

耐铜细菌及其菌群对纳米 CuO 的淋滤作用研究

咎树婷, 周 刚, 李 静, 苏楠楠, 邵宗圆, 杨如意*

(安徽师范大学环境科学与工程学院, 安徽 芜湖 241003)

摘要:通过 PCR-DGGE 和测序等方法分析了铜累积性植物茵陈蒿(*Artemisia capillaris* Thunb.)根际的细菌群落,并研究了耐铜细菌对纳米 CuO(CuO NPs)的淋滤作用,试图提高 CuO NPs 的生物有效性,以加速修复进程。结果表明,茵陈蒿根际细菌多样性很低,主要由气球菌属、寡养单胞菌属和微球菌属组成,其中气球菌属为优势属。低浓度 CuO NPs 处理对细菌 S31 的生长有一定促进作用,但 400 mg·L⁻¹ 的 CuO NPs 则会对其产生明显抑制;不同浓度下,细菌 S31 对 CuO NPs 的淋滤作用有明显差异;驯化不仅明显改善了细菌的生长状况,还进一步增强了 CuO NPs 的淋滤。通过微生物提高人工纳米材料生物有效性的方法能否实际用于环境修复还有待进一步的试验进行验证。

关键词:重金属;驯化;淋滤

中图分类号:X53 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)06-1082-08 doi:10.11654/jaes.2015.06.010

Leaching of CuO Nanoparticles with Copper Tolerant Bacteria and Their Communities

ZAN Shu-ting, ZHOU Gang, LI Jing, SU Nan-nan, SHAO Zong-yuan, YANG Ru-yi*

(College of Environmental Science and Engineering, Anhui Normal University, Wuhu 241003, China)

Abstract: Behavior, environmental fate and biotoxicity of manufactured nano materials (MNMs) have received extensive attention in recent years. However, it is unclear whether MNMs-contaminated soils could be remediated by combined plant and rhizospheric microbes. In this study, bacterial community structure associated with copper (Cu) accumulating plant *Artemisia capillaris* Thunb. was investigated using PCR-DGGE and sequencing techniques. Subsequently, Cu tolerant bacteria were screened using selective culture medium containing 500 mg·L⁻¹ CuSO₄. The effect of Cu tolerant bacteria and bacterial communities on leaching of nano CuO (CuO NPs) was then studied. Results showed that bacterial community in the rhizosphere had very low diversity, and mainly consisted of genus of *Aerococcus*, *Stenotrophomonas* and *Micrococcus*, with *Aerococcus* being the dominant genus. The growth of bacterium S31 was enhanced by low CuO NPs, but suppressed by 400 mg·L⁻¹ CuO NPs. The Cu tolerant bacterium S31 showed a concentration dependent enhancement on leaching of CuO NPs. Acclimation significantly improved the growth of bacterium S31 and increased the leaching of CuO NPs. This study indicates the potential to remediate MNMs-contaminated soil by combined plant and microbes.

Keywords: heavy metal; acclimation; leaching

人工纳米材料由于具有独特的物理、化学性质而得到广泛应用,但其对人体健康及环境的潜在影响也引起科学界和政府部门的高度关注^[1]。研究发现,不同粒径的重金属颗粒的生物有效性和毒性有显著区别^[2]。与微米级颗粒相比,纳米颗粒具有粒径小、比表面积大、生物活性强等特性,其环境行为、归趋、生物毒性、

生态风险,以及受其污染的环境修复工作越来越受到重视^[3]。CuO 纳米颗粒(CuO NPs)主要用于抗菌性涂料、塑料制品、纺织品和食品的包装^[4],相对于其他纳米材料具有更强的毒性^[5]。纳米颗粒进入环境后会与空气、水和土壤相互作用,导致颗粒的表面性质以及粒子的形态发生变化^[6]。最新研究表明,在培养基中的氨基酸等有机物的作用下,CuO NPs 的淋滤量会显著增加,其淋滤的铜离子量高达60%~75%,离子态的铜更容易被植物吸收,因而毒性显著增强^[2]。

土壤微生物是土壤中的活性胶体,比表面积大、带电荷、代谢活动旺盛,它们本身及其产生的各种物质广泛参与水体、土壤、沉积物等环境介质中的物

收稿日期:2015-01-20

基金项目:国家自然科学基金(41001368);安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2009A026)

作者简介:咎树婷(1980—),女,安徽潜山人,硕士,主要从事环境污染的生态修复、农业废弃物资源化利用等方面的研究。

E-mail:shuting@mail.ahnu.edu.cn

*通信作者:杨如意 E-mail:yangruiyi@mail.ahnu.edu.cn

理、化学和生物化学反应,进而影响多种元素的迁移、转化^[7]。微生物也被证明能够影响重金属形态,进而改变其生物有效性^[8]。海州香薷根际的耐铜细菌可以增加铜的生物有效性,并显著提高植物对铜的累积水平,有助于缩短修复周期^[9]。另有研究表明,丛枝菌根真菌(Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)能够将湿地植物芦苇(*Phragmites australis*)和鸢尾(*Iris pseudoacorus*)根际土壤中的铜转化为金属纳米颗粒^[10],从而降低其对植物的毒害;相反,AMF 会使玉米根际土壤中交换态铜的比例从 26% 升高到 43%^[11],提高白三叶(*Trifolium repens* Linn.)和黑麦草(*Lolium perenne* L.)根际土壤中水溶态砷的浓度^[12]。微生物对重金属形态、有效性的影响决定于微生物和重金属本身的特征,并与两者所处的环境有关。受到环境介质中土壤胶体等多种物质的复杂影响, CuO NPs 的淋滤量和淋滤比率要比在培养基中低很多,因此生物有效性差^[13],难以被植物吸收。如能通过微生物促进其淋滤,将显著提高植物的富集和修复效率。

本研究通过 PCR-DGGE(变性梯度凝胶电泳)和测序等方法,分析了铜矿废弃地上的先锋植物茵陈蒿(*Artemisia capillaris* Thunb.)的根际细菌群落,通过选择性培养基对耐铜细菌进行了筛选和驯化,开展了 CuO NPs 淋滤试验,探讨了影响微生物淋滤的环境因子,从而为提高植物-微生物联合修复 CuO NPs 污染土壤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况及土壤采集

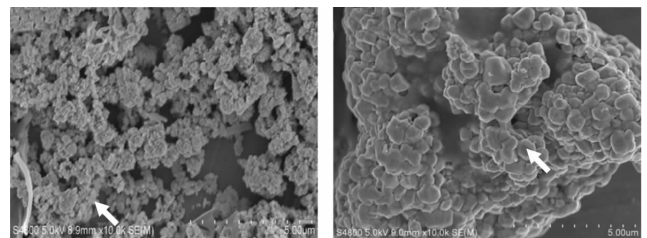
采样地点位于安徽省芜湖市南陵县大工山-凤凰山古铜矿区(30°55'51"N, 118°09'23"E),距铜陵市(30°45'12"~31°07'56"N, 117°42'00"~118°10'06"E)35 km。该地属亚热带季风气候,年均气温 15.8℃,年均降水量 1400 mm,年均蒸发量 1377 mm,平均日照长度为 1935 h,无霜期 237~258 d。废弃地土壤属砂质壤土,水土流失现象严重,由于废弃时间超过 50 a,经过长期自然演替表土层有机质较高。植被主要包括海州香薷(*Elsholtzia splendens* Nakai)、茵陈蒿、鸭跖草(*Commelina communis* L.)、酸模(*Rumex acetosa*)和头花蓼(*Polygonum capitatum*)等草本植物,覆盖率约为 40%。

茵陈蒿是一种铜耐性植物,根部铜积累量可达 533 mg·kg⁻¹^[14]。本研究取样时间为 2014 年 3 月,以 3 个面积约为 20 m² 的废弃地作为取样点,各样点之间

相距 100~120 m。每个取样点随机选取 4 个 1 m×1 m 的样方。将样方内的茵陈蒿整株取出,采用抖根法收集根际土壤,同一样方内的土样混合均匀,作为一个混合样(约 200 g)。所有土壤样品立即带回实验室,部分新鲜土壤用于提取细菌总 DNA,其余土壤自然风干后待用。

1.2 纳米材料

CuO NPs(CAS 1317-38-0)购自 Sigma-Aldrich 公司,分子量 79.55,粒径范围 25~60 nm,平均粒径 48 nm,颗粒近球形,比表面积 29 m²·g⁻¹。作为参照的微米级 CuO 购自生工生物工程(上海)有限公司。两种 CuO 颗粒进行扫描电镜表征,结果见图 1。



(a) CuO NPs 颗粒
CuO nanoparticle
箭头指示单个颗粒大小

(b) 微米级 CuO 颗粒
Micro-sized CuO
箭头指示单个颗粒大小

The arrows indicate the size of an individual particle

图 1 CuO 颗粒扫描电镜图

Figure 1 Scanning electron microscope (SEM) images of CuO particles

1.3 试验方法

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤 pH 值采用 1 mol·L⁻¹ 的 KCl 制成水、土混合液(土:溶液, 1:2.5), pH 计测定。有机质采用 K₂Cr₂O₇-H₂SO₄ 稀释热法测定^[15]。土壤总磷和有效磷浓度分别采用 H₂SO₄-HClO₄ 消解和 HCl-H₂SO₄ 浸提, 钼钼蓝比色法测定^[16]。土壤 Cu、Zn 总量采用 HF-HClO₄-HNO₃ 消解, 有效态 Cu、Zn 通过 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 浸提^[15], 火焰原子吸收分光光度计进行测定(AA-6650, 岛津, 日本)。

1.3.2 细菌群落分析

通过 PCR-DGGE 对细菌群落进行分析。采用 DNA 提取试剂盒 PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, CA, USA) 提取细菌总 DNA。通过巢式 PCR 对细菌 16S rDNA V3 区进行扩增。PCR 扩增均采用 30 μL 的反应体系, 包括: 3 μL 10× PCR buffer, 2.4 μL dNTP (2.5 mmol·L⁻¹), 2 μL MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹), 引物各 1 μL (10 pmol), 1U Taq 聚合酶, 1 μL 模板, 0.5 μL BSA (牛血清蛋白) 和 18.1 μL ddH₂O。

第一轮扩增采用细菌通用引物 27F 和 1492R^[17], 扩增条件为: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。产物大小约为 1500 bp, 扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检验 (80 V, 60 min)。将第一轮扩增产物稀释 10 倍作为第二轮扩增的模板, 引物为 341F (5' 端带有 GC 夹) 和 534R^[18]。第二轮扩增采用降温程序: 94 ℃ 10 min, 94 ℃ 1 min, 65 ℃ 1 min (退火温度每轮降低 1 ℃, 直到降至 56 ℃), 72 ℃ 1 min, 共 10 个循环。后 20 个循环程序为: 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物大小约为 200 bp, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检验 (80 V, 60 min)。

巢氏 PCR 产物采用 BioRad 公司的 Dcode™ 基因突变检测系统 (BioRad Lab, LA, USA) 进行 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶 (37.5:1) 的浓度为 8%, 变性梯度为 35%~50%, 电缓冲溶液为 1×TAE。预热温度达到 60 ℃ 时将 10 μL PCR 产物和 2 μL 6×loading buffer 加入胶孔, 200 V 电泳 5 min, 后将电压降至 120 V 电泳 7 h。电泳结束后, 小心将胶取下, 用 AgNO₃ 进行染色, 拍照。

通过 DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences, China) 对优势条带进行切胶回收, 采用无发夹结构的 341F 和 534R 重新进行扩增。扩增产物用试剂盒 (Axygen Biosciences, China) 进行纯化。纯化后的产物以 pMD18-T 作为载体 (Takara, 大连) 克隆到大肠杆菌 JM109 中表达。阳性克隆送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。

1.3.3 细菌群落淋滤能力分析及分离、纯化

取 10 g 茵陈蒿根际土壤加入 90 mL 无菌水制成土壤悬液, 180 r·min⁻¹ 振荡 30 min, 依次稀释成 10⁻¹~10⁻⁶ 六个梯度。取 0.1 mL 稀释度为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 的土壤悬浮液分别涂布于含有 500 mg·L⁻¹ CuSO₄ 的选择性培养基 (K₂HPO₄ 0.3 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 酵母提取物 5.0 g·L⁻¹, NaCl 10 g·L⁻¹, 琼脂 2%, pH7.2), 每个浓度 3 次重复, 在 37 ℃ 培养 24 h。选择最佳的稀释度, 用灭菌的去离子水将所有细菌菌落转移至水相, 并配制成含有 200、400、600、800 mg·L⁻¹ CuO NPs 的 LB 液体培养基, 37 ℃、280 r·min⁻¹ 培养 6 h。取 10 mL 培养液通过 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤, 去除细菌和 CuO NPs 颗粒, 淋滤液中铜离子浓度通过原子吸收分光光度法测定。从三个样点中选择淋滤能力最强的细菌群落, 对该群落中的细菌通过平板划线分离法逐步纯化, 并接种于斜面培养基, 37 ℃ 培

养 24 h 直至出现菌落, 放入 4 ℃ 冰箱中保存。纯化的细菌进行革兰氏染色^[19]。

1.3.4 耐铜细菌的驯化

将纯化后的耐铜细菌接入 50 mL 的液体 LB 培养基, 37 ℃ 振荡培养 12 h 进行活化。将 1 mL 活化后的菌液接入 50 mL 含有 100 mg·L⁻¹ CuO NPs 的液体 LB 培养基中, 37 ℃ 振荡培养 24 h。随后, 按同样的方法将菌液依次接入含有 200 mg·L⁻¹ 和 400 mg·L⁻¹ CuO NPs 的液体 LB 培养基中进行梯度驯化。在对照和含 200 mg·L⁻¹ CuO NPs 的液体 LB 培养基中检验驯化效果。随后, 将驯化的菌株接种于斜面培养基, 放入 4 ℃ 冰箱中保存。

1.3.5 淋滤实验

将驯化后的耐铜菌株接入 50 mL 液体 LB 培养基中, 37 ℃ 振荡培养 12 h 进行活化。利用超声分散法将 CuO NPs 配成 100、200、400 mg·L⁻¹ 的水悬液, 并作为水相配制 LB 液体培养基。将 1 mL 活化后的菌液接入含有 CuO NPs 的液体 LB 培养基中, 37 ℃、280 r·min⁻¹ 培养 6 h。取 10 mL 培养液通过 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤, 去除细菌和 CuO NPs 颗粒, 淋滤液中 Cu²⁺ 浓度通过原子吸收分光光度法测定。

将驯化后的耐铜菌株接入 50 mL 的液体 LB 培养基中, 37 ℃ 振荡培养 12 h 进行活化。利用超声分散法将 CuO NPs 颗粒配成 100、200、400 mg·L⁻¹ 的水悬液, 并作为水相制成 LB 液体培养基。随后, 按照 2% 的接种量分别接入含有 CuO NPs 颗粒的液体 LB 培养基中, 37 ℃、280 r·min⁻¹ 培养 6 h。取 10 mL 培养液 5000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀和上清液一起放入超声波细胞破碎仪中 (功率 200 W, 1/2 探头, 超声 30 s, 间歇 30 s) 进行超声破碎, 通过 0.22 μm 的微孔滤膜进行过滤, 淋滤液中 Cu²⁺ 浓度通过原子吸收法测定。

1.4 数据分析

使用 SPSS 20.0 对数据进行统计分析 (SPSS, Inc., Chicago, IL), 先进行正态分布和方差齐性检验 (Normal distribution and homogeneity of variance test), 然后进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。不同处理的均值在 5% 的显著性水平下进行 LSD (Least significant difference) 多重比较。细菌群落的多样性、均匀度按下列公式计算:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$E_H=\frac{H}{\ln S}$$

(2)

式中: H 为香农-威纳多样性指数; P_i 是某一泳道中第 i 个条带的亮度占该泳道中条带总亮度的比值; S 为条带数(即丰富度); E_H 为均匀度。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

试验土壤呈酸性(表 1),不同样点的酸度有显著差异($P<0.05$),S1 样点的 pH 最高。但 S1 的有机质、总磷、有效磷均显著低于其他两个样点($P<0.05$)。所有取样点均受到铜、锌两种重金属的复合污染,S1 和 S2 的污染水平相近,但均显著低于 S3 ($P<0.05$)。

表 1 土壤理化性质

Table 1 Soil physiochemical properties

土壤性质 Soil property	取样点 Sampling sites		
	S1	S2	S3
pH	6.98±0.06a	4.90±0.05c	5.82±0.06b
有机质/g·kg ⁻¹	6.40±0.41c	29.35±0.78a	22.21±0.93b
总磷/g·kg ⁻¹	0.22±0.02b	0.50±0.03a	0.53±0.05a
有效磷/mg·kg ⁻¹	8.99±0.05c	17.50±0.52a	14.90±0.41b
总铜/g·kg ⁻¹	7.81±0.71b	11.90±1.11b	25.76±1.95a
有效铜/g·kg ⁻¹	1.31±0.03b	1.51±0.06b	5.13±0.14a
总锌/g·kg ⁻¹	0.22±0.03b	0.25±0.01b	0.43±0.07a
有效锌/mg·kg ⁻¹	8.14±0.75b	9.27±0.41b	13.01±0.99a

注:不同字母标注的数据表示在 0.05 水平下有显著性差异。
Note:Data marked by different letters indicate significant difference at 0.05 level.

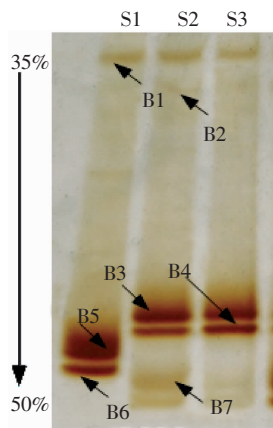


图 2 耐铜细菌群落 16S rDNA V3 区变性梯度凝胶电泳图谱
Figure 2 Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) profile of amplified 16S rDNA V3 region from Cu tolerant bacterial communities

2.2 细菌群落分析

三个取样点细菌群落的 DGGE 电泳结果见图2。细菌群落的多样性指数分别为 1.32、1.80 和 1.79,多样性水平均较低^[20]。丰富度为 4、8 和 8,均匀度为 0.96、0.85 和 0.86。对 3 个群落中亮度较高的 7 条优势条带进行回收测序(长度 160~194 bp),将测序结果与 Genbank 中的数据进行 Blast 比对,并利用核糖体数据库(The Ribosomal Database Project,RDP)中的 Classifier 模块判断序列所属的物种类别(置信度阈值设为 80%),结果列于表 2。结果表明,耐铜细菌分别与寡养单胞菌属、气球菌属和微球菌属相似度最高,其中气球菌属为优势属。

表 2 DGGE 回收条带序列比对结果

Table 2 Match of recovered DGGE bands to known species

条带	登录号	Genbank 中序列最相近的物种	相似度/%
B1	KJ890584	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (LN681567.1)	99
B2	KJ890586	Uncultured bacterium(GQ476158.1)	100
B3	KJ890589	Uncultured <i>Aerococcus</i> (KF506927.1)	100
B4	KJ890590	Uncultured <i>Aerococcus</i> (KM052399.1)	100
B5	KJ890587	<i>Aerococcus urinaeequi</i> (KM052399.1)	100
B6	KJ890588	Uncultured <i>Aerococcus</i> (KM052399.1)	100
B7	KJ890592	<i>Micrococcus luteus</i> (AB999931.1)	100

2.3 细菌群落对 CuO NPs 的淋滤作用

耐铜细菌群落对 CuO NPs 的淋滤结果如图 3。CuO NPs 的淋滤随着处理浓度的升高呈增加趋势,但不同 CuO NPs 浓度下各细菌群落的淋滤结果有明显差异。当 CuO NPs 浓度为 200 mg·L⁻¹ 时,未接种耐铜细菌的对照淋滤出的 Cu²⁺反而最高。但随着 CuO NPs 处理浓度的升高,处理组的淋滤量明显提高,在800 mg·L⁻¹ 浓度下,来自取样点 S3 的细菌群落淋滤效果最好,显著高于其他处理($P<0.05$)。

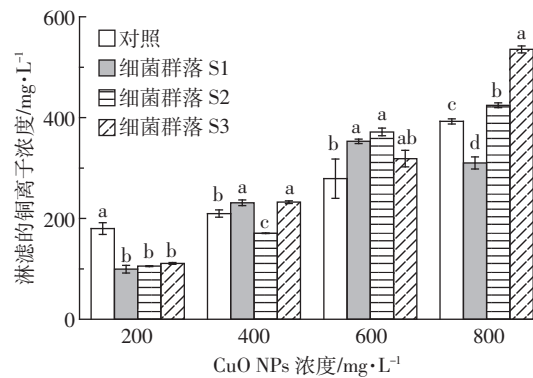


图 3 各细菌群落对 CuO NPs 的淋滤作用
Figure 3 Effect of bacterial communities on leaching of CuO NPs

2.4 细菌的分离、纯化

对细菌群落 S3 进行进一步分离培养和纯化,得到 3 种细菌 S31、S32、S33。通过上述 16S rDNA 序列分析结果(表 2)、革兰氏染色和形态学特征进行分类鉴定。3 种菌落表面湿润,易挑取,正反面颜色一致。其中,S31 呈亮黄色,菌落圆形、有隆起、不透明、边缘整齐、有粘性,革兰氏染色阴性、球菌,确定为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*,图 4a)。S32 呈灰白色,菌落呈圆形或不规则形状、不透明,革兰氏染色阴性、球菌,排列方式包括单个、多联体和成团块等形式,确定为气球菌属(*Aerococcus*,图 4b)。S33 呈棕黄色,菌落圆形、不透明、边缘整齐、革兰氏染色阳性、球菌,排列方式包括单个、多联体或成团块等形式,确定为微球菌属(*Micrococcus*,图 4c)。

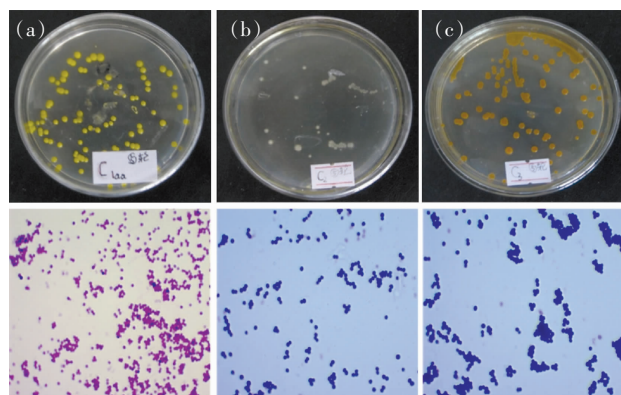
2.5 不同细菌的驯化效果

在驯化前先对细菌的铜耐受水平进行测试。结果表明,细菌在 0~6 h 数量增长较快,6 h 后进入平台期。随着 CuO NPs 浓度的提高,细菌生长受到显著抑制,在 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下细菌增殖速度非常缓慢。

对照条件下,驯化虽然能改善细菌的生长,但对三种细菌 OD 值的影响均不明显(图 5)。加入 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 均对细菌的生长产生明显的抑制作用,S31 和 S32 受抑制明显,但 S33 受影响较小。从驯化的效果来看,S31 驯化后在 CuO NPs 处理中的增殖情况显著改善($P < 0.05$),其他两种细菌驯化效果不明显。因此,选择 S31 进行后续淋滤试验。

2.6 CuO NPs 处理浓度对细菌 S31 的影响

无论是否添加 CuO NPs 及其处理浓度高低,驯



(a)寡养单胞菌属细菌;(b)气球菌属细菌;(c)微球菌属细菌
(a)*Stenotrophomonas* genus;(b)*Aerococcus* genus;
(c)*Micrococcus* genus

图 4 从群落 S3 分离、纯化的耐铜细菌菌斑和革兰氏染色结果
Figure 4 Colony and gram staining of copper-tolerant bacteria isolated and purified from community S3

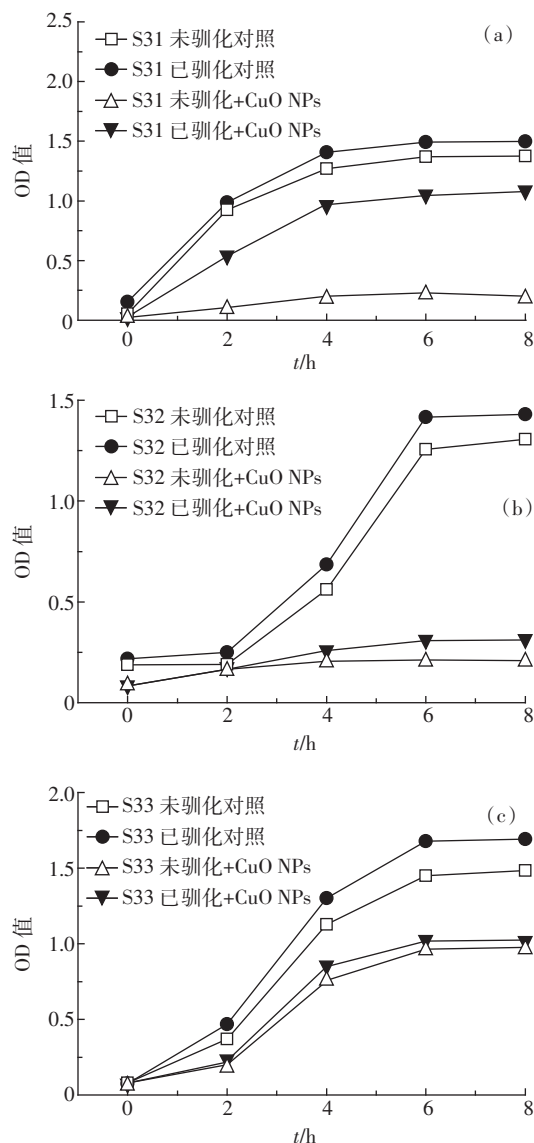


图 5 CuO NPs 对三种细菌的驯化效果

Figure 5 Acclimation of CuO NPs on three bacteria

化后细菌 S31 的生长状况均要好于驯化前。在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,S31 的菌体密度甚至显著高于对照($P < 0.05$,图 6a)。200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理中驯化对细菌 S31 生长的影响更加明显,其菌体密度仍然高于接种未驯化 S31 的对照处理($P < 0.05$,图 6b)。400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CuO NPs 对细菌 S31 的抑制仍十分明显,虽然驯化后细菌的菌体密度仍然相对较高,但增加并不明显(图 6c)。

2.7 细菌 S31 对 CuO NPs 的淋滤

随着 CuO NPs 处理浓度的增加,淋滤出的铜离子量明显提高,但不同浓度的 CuO NPs 处理中驯化对细菌 S31 的淋滤效果有不同影响。在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,接种耐铜细菌 S31 的两个处理淋滤效果均好于对照,但驯化没有明显提高细菌对 CuO NPs 的淋滤。

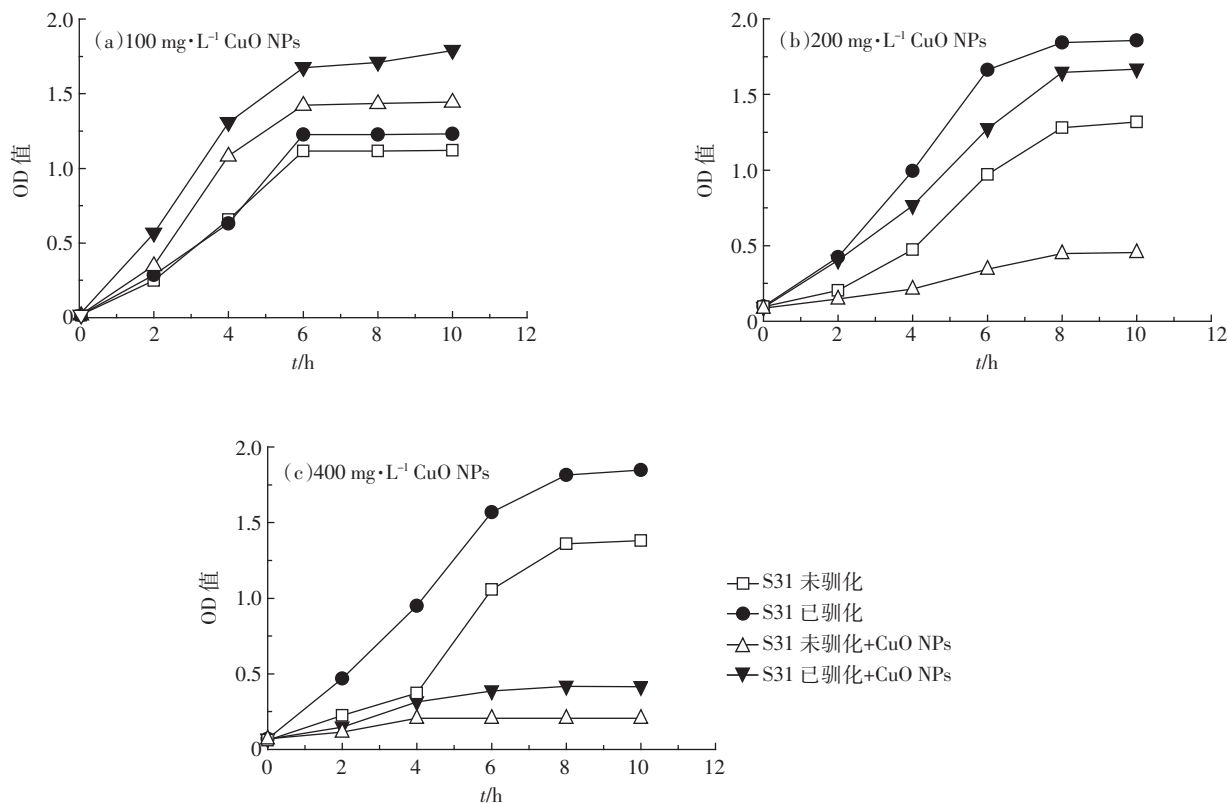


图 6 不同 CuO NPs 浓度对细菌 S31 的影响

Figure 6 Effect of different CuO NPs concentrations on growth of bacterium S31

在 200 mg·L⁻¹ 浓度下三种处理的结果均无差异。在最高的 400 mg·L⁻¹ CuO NPs 浓度下,接种 S31 处理的淋滤效果好于对照,并且驯化后 S31 的淋滤量显著提高 ($P < 0.05$, 图 7)。

2.8 超声对淋滤量的影响

超声处理后细菌 S31 淋滤的铜离子量均有所增加,但只有在 200 mg·L⁻¹ CuO NPs 的处理中达到显著水平 ($P < 0.05$, 图 8), CuO NPs 浓度达到 400 mg·L⁻¹ 时超声对淋滤结果基本没有影响。

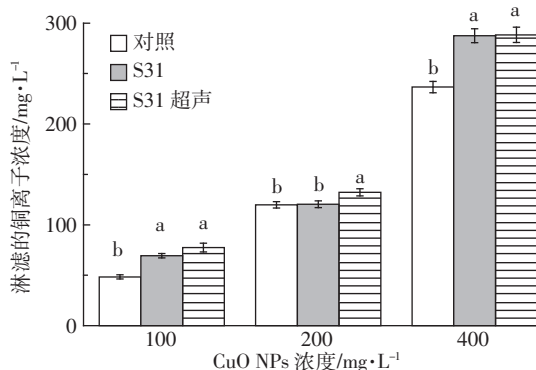


图 8 超声处理细菌 S31 对 CuO NPs 淋滤的影响

Figure 8 Effect of ultrasonic treatment on leaching of CuO NPs

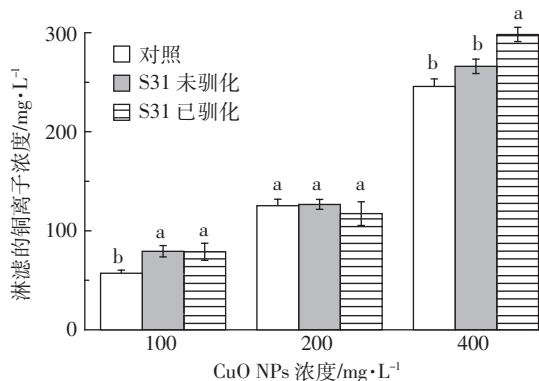


图 7 细菌 S31 对 CuO NPs 的淋滤

Figure 7 Effect of bacterium S31 on leaching of CuO NPs

3 讨论

3.1 耐铜细菌及其对 CuO NPs 的淋滤

本研究的三个样点均受到高浓度的铜锌复合污染,可能是导致茵陈蒿根际耐铜细菌多样性较低的原因之一。该区域铜矿废弃地上的另一种耐铜植物——海州香薷根际 AMF 的多样性也非常低,且多样性与铜污染水平呈显著负相关^[20]。研究中筛选的耐铜细菌分别属于气球菌属、寡养单胞菌属和微球菌属,其中气球菌属为优势属。微球菌、假单胞菌(*Pseudomonas*)

在铜污染生境中十分常见,铜离子浓度达 $560 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 仍可正常生长,耐铜能力较高^[21],但气球菌和寡养单胞菌目前还未曾报道。与其他研究中发现的耐铜细菌相比^[22],本研究筛选的三个属的细菌铜耐性水平均较低, $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs(铜离子浓度 $<300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对其增殖就已造成了非常明显的抑制,而且在有机物作用下通过淋滤作用产生的铜离子毒性要低于 CuSO_4 等盐类产生的铜离子。其原因可能是铜离子与多肽物质相结合,降低了对细菌的毒害作用^[2]。

Gunawan 等^[2]研究表明, CuO NPs 的淋滤主要是由氨基酸等小分子量有机物引起的,本研究中未接种细菌的对照处理 CuO NPs 的淋滤也可以达到 50% 左右,主要是源于酵母浸提液中各种有机物的影响。研究发现,耐铜细菌产生的有机酸可以进一步提高铜的淋滤量^[9]。这可能是本研究中细菌促进 CuO NPs 淋滤的重要原因之一。耐铜细菌可以通过细胞壁和细胞膜大量吸附铜离子^[23],以降低对细胞的氧化胁迫。本研究对细菌进行超声处理后,淋滤的铜离子量会有所增加(图 8),可能与细菌对铜离子的解吸有关,也可能与超声处理导致 CuO NPs 趋于分散,从而进一步促进淋滤有关。从本研究的结果可以推断,耐铜细菌对 CuO NPs 的淋滤决定于淋滤出的铜离子总量与被菌体吸附的铜离子的差值,并与 CuO NPs 的处理浓度有关。 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对照的淋滤量反而高于接种任何一种细菌群落的治疗,可能是由于该浓度下细菌的增殖并未受太明显的抑制,虽然接种细菌使淋滤出的铜离子总量有所增加,但被细菌所吸附的铜离子增加更多所造成的。细菌群落在不同 CuO NPs 浓度下的淋滤效果有显著差异,群落 S3 在 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下淋滤值最高,而 S1 和 S2 分别在 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时表现最好。由于 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 就已对细菌的增殖产生了显著抑制,可以推断 S3 之所以在 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下淋滤量达最大值可能与以下两方面的原因有关:一是 S3 在高浓度 CuO NPs 下通过菌体自身活动,产生了更多的氨基酸或其他小分子有机酸等代谢产物,增加了铜离子的溶出;二是由于细菌增殖受到强烈抑制,菌体吸附的铜离子大大减少。重金属胁迫下,微生物和植物大量释放有机酸是一种十分常见的现象,不仅可以改变金属的形态和粒径^[10],还可以通过螯合作用降低重金属毒害^[24]。因此,细菌为缓解铜的胁迫产生了更多有机酸,但同时又进一步增加了铜的有效性。Li 等^[25-26]发现,镉胁迫下不同藻类之间会产生互惠现象(Facilitation),镉敏感的藻类

会受到耐镉藻类的保护,因此多样性越高生产力也越高,对镉的去除能力越强。本研究未测定细菌群落在不同 CuO NPs 处理中的生长情况,因此难以判断细菌之间是否存在互惠作用。但从最终的淋滤量来看,从群落 S3 分离出的细菌 S31 无论是否进行驯化其淋滤量均高于群落 S3。实际上 S31 是组成群落 S3 的三种细菌中对铜胁迫最敏感的(图 5),其淋滤量高于群落 S3 可能是由于有机酸释放能力更强,菌体所吸附的铜离子更少造成的。

3.2 影响细菌淋滤 CuO NPs 的因素

经过铜梯度驯化后,三种细菌的增殖情况均有所改善,尤其是 S31,驯化后对铜胁迫的耐性显著增加。低浓度 CuO NPs 处理中($100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)S31 的生长量甚至高于对照,说明少量的铜离子对耐铜细菌的生长有一定的促进作用。这是很多耐受性生物的共同特征。但是, $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 对细菌生长的抑制仍十分明显。

本研究结果表明,耐铜细菌对 CuO NPs 的淋滤,以及驯化对淋滤的影响,与 CuO NPs 的处理浓度有关。 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CuO NPs 产生的铜离子促进细菌生长,虽然其吸附的铜离子也在增加,但细菌对淋滤作用的强化占优势,因此净淋滤量高于对照。 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CuO NPs 处理使细菌对铜离子的正负影响基本达到平衡,但此浓度下驯化对细菌增殖的效果最为明显。当 CuO NPs 浓度增加到 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细菌通过有机酸的作用溶出更多铜离子,吸附的铜离子则大大减少,因此净淋滤量高于对照。由于受到多种因素的共同影响,自然环境中 CuO NPs 的迁移、转化等环境行为将更加复杂。耐铜细菌能否强化 CuO NPs 污染环境的植物修复效果还有待通过进一步的盆栽试验进行验证。

4 结论

(1)茵陈蒿根际耐铜细菌群落多样性较低,主要包括气球菌、寡养单胞菌和微球菌等三个属,气球菌为优势属。

(2)细菌 S33 对铜耐性最强,但 S31 的驯化效果最好, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 处理对 S31 的生长有一定促进作用, $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 仍会产生明显抑制。

(3)不同处理浓度下,细菌 S31 对 CuO NPs 的淋滤作用、驯化对淋滤的影响均有明显差异,可能与细菌的增殖、有机酸的释放,以及菌体对铜离子的吸附等因素有关。

参考文献:

- [1] 王娜,程炯佳,金焰,等.人工纳米材料的生物效应及其对生态环境的影响[J].生态毒理学报,2007,2(3):252-264.
WANG Na, CHENG Jiong-jia, JIN Yan, et al. The biological effects of manufactured nanomaterials and their effects on eco-environment[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3):252-264.
- [2] Gunawan C, Teoh W Y, Marquis C P, et al. Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: Comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts[J]. *ACS Nano*, 2011, 5(9):7214-7225.
- [3] 王萌,陈世宝,马义兵.纳米材料在污染环境修复中的生态毒性研究进展[J].应用生态学报,2010,21(11):2986-2991.
WANG Meng, CHEN Shi-bao, MA Yi-bing. Application of nanoscale material in environmental remediation and its eco-environmental toxicity assessment: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(11):2986-2991.
- [4] Abramova A, Gedanken A, Popov V, et al. A sonochemical technology for coating of textiles with antibacterial nanoparticles and equipment for its implementation[J]. *Materials Letters*, 2013, 96:121-124.
- [5] Hsieh S F, Bello D, Schmidt D F, et al. Mapping the biological oxidative damage of engineered nanomaterials[J]. *Small*, 2013, 9(9/10):1853-1865.
- [6] Handy R D, von der Kammer F, Lead J R, et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles[J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(4):287-314.
- [7] Limbach L K, Wick P, Manser P, et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: Influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(11):4158-4163.
- [8] 陈怀满.土壤中化学物质的行为与环境质量[M].北京:科学出版社,2002:79-136.
CHEN Huai-man. The behavior of chemicals in the soil and environmental quality[M]. Beijing: Science Press, 2002:79-136.
- [9] Chen Y X, Wang Y P, Lin Q, et al. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens* [J]. *Environmental International*, 2005, 31(6):861-866.
- [10] Manceau A, Nagy K L, Marcus M A, et al. Formation of metallic copper nanoparticles at the soil-root interface[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(5):1766-1772.
- [11] Huang Y, Tao S, Chen Y J, et al. The role of arbuscular mycorrhiza on change of heavy metal speciation in rhizosphere of maize in wastewater irrigated agriculture soil[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17(2):276-280.
- [12] Dong Y, Zhu Y G, Smith F A, et al. Arbuscular mycorrhiza enhanced arsenic resistance of both white clover, (*Trifolium repens* Linn.) and ryegrass(*Lolium perenne* L.) plants in an arsenic-contaminated soil[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 155(1):174-181.
- [13] 金盛杨,王玉军,汪鹏,等.纳米与微米CuO及Cu²⁺对土壤脲酶的生态毒性比较研究[J].生态毒理学报,2010,5(6):835-841.
JIN Sheng-yang, WANG Yu-jun, WANG Peng, et al. Comparative ecotoxicity of nanometer-micrometer-sized CuO and ionic copper to soil urease[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(6):835-841.
- [14] 娄晓伟,杨如意,郭耀广,等.铜陵市主要铜矿废弃地耐铜植物的铜积累能力比较研究[C].2012中国环境科学学会学术年会论文集(第三卷),2012:2631-2634.
LOU Xiao-yi, YANG Ru-yi, GUO Yao-guang, et al. Comparative study of the Cu accumulation in Cu tolerant plants grown on Cu mine spoils of Tongling city[C]. Proceedings of Academic Annual Conference of Chinese Society for Environmental Science in 2012(volume 3), 2012:2631-2634.
- [15] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000:373-375.
BAO Shi-dan. Method of soil chemistry analysis[M]. Beijing: Chinese Agriculture Science and Technology Publishers, 2000:373-375.
- [16] Olsen S R, Sommers L E. Phosphorus[M]//Page A L, Miller R H, Keeney D R(Eds.). Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. American Society of Agronomy, Inc., Wisconsin, 1982:1159.
- [17] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. *Microbiology*, 2002, 148(4):1233-1239.
- [18] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.
- [19] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2007:41-48.
SHEN Ping, CHEN Xiang-dong. Microbiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007:41-48.
- [20] Yang R Y, Zan S T, Tang J J, et al. Variation in community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with a Cu tolerant plant: *Elsholtzia splendens* [J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(3):191-197.
- [21] He L Y, Zhang Y F, Ma H Y, et al. Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 44(1):49-55.
- [22] 王海鸥,钟广蓉,王立曼,等.一株耐铜细菌的鉴定及富集特性的研究[J].环境工程学报,2011,5(10):2380-2384.
WANG Hai-ou, ZHONG Guang-rong, WANG Li-man, et al. Identification of a copper resistant bacteria and its accumulation ability[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(10):2380-2384.
- [23] 林海,朱亦珺,董颖博,等.一株耐酸耐铜细菌的选育及其吸附铜离子的特性[J].环境化学,2013,32(4):509-604.
LIN Hai, ZHU Yi-jun, DONG Ying-bo, et al. Breeding and adsorption properties investigation of a strain resistant to acid and copper ions[J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(4):509-604.
- [24] 范伟,娄和强,龚育龙,等.调控铝诱导根尖有机酸分泌的分子机制[J].植物生理学报,2014,50(10):1469-1478.
FAN Wei, LOU He-qiang, GONG Yu-long, et al. Molecular mechanisms regulating aluminum-induced secretion of organic acids in root apex[J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(10):1469-1478.
- [25] Li J T, Duan H N, Li S P, et al. Cadmium pollution triggers a positive biodiversity-productivity relationship: Evidence from a laboratory microcosm experiment[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2010, 47(4):890-898.
- [26] Li S P, Li J T, Kuang J L, et al. Effects of species richness on cadmium removal efficiencies of algal microcosms[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2012, 49(1):261-267.