

研究报告

镉污染水土中抗镉菌株的筛选鉴定及功能特性

徐紫夏¹, 王婉婷¹, 郑文豪¹, 崔越童¹, 高启禹^{*1,2}¹ 新乡医学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003² 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000

徐紫夏, 王婉婷, 郑文豪, 崔越童, 高启禹. 镉污染水土中抗镉菌株的筛选鉴定及功能特性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1430-1446.

XU Zixia, WANG Wanting, ZHENG Wenhao, CUI Yuetong, GAO Qiyu. Screening, identification, and functional characterization of cadmium-tolerant bacteria in cadmium-polluted soil and water[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1430-1446.

摘要:【背景】重金属镉污染已经严重威胁到人类赖以生存的环境和生命安全。目前镉污染修复中微生物修复因其具有修复安全、简便、有效、成本低、环境友好等特点而具有更好的应用潜力。

【目的】从镉污染水土中筛选抗镉微生物, 为镉污染治理提供更佳的优势菌株。【方法】采用梯度稀释法和平板划线法从镉污染水土中筛选分离出 128 株抗镉菌株, 采用 16S rRNA 基因测序技术结合不同微生物的抗镉能力及遗传稳定性, 筛选到 1 株高抗镉菌株 HGX-24, 对其生物学特性及抗镉性能进行分析, 并通过傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、扫描电子显微镜-能量色散谱仪(scanning electron microscope-energy dispersive spectrometer, SEM-EDS)、胞外蛋白质和多糖含量测定等方法初步探究了菌株 HGX-24 在镉胁迫下的响应机制, 并通过植物盆栽试验探究了菌株 HGX-24 在修复镉污染中的实际应用效果。【结果】筛选分离的菌株 HGX-24 与已报道菌株的相似性≤97.0%, 为金黄杆菌属(*Chryseobacterium*), 该菌株的最高抗镉浓度为 350 mg/L, 遗传性能稳定, 可通过分泌胞外可溶性蛋白及结合菌体表面官能团对镉进行吸附, 并能有效缓解镉胁迫下玉米植株的氧化应激。【结论】抗镉菌株 HGX-24 具有较好的水土镉污染治理潜力, 在镉污染农田修复中发挥菌种优势。

关键词: 水土镉污染; 抗镉菌株; 分离鉴定; 抗镉机制

资助项目: 国家自然科学基金(82460093); 河南省科技攻关项目(222102320325); 河南省重点研发与推广项目(24B180011); 新乡医学院博士启动项目(XYBSKYZZ202125)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82460093), the Science and Technology Program of Henan Province (222102320325), the Key Research and Development and Promotion Project in Henan Province (24B180011), and the Doctoral Research Project of Xinxiang Medical University (XYBSKYZZ202125).

*Corresponding author. E-mail: gaog345@163.com

Received: 2024-07-17; Accepted: 2024-09-28; Published online: 2024-11-14

Screening, identification, and functional characterization of cadmium-tolerant bacteria in cadmium-polluted soil and water

XU Zixia¹, WANG Wanting¹, ZHENG Wenhao¹, CUI Yuetong¹, GAO Qiyu^{*1,2}

¹ School of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China

² School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

Abstract: [Background] Cadmium pollution has seriously threatened the environment and life safety of human beings. In recent years, microbial remediation has demonstrated great application potential due to its high safety, simple operation, effectiveness, low costs, and environmental friendliness. **[Objective]** To screen cadmium-tolerant microorganisms from cadmium-polluted soil and water and provide elite strains for the remediation of cadmium-polluted environments. **[Methods]** A total of 128 strains exhibiting tolerance to cadmium were isolated and identified from cadmium-polluted soil and water by gradient dilution and plate streaking methods. A highly cadmium-tolerant strain HGX-24 was successfully screened by 16S rRNA gene sequencing combined with the cadmium tolerance and genetic stability assays. The biological characteristics and cadmium tolerance properties of this strain were analyzed. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscope-energy dispersive spectrometer (SEM-EDS), and quantification of extracellular polysaccharides and proteins were employed to gain insights into the cadmium tolerance mechanism of HGX-24. Pot experiments were conducted to explore the application effect of HGX-24 in the remediation of cadmium pollution. **[Results]** The comparative genomic analysis revealed that the homology between the isolated strain HGX-24 and previously reported strains was below 97.0%, identifying HGX-24 as a strain of *Chryseobacterium*. This strain demonstrated exceptional cadmium tolerance, being capable of tolerating 350 mg/L cadmium and exhibiting genetic stability. It can adsorb cadmium through the secretion of extracellular soluble proteins and binding to chemical functional groups present on the bacterial surface. Moreover, it could alleviate the oxidative stress of maize under cadmium stress. **[Conclusion]** The cadmium-tolerant strain HGX-24 exhibits considerable potential for the remediation of cadmium-polluted soil and water and gives full play to the advantages of bacteria in the remediation of cadmium-polluted farmland.

Keywords: cadmium pollution of soil and water; cadmium-tolerant strains; isolation and identification; cadmium tolerance mechanism

随着社会的不断发展, 重金属污染已成为影响绿色生态发展的主要因素, 其不仅造成了严重的环境问题, 并且可通过食物链在人体内积累。常见的重金属包括镉(Cd)、汞(Hg)、砷(As)、铜(Cu)、铅(Pb)、铬(Cr)、锌(Zn)和镍(Ni)

等^[1], 其中镉(Cd)被认为是环境毒性最强的重金属之一。Cd在自然界分布广泛, 对人类的生命健康和生存环境均造成了严重的影响。近年来, 沙尘暴、海盐雾、农药产品的生产、工业废水的不当排放、火山活动及野火等自然因素, 以

及金属矿石^[2]的开采、风化、侵蚀和冶炼等人为因素的影响^[3],导致大量含镉废弃物进入环境,对土壤、大气、水体等产生了严重的污染,极大地威胁着人类的生存和健康。在我国的粮食主产区,耕地镉污染在所有的重金属污染中占比第一,其主要分布范围包括湖南、湖北、广东、云南、广西等中南地区和西南地区,尤其在郴州和黄石地区更为严重^[4-6]。

在水土中,镉主要以 CdCO_3 (高 pH) 和 CdS (低 pH) 的形式存在^[7],这些配合物很容易转化为植物可获取的吸收形式,被水稻、小麦、胡萝卜和芹菜等植物吸收。镉一旦进入人体,会与某些含羟基($-\text{OH}$)和巯基($-\text{SH}$)的低分子量蛋白结合^[8],导致机体内多种酶系统失活,影响人体对营养物质的吸收。其次镉还可以通过侵占 Ca^{2+} 通道进入细胞,使细胞内钙稳态失衡,并干扰相关的信号传递^[9]。

目前镉污染修复的方法主要包括物理修复^[10-11]、化学修复^[12]、生物修复和联合修复^[13]等,而近年来以微生物修复为主的生物修复凭借其安全、简便、有效、成本低、环境友好等特点而具有更深广的应用潜力^[14]。微生物修复是指在重金属的胁迫下,藻类、细菌、真菌等通过吸附、沉淀、淋滤、氧化还原等方式改变重金属的存在形态,调控重金属的生物有效性,将重金属转化为无毒或低毒化合物的修复方法。同时微生物能够通过生物转化、酶降解、外排物质产生和金属硫蛋白合成等方式抵抗镉离子的影响,对镉离子的生物降解发挥重要作用。其次镉离子可通过微生物细胞特有的胞外吸附、胞内沉淀^[15]、矿化沉淀^[16]、溶解活化^[17]和结合固定^[18]等方式予以固定处理,从而达到镉污染的治理效果。多数微生物菌株如阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*) T61、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等分泌的胞外聚合物(extracellular polymers, EPS)^[19-20]中存

在大量的羧基、羟基、羰基、巯基、酰基和磷酸基等带负电荷的官能团,这些官能团可通过离子交换、络合、共价吸附^[21]等方式与 Cd^{2+} 相结合从而达到固定环境中镉离子的目的。

1 材料与方法

1.1 样品

实验水土样本采集地点位于河南省新乡市凤泉区大块镇,使用采集器采集距地表 10–15 cm 的土壤及河渠水样,采集后保存至 4 °C 冰箱备用。玉米盆栽实验所用营养土,购买自河南新乡花卉市场。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨和酵母提取物,北京拜尔迪生物技术有限公司;琼脂粉,北京奥博星生物技术有限公司;氯化钠,天津市大茂化学试剂厂; CdCl_2 , 上海麦克林生化科技有限公司; QJ 磁珠,凯杰生物科技有限公司;过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒、过氧化物酶(peroxidase, POD)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒,南京建成生物工程研究所。

高压蒸汽灭菌锅, Tomy Digital Biology 公司;振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;高速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;扫描电子显微镜-能量色散谱仪(scanning electron microscope-energy dispersive spectrometer, SEM-EDS), 泰斯肯贸易有限公司;体视显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司; NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司;蓝色荧光定量系统, Promega 公司;红外光谱仪, Shimadzu 公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。

1.4 样本中水溶态镉离子含量及微生物多样性的检测

采用火焰原子吸收光谱法(flame atomic absorption spectroscopy, FAAS)检测采样地中水溶态镉离子的浓度^[22]。首先制备标准溶液,绘制标准曲线。随后取水土样品 1 g 加入无菌水 100 mL, 30 °C、180 r/min 悬浮培养 2 h 后 8 000 r/min 离心 10 min 取上清,使用超纯水逐级稀释后上机检测,代入标准曲线即获得样品中镉离子浓度。

同时通过 Illumina 测序法检测采样地的微生物多样性。首先使用 QJ 磁珠抽提水土样品的基因组 DNA 并利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 质量,使用 NanoDrop 2000 测定 DNA 的浓度和纯度。以上述提取的 DNA 为模板,使用携带 barcode 序列的上游引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和下游引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Pro Taq 10 μL, 上、下游引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, 模板 DNA (10 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 53 °C 3 s, 72 °C 45 s, 29 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。利用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒进行纯化,并用蓝色荧光定量系统对回收产物进行检测定量,按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。最后构建 Illumina EP300/PE250 文库进行测序。

1.5 高抗镉菌株的筛选、分离与鉴定

采用梯度稀释法和平板划线法^[23-24]将水土悬浮液梯度稀释,吸取 100 μL 10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 这 3 个稀释梯度的悬浮液涂布于含 50、100、150、200、250、300、350、400、450 和 500 mg/L 镉离子浓度的 LB 固体培养基上,30 °C 恒温培养箱中培养 3-5 d,接着挑取平板上的单菌落通过平板划线法进行纯化,划线接种并观察菌株

在不同镉离子浓度下的生长情况,由此获得最高抗镉浓度的菌株 HGX-24。通过 16S rRNA 基因测序^[22]对筛选得到的高抗镉菌株进行分子生物学鉴定,引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')。

Sanger 测序获得两端 raw sequence 后进行质控分析,对获取的 clean sequence 拼接组装,借助核酸序列(nucleotide sequence, NT)数据库进行物种相似度信息比较,完成菌种鉴定分析。同时使用体视显微镜对单菌落进行形态观察。

1.6 目的菌株的特征表征

高抗镉菌株 HGX-24 现保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC M20232105)。对目的菌株 HGX-24 的遗传稳定性、镉离子最低抑菌浓度、不同镉浓度下的生长曲线进行检测,使用 SEM-EDS 分析镉处理前后菌体形态差异和细菌表面元素的分布及含量变化。

1.7 目标菌株的抗镉机制

1.7.1 菌株 HGX-24 镉处理前后 SEM-EDS 分析

将目的菌株 HGX-24 分别接种至含有镉离子浓度为 0、350 mg/L 的 LB 液体培养基中,在 30 °C、180 r/min 恒温振荡摇床进行活化培养。取处于生长稳定期即菌体浓度达到 1×10⁹ CFU 的细菌培养液 10 mL, 4 °C、8 000 r/min 高速离心 5 min 后,使用 PBS (10×)洗涤菌体沉淀 3 次。采用扫描电子显微镜标准样品制备流程制备样品,流程如下:过夜固定(2.5%戊二醛)→缓冲液清洗 3 次以上→梯度乙醇脱水→乙酸异戊酯置换→二氧化碳临界点干燥→SEM 观察。

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

将目的菌株接种至含有 0、175、350 mg/L CdCl₂ 的 LB 液体培养基中进行培养。取处于生长

稳定期即菌体浓度达到 1×10^9 CFU 的细菌培养液 10 mL, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用无菌水洗涤 3 遍。将菌体进行冷冻干燥后过夜处理, 然后取固体粉末研磨并与溴化钾以 1:100 的比例压片制样, 采用红外光谱仪进行 FTIR 分析^[25]。

1.7.3 菌株胞外蛋白质、多糖含量的测定

将菌株 HGX-24 种子液($OD_{600} \geq 0.8$)按照 5% 的接种量接种在 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养, 每隔 24 h 收集菌液 10 mL, 10 000 r/min 离心 10 min 后获得上清液。采用考马斯亮蓝法^[26]测 EPS 中可溶性蛋白含量, 苯酚-硫酸法测 EPS 中可溶性多糖含量^[27-28]。

1.8 玉米盆栽试验

土壤样品为校园土壤与营养土以 2:3 的比例调配而成, 去除石块草茎等进行风干灭菌处理, 然后按照每盆 2 kg 土壤进行分装。盆栽研究的实验设计包括 6 个处理, 每个处理重复 3 次。各处理按完全随机方式分配: (1) 土壤中不加镉进行污染, 不添加菌株 HGX-24; (2) 土壤中不添加镉进行污染, 添加菌株 HGX-24; (3) 设置土壤镉浓度为 175 mg/L, 不添加菌株 HGX-24; (4) 设置土壤镉浓度为 175 mg/L, 添加菌株 HGX-24; (5) 设置土壤镉浓度为 350 mg/L, 不添

加菌株 HGX-24; (6) 设置土壤镉浓度为 350 mg/L, 添加菌株 HGX-24。镉以 $CdCl_2$ 溶液的形式施用, 各实验组菌株 HGX-24 经无菌水洗涤 3 次后加入, 添加浓度均为 1×10^9 CFU, 对照组加入等量的蒸馏水。平衡静置 7 d 后按照每盆 5 粒将浸泡过夜的玉米种子种植于花盆土壤 4–5 cm 深处, 并在发芽和生长期保持土壤湿润, 及时记录玉米生长情况。

处理 60 d 后进行收获, 用蒸馏水冲洗玉米根和叶, 记录玉米的株高及湿重。通过钼酸铵法^[29]测玉米内 CAT 活力、比色法测玉米体内 POD 活力、抽提法测玉米体内 SOD 活力。

1.9 数据分析

采用 Origin 2021 和 SPSS 21 软件进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 高抗镉菌株的筛选结果

本研究采用含镉培养基对镉污染地区的土壤和水体进行筛选, 共得到 128 株抗镉菌株, 比较最高抗镉浓度和遗传稳定性, 再次筛选得到 32 株高抗镉且遗传稳定性能更加稳定的菌株, 利用体视显微镜对其进行形态观察(图 1), 研究

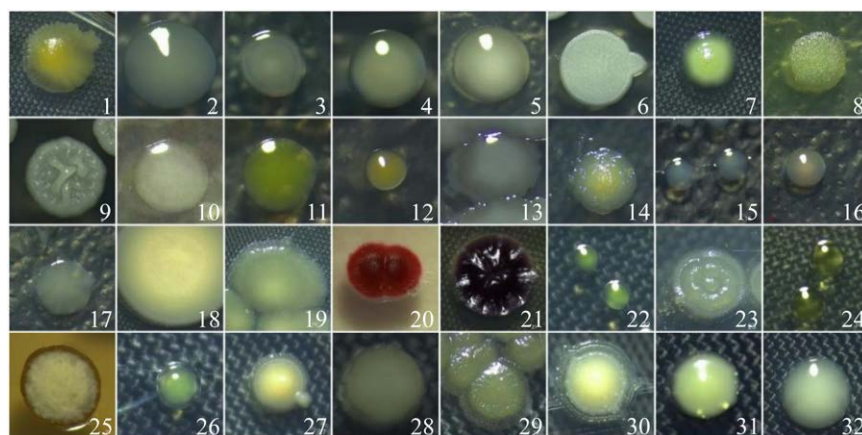


图 1 高抗镉菌株的形态观察

Figure 1 Morphological observation of high cadmium resistance strain.

证实筛选分离的菌株为厌氧及兼性厌氧菌, 大小形态各异, 以细菌及放线菌为主, 多数表面光滑且有凸起。

2.2 样本中镉离子浓度及微生物多样性分析

镉污染水土样本包括土壤样本 H1、M2 及水体样本 L3、K4, 通过测定发现样本中镉离子

浓度介于 31.159–0.191 $\mu\text{g/L}$ 之间, 并且土壤样本中水溶态镉离子浓度更高。

同时通过微生物多样性分析发现(图 2 和图 3), 门水平上, 含量较高的变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)占比分别为 44.55%、16.79%、9.26%、8.58%和

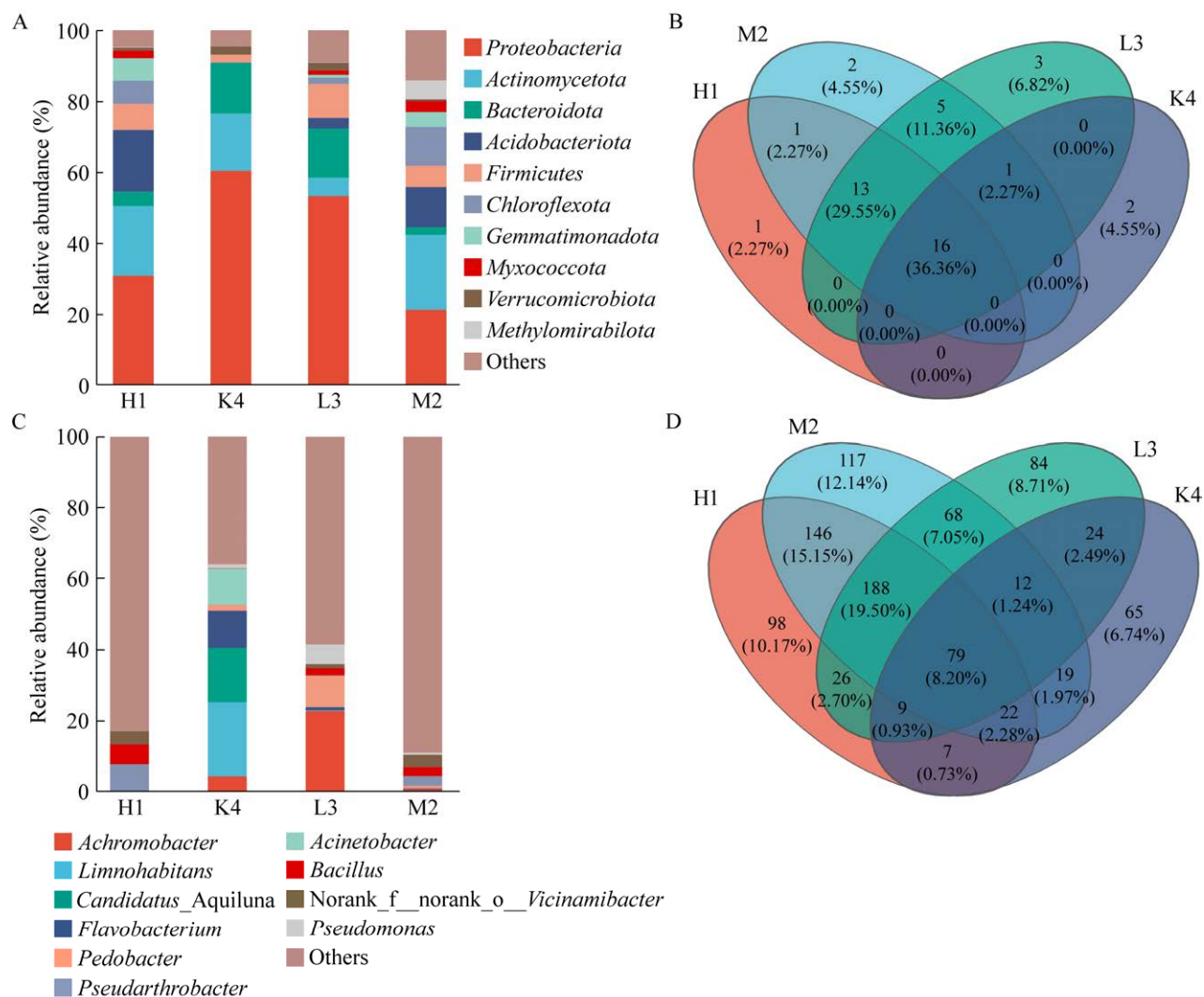
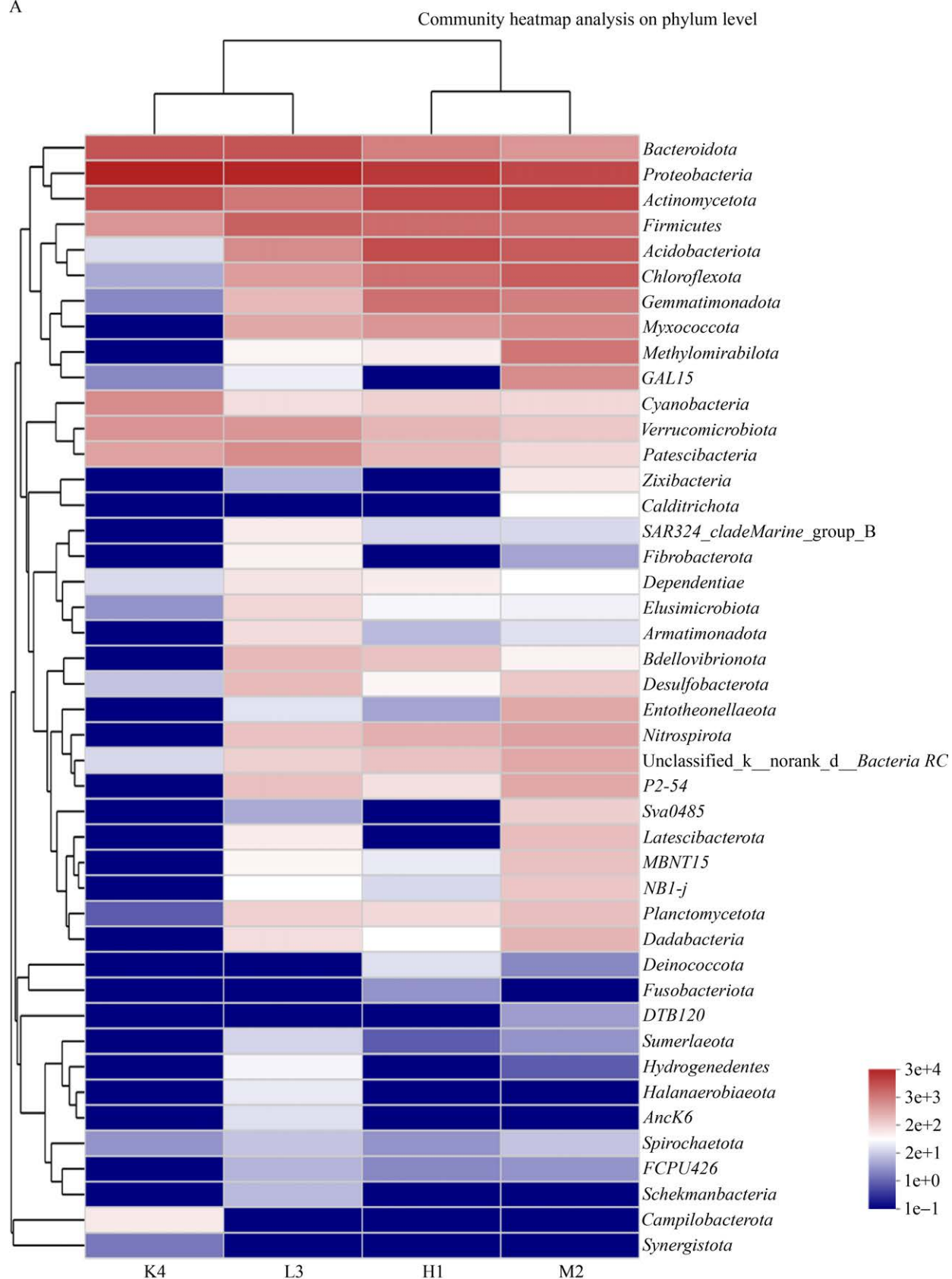


图 2 各样本的物种群落组成 A: 门水平上各样本的物种群落组成柱状图; B: 门水平上各样本的物种群落组成韦恩图; C: 属水平上各样本的物种群落组成柱状图; D: 属水平上各样本的物种群落组成韦恩图。

Figure 2 Community composition of each sample species site. A: The bar of species community composition of each sample at phylum level; B: Venn diagram of the species community composition of each sample at phylum level; C: The bar of species community composition of each sample at genus level; D: Venn diagram of species community composition of each sample at genus level.

A



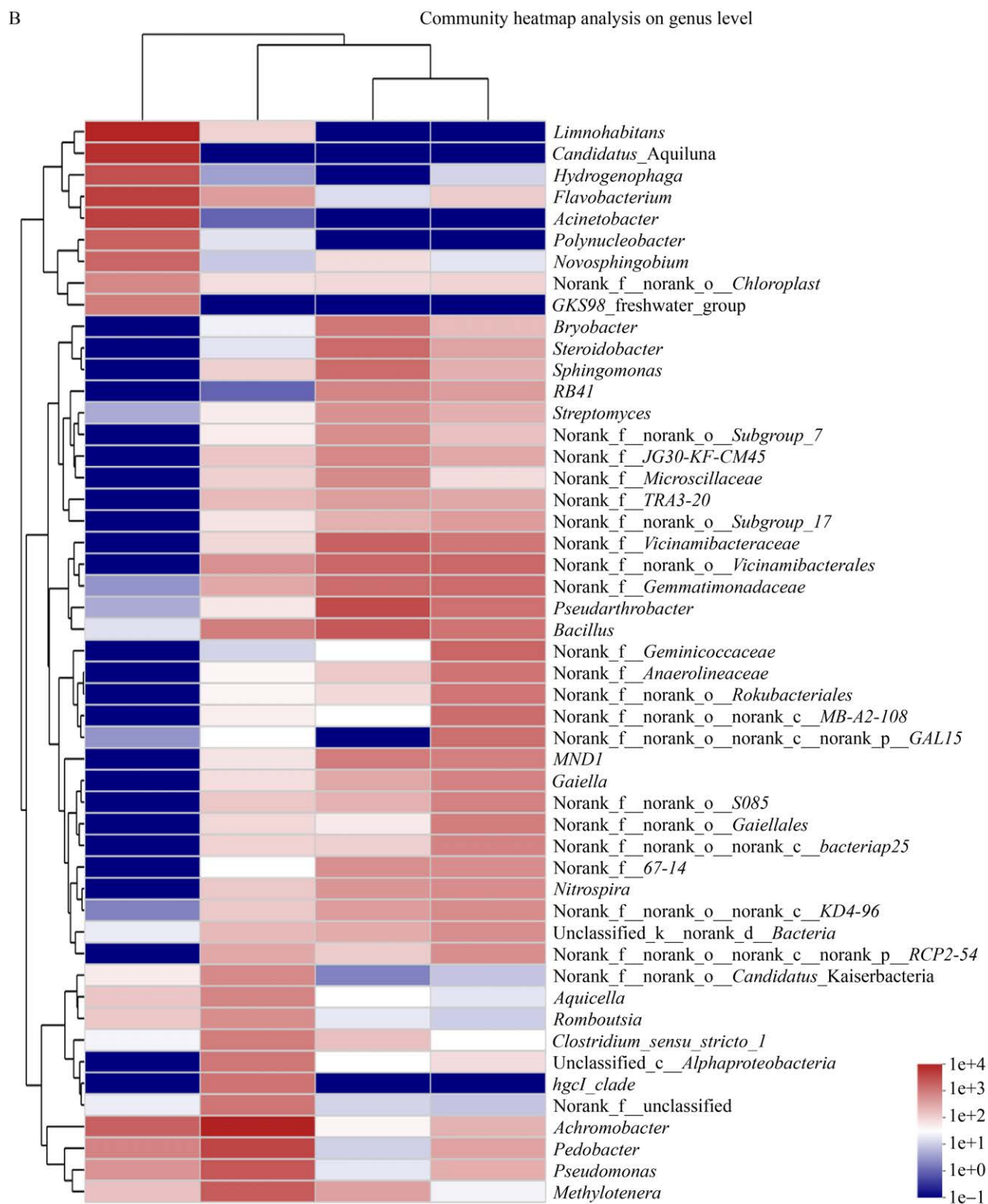


图3 各样本门水平(A)和属水平(B)的优势物种群落组成热图

Figure 3 Heatmap of dominant species community composition at both phylum (A) and genus levels (B).

6.78%。其中 H1 和 M2 的物种丰富度较高, 而 K4 的物种丰富度则最低(图 2A); H1、M2、L3 和 K4 中被检测出的物种数分别为 31、38、38 和 19, 样本中独有的物种数分别为 1、2、3 和 2, 共有的物种数为 16 (图 2B)。属水平上, 无色杆菌属(*Achromobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、土地杆菌属(*Pedobacter*)、假节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)占比较多, 分别为 19.18%、8.11%、7.92%、7.30% 和 7.05% (图 2C); H1、M2、L3 和 K4 中被检测出的物种数分别为 575、711、490 和 237, 其中 4 个样本中独有的物种数分别为 98、117、84 和 65, 共有的物种数为 79 (图 2D)。

2.3 目的菌株的确定及抗镉能力检测

将筛选出的菌株经 16S rRNA 基因鉴定并与 GenBank 中已登录的核苷酸序列号进行同源性比较, 发现菌株 HGX-24 与待定马氏金黄杆菌 (*Candidatus Chryseobacterium massiliae*) (登录号 FJ812379.1) 相似性为 96%, 初步鉴定为金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)新种, 其系统发育树如图 4 所示。

由图 5 可知, 菌株 HGX-24 的生长延迟期较短, 约 16 h 后达对数生长期末期, 此时菌体浓度为 6.5×10^9 CFU, 说明该菌生长状态良好, 生长成本低, 易培养。低镉条件下(镉浓度为 50 mg/L)对菌株 HGX-24 的生长有一定的促进作用, 但

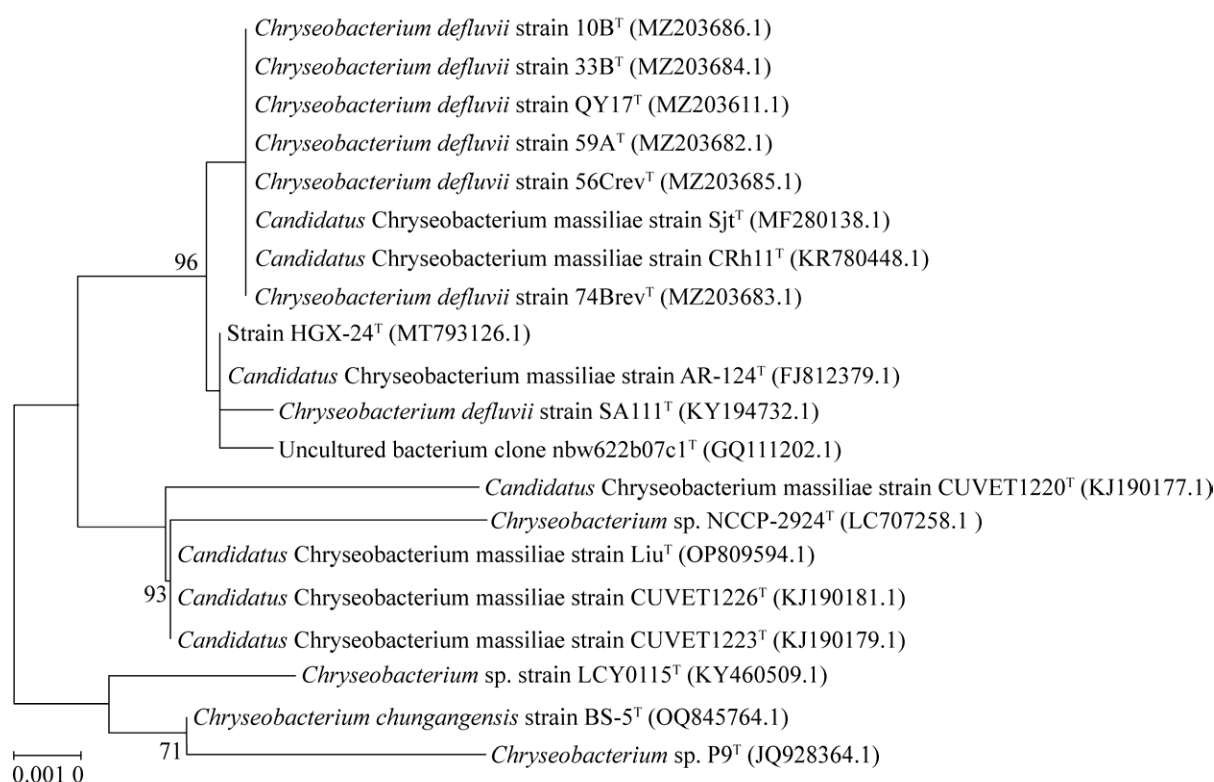


图4 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 HGX-24 的系统发育树 每个分支上方的值数表示自展值; 距离标尺用来显示序列的差异度比例; 括号中的数值代表 GenBank 登录号。

Figure 4 Phylogenetic tree of strain HGX-24 based on 16S rRNA gene sequence. The number of values above each branch represents the bootstrap, the distance ruler is used to show the difference ratio of the sequence, and the value in parentheses represents the GenBank accession number.

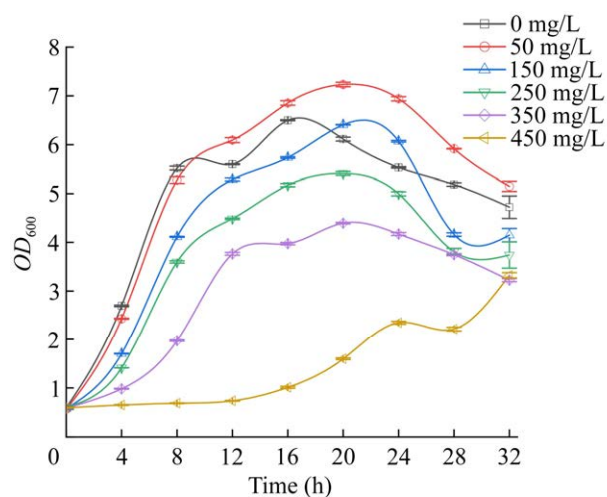


图5 菌株 HGX-24 的生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain HGX-24.

随着培养基中镉离子浓度的增加,菌株 HGX-24 的生长对数期逐渐推迟,菌体浓度也逐渐下降,当镉浓度超 350 mg/L 时对菌种的生长抑制显著。

2.4 SEM-EDS 分析

将抗镉菌株 HGX-24 分别在含有 0 mg/L Cd^{2+} 和 350 mg/L Cd^{2+} 的条件下培养 24 h,洗涤固定处理后使用扫描电子显微镜观察抗性菌株

HGX-24 在重金属镉处理前后细胞形态的变化,结果如图 6 所示。在无镉条件下(图 6A)菌株 HGX-24 呈短棒状,长度在 3.2–4.5 μm 之间,宽度在 0.7–1.0 μm 之间,表面光滑且均匀。在 350 mg/L 镉离子浓度下(图 6B),菌株 HGX-24 呈现不规则的棒状,长度及宽度分别介于 1.0–1.8 μm 和 0.3–0.8 μm 之间,表面呈竹节状,有明显的皱缩、弯曲及部分破裂。EDS 分析表明,相较于对照组,实验组中 C、O 元素含量下降,而 S、P、N、Cd 等元素有较明显的升高(图 7)。

2.5 菌株 HGX-24 的镉吸附性

2.5.1 菌株 HGX-24 红外光谱分析

细菌表面的一些活性化学基团在微生物的吸附过程中发挥着重要作用。由图 8 可知,菌株 HGX-24 在无镉条件下生长时,在 500–4 000 cm^{-1} 内均存在吸收峰。随着镉离子浓度的增加,FTIR 检测发现部分峰值发生明显偏移。随着镉离子浓度的增高,菌株表面官能团对应的峰值发生了明显偏移。其中 3 421 cm^{-1} 处的宽带对应-NH

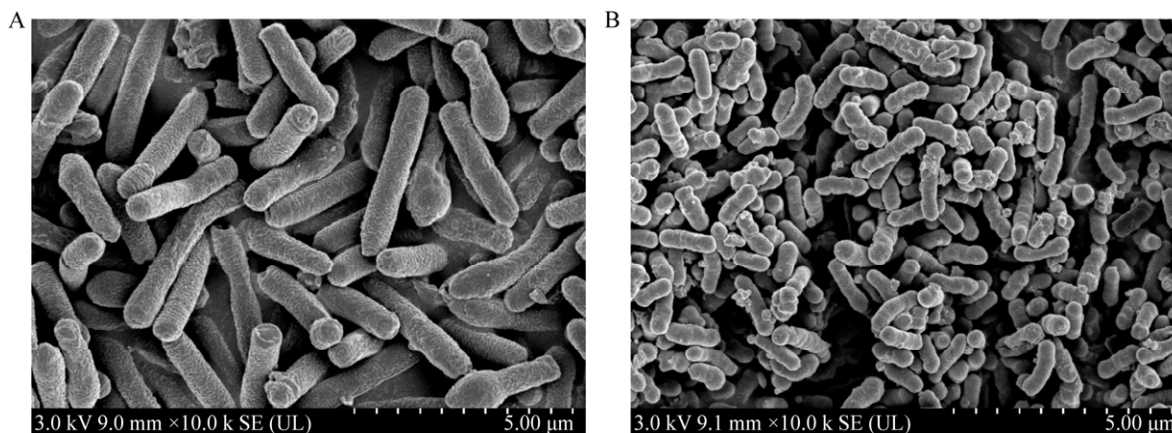


图6 菌株 HGX-24 的扫描电子显微镜形态图 A: 无镉条件下菌株 HGX-24 的形态特征图; B: 350 mg/L 镉离子浓度下菌株 HGX-24 的形态特征图。

Figure 6 Morphological diagram of strain HGX-24 by scanning electron microscope. A: Morphological characteristics of strain HGX-24 in the absence of cadmium; B: Morphological characteristics of strain HGX-24 under the concentration of cadmium ion at 350 mg/L.

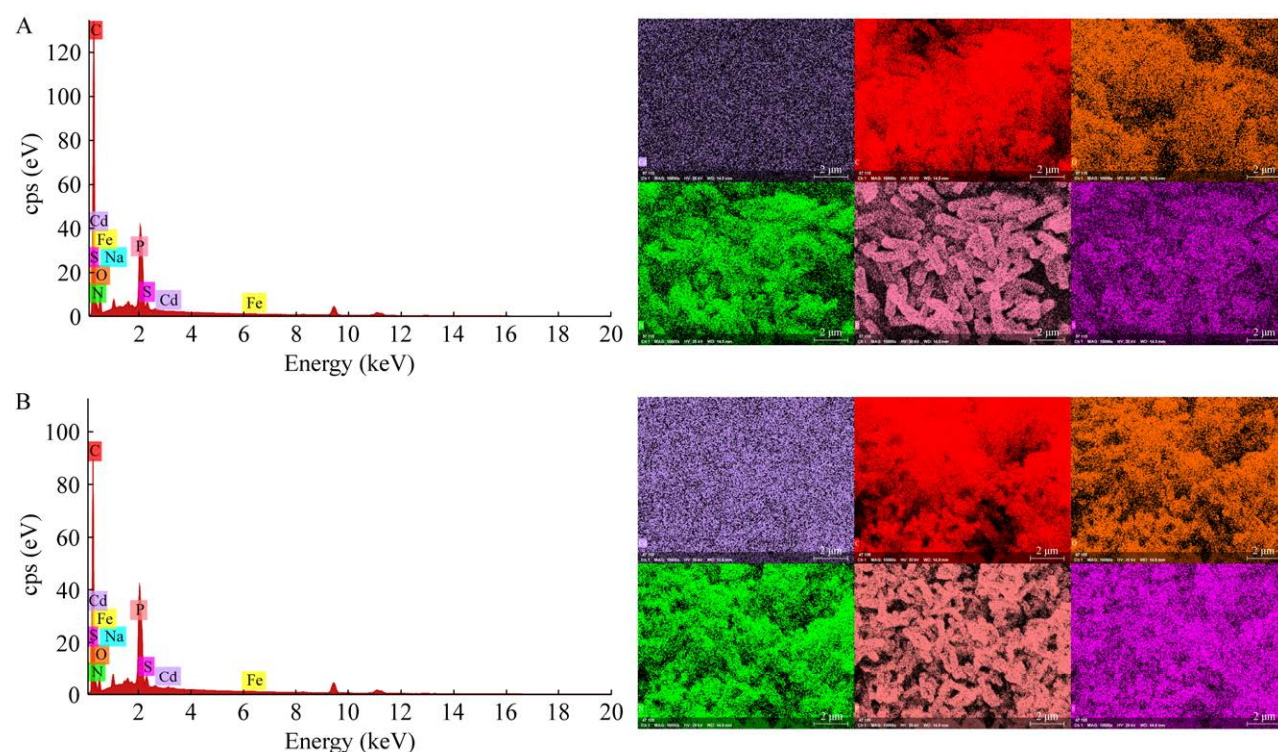


图7 菌株 HGX-24 表面元素分布情况 A: 无镉条件下菌株 HGX-24 表面元素分布情况; B: 350 mg/L 镉离子浓度下菌株 HGX-24 表面元素分布情况。

Figure 7 Distribution of elements on the surface of strain HGX-24. A: Distribution of elements on the surface of strain HGX-24 without cadmium; B: The distribution of elements on the surface of strain HGX-24 with 350 mg/L cadmium ion concentration.

和-OH 伸缩振动, 随着镉离子浓度的增加, 该峰变得更宽并且向左移动, 说明-NH 和-OH 通过伸缩振动参与对镉离子的吸附。随着镉离子浓度的增加, 2 929、2 831 和 774 cm^{-1} 处出现新的吸收峰, 主要是-CH 的伸缩振动和-OH 弯曲振动引起的, 说明在镉离子的存在下羧基(-COOH)表现活跃, 参与镉离子的吸收和积累。蛋白的酰胺II带中的 N-H 面内变形振动会在约 1 593 cm^{-1} 处产生吸收峰, 相较于对照组(不含镉), 镉浓度 175 mg/L 和 350 mg/L 的吸收峰分别左移了 3 cm^{-1} 和 17 cm^{-1} , 峰高逐渐降低。蛋白的酰胺III带中的 C-O 键伸缩振动和-NH 弯曲振动耦合约在 1 259 cm^{-1} 处有吸收峰, 相较于对照组, 镉浓度 175 mg/L 和 350 mg/L 的

吸收峰均右移约 2 cm^{-1} 和 5 cm^{-1} , 表明酰胺基(-CONH-)参与了镉离子的吸附和富集。1 078 cm^{-1} 处吸收峰是氨基中的 C-N 键的伸缩振动和磷酸基团的共同作用下形成的, 相较于对照组, 镉浓度 175 mg/L 和 350 mg/L 的吸收峰均右移约 7 cm^{-1} 和 8 cm^{-1} , 峰高逐渐降低, 说明菌株细胞壁上的磷酸基团和氨基参与重金属镉的吸附。1 384 cm^{-1} 处和 1 352 cm^{-1} 处吸收峰是-CH 弯曲振动峰, 相较于对照组, 最高抗镉浓度下 1 384 cm^{-1} 处的吸收峰消失了并且 1 352 cm^{-1} 处吸收峰左移了约 12 cm^{-1} ; 543 cm^{-1} 处吸收峰是 C-C=O 面内弯曲振动与 C-X (X 为卤素元素) 共同作用的结果, 随着镉离子浓度的增高, 此处峰度逐渐左移约 2 cm^{-1} 。以上结果表明菌株

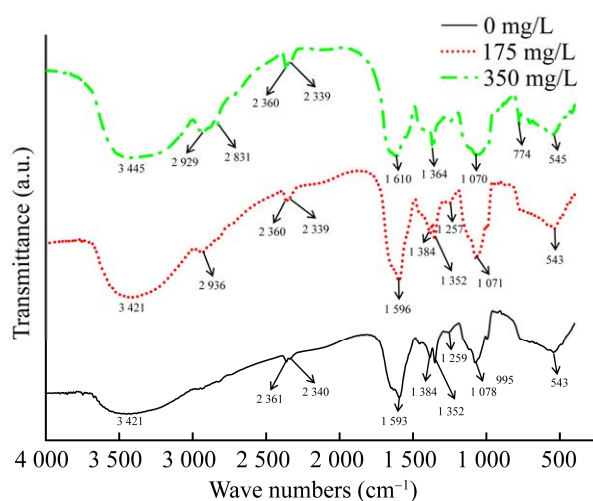


图 8 菌株 HGX-24 的傅里叶变换红外光谱分析
Figure 8 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis of strain HGX-24.

HGX-24 细胞壁上的羧基($-\text{COOH}$)、酰胺基($-\text{CONH}-$)、氨基($-\text{NH}$)、羟基($-\text{OH}$)、羰基($>\text{C}=\text{O}$)等活性基团能直接影响菌株对镉离子的吸附作用。

2.5.2 胞外聚合物含量分析

由图 9 可见,随着时间的增加,菌株 HGX-24

的胞外聚合物中可溶性蛋白含量呈现上升下降再上升的趋势,镉浓度为 0 mg/L 和 175 mg/L 的组别分别在 96 h 和 144 h 时达到最高,为 70.6 mg/mL 和 98.63 mg/mL (图 9A)。镉浓度为 175 mg/L 时,菌株 HGX-24 胞外聚合物中的可溶性蛋白含量显著高于无镉,由此推测在中镉浓度下,菌株 HGX-24 可通过分泌胞外蛋白质来抵抗镉的毒性,但镉浓度过高时对菌株毒害作用较强,抑制菌株 HGX-24 胞外蛋白质的分泌。而菌株 HGX-24 胞外聚合物中可溶性多糖含量则呈现下降上升再下降趋于平稳的变化趋势,3 个镉浓度下,菌株 HGX-24 均在 48 h 时可溶性多糖含量达到最大值,分别为 1.95、1.74 和 1.58 mg/mL (图 9B)。

2.6 菌株 HGX-24 对玉米生长的影响

如图 10 所示,随着盆栽中镉离子浓度的增加,玉米的株高呈现下降趋势,同时研究证明加入菌株 HGX-24 的组别生长状况均优于相同镉浓度下的未加菌组,由此说明该菌株 HGX-24 能有效减弱镉对玉米生长的不利影响。

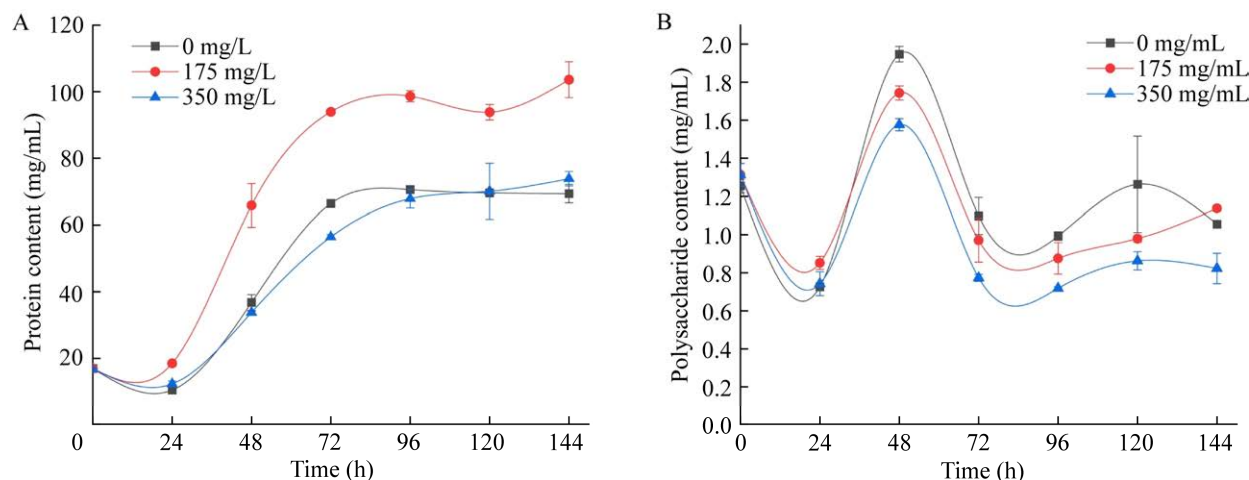


图 9 菌株 HGX-24 胞外聚合物中可溶性蛋白和可溶性多糖含量随时间的变化 A: 菌株 HGX-24 胞外可溶性蛋白含量随时间的变化; B: 菌株 HGX-24 胞外可溶性多糖含量随时间的变化。

Figure 9 Changes of soluble protein contents and soluble polysaccharides contents in EPS of HGX-24 with time. A: The change of extracellular soluble protein content of strain HGX-24 with time; B: The content of extracellular soluble polysaccharides of strain HGX-24 changed with time.

对各处理组玉米的株高与湿重通过 t 检验进行统计分析发现(图 11), 在未加入菌株 HGX-24 的情况下, 相较于不含镉离子的组别, 镉含量为 175 mg/L 时, 玉米株高减少了约 14.88%, 湿重下降了约 23.82%; 镉含量为 350 mg/L 时, 玉米株高减少了约 32.37%, 湿重下降了约 55.07%,

说明镉离子能明显抑制玉米的生长。相较于未加入菌剂 HGX-24 的组别, 镉含量为 0 mg/L 时, 加菌剂组玉米株高提高了约 21.68%, 湿重增加了约 112.33%, 说明菌剂 HGX-24 的加入对玉米的生长无毒害作用, 并且有利于玉米的生长; 镉含量为 175 mg/L 时, 加菌剂组玉米株高提高

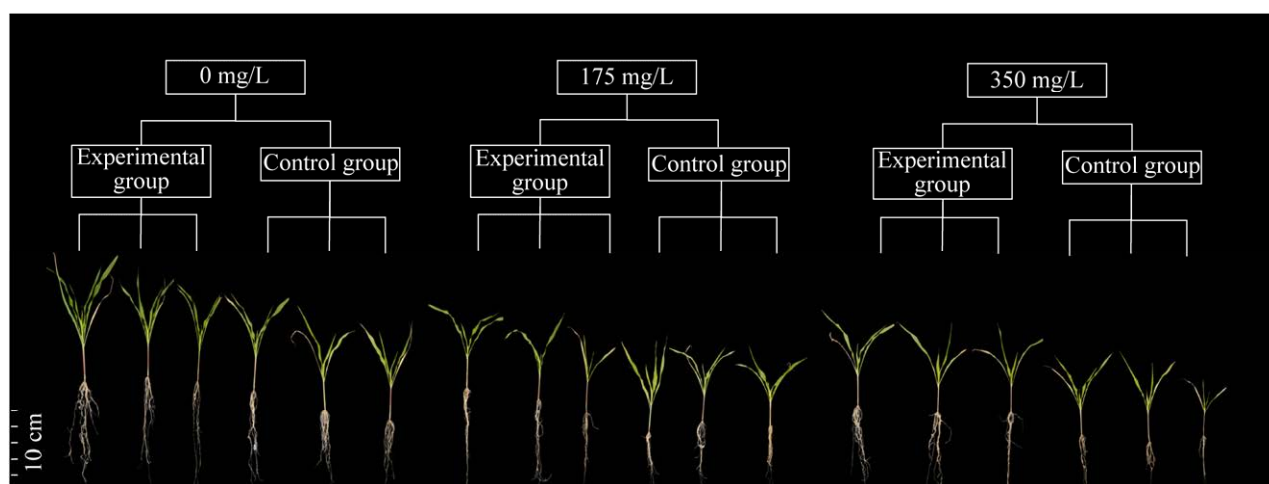


图 10 不同镉浓度处理下玉米的生长情况

Figure 10 Growth morphology of maize under different cadmium concentrations.

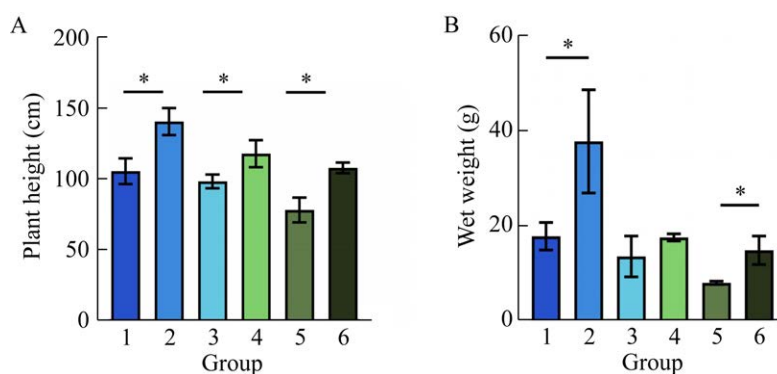


图 11 不同镉浓度处理下玉米的株高(A)及湿重(B) 1: 空白对照组; 2: 加菌组; 3: 175 mg/L 镉浓度下不加菌组; 4: 175 mg/L 镉浓度下加菌组; 5: 350 mg/L 镉浓度下不加菌组; 6: 350 mg/L 镉浓度下加菌组。

Figure 11 Plant height (A) and wet weight (B) of maize under different cadmium concentrations. 1: Blank control group; 2: Adding bacteria group; 3: No bacteria group at 175 mg/L cadmium concentration; 4: Adding bacteria group at 175 mg/L cadmium concentration; 5: No bacteria group at 350 mg/L cadmium concentration; 6: Adding bacteria group at 350 mg/L cadmium concentration. *: $P < 0.05$.

了 19.86%，湿重增加了约 29.71%；镉含量为 350 mg/L 时，玉米株高提高了约 38.04%，湿重增加了约 85.71%，说明菌株 HGX-24 能有效缓解镉离子对玉米生长的抑制作用。

为进一步探究菌株 HGX-24 的加入对镉处理下玉米生长的影响，分别对玉米地上部分和地下部分的 CAT、POD 和 SOD 的活力进行检测(图 12)。经 *t* 检验分析发现，不同镉浓度下，加入菌株 HGX-24 的玉米体内 3 种氧化还原酶活性均高于未添加 HGX-24 的组别，说明菌株 HGX-24 能通过协助玉米增加体内 CAT、POD 及 SOD 的活性来抵抗活性氧的不利影响。同时对加入 HGX-24 组的氧化还原酶活性与未加菌剂组相比，镉浓度为 0 mg/L 时，地上部分 SOD 活力提高了约 21.01%，地下部分 CAT 活力提高了约 16.58%，POD 活力提高了约 8.25%，SOD 活力提高了约 36.70%。镉浓度为 175 mg/L 时，地上部分 CAT 活力提高了约 52.28%，POD 活力提高了约 8.60%，地下部分 CAT 活力提高了

约 303.23%，POD 活力降低了约 8.24%，SOD 活力提高了约 31.50%。镉浓度为 350 mg/L 时，地下部分的 CAT 活力提高了约 566.67%，SOD 活力提高了约 49.57%。这说明菌株 HGX-24 能有效促进玉米的新陈代谢及生长。

3 讨论

自然界中的镉(Cd)作为一种有毒的重金属，对环境微生物的影响具有双向性，低浓度的镉在微生物菌株蛋白质合成、酶活性构型维持、氧化还原等过程中发挥积极作用，但是高浓度的镉则能够破坏菌株细胞壁的完整性、干扰 DNA 和 RNA 的合成、诱导部分酶的构型发生变化、阻碍辅因子与生物分子的结合，甚至会直接破坏细胞的物理结构，包括细菌表面的完整性，导致细菌表面出现皱缩现象^[30]。目前研究证实细菌对镉的抗性机制主要体现在细胞表面的吸附作用和内部积累作用^[31]。而胞外聚合物^[32]作为微生物代谢过程中产生的化合物，

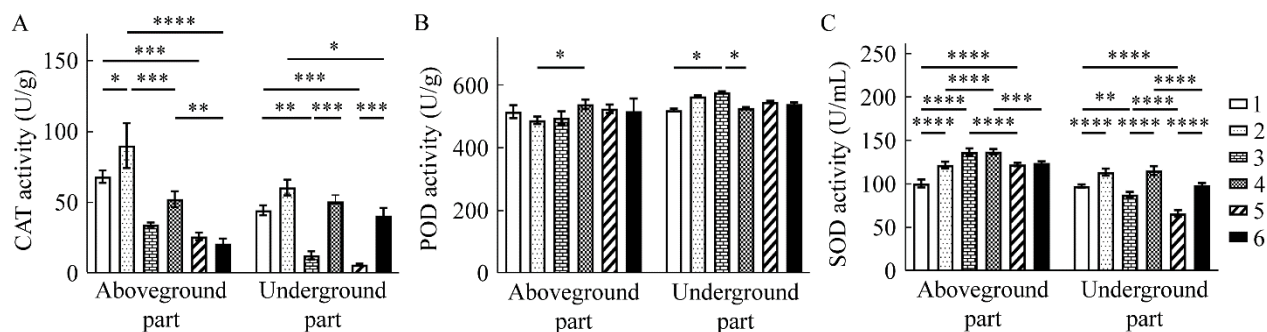


图 12 不同镉浓度处理下玉米地上部分和地下部分的 3 种氧化还原酶活力 A: 过氧化氢酶; B: 过氧化物酶; C: 超氧化物歧化酶。1: 空白对照组; 2: 加菌组; 3: 175 mg/L 镉浓度下不加菌组; 4: 175 mg/L 镉浓度下加菌组; 5: 350 mg/L 镉浓度下不加菌组; 6: 350 mg/L 镉浓度下加菌组。

Figure 12 Activities of three oxidoreductases in aboveground and underground parts of maize under different cadmium concentrations. A: Catalase; B: Peroxidase; C: Superoxide dismutase. 1: Blank control group; 2: Adding bacteria group; 3: No bacteria group at 175 mg/L cadmium concentration; 4: Adding bacteria group at 175 mg/L cadmium concentration; 5: No bacteria group at 350 mg/L cadmium concentration; 6: Adding bacteria group at 350 mg/L cadmium concentration. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

其成分包括蛋白质、多糖、脂类及其他物质^[33], 主要元素为 C、H、O、N、P、S 等, 在细菌对重金属的吸附作用中发挥着极其重要的作用。

本研究从镉污染土壤中筛选得到一株抗镉菌株 HGX-24, 在培养过程中发现, 在较低的镉浓度(175 mg/L)下, 可溶性蛋白的总含量最高, 说明菌株 HGX-24 可通过分泌胞外蛋白质来抵抗镉的毒性。而镉浓度过高时对菌株毒害作用较强, 抑制菌株 HGX-24 胞外蛋白质的分泌。但微生物分泌的可溶性多糖含量受镉离子浓度的影响, 呈现出明显的负相关, 可能与微生物对镉离子的调控响应有关。通过 EDS 分析发现, 在镉的影响下, 菌株 HGX-24 表面的 C、O 元素含量减少, N、P、S、Cd 等元素含量均发生明显增多, 由此证明菌株 HGX-24 可能会通过改变细胞胞外聚合物的组成成分来抵抗镉离子对细菌的影响。同时, FTIR 分析结果表明, 在重金属的影响下, 细菌细胞壁上的羧基(-COOH)、酰胺基(-CONH-)、氨基(-NH)、羟基(-OH)、羰基(>C=O)等负电荷官能团能与 Cd^{2+} 结合, 从而达到吸附环境中镉离子的目的。

有研究表明, 存在于水土环境中的高镉离子能导致植物产生较多的生理障碍, 如光合作用、可溶性蛋白下降及相关抗氧化酶活性的降低等, 同时增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 导致植物氧化应激的发生^[34], 从而进一步导致植物生长迟缓、生物量和谷物产量减少等。而氧化胁迫必然与植物中的 Cd 胁迫相关, 抗氧化防御机制能够保护植物免受氧化胁迫损害^[35]。抗氧化酶可以清除植物体内的 ROS, 减轻 Cd 对植物的非生物胁迫; 其中 SOD 是构成抵抗 ROS 第一道防线的关键酶, 可将超氧自由基转化为毒性较低的物质, 产生 H_2O_2 ; CAT 和 POD 是清除过量 H_2O_2 的重要酶, 通过将其催化为水和二价氧以进行 ROS 的解毒^[36]。

通过对不同处理组玉米的株高及湿重分析发现, 镉离子能明显抑制玉米的生长, 而菌株 HGX-24 的加入能明显改善镉离子对玉米生长的抑制作用。在无镉处理的情况下, 加入 HGX-24 的组别玉米生长情况优于不加菌的组别, 说明菌株 HGX-24 对玉米的生长无毒害作用。同时, 本研究发现镉胁迫下加入菌株 HGX-24 的处理组 CAT、POD 和 SOD 的活力均有所提高, 说明菌株 HGX-24 能调控玉米体内 3 种氧化还原酶的活力, 以降低活性氧毒害的目的。

4 结论

本研究筛选的抗镉菌株 *Chryseobacterium* sp. HGX-24 对重金属镉具有较高的耐受能力, 其最高抗镉浓度可达 350 mg/L 且遗传性能稳定。同时, 菌株 HGX-24 能借助胞外聚合物和细胞壁上的羧基(-COOH)、酰胺基(-CONH-)、氨基(-NH)、羟基(-OH)、羰基(>C=O)等活性基团对镉离子进行有效吸附。另外, 在镉污染环境下, 菌株 HGX-24 能通过调节胞外可溶性蛋白和多糖的分泌来调控重金属镉离子对菌体生长的不利影响, 并通过提高植物体内氧化还原酶活力来抵抗镉胁迫导致的氧化应激。综上所述, 本研究筛选分离的菌株 HGX-24 具有潜在的修复镉污染水土的能力。

REFERENCES

- [1] PENG JY, ZHANG S, HAN YY, BATE BT, KE H, CHEN YM. Soil heavy metal pollution of industrial legacies in China and health risk assessment[J]. Science of the Total Environment, 2022, 816: 151632.
- [2] CHEN L, ZHOU MX, WANG JZ, ZHANG ZQ, DUAN CJ, WANG XX, ZHAO SL, BAI XH, LI ZJ, LI ZM, FANG LC. A global meta-analysis of heavy metal(loid)s pollution in soils near copper mines: evaluation of pollution level and probabilistic health risks[J]. Science of the Total Environment, 2022, 835: 155441.
- [3] XU D, WANG ZJ, TAN XY, XU HH, ZHU DB, SHEN RL, DING K, LI HC, XIANG LJ, YANG ZB.

- Integrated assessment of the pollution and risk of heavy metals in soils near chemical industry parks along the middle Yangtze River[J]. Science of the Total Environment, 2024, 917: 170431.
- [4] HU BF, SHAO S, NI H, FU ZY, HU LS, ZHOU Y, MIN XX, SHE SF, CHEN SC, HUANG MX, ZHOU LQ, LI Y, SHI Z. Current status, spatial features, health risks, and potential driving factors of soil heavy metal pollution in China at province level[J]. Environmental Pollution, 2020, 266: 114961.
- [5] TANG SQ, YANG K, LIU F, PENG M, LI K, YANG Z, LIU XJ, GUO F, MA HH. Overview of heavy metal pollution and health risk assessment of urban soils in Yangtze River Economic Belt, China[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2022, 44(12): 4455-4497.
- [6] SHI JD, ZHAO D, REN FT, HUANG L. Spatiotemporal variation of soil heavy metals in China: the pollution status and risk assessment[J]. Science of the Total Environment, 2023, 871: 161768.
- [7] 吴炎, 潘子晴, 朱春鹏, 丁姝昱, 张志军, 胡坤. 重金属污染土工程性质研究进展[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2020, 50(6): 750-756.
- WU Y, PAN ZQ, ZHU CP, DING SY, ZHANG ZJ, HU K. Research progress on engineering properties of heavy metal contaminated soil[J]. Journal of Henan University (Natural Science), 2020, 50(6): 750-756 (in Chinese).
- [8] WANG RY, SANG PT, GUO YH, JIN P, CHENG YL, YU H, XIE YF, YAO WR, QIAN H. Cadmium in food: Source, distribution and removal[J]. Food Chemistry, 2023, 405: 134666.
- [9] GALDIERI J, ADAMS C, PADILLA M, STAWICKI TM. The role of calcium, Akt and ERK signaling in cadmium-induced hair cell death[J]. Molecular Cell Neuroscience, 2023, 124: 103815.
- [10] OH SJ, IRSHAD MK, KANG MW, ROH HS, JEON Y, LEE SS. *In-situ* physical and chemical remediation of Cd and Pb contaminated mine soils cultivated with Chinese cabbage: a three-year field study[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 459: 132091.
- [11] LI SK, WEN YJ, WANG YF, LIU M, SU LZ, PENG ZJ, ZHOU Z, ZHOU N. Novel α -amino acid-like structure decorated biochar for heavy metal remediation in acid soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 462: 132740.
- [12] 李萍, 黄文丽, 熊川, 彭梅芳, 金鑫, 李强. 一株耐镉细菌 *Exiguobacterium acetylicum* TC13 的分离鉴定及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1583-1599.
- LI P, HUANG WL, XIONG C, PENG MF, JIN X, LI Q. Isolation, identification, and whole-genome analysis of a cadmium-tolerant bacterium *Exiguobacterium acetylicum* TC13[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1583-1599 (in Chinese).
- [13] FAN WJ, DENG JM, SHAO L, JIANG SM, XIAO TF, SUN WM, XIAO EZ. The rhizosphere microbiome improves the adaptive capabilities of plants under high soil cadmium conditions[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 914103.
- [14] LIU F, ZHANG KL, ZHAO Y, LI D, SUN XY, LIN L, FENG HP, HUANG Q, ZHU ZQ. Screening of cadmium-chromium-tolerant strains and synergistic remediation of heavy metal-contaminated soil using king grass combined with highly efficient microbial strains[J]. Science of the Total Environment, 2024, 912: 168990.
- [15] LI Q, XING YN, HUANG B, CHEN X, JI L, FU XW, LI TY, WANG JN, CHEN GH, ZHANG Q. Rhizospheric mechanisms of *Bacillus subtilis* bioaugmentation-assisted phytostabilization of cadmium-contaminated soil[J]. Science of the Total Environment, 2022, 825: 154136.
- [16] PENG DH, QIAO SY, LUO Y, MA H, ZHANG L, HOU SY, WU B, XU H. Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 400: 123116.
- [17] 王杏, 王革娇, 史凯祥. 微生物镉解毒机制及微生物-植物互作修复研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1666-1680.
- WANG X, WANG GJ, SHI KX. Research progress in microbial detoxification of cadmium and bioremediation based on microorganism-plant interaction[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1666-1680 (in Chinese).
- [18] 张金秀, 苏琳, 蒋明, 李明锐, 王灿, 何永美, 陈建军, 湛方栋. 丛枝菌根真菌减少污染土壤 Cd 淋溶流失的效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(9): 1936-1943.
- ZHANG JX, SU L, JIANG M, LI MR, WANG C, HE YM, CHEN JJ, ZHAN FD. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on Cd leaching loss in contaminated soil and its preliminary mechanism[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(9): 1936-1943 (in Chinese).
- [19] VANDANA, PRIYADARSHANEE M, DAS S. Bacterial extracellular polymeric substances: biosynthesis and interaction with environmental pollutants[J]. Chemosphere, 2023, 332: 138876.
- [20] RUMBAUGH KP, SAUER K. Biofilm dispersion[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(10): 571-586.
- [21] YU Q, FEIN JB. Sulfhydryl binding sites within bacterial extracellular polymeric substances[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(11): 5498-5505.
- [22] NUGRAHA ED, MELLAWATI J, Wahyudi, KRANROD C, Makhsum, TAZOE H, AHMAD H, HOSODA M, AKATA N, TOKONAMI S. Heavy metal assessments of soil samples from a high natural background radiation area, Indonesia[J]. Toxics, 2022, 10(1): 39.
- [23] MA B, SONG WL, ZHANG XX, CHEN MX, LI JP, YANG XQ, ZHANG L. Potential application of novel cadmium-tolerant bacteria in bioremediation of Cd-contaminated soil[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 255: 114766.
- [24] YAN ZX, LI Y, PENG SY, WEI L, ZHANG B, DENG XY, ZHONG M, CHENG X. Cadmium biosorption and mechanism investigation using two cadmium-tolerant microorganisms isolated from rhizosphere soil of rice[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 470: 134134.
- [25] FAN RJ, XIE WX, MA HQ, ZHU MK, MA K, YAN XF. Isolation of cadmium-resistant microbial strains and their immobilisation of cadmium in soil[J]. Biodegradation, 2023, 34(5): 445-459.

- [26] 张楠, 杨洁秋, 蔡思恒, 陈欣欣, 彭堂见, 杨飞. *Sphingopyxis* sp. YF1 吸附镉的特性及其机制[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3330-3344.
ZHANG N, YANG JQ, CAI SH, CHEN XX, PENG TJ, YANG F. Characteristics and mechanisms of cadmium adsorption by *Sphingopyxis* sp. YF1[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3330-3344 (in Chinese).
- [27] MORE TT, YADAV JSS, YAN S, TYAGI RD, SURAMPALLI RY. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications[J]. Journal of Environmental Management, 2014, 144: 1-25.
- [28] SIDDHARTH T, SRIDHAR P, VINILA V, TYAGI RD. Environmental applications of microbial extracellular polymeric substance (EPS): a review[J]. Journal of Environmental Management, 2021, 287: 112307.
- [29] 陈彦芳, 曹柳, 马建华, 刘超, 李双纳. 土壤重金属复合污染钝化修复对酶活性的影响[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2020, 50(1): 1-10.
CHEN YF, CAO L, MA JH, LIU C, LI SN. Effect of *in situ* remediation of soil contaminated with multiple heavy metals on enzyme activities[J]. Journal of Henan University (Natural Science), 2020, 50(1): 1-10 (in Chinese).
- [30] SONG HJ, PENG L, LI ZY, DENG XZ, SHAO JH, GU JD. Metal distribution and biological diversity of crusts in paddy fields polluted with different levels of cadmium[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 184: 109620.
- [31] HUANG H, JIA Q, JING W, DAHMS HU, WANG L. Screening strains for microbial biosorption technology of cadmium[J]. Chemosphere, 2020, 251: 126428.
- [32] IZADI P, IZADI P, ELDYASTI A. Holistic insights into extracellular polymeric substance (EPS) in anammox bacterial matrix and the potential sustainable biopolymer recovery: a review[J]. Chemosphere, 2021, 274: 129703.
- [33] QIU DH, YU ZY, ZHANG X, WEN C, YAN CZ. Influence of extracellular polymeric substances on arsenic bioaccumulation and biotransformation in biofilms[J]. Chemosphere, 2024, 349: 140798.
- [34] QIN SY, XU YF, NIE ZJ, LIU HE, GAO W, LI C, ZHAO P. Metabolomic and antioxidant enzyme activity changes in response to cadmium stress under boron application of wheat (*Triticum aestivum*)[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(23): 34701-34713.
- [35] CUYPERS A, VANBUEL I, IVEN V, KUNNEN K, VANDIONANT S, HUYBRECHTS M, HENDRIX S. Cadmium-induced oxidative stress responses and acclimation in plants require fine-tuning of redox biology at subcellular level[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 199: 81-96.
- [36] 魏婧, 徐畅, 李可欣, 贺红军, 徐启江. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. 植物生理学报, 2020, 56(12): 2571-2584.
WEI J, XU C, LI KX, HE HJ, XU QJ. Progress on superoxide dismutase and plant stress resistance[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(12): 2571-2584 (in Chinese).