

DOI: 10.3969/j.issn.1004-6933.2014.01.013

耐辐射球菌对 Cu^{2+} 的去除效率

韩万春¹, 李铭锋^{2,3}, 田兵², 华跃进², 卢振兰¹

(1. 吉林农业大学资源与环境学院, 吉林 长春, 130118; 2. 浙江大学原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029;
3. 山东省东营市环境保护局, 山东 东营 257000)

摘要:耐辐射球菌是一种非致病菌, 拥有极强的抗辐射、抗氧化特性, 具有成为工程菌处理 Cu^{2+} 的潜力。采用酶标仪测定 Cu^{2+} 对耐辐射球菌的生长速度的影响, 用电感耦合等离子光谱法测定菌液离心后得到的上清液 Cu^{2+} 浓度。结果表明, 当 Cu^{2+} 初始质量浓度为 1.36 mg/L 时, 耐辐射球菌对其清除效率为 57.3%; 当 Cu^{2+} 初始质量浓度为 6.28 mg/L 时, 对其清除效率为 35.4%。此外, 用激光共聚焦显微镜观察受到 Cu^{2+} 胁迫的耐辐射球菌, 发现球菌具有明显的聚集效应。

关键词:耐辐射球菌; Cu^{2+} ; 电感耦合等离子光谱法; 去除效率

中图分类号: X703.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-6933(2014)01-0064-04

Removal efficiency of Cu^{2+} by *Deinococcus radiodurans*

HAN Wanchun¹, LI Mingfeng^{2,3}, TIAN Bing², HUA Yuejin², LU Zhenlan¹

(1. College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
3. Dongying Environmental Protection Agency of Shandong Province, Dongying 257000, China)

Abstract: As a non-pathogenic bacteria, *Deinococcus radiodurans* is extremely resistant to ionizing radiation and oxidative stress and shows great potential in remediation of Cu^{2+} pollution. In this study, we used the ELIASA plate reader and the ICP-OES, respectively, to monitor the growth rate of *Deinococcus radiodurans* and the Cu^{2+} concentration in the supernatant after the bacterial solution was centrifuged. The results show that the removal efficiency of Cu^{2+} by *Deinococcus radiodurans* reached 57.3% when the initial concentration of Cu^{2+} was 1.36 mg/L, and the removal efficiency dropped to 35.4% when the initial concentration of Cu^{2+} increased to 6.28 mg/L. Meanwhile, using confocal laser scanning microscopy (CLSM), we observed that *Deinococcus radiodurans* assembled at a high concentration of Cu^{2+} .

Key words: *Deinococcus radiodurans*; Cu^{2+} ; ICP-OES; removal efficiency

Cu^{2+} 污染存在于电镀、冶金、化工等行业已早为人熟知。人体摄入过量 Cu^{2+} 会引起一系列病变, 急性 Cu^{2+} 中毒可引起胃肠道黏膜刺激症状, 恶心、呕吐、腹泻, 甚至溶血性贫血、肝功能衰竭、休克、昏迷或死亡, 慢性摄入过高的 Cu^{2+} , 可引起儿童肝硬化; 土壤中过量的 Cu^{2+} 可间接污染农产品, Cu^{2+} 对水培青菜幼苗生长影响很大^[1]; Cu^{2+} 对玉米生长的影响同样严重, 当 $c(\text{Cu}^{2+}) = 50 \mu\text{mol/L}$ 时, 边缘细胞的死细胞数

量达 758 个 (存活率为 24.8%), 当 $c(\text{Cu}^{2+}) = 100 \mu\text{mol/L}$ 时, 存活率降低了 17.54%^[2]; Cu^{2+} 对鲫鱼红细胞、白细胞和血红蛋白影响较大^[3], 它通过食物链威胁人体健康, 并造成环境的二次污染^[4]。

目前, 人们已经提出了众多去除 Cu^{2+} 的方法。董静^[5] 采用吸附法去除 Cu^{2+} , 左鸣等^[6] 提出用铁氧体法去除废水中的 Cu^{2+} , 刘泊良等^[7] 采用改性碳纳米管对水中 Cu^{2+} 的去除作用, 朱一民等^[8] 采用海藻

基金项目: 国家自然科学基金(30830006, 31170079)

作者简介: 韩万春(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境管理与规划。E-mail: hs19880208@163.com

通信作者: 卢振兰, 教授。E-mail: zhenlan0431@163.com

酸钠吸附 Cu^{2+} , 滕洪辉等^[9] 采用纳米光催化还原去除水中 Cu^{2+} 。

耐辐射球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 是 Anderson 等人于 1956 年在用 x 射线给腐败的灌装食品灭菌时发现的非致病性红色球菌^[10], 被誉为地球上最顽强的细菌之一^[11], 该细菌具有惊人的电离辐射抗性和 DNA 修复能力, 其辐射耐受剂量是大肠杆菌的几百倍, 是人类的几千倍, 具有耐辐射、抗氧化、非致病菌的优良特性^[12-13]。本研究正是基于耐辐射球菌如此多的优良特性的基础上而展开的。GB 25467-2010《铜、镍、钴工业污染物排放标准》规定, 企业废水总排放二级处理后的 Cu^{2+} 质量浓度不超过 2.0 mg/L, 如果将耐辐射球菌作为废水排放中 Cu^{2+} 二级处理的工程菌株, 可为微生物清除 Cu^{2+} 污染提供条件^[14], 将在环境修复方面上具有一定的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料选用耐辐射球菌作为工程菌、大肠杆菌作为对照菌株; TGY 培养基 (TRYPTONE 0.5%、YEAST 0.3%、D-glucose 0.1%, pH=6.4±0.2) 用于培养耐辐射球菌; LB (TRYPTONE 0.1%、YEAST 0.5%、NaCl 0.10%, pH=7.5±0.2) 用于培养大肠杆菌; 用 Spectra Max M5 测定 OD_{600} 值; 用 PerkinElmer 公司生产的 Optical Emission Spectrometer optima 7300DV 测定 Cu^{2+} 浓度。

1.2 试验方法

a. 样本前处理时, 将耐辐射球菌划平板, 挑单菌落到 5mL TGY 培养基中 30℃ 下培养, 试验在无菌操作台进行。

b. 取 1 mL 培养好的菌液加入到 200 mL 的 TGY 培养基中, 为保证初始培养基中菌体浓度相等, 菌液培养到 $\text{OD}_{600}=0.57$ 。把摇好的菌分装到 20 cm 灭菌试管中, 每管 5 mL。再分别加入 10 μL 、50 μL Cu^{2+} ($c(\text{Cu}^{2+})=10\text{ mmol/L}$) 到试管中, 每样品做 3 次重复, 利用酶标仪测定不同时间下的 OD_{600} 的值。

c. 用激光共聚焦显微镜观察 Cu^{2+} 处理后的耐辐射球菌的细胞聚集情况^[15]。

d. 利用电感耦合等离子光谱法 (ICP-OES) 测定培养基中 Cu^{2+} 浓度, 以计算耐辐射球菌对 Cu^{2+} 的去除效率^[16]。

初始样测定: ①将 10 μL 的 Cu^{2+} ($c(\text{Cu}^{2+})=10\text{ mmol/L}$) 溶液加到 5 mL 的 TGY 培养基中, ICP-OES 检测出 Cu^{2+} 质量浓度为 1.36 mg/mL。②将 50 μL 的 Cu^{2+} ($c(\text{Cu}^{2+})=10\text{ mmol/L}$) 溶液加到 5 mL 的 TGY

培养基中, ICP-OES 检测出 Cu^{2+} 质量浓度为 6.28 mg/mL。

处理样测定: ①将 10 μL 的 Cu^{2+} ($c(\text{Cu}^{2+})=10\text{ mmol/L}$) 溶液加到 5 mL 的 TGY 培养基中, 加入 2 μL 耐辐射球菌, 生长到衰亡期, 经处理后, ICP-OES 检测出 Cu^{2+} 质量浓度为 0.58 mg/mL。②将 50 μL 的 Cu^{2+} ($c(\text{Cu}^{2+})=10\text{ mmol/L}$) 溶液加到 5 mL 的 TGY 培养基中, 加入 2 μL 耐辐射球菌, 生长到衰亡期, 经处理后, ICP-OES 检测出 Cu^{2+} 质量浓度为 4.06 mg/mL。

2 试验结果与分析

分析初始样与处理样 Cu^{2+} 浓度之间的关系, 并计算出耐辐射球菌对 Cu^{2+} 的去除效率。用 origin 75 软件绘制出不同 Cu^{2+} 浓度对耐辐射球菌生长影响的生长曲线。

2.1 生长曲线的测定

向试管中加入 Cu^{2+} 在一定程度上会影响耐辐射球菌的生长。为此利用酶标仪测定 Cu^{2+} 胁迫下的耐辐射球菌生长曲线, 以了解耐辐射球菌的生长状况, 如图 1 所示。

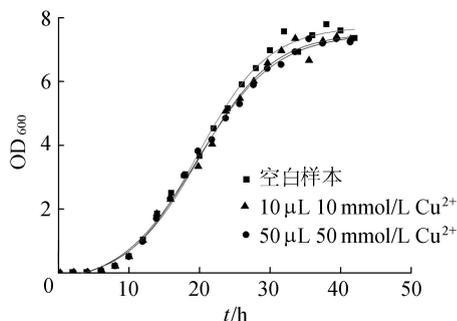


图 1 Cu^{2+} 对耐辐射球菌生长的影响

耐辐射球菌初始透光度 (OD_{600}) 为 0.57 时, 加入不同浓度的 Cu^{2+} 30℃ 培养。由空白样本与 Cu^{2+} 作用生长曲线可以看出, Cu^{2+} 用量对耐辐射球菌的生长影响小。重复多次试验后用平板计数方法统计出, 当 OD_{600} 值为 1.0 时, 1 mL 菌液中耐辐射球菌的个数为 10^8 个。

为了说明 Cu^{2+} 浓度对其他菌体的影响, 测定 Cu^{2+} 浓度对模式生物大肠杆菌的生长影响: 当大肠杆菌在 37℃ LB 培养基中, 其 OD_{600} 为 0.24 时, 不同浓度的 Cu^{2+} 对大肠杆菌的生长影响如图 2 所示。

试验结果表明, 在大肠杆菌的生长过程中, Cu^{2+} 浓度对其生长具有促进作用。换言之, 大肠杆菌对 Cu^{2+} 浓度不敏感。但 GB3838-2002《地表水环境质量标准》中明确提出了对粪大肠杆菌群的规定, 因为其有一定的致病性, 所以不能作为污水处理的工程菌。

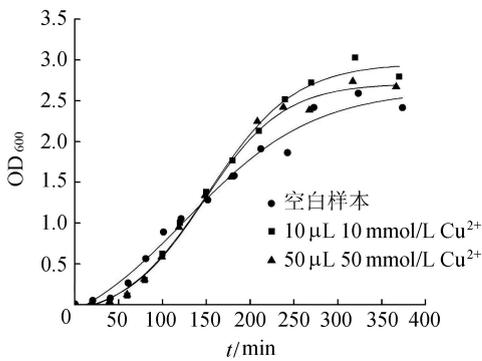


图2 Cu²⁺对大肠杆菌的生长影响

2.2 耐辐射球菌的聚集效应

在Cu²⁺的作用下,耐辐射球菌出现了聚集现象(图3)。

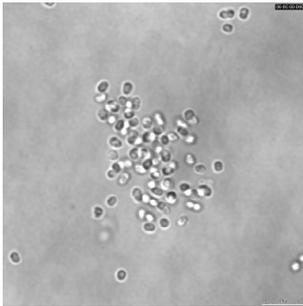


图3 耐辐射球菌聚集现象

由于Cu²⁺的胁迫,耐辐射球菌出现聚集现象。这可能是因为耐辐射球菌存在群体感应机制,以抵抗外来的胁迫。有文献表明,这可能与某种金属离子通道有关^[4]。

2.3 不同浓度Cu²⁺作用下的菌体质量变化

试验结果表明,耐辐射球菌对Cu²⁺有很强的耐受能力。按照表1数据向200 mL TGY培养基中加入各种浓度的Cu²⁺,培养48 h,精确量取100 mL菌液,离心30 min后(10 000 r/min)收集菌体,把收集到的菌体用真空冷冻干燥仪干燥,称取质量。

表1 不同浓度Cu²⁺加入后得到的菌体干质量

试验次数	V(Cu ²⁺)/μL	V(H ₂ O)/μL	ρ(Cu ²⁺)/(mg·L ⁻¹)	菌体干质量/g
1	0	4000	0	0.24
2	400	3600	1.28	0.23
3	800	3200	2.56	0.22
4	1200	2800	3.84	0.22
5	1600	2400	5.12	0.21
6	2000	2000	6.40	0.18

随着Cu²⁺质量浓度的不断增加,耐辐射球菌的菌体干质量不断减少。Cu²⁺质量浓度低时,对耐辐射球菌的生长影响不大,但Cu²⁺质量浓度达到5.12 mg/L时,即1 600 μL Cu²⁺(c(Cu²⁺)=10 mmol/L)加入时,耐辐射球菌菌量开始快速下降。用SPSS18.0软件进行显著性分析,P值为9.06×10⁻⁷,远小于

0.5,效果显著。

2.4 耐辐射球菌对Cu²⁺的去除效率

计算耐辐射球菌对Cu²⁺的去除率:

$$r = (1 - \rho/\rho_0) \times 100\% \quad (1)$$

式中:ρ₀为Cu²⁺初始质量浓度,mg/L;ρ为加入耐辐射球菌后的Cu²⁺质量浓度,mg/L。

当10 μL Cu²⁺(c(Cu²⁺)=10 mmol/L)加入培养基中时,Cu²⁺质量浓度为1.36 mg/L,加入700 μL耐辐射球菌处理后,经ICP-OES测得Cu²⁺质量浓度为0.58 mg/L,则去除率r₁=(1-0.58/1.36)×100%=57.3%。

当50 μL Cu²⁺(c(Cu²⁺)=10 mmol/L)加入培养基中时,Cu²⁺质量浓度为6.28 mg/L,加入700 μL耐辐射球菌处理后,经ICP-OES测得Cu²⁺质量浓度为4.06 mg/L,则去除率r₂=(1-4.06/6.28)×100%=35.4%。

由去除率可知,Cu²⁺的初始浓度越高,耐辐射球菌对Cu²⁺去除效率越低。

3 结 语

采用酶标仪及ICP-OES等方法测定耐辐射球菌在Cu²⁺胁迫下生长曲线变化状况及耐辐射球菌对Cu²⁺去除效率的研究。结果表明,耐辐射球菌对Cu²⁺具有很强的耐受能力;在Cu²⁺作用下耐辐射球菌有聚集现象;当Cu²⁺初始质量浓度为1.36 mg/L时,耐辐射球菌对Cu²⁺的去除率为57.3%;Cu²⁺初始质量浓度为6.28 mg/L时,耐辐射球菌对Cu²⁺的去除率为35.4%;耐辐射球菌具有作为企业二级处理时的工程菌的能力。企业可将耐辐射球菌作为处理含Cu²⁺废水的工程菌,使处理后的水质达到GB25467-2010《铜、镍、钴工业污染物排放标准》的要求。今后,将用分子生物学手段进一步对Cu²⁺作用下耐辐射球菌的聚集现象进行研究,从而揭示其产生机理。

参考文献:

- [1] 单广福.铜离子对水培青菜幼苗生长的影响[J].安徽农业科学,2005,33(7):1202-1203,1206.(SHAN Guangfu.The influence of copper ions in hydroponic vegetables seedling growth[J].Anhui Agricultural Science,2005,33(7):1202-1203,1206.(in Chinese))
- [2] 刘婷婷,李锋,张曦.铜离子对玉米生长的影响[J].植物生理学报,2012,48(7):669-675.(LIU Tingting,LI Feng,ZHANG Xi.Copper ion effect on maize growth[J].Acta Phytophysiological Sinica,2012,48(7):669-675.(in Chinese))
- [3] 南旭阳.铜离子对鲫鱼红细胞、白细胞和血红蛋白量的

- 影响[J]. 江西科学, 2002, 20 (1): 39-41. (NAN Xunyang. Effects of copper ion on the erythrocyte (RBC) and leucocyte (WBC) and hemoglobin (HB) in the blood of *Carassius auratus* [J]. Jiangxi Science, 2002, 20 (1): 39-41. (in Chinese))
- [4] 向华. 铜离子胁迫对4种水生植物生理生化特性的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [5] 董静. 电镀废水中铜离子的处理方法研究[J]. 河北化工, 2011, 34 (6): 77-78. (DONG Jing. Study on the methods used in treating copper ions in electroplating wastewater [J]. Hebei Chemical Industry, 2011, 34 (6): 77-78. (in Chinese))
- [6] 左鸣, 汪晓军. 铁氧体法去除废水中的镍、铬、锌、铜离子[J]. 电镀与涂饰, 2011, 30 (7): 48-50. (ZUO Ming, WANG Xiaojun. Treatment of wastewater containing nickel, chromium, zinc and copper by ferrite process [J]. Electroplating & Finishing, 2011, 30 (7): 48-50. (in Chinese))
- [7] 刘泊良, 张玉军, 王蒲芳. 改性碳纳米管对水中铜离子的去除作用[J]. 应用化工, 2011, 40 (1): 69-70. (LIU Poliang, ZHANG Yujun, WANG Pufang. Removal of copper from aqueous solution by carbon nanotubes [J]. Applied Chemical Industry, 2011, 40 (1): 69-70. (in Chinese))
- [8] 朱一民, 沈岩柏, 魏德洲. 海藻酸钠吸附铜离子的研究[J]. 东北大学学报: 自然科学版, 2003, 24 (6): 590-592. (ZHU Yimin, SHEN Yanbo, WEI Dezhou. The research of sodium alginate adsorbed the copper ion [J]. Journal of Northeastern University: Natural Science, 2003, 24 (6): 590-592. (in Chinese))
- [9] 滕洪辉, 林沛钧, 李微微, 等. 纳米光催化还原去除水中铜离子[J]. 环境工程学报, 2011, 5 (10): 2258-2260. (TENG Honghui, LIN Peijun, LI Weiwei, et al. Removal of Cu^{2+} from water by nano photocatalytic reduction [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2011, 5 (10): 2258-2260. (in Chinese))
- [10] ANDERSON A W, NORDON H C, CAIN R F, et al. Studies on a radio-resistant micrococcus I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation [J]. Food Technology, 1956, 10 (12): 575-578.
- [11] 华跃进, 高冠军. 耐辐射异常球菌 DNA 损伤与修复相关基因的比较基因组研究[J]. 微生物学报, 2003, 43 (1): 121-126. (HUA Yuejin, GAO Guanjun. Comparative genomics of genes contributed to DNA repair in the radiation resistant *Deinococcus radiodurans* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43 (1): 121-126. (in Chinese))
- [12] 华孝挺, 田兵, 华跃进. 耐辐射奇球菌同源重组修复机制研究新进展[J]. 核农学报, 2010, 24 (6): 1192-1197. (HUA Xiaoting, Tian Bian, Hua Yuejin. Research progress on homologous recombination repair mechanism in *Deinococcus radiodurans* [J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2010, 24 (6): 1192-1197. (in Chinese))
- [13] 宋道军, 余增亮. 耐辐射异常球菌抗辐射机理的研究新进展[J]. 生命科学, 1999, 11 (5): 222-224. (SONG Daojun, YU Zengliang. Research progress in mechanism of radioresistance about *Deinococcus radiodurans* [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 1999, 11 (5): 222-224. (in Chinese))
- [14] 余晨兴, 许旭萍, 沈雪贤, 等. 球衣菌对重金属离子的耐受性及其吸附能力[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11 (1): 90-92. (SHEN Chenxing, XU Xunping, SHEN Xuexian, et al. Biosorption and tolerance of *Sphaerotilus natans* to heavy metal ion [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11 (1): 90-92. (in Chinese))
- [15] NIES D H. Microbial heavy-metal resistance [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 730-750.
- [16] 陈红梅, 张滨. ICP-MS 法测定茶叶中铅、铬、镉、砷、铜等重金属元素[J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2 (4): 193-197. (CHEN Hongmei, ZHANG Bin. Determination of Lead, Chromium, Cadmium, Arsenic, Copper and other heavy metals in tea by ICP-MS [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2011, 2 (4): 193-197. (in Chinese))

(收稿日期: 2013-06-21 编辑: 高渭文)

· 简讯 ·

水文水资源与水利工程科学国家重点实验室被评为优秀类国家重点实验室

近期科技部发布了《2013年材料领域与工程领域国家重点实验室评估报告》, 水文水资源与水利工程科学国家重点实验室(河海大学·南京水利科学研究院)被评为优秀类国家重点实验室。

2013年科技部委托国家自然科学基金委员会对材料领域与工程领域64个国家重点实验室进行了评估。工程领域中有11个实验室被评为优秀类实验室, 28个实验室被评为良好类实验室。科技部将依据评估结果, 对优秀类国家重点实验室加大支持力度, 同时实行末位淘汰制。

水文水资源与水利工程科学国家重点实验室在本评估期内面向国家重大需求, 瞄准科学技术发展前沿, 开展了大量创新性研究, 取得了显著的研究成果。该实验室已成为我国在水文水资源、水利工程、水环境、水生态等领域开展创新性应用基础研究、解决重大工程关键技术问题、培养高层次人才以及进行高水平学术交流的重要基地。

(本刊编辑部供稿)