

根际微生物研究进展^①

陆雅海, 张福锁

(中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘要: 根际是土壤-植物生态系统物质交换的活跃界面。植物作为第一生产者同化大气 CO₂, 将部分光合产物转运至地下, 激发土壤微生物的生长和新陈代谢; 土壤微生物则将有机态养分转化成无机形态, 利于植物吸收利用。这个植物-微生物的互作关系维系和主宰着陆地生态系统的功能。自从 100 年前德国科学家 Lorenz Hiltner 提出根际概念以来, 根际研究方兴未艾, 研究内容不断得以丰富和发展。近年来, 随着分子生物学在土壤环境领域的应用, 根际微生物研究出现快速发展的趋势。本文根据 2004 年在慕尼黑召开的第一届国际根际大会交流内容、结合近年来国际上报道的研究动向, 对根际微生物研究方法、根际微生物生物多样性和生态功能、转基因生物的环境安全和根际微生物生物修复技术等内容作一综述。期望我国的根际微生物研究能在基础和应用领域得到快速发展。

关键词: 根际; 微生物生态; GMOs; 根际生物修复; 16S rRNA; 18S rRNA

中图分类号: S154.3

1904 年, 德国微生物学家 Lorenz Hiltner 提出了根际概念, 他将根际定义为根系周围、受根系生长影响的土体。100 多年来, 根际研究方兴未艾, 根际概念也不断得以丰富和完善。为纪念根际概念诞生 100 周年, 亦为交流根际研究的最新进展, 2004 年 9 月在 Hiltner 的故乡、也是他曾工作多年的城市—慕尼黑召开了第一届国际根际大会。450 多位国际根际研究专家参加了会议, 会议分成 16 个分会, 共有 113 个会议报告和 308 个墙报展示。微生物是整个会议交流的重点, 共有 9 个分会、69 篇会议报告和 192 篇墙报报告微生物的研究进展, 分别占总数的 56%、61% 和 62%。现根据会议交流情况结合近年来国际上根际微生物的研究动向, 对根际微生物研究的最新进展和面临的挑战作一概要综述。

1 根际微生物研究方法进展

环境微生物的生物多样性过去通常是用分离和培养技术加以研究的。近 20 年来, 分子生态技术迅速发展, 通过对环境 16S rRNA 基因进行的大量研究表明, 微生物生物多样性远比用传统方法估计的要高^[1]。微生物工作者惊奇发现环境中绝大部分

微生物实际上从没有得到过培养, 这些未培养的微生物与已培养的种群在系统发育上存在很大差距^[2]。根际与其他生境一样, 用分子生态方法证明根际微生物不仅具有丰富的多样性, 而且含有大量未培养的微生物种群^[3]。但是尽管在包括根际在内的不同生境中发现了大量未培养微生物, 对这些微生物在环境中的功能目前仍了解很少。大部分根际过程的微生物学机理尚不清楚。深入理解根际微生物生化过程和植物-微生物相互作用的机理仍然是根际微生物工作所面临的重大挑战。近年来分子生态方法已取得了一系列新的突破性进展, 这些新方法使探索根际微生物不同个体的生态功能成为可能。

Hurek 等^[4]提出测定环境微生物新陈代谢中的关键基因能提供微生物群体的功能信息。例如固氮基因特别适合于进行固氮微生物的系统发育分析。建立功能基因文库可揭示根际微生物的功能多样性。mRNA 实时定量分析则可预测功能基因的表达水平。Martin 等^[5]认为功能基因组学正在使生物机理研究有了突飞猛进的进展。功能基因组学是分析有机体的所有遗传物质, 并将遗传信息与有机体的形态和功能联系起来。通过以基因组学为基础, 在不同水平上分析转录组学、蛋白组学和代谢组学,

^①基金项目: 国家自然科学基金项目 (40571080)、农业部 948 重大国际合作项目养分资源综合管理技术引进与中国技术体系的建立和应用项目资助。

作者简介: 陆雅海 (1963—), 男, 浙江省上虞市人, 教授, 主要从事土壤微生物学的研究。E-mail: yhlu@cau.edu.cn

有可能使生物共生关系的机理研究取得突破性进展。但是基因组学在共生菌根菌、细菌-真菌-植物多级营养关系的研究上还面临着许多技术上的困难。将有机体之间的相互作用在分子层面上进行剖析,不仅需要单个基因进行了解、还需要对多个基因的相互作用和表达进行研究。基因组学必须要面对这些相互作用的复杂性、面对根际微生物及其共生体随根际生物、物理、化学条件而发生适应变化的复杂性。目前, DNA 芯片技术已在植物和基础微生物学研究方面得到广泛应用,但在根际微生物生态领域的应用尚属起步阶段。Sanguin 等用 16S rRNA 基因芯片技术观测玉米根际的细菌群体结构。他们设计了包含 200 个正核苷酸探针(片段长为 20 碱基)的 DNA 芯片,测试玉米根际和根外土壤的微生物群体,当以 19 个农杆菌(*Agrobacterium*)序列为目标时,根际 DNA 的杂交水平明显高于根外土壤;但当用广谱性探针时,尽管有 12 个探针的杂交水平高于根外土壤,41 个探针的杂交水平却明显低于根外土壤。Shinano 等亦报道了用于探测根际微生物群体的 DNA 芯片研制工作,通过用人工细菌组合,发现一些细菌,如伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)和芽孢杆菌(*Bacillus*),很容易被 DNA 芯片检测到,但另一些细菌如农杆菌、根瘤菌(*Rhizobium*)和亚硝化螺菌(*Nitrospira*)却难以测到^[6]。这些研究表明用 DNA 芯片技术有可能对根际微生物群体结构和功能进行高通量分析,但是技术本身尚有许多有待完善的地方。

在探索根际微生物功能的研究中,另一个新的方法是将稳定同位素标记技术与分子生态技术相结合。这是一个很有应用前景的方法,在研究植物-土壤生态系统物质流对根际微生物群落结构和功能的影响方面大有用途。根际碳流是土壤微生物多样性的主要驱动力。如何将根际碳流与微生物多样性联系起来一直是根际研究的一个重要命题。Radajewski 等^[7]首次报道稳定性同位素探针在环境微生物生态中的应用,此技术为测定微生物底物利用和功能研究提供了强有力手段,特别适合于根际生物过程的研究。技术要点是首先向受试环境供应¹³C 标记底物,然后从环境提取核酸,用超速离心将核酸分成重核酸(¹³C 标记)和轻核酸(非¹³C 标记)若干部分。用分子生态技术分析¹³C 标记和非标记的核酸,用系统发育分析方法确定‘活跃’和‘非活跃’微生物的种类。此技术可避免实验室

培养而直接原位探测微生物种类的功能。目前此技术已经应用于探测有机污染物的生物分解。Prosser 等认为此技术可用于原位探测参与根际碳流的‘活跃’微生物群落^[6]。Lu 等^[8]用此技术测定了水稻根系的产甲烷古生菌和产乙酸细菌群落。

2 微生物生物多样性和生态功能

2.1 植物-微生物相互作用

在陆地生态系统中,植物是第一生产者,土壤微生物是有机质的分解者。植物将光合产物以根系分泌物和植物残体形式释放到土壤,供给土壤微生物碳源和能源;而微生物则将有机养分转化成无机养分,以利于植物吸收利用。这种植物-微生物的相互作用维系或主宰了陆地生态系统的生态功能。根据碳同位素示踪研究,禾谷类作物一生中,约有 30%~60% 光合同化产物转移到地下部,其中 40%~90% 以有机和无机分泌物形式释放到根际^[9]。Lynch 和 Wipps^[9]将所有从根释放的物质定义为根际淀积,其成分和数量受植物种类、年龄、土壤生物、化学和物理因子的影响。

根际微生物是受植物影响最大的土壤微生物群体。与根外土壤比,可溶性根系分泌物为微生物提供了丰富的有效性碳源。Piutti 等研究了玉米根际微生物群体的季节性变化,在营养生长阶段,根际微生物活性和细菌丰度明显高于根外土壤,但在植物生殖生长阶段,由于根系可溶性碳的释放下降,根际效应随之消失,可培养细菌的生物多样性也明显下降^[6]。Zolotilina 等观察到沙漠野生植物的根际细菌种类比根外土壤多 1.5~3 倍,根际微生物数量在不同植物间有明显差异。Costa 等用 PCR-DGGE 方法对 16S rRNA 和 18S rRNA 基因进行多态分析,发现细菌的 DGGE 指纹在根际和根外土壤有很大差别,根际微生物群体在不同植物间亦有很大差异^[6]。Marschner 等用相似方法研究了根距、土壤 pH、植物类型和共生菌根菌对根际细菌群体结构的影响。发现在玉米根际,离根 2 mm 土壤的细菌群体明显不同于 2 mm 以外土壤;在高粱根际,根系有机酸分泌引起的土壤 pH 变化影响了细菌群体结构;白羽扇翩豆的根际细菌群体结构也与有机酸分泌作用密切相关^[6]。Sharma 等用 PCR-DGGE 方法研究了在中欧地区 3 种主要豆科作物根际微生物的生物多样性,发现发酵性细菌(*Firmicutes*)是所有豆科作物根际丰度最高的细菌种群,其次是变

形杆菌 (*Proteoabacteria*)；作物种类对根际土壤细菌种类的影响十分明显，如豌豆根际缺少 β -变形杆菌，而蚕豆根际缺少 γ -变形杆菌；羽扇豆和豌豆根际的细菌结构比较接近，而与蚕豆根际的细菌结构差异较大^[6]。Deubel 等研究了土壤 pH 和 P 供应状况对 3 种作物（大麦、豌豆、甘蔗）根系微生物的影响，3 种作物根系分泌物的差异导致了根际微生物群落功能的差异^[6]。以上这些研究表明根系分泌物的质和量对根际微生物群落结构和生态功能有很大影响。

根际微生物生物多样性不仅受植物种类、年龄等因子影响，而且也受地上部生物多样性的影响。Kowalchuk 等^[10]研究了地上部-地下部生物多样性的耦联作用。他们认为地上部-地下部的耦联作用随根距离的增大而减弱；地上部生物多样性对土壤微生物结构的影响只在根际有明显反映；若将根际微生物分成植物根紧密结合型（如固氮细菌、菌根菌和内生细菌等）和非紧密结合型（如硝化细菌）两类，植物生物多样性对紧密结合型微生物的影响显著大于非紧密结合型。他们还专门研究了植物种类对未培养微生物如乳杆菌 (*Acidobacterium*) 和疣微菌 (*Verrucomicrobium*) 的影响，发现植物对这些细菌有高度的选择性。这个研究表明植物生物多样性对根际微生物、特别是紧密结合型微生物的生物多样性有很大的调控作用。植物间作套种能增加地上部的生物多样性，这不仅可改善地上部生态功能^[11]，还可促进根际生物多样性。Hiddink 等在 3 种土壤上测试黑小麦和三叶草间作对微生物群体的影响，发现间作降低了黑小麦的发病指数。16S 和 18S rRNA 基因分析表明黑小麦和三叶草单作时，其根际微生物群体有很大差异；但间作后一些三叶草根际特有的微生物出现在黑小麦根际。这些结果表明间作可改变根际微生物群落结构并影响植物健康^[6]。

另一个影响根际微生物生物多样性的重要因子是生活在根际内的其他生物体、如菌根菌和原生动物的影响^[12]。Paul 和 Finlay 研究了森林土壤外生菌根菌对细菌生物多样性的影响。他们采集油松根系的两种菌根菌类型，用 DGGE 技术分析发现与两种菌根菌结合的细菌群体有明显差异。他们认为森林土壤菌根菌的演替变化可能影响了细菌群落结构，从而影响了森林土壤的生物地球化学过程^[6]。Jansa 等将 3 个菌根菌接种到韭葱和蕨藜状苜蓿两类植物，发现单独接种时，3 种菌根菌均能很好定植根

系，但当混合接种时，真菌间发生了竞争^[6]。这些研究表明根际内存在目前还很不清楚的生物间协作和竞争关系，这些关系显然会影响根际不同生物体的群落结构和功能。

2.2 植物有益细菌生物多样性

根际存在着许多对植物有益的细菌群落，包括生防细菌、能生产植物生长激素的细菌和固氮菌等。在农业生态系统中，充分利用这些细菌的生物学潜力将有助于减少化肥和农药投入、促进植物生长、减轻环境污染，实现农业可持续发展。

荧光假单胞菌 (*fluorescent pseudomonas*) 的一些基因型是最常见的生防细菌，它们能生产抗生素氰化氢 (hydrogen cyanide, HCN) 和 2,4-二乙酰基藤蕨酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, PhI)，对许多病原菌有抑制作用^[13]。在两种根腐病程度不同的土壤中，Ramette 等^[14]用分子手段分析了 HCN 合成基因的多态性，发现荧光假单胞菌有很多遗传突变型，土壤 Fe 的有效性可调节荧光假单胞菌的抗生素生产能力。Svercel 等从新老葡萄园（951 年和 1603 年）和葡萄-烟草轮作土壤分离荧光假单胞菌，并进行 HCN 和 PhI 基因的多态分析，发现葡萄根际的 HCN 和 PhI 基因型假单胞菌数高于烟草根际，老葡萄园土壤的 HCN 和 PhI 基因型高于新葡萄园土壤；轮作降低了 HCN 和 PhI 基因型相对于总假单胞菌数的比例；根系分泌物似乎促进了一些生防细菌的发展^[6]。Bergsma-Vlami 等也研究了植物种类（小麦、甜菜、马铃薯和百合）对内生假单胞菌生物多样性和抗生素生产的影响，发现除百合根际外，其他植物均支持了大量生防假单胞菌的生长；用 DGGE 对 *phlD* 基因进行多态分析发现 500 个分离菌株可分成 7 个基因型；某些基因型有很高的植物专一性，但主要基因型没有植物专一性；小麦根际抗生素的生产能力比其他植物根际强^[6]。这些研究表明寄主植物种类对生防菌的成分、动态和活性有一定调节作用。

固氮细菌能将大气 N_2 转变成氨态氮，是重要的植物有益细菌。固氮细菌可分成共生固氮菌和非共生固氮菌。Zakhia 等从 20 个豆科植物分离到 100 多个共生固氮的根瘤菌；部分根瘤菌具有耐盐、耐干旱特性。Sarita 等试图用 *nodC* 基因作为分子标记物，从土壤中提取 DNA 直接进行根瘤菌生物多样性分析，但 *nod* 基因的专一性有待进一步提高^[6]。Rothballer 等用多克隆抗体方法原位测定了草

螺菌 (*Herbaspirillum*) 在植物根系的定植能力, 发现草螺菌分别在 7 天和 14 天后进入芒根皮层细胞和根中局细胞, 扫描电镜观察到这些细菌定植在根细胞间空隙。Ofek 等报道在蚕豆根系, 侧根上有大量草螺菌定植, 但在主根上没有这些固氮细菌^[6]。Nagarajan 等从不同草根分离到 8 个固氮螺菌 (*Azospirillum*), 发现它们的抗盐能力有明显差异^[6]。Heijden 等发现将根瘤菌接种到草原植物后, 根瘤菌不仅增加了植被生物量, 还促进了植被生物多样性。共生关系可能增加了生态系统对稀有资源的有效利用, 从而影响生态系统的生产力和生物多样性^[6]。显然, 根际固氮细菌对环境有不同适应性, 其生物多样性有待开发利用。

伯克霍德氏菌 (*Burkholderia*) 是一类广泛分布的土壤细菌, 对植物的影响既有促进作用也有抑制病害的作用。Levy 等将伯克霍德氏菌定植到豆科植物刺槐种苗, 发现伯克霍德氏菌增加了刺槐的发芽率, 电镜观察发现伯克霍德氏菌在刺槐苗根内外都有生长。白羽扇翩豆从排根释放大量有机酸而增强自身吸 P 能力, Unno 等用植物难以利用的植酸盐作为专性介质, 在白羽扇翩豆根际分离到 300 个植酸盐利用细菌, 16S rRNA 基因分析表明这些细菌属于伯克霍德氏菌。Peix 等报道在豌豆的根际和根外土壤存在溶磷细菌, 在一个测试土壤, 根际溶磷细菌数高于根外土壤^[6]。

2.3 真菌生物多样性

菌根菌与大部分陆生植物形成共生关系: 植物向菌根菌供应光合产物, 而菌根菌则增强植物从土壤吸收难利用性养分的能力。Opelt 等从 3 个不同土壤中分离到 4320 个真菌。这些真菌可根据形态分成 26 类, 其中青霉 (*Penicillium*)、木霉 (*Trichoderma*)、*Plectosporium* 和拟青霉 (*Paecilomyces*) 丰度最高^[6]。群体结构呈现季节性变化, 根际的真菌生物多样性高于根外土壤。Oros-Sichler 等用 DGGE 指纹分析研究了甜菜根际真菌群体的生物多样性, 发现甜菜品种对根际真菌的生物多样性大于土壤类型的影响^[6]。Kamal 发现菌根菌接种可显著减少土著真菌的生物多样性。他们将菌根菌接种到甘蔗根系后, 可分离的土著真菌从 22 种减少到 9 种, 有意思的是, 减少的土著真菌大都属于致病性真菌^[6]。Lumini 等报道长期施用化肥后, 水稻根系失去了菌根菌共生, 但经 5 年连续施用有机肥后, 水稻根系又恢复了菌丝体形成。可以看出,

根际真菌的生物多样性不但受植物影响, 还受外来真菌定植和田间肥料管理等不同因子的影响^[6]。

3 转基因生物环境安全

3.1 转基因植物的生物安全

植物转基因技术正在迅速发展, 许多农业和环境问题有可能通过植物转基因技术得以解决。如马铃薯生产常遇到病害发生, 传统育种方法和田间管理始终难以解决病害问题, 发展以生物防治为目的的转基因马铃薯可能为此提供一个有效途径。再比如植物生物修复是一项受人关注的环境修复技术, 但超积累植物往往生物量低而达不到修复目的。利用转基因技术可能既能促进植物超积累能力、又能提高生物产量。但发展转基因植物的一个重要问题是转基因植物可能带来的生态负效应。目前关于转基因植物对植物和动物的影响有许多研究, 但转基因植物对土壤微生物群体的影响却研究较少。对土壤生态系统, 最令人担忧的后果是转基因植物可能激发或抑制非目标微生物种类, 使土壤微生物群体结构发生变化, 最终导致生态系统功能的改变。Baumgarte 等评价了 Bt 转基因玉米对土壤微生物群体的影响。Bt 毒素能防止玉米毛虫的侵害。转基因玉米连续种植 3 年后, 作者用分子手段分析土壤总细菌、放线杆菌 (*Actinobacteria*)、 α - 变形杆菌和假单孢菌的生物多样性, 发现尽管玉米品种、生育期、和土壤田块均对微生物群体结构产生一定影响, 玉米的转基因特性却没有产生明显影响; 但玉米收获后, 作物根茎残体仍含有较高 Bt 毒素。因此, 对 Bt 转基因玉米的环境评价还应包括收获后的残体影响^[6]。Andreote 等研究了转基因烟草和桉树对根面和根际细菌群体的影响, 发现转基因烟草减少了根际放线菌 (*Actinomycetes*) 丰度, 而转基因桉树使甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 细菌消失了^[6]。Santomassimo 等用盆栽和田间试验测定了几个转基因植物对根际细菌群体结构的影响, DGGE 指纹分析表明所有转基因植物的根际细菌群体明显不同于非转基因植物的根际群体。Villanyi 等用 BIOLOG 方法研究表明, Bt 转基因玉米使根际微生物群体的功能发生了变化^[6]。

3.2 转基因微生物的生物安全

将一些有用基因导入到根际微生物, 促进这些微生物在生物防治、生物固氮和有机污染物的生物

修复中发挥更大作用,是目前环境生物技术令人瞩目的发展方向。这些技术可能在保护环境、促进低投入持续农业的发展中发挥巨大作用。但和转基因植物一样,基因工程细菌在释放之前,必须进行环境生态安全评价。Mark 等^[15]认为安全评价至少应包括对土著假单孢菌、共生固氮菌和菌根菌等植物有益微生物群体的影响,对转基因工程菌的安全评价可用其野生型作对照。

一些荧光假单孢菌株能产生 2,4-二乙酰基藤黄酚(PhI),常被用作生防细菌。但 PhI 产量受复杂的转刻因子和后转刻因子调控,一个相应的基因工程技术是通过修饰这类因子,增强 PhI 生产。欧洲已经研制并准备释放几个荧光假单孢菌的基因工程菌,Girlanda 等^[16]和 Mark 等^[15]对这些工程菌进行安全评价后声明这些工程菌对土著细菌群体的影响与它们的野生型相似。相似地,Viebahn 等以恶臭假单孢菌(*pseudomonas putida*)株 WCS358r 为母本,构建了两株工程菌,以提高抗生素吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)和 2,4-二乙酰基藤黄酚的生产效率。他们将菌种以小麦种子包衣形式释放到土壤,进行连续 4 年试验,然后用 DGGE 进行微生物群体指纹分析,发现工程菌和非工程菌对土壤微生物群体的影响有差异,工程菌对子囊菌(*Ascomycetes*)的几个属产生了特殊影响。荧光假单孢菌株 Q8r1-96 已被用作小麦全蚀病的生防菌^[6]。Blouin 等将 PCA 合成基因导入 Q8r1-96 构建一组新工程菌,这些新工程菌以种子处理方式释放到小麦田间。工程菌在单独接种时,其根际定植和存活能力与 Q8r1-96 相同,但当工程菌与 Q8r1-96 同时接种时,Q8r1-96 抑制了工程菌在根系的定植。所以,增加抗生素的生产并不一定能增加工程菌在根际的定植能力^[6]。

巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)不仅能固氮,而且能生产 Auxin 等植物生长激素。Luyten 等将 IAA(吲哚乙酸)合成基因 ipdC 导入固氮螺菌,以增加 ipdC 基因拷贝数,增加 IAA 合成,促进植物生长。他们将工程菌接种到菜豆后,评价了工程菌对植物根系土著根瘤菌的影响^[6]。Baudoin 等也构建了 ipdC 基因高表达工程菌,他们进行多个工程菌和非工程菌的接种对比试验,发现工程菌对土著细菌群体的影响随实验条件而变。多数情况下,工程菌的影响并不显著^[6]。

有机污染的根际生物修复技术要求所用的生物降解细菌既要有强的根际定植能力,又要在根际高水平表达降解基因。荧光假单孢菌株 F113 是一个生防菌株,能有效定植不同植物的根际。以前的研究表明某些 F113 突变型能表达多氯联苯(PCB)降解基因,但基因表达水平很低。中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)有一个 nodbox4 因子能调节 nod 基因的高水平表达,Villacieros 等将从伯克霍德氏菌克隆的 bph 基因操纵子融合到中华根瘤菌的 nodbox4/nodD1 组合带,然后再导入 F113 基因组,建立新突变体 F113L::1180,此工程菌既保留原有的生防和根际定植能力,又表达 bphC 高水平活性,具备优秀的生物修复潜力^[6]。但其环境生态副作用尚待进一步研究。

4 污染环境的微生物生物修复

4.1 重金属污染

自然选择导致生物体适应进化,如长期生活在污染环境的植物和微生物会形成对污染物的抗性。菌根菌能改善土壤质量和植物生长,接种对污染物有抗性的菌根菌将有利于更好保护植物免受污染侵害。Turnau 等从污染土壤分离菌根菌,将获得的菌根菌接种到蔬菜,降低了植物对重金属的吸收,减少了污染土壤种蔬菜的健康危险性^[6]。Adriaensen 等^[17]比较了污染和非污染森林土壤根际共生菌根菌对重金属的抗性。耐性菌种能有效保护树木对养分的吸收,而敏感型菌种在重金属浓度升高时生长受到抑制,对树木的养分供应显著减少。他们认为树木在重金属污染土壤的生长适应性可能来自于共生菌根菌的遗传变异。砷(As)污染灌溉水是孟加拉国最严重的环境问题。Ahmed 等从孟加拉国 As 污染土壤分离到不同菌根菌和根瘤菌,在 5 个 As 水平土壤进行接种试验。菌根菌增加了植物高度、植物生物量、总叶数、根茎 P 浓度和固氮酶活性,同时降低了根茎 As 含量。这些结果表明根际共生能改善植物 N、P 吸收,同时减少植物 As 毒害^[6]。Barea 等在 Pb、Cd、Ni 污染土壤分离和鉴定主要细菌和真菌种属,得到丰度最高的真菌为 VA 菌根真菌(*glomus mosseae*)、丰度最高的细菌为芽孢短杆菌(*Brevibacillus*)。将 VA 菌根真菌接种到三叶草作物根系增加了植物根、茎干物重和植物 N、P 含量,同时降低了植物茎的含 Cd 量;而接种芽孢短杆菌

则增加了土壤脱氢酶、磷酸酶、 β -糖解酶和植物生长素的活性, 这些酶活性对植物根系生长有促进作用。他们认为接种对重金属污染有抗性的微生物将在改善植物抗性和生物修复上有良好应用前景^[6]。Tugarova 等研究了重金属对 2 个固氮螺菌 (Sp245 和 Sp7) 的影响。Cu(II) 和 Cd(II) 降低了 2 个菌种的 IAA 生产, 降低了它们对植物生长的促进作用。但 Sp7 对重金属有一定抗性, 其抗性可能与重金属诱导的聚羟基丁酸酯 (Polyhydroxybutyrate) 合成有关^[6]。

不同于有机污染物, 重金属难以被土壤微生物降解, 因此重金属污染的一个重要修复途径是通过超积累植物浸提去除土壤中重金属。提高植物浸提效率是植物修复技术的关键。发达的植物根系往往有利于植物吸收土壤重金属, 因此在根际接种能促进植物根系生长的细菌, 将有助于提高植物修复效率。Bosco 和 Picard 从重金属超积累植物香薷草根系分离到 200 个产 auxin 细菌。通过 rDNA 扩增和限制片断分析, 发现产 auxin 细菌的生物多样性丰富, 其中一组丰度较高的荧光假单孢菌属在整个植物生长季节都能检测到, 有潜在的纯化和应用价值^[6]。增加植物对重金属的移动性是提高植物浸提效率的另一有效途径, 促进根系和根际微生物对重金属螯合物的分泌作用有助于达到这一目的。Puschenreiter 等从 Ni 超积累植物遏蓝菜分离和鉴定外生和内生细菌, 发现其中一个内生甲基杆菌 iEIII 能耐高浓度 Ni、生产铁运载体 (Siderophores)、并促进植物生长, 其接种应用价值有待进一步开发。菌根菌能增强植物对 P 和其他养分的吸收能力, As 和 P 有相似的化学性质, 因此菌根菌接种有可能提高超积累植物对 As 污染土壤的修复效率^[6]。Sylvia 和 Alagely 把从污染土壤中分离的菌根菌接种到超积累植物蜈蚣草, 发现菌根菌接种显著增加了植物 As 吸收和植物含 As 量^[6]。

4.2 有机物污染

由于工业、农业和城市污染, 一些土壤的持久性有机污染物如多环芳烃类浓度不断升高。根际生物修复技术因其高效低耗而受到普遍欢迎。但是对植物如何激发根际生物降解的机理目前了解很少, 对降解微生物的种类、根际生态过程、降解基因和降解途径的多样性也只有零星了解。一般认为根系分泌物促进根际微生物的生长和代谢过程, 从而加

强有机物的生物降解。如 Mackova 等将 3 种不同植物种在多氯联苯长期污染的土壤上, 6 个月后, 土壤多氯联苯含量显著降低, 其中烟草土壤的多氯联苯降低最多, 他们发现植物显著增加了土壤细菌总数, 其中烟草和龙葵植物显著增加了多氯联苯降解细菌数。根际共生菌根菌有助于植物养分吸收, 增加植物生长和根系生物量^[6]。Leyval 等认为菌根菌接种促进多环芳烃降解的原因是菌根菌增加了根系生物量、促进了根际降解细菌的生长。他们将 VA 菌根真菌接种到工业污染土壤和多环芳烃加富土壤, 发现多环芳烃浓度在菌根菌接种的土壤低于非接种土壤, 多环芳烃浓度随着根距增加而增加^[6]。

根际不仅分泌一般性有机物, 而且可能产生特殊化合物, 作为降解细菌的底物, 促进降解细菌生长。Leigh 等^[18]通过实验室和温室根箱试验证实从树根释放的芳香类化合物可作为多氯联苯降解菌的底物, 激发它们的生长。所以一般在多年生植物土壤上, 多氯联苯降解菌的丰度较高。他们在 5 类植物根际研究多氯联苯降解菌的动态, 发现植树木土壤的多氯联苯降解菌显著高于非植树木土壤。丰度最高、多氯联苯降解潜力最大的细菌是 G⁺ 的红球菌 (*Rhodococci*)。他们还发现某些树种特别能激发多氯联苯降解细菌的生长。树根化学组成和周转速率可能起重要作用。

在不少情况下, 根际和根外土壤含有大量能降解有机污染物的细菌, 但是有机污染物常常与土壤颗粒和有机物质结合在一起, 其生物有效性很低。所以在实施微生物生物修复时, 首先必须提高有机污染物的生物有效性。有些植物根际能产生鼠李糖脂 (rhamnolipids) 和生物表面活性剂, 这些物质可增加有机污染物的溶解性和移动性, 从而促进微生物降解。

植物和微生物还可能进行协同代谢过程, 如植物释放某种特殊底物, 诱导在降解过程中起重要作用的双氧酶或其他酶的合成。Rugh 等将 18 种植物种在多环芳烃处理土壤上, 发现与对照比, 植物显著增加了多环芳烃的生物降解, 总细菌数和菲 (Phenanthrene) 降解菌也显著增加; 分离到的降解菌比对照土壤的降解菌有更强的降解能力^[6]。Francova 等^[19]从污染土壤分离到 2 个细菌: 睾酮假单孢菌 (*Comamonas testosteroni*) B-356 和伯克霍德氏菌 LB400。用几种多氯联苯衍生物测试细菌的

分解能力和代谢产物，发现多氯联苯降解产生过渡产物氯苯酸，烟草和山葵等植物具有氯苯酸降解能力，所以植物和微生物可联合加强多氯联苯的降解。但大多数情况下，污染物的降解往往有一组微生物联合进行，对这些微生物组合如何在根际进行空间分布并联合代谢目前尚缺乏研究。微点取样方法结合分子生物学技术可能为原位测定微生物群体、研究基因表达提供新的途径。

共生菌根菌能促进植物生长和植物抗胁迫能力，常被用于植物生物修复技术。Sainz 等研究了有机氯农药对根际菌根菌的影响，发现有机氯农药对菌根菌在根表面的定植范围没有影响，但显著降低了根际土壤菌根菌的孢子数和菌丝体密度，说明内生菌根菌可能受到植物保护，免受农药的毒害^[6]。Volante 等研究了菌根菌对单环芳烃降解的影响，把 3 个 VA 菌根真菌接种到菲葱，16 天后，根际单环芳烃浓度降低到加入量的 2%~40%，而在非接种对照植物中，16 天后仍有 75%~95% 单环芳烃滞留。在 3 种真菌中，*G. margarita* 对降解单环芳烃最有效^[6]。Girlanda 等从工业污染土壤分离了 6 个真菌，用土培和砂培试验表明无论菌根菌单独或与植物共生时，均具有较强多环芳烃降解潜力^[6]。

开发基因工程菌是微生物生物修复技术的重要手段。目前一个广为研究的技术是将生防功能和生物降解功能集装在同一工程菌株。如一些荧光假单孢菌拥有一系列基因，控制着生防化合物和植物生长激素的合成，把生物降解基因导入这类细菌将大大增强此类工程菌的应用前景。Boronin 和 Kochetkov 将多环芳烃降解基因导入荧光假单孢菌，产生一组突变体，有些变种的多环芳烃降解能力显著增强。他们再将重金属（如 Ni、Co、Zn、Cd）阻抗质粒导入上述工程菌，构建新一组突变体，发现其中一个突变体的耐 Co 能力比原种高出 6 倍，但没有降低生防功能和多环芳烃降解能力^[6]。在另一个试验，Kochetkov 等将 2 个含降解基因的质粒导入到 4 个假单孢菌种，这 4 个菌种以及它们的突变型呈现不同的生长动力学和质粒稳定性。转化后，pOV 质粒的邻苯二酚双氧酶活性高于 PAS216 质粒，但这些菌种呈现相似的萘（naphthalene）双氧酶活性和水杨酸酯水解酶活性。将带质粒的菌种接种到油菜种子，萘的存在促进了植物生长，而在高萘条件下，对照植物很快死亡^[6]。

此试验表明生防菌与降解质粒重组可更有效促进多环芳烃污染土壤的生物修复。对高度水溶和挥发性有机污染物（如 xenobiotics，异源生物毒素），植物修复技术往往难以达到预期目的，因为在生物降解前，大部分污染物就已经从植物释放到大气。Barac 等^[18]报道了用接种内生工程菌以提高植物修复作用的可能性。许多内生菌在根际能找到相似菌种。他们测试了 2 个洋葱伯克霍德氏菌（*Burkholderia cepacia*）菌株，一个为内生菌，另一个来自根际。将 pTOM 甲苯降解质粒导入到 2 个菌株，发现修饰的内生菌能有效降解甲苯、减少植物毒性、减少甲苯从叶子的挥发，但修饰的根际伯克霍德氏菌只轻微改善了甲苯的降解能力。此试验表明开发内生工程菌可作为提高植物修复作用的一个有效手段。

5 结语

分子生物学技术的应用正在极大地推动着根际微生物研究的迅速发展。16S rRNA 和功能基因的调查分析已经揭示根际存在大量未培养微生物和丰富的生物多样性。植物对根际微生物生物多样性的影响已从不同层面得到更深的认识。分子生态方法亦为评价转基因生物的生态负效应提供有力手段。转基因生物工程技术正在使调控根际生态过程成为可能。但是根际环境随着土壤类型、植物种类和生育阶段存在很大时空变异，根际微生物的生物多样性和功能受土壤、植物等多重因子的复合影响。原位测定根际微生物生物多样性、了解微生物生物多样性与生态功能的关系、探索土壤-植物-微生物的互作关系仍然需要研究手段的深入发展。目前环境基因组学方法正在迅速应用于相对简单的微生物生态系统，如河流、海洋等。这个方法不仅能更准确展示微生物的生物多样性，而且能综合揭示微生物群体的生态功能。分子生态技术与稳定同位素技术相结合的方法亦是原位测定微生物群体结构和功能的有力手段。随着这些方法在根际微生物研究的应用和发展，根际微生物的基础和应用研究一定能在不久的将来获得重大进展。

参考文献：

- [1] Amann, RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 1995, 59:

- 143–169
- [2] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 1997, 276: 734–740
- [3] Prosser JI. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant Soil*, 2002, 244: 9–17
- [4] Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piche Y. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecul. Plant-Micro. Interact.*, 2002, 15 (3): 233–242
- [5] Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: Signals and communication genes. *New Phytol.*, 2001, 151 (1): 145–154
- [6] Hartmann A, Schmid M, Wenzel W, Hinsinger Ph. *Rhizosphere 2004 — Perspectives and Challenges — A Tribute to Lorenz Hiltner*. Munich, Germany: GSF-National Research Center for Environment and Health, 2005
- [7] Radajewski S, Ineson P, Parekh N, Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403: 646–649
- [8] Lu Y, Lueders T, Friedrich MW, Conrad R. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environ. Microbiol.*, 2005
- [9] Lynch JM, Whipps JM. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*, 1990, 129:1-10
- [10] Kowalchuk GA, Buma DS, de Boer W, Klinkhamer PGL, van Veen JA. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 2002, 81: 509–520
- [11] Zhang FS, Shen JB, Li L, Liu XJ. An overview of rhizosphere processes related with plant nutrition in major cropping systems in China. *Plant Soil*, 2004, 260: 89–99
- [12] Johansson JF, Paul LR, Finlay RD. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2004, 48 (1): 1–13
- [13] Preston GM. Plant perceptions of plant growth-promoting *pseudomonas*. *Philosophic. Trans. Royal Soc. London Seri. B-Biol. Sci.*, 2004, 359 (1446): 907–918
- [14] Ramette A, Frapolli M, Defago G, Moenne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol *fluorescent pseudomonads* and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecul. Plant-Micro. Interact.*, 2003, 16 (6): 525–535
- [15] Mark GL, Morrissey JP, O’Gara F. Designing improved GM bacteria for application in environmental biotechnology//Lelley T, Bal’azs. E, Tepfer M. *Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems*. Vienna, Austria: Facultas Verlags-und Buchhandels AG, 2003: 11–24
- [16] Girlanda H, Perotto S, Moëne-Loccoz Y, Bergero R, Lazzari A, Defago G, Bonfante P, Luppi AM. Impact of biocontrol *pseudomonas fluorescens* CHA0 and a genetically modified derivative on the diversity of culturable fungi in the cucumber rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67(4): 1851–1864
- [17] Adriaensen K, Van der Lelie D, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert JV. A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist*, 2004, 161: 549–555
- [18] Leigh MB, Fletcher JS, Fu XO, Schmitz FJ. Root turnover: An important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36 (7): 1579–1583
- [19] Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotech.*, 2004, 22 (5): 583–588
- [20] Francova K, Mackova M, Macek T, Sylvestre M. Ability of bacterial biphenyl dioxygenases from *Burkholderia* sp. LB400 and *Comamonas testosteroni* B-356 to catalyse oxygenation of ortho-hydroxychlorobiphenyls formed from PCBs by plants. *Environ. Pollution.*, 2004, 127 (1): 41–48

The Advances in Rhizosphere Microbiology

LU Ya-hai, ZHANG Fu-suo

(*College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China*)

Abstract: The rhizosphere is the dynamic interface between plant and soil. Through this interface, plants release photo-assimilated substances, which stimulate soil microbial activity. Microorganisms in turn transform the organic nutrients to inorganic forms, facilitating the uptakes by plants. This above- and below-ground feedback interaction constitutes the base for ecological functioning of the terrestrial ecosystems. Great advances have been achieved since the German scientist Lorenz Hiltner defined the term ‘rhizosphere’ 100 years ago. Particularly, the recent development of molecular ecological tools has largely expanded the knowledge of microbial diversity in the rhizosphere. To exchange the proceedings and document the perspectives and challenges in rhizosphere researches, the International Rhizosphere Congress was held September 2004, in Munich, Germany. Here we review the recent advances in: (1) the developments of research methods for rhizosphere microbiology; (2) the biodiversity and function of the rhizosphere microorganisms; (3) the GMOs’ environmental safety; and (4) the rhizosphere bioremediation.

Key words: Rhizosphere, Microbial ecology, GMOs, Rhizosphere bioremediation, 16s rRNA, 18S rRNA