

刘 灿,邹 娣,董 思,等. 1 株耐镉根际促生菌的筛选鉴定及对镉胁迫下油菜种子萌发的影响 [J]. 江苏农业科学,2025,53(1):262-270.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.01.036

1 株耐镉根际促生菌的筛选鉴定及对镉胁迫下油菜种子萌发的影响

刘 灿,邹 娣,董 思,陈嘉懿,白 婧,郑 玉
(湖南人文科技学院农业与生物技术学院,湖南娄底 417000)

摘要:从锡矿山优势植物金荞麦(*Fagopyrum dibotrys*)根际土壤中筛选出 1 株耐镉根际促生菌 A-73-1,对该菌株的菌落形态进行观察,分析该菌株在镉胁迫下的潜在促生能力,同时通过种子萌发试验,探究镉胁迫下该菌株对油菜种子萌发的影响。结合菌落形态、生理生化特征、16S rDNA 序列测序,鉴定该菌株为好氧革兰氏阴性菌,属铜菌(*Cupriavidus metallidurans*)。菌株 IAA 产量最高为 93.33 $\mu\text{g/mL}$;在 243.52 mg/L 镉胁迫下,最大无机溶磷量为 445.61 $\mu\text{g/mL}$,ACC 脱氢酶产量最高为 0.047 86 U/mg。在不同浓度镉(20、40、60 mg/L)胁迫下观察油菜种子的萌发结果,与对照组(不加镉)相比,接种 A-73-1 后,幼苗的根长、茎长、鲜重、干重等生物量指标均显著提升,根系抗氧化酶活性显著提升,丙二醛含量降低;种子萌发后根、茎、叶的镉含量显著降低,尤其是在 60 mg/L 镉胁迫下,分别降低 42.97%、48.36%、77.99%。菌株 A-73-1 有优良的促生能力,并能提高镉胁迫下油菜幼苗的抗逆性,期待本研究结果可以为进一步研发耐镉促生菌剂修复镉污染土壤提供理论依据,同时为“边生产边修复”的修复策略提供潜在解决方案。

关键词:镉胁迫;耐镉根际促生菌 A-73-1;促生特性;油菜种子萌发

中图分类号:S634.304;S182;X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)01-0262-09

镉(antimony, Sb)是一种有毒的类金属,世界卫生组织规定,土壤中镉的最大允许含量为 36 mg/kg,而我国许多地区土壤镉的含量远超规定含量^[1-2]。莫昌琨等发现,在贵州省独山矿区周边的农用地上,镉含量达到 220.80 mg/kg^[3]。陈秋平等对贵州省晴隆镉矿区调查发现,矿区农田土壤中的平均镉含量达到 71.65 mg/kg^[4]。湖南省锡矿山矿区周边的土壤中,镉含量高达 6 946 mg/kg,严重影响当地的植物生长和人们的身体健康^[5-6]。湖南省农田镉污染被认为是亟待解决的重要生态环境问题。2022 年 3 月,生态环境部印发的《关于进一步加强重金属污染防治的意见》中,首次将镉列为重点防控的类金属污染物^[7]。近年来,对土壤镉的相关研究工

作也陆续展开,主要围绕镉对动植物的毒性以及在环境中的迁移转化,但针对农田镉污染的修复工作比较缺乏。目前,对土壤重金属的修复方法主要有物理化学法^[8-9]、生物修复法^[10-11],但均存在处理成本高、修复方法较单一等问题,大多数无法实现农田重金属污染的“边生产边修复”策略。

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是我国种植面积最广的油料作物,其中湖南省是种植面积最大的省份^[12]。甘蓝型油菜以“稻油”轮作为主,对镉、铜、锌等重金属具有较强的富集能力,其籽粒中重金属的富集量比根、茎、叶中低^[13-15]。因此,甘蓝型油菜较适宜于在重金属污染的农田种植且能保持其原有的经济价值,可认为其具备绿色可持续修复所需的关键特质。但目前有关油菜用于镉污染农田修复的研究非常缺乏。

根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是一类存活于土壤中或者定殖于植物根际、根表、根内或植物茎叶内的,可以促进植物生长、增加作物产量或者拮抗植物病原微生物、防治作物病害的一系列细菌的统称^[16-18]。已有研究证明,在重金属污染环境中,一些耐受重金属的 PGPR 能通过抑制重金属的活性而降低农作物对

收稿日期:2023-12-02

基金项目:湖南省自然科学基金-区域联合基金(编号:2023JJ50086);湖南省自然资源厅科技计划(编号:20230105DZ);湖南省教育厅科学研究重点项目(编号:22A0608);全国大学生创新创业项目(编号:S202310553001)。

作者简介:刘 灿(1999—),女,湖南益阳人,硕士研究生,研究方向为生态修复。E-mail:liucan111002@163.com。

通信作者:郑 玉,博士,讲师,主要从事生态修复研究。E-mail:zhengyu7175@163.com。

重金属的吸收量,同时保证粮食的安全生产。Pramanik 等分离得到 1 株对重金属镉具有抗性的 PGPR 菌株 K6,制成菌液后灌溉被镉污染的水稻根际土壤,发现 K6 菌株对水稻幼苗具有一定的抗镉能力,同时能促进水稻根系的生长^[19]。Liaquat 等发现,在 28.10 mg/L 的镉浓度下,嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)处理后的辣椒种子根系长度是未处理辣椒种子的 1.46 倍,该菌具有较强的金属耐受性和对镉的生物修复潜力^[20]。利用 PGPR 作为微生物修复剂,强化油菜生长从而修复镉污染农田土壤,是一种非常有前景的绿色修复策略。

本研究从锡矿山优势植物金荞麦 [*Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara] 的根际土壤中分离、筛选、鉴定得到 1 株耐镉能力较强的促生菌,研究其生理生化特性。植物种子的萌发影响植物的整个生长周期,萌发后的幼苗比植物更容易受到金属毒性的影响。本研究分析镉胁迫下,油菜种子萌发后其幼苗的生长特性及根系的抗氧化酶活性等相关指标,以期利用耐镉 PGPR 与油菜联合修复镉污染农田土壤提供可行方案和理论依据,同时为“边生产边修复”的修复策略提供潜在的解决方案。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2020 年 7 月在湖南省娄底市湖南人文科技学院进行。

供试土壤:于娄底市冷水江市(27°30′49″~27°50′38″N,111°18′57″~111°36′40″E)锡矿山地区,采用 5 点取样法,采集 125 份土样,均装入无菌采样袋,标注地理坐标,带回实验室置于 4℃ 冰柜中保存^[21]。

供试培养基:LB 培养基^[22]、CDM 培养基^[23]、无机磷(PKO)液体培养基^[24]。

供试油菜种子:甘蓝型油菜娄文油 98 种子,由湖南省娄底市农业科学研究所提供。

不同浓度镉(Sb III)溶液由半水合酒石酸镉钾($C_4H_4KO_7Sb \cdot 1/2H_2O$)分析纯配制。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选分离 取根际土壤悬液,梯度稀释至 10^{-3} 涂布于 LB 平板,28℃ 培养 2~4 d 后,挑取不同菌落置于 LB 培养基上划线纯化,暗培养 2~3 d 后,将纯化 1 次后的菌落挑取至含镉的 CDM 培

养基上,至少进行 3 次划线纯化,直至获得单一菌落。将纯化的菌株接种于 LB 斜面培养基,放入 4℃ 冰箱中保存,用于后续试验。

1.2.2 菌株的鉴定与形态观察 对菌株进行形态学鉴定,将菌种涂布在 LB 平板上,28℃ 培养 2~4 d,观察其菌落形态。生理生化试验方法均参照《常见细菌系统鉴定手册》^[25] 进行。利用细菌 DNA 提取试剂盒对筛选出的菌株进行 DNA 提取,然后进行细菌基因组 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为基因组 DNA(20 ng/ μ L)1 μ L、10× Buffer(含 2.5 mmol/L Mg^{2+})5 μ L、*Taq* 聚合酶(5 U/ μ L)1 μ L、dNTP(10 mmol/L)1 μ L、27F 引物(10 mmol/L)1.5 μ L、1492R 引物(10 mmol/L)1.5 μ L、ddH₂O 39.0 μ L。引物序列为 27F:5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3;1492R:5-CTACGGCTACCTTGTACGA-3,以基因组 DNA 为模板。扩增条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,35 个循环;72℃ 终延伸 7 min。反应完成后,取 3 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,确认 PCR 扩增片段。PCR 产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收。回收后送至上海派森诺生物科技有限公司进行序列测定。将测序获得菌株的 16S rDNA 序列与 NCBI GenBank 数据库中的核酸序列对比,通过 BLAST 进行同源分析。

菌株液体培养,培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.5~0.8 时,于 4℃,8 000 r/min,离心 5 min。离心后倒掉上清液,收集沉淀于管底的菌体,使用 PBS 磷酸盐缓冲液洗 1~2 次,舍弃上清液,沿管壁缓慢加入 4℃ 预冷的 2.5% 戊二醛固定液,固定 12 h 后进行 SEM 拍摄。

1.2.3 菌株在不同镉浓度下生长曲线的测定 经 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min 后,将菌株 A-73-1 接种在不同镉浓度(0、243.52、608.80、1 217.60 mg/L)的 LB 液体培养基,在 28℃ 的摇床以 120 r/min 培养 7 d,每天取液 1 次,制成菌悬液并测定 $D_{600\text{ nm}}$ 值。每个处理设重复 3 次,计算其平均值,并绘制生长曲线。

1.2.4 菌株的促生特性研究 采用 Salkowski 比色法^[26]测定菌株 A-73-1 分泌 IAA 的能力,固体 LB 培养基活化 A-73-1 菌株,然后接种于含 0.5 g/L 色氨酸的 LB 液体培养基中,120 r/min 28℃ 培养 48 h,8 000 g 离心 10 min,取 2 mL 上清液于 5 mL 离心管中,再加入等体积的 Salkowski 比色液

(10.8 mol/L H_2SO_4 含 4.5 g/L FeCl_3), 室温避光放置 30 min。根据混合液的颜色可初步判断产 IAA 量(若菌株产 IAA, 混合液则显示红色); 然后用分光光度计测定 $D_{530\text{ nm}}$, 以空白培养基作对照, 重复 3 次。以纯 IAA 浓度(0、30、60、90、120、150 $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, $D_{530\text{ nm}}$ 值为纵坐标, 作标准曲线。根据 IAA 标准曲线计算菌液中的 IAA 浓度^[27]。参照 Honma 等的方法^[28-29] 进行 ACC 脱氨酶活性测定。将供试菌株接种在已灭菌的含不同镉浓度(0、243.52、608.80、1 217.60 mg/L) 的 PKO 液体培养基中, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 的摇床培养 7 d, 每天记录 pH 值的变化; 同时取 10 mL 溶液, 4 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液用钼锑抗比色法测定溶磷量^[30]。

1.2.5 油菜种子萌发试验 将 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 恒温振荡培养 24 h 的菌液离心后, 收集菌体, 再用无菌水将菌液重新悬浮混匀至 $D_{600\text{ nm}} \approx 1$, 作为菌悬液备用。挑选颗粒饱满的油菜种子, 用 75% 乙醇溶液消毒 10 min 后, 用无菌水洗净, 沥干后放入菌悬液浸泡 2 h 后, 迅速将种子取出, 在无菌环境中晾干, 备用。在培养皿中铺 2 层滴入等量不同镉浓度(0、20、40、60 mg/L) 溶液浸湿的滤纸, 放置菌液处理过的 30 粒油菜种子, 每个处理重复 3 次, 置于人工气候培养箱, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 75%, 光—暗周期为 14 h—10 h 静置培养。以不加菌液处理的种子作为对照。培养 7 d 后, 用游标卡尺测量幼苗的根长、茎长, 用天平称其鲜重、干重等指标。

1.2.6 油菜种子萌发试验 为测定抗氧化酶活性和丙二醛(MDA) 含量, 萌发 7 d 后, 取油菜根、茎连接处的新鲜组织, 置于冰水浴条件下研磨, 取上清液置于冰中进行酶活性测定。过氧化氢酶(catalase, CAT) 活性采用可见光法测定, 过氧化物酶(peroxidase, POD) 活性采用比色法测定, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活性采用羟胺法测定, MDA 含量采用硫代巴比妥酸(TBA) 法测定。检测均采用试剂盒法, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2.7 油菜种子萌发后各部位镉含量测定 油菜种子萌发 7 d 后, 收集根、茎、叶, 测定其镉含量, 按照 GB/T 5009.268—2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》, 采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS) 测定。

1.3 数据分析

数据处理采用 Microsoft Excel 2010 计算平均值

和标准误, 用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素方差分析及多重比较, 数据以平均值 \pm 标准差表示, 并用 Origin 8.0 软件绘制相关图形。

2 结果与分析

2.1 耐镉菌株的筛选及分子生物学鉴定

从锡矿山金荞麦根际土壤中分离得到耐镉菌株, 命名为 A-73-1。在 LB 培养基上, 菌落隆起, 边缘规则, 表面光滑, 呈黄色, 如图 1-A 所示。当 16S rDNA 序列同源性高于 97% 时, 可以认为是属内的同种^[31]。以 16S rDNA 基因通用引物 27F/1492R 对菌株 A-73-1 进行 PCR 扩增, 获得 1 500 bp 左右的特异性条带(图 1-A)。将菌株 A-73-1 的 16S rDNA 序列在 NCBI GenBank 数据库中比对, 显示菌株 A-73-1 与 *Cupriavidus metallidurans* strain NBRC 102507 (NR_114128.1)、*Cupriavidus metallidurans* CH34 (NR_074704.1) 的相似性高达 98.86%, 故判断菌株 A-73-1 为贪铜菌(*Cupriavidus metalliduran*)。扫描电镜结果如图 1-C、图 1-D 所示, 菌体呈短杆状, 表面有褶皱。

2.2 菌株生理生化试验结果

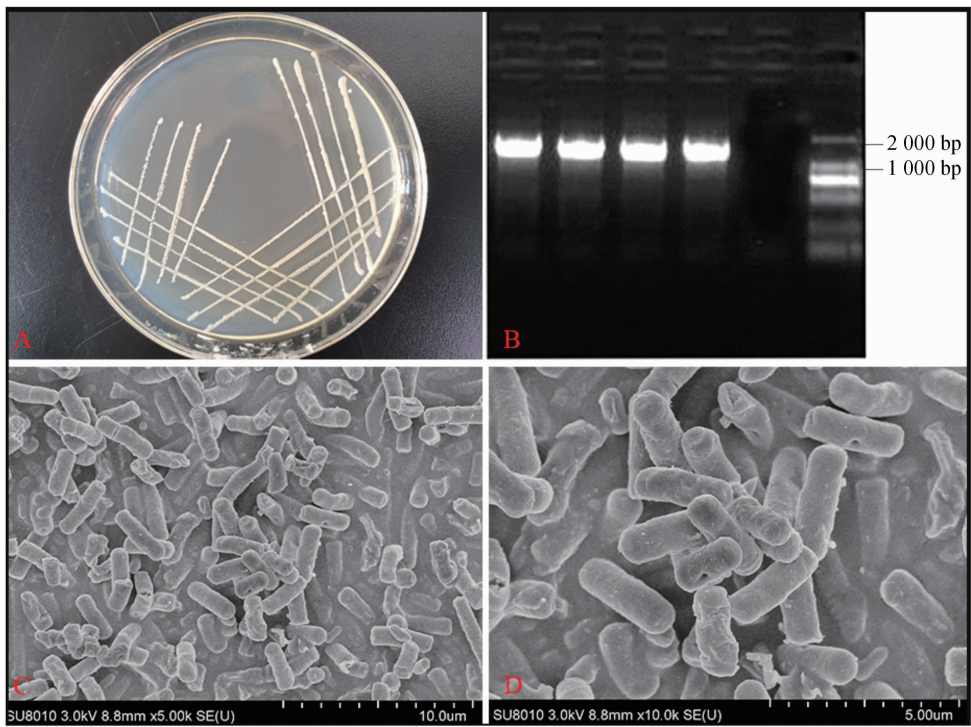
菌株 A-73-1 的生理生化试验结果如表 1 所示。菌株 A-73-1 是一株好氧革兰氏阴性菌, 经淀粉水解、过氧化氢酶试验、糖发酵试验、明胶液化试验, 结果均为阳性, 甲基红试验结果为阴性。

2.3 不同浓度镉对菌株 A-73-1 生长影响

如图 2 可知, 菌株 A-73-1 在 0、243.52、608.80、1 217.60 mg/L 的镉浓度下, 菌株的 $D_{600\text{ nm}}$ 随着培养时间的增加迅速增长。对照(不加镉)、243.52 mg/L 镉浓度下的菌株 $D_{600\text{ nm}}$ 在培养 3 d 时达到最高值, 分别为 2.156 6、2.578 4。随着培养时间的延长, 对照、243.52 mg/L 镉浓度下的菌株 $D_{600\text{ nm}}$ 在 4 d 时开始下降。608.80 mg/L 镉浓度下的菌株 $D_{600\text{ nm}}$ 则在 4 d 时达到最高值, 为 2.062 7, 在 5 d 时开始平缓降低。在 1 217.60 mg/L 镉浓度下, 菌株刚开始生长较缓慢, $D_{600\text{ nm}}$ 在 4 d 时达到最高值 1.832 4, 到 5 d 时便出现降低的情况。试验初步表明, 菌株 A-73-1 的最适生长浓度为 243.52 mg/L 镉浓度, 最佳培养时间为 3 d; 即使在高达 1 217.60 mg/L 的镉浓度下, 菌株 A-73-1 也能生长, 进一步表明菌株 A-73-1 具有修复被重金属镉污染土壤的潜力。

2.4 菌株 A-73-1 产 IAA 的能力

植物根际促生菌能够分泌植物激素 IAA, 能够



A. 菌株 A-73-1 的形态学特征；B. 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 对 A-73-1 菌株 DNA 的 PCR 扩增结果；C. 菌株 A-73-1 在 10 000 倍电镜下的形态；D. 单个菌体在 30 000 倍电镜下的形态

图1 菌株形态学特征及 DNA 的 PCR 扩增

表 1 菌株 A-73-1 的生理生化试验结果

生理生化	试验结果
淀粉水解	+
过氧化氢酶试验	+
糖发酵试验	+
甲基红试验	-
革兰氏染色	-
明胶液化试验	+
厌氧生长试验	-

注：+ 为阳性；- 为阴性。

有效刺激植物细胞伸长,促进细胞分裂与分化。菌株 A-73-1 产生的 IAA 如图 3-A 所示,根据标准

曲线 $y = 0.0206x + 0.1189$ ($r^2 = 0.9992$), 计算菌株 A-73-1 产 IAA 的能力,菌株 A-73-1 产 IAA 的量达到 $(93.33 \pm 1.03) \mu\text{g/mL}$, 这说明该菌株能分泌大量的 IAA。

2.5 镉胁迫下菌株 A-73-1 的溶磷能力及 pH 值的动态变化

培养前,将不同镉浓度培养液的 pH 值统一调整至 7 左右。菌株在不同镉胁迫下产生的溶磷量及 pH 值的动态变化如图 4 所示。结果表明,在不同镉浓度下, pH 值和溶磷量呈负相关。从培养 2 d 开始,不同镉浓度培养液 pH 值急剧下降,溶磷量均显著增加。不加镉、243.52 mg/L 镉浓度下的培养液

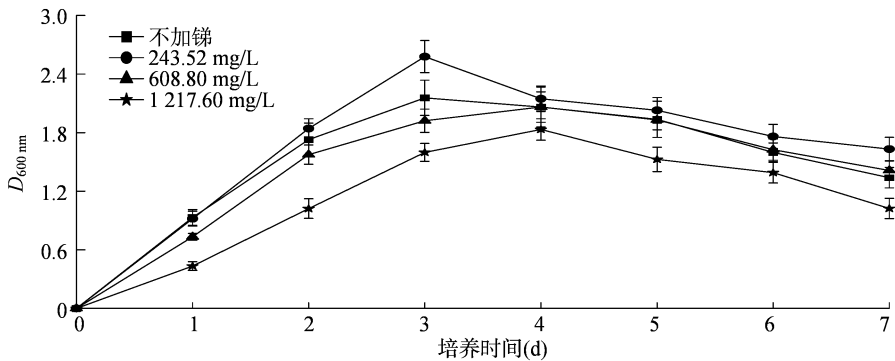


图2 菌株 A-73-1 不同镉浓度下生长曲线

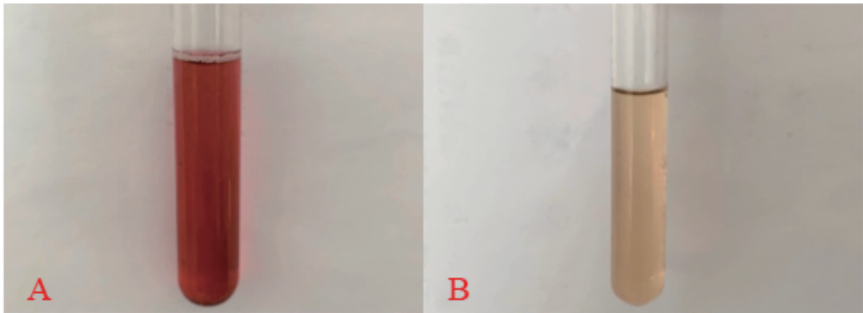
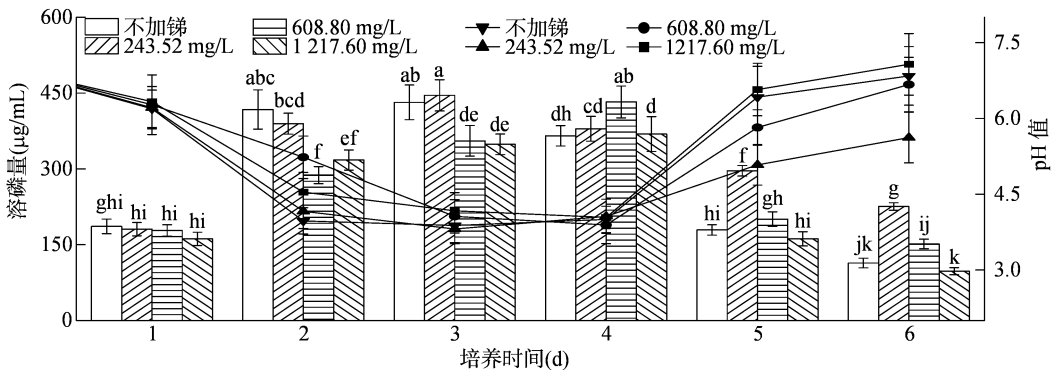


图3 Salkowski 比色液中接种 A-73-1(A)、不接种 A-73-1(B) 产生 IAA 的显色结果



柱状图为溶磷量，柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)；折线图为 pH 值
图4 菌株 A-73-1 在不同镉浓度的 PKO 培养基中溶磷量变化和 pH 值动态变化

在培养 3 d, 溶磷量达到最大值, 分别为 431.75、445.61 $\mu\text{g/mL}$, pH 值则降至 3.86、3.82。608.80、1 217.60 mg/L 镉浓度下的培养液则在培养 4 d 溶磷量达到最大值, 分别为 432.45、368.97 $\mu\text{g/mL}$, pH 值则分别降至 3.88、4.05。随着培养时间的延长, 菌株可能因为营养物质缺乏或吸收过量镉而死亡, 从而导致溶磷量逐渐下降。到 6 d, 不加镉、243.52、608.80、1 217.60 mg/L 镉浓度下的溶磷量分别下降至 113.67、225.59、151.44、97.36 $\mu\text{g/mL}$, pH 值分别为 6.84、6.00、6.67、7.07。243.52 mg/L 镉浓度胁迫 3 d, 菌株 A-73-1 的溶磷能力达到最佳。以上结果表明, 不同浓度镉胁迫下菌株 A-73-1 仍具有溶磷能力, 说明菌株可用于镉污染农田修复。

2.6 镉胁迫下菌株 A-73-1 产 ACC 脱氨酶的能力

如表 2 所示, 在不同浓度镉处理下, 菌株 A-73-1 产生的 ACC 脱氨酶活性表现为 243.52 mg/L > 不加镉 > 608.80 mg/L > 1 217.60 mg/L。在 243.52 mg/L 镉浓度下菌株 A-73-1 产生的 ACC 脱氨酶活性为 (0.04786 ± 0.0123) U/mg, 且在高达 1 217.60 mg/L 镉浓度下菌株也仍能产生 ACC 脱氨酶。

表 2 镉胁迫下菌株 A-73-1 的 ACC 脱氨酶活性

镉浓度	ACC 脱氨酶活性 (U/mg)
不加镉	$0.03520 \pm 0.0009\text{b}$
243.52 mg/L	$0.04786 \pm 0.0123\text{a}$
608.80 mg/L	$0.02185 \pm 0.0011\text{c}$
1 217.60 mg/L	$0.01937 \pm 0.0004\text{c}$

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$), 表 3 同。

2.7 不同浓度镉胁迫下菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子的影响

2.7.1 菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子的促生效果 在镉胁迫下, 油菜种子萌发 7 d 后, 接种菌株 A-73-1 组的油菜种子萌发情况要显著优于对照组。由表 3 可知, 加入菌株 A-73-1 后油菜种子萌发的根长显著增加; 其中, 在 20 mg/L 的镉浓度下, 最长达到 8.40 cm, 较对照增长 252.94%; 在 不加镉的情况下, 较对照组增加 45.09%。未接种 A-73-1 的对照组在 40、60 mg/L 镉浓度下均未生根, 只有根茎。接种 A-73-1 后, 对萌发种子茎的增长同样表现出类似显著性, 在 不加镉、20、40、60 mg/L 镉浓度胁迫下, 接种后较对照组分别增加

了 0.56、1.41、3.10、6.26 倍。鲜重在不加镉的对照组和试验组之间没有表现出显著差异。其他镉胁迫下试验组的鲜重、干重均表现出比对照组显著增

长。试验结果表明,接种菌株 A-73-1 后能明显促进萌发后油菜种子的生长。

表 3 不同浓度镉胁迫下菌株 A-73-1 对油菜种子的促生效果

处理组	根长 (cm)	茎长 (cm)	鲜重 (mg)	干重 (mg)
不加镉(CK)	4.68 ± 0.44c	2.50 ± 0.38c	920.00 ± 0.15b	85.00 ± 0.004c
不加镉 + A-73-1	6.79 ± 0.71b	3.91 ± 0.54a	960.00 ± 0.21b	110.00 ± 0.013b
20 mg/L	2.38 ± 0.25e	1.59 ± 0.12d	670.00 ± 0.09d	51.00 ± 0.008d
20 mg/L + A-73-1	8.40 ± 0.51a	3.83 ± 0.21a	1 230.00 ± 0.14a	186.00 ± 0.021a
40 mg/L	—	0.80 ± 0.08e	470.00 ± 0.05e	42.00 ± 0.001d
40 mg/L + A-73-1	5.15 ± 0.57c	3.28 ± 0.14b	950.00 ± 0.13b	105.00 ± 0.017b
60 mg/L	—	0.43 ± 0.08f	280.00 ± 0.06f	25.00 ± 0.001e
60 mg/L + A-73-1	3.78 ± 0.47d	3.12 ± 0.13b	830.00 ± 0.16c	76.00 ± 0.014c

2.7.2 菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子抗氧化酶及脂质过氧化物的影响 镉胁迫可以诱导 ROS (活性氧自由基)的产生,从而表现出对油菜等植物的毒害作用。由 CAT、POD、SOD 等活性物质组成的抗氧化酶系统可以消除 ROS 的生成,从而保护植物细胞免受过氧化损伤带来的毒害。油菜种子在不加镉、20、40、60 mg/L 镉浓度胁迫下,添加菌株 A-73-1 后,测得萌发 7 d 后的 CAT 活性(图 5-A)与相同处理下的对照比,均有显著提高,分别提高 110.11%、150.20%、186.48%、208.52%。测得 POD 活性(图 5-B),分别提高 79.21%、120.52%、120.11%、140.14%。测得 SOD 活性(图 5-C),分别提高 21.96%、73.55%、147.69%、230.68%。在镉胁迫下,植物产生抗氧化酶的能力随着镉浓度的增加而逐渐降低,而接种促生菌株 A-73-1 后可以提高植物产生 CAT、POD、SOD 等抗氧化酶的能力,使得油菜根际细胞受到的氧化损伤得到有效抑制。

MDA 的积累量能够间接反映出细胞损伤的程度,如图 5-D 可知,接种菌株 A-73-1 的处理组在 20、40、60 mg/L 镉浓度的胁迫下显著降低了 MDA 的积累,分别降低 37.02%、49.30%、57.17%。在 60 mg/L 的镉浓度下,对照组的 MDA 含量为 9.27 nmol/mL,处理组的 MDA 含量仅为 3.97 nmol/mL。试验结果说明,接种菌株 A-73-1 后能提高油菜种子的抗逆性,增强镉胁迫下植物的自我调控能力。

2.7.3 菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子吸收镉的影响 由图 6 可知,萌发 7 d 后,接种菌株 A-73-

1 能降低萌发后油菜种子镉的积累,镉胁迫下油菜根(根茎)、茎、叶中的镉含量均随胁迫浓度的增加呈增加趋势,且根(根茎) > 茎 > 叶。特别是在 60 mg/L 镉胁迫处理下,根(根茎)、茎、叶的镉浓度分别比未接种菌株 A-73-1 的处理降低 42.97%、48.36%、77.99%。试验结果表明,油菜种子接种菌株 A-73-1 后能显著降低镉的积累。

3 结论与讨论

微生物修复作为一种新兴的土壤重金属修复技术,已经成为当前修复重金属污染土壤的研究热点。受重金属污染的土壤中,可能生存着某些能适应该种污染环境且完成自身正常生理代谢的细菌种类,这些细菌能产生植物激素、铁载体、有机酸、酶类等代谢产物,并促进植物生长^[32]。本研究从锡矿山优势植物金荞麦根际土样中,分离出 1 株耐镉根际促生细菌 A-73-1,根据形态学观察、16S rDNA 基因测序等方法,鉴定该菌株为贪铜菌(*Cupriavidus metalliduran*)。

研究发现,该菌对多种重金属都有较好的耐受性,能在 1 217.60 mg/L 镉浓度下生存。李姗姗等从 Sb 污染的土壤中筛选得到 1 株假单胞菌属菌株 ZLX16,能耐受 0.24 mg/L 的 Sb(Ⅲ)及 1.22 mg/L 的 Sb(V)^[32]。杜辉辉等从湖南省冷水江锡矿山尾渣土壤中筛选分离出 3 株耐镉细菌[苍白杆菌(*Ochrobactrum*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)],最高耐镉浓度可达 2 000 mg/L^[33]。菌株 A-73-1 在镉胁迫下的 IAA 产量为 93.33 μg/mL,这一结果优于聂孝红等的发现,即非

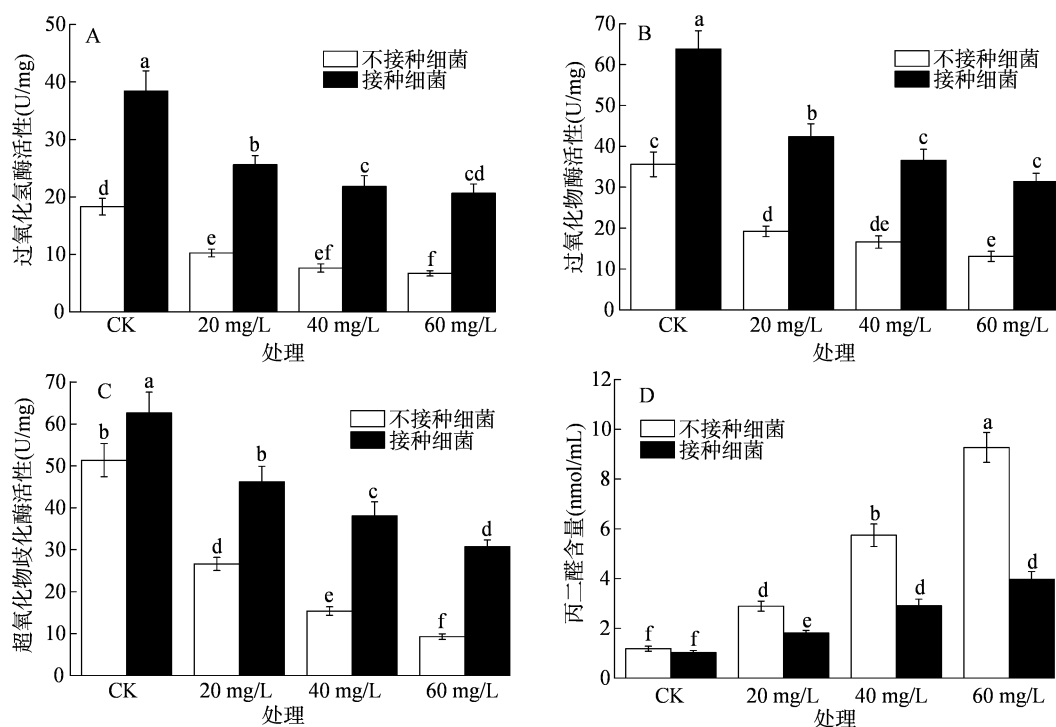


图5 不同浓度镉胁迫下菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子根系 CAT、POD、SOD 活性和 MDA 含量的影响

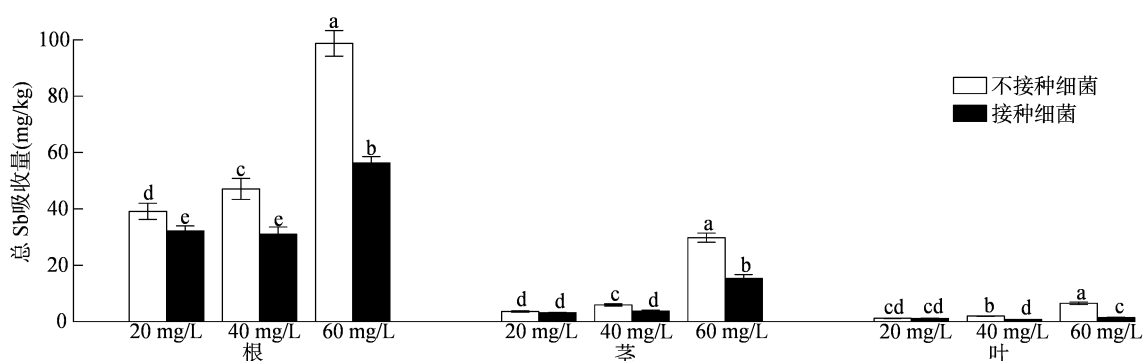


图6 不同浓度镉胁迫下菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子根、茎、叶中镉含量的影响

镉胁迫下 4 株均能分泌 IAA 的细菌, 其中 *Stenotrophomonas* 属菌株 NXH-3 的 IAA 最高产量为 $90.16 \mu\text{g/mL}$ ^[34]。在 243.52 mg/L 镉胁迫下菌株 A-73-1 的 ACC 脱氨酶产量为 0.04786 U/mg , ACC 脱氨酶能缓解逆境胁迫下所产生的乙烯对植物造成的伤害, 从而提升植物的抗逆能力, 促进植物生长发育^[35-36]。同时, 在 243.52 mg/L 镉浓度下菌株 A-73-1 的可溶磷产量达到 $445.61 \mu\text{g/mL}$, 这一结果优于吕俊等的发现, 即菌株 WJ27 伯克霍尔德菌在第 5 天的最大溶磷量为 $411.98 \mu\text{g/mL}$ ^[30]。初步推测, 菌株 A-73-1 通过产有机酸促进难溶性磷酸盐转变为可溶磷, 但其解磷机制还需进一步研究。菌株 A-73-1 在镉胁迫下的优良促生性具有进一

步开发为微生物菌剂的潜力。

不同浓度镉胁迫下的油菜种子萌发试验发现, 与未接种的处理对比, 接种 A-73-1 萌发后种子的根长、茎长、鲜重、干重、镉含量均有显著性差异, 说明菌株 A-73-1 能够在一定程度上缓解重金属镉对油菜种子萌发的影响, 减轻镉对萌发后种子的生长毒性。其他研究也发现, PGPR 能促进重金属胁迫下萌发后种子的生长, 如姚强等将小麦种子浸泡在菌液中与不接菌的处理相比, 芽长和根长平均提升 $20\% \sim 26\%$ ^[37]。重金属胁迫能使植物产生大量 ROS, 破坏植物蛋白质和 DNA 等, 最终导致植物的氧化胁迫^[38]。SOD、CAT、POD 通过清除过量 ROS 而减缓重金属对植物的胁迫, 是植物抵抗重金

属胁迫重要的抗氧化酶^[39]。研究结果显示,在镉胁迫下接种菌株 A-73-1,可通过提高 SOD、CAT、POD 的活性来抵抗这种胁迫产生的氧化损伤,从而帮助萌发后的种子提高对重金属的抗性并生长。本研究中 MDA 含量的减少也证明了这一点,尤其在高浓度镉胁迫下(60 mg/L),接种菌株 A-73-1 的处理组显著降低了萌发后种子 MDA 的积累,降低 57.17%。MDA 是植物细胞膜发生过氧化反应下的产物,MDA 的过量积累会引起蛋白质、DNA 等大分子的交联聚合,导致植物细胞膜结构完整性和功能发生改变^[40]。史雅甜研究发现,羊蹄草的 MDA 含量随着 Cd、Pb 浓度的升高而增加^[41]。另一方面,本研究也表明,与未加菌的处理对比,添加菌株 A-73-1 的油菜种子萌发后,其根、茎、叶的镉含量显著下降($P < 0.05$);尤其是叶部,60 mg/L 镉胁迫处理下降了 77.99%,说明菌株 A-73-1 能显著降低镉在萌发后油菜种子体内的向上转运。推测菌株 A-73-1 可能是通过产生植物激素(如 IAA)减少镉在萌发后种子中的积累与转运。也有研究表明,IAA 能通过增加根尖数量和根表面积来减少重金属在根部的积累^[42]。这也可能通过与细菌 IAA 诱导在根部产生螯合剂等分泌物形成螯合物,从而减少镉的吸收,需要作进一步的研究。

PGPR 对植物在非生物胁迫下具有一定的促生效果,并增强植物抗逆能力,但未见报道 *Cupriavidus metallidurans* 对镉胁迫下油菜种子的促生作用。本研究从锡矿山优势植物金荞麦根际土样得到 PGPR *Cupriavidus metallidurans* A-73-1,能显著促进镉胁迫下萌发后油菜种子的生长,且能显著降低镉在油菜种子体内的积累与转运。但本研究仅对菌株 A-73-1 基本促生效应进行了初步探讨,针对菌株 A-73-1 对萌发后油菜种子的内在促生机制还需进一步深入研究。总体来说,本试验筛选的耐镉 PGPR 菌株 A-73-1,对镉胁迫下萌发后种子的生长发挥着重要的作用。期待本研究结果可为 A-73-1 进一步开发成促生菌剂或微生物有机肥用于修复镉污染农田提供依据,也为“边生产边修复”的可持续农业提供潜在的解决方案。

参考文献:

- [1] Deng R J, Chen Y L, Deng X P, et al. A critical review of resistance and oxidation mechanisms of Sb-oxidizing bacteria for the bioremediation of Sb(III) pollution[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 738596.
- [2] Bai J, Zhang W, Liu W Y, et al. Implications of soil potentially toxic elements contamination, distribution and health risk at human's xikuangshan mine[J]. *Processes*, 2021, 9(9): 1532.
- [3] 莫昌琨, 李家有, 肖超. 独山锡矿区农用土壤镉污染状况研究[C]//中国环境科学学会. 2015 年中国环境科学学会学术年会. 深圳, 2015: 4.
- [4] 陈秋平, 胥思勤, 孙浩然, 等. 锡矿区土壤 As 和 Sb 形态分布及生态风险评价[J]. *地球与环境*, 2014, 42(6): 773-778.
- [5] 任杰, 刘晓文, 李杰, 等. 我国锡的暴露现状及其环境化学行为分析[J]. *环境化学*, 2020, 39(12): 3436-3449.
- [6] Zhu Y M, Yang J G, Wang L Z, et al. Factors influencing the uptake and speciation transformation of antimony in the soil-plant system, and the redistribution and toxicity of antimony in plants[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 738: 140232.
- [7] Zeng S Y, Ma J, Yang Y J, et al. Spatial assessment of farmland soil pollution and its potential human health risks in China[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 687: 642-653.
- [8] Song P P, Xu D, Yue J Y, et al. Recent advances in soil remediation technology for heavy metal contaminated sites: a critical review[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 838(Pt 3): 156417.
- [9] 屠兴坤. 土壤重金属镉污染修复研究进展[J]. *广东化工*, 2021, 48(24): 93-94, 115.
- [10] 张譔, 郭婧. 土壤镉污染及其修复技术[J]. *工程技术研究*, 2021, 6(15): 249-250.
- [11] 赵云峰, 张涛, 田志君, 等. 矿区周边重金属污染土壤植物修复技术研究进展[J]. *城市地质*, 2020, 15(1): 22-33.
- [12] 范连益, 惠荣奎, 邓力超, 等. 湖南油菜产业发展的现状、问题与对策[J]. *湖南农业科学*, 2020(4): 80-83, 87.
- [13] Ren X M, Guo S J, Tian W, et al. Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1455.
- [14] Zhang J W, Cao X R, Yao Z Y, et al. Phytoremediation of Cd-contaminated farmland soil via various *Sedum alfredii*-oilseed rape cropping systems: efficiency comparison and cost-benefit analysis[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 419: 126489.
- [15] 孙刚, 刘针延, 王琪, 等. 不同油菜品种对有色金属冶炼区土壤重金属吸收累积研究[J]. *分子植物育种*, 2022: 1-11 (2022-03-25) [2023-11-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220324.1643.016.html>.
- [16] Vociante M, Grifoni M, Fusini D, et al. The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(3): 1231.
- [17] Goswami D, Thakker J N, Dhandhukia P C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review[J]. *Cogent Food & Agriculture*, 2016, 2(1): 1127500.
- [18] Basu A, Prasad P, Das S N, et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects[J]. *Sustainability*, 2021, 13(3): 1140.
- [19] Pramanik K, Mitra S, Sarkar A, et al. Alleviation of phytotoxic

- effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 351: 317–329.
- [20] Liaquat F, Munis M F H, Arif S, et al. Cd-tolerant SY-2 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*: a potential PGPR, isolated from the Nanjing mining area in China[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(12): 519.
- [21] 李玲玲. 阳谷县麦田杂草发生现状分析[J]. *基层农技推广*, 2020, 8(11): 16–18.
- [22] 王威, Toe T, 张亚, 等. 一株烟草肠杆菌(*Enterobacter tabaci*) S4 菌株的鉴定及其效果测定[J]. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(3): 407–412.
- [23] Weeger W, Lièvrement D, Perret M, et al. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment[J]. *Biometals*, 1999, 12(2): 141–149.
- [24] 杨统一, 杜秋霞, 刘静霏, 等. 一株桑树根际促生菌的筛选鉴定及促生性能研究[J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(1): 80–84, 146.
- [25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 372–384.
- [26] 吴丹, 张志鹏, 马玉超. 铅锌矿区耐砷细菌的分离、鉴定及性质研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(5): 210–218.
- [27] 张东艳, 刘晔, 吴越, 等. 花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(1): 104–110.
- [28] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 42(10): 1825–1831.
- [29] Saleh S S, Glick B R. Involvement of gacS and rpoS in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(8): 698–705.
- [30] 吕俊, 于存. 一株高效溶磷伯克霍尔德菌的筛选鉴定及对马尾松幼苗的促生作用[J]. *应用生态学报*, 2020, 31(9): 2923–2934.
- [31] Wei G F, Pan L, Du H M, et al. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 59(1): 91–108.
- [32] 李姗姗, 张立鑫, 李梅. 高效铈氧化菌的筛选鉴定及其对土壤中铈迁移转化的影响[J]. *环境工程学报*, 2022, 16(5): 1602–1609.
- [33] 杜辉辉, 刘新, 陶洁, 等. 3 种耐铈土壤细菌的筛选及对铈的吸附研究[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(6): 2205–2211.
- [34] 聂孝红, 尹昊, 郭东鑫, 等. 四株耐铈细菌的生物学特性及其对油菜在铈污染土壤中的促生作用[J]. *生态学杂志*, 2017, 36(6): 1658–1666.
- [35] Jha C K, Sharma P, Shukla A, et al. Microbial enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase: an elixir for plant under stress[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2021, 115: 101664.
- [36] 王琪媛, 王甲辰, 叶磊, 等. 含 ACC 脱氨酶的根际细菌提高植物抗盐性的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(2): 174–186.
- [37] 姚强, 董晓霞, 宫志远, 等. 滨海盐碱地产 ACC 脱氨酶细菌的筛选及根际促生研究[J]. *山东农业科学*, 2020, 52(2): 54–58.
- [38] 李艳楠, 袁存霞, 张肖冲, 等. 耐多种重金属细菌的筛选、鉴定和酶活测定[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(10): 44–52.
- [39] 葛坤, 王培军, 邵海林, 等. 重金属胁迫对植物生理生化影响及其抗性机理研究[J]. *山西林业科技*, 2021, 50(3): 43–46.
- [40] 辛树权, 母若雨, 时东方, 等. 一株产多胺菌的分离及 NaCl 胁迫下对黄瓜幼苗生长的影响[J]. *吉林农业大学学报*, 2017, 39(6): 675–682.
- [41] 史雅甜. Cd、Pb 及其复合污染胁迫对羊蹄生长和生理特性的影响[D]. 南昌: 江西师范大学, 2017: 40–41.
- [42] Zheng Y, Tang J Q, Liu C, et al. Alleviation of metal stress in rape seedlings (*Brassica napus* L.) using the antimony-resistant plant growth-promoting rhizobacteria *Cupriavidus* sp. S-8-2[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 858(Pt 3): 159955.