

植物多环芳烃污染 控制技术及原理 ——利用功能内生细菌

高彦征 刘娟 朱雪竹 著



科学出版社

植物多环芳烃污染控制技术及原理 ——利用功能内生细菌

高彦征 刘 娟 朱雪竹 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

多环芳烃(PAHs)是一类污染土壤中常见的具有“致畸、致癌、致突变”效应的有机污染物。从污染区植物体内筛选具有降解 PAHs 功能的植物内生细菌,并将其重新定殖在目标植物上,有望去除植物体内 PAHs,进而降低污染区植物污染风险。本书共分 5 章,介绍了功能内生细菌及其对植物 PAHs 污染调控作用的研究进展,分析了污染区植物体内内生细菌及 PAHs 降解基因多样性,分离筛选出 10 株具有 PAHs 降解功能的植物内生细菌,并阐述了功能内生细菌在植物体内的定殖、效能及作用机制。

本书可供环境、土壤、生态、农业、微生物等领域相关科技工作者、管理人员及研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

植物多环芳烃污染控制技术及原理:利用功能内生细菌/高彦征等著.
—北京:科学出版社,2016.12

ISBN 978-7-03-050999-4

I. ①植… II. ①高… III. ①植物-应用-多环烃-土壤污染-污染防治-研究 IV. ①X53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 284305 号

责任编辑:周 丹 王 希/责任校对:李 影

责任印制:张 倩/封面设计:许 瑞

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 12 月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2016 年 12 月第一次印刷 印张:12 插页:3

字数:250 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

土壤是农业生产的基础。随着生活水平的提高,人们对农产品安全的呼声日渐高涨,这对农业生产提出了更高的要求:不仅要“保丰”——确保粮食丰产,而且要“保质”——确保生产安全农产品。然而,我国耕地资源十分紧张,污染土壤面积较为广阔。2014 年国家环境保护部和国土资源部联合发布的《全国土壤污染状况调查公报》(以下简称《公报》)中指出,“全国土壤环境状况总体不容乐观,耕地土壤环境质量堪忧,点位超标率为 19.4%”。土壤污染危害极大,它不仅直接导致粮食减产,加剧我国人多地少的矛盾,而且污染物可通过食物链危及生态安全和人群健康。土壤污染已成为影响农业生产“保丰、保质”、制约农业可持续发展、关系国计民生的重大环境问题之一。

多环芳烃(PAHs)是一类污染土壤中常见的具有“致畸、致癌、致突变”效应的有机污染物,极易在土壤中累积;《公报》中指出,“我国土壤中 PAHs 点位超标率达 1.4%”,面源污染问题突出。PAHs 污染已成为影响农产品安全的主要障碍之一。研究者多是从污染土壤修复的角度来去除土壤中的 PAHs,进而降低其向植物迁移的风险;然而,我国受 PAHs 污染的土壤面积巨大,目前污染土壤修复工作受技术、资金等多方面制约,仍然任重而道远。如何在如此面积广阔的 PAHs 污染区生产安全农产品、实现污染土壤资源的安全利用?近些年来该领域研究颇受关注。

植物内生细菌能够定殖在健康植物组织内,并与宿主植物建立和谐共生关系。从污染区植物体内筛选具有降解 PAHs 特性的植物内生细菌,并将其重新定殖在污染区目标植物上,有望去除植物体内 PAHs,进而降低植物污染的风险。本课题组在国家自然科学基金“PAHs 降解菌在土壤-植物系统中的定殖特征及其强化植物修复机制研究”(31270574)、“植物体内多环芳烃降解功能内生细菌的定殖、传导及效能优化”(41171380)、“PAHs 降解细菌在根表的成膜作用及其对植物吸收 PAHs 的影响”(41201501)、江苏省自然科学基金“功能内生细菌调控植物体内 PAHs 代谢的机制及效能优化”(BK20130030)、“根表功能细菌成膜作用对植物吸收 PAHs 的影响及机理”(BK2012370)和公益性行业(农业)科研专项经费“有机化学品污染农田和农产品质量安全综合防治技术方案”(201503107)等项目的资助下,紧密结合我国土壤污染控制与农产品安全的重大需求,提出利用植物功能内生细菌来降低污染区植物 PAHs 污染风险的新途径,

分析了污染区植物体内内生细菌及 PAHs 降解基因多样性,从污染区植物体内分离筛选并获得了具有 PAHs 降解功能的内生细菌 10 株,揭示了这些功能菌株在植物体内的定殖及分布规律,阐明了功能内生细菌减少植物 PAHs 污染的效能及作用机制。这些成果不仅丰富了 PAHs 降解功能微生物菌种库,而且为降低污染区植物 PAHs 污染风险、保障农产品安全、实现污染土壤的资源化利用等提供了参考技术。

本书是在总结课题组“利用功能内生细菌降低植物 PAHs 污染风险”相关成果的基础上撰写的,介绍了功能内生细菌及其对植物 PAHs 污染调控作用的研究进展,阐述了 10 株具有 PAHs 降解功能的植物内生细菌的分离筛选过程及降解性能,分析了功能内生细菌在植物体内的定殖、效能及作用机制。在此特向参加课题研究的凌婉婷、孙凯、王建、刘爽、倪雪、靳璞、彭安萍、顾玉骏、盛月慧、王万清、林相昊、Waigi Michael Gatheru、相妍冰等表示衷心感谢。

本书由高彦征组织编写,并以其为主撰写整理第 1、2 章,刘娟为主撰写整理第 3、5 章,朱雪竹为主撰写整理第 4 章;孙凯、王建参加了书稿的撰写整理工作。

“利用功能内生细菌降低植物 PAHs 污染风险”的研究工作仍在深化之中,目前国际上可供参考的资料也较少。书中一些内容显得不够深入和完善,仍有待后续研究推进和补充。作者“抛砖引玉”,期望通过本书引起读者对该领域研究的关注和重视。

由于作者水平有限,书中不足之处在所难免,欢迎读者批评指正。

作 者

2016 年 12 月 8 日

目 录

前言

1 功能内生细菌及其对植物 PAHs 污染的调控作用	1
1.1 植物对 PAHs 的吸收积累作用	2
1.1.1 植物吸收 PAHs 的基本过程	2
1.1.2 植物吸收 PAHs 的调控	5
1.2 植物内生细菌	7
1.2.1 植物内生细菌及其多样性	7
1.2.2 植物体内内生细菌功能	10
1.2.3 植物内生细菌对宿主植物的侵染与定殖	11
1.3 利用功能内生细菌减低植物 PAHs 污染	13
1.3.1 具有调控植物体内有机污染物代谢功能的内生细菌	13
1.3.2 具有 PAHs 降解功能的植物内生细菌	14
参考文献	16
2 污染区植物体内内生细菌及 PAHs 降解基因多样性	25
2.1 污染区植物体内可培养内生细菌的种群特性和分布	25
2.1.1 供试污染区土壤及植物的 PAHs 含量	26
2.1.2 污染区植物体内内生细菌数量	28
2.1.3 污染区植物体内可培养内生细菌的分离和鉴定	29
2.1.4 污染区植物体内可培养内生细菌优势种群	32
2.1.5 可培养内生细菌对不同 PAHs 的耐受性	35
2.2 污染区植物体内内生细菌群落结构	39
2.2.1 植物内生细菌 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱及分析	40
2.2.2 污染区植物内生细菌群落结构相似度指数及多样性	41
2.2.3 DGGE 图谱中优势条带的系统发育分析	44
2.3 污染区植物体内 PAHs 降解基因多样性	49
2.3.1 污染区植物内生细菌中 NAH 和 PHE 基因的 DGGE 图谱及分析	49
2.3.2 污染区植物体内 NAH 和 PHE 基因多样性分析	51
2.3.3 污染区植物体内 NAH 和 PHE 基因的系统进化分析	51
2.3.4 污染区植物体内 16S rRNA 基因和 PHE 基因的拷贝数	55

2.4 模拟污染条件下植物体内内生细菌对 PAHs 污染的响应	55
2.4.1 植物体内菲含量	56
2.4.2 菲污染下植物体内可培养内生细菌的分离、鉴定及进化分析	56
2.4.3 菲污染下黑麦草体内可培养内生细菌数量	58
2.4.4 菲污染下黑麦草体内可培养内生细菌种群特性	59
2.4.5 体内可培养内生细菌对菲的耐受性	60
参考文献	61
3 具有 PAHs 降解功能的植物内生细菌分离筛选及降解性能	64
3.1 <i>Pseudomonas</i> sp. Ph6	64
3.1.1 菌株 Ph6 的鉴定和 GFP 基因标记	65
3.1.2 菌株 Ph6- <i>gfp</i> 的生长应答和生物膜形成	66
3.1.3 菌株 Ph6- <i>gfp</i> 的生长和菲降解动力学	68
3.2 <i>Massilia</i> sp. Pn2	69
3.2.1 菌株 Pn2 鉴定	69
3.2.2 菌株 Pn2 生长特性	71
3.2.3 菌株 Pn2 对 PAHs 降解作用	73
3.3 <i>Stenotrophomonas</i> sp. P ₁	77
3.3.1 菌株 P ₁ 鉴定	77
3.3.2 菌株 P ₁ 生长特性	79
3.3.3 菌株 P ₁ 对 PAHs 降解作用	81
3.4 <i>Sphingobium</i> sp. RS2	85
3.4.1 菌株 RS2 鉴定	85
3.4.2 菌株 RS2 对菲降解性能	87
3.4.3 环境条件对菌株 RS2 降解菲的影响	88
3.4.4 菌株 RS2 对其他 PAHs 降解作用	90
3.5 <i>Diaphorobacter</i> sp. Phe15	90
3.5.1 菌株 Phe15 鉴定	90
3.5.2 菌株 Phe15 对菲降解作用	92
3.5.3 环境条件对菌株 Phe15 生长和降解菲的影响	93
3.6 <i>Staphylococcus</i> sp. BJ06	96
3.6.1 菌株 BJ06 的分离筛选和鉴定	96
3.6.2 菌株 BJ06 的生物学特性	97
3.6.3 菌株 BJ06 的生长和芘降解动力学	98
3.6.4 环境因子对菌株 BJ06 生长和降解芘的影响	99

3.6.5 代谢产物和途径分析	100
3.7 <i>Acinetobacter</i> sp. BJ03	103
3.7.1 菌株 BJ03 的形态及生理生化特性	103
3.7.2 菌株 BJ03 的 16S rRNA 基因序列同源性分析	104
3.7.3 菌株 BJ03 的生长和茚降解曲线	104
3.7.4 环境因子对菌株 BJ03 生长和降解茚的影响	105
3.7.5 外加 C、N 源对菌株 BJ03 生长和降解茚的影响	106
3.8 <i>Kocuria</i> sp. BJ05	107
3.8.1 菌株 BJ05 形态和生理生化特性	107
3.8.2 菌种鉴定	109
3.8.3 菌株 BJ05 生长和茚降解曲线	109
3.8.4 环境因子对菌株 BJ05 生长和降解茚的影响	109
3.8.5 外加 C、N 源对菌株 BJ05 生长和降解茚的影响	110
3.9 <i>Serratia</i> sp. PW7	111
3.9.1 菌株 PW7 鉴定	112
3.9.2 菌株 PW7 生长特性及抗生素的抗性	113
3.9.3 菌株 PW7 对茚降解作用	115
3.10 <i>Mycobacterium</i> sp. Pyr9	119
3.10.1 菌株 Pyr9 鉴定	119
3.10.2 菌株 Pyr9 对茚降解作用	120
3.10.3 环境因子对菌株 Pyr9 生长和降解的影响	122
参考文献	124
4 功能内生细菌在植物体内的定殖及分布	128
4.1 <i>Pseudomonas</i> sp. Ph6- <i>gfp</i>	128
4.1.1 菌株 Ph6- <i>gfp</i> 在植物体内定殖分布及数量	129
4.1.2 不同定殖方式下菌株 Ph6- <i>gfp</i> 在植物体内定殖差异	130
4.2 <i>Massilia</i> sp. Pn2	132
4.3 <i>Sphingobium</i> sp. RS2	133
4.3.1 菌株 RS2 的抗生素抗性和 GFP 基因标记	133
4.3.2 菌株 45-RS2 在紫花苜蓿体内的定殖和分布	135
4.4 <i>Staphylococcus</i> sp. BJ06	135
4.4.1 菌株 BJ06 的促植物生长作用	135
4.4.2 菌株 BJ06 在黑麦草体内的定殖和分布	137
4.5 <i>Serratia</i> sp. PW7	138

4.6	<i>Mycobacterium</i> sp. Pyr9	139
4.6.1	菌株 Pyr9 的抗生素抗性和 GFP 基因标记	139
4.6.2	菌株 Pyr9- <i>gfp</i> 在三叶草体内的定殖和分布	140
	参考文献	142
5	功能内生细菌降低植物 PAHs 污染风险的效能及机制	145
5.1	定殖功能内生细菌对植物吸收积累 PAHs 的影响	145
5.1.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Ph6- <i>gfp</i>	145
5.1.2	<i>Massilia</i> sp. Pn2	148
5.1.3	<i>Sphingobium</i> sp. 45-RS2	150
5.1.4	<i>Staphylococcus</i> sp. BJ06	151
5.1.5	<i>Serratia</i> sp. PW7	152
5.1.6	<i>Mycobacterium</i> sp. Pyr9- <i>gfp</i>	154
5.1.7	复合功能菌对植物吸收累积 PAHs 的影响	156
5.2	功能内生细菌对土壤中 PAHs 去除的影响	161
5.2.1	<i>Massilia</i> sp. Pn2	162
5.2.2	<i>Sphingobium</i> sp. 45-RS2	162
5.2.3	<i>Staphylococcus</i> sp. BJ06	163
5.2.4	<i>Serratia</i> sp. PW7	164
5.2.5	<i>Mycobacterium</i> sp. Pyr9- <i>gfp</i>	164
5.2.6	复合功能菌促进土壤中 PAHs 去除	165
5.3	接种功能内生细菌对植物体内酶系活性的影响	166
5.3.1	<i>Massilia</i> sp. Pn2	167
5.3.2	<i>Sphingobium</i> sp. 45-RS2	169
5.3.3	<i>Serratia</i> sp. PW7	171
5.4	功能内生细菌根表成膜阻控植物吸收积累 PAHs	175
5.4.1	<i>Massilia</i> sp. Pn2	175
5.4.2	<i>Sphingobium</i> sp. 45-RS2	176
5.4.3	<i>Mycobacterium</i> sp. Pyr9- <i>gfp</i>	177
	参考文献	178

1 功能内生细菌及其对植物 PAHs 污染的调控作用

土壤是农业生产的基础、人类赖以生存的最基本的物质条件。但当前许多国家存在土壤污染问题。在我国,耕地资源十分紧张,污染土壤面积较为广阔;2014 年国家环境保护部和国土资源部联合发布的《全国土壤污染状况调查公报》(以下简称《公报》)中指出,“全国土壤环境状况总体不容乐观,耕地土壤环境质量堪忧,全国土壤中污染物总超标率为 16.1%,其中耕地土壤点位超标率为 19.4%”。土壤污染的危害极大,它不仅直接导致粮食减产、加剧我国人多地少的矛盾,而且污染物可通过食物链危及生态安全和人群健康。土壤污染问题已成为影响农产品安全、制约农业可持续发展、关系国计民生的重大环境问题之一。

PAHs 是一类具有“三致”效应的有机污染物,易在土壤中累积。Jones 等(1989)研究表明,从 1846 年到 1986 年的 140 年间,威尔士农田土壤中 PAHs 总量从 0.3 $\mu\text{g/g}$ 上升至 1.8 $\mu\text{g/g}$,上升了 5 倍;日本大阪市土壤中测得的苯并[a]芘含量达 1.19~4.93 $\mu\text{g/g}$ (葛成军等,2006)。多环芳烃(PAHs)已成为我国土壤环境中常见的一类重要污染物,农田面源污染突出。《公报》中指出,“我国土壤中 PAHs 点位超标率达 1.4%”。土壤受污染后,PAHs 可在土壤-植物系统中迁移,进而危及农产品安全和人群健康。2005 年针对津、鲁地区的调查结果表明,谷物中苯并[a]芘的含量达 13.2 ng/g ,是国家标准的 2.6 倍(Tao et al., 2006);2007 年广州市污染区蔬菜中 16 种 PAHs 总量达 558 ng/g (Wang et al., 2012),广西省污染区玉米中 16 种 PAHs 含量则达 124 ng/g (佟玲等,2009)。显然,PAHs 污染问题已成为影响农产品安全的主要障碍之一。研究者多是从污染土壤修复的角度来去除土壤中 PAHs,进而降低其向植物迁移的风险;然而,我国 PAHs 污染土壤面积巨大,污染土壤修复工作往往受技术、成本等多种因素制约。能否采用化学和生物手段来直接去除污染区植物体内 PAHs 以降低植物 PAHs 污染风险,进而保障农产品安全?近年来该领域研究引起重视。

植物内生细菌能够定殖在健康植物组织内,并与寄主植物建立和谐联合关系。1992 年, Kleoppper 等第一次提出了植物内生细菌的概念:植物内生细菌是指从植物体内分离出的、在不改变植物功能和特征的同时能够在健康植物内良好定殖的一类微生物(Kleoppper et al., 1992),其不会对宿主植物造成任何负面影响,并与寄主植物之间存在互利共生关系。地球上现存的近 300 000 种植物中,几乎每种植物体内均存有一种或多种内生细菌(Strobel et al., 2004),表现出丰富的生物

多样性 (Suto et al., 2002)。与从土壤中筛选的功能细菌相比, 植物内生细菌能更有效地在植物体内定殖。近年来的研究已证实, 筛选具有降解 PAHs 特性的功能内生细菌, 并将其定殖在目标植物上, 有望消除植物 PAHs 污染。本章在简要介绍植物对 PAHs 吸收积累作用的基础上, 概述了功能内生细菌减少植物 PAHs 污染的相关进展。

1.1 植物对 PAHs 的吸收积累作用

1.1.1 植物吸收 PAHs 的基本过程

植物可以以被动或主动方式吸收有机污染物, 土壤中 PAHs 进入植物体内主要有两种途径 (图 1-1): 根系从土壤中吸收 PAHs、并随蒸腾流沿木质部向茎叶传输; PAHs 从土壤挥发到大气后, 植物地上部分吸收空气中 PAHs。

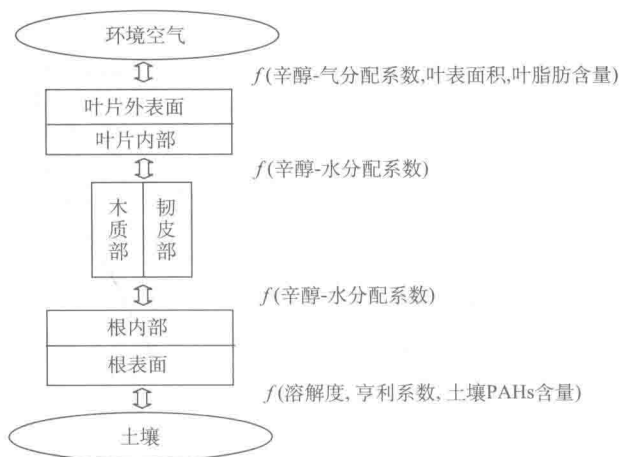


图 1-1 植物吸收 PAHs 基本过程 (Simonich and Hites, 1995)

植物根系从土壤中吸收 PAHs 可分为两个过程。一是 PAHs 从土壤固相中解吸出来进入土壤溶液中, 随着溶液与植物根系的接触, PAHs 扩散到根系表面自由空间, 并吸附在根系表皮外部; 二是 PAHs 通过质外体或者共质体途径, 依次经过表皮、皮层、内皮层、维管组织等进入根系内部组织中, 并在此过程中发生分配、代谢等各种过程 (林庆祺等, 2013; Gao et al., 2011a)。一般认为, 持久性有机污染物主要通过被动吸收进入到植物根系, 其迁移动力来源于蒸腾拉力 (Paraíba, 2007)。植物对 PAHs 的被动吸收可看作 PAHs 在土壤固相-水相、土壤水相-植物水相、植物水相-有机相间一系列分配过程的总和 (Chiou et al., 2001;

Gao et al., 2008; Ryan et al., 1988)。近年来,有学者发现,一些植物根系也可主动吸收低相对分子质量 PAHs (Zhan et al., 2010)。

植物茎叶也可以直接吸收挥发到空气中的 PAHs。空气中 PAHs 主要以气态或与气溶胶、颗粒物等结合态存在。气态 PAHs 经叶片气孔直接被吸收进入植物体,附着在大气颗粒物等的 PAHs 可以通过干湿沉降过程聚集在植物叶片表面,再通过扩散作用进入叶片内部,扩散到细胞间隙后在临近亲水或疏水组织中进行分配。Wild 等 (2006) 采用双光子激光共聚焦显微技术观察了菲从空气进入玉米和菠菜叶内部的过程及其在叶片中的分布,发现空气中菲既可以气态形式被吸收,也可通过颗粒沉降在叶片表面再扩散进入叶片中。

植物吸收积累 PAHs 与植物种类和组成、土壤环境条件、PAHs 性质等有关。

植物种类是影响其吸收 PAHs 的主要因素之一。植物种类不同,其对 PAHs 的吸收积累亦存在差异,即使同类植物在不同环境下也会有所差别。禾本科植物比木本科类植物更易吸收积累 PAHs; 这是由于须根比主根有更大的比表面积,且通常处于土壤表层,而表层土壤中 PAHs 含量多高于深层土壤 (孙铁珩等, 2001)。植物根系类型不同,根的比表面积、根系分泌物、酶、根际微生物等会有差异,这导致根际土壤中 PAHs 降解不同,进而影响植物根系吸收行为 (林道辉等, 2003)。由于不同植物的脂质含量存在差别,而辛醇的性质与生物脂质相似,因此,研究人员普遍利用辛醇-水分配系数 (K_{ow}) 来代替脂质-水分配系数 (K_{lip}), 用于表征 PAHs 等亲脂性有机污染物在脂相和水相间的分配行为 (Stales et al., 1997)。研究发现,植物根系积累 PAHs 与该植物脂质含量呈显著正相关 (Gao and Collins, 2009; Gao and Zhu, 2004; Gao et al., 2005)。植物根系吸收 PAHs 不仅与植物脂质有关,还与根系碳水化合物、细胞壁成分等因素有关。Zhang 等 (2009) 发现,尽管 K_{lip} 能够比 K_{ow} 更准确地评价脂质对 PAHs 的富集能力,但是碳水化合物在植物中质量分数占比大 (例如,在黑麦草根部分占比约为脂质的 98 倍)。有学者发现,细胞壁成分 (纤维素、果胶等多糖物质) 也是影响植物根系 PAHs 积累的一个重要原因; Chen 等 (2009) 发现,小麦根的细胞壁比其他成分具有更高的菲亲合力和更低极性,3 种小麦细胞壁成分 (果胶和两种半纤维素) 对菲的吸附能力分别与它们自身的芳香化程度和极性呈极显著正相关和负相关,这也从侧面反映了以碳水化合物为主的细胞壁在根系富集 PAHs 时的重要作用。植物组成也会影响植物茎叶从空气中吸收 PAHs, 茎叶从空气中吸收 PAHs 的量 (C_p , ng/g) 为针叶 > 阔叶 > 种子, 与其脂质含量 (f_{lip}) 正相关; 当用 f_{lip} 标化后 (即 C_p/f_{lip}), 针叶、阔叶和种子的 PAHs 含量差异大大降低 (Hermanson and Hites, 1990)。

土壤不仅是有机污染物的汇,也是植物生长的基本载体。土壤质量优劣直接影响植物生长状况,这必然会在植物吸收污染物中有所反映。以植物对 PAHs 的

直接吸收为例,其吸收作用取决于植物对 PAHs 的吸收效率和植物生物量;吸收效率与植物、PAHs 固有性质有关,而生物量则取决于土壤的土宜状况(土壤肥力、土壤质地、酸碱度、通气性、有机质含量、微生物群落组成等)(Gao et al., 2003)。土壤有机质含量、矿物组成、酸碱度等理化性质会影响植物吸收 PAHs。Chiou 等(2001)认为,植物对亲脂性有机污染物的吸收作用与土壤有机碳含量呈负相关。土壤中矿物质和有机质的含量是影响有机污染物生物可利用性的两个重要因素,矿物质含量高的土壤对离子型有机污染物的吸附能力较强,并降低其生物可利用性;有机质含量高的土壤会吸附或固定 PAHs 等疏水性有机物,从而降低其生物可利用性(Gao et al., 2006)。土壤有机质含量越高,对 PAHs 吸附越强,土壤中 PAHs 生物可利用性越低,植物吸收越少。植物吸收 PAHs 与土壤污染强度有关。Petersen 等(2002)报道,几种作物对土壤中苯并[a]芘的富集系数一般小于 0.004,且随土壤苯并[a]芘污染负荷的提高而减小。Gao 和 Ling (2006)研究发现,植物根部的 PAHs 含量与土壤中 PAHs 含量间呈正相关。

PAHs 理化性质也会影响植物吸收 PAHs。植物吸收 PAHs 与 PAHs 的 K_{ow} 、分子大小、亨利系数(H)、半衰期、浓度等理化性质有关。Ryan 等(1988)指出 $\log K_{ow}$ 为 1~2 的有机污染物最有可能在植物体内迁移;而 $\log K_{ow} > 5.0$ 的有机物主要被土壤或植物根部吸附,难在植物体内迁移。可用 $\log K_{ow}$ 近似反映有机物在土壤-植物系统中的迁移行为: $\log K_{ow} \leq 1$ 的有机物易溶于水,可在植物木质部或韧皮部流动; $\log K_{ow}$ 在 1~4 的有机物易被根吸收,可在植物木质部流动,但不能在韧皮部流动; $\log K_{ow} > 4$ 的有机污染物大量被根吸收积累,但难传输至地上部分。PAHs 的相对分子质量和分子结构也影响了植物对其吸收。植物一般容易吸收相对分子质量小于 500 的有机物、而不易吸收相对分子质量较大的非极性有机物(林道辉等, 2003)。PAHs 分子结构的不同,对植物的毒害作用也不同,这影响了植物根对其的吸收。植物茎叶吸收与 PAHs 的辛醇-气分配系数(K_{oa})以及亨利系数(H)等相关(Chiou et al., 2001; Hung et al., 2001)。疏水性较强、蒸气压较大的污染物易从土壤挥发至环境空气,并以气态形式通过叶片气孔被植物吸收。Kipopoulou 等(1999)报道,植物茎叶对 PAHs 的富集系数与 PAHs 的蒸气压(P)呈显著负相关,与辛醇-气分配系数(K_{oa})呈显著正相关。Simonich 和 Hites (1995)综述了植物吸收环境空气中有机污染物的行为:茎叶吸收环境空气中有机污染物与污染物的 K_{oa} 、 H 、茎叶比表面积和脂肪含量密切相关。

吸收后的 PAHs 可进一步在植物亚细胞中分配。Wild 等(2005)利用激光共聚焦荧光显微镜观察发现,PAHs 可透过细胞壁进入细胞液泡中,由于液泡区室化作用而储存于液泡中。从亚细胞的水平上来看,理论上植物为了避免 PAHs 的毒害可表现出选择性分布。Kang 等(2010)和陈冬升等(2010)采用温室水培试

验方法,研究了黑麦草、苏丹草、墨西哥玉米、高羊茅、三叶草等植物根亚细胞中菲的分配作用,发现随着培养液中菲浓度增大,植物根、细胞壁、细胞器中菲的含量提高,富集系数则降低;菲主要分配于植物亚细胞的固相组分中,5种植物根亚细胞中菲分配的比例大小顺序为细胞器>细胞壁>可溶部分;尽管细胞器在植物组成中占比较小,但由于细胞器具有较高的脂质含量,其对菲的富集能力强于细胞壁。

吸收后的 PAHs 在植物体内被部分代谢。姜霞等(2001)采用封闭培养箱系统,应用同位素示踪技术研究了 ^{14}C -菲在“植物-火山石-营养液-空气”系统中的迁移转化:在该系统各部分中 ^{14}C 的放射性强度大小为根(38.55%)>挥发性有机代谢物(17.68%)>火山石(14.35%)> CO_2 (11.42%)>茎叶(2%),而母体形态(parent compound)的菲含量为根>茎叶>火山石>营养液。Gao 等(2013)和张翼等(2010)采用水培试验方法以黑麦草为供试植物证实了植物对蒽的代谢作用,发现根部是代谢蒽的主要部位,蒽的一级代谢产物蒽醌和蒽酮可以由根系向培养液中释放,也可由根向茎叶传输。酶是植物代谢 PAHs 的主要媒介。PAHs 低污染强度刺激了植物体内酶活性的提高,但高污染强度则使植物受害、酶活性降低(卢晓丹等,2008)。Ling 等(2012)剖析了与植物代谢 PAHs 密切相关的几种酶系在亚细胞中的分配行为,发现 PAHs 污染胁迫下植物根和茎叶细胞液中总酶活性占比最高,但细胞壁具有最大的比酶活性。一系列酶系在植物代谢 PAHs 过程中起重要作用。具有木质素降解酶系——漆酶的白腐菌可以降解 PAHs;有报道指出,经纯化后的漆酶可以氧化多种 PAHs,用纯漆酶液处理 72h,芘去除率高达 35%,蒽和苯并[a]芘分别被氧化 18%和 19%(Majcherczyk et al., 1998)。过氧化物酶(POD)是氧化有机污染物的重要酶。Gao 等(2012)发现,辣根过氧化物酶可以降解溶液中萘、蒽和菲,并提出通过调节植物酶系活性可调控植物对 PAHs 的代谢过程,这为污染区规避植物 PAHs 污染风险提供了途径。

1.1.2 植物吸收 PAHs 的调控

抑制剂和安全剂可调控植物对 PAHs 的吸收积累和代谢。研究者发现,通过调节植物酶活性,可调控植物对有机污染物的吸收积累和代谢过程。其中,代谢抑制剂能显著地提高除草剂等的植物活性,如甲吡酮、胡椒基丁醚、1-氨基苯并三唑等可通过抑制细胞色素 P450 单加氧酶的活性而增进除草效果(Banerjee et al., 1999);安全剂则能在不影响农药对靶标植物(如杂草)活性的前提下,增强作物体内细胞色素 P450 酶活性、诱导农药代谢,或增加作物体内谷胱甘肽-S-转移酶和谷胱甘肽的含量,促进农药与谷胱甘肽缀合而解毒(Badiani et al., 1990)。Gao 等(2012)和龚帅帅等(2011)以高羊茅(*Festuca arundinacea*)为供试植物,

利用水培体系研究了抑制剂和安全剂对植物根中过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性以及菲代谢的影响,供试安全剂为浓度0.3%的NaCl,抑制剂为浓度2.00 mg/L的抗坏血酸(VC);发现安全剂作用下植物根部PPO和POD的活性略高于对照,VC显著抑制植物根中菲的代谢,降低了高羊茅根部PPO和POD的活性,抑制剂对植物根中POD和PPO活性的抑制效率与根部菲代谢抑制效率呈显著正相关。

表面活性剂则可通过改变PAHs的溶解度和生物可利用性而影响植物对PAHs的吸收积累。高彦征等(2004)采用水培试验研究发现,低浓度Tween 80(<13.2 mg/L)能显著增强黑麦草和红三叶吸收溶液中的菲和芘,浓度为6.6 mg/L时促进作用最强,根和茎叶中菲和芘含量、积累量、富集系数为无Tween 80对照处理的216%;高浓度Tween 80(>39.6 mg/L)则会抑制根和茎叶吸收积累菲和芘。Gao等(2008)通过添加非离子型表面活性剂Brij 35研究了黑麦草对菲和芘的吸收作用,得出添加低浓度(≤74 mg/L)Brij 35促进黑麦草对菲和芘的吸收与积累,而高浓度(≥148 mg/L)Brij 35则抑制了植物对菲和芘的吸收。Zhu和Zhang(2008)则通过水培实验研究了生物表面活性剂鼠李糖脂对植物吸收PAHs的影响,发现添加低浓度(0~25 mg/L)鼠李糖脂促进了黑麦草根系对PAHs的吸收。

近年来,一些研究者尝试采用微生物技术来调控植物吸收积累PAHs。

丛枝菌根真菌(AMF)是土壤微生物区系中生物量最大、最重要的成员之一,与外生菌根相比,AMF能与80%以上的陆生植物和绝大多数速生草本植物形成共生体系(李秋玲等,2006)。AMF在改善植物营养状况、促进植物生长、增强植物抗逆能力等方面作用显著(肖敏等,2009)。已有资料表明,接种AMF能显著地促进土壤中PAHs降解、并影响植物吸收PAHs(李秋玲等,2008;孙艳娣等,2012)。Leyval和Binet(1998)研究发现,土壤中含有5 g/kg PAHs时只有接种AMF的黑麦草才能存活。刘世亮等(2004)发现,种植紫花苜蓿的土壤中,接种AMF(*Glomus caledonium*)后土壤中可萃取态苯并[a]芘的降解率要远高于不接种对照。从已有的资料来看,AMF可显著影响植物对PAHs的吸收和分配。Wu等(2009)研究发现,接种AMF(*Glomus etunicatum*、*Glomus caledonium*)可提高玉米根中菲的积累量,但却降低了其茎叶中的含量。程兆霞等(2008)研究得出,接种AMF(*Glomus mosseae*、*Glomus etunicatum*)可显著地提高三叶草根的芘含量、积累量和根系富集系数,但对辣椒的影响并不显著,这主要与植物的菌根感染率和“菌根依赖度”不同有关。Gao等(2011b)发现,接种AMF(*Glomus mosseae*、*Glomus etunicatum*)降低了紫花苜蓿地上部菲和芘的含量。AMF菌丝是直接联系土壤和植物根系的桥梁,在植物污染生态、植物营养中作用显著。Gao等(2011a)揭示了AMF菌丝在植物吸收PAHs中的作用和功能,发现数量庞大的AMF菌丝

可从土壤中吸收 PAHs 并将其传输至根部, 传输效率与 PAHs 性质密切相关, 相对分子质量小、溶解度大的 PAHs 更易被传输; 与植物根相比, 菌丝对 PAHs 的分配系数 (K_d) 要比根高 2~4 倍, 其富集 PAHs 后进一步将其传输至根中, 这是导致接种 AMF 促进根部积累 PAHs 的根本原因。AMF 菌丝减低了植物体内 PAHs 由根部向地上部的传输能力, 进而降低了植物地上部 PAHs 污染的风险。

微生物在植物根表形成的生物膜可以影响植物吸收 PAHs。根表是根系吸收污染物的重要窗口。研究发现, 植物根表细菌能产生植物激素, 促进植物生长, 提高植物对矿物质的吸收, 且植物根表细菌的代谢产物可以作为营养物质被植物吸收, 产生抗性物质抵抗和抑制病原体 (Rudrappa et al., 2008)。细菌的成膜作用可以增强 PAHs 等有机污染物的生物可利用性。Johnsen 和 Karlson (2004) 发现, 绝大部分供试 PAHs 降解细菌皆可在 PAHs 晶体表面形成生物膜, 该生物膜的形成对提高难溶性 PAHs 的生物可利用性具有重要作用, 是其克服 PAHs 晶体分子转移并利用难溶性 PAHs 生长的主要机制。Seo 和 Bishop (2007) 在研究菲降解菌在不溶性菲表面的成膜作用时发现, 产生胞外聚合物 (exopolysaccharide, EPS) 形成生物膜是细菌利用难溶性 PAHs 的主要手段。盛月惠 (2015) 分离筛选获得了具有菲降解功能的细菌 *Sphingobium* sp. 45-RS2, 发现该菌株在紫花苜蓿根表的定殖和成膜作用促进紫花苜蓿的生长、并显著降低植物体内菲含量和积累量。顾玉骏 (2015) 用绿色荧光蛋白基因 (*gfp*) 对获得的具有芘降解能力的 *Mycobacterium* sp. Pyr9 进行了标记, 发现标记菌株 (Pyr9-*gfp*) 对芘的降解能力没有显著变化, 菌株 Pyr9-*gfp* 可以在三叶草根表定殖并形成细菌生物膜, 根表 Pyr9-*gfp* 可以进入植物根部组织, 并在植物体内增殖, Pyr9-*gfp* 在三叶草根表的定殖可以显著提高植物茎叶和根部生物量, 降低植物体内芘含量、积累量及富集系数, 也显著提高了土壤中芘的去除率。利用根表细菌成膜技术有望阻控和降低植物 PAHs 污染风险。

筛选具有 PAHs 降解功能的植物内生细菌、并将其重新定殖到植物体内, 有望降低或消除植物 PAHs 污染的风险。近些年来, 该领域研究受到关注。

1.2 植物内生细菌

1.2.1 植物内生细菌及其多样性

1866 年德国科学家 De Bary 首先提出 “Endophyte” 的概念, 在植物体内的微生物均为内生细菌。1992 年, Kleopfer 等 (1992) 提出 “植物内生细菌” 的概念, 即从植物体内分离出的、在不改变植物特征和功能的同时能够良好定殖在健康植物体内的一类细菌, 植物内生细菌对宿主植物不造成任何负面影响及实质性危害,

并与宿主植物存在互利共生关系。

几乎所有健康的植物体根、茎叶等各个器官、组织的细胞或间隙中都存在不同种类的植物内生细菌,表现出丰富的生物多样性(Suto et al., 2002)。自20世纪中叶以来,从各种农作物和经济作物中分离筛选的植物内生细菌已达120余种,分为50多个属,主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)等(Sturz et al., 1999)。例如,Hironobu和Hisao(2008)对从水稻各个组织中分离到的30株内生细菌进行序列分析,结果显示这些植物内生细菌可分为6大种属。

植物体内的内生细菌主要是外界细菌通过植物表面、体表自然开口或伤口、种子、根部裂隙等进入植物的(Kluepfel, 1993; Lodewyckx et al., 2002; McCully, 2001),也可来源于植物的致病虫等(Ashbolt and Inkerman, 1990)。土壤细菌从根部入侵是内生细菌进入植物的主要途径,细菌通过根部进入植物后扩散到茎、叶等地上组织中(Compant et al., 2010),因此内生细菌的多样性一定程度上取决于根际细菌的多样性(Berg et al., 2005)。Seghers等(2004)研究发现,植物根部和茎部中栖息的内生细菌有许多与土壤细菌的分类单位相同,且根部细菌数远大于茎叶,表明大部分内生细菌来源于植物根际,并由此进入植物组织。内生细菌的多样性、分布受宿主植物及植物生长环境的影响。污染胁迫是影响植物内生细菌群落结构的重要环境因素之一。王陶等(2010)研究发现,与对照相比,喷洒有机农药恶霉灵的小白菜茎中内生细菌多样性明显增加,根部内生细菌多样性有所增加,而叶部内生细菌多样性为先增加后降低;Phillips等(2008)发现,在烃类污染土壤中生长的不同植物体内内生细菌群落结构各不相同,部分内生细菌可能对植物代谢烃类污染物的能力有一定影响。

在植物内生细菌多样性研究方法方面,主要有以下两类:一类为传统的涂布分离培养方法,另一类是随着分子生物学技术而发展起来的非培养方法。

传统的分离培养方法是研究植物内生细菌最常用的手段之一,对微生物种群类别、特别是在新物种资源的发现方面有着举足轻重的作用。传统培养法分离植物内生细菌的步骤主要为:植物表面消毒、研磨、培养、分离、纯化,最终得到单一内生细菌的菌落。虽然传统分离培养方法较为方便快捷、直观且经济易行,但它也有其不足及需要改进的地方。传统的分离培养方法的主要缺点是无法分离出一些尚不可培养的微生物,因而其不能完全准确地判断植物体内内生细菌的种类与数量。同时,灭菌时间、消毒剂、培养基及培养温度的选择等过程均会影响内生细菌的分离结果(彭安萍, 2014)。

自然界中绝大多数微生物尚不能利用现有的培养技术分离获得,目前利用传