

研究报告

鄱阳湖-乐安河段湿地耐 Cu、Zn、Pb 植物促生菌的分离、筛选及鉴定

黄程 吴子君 何颖慧 石文苏 路世娜 孔召玉 吴兰*

(南昌大学生命科学学院 鄱阳湖环境与资源利用教育部重点实验室 江西 南昌 330031)

摘要:【背景】植物促生菌因其对植物生长促进及增强抗逆性等优点在植物-微生物联合修复重金属污染土壤中具有良好应用潜力。在污染土壤中,土著植物促生菌能够更好地定殖并保证促植物生长能力的发挥。【目的】从常年受上游多种重金属污染的鄱阳湖-乐安河段湿地分离出一批具有多种重金属抗性的优势土著植物促生菌,以期作为植物-微生物联合修复重金属污染湿地提供一批优质的菌种资源。【方法】从乐安河流域戴村受重金属污染的湿地土壤及水体中分离具有 Cu、Zn、Pb 抗性菌株,测定菌株的促植物生长特性[产 IAA (Indole acetic acid)、溶磷、产铁载体及 ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid)脱氨酶活性],挑选促生特性较好的菌株进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定,并测定菌株对其他胁迫条件(抗生素、酸碱、盐)的耐受能力。【结果】分离得到 22 株能够同时耐受 Cu 50 mg/L、Zn 400 mg/L、Pb 800 mg/L 的菌株,其中 10 株表现出较好的促植物生长特性,对其进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定,有 4 株属于 *Ralstonia* sp., 3 株属于 *Burkholderia* sp., 另 3 株则分别属于 *Cupriavidus* sp.、*Stenotrophomonas* sp. 和 *Novosphingobium* sp.。基于这 10 株菌抗性特征的聚类分析及主成分分析,结果与系统发育树分析结果高度一致。【结论】耐受多种重金属的土著植物促生菌的分离鉴定为重金属污染土壤的植物-微生物联合原位修复提供良好的微生物资源。

关键词: 重金属污染, 植物-微生物修复, 植物促生菌, 抗性菌株

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (41601337)

*Corresponding author: E-mail: ncusk724@hotmail.com

Received: October 10, 2017; **Accepted:** February 05, 2018; **Published online** (www.cnki.net): March 19, 2018
基金项目: 国家自然科学基金(41601337)

*通信作者: E-mail: ncusk724@hotmail.com

收稿日期: 2017-10-10; 接受日期: 2018-02-05; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-19

Isolation, screening and identification of Cu, Zn and Pb resistant plant growth-promoting bacteria from Le'an River-Poyang Lake Wetland

HUANG Cheng WU Zi-Jun HE Ying-Hui SHI Wen-Su LU Shi-Na
KONG Zhao-Yu WU Lan*

(School of Life Sciences, Key Laboratory of Poyang Lake Environment and Resource Utilization, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China)

Abstract: [Background] Plant growth-promoting bacteria (PGPB) have good potential in assisting phytoremediation of heavy metal pollution due to their advantages in promoting the growth and heavy metal-resistance of plants. In heavy metal-contaminated soils, indigenous PGPB can better colonize and exert their plant growth-promoting abilities. [Objective] Our aim is to isolate the indigenous heavy metal-resistant PGPB from the Le'an River-Poyang Lake Wetland, which has been polluted by acid mine drainage for many years, thus to provide superior microbial resources for bacterial assisted phytoremediation of heavy metal polluted wetland soil. [Methods] Cu, Zn and Pb-resistant strains were isolated from heavy metal polluted wetland soils and water in Dai cun, which is located in Le'an River. The plant growth-promoting characteristics (IAA (Indole acetic acid), phosphate solubilization, siderophore and ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase activity) of the studied isolates were measured, and the isolates with good growth-promoting characteristics were selected and identified using 16S rRNA gene sequencing. The resistant characteristics (heavy metal, antibiotics, acid and alkali, salt) of the selected strains were also determined. [Results] A total of 22 isolates were able to grow in the presence of Cu 50 mg/L, Zn 400 mg/L and Pb 800 mg/L. Among them, 10 strains showed good plant growth-promoting characteristics. According to 16S rRNA gene sequencing, 4 strains belonged to the genus *Ralstonia*, 3 strains belonging to the genus *Burkholderia* and the other 3 strains belonged to the genera *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas* and *Novosphingobium*, respectively. The numerical classification based on bacterial resistant characteristics was mostly consistent with their phylogenetic position. [Conclusion] The isolation and identification of multiple heavy metal-resistant PGPB could provide good microbial resources for *in situ* remediation of heavy metal contaminated soils.

Keywords: Heavy metal pollution, Phyto-microbial remediation, PGPB, Resistant strain

随着工业化、城镇化进程的快速发展, 矿产资源的大量开发, 各种化学产品的广泛使用, 导致工业三废通过大气沉降、污水灌溉等途径进入土壤中, 引起土壤重金属污染, 其中尤以农田土壤的重金属污染问题日趋严重。根据 2014 年《全国土壤重金属污染状况调查公报》, 我国约有 19.4% 耕地受到了重金属污染, 其中 1.8% 和 1.1% 的耕地污染达到了中度和重度污染程度^[1], 其中大多分布在南方经济发达地区及鱼米之乡。植物修复技术, 作为一种成本低、环境友好、可进行原位修复的措施在土壤重金属污染治理中表现出良

好的应用前景^[2]。然而, 随着研究的不断深入和延伸, 将这种技术大规模应用于土壤重金属的实际治理中还为时过早。单一的植物修复技术存在诸多不足之处, 如重金属胁迫下植物生物量小、生长缓慢且对重金属的耐受性有限^[3]等问题。植物-微生物联合修复技术利用微生物-植物的共生关系或共存关系, 充分发挥结合植物修复和微生物修复技术的各自优势, 提高重金属污染土壤的修复效率, 表现出良好的应用潜力。

植物促生菌(Plant growth-promoting bacteria, PGPB)是一类自由生活在土壤或根系周围的有益

微生物,能够缓解重金属对植物的毒害,促进植物生长并影响重金属迁移,在植物-微生物联合修复过程中发挥着重要的作用。PGPB 能通过产生植物生长激素如 IAA (Indole acetic acid),促进植物根系中侧根和不定根的生长,从而促进植物对环境矿物元素和营养的吸收^[4];通过产生 ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid)脱氨酶能降低乙烯的前体物质 ACC 的浓度,从而降低植物逆境胁迫(旱涝、重金属胁迫、高盐环境等)下乙烯的浓度水平^[5]。在重金属污染土壤中,部分 PGPB 还具有溶磷能力和产铁载体能力,将土壤中难溶性磷转化为可溶性磷,或与铁结合则形成可溶性铁-嗜铁素复合体,提高土壤中可溶性磷和铁的含量,从而促进植物更好的吸收和利用^[6]。此外,PGPB 还能通过根系代谢活动及其分泌物促进重金属的溶解,提高重金属在土壤中的生物有效性,促进植物对重金属的吸收与富集^[7]。

然而,目前利用 PGPB 强化植物修复重金属污染土壤的研究主要停留在修复效果的评价上,大多关注于 PGPB 对植物生物量、重金属累积量和土壤重金属迁移量的影响,而 PGPB 作为外源微生物引入对土壤原有微生物群落及其生态效应还不清楚^[8]。采用植物-微生物联合技术修复土壤重金属污染,对 PGPB 的选择上不仅要保证其自身能在污染环境中生存繁殖,也要考虑这些菌株对生态环境可能造成的潜在危害。从污染土壤中原位分离土著 PGPB 强化植物修复,不仅使本土物种能够更好地适应当地特定环境,而且能够尽量避免非本土化的生态风险^[9]。

德兴铜矿位于江西省德兴市,是亚洲最大的露天铜矿,已有 40 余年的采矿历史^[10]。鄱阳湖-乐安河(德兴段)是该区重要的河流,主要汇集了矿区酸性废水、尾砂库废水、居民生活污水、工业废水等,流经戴村等多个村庄,下游有大量的农田,对周边生态环境及人类健康造成严重威胁。本研究从乐安河区域受 Cu、Zn、Pb 等多种重金属污染严重的湿地中分离筛选获得一批具有

Cu、Zn、Pb 复合抗性的土著菌株。通过测定菌株的促生特性(IAA、溶磷、铁载体、ACC 脱氨酶活性),进一步挑选具有较好促生能力的菌株,同时测定其抗性能力(重金属、酸碱、盐及抗生素),并基于 16S rRNA 基因序列及表型分析鉴定其种属。以期得到一批优势的土著植物促生菌,为进一步利用微生物-植物联合修复鄱阳湖-乐安河流域湿地重金属污染提供一批微生物资源。

1 材料与方法

1.1 培养基、主要试剂和仪器

NA (Nutrient agar)培养基^[11]、CAS (Chromocult S)固体培养基^[12]、PKO (Pikovaskia's)固体培养基^[13]。

DNA 标准分子量 Marker、Taq 酶、PCR 扩增引物,大连 TaKaRa 公司;其余试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。恒温培养箱振荡器购自上海智城分析仪器制造公司;PCR 扩增仪购自美国 Applied Biosystems;分光光度计购自上海元析仪器有限公司。

1.2 供试菌株的筛选

1.2.1 样地介绍

样品采集于江西省戴村(28°92'N, 117°48'E),该地区位于乐安河(德兴段)流域,该河常年受到上游德兴铜矿酸矿废水排放等污染,流经下游村庄及大量农田。本实验选取使用乐安河水进行灌溉的表层农田土壤,沿着乐安河流域戴村地区上游至下游采集了 9 个土壤样品和 5 个水样。将样品在 24 h 内带回实验室进行处理。基于前期研究数据,采样区域所受到的重金属污染主要有 Cu (319.50–2 435.39 mg/kg)、Zn (673.72–650.17 mg/kg)和 Pb (305.89–1 110.72 mg/kg),因此后续研究选用这 3 种重金属筛选菌株。

1.2.2 菌株筛选

将采集的 10 g 土样置于 100 mL 灭菌生理盐水的锥形瓶中,在 28 °C、180 r/min 振荡 30 min,使

细菌从土壤样品上充分洗脱下来,静置 20 min。使用 CuSO_4 、 ZnSO_4 、 PbNO_3 分别配制 Cu、Zn、Pb 重金属母盐溶液,无菌操作台下过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,吸取 1 mL 土壤上清液加入到含有 3 种重金属(Cu 10 mg/L、Zn 100 mg/L、Pb 200 mg/L)的 SMS (Sucrose-minimal salts)液体培养基中^[14], 28 °C、180 r/min 培养 72 h。再取培养液涂布到含有 3 种重金属浓度 Cu 10 mg/L、Zn 100 mg/L、Pb 200 mg/L 的 SMS 固体平板上,待长出菌落后,逐步提高 3 种重金属浓度至 Cu 50 mg/L、Zn 400 mg/L、Pb 800 mg/L,依次接种到重金属浓度更高的固体平板上培养,挑选耐重金属能力最强的单菌落在平板上划线转接 3 次以上进行菌种纯化,并于 15% 甘油中-80 °C 保存,以便进行后续实验。

1.3 促生特性测定

1.3.1 产 IAA 能力测定

采用 Salkowski 比色法^[15]测定 IAA 含量,分别配制含色氨酸溶液为 0、100、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的 NA 液体培养基。接种待测菌株于不同处理中,置于 28 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6,5 500 $\times g$ 离心 10 min,取 0.5 mL 上清液加入 2 mL Salkowski 显色剂,室温静置 20 min,在 540 nm 波长条件下测定其 OD 值。通过 IAA 浓度与 OD_{540} 的标准关系曲线计算相应的 IAA 浓度,每组实验重复 3 次。

1.3.2 溶磷能力测定

将菌株点接于 PKO 固体培养基上,每个平板 4 个重复,于 28 °C 培养箱中培养 3–5 d。观察 PKO 培养基上透明圈的出现和大小。若无溶磷圈的产生则该菌株无溶磷能力;若产生溶磷圈则测定溶磷直径(D)、菌落直径(d),根据 D/d 的比值大小判断菌株溶磷能力^[16]。

1.3.3 产铁载体能力测定

将菌株点接至 CAS 平板上,每个平板 4 个重复,28 °C 培养 3–5 d。观察蓝色 CAS 培养基上橙黄色晕圈的出现和大小。若无橙黄色晕圈的产生则该菌株无产铁载体能力;若产生橙黄色晕圈则测定晕圈直径(D)、菌落直径(d),根据 D/d 的比值

大小判断菌株溶磷能力。

1.3.4 产 ACC 脱氨酶能力测定

参照 Honma 等^[17]的方法测定 ACC 脱氨酶活性,用蒸馏水作为空白对照,测定 OD_{540} 值。采用 Bradford 比色法测定酶蛋白浓度^[18]。以每分钟形成 1 μmol α -丁酮酸的活性作为 ACC 脱氨酶的单位活性。分别选用被广泛报道的植物促生菌 *Pseudomonas putida* UW4^[19-20] 与非植物促生菌 *P. fluorescens* 17400^[21] 作为阳性与阴性对照。

1.4 菌株 16S rRNA 基因序列分析

采用 CTAB 法^[22]提取菌体基因组 DNA,PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因。选用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[23]。PCR 反应体系(50 μL): DNA 2 μL , 10 \times Buffer 5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 3 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1 μL , 引物 27F 和 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , *Taq* 酶(5 U/ μL) 0.5 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将所得基因序列提交 GenBank 数据库比对并获得序列号(表 1)。

表 1 菌株 GenBank 登录号

Table 1 GenBank accession numbers of strains

菌株编号 Strain code	登录号 Accession No.
S4-3	KY357351
S6-4	KY357348
S6-9	KY357356
S6-12	KY357355
S6-13	KY357350
S8-1	KY357352
S9-7	KY357353
S9-15	KY357354
W1-18	KY357349
W4-18	KY357347

1.5 菌株的抗性能力测定

1.5.1 重金属抗性测定

将通过高压蒸汽灭菌的 SLP (Sucrose-minimal salts lowphosphate)^[24]培养基和在无菌操作台下过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌的重金属盐母液混匀, 倒平板。配制重金属浓度范围为 Cu 10–200 mg/L, Zn 1 000–6 000 mg/L, Pb 300–800 mg/L。以不添加任何重金属的 SLP 培养基为对照。吸取 5 μL 菌液点接于不同处理的培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察是否有菌落生成并记录重金属对菌株的最小抑制浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)。

1.5.2 抗生素抗性测定

将菌株分别接种到添加了四环素、链霉素、氨苄青霉素、氯霉素和萘啶酮酸(0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌)的 NA 液体培养基中, 抗生素浓度范围为 10–1 000 mg/L, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察生长状况并记录抗生素对菌株的 MIC。

1.5.3 耐盐能力测定

分别配制含 NaCl 浓度 1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%的 NA 液体培养基, 将菌株接种在不同浓度 NaCl 的 NA 培养基上, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养观察生长状况并记录数据。

1.5.4 耐酸碱能力测定

设置 pH 分别为 4.0、5.5、7.2、9.0、11.0 的 NA 液体培养基, 用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调至设定值, 经过高温灭菌后再次调节 pH 至设定值。将活化好的菌株接种至不同 pH 的 NA 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养观察生长状况并记录数据。

1.6 数据处理

使用 Microsoft excel 2010 和 SPSS 20 统计软件进行数据处理, 差异性分析采用 Duncan-test 法进行运算。采用 NTSYS-pc 2.1 对菌株抗性进行分析, 用非加权配对算术平均法(Unweighted pair group mean average, UPGMA)生成聚类分析图。使用 MEGA 7 按照 Neighbor-Joining 法将分离菌株和参比菌株构建基于 16S rRNA 基因的系统发育树。使用 DNAMAN 对测序序列与参比序列进行序

列相似性比较。使用 Canoco 5 对菌株促生特性和抗性进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

在第 1 次分离浓度(Cu 10 mg/L, Pb 200 mg/L, Zn 100 mg/L)下, 从所有样品中分离出 210 株耐受菌株, 逐步提高重金属浓度至第 3 次分离浓度(Cu 50 mg/L、Pb 800 mg/L、Zn 400 mg/L)下有 22 株菌能够生长。其中水体样品分离到 4 个菌株, 土壤样品分离到 18 个菌株。

2.2 促生特性测定

将分离得到的 22 株菌进一步进行促植物生长特性的测定, 其中有 10 株菌表现出较好的促植物生长特性(表 2), 选择这 10 株菌进行后续研究。

2.2.1 产 IAA 能力

分别在不同色氨酸浓度测定菌株 IAA 的产量。10 株菌中 9 株菌具有产生 IAA 的能力, 且随着色氨酸浓度的增加 IAA 产量都呈现升高趋势, 其中 S9-15 不产生 IAA。菌株 S4-3、S6-9、S6-12 在不同色氨酸浓度下 IAA 的产量均较高, 在 500 $\mu\text{g/mL}$ 的色氨酸浓度下 IAA 产量均大于 40 $\mu\text{g/mL}$; 菌株 S8-1、W1-18、W4-18 在不同色氨酸浓度下产 IAA 能力相对较弱, 在 500 $\mu\text{g/mL}$ 的色氨酸浓度下 W1-18 产 IAA 能力最弱(表 2)。

2.2.2 溶磷能力

10 株菌中只有 4 株菌具有溶磷能力, 分别为 S6-4、S6-9、S6-13、W4-18。这 4 株菌的溶磷能力相差不大, D/d 的比值范围均在 1–2 之间(表 2)。

2.2.3 产铁载体能力

10 株菌中只有 3 株菌具有产铁载体的能力, 分别为 S8-1、S9-7、S9-15, 其 D/d 比值为 1.71、1.69、1.48 (表 2)。

2.2.4 ACC 脱氨酶活性

10 株菌中有 9 株菌表现出 ACC 脱氨酶的活性, 只有 S4-3 没有表现出 ACC 脱氨酶的活性(表 2)。与阳性菌株 UW4 比较, 菌株 ACC 脱氨酶活性较低, 只有 W1-18 与 UW4 酶活力表现相当。

表 2 10 株菌的植物促生特性
Table 2 Plant growth promoting characteristics of 10 selected isolates

菌株编号 Strain code	IAA 产量 IAA production (μg/mL)				溶磷 Phosphate-solubilizing	铁载体 Siderophores	ACC 脱氨酶 ACC Deaminase
	0 μg/mL Try	100 μg/mL Try	250 μg/mL Try	500 μg/mL Try			
S4-3	1.61±0.07b	9.44±1.37a	19.05±2.57bc	42.92±6.90ab	—	—	—
S6-4	1.50±0.28b	3.56±1.00c	15.77±1.65c	38.09±2.75b	1.45±0.02b	—	0.63±0.03c
S6-9	0.71±0.07c	9.56±2.81a	38.36±4.17a	45.50±0.60a	1.55±0.14b	—	0.66±0.01c
S6-12	1.82±0.23b	11.38±0.48a	24.30±2.02b	40.67±2.95ab	—	—	0.68±0.01c
S6-13	0.95±0.12c	5.89±1.68b	21.18±5.66bc	39.38±8.49ab	1.40±0.05b	—	0.59±0.02c
S8-1	0.97±0.29c	2.12±0.10cd	3.27±0.32d	12.09±2.05d	—	1.71±0.04	1.11±0.02b
S9-7	0.89±0.20c	3.20±0.86c	17.58±4.84c	27.89±2.47c	—	1.69±0.03	0.26±0.02d
S9-15	—	—	—	—	—	1.48±0.09	1.10±0.03b
W1-18	0.79±0.46c	1.39±0.17cd	2.86±0.78d	6.92±1.79d	—	—	2.27±0.22a
W4-18	0.58±0.07c	1.77±0.73cd	2.94±0.16d	6.92±1.79d	1.99±0.34a	—	0.62±0.13c
UW4	1.49±0.07b	1.95±0.17cd	2.95±0.15d	5.02±0.46e	—	—	2.35±0.02a
17400	2.54±0.31a	3.13±0.04c	4.53±0.41d	6.33±0.46d	—	—	—

注：—：菌株无该能力；Try：色氨酸。
Note: —: Strains do not have this ability; Try: Tryptophane.

2.3 16S rRNA 基因序列分析

对 10 株具有较好植物促生特性的菌株进行 16S rRNA 基因片段扩增，将 PCR 产物测序，并提交 GenBank 与序列相似性较高的模式菌株进行序列比对，构建系统发育树(图 1)。结果显示，10 株菌分布于 5 个属，4 株为劳尔氏菌属(*Ralstonia* sp.)、3 株为伯克霍尔德菌属(*Burkholderia* sp.)、1 株为嗜铜菌属(*Cupriavidus* sp.)、1 株寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)和 1 株新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium* sp.)中。菌株 S6-4、S6-9、S6-13、W1-18 同属于 *Ralstonia* sp.，其中 S6-4 与 *R. pickettii* ATCC 27511^T 在同一个分支，其相似性为 99.78%，菌株 S6-9、S6-13、W1-18 与 *R. mannitolilytica* CSIB3-10 KU305707^T 属于一个分支，3 株菌与参比菌株的相似性均大于 99.7%。菌株 S8-1 与 *B. cepacia* ATCC 25416^T 的相似性为 99.93%，S9-7 和 S9-15 与 *B. seminalis* R-24196^T 相似性均大于 99.6%。菌株 S6-12、S4-3、W4-18 与其所在分支中参比菌株 *C. necator* N-1^T、*S. maltophilia* McS10^T 和

N. capsulatum D16147^T 的相似性分别为 99.69%、99.93%、99.10%。

2.4 抗性分析

2.4.1 重金属抗性

筛选的菌株对 Cu、Zn、Pb 均有一定耐受性。其中 W4-18 对 Cu 的耐受能力最强，可耐受 Cu 浓度为 200 mg/L。菌株 S8-1、S9-7、S9-15 对 Zn 和 Pb 均表现出最强的耐受能力，分别可以耐受 Zn 的浓度为 800 mg/L，耐受 Pb 的浓度为 6 000 mg/L (表 3)。

2.4.2 抗生素抗性

菌株对不同抗生素的耐受能力差异较大，普遍对氨苄青霉素和链霉素具有较强的抗性，而对四环素、氯霉素和萘啶酮酸的抗性较弱。在氨苄青霉素和链霉素抗性测定中，9 株菌均表现出抗性，其中 S8-1、S9-7、S9-15 对这 2 种抗生素能耐受最高浓度 1 000 mg/L (表 3)。在四环素、氯霉素、萘啶酮酸处理下，分别有 4、3、2 株菌能存活，且 MIC 值也较低。

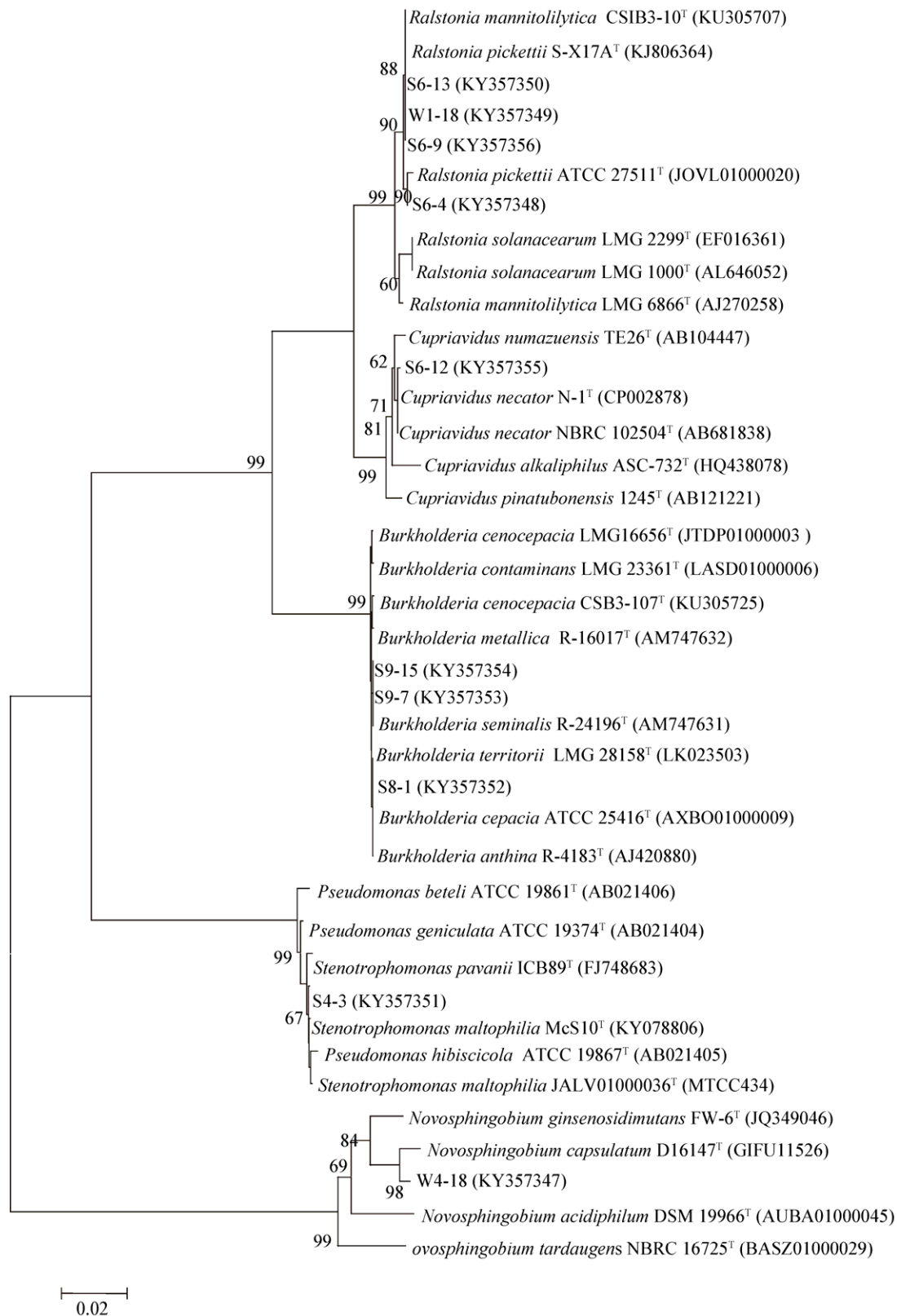


图 1 基于 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene

表 3 分离菌株的重金属、抗生素、酸碱和盐耐受的最小抑制浓度(MIC)

Table 3 Minimum inhibition concentration (MIC) of heavy metals, antibiotics, acid/alkali resistance and salt tolerance of the isolated strains

菌株编号 Strain code	重金属最小抑制浓度			抗生素最小抑制浓度					pH	NaCl inhibit concentration (%)
	MIC of heavy metals (mg/L)			MIC of antibiotic (mg/L)						
	Cu	Zn	Pb	四环素 Tc	氨苄青霉素 Amp	氯霉素 Cm	链霉素 Str	萘啶酮酸 Nal		
S4-3	75	1 200	400	—	800	—	>1 000	—	5.5–9.0	3.0
S6-4	75	2 400	500	—	800	50	800	—	5.5–7.2	2.0
S6-9	100	2 800	500	—	1 000	50	1 000	—	5.5–7.2	2.0
S6-12	30	2 000	500	—	—	—	300	—	5.5–7.2	3.0
S6-13	100	2 400	500	50	800	—	500	—	5.5–7.2	3.0
S8-1	75	>6 000	800	50	>1 000	—	>1 000	—	4.0–7.2	2.5
S9-7	150	>6 000	800	50	>1 000	—	>1 000	—	4.0–7.2	1.5
S9-15	150	>6 000	800	50	>1 000	—	>1 000	50	4.0–9.0	3.0
W1-18	100	1 200	400	—	800	50	300	100	5.5–7.2	3.0
W4-18	200	1 800	600	—	800	50	—	—	5.5–9.0	4.0

注：—：菌株不能正常生长；>：菌株在更高浓度下仍能生长。

Note: —: The strains are unable to grow well; >: The strains are able to grow at a higher concentration than that used.

2.4.3 耐酸碱能力

将菌株接种在 pH 4.0–11.0 的培养基中，在 pH 5.5–7.2 的培养基中菌株均能正常生长，在 pH 4.0 时菌株 S8-1、S9-7、S9-1 能够生长。在 pH 9.0 时菌株 S4-3 和 S9-15 能够生长，而在 pH 11.0 时，所测定菌株均不能正常生长(表 3)。由此可知，10 株菌普遍能在偏酸的环境下生长。

2.4.4 耐盐能力

将菌株接种至盐浓度 1%–5% 的培养基下观察，6 株菌能在 3% 盐浓度下生长，而在 4% 的盐浓度下只有菌株 W4-18 能生长(表 3)。

2.5 菌株抗性聚类分析

使用 NTSYS-2.0 对菌株抗性数据进行分析，得到 10 株菌聚类树状图。以相似系数 0.76 为阈值，可以将 10 株菌分为 4 个类群，其中 *Ralstonia* sp. S6-4、S6-9、S6-13、W1-18 和 *Cupriavidus* sp. S6-12 组成分支 1；*Burkholderia* sp. S8-1、S9-7、

S9-15 构成分支 2；*Stenotrophomonas* sp. S4-3 与 *Novosphingobium* sp. W4-18 分别形成独立的分支(图 2)。除菌株 S6-12 之外，各菌株基于抗性特征的聚类情况与其系统发育地位均表现一致(图 1)。

2.6 菌株抗性主成分分析(Principal components analysis, PCA)

PCA 图 3 中可知一二轴的解釋率分别为 36.08% 和 27.11%，10 株菌分为 5 类。其中 *Ralstonia* sp. S6-4、S6-9、S6-13、W1-18 聚在一起，*Burkholderia* sp. S8-1、S9-7、S9-15 聚为一类。*Stenotrophomonas* sp. S4-3、*Cupriavidus* sp. S6-12 和 *Novosphingobium* sp. W4-18 则单独聚为一类。这一结果与各菌株在系统发育树上的聚类情况完全吻合(图 3)。另外可知，*Burkholderia* sp. S8-1、S9-7、S9-15 受 Pb、Te、Zn 的影响较大，而 *Ralstonia* sp. S6-4、S6-9、S6-13 与 W1-18 则受 Str 影响较大。

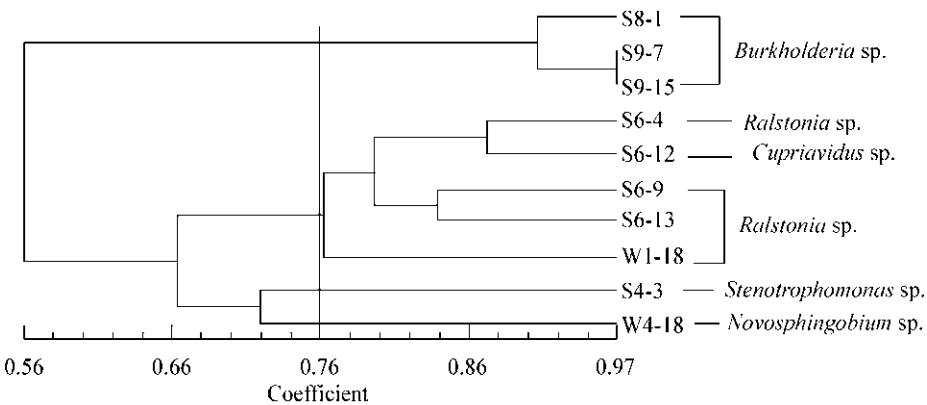


图 2 基于 10 菌株抗性 UPGMA 聚类树图
Figure 2 UPGMA clustering tree based on the resistant characteristics of the 10 selected strains

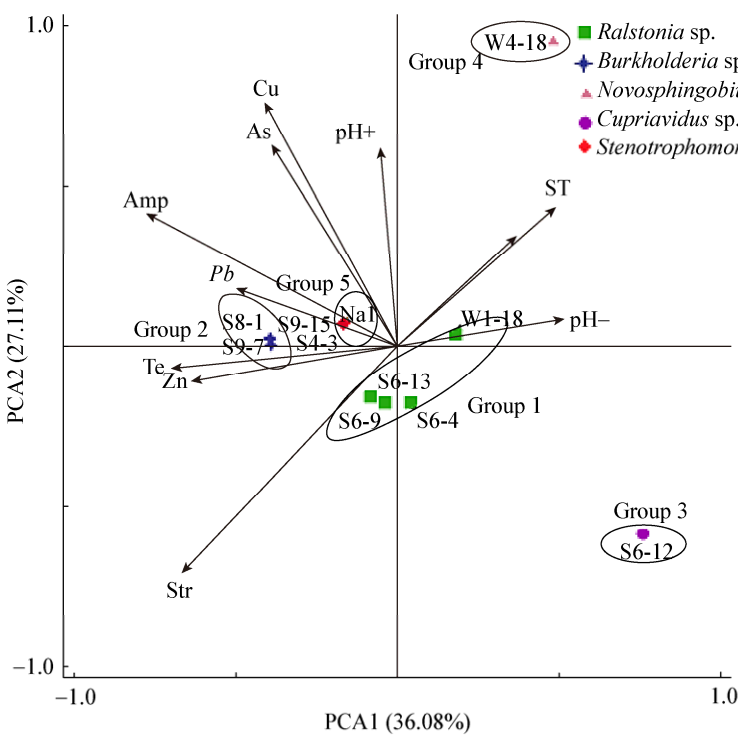


图 3 基于菌株抗性主成分分析
Figure 3 Principal component analyses of resistant characteristics of the 10 selected strains

注：pH+：pH 9.0 时菌株生长状况；pH-：pH 4.0 时菌株生长状况。

Note: pH+: The growth of strains at pH 9.0; pH-: The growth of strains at pH 4.0.

3 讨论与结论

重金属可以通过多种方式对微生物产生毒性作用，影响其体内的各种代谢活动^[25]。为适应重金属污染的环境，部分微生物在长期的进化过程中形成一系列解毒机制，逐渐具备了对于有毒重金

属的耐受性或抗性^[26]。例如，胞外金属离子内流、胞内的隔离作用和解毒作用以及促进金属离子外流和对胞内金属的转化作用等^[27]。通常情况下，从受重金属污染的环境中更容易分离筛选到能够耐受重金属的菌株^[28-29]。本研究从常年受重

金属污染的鄱阳湖-乐安河流域湿地中分离得到 22 株对 Cu、Zn、Pb 3 种重金属具有复合抗性的菌株。Jiang 等^[24]筛选出一株对 Pb 和 Cd 表现出较高抗性的菌株 *Burkholderia* sp. J62, 其在 Pb (1 000 mg/L)、Cd (2 000 mg/L)、Cu (100 mg/L)和 Zn (400 mg/L)的 SLP 培养基中生长良好。与之比较, 本研究中菌株的 Pb²⁺ (400–800 mg/L)抗性略小; 但均表现出更高的 Cu²⁺和 Zn²⁺抗性。

重金属污染环境中分离筛选的抗性菌株大都能表现出良好的促植物生长特性, 例如具有 ACC 脱氨酶、溶磷作用、产生 IAA、铁载体等^[30]。王璐等^[31]从铜矿废弃地分离出 2 株 Cu 耐受性菌株, 均表现出 ACC 脱氨酶活性、溶磷和 IAA 等促生特性。Navarro-Torre 等^[32]从重金属高污染地区分离出 48 株细菌, 其中大部分菌株能表现出多种重金属抗性, 所有菌株均具有促植物生长特性。本研究的 10 株菌中 9 株菌具有产 IAA 和 ACC 脱氨酶的能力; 7 株菌有 3 种促生特性, 表明这些菌株可能具有较好的促植物生长或提高植物胁迫的潜力。这些研究表明, 常年受到重金属污染的环境可能存在大量的同时具有重金属耐受性和促植物生长特性的土著优势菌株, 是一个潜在的可用于重金属污染修复的微生物资源库。

通过系统发育树可知, 10 株菌中有 4 株为劳尔氏菌属 (*Ralstonia* sp.)、3 株伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia* sp.), 这两个属占鉴定菌株的大多数 (70%)。有报道, 这两类菌在不同重金属污染下分布较为普遍, 且能表现出不同的促植物生长特性^[33]。如 Jiang 等^[24]从重金属污染的土壤中筛选获得一株伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia* sp. J62, 具备溶磷、产铁载体和 IAA 等促生特性。接种该菌到玉米和番茄与对照相比, 能显著增加植物生物量。本研究鉴定出的 3 株菌分别为嗜铜菌属 (*Cupriavidus* sp.)、新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium* sp.)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)。有研究表明, 陈雯等^[34]从胡杨林根际土壤中分离出菌株 *Cupriavidus* sp. N8, 该菌株对 3 种重金属

(Cu、Ni、Pb)表现出复合抗性, 且在 Cu 和 Zn 的胁迫下, 接种该菌的竹柳生物量比对照组显著增加。Pereira 等^[35]的研究中新鞘氨醇杆菌属 *Novosphingobium* sp. 1A8 是分离的耐受 3 种重金属 (Cd、Zn、As)的菌种中复合抗性最高的革兰氏阴性菌之一; 寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)在废水处理、污染水体修复及降解有机农药等方面也均表现出实际应用的潜力^[36]。

本研究中具有 3 种重金属抗性的菌株普遍能表现出对其他胁迫条件的耐受能力, 例如抗生素、酸碱、盐。这一结果表明, 重金属胁迫条件能够诱导菌株中协同调控机制的运行^[37]。例如, 重金属离子能够协同调控抗生素抗性基因, 进而降低菌株对抗生素的敏感度。de la Iglesia 等^[38]研究认为, 抗生素抗性基因的丰度与抗生素以及 As、Cu 等重金属污染程度显著相关, 表明 As、Cu 等重金属和抗生素的复合污染可以增加环境中抗性基因的丰度。陈光村^[39]的研究表明, 外界压力 (高温、低 pH 和一定的渗透压)下显著增加生物膜分泌更多的胞外物质, 与游离态 *P. putida* CZ1 相比, 其生物膜存在下对 Cu、Zn 的抗性分别增加 2 倍和 8 倍。

基于菌株抗性特征 (重金属、抗生素、pH 及盐)结果进行聚类及 PCA 分析, 发现通过这些表型特征能将大部分菌株很好地区分开, 且与各菌株相对应的系统发育地位高度一致。数值分类是一种被广泛应用的细菌分类方法, 其根据细菌生理生化指标的相似性来判断细菌种属间的亲缘性。本研究结果表明, 对于重金属抗性菌株, 利用其不同抗性指标进行数值分类或许也是一个很好的鉴定方法。本研究中, 劳尔氏菌属 (*Ralstonia* sp.)和伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia* sp.)与其他种属菌株表现出的抗性差异主要体现在对 Zn、Pb、四环素、氨苄青霉素和链霉素的抗性上。因此, 借助抗性指标对细菌进行分类鉴定, 能够在生理生化水平上为菌株鉴定提供更多信息。然而, 基于生理生化指标鉴定菌株的结果有时与分子遗传学

手段鉴定结果不一致。例如, 基因水平转移 (Horizontal gene transfer, HGT) 会导致某些基因引入新的宿主, 赋予其新的表型和生物功能^[40]。随着现代分子生物学技术的发展, 16S rRNA 基因测序具有快速、简便、灵敏等优点受到广泛使用, 但其理论程度较高, 影响因素也较多, 对操作者要求很高^[41]。因此在对菌株种属鉴定时, 应采用多种方法相结合的方式, 互相弥补、互相印证。

本研究通过从重金属污染土壤和水体中筛选出了一批具有 Cu、Zn、Pb 复合抗性和多种促植物生长特性的菌株。在实际利用植物-微生物联合修复重金属污染土壤时, PGPB 对植物生长的实际应用效果是检验该菌促植物生长的重要标准, 对构建植物-微生物联合体起着至关重要的作用^[42]。因此, 在后续研究拟将进行植物盆栽实验观察菌株的实际促植物生长效果。另外, 选取不同植物进行菌株促植物生长实验, 以期得到最好的植物-微生物联合体, 提高对重金属污染土壤的修复效率。

REFERENCES

- [1] Cheng JM, Zhang Y, Wang Y. Potential environmental problems resulted from contaminated farmland and solution for land consolidation in China[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(16): 1-6 (in Chinese)
成杰民, 张英, 王岩. 中国污染农地整理工程的环境问题及解决途径[J]. 农业工程学报, 2016, 32(16): 1-6
- [2] Stefanowicz AM, Niklińska M, Laskowski R. Pollution-induced tolerance of soil bacterial communities in meadow and forest ecosystems polluted with heavy metals[J]. European Journal of Soil Biology, 2009, 45(4): 363-369
- [3] Huo W, Cai QS. The advance of the enhancement of plant heavy metal resistance by plant growth-promote bacteria[J]. Microbiology China, 2010, 37(9): 1374-1378 (in Chinese)
霍伟, 蔡庆生. 植物促生菌提高植物重金属耐受性研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1374-1378
- [4] Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3795-3801
- [5] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances[J]. Plant Journal, 2008, 54(4): 621-639
- [6] Glick BR, Cheng ZY, Czarny J, et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria[J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 119(3): 329-339
- [7] Guo JK, Dong MF, Ding YZ, et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on plants heavy metal uptake and transport: a review[J]. Ecology and Environment Sciences, 2015, 24(7): 1228-1234 (in Chinese)
郭军康, 董明芳, 丁永祯, 等. 根际促生菌影响植物吸收和转运重金属的研究进展[J]. 生态环境学报, 2015, 24(7): 1228-1234
- [8] Kong ZY, Glick BR. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation[J]. Advances in Microbial Physiology, 2017, 71: 97-132
- [9] Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, et al. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges[J]. Plant Science, 2009, 176(1): 20-30
- [10] Chang YH, Zhao YY, Cao C, et al. Characteristics of heavy metals content and assessment of health risk in different environment media in the Dexing copper mining area[J]. Acta Geologica Sinica, 2015, 89(5): 889-908 (in Chinese)
常玉虎, 赵元艺, 曹冲, 等. 德兴铜矿区主要流域内环境介质中重金属含量特征与健康风险评价[J]. 地质学报, 2015, 89(5): 889-908
- [11] Deng ZS, Zhao LF, Kong ZY, et al. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(3): 463-475
- [12] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [13] Gull M, Hafeez FY, Saleem M, et al. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2004, 44(6): 623-628
- [14] Sheng XF, Chen XB, He LY. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(2): 88-95
- [15] Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid[J]. Plant Physiology, 1951, 26(1): 192-195
- [16] Katznelson H, Bose B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1959, 5(1): 79-85
- [17] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1978, 42(10): 1825-1831
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [19] Glick BR, Karaturović DM, Newell PC. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(6): 533-536
- [20] Duan J, Jiang W, Cheng ZY, et al. The complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58640
- [21] Shah S, Li JP, Moffatt BA, et al. Isolation and characterization of

- ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(9): 833-843
- [22] Mirimin L, Roodt-wilding R. Testing and validating a modified CTAB DNA extraction method to enable molecular parentage analysis of fertilized eggs and larvae of an emerging South African aquaculture species, the dusky kob *Argyrosomus japonicus*[J]. Journal of Fish Biology, 2015, 86(3): 1218-1223
- [23] Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223(1): 47-51
- [24] Jiang CY, Sheng XF, Qian M, et al. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil[J]. Chemosphere, 2008, 72(2): 157-164
- [25] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(1): 55-63
- [26] Shaw DR, Dussan J. Mathematical modelling of toxic metal uptake and efflux pump in metal-resistant bacterium *Bacillus cereus* isolated from heavy crude oil[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2015, 226(4): 112
- [27] Rajkumar M, Ae N, Freitas H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction[J]. Chemosphere, 2009, 77(2): 153-160
- [28] Jiang CY, Sheng XF, He LY, et al. Isolation and characteristics of heavy metal-resistant strain WS34 and its effects on the phytoremediation of soils contaminated with lead and cadmium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(10): 1961-1968 (in Chinese)
江春玉, 盛下放, 何琳燕, 等. 一株铅铜抗性菌株 WS34 的生物学特性及其对植物修复铅铜污染土壤的强化作用[J]. 环境科学学报, 2008, 28(10): 1961-1968
- [29] Rasmussen LD, Sørensen SJ. The effect of long term exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment[J]. Current Microbiology, 1998, 36(5): 291-297
- [30] Ullah A, Heng S, Munis MFH, et al. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review[J]. Environmental and Experimental Botany, 2015, 117: 28-40
- [31] Wang L, He LY, Sheng XF. Isolation of endophytic bacteria from roots of Cu-tolerant *Sorghum sudanense* and their biological characteristics[J]. Soils, 2016, 48(1): 95-101 (in Chinese)
王璐, 何琳燕, 盛下放. 耐铜苏丹草根内生细菌的分离筛选及其生物学特性研究[J]. 土壤, 2016, 48(1): 95-101
- [32] Navarro-Torre S, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, et al. Isolation of plant-growth-promoting and metal-resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 110(1): 133-142
- [33] Karami A, Shamsuddin ZH. Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(25): 3689-3698
- [34] Chen W, Ouyang LM, Kong PJ, et al. Rhizospheric bacteria of *Populus euphratica* improve resistance of wood plants to heavy metals[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(9): 2811-2816 (in Chinese)
陈雯, 欧阳立明, 孔沛筠, 等. 胡杨根际细菌提高木本植物对重金属胁迫的耐受性[J]. 应用生态学报, 2015, 26(9): 2811-2816
- [35] Pereira SIA, Pires C, Henriques I, et al. Assessment of rhizospheric culturable bacteria of *Phragmites australis* and *Juncus effusus* from polluted sites[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(10): 1179-1190
- [36] Wang YL, Hua RM, Tang XY. Application of *Stenotrophomonas* in environmental protection[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(28): 15796-15797, 15800 (in Chinese)
王昀璐, 花日茂, 唐欣昀. 寡养单胞菌在环境保护中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15796-15797, 15800
- [37] Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance[J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(4): 176-182
- [38] de la Iglesia R, Valenzuela-Heredia D, Pavissich JP, et al. Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of bacterial copper P-type ATPases gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(6): 552-562
- [39] Chen GC. Molecular mechanisms of heavy metals tolerance and accumulation in unsaturated *Pseudomonas putida* CZ1 biofilm[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2011 (in Chinese)
陈光村. 恶臭假单胞菌 CZ1 非饱和和生物膜耐受和累积重金属的分子机制[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2011
- [40] Chen YT, Cheng N, Xu WT. Novel technologies for foodborne pathogenic microorganism detection[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(9): 3405-3413 (in Chinese)
陈玉婷, 程楠, 许文涛. 食源性致病微生物的检测新技术[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3405-3413
- [41] McDonald BR, Currie CR. Lateral gene transfer dynamics in the ancient bacterial genus *Streptomyces*[J]. mBio, 2017, 8(3): e00644-17
- [42] Wen XF, Yin LS, Zhang JF, et al. The research progress on plant-microorganism combined remediation of heavy metals-contaminated soil & sediments[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2016, 22(6): 82-84 (in Chinese)
文晓凤, 尹令实, 张金帆, 等. 植物-微生物联合修复重金属污染底泥/土壤的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2016, 22(6): 82-84