



Agromyces sp. CS16 去除水体中重金属镉、镍、铜、锌离子的研究

张祖焯, 何梦园, 乔月, 贾润梅, 彭祥轩, 麦华明, 陈思*

深圳大学生命与海洋科学学院, 广东 深圳 518060

张祖焯, 何梦园, 乔月, 贾润梅, 彭祥轩, 麦华明, 陈思. *Agromyces* sp. CS16 去除水体中重金属镉、镍、铜、锌离子的研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2791-2808.

ZHANG Zuye, HE Mengyuan, QIAO Yue, JIA Runmei, PENG Xiangxuan, MAI Huaming, CHEN Si. Removal of cadmium, nickel, copper, and zinc ions from water by *Agromyces* sp. CS16[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2791-2808.

摘要:【目的】本研究从深圳福田红树林表层土壤中分离出一株潜在放线菌新种 *Agromyces* sp. CS16, 研究其对水体中重金属的去除能力以及特征, 并初步探究其在去除水体重金属中的实际应用, 为利用微生物修复水体重金属污染提供技术支持。【方法】测定菌株 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力; 测定 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 在胞外吸附和胞内吸收的占比; 通过全基因组测序分析 CS16 基因组中与重金属耐受相关的基因; 采用海藻酸钠和聚乙烯醇将 CS16 包埋, 并测定包埋后 CS16 对重金属的去除能力。【结果】放线菌 *Agromyces* sp. CS16 在 Cd^{2+} 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时对其的去除量最大, 为 32.95 mg/g, 此时对溶液中 Cd^{2+} 的去除率也最高, 达到 83.71%; 菌株 CS16 在 Ni^{2+} 浓度为 75 $\mu\text{g/mL}$ 时去除量最大, 为 25.09 mg/g, 在 Ni^{2+} 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时去除率最高, 为 70.27%; CS16 在 Cu^{2+} 浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 时去除量最大, 为 30.69 mg/g, 在 Cu^{2+} 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时去除率最高, 为 80.11%; CS16 在 Zn^{2+} 浓度为 125 $\mu\text{g/mL}$ 时去除量最大, 为 39.29 mg/g, 在 Zn^{2+} 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时去除率最高, 为 88.91%。菌株 CS16 全基因组预测总共有 3 744 个基因, 其中有 37 个基因推测与 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的抗性相关。CS16 主要通过将重金属吸附在细胞外表面来去除水体中的重金属, 在被海藻酸钠(sodium alginate, SA)与聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)材料包埋后, CS16 对 Cd^{2+} 的去除能力下降, 但对 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力显著提高。【结论】放线菌 *Agromyces* sp. CS16 是一株分离自红树林表层沉积物的新菌, 本研究测定了 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力, 从细胞层面和基因层面初步探索了其对于 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的

资助项目: 广东省自然科学基金面上项目(2019A1515012047)

This work was supported by the Guangdong Provincial Natural Science Foundation (2019A1515012047).

*Corresponding author. Tel: +86-755-26919729, Fax: +86-755-26534274, E-mail: sichen@szu.edu.cn

Received: 2022-10-28; Accepted: 2023-02-08; Published online: 2023-02-14

去除机理，并成功用海藻酸钠和聚乙烯醇将其包埋，为探究微生物去除水体重金属离子的机制和之后应用 CS16 修复水体重金属污染提供了理论基础。

关键词：放线菌；重金属；微生物修复

Removal of cadmium, nickel, copper, and zinc ions from water by *Agromyces* sp. CS16

ZHANG Zuye, HE Mengyuan, QIAO Yue, JIA Runmei, PENG Xiangxuan, MAI Huaming, CHEN Si*

College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract: [Objective] A potential new actinomycete strain *Agromyces* sp. CS16 was isolated from the surface soil of the mangrove in Futian, Shenzhen. We studied the capacity and application of the strain in the removal of heavy metals from water, aiming to provide technical support for the bioremediation of heavy metal-polluted water. [Methods] The capacity of strain CS16 in removing Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} , and the extracellular and intracellular removal rates of the metal ions were determined. Moreover, the whole genome sequencing was performed to identify the genes associated with the heavy metal tolerance in strain CS16. Furthermore, CS16 was embedded with sodium alginate and polyvinyl alcohol, and the capacities of CS16 to remove heavy metals after embedding were also determined. [Results] *Agromyces* sp. CS16 presented great metal removal capacity. For Cd^{2+} , the strain showed the maximum removal capacity of 32.95 mg/g and the maximum removal rate of 83.71% with the initial Cd^{2+} concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. For Ni^{2+} , *Agromyces* sp. CS16 presented the maximum removal capacity of 25.09 mg/g with the initial Ni^{2+} concentration of 75 $\mu\text{g/mL}$, and it presented the maximum removal rate of 70.27% with the initial Ni^{2+} concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. For Cu^{2+} , CS16 had the maximum removal capacity of 30.69 mg/g with the initial Cu^{2+} concentration of 150 $\mu\text{g/mL}$ and the maximum removal rate of 80.11% with the initial Cu^{2+} concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$. For Zn^{2+} , the strain had the maximum removal capacity of 39.29 mg/g with the initial Zn^{2+} concentration of 125 $\mu\text{g/mL}$ and the maximum removal rate of 88.91% with the initial Zn^{2+} concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$. A total of 3 744 genes were predicted in the whole genome of strain CS16, of which 37 genes were deduced to be associated with the resistance to Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . CS16 mainly removed heavy metals in water by adsorbing heavy metal ions on cell walls. The embedding with sodium alginate (SA) and polyvinyl alcohol (PVA) decreased the removal capacity of CS16 for Cd^{2+} and improved the removal capacities for Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . [Conclusion] *Agromyces* sp. CS16 is a new strain isolated from mangrove surface sediments, with great capacity in removing Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} from water. We explored the metal removal mechanisms of the strain at both cellular and genetic levels. CS16 was embedded with sodium alginate and polyvinyl alcohol and the embedding product presented better removal capacity for

Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . In summary, CS16 is an efficient microbial agent in bioremediation of heavy metal-polluted water. Moreover, the findings of this study provide a theoretical basis for deciphering the mechanism of removing heavy metal ions from water by microorganisms.

Keywords: actinomycete; heavy metals; microbial remediation

重金属指密度大于 4.5 g/cm^3 的金属, 例如 Cd、Ni、Cu、Zn 等。重金属具有难以降解、易溶于水的特点, 容易在环境中累积造成污染, 已经造成了世界性的环境污染问题^[1-3]。重金属污染的不断加重使得重金属污染修复的研究愈加地受重视, 目前对于重金属污染的修复, 主要分为物理、化学、生物方法。其中传统的物理和化学方法可以有效的去除重金属污染, 但有着容易造成二次污染、成本高等缺点^[4]。而微生物修复方法不仅可以高效地修复重金属污染, 还有着成本低、对环境友好等特点^[5-6], 因此成为了如今研究重金属污染修复的热点^[7]。近几年有研究^[8-9]已经开始利用微生物修复土壤、水体等各种环境中的重金属污染, 对微生物修复技术的研究具有重要意义。

多数研究^[10-11]选择从重金属污染严重的区域寻找能够去除重金属的微生物, 例如金属矿区、污水处理厂等重金属污染严重的区域中常常存在着能够耐受重金属生长并具有去除重金属的潜力的微生物^[12-13], 但这些区域的重金属含量过于丰富, 会影响其中微生物的组成, 破坏微生物群落^[14-15]。而发达城市周边的红树林, 如深圳福田红树林, 有一定程度的、长期的重金属污染^[16-17], 在这样长时间、低剂量刺激的重金属污染环境中, 微生物群落与网络之间长期相互作用, 加强了环境中微生物对重金属的适应性^[18], 也许可以从中自然筛选出与重金属严重污染区域不同的、具有去除重金属潜力的微生物。本研究发现了一株通过重金属胁迫从红树林土壤中筛选出的放线菌新种 *Agromyces* sp. CS16, 其分离自长期受重金属污染的红树林土壤中, 具有去除重金属的潜力。

微生物繁殖快、成本低, 是修复重金属污染的理想材料, 但在实际应用微生物处理水体时常面临一个问题, 就是如何在去除完重金属离子后将微生物从环境中回收, 现有的研究常采用固定化的方法解决。微生物的固定化不仅可以使微生物方便回收, 其材料还对微生物菌体提供了保护和支撑的功能^[19]。海藻酸钠(sodium alginate, SA)是一种天然的高分子化合物, 具有良好亲水性、良好机械强度、接近水的密度、较长耐久等优点^[20], 是良好的微生物固定材料; 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)具有低成本、无毒性、微生物相性好等优点^[21], 两者与微生物结合形成凝胶小球是常见的包埋微生物的方法。

本研究测定了新种 *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力, 探究了不同重金属的初始浓度、不同接触时长对 CS16 去除重金属能力的影响, 通过测定 CS16 对重金属富集部位占比探究了 CS16 的去除机理, 通过全基因组分析从基因层面进一步探究其对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除机理, 成功利用海藻酸钠和聚乙烯醇将 CS16 包埋, 测定了包埋有 CS16 的凝胶小球去除重金属的能力。为微生物去除重金属的机制提供了理论支持, 丰富了微生物的基因库, 对应用微生物修复重金属污染的研究提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

Agromyces sp. CS16 分离自深圳福田红树林表层土壤, 由本实验室筛选并培养。*Agromyces kandeliae* Q22 (MCCC 1K03340)购自中国海洋

微生物菌种保藏中心,由自然资源部第三方海洋研究所提供。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 5 g/L 氯化钠, pH 调至 7.6 ± 0.2 , 配制固体培养基需加入 18 g/L 琼脂粉。

1.2 抗重金属微生物的筛选

使用传统的稀释涂布平板法对抗重金属的微生物进行筛选。取 1.0 g 土样于 9 mL 无菌水中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡 30 min, 作为土壤悬浊液。将土壤悬浊液梯度稀释得到稀释浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的稀释液, 分别取 100 μL 稀释液于含 100 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 和含 50 $\mu\text{g/mL}$ Ni^{2+} 的固体 LB 平板中, 加入小玻璃珠并摇晃平板, 使稀释液均匀涂布在平板上。用平板划线法对平板上的单菌落进行分离。

1.3 *Agromyces* sp. CS16 的鉴定

Agromyces sp. CS16 分离自含 50 $\mu\text{g/mL}$ Ni^{2+} 的 LB 固体平板中, 鉴定采用 16S rRNA 基因测序的方法。从平板刮取少量 CS16 菌体, 用 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒提取 DNA, 用 1.1 \times T3 Super Mix 酶和通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') 进行 PCR, 将 PCR 产物送至北京擎科生物科技有限公司进行 DNA 测序, 将测序所得结果上传至 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 网站的数据库上进行基因序列的比对, 获得相似种的相似性。根据 CS16 的 16S rRNA 序列, 用 MEGA-X 构建 CS16 的进化树。

1.4 菌株重金属耐受性的测定

取 2.5 mL 培养基于 6 孔细胞培养板中, 在含 20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} , 100、200、300、400、500 $\mu\text{g/mL}$ Ni^{2+} , 200、400、600、800、1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} , 200、400、600、800、1 000 $\mu\text{g/mL}$

Zn^{2+} 的液体培养基中各接种 125 μL CS16 菌株 (接种量 5%), 放入酶标仪测定初始 OD_{600} 后用封口膜密封, 放置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床中 100 r/min 振荡培养, 7 d 后取出测定 OD_{600} , 对比培养前后 OD_{600} 变化判断 CS16 是否生长。

1.5 菌株去除重金属离子能力的测定

1.5.1 对不同初始浓度的重金属的去除

参考 He 等^[22]的方法, 测定菌体对重金属的去除。将 CS16 菌液、Q22 菌液按每管 20 mL 的量分装到 50 mL 离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min 后, 倒去上清液, 再向离心管中加入 25 mL 高纯水, 再次 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min, 倒去上清液, 以洗去培养基。各取 3 管 CS16 菌体、Q22 菌体, 放入冻干机中冻干, 24 h 后称量其中菌体干重。用电动移液枪向其余离心管中分别加入 25 mL 的 10、25、40、55、70 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} 溶液, 25、50、75、100、125 $\mu\text{g/mL}$ Ni^{2+} 溶液, 30、60、90、120、150 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 溶液, 25、75、100、125 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} 溶液, 每个浓度各加 3 管, 将离心管放入摇床中振荡培养 2 h 后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 10 mL, 用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测定上清液中重金属的浓度, 即为去除后剩余浓度。

1.5.2 不同接触时长下对重金属的去除

将 CS16 菌液按每管 20 mL 的量分装到 50 mL 离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min 后, 倒去上清液, 再向离心管中加入 25 mL 高纯水, 再次 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min, 倒去上清液, 以洗去培养基。洗去培养基后取 3 管 CS16 菌体放入冻干机中冻干, 24 h 后称量其中菌体干重。用电动移液枪向其余离心管中分别加入 40 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} 溶液、125 $\mu\text{g/mL}$ Ni^{2+} 溶液、150 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 溶液、75 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} 溶液, 将离心管放入摇床中分别振荡培养, 分别在振荡 15、30、60、120、240、360 min 后取 3 管, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、

8 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 10 mL, 用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测定上清液中重金属的浓度, 即为去除后剩余浓度。

1.5.3 凝胶小球对重金属的去除

称取 3 g 湿重的凝胶小球到 50 mL 离心管中, 用电动移液枪向离心管中加入 30 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 溶液, 每种金属分别加 3 管, 将离心管放入摇床中振荡培养 2 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 10 mL, 用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测定上清液中重金属的浓度, 即为去除后剩余浓度。

1.5.4 去除率和去除量的计算

去除率可以表示菌体去除了溶液中多少百分比的重金属, 即溶液中重金属离子的去除率(公式 1); 去除量(公式 2)可以表示每 g 菌株去除了多少 mg 重金属。

$$\text{去除率} = \frac{\text{初始浓度} - \text{剩余浓度}}{\text{初始浓度}} \quad (1)$$

$$\text{去除量} = \frac{\text{初始浓度} - \text{剩余浓度}}{\text{菌体干重}} \times 25 \text{ mL} \quad (2)$$

1.5.5 数据的分析

采用 IBM SPSS statistics 25 软件进行统计分析。采用 *t*-test 分析数据差异显著性, “*”代表有统计学差异, $P < 0.05$; “**”代表有显著性差异, $P < 0.01$; “***”代表有极显著性差异, $P < 0.001$ 。采用单因素方差分析推断不同接触时间对去除率和去除量的影响, 其中接触时间为因素, 共有 15、30、60、120、240、360 min 六个因素水平, $P < 0.05$ 代表不同因素水平之间有统计学差异。

1.6 重金属离子在菌体细胞不同部位占比的测定

参考李森等^[23]的方法, 测定重金属在 CS16 上的富集占比。收集接触了重金属离子溶液 2 h 的 CS16 菌体, 加入 25 mL 0.1 mol/L 的 EDTA·2Na 洗脱液, 于摇床振荡洗脱 30 min, 离心取上清液, 测定重金属浓度, 即为细胞表面吸

附重金属的量。倒去多余上清液, 再向菌体中加入 25 mL 0.1 mol/L 的 EDTA·2Na 洗脱液, 于细胞破碎仪中超声破壁 8 min, 然后于摇床振荡培养 30 min, 离心取上清液, 测定重金属浓度, 即为细胞内吸收重金属的量; 倒去多余上清, 向剩余的细胞残体加入 4 mL 王水, 消解 2 h 后测定其重金属含量作为菌体对重金属离子的稳定结合量, 每组设立 3 个重复。

1.7 全基因组分析

将 *Agromyces* sp. CS16 和 *Agromyces kandeliae* Q22 菌体送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行全基因组测序。通过返还数据的注释, 从基因组中挑选与 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 去除相关的基因并进行对比。

1.8 海藻酸钠-聚乙烯醇(SA-PVA)凝胶小球的制备

参考徐梦洁等^[24]的方法制备凝胶小球。将 400 mL CS16 菌液离心浓缩至 30 mL, 加到 100 mL 已灭菌的 PVA-SA 混合物(14%聚乙烯醇+1%海藻酸钠)中, 混匀成 SA-CS16 混合液, 与已灭菌的 500 mL 饱和硼酸和 5% CaCl_2 溶液同时接到自动滴定装置的两端, 控制 0.1 mL/min 滴速, 300 r/min 转速, 将 SA-CS16 混合液缓慢滴入饱和硼酸和 5% CaCl_2 溶液中, 得到乳白色弹性的小球颗粒。

菌液浓缩后取 5 mL 菌液放入冻干机中冻干, 24 h 后称重, 得菌体总干重。凝胶小球制备完成过后称重, 得凝胶小球总湿重。通过菌体总干重和凝胶小球总湿重换算每 g 湿重的凝胶小球包含 CS16 菌体的重量。

2 结果与分析

2.1 *Agromyces* sp. CS16 的形态和进化树

本研究对深圳福田红树林保护区潮滩处的表层土壤进行耐受重金属微生物的筛选, 并从中

分离出一株潜在的放线菌新种 *Agromyces* sp. CS16, 通过 16S rRNA 基因测序发现它与 *Agromyces binzhouensis* 相似度最高, 为 98.48%, 将两者进一步进行比较发现两者的全基因组平均核苷酸相似度(average nucleotide identity, ANI) 结果为 89.84% (此值小于 95% 则界定为新种), DNA-DNA 杂交值为 64.80% (此值小于 70% 则界

定为新种)。观察 CS16 平板发现其单菌落特征表现为圆形、淡黄色、半透明、表面和边缘光滑(图 1A), 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察发现 CS16 细胞呈长杆状, 相互交联(图 1B)。根据 16S rRNA 基因序列构建进化树, 结果如图 2 所示, CS16 与 *Agromyces kandeliae* Q22 在进化树上最为接近。

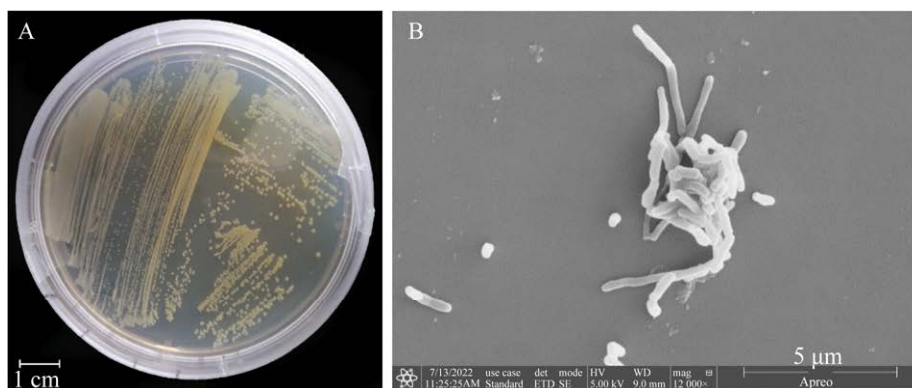


图 1 *Agromyces* sp. CS16 菌落与细胞的形态观察

Figure 1 Morphological observation on colony and cell of *Agromyces* sp. CS16.

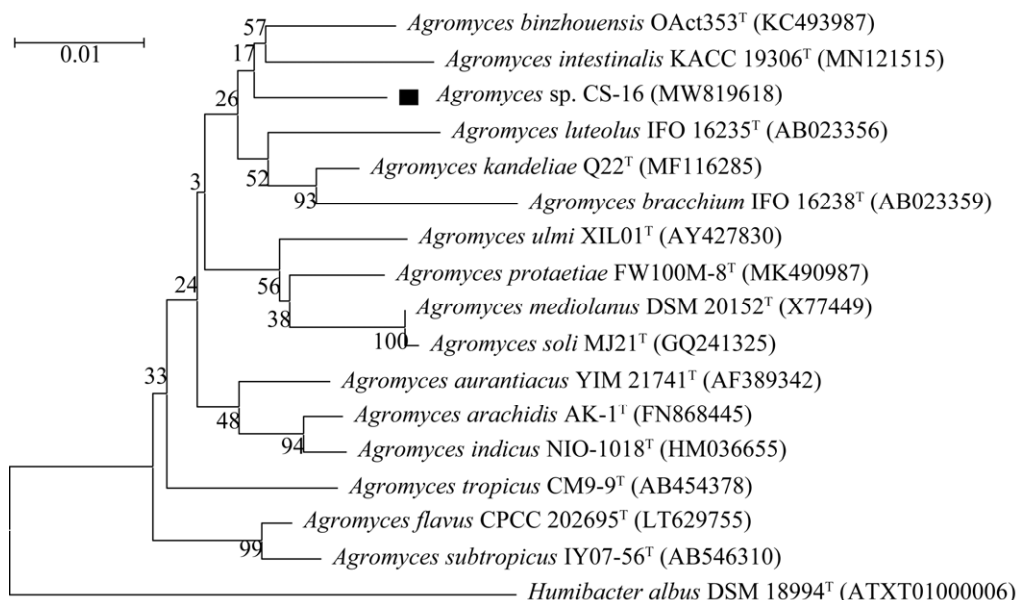


图 2 *Agromyces* sp. CS16 进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of *Agromyces* sp. CS16. Node values represent percent bootstrap confidence derived from 1 000 replicates. Bar 0.01 at the top is the sequence divergence. The GenBank accession numbers of the indicated sequences are shown in the parentheses.

2.2 *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的耐受性

为了探究 *Agromyces* sp. CS16 在液体环境中能够耐受的 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度范围, 分别将 CS16 菌株接种在含 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的液体培养基中, 并观察其生长状况。结果如表 1 所示, 培养 1 周后, 含有 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd^{2+} 、400 $\mu\text{g/mL}$ Ni^{2+} 、1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 、400 $\mu\text{g/mL}$ Zn^{2+} 的培养基变浑浊, 说明 CS16 能够在其中生长; 而更高浓度的含 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 培养基未变浑浊, 说明 CS16 的生长受到了抑制。因此 CS16 在液体 LB 培养基中对 Cd^{2+} 的耐受浓度在 20–40 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 对 Ni^{2+} 的耐受浓度在 400–500 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 对 Zn^{2+} 的耐受浓度在 800–1 000 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 对 Cu^{2+} 的耐受浓度 > 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。总体而言, *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 都有较高的耐受性。

2.3 *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去 除能力

2.3.1 不同初始浓度 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对 *Agromyces* sp. CS16 去除能力的影响

为了探究不同初始浓度的 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对 *Agromyces* sp. CS16 去除重金属离子能力

的影响, 分别测定了 CS16 在接触了不同浓度 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 溶液 2 h 后的去除率和去除量。图 3B、D、F、H 分别显示了 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除率, 发现 CS16 对低浓度 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除率分别可达到 83.71%、80.96%、80.11%、88.91%, 这意味着在低浓度的重金属溶液中, CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 都有着较高的去除能力。图 3A 显示了 CS16 对 Cd^{2+} 的去除量, 发现 CS16 对 Cd^{2+} 的去除量随 Cd^{2+} 的初始浓度上升而下降, 在 Cd^{2+} 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时最高, 为 32.95 mg/g; 当 Cd^{2+} 的初始浓度达到 70 $\mu\text{g/mL}$ 时, 去除量下降到 18.37 mg/g。对 Cd^{2+} 去除量的下降可能是由于高浓度的 Cd^{2+} 对 CS16 产生了毒害作用, 使得 CS16 生物量下降, 进而导致了去除量下降。图 3B–D 分别显示了 CS16 对 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除量, 发现 CS16 对 Ni^{2+} (最高去除量为 25.09 mg/g)、 Cu^{2+} (最高去除量为 30.69 mg/g)、 Zn^{2+} (最高去除量为 36.29 mg/g) 的去除量随重金属浓度而先升高后略微浮动, 可能是 CS16 随着溶液中重金属含量的增加而去除更多的重金属, 而后达到一定浓度时, CS16 对重金属的去除趋于饱和。

Agromyces kandeliae Q22 分离自红树林土壤, 是一株在进化上以及生存环境上均与 CS16 相近的菌株, Q22 可以作为 CS16 的阳性对照, 比较二者可以初步验证 CS16 是否具有较强的去除重金属能力, 因此本研究将 Q22 与 CS16 同步培养进行实验。图 3 显示, 在大多数浓度条件下, CS16 具有比 Q22 更高的去除量和去除率, 可见在某些条件下, CS16 能够去除比 Q22 更多的重金属离子。而在一些浓度下 Q22 与 CS16 的去除量无显著性差异, 并且在 Q22 具有较大生物量时可以有更高的去除率, 说明 Q22 也具有相当可观的去除能力。图 3A 显示, 在 10 $\mu\text{g/mL}$

表 1 *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的耐受性

Table 1 Tolerance of *Agromyces* sp. CS16 to Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+}

Heavy metal	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
Cd^{2+}	20	40	60	80	100
	–	–	–	–	–
Ni^{2+}	100	200	300	400	500
	–	–	–	–	–
Cu^{2+}	200	400	600	800	1 000
	–	–	–	–	–
Zn^{2+}	200	400	600	800	1 000
	–	–	–	–	–

– means that the medium became turbid and bacteria grew.

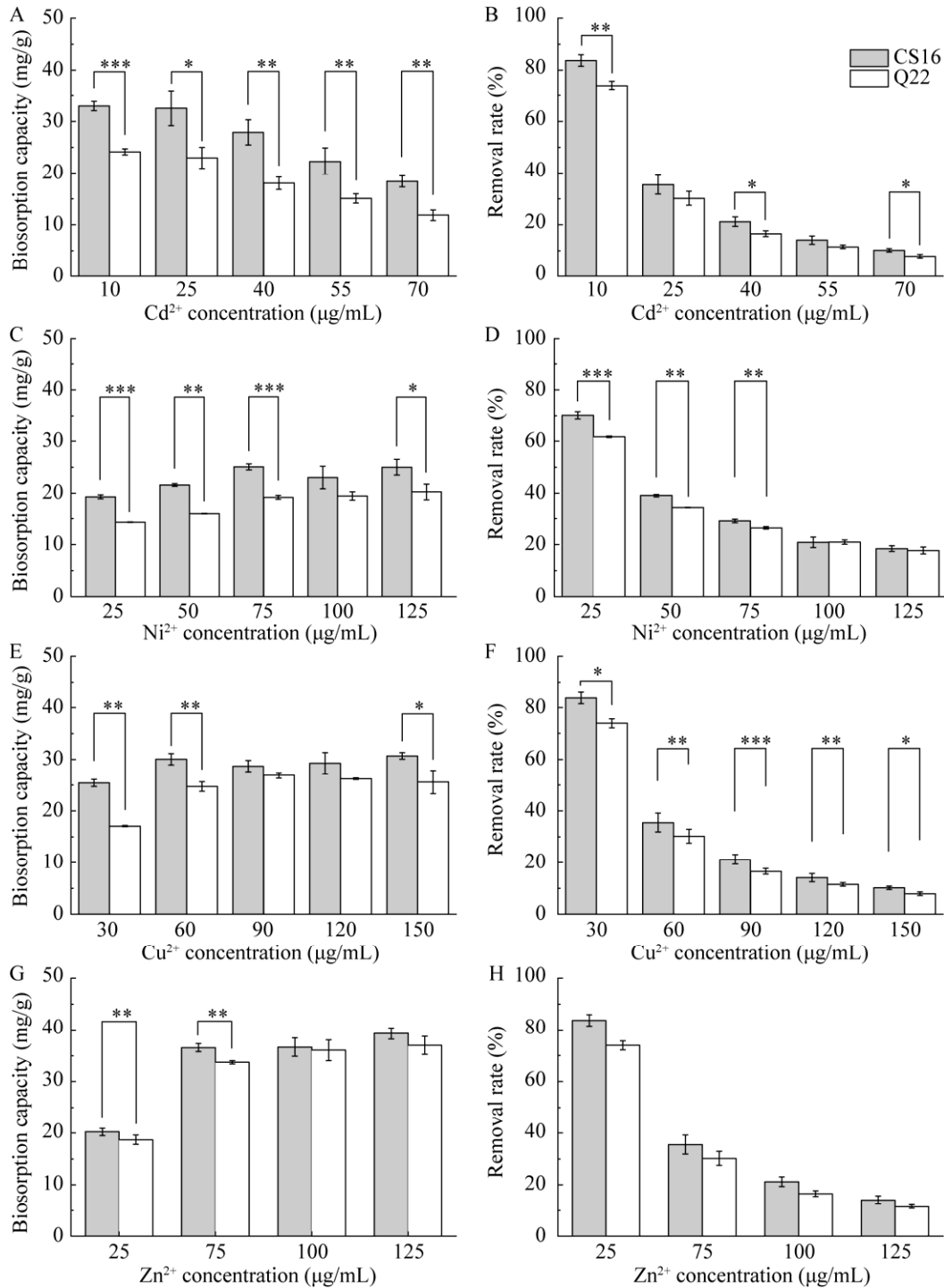


图 3 *Agromyces* sp. CS16 和 *Agromyces kandeliae* Q22 对不同浓度 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 去除量和去除率
 Figure 3 The biosorption capacity and removal rate of Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ by *Agromyces* sp. CS16 and *Agromyces kandeliae* Q22 at different initial concentrations. A: The biosorption capacity of Cd²⁺. B: The removal rate of Cd²⁺. C: The biosorption capacity of Ni²⁺. D: The removal rate of Ni²⁺. E: The biosorption capacity of Cu²⁺. F: The removal rate of Cu²⁺. G: The biosorption capacity of Zn²⁺. H: The removal rate of Zn²⁺. *t*-test was used to analyze the differences between groups of data (* represents statistical difference, $P < 0.05$; ** represents significant difference, $P < 0.01$; *** represents extremely significant difference, $P < 0.001$).

Cd^{2+} 溶液中, CS16 对 Cd^{2+} 的去除量比 Q22 高了 8.81 mg/g, 是 Q22 去除量的 1.36 倍; 图 3C 显示, 在 30 $\mu\text{g/mL}$ Cu 溶液中, CS16 对 Cd^{2+} 的去除量比 Q22 高了 8.36 mg/g, 是 Q22 去除量的 1.49 倍。说明在低浓度时, CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力可能相对更高。

2.3.2 不同接触时长对 *Agromyces* sp. CS16 去除能力的影响

为了探究不同接触时长对 *Agromyces* sp. CS16 去除重金属离子能力的影响, 分别测定了 CS16 在 Cd^{2+} (40 $\mu\text{g/mL}$)、 Ni^{2+} (125 $\mu\text{g/mL}$)、 Cu^{2+} (150 $\mu\text{g/mL}$)、 Zn^{2+} (75 $\mu\text{g/mL}$) 溶液中振荡接触了不同时长后的去除率和去除量。结果如图 4 所示, CS16 对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除率和去除量未随接触时长的增加而上升, 说明 CS16 对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除可能在 15 min 内就基本完成了, 是一个较快的过程。而对于 Ni^{2+} , CS16 的去除率和去除量随接触时间的增加而升高, 说明 CS16 对 Ni^{2+} 的去除是一个持续性的、较慢的过程。

2.4 *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除机制

2.4.1 重金属离子在菌体细胞不同部位的占比

为了探究 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除机理, 分别试验了 CS16 在 Cd^{2+} (40 $\mu\text{g/mL}$)、 Ni^{2+} (50 $\mu\text{g/mL}$)、 Cu^{2+} (50 $\mu\text{g/mL}$)、 Zn^{2+} (25 $\mu\text{g/mL}$) 溶液中接触了 2 h 后胞内吸收和胞外吸附的重金属离子的占比。结果如图 5 所示, CS16 对 Cd^{2+} (胞外吸附占 83.64%)、 Ni^{2+} (胞外吸收占 62.63%)、 Cu^{2+} (胞外吸附占 86.70%)、 Zn^{2+} (胞外吸附占 81.57%) 的富集大部分为胞外吸附, 少部分为胞内吸收, 极少部分为稳定结合量, 说明 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除主要是通过胞外吸附的机制进行的。图 5C 显示, CS16 对 Ni^{2+} 的去除与其他 3 种金属离子略

有不同, 其胞内吸收占 35.68%, 而对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 三种离子的去除中胞内吸收分别仅占 15.73%、12.88%、15.60%, 说明胞内吸收机制可能在 CS16 去除溶液中 Ni^{2+} 时占有重要作用。

2.4.2 *Agromyces* sp. CS16 的重金属耐受相关基因

为了进一步探究 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除机理, 对比 CS16 与 Q22 之间的差异, 对 CS16 和 Q22 做了全基因组分析。结果表明 *Agromyces* sp. CS16 基因组全长 34 561 bp, GC 含量为 71.43%, 通过基因元件预测出总计 3 744 个基因, 其中共有 3 672 个基因被成功注释。对 CS16 和 Q22 基因组中与 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 相关的重金属耐受基因进行筛选, 结果如表 2 所示, CS16 全基因组中共有 37 个预测与 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 相关的重金属耐受基因, 大多数基因的功能与重金属的转运相关。关于 Cd^{2+} , CS16 有 4 个基因与 Cd^{2+} 的耐受有关, 包含 *CmtR*、*CzcD*、*FieF*, 其中 *CzcD* 预测为 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的外排系统的组成部分, *FieF* 预测为 Fe^{2+} 的外排泵, 二者都涉及 Cd^{2+} 的转运^[25-26], *CmtR* 预测为转运的调节子, 涉及 Cd^{2+} 稳态的调节^[27]; Q22 有 6 个基因与 Cd^{2+} 的耐受有关, 除未确认基因外基因的种类与 CS16 相同, 也包含 *CmtR*、*CzcD*、*FieF*。关于 Ni^{2+} , CS16 有 *DdpF*、*DppB*、*DppC* 等 9 个基因与 Ni^{2+} 的耐受有关, 功能预测全部都涉及 Ni^{2+} 的转运, *DdpF*、*DppB*、*DppC* 等预测为 ABC 型寡肽、二肽、镍的转运系统的组成部分, *MgtE* 预测为 Mg、Co、Ni 的转运蛋白; Q22 有 11 个基因与 Ni^{2+} 的耐受有关, 功能预测全部涉及 Ni^{2+} 的转运, 与 CS16 相比缺少 1 个 *DdpF* 基因, 但多出了 *OppB*、*OppD* 2 个基因。关于 Cu^{2+} , CS16 有 *CopC*、*CopZ*、*CsoR*

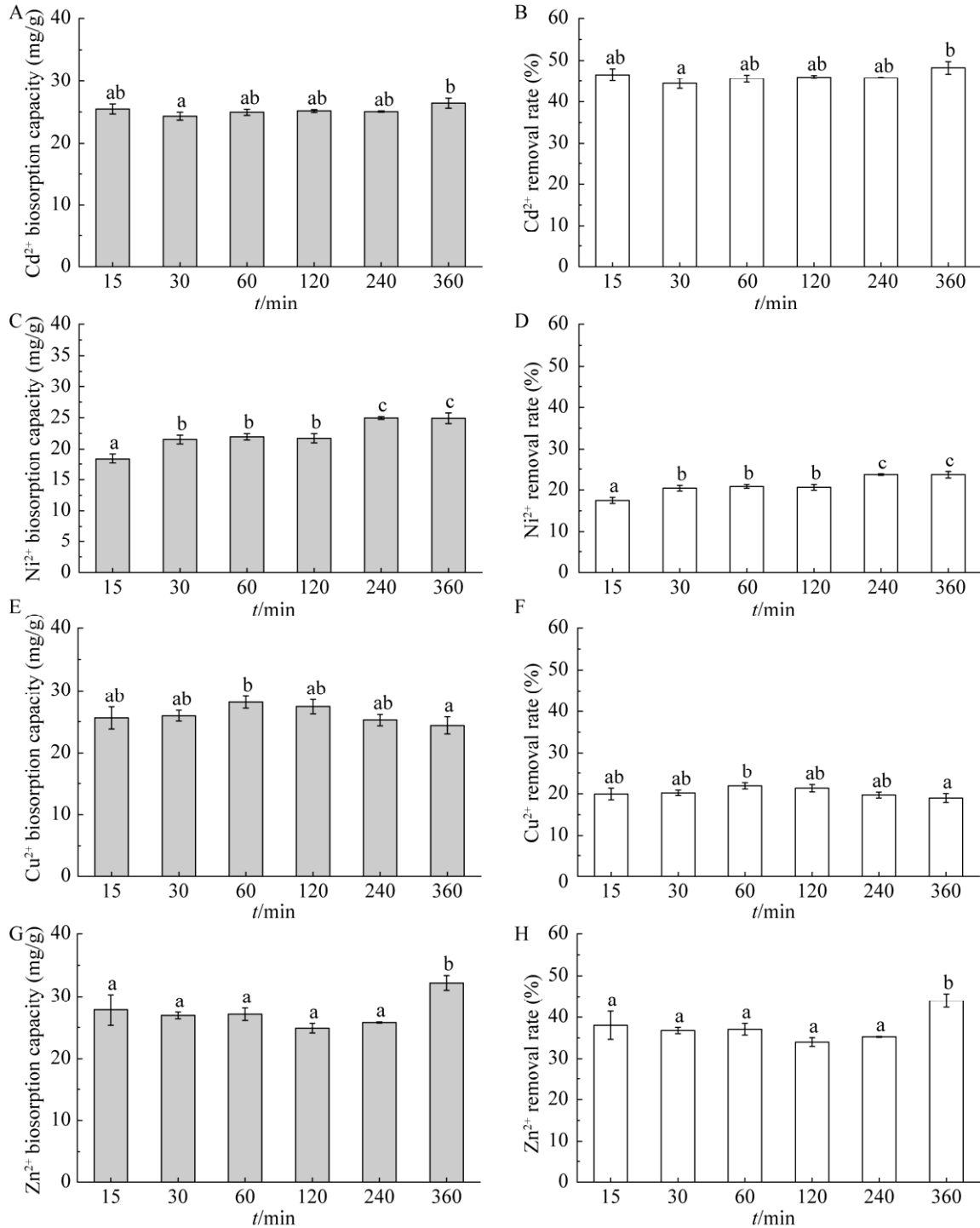


图 4 不同接触时长下 *Agromyces sp.* CS16 对 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 的去除量和去除率

Figure 4 The biosorption capacity and removal rate of Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ by *Agromyces sp.* CS16 under different contact duration. A: The biosorption capacity of Cd²⁺. B: The removal rate of Cd²⁺. C: The biosorption capacity of Ni²⁺. D: The removal rate of Ni²⁺. E: The biosorption capacity of Cu²⁺. F: The removal rate of Cu²⁺. G: The biosorption capacity of Zn²⁺. H: The removal rate of Zn²⁺. One-way ANOVA was used to analyze the effect of different time on removal rate and biosorption capacity, $P < 0.05$ represents a statistical difference (a < b).

等 14 个基因与 Cu^{2+} 的耐受有关, *CopC*、*CopZ* 预测为铜离子的抗性蛋白和分子伴侣, *CsoR* 预测为铜感应转录阻遏物, 可能在铜耐受起重要作用^[28-30]; Q22 有 12 个基因预测与 Cu^{2+} 的耐受有关, 除未确认基因外基因种类与 CS16 相同, 同样包含 *CopC*、*CopZ*、*CsoR* 等。关于 Zn^{2+} , CS16 有 *FurA*、*MntB*、*YusV*、*ZupT* 等 13 个基因

与 Zn^{2+} 的耐受有关, *FurA* 预测为转录调节因子, 在锌耐受中起作用, *MntB* 预测为锰转运的膜组成部分, *YusV* 预测为铁载体转运系统的组成部分, *ZupT* 预测为锌转运蛋白, 三者功能都预测与锌的转运相关; Q22 有 13 个基因预测与 Zn^{2+} 的耐受有关, 除未确认基因外基因种类与 CS16 相同。

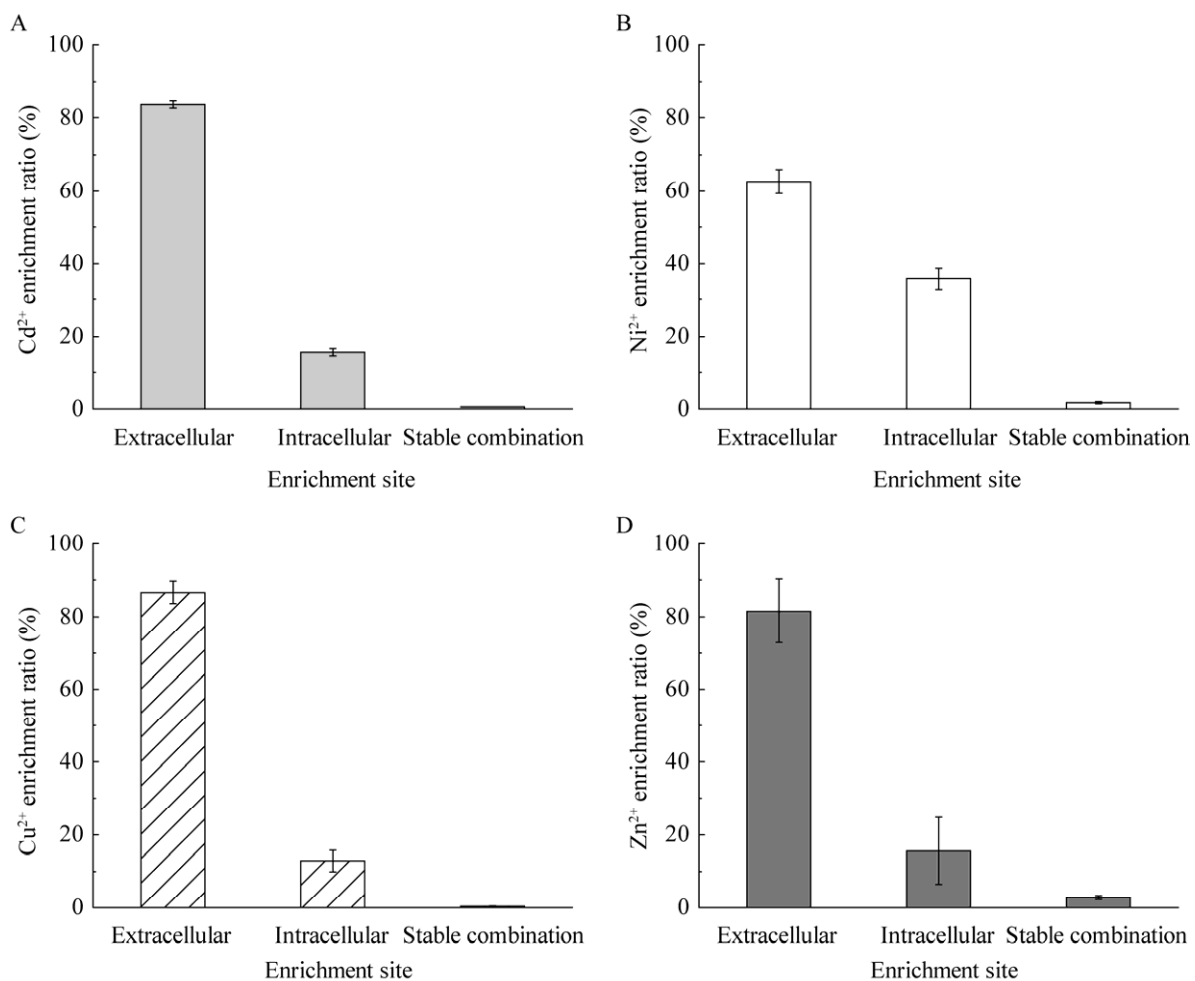


图 5 *Agromyces sp.* CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的富集部位占比

Figure 5 The extracellular and intracellular portions in removing Cd^{2+} (A), Ni^{2+} (B), Cu^{2+} (C), Zn^{2+} (D) by *Agromyces sp.* CS16. “Extracellular” indicates the proportion of extracellular absorption. “Intracellular” indicates the proportion of intracellular absorption. “Stable combination” indicates the proportion of stable combination.

表 2 重金属耐受相关基因

Table 2 Heavy metal tolerance genes

CS16	Q22	Related metals	Annotation
CmtR	CmtR	Cd	HTH-type transcriptional regulator
CzcD	CzcD	Zn, Cd	Co/Zn/Cd efflux system component
FieF	FieF	Zn, Cd	Ferrous-iron efflux pump
Unidentified	\	Zn, Cd	Predicted Co/Zn/Cd cation transporters
\	Unidentified	Zn, Cd, Cu	Lead, cadmium, zinc and mercury-transporting ATPase
\	Unidentified	Zn, Cd	Cadmium, zinc and cobalt-transporting ATPase
DdpF	\	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component
DppB	DppB	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components
DppC	DppC	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components
GsiA	GsiA	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component
GsiD	GsiD	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components
MgtE	MgtE	Ni	Mg/Co/Ni transporter MgtE (contains CBS domain)
\	OppB	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components
\	OppD	Ni	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system
\	Unidentified	N	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components
CopC	CopC	Cu	Copper resistance protein
CopZ	CopZ	Cu	Copper chaperone
CsoR	CsoR	Cu	Copper-sensing transcriptional repressor
mco	mco	Cu	Multicopper oxidase
Unidentified	\	Cu	Copper resistance protein A precursor
Unidentified	\	Cu	ABC-2 family transporter protein
Unidentified	\	Cu	Copper-exporting P-type ATPase A
Unidentified	\	Cu	Copper-exporting P-type ATPase B
Unidentified	\	Cu	Copper-exporting P-type ATPase A
Unidentified	\	Cu	Spore coat protein A
Unidentified	\	Cu	Fluoroquinolones export ATP-binding protein
FurA	FurA	Zn	Transcriptional regulator
MntB	MntB	Zn	Manganese transport system membrane protein
YusV	YusV	Zn	Putative siderophore transport system ATP-binding protein
ZupT	ZupT	Zn	Zinc transporter
Unidentified	\	Zn	Cation transport ATPase
Unidentified	\	Zn	Putative periplasmic iron-binding protein precursor, ABC-type metal ion transport system
Unidentified	\	Zn	ABC-type Mn/Zn transport systems, ATPase component
Unidentified	\	Zn	Zinc uptake regulation protein

\ indicates that the strain does not have this gene.

2.5 海藻酸钠-聚乙烯醇包埋对重金属离子吸附的影响

本实验室通过调整 SA 浓度、PVA 浓度、加菌量、硼酸浓度、CaCl₂ 浓度最终确定 14% PVA、1%海藻酸钠、5%硼酸、5% CaCl₂、30 mL 加菌量的配比能够成功制备出包埋有 *Agromyces* sp. CS16 的凝胶小球。为了验证包埋后对 CS16 去除能力是否会造成影响,对比了 CS16 包埋前后对 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ (浓度均为 30 μg/mL) 的去除率和去除量。结果如图 6 所示,在去除 Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 时,对比单纯的菌株 CS16,经过 SA-PVA 包埋后的 CS16 的去除量分别提高了 4.74、12.26、11.72 mg/g,说明 SA-PVA 包埋 CS16 不仅不会降低 CS16 对 Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 的去除能力,反而还能加强。而在去除 Cd²⁺ 时,在包埋过后小球的去除量降低了 6.03 mg/g,说明包埋可能影响到了菌株 CS16 对 Cd²⁺ 的吸收。

3 讨论

近年来重金属污染越来越严重,人们对重金属污染修复的问题也越来越重视,微生物修复方

法具有成本低、效率高、对环境友好的优势,成为了近几年研究修复重金属污染的热点。本研究从深圳福田红树林表层土壤筛选分离出了一株放线菌 *Agromyces* sp. CS16,初步分析了 CS16 对 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 的耐受能力,并测定了 CS16 对 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 的去除能力。早前已经有许多报道介绍了放线菌对重金属离子的去除能力, Yous 等^[31]利用 *Streptomyces rimosus* 去除溶液中的 Cd²⁺和 Ni²⁺,达到平衡时分别去除了 22.8 mg/g Ni²⁺、9.86 mg/g Cd²⁺,与 CS16 比较,CS16 对 Ni²⁺ 的去除量提高了 2.29 mg/g,对 Cd²⁺ 的去除量提高了 23.09 mg/g。Mattuschka 等^[32]发现 *Streptomyces noursei* 在水中铜的结合能力最强,最大吸附量为 9 mg/g,相比 CS16 要低了 21.69 mg/g。总而言之,CS16 对于 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 有着相当强的耐受性和去除能力。CS16 的全基因组分析发现其具有镉抗性基因 *CzcD*,其编码的 CzcD 蛋白属于阳离子扩散促进子(cation diffusion facilitator, CDF)家族,在镉抗性中起重要作用^[25],本研究也发现 CS16 能够耐受浓度高达 20 μg/mL 的 Cd²⁺,并且在 Cd²⁺浓度为

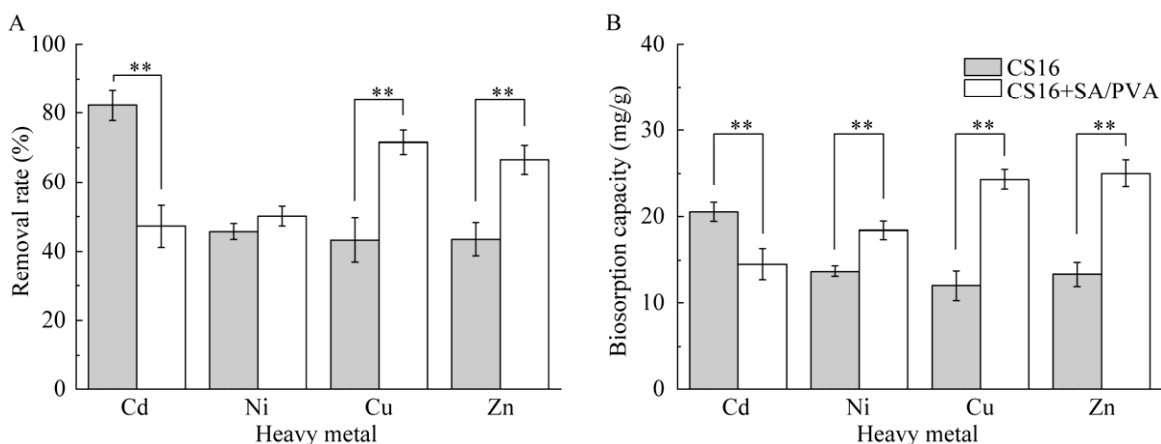


图 6 *Agromyces* sp. CS16 纯菌体以及包埋 CS16 的凝胶小球(CS16+SA/PVA)对 Cd²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 的去除率和去除量

Figure 6 The removal rate (A) and biosorption capacity (B) of Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ by suspended cells of *Agromyces* sp. CS16 and gel beads (CS16+SA/PVA) embedded with CS16, *t*-test was used to analyze the differences between groups of data (** represents significant difference, *P*<0.01).

10 $\mu\text{g/mL}$ 时, CS16 可以去除其中 83.71% 的 Cd^{2+} (图 3B)。其次, CS16 具有同属于阳离子扩散促进子(CDF)家族的 *FieF* 基因编码蛋白^[33], 另外, CS16 还具有一个属于一种 Zn^{2+} 摄取系统 *ZupT* 基因编码蛋白, 这个蛋白介导 Zn^{2+} 的吸收^[34], 这些基因都与锌的转运和抗性有关, 相应地也发现 CS16 能够耐受浓度高达 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 Zn^{2+} , 并且在 Zn^{2+} 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, CS16 对 Zn^{2+} 的去除率可达到 88.91% (图 3H)。然后, CS16 具有 Mg^{2+} 转运蛋白 *MgtE*, 有研究推测此基因与 Ni 的转运有关^[35], 而本研究也发现 CS16 能够耐受浓度高达 400 $\mu\text{g/mL}$ 的 Ni^{2+} , 并且在 Ni^{2+} 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, CS16 对 Ni^{2+} 的去除率可达到 70.27% (图 3D)。同时, CS16 还具有铜的抗性蛋白 *CopC*、*CopZ*, 这些抗性蛋白在铜抗性中起重要作用, 使 CS16 能够耐受浓度超过 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cu^{2+} , 并且在 Cu^{2+} 浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 时, CS16 可以去除其中 83.71% 的 Cu^{2+} (图 3F)。对比已有的研究, CS16 的去除能力并不是最高的, 但其优势是对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 都有着较高的去除能力。但是, 要将 CS16 应用于真实废水的处理, 其在包含多种重金属环境下的耐受性以及富集能力仍有待研究。

微生物去除重金属的机制复杂, 但主要还是分为两种机制。一种是胞外吸附机制, 当微生物接触到重金属溶液时, 细胞壁首先与重金属发生相互作用, 细胞壁上具有羧基、羟基、氨基和磷酸基等官能团, 这些官能团可以通过离子交换、氧化还原、络合等方式将重金属吸附在表面。许多微生物还会分泌胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS), EPS 通常由多糖、蛋白质组成, 其中包含丰富的官能团, 能够将重金属吸附在细胞外。例如, *Bacillus subtilis* 和 *Pseudomonas putida* 表面 EPS 的存在被发现有利于 Cd^{2+} 的吸附^[36], *Aspergillus fumigatus* EPS 上

的羧基、酰胺基和羟基官能团可以与 Cd^{2+} 进行离子交换, 有利于对 Cd^{2+} 的吸附^[37]。胞外吸附的过程往往耗时较短, 与微生物和重金属的接触面积有关。另一种机制是胞内吸收, 微生物通过细胞膜上的离子通道或转运蛋白将重金属吸收到细胞内, 吸收到胞内的重金属通常被隔离储存在细胞器或细胞质中, 以防止重金属的毒害作用。例如有的微生物会分泌植物螯合蛋白 (phytochelatin, PCs), 结合重金属并将其区隔在液泡进行储存^[38]。有的微生物还会对部分重金属进行氧化还原, 减少重金属的毒性, 例如 *Euglena gracilis* 可以吸收 Cr^{6+} , 并将较高毒性的 Cr^{6+} 还原为较低毒性的 Cr^{3+} , 提高了其积累 Cr 的能力^[39]。胞内吸收的过程受到离子转运的限制, 通常耗时较长, 是一个较缓慢的过程。本研究发现 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 主要被吸附在 CS16 的胞外(图 5), 并且 CS16 的去除在较短时间内就完成了(图 4), 说明 CS16 主要是用过胞外吸附的机制去除水体中的 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 。

Agromyces kandeliae Q22 在进化上以及生存环境上均与 CS16 相近, 通过测定不同浓度下 CS16 和 Q22 对重金属的去除能力, 本研究发现 Q22 和 CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 都具有相当可观的去除能力, 这与全基因组的分析发现相对应, CS16 和 Q22 都具有丰富的重金属耐受基因。大部分基因与重金属离子的外排有关, *CzcD* 预测为钴、锌、镉转运系统的组成部分, 通过外排 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 提供抗性^[25], *MgtE* 预测为镁、钴、镍转运体, 可能通过转运调节胞内 Ni^{2+} 稳态^[40], 还有不少未确认基因推测功能为编码介导铜输出 P 型 ATP 酶。这些基因大多编码阳离子扩散促进因子(CDF)和 ABC 转运体的组成成分, 这些转运蛋白通过外排离子维持胞内的重金属稳态为菌株提供抗性, 主要功能是提高了菌株对重金属的耐受性^[41-42], 使菌株在高中金属浓

度环境下依然能进行去除重金属的活动。还有些基因功能预测与重金属的吸收有关,例如 DdpF、DppB、DppC 等,这些基因均是 ABC 型寡肽、二肽、镍的转运系统的组成部分,而本研究也发现 CS16 对的胞内吸收占比明显比其他 3 个金属要高(图 5)。在重金属的去除实验中,发现对比 Q22, CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力要更高,但二者在重金属耐受基因的种类和数量上差别都不大,说明二者对重金属的去除机制之间的差别可能并不集中特异性的耐受基因上,而更多地集中在非特异性胞外组分上。Q22 和 CS16 相似度很高,重金属耐受基因种类和数量也相近,Q22 很可能机制上与 CS16 也相近,偏向于通过胞外吸附的机制去除水体的重金属,因此,要探明 Q22 与 CS16 对重金属去除能力之间的差异,可能还需要对其他非特异性组分作进一步研究。

Agromyces sp. CS16 在水体中能够耐受高浓度 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 生长,并且拥有去除水体中重金属的能力,是用于处理水样中重金属污染的理想微生物材料。本研究探索条件后,成功利用 SA-PVA 将 CS16 包埋后制备出成型的凝胶小球,通过小球的重金属去除实验发现,包埋未降低 CS16 对 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的去除能力反而有所提高(图 6)。SA 给 CS16 提供机械支撑和保护的同时,提高了 CS16 对重金属的去除能力。本研究成功探索出了用 SA-PVA 将 CS16 包埋成凝胶小球的配比,确认了包埋后的去除能力,是一次成功的包埋,为以后实际应用 CS16 处理重金属污染水体提供了理论基础。本研究在利用 SA-PVA 包埋 CS16 去除浓度 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Cd^{2+} 时,去除率对比 CS16 单纯菌体低了 34.99%,虽然成功地将 CS16 固定了,但是影响到了其对 Cd^{2+} 的去除,没能保持或者提高 CS16 对 Cd^{2+} 的去除能力(图 6)。想要在固定 CS16 的同时还提

高其对重金属的去除能力,仍需要进一步实验尝试其他的固定化的方法。例如制作固定化生物膜,MA 等^[43]分别采用聚苯乙烯和海绵作固定化载体制作 *Scenedesmus obliquus* FACHB-12 生物膜,在去除 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Cd^{2+} 时,成功将对 Cd^{2+} 去除率分别提高了 58.58%、77.66% (对比 FACHB-12 悬浮菌体),是一个可行的实验参考。

总之,本研究测定了一株新菌 *Agromyces* sp. CS16 对 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的耐受能力与去除能力,通过不同条件的实验进一步研究了 CS16 去除重金属的影响因素,通过胞内胞外实验和全基因组分析从细胞和基因层面分析了其去除机理,并通过 SA-PVA 包埋初步探究了 CS16 的实际应用。本研究丰富了放线菌基因库,为重金属耐受机制的研究和微生物修复水体重金属污染的研究提供了理论基础。

致谢

感谢深圳大学生命与海洋科学学院大型仪器设备公共服务平台的支持。感谢广东省深圳市福田区红树林自然保护区和广东省深圳市福田区红树林生态公园对采样的支持。

参考文献

- [1] VAREDA JP, VALENTE AJM, DURÃES L. Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: a review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 246: 101-118.
- [2] TANG JY, ZHANG JC, REN LH, ZHOU YY, GAO J, LUO L, YANG Y, PENG QH, HUANG HL, CHEN AW. Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: a review on heavy metal pollution[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 242: 121-130.
- [3] WEI YQ, ZHAO Y, ZHAO XY, GAO XT, ZHENG YS, ZUO HD, WEI ZM. Roles of different humin and heavy-metal resistant bacteria from composting on

- heavy metal removal[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 296: 122375.
- [4] OJUADERIE OB, BABALOLA OO. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(12): 1504.
- [5] KAPAHI M, SACHDEVA S. Bioremediation options for heavy metal pollution[J]. *Journal of Health & Pollution*, 2019, 9(24): 191203.
- [6] MISHRA GK. Microbes in heavy metal remediation: a review on current trends and patents[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2017, 11(3): 188-196.
- [7] UTTAROTAI T, MUKJANG N, CHAISOUNG N, PATHOM-AREE W, PEKKOH J, PUMAS C, SATTAYAWAT P. Putative protein discovery from microalgal genomes as a synthetic biology protein library for heavy metal bio-removal[J]. *Biology*, 2022, 11(8): 1226.
- [8] UKOH SNB, AKINOLA MO, NJOKU KL. Comparative study on the remediation potential of *Panicum maximum* and *Axonopus compressus* in zinc (Zn) contaminated soil[J]. *Pollution*, 2019, 5(4): 687-699.
- [9] LUO HT, WANG Q, LIU ZW, WANG SY, LONG AM, YANG YF. Potential bioremediation effects of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* on heavy metals in coastal sediment from a typical mariculture zone[J]. *Chemosphere*, 2020, 245: 125636.
- [10] OLADIPO OG, AWOTOYE OO, OLAYINKA A, BEZUIDENHOUT CC, STEVE MABOETA M. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49(1): 29-37.
- [11] ZAGUI GS, MOREIRA NC, SANTOS DV, DARINI ALC, DOMINGO JL, SEGURA-MUÑOZ SI, ANDRADE LN. High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: a new concern?[J]. *Environmental Research*, 2021, 196: 110352.
- [12] EMENIKE CU, JAYANTHI B, AGAMUTHU P, FAUZIAH SH. Biotransformation and removal of heavy metals: a review of phytoremediation and microbial remediation assessment on contaminated soil[J]. *Environmental Reviews*, 2018, 26(2): 156-168.
- [13] 劳昌玲, 罗立强, 沈亚婷, 朱帅. 微生物与重金属相互作用过程与机制研究进展[J]. *环境科学研究*, 2020, 33(8): 1929-1937.
- LAO CL, LUO LQ, SHEN YT, ZHU S. Progress in the study of interaction process and mechanism between microorganism and heavy metal[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(8): 1929-1937 (in Chinese).
- [14] ZHANG M, ZHANG T, ZHOU L, LOU W, ZENG WA, LIU TB, YIN HQ, LIU HW, LIU XD, MATHIVANAN K, PRABURAMAN L, MENG DL. Soil microbial community assembly model in response to heavy metal pollution[J]. *Environmental Research*, 2022, 213: 113576.
- [15] LIN YB, YE YM, HU YM, SHI HK. The variation in microbial community structure under different heavy metal contamination levels in paddy soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180: 557-564.
- [16] CHEN S, ZHOU GW, DING SL, ZHANG QJ, HUANG DD, SHANG CJ. A thirty-year record of PTE pollution in mangrove sediments: implications for human activities in two major Chinese metropolises, Shenzhen and Hong Kong[J]. *Sustainable Cities and Society*, 2021, 68: 102766.
- [17] DING S, ZHANG Q, DONG J, CHEN Z, CHEN S. Kong mangrove sediments[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2018, 37(10): 3018-3030.
- [18] LI XQ, MENG DL, LI J, YIN HQ, LIU HW, LIU XD, CHENG C, XIAO YH, LIU ZH, YAN ML. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 231: 908-917.
- [19] YIN YX, LI Y. Study on the feasibility of enhancing the biodegradation of aniline wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate gel pellets embedded activated sludge[J]. *Environmental Engineering Science*, 2022, 39(5): 431-440.
- [20] LI LT, ZHANG M, JIANG WQ, YANG P. Study on the efficacy of sodium alginate gel particles immobilized microorganism SBBR for wastewater treatment[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(2): 107134.
- [21] MAHDAVINIA GR, SOLEYMANI M, SABZI M, AZIMI H, ATLASI Z. Novel magnetic polyvinyl

- alcohol/laponite RD nanocomposite hydrogels for efficient removal of methylene blue[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017, 5(3): 2617-2630.
- [22] HE MY, XU Y, QIAO Y, ZHANG ZY, LIANG JY, PENG YH, LIAO JX, QIAO Y, SHANG CJ, GUO ZP, CHEN S. A novel yeast strain *Geotrichum* sp. CS-67 capable of accumulating heavy metal ions[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236: 113497.
- [23] 李森, 尹华, 何宝燕, 叶锦韶, 彭辉, 龙焰, 张娜. 融合酵母对重金属Cr的富集机理[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(11): 1645-1650.
- LI S, YIN H, HE BY, YE JS, PENG H, LONG Y, ZHANG N. Mechanism of chromium accumulation by fused yeast[J]. *Microbiology*, 2009, 36(11): 1645-1650 (in Chinese).
- [24] 徐梦洁, 张秀梅, 胡银春, 魏延, 杜晶晶, 连小洁, 陈维毅, 黄棣. 双交联聚乙烯醇/海藻酸钠水凝胶的制备与表征[J]. *高分子材料科学与工程*, 2020, 36(4): 55-60, 66.
- XU MJ, ZHANG XM, HU YC, WEI Y, DU JJ, LIAN XJ, CHEN WY, HUANG D. Preparation and characterization of double crosslinked polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogels[J]. *Polymer Materials Science & Engineering*, 2020, 36(4): 55-60, 66 (in Chinese).
- [25] ANTON A, GROSSE C, REISSMANN J, PRIBYL T, NIES DH. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH₃4[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(22): 6876-6881.
- [26] MUNKELT D, GRASS G, NIES DH. The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH₃4 are transporters of broad metal specificity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(23): 8036-8043.
- [27] ZHENG CL, LI YJ, NIE L, QIAN L, CAI L, LIU JS. Transcriptional and functional studies of a Cd(II)/Pb(II)-responsive transcriptional regulator (CmtR) from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270[J]. *Current Microbiology*, 2012, 65(2): 117-121.
- [28] MARCUS SA, SIDIROPOULOS SW, STEINBERG H, TALAAT AM. CsoR is essential for maintaining copper homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151816.
- [29] LAWTON TJ, KENNEY GE, HURLEY JD, ROSENZWEIG AC. The CopC family: structural and bioinformatic insights into a diverse group of periplasmic copper binding proteins[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(15): 2278-2290.
- [30] UTZ M, ANDREI A, MILANOV M, TRASNEA PI, MARCKMANN D, DALDAL F, KOCH HG. The Cu chaperone CopZ is required for Cu homeostasis in *Rhodobacter capsulatus* and influences cytochrome cbb₃ oxidase assembly[J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 111(3): 764-783.
- [31] YOUS R, MOHELLEBI F, CHERIFI H, AMRANE A. Competitive biosorption of heavy metals from aqueous solutions onto *Streptomyces rimosus*[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2018, 35(4): 890-899.
- [32] MATTUSCHKA B, STRAUBE G. Biosorption of metals by a waste biomass[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2007, 58(1): 57-63.
- [33] GRASS G, OTTO M, FRICKE B, HANEY CJ, RENSING C, NIES DH, MUNKELT D. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress[J]. *Archives of Microbiology*, 2005, 183(1): 9-18.
- [34] GRASS G, WONG MD, ROSEN BP, SMITH RL, RENSING C. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(3): 864-866.
- [35] TOMITA A, ZHANG MF, JIN F, ZHUANG WH, TAKEDA H, MARUYAMA T, OSAWA M, HASHIMOTO KI, KAWASAKI H, ITO K, DOHMAE N, ISHITANI R, SHIMADA I, YAN ZQ, HATTORI M, NUREKI O. ATP-dependent modulation of MgtE in Mg²⁺ homeostasis[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 148.
- [36] WEI X, FANG LC, CAI P, HUANG QY, CHEN H, LIANG W, RONG XM. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(5): 1369-1374.
- [37] YIN YR, HU YY, XIONG F. Sorption of Cu(II) and Cd(II) by extracellular polymeric substances (EPS) from *Aspergillus fumigatus*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(7): 1012-1018.

- [38] GARCÍA-GARCÍA JD, SÁNCHEZ-THOMAS R, MORENO-SÁNCHEZ R. Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(5): 859-873.
- [39] GARCÍA-GARCÍA JD, RODRÍGUEZ-ZAVALA JS, JASSO-CHÁVEZ R, MENDOZA-COZATL D, MORENO-SÁNCHEZ R. Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*[J]. *Archives of Microbiology*, 2009, 191(5): 431-440.
- [40] SMITH RL, THOMPSON LJ, MAGUIRE ME. Cloning and characterization of MgtE, a putative new class of Mg^{2+} transporter from *Bacillus firmus* OF₄[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(5): 1233-1238.
- [41] KOLAJ-ROBIN O, RUSSELL D, HAYES KA, PEMBROKE JT, SOULIMANE T. Cation diffusion facilitator family: structure and function[J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(12): 1283-1295.
- [42] 曹冠华, 柏旭, 陈迪, 张晓蓉, 贺森. ABC 转运蛋白结构特点及在植物和真菌重金属耐性中的作用与机制[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(10): 1617-1628.
- CAO GH, BAI X, CHEN D, ZHANG XR, HE S. Structure characteristics of ABC transporter protein and the function and mechanism on enhancing resistance of plants and fungi to heavy metals[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(10): 1617-1628 (in Chinese).
- [43] MA XM, YAN X, YAO JJ, ZHENG SM, WEI Q. Feasibility and comparative analysis of cadmium biosorption by living *Scenedesmus obliquus* FACHB-12 biofilms[J]. *Chemosphere*, 2021, 275: 130125.