

杨 威, 闫海霞, 汪家璐, 等. 一株协助寄主植物缓解镉胁迫的芽孢杆菌筛选及其耐镉机制[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 806-810.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.015

一株协助寄主植物缓解镉胁迫的芽孢杆菌筛选及其耐镉机制

杨 威¹, 闫海霞², 汪家璐¹, 纪丽莲¹, 王新风¹

(1. 淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300; 2. 淮安市农业技术推广中心, 江苏 淮安 223300)

摘要: 为研究植物内生细菌在缓解寄主植物镉污染中的作用, 通过离体条件下耐镉活性鉴定, 筛选了 5 株根围细菌和内生细菌, 其中内生细菌菌株 1JN2 在以辣椒和黄瓜作为寄主进行的盆栽试验中能够增强寄主植物对镉的耐受性, 与空白对照(不接种菌株、硫酸镉溶液培养)相比, 黄瓜和辣椒叶绿素含量分别增加 10.85%、20.14%, 根系活力分别增加 363.32%、525.51%, 组织中镉离子浓度分别降低 23.34%、40.39%, 在 5 株细菌中对镉胁迫植物综合保护效果最佳。该菌株经形态学和分子学鉴定为枯草芽孢杆菌。扫描电镜检查发现, 1JN2 在镉离子处理后 24 h 开始进行菌体自我复原, 在 48 h 出现胞外多糖固化现象。

关键词: 植物内生细菌; 镉胁迫; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: S423.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0806-05

Selection of a *Bacillus subtilis* strain alleviating Cd²⁺ stress in host plants and the mechanism

YANG Wei¹, YAN Hai-xia², WANG Jia-lu¹, JI Li-lian¹, WANG Xin-feng¹

(1. School of Life Sciences, Huaiyin Normal University/Jiangsu Key Laboratory for Eco-agricultural Biotechnology around Hongze Lake, Huaian 223300, China; 2. Huaian Agro-tech Extension and Service Center, Huaian 223300, China)

Abstract: Experiments on *in vitro* Cd tolerance were conducted on 183 bacteria strains, five of which were selected for their strong performance. Strain 1JN2 outplayed other four strains in improving host plants Cd-tolerance. Compared to blank control (bacterium free and Cd free), pot-cultured cucumber and pepper treated with strain 1JN2 under Cd stress showed greater chlorophyll contents by 10.85% and 20.14%, and stronger root vigor by 363.32% and 525.51%. The Cd concentrations in 1JN2-treated cucumber and pepper were decreased by 23.34% and 40.39%. Morphological and molecular identification revealed that 1JN2 was a strain of *Bacillus subtilis*. Scanning electron microscopy showed that strain 1JN2 started to heal itself 24 h post Cd stress and solidify extracellular polysaccharide 48 h post Cd stress.

Key words: plant endophytic bacterium; Cd stress; *Bacillus subtilis*

收稿日期: 2014-12-06

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(13)3026]; 江苏省高校自然科学基金项目(14KJB210003)

作者简介: 杨 威(1983-), 男, 河北承德人, 博士, 主要从事生物防治研究。(E-mail) yangw107@gmail.com

通讯作者: 王新风, (Tel) 0517-83526671; (E-mail) hywdwxf@sohu.com

农用土壤是受人类活动强烈影响的一类特殊土壤, 其质量与人类健康密切相关^[1]。土壤污染源主要来自工业“三废”和农药、化肥, 污染物可通过灌溉水进入土壤, 也可通过空中的颗粒物(含重金属和致癌物质等)干湿沉降造成土壤污染, 随着时间的推移, 农田表层土壤镉、铅、铜、锌等重金属含量有

增加的趋势^[2]。由于农作物的吸收作用,重金属元素从土壤迁移转化到农作物根、茎、叶及果实中去,从而连带造成农作物的重金属污染。全球每年释放到环境中的镉高达 $3.9 \times 10^4 \text{ t}$ ^[3],而在环洪泽湖地区几种重金属污染当中,镉要高于其他几种^[4]。如何修复受到镉污染的土地和水体是我们急需面对的问题。

目前,工程修复、电动修复、电热修复、土壤淋洗以及化学修复等方法虽然在一定程度上能够缓解重金属污染,但是却存在着一些弊端,如实施工程量大、投资费用高,破坏土体结构造成土壤肥力下降,并且还要对换出的污土进行堆放或处理,其中化学修复只是改变重金属的存在形态,并不能彻底根除重金属,重金属还有再度活化污染的可能。另外,一些特定植物也可以通过金属离子的吸收、挥发以及稳定对重金属污染进行修复。这种修复方式虽然效果好、易操作,但是却只能用于非耕作土壤或水体,对于农田重金属污染依然无能为力^[5]。

利用从自然环境中分离得到的有益微生物来修复农田及水体的重金属污染就可以克服这一缺点^[6]。受到重金属污染的土壤,往往富集多种耐重金属的真菌和细菌,其通过多种作用方式影响土壤重金属的毒性^[7-8]。如魏本杰等人报道,产铁载体细菌可以活化土壤中的镉^[9]。周小梅等人也发现了一株具有较强产酸能力的芽孢杆菌,该菌株除对镉有耐性之外,对铅、铜等均具有一定耐受性^[10]。除此之外,植物内生菌作为与植物关系紧密的重要微生物资源,也在修复重金属污染中发挥着作用。如曹喆等人从重金属镉(Cd)超累积植物龙葵中分离到一株能够去除镉离子的芽孢杆菌^[11]。另外,姜敏等人报道从重金属富集植物(大叶相思)与非富集植物(水禾、水稻)中分离到的重金属抗性真菌均高于根际真菌^[12],也说明了内生菌在重金属修复中的巨大潜力。寻找一种能够有效降低环境中镉离子浓度从而减少农作物吸收积累的修复方式,对于日益严重的耕地重金属污染来说意义重大。

本研究拟在离体条件下选择能够耐受并且降低环境中镉离子浓度的菌株,并进行盆栽条件下耐镉菌株的活性评价,初步探讨其降低镉离子浓度的可能机制,旨在寻找一条降低农业生产中镉污染危害的途径。

1 材料与方法

1.1 离体条件下菌株耐镉活性检测

从本实验室菌株资源库中选择了 183 株细菌,将活化后的菌株接种到含有终浓度为 15 mg/L 硫酸镉的 LB 培养液中,28 ℃,180 r/min 摇床培养 24 h,对照组不加硫酸镉溶液。分别从培养后的培养液中吸取 2.0 ml 溶液在 600 nm 下检测其吸光值,判断菌株生长情况。另取 1.0 ml 培养液离心后取上清液,在上清液中分别加入 9.0 ml 去离子水,转移至 50.0 ml 小烧杯中,加入浓硝酸 1.0 ml,80 ℃ 水浴,蒸发至 1.0 ml 左右再加入浓硝酸 1.0 ml、高氯酸 0.5 ml。混匀后继续水浴蒸发至 1.0 ml,冷却,加入 4.0 ml 去离子水,混匀后利用原子发射光谱法(ICP)测定其中镉离子浓度。

1.2 盆栽条件下耐镉菌株的活性评价

试验共进行 2 批次,所用寄主分别为黄瓜品种新津优 1 号和辣椒品种大禹牛角王,穴盘育苗,待苗长出 3~4 片真叶后移栽到温室盆钵中,每盆 1 株。盆钵高 10 cm,口径 12 cm,每盆装基质 400~500 g。温室条件设定为 30 ℃,光照时间 16 h,黑暗时间 8 h。

根据菌株离体条件下耐镉活性筛选结果,选择培养液中镉离子浓度下降率最高的 5 株菌株进行 2 批次温室试验。其中根围细菌 4 株,编号分别为 H2-1L、H2-22K、H3-11L 和 L5-2L;内生菌 1 株,编号为 1JN2。每批温室试验分别设 5 个处理组,处理方式如下:移栽时用 1×10^9 CFU/ml 的菌悬液灌根处理,每盆 20 ml,移栽 7 d 后用 30 mg/L 硫酸镉灌根处理,每盆 20 ml。另设 2 个对照,对照 1 不接种菌株,移栽 7 d 后用 30 mg/L 硫酸镉灌根处理,每盆 20 ml;对照 2 不接种菌株,正常培养。每组重复 3 次,每个重复 24 株植株。

1.3 植株生理指标检测

植株移栽后第 21 d 分别检测各处理组根长、鲜质量、叶绿素含量、根系活力以及叶片相对电势。检测方法参照《植物生理学实验指导》^[13]。

每个处理组随机选取植株 3 株,准确称取 1 g 茎,600 ℃ 灰化 4 h(干法灰化),1% 盐酸洗脱灰分,去离子水定容至 5 ml,利用原子发射光谱法测定镉离子浓度。

1.4 耐镉菌株的鉴定

对菌株进行革兰氏染色反应,并观察其形态。采用树脂型基因组试剂盒(赛百盛有限公司生产)提取菌株基因组 DNA,以提取的基因组 DNA 为模板,利用 16S 通用引物扩增其 16S rDNA 片段并送南京金斯瑞有限公司测序,结果提交 NCBI 数据库进行比对。结合比对结果和菌株形态对其进行鉴定。

1.5 耐镉菌株镉离子耐受机制

选择温室试验中协助寄主植物缓解镉胁迫效果最好的菌株进行耐镉机制研究。将浓度为 1×10^7 CFU/ml 的该菌株菌悬液按照 1% 接种量接入含有 3 g/L 硫酸镉的 LB 培养液中,28 °C、180 r/min 摇床培养,分别在 12 h、24 h、36 h 和 48 h 吸取培养液,离心收集菌体,超纯水洗脱后用 2.5% 戊二醛固定,通过扫描电镜观察菌株的群体以及单细胞形态。以不加镉离子的处理组作为对照。

2 结果与分析

2.1 离体条件下菌株耐镉活性检测

183 株细菌中 58 株在含有 15 mg/L Cd^{2+} 的 LB

培养液中培养 24 h 后 OD_{600} 大于 0.5,说明在外源镉离子存在的情况下菌株依然能够正常生长。其中 22 株菌株培养后溶液中 Cd^{2+} 浓度下降大于 10%,下降最高达 51%。选择其中 5 株菌株(H2-1L、H2-22K、H3-11L、1JN2、L5-2L)进行盆栽试验评价其协助寄主植物耐受镉胁迫的能力。

2.2 耐镉菌株的温室评价

与对照 1 相比(表 1),耐镉菌株处理组能够在镉胁迫下增加黄瓜植株的根长、鲜质量、叶绿素含量以及根系活力,其中菌株 1JN2 和 L5-2L 增加效果比较明显,特别是植株鲜质量、叶绿素含量以及根系活力 3 项指标。菌株 1JN2 处理组显著降低黄瓜植株叶片的相对电导率。

为了更直接反应耐镉菌株协助寄主植物缓解镉胁迫能力,我们检测了镉胁迫环境下寄主植物对于土壤中镉离子的吸收和积累情况。如表 1 所示,在缺少耐镉菌株保护情况下(对照 1),1 g 黄瓜茎组织中镉离子浓度达到 0.1 mg/L,5 株耐镉菌株接种均能在一定程度上减少植物对于基质中镉离子的吸收,降低幅度从 13.53% 到 23.43%。

表 1 耐镉菌株处理对黄瓜生长指标及体内镉积累的影响

Table 1 Growth and Cd accumulation in cucumber inoculated with Cd-tolerant bacterial strains

处理	根长 (cm)	鲜质量 (g)	叶绿素含量 (mg/L)	根系活力 [mg/(g·h)]	相对电导率 (S/m)	植株中 Cd^{2+} 浓度 (mg/L)
菌株 H2-1L	14.17±1.26a	4.54±0.44a	20.41±1.36d	2.64±0.48b	1.60±0.02a	0.082±0.002bc
菌株 H2-22K	13.83±4.37a	4.83±1.38a	22.49±0.23b	0.67±0.14d	1.36±0.03abc	0.085±0.004b
菌株 H3-11L	16.17±1.04a	4.58±1.17a	22.00±0.13bc	1.41±0.01c	1.30±0.09abc	0.084±0.005bc
菌株 1JN2	16.50±0.87a	5.26±0.32a	23.75±0.27a	3.54±0.14a	1.11±0.11c	0.077±0.003c
菌株 L5-2L	14.00±1.73a	6.24±1.02a	23.60±0.14a	3.52±0.12a	1.23±0.45bc	0.087±0.002b
CK1	13.67±0.76a	4.42±1.05a	21.42±0.35c	0.77±0.03d	1.47±0.08ab	0.101±0.006a
CK2	15.33±0.76a	5.31±1.54a	24.42±0.14a	3.51±0.56a	1.13±0.04bc	0.004±0.004d

CK1:不接种菌株,硫酸镉溶液培养;CK2:不接种菌株,正常培养。同列数字后不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平($P < 0.05$)。

与对照 1 相比,菌株 1JN2、L5-2L 和 H2-22K 处理增加了辣椒植株的根长、鲜质量、叶绿素含量以及根系活力,特别是菌株 1JN2 处理,辣椒植株的根长、鲜质量、叶绿素含量与正常培养的对照 2 相当,而对根系活力的增加效果则显著高于对照 2。菌株 H3-11L、1JN2 和 L5-2L 处理与对照 1 相比均能够明显降低寄主植物叶片的相对电导率,表现出在镉胁迫条件下对于寄主植物的保护作用。相比于黄瓜而言,5 株耐镉菌株降低辣椒植株

吸收镉离子的效果更明显,降低幅度从 29.64% 到 40.39% (表 2)。

综合 2 批次温室盆栽试验结果,菌株 1JN2 在镉胁迫条件下对于寄主植物的综合保护效应更佳。

2.3 耐镉菌株鉴定

菌株 1JN2 呈革兰氏染色反应阳性,通过形态学与 16S rDNA 序列比对鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

表 2 温室条件下耐镉菌株处理对于辣椒生长指标及体内镉积累的影响

Table 2 Growth and Cd accumulation in pepper inoculated with Cd-tolerant bacterial strains

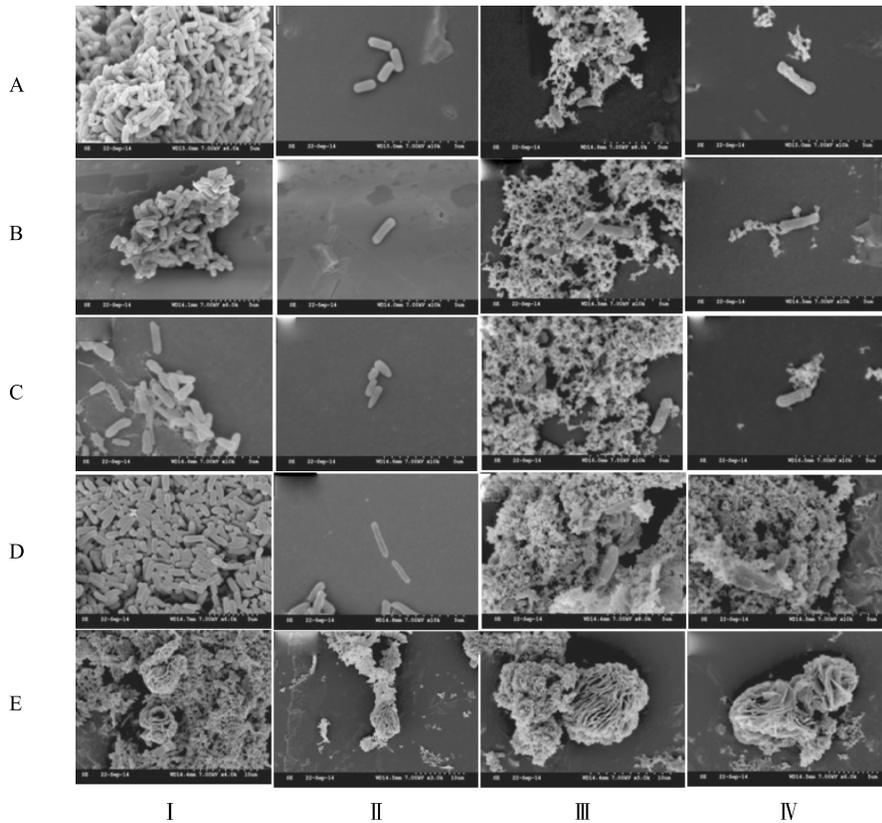
处理	根长 (cm)	鲜质量 (g)	叶绿素含量 (mg/L)	根系活力 [mg/(g·h)]	相对电导率 (S/m)	Cd ²⁺ 浓度 (mg/L)
菌株 H2-1L	13.57±4.75a	2.42±0.67a	21.23±0.64a	0.86±0.04b	12.88±0.77a	0.072±0.004b
菌株 H2-22K	15.43±4.85a	2.37±0.29a	19.15±0.29bc	0.55±0.07d	12.45±0.6a	0.070±0.004b
菌株 H3-11L	12.63±2.10a	2.76±0.30a	18.84±0.35cd	0.51±0.02d	9.56±0.77b	0.071±0.006b
菌株 1JN2	17.57±3.00a	2.98±0.08a	19.79±0.74b	2.39±0.09a	11.38±0.56ab	0.061±0.002c
菌株 L5-2L	14.03±2.40a	2.54±0.92a	18.29±0.27d	0.60±0.03d	11.58±0.97ab	0.069±0.005b
CK1	13.70±2.39a	2.26±0.99a	16.47±0.22e	0.38±0.03e	13.07±2.94a	0.102±0.004a
CK2	18.13±1.17a	3.26±0.76a	20.81±0.19a	0.75±0.05c	11.95±1.51ab	0.003±0.002d

CK1:不接种菌株,硫酸镉溶液培养;CK2:不接种菌株,正常培养。同列数字后不同小写字母表示差异达0.05 显著水平($P<0.05$)。

2.4 耐镉菌株的扫描电镜观察

根据扫描电镜结果,与对照组相比,在培养液中加入镉离子之后,菌株 1JN2 的胞外多糖黏度增强,且洗脱后胞外多糖残留较多。镉离子处理组在 12 h 时菌体受到明显损伤,出现外壁内陷。但是这种现象从 24 h 开始有一定程度缓解,菌体开始自我复

原,至 48 h,菌体已经基本恢复到原有状态(图 1A ~ 1D)。说明此时菌株已适应镉离子的存在,并且能够进行正常生长代谢。第 48 h 时,处理组的胞外多糖开始发生形态上的变化,由最初的絮状开始固化,形成片层状固态(图 1E)。



A:处理后 12 h;B:处理后 24 h;C:处理后 36 h;D:处理后 48 h;E:处理 48 h 胞外多糖。I:正常群体;II:正常单细胞;III:镉胁迫群体;IV:镉胁迫单细胞。

图 1 菌株 1JN2 在镉离子处理后群体和单细胞的形态

Fig.1 The morphology of population and single cell of Cd-treated strain 1JN2

3 讨论

植物内生菌^[14]和号称植物“第二基因组”^[15]的植物根围细菌在寄主植物生长过程中发挥重要作用。这些微生物不仅能够协助寄主植物阻止病原菌的入侵^[16],为植物生长提供必要的营养^[17],还能协助寄主抗逆,包括抗旱、耐盐碱以及耐重金属污染等^[18-21]。

与以往报道中发现内生菌在重金属抗性方面的优势^[12,22]类似,本研究筛选出一株植物内生菌1JN2,在离体条件和温室盆栽试验中均表现出显著耐镉活性,并降低植物体内镉离子的吸收累积,且活性显著高于植物根围细菌。该菌株能够逐渐适应镉胁迫压力,在处理24 h后开始进行菌体的自我复原。从胞外多糖的形态来看,推测该菌株可能利用胞外多糖固定环境中的镉离子,从而减少寄主植物对于镉离子的吸收。在前期的研究中我们还发现菌株1JN2同时具有产IAA以及多种胞外酶的活性,能够协助寄主植物防控土传病害的侵袭^[23]。在农业生产环境不断恶化的大背景下,该菌株表现出一定的开发潜力。在今后的研究中,我们将重点研究其耐镉机制、发酵条件优化以及剂型开发等,为农业安全生产提供保障。

参考文献:

- [1] 李秀兰,胡雪峰. 上海郊区蔬菜重金属污染现状及累积规律研究[J]. 化学工程师, 2005(5): 36-38.
- [2] 张民,龚子同. 我国菜园土壤中某些重金属元素的含量与分布[J]. 土壤学报, 1996, 33(1): 85-93.
- [3] NRIAGU J O, PACYNA J M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals[J]. Nature, 1988, 333:134-139.
- [4] 余辉,张文斌,余建平. 洪泽湖表层沉积物重金属分布特征及其风险评价[J]. 环境科学, 2011, 32(2):437-444.
- [5] ZHUANG X L, CHEN J, SHIM H, et al. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation[J]. Environment International, 2007, 33: 406-413.
- [6] RATHNAYAKE I V N, MEGHARAJ M, BOLAN N, et al. Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria[J]. World Academy of Science, Engineering and Technology, 2009, 53:1185-1190.
- [7] GADD G M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation[J]. Microbiology, 2010, 156: 609-643.
- [8] ZOUBOULIS A I, LOUKIDOU M X, MATIS K A. Biosorption of toxic metalsmith from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils[J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 909-916.
- [9] 魏本杰,曾晓希,刘志成,等. 产铁载体菌的筛选鉴定及活化镉的性能探究[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(11): 26-31.
- [10] 周小梅,赵运林,胥正钢,等. 萎蒿(*Artemisia selengensis*)根际耐镉产酸细菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(11):5010-5014.
- [11] 曹喆,罗胜联,曾光明,等. 一株龙葵内生细菌SDE06去除Cd²⁺的实验[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 328-333.
- [12] 姜敏,曹理想,张仁铎. 重金属抗性内生真菌与其宿主植物重金属抗性关系初探[J]. 农业环境科学学报, 2008, 26(6): 2038-2042.
- [13] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2002:59-62,88-91,257-258.
- [14] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001(9):881-892.
- [15] BERENDSEN R L, PIETERSE C M J, BAKKER P H M. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(8):478-486.
- [16] 宋小双,邓勋,遇文婧,等. 一株生防内生真菌D202对立枯丝核菌的抑制作用及生理学特性研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(27):9274-9275.
- [17] 陈晓斌,张炳欣. 植物根围促生细菌(PGPR)作用机制的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(1):38-44.
- [18] 王娜,杨镇,马晓颖,等. 植物内生菌次生代谢产物对干旱胁迫下辣椒幼苗生理机制的影响[J]. 北方园艺, 2014(22): 29-32.
- [19] ZAHIR Z A, MUNIR A, ASGHAR H N, et al. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(5):958-963.
- [20] EGAMBERDIEVA D, LUGTENBERG B. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to alleviate salinity stress in plants[M]//Use of microbes for the alleviation of soil stresses. New York:Springer, 2014: 73-96.
- [21] TEKAYA S B, TIPAYNO S, KIM K, et al. Rhizobacteria: restoration of heavy metal-contaminated soils[M]// AHMAD P, WANI M R. Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment. New York: Springer, 2014: 297-323.
- [22] 王银科,宋剑飞. 内生菌在修复重金属污染土壤的研究进展[J]. 北方环境, 2013(12):68-71.
- [23] YANG W, XU Q, LIU H X, et al. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger[J]. Biological Control, 2012, 62(3): 144-151.

(责任编辑:孙宁)