



强化龙葵富集镉根际促生菌的分离、筛选与鉴定

蒋淼 张丹 支月娥 吾兰·恩特马克 周培*

上海交通大学农业与生物学院 上海 200240

摘要:【背景】植物-微生物联合修复土壤重金属污染日渐兴起,获取与超富集植物高效互作的微生物是实现联合修复技术进步的关键。龙葵在镉农田污染修复中广泛应用。【目的】筛选可促进龙葵生长及富集镉的耐镉根际促生菌。【方法】从龙葵根际土分离耐镉菌株,筛选具有良好促生特性的菌株,水培试验考察镉胁迫下菌株对植物生长及镉富集能力的影响,确定可促进龙葵生长及富集镉的微生物菌株,通过生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析进行菌株的初步鉴定。【结果】分离得到 NT1、AXY1、AW2 和 AW1 四株强化龙葵富集镉促生菌,经鉴定分别为 *Lysinibacillus* sp.、*Beijerinckia fluminensis*、*Achromobacter animicus* 和 *Herbaspirillum huttiense*。上述菌株均可有效促进龙葵生长,增加其株高和干物质积累,提高地上部镉富集量。其中,NT1 可使株高、地上部干重分别增加 31.33% 和 62.65%,AW2 可使地上部镉富集量增加 37.29%。【结论】筛选所得菌株可为提高植物修复效率提供实践依据,为研制田间施用生态功能菌剂做铺垫,用于农田镉污染的微生物-龙葵联合原位修复。

关键词: 龙葵, 根际促生菌, 土壤镉污染, 植物-微生物联合修复

Isolation, screening and identification of plant growth promoting rhizobacteria to enrich cadmium accumulation in *Solanum nigrum* L.

JIANG Miao ZHANG Dan ZHI Yue-E Wulan·Entemake ZHOU Pei*

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] Plant-microbial remediation becomes prevailing in the remediation of soil heavy metal pollution. The key to achieve this is to obtain microorganisms which can interact with hyperaccumulator effectively. *Solanum nigrum* L. is widely used in the remediation of cadmium pollution of farmland. [Objective] To screen cadmium tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) which can promote the growth and cadmium accumulation of *Solanum nigrum* L. [Methods] Cadmium tolerant strains with good growth promoting characteristics were isolated and screened from rhizosphere soil of *Solanum nigrum* L. The effects of cadmium stress on plant growth and cadmium accumulation ability were investigated under hydroponic culture, and microorganism which can promote growth and cadmium accumulation of *Solanum nigrum* L. was determined. The strain was identified by its physiological and

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0800803)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34205762; E-mail: zhoupei@sjtu.edu.cn

Received: 21-08-2018; Accepted: 30-11-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0800803)

*通信作者: Tel: 021-34205762; E-mail: zhoupei@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-08-21; 接受日期: 2018-11-30

biochemical characteristics and the analysis of its 16S rRNA gene sequence. **[Results]** Four PGPR strains, NT1, AXY1, AW2 and AW1, were isolated from *Solanum nigrum* L., which were identified as *Lysinibacillus* sp., *Beijerinckia fluminensis*, *Achromobacter anemicus* and *Herbaspirillum huttiense*. The growth of *Solanum nigrum* L., was enhanced by four strains, as the increase of height, dry matter accumulation and the cadmium accumulation of the aboveground part. Strain NT1 increased height by 31.33%, and increased the dry weight of the aboveground part by 62.65%. Strain AW2 increased the cadmium accumulation by 37.29%. **[Conclusion]** Screening of strains can provide a practical basis when it comes to improving the efficiency of plant remediation. It can also help to prepare the ecologically functional bacteria and be used for the microorganism and *Solanum nigrum* L. combination *in situ* remediation in the cadmium polluted farmland.

Keywords: *Solanum nigrum* L., Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), Soil cadmium pollution, Plant-microbial remediation

据 2014 年全国土壤污染状况调查显示, 镉 (Cd) 是我国耕地土壤主要重金属污染物之一, 它可在植物可食用部位累积, 进而被人类取食, 严重危害人类健康^[1-3]。清除土壤重金属污染, 保证食品安全, 是目前农业生产面临的严重问题。

重金属在自然界净化循环中只能从一种形态转化为另一种形态, 从一地迁移到另一地, 从高浓度变成低浓度, 不能被降解而消除^[4]。农田土壤一旦被重金属污染就很难彻底消除。由于农田系统的特殊性, 在其修复过程中若大面积采用物理修复或化学修复的方法, 成本高, 破坏性大, 可操作性弱^[5-7]。因此, 植物修复技术(Phytoextraction)逐渐兴起^[8]。

植物修复技术是指通过超富集植物对土壤中重金属的吸收、运输和贮藏, 将土壤中重金属累积到植物茎叶中, 可用于修复重金属污染程度较轻的土壤, 具有经济成本低、可持续、技术简单、就地修复、前景广阔的优势^[9]。已发现的重金属超富集植物多为草本科, 其共同特点是富集效率高, 但生物量较小, 同时受不同土壤理化性质和重金属化学形态的影响, 富集效果不甚理想。为解决这一弊端, 研究者利用微生物进行联合修复^[10], 众多研究表明促生菌可通过产生生长素、解磷、解钾、产特载体等作用促进植物生长^[11]; 微生物可通过生物吸附^[12]、分泌胞外酶、产有机酸和胞外多糖等作用改变根际土壤酸碱性和微生物群落分布特征及重金属形态^[13-14], 影响植物对重金属的吸收、富集、转运特性, 从而提高植物对土壤重金属的修复效率^[15]。

目前发现的镉超富集植物已有 60 余种, 如东南景天^[16]、伴矿景天、龙葵^[17]、宝山堇菜、蒲公英、三叶鬼针草、球果薄菜、锥南芥等, 国内常用的植物修复材料主要是景天科植物和龙葵^[18]。研究者针对景天科植物和龙葵两种常用修复材料的联合修复微生物筛选开展部分研究, 刘莉华等^[19]筛选到 3 株龙葵内生菌, 分别为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.) 和巨大芽孢杆菌属 (*Bacillus megaterium*), 盆栽试验表明混菌处理后植株地上和地下镉富集量分别增加 109.53% 和 83.01%, 叶、茎和根干重分别比不接菌对照高出 118.22%、109.83% 和 113.01%; 张亚经等^[20]对东南景天接种伯克氏菌 D54 后发现, 接菌处理显著降低了东南景天茎、叶中 Cd、Fe、Mg、Mn 和 Zn 的含量, 茎/根、叶/根重金属的转移系数; 何琳燕等^[21]筛选到 5 株镉抗性内生菌, 经鉴定其菌为芽孢杆菌, 可产吲哚乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA) 和铁载体。

龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 为田间杂草, 相较于景天科植株, 种苗更易获得, 生物量更大, 具有生命力强且易于繁殖的优势。本研究从龙葵根际土筛选具有镉抗性的促生菌, 水培试验考察重度镉农田污染条件下不同菌种对植物生长及 Cd 富集能力的影响, 对筛选获得的菌株进行 16S rRNA 基因鉴定, 初筛获得可促进龙葵生长及富集镉的微生物菌株, 为制备田间施用高效修复功能菌剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基、PAF 培养基、DF 培养基、ADF 培养基、无机磷培养基、有机磷培养基、CAS 培养基参考文献[22-24]。

Salkowski 试剂、钼锑抗显色剂、二硝基酚指示剂均购自国药集团上海化学试剂有限公司;酶标仪购自 BioTek 公司;电感耦合等离子体发射光谱仪购自铂金埃尔默公司;台式高速冷冻离心机购自上海力申科学仪器有限公司;PCR 仪、测序仪购自 Applied Biosystem 公司。

1.2 供试土壤采集

取龙葵根际土,将植物连根采集,剪掉地上部分,去除根周围的大块土,用刷子将根系 1 cm 内的根际土刷进无菌保鲜袋中,带回实验室置于 4 °C 保存,2 d 内进行筛选。

1.3 耐 Cd 菌株筛选

耐 Cd 菌株筛选悬浊液制备:称取 5 g 土样,加入盛有玻璃珠和 50 mL 无菌水的锥形瓶中,37 °C、200 r/min 振荡培养 30 min。

耐 Cd 芽孢杆菌筛选悬浊液制备:取耐镉菌株悬浊液于 80 °C 水浴锅中保持 10 min。

分别取 10 mL 悬浊液转移至含有 100 mL LB-Cd (Cd²⁺含量 10 mg/L,采用 CdCl₂ 配制)液体培养基的锥形瓶中,37 °C、200 r/min 培养 24 h,制备初始富集培养液。取初始富集培养液 10 mL,按照上述操作重复 2 次,制备最终富集培养液。取最终富集培养液在超净工作台中稀释,取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液各 200 μL 涂布于 LB、LB-Cd (Cd²⁺含量 10 mg/L)固体平板,倒置于 37 °C 恒温培养,待平板上出现较多单菌落时在超净台挑取菌落形态、颜色等性状不同的单菌落于对应固体平板划线纯化,制成甘油菌-80 °C 保存。

1.4 促生特性研究

1.4.1 产 IAA 能力定性定量测定

定性测定:采用 Salkowski's 试剂微孔板比色

法,参考 Loper 等^[25]的方法,将分离所获菌株分别接种在含色氨酸(100 mg/L)的 20 mL TSB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 条件下振荡培养 48 h,8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液 2 mL,加入 50 μL 体积分数 83%的正磷酸和 4 mL Salkowski 试剂,溶液变为粉红色即表示有 IAA 产生。

定量测定:参照定性测定条件进行反应后,黑暗下 25 °C 显色 30 min,测定波长 530 nm 下的吸光值。以蒸馏水代替培养液的反应作为对照调零,配制 10、20、30、40 和 50 mg/L 的标准 IAA 梯度溶液,测定 530 nm 吸光值,作标准曲线,计算菌液的 IAA 浓度。

1.4.2 解磷能力定性定量测定

定性测定:吸取 10 μL 菌液点接在无机磷、有机磷平板培养基上,于恒温培养箱 30 °C 倒置培养 3-5 d,观察是否产生溶磷圈。

定量测定:将菌株接种于 LB 培养基,30 °C、200 r/min 培养 24 h,吸取 1 mL 接种于无机磷、有机磷培养基,28 °C、200 r/min 培养 7 d,采用钼锑抗比色法测定可溶性磷含量^[22]。

1.4.3 产铁载体定性定量测定

定性检测^[23]:采用 CAS 平板法,用铂金丝接种环挑取菌株接种于 CAS 平板上,置 28 °C 培养箱培养,产铁载体菌株表现为在菌苔周围形成橙黄色晕圈,若无橙黄色晕圈产生则该菌株无产铁载体能力。

定量检测:用铂金丝接种环挑取菌株接种于 MKB 液体培养基,28 °C、200 r/min 培养 48 h,取 3 mL 菌液 1 500 r/min 离心 15 min,离心上清液与 3 mL CAS 检测液充分混匀,1 h 后 630 nm 波长处测定吸光值,并取双蒸水作为对照调零。另取 3 mL CAS 检测液与 3 mL MKB 液体培养基充分混匀,同法测定吸光值即为参比值(A_r)。

1.4.4 产 ACC 脱氨酶能力测定

挑取筛选所得菌株,加入 50 mL PAF 培养基中,28 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 后,吸取 1 mL 菌悬液至 50 mL DF 培养基中,28 °C、200 r/min

振荡培养 24 h。相同条件下, DF 培养液转接富集培养 3 次。梯度稀释菌悬液, 涂布于 ADF 固体平板, 28 °C 恒温培养, 待观察生长情况^[24]。

1.5 微生物-龙葵互动水培试验

取饱满龙葵种子, 消毒浸泡后, 预培养 4 周, 选取长势健壮且一致的龙葵幼苗于水培箱, 水培液选用 Hoagland 营养液, 外源添加 CdCl₂, 处理浓度 4 mg/L, 促生菌于 LB 液体培养基, 28 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 加入水培液内(水培液内菌液浓度大约为 1×10⁷ CFU/mL), 每 5 d 更换一次水培液及菌液, 玻璃温室内连续培养 8 周。设置不加镉不加菌空白对照(CK), 加镉不加菌对照(CK-Cd)。

1.5.1 龙葵生长指标测定

轻轻取出整株龙葵, 用直尺测量龙葵株高及根长, 不锈钢剪刀将龙葵根、茎、叶 3 部分吸干水分后分别称重, 分别放入牛皮纸信封, 105 °C 杀青 10 min, 70 °C 烘干至恒重, 测定植物样品干物质重。

1.5.2 龙葵 Cd 含量测定

取植物样品根、茎、叶各 5 g 左右于 20 mmol/L Na₂EDTA 溶液中浸泡 15 min, 然后用去离子水冲洗, 去除表面吸附的重金属。去除表面水分后, 105 °C 杀青 10 min, 70 °C 烘干至恒重, 测定植物样品干物质重, 将烘干后样品粉碎备用。植物样品用 HNO₃-H₂O₂ (3:1, 体积比)法消化, 消解后的样

表 1 菌株定性测定结果

Table 1 The results of qualitative determination of strains

菌株编号 Strain number	产 IAA IAA production	解有机磷 Organic phosphate-solubilizing	解无机磷 Inorganic phosphate-solubilizing	产铁载体 Siderophores	产 ACC 脱氨酶 ACC deaminase
QT3	+	-	+	-	-
NT1	+	+	+	+	-
WT5	+	+	+	+	-
WT4	+	+	+	+	-
NCT2	+	+	+	-	-
AXY1	+	+	+	+	+
ANT2	+	-	-	+	+
AW2	+	-	-	-	+
AW1	+	-	+	-	+

注: +: 菌株有相应特性; -: 菌株无相应特性。

Note: +: Strain has the related capacity; -: Strain does not have the related capacity.

品用去离子水稀释, 采用 ICP-AES 法测定样品内 Cd 含量。

1.6 菌株 16S rRNA 基因序列分析鉴定

菌株于 LB 培养液活化, 28 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 后转接于 LB 固体平板划线, 28 °C 恒温培养 24 h 后, 送上海桑尼生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因测序检测。

1.7 数据处理

使用 Excel 2017 和 SPSS 20 统计软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 耐 Cd 菌株筛选与促生特性测定

根据菌落颜色、形状、透明度等形态特征辨别菌株, 在 10 mg/L Cd²⁺胁迫处理下, 初步筛选得到耐受 Cd 的菌株 13 株, 进一步经 80 °C 处理获得耐高温的菌株 9 株, 对其促生特性进行试验验证。如表 1 所示, 筛选获得的 9 株菌均具有产 IAA 能力, 其中, 5 株可溶解有机磷, 7 株可溶解无机磷, 5 株具有产铁载体能力, 4 株具有产 ACC 脱氨酶能力。

2.2.1 产 IAA 能力定量测定

IAA 是鉴定促生菌的重要指标之一, 可促进植物根系侧根和不定根的生长, 改善植物生长发育。根据标准曲线计算菌株产 IAA 能力, 结果如图 1 所示。所有菌株均有产 IAA 能力, AW1 产 IAA 能力最强, 可达 51.34 mg/L; 其次是 QT3 及 WT4,

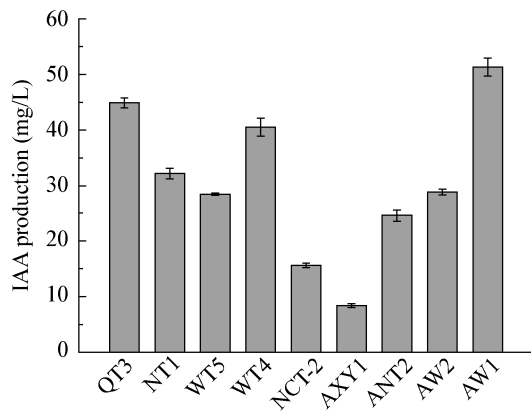


图1 菌株产 IAA 能力定量测定

Figure 1 Quantitative determination of IAA production of strain

IAA 产量均可达 40 mg/L 以上; AXY1 产 IAA 能力最弱, 仅有 8.38 mg/L。

2.2.2 解磷能力测定

解磷性促生菌可溶解土壤中的难溶性有机磷和部分无机磷, 转化为水溶性磷, 提高土壤中可溶性磷含量, 促进植物吸收磷^[26]。根据是否产生解磷圈来判断菌株解磷能力, 具有解无机磷能力的菌株共 7 株, 具有解有机磷能力的菌株共 5 株, 分别为 NT1、WT5、WT4、NCT-2 和 AXY1, 其既可溶解有机磷, 也可溶解无机磷; WT4 解有机磷能力最强, 可达 41.79 mg/L; NT1 解无机磷能力最强, 可达 57.95 mg/L (图 2)。

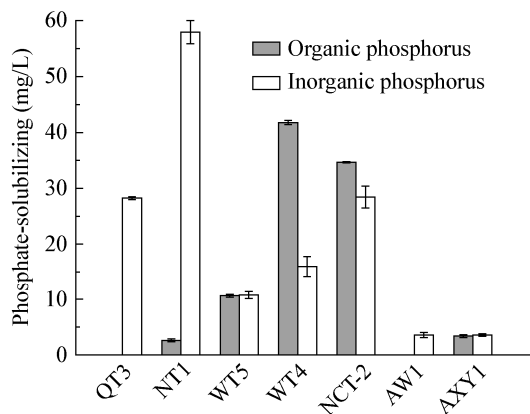


图2 菌株解磷能力定量测定

Figure 2 Quantitative determination of phosphate-solubilizing of strain

2.2.3 产铁载体能力定量测定

铁载体具有很强的 Fe^{3+} 特异螯合能力, 许多植物根际微生物可通过合成这类物质来摄取环境中的铁, 并将多余的铁提供给植物利用, 改善植物铁素营养。筛选到的 5 株菌株可产橙黄色晕圈, 对其进行定量检测, SU 表示铁载体活性, $SU = [(A_r - A) / A_r] \times 100$, SU 越大, 表明菌株产铁载体能力越强。

由于迄今尚无一种铁载体(或化合物)可以充当各类微生物铁载体的标准品用于标准曲线测定, 本方法所用的定量检测只是一种相对定量, 反应不同菌株产铁载体的能力。菌株 NT1、WT5、WT4 和 ANT2 的铁载体活性均可达 80% 以上, AXY1 产铁载体能力最弱, 活性为 69.97% (图 3)。

2.2.4 产 ACC 脱氨酶能力测定

在重金属胁迫等逆境条件下, 植物会产生过量乙烯, 对其生长发育造成不利影响, ACC 脱氨酶能把乙烯的前体 ACC 水解成 α -丁酮酸和氨, 抑制植物体内乙烯合成, 从而减少胁迫; 同时可增加根际土壤中 C 源和 N 源, 增强作物抗逆性和产量^[27]。具有产 ACC 脱氨酶能力的菌株可将 ACC 水解, 为其生长发育提供氮源, 反之在 ADF 平板上无法生长。筛选得到可产 ACC 脱氨酶菌株 4 株, 分别为 ANT2、AW1、AW2、AXY1。

综上, AXY1 菌株具备所考察的所有促生特

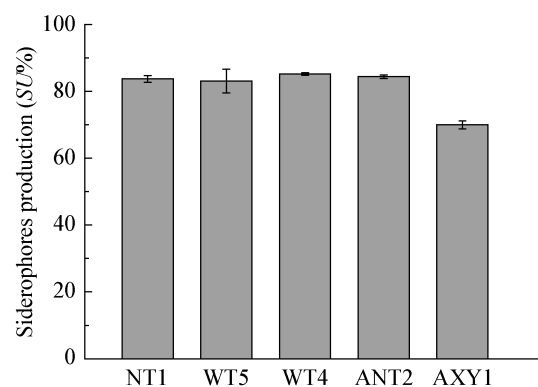


图3 菌株产铁载体能力定量测定结果

Figure 3 Quantitative determination of siderophores production of strain

性,但各项促生能力不强;其中,NT1、WT5、WT4 三株具有除产 ACC 脱氨酶外所有促生特性,NT1 解无机磷能力最强,WT4 解有机磷能力最强。

2.3 微生物处理对龙葵富集镉的影响

2.3.1 微生物处理对龙葵生长指标的影响

如图 4 和图 5 所示,在 4 mg/L 镉胁迫下 CK-Cd 与 CK 相比,其株高和根长均无显著差异,地上部及地下部干重均极显著降低,说明在重度 Cd 污染农田下镉胁迫对龙葵株高和根长生长没有显著抑制作用,但可极显著减少植物干物质积累量。

由图 4 可知,相对 CK-Cd,NT1、AXY1、AW2 和 AW1 处理可显著促进龙葵地上部生长,分别可促进株高增加 31.33%、26.78%、24.48%和 23.96%。相对 CK-Cd,NCT-2 可以促进根长增加 19.28%,除 NCT-2 外其余菌株对根长生长不具有显著影响。

由图 5 可知,相对 CK-Cd,所有菌株处理后对地上部干重均有极显著影响,地上部干重最高可增加 62.65%,这可能是由于促生菌株作用下减轻了重金属胁迫的毒害作用,促进龙葵地上部有机物积累。相对 CK,NT1、AW1 和 AW2 对地上部干

重有极显著影响,干重分别增加 21.15%、16.18%和 9.91%。相对 CK-Cd,NT1 和 ANT2 可显著提高地下部干物质积累量,干重分别增加 28.1%和 5.17%;但 QT3 处理下地下部干重极显著减少。

2.3.2 微生物处理对龙葵富集镉的影响

由图 6 可见,添加菌株处理后对龙葵体内根茎叶 Cd 含量均有显著影响;加菌与不加菌处理相比,加菌后龙葵茎部 Cd 含量均极显著降低,最高降低 41.13%;除 AXY1 和 AW2 外,其余菌株处理下叶部 Cd 含量均显著降低,最高可降低 35.91%。QT3、WT5、WT4 和 NCT2 处理下,龙葵根茎叶 Cd 含量均显著降低;NT1、ANT2 和 AW1 处理下,根部 Cd 含量极显著升高,但可显著降低茎叶 Cd 含量。

由表 2 可见,NT1、WT4、AXY1、AW2 和 AW1 处理下,龙葵地上部镉富集量显著增加,AW2 处理地上部镉富集量最高,增加 37.29%;QT3、NCT2 和 ANT2 处理下地上部富集量显著降低;NT1 可极显著增加地上部及地下部镉富集量,分别增加 28.63%和 66.32%;QT3 可极显著降低地上部及地下部镉富集量,分别降低 19.22%和 77.76%。

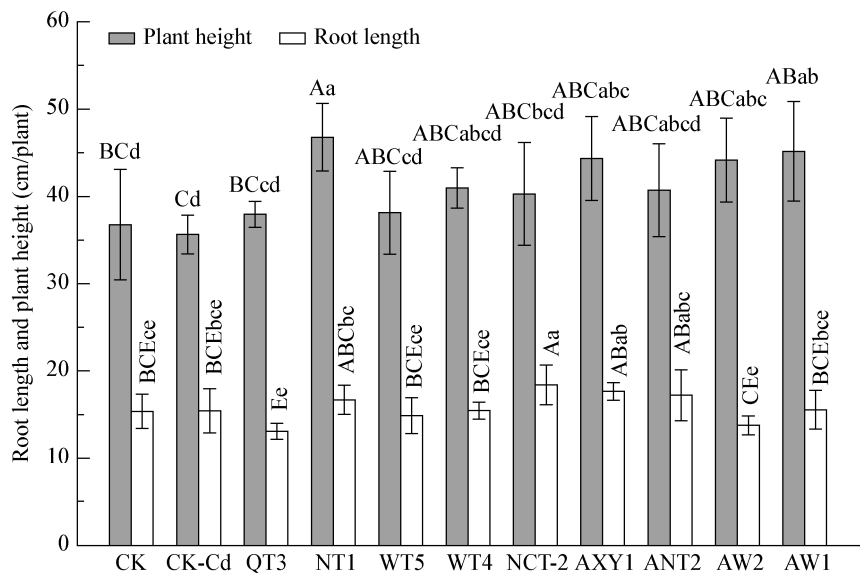


图 4 微生物处理对龙葵株高根长的影响

Figure 4 Effect of microbial treatment on root length and plant height of *Solanum nigrum* L.

注:小写字母代表差异显著 $P < 0.05$;大写字母代表差异极显著 $P < 0.01$ 。

Note: The lowercase letters indicate the significant difference at 5% level and the capital letters indicate the significant difference at 1% level.

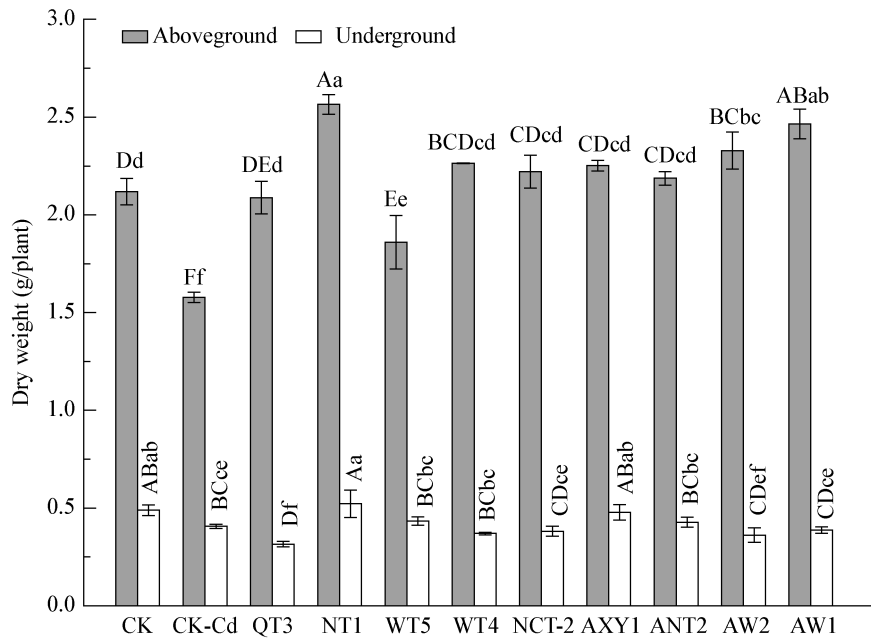


图 5 微生物处理对龙葵地上、地下部干重的影响

Figure 5 Effect of microbial treatment on dry weight in aboveground part and underground part of *Solanum nigrum* L.

注: 小写字母代表差异显著 $P < 0.05$; 大写字母代表差异极显著 $P < 0.01$.

Note: The lowercase letters indicate the significant difference at 5% level and the capital letters indicate the significant difference at 1% level.

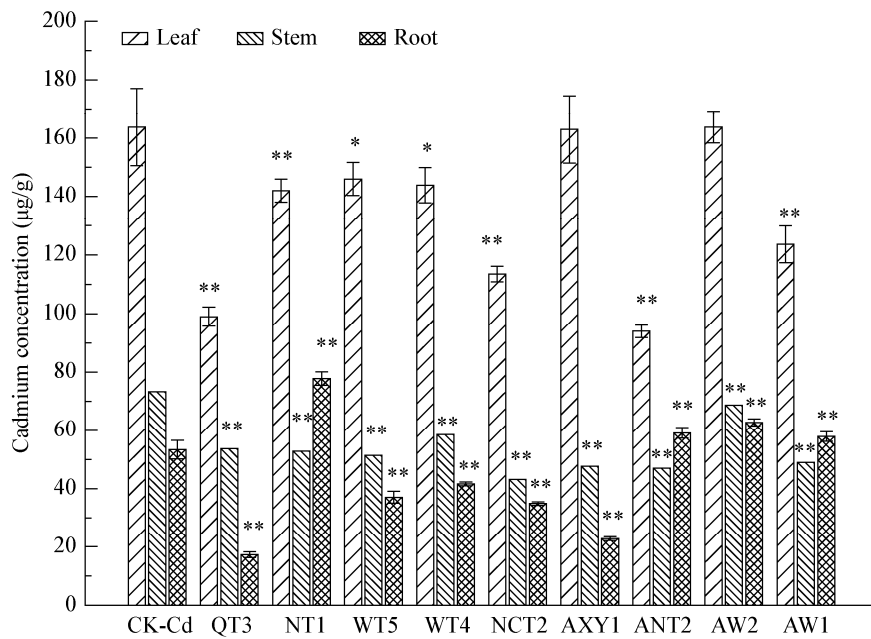


图 6 微生物处理对龙葵根茎叶镉含量的影响

Figure 6 Effect of microbial treatment on cadmium concentration in root, stem and leaf of *Solanum nigrum* L.

注: *: 差异显著 $P < 0.05$; **: 差异极显著 $P < 0.01$.

Note: *: Significant difference at 5% level; **: Significant difference at 1% level.

表 2 微生物处理下龙葵镉富集量

Table 2 Cadmium accumulation of *Solanum nigrum* L. in microbe treatment

菌株编号 Strain No.	地上部镉富集量 Cadmium accumulation in aboveground part ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	地下部镉富集量 Cadmium accumulation in underground part ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	生物转移系数 Biological transfer factor
CK-Cd	213.53 \pm 18.42	24.50 \pm 0.69	2.533
QT3	172.50 \pm 13.02**	5.45 \pm 0.29**	4.767
NT1	274.42 \pm 10.12**	40.56 \pm 5.51**	1.375
WT5	207.60 \pm 16.99	16.02 \pm 0.81**	2.886
WT4	255.53 \pm 8.66**	15.39 \pm 0.24**	2.631
NCT2	187.47 \pm 11.64*	13.28 \pm 0.92**	3.247
AXY1	267.32 \pm 11.50**	10.90 \pm 0.86**	4.006
ANT2	165.73 \pm 5.17**	25.27 \pm 1.47	1.484
AW2	293.15 \pm 15.96**	22.64 \pm 2.31	1.936
AW1	235.35 \pm 0.89**	22.64 \pm 0.79	1.622

注: *: 差异显著 $P < 0.05$; **: 差异极显著 $P < 0.01$; 生物转移系数^[28](BTF)=地上部重金属含量(mg/kg)/地下部重金属含量(mg/kg).
Note: *: Significant difference at 5% level; **: Significant difference at 5% level; Biological transfer factor^[28] (BTF)=Concentration of heavy metal in underground part (mg/kg)/Concentration of heavy metal in underground part (mg/kg).

2.4 菌株 16S rRNA 基因序列分析鉴定

综上, NT1、AXY1、AW2 和 AW1 菌株具有良好的促生特性,在镉胁迫下均可显著增强龙葵株高生长,极显著提高地上部干物质积累量和单株龙葵地上部镉富集量。目前,细菌学家普遍认为,当 16S rRNA 基因序列相似性高于 97%时应属于同一物种。结合菌株生理生化特征和 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的核酸数据比对^[29-30]结果,初步鉴定 NT1 (GenBank 登录号为 MH559628)菌株属于 *Lysinibacillus* sp., AXY1 (GenBank 登录号为 MK064217)菌株属于 *Beijerinckia fluminensis*, AW2 (GenBank 登录号为 MK064218)菌株属于 *Achromobacter animicus*, AW1 (GenBank 登录号为 MK064226)菌株属于 *Herbaspirillum huttiense*。

3 讨论与结论

促生菌的促生功能主要分为 3 个方面: (1) 通过生物固氮、解磷、解钾、产铁载体等作用促进植物营养吸收; (2) 通过产生生长素 (Indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素 (Gibberellins acid, GA)、细胞分裂素 (Cytokinins, CTK) 或 ACC 脱氨酶等调节植物生长; (3) 通过分泌抗生素、酶类和脂多糖等防

治植物病害^[31-33]。

本研究主要考察与植物营养吸收和生长发育相关的 4 项指标,定性定量测定菌株解磷、产铁载体、产 IAA 和产 ACC 脱氨酶能力,得到 9 株促生性良好的耐镉菌株。微生物-龙葵水培试验表明,镉胁迫下所有菌株均可极显著促进龙葵地上部干物质积累,其中 4 株可显著促进株高生长,证明筛选所得菌株对龙葵有良好的促生作用。

在植物修复过程中,植物吸收污染土壤重金属后,一般通过收割植物来实现重金属的回收迁移,植物重金属富集量是衡量植物修复效率的重要指标。促生菌可促进植物生长,也可通过微生物-重金属和微生物-植物的相互作用影响植物吸收、转移和累积重金属,改变植物重金属富集量^[1,34]。微生物-龙葵水培试验考察菌株对龙葵富集镉的影响,发现不同促生菌处理下龙葵镉转移系数差异较大,证明微生物与重金属互作,改变了植株对重金属的吸收迁移特性。结果表明所有菌株均可极显著降低龙葵茎镉含量,除 AXY1 和 AW2 对叶镉含量无显著影响外,其余菌株均可显著降低叶镉含量。

筛选获得 NT1、AXY1、AW2 和 AW1 四株强

化龙葵富集镉促生菌, 经鉴定分别为 *Lysinibacillus* sp.、*Beijerinckia fluminensis*、*Achromobacter animicus* 和 *Herbaspirillum huttiense*。4 株菌均有优良的促生特性, 可促进龙葵株高生长和干物质积累, NT1 促生效果最好; 4 株菌均可提高地上部镉富集量, AW2 镉富集效果最好。NT1、AW2 和 AW1 处理地下部镉含量显著增加, 转移系数减小, 这可能是由于促生菌促进了植物地下部吸收镉, 但抑制了镉向地上部迁移, 使茎叶镉含量降低, 从而减轻重金属对龙葵地上部的毒害。AXY1 处理转移系数增大, 但其叶镉含量无显著升高, 这可能是由于该菌虽然促进了镉向龙葵地上部分转移, 但不能促进龙葵地下部吸收镉。

农田重金属污染涉及面积较广, 在修复中采用“边生产、边修复”的修复模式, 利用重金属超富集植物与经济作物间作, 既可保证农民收益, 又可去除土壤中的重金属^[35]。本研究筛选获得的菌株具有良好的促生特性, 间作模式既可强化龙葵富集镉, 又可促进经济作物生长发育, 可用于微生物-龙葵联合原位修复农田 Cd 污染, 为制备田间生态功能菌剂奠定了基础。

本研究仅考察了微生物-龙葵在水培试验下对龙葵的生长情况及镉富集能力的影响, 但在实际修复过程中微生物-龙葵互作结果受多种外界条件影响。不同土壤环境下微生物代谢产物、微生物群落结构和微生物酶活性均有不同, 不同酸碱性土壤条件下镉存在形态差异, 从而影响微生物-龙葵联合修复效果。后续研究应利用盆栽试验和大田试验进一步考察不同类型土壤环境下菌株对龙葵富集镉的作用效果。

REFERENCES

- [1] Kirkham MB. Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments[J]. *Geoderma*, 2006, 137(1/2): 19-32
- [2] Holmgren GGS, Meyer MW, Chaney RL, et al. Cadmium, lead, zinc, copper, and nickel in agricultural soils of the United States of America[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1993, 22(2): 335-348
- [3] Wang KR. Current status of cadmium pollution in farmland in China and its countermeasures[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 1997, 16(6): 274-278 (in Chinese)
- [4] 王凯荣. 我国农田镉污染现状及其治理利用对策[J]. *农业环境保护*, 1997, 16(6): 274-278
- [5] Liu CD, Wang Q, Yu B, et al. Characteristics and control countermeasures of heavy metal pollution in farmland[J]. *Agricultural Technology Service*, 2008, 25(7): 118-119 (in Chinese)
- [6] 刘传德, 王强, 于波, 等. 农田土壤重金属污染的特点和治理对策[J]. *农技服务*, 2008, 25(7): 118-119
- [7] Tang X, Li Q, Wu M, et al. Review of remediation practices regarding cadmium-enriched farmland soil with particular reference to China[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 181: 646-662
- [8] Wuana RA, Okieimen FE. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation[J]. *ISRN Ecology*, 2011, 2011: 402647
- [9] Zhang X, Zhou AG, Gan YQ, et al. Advances in bioremediation technologies of contaminated soils by heavy metal in metallic mines[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(3): 106-112 (in Chinese)
- [10] 张溪, 周爱国, 甘义群, 等. 金属矿山土壤重金属污染生物修复研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(3): 106-112
- [11] Kumar PNAN, Dushenkov V, Motto H, et al. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 1995, 29(5): 1232-1238
- [12] Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(7): 869-881
- [13] Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(3): 367-374
- [14] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 541-556
- [15] Ansari MI, Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(16): 3149-3153
- [16] Nies DH. Microbial heavy-metal resistance[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(6): 730-750
- [17] Roane TM, Kellogg ST. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, 42(6): 593-603
- [18] Niu ZX, Sun LN, Sun TH. Plant-microorganism combined remediation of heavy metals-contaminated soils: Its research progress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(11): 2366-2373 (in Chinese)
- [19] 牛之欣, 孙丽娜, 孙铁珩. 重金属污染土壤的植物-微生物联合修复研究进展[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(11): 2366-2373
- [20] Yang XE, Long XX, Ye HB, et al. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance)[J]. *Plant and Soil*, 2004, 259(1/2): 181-189
- [21] Sun RL, Zhou QX, Jin CX. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found

- cadmium hyperaccumulator[J]. *Plant and Soil*, 2006, 285(1/2): 125-134
- [18] Xu J, Sun JH, Du LG, et al. Comparative transcriptome analysis of cadmium responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum*[J]. *New Phytologist*, 2012, 196(1): 110-124
- [19] Liu LH, Liu SJ, Chen FM, et al. Effect of endophytic bacteria inoculation on cadmium uptake in *Solanum nigrum* L.[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(12): 3368-3375 (in Chinese)
刘莉华, 刘淑杰, 陈福明, 等. 接种内生细菌对龙葵吸收积累镉的影响[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(12): 3368-3375
- [20] Zhang YJ, Ma CC, Guo JK, et al. The effect of inoculating *Burkholderia* sp. D54 on cadmium uptake and accumulation in *Sedum alfredii* Hance[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(3): 449-457 (in Chinese)
张亚经, 马成仓, 郭军康, 等. 接种伯克氏菌 D54 对东南景天吸收富集 Cd 的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(3): 449-457
- [21] He LY, Li Y, Liu T, et al. Isolation and characterization of cadmium-resistant endophytic and rhizobacteria from *Solanum nigrum* in Orefield[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2011, 27(6): 83-88 (in Chinese)
何琳燕, 李娅, 刘涛, 等. 龙葵根际和内生 Cd 抗性细菌的筛选及其生物学特性[J]. *生态与农村环境学报*, 2011, 27(6): 83-88
- [22] Wei X. Study on phosphate solubilizing characteristics of *Bacillus megaterium* NCT-2[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2015 (in Chinese)
卫星. 巨大芽孢杆菌 NCT-2 的溶磷特性研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2015
- [23] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56
- [24] Zhao LF, Xu YJ, Chang JL, et al. Screening, resistance and growth-promoting effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity isolated from soybean nodules[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(6): 1009-1021 (in Chinese)
赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 等. 具 ACC 脱氨酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用[J]. *微生物学报*, 2016, 56(6): 1009-1021
- [25] Loper JE, Schroth MN. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet[J]. *Phytopathology*, 1986, 76(4): 386-389
- [26] Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants[J]. *Plant and Soil*, 2002, 245(1): 83-93
- [27] Glick BR, Todorovic B, Czarny J, et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2007, 26(5/6): 227-242
- [28] Pan YH, Wang HB, Gu ZP, et al. Accumulation and translocation of heavy metals by macrophytes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(23): 6430-6441 (in Chinese)
潘义宏, 王宏斌, 谷兆萍, 等. 大型水生植物对重金属的富集与转移[J]. *生态学报*, 2010, 30(23): 6430-6441
- [29] Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics[J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(2): 407-438
- [30] Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 299-305
- [31] Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review[J]. *Cogent Food & Agriculture*, 2016, 2(1): 1127500
- [32] Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers[J]. *Plant and Soil*, 2003, 255(2): 571-586
- [33] Martínez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, 10(3): 293-319
- [34] Burd GI, Dixon DG, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(3): 237-245
- [35] Wu S. Phytoremediation of Zn-Cd contaminated soil by intercropping system consisted of *Sedum plumbizincicola* and cash crops and post-treatment of the harvested plant biomass[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2018 (in Chinese)
武帅. 伴矿景天与经济作物间作修复锌镉复合污染土壤及其产后处理技术[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2018