

喜温嗜酸硫杆菌 YN12 菌株的鉴定及其镉抗性能

丁建南, 朱若林, 康健, 张成桂, 吴学玲, 邱冠周

(中南大学 资源加工与生物工程学院, 长沙 410083)

摘要: 自云南酸性热泉水样中分离出一株中度嗜热硫氧化菌 YN12。对其形态特征和生理生化特性以及 16S rDNA 序列分析结果证明, 该菌株归属于喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)。重金属抗性实验表明, YN12 菌株对 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 具有超强抗性, 其最高初始 Cd^{2+} 耐受浓度达 4.8 g/L。在此基础上, 不断提升 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 浓度, 其最终 Cd^{2+} 耐受浓度可达 31.5 g/L(相当于 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 210 g/L)。在该最终 Cd^{2+} 耐受浓度下, 经过连续 3 代的适应性生长, YN12 菌株的生长速度和硫氧化活性均能得到较好的恢复。

关键词: 喜温嗜酸硫杆菌; YN12 菌株; 镉抗性; 最高耐受浓度

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Identification and cadmium (II) resistance of strain YN12, *Acidithiobacillus caldus*

DING Jian-nan, ZHU Ruo-lin, KANG Jian, ZHANG Cheng-gui, WU Xue-ling, QIU Guan-zhou

(School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Abstract: A moderately thermophilic sulfur-oxidizing strain, YN12, was isolated from an acidic hot spring sample collected in Yunnan Province, southeastern China. Morphological, physiological and 16S rDNA sequence data suggest that YN12 belongs to the species, *Acidithiobacillus caldus*. YN12 exhibits a very high degree of resistance to cadmium (II), with an original maximum tolerated concentration (MTC) of 4.8 g/L and an ultimate MTC of 31.5 g/L after adapted by a gradually increased concentration of $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Continuously cultured in the medium containing 210 g $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ /L (equal to 31.5 g/L of Cd^{2+}) for three generations, the strain is capable of restoring its growth and sulfur oxidation activity to an approximately normal level.

Key words: *Acidithiobacillus caldus*; strain YN12; cadmium resistance; maximum tolerated concentration

喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)是嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)中惟一的适度嗜热菌, 自 1994 年由 HALLBERG 和 LINDSTROM 分离、鉴定以来^[1], 随着人们对其浸矿作用的不断认识, 该菌在硫化矿生物浸出, 特别是在金属硫化精矿高温生物浸矿反应器中的应用越来越广泛^[2-4]。喜温嗜酸硫杆菌的应用, 最早始于其对含金砷硫铁矿(毒砂)的生物预氧化, 因而该菌对砷离子的抗性从一开始就备受关注。目前国内有关喜温嗜酸硫杆菌的抗性研究主要集中于

砷^[5-7], 对其它有毒金属离子抗性的研究报道较少。金属硫化矿的化学组成较为复杂, 随着浸矿的进行, 除了砷以外, 往往还有其它有毒金属离子游离出来, 抑制微生物的生长和浸矿活性^[8-9], 因此, 研究喜温嗜酸硫杆菌对这些离子的抗性, 对于提高其浸矿效率具有十分重要的意义。本文作者分离纯化了 21 株喜温嗜酸硫杆菌新菌株, 其中包括一株高抗镉(Cd^{2+})菌株 YN12。本文报道了该菌株的分离、鉴定及其抗 Cd^{2+} 性能的研究结果。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2004CB619201); 国家自然科学基金创新研究群体科学基金资助项目(50621063)

收稿日期: 2007-05-08; **修订日期:** 2007-11-04

通讯作者: 邱冠周, 教授, 博士; 电话: 0731-8879212; E-mail: guanzhouqiu@yahoo.com.cn

实验所用培养基均为该培养基。

1 菌株的分离与鉴定

1.1 菌株分离

从云南瑞甸采集到酸性热泉水样一式 2 份, 其中一份保存在 45 ℃, 用于菌种富集, 另一份保存在 4 ℃, 用于元素分析。样品从采集到使用, 保存时间不超过 4 d。采用原子吸收分光光度法(Atomic absorption spectrometry, AAS)分析水样化学成分。该酸性热泉水样的主要特性见表 1。

表 1 酸性热泉样品 80 ℃时的主要特性

Table 1 Main properties of acidic hot spring sample at 80 ℃

pH	P	Al	Zn	Mg	Ca	K
5.2	0.03	0.08	0.05	2.66	24.31	5.44
S	Mo	Mn	Si	Cu	Fe	Na
16.22	0.02	0.32	36.21	0.02	0.08	41.2

将 3 mL 45 ℃下保存的水样加到装有 47 mL 富集培养基的三角瓶中, 用硫酸调整 pH 值至 2.5, 然后加入灭菌升华硫(S⁰), 于 45 ℃、转速 180 r/min 下振荡培养 5~7 d, 每天监测 pH 值变化, 待 pH 值降到 1.0 左右时, 按同样方法转接培养, 待 pH 值再次降到 1.0 左右时, 进行又一次转接培养, 如此富集 3 次。第 3 次富集物用来进行菌株分离。富集培养基^[10]包括以下基本盐成分(g/L): (NH₄)₂SO₄ (3.0)、Na₂SO₄·10H₂O (3.2)、KCl (0.1)、K₂HPO₄ (0.05)、MgSO₄·7H₂O (0.5)、Ca(NO₃)₂ (0.01), 并含 0.02%(w/v)酵母提取物(YE)。该培养基另含数种微量元素, 微量元素的配方如下(mg/L): FeCl₃·6H₂O (11.0)、CuSO₄·5H₂O (0.5)、HBO₃ (2.0)、MnSO₄·H₂O (2.0)、Na₂MoO₄·2H₂O (0.8)、CoCl₂·6H₂O (0.6)、ZnSO₄·7H₂O (0.9)、Na₂SeO₄ (0.1)。基本盐培养基和 YE 采用常规高压灭菌法灭菌, 微量元素过滤除菌, S⁰采用间歇灭菌法连续灭菌 3 次。

将第 3 次富集培养物涂布在配方与富集培养基相同但能量物质不同、pH 值为 2.5 的 0.7%(w/v)琼脂平板上。该固体培养基的能量物质由富集培养基的 S⁰改为 1.5 g K₂O₆S₄/L(过滤除菌)。将涂布好的平板置于 45 ℃下培养 7 d 后, 挑取单菌落接入与上述富集培养基相同, pH 2.5 的液体培养基中, 振荡培养 5~7 d, 然后再用前述固体培养基分离, 如此反复分离 3 次, 最后得到纯培养的 YN12 菌株。该菌株在 4 ℃下保存于液体富集培养基中, 定期活化。除另有说明外, 以下

1.2 菌株鉴定

1.2.1 16SrRNA 基因分析

将 YN12 菌株培养在液体培养基中, 当菌体生长达到稳定期时, 用无菌定性滤纸过滤 2 次, 除去硫粉, 取 100 mL 菌液, 离心收集菌细胞, 先后用 pH 1.8 值为左右的稀硫酸溶液和 pH 值为 8.0 的 TE 缓冲液分别洗涤 2 次, 然后悬浮于 200 μL TE 缓冲液中。使用 EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (Bio Basic Inc.)试剂盒, 按说明提取基因组 DNA。用 63f(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3')/1387r (5'-GGG-CGGWGTGTACAAGGC-3')引物对, 扩增 YN12 菌株的 16S rDNA 序列。PCR 体系 25 μL, 包含: 2.5 μL 10×PCR 缓冲液、2.5 μL (25 mmol) MgCl₂、1 μL (10 mmol) dNTP mix (Fermentas)、1 μL 63f 引物和相同体积的 1387r 引物、1 μL (5 units) Taq 酶 (Fermentas)、1 μL 模板 DNA 以及 15 μL 灭菌双蒸水。对照体系除模板 DNA 被相同体积的灭菌双蒸水代替外, 其它与前述体系完全相同。PCR 程序如下: 94 ℃初始变性 5 min, 33 个循环, 每个循环包括 94 ℃变性 45 s, 55 ℃退火 45 s, 72 ℃下延伸 90 s, 循环过后, 最后在 72 ℃下延伸 10 min。PCR 产物使用 E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, Inc.)纯化试剂盒纯化, 纯化后的 PCR 产物用 pBS-T PCR Products Clone Kit (Tiangen Biotech Co., Ltd., Beijing)克隆试剂盒克隆转化。具体方法参照夏金兰等^[11]的研究成果。将阳性克隆菌液送北京三博远志生物技术有限责任公司, 进行 16S rDNA 测序。

使用 Clustal X (1.8) 和 MEGA3 软件构建 16S rDNA 系统发育树, 以表明 YNTC-1 菌株与其相近菌株的亲缘关系。

1.2.2 菌株形态特征

将菌体处于稳定期的 YN12 菌液用无菌定性滤纸过滤, 收集菌细胞, 再用 pH 值为 2.5 左右的稀硫酸洗涤 2 次, 取少量细胞制片, 做革兰氏染色, 在光学显微镜下观察, 剩余细胞送湖南师范大学生命科学学院电镜室进行扫描电镜分析。

1.2.3 菌株生理生化特性

将 YN12 菌株接种于液体培养基中, 分别置于 30、35、40、45、50、55 和 60 ℃的温度下培养, 起始 pH 值为 2.5, 培养 100 h 后, 采用直接计数法, 结合光密度, 评价其生长状况。大致温度范围确定后, 再缩小温度间隔, 继续以同样的方式进行实验, 直至精确到 ±1 ℃。

以上述同样的方式接种,用稀硫酸分别调整培养基起始 pH 值为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5,于 YN12 菌株的最适温度下培养 100 h 后,用上述同样的方法观察其生长状况。

将 YN12 菌液离心,收集菌细胞,用 pH 值为 2.0 左右的稀硫酸洗涤 2 次,以相同接种量接种在分别以 S^0 (5 g/L)、 $Na_2S_2O_3$ (10 g/L, 过滤除菌)、 $K_2O_6S_4$ (1.5 g/L, 过滤除菌)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5 g/L, 过滤除菌)、蛋白胨(2 g/L)、YE(0.2 g/L)、葡萄糖(1 g/L)、 S^0 (5 g/L)+蛋白胨(1 g/L)、 S^0 (5 g/L)+YE(0.2 g/L)和 S^0 (5 g/L)+葡萄糖(1 g/L)为能源物质的液体培养基中,在 YN12 菌株的最适起始 pH 值、最适温度和转速 180 r/min 下,振荡培养 100 h,用直接计数法,结合光密度,检测菌株的生长,考察其能源物质利用情况。

2 菌株的镉抗性

2.1 Cd^{2+} 最高初始耐受浓度

实验前先将 YN12 菌株接种在前述 S^0 培养基中,于最佳生长条件(表 2)下活化,待 pH 值降到 1.0 时,从摇床中取出,室温下静置 24 h 后,在一系列装有 47 L 相同培养基的三角瓶中分别接种 3 L 活化的菌液,这些三角瓶中含不同浓度的分析纯 $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ 。实验在相同 pH 值(2.5)、相同振摇速度(180 r/min)以及菌株的最适温度下进行。共设置 10 个浓度,构成一组,其中包括 0 g $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ /L 的对照。分别取各实验瓶菌液在 UV 2300 分光光度计(Techcomp)上,于波长 440 nm 处,测定起始光密度(Optical Density, OD)值,测得各实验瓶的起始 OD 值为 0.020~0.025;另取 3 瓶菌液做活细胞计数,测得各组的平均起始活细胞数为 2.1×10^6 /mL。每组实验重复一次。实验过程中定期测定各组对照菌液的 pH 值,当 pH 值降到 1.0 时,实验停止,立即测定该组其它实验瓶的 pH 值,再在实验温度下静置 3 h 后取各瓶菌液上清液,加入适量的 CS_2 ,溶解可能悬浮于菌液中的元素硫,立即测定最终 OD 值。另从各实验瓶中取少量菌液,经适当稀释后,采用血球计数板直接计数法,在 Olympus CX31 光学显微镜下测定最终活细胞数。当最终 OD 值比起始 OD 值平均高 0.005、最终活细胞数平均达到 2.5×10^6 /mL 时,实验瓶中的 Cd^{2+} 浓度就是该菌株对 Cd^{2+} 的最高初始耐受浓度(Original maximum tolerated concentration, OMTC)。

2.2 Cd^{2+} 抗性驯化

未经 Cd^{2+} 驯化的 YN12 菌株已对 Cd^{2+} 具有较高的初始抗性,为研究其抗 Cd^{2+} 能力是否还可以通过 Cd^{2+} 驯化得到进一步的提高,我们从菌株的最高初始 Cd^{2+} 耐受浓度(4.8 g/L)起步,对 YN12 进行逐步提升 Cd^{2+} 浓度的抗性驯化。驯化过程中定期测定菌液 OD 值、活菌数及 pH,观察逐步提升的 Cd^{2+} 浓度对该菌株生长和氧化活性的影响。 $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ 浓度的具体提升步骤为: 32 g/L→64 g/L→96 g/L→120 g/L→144 g/L→173 g/L→210 g/L。每级浓度均设不加 $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ 的对照,各处理分别重复 3 次,所用培养基与最高初始耐受浓度实验相同。每次接种前先收集前一级 Cd^{2+} 浓度下培养的菌细胞,并用无菌水洗涤 2 次,然后再接入实验瓶中;对照瓶接种,用前次对照培养基培养的菌细胞,处理方法与实验瓶接种物完全相同,对照瓶和实验瓶的接种量也完全相同。OD 值、活菌数和 pH 测定方法与最高初始耐受浓度实验相同。以前后两次,相差 24 h,OD 值和活菌数不发生变化作为实验终止的依据,此时的 OD 值和活菌数代表该 Cd^{2+} 浓度下的最终菌浓度。

实验分两阶段进行。第一阶段是按上述步骤逐步提升 Cd^{2+} 浓度的连续驯化阶段,目的是确定各级 Cd^{2+} 浓度下 YN12 菌液能达到的最大菌浓度,以及达到该菌浓度所需要的时间;第二阶段是已驯化菌株生长特性研究阶段,该阶段是将经过最终 Cd^{2+} 浓度驯化的第一代 YN12 菌株,继续在此 Cd^{2+} 浓度下转接 2 次,得到驯化第二代和第三代菌株,观察 YN12 菌株的生长速度、最终菌浓度和 pH 是否会随着转接代数的增加而发生变化。

3 结果与讨论

3.1 菌株的分离与鉴定

对采集的酸性热泉水样进行了 3 次富集后,再对第 3 次富集物进行连续 3 次琼脂平板分离,得到纯培养的 YN12 菌株。

YN12 菌株革兰氏染色反应为阴性,光学显微镜和扫描电镜显示该菌为典型的短杆状,大小为 $0.5 \sim 0.6 \mu m \times 1.3 \sim 1.4 \mu m$,与同处于稳定期的同种其它 20 株菌株比较,YN12 细胞较短(其它菌株大小约 $0.4 \sim 0.6 \mu m \times 1.4 \sim 1.8 \mu m$),详见图 1 和表 2。

表 2 列出了 YN12 菌株的主要形态特征与生理生化特性。该菌株的生长温度为 $28 \sim 57^\circ C$ (最适温度为 $45^\circ C$),生长 pH 值为 $0.5 \sim 5.5$ (最适 pH 值为 2.5)。能利用 S^0 、 $S_2O_3^{2-}$ 和 $S_4O_6^{2-}$ 进行化能自养生长,不能进

表 2 YN12 菌株的主要特征

Table 2 Main properties of strain YN12

Cell morphology	Gram strain	Growth temperature (Optimal temperature)	Growth pH (Optimal pH)	Chemo-autotrophic growth	Chemo-organotrophic growth	Chemo-mixotrophic growth	Energy source	Optimal YE content/(mg·L ⁻¹)
Rod	—	28–57 °C (45 °C)	0.5–5.5 (2.5)	+	—	++	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	300

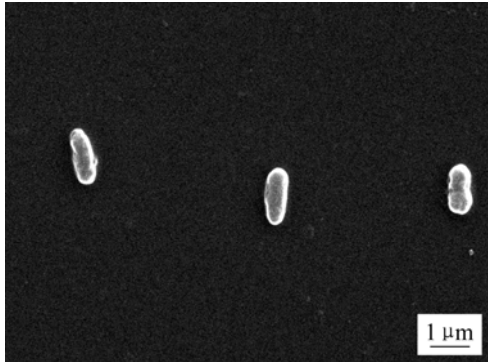


图 1 YN12 菌株扫描电镜照片
Fig.1 SEM image of strain YN22 (×10 000)

行专性异养生长;在以 S⁰ 为能源物质的情况下可以进行混合营养生长,在这种情况下,蛋白胨、YE 和葡萄糖可以促进菌株的生长,最佳 YE 浓度 300 mg/L。图 2 所示为不同能源物质下 YN12 菌株的生长情况,该菌株不能氧化 Fe²⁺, S⁰ 为能源时生长最好,酵母提取物可以显著促进其生长。

采用 NCBI 中的 BLAST(blastn)程序对 YN12 菌株的 16S rDNA 序列片断与 GenBank 中收录的 16S rDNA 序列进行同源性比较,发现 YN12 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已有的喜温嗜酸硫杆菌菌株

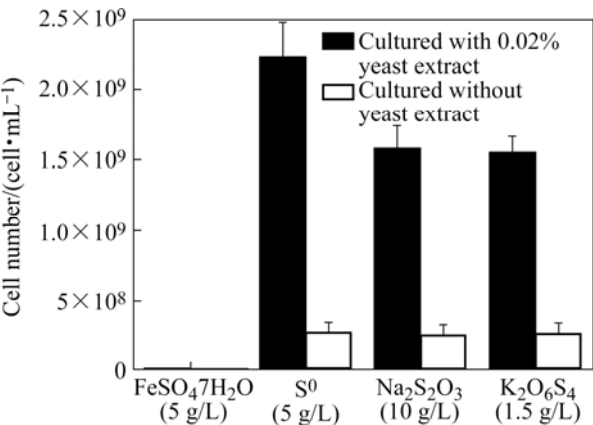


图 2 不同能源物质对 YN12 菌株生长的影响
Fig.2 Effect of energy source on growth of YN12

(*Acidithiobacill caldus*) 16SrDNA 序列的相似性都在 99%以上。图 3 所示为使用 3.1 版本 MEGA 软件^[12]构建的基于 16S rDNA 序列的系统发育树,很明显 YN12 菌株与喜温嗜酸硫杆菌标准菌株 DSM 8584 及其它同种菌株聚在同一组,氧化亚铁嗜酸硫杆菌(*A. ferrooxidans*)菌株和氧化硫嗜酸硫杆菌(*A. thiooxidans*)菌株则分别聚在另外两组。

YN12 菌株的主要形态特征和生理生化特性,以及 16S rDNA 序列分析结果均与已报道的喜温嗜酸硫杆菌菌株相同^[1, 13–15]。研究结果证明 YN12 菌株归属于喜温嗜酸硫杆菌。

3.2 菌株的镉抗性

3.2.1 初始 Cd²⁺耐受浓度

YN12 菌株对 3CdSO₄·8H₂O 的最高初始耐受浓度为 32 g/L,其实际 Cd²⁺浓度达到 4.8 g/L,是其它菌株的 4~32 倍(其它菌株的数据未列出),表现出较强的抗 Cd²⁺性能。从图 4 可以看出 0.5~2.0 g/L 的 3CdSO₄·8H₂O 浓度对 YN12 菌株生长没有明显影响,而当 3CdSO₄·8H₂O 浓度增加到 4 g/L 时,YN12 菌液的最终光密度值比同期的对照菌液提高了 25.1%,这种现象值得深入研究。在 3CdSO₄·8H₂O 浓度增加到 8.0 g/L 时,开始对 YN12 生长产生抑制作用,随着 3CdSO₄·8H₂O 浓度的增加,对 YN12 生长的抑制作用进一步加强,至 16 g/L 时,OD 值比对照下降了 22.2%。在此基础上将 3CdSO₄·8H₂O 浓度再提高 100%,达到 32.0 g/L 时,菌细胞已不能正常增殖,此时的 OD 值只比起始 OD 值高 0.005,活菌数也只有 2.5×10⁶/mL,仅略高于起始值(2.1×10⁶/mL),这表明该浓度已是 YN12 对 3CdSO₄·8H₂O 的最高初始耐受浓度。

3.2.2 Cd²⁺抗性驯化

图 5 所示为不同 Cd²⁺浓度下,YN12 菌株培养液能达到的最大 OD 值及其所需时间。随着 Cd²⁺浓度的逐级提升,OD 值渐次下降,从对照样品(0 g/L 3CdSO₄·8H₂O)的 0.536 降到最终 Cd²⁺浓度(210 g/L 3CdSO₄·8H₂O)下的 0.313,以 64 g/L 到 96 g/L 3CdSO₄·

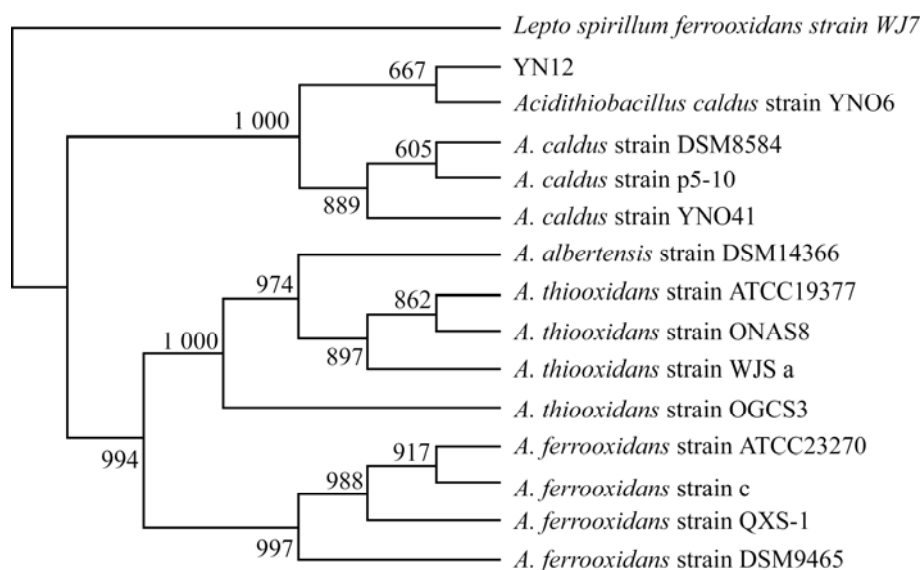
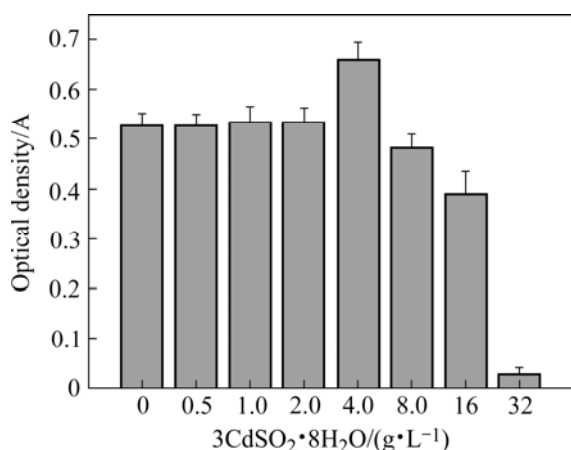
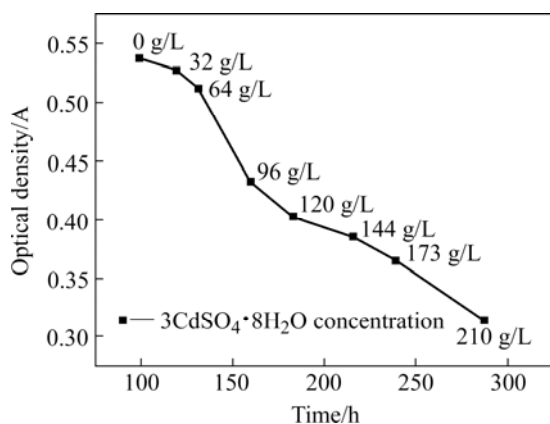


图3 基于 16SrRNA 基因序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain YN12 and related species

图4 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 对 YN12 菌株生长的影响Fig.4 Effect of $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ on growth of strain YN12图5 不同 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 浓度对 YN12 菌株生长的影响Fig.5 Effect of various $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ concentrations on growth of strain YN12

$8\text{H}_2\text{O}$ 之间的 OD 值下降幅度最大; 同时, 随着 Cd^{2+} 浓度提高, 达到相应 Cd^{2+} 浓度下最大 OD 值的所需时间也逐渐增加, $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 的浓度为 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 达到 0.536 的最大 OD 值只需 100 h, 而当 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 为 210 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的最终浓度时, 需要 288 h 才能达到最大 OD 值 0.313。

经过最终浓度 Cd^{2+} (210 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) 驯化的 YN12 菌株再在相同 Cd^{2+} 浓度下转代培养, 生长速度呈逐步提高的趋势(图 6)。不但最大 OD 值由驯化一代 (210 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ -I) 的 0.313 提高到驯化二代 (210 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ -II) 的 0.4, 并进而提高到驯化三代 (210 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ -III) 的 0.46, 而且达到最高菌浓度的时间也由 288 h (驯化一代) 缩短到 240 h (驯化二代) 和 192 h (驯化三代)。从 pH 值的变化情况来看, 随着驯化代数的增加, 越来越接近无 Cd^{2+} 对照样品(图 7), 说明菌株对硫的氧化能力在逐步恢复。YN12 的最适生长 pH 值为 2.5, 在 Ac base-S^0 培养基中生长时, 随着 S^0 的氧化, SO_4^{2-} 不断累积, pH 值快速下降, 过低的 pH 值会抑制细胞的正常增殖和生长, 并导致细胞自溶。结合图 6 和图 7, 可以清楚地看到, 所有菌液的最大菌浓度均出现在 pH 值为 1.0 附近, 随着 pH 值的逐步下降, 菌浓度不断降低。在实验期内, 因为对照菌液的 pH 值下降幅度最大, 下降速度最快, 所以菌浓度下降也最迅速; 相反, 驯化一代菌液的 pH 值下降最为缓和, 因而, 至实验结束时菌浓度仍未出现明显的降低。

YN12 菌株对 Cd^{2+} 的抗性十分突出, 未经驯化的

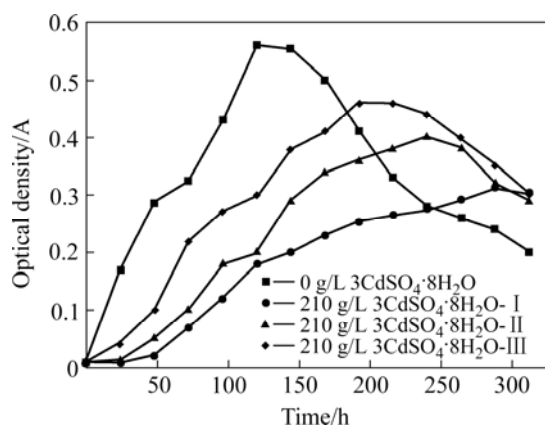


图 6 最终 Cd^{2+} 浓度下连续传代的 YN12 菌株生长曲线

Fig.6 Growth curves of strain YN12 continuously grown at final Cd^{2+} concentration

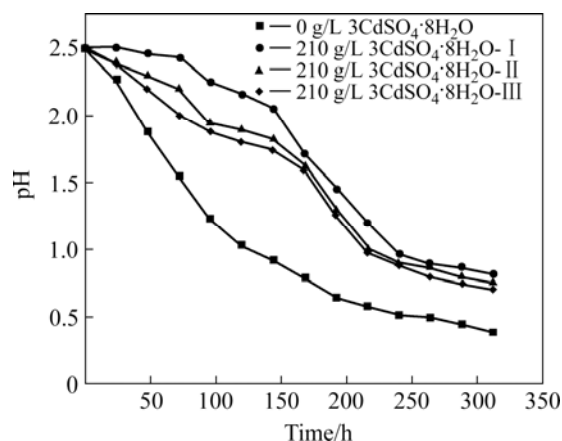


图 7 最终 Cd^{2+} 浓度下连续传代的 YN12 菌液中 pH 值的演化

Fig.7 pH evolution in cultures of strain YN12 continuously grown at final Cd^{2+} concentration

菌株对 Cd^{2+} 的最高初始耐受浓度达到 4.8 g/L (32.0 g/L $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), 不断提升 Cd^{2+} 浓度的驯化实验进一步表明, YN12 菌株的最终 Cd^{2+} 耐受浓度可以高达罕见的 31.5 g/L (相当于 210 g/L $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), 其抗 Cd^{2+} 能力远远强于其它浸矿或非浸矿微生物^[16-18], YN12 是目前所报道的抗 Cd^{2+} 能力最强的菌株。

在最终 Cd^{2+} 耐受浓度 (31.5 g/L) 下, 对驯化后的 YN12 菌株进行连续转代培养, 结果显示该菌在该 Cd^{2+} 浓度下, 经过连续三代的适应性生长, 其生长速度和硫化活性均得到了较好的恢复, 说明该菌还有进一步提高 Cd^{2+} 抗性的潜力。

有趣的是, YN12 来源于并不含镉的酸性热泉 (表 1), 但对 Cd^{2+} 却具有如此高的抗性, 其对 Cd^{2+} 的抗性机理值得深入研究。此外, 该菌在富镉硫化矿加工方

面的应用前景也值得深入探讨。本文作者将在此基础上, 就 YN12 菌株抗 Cd^{2+} 的生理生化和分子生物学机制, 以及该菌在富镉硫化矿加工方面开展进一步的工作, 以初步阐明其抗 Cd^{2+} 机理和应用潜力。

4 结论

1) 对采自云南的酸性热泉水样进行 3 次定向富集, 然后对第 3 次富集物进行琼脂平板分离, 得到适度嗜热硫化菌单菌落, 该单菌落再经两次平板分离, 最后得到纯培养的 YN12 菌株, 该菌株经形态学观察、生理生化研究和 16S rRNA 基因序列分析, 证明为喜温嗜酸硫杆菌。

2) 使用分析纯 $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 对未经 Cd^{2+} 驯化的 YN12 菌株进行的初始 Cd^{2+} 耐受浓度实验表明, 其 Cd^{2+} 最高初始耐受浓度达 4.8 g Cd^{2+} /L (相当于 32 g/L $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)。不断提升 Cd^{2+} 浓度的驯化实验进一步表明, YN12 菌株对 Cd^{2+} 的抗性可以通过驯化不断增强, 其对 Cd^{2+} 的最终耐受浓度达到罕见的 31.5 g/L (相当于 210 g/L $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)。

3) 在 31.5 g/L 的最终 Cd^{2+} 耐受浓度下, 对 YN12 菌株进行连续传代, 发现该菌在该 Cd^{2+} 浓度下, 经过连续三代的适应性生长, 其生长速度和硫化活性均能得到较好的恢复, 说明该菌还有进一步提高 Cd^{2+} 抗性的潜力。

4) YN12 菌株来源于并不含镉的酸性热泉, 但对 Cd^{2+} 却具有如此高的抗性, 其 Cd^{2+} 抗性机理值得深入研究。同时, 该菌在富镉硫化矿加工方面也具有较好的应用前景, 值得深入探讨。

REFERENCES

- [1] HALLBERG K B, LINDSTROM E B. Characterization of *Thiobacillus-Caldus* sp-nov, amoderately thermophilic acidophile[J]. Microbiology, 1994, 140: 3451-3456.
- [2] DOPSON M, LINDSTORM E B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching[J]. Appl Environ Microbiology, 1999, 65(1): 36-401.
- [3] SEMENZA M, VIERA M, CURUTCHET G, DONATI E. The role of *Acidithiobacillus caldus* in the bioleaching of metal sulfides[J]. Latin American Applied Research, 2002, 32: 303-306.
- [4] OKIBE N, JOHNSON D B. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: Significance of microbial

- interactions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87(5): 574–583.
- [5] 赵清, 刘相梅, 詹杨, 林建群, 颜望明. 一株高效抗砷喜温硫杆菌工程菌的构建[J]. *微生物学报*, 2005, 45(5): 675–679.
- ZHAO Qing, LIU Xiang-mei, ZHAN Yang, LIN Jian-qun, YAN Wang-ming. Construction of an engineered *Acidithiobacillus caldus* with high efficiency arsenic resistance[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(5): 675–679.
- [6] TUFFIN I M, HECTOR S B, DEANE S M, RAWLINGS D E. Resistance determinants of a highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial biooxidation tank[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2247–2253.
- [7] KOTZE A A, TUFFIN I M, S M DEANE, RAWLINGS D E. Cloning and characterization of the chromosomal arsenic resistance genes from *Acidithiobacillus caldus* and enhanced arsenic resistance on conjugal transfer of *ars* genes located on transposon TnAtcArs[J]. *Microbiology*, 2006, 152(12): 3551–3560.
- [8] SILVER S, SCHOTTEL J, WEISS A. Bacterial resistance to toxic metal ions—A review[J]. *Gene*, 1996, 179(1): 9–19.
- [9] RAWLINGS D E. Heavy metal mining using microbes[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 65–91.
- [10] DOPSON M, LINDSTROM E B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 36–40.
- [11] XIA Jin-lan, PENG An-an, HE Huan. A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores[J]. *Trans Nonferrous Met Soc China*, 2007, 17(1): 168–175.
- [12] KUMAR S, TAMURA, K, NEI M. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150–163.
- [13] OKIBE N, GERICKE M, HALLBERG K B, JOHNSON D B. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1936–1943.
- [14] KAMIMURA K, OKAYAMA T, MURAKAMI K, SUGIO T. Isolation and characterization of a moderately thermophilic sulphur-oxidizing bacterium[J]. *Microbios*, 1999, 99(392): 7–18.
- [15] 刘纓, 齐放军, 林建群, 田克立, 颜望明. 一株中度嗜热嗜酸硫氧化杆菌的分离和系统发育分析[J]. *微生物学报*, 2004, 44(3): 382–385.
- LIU Ying, QI Fang-jun, LIN Jian-qun, TIAN Ke-li, YAN Wang-ming. Isolation and phylogenetic analysis of a moderately thermophilic acidophilic sulfur oxidizing bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(3): 382–385.
- [16] 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 16SrDNA 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 16SrDNA sequences analysis of a bacterial resistant to copper and cadmium[J]. *Microbiology Aviso*, 2005, 32(3): 68–72.
- [17] ABOU-SHANAB R A I, VAN BERKUM P, ANGLE J S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*[J]. *Chemosphere*, 2007, 68: 360–367.
- [18] SHENG Xia-fang, XIA Juan-juan. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria[J]. *Chemosphere*, 2006, 64: 1036–1042.

(编辑 何学锋)