

赵娟娟, 吴荣荣, 李志涛. 耐铅细菌分离鉴定及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 215–217.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.064

耐铅细菌分离鉴定及生物学特性

赵娟娟, 吴荣荣, 李志涛

(衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000)

摘要:从河北省枣强县受重金属污染的土壤中分离得到 2 株耐铅细菌, 即 ZQq1 和 DYq2, 耐受铅离子最高浓度分别为 2.0、2.5 mmol/L, 经鉴定为芽孢杆菌属。2 株菌的生物学特性研究表明, 菌株 ZQq1 和 DYq2 在 pH 值 4~10 之间, 盐度不超过 10% 时能够生长。菌株 ZQq1 最适 pH 值为 8, 最适生长温度 42 ℃, 最适渗透压为 0%; 菌株 DYq2 最适生长温度为 42 ℃, 最适 pH 值为 8, 最适渗透压为 1%。

关键词:耐铅细菌; 分离鉴定; 生物学特性; 芽孢杆菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0215-02

伴随着我国工业程度的加深, 重金属铅对环境的破坏程度越来越严重。铅可以通过汽车尾气、印染企业废弃物的排放、电池和电子产品的丢弃等各种途径而传递到环境中, 进入土壤和地下水中^[1]。在被铅污染的水体和土壤中, 生长的各种生物通过富集作用, 经过食物链传递, 最终可以使大量铅进入食物链的顶端包括人类。蓄积在人体内的铅能对血液循环再生系统造成损伤, 蓄积到一定的程度时, 人就会表现出失眠、噩梦等症状, 更有甚者会引起智力下降^[2]。

研究表明, 微生物可降低环境中重金属铅的生物毒性, 在用于土壤重金属污染铅的治理等方面的研究均取得了一定的成果^[3]。从枣强工业区采集土样, 通过逐级分离筛选耐铅细菌并进行形态观察和生理生化测定鉴定。通过对所得菌株的生物学特性研究, 可以初步得出菌株对环境的耐受性及在不同环境中的生长趋势, 可为以后在用耐铅细菌或与其他方法联合使用时提供理论依据, 以实现高效、快速、低成本治理铅污染。

1 材料和方法

1.1 材料

土样, 来自河北省枣强县受重金属污染的土壤。

1.2 设备

超净工作台 (SW-CJ-2FD, 上海博迅实业有限公司)、振荡培养箱 (ZD-85, 江苏金坛市医疗器械厂)、恒温生化培养箱 (LRH-250, 上海一恒科技有限公司)、显微镜 (BME, 徕卡显微系统上海贸易有限公司)、数码生物显微镜 (N-800M, 上海旦鼎国际贸易有限公司)、高压灭菌锅 (MLS-3750, SANYO)。

1.3 耐铅细菌的分离

取 0.1 g 的土样, 接入 Pb^{2+} 浓度 0.01 mmol/L 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 在 37 ℃、140 r/min 条件下进行富集培养。取稀释 100 倍后的富集菌悬液 100 μ L 涂布在 Pb^{2+} 浓度为 0.02 mmol/L 的牛肉膏蛋白胨固体培养基中, 每组重复 3

次, 于 37 ℃ 下进行培养, 观察菌落生长情况。挑取单菌落在 Pb^{2+} 浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 mmol/L 的牛肉膏蛋白胨固体培养基上逐渐划线分离, 经过多次纯化, 得到单菌株。将筛选出的菌株接入 2.0、2.5、3.0 mmol/L 不同浓度的固体培养基中, 观察细菌生长状况, 并淘汰耐铅能力差的菌株, 筛选出耐铅能力最强的菌株^[4]。

1.4 耐铅细菌鉴定

1.4.1 对单菌落的大小、形状等进行观察 采用革兰氏染色法对菌株进行染色并观察。

1.4.2 生理生化特征 主要包括柠檬酸盐的利用, 丙酸盐的利用, 氧化酶、接触酶、酪氨酸水解、苯丙氨酸脱氢酶实验, 糖醇发酵、V.P 产生、明胶、液化、需氧性测定等^[5]。

1.4.3 生物学特性试验

1.4.3.1 耐铅细菌生长曲线的测定 将菌株活化 18 h 后接种到液体培养基, 37 ℃、转速 140 r/min 条件下振荡培养。每 2 h 测定 1 次细菌菌悬液的 $D_{600\text{nm}}$ 值。

1.4.3.2 pH 值对耐铅细菌生长的影响 将菌株活化 18 h 后, 分别接入 pH 值为 4、6、7、8、9、10 的液体培养基中, 37 ℃、转速 140 r/min 条件下振荡培养 24 h。测定不同 pH 条件下细菌悬液的 $D_{600\text{nm}}$ 值。

1.4.3.3 盐度对耐铅细菌生长的影响 将菌株活化 18 h 后接入 0%、1%、2%、4%、5%、7%、10% 盐度的培养液, 37 ℃、转速 140 r/min 条件下振荡培养 24 h。测定不同盐度条件下细菌悬液的 $D_{600\text{nm}}$ 值。

1.4.3.4 不同温度对耐铅细菌生长的影响 将菌株活化 18 h 后接种到液体培养基, 在温度分别为 4、25、32、37、42、48、50、60 ℃, 转速 140 r/min 条件下振荡培养 24 h。测定在不同温度下的细菌悬液的 $D_{600\text{nm}}$ 值。

2 结果与分析

2.1 耐铅细菌的分离

通过对样品的分离纯化, 筛选出 2 株耐铅能力强的耐铅细菌。1 株耐受铅离子浓度最高为 2.0 mmol/L, 命名为 ZQq1, 另外 1 株耐受铅离子最高浓度为 2.5 mmol/L, 命名为 DYq2。

收稿日期: 2015-12-14

作者简介: 赵娟娟 (1982—), 女, 河北省衡水人, 硕士, 讲师, 主要从事食品微生物研究。E-mail: zhaajuanjuan456@163.com。

2.2 耐铅细菌的鉴定

2.2.1 耐铅细菌菌落特征 耐铅细菌菌落特征结果见表 1。 2.2.2 耐铅细菌生理生化特征 细菌的生理生化特征是鉴定细菌种类的重要指标和依据,结果见表 2。

表 1 抗铅细菌菌落特征和革兰氏染色情况

菌株	菌落特征
ZQq1	菌落表面光滑,边缘整齐,菌落直径约 2 mm,乳白色;G ⁺ ,菌体杆状,有芽孢
DYq2	菌落表面光滑,边缘整齐,菌落直径约 2.2 mm,乳白色;G ⁺ ,菌体杆状,有芽孢,有成链趋势

表 2 2 株耐铅细菌的生理生化指标

形态及生理生化特征	测定结果	
	ZQq1	DYq2
运动性	+	+
接触酶	+	+
氧化酶	+	+
菌落直径 >5 mm	-	-
胞囊膨大	-	-
菌落色素(类胡萝卜素)	-	-
好氧生长	+	+
厌氧生长(巯基乙酸钠)	-	-
水解:明胶	+	-
淀粉	+	-
V. P 产生	-	+
甲基红	+	-
吡啶产生	+	+
利用:柠檬酸盐	+	+
丙酸盐	+	+
好氧产酸:D-葡萄糖	+	+
乳糖	+	-
蔗糖	-	-
甘露醇	-	-
麦芽糖	-	-
山梨醇	-	-
酪氨酸水解	ND	ND
苯丙氨酸脱氨酶	-	-

注: + 表示阳性结果; - 表示阴性结果;ND 表示未检出。

根据表 1 中 2 株细菌的菌落形态特征和表 2 以及 2 株耐铅细菌的革兰氏染色情况,依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版),将 2 株菌 ZQq1 和 DYq2 鉴定为芽孢杆菌属。

2.3 耐铅细菌的生物学特性

2.3.1 耐铅细菌的生长曲线 从样品中筛选出的 2 株耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 的生长曲线见图 1。

由图 1 可知,ZQq1 在 2 h 内为生长延迟期,18 h 附近达到稳定期,在约 32 h $D_{600\text{ nm}}$ 值开始下降,即过了稳定期;DYq2 在 2 h 内为生长延迟期,在 22 h 附近达到稳定期,在约 35 h 开始进入衰亡期。

2.3.2 pH 值对耐铅细菌生长的影响 菌株对 pH 值的适应

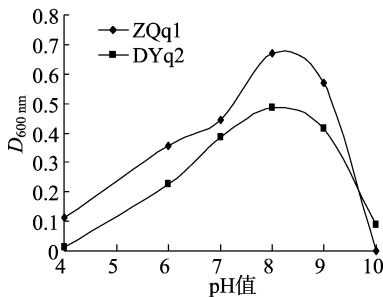


图2 pH 值对耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 生长的影响

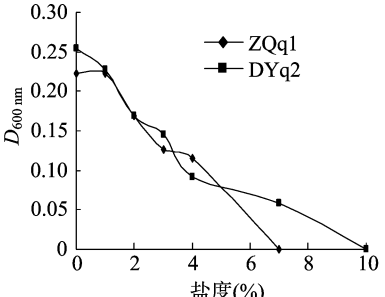


图3 盐度对2株耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 生长的影响

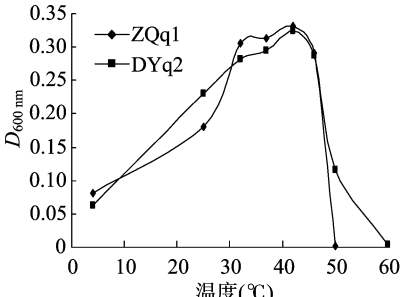


图4 温度对耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 生长的影响

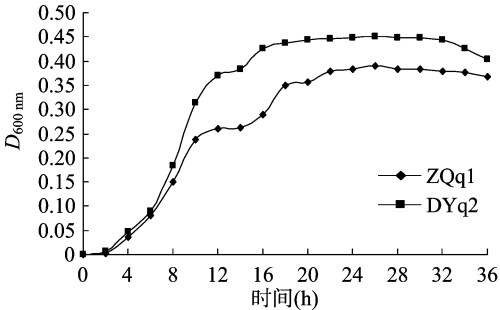


图1 耐铅细菌生长曲线

力,在一定程度上也表明了菌株对环境的适应能力。pH 值对耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 生长的影响见图 2。由图 2 可知,ZQq1 和 DYq2 均在弱碱性(pH 值约为 8)条件下生长最好。ZQq1 在 pH 值为 4~8 的区间内,随着 pH 的增大 ZQq1 生长逐渐变好,当 pH 值大于 10 时 ZQq1 无法生长。DYq2 在 pH 值为 4~8 的区间内,随着 pH 值的增大 DYq2 生长逐渐变好,当 pH 值小于 4 时会抑制 DYq2 菌的生长。

2.3.3 盐度对耐铅细菌生长的影响 细菌对不同盐度的适应性差异,可以反映出细菌对环境的适应能力。一般的培养基中也会添加少量盐以维持渗透压。由图 3 可知盐度对 2 株耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 生长的影响。随着盐度的增加,ZQq1 和 DYq2 生长受抑制程度也在增加。ZQq1 最适生长盐度为 1%,DYq2 最适生长盐度为 0。ZQq1 耐盐度极限 7%,DYq2 耐盐度已达到接近于 10%。

2.3.4 温度对耐铅细菌生长的影响 不同的温度下细菌的生长速率不同,从中也体现出了细菌对生长环境的一定适应能力。温度对耐铅细菌 ZQq1 和 DYq2 的生长影响见图 4。由图 4 可知,随着温度的增加 2 株菌的生长速率均提高,约 42℃ 为最适生长温度,ZQq1 在 4~20℃ 区间范围内,生长速率变化比较平缓,而在 20~40℃ 区间变化较大,随着温度升高曲线变得平缓,之后陡然下降,在 50℃ 时不能生长,而 DYq2 在 4℃ 到最适合生长温度之间变化趋势相同,过了最适生长温度下降明显,在 60℃ 时生长被抑制。

孙英彪,贺文龙,赵瑞东,等. 河北省南和县耕地集约利用评价及障碍度诊断[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):217-223.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.065

河北省南和县耕地集约利用评价及障碍度诊断

孙英彪¹, 贺文龙², 赵瑞东³, 门明新²

(1. 河北农业大学资源与环境科学学院, 河北保定 071000; 2. 河北农业大学国土资源学院, 河北保定 071000;

3. 河北农业大学商学院, 河北保定 071000)

摘要:为探究耕地利用中的主要障碍限制因素,实现耕地的集约高效利用,以有着“畿南粮仓”之称的河北省南和县为例,从耕地投入强度、利用程度、利用效率、持续状况 4 个方面构建评价指标体系,应用变异系数法确定指标的权重。在此基础上通过构建的评价模型定量计算南和县及各乡镇耕地集约利用分值,并进行时空特征分析以及障碍因素分析。主要研究结论如下:(1)2003—2013 年,南和县各乡镇的集约水平在提高,集约利用等级逐渐由低等级向高等级转化;集约利用等级相同的乡镇呈现集聚连片分布和数量逐年扩大的特征;(2)2003—2013 年,南和县各乡镇因素层因子间的协调度在增加;(3)2003、2008、2013 年,因素层障碍因子中,投入强度和持续状况分别是全县最大和最小的限制因子,其他 2 项因素排名中等、差别不大;各乡镇的排序和全县的整体情况基本一致;2013 年,持续状况是和阳镇最大的因素层限制因子。指标层因子中,南和县以及各乡镇排名前 6 位的限制因子不尽相同,绝大多数属于投入强度指标;2013 年,除投入强度指标外,人均耕地、粮食安全系数、垦殖系数、复种指数也是某些乡镇耕地集约的限制因子。

关键词:时空分异;集约利用;障碍度;耕地;南和县

中图分类号:F301.21 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)04-0217-07

耕地是人类生产和生活资料的最重要来源,是保障国家粮食安全、经济发展和社会稳定的基本物质条件^[1]。随着经济发展和粮食需求量的增加,以及现代化进程中建设用地对耕地资源的挤占,耕地资源的稀缺性已成为国计民生的瓶颈^[2]。这一现实矛盾的解决之道在于认知耕地集约利用现状并有效提高其水平,以便充分挖掘存量耕地的生产潜力,从

而确保地力提升和粮食的充分供给,最终实现农业现代化和社会经济的稳步推进。特别是河北省具有良好的农业基础以及区位优势,为京津冀经济增长稳定发展起着不可或缺的作用,因此对河北省耕地集约利用水平的评价和对策分析,具有重要的现实意义以及示范价值。

对于耕地集约利用评价的研究,国内外学者进行了大量有益的探索,并取得了一定的成效,而大多数的研究内容集中于理论内涵挖掘、现状及潜力评价。其他方面的研究内容主要包括时空变异分析、协调性研究^[3-5]、利用模式研究、驱动力研究^[6-8]、相关性研究^[9-10]、通径分析研究^[11]、限制因子或驱动力分析研究^[12-15]、环境生态变化、政策建议和影响因素研究^[16-18]等。评价方法可分成单类法、多类法。单类法是指选取某一类指标进行评价的方法,最典型是通过单位面积的各种投入程度来衡量集约水平大小^[19];多类法是指选择多类

收稿日期:2016-05-25

基金项目:国土资源部公益性行业科研专项(编号:201311060);河北省科技支撑计划(编号:132276329)。

作者简介:孙英彪(1981—),男,河北巨鹿人,博士,主要从事土地资源利用与管理研究。E-mail: yb2712@163.com。

通信作者:门明新,教授,博士生导师,主要从事景观生态和土地资源可持续利用研究。Tel: (0312) 7528231; E-mail: menmingxin@sina.com。

3 结论

从河北省枣强县受重金属污染的土壤中分离出 2 株耐铅能力较强的耐铅细菌,即 ZQq1 和 DYq2。分别从以下进行描述:(1)ZQq1 的菌落边缘整齐,表面光滑,乳白色。菌体杆状,产生芽孢,革兰氏阳性,具有运动性,好氧生长,经鉴定为芽孢杆菌属菌。其在 pH 值为弱碱性条件下生长最好,在 pH 值大于 10 时或小于 4 时不能生长,最适生长温度在 42℃ 附近,在 50℃ 及以上不能生长,其菌株在盐度为 7% 及以上完全抑制生长,耐受铅离子浓度最高 2 mmol/L。(2)DYq2 的菌落边缘整齐,表面光滑,乳白色。菌体杆状,产生芽孢,革兰氏阳性菌,具有运动性,好氧生长,菌体有链状趋势,经鉴定为芽孢杆菌属菌。DYq2 在 pH 值为 8 时生长最好,其能在 42℃ 条件下生长,在 60℃ 及以上不能生长,其菌株不耐盐,在盐度 10% 及以上

完全抑制生长,耐受铅离子浓度最高为 2.5 mmol/L。

参考文献:

- [1] 李宏,江澜. 土壤重金属污染的微生物修复研究进展[J]. 贵州农业科学,2009,37(7):72-74.
- [2] 高文谦,陈玉福. 铅污染土壤修复技术研究进展及发展趋势[J]. 有色金属,2011,63(1):131-136.
- [3] 骆永明. 污染土壤修复技术研究现状与趋势[J]. 化学进展,2009(2):558-565.
- [4] 陈美标,郭建华,姚青,等. 大宝山矿区耐 Cd²⁺ 细菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报,2012,39(12):1720-1733.
- [5] 江春玉,盛下放,何琳燕,等. 1 株铅镉抗性菌株 WS34 的生物学特性及其对植物修复铅镉污染土壤的强化作用[J]. 环境科学学报,2008,28(10):1961-1968.