

## 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性

卞光凯<sup>1</sup>, 张越己<sup>1</sup>, 秦盛<sup>1\*</sup>, 邢珂<sup>1</sup>, 谢焕松<sup>2</sup>, 蒋继宏<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>徐州师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室, 徐州 221116

<sup>2</sup>南通大学生命科学学院, 南通 226019

**摘要:**【目的】沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及其促生长潜在能力的研究有助于我们获得一些能够耐受并促进耐盐植物在被  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等重金属离子污染的贫瘠的沿海滩涂上正常生长的菌株, 达到既能够利用广袤的滩涂生物资源产生经济价值又能够净化生态环境的目的。【方法】以江苏南通沿海滩涂地区的 4 种耐盐植物为材料, 采用稀释平板涂布法从中分离得到 45 株内生细菌, 从中挑取 23 株代表性的菌株, 对其进行抗重金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  的活性筛选; 固氮、解磷、吲哚乙酸 (IAA) 的产生、1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶活性等促生指标以及 NaCl 耐受能力的筛选。【结果】发现分离所得的大多数细菌能够耐受高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  以及  $\text{Pb}^{2+}$ , 但是对  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  的耐受能力则较弱; 26.1% 的细菌具有固氮能力, 21.7% 的细菌具有解磷能力, 60.9% 的细菌能够产生 IAA, 39.1% 的细菌含有 ACC 脱氨酶。对他们进行 16S rRNA 基因鉴定后发现, 他们分属于芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*)、海洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 共 8 个属, 显示了丰富的多样性。其中菌株 KLBMP 2432 以及菌株 KLBMP 2447 为潜在的新种。【结论】沿海滩涂地区的耐盐植物内生细菌具有丰富多样的生物多样性以及促生长能力, 且存在潜在的新种资源, 并对重金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  具有较强的抗性。

**关键词:** 耐盐植物, 内生细菌, 重金属, 促生, 生物多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1538-10

近年来, 伴随着沿海地区经济的发展, 环境污染问题日益严重, 许多重金属离子如  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等随着上游河流及雨水的冲刷流向沿海滩涂及大海, 使得沿海滩涂地区的土壤重金属污染问题日趋严重, 对人类健康及生态环境造成严重威胁。同时, 由于沿海滩涂地区土壤盐碱化程

度高以及有机质含量低, 人们通常采用低效率的人工方法进行土壤堆肥改良, 造成了大量的人力物力资源浪费。而生长于盐沼地区的植物能够促进土壤中的重金属离子的吸收<sup>[1]</sup>, 因而采用一些能够耐盐及重金属离子的先锋植物, 既可以起到改良土壤又可以获得可观的经济价值。如 Windham 等<sup>[1]</sup>报道

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000005, 30872028); 江苏省高校自然科学基金项目 (10KJB180008); 江苏高校优势学科建设工程项目 (化学生物学); 江苏高校优秀科技创新团队资助项目 (药用微生物前期开发); 江苏省研究生教育创新工程项目 (CXLX11\_0911)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-516-83403515; E-mail: shengqin@xznu.edu.cn; jhjiang@xznu.edu.cn

作者简介: 卞光凯 (1986-) 男, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源研究。E-mail: bianguangkai@126.com

收稿日期: 2011-07-04; 修回日期: 2011-08-30

两种主要盐碱地强抗逆性植物互花米草以及芦苇的地上组织能够不同程度地富集  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  等 5 种重金属离子。然而,生长于重金属污染环境中的植物的生长是一个缓慢的过程,这使得植物在改良土壤方面略显不足。研究发现,微生物可以促进超富集植物生长,提高对重金属离子的吸收。其中植物内生细菌在植物修复中的应用当前倍受关注,已成为国内外的研究热点。Castro CB 等<sup>[2]</sup>对分离自植物 *Cytisus striatus* 的内生细菌进行抗重金属  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  以及  $\text{Cd}^{2+}$  活性的筛选,共发现有 15 株细菌对 3 种以上重金属离子具有抗性。Altalhi AD<sup>[3]</sup>从葡萄树中分离得到 7 个属 16 株内生细菌,对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  等多种重金属离子具有抗性。内生细菌生长在植物体内,具有稳定的生长环境,易获得有机物质,与其他微生物相比可对植物产生更稳定的影响<sup>[2]</sup>。它们主要通过以下三种方式来促进植物富集土壤中的重金属离子:(1)增强植物的生长速率,如通过固氮作用为植物提供氮素营养<sup>[4]</sup>;调节植物体内的乙烯以及其它激素类物质的含量,分泌 IAA,产生铁载体以及其它有利于植株适应环境胁迫的酶,减少植物病菌感染等<sup>[5-7]</sup>;(2)对植物激素、酶活力、铁载体含量的贡献等<sup>[8-10]</sup>;(3)提高重金属吸收与向茎叶中转移。因此,利用重金属抗性促生细菌提高植物修复效率为土壤重金属污染修复工程提供了新的思路与方法,具有很好的应用前景。

江苏有着大量的沿海滩涂,具有丰富的植物资源,调查显示,该区共有 230 多种有耐盐植物<sup>[11]</sup>,蕴藏着丰富的植物内生菌资源。田菁、互花米草、芦苇和怪柳等耐盐植物广泛分布于南通沿海滩涂地区,具有多种药用价值及经济价值。对这些植物的内生细菌重金属抗性以及促生方面的研究具有一定的应用价值及潜在的经济效益。

本研究通过从田菁 (*Sesbania cannabina* Pers)、互花米草 (*Spartina alterniflora* Loisel)、芦苇 (*Phragmites communis* Trin)、怪柳 (*Tamarix chinensis* Lour) 等 4 种耐盐植物中分离内生细菌,对其进行抗  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  等重金属离子活性研究,从中筛选出具有高活性的菌株,并对菌株进行耐盐、促生等指标的分析及其生物多样性的研究,为进一步的沿海滩涂重金属污染修复与生态环境保护提供一定的理论依据和微生物资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源:田菁、互花米草、芦苇、怪柳等 4 种植物于 2010 年 10 月采集自江苏南通沿海滩涂地区。将完整的植株采集回来后立即进行分离。

1.1.2 培养基:①细菌分离培养基:R2A<sup>[12]</sup>、营养琼脂(NA)、LB 培养基,并添加一定浓度的 NaCl。②促生筛选培养基:无氮培养基、有氮培养基、SM 培养液、无机磷培养基参照文献[13]配制。以上培养基配好后置于  $1.034 \times 10^5$  Pa 高压下,121 °C 灭菌 20 min。③SMA 培养基:向 SM 培养基中添加滤器过滤除菌的 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC),使其终浓度为 3 mmol/L。

1.1.3 主要试剂及仪器:16S rRNA 基因扩增引物由上海生工生物工程公司合成,Taq 酶及 pMD-18T 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司,ACC 购自 Sigma 公司, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{HgCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  及其它化学试剂均为分析纯。实验涉及的主要仪器有:PTC 200 梯度 PCR 仪(美国 MJR. I),冷冻离心机,凝胶成像仪,Spectromax M2 多功能全自动定量绘图酶标仪(美国 Molecular Devices)。

### 1.2 内生细菌的分离

将采集来的新鲜植物样品剪成 2 cm × 5 cm 小块,超声清洗干净,随后将植物样品浸泡于次氯酸钠中处理 3-5 min,2.5% 的硫代硫酸钠处理 10 min,无菌水清洗 1 次,75% 酒精处理 3-5 min,无菌水清洗 3-5 次,将消毒好的植物样品研磨破碎并梯度稀释,挑取  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  浓度的悬液 100 μL 涂布到分离培养基上,30 °C 培养 3-10 天。同时,取最后一遍清洗的无菌水 100 μL 涂布到 LB 培养基上,以验证消毒效果。随后采用四区划线法纯化分离到的内生细菌菌株并保藏到 NA 斜面上。

### 1.3 内生细菌抗重金属活性的筛选

将分离得到的菌株点接到分别含有终浓度为 40 mg/mL 的  $\text{Cu}^{2+}$ ,10 mg/mL 的  $\text{Hg}^{2+}$ ,100 mg/L 的  $\text{Zn}^{2+}$ ,200 mg/L 的  $\text{Pb}^{2+}$  的 LB 培养基上,观察他们生长与否,若生长,则继续增加重金属离子的浓度直至菌株不能生长,实验均重复 3 次。

## 1.4 内生细菌促生活性筛选

**1.4.1 菌株固氮能力测定:**将菌株点接于无氮培养基,37℃培养5天,观察其生长情况,转接5次。

**1.4.2 菌株解磷能力测定:**将菌株点接于无机磷培养基,37℃培养5天,观察有无溶磷圈。

**1.4.3 菌株产生生长素(IAA)能力的测定:**

定性测定:向有氮培养液中添加过滤除菌的色氨酸溶液,终浓度至0.5 mg/mL。挑取菌株接种于上述培养液中,37℃摇床培养24 h,用无菌枪头取出1 mL的菌液于无菌的离心管中,加入2 mL的Sackoweki's显色剂<sup>[14]</sup>充分混合,室温下避光显色20 min,出现粉红色为阳性,说明有IAA产生。阳性菌株避光放置30 min,测定其 $OD_{530}$ 值。通过IAA浓度与 $OD_{530}$ 的标准关系曲线计算相应的IAA浓度,每组实验重复3次。各菌株IAA含量测定均扣除样品对照中自发产物后计算。

**1.4.4 菌株产ACC脱氨酶能力的测定:**①定性测定:菌株接种于SMA固体平板,传代5次后能够在唯一氮源为ACC的培养基上生长的为产ACC脱氨酶阳性菌株。②定量测定:将各菌株在LB培养液中24 h的纯培养物4℃,6000×g离心力下离心10 min收集菌体,用SM培养液洗涤离心2次,菌体悬浮于SMA培养液,在28℃旋转摇床180 r/min的条件下培养24 h,以诱导产生ACC脱氨酶。4℃离心收集菌体,用pH值为7.6的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液洗涤离心2次,重悬浮于pH值为8.5的600 μL 0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液中,加入30 μL甲苯并迅速振荡30 s以破碎细胞。ACC脱氨酶活性的测定方法参照Honma<sup>[15]</sup>和Saleh<sup>[16]</sup>的方法,于540 nm下测定其 $OD$ 值。ACC脱氨酶的单位酶活为在测酶体系中以1 μmol/min的速率形成α-丁酮酸的活性。蛋白质测定采用Bradford比色法<sup>[17]</sup>,以牛血清白蛋白作为标准物制作标准曲线。ACC脱氨酶酶活单位为μmol α-KA/(mg Pr·h)。各菌株酶活性测定均扣除样品对照中自发产物后计算。

## 1.5 内生细菌盐浓度实验

将挑选的23株内生细菌分别接种到终浓度为0%–30%(1%浓度递增)盐浓度的LB固体培养基上,观察其生长情况。

## 1.6 内生细菌16S rRNA基因序列的测定以及系统发育分析

分离菌株总DNA的提取参照文献<sup>[18]</sup>的方法进

行;PCR扩增采用细菌16S rRNA通用引物<sup>[19]</sup>27f:5'-CAGAGTTTGCCTGGCT-3';1942r:5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3'。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,95℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸90 s,35个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物用经EB染色的0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测后送至中国农业科学院测序。根据测序结果,从NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)以及EzTaxon(<http://www.eztaxon.org>)数据库中调出相似性较高的相关菌株的16S rRNA基因序列,分别用Clustal X 1.8及Mega 4软件进行序列比对和分析,最后用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)自举1000次进行系统进化树的构建与系统发育分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 内生细菌的分离结果

采用R2A、NA、LB培养基从田菁、互花米草、芦苇、柽柳4种耐盐植物中共分离到45株内生细菌,根据菌落颜色、大小、形态等特征初步去重复后获得23株细菌,其中6株分离自田菁、5株分离自互花米草、2株分离自芦苇、10株分离自柽柳。在涂有最后一遍清洗植物样品的无菌水的培养基上没有细菌菌落生长,说明植物表面消毒已经彻底,分离得到的细菌都是植物内生细菌。随后对这23株细菌进行重金属抗性筛选及促生潜在性评价。

### 2.2 内生细菌的抗重金属能力

对分离获得的23株内生细菌进行重金属离子抗性研究。结果显示,大部分菌株对 $Cu^{2+}$ 以及 $Pb^{2+}$ 的耐受能力较强,91.3%的菌株能够耐受至少40 mg/mL浓度的 $Cu^{2+}$ ,其中有3株内生细菌能够在 $Cu^{2+}$ 浓度为500 mg/L的培养基上正常生长;95.7%的菌株能够耐受600 mg/mL浓度的 $Pb^{2+}$ ,其中有15株能够耐受1500 mg/L浓度的 $Pb^{2+}$ ;而对 $Cd^{2+}$ (100 mg/mL),  $Zn^{2+}$ (100 mg/mL),  $Hg^{2+}$ (10 mg/mL)的耐受能力则较弱,分别为26.1%, 39.1%, 47.8%。这可能与该地区受这5种重金属污染程度不同以及毒性不同有关。综合以上几个指标我们可以看出,该地区四种植物大部分内生细菌对重金属 $Cu^{2+}$ 和 $Pb^{2+}$ 具有一定的耐受能力,而对 $Cd^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 的耐受能力则较弱。其中,在一定的浓度下,菌株KLBMP 2430、KLBMP 2435和

KLBMP 2436 对 5 种重金属离子都具有耐受能力, 具有广谱的抗重金属能力(见表 1)。

表 1 内生细菌促生、抗重金属以及 NaCl 耐受力等指标的筛选

Table 1 The index of plant growth promoting, heavy metal resistance and NaCl tolerance of endophytic bacteria

No. of isolates	Nitrogen fixation	Phosphate Solubilization	c(IAA) / (mg/L)	ACC deaminase activity $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA} / (\text{mg Pr}\cdot\text{h})$	NaCl / %	$\text{Cu}^{2+}$ $\text{Pb}^{2+}$ $\text{Cd}^{2+}$ $\text{Zn}^{2+}$ $\text{Hg}^{2+}$ (mg/L)				
KLBMP 2429	-	-	7.842 $\pm$ 0.008	-	0-21	450	1 700	-	100	10
KLBMP 2430	+	-	18.844 $\pm$ 0.003	25.296 $\pm$ 0.422	0-11	60	2 000	100	100	20
KLBMP 2431	-	-	22.587 $\pm$ 0.013	-	3-27	60	1 500	-	-	10
KLBMP 2432	-	-	-	-	1-5	-	1 500	-	-	10
KLBMP 2433	+	+	-	-	0-11	60	1 100	-	-	-
KLBMP 2434	-	-	3.290 $\pm$ 0.002	20.154 $\pm$ 0.670	0-11	60	2 000	-	-	20
KLBMP 2435	-	-	-	-	0-5	250	2 000	400	100	40
KLBMP 2436	-	-	-	-	0-7	650	1 100	100	100	20
KLBMP 2437	+	-	-	-	0-11	60	600	-	-	-
KLBMP 2438	+	+	-	86.542 $\pm$ 0.549	0-13	60	2 000	-	-	-
KLBMP 2441	-	-	43.618 $\pm$ 0.010	23.120 $\pm$ 0.710	0-7	500	2 000	-	-	20
KLBMP 2442	+	+	2.596 $\pm$ 0.024	60.673 $\pm$ 0.275	1-11	60	-	-	-	-
KLBMP 2443	-	+	2.037 $\pm$ 0.001	112.933 $\pm$ 0.053	1-11	80	1 900	-	100	50
KLBMP 2445	-	-	10.664 $\pm$ 0.017	-	1-9	250	2 000	-	-	-
KLBMP 2447	-	-	6.724 $\pm$ 0.002	-	0-16	350	1 000	-	-	10
KLBMP 2448	-	-	-	42.667 $\pm$ 0.268	0-13	60	2 000	-	100	-
KLBMP 2449	-	-	11.382 $\pm$ 0.001	-	0-9	250	1 900	-	-	-
KLBMP 2450	-	-	2.596 $\pm$ 0.006	8.722 $\pm$ 0.108	0-13	40	2 000	-	-	-
KLBMP 2451	-	-	-	-	3-23	200	700	-	-	-
KLBMP 2453	-	-	-	-	1-20	350	1 200	100	-	10
KLBMP 2454	+	+	9.184 $\pm$ 0.010	28.534 $\pm$ 0.048	0-5	350	1 100	100	100	-
KLBMP 2456	-	-	2.164 $\pm$ 0.002	-	3-9	-	1 900	-	100	-
KLBMP 2458	-	-	2.854 $\pm$ 0.003	-	0-7	350	1 800	100	100	-
总计	6	5	14	9		21	22	6	9	11
%	26.1%	21.7%	60.9%	39.1%		91.3%	95.7%	26.1%	39.1%	47.8%

IAA、ACC quantitative analysis of the data expressed as mean value  $\pm$  SD

### 2.3 内生细菌的促生长潜力

从表 1 中我们可以看出, 23 株细菌中 6 株 (26.1%) 具有固氮能力; 5 株 (21.7%) 细菌具有溶磷能力; 14 株 (60.9%) 细菌能够产生 IAA, 其中菌株 KLBMP 2430、KLBMP 2431、KLBMP 2441 的 IAA 产量在 15 mg/L 以上, 分别达到 18.844  $\pm$  0.003 mg/L, 22.587  $\pm$  0.013 mg/L 以及 43.618  $\pm$  0.010 mg/L; 在 ACC 脱氨酶活性定性筛选中, 传代 3 次后有 9 株 (39.1%) 内生细菌能够在 SMA 固体平板上正常生长, 说明他们具有 ACC 脱氨酶活性。进一步的定量结果显示, 菌株 KLBMP 2438、KLBMP 2442、KLBMP 2443 以及 KLBMP 2448 的 ACC 脱氨酶酶活较高, 分别为 86.542  $\pm$  0.549  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA} / (\text{mg Pr}\cdot\text{h})$ 、60.673  $\pm$  0.275  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA} / (\text{mg Pr}\cdot\text{h})$ 、112.933  $\pm$  0.053  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA} / (\text{mg Pr}\cdot\text{h})$ 、42.667  $\pm$  0.268  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA} / (\text{mg Pr}\cdot\text{h})$ 。与吉秀云<sup>[20]</sup>报道的 IAA 及 ACC 脱氨酶活性相比均有较大幅度

的提升, 但与 Zhang<sup>[21]</sup>等报道的 ACC 脱氨酶活性相比仍有一定差距。科学研究结果显示, 当 ACC 脱氨酶酶活不低于 20  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA} / (\text{mg Pr}\cdot\text{h})$  时就可促进植物的生长<sup>[22]</sup>, 因而, 我们可以推断, 这 9 株内生细菌具有促进植物生长的潜能。综合以上 4 个指标, 仅发现有 5 株 (21.7%) 细菌不具有促生潜在性。由此可知, 沿海滩涂地区耐盐植物蕴藏着大量的促进植物生长的内生细菌, 这可能是这一类植物能够在高盐以及寡营养等恶劣环境下正常生长的重要原因之一。

### 2.4 内生细菌盐浓度实验

从表 1 中我们可以看出, 大多数的内生细菌能够在较广范围的盐浓度下生长, 这与植物生长的盐碱环境有关。其中菌株 KLBMP 2431、KLBMP 2432、KLBMP 2442、KLBMP 2443、KLBMP 2445、KLBMP 2451 以及 KLBMP 2453 为严格的嗜盐菌, 只能在含盐的培养基上生长。其中又以菌株 KLBMP 2432 对

盐浓度要求最高,仅能够在 1% - 5% 的盐浓度下正常生长;菌株 KLBMP 2431 对 NaCl 的耐受能力最强,能够在 1% - 27% 的盐浓度下正常生长。

## 2.5 内生细菌 16S rRNA 基因序列的测定以及系统发育分析

以提取的总 DNA 为模板,扩增得到 23 株细菌的 16S rRNA 基因序列信息,NCBI 登录号为: JN119340-JN119362(表 2)。结果显示,23 株细菌可以分为 Firmicutes 门和 Gamma-Proteobacteria 亚门两大系统发育类群,包括芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*)、微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、弧菌属 (*Vibrio*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、海洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 以及沙雷氏菌属 (*Serratia*) 共 8 个属(图 1),显示了沿海滩涂地区耐盐植物体内较为丰富的重金属抗性细菌资源。其中以芽胞杆菌属为主要类群,占分离总数的 52.17%,分别属于 *B. aryabhatai*, *B. aerophilus*, *B. pseudofirmus*, *B. licheniformis*, *B. indicus*, *B. anthracis* 6 个种以及一个潜在新种 KLBMP 2447。

菌株 KLBMP 2447 (1 458 bp) 与该属 6 株典型菌株相似性大于 97%, 但只能与 *Bacillus aquimaris*, *Bacillus vietnamensis* 以及 *Bacillus marisflavi* 聚类到同一个大的分支上(图 2), 它们相似性分别为 98.90%、98.62% 以及 98.41%, 但在这一大的分支内它又独自占据着一个分支, 并且有较高的自举值。而菌株 KLBMP 2432 (1 443 bp) 与短波单胞菌属的典型菌株相似性较低, 只与 *Brevundimonas naejangsanensis* (FJ544245), *Brevundimonas olei* (GQ250440) 以及 *Brevundimonas diminuta* (GL883089) 的相似性大于 97%, 分别为 97.43%、97.39%、97.21%, 系统发育分析结果显示它能够独自聚类到一个新的进化分支上, 并且有很高的自举值(图 3)。另外, 菌株 KLBMP 2447、KLBMP 2432 的表型及生理生化特征与各自相关的典型菌株之间经分析存在较大差异, 因此初步认为它们代表 *Bacillus* 和 *Brevundimonas* 属的新种, 但要最终确定它们的分类地位, 还要综合形态特征、生理生化与化学分类特征以及与最近菌株的 DNA-DNA 同源性分析结果来判断。这些菌株的多相分类工作正在进行中。

表 2 内生细菌的群落结构, 登录号以及 16S rRNA 序列同源性

Table 2 The community structure, accession number and 16S rRNA gene sequence homology of the isolated endophytic bacteria

No. of isolates	Genus	Accession No	Origin	Nearest type strain Homology	Origin of nearest type strain
KLBMP 2430	<i>Bacillus</i>	JN119341	Stem of <i>S. cannabina</i>	<i>B. aryabhatai</i> (EF114313), 99.72	Airspace
KLBMP 2433		JN119344	Root of <i>P. communis</i>	<i>B. aryabhatai</i> (EF114313), 99.87	Airspace
KLBMP 2434		JN119345	Root of <i>P. communis</i>	<i>B. aerophilus</i> (AJ831844), 99.87	Airspace
KLBMP 2437		JN119348	Leaf of <i>T. chinensis</i>	<i>B. pseudofirmus</i> (X76439), 99.71	Lake bank soil
KLBMP 2438		JN119349	Leaf of <i>T. chinensis</i>	<i>B. licheniformis</i> (CP000002), 98.43	Lichen
KLBMP 2445		JN119353	Root of <i>T. chinensis</i>	<i>B. indicus</i> (AJ583158), 99.51	Aquifers
KLBMP 2447		JN119354	Stem of <i>T. chinensis</i>	<i>B. aquimaris</i> (AF483625), 98.90	Sea water
KLBMP 2448		JN119355	Stem of <i>T. chinensis</i>	<i>B. aerophilus</i> (AJ831844), 100.00	Airspace
KLBMP 2449		JN119356	Root of <i>T. chinensis</i>	<i>B. indicus</i> (AJ583158), 99.86	Aquifers
KLBMP 2450		JN119357	Stem of <i>T. chinensis</i>	<i>B. aerophilus</i> (AJ831844), 100.00	Airspace
KLBMP 2454		JN119360	Stem of <i>S. cannabina</i>	<i>B. anthracis</i> (AB190217), 100.00	Animal
KLBMP 2458		JN119362	Leaf of <i>T. chinensis</i>	<i>B. anthracis</i> (AB190217), 99.85	Animal
KLBMP 2429	<i>Halobacillus</i>	JN119340	Stem of <i>S. cannabina</i>	<i>H. trueperi</i> (AJ310149), 98.71	Salt lake sediment
KLBMP 2431		JN119342	Stem of <i>S. cannabina</i>	<i>H. trueperi</i> (AJ310149), 99.73	Salt lake sediment
KLBMP 2451		JN119358	Root of <i>T. chinensis</i>	<i>H. trueperi</i> (AJ310149), 99.67	Salt lake sediment
KLBMP 2436	<i>Exiguobacterium</i>	JN119347	Stem of <i>S. alterniflora</i>	<i>E. mexicanum</i> (AM072764), 99.57	Animal
KLBMP 2441		JN119350	Root of <i>S. alterniflora</i>	<i>E. mexicanum</i> (AM072764), 99.67	Animal
KLBMP 2442	<i>Vibrio</i>	JN119351	Root of <i>S. alterniflora</i>	<i>V. ruber</i> (AF462458), 99.71	Sea water
KLBMP 2443		JN119352	Root of <i>S. alterniflora</i>	<i>V. ruber</i> (AF462458), 99.62	Sea water
KLBMP 2432	<i>Brevundimonas</i>	JN119343	Stem of <i>S. cannabina</i>	<i>B. naejangsanensis</i> (FJ544245), 97.43	Soil
KLBMP 2435	<i>Serratia</i>	JN119346	Stem of <i>S. alterniflora</i>	<i>S. nematodiphila</i> (EU036987), 100.00	Animal
KLBMP 2453	<i>Oceanobacillus</i>	JN119359	Stem of <i>S. cannabina</i>	<i>O. iheyensis</i> (BA000028), 99.87	Deep sea
KLBMP 2456	<i>Staphylococcus</i>	JN119361	Leaf of <i>T. chinensis</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i> (AP008934), 99.84	Human

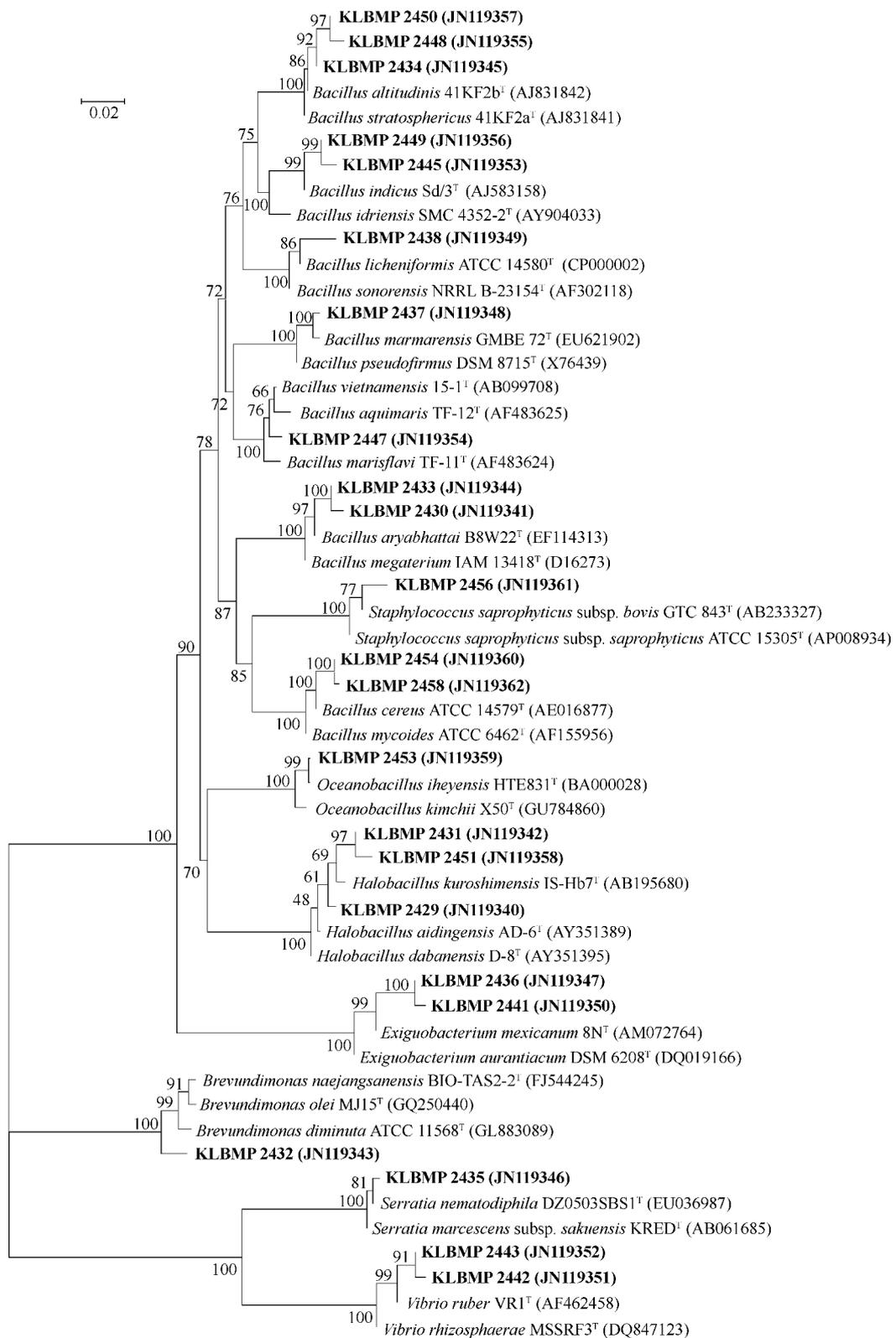


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的内生细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic neighbour-joining tree of the isolated endophytic bacteria based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 replicates). Bar, 0.02 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

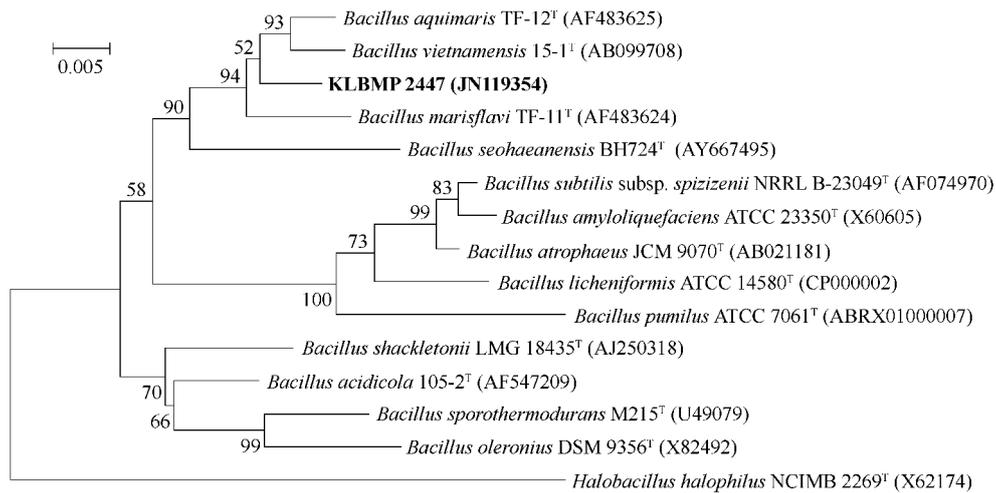


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 KLBMP 2447 及其相关典型菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships of strain KLBMP 2447 and closely related *Bacillus* type strains. Bootstrap values of >50% (percentages of 1 000 replications) are shown at branch points. Bar ,0. 005 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

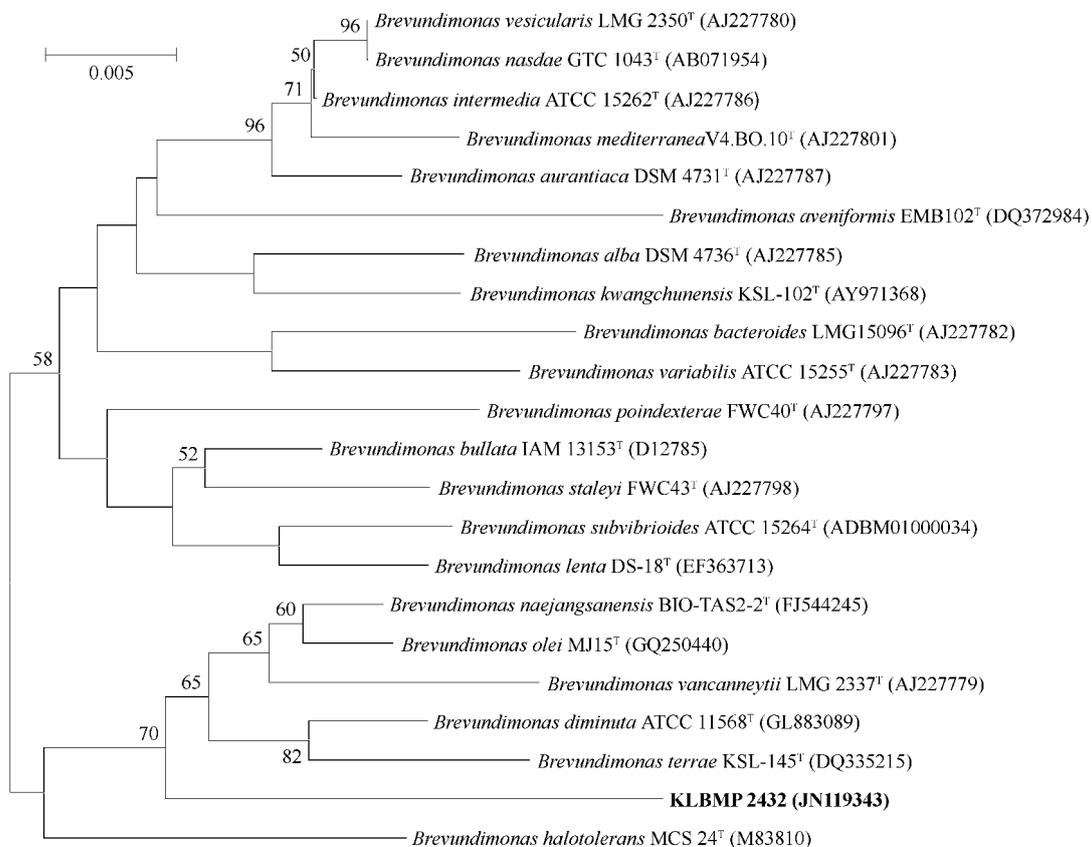


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 KLBMP 2432 及其相关典型菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic neighbour-joining tree based upon 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between strain KLBMP 2432 and closely related *Brevundimonas* type strains. Bootstrap values of >50% (percentages of 1000 replications) are shown at branch points. Bar ,0. 005 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

### 3 讨论

随着工业化进程的加速,沿海滩涂地区生长的植物在受着土地高盐碱化及有机质匮乏威胁的同时,还受着重金属污染问题的困扰<sup>[23]</sup>,使得许多植物不能够在该地区生长,造成了大量的土地资源的浪费。而如何解决这些问题则成为沿海滩涂地区土地资源开发利用的关键因素。

近年来,植物内生细菌由于其在促进植物生长、重金属等污染修复方面的卓越能力而越来越得到人们的重视。而目前有关沿海滩涂地区耐盐植物内生细菌的重金属抗性能力,促生及其生物多样性等方面的综合研究尚未见报道。国内仅有滕松山等<sup>[24]</sup>关于山东沿海滩涂地区碱蓬内生细菌促生长的报道,显示了较强的促生潜力。本研究以江苏南通沿海滩涂地区的田菁、互花米草、芦苇、柽柳等4种植物为材料,通过表面消毒及采用不同的培养基从中分离内生细菌,对其进行抗重金属 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 活性的筛选,研究结果表明它们分属于8个属,其中包括两个潜在新种,显示了该地区有着较为丰富的重金属抗性植物内生促生细菌资源以及一些潜在的新的分类单元。

重金属抗性内生细菌有很大的生物多样性,常随宿主的不同而变化。通过16S rRNA序列分析、以及生理生化鉴定可以初步确定它们的分类地位。另外,通过免培养(Culture independent)研究可以了解内生细菌的优势菌及群落的结构变化,为进一步开发菌种资源提供理论指导。Sun等<sup>[25]</sup>从具有铜抗性的超富集植物海州香薷(*Elsholtzia splendens*)和鸭跖草(*Commelina communis*)中分离得到3个主要铜抗性发育类群:厚壁菌门、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria),其中芽胞杆菌属和不动杆菌属的细菌为主要的抗铜性细菌。研究表明,对于各种主要重金属污染,都能够从该地区生长的植物体内找出具有相应抗性的内生细菌。如在对油菜(*Brassica napus*)的试验中,铅抗性植物内生菌株*Pseudomonas fluorescens* G10和*Microbacterium* sp. G16都显著提高了在铅污染土地上的油菜的生物量和铅积累量<sup>[6]</sup>。与特定重金属富集植物通常可能只耐受或吸收一种或两种重金属元素相比,许多重金属超富集植物内生细菌同时具有多种重金属抗性,能抵抗重金属复合毒性。Abou-Shanab等<sup>[26]</sup>发现了多株具有重金属抗性的细菌,能够抵抗9种复合重金属毒性的影响。在本研究中,我们得到了3个菌株KLBMP 2430、KLBMP

2435、KLBMP 2436,它们对本研究所涉及的5种重金属离子都具有抗性,为今后重金属复合污染地区土壤的修复提供了潜在高效的菌种资源。

本研究所选取的实验材料受着沿海滩涂地区特有的环境的影响,植物体内蕴藏的细菌也具有相应的区域特性,分离得到的许多菌株具有一些海洋及嗜盐细菌的特点。如菌株KLBMP 2429、KLBMP 2431以及KLBMP 2451与典型菌株*Halibacillus trueperi*具有高度相似性(98.71%–99.73%),它们对盐的耐受能力有微小的差别。据报道,来源于盐田沉积物的*Halibacillus trueperi*体内含有能够编码产生ABC型的甘氨酸甜菜碱的基因,该基因的表达能够使得体内维持一定的渗透压以适应高盐的环境<sup>[27]</sup>。同时,我们也发现,与菌株KLBMP 2453相似性最高(99.87%)的极端嗜盐嗜碱典型菌株*Oceanobacillus iheyensis*分离自1050 m深海沉积物<sup>[28]</sup>,而它们则是来源于两个完全不同的样本。由此我们可以看出,生长于沿海滩涂地区的植物内生细菌有着独特的生存环境,它们受着宿主植物、土壤以及海洋环境的共同影响,许多细菌资源在具有内生细菌特征的同时也被打上了海洋的烙印,在体内形成了一整套对盐碱环境的适应机制。经过长期的协同进化,这些内生细菌对沿海滩涂盐生植物的盐环境适应是否有帮助呢?它们又扮演着怎样的生态学角色?滩涂盐生植物-内生细菌相互关系值得进一步深入研究。

目前已报道的具有促生长活性的细菌主要有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)<sup>[6,25,29-30]</sup>等。在本研究中,综合固氮、解磷、IAA、ACC等4个指标我们发现,芽胞杆菌属的菌株KLBMP 2430、KLBMP 2434、KLBMP 2438、KLBMP 2454;*Exiguobacterium*属的KLBMP 2441以及*Vibrio*属的KLBMP 2442、KLBMP 2443具有较强的促生长潜在性能,可以通过进一步的盆栽回接试验来验证它们的实际促生效果。

综上所述,我们可以看出,沿海滩涂地区的植物体内含有一些具有抗重金属促生能力的内生细菌资源,具有巧妙解决沿海地区土壤盐碱化程度高、重金属含量高以及土壤有机质含量低等问题的潜力,这为我们提供了一个低成本高效率的土地资源开发及生态环境保护策略。有关高活性菌株的抗重金属促生能力还需要进一步通过试验来验证,它们具体的作用机理也将是我们今后要解决的一个问题。

## 参考文献

- [ 1 ] Windham L , Weis JS , Weis P. Uptake and distribution of metals in two dominant salt marsh macrophytes , *Spartina alterniflora* ( cordgrass ) and *Phragmites australis* ( common reed ). *Estuarine , Coastal and Shelf Science* , 2003 , 56( 1 ) : 63-72.
- [ 2 ] Castro CB , Kidd PS , Fernández AP , Weyens N , Acea MJ , Vangronsveld J. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. *Plant Soil* , 2011 , 340( 1 ) : 413-433.
- [ 3 ] Altalhi AD. Plasmids profiles , antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine ( *Vitis vinifera* L ). *African Journal of Biotechnology* , 2009 , 8( 21 ) : 5873-5882.
- [ 4 ] 朱雪竹 , 倪雪 , 高彦征. 植物内生细菌在植物修复重金属污染土壤中的应用. *生态学杂志 ( Chinese Journal of Ecology )* , 2010 , 29( 10 ) : 2035-2041.
- [ 5 ] 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 Heilong jiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry* , 2008 , 40( 1 ) : 238-246.
- [ 6 ] Sheng XF , Xia JJ , Jiang CY , He LY , Qian M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape ( *Brassica napus* ) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* , 2008 , 156( 3 ) : 1164-1170.
- [ 7 ] Rajkumar M , Ae N , Prasad MNV , Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* , 2009 , 28( 3 ) : 142-149.
- [ 8 ] 丁建 , 陈贝 , 袁建军. 植物修复重金属污染及内生细菌效应. *微生物学通报 ( Microbiology )* , 2011 , 38( 6 ) : 921-927.
- [ 9 ] Ma Y , Prasad MNV , Rajkumar M , Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* , 2011 , 29( 2 ) : 248-258.
- [ 10 ] Weyens N , Van DLD , Taghavi S , Vangronsveld J. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology* , 2009 , 20( 2 ) : 248-254.
- [ 11 ] 郭巧生 , 苏筱娟. 江苏省沿海滩涂野生药用植物生物多样性及其保护. *中国野生植物资源 ( Chinese Wild Plant Resources )* , 1999 , 18( 3 ) : 28-30.
- [ 12 ] Skidmore ML , Foght JM , Sharp MJ. Microbial life beneath a high arctic glacier. *Applied and Environmental Microbiology* , 2000 , 66( 8 ) : 3214-3220.
- [ 13 ] 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. 南京农业大学博士学位论文 , 2006.
- [ 14 ] Gordon SA , Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* , 1951 , 26 : 192-195.
- [ 15 ] Honma M , Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* , 1978 , 42( 10 ) : 1825-1831.
- [ 16 ] Saleh SS , Glick BR. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Canadian Journal of Microbiology* , 2001 , 47( 8 ) : 698-705.
- [ 17 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* , 1976 , 72( 7 ) : 248-254.
- [ 18 ] Janso JE , Carter GT. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Applied and Environmental Microbiology* , 2010 , 76( 13 ) : 4377-4386.
- [ 19 ] Magarvey NA , Keller JM , Bernan V , Dworkin M , Sherman DH. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Applied and Environmental Microbiology* , 2004 , 70( 12 ) : 7520-7529.
- [ 20 ] 吉秀云. 含 ACC 脱氨酶 PGPR 分离及提高植物抗逆性. 大连海事大学博士学位论文 , 2007.
- [ 21 ] Zhang YF , He LY , Chen ZJ , Wang QY , Qian M , Sheng XF. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere* , 2011 , 83( 1 ) : 57-62.
- [ 22 ] Penrose DM , Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* , 2003 , 118( 1 ) : 10-15.
- [ 23 ] 王鹏 , 徐国华. 江苏省沿海滩涂生态环境面临的主要问题与对策. *水利规划与设计 ( Water Resources Planning and Design )* , 2009 , 4 : 15-20.
- [ 24 ] 滕松山 , 刘艳萍 , 赵蕾. 具 ACC 脱氨酶活性的碱蓬内生细菌的分离、鉴定及其生物学特性. *微生物学报 ( Acta Microbiologica Sinica )* , 2010 , 50( 11 ) : 1503-1509.
- [ 25 ] Sun LN , Zhang YF , He LY , Chen ZJ , Wang QY , Qian M , Sheng XF. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology* , 2010 , 101( 2 ) : 501-509.

- [26] Abou-Shanab RAI, Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 2007, 68(2): 360-367.
- [27] Lu WD, Zhang B, Zhao BS, Feng DQ, Yang LF, Wang L, Yang SS. Cloning and characterization of the genes encoding a glycine betaine ABC-type transporter in *Halobacillus trueperi* DSM10404<sup>T</sup>. *Current Microbiology*, 2007, 54(2): 124-130.
- [28] Lu J, Nogi Y, Takami H. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 205(2): 291-297.
- [29] Dastager SG, Kumaran DC, Pandey A. Characterization of plant growth promoting rhizobacterium *Exiguobacterium* NII-0906 for its growth promotion of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Biologia*, 2010, 65(2): 197-203.
- [30] 陆俊锟, 陈俊, 康丽华. 四株红树林促生菌的遗传分析鉴定及其促生能力. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(10): 1358-1365.

## Isolation and biodiversity of heavy metal tolerant endophytic bacteria from halotolerant plant species located in coastal shoal of Nantong

Guangkai Bian<sup>1</sup>, Yueji Zhang<sup>1</sup>, Sheng Qin<sup>1\*</sup>, Ke Xing<sup>1</sup>, Huansong Xie<sup>2</sup>, Jihong Jiang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China

<sup>2</sup> School of Life Science, Nantong University, Nantong 226019, China

**Abstract:** [Objective] We isolated and identified endophytic bacteria from halotolerant plants collected from coastal shoal of Nantong and investigated their heavy-metal tolerance and plant growth promoting potential. [Methods] In total 45 strains were obtained from 4 halotolerant plants and 23 representative isolates were selected to detect their tolerance against NaCl and heavy metals of Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>; plant growth promoting index of nitrogen fixation, phosphate solubilization, indoleacetic acid (IAA) production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase. [Results] Most of the isolates could grow under high consistency of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>. Of the bacteria 26.1% had the ability of nitrogen fixation, 21.7% of phosphate solubilization, 60.9% of IAA production and 39.1% of ACC deaminase activity. The results of 16S rRNA sequencing show that they belonged to the genera of *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Exiguobacterium*, *Serratia*, *Brevundimonas*, *Vibrio* and *Staphylococcus*. Among them, strains KLBMP 2432 and KLBMP 2447 were potential novel species. [Conclusion] The halotolerant plants located in the area of coastal shoal contain a variety of endophytic bacteria as well as the source of novel taxa. Some of them had the ability of plant growth promoting and high resistance against heavy-metal Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>.

**Keywords:** halotolerant plants, endophytic bacteria, heavy metal, plant growth promoting, biodiversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000005, 30872028), by the Natural science fund for colleges and universities in Jiangsu Province (10KJB180008), by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (chemicobiology), by the Project of Outstanding Scientific and Technological Innovation Team for Higher Education Institutions in Jiangsu Province (Pre-development of medical microbiology) and by the Graduate Education Innovation Engineering Project of Jiangsu Province (CXLX11\_0911)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-516-83403515; E-mail: shengqin@xzu.edu.cn; jihjiang@xzu.edu.cn

Received: 4 July 2011 / Revised: 30 August 2011