

高效富集铅菌株的初筛

赵士豪, 田荣芳, 张红兵, 马同锁

(1. 河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050061; 2. 河北中润制药集团, 河北石家庄 050041)

摘要 从铅污染较严重的石家庄市华北蓄电池有限公司的车间土壤中初步分离了多株细菌和真菌, 经过进一步筛选, 发现有些菌株具有较好的耐铅能力和富铅性能, 其中一株斑点霉菌, 可在含铅达 1 000 ng/L 的培养基中生长, 具备较好的开发价值。

关键词 铅污染; 富集; 斑点霉菌

中图分类号 Q939.96 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00839-03

Screening of Lead accumulation Strain

ZHAO Shi-hao et al (Biology Science and Engineering Academy, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061)

Abstract Many bacterium and fungus were separated from soil contaminated with lead in the workshop of Habei Storage Battery Co., Ltd in Shijiazhuang city and we discovered the strains with lead tolerance and accumulation. And a fungus can grow in medium with 1 000 ng/L of lead and the strain had a good exploitation value.

Key words Lead pollution; Accumulation; Fungus

随着经济的飞速发展, 铅污染在我国乃至全世界越来越严重。众所周知, 冶金、采矿、蓄电池、印刷、涂料、化工等行业大量排放铅; 油漆、颜料、陶瓷、搪瓷等也含有一定量的铅。另外, 随着汽车工业的发展, 汽车尾气的铅污染也不容忽视。以上所有的铅污染, 都会通过各种途径污染土地和水, 再通过生物链进入人体, 从而威胁着人类, 尤其是儿童的身心发育和健康^[1]。由于铅是积蓄性毒物, 在体内的代谢半衰期很长, 约 4 年之久, 危害十分严重, 因此必需加以重视。

治理铅污染的传统方法包括化学沉淀、化学氧化还原、离子交换、过滤、电化学处理等, 但这些方法都有一些较大的缺点, 比如去除不完全、能量要求较高、会产生需要进一步处理的毒性淤泥及废弃物, 而且成本较高。近十年来发展起了一些替代方法, 其中生物修复法就是较好的方法之一, 它造成二次污染的机会少, 对生态环境的破坏较小, 成本低且专一性较高, 引起了广泛关注。其中尤其以植物富集修复土壤污染和微生物吸附处理水体铅污染倍受青睐。利用微生物修复铅污染的研究在 20 世纪末已经展开, 研究重点包括: 微生物吸附体的筛选及吸附特性研究, 对重金属的富集与抗性机制, 以及对重金属的固定或活化作用, 这些研究具有相当大的经济应用价值。

该研究拟从目前受铅污染较严重的地区(石家庄市华北蓄电池有限公司)采取土样, 利用富含铅的培养基进行分离培养, 以期获得一些能够富铅的真菌和细菌菌株, 并进行初步鉴定和研究。

1 材料与方

1.1 土样 采自河北省石家庄市华北蓄电池有限公司, 共 18 份土样, 分别采自浇铸(1、2、3 号)、整片(4、5、6 号)、涂片(7、8、9 号)、化成(10、11、12 号)、烘房(13、14、15 号)和总成车间(16、17、18 号), 每份土样重 500 g。

1.2 培养基配方

1.2.1 牛肉膏蛋白胨培养基。牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g,

NaCl 5 g, pH 值 7.0 左右。

1.2.2 查氏培养基。NaNO₃ 3 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.01 g, 蔗糖 30 g, pH 值 6.0 左右。

1.2.3 马铃薯培养基(PDA)。马铃薯 200 g 加水煮沸半小时, 双层纱布过滤, 滤液加蔗糖 20 g, 补足 1 000 ml, pH 值 7.0。

1.3 大肠杆菌(*E. coli*)。

1.4 抗铅及富集铅菌株的分离, 纯化

1.4.1 梯度平板分离。制备土样悬浮液。分别取 2 g 土样加入到 100 ml 生理盐水中, 振荡 10 min; 梯度平板的制备。将铅浓度为 1 000 ng/L 的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基融化后, 吸取 10 ml, 倒入培养皿中并使培养皿倾斜, 待培养基凝固后加入 10 ml 融化并冷却至 60 左右的无铅牛肉膏蛋白胨琼脂培养基的表面, 冷凝后待用。这样, 由于扩散作用, 平板上的铅浓度由一侧到另一侧呈 0~1 000 ng/L 梯度递增。同法共制备培养基 54 个梯度平板。

1.4.2 分离。吸取 0.1 ml 土壤悬浮液分别涂布于铅梯度牛肉膏蛋白胨培养基平板表面, 观察微生物生长情况, 并从中挑取形态不同的菌落进行平板划线纯化, 分离抗性约为 1 000 ng/L 的菌株, 接种到相应浓度的牛肉膏蛋白胨斜面培养基上保存。每组 3 次重复。

1.5 菌株富集铅能力的分析

1.5.1 平板熏蒸法(定性分析)^[2]。将所得菌株, 在无铅牛肉膏蛋白胨培养基平板上进行稀释涂布和点接培养, 菌落长出后, 上铺一层铅浓度约 100 ng/L 的琼脂凝胶, 菌落与铅作用后, 将培养皿于干燥器内暴露于硫化氢气体(由 Na₂S 和 HCl 产生)中, 使培养基和菌落中的铅以硫化铅的形式形成沉淀, 具有铅吸收能力的菌落周围将出现透明圈。菌落与铅作用时间为 1 d 左右。

1.5.2 液体培养法(定量分析)。将待分析菌株在不同初始铅浓度的液体牛肉膏蛋白胨培养基中培养 1 周, 溶液经细菌过滤器(0.22 μm)除去菌体后测定滤液的铅浓度, 同时用大肠杆菌(*E. coli*)进行空白对比实验。

1.6 铅标准溶液制备及铅含量测定^[3]

1.6.1 铅标准溶液。精密称取 0.159 8 g 硝酸铅, 加 10 ml 硝酸, 全部溶解后, 移入 100 ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度。此

基金项目 河北省科技厅资助项目(05215513)。

作者简介 赵士豪(1966-), 男, 河北晋州人, 硕士, 讲师, 从事食品工程及微生物方面的教学和研究工作。

收稿日期 2006-10-29

溶液每毫升相当于1.0 ng 铅。

1.6.2 铅标准使用液。吸取1.0 ml 铅标准溶液,置于100 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,此溶液每毫升相当于10.0 μg 铅。

1.6.3 铅含量测定。按照国标 GB/T 5009.12-1996 食品中铅的测定方法二硫脲比色法进行。

1.7 菌种鉴定

1.7.1 菌落形态观察。分别在PDA 培养基和查氏培养基平板中央接种F11a,28℃ 培养1 周,观察菌落形态。

1.7.2 载片培养法观察菌丝形态。以载片培养的方法原位观察F11a 在薄层PDA 培养基上生长的菌丝形态。

1.7.3 分生孢子形态观察。接种马铃薯培养基平板,原位镜检观察分生孢子器形态并测量大小。

1.7.4 孢子萌发及单孢菌株分离。取分生孢子器,挤压后得到分生孢子。用载玻片上萌发法观察其在PDA 培养液中的萌发情况。并用稀释分离的方法分离单孢菌株。

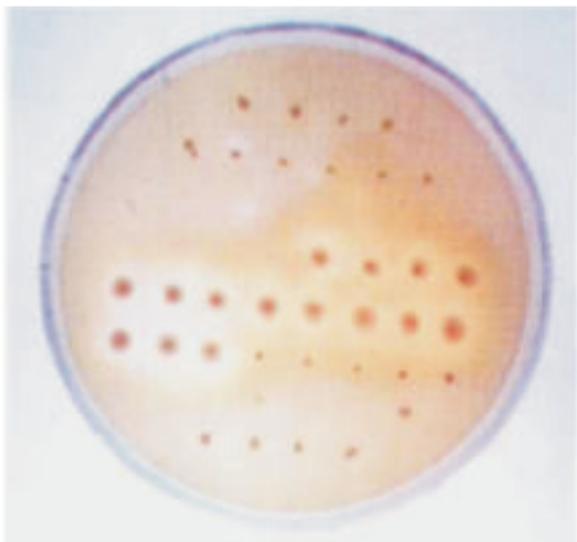
1.7.5 分子生物学方法鉴定菌株。利用16S rDNA 间隔序列和18S rDNA 间隔序列的通用引物,以相应菌株的总DNA 为模板,进行PCR 反应,分别克隆相应的序列,然后进行测序,根据测序的结果,在NCBI 网站中进行比对鉴定。

2 结果与分析

2.1 梯度平板法分离抗铅菌株 各号土样梯度平板分离结果发现,随环境土样中的铅含量的增长,微生物数量呈不同程度的下降趋势,表明高浓度铅对土样中大多数微生物具有明显抑制作用。总体上各土样微生物在富营养条件下生长较好。从中挑选并初步分离得到抗铅1 000 ng/L 菌株8 株。其中霉菌1 株,酵母菌3 株,细菌4 株。

2.2 菌株的富集铅能力的测定

2.2.1 平板熏蒸法定性分析菌株富集铅的能力。将上述筛选所得菌株以平板熏蒸法筛选,每个菌种接种5 个菌落作为重复,得到产生肉眼可见透明圈的菌落,其中酵母菌菌落周围的透明圈较大而明显,而细菌的透明圈小且不明显(图1),说明酵母菌的富铅能力比细菌较强。由于丝状真菌体积较大,菌落不够光滑,加入的上层含铅培养基难以与其紧密接触,所以未用此法分析其富集能力。



注:培养皿中点接了细菌及酵母菌,中间区域示15 个酵母菌,菌落周围出现了较强的透明圈,而细菌周围的透明圈较小。

图1 加铅1 d 后熏蒸的菌落情况

2.2.2 液体培养下富集及去除铅能力的定量分析。将筛选所得的强抗铅真菌F11a、F11b 进行液体培养后对培养基中铅的去除及富集能力的比较,培养基初始浓度分别为铅10、

200、400、800、1 000 ng/ml。结果表明(表1),在10 ng/L 铅浓度下,F11a 对溶液中铅去除率可达78.4%;浓度大于200 ng/L 时去除数量相差不大。由此可见,随铅浓度增大,去除率减小,可能是因为菌体吸收趋于饱和。

表1 不同初始铅浓度液体培养下F11a、F11b 和E.coli 对溶液中铅的去除率

初始铅浓度 ng/L	处理	测定浓度 ng/L	去除率 %
10	E.coli (CK)	9.03	9.70
	F11a	2.16	78.40
	F11b	2.63	73.70
200	E.coli (CK)	192	4.00
	F11a	169	16.50
	F11b	175	12.50
400	E.coli (CK)	388	3.00
	F11a	358	10.50
	F11b	366	8.50
800	E.coli (CK)	782	2.25
	F11a	753	5.75
	F11b	766	4.25
1 000	E.coli (CK)	981	0.90
	F11a	950	5.00
	F11b	963	3.70

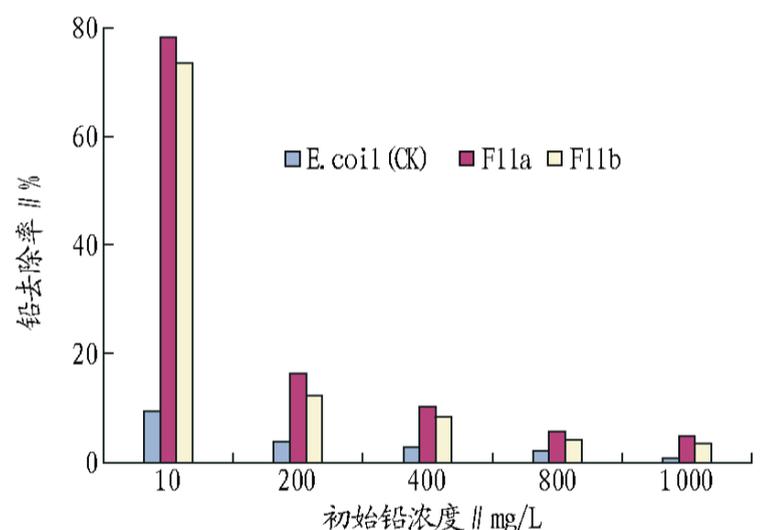


图2 不同初始铅浓度液体培养下

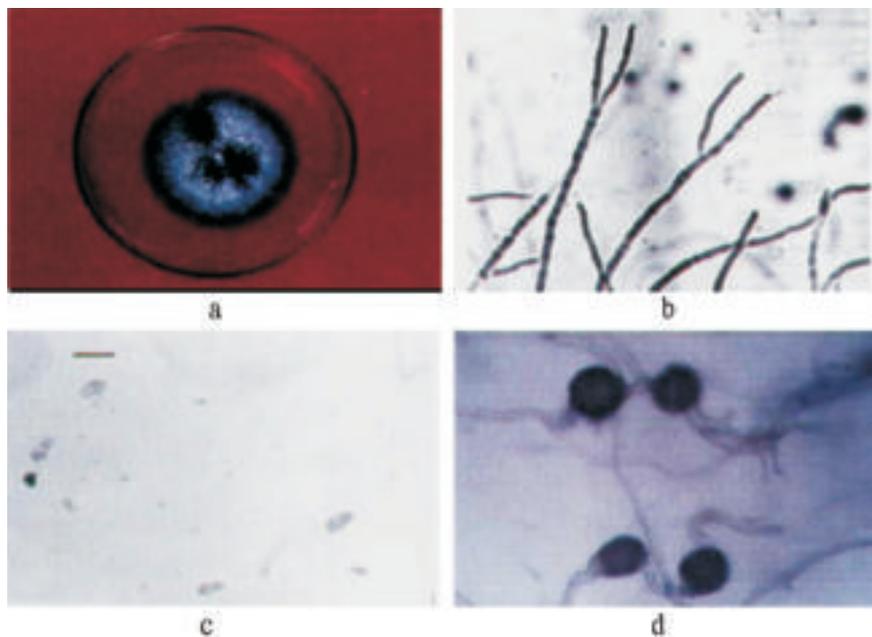
F11a、F11b 和E.coli 对溶液中铅的去除率

2.3 菌种鉴定 选取富集铅能力较好的一株真菌,用PDA 平板培养,其生长气生菌丝白色,基内菌丝近黑色(图3a),查氏培养基上生长时气生菌丝不发达,基内菌丝初期为白色或浅黄褐色,后期为黑褐色。液体查氏培养基摇床培养时形成菌丝球直径较大,菌丝间易集结成团。菌丝间有隔,细胞壁较厚(图3b)。分生孢子单细胞,形态多样,卵形、长形、肾形或近球形,大小约(4~5) μm × (5~8) μm(图3c),分生孢子器近球形,直径约150~200 μm,无菌丝层包裹,碳质,无明显孔口,器壁厚,含有厚壁透明细胞(图3d)。根据真菌鉴定手册中分类系统和真菌字典及其所列参考文献,初步将其归入斑点霉属。

3 结论与讨论

3.1 抗铅菌株的分离 微生物对铅的抗性是将微生物用于铅污染治理的前提。铅酸蓄电池是世界上各类电池中产量最大、用途最广的一种电池,铅含量较高,污染严重,所以从其各生产车间中取样分离抗铅菌株是可行的。用梯度平板法和富集法从上述不同土样中分离筛选抗铅菌株的过程中,10、11、12 号图样中分离到的微生物较多,与化成车间污染最

为严重情况相符。其余土样在分离过程中,随着培养基中铅浓度的增大,微生物数量减少,表明铅对微生物的毒性随着浓度的增大而增大,也证实梯度平板法分离抗铅微生物是有效的。从各土样中分离得到在1 000 ng/L 铅浓度下可以存活的强抗铅菌株共8 株,包括2 株真菌F11a、F11b,3 株酵母菌Y₁₀、Y₁₁和Y₉及3 株细菌M₈、M₁和M₂。



注:a.平板上生长的菌落;b.载片培养上的菌丝;c.压碎后的分生孢子;d.平板上原位生长的分生孢子(10×100)。

图3 PDA 培养基上一株真菌F_{11a}的形态观察

3.2 从抗铅菌株中筛选富集铅的菌株 对以上分离到的8 株强抗铅菌株用硫化氢熏蒸法定性分析其富集铅的能力,不同菌株产生透明圈的情况不同,由此筛选出一株富集能力较强的酵母菌Y₁₀。丝状真菌由于体积较大,菌落不够光滑,加入的上层含铅培养基难以与其紧密接触,不太适合以此法分析其富集能力。所以熏蒸法可作为快速筛选具有富集能力的单细胞菌株的有效方法。

3.3 富铅真菌的富铅能力测定 Y_{11a}、Y_{11b} 的富铅能力比较,前者略强些,但都随着培养基中铅浓度的增加而降低,估计与菌体内铅吸收达到饱和有关,至于吸收后的铅是否能转化成无毒的有机铅,有待进一步研究。

3.4 菌种的鉴定 用菌落肉眼观察的形态特征结合显微观察和生化特性研究结果,查伯杰氏手册是鉴定菌种的传统方法,多年来一直沿用。但耗时长,误差大,要求观察者具备较丰富的经验。而近年兴起的分子生物学法越来越受到青睐。在真核生物中,rDNA 是基因组DNA 中的中等重复(103 ~ 105)、并有转录活性的基因序列。一般由转录区和非转录区构成,转录区包括编码区5S,5.8S,18S,28SrDNA 基因,由2 个非编码的ITS 分开。在进化速率上,由于编码区比较保守,可在属、科、目水平上用于不同生物种的比较,而基因间隔区是rDNA 中基因进化速度最快的区域,其中IGS 区是一个高变区,ITS2 区较ITS1 区保守些。它们常用于属内种间比较或种内群体比较^[4]。因此,用rDNA 的内转录间隔序列进行菌种鉴定较方便、准确和经济。

4 结论

从富铅的环境中初步分离了多株细菌和真菌,其中有些菌株具有较好的耐铅能力和富铅性能,可在含铅量为1 000 ng/L 的培养基中良好生长,富铅率能力低浓度时较强,最高可达78.4%,具备进一步研究开发的价值。

参考文献

- [1] 曹会兰. 铅对人类的危害及防治[J]. 化学世界,2002(7):391.
- [2] THOMAS P, BARBARA P. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1994, 14: 213 - 217.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.12 - 1996, 食品中铅的测定方法[S].
- [4] 张星耀, 曹支敏. 真菌核糖体基因间隔区研究概况[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(2): 107 - 112.