

王 姣, 田海霞, 和文祥. 蜈蚣草内生及根际砷还原菌的表征[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(12): 2765–2773.

WANG Jiao, TIAN Hai-xia, HE Wen-xiang. Identification of As(V)-reducing bacteria from the rhizosphere and tissues of *Pteris vittata* L.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(12): 2765–2773.

蜈蚣草内生及根际砷还原菌的表征

王 姣, 田海霞, 和文祥*

(西北农林科技大学资源环境学院, 农业部西北植物营养与农业环境重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 砷还原菌是影响自然环境中砷转化的主要生物因素, 其多样性特征及还原机制研究将为土壤砷污染修复奠定重要基础。本文采用4种培养基及两种培养方法, 从蜈蚣草体内及其根际土壤中筛选砷还原菌, 并探讨其还原特征及机制。结果表明, 共获得23株砷抗性菌, 分别属于2个门、10个属, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)为优势菌群。23株菌表现出了不同的砷抗性及还原特征, 抗砷浓度范围分别为 $80\sim 150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}[\text{As}(\text{V})]$ 与 $5\sim 30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}[\text{As}(\text{III})]$ 。在含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{As}(\text{V})$ 的培养体系中, 菌株砷还原率范围为 $0\%\sim 100\%$, 砷累积率为 $3\%\sim 79\%$ 。其中, *Pseudomonas* sp. S2、*Pseudomonas* sp. P3、*Staphylococcus* sp. S14及*Agrobacterium* sp. P1具有较高的砷累积率($75\%\sim 79\%$)与还原率($81\%\sim 100\%$)。21株菌存在抗砷及砷还原的重要基因*arsC*, 揭示其是砷还原菌中普遍存在的砷还原基因。

关键词: 砷积累; 砷还原菌株; *arsC*; 砷生物修复

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2018)12-2765-09 doi:10.11654/jaes.2018-0156

Identification of As(V)-reducing bacteria from the rhizosphere and tissues of *Pteris vittata* L.

WANG Jiao, TIAN Hai-xia, HE Wen-xiang*

(College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Key Laboratory of Plant Nutrition and Agri-environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, Yangling 712100, China)

Abstract: Arsenic-reducing bacteria are the main biological factor affecting arsenic transformation in the natural environment. Investigation of the diversity and reduction mechanism of arsenic-reducing bacteria will be an important foundation for arsenic pollution remediation. To obtain aerobic arsenic-reducing bacteria and determine their arsenic-reducing characteristics, four media and two culture methods were employed. The results showed that 23 arsenic-resistant strains from 2 phyla and 10 genera were screened from the rhizosphere and tissues of *Pteris vittata* L. Most of the isolated bacteria were identified as being from the genus *Pseudomonas*. The 23 isolated bacterial strains exhibited distinct arsenic resistance and reducing abilities. The As(V)-resistance concentration ranged from 80 to 300 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the As(III)-resistance concentration ranged from 2 to 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. In the medium with 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of As(V), the 23 isolated bacterial strains reduced 0%~100% of the arsenate to arsenite and removed 3%~79% of the arsenic from the medium. It was found that among these 23 isolated bacterial strains, four of them, i.e., *Pseudomonas* sp. S2, *Pseudomonas* sp. P3, *Staphylococcus* sp. S14, and *Agrobacterium* sp. P1, were able to remove 75%~79% of the arsenic from the culture medium and reduce more than 81% of the arsenate to arsenite. The arsenic-reducing mechanism of all 23 isolated bacterial strains was detected. The *arsC* gene, which is well known for its involvement in arsenate reduction, was amplified from 21 of the strains, indicating its prevalence in arsenic-reducing bacteria.

Keywords: arsenic accumulation; arsenic-reducing bacteria; *arsC*; arsenic bioremediation

收稿日期: 2018-01-28 录用日期: 2018-04-27

作者简介: 王 姣(1993—), 女, 陕西富平人, 硕士研究生, 从事环境微生物研究。E-mail: jiaowangcassiel@126.com

*通信作者: 和文祥 E-mail: wenxiang.he@nwfau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(41603116, 41571245); 中国博士后科学基金项目(2016M602864)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41603116, 41571245); China Postdoctoral Science Foundation(2016M602864)

砷(As)是一种有毒的类金属,可通过自然环境作用或人类活动释放到环境中^[1-2],并对人类健康造成极大的威胁^[3]。其中无机砷主要以五价砷[As(V)]和三价砷[As(Ⅲ)]^[4-5]形态存在,二者生物毒性相差60~80倍。由于环境条件的变化,会导致土壤中砷形态的转化,此过程极有可能受到砷还原菌的调控。国内外学者对砷还原菌开展了研究工作,如Krumova等^[6]从5个土样中分离出27株变形菌门(Proteobacteria)的抗砷菌,兼具氧化和还原能力;Chang等^[7]从砷污染土壤中分离出*Citrobacter* sp. NC-1,24 h内可将固相中的As(V)还原为具有更高迁移性的As(Ⅲ),与硫化物或亚铁离子结合从而降低其移动性。目前公认砷还原机制有两种,包括呼吸和解毒机制^[8]。As(V)进入好氧砷还原菌后,在细胞内被还原为As(Ⅲ)并排出体外,实现砷解毒作用。这一过程由染色体^[9]或质粒^[10]编码的*ars*操纵子调控,具体包括3~5个基因(*arsR*,*-D*,*-A*,*-B*,与*-C*)^[11]。研究表明,好氧砷还原菌可以控制砷的迁移转化,促进沉积物中砷的释放^[7]。因此,好氧砷还原菌的多样性及其在砷地球化学循环中的重要调控作用受到了广泛关注。

对砷而言,蜈蚣草是一种理想的修复植物。但目前关于蜈蚣草砷富集研究主要集中于体内砷还原酶及砷转运机制^[12],对微生物在蜈蚣草砷富集过程中的作用研究尚处于初始阶段。已有研究表明,微生物在促进蜈蚣草砷富集能力的同时,还可以提高蜈蚣草的生物量。Ghosh等^[13]将根际菌与蜈蚣草共培养,提高了蜈蚣草对砷的摄入量(18.1~35.3 mg·kg⁻¹),并且蜈蚣草的生物量有所增加[1.5~3.4 g(dw)]。Yang等^[14]也有类似的发现,在添加砷还原菌后,蜈蚣草的生物量增加了53%,砷吸收量增加了44%。Han等^[15]在加入抗砷菌之后,蜈蚣草的砷和磷吸收量分别增加了47%和69%,且生物量增加了20%~74%。蜈蚣草体内及根际土壤中分布着大量的抗砷及砷还原菌,但是目前相关研究较少,且分离出的抗砷菌种类十分有限。

本文从蜈蚣草体内及根际土壤中分离抗砷菌,以期不断扩充砷还原菌的种类,加强对砷还原菌群分布

的认识,并对其砷还原效率和机制进行表征,进一步证明它们在抗砷及砷的地球化学循环中的重要作用,为砷污染土壤中的微生物-植物联合修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

蜈蚣草及其根际土壤采自湖南石门地区的雄黄尾砂矿区(29°38′55″N,111°01′46″E),其中蜈蚣草连根采集装入样品袋;振荡除去粘附根系的松散土壤后,刮下紧紧粘附在根系的土壤作为根际土壤,保存于塑封袋中^[16];用大量自来水冲洗附着在植物样品表面的尘土,最后用去离子水冲洗干净备用。所有样品存储于4℃冰箱保存备用。

1.2 抗砷菌的筛选和鉴定

1.2.1 抗砷菌的筛选

本试验选用4种培养基,分别为含20 mmol·L⁻¹磷酸钠的寡营养培养基(BCM和YCM)与富营养培养基(TYEG和BPM),具体成分见表1。蜈蚣草内生抗砷菌的分离方法如下:称取3 g植物样品,移入超净工作台后,用75%酒精消毒处理,并用手术刀剪碎至5 mm片段,充分研磨后^[17],再分别加入30 mL的4种培养基。

筛选根际土壤中抗砷菌时,称3 g土样分别加入30 mL的4种培养基。两类菌均采用如下两种培养方法。直接稀释法:将混合培养物充分振荡混匀后取1 mL液体进行稀释,吸取不同稀释度的100 μL稀释液进行平板涂布。驯化法:将上述混合物于30℃、150 r·min⁻¹下振荡培养12 h,取样品3 mL再次转接入相同的无菌培养基中,重复3次后进行平板涂布。通过划线培养挑取单菌落,再转接入相应的培养基进行二次划线培养,挑取的单菌落保存至含30%甘油的培养基中,置于-80℃冰箱备用。

1.2.2 抗砷菌的16S rRNA鉴定

利用LB(Luria-Bertani)液体培养基对保存菌株进行活化培养,10 000 r·min⁻¹下离心10 min后收集菌体。采用细菌基因组试剂盒(Omega,美国)提取细

表1 分离抗砷菌的培养基配方

Table 1 The component of four mediums used in the isolation experiment

名称	成分
BCM	葡萄糖 5 g, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g, K ₂ HPO ₄ 5 g, 维生素 10 mL, 微量元素 1 mL, Na ₂ HAsO ₄ ·12H ₂ O 8.04 g, 水 1 L
YCM	酵母粉 1 g, NH ₄ Cl 1 g, MgSO ₄ 0.2 g, K ₂ HPO ₄ 0.5 g, KH ₂ PO ₄ 0.5 g, 维生素 10 mL, 微量元素 1 mL, Na ₂ HAsO ₄ ·12H ₂ O 8.04 g, 水 1 L
TYEG	胰蛋白胨 5 g, 酵母粉 2.5 g, D-葡萄糖 1 g, K ₂ HPO ₄ 3 g, Na ₂ HAsO ₄ ·12H ₂ O 8.04 g, 水 1 L
BPM	牛肉膏浸提液 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, Na ₂ HAsO ₄ ·12H ₂ O 8.04 g, 水 1 L

菌总DNA后,PCR扩增仪(Eppendorf,德国)扩增各菌株16S rRNA序列。所用引物为27F(5'-AGAGTT-GATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGGT-TACCTTTTACGACTT-3'),随后1×TAE-1%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物。胶回收试剂盒(Omega,美国)回收PCR产物后,按常规步骤克隆后由擎科公司(北京,中国)进行DNA测序,利用NCBI的BlastN程序进行序列比对,确定鉴定结果。

1.3 抗砷能力及还原基因鉴定

1.3.1 抗砷菌的As(V)与As(Ⅲ)抗性

本试验采用最大生长抑制浓度(Minimum inhibitory concentration,简称MIC)来表征菌株的砷抗性^[7]。具体方法如下:利用LB液体培养基对保存菌株进行活化。同时配制50 mL含砷的LB液体培养基,As(V)和As(Ⅲ)的浓度分别为0~500 mmol·L⁻¹与0~50 mmol·L⁻¹。将对数生长期的菌液100 μL接入上述含砷培养基中,于150 r·min⁻¹、30℃条件下培养48 h,利用紫外分光光度计(HACH DR2800,美国)测定其OD₆₀₀。

1.3.2 砷还原基因(*arsB*,*arsC*)鉴定

将保存菌株利用LB液体培养基活化培养至对数期后,离心收集菌体。用细菌基因组试剂盒(Omega,美国)提取其DNA,采用表2中引物扩增目的基因片段。阳性PCR产物采用胶回收试剂盒(Omega,美国)回收,按常规步骤克隆后由擎科公司(北京,中国)进行DNA测序,利用NCBI的BlastN程序进行序列比对。

1.4 砷还原率及累积率测定

将保藏菌液接种于LB液体培养基活化培养至对数期后,取100 μL菌液于含1 mmol·L⁻¹ As(V)的LB培养基中,150 r·min⁻¹、30℃下培养24 h后,取1 mL混合培养液于5000 r·min⁻¹离心5 min,收集上清液。同时设置无菌处理为对照。用高效液相色谱-原子荧光联用仪(HPLC-AFS)(吉天,中国)测定上清液中As(V)与As(Ⅲ)的浓度,计算菌株的砷还原率与累积率。

表2 *arsBC*引物序列^[18]

Table 2 The primer sequences used in the detection of *arsBC* genes

引物	序列(5'到3')	<i>T_m</i> /℃
<i>arsC</i> f	TCGCGTAATACGCTGGAGAT	53
<i>arsC</i> r	ACTTTCTCGCCGTCTTCCTT	
<i>arsB</i> f	GTGGAATATCGTCTGGAATGCGAC	55
<i>arsB</i> r	GGTAATTTTCGGCCCCAAATCG	

$$\text{还原率} = (C_{\text{As(Ⅲ)}}/C_{\text{T-As}}) \times 100\%$$

$$\text{累积率} = (C_0 - C_{\text{T-As}}/C_0) \times 100\%$$

式中: C_0 为初始砷浓度; $C_{\text{As(Ⅲ)}}$ 为加入菌株反应24 h后的As(Ⅲ)浓度; $C_{\text{T-As}}$ 为加入菌株反应24 h后的总砷浓度。

1.5 系统发育树构建

通过NCBI查询并获得构建发育树所需的参考序列。将所有序列通过Clustal X2程序编辑成相同片段长度后,利用MEGA6.0软件中的Neighbor_Joining方法构建系统发育树^[19]。本研究所得DNA序列已全部提交至GenBank数据库,序列号分别为MG759526~MG759548(16S rRNA);MG765306~MG765326(*arsC*)及MG765327~MG765328(*arsB*)。

2 结果与分析

2.1 砷抗性菌分离和鉴定

从蜈蚣草体内及根际土壤共筛选分离到23株砷抗性菌,结果见表3与表4。寡培养基和富培养基中

表3 23株抗砷菌的分离培养基及培养方法

Table 3 The culture media and methods used for 23 arsenic-resistant strains

序号	菌株名称	培养基	培养方法
1	<i>Pseudomonas</i> sp. S1	BCM	驯化法
2	<i>Cedecea</i> sp. S6		
3	<i>Staphylococcus</i> sp. S14		
4	<i>Pseudomonas</i> sp. S11		
5	<i>Pseudomonas</i> sp. S12	YCM	驯化法
6	<i>Stenotrophomonas</i> sp. S16		
7	<i>Pseudomonas</i> sp. S2		
8	<i>Pseudomonas</i> sp. S4		
9	<i>Exiguobacterium</i> sp. S17		直接稀释法
10	<i>Agrobacterium</i> sp. P1		
11	<i>Pseudomonas</i> sp. S8	TYEG	
12	<i>Pseudomonas</i> sp. S9		
13	<i>Exiguobacterium</i> sp. S13		驯化法
14	<i>Bacillus</i> sp. S15		
15	<i>Pseudomonas</i> sp. P4		
16	<i>Pseudomonas</i> sp. P5	BPM	
17	<i>Pseudomonas</i> sp. S10		驯化法
18	<i>Pseudomonas</i> sp. S5		
19	<i>Acinetobacter</i> sp. S7		
20	<i>Lysinibacillus</i> sp. S18		
21	<i>Pseudochrobactrum</i> sp. S3		直接稀释法
22	<i>Pseudomonas</i> sp. P2		
23	<i>Pseudomonas</i> sp. P3		

分别获得10、13株菌;驯化培养法和直接稀释法各分离出13、10株抗性菌;而且18株和5株分别分离自根际土壤和蜈蚣草体内。23株菌归属于两个门:变形菌门(Proteobacteria,其中 γ -Proteobacteria,16株; α -Proteobacteria,2株)、厚壁菌门(Firmicutes,5株),涉及10个属。其中13株菌来自假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

为确定抗砷菌的分类学地位,测定其16S rRNA序列,经与NCBI数据库比对发现所有抗砷菌与已报道模式菌的同源性高达99%。并对23株抗砷菌的16S rRNA构建了系统发育树(图1),表明所有假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)的菌株同源性高,亲缘关系近,只存在种间差异;来自微小杆菌属(*Exiguobacterium* sp.)的两株菌S13和S17也存在类似关系。解糖假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum* sp.)和土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)不同属序列之间也显示了较高的一致性,这可能是因为它们来源于相距较近的类群。

2.2 砷抗性菌的抗性、还原率和累积率

23株抗性菌对As(V)、As(III)的耐受浓度截然

不同,其浓度范围分别为80~150 mmol·L⁻¹与5~30 mmol·L⁻¹(表5)。比较各个菌株对不同价态砷的抗性可以发现,其对As(V)与As(III)的抗性能力并未呈现出一致性。如菌株S4和P1对As(V)和As(III)抗性最高,而S16虽然可耐受30 mmol·L⁻¹的As(III),但其抗As(V)能力相对较小,耐受浓度仅为80 mmol·L⁻¹。

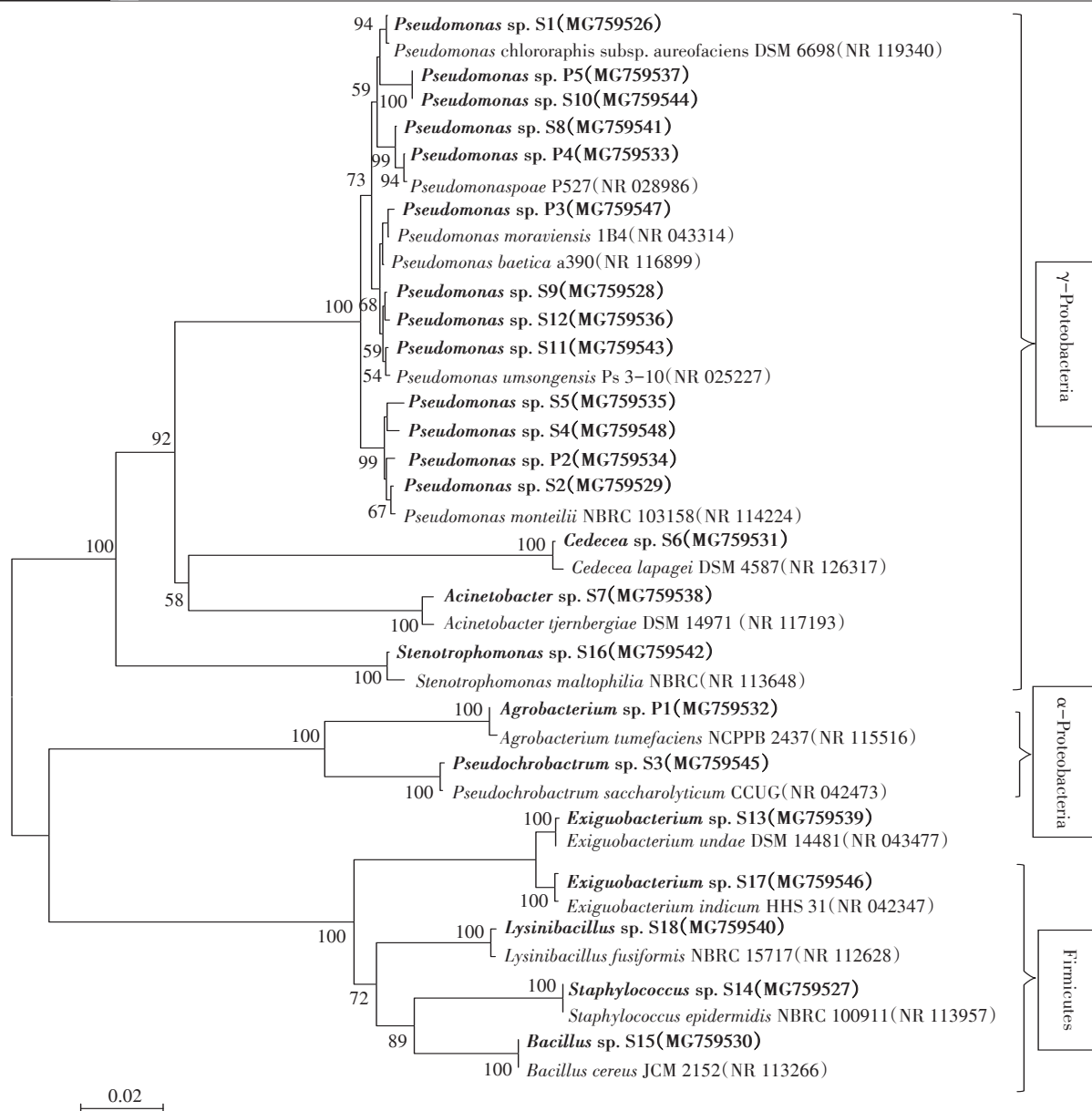
各菌株的砷还原及累积特性差异较大,砷还原率范围为0%~100%,砷累积率为3%~79%。其中19株抗砷菌的砷还原率均低于20%,砷累积率低于50%。仅有4株菌(*Pseudomonas* sp. S2、*Pseudomonas* sp. P3、*Staphylococcus* sp. S14与*Agrobacterium* sp. P1)同时表现出较高的砷还原率(81%~100%)与累积率(75%~79%),表明这几株菌在砷污染土壤的生物修复中具有一定的应用潜力。

2.3 砷还原基因arsBC

对23株菌的arsBC基因进行扩增,结果表明,从21株菌可扩增出arsC基因,而仅在2株菌中扩增出arsB基因。综合比较23株菌的砷抗性特征发现,arsC

表4 23株抗砷菌16S rRNA的鉴定结果
Table 4 16S rRNA identification of 23 arsenic-resistant bacteria

序号	菌株名称	Blast 比匹配上的同源菌株	门/纲	相似率/%	来源
1	<i>Pseudomonas</i> sp. S1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. aureofaciens ATCC 13985	γ -Proteobacteria	99	根际土
2	<i>Pseudomonas</i> sp. S2	<i>Pseudomonas monteilii</i> CIP 104883		99	
3	<i>Pseudomonas</i> sp. S4	<i>Pseudomonas mosselii</i> CFML 90-83		99	
4	<i>Pseudomonas</i> sp. S5	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> KL28		99	
5	<i>Pseudomonas</i> sp. S8	<i>Pseudomonas marginalis</i> ICMP 3553		99	
6	<i>Pseudomonas</i> sp. S9	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> DhA-51		99	
7	<i>Pseudomonas</i> sp. S10	<i>Pseudomonas weihenstephanensis</i> DSM 29166		99	
8	<i>Pseudomonas</i> sp. S11	<i>Pseudomonas baetica</i> a390		99	
9	<i>Pseudomonas</i> sp. S12	<i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10		99	
10	<i>Cedecea</i> sp. S6	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587		99	
11	<i>Acinetobacter</i> sp. S7	<i>Acinetobacter dispersus</i> ANC 4105	Firmicutes	99	
12	<i>Exiguobacterium</i> sp. S13	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> 255-15		99	
13	<i>Staphylococcus</i> sp. S14	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel		99	
14	<i>Bacillus</i> sp. S15	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579		99	
15	<i>Stenotrophomonas</i> sp. S16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637		99	
16	<i>Exiguobacterium</i> sp. S17	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> DSM 20416		99	
17	<i>Lysinibacillus</i> sp. S18	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC15717		99	
18	<i>Pseudochrobactrum</i> sp. S3	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> CCUG 46016		99	
19	<i>Agrobacterium</i> sp. P1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 12048		99	
20	<i>Pseudomonas</i> sp. P2	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164	γ -Proteobacteria	99	蜈蚣草
21	<i>Pseudomonas</i> sp. P3	<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14		99	
22	<i>Pseudomonas</i> sp. P4	<i>Pseudomonas lurida</i> P513/18		99	
23	<i>Pseudomonas</i> sp. P5	<i>Pseudomonas lundensis</i> ATCC 49968		99	



粗体即为本实验中所获得数据。采用Neighbor-Joining(NJ)方法建树。进化距离采用Poisson方法计算。比例尺为0.02

Sequences from this study are in bold type. The tree is constructed using the Neighbor-Joining method. The evolutionary distances are computed using the Poisson method. The scale bar represents 0.02 substitutions per site

图1 23株抗砷菌的16S rRNA序列系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of 23 As(V)-resistant bacteria

基因是抗砷菌中普遍存在的还原基因,但并非砷还原率及抗性的决定性因素。分别将21个*arsC*和2个*arsB*序列与GenBank中的参比序列比对,构建相应氨基酸的系统发育树(图2和图3)。结果表明,21株菌的*arsC*序列与已验证的砷还原酶*arsC*亲缘关系较近。菌株S1、S15和S6在16S rRNA结果中显示为不同属(图1),但其*arsC*基因的相似度高达99%,说明*arsC*基因在进化过程中可能保守性较高或存在相关的水

平转移。而*arsB*的系统发育树结果发现,菌株S7和S14的*arsB*存在于不同分支,亲缘关系较远。

3 讨论

3.1 抗砷菌的多样性

本研究共筛选获得来自10个属的23株抗砷菌,其中5个属(*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Exiguobacterium*、*Bacillus*与*Lysinibacillus*)在其他众多文献中被报

表 5 抗砷菌的抗性能力、抗性基因、还原率及累积率

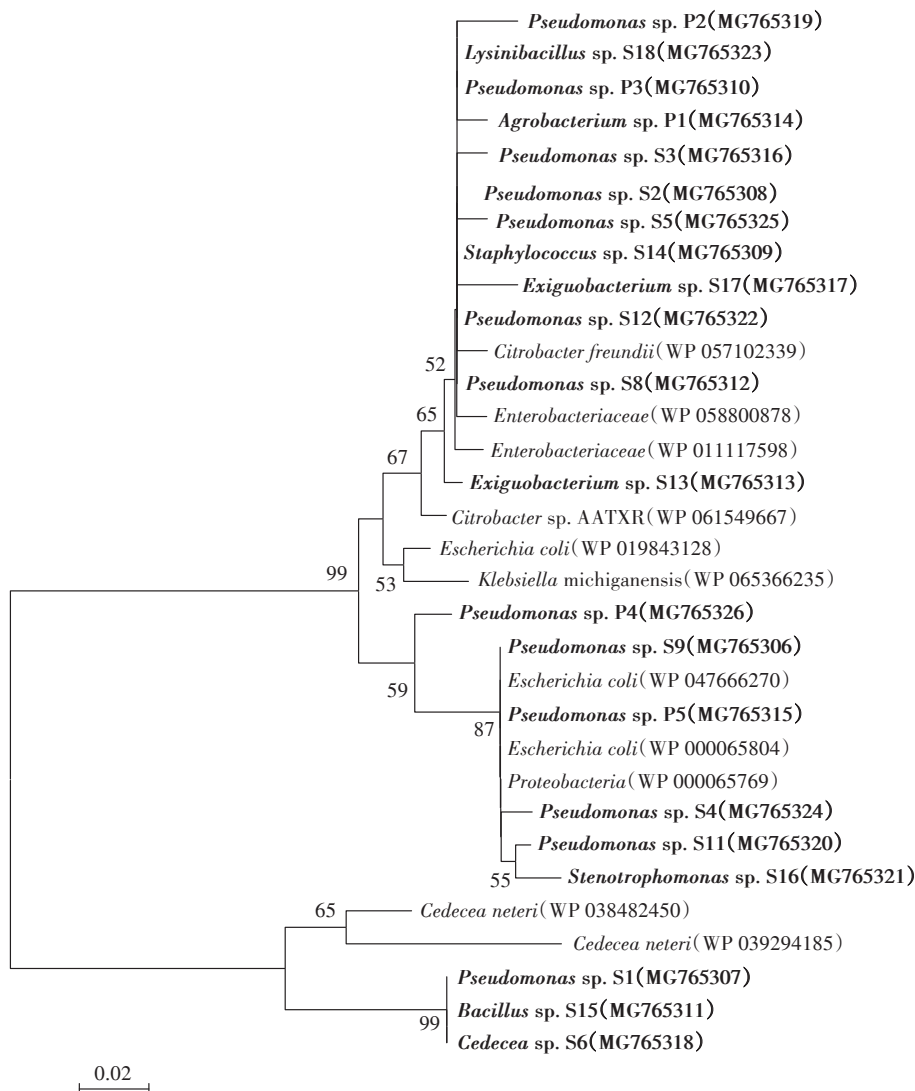
Table 5 Arsenic resistance, *ars* genes, reduction and accumulation rate of resistant strains

序号	菌株	最大耐受浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$		抗性基因		还原率/%	累积率/%
		As(Ⅴ)	As(Ⅲ)	<i>arsC</i>	<i>arsB</i>		
1	<i>Pseudomonas</i> sp. S11	80	10	+	—	4	29
2	<i>Stenotrophomonas</i> sp. S16	80	30	+	—	5	17
3	<i>Pseudomonas</i> sp. S5	80	10	+	—	4	35
4	<i>Exiguobacterium</i> sp. S17	100	5	+	—	9	34
5	<i>Lysinibacillus</i> sp. S18	100	5	+	—	5	41
6	<i>Pseudomonas</i> sp. S10	100	10	—	—	3	20
7	<i>Pseudomonas</i> sp. S9	100	10	+	—	0	5
8	<i>Pseudomonas</i> sp. S1	100	10	+	—	5	36
9	<i>Pseudomonas</i> sp. S12	100	10	+	—	5	31
10	<i>Pseudomonas</i> sp. S8	100	10	+	—	4	23
11	<i>Pseudomonas</i> sp. P5	100	10	+	—	5	38
12	<i>Pseudomonas</i> sp. P4	100	10	+	—	8	31
13	<i>Cedecea</i> sp. S6	100	10	+	—	20	49
14	<i>Acinetobacter</i> sp. S7	100	10	—	+	3	18
15	<i>Exiguobacterium</i> sp. S13	100	10	+	—	19	49
16	<i>Bacillus</i> sp. S15	100	10	+	—	4	5
17	<i>Pseudomonas</i> sp. S2	100	10	+	—	100	79
18	<i>Pseudomonas</i> sp. P3	100	10	+	—	81	78
19	<i>Staphylococcus</i> sp. S14	100	10	+	+	100	76
20	<i>Pseudomonas</i> sp. P2	100	30	+	—	11	24
21	<i>Pseudochrobactrum</i> sp. S3	150	10	+	—	3	21
22	<i>Pseudomonas</i> sp. S4	150	30	+	—	6	3
23	<i>Agrobacterium</i> sp. P1	150	30	+	—	91	75

道为抗砷菌^[18,20-21]。不同于以往的研究中仅选用单一培养基及培养方法^[22],本研究同时采用了4种培养基及2种培养方法筛选蜈蚣草体内及根际土壤抗砷菌,获得比以往研究更为丰富的菌种资源。富营养培养基(TYEG与BPM)与驯化培养法在筛选抗砷菌方面稍显优势(表3),在未来的抗砷菌分离中可优先采用。同时我们发现假单胞菌属(*Pseudomonas*)是抗砷菌的重要来源,这与前人研究结果相近。如Krumova等^[6]在研究中分离出27株抗砷菌,其中20株都来自假单胞菌属;Ghosh等^[13]从蜈蚣草根际土壤中分离到7株菌,其中5株来自假单胞菌属。而侯运楠、潘建华等^[23-24]对该5个属的重金属抗性研究中,发现其对外界环境表现出极强的适应力,因此广泛拥有抗砷能力可能是这些微生物适应恶劣环境的表现之一。而针对其他5个属(*Cedecea*、*Pseudochrobactrum*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*与*Agrobacterium*),则鲜有报道其为抗砷菌。

从不同分离来源来看,本研究中18株菌分离自

根际土壤,仅5株菌为蜈蚣草内生菌,而Han等^[25]从蜈蚣草中分离的根际菌和内生菌数量比达到17:20。两者差异性可能来自于筛选培养基中的砷胁迫浓度不一致。Han等^[25]在分离抗砷菌的培养基中添加的砷浓度仅为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而本文中为了研究高抗性的砷还原菌,所添加的砷浓度为 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外,分离结果显示67%的根际抗砷菌来源于变形菌门(Proteobacteria),其中61%属于 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria),其余33%来源于厚壁菌门(Firmicutes),这与Huang等^[26]的研究结果一致,他们同样发现 γ -变形菌纲是抗砷菌的主要来源(84%)。但Han等^[27]的研究却发现 α -变形菌纲(α -Proteobacteria)和 β -变形菌纲(β -Proteobacteria)占所分离抗砷菌的80%,并且微生物群落结构组成主要取决于土壤有机质含量而非砷含量。因此,可以推断抗砷菌主要来源的差异可能由分离土壤的性质差异引起的。另一方面发现5株蜈蚣草内生菌全部来自变形菌门,这与前人研究结果也存在一定差异性,如Zhu等^[28]从蜈蚣草中分离的内生



粗体即为本实验中所得数据。采用 Neighbor-Joining (NJ) 方法建树。进化距离采用 Poisson 方法计算。比例尺为 0.02

Sequences from this study are in bold type. The tree is constructed using the Neighbor-Joining method. The evolutionary distances are computed using the Poisson method. The scale bar represents 0.02 substitutions per site

图2 *arsC* 氨基酸序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed from *arsC* amino acid sequences of 21 *As(V)*-resistant bacteria

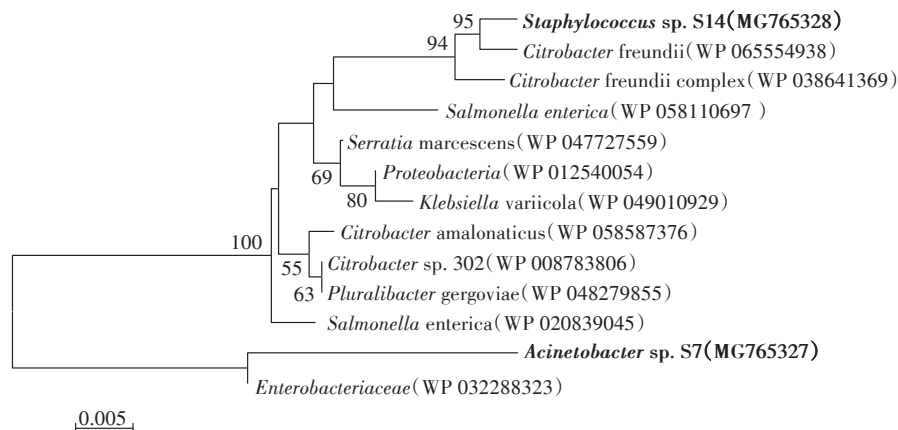
菌全部归属于厚壁菌门。Rajendran 等^[29]发现内生菌的不同归属同样与土壤的性质密切相关,认为植物组织的内生菌可能来源于植物根际,并由此进入植物组织的内部,而植物根部长时间与土壤接触,因此土壤的性质差异也会间接影响植物内生菌的群落结构。

3.2 高效砷还原菌的砷还原及累积特性

目前对好氧砷还原菌株已有很多报道,但对高效砷累积菌株研究较少。本研究发现 4 株菌:*Pseudomonas* sp. S2、*Pseudomonas* sp. P3、*Staphylococcus* sp. S14 和 *Agrobacterium* sp. P1 除了具有高效的砷还原能力,

还可累积 75% 以上的砷 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 远高于其他砷累积菌株。Majumder 等^[30]发现 *Bacillus* sp. HGH-21 在 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *As(V)* 浓度中培养 3 d 后的累积率仅为 25.6%。Takeuchi 等^[31]发现 *M. communis* 在含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 *As(V)* 培养基中,可累积 $2290 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ *As*。因此,基于这 4 株菌表现出的高累积能力,有必要深入探究其累积部位、形态及机理,以及与砷浓度、培养时间等的关系,优化其累积效率并将其应用于砷的生物修复。

以往研究发现砷还原菌的还原能力与砷抗性有关。Zhu 等^[28]发现,在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ *As(V)* 条件下,砷还



粗体即为本实验中所得数据。采用 Neighbor-Joining (NJ) 方法建树。进化距离采用 Poisson 方法计算。比例尺为 0.005

Sequences from this study are in bold type. The tree is constructed using the Neighbor-Joining method. The evolutionary distances are computed using the Poisson method. The scale bar represents 0.005 substitutions per site

图3 *arsB* 氨基酸序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed from *arsB* amino acid sequences of 2 As(V)-resistant bacteria

原能力与抗性呈负相关,而在 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ As(V) 浓度下,砷还原能力与抗性呈显著正相关。而在本研究中,菌株砷抗性在任何浓度下都并未与砷还原率呈现显著的相关性,可能是由于这些长期处于砷污染环境中的土著细菌,为了保护细胞免于毒害,表达出了特异性蛋白并与砷结合,降低了砷的毒性,进一步增强细胞的抗砷性^[12]。另外,Chen 等^[32]发现甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和有机砷化物外排透性酶(*arsJ*)共同作用也可将 As(V) 外排。Zhu 等^[33]发现 *arsN* 表达出一种类似乙酰基转移酶的蛋白影响砷抗性。*Bacillus* sp.CDB3 编码的 5 种蛋白(*arsR*₃TO₁O₂N)也与砷抗性有关^[34]。另一方面,菌株砷还原能力很大程度上并不依赖于 *arsC* 基因的表达。本研究虽在 21 株菌中扩增出 *arsC* 基因,但并非均表现出还原功能,因此砷还原能力与相关基因之间可能存在的关系还有待进一步探究。

4 结论

(1) 本研究从蜈蚣草内及其根际土壤中分离到 23 株砷抗性菌,涉及 2 个门,10 个属,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)为优势菌群。

(2) 在 23 株砷抗性菌中,4 株菌被鉴定为高效砷还原及累积菌,砷还原率和累积率分别达到 81% 以上和 75% 以上。

(3) 从 21 株抗砷菌中检测到 *arsC* 还原基因,而仅从 2 株菌中扩增出 *arsB* 基因,关于砷还原能力与基因表达之间的关系有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Bachate S P, Cavalca L, Andreoni V. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(1):145-156.
- [2] Cullen W R, Reimer K J. Arsenic speciation in the environment[J]. *Chemical Reviews*, 1989, 89(4):713-764.
- [3] 段桂兰, 王利红, 陈 玉, 等. 水稻砷污染健康风险与砷代谢机制的研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2):430-435.
DUAN Gui-lan, WANG Li-hong, CHEN Yu, et al. Health risk from consumption of rice with elevated arsenic and studies of arsenic metabolism in rice plants[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2):430-435.
- [4] Hervas M, Lopez-Maury L, Leon P, et al. ArsH from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is an efficient NADPH-dependent quinone reductase[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(6):1178-1187.
- [5] 谢正苗. 砷的土壤化学[J]. 农业环境保护, 1989, 8(1):36-38.
XIE Zheng-miao. Arsenic soil chemistry[J]. *Agro-Environmental Protection*, 1989, 8(1):36-38.
- [6] Krumova K, Nikolovska M, Groudeva V. Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2008, 22(2):721-728.
- [7] Chang Y C, Nawata A, Jung K, et al. Isolation and characterization of an arsenate-reducing bacterium and its application for arsenic extraction from contaminated soil[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(1):37-44.
- [8] Silver S, Phung L T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2):599-608.

- [9] Diorio C, Cai J, Marmor J, et al. An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(8): 2050–2056.
- [10] Owolabi J B, Rosen B P. Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(5):2367–2371.
- [11] Silver S, Phung I T. A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2005, 32(11/12):587–605.
- [12] Tu C, Ma L Q, Bondada B. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2002, 31(5):1671–1675.
- [13] Ghosh P, Rathinasabapathi B, Ma L Q. Arsenic-resistant bacteria solubilized arsenic in the growth media and increased growth of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L.[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19):8756–8761.
- [14] Yang Q, Tu S, Wang G, et al. Effectiveness of applying arsenate reducing bacteria to enhance arsenic removal from polluted soils by *Pteris vittata* L.[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2012, 14(1): 89–99.
- [15] Han Y H, Fu J W, Chen Y, et al. Arsenic uptake, arsenite efflux and plant growth in hyperaccumulator *Pteris vittata*: Role of arsenic-resistant bacteria[J]. *Chemosphere*, 2015, 144:1937.
- [16] Asde R D, Kowalchuk G A, Pjak G, et al. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(2):349–357.
- [17] Rashid S, Charles T C, Glick B R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 61(5):217–224.
- [18] Wu Q, Du J, Zhuang G, et al. *Bacillus* sp. SXB and *Pantoea* sp. IMH, aerobic As(V)-reducing bacteria isolated from arsenic-contaminated soil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(3):713–721.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10):2731–2739.
- [20] Fan H, Su C, Wang Y, et al. Sedimentary arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with high arsenic groundwater from Shanyin, Northwestern China[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(2):529–539.
- [21] Anderson C R, Cook G M. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand[J]. *Current Microbiology*, 2004, 48(5):341–347.
- [22] Villegas-Torres M F, Bedoya-Reina O C, Salazar C, et al. Horizontal *arsC* gene transfer among microorganisms isolated from arsenic polluted soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(1):147–152.
- [23] 侯运楠. 重金属抗性菌的生物吸附特性及抗性基因 *CzcA* 的克隆表达[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2015.
- HOU Yun-nan. Biosorption research of heavy metal resistance bacteria and expression of resistance gene *CzcA*[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2015.
- [24] 潘建华. 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)与重金属的作用机理及模式[D]. 北京:中国科学院, 2006.
- PAN Jian-hua. Interaction mechanism and model of heavy metals with *Bacillus cereus*[D]. Beijing:Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [25] Han Y H, Jia M R, Liu X, et al. Bacteria from the rhizosphere and tissues of As-hyperaccumulator *Pteris vittata* and their role in arsenic transformation[J]. *Chemosphere*, 2017, 186:599–606.
- [26] Huang A, Teplitski M, Rathinasabapathi B, et al. Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2010, 56(3):236–246.
- [27] Han Y H, Fu J W, Xiang P, et al. Arsenic and phosphate rock impacted the abundance and diversity of bacterial arsenic oxidase and reductase genes in rhizosphere of As-hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Journal of Hazard Materials*, 2017, 321:146–153.
- [28] Zhu L J, Guan D X, Luo J, et al. Characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria from hyperaccumulators *Pteris vittata* and *Pteris multifida*[J]. *Chemosphere*, 2014, 113:9–16.
- [29] Rajendran G, Sing F, Desai A J, et al. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp.[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11):4544–4550.
- [30] Majumder A, Ghosh S, Saha N, et al. Arsenic accumulating bacteria isolated from soil for possible application in bioremediation[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2013, 34(5):841–846.
- [31] Takeuchi M, Kawahata H, Gupta L P. Arsenic resistance and removal by marine and non-marine bacteria[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(3):434–442.
- [32] Chen J, Yoshinaga M, Garbinski L D, et al. Synergistic interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(6):945–953.
- [33] Zhu Y G, Xue X M, Kappler A, et al. Linking genes to microbial biogeochemical cycling: Lessons from arsenic[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(13):7326–7339.
- [34] Yang Y, Ren Z. Draft genome sequence of *Bacillus* sp. strain CDB3, an arsenic-resistant soil bacterium isolated from cattle dip sites[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(25):e00429–17.