

# 西北部分矿区豆科植物根瘤菌重金属抗性 及 16S rDNA RFLP 分析

曹莹, 马宁, 常佳丽, 赵龙飞, 孔召玉, 李哲斐, 韦革宏

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

**摘要:**从生长在西北部分矿区的豆科植物根瘤中分离筛选到对重金属有抗性的 38 株根瘤菌,采用 PCR-RFLP 分子技术进行 16S rDNA 指纹图谱分析,选取每种类型的代表菌株进行 16S rDNA 全序列测定,建立系统发育树状图,并对 38 株菌进行 Zn、Hg、Cu、Cd 和 Pb 5 种重金属的抗性研究。结果表明,供试菌株分别归属于中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*)。代表菌株 CCNWSX1277 和 CCNWSX1294 可耐受  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Zn}^{2+}$ ,CCNWSX1277 可耐受  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Hg}^{2+}$ ,多数代表菌株可耐受  $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Cu}^{2+}$ ,仅 3 株代表菌株可以耐受  $\text{Cd}^{2+}$ ,其中 CCNWSX1277 能耐受  $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Cd}^{2+}$ ,所有代表菌株能耐受  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Pb}^{2+}$ 。*Agrobacterium* 属的 2 株代表菌株对 5 种重金属均有较强的耐受性;而 *Rhizobium* 属的 4 株菌和 *Sinorhizobium* 属的 3 株菌对 5 种重金属的耐受性不同,表现出较大的差异。总体来看,供试菌株对重金属的耐受性顺序为 *Agrobacterium*>*Rhizobium*>*Sinorhizobium*。

**关键词:**矿区;根瘤菌;重金属抗性;16S rDNA RFLP;系统发育

**中图分类号:**X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)06-1156-08

## Identification and Heavy Metal Toxicity of Rhizobia Isolated from Leguminous Plants in Some Mining Areas of Northwest China

CAO Ying, MA Ning, CHANG Jia-li, ZHAO Long-fei, KONG Zhao-yu, LI Zhe-fei, WEI Ge-hong

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

**Abstract:** The aim of this experiment is to study the phylogeny of rhizobial strains, their resistance to heavy metals and the relationship between these two aspects. Thirty-eight rhizobial strains were isolated from the leguminous plants which grew in some mining areas of Northwest China. The genetic diversity of these strains was analyzed by using 16S rDNA PCR-RFLP and the complete 16S rDNA sequences of the representative strains to establish the phylogenetic tree. Response to increasing levels of Zn, Hg, Cu, Cd, Pb in media by these strains was observed. The result of the genetic diversity analysis was that these strains belonged to *Sinorhizobium*, *Rhizobium* and *Agrobacterium* based on 16S rDNA phylogenetic tree. Nine strains were selected as representative in the phylogenetic tree. The two strains CCNWSX1277 and CCNWSX1294 survived at  $\text{Zn}^{2+}$  concentration of  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Only one of the nine strains, CCNWSX1277, survived at  $\text{Hg}^{2+}$  concentration of  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Most of the nine strains survived at  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of  $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Only three representative strains could survive any exposure to  $\text{Cd}^{2+}$  of which CCNWSX1277 could survive at the highest level of the three ( $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ ). All nine of these strains survived at  $\text{Pb}^{2+}$  concentration of  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Two representative strains, both belonging to *Agrobacterium* had strong and stable tolerance to all five kinds of heavy metals. But four representative strains belonging to *Rhizobium* and three representative strains belonging to *Sinorhizobium* had different tolerances to all five kinds of heavy metals. Overall, the genus order of the tolerance to all five heavy metals was *Agrobacterium*>*Rhizobium*>*Sinorhizobium*.

**Keywords:** mining areas; rhizobia; resistance to heavy metals; 16S rDNA RFLP; phylogeny

收稿日期:2009-12-24

基金项目:国家自然科学基金(30970003,30900215)

作者简介:曹莹(1985—),女,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:nov1110cy@163.com

通讯作者:韦革宏 E-mail:weigehong@yahoo.com.cn

我国西北地区地域广阔,矿产资源丰富,生态环境却十分脆弱。随着人们对矿物质需要的增加,人类开采矿物的活动范围逐渐扩大,受到重金属污染的土壤面积也日趋增加,若依赖自然修复能力使受到污染的土壤自行修复,要经过一个漫长的过程。据报道,我国受采矿业影响的土地大约有 300 万  $\text{hm}^2$ ,其中受乡镇企业影响的占 1/3,20 世纪末每年因采矿造成的废弃地面积达 313 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>;受重金属污染的耕地面积近 2 000 万  $\text{hm}^2$ ,约占总耕地面积的 1/5,由此造成的粮食减产达 1 000 万 t,每年受重金属污染的粮食达 1 200 万 t,年经济损失超过 200 亿元<sup>[2]</sup>。因此,矿区土壤修复对生态环境的保护与可持续利用有重要的意义。生物修复具有无污染、超富集、成本低等优点<sup>[3]</sup>。在生物改良中,植物与微生物联合修复技术效果较为明显<sup>[4]</sup>,而根瘤菌-豆科植物形成的共生体具有很好的研究价值。同时,利用豆科植物固定矿区废弃物,可控制风蚀和水蚀,从而改善土壤物理、化学和微生物的性质<sup>[5]</sup>。

西北地区同时也是一个生物多样性非常集中的地区,微生物数量庞大,很多尚未被人们所认知,这其中就包括很多根瘤菌。根瘤菌与其宿主植物形成的共生体系在环境较为恶劣的西北矿区重金属污染地能很好地生存,表明它们是一类生命力旺盛且具有强适应性的生物群落。因此,本实验对分离自矿区的 38 株根瘤菌采用 16S rDNA PCR-RFLP 技术进行遗传多样性研究以确定其系统发育地位,并研究其重金属抗性以发掘重金属抗性的优良菌株,为根瘤菌及其共生体系在污染环境修复中的应用提供重要的种质资源和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株及分离纯化

供试菌株共 38 株,分别来自陕西、甘肃部分矿区的大豆属、野豌豆属和苜蓿属 3 种宿主植物。采用 YMA (yeast-manitol agar) 培养基<sup>[6]</sup>培养,进行分离纯化。菌株编号及地理来源见表 1。

### 1.2 16S rDNA PCR-RFLP

#### 1.2.1 总 DNA 的提取

根据 Terefework<sup>[7]</sup>的提取方法进行提取,用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测。

#### 1.2.2 PCR 扩增

以总 DNA 为模板,选取来源于 *E. coli* 16S rRNA 基因序列保守区域的两段引物 P1 和 P6,配制成 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度备用。正向引物 P1:5'-CGg gat ccA GAG

TTT GAT CCT GGC TCA GAA CGA ACG CT-3',对应于 *E. coli* 的第 8~37 碱基位置;反向引物 P6:5'-CGg gat ccT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3',对应于 *E. coli* 的第 1 479~1 506 碱基位置<sup>[8]</sup>。所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为:Reaction Buffer(10 $\times$ )5.0  $\mu\text{L}$ 、dNTPs(10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )4.0  $\mu\text{L}$ 、正向引物 P1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )1.0  $\mu\text{L}$ 、反向引物 P6(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )1.0  $\mu\text{L}$ 、Taq 聚合酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )0.25  $\mu\text{L}$ 、 $\text{MgCl}_2$  3.0  $\mu\text{L}$ 、重蒸去离子水 33.75  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA(约 50 ng) 2.0  $\mu\text{L}$ ,总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min、94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min、72  $^{\circ}\text{C}$  最终延伸 10 min、4  $^{\circ}\text{C}$  保藏,36 个循环。

#### 1.2.3 RFLP 分析

选用 4 种限制性内切酶进行酶切,分别为 *Hinf* I、*Hae* III、*Msp* I 和 *Hha* I,酶切反应体系均为 20  $\mu\text{L}$ ,分别取 8  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物,各加入适量的限制性内切酶缓冲液和 1  $\mu\text{L}$  的限制性内切酶,充分混匀后 37  $^{\circ}\text{C}$  酶切 4 h。酶切产物用 2% 的琼脂糖凝胶,70 V、4 h 电泳,凝胶成像系统拍照。

#### 1.2.4 16S rDNA 全序列测定

根据供试菌株的 16S rDNA-RFLP 图谱类型组合,选取符合每种图谱类型组合的代表菌株,其扩增产物送北京奥科生物技术有限公司进行测序。将测得的 16S rDNA 的全序列与从 GenBank (NCBI) 中获得的根瘤菌已知种进行多重序列比对,数据用 Clustal X 和 Treeconw 软件包分析,构建出以 16S rDNA 全序列为基础的系统分类树状图,并使用 DNAMAN 计算各测试菌株间 16S rDNA 序列的相似性。

### 1.3 菌株的重金属抗性测定

对 38 株供试菌株进行不同浓度 Cu、Hg、Zn、Cd、Pb 的耐受性测定,筛选抗性菌株。将不同浓度的重金属母液与 YMA 培养基分别湿热灭菌(121  $^{\circ}\text{C}$ , 30 min),倒皿前混合均匀。使终浓度分别为(单位  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ):0.4、0.8、1.2、1.6、2.0  $\text{Zn}^{2+}$ ;0.05、0.1、0.15、0.2、0.25  $\text{Hg}^{2+}$ ;0.4、0.8、1.2、1.6、2.0  $\text{Cu}^{2+}$ ;0.2、0.6、1.0、1.4、1.8  $\text{Cd}^{2+}$ ;0.5、1.0、1.5、2.0、2.5  $\text{Pb}^{2+}$ 。采用多点接种法,吸取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液到多点接种器槽内,然后接种到含不同浓度重金属离子的 YMA 平板培养基上,培养 3~5 d,观察菌株的生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 16S rDNA PCR-RFLP 分析

将 38 株供试菌株的 16S rDNA 用 *Hinf* I、*Hae* III、*Msp* I 和 *Hha* I 4 种限制性内切酶进行酶切,对应每

一个酶切电泳图谱照片,凡是电泳图谱上不同菌株间迁移率相同的带被认为是同个性状,随机标记为 a→e,如图 1 所示。从图谱中可以看出:38 株供试菌株的 *Hinf* I 酶切类型有 3 种,*Hae* III 酶切类型有 5 种,*Msp* I 酶切类型有 5 种,*Hha* I 酶切类型有 1 种,其酶切组合类型列于表 1。

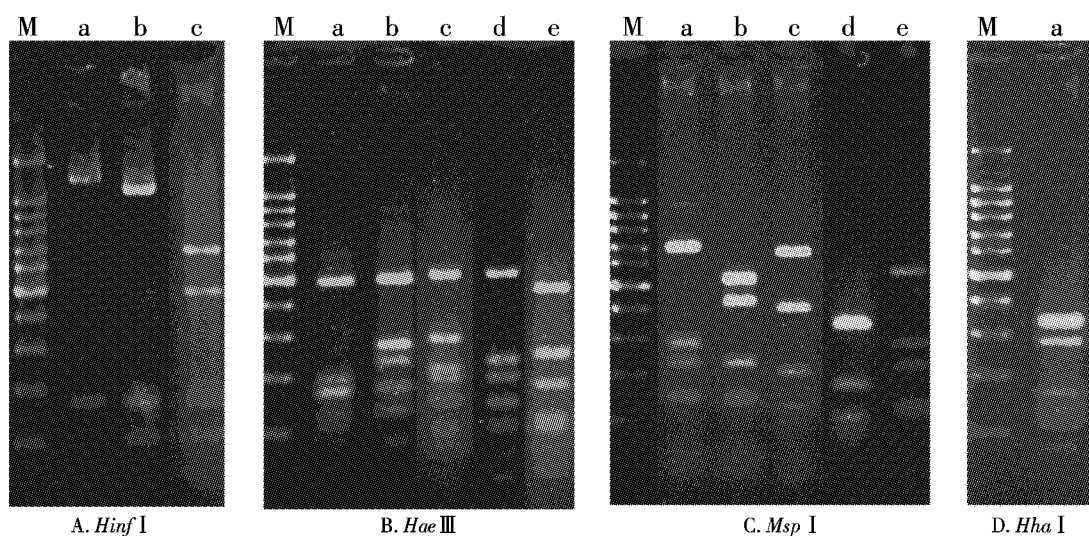
综合以上结果分析可知:供试菌株共有 8 种酶切图谱类型,其中大豆根瘤菌的酶切图谱有 aaaa、aeba、

表 1 供试菌株及其 16S rDNA PCR-RFLP 图谱类型

Table 1 The tested strains and their types of 16S rDNA PCR-RFLP fingerprint patterns

| 菌株 Strain           | 宿主 Host | 来源 Origin | 生境 Habitat | 酶切类型 Restriction enzyme pattern |                |              |              | 酶切组合类型<br>Fingerprint pattern of 16S rDNA |
|---------------------|---------|-----------|------------|---------------------------------|----------------|--------------|--------------|-------------------------------------------|
|                     |         |           |            | <i>Hinf</i> I                   | <i>Hae</i> III | <i>Msp</i> I | <i>Hha</i> I |                                           |
| CCNWSX1293          | 大豆      | 陕西宁强      | 铁矿         | a                               | a              | a            | a            | I                                         |
| <b>CCNWSX1287</b>   | 野大豆     | 陕西宁强      | 铁矿         | a                               | a              | a            | a            | I                                         |
| <b>CCNWSX1277</b>   | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 镍矿         | a                               | a              | a            | a            | I                                         |
| CCNWSX1270-1        | 山野豌豆    | 陕西凤县      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1270-2        | 山野豌豆    | 陕西凤县      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1271-1        | 山野豌豆    | 陕西凤县      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1271-2        | 山野豌豆    | 陕西凤县      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1278-1        | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1278-1-1      | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1278-1-2      | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1281          | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1283          | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1280          | 大豆      | 陕西略阳      | 金矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| <b>CCNWSX1289</b>   | 四籽野豌豆   | 陕西宁强      | 铁矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSX1290          | 四籽野豌豆   | 陕西宁强      | 铁矿         | b                               | b              | b            | a            | II                                        |
| CCNWSG0752          | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0753-1        | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0753-2        | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0754          | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| <b>CCNWSG0755-1</b> | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0755-2        | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0756-1        | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0756-2        | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSX1273-1        | 天蓝苜蓿    | 陕西凤县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSX1273-2        | 天蓝苜蓿    | 陕西凤县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSX1275          | 大豆      | 陕西凤县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSX1276          | 大豆      | 陕西凤县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0750-1        | 大豆      | 甘肃成县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSG0750-2        | 大豆      | 甘肃成县      | 铅锌矿        | c                               | b              | d            | a            | III                                       |
| CCNWSX1279          | 野大豆     | 陕西略阳      | 金矿         | c                               | b              | c            | a            | IV                                        |
| CCNWSX1282          | 广布野豌豆   | 陕西略阳      | 金矿         | c                               | b              | c            | a            | IV                                        |
| <b>CCNWSX1291-1</b> | 天蓝苜蓿    | 陕西宁强      | 铁矿         | c                               | b              | c            | a            | IV                                        |
| CCNWSX1291-2        | 天蓝苜蓿    | 陕西宁强      | 铁矿         | c                               | b              | c            | a            | IV                                        |
| CCNWSX1272-1        | 山野豌豆    | 陕西凤县      | 金矿         | a                               | c              | b            | a            | V                                         |
| <b>CCNWSX1272-2</b> | 山野豌豆    | 陕西凤县      | 金矿         | a                               | c              | b            | a            | V                                         |
| <b>CCNWSG0751-2</b> | 野大豆     | 甘肃徽县      | 铅锌矿        | b                               | b              | c            | a            | VI                                        |
| <b>CCNWSX1288</b>   | 野大豆     | 陕西宁强      | 铁矿         | b                               | d              | e            | a            | VII                                       |
| <b>CCNWSX1294</b>   | 大豆      | 陕西宁强      | 铁矿         | a                               | e              | b            | a            | VIII                                      |

注:黑体表示 16S rDNA 测序菌株。The boldfaces are the strains for sequencing.



M. DL 100bp; A. *Hinf* I 酶切图谱; B. *Hae* III 酶切图谱; C. *Msp* I 酶切图谱; D. *Hha* I 酶切图谱

M. DL 100bp; A. digested by *Hinf* I; B. digested by *Hae* III; C. digested by *Msp* I; D. digested by *Hha* I.

图1 供试菌株的 16S rDNA 酶切图谱类型

Figure 1 16S rDNA-RFLP fingerprint patterns of the tested strains

bbba、cbda 4 种类型, 野大豆根瘤菌的酶切图谱有 aaaa、bbca、bdea、cbca、cbda 5 种类型, 山野豌豆根瘤菌的酶切图谱有 acba、bbba 2 种类型, 广布野豌豆根瘤菌的酶切图谱有 aaaa、bbba、cbca 3 种类型, 四籽野豌豆根瘤菌的酶切图谱有 bbba 1 种类型, 天蓝苜蓿根瘤菌的酶切图谱有 cbca 和 cbda 2 种类型。它们的酶切图谱类型存在部分一致的现象, 属于 aaaa 的有大豆根瘤菌、野大豆根瘤菌和广布野豌豆根瘤菌; 属于 bbba 的有大豆、广布野豌豆、山野豌豆和四籽野豌豆根瘤菌; 属于 cbca 的有野大豆、广布野豌豆和天蓝苜蓿根瘤菌; 属于 cbda 的有大豆、野大豆和天蓝苜蓿根瘤菌。总体来讲, 供试菌株 16S rDNA 酶切图谱存在一定的差异, 表明 16S rDNA 具有丰富的遗传多样性。

## 2.2 16S rDNA 全序列分析

根据代表菌株的 16S rDNA 全序列与已知种的模式根瘤菌序列比较, 计算各菌株之间的遗传距离, 采用 Neighbor-joining 的方法构建出系统分类树状图 (图 2)。从树状图可以看出, 38 株供试根瘤菌在系统分类上分别归属于: 中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*) 与土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 形成的交叉分支和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的系统发育分支上。

在中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 分支上, 分离自野大豆的供试菌株 CCNWGS0755-1 为代表的菌株与参比菌株 *S. fredii* 和 *S. xinjiangense* 构成一个小的发育分支, 其序列相似性分别为 99.64% 和 99.78%; 以分离自天蓝苜蓿的供试菌株 CCNWSX1291-1 为代表

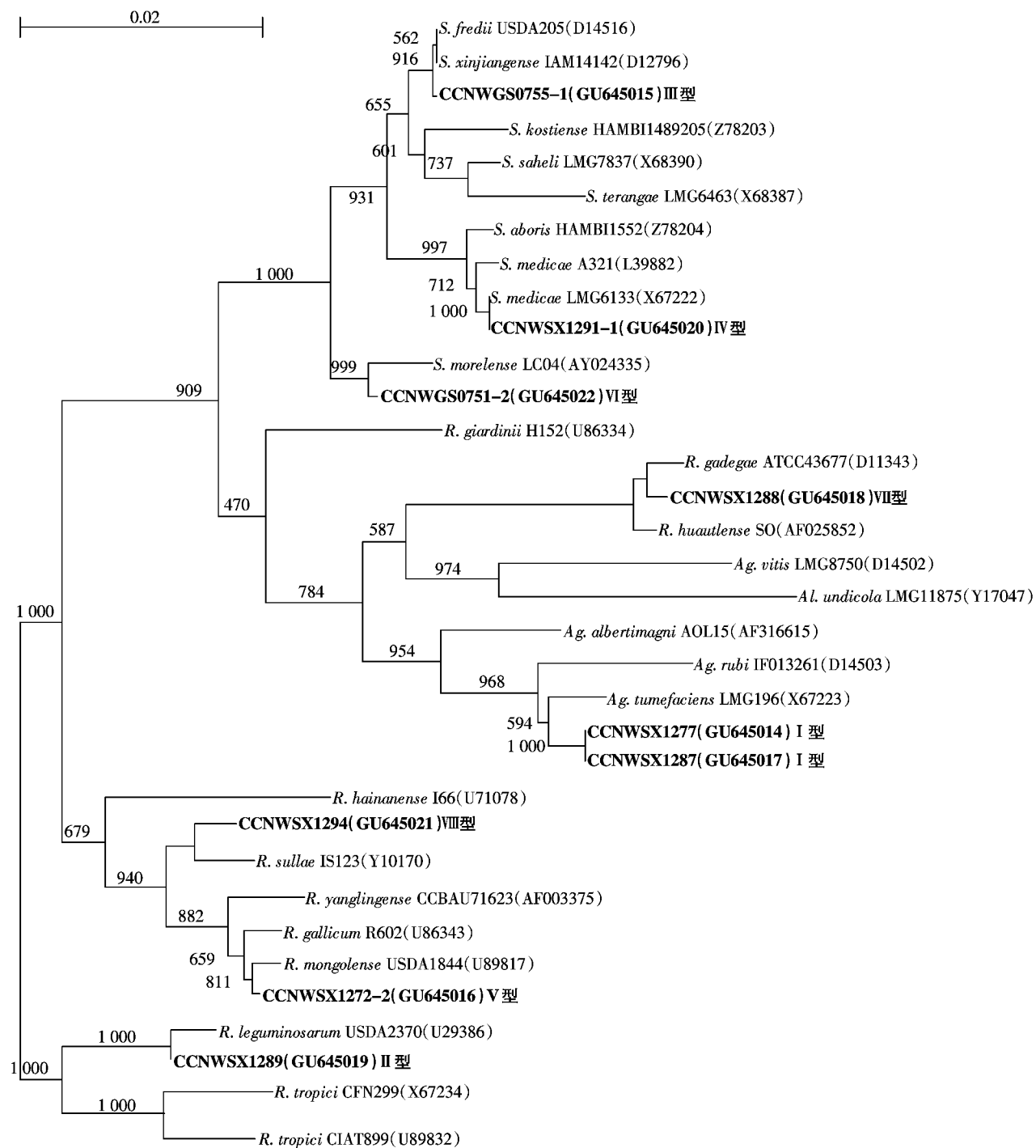
的菌株与参比菌株 *S. meliloti* 构成一个小的分支, 相似性为 99.93%; 分离自野大豆的 CCNWGS0751-2 与参比菌株 *S. morelense* 构成一个独立的发育分支, 其序列相似性为 99.42%。

在根瘤菌属 (*Rhizobium*) 与土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 形成的交叉分支上, 以分离自野大豆的 CCNWSX1288 为代表的菌株与 *R. galegae* 形成一个小的分支, 其序列相似性为 98.91%; 以 CCNWSX1277 和 CCNWSX1287 与 *Ag. tumefaciens* 形成一个小的发育分支, CCNWSX1277 与 CCNWSX1287 的序列相似性为 100%, 这两株供试菌株与参比菌株 *Ag. tumefaciens* 的序列相似性均为 99.21%。

根瘤菌属 (*Rhizobium*) 分支上, 以分离自四籽野豌豆的供试菌株 CCNWSX1289 为代表的菌株与 *R. leguminosarum* 构成一个小的系统发育分支, 序列相似性为 99.64%; 以分离自山野豌豆 CCNWSX1272-2 为代表的菌株与 *R. mongolense* 构成一个小的发育分支, 其序列相似性为 99.42%; 分离自大豆的 CCNWSX1294 与 *R. sullae* 构成一个小的发育分支, 序列相似性为 98.83%, 相似性较低, 为根瘤菌属内的一个潜在新种, 需要扩大菌株数做进一步的研究。

## 2.3 菌株的重金属抗性

能在含有重金属的 YMA 培养基上生长的根瘤菌均具有共同的菌落特征: 表面皱缩, 干燥, 呈现对应金属的色泽。28.9% 的菌株能在含  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$  的 YMA 培养基上生长, 23.7% 的菌株能在含  $0.25 \text{ mmol} \cdot$



图中分枝上数字表示树形可信度,括号内为 GenBank 登录号  
The numbers on the nodes stand for bootstrap values. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

图 2 供试菌株 16S rDNA 全序列系统发育树  
Figure 2 Phylogenetic tree on the basis of 16S rDNA full-length sequence

L<sup>-1</sup>Hg<sup>2+</sup>的 YMA 培养基上生长,42.1%的菌株可在含 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 的 YMA 培养基上生长,仅 1 株菌能在含 1.4 mmol·L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> 的培养基上生长,所有菌株均能在含 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup> 的培养基上生长。其中用于测

序的代表菌株对各种重金属的耐受水平如表 2 所示。

3 讨论

菌株的宿主植物生长的土壤环境大多数是铅锌

表 2 代表菌株的重金属抗性测定结果

Table 2 Heavy metal toxicity testing of the representative strains

| 菌株 Strain    | 寄主 Host | 重金属浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Heavy metal concentration |                  |                  |                  |                  | 生境 Habitat |
|--------------|---------|--------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|
|              |         | $\text{Zn}^{2+}$                                                   | $\text{Hg}^{2+}$ | $\text{Cu}^{2+}$ | $\text{Cd}^{2+}$ | $\text{Pb}^{2+}$ |            |
| CCNWSX1277   | 广布野豌豆   | 2.0                                                                | 0.25             | 2.0              | 1.4              | 2.5              | 镍矿         |
| CCNWSX1287   | 野大豆     | 1.6                                                                | 0.15             | 2.0              | 0.2              | 2.5              | 铁矿         |
| CCNWSX0751-2 | 野大豆     | 0.4                                                                | 0.05             | 1.6              | —                | 2.5              | 铅锌矿        |
| CCNWSX0755-1 | 野大豆     | 0.4                                                                | —                | 2.0              | —                | 2.5              | 铅锌矿        |
| CCNWSX1291-1 | 天蓝苜蓿    | 1.2                                                                | 0.1              | 1.2              | —                | 2.5              | 铁矿         |
| CCNWSX1272-2 | 山野豌豆    | —                                                                  | —                | 1.6              | —                | 2.5              | 金矿         |
| CCNWSX1288   | 野大豆     | 1.2                                                                | 0.1              | 2.0              | —                | 2.5              | 铁矿         |
| CCNWSX1289   | 四籽野豌豆   | 1.2                                                                | 0.1              | 1.6              | —                | 2.5              | 铁矿         |
| CCNWSX1294   | 大豆      | 2.0                                                                | 0.15             | 2.0              | 0.2              | 2.5              | 铁矿         |

注:“—”表示菌株在所设重金属浓度下不能生长。“—” is that the strains couldn't grow at this concentration of heavy metal.

矿、金矿和铁矿,并且分布在年均降雨量少的甘肃和陕西两省,长期的盐碱、干旱、低温及较大的昼夜温差等选择性压力使得这些地区的根瘤菌具有以下特性,而这些特性中所蕴含着的丰富基因资源,对尾矿区重金属污染治理具有重要的意义。

### 3.1 供试菌株的遗传多样性

本实验对西北矿区大豆属、野豌豆属和苜蓿属根瘤菌进行了遗传多样性和系统分类地位研究。结果表明,同一种植物在不同生态环境中可与不同的根瘤菌结瘤固氮,同一生态环境同种植物的根瘤菌可以属于不同种属,根瘤菌与豆科植物的共生关系因生态环境的差异而具有种的多样性<sup>[9]</sup>。天蓝苜蓿根瘤菌 CCNWSX1273-1 和 CCNWSX1273-2,经过对系统发育树状图的分析,它们属于 *S. fredii*;分离自天蓝苜蓿的 CCNWSX1291-1 和 CCNWSX1291-2 属于 *S. meliloti*。天蓝苜蓿的根瘤菌都聚在中华根瘤菌属内,说明与天蓝苜蓿共生的根瘤菌较为专一<sup>[10-11]</sup>。大多数野豌豆属根瘤菌与 *R. leguminosarum* 聚成一类,少数属于 *R. mongolense* 和 *S. meliloti*;同样,大豆属根瘤菌也存在此种情况,多数属于 *S. xinjiangense*,少数属于 *S. morelense*、*R. galegae* 和 *R. sullae*,这些野豌豆属和大豆属根瘤菌采集自陕西和甘肃;而分离自甘肃徽县的野大豆根瘤菌 CCNWSX0755-1 和 CCNWSX0751-2 却又分别属于 *S. xinjiangense* 和 *S. morelense*。此外,分离自山野豌豆的 CCNWSX1272-2 属于 *R. mongolense*,而 *R. mongolense* 是来自内蒙古花苜蓿的根瘤菌,CCNWSX1272-2 可能与内蒙古花苜蓿形成共生体。从 16S rDNA 全序列分析的结果中可以看出,供试菌株分布在中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和土壤杆菌属(*Agrobacterium*),表

明这些菌株具有较为丰富的遗传多样性。

### 3.2 不同菌株与重金属抗性的关系

从实验结果可以看出,根瘤菌对重金属较为敏感,随着重金属的浓度增大,耐受菌株的数量减少,不同菌株对重金属的抗性不同,重金属污染使耐受菌富集而敏感菌丧失<sup>[12]</sup>,这使得微生物群落对环境胁迫的适应能力增强。M. Díaz-Raviña<sup>[13]</sup>证明了污染土壤中细菌的金属抗性模式与土壤中金属浓度有关,且这些细菌对多种金属的耐受性得到了论证,这与本实验结果相互印证。

综合图 2 和表 2 分析可以看出,供试菌株均能耐受两种以上的重金属。这可能是根瘤菌可通过分泌质子、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,使其对多种重金属具有耐受性<sup>[14]</sup>。所有菌株都能耐受较低浓度的  $\text{Pb}^{2+}$  ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),与何新华等<sup>[15]</sup>采用生长抑制法从杨梅根瘤中分离得到的 10 株 *Frankia* 菌对重金属  $\text{Pb}^{2+}$  抗性结果一致。低浓度铅能促进抗铅菌株的生长且可能增强其酶活性,高浓度铅对其生长有一定的抑制作用,说明这些菌株具有耐受更高浓度  $\text{Pb}^{2+}$  的潜在能力。所有供试菌株均对  $\text{Cu}^{2+}$  有耐受性,多数达到  $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验获得能耐受  $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  属于 *Agrobacterium* 的 CCNWSX1277,该菌株是梁建强<sup>[16]</sup>筛选出的根瘤菌对  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  抗性水平的 7 倍。属于 *Agrobacterium* 的 CCNWSX1287 和 CCNWSX1277 分别可以耐受  $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Hg}^{2+}$ ,有 2 株属于 *Sinorhizobium* 的菌耐受  $0.05 \sim 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Hg}^{2+}$ ,有 3 株属于 *Rhizobium* 属的菌耐受  $0.1 \sim 0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Hg}^{2+}$ 。属于 *Agrobacterium* 的 CCNWSX1287 和 CCNWSX1277 分别可以耐受  $1.6$

mmol·L<sup>-1</sup>和2.0 mmol·L<sup>-1</sup>的Zn<sup>2+</sup>,有3株属于*Sinorhizobium*的菌耐受0.4~1.2 mmol·L<sup>-1</sup>的Zn<sup>2+</sup>,有3株属于*Rhizobium*属的菌耐受1.2~2.0 mmol·L<sup>-1</sup>的Zn<sup>2+</sup>。通过比较可以看出,*Agrobacterium*属的2株菌对5种重金属均有较强的耐受性;而*Rhizobium*属的4株菌和*Sinorhizobium*的3株菌对5种重金属的耐受性各不相同。这表明,根瘤菌对重金属的抗性因其种属不同呈现较大的差异,这可能与不同种属的重金属抗性机制有关,有待于进一步研究。

### 3.3 根瘤菌的生境与其对重金属抗性的关系

E. Bååth<sup>[17-18]</sup>认为重金属可能对存在于污染土壤中的细菌具有选择性压力,使得它们生存的土壤中存在抗性细菌。在菌株的重金属抗性实验中,分离自陕西宁强铁矿的野大豆根瘤菌CCNWSX1288、四籽野豌豆根瘤菌CCNWSX1289、天蓝苜蓿根瘤菌CCNWSX1291-1和大豆根瘤菌CCNWSX1294对5种重金属的抗性存在差异;来自甘肃徽县铅锌矿的野大豆根瘤菌CCNWGS0751-2和CCNWGS0755-1,以及来自陕西宁强铁矿的野大豆根瘤菌CCNWSX1287和CCNWSX1288,对5种重金属的抗性也不尽相同。表明分离自同一地区不同豆科植物的根瘤菌对同一种重金属的抗性有一定差异,甚至是分离自同一地区同一种属豆科植物的根瘤菌对同一种重金属的抗性也不尽相同。这些根瘤菌-豆科植物共生体生长在金矿、铁矿和铅锌矿等地,由于矿区土壤受到重金属元素Pb、Zn、Cr、As和Cd等的污染<sup>[19]</sup>,长期受到重金属的胁迫使得根瘤菌对不同的重金属产生了不同的耐受性。本实验中分离自镍矿附近的测序菌株CCNWSX1277对重金属Hg、Cu、Cd、Zn和Pb耐受性较强,可能是由于生境中重金属的胁迫造成的。

此外,还有学者研究了根瘤菌抗性、重金属土壤污染和蛋白质选择这三者之间的关系,结果表明,蛋白质选择的分析可能成为一个估计重金属污染对根瘤菌种群选择性压力水平的很好指标<sup>[20]</sup>。基于各种因素的影响及复杂性,对于重金属的抗性研究还需进一步深入。

## 4 结论

(1)分离自陕西宁强、略阳、凤县、甘肃徽县和成县的大豆属、野豌豆属和苜蓿属的38株根瘤菌在系统分类上归属于中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)与土壤杆菌(*Agrobacterium*)形成的交叉分支和根瘤菌属(*Rhizobium*)的系统发育分支上。

(2)根瘤菌对重金属的抗性因其种属及生境不同呈现较大的差异。*Agrobacterium*属的CCNWSX1287和CCNWSX1277对Zn、Hg、Cu、Cd和Pb 5种重金属均有较强的耐受性;而*Rhizobium*属的4株菌CCNWSX1288、CCNWSX1289、CCNWSX1294和CCNWSX1272-2以及*Sinorhizobium*的3株菌CCNWGS0755-1、CCNWGS0751-2和CCNWSX1291-1对5种重金属的耐受性各不相同。总体来看,供试菌株对重金属的耐受性顺序为*Agrobacterium*>*Rhizobium*>*Sinorhizobium*。其中分离自镍矿附近的CCNWSX1277对重金属Hg、Cu、Cd、Zn和Pb的耐受性最强。

### 参考文献:

- [1] 舒俭民,王家骥,刘晓春. 矿山废弃地的生态恢复[J]. 中国人口、资源与环境, 1998, 8(3): 72-75.
- [2] SHU Jian-min, WANG Jia-ji, LIU Xiao-chun. Ecological restoration of mining wasted lands[J]. *China Population, Resources and Environment*, 1998, 8(3): 72-75.
- [3] 武正华. 土壤重金属污染植物修复研究进展[J]. 盐城工业学院学报(自然科学版), 2002, 15(6): 53-57.
- [4] WU Zheng-hua. Advance of phytoremediation on soils polluted by heavy metal[J]. *Journal of Yancheng Institute of Technology(Natural Science Edition)*, 2002, 15(6): 53-57.
- [5] 赵默涵. 矿山废弃地土壤基质改良研究[J]. 农业基础科学, 2008, 24(12): 128-131.
- [6] ZHAO Mo-han. The research on amelioration of soil in the mining waste-land[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(12): 128-131.
- [7] 仇荣亮,仇浩,雷梅,等. 矿山及周边地区多金属污染土壤研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6): 1085-1091.
- [8] QIU Rong-liang, QIU Hao, LEI Mei, et al. Advances in research on remediation of multi-metal contaminated soil in mine and surrounding area[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(6): 1085-1091.
- [9] 李若愚,侯明明,卿华,等. 矿山废弃地生态恢复研究进展[J]. 矿产保护与利用, 2007, 2(1): 50-54.
- [10] LI Ruoyu, HOU Ming-ming, QING Hua, et al. Advances in the research on ecological restoration of mining wasteland[J]. *Conservation and Utilization of Mineral Resources*, 2007, 2(1): 50-54.
- [11] Ber Gersen F J. The growth of *Rhizobium* in synthetic media[J]. *Aust J Biol*, 1961, 14: 349-361.
- [12] Terefework 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.
- [13] 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.
- [14] 陈文新,汪恩涛,陈文峰. 根瘤菌-豆科植物共生多样性与地理环境

- 的关系[J]. 中国农业科学, 2004, 37(1):81-86.
- CHEN Wen-xin, WANG En-tao, CHEN Wen-feng. The relationship between the symbiotic promiscuity of rhizobia and legumes and their geographical environments[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(1): 81-86.
- [10] 余建福, 韦革宏, 丁小平, 等. 陕西太白尾矿废弃地豆科植物根瘤菌 16S rDNA PCR-RFLP 及全序列分析[J]. 西北植物学报, 2007, 27(3):502-508.
- YU Jian-fu, WEI Ge-hong, DING Xiao-ping, et al. 16S rDNA PCR-RFLP and sequencing of legume rhizobia isolated from Taibai Mining Tailing of Shaanxi Province[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(3):502-508.
- [11] 冯春生, 郭军康, 位秀丽, 等. 西北地区天蓝苜蓿根瘤菌 16S rDNA RFLP 分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(5):940-945.
- FENG Chun-sheng, GUO Jun-kang, WEI Xiu-li, et al. 16S rDNA RFLP Analysis of rhizobia isolated from *Medicago lupulina* in North-western China [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, 28(5):940-945.
- [12] 王发园. 土壤重金属污染对微生物多样性的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18):7827-7828.
- WANG Fa-yuan. Effect of the soil heavy metal pollution on microbial diversity[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(18):7827-7828.
- [13] M Díaz-Raviña, M Bååth, A Frostegård. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by thymidine incorporation technique[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60:2238-2247.
- [14] 郭学军, 黄巧云, 赵振华, 等. 微生物对土壤环境中重金属活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 8(1):105-110.
- GUO Xue-jun, HUANG Qiao-yun, ZHAO Zhen-hua, et al. Effect of microorganisms on the mobility of heavy metals in soil environments[J]. *China Appl Environ Biol*, 2001, 8(1):105-110.
- [15] 何新华, 陈力耕, 胡西琴, 等. 杨梅根瘤 *Frankia* 菌对重金属的抗性[J]. 水土保持学报, 2003, 17(3):127-130.
- HE Xin-hua, CHEN Li-geng, HU Xi-qin, et al. Heavy metal resistance of *Frankia* strains from root nodule of *myrica rubra*[J]. *Journal of Soil Water Conservation*, 2003, 17(3):127-130.
- [16] 梁建强, 段晓丹, 崔广玲, 等. 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[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(6):1120-1126.
- LIANG Jian-qiang, DUAN Xiao-dan, CUI Guang-ling, et al. Heavy metal tolerance and phylogenetic analysis of rhizobia isolated from metal tailings in Northwestern China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(6):1120-1126.
- [17] E Bååth. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation[J]. *Soil Biol Biochem*, 1992, 24:1167-1172.
- [18] E Bååth, M Díaz-Ravina, Å Frostegård, et al. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64:238-245.
- [19] 郭朝晖, 朱永官. 典型矿冶周边地区土壤重金属污染及有效性含量[J]. 生态环境, 2004, 13(4):553-555.
- GUO Zhao-hui, ZHU Yong-guan. Contamination and available contents of heavy metals in soils in the typical mining and smelting circumjacent districts[J]. *Ecology and Environment*, 2004, 13(4):553-555.
- [20] Sofia Isabel Almeida Pereira, et al. Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: Effects on protein expression[J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 33:286-293.