

大宝山矿区耐 Cd^{2+} 细菌的分离鉴定 及其生物学特性

陈美标¹ 郭建华¹ 姚青² 段锦梅¹ 冯广达¹ 蔡卓平¹ 朱红惠^{1*}

(1. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室
广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地 广东 广州 510070)

(2. 华南农业大学 园艺学院 广东 广州 510642)

摘要: 【目的】从 Cd^{2+} 污染土壤中分离获取强耐 Cd^{2+} 微生物, 研究其生物学特性。【方法】采用选择性培养基 TSA 对广东省大宝山重金属污染土壤中耐镉(Cd^{2+})细菌进行分离筛选, 结合细菌形态观察、生理生化检测、16S rRNA 基因序列分析等方法确定了它们的分类地位, 并开展了细胞形态、 Cd^{2+} 耐受性、 Cd^{2+} 吸附性、对不同 pH 和盐度适应性、以及对抗生素的抗性等生物学特性的研究。【结果】从土壤中分离到 8 株具有强耐 Cd^{2+} 能力的细菌(YN-6、YN-7、YN-8、YN-9、YN-16、YN-17、YN-18、YN-19), 初步鉴定其分别属于 *Rhizobium*、*Roseateles*、*Cupriavidus*、*Methylobacterium*、*Variovorax*、*Rhizobium*、*Achromobacter* 和 *Leifsonia* 属。细菌生物学特性研究表明, 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的形态存在一定的差异, 其中 YN-6、YN-8、YN-9、YN-16、YN-17 和 YN-18 菌体为短杆状, 而 YN-7 和 YN-19 菌体为长杆状。它们对 Cd^{2+} 的最低抑制浓度均在 3 mmol/L 以上, 且每克细胞吸附 1 mg 以上的 Cd^{2+} 。其中, 菌株 YN-8 对 Cd^{2+} 的耐受性最强(9 mmol/L), 菌株 YN-9 对 Cd^{2+} 的吸附能力最强(316.7 mg Cd^{2+} /g cells)。不同 pH、盐度和抗生素对 8 株细菌生长的影响存在较大差异。【结论】菌株 YN-8 和 YN-9 对环境的适应性较强, 可以作为较好的试验材料应用于生物修复重金属 Cd^{2+} 污染土壤的研究。

关键词: 矿区, 耐 Cd^{2+} 细菌, 分离鉴定, 生物学特性

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070103); 广东省自然科学基金重点项目(No. 10251007002000001); 广东省科技攻关项目(No. 2009B030802013)

*通讯作者: Tel: 86-20-37656629; 信箱: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-18; 接受日期: 2012-07-09

Isolation and identification, and biological characteristics of cadmium-tolerant bacteria from the Dabao Mine

CHEN Mei-Biao¹ GUO Jian-Hua¹ YAO Qing² DUAN Jin-Mei¹

FENG Guang-Da¹ CAI Zhuo-Ping¹ ZHU Hong-Hui^{1*}

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] To isolate and obtain cadmium-tolerant bacteria from polluted soil by cadmium and to study their biological characteristics. **[Methods]** The cadmium-tolerant bacteria were isolated from the heavy metals contaminated soil around the Dabao Mine, Guangdong Province by the selective TSA medium, and identified based on morphological observation, physiological-biochemical test and 16S rRNA gene sequence analysis. Their biological characteristics including morphology, Cd^{2+} tolerance and absorption, the growth range of pH and salinity as well as antibiotic resistance were investigated. **[Results]** Eight cadmium-tolerant isolates (YN-6, YN-7, YN-8, YN-9, YN-16, YN-17, YN-18 and YN-19) belonged to the genus of *Rhizobium*, *Roseateles*, *Cupriavidus*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Rhizobium*, *Achromobacter* and *Leifsonia*. They were different in the morphology, with YN-6, YN-8, YN-9, YN-16, YN-17 and YN-18 being short rod sharp, while YN-7 and YN-19 being long rod sharp. Their minimum inhibitory concentrations (MIC) of Cd^{2+} were 3 mmol/L or above, and 1 g cells could at least adsorb 1 mg Cd^{2+} . Among these strains, YN-8 was the most tolerant to Cd^{2+} (9 mmol/L) while YN-9 showed the highest adsorbing capacity of Cd^{2+} (316.7 mg Cd^{2+} /cells). The eight bacteria differed in the response to pH, salinity and antibiotic. **[Conclusion]** YN-8 and YN-9 were much more adaptive to the environment, which could be used for further studies on soil bioremediation polluted by cadmium.

Keywords: Mine, Cadmium-tolerant bacteria, Isolation and identification, Biological characteristics

作为一种具有较强毒性的重金属元素, 镉(Cd^{2+})会对生物体的生长发育产生一系列不良影响, 包括导致生物体细胞氧化损伤, 造成DNA断裂破坏, 影响细胞内含物合成代谢, 降低系统酶类活性等, 最终可能引起生物体生长缓慢甚至死亡^[1]。此外, Cd^{2+} 存在于土壤或水体等环境中, 由于其具有较强的生物活性, 可以被植物吸收进入植物体内, 通过在食物链的传递转移、富集浓缩,

能够进入到处于食物链顶端的人体内, 对人体内脏器官、血液循环系统和生殖系统等产生损伤, 产生“三致性”危害^[2]。我国土壤环境质量标准规定维护人体健康的土壤Cd限制值为0.3 mg/kg^[3]。近几十年来, 随着工业的发展, 尤其是采矿、冶炼、电镀活动的大肆进行, 大量的 Cd^{2+} 向环境排放, 使得土壤和水体的 Cd^{2+} 污染日益加重^[4]。因此, 如何有效治理 Cd^{2+} 污染问题, 成为科技工作

者目前异常紧迫的任务。

微生物修复在治理 Cd^{2+} 污染上显示出广阔的应用前景, 已逐渐引起人们的重视, 成为了目前 Cd^{2+} 环境污染治理的研究热点。土壤中的细菌种类繁多、数量巨大、代谢活动旺盛, 是土壤生态系统的重要生命体。它们可以通过吸附、络合、氧化还原等作用影响 Cd^{2+} 在土壤中的移动性和生物有效性, 从而降低 Cd^{2+} 的环境危害毒性^[5-6]。因此, 从 Cd^{2+} 污染土壤中分离筛选耐受 Cd^{2+} 的细菌是开展微生物修复治理 Cd^{2+} 污染研究的首要工作。近年来, 有学者在受重金属污染严重的土壤或水体中分离到一些耐重金属细菌, 并对其生物学特征和应用效果进行了初步的研究, 如从废水中分离的大肠杆菌(*E. coli*) ASU 7 能耐 4.4 mmol/L 的 Cd^{2+} ^[7]; Filali 等^[8]在研究废水中细菌对重金属和抗生素的抗性时发现 *Klebsiella pneumoniae* 菌株能够耐 4 mmol/L 的 Cd^{2+} ; 刘红娟等^[9]在广东南海 Cd^{2+} 污染蔬菜土壤中分离到一株耐受 2 mmol/L Cd^{2+} 的 *Bacillus cereus*, 并探讨了其富集 Cd^{2+} 的机理, 通过红外光谱发现菌株细胞壁上的化学官能团-OH、-NH、-CO 和-CO-NH-等主要参与了 Cd 的富集。然而, 由于 Cd^{2+} 环境污染的严重性、细菌种类的多样性、细菌生物特性的差异性以及重金属与细菌间相互作用的复杂性, 目前仍需要进一步深入开展对土壤细菌分离筛选及其生物学特性方面的研究工作。

广东省大宝山矿是大型铁多金属伴生矿床, 长期粗放的开采方式, 采矿废水的直接排放, 采

矿废石的大量堆积和淋滤, 对当地的土壤环境造成了严重的破坏^[10]。我们曾对大宝山矿区土壤重金属污染状况及土壤微生物群落优势种群进行分析研究^[11], 结果表明大宝山矿区土壤中的 Cd^{2+} 浓度普遍超标(超出国家土壤环境质量标准 2-28 倍)。尽管如此, 受污染土壤中的微生物资源依然保持了较高的多样性。长期生存在高浓度重金属环境中使得这些微生物具备了较强的耐受性, 因此, 值得我们对其中的耐受菌资源开展深入的发掘。本文对大宝山矿周围污染土壤中强耐 Cd^{2+} 的细菌进行分离鉴定, 并对分离鉴定的细菌株系的生物学特性开展初步研究, 以期土壤 Cd^{2+} 污染的微生物修复工作提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 取样点及土壤特性

广东省大宝山矿区位于广东省韶关市曲江县和翁源县的交界处(东经 113°40'-113°43', 北纬 24°30'-24°36'), 地处亚热带季风气候区, 土壤表层岩石风化强烈。大宝山矿山为铁多金属伴生矿床, 是一处由大型铁、铜、锌、硫铁矿床和中型铅钨矿床组成的大型矿产资源地。于 2008 年 3 月在广东省大宝山矿的水池和上坝横石河边分别取土壤样品, 并对取样土壤的基本特性进行测定分析, 结果见表 1。从表 1 中结果可知, 取样土壤的质量超出了国家土壤环境质量标准(GB15618-1995)的二级土壤规定值: Cu (100 mg/kg), Zn (250 mg/kg), Pb (300 mg/kg), Cd (0.3 mg/kg)^[3]。

表 1 取样土壤的基本特性
Table 1 Characteristics of soil samples

土壤样品 Soil samples	取样位置 Sampling position	地表植物 Ground surface vegetation	Cu 总含量 Total copper content (mg/kg)	Zn 总含量 Total zinc content (mg/kg)	Pb 总含量 Total lead content (mg/kg)	Cd 总含量 Total cadmium content (mg/kg)
6	矿山水池	香根草	772.7	1 525	2 544	4.283
14	上坝横石河边	芦苇草	649.9	496.4	2 057	0.742

1.2 大宝山矿区耐 Cd^{2+} 细菌的分离鉴定

1.2.1 细菌分离培养基及试剂: 用于细菌分离的培养基包括 TSA^[12] (胰胨 1.5%, 植物蛋白胨 0.5%, NaCl 3%, 琼脂 2.0%, ddH₂O 1 L, pH 7.2) 和 SLP^[13] [蔗糖 1%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.05%, NaCl 0.01%, 酵母膏 0.05%, 琼脂 2.0%, ddH₂O 1 L, pH 7.2]。培养基经过 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后, 加入单独灭菌的 CdCl_2 溶液, 使 Cd^{2+} 的终浓度为 1 mmol/L; 与培养基混合倒平板, 分离耐 Cd^{2+} 细菌。采用 NA 培养基(牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, 氯化钠 0.5%, 琼脂 2%, ddH₂O 1 L, pH 7.2)进行耐 Cd^{2+} 细菌的活化及其生物学特性的研究。

培养基所用的试剂、革兰氏染色试剂、芽孢染色剂以及各类碳源均购自广东环凯生物科技有限公司; PCR 扩增试剂盒和小量细菌总 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; 所用抗生素及 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 购自广州化学试剂公司。

1.2.2 耐 Cd^{2+} 菌株的分离筛选: 在无菌操作下将 10 g 土样倒入装有适量玻璃珠和 90 mL 无菌水的三角瓶中, 旋转式摇床上 30 °C、150 r/min 振荡 30 min, 分别稀释到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} , 各吸取 0.1 mL 涂布于含有 1 mmol/L Cd^{2+} 的 TSA 和 SLP 分离培养基上, 30 °C 恒温箱中倒置培养。待长出菌落后, 挑取菌落划线分离, 获得其纯培养; 进一步转接到含有 2 mmol/L Cd^{2+} 培养基中, 选用长势较好的菌为斜面保存以及冻干种, 于 4 °C 保存。

1.2.3 耐 Cd^{2+} 细菌的常规生理生化鉴定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14] 对分离筛选到的耐 Cd^{2+} 菌株进行生理生化鉴定。

1.2.4 耐 Cd^{2+} 细菌的 16S rRNA 基因序列分析: 将筛选到的耐 Cd^{2+} 细菌接种到培养基平板上, 培养过夜。取单菌落到液体培养基中摇床培养过夜,

CTAB 法^[15]提取菌株的总 DNA 为模板, 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。采用的通用引物为 F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 R1522 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[16]。PCR 反应体系(25 μL): 10 $\times$ Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL , F27 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , R1522 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 模板 DNA (10–20 mg/L) 1 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.1 μL , 加去离子水补齐到 25 μL 。反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 7 min (Eppendorf 5331, Germany)。采用 1% 琼脂糖分析检验扩增产物, 由上海英骏公司测序。将测序结果与 NCBI 上的已知序列进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), 将测序结果登录至 GenBank, 获取登录号: JQ901424–JQ901431。采用软件 MEGA 5.0 以 Neighbor-Joining 法构建耐 Cd^{2+} 菌株的系统发育树, Bootstrap 值设为 1 000。

1.3 大宝山矿区耐 Cd^{2+} 细菌生物学特性

1.3.1 耐 Cd^{2+} 细菌的透射电镜观察: 参照文献[17]对样品进行处理。

1.3.2 耐 Cd^{2+} 细菌对 Cd^{2+} 的耐受性: 向 NA 培养基添加 Cd^{2+} 储备液, 使培养液中的 Cd^{2+} 终浓度分别为 2、3、4、6、8 和 10 mmol/L; 将斜面保存的耐 Cd^{2+} 菌株在 NA 培养液中活化 24 h, 以 2% 接种量接入培养液中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 观察菌株生长情况, 能够抑制菌株生长的最低浓度为该菌株的最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.3.3 耐 Cd^{2+} 细菌对 Cd^{2+} 的吸附性: 将斜面保存菌种接种于未添加 Cd^{2+} 的 NA 培养基中活化 24 h 后, 整个斜面菌体全部洗下后, 活化菌体接入添加 Cd^{2+} 终浓度为 2 mmol/L 的 500 mL 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 取样离心收集菌体^[18]。将上清液与收集烘干的菌体用原

子吸收仪测定其重金属含量,重复 3 次,求平均值,以不接种但含有重金属的培养基作为对照。菌株对 Cd^{2+} 的吸附能力以及吸附率按照下列公式计算^[19]:

吸附能力(RC)=溶液体积 $\times$ (溶液初始浓度-溶液终浓度)/细胞干重,单位为 $\text{mg Cd}^{2+}/\text{g}$ 细胞;

吸附率(RE)=(溶液初始浓度-溶液终浓度)/初始浓度 $\times 100\%$ 。

1.3.4 耐 Cd^{2+} 细菌的生长: 将筛选所得的菌株接种于 NA 培养基中活化 24 h, 取 2 mL 转入装有 100 mL NA 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、150 r/min 振荡培养; 以未接种的 NA 液体培养基为对照, 选择 600 nm 的波长, 用分光光度计测定不同培养时间细菌悬浮液的光密度值 (OD_{600})。以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标, 绘制细菌的生长曲线。

1.3.5 pH 和盐度对耐 Cd^{2+} 细菌生长的影响: 利用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 溶液将 NA 培养液的 pH 分别调节为 4.0、6.0、7.2、8.0 和 9.0, 以 2% 的接种量将活化的细菌接入培养液中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 用分光光度计测定不同 pH 下细菌悬浮液的 OD_{600} ; 以相同方法接种至 NaCl 浓度分别为 1%、2%、3%、5%和 7%的 NA 培养液中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 24 h, 用分光光度计测定不同盐度下细菌悬浮液的 OD_{600} 。

1.3.6 耐 Cd^{2+} 细菌对抗生素的抗性: 分别向 NA 培养基中加入不同浓度氨苄青霉素(100、200 mg/L)、卡那霉素(10、20 mg/L)、氯霉素(10、20 mg/L)、链霉素(10、20 mg/L) 4 种抗生素, 斜面活化耐 Cd^{2+} 细菌 24 h, 采用划线法接种, 30 °C 倒置培养 24 h。取在低浓度抗生素平板上生长的菌株, 接种于 2 倍浓度的抗生素平板中, 72 h 后观察其生长情况。

2 结果与分析

2.1 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的生理生化测试

对采自广东省大宝山矿区土壤中的细菌进行分离筛选, 从 Cd^{2+} 浓度为 1 mmol/L 的培养基中筛选得到 20 株抗性菌株, 逐步提高 Cd^{2+} 浓度, 发现当中有 8 株在 2 mmol/L Cd^{2+} 培养基中依然能够正常生长, 具有较强的耐 Cd^{2+} 能力。8 株耐 Cd^{2+} 细菌的常规生理生化鉴定结果如表 2 所示, 它们的生理生化特征存在明显的差异。其中, YN-6 对过氧化氢酶、氧化酶、吲哚、葡萄糖、木糖、果糖和乳糖反应为阳性; YN-7 对过氧化氢酶、氧化酶、明胶液化、葡萄糖和果糖反应为阳性; YN-8 对过氧化氢酶、氧化酶、吲哚、尿素、赖氨酸脱羧酶、柠檬酸盐和果糖反应为阳性; YN-9 对过氧化氢酶、氧化酶、甲基红、D-核糖、葡萄糖和木糖反应为阳性; YN-16 对过氧化氢酶、氧化酶、吲哚、葡萄糖和木糖反应为阳性; YN-17 对吲哚、葡萄糖和乳糖反应为阳性; YN-18 对过氧化氢酶、尿素、柠檬酸盐和蔗糖反应为阳性; YN-19 对氧化酶、V-P、吲哚、蔗糖、木糖、果糖和革兰氏染色反应为阳性。

2.2 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的 16S rRNA 基因测序及系统发育分析

8 株耐 Cd^{2+} 细菌的 16S rRNA 基因序列经 BLAST 比对结果如表 3 所示, 8 株细菌与已知发表的模式菌株最大相似度为 99.19%–100%。其中, 菌株 YN-6 的 16S rRNA 基因序列与已发表的模式种 *Rhizobium vignae* CCBAU05176^T 相似度为 100%, YN-17 与 *Rhizobium tibeticum* CCBAU 85039^T 相似度为 99.19%, 两者可能均为 *Rhizobium* 属的菌株。YN-7、YN-8、YN-9、YN-16、YN-18 和 YN-19 分别与 *Mitsuaria*、*Cupriavidus*、*Methylobacterium*、*Variovorax*、*Achromobacter*、*Leifsonia* 属内的菌株具有最大的相似度。

表 2 8 株耐 Cd²⁺细菌的生理生化测试结果
Table 2 Results of physiological and biochemical identification of eight cadmium-tolerant bacteria

生化指标 Physiological and biochemical index	菌株 Strains							
	YN-6	YN-7	YN-8	YN-9	YN-16	YN-17	YN-18	YN-19
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	+	+	—	+	—
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	—	+	+
福格斯-普里斯考尔 Voges-proskauer	—	—	—	—	—	—	—	+
甲基红 Methyl red	—	—	—	—	—	—	—	—
吡啶 Benzpyrole	+	—	+	—	+	+	—	+
尿素 Urea	—	—	+	+	ND	ND	—	—
D-核糖 D-ribose	ND	ND	—	+	ND	ND	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	ND	ND	+	—	ND	ND	—	ND
柠檬酸盐 Citrate	—	—	+	—	—	—	+	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—	+	—	—	—	—	—	—
淀粉水解 Amylolysis	—	—	—	—	—	—	—	—
葡萄糖 Glucose	+	+	—	+	+	+	—	—
蔗糖 Sugar	—	—	—	—	—	—	+	+
木糖 Xylose	+	ND	ND	—	+	—	—	+
果糖 Fructose	+	+	+	—	ND	ND	—	+
乳糖 Lactose	+	—	—	—	—	+	—	—
革兰氏染色 Gram stain	—	—	—	—	—	—	—	+
菌体形态 Thallus morphology	短杆	长杆	短杆	短杆	短杆	短杆	短杆	长杆

注: +: 阳性; —: 阴性; ND: 未检测到。

Note: +: Positive; —: Negative; ND: Not detected.

表 3 8 株耐 Cd²⁺细菌 16S rDNA 基因序列分析
Table 3 Sequence analysis of 16S rRNA gene of eight cadmium-tolerant bacteria strains

菌株(登录号) Strains (Accession number)	最大相似菌株(登录号) Maximum similar strain (Accession number)	相似度 Similarity (%)
YN-6 (JQ901424)	<i>Rhizobium vignae</i> CCBAU05176 ^T (GU128881)	100
YN-7 (JQ901425)	<i>Mitsuaria chitosanitabida</i> 3001 ^T (AB006851)	99.23
YN-8 (JQ901426)	<i>Cupriavidus necator</i> N-1 ^T (CP002878)	99.21
YN-9 (JQ901427)	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> DSM 5686 ^T (AB175634)	99.93
YN-16 (JQ901428)	<i>Variovorax paradoxus</i> IAM12373 ^T (D88006)	99.58
YN-17 (JQ901429)	<i>Rhizobium tibeticum</i> CCBAU 85039 ^T (EU256404)	99.19
YN-18 (JQ901430)	<i>Achromobacter insolitus</i> LMG 6003 ^T (AY170847)	99.93
YN-19 (JQ901431)	<i>Leifsonia soli</i> TG-S248 ^T (EU912483)	99.40

基于 16S rRNA 基因序列构建的 8 株菌的系统发育树如图 1 所示, YN-6 与 *Rhizobium vignae* 和 *Rhizobium algalisoli* 聚成一簇, 与 *R. vignae* 表现出更近的亲缘关系, 自举值高达 91%。在筛选的菌株中, YN-17 在进化树上与 YN-6 距离最近, YN-17 与 *Rhizobium tibeticum* 和 *Rhizobium mesoamericanum* 聚成一簇, 与前者表现出更近的亲缘关系, 自举值为 64%。系统发育树的分析表

明菌株 YN-6 和 YN-17 均为 *Rhizobium* 属的菌株, 但两者又不属于同一个种内, 它们在 16S rRNA 基因序列和系统发育上均具有一定的差异。菌株 YN-7 尽管在相似度上与 *Mitsuaria chitosanitabida* 最高, 但在系统发育树中它与 *Roseateles terrae*、*Roseateles depolymerans* 和 *Roseateles aquatilis* 聚成一簇, 自举值为 52%, 与 *Mitsuaria chitosanitabida* 表现出较远的进化距离。因此, YN-7 可能是

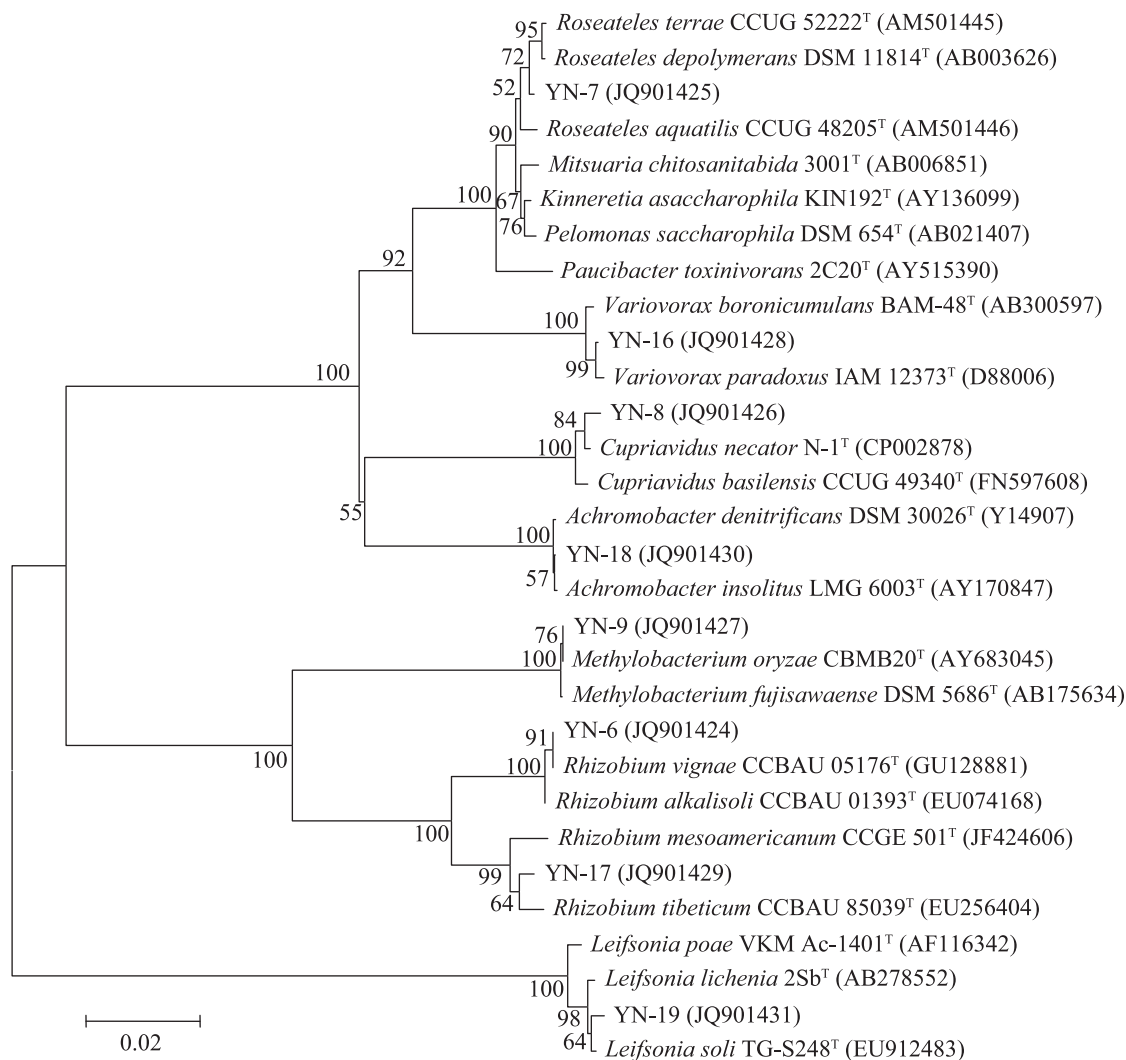


图 1 基于 16S rRNA 基因序列 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of eight cadmium-tolerant bacteria

注: 节点处数值为自举值(>50%); 括号内为 GenBank 登录号; 每一刻度为 2% 的序列差异。

Note: Numbers at nodes indicate the bootstrap values (>50%). GenBank accession numbers are given in parentheses. Bar: 2% sequence divergence.

Roseateles 属的菌株。菌株 YN-8 与 *Cupriavidus necator* 和 *Cupriavidus basilensis* 聚成一簇, 与前者表现出更近的亲缘关系(自举值为 84%), YN-8 是 *Cupriavidus* 属的菌株。菌株 YN-9 与 *Methylobacterium oryzae* 和 *Methylobacterium fujisawaense* 聚成一簇, 与其中的 *M. oryzae* 有着更近的进化距离, 自举值为 76%, YN-9 为 *Methylobacterium* 属内的菌株。菌株 YN-16 与 *Variovorax paradoxus* 和 *Variovorax boronicumulus* 聚成一簇, 与其中的 *V. paradoxus* 表现出更近的亲缘关系, 自举值为 99%, 因此 YN-16 是 *Variovorax* 属内的菌株。菌株 YN-18 与 *Achromobacter insolitus* 和 *Achromobacter denitrificans* 聚成一簇, 与其中的 *A. insolitus* 表现出更近的亲缘关系, 自举值为 57%, YN-19 则与 *Leifsonia soli* 和 *Leifsonia lichenia* 聚成一簇, 与其中的 *L. soli* 表现出更近的亲缘关系, 自举值为 64%。因此, YN-18 和 YN-19 分别是 *Achromobacter* 和 *Leifsonia* 属内的菌株。YN-16 在生理生化和系统发育树上均与 *Variovorax paradoxus* IAM12373^T 较为相似, 因此 YN-16 在种水平上应为

Variovorax paradoxus。其他菌株与模式菌尽管在进化树上具有较近的进化距离, 但生理生化结果仍存在一定的差异, 只能判断到属以内。

2.3 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的形态观察

利用透射电镜对 8 株耐 Cd^{2+} 细菌进行观察, 如图 2 所示, 8 株菌在细胞形态存在一定的差异, 其中 YN-6、YN-8、YN-9、YN-16、YN-17 和 YN-18 菌体为短杆状(YN-8 短杆状近球形), 而 YN-7 和 YN-19 为菌体长杆状。大多数菌株细胞周围存在黏液, YN-6 与 YN-16 细胞周围有黏液及透明颗粒物质, 而 YN-18 菌体的表面有沉淀状物质, YN-7、YN-16、YN-17 和 YN-18 均有鞭毛存在, 其他 4 株菌则未观察到鞭毛。

2.4 8 株细菌的 Cd^{2+} 耐受性

对土壤中所分离筛选到的耐 Cd^{2+} 细菌经过逐步驯化, 研究其对 Cd^{2+} 的耐受能力。结果如表 4 所示, 8 株细菌对 Cd^{2+} 均有较强的耐受性, 最低抑制浓度(MIC)均在 3 mmol/L 以上。其中 YN-8 的 Cd^{2+} 最低抑制浓度最大, 达到了 9 mmol/L, YN-18 的 Cd^{2+} MIC 次之, 为 6 mmol/L, 其他菌株的 MIC 分别为 4 mmol/L 和 3 mmol/L。

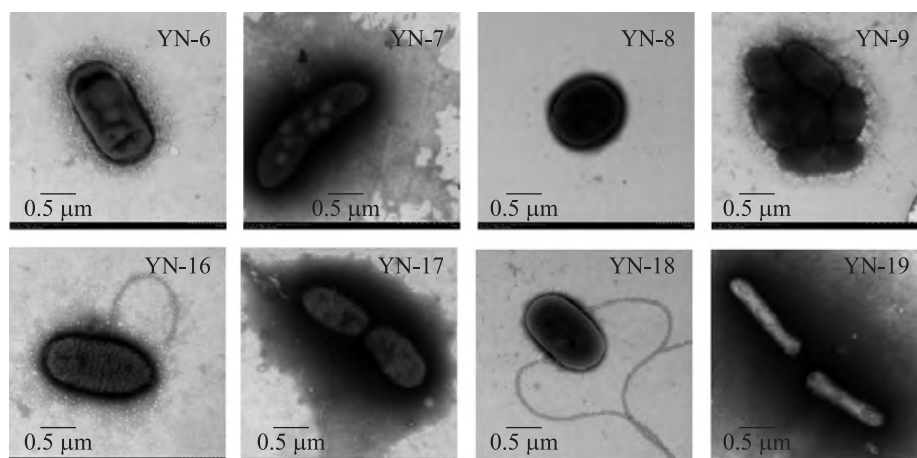


图 2 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的透射电镜照片

Fig. 2 The transmission electron microscopy graphs of the eight bacteria strains

表 4 8 株细菌的 Cd ²⁺ 最低抑制浓度								
Table 4 Minimum inhibitory concentration of the eight cadmium-tolerant bacteria strains								
菌株 Strains	YN-6	YN-7	YN-8	YN-9	YN-16	YN-17	YN-18	YN-19
Cd ²⁺ 最低抑制浓度 Cd ²⁺ minimum inhibition concentration (mmol/L)	3	3	9	4	4	3	6	3

2.5 8 株细菌对 Cd²⁺的吸附性能

供试菌株在较高浓度 Cd²⁺培养液中可以生长,可能与菌株对 Cd²⁺有较强的吸附性有关。不同菌株对 Cd²⁺的吸附能力和吸附率如图 3 所示,不同的耐 Cd²⁺菌株对 Cd²⁺的吸附性能存在明显的差别。除 YN-19 吸附能力较低外,其他菌株均能不同程度地吸附 Cd²⁺。YN-7、YN-8、YN-9 菌对 Cd²⁺吸附能力都较强,每克细胞分别可以吸附 211.99、123.68、316.7 mg 的 Cd²⁺;而 YN-6、YN-16、YN-17、YN-18 四株细菌每克菌体分别可以吸附 56.83、44.67、61.39、99.65 mg 的 Cd²⁺,Cd²⁺吸附能力中等。8 株 Cd²⁺耐性菌对 Cd²⁺的吸附率都在 67%以上,对 Cd²⁺吸附率最大的为 YN-9,约 90%;其次为 YN-8 和 YN-7,对 Cd²⁺吸附率分别约为 83%和 80%。

2.6 耐 Cd²⁺细菌的生长曲线

8 株耐 Cd²⁺的生长曲线如图 4 所示,8 种细菌

的生长延滞期与稳定期在时间上差别较大,其中 YN-9 的生长延滞期较长,约为 9 h,稳定期的光密度值 OD₆₀₀ 最大;YN-8 的生长延滞期较短,为 3 h,较快进入稳定期,稳定期 OD₆₀₀ 相对较低,仅高于 YN-16 和 YN-18;其他几株细菌的延滞期与稳定期差异不明显。8 株菌均能在 24 h 达到稳定期,稳定期维持时间长达 40 h 以上,表明 8 株菌的生长均较为旺盛。

2.7 pH 和盐度对细菌生长的影响

菌株对不同 pH 条件适应性的不同,能在一定程度上反映出菌株对环境的适应能力。不同 pH 条件下 8 株菌的生长情况如图 5A 所示,8 种细菌均能在 pH 为 4.0–9.0 条件下正常生长,但在不同 pH 下其生长状况差异较大。其中 YN-7 和 YN-8 最适生长的 pH 为 4.0,随着 pH 增大,生长速度逐渐降低,在供试 pH 条件下 pH 4.0 最适合 YN-7 和 YN-8 的生长。菌株 YN-9 和 YN-16 随 pH 生长

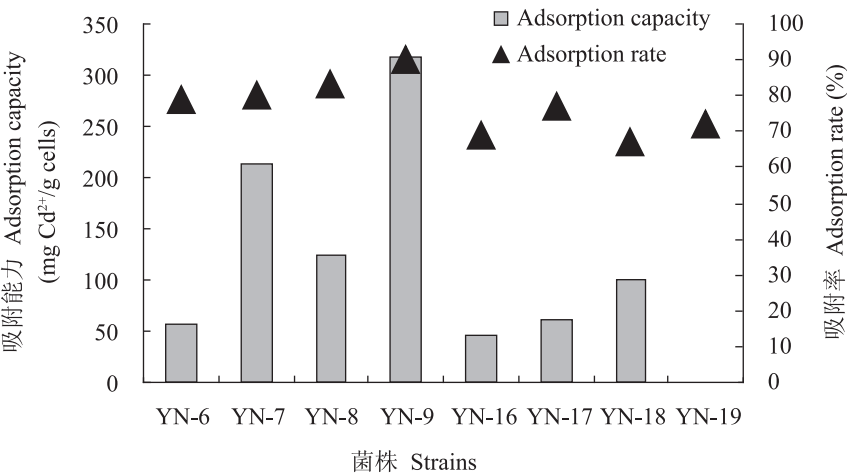


图 3 耐 Cd²⁺细菌对 Cd²⁺的吸附性能
Fig. 3 Cadmium adsorption capacity of different cadmium-tolerant bacteria strains

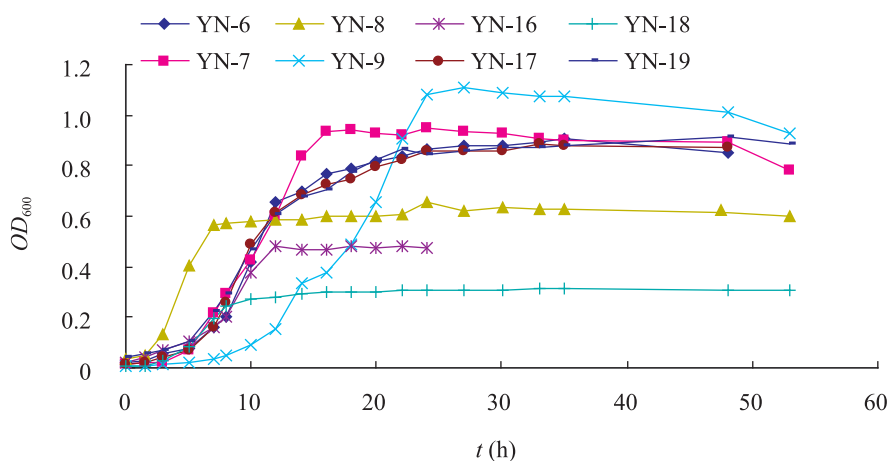
图 4 8 株耐 Cd^{2+} 细菌的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of the eight cadmium-tolerant bacteria strains

的变化趋势类似, 它们最适的生长 pH 为 5.5, 随 pH 增大, 生长速度减缓。菌株 YN-6、YN-17、YN-18 和 YN-19 的最适生长 pH 为 6.0, 其他情况下生长速度均低于 pH 6.0。这表明不同种属的菌株对 pH 适应性存在较大的差异。YN-7 和 YN-8 适宜在酸性条件下生长。而其他菌株在中性偏酸条件下生长情况较好。

盐浓度与维持细胞渗透压有关, 在培养基设计时常加入少量的钠盐, 但用量过高会影响微生物生长, 不同类型微生物对渗透压变化的适应能力可能有所差异。不同盐浓度对 8 株耐 Cd^{2+} 菌生

长的影响如图 5B 所示, 8 株细菌在不同盐浓度下的生长情况较为相似。多株细菌在低钠离子浓度下(1%和 2%)能正常生长。高浓度的钠离子明显抑制了细菌的生长, 1%的盐浓度下各菌株均生长较好, 除菌株 YN-18 和 YN-19 外, 其余菌株随着盐浓度增加生长受到明显的抑制。而 YN-18 在盐度为 3%以下时生长没有受到明显的抑制, YN-19 在盐度 2%以下生长未受到抑制。YN-8、YN-16 和 YN-17 能够在盐度 2%的条件下生长, YN-18 和 YN-19 能够在盐度 3%的条件下生长。不同耐 Cd^{2+} 菌株对盐浓度的适应性不同。

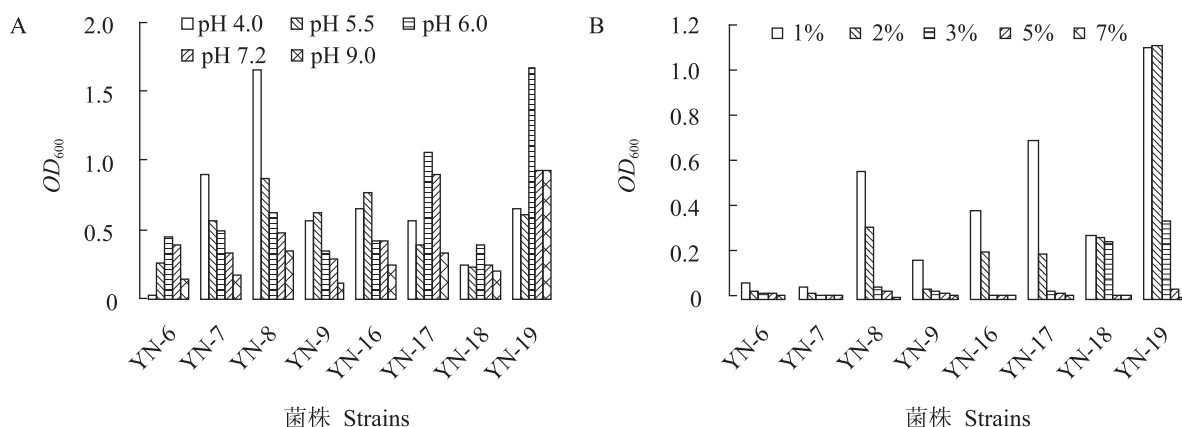
图 5 不同 pH 和盐度对 8 株耐 Cd^{2+} 细菌生长的影响

Fig. 5 Effect of different pH and salt concentrations on the growth of eight cadmium-tolerant bacteria strains

2.8 耐 Cd^{2+} 细菌的抗生素抗性

8 株耐 Cd^{2+} 细菌对 4 种不同种类和浓度的抗生素抗性如表 5 所示, 它们对不同类型的抗生素抗性存在明显的差异。其中, YN-6 对 4 种不同类型的和浓度抗生素均较为敏感, 不具备抗性, 而菌株 YN-18 则对 4 种抗生素均表现出较强的抗性; 菌株 YN-7 和 YN-9 只对氨苄青霉素和低浓度的卡那霉素具有抗性, 菌株 YN-17 和 YN-19 则仅对

低浓度的卡那霉素具有抗性。菌株 YN-8 则对不同浓度的氯霉素和链霉素具有抗性, 但对氨苄青霉素和卡那霉素没有抗性。菌株 YN-16 对不同浓度的氨苄青霉素、卡那霉素和链霉素均具有抗性, 但对氯霉素没有抗性。YN-6 与 YN-17 为同一属, 但对卡那霉素的抗性上却有所差异。由此可见, 不同种属的菌株对不同类型的抗生素存在较大的差异。

表 5 8 株耐 Cd^{2+} 细菌对抗生素的抗性
Table 5 Resistance of the eight cadmium-tolerant bacteria to different antibiotics

抗生素 Antibiotics (mg/L)		菌株 Strains							
		YN-6	YN-7	YN-8	YN-9	YN-16	YN-17	YN-18	YN-19
氨苄青霉素 Penbritin	100	—	+	—	—	+	—	+	—
	200	—	+	—	+	+	—	+	—
卡那霉素 Kanamycin	10	—	+	—	+	+	+	+	+
	20	—	—	—	—	+	—	+	—
氯霉素 Paraxin	10	—	—	+	—	—	—	+	—
	20	—	—	+	—	—	—	+	—
链霉素 Streptomycin	10	—	—	+	—	+	—	+	—
	20	—	—	+	—	+	—	+	—

3 结论与讨论

重金属对土壤生态毒性效应是目前污染生态学和生态毒理学中最活跃的研究领域之一, 而利用微生物修复重金属污染土壤是其中的研究热点^[20]。研究表明细菌不仅可以指示污染土壤生态系统的稳定性, 而且能够通过其生物活性对重金属进行吸附转化, 因此在土壤重金属污染生物修复上有巨大的应用前景^[21]。受重金属污染的土壤系统中, 可能生存着某些能适应该种污染环境, 完成自身正常生理代谢的细菌种类。广东省大宝山矿为 Cd^{2+} 污染严重地区, 本研究采集的土壤样本测定结果显示, 土壤中 Cd^{2+} 等含量超出了国家土壤环境质量二级标准 2–28 倍。在大宝山矿重金属污染土壤中, 我们分离鉴定出 8 株耐 Cd^{2+} 细

菌, 采用形态观察、生理生化检测和 16S rDNA 序列分析等方法, 发现它们分属于 *Rhizobium*、*Roseateles*、*Cupriavidus*、*Methylobacterium*、*Variovorax*、*Rhizobium*、*Achromobacter* 和 *Leifsonia*。其中 YN-16 为 *Variovorax paradoxus*。

对从大宝山重金属污染土壤中分离筛选到的 8 株耐 Cd^{2+} 细菌进行透射电镜观察, 发现多数菌体胞外分泌了较多粘性物质, 这些粘性物质可能与重金属的吸附与螯合作用相关; 细菌在受 Cd^{2+} 毒害时, 可能产生黏液, 促使 Cd^{2+} 在细胞表面形成沉淀从而达到对 Cd^{2+} 的富集与解毒^[22], 因此有必要对这些分泌物质的种类和组成开展进一步的研究。 Cd^{2+} 耐受性试验结果表明, 供试菌株对重金属 Cd^{2+} 均有较高的耐受性, 它们均可以在 3 mmol/L 的 Cd^{2+} 培养液中生长, 其中以菌株

YN-8 的 Cd^{2+} 最低抑制浓度为最高, 达到 9 mmol/L, 表明这些细菌对 Cd^{2+} 均具有较强的适应性, 不同种属的菌株对 Cd^{2+} 的适应性有所差异, YN-8 的适应性更强。与本研究相似, Wang 等^[23] 从深海口分离出一种铜绿假单胞菌, 该菌株耐 Cd 浓度超过了 5 mmol/L; 张玉秀等^[24] 采用梯度浓度法分离筛选到一株耐 Cd^{2+} 细菌 ZGKD2, 其耐 Cd^{2+} 浓度高达 8.89 mmol/L。结合本研究的结果, 表明了微生物对重金属抗性的多样性, 同时也暗示了微生物在重金属降解和修复中有着良好的应用潜力。本研究通过对 8 株耐 Cd^{2+} 细菌 Cd^{2+} 吸附性能研究发现所分离的耐 Cd^{2+} 细菌对重金属 Cd^{2+} 的吸附能力都较强, 如菌株 YN-9、YN-7、YN-8 每克菌体分别可以吸附 316.7、211.99、123.68 mg 的 Cd^{2+} ; 但 YN-19 对 Cd^{2+} 的吸附能力较低, 每克干菌体仅可以吸附 1 mg Cd^{2+} 。相关研究表明, 微生物对重金属的吸附分为直接结合在细胞表面的物理吸附过程和靠细胞代谢向细胞内转移运送的生物学过程^[25]。推测耐 Cd^{2+} 细菌 YN-19 的生长菌体对 Cd^{2+} 的作用不同, 生长的菌体可能没有胞内运输过程, 环境中离子的减少主要是细胞的表面积累, 因此相比其他菌体而言没有更高的重金属离子积累量。

通过对几株耐 Cd^{2+} 细菌的生长进行研究, 发现它们的生长均经历了延缓期和稳定期, 只是不同细菌的延缓期有一定的差别, 总的来说, 8 株细菌的生长比较旺盛, 多数菌体的稳定期为 15–40 h。同样地, 8 株细菌的生长对 pH 和渗透压变化的响应也存在明显的差异, 菌株对 pH 和渗透压条件要求的不同, 能在一定程度上反映出菌株对环境的适应能力。绝大多数的细菌在较高钠离子浓度下停止生长, 但 YN-18、YN-19 在 3% 的浓度下仍然能正常生长, 说明其能适应较高的渗透压环境。

不同的抗生素作用微生物细胞的机理不同,

可以影响细胞壁的合成、细胞膜的通透性、蛋白质和酶的合成、核酸的复制等。氨苄青霉素能抑制微生物细胞壁的合成, 卡那霉素、链霉素和四环素能与 35 核糖体结合抑制蛋白质合成^[26]。抗生素抗性试验结果表明, 所分离筛选到的菌株对 4 种抗生素的抗性有较大差异, 而 YN-18 对 4 种抗生素都表现出了抗性。许多研究认为, 微生物对重金属和抗生素的抗性具有一定的相关性联系, 这可能是因为细菌对抗生素和重金属的抗性基因位置较近, 都存在于相同的细菌质粒中, 所以可能在同一环境中抗性基因表达。此外, 微生物对重金属的抗性机制可能归结于微生物对抗生素抗性的增加, 但是微生物对重金属和抗生素的抗性, 两者不呈对应关系^[27]。在自然环境的土壤中, 微生物可以通过产生抗生素来抑制其他微生物群体的生长, 因此具有抗生素抗性的菌株更有利于在土壤环境中生存。

总而言之, 本研究从大宝山重金属污染地区分离鉴定了 8 株耐 Cd^{2+} 细菌, 通过综合 8 株耐 Cd^{2+} 细菌生物学特性, 结果表明 YN-8 和 YN-9 菌株对土壤环境有较强的适应性, 因此它们可以作为较好的试验材料应用于生物修复 Cd^{2+} 污染土壤的研究中, 而今后应该进一步研究这些强耐 Cd^{2+} 细菌的相关耐受性机理, 以期更好地为 Cd^{2+} 污染土壤的微生物修复研究提供必要的基础理论依据。

参 考 文 献

- [1] Mielniczki-Pereira AA, Hahn ABB, Bonatto D, et al. New insights into the Ca^{2+} -ATPases that contribute to cadmium tolerance in yeast[J]. Toxicology Letters, 2011, 207(2): 104–111.
- [2] 张征田, 庞振凌, 夏敏, 等. 镉污染对不同生境拟水狼蛛氧化酶和金属硫蛋白应激的影响[J]. 生态学报, 2011, 31(16): 4579–4585.

- [3] 国家环境保护局. GB15618-1995土壤环境质量标准[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995: 1-3.
- [4] 邹晓锦, 仇荣亮, 周小勇, 等. 大宝山矿区重金属污染对人体健康风险的研究[J]. 环境科学学报, 2008, 28(7): 1406-1412.
- [5] Sheng XF, Xia JJ. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria[J]. Chemosphere, 2006, 64(6): 1036-1042.
- [6] 耿印印, 王旭梅, 王红旗, 等. 污染土壤中耐镉菌株的筛选、鉴定及吸附试验研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 41(11): 59-65.
- [7] Abskharon RNN, Hassan SHA, Gad SMF, et al. Heavy metal resistant of *E. coli* isolated from wastewater sites in Assiut City, Egypt[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 81(3): 309-315.
- [8] Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, et al. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics[J]. Current Microbiology, 2000, 41(3): 151-156.
- [9] 刘红娟, 张慧, 党志, 等. 一株耐镉细菌的分离及其富集Cd的机理[J]. 环境工程学报, 2009, 3(2): 367-371.
- [10] 付善明, 周永章, 赵宇鹄, 等. 广东大宝山铁多金属矿废水对河流沿岸土壤的重金属污染[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 805-812.
- [11] 郭建华, 李华平, 朱红惠. 大宝山重金属污染土壤微生物群落优势种群分析[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(3): 56-60, 89.
- [12] Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. [J]. Microbiology and Immunology, 1995, 139(11): 897-904.
- [13] Jiang CY, Sheng XF, Qian M, et al. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil[J]. Chemosphere, 2008, 72(2): 157-164.
- [14] 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: 370-398.
- [15] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences[J]. New Phytologist, 2000, 147(3): 617-630.
- [16] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [17] 魏玉利, 邹宁. 光合细菌的透射电镜观察[J]. 生命科学仪器, 2007, 5(5): 16-18.
- [18] Llanos J, Capasso C, Parisi E, et al. Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents[J]. Current Microbiology, 2000, 41(3): 201-205.
- [19] 李春明, 姜恒, 侯文强, 等. 酵母菌对重金属离子吸附的研究[J]. 菌物系统, 1998, 17(4): 367-373.
- [20] 刘爱民, 黄为一. 镉铜污染尾矿土中添加耐镉铜菌剂 J5 后微生物区系多样性的变化[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(3): 265-270.
- [21] Ruta L, Paraschivescu C, Matache M, et al. Removing heavy metals from synthetic effluents using "kamikaze" *Saccharomyces cerevisiae* cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 763-771.
- [22] Tucker SL, Thornton CR, Tasker K, et al. A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*[J]. Plant Cell, 2004, 16(6): 1575-1588.
- [23] Wang CL, Michels PC, Dawson SC, et al. Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(10): 4075-4078.

- [24] 张玉秀, 宋小庆, 黄琳, 等. 煤矿区耐镉细菌的筛选鉴定和重金属耐性研究[J]. 煤炭学报, 2010, 35(10): 1735-1741.
- [25] Asma S, Muhammed I, Waheed AM. Removal and recovery of lead (II) from single and multimetal (Cd, Cu, Ni, Zn) solutions by crop milling waste (black gram husk)[J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 117(1): 65-73.
- [26] Lawrence JG. Clustering of antibiotic resistance genes: beyond the selfish operon[J]. American Society for Microbiology News, 2000, 66(5): 281-286.
- [27] Spain N, Alm E. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment[J]. Reviews in Undergraduate Research, 2003, 2: 1-6.



书 讯

欢迎订阅《英语科技论文撰写与投稿(第二版)》

本书是科技论文写作与投稿的指南读物, 书中全方位地分析和展示了科技论文写作的技巧与诀窍。从论文选题、科技写作的道德规范、拟投稿期刊的选择等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量的实例分析阐述了论文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则, 分别从写作技巧、时态和语态的使用等角度介绍了科技论文正文的撰写, 举例说明了致谢及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

书中还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 从选词、重要语法和文体等方面系统地阐述了科技英语写作的文法与表达, 全面总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、在线投稿、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。此外, 还从 PPT 制作、会议讲演等方面系统地阐述了会议报告的准备与口头交流的注意事项。

本书可作为理工科研究生的教学用书或自学教材; 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

作者简介

任胜利: 理学博士, 国家自然科学基金委杂志社编审, 《中国科学》杂志社副总编辑。社会兼职有中国科技期刊编辑学会理事, 《编辑学报》编委、《中国科技术语》编委、《中国科技期刊研究》副主编等。

自 1997 年博士后出站后从事科技编辑工作以来, 先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学和科技编辑与写作方面的论文或杂文 60 余篇。有丰富的科技编辑与写作方面的培训经验, 2007 年和 2009 年先后主持翻译了《科技英文写作与演讲》和《科技英语写作进阶》。曾获中国科学院期刊出版领域引进优秀人才择优支持、第二届中国出版政府奖优秀出版人物奖等资助和奖项。

个人博客: www.sciencenet.cn/blog/rensl.htm

订阅方式: 各地图书卖场及网上书店。

邮购: 定价: 35 元 ISBN: 978-7-03-031305-8

北京学士书店: 地址: 北京东黄城根北街 16 号(100717); 电话: 010-64000246, 64034558, 64034205;

科学出版社科学书店: 地址: 北京朝阳门内大街 135 号(100010); 电话: 010-64017892。