

硫酸盐还原菌对汞的甲基化作用及其影响因子

陈效¹ 徐盈² 张甲耀¹ 惠阳² 孙立苹¹

(1 武汉大学环境科学系; 2 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 从受氯碱化工废水严重污染的湖北鸭儿湖1号氧化塘底泥中分离获得了硫酸盐还原菌, 研究了其生理特性和环境因子对其生长的影响。并在实验室条件下建立了模拟厌氧水环境, 通过正交实验获得汞甲基化的最佳条件, 研究了该条件下硫酸盐还原菌在好氧和厌氧状况下对汞的甲基化作用, 以及非生物甲基化作用。同时又分别作了单因素实验, 并用高效液相色谱法测定了水样中不同形态的汞。结果显示, 该硫酸盐还原菌营厌氧生活, 在35℃、pH 7.0、0.7%的盐度、0.5g/L Fe^{2+} 和不含硫化物等条件下, 可达到最佳生长状态。水环境中汞的甲基化作用主要发生在有微生物为媒介的厌氧环境下, 汞的非生物甲基化作用和好氧环境下的甲基化作用均可忽略不计。厌氧环境下, 水体温度、pH值、硫化物和盐度等诸多环境因素对汞的微生物甲基化作用的影响也进行了研究与讨论。

关键词: 汞; 甲基化; 硫酸盐还原菌; 水环境因子

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)01-0050-05

汞作为全球性污染物已日益受到人们的重视。环境中汞的主要来源是金属熔炼、氯碱化工以及工业与生活燃煤的排放^[1,2]。不同化学形态汞毒性差别很大, 无机汞毒性最小, 甲基汞(MMHg)的毒性最大, 是无机汞的50—100倍, 而且亲脂性强。水环境中的甲基汞最有可能对人类健康构成威胁。它一般由无机汞转化而成, 通过生物富集作用和食物链传递的生物放大作用, 最终在人体内积累^[3,4]。当人体内甲基汞浓度达到一定程度后, 会引起中枢神经中毒症, 甚至可能导致死亡。因此, 汞的环境释放及其甲基化机制的研究成为国际上研究的热点之一。

水环境中, 汞的甲基化主要是在微生物作用下进行的。微生物在水环境汞的循环中扮演着一个关键角色, 它促进了不同形态汞化合物之间的相互转化, 如 $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{MMHg}/\text{DMHg}$, $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$ ^[5]。大量的微生物, 包括厌氧及好氧微生物, 都可在实验室条件下甲基化汞。其中, 厌氧的硫酸盐还原菌(SRB)被认为是最重要的微生物^[6]。汞的微生物甲基化效率通常依赖于微生物的活性和生物可利用性, 汞的浓度, 而其又受温度、pH、氧化还原电极电位及各种无机与有机络合剂的影响。

本实验从受氯碱化工废水严重污染的湖北鸭儿

湖1号氧化塘底泥中分离获得硫酸盐还原菌, 在实验室模拟条件下, 研究了不同水环境因子对硫酸盐还原菌甲基化汞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 水样中不同形态汞的富集用 Agilent C18 Sep-Pak 柱, 测定用 HP1100 系列高效液相色谱系统; 微生物生长情况的测定用 UV-9100 型紫外可见分光光度计。

高效液相色谱流动相均为色谱纯试剂, 其他药品均为分析纯, 溶剂水为 Milli-Q 超纯水。 HgCl_2 和 MMHg 标样均用甲醇配制。混合液 M: 含 166 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 和 0.1 mol/L 乙酸钠-乙酸缓冲液, pH 4.0。

SRB 培养基: KH_2PO_4 0.5g/L、 NH_4Cl 1.0g/L、 MgSO_4 2.0g/L、 NaCl 1.0g/L、 FeSO_4 0.5g/L、 Na_2SO_4 2.0g/L、甲基钴氨素 0.2g/L、抗坏血酸 0.2g/L、乳酸钠 3.0ml/L、酵母膏 1.0g/L。

土样 A 取自湖北鸭儿湖1号氧化塘表层以下 0.8m; 土样 B 取自鸭儿湖1号氧化塘表层。

1.2 硫酸盐还原菌的生理特性 无菌条件下从土样 A 中分离细菌, 在平板上厌氧培养 96h。

用生长谱法测定细菌的营养要求, 包括碳源、硫

收稿日期: 2003-04-17; 修订日期: 2004-07-15

基金项目: 中国科学院重要方向项目(KZCX2-414; KZCX3-SW-431)资助

作者简介: 陈效(1979—), 男, 浙江海盐人, 主修环境微生物工程

通讯作者: 徐盈, E-mail: xuying@ihb.ac.cn

源和生长因子。从温度、pH、盐度、 Fe^{2+} 和硫化物浓度等五个方面考察环境因素对 SRB 生长的影响。采用光电比浊计数法, 用 UV-9100 型紫外可见分光光度计, 在 625nm 波长处, 测量 SRB 的生长情况, 并绘制其生长曲线。

1.3 水体中汞的甲基化 在实验室模拟条件下, 将 SRB 菌悬液接种至盛有液体培养基的密闭玻璃容器中, 于 35℃ 培养 5d。再向容器中添加 HgCl_2 水溶液, 定容, HgCl_2 浓度为 10mg/L。设计 4 水平 5 因素 ($\text{L}_{16}(4^5)$) 的正交实验, 从温度、pH、有机质、硫化物和盐度等 5 个方面研究汞甲基化的影响因子, 通过极差分析, 得到汞甲基化最佳综合条件, 并在该条件基础上分别作单因素实验。

2 结果

2.1 硫酸盐还原菌的生理特性

研究发现, 培养 4d 后, 固体培养基上出现圆形菌落, 表面突起。含 Fe^{2+} 的固体培养基上菌落呈黑色, 液体培养基出现黑色浑浊, 这证明有 SRB 的存在。SRB 将培养基中的 SO_4^{2-} 还原为 S^{2-} , 与 Fe^{2+} 生成 FeS 。该 SRB 可以利用乳酸钠、丙酸等为电子供体来还原硫酸盐, 其在 35℃、pH7.0、0.7% 的盐度、0.5g/L Fe^{2+} 和不含硫化物的条件下, 达到最佳生长状态。在该条件下得到的生长曲线见图 1。由于添加的是高浓度的菌悬液, 而且水环境的厌氧条件随着培养时间渐趋严格, 因此延滞期与对数期的界限不分明, 延滞期时间较短, 而对数期时间较长。

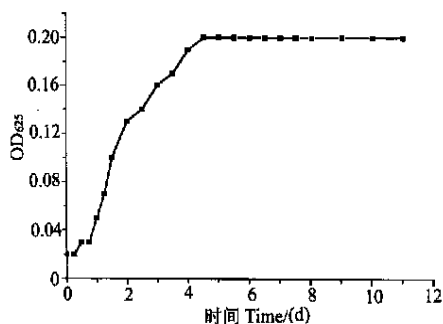


图 1 最适条件下 SRB 的生长曲线

Fig. 1 The curve of SRB growth under the optimum conditions

2.2 水环境中汞的微生物甲基化作用

2.2.1 单因素实验 通过正交实验, 得到甲基化过程中各水环境因子的最佳值, 即温度为 35℃、pH 为 5.0、腐殖酸为 0mg/L、硫化物为 0mg/L 和盐度为 0.7%。以其中一个因子为变量分别作单因素实验, 结果见图 2—图 6。

图 2 显示了温度对甲基化的影响。投加 HgCl_2 9d 后, 水中 MMHg 的浓度趋于稳定。35℃ 时, 水中汞的甲基化率最大, 达到 47%, 明显高于其他温度下的甲基化率。由此可见, 适当的提高温度对甲基化有促进作用。夏季水体中汞的甲基化速率达到最高值, 大部分研究显示夏季的中后期甲基化最活跃, 甲基汞的形成和分解的季节性变化实际上是受温度的影响。温度影响甲基化其实是影响微生物的活性。在 5℃ 时, 水中 MMHg 的浓度明显偏低, 这是由于低温下微生物生长速度缓慢, 新陈代谢活性降低。在 4℃ 时从沉积物中分离的 MMHg 只有 20℃ 时的 50%—70%^[7]。Callister 和 Winfrey^[8] 报道认为微生物甲基化的最佳条件是 35℃。Korthals 和 Winfrey^[9] 也认为温度是影响甲基化的重要因素, 它对汞甲基化率的影响至少可达 30%。

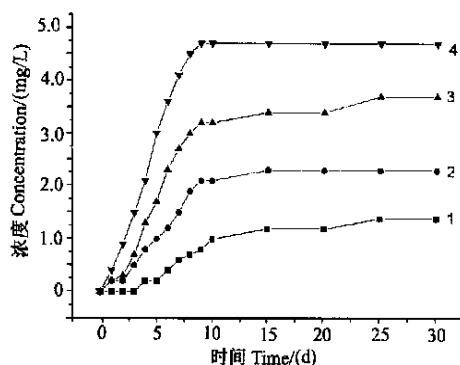


图 2 温度对汞甲基化的影响

Fig. 2 Effect of temperature on mercury methylation
1- 5℃; 2- 15℃; 3- 25℃; 4- 35℃

图 3 显示了 pH 值对甲基化的影响。在投加 HgCl_2 9d 后, 不同 pH 值的水体中甲基汞浓度均趋于稳定, 当 pH5.0 时汞的甲基化率达到最大, 为 47%。

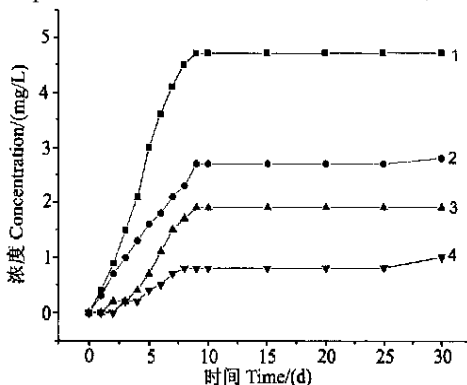


图 3 pH 对汞甲基化的影响

Fig. 3 Effect of pH on mercury methylation
1- pH5.0; 2- pH6.0; 3- pH7.0; 4- pH8.0

而在 SRB 生长的最适酸度环境即 pH7.0 时, 甲基化率并非最大, 只有 19%。这其间的差别可能是由于 pH 影响了微生物对汞的吸收, 当 pH7.0 时, 汞的生物可利用性并非最佳, 而是在 pH5.0 时微生物对汞的利用率达到最高。水环境中通过 pH 的改变而影响甲基汞浓度的方式有很多, pH 对甲基化速率的影响并不是直接的。Hg 和 MMHg 的溶解性和流动性都依赖于 pH, 酸雨会增加 Hg 的输入^[10]。有些研究表明, 在高 pH 值的水体中, 用于甲基化的 Hg^{2+} 的浓度会降低^[11]。

图 4 显示了腐殖酸对甲基化的影响。随着水中腐殖酸浓度的增加, 汞的甲基化速率逐渐减小。当水体中腐殖酸达到 50mg/L 时, MMHg 的浓度为 23%, 约为不含腐殖酸时 MMHg 浓度的一半。一般情况下, 随着有机质浓度的增高, 水、沉积物和鱼体内甲基汞的浓度也增高, 这归因于有机营养物对微生物甲基化活性的促进作用。在本实验培养条件下, 有机质含量充分, 并不是微生物甲基化活性的限制因子, 因此, 添加腐殖酸后甲基汞产量的减少应归因于其对甲基化的抑制作用。Porvari 和 Verta^[12] 的研究数据显示, 尽管腐殖酸承担了主要的 MMHg 输送, 但它并不是甲基化的积极因素。Miller^[13] 发现水中腐殖酸可以将 Hg^{2+} 还原为 Hg^0 , 这不仅降低了用于甲基化的汞的含量, 而且减少了总汞的含量。

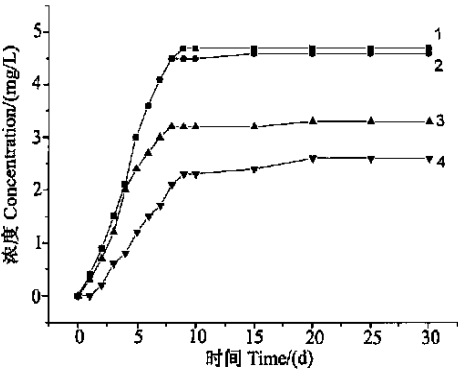


图 4 腐殖酸含量对汞甲基化的影响

Fig 4 Effect of humic acid on mercury methylation
1- 0mg/L; 2- 10mg/L; 3- 20mg/L; 4- 50mg/L

图 5 显示了硫化物对甲基化的影响。在未添加 Na_2S 的水样中, 汞的甲基化率最高, 达到 47%。随着 Na_2S 投量的增加, 汞甲基化率逐渐下降。在 Na_2S 投量为 100mg/L 时, 水样中检测不到 MMHg 的生成。可见, 硫化物的浓度和 MMHg 的生成是一个相反的关系。硫化物对汞甲基化的抑制作用是由于硫化汞

的沉淀导致 Hg^{2+} 的可溶性和生物可利用性降低。在厌氧状态下, HgS 形态中的 Hg 并不能被 SRB 所利用。

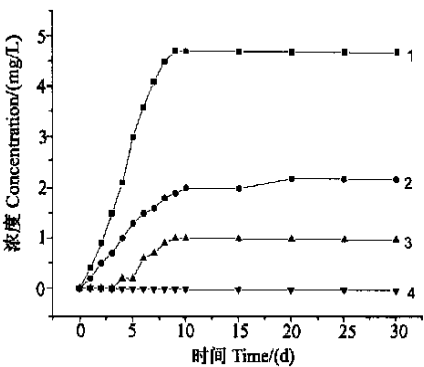


图 5 硫化物浓度对汞甲基化的影响

Fig 5 Effect of sulfide on mercury methylation
1- 0mg/L; 2- 10mg/L; 3- 20mg/L; 4- 100mg/L

图 6 显示了盐度对甲基化的影响。盐度为 0.7% 时, 汞甲基化率最高, 达到 47%。随着盐度的增大, 甲基化率随之减小。当盐度为 3.5% 时, 硫酸盐还原菌的甲基化作用完全受到抑制, 水体中已检测不到 MMHg 存在。盐对微生物的影响是通过水中渗透压变化而影响其物质运输过程。盐度过高会引起细胞质壁分离, 造成细胞死亡。同时, 盐度对甲基化的抑制作用是因为微生物在还原盐分中所含的硫酸盐的过程中生成了硫化物。高盐度沉积物中甲基汞的含量通常只有低盐度沉积物的 40%^[14]。盐度对甲基化的抑制作用在还原状态下更为明显, 高盐度的状态促进了脱甲基化作用^[15]。

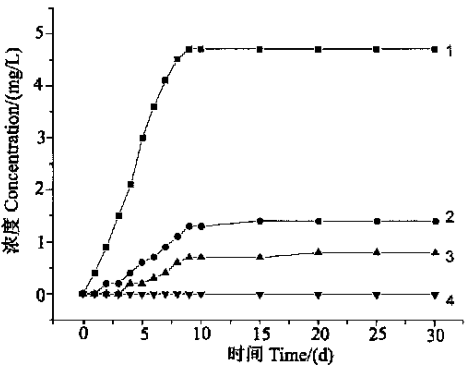


图 6 盐度对汞甲基化的影响

Fig. 6 Effect of salinity on mercury methylation
1- 0.7%; 2- 1.4%; 3- 2.1%; 4- 3.5%

2.2.2 最适条件下微生物的甲基化 在得到的最佳甲基化条件下考察 SRB 作用下 $Hg(II)$ 的转化情

况, 结果见图 7 和图 8。

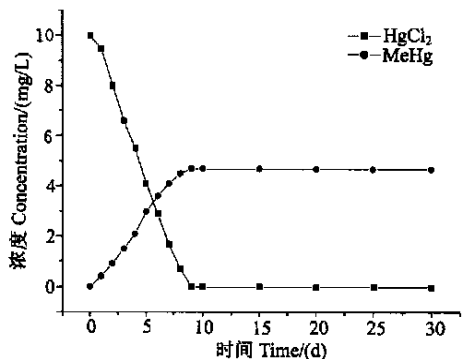


图 7 最适条件下汞甲基化的动态曲线

Fig. 7 Dynamic curve of mercury methylation under the optimum conditions

图 7 显示, 在 SRB 作用下, 当 Hg^{2+} 的浓度逐渐减小时, MMHg 的浓度逐渐增大, 9d 后已检测不到 Hg^{2+} 的存在, 此时 MMHg 的浓度达到最大值, 为 4.7mg/L。这表明, 在厌氧条件下, SRB 可以以甲基钴素为胞内中介介质甲基化汞, 在未添加甲基钴素的对照组则没有检测到 MMHg 的生成。

实验结果又显示, 当水体中检测不到 Hg^{2+} 时, MMHg 的浓度并非达到 10mg/L, 而仅为 4.7mg/L, 也就是说 Hg^{2+} 并未全部转化为 MMHg。这是因为在厌氧条件下, SRB 还原硫酸盐生成 H_2S , Hg^{2+} 便与 S^{2-} 结合生成了 HgS , 由于 HgS 形态中 Hg^{2+} 的生物可利用性大大降低, 因而不能被甲基化。

图 8 显示, 在未添加 SRB 菌悬液的对照组中一直未检测到 MMHg 的生成(曲线 3), 表明在本实验条件下非生物的甲基化作用可忽略不计。从土样 B 中分离得到的微生物在好氧条件下对汞的甲基化作用也不明显(曲线 2)。试验 9d 后 MMHg 的浓度为 0.5mg/L, 仅为厌氧条件下的 11%。在整个实验期

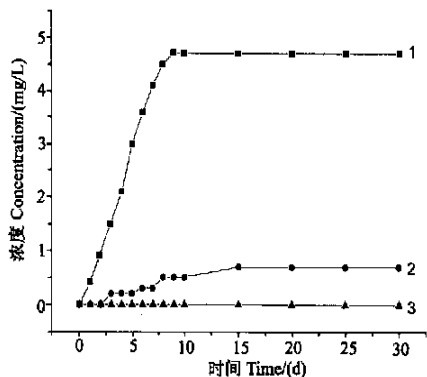


图 8 微生物对汞甲基化的影响

Fig. 8 Effect of microorganism on mercury methylation

间, MMHg 的浓度一直未超过 0.7mg/L, 这表明好氧条件下汞的甲基化速率大大低于厌氧条件。Regnell 和 Tunlid^[16] 使用同位素标记的 $HgCl_2$ 在模拟水环境中试验, 其研究结果证明, 在淡水沉积物中汞的甲基化在厌氧条件下比有氧条件下有显著增高。水和沉积物中的 MMHg 浓度在厌氧条件下比有氧条件下高出几个数量级。

从上述实验可知, 水体中 MMHg 的形成和环境溶解氧的低浓度水平有关。而在含氧的淡水湖泊和海洋中 MMHg 的形成明显受到抑制, 如在分层的湖泊和入海口水体中, 含氧和缺氧水层的界面以及缺氧水层中, MMHg 的浓度通常最高^[18]。因此, 夏季水体中 MMHg 的浓度会有所增高, 这是因为高温下有机物分解的加快和 MMHg 形成的增速使水体趋于无氧的状态, 同时高温促进了微生物的甲基化作用。另外, 硫化物、盐和腐殖酸浓度的增高在一定程度上可以抑制 MMHg 的生成。因此, 在治理 MMHg 污染的过程中应当充分考虑上述环境因素的影响。

2.3 讨论

(1) 水体中汞的甲基化作用主要发生在有微生物为媒介的厌氧环境条件下, 汞的非生物甲基化作用 and 好氧环境条件下的甲基化作用很小, 因此可以忽略。

(2) 厌氧环境下, 水体中汞的微生物甲基化作用受诸多环境因素的影响。甲基化作用随温度的增高而提高, 在 35℃ 的高温下达到最大; 偏酸性的环境 (pH5.0) 比中性或弱碱性环境更有利于甲基化; 硫化物对微生物的甲基化作用有明显的抑制作用; 水体适当的盐度 (0.7%) 对甲基化有一定的促进作用。

参考文献:

- [1] Eric D S, Yoram C, Arthur M W, Environmental distribution and transformation of mercury compounds[J]. *Critical reviews in environmental science and technology*, 1995, 26(1): 1—43
- [2] Xu X Q, Deng G Q, Hui J Y, et al. Heavy metal pollution in sediments from the three gorge reservoir area[J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 1999, 23(1): 1—10[徐小清, 邓冠强, 惠嘉玉, 等. 长江三峡库区江段沉积物的重金属污染特征, 水生生物学报, 1999, 23(1): 1—10]
- [3] Tetsuo H, Hisamitsu N, Yoshitada Y, et al. Formation, distribution, and ecotoxicity of methylmetals of Tin, Mercury, and Arsenic in the environment[J]. *Critical reviews in environmental science and technology*, 1995, 25(1): 45—91
- [4] Susanne M U, Trevor W T, Svetlana A. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation[J]. *Critical reviews in environmental science and technology*, 2001, 31(3): 241—293

- [5] Robinson J B, Tuovinen O H, Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds-physiological, biochemical and genetic analyses[J]. *Microbiol. Reviews*, 1984, **48**: 95
- [6] Gilmour C C. , Henry E A. , Mitchell R, Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**: 2281
- [7] Wright D R, Hamilton R D, Release of methylmercury from sediments: effects of mercury concentration, low temperature and nutrient addition [J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1982, **39**: 1459
- [8] Callister S M, Winfrey M R. Microbial methylation of mercury in upper Wisconsin River sediments[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1986, **29**: 453
- [9] Korthals E T, Winfrey M R. Seasonal and spatial variations in mercury methylation and demethylation in an oligotrophic lake[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **53**: 2397
- [10] Lee Y H, Hultberg H. Methylmercury in some Swedish surface waters [J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, **9**: 833
- [11] Fitzgerald W F, Mason R P, Vandal G M, Atmospheric cycling and air-water exchange of mercury over mid-continental lacustrine regions[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1991, **56**: 745
- [12] Amyot M, Lean D R S, Poissant L, Distribution and transformation of elemental mercury in the St. Lawrence River and Lake Ontario[J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 2000, **57**: 155
- [13] Miller D R, The role of humic acids in the uptake and release of mercury by freshwater sediments [J], *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 1975, **19**: 2082
- [14] Compeau G C, Bartha R, Effect of salinity on mercury-methylating activity of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments[J], *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, **53**: 261
- [15] Compeau G, Bartha R, Methylation and demethylation of mercury under controlled redox, pH and salinity conditions[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, **48**: 1203
- [16] Regnell O, Tunlid A, Laboratory study of chemical speciation of mercury in lake sediment and water under aerobic and anaerobic conditions [J], *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**: 789

MICROBIAL METHYLATION OF MERCURY AND THEIR AFFECTING FACTORS IN AQUATIC ENVIRONMENT

CHEN Xiao¹, XU Ying², ZHANG Jia-Yao¹, HUI Yang² and SUN Li-Ping¹

(1. Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Sulfate-reducing bacteria(SRB)was isolated from the sediments of the oxidation pond of Ya-Er Lake hubei, a heavily polluted lake by direct discharge of chloralkali effluent, and incubated in the laboratory. Its physiology characteristics and the effects of environmental factors were studied. The results show that temperature, pH, salinity, ferrous iron and sulfide greatly affect their characteristics. The effects on bivalent mercury methylation of SRB in the simulative anaerobic aquatic system were investigated. The methylation conditions were optimized by the orthogonal experiment. The mercury methylations of SRB under anaerobic and aerobic environment were studied, as well as its abiotic methylation. And we also studied the effects on methylation of the single environmental factor. The mercury compounds were detected by HPLC. In this paper, we developed a simple and rapid method for in situ preconcentration of inorganic and organic mercury compounds in water samples. At the same time, this developed method was indicated to be applicable for detecting Hg²⁺ and MeHg in environmental water samples in this test. The results indicated that this SRB grows best under the optimum conditions, such as 35 °C, pH5.0, 0.7% salinity, 0.5g/L ferrous iron, and without sulfide. Mercury methylation in aquatic environment mostly occurs under anaerobic condition, and is mediated by SRB. And the abiotic and aerobic mercury methylations are negligible. It has been found that microbial methylation in anaerobic aquatic environment is influenced by a wide variety of environmental factors. The temperature(35 °C), pH(5.0) and salinity(0.7%) are the most important affecting factors for mercury methylation.

In aquatic environment, Mercury may be one of the most hazardous contaminants. Its ecological and toxicological effects strongly dependent on its chemical species present. Species distribution and transformation processes in natural aquatic systems are controlled by various physical, chemical, and biological factors. Under the environmental conditions, inorganic mercury species may be converted to many times more toxic methylated forms such as methylmercury. So it is of great necessity and importance for us to study the microbial methylation process and their affecting factors in aquatic environment.

Key words: Mercury; Methylation; Sulfate-reducing bacteria; Aquatic environmental factors