

· 创新与探索 ·

# 白银矿区土壤重金属及可培养细菌重金属耐受性研究

马锦禄, 台喜生\*, 李军, 孟东旭, 刘满鑫, 李全, 沈祎菲, 高婷  
(兰州城市学院, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:**对白银矿区土壤重金属进行分析研究, 分离、筛选和鉴定了受污染土壤中的可培养细菌, 并考察其对土壤中重金属胁迫的耐受性。结果表明: 白银矿区王岷镇尾渣堆和东大沟河沟土壤重金属污染  $Pb > Zn > Cu$ ; 从污染最严重的土壤中分离、筛选出砖红色微杆菌 (*Microbacterium testaceum*)、特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*) 和解单端孢菌素微杆菌 (*Microbacterium trichothecenolyticum*) 3 种细菌, 其中菌株 M1 (*Microbacterium testaceum*) 对 Pb、Zn、Cu、Cd 的胁迫具有明显的耐受性。

**关键词:** 可培养细菌; 重金属耐受性; 土壤污染; 白银矿区

中图分类号: X53 文献标志码: B 文章编号: 1006-2009(2022)05-0060-04

## Investigation on Heavy Metal Content and Heavy Metal Tolerance of Culturable Bacteria in Soil of Baiyin Mining Area

MA Jin-lu, TAI Xi-sheng\*, LI Jun, MENG Dong-xu, LIU Man-xin, LI Quan,  
SHEN Yi-fei, GAO Ting  
(Lanzhou City University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**Abstract:** The heavy metals in soil of Baiyin mining area were analyzed, the culturable bacteria in contaminated soil were isolated, screened and identified, and their tolerance to heavy metal stress was investigated. The results showed that the pollution degree of heavy metals in soil of Wangxian town and Dongdagou river in Baiyin mining area was  $Pb > Zn > Cu$ . Three kinds of bacteria, *Microbacterium testaceum*, *Bacillus tequilensis* and *Microbacterium trichothecenolyticum* were isolated and screened from the most polluted soil. Among them, strain M1 (*Microbacterium testaceum*) had obvious tolerance to Pb, Zn, Cu and Cd stress.

**Key words:** Culturable bacteria; Heavy metal tolerance; Soil contamination; Baiyin mining area

白银矿区为甘肃省经济发展做出了巨大贡献, 长期的矿产资源开发利用, 使工矿企业废渣压占、植被破坏和水土流失等问题突出<sup>[1]</sup>。尾矿及废渣经风化淋滤, 重金属元素转移到土壤中, 造成土地质量下降, 污染农作物, 影响动物和人群健康<sup>[2-3]</sup>。随着矿产资源的枯竭, 白银市面临矿业经济向农业经济的转型, 故矿区土壤受污染状况调查及修复对经济转型至关重要<sup>[1]</sup>。

倪鼎文等<sup>[4]</sup>分析了白银矿区土壤重金属污染现状及来源, 提出应着重从工矿企业搬迁后的废弃场地重金属污染修复, 以及东大沟流域重金属污染整治两个方面实现白银矿区土壤重金属污染的治理。采用生物修复或生物与工程技术相结合的方法

对矿区进行土地复垦和生态重建, 受污染土壤的理化性质、重金属含量及土壤微生物都是需要关注和干预的主要因素<sup>[5-7]</sup>。对典型矿冶城市土壤重金属污染的调查和评价多关注 Pb、Zn、Cu、Cd, 而土壤重金属污染的生物修复中耐受性研究是一个重要方向<sup>[8-10]</sup>。

收稿日期: 2021-10-17; 修订日期: 2022-08-03

基金项目: 2020 年国家级大学生创新创业训练计划“植物内生菌修复矿区铜锌重金属污染土壤的技术研发”基金资助项目 (202010737004); 甘肃省科技计划“金昌矿区骆驼蓬根际微生物磷循环机制研究”基金资助项目 (20JR10RA282)

作者简介: 马锦禄 (1999—), 男, 甘肃白银人, 本科, 研究方向为环境工程。

\* 通信作者: 台喜生 E-mail: taixisheng@lzc.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要仪器与试剂

S1TITAN600型手持式土壤重金属分析仪, Bruker; SP-756P型紫外可见分光光度计, Spectrum; SW-CJ-2F型超净工作台, 浙江孚夏医疗科技有限公司; DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; PHS-3E型pH计, 雷磁; MGC-300A型光照培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; SHZ-B型水浴恒温振荡器, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司。

PbCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、NaCl、CdCl<sub>2</sub>, LB培养基组分酵母粉、胰蛋白胍和琼脂, 均为分析纯生化试剂。

### 1.2 土壤采样及处理

2021年3月, 分别在白银矿区王岷镇尾渣堆(E104.21°, N36.56°)布设7个样点, 在东大沟河沟(E104.25°, N36.51°)布设3个样点。采用梅花形布点法在各样点采样, 挖土壤剖面后用预先灭菌的铝盒采集5份表层(0 cm~15 cm)土壤样品, 装入无菌采样袋中混匀, 然后放入装有冰袋的土壤样品保存箱中, 带回实验室。一部分土壤样品在4℃下低温保存, 用于细菌的分离培养和土壤含水率的测定; 另一部分土壤样品风干后过10目筛和200目筛, 分别用于测定pH值和重金属。

### 1.3 土壤理化性质测定

土壤含水率和pH值测定参考文献[11], 重金属含量采用S1TITAN600型手持式土壤重金属分析仪(德国Bruker公司)测定, 参考文献[12]方法。

### 1.4 土壤细菌分离、纯化和鉴定

选择重金属污染程度最高的土壤样品, 在超净工作台上, 用紫外灭菌后的千分天平称取1g土壤样品, 置于预先灭菌的锥形瓶内。加入5mL无菌磷酸缓冲液, 振荡匀浆, 梯度稀释后用移液枪吸取100μL涂布在LB固体培养基平板上, 在恒温培养箱内28℃培养一周。根据菌落形态差异筛选出不同的菌株划线纯化, 用25%甘油超低温-70℃冻存, 对所有保存菌种进行16S rDNA测序鉴定<sup>[13]</sup>。

### 1.5 土壤细菌重金属耐受性检测

分别称取1.3422g PbCl<sub>2</sub>、2.0850g ZnCl<sub>2</sub>、3.9292g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O和1.6308g CdCl<sub>2</sub>, 用去离子水溶解并定容至100mL作为母液。取适量母液注入LB液体培养基, 体积25mL, 使Pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>质量浓度分别为600mg/L、

700mg/L、800mg/L、900mg/L、1000mg/L。培养基灭菌后接种活化的菌株, 对照组不接种作为参照, 在28℃条件下130r/min振荡培养4d。用紫外可见分光光度计在600nm下测定菌液的吸光值, 作为重金属胁迫下菌株的生长量。

### 1.6 数据处理

采用IBM SPSS Statistics 23统计软件, 对不同菌株在不同浓度重金属离子培养液中的生长量差异进行交叉分组的两因素方差分析。将研究所获细菌的16S rDNA序列在GenBank数据库中用BLAST程序与GenBank数据库内序列进行比对, 获得相似序列后, 将该细菌16S rDNA序列在线提交至GenBank数据库, 获得登录号OK287332—OK287335<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 土壤理化性质

土壤样品理化性质测定结果见表1。由表1可知, 研究区域土壤pH值为6.20~7.63, 土壤含水率为15.57%~49.24%。甘肃土壤中Cu、Pb、Zn、Cd背景值分别为24.1mg/kg、18.8mg/kg、69.3mg/kg、0.116mg/kg<sup>[14]</sup>。白银矿区土壤Cu值为甘肃土壤背景值的1.6~8.8倍, 土壤Pb值为背景值的2.7~38.8倍, 土壤Zn值除样点8之外, 为背景值的1.8~10.1倍, 样点2和样点3土壤Cd值为背景值的172.4倍和224.1倍。

《土壤环境质量标准》(GB 15618—1995)一级标准规定限值Cu、Pb、Zn、Cd分别为35mg/kg、35mg/kg、100mg/kg、0.2mg/kg, 二级标准规定限值分别为100mg/kg、350mg/kg、300mg/kg、0.6mg/kg, 三级标准规定限值分别为400mg/kg、500mg/kg、500mg/kg、1mg/kg。样点6的土壤Cu值介于国标二级和三级限值之间, 其余各样点土壤Cu值均介于国标一级和二级限值之间。50%的样点土壤Pb值介于国标一级和二级限值之间, 40%的样点土壤Pb含量介于国标二级和三级限值之间, 样点6的土壤Pb值超过了国标三级限值。20%的样点土壤Zn值介于国标一级和二级限值之间, 60%的样点土壤Zn值介于国标二级和三级限值之间, 样点6的土壤Zn值超过了国标三级限值。样点2和样点3土壤Cd值均超过国标三级限值。此外, 土壤重金属污染最严重的样点6, 其土壤pH值也是最低, 说明土壤pH值低可能会加剧土壤重

金属污染的程度。

白银矿区王岷镇尾渣堆和东大沟河沟的土壤重金属污染程度为  $Pb > Zn > Cu$ ; 虽然大多数样点 Cd 为未检出, 但样点 2 和样点 3 的土壤为矿区植物牛筋草和狗尾草根周土, 其 Cd 值远超甘肃土壤背景值及国标三级限值, 说明这两种矿区植物对土壤 Cd 具有很强的生物富集效应, 后续研究值得关注。崔以寒<sup>[5]</sup>研究了白银矿区、绿洲及其交错带土壤重金属污染特征, 发现土壤重金属污染程度为  $Cd > Pb > Cu > Zn$ 。李小虎<sup>[6]</sup>研究发现白银重金属污染物以 Cd、Cu、Pb、Zn 为主, 尾矿渣中 Cd 元素活

动性最强, 显示出对周围环境具有较大的潜在危害性; 白银土壤重金属污染主要分布在东和东南方向, 整个区域土壤 Cd 严重超标, 长期污灌是导致农田土壤重金属污染的重要原因, 土壤中不同元素的活性依次为  $Cd > Pb > Cu > As > Zn$ 。李有文等<sup>[15]</sup>发现除山区外, 生活区、工业区、交通区、公园绿地受 Hg、Zn、Pb、Cd 的污染较严重, 其中以 Hg 污染最为严重。陈任连等<sup>[16]</sup>发现白银市某冶炼厂区土壤受到严重的 Pb、Cd 污染。表明研究区域不同, 土壤重金属污染特征、重金属种类和污染程度均有差异。

表 1 土壤样品理化性质测定结果

Table 1 Determination results of physicochemical properties of soil samples

采样点	样点编号	土壤 pH 值	含水率/ %	$w(Cu)/$ ( $mg \cdot kg^{-1}$ )	$w(Pb)/$ ( $mg \cdot kg^{-1}$ )	$w(Zn)/$ ( $mg \cdot kg^{-1}$ )	$w(Cd)/$ ( $mg \cdot kg^{-1}$ )
白银市白	1	7.63	21.72	55	275	307	—
银区王岷	2	7.01	49.24	66	288	346	20
镇尾渣堆	3	7.23	23.23	86	411	478	26
	4	6.92	15.57	41	111	126	—
	5	7.24	34.52	49	288	211	—
	6	6.20	16.15	212	730	703	—
	7	6.74	29.04	79	439	450	—
白银市东	8	6.64	27.07	39	51	67	—
大沟河沟	9	7.13	17.49	99	387	452	—
	10	7.09	20.57	99	381	469	—

## 2.2 土壤细菌鉴定结果

选择重金属污染程度最高的样点 6 土壤样品, 采用可培养手段分离、筛选并纯化获得 4 株细菌 M1 ~ M4, 经 16S rDNA 测序鉴定和系统发育分析, 分别为 *Microbacterium testaceum* (OK287332), *Microbacterium testaceum* (OK287333), *Bacillus tequilensis* (OK287334) 和 *Microbacterium trichothecenolyticum* (OK287335), 归属于小细菌属 (*Microbacterium* sp.) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

陈任连等<sup>[16]</sup>的研究表明, 微生物丰度和多样性可能受到土壤性质及重金属的共同影响, 与 Pb、Cd 的污染程度大致呈负相关, 且受到生物有效态 Pb 的影响较大; *Sphingomonas* sp., *Gemmatimonas* sp., *Ohtaekwangia* sp. 和 *Rubrobacter* sp. 属丰度较高且分布广泛, 被认为可能含有丰富的重金属抗性基因, 对重金属具有较高的耐受性, 是该地区 Pb、Cd 污染土壤的优势菌属。 *Microbacterium* sp. 可能是白银矿区 Pb、Zn、Cu 共胁迫下的土壤优势菌属。

## 2.3 土壤细菌重金属耐受性

按 1.5 所述试验, 考察 M1、M2、M3 和 M4 细菌的金属耐受性, 结果见图 1。

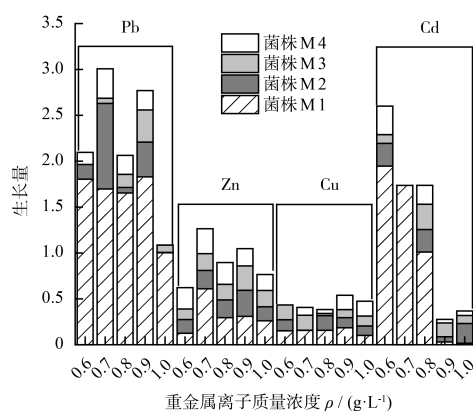


图 1 土壤细菌在金属离子胁迫下的生长量

Fig. 1 Bacteria growth in soil under metal ion stress

由图 1 可见, M1 对 Pb、Zn、Cu、Cd 的耐受性明显高于 M2、M3 和 M4, 是潜在的重金属污染土壤生

物修复的菌种资源。对不同菌株在不同质量浓度重金属离子培养液中的生长量差异进行交叉分组的两因素方差分析,结果表明:在不同  $Pb^{2+}$  质量浓度的培养液中,不同菌株间生长量差异极显著 ( $F = 44.920, P = 0, P < 0.01$ ), 菌株 M1 与菌株 M2、M3、M4 的生长量有显著的差异,菌株 M2、M3、M4 差异不显著;在不同  $Cd^{2+}$  质量浓度的培养液中,不同菌株间生长量差异显著 ( $F = 3.970, P = 0.035, P < 0.05$ )。900 mg/L 的  $Pb^{2+}$  能促进 M1 的生长,1 000 mg/L 的  $Pb^{2+}$  抑制 M1 的生长;700 mg/L 的  $Zn^{2+}$  能促进 M1 的生长,质量浓度 > 700 mg/L 的  $Zn^{2+}$  抑制 M1 的生长;900 mg/L 的  $Cu^{2+}$  能促进 M1 的生长,1 000 mg/L 的  $Cu^{2+}$  抑制 M1 的生长;质量浓度 > 600 mg/L 的  $Cd^{2+}$  抑制 M1 的生长。

试验表明,M1 菌株 *Microbacterium testaceum* 对 Pb、Zn、Cu、Cd 均具有明显的耐受性,与 Elahi 等<sup>[17]</sup> 对 *Microbacterium testaceum* 重金属耐受性的研究结果一致。景艳军<sup>[18]</sup> 从白银矿区土壤样品分离的嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 对  $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  的耐受性研究表明,生长周期短、菌体富集量大的菌株具有较强的重金属抗性。与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 相比,*Microbacterium testaceum* 对重金属的耐受性较弱<sup>[19-20]</sup>。

### 3 结语

对白银矿区王岷镇尾渣堆和东大沟河沟土壤重金属含量的检测结果表明,土壤重金属污染  $Pb > Zn > Cu$ , 矿区植物牛筋草和狗尾草对土壤 Cd 具有很强的生物富集效应。土壤可培养细菌 M1 ~ M4 经分子生物学鉴定为 *Microbacterium testaceum*、*Bacillus tequilensis*、*Microbacterium trichothecenolyticum*, 其中 M1 和 M2 为相同的种类 *Microbacterium testaceum*。菌株 M1 对 Pb、Zn、Cu、Cd 的耐受性明显高于 M2、M3 和 M4, 是潜在的土壤重金属污染生物修复菌种资源。该研究从污染程度最严重土壤中分离获得了重金属耐受菌株,对白银矿区土地复垦和生态环境恢复具有潜在应用价值。

#### [参考文献]

[1] 汤中立, 李小虎. 白银大型金属矿山环境地质问题及防治[J]. 国土资源, 2005(8): 4-7.  
[2] 刘宗平. 环境铅镉污染对动物健康影响的研究[J]. 中国农业

科学, 2005, 38(1): 185-190.  
[3] 刘宗平. 环境重金属污染物的生物有效性[J]. 生态学报, 2005, 25(2): 273-278.  
[4] 倪鼎文, 南海, 王婷. 白银市土壤重金属污染现状及来源分析[J]. 甘肃农业科技, 2015(8): 67-70.  
[5] 崔以寒. 白银矿区、绿洲及其交错带土壤重金属污染特征、风险及管理对策分析[D]. 兰州: 兰州大学, 2021.  
[6] 李小虎. 大型金属矿山环境污染及防治研究——以甘肃金川和白银为例[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.  
[7] 鲁海燕, 曹靖, 杨鑫, 等. 白银地区污灌对农田土壤细菌多样性的影响[J]. 长春理工大学学报(自然科学版), 2010, 33(2): 110-116.  
[8] 刘亚军, 杨勇, 谭秀丽, 等. 湖北典型矿冶城市土壤重金属污染评价及源解析[J]. 环境监测管理与技术, 2019, 31(5): 26-30.  
[9] 叶金利, 田路萍, 吴文卫, 等. 云南会泽者海镇典型矿区场地重金属污染特征及健康风险评估[J]. 环境监测管理与技术, 2019, 31(3): 36-40.  
[10] 王焱, 李江遐, 王冬良, 等. 花卉修复土壤重金属污染研究进展[J]. 环境监测管理与技术, 2019, 31(5): 1-5.  
[11] 贾建丽. 环境土壤学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016.  
[12] 朱梦杰. 便携式 XRF 测定仪在土壤检测中的应用及其影响因素[J]. 中国环境监测, 2019, 35(6): 129-137.  
[13] 毛文梁, 台喜生, 伍修锐, 等. 黑河上游祁连山区土壤可培养细菌群落生境的垂直分异特征[J]. 冰川冻土, 2013, 35(2): 447-456.  
[14] 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.  
[15] 李有文, 王晶, 巨天珍, 等. 白银市不同功能区土壤重金属污染特征及其健康风险评估[J]. 生态学杂志, 2017, 36(5): 1408-1418.  
[16] 陈任连, 蔡茜茜, 周丽华, 等. 甘肃某冶炼厂厂区土壤重金属铅镉污染特征及其对微生物群落结构的影响[J]. 生态环境学报, 2021, 30(3): 596-603.  
[17] ELAHI A, AJAZ M, REHMAN A, et al. Isolation, characterization, and multiple heavy metal-resistant and hexavalent chromium-reducing *Microbacterium testaceum* B-HS2 from tannery effluent[J]. Journal of King Saud University-Science, 2019, 31: 1437-1444.  
[18] 景艳军. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌中铁氧还蛋白基因 fd I 和 fd II 的克隆及其重金属抗性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2017.  
[19] MUNIR S, LI Y M, HE P F, et al. Core endophyte communities of different citrus varieties from citrus growing regions in China[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 645-655.  
[20] MADHUSMITA B, SAURAV D, SANKAR B S, et al. Comparative assessment of multi-trait plant growth-promoting endophytes associated with cultivated and wild *Oryza germplasm* of Assam, India[J]. Archives of Clinical Microbiology, 2021, 203(5): 2007-2028.