

两株抗镉细菌鉴定及其抗性研究

窦敏娜

(咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:从北京东三岔铅锌尾矿附近的土壤中筛选出两株高度抗镉细菌, 经过形态观察, 生理生化特征鉴定, 16S rDNA序列比对分析及BIOLOG快速鉴定, 分别为多杀巴斯德氏杆菌和黄杆菌, 对两株菌做了抗生素抗性和重金属抗性分析, 结果表明两株菌具有比较广泛的重金属抗性谱, 且与抗生素抗性相关, 即重金属抗性越强, 抗生素抗性也越强, 并对抗镉细菌的抗性机理进行了初步研究。

关键词:镉; 细菌鉴定; 重金属抗性; 抗生素抗性

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 94047- (2014) 02-043-04

北京东三岔铅锌矿区附近的土壤, 镉含量均超过0.60mg/kg。根据国家环境质量二级标准, 矿区附近土壤中镉含量都超过标准, 最高超标4.13倍, 最低超标1.15倍, 表明该矿区附近土壤已受到镉的严重污染^[1]。本实验从该铅锌尾矿附近的土壤中筛选出两株高度抗镉的细菌, 多杀巴斯德氏杆菌(*Pasteurella multocida*)和黄杆菌(*Flavobacterium*)。

据报道重金属的抗性基因大多都由质粒编码, 并且由质粒编码的重金属抗性基因的抗性极强, 比染色体编码的高出许多^[2-3], 而抗生素抗性基因是由质粒编码的, 已有许多关于质粒同时赋予细菌的重金属抗性和抗生素抗性的报道, 并且通过实验证明, 当质粒消失后抗性均随之消失^[4-6]。本文在对抗性细菌重金属抗性特征和抗生素抗性特征进行研究, 希望通过本研究为进一步阐明细菌的抗镉机理, 为利用微生物治理土壤镉污染提供必要的理论基础, 更好的将利用抗镉微生物修复环境污染应用于实践。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白胨、氯化钠、十二水合磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、硫酸铜、氯化锌、硝酸铅、乙酸钴及氯化镉, 均采购于生工生物工程(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备 抗性细菌筛选培养基: 蛋白胨10g, 氯化钠5g, 十二水合磷酸氢二钠9g, 磷酸二氢钾1.5g, 去离子水1000mL。pH为7.1~7.3。121℃

高温蒸汽灭菌30 min, 在此液体培养基中加入琼脂粉20g/L, 经高温蒸汽灭菌, 待培养基冷却至50℃时, 加入预先灭菌的0.1mol/L CdCl₂储液, 调配镉的终浓度分别为100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、500 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L、1200 mg/L、1500 mg/L、1700mg/L、2000 mg/L, 倒平板备用。

重金属抗性培养基: 蛋白胨10g, 氯化钠5g, 去离子水1000mL, pH为7.0~7.2。经121℃ 高温灭菌30 min, 待冷却后分别加入已灭菌的0.1mol/L的硫酸铜, 氯化锌, 硝酸铅, 乙酸钴及氯化镉储液, 至终浓度为0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 8.0, 12.0, 20.0, 30.0 mmol/L。

1.2.2 抗镉细菌的筛选及鉴定 土样采自离北京郊区东三岔铅锌尾矿矿口20米远的果树林地, 取1g土样于含镉100 mg/L的液体培养基20 mL中, 25℃振荡培养过夜。静置取上清100μL涂于含镉固体平板培养基, 在25℃培养观察, 待菌落长出后, 转接于更高含镉平板进行培养。

对分离细菌进行形态和分子生物学鉴定依《常见细菌系统鉴定手册》操作方法^[7]。

1.3 抗镉细菌的抗镉机理初步研究

1.3.1 分离菌株对镉最小抑制浓度测定 将纯培养菌株接种于液体培养基中, 25℃振荡培养过夜。将菌液浓度稀释至10⁻⁷后, 取10μL依次涂布于镉浓度逐渐递增的固体培养基平板上, 每个镉浓度做3次重复。25℃恒温培养3天, 观察菌落生长情况, 确定重金属最小抑制浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)^[8]。

1.3.2质粒消除试验 将纯培养菌株接种于含有SDS浓度为0.3%的缓冲蛋白胨水液体培养基20mL中, 42℃振荡培养2天。将菌液浓度依次稀释至0、10⁻¹、10⁻², 分别涂布于镉浓度为0mg/L、250 mg/L的固体培养基平板上, 每个浓度做3个重复。25℃恒温培养3天, 观察生长情况。

1.4 抗镉细菌的抗性研究

1.4.1 重金属抗性特征 将分离到的菌株分别接种于事先准备好的各重金属抗性培养基, 摇瓶30℃培养, 对数生长末期在560nm下应用紫外分光光度计测各菌液的吸光度值。由于重金属添加到一定浓度会有少量沉淀产生, 在观察或测量吸光度值时都以同浓度但不接种的培养液作为对照。

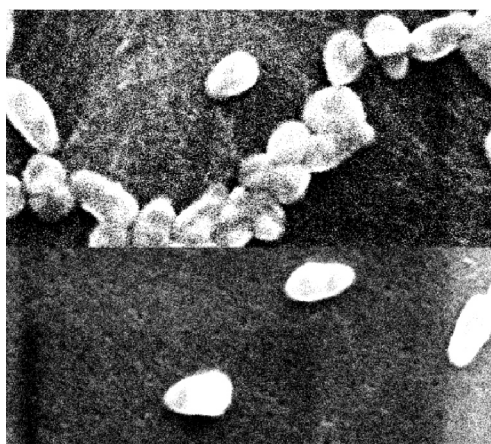
1.4.2 抗生素抗性特征 应用纸片法测定各菌株的抗生素抗性, 将含有氨苄青霉素, 利福平, 氯霉素, 卡那霉素, 青霉素, 红霉素, 四环素的纸片(北京天坛)贴附于已浓密涂布新鲜摇瓶培养的各抗镉细

菌悬液的固体平板上, 于30℃静置培养24~48h观察, 测量抑菌圈大小。菌株对抗生素的抗性按照其抑菌圈直径划分: 0~5mm, 无抑制作用; 6~15mm, 弱抑制作用, 大于15mm, 强抑制作用^[7]。

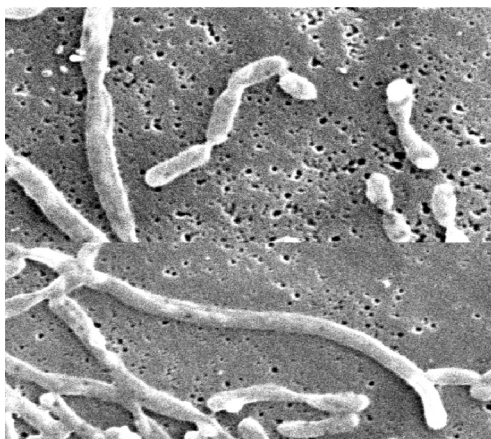
2 结果与分析

2.1 细菌分离和鉴定结果

从铅锌尾矿附近的林地土壤中, 最终筛选分离出两株高度抗镉细菌, 编码为Cd-1和Cd-2。形态见图1, 生理生化鉴定结果见表1, 16S rDNA序列比对分析对Cd-1和Cd-2都不能准确确定, 为此, 又做了BIOLOG鉴定分析。根据BIOLOG鉴定结果, 若相关度(SIM值)大于0.5则可以归为同一个属, Cd-1菌被鉴定为多杀巴斯德氏菌, 相关度为0.76; Cd-2菌的鉴定结果为黄杆菌, 相关度为0.87。综合鉴定为Cd-1多杀巴斯德氏杆菌(*Pasteurella multocida*)和Cd-2黄杆菌(*Flavobacterium*)。



Cd-1



Cd-2

图1细菌的扫描电子显微镜分析
Fig.1 Electron micrograph of bacteria

表1 抗镉细菌的生理生化鉴定
Tab.1 Biochemical and physiological identification of cadmium-resistant bacteria

实验名称	Cd-1	Cd-2
V-P 测定	—	d
接触酶	+	+
明胶液化	—	d
运动性	—	—
葡萄糖产酸	+	+
葡萄糖产气	—	—
丙二酸利用	d	+
吲哚	+	—
最适温度	37℃	25—30℃
细胞形态	短杆状	长杆或短杆状
黄色素	+	+黄色或橙色
大小(μm)	0.3-0.5×1.0-1.8	0.5×1.0-3.0
鞭毛	+	—
D-葡萄糖	+	+
L-阿拉伯糖	—	—
棉子糖	—	—
纤维二糖	—	—

注: “+”, 阳性; “—”, 阴性; “d”, 未测定。

2.2 抗镉机理分析

对镉最小抑制浓度结果为多杀巴斯德氏杆菌 MIC 1700 mg/L, 黄杆菌 MIC 1200mg/L, 而近年来报道的关于抗镉细菌MIC均较低。可以说明, 铅锌尾矿附近林地筛选高度抗镉细菌提供良好环境, 为进一步研究重金属镉对林地土壤污染和微生物修复提供了一定条件。

质粒消除实验的对照平板和处理平板对比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。说明三株菌对重金属镉的抗性是由质粒决定的。而在质粒消除后, 三株菌对镉的抗性随之消失。

2.3 抗性结果分析

2.3.1 重金属抗性结果 多杀巴斯德氏杆菌和黄杆菌对重金属抗性结果见图2和图3, 从图中可以看出这两株菌不仅对重金属镉有很高的抗性, 对其他

四种重金属铅、锌、钴和铜也有较高的抗性, 虽然其在重金属培养液中的生长情况各不相同, 但基本都存在在一定重金属浓度情况下有促进生长作用, 且在高浓度下其生长量受到完全抑制, 这些说明两株重金属抗性细菌具有比较广泛的重金属抗性谱, 并在长期的生存环境中可能形成了特定的抗性机制, 有专门的抗性基因系统, 这在文献中已经有大量报道。重金属广泛的抗性谱也从侧面说明, 铅锌尾矿作为重金属铅、锌、镉等的复合污染地区为抗性微生物的生长诱导形成抗性机制提供了极好的自然条件。本文所筛选到的这两株菌也被证明是此重金属高度污染地区的优势菌群, 所以在重金属抗性方面表现极佳, 这些野生菌群的抗性的获得经历长时间的野生驯化, 抗性高、幅度广, 并且在获得后不易退化, 比实验室驯化的抗重金属菌株稳定可靠, 所以这两株细菌将在治理重金属污染方面有潜在优势。

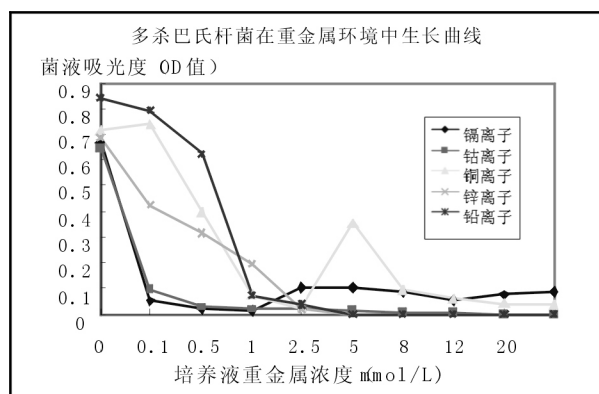


图2 多杀巴斯德氏菌在重金属环境中的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Pasteurella multocida* in heavy metals

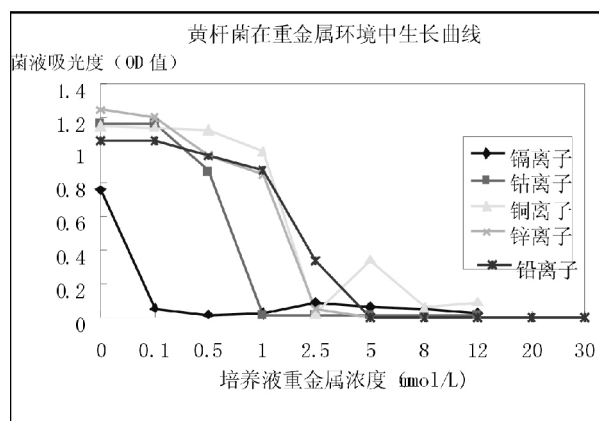


图3 黄杆菌在重金属环境中的生长曲线

Fig.3 Growth curve of *Flavobacterium* in heavy metals

2.3.2 抗生素抗性结果 多杀巴斯德氏杆菌和黄杆菌对抗生素抗性结果见表2, 从表中可以看出, 多杀巴斯德氏杆菌有较宽的抗生素抗性谱, 且对抗生素的抗性强, 从上文研究已知多杀巴斯德氏杆菌对重金属镉的抗性也是最强的, 所以从重金属抗性和抗生素抗性实验研究证实, 重金属抗性和抗生素抗性确实存在相关性, 即重金属抗性越强, 抗生素抗性也越强, 可能是两者的抗性在基因水平存在相关性, 这为我们进一步研究它们的抗性机理提供了重要依据。

表2 抗镉菌株抗生素抗性结果

Tab.2 Antibiotic resistance of cadmium-resistant bacteria

抗生素	抑菌圈直径 (mm)	
	多杀巴斯德氏杆菌	黄杆菌
四环素	45	30
红霉素	35	15
利福平	24	21
卡那霉素	26	5
氨苄青霉素	8	9
链霉素	38	33
氯霉素	34	24

注: 参考《常见细菌系统鉴定手册》, 0-5无抑制作用, 6-15弱抑制作用, 大于15强抑制作用。

3 结论

本研究北京东三岔铅锌尾矿附近的土壤中筛选出两株高度抗镉细菌,细菌形态学观察、生理生化鉴定, BIOLOG快速鉴定分析以及16S rDNA 序列比对分析,分别鉴定为多杀巴斯德氏杆菌和黄杆菌。这两株菌具极强的抗镉能力,当在含镉固体培养基平板上生长时,多杀巴斯德氏杆菌最小抑制浓度(MIC)为 1700 mg/L,黄杆菌最小抑制浓度(MIC)为1200mg/L,均具有较高的应用价值。通过对重金属抗性特征和抗生素抗性特征研究发现,两株菌的抗镉基因均受质粒编码,具有比较广泛的重金属抗性谱,且并与抗生素抗性相关,即重金属抗性越强,抗生素抗性也越强。这些终将为环境镉污染治理提供强有力的理论支持和实践基础。

参考文献

- [1] 刘辉等.矿区土壤镉污染研究[J].有色金属(矿山部分). 2004,56,(4):47-48.
- [2] Max Mergeay et.al.Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes[J].FEMS Microbiology Reviews .2003, 27,(2-3):385-410.
- [3] Z.Piotrowska-seget et.al.Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil[J].Applied Soil Ecology.2004,9:1-10.
- [4] Anjali Ghosh, et.al. Characterization of Large Plasmids Encoding Resistance to Toxic Heavy Metals in Salmonella abortus equi[J] .BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS. 2000,272,(1):6-11.
- [5] Ayse U ur and zg ü r Ceylan.Occurrence of Resistance to Antibiotics, Metals, and Plasmids in Clinical Strains of Staphylococcus spp.Archives of Medical Research.2003,34 :130.136.
- [6] Derie E. Fuentes,et.al. The product of the qacC gene of Staphylococcus epidermidis CH mediates resistance to β -lactam antibiotics in Gram-positive and Gram-negative bacteria[J] .Research in Microbiology. 2005,156:472.477.
- [7] 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.
- [8] A.Hassen et.al.Resistance of environmental bacteria to heavy metals[J].Bioresource Technology.1998,64:7-15.

[责任编辑、校对:王军利]

Identification and Resistance Research on Two Cadmium-Resistant Bacteria

DOU Min-na

(Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shanxi 712046)

Abstract: Two bacterial strains capable of resistance cadmium were isolated from a Pb-Zn mine tailing at suburb of Beijing city. Two strains were identified as pasteurella multocida Flavobacterium based on biochemical and physiological identification, analysis of the 16S rDNA sequence and biolog. Heavy metals resistance and antibiotic resistance also were tested.

Key words: Cadmium; cadmium-resistant bacteria; heavy metal resistance; antibiotic resistance