

植物促生菌提高植物重金属耐受性研究进展

霍伟 蔡庆生*

(南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘要: 近年来植物修复技术因其独特的优势而被广泛关注。许多植物被认为是有价值的利用资源,然而,最有实际使用价值的植物对重金属的耐受性有限,实际应用中变得越来越困难。植物促生菌资源对环境无污染,具有独特的多样性和巨大的潜力。随着资源的开发和技术的发展,微生物调控将会使植物修复技术变得更加可行和更有价值。回顾近年来新兴的微生物调控技术,主要是植物促生菌的筛选、鉴定和应用价值。

关键词: 植物促生菌, 根际微生物, 植物修复, 重金属

The Advance of the Enhancement of Plant Heavy Metal Resistance by Plant Growth-promote Bacteria

HUO Wei CAI Qing-Sheng*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Recently, phytoremediation is considered to be a promising alternative for extraction of heavy metals from polluted soils. Many plant species are useful resources but not tolerant to heavy metals, making it difficult in practical application. Plant growth-promote bacteria are environmental friendly and highly diversity, which will probably facilitate the practical realization of phytoremediation. With the development in technology and resources, bio-regulation will make phytoremediation more viable and more valuable. This paper reviews the emerging bio-regulation technology in recent years, mainly in screening, identification and application of plant growth-promote bacteria.

Keywords: Plant growth-promoting bacteria, Rhizosphere microorganisms, Phytoremediation, Heavy metal

由于持续的城市化和工业化,土壤的重金属污染已经成为对环境危害最大的污染之一,严重威胁着农业生产和人类健康^[1]。重金属污染是导致土壤退化的一个重要原因,过量的重金属通过粮食作物进入食物链,对人类健康造成巨大威胁^[2]。与此同时,在发展中国家,尤其是中国和印度,正面临着严重的可耕地流失^[3]。在这样的背景下,修复被重

金属污染的土地就显得尤为重要。

在众多修复方式中,植物修复因其廉价高效而越来越受到研究人员的重视^[4]。然而,绝大多数已知的超积累植物都是生物量低、生长缓慢的杂草,植物体难以回收利用^[5],于是越来越多的研究者把研究焦点放在那些有实际利用价值的植物上^[6]。所以,提高植物对重金属的抗性就显得特别重要。目前这

一领域的研究主要集中在植物生长调节剂上。抗赤霉素类比如多效唑(PP333)、矮壮素(CCC)是公认的对提高植物耐受不利环境有显著效果的调节剂^[7];此外,磷酸盐、水杨酸(SA)和多胺类也被认为有一定的效果。但随着实际应用中对植物要求的提高,人们发现这些调节剂在很多时候效果不够理想,并且可提高的空间十分有限。与化学调控剂相比,新兴的生物调控方式投入少、效率高,几乎对环境没有危害,正成为研究者和实际应用的首选。

研究发现植物与微生物有多种多样的生态关系。到目前为止,系统的研究只局限在很少的一部分微生物和它们的宿主植物中,所以,在庞大的微生物群体中发现新的对植物有益的种类很有希望^[8]。根际微生物是一类生活在植物根际土壤中的微生物,大部分是细菌^[9]。有证据表明其中一些可以提高宿主植物的抗逆性,尤其是对重金属^[10]。虽然大部分微生物与植物之间的分子互作机制还有待研究,但目前的研究表明根际微生物和植物内生细菌对提高植物重金属抗性有明显的作用。

1 植物根际促生菌

根际促生菌是在植物根系直接影响的土壤范围内生长繁殖的微生物。有细菌、放线菌、真菌、藻类和原生动物等,以细菌为主,一般数量比根际外多几倍至几十倍。它们和植物间是互生关系,与植物根系相互作用、相互促进。微生物大量聚集在根系周围,将有机物转变为无机物,为植物提供有效的氮磷养料;同时,微生物还能分泌维生素、生长刺激素等,促进植物生长。反过来,植物根际也为众多细菌提供了一个复杂而有活力的微环境。在这个微环境中,植物根系分泌物为细菌提供了生长所需的糖类物质。植物从这些相互作用中获得了更多的营养,也获得了某些对逆境的忍耐能力^[11-12]。在根际细菌中,植物根际促生细菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是一类能够显著地促进植物生长的细菌。大部分植物生长促进细菌可以分泌吲哚乙酸(IAA)和利用 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)作为唯一氮源,从而促进植株的生长。这一特征已被作为从土壤中筛选和鉴定 PGPR 的常用手段。此外,某些对重金属具有抗性的微生物可以通过释放螯合

剂和铁载体、酸化土壤环境、改变氧化还原电位等方式降低重金属的可利用浓度^[13],从而使生长在其中的植物免受重金属毒害。

分布在根际的植物促生菌种类较多,主要是不动杆菌属(*Acinetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)和芽胞杆菌属(*Bacillus*)等。在对于毛竹(*Phyllostachys pubescens*)的研究中发现芽胞杆菌属(*Bacillus*)是主要的根际细菌类群^[14]。宿主特异性对根际细菌的类群分布有重要影响。在对 *Porteresia coarctata* 根际细菌多样性的调查中发现,根际微生物有高度复杂的群落组成,其中伽马变性细菌(*Gamma proteobacteria*)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和一些未培养的细菌种类都十分丰富^[15]。根际细菌群落组成和多样性往往随地区不同而变化很大^[16]。关于圣罗勒(*Ocimum sanctum* L.)、毛喉蕊花(*Coleus forskholii* Briq.)、长春花[*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.]和芦荟(*Aloe vera*)的初步研究表明,固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)和假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)是根际中最常见的种类,而在不同地区的研究表明芽胞杆菌属(*Bacillus*)是芦荟根际的主导菌群^[17]。此外,非生物因素如土壤结构、降水量等也对微生物与植物的互作关系有较大的影响。

目前已有一些关于应用分离得到的 PGPB 来增强植物重金属耐性的研究。将从重金属污染土壤中分离得到的 Cr 抗性菌株 *Pseudomonas* sp. PsA4 和 *Bacillus* sp. Ba32 施用到芥菜(*Brassica juncea*)中,结果表明接种了 PsA4 或 Ba32 都增加了芥菜在 95.3 mg/g 和 198.3 mg/g Cr(6+)土壤中的生物量^[18]。Vivas 等测试了从 Zn 污染的土地中分离出的 *Brevibacillus* 属两个种的细菌,结果表明 B-I 株显著地增强了植物生长和氮磷的积累,抑制了 Zn 的吸收^[19]。然而,在重金属吸收方面,根际促生菌对植物的作用更多的是促进而不是抑制。Rajkumar 等从土壤中分离出根际微生物,经过镍、锌抗性筛选,选出了重金属抗性菌株 *Pseudomonas* sp. 和 *Pseudomonas jessenii*,然后将它们接种给蓖麻(*Ricinus communis*),发现它们显著地增加了蓖麻的生物量,并且增加了 Zn、Ni、Cu 的积累量^[20]。Ma 等从 *Alyssum serpyllifolium* 和 *Phleum phleoides* 的根际中分离出 5 个 Ni 抗性 PGPR 菌株,证明它们能

够显著地提高 Ni 的生物可利用浓度。随后他们将这 5 个菌株接种给种植在含 450 $\mu\text{g/g}$ Ni 土壤中的芥菜(*Brassica juncea*)和油菜(*B. oxyrrhina*), 结果表明 SRA2 菌株大大增加了植物的鲜重(351%)和干重(285%), SRA1 菌株和 SRA10 菌株显著地增加植物了地上和地下部分 Ni 的积累量^[21]。

PGPR 通过分泌有机酸和一些金属载体, 使土壤中的重金属得到活化, 提高了生物可利用浓度, 这一特性在植物修复中有一定的应用潜力。PGPR 的活动产生了非常多的对植物有利的物质, 这些物质对提高植物重金属抗性和重金属的积累量有十分巨大的潜力。根际细菌存在于所有植物的根际, 目前的研究还处于分离、鉴定和实验室内非特异性的接种实验, 今后的研究将更着重于精确的特异性和高效的施用, 以及对其余与植物相互作用的分子机制研究。

2 植物内生促生菌

植物内生细菌是一类寄生在植物体内的细菌, 目前的研究认为所有植物都有内生菌^[22]。在这些细菌中, 植物内生促生菌(PGPB)是一类营寄生生活, 非但不使宿主表现出受害病症, 反而可以促进宿主生长的细菌。内生 PGPB 通过产生铁载体蛋白、合成植物激素、合成分泌酶促进氮磷溶解等方式增进宿主的生长^[23]。研究证明一些 PGPB 可以促进植物生长, 并且可以增强植物对病原体、干旱、重金属等的抵抗力, 甚至可以有助于抵抗食草动物^[8]。

内生细菌有很大的物种多样性, 常随宿主的不同而变化。通过 16S rDNA 序列分析、BOX-PCR 染色体组 DNA 概要分析以及生理特性鉴定(包括底物利用率、抗生素和重金属敏感性)可以确定它们的分类地位。Germaine 调查了落叶乔木杨树中的植物促生菌, 结果发现有 3 种细菌可以侵入杨树的木质部组织中^[24]。从具有铜抗性的植物海州香薷(*Elsholtzia splendens*)和鸭跖草(*Commelina communis*)中分离得到的铜抗性菌株属于 3 个系统族群: 厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria), 这些是铜抗性菌株中的主要类群^[25]。在对于水稻(*Oryza sativa* L.)的研究中发现, 链霉菌(*Streptomyces* sp.)、球毛壳霉(*Chaetomium globosum*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、尖

孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和支孢样支孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)是主要的内生微生物种类^[26]。内生菌的多样性也与土壤条件和植物激素有关, 并且内生菌还会经常与土壤根际微生物进行物质和个体间的交换^[27]。Long 等在对烟草(*Nicotiana attenuata*)根系的研究中发现, 土壤组分和植物体内乙烯的变化对植物内生菌的组成有至关重要的作用^[28]。

通常, 对重金属有抗性的 PGPB 往往在重金属污染土壤上生长的植物中被发现。已有许多围绕多种根际和植物体内促生菌对植物促生作用的研究。一些特异的内生菌可以明显提高植物对重金属的耐受性, 对植物体内的重金属积累量则有不同的效果。在对油菜(*Brassica napus*)的试验中, 铅抗性植物内生菌株 *Pseudomonas fluorescens* G10 和 *Microbacterium* sp. G16 都显著提高了在铅污染土地上的油菜的生物量和铅积累量^[29]。而对于番茄(*Lycopersicon esculentum* L.), 甲基杆菌属(*Methylobacterium*)的一株 CBMB20 菌株以及伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.)的一株 CBMB40 菌株都在镍(Ni)和铬(Cd)胁迫下显著缓解了植株的受害程度。这两株细菌在培养状态下都显示出了很高的积累镍和铬的能力, 接种给番茄后, 在各浓度的镍或铬胁迫下都显著降低了番茄乙烯的产生量, 并且提高了各项生理指标。同时, 这两株促生菌显著地减少了植株体内的重金属积累量, 这也许是其促进植物生长的重要机理之一^[30]。

此外, 研究发现在特定的培养基中, 植物内生促生菌也可以产生一些植物激素^[31]。然而, 它们是否可以在植物体内共生状态下产生植物激素还有待研究。提高植物对逆境的耐受性对于环境保护有重要的意义。关于植物促生菌的研究有很广阔的前景。这项技术在可持续农业发展和能源植物的生产上也有非常重要的作用^[32]。研究认为植物促生菌技术的潜力比常规化学调控剂要大得多^[33]。由于其显著的效果、低廉的成本和广泛的适用性, 植物促生菌可能成为未来最有前途的生物调控剂。

3 讨论

由于人类的活动, 土壤重金属污染问题日益严重, 必须予以修复。在众多的选择方案中, 植物修复

有其独特的优势,正越来越吸引着这一领域中研究者的关注。在这一热点问题中,人们自然而然地将焦点聚集在如何提高植物对重金属的抗性上。目前研究人员仍然主要集中在化学调控方面,有一定的效果而且也有一些实际应用。但是,在许多情况下,化学调控的效果并不十分令人满意,而且难以提升。作为一种新兴的方式,生物调控有巨大的潜力,但目前仍处于起步阶段。随着研究的深入,有望发现更多的微生物资源,并开发新的技术,使实际应用成为可能。这一领域将是植物抗逆生理长时间的研究热点。

本文所描述的生物调控领域的探索性研究已经显示出非常诱人的前景。当前的研究大部分集中在 PGPR 菌种的应用,许多 PGPR 菌种已经被鉴定出有重金属抗性,它们无疑是非常重要的微生物资源。除 PGPR 外,一些内生的细菌和真菌(丛枝菌根真菌)也有类似的提高抗逆性的效果。相比于内生菌,根际促生细菌的宿主特异性较低,这一特性使其更具有广泛应用的潜力。

此外,目前的研究大部分是单一接种,几种微生物的共同接种试验还很少。虽然菌种和植物间以及不同菌种间的互作关系和机理还有待探索,但已经有实验室报道了他们用几个菌种共同侵染植物,促生作用明显好于单一侵染^[34]。

虽然根际微生物的宿主特异性不高,可以存活于多种植物的根际,但其在特定植物的根际能否表现出重金属抗性还缺乏相关研究。此外,特定的重金属抗性菌株大多发现于重金属污染土地中的超积累植物根际,这些微生物在施用给其他植物时能否和新的宿主建立与超积累植物类似的关系,从而提高宿主耐性还很不确定。相反的,在非重金属污染地区中分离出的根际微生物菌种是否有重金属抗性也是不明确的。总之,在大规模应用之前,这些问题都有待今后的研究予以解决。

参 考 文 献

- [1] Stafilov T, Sajin R, Pancevski Z, *et al.* Heavy metal contamination of topsoils around a lead and zinc smelter in the Republic of Macedonia. *J Hazard Mater*, 2010, **175**(1/3): 896–914.
- [2] Mazej Z, Al Sayegh-Petkovsek S, Pokorny B. Heavy metal concentrations in food chain of Lake Velenjsko jezero, Slovenia: an artificial lake from mining. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2010, **58**(4): 998–1007.
- [3] Kesavan PC, Swaminathan MS. Strategies and models for agricultural sustainability in developing Asian countries. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, **363**(1492): 877–891.
- [4] Leita AL. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Int J Environ Res Public Health*, 2009, **6**(4): 1393–1417.
- [5] Vetterlein D, Wesenberg D, Nathan P, *et al.* Pteris vittata revisited: uptake of As and its speciation, impact of P, role of phytochelatins and S. *Environ Pollut*, 2009, **157**(11): 3016–3024.
- [6] Shi GR, Cai QS. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**(5): 555–561.
- [7] Maia E, Siqueira DL, Salomao LC, *et al.* Development of the banana plants ‘Prata Ana’ and ‘FHIA-01’ under the effect of paclobutrazol applied on the soil. *An Acad Bras Cienc*, 2009, **81**(2): 257–263.
- [8] Ryan RP, Germaine K, Franks A, *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **278**(1): 1–9.
- [9] Pishchik Vn, Vorob’ev Ni, Provorov Na. Experimental and mathematical modeling of population dynamics of rhizospheric bacteria under conditions of cadmium stress. *Mikrobiologiya*, 2005, **74**(6): 845–851.
- [10] Ajungla T, Sharma GD, Dkhar MS. Heavy metal toxicity on dehydrogenase activity on rhizospheric soil of ectomycorrhizal pine seedlings in field condition. *J Environ Biol*, 2003, **24**(4): 461–463.
- [11] Gamalero E, Lingua G, Berta G, *et al.* Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can J Microbiol*, 2009, **55**(5): 501–514.
- [12] Kumar KV, Singh N, Behl HM, *et al.* Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere*, 2008, **72**(4): 678–683.
- [13] Abou-Shanab RA, Angle JS, Van Berkum P. Chromate-tolerant bacteria for enhanced metal uptake by *Eichhornia crassipes* (Mart.). *Int J Phytoremediation*, 2007, **9**(2): 91–105.
- [14] Li L, Liu M, Yang S, *et al.* Cultivable microbial diversity at the rhizosphere of *Phyllostachys pubescens*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2008, **48**(6): 772–779.
- [15] Bharathkumar S, Paul D, Nair S. Microbial diversity of culturable heterotrophs in the rhizosphere of salt marsh grass, *Porteresia coarctata* (Tateoka) in a mangrove ecosystem. *J Basic Microbiol*, 2008, **48**(1): 10–15.
- [16] Hao DAC, Ge GB, Yang L. Bacterial diversity of *Taxus* rhizosphere: culture-independent and culture-dependent approaches. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, **284**(2): 204–212.

- [17] Karthikeyan B, Jaleel Ca, Lakshmanan Gm, *et al.* Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008, **62**(1): 143–145.
- [18] Rajkumar M, Nagendran R, Lee KJ, *et al.* Influence of plant growth promoting bacteria and Cr^{6+} on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*, 2006, **62**(5): 741–748.
- [19] Vivas A, Biro B, Ruiz-Lozano JM, *et al.* Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere*, 2006, **62**(9): 1523–1533.
- [20] Rajkumar M, Freitas H. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 2008, **71**(5): 834–842.
- [21] Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *J Hazard Mater*, 2009, **166**(2/3): 1154–1161.
- [22] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Miller Wg, *et al.* Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to meloidogyne incognita infection. *Phytopathology*, 2001, **91**(4): 415–422.
- [23] Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol*, 2001, **91**(2/3): 127–141.
- [24] Germaine K, Keogh E, Garcia-Cabellos G, *et al.* Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, **48**(1): 109–118.
- [25] Sun LN, Zhang YF, He LY, *et al.* Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(2): 501–509.
- [26] Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy YL. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. *Microbiol Res*, 2009, **164**(3): 290–296.
- [27] Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, *et al.* The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol*, 2009, **7**(7): 514–525.
- [28] Long HH, Sonntag DG, Schmidt DD, *et al.* The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. *New Phytol*, 2009, **254**(2): 173–181.
- [29] Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, *et al.* Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ Pollut*, 2008, **156**(3): 1164–1170.
- [30] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, 2007, **69**(2): 220–228.
- [31] Sgroi V, Cassan F, Masciarelli O, *et al.* Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **85**(2): 371–381.
- [32] Thomas P, Soly TA. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand Naine and the affinity of endophytes to the host. *Microb Ecol*, 2009, **58**(4): 952–964.
- [33] Rajkumar M, Ae N, Freitas H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 2009, **77**(2): 153–160.
- [34] Pivato B, Offre P, Marchelli S, *et al.* Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 2009, **19**(2): 81–90.