

蜡状芽孢杆菌抗重金属性能及对镉的累积

刘红娟^{1,2}, 党志¹, 张慧¹, 易筱筠¹, 刘丛强³

(1.华南理工大学环境科学与工程学院, 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广东 广州 510006; 2.南华大学核科学技术学院, 湖南 衡阳 421001; 3.中国科学院环境地球化学研究所, 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要:所研究的蜡状芽孢杆菌 RC 可以在镉浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的固体培养基平板上生长良好, 表明菌株具有强抗镉的能力。该菌株在液体培养基中 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 浓度均为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Mn^{2+} 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养时, 菌株生长正常。在重金属 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 存在时, 采用红外光谱与原子吸收光谱分析菌株对 Cd^{2+} 的积累, 结果表明, 培养基中其他重金属离子的加入, 会影响菌株对 Cd^{2+} 的积累率; 当 Cr^{3+} 存在时, Cr^{3+} 可以增加细胞壁上有效官能团活性, 明显提高 RC 菌体对 Cd^{2+} 的积累率, 而其他重金属组合对 Cd^{2+} 吸附积累能力影响不大; RC 细胞壁上活性基团 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{PO}_4^{3-}$ 和 $-\text{M}-\text{O}(\text{O}-\text{M}-\text{O})$ 活跃参与 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 多种重金属离子的络合作用。通过高温和十二烷基硫酸钠处理菌株进行质粒消除试验, 未发现该菌株的抗镉性质与抗性质粒的存在相关。

关键词:蜡状芽孢杆菌; 镉; 抗性; 红外光谱

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2010)01-0025-05

Characterization of Heavy Metal Resistance and Cd-accumulation on a *Bacillus cereus* Strain

LIU Hong-juan^{1,2}, DANG Zhi¹, ZHANG Hui¹, YI Xiao-yun¹, LIU Cong-qiang³

(1.School of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, The Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters (Ministry of Education), Guangzhou 510006, China; 2.School of Nuclear Science and Technology, University of South China, Hengyang 421001, China; 3.State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: The Cd-resistant *Bacillus cereus* RC grows well on media plates containing $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cadmium. The strain grew normally in the presence of $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cd^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} or $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of Mn^{2+} . The accumulation to Cd in the strain was observed by infrared spectroscopy and atomic absorption spectroscopy, in the presence of Cr^{3+} , Pb^{2+} or Mn^{2+} . The results indicate that the presence of the other heavy metals affected the accumulation of Cd^{2+} . Cr^{3+} increased the activity of the groups and facilitated the accumulation of Cd^{2+} on the cell wall. Adsorption and accumulation varied only slightly in media containing the other metal ions. This shows that $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CO}$, $-\text{CO}-\text{NH}_2$ and $-\text{PO}_4^{3-}$ groups on the cell wall of RC actively participate in the complexing of Cr^{3+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} and Cd^{2+} ions. A plasmid elimination experiment suggests that Cd-resistant genes were not located on its plasmid. The results of this study show that this strain is resistant to cadmium and indicate the possible usefulness of this strain for bioremediation of sites contaminated with cadmium.

Keywords: *Bacillus cereus*; cadmium; resistance; infrared spectroscopy

Cd 是一种典型的有毒元素, 在环境中较易迁移, 并能在生物体中富集, 是重要的环境污染物质, 对生物

有致突、致癌、致畸的“三致”作用, 对 Cd 的遗传毒理机制研究一直是生态学家和环境生物学家研究的热点之一。许多微生物能抗 Cd^{2+} 并富集 Cd^{2+} , 尤其是微生物胞外基团和代谢产物对 Cd^{2+} 具有极强的富集能力。郭平等^[1]分离得到富集 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的优势细菌, 其最大吸附量分别为 $4.323 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.081 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。潘园园等^[2]分离到一株抗铜和镉的产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 该菌株可以单抗 $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铜和 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镉。White 等^[3]利用厌氧菌硫酸盐还原菌

收稿日期: 2009-06-07

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (40730741); 广东省自然科学基金研究团队项目 (9351064101000001); 广东省科技计划国际合作项目 (2007A050100023); 环境地球化学国家重点实验室开放基金

作者简介: 刘红娟 (1983—), 湖南邵阳人, 硕士, 主要从事重金属污染土壤的生物修复研究。E-mail: l_ruyue@126.com

通讯作者: 党志 E-mail: chzdang@scut.edu.cn

产生的 S^{2-} 与 Cd^{2+} 形成硫化镉沉淀而去除水中的镉。Kefala 等^[4]研究了放线菌对镉离子的吸收, Llanos 等^[5]研究了有氧和厌氧微生物对镉的积累, Lebeau 等^[6]研究了固定化和游离微生物对镉的吸附情况, Banjerdikij 等^[7]研究了 *Xanthomonas capestris* 对镉诱导的抗性, Zouboulis 等^[8]应用 *Bacillus laterosporus* 菌株对 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 进行吸附研究等。近年来, 基于微生物对重金属的积累和解毒作用^[9], 以修复有毒有害重金属污染或回收有经济价值金属为目的的生物处理技术正在兴起, 为了阐明微生物在环境污染修复中的作用, 充分发挥微生物在生物处理技术中的效能, 有必要对其与重金属之间的相互作用予以深入探讨。

本研究利用从镉污染土壤中分离获得到的一株对镉具有较强抗性和吸附功能的蜡状芽孢杆菌。在含 Cd^{2+} 浓度为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础上研究活菌体的吸附功能, 利用原子吸收光谱分析菌株在多种重金属离子共存的培养基中对 Cd^{2+} 的积累效果的变化; 借助红外光谱分析手段, 通过官能团吸收峰值的位移和变化, 分析多种重金属离子存在时微生物菌体表面参与吸附 Cd^{2+} 的官能团变化情况, 将为阐明细菌抗镉和吸附镉的内在机制, 提高细菌表面基团去除重金属镉污染的能力, 为高效修复环境重金属污染提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株 RC 从广东南海镉污染蔬菜土壤中分离得到, 经分析对镉具有较强的抗性和吸附能力^[10]。

1.2 菌体培养条件

蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 牛肉膏 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{NaCl } 5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}7.4\pm0.2$, 经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min , 固体培养基另加琼脂。

1.3 菌株 RC 在固体培养基上对重金属的耐性

将活化于固体斜面培养基上的菌体制成菌悬液稀释到一定浓度, 取 0.1 mL 分别依次涂布于镉浓度为 50 、 100 、 200 、 300 、 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、铜浓度 20 、 50 、 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、铅浓度为 100 、 300 、 500 、 $700\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的固体培养基平板上, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3 d 后, 观察菌落生长情况。

1.4 重金属离子对耐镉菌株生长的影响

分别将菌株接种到含终浓度为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn^{2+} 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 摇床转速为 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下振荡培养, 定时取样测定 $\text{OD}_{680\text{ nm}}$ 值, 以不含重金属离子培养基作为对照。

1.5 多种重金属离子共存时耐镉菌株对 Cd 的积累

将在 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 初始浓度均为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 Mn^{2+} 初始浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基中培养 24 h 后的 RC 菌体离心, 测定上清液中所含的 Cd^{2+} 浓度^[11], 按以下公式计算菌体总积累率 N :

$$N = (C_a - C_b) / C_a \times 100\%$$

式中: C_a 、 C_b 分别为培养基中 Cd^{2+} 的起始浓度和终浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.6 不同培养条件下菌株对 Cd 积累的 IR 光谱

按表 1 配制含各种金属离子的液体培养基, 接种 RC 菌株培养 24 h 后, 高速离心收集菌体, 用蒸馏水清洗 3 次, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重, 取少量菌体与预先烘干的 KBr 粉末混匀, 在玛瑙研钵中充分研磨, 压片制样后用红外光谱仪测定^[12]。

表 1 培养基中各种金属离子的组合

Table 1 The constituent of various metal ions in the mediums

编号	重金属离子
a	Cd^{2+}
b	$Cd^{2+}+Cr^{3+}$
c	$Cd^{2+}+Mn^{2+}$
d	$Cd^{2+}+Pb^{2+}$
e	$Cd^{2+}+Cr^{3+}+Mn^{2+}$
f	$Cd^{2+}+Pb^{2+}+Mn^{2+}$
g	$Cd^{2+}+Cr^{3+}+Pb^{2+}$
h	$Cd^{2+}+Cr^{3+}+Pb^{2+}+Mn^{2+}$

注: Mn^{2+} 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Cd^{2+} 和其余重金属离子浓度均为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.7 质粒消除试验

将分离得到的纯培养菌株接种于新鲜牛肉膏蛋白胨培养基中, 用下列两种方法处理^[13-14]: (1) $43\text{ }^{\circ}\text{C}$, 36 h ; (2) 培养基中含 $\text{SDS } 15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 36 h)。将处理后的培养液浓度依次稀释至 0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 后分别涂布于镉浓度为 0 、 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的固体培养基平板上, 每个镉浓度梯度做 3 个平行平板, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察菌落生长情况。

2 结果与讨论

2.1 菌株 RC 在固体培养基上对重金属的抗性

在含各种重金属浓度的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上稀释涂布接种 RC 菌株, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 培养 3 d , 见表 2。由表 2 可知, RC 菌株能够在 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内的 Cd^{2+} 浓度平板上也都能很好生长、在 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 浓度平板上生长量减少, Cd^{2+} 浓度为 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 RC 几

乎不生长。 Cu^{2+} 浓度在 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内时,RC 菌株能够生长较好,但当 Cu^{2+} 浓度达 $150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ RC 菌株基本停止生长。RC 菌株能够在含 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}^{2+}$ 的平板上微生长,但在 Pb^{2+} 浓度达到 $700\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时受到影响。结果表明 RC 菌株对 Cd 有较强的抗性,但与其他细菌菌株相比,RC 菌株对这另两种重金属并不具有特殊的忍耐性。表明该菌株对 Cd 的抗性较为特别,这种抗性不能用调节阳离子转运系统的转运蛋白的合成和活性加以解释^[15],可能有其特殊的抗性机理存在。

表 2 菌株 RC 在固体培养基上对重金属的抗性

Table 2 The resistance of RC on heavy metal in the solid medium

重金属离子	重金属离子浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RC 菌落生长情况
Cd^{2+}	50	+++
	100	+++
	200	+++
	300	+
	400	-
Cu^{2+}	25	+++
	50	+++
	150	-
Pb^{2+}	100	+++
	300	+++
	500	+
	700	-

注:+++为生长好,+=微生长,-为不生长。

2.2 菌株在含各种重金属离子培养基中的生长状况

菌株在 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mn}^{2+}$ 的液体培养基中生长情况见图 1。菌株能够在含 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 和 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mn}^{2+}$ 液体培养基中正常生长,与对照菌生长速率基本相当。RC 菌株在各种重金属液体培养基中培养 22.5 h 后生长达

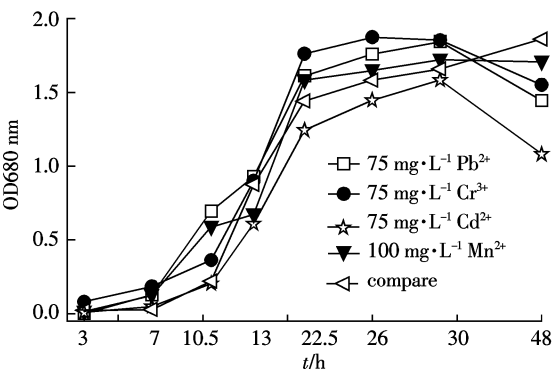


图 1 不同重金属离子对 RC 生长的影响

Figure 1 The growth of RC under different heavy metal ions

到稳定期,培养到 30 h 后基本上开始进入衰减期。

2.3 菌株在多种重金属离子共存的培养基中对 Cd 的积累

菌体生长在不同重金属离子组合的液体培养基中对浓度为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$ 吸附积累情况见表 3。由表 3 可知,培养基中其他重金属离子的加入,会影响菌株对 Cd^{2+} 的积累和进入菌体内的 Cd^{2+} 量。当培养液中只有 Cd^{2+} 与 Cr^{3+} 共存时,RC 菌体对 Cd^{2+} 的积累率增至最高。 Cr^{3+} 可能增加细胞壁上的基团活性和吸附 Cd^{2+} 的位点,据已有报道,重金属共存时会产生交互作用, Cr^{3+} 的存在改变了 RC 菌体的细胞结构特别是膜结构影响了 Cd^{2+} 的跨膜方式从而增加 Cd^{2+} 的胞内聚集^[16-17]。培养液中 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 共存时,菌株 RC 对 Cd^{2+} 的积累率受 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 影响不大。除了 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} , Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 这 3 种重金属离子组合会较明显提高 RC 菌株对 Cd^{2+} 的积累率外,其他重金属离子组合当从两种重金属离子增至 4 种重金属离子时,菌株对 Cd^{2+} 的积累量影响不大且不同组合之间的积累效果差不多。

表 3 培养基中各种金属离子的组合存在下 RC 菌株对 Cd^{2+} 的积累

Table 3 The constituent of various metal ions in the mediums

重金属离子搭配类型	菌体对 Cd 的积累率
Cd^{2+}	36.48%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Cr}^{3+}$	54.18%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Mn}^{2+}$	41.36%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$	42.38%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Cr}^{3+}+\text{Mn}^{2+}$	47.84%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}+\text{Mn}^{2+}$	39.54%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Cr}^{3+}+\text{Pb}^{2+}$	44.80%
$\text{Cd}^{2+}+\text{Cr}^{3+}+\text{Pb}^{2+}+\text{Mn}^{2+}$	42.71%

注: Mn^{2+} 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, Cd^{2+} 和其余重金属离子浓度均为 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 不同重金属离子共存时菌株 RC 对 Cd 积累的 IR 光谱图

图 2 是红外光谱检测 RC 菌体在不同重金属离子共存时细胞壁表面上一些化学基团变化结果。由图 2 可知,在不同重金属离子组合下积累 Cd 前后菌体的 IR 谱图呈现出明显的差异性。 $3\ 288\sim 3\ 337\text{ cm}^{-1}$ 处的谱峰可归属为细胞壁上来自蛋白质的 C-H 键、N-H 键的伸缩、碳水化合物中结合水的 O-H 的伸展振动; $1\ 542\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 654\text{ cm}^{-1}$ 处的谱峰来自典型的细胞蛋白质酰胺 II 带(N-H 的弯曲振动与 C-N 伸展

振动的叠加)和酰胺 I 带(CO 的伸展振动)^[12];1 237 cm^{-1} 处的谱峰为 P-O 和 C-S 的伸缩振动以及 C-O 与 O-H 的叠加吸收峰;1 000~1 100 cm^{-1} 处的谱峰主要为 $-\text{PO}_4^{3-}$ 、胺基中的 C-N 的伸缩振动和糖环的振动吸收带,低于 600 cm^{-1} 的 550 cm^{-1} 处的谱峰是 M-O 和 O-M-O(M-金属离子)振动吸收峰^[18]。

如图 2 所示,在含 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 中生长的菌株(图 2-d)与在 Cd^{2+} 浓度为 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中生长的菌株(图 2-a)其 IR 光谱基本类似,即 Cr^{3+} 和 Pb^{2+} 与 Cd^{2+} 在细胞壁上的吸附位点类似,菌株对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 这两类离子的吸附积累过程可能是相似的。 Cr^{3+} 存在时, $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{PO}_4^{3-}$ 和 $-\text{M}-\text{O}(\text{O}-\text{M}-\text{O})$ 基团的吸收峰增强变宽,表明低浓度 Cr^{3+} 促进 RC 菌株生长和产生更多的活性基团。在含 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 中生长的 RC 菌株(图 2-g)和在含 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 中生长的 RC 菌株(图 2-e)IR 光谱基本类似,与图 2-a 相比,所有活性基团的吸收峰强度稍微增强,且 550 cm^{-1} 处的谱峰 M-O 和 O-M-O 振动吸收峰^[12]强度明显增大。可以看出图 2-f 和图 2-h IR 谱图类似,而 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 中生长的 RC 菌株与 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 中生长的 RC 菌株 R 谱图相似性。图 2-f 和图 2-h 与图 2-a 相比, $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{COOH}$ 、和 $-\text{PO}_4^{3-}$ 吸收峰值^[12,19-20]变得强而宽,特别是 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{PO}_4^{3-}$ 基团吸收峰形变化明显, $-\text{PO}_4^{3-}$ 基团吸收强度突出,其余基团吸收峰锐减或消失。对不同重金属离子组合存在下 RC 菌体的 IR 光谱图进行比较,发现 RC 细胞壁上活性基团 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{PO}_4^{3-}$ 和 $-\text{M}-\text{O}(\text{O}-\text{M}-\text{O})$ 活跃参与 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 多种重金属离子的络合作用。

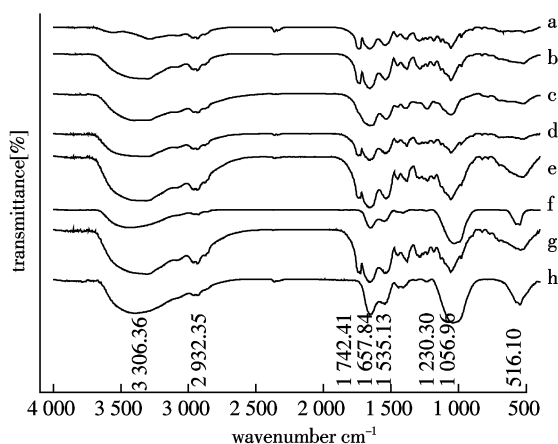


图 2 不同重金属存在下 RC 菌体的 IR 光谱图(a~h)

Figure 2 Infrared spectra of RC in the liquid medium containing different heavy metal ions

2.5 分离菌株 RC 的质粒消除结果

将分离得到的纯培养菌株接种于新鲜牛肉膏蛋白胨培养基中,通过高温和十二烷基硫酸钠(SDS)2种方法处理菌株。RC 菌液浓度依次稀释至 0、 10^{-1} 、 10^{-2} 后分别涂布于镉浓度为 0、80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的固体培养基平板上 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 36 h 后,观察菌落生长情况。

经过消除质粒处理后,3 个稀释度的菌液在含镉浓度为 0 的固体培养基上和含镉浓度为 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的固体培养基上均能生长,生长情况相差不大,0 的固体培养基上生长情况相对较好。结果表明,RC 菌株对重金属镉的抗性可能不是由质粒决定的,在质粒消除后,RC 菌株对镉的抗性依然存在;另外一种可能是所用的两种处理条件没有使质粒消除。

对菌株 RC 进行质粒消除试验得到的结果与有关报道^[21]细菌的某些表型特征,包括抗性、代谢能力、致病性等往往由质粒控制的结论不相符。由于结构及生理上的独特性,不同菌株的质粒消除机制各不相同,到目前为止,尚没有普遍适用的质粒消除方法^[22-23]。因此,菌株 RC 对重金属镉的抗性是否由质粒决定有待进一步探讨,可以试验其他的质粒消除方法并结合琼脂糖凝胶电泳检测等手段进一步研究。

3 结论

(1)该菌株在 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 浓度分别为 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 Mn^{2+} 浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基中能够正常生长。本研究表明 RC 菌株对重金属镉具有较强的抗性和吸附能力,在高效修复环境中重金属污染显示出很大的应用潜力。

(2)当 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 浓度均为 75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,RC 菌株 IR 谱图的相似性表明 Pb^{2+} 与 Cd^{2+} 在细胞壁上的吸附位点基本类似;且当 Cr^{3+} 存在时, $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{PO}_4^{3-}$ 和 $-\text{M}-\text{O}(\text{O}-\text{M}-\text{O})$ 基团的吸收峰增强变宽;对不同重金属离子组合存在下 RC 菌体的 IR 光谱图进行比较,发现 RC 细胞壁上活性基团 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{PO}_4^{3-}$ 和 $-\text{M}-\text{O}(\text{O}-\text{M}-\text{O})$ 活跃参与 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 多种重金属离子的络合作用。

(3)通过高温和十二烷基硫酸钠(SDS)两种方法进行质粒消除试验,未发现该菌株的抗镉性质与抗性质粒的存在相关。

参考文献:

- [1] 郭平,康春莉,李军,等.细菌胞壁多糖对水体中低浓度 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的吸附研究[J].微生物学通报,2004,31(6):62-67.

- GUO Ping, KANG Chun-li, LI Jun, et al. Adsorption of Pb^{2+} and Cd^{2+} onto polysaccharide of dominant bacterial cell wall in natural water[J]. *Bull Microbiol*, 2004, 31(6):62-67.
- [2] 潘园园, 陈雯莉, 黄巧云. 一株抗重金属铜镉细菌的分离、鉴定及其16S rDNA的序列分析[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3):68-72.
- PAN Yuan-yuan, CHEN Wen-li, HUANG Qiao-yun. Isolation, identification and 16S rDNA sequences analysis of a bacterial resistant to copper and cadmium[J]. *Bull Microbiol*, 2005, 32(3):68-72.
- [3] White C, Gadd G M. Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms[J]. *Microbiology*, 1998, 144:1407-1415.
- [4] Kefala M I, Zouboulis A I, Matis K A. Biosorption of cadmium ions by Actinomycetes and separation by flotation[J]. *Environ Pollut*, 1999, 104:283-293.
- [5] Llanos J, Capasso C, Parisi E, et al. Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea Hydrothermal Vents[J]. *Curr Microbiol*, 2000, 41:201-205.
- [6] Lebeau T, Bagot D, Jézéquel K, et al. Cadmium biosorption by free and immobilized microorganism cultivated in a liquid soil extract medium: Effects of Cd, PH and techniques of culture[J]. *Sci Total Environ*, 2002, 291:73-83.
- [7] Banjerdikij P, Vattanaviboon P, Mongkolsuk S. Cadmium-induced adaptive resistance and Cross-resistant to zinc in *Xanthomonas capestris*[J]. *Curr Microbiol*, 2003, 47:260-262.
- [8] Zouboulis A I, Loukidou M X, Matis K A. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by Bacteria strains isolated from metal-polluted soil[J]. *Process Biochem*, 2004, 39:909-916.
- [9] 陈素华, 孙铁珩, 周启星, 等. 微生物与重金属间的相互作用及其应用研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2):239-242.
- CHEN Su-hua, SUN Tie-heng, ZHOU Qi-xing, et al. Interaction between microorganisms and heavy metals and its application[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2002, 13(2):239-242.
- [10] 刘红娟, 张慧, 党志, 等. 一株耐镉细菌的分离及其富集Cd的机理[J]. 环境工程学报, 2009, 3(2):367-371.
- LIU Hong-juan, ZHANG Hui, DANG Zhi, et al. Isolation and bio-accumulation mechanisms of a Cd-resisting bacterium[J]. *Chin J Environ Engin*, 2009, 3(2):367-371.
- [11] Llanos J, Capasso C, Parisi E, et al. Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea Hydrothermal Vents[J]. *Current Microbiology*, 2000, 41:201-205.
- [12] Kamnev A A, Antonyuk L P, Matora L Y, et al. Spectroscopic characterization of cell membranes and their constituents of the plant associated soil bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. *J Mol Structure*, 1999, 480/481:387-393.
- [13] 段学军, 闵航. 一株抗镉细菌的分离鉴定及其抗性基因定位的初步研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(1):154-158.
- DUAN Xue-jun, MIN Hang. Isolation, identification and preliminary studies on the resistance gene detection of a Cd-resisting bacterium[J]. *Acta Sci Circumst*, 2004, 24(1):154-158.
- [14] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯敦 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2001:16-34.
- Osbert F, Brent R, Kingston R E, et al. Short protocols in molecular biology[M]. Beijing:Science Press, 2001:16-34.
- [15] Nalin R, Simonet P, et al. Rhodanobacter lindaniclasticus gen. nov., a lindane degrading bacterium[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(1):19-23.
- [16] 何勇田, 熊先哲. 复合污染研究进展[J]. 环境科学, 1994, 15(6):79-83.
- HE Yong-tian, XIONG Xian-zhe. Research evolvement of combined pollution[J]. *Environ Sci*, 1994, 15(6):79-83.
- [17] 沈国清, 陆贻通, 周培. 土壤环境中重金属和多环芳烃复合污染研究进展[J]. 上海交通大学学报, 2005, 23(1):102-106.
- SHEN Guo-qing, LU Yi-tong, ZHOU Pei. Advance of research on combined pollution of heavy metals with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil environment[J]. *Journal of Shanghaijiaotong University(Agricultural Science)*, 2005, 23(1):102-106.
- [18] Kamnev A A, Risti M, Antonyuk L P, et al. Fourier transform infrared spectroscopic study of intact cells of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*[J]. *J Mol Structure*, 1997, 408/409:201-205.
- [19] 刘爱民, 黄为一. 应用红外方法探讨耐镉菌株高积 Cd^{2+} 的机理[J]. 环境科学学报, 2005, 25(11):1502-1506.
- LIU Ai-ming, HUANG Wei-yi. Research on high accumulating Cd^{2+} mechanism of a tolerant- Cd^{2+} strain by Infrared spectroscopy analysis [J]. *Acta Sci Circumst*, 2005, 25(11):1502-1506.
- [20] Gabriela H P, Luciana M S M, Mauricio L T, et al. Biosorption of cadmium by green coconut shell powder[J]. *Minerals Engineering*, 2006, 19:380-387.
- [21] 吴乃虎. 基因工程原理(上册)第二版[M]. 北京:科学出版社, 1998:176-179.
- WU Nai-hu. Genetic engineering principle (Volume one) 2th[M]. Beijing:Science Press, 1998:176-179.
- [22] David M H, Richard P, Frank G, et al. Curing of plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation[J]. *Nucl Acids Res*, 1989, 17(23):10131.
- [23] 娄恺, 班睿, 赵学明. 细菌质粒的消除[J]. 微生物学通报, 2002, 29(5):99-103.
- LOU Kai, BAN Rui, ZHAO Xue-ming. Plasmid curing in bacteria[J]. *Bull Microbiol*, 2002, 29(5):99-103.