

土壤污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201803103 中图分类号 X53 文献标识码 A

王东升, 王立立, 李取生, 等. 产铁载体菌对龙葵修复土壤 Cd 污染的促进效应 [J]. 环境工程学报, 2018, 12(8): 2311-2319.

WANG Dongsheng, WANG Lili, LI Qusheng, et al. Enhancing effect of siderophore-producing bacteria on remediation of cadmium-contaminated soil by *Solanum nigrum* L [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(8): 2311-2319.

产铁载体菌对龙葵修复土壤 Cd 污染的促进效应

王东升, 王立立*, 李取生, 周婷, 周雪芳, 高琼

暨南大学环境学院, 广东省环境污染与健康重点实验室, 广州 510632

第一作者: 王东升 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 土壤重金属修复技术与应用。E-mail: 1021272603@qq.com

* 通信作者, E-mail: towanglili@163.com

摘要 通过 CAS 筛选培养基从龙葵根系土中筛选出 2 株产铁载体菌 T1、Y2, 经生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析, 初步确定 T1、Y2 分别为铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌。将 2 株细菌接种至溶镉溶磷培养基中进行实验室培养, 并对溶镉、溶磷结果和 2 株菌的胞外分泌物进行分析。结果表明, 接种 T1、Y2 培养基中的有效镉、有效磷与不接种对照相比显著增加 ($P < 0.05$), 2 株菌分泌的草酸、丁二酸、甘油酸等有机酸使培养基 pH 显著降低 ($P < 0.05$), 促进了碳酸镉和磷酸钙的活化。在受 Cd 污染的灌溉土中进行龙葵盆栽实验, 以灌根的方式分别接种 T1、Y2 菌, 并对龙葵的生物量、龙葵根系土水溶态 Cd 浓度、龙葵吸收 Cd 总量及其根系土壤 Cd 形态的转化进行分析。结果表明: 接种 T1、Y2 菌处理的龙葵根系土溶液 Cd 浓度比不接种对照增加 4.5、3.6 倍, 接种 T1 菌处理的地上部分与地下部分的干重比不接种对照增加 1.55、2.45 倍, 接种 Y2 菌处理的地上部分与地下部分的干重比不接种对照增加 1.47、2.28 倍, 接种 T1、Y2 菌处理的龙葵地上部分 Cd 总吸收量比不接种对照增加 1.56、1.69 倍; 接种 T1、Y2 菌处理的龙葵富集系数与未接种对照相比增加, 并没有达到显著性差异 ($P > 0.05$), 接种 T1、Y2 菌处理的转运系数与未接种对照相比未显著性变化 ($P > 0.05$)。接种菌处理有效促进了龙葵根系土壤难溶性形态 Cd 向可交换态 Cd 的转化。同时, 研究发现接种 T1、Y2 菌可显著促进 ($P < 0.05$) 龙葵对土壤 Cd 的吸收, 强化了龙葵修复土壤镉污染的能力。

关键词 产铁载体菌; 龙葵; 胞外分泌物; Cd 污染; 土壤修复

土壤是人类赖以生存的环境因子, 由于矿山开发、农田污水灌溉、污泥肥料的使用等人类活动, 土壤重金属污染日益严重^[1-3]。大量重金属通过食物链进入人体, 严重威胁人体健康^[4]。其中 Cd 污染是最常见的重金属污染之一, Cd 在土壤中活性较高, 更容易被植物吸收, 具有很强的迁移能力^[5-8]。研究表明 Cd 会通过破坏细胞膜的结构和功能、抑制光合作用的过程、降低酶的活性等方式对植物造成胁迫^[9-11]。当土壤 Cd 含量超过一定浓度时, 会通过食物链、地面扬尘等途径对人畜健康造成危害^[12]。

龙葵是我国内学者较早发现的对重金属 Cd 有较高富集系数的一种超富集植物。具有抗逆境能力强、生长周期短、在 Cd 污染土壤中种植不受抑制等特点, 是一种新型的可用于植物修复土壤 Cd 污染的材料^[13]。但单一的植物修复技术通常存在着修复周期长、植物生物量低、修复效率低等问题^[14], 限制了植物修复技术在土壤重金属污染中的应用。根系促生菌 (PGPR) 作为植物根系环境中的微生物, 对土壤中重金属的赋存形态、减缓重金属对宿主植物的危害、提高宿主植物的生物量等方面有重要的影响^[15]。根系促生菌可以分泌铁载体、吡啶乙酸、生长素等生物因子, 间接提高宿主植物的生物量, 宿主植物可以通过光合作用形成碳水化合物, 由根系分泌供给根系促生菌生长、繁

收稿日期: 2018-03-13; 录用日期: 2018-05-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0801305); 广东省科技计划项目 (2017A010105005)

殖^[16]。产铁载体根际菌 (SPR) 是一种常见的根系促生菌, 其分泌的铁载体可以为重金属胁迫下的植物提供营养物质, 缓解重金属胁迫的毒害, 促进植物生长^[17]。由于铁载体能与重金属离子结合, 形成金属-铁载体螯合物, 提高植物根系环境中重金属的活性, 增加植物对重金属的吸收和积累^[18], 因此, 产铁载体菌的发现为重金属污染土壤的植物修复带来了新的思路方法。

近年来, 利用龙葵提取修复 Cd 污染土壤的研究报道^[19-22] 较多, 有关产铁载体菌的筛选及其功能的研究也有相应报道。林天兴等^[23] 筛选出 30 株产铁载体菌, 并发现对棉花枯萎病致病菌尖孢镰刀菌生长有抑制效果。魏本杰等^[24] 从污染土壤中筛选得到 2 株产铁载体菌, 发现有较强的产铁载体能力和活化镉的能力。李艳梅等^[25] 研究发现产铁载体菌对花生有显著的促生作用, 增加了花生的氮磷钾含量, 降低了花生的镍含量。JIANG 等^[26] 筛选出 1 株产铁载体菌 *Burkholderia* sp. J62, 发现对印度芥菜有促生作用, 提高了对 Pb、Cd 的吸收。铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌作为常见的产铁载体菌, 对植物生长也有促进作用。ADESEMOYE 等^[27] 研究发现铜绿假单胞菌对番茄、秋葵、非洲菠菜都有显著的促生效果。SUPRAPTA 等^[28] 研究发现阴沟肠杆菌可以促进水稻的生长, 增加产量。但将产铁载体菌与超富集植物龙葵结合, 用于修复 Cd 污染土壤的研究鲜见报道。因此, 本研究从受镉污染的龙葵根系土中筛选得到 2 株产铁载体菌, 通过实验室培养, 比较了 2 株菌溶解碳酸镉和磷酸钙的能力, 并分析了 2 株菌的胞外分泌物成分, 揭示了菌株溶解碳酸镉和磷酸钙的机制。并通过盆栽实验, 验证了产铁载体菌和龙葵联合修复 Cd 污染土壤的效果, 为进一步开发植物联合微生物修复 Cd 污染土壤技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试龙葵种子和实验菌株

龙葵种子购自中国科学院沈阳应用生态研究所, T1、Y2 产铁载体菌在 Cd 污染土壤种植龙葵的根系土中通过 CAS 筛选培养基筛选所得。

1.1.2 供试土壤

供试土壤为广州市天河区棠东土, 去除异物后室内风干、磨碎、混匀, 过 4 mm 筛。土壤理化性质: pH 6.28, TOC 35.39 g·kg⁻¹, 有效磷 95.00 mg·kg⁻¹, CEC 20.90 cmol·kg⁻¹, 总 Cd 含量 1.37 mg·kg⁻¹, 按 tisser 法^[29] 提取; 其中可交换态 0.46 mg·kg⁻¹, 碳酸盐结合态 0.21 mg·kg⁻¹, 铁锰氧化物结合态 0.54 mg·kg⁻¹, 有机碳结合态 0.08 mg·kg⁻¹, 残渣态 0.08 mg·kg⁻¹。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 (tryptone) 10 g·L⁻¹, 酵母提取物 (yeast extract) 5 g·L⁻¹, 氯化钠 (NaCl) 10 g·L⁻¹, pH 7.0~7.5。

CAS 培养基^[30]: 每 100 mL 含 20% 蔗糖溶液 1 mL, 10% 酸水解酪素 3 mL, 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 100 μL, 1 mmol·L⁻¹ MgSO₄ 2 mL, 琼脂 1.8 g, 在约 60 °C 时缓慢加入磷酸盐缓冲液和 CAS 染液各 5 mL, 即得蓝色检测培养基。CAS 染液含 1 mmol·L⁻¹ CAS (铬天青), 0.1 mmol·L⁻¹ FeCl₃, 4 mmol·L⁻¹ 十六烷基三甲基溴化胺 (HDTMA)。0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 pH 6.8, 每 100 mL 含 Na₂HPO₄·12H₂O 2.427 g, NaH₂PO₄·2H₂O 0.591 g, KH₂PO₄ 0.075 g, NH₄Cl 0.250 g, NaCl 0.125 g, 使用时进行 10 倍稀释。所有溶液均用去离子水配制。

溶镉溶磷功能培养基: NaCl 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.53 g, MnSO₄·H₂O 0.02 g, KCl 0.30 g, (NH₄)₂SO₄ 0.50 g, FeSO₄·7H₂O 0.03 g, 葡萄糖 1.00 g, 去离子水 1 000 mL, pH 7.0~7.5。Ca₃(PO₄)₂ 2.1 mmol·L⁻¹ (0.668 g·L⁻¹), CdCO₃ 60 mg·L⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 产铁载体菌的筛选及其鉴定

从 Cd 污染土壤种植的龙葵根系周围采集 10 g 土。称取 1 g 至盛有 9 mL 无菌水的试管中, 制备 1 g·mL⁻¹ 土壤悬液, 将其稀释为 10²、10³、10⁴、10⁵ 倍, 得到不同浓度的土壤悬液, 吸取不同浓度的悬液 10 μL 至 CAS 蓝色筛选培养基, 涂平板后, 置于 28 °C 生化培养箱中培养 48 h, 当铁载体存在时, 由于铁载体能与 Fe³⁺ 形成更加稳定的螯合物, 伴随着 Fe³⁺ 从其结合的蓝色化合物转移到铁载体中而发生颜色变化, 其蓝色变为橙色。挑取具有较大橙色晕圈的单个菌落在 LB 培养基中纯化, 接种至 LB 斜面培养基, 于 4 °C 冰箱中保存。

采用 16S rDNA 序列分析方法, 并结合 API 试剂条生理生化特征分析, 用 AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒 (Axygen), 提取 T1、Y2 菌株总 DNA, 16S rDNA 基因用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGY TAC CTTGTTACGACTT-3') 对特定序列进行扩增。PCR 体系 20 μL 包括 10.0 μL 预混合物, 0.8 μL 27F 引物, 0.8 μL 1492R 引物, 1.0 μL 模板 DNA。PCR 反应条件: 95 °C, 5 min; 35 个循环包括 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 90 s 最后 72 °C 延伸 10 min^[31]。16S rDNA 基因测序后, 于 Genbank 数据库中与现有基因数据进行比对。

1.2.2 T1、Y2 菌对 CdCO₃ 和 Ca₃(PO₄)₂ 的活化作用及其胞外分泌物分析

将斜面保存的菌株接种至 LB 液体培养基中, 28 °C、150 r·min⁻¹ 摇床培养 14 h, 菌液离心 4 000 r·min⁻¹, 离心 10 min 后用无菌水等体积重悬, 取 2 mL 菌悬液接种于 100 mL 的溶磷溶镉功能培养基, 用 2 mL 的无菌水为对照, 28 °C、150 r·min⁻¹ 培养, 每个处理设置 3 个平行, 培养 2 d 后菌悬液用 100 mL 容量瓶定容, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液用雷磁 pH 计测 pH, 火焰原子吸收分光光度计测 Cd 体积浓度, 钼锑钒比色法测水溶性磷^[32], GC-MS 分析菌液代谢物^[33]。

1.2.3 盆栽实验处理

盆栽设计加菌 (T1、Y2) 与不加菌 2 个处理, 每个处理 3 个平行, 共计 9 盆。龙葵种子育苗: 在装有石英砂的育苗板上撒 20 颗种子 (每格), 放入植物培养箱中培养, 待龙葵长出 3 片真叶时移至盆栽。菌悬液的制备: 将 T1、Y2 菌从斜面接种至 LB 液体培养基中, 28 °C、150 r·min⁻¹ 摇床培养 14 h, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体, 用无菌水等体积重悬备用。以灌根的接种方式将菌悬液注入龙葵根部, 10 d 接种 1 次菌液。实验在暨南大学温室内进行, 采用直径为 18 cm 的塑料花盆, 每盆装有 1.5 kg 土壤, 调节盆中持水量约 80%, 龙葵生长 60 d 后分别收集龙葵茎叶、根、根系土溶液以及根系土。将茎叶、根放置 105 °C 烘箱内杀青 30 min 后 75 °C 烘干, 称量茎叶、根干重, 将烘干的茎叶、根粉碎, 称取 0.2 g 茎叶和根, 分别加 8 mL 硝酸微波消解。根系土溶液采用差速离心法收集, 在根系土中添加适量去离子水呈黏糊状, 称量 30 g 样品至锡箔纸上, 裹为圆柱形, 用针在锡箔纸上戳上密密麻麻的小洞, 将其放入 20 mL 的注射筒中, 再将注射筒放入 50 mL 的离心管中, 每盆取 6 个样。在 6 000 r·min⁻¹ 转速下离心 10 min, 4 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min。离心液过 0.45 μm 滤膜, 得到根系土溶液, 其浓度为 n , 离心过后的根系土烘干后的质量为 M , 计算出含水量 m 。根系土烘干后采用 tisser 法^[29] 提取土壤 Cd 形态。用石墨原子吸收分光光度计测定根系土溶液和消解茎叶、根、tisser 法^[29] 提取溶液的 Cd 体积浓度。

1.2.4 数据统计及分析

采用 Excel2007 对数据进行计算整理, 通过 SPSS 23.0 软件, Duncan 新复极差法, 在 0.05 水平上分析差异显著性 ($P < 0.05$)。

$$\text{根系土水溶态 Cd 浓度} = (mn) / M$$

式中: m 为含水量; n 为根系土溶液浓度; M 为离心过后的根系土烘干后的质量。

2 实验结果

2.1 T1、Y2的筛选及其鉴定

经实验室培养 48 h 后在蓝色 CAS 培养基出现橙色晕圈 (图 1), 挑取直径比较大的 2 个橙色晕圈, 再次在 CAS 培养基上进行纯化, 再次发现产生了橙色晕圈, 表明这 2 株菌产生了铁载体。随着培养时间延长, 水解晕圈逐渐变大, 反复传代 2 株菌产铁载体产生能力不发生变化。

菌株 16S rDNA 序列分析提取菌株 T1、Y2 的基因组 DNA, 采用 16S rDNA 通用引物扩增, 均得到了约 1 400 bp 的扩增片段。将序列在 Genbank 中 BLAST 比对, 结合菌株 T1、Y2 的 API 生理生化特征确定 T1 为铜绿假单胞菌, Y2 为阴沟肠杆菌。菌株 T1、Y2 的生理生化特征结果见表 1。

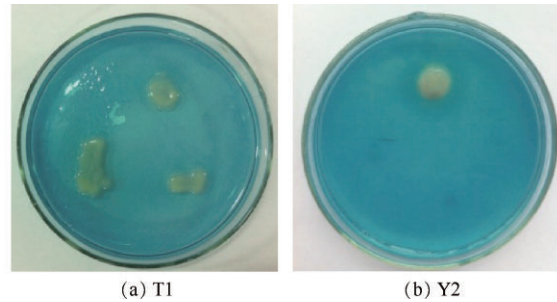


图 1 CAS 平板筛选 T1 和 Y2
Fig. 1 CAS plate screening T1 and Y2

表 1 菌株 T1 和 Y2 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical properties of strains T1 and Y2

底物	菌株		底物	菌株	
	T1	Y2		T1	Y2
OPNG	-	+	GLU	+	+
ADH	+	+	MAN	-	+
LDC	-	-	INO	-	-
ODC	-	+	SOR	-	+
CIT	+	+	RHA	-	+
H ₂ S	-	-	SAC	-	+
URE	+	+	MEL	-	+
TDA	+	+	AMY	-	+
IND	-	-	ARA	-	+
VP	-	+	OX	+	-
GEL	+	-			

注: “+”为阳性反应; “-”为阴性反应。

2.2 T1、Y2 菌对 CdCO₃ 和 Ca₃(PO₄)₂ 的活化作用及其代谢产物分析

将 T1、Y2 菌接种至功能培养基中培养 2 d, 结果如表 2 所示, 接种 T1、Y2 菌的 2 个处理可溶性 Cd 含量分别是 CK 未接菌的 4.6、5.5 倍, 其可溶性 P 含量约是 CK 未接菌的 4.3、6.5 倍, pH 也显著降低 ($P < 0.05$)。CK、T1、Y2 处理其可溶性 Cd 含量与可溶性 P 含量呈正相关, 而其可溶性 Cd 含量和可溶性 P 含量与 pH 呈负相关。因此, 与未接菌对照相比, 接种 T1、Y2 菌显著提高了溶液中的 Cd²⁺ 量和 PO₄³⁻ 量, 而且显著降低了溶液的 pH ($P < 0.05$)。

表 2 T1 和 Y2 菌对 CdCO₃ 和 Ca₃(PO₄)₂ 的活化效果

Table 2 Mobilization effect of CdCO₃ and Ca₃(PO₄)₂ by T1 and Y2

处理	Cd ²⁺ 含量 / (mg·L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ 含量 / (mg·L ⁻¹)	pH
CK	4.61 ± 1.01a	6.06 ± 0.46a	6.68 ± 0.03c
T1	21.23 ± 0.30b	26.09 ± 0.85b	6.07 ± 0.01b
Y2	25.20 ± 2.92c	39.45 ± 1.08c	5.64 ± 0.05a

注: 不同小写字母代表不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

如表 3 所示, 在 T1、Y2 菌检测出的代谢物中, 有机酸种类最多, 其次是糖类, 最后是氨基酸类。T1、Y2 菌的代谢产物种类和数量有所差异。T1 菌共检测到 21 种物质, 其中有机酸 11 种, 氨基酸 2 种, 糖类 2 种。Y2 菌共检测出 20 种物质, 其中有机酸 11 种, 氨基酸 1 种, 糖类 3 种。

表 3 在 CdCO₃、Ca₃(PO₄)₂ 条件下 T1、Y2 的代谢产物
Table 3 Metabolites of T1, Y2 under CdCO₃, Ca₃(PO₄)₂

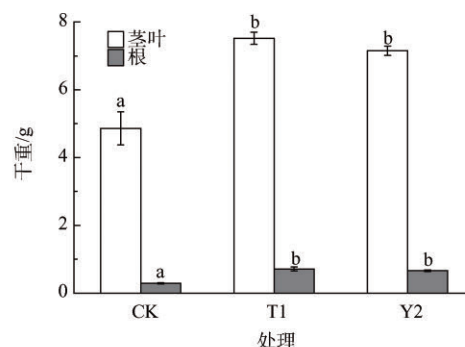
物质分类	保留时间/min	物质名称	峰面积/10 ⁵		物质分类	保留时间/min	物质名称	峰面积/10 ⁵	
			T1	Y2				T1	Y2
有机酸	11.38	草酸	1.210 1	3.077 6	有机酸	33.69	棕榈酸	6.818 9	6.395 7
	16.99	丁二酸	1.397 6	4.581 8	氨基酸	10.01	丙氨酸	4.582 2	未检出
	17.48	甘油酸	0.533 9	0.926 5	氨基酸	19.19	3-氨基异丁酸	8.257 4	4.920 3
	22.80	2-羟基戊二酸	0.886 5	1.093 2	糖类	21.92	苏阿糖	未检出	1.531 2
	23.07	蔗糖酸	3.791 5	2.099 2		25.88	树胶醛糖	10.624 3	未检出
	25.61	月桂酸	未检出	1.750 1		30.58	塔洛糖	6.686 4	0.422 9
	26.34	邻苯二甲酸	4.923 5	5.193 6		41.49	呋喃核糖	未检出	11.770 2
	28.42	核糖酸	1.631 8	未检出	其他	15.51	乙醇胺	5.577 6	未检出
	28.54	对苯二甲酸	22.152 7	19.023 0		15.88	甘油	17.174 5	16.352 9
	28.75	壬二酸	0.558 2	0.461 4		17.58	尿嘧啶	1.588 0	0.858 9
	29.84	十四烷酸	未检出	2.492 8		22.25	蔗糖醇	1.050 3	未检出
	30.14	2,4-二羟基戊二酸	未检出	6.410 6		27.39	腐胺	25.164 9	16.752 2
	32.13	葡萄糖酸	1.483 8	未检出		31.55	山梨醇	8.926 9	15.613 2

2.3 盆栽实验

如图 2 所示, 接种 T1、Y2 菌对龙葵的各部分干重影响不同。相对于对照, 龙葵接种 T1、Y2 菌后其茎叶、根干重显著增加 ($P<0.05$)。而接种 T1、Y2 菌处理之间的茎叶、根干重并没有显著差异性。与对照组未接菌相比, 龙葵接种 T1、Y2 菌后茎叶干重增加 1.55、1.47 倍, 根干重增加 2.45、2.28 倍。

盆栽结束后测得龙葵根系土水溶态 Cd 浓度表 4 所示, 相对于对照组未接菌, 龙葵接种 T1、Y2 菌后根系土水溶态 Cd 浓度显著增加 ($P<0.05$), 接种 T1 菌的龙葵根系土水溶态 Cd 含量显著大于接种 Y2 菌的龙葵根系土水溶态 Cd 浓度 ($P<0.05$)。不同处理下对土壤 Cd 的吸收能力不同, 相比于对照, 龙葵接种 T1、Y2 菌后, 茎叶、根的 Cd 浓度都有一定的提升, 富集系数也有一定的提升, 但没有达到显著性差异 ($P>0.05$)。接种 T1、Y2 菌对龙葵 Cd 总吸收量的影响较大, 接种 T1、Y2 菌龙葵茎叶总 Cd 含量分别是未接菌对照组的 1.56、1.69 倍, 其根总 Cd 含量是对照组的 1.42、2.5 倍。

接种 T1、Y2 菌对龙葵根际土壤 Cd 形态影响如表 5 所示, 相比于未接菌 CK, 接种 T1、Y2 菌的根系土壤可交换态 Cd 显著性增加 ($P<0.05$), 碳酸盐结合态和铁锰氧化物结合态显著性减少 ($P<0.05$), 使得根系土总 Cd 浓度显著性减少 ($P<0.05$)。由表 5 可知, 接种 T1、Y2 菌促进了土壤 Cd 难溶性形态向可交换态的转化。



注: 不同小写字母代表不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。

图 2 接种 T1, Y2 对龙葵干重的影响

Fig. 2 Effects of T1, Y2 inoculation on dry-weight of *Solanum nigrum* L.

表 4 龙葵的根系土水溶态 Cd 浓度及其吸收 Cd 情况

Table 4 Water-soluble Cd concentration and Cd uptake in root soil of *Solanum nigrum* L

处理	水溶态 Cd 含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Cd 含量/ $(\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1})$		Cd 吸收总量/ μg		富集系数	转运系数
	根系土	茎叶	根	茎叶	根		
CK	$0.16 \pm 0.02\text{a}$	$2.51 \pm 0.05\text{a}$	$2.39 \pm 0.25\text{a}$	$12.21 \pm 1.17\text{a}$	$0.7 \pm 0.12\text{a}$	$1.83 \pm 0.04\text{a}$	1.05
T1	$0.72 \pm 0.04\text{c}$	$2.53 \pm 0.08\text{a}$	$2.61 \pm 0.09\text{a}$	$19.06 \pm 0.93\text{b}$	$1.86 \pm 0.14\text{b}$	$1.85 \pm 0.06\text{a}$	0.96
Y2	$0.58 \pm 0.05\text{b}$	$2.88 \pm 0.36\text{a}$	$2.66 \pm 0.05\text{a}$	$20.62 \pm 2.50\text{b}$	$1.75 \pm 0.08\text{b}$	$2.1 \pm 0.26\text{a}$	1.08

注：不同小写字母代表不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 5 不同接菌处理龙葵根际土壤不同形态镉含量

Table 5 Different forms of cadmium in rhizosphere soil of *solanum nigrum* with different inoculation $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

处理	可交换态	碳酸盐结合态	铁锰氧化物结合态	有机结合态	残渣态	总 Cd
CK	$0.38 \pm 0.01\text{a}$	$0.20 \pm 0.16\text{c}$	$0.53 \pm 0.03\text{b}$	$0.08 \pm 0.02\text{a}$	$0.08 \pm 0.01\text{a}$	$1.27 \pm 0.05\text{b}$
T1	$0.45 \pm 0.03\text{b}$	$0.15 \pm 0.01\text{a}$	$0.41 \pm 0.06\text{a}$	$0.09 \pm 0.01\text{a}$	$0.09 \pm 0.02\text{a}$	$1.19 \pm 0.12\text{a}$
Y2	$0.43 \pm 0.05\text{b}$	$0.17 \pm 0.02\text{b}$	$0.39 \pm 0.02\text{a}$	$0.08 \pm 0.01\text{a}$	$0.08 \pm 0.01\text{a}$	$1.15 \pm 1.11\text{a}$

注：不同小写字母代表不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

产铁载体菌是一种促生性好的根系微生物，已被广泛运用到土壤重金属污染修复研究中。在不同的环境条件下产铁载体细菌各不相同，朱彭玲^[34]在新疆地区分离得到 68 株产铁载体菌，采用 BOXAIR-PCR、16S rDNA PCR-RFLP、16S rRNA 全序列分析研究了 68 株产铁载体菌的遗传多样性，挑选出 10 株测定了 16S rDNA 全序列构件系统发育树，10 株产铁载体菌属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、霍氏肠杆菌属 (*Enterobacter*)、成团菌属 (*Pantoea*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、短状杆菌属 (*Brachybacterium*) 和产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)，表现出很大的特异性。本研究筛选出的 T1、Y2 菌经过 16S rDNA 序列分析，结合其 API 试剂条生理生化特征鉴定分别为铜绿假单胞菌 (*P. Aeruginosa*) 和阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。

摇瓶实验中，接种 T1、Y2 菌的溶镉溶磷功能培养基中的有效磷与有效镉显著性增加，pH 显著性降低 ($P < 0.05$)。2 株菌的胞外分泌物通过 GC-MS 分析^[33]显示产生了草酸、丁二酸、甘油酸等有机酸和一些氨基酸、糖类物质，所以 pH 降低的原因可能是由于细菌分泌的草酸、丁二酸、甘油酸等有机酸造成的。有机酸活化重金属主要有 2 种机制：酸溶作用和螯合作用^[35]。细菌分泌的有机酸使培养基中的氢离子增加，氢离子促进了碳酸盐的溶解，释放出金属离子^[36]。魏佳等^[37]分析了多种有机酸、氨基酸、酚酸对土壤中碳酸镉的活化，结果发现低分子有机酸对土壤中碳酸镉有很强的活化作用，草酸、丁二酸、葡萄糖酸、邻苯二甲酸、甘油酸在 T1、Y2 菌的代谢物中也均有找到。陆文龙等^[38]发现低分子有机酸对不同的磷酸盐有活化作用，结果表明柠檬酸、草酸、酒石酸能明显地促进磷酸盐中磷的释放，这与 T1、Y2 菌的代谢物中草酸的存在相符合。

龙葵吸收 Cd 修复土壤重金属污染主要是通过提升龙葵的生长发育和龙葵茎叶中 Cd 的浓度 2 个方面来实现的。研究发现，铜绿假单胞菌和阴沟肠杆菌可以产生生物表面活性剂、铁载体、吲哚乙酸 (IAA) 等物质，有固氮、溶磷酸盐的作用^[39-40]。在本研究中，接种 T1、Y2 菌龙葵茎叶干重与对照相比增加了 1.55、1.47 倍，其根干重也增加了 2.45、2.28 倍，说明接种的 T1、Y2 菌具有良好的促生特性，促生的原因可能是由于 T1、Y2 菌具有良好的溶磷性能，增加了龙葵对磷素的吸收。胡晓峰^[41]通过 *Pikovskaya* 培养基筛选出 16 株溶磷菌，挑选其中效果较好的 5 株溶磷菌，接种溶磷菌的处理与对照未接菌相比显著地增加了玉米的生物量。也有可能是 T1、Y2 菌分泌的铁载体螯合铁营

养元素,促进了龙葵对铁元素的摄取。在本研究中,龙葵茎叶、根部Cd浓度稍有增加,并没有达到显著性差异($P>0.05$),可能原因T1、Y2菌在龙葵根部活化的Cd有限,限制了龙葵吸收Cd,也可能是接种T1、Y2菌处理的龙葵茎叶、根的干重都有显著性增加($P<0.05$),使得龙葵茎叶、根部的Cd含量得到了“稀释”,导致接种T1、Y2菌处理与对照组的龙葵茎叶、根中Cd浓度没有显著性差异。接种T1、Y2菌处理与对照组龙葵的根系土壤水溶态Cd相比有显著性增加($P<0.05$),原因可能是T1、Y2菌增加了根部环境有机酸和铁载体的含量从而促进了难溶性Cd的活化,增加了龙葵根部环境有效Cd的含量。根系土Cd形态经过tisser法提取发现,接种产铁载体菌T1、Y2使土壤Cd形态向龙葵可吸收利用的形态发生转变,提高了龙葵对Cd的吸收效率。BRAUD等^[18]发现,铜绿假单胞菌分泌的绿脓杆菌螯铁白能提高土壤中Cd和Pb可利用量,根系促生菌分泌的有机酸也可以活化土壤中的重金属,改变土壤重金属的形态,富集植物根部的营养矿物质,促进了植物的生长和重金属的转运^[42]。

4 结论

1) 从污染的龙葵根系土筛选出2株具有较强产铁载体的根系促生菌T1、Y2,经过16S rDNA序列分析和生理生化特征,T1、Y2分别鉴定为铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌。

2) T1、Y2菌通过溶P溶Cd摇瓶实验,与对照组相比,接种T1、Y2菌的溶Cd含量分别达到了4.6、5.5倍,可溶性P含量分别达到了4.3、6.5倍。对T1、Y2菌溶磷溶Cd的菌悬液进行GC-MS分析,其代谢物都含有大量的有机酸(如草酸、甘油酸、丁二酸等),为T1、Y2菌溶Cd、P提供了理论依据。

3) 将T1、Y2菌接种至龙葵盆栽中,接种T1菌与对照组相比,龙葵茎叶、根的干重分别增加了1.55、2.45倍。接种Y2菌与对照组相比,龙葵茎叶、根的干重分别增加了1.47、2.28倍。但其茎叶、根的Cd浓度并没有显著性差异($P>0.05$)。接种T1、Y2菌与对照组相比,茎叶总Cd含量增加了1.56、1.69倍,同时促进了龙葵根系土壤Cd难溶性形态向有效态的转化,提高了龙葵对土壤Cd的吸收效率。

参考文献

- [1] WANG X, LIANG C H, YIN Y. Distribution and transformation of cadmium formations amended with serpentine and lime in contaminated meadow soil[J]. Journal of Soils & Sediments,2015,15(7):1531-1537.
- [2] GARAU G, CASTALDI P, SANTONA L, et al. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil[J]. Geoderma,2007,142(1):47-57. DOI:10.1016/j.geoderma.2007.07.011.
- [3] LIU W, YANG Y S, LI P J, et al. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices[J]. Journal of Hazardous Materials,2009,161(2):878-883. DOI:10.1016/j.jhazmat.2008.04.038.
- [4] BRUNETTO G, G W B D M, TERZANO R, et al. Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity[J]. Chemosphere,2016,162:293-307. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.07.104.
- [5] 陈圣安. 镉污染对水稻生理生化的影响[J]. 农技服务,2011,28(7):1033-1035.
- [6] ZENG X W, QIU R L, YING R R, et al. The differentially-expressed proteome in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis paniculata* Franch in response to Zn and Cd[J]. Chemosphere,2011,82(3):321-328. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.10.030.
- [7] KUPPER H, LOMBI E, ZHAO F J, et al. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*[J]. Planta,2000,212(1):75-84. DOI:10.1007/s004250000366.
- [8] SATARUG S, BAKER J R, URBENJAPOL S, et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population[J]. Toxicology Letters,2003,137(1):65-83.
- [9] 张金彪,黄维南. 镉对植物的生理生态效应的研究进展[J]. 生态学报,2000,20(3):514-523.
- [10] 张春荣,李红,夏立江,等. 镉、锌对紫花苜蓿种子萌发及幼苗的影响[J]. 华北农学报,2005,20(1):96-99.

- [11] 孙光闻, 朱祝军, 陈日远, 等. 镉对小白菜根细胞质膜氧化还原系统的影响 [J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 65-67.
- [12] 李取生, 楚蓓, 石雷, 等. 珠江口滩涂湿地土壤重金属分布及其对围垦的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4): 224-228.
- [13] 魏树和, 周启星, 王新, 等. 一种新发现的镉超积累植物龙葵 (*Solanum nigrum* L.) [J]. 科学通报, 2004, 49(24): 2568-2573.
- [14] PUSCHENREITER M, STOGER G, LOMBI E, et al. Phytoextraction of heavy metal contaminated soils with *Thlaspi goesingense* and *Amaranthus hybridus*: Rhizosphere manipulation using EDTA and ammonium sulfate [J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2015, 164(6): 615-621.
- [15] KHAN N, BANO A. Modulation of phytoremediation and plant growth by the treatment with PGPR, Ag nanoparticle and untreated municipal wastewater [J]. International Journal of Phytoremediation, 2016, 18(12): 1258-1269. DOI:10.1080/15226514.2016.1203287.
- [16] 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.
- [17] DIMKPA C O, SVATOS A, DABROWSKA P, et al. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. [J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 19-25. DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.09.079.
- [18] BRAUD A, JEZEQUEL K, BAZOT S, et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacterial [J]. Chemosphere, 2009, 74(2): 280-286. DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.09.013.
- [19] 魏树和, 周启星, 王新. 超积累植物龙葵及其对镉的富集特征 [J]. 环境科学, 2005, 26(3): 167-171.
- [20] 于彩莲. 生长调节剂强化龙葵修复镉污染土壤能力的研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2011.
- [21] 殷永超, 吉普辉, 宋雪英, 等. 龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 野外场地规模 Cd 污染土壤修复试验 [J]. 生态学杂志, 2014, 33(11): 3060-3067.
- [22] 刘京. 龙葵对土壤中十溴联苯醚-镉复合污染的修复研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [23] 林天兴, 唐梅, 黄明远, 等. 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 668-676.
- [24] 魏本杰, 曾晓希, 刘志成, 等. 产铁载体菌的筛选鉴定及活化镉的性能探究 [J]. 环境科学与技术, 2014(11): 26-31.
- [25] 李艳梅, 王琼瑶, 涂卫国, 等. 镍胁迫下产铁载体细菌对花生的促生性 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1882-1890.
- [26] JIANG C Y, SHENG X F, QIAN M, et al. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil [J]. Chemosphere, 2008, 72(2): 157-164. DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.02.006.
- [27] ADESEMOYE A O, OBINI M, UGOJI E O. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39(3): 423-426. DOI:10.1590/S1517-83822008000300003.
- [28] SUPRAPTA D N, NI M I M, KHALIMI K. Effectiveness of enterobacter cloacae to promote the growth and increase the yield of rice [J]. Journal of Biology Agriculture & Healthcare, 2014, 4(1): 44-50.
- [29] TESSIER A, CAMPBELL P G C, BISSON M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals [J]. Analytical Chemistry, 1979, 51(7): 844-851.
- [30] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 691-695.
- [31] ZENG X X, TANG J X, JIANG P, et al. Isolation, characterization and extraction of mer gene of Hg(superscript 2+) resisting strain D2 [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2010, 20(3): 507-512.
- [32] RIBEIRO C M, CAIDOSO E J. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) [J]. Microbiological Research, 2012, 167(2): 69-78. DOI:10.1016/j.micres.2011.03.003.
- [33] 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.
- [34] 朱彭玲. 新疆棉花根际土壤铁载体产生菌的遗传多样性及系统发育研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2008.
- [35] KIM J O, LEE Y W, CHUNG J. The role of organic acids in the mobilization of heavy metals from soil [J]. KSCE Journal of Civil Engineering, 2013, 17(7): 1596-1602.
- [36] 杜彩艳, 祖艳群, 李元. 石灰配施猪粪对 Cd、Pb 和 Zn 污染土壤中重金属形态和植物有效性的影响 [J]. 植物科学学报, 2008, 26(2): 170-174.
- [37] 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. DOI:10.12030/j.cjee.201612218.

- [38] 陆文龙, 曹一平, 张福锁. 低分子量有机酸对不同磷酸盐的活化作用 [J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 99-104.
- [39] SHI P, ZHU K, ZHANG Y, et al. Growth and cadmium accumulation of *Solanum nigrum* L. seedling were enhanced by heavy metal-tolerant strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Water, Air & Soil Pollution, 2016, 227(12): 459. DOI:10.1007/s11270-016-3167-6.
- [40] SINGH R P, JHA P, JHA P N. Bio-inoculation of plant growth-promoting rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-3 increased resistance against salt and temperature stresses in wheat plant (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2017, 36(3): 783-798. DOI:10.1007/s00344-017-9683-9.
- [41] 胡晓峰. 溶磷菌的筛选、溶磷条件优化及对玉米的促生作用研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [42] ISRAR D, MUSTAFA G, KHAN K S, et al. Interactive effects of phosphorus and *Pseudomonas putida* on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes and organic acids exudation [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016, 108: 304-312. DOI:10.1016/j.plaphy.2016.07.023.

(本文责任编辑: 郑晓梅)

Enhancing effect of siderophore-producing bacteria on remediation of cadmium-contaminated soil by *Solanum nigrum* L

WANG Dongsheng, WANG Lili *, LI Qusheng, ZHOU Ting, ZHOU Xuefang, GAO Qiong

Key Laboratory of Environmental Pollution and Health of Guangdong Province, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China

* Corresponding author, E-mail: towanglili@163.com

Abstract Two strains of siderophore-producing bacteria T1 and Y2 were isolated from the root system soil of *Solanum nigrum* L by CAS screening medium. Physiological and biochemical identification and 16S rDNA sequence analysis confirmed that T1 and Y2 were *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*, respectively. These strains were inoculated into the cadmium and phosphorus-dissolving medium for the determination of cadmium and phosphate dissolution, and the analysis of extracellular secretions. The results showed that the effective cadmium and available phosphorus in the culture medium inoculated with T1 and Y2 were significantly higher than those in the non-inoculated control ($P < 0.05$). Organic acids such as oxalic acid, succinic acid and glyceric acid secreted by these strains significantly reduced the pH of the medium ($P < 0.05$). The activation of cadmium carbonate and calcium phosphate was promoted. Pot experiment of *Solanum nigrum* L in Cd-contaminated soil was conducted with strain irrigation at root. The biomass of *Solanum nigrum* L, the concentration of soluble Cd in root soil, the total amount of Cd absorbed by *Solanum nigrum* L and the transformation of Cd in root soil were analyzed. The results showed that the concentration of Cd in the root solution treated with T1 and Y2 was 4.5 and 3.6 times higher than that of the non-inoculated control. The dry weight of aerial and underground parts treated with strain T1 was increased by 1.55 and 2.45 times compared with the control. The dry weight ratio of aerial and underground parts treated with strain Y2 was 1.47 and 2.28 times higher than that of the control. The total Cd uptake of aerial parts of *Solanum nigrum* L treated with T1 and Y2 was 1.56 and 1.69 times higher than that of non-inoculated control. The enrichment coefficient of *Solanum nigrum* L treated with T1 and Y2 inoculation increased, whereas, it was not significant ($P > 0.05$). The transport coefficient of *Solanum nigrum* L treated with T1 and Y2 inoculation did not change significantly compared with the control ($P > 0.05$). The transformation of insoluble Cd to exchangeable form in root soil of *Solanum nigrum* L was promoted. Meanwhile it was found that inoculation with strains T1 and Y2 could significantly promote the uptake of Cd ($P < 0.05$) and enhance the ability of *Solanum nigrum* L to remediate polluted soil with cadmium.

Key words siderophore-producing bacteria; *Solanum nigrum* L; extracellular secretion; Cd-contaminated; soil remediation