

不同年代铅锌矿渣中细菌的重金属和 抗生素抗性特征

张汉波¹, 施雯¹, 于春蓓¹, 沙涛¹, 程立忠¹, 段昌群²

(1. 云南大学生物系, 云南 昆明 650091; 2. 云南大学环境科学系, 云南 昆明 650091)

摘要: 利用主成分分析法, 研究了不同年代铅锌矿渣堆化学性质的改变同细菌群体重金属和抗生素抗性特性的关系。结果表明, 随堆积年代的延长, 矿渣堆 5 ~ 10 cm 和 25 ~ 30 cm 层面的化学性质差异增加。与这种空间上的环境因子分化相对应, 312 株随机分离的细菌菌株和 97 株芽孢杆菌菌株在 5 种重金属和 4 种抗生素的抗性比例上也发生了变化。堆积时间在 80 a 左右的 C 矿渣抗性菌株比例同较年轻的矿渣 A (约 10 a)、B (约 20 a) 有较大差别, 但有趣的是矿渣 A 和矿渣 C 在层面上的差异都较矿渣 B 大。

关键词: 矿渣; 重金属; 抗生素; 抗性; 主成分分析; 细菌

中图分类号: S151.93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2004)02-0348-04

Resistant Features of Heavy Metals and Antibiotics in Bacteria from Mine Tailings with Different Deposited History

ZHANG Han-bo¹, SHI Wen¹, YU Chun-bei¹, SHA Tao¹, CHENG Li-zhong¹, DUAN Chang-qun²

(1. Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Department of Environment Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The relationship between resistance of heavy metals and antibiotics in bacteria and the chemical features of three mine tailings, which were abandoned at approximately 10, 20 and 80 years ago, were investigated by principal component analysis (PCA). We have found that with increase of abandoned history, the difference of the components for layers 5 ~ 10 cm and 25 ~ 30 cm was enlarged. Corresponding to the environmental heterogeneity, the resistance of heavy metals and antibiotics from 312 bacterial strains and 97 strains of Arthrobacteria isolated randomly from mine tailings differentiated. Tailings C, with a deposited history of around 80 years, exhibited the greatest difference in terms of resistance of bacteria from tailings A and B. Interestingly, both of tailings C and tailings B displayed much more difference of resistance than that of tailings B, between the layer 5 ~ 10 cm and 25 ~ 30 cm.

Keywords: mine tailings; heavy metals; antibiotics; resistance; principal component analysis

大量的研究报道表明, 重金属污染土壤中往往产生许多抗性微生物群体^[1-3], 作为适应这类胁迫环境的重要特征, 污染土壤中微生物的重金属抗性特性在某种程度上将反映微生物对选择环境的适应策略, 但较少见到这方面的报道。铅锌尾矿是一种特殊的重金属污染环境, 具有污染强度大、重金属离子种类多等

特点, 个别种类的重金属离子生物有效态含量可达 1 000 mg · kg⁻¹ 水平^[4-7]。经过长期堆积, 在雨水淋溶等自然力作用下, 矿渣堆不同层面的理化性质特别是重金属的总量、有效态含量、pH 值和有机物质等都发生有规律的变化^[8]。生活于其间的微生物群体的生物特征, 特别是重金属的抗性特征如何随选择环境的改变而改变, 这方面的数据可能为我们理解生物群体如何适应这类极端环境提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 样地调查与样品采集

收稿日期: 2003-04-03; 修订日期: 2003-06-03

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2002C0001Q); 云南省教育厅自然科学基金重点项目(02ZD013); 云南省工业微生物发酵工程重点实验室开放基金项目(KF-2001-01)

作者简介: 张汉波(1970—), 男, 在读博士, 副教授, 主要从事微生物生态学 and 遗传学的研究。E-mail: zhbdm@yahoo.com.cn

研究的 3 个矿渣堆位于云南省会泽县者海镇李家箐村, 矿渣堆 A 位于 26°35'78"N, 103°39'22"E, 海拔 2 180 m; 矿渣堆 B 位于 26°35'79"N, 103°39'28"E, 海拔 2 200 m; 矿渣堆 C 位于 26°35'75"N, 103°39'37"E, 海拔 2 250 m。经调查, 这些矿渣堆积的时间大约在 10, 20 和 80 a。样品的采集、理化分析见文献[8]。

1.2 选择培养基制备

基础培养基为改良牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, Tryptone 3 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2), 灭菌冷却到 50℃ 添加 0.1 mol · L⁻¹ ZnSO₄, Pb(NO₃)₂, CuSO₄, CdCl₂, CoCl₂ 等重金属溶液和 1 mg · mL⁻¹ 的链霉素、利福平、卡那霉素、氨苄青霉素等抗生素溶液, 分别制成含 4 mmol · L⁻¹ ZnSO₄, 4 mmol · L⁻¹ Pb(NO₃)₂, 1 mmol · L⁻¹ CdCl₂, 4 mmol · L⁻¹ CuSO₄ 和 2 mmol · L⁻¹ CoCl₂ 的重金属选择平板以及 4 μg · mL⁻¹ 链霉素, 8 μg · mL⁻¹ 利福平, 8 μg · mL⁻¹ 卡那霉素, 2 μg · mL⁻¹ 氨苄青霉素选择平板, 备用。

1.3 微生物菌种分离和鉴定

称取 10 g 矿渣样品, 加入含 90 mL 细胞洗涤液(NaCl 4.25 g, 明胶 0.1 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水)和适量玻璃珠的三角瓶中, 180 r · min⁻¹, 室温摇瓶 20 min, 静置 10 min 后, 吸取上清液进行 10 倍稀释, 然后取稀释液 0.2 mL 涂布在基础培养基上, 30℃ 培养观察。在平板上随机挑取 300 多个细菌单菌落保存, 其中 97 株按照文献[9]初步鉴定为节杆菌属一个种。

1.4 菌株抗性特性研究

将上述菌株在液体培养基中摇瓶增殖, 菌悬液离心, 菌体用生理盐水洗涤 2 次。用灭菌毛细管吸取菌悬液, 依次点种在上述 9 种选择平板上, 以不加任何重金属和抗生素的平板为对照。抗生素平板培养 2 ~ 3 d, 重金属平板培养 9 d 后观察记录。

1.5 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件进行主成分分析。

2 结果讨论

2.1 矿渣堆的理化性质

矿渣堆理化性质见表 1。为了清楚显示矿渣堆理化性质随堆积时间发生的变化, 将这些数值进行主成分分析。提取的 2 个主成分 PC1、PC2 分别解释 71.3% 和 15.1% 的方差, 累计解释 86.4% 的方差。在载荷图上(未显示图形), 可溶性 Cd 在 PC1 上有最大的特征值(0.975), 分布在最右边, 而有机物质在 PC2 上有最大特征值(0.834), 分布在图最上边。结合各观测量在 2 个因子上的得分图(图 1a), 可以直观地看到不同年代矿渣堆沿 PC2 分离, 因此它们的差异主要由有机物质的含量导致。同年代矿渣堆的不同层面主要沿 PC1 分离, 表明空间上的差异主要是可溶性 Cd 含量导致, 且年代越久上下层差异越大。聚类分析显示 A1 和 A2 聚成一类, C2 同 B1、B2 聚成一类, 而 C1 分得很远, 单独为一类。

表 1 中, 有机物质的含量在 4% ~ 9.9% 间变化,

表 1 矿渣堆的理化性质

Table 1 Physical chemical characters of mine tailings

矿渣 ^b	总 Pb	总 Zn	总 Cd	可溶性 Pb	可溶性 Zn	可溶性 Cd	有机物质	pH
A1	3 500.83	3 782.00	83.27	35.11	27.80	17.78	9.90	7.20
A2	3 252.75	3 719.55	68.35	34.95	27.99	17.24	7.99	7.18
B1	4 342.23	3 517.29	51.59	197.10	27.70	17.26	4.01	6.79
B2	7 520.18	3 804.80	75.41	106.03	27.82	18.69	6.03	6.80
C1	575.51	2 738.19	20.03	261.33	25.83	1.50	6.21	5.18
C2	4 920.27	3 549.94	44.36	329.70	27.76	10.18	8.85	6.11

注: 数据为两次实验平均值, 该表仅显示了平均值, 重金属的含量为 mg · kg⁻¹, 有机物质含量为%。更详细的数据分析和讨论参见文献[8]; A、B 和 C 分别代表矿渣堆 A、B 和 C; 1, 2 分别代表 5 ~ 10 cm 和 25 ~ 30 cm 层面。

总体上比一般土壤的含量要高。推测原因有 2 个, 1 是由于矿渣中含有的还原性物质使得利用重铬酸钾氧化法测定的结果偏高; 2 是矿渣中确实有如此高的有机物质含量, 原因是这些环境中存在大量的重金属, 其毒性抑制了微生物对有机物质的分解活性, 从而导致植物残渣的积累。具体原因需要今后进一步证实。

2.2 随机分离的细菌菌株重金属和抗生素抗性研究

经过多年的堆积后, 矿渣堆在空间上的差异是否导致生活其间的细菌抗性水平发生相应变化? 从不加重金属的平板上随机挑选 312 个细菌菌株, 制备成菌悬液后, 点种在五种重金属和四种抗生素选择平板上, 计算的抗性比例见表 2。

将这些数据进行主成分分析, 提取的 PC1、PC2

表2 随机分离的细菌菌株重金属和抗生素抗性比例

Table 2 The proportion of heavy metal - and antibiotics - resistant bacteria isolated randomly from mine tailings

矿渣	A1(n=40)	A2(n=51)	B1(n=54)	B2(n=49)	C1(n=65)	C2(n=53)	平均±SD
Zn	0.58	0.63	0.74	0.67	0.15	0.34	0.52±0.23
Pb	0.15	0.53	0.54	0.37	0.56	0.43	0.43±0.16
Cd	0.73	0.61	0.50	0.63	0.25	0.49	0.53±0.17
Cu	0.93	0.98	0.98	0.96	0.94	0.94	0.96±0.02
Co	0.06	0.78	0.74	0.86	0.62	0.78	0.73±0.10
Str	0.10	0.24	0.32	0.27	0.02	0.02	0.16±0.13
Rif	0.50	0.51	0.44	0.39	0.08	0.17	0.35±0.18
Kan	0.90	0.63	0.74	0.84	0.29	0.45	0.65±0.23
Amp	0.32	0.39	0.43	0.45	0.05	0.47	0.35±0.16

注:n为菌株数量。

分别解释了 58.3% 和 27.1% 的方差, 累计解释 85.4% 的方差。在载荷图上, 抗 Cd 细菌比例观测量在 PC1 上分布靠最右边(0.968), 而抗 Cu 细菌比例观测量在 PC2 上有最大特征值(0.964)(未显示图)。从各观测量得分图看(图 1b), 沿 PC2, B1、B2 和 A2 聚成一组, 与 C1、C2 和 A1 分离, 差异主要是抗 Cu 菌株的比例差异。而 A1 同 C1、C2 沿 PC1 上分离, 它们的抗 Cd 菌株比例有差异。

矿渣 B 和 C 的细菌抗性比例基本上反映了生活环境的差异, 即生活环境差异大, 抗性比例的差异也大。矿渣 A 的化学性质差异最小, 但细菌的抗性比例差异反而最大, 原因可能是堆积年代较短, 表层和下层的细菌群体本来就在种类和其他生物学特性上存在较大差异所致, 并非环境不同而选择了不同抗性水

平的结果。

2.3 节杆菌的重金属和抗生素抗性研究

正如前述, 抗性细菌比例在不同年代矿渣堆空间上的差异有可能是不同样品中细菌的种类不同导致, 对于同一个种来说情况是否一样? 表 3 是 3 个矿渣堆 97 个节杆菌 (*Arthrobacter* sp) 菌株的抗性比例分析。PC1、PC2 分别解释了 52.3% 和 22.0% 的方差, 累计解释 74.4% 的方差。在载荷图上, Cu 观测量在 PC1 上有最大特征值 (0.945), 分布靠最右边, 而 Cd 在 PC2 上有最大特征值 (0.900), 靠最上部 (未显示图形)。从各观测量的得分图看(图 1c), 沿 PC1, B1、B2、A1、A2 与 C1、C2 分离, 主要是 Cu 的抗性菌株比例有差异。而 A1 和 C2 形成一个组在 PC1 同其他分离, 它们的抗 Cd 的菌株比例有差异, C1 自成一组。差异情

表3 节杆菌菌株的重金属和抗生素抗性比例

Table 3 The proportion of heavy metal - and antibiotics - resistant strains of *Arthrobacter* sp. from mine tailings

矿渣	A1(n=18)	A2(n=19)	B1(n=17)	B2(n=14)	C1(n=14)	C2(n=15)	平均值±SD
Zn	1.00	1.00	1.00	0.93	0.47	0.93	0.89±0.20
Pn	0.11	0.68	0.42	0.36	0.66	0.57	0.47±0.21
Cd	0.95	0.79	0.47	0.50	0.67	0.79	0.70±0.19
Cu	1.00	1.00	1.00	1.00	0.93	1.00	0.99±0.03
Co	0.78	0.95	0.94	1.00	0.67	0.85	0.87±0.12
Str	0.06	0.11	0.12	0.14	0.00	0.00	0.07±0.06
Rif	0.71	0.84	0.41	0.72	0.33	0.57	0.60±0.20
Kan	1.00	0.95	0.71	0.93	0.53	0.79	0.82±0.18
Amp	0.40	0.21	0.46	0.21	0.20	0.50	0.33±0.14

注:n为菌株数量。

况基本同前一致。

3 结论

主成分分析用来统计含有大量变量的数据资料, 并在对这些变量分析的基础上得到另一组称为主成分的变量 (PC), 每个样品都在每个主成分上得到一

个分值, 根据每个样品在头 2 个或是 3 个主成分上的分值作散点图, 样品在该散点图上的分离代表了样品之间的差异^[10,11]。本研究的 6 个样品都有大量变量来描述, 为了区别这些样品中细菌菌株在重金属和抗生素抗性比例的差异, 尝试利用了主成分分析法。

经过研究发现, 矿渣堆在风吹雨淋等自然力作用

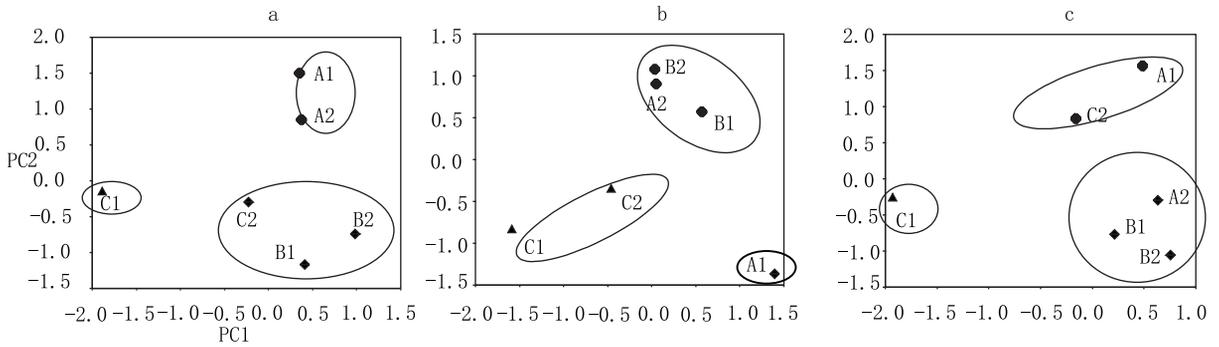


图 1 主成分分析因子得分图

(A, B 和 C 分别代表矿渣 A, B 和 C。1, 2 分别代表 5 ~ 10 cm 和 25 ~ 30 cm 层面。PC1, PC2 分别代表主成分 1, 2 的得分)

Figure 1 Scatter diagram of scores from the principal component analysis of the chemical characters (a), the proportion of resistant bacteria (b) and Arthrobacter (c).

(A, B and C representing tailings A, B and C, respectively; 1 and 2 representing layer 5 ~ 10 cm and 25 ~ 30 cm, respectively; PC1 and PC2 representing the scores of principal component 1 and 2, respectively)

下, 其化学性质在空间上发生明显的分化(表 1, 图 1a)。相对前期的报道^[8], 可以很明显看出这种统计分析方法的好处。矿渣这种化学实质的分化, 实际上是对生物的选择作用发生了改变。面对这种环境上的差异, 生活于其间的细菌在重金属和抗生素抗性比例上也发生相应的变化(表 2, 3; 图 1b, c)。值得注意的是, 不管是来自不同种的细菌群体还是来自同一个种的细菌群体, 年代较远的 C 矿渣抗性菌株比例都同年代较近的矿渣 A、B 有较大差别, 显示了堆积年代不同, 矿渣堆化学性质的改变对细菌群体抗性特性的影响。另外, 一个有趣的现象是年代较近的矿渣 A 和较远的矿渣 C, 在层面上的差异都较矿渣 B 大。我们推测新进入一个环境中生活的细菌群体, 就重金属和抗生素抗性特征来说, 它们先是在不同层面(或空间上)因生物群体本身的差异大而在上述两个特征上表现有较大差异(A 矿渣), 后因环境选择作用而导致群体差异逐渐减少(B 矿渣)。随堆积时间的延长, 环境化学性质本身发生巨大差异(矿渣 C), 又导致生物群体差异增加。具体的细节需要借助其他生物学特征进行深入的研究和验证。

参考文献:

[1] Pennanen T, Frostegård Å, Fritze H, et al. Phospholipid fatty acid

composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal - polluted gradients in coniferous forests[J].

Applied Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 420 - 428.

[2] 蒋先军, 骆永明, 赵其国. 重金属污染土壤的微生物学评价[J]. 土壤, 2000, 3: 130 - 134.

[3] Díaz - Raviña M, Bååth E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2970 - 2977.

[4] Dudka S, Adriano DC. Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review[J]. *J Environ Qual*, 1997, 26: 590 - 602.

[5] 孙庆业, 田胜尼. 尾矿污染与几种土壤酶活性[J]. 土壤, 2000, 1: 54 - 56.

[6] 孙庆业, 蓝崇钰, 黄铭洪, 等. 铅锌尾矿上自然定居植物[J]. 生态学报, 2001, 21(9): 1457 - 1462.

[7] 孙庆业, 蓝崇钰, 杨林章. 铅锌尾矿废弃地的化学性质研究[J]. 农村生态环境, 2000, 16(4): 36 - 39, 44.

[8] 张汉波, 段昌群, 胡斌, 等. 不同年代废弃的铅锌矿渣堆中重金属的动态变化[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(1): 67 - 69.

[9] 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. 267 - 294.

[10] Kelly JJ, Tate III RL. Use of BILOG for the analysis of microbial communities from zinc - contaminated soils[J]. *J Environ Qual*, 1998, 27: 600 - 608.

[11] Kelly JJ, Tate III RL. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter [J]. *J Environ Qual*, 1998, 27: 609 - 617.