耐受菌株生理生化鉴定

2.2.2.1 革兰氏染色

1、染色剂：

a 结晶紫液：甲液，结晶紫 2.0g、乙醇（95%）20ml；乙液：草酸铵 0.8g，蒸馏水 80ml。将甲、乙两液混合，静置于不透气棕色瓶中，48h 后使用。

b 碘：碘 1.0g、碘化钾 (KI) 2.0g，蒸馏水 300ml。先将碘化钾 (KI) 溶于少量蒸馏水 (3-5ml) 中，再放入碘，溶时可稍加热，待碘全溶后加水至 300ml。此溶液稳定，在不透气的棕色瓶中保存。

c 脱色液：95%的乙醇。d 复染液：即 0.5%番红 (safranin) 水溶液。取 2.5%番红 (又称沙黄) 的酒精溶液 20ml，蒸馏水混溶。

2、用具：显微镜、酒精灯、载玻片、接种环、蒸馏水、吸水纸。

3、染色观察：a 涂片：取一张干净载玻片于其中央滴一滴蒸馏水，按无菌操作作用接种环挑取已培养好的菌株少许于水滴中，调匀并涂成 1cm^2 的薄层；

b 干燥：涂片最好在室温中干燥。也可手持载玻片一端，小心地在酒精灯上放微微加热，让水分蒸发，但切勿直接将玻片在火焰上加热，以防标本烤枯变形；

c 初染：在涂片上加结晶紫一滴，约 1min 后，水洗；

d 媒染：滴加碘液并保存 1min，水洗；

e 脱色：将载玻片上的水甩干净，用 95%酒精滴洗片至滴出的酒精刚刚出现紫色为止，约 20s，立即用水冲洗；

f 复染：用番红染色 1min，水洗，吸干；

g 镜检：油镜下观察，被染成紫色者即为革兰氏阳性菌 (G+)，被染成红色者为革兰氏阴性菌 (G-)。

2.2.2.2 氧化酶试验

1、挑取耐 Cd^{2+} 菌株单菌落于 LB 斜面固体培养基中， 30°C 过夜培养。

2、配制成 1.0%的二甲基对苯撑二胺水溶液，保存在棕色瓶中，将二甲基对苯撑二胺水溶液滴在一张放在结晶的培养皿中的滤纸上，使滤纸刚好湿润。

3、用接种环取少量菌苔涂抹于滴有二甲基对苯撑二胺水溶液的滤纸上。

4、在 10 秒内菌苔或边缘呈现红色者为阳性，在 30 秒内出现红色者为迟缓阳性；不呈现红色或 30 秒以后才呈现红色则为阴性。

2.2.2.3 过氧化氢酶试验

1、挑取耐 Cd^{2+} 菌株单菌落接种于牛肉膏蛋白胨斜面培养基上， 30°C 过夜培养。

2、挑取一小环菌苔涂抹在滴有 $5\%\text{H}_2\text{O}_2$ 的玻璃片上，如有气泡产生则为过氧化氢酶阳性，无气泡则为阴性。

2.2.2.4 明胶液化实验

1、从分离得到的菌种平板上挑取单克隆于 LB 液体培养基中， 30°C ，200rpm 震荡

过夜培养。

2、用穿刺接种法接种高耐 Cd^{2+} 细菌于明胶液化培养基中， 30°C 培养 48h。

3、观察培养基有无液化及液化后的性状（因明胶在高于 25°C 时自行液化，观察时应放在冰浴中观察）。

2.2.2.5 淀粉水解试验

1、从分离得到的菌种平板上挑取单克隆于 LB 液体培养基中， 30°C ，200rpm 震荡过夜培养。

2、制备淀粉固体培养基平板，用接种环接环取少量高耐 Cd^{2+} 细菌点接在培养基表面， 30°C 培养 24h。

3、取出平板，打开培养皿，滴加少量的碘液于平板上，轻轻转动平板使碘液均匀铺满整个平板。

4、观察菌落，菌落周围若出现无色透明圈则说明淀粉已经被水解，该细菌具有分解淀粉的能力，还可以根据透明圈的大小说明菌株水解淀粉能力的强弱。

2.2.3 高耐菌株的 16SrDNA 鉴定

2.2.3.1 细菌基因组 DNA 的提取

1、挑取耐 Cd^{2+} 菌株单克隆于 5mL LB 液体培养基中， 30°C ，200rpm 震荡过夜培养。

2、细菌培养液 12000rpm 离心 30s，弃上清，所得菌体用 TE 洗涤 2 次。

3、加 1mL TE 溶解菌体，再加入 $100\mu\text{l}$ 50mg/mL 溶菌酶，混合均匀后于 37°C 水浴 40min。

4、加入 1/10 体积的 10%SDS，颠倒混匀， 65°C 水浴 10min。

5、加入 5mol/L NaCl，使其终浓度为 1mol/L。

6、加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）溶液，抽提 2 次。

7、两次所得上层溶液并入同一个离心管中，加入 2 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀， -20°C 静置 2h 沉淀 DNA。

8、12000rpm， 4°C 离心 30min，弃上清。

9、加入 1mL 70% 无水乙醇洗涤，12000rpm， 4°C 离心 20min，弃上清。

10、自然风干残留的液体，加入 $500\mu\text{l}$ 去离子水溶解沉淀，得到纯化的总 DNA 溶液，电泳检测， -20°C 保存备用。

2.2.3.2 16SrDNA 鉴定

1、依照细菌 16SrDNA 中最保守的序列设计并合成引物:

正向引物: 5'- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'

反向引物: 5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3' 。

2、PCR 反应:

0.2ml PCR 管中加入:

成分	用量
10×PCR Buffer	5 μ l
dNTP(2.5mM)	4 μ l
Mg ²⁺ (2.5mM)	3 μ l
正向引物(20 μ M)	1 μ l
反向引物(20 μ M)	1 μ l
模板	10~100ng
Taq (5U/ μ l)	0.5 μ l
灭菌超纯水	Up to 50 μ l

酶置于冰盒上最后加入，整个操作在冰盒上进行。混匀，4℃快速离心，加入矿物油，进行下列循环：94℃3min，35cycle (94℃1min，56℃1min，72℃1min)，72℃10min。电泳检测并回收目的片段，-20℃保存。

3、回收的目的片段送至上海生工进行测序。

4、将测序得到的序列提交 GeneBank 数据库，利用 BLAST 软件与数据库中已有的 16SrDNA 序列进行同源性比较分析。

2.2.4 菌株的生长曲线测定

2.2.4.1 菌株在无 Cd²⁺条件下的生长曲线

1、挑取耐 Cd²⁺菌株单菌落于 5mL LB 液体培养基中，30℃，200rpm 振荡过夜培养。

2、取盛有 5mlLB 培养液的试管 15 个，分别编号为不同的时间点。

3、按 2%的接种量分别接种于 15 个试管内，于 30℃，200rpm 振荡培养。然后分别按对应时间将试管取出，立即放 4℃冰箱中，待培养结束时一同测定 OD 值。

4、将未接种的 LB 液体培养基倒入比色皿中，选 600nm 波长分光光度计上调节零点，作为空白对照。

5、对不同时间培养液从 0h 起依次进行测定，对浓度大的菌悬液用未接种的 LB 培养基做适当稀释后测定，使测定的 OD 值在 0.100~0.650 以内，经稀释后测得的 OD

值要乘以稀释倍数，获得培养液的实际 OD 值。

2.2.4.2 菌株在有 Cd^{2+} 条件下的生长曲线

- 1、挑取耐 Cd^{2+} 菌株单菌落于 5mL LB 液体培养基中， 30°C ，200rpm 振荡过夜培养。
- 2、取盛有 25mg/L Cd^{2+} 5mlLB 培养液的试管 15 个，分别编号为不同的时间点。
- 3、按 2% 的接种量分别接种于 15 个试管内，于 30°C ，200rpm 振荡培养。然后分别按对应时间将试管取出，立即放 4°C 冰箱中，待培养结束时一同测定 OD 值。
- 4、将未接种的 LB 液体培养基倒入比色皿中，选 600nm 波长分光光度计上调节零点，作为空白对照。
- 5、对不同时间培养液从 0h 起依次进行测定，对浓度大的菌悬液用未接种的 LB 培养基做适当稀释后测定，使测定的 OD 值在 0.100~0.650 以内，经稀释后测得的 OD 值要乘以稀释倍数，获得培养液的实际 OD 值。

2.2.5 高耐受菌株对 Cd^{2+} 的吸附能力的测定

2.2.5.1 耐 Cd^{2+} 菌株对 Cd^{2+} 的吸附能力的测定

- 1、挑取耐 Cd^{2+} 菌株单菌落于 5mL 10mg/L Cd^{2+} 的 LB 液体培养基中， 30°C ，200rpm 震荡过夜培养。每个菌株分别挑两个单克隆，摇两瓶做平行实验。
- 2、以 2% 的接种量接种于 30mL 10mg/L Cd^{2+} 的 LB 液体培养基中， 30°C ，200rpm 震荡培养。
- 3、当 OD_{600} 达到 1.2~2.0 时，加入 Cd^{2+} ，使培养基中 Cd^{2+} 终浓度达到 100mg/L，继续培养 2h。
- 4、取少量菌液适当稀释后，100 μl 涂布于 LB 平板上，计算活菌数。
- 5、剩余菌液，12000rpm 离心 10min，取上清液做原子吸收测定 Cd^{2+} 浓度，计算吸附量、吸附率。
- 6、离心所得菌体 60°C 烘至恒重，称量细菌干重。

2.2.5.2 对照菌株对 Cd^{2+} 的吸附能力的测定

- 1、分别挑取对照菌株蜡状芽孢杆菌 11109，单克隆于 5mL LB 液体培养基中， 37°C ，200rpm 震荡过夜培养。
- 2、以 2% 的接种量接种于 30mL LB 液体培养基中， 37°C ，200rpm 震荡培养。
- 3、当 OD_{600} 达到 1.2~2.0 时，加入 Cd^{2+} ，使培养基中 Cd^{2+} 终浓度达到 100mg/L，继续培养 2h。

- 4、取少量菌液适当稀释后，100 μ l 涂布于 LB 平板上，计算活菌数。
- 5、剩余菌液，12000rpm 离心 10min，取上清液做原子吸收测定 Cd²⁺浓度，计算吸附量、吸附率。
- 6、离心所得菌体 60℃烘至恒重，称量细菌干重。

2.5.5.3 原子吸收分光光度法测定 Cd²⁺浓度

1、Cd²⁺标准液的配制：

吸取一定量的 Cd²⁺储存液 LB 液体培养基中，然后一定量分别用超纯水稀释 20 倍，配成含 Cd²⁺0、0.50、1.00、3.00、5.00mg/L 的标准溶液，空白对照用超纯水稀释 20 倍的 LB 液体培养基，测其吸光度，绘制标准曲线。

2、样品测定：

将试样上清液用超纯水稀释 20 倍，以相同超纯水稀释倍数的 LB 液体培养基为空白对照，按绘制标准曲线条件测定试样上清液的吸光度，从标准曲线上查得 Cd²⁺含量。

2.2.6 菌株对其他金属的最大耐受浓度（MTC）测定

最大耐受浓度（Maximal tolerant concentration, MTC）是指细菌对某一重金属离子的最高耐受浓度，在这一浓度下，细菌培养 4 天后，生长任然能够被观察到。因此 MTC 越高，细菌对这种金属的耐受能力也就越强。

1、在 LB 平板上挑取单克隆，接种于 2.0ml LB 液体培养基中，30℃、200rpm 振荡过夜培养

2、将培养至对数生长期的菌体，划线接种于一系列包含不同浓度，不同金属离子的 LB 平板上，30℃培养 4 天。

3、观察生长情况，如果观察到细微生长，并且在这个浓度基础上略微提升便观察不到生长，便把这一浓度定义为该菌株对此种金属的最大耐受浓度。

4、金属盐使用如下：NiSO₄·6H₂O、ZnSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、Pb(C₂H₃O₂)₂·6H₂O

2.2.7 高耐受菌株的质粒 DNA 提取和初步的酶切鉴定

2.2.7.1 细菌质粒 DNA 的试剂盒小量制备

- 1、在 LB 板上挑取单克隆到 5ml LB 液体培养基中，30℃，200rpm 振荡过夜培养
- 2、培养液倒入 EP 管中，室温 10000g 离心 1min
- 3、去上清，待管壁液体流尽，用 250 μ l 溶液 I（含 RNaseA）重悬沉淀，上下颠倒混匀
- 4、加 250 μ l 溶液 II，缓慢颠倒数次，得澄清裂解液

5. 加 350 μ l 溶液III, 立即颠倒 EP 管数次, 待白色沉淀出现, 室温 13000g 离心 10min
6. 上清转到 HinBind[®]DNA 柱中, 室温 10000 g 离心 1min, 弃滤液, 反复过柱, 直到上清液全通过 HinBind[®]DNA 柱
7. 加 500 μ l HB Buffer 到柱上, 室温 10000 g 离心 1min
8. 弃滤液, 加入 700 μ l DNA Wash Buffer 洗涤柱子, 室温 10000 g 离心 1min
9. 弃滤液, 再次用 700 μ l DNA Wash Buffer 洗涤柱子
10. 弃滤液, 空柱子, 13000g 离心 2min, 干燥柱子
11. 添加一定量洗脱液到柱上, 离心洗脱, 取少量洗脱液稀释待电泳检测, 其他-20 $^{\circ}$ C 保存待用

2.2.7.2 细菌质粒 DNA 的酶切鉴定

对所提取到的质粒进行酶切, 电泳观察结果。

1. BamH I 酶切

在 0.5ml EP 管加入:

成分	用量
10 \times K Buffer	2 μ l
质粒 DNA	$\leq 1\mu$ g
BamH I (8U/ μ l)	1 μ l
灭菌超纯水	Up to 20 μ l

酶置于冰盒上最后加入。混匀, 短暂离心, 30 $^{\circ}$ C 水浴 2~3h。65 $^{\circ}$ C 水浴 25min, 灭活酶, 电泳检测。

2.EcorR I 酶切

在 0.5ml EP 管加入:

成分	用量
10 \times H Buffer	2 μ l
质粒 DNA	$\leq 1\mu$ g
EcorR I (8U/ μ l)	1 μ l
灭菌超纯水	Up to 20 μ l

酶置于冰盒上最后加入。混匀, 短暂离心, 30 $^{\circ}$ C 水浴 2~3h。65 $^{\circ}$ C 水浴 25min,

3. HindIII 酶切

在 0.5ml EP 管加入:

成分	用量
10 \times M Buffer	2 μ l
质粒 DNA	$\leq 1\mu$ g

EcorR I (8U/ μ l)	1 μ l
灭菌超纯水	Up to 20 μ l

酶置于冰盒上最后加入。混匀，短暂离心，30℃水浴 2~3h。65℃水浴 25min，
4.Xho I 酶切

在 0.5ml EP 管加入：

成分	用量
10×H Buffer	2 μ l
质粒 DNA	\leq 1 μ g
EcorR I (8U/ μ l)	1 μ l
灭菌超纯水	Up to 20 μ l

酶置于冰盒上最后加入。混匀，短暂离心，30℃水浴 2~3h。65℃水浴 25min，
5.Bgl II 酶切

在 0.5ml EP 管加入：

成分	用量
10×M Buffer	2 μ l
质粒 DNA	\leq 1 μ g
EcorR I (8U/ μ l)	1 μ l
灭菌超纯水	Up to 20 μ l

酶置于冰盒上最后加入。混匀，短暂离心，30℃水浴 2~3h。65℃水浴 25min，
6.Mob I 酶切

在 0.5ml EP 管加入：

成分	用量
10×K Buffer	2 μ l
质粒 DNA	\leq 1 μ g
EcorR I (8U/ μ l)	1 μ l
灭菌超纯水	Up to 20 μ l

酶置于冰盒上最后加入。混匀，短暂离心，30℃水浴 2~3h。65℃水浴 25min，

2.2.8 耐 Cd²⁺ 菌株的质粒消除实验

1. 挑取 LB 固体培养基上生长的单菌落，接种于 2.0ml LB 液体培养基中，30℃、200 转振荡培养过夜（约 12-14h）。

2. 以 0.1% 的接种量接种分别到含有 SDS 的 LB 液体培养基中，SDS 的浓度分别为 0、0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%，30℃、200rpm 振荡培养过夜。

3. 将最大耐受 SDS 的 LB 液体培养基中的菌液，用 LB 液培稀释适当浓度后，铺在

不含有 Cd^{2+} 的固培上, 30°C 过夜培养。

4. 待长出菌落后, 挑取合适菌落, 影印接种于 $200\text{mg/L Cd}^{2+}\text{LB}$ 平板上, 30°C 过夜培养观察生长状况。

第 3 章 实验结果及讨论

3.1 实验结果

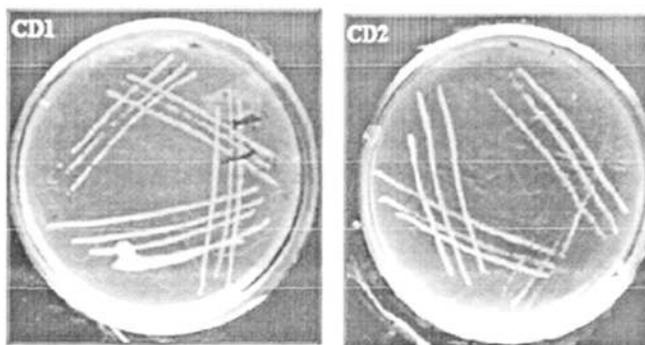
3.1.1 Cd^{2+} 高耐受菌株的筛选

3.1.1.1 耐 Cd^{2+} 菌株的分离

将土壤溶液涂布在 Cd^{2+} 浓度不断递增的 LB 板上, 发现在 800 、 1000 、 1500mg/L 的 Cd^{2+} 浓度下依然有菌株生存, 产生有单克隆。故从 Cd^{2+} 浓度为 800 、 1000 、 1500mg/L 的 LB 平板上挑取单克隆进行分离、筛选。

3.1.1.2 耐 Cd^{2+} 菌株的筛选

将分离得到的菌株通过 Cd^{2+} 浓度梯度培养筛选, 共得到 8 株耐 Cd 浓度在 400mg/L 以上的菌株, 对其中长势较好的 8 个菌株 CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8 测定其对 Cd^{2+} 的吸附能力并进行菌种鉴定, 在 800mg/L Cd^{2+} 的 LB 板上的生长情况见图 3-1。



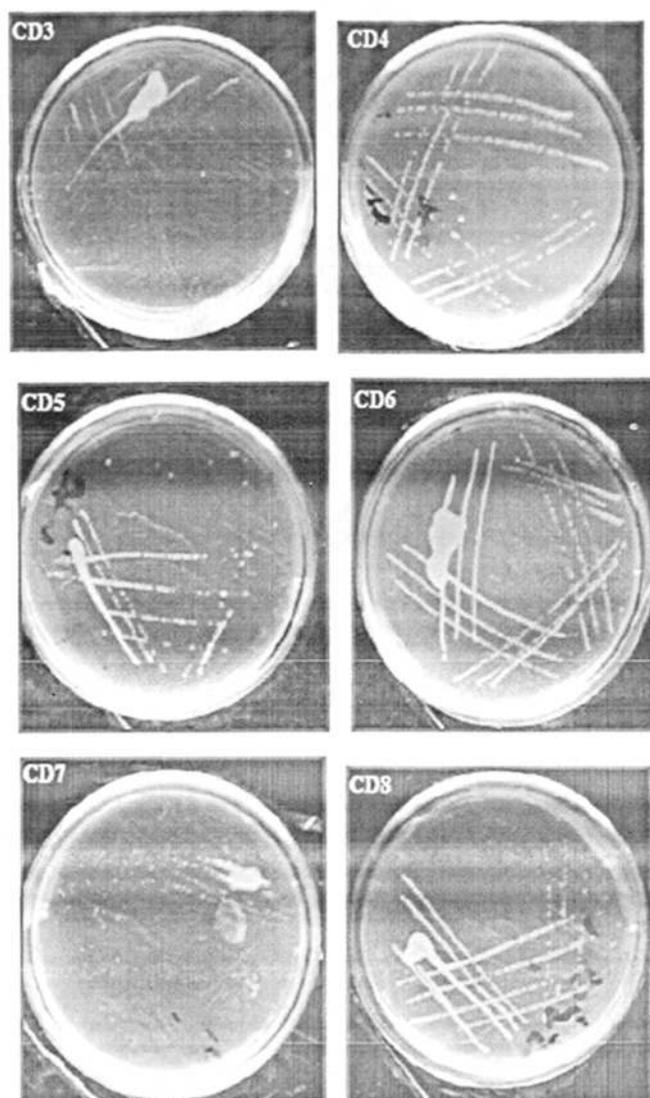


图 3-1 耐 Cd 菌株在 800mg/L Cd^{2+} 的 LB 板上的生长情况

Fig 3-1 Growth of different bacteria on 800mg/L Cd^{2+}

3.1.2 生理生化实验

对菌株 CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 进行了革兰氏染色实验和常规的生理生化鉴定, 8 株菌株的生理生化特征相同, 结果如表 3-1 所示。

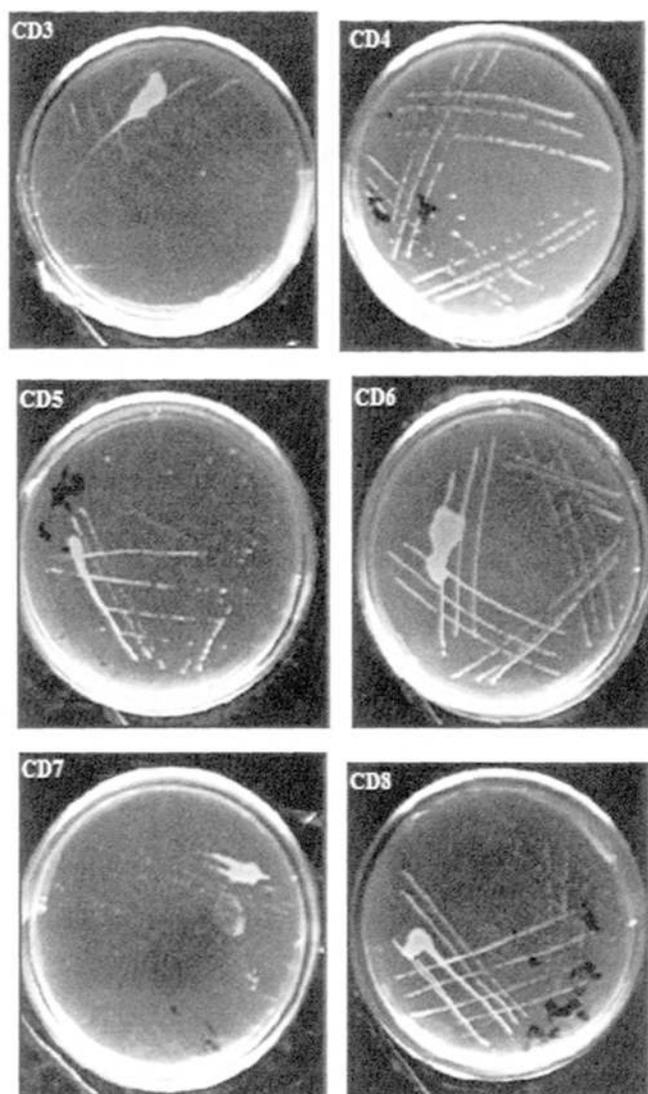


图 3-1 耐 Cd 菌株在 800mg/L Cd^{2+} 的 LB 板上的生长情况

Fig 3-1 Growth of different bacteria on 800mg/L Cd^{2+}

3.1.2 生理生化实验

对菌株 CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 进行了革兰氏染色实验和常规的生理生化鉴定, 8 株菌株的生理生化特征相同, 结果如表 3-1 所示。

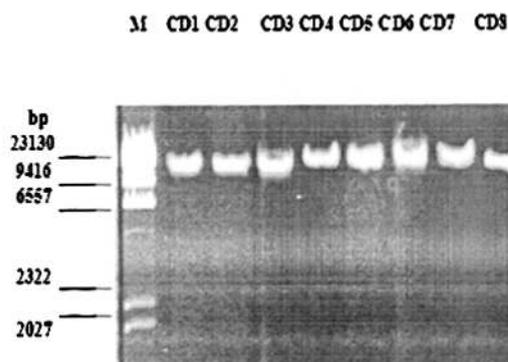


图 3-2 基因组 DNA 提取结果

Fig 3-2 Genome DNA of bacteria

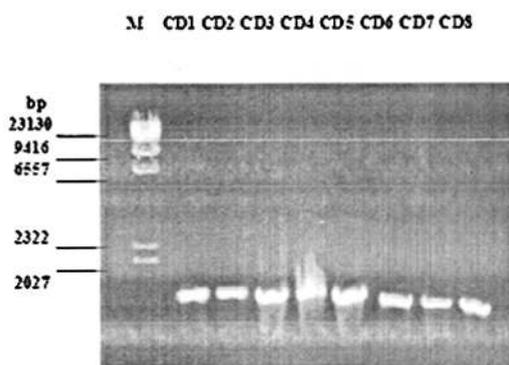


图 3-3 16S rDNA 的 PCR 反应

Fig 3-3 PCR of 16S rDNA

3.1.4 菌株的生长曲线测定

3.1.4.1 菌株在无 Cd^{2+} 条件下的生长曲线

将 30°C ， 200rpm 下振荡培养的细菌，分别在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、23、25、27、35h 后取出。以未接种的 LB 液体培养基为空白对照，选 600nm 波长分光光度计上调零。比色法测定各样品的 OD_{600} 值。为保证测定结果的准确性，使测定的 OD 值在 $0.100\sim 0.650$ 以内，需要对部分样品做稀释后测定的处理，2、4h 的样品是将原液稀释 2 倍后测定，6h 的样品是将原液进行 5 倍稀释，8~35h 的样品是将原液稀释 10 倍后测定。每个样品做三次平行实验，结果见表 3-2。对于稀释后进行测定的样品数据，计算实际 OD_{600} 值时，要将测定值乘以稀释倍数，结果见表 3-3。

表 3-2 样品的 OD600 值

Table3-2 OD600 of samples

时间 (h)	光密度值 (OD600)			
	第一次测量值	第二次测量值	第三次测量值	平均测量值
0	0.158	0.162	0.160	0.160±0.002
2	0.447	0.445	0.446	0.446±0.001
4	0.621	0.624	0.622	0.622±0.001
6	0.521	0.523	0.523	0.522±0.001
8	0.321	0.324	0.322	0.322±0.002
10	0.398	0.396	0.394	0.396±0.002
12	0.421	0.422	0.424	0.422±0.001
14	0.492	0.488	0.486	0.489±0.003
16	0.495	0.493	0.495	0.494±0.001
18	0.513	0.514	0.520	0.516±0.003
20	0.503	0.504	0.505	0.504±0.001
23	0.451	0.453	0.448	0.451±0.002
25	0.448	0.446	0.450	0.448±0.002
27	0.466	0.465	0.462	0.464±0.002
35	0.485	0.480	0.483	0.483±0.002

表 3-3 无 Cd²⁺条件下 CD5 的 OD600 值Table3-3 OD600 of stain CD5 cultivating in LB without Ca²⁺

时间 (h)	0	2	4	6	8	10	12	14
光密度值 (OD600)	0.160	0.892	1.244	2.610	3.220	3.960	4.220	4.890

时间	16	18	20	23	25	27	35
光密度值 (OD600)	4.940	5.160	5.040	4.510	4.480	4.640	4.830

根据表 3-3 的数据, 以时间为横坐标, OD600 值为纵坐标。绘制生长曲线, 见图 3-4。

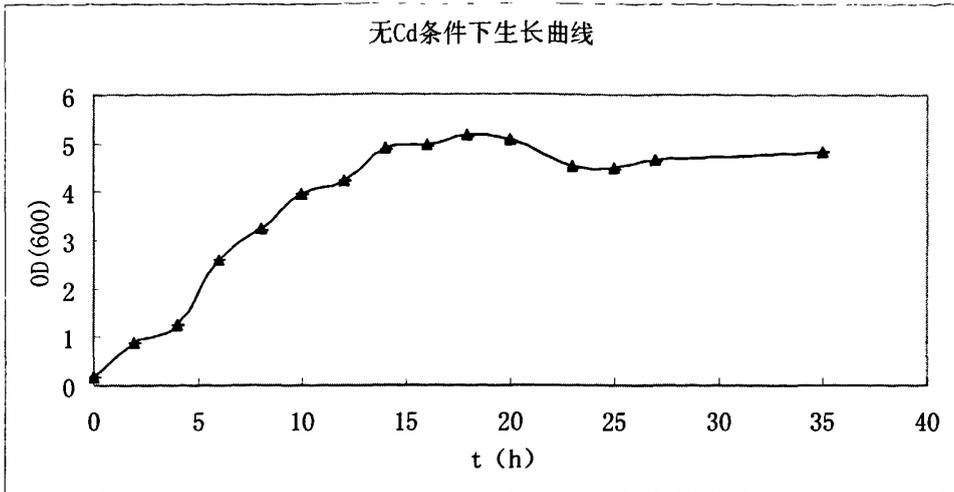
图 3-4 无 Cd^{2+} 条件下 CD5 的生长曲线

Fig3-4 The growth curves of strain CD5 cultivating in LB without Cadmium

3.1.4.2 菌株在有 Cd^{2+} 条件下的生长曲线

将 30°C ， 200rpm 下振荡培养的细菌，分别在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、23、25、27、35h 后取出。以未接种的 LB 液体培养基为空白对照，选 600nm 波长分光光度计上调零。比色法测定各样品的 OD_{600} 值。为保证测定结果的准确性，使测定的 OD 值在 $0.100\sim 0.650$ 以内，需要对部分样品做稀释后测定的处理，2h 的样品是将原液稀释 2 倍后测定，4h 的样品是将原液稀释 3 倍后测定，6h 的样品是将原液进行 5 倍稀释，8~35h 的样品是将原液稀释 10 倍后测定。每个样品做三次平行实验，结果见表 3-4。对于稀释后进行测定的样品数据，计算实际 OD_{600} 值时，要将测定值乘以稀释倍数，结果见表 3-5。

表 3-4 样品的 OD_{600} 值Table3-4 The OD_{600} of samples

时间 (H)	光密度值 (OD_{600})			
	第一次测量值	第二次测量值	第三次测量值	平均测量值
0	0.164	0.166	0.171	0.167 ± 0.004
2	0.396	0.395	0.398	0.396 ± 0.002
4	0.521	0.523	0.520	0.521 ± 0.002
6	0.624	0.622	0.625	0.624 ± 0.002
8	0.389	0.387	0.389	0.388 ± 0.001
10	0.482	0.485	0.483	0.483 ± 0.002

12	0.532	0.535	0.537	0.535±0.003
14	0.563	0.556	0.555	0.558±0.004
16	0.521	0.514	0.520	0.518±0.004
18	0.488	0.491	0.490	0.490±0.002
20	0.495	0.493	0.491	0.493±0.002
23	0.454	0.450	0.455	0.453±0.003
25	0.480	0.481	0.479	0.480±0.001
27	0.467	0.464	0.469	0.467±0.003
35	0.463	0.470	0.465	0.466±0.004

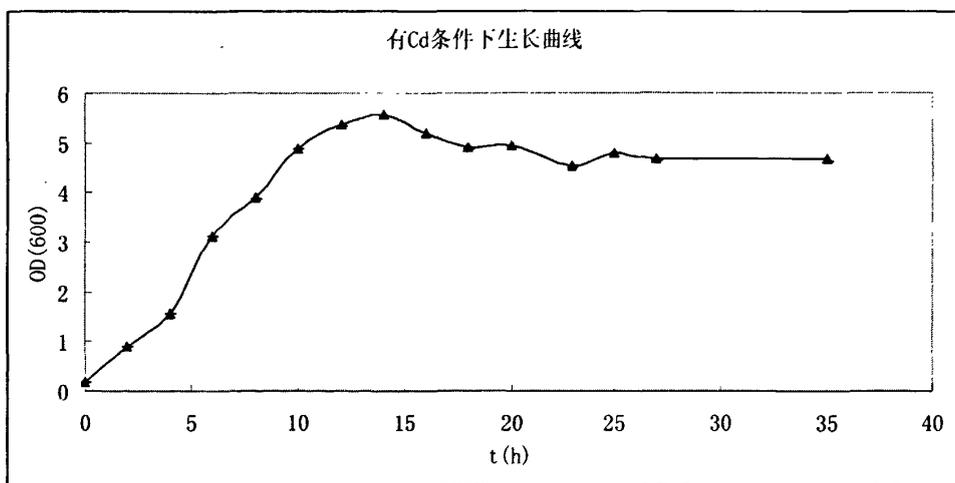
表 3-5 有 Cd^{2+} 条件下 CD5 的 OD600 值Table3-5 The OD600 of stain CD5 cultivating in LB without Ca^{2+}

时间 (h)	0	2	4	6	8	10	12	14
光密度值 (OD600)	0.167	0.792	1.564	3.118	3.883	4.833	5.355	5.580

时间	16	18	20	23	25	27	35
光密度值 (OD600)	5.183	4.897	4.930	4.530	4.800	4.677	4.660

根据表 3-5 的数据，以时间为横坐标，OD600 值为纵坐标。绘制生长曲线，见图 3-5。并对两组图最对比，见图 3-6。

从图上可以看出，在无 Cd^{2+} 条件下，培养 14h 后进入稳定期，18h 时 OD600 值达到了最大 5.16。菌体的在有 Cd^{2+} 的条件下，培养 10h 后进入稳定期，14h 时 OD600 达到最大 5.58。在存在一定量重金属 Cd 的条件下，对细菌的生长是有一定的促进作用的。

图 3-5 有 Cd^{2+} 条件下 CD5 的生长曲线Fig3-5 The growth curves of strain CD5 cultivating in LB with Ca^{2+}

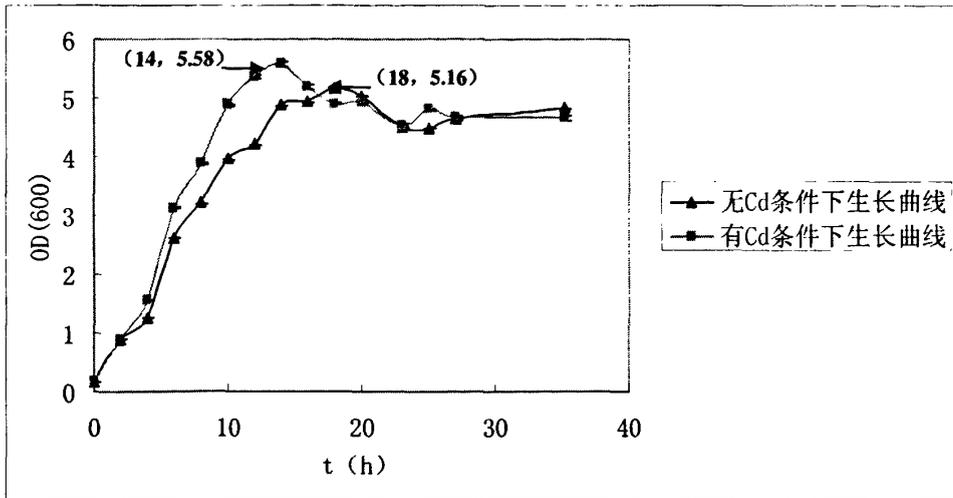


图 3-6

两组曲线的比较

Fig3-6 Comparison of the two curves

3.1.5 Cd^{2+} 高耐受菌株对 Cd^{2+} 的吸附能力的测定

对选取的 8 个菌株进行了 Cd^{2+} 吸附能力的测定，每个菌株做二个平行，同时对照菌株也做二个平行。其中， Cd^{2+} 吸附能力测定参照了国家标准-“水质 铜、锌、铅、镉的测定”（GB 7475-87）中的原子吸收分光光度法。

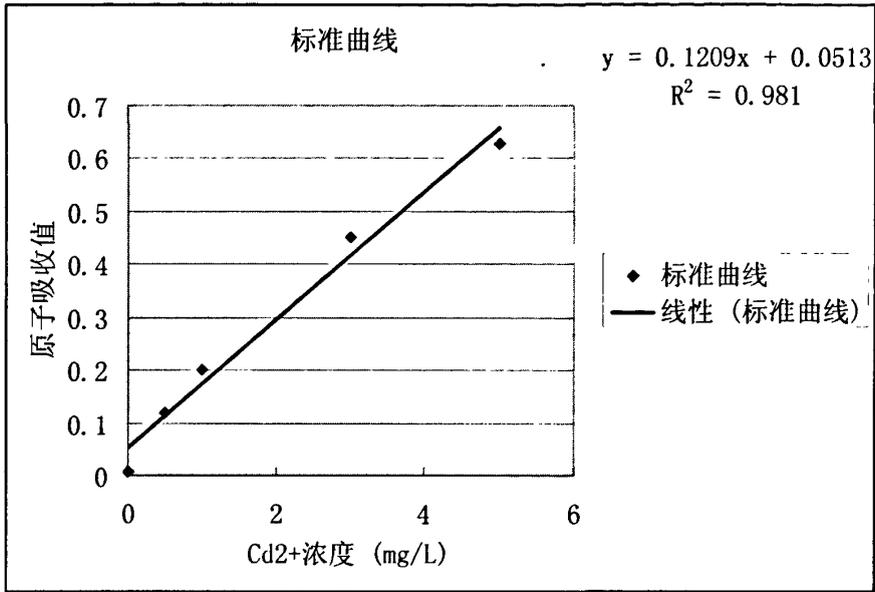
3.1.5.1 标准曲线的绘制

考虑到国家标准、原子吸收分光光度计的检出限以及实验所用试剂的纯度等因素，选取标准曲线的 Cd^{2+} 浓度为 0.00~5.00mg/L。标准曲线的原子吸收值和标准曲线图见表 3-6、图 3-7。

表 3-6 标准溶液的原子吸收值

Table 3-6 AAS of standard solution

Cd^{2+} 浓度 (mg/L)	0.00	0.50	1.00	3.00	5.00
原子吸收值	0.0081	0.1193	0.1990	0.4516	0.6272

图 3-7 Cd²⁺的原子吸收标准曲线Fig 3-7 Standard curve of AAS of Cd²⁺

3.1.5.2 样品测定

Cd²⁺吸附量 q 和吸附率 A 的计算方法:

$$q = (C_0 \times V - C_e \times V) / W$$

$$A = (C_0 \times V - C_e \times V) / (C_0 \times V) \times 100\%$$

式中 C_0 、 C_e 分别为 Cd²⁺离子起始和平衡浓度(mg/L); V 为溶液体积(L); W 为细胞干重(g)。

将各样品溶液稀释 20 倍, 使其 Cd²⁺浓度处于标准曲线内, 以通过标准曲线计算其 Cd²⁺浓度。各菌株的原子吸收测定、干重及吸附量、吸附率结果见表 3-7 到表 3-10。各菌株之间的吸附量、吸附率以及活菌数的对比结果见图 3-8、图 3-9、图 3-10。

CD1、CD3、CD4 以及 CD5 这四个菌株对 Cd²⁺的吸附率比较高, 分别为 87.69%、85.95%、85.73%、90.04%明显高于对照菌, 对照菌的吸附率最低为 77.38%。但 CD8 的吸附率与对照菌很接近仅为 78.13%。CD7 的活菌数最高为 5.01×10^{14} 。

表 3-7 耐 Cd²⁺菌株原子吸收测定结果Tab 3-7 AAS of different Cd²⁺ resistant bacteria

菌株	CD1-1	CD1-2	CD2-1	CD2-2	CD3-1	CD3-2
原子吸收值	0.1216	0.1299	0.1587	0.1597	0.1437	0.1469

菌株	CD4-1	CD4-2	CD5-1	CD5-2	CD6-1	CD6-2
原子吸收值	0.1380	0.1366	0.1102	0.1129	0.1402	0.1449

菌株	CD7-1	CD7-2	CD8-1	CD8-2	对照-1	对照-2
原子吸收值	0.1554	0.1642	0.1905	0.1815	0.1856	0.1850

表 3-8 耐 Cd²⁺菌株菌体干重测定结果Tab 3-8 Dry weight of different Cd²⁺ resistant bacteria

菌株	菌体干重 (g)						终干重
	空白	1d	3d	6d	9d	12d	
CD1-1	0.291	0.345	0.343	0.340	0.341	0.339	0.048±0.002
CD1-2	0.299	0.347	0.347	0.343	0.345	0.342	0.043±0.002
CD2-1	0.290	0.342	0.340	0.337	0.336	0.334	0.044±0.003
CD2-2	0.291	0.351	0.350	0.347	0.348	0.346	0.055±0.002
CD3-1	0.317	0.371	0.369	0.368	0.366	0.366	0.049±0.002
CD3-2	0.308	0.369	0.365	0.363	0.361	0.360	0.052±0.003
CD4-1	0.298	0.373	0.369	0.367	0.368	0.366	0.068±0.003
CD4-2	0.311	0.363	0.360	0.358	0.356	0.355	0.044±0.003
CD5-1	0.306	0.360	0.357	0.356	0.354	0.353	0.047±0.003
CD5-2	0.286	0.341	0.338	0.336	0.333	0.330	0.044±0.004
CD6-1	0.291	0.332	0.328	0.325	0.325	0.324	0.033±0.003
CD6-2	0.306	0.372	0.370	0.367	0.366	0.364	0.058±0.003
CD7-1	0.298	0.343	0.339	0.336	0.334	0.331	0.033±0.004
CD7-2	0.297	0.348	0.345	0.342	0.341	0.340	0.042±0.003
CD8-1	0.303	0.358	0.355	0.352	0.351	0.351	0.048±0.003
CD8-2	0.298	0.347	0.343	0.340	0.341	0.338	0.040±0.003
对照-1	0.288	0.346	0.342	0.339	0.338	0.337	0.049±0.003
对照-2	0.291	0.362	0.358	0.355	0.353	0.351	0.060±0.005

表 3-9 耐 Cd 菌株吸附结果

Tab 3-9 Adsorption of Cd²⁺ for different Cd²⁺ resistant bacteria

菌株	上清 Cd ²⁺ 浓度 (mg/L)	菌体总吸附量 30mL (mg)	吸附量 (mg/g)	吸附率 (%)	菌液的活菌数 30mL (个)
CD1-1	11.63	2.56	55.23	88.37	8.61×10 ¹³
CD1-2	13.00	2.61	60.69	87.00	7.43×10 ¹³
CD2-1	17.77	2.47	56.06	82.23	6.34×10 ¹¹
CD2-2	17.93	2.46	44.76	82.07	7.01×10 ¹¹
CD3-1	15.29	2.54	51.86	84.71	1.58×10 ¹⁴
CD3-2	15.81	2.53	48.57	87.19	2.10×10 ¹⁴
CD4-1	14.34	2.57	37.79	85.56	6.60×10 ¹²
CD4-2	14.11	2.58	58.56	85.89	1.92×10 ¹³
CD5-1	9.744	2.70	57.61	90.26	4.78×10 ¹⁴
CD5-2	10.19	2.69	61.23	89.81	2.55×10 ¹⁴
CD6-1	14.71	2.56	77.53	85.29	2.21×10 ¹³
CD6-2	15.48	2.53	43.72	84.52	3.07×10 ¹³
CD7-1	17.22	2.48	75.25	82.78	5.65×10 ¹⁴
CD7-2	18.68	2.44	58.08	81.32	4.37×10 ¹⁴
CD8-1	22.12	2.34	48.62	77.79	6.81×10 ¹³
CD8-2	21.53	2.35	58.85	78.47	5.27×10 ¹³
对照-1	22.22	2.33	47.62	77.78	6.30×10 ¹²
对照-2	23.03	2.31	38.48	76.97	5.62×10 ¹²

表 3-10 耐 Cd²⁺菌株原子吸收测定结果汇总

Tab 3-10 Summary of AAS of different Cd²⁺ resistant bacteria

菌株	平均吸附总量 30mL (mg)	平均吸附量 (mg/g)	平均吸附率(%)	平均活菌数 (个)
CD1	2.58±0.035	57.96±3.860	87.69±0.969	8.02×10 ¹³
CD2	2.47±0.007	50.41±7.990	82.15±0.113	6.68×10 ¹²
CD3	2.54±0.007	50.22±2.326	85.95±1.754	1.84×10 ¹⁴
CD4	2.58±0.007	48.18±14.68	85.73±0.233	1.29×10 ¹³
CD5	2.70±0.007	59.42±2.560	90.04±0.318	3.67×10 ¹⁴
CD6	2.55±0.212	60.63±23.91	84.91±0.544	2.64×10 ¹³
CD7	2.46±0.028	66.67±12.14	80.29±1.032	5.01×10 ¹⁴
CD8	2.35±0.007	53.73±7.234	78.13±0.481	6.04×10 ¹³

菌株	平均吸附总量 30mL (mg)	平均吸附量 (mg/g)	平均吸附率(%)	平均活菌数(个)
对照菌	2.32±0.014	43.05±6.463	77.38±0.573	5.96×10 ¹²

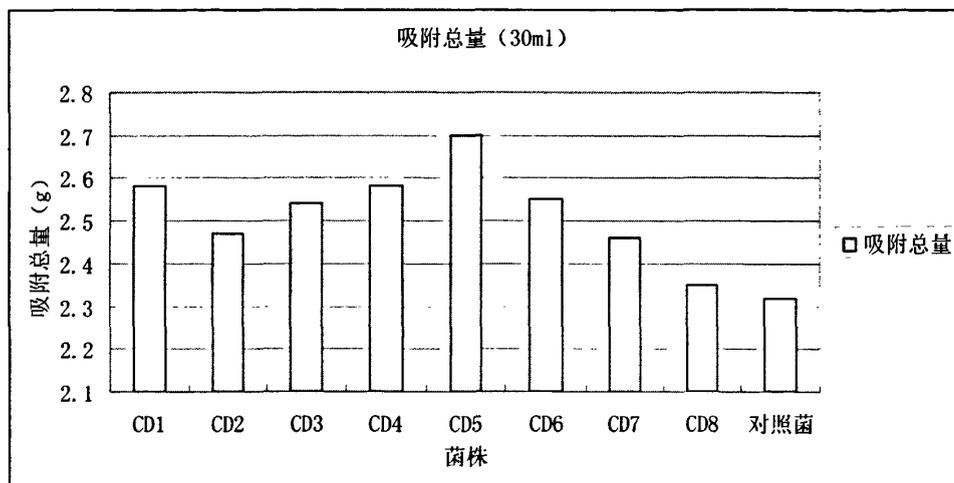
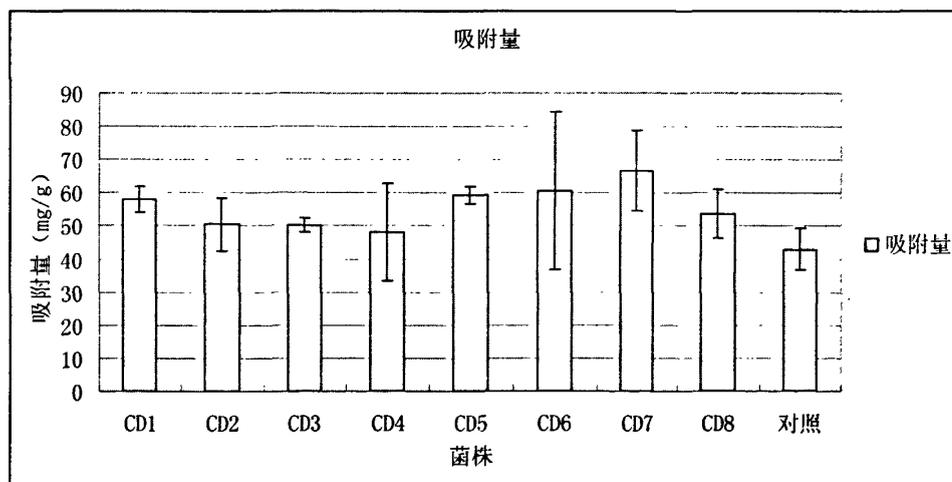
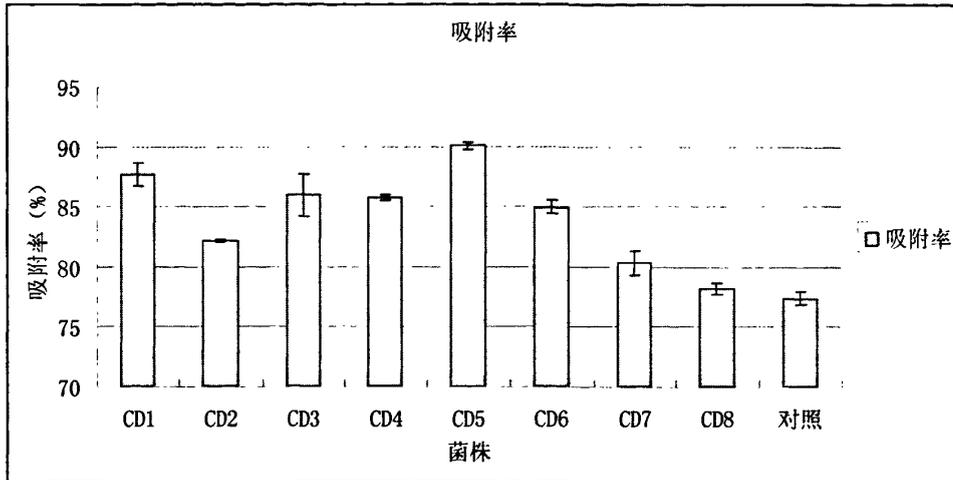


图 3-8

耐 Cd²⁺ 菌株的吸附总量Fig 3-8 Total adsorption of Cd²⁺ for different Cd²⁺ resistant bacteria图 3-9 耐 Cd²⁺ 菌株的吸附量Fig 3-9 Adsorption of Cd²⁺ for different Cd²⁺ resistant bacteria

图 3-10 耐 Cd²⁺ 菌株的吸附率Fig 3-10 Adsorption rate of different Cd²⁺ resistant bacterium

3.1.6 菌株对其他金属的最大耐受浓度 (MTC) 测定

对于一个细菌重金属耐受能力的测定,目前有两种方法:一种是测定细菌的最小抑制生长浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC),金属离子超过了 MIC 值,细菌的生长将被抑制。另外一种方法是测定细菌的最大耐受浓度 (Maximal tolerant concentration, MTC) 指细菌在这个浓度下培养 4 天后仍然能观察到生长。本实验采用 MTC 值来评价细菌细胞的重金属抗性能力。

筛选出的耐 Cd²⁺ 细菌除了对 Cd²⁺ 有高耐受性外,对其他的几种二价的重金属离子也表现出了较大的耐受性,结果见表 3-11。

表 3-11 菌株的 MTC 值

	Pb ²⁺ (mg/L)	Zn ²⁺ (mg/L)	Cu ²⁺ (mg/L)	Ni ²⁺ (mg/L)	Mn ²⁺ (mg/L)
CD1	150	200	200	100	150
CD2	200	150	200	150	200
CD3	100	200	300	150	200
CD4	200	150	250	100	200
CD5	200	150	200	150	250
CD6	150	200	200	150	150
CD7	200	200	250	150	200
CD8	150	200	300	150	250

3.1.7 耐 Cd^{2+} 菌株的质粒提取和初步酶切鉴定

3.1.7.1 耐 Cd^{2+} 菌株的质粒提取

用质粒 DNA 小量制备试剂盒对 CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8 进行质粒提取。提取结果凝胶电泳检测如图 (3-12) 所示, 通过与 Marker 比对, 大小在 23Kb 左右。初步判定在 8 株菌株中均提取到了质粒。

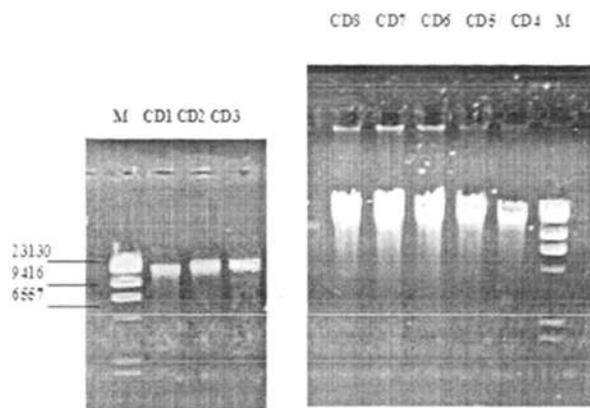


图 3-12 质粒电泳图

Fig3-12 Plasmid of Cd^{2+} resistant bacterium

3.1.7.2 质粒酶切反应

为确定质粒的酶切位点和进一步鉴定研究, 对所提取的质粒分别进行了 BamH I 酶、EcorR I 酶、HindIII 酶、Xho I 酶、Bgl II 酶、Mob I 酶的酶切反应。结果如图 (3-13, 3-14), 并没酶切出线性的 DNA 片段, 而切成弥散状。

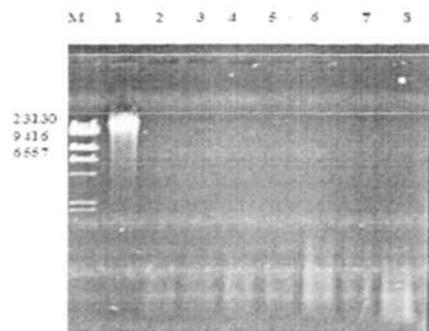


图 3-13 质粒的酶切鉴定

Fig3-13 Restriction of plasmid

其中 1 为未酶切的质粒, 2-8 为 Mob I 酶切后的质粒

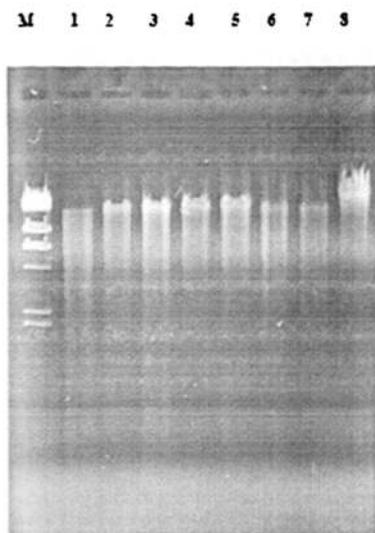


图 3-14 质粒酶切鉴定

Fig3-14 Restriction of plasmid

其中 1-7 为 BamH I、EcorR I、HindIII、Xho I、Bgl II 酶切后的质粒，9 为未酶切的质粒

3.1.8 耐 Cd^{2+} 菌株的质粒消除

经过夜培养，在最高 SDS 浓度 2.0% 的 LB 液体培养基中菌株仍生长，此时由于高浓度 SDS 的作用菌液已经呈粘稠状。取菌液做适当稀释，涂布在 200mg/L Cd^{2+} LB 平板上过夜培养，仍有菌落长出。出现此种现象产生的可能性是由于检验菌株是否还具有的耐 Cd^{2+} 能力的 Cd^{2+} 浓度选择不合理；或是由于细菌的基因组上也存在耐 Cd^{2+} 的抗性基因；或者是质粒并没有消除成功，SDS 方法消除也存在一定的失败率。具体原因的确定，尚需要进一步的实验。

3.2 讨论

绘制了两条生长曲线，分别 LB 液体培养基中未加入 Cd^{2+} 的生长曲线和加入 25mg/L 的 Cd^{2+} 的生长曲线。虽然是同一种菌株，但是却表现了不同的生长状态。在无 Cd^{2+} 条件下，培养 14h 后进入稳定期，18h 时 OD600 值达到了最大 5.16。菌体的在有少量 Cd^{2+} 的作用下，培养 10h 后进入稳定期，14h 时 OD600 达到最大 5.58。实验表明在存在一定量重金属 Cd^{2+} 的条件下，对细菌的生长是有一定的促进作用的。在平时的实验过程中也发现，菌株在无 Cd^{2+} LB 固体平板上的生在明显慢于在含有 Cd^{2+} 100mg/L 的 LB 固体平板上的生长。

Cd^{2+} 耐受菌株对 Cd^{2+} 的吸附测定只进行了一次测定, 结果存在很大的偶然性, 误差比较大, 需要对菌株的 Cd^{2+} 吸附能力多次重复测定, 尤其是吸附量高于对照菌的 CD1、CD3、CD4、CD5。此外在测量菌体干重的试验中, 由于干重质量相当小, 而且转移菌体的时候由于操作繁琐, 反复测量干重时的操作等, 也会造成不可忽视的操作误差。

在对 Cd^{2+} 的耐受角度看, CD8 的 Cd^{2+} 耐受浓度很高, 达到 1500mg/L, 但 CD8 对 Cd^{2+} 吸附率却只有 78%仅高对照菌一个百分点。远远低于 CD5 对 Cd^{2+} 90%的吸附率。由此可以看出, 细菌对 Cd^{2+} 的耐受与吸附是通过不同的途径来实现的, 高耐受的细菌不一定高吸附。因此, 在今后的筛选工作中, 不能轻易放弃耐受浓度不是特别突出的菌株。有可能会遗漏到具有良好吸附性能的菌株。在吸附能力测定里的对照菌也具有好的吸附能力, 对 Cd^{2+} 的吸附率为 77%, 此对照菌购自微生物菌种保藏中心, 是来源于土壤中的蜡状芽孢杆菌。曾有文献表明蜡状芽孢杆菌对重金属有一定的耐受和吸附能力, 而且土壤中广泛存在着重金属离子, 因此可以在后续工作中, 可以对对照菌的耐受能力的测定, 看是否也能对重金属有一定的耐受能力。

在对其他金属的最大耐受浓度 (MTC) 的测定结果中发现, 菌株对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 都有一定的耐受能力, 但是普遍不高。最高的是 CD3 和 CD8 对铜的最大耐受浓度为 300mg/L。我们知道 Cd^{2+} 是比 Cu^{2+} 毒性强很多的重金属离子, 但菌株对 Cd^{2+} 的耐受能力却能够达到 800~1500mg/L。这可能是由于某些菌株对金属离子的耐受和富集是有特异性的, 也曾见文献上有过类似的报道。但是准确的原因还需要后续工作的鉴定。后续工作中可以对不同金属的吸附能力做测定, 看菌株是否对 Cd^{2+} 有吸附的特异性。

在对耐 Cd^{2+} 质粒的提取和初步的酶切鉴定实验中, 通过质粒 DNA 试剂盒提取到了质粒, 电泳条带在 23Kb 左右。试通过酶切来确定其大小和酶切位点, 但是 6 种酶切结果都不理想, 酶切后电泳结果均为弥散状。分析原因, 可能是由于所提质粒比较大, 酶切位点多, 而造成此种现象。但是原因并不十分明确, 后续工作的重点需要放在质粒的鉴定上。希望能通过更多查阅文献, 借鉴其他工作者的研究工作, 来解决这个问题。

在质粒的消除实验中, 所选用的 SDS 浓度达到 2%, 培养的菌液已经呈现粘稠状。但是菌株在 Cd^{2+} 浓度为 200mg/L 的 LB 固体培养基上仍然生长。质粒消除结果并不理想, 但是也不排除细菌的基因组 DNA 中也具有抗性基因。接下来的工作中, 可以提高重金属平板的浓度看是否是由于重金属浓度低而没有达到抑制作用。同时可以采用其他方法来消除质粒, 如选用吡啶黄、吡啶橙、溴化乙锭等作为质粒消除剂。

结论

本文是在寻求更有效的生物吸附剂来治理环境中的重金属污染的大背景下,从西昌某矿区土壤中分离出耐 Cd^{2+} 菌株,经梯度浓度平板分离、划线分离纯化,浓度梯度筛选,获得了能够在 Cd^{2+} 浓度为 $800\sim 1500\text{mg/L}$ 的固体 LB 培养基上生长,同时能在 400mg/L 以上的液体 LB 培养基上生长的 8 株菌株。利用生理生化实验和 16SrDNA 鉴定其种属。利用比浊法测定在含 Cd^{2+} 和不含 Cd^{2+} 条件下的生长曲线。测定了菌株对不同金属离子 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 的最大耐受浓度 (MTC)。提取 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的质粒 DNA 并对质粒 DNA 进行 BamH I 酶、EcorR I 酶、HindIII 酶、Xho I 酶、Bgl II 酶、Mob I 酶切鉴定。结论如下:

1. 从西昌矿区的土壤中筛选得到 8 株高耐 Cd^{2+} 的菌株,在固体 LB 培养基中耐 Cd^{2+} 浓度为 $800\sim 1500\text{mg/L}$,液体培养基中耐 Cd^{2+} 浓度在 400mg/L 以上。
2. 进行生理生化实验,16SrDNA 鉴定,菌株初确定为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。
3. 细菌在无 Cd^{2+} 条件下培养 14h 进入稳定期。有 Cd^{2+} 条件下培养 10h 进入稳定期。一定浓度的 Cd^{2+} 会促进细菌的生长。
4. 9 株菌株对 Cd^{2+} 的吸附率由高到底分别是 CD5、CD1、CD3、CD4、CD6、CD2、CD7、CD8、对照。吸附重量最高的是 CD5,有 2.70mg 。吸附量最高的是 CD7, 66.67mg/g 。对照菌的吸附重量,吸附量和吸附率均为最低。
5. 菌株对 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 都有一定的耐受性,但都低于对 Cd^{2+} 的耐受性。
6. 用小量质粒 DNA 试剂盒提取到了质粒,电泳条带在 23KB 左右。

综述

生物吸附剂在环境重金属生物修复中的研究进展

研究生：黄晓蕊

指导老师：茆灿泉

摘 要 生物修复是一项用于治理重金属污染的有效技术。目前发现的能结合重金属的生物材料有细菌、真菌、藻类和工农业废弃物等。本篇文章从生物吸附剂的种类、吸附能力、生物吸附剂的改良等方面进行综述，并评价了生物修复技术存在的问题以及未来的发展方向。

关键词 生物修复；生物吸附剂；重金属

Abstract Bioremediation is a technique that can be used for the removal of heavy metals from environment. At present, a variety of biomaterials are known to bind heavy metals, including those raw materials from bacteria, fungi, algae, and industrial and agricultural wastes. In this review, the types and modification of biosorbents, as well as the biosorption abilities towards heavy metals are emphasized. In the end, the article reviews the present problems of biosorption and hopes to provide insights into this research frontier.

Keywords biosorption; biosorbent; heavy metal

前言：

重金属元素污染是一个世界普遍存在的环境问题。作为环境主要有毒污染物，随着采矿、冶金、电子、化工等行业的快速发展，问题日趋严重。与可降解有机物不同，重金属不能被降解，只能通过转移(迁移)来实现修复。有效降低或减少有害重金属的含量，改善环境质量，对于保护生态，增强人类健康，实现可持续资源利用和发展都具有重要的意义。

环境重金属污染的修复按方法可以分为物理、化学方法和生物修复(bioremediation)两大类：前者作为传统的方法，主要包括沉淀、凝聚、离子交换、电化学、吸附，膜分离等^[1]，它们各有特点，其中活性炭吸附是比较经典的方法，对特定金属离子的吸附可以达到 99%。但是该方法存在消耗很高、一般不能循环使用而容易造成二次污染、费用高、效率低、吸附的重金属不能回收再利用等不足；后者包括植物、微生物等生物资源为基础的方法，生物修复相对于传统技术的突出优点是环境友好（不产生二次污染）、高效、低成本，可以直接在被污染场所原位处理。生物技术和相关领域的飞速发展环境重金属的生物修复提供了大量新的思路和途径，正越来越被大家关注和重

视。

1. 生物修复及特点

1. 1 生物修复方法:

按生物资源的不同,生物修复可分为植物(Phytoremediation)、微生物(microbioremediation)和植物-微生物联合修复等;按重金属的主动吸收和被动吸附作用,又可分为生物累积(bioaccumulation)和生物吸附(biosorption)等方法。生物累积是活细胞的现象,而生物吸附则是利用死细胞。前者伴随着细胞的新陈代谢,将有毒物质通过细胞膜,运送到细胞内积累^[2]。而生物吸附则是死亡细胞或不具活性的生物质对有毒物质的被动吸收。吸附过程是独立于细胞的新陈代谢进行的,不同的生物种类吸附机理也有所差异。

1. 2 特点与比较:

生物吸附与生物积累的比较见表1。总的来说,活细胞吸附在处理毒性过大的污染或需要连续处理上是具有局限性的。一旦毒物浓度过高或生物吸附处理时间过长,细胞对有毒物质的积累将达到饱和。除此之外,在治理过程中也可能造成细胞的新陈代谢中断,导致细胞死亡。而利用死细胞的生物吸附则会避免以上情况的发生;而且治理过程对环境条件和污染程度的选择也是很灵活的。鉴于生物吸附的众多优点,本文重点对生物吸附中的关键要素-生物吸附剂(bioadsorbent)在环境重金属污染生物修复中的应用展开综述。

表1: 表生物吸附和生物积累的特性比较

Tab.1 Comparison of the features of biosorption and bioaccumulation

因素	生物吸附	生物积累
费用	低,材料来源于工业、农业等生物废弃物,费用主要是运输费和简单的处理费用。	高,维持细胞活性的费用较高。
pH	影响吸附能力,但生物吸附适用的pH范围较广。	影响吸附率,活细胞在极端pH下很难存活。
温度	对吸附剂少有影响,反而,温度越高,吸附能力越强。	温度严重影响这一过程。
维护/储存	储存、使用方便。	需要培养基维持细胞的新陈代谢。
选择性	选择性差,但可以通过改造,获得选择性。	比生物吸附要好。
吸收率	高,一些生物材料吸附的有毒物质接近其干重。	活细胞对毒性物质比较敏感,吸附率通常不高。
吸收速度	通常很快。	较生物吸附慢。

耐受性	在合适的条件下很高。	取决于污染物的毒性。
循环利用	大多可以循环利用。	毒物一般积累在细胞内，再利用较困难。
金属获得	可望重新利用。	很难重新获得。

2. 生物吸附剂的定义及分类

用于环境污染物处理的生物吸附剂是指某些具有吸附包含重金属污染在内的无机、有机等各种污染物的生物体及其人工制备的衍生物。其材料主要来源于细菌、真菌、藻类、工农业废料等物质。总的来说，各种生物材料对重金属离子均具有一定的吸附作用，其中表现出极强的金属吸附能力的细菌有芽孢杆菌、假单胞菌和链霉菌，主要的真菌类吸附剂有曲霉、根霉和青霉^[1]等。这些微生物原料广泛应用在食品和药品生产过程中，可在工业废料中较低的价格获得。海藻在生物修复方面的应用也越来越受到大家的关注，其中褐色海藻是极好的生物吸附剂。海藻对重金属的高吸附能力是由于其细胞壁上有以胶态形式存在的海藻酸盐，海藻酸盐对重金属有很强的吸附能力，并且，其宏观的结构也为吸附剂颗粒的制备提供了便利基础^[3]。对海藻的研究很多，其中有代表性的是 Davish 和 Volesky 的工作，其研究发现马尾海藻是极好的吸附剂材料，并对吸附机制进行了研究。

近年来，随着研究和应用的不断深入，人们在工农业废弃物中寻求到了更多低廉的新型吸附剂。如蟹壳、活性淤泥、稻壳、鸡蛋壳、泥炭苔、咖啡壳、橘子皮、豆渣（详见表 2）等对重金属都有一定的吸附能力。最新研究表明蟹壳具有很强的 As、Cr、Cu、Co、Ni、Zn 的吸附能力^[4]。目前已经发现的生物吸附剂有数百种之多。但目前国内外的研究重点依旧集中在微生物和藻类上。

表 2: 表文献中报道的吸附剂的吸附能力

Tab 2. Adsorption capacity (mg/g) of some adsorbents reported in literature

生物吸附剂	重金属离子	吸附率(%)	吸附能力(mg/g)	参考文献
螃蟹壳	Zn ²⁺		141.3	Shuguang and Stuart (2007)
小麦秸秆	Cr ²⁺		21.0	Chojnacka (2006)
小麦麸皮	Cd ²⁺		54.58	Nouri and Hamdaoui (2007)
木瓜木纤维	Cd ²⁺	94.6		Asma Saeed (2005)
柑橘果皮	Pb ³⁺		112.1	Flavio A.Pavan (2008)
山核桃果壳	Mn ²⁺		1.78 (mmol/g)	Julio C.P. et al.(2009) ^[5]
豆渣	Cd ²⁺	96.0	19.61	李莲, 等(2008)

3. 生物吸附剂的吸附机理

3. 1 生物吸附剂发展

早在1980年人们就发现有一些微生物可以积累金属离子。最初人们都认为金属的累积与微生物细胞代谢活动以及食物链积累的结果相关。但是,随着进一步的研究表明,非活性物质或死细胞也可以通过各种理化机制被动的结合金属离子。根据这项新的发现,对生物吸收的研究越来越活跃,有更多的生物材料被用于去除重金属。研究表明生物吸附不但取决于生物类型及化学成分,也与外部的物化因素和溶液的化学性质相关。不少学者对生物积累金属的机理行了研究,如离子交换,表面络合,吸附,静电吸附,螯合作用,微量沉淀等。

表3总结了一些利用微生物作为生物材料进行金属吸附的研究成果^[6]。由于不同系统采用的实验条件不同(pH值,温度,平衡时间和生物量),因此实验数据不可以做直接比较。但是,从表4提供的基本资料可以看出,使用细菌生物量来吸收金属离子是可行的。此外,应该指出,表3中生物吸附研究是针对非活性或死细菌生物量的生物吸附来进行的。

表3: 表不同细菌对金属的吸附情况

Tab3.Important results from the literature on metal biosorption by various bacterial species

重金属离子	生物类型	操作环境			吸收 (mg/g)	参考文献
		pH	温度 (°C)	生物量 (g/l)		
Cr ⁶⁺	<i>Aeromonas caviae</i>	2.5	20	0.5	284.4 (L)	Loukidou et al., 2004
	<i>Bacillus licheniformis</i>	2.5	50	1	69.4(L)	Zhou et al., 2007
Cu ²⁺	<i>Enterobacter sp. J1</i>	5.0	25	NA	32.5 (L)	Lu et al., 2006
	<i>Pseudomonas putida</i>	5.5	30	1	96.9 (L)	Uslu and Tanyol, 2006
Cd ²⁺	<i>Pseudomonas sp.</i>	7.0	NA	1	278.0 (L)	Ziagova et al., 2007
	<i>Enterobacter sp. J1</i>	6.0	25	NA	46.2 (L)	Lu et al., 2006
Pb ²⁺	<i>Pseudomonas putida</i>	5.5	25	1	270.4 (L)	Uslu and Tanyol, 2006
	<i>Enterobacter sp. J1</i>	5.0	25	NA	50.9 (L)	Lu et al., 2006
Hg ²⁺	<i>Bacillus sp.</i>	6	25	2	7.9 (L)	Green-Ruiz, 2006
Ni ²⁺	<i>Bacillus thuringiensis</i>	6	35	1	45.9 (L)	Öztürk, 2007
	<i>Streptomyces rimosus</i>	6.5	NA	3	32.6 (L)	Selatnia et al., 2004
Zn ²⁺	<i>Pseudomonas putida</i>	5.0	30	1	17.7 (L)	Chen et al., 2005

CZ1

Thiobacillus ferrooxidans	6.0	40	300	172.4 (L)	Lu et al., 2006
------------------------------	-----	----	-----	-----------	-----------------

NA = 不详

3. 2 生物吸附剂的修复机理

生物吸附是指固定相（生物吸附剂）与液相（溶剂，水）之间发生的传质过程。对于吸附过程不需要消耗能量的被动吸附模式，主要是通过官能团和重金属离子之间的范德华力、静电作用、毛细力等进行吸附。而主动的吸附过程则需要消耗能量，往往伴随着活细胞的新陈代谢过程。不同生物吸附材料，吸附的机理不同。

对于微生物类的生物吸附剂，重金属离子结合到细胞表面是快速的不可逆过程。由于重金属离子的种类不同及环境差异，与细胞表面结合的物理化学机制也有不同。但总的来说是通过静电作用、范德华力、共价键、氧化还原反应、无机微沉淀等方式与细胞表面结合。有研究表明，海洋细菌SG-1从含有混合重金属离子的废水中吸附 Cu^{2+} ，就是通过被动吸附的方式实现^[7]。除不可逆的重金属表面吸附外，一些细菌细胞可以将重金属积累到细胞内。这一过程是通过特殊的转运系统，伴随细胞代谢过程进行。重金属的细胞内积累过程相对于吸附过程要缓慢。在一些种类的微生物中，表面吸附和胞内积累会同时发生。例如在对假单胞菌的研究当中发现， Cu^{2+} 最初与细菌发生细胞外吸附反应，然后通过细胞壁与 Ca^{2+} ， Mg^{2+} 进行离子交换，最后在细胞内积累。

3. 3 影响因素

生物吸附重金属受到许多因素的影响，包括生物材料的种类、物理化学和一些环境因素等。如 pH、 Na^{2+} ， Ca^{2+} ， Mg^{2+} 浓度、温度、溶解氧、表面活性剂、共存离子等^[8]。作为螯合剂的有机和无机配位体对吸附过程也会造成影响，后者可与生物竞争与重金属结合，一旦重金属与螯合剂结合，将难以被生物吸附剂有效吸附。

在多离子吸附过程中除了以上影响因素外，多组分金属的组成，离子浓度也影响重金属的生物吸附，特别是多组分金属的组成在很大程度上决定了多组分金属离子共存对吸附的影响。由于各组分金属离子半径不同，导致电负性存在着差异，从而使不同组合的重金属有着不同的吸附结果。用酵母菌吸附重金属离子时， Zn^{2+} 对于 Cd^{2+} 吸附无影响，而用真菌吸附重金属离子时， Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 对 Cd^{2+} 吸附则起遏制作用。Liu等实验表明，当Am与 Au^{3+} 、 Ag^+ 共存时，啤酒酵母S.cerevisiae对Am吸附能力并不受 Au^{3+} 、 Ag^+ 的干扰。

4 生物吸附剂的制备

近年来，大家把研究的目光都集中在提高生物材料的吸附能力上。一些生物材料，来源于某些环节的工业废物，生物吸附能力并不是很高。由于吸附作用多是发生在生

物质的细胞表面,因此增加或活化细胞表面的结合位点将是提高吸附能力的有效途径。

4. 1 化学改性的生物吸附剂

化学修饰一般有预处理、结合位点的增强、修饰和聚合。常用的化学预处理方法包括酸、碱、乙醇、丙酮处理等。化学预处理的成功很大程度上取决于生物细胞表面的组成成分。研究表明,酸处理已在某些生物吸附剂上取得成功。Sar 等用 NaOH、NH₄OH 或甲苯对冻干的假单胞菌细胞进行预处理,可提高其对 Cu²⁺、Ni²⁺的吸附能力,但高温、高压、酸、丙酮及去污剂却会抑制该菌的吸附作用。尽管这些化学预处理对生物吸附剂,尤其是工业废料是必不可少的,但对吸附剂的吸附能力的改进方面还是有局限性的。

对生物材料中的结合位点进行扩增和修饰能通过结构上的多倍折叠来提高吸附能力。-COOH、NH₂-、PO₄³⁻、SO₃²⁻、-OH等是金属离子的重要结合位点,但由于细胞表面上这些基团密度低,使得大多数的生物吸附剂吸附效率不高。有很多方法可以增加细胞表面的功能团。可以通过化学处理方法使非功能基团或低活性基团转化为活性结合基团。Jeon和Holl用氯乙酸在羟基的位点引入羧基代替,然后羧基化的生物材料用乙二胺和碳二亚胺处理后形成胺基生物,胺基团的增加使该生物材料对Hg²⁺的吸收增加了47%。Li 等利用柠檬酸去修饰碱性皂化的生物材料,在用0.6mol/L的柠檬酸,80℃条件下处理生物材料2h后,其对Cd的吸收率提高两倍^[9]。但是许多研究都集中于提高活性结合位点方面,较少注意如何抑制某些抑制位点。

另一个把官能团引入到细胞表面的有效方法是直接在细胞表面通过接枝或聚合单体成长链聚合物。这方面的研究相对较少。Deng和Ting将聚乙烯亚胺交联到生物材料表面时,提高了对Cr⁶⁺、Cu²⁺、Ni²⁺和As³⁺的吸附能力;而通过共聚丙烯酸到生物表面来增加羧基,可使生物材料吸附对Cu²⁺和Cd²⁺的吸附能力提高5-7倍;由均苯四甲酸二酐和硫脲反应得到的聚酰胺酸,包括大量的羧基和亚氨基,当接枝到生物材料表面后使其对Cd²⁺和Pb²⁺吸附分别提高15-11倍。

4. 2 基因工程改造生物吸附剂

通过基因工程技术的生物改造,可增强生物体的重金属螯合能力,金属特异性和环境适应性更好。遗传修饰可以提高金属的特异选择性和生物细胞表面的积累作用。

高等生物体内存在多种重金属离子高亲和力的多肽或蛋白质,如谷胱甘肽(GSH)、植物螯合素(PCs)、金属硫蛋白(MTs)等,其可以非生物活性形式来结合或隔离重金属离子。MTs的超表达可提高细菌对重金属离子的积累能力。Sousa 等将MTs插入到LamB序列的153位点而在细菌表面展示表达。杂交蛋白在细胞表面的表达,大大增加了整个细胞对Cd的积累能力。细胞表面蛋白的表达可以取代亲和性吸附剂,而且价格更便宜。

在Bac的研究中也提出用与MTs同样的方式来利用PCs。PCs较短,富含半胱氨酸的

多肽，一般结构为(γ Glu-Cys) $_n$ Gly ($n = 2-11$)。PCs 由于其具有重复的 γ Glu-Cys 的特殊结构，因此相对与MTs 具有很多优势。一个典型的例子是一段具有重复(Glu-Cys) $_n$ Gly 的金属结合基序。这些多肽会表达PCs 类似结构，不同的是谷氨酸和半胱氨酸肽之间是一个标准的 α 肽键。细菌通过表面展示PCs 类似物，使其对Cd和Hg的积累能力分别提高了12和20倍。尽管如此，Pcs在生物体上的高表达还需要对生物体中的合成和肽链的延伸所涉及到的机制深入的研究。

除了以上利于生物体已有的金属亲和多肽及类似物以外，通过高通量的生物文库的构建和筛选获得高亲和力的重金属结合肽是目前国际该领域的前沿和热点^[10]。我们实验室在国家自然科学基金和国家863等研究项目的支持下，已构建和筛选了多个文库，并获得了数十条高亲和力或专一性的Cd等重金属的结合肽，相关工程菌的构建和微生物展示吸附剂的研究仍在进行中^[11]。作为生物吸附剂的重要载体，微生物尤其是单细胞吸附剂更为人们青睐：这不仅因为单细胞微生物如大肠杆菌、酵母等大大方便基因工程实验，而且每单位生物量可提供更多的细胞表面积，可以较大地提高环境重金属的去除率。

4. 3 复合型生物吸附剂

由于单种生物吸附剂在吸附过程中常常存在一些不足，因此将其与另外的生物吸附剂或有吸附性的无机材料通过物理化学方式结合起来。可使得在实际应用中更加便利，价格也更低廉。

甲壳质自然界来源广泛，壳聚糖是甲壳质乙酰化的产物，由氨基-D-葡萄糖和N-乙酰基-D-葡萄糖胺单体通过 β -1, 4-糖苷键连接形成。由于分子中游离的氨基和羟基，可以和许多种金属生成稳定的螯合物，因此被广泛应用在金属离子的去除中，并且具有无毒可降解等优点。但由于壳聚糖机械强度不高，易酸性水解等限制，常将其与一些本身具有较好吸附性能的无机物质如粘土、硅酸盐等经过物理或化学作用结合形成壳聚糖包被(chitosan-coated)的复合型材料，有效解决了上述问题。

Veera M(2007)将壳聚糖用浸涂法包被在陶瓷氧化铝的表面，形成一种新型的生物吸附剂CCB，对 As^{3+} 和 As^{5+} 的吸附量分别达到56.50和96.46 mg/g^[12]。任月明用交联剂将壳聚糖和磁粉(Fe^3O^4)交联在废丝体的表面，合成了具有磁性的生物吸附剂，对 Cu^{2+} 的吸附容量提高2.26倍，去除率提高3.66倍，同时提高了机械强度。由于纳米磁粉(Fe^3O^4)的交联，也可以用磁离法更加方便快速的回收^[13]。Copello et al(2008)以硅酸盐和壳聚糖制成层层自组装的复合物吸附剂，用于Cd、Cr的吸附，研究结果显示：壳聚糖在硅酸盐层间的固定并不会使壳聚糖吸附能力下降；由于有硅酸盐层作为载体，壳聚糖吸附剂在吸附重金属之后可以轻易地取出，回收方法极为方便^[14]。

4. 4 混合型生物吸附剂 (Hybrid biosorbent)

微生物类的生物吸附剂在实验研究中表现出了很好的吸附重金属的能力，但是

在商业应用上却具有一定的局限性。这是由于微生物类的生物材料在物理结构上存在颗粒小、浓度低、机械力差、刚直性低、固液分离难等问题。相反,一些农业植物废弃材料,如椰子纤维、黑鹰嘴豆壳、木瓜木的纤维结构、稻壳等虽不存在以上的问题,但普遍重金属吸附能力较低。为了解决两种吸附剂各自存在的问题,设计出一种新的方法,即将上述两种吸附剂用一种简单的技术固定起来,取长补短,成为一种混合型吸附剂。目前对混合型吸附剂的研究有许多报道, Muhammad将黄孢亮毛伏革菌和从木瓜木上提取的纤维状网络结构结合起来,使得对 Cd^{2+} 的吸附能力分别是提高了1和7倍。平衡时间也有所提高,88%的 Cd^{2+} 吸附在30min内完成,而且在对 Cd^{2+} 的回收提供了更大的便利^[15]。

5.0 结论

生物修复技术在处理重金属污染方面的优势已经受到广泛的关注,目前发现的可用于吸附有毒性重金属的生物吸附剂也有几百种,但总体而言仍处于实验室的研究阶段。要想尽快推动工业化进程的发展,有待于技术的进一步成熟和创新。

在微生物吸附剂方面,微生物的回收和吸附选择性差的问题会阻碍其在环境中的应用。不仅需要筛选和获得高吸附能力,并且兼具吸附选择性的菌株。通过化学和遗传学方法提高微生物的吸附选择性、吸附率以及最大吸附条件(pH, 温度, 离子强度等)的优化。此外,生物修复与化学修复的联合应用、新的生物吸附材料开发等方面也有很大的发展空间。

虽然目前并没有有效的生物吸附方法可以取代常规治理方法,但是除去价格低廉的优点外,许多生物吸附剂的使用效果远远好于常规处理方法,相信,随着生命科学的飞速发展和在生物材料、生物化工等领域的研究深入以及生物吸附全过程及控制器的系统研究,基于生物吸附剂的环境重金属污染生物修复技术最终将取得重大的进展和有效利用。

参考文献:

- [1] Katarzyna Chojnacka. Biosorption and bioaccumulation- the prospects for practical applications[J]. Environment international, 2010,36(3):299-307.
- [2] Anushree Malik. Metal bioremediation through growing cells[J]. Environment International 2004,30(2):261-297.
- [3] Gülay Bayramoglu, M.Yakup Arica. Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies[J]. Bi oresource Technology 2009,100(1):186-193.
- [4] Shuguang Lu, Stuart W.Gibb, Emma Cochrane. Effective removal of zinc ions from aqueous solutions using crab carapace biosorbent[J]. Journal of Hazardous Materi

-
- als, 2007,149(1):208-217.
- [5] Julio C.P. et al. Pecan nutshell as biosorbent to remove Cu(II), Mn(II) and Pb(I) from aqueous solutions. *Hazardous Materials*. 2009,162(1):270-280.
- [6] Wei-Bin Lu, Jun-Ji Shi et al. Biosorption of lead,copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance[J]. *Journal of Hazardous Materials* 2006,134(1-3):80-86.
- [7] L.M. HE, B.M. Tebo. Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus* sp. Strain SG-1, *Appl. Environ. Microbiol* 1998,64:1123-1129.
- [8] Sarabjeet Singh Ahluwalia, Dinesh Goyal. Microbial and plant derived biomass for removal of heavymetals from wastewater. *Bioresource Technology* 2007,98(12):2243-2257.
- [9] Xiaomin Li, Yanru Tang et al. Study on the preparation of orange peel cellulose adsorbents and biosorption of Cd^{2+} from aqueous solution[J]. *Separation and Purification Technology*. 2007,55(1):69-75.
- [10] 郭虹光, 吴海江, 茆灿泉. 蛋白骨架在随机肽库构建及靶分子筛选中的应用[J]. *中国生物工程杂志* 2009,29(9):75-80, 通讯作者.
- [11] 易卓林, 佟鑫, 马春燕, 黄敬双, 茆灿泉. Ni^{2+} 高效结合肽的筛选与作用研究[J]. *微生物学报* 2006,46(5):745-748, 通讯作者.
- [12] Veera M. Boddu et al. Removal of arsenic (III) and arsenic (V) from aqueous medium using chitosancoated biosorbent. *Water Research* 2008 42(3):633-642.
- [13] 任月明, 张密林, 玉萍. 磁性生物吸附剂的制备及其对 Cu^{2+} 的吸附[J]. *工业安全与环保*, 2007,33(11):27-29.
- [14] G.J.Copello, F.Varela et al. Immobilized chitosan as biosorbent for the removal of Cd(II),Cr(III) and Cr(VI) from aqueous solutions[J]. *Bioresource Technology* 2008,99(14):6538-6544.
- [15] Muhammad Iqbala, Asma Saeeda et al. Hybrid biosorbent: An innovative matrix to enhance the biosorption of Cd(II) from aqueous solution[J]. *Journal of Hazardous Materials Sep* 2007,148(1):47-55.
-

致谢

本课题是在恩师茆灿泉教授精心指导下完成的。茆老师治学严谨、学识渊博，和蔼可亲。衷心感激茆老师对我的悉心教诲和栽培，值此论文完成之际，谨对茆老师致以崇高的敬意和由衷的感谢。

感谢学校对我们生物科学与工程学院生物化学和分子生物学专业的硕士研究生给予的关怀和照顾，感谢学院给我们提供了良好的学习和科研工作环境，感谢学院的各位老师对我们的悉心栽培。

非常感谢江年、崔健、黄婷婷、陈颖等分子进化与应用生物学实验室的全体人员对我的帮助和支持。

最感谢我的父母对我二十几年来的抚育和培养使我能够站在这里进行我的硕士论文。

感谢所有支持和鼓励我的朋友们。

最后感谢论文评阅人和答辩委员会的专家在百忙之中给予我的宝贵的建议和指导。

本研究得到了茆灿泉教授主持的国家 863 项目(2006AA06Z353)的资助。

参考文献

- [1] Katarzyne Chojanacka. Biosorption and bioaccumulation the prospects for practical applications[J]. *Environment International*, 2010, 36(3): 399 - 307
- [2] M.X. Loukidou et al. Diffusion kinetic study of cadmium(II) biosorption by *Aeromonas caviae*[J]. *Chem Technol Biotechnol* 2004, 79(5): 711 - 719
- [3] 任继平, 李德发, 张丽英. 镉毒性研究进展[J]. *动物营养学报*. 2003, 15(1): 1 - 6
- [4] Sovet et al. Poisoning caused by powder used in the cleaning of Silver[J]. *Presse. Med* 1985 9: 69-70
- [5] Bohumil Volesky. Biosorption and me[J]. *Water Research* 2007, 41(18) : 4017 - 4029
- [6] 夏立江, 王宏康. 土壤污染及其防治[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2001
- [7] Sarabjeet Singh Ahluwalia, Dinesh Goyal., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater[J]. *Bioresource Technology* 2007, 98: 2243 - 2257
- [8] 华路, 陈承慈, 刘全义. 土壤污染的治理方法研究[J]. *农业工程学报* 1992 8: 90 - 99
- [9] O. Gyliene, O. Nivinskiene, I. Razmute, Copper(II)-EDTA sorption onto chitosan and its regeneration applying electrolysis[J]. *Journal of Hazardous Materials* 2006, 137(3): 1430 - 1437
- [10] W.W. Wenzel, et al., Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassicanapus L*) in outdoors pot and lysimeter experiments[J]. *Plant Soil* 200, 249: 83 - 96
- [11] S.P. Bizily, et al., Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants[J]. *Biotechnol* 2002, 18: 213 - 217
- [12] A.J.M. Baker, et al., Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils, in: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*[J]. *CRC Press* 2000, 30: 85 - 107
- [13] D.E. Crowley, et al. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants[J]. *Plant Soil* 1991, 130: 179 - 198
- [14] R.K. Mehra, et al., Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression[J]. *Cell Biochem* 1991, 14: 30 - 40
- [15] Sarabjeet Singh Ahluwalia Dinesh Goyal. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology* 2007 98(12): 2243 - 2257
- [16] Y. Fu and T. Viraraghavan, Column studies for biosorption of dyes from aqueous solutions on immobilized *Aspergillus niger* fungal biomass[J]. *Water SA* 2003, 29: 465 - 472
- [17] Padilha, F.P., de Franca, F.P., da Costa, A.C.A. The use of waste biomass of *Sargassum* sp. for the biosorption of copper from simulated semiconductor effluents[J]. *Bioresource*
-

Technology 2005 96:1511 - 1517

[18] 王建林等. 水稻根际中铁的形态转化[J]. 土壤学报, 1992, 29(4):358 - 363

[19] Tsezos, M., Volesky, B., Biosorption of uranium and thorium[J]. Biotechnology & Bioengineering 1981,23:583 - 604

[20] Pons, M.P., Fuste, C.M., Uranium uptake by immobilized cells of Pseudomonas strain EPS 5028[J] Applied Microbiology Biotechnology 1993,39:661 - 665

[21] Ozdemir, G., Ozturk, T., Ceyhan, N. et al., Heavy metal biosorption by biomass of Ochrobactrum anthropi producing exopolysaccharide in activated sludge[J]. Bioresource Technology 2003,90:71 - 74

[22] Blanco, A., Sanz, B., Llama, M.J. et al., Reutilization of nonviable biomass of P hormidium laminosum for metal biosorption[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry 1998,27:167 - 174

[23] Celaya, R.J., Noriega, J.A., Yeomans, J.H. et al. Biosorption of Zn(II) by Thiobacillus ferrooxidans[J]. Bioprocess Engineering 2000,22:539 - 542

[24] Plette, A.C.C., Benedetti, M.F., Riemsdijk, W.H., Competitive binding of protons, calcium, cadmium, and zinc to isolated cell walls of Gram-positive bacterium[J]. Environmental Science and Technology 1996,30:1902 - 1910

[25] Melo, J.S., D' Souza, S.F., Removal of chromium by mucilaginous seeds of Ocimum basilicum[J]. Bioresource Technology 2004,92:151 - 155

[26] Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Cadmium biosorption by Sphingomonas paucimobilis biomass[J]. Bioresource Technology 2002,8:103 - 105

[27] Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A., Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from Bacillus firmus[J]. Water Research 2003,17: 4231 - 4235

[28] Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W. et al. Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria[J]. Chemosphere 2002,48:427 - 435

[29] Nourbakhsh, M., Sag, Y., Ozer, D. et al. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium(VI) ions from industrial wastewater[J]. Process Biochemistry 1994, 29:1 - 5

[30] Aksu, Z., Sag, Y., Kutsal, T., The biosorption of copper(II) by C. vulgaris and Z. ramigera[J]. Environment Technology 1992,13:579 - 586

[31] Mattuschka, B., Straube, G. Biosorption of metals by waste biomass[J]. Journal of Chemical Technology Biotechnology 1993,58:57 - 63

[32] Friis, N., Myers-Keith, P., Biosorption of uranium and lead by Streptomyces

longwoodensis[J]. *Biotechnology & Bioengineering* 1986,28: 21 - 28

[33] Mameri, N., Boudries, N., Belhocine, D. et al. Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass[J]. *Water Research* 1999,33 (6):1347 - 1354

附录

附录 1 含不同量琼脂糖的凝胶的分离范围

凝胶中琼脂糖含量[% (W/V)]	线状DNA分子的有效分离范围(kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

附录 2 耐 Cd 菌株 16S rDNA 的克隆序列

菌株 CD1 16S rDNA 的克隆序列:

CACCTTGGCGGCAGGCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGC
TCTTCGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG
GGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGC
AGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
GTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT
TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACAGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCG
TAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAT
CCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGC
TCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAG
TGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
AAACTCAAATGAATTGAC

菌株 CD2 16S rDNA 的克隆序列:

CCCTGGCGGCTGCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGCTCTT
CGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG
ACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGCAGG
GGACCTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCT
TCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCT
GTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
TGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAA
AACTGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCAT
ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC
TCAAATGAATTGACAGC

菌株 CD316S rDNA 的克隆序列:

GGCCGCCAGGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAG
CTTGCTCTTCGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAG
AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGA
TGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAAT
ACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
CGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGT
GCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCT
GGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATT
TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG

TTAAAACTCAAATGAATTGAC

菌株 CD4 16S rDNA 的克隆序列:

TTGGGGCAGTCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGCTCTTCG
ATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAC
AACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGG
ACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC
ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC
GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGT
TTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTG
GTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAA
CTGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTCATAC
TGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGC
AGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTC
AAATGAATTGAC

菌株 CD516S rDNA 的克隆序列:

GGAAATGGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTT
GCTCTTCGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAG
TGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAA
AGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
AGGTCTTCGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATAC
CTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCG
CGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGC
ATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGG
GCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC

CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTA
GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA

菌株 CD6 16S rDNA 的克隆序列:

GGAAAAATGGGGGGGCCGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGA
GCTTGCTCTTCGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGG
TAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAG
AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAC TGGTCTGAGAGGA
TGATCAGTCACACTGGAAGT GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAAT
ACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCG
CGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATCCAAAAC TGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCT
GGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGAIT
TTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCG

菌株 CD7 16S rDNA 的克隆序列:

CACCTTGGCGGCAGGCTACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAGCTTGCT
CTTCGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG
GGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCA
GGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGG
TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGTAAC TGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAAGT GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATA
CCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGC
GCGTAGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA
TCCAAAAC TGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGC

GGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGG
CTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTA
GTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA

菌株 CD8 16S rDNA 的克隆序列:

GGCCGCCAGGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAGAAGAG
CTTGCTCTTCGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
AGTGGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAG
AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGA
TGATCAGTCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGTCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG
GTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT
TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC
GCCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCG
TAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
CCAAAAC TGGCGAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGG
ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC
TCAAATGAATTGAC

攻读硕士学位期间发表的学术论文

- [1]黄晓蕊, 茆灿泉. 生物吸附剂在环境重金属生物修复中的研究进展. 西南交通大学学报(增刊), 已接受。
-