

一株产脲酶菌株的分离及其 固化土壤中 Cd^{2+} 的研究

王继勇 杨子陆 陈加立 江英杰

(武汉理工大学 化学化工与生命科学学院 武汉 430070)

摘要 指出了微生物诱导碳酸盐成矿(MICP)技术可有效修复镉污染土壤.从土壤中分离出了一株高效产脲酶菌株,该菌株对 $10 \text{ mg Cd}^{2+}/\text{kg}$ 模拟污染土壤的 Cd^{2+} 固化率为 67.7% .X射线衍射(XRD)、能谱分析(EDS)、扫描电子显微镜(SEM)和红外光谱(IR)等分析显示:产物为碳酸镉和碳酸钙,碳酸盐结晶方式为晶格掺杂.

关键词 碳酸盐矿化菌株;碳酸镉

中图分类号 X131.3;S154.3 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)01-0017-04

Isolation of A Urease-producing Bacterium and Its Curing Function of Cd^{2+} in Soil

Wang Jiyong, Yang Zilu, Chen Jiali, Jiang Yingjie

(School of Chemistry and Life Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070)

Abstract Microbial induced carbonate mineralization (MICP) is an effective way to repair cadmium polluted soil. A highly efficient urease-producing bacterium was isolated from soil and the curing rate of 10 mg/kg soil Cd^{2+} ion was determined as 67.7% . XRD, EDS, SEM and IR results showed that the sediments were cadmium carbonate and calcium carbonate, which were formed through lattice doping crystallization.

Keywords carbonate mineralization bacteria; cadmium carbonate

土壤镉污染具有潜伏性强、毒害作用大等特点,治理难度较大^[1,2].在镉污染治理技术中,微生物技术具有成本低、无二次污染等优点,其中微生物诱导碳酸盐成矿(MICP)修复技术已成为国内外研究的热点^[3-5].MICP是指产脲酶微生物将尿素水解为 CO_3^{2-} 与 Ca^{2+} 形成碳酸盐沉淀的过程^[6].若细菌生长环境中含有 Cd^{2+} ,则 Cd^{2+} 也会参与这一过程并形成碳酸盐. Li等^[7]从土壤中筛选出的产脲酶芽孢杆菌和芽孢八叠球菌对 Cd^{2+} 的固化率达 88% 以上;许燕波等^[8]筛选得到的产脲酶菌株,成功固化了土壤中 48.4% 的有效态镉.虽然目前国内对 MICP 技术修复镉污染土壤已有研究,但对固化产物形成机理研究则较少.本文选用红棕壤中筛选分离出一株高效产脲酶菌株,验证了其固化污染土壤中 Cd^{2+} 能力,并采用 XRD、EDS、SEM 等技术对其固化产物和机理进行了探究,以期 MICP 技术

在土壤镉污染治理中的应用提供理论基础.

1 材料及方法

1.1 仪器和试剂

SM-IT300 型扫描电子显微镜(日本电子株式会社), Nicolet6-700 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo), MD3X 射线能谱仪(上海沃埃得), A360 型紫外-可见分光光度计(上海翱艺仪器), PH10S-E 笔式酸度计(上海精密仪器仪表), GGX-100 火焰原子吸收分光光度计(北京海光仪器).

将 1 mg 干燥样品与 100 mg KBr(光谱纯)磨细混匀,压制成片检测. $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NaCl 、苯酚红(酚红)、无水乙醇、蛋白胨、葡萄糖、尿素均为 AR 级,蛋白胨和酵母浸出粉 BR 级,试剂均购自国药集团化学试剂有限公司.

收稿日期 2016-12-03

作者简介 王继勇(1966-)男,副教授,博士,研究方向:土壤重金属污染修复, E-mail: wangjiyong66@sina.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(46120511)

1.2 实验材料

采集武汉理工大学花木种植园深度 5~20 cm 处的土壤样本,富集培养后从富集液中分离具有产脲酶能力的菌株,培养 24 h 后检测菌浓度(OD_{600})和氨氮含量,选取产脲酶能力最强的菌株。

使用产脲酶菌株筛选分离培养基、生长培养基和 LB 培养基(配方略)。取土壤试样 5 kg,去除大颗粒杂质后自然风干,向风干后土壤中加入适量 0.5 mol/L 的 $CdCl_2$ 溶液,使土壤中镉含量为 10 mg/kg。

1.3 菌株培养与检测

将产脲酶菌株生长培养基在 121℃ 灭菌 30 min,从保存产脲酶菌株的 LB 斜面上挑取部分菌苔,接种到灭菌后的 150 mL 培养液中,置于 150 r/min、37℃ 的恒温摇床中培养 72 h,测量培养液的 OD_{600} 和 pH 值,采用二甲氨基苯甲醛显色分光光度法检测培养液中尿素含量^[9]。菌株产脲酶能力以培养液中氨氮含量计,氨氮含量检测选用苯酚钠-次氯酸钠比色法^[10,11]。

称取 1 g 土壤,加入 10 mL 去离子水,搅拌均匀后放置 5 min,检测浸提液的 pH 值。参照王瑞兴等^[12]的实验方法检测土壤中 Cd^{2+} 含量。

1.4 细菌诱导土壤中 Cd^{2+} 矿化

在 5 kg 镉含量为 10 mg/kg 的模拟污染土壤中,每天加入 100 mL 5 mol/L 尿素溶液和 100 mL 培养 48 h 的菌液,每 12 h 检测 1 次土壤 pH 值和 Cd^{2+} 含量,直至土壤的 pH 值稳定。选取实验土壤中板结土壤颗粒于 60℃ 干燥 2 h 后备用。

1.5 土壤中矿化产物的分析

使用 SEM、XRD、IR、EDS 等技术分析土壤中矿化产物。

2 结果与分析

2.1 产脲酶菌株的生长特性及产酶活性

成亮等^[5]的产脲酶芽孢杆菌对尿素的水解率为 80%,许燕波等^[8]的碳酸盐矿化菌对尿素的水解率为 67.5%。本研究分离的产脲酶能力最强的菌株 UR-2 的尿素水解率达 94.5%,其培养中各参数的变化见图 1。图中 UR-2 的生长符合微生物生长的“S”形曲线,培养 8 h 后细菌生长进入对数期,培养液 OD_{600} 最大值为 0.5972,细菌生长进入对数期后,培养液 pH 值由 7.23 升至 9.15(图 1a, 1b)。细菌生长过程中,尿素逐渐被水解,培养液氨氮含量迅速上升,最终尿素水解率达到 94.5%,氨氮含量最大值为 0.81 g/L。40 h 后培养液中氨氮含量下降,由于部分 NH_4^+ 以氨气形式挥发至空气中(图 1c, 1d)。

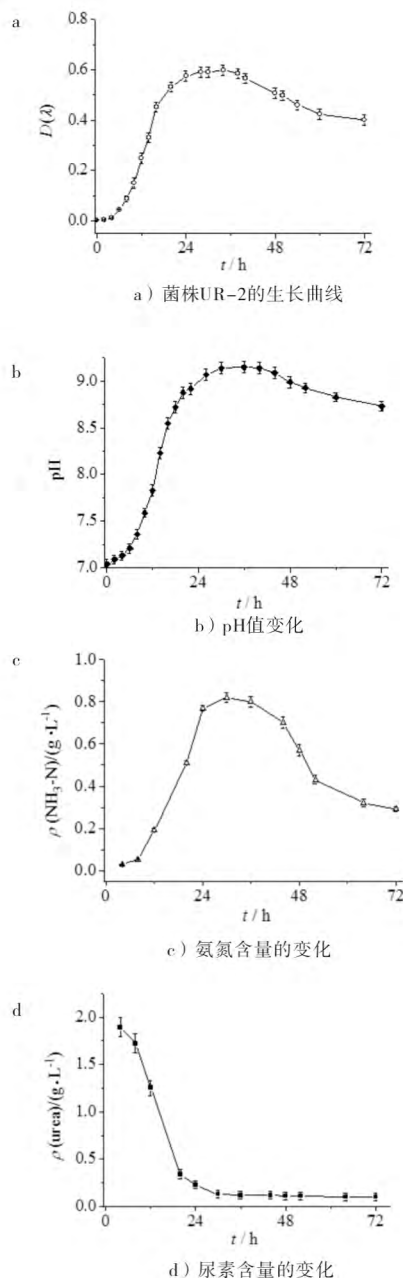


图1 菌株 UR-2 的生长曲线及培养中各参数变化

Fig.1 Growth curve and various parameter changes of UR-2 strain during cultivation

2.2 产脲酶菌株矿化土壤中 Cd^{2+} 进程

实验土壤 pH 值和 Cd^{2+} 含量的变化见图 2。1 d 后细菌适应土壤环境并大量繁殖,开始水解尿素,土壤 pH 值在 5 d 内迅速从 7.02 增至 8.35,随着营养物质的消耗,土壤 pH 值稳定在约 8.61(图 2a)。土壤中 Cd^{2+} 含量随土壤 pH 值上升逐渐减小,0~1 d 内 Cd^{2+} 含量基本无变化;1~5 d 内,由于尿素的快速水解和土壤 pH 值升高, Cd^{2+} 含量迅速下降并稳定在 3.23 mg/kg; 10 d 后 Cd^{2+} 固化率为 67.7%,说明 UR-2 对土壤 Cd^{2+} 具有较强的固化能力(图 2b)。许燕波等^[8]的碳酸盐矿化菌

对污染土壤 Cd 去除率为 51% ,修复周期为 7 d; 王瑞兴等^[12]的碳酸盐矿化菌 A 对土壤 Cd 去除率为 75.5% ,修复周期为 10 d; 故菌株 UR-2 在镉污染土壤治理中具有一定潜能.

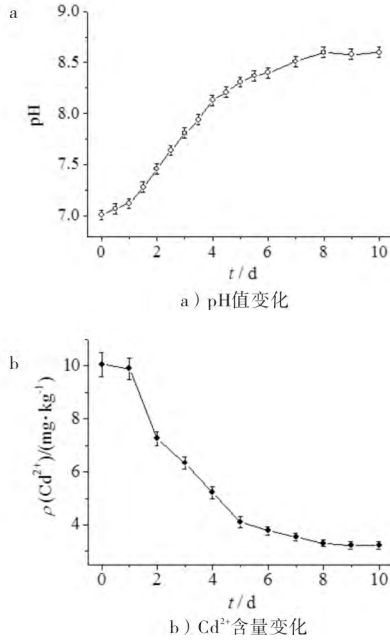


图 2 菌株 UR-2 固化进程中土壤 pH 及其 Cd²⁺ 含量变化

Fig.2 Content changes of Cd²⁺ ion and pH changes during soil curing process by urease-producing bacteria UR-2

2.3 矿化产物 XRD 分析

细菌投加到污染土壤后附着生长在土壤中的 SiO₂ 等颗粒上, 细菌水解尿素产生的 CO₃²⁻ 与周围 Ca²⁺、Cd²⁺ 反应 形成了白色的碳酸盐固体, 引起土壤固化, XRD 分析谱图见图 3. 由图 3 可见, 产物由 CdCO₃ 和 CaCO₃ 共同组成, 各吸收峰较尖锐, 说明产物结晶度较好.

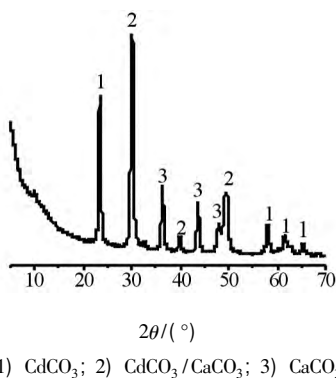
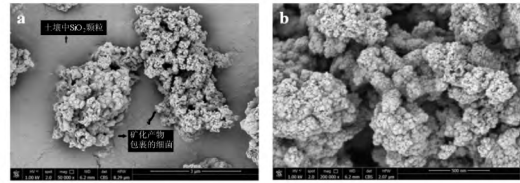


Fig.3 XRD patterns of mineralized productions

2.4 矿化产物 SEM 分析

矿化产物的 SEM 分析结果见图 4. 由图 4 可见 细菌将尿素水解后产生了 CO₃²⁻, 与细菌周围的 Cd²⁺、

Ca²⁺ 反应 形成了图 4b 中粒径分布不均匀的椭球形颗粒 颗粒包裹在细菌表面又形成了图 4a 中的结构.



a) ×50 000 倍矿化产物; b) ×200 000 矿化产物

图 4 矿化产物的 SEM 扫描图

Fig.4 SEM images of mineralization products

2.5 矿化产物 IR 分析

矿化产物的红外光谱分析(IR) 谱图见图 5. 图 5 中 1639 cm⁻¹处和 1034 cm⁻¹处分别为蛋白酰胺 I 带和 II 带的 C=O 基振动吸收峰, 证明细菌细胞壁通过 C=O 基团吸附了 Cd²⁺、Ca²⁺. 797 cm⁻¹处出现的双峰吸收峰为 Si-O-Si 的振动, 是土壤石英的特征峰; 537 cm⁻¹处的吸收峰为 Si-O-Al、Si-O-Mg 的弯曲振动^[13] 显示细菌吸附在了土壤颗粒中的 SiO₂ 上. 721 cm⁻¹处吸收峰为 Cd-O 和 Ca-O 振动叠加, 两处为矿化产物的特征峰, 1395 cm⁻¹、860 cm⁻¹处吸收峰为 CaCO₃ 和 CdCO₃ 晶体中 C-O 基团的弯曲振动, 两处吸收峰明显, 说明矿化产物中碳酸盐含量较多, 与 XRD 谱图结果一致.

通过 IR 和 SEM 可确定菌株 UR-2 固化土壤中 Cd²⁺ 的机理: 吸附生长在土壤中 SiO₂ 等颗粒上的细菌, 先通过细胞壁络合吸附 Ca²⁺、Cd²⁺ 等作为有效结晶点, 使细菌水解尿素产生的 CO₃²⁻ 与被吸附金属阳离子反应形成晶体, 进而形成沉淀.

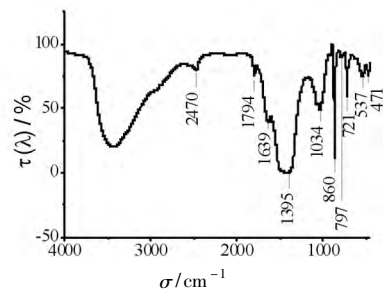


图 5 成矿化产物的 IR 图谱

Fig.5 IR patterns of mineralization products

2.6 矿化产物 EDS 分析

分析图 4a 细菌周围矿化产物的 EDS 谱图见图 6. 由图 6 可见 矿化产物中含有 Cd、Ca、Al、Si、Fe、K 等金属元素. 实验土壤为红棕壤, Ca²⁺ 含量较少, Fe³⁺ 含量较高; Fe 含量为 3.32% (以下均为原子百分比), Ca 为 0.62% 验证了实验土壤的种类. 同时, 矿化产物中 Ca 含量为 0.62% ,Cd 为 3.94% ,说明 Cd 含量高于 Ca 除

了土壤中 Cd 含量为 10 mg/kg 外 相比于离子半径为 9.9×10^{-9} cm 的 Ca^{2+} ,离子半径为 9.7×10^{-7} cm 的 Cd^{2+} 与细菌的络合强度更大 , Cd^{2+} 在细菌细胞壁上的有效结合位点更多 ,因而矿化产物中 Cd 元素含量较高.

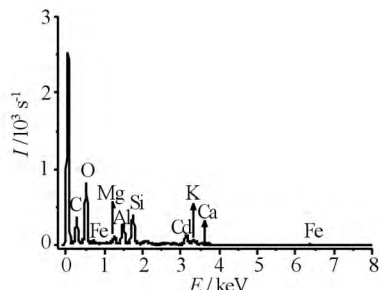
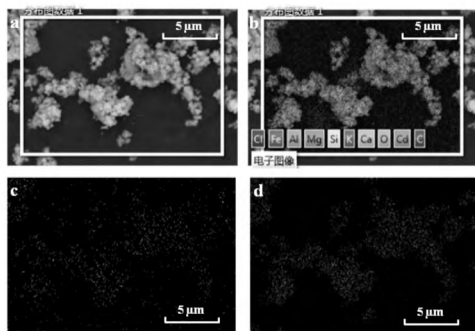


图6 矿化产物的EDS图谱

Fig.6 The EDS patterns of mineralized products

Kumari 等^[14]提出:在产脲酶微生物作用下,镉污染土壤过程中的 Cd^{2+} 与 Ca^{2+} 一般以晶格掺杂或单一相 CdCO_3 沉积在单一相 CaCO_3 表面的方式形成共沉淀.为确定 CdCO_3 和 CaCO_3 的结晶方式,使用 X 射线能谱仪元素分布(EDS-mapping)对矿化产物进行分析,结果见图7.由图7可见,矿化产物中 Cd、Ca 元素互相掺杂, Cd^{2+} 与 Ca^{2+} 以晶格掺杂的方式形成了共沉淀.由于 CdCO_3 和 CaCO_3 的结晶均以细菌细胞壁上的 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 吸附位点展开,但细菌对两种金属阳离子的吸附无选择性,导致 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 的结晶位点相邻、相对甚至重叠,形成的 CdCO_3 和 CaCO_3 晶体互相掺杂.



a) 电子图像; b) EDS 分层图像; c) Ca Kα1; d) Cd Lα1

图7 矿化产物中 Cd、Ca 元素的分布图

Fig.7 EDS-mapping patterns of Cd、Ca in mineralized productions

3 结论

(1) 从湖北省红棕壤中分离出一株高效产脲酶菌株 UR-2, 生长周期为 64 h. 该菌株生长过程中分泌的脲酶对尿素水解率为 95.4% 培养液 pH 达 9.15.

(2) 投加菌株 UR-2 可有效提高土壤 pH, Cd^{2+} 的固化去除率为 67.7% 该菌株在镉污染土壤治理中具有一定的潜能.

(3) 矿化产物主要为 CdCO_3 和 CaCO_3 , 分布在细菌周围, CdCO_3 和 CaCO_3 为粒径不均匀的椭圆形颗粒,细菌细胞壁部分基团络合吸附了 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} .

(4) 菌株 UR-2 细胞壁首先吸附 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} , 其后被吸附的金属阳离子作为有效结晶位点,与细菌代谢产生的 CO_3^{2-} 反应,以晶格掺杂的方式形成 CdCO_3 和 CaCO_3 晶体,最终形成碳酸盐沉淀.

参 考 文 献

- [1] 吴桂萍,黄慧,唐太平,等.武汉市某工业用地土壤重金属污染状况分析与评价[J].中南民族大学学报(自然科学版),2012,31(3):25-25,55.
- [2] 王艳娜.土壤重金属污染现状与防治方法[J].价值工程,2014(35):311-312.
- [3] 孙杰,刘骏龙,胡晶晶,等.广西锰矿区土壤重金属垂直分布和赋存形态分析[J].中南民族大学学报(自然科学版),2016,35(1):12-16.
- [4] Helmi F M, Eimitwalli H R, Elnagdy S M, et al. Calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria Bacillus licheniformis[J]. Ecol Eng, 2016, 90: 367-371.
- [5] 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.
- [6] Krajewska B. Ureases I: functional, catalytic and kinetic properties: a review[J]. J Mol Catal B: Enzym, 2009, 59(1/3): 9-21.
- [7] Li M, Cheng X, Guo H. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil[J]. Int Biodeter Biodegr, 2013, 76(1): 81-85.
- [8] 许燕波,钱春香,陆兆文.微生物矿化修复重金属污染土壤[J].环境工程学报,2013,7(7):2763-2768.
- [9] 周佳,孙勇,唐传球,等.对二甲氨基苯甲醛比色法测定溶液中的尿素[J].化学与生物工程,2014,31(2):75-78.
- [10] 周礼恺,张志明.土壤酶活性的测定方法[J].土壤通报,1980(5):37-38,49.
- [11] 耿玉清,王冬梅.土壤水解酶活性测定方法的研究进展[J].中国生态农业学报,2012,20(4):387-394.
- [12] 王瑞兴,钱春香,吴森,等.微生物矿化固结土壤中重金属研究[J].功能材料,2007,38(9):1523-1526,1530.
- [13] 甘化民,张一平.陕西五种土壤红外光谱特征的初步研究[J].土壤学报,1992,29(2):232-236.
- [14] 安晓雯,孙道玮,孙明星,等.纳氏试剂光度法测定中小氨氮实验条件的优化[J].中南民族大学学报(自然科学版),2005,24(4):15-17.