

文章编号: 1000-0615(2018)11-1840-08

DOI: 10.11964/jfc.20170910985

扇贝内脏团中耐镉菌株的分离及其吸附镉机理

赵艳芳^{1,2}, 翟明丽^{1,2}, 宁劲松^{1,2}, 翟毓秀^{1,2},
尚德荣^{1,2*}, 盛晓风^{1,2}, 丁海燕^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,

农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部水产品质量安全风险评估实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为探讨扇贝内脏团中微生态系统与扇贝高能力富集镉(Cd)的关系, 从自然环境中采集的栉孔扇贝内脏团中分离、纯化了2株耐Cd细菌(编号为菌株A和B), 运用16S rDNA基因序列进行分子鉴定, 通过金属吸附实验研究了耐Cd菌株对Cd的吸附能力及其对Cd的吸附特性, 并利用扫描电镜、透射电镜相结合的方法研究了Cd胁迫条件下耐镉菌株细胞形态与结构变化, 探讨了其对Cd的吸附机理。结果显示, 2株菌株(A和B)在固体培养基上能耐受Cd的浓度分别为100和80 mg/L。经16S rDNA测序鉴定菌株A与*Nitratireductor* sp.亲源关系最近, 菌株B与*Ruegeria* sp.亲源关系最近。2株菌株对Cd的吸附率远高于铜(Cu)、锰(Mn)、锌(Zn)和铅(Pb)等重金属。在50 mg/L Cd浓度的液体培养基中, 菌株A、B对Cd富集量分别为48.57和42.14 mg/g, 富集系数分别为971.4和842.8。电镜观察结果显示, 经过Cd处理后, 2菌株数量均有所减少, 细胞中出现空泡, 菌株A细胞外沉淀增多, 菌株B表面变得粗糙且出现凹陷, 表明胞外沉积作用可能是耐Cd菌株对Cd富集作用的重要途径。

关键词: 扇贝; 镉; 耐镉菌株; 吸附机理

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

镉(cadmium, Cd)是一种易在生物体内蓄积且难代谢的有害元素, 被美国毒物管理委员会(ATSDR)列为第6位危及人类健康的有毒物质。镉广泛存在于自然环境中, 也可通过食物链传递, 对消费者的身体健康造成威胁。重金属Cd污染成为土壤和海洋所面临的一大环境难题, 在长期的污染、监测和治理研究过程中发现了一些对Cd具有强吸附能力、高耐受性的微生物。有关这些耐Cd微生物的研究不仅为微生物Cd污染的修复与治理提供了可能, 也对探究生物体对Cd的耐性机理具有重要意义。目前, 对于耐Cd微生物的研究大多集中在土壤Cd污染方面^[1-2]。

贝类作为滤食性底栖动物, 无论其周围环境还是机体消化系统内都存在着多种微生物。细菌是对海洋贝类影响最大的微生物, 在贝类生长过程中发挥着有益或有害的作用。研究表明, 贝类内脏组织中存在多种细菌, 它们与机体细胞密切接触, 进行物质与能量的交换, 同贝类自身形成了一个复杂而又互相协调的微生态系统, 与贝类的生长、繁殖、免疫等功能紧密相关^[3]。目前有关贝类消化系统内细菌的研究主要集中在病害、免疫、营养的消化吸收等方面。双壳贝类(扇贝、贻贝、牡蛎等)对重金属具有较强的富集能力^[4-5], 尤其是扇贝, 在无Cd污染的正常环境中能够在体内积累高浓度的Cd,

收稿日期: 2017-09-30 修回日期: 2018-05-13

资助项目: 国家重点研发计划子课题(2017YFC1600702); 国家自然科学基金(41206101)

通信作者: 尚德荣, E-mail: shangdr@ysfri.ac.cn

但是对其他元素如锌(Zn)、铜(Cu)等具有很好的代谢调节作用^[6], 但目前的研究尚不能完全解释扇贝对Cd的特异性富集与高耐受能力^[7]。潘风山等^[8]从我国原生的Cd超积累植物东南景天根部筛选到4株对Cd具有耐性的内生菌株, 并发现接种上述菌株能显著提高植物对Cd的积累量。贝类对Cd的富集主要集中在内脏团中, 但有关内脏团中微生态系统对贝类富集Cd的作用, 以及在其体内是否存在具有高Cd富集能力的耐Cd细菌等尚未见报道。

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国北方沿海主要的养殖贝类, 具有重要的经济价值。本实验尝试从自然环境中采集的栉孔扇贝内脏团中分离、纯化具有一定Cd耐受性的细菌菌株进行鉴定并研究其对Cd的吸附特性, 同时利用电子显微镜观察Cd胁迫条件下细菌的生长情况, 探讨耐Cd菌株对Cd的吸附机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2016年4月采集山东省青岛市黄岛区某贝类养殖海区健康栉孔扇贝约20 kg, 随机选取10只, 清洗附着物, 在无菌工作室解剖, 取出内脏团, 用无菌水清洗3次后, 组织匀浆备用。

1.2 细菌的培养、筛选与分离

取内脏团匀浆液用无菌水梯度稀释, 将不同稀释倍数的匀浆液涂布于含Cd²⁺浓度为30 mg/L的2216 E平板培养基中, 于20 °C培养箱中倒置培养48 h。培养结束后, 观察菌落生长情况, 挑取形态、颜色各异的菌落, 分别接种到更高Cd²⁺浓度梯度(50, 80, 100 mg/L)的培养基平板上, 置于20 °C继续培养48 h, 挑取单菌落, 经多次划线、分离纯化, 获得2株纯菌株。

1.3 菌株的鉴定

将固体培养基上纯化培养的2株细菌分别接种到液体培养基, 20 °C 150 r/min振荡培养24 h, 采用柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒(上海生工)提取DNA, 经电泳检测后进行PCR扩增。PCR扩增采用16S引物序列为27f: AGAGTTTG-ATCMTGGCTCAG; 1492R: TACGGYTACCT-TGTTACGACTT; 反应体系(30 μL): Buffer 3 μL, dNTP 2 μL, Primer1 3 μL, Primer 2 3 μL, 酶

0.2 μL, DNA模板 1 μL, H₂O 17.8 μL。反应条件为95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35个循环, 72 °C 10 min, 12 °C延伸。PCR产物测序工作及菌株鉴定工作均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.4 耐Cd菌株的金属吸附实验

将培养的2株菌株以2%的接种量分别接种到终浓度为10 mg/L的5种不同重金属离子(Cd²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺)的液体培养基中, 实验设3个平行组, 20 °C 150 r/min振荡培养24 h后, 4 °C 11 000 r/min离心10 min, 取1 mL上清液, 采用密闭微波消解, 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)^[7-8]分别测定上清液中5种金属离子的初始浓度(C₁)和吸附后浓度(C₂), 离心后的菌体沉淀在70 °C下烘干至恒重后称重。

金属吸附率计算公式: 吸附率(%)=(C₁-C₂)/C₁×100

1.5 耐Cd菌株的Cd吸收特性测定

将固体培养基中培养的2株菌株分别接种到Cd浓度为50 mg/L的2216E液体培养基中, 20 °C 150 r/min振荡培养24 h, 实验设3个平行。培养结束后, 每组取5 mL培养液, 4 °C下, 11 000 r/min离心10 min, 获得的菌体沉淀经无菌双蒸水漂洗, 烘干, 称重后测定菌体Cd含量, 结果以菌体干重表示。

菌体内Cd的含量分析采用密闭微波消解, 电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定。

菌株Cd富集系数公式: Cd富集系数=菌体Cd含量/培养液Cd含量。

1.6 耐Cd菌株的电镜观察

将固体培养基培养的2株菌株在无菌条件下分别接种到未加Cd处理(空白对照组)和含Cd 50 mg/L的2216E液体培养基中, 每组设2个平行, 20 °C 150 r/min振荡培养48 h。培养结束后, 取1 mL菌液, 4 °C下, 5 000 r/min离心10 min, 将沉淀菌体洗涤3次, 用2.5%的戊二醛固定1 h。一组平行样经洗涤、梯度乙醇脱水、干燥以及喷金等操作后用扫描电镜观察菌体表面特征拍照; 另一组平行样经脱水、包埋、切片和染色等步骤制备超薄切片, 在透射电镜下进行观察和拍照。

2 结果

2.1 扇贝内脏团中获得的耐Cd菌株

从扇贝内脏团中经培养、筛选、分离和纯化后获得2株耐Cd菌株,标记为菌株A和菌株B。菌株A在固体培养基上能耐受的Cd浓度为100 mg/L,菌株B在固体培养基上能耐受的Cd浓度为80 mg/L。固体培养基上2种菌落均不透明,菌株A呈乳白色、圆形、边缘锯齿状、表面较粘稠;菌株B呈

深棕色、圆形、表面隆起、边缘平滑。

2.2 菌株鉴定结果

2株菌株A和B经16S rDNA测序后所得片段分别为1 357和1 341 bp,通过NCBI数据库中的BLAST软件将测序所得的序列与GenBank中已发表的16S rDNA序列进行同源性比对,结果显示,菌株A与*Nitratireductor* sp.亲源关系最近,菌株B与*Ruegeria* sp.亲源关系最近(图1)。

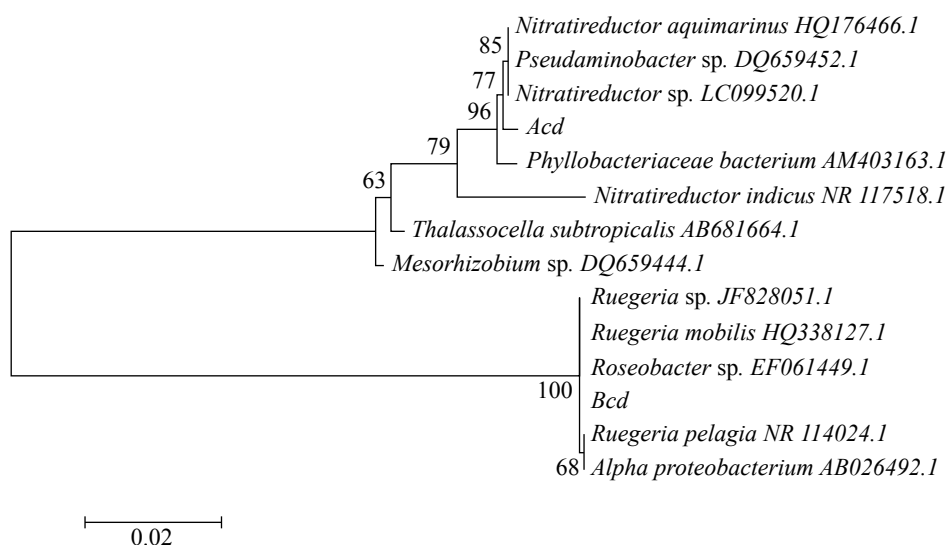


图1 基于16S rDNA序列构建的菌株A和B的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strains A and B based on 16S rDNA sequences

2.3 耐Cd菌株的金属吸附情况

2株菌株对Cd²⁺, Pb²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺和Cu²⁺等5种金属离子均有一定的吸附能力,且菌株A对5种金属离子的吸附能力要强于菌株B。2株菌株

对不同金属离子的吸附率不同,菌株A对5种金属离子的吸附率依次为Cd²⁺>Pb²⁺>Cu²⁺>Mn²⁺>Zn²⁺;菌株B对5种金属离子的吸附率依次为Cd²⁺>Pb²⁺>Mn²⁺>Zn²⁺>Cu²⁺(表1)。

表1 2株菌株金属吸附结果

Tab. 1 Accumulation of metal by two Cd-resistant strains

菌株 strain	吸附率/% adsorption rate				
	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
菌株A	17.43±2.11	7.14±1.25	3.40±0.78	2.27±0.26	10.89±1.32
菌株B	9.13±1.08	1.10±0.33	2.35±0.19	1.89±0.48	8.80±1.53

2.4 耐Cd菌株的Cd吸附特性

在50 mg/L Cd浓度的液体培养基中,菌株A和B均吸附较高的Cd含量,固定量分别为48.57和42.14 mg/g(表2)。菌株A对Cd的富集系数为971.4,菌株B对Cd的富集系数为842.8,因此,

菌株A对Cd的富集能力比菌株B高。

2.5 耐Cd菌株电镜观察

对于菌株A,对照组的菌体细长,表面光滑,聚集在一起且细胞周围有沉淀(图2-a);而经

表 2 2株菌株对Cd吸附能力测定

Tab. 2 Capacity of cadmium adsorption of the two strains

菌株 strain	培养液Cd浓度/(mg/L) Cd concentration	菌体Cd固定量/(mg/g) Cd content of strains	Cd富集系数 enrichment coefficient
A	50	48.57±2.25	971.40
B	50	42.14±3.06	842.80

过50 mg/L Cd²⁺处理后, 菌体数量变少, 形态变短变粗, 细胞胞外沉淀明显增加(图2-b)。对于菌株B, 对照组的菌体较短小, 菌体表面光滑, 呈

单个或聚集成团排列(图2-c); 而Cd处理组细菌数量明显减少、菌体变长, 菌体表面变得粗糙且出现凹陷(图2-d)。

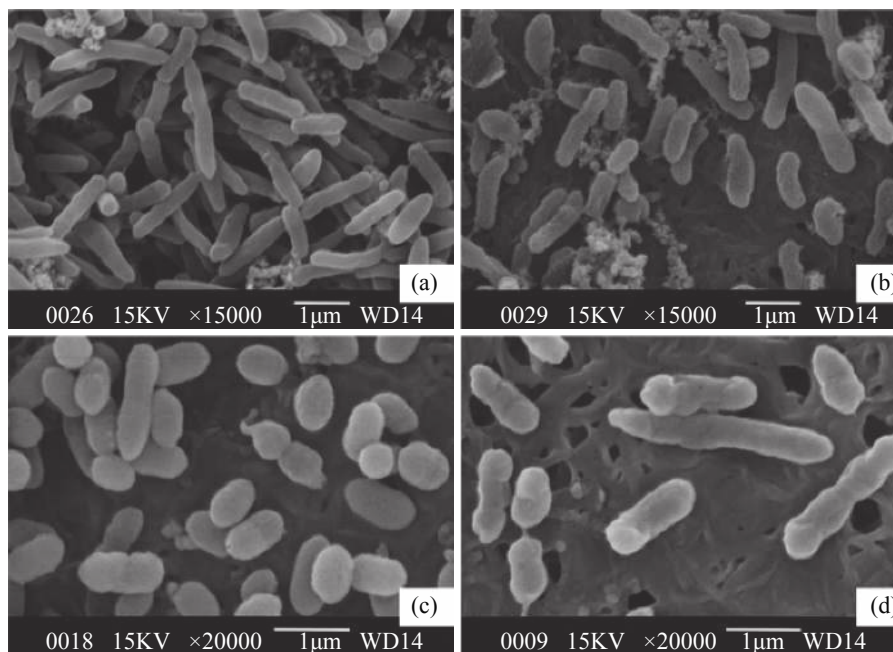


图 2 Cd处理前后菌株A、B的扫描电镜图

(a)(b)分别为菌株A未经Cd处理和50 mg/L Cd²⁺处理的电镜照片; (c)(d)分别为菌株B未经Cd处理和50 mg/L Cd²⁺处理的电镜照片

Fig. 2 Scanning electron microscopy (SEM) images of strains A and B

(a) strain A untreated with Cd²⁺; (b) strain A treated with 50 mg/L Cd²⁺; (c) strain B untreated with Cd²⁺; (d) strain B treated with 50 mg/L Cd²⁺

Cd处理对2株菌株细胞内部结构产生了严重影响(图3)。对照组的菌株A(图3-a)和菌株B(图3-c)细胞内充实, 而经过Cd处理后, 菌株A细胞中出现空泡(图3-b), 部分菌株B的细胞中也出现大小不一的空泡(图3-d)。并且从透射电镜图中可以观察到, 菌株A和菌株B经过Cd处理后, 部分菌体出现凋亡特征, 这与扫描电镜观察到的Cd处理后细菌数量变少的现象一致。

3 讨论

水产动物消化系统内的细菌主要来自于摄食的饵料和周围的养殖水环境。杨彩霞等^[9]分析

了沙子口养殖海区栉孔扇贝消化盲囊细菌群落结构的周年变化, 发现12个月份的扇贝消化盲囊内的细菌群落结构非常稳定, 共有谱带占总谱带数的81.82%。目前针对扇贝消化盲囊中的微生物研究主要集中在细菌的免疫、消化及致病性方面^[3], 而针对这些细菌对环境中的重金属的富集作用研究较少。由于扇贝等贝类属于滤食性动物, 水体中的悬浮颗粒如各种粒径大小的浮游生物、水底再悬浮的有机质、碎屑、粪便颗粒以及微生物等都可以被贝类摄食, 导致水体中以离子状态存在或吸附在有机体和有机颗粒表面的重金属在贝类滤食过程中摄入, 形成重金属在贝类体内的富集^[10]。本研究成功从扇贝内脏

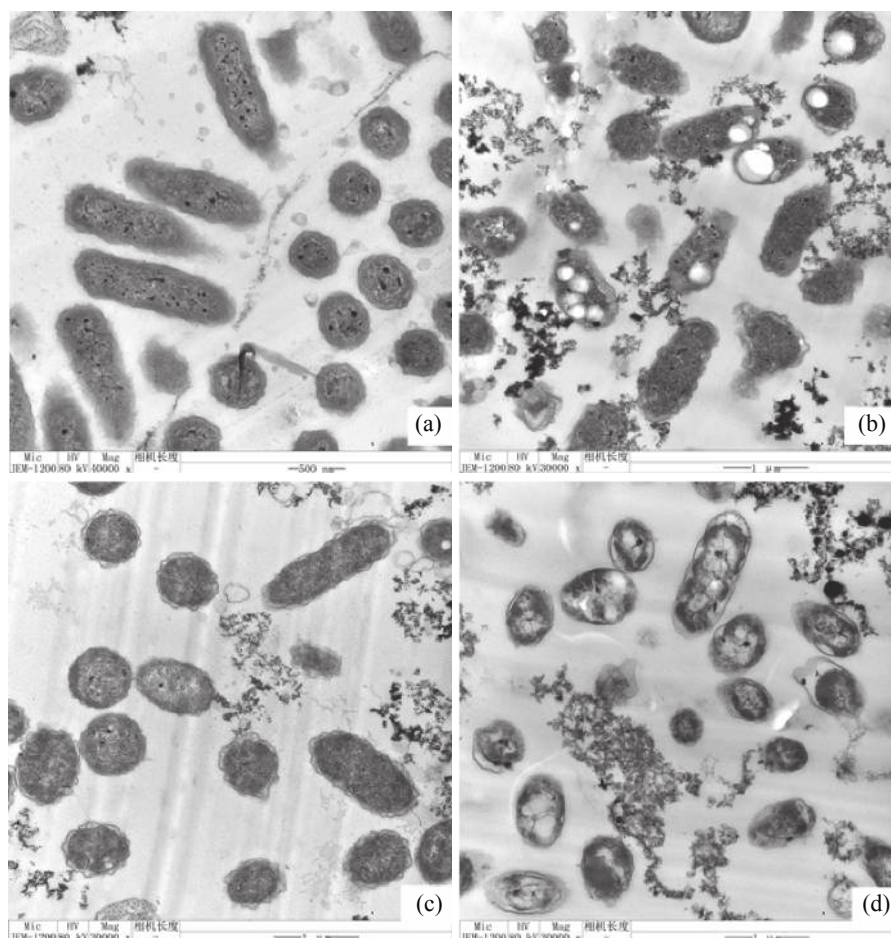


图3 Cd处理前后菌株A、B的透射电镜图

(a)(b)分别为菌株A未经Cd处理和50 mg/L Cd²⁺处理的电镜照片；(c)(d)分别为菌株B未Cd经处理和50 mg/L Cd²⁺处理的电镜照片

Fig. 3 Transmission electron microscopy (TEM) images of strains A and B

Note: (a) strain A untreated with Cd²⁺; (b) strain A treated with 50 mg/L Cd²⁺; (c) strain B untreated with Cd²⁺; (d) strain B treated with 50 mg/L Cd²⁺

团中筛选出2株具有Cd耐受性和较高富集特性的菌株(分别属于*Nitratireductor*属和*Ruegeria*属), 查阅有限的研究文献发现*Nitratireductor*属和*Ruegeria*属分别在牡蛎和扇贝内脏团中被分离鉴定, 研究表明*Ruegeria*属菌株对栉孔扇贝无致病性^[3], 且*Nitratireductor*属菌具有一定的抗菌活性^[11], 该2属菌可以稳定存活于扇贝体内。

有研究提出扇贝能富集高浓度Cd, 其原因可能是由于其对Cd的吸收率和膳食同化率极高^[12]。如欧洲扇贝(*Chlamys varia* 和*Pecten maximus*)对Cd的同化率分别>86%和>80%^[13], 扇贝*Chlamys nobilis*对Cd的膳食同化率高达100%^[12]。扇贝对摄食中Cd的吸收率和同化率远远高于其他双壳贝类, 如菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)对Cd的膳食同化率为22%~55%, 翡翠贻贝(*Perna viridis*)对Cd的膳食同化率为11%~25%^[14]。而扇贝

中Cd的排出速率较低, 远低于其他双壳贝类, 也远低于对锌的代谢速率^[15-16]。针对扇贝的这一特点, 目前尚没有明确的解释。本实验成功从扇贝内脏团中分离出2株对Cd具有较高耐受和富集能力的菌株, 由于扇贝中大部分Cd(>80%)储存在内脏团中^[12], 因此, 实验可以推测扇贝通过摄食吸收的Cd在内脏团中被耐Cd细菌吸收、富集和固定, 因此使得扇贝对Cd的吸收率和膳食同化率极高, 而代谢率很低。因此, 本实验对扇贝内脏团中耐Cd菌株的筛选、分离及其吸收特性的研究对于解释扇贝特异性富集Cd的特性提供新的思路具有重要意义。

重金属Cd与细菌的相互作用主要有胞外络合、胞外沉淀、表面吸附和细菌积累。长期生存在高浓度Cd污染中使得一些细菌具备了较强的耐受性, 它们可以通过与Cd的相互作用来降

低重金属毒性作用。细菌对Cd的耐受性与累积能力会因种类和生长条件而存在差异。梁淑君等^[17]从近海海域筛选的强Cd抗性和富集能力的一株蓝杆菌在液体培养基中的最大耐受浓度为1 000 mg/L,且在200 mg/L Cd浓度下,吸附率高达93.4%。许钦坤等^[18]从污染土壤中分离的能高度抗Cd和吸附Cd的蜡状芽孢杆菌在液体培养基中耐Cd浓度为600 mg/L,对Cd的吸附率为75.4%。沈秋悦等^[19]从重金属污染工业地区分离的一株芽孢杆菌在固体培养基中的最大耐Cd浓度为50 mg/L。周丽英等^[20]从水稻根际土壤中分离的耐Cd细菌富集系数为90.4~285.8。本研究从扇贝内脏团中分离纯化的2株细菌对Cd均具有一定的耐受性,菌株A、B在固体培养基上能耐受的Cd浓度分别为100和80 mg/L。在50 mg/L Cd浓度液体培养条件下,菌株A的Cd富集浓度为48.57 mg/g,富集系数为971.4;菌株B对Cd的富集浓度为42.14 mg/g,富集系数为842.8,2菌株对Cd的富集能力均很高。有研究表明耐Cd菌株的细胞壁在吸附Cd的过程中起重要作用,菌体细胞累积的Cd大部分吸附在细胞壁^[21]。从对其他金属离子的吸附能力来看,菌株A、B对铜、锰、锌和铅的吸附能力要弱于Cd,且菌株A对5种金属离子的吸附能力均强于菌株B。有关耐Cd细菌的红外光谱研究显示,由于菌株本身性质不同,细胞壁上参与重金属吸附的基团不尽相同,这也是导致菌株对不同金属离子的选择性吸附的直接原因^[2]。

另外,本研究还对Cd处理下2菌株在电子显微镜下形态结构的变化情况进行了观察。结果显示与对照组相比,在50 mg/L Cd浓度液体培养基中生长的2种菌株数量均有所减少,菌株B经Cd处理后菌体变长,菌体表面变得粗糙且出现凹陷,而菌株A变短粗,周围沉淀也有所增多。细菌细胞的生理生化活动可以产生一些细胞物质,这些物质能与金属离子结合在菌体细胞的周围从而形成一个新凝结相,这就是细菌的胞外沉淀作用。胞外沉淀被认为是细菌吸附Cd的一个重要机理,Cd与菌体分泌的物质形成较大的颗粒附着在菌体上并聚集在一起,进而减轻了重金属Cd对菌体本身的毒性危害。由此看来,正是由于这种胞外沉淀机制,菌株A比菌株B具有更强的Cd富集能力和耐受性。吴海江等^[22]从工厂排污口污泥中分离的CD2Y耐Cd菌株在电

镜下观察到菌体膨大,胞浆出现大小不一的空泡。本实验中Cd处理后的菌株B细胞以及部分菌株A的细胞中也出现了大小不一的空泡,相关研究表明,细菌对重金属的吸附除了直接结合在细胞表面的物理吸附过程外,还会依靠细胞代谢向细胞内转移运送^[23]。由此推测,Cd与细菌相互作用在细胞内可能发生了变性反应,这也表明一定浓度的Cd会给细菌的细胞带来损伤,甚至个别菌体细胞发生了凋亡现象,因为可以在电镜下观察到菌株A和菌株B细胞的降解残留体。

参考文献:

- [1] 李霞,张玉秀,刘金光,等. 煤矿区耐镉青霉菌的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2013, 40(8): 1347-1355.
Li X, Zhang Y X, Liu J G, et al. Isolation and characterization of cadmium-resistant *Penicillium* sp. from coal mining area[J]. Microbiology China, 2013, 40(8): 1347-1355(in Chinese).
- [2] 林晓燕,牟仁祥,曹赵云,等. 耐镉细菌菌株的分离及其吸附镉机理研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(9): 1700-1706.
Lin X Y, Mou R X, Cao Z Y, et al. Isolation and cadmium adsorption mechanisms of cadmium-resistant bacteria strains[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(9): 1700-1706(in Chinese).
- [3] 杨彩霞. 两个养殖海区及稚孔扇贝消化盲囊细菌群落多样性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
Yang C X. Seasonal changes of bacterial community composition in two culture area and digestive diverticula of scallops, *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011(in Chinese).
- [4] Miller B S. Mussels as biomonitors of point and diffuse sources of trace metals in the Clyde sea area, Scotland[J]. Water Science & Technology, 1999, 39(12): 233-240.
- [5] Roméo M, Frasila C, Gnassia-Barelli M, et al. Biomonitoring of trace metals in the Black Sea (Romania) using mussels *Mytilus galloprovincialis*[J]. Water Research, 2005, 39(4): 596-604.
- [6] Bustamante P, Miramand P. Interspecific and geographical variations of trace element concentrations in Pectinidae from European waters[J]. Chemosphere, 2004, 57(10): 1355-1362.

- [7] 赵艳芳, 宁劲松, 翟毓秀, 等. 栉孔扇贝不同组织中镉的微区分布特征及其变化规律[J]. 水产学报, 2016, 40(8): 1203-1210.
Zhao Y F, Ning J S, Zhai Y X, *et al.* Research on the subcellular fate and transformation of cadmium in different tissues of the scallop *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(8): 1203-1210(in Chinese).
- [8] 潘风山, 陈宝, 马晓晓, 等. 一株镉超积累植物东南景天特异内生细菌的筛选及鉴定[J]. 环境科学学报, 2014, 34(2): 449-456.
Pan F S, Chen B, Ma X X, *et al.* Isolation and characterization of a specific endophytic from the Cd hyperaccumulator *Sedum alfredi* Hance[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(2): 449-456(in Chinese).
- [9] 杨彩霞, 李赟, 张婧宇, 等. 栉孔扇贝消化盲囊细菌群落组成的季节变化分析[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1579-1584.
Yang C X, Li Y, Zhang J Y, *et al.* Seasonal changes of bacterial community composition in digestive diverticula of scallops *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(10): 1579-1584(in Chinese).
- [10] 许强, 杨红生, 王红, 等. 桑沟湾养殖栉孔扇贝食物来源研究——脂肪酸标志法[J]. 海洋科学, 2007, 31(9): 78-84.
Xu Q, Yang H S, Wang H, *et al.* Food sources of cultured scallop *Chlamys farreri* in Sanggou bay: Indicated by fatty acid biomarkers[J]. Marine Sciences, 2007, 31(9): 78-84(in Chinese).
- [11] 肖建青, 朱泓溢, 刘祝祥, 等. 碓洲岛潮汐带牡蛎相关可培养细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 939-950.
Xiao J Q, Zhu H Y, Liu Z X, *et al.* Biodiversity of culturable bacteria associated with *Crassostrea hongkongensis* from the tidal flat of Naozhou Island in the South China Sea[J]. Microbiology China, 2013, 40(6): 939-950(in Chinese).
- [12] Pan K, Wang W X. Allometry of cadmium and zinc concentrations and bioaccumulation in the scallop *Chlamys nobilis*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2008, 365: 115-126.
- [13] Metian M, Warnau M, Oberhänsli F, *et al.* Interspecific comparison of Cd bioaccumulation in European Pectinidae (*Chlamys varia* and *Pecten maximus*)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 353(1): 58-67.
- [14] Chong K, Wang W X. Assimilation of cadmium, chromium, and zinc by the green mussel *Perna viridis* and the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, 19(6): 1660-1667.
- [15] Wang W X. Metal bioaccumulation in bivalve mollusks: recent progress[M]//Villalba A, Reguera B, Romalde J L, *et al.* Molluscan Shellfish Safety. Spain: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO and Conselleria de Pesca e Asuntos Maritimos da Xunta de Galicia, 2003: 503-520.
- [16] Wang W X, Rainbow P S. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 148(4): 315-323.
- [17] 梁淑君, 王雅玲, 孙力军, 等. 海洋耐镉微生物筛选及其生物学特性[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(4): 488-491.
Liang S J, Wang Y L, Sun L J, *et al.* Screen and biological characteristics of marine resistance cadmium microbe[J]. Marine Environmental Science, 2012, 31(4): 488-491(in Chinese).
- [18] 许钦坤, 赵翠燕. 耐镉菌株的筛选及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 317-318.
Xu Q K, Zhao C Y. Screening and biological characteristics of cadmium resistant strains[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(2): 317-318(in Chinese).
- [19] 沈秋悦, 曹志强, 朱月芳, 等. 一株耐镉细菌的分离鉴定及其吸附条件的优化[J]. 土壤, 2016, 48(3): 615-620.
Shen Q Y, Cao Z Q, Zhu Y F, *et al.* Isolation of a cd-resistant bacterium and optimization of its bio-accumulation condition[J]. Soils, 2016, 48(3): 615-620(in Chinese).
- [20] 周丽英, 叶仁杰, 林淑婷, 等. 水稻根际耐镉细菌的筛选与鉴定[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(5): 597-603.
Zhou L Y, Ye R J, Lin S T, *et al.* Screening and identification of cadmium-tolerant bacteria from rhizosphere soils under rice[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(5): 597-603(in Chinese).
- [21] 刘爱民, 黄为一. 耐镉菌株的分离及其对Cd²⁺的吸附富集[J]. 中国环境科学, 2006, 26(1): 91-95.
Liu A M, Huang W Y. Separation of tolerant cadmium bacterium strain and its accumulation adsorption of Cd²⁺[J]. China Environmental Science, 2006, 26(1): 91-95(in Chinese).

- [22] 吴海江. 耐Cd细菌的筛选及抗性机理研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2009.
Wu H J. Screening and resistance mechanism study on a cadmium resistant strain[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2009(in Chinese).
- [23] 陈美标, 郭建华, 姚青, 等. 大宝山矿区耐Cd²⁺细菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1720-1733.
Chen M B, Guo J H, Yao Q, *et al.* Isolation and identification, and biological characteristics of cadmium-tolerant bacteria from the Dabao Mine[J]. Microbiology China, 2012, 39(12): 1720-1733(in Chinese).

Isolation and cadmium adsorption mechanisms of cadmium-resistant bacteria strains in digestive gland of scallops

ZHAO Yanfang^{1,2}, ZHAI Mingli^{1,2}, NING Jinsong^{1,2}, ZHAI Yuxiu^{1,2},
SHANG Derong^{1,2*}, SHENG Xiaofeng^{1,2}, DING Haiyan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to explore the relationship between the role of bacteria community and the high capacity for accumulation of Cd in the digestive tissues in scallops, two cadmium (Cd)-resistant bacterial strains (named A and B) were isolated from the digestive gland of scallop which were collected from the natural marine environment. Two bacterial strains were classified using 16S rDNA sequence analysis. And the ability of two bacterial strains for the accumulation of Cd and their adsorption characteristics of Cd were researched by the metal adsorption experiments. In addition, the combined technique of scanning electron microscopy (SEM) observation and transmission electron microscopy (TEM) observation was used to observe the cell morphology and inside structure of the bacterial strains under Cd exposure, and the cadmium precipitation and distribution outside and inside the cell were studied to explore the adsorption mechanism of Cd for two bacterial strains. Results showed that the two bacterial strains (A and B) could tolerate Cd²⁺ up to 100 mg/L and 80 mg/L in solid medium respectively. Based on 16S rDNA homology analysis, bacterial A sequences shared high similarities with *Nitratireductor sp.* and bacterial B was classified as *Ruegeria sp.* Their adsorption ability of 5 kinds of heavy metal ions (Cd²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺) were examined and both of them had higher adsorption of Cd than that of other four kinds of metals. In addition, bacterial strain A and B could accumulate Cd to 48.57 mg/g and 42.14 mg/g respectively in 50 mg/L liquid mediums and the accumulation factor for Cd was 971.4 and 842.8 respectively. Scanning electron microscopy (SEM) indicated that the amount of two strains both decreased and empty cavity occurred in some cells after Cd exposure. Obvious Cd precipitates appeared on A strain and more rough surface and irregular convex also appeared on B strain; therefore, extracellular precipitation might be an important way for two bacterial strains to resist and accumulate Cd.

Key words: scallop; cadmium; cadmium-resistant bacteria; adsorption mechanism

Corresponding author: SHANG Derong. E-mail: shangdr@ysfri.ac.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600702); National Natural Science Foundation of China (41206101)