

1 株高耐镉菌株的分离与鉴定及 16S rDNA 序列分析

郭照辉, 单世平, 张德元, 刘清术, 魏小武, 杜东霞*

(湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009)

摘要: 采用梯度浓度驯化方法, 从重金属镉污染土壤中分离、纯化 1 株具有较强镉抗性的菌株(编号为 6-5)。经形态观察和生化分析、16S rDNA 序列同源性比较以及系统发育分析, 鉴定该菌株为贪铜菌属细菌, 能耐受镉离子的最高浓度为 20 mmol/L, 在 0.54 mmol/L 镉离子 LB 培养基中, 该菌株对镉离子的吸附量达 72.18%。最低抑制浓度试验结果表明, 该菌株对铅、铜、铬、锰、锌也表现出了一定的抗性。

关键词: 贪铜菌属细菌; 镉污染; 土壤; 梯度浓度驯化法; 吸附去除率; 最低抑制浓度

中图分类号: X53; X52; S154.39 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2014)02-0207-04

Isolation, identification and 16S rDNA sequences analysis of a high Cd-resistance bacterial strain

GUO Zhao-hui, SHAN Shi-ping, ZHANG De-yuan, LIU Qing-shu, WEI Xiao-wu, DU Dong-xia*

(Hunan Academy of Microbiology, Changsha 410009, China)

Abstract: A high Cd-resistance strain (No.6-5) was screened from cadmium contaminated soil by acclimation of concentration gradient approach. The strain was identified as *Cupriavidus* from morphological examination, physiological and biochemical characteristics as well as 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis. The strain could endure 20 mmol/L maximum concentration of cadmium (Cd^{2+}), and the maximum adsorption capacity could reach to 72.18% in LB medium with 0.54 mmol/L Cd^{2+} . The strain was also proved to have the ability to resist Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} through experiment of minimum inhibitory concentration (MIC).

Key words: *Cupriavidus* bacterial strain; cadmium contaminated; soil; acclimation of concentration gradient; adsorption quantity; minimum inhibitory concentration

随着工业化进程的推进, 重金属对环境的污染及其对人类健康的危害已成为影响社会发展的重大问题之一。采矿、冶炼、电镀等重工业发展导致镉、铅、汞等重金属大量进入农田土壤^[1-2]。镉在土壤中的活性较强, 容易被作物吸收, 是目前危害农田最严重的重金属, 长期摄入会导致骨软化症, 甚至引起肺、前列腺和睾丸等的恶性肿瘤^[3-5]。近年来, 利用微生物修复重金属污染已成为研究热点, 其研究原理是将镉吸附性微生物添加到污染土壤中, 利用这些微生物对重金属的胞外络合、胞内积累、沉淀和氧化还原反应等作用, 降低土壤中重金属的生物可利用性, 进而降低农作物和农产品中镉的含量^[6]。

笔者对长期镉污染土壤进行分离、纯化, 获得 1 株对镉离子耐性高的细菌, 并通过形态观察、生理生化分析、16S rDNA 序列同源性比较以及系统发育分析, 研究该菌株对镉和其他重金属的抗性, 旨在为该菌株的实际应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

于湖南省某化工厂厂区内用常规方法采集样品 6 份(表 1), 用无菌纸袋带回实验室分离和筛选。

收稿日期: 2013-08-16

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(13JJ2035); 湖南省“一化四体系”专项资金项目(2011 年); 湖南省农业厅科研计划项目(2013 年)

作者简介: 郭照辉(1969—), 男, 湖南益阳人, 高级工程师, 主要从事农田土壤重金属污染防治、土壤肥料发酵工艺等方面的研究;

*通信作者, ssp312@hotmail.com

表 1 供试样品

Table 1 Outline of samples collection

样品编号	样 品
1	化工厂排污口附近黄土
2	化工厂厂区内的黑色渣土
3	化工厂内工作池 1 周边的污泥
4	化工厂内工作池 2 周边的污泥
5	化工厂内工作池 1 中的污水
6	化工厂内工作池 2 中的污水

1.2 仪器与试剂

主要仪器：原子吸收光谱仪(AA-670 型，日本岛津制作所生产)；紫外分光光度计(751GW，惠普上海分析仪器有限公司生产)；pH 计(8904 型，江苏江环分析仪器有限公司生产)。

主要试剂 CdCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 ZnSO_4 、 CoCl_2 、 CuSO_4 、 AgNO_3 等均为分析纯，购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

LB 培养基中含胰蛋白胨 10 g/L，酵母提取物 5 g/L，氯化钠 10 g/L。用 5 mol/L 的氢氧化钠溶液调培养基 pH 至 7.0。LB 固体培养基另加 2% 的琼脂粉，于 121 °C 高压灭菌 25 min。

1.3 方 法

1.3.1 梯度稀释法分离菌株

称取土壤 5 g 或水样 5 mL，放入装有 45 mL 无菌水的三角瓶中，磁力搅拌 10 min，即为 10^{-1} 的土壤悬液。另取装有 4.5 mL 无菌水的试管 5 支，用记号笔编 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} 。取已稀释成 10^{-1} 的土壤悬液或水样悬液，振荡后静置 0.5 min，用无菌吸管吸取 0.5 mL 土壤悬液或水样悬液，加入到 10^{-2} 的无菌水试管中，充分振荡使之混匀，即成 10^{-2} 土壤稀释液或水样悬液。同法，分别获得 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 土壤稀释液或水样悬液。

用无菌操作法分别吸取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 土壤稀释液或水样稀释液 0.1 mL，加在已制备的含有重金属镉的 LB 固体培养基上。用涂布棒将稀释液反复涂布，充分混匀，铺平后于培养箱中倒置培养。待长出菌落后挑取细菌单菌落，划线，纯培养。镜检，转至斜面 4 °C 保存。在筛选过程中，将同一样品分别涂布于常规 LB 平板和含有 2 mmol/L CdCl_2 的 LB 平板，过夜培养后对菌落进行计数，计算样品中能够耐受 2 mmol/L CdCl_2 细菌的比率。

1.3.2 梯度浓度驯化筛选菌株

在固体培养基中加入一定量的氯化镉标准液，分别配制成 Cd^{2+} 含量 2、4、6、8、10 mmol/L 的 LB

固体培养基，将各梯度土壤稀释液或水样稀释液分别涂布到不同浓度平板上，培养 3~5 d 后，挑选出长势较好的菌株，接种到 Cd^{2+} 含量比筛选平板大 2 mmol/L 的培养基中再次培养、筛选，观察其生长情况。以相同的方法逐步淘汰抗镉能力差的菌株，并记录不同细菌的最高耐受浓度，筛选出耐受力最高的菌株。

1.3.3 菌株吸附镉离子的性能测定

配制镉离子浓度 0.54 mmol/L 的 LB 液体培养基，并接种菌株(对照不接种菌)，摇床培养 24 h。高速离心去除菌体，收集上清液，利用石墨炉原子吸收仪测定样品的镉含量。每份样品设 3 个重复，结果取其平均值。

1.3.4 菌株形态的观察

在 LB 培养基上观察菌落形态，在光学显微镜下观察菌体形态。

1.3.5 菌株的生理生化试验

氯化钠生长试验、V-P 试验、甲基红试验、吲哚试验、淀粉水解试验、糖醇类的氧化发酵试验(包括葡萄糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇等)、硫化氢试验、明胶液化试验、柠檬酸盐利用试验、吐温 80 试验、七叶灵水解试验、卵磷脂酶试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、精氨酸脱羧基酶试验、赖氨酸脱羧基酶试验的具体方法均参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 9 版)和文献[7]。

1.3.6 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定

取生长至对数期的菌液，离心收集菌体，利用试剂盒抽提基因组 DNA。依照细菌 16S rDNA 中的最保守区设计并合成引物。引物(方向均为 5'-3')^[8] 序列如下。

27-F，GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG；

1492-R，AAGGAGGTGATCCARCCGCA。

PCR 扩增反应参照文献[9]，并对其加以改进(PCR 反应缓冲液改用 2×GC 缓冲液)。PCR 产物的纯化和测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.4 序列比对及系统发育分析

通过 Blast 程序，将待测定的序列与 GenBank 数据中已有的 16S rDNA 序列进行相似性分析^[10]，利用 DNASTAR 构建系统进化树。于重金属抗性菌株中选取一些亲缘关系相近的代表菌株构建系统发育树。

1.5 重金属最小抑制浓度的测定

挑取菌株的单菌落于新鲜 LB 液体培养基中进行活化培养,并按 1%的接种量接种至 LB 液体培养基中(根据所测定的重金属样品数以及设置的浓度梯度数来决定培养多少瓶菌液),30℃继续振荡培养,待 $A_{600\text{ nm}}$ 达 0.2 左右,在其中分别加入相应浓度的 9 种重金属(Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+}),约 24 h 后取出,用比色法^[11]测定各重金属菌液的 $A_{600\text{ nm}}$ 。

2 结果与分析

2.1 供试土样的镉含量

经测定,1、2、3、4 号土样的镉含量分别为(63±1)、(129±1)、(1 608±2)、(219±1) mg/kg,5、6 号水样的镉含量分别为(6.00±0.2)、(24.36±0.5) mg/L。

表 2 镉抗性细菌初步梯度筛选结果

Table 2 Preliminary statistical results of cadmium resistance bacteria by gradient screen							
样品 编号	常规 LB 平板菌落数/个			含 2 mmol/L CdCl ₂ 的 LB 平板菌落数/个			抗镉细菌占细菌 总数的比率/%
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
1		31	1		10	0	3.23
2	29	2	0	165	2	0	6.90
3	157	24	1	214	6	0	13.38
4	34	6	2	33	3	0	8.82
5	98	0	0	27	3	0	3.06
6	17	1	1	3	0	0	1.76

“ ” 指 LB 平板生长菌落太多,连成一片,无法计数。

2.3 细菌 6-5 吸附镉离子的性能

测定结果表明,经细菌 6-5 吸附后,培养基上清中镉含量为 41.85 ng/mL,对照培养基上清中镉含量为 150 ng/mL,因此,该菌株具有较好的镉离子吸附去除能力,吸附去除率达 72.18%。

2.4 细菌 6-5 的革兰氏染色、形态观察及生理生化试验结果

细菌 6-5 菌体细胞为杆状,无荚膜,无鞭毛,通常单个出现,在 LB 固定平板上的菌落为圆形,边缘齐整,表面光滑。革兰氏染色阴性。

生理、生化试验结果:氯化钠生长试验浓度为 2%;V-P 试验、甲基红试验、吲哚试验、淀粉水解试验、葡萄糖发酵试验、麦芽糖发酵试验、蔗糖发酵试验、甘露醇发酵试验、硫化氢试验、明胶液化试验、吐温 80 试验、七叶灵水解试验、卵磷脂酶试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、精氨酸脱羧基酶试验和赖氨酸脱羧基酶试验的结果均为阴性。木糖发酵产酸试验和柠檬酸盐试验的结果均为阳性。

2.5 细菌 6-5 的 16S rDNA 序列分析

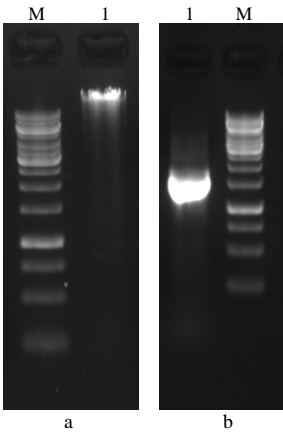
细菌 6-5 的 16S rDNA 序列扩增长度为 1 435

bp(图 1)。将经测序得到的序列进行 Blast 序列分析和同源性比较,与其他重金属抗性菌株 *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, *Cupriavidus necator* strain DSM 2839 和 *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424 的 16S rDNA 序列具有 98%~99%的同源性。

2.2 镉抗性细菌的梯度分离和驯化结果

利用梯度稀释分离筛选法,从 6 种镉污染样品中筛选到一批镉抗性细菌,其中 3 号土壤样品中筛选到的抗镉细菌占细菌总数的 13.38%(表 2)。通过浓度梯度驯化,最终得到 1 株镉高抗性菌株(下称“细菌 6-5”),其最高耐镉浓度达 20 mmol/L。

bp(图 1)。将经测序得到的序列进行 Blast 序列分析和同源性比较,与其他重金属抗性菌株 *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, *Cupriavidus necator* strain DSM 2839 和 *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19424 的 16S rDNA 序列具有 98%~99%的同源性。



a、b 图中“M”均为 1 kb ladder, a 图中“1”为细菌 6-5 的基因组 DNA; b 图中“1”细菌 6-5 的 16S rDNA 扩增产物。

图 1 细菌 6-5 的 16S rDNA 扩增结果

Fig.1 Results from cadmium resistance bacteria (No.6-5) PCR amplification of 16S rDNA

2.6 细菌 6-5 的系统发育分析

计算细菌 6-5 的 16S rDNA 序列和与它同源性最高的 12 株细菌的 16S rDNA 全序列遗传距离,并根据遗传距离得到系统发育树(图 2)。由图 2 可见,细菌 6-5 与 *Cupriavidus* 菌属的几株细菌具有较近的同源性。综合前述的形态学和生理生化试验鉴定结果,可以判定试验分离到的菌株为贪铜菌。

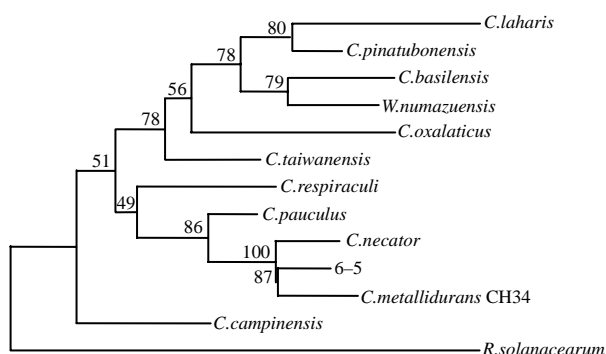


图 2 细菌 6-5 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain 6-5

2.7 细菌 6-5 的毒性测定结果

9 种重金属对细菌 6-5 的毒性结果(图 3)表明,该菌株对汞和银非常敏感,其浓度为 0.125 mmol/L 时该菌株的生长基本受到抑制;该菌株对其他重金属也都表现出不同程度的抗性,因此,该菌株具有较高的抗多种重金属的性能。

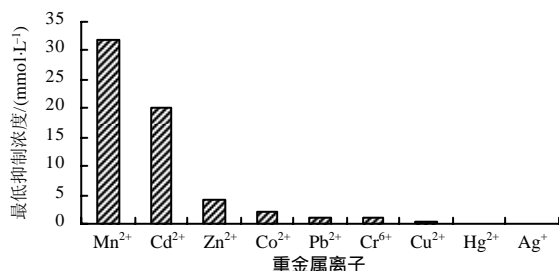


图 3 细菌 6-5 对 9 种重金属的最低抑制浓度

Fig.3 Minimum inhibitory concentration of *Cupriavidus* 6-5 on 9 kinds of heavy metals

3 结论与讨论

本试验样品中镉离子的含量较高,且具有长期性,所以从本试验样品中分离抗镉菌株是可行的。6 个样品中,从镉含量最高的 3 号土样中筛选出的抗镉细菌比率最高,所以,抗镉细菌对恶性环境具有较强的适应能力;随着镉浓度的增大,其余土样或水样中微生物的数量减少,种类逐渐趋于单一,表明镉对微生物的毒性随着镉浓度的增大而增大,也证明了梯度平板法^[12]能有效分离抗镉细菌。抗性

菌株对极端重金属污染环境的适应性是逐渐提高的。本研究中从 2 mmol/L 镉离子浓度开始筛选,通过逐步提高镉离子浓度(提高幅度为 1 mmol/L 或 2 mmol/L)来提高菌株对恶性环境的适应能力,成功将细菌 6-5 驯化至抗性浓度 20 mmol/L。细菌 6-5 活菌体在液体培养下对培养基中镉的富集和去除能力达 72.18%,而且对不同重金属离子的耐性各不相同,对 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 的耐性依次减小,对铜、汞和银的耐性最差。这可能是因为该菌株表面的某些活性基团(吸附位点)具有选择性,对锰离子的亲和力最好,对镉离子的亲和力其次,对于单价阳离子没有选择性,直接产生毒害作用;也可能是因为该菌株的菌体表面存在阳离子转运系统,通过培养基重金属离子的调节作用,重金属离子可以通过菌体表面的转运蛋白进入细胞内进行螯合(不同重金属离子的耐性可能与细胞膜表面转运蛋白的种类和数量有关)。

参考文献:

- [1] 王慧萍. 耐锌细菌的筛选、抗锌特性及其对苯酚的降解研究[D]. 上海: 东华大学, 2011.
- [2] 曾维爱, 曾敏, 李宏光, 等. 海泡石及钙镁磷肥对烟草主要农艺性状及吸收镉的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(4): 435-437.
- [3] 毛娟. 产碱杆菌 *CzcD* 基因的克隆、表达以及功能的初步研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- [4] 段学军, 闵航. 1 株抗镉细菌的分离鉴定及其抗性基因定位的初步研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(1): 154-158.
- [5] 范芙蓉, 罗琳, 廖育林, 等. 不同改良剂对镉污染土壤的改良效果和对水稻光合特性的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2012, 38(4): 430-434.
- [6] 马占强. 苜蓿中华根瘤菌 CCNWSX0020 抗铜基因的克隆与功能验证[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[K]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 潘园园, 陈雯莉, 黄巧云. 1 株抗重金属铜细菌的分离、鉴定及其 16S rDNA 的序列分析[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 68-72.
- [9] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯敦 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16-34.
- [10] Stephen F, Altschul, Eugene V Koonin. Iterated profile searches with PSI2BLAST2a tool for discovery in protein databases [J]. Trends in Biochemical Science, 1998, 23 (11): 444-447.
- [11] 许嘉琳, 杨居荣. 陆地生态系统中的重金属[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995: 172-181.
- [12] 应娇妍. 高效富集镉菌株的筛选及其富集特性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库