

林欣,王立立,杨平,等.一株溶磷菌对盐地碱蓬修复盐渍土 Cd 污染的促进效应[J].农业环境科学学报,2018,37(5):883–891.

LIN Xin, WANG Li-li, YANG Ping, et al. The promoting effect of phosphorus-solubilizing bacteria on remediation of cadmium-contaminated saline soil by *Suaeda salsa*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(5): 883–891.

一株溶磷菌对盐地碱蓬修复盐渍土 Cd 污染的促进效应

林欣¹,王立立¹,杨平¹,李取生^{1*},徐智敏^{1,2},魏佳¹,周婷¹

(1.暨南大学环境学院,广州 510632;2.暨南大学生命科学技术学院,广州 510632)

摘要:为提高盐渍土 Cd 污染植物修复效率,探讨溶磷菌对盐地碱蓬生长和镉提取效果的影响,采用浸根法收集水培(含 2% NaCl)盐地碱蓬的根系分泌物,将其作为唯一碳源培养 5 株具有 Cd 活化能力的溶磷菌并依据细菌 OD 值绘制生长曲线。挑选繁殖速度较快且溶磷和活化 Cd 能力显著性强($P<0.05$)的大肠埃希菌(*Escherichia*)在 3 个 NaCl 浓度(0.3、6、12 g·L⁻¹)处理下,采用摇瓶实验研究该条件下大肠埃希菌对 Ca₃(PO₄)₂ 和 CdCO₃ 的溶解效应及代谢产物变化。进一步采用 Cd 平均含量为 1.37 mg·kg⁻¹ 的污灌菜园土,在 3 个外源 NaCl 浓度(0、4、8 g·kg⁻¹)处理下,利用盆栽实验研究大肠埃希菌对盐地碱蓬修复盐渍土 Cd 污染的促进效应。结果显示,随盐分增加(0.3、6、12 g·L⁻¹),菌株平均绝对溶磷量(扣除不接菌对照值)分别为 80.19、78.79、77.54 mg·L⁻¹,平均绝对活化 Cd 量依次为 17.84、17.30、19.73 mg·L⁻¹,说明盐分的增加没有阻碍菌株的溶磷功能,且随盐分的增强,可促进 Cd 的活化。不同盐分下菌株的代谢物组成有明显变化,0.3、6、12 g·L⁻¹ 盐分处理下菌株分泌的有机酸分别为 5、10、13 种,分泌的氨基酸分别为 4、8、8 种。其中缬氨酸的量随盐分增加显著增加($P<0.05$)。盆栽实验中,4 g·kg⁻¹ 盐分胁迫下,接菌处理的生物量和根际土壤溶液 Cd 含量较不接菌对照显著增加($P<0.05$),Cd 总活化量平均增加 3.17 倍,全量和 DTPA 提取态 Cd 富集系数平均提高 260%。综上,盐分胁迫下大肠埃希菌可正常生长并促进盐地碱蓬 Cd 富集。

关键词: 溶磷菌;盐地碱蓬;根系分泌物;盐渍地;Cd;修复

中图分类号: X53 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)05-0883-09 doi:10.11654/jaes.2018-0087

The promoting effect of phosphorus-solubilizing bacteria on remediation of cadmium-contaminated saline soil by *Suaeda salsa*

LIN Xin¹, WANG Li-li¹, YANG Ping¹, LI Qu-sheng^{1*}, XU Zhi-min^{1,2}, WEI Jia¹, ZHOU Ting¹

(1.School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2.School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of phytoremediation on cadmium-contaminated saline soil and to explore the effect of phosphorus-solubilizing bacteria on plant growth and cadmium uptake in contaminated soil, root exudates of *Suaeda salsa* were collected from a sterile hydroponic (with 2% NaCl) culture. Five cadmium- and phosphorus-solubilizing isolates were cultivated using the exudates as a unique carbon source in medium. Their growth curves were obtained by determining their OD values. *Escherichia* grew faster and had stronger cadmium- and phosphorus-solubilizing abilities than the rest of the isolates ($P<0.05$). Herein, its changes in ability to solubilize P and Cd from Ca₃(PO₄)₂ and CdCO₃, respectively, and in its metabolic products in three concentrations of NaCl medium (0.3, 6, 12 g·L⁻¹) were studied using a shaking flask experiment. A pot experiment was also conducted in sewage-irrigated garden soil (1.37 mg·kg⁻¹ Cd) pre-treated with three concentrations of NaCl (0, 4, 8 g·kg⁻¹). The promoting effect of *Escherichia* on remediation of cadmium-contaminated

收稿日期 2018-01-15 录用日期 2018-03-21

作者简介 林欣(1992—),女,云南建水人,硕士研究生,从事环境修复技术与应用研究。E-mail: 603448408@qq.com

*通信作者 李取生 E-mail: liqusheng@21cn.com

基金项目 国家自然科学基金项目(41673094) 广东省科技计划项目(2016A020221015)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41673094); The Science and Technology Planning Foundation of Guangdong Province, China(2016A020221015)

ed saline soil by *Suaeda salsa* was investigated. The results showed that *Escherichia* produced 80.19, 78.79 mg·L⁻¹, and 77.54 mg·L⁻¹ dissolved phosphorus and 17.84, 17.30 mg·L⁻¹, and 19.73 mg·L⁻¹ dissolved cadmium, respectively, with the 0.3, 6 g·L⁻¹, and 12 g·L⁻¹ salt concentration treatments. This shows that an increasing concentration of salt had no effect on P release and promoted Cd release. There was obvious change in the composition of metabolites of *Escherichia* under the different salt treatments. With the 0.3, 6 g·L⁻¹, and 12 g·L⁻¹ salt treatments, 5, 10 kinds, and 13 kinds of organic acids and 4, 8 kinds, and 8 kinds of amino acids were released, respectively. The valine content increased significantly with increasing salt ($P<0.05$). In the pot experiment, biomass and Cd content in the rhizosphere soil solution of *Suaeda salsa* with bacterial inoculation treatment increased significantly compared with the control ($P<0.05$), with 4 g·kg⁻¹ salt treatment. The total mobilized Cd in the rhizosphere soil increased by 3.17-fold. The average enrichment coefficient of the total and DTPA-extractable Cd increased by 260%. These results suggest that *Escherichia* grew normally and promoted the accumulation of Cd in *Suaeda salsa* under salt stress. This study provides some useful information regarding remediation of cadmium-contaminated saline soil.

Keywords phosphorus-solubilizing bacteria; *Suaeda salsa*; root exudates; saline soil; Cd; remediation

随着灌溉盐渍化、干旱盐渍化、城市盐渍化,以及咸水入侵等多种自然或人为的影响,全球受盐渍化影响的土壤已达 8.31 亿 hm²[1-2]。由于施肥不当、污水灌溉、大气 Cd 沉降等原因,许多盐渍地又受到 Cd 污染[3-5]。植物修复具有成本低和环境友好等诸多优点,关于利用植物修复 Cd 污染土壤的应用研究卓有成效[6],而对于受 Cd 污染的盐渍土壤,如果采用多为非盐生植物的 Cd 超富集植物,将导致修复过程中修复植物受到盐分胁迫[7],使修复效率降低。盐地碱蓬是一种对盐渍土壤环境有较强适应性的盐生植物,同时其对 Cd 具有耐受性和富集能力[8],可实现盐分和 Cd 同步提取,对修复 Cd 污染的盐渍地具有很大的潜力。

盐渍土的特点之一就是土壤有效磷含量低[9],而根际促生溶磷菌一方面可通过将土壤中难溶态磷转换为植物可直接吸收利用的有效磷[10],缓解因土壤缺磷而制约修复植物生长这一难题,另一方面其可分泌许多物质,其中的维生素、生长素和抗生素等也可直接或间接促进植物生长,同时其分泌的有机酸、表面活性剂、铁载体等物质可活化土壤重金属[11-13],所以通过建立溶磷菌-盐地碱蓬共生体系可从增加修复植物生物量和土壤溶液中离子态 Cd 浓度两方面来强化植物修复。近些年不少有关溶磷菌-植物联合修复的技术已运用于实际修复工程[14],但将这类技术用于受 Cd 污染的盐渍土壤的报道却鲜见,因为盐渍土壤环境对微生物生长有着极大的影响,在盐分胁迫下有的根际微生物会死亡、微生物量降低以及种类减少,但也有的微生物具有很强的环境适应能力[15-16],所以本研究试图筛选出在盐渍环境下仍能正常繁殖的溶磷菌,使其与修复植物形成共生关系,促进植物生长且提高植物修复效率。

本研究收集盐地碱蓬根系分泌物作为筛选溶磷

菌实验中的唯一碳源,模拟土培盐地碱蓬根际营养环境,挑选出生长最好的菌株先进行耐盐性实验,以期微生物接种到盐渍土壤后在盐分胁迫下仍能利用盐地碱蓬根系分泌物为碳源生长繁殖,最终自然定植于其根际,发挥其溶磷和活化 Cd 的作用。然后利用盆栽实验进一步研究溶磷菌-盐地碱蓬对 Cd 污染盐渍土的联合修复效应。为未来修复受 Cd 污染的盐渍地提供科学参考。

1 实验材料与方法

1.1 根系分泌物收集及定性

盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)种子(来源于中国科学院新疆生态与地理研究所)用石英砂育苗一个月后,将幼苗移至 1/4 霍格兰营养液中曝气水培,定期更换营养液时逐渐添加 NaCl 至 2%。一个月后,用去离子水和无菌水洗净根部并放入无菌水中,在曝气光照的条件下水培 6 h[17-18],将水溶液过 0.22 μm 滤膜,先后置于 -80 °C 冰箱和冷冻干燥机中冷冻干燥至 0.3 L,用 GC-MS(SHIMADZU AOC-20i)外标法对根系分泌物进行定性和定量[19]。

1.2 溶磷菌的筛选和耐盐实验

供试的 5 株溶磷菌均来源于中国工业菌种保藏中心(CICC),分别是:不动杆菌(*Acinetobacter*, 编号 CICC10526)、大肠埃希菌(*Escherichia*, 编号 CICC10527)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter*, 编号 CICC10528)、绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*, 编号 CICC21461)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, 编号 CICC23701)。所需培养基:(1)富集培养基(牛肉膏蛋白胨培养基):将 10 g 细菌学蛋白胨、3 g 牛肉膏、5 g NaCl 溶于 1 L 水中,pH 调节至 7.0~7.5 之间,灭菌备用。(2)根系分泌物培养基:向 1 L 去除葡萄糖和 Ca₃(PO₄)₂

的蒙金娜液体培养基^[20]添加 0.256 2 g CaCl₂、0.920 6 g KH₂PO₄ ,pH 调节至 7.0~7.5 之间,灭菌后按体积比 1:1 加入上述收集到的根系分泌物中(培养基的碳源浓度为 0.085 g·L⁻¹) ,混匀备用。(3)无机磷功能培养基 将去除 Ca₃(PO₄)₂ 的蒙金娜液体培养基中的葡萄糖改为 1 g ,量取 0.1 L 上述溶液于装有 0.066 8 g Ca₃(PO₄)₂ 和 0.006 0 g CdCO₃ 的锥形瓶中 ,pH 调节至 7.0~7.5 之间,灭菌备用。

用牛肉膏蛋白胨培养基将 5 株菌于 150 r·min⁻¹、28 °C 的恒温振荡培养箱中富集后,取菌液用高速冷冻离心机于 4000 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min ,弃去上层清液,加入等体积无菌水,混匀,重复 3 次得重悬菌液。向装有 10 mL 根系分泌物培养基的试管中加入 0.2 mL 菌悬液,加塞后放于与上述条件相同的培养箱中,每隔 4 h 取出一根试管用紫外分光光度计在 600 nm 条件下测定菌液 OD 值(以无菌水调零),取样测定至 40 h ,绘制生长曲线。用葡萄糖含量为 1 g·L⁻¹ 的蒙金娜液体培养基分别培养 5 株溶磷菌,7 d 后测定溶磷与活化 Cd 量。依据生长曲线与溶磷、活化 Cd 量挑选出最优后续供试菌株。

按上述方法将挑选出的菌株富集,分别向装有 100 mL 的 3 个 NaCl 浓度(0.3、6、12 g·L⁻¹) 的无机磷功能培养基中加入 2 mL 菌悬液,每个 NaCl 浓度均设置不加菌的空白对照,每个处理 4 个重复,放于与上述条件相同的培养箱中,7 d 后取出菌液用高速冷冻离心机于 4000 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min ,取上层清液过 0.22 μm 滤膜,用钼锑抗比色法^[21]测定水溶性磷浓度,石墨炉原子吸收分光光度计(PE 900T)测 Cd 浓度,GC-MS 分析^[19]菌液代谢物。

1.3 盆栽实验

将采集的污灌菜园土(pH 为 6.28 ,Cd 平均总含量为 1.37 mg·kg⁻¹ ,DTPA 提取态 Cd 含量为 0.57 mg·kg⁻¹) 晒干过筛,根据土壤干重质量和所需盐分含量,将固体 NaCl 溶于去离子水后倒入土壤中拌匀,晒干,过筛。将育苗一个月后的盐地碱蓬幼苗以 3 棵·盆⁻¹ 移栽至装有 500 g 土壤的花盆中,待植株成活后接菌,在 3 个盐分梯度(0、4、8 g·kg⁻¹) 下分别设计接菌、不接菌处理,每个处理 3 个重复。接菌方式为:将挑选出的菌株制得的重悬菌液,以 10 mL·棵⁻¹ 的量用移液枪打入根部土壤中,不接菌处理以相同方式加入等体积无菌水,每 10 d 接菌一次并定期浇水,待生长至 60 d 收获植株。收获的植株用自来水和去离子水洗净,置于烘箱中于 75 °C 烘至恒重。称取 0.3 g 粉碎后的干

样,加 8 mL HNO₃ (质量分数为 68%) ,用微波消解仪(CEM MARS6)消解,同时收集湿润的附着于根际的土壤在转速为 6000 r·min⁻¹ 的高速离心机中离心,取离心液过滤后用于测定根际溶液 Cd 含量^[22] ,用石墨炉原子吸收分光光度计测定土壤根际溶液和植物消解样中 Cd 含量。

1.4 数据处理

采用植物生物量、根和茎叶 Cd 含量作为植物对 Cd 污染盐渍地修复的分析指标。采用 Microsoft Excel 2014 和 IBM SPSS statistics 19.0 进行数据整理和分析,采用 Origin 9 绘图。

总活化量(μg·盆⁻¹)=植物中 Cd 含量(μg·盆⁻¹)+根际溶液 Cd 含量(μg·盆⁻¹)

富集系数=植物地上部 Cd 含量(mg·kg⁻¹)/土壤中对应形态 Cd 含量(mg·kg⁻¹)

转运系数=地上部 Cd 含量(mg·kg⁻¹)/根部 Cd 含量(mg·kg⁻¹)

2 实验结果

2.1 盐分处理下盐地碱蓬的根系分泌物 GC-MS 分析

盐地碱蓬根系分泌物中检测出的有机物种类和含量如表 1 所示,16 种物质中,甘油的浓度最高,为

表 1 盐地碱蓬根系分泌物 GC-MS 分析结果

Table 1 Quantitative and qualitative result of root exudates of *Suaeda salsa*

物质	保留时间	浓度/mmole·L ⁻¹	碳浓度/mg·L ⁻¹
乳酸	8.817	0.025±0.002	0.900±0.072
正癸醇	8.824	0.008±0.003	0.960±0.360
乙醇酸	9.450	0.058±0.005	1.392±0.120
草酸	11.592	0.122±0.007	2.928±0.168
缬氨酸	14.350	0.112±0.007	6.720±0.420
尿素	15.242	0.093±0.008	1.116±0.096
乙醇胺	14.799	0.052±0.002	1.248±0.048
甘油	16.300	1.741±0.008	62.676±0.288
甘氨酸	17.056	0.160±0.008	3.848±0.192
甘油酸	17.861	0.029±0.008	1.030±0.288
丁烯酸	18.345	0.050±0.005	2.390±0.235
丝氨酸	18.710	0.182±0.007	6.547±0.252
苏氨酸	19.411	0.112±0.008	5.359±0.384
苹果酸	22.112	0.015±0.004	0.725±0.192
天冬氨酸	22.890	0.038±0.003	1.837±0.144
邻苯二甲酸	26.725	0.007±0.002	0.637±0.192

注:数值是 3 次重复的平均值与标准误。

Note: Values are given as mean±SD from triplicate determinations.

1.741 mmol·L⁻¹, 是其余物质的 9~262 倍, 浓度最低的物质为邻苯二甲酸, 为 0.007 mmol·L⁻¹。

2.2 不同溶磷菌对根系分泌物碳源响应

如图 1 所示, 5 株菌都能在以盐地碱蓬根系分泌物为唯一碳源的培养基中生长, 且均在 10 h 附近达到稳定期。大肠埃希菌稳定期的 OD 值最大, 为 0.53。阴沟肠杆菌稳定期的 OD 值最小, 为 0.32。大肠埃希

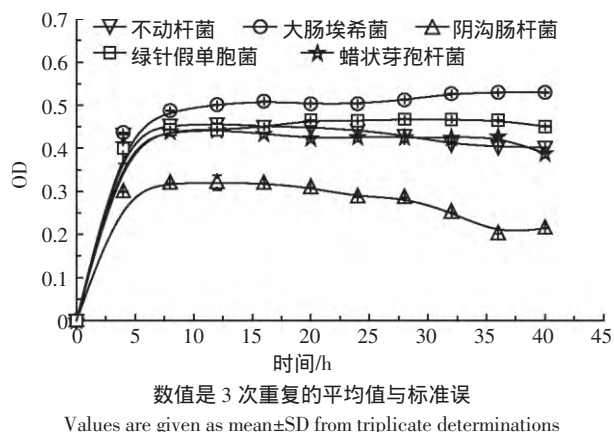


图 1 5 株溶磷菌在根系分泌物培养基中的生长曲线

Figure 1 The growth curve of five phosphate-solubilizing bacteria in culture solution with root exudates of *Suaeda salsa*

菌、不动杆菌、绿针假单胞菌和蜡状芽孢杆菌生长曲线较为接近, 但不动杆菌和阴沟肠杆菌的生长曲线在 28 h 后有下降趋势。如表 2 所示, 绿针假单胞菌和蜡状芽孢杆菌溶磷与活化 Cd 的能力显著低于其余菌株, 加之大肠埃希菌溶磷和活化 Cd 的能力较其余菌表现出显著优势, 综上所述, 选择大肠埃希菌为后续供试菌株。

2.3 不同盐分处理下大肠埃希菌对 Ca₃(PO₄)₂ 和 CdCO₃ 的溶解作用及代谢差异

将大肠埃希菌做耐盐摇瓶实验, 实验结果如图 2 所示, 随盐分的增加, 接菌较不接菌处理下溶磷和活化 Cd 量均显著增加 ($P < 0.05$), 其中两个处理间溶磷量相差 2.0~2.4 倍, 活化 Cd 量相差 4.5~12 倍。从低到高的 3 个盐分处理平均溶磷能力绝对值 (扣除不接菌对照值) 分别为 80.19、78.79、77.54 mg·L⁻¹, 平均绝对活化 Cd 量依次为 17.84、17.30、19.73 mg·L⁻¹。综上所述, 盐分不会阻碍本实验菌株的溶磷和活化 Cd 能力。

不同盐分处理下大肠埃希菌的代谢物存在明显的差异, 如表 3 所示, 丁酸、4-氨基丁酸、亮氨酸、焦谷氨酸、蛋氨酸、络氨酸、棕榈酸在 0.3 g·L⁻¹ 盐分处理下未被检测到, 而在 6、12 g·L⁻¹ 盐分处理下均被检测

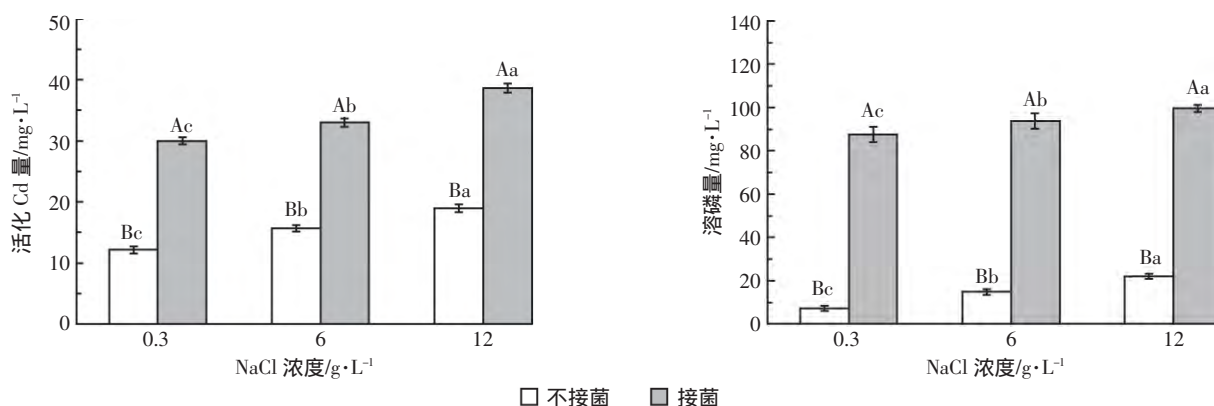
表 2 5 株溶磷菌溶磷和活化 Cd 的能力

Table 2 The ability of dissolved phosphorus and mobilized cadmium of five phosphate-solubilizing bacteria

项目	不动杆菌	大肠埃希菌	阴沟肠杆菌	绿针假单胞菌	蜡状芽孢杆菌
绝对溶磷量/mg·L ⁻¹	70.815±2.375b	80.193±3.595a	54.612±4.494c	3.186±0.224d	2.573±0.142d
绝对活化 Cd 量/mg·L ⁻¹	18.013±0.494b	17.844±0.085b	23.204±0.704a	4.545±0.403c	2.541±0.243d

注: 表中不同小写字母表示不同溶磷菌间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different lower case letters represent the different phosphate-solubilizing bacteria was significant ($P < 0.05$).



不同大写字母代表相同盐分下不同处理差异显著, 不同小写字母代表不同盐分下相同处理差异显著 ($P < 0.05$)

Different capital letters represent the different treatments under same salinity gradients was significant, different lower case letters represent the same treatments under different salinity gradients was significant ($P < 0.05$)

图 2 大肠埃希菌的耐盐实验结果

Figure 2 Salinity tolerant of *Escherichia*

表3 不同盐分处理下大肠埃希菌的代谢产物

Table 3 The metabolites of *Escherichia* under different salt treatments

物质分类	保留时间/min	物质名称	峰面积/ $\times 10^5$					
			0.3 g·L ⁻¹ CK	6 g·L ⁻¹ CK	12 g·L ⁻¹ CK	0.3 g·L ⁻¹	6 g·L ⁻¹	12 g·L ⁻¹
有机酸	11.697	草酸	ND	ND	ND	0.923±0.075b	1.877±0.030a	1.033±0.095b
	24.233	苯基乳酸	ND	ND	ND	2.165±0.116	ND	ND
	20.058	丁酸	ND	ND	ND	ND	0.692±0.073a	0.591±0.030b
	21.165	4-氨基丁酸	ND	ND	ND	ND	0.940±0.062a	0.654±0.031b
	21.511	苹果酸	ND	ND	ND	ND	1.756±0.184	ND
	24.058	异丙基苹果酸	ND	ND	ND	ND	ND	1.613±0.210
	25.325	对羟基苯甲酸	ND	ND	ND	ND	ND	0.464±0.017
	26.298	戊糖酸	ND	ND	ND	ND	ND	0.440±0.037
	28.565	己糖酸	ND	ND	ND	ND	ND	0.804±0.065
	18.095	衣康酸	ND	ND	ND	ND	ND	1.295±0.057
氨基酸	14.239	缬氨酸	ND	ND	ND	9.227±0.569b	15.097±0.865ab	20.950±1.991a
	16.661	异亮氨酸	ND	ND	ND	9.015±4.585a	6.490±1.068a	1.204±0.104b
	17.459	正亮氨酸	ND	ND	ND	1.049±0.369ab	1.387±0.101a	0.950±0.098b
	12.218	亮氨酸	ND	ND	ND	ND	1.744±0.091a	0.971±0.135b
	22.308	焦谷氨酸	ND	ND	ND	ND	0.772±0.060b	0.908±0.058a
	22.691	蛋氨酸	ND	ND	ND	ND	2.248±0.056a	2.553±0.065a
	31.917	络氨酸	ND	ND	ND	ND	2.171±0.251a	1.865±0.300b
	25.229	苯基丙氨酸	ND	ND	ND	1.870±0.602c	9.923±0.833a	8.124±0.361b
其他	20.37	乙醇	ND	ND	ND	ND	2.200±0.155	ND
	8.737	正癸醇	ND	ND	ND	ND	ND	1.640±0.075
	34.045	棕榈酸	ND	ND	ND	ND	0.634±0.056b	0.890±0.095a
	15.443	尿素	ND	ND	ND	2.507±0.232a	1.569±0.080b	1.295±0.054b
	17.898	尿嘧啶	ND	ND	ND	7.085±0.514c	16.053±1.331a	12.951±1.554b

注:不同小写字母代表不同盐分下相同处理差异显著($P<0.05$)。

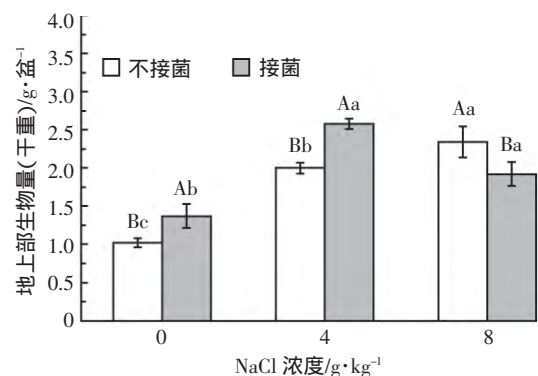
Note: Different lower case letters represent the same treatments under different salinity gradients was significant($P<0.05$).

到。正癸醇、衣康酸、己糖酸、戊糖酸、对羟基苯甲酸、异丙基苹果酸只在 12 g·L⁻¹ 盐分处理下被检测到。在 0.3、6、12 g·L⁻¹ 盐分处理下,大肠埃希菌分泌的有机酸分别为 2、4、8 种,分泌的氨基酸分别为 4、8、8 种,统计分泌的有机物分别为 7、15、19 种。

2.4 盆栽实验

如图 3 所示,总体而言,盐分含量与盐地碱蓬生物量呈正相关,一定盐分有利于其生长,这与前期研究结果一致。在接菌、不接菌处理中,3 个盐分条件下植物的生物量均存在显著差异($P<0.05$),其中 4 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理的生物量最大。在 0、4 g·kg⁻¹ 盐分条件下,接菌显著促进了植物生长($P<0.05$),其地上部生物量分别是不接菌的 1.36 倍和 1.30 倍,而 8 g·kg⁻¹ 盐分条件下,接菌处理的生物量较不接菌处理显著减少 22%($P<0.05$)。

如图 4 所示,随盐分浓度的增加,不接菌条件下



不同大写字母代表相同盐分下不同处理差异显著,不同小写字母代表不同盐分下相同处理差异显著($P<0.05$)。下同
Different capital letters represent the different treatments under same salinity gradients was significant, different lower case letters represent the same treatments under different salinity gradients was significant($P<0.05$). The same below

图3 不同处理下盐地碱蓬生物量

Figure 3 Aboveground biomass of *Suaeda salsa* under different treatments

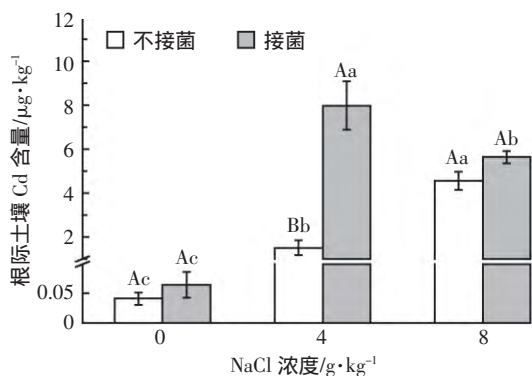


图4 不同处理下盐地碱蓬根际溶液 Cd 含量

Figure 4 The Cd concentration in rhizosphere soil solution of *Suaeda salsa* under different treatments

根际溶液 Cd 含量显著增加($P<0.05$)。3 个盐分条件下, 接菌均增加了土壤溶液中 Cd 含量, 但只有 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分条件下, 接菌与不接菌处理间存在显著差异($P<0.05$)。在所有处理中, $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分条件下接菌处理的根际溶液中 Cd 含量最高, 是其余处理的 1.41~194 倍。

如表 4 所示, 接菌、不接菌处理中, 根部 Cd 为 4 、 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分处理比无盐分处理显著增加($P<0.05$, 图 5)。3 个盐分条件下, 接菌与不接菌处理间根部 Cd 含量无显著差异。不接菌处理中, 3 个盐分条件下茎叶 Cd 含量均有显著差异($P<0.05$)。在 4 、 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分条件下, 接菌处理的茎叶 Cd 含量显著高于不接菌处理($P<0.05$)。在 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分条件下接菌处理的根、茎叶 Cd 含量均为所有处理中最高, 分别是其余处理的 1.02~4 倍和 1.01~4.18 倍。

综上, 植物体内 Cd 的分布差异表明 Cd 的吸收在不同处理间存在差异。如表 4 所示, 盐分促进了植物对 Cd 的富集, 但在相同盐分条件下, 接菌处理也同样促进了 Cd 富集。在 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分条件下, 接菌处理的全量 Cd 富集系数最大, 且与不接菌的处理间存在显著差异($P<0.05$)。Cd 在土壤中的生物毒性不仅与其总量有关, 在很大程度上是取决于它们在土壤中的化学形态, 尤其是生物有效态, 实验研究了 DTPA 提取态 Cd 的富集系数, 发现其均比全量 Cd 的富集系数高, 但二者在

表 4 不同盐分处理下接菌、不接菌 Cd 富集系数与转运系数

Table 4 Accumulation and transfer factor of *Suaeda salsa* under the different treatments

盐分浓度/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	接菌情况	Cd 总活化量/ $\mu\text{g} \cdot \text{盆}^{-1}$	全量 Cd 富集系数	DTPA 提取态 Cd 富集系数
0	无	$0.625 \pm 0.048 \text{Ac}$	$0.391 \pm 0.027 \text{Ac}$	$0.941 \pm 0.064 \text{Ac}$
0	有	$0.766 \pm 0.081 \text{Ac}$	$0.351 \pm 0.079 \text{Ab}$	$0.844 \pm 0.190 \text{Ab}$
4	无	$2.149 \pm 0.198 \text{Bb}$	$0.565 \pm 0.039 \text{Bb}$	$1.357 \pm 0.094 \text{Bb}$
4	有	$6.815 \pm 0.290 \text{Aa}$	$1.469 \pm 0.044 \text{Aa}$	$3.530 \pm 0.108 \text{Aa}$
8	无	$4.791 \pm 0.372 \text{Aa}$	$1.138 \pm 0.029 \text{Ba}$	$2.737 \pm 0.069 \text{Ba}$
8	有	$4.830 \pm 0.400 \text{Ab}$	$1.403 \pm 0.026 \text{Aa}$	$3.372 \pm 0.062 \text{Aa}$

注: 表中不同大写字母代表相同盐分下不同处理差异显著, 不同小写字母代表不同盐分下相同处理差异显著($P<0.05$)。

Note: Different capital letters represent the different treatments under same salinity gradients was significant, different lower case letters represent the same treatments under different salinity gradients was significant($P<0.05$).

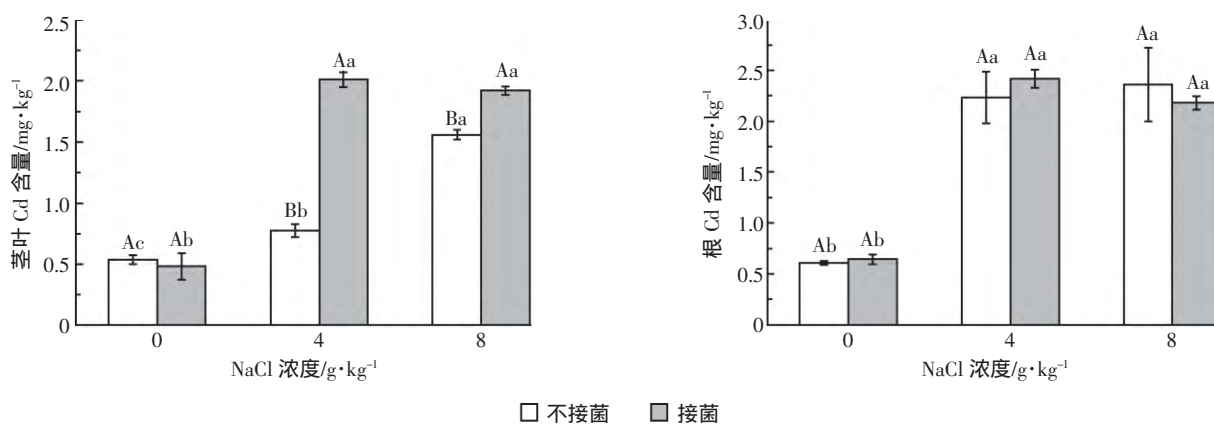


图5 不同处理下植物中 Cd 含量

Figure 5 The Cd concentration in *Suaeda salsa* under different treatments

不同处理间表现出相同的规律。4、8 g·kg⁻¹ 盐分条件下,接菌处理显著提高了Cd转运系数($P<0.05$)。4、8 g·kg⁻¹ 盐分条件接菌处理下Cd总活化量、全量Cd富集系数和DTPA提取态Cd富集系数均较不接菌处理高,且在所有处理中4 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理的各项指标均为最高,盐分显著促进了土壤Cd的活化($P<0.05$),促进了植物对Cd的吸收累积。

3 讨论

溶磷菌自然定殖于盐地碱蓬根际土壤是其促进修复Cd污染盐渍地的保障。一方面,本论文模拟盐地碱蓬根际营养环境,将5株溶磷菌在相同浓度盐地碱蓬根系分泌物为唯一碳源的培养基中培养,所供试的5株溶磷菌均能生长但呈现出不同生长趋势。出现此结果的原因可能是因为实验收集的盐地碱蓬根系分泌物中7种有机酸均属于短链低分子有机酸,容易透过细菌较薄的细胞壁和细胞膜,作为能源物质被细菌利用^[23],且16种物质都含有亲水基团,不会与细胞壁结合和干扰细胞膜的通透性^[24],其次,本实验所用的盐地碱蓬根系分泌物中以甘油的量最多,且远超其余物质。甘油作为一种微生物可利用的碳源^[25],可合成脂肪酸,也可以进入戊糖-磷酸途径(HMP)而后进入三羧酸循环(TCA),产生能量和有用的代谢产物供给细菌生长繁殖。许多生物代谢工程研究中发现大肠埃希菌能利用甘油比较好地生长^[26-27],这与本实验用甘油含量最多的盐地碱蓬根系分泌物筛选出大肠埃希菌的结果一致。另一方面,结合5株溶磷菌的溶磷和活化Cd的能力,筛选出既能利用盐地碱蓬生长较好,又具备较好溶磷和活化Cd能力的大肠埃希菌。

大肠埃希菌在3个盐分处理下(0.3、6、12 g·L⁻¹)的溶磷和活化Cd结果显示,随盐分的增加,菌株平均绝对溶磷率依次为(扣除不接菌对照值)60.7%、60.9%、58.5%,呈先增后减的趋势,说明大肠埃希菌具有一定的耐盐性,但高浓度的盐分可能抑制细菌正常生长。因为太低的NaCl浓度可能不能满足溶磷菌对Na⁺的吸收,而NaCl浓度过高则会增加培养液的渗透势,从而破坏微生物细胞结构^[28]。黄明达等^[29]在对溶磷菌条件的优化实验中发现碳源、氮源的类型和浓度固定时,增加NaCl浓度,细菌的溶磷能力出现先增加后下降的趋势。实验中还发现,随着盐分浓度的增加,大肠埃希菌代谢产物从浓度和种类上均发生了显著变化。在6、12 g·L⁻¹ 盐分胁迫下,细菌代谢氨基酸的种类均是0.3 g·L⁻¹ 盐分胁迫下的2倍,其中缬氨酸

和苯基丙氨酸的量随盐分增加而显著增加($P<0.05$),异亮氨酸则呈现相反的趋势。有研究表明当受到盐分胁迫时,细胞可通过诱导信号分子分泌氨基酸代谢物,增加细胞膜不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例而改变细胞膜的通透性,以此来应对NaCl胁迫后的渗透压^[30]。因此,大肠埃希菌可能通过调节自身代谢途径增强氨基酸代谢通路,适应盐分胁迫环境。在6、12 g·L⁻¹ 盐分胁迫下,大肠埃希菌代谢有机酸的种类分别是0.3 g·L⁻¹ 盐分胁迫下的2、4倍,随盐分增强的有机酸代谢通路可能是其对盐分胁迫环境的反馈,可能因为乳酸在细胞抗高渗胁迫过程中起重要作用^[31],所以随盐分的增加,较快的乳酸合成和消耗速率导致乳酸代谢途径增强,乳酸合成代谢过程中产生了更多种类的有机酸。此外,在接菌处理间碳酸镉的溶解量随盐分的增加显著增加($P<0.05$),可能是由于细菌随盐分胁迫增强而显著增加的氨基酸和有机酸增强了碳酸镉的活化。有研究表明氨基酸中天冬氨酸、组氨酸、谷氨酸对碳酸镉具有较强的活化能力^[32]。虽然随着盐分的增加,接菌与不接菌的溶Cd量均显著增加($P<0.05$),但在相同的盐分处理下,接菌的处理溶Cd量依然显著高于($P<0.05$)不接菌的处理。说明在盐分胁迫下,该溶磷菌株仍能正常发挥活化Cd的作用。对挑选出的大肠埃希菌进行耐盐实验,实验结果证明其具有一定的耐盐性,可以推测接种到盐渍地的大肠埃希菌能适应盐分胁迫环境,进一步保障其能自然定殖于生长在盐渍土壤中的盐地碱蓬根际。

在将菌株接于盐地碱蓬根际的盆栽实验中,0、4 g·kg⁻¹ 盐分条件下,接菌处理的生物量较不接菌处理的生物量显著增大($P<0.05$),可能接种到根际的菌株在一定程度通过溶磷或分泌生长激素等促进植物生长。根际溶液Cd活化量的增加是土培盆栽实验中盐地碱蓬Cd累积显著增加的重要原因,4 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理的根际溶液Cd含量显著高于($P<0.05$)其余处理,此外8 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理的生物量和根际Cd含量均没达到预期的显著效果,推测原因可能是因为土壤高浓度的盐分一方面导致土壤板结不利于植物根系生长和吸收养分,另一方面导致土壤微生物群落发生改变不利于大肠埃希菌定殖生长^[33]。4、8 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理的Cd总活化量、全量Cd富集系数和DTPA态Cd富集系数比不接菌处理显著增加($P<0.05$),其中4 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理的Cd总活化量显著高于8 g·kg⁻¹ 盐分条件下接菌处理($P<0.05$)。总体看来,即使在盐分的胁迫下具有

耐盐性能的大肠埃希菌也可以在盐地碱蓬根际定殖,并通过溶磷和活化 Cd 的功能提高盐地碱蓬对受 Cd 污染盐渍土的修复效率,其中在 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 盐分条件下效果最显著。

4 结论

(1) 大肠埃希菌可利用盐地碱蓬根系分泌物作为唯一碳源正常生长繁殖。

(2) 大肠埃希菌具有一定的耐盐性,在盐分胁迫下仍能发挥溶磷、活化 Cd 的功能。

(3) 大肠埃希菌可促进盐地碱蓬的生长并增强其对土壤中 Cd 的富集。

参考文献:

- 王佳丽, 黄贤金, 钟大洋, 等. 盐碱地可持续利用研究综述[J]. 地理学报, 2011, 66(5): 673-684.
WANG Jia-li, HUANG Xian-jin, ZHONG Tai-yang, et al. Review on sustainable utilization of salt-affected land[J]. *Acta Geographica Sinica*, 2011, 66(5): 673-684.
- 李建国, 濮励杰, 朱明, 等. 土壤盐渍化研究现状及未来研究热点[J]. 地理学报, 2012, 67(9): 1233-1245.
LI Jian-guo, PU Li-jie, ZHU Ming, et al. The present situation and hot issues in the salt-affected soil research[J]. *Acta Geographica Sinica*, 2012, 67(9): 1233-1245.
- Gabrijel O, Davor R, Zed R, et al. Cadmium accumulation by muskmelon under salt stress in contaminated organic soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(7): 2175-2182.
- 李婧, 周艳文, 陈森, 等. 我国土壤镉污染现状、危害及其治理方法综述[J]. 安徽农业通报, 2015, 21(24): 104-107.
LI Jing, ZHOU Yan-wen, CHEN Sen, et al. Actualities, damage and management of soil cadmium pollution in China[J]. *Anhui Agri Sci Bull*, 2015, 21(24): 104-107.
- Duarte B, Caetano M, Almeida P R, et al. Accumulation and biological cycling of heavy metal in four salt marsh species, from Tagus Estuary (Portugal)[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(5): 1661-1668.
- 苏慧, 魏树和, 周启星. 镉污染土壤的植物修复研究进展与展望[J]. 世纪科技研究与发展, 2013, 35(3): 315-319.
SU Hui, WEI Shu-he, ZHOU Qi-xing. Advances in phytoremediation of cadmium contaminated soil[J]. *World Sci-Tech R&D*, 2013, 35(3): 315-319.
- 吴旭红, 高玉芝, 常志敏. 盐胁迫对作物形态和生理过程的影响[J]. 高师理科学刊, 2002, 22(4): 51-53.
WU Xu-hong, GAO Yu-zhi, CHANG Zhi-min. Effect of the salt content coercive on morphological and physiological process of crops[J]. *Journal of Science of Teachers College University*, 2002, 22(4): 51-53.
- 陈柯罕, 张科, 李取生, 等. 四种盐生植物对 Cd Pb 复合污染提取修复效果比较研究[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(3): 458-465.
CHEN Ke-han, ZHANG Ke, LI Qu-sheng, et al. Remediation effects of four halophytes on Cd and Pb compound pollution[J]. *Journal of Agro-*
- Environment Science*, 2017, 36(3): 458-465.
- 郝晋珉, 魏小静, 牛灵安. 盐渍土利用过程中土壤磷素的积累与应用[J]. 中国农业大学学报, 1997, 2(3): 69-72.
HAO Jin-min, WEI Xiao-jing, NIU Ling-an. Accumulation and crop recovery of soil phosphorus in the use of salt-affected soil[J]. *Journal of China Agricultural University*, 1997, 2(3): 69-72.
- 席琳乔, 冯瑞章. 植物根际解磷菌的研究进展[J]. 塔里木大学学报, 2006, 18(4): 57-61.
XI Lin-qiao, FENG Rui-zhang. Research of plant phosphate-solubilizing microorganisms[J]. *Journal of Tarim University*, 2006, 18(4): 57-61.
- Sheng X F, He L Y, Wang Q Y, et al. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 155(1/2): 17-22.
- Dimkpa C O, Merten D, Svatoš A, et al. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(1): 154-162.
- Li W C, Ye Z H, Wong M H. Metal mobilization and production of short-chain organic acids by rhizosphere bacteria associated with a Cd/Zn hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*[J]. *Plant and Soil*, 2010, 326(1/2): 453-467.
- 马莹, 骆永明, 滕应, 等. 根际促生菌及其在污染土壤植物修复中的应用[J]. 土壤学报, 2013, 50(5): 1021-1031.
MA Ying, LUO Yong-ming, TENG Ying, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and their role in phytoremediation of heavy metal contaminated soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(5): 1021-1031.
- Tripathi S, Kumari S, Chakraborty A, et al. Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2006, 42(3): 273-277.
- Chowdhury N, Marschner P, Burns R G. Soil microbial activity and community composition: Impact of changes in matric and osmotic potential[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(6): 1229-1236.
- Luo C L, Shen Z G, Li X D. Root exudates increase metal accumulation in mixed cultures: Implications for naturally enhanced phytoextraction[J]. *Water Air Soil Pollute*, 2008, 193: 147-154.
- Mike F Q, Barbara I, Cristina G, et al. Naturally-assisted metal phytoextraction by *Brassica carinata*: Role of root exudates[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(10): 2697-2703.
- 郭世鸿. 盐分胁迫对苋菜(*Amaranthus mangostanus* L.)活化和吸收土壤重金属 Cd 的影响机制[D]. 广州: 暨南大学, 2017.
GUO Shi-hong. Effect of salt stress on soil Cd mobility and Cd uptake by edible amaranth(*Amaranthus mangostanus* L.) cultivar[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- 冯哲叶, 陈莎莎, 王文超, 等. 几株溶磷细菌的筛选和鉴定及其溶磷效果[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(5): 842-849.
FENG Zhe-ye, CHEN Sha-sha, WANG Wen-chao, et al. Screening and identification of several phosphate-solubilizing bacteria and effect of their P-solubility[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(5): 842-849.
- Ribeiro C M, Cardoso E J B N. Isolation, and characterization of root-

- associated growth promoting bacteria in *Brazil Pine* (*Araucaria angustifolia*) [J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(2) :69-78.
- [22] Xu Z M, Li Q S, Yang P, et al. Impact of osmoregulation on the differences in Cd accumulation between two contrasting edible amaranth cultivars grown on Cd-polluted saline soils [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 224 :89-97.
- [23] Bowere J H, Nameth S T, Riedel R M, et al. Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *pratylenchus penetrans* and *P-crenatus* [J]. *Phytopathology*, 1996, 86(6) :614-621.
- [24] 谈家金, 冯志新. 苯甲酸和苯乙酸对松材线虫和细菌活性的影响 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2003, 27(6) :59-62.
TAN Jia-jin, FENG Zhi-xin. Activity determination of benzoic acid and phenylacetic acid against *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria [J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Science Edition)*, 2003, 27(6) :59-62.
- [25] Yeounjoo K, Eunhee S, Balaji S S, et al. Metabolic engineering of *Kelebsiella pneumoniae* J2B for co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1, 3-propanediol from glycerol: Reduction of acetate and other byproducts [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244 :1096-1103.
- [26] Bryson D B, Elizabeth H K, Melissa G, et al. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli* [J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(8) :593-599.
- [27] Takuya M, Tsutomu T, Akihiko K. Engineering metabolic pathways in *Escherichia coli* for constructing a "microbial chassis" for biochemical production [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245 :1362-1368.
- [28] 冯瑞章, 姚拓, 周万海, 等. 不同生长环境和磷酸盐对4株溶磷菌溶磷能力影响 [J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(6) :856-860.
FENG Rui-zhang, YAO tuo, ZHOU Wan-hai, et al. Effects of different habitats and insoluble phosphates on phosphate solubilizing activity of four phosphate solubilizing bacteria [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, 15(6) :856-860.
- [29] 黄达明, 李倩, 管国强, 等. 一株解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷培养条件的优化 [J]. *生物技术报*, 2015, 31(2) :173-178.
HUANG Da-ming, LI Qian, GUAN Guo-qiang, et al. Selection, identification and medium optimization of a phosphate-solubilizing bacterium [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(2) :173-178.
- [30] He G Q, Wu C D, Huang J, et al. Metabolic response of *Tetragenococcus halophilus* under salt stress [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2017, 22(4) :366-375.
- [31] 刘阳, 邓静, 吴华昌, 等. 盐胁迫对枯草芽孢杆菌发酵代谢产物的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(7) :29-33.
LIU Yang, DENG Jing, WU Hua-chang, et al. Influence of salt stress on metabolite of *Bacillus subtilis* [J]. *Food and Fermentation Engineering*, 2015, 41(7) :29-33.
- [32] 魏佳, 李取生, 徐智敏, 等. 多种有机酸对土壤中碳酸镉的活化效应 [J]. *环境工程学报*, 2017, 11(9) :5298-5306.
WEI Jia, LI Qu-sheng, XU Zhi-min, et al. Mobilization effects of various organic acid on cadmium carbonate in soil [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(9) :5298-5306.
- [33] 周德平, 吴淑杭, 褚长彬, 等. 盐胁迫对蔬菜地土壤微生物及土壤酶活的毒害效应 [J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(8) :1602-1607.
ZHOU De-ping, WU Shu-hang, CHU Chang-bin, et al. Eco-toxicological effect of salt stress on microorganisms and enzymes activities in vegetable soil [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(8) :1602-1607.