

许钦坤, 赵翠燕. 耐镉菌株的筛选及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 317-318.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.103

耐镉菌株的筛选及生物学特性

许钦坤¹, 赵翠燕²

(1. 广东韶关学院英东生命科学学院, 广东韶关 512005; 2. 广东韶关学院英东农业科学与工程学院, 广东韶关 512005)

摘要:从污染土壤中, 分离出 1 株能高度抗镉和吸附镉的菌株 S-1, 经初步鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。对其生物学特性进行研究, 结果表明, 该菌株在液体细菌培养基中耐镉(Cd)浓度高达 600 mg/L; 菌株 S-1 对 Cd²⁺ 有较好的吸附效果, 吸附率高达 75.4%。

关键词:筛选; 耐镉菌株; 生物学特性

中图分类号: X131.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0317-02

镉(Cd)是严重危害人类健康的重金属元素, 极微量就会对人体造成危害, 镉进入人体后, 可对肾脏、骨骼、肺部、心血管等器官造成危害。许多农村、城市的土壤和水资源受到不同程度的镉污染, 用受污染的水灌溉时, 可使灌区和下游地区的农作物受镉污染, 并富集于农作物中, 从而进一步危害人体健康。另外, 自然环境一旦被镉污染, 消除其影响是很困难的。生物修复技术是重金属污染土壤治理的重要手段之一, 具有处理费用低、对环境的影响小、效率高等优点, 目前, 利用微生物进行重金属污染土壤的修复是近几年国内外研究的热点。微生物是通过代谢活动及其产物来促进重金属的溶解, 从而提

高重金属在土壤中的生物有效性^[1], 微生物还能促进植物旺盛生长, 增大植物生物量, 通过强化植物来修复重金属污染土壤。本研究从镉污染土壤中分离耐镉细菌, 对其进行初步研究, 以期为该细菌在镉污染治理中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品 采自广东某铅锌矿区周围土壤。

1.1.2 培养基和试剂 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 6 g、NaCl 3 g、琼脂粉 12.0 g、水 600 mL, pH 值为 7.0~7.2; 液体培养基: 不加琼脂的牛肉膏蛋白胨培养基; 筛选培养基: 在固体牛肉膏蛋白胨培养基中, 加入不同浓度的 Cd²⁺ 溶液。硝酸镉、牛肉膏、蛋白胨、琼脂等试剂, 化学纯, 均为国产; 细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒、凝胶回收试剂盒等, 均购于大连宝生物工程有限公司; Goldview, 购于广州瑞真公司。

1.1.3 主要仪器 手提式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有

收稿日期: 2014-04-02

基金项目: 广东省科技计划(编号: 2011B010500018); 广东省韶关市科技计划(编号: 313-140513)。

作者简介: 许钦坤(1977—), 男, 山东单县人, 硕士, 讲师, 主要从事资源微生物利用研究。

通信作者: 赵翠燕。E-mail: bethzhao2003@163.com。

生态系统服务价值的评估虽然能为花江示范区生态系统恢复和建设提供一定参考, 但估算过程中有可能存在一些偏差或不足: (1) Costanza、谢高地等人计算的中国不同陆地生态系统单位面积生态服务价值固然不能体现出喀斯特地区的特殊性, 但刘宇等人计算出的与贵州省土地利用类型相对应的生态系统类型及其生态价值系数是否考虑了全部的生态系统服务, 对这些生态系统的估价是否准确需要进一步研究; (2) 花江示范区是贵州典型的喀斯特区域, 生态环境较差, 采用整个贵州范围内的生态系统服务价值系数来对其进行估算, 花江示范区的空间异质性也可能出现被低估的情况; (3) 计算中将裸岩石砾地与未利用土地对应, 园林系数取林地和草地的平均值可能会造成计算结果与实际情况有一定的偏差。

参考文献:

- [1] 欧阳志云, 王如松. 生态系统服务功能、生态价值与可持续发展[J]. 世界科技研究与发展, 2000, 22(5): 45-50.
- [2] 张飞, 孔伟. 苏州市不同土地利用变化类型的生态环境效应分析[J]. 江苏农业科学, 2011(1): 421-423.

- [3] 向悟生, 李先琨, 丁涛, 等. 土地利用变化对漓江流域生态服务价值影响[J]. 水土保持研究, 2009, 16(6): 46-50, 55.
- [4] 熊鹰, 谢更新, 曾光明, 等. 喀斯特区土地利用变化对生态系统服务价值的影响——以广西环江县为例[J]. 中国环境科学, 2008, 28(3): 210-214.
- [5] 陈起伟, 熊康宁, 蓝安军. 基于“3S”的贵州喀斯特石漠化现状及变化趋势分析[J]. 中国岩溶, 2007, 26(1): 37-42.
- [6] 张宁, 曾光建, 关国锋. 近 25 年来黑龙江省生态系统服务价值对土地利用变化的响应[J]. 国土资源情报, 2011, 20(9): 38-44.
- [7] Costanza R D, Arge R, Groot R, et al. The value of the world's ecosystem services and nature capital[J]. Nature, 1997, 386: 253-260.
- [8] 鲁春霞, 谢高地, 肖玉, 等. 青藏高原生态系统服务功能的价值评估[J]. 生态学报, 2004, 24(12): 2749-2755.
- [9] 刘宇, 陈学华, 罗勇. 土地利用变化对生态系统服务价值的影响——以贵州省为例[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(1): 219-223.
- [10] 李开忠, 彭贤伟, 熊康宁. 贵州喀斯特峡谷地区土地利用效果评价——以贵州花江峡谷地区为例[J]. 中国岩溶, 2005, 24(4): 293-299, 337.

限公司医疗设备厂生产; MAKE KA-1000 型低速离心机, 海安亭科学仪器厂生产; 恒温振荡培养箱, 金坛市晶玻实验仪器厂生产; SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的培养及分离纯化 试验选用稀释平板法^[2], 在无菌条件下, 将一定量的土样放入一定体积的无菌水中, 用移液管反复吹洗, 直至颗粒状样品打散, 摇匀, 分别配制 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 菌悬液; 分别吸取 0.1 mL 菌液, 置于含有 40 mg/L Cd^{2+} 的牛肉膏蛋白胨培养基内, 涂布均匀, 倒置于 37 °C 培养箱中培养 24 h; 待长出菌落后, 挑取光滑透明、湿润的单菌落划线分离, 在 37 °C 下倒置培养 24 h, 获得其纯培养; 进一步转接到含有 100 mg/L Cd^{2+} 的牛肉膏蛋白胨培养基中, 选用长势较好的菌作斜面, 4 °C 冰箱内保存。

1.2.2 菌株常规生理生化鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[3], 对菌株进行系列生理生化特性试验, 主要包括甲基红试验、乙酰甲基醇试验、淀粉水解试验、过氧化氢酶试验、明胶液化试验及吲哚试验等, 每组 2 个平行。

1.2.3 耐镉菌株 16S rRNA 基因序列分析 将筛选到的菌株接种到培养基平板上, 倒置于 37 °C 培养箱中培养 24 h; 取单菌落到液体培养基中摇床培养过夜; 用细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒提取总 DNA 为模板, 进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增, 所用引物为 27 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 R1492: 5'-GGCTACCTGTTCACGACTT-3'^[4]。PCR 总反应体系为: 10 × buffer 25 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, 模板 DNA 1 μL, dNTPs 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 去离子水补至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 5 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 由上海生工公司测序; 将 16S rDNA 的测序结果输入基因库 (GenBank) 进行序列比对。

1.2.4 菌株对镉的耐受性 配制含 Cd^{2+} 浓度分别为 0、100、200、300、400、500、600、700、800 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养液; 将斜面保存的菌株在无镉液体培养基中活化 24 h, 以 2% 接种量接入培养液中, 37 °C 振荡培养 24 h, 观察菌株生长情况。

1.2.5 菌株对镉的吸收性能 将斜面保存的菌株转接到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37 °C 振荡培养 24 h; 吸取菌液 0.5 mL 接入 50 mL 灭菌、含 Cd^{2+} 100 mg/L 的牛肉膏蛋白胨液体培养基, 以不加菌株、直接加入 0.5 mL 无菌水为对照培养基, 于 37 °C 下振荡培养 24 h; 细菌悬浮液经 12 000 r/min 离心 5 min, 取其上清液; 用原子吸收仪测定上清液中镉的浓度, 计算菌株对培养液中有效镉的吸附率: 吸附率 = $(C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%$, 式中, C_0 为对照的镉浓度 (mg/L), C_1 为吸附后上清液的镉浓度 (mg/L)^[5]。试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 耐镉菌株的筛选

从含 Cd^{2+} 100 mg/L 的培养基中分离得到 1 株耐镉细菌, 菌落乳白色, 表面粗糙, 不透明, 经革兰氏染色呈阴性; 菌体杆状, 命名为 S-1。经生理生化试验分析, 结果表明, 菌株 S-1

甲基红、乙酰甲基醇、淀粉酶、过氧化氢酶、明胶液化试验检测均呈阳性, 吲哚试验检测呈阴性。

利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到长度约为 1 500 bp 的扩增产物 (图 1)。Blast 比对分析显示, 菌株 S-1 与 *Bacillus cereus* AF290547 的 16S rDNA 序列同源性高达 97%, 结合形态观察和生理生化试验结果, 表明 S-1 菌株为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

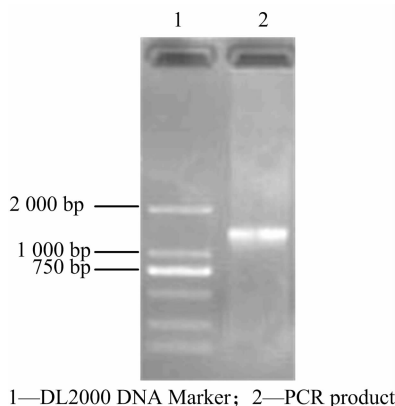


图1 PCR扩增结果

2.2 菌株对镉的耐受性

菌株 S-1 在含 Cd^{2+} 浓度范围 0 ~ 200 mg/L 的液体培养基中生长良好; Cd^{2+} 浓度超过 300 mg/L 时, 菌株 S-1 的生长受到抑制; 当 Cd^{2+} 浓度增加到超过 700 mg/L 时, 菌株 S-1 的生长完全被抑制。这说明菌株 S-1 对 Cd^{2+} 的最大耐受浓度为 600 mg/L。

2.3 菌株对镉的吸收性能

菌株 S-1 在含 Cd^{2+} 100 mg/L 的培养基 37 °C 下振荡培养 24 h, 离心, 收集上清液, 过原子吸收仪测定上清液中 Cd^{2+} 的浓度, 结果表明, 菌株 S-1 对 Cd^{2+} 的吸附率为 75.4%。

3 结论

试验筛选到 1 株耐镉菌株 S-1, 经生理生化试验和 16S rRNA 序列分析, 鉴定该菌株为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*); 菌株 S-1 的 Cd^{2+} 最大耐受浓度为 600 mg/L, 对 Cd^{2+} 的吸附率为 75.4%。菌株 S-1 对镉具有较强的抗性和富集能力, 在镉污染治理中有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 陈素华, 孙铁珩, 周启星, 等. 微生物与重金属间的相互作用及其应用研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 239-242.
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [3] 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.
- [4] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [5] 王俊丽, 任建国. 耐镉微生物的筛选及其吸附能力研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 499-502.