

Isolation Identification and Phylogenetic Analysis of Cd²⁺ and Pb²⁺ Tolerance Strains from Gejiu Mining Area of Yunnan

Zongping Tao, Tiantao Wang, Degang Zhang, Chuanming Wang, Xian Shi*

Key Laboratory of Crop Quality and Efficient Cultivation and Security Control of College in Yunnan Province, College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi Yunnan
Email: 1677624546@qq.com, *sx_bilogy2@126.com

Received: May 27th, 2019; accepted: June 11th, 2019; published: June 18th, 2019

Abstract

[Objective]: Isolation and phylogenetic analysis of Pb²⁺ and Cd²⁺ tolerance strains from Gejiu mining soil of Yunnan. [Methods]: Microbial strains and their tolerance heavy metals of Cd²⁺ and Pb²⁺ by using the plate separation method, Phylogenetic analysis of Cd²⁺ and Pb²⁺ Tolerance strains based on 16SrDNA and ITS gene sequence. [Results]: 57 strains of Cd²⁺ tolerant microorganisms were isolated by using three media, including 39 bacteria, 18 fungi; 161 strains of Pb²⁺ tolerant microorganisms were isolated, including 121 bacteria, 48 bacteria. The tolerance of 178 strains of bacteria to 100 mg/L Cd²⁺ and 2000 mg/L Pb²⁺ were 28.9% and 32.2% respectively. The tolerance of fungi to 1000 mg/L Cd²⁺ was 27.6%, and the tolerance of fungi to different concentrations of Pd²⁺ was 25.0%. The tolerance of strains to Pb²⁺ was significantly better than that of Cd²⁺. Through phylogenetic analysis of 16SrDNA and ITS gene sequence, it confirmed S73-1 strain as *Enterobacter*, S156-1 as *Acinetobacter* and IS73-1 as *Rhizopus*.

Keywords

Mining Area, Cd²⁺ Resistance Strain, Pb²⁺ Resistance Strain, Phylogenetic Analysis

云南省个旧市矿区耐镉和铅菌株的分离、鉴定及系统发育分析

陶宗苹, 王田涛, 张德刚, 王传铭, 施 娟*

红河学院, 生命科学与技术学院, 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南 蒙自
Email: 1677624546@qq.com, *sx_bilogy2@126.com

*通讯作者。

文章引用: 陶宗苹, 王田涛, 张德刚, 王传铭, 施娟. 云南省个旧市矿区耐镉和铅菌株的分离、鉴定及系统发育分析[J]. 环境保护前沿, 2019, 9(3): 423-430. DOI: 10.12677/aep.2019.93059

摘要

[目的]：通过对云南省个旧市矿区周边进行土壤采样，筛选出耐 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株并且对其 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 耐受性进行评价和系统发育分析。[方法]：采用平板法进行微生物菌株分离和 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 耐受性评价，基于16SrDNA和ITS序列对耐受 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株进行系统发育分析。[结果]：共筛选到耐重金属 Cd^{2+} 微生物57株，其中细菌39株，真菌18株；耐重金属 Pb^{2+} 微生物161株，其中细菌121株，真菌40株。对178株菌株耐受性研究发现，细菌在100 mg/L Cd^{2+} 浓度和2000 mg/L Pb^{2+} 浓度下耐受性最好，达28.9%和32.2%，真菌在1000 mg/L Cd^{2+} 浓度耐受性最好，达27.6%，真菌在不同 Pd^{2+} 浓度处理下耐受性均表现出一致为25.0%。菌株对 Pb^{2+} 的耐受性明显好于 Cd^{2+} 。通过16SrDNA和ITS序列和系统发育分析，经鉴定S73-1菌株属于肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌，S156-1为不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌，IS73-1为根霉属(*Rhizopus*)真菌。

关键词

矿区，镉抗性菌株，铅抗性菌株，系统发育分析

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

云南省个旧市是我国有名的“锡都”，具有历史记载的矿业发展有二千多年的历史。由于长期利用土法炼矿，导致矿区周边的环境受到严重破坏。郑国强等[1]研究矿区土壤时发现 Pb 属于强度污染。黄玉[2]等研究个旧矿区矿业活动对土壤重金属的累积贡献，结果表明矿业活动区重金属累积贡献率排序为 $\text{Pb} > \text{Zn} > \text{As} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Hg}$ ，Pb、Cd、As、Zn、Cu 与矿业活动关系密切，矿业活动区 Pb、Cd、As 均表现为极高累积和极高风险。宋雁辉等[3]在研究中发现个旧乍甸的农田土壤中 Pb、Zn、Cu、Cd、As 的含量均已超出《土壤环境质量标准》(GB15618-1995)二级标准；米艳华等[4][5]研究发现，矿区蔬菜、玉米等作物中均有重金属 Pb、Cd 和 As 的检出，对人体健康存在潜在的健康风险。众多的研究表明，矿区矿产作业破坏了当地的生态环境，带来的土壤重金属污染对当地居民的生活影响越来越大，对于矿区土壤重金属污染的治理，已到了刻不容缓的地步。微生物修复方法在治理重金属污染方面表现出菌种来源丰富、低成本、无二次污染等方面的优势，具有较大的应用前景[6]。抗性细菌能够通过特异性生物吸附、富集活化等多种方式减少重金属的污染，尤其适用于治理土壤低浓度或大面积重金属污染。因此，有针对性地筛选抗 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株，研究探索其抗 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 机制，对于农田土壤环境中重金属污染的治理具有一定的理论意义[7][8][9][10]。肖炜等[11]在研究云南个旧锡矿区可培养细菌多样性及其重金属抗性时发现，个旧锡矿区土壤可培养细菌具有丰富的多样性，而且蕴含着不少潜在新类群，该环境中含有大量 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 耐受菌株，并对 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 具有较强的抗性或适应性。因此，试验从云南个旧市矿区受重金属污染土壤中采样，分离纯化具有耐受 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株，并通过形态观察及系统发育分析，了解耐受 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株特性，旨在为将来更好地治理土壤中重金属污染提供基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

重金属污染土壤来自于云南个旧矿区周边土壤。耐 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株筛选与纯化培养基：细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基[12]、真菌采用马铃薯培养基[12]、放线菌采用高氏一号培养基[12]。

2.2. 试验方法

2.2.1. 菌株的分离、纯化

称取各土壤 25 g 置于盛有 225 ml 灭菌水和玻璃珠的三角瓶中, 在转速 180 r/min 的摇床上振荡 30 min, 制得土样悬液, 然后用无菌水进行 6 倍梯度稀释。取 1 ml 10^{-3} ~ 10^{-5} 稀释度的土壤悬液涂布平板, 于 28℃ 培养, 每天观察并记录各培养基上的微生物生长情况及数量。7~30 d 后挑选出的合适的菌液浓度的菌株接种到相应的培养基上, 倒置于 26℃ 的恒温培养箱中培养纯化 3~4 天。

2.2.2. 耐重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株的筛选

将纯化好的菌株点接到 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度为 100 mg/L、500 mg/L、1000 mg/L、2000 mg/L 的相应培养基上观察它们生长与否及生长程度, 实验重复 3 次。

2.2.3. 耐重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株的形态观察与鉴定

分离获得的细菌和真菌分别接种到牛肉膏蛋白胨培养基和马铃薯培养基平板中央, 28℃ 培养 10 d, 观察菌落形态。筛选出的耐重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株送上海生工生物工程有限公司测序。将序列进行 Blast 序列分析, 确定各菌株边缘种及相似性。使用 MEGA 5.2 软件构建系统发育树。

2.3. 数据分析

实验数据采用 Excel 2013 分析, 利用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 检验多重比较($P < 0.05$), 结果以平均值±标准差表示。

3. 结果与分析

3.1. 耐重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 菌株的筛选

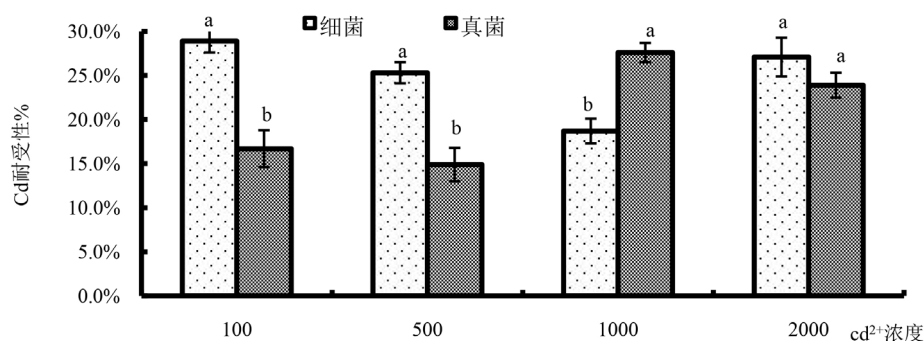
经过固体培养基及多次的筛选和划线纯化后, 共筛选到耐重金属 Cd^{2+} 微生物 57 株, 其中细菌 39 株, 真菌 18 株, 放线菌 0 株; 耐重金属 Pb^{2+} 微生物 161 株, 其中细菌 121 株, 真菌 40 株, 放线菌 0 株。由图 1 数据可见到, 筛选培养的细菌和真菌耐受 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的浓度均达到 2000 mg/L。但各处理各菌株表现出差异, 由图 1(a)可知, 细菌在不同 Cd^{2+} 浓度下耐受性表现出 100 mg/L 处理最好达 28.9%, 其次为 2000 mg/L 处理为 27.1%, 经过方差分析两个处理之间未达显著差异; 真菌表现出在 1000 mg/L 浓度处理下最好达 27.6%, 其次为 2000 mg/L 处理为 23.8%, 经方差分析两个处理未达显著差异。由图 1(b)可见, 细菌在不同 Pb^{2+} 浓度下表现耐受性不同, 各处理表现为 2000 mg/L > 100 mg/L > 500 mg/L > 1000 mg/L, 经过方差分析细菌在 2000 mg/L 处理下的耐受性与 100 mg/L 处理未达显著差异, 与 500 mg/L 和 1000 mg/L 处理达显著差异; 真菌在不同 Pb^{2+} 浓度处理下耐受性均表现出一致为 25.0%。结果说明, 矿区土壤在长期受重金属污染的情况下, 细菌、真菌对重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 产生了不同的抗性。

3.2. 耐重金属 Cd 和 Pb 菌株的形态观察

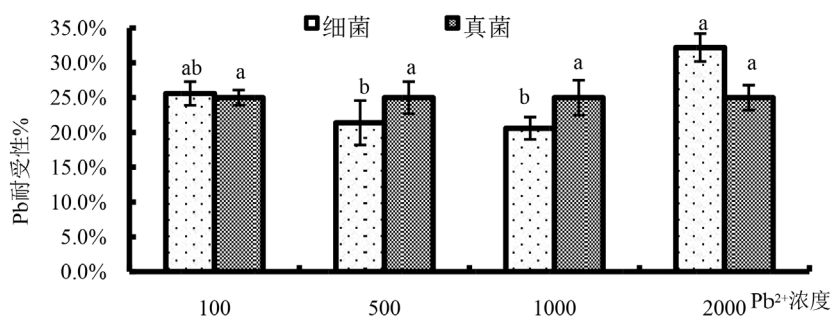
3.2.1. 耐重金属 Cd 菌株形态观察

从筛选出的所有菌株中选取 1 株耐受 Cd 的细菌进行形态观察, 该细菌为 100 mg/L 处理, 编号为 S73-1。

由图 2 可看出, 该菌株从形态观察上看呈乳白色, 菌落呈圆形, 边缘光滑整齐。经过细菌革兰氏染色显微形态观察该细菌为红色, 所以属于革兰氏阴性菌, 杆状。



(a) 不同 Cd²⁺ 浓度下细菌和真菌耐受性



(b) 不同 Pb²⁺ 浓度下细菌和真菌耐受性

Figure 1. The percentage of Cd²⁺ and Pb²⁺-tolerance strains

图 1. 不同 Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 浓度下菌株的耐受性



Figure 2. Colony morphology of S73-1 strains

图 2. S73-1 菌株菌落形态

3.2.2. 耐重金属 Pb 菌株形态观察

从筛选出的所有菌株中选取长势最好的一株细菌(编号 S156-1)和一株真菌(编号 IS73-1)进行形态观察。如图 3 可知, 筛选培养的细菌菌落形态及特征, 均为粘液性型菌株, 落呈淡黄色, 呈圆形, 表面光滑经过革兰氏染色法对筛选细菌染色鉴定, 被测细菌为革兰氏阴性球杆菌, 常见成对排列, 无芽孢, 无鞭毛。

如图 4 可知, 筛选培养的真菌菌落形态及特征, 菌落中心菌株的颜色最初为白色, 后随着菌株生长使菌落色发生变化, 变为淡黄色或灰褐色, 菌株分布类似同心圆状向四周呈丝状散开生长, 菌落边缘比较稀松。孢囊梗直立或稍弯曲, 2~4 株成束, 与假根对生, 有时膨大或分枝, 呈褐色, 孢囊孢子呈椭圆形, 其形状、大小不一致。可明显观察出该真菌与根霉属真菌相似性高。

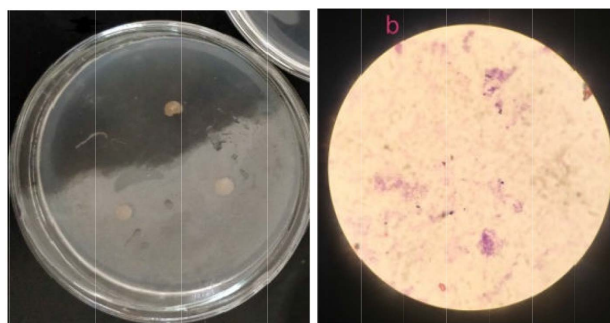


Figure 3. Colony morphology of IS73-1 strains

图 3. S156-1 菌株菌落形态

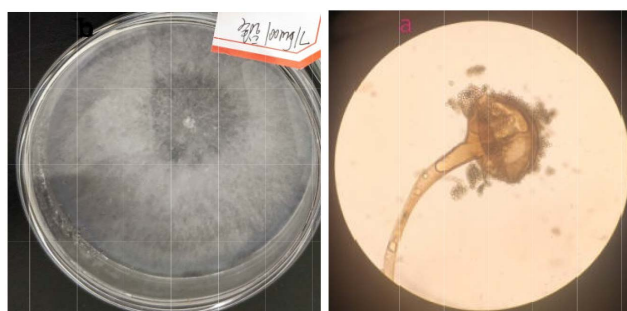


Figure 4. Colony morphology of S156-1 strain

图 4. IS73-1 菌株菌落形态

3.3. 耐 Cd 和 Pb 菌株的 16SrDNA 和 ITS 序列分析

由图 5 可知, 可测定耐 Cd^{2+} 菌株 S73-1 的 16SrDNA 序列全长为 1503 bp。将经测序得到的序列进行 Blast 序列分析, S73-1 菌株属于肠杆菌属(*Enterobacter*), 同源性达到 99%。对耐 Pb^{2+} 细菌 IS73-1 的 16SrDNA 基因和 S156-1 ITS 的扩增和测序, 得到 S156-1 的扩增物长度为 1359 bp, IS73-1 的扩增物长度为 604 bp, 将测序结果进行 BLAST 在线对比, 结果表明编号 S156-1 的菌株与不动杆菌属(*Acinetobacter pittii*)微生物的同源性为 100%。菌株 IS73-1 对比结果表明与根霉属(*Rhizopus*)的同源性为 100%。

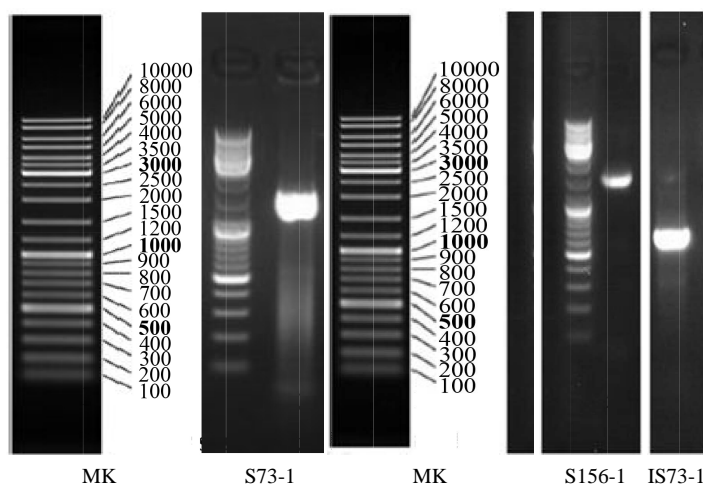


Figure 5. PCR results of S73-1, IS73-1 and S156-1 16S rDNA and ITS gene sequences

图 5. S73-1、IS73-1 和 S156-1 16S rDNA 和 ITS 基因序列 PCR 结果

3.4. 耐 Cd 和 Pb 菌株的系统发育分析

将 S73-1 和 IS73-1 的 16SrDNA 和 S156-1 的 ITS 序列构建系统发育树进行进一步的种属鉴定(图 6)。结果表明菌株 S73-1 在系统发育树上可以划分为肠杆菌属(*Enterobacter*)，菌株 S73-1 与鲁氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii* strain LY-62)在系统进化树上处于同一分支，序列同源性达 99%。菌株 S156-1 在系统发育树上划分到不动杆菌属(*Acinetobacter pittii*)，菌株 S156-1 与皮特不动杆菌在系统进化树上处于同一分支，序列同源性达 100%。菌株 IS73-1 在系统发育树上划分到根霉属(*Rhizopus*)，菌株 IS73-1 与米根霉菌(*Hizopus oryzae*)在系统进化树上处于同一分支，序列同源性达到 100%。

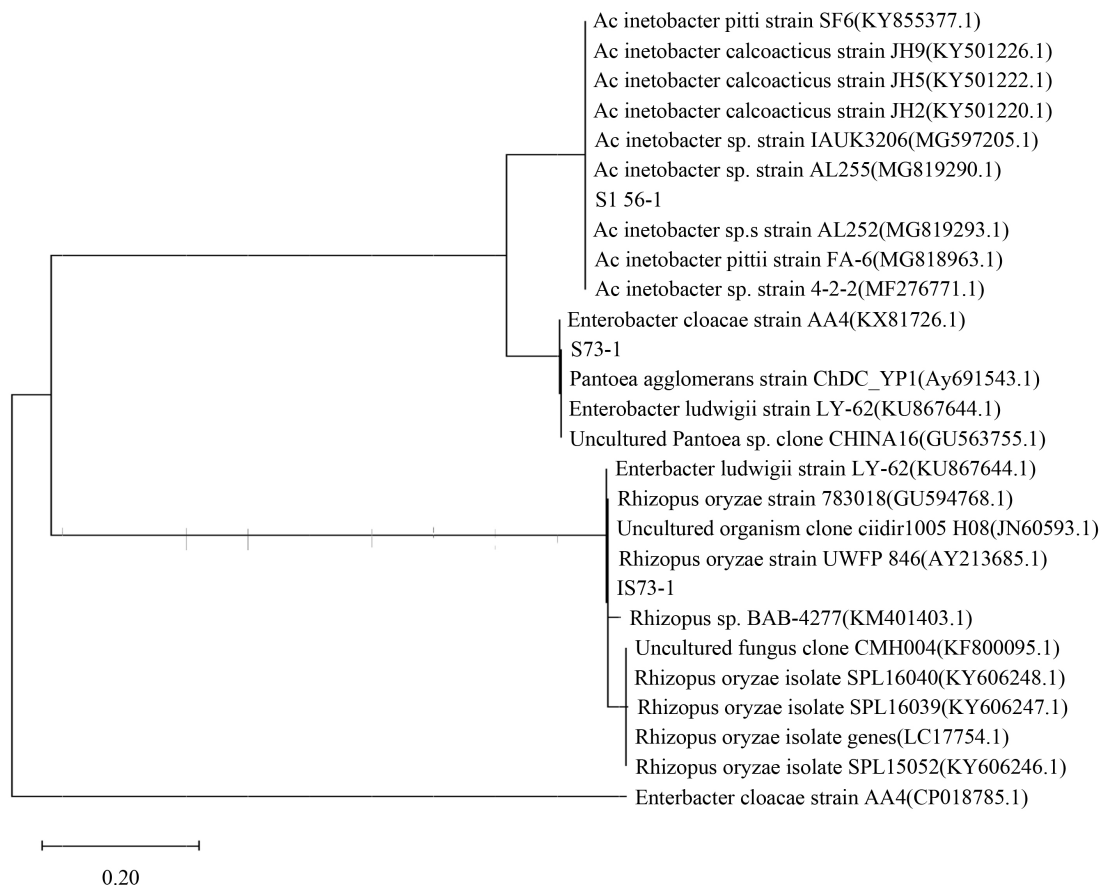


Figure 6. Phylogenetic tree of 16SrDNA and ITS gene sequence of S73-1、IS73-1、S156-1

图 6. S73-1、S156-1 和 IS73-1 的 16SrDNA 和 ITS 基因序列系统发育树

4. 讨论与结论

本试验通过从云南个旧矿区受重金属污染的土壤中进行耐重金属耐 Cd 和 Pb 微生物筛选，筛选培养的耐重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 细菌和真菌耐受性均达到 20,000 mg/L 浓度处理，放线菌的耐受性低于 100 mg/L 浓度处理。说明个旧矿区土壤在长期受重金属污染的情况下，细菌和真菌对重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 产生一定的抗性，因为重金属污染对农用土壤中微生物类群动态变化的影响是多样的[13] [14] [15]，可使微生物的基因发生突变，以适应重金属污染的土壤环境。而在 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度为 2000 mg/L 的条件下，长出的细菌菌株数量明显多于真菌，这就说明细菌对镉和铅的耐受性强于真菌。筛选得到的结果与沈国清等[16] 报道的 10 mg/kg 土壤中细菌、真菌对镉产生的耐性作用大小为细菌 > 真菌基本相符。本研究中未能筛

选出放线菌,可能是因为重金属 Cd 和 Pb 的浓度超出了个旧矿区土壤中的放线菌对重金属 Cd 和 Pb 的最大耐受性,除此之外也可能是因为矿区土样中存在的放线菌数量极少,未能成功筛选出来。丁自立[4]等在研究中发现放线菌对镉的耐性最高才达到 45 mmol/L,所以说明放线菌对镉的耐受性很弱,当 Cd²⁺为 100 mg/L 时,放线菌无法生长。我们发现来自个旧矿区的耐受 Pb 的微生物菌株数多于耐受 Cd 的菌株数。这与卞光凯[17]等对沿海滩涂耐盐植物内生细菌的重金属耐受情况相似,他们的结果显示能够耐受 Pb²⁺的菌株数明显多于耐受 Cd²⁺的菌株数。

而想利用从重金属污染的土壤中筛选得到的微生物来修复重金属污染的土壤,就必须知道筛选出的微生物种类、分属及以上单位。从所采集土样中筛选 3 株微生物,其中 1 株耐 Cd 细菌 S73-1,1 株耐 Pb 细菌 S156-1,1 株耐 Pb 真菌 IS73-1。经鉴定 S73-1 菌株属于肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌,S156-1 为不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌,IS73-1 为根霉属(*Rhizopus*)真菌。目前还未发现从土壤中鉴定出属于不动杆菌属和根霉属的耐重金属菌株,但鉴定出属于其他属的研究有很多。如曾奇玉[18]等从采矿废水湖和实验废液池中筛选出一种耐受 Pb²⁺菌株,该菌株属于肠杆菌属(*Enterobacter*)。潘园园[19]从铜矿区土壤中分离筛选到一株耐 Cd²⁺菌株,耐 Cd²⁺浓度为 2 mmol/L,经鉴定为产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)。蔡青云[20]从钨矿区铅镉污染的土壤中分离纯化得到 2 株对 Cd²⁺具有很高耐受性的菌株,其中一株对 Cd²⁺的最大耐受浓度达到 1800 mg/L,经 16SrDNA 测序鉴定该细菌属于大肠杆菌属(*Enterobacter sp.*)。本次实验经筛选鉴定发现了新的耐重金属 Cd 和 Pb 微生物,为治理重金属污染土壤提供新的菌株。

试验中仅得出了肠杆(*Enterobacter*)菌属菌株对 Cd²⁺耐受性,不动杆菌属(*Acinetobacter*)和根霉属(*Rhizopus*)对 Pb²⁺具有耐受性,还未能研究它对其它重金属是否也有耐性,以一种重金属考虑其抗性还不全面,因此,今后可以对各菌株进行耐其它重金属的研究、它们最佳的除去环境条件及和植物协同作用等,通过一系列研究为治理更多的重金属污染土壤提供优质菌株。

基金项目

云南省教育厅项目(2016ZDX138),云南省科技厅项目(2016FD089),红河学院教学项目(YYKC181005)。

参考文献

- [1] 郑国强,方向京,张洪江,等. 云南省个旧锡矿区重金属污染评价及植被恢复初探[J]. 水土保持通报, 2009, 29(6): 208-213.
- [2] 黄玉,蔡保新,王宇,等. 云南个旧锡矿区矿业活动对土壤重金属的累积贡献[J]. 地址通报, 2014, 33(8): 1167-1174.
- [3] 宋雁辉. 云南个旧乍甸农作物重金属污染现状及土壤改良[D]: [硕士学位论文]. 昆明: 昆明理工大学, 2012.
- [4] 米艳华,雷梅,黎齐万,等. 滇南矿区重金属污染耕地的植物修复及其健康风险[J]. 生态环境学报, 2016, 25(5): 864-871.
- [5] 张德刚,刘艳红,张虹,等. 选冶厂周边农田中几种农作物的重金属污染状况[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5803-5804, 5850.
- [6] 刘敬勇. 陕矿区土壤重金属污染及生态修复[J]. 中国矿业, 2015, 15(12): 66.
- [7] 陈华君,栾景丽,何艳明,熊国焕,杨勇. 云南金属矿区土壤重金属污染现状及生物修复技术研究进展[C]//中国环境科学学会. 中国环境科学学会 2013 年学术年会论文集. 北京: 北京出版社, 2013: 5107-5111.
- [8] 许钦坤,赵翠燕. 耐镉菌株的筛选及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 317-318.
- [9] 丁自立. 抗耐镉、铬重金属菌株筛选及水稻根际土壤微生态效应研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [10] 艾建超,李宁,王宁. 污染区土壤-蔬菜系统中镉的有效性及其迁移特征[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 491-497.

- [11] 肖炜, 张仕颖, 赵琴, 等. 云南个旧锡矿区可培养细菌多样性及其重金属抗性[J]. 微生物学报, 2013, 53(11): 1158-1165.
- [12] 李太元, 许广波. 微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [13] 尹军霞, 陈瑛, 郑丽. Cd 胁迫下油菜土壤微生物区系及主要生理类群研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1529-1534.
- [14] 谢晓梅. 镉污染对红壤微生物生态特性的影响[J]. 广东微量元素, 2002(9): 54-59.
- [15] 沈国清, 陆贻通, 洪静波, 等. 菲和镉复合污染对土壤微生物的生态毒理效应[J]. 环境化学, 2005, 24(6): 662-665.
- [16] 郭雄飞. 生物炭和 AM 真菌对重金属污染下土壤养分及望江南生长的影响[J]. 草业学, 2018, 27(11): 150-161.
- [17] 卞光凯, 张越己, 秦盛, 等. 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(11): 1538-1547.
- [18] 曾奇玉, 梁丽妮, 杨永凤, 等. 一株重金属高耐受菌的分离及鉴定[J]. 生物技术进展, 2015, 5(5): 381-391.
- [19] 潘园园. 一株抗铜锡细菌的分类鉴定和基因组文库的构建[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [20] 蔡青云. 耐铅镉菌株的分离筛选及其吸附特性研究[D]: [硕士学位论文]. 赣州: 江西理工大学, 2015.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5485, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: aep@hanspub.org