

苕麻根际抗 Cd 细菌筛选及对苕麻生长和吸收 Cd 能力的影响

邵继海¹, 姚习文¹, 何绍江²

(1.湖南农业大学资源环境学院,长沙 410128;2.华中农业大学 农业微生物国家重点实验室,武汉 430070)

摘要 本文报道从苕麻根际筛选出 5 株抗 Cd 细菌(cdr1、cdr2、cdr3、cdr6、cdr7) 通过 16S rRNA 基因序列分析结果显示 *ε*cdr1 和 cdr3 属于金黄杆菌属(*Chryseobacterium*) *ε*cdr2 属于农杆菌属(*Agrobacterium*) *ε*cdr6 属于贪噬菌属(*Variovorax*) *ε*cdr7 属于黄杆菌属(*Flavobacterium*)。采用盆栽试验方法 研究了抗 Cd 细菌对苕麻生长和吸收 Cd 能力的影响。结果表明 在 Cd 添加量为 10 mg·kg⁻¹ 土壤中接种 cdr6、cdr7 能显著增加苕麻生物量和叶片叶绿素含量 降低植株地下部分丙二醛(MDA)含量 但对植株 Cd 含量没有影响。从平均值来看 接种 cdr1 和 cdr3 的苕麻株高低于对照 但只有接种 cdr3 的处理达到显著水平。接种 cdr1 和 cdr3 的苕麻地上和地下部分干重、叶片叶绿素含量均低于对照 CK-1 但其差异均没有达到统计意义的显著水平。接种 cdr1、cdr3 的苕麻地上部分 Cd 含量显著高于对照 CK-1。接种 cdr2 对苕麻植株生物量和 Cd 含量均没有显著影响。

关键词 苕麻 抗 Cd 细菌 根际

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)03-0487-05

Isolating Cd Resistant Bacteria from Ramie Rhizosphere and Their Effects on the Growth and Cd Absorptional Characters of Ramie

SHAO Ji-hai¹, YAO Xi-wen¹, HE Shao-jiang²

(1.College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China ;2.National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract This paper first reports five Cd resistant bacteria strains isolated from rhizosphere of ramie. Sequences of 16 S rRNA gene suggested cdr1 and cdr3 belonged to *Chryseobacterium*, cdr2 belonged to *Agrobacterium*, cdr6 and cdr7 belonged to *Variovorax* and *Flavobacterium* respectively. The results of pot experiment showed that Inoculation of cdr6 and cdr7 increased biomasses and Chlorophyll contents of ramie in the soil which amended 10 mg·kg⁻¹ Cd. And also, cdr6 and cdr7 could decrease the contents of malodialdehyde(MDA) in the roots, but have no effects on the absorption of Cd both in the shoots and roots in this soil. The stem lengths which inoculated cdr1 and cdr3 were lower than the control, but only the treatment which inoculated cdr3 reached static significant level. The means of biomasses and Chlorophyll contents of ramie were lower than the control when inoculated cdr1 and cdr3, but these differences were not reached static significant level. Cd contents in the shoots were significantly higher than the controls' when inoculated cdr1 and cdr3. There was no effect on the biomasses, Chlorophyll contents, and Cd content when inoculated cdr2 in this Cd contaminated soil.

Keywords ramie; Cd resistant bacteria strains; rhizosphere

中国人均耕地面积仅为 0.1 hm², 不足世界平均值的 1/4^[1]。近年来由于工农业污染物的非合理排放, 大量耕地受到污染, 据统计, 我国受 Cd、As、Pb 等重

金属污染的耕地面积近 2.0 × 10⁷ hm², 约占总耕地面积的 1/5^[2]。Cd 是对人、动植物毒性大的一种重金属元素, 也是一种常见的重金属污染元素, 我国 Cd 污染农田面积已达 1.09 万 hm² [3]。在镉污染耕地上直接耕种食用农作物往往会造成农产品重金属超标, 如果对这些 Cd 污染耕地弃之不用, 中国人均耕地面积不足的矛盾将更加突出, 如何合理利用这些被重金属污染的耕地显得尤为重要。

收稿日期 2009-06-27

基金项目 湖南农业大学青年基金(06QN20) 国家自然科学基金项目(30070027)

作者简介 邵继海(1979—), 男, 硕士, 讲师, 主要研究方向为环境微生物。E-mail: shaojihai@yahoo.com.cn

苎麻是我国温带及亚热带地区以纺织为主要用途的重要非食用农作物,有研究表明,当苎麻种植于 Cd 污染土壤中时,镉主要累积在苎麻的根、茎秆和叶片中,原麻中含镉量较低^[4]。因此,在 Cd 污染土壤中发展苎麻业是一种相对安全有效的提高 Cd 污染耕地利用率的方式。微生物可以通过多种方式影响重金属的生物有效性,从而改变植物对重金属的吸收^[5-6]。此外,微生物还可以通过多种机制刺激植物生长,如分泌铁载体^[7]、生长素^[8]等。利用重金属抗性微生物来减轻重金属对植物毒性、促进植物生长,是一种较新的提高重金属污染耕地利用率的方法。这种方法往往要求这些微生物能定殖于植物的根际。从非植物根际筛选的重金属抗性菌虽然对重金属有抗性,但在植物根际定殖能力往往不佳,使得修复效果不理想。另外,所分离到的微生物也不一定对植物有促长作用,毕竟只有少数的土壤微生物对植物具有促长作用。而从植物根际分离的微生物再回接植物根部时,其定殖能力往往较强,而且根际微生物中植物促长菌的比例大,易筛选到对植物有促长作用的微生物。目前从植物根际筛选抗重金属的微生物应用于菌植互作来加强重金属污染耕地利用率还鲜见报道。

本文从种植于 Cd 污染土壤的苎麻根际筛选出 5 株抗 Cd 菌,再将其接种到苎麻根际,探讨抗 Cd 菌对苎麻生长和累积 Cd 的影响,旨在为利用微生物与植物互作方式提高 Cd 污染耕地的利用率打下理论基础。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤

盆栽试验土壤(河潮土)取自湖南农业大学资源环境学院实验基地,其基本理化性状如下:全氮 1.55 g·kg⁻¹,pH 5.2,CEC 8.79 cmol·kg⁻¹,有机质 17.4 g·kg⁻¹;Cd 含量 0.20 mg·kg⁻¹。将其风干、粉碎、过筛。

1.2 供试作物

供试作物苎麻为湘苎 3 号,由湖南农业大学苎麻研究所提供。

1.3 苎麻根际抗 Cd 细菌筛选

从湖南郴州锌铅矿附近镉污染耕地取回苎麻根际土壤,按稀释平板法,用牛肉膏蛋白胨固体培养基(Cd 含量 50 mg·L⁻¹)分离筛选抗 Cd 细菌。

1.4 抗 Cd 菌分子鉴定

将菌株用牛肉膏蛋白胨液体培养基活化至对数生长期,离心收集菌体,用 STE 缓冲液洗涤 3 次后,

以 10% SDS 裂解细胞,苯酚-氯仿提取裂解液,细菌总 DNA 用乙醇沉淀,将沉淀最后溶解在 ddH₂O 中。以引物 F1^[9]和 R4^[9]进行 PCR 扩增 5 株抗 Cd 细菌的 16 S rDNA。PCR 反应条件见参考文献^[9],PCR 产物纯化后送华大基因测序公司测序。

1.5 盆栽试验

向粉碎过筛的土壤中加入 CdCl₂·2H₂O 溶液,使 Cd 添加量为 10 mg·kg⁻¹,对照加入等量蒸馏水,28 °C 温育 96 h,然后风干、粉碎、过筛。装入一次性塑料杯中,每杯 300 g。

将筛选的抗 Cd 菌用牛肉膏蛋白胨液体培养基扩大培养,离心收集菌体,无菌水洗涤 2 次,然后重悬于无菌水中,菌体终浓度为 10⁷cfu·mL⁻¹。

将苎麻种子播种于杯中土壤,2 mL 重悬抗 Cd 菌种接到苎麻种子表面,对照组接入等量的无菌水,每种处理设 3 个重复试验。待苎麻幼苗长出后间苗,每杯 2 株。自然光照培养 60 d。

1.6 样品的检测

1.6.1 生物量的测定

按参考文献[10]的方法,先将植株于 105 °C 下杀青 1 h,再在 65 °C 下烘干 24 h,用电子天平准确称量地上部分干重和地下部分干重。

1.6.2 叶绿素含量的测定

叶片叶绿素用 80% 丙酮黑暗浸提 24 h,用 721 型分光光度计在 645 nm 和 663 nm 处测定其吸光值。

1.6.3 植株重金属含量的测定

按参考文献[11]的方法对样品进行酸消解,用 varian 240 原子吸收测定 Cd 含量。

1.6.4 植株地下部分丙二醛含量测定

按参考文献[12]用三氯乙酸方法测定植株地下部分丙二醛含量。

2 结果与分析

2.1 抗 Cd 菌分子鉴定

对 5 株抗 Cd 菌及 Genbank 中相关模式菌株的 16 S rRNA 基因序列构建系统树(图 1),从系统发育树和序列同源比对结果来看,cdr1 和 cdr3 均属于金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)。序列同源比对结果显示 cdr1 和 cdr3 与 *Chryseobacterium* 高度同源,与 *Chryseobacterium luteum* P 528/18 同源率分别为 99% 和 98%。cdr2 属于农杆菌属(*Agrobacterium*)其 16 S rRNA 基因序列与 *Agrobacterium tumefaciens* C58 同源率为 100%。cdr6 属于贪噬菌属(*Variovorax*)其 16

S rRNA 基因序列与 *Variovorax paradoxus* S110 同源率为 99%。cdr7 属于黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 其 16 S rRNA 基因序列与 *Flavobacterium johnsoniae* UW101 同源率为 97%。

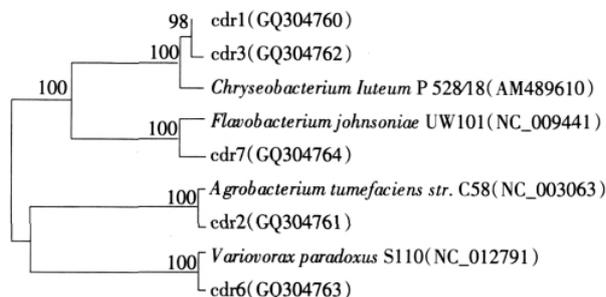


图 1 基于 16 S rRNA 基因序列构建的 5 株抗 Cd 菌的系统发育树(邻接树)

Figure 1 Neighbor-joining Phylogenetic tree of five Cd resistant strains basis on 16 S rRNA gene sequence. Bar, 0.02 changes per nucleotide position

2.2 抗 Cd 菌对苧麻生长和叶片叶绿素含量的影响

表 1 显示 5 株抗 Cd 菌在人工模拟 Cd 污染土壤中对苧麻生长和叶片叶绿素含量的影响。比较 CK-0 和 CK-1 可知,当土壤中 Cd 添加量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,苧麻的生长受到明显的抑制。在该 Cd 污染土壤中接种 cdr7 的植株地上部分干重和地下部分干重均明显高于 CK-1。从平均值来看,接种 cdr6 的植株株高、植株干重均高于 CK-1,但统计分析结果显示,只有地上部分干重显著高于 CK-1。接种 cdr3 的植株生物量平均值均比 CK-1 低,株高与 CK-1 相比有显著差异。接种 cdr1 和 cdr2 的植株生物量与 CK-1 相比均没有显著差异。接种 cdr6 和 cdr7 的植株叶片叶绿素显著高于 CK-1(图 2),而接种 cdr1、cdr2 和 cdr3 的植株叶片叶绿素与 CK-1 相比没有显著差异。

2.3 抗 Cd 菌对苧麻地下部分丙二醛含量的影响

图 3 显示了 5 株抗 Cd 菌对生长于 Cd 污染土壤中苧麻的地下部分丙二醛(MDA)含量的影响。比较没有接种抗 Cd 菌的 CK-0 和 CK-1 可知,当土壤中 Cd 添加量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,苧麻地下部分丙二醛含量明显升高。在人工模拟 Cd 污染土壤中接种 cdr7、cdr6、cdr2 的苧麻地下部分丙二醛含量显著低于 CK-1,与 CK-0 没有显著差异。接种 cdr3、cdr1 的苧麻地下部分丙二醛含量与 CK-1 相比没有显著差异,但显著高于 CK-0。

2.4 抗 Cd 菌对苧麻植株 Cd 含量的影响

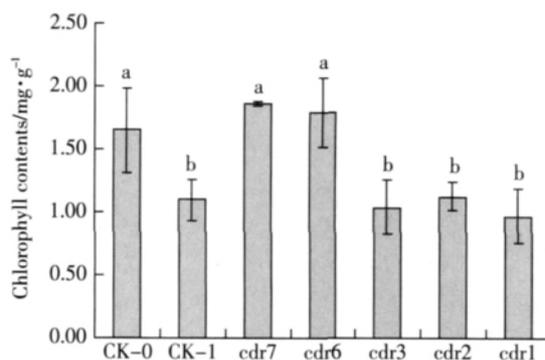
图 4 和图 5 显示了 5 株抗 Cd 菌对苧麻植株 Cd

表 1 土壤中 Cd 添加量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 5 株抗 Cd 菌对苧麻生物量的影响

Table 1 Effect of five Cd resistant strains on the growth of ramie in the soil adding $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd

处理	株高/cm	地上部分干重/g	地下部分干重/g
CK-0	21.13a	0.48a	0.16a
CK-1	17.93bc	0.26c	0.08b
cdr7	19.03ab	0.51a	0.19a
cdr6	19.07ab	0.42ab	0.13ab
cdr3	13.93d	0.21c	0.06b
cdr2	15.67cd	0.30bc	0.13ab
cdr1	16.97bc	0.19c	0.06b

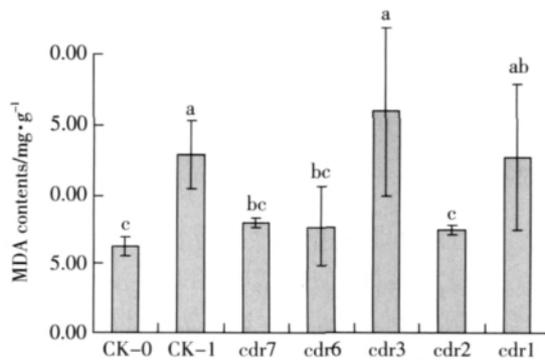
注:CK-0 为种植于没有添加 Cd 的土壤中的苧麻,没接种抗 Cd 菌,CK-1 为种植于添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 的土壤中的苧麻,没接种抗 Cd 菌,cdr1-7 为种植于添加 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 的土壤中的苧麻,分别接种抗 Cd 菌 cdr1-7。



CK-0、CK-1、cdr1-7 见表 1 脚注

图 2 5 株抗 Cd 菌对苧麻叶片叶绿素含量的影响

Figure 2 Effect of five Cd resistant strains on the chlorophyll contents in the leaves of ramie



CK-0、CK-1、cdr1-7 见表 1 脚注

图 3 5 株抗 Cd 菌对苧麻地下部分 MDA 含量的影响

Figure 3 Effect of five Cd resistant strains on the MDA contents in the roots of ramie

含量的影响。当土壤中 Cd 添加量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,与对照 CK-1 相比,接种 cdr7、cdr6、cdr2 对植株地上部

分和地下部分 Cd 含量没有显著影响。接种 cdr3、cdr1 可以显著增加植株地上部分 Cd 含量。从平均值来看接种 cdr3、cdr1 的苕麻植株地下部分 Cd 含量也均高于 CK-1, 但统计分析结果表明其差异没有达到显著水平。

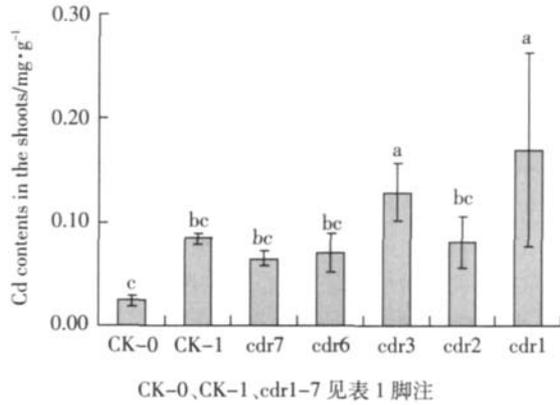


图 4 5 株抗 Cd 菌对苕麻地上部分 Cd 含量的影响

Figure 4 Effect of five Cd resistant strains on the Cd contents in the shoots of ramie

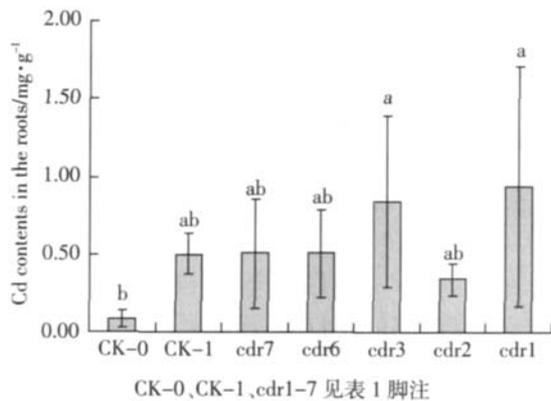


图 5 5 株抗 Cd 菌对苕麻地下部分 Cd 含量的影响

Figure 5 Effect of five Cd resistant strains on the Cd contents in the roots of ramie

3 讨论

氧化性损伤是重金属生物毒性的重要作用机理之一, 当没有接种抗 Cd 菌时, CK-1 植株地下部分 MDA 含量显著高于 CK-0, 这也进一步肯定了 Cd 胁迫可导致植物氧化性损伤。cdr6 和 cdr7 分别属于噬菌属和黄杆菌属, 黄杆菌属是一类常见的根际微生物, 噬菌属在一些植物根际也有报道, 但在苕麻根际还未见有这两类微生物的报道, 本试验结果显示接种 cdr6、cdr7 的苕麻植株生物量、叶片叶绿素含量显著高于 CK-1, 地下部分 MDA 含量显著低于 CK-1, 这意味着接种 cdr6、cdr7 可以促进植物生长, 减轻 Cd

对苕麻氧化性损伤。而这种作用并不是通过抗 Cd 菌减少苕麻对 Cd 的吸收来实现的, 因为接种 cdr6、cdr7 的植株地上部分和地下部分 Cd 含量与 CK-1 相比并没有显著差异。微生物可以通过多种方式影响植物的抗逆性和生长。Belimov 等 (2009) 报道 *Variovorax paradoxus* 5C-2 可以通过分泌 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶增强豌豆抗逆性。 *Flavobacterium* sp. L30 可以通过固定土壤中 Cd、联合固氮、分泌吡啶乙酸等增强大麦对 Cd 胁迫的抵抗力, 促进大麦生长^[4]。本试验结果显示接种 cdr6 和 cdr7 可以增强苕麻对 Cd 胁迫的抵抗力, 促进苕麻生长, 对于其作用机理还有待进一步深入研究。

cdr1 和 cdr3 均属于金黄杆菌属, 金黄杆菌作为一种根际微生物在莴笋^[15]、小麦^[16]、水稻^[17]等作物根际均有报道, 但作为苕麻根际微生物还未见有报道。从平均值来看, 接种 cdr1、cdr3 的苕麻株高、地上和地下部分干重、叶片叶绿素含量均低于对照 CK-1, 地上和地下部分 Cd 含量高于对照 CK-1, 但统计分析结果显示, 仅接种 cdr3 的苕麻株高显著低于对照, 接种 cdr1、cdr3 的苕麻地上部分 Cd 含量显著高于对照 CK-1。这些结果意味着接种 cdr1、cdr3 可以增加苕麻对 Cd 吸收, 加重 Cd 对苕麻的生物毒性, 只是这种作用比较微弱, 很多生物学指标达不到统计学意义的显著性。

参考文献:

- [1] 曾希柏, 杨正礼. 中国农业环境质量状况与保护对策[J]. 应用生态学报, 2006, 17(1): 131-136.
ZENG Xi-bai, YANG Zheng-li. Agricultural environment quality of China and its improving countermeasures[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(1): 131-136.
- [2] 顾继光, 周启星, 王新. 土壤重金属污染的治理途径及其研究进展[J]. 应用基础与工程科学学报, 2003, 11(2): 143-151.
GU Ji-guang, ZHOU, Qi-xin, WANG xin. Reused path of heavy metal pollution in soils and its research advance[J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2003, 11(2): 143-151.
- [3] 郑世英, 商学芳. 土壤镉污染研究进展[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(5): 43-4.
ZHENG Shi-ying, SHANG Xue-fang. Progress in Cd polluted soil[J]. *Auhui Agricultural Science Bulletin*, 2006, 12(5): 43-4.
- [4] 许英, 揭雨成, 孙志民, 等. 苕麻品种对镉污染土壤适应性的研究[J]. 中国麻业, 2005, 27(5): 249-253.
XU Ying, JIE Yu-cheng, SUN Zhi-min, et al. A Study on ramie adaptability to Cd polluted soil[J]. *Plant Fibers and Products*, 2005, 27(5): 249-253.
- [5] Agely A A, Sylvia D M, and Lena Q M. Mycorrhizae increase arsenic up-

- take by the hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) [J]. *J Environ Qual*, 2005, 34 :2181–2186.
- [6] Vivas A, Biro B, Ruiz-Lozano J M, et al. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity[J]. *Chemosphere*, 2006, 62(9) :1523–1533.
- [7] Penyalver R, Oger P, López M M, et al. Iron-binding compounds from a *Agrobacterium* spp. Biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophore[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2001, 67 :654–664.
- [8] Rughia I dris, Trifonova R, Puschenreiter M, et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2004, 70 :2667–2677.
- [9] Sow N D M, Dayphin R D, Roblain D, et al. Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces[J]. *Afr J Biotech*, 2005, 4(5) :409–421.
- [10] 夏来坤, 郭天财, 朱云集, 等. 土壤重金属铜、镉胁迫对冬小麦碳氮运转的影响[J]. 水土保持学报, 2006, 20(1) :117–120.
XIA Lai-kun, GUO Tian-cai, ZHU Yun-ji, et al. Effects of stress of copper, cadmium on carbon and nitrogen assimilate translocation in winter wheat[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2006, 20(1) :117–120.
- [11] 何江华, 杜应琼, 周晓红, 等. Cr()对叶菜生长和产量的影响及其在叶菜体内的累积[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(3) :597–601.
HE Jiang-hua, DU Ying-qiong, LIU Yong, et al. Effects of chromium () on the vegetable growth and uptake of chromium[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(3) :597–601.
- [12] 邹 琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京 :中国农业出版社, 2000.
ZOU Qi. Experiment in plant physiology[M]. Beijing :Chinese Agricultural Press, 2000.
- [13] Belimov A A, Dodd I C, Hontzeas N, et al. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling[J]. *New Phytol*, 2009, 181(2) :413–423.
- [14] Pishchik V N, Vorobev N I, Provorov N A. Experimental and mathematical simulation of population dynamics of rhizospheric bacteria under conditions of cadmium stress[J]. *Microbiology*, 2005, 74(6) :735–740.
- [15] Young C C, Kämpfer P, Shen F T, et al. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce)[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005;55(Pt 1) :423–6.
- [16] Gardener B B M, Weller D M. Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10) :4414–4425.
- [17] Gandhi Pragash M, Narayanan K B, Naik P R, et al. Characterization of *chryseobacterium aquaticum* strain PUPC1 producing a novel antifungal protease from rice rhizosphere soil *Journal of microbiology and biotechnology*[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(1) :99–107.