

抗锌细菌 *Sphingomonas* sp. DX-T3-03 分离、 鉴定及性质

王慧萍 谢学辉 柳建设*

(东华大学环境科学与工程学院 上海 201620)

摘要: 从江西德兴铜矿重金属污染土壤中筛选得到一株对重金属锌具有极强抗性的菌株, 命名为 DX-T3-03。对该菌株进行形态观察、生理生化试验, 采用 16S rRNA 序列分析, 鉴定该菌为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)。研究其最佳生长条件及抗重金属特性。试验结果表明: 该菌株的最适应生长条件为温度 35°C, pH 约 6.7, 转速 150 r/min; 对重金属锌有极高抗性, 可以达到 25 mmol/L 及以上, 并能够在多种单一及复合重金属(Cu 70 mg/L、Cd 300 mg/L、Pb 400 mg/L、Ni 60 mg/L)中生长。

关键词: 重金属, 抗锌细菌, 分离鉴定, 16S rRNA

Isolation, Identification and Characteristics of a Zn-resisting Bacterium, *Sphingomonas* sp. DX-T3-03

WANG Hui-Ping XIE Xue-Hui LIU Jian-She*

(School of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: A strain of resistance to zinc with high concentration, named DX-T3-03, was isolated from the metal-polluted sediment of soils around Dexing copper mine. Basing on morphology, biochemical and physiological characterization, DX-T3-03 was characterized as *Sphingomonas* sp.. A phylogenetic tree was constructed with the published 16S rRNA sequences of relative bacteria species. In the phylogenetic tree, the DX-T3-03 strain has the closest relative to *Sphingomonas aquatilis* strain JSS-7 with 99% sequence homeology. The optimum growth conditions of DX-T3-03 strain were temperature of 35°C, pH of 6.7, rotating rate of 150 r/min. It could resist zinc of 25 mmol/L or above and be able to grow in a variety of single and combined heavy metals (Cu 70 mg/L, Cd 300 mg/L, Pb 400 mg/L, Ni 60 mg/L).

Keywords: Heavy metals, Zinc resistance, Identification, 16S rRNA

随着采矿业的发展和重金属在电镀、冶金、化工和制药业等方面的应用, 重金属污染日趋严重。由于重金属在土壤中难降解、难迁移、危害期长等

特点, 已使得土壤重金属污染成为国内外普遍关注的环境问题之一。其中重金属锌既是重要的营养元素, 也是污染元素。锌曾被誉“生命之花”^[1], 是维

基金项目: 全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目(No. 200549); 国家自然科学基金项目(No. 50874032); 上海市重点学科建设项目(No. B604)

* 通讯作者: Tel: 86-21-67792973; 信箱: liujianshe@dhu.edu.cn
收稿日期: 2010-04-07; 接受日期: 2010-06-04

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

持机体正常生长发育、新陈代谢的重要物质。我国是产锌大国,最大的消费领域是镀锌工业,消费量约占锌总产量的30%–40%。除此之外,其它工业产生的含锌废水也不容忽视。许多实验和流行病学调查已经证实,如果锌在人体内含量过高,将会抑制吞噬细胞的活性和杀菌力,从而降低人体的免疫功能,对疾病易感性增加。最近的科学研究表明,摄入过量的锌,会对人体造成一定的伤害,甚至可引起中毒,以至死亡^[2-4];同时锌中毒会导致胰腺、肾和体内多元系统(Multisystem)功能紊乱甚至死亡^[5]。

对于重金属的处理,由于传统的物理或化学方法常伴随二次污染,且运行费用高,操作复杂,已越来越不适宜现代污染治理的需要。近年来,微生物在重金属污染治理的潜在应用前景使得其在处理重金属污染问题上成为国内外一个新型的研究方向^[6]。因此,筛选新的具有高抗性能力的微生物并研究它们的抗性机理也成为当前的主要任务之一。

Sphingomonas sp.是一类丰富的新型微生物资源,具有特殊的细胞结构,可用于芳香化合物的生物降解^[7-9]。但其在重金属方面的研究甚少报道。本研究对长期受重金属污染土壤中筛选出的一株高抗锌菌株 DX-T3-03 进行了研究。通过其生理生化分析、16S rRNA 鉴定并针对重金属锌及其它重金属的抗性试验,以期探讨此细菌对重金属的抗性机制,为该菌在重金属污染治理中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 培养基与仪器

菌种富集培养基 I (PTYG): 蛋白胨 0.25 g, 胰蛋白胨 0.25 g, 酵母粉 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 30 mg, 微量元素溶液 3300 μL, 置于容量瓶中, 蒸馏水定容至 1 L, pH 约 6.7。

无机盐培养基 II: KH₂PO₄ 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, NaCl 1.0 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 微量元素溶液 3300 μL, 置于容量瓶中, 蒸馏水定容至 1 L, pH 约 6.5。

固体培养基: 在相应的液体培养基基础上加入质量分数 1.5%的琼脂, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min。

重金属储存液: 分别配制 ZnSO₄·7H₂O 1 mol/L, C₄H₆O₄Pb·3H₂O 0.5 mol/L, NiSO₄·6H₂O 1 mol/L, CuSO₄·5H₂O 1 mol/L, Cd(NO₃)₂·4H₂O 2 mol/L (均为分析纯药品), 于酸浸泡过夜的 50 mL 塑料瓶中避光

保存。

仪器: YXQ-LS-30 S II 型立式压力蒸汽高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司); Hitachi U-2910 型日立紫外分光光度计(天津市科学器材公司); YP202N 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); TF-1A 型生化培养箱(江苏姜堰市分析仪器厂); 超净工作台(上海精密仪器仪表有限公司); Olympus CX31 型双目生物显微镜(上海锐聪实验室设备有限公司)。

1.2 富集培养与分离纯化

实验用土壤取自德兴铜矿重金属污染地区, 于受重金属污染的土壤中取一定量土样接入 PTYG 富集培养液中, 经 Zn²⁺ 在富集培养液中梯度压力式驯化法驯化, Zn²⁺ 浓度梯度依次为 2、5、8、10、15、20 mmol/L, 于 35°C 条件下培养 3–4 d 后, 选取培养基明显变浑浊者于固体培养基平板(浓度为 20 mmol/L Zn²⁺ 的富集固体培养基)上接种培养, 多次平板涂布法分离直至得到耐受性较高的单菌落 DX-T3-03。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态学与生理生化鉴定: 菌株的生理和生化特性实验测定方法及初步鉴定见《常见细菌系统鉴定手册》^[10]。

1.3.2 16S rRNA 的 PCR 扩增及系统发育分析: 为进一步准确鉴定该菌, 进行 16S rRNA 提取纯化、测序并构建系统发育树。按照天根公司 DNA 提取试剂盒的说明书进行细菌基因组 DNA 的提取, 以提取的细菌 DNA 为模板进行 16S rRNA 的 PCR 扩增。用于 16S rRNA 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 27F: 5'-AGAGTTYGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'^[11-12]。测序由上海生工完成。将测序结果用 BLAST 软件于 GenBank 中的 16S rRNA 序列进行同源性比较分析。用 ClustalX 进行序列比对后采用 MEGA 3.1 软件进行系统发育分析。

1.4 生长条件试验

每次选定一个因素作为变量(如温度、pH 值、通气量), 保持其它因素不变, 考察其对菌体生长的影响。基本试验条件为: 以初始培养液(未接菌悬液时)为空白参比, 调节 PTYG 培养液的初始值, 接入事先于 35°C 培养 24 h 的 DX-T3-03 菌液, 控制摇瓶

中的菌浓度为 1×10^6 CFU/mL, 每一条件做 3 个平行试验, 定时取样测定菌体浓度(OD_{600} 值表示)。

1.5 菌株 DX-T3-03 对重金属的耐受性试验

以下试验菌均为事先于 35°C 培养 24 h 的 DX-T3-03 菌, 并控制摇瓶中的菌浓度为 1×10^6 CFU/mL。在 PTYG 培养液中投加 Zn^{2+} 储存液, 使其浓度分别为 0、4、8、25、40 mmol/L, 于最优生长条件下培养并定时取样, 测定菌体浓度(以 OD_{600} 值表示), 用以确定菌株 DX-T3-03 在不同浓度 Zn^{2+} 下的生长曲线; 参照不同重金属对微生物的毒性浓度^[13-15], 将菌液接种于单一及复合重金属(Cu 70 mg/L、Cd 300 mg/L、Pb 400 mg/L、Ni 60 mg/L) 的富集培养液中, 显微镜下观察其生长状况。

2 结果

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌株的形态学观察: 在光学显微镜下对菌株 DX-T3-03 观察发现, 该菌株为短杆菌, 大小约为 $(0.4-0.6) \mu\text{m} \times (1.0-2.0) \mu\text{m}$ 。将菌株 DX-T3-03 接种于 PTYG 固体平板培养基上, 于 35°C 恒温培养箱中培养 24 h 后, 观察发现, 菌落呈圆形, 凸起, 乳白略带淡黄色, 表面光滑湿润, 不透明, 边缘规则整齐, 极易挑起。菌株 DX-T3-03 的菌落和 SEM 图片见图 1 和图 2。

2.1.2 菌株生理生化特性: 具体常规生理生化特性见表 1。

该菌株 DX-T3-03 革兰氏染色阴性, 无芽孢, 接触酶阳性, 表 1 列出了菌株 DX-T3-03 的生理生化指标。根据《伯杰细菌鉴定手册》^[16], 其特征与鞘氨醇单胞菌属细菌较为相似。

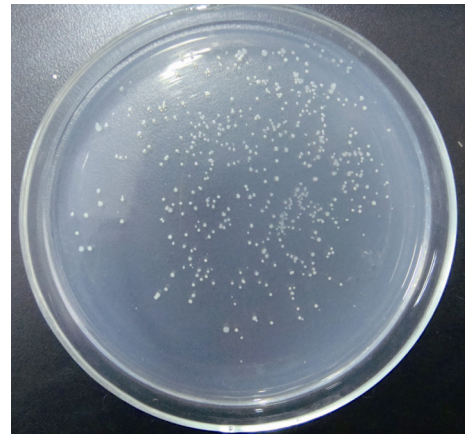


图 1 菌株 DX-T3-03 的菌落

Fig. 1 Colony of strain DX-T3-03

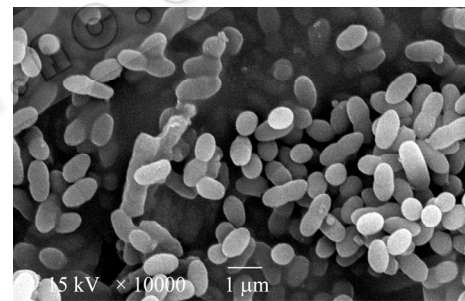


图 2 菌株 DX-T3-03 的电镜扫描

Fig. 2 SEM photo of strain DX-T3-03

表 1 菌株 DX-T3-03 的生理生化特性
Table 1 Physio-biochemical characteristics of strain DX-T3-03

试验项目 Items	结果 Results	试验项目 Items	结果 Results	试验项目 Items	结果 Results
接触酶 Catalase	+	V-P	-	D-甘露糖 D-Mannose	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	吲哚 Indole	-	D-果糖 D-Fructose	+
4°C 生长 Growth at 4°C	-	产 H_2S Production of H_2S	-	α -半乳糖 α -Galactose	+
41°C 生长 Growth at 41°C	-	淀粉水解 Starch hydrolysis	-	D-岩藻糖 D-Fucose	+
水解明胶 Gelatin hydrolysis	-	葡萄糖 Glycerol	+	D-甘露醇 D-Mannitol	+
硝酸盐还原 Nitrate reducing	-	麦芽糖 Maltose	+	D-木糖 D-xylose	+
反硝化 Nitrate used as a nitrogen source	-	纤维二糖 Cellobiose	+	葡聚糖 Glucan	-
甲基红 Methyl red	-	蔗糖 Sucrose	+	α -乳糖 α -Lactose	-

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

2.1.3 16S rRNA 的 PCR 扩增及系统发育分析: 将所得的 DX-T3-03 的 16S rRNA 序列(GenBank 上的基因登录号为 GQ895737)在 NCBI 上进行 BLAST 比较, 结果显示其 16S rRNA 序列与 *Sphingomonas aquatilis* strain JSS-7 (AF131295)的亲缘关系最近, 同源性为 99%。为确定该菌株的系统发育位置, 选取了一些鞘氨醇单胞菌构建系统树, 并选择 *Escherichia coli* 为外群, 各菌株名称及序列号见图 3。

2.2 培养条件对菌株 DX-T3-03 生长的影响

2.2.1 pH 的影响: 分别调节 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 各样的终点 pH 为

3.5、3.8、5.2、6.5、7.2、8.4、8.9、9.7、10.4。菌体的生长情况如图 4 所示。

由图 4 可见, pH 对菌体生长影响不大, 当 pH 在 5-9 间菌体均能较好地生长, 过酸或过碱, 如 pH 值为 3.5、3.8、9.7、10.4 的培养基均会抑制目的菌株的生长。DX-T3-03 生物量维持较高值的最佳 pH 值为 5-7, 其中 pH 值为 8.4、8.9 时细菌生长量偏低, 可见目的菌的耐碱性较弱, 耐酸性较强。最后选定培养基自身 pH 为最优值, 约为 6.7。

2.2.2 温度的影响: 菌株 DX-T3-03 分别在 20°C、25°C、30°C、35°C、37°C、41°C、45°C 进行振荡培养 24 h, 其生长情况如图 5 所示。

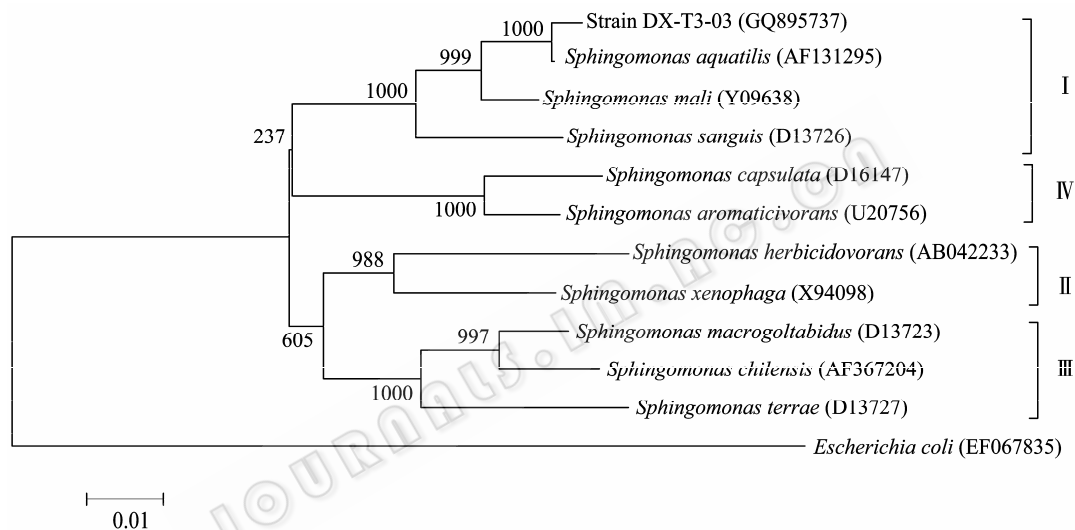


图 3 菌株 DX-T3-03 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of strain DX-T3-03

注: 发育树节点的数字表示 Bootstrap 值, 表示进化距离, 括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号, 0.01 为进化距离的标尺。

Note: Numbers in branches are the length of a branch denotes the genetic distance between the two taxa it connects (based on 1000 samplings), the numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. 0.01 is the length of scale bar.

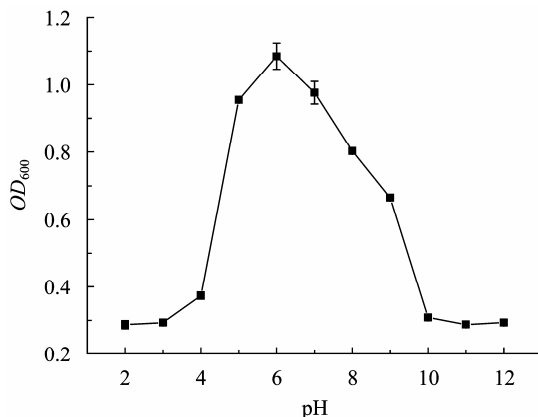


图 4 不同 pH 对菌株 DX-T3-03 生长的影响

Fig. 4 Effect of pH values on the growth of strain DX-T3-03

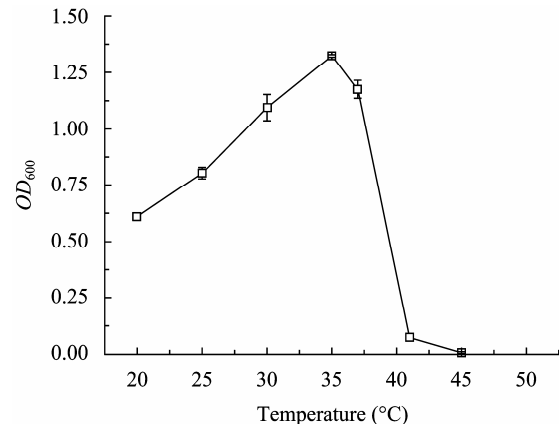


图 5 不同温度对菌株 DX-T3-03 生长的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the growth of strain DX-T3-03

温度对菌体的影响由图 5 可见, 此菌在温度 30°C–37°C 范围内生长较好, 属于中温微生物, 温度过高或过低都不利于菌体生长。

2.2.3 通气量的影响: 好氧微生物为异养型微生物, 它们以有机底物为其生长繁殖的主要基质, 而其中对有机物的氧化分解是以氧的消耗为先决条件的。摇床的转动旨在为微生物提供充足的氧气。调节摇床转速至 0、60、90、120、150、180、210 r/min, 恒温振荡 24 h 后, 通气量对菌体的生长影响可如图 6 所示。

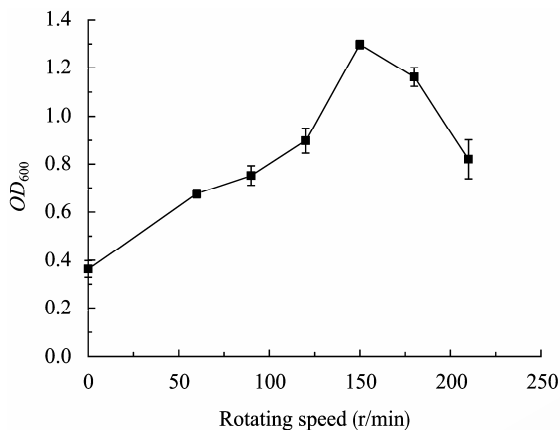


图 6 不同转速对菌株 DX-T3-03 生长的影响
Fig. 6 Effect of shaking speed on growth of strain DX-T3-03

在摇床转速 < 150 r/min 时, 由于没有足够的氧气, 细菌生长缓慢。细菌在转速为 150–180 r/min 均生长良好。考虑能量节省和菌体生长问题, 在其生长相差不大的情况下, 控制较小的摇床转速。因此, 选择通气量 150 r/min 作为理想的培养条件之一。

2.3 重金属耐受性试验结果

2.3.1 菌株 DX-T3-03 对不同浓度 Zn²⁺ 的耐受性: 图 7 是初始 Zn²⁺ 浓度分别为 0、4、8、25、40 mmol/L 下菌株 DX-T3-03 的生长曲线。

由图 7 可见, 8 mmol/L 锌浓度的菌株生长量较 4 mmol/L 稍高。25 mmol/L 以下的锌浓度对 DX-T3-03 的生长抑制作用较小。加入锌离子后, 延长了菌体的延滞期, 进入对数期后的生长量稍低, 当锌浓度为 40 mmol/L 时会对 DX-T3-03 的生长产生较强的抑制作用。菌株能够在含锌 (25 mmol/L 以下) 的液体培养基中良好生长, 表明该菌株对锌具有极强的耐受性。

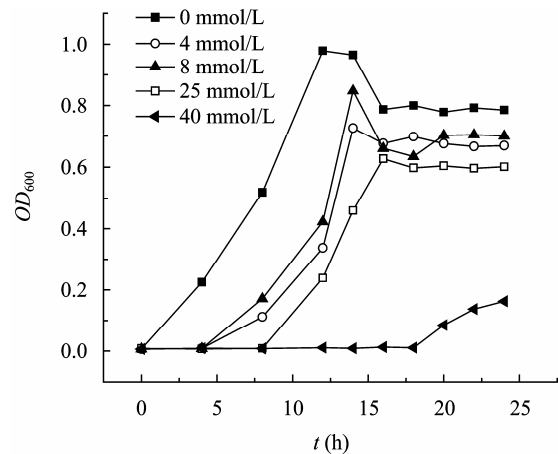


图 7 不同锌浓度下菌株 DX-T3-03 生长曲线
Fig. 7 Growth curve of strain DX-T3-03 on different Zn²⁺ concentration

2.3.2 单一及复合重金属的抗性试验结果: 表 2 为菌株 DX-T3-03 对单一及复合重金属 (Zn 400 mg/L, Cu 70 mg/L, Cd 300 mg/L, Pb 400 mg/L, Ni 60 mg/L) 的抗性试验结果。

重金属 Heavy metal	结果 Results
Zn + Pb	++
Zn + Cd	+
Zn + Cu	++
Zn + Ni	++
Zn + Pb + Cd	+
Zn + Ni + Pb	++
Zn + Cu + Ni	++
Zn + Pb + Cd + Ni	+
Zn + Cu + Ni + Pb	+
Zn + Pb + Cd + Ni	+
Zn + Cu + Ni + Cd	+
Zn + Cd + Cu + Pb	+
Zn + Cd + Cu	+
Zn + Pb + Cd + Ni + Cu	+
Cd	+
Cu	++
Pb	++
Ni	++

注: +: 生长; ++: 生长良好。

Note: +: Grown; ++: Grow well.

可见, 菌株 DX-T3-03 不仅对锌有较强抗性, 也能在单一的 Cu、Pb、Cd、Ni 及复合污染培养基中不同程度地生长。复合重金属污染对该菌的生长影响还需进一步研究。

3 讨论

鞘氨醇单胞菌属在环境中分布广泛,但从重金属污染场地中分离出的该属细菌的报道较少,盛下放等人从铜矿废弃土壤中分离出耐铜菌株 *Sphingomonas* sp. (JM14、YM22 和 YM12)^[17]。Tangaromsuk J 等人^[18]研究得出 *Sphingomonas paucimobilis* 对重金属 Cd 最大抑制浓度达到 200 mg/L,研究表明该菌株对重金属 Cd 具有吸附性能,该菌株对重金属最大去除率可以达到 84%。

从受重金属污染场地中筛选得到一株对重金属锌具有高抗性的菌株 DX-T3-03,经生理生化、Biolog 及 16S rRNA 序列分析,该菌株属于鞘氨醇单胞菌属。将所得序列与已知的 16S rRNA 序列进行同源性比较,菌株 DX-T3-03 与鞘氨醇单胞菌属的多种菌株具有较高的同源性(大于 95%),其中与 *Sphingomonas aquatilis* strain JSS-7 (AF131295)的同源性高达 99%。因此,该菌株可归属为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.),在系统分类学上属于变形细菌 α 亚类。从图 3 的系统发育树可以看出,鞘氨醇单胞菌属菌株分为 4 个分支,菌株 DX-T3-03 位于第 I 类中。

Sphingomonas sp. DX-T3-03 对重金属锌具有高抗性,能够在浓度高达 25 mmol/L 的 Zn^{2+} 培养基中较好地生长。根据 Mergeay 等人^[19]的分类,耐锌浓度超过 10 mmol/L 就为抗锌细菌。因此,可以判断出菌株 DX-T3-03 为超强抗锌细菌。并且,其能在单一 Cu、Cd、Pb、Ni 的培养基中较好地生长,也能在复合重金属培养基中生长,这为菌株 DX-T3-03 对重金属复合污染土壤的生物修复提供前提条件。

尽管如此,鞘氨醇单胞菌与重金属相互关系及其抗性机理几乎没有报道。因此,研究鞘氨醇单胞菌抗性基因,可为进一步阐明细菌抗性机理,进而构建耐重金属基因工程菌,为修复环境重金属污染提供重要理论基础。

参 考 文 献

- [1] 郑超一,胡妙申. 在儿童生长发育中铅的危害与锌的作用. 广东微量元素科学, 2001, 8(10): 10-13.
- [2] Irving JA, Mattman A, Lockitch G, et al. Element of caution: a case of reversible cytopenias associated with excessive zinc supplementation. *Canadian Med Association*, 29(2): 129-131.
- [3] Li B, Wang F, Luo W, et al. Effect of excessive Zn^{2+} and

deficient Zn^{2+} on the expression of wild type p53m RNA in rate flicoma cells. *J Hyg Res*, 2002, 31(2): 116-117.

- [4] 孔祥英,刘力建. 饲料锌过量对幼鼠脑发育及学习记忆的影响及其机理探讨. 中华预防医学杂志, 1998, 32(4): 225-228.
- [5] Sheline CT, Behrens MM, Choi DW. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *The J Neurosci*, 2000, 20(9): 3139-3146.
- [6] 周薇. 耐铅锌微生物的筛选及吸附性能的研究. 成都: 四川农业大学, 2009: 12-21.
- [7] 胡杰,何晓红,李大平,等. 鞘氨醇单胞菌研究进展. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431-437.
- [8] 苟敏,曲媛媛,杨桦,等. 鞘氨醇单胞菌: 降解芳香化合物的新型微生物资源. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 276-282.
- [9] Andreas Stolz. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009(81): 793-811.
- [10] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-390.
- [11] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing//STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1991: 115-175.
- [12] Liu JS, Xie XH, Xiao SM, et al. Isolation of *Leptospirillum ferriphilum* by single-layered solid medium. *J Cent South Univ Technol*, 2007(4): 467-473.
- [13] 张汉波,郑月,曾凡,等. 几株细菌的重金属抗性水平和吸附量. 微生物学通报, 2005, 32(3): 24-29.
- [14] Takashi Kunto, Satoshi Dhibata, Satoshi Matsumoto, et al. Note zinc resistance of methylobacterium species. *Biosci Biotech Bioche*, 1997, 61(4): 729-731.
- [15] Gehong Wei, Lianmei Fan, Wenfei Zhu, et al. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR333-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous Materials*, 2009(162): 50-56.
- [16] RE 布坎南, NE 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-795.
- [17] Le-Ni Sun, Yan-Feng Zhang, Xia-Fang Sheng, et al. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology*, 2009(101): 501-509.
- [18] Tangaromsuk J, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, et al. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology*, 2002(85): 103-105.
- [19] Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, et al. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol*, 1985(162): 328-334.