

Effects of Cadmium-Resistant Bacterium on Hot Pepper Seeding Growing under Cadmium Stress

Jing Fu¹, Lina Li¹, Yingying Lin¹, Lan Xiao¹, Yulian Dong¹, Aiqing Xu^{1,2*}

¹School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan Hunan

²Ecological Remediation and Safe Utilization of Heavy Metal-Polluted Soils, College of Hunan Province, Xiangtan Hunan

Email: xuaiqing003@163.com

Received: May 21st, 2019; accepted: Jun. 3rd, 2019; published: Jun. 10th, 2019

Abstract

It is aimed to isolate cadmium-resistant bacteria to be utilized as rhizosphere microbial inoculants when crops grow at the cadmium-polluted soil. Four cadmium-resistant bacteria were isolated from the soil sample of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) field. Based on partial sequence of the 16SrRNA gene, they were identified as *Serratia nematodiphila* Cd-r-11, *Burkholderia pyrrocinia* Cd-r-A, *Achromobacter* sp. Cd-r-C and *Achromobacter* sp. Cd-r-D respectively. The strain Cd-r-11 was screened out with the least inhibitory effect on the hot pepper sprouting seeds placed on the filter paper absorbing cadmium ion in Petri dishes. The strain Cd-r-11 has no significant inhibitory effect on the hot pepper seedlings growing under the cadmium ion (20 mg/kg media) stress in pot test. After inoculating in beef extract-peptone broth containing 100 mg/L to 400 mg/L of cadmium ion, the strain Cd-r-11 could adsorb and remove more than 50% of cadmium ion detected with flame atomic absorption spectrophotometric method. It is concluded that the *S. nematodiphila* Cd-r-11 has the potential to be utilized as inoculum at the rhizosphere of hot pepper to treat the cadmium-polluted soil.

Keywords

Cadmium, *Serratia nematodiphila*, *Capsicum annuum*

抗镉细菌对镉胁迫辣椒幼苗生长的影响

伏靖¹, 李丽娜¹, 林莹莹¹, 肖兰¹, 董玉莲¹, 许爱清^{1,2*}

¹湖南科技大学生命科学学院, 湖南 湘潭

²重金属污染土壤生态修复与安全利用湖南省普通高等学校重点实验室, 湖南 湘潭

*通讯作者。

摘要

旨在筛选分离可用于镉污染土地栽培农作物根际的抗镉细菌接种物。从辣椒耕地土样分离纯化出4株抗镉细菌, 通过16SrRNA基因序列分析鉴定为嗜线虫沙雷氏菌Cd-r-11、吡咯伯克霍尔德菌Cd-r-A、无色杆菌Cd-r-C和Cd-r-D; 采用平皿滤纸片法种子萌发试验筛选出对辣椒种子发芽抑制作用较小的是菌株Cd-r-11; 采用辣椒幼苗盆栽试验显示菌株Cd-r-11对镉胁迫(20 mg/kg基质)辣椒幼苗的生长无显著性抑制作用; 通过含镉离子(100 mg/L~400 mg/L)牛肉膏蛋白胨培养液振荡培养菌株Cd-r-11, 火焰原子吸收分光光度法检测显示它能吸附去除超过50%的镉离子。研究结论认为嗜线虫沙雷氏菌Cd-r-11有用做辣椒根际接种物来处理镉污染土壤的应用潜力。

关键词

镉, 嗜线虫沙雷氏菌, 辣椒

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

我国土壤重金属污染问题突出, 农业部开展的全国污灌区调查表明在约 140 万 hm^2 的污水灌区中, 遭受重金属污染的土地面积占污水灌区面积的 64.8%, 其中轻度污染的占 46.7%, 中度污染的占 9.7%, 严重污染的占 8.4%。以 Hg 和 Cd 的污染面积最大。Cd 污染耕地 1.3 万 hm^2 [1]。调查报告显示湖南省是受重金属污染最严重省份之一, 遭受重金属污染土地近 28,000 km^2 , 占湖南省土地面积的 13%; 湘江流域内汞、镉、铬、铅排放量居全国首位, 其中湘江(株洲)霞湾港段排污口下游底泥最高值达 359.8 g/kg, 是《土壤环境质量标准》一级标准限定值的 1800 倍[2]。土壤重金属污染事件进入集中多发期, 2013 年在湖南省局部地区已经发生类似“镉米事件”、“镉中毒”等的农业经济问题和粮食安全问题。

世界各国很重视对重金属污染治理方法的研究, 对土壤中重金属污染大致有工程治理方法、化学治理方法、农业治理和生物治理等 4 种治理措施[3]。生物治理之中的微生物治理是利用土壤中的某些微生物等对重金属具有吸收、沉淀、氧化、还原等作用, 降低土壤中重金属的毒性。根据微生物菌体对 Cd^{2+} 的抗性机理, 利用一些菌体配制能吸附固化、钝化、螯合水溶态 Cd^{2+} 的微生物组合菌体, 使 Cd^{2+} 在微生境中固着或解毒, 降低 Cd^{2+} 的迁移性和生物利用度。研究资料表明抗镉微生物接种剂能起到阻碍植物对镉的生物积累作用, 也可能起到促进植物对镉的吸收积累作用。盛下放等(2003)将土壤中分离的镉抗性细菌(假单胞菌和芽孢杆菌), 接种到添加镉(200 mg/kg)的土壤进行番茄盆栽试验, 表明它们能活化菌株根际镉, 植株吸收的镉含量比不接菌对照增加 107.8% [4]。孙刚忠等(2011)将从湖南株洲铅镉污染土壤中分离的 2 株耐铅镉的细菌(鞘氨醇杆菌、金黄杆菌)分别接种至铅镉污染的土壤中进行小白菜盆栽试验, 发现接菌处理均能显著降低小白菜地上部铅、镉含量, 但对地下部铅、镉含量影响不显著[5]。唐八生等(2013)选用能去除镉的光合细菌沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudanonas palustris*)与吸附铅的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus*

cereus)和吸附铬(VI)啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的特定菌株配制成复合菌剂, 适量施用可显著降低土壤中重金属镉离子含量、削减水稻累加吸收、减少或降低稻米中的镉含量[6]。

在镉污染土壤栽培农作物存在植物体吸收富集镉并造成镉超标的风险, 而作物根际抗镉细菌有可能生物吸附和固化镉离子, 阻断可溶性镉离子被植物体吸收, 从而降低植物体中镉的积累量。本研究从辣椒栽种地土样中分离了4株抗镉细菌, 从中筛选出一株嗜线虫沙雷氏菌 Cd-r-11, 它对镉胁迫的辣椒种子萌发抑制作用最小, 以及对镉胁迫条件下辣椒幼苗正常生长无显著抑制性影响。鉴于菌株 Cd-r-11 生长繁殖过程中具有较强的生物吸附除镉能力, 因此可能用于辣椒根际接种来生物吸附降低土壤中的可溶性镉含量。

2. 材料与方法

2.1. 材料与仪器

辣椒种子(湘研五号, 湖南湘研种业有限公司); 育苗专用基质(江苏兴农基质科技有限公司); 普通牛肉膏蛋白胨培养基(0.5% NaCl); Cd (NO₃)₂·4H₂O (分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 镉离子标准溶液(1000 μg/mL, 国家有色金属及电子材料分析测试中心); 磁珠法细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, Taq DNA 聚合酶(含有 Taq DNA polymerase、10 × buffer 和 MgCl₂), 细菌通用引物 27F 和 1492R, dNTPs Mixture Solution (生工生物工程(上海)股份有限公司)。

高压蒸汽灭菌锅(MLS-3780, 日本 SANYO 公司); 立式恒温振荡器(IS-RDV1, 中国上海珂淮仪器有限公司); 高速冷冻离心机(Multifuge X1R, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司); 稳压稳流电泳仪(SCR-600A, 中国上海康华生化仪器制造厂); PCR 扩增仪(Eppendorf AG 22331 Hamburg, 德国 Eppendorf AG 公司); 人工气候培养箱(MGC-450HP, 上海一恒科学仪器有限公司); 原子吸收分光光度计(AA-7000, 岛津企业管理(中国)有限公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 抗镉细菌的分离纯化

称取校园内辣椒栽种地采集的土样 1 g, 转入牛肉膏蛋白胨培养液(含 100 mg/L 镉离子), 25℃, 100 r/min 恒温振荡培养 48 h 富集抗镉细菌。培养物涂布到牛肉膏蛋白胨固体平板(含 100 mg/L 镉离子), 25℃恒温培养 48 h。从固体平板上生长的抗镉细菌中挑取单菌落数个转接到新鲜斜面培养并保藏待用。取其中 4 株抗镉菌 Cd-r-11、Cd-r-A、Cd-r-B 和 Cd-r-C, 分别接入牛肉膏蛋白胨培养液(含 0.5% NaCl)中于 25℃, 100 r/min 振荡培养 48 h, 制备接种用液体菌种。

2.2.2. 抗镉细菌的对镉耐受性检测

液体菌种按 1%接种量(V/V)分别接种于 100 ml 含镉离子浓度为 10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 400 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养液中, 25℃恒温 100 r/min 振荡培养 48~72 h, 观察液体培养物的浊度以衡量菌体细胞的生长状况, 检测细菌生长对镉离子耐受性。

2.2.3. 菌株的 16S rRNA 基因序列分析

移取菌株 Cd-r-11、Cd-r-A、Cd-r-B 和 Cd-r-C 的牛肉膏蛋白胨液体培养物, 室温下离心(10,000× g, 10 min)收集菌体细胞。用磁珠法细菌 DNA 抽提试剂盒提取各菌株的总 DNA, 以 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 质量。以合适的 PCR 反应体系和反应条件[7], 采用细菌通用引物 27F 和 1429R 扩增得到菌株 16SrRNA 基因的 PCR 产物。经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物质量后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将序列提交到 GenBank 中。所得 16SrRNA 基因序列在 GenBank 中比对搜索相似的序列,

鉴定菌株的种属类别。

在构建菌株 Cd-r-11 与沙雷氏菌属典型菌株的系统发育树时,首先利用 LPSN 数据库检索沙雷氏菌属 (*Serratia*) 的菌种名及种的典型菌株,查找到部分典型菌株的 16S rRNA 基因序列在 Genbank 中的登录号;其次运用 ClustalW1.8.3 程序将所选典型菌株与待测菌株 Cd-r-11 的 16SrRNA 基因序列进行多序列比对;最后运用分子进化遗传分析软件 MEGA7.0.26 构建 N-J 系统发育树。系统发育树的可靠性检测的自举值设定为 1000 次,以大肠杆菌(*E. coli*)做外群。

2.2.4. 菌株对辣椒种子发芽的影响

辣椒种子用高锰酸钾溶液(0.3%)浸泡消毒 20~30 min,用灭菌去离子水反复三次清洗种子表面的药液,再用温水(25℃~30℃)浸泡 8~12 h 催芽,然后播种于湿润的棉纱布上,30℃温育 24 h 至种子破口露白,将 10 颗健康种子摆放到铺有 3 片灭菌定性滤纸的无菌平皿中,在各平皿中分别加入 5 ml 相应处理液以湿润滤纸(见表 1)。共设 12 个处理组,每组 2 重复。置于人工气候培养箱中 25℃培养 5~7 天。统计种子发芽率、测量幼芽长和幼根长以指示各菌株对辣椒种子发芽的影响。选取对辣椒种子发芽具有促进效应或者抑制效应较小的菌株用于后续幼苗盆栽实验。

Table 1. Test groups and treatment methods to culture hot pepper sprouts on filter paper in Petri dishes

表 1. 平皿滤纸片法培育辣椒种子发芽的实验分组与处理方法

序号	组名称	处理方法
1	自然组	去离子水 5 ml
2	培养液组	灭菌液体培养基 5 ml
3	镉胁迫组	镉离子(终浓度 50 mg/L)溶液 5 ml
4	培养液 + 镉组	灭菌液体培养基和镉离子(终浓度 50 mg/L)溶液共 5 ml
5	A 菌组	菌株 Cd-r-A 培养液稀释液 5 ml
6	B 菌组	菌株 Cd-r-B 培养液稀释液 5 ml
7	C 菌组	菌株 Cd-r-C 培养液稀释液 5 ml
8	11 菌组	菌株 Cd-r-11 培养液稀释液 5 ml
9	Cd + A 组	Cd-r-A 培养液稀释液和镉离子(终浓度 50 mg/L)溶液共 5 ml
10	Cd + B 组	Cd-r-B 培养液稀释液和镉离子(终浓度 50 mg/L)溶液共 5 ml
11	Cd + C 组	Cd-r-C 培养液稀释液和镉离子(终浓度 50 mg/L)溶液共 5 ml
12	Cd + 11 组	Cd-r-11 培养液稀释液和镉离子(终浓度 50 mg/L)溶液共 5 ml

2.2.5. 菌株 Cd-r-11 对辣椒幼苗生长的影响

采用盆栽试验检测菌株 Cd-r-11 对辣椒幼苗生长的影响。市售塑料口杯(容积 200 ml)中先装入 40 g 育苗专用基质,放入 1 颗萌发露白的辣椒种子,再覆盖 10 g 育苗专用基质铺平。设 4 个处理组,每组 3 重复。1) 自然组:加入 10 ml 去离子水湿润基质;2) 镉胁迫组:加入 10 ml 镉离子溶液,镉离子终浓度 20 mg/kg 基质;3) 接菌组:接种菌株 Cd-r-11,取液体菌种 10 ml,8000 r/min 离心 10 min,再用 10 ml 无菌生理盐水悬浮菌体,加入基质中,使菌体细胞终浓度约 10^8 CFU/g 基质;4) 镉 + 菌组:加入菌株 Cd-r-11 的 24 h 培养物与镉离子的混合溶液共 10 ml。置于室内(15℃~25℃)培养 30 d。测量统计幼苗的叶片数目(含子叶)、茎第一节长和茎第二节长。

2.2.6. 菌株 Cd-r-11 对镉吸附去除能力检测

制备菌株 Cd-r-11 的液体菌种,按 1%接种量(V/V)接种于 100 ml 含镉离子浓度分别为 100 mg/L、200 mg/L 和 400 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养液中,25℃下 100 r/min 恒温振荡培养 48 h,10,000×g 离心 10 min,收集上清液。采用火焰原子分光光度法检测上清液中镉残留量,检测其对镉离子的吸附去除能力。

3. 结果与分析

3.1. 抗镉菌株的筛选与抗镉特性

经抗镉细菌的富集培养和分离纯化操作,筛选得到 4 株抗镉细菌,命名为 Cd-r-11, Cd-r-A, Cd-r-B 和 Cd-r-C。经在含镉离子浓度梯度的牛肉膏蛋白胨培养液中培养,结果表明 4 株菌均能在含 400 mg/L 镉离子的牛肉膏蛋白胨培养液中生长繁殖。

3.2. 菌株的 16S rRNA 基因序列分析

提取 Cd-r-11、Cd-r-A、Cd-r-B 和 Cd-r-C 的总 DNA,用细菌通用引物 PCR 扩增 16S rRNA 基因部分序列,PCR 扩增片段测序结果提交到 GenBank 中的登录号依次为 MF319209、MF319206、MF319207 和 MF319208。在 NCBI 数据库中 BLAST 比对搜索,表明 4 株菌的亲缘种(属)分别是:嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*)、吡咯伯克霍尔德菌(*Burkholderia pyrrocinia*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)和无色杆菌属。其中菌株 Cd-r-11 与沙雷氏菌属的一些典型菌株构建的系统发育树见图 1。

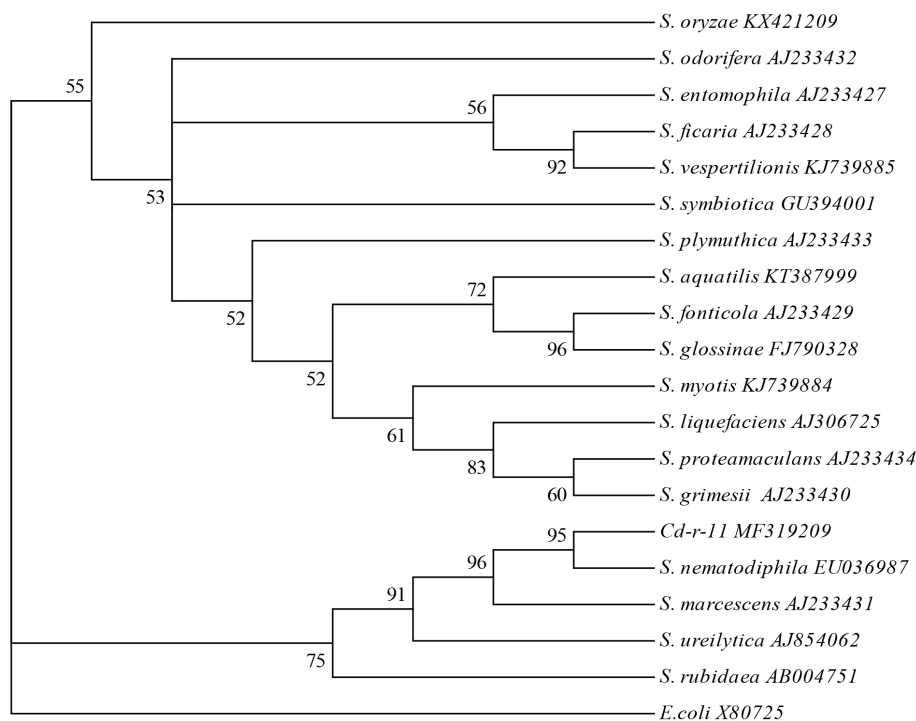


Figure 1. Neighbor-joining phylogenetic consensus tree based on the 16SrRNA gene partial sequences of strain Cd-r-11 and type strains of genus *Serratia*

图 1. 基于 16SrRNA 基因构建菌株 Cd-r-11 与沙雷菌属典型菌株的 N-J 系统发育树

3.3. 菌株对辣椒种子发芽的影响

平皿滤纸片法培养试验检测辣椒种子萌发情况统计结果见表 2。镉离子胁迫(第 2 组)能抑制辣椒种子

幼芽的生长,芽长缩短 0.996 cm,与自然组的差异极显著($p < 0.01$)。在所有镉加菌处理组(第 9~12 组)中,(Cd + 11 组)的发芽率较高。运用 LSD 法(最小显著性差异法)多重比较分析(Cd + 11 组)与其它 11 个组的芽长均值的差异性,结果表明(Cd + 11 组)的芽长均值与自然组的差异极显著($p < 0.01$),芽长缩短 1.227 cm;而与 B 菌组和(Cd + C 组)的芽长均值之间有显著性差异($p < 0.05$);与其它 8 组的芽长均值之间没有显著性差异($p > 0.05$)。根长数据表明所有镉加菌组的根长差异不显著($p > 0.05$)。综合比较结果,推断(Cd + 11 组)在对种子的发芽影响方面要优于其它各处理组,适合用菌株 Cd-r-11 来处理镉胁迫的辣椒幼苗。因此,挑选菌株 Cd-r-11 作为试验菌进行辣椒幼苗的盆栽实验。

Table 2. Statistic results of culture hot pepper sprouts on filter paper in Petri dishes

表 2. 辣椒种子萌发的平皿滤纸片法培养试验统计结果

序号	组别	出芽率(%)	幼芽长(cm)		生根率(%)	幼根长(cm)	
			均值	标准误		均值	标准误
1	自然组	95	2.537 ^a	0.209	95	5.380 ^a	0.731
2	培养液组	75	1.358	0.379	95	1.829 ^a	0.311
3	镉胁迫组	90	1.571	0.431	90	0.979 ^b	0.191
4	培养液 + 镉组	65	1.418	0.154	85	0.527	0.094
5	A 菌组	60	0.973	0.472	90	0.962 ^b	0.227
6	B 菌组	30	0.885 ^b	0.348	90	1.167 ^a	0.273
7	C 菌组	55	1.310	0.300	90	1.131 ^a	0.187
8	11 菌组	55	1.105	0.162	95	1.264 ^a	0.254
9	Cd + A 组	55	1.281	0.342	90	0.695	0.133
10	Cd + B 组	60	1.470	0.312	80	0.520	0.079
11	Cd + C 组	40	0.928 ^b	0.318	80	0.508	0.125
12	Cd + 11 组	75	1.310	0.226	85	0.502	0.135

注: a 表示与(Cd + 11 组)比较时差异极显著($p < 0.01$), b 表示差异显著($p < 0.05$)。

3.4. 菌株 Cd-r-11 对辣椒幼苗生长的影响

辣椒幼苗盆栽培养 30 d 后,测量幼苗地上部分叶片数目、茎第一节长和茎第二节长,统计结果见表 3。虽然(镉 + 菌组)的叶片数目、茎第一节长和茎第二节长的数值最小,但是运用 LSD 法多重比较分析表明各实验组茎节长度均值的差异不显著($p > 0.05$)。实验结果表明含镉(20 mg/kg 基质)的土壤培养时,菌株 Cd-r-11 不会对镉胁迫辣椒幼苗的正常生长产生显著性的不良影响。

Table 3. Statistic results of culture hot pepper seedling in pots

表 3. 辣椒幼苗盆栽培养试验统计结果

序号	组别	叶片数目 (众数)	茎第一节长(cm)		茎第二节长(cm)	
			均值	标准误	均值	标准误
1	自然组	5	7.043	0.595	2.485	0.904
2	镉胁迫组	5	7.153	0.485	2.559	0.781
3	接菌组	4	7.193	0.351	2.957	0.908
4	镉 + 菌组	4	6.936	0.544	2.039	0.439

3.5. 菌株 Cd-r-11 对镉吸附去除能力检测

菌株 Cd-r-11 培养在含不同浓度镉离子的牛肉膏蛋白胨培养液中,离心上清液中镉残留量测定结果见表 4。结果表明,在含 100 mg/L~400 mg/L 镉离子的范围内,菌株 Cd-r-11 生长繁殖过程中能吸附去除超过 50%的镉离子。

Table 4. Detection results of biosorption and removal of cadmium ion capability of strain Cd-r-11

表 4. 菌株 Cd-r-11 对镉离子吸附去除能力检测结果

序号	镉初始浓度(mg/L)	镉残留量(mg/L)	镉去除率(%)
1	100	45.6	54.4
2	200	59.3	70.4
3	400	139.7	65.1

4. 结论

1) 从土壤中分离纯化出 4 株抗镉细菌 Cd-r-11、Cd-r-A、Cd-r-B 和 Cd-r-C。运用 16SrRNA 基因测序鉴定其种属分别是嗜线虫沙雷氏菌、吡咯伯克霍尔德菌、无色杆菌属和无色杆菌属; 2) 镉离子耐受性试验表明 4 株抗镉细菌均能耐受 400 mg/L 镉离子; 3) 种子萌发平皿滤纸片法培养试验表明在含 50 mg/L 镉离子的培养体系中,嗜线虫沙雷氏菌 Cd-r-11 对辣椒种子发芽的抑制效应最小; 4) 盆栽试验表明菌株 Cd-r-11 对镉胁迫(20 mg/kg 基质)的辣椒幼苗正常生长无显著性影响; 5) 吸附除镉实验表明菌株 Cd-r-11 对镉离子具有较强的吸附去除能力。嗜线虫沙雷氏菌 Cd-r-11 有用做辣椒根际接种物来处理镉污染土壤的应用潜力。

基金项目

湖南省教育厅资助科研项目(16B095); 湖南科技大学大学生科研创新计划项目(SYZ2018065)。

参考文献

- [1] 白洁, 孙学凯, 王道涵. 土壤重金属污染及植物修复技术综述[J]. 环境保护与循环经济, 2008, 28(3): 49-51.
- [2] 龙志. 湘江启示录 中国重金属污染最严重的河流治理之困[Z/OL]. <http://www.zznews.gov.cn/news/2010/1103/48409.shtml>, 2010-11-03.
- [3] 郑喜坤, 鲁安怀, 高翔, 等. 土壤中重金属污染现状与防治方法[J]. 土壤与环境. 2002, 11(1): 79-84.
- [4] 盛下放, 白玉, 夏娟娟, 等. 镉抗性菌株的筛选及对番茄吸收镉的影响[J]. 中国环境科学, 2003, 23(5): 467-469.
- [5] 孙刚忠, 王荣, 曹霞, 等. 抗铅、镉菌株对土壤铅、镉生物有效性的影响[J]. 环境科学与管理, 2011, 36(11): 103-107.
- [6] 唐八生, 杨怀兆. 复合菌剂对削减水稻镉吸收的生物技术研究[J]. 现代农业科技, 2013(15): 28, 30.
- [7] 许爱清, 周士镭, 冯杏杏, 等. 一株墨鱼干源中度嗜盐菌的系统发育分析与生长特性[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 175-179.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：amb@hanspub.org