2015-12-25 DOI: 10.3724/SP.J.1145.2015.07008 http://www.cibj.com/
应用与环境生物学报 *Chin J Appl Environ Biol* 2015, **21** (6): 1025-1031

铬污染区糙野青茅内生耐铬细菌筛选及其促生能力*

廖 萍[1] 刘茂柯[2] 张瀚能[1] 赵 翀[1] 杨雅琳[1] 张小平[1] 张金羽[1] 赵 珂[1]**
[1]四川农业大学资源学院微生物系 成都 611130
[2]四川省农科院水稻高粱研究所 泸州 646000

摘 要 以铬污染区糙野青茅[*Deyeuxia scabrescens* (Griseb.)]为研究对象，从中分离耐重金属铬的内生菌，获得对重金属铬有强耐受性和具有促生功能的细菌，为微生物与植物联合修复重金属污染提供菌种资源. 采用LB培养基，以涂布和撒接两种分离方法获得内生细菌，通过内生细菌在不同铬浓度培养基的生长状况来判断其对于重金属铬的耐受性，初筛耐受性强的菌株培养于含铬LB液体培养基培养后测定其OD值，以验证其对铬的耐受性. 将耐铬能力突出的菌株接种于含铬LB液体培养基培养后测定培养基中的残留铬含量，初探其去铬能力，并分析耐铬菌株多样性和产吲哚乙酸IAA、产铁载体、溶磷、降解纤维素等促生能力. 结果显示：从糙野青茅中共分离得到33株内生细菌，其中27株表现出较强的铬耐受性，5株细菌的铬耐受浓度高达1 000 μg/mL. 2株菌在铬浓度为300 μg/mL的处理下培养48 h后去铬率分别为79.55%和75.27%. 经16S rDNA序列测定，内生细菌属于*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Terribacillus*、*Ochrobacterium*、*Ignatzschineria*、*Alcaligenes* 6个属. 24株菌（88.89%）具有产IAA能力，18株菌（66.67%）具有产铁载体能力，10株菌（37.04%）具有溶磷能力，13株菌（48.15%）具有降解纤维素能力. 本研究表明，铬污染区植物内生细菌在铬污染土壤的生物修复中具有很大潜力. 图4 表3 参41

关键词 糙野青茅；内生细菌；耐铬；促生
CLC X172

Chromium-resistant endophytic bacteria from *Deyeuxia scabrescens* (Griseb.) in Chromium contaminated area: isolation, screening and plant growth promoting*

LIAO Ping[1], LIU Maoke[2] , ZHANG Hanneng[1] , ZHAO Chong[1] , YANG Yalin[1] , ZHANG Xiaoping[1], ZHANG Jinyu[1] & ZHAO Ke[1]**
[1]*Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University*, Chengdu 611130, China
[2]*Rice and Sorghum Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences*, Luzhou 646000, China

Abstract This research aimed to isolate the chromium-resistant bacterial endophyte strains and to evaluate their chromium resistance and plant growth promoting traits. LB medium and two isolate approaches were employed to isolate endophytic bacteria from *Deyeuxia scabrescens* (Griseb.) growing in chromium contaminated soil. In order to analyze the chromium resistance of the endophytic bacteria, the isolates were inoculated on medium of different chromium concentration. To verify the chromium stress resistance and removal ability, the isolates with strong chromium resistance in preliminary screening were measured for the OD value in LB liquid medium containing different concentration of chromium. The diversity and plant growth promoting activity of the endophytes were also analyzed. Out of the 33 endophytic bacteria isolated from *Deyeuxia scabrescens* (Griseb.), 27 strains could grow on media with chromium concentration greater than 500 ug/mL, with 5 isolates showing chromium stress resistance up to 1000 μg/mL. Additional experimental revealed the high chromium removal rate of SCAUE9002 (79.55%) and SCAUE9006 (75.27%) in LB medium (300 mg Cr^{6+}/L, 48 h incubation). Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences showed that these isolates belonged to 6 species, including *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Terribacillus*, *Ochrobacterium*, *Ignatzschineria* and *Alcaligenes*. In terms of plant growth promoting ability, indole-3-acetic acid (IAA) production was detected in 24 strains (72.73%), Siderophore production was positive in 18 strains (54.54%), 10 strains (30.3%) of the test isolates showed ability to solubilize phosphate, and 13 strains produced cellulases (39.40%). Our research suggested that bacterial endophytes from chromium contaminated area are promising in bioremediation for chromium contaminated soils.

Keywords *Deyeuxia scabrescens* (Griseb.); endophytic bacteria; chromium resistant; plant growth promoting

收稿日期 Received: 2015-07-02 接受日期 Accepted: 2015-08-12
*国家863计划项目（2013AA102802-05）资助 Supported by the National High-tech R&D Program (863 Program, 2013AA102802-05)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaoke82@126.com)

铬（Cr）的毒性主要来自六价铬Cr(VI)，Cr(VI)是国际公认的致癌金属物，严重危害生态环境和人类健康[1]. 铬一旦污染环境很难自然修复，研究铬污染的脱污修复技术，对生态环境保护和人类健康意义重大. 目前建立的土壤Cr(VI)污染修复方法主要有物理、化学、生物等方法[2]. 微生物–植物联合修复克服了传统的物理、化学修复技术的弊端，具有高效、低成本、无二次污染等优势，已成为全球环境修复技术与工程科学研究的前沿领域之一[3-4]. 从环境中筛选出具有抗重金属性质的微生物是微生物修复技术的难点和关键[5]，目前已发现较多对铬具有耐受性的细菌菌株[6-7] .

糙野青茅[*Deyeuxia scabrescens* (Griseb.)]是禾本科野青茅属下的一种丛生型高大多年生草本植物[8]，作为饲草被广泛运用于畜牧业. 植物内生细菌（Endophytic bacteria）是指从表面消毒的植物组织中分离得到或从植物内部获得的能够定殖在健康植物各种组织和器官内，并未使植物的表型特征和功能发生改变的细菌[9]. 内生细菌与植物在长期的共同进化中，已成为植物微生态系统的天然组成成份，它促进植物对恶劣环境的适应，加强系统的生态平衡. 近年来，内生细菌引起许多学者的关注，特别是内生细菌、重金属和植物三者间的相互作用. 有研究发现，内生细菌可以提高重金属污染的植物修复作用，减轻土壤污染物对植物的毒害作用，使植物可以进行自我修复[10]. 有研究表明重金属环境中的植物内生细菌具有耐重金属作用，如镉污染区龙葵中分离到的内生细菌具有解锌铬毒能力[11]，镍矿区十字花科植物香雪球中分离得到的内生细菌具有抗重金属能力[12]等. 此外，植物内生促生细菌（Plant growth promoting endophytic bacteria，PGPE）寄生在植物体内，将有机物转变为无机物，为植物提供有效的矿质营养元素；同时还能分泌植物激素、合成特异性酶等，促进植物生长发育，增强植物抗逆性[13-15]. 因此，从铬污染区植物中分离获得具有耐铬和促生功能的菌株具有可行性.

目前关于内生细菌的研究还是主要集中在农业生产领域，在环境污染方面的应用还处于研究探讨的起步阶段，尤其是运用内生细菌与植物联合修复重金属污染土壤的研究相对较少[16]. 本研究以铬污染区糙野青茅为材料，分离样品中的内生细菌，并分析其对于重金属铬的耐受性，同时对耐铬菌株进行16S rDNA序列分析和促生能力检测，以期筛选出耐铬、产IAA、产铁载体、溶磷、降解纤维素的PGPE菌株，为微生物–植物联合修复重金属污染土壤提供一定的理论基础和菌株资源.

1 材料与方法

1.1 实验材料

糙野青茅：样品于2012年11月采自攀枝花矿区（26°05′-27°21′N, 101°08′-102°15′E）糙野青茅生长区域，随机选取3个样方，每个样方面积约1 m^2. 在每个样方中随机采集5株糙野青茅植株，同时采集适量生境土，将植物样品与土样装入无菌塑料袋，立即带回实验室.

分离培养基[17]：LB固体培养基（Tryptone 10 g, Yeast-extrace 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL）；LB液体培养基（Tryptone 10 g, Yeast-extrace 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水1 000 mL）.

IAA显色液[18]：0.5 mol/L $FeCl_3$ 2 mL缓慢加入98 mL 35%的高氯酸.

CAS检测液[19]：取10 mmol/L十六烷基三甲基溴化铵溶液6 mL加入100 mL容量瓶，并用双蒸水稀释，将1.5 mL的1 mmol/L的$FeCl_3 \cdot 6H_2O$与7.5 mL 2 mmol/L的铬天青混合，装入上述容量瓶，称取4.307 g哌嗪二乙磺酸溶解于30 mL双蒸水中，再小心加入6.5 mL的12 mol/L的盐酸，即得pH = pKa = 5.6的缓冲液，将此溶液转入上述容量瓶中混匀定容至100 mL，按照文献[19]的方法配制CAS培养基.

蒙金娜培养基[20]：葡萄糖10 g, $(NH4)_2SO_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.03 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g, 磷矿粉10 g, 酵母膏0.4 g, 琼脂20 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.0-7.5.

刚果红培养基[21]：K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.25 g, CMC-Na 1.88 g, 刚果红 0.2 g, 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL.

1.2 方 法

1.2.1 糙野青茅生境土及重金属含量测定 测定糙野青茅生境土pH值，将糙野青茅生境土、根、茎、叶器官处理后，HNO_3-$HCLO_4$消解（LabTech DigiBlock消解仪），采用原子吸收法（MKⅡ M6原子吸收光谱仪）测定Cr(VI)元素浓度[22].

1.2.2 植物内生细菌分离、纯化 将糙野青茅植株进行严格的表面消毒及消毒效果检测[23]后，置于无菌研钵中，加入无菌石英砂捣碎后，一部分样品转移至离心管中，加入5 mL磷酸缓冲液混匀，从离心管中吸取1 mL溶液到装有9 mL无菌水的试管之中，依次稀释为10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}三个浓度梯度的悬液[24]，取3个浓度梯度的茎、叶、根悬液各80 μL涂布于分离培养基上；将另一部分样品直接均匀地铺于分离培养基上. 将涂布好的培养基放入28 ℃培养箱内培养1-2 d，待菌落长出后，用LB培养基进行菌落纯化、镜检、记录，并将纯化好的菌株保种于LB斜面培养基上，室温保存.

1.2.3 糙野青茅内生细菌重金属耐受实验 将分离出的纯菌株接种于1.5 mL无菌水中，进行涡旋后得到相应的菌悬液，并将其接种在含$K_2Cr_2O_7$ [25-26]的LB平板上，$K_2Cr_2O_7$浓度为50、100、200, …, 1 000 μg/mL，3次重复，于28 ℃中培养24 h，记录生长情况，筛选出耐受性较强的菌株，接入LB液体培养基，在28 ℃摇床培养24 h，制成种子液. 离心去弃上清液后，加蒸馏水，调节其OD值一致，按2 %的接种量加入含$K_2Cr_2O_7$的LB液体培养基中，$K_2Cr_2O_7$浓度为200、500、800、1 000 μg/mL，在28 ℃摇床培养24 h和48 h，在波长600 nm处测定其OD值，同时做空白对照[27].

1.2.4 不同铬浓度对内生细菌去铬率的影响研究 选出耐铬能力最为突出的菌株，按照1.2.3的方法接入含$K_2Cr_2O_7$的LB液体培养基中，$K_2Cr_2O_7$浓度为100、200、300, …, 1 000 μg/mL，以不接菌的含$K_2Cr_2O_7$的LB液体培养基为空白对照，3次重复，在28 ℃摇床培养24 h，取2 mL菌液离心取上清，采用原子吸收法测定上清中Cr(VI)含量.

1.2.5 不同培养时间内生细菌去铬率的影响研究 根据代表菌株在不同铬浓度的去铬率，确定最适铬浓度，将代表菌株按照1.2.3的方法接入含有该铬浓度的LB液体培养基中，以不接菌的含$K_2Cr_2O_7$的LB液体培养基为空白对照，3次重复，28 ℃摇床培养24 h、48 h、72 h. 取2 mL菌液离心取上清，采用

原子吸收法测定上清中Cr(VI)含量.

1.2.6 **耐铬菌株DNA提取及PCR扩增** DNA提取及PCR扩增参照李百元等[28]和陈强[29]等的方法进行.

1.2.7 **内生细菌的多样性分析** 将PCR产物进行纯化，送往生工生物工程上海（股份）有限公司进行测序，测序结果在美国生物技术研究中心（National Center for Biotechnology, NCBI）数据库中进行BLAST比对，在GenBank中寻找相似性最大的序列，采用Neighbor-joining法构建系统发育树[30].

1.2.8 **内生细菌促生能力测定** 供试菌株产IAA能力参考Gordon和Weber（1951）的方法[18]进行测定. 将1.2.3制备的种子液接入含0.5 mol/L色氨酸的LB液体培养基中，3次重复，设置空白对照，28 ℃ 120 r/ min摇床培养3 d，8 000 r/min离心，取2 mL菌液上清，加入4 mL IAA显色液，25 ℃暗反应30 min，530 nm波长下比色，记录吸光度值. 供试菌株产铁载体和溶磷能力参照夏娟娟[19]和林启美等[20]的方法进行测定. 将1.2.3制备的种子液取5 μL分别点接至CAS培养基和蒙金娜培养基，3次重复，28 ℃培养4-5 d，观察记录菌株周围橘黄色晕圈及无色透明圈直径.

1.2.9 **内生细菌纤维素酶活性检测** 糙野青茅内生细菌代表菌株纤维素酶活性按照黄玉兰等的方法[21]进行检测. 将1.2.3中的种子液取 5 μL点接至刚果红培养基，3次重复，28 ℃培养2 d，测量记录菌株透明圈直径.

1.2.10 **数据分析** 试验数据通过MEGA5.0, SPSS 17.0 软件（SPSS Inc., Chicago, US）进行分析.

2 结果与分析

2.1 糙野青茅生境土及各器官重金属含量

糙野青茅生境土及各器官中重金属铬含量见表1. 糙野青茅生长区域铬浓度达到了(375.4932 ± 1.0550) mg/kg，超过了环境总铬质量标准中的三级标准值（300 mg/kg）[31]，属于铬污染土壤，糙野青茅生境土壤pH值测定为7.32 ± 0.01，偏弱碱性土壤，而在此环境中Cr^{6+}主要以CrO_4^{2-}形态存在，极易在土壤中迁移扩散造成环境污染. 由此可见，在这种环境中生长的糙野青茅势必会受到重金属铬的胁迫，在对糙野青茅各器官中铬含量进行测定发现，根的铬含量最高，其次是茎和叶. 这可能是根从土壤中直接吸收铬，铬在根中积累到一定量后再向植物地上部分转运. 生活在糙野青茅中的内生细菌也会受到铬的影响，可能具有耐铬能力.

表1 糙野青茅土壤及器官中重金属铬浓度（*w*/mg kg^{-1}）（最小显著差数法，a和b代表0.05显著水平）

Table 1 Cr concentrations (*w*/mg kg^{-1}) of soil and plant tissues of *Deyeuxia scabrescens* (Griseb.) (LSD α = 0.05)

生境土 Soil	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
375.4932 ± 1.0550 a	0.2440 ± 0.0181 b	0.1860 ± 0.0085 b	0.1221 ± 0.0042 b

2.2 糙野青茅内生细菌的分离及耐铬初筛结果

用涂布和撒接两种分离方法从糙野青茅的根、茎、叶中共分离得到33株内生细菌. 对比不同六价铬浓度下内生细菌的生长状况，最后筛选出27株耐铬能力较强的菌株进行鉴定和促生研究. 33株内生细菌均能在$K_2Cr_2O_7$浓度为500 μg/mL及以下的LB平板上生长，随着$K_2Cr_2O_7$浓度增大，内生细菌长势逐渐变差或不能生长，当$K_2Cr_2O_7$达到1 000 μg/mL时只有5株内生细菌（表2）能够生长，占分离菌株的15.15%，表明这5株菌株具有较强的耐铬能力，SCAUE9002和SCAUE9006耐铬能力较为突出.

表2 浓度梯度为50-1 000 μg/mL $K_2Cr_2O_7$ LB平板上菌体生长状况

Table 2 LB panel bacterial growth with concentration gradient of 50-1000 μg/mL $K_2Cr_2O_7$

Cr^{6+}(ρ/μg mL^{-1})	菌株 Strain
≥ 500	SCAUE9001-SCAUE9033
600-800	SCAUE9001-SCUAE9027
900	SCAUE9002-SCAUE9003, SCAUE9005-SCAUE9007, SCAUE9009, SCAUE9011-SCAUE9016, SCAUE9023, SCAUE9026-SCAUE9027
1000	SCAUE9002, SCAUE9005-SCAUE9007, SCAUE9014

2.3 内生细菌耐铬验证结果

5株耐铬能力较强的细菌在不同浓度重金属铬的处理下，随着$K_2Cr_2O_7$浓度增加，$OD_{600\ nm}$值均降低（图1）. 由于细菌个数与$OD_{600\ nm}$值之间存在线性关系，可知5株细菌生长都受到了重金属铬的抑制. 在$K_2Cr_2O_7$浓度由200 μg/mL增加至500 μg/mL时，所有菌株的OD值降幅最大，表明此浓度下糙野青茅内生细菌受到了较强的抑制；代表菌株培养48 h的OD值明显高于24 h的，表明在$K_2Cr_2O_7$浓度小于500 μg/mL时，代表菌株培养48 h较为适宜. 当$K_2Cr_2O_7$浓度由500 μg/mL增加至1 000 μg/mL时，24 h培养后所有菌株的OD值下降趋势较平缓，48 h培养后的菌株的OD值几乎趋近于0，这说明代表菌株在高浓度的$K_2Cr_2O_7$环境中24 h的培养时间较为适宜. 虽然铬浓度增加，糙野青茅内生细菌仍能够在该逆境环境下生长，表明这些菌株对于高浓度的铬污染有一定的适应能力，其耐铬能力为SCAUE9002 > SCAUE9006 > SCAUE9014 > SCAUE9005 > SCAUE9007.

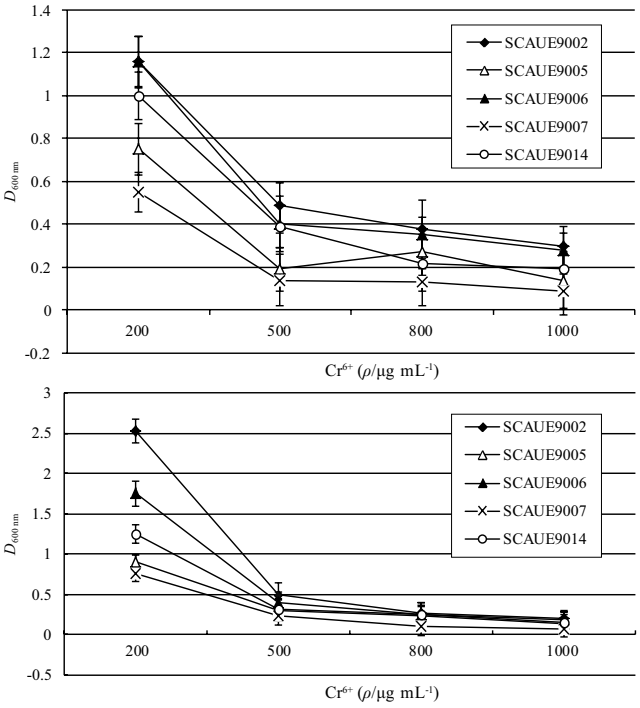


图1 5株细菌在不同浓度Cr^{6+}处理下的$OD_{600\ nm}$值. 上: 24 h; 下: 48 h.

Fig. 1 $OD_{600\ nm}$ values of 5 strains in different concentration of Cr. Upper: 24 h; Lower: 48 h.

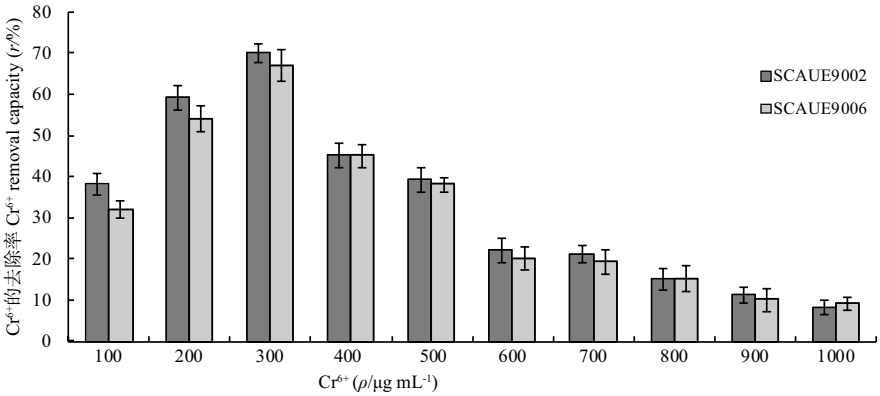


图2 SCAUE9002和SCAUE9006在不同铬浓度下的铬去除率.
Fig. 2 Effect of chromium concentration on Cr^{6+} removal capacity of SCAUE9002 and SCAUE9006.

2.4 铬浓度对内生细菌去除铬的影响

将耐铬能力突出的SCAUE9002和SCAUE9006接入不同浓度的$K_2Cr_2O_7$中培养24 h后的结果（图2）表明，在$K_2Cr_2O_7$浓度为300 μg/mL时，2株菌的铬去除率最高，分别为70.15%和67.21%. $K_2Cr_2O_7$浓度在小于300 μg/mL时，菌株对铬的去除能力随铬浓度的增加而增加，而大于300 μg/mL时，菌株对铬的去除率逐渐减小，可见$K_2Cr_2O_7$浓度在小于等于300 μg/mL时，铬对SCAUE9002和SCAUE9006的去铬能力有促进作用，一旦超过300 μg/mL就会抑制其对铬的去除率.

2.5 培养时间对内生细菌去除铬的影响

将耐铬能力最为突出的SCAUE9002和SCAUE9006在300 μg/mL的铬浓度下培养不同时间，其对铬的去除率表明，培养48 h后的去铬率最高（图3），分别为79.55%和75.27%，这与菌株在铬浓度小于500 μg/mL处理下培养48 h的OD值大于24 h的结果相符. 由此可以得出，内生细菌在300 μg/mL铬浓度下的最佳培养时间为48 h.

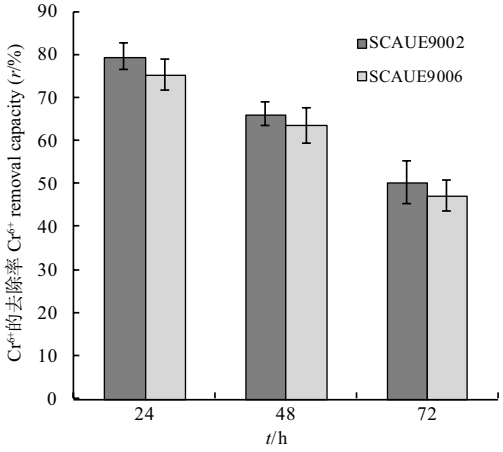


图3 培养时间对SCAUE9002和SCAUE9006去铬率的影响.
Fig. 3 Effect of culture time on Cr^{6+} removal capacity of SCAUE9002 and SCAUE9006.

2.6 内生细菌多样性分析

对27株耐铬能力较强的菌株进行16S rDNA测序分析，系统发育树（图4）表明，27 株菌株共被分为了6个属，分别属于*Ignatzschineria*、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Ochrobactrum*、*Alcaligenes*和*Terribacillus*属. 菌株在GenBank中的登录号为KT154804-KT154830. 16株属于*Bacillus*属，占代表菌株的59.26%，为糙野青茅内生细菌的优势菌群.

2.7 糙野青茅内生放线菌促生能力

代表菌株促生能力检测结果（表3）表明，菌株产IAA浓度在2.95-29.10 mg/L之间，7株菌产IAA能力较强，其中SCAUE9023产IAA能力最强，SCAUE9024产IAA能力次之；产铁载体能力定性筛选表明，18株（54.54%）能在CAS培养基上产生橘红色的透明圈，对其进行液体复筛结果进一步证明，它们均具有一定的产铁载体能力；10株菌（30.3%）具有

表3 内生细菌促生能力及纤维素酶活性检测结果
Table 3 Plant growth promoting and cellulose enzyme activities of endophytic bacteria

菌株 Strain	IAA (ρ/mg L^{-1})	铁载体 Siderophore	溶磷 Phosphate solubilization	纤维素酶 Cellulase
SCAUE9001	3.2955 ± 0.42	+	+	+
SCAUE9002	5.5383 ± 0.51	+	-	+
SCAUE9003	16.9190 ± 0.58	+	-	+
SCAUE9005	12.3792 ± 0.76	+	+	-
SCAUE9006	10.7723 ± 0.65	+	+	-
SCAUE9007	7.3550 ± 0.71	+	+	-
SCAUE9008	11.4507 ± 0.68	+	-	-
SCAUE9009	19.8426 ± 0.89	+	-	-
SCAUE9010	26.7226 ± 1.02	+	-	+
SCAUE9011	-	+	-	-
SCAUE9012	10.6914 ± 0.91	+	+	+
SCAUE9013	11.7676 ± 0.87	+	+	+
SCAUE9014	9.5189 ± 0.25	+	-	-
SCAUE9015	11.9244 ± 1.13	-	-	+
SCAUE9016	5.9450 ± 0.39	+	-	-
SCAUE9017	4.6048 ± 0.49	+	-	+
SCAUE9004	6.1512 ± 0.28	-	-	-
SCAUE9019	-	-	+	-
SCAUE9026	2.9519 ± 0.26	-	+	+
SCAUE9027	10.3436 ± 0.83	+	+	-
SCAUE9019	3.4708 ± 0.37	-	-	-
SCAUE9020	-	+	-	+
SCAUE9021	16.8385 ± 0.55	-	-	+
SCAUE9022	10.6873 ± 0.67	-	-	-
SCAUE9023	29.1065 ± 1.23	+	+	-
SCAUE9024	27.6289 ± 0.92	+	-	+
SCAUE9025	17.0962 ± 1.08	-	-	+

+：有对应的功能；-：无对应的功能. +: positive; —: negative.

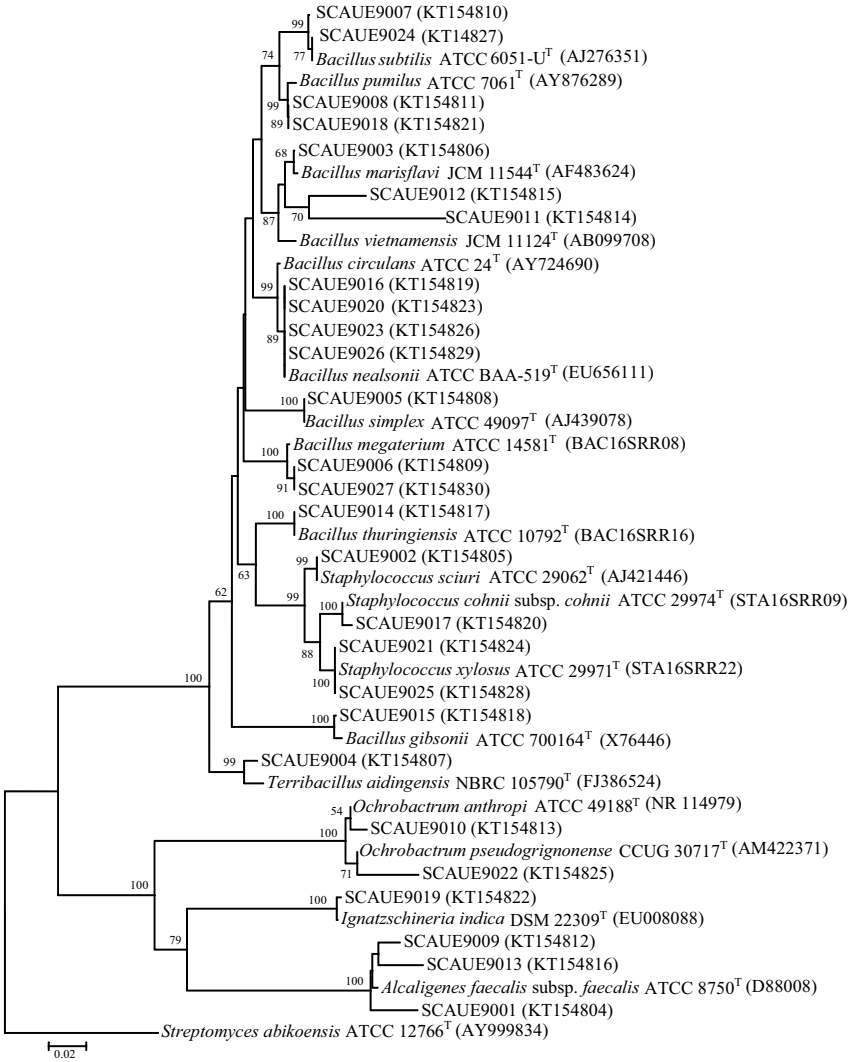


图4 糙野青茅内生细菌16S rDNA系统发育树.
Fig. 4 Phylogenetic N-J tree based on16S rDNA gene sequences showing the positions of isolate endophytic bacteria.

溶磷能力. 6株菌(SCAUE9001、SCAUE9007、SCAUE9012、SCAUE9013、SCAUE9027、SCAUE9023)至少具有3种促生功能,说明糙野青茅内生细菌在促进植物生长方面具有很大潜力.

2.8 内生细菌降解纤维素能力筛选结果

糙野青茅内生细菌代表菌株纤维素酶活性检测结果(表3)表明,33株菌中有13株菌(39.40%)具有降解纤维素能力. 其中SCAUE9003、SCAUE9017和SCAUE9026在刚果红培养基上的水解圈较明显,相对其余菌株其降解纤维素菌能力较强.

3 讨论

植物内生细菌可以表面吸附、积累重金属,降低重金属对植物的毒性. 此外,一些对重金属具有抗性的内生细菌可以通过释放螯合剂和改变氧化还原电位等方式碱化土壤微环境、析出重金属离子,降低重金属的生物有效性,从而使长期生长在重金属污染条件下的植物免受重金属毒害,提高植物对重金属固化/稳定效率[16]. 从糙野青茅中分离获得的内生细菌中27株菌均可以在大于500 μg/mL的铬浓度下生长,有5株菌(SCAUE9002、SCAUE9005、SCAUE9006、SCAUE9007、SCAUE9014)能够耐受很高浓度的重金属铬(1 000 μg/mL),SCAUE902和SCAUE9006的耐铬能力最突出,其耐铬能力高于Srinath T等分离到的耐受Cr(Ⅵ)浓度为50 mg/L的细菌[32]和Viti C等发现的最高耐Cr(Ⅵ)浓度为22 mmol/L的细菌[33];SCAUE902和SCAUE9006在铬浓度为300 μg/mL下培养48 h的去铬率最高,分别为79.55%和75.27%. Luo等通过将4株超富集植物龙葵(*Solanum nigrum*)体内分离的内生细菌重新接种发现,内生细菌的存在可以大大降低重金属镉对植物的毒害作用,同时显著提高植物根和地上部分的生物量,促进植物对重金属的固化效果[34]. 糙野青茅生境土中铬浓度达到(375.493 2 ± 1.055) mg/kg,而植物中根的铬含量仅为(0.244 0 ± 0.018 1) mg/kg,茎叶含量更低. 由此我们可以推测,内生细菌可能是通过自身作用降低重金属铬的生物

有效性和铬毒性，从而使糙野青茅免受重金属毒害，其具体作用机制值得进一步研究. 试验结果也暗示铬污染区植物内生细菌在微生物–植物修复铬污染土壤的应用中潜力很大.

33株糙野青茅内生细菌经过耐铬初筛选出27株代表菌株进行16S rDNA序列分析，分别属于6个属，表明糙野青茅耐铬内生细菌具有丰富的多样性. 代表菌株主要分布于*Bacillus*（59.16%）和*Staphyloccoccus*（14.82%），它们在生长于重金属污染区的植物中分布较为普遍[12, 35]. 而来自不同重金属污染环境不同类型植物中的内生细菌种类也存在着明显的差异. 如Barzanti等从镍超富集植物*Alyssum bertolonii*中分得83株内生细菌，属于*Bacillus*、*Microbacterium*、*Leifsonia*、*Curtobacterium*、*Paenibacillus*、*Staphyloccoccus* [12]；Khan等从*Prosopis juliflora*中分得21株内生细菌，主要属于*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Aerococcus* [35]. 在本研究中，从糙野青茅中获得的耐铬内生细菌除了*Bacillus*和*Staphyloccoccus*外，还包括*Terribacillus*、*Ochrobacterium*、*Ignatzschineria*、*Alcaligenes*属，表明不同植物中内生菌的组成存在差异，这可能与植物种类和植物生长的环境有关[36-37].

目前发现的大多数超富集植物具有生长缓慢、生物量小、根系扩展深度有限、对金属有选择性以及从根部到地上部的重金属转移率低等缺陷，导致实际修复效率低和修复时间长[38]，而土壤中过量的重金属会导致细胞新陈代谢紊乱，阻碍植物正常生长发育[39]. 植物内生细菌能够直接或间接促进植物的生长和根部活动强度，相应地提高植物对重金属的吸收能力以及修复效率，直接作用机制包括生物固氮、溶磷、产生铁载体、合成特异性酶和分泌植物激素，从而改善植物营养和增强抗逆能力[16, 40]. 植物内生细菌还能通过与病原菌竞争有限的生活空间和营养，从而增强宿主抵御病害的能力并间接促进植物生长[41]，此外，细菌铁载体含有的各种能螯合铁的结构基团（如邻二苯酚、羧基和乙二胺结构等）能够专一且高度亲和游离的铁，从而使土壤中可用的铁降低至更为缺乏的程度，使病原菌的繁衍和侵染能力大大下降. 可见，PGPE产生的铁载体可以有效地直接或间接促进植物生长. 本研究发现糙野青茅内生细菌中，24株菌（88.89%）具有产IAA能力，18株菌（66.67%）具有产铁载体能力，10株菌（37.04%）具有溶磷能力，13株菌（48.15%）具有降解纤维素能力. 值得注意的是，3株菌（SCAUE9001、SCAUE9012、SCAUE9013）同时具有产IAA、铁载体、溶磷和纤维素降解能力，说明内生细菌能通过多种促生机制促进植物生长，提高植物富集重金属能力. 耐铬能力最突出的SCAUE9002和SCAUE9006也分别具有3种促生功能，说明它们在微生物–植物联合修复铬污染中具有很大应用潜力. 综上所述，糙野青茅内生细菌不但具有较强的耐铬能力，而且还能够促进植物生长，对其进行进一步的研究，在生物修复铬污染功能菌株的寻找和开发中具有重要的理论和实践意义.

参考文献 [References]

1 陈灿灿, 谢英荷, 洪坚平, 李红梅. 土壤中耐铅微生物的筛选[J]. 中国生态农业学报, 2007, **15** (2): 85-87 [Chen CC, Xie YH , Hong JP, He XF, Li HM. Selection of lead-resistant strains of microorganisms from soil [J]. *Chin J Eco-agric*, 2007, **15** (2): 85-87]

2 Koçberber N, Dönmez G. Bioaccumulation of hexavalent chromium by enriched in icrobial cultures obtained from molases and NaCl containing media [J]. *Process Biochem*, 2005, **40** (7): 2493-2498

3 Glick BR. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment [J]. *Biotechnol Adv*, 2003, **21**: 383-393

4 牛之欣, 孙丽娜, 孙铁珩. 重金属污染土壤的植物–微生物联合修复研究进展[J]. 生态学杂志, 2009, **28** (11): 2366-2373 [Niu ZX, Sun LN, Sun TH. Plant-microorganism combined remediation of heavy metals-contaminated soils: its research progress [J]. *Chin J Ecol*, 2009, **28** (11): 2366-2373]

5 曹旭霞. 抗铬细菌的筛选鉴定以及吸附性能研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2012 [Cao XX. Screening identification of heavy metal chromium resistance bacteria and research on biosorption properties [D]. Chengdu: Sichuan Normal University, 2012]

6 杨文玲, 王继雯, 慕琦, 甑静, 陈国参. 耐Cr (VI)菌株的筛选及条件优化[J]. 河南科学, 2013, **31** (8): 1175-1179 [Yang WL, Wang JW, Mu Q, Zeng J, Chen GC. Screening of Cr (VI)-resistant strains and condition optimization [J]. *Henan Sci*, 2013, **31** (8): 1175-1179]

7 白群华, 肖虹, 贾燕, 张永光. 耐铬菌株CQMUXH-1耐受和还原Cr (VI)的特性研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, **35** (6): 837-839 [Bai QH, Xiao H, Jia Y, Zhang YG. Characteristics about tolerance and reduction of bacteria CQMUXH-1 to hexavalent chromium [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2010, **35** (6): 837-839]

8 郭本兆, 卢生莲, 孙永华. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1987, **9** (3): 195 [Guo BZ, Lu SL, Sun YH. The Flora of China [M]. Beijing: Science Press, 1987, **9** (3): 195]

9 Schulz B, Boyle C. What Are Endophytes? Microbial Root Endophytes [M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, **9**: 1-13

10 Siciliano SD, Fortin N, Mihoc A, Wisse G, Labelle S, Beaumier D, Ouellette D, Roy R, Whyte LG, Banks MK, Schwab P, Lee K, Greer CW. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (6): 2469-2475

11 Luo SL, Wan Y, Xiao X, Guo HJ, Chen L, Xi Q, Zeng GM, Liu CB, Chen JL. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89** (5): 1637-1644

12 Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* [J]. *Microb Ecol*, 2007, **53** (2): 306-316

13 Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: Recent developments and applications [J]. *FEMS Microbiol Lett* , 2008, **278** (1): 1-9

14 Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China [J]. *Soil Biol Biochem*, 2008, **40** (1): 238-246

15 Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria [J]. *Can J Microbiol*, 1992, **38**: 1219-1232

16 Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, **29**: 248-258

17 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007 [Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007]

18 Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid [J]. *Plant Physiol*, 1951, **26** (1): 192

19 夏娟娟. 植物促生内生细菌的筛选及其强化油菜富集土壤铅镉重金属的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006 [Xia JJ. Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria and their effects on the accumunation of lead and cadmium from soil by rape [J]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006]

20 林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 姚军. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J]. 土壤与环境, 2000, **9** (1): 44-46 [Lin QM, Zhao XR, Sun YX, Yao J. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems [J]. *Soil Environ Sci*, 2000, **9** (1): 44-46]

21 黄玉兰, 李征, 刘晓宁, 王培培, 张杰. 一株耐低温纤维素酶高产菌株的筛选, 鉴定和产酶的初步试验[J]. 微生物学通报, 2010, **37** (5): 637-644 [Huang YL, Li Z, Liu XN, Wang PP, Zhang J. Screening and identification of a cold-adapted cellulase-producing bacteria [J]. *Microbiology*, 2010, **37** (5): 637-644]

22 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000 [Lu RK. Methods of Soil Agricultural Chemistry Analysis [M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2000]

23 崔林, 孙振, 袁军, 田宏先, 王利琴, 徐惠云. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, **33** (4): 353-358 [Cui L, Sun Z, Yuan J, Tian HX, Wang LQ, Xu HY. Isolation of endophytic bacteria from potato and selection of antagonistic bacteria to potato ring rot disease [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2003, **33** (4): 353-358]

24 罗雅, 蒋代华, 夏颖, 雷冬莉, 张福权. 一株耐铅细菌J3的筛选分离及其生物学特性[J]. 南方农业学报, 2011, **42** (9): 1041-1044 [Luo Y, Jiang DH, Xia Y, Lei DL, Zhang FQ. Isolation of lead-resistant bacterial strain J3 and its characteristics [J]. *Guangxi Agric Sci*, 2011, **42** (9): 1041-1044]

25 周围, 李友国, 程国军, 杨凯. 一株抗重金属铬细菌的分离、鉴定及抗性基因型的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, **27** (2): 248-250 [Zhou W, Li YG, Cheng GJ, Yang K. Isolation, identification and genotypic analysis of a bacterium strain with resistance to chromium (Ⅵ) [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2008, **27** (2): 248-250]

26 段学军, 闵航. 一株抗镉细菌的分离鉴定及其抗性基因定位的初步研究[J]. 环境科学学报, 2004, **24** (1): 154-158 [Duan XJ, Min H. Isolation, identification and preliminary studies on the resistance gene detection of a Cd-resisting bacterium [J]. *Acta Sci Circumst*, 2004, **24** (1): 154-158]

27 周丽英, 叶仁杰, 林淑婷, 刘杰, 肖清铁, 林素兰, 李艺, 林文雄, 林瑞余. 水稻根际耐镉细菌的筛选与鉴定[J]. 中国生态农业学报, 2012, **20** (5): 597-603 [Zhou LY, Ye RJ, Lin ST, Liu J, Xiao QT, Lin SL, Li Y, Lin WX, Lin RY. Screening and identification of cadmium-tolerant bacteria from rhizosphere soils under rice [J]. *Chin J Eco-Agric*, 2012, **20** (5): 597-603]

28 李百元, 谢小林, 张鲜娇, 蔡卓平, 朱红惠. 不同被捕食细菌对新疆盐碱地粘细菌分离的影响[J]. 微生物学报, 2013, **53** (4): 379-389 [Li BY, Xie XL, Zhang XJ, Cai ZP, Zhu HH. Influence of different prey strains on isolation of myxobacteria in saline-alkaline soils of Xinjiang [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2013, **53** (4): 379-389]

29 陈强, 陈文新, 张小平, 李登煜, Lindstrom K. 四川省部分豆科植物根瘤菌的遗传多样性[J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14** (1): 83-89 [Chen Q, Chen WX, Zhang XP, Li DY, Lindstrom K. Genetic diversity of rhizobia isoluted from some legumes in Sichuan, China [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (1): 83-89]

30 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28** (10): 2731-2739

31 GB 15618-1995 土壤环境总铬质量标准值[S]. [GB 15618-1995 Environmental quality standard for soils [S].]

32 Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria [J]. *Chemosphere*, 2002, **48** (4): 427–435

33 Viti C, Pace A, Giovannetti L. Characterization of Cr (VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity [J]. *Curr Microbiol*, 2003, **46**: 1-5

34 Luo S L, Chen L, Chen JL, Xiao X, Xu TY, Wan Y, Rao C, Liu CB, Liu YT, Lai C, Zeng GM. Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation [J]. *Chemosphere*, 2011, **85**: 1130-1138

35 Khan MU, Sessitsch A, Harris M, Fatima K, Imran A, Arslan M, Shabir G, Khan QM, Afzal M. Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils [J]. *Front Plant Sci,* 2015, **5**: 755. doi: 10.3389/fpls.2014.00755

36 Liu Y, Zuo S, Zou Y, Wang JH, Song W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays L.*, Nongda108) at different growth stages [J]. *Ann Microbiol*, 2013, **63** (1): 71-79

37 Rosenblueth M, Martínez-Romero E . Bacterial endophytes and their interaction with hosts [J]. *Mol Plant Microbe In*, 2006, **19**: 827-837

38 Puschenreiter M, Stoger G, Lombi E, Horak O, Wenzel WW. Phytoextraction of heavy metal contaminated soils with *Thlaspi goesingense* and *Amaranthus hybridus*: rhizosphere manipulation using EDTA and ammonium sulfate [J]. *J plant Nutr Soil Sci*, 2001, **164**: 615-621

39 Sheoran IS, Singal HR, Singh R. Effect of cadmium and nickelon photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cdjan L.*) [J]. *Photosynth Res*, 1990, **23**: 345-351

40 Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation [J]. *Biotechnol Adv*, 2010, **28**: 367-374

41 Bacon CW, Yates IE, Hinton DM, Meredith F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, **109**: 325-332