

# 西北地区金属尾矿地根瘤菌的重金属抗性及其系统发育研究

梁建强,段晓丹,崔广玲,唐静,朱闻斐,韦革宏

(西北农林科技大学生命科学院,陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

**摘要** 对分离自陕西、甘肃金属尾矿废弃地寄主为刺槐、鸡眼草、草木樨等 23 种豆科植物的 188 株根瘤菌进行了 7 种重金属的抗性分析、最大抗性水平(MRL)的确定和抗性菌株的系统发育研究。结果表明,菌株之间对重金属的耐受性存在较大差异,大部分菌株表现出对  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$  ( $<0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 敏感,而对  $\text{Pb}^{2+}$  ( $<2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 不敏感。在液体培养基中,CCNWSX0403 和 CCNWSX0360 可耐受  $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ , 分别可耐受  $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ , CCNWSX0139 可耐受  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ , CCNWSX0003 可耐受  $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ , CCNWSX0284 和 CCNWSX0142 可耐受  $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ 。9 株抗性菌株的 16S rDNA 全序列分析表明: CCNWSX0122 和 CCNWSX0003 分别属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)和中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)。4 株对  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  耐受性较强的菌株 CCNWSX0386、CCNWSX0139、CCNWSX0284 和 CCNWSX0142 均属于土壤杆菌属(*Agrobacterium*)。而属于慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)的 3 株菌 CCNWSX0309、CCNWSX0403 和 CCNWSX0360 对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  耐受性较好。总体上 *Agrobacterium* 对  $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  的耐受性较好, *Bradyrhizobium* 比 *Rhizobium*、*Sinorhizobium*、*Mesorhizobium* 有较强的重金属耐受性。

**关键词** 根瘤菌;重金属;抗性;16S rDNA

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)06-1120-07

## Heavy Metal Tolerance and Phylogenetic Analysis of Rhizobia Isolated from Metal Tailings in Northwestern China

LIANG Jian-qiang, DUAN Xiao-dan, CUI Guang-ling, TANG Jing, ZHU Wen-fei, WEI Ge-hong

(College of Life Sciences, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

**Abstract** 188 rhizobium strains, which isolated from 23 species of leguminous plants growing in metal mining tailings in Shaanxi and Gansu Province were used to analyse resistance and the maximum resistance level(MRL) to seven heavy metals. The result showed that there were great differences in the resistance of tested strains to heavy metals. Strains CCNWSX0386, CCNWSX0138 and CCNWSX0310 were tolerant to six heavy metals tested. All of the strains were sensitive to low concentration of  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  ( $<0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), but most of strains were less sensitive to  $\text{Pb}^{2+}$  ( $<2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The resistant strains had higher tolerance in liquid media(TY) than in solid media(YMA). In liquid media, strains CCNWSX0403 and CCNWSX0360 could tolerate to  $\text{Zn}^{2+}$   $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and tolerate to  $\text{Cu}^{2+}$  concentration up to  $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  in liquid media, respectively. Strain CCNWSX0139 could tolerate to  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ , CCNWSX0003 could tolerate to  $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ . Both CCNWSX0284 and CCNWSX0142 could tolerate to  $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ . 16S rDNA sequences of nine resistant strains screened were analyzed. Strains CCNWSX0122 and CCNWSX0003 were identified as *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium*, respectively. Four strains, specifically CCNWSX0386, CCNWSX0139, CCNWSX0284 and CCNWSX0142, which had better resistance to  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  belonged to the genus of *Agrobacterium*. But three strains, specifically CCNWSX0309, CCNWSX0403 and CCNWSX0360, which belonged to the genus of *Bradyrhizobium* had better resistance to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . In general, *Agrobacterium* were highly resistant to  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ , *Bradyrhizobium* had higher resistance to heavy metals than *Rhizobium*, *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*.

**Keywords** rhizobium; heavy metal; resistance; 16S rDNA

收稿日期 2008-10-26

基金项目 国家自然科学基金(30670372);科技部农业微生物菌种资源整理、整合及共享试点子项目(2005DKA21201);霍英东青年教师基金(101029);高等学校博士点基金(20050712013)

作者简介 梁建强(1984—)男,山西汾阳人,硕士,主要从事重金属污染土壤的微生物修复技术研究。E-mail: tianqidazhan@163.com

责任作者: 韦革宏 E-mail: weigehong@yahoo.com.cn

重金属毒害和 N 素缺乏是金属尾矿废弃地植被重建和生态恢复过程中的主要限制因子之一<sup>[1]</sup>, 将具有天然共生关系的豆科植物——根瘤菌固氮体系应用到重金属污染土壤中不仅能促进土壤营养元素特别是 N 元素的循环和积累, 而且可能吸附重金属或转化其形态, 降低毒性, 从而将微生物修复和植物修复结合起来。但在矿业废弃地上种植豆科植物的技术问题是寄主植物、根瘤菌和它们的共生体系对矿区废地特别是重金属毒性的耐受能力, 因此筛选并获得能高效固氮、具有优良抗性的根瘤菌和豆科植物成为该领域研究的关键。黄名洪等<sup>[2]</sup>在安徽铜陵铜矿废弃地、甘肃白银铜矿废弃地发现有不少自然生长的豆科植物, 如紫穗槐、鸡眼草、美丽胡枝子、天蓝苜蓿、国槐等。国外研究人员在美国加洲北部的铜矿废弃地上发现了生长良好的豆科百脉根属、羽扇豆属和车轴草属植物, 从其根瘤中分离的根瘤菌对 Cu 亦具有较强的耐性<sup>[3]</sup>。但目前尚未有人对金属尾矿废弃地的根瘤菌进行较为系统的重金属抗性分析和相关研究。本实验以分离自陕西、甘肃金属尾矿废弃地的 188 株根瘤菌为材料对 7 种重金属进行抗性分析, 筛选出抗性菌株并通过 16S rDNA 全序列分析方法确定其系统发育地位, 以便建立重金属抗性优良的根瘤菌——豆科植物共生体系, 发挥其在生态环境治理中的重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

分离自陕西、甘肃金属尾矿废弃地寄主为刺槐、鸡眼草、草木樨等 23 种豆科植物根瘤的 188 株菌。根瘤经无菌水充分浸泡后, 95% 酒精浸泡 3~5 min, 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 表面消毒 3~5 min, 随后用无菌水漂洗 5~7 次, 用无菌镊子压破根瘤, 在 YMA 平板培养基上划线接种, 28 °C 培养约 7 d。根据单菌落的形态、镜检结果, 初步鉴定为根瘤菌。然后接种到 YMA 斜面上, 28 °C 培养约 7 d 后于 4 °C 低温保藏。

### 1.2 主要试剂

Tap 酶, 100bp DNA 标样购自东盛生物科技有限公司, Proteinase K 购自德国 Merck KgaA 生物公司。

CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、PbNO<sub>3</sub>、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、HgCl<sub>2</sub>、CdCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 均为分析纯。

### 1.3 主要培养基

YMA 培养基: 甘露醇 10 g, 酵母粉 3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.1 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

TY 液体培养基: 胰蛋白胨 5 g, 酵母酶解粉 3 g, 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.46 g, pH 6.8~7.2。

### 1.4 抗性菌株筛选

筛选采用多点接种法。吸取 100 μL 供试菌悬液到多点接种器槽内, 然后接种到含不同浓度的重金属离子的 YMA 平板培养基上, 对抗 Pb<sup>2+</sup> 菌株的筛选采用 TY 固体培养基加 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 28 °C 培养 5~10 d, 以不加重金属的培养基为对照, 观察并比较菌株生长情况。每个处理设 3 个重复。重金属离子浓度(单位 mmol·L<sup>-1</sup>)设置如下: Cu<sup>2+</sup>: 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0; Zn<sup>2+</sup>: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5; Pb<sup>2+</sup>: 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5; Cd<sup>2+</sup>: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0; Cr<sup>6+</sup>: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5; Ni<sup>2+</sup>: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0; Hg<sup>2+</sup>: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5。通过筛选分析根瘤菌对重金属的抗性。

### 1.5 最大抗性水平(MRL)的确定

采用最大抗性水平(MRL)<sup>[4]</sup>来评价根瘤菌对重金属的耐受性, MRL 的确定采用梯度培养法, 即 TY 液体培养基加一系列重金属浓度(含 Pb<sup>2+</sup> 培养基加 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 EDTA), 重金属离子浓度(单位 mmol·L<sup>-1</sup>)设置 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> 和 Ni<sup>2+</sup>: 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6、4.0、4.8、5.6; Hg<sup>2+</sup>: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5。选取耐受性较好的菌株液体培养至对数期, 吸取 50 μL 菌悬液接种到加有不同浓度重金属的 5 mL TY 液体培养基, 于 28 °C, 120 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 3~5 d, 观察菌体是否生长, 以加重金属不接菌的管为对照, 每个处理设 3 个重复, 菌株所能耐受的最大金属浓度定为该菌株的最大抗性水平。

### 1.6 抗重金属菌株的 16S rDNA 序列分析

总 DNA 提取参照 Terefework<sup>[5]</sup>的提取方法, 提取的总 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测后作为 PCR 扩增的模板。

以总 DNA 为模板, 正向引物 P1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT-3' (*E. coli* 对应位置为 8-37)<sup>[4]</sup>; 反向引物 P6 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC C-3' (*E. coli* 对应位置为 1479-1506)。PCR 反应体系为 50 μL, 模板 DNA (约 20~30 ng) 2.0 μL, Reaction Buffer (10×) 5.0 μL, dNTPs (20 mmol·L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, 正向引物 P1 (50 μmol·L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, 反向引物 P6 (50 μmol·L<sup>-1</sup>) 1.0 μL, Taq 聚合酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 3.0 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 56 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 72 °C 再延伸 6 min, 39 个循环, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 2.5 μL PCR 扩增产物与 2 μL 溴酚

兰混合点样,100 V、30 min,溴化乙锭(EB)染色 20 min,UV 照相,检测无特异性扩增后 4℃保存。

PCR 产物的纯化和测序由北京奥科测序公司完成。序列结果与 GeneBank 上的参比菌株序列用 CLUSTAL X 进行多重序列比对分析后,利用 Treecon W 软件构建系统发育树。各个菌株之间的遗传距离计算用 DNAMAN 软件。各参比菌株在 GeneBank 上的索取号见图 3。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重金属对根瘤菌生长的影响

通过实验观察,在加有重金属的培养基上菌体生长速度明显减慢,菌落表面粗糙,较干。光学显微镜下重金属胁迫下的根瘤菌细胞变小,皱缩。随着重金属浓度的提高菌株的存活率(存活率=某金属浓度下生长的菌株数/供试菌株总数×100%)不断下降,且不同重金属胁迫的下降速率不同。结果见图 1。

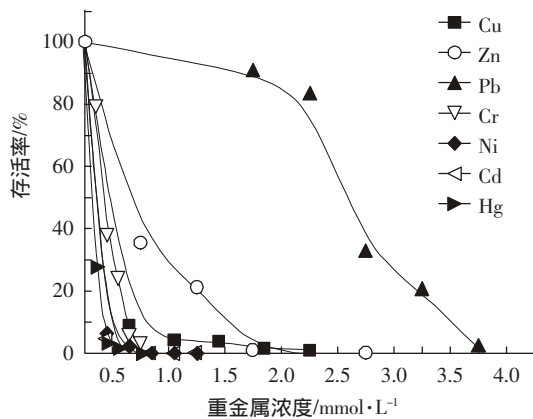


图 1 重金属浓度对根瘤菌存活率的影响

Figure 1 Effect of heavy metal concentration on the survival rate of rhizobia

由图 1 可以看出,Pb<sup>2+</sup>胁迫下菌株存活率下降最为缓慢,在 Pb<sup>2+</sup>浓度 1.5、2.0、2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 时分别有 90%、82.9%、32.4% 的菌株能够生长,高达 3.0 mmol·L<sup>-1</sup> 时仍有 20.2% 的菌株能够生长,而在此浓度其他金属已完全抑制菌株生长,说明低浓度的 Pb<sup>2+</sup>对菌株产生毒性很小,可能是由于 Pb<sup>2+</sup>与培养基的成分产生沉淀后毒性减小。Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>胁迫下菌株存活率下降较 Pb<sup>2+</sup>快,Hg<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cr<sup>6+</sup>、Cd<sup>2+</sup>比较接近,最快的为 Hg<sup>2+</sup>,依次为 Cd<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cr<sup>6+</sup>。从重金属对供试菌株的抑制曲线可以看出,不同重金属对供试菌株的半抑制浓度 EC<sub>50</sub> (50%供试菌株不能生长时的金属离子浓度)大小依次为:Pb<sup>2+</sup>>Zn<sup>2+</sup>>Cu<sup>2+</sup>>Cr<sup>6+</sup>>Ni<sup>2+</sup>>Cd<sup>2+</sup>>Hg<sup>2+</sup>。因此,实验

得出重金属对供试根瘤菌毒性顺序依次为: Cd<sup>2+</sup>>Hg<sup>2+</sup>>Ni<sup>2+</sup>>Cr<sup>6+</sup>>Cu<sup>2+</sup>>Zn<sup>2+</sup>>Pb<sup>2+</sup>,这可能与重金属的生物可利用性有关,微量的 Cu、Zn、Cr、Ni 元素为大多数生物体所必需,如生物体中的某些酶是以 Cu 和 Zn 作为辅基,Ni、Cr 与细胞膜稳定性、核酸结构以及生物体的正常代谢有很大关系<sup>[7]</sup>,而元素 Hg、Cd、Pb 对生物是否必需未见报道。关于重金属毒性,由于供试菌株、培养基成分等因素,所报道的重金属对微生物的毒性顺序不尽相同,本实验从群体效应上得出各种重金属对根瘤菌的毒性顺序较为合理。

### 2.2 根瘤菌对重金属的抗性分析

重金属浓度增加对菌体的毒害作用加深,这和高浓度重金属对细胞的正常生理产生抑制作用是密切相关的,但是仍有部分菌株对重金属具有一定的耐性。通过对供试的 188 株根瘤菌进行筛选,获得 22 株具有较好耐受性的菌株,见表 1。

从表 1 可以看出,在供试的 188 株根瘤菌中能耐 1.2 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 的有 7 株、耐 1.6 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 的有 3 株、耐 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 的有 2 株,分别占供试菌株的 3.7%、1.6%、1.1%,其寄主分别为豇豆、多花胡枝子、刺槐、鸡眼草,说明 Cu<sup>2+</sup> 在较低浓度下仍对根瘤菌产生较强的抑制作用。但仍有个别菌株如:CCNWSX0403、CCNWSX0360 可以耐受高达 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>,为聂湘平等<sup>[8]</sup>发现的大叶相思根瘤菌能耐受<0.80 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 的结果的 2.5 倍,比陈雯莉等<sup>[9]</sup>从大豆根瘤菌中筛选到抗 0.4 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 的菌株高出 4 倍。表明这 2 株菌对 Cu<sup>2+</sup> 有较高的耐受水平,其可能有着特殊的抗 Cu 机制。供试菌株对 Zn<sup>2+</sup> 的耐受能力较差,有 21.3% 的菌株能够在含 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> 的培养基上生长,而耐受 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> 的菌株只有 3 株,寄主分别为豇豆、大豆和野豌豆,没有能耐受 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> 的菌株,与朱毓华等<sup>[10]</sup>对太白尾矿根瘤菌的筛选结果(3 株菌能够耐受 1.6 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup>)接近,但与聂湘平等<sup>[11]</sup>发现的大叶相思根瘤菌能够耐受<10.0 mmol·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> 的结果相差较大。实验还筛选到耐受 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup> 的 3 株菌,其中 CCN-WGS0139 和 CCNWSX0386 可达到 0.4 mmol·L<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup>,寄主分别为截叶铁扫帚和野豌豆,其抗性水平为抗 Hg 菌株 *Alcaligenes eutrophus* (真氧产碱杆菌) CH34 的 4 倍, *Alcaligenes eutrophus* CH34 已研究得出含有 *mer<sup>r</sup>* 转座子<sup>[12]</sup>。大多数菌株对 Pb<sup>2+</sup> (<2.0 mmol·L<sup>-1</sup>) 不敏感,采用 TY 培养基+EDTA,并且提高金属浓度筛选得到耐 3.0 mmol·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup> 的菌株 38 株,3.5 mmol·L<sup>-1</sup>

表 1 重金属抗性根瘤菌筛选结果

Table 1 The results of screening for heavy metal-resistant rhizobia

菌株 Strain	寄主 Host plant	重金属浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Heavy metal concentration							生境 Habitat
		$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Cr}^{6+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Hg}^{2+}$	
CCNWGS0122	刺槐	1.2	0.5	2.5	—	0.3	—	0.1	铅锌矿
CCNWGS0278	刺槐	—	—	3.0	—	0.3	—	—	铅锌矿
CCNWGS0123	刺槐	1.2	—	3.0	0.2	0.5	—	0.1	铅锌矿
CCNWGS0284	刺槐	—	1.0	3.5	—	0.3	0.2	0.3	铅锌矿
CCNWGS0124	刺槐	0.4	—	2.0	0.2	0.3	—	—	铅锌矿
CCNWGS0136	多花胡枝子	—	1.0	3.0	—	0.1	—	0.2	铅锌矿
CCNWSX0360	多花胡枝子	2.0	1.0	2.0	—	0.2	—	—	铁尾矿
CCNWSX0366	多花胡枝子	1.2	0.5	3.0	0.2	0.2	—	—	铜锌矿
CCNWSX0365	多花胡枝子	—	—	3.0	0.2	0.3	—	—	铜锌矿
CCNWGS0139	截叶铁扫帚	0.4	1.0	3.0	—	0.2	0.2	0.4	镍矿
CCNWGS0142	截叶铁扫帚	—	1.0	3.5	—	0.2	—	0.1	铅锌矿
CCNWGS0138	截叶铁扫帚	0.4	1.0	3.0	—	0.2	0.4	0.1	铁矿
CCNWGS0309	鸡眼草	1.6	1.0	2.5	0.2	0.1	—	—	铅锌矿
CCNWGS0310	鸡眼草	1.2	1.0	3.0	0.2	0.1	0.4	—	铅锌矿
CCNWGS0007	白香草木樨	—	—	2.0	—	0.2	0.4	—	铅锌矿
CCNWSX0003	草木樨	0.4	—	2.0	—	0.2	0.4	0.1	金矿
CCNWSX0386	野豌豆	—	1.5	3.0	0.2	0.2	0.2	0.4	金矿
CCNWSX0403	豇豆	2.0	1.5	1.5	—	0.3	—	—	铜锌矿
CCNWSX0374	野大豆	—	1.0	3.0	—	0.5	—	0.1	铁矿
CCNWGS0153	狼牙刺	—	1.0	3.0	—	0.5	0.2	0.1	铅锌矿
CCNWSX0332	大豆	—	1.5	1.5	0.2	0.2	—	—	铁尾矿
CCNWSX0399	菜豆	0.4	0.5	3.0	—	0.5	—	0.1	铅锌矿

注 表中所示为至少对一种重金属有较好抗性的菌株,“—”表示在所设金属的最低浓度不能生长。

的 2 株,寄主分别为刺槐和截叶铁扫帚,同时筛选得到 8 株菌耐受  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ , 4 株菌耐受  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cr}^{6+}$  和 4 株耐受  $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$  的菌株,分别占供试菌株的 4.2%、2.2%、和 2.2%。菌株之间对重金属耐受性存在较大差异,寄主分别为野豌豆的 CCNWSX0386、截叶铁扫帚的 CCNWGS0138 和鸡眼草的 CCNWGS0310,可以耐受 6 种浓度较高的重金属,表现出对多种重金属同时具有较好耐受性的特点,而部分菌株对所有重金属都敏感(表中未列出)。能够同时耐受多种重金属的菌株可能是通过分泌质子、氨基酸以及各种有机酸,提高体系的酸度,溶解重金属,或者利用代谢产物与重金属配合改变形态<sup>[13]</sup>。有研究表明,快生型大豆根瘤菌在代谢过程中能分泌有机酸和各种氨基酸等代谢产物<sup>[14]</sup>。实验还发现能耐受  $\text{Cu}^{2+}>1.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的菌株中只有 12.3% 分离自铜锌矿,而分离自铜锌矿的菌株对  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{6+}$  却有较好的耐受性。同时,耐受  $\text{Pb}^{2+}>3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Zn}^{2+}>1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的菌株也分别有 28.6%、46.1% 的菌株不是分离自铅锌矿,

而分离自铁矿、镍矿、金矿的根瘤菌对  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  却具有较好的耐受性。Gadd 等<sup>[15]</sup>认为微生物能够获得特定的抗性机制来适应不良生长环境,但本实验未发现根瘤菌的抗重金属特性与环境的直接关系,需要进一步对土壤理化性质、重金属含量进行分析。在筛选得到的具有较好耐受性的 22 株菌中,寄主为胡枝子和刺槐的菌株最多,各占 31.8% 和 22.7%,说明这 2 种豆科植物与根瘤菌的共生体系可能具有较强的抗重金属能力。此外,刺槐和胡枝子属于木本植物,具有耐干旱、耐瘠薄、根系发达、适应性强,因此有望成为重金属污染、氮素缺乏的矿业废弃地生态恢复的先鋒植物。

### 2.3 抗性菌株的最大抗性水平(MRL)

选取表 1 中对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  具有较好耐受性的 9 株菌:CCNWGS0309、CCNWSX0360、CCNWSX0403、CCNWSX0386、CCNWGS0142、CCNWGS0139、CCNWGS0284、CCNWGS0122 和 CCNWSX0003 进行最大抗性水平的确定,结果见图 2。

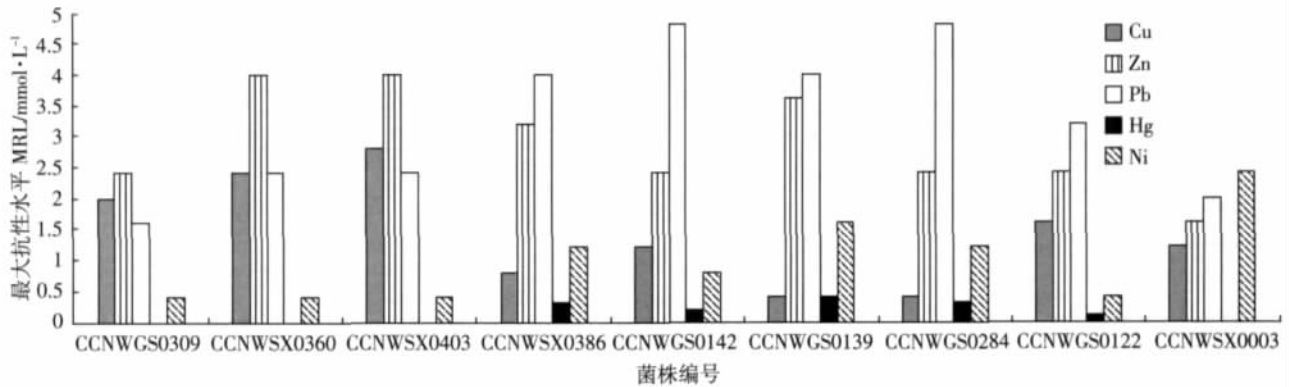


图2 抗重金属根瘤菌的最大抗性水平 MRL

Figure 2 The maximum resistance level(MRL) of heavy metal-resistant rhizobia tested

由表 1 和图 2 可以看出,在液体培养基中菌体能够耐受更高浓度的重金属离子,CCNWSX0003 的结果尤为明显,对 Ni<sup>2+</sup>的 MRL 值达到 2.4 mmol·L<sup>-1</sup>,为固体培养基上耐受水平的 6 倍。CCNWSG0309、CCNWSX0360 和 CCNWSX0403 对 Cu<sup>2+</sup>的 MRL 值分别为 2.0、2.4 和 2.8 mmol·L<sup>-1</sup>,对 Zn<sup>2+</sup>的 MRL 值分别为 2.5、4.0 和 4.0 mmol·L<sup>-1</sup>,均比在固体培养基中的耐受水平高出 20%~300%,这可能与所采用的培养基有关。CCNWSG0284 和 CCNWSG0142 对 Pb<sup>2+</sup>的 MRL 值高达 4.8 mmol·L<sup>-1</sup>,也比在固体培养基中的耐受性提高了 37.1%,对 Hg<sup>2+</sup>的这种现象不明显,CCNWSG0139 对 Hg<sup>2+</sup>的 MRL 值为 0.4 mmol·L<sup>-1</sup>,与在固体培养基中的耐受水平相同,而 CCNWSX0386 却有所下降,说明 Hg<sup>2+</sup>在液体培养基有较高的毒性,可能与 Hg<sup>2+</sup>的活化程度和培养基的化学组成有关。这两株菌对 Hg<sup>2+</sup>的耐受水平较高,但对 Cu<sup>2+</sup>的耐受水平一般,仅为 CCNWSX0403 耐 Cu<sup>2+</sup>水平的 14.3%和 28.6%,CCNWSX0360 的 16.7%和 32.4%,可能对 Hg<sup>2+</sup>有独特的抗性机制,需进一步研究。

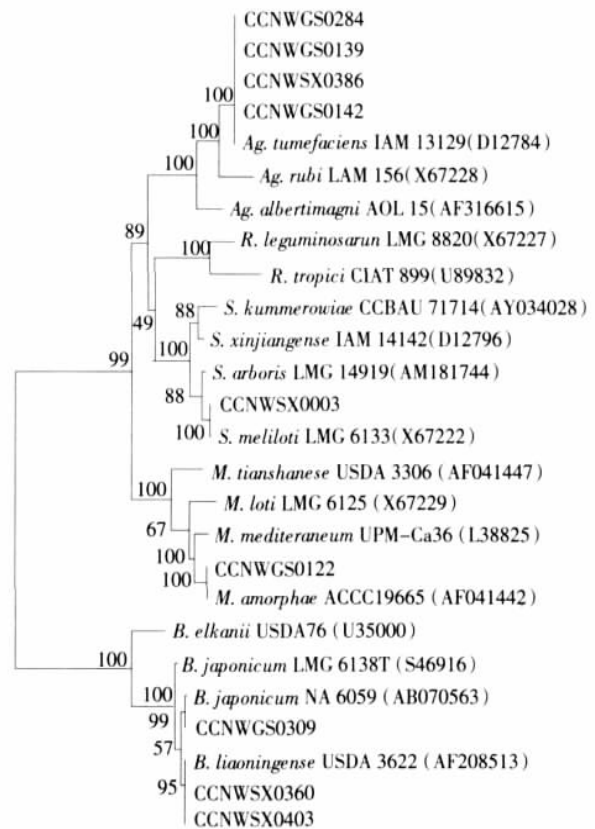
2.4 抗性菌株的系统发育关系分析

选取上述 9 株菌进行 16S rDNA 全序列测定。将所测序列与参比菌株全序列进行比较,得到以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树状图(图 3)。

结果表明,分离自刺槐的菌株 CCNWSG0284、野豌豆的 CCNWSX0386、截叶铁扫帚的 CCNWSG0139 和 CCNWSG0142 与土壤杆菌的亲缘关系较近,其 16S rRNA 核苷酸序列与 *Ag. tumefaciens* IAM 13129 相似性均为 100%,鉴定为根瘤土壤杆菌(*Ag. tumefaciens*)。实验表明从刺槐、野豌豆、截叶铁扫帚根瘤中均分离到土壤杆菌,这与 Mhamdi<sup>[16]</sup>用 *gusA* 标记法得出土壤杆菌确实存在于根瘤,并可入侵成熟根瘤的结

Genetic distances

0.05



注:树状分支上的数值表示树形的可信值,0.05 表示遗传距离,括号内为 GenBank 登录号

The figures on branch stand for the reliabilities. The numbers in the parenthesis are the GenBank accession number of the sequences

图3 抗性菌株与参比菌株的 16S rDNA 全序列系统发育树状图

Figure 3 Phylogenetic dendrogram based on the 16S rDNA gene sequences of resistant species and sequences of relating species

论一致。CCNWSG0309、CCNWSX0403 和 CCNWSX0360 均属于慢生根瘤菌属的分支,其中 CCNWSX0403、

CCNWSX0360 与 *B. liaoningense* USDA 3622 的相似性为 100% ;CCNWS0309 与 *B. japonicum* NA6059 的相似性为 99.6%。CCNWS0122 属于中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*) ,与 *M. amorphae* ACCC19665 的相似性为 100% ;CCNWSX0003 属于中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*) ,与 *S. meliloti* LMG6133 的相似性为 99.9%。不同属的根瘤菌对重金属的耐受能力不同 ,结合图 2 和图 3 可以看出 ,慢生根瘤菌比快生根瘤菌具有较强的耐重金属特性 ,在筛选到的耐性菌株中慢生根瘤菌占 33.3% ,未筛选到根瘤菌属的菌株 ,与已有的研究结果<sup>[17]</sup> :根瘤菌对重金属的敏感顺序为 *Azorhizobium*>*Rhizobium*=*Mesorhizobium*=*Sinorhizobium*>*Bradyrhizobium* 一致。Kinkle 等<sup>[18]</sup>也研究发现 ,在重金属污染土壤中 *Bradyrhizobium japonicum* 的数量、其寄主植物生长以及固氮酶活性未发生改变。值得研究的是 ,对  $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  耐受性较好的 4 株菌 CCNWSX0386、CCNWS0139、CCNWS0284 和 CCNWS0142 均属于土壤杆菌属 ,而这 4 株菌对  $Cu^{2+}$  的耐受性不高 ,属于慢生根瘤菌属的 CCNWS0309、CCNWSX0403 和 CCNWSX0360 对  $Cu^{2+}$  的耐受水平较高 ,对  $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  的耐受水平一般 ;CCNWS0122、CCNWSX0003 则表现出对  $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$  中度耐受。Mohamed 等<sup>[19]</sup>将重金属耐性作为一部分生理生化指标运用于金合欢根瘤菌的聚类分析中取得了良好的效果 ,实验结果也说明了这种方法具有可行性。

### 3 结论

(1)获得 6 株有较高重金属抗性的菌株 ,其中分离自豇豆的菌株 CCNWSX0403 对  $Cu^{2+}$  的 MRL 值为  $2.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,对  $Zn^{2+}$  的 MRL 值为  $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ,CCNWSX0360 也可耐受  $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Zn^{2+}$  ,这 2 株菌均为慢生根瘤菌。CCNWS0284 和 CCNWSX34-2 可以耐受  $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Pb^{2+}$  ,寄主分别为刺槐、截叶铁扫帚 ;CCNWS0139 可以耐受  $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Hg^{2+}$  ,寄主为截叶铁扫帚 ,这 3 株菌均属于土壤杆菌属的分支。CCNWSX0003 可以耐受  $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Ni^{2+}$  ,寄主为草木樨 ,属于中华根瘤菌属的分支。

(2)从群体效应上确定重金属离子对根瘤菌的毒性顺序为  $Cd^{2+} > Hg^{2+} > Ni^{2+} > Cr^{6+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+}$ 。土壤杆菌对  $Pb^{2+}$  和  $Hg^{2+}$  具有的耐受性较强 ,慢生根瘤菌比快生根瘤菌、中华根瘤菌、中慢生根瘤菌有较强的重金属耐受性。根瘤菌在液体培养基比固体培养基中有较高耐受性。从刺槐、野豌豆、截叶铁扫帚的根瘤中分离

到的土壤杆菌 ,具有较好的耐重金属能力。

(3)分离自金属尾矿的豆科植物的根瘤菌对重金属有较强的耐受性 ,而且部分菌株可同时耐受多种重金属 ,如能将这些抗重金属能力较强的根瘤菌接种到污染的土壤、矿山 ,或接种到豆科植物使之形成根瘤 ,将能起到消除重金属污染 ,改良土壤和防止水土流失的作用。

### 参考文献 :

- [1] Williamson N A, Johnson M S, Bradshaw A D. Mine wastes reclamation : the establishment of vegetation on metal mine wastes[M]. London, England :Mining Journal Books, 1982.
- [2] 黄名洪. 环境污染与生态恢复[M]. 北京 :科学技术出版社, 2003 :168-169.  
HUANG Ming-hong. Environmental pollution and ecological restoration[M]. Beijing :Science and Technology Press, 2003 :168-169.
- [3] Thatoi H, et al. Comparative growth nodulation and total nitrogen content of six tree legume species grown in iron mine waste soil[J]. *Journal of Tropical Forest Science*, 1995, 81 :107-115.
- [4] Sofia I A P, Ana I G L, Etelvina A P F. Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated portuguese soils[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 56 :176-186.
- [5] Terefewor Z, Kaijainen S, Lindstrom K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 91 (2-3) :169-180.
- [6] 杨雪颖, 张执欣, 杨亚珍, 等. 甘草根瘤菌的 16S rDNA 全序列测定及系统进化分析[J]. 西北植物学报, 2006, 26(4) :707-711.  
YANG Xue-ying, ZHANG Zhi-xin, YANG Ya-zhen, et al. Determination and phylogenetic analysis of whole 16S rDNA sequence in *Glycyrrhiza rhizobia*[J]. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 2006, 26(4) :707-711.
- [7] Dedyukhina E G, Eroshin V K. Essential metal ions in the control of microbial metabolism[J]. *Process Biochem*, 1991, 26 :31-37.
- [8] 聂湘平, 蓝崇钰, 张志权, 等. 铜对大叶相思—根瘤菌共生固氮体系的影响[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2) :137-140.  
NIE Xiang-ping, LAN Chong-yu, ZHANG Zhi-quan, et al. Effect of copper on rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculiformis*) symbiotic association[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(2) :137-140.
- [9] 陈雯莉, 黄巧云, 郭学军, 等. 根瘤菌对土壤铜、锌和镉形态分配的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14 :1278-1282.  
CHEN Wen-li, HUANG Qiao-yun, GUO Xue-jun, et al. Effects of zinc on rhizobia on morphological distribution of Cu, Zn and Cd in soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14 :1278-1282.
- [10] 朱毓华, 韦革宏, 陈卫民, 等. 陕西太白尾矿区根瘤菌多样性及抗性菌株筛选[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7) :1443-1448.  
ZHU Yu-hua, WEI Ge-hong, CHEN Wei-min, et al. Diversity of the rhizobia in the tailings area of Taipai mine and screening of resistant rhizobium strains to heavy metals and phenol[J]. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 2006, 26(7) :1443-1448.

- [11] 聂湘平, 蓝崇钰, 张志权, 等. 锌对大叶相思—根瘤菌共生固氮体系影响研究[J]. 植物生态学报, 2002, 26(3) :264-268.  
NIE Xiang-ping, LAN Chong-yu, ZHANG Zhi-quan, et al. Effect of zinc on rhizobia-earleaf acacia(*Acacia auriculiformis*) symbiotic association[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2002, 26(3) :264-268.
- [12] Diels L, Dong Q, Baeyens W, et al. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34 from resistance mechanism to the removal of heavy metal[J]. *Ind Microbiol*, 1995, 14 :142-153.
- [13] Guo X J, Huang Q Y, Chen W L, et al. Effect of microorganisms on the mobility of heavy metals in soil environments[J]. *China Appl Environ Biol*, 2001, 8(1) :105-110.
- [14] You C S, Jiang Y M, Song H Y. Biological Nitrogen Fixation[M]. Beijing : Science Press, 1987.
- [15] Gadd G M. Fungal response towards heavy metals[M]. In microbes in extreme environments. Edited by R. A. Herbert and G. A. Codd. Academic Press, London, 1986 :83-110.
- [16] Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, et al. Colonization of *Phaseolus vulgaris* nodules by *Azobacterium* like strains[J]. *Can J Microbiol*, 2005, 51 :105-111.
- [17] Matsuda A, Moreirafmde S, Siqueira J O, et al. Tolerance of rhizobia genera from different origins to zinc, copper and cadmium[J]. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2002, 37(3) :343-355.
- [18] Ninkle B K, Angle J S, Keyser H H. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53, 315-319.
- [19] Mohamed S H, Smouni A, Neyra M, et al. Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya[J]. *Plant and Soil*, 2000, 224(2) :171-183.

## “气候变化、温室气体减排与土壤固碳固氮” 专题征文通知

农业碳氮循环是全球碳氮循环中的重要组成部分,农业温室气体的减排对应对全球气候变化有重大意义。为了交流我国在农业碳氮循环领域的最新研究成果,本刊将集中刊登气候变化、温室气体减排与土壤固碳固氮方面的研究论文,包括(1)农业温室气体减排的潜力与措施(2)农业土壤固碳固氮新技术与措施(3)农业生态系统中(种植业、养殖业、农业固废堆放等)碳氮循环规律与机理等。专辑征文请从学报网站上注册投稿(学报网址:www.aes.org.cn),经专家审阅合格的稿件将于2009年第12期(2009年12月20日)出版,欢迎各有关单位和专家踊跃投稿,征文截止时间为2009年9月15日。

《农业环境科学学报》编辑部  
2009年5月20日