

毛竹耐铅内生细菌分离及其 16S rDNA 鉴定

丁嘉仪^{1,2}, 邓宇慧^{2,3}, 李国豪^{1,2}, 朱婉蓉^{1,4}, 刘希华^{1,2}

(1. 福建省资源环境监测与可持续经营利用重点实验室, 福建 三明 365004; 2. 三明学院资源与化工学院, 福建 三明 365004; 3. 大田县第七中学, 福建 大田 366100; 4. 三明学院海峡理工学院, 福建 三明 365004)

摘要: 铅污染是当前土壤重金属污染亟待解决的难题之一, 利用微生物与树木的互作来修复铅污染土壤是一个行之有效的办法。为了给利用植物内生细菌提升植物修复铅污染土壤效率提供支持, 以毛竹的芽和叶为材料, 分离耐铅内生细菌, 采用生理分析和分子鉴定相结合的方法, 对分离到的菌种进行鉴定。结果发现, 在不同铅离子浓度的胁迫下, 从毛竹芽和叶组织中分离出 27 株内生细菌, 革兰氏染色和 VP 实验均为阳性。过氧化氢酶实验中, 24 株表现为阳性(+), 3 株为阴性(-); 甲基红实验测定结果为阳性(++)4 株、弱阳性(+)20 株、阴性(-)3 株。对细菌提取 DNA, 并 PCR 扩增 16S rDNA 序列, 通过 BLAST 比对分析, 并用 MEGA 软件建立发育树等分子鉴定手段, 初步推断分离得到的内生细菌为假单胞菌属、蜡样芽孢杆菌和不动杆菌属。

关键词: 毛竹; 铅; 内生细菌; 植物修复

中图分类号: Q938

文献标志码: A

文章编号: 2097-2172(2023)08-0740-05

doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2023.08.011

Isolation and 16S rDNA Identification of Pb-resistant Endophytic Bacteria Isolated from *Phyllostachys pubescens*

DING Jiayi^{1,2}, DENG Yuhui^{2,3}, LI Guohao^{1,2}, ZHU Wanrong^{1,4}, LIU Xihua^{1,2}

(1. Fujian Provincial Key Laboratory of Resources and Environment Monitoring and Sustainable Management and Utilization, Sanming Fujian 365004, China; 2. School of Resources & Chemical Engineering, Sanming University, Sanming Fujian 365004, China; 3. The Seventh Middle School of Datian County, Datian Fujian 366100, China; 4. Strait Institute, Sanming Fujian 365004, China)

Abstract: Lead pollution is one of the difficult problems to be solved urgently in soil heavy metal pollution at present. It is an effective method to repair lead-contaminated soil by interaction between microorganisms and trees. In this paper, the lead-tolerant endophytic bacteria from the stems and leaves of *Phyllostachys pubescens* were isolated and purified, and the strains were identified by physiological analysis and molecular identification. Results showed that a total of 27 endophytic bacteria were isolated under different concentrations of lead stress, which were positive by Gram staining and VP test, 24 strains were positive (+) and 3 strains were negative (-) in catalase test. The results of methylene red test showed that 4 strains were positive (++) , 20 strains were weak positive (+) and 3 strains were negative (-), and the 16S rDNA sequence was amplified by PCR. By means of molecular identification methods such as BLAST, comparative analysis and establishment of phylogenetic tree with MEGA software, it was preliminarily inferred that the endophytic bacteria isolated were *Pseudomonas*, *Bacillus cereus* and *Acinetobacter*.

Key words: *Phyllostachys pubescens*, Lead, Endophytic bacteria, Phytoremediation

由于人类活动的影响和缺乏适当的管理, 土壤的有毒金属污染成为全球范围内最严重的环境问题之一。污染土壤的重金属种类较多, 以铅(Pb)污染最为严重, 其次为铬(Cr)、砷(As)、锌

(Zn)、镉(Cd)、铜(Cu)和汞(Hg), 可见铅污染的问题更是亟待解决。土壤一旦被铅污染, 铅就会长期存在于土壤中而不被生物降解, 且经不断积累并通过食物链转移到生物系统中, 最终毒害人

收稿日期: 2022-12-13; 修订日期: 2023-06-23

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2020J01375); 福建省资源环境监测与可持续经营利用重点实验室开放课题(ZD202103); 国家级大学生创新创业项目(CA220241); 福建省大学生创新创业项目(S202311311071)。

作者简介: 丁嘉仪(2001—), 女, 宁夏石嘴山人, 本科, 研究方向为生物技术。Email: 1930966866@qq.com。

通信作者: 刘希华(1978—), 男, 福建闽清人, 副教授, 博士, 研究方向为土壤重金属污染的生物修复。Email: xihua7808@163.com。

类和其他动物的健康^[1-3]。目前应用的物理和化学的方法虽然可以修复铅污染土壤,但这些方法一般成本较高,且会对土壤生物活性、土壤结构和肥力产生不利影响^[4]。利用植物修复是解决土壤中铅污染的另一种选择,因为它成本不高且有效、环保,而且是就地修复,具有良好的公众接受度^[1]。植物的稳定化利用,即利用植物来固定或减少土壤中重金属的流动性,以防止污染物迁移到地下水或进入食物网,目前正受到广泛关注。但铅离子对植物,特别是草本植物有毒性,使植物生长受到抑制,这降低了植物从土壤中去除污染物的效率^[5]。于是,一些生物量大、生长速度快、能有效积累重金属、具有经济价值的植物被建议作为植物修复最佳材料^[6]。快速生长的树木虽然可以用于土壤污染修复,并作为能源获得经济收益,但铅离子会对树木幼苗产生伤害,从而影响其在污染土壤中的生长^[5]。近年来的研究表明,一些植物生长促进菌(plant growth promoting bacteria, PGPB)可以通过刺激植物激素(生长素、细胞分裂素、赤霉素等)的合成来辅助寄主植物,并通过产生铁团、增磷和固氮效应来缓解营养缺乏,还可通过细胞外沉淀、细胞内积累、隔离和酶解毒(如氧化/还原)降低重金属的生物毒性^[7]。此外,接种 PGPB 还可提高成年植物体内重金属的积累和转运能力^[8]。

毛竹(*Phyllostachys pubescens*)在中国的种植面积占全部竹子的 70%^[9]。与其他竹种相比,毛竹在适应环境条件、生长速度快、多用途、生态价值高等方面具有优越的属性^[10]。有文献报道,毛竹可以生长在铅锌矿尾砂地区,说明它可能对这些异常高浓度的 Pb 具有某种特殊的耐受机制^[11]。我们从毛竹的叶和芽 2 个部位分离出耐铅内生细菌,并采用生理分析和分子鉴定相结合的方法,对分离到的菌种进行了鉴定,以期利用植物内生细菌提升植物修复铅污染土壤效率提供支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为毛竹的芽与叶新鲜组织,采自三明市三元区三明学院,其母株长势良好、无病虫害。供试培养基为牛肉膏蛋白胨固体培养基^[12],培养

基铅浓度分别配制为 0、0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L。

1.2 毛竹内生细菌的分离及鉴定

分离与生理生化分析:毛竹内生细菌的分离参照刘希华等^[12]的方法,并对分离得到的菌株进行革兰氏染色、接触酶反应、柠檬酸盐反应、吡啶试验和甲基红实验检验。分子鉴定:采用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒 V2.2 提取分离菌株基因组 DNA,以通用引物 8f(5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492r(5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3')(上海华大基因)进行 PCR 扩增。退火温度为 52 ℃。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。回收 1 800 bp 左右的 PCR 产物并连接到 pMD19-T Vector,挑取阳性克隆送往上海华大基因公司测序。序列经 BLAST 进行最大相似性比对,用 Clustal X 1.83 进行同源性分析,用来自 MEGA(7.0)的 Neighbor-Joining(NJ)法构建系统发育树^[13]。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离

将毛竹芽、叶新鲜组织经表面消毒处理后,用无菌水淋洗,取组织表面的无菌水涂布培养检测,无菌落长出,说明组织表面消毒彻底。将消毒后的毛竹芽、叶组织接种到铅浓度不同的牛肉膏蛋白胨固体培养基上,共分离到 27 株内生细菌(编号为 S1-27),其中从芽组织中分离到 15 株,从叶组织中分离到 12 株(表1)。可见,分离到的内生菌菌株数量与所接种的毛竹器官类型和培养基的铅浓度没有明显的关联。

表 1 毛竹耐铅内生细菌分离情况

接种组织	培养基含铅浓度/(mmol/L)						株 合计
	CK	0	0.3	0.6	0.9	1.2	
芽	0	3	1	4	3	4	15
叶	0	3	4	2	1	2	12

2.2 形态学与生理指标

通过肉眼观察,分离得到的菌株单菌落均呈圆形,乳白色,轮廓光滑。经革兰氏染色、显微镜观察,所有菌株均为 G+ 菌,其形态为杆状。过氧化氢酶实验中,24 株为阳性(+),3 株为阴性(-);甲基红实验测定结果表明,4 株为阳性(++),20 株为弱阳性(+),3 株为阴性(-)。分离得到的 27 株内生细菌的 VP 实验结果均为阳性(+)(表2)。

表 2 菌株生理生化检测结果^①

序号	革兰氏染色	过氧化氢酶反应	甲基红实验	VP实验	序号	革兰氏染色	过氧化氢酶反应	甲基红实验	VP实验
S1	+	+	++	+	S15	+	+	+	+
S2	+	-	++	+	S16	+	+	+	+
S3	+	-	-	+	S17	+	+	+	+
S4	+	+	+	+	S18	+	-	+	+
S5	+	+	++	+	S19	+	+	+	+
S6	+	+	+	+	S20	+	+	+	+
S7	+	+	++	+	S21	+	+	-	+
S8	+	+	+	+	S22	+	+	+	+
S9	+	+	+	+	S23	+	+	+	+
S10	+	+	+	+	S24	+	+	+	+
S11	+	+	++	+	S25	+	+	+	+
S12	+	+	+	+	S26	+	+	+	+
S13	+	+	+	+	S27	+	+	-	+
S14	+	+	+	+					

①表中甲基红实验“++”为阳性，“+”为弱阳性，“-”为阴性；其余实验“+”为阳性，“-”为阴性。

2.3 内生菌株的 16S rDNA 基因序列分析及系统发育树构建

提取甲基红实验、VP 实验结果和过氧化氢实验结果不一致的 S1、S2、S3、S5、S18 和 S27 等毛竹内生细菌的 DNA，分别扩增各菌株的 16SrDNA 序列，送上海华大基因公司测序。对测序结果经两两 BLAST 分析结果表明，这些内生细菌有 3 种不同序列，其中 S1 与 S5 序列相同，S2 和 S27 序列相同，S3 和 S18 序列相同。经判断，16S rDNA 序列相同的为同 1 个菌种。对 S1、S2 和 S3 构建系统发育树，将这 3 段序列置入 NCBI 数据库，经过 BLAST 检索，分别找到了与之相似性最高的种属。

将毛竹内生细菌菌株与其同源性较高的菌株 16SrDNA 序列利用 MEGA(7.0)程序包构建系统发育树(图 1)。经对系统发育树分析，可初步推断 S5 为假单胞菌属(*Pseudomonas* SP.)、S17 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、S43 为不动杆菌属(*Acinetobacter* SP.)。

3 讨论与结论

相关研究表明，微生物在植物生长发育中发挥着重要作用，同时植物与微生物的共生可以有效改善土壤质量和养分循环，因此接种经过筛选和驯化的微生物可以显著提高植物对受污染土壤的修复效率^[14-15]。本研究在不同铅离子浓度的胁迫下，从毛竹芽和叶组织中分离出 27 个耐铅内生菌菌株，革兰氏染色和 VP 实验均为阳性。过氧化氢酶实验中，24 株表现为阳性(+)，3 株为阴性(-)；甲基红实验测定结果为阳性(++)4 株、弱阳性(+)20 株、阴性(-)3 株。通过生理生化以及 16S rDNA 的分子鉴定，确定共获得 3 个不同的菌株，并推断 3 个菌株分别属于假单胞菌属、蜡样芽孢杆菌属和不动杆菌属。

有研究者指出，芽孢杆菌的铁载体可以通过与 10 种不可用形式的 Fe³⁺ 形成络合物，并将它们改变为可用于植物吸收的方式来促进植物生长^[16]。假单胞菌是可以从根组织中分离出的 5 个最常见的可培养内生细菌种类之一，是广为人知的植物

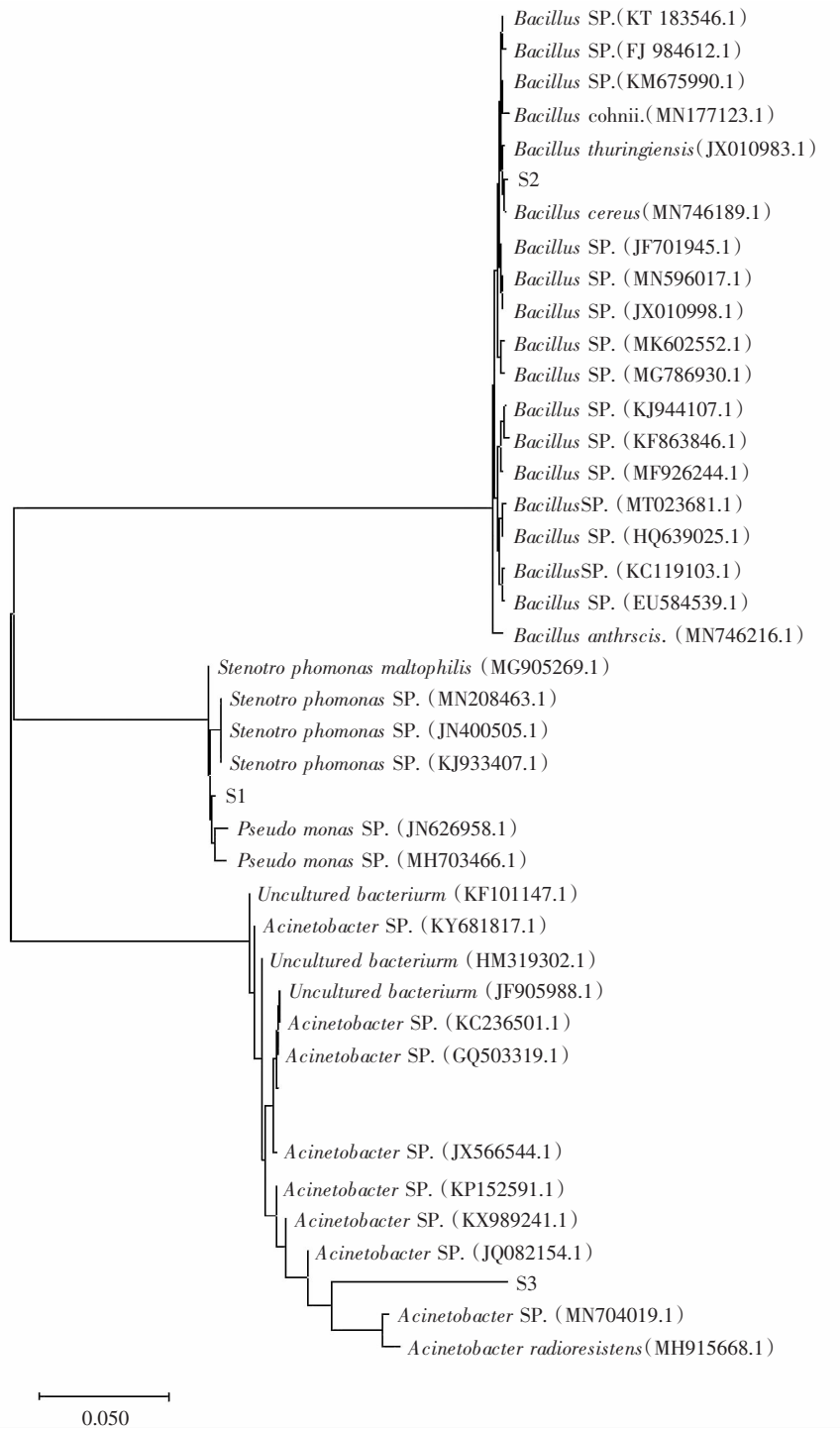


图 1 基于 16S rDNA 基因序列构建的毛竹内生细菌系统发育树

伴生细菌, 具有许多 PGPB 性质, 也是一种抗铅植物生长促进细菌, 可用于植物修复 [17]。因此, 对这两类菌的定植能力, 以及它们对铅的吸附能力进行研究, 将有助于提高微生物与树木联合修复重金属污染土壤技术水平。

参考文献:

[1] ALI H, KHAN E, SAJAD M A. Phytoremediation of

heavy metals—concepts and applications[J]. Chemosphere, 2013, 91(7): 869–881.

[2] FAHR M, LAPLAZE L, BENDAOU N, et al. Effect of lead on root growth[J]. Front Plant Sci, 2013, 4: e00175.

[3] YANG Y, HUANG B, XU J, et al. Heavy metal domestication enhances beneficial effects of arbuscular mycorrhizal fungi on lead (Pb) phytoremediation efficiency of *Bidens parviflora* through improving plant growth and root Pb ac-

- cumulation [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29 (22): 32988–33001.
- [4] ZHI-XIN N, SUN L N, SUN T H, et al. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture[J]. *J Environ Sci (China)*, 2007, 19(8): 961–967.
- [5] PULFORD I D, WATSON C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review[J]. *Environment International*, 2003, 29(4): 529–540.
- [6] SELAMAT S N, ABDULLAH S R, IDRIS M. Phytoremediation of lead (Pb) and arsenic(As) by *Melastoma malabathricum* L. from contaminated soil in separate exposure[J]. *Int J Phytoremediation*, 2014, 16(7–12): 694–703.
- [7] LIU C, LIN H, LI B, et al. Endophyte *Pseudomonas putida* enhanced *Trifolium repens* L. growth and heavy metal uptake: A promising in-situ non-soil cover phytoremediation method of nonferrous metallic tailing[J]. *Chemosphere*, 2021, 272: e129816.
- [8] BAN Y, XU Z, YANG Y, et al. Effect of dark septate endophytic fungus *Gaeumannomyces cylindrosporus* on plant growth, Photosynthesis and Pb Tolerance of Maize (*Zea mays* L.)[J]. *Pedosphere*, 2017, 27(2): 283–292.
- [9] 袁宗胜. 福建毛竹冬笋营养品质地域性差异分析[J]. *江西农业学报*, 2013, 25(9): 31–33.
- [10] 郭起荣, 张元庆. 毛竹分子辅助选择育种工作展望[J]. *江西农业大学学报*, 2001(3): 379–383.
- [11] LIU D, LI S, ISLAM E, et al. Lead accumulation and tolerance of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) seedlings: applications of phytoremediation [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(2): 123–130.
- [12] 刘希华, 江丹丹, 文欣. 小飞蓬耐铅内生细菌的分离及其 16S rDNA 鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(4): 260–262.
- [13] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [14] FAN M, LIU Z, NAN L, et al. Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a Pb/Zn mining area [J]. *Microbiol Res*, 2018, 217: 51–59.
- [15] JEBARA S H, SAADANI O, FATNASSI I C, et al. Inoculation of *Lens culinaris* with Pb-resistant bacteria shows potential for phytostabilization[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(4): 2537–2545.
- [16] SHIN M N, SHIM J, YOU Y, et al. Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyper-accumulator *Alnus firma*[J]. *J Hazard Mater*, 2012, 199–200: 314–320.
- [17] BABU A G, SHEA P J, SUDHAKAR D, et al. Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal (loid)-contaminated mining site soil[J]. *Journal of Environmental Management*, 2015, 151: 160–166.