

研究报告

镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生性

李艳梅¹ 王琼瑶² 涂卫国² 崔永亮² 钟玘狄¹李俐珩¹ 陈强¹ 余秀梅^{1*}

(1. 四川农业大学资源学院微生物系 四川 成都 611130)

(2. 四川省自然资源科学研究院 四川 成都 610041)

摘要:【目的】挖掘镍耐受性强、产铁载体活性高的植物根际促生细菌, 研究镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生作用及其对花生吸收镍的影响。【方法】利用 CAS (Chrome azurol S) 培养基对花生根际产铁载体细菌定性筛选及定量测试获得产铁载体能力强的菌株, 16S rRNA 基因相似性及系统进化分析鉴定产铁载体细菌, 并用含 Ni^{2+} 牛肉膏蛋白胨培养基测试细菌对 Ni 的耐受性; 通过花生盆栽实验, 测试花生的株高、根长、生物量、氮磷钾含量及镍含量来分析镍胁迫下产铁载体细菌对花生的影响。【结果】从花生根际分离筛选产铁载体芽孢杆菌 5 株, 其中 HSGJ1 产铁载体能力最强, 培养 2 d 后产 156.56 mg/L 的铁载体。HSGJ1 对 Ni^{2+} 具有较强的耐受性, 最小致死浓度为 150 mg/L。在 50、100 mg/kg 的 Ni^{2+} 盆栽基质中, HSGJ1 能够有效地促进花生的生长、增加花生的生物量及氮磷钾含量, 并使花生根部和地上部分的镍含量降低。【结论】产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 是一株优良的植物根际促生细菌, 可应用于镍污染农耕土壤的作物种植中, 以提高作物在镍胁迫下的抗逆性, 降低作物对镍的富集量, 具有较好的应用价值。

关键词: 促生细菌, 铁载体, 镍, 花生

Growth promoting activity of siderophore secreting bacteria for peanut plant under nickel stress

LI Yan-Mei¹ WANG Qiong-Yao² TU Wei-Guo² CUI Yong-Liang² ZHONG Qi-Di¹
LI Li-Heng¹ CHEN Qiang¹ YU Xiu-Mei^{1*}

(1. Department of Microbiology, College of Resource Sciences, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Natural Resources Science Research Institute of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: [Objective] We explored plant growth promoting rhizobacteria with strong activity of resisting nickel and secreting siderophore, and studied their effect on promoting peanut plant growth and absorbing nickel. [Methods] Strains with strong siderophore secreting capacity were isolated from

Foundation item: Key Research Project in Sichuan Province (No. 2017SZ0087); Science and Technology Innovation Talent Project in Sichuan Province (No. 2017RZ0064)

*Corresponding author: Tel: 86-28-86290982; E-mail: yuxiumeicool@163.com

Received: November 01, 2016; **Accepted:** December 28, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 08, 2017
基金项目: 四川省重点研发项目(No. 2017SZ0087); 四川省科技创新苗子工程项目(No. 2017RZ0064)

*通讯作者: Tel: 86-28-86290982; E-mail: yuxiumeicool@163.com

收稿日期: 2016-11-01; **接受日期:** 2016-12-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-02-08

peanut rhizosphere by using qualitative and quantitative test of CAS (Chrome azurol S) medium. Siderophore secreting strains were identified by similarity and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene. Tolerance of siderophore secreting strains to nickel was measured by beef extract-peptone medium supplemented with nickel ion. In the pot experiment of peanut, effects of siderophore secreting strains on peanut plant was analyzed by measuring shoot height, root length, biomass and the content of nitrogen, phosphorus, potassium and nickel in peanut plant. **[Results]** Five *Bacillus* strains with siderophore secreting capacity were isolated from peanut rhizosphere. *Bacillus* sp. HSGJ1 showed the strongest siderophore secreting capacity among the five strains. It secreted 156.56 mg/L of siderophore after 2 days. *Bacillus* sp. HSGJ1 showed strong tolerance to nickel with 150 mg/L of minimum lethal concentration. HSGJ1 could promote plant growth, increase the biomass and nitrogen, phosphorus and potassium contents of peanut, and decrease the nickel content in the root and shoot of peanut plant in 50 and 100 mg/kg of Ni^{2+} in pot soil. **[Conclusion]** As a good plant growth promoting rhizobacterium, the siderophore secreting *Bacillus* sp. HSGJ1 can be applied for planting crop in the nickel contaminated soil to improve crop tolerance under nickel stress and decrease nickel accumulating in crop. Therefore, *Bacillus* sp. HSGJ1 shows good application value.

Keywords: Growth promoting bacteria, Siderophore, Nickel, Peanut

随着城市化和工业化的快速发展, 土壤重金属污染问题突出, 严重影响人类的生存环境。据调查, 我国近 $2 \times 10^{11} \text{ m}^2$ 的耕地受到重金属的污染, 约占总耕种面积 20%^[1]。重金属污染导致土壤作物产量和品质的下降, 还会引发地下水污染, 甚至通过“土壤-植物-人体”或“土壤-水-人体”^[2]食物链富集到人体, 严重威胁人类的生命健康。土壤重金属污染具有隐蔽性、长期性、不可降解、不可逆转等特点, 因此重金属污染与治理已成为国内外研究的热点和难点。

重金属污染土壤的修复有物理化学修复、生物修复和农业生态修复。其中, 生物修复具有成本低、效果好、无二次污染、操作简单等优点, 主要包括植物修复和微生物修复。微生物修复以微生物吸附、氧化还原、矿化重金属离子等方式来修复土壤中的重金属^[3-4]。植物根际促生菌可通过产铁载体、分泌吲哚乙酸(IAA)、固氮、溶磷、解钾等方式促进植物生长、改善重金属耐受性, 以提高植物修复重金属污染土壤的效率^[5-6]。微生物产生的铁载体^[7]对铁元素具有较高亲和力, 其不仅可以螯合 Fe^{3+} , 还可以螯合 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Zn^{2+} 等金属离子^[8]。重金属离子以主动运输或被动运输方式进入细胞产生毒害^[9], 而铁载体螯合重金属离子后形成的大分子物质无法进入细胞内, 从而提高

修复植物或土壤微生物对重金属的耐受性^[10]。同时, 在螯合反应中铁载体还能通过降低重金属的毒害作用来促进微生物产 IAA^[11]。植物根际微生物分泌高亲和性的铁载体可增加根际铁的供给量, 竞争性抑制重金属的根系吸收, 并抑制重金属元素向植物地上部分转运, 以促进植物的生长, 增加作物的生物量^[12]。

花生是一种铁敏感的植物, 缺铁的花生叶片会黄化, 严重时植株会矮化, 甚至不结果导致产量低^[13]。Jadhav 等研究报道, 产生铁载体的豇豆根瘤菌可有效地将土壤中不溶性铁转化为生物有效铁来补充花生植株的铁营养, 进而促进花生的生长, 提高叶绿素含量, 其与直接添加去铁敏 B 的效果相似^[14]。据调查, 镍在农耕土壤中平均含量为 26.12 mg/kg, 而镍对植物危害的极限值为 20 mg/kg^[15], 农耕土壤中过多的镍会影响植物生长, 同时还可通过食物链的富集作用转移到人体, 严重者可致癌^[16]。花生是我国重要的经济粮油作物, 年种植面积数百万公顷, 部分花生耕作地也受到不同程度的镍污染。然而, 镍污染土壤上的花生植株施用产铁载体细菌, 是否可以促进花生植株的生长并影响花生对镍的吸收还是一个尚未解答的问题。因此, 本研究从花生根际土中分离筛选出产铁载体能力强的细菌, 并通过花生盆栽实验分析镍胁迫下产铁载体菌株对

花生促生性及固定土壤中镍的作用,为镍污染农耕土壤作物种植提供可利用的微生物固定技术和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 花生植株的采集: 2015年6月,从攀枝花钒钛磁铁尾矿库边缘采集长势较好的花生植株。以花生植株为中心,以半径5 cm的范围,用铁铲将花生植株挖出,将其根部及包裹的土壤装入聚乙烯塑料袋中带回实验室。在超净工作台上,抖动根系(<2 mm)的土壤于无菌自封袋中,获得花生根际土样^[17]。

1.1.2 主要试剂和仪器: (1) 用于DNA提取的试剂: 异硫氰酸胍(GUTC),购自南京化学试剂股份有限公司; (2) 植物样品消煮试剂: 浓硫酸、30%过氧化氢,购自四川西陇化工有限公司; (3) 植物重金属测定试剂: 浓硝酸、高氯酸($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4=4:1$,体积比)混酸,购自国药集团化学试剂有限公司; 国家标准重金属液体Ni购于国家有色金属及电子材料分析测试中心; (4) 16S rRNA基因扩增引物由深圳华大基因公司合成。

HYQ系列双层恒温摇床,武汉汇诚生物技术有限公司; V-1100D分光光度计,上海美谱达仪器有限公司; Centrifuge 5148R离心机,艾本德中国有限公司; FP6410火焰光度计,上海精科仪器有限公司; PCR仪、凝胶成像系统、电泳仪, Bio-Rad公司; ICP-AES, 美国热电公司。

1.1.3 培养基: (1) 菌株的分离、纯化及保种培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基^[18]; (2) 产铁载体筛选培养基: CAS定性培养基^[19]和费氏定量基本培养基^[20]; (3) 耐镍筛选培养基: 将不同浓度的 Ni^{2+} 添加到牛肉膏蛋白胨培养基中; (4) LB液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0。所有培养基在用前 1×10^5 Pa灭菌30 min。

1.2 方法

1.2.1 产铁载体细菌的分离与筛选: 利用牛肉膏蛋白胨培养基的稀释平板涂布法^[18]分离花生根际细

菌,通过多次划线镜检获得根际细菌纯培养,并保存于牛肉膏斜面(-20°C)和30%甘油(-80°C)中。利用CAS检测法来定性和定量地筛选产铁载体细菌: 在CAS平板上点接10 μL 菌悬液后 28°C 恒温培养4–5 d,将菌斑周围产生黄色晕圈的菌株定性筛选为产铁载体阳性细菌^[21]; 将产铁载体阳性细菌新鲜菌液(1%)接种于费氏基本培养基中, 28°C 、150 r/min培养2 d,取上清液,用CAS检测液处理1 h后测 OD_{400} ,计算铁载体浓度(mg/L)。

1.2.2 产铁载体细菌的分子鉴定与系统进化分析: 用异硫氰酸胍(GUTC)法^[22]提取细菌的总DNA,并将总DNA保存在 -20°C 备用。16S rRNA基因的PCR扩增引物为27F (5'-AGAGTTTGATTGGCTCAG-3')和1492R (5'-TACGGTACCTTGTTACGACT-3')^[23]; PCR扩增体系(30 μL): 2 \times PCR mix 15 μL , 27F和1492R (10 $\mu\text{mol/L}$)引物各0.15 μL , DNA模板1 μL ,超纯水补至30 μL 。PCR扩增程序^[24]中退火温度为 54°C 。PCR扩增产物测序(深圳华大基因公司)后,将16S rRNA基因序列在GenBank数据库里进行BLASTn分析^[25]获得序列相似性及同源基因; 用MEGA 6.0软件的邻接法(Neighbor-Joining)对产铁载体细菌的16S rRNA基因序列构建系统发育树^[26]。

1.2.3 产铁载体细菌对镍的耐受性测试: 产铁载体细菌对 Ni^{2+} 的耐受性主要通过测定镍的最小致死浓度(MLC)^[27]来评价,即: 接种10 μL 新鲜菌液(10^8 CFU/mL)到 Ni^{2+} 浓度为10–200 mg/L的牛肉膏液体培养基中,并以接菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基作为对照, 28°C 、150 r/min培养2 d后测定 OD_{660} ,以培养液 OD_{660} 为零 Ni^{2+} 浓度作为镍对细菌的最小致死浓度(MLC)。

1.2.4 花生盆栽实验: 根据产铁载体细菌对 Ni^{2+} 的耐受性设置盆栽蛭石基质中 Ni^{2+} 的浓度为0、50、100、150 mg/kg的梯度,测试产铁载体细菌在不同浓度镍胁迫下的促生特性。先对种子进行表面灭菌^[28],用纱布包裹花生种子浸泡在95%的酒精30 s,浸泡灭菌0.1%的 HgCl_2 溶液5 min,无菌水清洗5–6次; 将种子播种在已进行灭菌(1×10^5 Pa灭菌30 min)处

理的改进的 Leonard Jar 装置^[29], 基质蛭石用含 Fe^{3+} 的营养液润湿, 下方塑料瓶装入含氮营养液。在植株长出土表 2 cm–3 cm, 接种优势产铁载体菌悬液 (10^8 个细胞) 1 mL 于植物根围, 同时在表面铺上已灭菌并干燥石英砂防止杂菌进入装置。每个处理 3 个重复, 并以不接菌的处理作为对照, 在光照室 (25 °C 光照 17 h 和 17 °C 黑暗 7 h) 种植 60 d 后收获。

1.2.5 评估指标与测试方法: 盆栽花生的评估指标主要包括株高、根长、干重、植株氮磷钾及镍含量。盆栽 60 d 后, 收获花生植株, 测定株高和根长; 收获的新鲜植株置于 105 °C 烘箱中杀青 30 min, 80 °C 烘干至恒重; 用硫酸-过氧化氢消煮法^[30]消煮粉碎的植物样品后测定植株氮、磷、钾含量: 全氮用溴酚蓝比色法测定, 全磷用钼锑抗比色法测定, 全钾用原子吸收火焰光度法测定^[31]; 花生植株镍含量用 ICP-AES^[32]测定。

1.2.6 实验数据分析方法: 实验数据用 Microsoft office 2010 进行均值和标准差的分析, 用 SPSS 17.0 进行显著性差异 ($P < 0.05$) 分析, 用 Sigmaplot 10.0 作图。

2 结果与分析

2.1 产铁载体细菌的分离纯化筛选

通过稀释涂布法纯化获得菌落形态、大小、颜色不同的花生根际细菌 21 株, 其中包括 19 株革兰氏阳性细菌和 2 株革兰氏阴性菌。在细菌产铁载体定性测试中, 5 株细菌在 CAS 平板上产生了大小不同的黄色晕圈, 说明其能产铁载体。细菌产铁载体定量测试说明这 5 株细菌培养 2 d 后产生的铁载体为 10.33–156.56 mg/L (表 1), 说明其产铁载体的能

力不同, 其中 HSGJ1 产铁载体能力最强。

2.2 产铁载体细菌对镍的耐受性测试

在耐镍细菌的平板筛选实验中, 这 5 株产铁载体细菌对 Ni^{2+} 表现出了不同的耐受性, 其中 HSGJ1 存活于 100 mg/kg 的 Ni^{2+} 牛肉膏蛋白胨平板上, 但菌斑略小于无 Ni 培养基上的对照菌斑, 而其他 4 株产铁载体细菌死亡, 说明其不能耐受高于 100 mg/kg 的 Ni^{2+} 。产铁载体细菌 HSGJ1 在 10–200 mg/L 的 Ni^{2+} 牛肉膏液体培养基中培养 2 d 后细胞浓度各不相同。当 Ni^{2+} 浓度达到 150 mg/L 时, 培养液中无菌细胞, 说明产铁载体细菌 HSGJ1 的最小致死浓度为 150 mg/L。

2.3 产铁载体菌株的系统发育分析

产铁载体菌株的 16S rRNA 基因测序后获得约 1 400 bp 的序列, 其在 GenBank 数据库中的 BLASTn 分析发现, 这 5 株产铁载体的 16S rRNA 基因与芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的 16S rRNA 基因的相似度达 99%–100% (表 1)。因此, 将这 5 株产铁载体细菌初步鉴定为芽孢杆菌, 并将这 5 株芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库获得相应的序列编号 (表 1)。用软件 MEGA 6.0 的邻接法 (Neighbour-Joining) 对 5 株产铁载体的菌株和 30 株芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的标准菌株 16S rRNA 基因构建系统发育树 (图 1), 这 5 株产铁载体菌株在系统发育树上与芽孢杆菌特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 聚在同一分支上, 说明他们的遗传距离近、同源性高, 但不能准确地将其鉴定为种水平。因此, 将这 5 株产

表 1 细菌产铁载体能力及 16S rRNA 基因相似性分析
Table 1 The siderophore secreting capacity and similarity analysis of 16S rRNA genes for strains

菌株编号 Strain No.	晕圈直径 Halo diameter (cm)	浓度 Concentration (mg/L)	长度 Length (bp)	序列编号 Sequence No.	序列号 Accession No.	同源性 Similarity (%)	属名 Genus name
HSGJ1	2.98	156.56	1 421	KJ739954	CP005881	100	<i>Bacillus</i>
HSGJ5	0.57	10.33	1 453	KJ733951	FJ253021	99	<i>Bacillus</i>
HSGJ8	0.74	19.17	1 429	KJ733958	JF411247	100	<i>Bacillus</i>
HSGJ13	0.85	20.08	1 430	KJ733970	JF411297	100	<i>Bacillus</i>
HSGJ19	2.53	105.33	1 419	KJ733955	CP005881	100	<i>Bacillus</i>

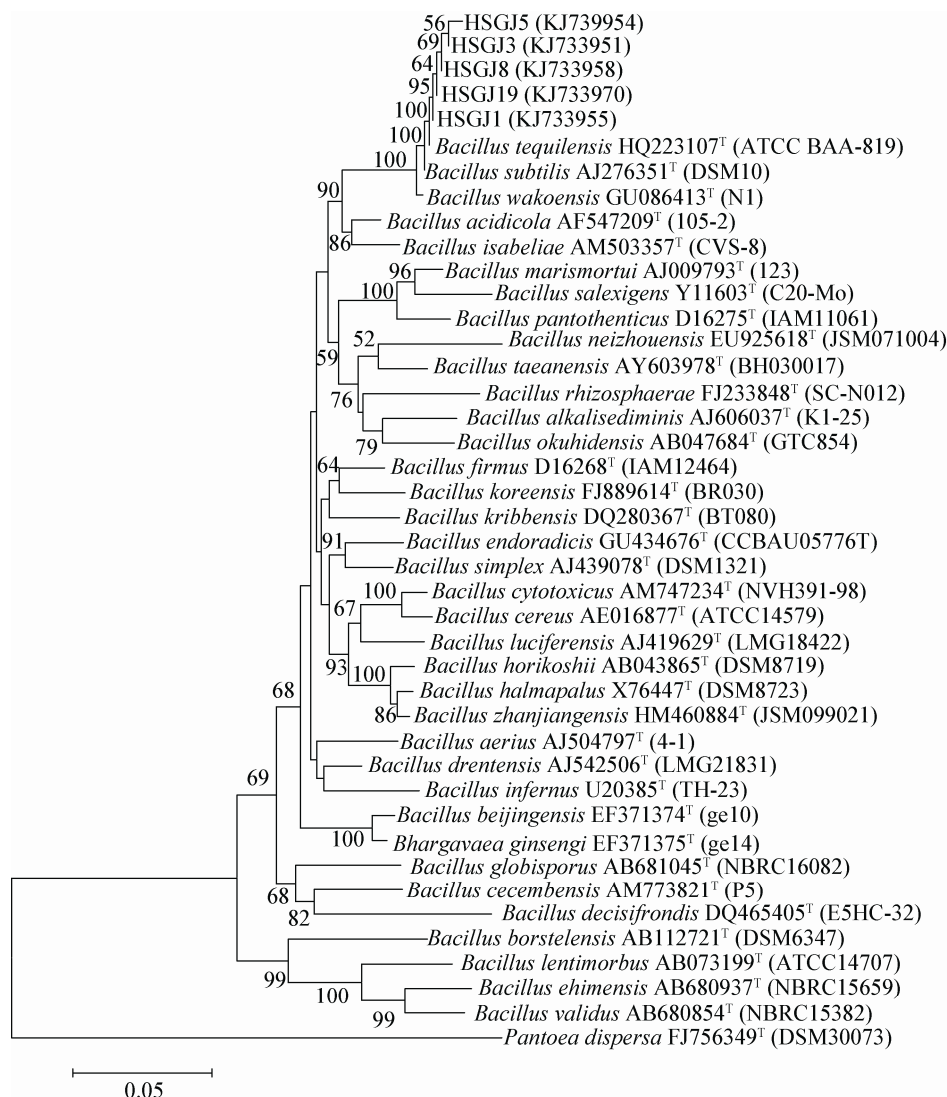


图1 产铁载体菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence for the siderophore secreting strains

注：括号里的数字为 GenBank 登录号；分支点上的数字为 Bootstrap 值，代表分类单位被聚在一起的几率；比例尺显示水平线的长度，代表碱基替换数；^T 代表标准菌株。

Note: Numbers in parentheses represent the sequence accession number. The numbers at the nodes indicate the level of bootstrap support (%) based on 1 000 resample data set, only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position. ^T: Type strains.

铁载体细菌鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。这 5 株产铁载体菌株在系统发育进化树上又分处于不同亚支，说明这 5 株产铁载体细菌各不相同。

2.4 花生的生长与营养状况

对不同 Ni^{2+} 浓度梯度胁迫下花生的生理指标测试表明：产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 能促进花生的生长并提高植株氮磷钾含量(表 2)。在没有 Ni 胁迫下，

接种 HSGJ1 的花生株高、根长、生物量及氮磷钾含量显著高于($P < 0.05$)不接菌的对照花生植株，且其长势和营养状况明显优于 Ni 胁迫下的植株。在盆栽基质中加入 50 mg/kg 和 100 mg/kg 的 Ni^{2+} 后，花生的生长明显被抑制，但是 HSGJ1 对花生仍然表现出了促生作用。在基质 Ni^{2+} 浓度为 50 mg/kg 时，花生的株高、根长和生物量分别比不接菌植株增加了

表 2 花生植株的生长与生理特征
Table 2 Growth and physiological feature of peanut plants

Ni 浓度 Ni concentration (mg/kg)	处理 Treatment	株高 Stem length (cm)	根长 Root length (cm)	生物量 Dry weight (g)	N 含量 N content (g/kg)	P 含量 P content (g/kg)	K 含量 K content (g/kg)
0	HTR3	34.45±1.06a	28.99±0.65a	3.64±0.74a	22.88±0.45a	2.41±0.07a	38.81±0.59a
	TR3	29.06±1.99a	24.70±0.80b	2.58±0.19a	20.37±0.21b	1.94±0.17b	30.55±0.31b
50	HTR3	31.02±2.49a	25.47±1.96a	2.27±0.50a	20.90±0.02a	2.01±0.15a	32.00±0.57a
	TR3	28.96±2.39a	22.37±2.81a	2.08±0.15a	18.47±0.32b	1.80±0.15a	25.85±0.54b
100	HTR3	30.62±1.96a	19.61±1.76a	1.99±0.12a	19.92±0.25a	1.98±0.14a	30.70±0.70a
	TR3	25.72±1.82a	17.72±1.00a	1.72±0.31a	17.53±0.27b	1.32±0.20b	23.23±0.52b
150	HTR3	24.87±1.60a	13.37±1.11a	1.10±0.02a	17.05±0.08a	1.23±0.15a	19.40±0.25a
	TR3	24.83±0.99a	13.95±0.32a	1.13±0.10a	17.22±0.11a	1.25±0.17a	19.77±0.59a

注: HTR3: 接种 HSGJ1; TR3: 不接菌的对照; 加粗字母: Ni 浓度为 0 mg/kg 的显著性差异; 斜体字母: Ni 浓度为 50 mg/kg 的显著性差异; 斜体加粗字母: Ni 浓度为 100 mg/kg 的显著性差异; 正常字母: Ni 浓度为 150 mg/kg 的显著性差异; 表中字母均是 $P<0.05$ 水平的显著性差异。

Note: HTR3: HSGJ1 inoculation; TR3: The control without inoculation; Bold letters: The significant difference at Ni concent of 0 mg/kg; Italic letters: The significant difference at Ni concent of 50 mg/kg; Italic and bold letters: The significant difference at Ni concent of 100 mg/kg; Normal letters: The significant difference at Ni concent of 150 mg/kg; Letters in table means significant difference at $P<0.05$.

7.1%、13.9%和 9.1%，花生氮磷钾的含量分别增加了 13.2%、11.7%和 23.8%。在基质中 Ni^{2+} 浓度为 100 mg/kg 时，花生的株高、根长和生物量分别比不接菌植株增加了 19.0%、10.6%和 15.7%，花生氮磷钾的含量分别增加了 13.0%、50.0%和 32.2%。与无 Ni 胁迫及低浓度 Ni^{2+} 胁迫下的花生相比，在含 150 mg/kg Ni^{2+} 的盆栽基质中的花生株高、根长、生物量及氮磷钾含量明显较低，且接种 HSGJ1 与不接

菌的对照植株不存在显著性差异($P<0.05$)。

2.5 花生植株镍含量测试

在花生盆栽实验中，基质中不加 Ni^{2+} 的花生植株中没有检测到镍元素。与未接菌的对照植株相比，接种产铁载体细菌 HSGJ1 可以显著降低花生地上部分和根部的 Ni 含量($P<0.05$) (图 2)。在盆栽基质 Ni^{2+} 浓度为 50、100 mg/kg 时，接种 HSGJ1 花生地下部分的 Ni 含量较对照植物分别降低了 68.9%和

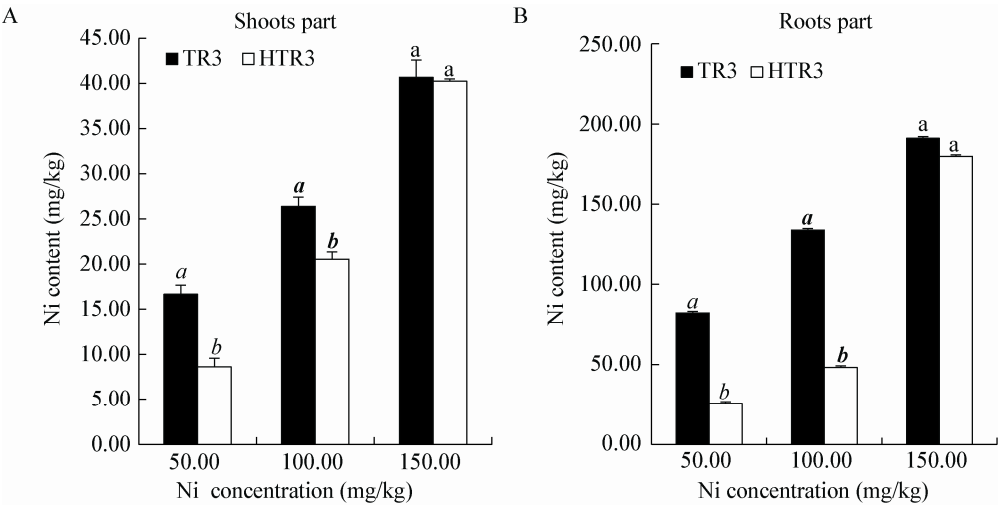


图 2 花生植株地上部分(A)和根部(B)的 Ni 含量

Figure 2 The nickel content in the shoots (A) and roots (B) of peanut plant

注: HTR3: 接种 HSGJ1; TR3: 不接菌的对照; 图中字母均是 $P<0.05$ 水平的显著性差异。
Note: HTR3: HSGJ1 inoculation; TR3: The control without inoculation; Letters in figure mean significant difference at $P<0.05$.

63.9%，而地上部分也分别降低了 48.3%和 22.1%。在基质 Ni^{2+} 含量为 150 mg/kg 时，花生地上部分和根部 Ni 含量较其他两个 Ni 浓度处理花生植株含量高，且接种产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 与不接菌的对照花生植株中的 Ni 含量不存在显著差异($P<0.05$)。

3 结论与讨论

产铁载体菌是促生性好的根际微生物，已被广泛应用到重金属的污染修复中。本研究分离到的产铁载体细菌是来源于矿区含镍土壤中的花生根际，因此其对镍有一定的耐受性。重金属镍是植物生长的微量营养元素，但过多的镍会给植物带来危害^[33]，而有些植物却是镍的富集体，比如车前草^[34]和 *Alyssum Linnaeus*^[35]。本研究分离筛选出产铁载体能力强的芽孢杆菌 HSGJ1，其培养 2 d 后产生铁载体的浓度为 156.56 mg/L，且其对 Ni^{2+} 具有较强的耐受性。因此，可将 HSGJ1 应用于有轻微 Ni 污染土壤的植物栽培种植中，具有较好的应用价值。

芽孢杆菌是一类分布广泛、功能多样化的微生物，但不同环境下产铁载体细菌各不相同。林天兴等^[36]从棉田土壤中分离获得的产铁载体细菌 SS05 属于莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)。朱彭玲等^[37]在新疆地区的根际棉土壤中捕获到 58 株产铁载体菌株，BOX-A1R 及 16S rRNA 基因测序分析供试菌株属于假单胞杆菌(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、短状杆菌属(*Brachybacterium*)和泛菌属(*Pantoea*)。本研究筛选获得的花生根际产铁载体细菌都属于芽孢杆菌(*Bacillus*)，其可能因为有芽孢休眠体具有较强的抗逆性而存活于矿区边缘的含镍土壤中。本研究分离获得的 5 株产铁载体菌株的 16S rRNA 基因相似性和系统进化分析表明其与芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* 和 *Bacillus subtilis* 高度同源。Gatson 等^[38]曾报道 *Bacillus tequilensis* 是一类与 *Bacillus subtilis* 密切相关的种属，具有很高的相似性，很难通过 16S rRNA 基因序列分析将其分开。Stackebrandt 等^[39]将大于 97%的 16S rRNA 基因序列相似性鉴定为同一种群，

但由于 16S rRNA 基因很难将 *Bacillus tequilensis* 和 *Bacillus subtilis* 鉴别开，因此只能将 HSGJ1 鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。本研究获得的 5 株产铁载体细菌与 *Bacillus tequilensis* 和 *Bacillus subtilis* 在系统进化树上虽聚为同一个分支，但在遗传距离上存在微小的差别，且这 5 株细菌产铁载体活性和对 Ni^{2+} 耐受能力各不相同，这都说明这 5 株产铁载体细菌是完全不同的芽孢杆菌(*Bacillus*)。

盆栽实验中，接种产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 的花生植株的生长、生物量及氮磷钾含量明显增加，这说明产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 具有较好的促生特性。同时，产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 能明显降低花生地上部分和根部的 Ni^{2+} 含量，这可能是由于 HSGJ1 产生铁载体螯合基质中的 Ni^{2+} ，从而抑制花生对镍的吸收。花生是对铁元素敏感的植物之一，铁能影响花生的氮素代谢和叶绿素的合成，并增强植株的抗病能力^[40]。重金属镍胁迫下会影响花生对 Fe 元素的吸收与利用，从而造成铁元素的缺失，使叶绿素的合成受阻，影响花生的生长^[41]。本研究筛选的产铁载体细菌接种到花生根际可以改善花生的缺铁症状，可能与其产生的铁载体螯合铁来摄取铁营养元素有关，从而增强花生抵抗重金属镍的毒害作用，有效促进了花生的生长。Tank 等^[42]报道在重金属 Ni 污染的土壤中接种产铁载体的根际促生菌能增加鹰嘴豆的生物量并使植物 Ni 含量降低 50%。Tripathi 等^[43]研究报道接种耐 Pb 和 Cd 的产铁载体菌株 *Pseudomonas putida* KNP9 可提高绿豆的生物量，并减少对 Pb 和 Cd 的富集吸收。在本研究中，花生植物对重金属镍的吸附随基质中 Ni^{2+} 浓度的增加而增加，但在 50 mg/kg 和 100 mg/kg 的 Ni^{2+} 基质中产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 均能使花生根部和地上部分的 Ni 含量减少，使其株高、根长、生物量及氮磷钾含量增加，这可能是通过缓解重金属 Ni 对花生的毒害作用而促进了植株生长。当基质中 Ni^{2+} 浓度为 150 mg/kg 时，接种花生和对照植株的株高、根长、生物量、氮磷钾含量及重金属镍含量不存在显著性差异($P<0.05$)，可能是因为镍对

HSGJ1 的最小致死浓度为 150 mg/kg, 在此浓度的 Ni^{2+} 基质中 HSGJ1 已死亡。

农耕地是经济作物种植常用地, 土壤中镍含量较高会影响经济作物的种植。为了模拟含 Ni 农耕地土壤环境, 根据土壤环境质量标准 GB15618-1995 要求农耕地土壤中三级标准 Ni 总量 ≤ 200 mg/kg, 盆栽实验中 Ni^{2+} 最大浓度设置为 150 mg/kg。本研究验证了在农耕地土壤镍污染三级标准值范围内, 不同浓度镍胁迫下产铁载体芽孢杆菌 HSGJ1 对花生均有促生作用, 并能够有效地降低花生植株中的 Ni^{2+} 含量, 这为镍污染农耕地土壤花生等农作物的生产提供了可利用的微生物固定技术和理论依据。

参 考 文 献

- [1] Huang YZ, Hao XW, Lei M, et al. The remediation technology and remediation practice of heavy metals-contaminated soil[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(3): 409-417 (in Chinese)
黄益宗, 郝晓伟, 雷鸣, 等. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 409-417
- [2] Cui B, Wang L, Zhang GY, et al. Status and harm of heavy metal pollution in soil and research progress in remediation technology[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(1): 373-375, 447 (in Chinese)
崔斌, 王凌, 张国印, 等. 土壤重金属污染现状与危害及修复技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(1): 373-375, 447
- [3] Qian CX, Wang MM, Xu YB. Current situation of soil contamination by heavy metals and research progress in bio-remediation technique[J]. Journal of Southeast University (Natural Science Edition), 2013, 43(3): 669-674 (in Chinese)
钱春香, 王明明, 许燕波. 土壤重金属污染现状及微生物修复技术研究进展[J]. 东南大学学报: 自然科学版, 2013, 43(3): 669-674
- [4] Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(2): 248-258
- [5] Zeng JH, Li YY, Ruan DS, et al. Phytoremediation of heavy metal contaminated soils by plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1214-1221
曾加会, 李元媛, 阮迪申, 等. 植物根际促生菌及丛枝菌根真菌协助植物修复重金属污染土壤的机制[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1214-1221
- [6] Khan MS, Zaidi A, Wani PA, et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils[J]. Environmental Chemistry Letters, 2009, 7(1): 1-19
- [7] Zhang Y, Zhang WL, Chen XB, et al. The structure, function and its research progress of bacteria producing siderophore[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(9): 2249-2251 (in Chinese)
张莹, 张文莉, 陈小贝, 等. 细菌产铁载体的结构、功能及其研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(9): 2249-2251
- [8] Kiss T, Farkas E. Metal-binding ability of desferrioxamine B[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 1998, 32(2/3): 385-403
- [9] Schalk IJ, Hannauer M, Braud A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(11): 2844-2854
- [10] Wang YL, Lin QQ, Li Y, et al. Application potential of siderophore-producing rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals-contaminated soils: a review[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(7): 2081-2088 (in Chinese)
王英丽, 林庆祺, 李宇, 等. 产铁载体根际菌在植物修复重金属污染土壤中的应用潜力[J]. 应用生态学报, 2013, 24(7): 2081-2088
- [11] Dimkpa CO, Svatoš A, Dabrowska P, et al. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp.[J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 19-25
- [12] 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 Science, 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
- [13] Xia YL, Liao BS, Mao JX, et al. Evaluation of lime induced iron-deficiency chlorosis tolerance of peanut on calcareous and purplish soil in Sichuan[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(3): 326-330 (in Chinese)
夏友霖, 廖伯寿, 毛金雄, 等. 四川丘陵紫色土花生品种耐缺铁性鉴定与评价[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 326-330
- [14] Jadhav RS, Thaker NV, Desai A. Involvement of the siderophore of cowpea *Rhizobium* in the iron nutrition of the peanut[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1994, 10(3): 360-361
- [15] Su C, Jiang LQ, Zhang WJ. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: situation, impact and remediation techniques[J]. Environmental Skeptics and Critics, 2014, 3(2): 24-38
- [16] Zhong WK, Fan YB, Wang MJ. Pollution of heavy metals on crops and its countermeasures in China[J]. Agro-Environmental Protection, 2001, 20(4): 270-272 (in Chinese)
仲维科, 樊耀波, 王敏健. 我国农作物的重金属污染及其防止对策[J]. 农业环境保护, 2001, 20(4): 270-272
- [17] Su BL, Han SJ, Wang JG. Advance in soil sampling methods in rhizosphere microzone study[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2000, 11(3): 477-480 (in Chinese)
苏宝玲, 韩士杰, 王建国. 根际微域研究中土壤采集方法的研究进展[J]. 应用生态学报, 2000, 11(3): 477-480
- [18] Yuan HL, Wang HX. Agricultural Microbiology and Experiment Tutorial[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2009: 470 (in Chinese)
袁红莉, 王贺祥. 农业微生物学及实验教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 470
- [19] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical

- Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [20] Murugappan RM, Rekha S, Thirumurugan R. Characterization and quantification of siderophores produced by *Aeromonas hydrophila* isolated from *Cyprinus carpio*[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2006, 9(3): 437-440
- [21] Chen SX, Zhao X, Shen P, et al. High-sensitive detection method for siderophores from *Pseudomonas*[J]. Microbiology China, 2006, 33(3): 122-127 (in Chinese)
陈绍兴, 赵翔, 沈萍, 等. 高灵敏假单胞菌铁载体的平板检测方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 122-127
- [22] Chen Q, Zhang XP, Li DY, et al. Isolation of DNA from the root nodule of legume plant[J]. Microbiology China, 2002, 29(6): 63-67 (in Chinese)
陈强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 63-67
- [23] Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 625-630
- [24] Wang ZG, Yang WJ, Sun LH, et al. Characterization of a neutral protease gene of *Bacillus subtilis* isolated from the Guts of *Bombyx mori*[J]. Pakistan Journal of Zoology, 2016, 48(1): 179-185
- [25] Cho YG, Ishii T, Temnykh S, et al. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100(5): 713-722
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [27] Fu X, Jiang DH, Cui JF, et al. Screening of bacteria resistant to heavy metal contaminated soil in cadmium – lead mining area and their effects on activation of cadmium-lead[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(2): 153-155 (in Chinese)
付晓, 蒋代华, 崔俊峰, 等. 矿区重金属污染土壤中铅镉抗性细菌的筛选及其活化作用研究[J]. 广西农业科学, 2010, 41(2): 153-155
- [28] Wei S. Studies on the microbial species diversity and phylogenies of beta-rhizobia isolated from *Mimosa* spp.[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2012 (in Chinese)
魏爽. 含羞草(*Mimosa* spp.) beta-根瘤菌物种资源多样性及系统发育研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2012
- [29] Prakamhanga J, Tittabutra P, Boonkerda N, et al. Proposed some interactions at molecular level of PGPR coinoculated with *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 and *B. japonicum* THA6 on soybean symbiosis and its potential of field application[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 85: 38-49
- [30] Zhang SQ, Chen C, Xu S, et al. Improvement in sulfuric-acid-hydrogen-peroxide assimilating method for determination of NPK in plant[J]. Soils, 2003, 35(2): 174-175 (in Chinese)
张山泉, 陈川, 徐沐, 等. 硫酸-过氧化氢消化法测定植株氮磷钾方法的改进[J]. 土壤, 2003, 35(2): 174-175
- [31] Lu RK. Soil Agricultural Chemical Analysis Method[M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2000: 302-316 (in Chinese)
- 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 302-316
- [32] Zhang SR, Chen MY, Li T, et al. A newly found cadmium accumulator — *Malva sinensis* Cavan[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 173(1/3): 705-709
- [33] Zhang XL, Song GY. The nickel nutrients of Plant[J]. Soils and Fertilizers, 2004(6): 33-36 (in Chinese)
张秀玲, 宋光煜. 植物的镍素营养[J]. 土壤肥料, 2004(6): 33-36
- [34] Lu YG, Huang JG, Teng Y, et al. Growth and uptake response to Ni by hyperaccumulator Plantain[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2004, 18(1): 108-110,114 (in Chinese)
陆引罡, 黄建国, 滕应, 等. 重金属富集植物车前草对镍的响应[J]. 水土保持学报, 2004, 18(1): 108-110,114
- [35] Brooks RR, Morrison RS, Reeves RD, et al. Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum* Linnaeus (Cruciferae)[J]. Proceedings of the Royal Society of London: Series B, 1979, 203(1153): 387-403
- [36] Lin TX, Tang M, Huang MY, et al. Screening and identification of a high yield siderophore-producing bacteria SS05 isolated from cotton soil[J]. Microbiology China, 2012, 39(5): 668-676 (in Chinese)
林天兴, 唐梅, 黄明远, 等. 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 668-676
- [37] Zhu PL, Du BH, Ding YQ, et al. Genetic diversity and phylogeny of siderophore producing bacteria isolated from cotton rhizosphere in China's Xinjiang[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(5): 1568-1574 (in Chinese)
朱彭玲, 杜秉海, 丁延芹, 等. 新疆棉花根际土壤铁载体产生菌的遗传多样性及系统发育研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1568-1574
- [38] Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, et al. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(7): 1475-1484
- [39] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44(4): 846-849
- [40] Zhang FT, Cao SH, Cai DL. Preliminary exploration of iron absorption and utilization of peanut[J]. Peanut Science and Technology, 1987(4): 31-32 (in Chinese)
张福田, 曹生海, 蔡德龙. 花生对铁的吸收利用初探[J]. 花生科技, 1987(4): 31-32
- [41] Parida BK, Chhibba IM, Nayyar VK. Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition[J]. Scientia Horticulturae, 2003, 98(2): 113-119
- [42] Tank N, Saraf M. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(2): 195-204
- [43] Tripathi M, Munot HP, Shouche Y, et al. Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9[J]. Current Microbiology, 2005, 50(5): 233-237