

## 云南个旧锡矿区可培养细菌多样性及其重金属抗性

肖炜<sup>1</sup>, 张仕颖<sup>2</sup>, 赵琴<sup>1</sup>, 王永霞<sup>1</sup>, 赖泳红<sup>1</sup>, 李治滢<sup>1</sup>, 崔晓龙<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 云南大学云南省微生物研究所, 教育部西南微生物多样性重点实验室, 昆明 650091

<sup>2</sup> 云南农业大学资源与环境学院, 昆明 650201

**摘要:** 【目的】揭示个旧锡矿区尾矿库和矿坑土壤中可培养细菌的多样性; 发掘一批锡矿区土壤细菌菌株并对其  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  耐受性进行评价。【方法】采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对样品中可培养细菌多样性进行研究, 平板法评价代表菌株对  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  的耐受性。【结果】使用 2 种培养基从尾矿库和矿坑土壤中分离到 214 株细菌, 对其中 107 株代表菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育分析结果显示, 菌株分属细菌域的 5 个门、12 个目、25 个科、42 个属; 其中变形菌门 (*Proteobacteria*) 是优势类群, 占总菌株数的 69.2%; 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株是优势物种, 占 24.8%; 2 株菌代表了 2 个潜在新类群。对 105 株代表性菌株的重金属耐受性研究表明, 耐受浓度 1000 mg/L  $Pb^{2+}$  或  $Cd^{2+}$  的菌株分别占 73.3% 和 8.6%, 菌株对  $Pb^{2+}$  的耐受性明显好于  $Cd^{2+}$ ; 分离自锡尾矿库的菌株耐受不同浓度  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  菌株比例明显高于矿坑来源的菌株; 分离自锡尾矿区的 2 株菌 (DT47-2A 和 DT50-1) 对 1000 mg/L 浓度  $Pb^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  均具耐受性。【结论】个旧锡矿区土壤可培养细菌具有丰富的多样性, 而且蕴含着不少潜在新类群; 该环境中含有大量  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  耐受菌株, 并对  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  具有较强的抗性或适应性。

**关键词:** 锡矿区, 纯培养方法, 细菌多样性, 16S rRNA 基因同源性, 重金属

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1158-08

重金属因具有不能被生物分解, 可通过食物链富集, 且可转化为毒性更强的金属有机化合物而倍受人们的关注。土壤重金属污染造成土壤环境质量日趋下降, 成为当前环境污染治理中的热点问题。而由于重金属污染的特殊性, 土壤重金属污染的治理也有着特殊的困难。植物修复和微生物修复是新兴的高效修复技术, 具有良好的社会和生态效益, 并且易被公众接受, 因而具有广阔的应用前景, 也逐渐成为国内外在土壤修复方面研究的重点<sup>[1]</sup>。因此,

了解重金属污染土壤中的微生物多样性, 并寻找具有高效重金属污染修复能力的菌株, 具有重要的理论意义和应用价值。

金属矿区土壤是一类特殊的土壤, 金属矿山开发的采、选、冶都会向环境中排放重金属元素<sup>[2-4]</sup>, 矿区周边的生态环境特别是土壤中重金属的污染已成为严重的环境污染问题<sup>[5]</sup>。云南个旧是世界闻名的“锡都”, 锡储量和 20 世纪后 50 年代以来的锡产量均居世界前列<sup>[6]</sup>。作为我国重要的锡工业基

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31200138, 41201321, 31000003, 31160123); 云南微生物菌种资源标准化整理、共享及利用平台建设 (2009DA002)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-871-65034621; E-mail: xlcul@ynu.edu.cn

**作者简介:** 肖炜 (1979 -), 男, 云南弥勒人, 博士, 主要从事极端环境微生物学研究。E-mail: xiaow313@aliyun.com

**收稿日期:** 2013-03-07; **修回日期:** 2013-05-28

地,当地发达的矿业活动为我国特别是云南省经济社会发展作出了重大贡献,但同时也使矿区背负了沉重的环境污染的包袱。砂锡矿中多共生和伴生铅、铜、砷等多种元素,由于选矿回收有限,大量重金属进入尾矿中,造成尾矿库周围土壤和地下水的重金属污染<sup>[7]</sup>。目前,国内外对铅锌矿尾矿场环境微生物的研究较多<sup>[8-10]</sup>,但对锡尾矿中微生物的种类及其功能的研究还很少<sup>[11-13]</sup>。目前,对其它重金属污染区微生物的研究发现,微生物可以通过对重金属进行吸附、溶解、转化等过程来降低重金属的毒性和浓度<sup>[14]</sup>。个旧地区现有不同规模尾矿库 30 余座,大屯尾矿库是目前正在使用的尾矿库之一,使用时间超过 50 年<sup>[7, 11]</sup>。本文采集大屯锡尾矿库和附近松矿矿坑土壤,使用 2 种培养基分离其中的细菌并对部分代表性菌株的  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  耐受性进行评价。结果显示,个旧锡矿区存在丰富而多样的可培养细菌和潜在新物种 (potential novel species),大部分菌株对重金属具有良好的耐受性。本研究获得了一批可用于治理土壤污染的微生物菌种资源,并为进一步开展用于环境修复的微生物-植物人工群落的构建、重金属吸附特征和抗性基因的研究与发掘奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

2009 年 12 月 17 日分别采集位于云南省个旧市大屯尾矿库和松矿矿坑的土壤样品。松矿在采样时仍在开采,样品为矿坑中新鲜挖掘出的矿石,呈灰白色至粉红色,粉末状土壤中夹杂大量石块。大屯尾矿场中少有植被,样品为距地表 5 - 10 cm 的土壤,呈浅红色。所有样品用灭菌小铲收集于无菌采样袋中,常温下带回实验室,次日进行微生物的分离。

### 1.2 材料

**1.2.1 培养基:** (1) R2A 培养基: 酵母膏、蛋白胨、可溶性淀粉、酸水解酪素和葡萄糖各 0.5 g/L,  $K_2HPO_4$  0.3 g/L,  $MgSO_4$  0.024 g/L, 丙酮酸钠 0.3 g/L。 (2) 改良 LB (M-LB): 胰蛋白胨 1 g/L, 酵母膏 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, 丙酮酸钠 2 g/L。

**1.2.2 主要试剂和仪器:** PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶等扩增所用试剂为宝生物工程

(大连)有限公司产品。 $Pb(NO_3)_2$  和  $CdSO_4$  为国产分析纯。

### 1.3 菌株分离

以 R2A 和 M-LB 为分离培养基,在各培养基中加入制霉菌素至 16 mg/L。称取土样各 10 g 置于盛有 90 mL 无菌 0.85% (W/V) NaCl 溶液和玻璃珠的 250 mL 三角瓶中,在摇床上 120 r/min 室温振荡 2 h,制得土样悬液,然后用 0.85% (W/V) 无菌盐水进行 10 倍梯度稀释。取 0.2 mL  $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  稀释度的土壤悬液涂布平板,于 28℃ 培养。7 - 30 d 后挑取单菌落用相应的培养基进行四分体划线纯化。所得纯培养物制成冻干牛奶管,同时接种于相应的斜面培养基,4℃ 保存备用。

### 1.4 菌株的重金属耐受性评价

将菌株点接到  $Pb^{2+}$  或者  $Cd^{2+}$  终浓度为 100 mg/L、500 mg/L、1000 mg/L 和 2000 mg/L 的相应培养基上,观察它们生长与否及生长程度,实验重复 3 次。

### 1.5 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

参照文献 [15] 的方法提取菌株基因组 DNA 并扩增其 16S rRNA 基因片段。扩增产物送上海生工生物工程有限公司测序。使用 EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) 在线比对序列,确定各菌株近缘种及相似性。结合 RDP Classifier (The Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/>) 和 LPSN (<http://www.bacterio.cict.fr/>) 在线分析各菌株的属及以上分类单位。从 GenBank 中调取与分离菌株最相似的菌株序列构建系统发育树。测序所得序列及其相似序列通过 Clustal X 2.0 程序进行多重比对,用 Mega4.0 软件以 Kimura two-parameter model 为参数,采用邻接法 (Neighbor-joining) 自举 1000 次构建系统进化树<sup>[16]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的分离

使用 R2A, M-LB 培养基对采自大屯锡尾矿库 (DT) 和松矿矿坑 (SQ) 土样中的微生物进行分离。根据菌落形态、大小和颜色等特征最终从不同土样中共挑取菌株 214 株,其中松矿 129 株,大屯 85 株。M-LB 培养基是 1/10 LB 中加入 0.2% 丙酮酸钠配制而成,M-LB 分离平板上生长的菌落数明显多于

R2A, 菌落特征也显多样, 最终从 M-LB 平板上共挑取菌株 157 株, R2A 挑取 57 株。

## 2.2 分离菌株的 16S rRNA 基因多样性

对挑取的菌株进行多次平板划线纯化, 根据纯菌株菌落形态和菌株在 R2A、M-LB 培养基上的生长状况选取其中 107 株代表性菌株进行 16S rRNA 基因序列测序分析 (大屯 35 株, 松矿 72 株, 已尽可能去除冗余菌株)。GenBank 登录号为 KC686386–KC686399, KC920925–KC921017。16S rRNA 基因同源性分析表明, 107 个菌株属于细菌域的 5 个门、12 个目、25 个科、42 个属。各门和目所占比例见图 1。假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株是最优势物种, 该属菌株占有所有菌株的 24.8%。

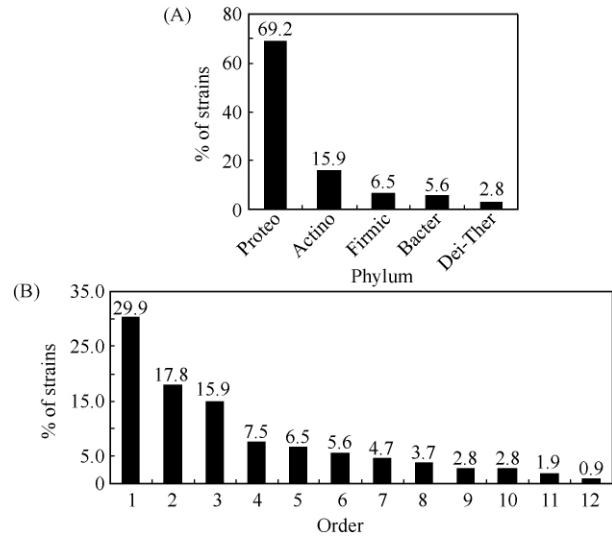


图 1. 个旧锡矿区土壤可培养细菌群落组成

Figure 1. Culturable bacterial community composition of soils collected from Gejiu tin mining area. A: Phylum-level phylogenetic diversity. The following abbreviations are used: Proteo: Proteobacteria; Actino: Actinobacteria; Firmic: Firmicutes; Bacter: Bacteroidetes; Dei-Ther: Deinococcus-Thermus. B: Order-level phylogenetic diversity (12 orders): 1. Pseudomonadales; 2. Burkholderiales; 3. Actinomycetales; 4. Caulobacteriales; 5. Bacillales; 6. Flavobacteriales; 7. Sphingomonadales; 8. Enterobacteriales; 9. Deinococcales; 10. Xanthomonadales; 11. Rhizobiales; 12. Chromatiales.

值得注意的是, 测序的 107 株菌中, 有 2 株菌 [DT52 (KC686386) 和 SQ48-1 (KC686395)] 的 16S rRNA 基因序列相似性与正式发表的模式菌株的相似性均低于 97%, 表明这 2 个菌株为潜在新类群, 说明个旧锡矿区蕴藏着较丰富的新类群, 值得我们进行进一步的探索 (图 2)。

## 2.3 菌株的重金属耐受性

根据菌株的生长速率和菌落形态选出 105 个代表性菌株进行重金属耐受试验。结果表明, 68.6% 的菌株至少能够耐受 100 mg/L 的  $\text{Cd}^{2+}$ , 31.4% 的菌株至少能够耐受 500 mg/L 的  $\text{Cd}^{2+}$ , 8.6% 的菌株至少能够耐受 1000 mg/L 的  $\text{Cd}^{2+}$ 。这些菌株能够耐受 100 mg/L、500 mg/L 和 1000 mg/L 浓度  $\text{Pb}^{2+}$  的菌株分别占 84.8%, 81.9% 和 73.3%, 对  $\text{Pb}^{2+}$  的耐受性明显好于  $\text{Cd}^{2+}$ 。当  $\text{Pb}^{2+}$  或者  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 2000 mg/L 时, 所有的筛选菌株都无法生长。其中, 菌株 DT47-2A (KC686388) 和 DT50-1 (KC686389) 能同时耐受 1000 mg/L 的  $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$ 。这 2 个菌株与 *Brevundimonas diminuta* 的相似性分别为 99% 和 98%。菌株 DT45 (KC686390) 虽然也与 *Brevundimonas diminuta* 具有较高的相似性 (99%) (图 2), 但不能耐受 1000 mg/L 的  $\text{Cd}^{2+}$ , 说明重金属耐受性具有菌株特异性。另外, 有 10 个菌株 (占被筛选菌株的 9.5%) 对  $\text{Pb}^{2+}$  或者  $\text{Cd}^{2+}$  都较敏感, 不能耐受 100 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  或者  $\text{Cd}^{2+}$ 。这 10 个菌株均分离自松矿矿坑, 表明菌株对重金属的耐受性与其生活的小生境具有密切关联。

## 2.4 锡尾矿库和矿坑中细菌多样性和重金属耐受性比较

107 株测序的菌株中, 35 株分离自锡尾矿库, 72 株分离自矿坑。RDP 分析显示, 来自锡尾矿库的菌株分属细菌域的 4 个门: Proteobacteria (26 株, 74.3%; Alpha- Beta- Gamma-proteobacteria 分别为 10、2、11 株), Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria 分别为 3 株 (8.6%)。来自矿坑的菌株分属 5 个门: Proteobacteria (48 株, 66.7%; Alpha- Beta- Gamma-proteobacteria 分别为 5、14、29 株), Actinobacteria (14 株, 19.4%), Firmicutes (4 株, 5.6%), Bacteroidetes (3 株, 4.2%), Deinococcus-Thermus (3 株, 4.2%)。Actinobacteria 所占比例明显高于锡尾矿库, 且含有锡尾矿库中没有的 Deinococcus-Thermus。显示两种环境中微生物群落具有较大差别。

同时, 我们发现 2 种样品中均有其特有的细菌属。锡尾矿特有属: *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Agrococcus*, *Rheinheimera*, *Hydrogenophag*, *Tessaracoccus*, *Arenimonas*, *Yonghaparkia*。矿坑特有属: *Arthrobacter*, *Sphingopyxis*, *Novosphingobiu*,

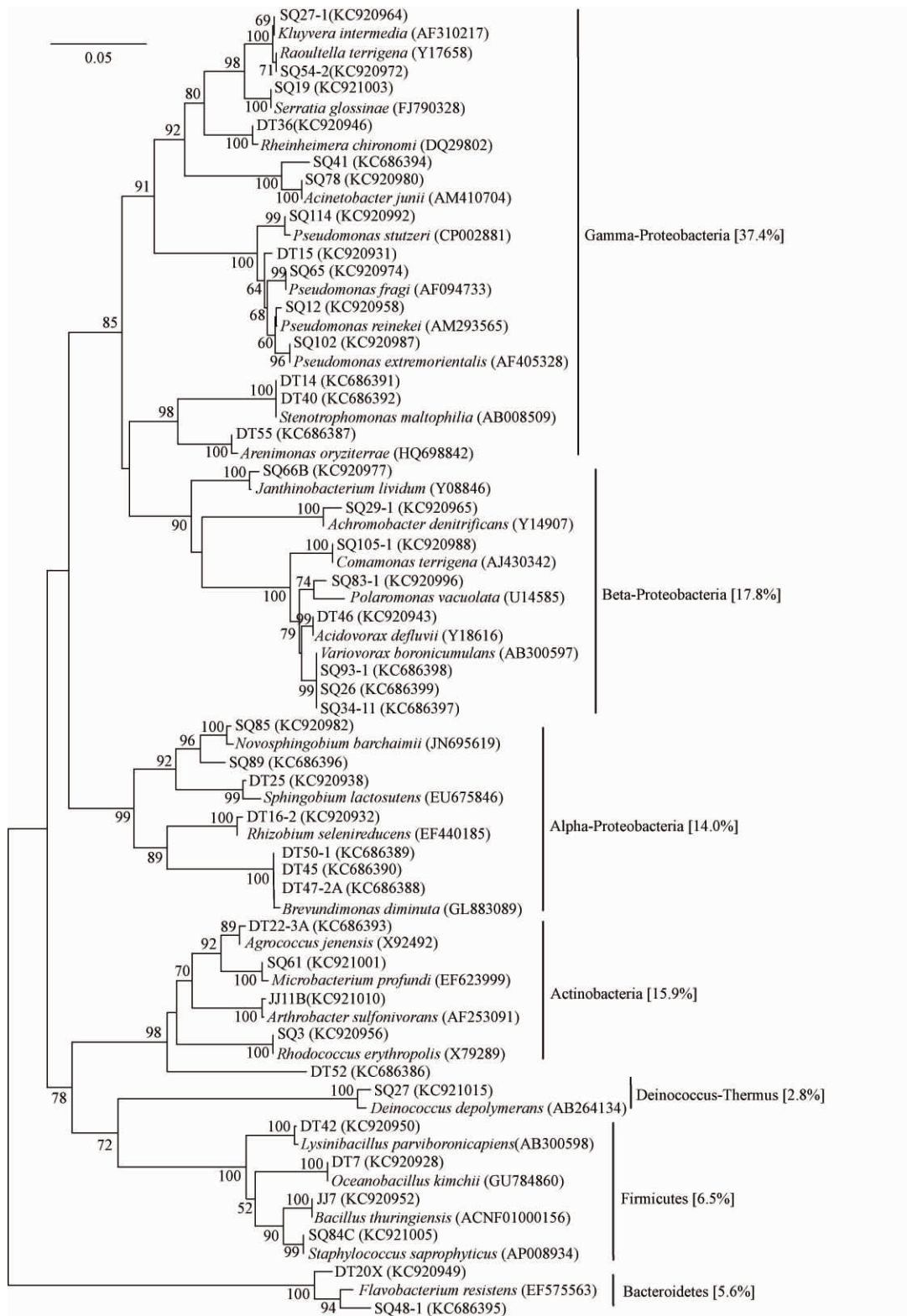


图 2. 邻接法构建的个旧锡矿区可培养细菌 16S rRNA 序列系统发育树

Figure 2. Phylogenetic neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of culturable bacteria from Gejiu tin mining area. Numbers in the parentheses indicate the GenBank accession numbers; Numbers at branch points are percentage bootstrap (values based on 1000 replicates). Numbers in the square brackets indicate the percentage of the phylum or class. Bar 0.05 corresponds to 5% levels of the sequence divergence.

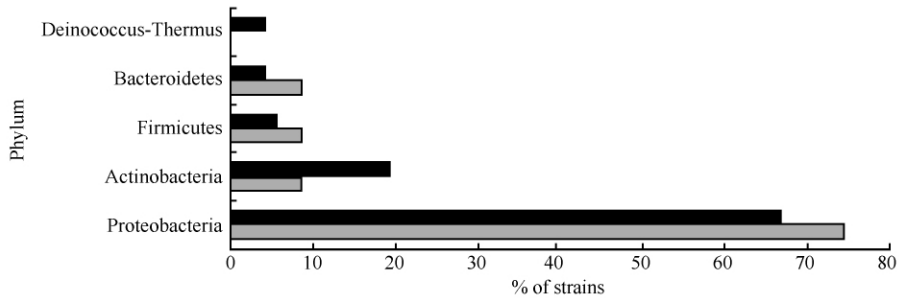


图 3. 锡尾矿库和矿坑分离到的菌株群落组成

Figure 3. Culturable bacterial community composition of soils collected from tin mine tailings area (black) and tunnel adit (gray).

*Comamonas*, *Raoultella*, *Achromobacter*, *Kluyvera*, *Deinococcus*, *Variovorax*, *Serratia*, *Rhodococcus*.

用于重金属抗性筛选的 105 个菌株中 33 株来自锡尾矿库, 72 株来自锡矿矿坑, 筛选发现来自锡尾矿库的菌株对重金属的耐受性明显好于来自矿坑的菌株, 这表现在能耐受不同浓度重金属的菌株比例高于矿坑菌株(表 1)。

表 1. 分离自锡尾矿库和矿坑菌株中耐受不同浓度  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  的菌株比例

Table 1. The percentage of  $Pb^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ -tolerance strains from tin mine tailings area and tunnel adit.

Sampling site	$Cd^{2+}/Pb^{2+}$ (mg/L)		
	100	500	1000
tin mine tailings area	72.7% / 96.9%	36.4% / 96.9%	12.1% / 87.9%
tin mine tunnel adit	66.7% / 79.2%	29.2% / 75.0%	6.9% / 66.7%

### 3 讨论

对某一环境中微生物的存在、种类和数量的认识是研究该环境微生物生态功能的基础。虽然目前大量分子生物学方法不断涌现并被广泛使用, 但经典的纯培养方法仍具有不可替代的地位和重要性。这是因为只有获得可供培养的菌株才能深入研究微生物的生理生化特性、特殊代谢产物和特殊基因。诚然, 目前宏基因组的方法也能为我们提供环境中微生物的某些特征, 但要全面系统地了解某一微生物, 获得其菌株仍然是重要和必须的。因此, 目前各国科学家都在努力寻找“未培养微生物”的可培养策略<sup>[17]</sup>。同时, 从各类环境中分离获得的菌株, 特别是特殊环境中的特殊微生物, 更是成为食品、农业、生化和制药企业争相购买的资源。本研究所获得的 214 株细菌虽然还未进行全面细致的活性筛

选, 但从已有的结果来看, 这些菌株在重金属抗性方面具有广阔的开发前景。除了重金属抗性, 锡尾矿分离到的菌株还产生大量活性次生代谢产物。例如: 云南大学的文孟良团队从分离自大屯锡尾矿的诺卡氏菌 (*Nocardiosis* sp.) YIM DT266 和 *Streptomyces diastaticus* YIMDT26 中发现 naphthospirozone A<sup>[11]</sup>、griseusins F 及 G<sup>[13]</sup> 和 phenazinolins A - E<sup>[12]</sup> 等新奇先导化合物。这些化合物表现出很好的细胞毒性或抗菌活性, 极具应用前景。本研究所获得的菌株也将成为活性次生代谢产物筛选的候选菌株。

由于目前对锡矿区环境微生物的研究资料很少, 所以无法比较本研究结果与其它锡矿区环境微生物区系的异同。但与铅锌矿环境比较来看, 采用免培养方法对云南兰坪铅锌矿区的研究也发现矿区土壤中细菌属于 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* 和 *Actinobacteria*, 其中也以 *Proteobacteria* 为优势<sup>[9]</sup>。该结果与我们所得结果一致, 表明锡矿区与铅锌矿区在细菌类群上较相似。我们的研究中分离到大量假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.), 该属菌株广泛分布于各类环境, 不同来源的假单胞菌都具有污染物降解能力, 是环境中重要的污染物降解菌<sup>[18-21]</sup>。我们所分离的多株假单胞菌都具有良好的重金属耐受能力。

分离自尾矿库的菌株 DT14 (KC686391) 和 DT40 (KC686392) 与嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 的相似性都高于 99% (图 2)。嗜麦芽窄食单胞菌在自然界广泛分布, 同时该菌也是人和动物皮肤、胃肠道和呼吸道较为常见的定植菌, 是临床上较常见的条件致病菌<sup>[22]</sup>, 分离自镉污染土壤的该菌对镉具有吸附能力<sup>[23]</sup>。我们从矿坑土壤中分离到 4 株节杆菌 (*Arthrobacter*

sp.)。该属菌广泛分布于铅锌矿区<sup>[10-11, 19]</sup>, 有的菌株能有效降解甲基对硫磷<sup>[18]</sup>。菌株 SQ89 (KC686396) 与鞘胺醇盒菌 (*Sphingopyxis macrogoltabida*) 的相似性达 98% (图 2)。该属菌株大多与有机污染物的降解有关, 具有多种污染物降解能力, 如多环芳烃<sup>[24]</sup>, 毒死蜱<sup>[25]</sup>, 甲基对硫磷<sup>[26]</sup>, 微囊藻毒素<sup>[27]</sup>。从锡矿坑中分离到该菌说明这类细菌不但广泛存在, 并且积极参与环境中难降解有机污染物的降解, 是环境中一类重要的降解菌。从锡矿坑中还分离到 3 株贪噬菌属菌株 [SQ34-11 (KC686397), SQ93-1 (KC686398) 和 SQ26 (KC686399)], 从其它环境分离到的该属菌株具有 Cd<sup>2+</sup> 耐受性<sup>[27]</sup> 和苯酚降解能力<sup>[19]</sup>, 是良好的污染物降解候选菌。同时, 我们获得的菌株 DT22-3A (KC686393) 为壤球菌属 (*Agrococcus*) 的菌株 (图 2), 该属菌株分布范围较小且不易被分离, 是一类稀有放线菌。另外, 菌株 DT22-3A (KC686393) 能耐受 1000 mg/L 的 Pb<sup>2+</sup> 和 500 mg/L 的 Cd<sup>2+</sup>, 对重金属具有较好的耐受性。

微生物具有极高的适应性, 因而在某种特定环境中的微生物必然具备适应这一特定环境的能力。生活在富含重金属的锡尾矿中的微生物也表现出对于这一环境的适应。我们发现来自大屯锡尾矿的菌株的重金属耐受性好于来自松矿的菌株, 不仅比例高而且可耐浓度也高。这与卞光凯等对沿海滩涂耐盐植物内生细菌的重金属耐受情况相似, 他们的结果显示能够耐受 Pb<sup>2+</sup> 的菌株数明显多于耐受 Cd<sup>2+</sup> 的菌株数<sup>[29]</sup>。这可能与菌株所处环境中 Pb<sup>2+</sup> 浓度较高有关。表明锡尾矿是良好的重金属耐受菌株资源宝库。当然, 微生物生长的环境是相当复杂的, 以一种重金属来衡量其抗性并不全面, 很多菌株可能具有多种重金属交叉抗性, 甚至抗生素抗性或其他特殊能力。因此, 作为重金属污染治理所用菌株的筛选, 这只是初步的结果, 接下来我们要全面评价这些菌株的其他特征, 包括这些菌株是否具有植物促生作用, 它们对不同重金属的交叉抗性如何? 他们是否能耐受极端酸性或碱性环境, 生长速率如何? 对重金属的吸附转化能力如何, 是否能与植物协同作用提高植物吸收固定重金属的能力等。只有经过这一系列系统全面地评价才能筛选到能够应用的高效重金属污染治理菌株。

## 参考文献

- [1] Gu J, Zhao J. Status of soil contamination by heavy metals and study on remediation techniques in Yunnan. *Environmental Science Survey*, 2010, 29(5): 68-71. (in Chinese)  
顾济沧, 赵娟. 云南省土壤重金属污染现状及治理技术研究. *环境科学导刊*, 2010, 29(5): 68-71.
- [2] Sastre J, Hernández E, Rodríguez R, Alcobé X, Vidal M, Rauret G.. Use of sorption and extraction tests to predict the dynamics of the interaction of trace elements in agricultural soils contaminated by a mine tailing accident. *Science of the Total Environment*, 2004, 329(1-3): 261-281.
- [3] Aguilar J, Dorronsoro C, Fernández E, Fernández J, Garéa I, Martín F, Simón M. Soil pollution by a pyrite mine spill in Spain: evolution in time. *Environmental Pollution*, 2004, 132(3): 395-401.
- [4] Yang QW, Shu WS, Qiu JW, Wang HB, Lan CY. Lead in paddy soils and rice plants and its potential health risk around Lechang Lead/Zinc Mine, Guangdong, China. *Environment International*, 2004, 30(7): 883-889.
- [5] Chen HM, Zheng CR, Tu C, Zhu YG. Heavy metal pollution in soils in China: status and countermeasures. *Ambio*, 1999, 28(2): 130-134.
- [6] Qin D, Li Y, Fan Z, Chen A, Tan S, Hong T, Li L, Lin X. The geochemistry and mineralization evolution of Gejiu tin ore deposits. *Engineering Science*, 2006, 8(1): 30-39. (in Chinese)  
秦德先, 黎应书, 范柱国, 陈爱兵, 谈树成, 洪托, 李连举, 林小平. 个旧锡矿地球化学及成矿作用演化. *中国工程科学*, 2006, 8(1): 30-39.
- [7] Gan F, Fang W, Wang X, Yang S, Zheng H. The heavy metal contamination in soil-potato and pea of tin tailings. *Ecology and Environment*, 2008, 17(5): 1847-1852. (in Chinese)  
甘凤伟, 方维萱, 王训练, 杨社锋, 郑厚义. 锡矿尾矿库土壤-食用马铃薯和豌豆中重金属污染状况. *生态环境*, 2008, 17(5): 1847-1852.
- [8] Deng W, Ji X, Yuan W, Li B, Lin L, Zhang Q, Wei Y. Diversity of bacteria in Lanping Zinc-lead ore in Yunnan province. *Chinese Journal of Microecology*, 2012, 24(2): 109-112. (in Chinese)  
邓伟, 季秀玲, 袁文功, 李波, 林连兵, 张琦, 魏云林. 云南兰坪铅锌矿区细菌多样性研究. *中国微生态学杂志*, 2012, 24(2): 109-112.
- [9] 杨琳琳. 云南有色金属矿山细菌多样性初步探究. 昆明理工大学硕士学位论文, 2011.

- [10] 张汉波. 铅锌矿渣中重金属耐受细菌的进化生态特征研究. 云南大学博士毕业论文, 2003.
- [11] Ding ZG, Li MG, Zhao JY, Ren J, Huang R, Xie MJ, Cui XL, Zhu HJ, Wen ML. Naphthospirozone A, an unprecedented and highly functionalized polycyclic metabolite from an alkaline mine waste extremophile. *Chemistry – A European Journal*, 2010, 16 (13) : 3902–3905.
- [12] Ding ZG, Li MG, Ren J, Zhao JY, Huang R, Wang QZ, Cui XL, Zhu HJ, Wen ML. Phenazinolins A – E: novel diphenazines from a tin mine tailings-derived *Streptomyces* species. *Organic Biomolecular Chemistry*, 2011, 9 (8) : 2771–2776.
- [13] Ding ZG, Zhao JY, Li MG, Huang R, LiQM, Cui XL, Zhu HJ, Wen ML. 2012, Griseusins F and G, spiro-naphthoquinones from a tin mine tailings-derived alkalophilic *Nocardiopsis* species. *Journal of Natural Products*, 2012, 75 (11) : 1994–1998.
- [14] Chen X, Feng X. Review on mechanism of microbiological effects on heavy metals. *Nonferrous Metals Science and Engineering*, 2012, 3 (3) : 56–59. (in Chinese)  
陈小攀, 冯秀娟. 微生物对重金属元素作用机理综述. 有色金属科学与工程, 2012, 3 (3) : 56–59.
- [15] Xiao W, Yang Y, Liu H, Wen M, Cui X. Culturable bacterial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine, P. R. China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46 (6) : 967–972. (in Chinese)  
肖炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 文孟良, 崔晓龙. 昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌多样性研究. 微生物学报, 2006, 46 (6) : 967–972.
- [16] Xiao W, Wang ZG, Wang YX, Schneegurt MA, Li ZY, Lai YH, Zhang SY, Wen ML, Cui XL. Comparative molecular analysis of the prokaryotic diversity of two salt mine soils in southwest China. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53: 1–11.
- [17] Cui X, Xu L, Wen M, Li M, Li Y, Li W, Peng Q, Jiang C. Uncultured microbial resources. *Microbiology China*, 2005, 32 (3) : 144–146. (in Chinese)  
崔晓龙, 徐丽华, 文孟良, 李铭刚, 李一青, 李文均, 彭谦, 姜成林. 未培养微生物资源. 微生物学通报, 2005, 32 (3) : 144–146.
- [18] Xie X, Yan Y, Liu P, Wang S. Isolation, degradation and characterization of methylparathion degradative strain L4. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26 (10) : 1637–1642.  
解秀平, 闫艳春, 刘萍萍, 王圣惠. 降解甲基对硫磷的节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) L4 菌株的分离和降解特性研究. 环境科学学报, 2006, 26 (10) : 1637–1642.
- [19] 何晓丽. 苯酚降解菌的筛选、鉴定及其降解特性研究. 上海师范大学硕士毕业论文, 2009.
- [20] Piotrowska-Seget Z, Cycon M, Kozdroj J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 2005, 28 (3) : 237–246.
- [21] Zhang Y, Song X, Huang L, Hu Z, Chai T. Isolation of a cadmium-resistant bacterium from coal mining and heavy metal tolerance. *Journal of China Coal Society*, 2010, 35 (10) : 1735–1741. (in Chinese)  
张玉秀, 宋小庆, 黄琳, 胡振琪, 柴团耀. 煤矿区耐镉细菌的筛选鉴定和重金属耐性研究. 煤炭学报, 2010, 35 (10) : 1735–1741.
- [22] Xie W, Li M, Feng Y, Yan Q. Cloning and phylogenetic analysis of 16S rDNA gene of *Stenotrophomonas maltophilia* derived from swine high fever cases. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2009, 36 (12) : 49–52. (in Chinese)  
谢文绮, 李蜜, 冯迎春, 颜其贵. 猪“高热病”源嗜麦芽窄食单胞菌 16S rDNA 基因的克隆和系统发育分析. 中国畜牧兽医, 2009, 36 (12) : 49–52.
- [23] Qiu Y, Yin H, Ye J, Peng H, Qin H, Zhang N, Long Y. Biosorption of cadmium by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environment Pollution and Control*, 2011, 33 (4) : 40–45. (in Chinese)  
邱云云, 尹华, 叶锦韶, 彭辉, 秦华明, 张娜, 龙焰. 嗜麦芽窄食单胞菌对镉的吸附. 环境污染与防治, 2011, 33 (4) : 40–45.
- [24] Wang C, Li D, Liu S. Screening and identification of four PAHs-biodegrading strains. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 13 (4) : 546–550. (in Chinese)  
王春明, 李大平, 刘世贵. 4 株多环芳烃降解菌的分离及鉴定. 应用与环境生物学报, 2007, 13 (4) : 546–550.
- [25] Li R, Hua R, Tang X, Wang Y, Zhang J, Wang D. Isolation, identification and chlorpyrifos degradation characteristic of new chlorpyrifos degrading strain *Sphingopyxis terrae* R17. *Acta Laser Biology Sinica*, 2011, 2: 261–268. (in Chinese)  
李瑞雪, 花日茂, 唐欣昀, 王昀璐, 张君, 王道胜. 一株毒死蜱降解新菌株 *Sphingopyxis terrae* R17 的分离鉴定及降解特性. 激光生物学报, 2011, 2: 261–268.
- [26] 孙金金. 甲基对硫磷降解菌 *Sphingopyxis* sp. DLP-2 的生物学特性及 Tnmpd 的克隆和功能鉴定. 南京农业大学硕士毕业论文, 2011.
- [27] Wang JF, Wu PF, Chen J, Yan H. Biodegradation of microcystin-RR by a new isolated *Sphingopyxis* sp. USTB-05. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2010, 18

(1) :108-112.

- [28] Shao J, Yao X, He S. Isolating Cd resistant bacteria from Ramie rhizosphere and their effects on the growth and Cd absorptional characters of Ramie. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 3: 487-491. (in Chinese)  
邵继海, 姚习文, 何绍江. 苧麻根际抗 Cd 细菌筛选及对苧麻生长和吸收 Cd 能力的影响. *农业环境科学学报*, 2010, 3: 487-491.
- [29] Bian G, Zhang Y, Qin S, Xing K, Xie H, Jiang J. Isolation and biodiversity of heavy metal tolerant endophytic bacteria from halotolerant plant species located in coastal shoal of Nantong. *Acta Microbiologica Sinica*, 51 (11) :1538-1547. (in Chinese)  
卞光凯, 张越己, 秦盛, 邢珂, 谢焕松, 蒋继宏. 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性. *微生物学报*, 2011, 51 (11) : 1538-1547.

## Diversity and heavy-metal tolerance of bacteria isolated from Gejiu tin mining area of Yunnan

Wei Xiao<sup>1</sup>, Shiyong Zhang<sup>2</sup>, Qin Zhao<sup>1</sup>, Yongxia Wang<sup>1</sup>, Yonghong Lai<sup>1</sup>, Zhiying Li<sup>1</sup>, Xiaolong Cui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

<sup>2</sup>College of Resources and Environment Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Abstract:** [Objective] We assessed the culturable bacterial diversity in tin mine area in Gejiu, Yunnan, China, and heavy-metal tolerance of the isolated bacteria. [Methods] Bacterial strains were isolated from the samples by using the culture-dependent method and investigated by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. Representatives of isolates were selected to detect their tolerance against heavy metals of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. [Results] We isolated 214 bacterial strains from soils by using two media. Based on colony characteristics, we selected 107 representatives of strains for phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Results showed that 107 isolates belong to 42 genera of 25 families of 12 orders in 5 phyla. The most abundant isolates were within the phylum Proteobacteria (69.2%) and the genus *Pseudomonas* (24.8%). Among the 107 isolates, at least 2 strains should represent 2 potential novel species. One hundred and five strains were selected to investigate heavy-metal tolerance and results showed that 73.3% and 8.6% isolates could grow under 1000 mg/L Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>, respectively. Most strains were more sensitive to Cd<sup>2+</sup> than Pb<sup>2+</sup>. Isolates from tin mine tunnel adit were more sensitive to Cd<sup>2+</sup> or Pb<sup>2+</sup> than those from tin tailings area. Moreover, 2 strains (DT47-2A and DT50-1) can grow under both 1000 mg/L Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>. [Conclusion] There is abundant bacteria as well as source of novel taxa in Gejiu tin mining area. Most of them had the ability of high resistance against heavy-metal Cd<sup>2+</sup> or Pb<sup>2+</sup>.

**Keywords:** tin mining area, culture-dependent method, bacterial diversity, 16S rRNA gene homology, heavy-metal

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200138, 41201321, 31000003, 31160123) and by the Yunnan Provincial Sciences and Technology Department (2009DA002)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-871-65034621; E-mail: xlcul@ynu.edu.cn

Received: 7 March 2013 / Revised: 28 May 2013