

强抗镉蜡状芽孢杆菌的分离鉴定及其抗性机理

呼庆¹, 齐鸿雁^{1*}, 窦敏娜^{1,2}, 张洪勋¹

(1. 中国科学院生态环境研究中心环境生物技术研究室, 北京 100085; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:从北京市远郊东三岔地区废弃的铅锌尾矿中筛选到 1 株强抗镉的细菌. 通过细菌形态学观察、扫描电镜、X 射线衍射能谱分析、甲基乙酰甲醇试验与酪氨酸水解试验等特征生理生化试验、菌株“G + C mol %”值以及 16S rDNA 扩增与序列测定, 鉴定此菌株为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*). 分离菌株可以在镉浓度为 1 000 mg/L 的固体培养基平板上生长, 表明菌株具有强抗镉的能力. 进一步分析了菌株在添加 Cd²⁺ 与未添加 Cd²⁺ 的液体培养基中的生长曲线, 并通过质粒消除试验证明该菌株的抗镉性质与抗性质粒的存在有关.

关键词: 镉; 抗性质粒; 蜡状芽孢杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)02-0427-04

Isolation, Molecular Characterization and Resistance Mechanism Study on a Cadmium Hyperresistant *Bacillus cereus*

HU Qing¹, QI Hong-yan¹, DOU Min-na^{1,2}, ZHANG Hong-xun¹

(1. Department of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Biology Science and Technology College, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: A Gram-positive, aerobic, motile, spore-forming bacterium was isolated from a Pb-Zn mine tailing at suburb of Beijing City. The bacterial strain isolated could resist cadmium efficiently and it was able to grow well on media plates containing 1 000 mg/L cadmium. The DNA G + C content were found to be 60%. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed that this isolate was a member of the genus *Bacillus*. Two growth curves about this strain were drawn on media with and without cadmium. This strain harbors a plasmid putatively bearing essential cadmium resistant genes as demonstrated by a plasmid elimination experiment. The results of this study indicate that this strain has a better potential for cadmium resistance compared to other reports. The physiological characterization of the isolates also indicates the possible application of this strain for bioremediation of sites contaminated with cadmium.

Key words: cadmium; resistant plasmid; *Bacillus cereus*

镉是一种 d 原子轨道被完全填充的非典型过渡金属元素^[1]. 原子序数为 48, 呈蓝白色, 性质柔软. 镉主要以各种酸盐及硫化物的形式存在. 金属镉具有很强的生物毒性, 化学性质类似于锌, 在多种生化过程中, 镉通过与酶类巯基结合与替代作用, 置换出酶结合金属, 降低机体抗氧化活性, 引起氧化损伤; 镉可以占据钙离子通道进入细胞, 干扰细胞钙代谢; 镉还能引起 DNA 断裂, 损坏 DNA 修复系统, 引起细胞凋亡^[2]. 同时, 镉在土壤具有较强的代谢活性, 极易被作物吸收而进入食物链, 因而容易对人体健康造成威胁. 镉的半衰期最长可达 3 000 a, 在人体内的半衰期也可长达 6.2~18 a, 为最易在人体内蓄积的毒性物质. 1974 年联合国将其定为重点污染物, 后美国毒物管理委员会(ATSDR)将其列为第 6 位危及人类健康的有毒物质^[3~6].

利用微生物技术治理环境中的镉污染是目前环境污染治理研究的热点. Iyer 等报道利用 1 株海洋

细菌可以高效吸附镉等重金属^[7]. Elena Dell-Amico 等报道利用抗镉细菌促进植物在重金属污染土壤中生长^[8]. Cerruti 等报道利用氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)生物溶解含镉的废电池^[9]. 利用微生物技术治理镉污染, 关键是获得具有高度抗镉能力的菌株. 本研究从富含镉的铅锌尾矿中分离获得 1 株高度抗镉的蜡状芽孢杆菌. 对该菌株进行了生理生化及分子生物学的初步鉴定, 利用该菌株部分 16S rDNA 序列进行了序列比对分析, 并对该菌株的抗性特征进行了初步研究, 为进一步探索利用该菌株治理环境中的镉污染提供理论基础.

收稿日期: 2006-02-21; 修订日期: 2006-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(20477051)

作者简介: 呼庆(1977~), 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为微生物分子生态学与生物技术, E-mail: huqing@rcees.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: qihy@rcees.ac.cn

1 材料与方法

1.1 抗镉微生物的分离与鉴定

1.1.1 抗镉微生物的筛选与分离

分离抗性细菌的矿土样品取自北京市远郊东三岔地区一座长期废弃的铅锌尾矿, 采样点以水平方式分布, 分别为铅锌尾矿矿内, 铅锌尾矿矿口, 距铅锌尾矿 20 m 的矿渣堆放处. 利用原子吸收分光光度法对 3 种矿土样品中的主要重金属进行了分析, 结果见表 1.

表 1 土壤样品重金属含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

Table 1 Heavy metal content in soil samples/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

采样位置	Pb	Cd	Cr
铅锌尾矿矿洞内	204	226.9	5
铅锌尾矿矿洞口	96	115.5	8
20 m 的矿渣堆放处	67	168.6	2

将 3 种矿土样品等量混合后, 取 2 g 加入含镉 100 mg/L 的缓冲蛋白胨水液体培养基 25 mL 中, 30 ℃ 振荡培养过夜^[10]. 静置后取含菌上清液接种于固体培养基, 在 30 ℃ 培养, 待菌落长出后, 分别转移接种于更高镉浓度的固体培养基进一步培养、纯化、分离.

液体培养基: 蛋白胨 10 g, 氯化钠 5 g, 十二水合磷酸氢二钠 9 g, 磷酸二氢钾 1.5 g, 去离子水 1 000 mL, pH 为 7.1~7.3. 经 121 ℃ 灭菌 30 min, 加入灭菌后的 CdCl_2 溶液, 使 Cd 终浓度达到 100 mg/L.

固体培养基: 在上述液体培养基中加入琼脂粉 20 g/L. 分装到 250 mL 三角烧瓶, 每瓶 50 mL. 加入 CdCl_2 溶液, 调配至镉的终浓度分别为 100、200、300、500、1 000 mg/L. 灭菌、冷却备用.

1.1.2 光镜与电镜观察分析

将分离得到的纯培养菌株革兰氏染色后, 利用 LEICA MPS30 显微镜进行初步的形态观察. 纯培养菌株细胞经过收集、清洗、固定、乙醇梯度脱水、干燥以及喷金等操作后, 利用扫描电子显微镜观察细菌细胞的精细结构(见图 1). 同时利用 X 射线能谱技术研究纯培养菌株细胞表面的特征元素含量.

1.1.3 分离菌株特征生理鉴定

甲基乙酰甲醇试验(Veges-Proskauer 试验): 将纯培养菌种接种于 V.P 培养基中, 37 ℃ 培养 4 d. 取 2 mL 菌液与等量 V.P 试剂混合, 观察颜色变化. 在培养 7 d 以后, 用 Thermo Orion868 精密 pH 计测定培养液的 pH 值.

酪氨酸水解试验: 将 L-酪氨酸 0.5 g 悬浮于 10 mL 去离子水中, 高压灭菌后与 100 mL 无菌的营养

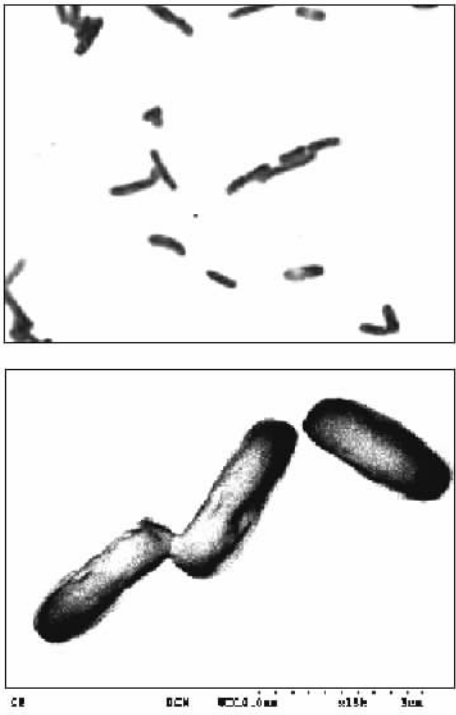


图 1 革兰氏染色与扫描电镜照片($\times 5\,000$)
Fig.1 Photo of Gram test and SEM ($\times 5\,000$)

肉汤混合, 倾倒入平板, 将纯培养菌种转接于平板上, 培养 7~14 d, 记录酪氨酸结晶是否被水解^[11].

1.1.4 分离菌株“G + C mol%”值的测定

细菌总 DNA 提取采用氯仿苯酚混合提取法制备, DNA 溶于 0.1SSC 溶液中. 确定 T_m 采用热变性解链法. “G + C mol%”含量按照下式计算: $0.1\text{SSC } G + C\% = 2.44(T_m - 53.9)$.

1.1.5 分离菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增与序列测定

用于 16S rDNA 的 PCR 扩增反应的引物为一对通用引物. 其序列如下: 正向引物 Primer1 5'-AGAGT TYGAT CCTGG CTCAG-3'; 反向引物 Primer2 5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'. PCR 产物的测序由北京华中中生科技发展有限公司完成.

1.1.6 序列对比与系统发育分析

利用 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析.

1.2 抗性机理的初步研究

1.2.1 分离菌株对镉的耐性试验

将分离得到的纯培养菌株接种于缓冲蛋白胨水液体培养基 25 mL 中, 30 ℃ 振荡培养过夜. 将菌液浓度稀释至 10^{-7} 后, 取 20 μL 依次涂布于镉浓度分别为 100、200、300、500、1 000 mg/L 的固体培养基平板上, 每个镉浓度梯度做 3 个平行平板. 30 ℃ 恒温

培养 3 d 后,观察菌落生长情况.

1.2.2 测定分离菌株在含镉与不含镉 2 种情况下的生长曲线

将分离得到的纯培养菌株接种于缓冲蛋白胨水液体培养基 25 mL 中,30 ℃振荡培养过夜.取 100 μL 依次接种于镉浓度分别为 0、100 mg/L 缓冲蛋白胨水液体培养基 25 mL 中.以未接种的液体培养基作空白对照,选用 540 ~ 560 nm 波长进行光电比浊测定,每 30 min 记录吸光值 1 次,绘制生长曲线.

1.2.3 质粒消除试验

将分离得到的纯培养菌株接种于含有 SDS 至终浓度为 0.3% 的缓冲蛋白胨水液体培养基 25 mL 中,42 ℃振荡培养 48 h.将菌液浓度依次稀释至 0、10⁻¹、10⁻² 后分别涂布于镉浓度为 0、250 mg/L 的固体培养基平板上,每个镉浓度梯度做 3 个平行平板.30 ℃恒温培养 3 d 后,观察菌落生长情况.

2 结果与讨论

2.1 分离菌株的细胞形态学

在含有高浓度镉的固体培养基平板上筛选到 1 株细菌,编号为 BG.该菌菌体细胞为杆状,大小为 (1.0 ~ 1.2) μm × (3.0 ~ 5.0) μm,具稀疏周生鞭毛,可运动.该菌株在固体培养基上的菌落不透明,乳白色,圆形,边缘缺刻状,表面略显干燥,有皱褶,较粘稠,易挑起.革兰氏染色阳性,芽孢中生,芽孢囊不膨大,无伴孢晶体.

2.2 分离菌株的 X 射线能谱(EDS)分析结果

进行扫描电子显微镜拍照的同时,选取 BG 菌表面的若干位点,对细菌细胞膜的特征元素含量进行 X 射线能谱分析,结果见图 2.

从能谱分析结果可以看出,菌株细胞膜表面的 C、N、O 等元素有特征的百分含量,其质量分数值分别为 34.35%,7.29%,22.83%,摩尔比值近似于 55:10:27.除了 C、N、O 等主要元素以外,菌株细胞膜表面对微量元素也有一定的吸收.

2.3 分离菌株的“G + C mol%”值

由热扫描曲线得出菌株 BG 的 *T_m* 值为 70 ℃.由公式计算得 DNA 中的“G + C mol%”值为 60%,此值在 *Bacillus* 属 32% ~ 62% 的范围内,符合 *Bacillus* 属的“G + C mol%”值特征.

2.4 16S rDNA 的序列测定与系统发育分析

将分离菌株部分长度的 16S rDNA(约 700 bp)序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析.结果表明,该菌株序列与 *Bacillus cereus* 具有 100% 的相似率,结合分离菌株的“G + C mol%”值特征和 16S rDNA 序列比对分析结果,可确定所分离的抗性菌株为 *Bacillus cereus* 的 1 个株系.

2.5 分离菌株特征生理生化实验结果

甲基乙酰甲醇试验(Veges-Proskauer 试验):V.P 试验结果为阳性.培养 7 d 后,液体培养基 pH = 4.38.符合 *Bacillus cereus* 的特征数值.

酪氨酸水解试验:分离的菌株在营养肉汤琼脂

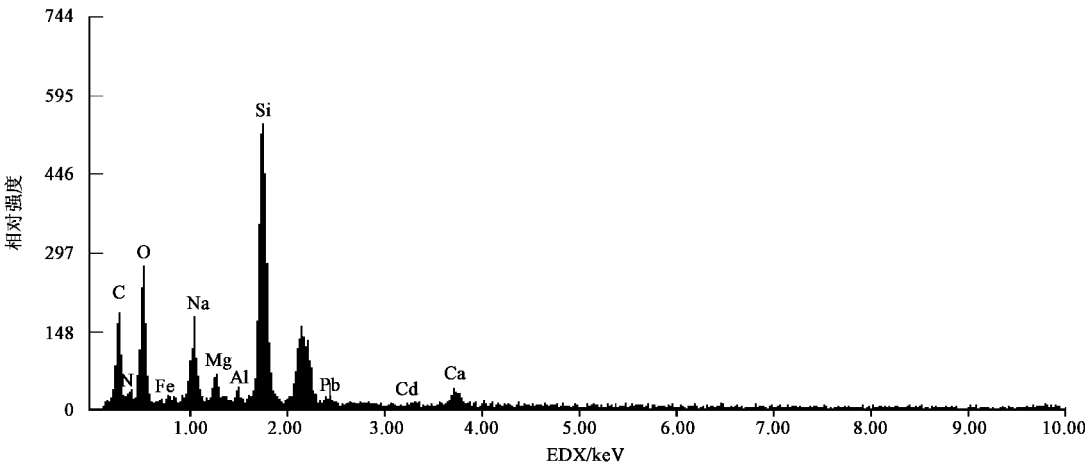


图 2 细胞膜特征元素能谱分析结果
Fig.2 The result of EDS

上培养 14 d 后,酪氨酸结晶被水解,符合 *Bacillus cereus* 的特征.

2.6 分离菌株对镉离子的耐性试验结果

分离得到的纯培养菌株在镉浓度分别为 100、200、300、500、1 000 mg/L 的固体培养基平板上均能够生长,但是在 1 000 mg/L 的固体培养基平板上菌

落数量显著减少,说明镉浓度为1 000 mg/L已经接近该分离菌株的极限浓度.

2.7 分离菌株的生长曲线

从图3可以看出,分离菌株在镉浓度为0 mg/L及100 mg/L 2种情况下都有较为平滑的生长曲线.在镉浓度为0 mg/L的情况下,分离菌株的延滞期比镉浓度为100 mg/L的情况时略短.在开始的1~5 h内,分离菌株在镉浓度为0 mg/L的培养基中生长速率大于其在镉浓度为100 mg/L的培养基中的生长速率.在随后的6~15 h内,分离菌株在镉浓度为100 mg/L的培养基中生长速率超过其在镉浓度为0 mg/L的培养基中的生长速率.在镉浓度为100 mg/L的培养基中生长的分离菌株首先在培养16 h后出现稳定期,并在培养22 h后出现衰亡期.在镉浓度为0 mg/L的培养基中生长的分离菌株培养16 h没有出现稳定期并继续缓慢增长,在培养21 h后出现稳定期,没有明显的衰亡期.

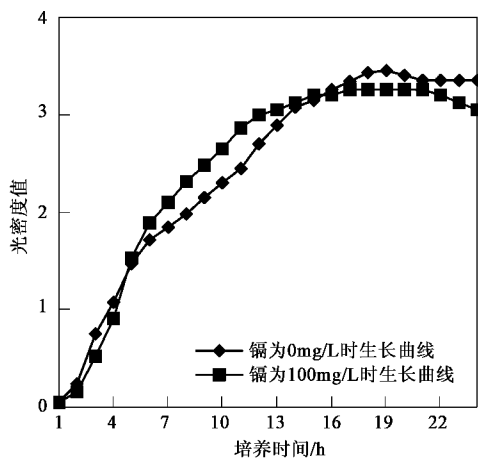


图3 分离菌株在不同镉浓度条件下的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Bacillus* BG in different Cd²⁺ concentrations

2.8 分离菌株的质粒消除结果

将菌液浓度依次稀释至0、10⁻¹、10⁻²后分别涂布于镉浓度为0、250 mg/L的固体培养基平板上30℃恒温培养3 d后,观察菌落生长情况.

如图4所示,经过消除质粒处理后,3个稀释度的菌液在含镉浓度为0 mg/L的固体培养基上均能生长,而在含镉浓度为250 mg/L的固体培养基上均不生长.说明BG菌株对重金属镉的抗性是由质粒决定的.在质粒消除后,BG菌株对镉的抗性随之消失.

3 结论

(1)从铅锌尾矿中分离纯化并鉴定了1株强抗

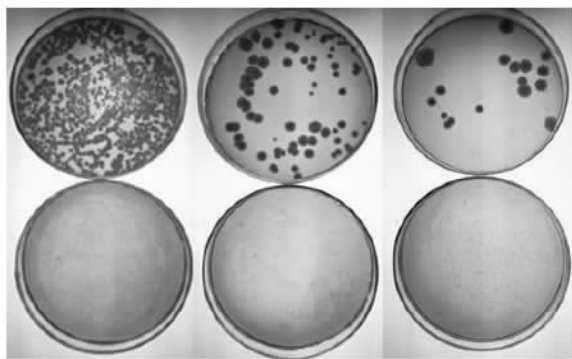


图4 分离菌株的质粒消除试验

Fig.4 Result of plasmid elimination test

镉细菌.通过细菌形态学观察、特征生理生化试验、菌株“G+C mol%”值分析以及16S rDNA扩增与序列测定等技术,鉴定此菌株为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*).

(2)筛选到的菌株具有强抗镉的能力,可以在镉浓度为1 000 mg/L的固体培养基平板上生长,具有很高的应用价值.分析了该强抗镉菌株的生长曲线,并通过质粒消除试验证明该菌株的抗镉性质与抗性质粒的存在有关.

参考文献:

- [1] 谢黎虹,许梓荣. 重金属镉对动物及人类的毒性研究进展[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(6): 376~381.
- [2] 刁书永,张立志,袁慧. 镉中毒机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(5): 49~51.
- [3] 魏树和,周启星,王新. 超积累植物龙葵及其对镉的富集特征[J]. 环境科学, 2005, 26(3): 167~171.
- [4] 王代长,蒋新,卞永荣,等. 模拟酸雨条件下Cd²⁺在土壤及其矿物表面的解吸动力学特征[J]. 环境科学, 2004, 25(4): 118~122.
- [5] 李正文,张艳玲,潘根兴. 不同水稻品种籽粒Cd、Cu和Se的含量差异及其人类膳食摄取风险[J]. 环境科学, 2003, 24(3): 112~115.
- [6] 王旭,颜丽,张宇,等. 外源水溶性Cd在棕壤中的迁移和形态转化[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(3): 456~459.
- [7] Iyer A, Mody K, Jha B. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium[J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 50: 340~343.
- [8] Amico E D, Cavalca L, Andreoni V. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil: and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 52: 153~162.
- [9] Cerruti C, Curutchet G, Donati E. Bio-dissolution of spent nickel-cadmium batteries using *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Journal of Biotechnology, 1998, 62: 209~219.
- [10] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 179.
- [11] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 62~82.