

铜耐性优势植物根际土壤铜抗性菌株的筛选 及其对铜的促溶作用^①

马海艳, 张艳峰, 孙乐妮, 何琳燕, 盛下放*

(农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要: 从铜矿废弃地重金属耐性优势植物根际土壤中分离筛选到两株抗高浓度 Cu 的细菌菌株 HQN2 和 JYC17。对菌株 HQN2 和 JYC17 溶解难溶性 Cu 的作用进行了研究。结果表明: 菌株 HQN2 和 JYC17 具有明显的溶解碳酸铜的能力, 与接灭活菌对照相比, 菌株 HQN2 和 JYC17 分别使培养液中水溶性 Cu 含量增加 306%和 136%, 培养液的 pH 由初始的 7.00 分别降低到 4.08 和 4.46, 另外, Cu 能促进供试菌株有机酸(葡萄糖酸、苹果酸和乙酸等)的合成。菌株 HQN2 和 JYC17 对土壤中难溶性 Cu 亦有明显的促溶作用。与接灭活菌对照相比, 菌株 JYC17 和 HQN2 分别使土壤中交换态 Cu 含量增加 110%和 270%。经生理生化特征分析及 16S rDNA 序列分析, 菌株 HQN2 和 JYC17 分别被鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)和微杆菌属(*Microbacterium* sp.)。

关键词: 铜矿废弃地; 铜抗性菌株; 铜促溶作用; 有机酸; 节杆菌属; 微杆菌属

中图分类号: X53

矿区的开采和冶炼在带来经济效益的同时也带来了环境污染, 尤其是重金属污染。土壤重金属污染具有长期性、隐蔽性、不可逆性以及不能完全被分解或消逝的特点, 它直接影响土壤质量、水质状况、作物生长、农业产量及品质等并通过食物链对人体健康造成危害。因此, 开展土壤污染的治理方法和技术研究, 显得更为必要和迫切。重金属污染土壤植物修复技术以其安全、廉价、绿色的特点日益成为环境生物技术研究 and 开发的热点和重点。但土壤中重金属低的生物有效性是限制植物修复效率进一步发挥的重要影响因素之一^[1-2]。铜(Cu)是一种必需的元素, 但过量 Cu 的存在则对环境造成污染, 由于 Cu 被土壤的各个组分吸附或结合, 生物有效性很低, 较难被植物吸收富集^[3-4]。有报道表明, 螯合剂 EDTA 等可以提高土壤中重金属 Cu 的生物有效性, 促进印度芥菜对 Cu 的吸收^[5]。虽然螯合剂用于植物修复可以提高植物修复的效率, 但螯合剂的使用会增加重金属在土壤中的移动性, 可能会导致重金属对地表水和地下水的污染^[6]; 另外, 螯合剂在活化重金属的同时也活化了土壤中的其他微量元素, 如 Fe、Mn、Ca、Mg 等, 使这些元素的淋失量增加, 有可能导致植物营养缺乏。

研究表明, 土壤微生物通过产生的质子、有机酸、氨基酸以及酶等提高植物根际重金属的生物有效性^[7-8]。Chen 等^[9]的研究发现, Cu耐性根际细菌可以提

高土壤中Cu的活性并提高海州香薷对Cu的积累, 江春玉等^[10]从重金属污染土壤中分离到Cu抗性菌株, 分离菌株能明显提高可溶性重金属Cu的浓度。另外, 微生物不仅可以活化土壤中的重金属, 而且也可以吸附与富集重金属^[11], 从而减少了重金属对水域环境危害的可能。虽然重金属Cu抗性菌株的筛选及Cu的细菌活化作用等研究已有一些报道^[9-10], 但从铜矿废弃地中Cu耐性优势植物根际土壤中分离筛选Cu抗性菌株, 并对分离菌株的生物学特性、溶解难溶性Cu的效应及其机制等研究至今未见报道, 为此, 本研究开展Cu抗性菌株的分离筛选和溶解重金属Cu的作用研究, 以期为提高植物修复Cu污染土壤提供理论依据和技术途径。

1 材料与方法

1.1 培养基

以有N改良培养基(蔗糖 10 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.2)为基础培养基, 121℃湿热灭菌 25 min, 加入单独灭菌的CuSO₄溶液, 使Cu终浓度为 50~200 mg/L。

1.2 铜抗性菌株的分离筛选

采集南京汤山铜矿废弃地重金属耐性优势植物, 取根际土壤保存于无菌纸袋中带回实验室进行 Cu 抗性

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(40371070)、国家 863 专题项目(2006AA10Z404)、“111”项目(B07030)资助。

* 通讯作者(xfsheng604@sohu.com)

作者简介: 马海艳(1982—), 女, 辽宁本溪人, 硕士研究生, 主要从事土壤重金属污染生物修复研究。E-mail: 2005116055@njau.edu.cn

的筛选平板上, 28℃培养 2 d, 挑取细菌单菌落, 转入逐步提高 Cu 浓度的平板上, 选取能够在含 Cu 200 mg/L 的平板上生长的细菌, 4℃保藏备用。

1.3 铜抗性菌株对难溶性铜的溶解作用

1.3.1 摇瓶条件下菌株对Cu的促溶效果 菌株对Cu的溶解试验采用上述有N改良液体培养基, 每 100 ml培养基中加入 0.100 g碱式碳酸铜, 接种量为 5%。设接菌和接灭活菌(121℃灭菌 40 min)两种处理, 每种处理 3 个重复, 28℃下摇床振荡培养(150 r/min) 72 h。每间隔 18 h取培养液, 培养液离心(10000 r/min, 3 min)使菌体和未溶解的重金属盐沉淀, 取上清液, 原子吸收法测上清液中Cu²⁺的浓度; 用 722 分光光度计比色法测定细菌悬浮液的OD₆₀₀值, 确定其生长势; 用pH计测定培养液中pH值, 观察菌株的代谢产酸能力; 用高效液相色谱法检测培养液中有机酸(草酸、葡萄糖酸、酒石酸、苹果酸、乙酸、柠檬酸、丁二酸和丙酸)含量, 采用的色谱柱为Hedera ODS C₁₈ (250

mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.2 mol/L KH₂PO₄ (pH2.40), 流速为 0.7 ml/min, 柱温 30℃, 检测波长 214 nm。

1.3.2 菌株对污染土壤中Cu的溶解作用 试验用土壤采自南京汤山铜矿废弃地表层(0~10 cm)土壤, 其基本理化性质见表 1。供试土壤风干后过 20 目筛, 直接分装在 50 ml离心管中, 每管 10 g土。将菌株接种于有N改良液体培养基中培养 18 h, 离心收集菌体, 菌体用无菌去离子水制备成 1×10⁹ CFU/ml的菌悬液。将制备好的菌悬液接入上述离心管中, 每管加入 1 ml菌悬液和 4 ml无菌去离子水, 28℃静置培养 10 d。试验设接菌和接灭活菌两种处理, 每种处理 3 个重复。土壤Cu全量分析采用氢氟酸-硝酸-高氯酸消煮, 土壤交换态Cu的提取采用 1 mol/L乙酸铵(1:5 土液比)浸提, 土壤水溶态Cu的提取采用去离子水(1:1 土水比)浸提。重金属Cu的测定采用原子吸收分光光度法。

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of soil used in the experiment

土壤类型	有机质(g/kg)	CEC(cmol/kg)	pH	全 N(g/kg)	速效 P(mg/kg)	速效 K(mg/kg)	有效 Cu(mg/kg)	总 Cu(mg/kg)
铁质湿润淋溶土	30.4	7.22	6.68	1.41	13.4	85.7	1.57	256

1.4 菌株鉴定

根据分离菌株Cu溶解试验结果, 选择两株溶解Cu效果最好的菌株HQN2 和JYC17 进行鉴定。采用 16S rDNA序列分析并结合菌株生理生化试验鉴定供试菌株。以供试菌株的总DNA为模板, 利用细菌 16S rDNA通用引物^[12] 进行PCR扩增, 序列由上海英骏生物技术有限公司进行测定。按东秀珠等^[13]的方法测定菌株生理生化特征。

2 结果与讨论

2.1 铜抗性菌株的分离与鉴定

虽然重金属可以通过各种机制对微生物产生毒害作用, 但重金属耐性细菌能够在重金属环境中存活, 可以从重金属污染环境分离并筛选出重金属耐性细菌用于污染环境的生物修复^[14-15]。研究表明, 11 种Cu耐性优势植物(稗草、水竹叶、华芥宁、野菊、马唐、酸模、鸡眼草、山莴苣、鬼针草、野艾蒿和茅叶荩草)根际土壤和非根际土壤中的总细菌数分别为(1.4~17)×10⁷ CFU/g干土和(0.1~3.2)×10⁷ CFU/g干土, Cu抗性细菌数分别为(0.7~9.4)×10⁶ CFU/g

干土和(1.9~8.7)×10⁵ CFU/g干土, 根际土壤和非根际土壤中Cu抗性细菌数分别占总细菌数的 0.7%~21%和 2.5%~40%; 在含Cu 50 mg/L的平板上分离到 89 株Cu抗性菌株, 逐步提高Cu浓度, 筛选到可以在含Cu 200 mg/L的平板上生长的细菌菌株 28 株。

将筛选到的 28 株Cu抗性菌株做摇瓶条件下Cu促溶试验, 结果表明菌株HQN2 和JYC17 对碱式碳酸铜的促溶效果最好, 因此选取这两株菌为供试菌株进行后续研究。经生理生化特征分析(表 2)及 16S rDNA序列分析(图 1 和图 2), 菌株HQN2 和JYC17 分别被鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)和微杆菌属(*Microbacterium* sp.), 它们的GenBank登录号分别为EU036696 和EU036699。

2.2 摇瓶条件下铜抗性菌株对铜的溶解作用

由图 3 和图 4 可以看出, 对照处理的培养液中的可溶性 Cu 含量、pH 值在整个培养时间内没有显著差异, 而菌株 HQN2 和 JYC17 对碱式碳酸铜有明显的溶解作用。随着培养时间的延长, 溶液中可溶性 Cu 含量逐渐增加, pH 值不断下降, 菌体数量不断增加。在菌

表 2 供试菌株的生理生化特性

Table 2 Physiological and biological characterizations of the strains HQN2 and JYC17

项目	菌株	
	HQN2	JYC17
甲基红(M.R.)试验	-	+
乙酰甲基醇(V.P.)试验	-	-
过氧化氢酶试验	+	+
淀粉水解	-	+
明胶液化	+	-
柠檬酸盐试验	+	-
硫化氢试验	-	-

注: +表示阳性, -表示阴性。

体生长初期 (0~18 h), 培养液中可溶性 Cu 浓度随菌

体数量的增加而降低, 18 h 后逐渐升高, 并在 72 h 达到最大值, 与接灭活菌对照相比, 菌株 HQN2 和 JYC17 处理的培养液中可溶性 Cu 含量分别增加了 306% 和 136%, 菌株 HQN2 溶解碱式碳酸铜的能力比菌株 JYC17 强。培养液的 pH 随菌体密度的增加呈下降趋势, 当培养到 72 h 时, 菌株 HQN2 和 JYC17 培养液中的 pH 由原来的 7.00 分别降到 4.08 和 4.46。培养基中的 Cu 对菌株 HQN2 和 JYC17 合成有机酸的影响见表 3。由表 3 可以看出, Cu 对菌株有机酸的合成有明显的影响。Cu 能促进菌株 HQN2 产草酸、葡萄糖酸、酒石酸、苹果酸和乙酸, 但对其合成柠檬酸、丁二酸和丙酸有抑制作用; Cu 对菌株 JYC17 产草酸、葡萄糖酸、

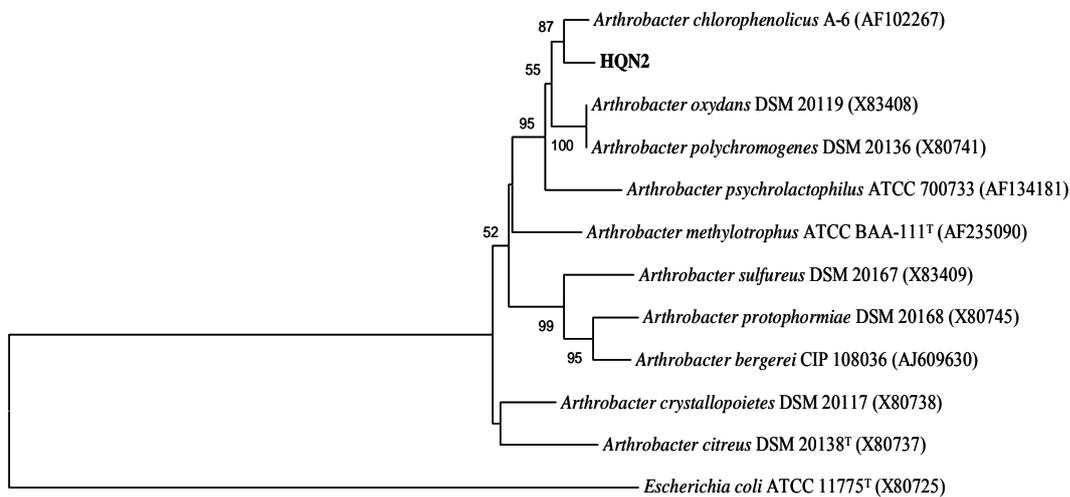


图 1 基于 16S rDNA 序列的菌株 HQN2 的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain HQN2

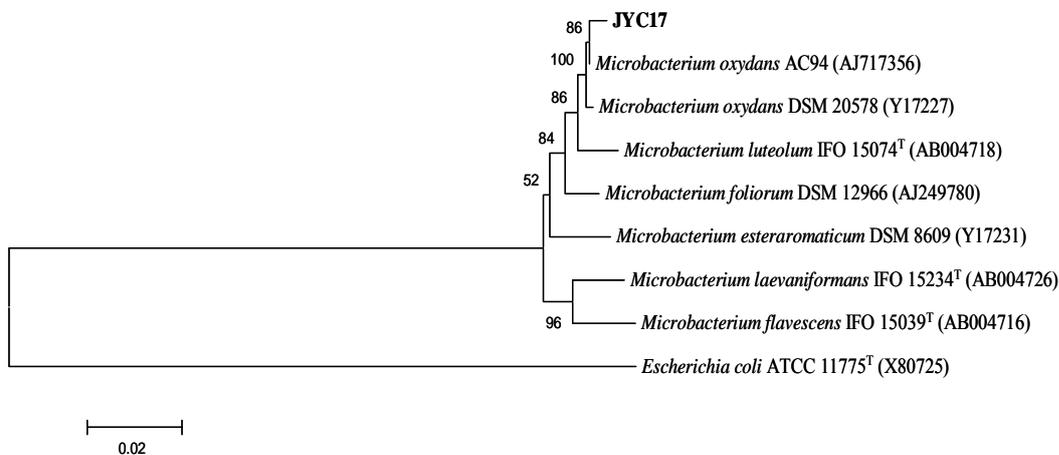


图 2 基于 16S rDNA 序列的菌株 JYC17 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain JYC17

酒石酸、苹果酸、乙酸和丁二酸能力有促进作用，但干扰其合成柠檬酸和丙酸。重金属 Cu 的存在促进了供试菌株有机酸的合成。

菌株HQN2 和JYC17 在生长过程中逐渐溶解了碱式碳酸铜（图 3 和图 4），表明供试菌株不仅能够耐受重金属Cu而且能够溶解难溶性的碱式碳酸铜。与对照相比，接菌处理的培养液中水溶性Cu含量有显著的增加。培养初期（0 ~ 18 h），随着细胞数量增加，溶液

中水溶性Cu含量逐渐减少，可能是细胞对Cu的吸附作用从而减少了溶液中水溶性Cu含量，培养 18 h后，菌株的代谢活动增强，溶液中的pH降低，对碱式碳酸铜的溶解能力增强。另外，细菌可以通过代谢产生的有机酸来溶解难溶性重金属^[4,6]，本实验表明，菌株HQN2 和JYC17 可能主要通过代谢产生的葡萄糖酸、苹果酸和乙酸来溶解难溶性碱式碳酸铜，提高溶液中水溶性Cu含量（图 3 和图 4，表 3）。

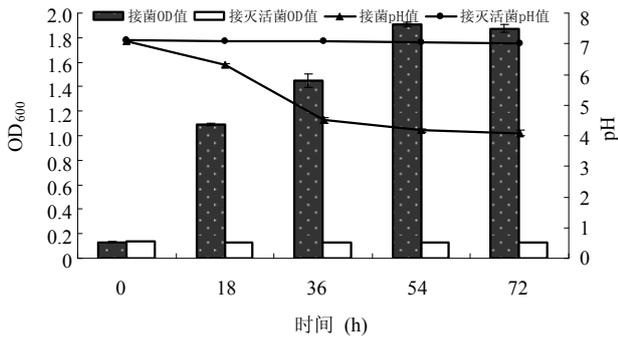


图 3 菌株 HQN2 对碱式碳酸铜的促溶作用

Fig. 3 Solubilization of Cu₂(OH)₂CO₃ by strain HQN2

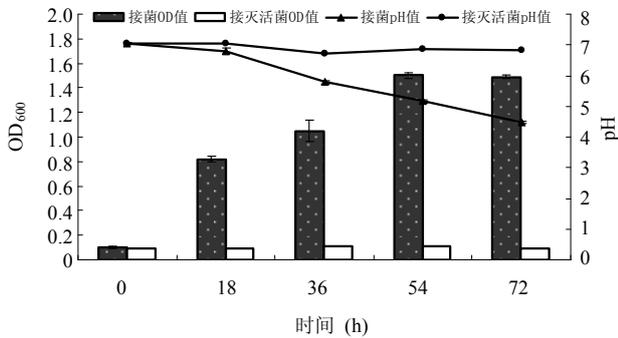
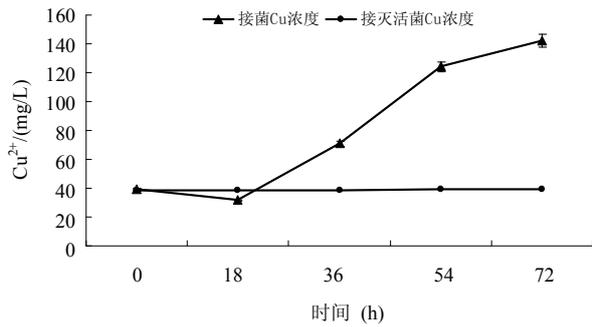


图 4 菌株 JYC17 对碱式碳酸铜的促溶作用

Fig. 4 Solubilization of Cu₂(OH)₂CO₃ by strain JYC17

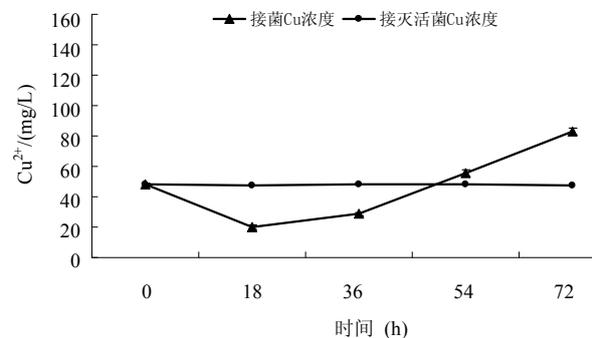


表 3 重金属 Cu 对菌株 HQN2 和 JYC17 产生有机酸的影响 (mg/L)

Table 3 Effects of copper on the production of organic acids in solution by strains HQN2 and JYC17

菌株	处理	有机酸							
		草酸	葡萄糖酸	酒石酸	苹果酸	乙酸	柠檬酸	丁二酸	丙酸
HQN2	A	21.8	86.9	6.0	99.2	116.5	-	7.6	-
	B	16.4	52.1	2.1	37.0	86.4	5.4	10.9	65.6
JYC17	A	7.4	57.6	3.2	43.4	127.3	-	137.5	16.4
	B	6.8	23.7	2.1	-	46.2	12.5	-	33.1

注：A：添加碱式碳酸铜；B：未添加碱式碳酸铜；-表示未检测到该种有机酸；以上数据均为菌株培养 72 h 时测定的平均值。

2.3 供试菌株对土壤中铜的促溶作用

将菌株 HQN2 和 JYC17 接入铜矿区污染土壤中，

经过 10 天的室温培养，土壤中交换态和水溶态 Cu 含量变化见图 5。接菌处理的土壤中交换态 Cu 含量均高

于对照, 且达到显著差异水平 ($p < 0.05$)。与对照相比, 接菌处理土壤中的交换态 Cu 含量分别增加了 1.1 倍 (菌株 JYC17) 和 2.7 倍 (菌株 HQN2); 与对照相比, 接菌 JYC17 处理的土壤中水溶性 Cu 含量没有明显增加, 而菌株 HQN2 能显著 ($p < 0.05$) 提高土壤中水溶性 Cu 的含量, 使土壤中水溶性 Cu 含量增加了 106.6%。

根际微生物能够通过代谢活动提高土壤重金属的

生物有效性。本试验表明, 与对照相比, 接菌处理土壤 pH 下降。对照处理土壤 pH 为 6.95 ± 0.23 , 而接菌处理土壤 pH 分别为 6.74 ± 0.31 (HQN2) 和 6.88 ± 0.49 (JYC17), 表明菌株 HQN2 和 JYC17 可以通过其代谢活动活化土壤中难溶性 Cu, 提高土壤中有效性 Cu 含量。因此, Cu 抗性菌株 HQN2 和 JYC17 在 Cu 污染土壤中的定殖规律、溶解土壤 Cu 效应及其机制以及菌株强化 Cu 污染土壤植物修复作用等值得进一步研究。

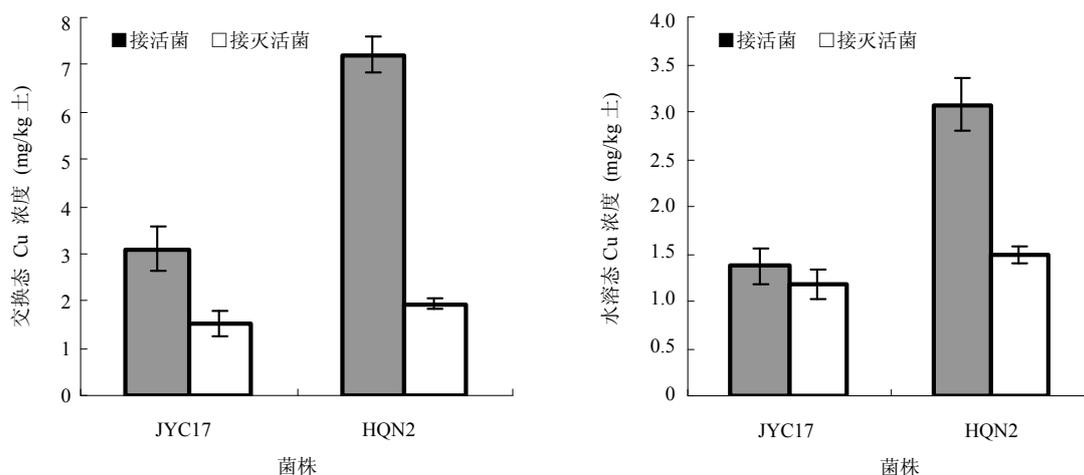


图 5 菌株 HQN2 和 JYC17 对土壤中难溶性 Cu 的促溶作用

Fig. 5 Solubilization of unavailable copper in soil by strains HQN2 and JYC17

3 小结

(1) 从铜矿废弃地重金属耐性优势植物根际土壤中分离筛选到两株 Cu 抗性菌株 HQN2 和 JYC17, 经生理生化和 16S rDNA 序列分析分别鉴定为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.) 和微杆菌属 (*Microbacterium* sp.)。

(2) Cu 抗性菌株 HQN2 和 JYC17 有明显的溶解难溶性 Cu 的能力, 菌株 HQN2 的促溶能力较 JYC17 强, 供试菌株溶解难溶性 Cu 的作用与其代谢产生的有机酸有关, 而且分离菌株对矿区 Cu 污染土壤中的 Cu 有明显的活化作用。

参考文献:

- [1] Sheng XF, Xia JJ. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere*, 2006, 64: 1036-1042
- [2] Mani R, Helena F. Effect of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresource Technol.*, 2008, 99: 3491-3498
- [3] 彭红云, 杨肖娥. 香薷植物修复铜污染土壤的研究进展. *水土保持学报*, 2005, 19 (5): 195-199
- [4] 倪才英, 陈英旭, 骆永明, 田光明. 不同活化剂对铜冶炼厂污染土壤中铜的活化. *农业环境科学学报*, 2004, 23 (1): 85-89
- [5] do Nascimento CWA, Amarasiriwardena D, Xing BS. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 2006, 140: 114-123
- [6] Wu LH, Luo YM, Xing XR, Christie P. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 2004, 102: 307-318
- [7] Francis AJ, Dodge CJ. Anaerobic microbial dissolution of transition and heavy metal oxides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54: 1009-1014
- [8] Yang XE, Feng Y, He ZL, Stoffella PJ. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2005, 18: 339-353

- [9] Chen YX, Wang YP, Lin Q, Luo YM. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. *Environ. Int.*, 2005, 31: 861-866
- [10] 江春玉, 盛下放, 夏娟娟. 重金属铜抗性菌株的筛选及其生物学特性的研究. *生态学杂志*, 2005, 24 (1): 6-8
- [11] Ansari MI, Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technol.*, 2007, 98: 3149-3153
- [12] William D, Hioms B, Methe A. Bacterial diversity in Adirondack Mountain Lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 2957-2960
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- [14] Piotrowska-Seget Z, Cycon M, Kozdrój J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl. Soil Ecol.*, 2005, 28: 237-246
- [15] 李杰, 贺纪正, 马延和, 朱永官, 张蕾. 生物耐铜的分子机理及铜污染环境的生物联合修复. *生态学报*, 2007, 27 (6): 2615-2626

Isolation of Copper-resistant Bacteria from Rhizosphere Soils of Copper-tolerant Dominant Plants and Bacterial Solubilization of Copper

MA Hai-yan, ZHANG Yan-feng, SUN Le-ni, HE Lin-yan, SHENG Xia-fang

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study two copper-resistant bacterial strains, HQN2 and JYC17, were isolated from rhizospheric soils of heavy metal-tolerant dominant plants growing in copper mining wasteland. Copper solubilization of strains HQN2 and JYC17 were investigated in solution culture and copper-contaminated soil. Compared to the control treatment (CK), water-soluble Cu concentrations released from $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ by strains HQN2 and JYC17 increased by 306% and 136%, respectively. pH values in the bacterial inoculation treatments decreased from 7.00 to 4.08 (strain HQN2) and 4.46 (strain JYC17) respectively. Copper could promote the production of organic acids (such as gluconic, malic and acetic acids) by the tested strains. The two strains could significantly increase the exchangeable Cu compared to CK. The exchangeable Cu concentrations increased by 110% and 270% respectively compared to CK. Based on the physiological and biochemical tests as well as 16S rDNA gene sequence analysis, the bacterial strains HQN2 and JYC17 were identified as *Arthrobacter* sp. and *Microbacterium* sp. respectively.

Key words: Copper mining wasteland, Copper-resistant strains, Copper solubilization, Organic acids, *Arthrobacter* sp., *Microbacterium* sp.