



# 耐镉促生缺陷短波单胞菌 Y01Z 的分离与表征

张媛<sup>1</sup>, 吴叶亮<sup>1</sup>, 项德发<sup>1</sup>, 肖铭<sup>1</sup>, 张献华<sup>1</sup>, 李亚东<sup>1</sup>, 谢尚潜<sup>2</sup>, 喻雪婧<sup>1\*</sup>

1 湖北大学生命科学学院 生物催化与酶工程省部共建国家重点实验室 湖北省生物资源绿色转化协同创新中心 湖北省工业生物技术重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 海南大学林学院 热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室, 海南 海口 570228

张媛, 吴叶亮, 项德发, 肖铭, 张献华, 李亚东, 谢尚潜, 喻雪婧. 耐镉促生缺陷短波单胞菌 Y01Z 的分离与表征[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4769-4782.

ZHANG Yuan, WU Yeliang, XIANG Defa, XIAO Ming, ZHANG Xianhua, LI Yadong, XIE Shangqian, YU Xuejing. Isolation and characterization of a cadmium-tolerant and plant growth-promoting bacterium, *Brevundimonas diminuta* Y01Z[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4769-4782.

**摘要:**【目的】本研究旨在从湖北地区镉污染严重的水稻根际土壤中, 分离并鉴定能耐受高浓度的镉离子, 同时具有镉去除能力和促进植物生长的细菌。【方法】采用稀释涂布平板和镉浓度梯度驯化的方法, 成功分离出一株最高可耐受 700 mg/L CdCl<sub>2</sub> 且稳定生长的菌株, 命名为 Y01Z, 并结合形态学、生理生化和分子生物学等方法对其进行鉴定。【结果】结果显示该菌株属于缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*), 其最适生长条件为 pH 值 7.0、温度 30 °C、NaCl 浓度 0.5%。扫描电镜和透射电镜分析显示, Y01Z 通过拉长细胞尺寸以确保在高浓度镉处理下的生存和繁殖, 同时能吸附镉离子, 并将其输送到细胞内沉积。傅里叶变换红外光谱分析显示, Cd<sup>2+</sup>与细菌表面羧基、羟基、羰基和酰胺等官能团结合。经过 104 h 的培养, Y01Z 菌株能够去除高达 75% 的总添加镉, 从 300 mg/L 降至 74.73 mg/L。此外, 该菌株还具有促进植物生长的功能, 如溶解磷, 产生铵态氮和吲哚乙酸, 并含有嗜铁载体等物质。【结论】本研究探讨了缺陷短波单胞菌 Y01Z 在耐镉、植物促生方面的性质, 以及在修复镉污染土壤方面的应用前景。本研究为深入探究根际微生物与植物之间的互作关系, 并开发高效的镉修复菌剂和绿色农业提供了理论依据。

**关键词:** 耐镉细菌; 缺陷短波单胞菌; 植物促生; 镉修复; 根际细菌

资助项目: 国家重点研发计划(201910701003011); 中国博士后科学基金(2020M672433); 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室开放课题基金

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (201910701003011), the China Postdoctoral Science Foundation (2020M672433), and the Open Research Fund Program of State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering.

\*Corresponding author. E-mail: xuejing.yu@hubu.edu.cn

Received: 2023-05-08; Accepted: 2023-07-27; Published online: 2023-07-31

# Isolation and characterization of a cadmium-tolerant and plant growth-promoting bacterium, *Brevundimonas diminuta* Y01Z

ZHANG Yuan<sup>1</sup>, WU Yeliang<sup>1</sup>, XIANG Defa<sup>1</sup>, XIAO Ming<sup>1</sup>, ZHANG Xianhua<sup>1</sup>, LI Yadong<sup>1</sup>, XIE Shangqian<sup>2</sup>, YU Xuejing<sup>1\*</sup>

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei Key Laboratory of Industrial Biotechnology, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics and Germplasm Innovation of Tropical Special Trees and Ornamental Plants, College of Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

**Abstract: [Objective]** This study aims to isolate and characterize the bacteria with tolerance to cadmium ions and the abilities to remove cadmium and promote plant growth from the rice rhizosphere soil in Hubei province, China. **[Methods]** Using the dilution-plate spreading and gradient domestication methods with cadmium concentration gradients, we isolated a bacterial strain named Y01Z, which demonstrated stable growth and could tolerate 700 mg/L CdCl<sub>2</sub>. The strain was then identified based on morphological, physiological, biochemical, and molecular biological characteristics. **[Results]** Y01Z was identified as *Brevundimonas diminuta*, with the optimal growth conditions of pH 7.0, 30 °C, and 0.5% NaCl. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) revealed that Y01Z elongated its cells under high cadmium concentrations to ensure survival and reproduction. Moreover, it accumulated cadmium ions and transported them intracellularly. Fourier transform infrared spectroscopy indicated that Cd<sup>2+</sup> bound to carboxyl, hydroxyl, carbonyl, and amide functional groups on the cell surface. After 104 hours of cultivation, *B. diminuta* Y01Z removed 75% of the total added cadmium, reducing the cadmium concentration from 300 mg/L to 74.73 mg/L. Additionally, the bacterium exhibited plant growth-promoting properties, including solubilization of phosphorus, production of amino nitrogen and indole-3-acetic acid, and possession of iron-chelating agents. **[Conclusion]** The findings suggest that *B. diminuta* Y01Z has significant potential for rhizobacteria-mediated remediation of cadmium-contaminated soils and the promotion of sustainable agriculture practices.

**Keywords:** cadmium-tolerant bacterium; *Brevundimonas diminuta*; plant growth-promoting property; remediation of cadmium contamination; rhizobacteria

镉(Cadmium, 符号 Cd)是一种有毒、非必需的重金属元素,普遍存在于土壤、水和空气中<sup>[1]</sup>。根据 2021 年中国生态环境状况公报,镉已成为我国农田土壤的首要污染物<sup>[2]</sup>。在水稻栽培过程中,因其流动性大、难以分解等特性,镉会被水

稻根系所吸收并积累,在一定程度上导致“镉大米”现象的发生<sup>[3-4]</sup>。由于人们长期食用镉含量超标的稻米可能诱发多种疾病,如骨质疏松、肾脏损伤、性功能障碍和癌症等<sup>[5]</sup>,因此,限制水稻中镉的积累并解决镉污染问题已迫在眉睫。

目前, 存在 3 种可行的水稻镉污染修复方法: 物理、化学和生物修复<sup>[6]</sup>。物理修复主要包括淋洗法、翻土法和换土法, 这些方法可以降低或清除土壤中的镉。化学修复则是利用钝化剂对镉离子进行吸附和螯合。生物修复是借助动物<sup>[7]</sup>、植物<sup>[8]</sup>和微生物<sup>[9]</sup>等生物体来吸收土壤中的镉或者将其转化为毒性较小的形态<sup>[10]</sup>。其中, 生物修复因其费用低、操作简单、可持续、无二次污染等优势而备受研究人员的关注。

近年来, 植物促生根际细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)技术已成为修复土壤镉污染的研究热点<sup>[9-12]</sup>。在遭遇镉胁迫时, PGPR 可以通过生成胞外多糖和铁载体来吸附和固定镉, 并通过提高酚类化合物水平、增加渗透压<sup>[13]</sup>等方式来减轻植物所受金属毒性。此外, PGPR 也能够促进植物生长。例如, 它们可以分泌植物促生剂、溶解磷酸盐、固氮, 以及通过 ACC 脱氨酶减少乙烯过度产生并增加碳、氮来源, 甚至产生铁载体等<sup>[14]</sup>。目前, 研究人员已成功分离鉴定了多种耐镉的植物促生菌: 包括嗜麦芽窄食单胞菌 R5-5<sup>[15]</sup>, 内生菌 S28<sup>[16]</sup>, 以及芽孢杆菌 HNR-4<sup>[17]</sup>。然而, 公开报道的耐镉植物促生菌品种较为单一, 并需要进一步加强其耐镉能力和去除镉的能力。

缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)是一种常见的根际微生物, 其能够通过共生关系促进植物生长<sup>[18]</sup>。该菌属于柄杆菌(*Caulobacteraceae*)家族的革兰氏阴性非发酵菌, 由于该细菌直径和长度较小, 经常被用作挑战微生物来测试除菌过滤器的微生物拦截能力, 因此被广泛应用于生物技术和制药业等领域<sup>[19]</sup>。早期的研究表明该菌具有吸附重金属离子的能力, 并在污染土壤修复方面具有应用潜力。Singh 等<sup>[18]</sup>从水稻根际中分离的缺陷短波单胞菌 NBRI012 表现出耐受高浓度的砷的特性; Mirhendi 等<sup>[20]</sup>的研究表明, 该菌

能在细菌表面形成 ZnO 纳米颗粒以固定锌; Ali 等<sup>[21]</sup>从矿区土壤中分离出对 Cd 和 Zn 有很高的耐受性的缺陷短波单胞菌, 在 pH 值为 7 和温度为 30 °C 时分别可以沉淀出高达 99.2%和 99.7%的溶解 Cd 和 Zn。然而, 目前该菌在镉污染修复方面的研究报道相对较少。因此, 对植物促生根际细菌缺陷短波单胞菌的分离和性质鉴定具有重要的理论和实际意义。进一步的研究可以更好地了解该菌在生态系统中的作用, 并为其在生物技术和环境修复等领域的应用提供更加可靠的理论依据。

本研究选取湖北地区镉污染稻田中分离的耐镉促生植物根际细菌作为研究对象, 利用形态学、生理生化和分子生物学等多种方法进行深入探究。在探究过程中, 成功鉴定出该细菌为缺陷短波单胞菌, 并进一步探究了其镉的结合位点, 以揭示其吸附镉离子的分子机制。此外, 还测定了耐镉细菌对镉的吸附效果, 并研究了其促进植物生长的特性, 以评估其在降低水稻中镉含量方面的应用潜力。本研究的结果不仅能为开发新型高效镉修复菌剂提供所需的试验材料, 还为深入探究促生根际细菌对水稻生长、养分吸收和镉积累的影响提供理论依据和实践意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种来源

本研究针对湖北省大冶市镉污染稻田, 所选取的土壤层为根际 0–20 cm (pH 5.9)。通过使用石墨炉原子吸收分光光度法(标准编号 GB/T 17141)进行测定, 该土壤的镉含量为 0.8 mg/kg。这一数值已经超过中华人民共和国国家标准土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准(试行) GB15618—2018 中, 土壤总镉 0.4 mg/kg (5.5<pH 值≤6.5)的限值, 表明该土壤存在镉污染, 需要采取措施进行治理和修复。

## 1.2 培养基及试剂

### 1.2.1 培养基

肉汁胨培养基(nutrient broth, NB): 在 1 L 水中加入 5 g NaCl, 3 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 调节 pH 值为 7.2–7.4。每 100 mL 的 NB 培养基中加入 1.5 g 琼脂即为肉汁胨固体培养基(NA)。

### 1.2.2 试剂

(1) 沙尔科夫斯基(Salkowski)比色液: 在 450 mL 35%高氯酸中加入 1 mL 0.5 mol/L FeCl<sub>3</sub> 溶液。

(2) 蔡氏试剂: 称取 11.5 g HgI<sub>2</sub>, 8 g KI, 溶于 50 mL 水中, 再缓慢加入 20% NaOH 溶液, 定容至 100 mL。

(3) API 20NE 20050 试剂盒。

## 1.3 耐镉菌株 Y01Z 的分离及纯化

从镉污染严重的土壤中采集水稻根际土样, 使用无菌水将土壤样品重悬后, 将土壤悬浊液接种到含有 300 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 NB 培养基中, 在 28 °C 和 220 r/min 的条件下进行培养。适当稀释后, 将得到的细菌悬浊液涂布于平板上, 并挑取出长势良好、具有代表性的单菌落, 将其接种到含有不同浓度(400、500、600、700 和 800 mg/L) CdCl<sub>2</sub> 的 NB 培养基中。在含有 700 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 NB 培养基中, 选取能够生长且在 48 h 内生长良好的细菌进行划线纯化。经过几轮传代后, 最终得到一株能够在含高浓度镉培养基中稳定生长的纯化菌株 Y01Z。将纯化的菌株与灭菌甘油(终浓度为 30%)混合, 并储存在-80 °C 的冰箱中备用。

## 1.4 耐镉菌株的分子生物学鉴定

利用微波炉法快速抽提耐镉菌株 Y01Z 的基因组 DNA<sup>[22]</sup>。以该 DNA 为模板, 采用通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对其 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物送至武汉金开瑞生物科技有限公司进行测序。所得序

列经过 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)同源比对, 然后使用 MEGA11 软件中的相邻连接法构建系统发育树。在此过程中, 采用大春芽杆菌(*Caulobacter daechungensis*) H-E3-2 的 16S rRNA 基因作为外源菌序列。由于大春芽杆菌(*Caulobacter daechungensis*) H-E3-2 与耐镉菌株 Y01Z 同属于柄杆菌科, 因此使用其 16S rRNA 基因作为外源菌序列可以增加 PCR 扩增的特异性和敏感性。

## 1.5 Y01Z 菌株的形态学观察

为研究细菌 Y01Z 形态结构和表面特征, 分别使用扫描电镜和透射电镜对其进行观测。具体的细菌固定化处理和样品制备步骤如下: 首先, 将 Y01Z 以 1:100 的比例分别接种到含有 0 mg/L 和 600 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 100 mL 的 NB 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 条件下培养 24 h。接着, 取适量菌液进行离心处理, 去除上清液, 并使用(phosphate buffered saline, PBS)磷酸缓冲液(pH 值 7.2–7.4)清洗菌体 3 次。然后, 清洗后的菌体加入 2.5%戊二醛进行固定处理, 固定时间为 1–3 h。接下来, 将样品分别在 30%、50%、70%、80% 和 90%浓度的梯度乙醇溶液中脱水, 每次脱水 15 min。随后, 在 100%乙醇中脱水 2 次, 每次 15 min, 并进行离心处理去除上清液。然后, 将样品置于 1:1 (体积分数)的乙醇和叔丁醇的混合液中脱水 15 min, 离心去上清液。最后, 使用纯叔丁醇置换酒精 2 次, 每次 15 min, 将样品放入冷冻干燥机中进行干燥处理。

### 1.5.1 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观测

取少量充分干燥的样品粉末, 将其溶于纯净水或酒精中进行超声分散。随后, 取少量溶液滴于铜网上, 并充分干燥, 使其粘附到贴好导电胶带的样品台上。最后, 进行喷金制样处理, 并在扫描电子显微镜下(EOL JSM 5310)进行观察, 工作电压为 15 kV。

### 1.5.2 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观测

首先取适量 100%无水丙酮和包埋剂(环氧树脂)的混合液(1:1, 体积比), 并将其转移至含有处理过的样品的离心管中, 浸没, 不加盖, 静置过夜。然后将样品放在纯包埋剂中浸泡 2 h, 并通过将包埋剂注入包埋板的孔中进行聚合, 接着将样品从离心管中取出, 在 35 °C 下放置在包埋板的孔中 16 h。随后, 在自然冷却后, 将包埋块在超薄切片机上进行切片。超薄切片制备完成后, 将适量的样品溶解在纯水中, 并滴加到碳支持膜上。接着, 用滤纸擦掉多余的溶液, 并迅速滴加 3%的醋酸铀染色液, 使染色液与支撑膜上的样品颗粒充分接触。随后, 用滤纸吸掉多余的染色液, 在室温下将样品烘干, 然后在透射电子显微镜(G20S-TWIN)下进行观察分析, 工作电压为 200 kV。

### 1.6 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)分析

将 Y01Z 接种至含有 0、300 和 600 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 NB 培养基中进行培养。取适量菌液离心收集菌体, 并用无菌水清洗 3 遍。然后, 将菌体真空冷冻干燥为固体粉末, 并研磨后与溴化钾以 1:100 的比例压片制样。最后, 使用红外光谱仪 Nicolet Is10 进行 FTIR 分析。

### 1.7 耐镉菌株 Y01Z 在不同镉浓度下的生长曲线测定

为了研究 Y01Z 菌株在不同镉浓度下的生长情况, 本试验将 Y01Z 以 1:100 的比例分别接种到含有 0、100、300 和 600 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 100 mL 的 NB 培养基中, 在 37 °C, 220 r/min 条件下进行培养。定时取样, 并使用酶标仪(PowerWave, BioTek)测定其 OD<sub>600</sub> 值。每个试验重复 3 次。根据测定结果, 绘出 Y01Z 在 CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0、100、300 和 600 mg/L 下的生长曲线。

### 1.8 耐镉菌株 Y01Z 对镉离子去除率测定

为了研究 Y01Z 菌株对高浓度镉的吸收能

力, 本试验将 Y01Z 菌株分别接种到 100 mL 含有 300 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 NB 培养基和不含 Cd 的 NB 培养基(对照)中, 在 37 °C, 220 r/min 条件下进行培养 5 d。定期取 1 mL 培养物, 离心除去沉淀, 并用 0.22 μm 过滤器过滤。利用石墨炉原子吸收光谱仪 WYG2200 (Wayeal)测定培养基中的镉浓度。该试验至少重复 3 次。根据测定结果, 计算 Y01Z 对镉离子的去除能力。去除率的计算公式为: 去除率(%)=(C<sub>0</sub>-C<sub>1</sub>)/C<sub>0</sub>×100  
式中: C<sub>0</sub> 为总加入镉的浓度(mg/L); C<sub>1</sub> 为培养基中镉的浓度(mg/L)。

### 1.9 耐镉菌株 Y01Z 在镉污染土壤中的应用

为了研究耐镉菌株 Y01Z 在镉污染土壤中的应用, 采取了镉污染土样灭菌处理。每 250 g 加入 100 mL 菌液(7.8×10<sup>12</sup> CFU/mL), 同时加入等量 NB 培养基作为对照。每个处理重复 3 次。将处理后的土样室温放置 5 d 后, 将其自然风干研磨并过筛。接着, 分别取 5 g 土样, 加入 25 mL 二乙基三胺五乙酸(diethylenetriaminepenta acetic acid, DTPA)浸提剂, 在 25 °C、180 r/min 振荡提取 2 h。将提取液 100 °C 加热 30 min, 离心过滤后, 利用石墨炉原子吸收光谱仪 WYG2200 (Wayeal)测定, 并用《中华人民共和国国家标准 GB/T 23739—2009》计算有效镉浓度。

### 1.10 耐镉菌株 Y01Z 的植物促生能力测定

为了检测菌株 Y01Z 固氮、溶磷、产铵态氮、产嗜铁载体及生长激素吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的能力, 参考了本课题组之前的试验方法<sup>[23]</sup>, 具体方法如下:

(1) 固氮能力检测: 对固氮酶基因 *nifD* 和 *nifH* 进行 PCR 扩增, 并将 Y01Z 分别接种到无氮源的阿须贝(Ashby)培养基和 JNFb 无氮(nitrogen free)培养基中观察其是否生长, 以及培养基颜色变化来检测该菌株的固氮能力。

(2) 溶磷能力检测: 采用钼锑抗比色法定量

检测细菌的溶磷能力<sup>[24]</sup>。具体来说,将细菌悬浮液离心后,得到上清液,用2,4-二硝基酚作为指示剂进行比色测定,根据磷标准溶液绘制的标准曲线计算磷酸盐-磷的含量。

(3) 产铵态氮能力检测:采用萘氏试剂比色法定量测定细菌产铵态氮的能力<sup>[25]</sup>。具体来说,将在蛋白胨水培养基中培养的细菌悬浮液离心后,得到上清液与萘氏试剂混合反应测定其 $OD_{420}$ ,根据氨标准溶液曲线绘制的标准曲线计算产生氨的含量。

(4) 产植物生长激素 IAA 的能力检测:通过测定细菌悬浮液的 $OD_{600}$ 值,以及 Salkowski 比色法来计算每单位体积的细菌悬浮液所分泌的 IAA 数量。

(5) 产嗜铁载体能力检测:采用高氯酸铁分光光度法定量检测细菌产嗜铁载体的能力<sup>[26]</sup>。具体来说,将细菌悬浮液离心后,得到上清液,与高氯酸铁溶液混合测定 $OD_{495}$ ,根据甲磺酸去铁胺标准曲线计算铁载体的产量。

### 1.11 统计分析

本试验采用 GraphPad 和 Origin 软件进行统计分析绘图。通过 Multiple  $t$  test 分析不同处理组之间的差异,确定各处理组之间的极显著性差

异( $P<0.001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 Y01Z 的鉴定

本研究从湖北地区镉污染严重的土壤中采集了水稻根际土样。通过稀释涂布平板和镉浓度梯度驯化的方法,成功分离出一株最高可耐受 700 mg/L  $CdCl_2$  且稳定生长的菌株,编号为 Y01Z。Y01Z 在 NB 固体培养基上 30 °C 培养 48 h 后,菌落呈圆形乳白色,表面光滑,中间凸起,质地较湿润等特征,如图 1A 所示。通过扫描电镜下观察, Y01Z 呈杆状纺锤形,细胞大小约为 $(0.4-0.5) \mu m \times (0.6-1.2) \mu m$ ,无芽孢(图 1B)。

Y01Z 的生理生化试验表明,该细菌是一种革兰氏阴性菌,无荧光,兼性好氧。它不能利用右旋糖、左旋阿拉伯糖、右旋甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、D-麦芽糖、葡萄糖酸钾、羊蜡酸、己二酸、枸橼酸钠和苯乙酸。此外,它不能将硝酸盐还原为亚硝酸盐和氮气、不产生吲哚、不能发酵葡萄糖、有精氨酸二水解酶活性、可分解尿素、可水解七叶苷柠檬酸铁、无蛋白酶活性、无  $\beta$ -半乳糖苷酶活性、有过氧化氢酶活性,能利用丙二酸盐。对四环素、壮观霉素和庆大霉素都很敏

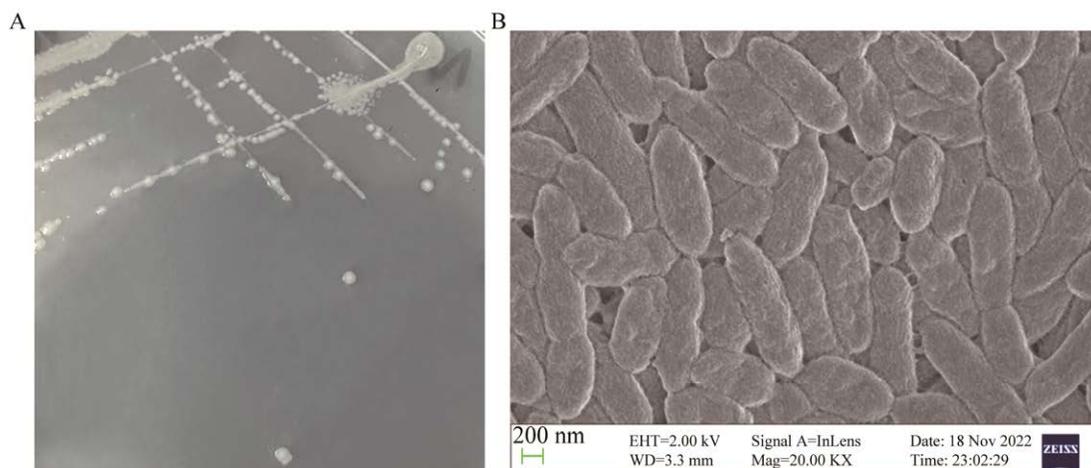


图 1 Y01Z 的形态特征

Figure 1 Morphological characterization of the Y01Z strain. A: Colony image. B: SEM image.

感。这些生理生化特性都与伯杰氏系统细菌学手册中指出的 *Brevundimonas diminuta* 的生理生化性质一致。

采用 16S rRNA 扩增法对 Y01Z 菌株进行分子生物学鉴定, 所得基因序列与缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*) 的相似度最高 (>99.8%)。系统发育树的结果(图 2)进一步表明, 菌株 Y01Z 与 *Brevundimonas diminuta* 聚类为同一分支, 相似度为 100%。因此, 结合菌株形态, 生理生化特征和 16S rDNA 序列比对分析, 最终确定 Y01Z 是一株缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*), 将其 16S rDNA 序列在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站上进行注册, 登录号为 OQ788288。

## 2.2 Y01Z 菌株响应镉胁迫的形态变化

利用扫描电镜(scanning electron microscope,

SEM)观察 Y01Z 菌株在高浓度  $\text{CdCl}_2$  处理下的表面形态。结果如图 3 所示, 在含有 600 mg/L  $\text{CdCl}_2$  的 NB 培养基中培养出的菌株 Y01Z, 其细胞尺寸(图 3D、3E, 图 4)明显长于无镉处理的对照组(图 3A、3B), 平均尺寸为  $(0.2-0.3) \mu\text{m} \times (1.2-2.5) \mu\text{m}$ 。此结果表明 Y01Z 可能通过拉长细胞尺寸以其确保在高镉浓度下的生存和繁殖。另外, 图 3C 和 3F 中显示的能量色散 X 射线显微分析(energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX)结果证实了细菌表面存在镉元素, 由此证明了 Y01Z 能积累镉离子。

为了更全面了解 Y01Z 菌株对镉的吸附情况, 利用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察细胞表面及内部镉元素的空间分布。由图 4 可以看出, 在含有 600 mg/L  $\text{CdCl}_2$  的培养基中培养的 Y01Z 能有效地将镉沉积在细胞体内。以上试验结果表明该耐镉菌株能够吸附镉离子并将其输送到细胞内部。

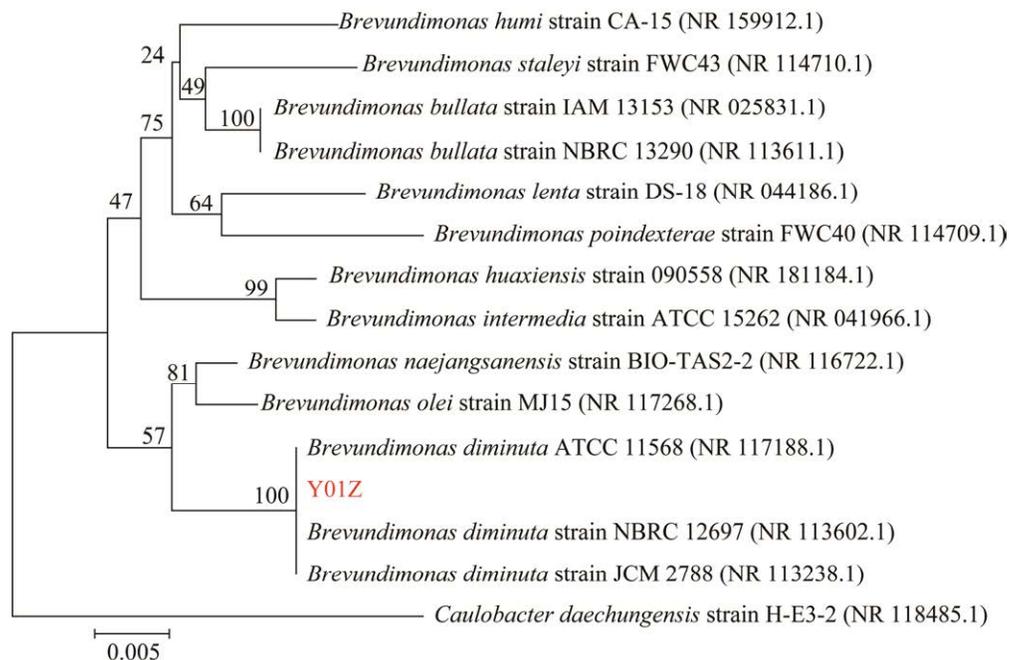


图 2 耐镉菌株 Y01Z 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of cadmium-resistant strain Y01Z. Bootstrap values based on 1 000 replications are listed as percentages at the branching points. The accession number for each strain is given in parentheses. The scale bar represents 0.005 substitutions per nucleotide position.

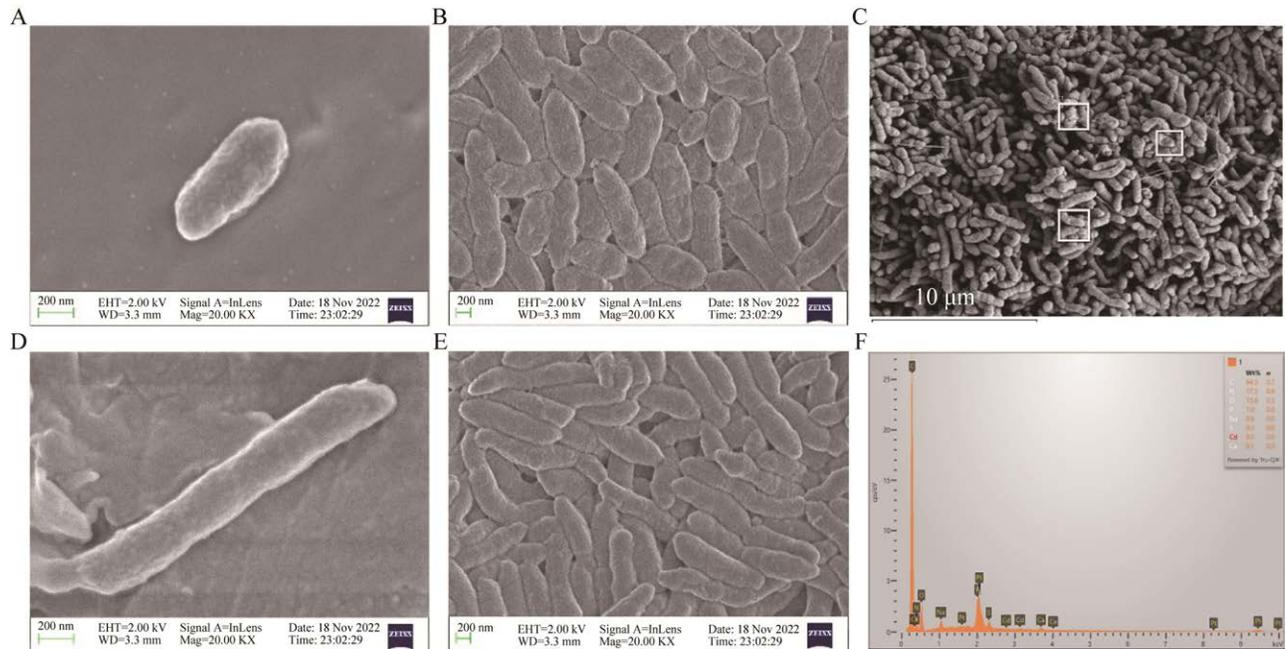


图 3 不同镉浓度胁迫下菌株 Y01Z 的 SEM 图像及 EDX 元素分析

Figure 3 SEM analysis of strain Y01Z in the absence of  $\text{CdCl}_2$  (A, B), in the presence of 600 mg/L  $\text{CdCl}_2$  (C, D, E), and EDX analysis of strain Y01Z exposure to 600 mg/L  $\text{CdCl}_2$  (F).

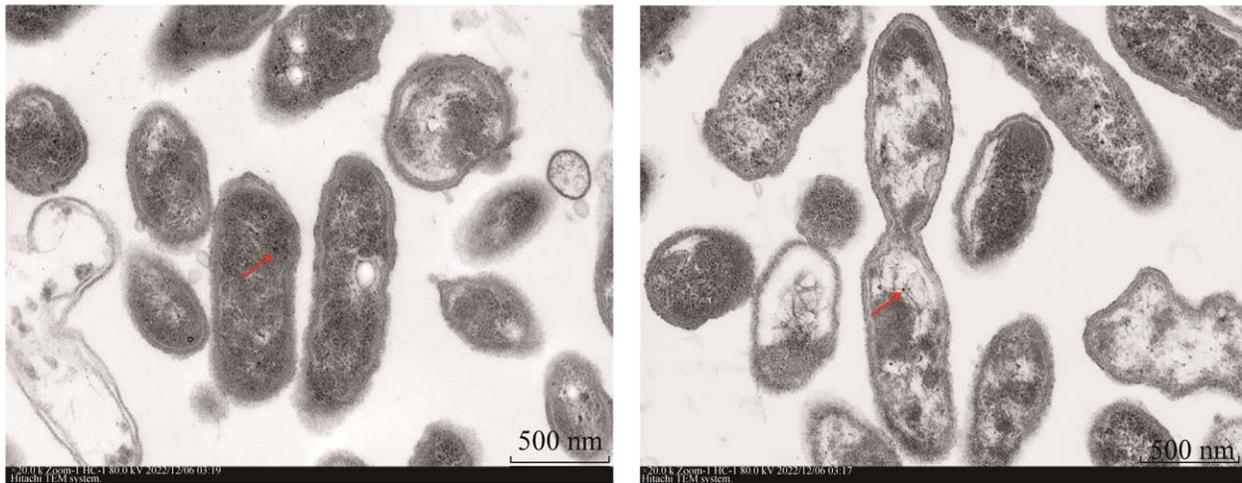


图 4 600 mg/L 镉胁迫下菌株 Y01Z 的 TEM 图像

Figure 4 TEM analysis of strain Y01Z exposure to 600 mg/L  $\text{CdCl}_2$ . Red arrows represent Cd deposition.

### 2.3 *Brevundimonas diminuta* Y01Z 与镉结合的官能团

利用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)分析鉴定 *B. diminuta*

Y01Z 在吸附镉过程中的具有重要作用的官能团。如图 5 所示, 菌株 Y01Z 吸附镉前后的红外光谱图的峰型基本保持一致, 吸附后没有新的谱带出现, 表明吸附过程中镉未对菌体细胞壁造成

破坏。从镉吸附前后特征峰值强度变化可知<sup>[27]</sup>, 菌株 Y01Z 吸附镉主要利用细胞表面的羟基(-OH, 吸收峰在 3 394.20–3 306.77  $\text{cm}^{-1}$ 处), 亚基(-CH<sub>2</sub>)和甲基(-CH<sub>3</sub>)中的饱和-CH (吸收峰在 2 926.42–2 926.70  $\text{cm}^{-1}$ 处), 酰胺基团(-RCONH<sub>2</sub>, 吸收峰在 1 654.84–1 657.67  $\text{cm}^{-1}$ 和 1 535.81–1544.60  $\text{cm}^{-1}$ 处), P=O (吸收峰在 1 237.89–1 241.55  $\text{cm}^{-1}$ 处)和脂肪醚 C-O-C (吸收峰在 1 067.50–1 082.78  $\text{cm}^{-1}$ 处)。综上结果表明, C-OH、C-H、C=O、-NH 和-NH<sub>2</sub>是重金属吸附的主要位点。

#### 2.4 *B. diminuta* Y01Z 的最适生长条件

为了探究 *B. diminuta* Y01Z 菌株的最适生长条件, 进行了不同温度、pH 和盐浓度对其生长的研究。试验结果表明, 该菌株能够在 LB 和 NB 培养基中正常生长。在生长温度为 30 °C, pH 值为 7.0, NaCl 浓度为 0.5%的条件下, *B. diminuta* Y01Z 的生长表现最佳(图 6)。然而, 当盐浓度大于 1.5%或者培养基中的 pH 值小于 6 时, 该菌株生长受到了抑制。

#### 2.5 不同镉浓度胁迫下, 菌株 Y01Z 的生长曲线

研究 Y01Z 菌株在不同浓度的 CdCl<sub>2</sub> 培养基

中的生长情况。试验结果表明, 镉对 Y01Z 菌株的最小抑制浓度为 700 mg/L(图 7A)。低浓度的镉(100 mg/L)对 Y01Z 菌株的生长影响很小, 但当浓度增加到 300 mg/L 时, Y01Z 细胞生长缓慢, 并且由于镉的毒性经历了一个延长的滞后期。在 600 mg/L CdCl<sub>2</sub> 条件下, 菌株的生长受到更严重的抑制, 进入对数期后的生长量也进一步下降(图 7B)。

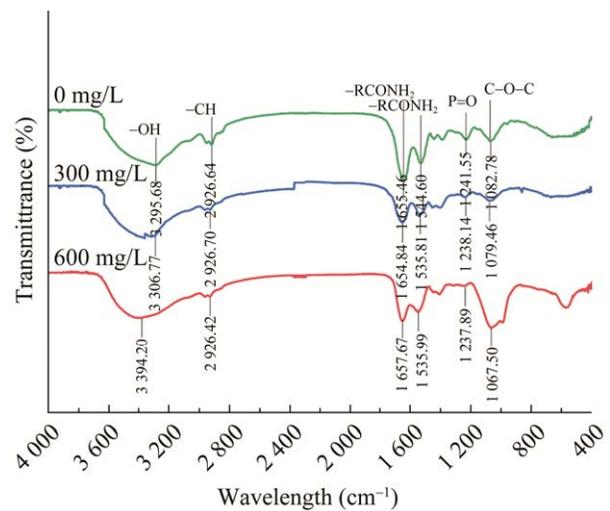


图 5 菌株 Y01Z 吸附镉前后的红外光谱图

Figure 5 FTIR analysis of strain Y01Z exposure to 0, 300 and 600 mg/L CdCl<sub>2</sub>.

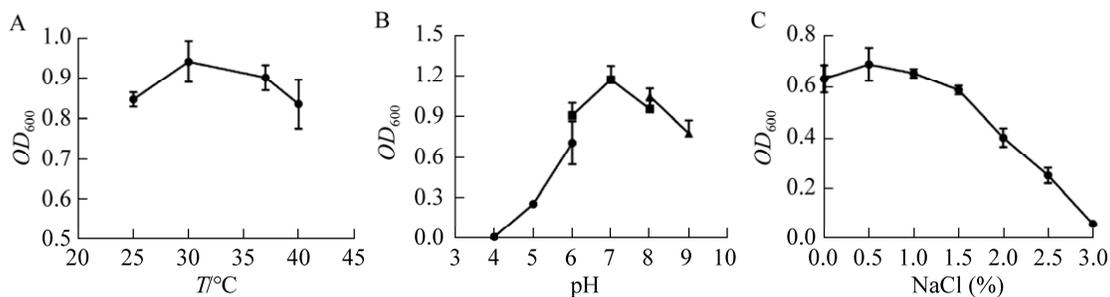


图 6 不同温度、pH 和 NaCl 浓度对菌株 Y01Z 生长的影响

Figure 6 Effect of various temperatures (A), pH (B), and NaCl concentrations (C) on the growth of strain Y01Z. The values presented are the mean of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations of the mean.

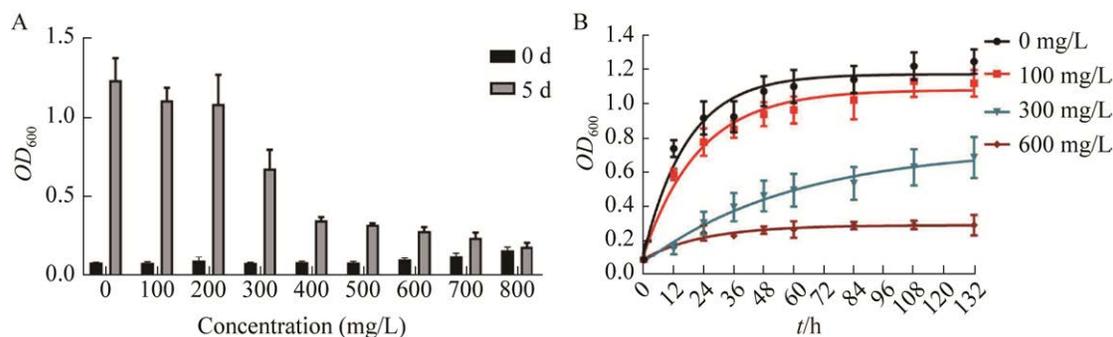


图 7 不同镉浓度对 Y01Z 生长的影响

Figure 7 Effect of different cadmium concentrations on the growth of Y01Z. A: The minimum inhibitory concentration (MIC) of Y01Z strain against cadmium. B: Growth curves of Y01Z strain under exposure to varying concentrations of cadmium. The values presented are the mean of three independent experiments  $\pm$  standard deviations.

## 2.6 耐镉菌株 Y01Z 的镉去除率

*B. diminuta* Y01Z 菌株在初始浓度为 293.23 mg/L CdCl<sub>2</sub> 的 NB 培养基中生长。随着生长的进行, 培养基中镉的含量逐渐降低(图 8A)。在 104 h 后, 培养基中的镉含量从 293.23 mg/L 降至约 74.73 mg/L, 这表明 Y01Z 细胞能够去除高达 75% 的总添加镉。进行 5 组的重复试验, 结果验证了 Y01Z 菌株能有效地去除培养里中的镉离子, 与对照组相

比, 两者差异极显著( $P < 0.0001$ ) (图 8B)。

## 2.7 耐镉菌株 Y01Z 的在镉污染土壤中的应用

将 *B. diminuta* Y01Z 菌株加入初始有效镉浓度约为 0.8 mg/kg 的镉污染土壤中。5 d 后, 土壤中有效镉的含量明显降低, 有效镉浓度从 0.814 mg/kg 降至约 0.047 mg/kg, 这表明 Y01Z 细胞能够去除土壤中有效镉的含量。

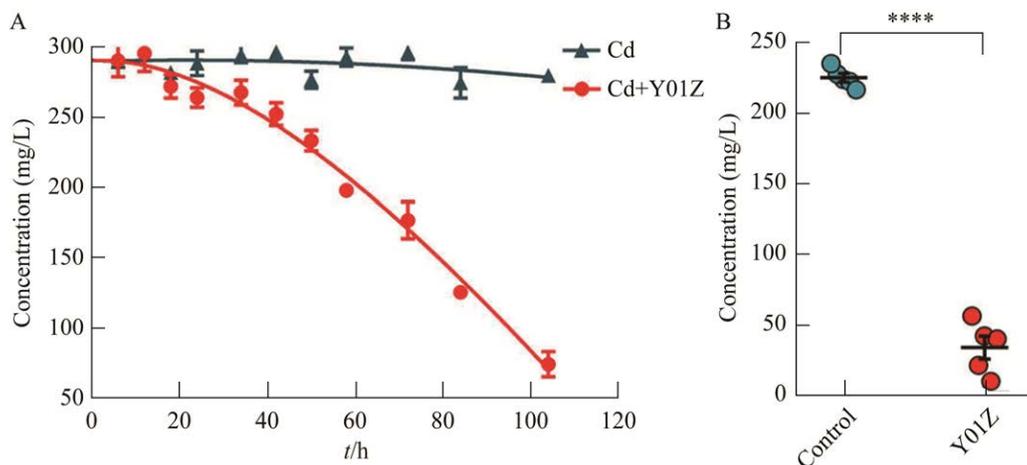


图 8 Y01Z 菌株对镉的吸附能力

Figure 8 Cadmium concentration in *Brevundimonas diminuta* Y01Z cultivation compared with control. A: NB medium with 293.23 mg/L cadmium supplementation. Error bars represent the standard deviations of the mean ( $n=3$ ). B: NB medium with 225 mg/L cadmium supplementation. Error bars represent the standard deviations of independent experiments ( $n=5$ ). \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

## 2.8 Y01Z 菌株促生能力的评估

Y01Z 是一株从稻田土壤中分离的根际细菌。通过检验该菌株固氮、溶解有机磷、产生铵态氮、吡啶乙酸、1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶以及嗜铁载体等能力,进一步评估了该菌株是否能促进植物生长。综合结果显示该菌株虽然不能固氮,但它具有溶解有机磷的能力,并且可以产生 63.61 mg/L 的铵态氮和 5.97 mg/L 吡啶乙酸等植物生长相关的代谢产物。此外,发现该菌株含有 5.70 mg/L 嗜铁载体,可能有助于提供植物所需的铁元素(表 1)。

## 3 讨论

近年来,利用微生物修复土壤镉污染已成为研究热点。前期研究发现,细菌能通过表面电荷、代谢产物和调节细胞内 pH 等方式结合和储存镉离子,同时通过分泌螯合剂稳定和缓慢释放镉离子<sup>[10]</sup>,为修复镉污染提供了可能性。

本研究成功地从湖北地区镉污染严重的水稻根际土壤中分离和鉴定出一株缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) Y01Z,该细菌能够在高达 700 mg/L 的镉离子浓度下生存。值得注意的是:研究发现 Y01Z 可能通过拉长细胞尺寸来确保在高镉浓度下的生存和繁殖。细菌已发展

出复杂的遗传和生化程序来严格控制细胞的尺寸,但也保留了一些基因编码的蛋白质,专门用于在特定条件下有目的的改变细菌细胞的整体长度<sup>[28]</sup>。例如,当细菌新陈代谢发生变化或出现 DNA 损伤时,细胞会不间断生长而不经历细胞分裂,从而导致拉长细胞体的出现。因此,这种形态上的改变可能与菌株特定的生物途径有关,推测其可能存在如渗透屏障、流出泵、细胞内存储和沉淀镉离子、酶解和还原镉离子等机制,以帮助其在高浓度镉环境中生存。

此外,本研究发现, Y01Z 菌株能利用细胞表面的羧基、羟基、羰基和酰胺基团与  $\text{Cd}^{2+}$  离子结合,并将其输送到细胞内沉积。这些机制与此前的研究<sup>[10]</sup>一致。缺陷短波单胞菌菌体表面的羟基、羰基和酰胺基团可以与重金属离子形成配位键,从而将其吸附在细胞表面。例如, *B. diminuta* MYS6 菌株可以通过细胞表面羧酸、醇和脂肪族胺基吸附 Cu 离子,从而减少了环境中的铜污染<sup>[29]</sup>。然而,镉的吸附和输运可能涉及多种蛋白质和信号通路的参与,需要进一步研究以深入地了解其分子机制。

研究表明, Y01Z 菌株在高浓度的镉环境中(300 mg/L),能显著减少培养基中的镉含量,从而能去除高达 218.5 mg/L 的总添加镉。相比之前发现的 *B. diminuta* 对镉的去除能力为 39.86 mg/L<sup>[21]</sup>, Y01Z 菌株表现出更强的耐镉能力和镉去除能力。与枯草芽孢杆菌、柠檬酸杆菌、蜡样芽孢杆菌<sup>[30]</sup>和铜绿假单胞菌<sup>[31]</sup>等其他适用低镉环境(10–40 mg/L)的镉生物吸附菌和降解菌相比,它也更适用于高浓度的镉环境,其在治理高浓度镉污染方面,具有重要的应用前景。

未来的研究可以深入探究 Y01Z 菌株的镉吸附机制,以及其对其他重金属(如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$ )的耐受性和去除能力。同时研究该菌株与其他微生物菌株的联合应用,以实现更好

表 1 耐镉菌株 Y01Z 的促生能力

Test item	Y01Z
Nitrogen fixation	–
Phosphate-phosphorus (mg/L)	0.48±0.06a
IAA (mg/L)	5.97±0.45b
Ammonium nitrogen (mg/L)	63.61±1.40c
Siderophore (mg/L)	5.70±0.72b

Values shown are means±standard error ( $n=3$ ). Different lowercase letters indicate that the same index is significantly different ( $P<0.05$ ). –: The corresponding performance is not detected.

的重金属生物修复效果。同时,也需要注意其在环境安全性和生产成本方面等问题。总之,本研究为开发和应用生物菌剂治理重金属污染提供了宝贵的参考。

## 4 结论

本研究成功地从湖北地区镉污染严重的水稻根际土壤中分离和鉴定出一株缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) Y01Z, 其最适生长条件为 pH 值 7.0、温度 30 °C、NaCl 浓度 0.5%。该菌株能通过细胞表面的羧基、羟基、羰基和酰胺基团结合与积累镉离子,并将其输送到细胞内部进行沉积。Y01Z 菌株能够去除高达 75% (218.5 mg/L)的总添加镉。此外,该菌株还具有促进植物生长的功能,如溶解磷,产生铵态氮和吲哚乙酸(IAA),并含有嗜铁载体等物质。

## 参考文献

- [1] GENCHI G, SINICROPI MS, LAURIA G, CAROCCI A, CATALANO A. The effects of cadmium toxicity[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(11): 3782.
- [2] 中华人民共和国生态环境部. 中国生态环境状况公报[R]. 2021.  
Ministry of Ecological Environment of the People's Republic of China. Bulletin on China's Ecological Environment[R]. 2021 (in Chinese).
- [3] SARAN A, IMPERATO V, FERNANDEZ L, GKOREZIS P, D'HAEN J, MERINI LJ, VANGRONVELD J, THIJS S. Phytostabilization of polluted military soil supported by bioaugmentation with PGP-trace element tolerant bacteria isolated from *Helianthus petiolaris*[J]. *Agronomy*, 2020, 10(2): 204.
- [4] RIAZ M, KAMRAN M, RIZWAN M, ALI S, PARVEEN A, MALIK Z, WANG XR. Cadmium uptake and translocation: selenium and silicon roles in Cd detoxification for the production of low Cd crops: a critical review[J]. *Chemosphere*, 2021, 273: 129690.
- [5] LI H, LUO N, LI YW, CAI QY, LI HY, MO CH, WONG MH. Cadmium in rice: transport mechanisms, influencing factors, and minimizing measures[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 224: 622-630.
- [6] PEERA SHEIKH KULSUM PG, KHANAM R, DAS S, NAYAK AK, TACK FMG, MEERS E, VITHANAGE M, SHAHID M, KUMAR A, CHAKRABORTY S, BHATTACHARYA T, BISWAS JK. A state-of-the-art review on cadmium uptake, toxicity, and tolerance in rice: from physiological response to remediation process[J]. *Environmental Research*, 2023, 220: 115098.
- [7] YAO ZT, LI JH, XIE HH, YU CH. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals[J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2012, 16: 722-729.
- [8] 孙婕妤, 刘艳秋, 李佰林, 周蕴薇. 植物对镉的耐性机制以及对镉污染土壤修复的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(7): 12-19.  
SUN JY, LIU YQ, LI BL, ZHOU YW. Research progress on tolerance mechanism of plants to cadmium and remediation of cadmium contaminated soil[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(7): 12-19 (in Chinese).
- [9] ZHAO XF, LEI M, GU RY. Knowledge mapping of the phytoremediation of cadmium-contaminated soil: a bibliometric analysis from 1994 to 2021[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(12): 6987.
- [10] ABBAS SZ, RAFATULLAH M, HOSSAIN K, ISMAIL N, TAJARUDIN HA, ABDUL KHALIL HS. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2018, 15(1): 243-262.
- [11] ROMAN-PONCE B, REZA-VAZQUEZ DM, GUTIERREZ-PAREDES S, DE HARO-CRUZ MD, MALDONADO-HERNANDEZ J, BAHENA-OSORIO Y, ESTRADA-DE LOS SANTOS P, WANG ET, VASQUEZ-MURRIETA MS. Plant growth-promoting traits in rhizobacteria of heavy metal-resistant plants and their effects on *Brassica nigra* seed germination[J]. *Pedosphere*, 2017, 27(3): 511-526.
- [12] HALIM MA, RAHMAN MM, MEGHARAJ M, NAIDU R. Cadmium immobilization in the rhizosphere and plant cellular detoxification: role of

- plant-growth-promoting rhizobacteria as a sustainable solution[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(47): 13497-13529.
- [13] KUMAR A, KUMARI N, SINGH A, KUMAR D, YADAV DK, VARSHNEY A, SHARMA N. The effect of cadmium tolerant plant growth promoting rhizobacteria on plant growth promotion and phytoremediation: a review[J]. *Current Microbiology*, 2023, 80(5): 1-12.
- [14] HAN YL, WANG R, YANG ZR, ZHAN YH, MA Y, PING SZ, ZHANG LW, LIN M, YAN YL. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 facilitates the growth of rice in the presence of salt or heavy metals[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(7): 1119-1128.
- [15] ZHOU JY, LI P, MENG DL, GU YB, ZHENG ZY, YIN HQ, ZHOU QM, LI J. Isolation, characterization and inoculation of Cd tolerant rice endophytes and their impacts on rice under Cd contaminated environment[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 260: 113990.
- [16] WANG YL, WANG R, KOU FL, HE LY, SHENG XF. Cadmium-tolerant facultative endophytic *Rhizobium larrymoorei* S28 reduces cadmium availability and accumulation in rice in cadmium-polluted soil[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2022, 26: 102294.
- [17] 付少委, 楚超群, 黎妮, 宋崇洋, 梁爽, 张超, 王伟平, 杨志伟. 镉污染水稻种子内生细菌的分离及其耐镉性和植物促生性研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1536-1548.
- FU SW, CHU CQ, LI N, SONG CY, LIANG S, ZHANG C, WANG WP, YANG ZW. Isolation of endophytic bacteria from cadmium-contaminated rice seeds and their cadmium tolerance and plant growth-promoting traits[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1536-1548 (in Chinese).
- [18] SINGH N, MARWA N, MISHRA SK, MISHRA J, VERMA PC, RATHAUR S, SINGH N. *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 125: 25-34.
- [19] DONOFRIO R, SAHA R, BESTERVELT L, BAGLEY S. Molecular cloning of *Brevundimonas diminuta* for efficacy assessment of reverse osmosis devices[J]. *Journal of Water and Health*, 2012, 10(2): 278-287.
- [20] MIRHENDI M, EMTIAZI G, ROGHANIAN R. Production of nano zinc, zinc sulphide and nano complex of magnetite zinc oxide by *Brevundimonas diminuta* and *Pseudomonas stutzeri*[J]. *IET Nanobiotechnology*, 2013, 7(4): 135-139.
- [21] ALI A, LI M, SU JF, LI YF, WANG Z, BAI YH, ALI EF, SHAHEEN SM. *Brevundimonas diminuta* isolated from mines polluted soil immobilized cadmium ( $Cd^{2+}$ ) and zinc ( $Zn^{2+}$ ) through calcium carbonate precipitation: microscopic and spectroscopic investigations[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 813: 152668.
- [22] 赫然, 张颖, 王强, 李刚, 王志学, 崔亮, 刘秋云, 李宝健. 利用微波炉和煮沸法快速制备大肠杆菌基因组 DNA PCR 模板[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2004(S1): 80-81.
- HE R, ZHANG Y, WANG Q, LI G, WANG ZX, CUI L, LIU QY, LI BJ. Rapid preparation of PCR templates of genomic DNA from *Escherichia coli* by using microwave and boiling[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004(S1): 80-81 (in Chinese).
- [23] 王婷, 杨升, 陈亚雪, 胡玲玲, 屠琴, 张丽, 刘雪芹, 王行国. 两株茶树内生草螺菌的微生物学特性[J]. *微生物学报*, 2014, 54(4): 424-432.
- WANG T, YANG S, CHEN YX, HU LL, TU Q, ZHANG L, LIU XQ, WANG XG. Microbiological properties of two endophytic bacteria isolated from tea (*Camellia sinensis* L.)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(4): 424-432 (in Chinese).
- [24] 郑喜清, 邸娜, 张志超, 纪晓贝. 解磷细菌的分离筛选及培养条件优化[J]. *天津农业科学*, 2020, 26(3): 44-48.
- ZHENG XQ, DI N, ZHANG ZC, JI XB. Isolation and screening of phosphate-solubilizing strains and optimization of culture conditions[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2020, 26(3): 44-48 (in Chinese).
- [25] 刘俊清, 金晓雪, 宋科稷, 贾芳, 张建峰. 一株溶磷真菌的筛选及相关促生特性初探[J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 2023, 47(3): 90-97.
- LIU JQ, JIN XX, SONG KJ, JIA F, ZHANG JF. Screening and identification of a high-efficient phosphate-solubilizing fungus *Penicillium decumbens* and analysis of its phosphate-solubilizing

- characteristics[J]. *Journal of Anhui University (Natural Science Edition)*, 2023, 47(3): 90-97 (in Chinese).
- [26] 彭雯杰, 詹伊婧, 雷鹏, 孙涛, 钱家熠, 徐虹. 阿斯青霉菌 XK-12 产铁载体特性及其抑菌活性[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(1): 73-80.  
PENG WJ, ZHAN YJ, LEI P, SUN T, QIAN JY, XU H. Characteristics of siderophores production by *Penicillium asturianum* XK-12 and its effect on antibacterial activity[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 38(1): 73-80 (in Chinese).
- [27] SHEN L, CHEN R, WANG JJ, FAN L, CUI LL, ZHANG YJ, CHENG JJ, WU XL, LI JK, ZENG WM. Biosorption behavior and mechanism of cadmium from aqueous solutions by *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(30): 18637-18650.
- [28] JUSTICE SS, HUNSTAD DA, CEGELSKI L, HULTGREN SJ. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(2): 162-168.
- [29] RATHI M, YOGALAKSHMI KN. *Brevundimonas diminuta* MYS6 associated *Helianthus annuus* L. for enhanced copper phytoremediation[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128195.
- [30] 杨文玲, 杜志敏, 孙召华, 周伏忠, 安明理, 雷高, 魏传军, 巩涛. 芽孢杆菌在重金属污染土壤修复中的研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2021, 43(6): 759-763.  
YANG WL, DU ZM, SUN ZH, ZHOU FZ, AN ML, LEI G, WEI CJ, GONG T. Research progress of *Bacillus* in remediation of heavy metal contaminated soil[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2021, 43(6): 759-763 (in Chinese).
- [31] 何小三, 王微, 肖清铁, 郑新宇, 郑梅琴, 朱静静, 韩永明, 汪敦飞, 林瑞余, 林文雄. 铜绿假单胞菌对镉胁迫水稻苗期生长与镉积累的影响[J]. *中国生态农业学报*, 2018, 26(6): 884-891.  
HE XS, WANG W, XIAO QT, ZHENG XY, ZHENG MQ, ZHU JJ, HAN YM, WANG DF, LIN RY, LIN WX. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth and cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) seedling under Cd stress[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2018, 26(6): 884-891 (in Chinese).