DOI:10.11686/cyxb2025415 http://cyxb.magtech.com.cn
宋娟, 赵根, 王靖涵, 等. 耐镉细菌的筛选及其对牵牛花幼苗生长和镉积累的影响. 草业学报, 2026, 35(10): 106－116.
SONG Juan, ZHAO Gen, WANG Jing-han, *et al*. Screening of cadmium-resistant bacteria and its effect on the growth and cadmium accumulation of *Pharbitis nil* seedlings. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(10): 106－116.

耐镉细菌的筛选及其对牵牛花幼苗生长和镉积累的影响

宋娟[1],赵根[2],王靖涵[1],顾炜[1],林锦凯[1],洪东睿[1],张立钦[1],闵莉静[1*]
(1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000;2. 湖州市农业科学研究院, 浙江 湖州 313002)

摘要:本研究探讨耐镉微生物的生物学特性及其对植物耐镉性的影响,为微生物－植物联合修复重金属污染土壤提供科学依据。从污染土壤中筛选耐镉菌株,通过形态学、生理生化和16S rDNA序列分析的方法进行鉴定;采用液体培养法,测定其对镉(Cd)及其他重金属[铁(Fe)、铜(Cu)、铅(Pb)]的耐受性;运用傅里叶红外光谱(FTIR)技术对其进行表征分析;通过平皿试验分析菌株Hz_Cp与牵牛花联合富集镉的效果,并利用RT-qPCR检测牵牛花耐镉相关基因的表达。分离菌株Hz_Cp鉴定为嗜铜菌属(*Cupriavidus* sp.),其对Cd^{2+}的耐受浓度达1600 mg·L^{-1},在pH 7.0条件下,其对镉的去除率高达90.16%。该菌株具有固氮、分泌吲哚-3-乙酸(IAA)和铁载体的能力,且能耐受重金属、盐胁迫及极端温度。Hz_Cp通过其－OH、－COOH、－PO_4^{3-}等基团对镉离子进行生物吸附。牵牛花能够有效去除培养基中25.34%的镉离子(从200.00降低至149.32 mg·L^{-1}),且外源添加Hz_Cp显著提高了其对Cd的耐受性。菌株Hz_Cp不仅显著增强了牵牛花的叶绿素、类胡萝卜素和花青素含量,还提升了过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,并上调了*IpYUC1*、*IpPAP1*等基因的表达水平。Hz_Cp能够促进牵牛花幼苗在镉胁迫下的生长,同时降低镉的积累,展现出在土壤重金属污染治理中的应用潜力。

关键词:镉污染;植物促生菌;牵牛花;重金属吸附;耐受机理

Screening of cadmium-resistant bacteria and its effect on the growth and cadmium accumulation of *Pharbitis nil* seedlings

SONG Juan[1], ZHAO Gen[2], WANG Jing-han[1], GU Wei[1], LIN Jin-kai[1], HONG Dong-rui[1], ZHANG Li-qin[1], MIN Li-jing[1*]
1. *School of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou* 313000, *China*; 2. *Huzhou Academy of Agricultural Sciences, Huzhou* 313002, *China*

Abstract: This study investigated the biological characteristics of Cd-resistant microorganisms and their effects on plant cadmium tolerance, providing scientific evidence for the joint microbial-plant remediation of heavy metal-polluted soils. Cd-resistant bacteria strains were isolated from polluted soil and identified using morphological, physiological, biochemical, and 16S rDNA sequence analysis. The liquid culture method was used to assess the strain's tolerance to Cd and other heavy metals (Fe, Cu, Pb). Fourier transform infrared (FTIR) technology was applied for characterization. The effect of the strain Hz_Cp in conjunction with *Pharbitis nil* on cadmium accumulation was analyzed through petri dish experiments. RT-qPCR was used to detect the expression of genes

收稿日期:2025-10-17;改回日期:2025-11-28
基金项目:国家重点研发计划(2021YFC2600104)和2022科研启动-引进人才科研启动经费(RK23097)资助。
作者简介:宋娟(1987－),女,陕西咸阳人,博士,讲师。E-mail: 03170@zjhu.edu.cn
*通信作者 Corresponding author. E-mail: minlijing@zjhu.edu.cn

related to cadmium tolerance in *P. nil*. The isolated strain Hz_Cp was identified as a species of *Cupriavidus*, with a cadmium tolerance concentration of up to 1600 mg·L^{-1}. When cultured at pH 7.0 conditions, the strain removed 90.16% of cadmium. In addition to its ability to fix nitrogen, secrete indole-3-acetic acid (IAA), and produce siderophores, this strain also displays remarkable tolerance to a range of abiotic stresses, including heavy metals, salt, and extreme temperatures. *Cupriavidus* sp. (Hz_Cp) bio-adsorbs cadmium ions through functional groups such as —OH, —COOH, and —PO_4^{3-}. *P. nil* was able to remove 25.34% of cadmium ions from the culture medium (reducing from 200.00 to 149.32 mg·L^{-1}), and the addition of Hz_Cp significantly enhanced its cadmium tolerance. The *Cupriavidus* strain Hz_Cp not only significantly increased the chlorophyll, carotenoid, and anthocyanin content in *P. nil* but also improved peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) activities, and upregulated the expression of genes such as *IpYUC1* and *IpPAP1*. Hz_Cp promotes the growth of *P. nil* seedlings under cadmium stress while reducing cadmium accumulation, demonstrating its potential for application in remediation of soil heavy metal pollution.

Key words: cadmium pollution; plant growth-promoting bacterium; *Pharbitis nil*; heavy metal adsorption; tolerance mechanism

随着工业发展,农田不同程度地受到重金属的污染。据调查,我国被镉污染农田面积已超过 1.3×10^7 hm^2[1]。由于镉(cadmium,Cd)的移动性强、毒性高、污染土壤面积大等特点[2],如何有效修复镉污染并提高镉污染土壤的生产力,已成为当前土壤及生态环境领域的研究热点和难点之一[3]。

传统的物理、化学修复方法费用高、能耗大,并易造成二次污染,如吸附法、絮凝沉淀法、电化学法与化学沉淀法[4]。相比传统方法,微生物修复技术因操作简便、成本低及环境友好等突出优点,备受青睐[5]。目前,已发现多种对单一重金属具有耐受性的微生物,例如,闫敏等[6]筛选到普罗威登斯菌属(*Providencia* sp.)和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),能耐受镉浓度可达 650 mg·L^{-1}。然而,环境中的重金属污染通常为复合污染[7]。当前,能够同时耐受和去除多种重金属的微生物种类相对较少,而针对兼具广谱环境适应性(如宽 pH 范围、耐高低温、高盐)及多金属抗性[如高浓度镉(>1000 mg·L^{-1})、铁、铜、铅等]的多功能菌株的系统研究仍较为匮乏。因此,筛选具有多种重金属吸附能力的微生物很重要。

考虑到环境条件(如温度、pH 等)会对微生物的活性产生影响,导致其对镉的富集效率降低。微生物—超积累植物联合修复技术利用二者的共生关系,整合优势以产生协同效应,该策略旨在实现对重金属污染土壤的高效治理[8]。目前,发现的镉超富集植物已有 60 余种,如水茄(*Solanum torvum*)、龙葵(*Solanum nigrum*)等[9]。为了进一步拓宽镉超富集植物类群,笔者所在课题组首次选用牵牛花(*Pharbitis nil*)作为目标植物。牵牛花为一年生草本,直根系发达,抗性强,花叶繁茂,是优良的园林绿化材料[10]。其花、茎叶中含有丰富花青素(anthocyanins),能螯合重金属离子,降低重金属离子在植物体内的迁移[11]。由此推测,牵牛花在重金属修复方面可能具有一定的潜力。本研究从浙江临安重金属污染区,筛选出一株耐 Cd、Cu 和 Pb 的菌株,其能够和超累积植物牵牛花共生,并通过促生长[固氮和产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)]、活化镉(分泌铁载体等)等作用提高牵牛花的修复效率,以期为推动植物—微生物联合修复技术的大面积应用奠定理论与实践基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

土样采自浙江临安重金属污染区(北纬 30°37′50″,东经 119°59′04″)。牵牛花种子由本实验室提供。

1.2　试验方法

1.2.1　土壤因子测定　在浙江临安重金属污染区采集 5 个点位的土壤样品(过 0.300 mm 筛)。准确称取 0.1～0.2 g(±0.0001 g)于聚四氟乙烯消解罐中,加入 HNO_3(HNO_3:HCl=1:3),静置过夜。随后补加 1 mL H_2O_2

(30%)和1 mL HF(40%),密封后140～160 ℃消解6 h。消解液120 ℃赶酸至0.5～1.0 mL,超纯水定容至50 mL,0.45 μm滤膜过滤,重金属含量采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Agilent 7900, 圣克拉拉,加利福尼亚州,美国)测定,同步设置空白对照[12]。土壤有机质(重铬酸钾氧化法)、全磷(钼锑抗比色法)、全钾(火焰光度法)和速效氮(碱解扩散法)含量测定参照鲍士旦[13]《土壤农化分析》。

1.2.2 Hz_Cp菌株的分离及性能测试 耐镉菌株Hz_Cp的分离及系统发育分析:耐镉细菌分离采用平板法[14],取10 g土样加90 mL无菌水,28 ℃振荡12 h。取1 mL 10^{-6}土壤悬液涂布于含200 mg·L^{-1} Cd^{2+}的LB培养基(Luria-Bertani Broth)平板,3次重复。对Hz_Cp菌株PCR扩增16S rRNA,NCBI数据库BLAST比对,MEGA 7.0软件构建系统发育树。

Hz_Cp菌株的镉抗性、铁载体分泌、固氮潜力及IAA合成能力评估:采用含Cd^{2+}的LB固体培养基(Cd^{2+}浓度设置为200～1600 mg·L^{-1}梯度),每皿涂布10 μL菌液,28 ℃, 12 h后观察生长(n=3),菌株在平板上可见单个菌落形成即判定为该浓度下具有生长能力。取纯化后的耐镉菌株,接种于固体Ashby无氮培养基[15],其成分(每L)如下:甘露醇10.0 g,K_2HPO_4 0.2 g,$MgSO_4·7H_2O$ 0.2 g,NaCl 0.2 g,$CaSO_4·2H_2O$ 0.1 g,$CaCO_3$ 5.0 g,琼脂15.0 g,pH 7.0～7.2。所有试剂均需确保无氮杂质污染。28 ℃培养4 d,观察菌株生长状况,若在Ashby平板上可见菌落生长,则初步判定该菌株具有潜在的固氮能力。为检测Hz_Cp菌株的产铁载体能力,将Hz_Cp接种于Chrome Azurol S (CAS)检测平板[16],28 ℃恒温培养1～7 d,每12 h观察1次,通过黄色晕圈的形成情况判断其产铁载体能力。Hz_Cp产IAA分析采用sucrose-magnesium sulfate(SMS)培养基,其成分如下(每L去离子水):蔗糖20.0 g,硫酸镁0.2 g,磷酸氢二钾0.8 g,磷酸二氢钾0.2 g,氯化钠0.1 g,氯化钙0.05 g,酵母浸粉1.0 g,琼脂粉15.0 g。调节溶液pH至7.0。1% 接种量,28 ℃,180 r·min^{-1},培养4 d。取培养上清液1 mL于2 mL Salkowski试剂避光反应40 min,测OD_{530}波长下吸光值,通过IAA标准曲线计算菌株分泌IAA的具体浓度(μg·mL^{-1})[17]。

Hz_Cp菌株的温度适应性、盐胁迫及重金属抗性评估:将生长对数期菌悬液按10% 接种量(v/v)分别接入LB液体培养基,于180 r·min^{-1}、不同温度(5、28、40 ℃)下培养1～7 d,定期测定OD_{600}。设置NaCl浓度梯度(0、1%、3%、5%)的LB培养基,相同条件下培养并检测OD_{600}进一步研究重金属胁迫效应,在LB培养基中添加$FeCl_3$、$CuSO_4$、$Cd(NO_3)_2$、$Pb(NO_3)_2$(Fe^{3+}、Cu^{2+}、Pb^{2+}终浓度均为200 mg·L^{-1};Cd^{2+}终浓度为200～1500 mg·L^{-1}),以无重金属LB为对照。接种后于28 ℃、180 r·min^{-1}振荡培养,每24 h测定OD_{600},绘制生长曲线。

Hz_Cp菌株对Cd^{2+}的去除特性与pH相关性分析:采用初始pH梯度(5、7、9)的LB液体培养基(含200 mg·L^{-1} Cd^{2+}),接种10 μL Hz_Cp对数期菌液,28 ℃、180 r·min^{-1}振荡培养96 h。培养结束后,取发酵液8000 r·min^{-1}离心10 min,0.22 μm滤膜过滤,参照《HJ 700－2014》火焰原子吸收分光光谱法测定Cd^{2+}含量[18],每个处理设置3个平行组。

1.2.3 Hz_Cp表面Zeta电位及其官能团分析 将对数期(约18 h)的细菌离心收集,用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤2～3次去除残留培养基。菌体重悬于含0、500、1000 mg·L^{-1} Cd^{2+}的水溶液,检测Cd^{2+}浓度对Hz_Cp表面Zeta电位的影响。所有样品调至OD_{600}=0.5后立即测定,进样前充分混匀确保准确性。

以2%的接种量将菌悬液分别接种于无镉(对照)和含200 mg·L^{-1} Cd的液体LB培养基中,于适宜条件下培养1、4、7 d后,8000 r·min^{-1}离心5 min收集菌体,并用无菌PBS洗涤3次。随后,样品在80 ℃鼓风干燥箱中干燥,按1∶100比例与光谱纯溴化钾(KBr)粉末混合研磨后,采用衰减全反射－傅里叶变换红外光谱(attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR)分析,测试波数范围为400～4000 cm^{-1},分辨率为4 cm^{-1}。

1.2.4 植物生理指标的测定 本试验共设4组处理:1)空白对照(CK);2)Cd胁迫对照(CK_Cd);3)单接菌处理(Hz_Cp);4)Cd胁迫＋接菌处理(Hz_Cp_Cd)。接种方式为液体灌根(Hz_Cp菌悬液浓度为$1×10^4$ CFU·$皿^{-1}$),每皿播种20粒牵牛花种子,3次生物学重复。所有组别统一培养于温室[光周期16 h光照/8 h黑暗,温度(23±1) ℃,湿度70%]。培养7 d后采集幼苗各器官样本用于后续分析。

叶绿素、类胡萝卜素含量：取适量样品经液氮速冻后研磨，准确称取 0.1 g 于 15 mL 离心管中，加入 2 mL 乙醇涡旋混匀，12000 r·min^{-1}离心 10 min。收集上清液至新离心管，重复提取至残渣无色，合并所有上清液。分别测定 665、649 nm 处的吸光度（以乙醇为空白），计算叶绿素 a、b 含量[19]；另测定 470 nm 处吸光度，按 Porra 等[19]的方法计算类胡萝卜素含量。

花青素含量测定参照张志良等[20]的方法。取 7 d 苗龄牵牛花幼苗 0.1 g，用 10 mL 1% HCl-甲醇（1∶99，v/v）避光萃取 24 h，4 ℃、8000 r·min^{-1}离心 5 min。测定上清液 A_{530} 和 A_{657}，以 1% HCl-甲醇为空白，按公式：花青素含量（mg·g^{-1}）=[$A_{530}-0.25\times A_{657}$]×V/(ε×m)计算（V：体积；ε：消光系数；m：鲜重）。

超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化物酶（peroxidase，POD）的测定根据试剂盒的说明书（索莱宝生物科技有限公司）进行操作，采用分光光度法[21−22]，取牵牛花幼苗组织（0.1 g）与试剂 1（1 mL）冰浴匀浆，8459 r·min^{-1}，4 ℃离心 10 min，收集上清液于冰上待测。

牵牛花 Cd 含量：取培养 7 d 的牵牛花组织样品 0.2 g，按 GB 5009.268−2016[23]火焰原子吸收法测定。

1.2.5　实时荧光定量 PCR　　取 7 日龄牵牛花组织，用植物 RNA 提取试剂盒（源叶生物）提取总 RNA，经逆转录试剂盒（PrimeScript RT Reagent Kit，Takara Bio InC.，滋贺县，日本；Cat# RR047A）合成 cDNA。本研究采用 SYBR Green 染料结合荧光定量 PCR 技术，使用 Applied Biosystems 7500（ABI 7500）荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司，中国上海生产）检测 *IpZIP2*、*IpPAP1*、*IpPOD* 及 *IpYUC1* 基因在不同样本中的表达量，*GAPDH* 作为内参基因进行标准化。反应体系（20 μL）：cDNA 2 μL、正反向引物各 0.4 μL、SYBR Green supermix 10 μL，ddH_2O 补足。扩增程序：95 ℃ 30 s；40 个循环（95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s）；熔解曲线分析（95 ℃ 10 s，58 ℃ 30 s）。每组 4 次重复，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法[24]计算相对表达量。用于扩增这些基因的引物如表 1 所示。

表 1　试验所用引物序列

Table 1　Primer sequences used in this test

基因名 Gene name	基因功能注释 Gene function annotation	引物序列（正向引物 F/反向引物 R） Primer sequence (forward primer F/reverse primer R)
IpZIP2	金属离子吸收和运输功能基因 Metal ion absorption and transport functional genes	GATTTGACGGAGAAGGAGTA GTTTGAAGCGTTGCCTGATG
IpPAP1	花青素生物合成 Anthocyanin biosynthesis	TCTTCCATTGTGCTTTCCCTG GTTGCTGGAGTGTAGTCAGTAG
IpPOD	过氧化物酶 Peroxidase	CGCCAACACTCTTTGACAACAAG ACTCATCCTTATCATTGCCTTCGC
IpYUC1	生长素生物合成 Auxin biosynthesis	CAAAGAAAGGAGCAAAGTTTATGG CTGAAGCCAAGTAGGCACGTT
GAPDH	牵牛花的内参基因 The endogenous reference gene for *P. nil*	AGCGGAAAGCCTCGCAGT TGTCGTTACCATCTCGACCCA

1.3　数据处理

采用 Excel 2013 软件完成统计分析及制图。采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Duncan 检验多重比较（$P<0.05$）。

2　结果与分析

2.1　耐镉菌株 Hz_Cp 的耐受性与促生特性研究

浙江临安污染区土壤重金属含量分析结果（表 2）显示：Zn（403.95 mg·kg^{-1}）、Pb（117.43 mg·kg^{-1}）、Cd（1.20 mg·kg^{-1}）、Hg（8.58 mg·kg^{-1}）、As（7.27 mg·kg^{-1}）中，Pb、Cd、Hg 含量均超过风险筛选值，分别为中国背景值（表 3）的 1.41、4.00 和 17.16 倍，尤以 Cd、Hg 富集突出。鉴于 Cd 含量超标，故开展了修复研究。

表2 土壤理化性质

Table 2 Soil physicochemical properties

指标 Indices	测定数值 Measured values	指标 Indices	测定数值 Measured values
镉 Cadmium (mg·kg^{-1})	1.20±0.04	铅 Lead (mg·kg^{-1})	117.43±0.97
汞 Mercury (mg·kg^{-1})	8.58±0.10	有机质 Soil organic matter (g·kg^{-1})	23.85±0.16
砷 Arsenic (mg·kg^{-1})	7.27±0.12	全磷 Total phosphorus (g·kg^{-1})	0.57±0.00
锌 Zinc (mg·kg^{-1})	403.95±3.62	全钾 Total potassium (g·kg^{-1})	17.01±0.28
钙 Calcium (mg·kg^{-1})	204.44±2.93	速效氮 Available nitrogen (g·kg^{-1})	0.59±0.06
铜 Copper (mg·kg^{-1})	196.46±2.21		

表3 土壤重金属含量中国背景值

Table 3 Background values of heavy metals in soil in China (mg·kg^{-1})

序号 Serial number	污染物项目 Pollutant items[a, b]		风险筛选值 Risk screening value			
			pH≤5.5	5.5<pH≤6.5	6.5<pH≤7.5	pH>7.5
1	镉 Cadmium	水田 Paddy field	0.3	0.4	0.6	0.8
		其他 Others	0.3	0.3	0.3	0.6
2	汞 Mercury	水田 Paddy field	0.5	0.5	0.6	1.0
		其他 Others	1.3	1.8	2.4	3.4
3	砷 Arsenic	水田 Paddy field	30	30	25	20
		其他 Others	40	40	30	25
4	铅 Lead	水田 Paddy field	80	100	140	240
		其他 Others	70	90	120	170
5	铬 Chromium	水田 Paddy field	250	250	300	350
		其他 Others	150	150	200	250
6	铜 Copper	果园 Orchard	150	150	200	200
		其他 Others	50	50	100	100
7	镍 Nickel		60	70	100	190
8	锌 Zinc		200	200	250	300

注：[a]重金属和类金属砷均按元素总量计。[b]对于水旱轮作地，采用其中较严重的风险筛选值。国家土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准(试行)。

Note: [a] Heavy metals and metalloids, including arsenic, are calculated based on the total elemental content. [b] For water and dry crop rotation land, the more severe risk screening value is applied. National standard for soil environmental quality: risk control of soil pollution in agricultural land (trial).

通过富集培养获得耐镉菌株Hz_Cp(图1a)，其在LB培养基中对Cd^{2+}的最高耐受浓度达1600 mg·L^{-1}(图2a)。16S rRNA基因分析显示该菌株与嗜铜菌属(*Cupriavidus* sp.)相似(图1b)。环境适应性研究表明，Hz_Cp在28～40 ℃和0～5% NaCl条件下生长良好，但在5 ℃时生长受抑制(图1c,d)。中性条件(pH=7)下Cd^{2+}去除率最高(90.16%)，显著优于酸性和碱性环境(图1e)。该菌株同时表现出多种促生特性：IAA分泌量达(60.17±1.24) μg·mL^{-1}；在Ashby培养基上48 h形成菌落(图1f)；CAS平板上产生明显的黄色水解圈(图1g)，证实其具有固氮潜力和铁载体分泌能力。这些特性表明Hz_Cp是一株性能全面、极具应用前景的耐镉促生菌。

2.2 菌株Hz_Cp的重金属抗性、Zeta电位和ATR-FTIR表征分析

Hz_Cp菌株在0～1600 mg·L^{-1} Cd^{2+}浓度均能良好生长(图2a,b)，其在LB固体培养基中对镉的最高耐受浓度可达1600 mg·L^{-1}。此外，该菌株对多种重金属元素均表现出抗性能力，包括Fe^{3+}、Cu^{2+}、Pb^{2+}和Cd^{2+}，但抗性程度存在差异(图2c)。

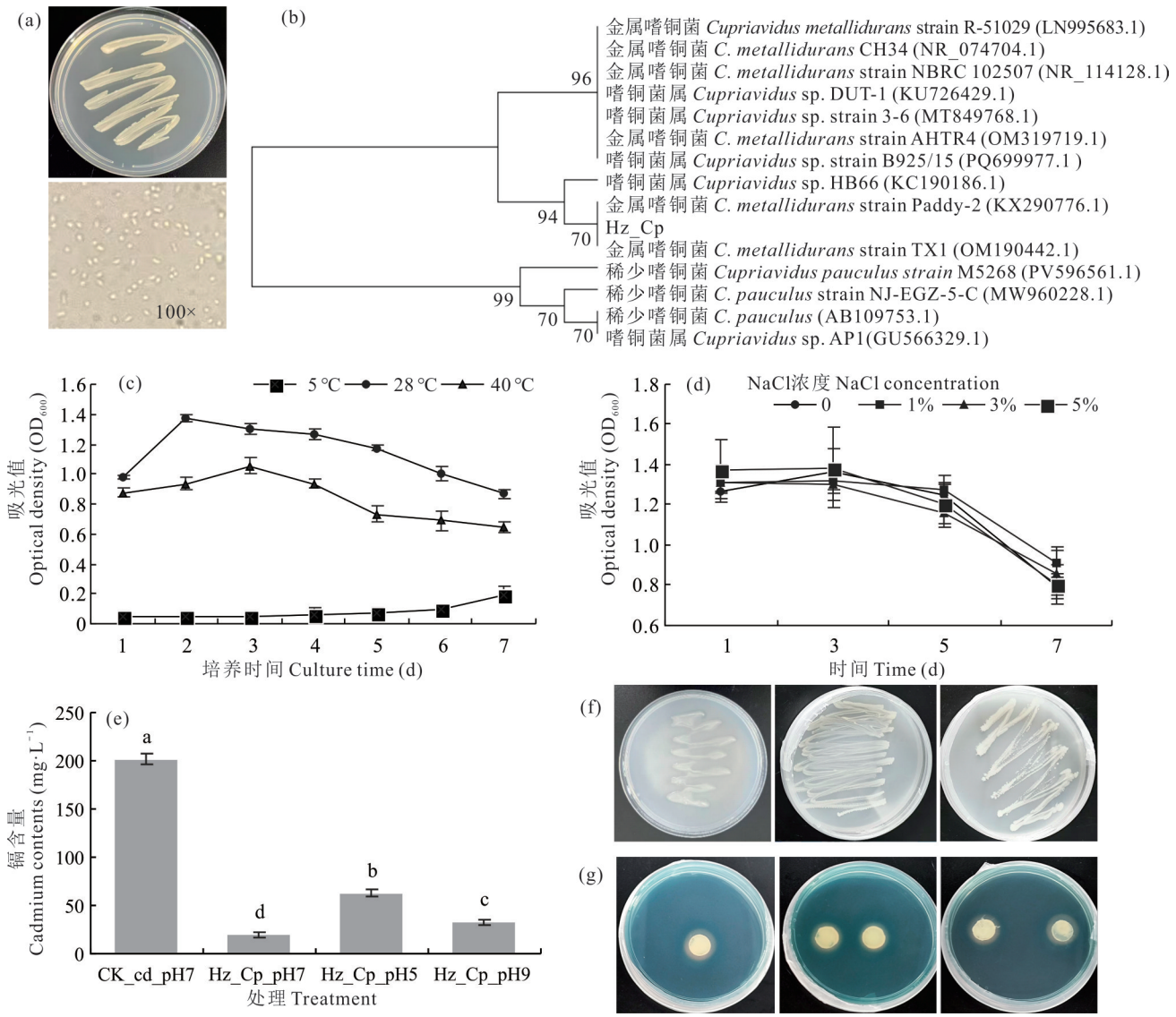


图 1　Hz_Cp 菌株特性研究

Fig. 1　Study on the characteristics of Hz_Cp strain

(a) Hz_Cp 在 Luria-Bertani (LB)固体平板上的菌落形态;(b) 菌株 Hz_Cp 的系统发育树;(c,d) 不同温度、NaCl 浓度对 Hz_Cp 生长特性的影响;(e) 探究 pH 对 Hz_Cp 发酵液吸附镉的效应;(f) 菌株 Hz_Cp 固氮活性;(g)产铁载体能力的检测。不同小写字母表示在不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。(a) Colony morphology of Hz_Cp on Luria-Bertani (LB) agar plates; (b) Phylogenetic tree of strain Hz_Cp; (c, d) Effects of different temperatures and NaCl concentrations on the growth characteristics of Hz_Cp; (e) Investigation of the effect of pH on cadmium adsorption by Hz_Cp fermentation broth; (f) Detection of nitrogen-fixing activity; (g) Siderophore production capability of strain Hz_Cp. Different lowercase letter indicate the significant differences ($P<0.05$) among different treatments. The same below.

中性 pH 条件下,Hz_Cp 细胞的 Zeta 电位随 Cd^{2+} 浓度(0～1000 mg·L^{-1})增加呈现显著变化:从初始的－4.62 mV 降至 500 mg·L^{-1} 时的－12.50 mV($P<0.05$),1000 mg·L^{-1} 时略回升至－11.23 mV(图 2d),表明 Cd^{2+} 吸附明显改变了细胞表面电性,Hz_Cp 菌株具有更强的吸附镉潜力。FTIR 分析结果(图 2e)显示特征峰位移:3416 cm^{-1}(－OH)、1449 cm^{-1}(－COOH)、1073 cm^{-1}(－PO_4^{3-})和 531 cm^{-1}(硫基团)的偏移证实这些官能团参与 Cd^{2+} 配位;而 824、780 和 642 cm^{-1} 处峰强增强(C－H、=C－H 键)则表明疏水性基团增加,共同促进了 Cd^{2+} 的生物固定。

2.3　Hz_Cp 促进牵牛花生长,减轻镉毒性

Hz_Cp 对牵牛花种子生长的影响,结果(图 3a)显示:与 CK_Cd 相比,接菌处理使叶绿素和类胡萝卜素含量显著提升($P<0.05$,图 3b～e),有效提高了植物的光合作用效率。相较于 CK_Cd 处理,Hz_Cp 处理使花青素含量显著提高了 84.29%($P<005$,图 3f),同时显著激活抗氧化酶系统(SOD 和 POD 活性分别提升 4.69 和 1.63 倍)(图

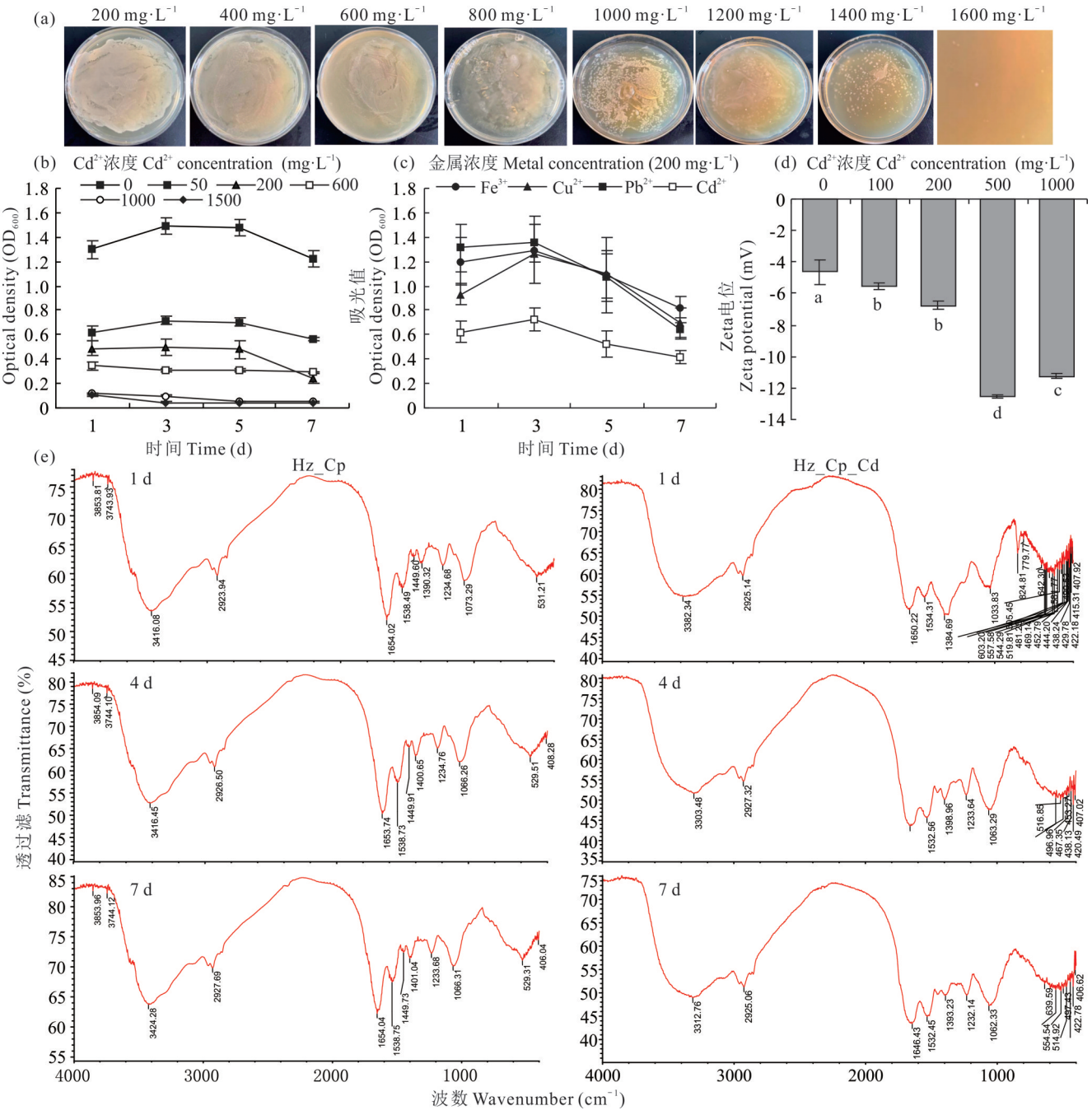


图2 Hz_Cp的重金属抗性及衰减全反射-傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)分析

Fig. 2 Hz_Cp's heavy metal resistance and attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) analysis

(a、b) 菌株Hz_Cp对镉的抗性水平测定;(c) 菌株Hz_Cp对多种重金属的抗性评估;(d) 不同Cd^{2+}浓度对Hz_Cp表面Zeta电位的影响(pH=7);(e) 菌株Hz_Cp的衰减全反射-傅里叶变换红外光谱(ATR-FTIR)光谱分析。(a,b) Determination of the cadmium resistance level of strain Hz_Cp; (c) Assessment of the resistance of strain Hz_Cp to various heavy metals; (d) Effect of different Cd^{2+} concentrations on the surface Zeta potential of Hz_Cp (pH=7); (e) Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) spectral analysis of strain Hz_Cp.

3g,h),协同增强氧化应激的防御能力。尤为重要的是,Hz_Cp_Cd处理使植株Cd富集量较CK_Cd组降低211.03倍(图3i),证实其具有显著的植物—微生物协同修复效应。

2.4 Hz_Cp接种对牵牛花基因表达的调控作用

基因表达分析结果(图4)显示,Hz_Cp处理较CK处理显著上调牵牛花*IpYUC1*、*IpPAP1*、*IpZIP2*和*IpPOD*基因的表达($P<0.05$)。镉处理(CK_Cd)抑制了前3个基因的表达,而Hz_Cp_Cd处理不仅逆转了这种抑制,还使所有4个基因相对表达量显著高于CK_Cd($P<0.05$)。

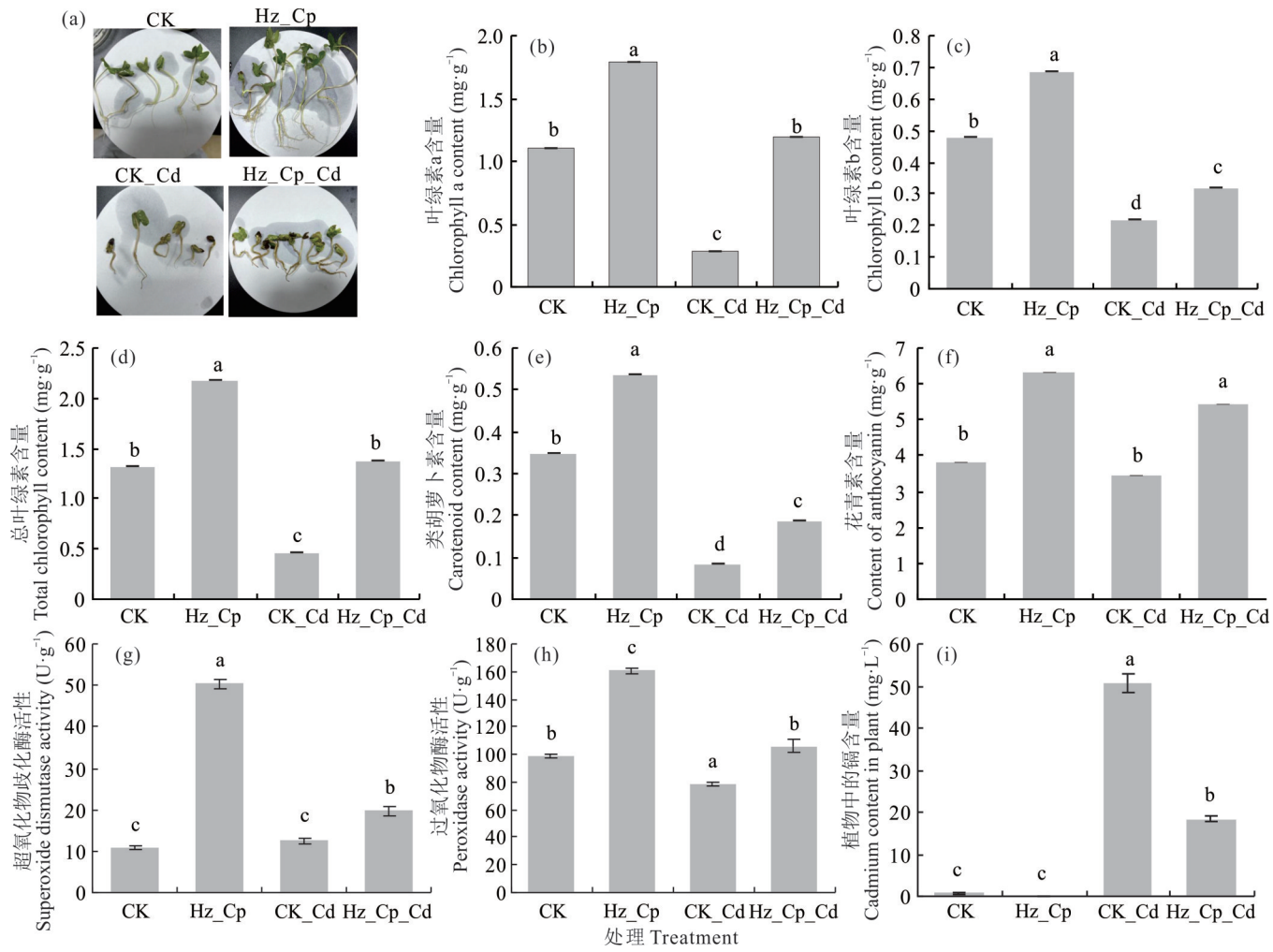


图3　不同处理对牵牛花生长的影响

Fig. 3　Effects of different treatments on the growth of *P. nil*

(a～f) Hz_Cp处理对牵牛花生长及色素含量(叶绿素、类胡萝卜素、花青素)的影响;(g,h) Hz_Cp接种对牵牛花SOD和POD活性的影响;(i) 牵牛花对镉吸收富集能力的评估。(a－f) Effects of Hz_Cp treatment on the growth and pigment contents (chlorophyll, carotenoid, anthocyanin) of *P. nil*; (g,h) Effects of Hz_Cp inoculation on SOD and POD activities in *P. nil*; (i) Assessment of cadmium uptake and enrichment capacity in *P. nil*.

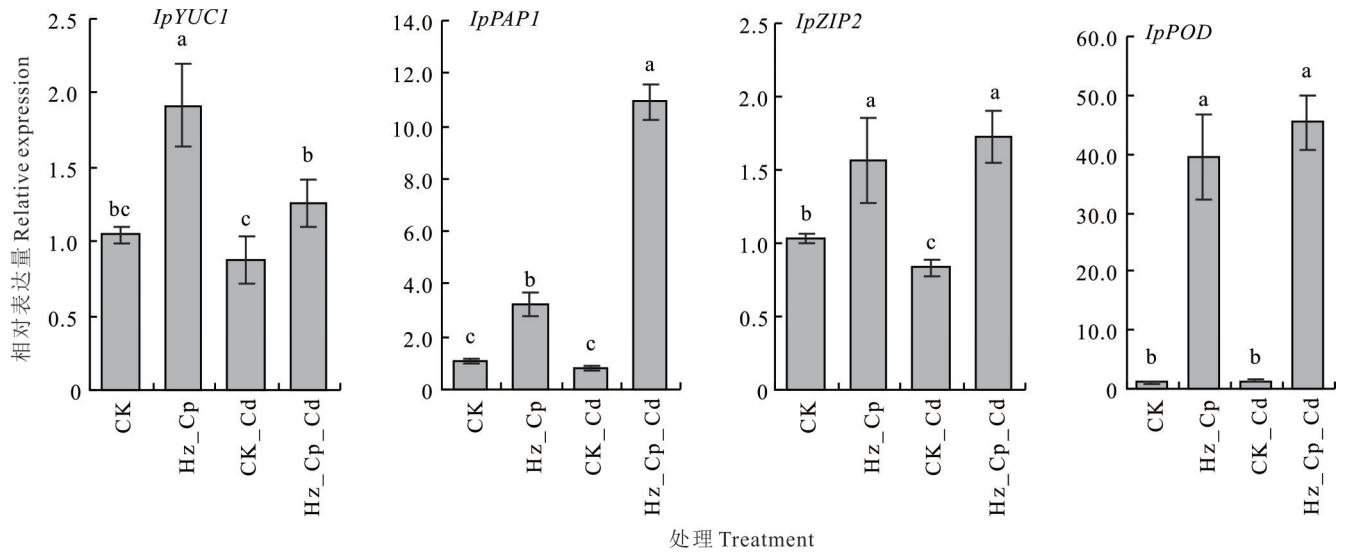


图4　牵牛花中相关基因的表达分析

Fig. 4　Analysis of related gene expression in *P. nil*

3 讨论

微生物修复技术是治理镉污染的研究热点,对耐镉微生物的筛选已有广泛报道。Ma等[25]筛选的尼古丁节杆菌(*Paenarthrobactor nitroguajacolicus*)耐镉能力达100 mg·L^{-1}。张书东等[26]获得的拟盘多毛孢属菌耐镉能力达1000 mg·L^{-1}。本研究从浙江临安镉污染区分离的高效耐镉菌Hz_Cp表现突出,其Cd^{2+}耐受浓度达1600 mg·L^{-1},去除率达90.16%,优于已报道菌株。

开发耐复合重金属的根际促生菌是生物修复重金属污染土壤的关键。本研究中,菌株Hz_Cp对Fe^{3+}、Cu^{2+}、Pb^{2+}和Cd^{2+}均表现出较强的广谱耐受性,表明其可作为重金属污染修复的优良候选菌剂。相较于已报道的单一金属耐受菌,如肠球菌(*Enterococcus* sp. Cdq4-2)[27]、根瘤菌(*Sinorhizobium* sp. C10)[28]、产孢霉甲杆菌(*Methylobacterium* sp. EM2)[29]、尼古丁节杆菌[25],Hz_Cp的多金属耐受特性使其更适用于复杂污染环境的生物修复。后续研究可深入解析其耐受机制以优化实际应用。

Hz_Cp菌株具备良好的耐盐特性,可在NaCl浓度为0~5%内正常生长。根据嗜盐菌的耐盐性分类标准[30],该类微生物可分为非嗜盐菌(NaCl<1.17%)、弱嗜盐菌(1.17%~2.93%)、中等嗜盐菌(2.93%~14.63%)、临界极端嗜盐菌(14.63%~23.38%)、极端嗜盐菌(23.28%~34.48%)以及极端耐盐菌(非嗜盐但耐盐度达14.63%)。Hz_Cp的耐盐范围覆盖了从非嗜盐至弱嗜盐的区间,表明其具有较强的耐盐能力。因此,该菌株在盐碱地改良与生态修复方面具备良好的应用潜力,可为相关治理工作提供重要的微生物资源。

红外光谱分析可揭示细菌吸附重金属的分子机制。有研究表明,细胞壁表面官能团在重金属生物固定中起关键作用[31-33]。具体而言,代淑娟等[31]发现鞘氨醇单胞菌DX-T3-03通过表面的—OH、—NH、—COOH和—PO等基团吸附重金属并形成沉淀;刘爱民等[32]则证实假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)通过—NH_2、—OH、—COOH、—PO_4^{3-}、—M—O(O—M—O)基团结合Cd^{2+}。本研究证实Hz_Cp菌具有与文献报道相似的吸附特性,为微生物修复镉污染技术提供了理论支撑,但其分子水平的耐镉机制仍需深入探究。

植物—微生物协同修复体系在重金属污染治理中展现出显著优势[34]。本研究发现,在200 mg·L^{-1} Cd^{2+}胁迫条件下,未接种菌株的牵牛花(CK_Cd)体内Cd积累量达到对照组(CK)的64.15倍,而接种Hz_Cp菌株的处理组(Hz_Cp_Cd)Cd积累量仅为对照组的23.40倍。值得注意的是,Hz_Cp菌株不仅显著降低了植物对Cd的吸收,还提高了牵牛花的株高、花青素含量以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性。这一保护效应可能源于Hz_Cp菌株的多种促生特性,包括固氮作用、吲哚乙酸(IAA)分泌和铁载体产生等。研究结果与现有文献报道相似:密歇根克雷伯氏菌MCC3089(*Klebsiella michiganensis* MCC3089)可有效缓解Cd胁迫对水稻(*Oryza sativa*)幼苗生长的抑制[35]。类似地,产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)通过Cd吸附机制显著增强了植物的抗逆能力[36]。综上所述,Hz_Cp、牵牛花均具有高镉的耐受性,牵牛花联合Hz_Cp可望成为Cd污染修复的新途径。

4 结论

本研究筛选获得一株高性能嗜铜菌属菌株Hz_Cp,其对镉具有强耐受与吸附能力,并能通过提升牵牛花的光合作用、抗氧化酶活性及调控相关基因表达,协同增强植物耐镉性及土壤镉污染修复效率,实现了“增效降毒”,具备良好的应用潜力。

参考文献 References:

[1] Zhao J X, Yin P C, Yue R, *et al*. Research progress of status, source, restoration technique of heavy metals pollution in cropland of China. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(4): 19—21, 6.
赵纪新, 尹鹏程, 岳荣, 等. 我国农田土壤重金属污染现状·来源及修复技术研究综述. 安徽农业科学, 2018, 46(4): 19—21, 6.

[2] Shan X Y, Dou F, Li D W, *et al*. Cadmium accumulation and translocation in maize cultivars on contaminated soils in southern China. BMC Plant Biology, 2025, 25(1): 589.

[3] Priya A K, Muruganandam M, Ali S S, *et al*. Clean-up of heavy metals from contaminated soil by phytoremediation: A

multidisciplinary and eco-friendly approach. Toxics, 2023, 11(5): 422.

[4] Razzak S A, Faruque M O, Alsheikh Z, *et al*. A comprehensive review on conventional and biological-driven heavy metals removal from industrial wastewater. Environmental Advances, 2022, 7(10): 100168.

[5] Sharma P, Bano A, Singh S P, *et al*. Recent advancements in microbial-assisted remediation strategies for toxic contaminants. Cleaner Chemical Engineering, 2022, 2(11): 100020.

[6] Yan M, Qin S J, Cui Y L, *et al*. Isolation of cadmium-adsorbing bacteria for soil cadmium fixation. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(11): 2423－2433.
闫敏, 秦诗洁, 崔永亮, 等. 镉吸附细菌的分离及其对土壤镉的固定. 微生物学报, 2020, 60(11): 2423－2433.

[7] Luo Y T, Pang J L, Li C H, *et al*. Long-term and high-bioavailable potentially toxic elements (PTEs) strongly influence the microbiota in electroplating sites. Science of the Total Environment, 2022, 814: 151933.

[8] Han F, Shan X Q, Zhang S Z, *et al*. Enhanced cadmium accumulation in maize roots－the impact of organic acids. Plant and Soil, 2006, 289(6): 355－368.

[9] Xu J, Sun J H, Du L G, *et al*. Comparative transcriptome analysis of cadmium responses in *Solanum nigrum* and *Solanum torvum*. New Phytologist, 2012, 196(1): 110－124.

[10] Jiao H H, Liu Y, Jin D C, *et al*. Effect of *Pharbitis nil* (Linn.) Choisy growth on the microbial community and petroleum hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated saline-alkali soil. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(12): 3350－3358.
焦海华, 刘颖, 金德才, 等. 牵牛花对石油污染盐碱土壤微生物群落与石油烃降解的影响. 环境科学学报, 2013, 33(12): 3350－3358.

[11] Cao Y Q, Nie Q K, Gao Y, *et al*. The studies on cadmium and its chelaterelated transporters in plants. Crops, 2018, 34(3): 15－24.
曹玉巧, 聂庆凯, 高云, 等. 植物中镉及其螯合物相关转运蛋白研究进展. 作物杂志, 2018, 34(3): 15－24.

[12] Yang L, Li H P. Effects of testing conditions on simultaneous determination of 33 elements in soil. Henan Journal of Preventive Medicine, 2018, 29(11): 4.
杨丽, 李和平. 测试条件对土壤中33种元素同时测定的影响. 河南预防医学杂志, 2018, 29(11): 4.

[13] Bao S D. Soil agro-chemical analysis (3rd ed.). Beijing: China Agriculture Press, 2000.
鲍士旦. 土壤农化分析(3版). 北京: 中国农业出版社, 2000.

[14] Wu H J, Feng X, Guo H G, *et al*. Screening of Cd-resistant bacteria and study on their enrichment effects. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(11): 175－177.
吴海江, 冯侠, 郭红光, 等. 耐Cd细菌的筛选及富集作用研究. 江西农业学报, 2011, 23(11): 175－177.

[15] Xie G H, Cai M Y, Tao G C, *et al*. Cultivable heterotrophic N_2-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. Biology and Fertility of Soils, 2003, 37(1): 29－38.

[16] Srivastava P, Sahgal M, Sharma K, *et al*. Optimization and identification of siderophores produced by *Pseudomonas monteilii* strain MN759447 and its antagonism toward fungi associated with mortality in *Dalbergia sissoo* plantation forests. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 984522.

[17] Xu J Y, Han Y H, Chen Y, *et al*. Arsenic transformation and plant growth promotion characteristics of As-resistant endophytic bacteria from As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. Chemosphere, 2016, 144(12): 1233－1240.

[18] Yan D, Zeng X C, Song J E, *et al*. Determination of 65 soluble elements in water by inductively coupled plasma mass spectrometry. Environmental Chemistry, 2014, 33(8): 1418－1421.
严冬, 曾祥程, 宋娟娥, 等. 电感耦合等离子体质谱测定水体中可溶性65种元素. 环境化学, 2014, 33(8): 1418－1421.

[19] Porra R J, Thompson W, Kriedemann P. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)－Bioenergetics, 1989, 975(3): 384－394.

[20] Zhang Z L, Qu W J. Experimental guidance for plant physiology. Beijing: Higher Education Press, 2003.
张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2003.

[21] Ors S, Suarez D L. Spinach biomass yield and physiological response to interactive salinity and water stress. Agricultural Water Management, 2017, 190(3): 31－41.

[22] Ors S, Ekinci M, Yildirim E, *et al*. Interactive effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings. South African Journal of Botany, 2021, 137: 335－339.

[23] Zhang J B, Wang H L. Composition and characteristics analysis of food additive standard system in China. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(3): 279-286.
张俭波, 王华丽. 食品添加剂食品安全国家标准体系的构成及特点分析. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(3): 279-286.

[24] Hu L J, Wu X Q, Ding X L, *et al*. Comparative transcriptomic analysis of candidate effectors to explore the infection and survival strategy of *Bursaphelenchus xylophilus* during different interaction stages with pine trees. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 224.

[25] Ma B, Song W L, Zhang X X, *et al*. Potential application of novel cadmium-tolerant bacteria in bioremediation of Cd-contaminated soil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 255(15): 114766.

[26] Zhang S D, Chen W B, Lei Y, *et al*. Effects of temperature and pH on two cadmium resistant fungi. Journal of Liupanshui Normal University, 2023, 35(3): 105-111.
张书东, 陈文波, 雷艳, 等. 温度和pH对两种耐镉真菌生长的影响. 六盘水师范学院学报, 2023, 35(3): 105-111.

[27] Song L, Zhou J H, Xu X, *et al*. Inoculation of cadmium-tolerant bacteria to regulate microbial activity and key bacterial population in cadmium-contaminated soils during bioremediation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 271: 115957.

[28] Li P H, Chen J L, Ying S M, *et al*. Different responses of *Sinorhizobium* sp. upon Pb and Zn exposure: Mineralization versus complexation. Environmental Pollution, 2024, 343: 123260.

[29] Jeong S W, Kim H K, Yang J E, *et al*. Removal of Pb (II) by pellicle-like biofilm-producing *Methylobacterium hispanicum* EM2 strain from aqueous media . Water, 2019, 11(10): 2081.

[30] Zhang J, Song H, Chen Z, *et al*. Biomineralization mechanism of U(Ⅵ) induced by *Bacillus cereus* 12-2: The role of functional groups and enzymes. Chemosphere, 2018, 206: 682-692.

[31] Dai S J, Wang Y J, Wei D Z, *et al*. Biosorption of cadmium from cadmium-containing electroplating wastewater by *Bacillus subtilis*. Nonferrous Metals Engineering, 2010, 62(3): 156-159.
代淑娟, 王玉娟, 魏德洲, 等. 枯草芽孢杆菌对电镀废水中镉的吸附. 有色金属, 2010, 62(3): 156-159.

[32] Liu A M, Huang W Y. Research on high accumulating Cd^{2+} mechanism of a toletant-Cd^{2+} strain by infrared spectroscopy analysis. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(11): 74-78.
刘爱民, 黄为一. 应用红外方法探讨耐镉菌株高积累Cd^{2+}的机理. 环境科学学报, 2005, 25(11): 74-78.

[33] Liu S, Liu H M, Chen R, *et al*. Role of two plant growth-promoting bacteria in remediating cadmium-contaminated soil combined with *Miscanthus floridulus* (Lab.). Plants, 2021, 10(5): 912.

[34] Mitra S, Pramanik K, Ghosh P K, *et al*. Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth promotion under Cd stress. Microbiological Research, 2018, 210: 12-25.

[35] Halim M A, Rahman M M, Megharaj M, *et al*. Cadmium immobilization in the rhizosphere and plant cellular detoxification: role of plant-growth-promoting rhizobacteria as a sustainable solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(47): 13497-13529.

[36] Edbeib M F, Wahab R A, Huyop F. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(8): 135.