基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0837-03

耐铬菌株 CQMUXH-1 耐受和还原 Cr(Ⅵ)的特性研究

白群华[1],肖 虹[1],贾 燕[1],张永光[2]

(1. 重庆医科大学公共卫生学院卫生检验教研室,重庆 400016;2. 2004 级预防医学本科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨菌株 CQMUXH-1 耐受和还原 Cr(Ⅵ)的特性。方法:实验室模拟含 Cr(Ⅵ)环境,于各种不同的条件下(反应时间、pH、温度、Cr(Ⅵ)浓度、其它污染物)培养细菌,测定细菌的生长量和(或)剩余 Cr(Ⅵ)浓度以评价菌株耐受和还原 Cr(Ⅵ)的能力。结果:菌株 CQMUXH-1 在 30℃振荡培养 5~20 h 为对数生长期;该菌株对 Cr(Ⅵ)的耐受能力明显高于对照菌大肠杆菌 DH5α;该菌株在恒温振荡培养(37℃,200 r/min)下,对 100 mg/L Cr(Ⅵ)的去除率为 84 h 73%;弱碱环境对 CQMUXH-1 的生长有较大影响,37℃培养能加快细菌的生长,Hg^{2+}、As^{3+} 能明显抑制、Cu^{2+} 能促进 CQMUXH-1 的生长。结论:菌株 CQMUXH-1 能耐受和还原较高浓度 Cr(Ⅵ),可有效应用于废水中 Cr(Ⅵ)污染的生物治理。

【关键词】六价铬;细菌;耐受;还原

【中国图书分类法分类号】Q93 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-14

Characteristics about tolerance and reduction of bacteria CQMUXH-1 to Hexavalent Chromium

BAI Qun-hua, et al

(*Department of Health Laboratory Science, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To research the characteristics about resistance and reduction on Cr(Ⅵ) of CQMUXH-1. *Methods*: Simulating the environment of Cr(Ⅵ) in the lab. Cultivating bacteria under different condition(reaction time, pH, temperature, Cr(Ⅵ) concentration, other pollutants) and determining the growth quantity of bacteria and(or) concentration of residual Cr(Ⅵ) to evaluate the ability for tolerating and reducing Cr(Ⅵ) of CQMUXH-1. *Results*: 5~20 h is the logarithmic growth phase of CQMUXH-1 when cultured in 30℃ and vibration conditions. The resistant ability to Cr(Ⅵ) of CQMUXH-1 is better than the *E. coli* DH5α control bacteria. The reduction rate of CQMUXH-1 to 100 mg/L Cr(Ⅵ) is 73% when cultured in 37℃, 200 r/min after 84 h. The weak base environment has bad effects to the growth of CQMUXH-1 and 37℃ can speed up its growth. Hg^{2+}, As^{3+} can obviously restrain the growth of CQMUXH-1 and Cu^{2+} can promote its growth. *Conclusion*: CQMUXH-1 has strong ability to resist and reduce Cr (Ⅵ), which can be effectively used in the bioremediation of waste water with Cr(Ⅵ) pollution.

【Key words】Bacteria; Cr(Ⅵ); Tolerance; Reduction

环境问题是人类生存与发展过程中所面临的重大问题。铬化物是重要的化工产品,被广泛的使用于电镀、制革、染料、胶片等行业中[1]。这些行业排放的含六价铬[Cr(Ⅵ)]废水废渣对环境造成的危害日益严重,Cr(Ⅵ)污染事故层出不穷。

本研究使用从 Cr(Ⅵ)污染环境中筛选获取的耐 Cr(Ⅵ)菌株 CQMUXH-1,实验室模拟含 Cr(Ⅵ)条件,初步探讨了菌株生长、菌株耐受和还原 Cr(Ⅵ)及某些环境因素对菌株生长的影响,为进一步从分子水平研究微生物除 Cr(Ⅵ)机制、构建高效工程菌及建立经济实用、解毒彻底的微生物除 Cr(Ⅵ)生产工艺打下基础。

作者介绍:白群华(1973-),女,讲师,硕士,研究方向:微生物治理环境污染。

通讯作者:肖 虹,女,副教授,E-mail:xhk20@163.com。

基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2007BB7271);重庆市教委科学技术研究项目(编号:KJ080317);重庆医科大学校校级科研课题(编号:XBYB2008065)。

1 材料和方法

1.1 菌种

耐 Cr 菌株 CQMUXH-1:从重庆亮滩河中游底泥及污水中分离培养,经逐步高浓度含 Cr(Ⅵ)LB 肉汤筛选,经革兰氏染色鉴定为革兰氏阴性杆菌。

1.2 生长曲线的测定——比浊法

取 CQMUXH-1 菌种接入 LB 肉汤中,30℃静止培养 18 h 为种子液。准确吸取 2 ml 种子液加入含 Cr(Ⅵ) 100 mg/L 的

LB 肉汤 100 ml 中,恒温振荡培养(30℃,200 r/min),分别按对应时间 0、2、4、6、8、10、12、16、20、34、42、60、84 h 取出菌液,以未接种的含 Cr(Ⅵ) 100 mg/L LB 肉汤为空白测 OD_{600} 值。

1.3 铬(Ⅵ)耐受实验

分别取 CQMUXH-1、对照菌大肠杆菌 DH5α 菌种接种于 LB 肉汤中,36℃静止培养 4~6 h 为种子液。分别接种 0.5×10^6 CFU/ml(0.5 麦氏比浊度后稀释 10 倍)种子液各 0.1 ml 于含 Cr(Ⅵ) 6 400、3 200、1 600、800、400、200、100、50、25、0 mg/L 的 LB 肉汤 2 ml 中。36℃静止培养 16~18 h。以未接种的 LB 肉汤为空白测定上述各 LB 肉汤在 750 nm 处的透光率。以 Cr(Ⅵ)浓度为分组因素,对实验结果进行配对 t 检验。

1.4 铬(Ⅵ)还原实验

接种 CQMUXH-1 种子液 2 ml(同 1.2)于含 Cr(Ⅵ) 100 mg/L 的 LB 肉汤中,恒温振荡培养(30℃,200 r/min),进行 Cr(Ⅵ)还原实验,测定不同时间(20、36、60、84 h)培养液中的 Cr(Ⅵ)浓度。

Cr(Ⅵ)的测定采用按照中华人民共和国国家标准 GB/T 7467-1987《水质六价铬的测定 - 二苯碳酰二肼分光光度法》。

1.5 外界因素对 CQMUXH-1 生长的影响

1.5.1 pH 值对 CQMUXH-1 生长的影响 用 HCl 溶液和 NaOH 溶液调节 LB 肉汤的 pH 值分别为 5.0、7.0、9.0,以模拟环境 pH 值,测定菌液 OD_{600} 值,绘制生长曲线。

1.5.2 温度对 CQMUXH-1 生长的影响 接种 CQMUXH-1 种子液于含 Cr(Ⅵ) LB 肉汤中,分别于恒温 30℃、37℃下振荡(200 r/min)培养,测定菌液 OD_{600} 值,绘制生长曲线。

1.5.3 其它物质对细菌生长的影响 在 Cr(Ⅵ)浓度为 100 mg/L 的 LB 肉汤 50 ml 中分别加入 50 mg/L 的 Pb^{2+}、Hg^{2+}、Cd^{2+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、F^-、As^{3+}、苯酚、氨基氮(NH_4^+)、亚硝酸盐氮(NO_2^-),同时每瓶接种 CQMUXH-1 种子液 1 ml,恒温振荡培养 16 h(37℃,200 r/min),测其 OD_{600} 值。

2 结 果

2.1 生长曲线

菌株 CQMUXH-1 在含 Cr(Ⅵ)100 mg/L 的 LB 肉汤中的 30℃生长曲线如图 1 所示。由生长曲线可见在含 Cr(Ⅵ) 100 mg/L 的 LB 液体培养基中,该菌在接种后有 5 h 的生长延滞期,5 h 以后为对数生长期,40 h 后为稳定期,60 h 左右达到峰值。

2.2 铬(Ⅵ)耐受实验

CQMUXH-1 和大肠 DH5α 的 Cr(Ⅵ)耐受实验结果如表 1 所示,配对 t 检验结果表明:试验组的细菌生长量明显高于对照组($P<0.05$),说明菌株 CQMUXH-1 对 Cr(Ⅵ)的耐受能力明显高于对照菌。

2.3 铬(Ⅵ)还原实验

30℃振荡培养条件下,菌株 CQMUXH-1 的 Cr(Ⅵ)还原效果如图 2 所示。从图 2 可知,随着培养时间的增加,Cr(Ⅵ)浓度下降,Cr(Ⅵ)去除率升高,培养 84 h Cr(Ⅵ)浓度由 100 mg/L 降至 27 mg/L,Cr(Ⅵ)去除率 73%。

2.4 外界因素对 CQMUXH-1 生长的影响

2.4.1 pH 值对 CQMUXH-1 生长的影响 见图 3。由图 3 可知,弱碱环境对 CQMUXH-1 的生长有较大影响,弱酸在生长前期会使生长较缓慢,后期几乎没有影响。

2.4.2 温度对 CQMUXH-1 生长的影响 见图 4。从图 4 可以看出,温度对 CQMUXH-1 的生长有一定影响,与 30℃相比,37℃能加快细菌的生长,提前达到生长高峰,同时细菌衰败得也快。

2.4.3 其它物质对细菌生长的影响 Cr(Ⅵ)污染的环境可能伴随工业和生活污染,本实验选定具有代表性的 10 种物质进行试验:Pb^{2+}、Hg^{2+}、Cd^{2+} 代表重金属污染;Cu^{2+}、Zn^{2+} 代表常见有益金属;F^-、As^{3+} 代表常见非金属污染;酚、氨基氮(NH_4^+)、亚硝酸盐氮(NO_2^-)代表有机污染。

由表 2 可见,除了 Hg^{2+}、As^{3+} 能明显抑制、Cu^{2+} 能促进 CQMUXH-1 的生长外,其它物质无明显的抑制或促进 CQ-

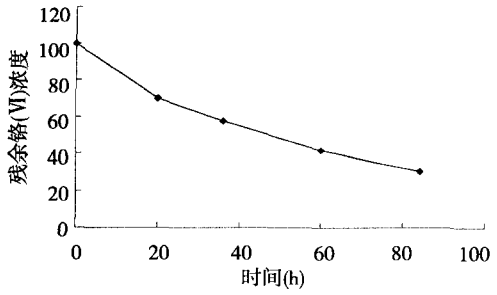


图 1 菌株 CQMUXH-1 的生长曲线

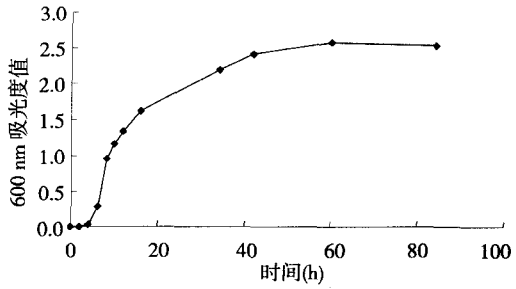


图 2 Cr(Ⅵ)还原实验效果

表 1 Cr(Ⅵ)耐受实验结果透光率(%)

Cr(Ⅵ)浓度(mg/L)	6 400	3 200	1 600	800	400	200	100	50	25	12.5	t	P
CQMUXH-1 大肠杆菌	97.0	94.9	89.3	69.5	56.1	49.8	29.4	16.6	22.0	18.1	4.369	0.002
DH5α	97.5	96.7	97.4	90.3	85.4	71.8	53.6	37.9	31.2	30.6		

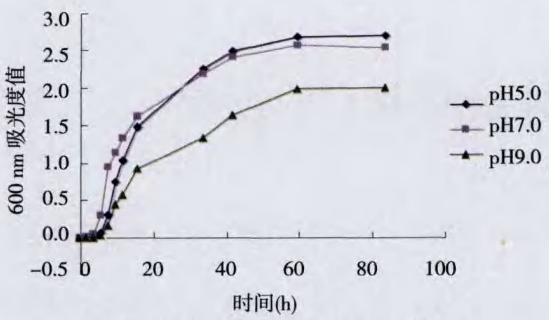


图 3 pH 值对 CQMUXH-1 生长的影响

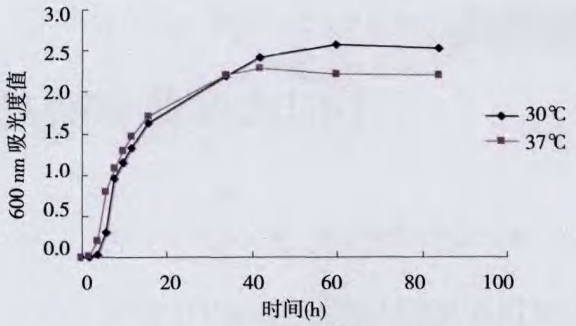


图 4 温度对细菌生长的影响

表 2 其它物质对细菌生长的影响

加入物质	Pb^{2+}	Hg^{2+}	Cd^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	F^-	As^{3+}	酚	氨基氮	亚硝酸盐氮	空白
OD_{600} 值	2.380	0.157	2.274	2.462	2.348	2.395	0.027	2.291	2.356	2.324	2.316
作用	±	−	±	+	±	±	−	±	±	±	

注:以空白的 OD_{600} ± 5%为标准,大于则为 +,表示促进生长;小于则为 −,表示抑制生长

MUXH-1 生长的作用。

3 讨 论

在自然界中 Cr 主要以三价和六价 2 种形式存在,其中六价铬[Cr(Ⅵ)]的毒性很大,大约是三价铬[Cr(Ⅲ)]的 100 倍。Cr(Ⅵ)可通过皮肤、呼吸道、消化道吸收,对皮肤、呼吸道、消化道有刺激、致癌和诱变作用[2]。当 Cr(Ⅵ)被还原为 Cr(Ⅲ)时,生物毒性大为减弱,且易形成不溶性化合物得沉淀除去。因此,目前治理环境中 Cr 污染的重点是如何把 Cr(Ⅵ)还原为 Cr(Ⅲ),Cr(Ⅲ)再通过形成氧化物、氢氧化物沉淀而进一步从水中除去。

目前世界各国在工业生产中处理 Cr(Ⅵ)污染大多采用物理化学方法,如化学还原法、沉淀法、离子交换法、吸附法、膜分离法等,但物理化学法存在消耗大量原材料、产生大量污泥、处理费用高、易产生新的二次污染等缺点[2,3]。与之相比,微生物法具有经济高效、温度低、pH 范围宽、对低浓度 Cr(Ⅵ)处理效果好、无需大量化学试剂、污泥量少、无二次污染等优点[1~3]。因此,微生物法治 Cr(Ⅵ)成为新时期治理 Cr(Ⅵ)污染的研究热点。

至今已见报道的具有除 Cr(Ⅵ)能力的菌株已非常广泛,如铜绿假单胞菌、大肠杆菌、*Caulobacter crescentus*、*Shewanella oneidensis*、*Cupriavidus metallidurans* 等[4]。其中需氧菌与厌氧菌相比,具有培养简单、还原能力强等优点。我国对细菌耐受和还原 Cr(Ⅵ)还处于起步阶段,仅见有无色杆菌[5]、芽胞杆菌[6]、硫酸盐还原菌[7]、*Bacillus cereu*[8]、*Bacillus Luciferensis* 等[9]几种细菌的研究,且全部研究都局限在研究菌株对 Cr(Ⅵ)耐受和还原的特性上,未见有对其质粒、酶等分子机制的研究。

本研究选用的从电镀废水淤泥中分离、筛选出 1 株高效耐受和去除 Cr(Ⅵ)的革兰氏阴性杆菌 CQMUXH-1。该菌株为需氧菌,能耐受和还原较高浓度 Cr(Ⅵ),外界环境因素对该菌株的生长影响小,可有效应用于环境中的 Cr(Ⅵ)污染的生物治理。目前国内尚未见细菌耐受和去除 Cr(Ⅵ)分子机制研究的相关文献报道,本文为下一步从基因、蛋白质水平研究微生物除 Cr(Ⅵ)打下理论基础。

参 考 文 献

[1] 刘淑云,李小明,曾光明.含铬(Ⅵ)废水处理研究进展[J].湖南城市学院学报(自然科学版),2006,15(2):66-68.

[2] 马锦民,张烂漫,夏 君,等.微生物处理含铬(Ⅵ)废水的研究进展[J].江苏化工,2005,33(2):46-50.

[3] 江 澜.微生物治理铬污染的应用与发展[J].重庆工商大学学报(自然科学版),2006,23(2):132-134.

[4] Ramírez-Díaz M I,Díaz-Pérez C,Vargas E,et al. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds[J].Biometals,2008,21(3):321-332.

[5] 柴立元,龙腾发,唐 宁,等.微生物治理碱性含铬废水的试验研究[J].中南大学学报(自然科学版),2005,36(5):816-820.

[6] 胡 勇,全学军,谭怀琴,等.细菌 X07 吸附 Cr(Ⅵ)的研究[J].环境保护科学,2005,31(131):9-12.

[7] 瞿建国,申如香,徐伯兴,等.硫酸盐还原菌还原 Cr(Ⅵ)的初步研究[J].华东师范大学学报(自然科学版),2005,(1):105-110.

[8] 肖 伟,王 磊,张思维,等.六价铬还原细菌 Bacillus cereus S5.4 的筛选鉴定及还原特性研究[J].工业微生物,2007,37(6):1-6.

[9] 程国军,胡光济,李友国.抗铬(Ⅵ)细菌的分离、鉴定及其铬(Ⅵ)还原能力[J].中南民族大学学报(自然科学版),2008,27(3):29-31.

(责任编辑:冉明会)