

几株细菌的重金属抗性水平和吸附量*

张汉波 郑 月 曾 凡 朱之英 王 杰

(云南大学生物系 昆明 650091)

摘要: 从堆积时间为 80 ~ 100a 的铅锌矿渣中分离了 6 株细菌, 通过测定部分 16S rRNA 基因序列确定了它们的系统发育地位。结果表明有 3 株细菌属于节杆菌属 (*Arthrobacter*), 同 *A. nicotinovorans* 和 *A. histidinovorans* 两个种关系密切。另外 3 株属于壤霉菌属 (*Agromyces*), 同 *Ag. mediolanus* 具有较近的亲缘关系。总体来看, 这些菌株都对检测的 5 种重金属有高的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。节杆菌对 Zn、Co 的耐受明显高于壤霉菌。此外, 这些重金属高抗性菌株也对重金属有较强的吸附能力。在环境中有一单一重金属离子的情况下, 冻干的节杆菌对 Pb 的吸附率平均达到了约 400mg/g 干菌体, 对 Cd 和 Zn 的吸附也分别达到了近 177 和 80mg/g 干菌体, 具有进一步开发为重金属吸附剂的潜力。

关键词: 铅锌矿渣, 节杆菌, 壤霉菌, 重金属

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0024-06

Resistance and Adsorption of Several Bacterial Strains to Heavy Metals*

ZHANG Han-Bo ZHENG Yue ZENG Fan ZHU Zhi-Ying WANG Jie

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming, 650091)

Abstract: Six bacterial strains were isolated from lead-zinc mine tailings with the age of about 100 years, and their phylogenetic position was determined by the analysis of partial 16S rRNA gene sequence. Three strains belonged to genus *Arthrobacter*, and were close to *A. nicotinovorans* and *A. histidinovorans*. Other three strains belonged to genus *Agromyces*, and were close to *Ag. mediolanus*. All of them were resistant to Pb (NO_3)₂, CdCl₂, ZnSO₄, CuSO₄ and CoCl₂. Relatively, minimal inhibitory concentration (MIC) of Zn²⁺ and Co²⁺ of three *Arthrobacter* strains was significantly higher than that of three *Agromyces* strains. Additionally, these strains displayed strong adsorption of Pb (NO_3)₂, CdCl₂, ZnSO₄. Averagely three *Arthrobacter* strains could adsorb about 400mg of Pb²⁺, 177mg of Cd²⁺ or 80mg of Zn²⁺ per gram of dried cells. Therefore, these strains were important candidates for application in bioremediation of heavy metal-contaminated environment.

Key words: Lead-zinc mine tailings, *Arthrobacter*, *Agromyces*, Heavy metals

随着采矿业的发展和重金属在冶金、化工和制药业等方面的应用, 重金属的污染日趋严重。在全球范围内, 人类活动引起的 Pb、Cd 与 Zn 的释放量分别是自然情况下的 12.5、3.0 和 3.0 倍^[1]。这些离子进入人体血液循环系统后可长期留存于体内, 使机体的某些代谢途径受阻^[2], 因此对重金属污染的治理成了一个极其重要的环境问题。由于生物吸附法的材料来源广泛, 在低浓度下 (1 ~ 100mg/L) 吸附重金属离子效率高^[3]。加上吸附容量大、速度快、选择性好、吸附设备简单和易操作等特点, 近年来

* 云南省自然科学基金项目资助 (No. 2002C0001Q)

云南省教育厅自然科学基金重点项目资助 (No. 02ZD013)

通讯作者 Tel: 0871-5034282, E-mail: zhhb@ynu.edu.cn

收稿日期: 2004-08-02, 修回日期: 2004-11-20

重金属生物吸附剂的研究工作得到了广泛开展。微生物来源的吸附剂更有操作简单,易于工业化生产等特点,在去除环境中的重金属方面预期具有广阔的应用前景。

一般情况下,在受重金属污染的地区都可筛选到抗重金属的微生物。初步的测试工作表明,这些抗性微生物有潜在的重金属吸附作用。本文报道了铅锌矿渣中两类在系统发育地位上明显不同的细菌以及它们对锌、铅、镉等重金属的抗性水平和吸附量。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验菌株 CS13, CS14, CS15, CM02, CM03 和 CM05 分离自堆积时间约 80 ~ 100a 的铅锌矿渣^[4],保存于 TY 斜面培养基^[5]。

1.2 菌株系统发育地位

菌体在液体 TY 培养基 28℃ 摇瓶 16 ~ 18h,取 1mL 菌液用试剂盒 (WATSON Bacteria Genomic DNA Isolation Mini Kit) 提取基因组 DNA,用两个引物 (前引物为: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 后引物为: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3') 来扩增 16S rRNA 基因^[6]。扩增体系含 1μL DNA 模板 (大约 20 到 100ng DNA); 5μL 10 × PCR 缓冲溶液 (100mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 500mmol/L KCl; 15mmol/L MgCl₂), 4μL dNTP 混合物 (每个 dNTP 浓度为 2.5mmol/L) (TaKaRa), 1.25U Taq 酶 (TaKaRa), 两个引物各 1μL (终浓度为 0.4μmol/L), 无菌去离子水补足 50μL。PCR 扩增仪器为 GeneAmp PCR system, 扩增程序为: 95℃ 4min; 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1min, 共 32 个循环; 72℃ 10min, 4℃ ∞。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后切出 1,500bp 大小的片段,经胶回收试剂盒 (WATSON Gel Extraction Mini Kit) 回收后用 ABI PRISM 377-96 sequencer 直接测定序列, BigDye (Perkin-Elmer) 作为终止剂, 测序引物为扩增用的前引物。测序反应体系: 纯化后的扩增产物约 1μL (约 30ng), BigDye 2.5μL, 引物 1μL (约 3.2pmol/L), 用水补足 10μL。扩增程序为: 95℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 1min, 35 循环; 72℃, 5min, 4℃ 保存。

测得的 DNA 序列经 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST 引擎搜索后,用 CLUSTAL X (ver. 1.8) 软件将这些序列与若干个近缘种以及其他几个系统发育相关属的 16S rRNA 基因序列进行排列。在系统发育分析时排除碱基缺失位点,用邻接法 (Neighbor-joining analysis) 构建系统发育树。距离矩阵按照 Kimura's 双参数模型进行计算^[7], Bootstrap 检验进行 1,000 次取样。

1.3 重金属的抗性特征

先配制 1mol/L ZnSO₄, Pb (NO₃)₂, CdCl₂, CuSO₄ 和 CoCl₂ 储液,经高压蒸汽灭菌后加入 TY 液体培养基,制成浓度变化在 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、16.0、32.0 mmol/L 的一系列试管。接种活化菌液后,28℃ 摇瓶培养 15d,能够抑制细胞生长的最低浓度为该菌株的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。由于添加到一定浓度有沉淀反应,在观察或测量光密度值时都以同浓度但不接种试管作为对照。

1.4 重金属吸附特性研究

1.4.1 干菌体吸附:活化菌体接入 200mL 液体 TY 培养基 (pH7.0 ~ 7.2), 28℃, 100r/min 摇瓶培养 24h。培养液在 8,000r/min 离心收集菌体,菌体经蒸馏水洗涤 2

遍, 真空冷冻干燥后用于吸附实验。取约 0.01 g 干燥菌体分别用浓度为 5 mmol/L 的 ZnSO_4 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 CdCl_2 溶液 50 mL 悬浮 (在混合吸附实验中重金属溶液为 3 种金属溶液的混合), 28℃, 100 r/min 摇瓶 24 h。8,000 r/min 离心 10 min, 上清液稀释后用等离子光谱仪 (ICPS—1000 II 型, 日本岛津公司) 测定残余离子量。同时以相同操作但不加菌体的重金属离子溶液作为对照。吸附量按照下列公式计算^[8]:

菌体吸附量 (mg/g) = (对照溶液浓度 - 实测浓度) × 溶液体积 (L) × 稀释倍数 / 菌体质量 (g)

1.4.2 生长菌体吸附: 活化菌体接入 50 mL 分别含有 2 mmol/L Zn^{2+} 、1 mmol/L Pb^{2+} 、0.1 mmol/L Cd^{2+} 的液体培养基中, 28℃, 100 r/min 摇瓶 24 h 增殖培养。8,000 r/min 离心 10 min 后, 上清液按照上述方法测定残余重金属含量, 菌体经 80℃ 干燥至衡重后称重, 然后按照上述方法计算重金属吸附量。以不接种但含有重金属的培养基作为对照。

2 结果

2.1 菌株系统发育分析

在 TY 平板上, 有两类菌落分别表现为奶油色不扩散特征 (creamy and nondiffusionable, CND) 和白色、大而扩散的特征 (big, white and diffusionable, BWD), 出现频率分别达到 34.0% 和 16.3%。随机各挑选 3 个菌落, 测定了它们的部分 16S rRNA 基因序列, 并构建了系统发育树 (图 1)。结果显示 CND 菌落的 3 株菌都属于节杆菌属 (*Arthrobacter*), 同 *A. nicotinovorans* 和 *A. histidinolorans* 两个种关系密切。BWD 菌落的 3 株属于壤霉菌属 (*Agromyces*), 同 *Ag. mediolanus* 具有较近的亲缘关系。结果表明两类菌落代表了在系统发育上明显不同的类群。

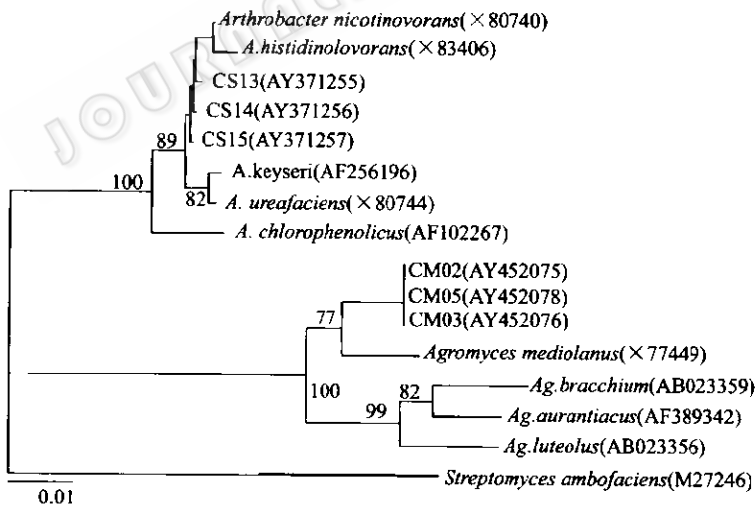


图 1 根据 6 个菌株和其近缘种的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

作图时以 *Streptomyces ambofaciens* 为外群, 树节上的数字表示 1,000 次随机取样发生的百分率, 只显示了等于或大于 50% 的数字, 括号中的数字表示菌株的 GenBank 获取号

2.2 重金属抗性特征

这些菌落在矿渣中高频率出现, 推测它们应当具有较高的重金属抗性能力。测定了它们对 5 种重金属离子的抗性特征, 结果与预期符合 (表 1)。但两类菌相比较, 节

杆菌对 Zn、Co 的耐受水平明显高于壤霉菌，表明不同类型的细菌对同一环境的适应差异。

表 1 两类菌株的重金属最低抑制浓度 (mmol/L)

分类地位	菌株编号	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺
节杆菌	CS13	32	8	2	8	4
	CS14	32	4	4	8	4
	CS15	32	4	2	8	8
壤霉菌	CM02	8	4	2	8	2
	CM03	8	4	2	16	1
	CM05	8	4	4	16	1
统计显著水平		*	NS	NS	NS	*

统计显著水平进行 χ^2 检验, * $P<0.05$, NS 不显著

2.3 菌株吸附重金属特性

2.3.1 干菌体吸附特性：高的重金属抗性能力是否也赋予了菌株较强的重金属吸附能力？实验首先检测了经真空冷冻干燥后的菌体对 Zn、Pb 和 Cd 的吸附。在溶液仅有单一金属离子时，节杆菌和壤霉菌对 Zn 的吸附量分别为 77.9 和 84.1mg/g 干菌体，二者没有明显差异。对 Pb 的吸附率分别为 404 和 363mg/g 干菌体，前者略高。而对 Cd 的吸附率分别为 177 和 91mg/g 干菌体，前者为后者的两倍水平（图 2）。当溶液中同时存在 3 种重金属离子的情况下，两种菌体对 Zn 的吸附率分别降至 11 和 19mg/g 干菌体，对 Pb 的吸附率也降至 147 和 210mg/g 干菌体。对 Cd 来说，节杆菌菌株的吸附率也降低了一半，仅为 95 mg/g 干菌体，但壤霉菌却略升高至 135 mg/g 干菌体（图 3）。

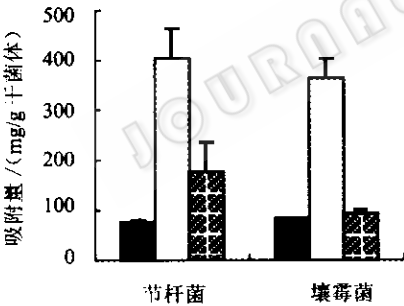


图 2 两种细菌干菌体对单一金属的吸附量
误差棒为一个标准差
■ Zn²⁺, □ Pb²⁺, ▨ Cd²⁺

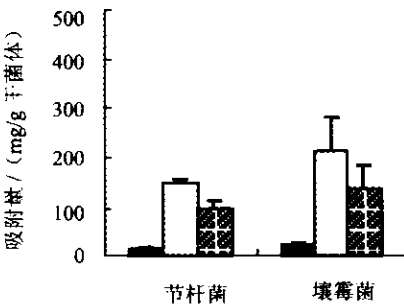


图 3 两种细菌干菌体对混合金属的吸附量
误差棒为一个标准差
■ Zn²⁺, □ Pb²⁺, ▨ Cd²⁺

2.3.2 生长细胞吸附特性：这些菌株在含有较高浓度重金属的培养基中仍然可以繁殖，因此可以检测细胞在生长过程中对环境中的重金属富集能力。在本实验中仅检查了节杆菌株 CS14、CS15 和壤霉菌株 CM02 的情况。菌株在分别含有 2mmol/L Zn²⁺、1mmol/L Pb²⁺、0.1mmol/L Cd²⁺ 的 TY 液体培养基中摇瓶增殖 1d，它们的吸附量见图 4、5。相对于冻干菌体，两种系统发育有差异的细菌对 Zn 的吸附率都增加了近 1 倍，分别达到 143 和 167 mg/g 干菌体。但两个节杆菌株对 Pb 和 Cd 的吸附大大降低，分别为 107 和 10mg/g 干菌体，仅达到干菌体吸附实验的 1/4 和 1/10。壤霉菌株 CM02 的生长细胞对 Pb 的吸附量为 551mg/g 干菌体，相对冻干菌体的吸附量 417mg/g 干菌体略有升高。但对 Cd 的吸附量也明显降低，仅有 14 mg/g 干菌体，为冻干菌体吸附实验的 1/10。

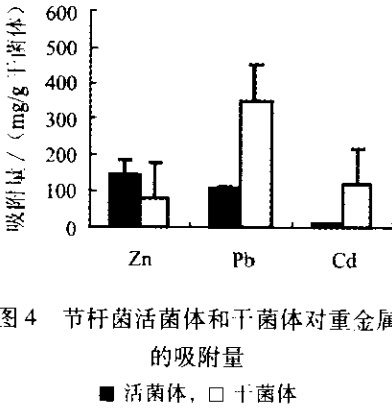


图 4 节杆菌活菌体和干菌体对重金属的吸附量

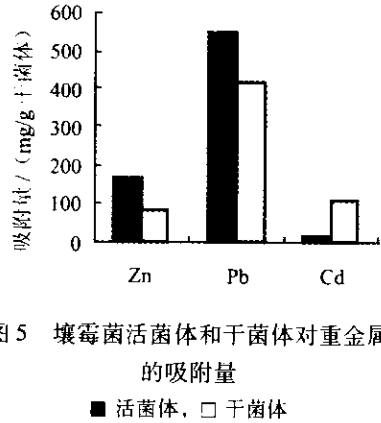


图 5 壤霉菌活菌体和干菌体对重金属的吸附量

3 讨论

尽管铅锌矿渣的 Pb、Zn 和 Cd 平均总量达到了 4481.08 ± 716.23 、 3590.03 ± 112.63 和 $63.31 \pm 7.82 \text{mg/kg}$ ^[4]，但仍然生活有大量化能异养细菌，数量达 1×10^6 个/g 矿渣^[5]。在这些细菌中随机选取的两类优势菌分属于节杆菌和壤霉菌（图 1）。所有菌株都表现出对重金属的高抗性水平（表 1），显示了对重金属污染环境的适应性。由于目前矿渣中的微生物类群的系统发育研究工作较少，因此不能判断是否大部分矿渣环境中可培养的细菌都是这两类细菌或是相关种类占优势。此外这些菌株与相关种在 16S rRNA 基因序列以及在形态、生理特征方面也有大的差别（另文报道），暗示矿渣中可能生活有较多的潜在新物种。

尽管这些高抗性菌株也对重金属有较强的吸附能力，但两类细菌有一定差异。在冻干菌体对单一金属离子的吸附实验中，壤霉菌对 Pb、Cd 的吸附力相对较弱（图 2）。此外，菌株对重金属的吸附还受环境中其他金属离子共存的影响。总体看菌体对单一金属离子的吸附量普遍比在多种离子混合时高（图 3），表明金属离子间有相互抑制作用^[3]。

此外同种菌体在生长繁殖时对金属离子的吸附不同于冻干菌体。在本实验条件下，两种细菌在生长过程中都增加了对 Zn 离子的吸附但对 Cd 的吸附大幅度下降（图 4、5）。该现象可用“吸附 + 细胞膜传输”模型来解释。该模型认为菌体对金属的吸附分为直接结合在细胞表面的物理吸附过程和靠细胞代谢向细胞内转移运送的生物学过程^[3,9]。因此我们推测在细菌生长吸附实验中，由于 Zn 的毒性相对较小，且是一种生长必须的微量元素，多数微生物都存在主动吸收的机制。因此生长繁殖的细胞除表面积累外，还将 Zn 离子转移进入细胞内部。而在冻干菌体吸附实验中仅有表面积累过程，因此后者的吸附量较前者小。由于 Cd 离子毒性较大，生长的菌体可能没有胞内运输过程，环境中离子的减少主要是细胞的表面积累，因此不会比冻干菌体积累更多的量。

节杆菌在培养时对 Pb 离子的富集力降低，可能与 Cd 离子的情况具有相同的机理。但壤霉菌在培养时对 Pb 离子富集的增加，除了存在“吸附 + 细胞膜传输”机制外，还可用一种“诱导”模型来解释，即在 Pb 离子存在时，生长的菌体可能被诱导合成一种可以吸附 Pb 离子的表面附属物，比如多糖类物质，从而增加了培养菌体对金属离子的富集力。因为在含有 1mmol/L 的 Pb 离子 TY 液体培养基中可以观察到壤霉菌的细胞具

有大量类似多糖的不规则分泌物, 细胞也不象在其他培养基中呈现的分散状态, 而是聚集成团状, 因此存在这种可能性, 具体机制需要进一步研究。

致谢 菌体的冷冻干燥在中国医学科学院医学生物学研究所完成, 重金属测试工作在云南大学实验中心完成。

参 考 文 献

- [1] 郭学军, 黄巧云. 应用与环境生物学报, 2002, **8** (1): 105 ~ 110.
- [2] 郝建栓. 环境污染与防治, 1996, **18** (4): 28 ~ 31.
- [3] 刘 刚, 李清彪. 水处理技术, 2002, **28** (1): 17 ~ 21.
- [4] 张汉波, 段昌群, 胡 斌, 等. 农业环境科学学报, 2003, **22** (1): 67 ~ 69.
- [5] 张汉波, 于春蓓, 施 雯, 等. 农村生态环境, 2004, **20** (1): 44 ~ 47.
- [6] Edwards U, Rogall T, Blöcker H, *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 7843 ~ 7853.
- [7] Kimura M. *J Mol Evol*, 1980, **16**: 111 ~ 120.
- [8] 杨晓玲. 环境污染与防治, 1986, **8** (1): 23 ~ 28.
- [9] 王亚雄, 郭瑾珑, 刘瑞霞. 环境科学, 2001, **22** (6): 72 ~ 75.