

粤北大宝山矿区土壤中抗铅菌株的筛选鉴定

柯野, 卢星燕, 曾松荣, 陈韵

(韶关学院英东生命科学学院, 韶关 512005)

摘要: 采集大宝山矿区重金属污染的土壤样品, 采用稀释涂布平板法对土壤样品中抗铅菌株的筛选, 进一步在含不同铅浓度的培养液中进行驯化; 通过对该菌株的形态观察、一系列生理生化试验、以及 16S rDNA 序列的比对研究进行鉴定; 利用原子荧光光度计测定其对发酵液中铅的吸附能力。结果表明, 分离获得的抗铅菌株在铅浓度为 500 mg·L⁻¹ 的培养液中长势良好, 鉴定为类短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus parabrevis*), 该菌株在含铅浓度为 300 mg·L⁻¹ 的液体培养情况下, 培养 20 h 左右, 对发酵液中铅的去除效率高, 高达 30.27%。

关键词: 铅; 菌株筛选鉴定; 类短短芽孢杆菌

中图分类号: X53

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)03-0489-05

Screening and identification of Pb-resistance strain from Dabaoshan mining area in Northern Guangdong Province

KE Ye, LU Xingyan, ZENG Songrong, CHEN Yun

(Henry Fok College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan 512005)

Abstract: Using the method of dilution butter on plate, a Pb-resistance strain was screened from the heavy metal polluted soil in Dabaoshan mining area, north of Guangdong Province. The strain was further acclimatized by culturing in liquid medium containing different lead concentrations. The strain was identified by cell morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence alignment. Further its Pb adsorption capacity in fermentation broth was determined by atom fluorescence spectrometry. The results showed a Pb-resistance strain was obtained and it grew well in the condition of 500 mg/L Pb. This strain was identified as *Brevibacillus parabrevis*. Cultured in liquid medium containing 300 mg/L Pb, the strain had the highest Pb removal efficiency (30.27%) after culturing for 20 hours.

Key words: Pb; screening and identification of strain; *Brevibacillus parabrevis*

随着工业社会的飞速发展, 如采矿、工业废物排放等人类活动的加剧, 导致铅、镉、铬、铜、镍等重金属以水溶性形式释放于土壤、地下水或地表水中^[1], 并且这些重金属不能被化学或生物降解^[2]。这种水溶性重金属被美国政府明确指出的首批污染元素(<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>), 由于这些重金属即使在较低浓度下对生物细胞都有毒害作用^[3]。因此, 对重金属污染的修复越来越受到人们的重视。

多年来, 人们一直采用易地修复和原位修复两种策略。易地修复通常是成本高, 土壤结构和功能

受到扰乱^[4]; 原位修复表现出耗时和不确定性的不足。在原地修复中, 可采用物理、化学和生物方法。虽然物理和化学方法广泛应用, 但是存在不足也较为明显, 一方面, 特别是当重金属污染物浓度低于 100 mg·L⁻¹ 的情况下, 降低重金属毒性效果并不明显^[5]; 另一方面, 这些试剂也是高污染的潜在有毒试剂^[6]。相反而言, 利用生物修复重金属污染的环境日益受到关注, 由于该技术是一种清洁、不破坏环境, 且是对重金属污染治理的一种有效策略^[7]。生物修复主要是利用植物和微生物的联合修复。对于微生物而言, 主要是利用微生物对重金属的生物

收稿日期: 2015-11-23

基金项目: 韶关学院科研项目 (2013-09), 广东省自然科学基金 (2016A030307047), 2014 年韶关市科技创新资金项目 (2014CX/K311) 和韶关学院大学生创新创业训练计划国家级立项项目(201510576007)共同资助。

作者简介: 柯野, 博士, 副教授。E-mail: keye518@163.com

吸附、生物浸取、矿化作用、细胞内积累与酶催化转化等方式^[8]。

粤北大宝山矿区是一个铅、镉和铜等重金属丰富的矿区。近年来,对矿区的过度开发,致使铅重金属的可溶性离子对矿区及下游区域污染严重,如尾矿和矿山废水中的铅等重金属超标,导致大宝山矿区周围的83个自然村成为了肝病、皮肤病和癌症的高发区^[9-10]。因此,大宝山矿区的重金属污染现状令人堪忧,对重金属污染的修复亟待解决。本论文通过从大宝山矿区受到铅污染严重的土壤中,分离纯化鉴定了1株耐铅能力强的菌株,进一步对该菌株对铅的去除能力进行了研究。本研究为该地区采用微生物去除重金属技术而需要高去除能力的菌株奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 供试土样采自广东省韶关市曲江区大宝山矿区土壤,采集土样后风干过筛,然后分装于三角瓶中备用。

1.1.2 培养基 筛选培养基:牛肉膏3.0 g,蛋白胨10.0 g, NaCl 5.0 g,琼脂15~20.0 g,水1000.0 mL, pH 7.0~7.4。为了防止重金属在灭菌过程中变质沉淀,先配制高浓度的硝酸铅溶液后,采用0.45 μm的细菌过滤膜进行过滤除菌,然后加至已熔化的牛肉膏蛋白胨培养基中,混匀倒平板。

驯化培养基:采用液体牛肉膏蛋白胨培养基,按照上述方法加入过滤除菌的重金属溶液,配制不同浓度的硝酸铅培养液。

1.1.3 试剂 细菌基因组DNA快速抽提试剂盒、高保真PCR酶和扩增引物购自于生工生物工程(上海)股份有限公司,铅标准储备液(1000 mg·L⁻¹):由国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院提供,编号GBS G62071-90(8201);测定铅含量所用的硝酸、盐酸、高氯酸等试剂均为优级纯,并且均是现配现用;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗铅菌株的筛选 称取土壤20 g加入至180 mL无菌水中,振荡30 min,制备成土悬液。按10倍的梯度稀释,吸取稀释的1.0 mL土悬液涂布在含硝酸铅浓度分别为20.0、40.0和80.0 mg·L⁻¹的牛肉膏蛋白胨平板培养基上,37℃培养24 h左右,观察平板长出的菌落,进一步将平板上的菌落利用无菌水进行洗脱,配制为混合的菌悬液备用。

1.2.2 菌株的驯化与纯化 将1.2.1中制备的菌悬

液接种至含100.0 mg·L⁻¹硝酸铅的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,200 r·min⁻¹,37℃振荡培养24 h;然后取1.0 mL菌悬液接种到含120.0 mg·L⁻¹硝酸铅的液体培养基中培养24 h,又取1.0 mL菌悬液再次转接到含硝酸铅浓度更高的培养液中培养,最终至菌株不能在更高浓度硝酸铅培养液中生长为止。取少量菌悬液采用稀释涂布平板法于牛肉膏蛋白胨培养基上培养,挑取单菌落,然后采用多次划线分离法获得纯化的抗铅菌株。

1.2.3 菌株的鉴定 根据东秀珠与蔡妙英共同编著的《常见细菌系统鉴定手册》中对细菌菌株的鉴定方法,对筛选纯化的抗铅菌株进行常规的生理生化鉴定。进一步对该菌株的16S rDNA序列进行了测序和比对,具体的方法如下:按照细菌基因组抽提试剂盒的操作说明,利用试剂盒提取抗性菌株的基因组DNA;以基因组DNA作为模板,以细菌的通用保守引物为引物(即27F:5'-AGAGTTTGATCCTG GC TCAG-3',1492R:5'-TACCTTGTTACGACTT-3'),进行50 μL反应体系的PCR反应。反应程序为:94℃变性2 min;98℃变性15 s,55℃退火20 s,72℃延伸2 min;29个循环,最后72℃延伸4~5 min。电泳鉴定、纯化PCR产物后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将获得的测序结果在美国国家生物技术信息中心建立的DNA序列数据库中,利用Blastn程序搜索比对获得亲缘关系近的细菌序列,再利用Mega 5.0软件中的Neighbor-Joining算法对这些菌株的系统发育关系进行分析。

1.2.4 抗铅菌株对液体中铅的去除能力的测定 参考陈韵等报道的试验方法,采用AFS-820双光道原子荧光光度计测定其荧光值来制作测定铅浓度的标准曲线^[11]。原子荧光光度计的设备参数设定为:氩气的气压0.2~0.5 MPa,流速600 mL·min⁻¹,屏蔽气1000 mL·min⁻¹,灯电流为75 mA,负高压323 V,原子化器的温度为200℃,原子化器的高度为8 mm,样品的进样时间在100 r·min⁻¹速度下为4 s,读数时间为10 s,读数方式为峰值,延迟时间为1 s,以Pb浓度值C作为横坐标,荧光值强度值I作为纵坐标,绘制出标准曲线。

将筛选获得的抗铅菌株接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中进行培养,制备液体菌种;然后将液体菌种接种至含有300 mg·L⁻¹铅浓度的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37℃、200 r·min⁻¹振荡培养,每隔1 h取5 mL发酵液,4000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,取1 mL上清液用超纯水(电导率≥18.2 M·cm⁻¹)稀释定容至1000 mL,然后取1 mL稀释液,

加入 (4HNO₃:1HClO₄) 40 mL 混酸, 用超纯水稀释定容至 50 mL 后, 对其溶液进行加热微沸状态 (4~5 h) 消化, 至消化到还剩 1 mL 左右, 然后再加 1:1 浓 HCl 1 mL, 5% 草酸 1 mL, 10% 铁氰化钾 2 mL, 用超纯水冲洗烧杯, 并定容至 50 mL, 同时做样品的空白对照, 混匀放置 30 min 后采用 AFS-820 双光道原子荧光光度计测定其荧光值。抗铅菌株对铅的去除率用以下公式计算, 即去除率 = (空白对照上清液含铅浓度 - 菌体处理溶液含铅浓度) / 空白对照含铅浓度。

2 结果与分析

2.1 粤北大宝山矿区土壤中抗铅菌株获得及形态

当平板培养基中铅浓度低于 80.0 mg·L⁻¹ 时, 平板上能长出了大量的菌落; 但是当铅的浓度逐渐提高时, 平板上生长的菌落种类越来越少。当铅浓度高达 500.0 mg·L⁻¹ 时, 平板上仍生长有长势较好的菌落, 但是菌落的形态基本完全一致; 当硝酸铅的浓度高于 560.0 mg·L⁻¹ 以上后, 菌株基本上不生长, 由此初步确定抗铅菌株抗铅的最高浓度为 500.0~560 mg·L⁻¹。

将抗铅菌株接种于牛肉膏蛋白胨培养基中进行培养观察, 通过观察可见该菌株的菌落形态特征为: 菌落为浅灰黄色、表面湿润、呈圆形状、菌落中等

大小、扁平、不透明、边缘较规则。取少许菌苔置于油镜下观察, 观察结果见图 1 所示, 由图 1 可见菌体为杆状, 两端钝圆。

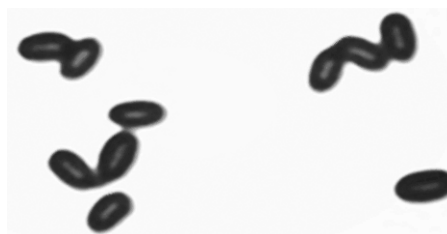


图 1 抗铅菌株的染色镜检图

Figure 1 Cell morphology of Pb-resistance strain

2.2 抗铅菌株的生理生化鉴定

对抗铅菌株进行生理生化试验, 试验结果表明该菌株生长的温度范围较宽, 生长 pH 的范围也较宽, 5% NaCl 对菌株的生长有抑制作用, 具体的生理生化结果见表 1。

2.3 抗铅菌株的 16S rDNA 的克隆及其序列分析

提取抗铅菌株的基因组 DNA 见图 2; 利用 16S rDNA 的 PCR 引物进行 PCR 扩增, 电泳 PCR 产物可见获得单一 PCR 产物条带, 然后将该 PCR 产物进行回收纯化, 测序结果表明该 PCR 产物大小为 1438 bp。

表 1 抗铅菌株的生理生化特性

Table 1 Morphological, biological and physiological characteristics of Pb-resistance strain

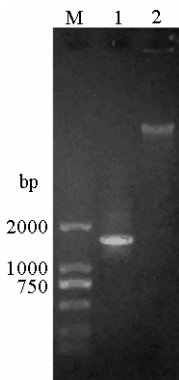
特性 Characteristics	结果 Results	特性 Characteristics	结果 Results	特性 Characteristics	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	+	50℃	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
pH 5.5	v	油脂水解 Oil hydrolysis	+	干酪素水解 Casein hydrolysis	+
pH 7.0	+	淀粉水解 Amylolysis	+	阿拉伯糖产酸 Fermented arabia sugar producing acid	-
pH 9.0	v	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	木糖产酸 Fermented xylose producing acid	-
3.0% (W/V) NaCl	+	柠檬酸盐的利用 Utilization of citric acid	+	甘露醇产酸 Fermented mannitol producing acid	+
5.0% (W/V) NaCl	-	V-P 反应 V-P reaction	-	葡萄糖产酸 Fermented glucose producing acid	+
15℃	+	DNA 酶 DNase	+		

注: “+”阳性反应; “-”阴性反应; “v”长势弱, 能生长。

Note: “+” indicates positive reaction; “-” indicates negative reaction; “v” indicates weak growth.

将该序列提交至 GenBank 数据库, 利用数据库中的 Blastn 程序进行序列比对, 通过比对发现 7 种菌 (8 个菌株) 的 16S ribosomal RNA gene 与分离获得的菌株 RS 的同源性高达 95% 以上; 进一步利用 Clustalx 2.0 版本对 8 个 16S ribosomal RNA gene 序

列进行比对, 然后利用运用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建进化树, 设定的参数如下: 测试方法选择 Bootstrap method, 重复次数选择 1000, 采用 Kimura 2-parameter 参数模型, 获得的抗铅菌株 16S rDNA 序列系统发育树见图 3 所示。



M: DNA marker; 1: PCR 产物; 2: 抗铅菌株的基因组 DNA

M: DNA marker; 1: PCR product; 2: Genome DNA of Pb-resistance strain

图 2 抗铅菌株 16S rDNA 的 PCR 产物电泳图

Figure 2 Electrophoresis results of PCR products of 16S rDNA of Pb-resistance strain

由图 3 可见, 抗铅菌株与 8 个菌株均具有较高同源性, 特别与 gi|694216992|gb|KM191288.1 (*Brevibacillus brevis*)、gi|359802914|dbj|AB680273.1 (*B. parabrevi s*) 和 gi|359804441|dbj|AB680065.1 (*B. parabrevi s*) 3 个菌株的同源性最近。因此, 结合抗铅菌株的菌落形态、菌株形态、生理生化反应结果和

16S rDNA 序列的系统发育分析结果, 初步鉴定抗铅菌株为类短短芽孢杆菌 (*B. parabrevi s*)。

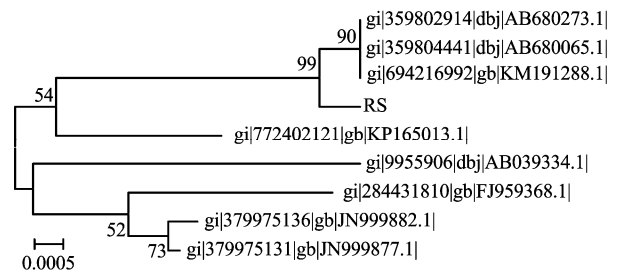


图 3 抗铅菌株(RS)的 16S rDNA 序列系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of Pb-resistance strain

2.4 抗铅菌株对液体中铅的去除能力

不同培养时间抗铅菌株对发酵液中铅的去除效率见表 2, 由表 2 可见, 未接种抗性菌株的空白发酵液中含 Pb 量为 $302 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 抗性菌株培养 20 h 左右, 发酵液中的铅含量最低为 $210.59 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 根据菌株对铅的去除率 = (空白对照上清液含铅浓度 - 菌体处理溶液含铅浓度) / 空白对照含铅浓度, 因此, 这表明抗铅菌株对重金属铅的去除率为 30.27%。

表 2 抗铅菌株在不同培养时间对铅的去除效率

Table 1 Removal efficiency of Pb-resistance strain to Pb in different culture time

项目 Item	培养时间/h Incubation time				
	10	14	18	20	24
接种抗铅菌株的发酵液中含铅量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb content in fermentation broth inoculated with Pb-resistance strain	259.58	241.68	228.03	210.60	212.76
未接种抗铅菌株的发酵液含铅量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb content in fermentation broth of non inoculated Pb-resistance strain	302.00	302.00	302.00	302.00	302.00
铅的去除效率/% Removal efficiency of Pb	14.05	19.97	24.50	30.27	29.55

3 讨论

3.1 抗性菌株的筛选

微生物被认为是对有机或无机污染物很好的生物修复剂, 对微生物筛选方案的设计就显得尤为重要。因此, 对重金属抗性微生物的筛选, 一般都如本研究一样从矿区、制革等重金属污染严重地区筛选出土著微生物^[12]。又如曹德菊等^[13]从重金属污染地分离获得 1 株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的抗铅菌株, 付晓等^[14]从广西大新铅锌矿区重金属污染土壤中分离获得铅抗性菌株 K2 菌株。

在抗重金属菌株的筛选过程中, 采用逐渐提高重金属的浓度, 对抗性菌株的筛选和驯化。在本试

验中, 随着培养基中铅浓度的增加, 能够在平板上生长的菌株越来越少, 基本上趋向于单一的菌株, 这表明重金属含量的提高对微生物的毒性逐渐增加, 能够耐高浓度的菌株越来越少; 这个过程也是对菌株的驯化适应高浓度铅溶液的过程。这也表明采用平板梯度稀释法筛选抗重金属菌株是一种可行的方法。

3.2 对重金属去除的机理

微生物对重金属的去除主要通过 3 种机制: 一是通过生物吸附, 利用微生物的细胞表面的细胞壁、糖蛋白等对重金属的吸附作用, 并且微生物细胞的比面值高, 这也体现了较强的重金属吸附能力。二是生物积累, 将重金属通过代谢作用吸入到微生物

细胞内。三是化学转化, 利用微生物的代谢过程如产酸、某些代谢产物等将重金属转转为其他的化学物质^[16]。对于微生物对铅的去除作用主要采用生物积累的方式^[13], 对于本研究分离获得的抗铅菌株主要以那种方式对铅的去除有待于进一步的研究。

4 结论

本试验从粤北重金属污染严重的大宝山矿区的土壤中, 分离获得 1 株在含铅浓度为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中生长良好的菌株, 该菌株为革兰氏阳性的杆状菌株, 结合一系列的生理生化反应结果和 16S rDNA 的测序比对结果, 将该抗铅菌株鉴定为短芽孢杆菌, 并且该菌株对铅的去除效率高达 30.27%。

参考文献:

- [1] XU R, LI T, CUI H, et al. Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 93: 11-18.
- [2] PÉREZ D E MORA A, Burgob P, MADEJÓN E, et al. Microbial community structure and function in soil contaminated by heavy metals: effects on plant growth and different amendments[J]. *Soil Biol Biochem*, 2006, 38(2): 327-341.
- [3] CÁLIZ J, MONTSERRAT G, MARTÍ E, et al. Emerging resistant microbiota from an acidic soil exposed to toxicity of Cr, Cd and Pb is mainly influenced by the bioavailability of these metals[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013, 13(2): 413-428.
- [4] HELMISAARI H S, SALEMAA M, DEROME J, et al. Remediation of heavy metal-contaminated forest soil using recycled organic matter and native woody plants.[J]. *J Environ Qual*, 2007, 36(4): 1145-1153.
- [5] WANG J L, CHEN C. Biosorbents for heavy metals removal and their future[J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(2): 196-226.
- [6] NEAGOE A, MERTEN D, IORDACHE V, et al. The effect of bioremediation methods involving different degrees of soil disturbance on the export of metals by leaching and by plant uptake[J]. *Chem Erde-Geochem*, 2009, 69(S2): 57-73.
- [7] WU G, KANG H B, ZHANG X Y, et al. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities[J]. *J Hazard Mater*, 2010, 174(1/3): 1-8.
- [8] LLOYD JON R. Bioremediation of metals: the application of microorganisms that make and break minerals[J]. *Microbiol Today*, 2002, 29: 67-69.
- [9] 李永涛, 张池, 刘科学, 等. 粤北大宝山高含硫多金属矿污染的水稻土壤污染元素的多元分析[J]. *华南农业大学学报*, 2005, 26(2): 22-25; 34.
- [10] 刘奕生, 高怡, 王康玮, 等. 广东消化道恶性肿瘤高发村的病因学研究[J]. *中国热带医学*, 2005, 5(5): 1139-1141.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] 陈韵, 陈晓远, 肖艳辉, 等. 微波消解-氢化物发生-原子荧光光谱法测定土壤中的铅[J]. *韶关学院学报(自然科学版)*, 2006, 27(9): 62-66.
- [13] VARGAS-GARCÍA M D C, LÓPEZ M J, SUÁREZ-ESTRELLA F, et al. Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals: In vitro selection[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 431: 62-67.
- [14] 曹德菊, 王方, 胡海荣. 抗铅菌株的筛选及对水中铅的去除效果研究[J]. *环境与健康杂志*, 2011, 28(1): 66-68.
- [15] 付晓, 蒋代华, 崔俊峰, 等. 矿区重金属污染土壤中铅镉抗性细菌的筛选及其活化作用研究[J]. *广西农业科学*, 2010, 41(2): 153-155.
- [16] LEITÃO A L. Potential of penicillium species in the bioremediation field [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2009, 6(4): 1393-1417.