



# 接种功能内生细菌 *Diaphorobacter* sp. Phe15 减少蔬菜亚细胞菲积累的体外试验研究

魏通<sup>1</sup>, 段振宇<sup>1</sup>, 张贵驰<sup>2</sup>, 凌婉婷<sup>1</sup>, 王建<sup>1\*</sup>

1 南京农业大学资源与环境科学学院, 土壤有机污染控制与修复研究所, 江苏 南京 210095

2 南京市生态环境保护科学研究院, 江苏 南京 210095

魏通, 段振宇, 张贵驰, 凌婉婷, 王建. 接种功能内生细菌 *Diaphorobacter* sp. Phe15 减少蔬菜亚细胞菲积累的体外试验研究. 微生物学报, 2022, 62(9): 3437–3448.

Wei Tong, Duan Zhenyu, Zhang Guichi, Ling Wanting, Wang Jian. *In vitro* experiment on reducing phenanthrene accumulation in vegetable subcells with inoculation of endophytic bacteria *Diaphorobacter* sp. Phe15. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3437–3448.

**摘要:** 【目的】土壤中的多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)可被蔬菜根系吸收并在可食部分积累进而通过食物链威胁人群健康。接种功能内生细菌能有效减低蔬菜中 PAHs 的积累, 而关于其对蔬菜亚细胞组分中 PAHs 积累的影响却鲜有报道。【方法】采用体外实验, 研究了接种具有菲降解功能的菌株 *Diaphorobacter* sp. Phe15 对空心菜茎叶亚细胞组分中菲积累的影响及 PAHs 代谢相关酶活性的响应。【结果】接种 Phe15 可以可加速空心菜茎叶亚细胞中菲的降解, 显著削减空心菜亚细胞组分中菲的含量, 接菌后空心菜亚细胞组分中菲降解率达 90%以上。此外, 接种功能菌 Phe15 可以影响空心菜亚细胞组分中 PAHs 代谢相关酶系的活性, 空心菜亚细胞水平 POD、PPO、C230 活性整体得到提高, 且酶系活性与空心菜体内菲积累呈负相关关系。【结论】接种具有菲降解功能的菌株 Phe15 增加了空心菜亚细胞水平 PAHs 代谢相关酶系活性, 进而降低空心菜体内菲的积累, 研究结果为利用功能内生细菌削减蔬菜中多环芳烃污染提供了一定的参考和理论依据。

**关键词:** 植物内生细菌; 多环芳烃; 空心菜; 亚细胞; 酶

**基金项目:** 国家自然科学基金(42007104, 41771523); 江苏省农业科技自主创新资金(CX[21]2033); 中央高校基本科研业务费专项资金(KJQN202120)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (42007104, 41771523), by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (CX[21]2033) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (KJQN202120)

\*Corresponding author. E-mail: wj308119@njau.edu.cn

Received: 21 November 2021; Revised: 14 December 2021; Published online: 6 May 2022

# ***In vitro* experiment on reducing phenanthrene accumulation in vegetable subcells with inoculation of endophytic bacteria *Diaphorobacter* sp. Phe15**

**WEI Tong<sup>1</sup>, DUAN Zhenyu<sup>1</sup>, ZHANG Guichi<sup>2</sup>, LING Wanting<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Nanjing Research Institute of Ecological and Environmental Protection, Nanjing 210095, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil can be absorbed by vegetable roots and accumulated in edible parts, thus threatening human health through the food chain. Inoculation of endophytic bacteria can reduce the accumulation of PAHs in vegetables, but their effects on the accumulation of PAHs in subcellular components of vegetables are rarely reported. [Methods] *In vitro* experiment was carried out to study the effects of *Diaphorobacter* sp. Phe15 inoculation on phenanthrene accumulation in the subcellular components of water spinach as well the response of activities of enzymes related to PAHs metabolism. [Results] *Diaphorobacter* sp. Phe15 inoculation accelerated the degradation of phenanthrene in subcellular components of water spinach stems and leaves, and the content of phenanthrene in water spinach was significantly reduced, with the degradation rate in subcellular components reaching more than 90%. In addition, *Diaphorobacter* sp. Phe15 inoculation affected the activities of the enzymes related to PAHs metabolism in subcellular components of water spinach. The activities of peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and catechol 2,3-dioxygenase (C23O) were increased overall at subcellular level, and there was a negative correlation between enzyme activities and phenanthrene accumulation in water spinach. [Conclusion] *Diaphorobacter* sp. Phe15 inoculation improved activities of enzymes related to PAHs metabolism, and lowered the accumulation of phenanthrene in water spinach. The results provided a certain reference and theoretical basis for the use of functional endophytic bacteria to reduce PAHs pollution in vegetables.

**Keywords:** endophytic bacteria; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); water spinach; subcells; enzymes

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类广泛分布且稳定存在于自然环境中的持久性有毒有机污染物<sup>[1]</sup>,由至少2个由5或6个碳和氢原子组成的共轭芳香环组成。据2014年《全国土壤污染状况调查公报》<sup>[2]</sup>显示,全国土壤环境状况总体不容乐观,部分地区土壤污染较重,全国土壤总的超标率为16.1%,多环芳烃点位超标率为1.4%,耕地土壤环境质

量堪忧,点位超标率为19.4%,其中轻微、轻度、中度和重度污染点位比例分别为13.7%、2.8%、1.8%和1.1%,多环芳烃是主要的有机污染物之一。进入土壤后,多环芳烃可在土壤-植物系统中迁移,并通过食物链进入人体,进而危及农产品安全及人群健康。Tao等<sup>[3]</sup>针对津、鲁地区的调查结果表明,谷物中苯并[a]芘含量超出国家标准2.6倍,高达13.2 μg/kg。马妍等<sup>[4]</sup>

调查发现,我国表层土壤 PAHs 含量数据大体稳定在 313.10–1 070.45  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的中度污染水平范围内。Wang 等<sup>[5]</sup>对长三角典型 PAHs 污染区调查结果表明,该地区土壤和作物均存在一定程度的 PAHs 污染,且 PAHs 污染土壤和作物对当地居民存在潜在的致癌风险。显然,土壤 PAHs 污染问题已严重影响农产品安全及人群健康。如何有效削减作物中 PAHs 积累、保障农产品的安全以及人群健康,已成为国内外环境领域研究的热点之一。

植物内生细菌是指从植物体内分离出的、在不改变植物功能和特征的同时能够在健康植物体内良好定殖的一类微生物,其不会对宿主植物造成任何负面影响,并与寄主植物之间存在互利共生关系,与从土壤中筛选的功能内生细菌相比,植物内生细菌能更有效地在植物体内定殖<sup>[6]</sup>。近年来的研究表明,通过定殖具有 PAHs 降解功能的内生细菌可以减低植物中 PAHs 的含量<sup>[7–8]</sup>。李爽等<sup>[9]</sup>将菌株 *Serratia* sp. PW7 定殖到黑麦草中,在高浓度芘污染水平下,相比未接菌对照组,浸根接种使植株根中和茎叶中芘浓度分别显著降低了 44.2%和 42.3%, Yang 等<sup>[10]</sup>将 *Mycolicibacterium* sp. Pyr9 定殖到白三叶草中,与无菌株 Pyr9 的处理相比,接种菌株 Pyr9 的白三叶草根和茎叶中芘含量分别降低了 25%–30%和 33%–42%, Zhang 等<sup>[8]</sup>构建具有多环芳烃降解能力的内生菌群,定殖菌群后,菠菜、大白菜和小白菜的茎和根中美国环保署优控的 16 种 PAHs 含量分别降低了 46%和 51%以上。显然,定殖功能内生细菌可有效减低作物体内 PAHs 的积累。

对有机污染物等污染物在植物体内的亚细胞分配情况进行分析和研究是十分重要的,通过对这些污染物在亚细胞层面的分配情况的研究,有助于了解这些污染物对植物的侵害机制,

并为减低或消除植物的有机污染等提供一定的理论支撑。

然而,接种功能菌对于蔬菜亚细胞水平上 PAHs 代谢、酶系活性响应以及二者之间关系的影响还不明确。在以往的研究中,多采用盆栽培养试验的方式进行,但是在培养状态下,植物根部会不断地吸收营养物质,进行生长代谢,是一个复杂的动态过程,影响因素过多,不利于明确功能菌株的定殖对于植物亚细胞水平上 PAHs 代谢与酶活性的影响。基于此,本研究选用一株本实验室前期分离筛选出的、具有良好菲降解能力的功能内生菌株 *Diaphorobacter* sp. Phe15,通过体外试验研究其对空心菜亚细胞组分中菲积累及 PAHs 代谢相关酶活性的影响,探究 PAHs 的可能代谢机制以及体内酶的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试试剂

所需试剂:菲购自 Aldrich 公司,纯度大于等于 98%。聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、邻苯二酚、愈创木酚、过氧化氢、磷酸盐缓冲液(PBS 缓冲液)、醋酸缓冲液、亚细胞提取液、霍格兰营养液(HNS)、LB 培养基和无机盐培养基(MSM)、氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Cm)。二氯甲烷、分析纯正己烷,色谱纯甲醇。

### 1.2 供试蔬菜和菌株

供试蔬菜:空心菜(water spinach)。

供试菌株:供试菌株为本实验室前期分离筛选的一株具有菲降解能力的细菌 *Diaphorobacter* sp. Phe15,菌株相关信息参考顾玉俊的研究<sup>[11]</sup>。

### 1.3 体外实验

空心菜种子经催芽露白后,放置于经过紫外消毒的育种盘中育苗 14 d,定期换水。温室培养条件为使用霍格兰营养液培养空心菜,昼夜温度分别设置为 25、20  $^{\circ}\text{C}$ ,各 12 h 循环培

养。菌株活化及制备菌悬液:使用 LB 培养基(固体)及含菲的无机盐培养基对 Phe15 进行活化, Phe15 菌悬液制备参照段振宇等<sup>[12]</sup>。采集长势一致的空心菜,将空心菜茎叶剪成大小一致的小块,称取 200 mg 叶片置于 20 mL 菲浓度为 2 mg/L PBS 中,浸泡染毒 48 h,无菌水充分清洗,置于无菲的 PBS 中,接种 5% (V/V)的 Phe15 的菌悬液(CPR),以不接菌作为空白对照(CP),然后置于摇床中 25 °C、150 r/min 培养,分别于培养后的第 0、6、12、24、36、48、72 h 定期取样,对照组与接菌组每组处理均重复 3 片叶片。

#### 1.4 蔬菜亚细胞组分提取

空心菜亚细胞组分的分离方法参照 Kang 等<sup>[13]</sup>,略有改动。取 0.5 g 新鲜空心菜样品置于研钵中,加入 5 mL 亚细胞提取液中,充分混合后研磨,将研磨液过 100 μm 尼龙细胞筛以去除纤维,将滤液置于离心管中,不同亚细胞组分的分离如下:(1) 细胞壁组分(cell wall, CW): 滤液经 500×g 离心 5 min,沉淀部分即细胞壁组分;(2) 细胞器组分(cell organelle, CO): 将步骤(1)后的上清液移至新离心管中,10 000×g 离心 30 min,沉淀部分即细胞器组分;(3) 细胞膜组分(cell membrane, CM): 将(2)步骤后的上清液置于高速离心机中 10 000×g 离心 30 min,沉淀部分即细胞膜组分;(4) 细胞液组分(cell soluble, CS): (3)中离心后的上清液即为细胞液组分(cell soluble, CS)。

#### 1.5 磷酸盐缓冲液、蔬菜中细菌数量测定

空心菜茎叶内功能菌数量的测定:(1) 用无菌水清洗植物表面,随后用 75%乙醇进行漂洗 5 min,再用无菌水冲洗 2 次;(2) 将处理过后的植物取出,放入已灭菌的研钵中,加入 10 mL 无菌水并研磨均匀;(3) 用移液枪吸取 1 mL (2) 所制得的悬液,稀释涂布于含有抗生素的固体 LB 抗性平板。

磷酸盐缓冲液(PBS)中功能菌数量的测定:直接吸取 PBS,进行稀释涂布。

所用抗生素抗性平板为 LB,含有 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)与 10 mg/L 氯霉素(Cm)。

#### 1.6 蔬菜亚细胞组分中 PAHs 含量分析

亚细胞组分中 PAHs 提取:称取冷冻干燥后的经分离得到的亚细胞组分重量。加入 5 mL 二氯甲烷和正己烷溶液(V/V, 50/50),超声萃取 30 min,重复 3 次,再参考植物样操作对 PAHs 进行提取<sup>[14]</sup>。HPLC 的分析条件具体参考 Chen 等<sup>[15]</sup>。

#### 1.7 蔬菜茎叶亚细胞组分中酶活性测定

空心菜茎叶亚细胞组织多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性测定参考 Shah 等<sup>[16]</sup>,略有改进。称取 0.1 g 植物样品,加入 0.05 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 3 mL pH 值为 7.8 的磷酸缓冲溶液(PBS),于冰浴中充分研磨,研磨液于 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即植物体粗酶液。参考李腾武等<sup>[17]</sup>,分离亚细胞组分的过程中,每个层次离心得到的沉淀加入 3 mL PBS,于 10 000 r/min 条件下离心 15 min,上清液即为细胞壁、细胞器及细胞膜的酶提取液,细胞液可直接测定酶活。POD 和 PPO 活性测定分别参考郝再彬等<sup>[18]</sup>和杨秀清等<sup>[19]</sup>的方法。

邻苯二酚 2,3-双加氧酶(C23O)的测定:用移液枪加入 4.9 mL 粗酶液、0.1 mL 的 10 mmol/L 邻苯二酚,总体积为 5 mL。于室温环境反应 1 h,然后用紫外分光光度计测定其在 375 nm 处的 OD 值。酶活力(U/g·min)单位定义为每分钟吸光度(D 值)增加 0.01(公式 1)。

$$\text{活性} = \Delta D \times A / (0.01 W \times t) \quad \text{公式(1)}$$

式中,  $\Delta D$ : 反应时间内 D 值的变化, A: 稀释倍数, W: 样品鲜质量(g), t: 反应时间。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,

SOD)的测定: 采用黄嘌呤氧化法测定酶活力, 选用南京建成的总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(A001-1)。过氧化氢酶(catalase, CAT)的测定: 采用可见光法测定, 选用南京建成的过氧化氢酶(CAT)测试盒(A007-1-1)。

## 2 结果与分析

### 2.1 蔬菜体内 Phe15 数量变化

体外试验中, PBS 中的内生功能菌 Phe15 可以成功进入植物体内。如表 1 所示, 在 96 h 的培养期内, 空心菜叶表和叶内功能菌 Phe15 的数量呈现出先增加后降低的趋势, 均在第 72 h 达到最大值, 分别为 7.72 log CFU/g (以鲜重计)和 8.07 log CFU/g, 空心菜茎叶部功能菌 Phe15 的数量为叶内>叶表。PBS 中的细菌数量也呈现出先增加后降低的趋势, 与空心菜茎叶中不同的是, 在第 12 h 达到最大值, 为 6.58 log CFU/g。以上结果表明, 功能内生细菌 Phe15 可以有效定殖在空心菜叶表和叶内。

### 2.2 接种 Phe15 对蔬菜茎叶亚细胞组分中菲含量的影响

如图 1 所示, 接种 Phe15 可有效减低空心菜茎叶中各亚细胞组分中菲的积累, 空心菜茎叶各亚细胞组分中菲的含量随处理时间的延长

而降低。接种 Phe15 对不同亚细胞组分中菲的积累及降解影响不同, 不同亚细胞组分中菲的积累量为细胞器 > 细胞膜 > 细胞壁 > 细胞液。在相同培养时间内, 接菌组菲的降解率始终高于对照组, 第 96 h 时空心菜茎叶各亚细胞组分菲降解率均在 90%左右。细胞壁中, 接菌组和对照组对菲的降解趋势大致相同, 均逐步增高, 菲的初始降解率差别较大, 到了后期逐渐接近; 细胞器中, 第 48 h 之前, 接菌组和对照组菲降解率相差较大, 第 24 h 降解率分别为 92.06%和 42.37%, 第 48 h 及之后接菌组和对照组菲降解率相近, 均维持在较高水平; 细胞膜中, 接菌组的降解率也始终高于对照组, 第 48 h 时, 对照组降解率接近接菌组, 分别为 77.21%和 78.52%, 第 96 h 内, 对照组与接菌组对菲的降解率达到最大值均在 85%以上; 细胞液中, 接菌组在实验初期就对菲有较高降解率, 随着实验时间增加, 降解率也呈增加趋势, 对照组在初期对菲的降解率不高, 第 72 h 起与接菌组相接近。以上结果表明, 相比于对照组, 接种功能内生细菌 Phe15 可加速空心菜茎叶亚细胞中菲降解, 减低菲在空心菜茎叶部的积累。

表 1 培养液及空心菜茎叶 Phe15 细菌数量变化

Table 1 The cell counts of strain Phe15 in PBS and water spinach

t/h	Counts of Phe15 in PBS/(log CFU/mL f.w)	Counts of Phe15 in water spinach/(log CFU/g f.w)	
		The surface of the leaf	The interior of the leaf
6	5.53 <sup>cd</sup> ±0.16	6.69 <sup>d</sup> ±0.05	6.23 <sup>d</sup> ±0.11
12	6.58 <sup>a</sup> ±0.01	6.70 <sup>d</sup> ±0.16	6.21 <sup>d</sup> ±0.03
24	6.08 <sup>b</sup> ±0.07	6.96 <sup>c</sup> ±0.02	6.94 <sup>c</sup> ±0.07
48	5.49 <sup>d</sup> ±0.11	7.57 <sup>b</sup> ±0.04	7.42 <sup>b</sup> ±0.04
72	5.80 <sup>e</sup> ±0.25	7.72 <sup>a</sup> ±0.10	8.07 <sup>a</sup> ±0.25
96	5.35 <sup>d</sup> ±0.14	6.73 <sup>d</sup> ±0.06	6.64 <sup>c</sup> ±0.21

Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

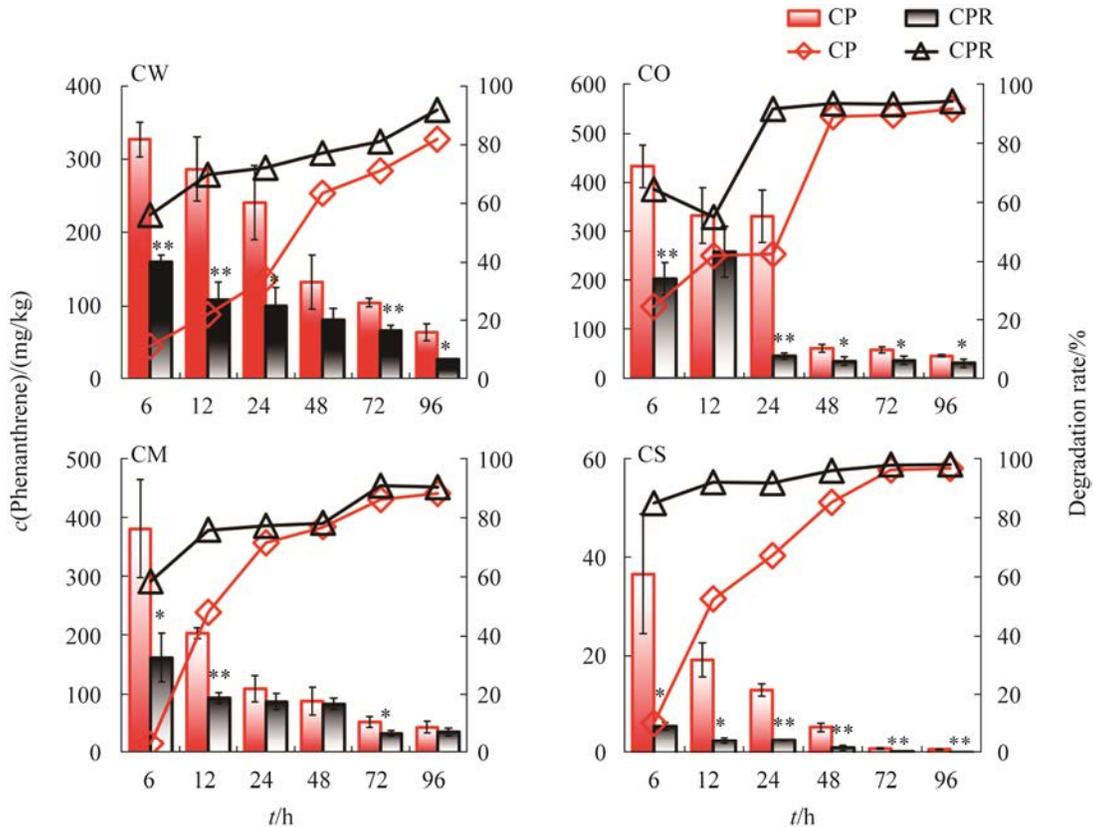


图 1 空心菜茎叶各亚细胞组分中菲含量及其降解率

Figure 1 Concentrations of phenanthrene in subcellular components of shoots of water spinach degradation rate. CW: cell wall; CO: cell organelle; CM: cell membrane; CS: cell soluble. \*\* and \* represent significant differences ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). CP and CPR represent no inoculation and inoculation treatment, respectively.

### 2.3 接种菌株 Phe15 对蔬菜亚细胞组分中酶系活性的影响

如图 2 所示, 在亚细胞水平, PAHs 代谢相关酶系活性对功能内生细菌 Phe15 响应不同。接菌 6 h 后, 空心菜各亚细胞组分中 POD 活性均低于对照, 6 h 后除细胞膜组分外, 其余 3 个亚细胞组分中 POD 活性均高于对照组。随着培养时间的延长, 各亚细胞组分中 POD 活性均呈现先升高后降低的趋势, 并且在处理结束时, 接菌组和对照组酶活性均处于较低水平。接菌处理后第 24 h, 细胞壁和细胞器中 POD 活性最高, 而细胞膜和细胞液中 POD 活性在接菌后第 48 h 达最高值。以上结果表明, 接种功能内生细菌 Phe15 可有效提高植物体内 POD 酶系

活性。

接种功能内生细菌对不同亚细胞组分中 PPO 活性影响不同, 细胞器中 PPO 活性最高。接菌后, 细胞膜和细胞液中 PPO 活性在整个处理期间呈现先上升后下降的趋势, 且接种组高于对照组。细胞膜和细胞液中 PPO 活性在接菌处理后第 12 h 达到最大值。细胞膜中第 48 h 显著提高 ( $P < 0.05$ ), 提高了 124.12%, 细胞液中 PPO 活性的提高在第 72 h 和第 96 h 达到显著水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 分别提高了 43.58% 和 17.62%。而细胞壁和细胞器中 PPO 活性变化比较复杂, 细胞壁中 PPO 活性在处理 24 h 时最高, 第 72 h 显著提高 ( $P < 0.01$ ), 提高了 187.42%, 而细胞器中处理 24 h 时最高, 提高了 50.41%。

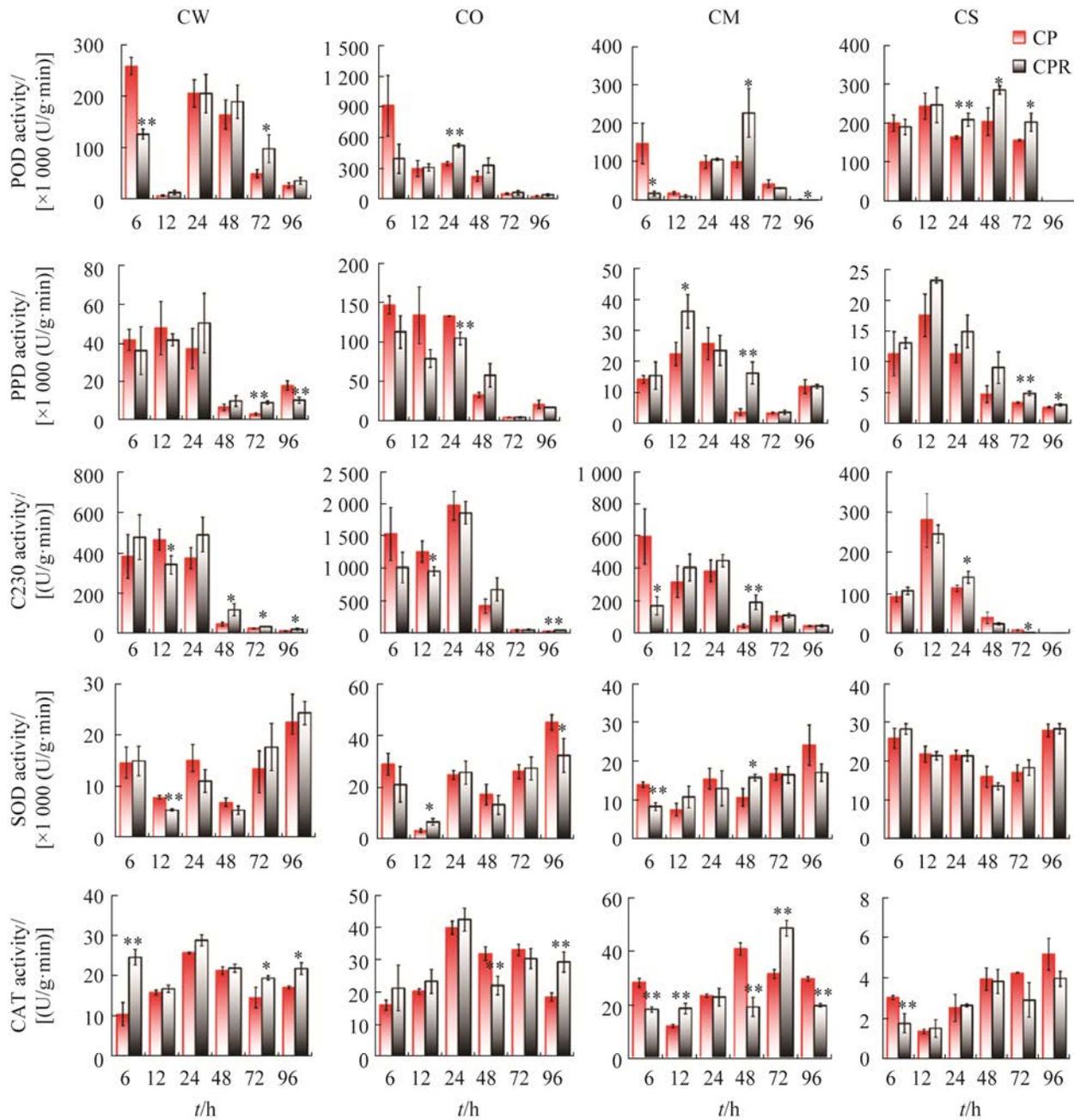


图 2 空心菜茎叶各亚细胞组分中 POD、PPO、C23O、SOD、CAT 活性

Figure 2 Activity of POD, PPO, C23O, SOD, CAT in the subcellular components of shoots of water spinach. The control was non inoculated strain and the inoculated strain is Phe15. CP and CPR represent no inoculation and inoculation treatment, respectively. CW, CO, CM and CS represent cell wall, cell organelle, cell membrane and cell soluble, respectively. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*:  $P < 0.05$ .

接菌处理对各亚细胞组分 C23O 活性的影响各异, 与其他亚细胞组分相比, 细胞器中酶系活性较高。与处理初期相比, 在第 72 h 和 96 h

C23O 酶活性均处于较低水平。细胞壁中, 除第 12 h 外, 接菌组酶活均高于对照组, 其中第 48、72、96 h 存在显著差异, 分别高出 150.47%、

34.31%、51.21%；细胞器中，处理后第 6、12、24 h 接菌组酶活低于对照组，第 48 h 及之后，接菌组酶活高于对照组，其中第 96 h 存在极显著差异，高出 80.67%；细胞膜中，第 6 h，对照组酶活显著高于接菌组，除第 6 h 外，接菌组酶活均高于对照组，其中，第 48 h 存在极显著差异，高出对照组 303.89%；细胞液中，第 6、24、96 h 接菌组酶活高于对照组，其中，第 24 h 显著高于对照组，高出 24.23%，其余采样时间，接菌组酶活均低于对照组。

接种功能内生细菌 *Phe15* 对不同亚细胞组分中 SOD 活性影响不同。细胞壁中，接菌组与对照组相比，细胞壁中接菌后 96 h SOD 酶活性最高，第 12、24、48 h 酶活性低于对照组，第 12 h 存在极显著差异，比对照组低 30.87%；细胞器中，第 12 h 时，接菌组酶活显著高于对照组，高出 102.37%，两组酶活在第 24、72 h 相近，接菌组酶活在第 6、48、96 h 低于对照组，其中第 96 h 存在极显著差异，接菌组酶活比对照组低了 28.43%；细胞膜中，第 72 h 接菌组和对照组酶活性基本持平，第 6、24、96 h，对照组酶活高于接菌组，其中第 6 h 时存在极显著差异，高出 40.82%，第 12、48 h 时，接菌组酶活高于对照组，第 48 h 存在显著差异，高出 47.45%；细胞液中，在各采样时间接菌组和对照组之间 SOD 活性均基本持平，无显著差异。

各亚细胞组分中 CAT 活性先升高后降低。在细胞壁中，接菌处理组 CAT 活性高于对照组，第 6 h 存在极显著差异，接菌组酶活高出对照组 132.00%，第 72、96 h 存在显著差异，接菌组酶活分别高出对照组 32.13%、26.64%；接菌处理 24 h 内，细胞器中 CAT 活性升高且高于对照组，第 48、72 h 接菌组低于对照组，第 48 h 存在极显著差异，比对照组低 30.62%，第 96 h 存在极显著差异，高出对照组 56.97%。在细胞

膜中，接菌处理第 12 h 和 72 h 酶活性高于对照组，存在极显著差异，分别高出 53.38%和 54.38%；在细胞液中，第 6 h 时，存在极显著差异，处理组酶活比对照组酶活低 41.10%，后续培养期内各采样时间均无显著变化。

为了进一步探究体外空心菜茎叶亚细胞组分中 POD、PPO、C23O、SOD、CAT 活性与 PAHs 残留含量之间的关系，对两者进行了相关性分析，结果如表 2 所示。整体来看，空心菜茎叶各亚细胞组分 POD、PPO、C23O 活性与 PAHs 含量之间呈现出负相关规律。其中，在培养初期，尤其是第 6 h 时，各酶系活性与 PAHs 残留含量之间的相关关系不明确，在细胞膜中 POD 活性与 PAHs 残留含量呈显著正相关 ( $P < 0.01$ )，细胞器中 PPO 活性与 PAHs 残留含量呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )，细胞壁中 CAT 活性与 PAHs 残留含量呈显著负相关 ( $P < 0.01$ )，均与整体上得出的相关性规律相反。在实验中期，即第 24 h 和 48 h 时，亚细胞组分中各酶系活性与 PAHs 残留含量之间的相关性规律较明确，与空心菜茎叶中一致。

### 3 讨论

体外试验既可以与体内试验相对照，也可以为体内试验提供先行的经验铺垫。本研究采用体外试验，探索与研究了植物功能内生细菌在新宿主植物体内的定殖效能、对植物体内非的降解效能、对植物体内某些非降解相关酶系活性的影响等内容。本研究以空心菜为目标蔬菜，以 *Diaphorobacter* sp. *Phe15* 作为目标菌株，通过将空心菜叶片浸入含有菌悬液的缓冲液中，尝试使菌株浸染空心菜，从而成功定殖到空心菜体内。这种浸染的方式是较为常见的定殖方式，许多研究者均采用这种用菌悬液浸染植物的方式，达到定殖菌株的目的。如李爽等<sup>[9]</sup>

表 2 空心菜茎叶各亚细胞组分 PAHs 含量与酶活性相关性

Table 2 Pearson's correlation analysis between enzyme activity and concentrations of phenanthrene in the subcellular components of shoots of water spinach

t/h	Subcellular components	Enzymes				
		POD	PPO	C23O	SOD	CAT
6	CW	0.976**	0.329	-0.325	-0.128	-0.920**
	CO	0.636	0.881*	0.802	0.766	-0.441
	CM	0.958**	-0.129	0.802	0.876*	0.943**
	CS	0.573	-0.565	-0.372	-0.462	0.811
12	CW	-0.833*	0.414	-0.847*	0.876*	-0.654
	CO	0.270	0.194	0.337	-0.716	-0.654
	CM	0.771	-0.930**	-0.458	-0.729	0.950**
	CS	-0.084	-0.747	0.166	-0.072	-0.262
24	CW	0.066	-0.246	-0.590	0.570	0.792
	CO	-0.988**	-0.921**	0.481	-0.113	-0.403
	CM	-0.758	-0.583	-0.462	0.400	0.011
	CS	-0.892*	-0.742	-0.854*	0.094	0.279
48	CW	-0.688	-0.502	-0.745	0.164	-0.702
	CO	-0.530	-0.613	-0.403	0.452	0.875*
	CM	-0.215	-0.016	-0.191	-0.489	0.047
	CS	-0.784	-0.758	0.669	0.671	0.022
72	CW	-0.832*	-0.973**	-0.856*	-0.606	-0.717
	CO	-0.325	0.337	-0.361	0.060	0.449
	CM	0.455	-0.276	-0.514	0.071	-0.753
	CS	-0.777	-0.941**	0.795	-0.534	0.829*
96	CW	-0.546	-0.907*	-0.729	-0.529	-0.911*
	CO	-0.451	0.492	-0.744	0.459	-0.785
	CM	0.436	0.724	0.267	0.746	0.500
	CS	0.185	-0.749	-0.795	-0.084	0.870*

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

采用了浸根和浸种两种方式将一株 *Serratia* sp. PW7 定殖到了黑麦草体内。Wang 等<sup>[20]</sup>研究发现, 接种具有 PAHs 降解能力功能内生细菌菌群可有效减低蔬菜体内 PAHs 的积累。

有机污染物及其他污染物在植物体内的亚细胞分配研究十分重要, 通过对这些污染物在亚细胞层面的分配情况进行分析和研究, 有助于了解植物的抗逆性以及这些污染物对植物的侵害机制。如常江海等<sup>[21]</sup>为了探明 2 甲 4 氯丙酸(mecoprop, MCPP)在植物中的吸收、代谢等差异, 研究了 MCPP 在拟南芥中的吸收转运与

亚细胞分布特征。林静等<sup>[22]</sup>以铺地黍为研究对象, 研究了铅在其根部亚细胞的分布特征。本研究通过分析比较了接菌与否对于空心菜及其亚细胞组分中菲含量的影响, 明确定殖功能内生细菌对于植物体内菲降解的促进作用。结果显示, 接种功能内生细菌 Phe15 后, 空心菜茎叶及其亚细胞组分中的菲含量均低于未接菌对照, 证实了接种功能菌株对于空心菜茎叶中菲的削减作用。Sun 等<sup>[23]</sup>研究发现, 体外培养的状态下, 菌株 Ph6-*gfp* 能够成功定殖到小白菜叶片中, 并且会使菲的去除效率增加, 结果与本

研究相类似。

采用浸染的方式定殖功能菌株,使得有部分菌株游离于植物体表以及缓冲液中。同时,浸泡于缓冲液中的植物或许也会释放部分吸收与富集的非,使得自身含有的非的含量有所降低。因此,本研究中,接种的功能内生菌株 Phe15 或许是通过以下方式降低植物及其亚细胞组分中的非含量。首先,定殖到植物的菌株 Phe15 可以直接以植物体内富集的非作为碳源,进行生长和增殖;植物释放的非进入缓冲液后,被缓冲液中及植物体表附着的菌株所消耗,从而避免植物对这部分非的再吸收;培养环境中非含量的降低,避免了植物体内的非进一步向亚细胞组分中分配和迁移,从而使得植物亚细胞组分中的非含量降低。

当植物受到外界环境胁迫时,植物体可通过上调一些酶系活性,进而缓解外界环境胁迫对植物的影响。此外,一些酶系还可参与植物体内污染物的降解,进一步缓解外界环境胁迫对植物的损伤。SOD 和 CAT 是植物体内最重要的抗氧化酶系统,这些酶可有效清除植物体内的活性氧,进而缓解外界环境胁迫<sup>[24]</sup>。植物在代谢 PAHs 等有机污染物时,需要多种酶系的参与。因此,对定殖功能菌株后植物体内这些 PAHs 降解相关酶系活性的变化进行分析,将有助于明晰功能菌株削减植物体内 PAHs 等有机污染物的可能机制。本研究中,采用浸染方式将菌株 Phe15 定殖进入空心菜体内后,空心菜体内几种与 PAHs 降解有关的酶 POD、PPO、C23O、SOD、CAT 的活性均发生了不同程度的变化。接种功能菌株后,植物体内 POD、PPO 和 C23O 的活性整体均高于未接菌对照组,而 SOD 和 CAT 的活性变化趋势则相反,整体低于未接菌对照组。这或许与这些酶的功能差异有关。Liu 等<sup>[25]</sup>研究发现,种植火凤凰后,根际

土壤中 8 种 PAHs 的降解速率与 PPO 活性的变化呈显著负相关。Chen 等<sup>[26]</sup>研究了镉和砷共同污染土壤中生长的食用菌,发现抗氧化酶的活性,包括 SOD、POD 和 CAT,与对照相比有显著变化。Hou 等<sup>[27]</sup>研究了 *Mycobacterium* sp. N12 对火凤凰和紫锥花的影响,发现脱氢酶(DHO)活性与多环芳烃的降解速率呈正相关,多酚氧化酶(PPO)活性随时间的变化与 PAHs 降解速率呈显著负相关。一般而言,POD 和 PPO 在有机污染物代谢研究中受到关注较多<sup>[28-30]</sup>。这是由于其已被证实有助于 PAHs 等有机污染物的去除。关于植物中其他几种酶对 PAHs 降解代谢作用影响的研究报道还并不多,仍需要进一步研究。此外,除了提高酶系活性之外,接种功能内生细菌 Phe15 还可能从以下两个方面加速植物体内非的降解:(1)接种的功能内生细菌可能以植物体内内源性有机物(比如氨基酸、葡萄糖和脂肪酸等)为碳源和能源物质,促进其自身的共代谢进而减低作物体内污染物的含量<sup>[31]</sup>;(2)接种功能内生细菌增加植物体内降解基因丰度,Zhang 等<sup>[8]</sup>构建了功能内生细菌菌群 CEB,并将其重新定殖回植物体内,结果发现接种 CEB 增加了植物中 PAHs 代谢相关功能基因(*nidA*、*bphA1f* 和 *phe*)的拷贝数,进而促进了多环芳烃在植物体内的降解。

本研究仅只是一个体外试验,初步探索了定殖功能内生菌株 Phe15 对于空心菜茎叶及其亚细胞组分中非含量的影响,并尝试分析了其中的可能机制,至于该菌株对于培养条件下空心菜及其亚细胞中的非含量的影响是否与体外试验相似,还需要下一步的研究。

## 4 结论

接种功能菌株 Phe15 可以加速空心菜茎叶亚细胞组分中非的降解,并且通过提高空心菜

茎叶亚细胞组分 PAHs 代谢相关酶系活性减低  
菲的积累。

## 参考文献

- [1] 闫双堆, 刘利军, 曹燕篆, 闫秋艳, 董馨宇, 洪坚平. 3 株多环芳烃高效降解菌株的分离鉴定及降解特性. *应用生态学报*, 2021, 32(12): 4439–4446.  
Yan SD, Liu LJ, Cao YZ, Yan QY, Dong XY, Hong JP. Isolation, identification, and degradation characteristics of three effective PAHs degradation strains. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, 32(12): 4439–4446. (in Chinese)
- [2] 全国土壤污染状况调查公报[EB/OL]. (2014-04-17). [https://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/t20140417\\_270670\\_wh.htm](https://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/t20140417_270670_wh.htm).
- [3] Tao S, Jiao XC, Chen SH, Liu WX, Coveney RM Jr, Zhu LZ, Luo YM. Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Pollution*, 2006, 140(3): 406–415.
- [4] 马妍, 程芦, 阮子渊, 史鹏飞, 路超君, 运晓彤, 李璐嫣, 徐雁秋, 史怡. 近 20 年中国表层土壤中多环芳烃时空分布特征及源解析. *环境科学*, 2021, 42(3): 1065–1072.  
Ma Y, Cheng L, Ruan ZY, Shi PF, Lu CJ, Yun XT, Li LY, Xu YQ, Shi Y. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soil of China(2000-2020): temporal and spatial distribution, influencing factors. *Environmental Science*, 2021, 42(3): 1065–1072. (in Chinese)
- [5] Wang J, Zhang XF, Ling WT, Liu R, Liu J, Kang FX, Gao YZ. Contamination and health risk assessment of PAHs in soils and crops in industrial areas of the Yangtze River Delta region, China. *Chemosphere*, 2017, 168: 976–987.
- [6] 高彦征. 植物多环芳烃污染控制技术及其原理——利用功能内生细菌. 北京: 科学出版社, 2017.
- [7] Liu J, Liu S, Sun K, Sheng YH, Gu YJ, Gao YZ. Colonization on root surface by a phenanthrene-degrading endophytic bacterium and its application for reducing plant phenanthrene contamination. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108249.
- [8] Zhang GC, Wang J, Zhao H, Liu J, Ling WT. PAH degradation and gene abundance in soils and vegetables inoculated with PAH-degrading endophytic bacteria. *Applied Soil Ecology*, 2021, 168: 104193.
- [9] 李爽, 左尚武, 王万清, 王金嵩, 权成伟, 朱雪竹. 菌株 *Serratia* sp. PW7 不同定殖方式对黑麦草中芘污染去除及其内生菌群的影响. *农业环境科学学报*, 2018, 37(12): 2755–2764.  
Li S, Zuo SW, Wang WQ, Wang JS, Quan CW, Zhu XZ. Determining the effects of *Serratia* sp. PW7 on pyrene removal and the endophytic bacterial community in ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) via different inoculation methods. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(12): 2755–2764. (in Chinese)
- [10] Yang J, Gu YJ, Chen ZG, Song Y, Sun FF, Liu J, Waigi MG. Colonization and performance of a pyrene-degrading bacterium *Mycolicibacterium* sp. Pyr9 on root surfaces of white clover. *Chemosphere*, 2021, 263: 127918.
- [11] 顾玉骏. 根表多环芳烃降解细菌的分离筛选及其在植物根表的定殖和效能. 南京农业大学硕士学位论文, 2015.
- [12] 段振宇, 高乃征, 张贵驰, 王建, 凌婉婷. 接种功能内生细菌对蔬菜亚细胞菲积累的削减作用. *环境科学学报*, 2021, 41(4): 1529–1537.  
Duan ZY, Gao NZ, Zhang GC, Wang J, Ling WT. Inoculation of endophytic bacteria for the abatement of the phenanthrene accumulation in vegetable subcellular fraction: efficiency and mechanism. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(4): 1529–1537. (in Chinese)
- [13] Kang FX, Chen DS, Gao YZ, Zhang Y. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in subcellular root tissues of ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 210.
- [14] 高彦征, 朱利中, 凌婉婷, 熊巍. 土壤和植物样品的多环芳烃分析方法研究. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5): 1003–1006.  
Gao YZ, Zhu LZ, Ling WT, Xiong W. Analysis method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plant and soil samples. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2005, 24(5): 1003–1006. (in Chinese)
- [15] Chen S, Ma Z, Li SY, Waigi MG, Jiang JD, Liu J, Ling WT. Colonization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria on roots reduces the risk of PAH contamination in vegetables. *Environment International*, 2019, 132: 105081.
- [16] Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 2001, 161(6): 1135–1144.

- [17] 李腾武, 高希武, 郑炳宗, 崔建州. 小菜蛾不同亚细胞层羧酸酯酶的性质研究. *农药学报*, 1999, 1(2): 47–53.  
Li TW, Gao XW, Zheng BZ, Cui JZ. Study on the properties of carboxylesterase from subcellular fractions in *Plutella xylostella*-L. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 1999, 1(2): 47–53. (in Chinese)
- [18] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.
- [19] 杨秀清, 原海云, 焦晓光, 麻彦明, 李云峰. 铜、锌元素对华北落叶松苗期酶活性影响. *山西农业大学学报*, 2001, 21(3): 277–280.  
Yang XQ, Yuan HY, Jiao XG, Ma YM, Li YF. The effect of nutrient elements of copper and zinc on ferment activity of *Larix principis-rupprechtii* seedlings. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 2001, 21(3): 277–280. (in Chinese)
- [20] Wang J, Liu J, Ling WT, Huang QG, Gao YZ. Composite of PAH-degrading endophytic bacteria reduces contamination and health risks caused by PAHs in vegetables. *Science of the Total Environment*, 2017, 598: 471–478.
- [21] 常江海, 郭维, 郑姚颖, 张素芬, 叶庆富. 手性除草剂 2 甲 4 氯丙酸对映体在拟南芥中吸收转运及亚细胞分布的差异研究. *核农学报*, 2021, 35(3): 681–687.  
Chang JH, Guo W, Zheng YY, Zhang SF, Ye QF. Uptake, translocation and subcellular distribution of mecoprop enantiomers in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(3): 681–687. (in Chinese)
- [22] 林静, 李锋, 刘云滔, 林晓璇, 高桂娟. 植物体铅的亚细胞分布与化学形态特征测定方法改进. *中国农学通报*, 2020, 36(36): 74–78.  
Lin J, Li F, Liu YT, Lin XX, Gao GJ. Subcellular distribution and chemical morphological characteristics of lead in plants: improvement of determination method. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(36): 74–78. (in Chinese)
- [23] Sun K, Habteselassie MY, Liu J, Li SY, Gao YZ. Subcellular distribution and biotransformation of phenanthrene in pakchoi after inoculation with endophytic *Pseudomonas* sp. as probed using HRMS coupled with isotope-labeling. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 858–867.
- [24] 潘铨焱. 镉胁迫下秋茄超氧化物歧化酶家族基因的表达调控与功能分析. 厦门大学博士学位论文, 2019.
- [25] Liu R, Xiao N, Wei SH, Zhao LX, An J. Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of the Total Environment*, 2014, 473/474: 350–358.
- [26] Chen R, Zhou ZR, Liu YX, Jiang J, Li Q, Song HH, Pei DH, Xu H. Mycoremediation potential and tolerance responses of *Oudemansiella radicata* in cadmium-pyrene co-contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 2015, 15(5): 1083–1093.
- [27] Hou LQ, Liu R, Li N, Dai YY, Yan J. Study on the efficiency of phytoremediation of soils heavily polluted with PAHs in petroleum-contaminated sites by microorganism. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(30): 31401–31413.
- [28] Smith JJ, Saddler GS. Biotic interactions in plant-pathogen associations. CABI Publishing: Wallingford, 2001.
- [29] Kvesitadze E, Sadunishvili T, Kvesitadze G. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 2009, 3: 361–371.
- [30] Sinsabaugh RL. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(3): 391–404.
- [31] 孙凯. 具有 PAHs 降解功能的植物内生细菌 BJ06 和 Ph6 分离筛选及定殖效能. 南京农业大学博士学位论文, 2016.