

# 耐铜苏丹草根内生细菌的分离筛选及其生物学特性研究<sup>①</sup>

王璐, 何琳燕, 盛下放\*

(农业部农业环境微生物实验室, 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

**摘要:** 从生长在铜矿废弃地土壤中的 Cu 耐性苏丹草根中分离筛选到二株产 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氢酶内生细菌 K1-6 和 K3-9 菌株, 并对菌株生物学特性进行了研究。菌株 K1-6 和 K3-9 具有较强的 Cu 抗性和多种抗生素抗性, 菌株 K1-6 和 K3-9 能够溶磷和分泌吲哚乙酸(IAA), 另外, 菌株 K3-9 还能够产生铁载体和精氨酸脱羧酶, 菌株 K1-6 和 K3-9 对温度、pH 和盐浓度具有一定的耐受性, 经 16S rDNA 序列分析, 菌株 K1-6 和 K3-9 分别被鉴定为根瘤菌属(*Rhizobium* sp. K1-6)和肠杆菌属(*Enterobacter aerogenes* K3-9)。采用平皿培养试验研究了菌株 K1-6 和 K3-9 对生长在不同浓度 Cu(0、4 mg/L)环境中的苏丹草的生长和吸收 Cu 的影响。结果表明, 接菌处理苏丹草根部和地上部干重分别比对照增加了 10.6%~45.5% 和 13%~40%, 差异达显著水平( $P < 0.05$ ); 接菌株 K1-6 处理苏丹草根部和地上部 Cu 含量比对照增加了 46% 和 85% ( $P < 0.05$ ), 而接菌株 K3-9 处理苏丹草根部和地上部 Cu 含量与对照相比没有显著差异。另外, 接菌株 K1-6 处理苏丹草根部和地上部总 Cu 吸收量比对照增加了 88% 和 114% ( $P < 0.05$ ), 接菌株 K3-9 处理苏丹草根部总 Cu 吸收量比对照增加了 44% ( $P < 0.05$ )。另外, 接菌株 K1-6 和 K3-9 处理的苏丹草根部吸收的 Cu 是地上部吸收 Cu 的 16~23 倍。研究表明, 分离自耐铜苏丹草根部的内生细菌具有多种植物促生特性, 能够显著促进苏丹草的生长、提高苏丹草对 Cu 的耐受性, 并强化苏丹草根部对 Cu 的富集能力。另外, 不同的内生细菌对苏丹草的生长、富集和耐受 Cu 的影响不同。

**关键词:** 铜矿废弃地; 苏丹草; 植物内生促生细菌; *Rhizobium* sp. K1-6; *Enterobacter aerogenes* K3-9;

**中图分类号:** X53

由于铜矿开采和提炼而产生的铜矿废弃地, 不仅占用了土地资源, 而且对相邻的生态系统和人类健康产生严重的影响<sup>[1-4]</sup>, 而铜矿废弃地因其营养状况差和重金属的毒害导致植被自然恢复困难<sup>[5-6]</sup>。为了矿区废弃地土壤资源的利用和生态环境的保护, 人们开展了大量的矿区废弃地植被恢复和修复等研究工作<sup>[4, 7]</sup>。植物修复因其成本低、环境友好以及可大规模原位修复等优点备受关注<sup>[8-9]</sup>。研究发现一些能源植物对重金属具有一定的耐受性<sup>[5-6]</sup>, 利用能源植物对重金属污染矿区废弃地进行生态重建, 能将土壤修复与生物能源生产有机结合, 具有广阔的应用前景<sup>[10]</sup>。其中苏丹草作为一年生禾本科高粱属能源植物, 适应性广、植株根系发达、生物量大、生长周期短、可多次刈割, 有望用于矿区废弃地的生态重建。然而由于矿区废弃地土壤的水肥条件恶劣、重金属等有害物质含量高, 能源植物很难定居或生长不良<sup>[4]</sup>,

从而限制了能源植物苏丹草对铜矿废弃地的植物修复效率。

植物内生细菌(endophytic bacteria)是指能在健康植物组织内栖居而对植物不造成实质性危害并与植物建立了和谐联合关系的微生物<sup>[11]</sup>。植物内生细菌可以通过产生的 ACC 脱氢酶、IAA、铁载体以及精氨酸脱羧酶等促进植物生长, 提高植物对重金属的耐受性和富集能力<sup>[8, 12-16]</sup>。虽然有关重金属污染土壤和植物体内重金属抗性细菌的筛选、菌株对植物生长和富集重金属的影响等研究已有不少报道<sup>[14, 17-19]</sup>, 但有关从耐受重金属的苏丹草根内分离 Cu 抗性植物促生细菌并研究其生物学特性及其对苏丹草生长和富集 Cu 的影响的研究至今未见报道。本项目的开展有望为植物-微生物联合修复体系的建立和铜矿废弃地生态修复以及能源植物的生产提供理论基础和技术途径。

基金项目: 国家自然科学基金项目(40871127, 41171257)资助。

\* 通讯作者(xfsheng@njau.edu.cn)

作者简介: 王璐(1988—), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事重金属污染土壤植物-微生物联合修复研究。E-mail: wanglu813126@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤采集和分析

供试土壤采自南京汤山铜矿废弃地(31°14' ~ 32°07'N, 118°22' ~ 119°14'E)0 ~ 20 cm 表层土, 土壤类型为黄棕壤, 自然风干过 20 目筛, 土壤 pH、有机质、速效性氮、磷和钾等测定按土壤农化常规分析法<sup>[20]</sup>。土壤 Cu、Pb、Zn、Mn 总量测定采用硝酸-盐酸-高氯酸消煮土壤样品, 5% HNO<sub>3</sub> 定容后用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测定; 土壤水溶态、醋酸铵提取态和二乙基三胺五乙酸(DTPA)提取态 Cu 含量的测定: 准确称取自然风干土壤 3.00 g 于 50 ml 离心管中, 以 1:2 的土水比分别加入 6 ml 去离子水、1 mol/L NH<sub>4</sub>OAC 和 0.05 mol/L DTPA, 分别振荡提取 2 h, 12 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液用 ICP-OES 分别测定溶液中的土壤水溶态、NH<sub>4</sub>OAC 提取态和 DTPA 提取态 Cu 含量。

### 1.2 供试植物

供试植物为禾本科能源植物苏丹草(*Sorghum sudanense*(Piper)Stapf.), 种子购自于江苏省南京市明达种子经营部。

### 1.3 苏丹草根内生细菌的分离筛选和苏丹草生物量及铜含量分析

盆栽试验在温室中进行, 所用土壤为上述铜矿废弃地土壤, 每公斤土壤拌入灭菌有机肥(含有机质 310 g/kg, 氮 20 g/kg, 磷 8.7 g/kg, 钾 7.1 g/kg)2 g, 土壤充分混匀后装入塑料盆, 每盆 6.0 kg 土壤, 每盆播入经 2% 次氯酸钠表面消毒的苏丹草种子 15 颗, 播种两周后间苗, 每盆留苗 8 株, 培养温度: 白天 25 ~ 32°C, 夜间 21 ~ 25°C, 相对湿度 75% ~ 79%, 苏丹草生长期间适时浇水, 苏丹草生长 80 天后用于细菌的分离筛选。

取出苏丹草植株, 用灭菌剪刀取植株根部和地上部, 先用自来水将根部清洗干净, 然后用无菌水再清洗一遍, 接着用 75% 乙醇浸泡 3 min 后, 用无菌水冲洗一遍, 2.5% 次氯酸钠再浸泡 2 min, 无菌去离子水冲洗 3 次。将表面消毒的根置于无菌研钵内研磨后取匀浆液涂布在含有 10 mg/L Cu<sup>2+</sup> 的 1/5 LB 平板上, 同时取最后一次浸洗的无菌水 100 μl 涂布于 1/5 LB 平板上, 以检测样品表面消毒是否彻底。从平板上随机挑取细菌单菌落, 纯化后保存待用。

用去离子水充分漂洗植株根部和地上部后置于 105°C 烘箱杀青 30 min, 55°C 条件下烘干至恒重, 称取植物组织干重; 烘干的植物组织用研磨机粉碎, 并准确称取 200 mg 样品于微波消煮管中, 加入 2 ml

的 HNO<sub>3</sub> 消煮至澄清透明, 消煮后的样品加 5% HNO<sub>3</sub> 冷却后定容至 10 ml, 用 ICP-OES 测定溶液中的 Cu 浓度。

### 1.4 细菌生物学特性研究

**1.4.1 菌株产 ACC 脱氨酶能力测定** 参考 Belimov 等<sup>[12]</sup>方法, 将供试菌株接入 SMN 培养基在 28°C 的摇床中培养 18 h, 离心收集菌体, 用 SM 培养基将菌体洗涤 2 次后分别等量接入 SM (无氮培养基)、SMC(ACC 为唯一氮源)、SMN((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为唯一氮源)液体培养基。28°C 摇床振荡培养 48 h, 比色法测定不同培养基中菌悬液的 OD<sub>600</sub> 值。在 SMC 和 SMN 培养基中生长良好, 而在 SM 培养基中不能生长的菌株具有 ACC 脱氨酶活性。

**1.4.2 菌株产铁载体能力测定** 将供试菌株接入 1/5 LB 液体培养基, 在 30°C 摇床中振荡培养 48 h, 发酵液 6 000 r/min 离心 10 min, 取 1.0 ml 上清液加入 1.0 ml CAS 检测液, 混匀, 以去离子水作对照, 1 h 后测定 630 nm 波长处的吸光值; 取 1.0 ml 未接菌的 1/5 LB 液体培养基与 1.0 ml CAS 检测液混匀, 同法测定为参比值<sup>[21-22]</sup>。

**1.4.3 菌株产吲哚乙酸(IAA)能力测定** 将色氨酸配成 2.5 mg/ml 的溶液, 过滤除菌。准备 LB 液体培养基试管(2 ml), 灭菌后加入过滤除菌的色氨酸溶液 0.5 ml, 使培养基中色氨酸的最终浓度为 0.5 mg/ml。将供试菌株接入上述培养液中, 在 30°C 摇床中振荡培养 72 h, 发酵液 6 000 r/min 离心 10 min, 取 1.0 ml 上清液, 加 50 μl 10 mmol/L 的正磷酸和 2 ml Sackowski's 显色剂, 混匀, 黑暗下 25°C 显色, 30 min 后测定 530 nm 波长处吸光值。以双蒸水代替培养液作为对照。以浓度为 5、10、20、40、60 mg/L 的 IAA 标准液作标准曲线, 计算发酵液中 IAA 的浓度<sup>[23-24]</sup>。

**1.4.4 菌株产精氨酸脱羧酶(ADC)能力测定** 参考 Sun 等<sup>[14]</sup>的方法, 培养基配方为: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 5.0 g, D-葡萄糖 0.5 g, 维生素 B6(吡哆醛)5 mg, 溴甲酚紫(1.6%)0.625 ml, 酚红 0.02 g, 蒸馏水 1 L, 琼脂 18 g, pH 6.0。以上培养基分为两份, 一份不加 L-精氨酸盐酸盐作为空白对照, 一份加入 L-精氨酸盐酸盐, 使最终浓度为 1%, 再调 pH 6.0 ~ 6.3, 分别分装试管中, 121°C 灭菌 10 min。将供试菌株分别接入上述两种培养基中, 30°C 培养 3 ~ 5 天, 若对照管不变色, 而测试管变为紫红色则为阳性, 菌株产精氨酸脱羧酶(arginine decarboxylase), 不变色则为阴性。

**1.4.5 菌株溶解难溶性磷酸盐能力测定** 采用溶磷圈法对细菌的溶磷特性进行测定。用牙签将供试菌株分别点接种于 NBRIIP 培养基上<sup>[25]</sup>, 置于 30°C 培

养箱中培养 4 天, 观察有无透明溶磷圈产生。

### 1.5 菌株对环境条件的抗性

**1.5.1 Cu 和抗生素抗性** 供试菌株划线接种于含  $\text{CuSO}_4$  的 1/5 LB 培养基, 使  $\text{Cu}^{2+}$  的终浓度为 20, 50, 100, 200, 500 mg/L, 30℃ 培养 3 天, 观察其能否生长。

将供试菌株点接于含不同浓度抗生素的固体培养基, 使抗生素终浓度如下: 氨苄青霉素 50, 100, 200 mg/L; 卡那霉素 20, 50, 100 mg/L; 链霉素 20, 50, 100 mg/L; 氯霉素 50, 100, 200 mg/L, 28℃ 培养 48 h, 观察其能否生长。

**1.5.2 温度、初始 pH 和盐浓度对菌体生长的影响** 将供试菌株点接于 1/5 LB 固体平板, 分别在 7℃、15℃、28℃、37℃、42℃ 的温度下培养 72 h, 观察其能否生长及生长情况。

用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 将 1/5 LB 培养基的 pH 调节至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。将活化的供试菌株分别点接于上述不同 pH 的培养基中, 28℃ 培养 72 h, 观察其能否生长及生长情况。

按质量百分比浓度分别配制 NaCl 浓度为 0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0%, 5.0% 的 1/5 LB 培养基。将供试菌株分别点接于上述培养基上, 28℃ 培养 72 h, 观察其能否生长。

### 1.6 菌株的分子鉴定

参考萨姆布鲁克<sup>[26]</sup>的《分子克隆实验指南》提取细菌基因组 DNA。用 16S rRNA 基因通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3', 以分离菌株的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系(25  $\mu\text{l}$ )为: 10 $\times$ Taq DNA polymerase buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{l}$ , 引物 27F 和 1492R(10 mmol/L)各 0.5  $\mu\text{l}$ , 2.5 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{l}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq 酶 0.15  $\mu\text{l}$ , 适量 DNA 模板, 将 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 72℃ 后延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增产物送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。将所获得序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 16S rRNA 基因序列进行比对分析, 鉴定菌株。

### 1.7 菌株对苏丹草幼苗生长和 Cu 含量的影响

选择大小均匀的苏丹草种子经 75% 无水乙醇溶液消毒 5 min, 用无菌去离子水漂洗种子, 置于 25℃ 恒温箱中催芽 18 h。将菌株接种于 LB 液体培养基中, 30℃ 摇床 180 r/min 振荡培养 18 h, 8 000 r/min 离心

5 min 收集菌体, 用无菌生理盐水清洗 2 次, 最终制备成  $10^8$  cfu/ml 菌悬液。待种子萌芽后, 选取萌芽一致的种子用细菌悬液浸泡 4 h, 并以无菌生理盐水浸泡处理作为对照。将苏丹草种子播种于含灭菌水琼脂(0.6%)的平皿中进行培养, 每皿种植 10 株苏丹草。Cu 处理浓度为 0 和 4.0 mg/L, 设 3 个重复。平皿置于光照培养架上培养, 每天光照 12 h, 培养温度为 15~25℃, 每天定量浇 Hoagland 营养液, 培养 15 天后分析。苏丹草生物量和 Cu 吸收量的测定同 1.3 节。

### 1.8 数据处理

所有试验数据均采用 Microsoft Office Excel 2007 处理, Originpro 8.0 作图, 采用 SPSS 20.0 对数据进行方差分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 铜矿废弃地土壤理化分析

铜矿废弃地土壤理化特性: pH 6.29, 有机质 8.0 g/kg, 速效氮 58.6 mg/kg, 速效磷 8.5 mg/kg, 速效钾 50.2 mg/kg, 总铜 2 297 mg/kg, 水溶性铜 4.06 mg/kg, 醋酸铵提取态铜 32.2 mg/kg, DTPA 提取态铜 171 mg/kg, 总铅 13.4 mg/kg, 总锌 91.5 mg/kg, 总锰 652 mg/kg。该铜矿废弃地土壤营养比较贫乏, 土壤主要重金属污染元素为 Cu, 土壤 Cu 含量明显高于国家土壤环境质量三级标准(Cu 质量标准 400 mg/kg)。由此可见, Cu 的毒性和营养贫乏是矿区废弃地中限制植物生长的重要因素<sup>[4]</sup>。

### 2.2 菌株的筛选和鉴定

虽然铜矿废弃地中高含量的 Cu 对植物的生长会产生重要的影响, 供试能源植物苏丹草在供试铜矿废弃地上能够正常生长, 每盆苏丹草根和地上部干重分别达 4.2 g 和 10.5 g。另外, 苏丹草根和地上部 Cu 含量分别达 673 mg/kg 和 40 mg/kg。苏丹草根表面消毒后用无菌去离子水冲洗 3 次并将最后一次冲洗的无菌水涂布于 1/5 LB 平板上, 培养 3 天后在平板上没有菌落出现, 证明苏丹草根表面消毒彻底, 从苏丹草根中分离到的细菌可以认为是根内生细菌<sup>[14]</sup>。虽然重金属的毒害对微生物的生长产生重要的影响, 但是微生物可以通过多种机制提高其对重金属的耐受能力<sup>[8]</sup>, 本试验从苏丹草根中分离到 15 株 Cu 抗性植物内生细菌, 说明这些菌株已经适应了苏丹草根环境, 经过对分离菌株 ACC 脱氢酶活性的测定, 菌株 K1-6 和 K3-9 具有 ACC 脱氢酶活性, 因此选择 K1-6 和 K3-9 菌株作为进一步研究的功能菌株。根据 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 K1-6 和 K3-9 分别被鉴定为根瘤菌属(*Rhizobium* sp. K1-6)和肠杆菌属(*Enterobacter*

*aerogenes* K3-9), Genbank 登录号分别为 KJ631290 和 KJ631293, 同源性分别为 100% 和 99%。

### 2.3 菌株的生物学特性

**2.3.1 菌株对 Cu 和抗生素的抗性** 菌株 K1-6 和 K3-9 分别能在 Cu 含量 500 mg/L 和 100 mg/L 的条件下正常生长, 其中菌株 K1-6 比菌株 K3-9 具有更强的 Cu 抗性。由表 1 可知, 菌株 K1-6 和 K3-9 对抗生素的抗性存在一定的差异。菌株 K1-6 对 4 种抗生素均具有一定的抗性, 而菌株 K3-9 对链霉素敏感, 对氨苄青霉素和氯霉素有较强的抗性。菌株 K1-6 和 K3-9 抗生素抗性的差异可能与菌株本身携带的抗性质粒有关。

表 1 菌株对抗生素的抗性  
Table 1 Antibiotics-resistances of bacterial strains

抗生素	浓度(mg/L)	菌株	
		K1-6	K3-9
氨苄青霉素	50	+	+
	100	+	+
	200	-	+
卡那霉素	20	+	+
	50	+	-
链霉素	20	+	-
	50	+	-
	100	+	-
氯霉素	50	+	+
	100	-	+

注: +: 生长, -: 不生长, 下同。

**2.3.2 菌株的植物促生特性** 由表 2 可以看出, 分离自苏丹草根部的 Cu 抗性和 ACC 脱氨酶活性菌株具有不同的植物促生特性。菌株 K1-6 和 K3-9 均具有产生 IAA 的能力, 产量为 21.8 ~ 54.9 mg/L。菌株 K1-6 不产铁载体和精氨酸脱羧酶, 而菌株 K3-9 能够产生铁载体和精氨酸脱羧酶, 菌株 K1-6 和 K3-9 均能够溶解难溶性磷酸盐, 在 NBRIP 培养基上有透明的溶磷圈产生。从 Cu 耐性植物海州香薷和鸭趾草植株体内分离到的一些细菌菌株也具有产生 ACC 脱氨酶、IAA、铁载体和精氨酸脱羧酶的能力<sup>[14]</sup>。

表 2 菌株的植物促生特性  
Table 2 Plant growth-promoting characteristics of bacterial strains

菌株	吡啶乙酸 (mg/L)	铁载体	ACC 脱 氨酶	溶磷	精氨酸脱 羧酶
K1-6	54.9 ± 1.6	-	+	+	-
K3-9	21.8 ± 0.7	++	+	+	+

注: : 铁载体的产生, 630 nm 下菌株测定值与对照值之比, 比值越小, 产铁载体能力越强; +: 0.8 ~ 1.0; ++: 0.6 ~ 0.8; : +: 产, -: 不产。

**2.3.3 温度、pH 和盐浓度对菌株生长的影响** 由表 3 可以看出, 菌株 K1-6 和 K3-9 为中温菌, 在 15 ~ 37℃ 下能较好生长, 最适生长温度为 30℃ 左右; 菌株 K1-6 和 K3-9 生长的 pH 范围是 5 ~ 10, 菌株 K1-6 耐酸, 在 pH 4 的条件下能生长; 菌株 K1-6 和 K3-9 均可在 0.5% ~ 3% 的 NaCl 中良好生长, 菌株 K1-6 也能够在 5% NaCl 中生长。由此可见, 与菌株 K3-9 相比, 菌株 K1-6 有较强的耐酸和耐受高渗的能力。

表 3 培养温度、初始 pH 和盐浓度对菌株生长的影响  
Table 3 Effects of culture temperature, initial pH and NaCl concentration on strain growths

环境条件		菌株	
		K1-6	K3-9
温度(℃)	4	-	-
	15	+	+
	28	+	+
	37	+	+
	pH	5	+
NaCl 浓度(%)	6	+	+
	7	+	+
	8	+	+
	9	+	+
	10	+	+
NaCl 浓度(%)	0.5	+	+
	1	+	+
	3	+	+
	5	+	-

### 2.4 菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草生长的影响

研究表明, 能够产生 ACC 脱氨酶、IAA、铁载体和精氨酸脱羧酶的植物内生细菌能够显著促进植物的生长和对重金属的耐受性<sup>[14-15, 27-28]</sup>。菌株 K1-6 和 K3-9 能够产生 ACC 脱氨酶、IAA、铁载体和精氨酸脱羧酶, 能够显著促进苏丹草的生长(图 1)。另外, 由图 1 可以看出, 菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草生长的影响存在明显差异, 在不添加 Cu<sup>2+</sup> 的条件下, 接菌株 K1-6 处理的苏丹草根和地上部干重分别比对照增加 46% 和 40%, 差异达显著水平( $P < 0.05$ ), 而接菌株 K3-9 处理的苏丹草根和地上部干重分别比对照增加 11% 和 18%, 但差异未达显著水平( $P > 0.05$ ); 在添加 Cu<sup>2+</sup> 的条件下, 接菌株 K1-6 处理的苏丹草根和地上部干重分别比对照增加 27% 和 13%, 差异达显著水平( $P < 0.05$ ), 接菌株 K3-9 处理的苏丹草根和地上部干重分别比对照增加 41% 和 37%, 差异达显著水平( $P < 0.05$ )。由此可见, 在 Cu<sup>2+</sup> 胁迫条件下, 菌株 K3-9 比菌株 K1-6 能够更好地促进苏丹草的生长。

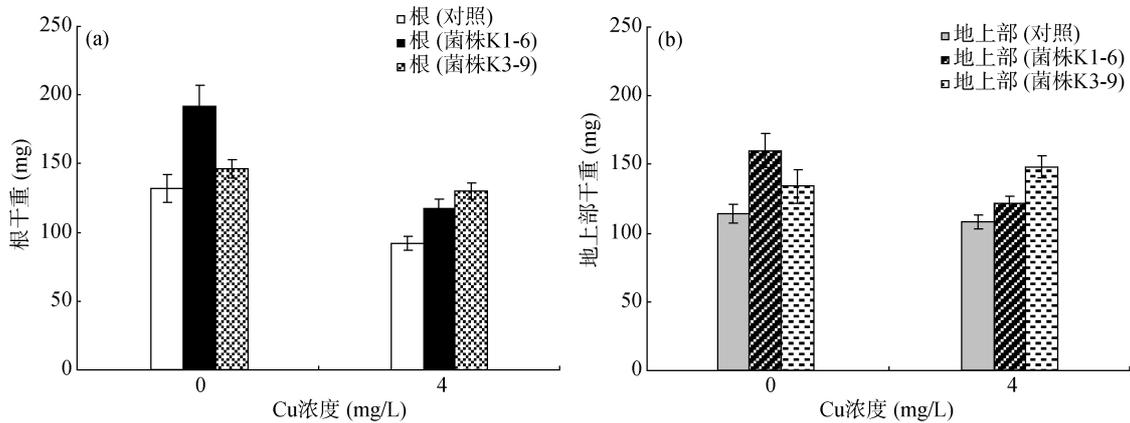


图 1 菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草生长的影响

Fig. 1 Effects of strains K1-6 and K3-9 on growths of *Sorghum sudanense*

### 2.5 菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草富集铜的影响

菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草根和地上部 Cu 含量的影响见图 2。由图 2 可以看出，接菌株 K1-6 处理的苏丹草根和地上部 Cu 含量分别比对照增加 46% 和 85%，差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )，而接菌株 K3-9 处理的苏丹草根和地上部 Cu 含量与对照相比没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。另外，与对照相比，接菌株 K1-6 处理的苏丹草根和地上部吸收的总 Cu 分别比对照增加 88% 和 114%，差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )，接菌株 K3-9 处理的苏丹草根和地上部吸收的总 Cu 分别比对照增加 44% 和 16%。值得注意的是，苏丹草富集的 Cu 主要分布在根部组织，接菌处理根中 Cu 含量是地上部 Cu 含量的 17 ~ 25 倍，而根中吸收的总 Cu 含量是地上部吸收的总 Cu 含量的 16 ~ 23 倍。研究表明，能够产生 ACC 脱氨酶、IAA、铁载体和精氨酸脱羧酶的植物内生细菌不仅能够显著促进植物的生长而且能够显著促进植物对重金属的富集能力<sup>[14-15, 27]</sup>。刘莉华等<sup>[29]</sup>在龙葵的根际土壤分别接入 Cd 抗性植物内生细菌，结果表明，接菌处理龙葵地上部和根部 Cd 的吸收量比对照增加 50%；Zhang 等<sup>[8]</sup>发现，重金属抗性和 ACC 脱氨酶产生细菌能够显著增加油菜对 Pb 的吸收。本试验也表明，Cu 抗性植物促生内生细菌 K1-6 和 K3-9 菌株能够显著促进苏丹草根和地上部对 Cu 的富集能力。虽然菌株 K3-9 没有显著影响苏丹草根和地上部 Cu 含量，但菌株 K3-9 显著促进了苏丹草根的生长，从而增加了苏丹草根对 Cu 的总吸收量(图 3)。Dell'Amico 等<sup>[30]</sup>也发现 Cd 抗性根际细菌没有影响油菜根和茎中 Cd 的含量，但提高了油菜生物量，从而显著提高了油菜对 Cd 的总吸收量。另外，在培养 15 天后在添加  $\text{Cu}^{2+}$  (100 mg/L) 和链霉素(100 mg/L，检测菌株 K1-6)或氯霉素(100 mg/L，检测菌株 K3-9)的 1/5 LB 平板上可

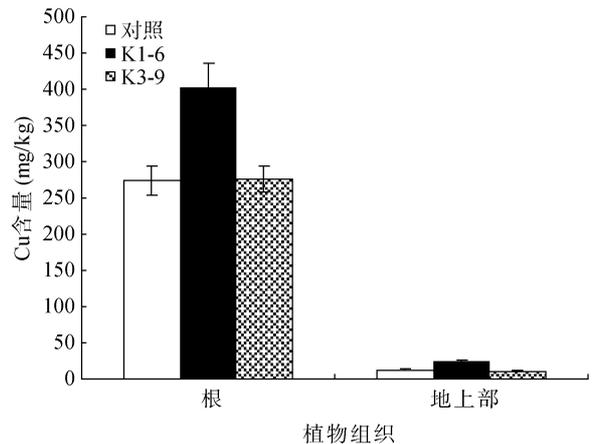


图 2 菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草组织 Cu 含量的影响

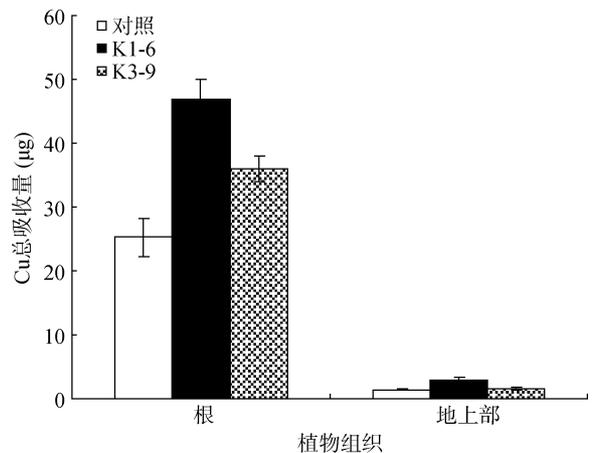
Fig. 2 Effects of strains K1-6 and K3-9 on Cu contents of *Sorghum sudanense*

图 3 菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草吸收 Cu 的影响

Fig. 3 Effects of strains K1-6 and K3-9 on total Cu uptakes of *Sorghum sudanense*

以在苏丹草根中检测到菌株 K1-6 和 K3-9，其细胞数量达  $10^4$  CFU/g 根，而对照处理的根中未检测到细菌菌落，说明菌株 K1-6 和 K3-9 可以在苏丹草根中成功定殖。虽然菌株 K1-6 和 K3-9 在平皿培养条件下

表现出了对苏丹草生长和耐受 Cu 的促进作用,但有关菌株 K1-6 和 K3-9 对生长在铜矿废弃地中的苏丹草的生长、耐受和富集 Cu 的效应及其机制等值得进一步研究。

### 3 结论

1) 供试苏丹草能够在铜矿废弃地土壤中生长,并能够在苏丹草根中分离筛选到 Cu 抗性植物促生内生细菌 K1-6 和 K3-9 菌株,16S rDNA 序列分析表明,菌株 K1-6 和 K3-9 分别属于根瘤菌属(*Rhizobium* sp. K1-6)和肠杆菌属(*Enterobacter aerogenes* K3-9)。

2) 菌株 K1-6 和 K3-9 具有多种植物促生特性,菌株 K1-6 和 K3-9 产生植物促生物质的能力不同。另外,菌株 K1-6 和 K3-9 对温度、pH 和盐浓度具有一定的耐受性。

3) 研究表明,K1-6 和 K3-9 菌株能够显著促进苏丹草的生长,提高苏丹草对 Cu 的耐受性,并强化苏丹草根对 Cu 的富集能力。另外,菌株 K1-6 和 K3-9 对苏丹草的生长、富集和耐受 Cu 的影响不同。

#### 参考文献:

- [1] Andrezza R, Okeke B C, Lambais M R, et al. Bacterial stimulation of copper phytoaccumulation by bioaugmentation with rhizosphere bacteria[J]. Chemosphere, 2010, 81: 1 149-1 154
- [2] Meers E, Slycken S V, Adriaenssens K, et al. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment [J]. Chemosphere, 2010, 78: 35-41
- [3] 罗仙平, 张艳, 邓扬悟. 矿山废弃地分析及植物修复重金属污染土壤技术探讨[J]. 有色金属科学与工程, 2013 (1): 62-66
- [4] 叶文玲, 陈增, 徐晓燕. 铜陵铜尾矿库优势植物对重金属富集特征研究[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(5): 11-14
- [5] Sheng X F, Sun L N, Huang Z, et al. Promotion of growth and Cu accumulation of bio-energy crop (*Zea mays*) by bacteria: Implications for energy plant biomass production and phytoremediation[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 103: 58-64
- [6] 叶文玲, 徐晓燕, 陈增, 等. 苏丹草对铜尾矿的适应性研究[J]. 环境科学研究, 2008, 21(6): 193-196
- [7] 唐莲, 刘振中, 蒋任飞. 重金属污染土壤植物修复法[J]. 环境保护科学, 2003, 29(120): 33-36
- [8] Zhang Y F, He L Y, Chen Z J, et al. Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186: 1 720-1 725
- [9] 贾伟涛, 吕素莲, 冯娟娟, 等. 利用能源植物治理土壤重金属污染[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(1): 88-95
- [10] 侯新村, 范希峰, 武菊英, 等. 草本能源植物修复重金属污染土壤的潜力[J]. 中国草地学报, 2012, 34(1): 59-64
- [11] 陈兆进. 重金属抗性植物促生细菌提高能源植物耐受与富集土壤重金属机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2013
- [12] Belimova A A, Hontzas N, Safronova V I, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard(*Brassica juncea* L. Czern.)[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 241-250
- [13] Zaidi S, Usmani S, Singh B R, et al. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*[J]. Chemosphere, 2006, 64: 991-997
- [14] Sun L N, Zhang Y F, He L Y, et al. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 501-509
- [15] Chen Z J, Sheng X F, He L Y, et al. Effects of root inoculation with bacteria on the growth, Cd uptake and bacterial communities associated with rape grown in Cd-contaminated soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 244-245: 709-717
- [16] 陈佛保, 柏珺, 林庆祺, 等. 植物根际促生菌(PGPR)对缓解水稻受土壤锌胁迫的作用[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(1): 67-74
- [17] Glick B R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28: 367-374
- [18] Ma Y, Prasad M N V, Rajkumar M, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29: 248-258
- [19] Rajkumar M, Sandhya S, Prasad M N V, et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30: 1 562-1 574
- [20] 鲍式旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1981
- [21] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytic Biochemistry, 1987, 160: 47-56
- [22] Manjanatha M G, Loynachan T E, Atherly A G. Tn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fredii* for siderophore overproduction[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1992, 24: 151-155
- [23] Gordon S A, Weber R P. Colorimetric estimation of indole acetic acid [J]. Plant Physiology, 1951, 26: 192-195
- [24] Sheng X F, Xia J J, Jiang C Y, 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[J]. Environmental Pollution, 2008, 156: 1 164-1 170

- [25] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170: 265–270
- [26] J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1995
- [27] 马莹, 骆永明, 滕应, 等. 内生细菌强化重金属污染土壤植物修复研究进展[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 195–201
- [28] Mastretta C, Taghavi S, van der Lelie D, et al. Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity[J]. International Journal of Phytoremediation, 2009, 11: 251–267
- [29] 刘莉华, 刘淑杰, 陈福明, 等. 接种内生细菌对龙葵吸收积累镉的影响[J]. 环境科学学报, 2013, 33(12): 3 368–3 375
- [30] Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40: 74–84

## Isolation of Endophytic Bacteria from Roots of Cu-tolerant *Sorghum sudanense* and Their Biological Characteristics

WANG Lu, HE Linyan, SHENG Xiafang\*

(Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Two ACC deaminase-producing endophytic bacteria (K1-6 and K3-9) were obtained from the roots of Cu-tolerant *Sorghum sudanense* grown in Cu mine wasteland. The biological characteristics of the two endophytic bacterial strains were characterized. Strains K1-6 and K3-9 showed resistance to high levels of Cu and antibiotics, solubilized inorganic phosphate, and produced indole acetic acid (IAA). Strain K3-9 could also produce siderophores and arginine decarboxylase. Strains K1-6 and K3-9 had also the characteristics of acid or alkali and salt tolerance and temperature resistance. Strains K1-6 and K3-9 were identified as *Rhizobium* sp. K1-6 and *Enterobacter aerogenes* K3-9 based on the analyses of their 16S rDNA gene sequences, respectively. Plate culture experiment was used to investigate the effects of the two endophytic bacterial strains on the growth and Cu accumulation of *Sorghum sudanense* grown in 0 and 4 mg/L of Cu added as CuSO<sub>4</sub>. The results showed that significant ( $P < 0.05$ ) increase was observed in the root (ranging from 10.6% to 45.5%) and above-ground tissue (ranging from 13% to 40%) dry weight of the bacteria-inoculated *Sorghum sudanense* compared with the control. Inoculation with strain K1-6 was found to significantly increase Cu contents of the roots and above-ground tissues of *Sorghum sudanense* compared with the control, however, no significant difference was observed in Cu contents of the roots and above-ground tissues between the strain K3-9-inoculated and control plants. Furthermore, total Cu uptakes of the roots and above-ground tissues of the plants inoculated with strain K1-6 were increased by 88% and 114% ( $P < 0.05$ ) respectively compared with the control, while total Cu uptakes of the roots was increased by 44% in the presence of strain K3-9 compared with the control. Notably, Cu content of the roots was 16-23-fold higher than that of the above-ground tissues of the plants inoculated with the two strains. The above results showed that the endophytic bacterial strains K1-6 and K3-9 from the roots of Cu-tolerant *Sorghum sudanense* have the innate multiple plant growth-promoting traits, can increase the growth and Cu tolerance of *Sorghum sudanense*, and enhance Cu accumulation in the roots. In addition, the increases in the growth, Cu accumulation and tolerance of *Sorghum sudanense* are dependent on the strains.

**Key words:** Cu mine wasteland; *Sorghum sudanense*; Plant growth-promoting endophytic bacteria; *Rhizobium* sp. K1-6; *Enterobacter aerogenes* K3-9