

管思琪, 罗 蕾, 邢 辉, 等. 湖南石门磺厂矿区尾矿库抗砷菌株的分离、鉴定及性质研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 300–303.

湖南石门磺厂矿区尾矿库抗砷菌株的分离、鉴定及性质研究

管思琪¹, 罗 蕾¹, 邢 辉¹, 陆现彩², 陆建军², 王睿勇¹

(1. 南京大学生命科学院, 江苏南京 210089; 2. 南京大学地球科学与工程学院, 江苏南京 210093)

摘要:在湖南石门磺厂采集含砷尾砂样品和水样, 利用选择性培养基富集培养和分离, 获得 13 株对砷有抗性的菌株, 这些菌株属于 *Pseudomonas otitidis* 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 均能在较高浓度的砷培养液中生存, 主要通过还原砷达到对砷的高抗性作用。其中, 菌株 SM-T1 对 As(Ⅲ) 和 As(V) 的抗性分别达到了 60 mmol/L 和 100 mmol/L, 该菌株最适生长 pH 值为 7.0~8.0, 最适生长温度为 20℃; 在砷浓度未达到致死浓度时, 砷浓度对 SM-T1 的生长速度影响较大, 对其最终的生长状况影响较小。这为进一步利用砷抗性菌开展含砷环境的生物修复奠定了良好的基础。

关键词:湖南石门; 砷矿区; 砷抗性菌; 氧化还原; 最适生长条件

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0300-03

随着社会发展, 自然环境正面临着空前压力, 砷污染日益加重便是其中之一。砷(As)是一种类金属, 广泛存在于岩石圈、水圈和生物圈^[1], 可能导致膀胱癌、肾癌、肝癌、肺癌、皮肤癌等的发生, 被美国环境保护署列为典型致癌物^[2]。砷可导致急性中毒和慢性中毒, 在砷污染严重地区比如孟加拉国和印度引起极大关注。在我国很多地区也存在不同程度的砷污染, 目前超过 10 个省、自治区发现了饮用水型砷中毒, 因此, 含砷化合物污染和防治已引起人们的普遍关注^[3]。

砷污染对人类主要来自地方性的砷中毒和饮用水中砷含量超标。2001 年, 世界卫生组织建议将饮用水中砷的最高限度由原来的 50 μg/L 调整为 10 μg/L^[4], 如何治理砷污染, 特别是如何从源头上防止砷污染引起了人们的广泛关注。目前主要的砷污染治理方法是将高毒性的砷转化为低毒性的砷, 或者将水体中的砷转化为低水溶性或不溶于水的物质。近年来, 研究者发现砷抗性菌可以通过对砷的氧化/还原、吸附/去吸附、甲基化/去甲基化、沉淀/溶解等途径来降低环境中砷的毒性^[5-7]。砷抗性菌对砷的各种作用为治理砷污染提供了新的思路。

矿业活动是导致砷污染的重要原因之一。从 1850 年工业革命到 21 世纪初, 全球人为活动向环境排放的砷含量逐年增加, 其中矿业活动产生的砷量占 72.6%^[8]。全球砷矿分布不均, 其中, 砷探明储量的 70% 集中在中国。湖南石门有国内外最大的雄磺矿, 距今已有 1 500 年的开采历史, 年产砷矿 3 000 t 左右, 在矿物开采过程中, 极大污染了周围的大气、水

和土壤环境, 曾经引起居民砷中毒事件的发生。本试验以该矿区的尾砂、水样为研究对象, 筛选分离砷抗性菌, 对其进行鉴定, 并研究抗性菌对砷的氧化还原能力, 为砷抗性菌的生物修复利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 含砷尾砂、水样采集及其地化分析

尾砂来源于湖南省石门县白云乡界牌村的磺厂矿部选矿厂(29°38.727'N, 111°2.049'E); 水样来自矿厂一号窿二平硐口(29°38.760'N, 111°2.130'E), 现场测定 pH 值。采回的新鲜样品充分混匀后, 取一部分立刻进行细菌分离, 剩余的样品经冷冻干燥, 参照孙青等的方法^[9]测定元素含量。

1.2 试验方法

1.2.1 抗砷菌的富集、分离与纯化 抗砷富集培养基: 1 L 去离子水中加入 (NH)₂SO₄ 2.0 g、乙酸钠 2.0 g、酵母提取物 0.5 g、胰蛋白胨 1.0 g、葡萄糖 0.2 g, pH 值为 7.5±0.2。培养基灭菌后, 无菌加入 NaAsO₂ 至终浓度为 10 mmol/L。制备固体培养基时, 1 L 培养基加入 10.0 g 琼脂。取尾砂 1.0 g 或水样 20 mL 加入 100 mL 抗砷富集培养基中, 30℃、120 r/min 摇床培养 3 d; 取 1 mL 富集培养液转接到新的抗砷富集培养基中, 转接 2 次; 将第 3 次转接的富集培养物梯度稀释后, 涂布于抗砷富集培养基平板上, 30℃培养 3 d 后划线分离至纯培养, 获得单菌落, 转接斜面保存备用。

1.2.2 抗砷菌的鉴定 参照东秀珠等的方法^[10]进行。

1.2.3 抗砷菌的抗性试验 采用含有 As 的 R2A 培养基进行抗性鉴定。将 R2A 培养基中 As(Ⅲ) 浓度调节为 10、20、30、40、50、60 mmol/L, 将 As(V) 浓度调节为 20、40、60、80、100、120 mmol/L; 然后分别接入菌液, 接种细胞密度约为 1×10⁶ 个/mL, 30℃、120 r/min 条件下培养 120 h; 600 nm 下测定吸光度 D 值, 确定 As(Ⅲ) 的最小致死浓度和最大抗砷浓度。以大肠杆菌为对照菌株。

1.2.4 菌株氧化、还原砷能力确定 采用高锰酸钾法。原

收稿日期: 2013-08-29

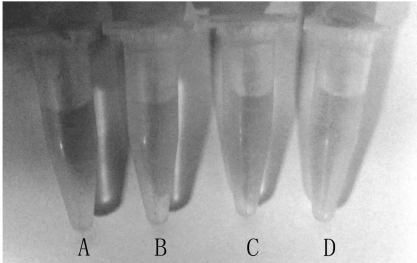
基金项目: 国家自然科学基金(编号: 40930742); 国家重点基础研究发展计划(编号: 2014CB846004)。

作者简介: 管思琪(1987—), 女, 江苏南通人, 硕士, 从事环境微生物研究。

通信作者: 王睿勇。Tel: (025) 83592685; E-mail: wangry@nju.edu.cn。

理:高锰酸钾具有强氧化性,与 As(Ⅲ)接触时氧化 As(Ⅲ),同时自身还原而褪去红色。检验方法为:取 50 μL R2A 培养液、4 μL 0.01 mol/L 高锰酸钾溶液和 946 μL 无菌水摇匀。空白 1 为不加砷、高压灭菌的 R2A 培养基 50 μL,空白 2 为不接种、高温高压灭菌的 R2A 培养基 50 μL,检测样为含有 10 mmol/L As(Ⅲ)或 As(V)的 R2A 培养基 50 μL。

将菌种接入 As(Ⅲ)浓度为 10 mmol/L 的 R2A 培养基,30 ℃、120 r/min 下培养 168 h。72 h 和 168 h 各检测 1 次,空白样 1 中红色不褪去,空白样 2 中红色褪去,样品红色不褪去或变淡,即该菌种具有砷氧化功能(图 1)。



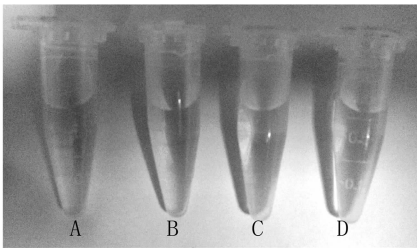
A 为空白 1; B 为空白 2; C、D 为检测样, C 表示菌种具有氧化性, D 表示菌种不具有氧化性

图1 高锰酸钾法氧化性确定显色图解

将菌种接入 As(V)浓度为 10 mmol/L 的 R2A 培养基,30 ℃、120 r/min 下培养 168 h,72 h 和 168 h 各检测 1 次,空白样 1 中红色不褪去,空白样 2 中红色不褪去,样品红色褪去,即该菌种具有砷还原功能(图 2)。

1.2.5 菌株 SM-T1 的最适生长条件试验

1.2.5.1 pH 值对 SM-T1 生长的影响 分别将 As(Ⅲ)浓度为 10 mmol/L 的 R2A 培养基初始 pH 值调为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,接种 SM-T1 种子液,孢子浓度控制在 1×10⁶ 个/mL,30 ℃、120 r/min 条件下培养 48 h,测定 D 值,确定细菌在不同 pH 值下的生长情况。



A 为空白 1; B 为空白 2; C、D 为检测样, C 表示菌种不具有还原性, D 表示菌种具有还原性

图2 高锰酸钾法还原性确定显色图解

1.2.5.2 温度对 SM-T1 生长的影响 将温度分别设置为 15、20、25、30、35 ℃,接种 SM-T1 种子液,孢子浓度 1×10⁶ 个/mL,120 r/min 下培养 48 h,测定 D 值,确定细菌在不同温度下的生长情况。

1.2.5.3 不同砷浓度对 SM-T1 生长的影响 在获得最适 pH 值和最适温度条件下,将 As(Ⅲ)浓度设置为 0、10、20、30 mmol/L,接种 SM-T1 种子液,孢子浓度 1×10⁶ 个/mL,120 r/min 条件下培养 72 h,每隔 4 h 用分光光度计测定 D 值 1 次,确定细菌在不同浓度 As(Ⅲ)条件下的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 尾砂和水样的化学分析结果

本研究共采集 10 个尾砂样品和 3 个水样,典型样品的元素分析结果(表 1)表明,尾矿 SM-T-1 和 SM-T-6 的砷含量极高,超过了质量的 30%,除 Ca、Mg、Al 外,2 个样品的其他金属含量也均高于其他尾矿样品;水样 SM-S-4 的砷含量也达到了 24.0%,除 Ca、Mg 外,主要金属含量也均高于其他样品。参照国标 GB 15618—1995《土壤环境质量标准》,所有样品砷含量均达到重度污染程度。水样分析表明,pH 值为中性,砷含量严重超标,达到 30 mg/L 以上。

表 1 尾砂和水样的化学分析

| 样品 | 元素含量(%) | | | | | | | |
|-----------|---------|------|-------|-------|------|------|------|-------|
| | Ca | Mg | As | S | Si | Fe | Al | K |
| 尾矿 SM-T-1 | 10.74 | ND | 33.96 | 34.53 | 0.78 | 1.38 | 0.24 | 0.108 |
| 尾矿 SM-T-3 | 22.25 | 4.88 | 14.14 | 8.25 | 1.73 | 0.35 | 0.39 | 0.060 |
| 尾矿 SM-T-6 | 6.62 | ND | 37.17 | 28.65 | 6.17 | 1.07 | 1.29 | 0.247 |
| 水样 SM-S-1 | 23.19 | 7.98 | 3.56 | 2.82 | 2.43 | 1.27 | 0.43 | 0.070 |
| 水样 SM-S-4 | 15.62 | ND | 24.01 | 17.62 | 6.87 | 1.29 | 1.05 | 0.277 |

2.2 抗砷菌的富集培养、分离、纯化和鉴定

经过含 As(Ⅲ)浓度为 10 mmol/L 的抗砷培养基富集培养、相同浓度抗性平板筛选及多次划线分离,所有样品都分离得到了抗砷菌株,说明砷抗性菌在该环境中普遍存在。对分离获得的 13 株细菌(均为好氧杆菌)进行形态学和生理学鉴定,结合 16S rDNA 序列分析,初步鉴定这 13 株细菌为 *Pseudomonas otitidis* 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。典型菌株的 16S rDNA 序列分析结果如图 3 所示。

2.3 菌株的抗砷试验

由表 2 可见,13 个菌株都有很强的抗砷能力:除菌株 SM-S-7 外,其他菌株对 As(Ⅲ)的抗性都超过 40 mmol/L,对 As(V)的抗性超过 60 mmol/L。对砷抗性最强的是菌株

SM-T1,其对 As(Ⅲ)和 As(V)的抗性分别达到 60 mmol/L 和 100 mmol/L;As(Ⅲ)的毒性虽然比 As(V)的毒性要大得多,但是 13 个菌株对两者的抵抗能力差异不大,这可能是菌株对砷发生氧化还原作用所致。

2.4 抗砷菌对砷的氧化、还原作用

用高锰酸钾法鉴定结果表明,大部分菌株对 As(V)有还原性,As(V)被还原为 As(Ⅲ)后,As(Ⅲ)对细胞的毒性更强,这可能也是这些菌株对 As(Ⅲ)和 As(V)耐受能力差别不大的原因。

2.5 菌株 SM-T1 最适生长条件

在 R2A 培养基中,SM-T1 在 pH 值 5.0~9.0 都有不同程度的生长,在 pH 值 7.0~8.0 之间,SM-T1 的生长速率和

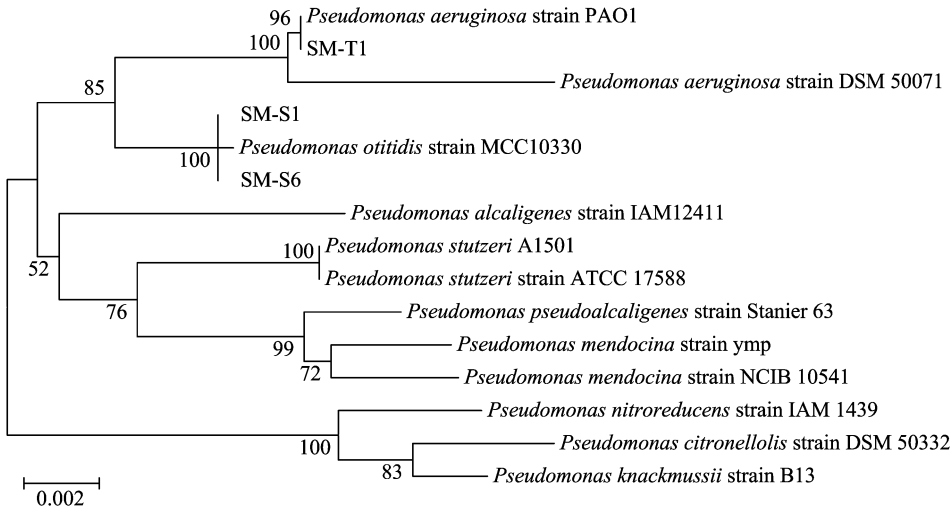


图3 尾砂中分离的典型菌株16S rDNA序列分析

表 2 菌株对 As(Ⅲ) 和 As(Ⅴ) 的抗性试验结果

| 菌株 | As(Ⅲ) (mmol/L) | | | | | | As(Ⅴ) (mmol/L) | | | | | |
|---------|----------------|----|----|----|----|----|----------------|----|----|----|-----|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| SM-S1 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| SM-S2 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| SM-S3 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - |
| SM-S4 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| SM-S5 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| SM-S6 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - |
| SM-S7 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| SM-S8 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - |
| SM-S9 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| SM-S10 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| SM-S11 | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - |
| SM-T1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| SM-T2 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - |
| E. coli | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

注：“+”表示有抗性，“-”表示无抗性。

生物量均为最高,因此,确定 SM-T1 在 R2A 培养基中最适 pH 值在 7.0~8.0 之间。对采取的水样进行分析,结果表明采样点的 pH 值为中性,环境 pH 值与 SM-T1 的最适 pH 值相一致,有利于菌株 SM-T1 的生长。

在 R2A 培养基中,SM-T1 在 15~35℃ 都有不同程度的生长,在 20℃ 时生长速率和生物量均为最高,因此,确定 SM-T1 最适生长温度为 20℃。

由图 4 可见,砷对菌株 SM-T1 的生长影响明显,随着砷浓度的增大,菌株的生长受到明显抑制;As(Ⅲ) 浓度为 20 mmol/L 和 30 mmol/L 时,菌株 SM-T1 生长迟缓期明显变长,进入对数期更晚,且进入对数期的斜率明显小于 0 mmol/L,对 SM-T1 都有很强的抑制作用;As(Ⅲ) 浓度为 30 mmol/L 时,菌株 SM-T1 的生长最为迟缓;进入稳定期时,As(Ⅲ) 浓度为 0 mmol/L 时细菌的生物量最大;As(Ⅲ) 浓度为 10 mmol/L 与 As(Ⅲ) 浓度为 0 mmol/L 几乎同时进入对数期,且斜率差别不大,这说明在 As(Ⅲ) 浓度较低时,As(Ⅲ) 对菌株 SM-T1 的生长只有轻微的抑制作用。

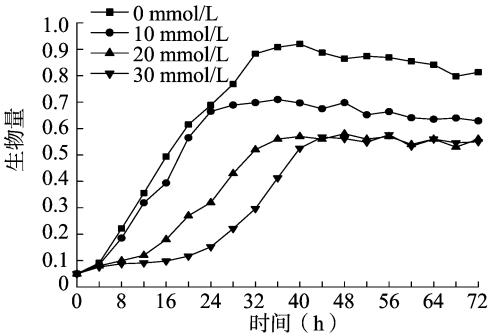


图4 不同砷浓度条件下菌株SM-T1的生长曲线

3 小结与讨论

通过在湖南石门矿采集含砷尾砂样品和水样,在实验室利用选择性培养基富集培养和分离,获得 13 株对砷有抗性的菌株;对菌株的鉴定表明,它们属于 Pseudomonas otitidis 和铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)。对砷的抗性试验表

赵志忠,叶心媛,朱敏捷,等. 海口市美舍河城区段沉积物中重金属的分布特征及其污染评价[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):303-307.

海口市美舍河城区段沉积物中重金属的分布特征及其污染评价

赵志忠, 叶心媛, 朱敏捷, 何雨琪, 王雅昕

(海南师范大学地理与旅游学院,海南海口 570100)

摘要:选择海口市美舍河城区段的 11 个沉积物样本进行分析,结果表明:沉积物中的重金属元素 Cr、Ni、As、Cd 的含量较高,城区居民的生产、生活可能导致 Cr、Ni、Cd、Cu、Zn 在河流沉积物中发生叠加富集,而 As 与城区周边地区农业活动密切相关。通过利用 Hakanson 的潜在风险指数法进行美舍河河底沉积物重金属综合污染的研究,结果表明:该研究区主要重金属污染因子是 Cr,重金属影响因子的顺序由大到小为 $Cr > As > Cd > Ni > Pb > Cu > Zn$;各种重金属潜在生态危害系数由大到小为 $Cd > As > Cr > Ni > Pb > Cu > Zn$;该研究区潜在生态风险指数平均为 51.04,属于轻微生态危害。

关键词:美舍河;沉积物;重金属元素;污染评价

中图分类号:X522 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)04-0303-05

近年来,由于城市化进程加快和人类活动加剧,城市工业废水、生活污水大量排入河流,并导致河流沉积物中发生重金属元素积累。现在,国内部分河流沉积物重金属污染越来越严重,并通过食物链成为威胁人类健康的重要环境问题之一^[1-6]。已有研究表明,重金属元素是自然条件下不能被降解而成为水系统中最持久的污染物之一^[7],只有极少部分重金属元素可以以溶解态停留在水体中,大部分重金属元素会

通过吸附和积聚以残渣态等其他形态长期贮存在底部沉积物中^[8],而一旦河流沉积物发生重金属污染,就会对水生生物产生长期而严重的危害^[9]。正因为如此,城市河流沉积物重金属污染已成为人们普遍关注的焦点^[10-14]。

本研究选择的美舍河为贯穿海口市的一条外流河,该河流从沙坡水库流经城区而入海,是海口市内流域面积最大、流经途径最长、与居民生活最密切的一条河流。近 20 年来,由于海口市城市化进程加快,而城市基础设置建设滞后,城市居民生活污水、城市垃圾无序排放,使美舍河成为了一条名副其实的“臭水沟”,虽经多次整治与清淤工作,但效果并不明显,其环境污染严重影响了周围居民的生产和生活以及海口市的城市形象。本研究探讨美舍河海口市城区段沉积物中重

收稿日期:2013-08-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:41261062);海南省重点科技计划(编号:ZDXM20130021);海南省地理学重点(培育)学科项目。

作者简介:赵志忠(1965—),男,湖南邵东人,博士,教授,主要研究自然地理学。E-mail:zhizhong@hainnu.edu.cn。

明,13 个菌株均能在较高浓度的砷培养液中生存,主要通过还原砷达到对砷的高抗性作用,其中,菌株 SM-T1 对 As(Ⅲ)和 As(V)的抗性分别达到了 60 mmol/L 和 100 mmol/L。

对典型抗性菌株 SM-T1 研究表明,菌株 SM-T1 能在 pH 值 5.0~9.0、温度 15~35℃ 范围内生长,最适生长 pH 值为 7.0~8.0、最适生长温度为 20℃。在砷浓度未达到致死浓度时,砷浓度对 SM-T1 生长影响较大,对其最终的生长状况影响较小,细菌可以进行正常旺盛的细胞分裂。这为进一步利用砷抗性菌开展含砷环境的生物修复奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] Cullen W R, Reimer K J. Arsenic speciation in the environment[J]. Chemical Review, 1989, 89(4): 713-764.
- [2] Chen M, Ma L Q, Harris W G. Arsenic concentrations in florida surface soils: influence of soil type and properties[J]. Soil Sci Soc J, 2002, 66: 632-640.
- [3] 王薇, 徐炎华. 水体中砷污染和治理概况[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22(5): 59-61.
- [4] Gomez-Caminero A, Howe P, Hughes M, et al. Environmental health

criteria 224 arsenic and arsenic compounds [R]. Geneva: World Health Organization, 2001.

- [5] Turpeinen R, Pääntas - Kallio M, Häggblom M, et al. Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biotransformation of arsenic in soil[J]. Science of the Total Environment, 1999, 236(1/3): 173-180.
- [6] Silver S, Phung L T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 599-608.
- [7] Kashyap D R, Botero L M, Franck W L, et al. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(3): 1081-1088.
- [8] Han F X, Su Y, Monts D L, et al. Assessment of global industrial-age anthropogenic arsenic contamination[J]. Naturwissenschaften, 2003, 90(9): 395-401.
- [9] 孙青, 邢辉, 何斌, 等. 安徽铜陵狮子山硫化物矿山酸矿水中微生物功能群的研究[J]. 岩石矿物学杂志, 2009, 28(6): 547-552.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-398.