

土壤中 Cd^{2+} 胁迫对 *gfp* 基因标记的饭豆 (*Vigna umbellata* L.) 根瘤菌生物毒性的研究

邵继海^{1,2}, 何绍江¹, 冯新梅¹

(1. 华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2. 湖南农业大学 资源环境学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 利用绿色荧光蛋白基因(*gfp*)标记研究了土壤中 Cd^{2+} 胁迫对饭豆(*Vigna umbellata* L.) 根瘤菌 JMC1402G 腐生存活的影响, 同时也探讨了 Cd^{2+} 胁迫对其共生固氮能力的影响。结果表明, YMA 培养基平板培养时, Cd^{2+} 对 JMC1402G 的 LC_{50} 为 $8.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。不管土壤灭菌与否, 当土壤中 Cd^{2+} 添加量为 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 向土壤接种的 37 d 内对 JMC1402G 的腐生存活无影响, 当 Cd^{2+} 添加量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 土壤中 JMC1402G 的数量明显低于对照, 随着 Cd^{2+} 添加量的进一步增大, 土壤中 JMC1402G 的数量迅速落于 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 以下。饭豆盆栽试验结果表明, Cd^{2+} 添加量在 $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内对 JMC1402G 共生固氮能力的影响不大, 当土壤中 Cd^{2+} 添加量达到 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 对 JMC1402G 产生较明显的生理毒性, 当 Cd^{2+} 添加量达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 饭豆根瘤菌-饭豆体系失去结瘤能力。JMC1402G 质粒快检结果表明, JMC1402G 在 Cd^{2+} 添加量为 $0, 3, 20, 50, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤中营腐生生活 37 d, 未出现质粒丢失情况。

关键词: 饭豆; 根瘤菌; Cd; 生物毒性; 土壤

中图分类号: X503.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0457-05

Bio-toxicity of Cd^{2+} Stress on a *gfp* Gene Marked Rice Bean (*Vigna umbellata* L.) *Rhizobium* Strain JMC1402G in Soil

SHAO Ji-hai^{1,2}, HE Shao-jiang¹, FENG Xin-mei¹

(1. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Resources and Environmental College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The effects of Cd^{2+} on the saprophytic survival and the symbiotic nitrogen fixation ability of a *gfp* gene-marked rice bean (*Vigna umbellata* L.) *rhizobium* strain JMC1402G in soils were studied. The results showed that the LC_{50} of Cd^{2+} to JMC1402G was $8.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in the YMA plates. No inhibition effect was observed on the numbers of JMC1402G in 37 d after it was inoculated into the sterile soil when the amendment amount of Cd^{2+} was $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The number of JMC1402G was one hundred times less than the control from 23 d to 37 d when the amendment amount of Cd^{2+} reached $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The number of JMC1402G decreased from $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ to $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ in 9 d after inoculated when the amendment concentration of Cd^{2+} was $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. In the non-sterile soil, there was also no obvious inhibition effect on the saprophytic survival of JMC1402G, but the inhibition effect appeared when Cd^{2+} amendment was $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. And the numbers of JMC1402G decreased from $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ to $10^4 \sim 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively in 23 d after inoculation when the concentration of Cd^{2+} amendment were $0 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The numbers of JMC1402G declined to less than $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ with the increment of amended Cd^{2+} . The results of pot experiment showed that there was no serious inhibition effect of external amendment of Cd^{2+} on symbiotic nitrogen fixation ability in soils when the external Cd^{2+} amendment was less than $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, but obvious bio-toxicity was found when the concentration of amended Cd^{2+} was $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and no nodule was observed when the concentration reached to $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The plasmid profile of the strains JMC1402G recovered respectively from soils amended different levels of Cd^{2+} indicated that there were no plasmid elimination effect appeared in 37 d after inoculation at the concentration of Cd^{2+} amendment less than $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Keywords: rice bean (*Vigna umbellata* L.); *rhizobium*; Cd; bio-toxicity; soil

收稿日期: 2007-05-24

基金项目: 国家自然科学基金(30070027)

作者简介: 邵继海(1979—), 硕士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: shaojihai@yahoo.com.cn

近年来,随着工农业的发展,重金属的污染也越来越严重。Cd 为生物非必需的有毒元素,土壤中 Cd 的含量一般较低,其本底值在 0.1 mg·kg⁻¹ 左右,但近年来,由于矿产资源的非合理开采及工业三废的排放,造成了大面积的 Cd 污染,据报道我国 Cd 污染土地面积已达 1.3 万 hm²^[1]。Cd 积累能引起植物光合能力下降、代谢途径中一些关键酶活性的丧失,从而导致植株出现生长矮小,枯萎死亡^[2],这对于矿山生态恢复是一个严重的障碍。

饭豆是一种耐高温、耐贫瘠、较抗旱,多种植于热带和亚热带的低海拔地区的一种豆科植物,对矿山环境有较强的适应性,有希望应用于矿区污染土壤的生态修复。根瘤菌在土壤中有营腐生生活和共生生活两种生活形式,目前关于重金属对根瘤菌毒性的研究一般只集中在共生固氮阶段^[3-5],而将根瘤菌腐生生活与共生固氮联系起来的研究却鲜见报道,本文以绿色荧光蛋白基因(*gfp*)标记的饭豆根瘤菌为材料,研究了在黄棕壤中添加 Cd²⁺对饭豆根瘤菌腐生存活、共生固氮能力及质粒稳定性的影响,旨在能为 Cd 污染矿区的生态修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

带绿色荧光蛋白基因(*gfp*)标记的饭豆根瘤菌 JMC1402G,抗卡拉霉素(Km^r),在 360 nm 的紫外灯下其菌落发出绿色荧光,华中农业大学农业微生物国家重点实验室提供。Cd²⁺为 CdCl₂·2.5H₂O(分析纯)。饭豆种子来自于湖北长阳。供试土壤为黄棕壤,取自华中农业大学实验农场,其基本理化性质如下:碱解氮 38.06 mg·kg⁻¹,有效磷 18.32 mg·kg⁻¹,有效钾 42.90 mg·kg⁻¹,有机质 1.85%,pH 6.43,总 Cd 0.13 mg·kg⁻¹。

1.2 培养基

YMA 培养基配方见参考文献[6],SM 培养基配方见参考文献[7]。

1.3 供试土壤处理

土壤风干过筛(2 mm),装入棉布袋中,装入量分别为 600 g·袋⁻¹(分灭菌组和不灭菌组,用于腐生存活实验)和 1 650 g·袋⁻¹(灭菌,用于盆栽实验)两种,将灭菌组土壤以 121 ℃ 1 h 湿热间歇灭菌 2 次。灭菌后装入经表面灭菌的 2.5 L 的塑料小桶中,于超净工作台上加入 CdCl₂ 溶液,加入量分别为 3、20、50、100 mg·kg⁻¹(以 Cd²⁺量为准),对照处理则加入等量的无菌水,混合均匀,盖上桶盖,28 ℃ 温育 10 d,使添加的

Cd²⁺与土壤充分作用。

1.4 Cd²⁺对饭豆根瘤菌生长抑制程度的测定

按参考文献[5]方法向 YMA 固体培养基中加入 Cd²⁺,使其浓度分别为 0、1.78、3.16、5.62、10、17.78 μg·mL⁻¹(等对数距),各处理按标准平板稀释测数方法加入 10 倍系列稀释的 JMC1402G 菌液,于 28 ℃ 培养 10 d,数出各处理的菌落数。

1.5 土壤中不同浓度 Cd²⁺对饭豆根瘤菌腐生存活的影响

1.5.1 菌株的活化、收集及接种于土壤

见参考文献[8]。

1.5.2 活菌检测

分别在接种后第 2、5、9、16、23、30、37 d 于超净工作台上按无菌操作规程取样作稀释平板测数,所用培养基为 SM 培养基,纳入记数的菌落以在 360 nm 的紫外灯下发绿色荧光者为准。

1.6 土壤中不同浓度 Cd²⁺对饭豆根瘤菌结瘤、共生固氮能力的影响

按照参考文献[9]进行种子催芽,选取芽长一致的种子种于经上述处理的含土量为 1 650 g·桶⁻¹的塑料小桶中,同时在种子表面接入 1 mL 活化好了的 JMC1402G 菌悬液(含菌数约 10⁸·mL⁻¹),保持 30% 的含水量,自然光照培养,60 d 后取样分析。

1.7 饭豆根瘤菌共生固氮酶活性的测定

利用日立 163 型气相色谱仪进行固氮酶活测定,氢火焰检测,担体为 GDX-502,柱温 55 ℃,检测室温度 90 ℃,N₂ 流速为 50 mL·min⁻¹,H₂ 流速为 30 mL·min⁻¹,空气流速为 400 mL·min⁻¹。固氮酶活的测定及计算见参考文献[9]。

1.8 土壤中 Cd²⁺胁迫对根瘤菌质粒稳定性的影响

将实验 1.5 第 37 d 灭菌土壤各处理组中分离的 JMC1402G 接至 YMA 液体培养基中(每个 Cd²⁺梯度挑取 50 个菌落,分 50 批分别进行质粒检测),待培养到对数期时,取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL 离心管内离心收集菌体。置冰上预冷 30 min 后,加入新配制的溶菌酶裂解液约 50 μL(视菌体多少而定),小心搅拌均匀以避免泡沫产生,于冰上放置 10 min 后点样。该电泳凝胶为适宜于质粒快检所用的特制凝胶,即点样孔后的胶内加有 SDS 以进一步促进菌体的裂解。点样后于 4 ℃ 冰箱中低温电泳,电泳电压为先用 20 V 低电压电泳 0.5 h,然后升高至 100 V 电泳 7~8 h,EB 染色后观察结果。

2 结果与讨论

2.1 Cd^{2+} 对饭豆根瘤菌 JMC1402G 生长抑制程度的测定

采用平板培养法得到的结果如图 1 所示。由图 1 可知 Cd^{2+} 对饭豆根瘤菌 JMC1402G 的 LC_{50} 为 $8.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

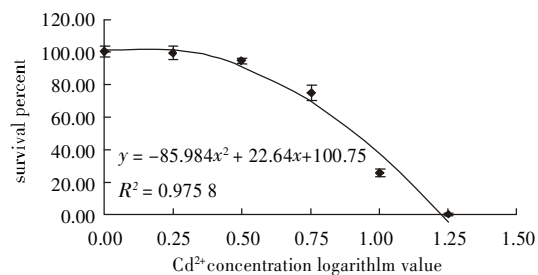


图 1 平板中 Cd^{2+} 对 JMC1402G 存活的影响

Figure 1 Effect of Cd^{2+} on the survival of JMC1402G in the YMA plates

2.2 土壤中不同浓度 Cd^{2+} 对饭豆根瘤菌 JMC1402G 腐生存活的影响

在灭菌土壤中添加不同浓度的 Cd^{2+} 后对饭豆根瘤菌 JMC1402G 腐生存活的影响见图 2。从图 2 中可以看出 Cd^{2+} 添加量为 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,对 JMC1402G 在灭菌土壤中腐生存活无影响, Cd^{2+} 添加量为 $0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 两组在取样的整个过程中,JMC1402G 的数量在前 9 d 略呈下降趋势,第 9 d 后其数量开始回升;当 Cd^{2+} 添加量为 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,JMC1402G 的数量

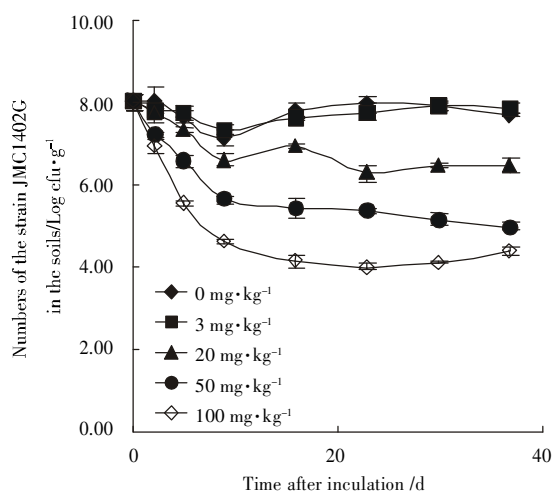


图 2 灭菌土中 Cd^{2+} 添加量对饭豆根瘤菌 JMC1402G 腐生存活的影响

Figure 2 Effect of external Cd^{2+} amendment on the survival of rhizobium strain JMC1402G in the sterile soils

在接种后的第 23~37 d 与对照组相比下降了近 2 个数量级; Cd^{2+} 添加量为 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,在接种后的第 9 d 其活菌数已降至 $10^5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下,接种后第 16~37 d,其数量略有上升,在接种后的第 37 d 其活菌数为 $2.08\times 10^4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

在未灭菌土壤中添加不同浓度的 Cd^{2+} 后对饭豆根瘤菌 JMC1402G 腐生存活的影响见图 3。从图 3 可以看出 Cd^{2+} 添加量为 $0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 两组处理中,在接种后第 23 d,JMC1402G 的数量已由 $10^8 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 降至 $10^5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$; Cd^{2+} 添加量为 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理组中 JMC1402G 在数量上均比对照组低; Cd^{2+} 添加量为 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,JMC1402G 的数量急剧降低,且分别于第 37 d 和第 16 d 降至 $10^4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下。因为 JMC1402G 只有一个抗性标记(Km^r),当其数量落入 $10^4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下时,通过稀释平板测数方法测定其数量会受到土壤中土著微生物的干扰而使计数失败,所以在未灭菌土壤中本文只能测定 $10^4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 以上的 JMC1402G 的数量。

灭菌土壤中,对照组的 JMC1402G 在取样的整个过程中其数量均保持在 $10^8 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右,而在未灭菌土壤中,对照组的 JMC1402G 数量在接种后 23 d 已由 $10^8 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 土降至 $10^5 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 土。比较两者结果发现灭菌土壤更有利于 JMC1402G 的腐生存活,分析其原因可能是土壤灭菌后消除了其他微生物的竞争与干扰,更有利于 JMC1402G 的生长繁殖。

2.3 土壤中添加 Cd^{2+} 对饭豆根瘤菌 JMC1402G 结瘤、共生固氮能力的影响

土壤中不同 Cd^{2+} 添加量对 JMC1402G 的结瘤及

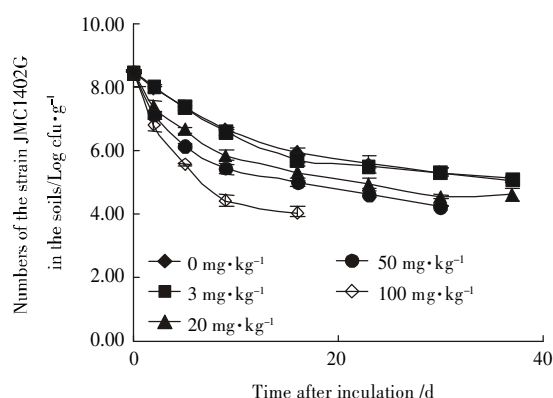


图 3 未灭菌土中 Cd^{2+} 添加量对饭豆根瘤菌 JMC1402G 腐生存活的影响

Figure 3 Effect of external Cd^{2+} amendment on the survival of rhizobium strain JMC1402G in the non-sterile soils

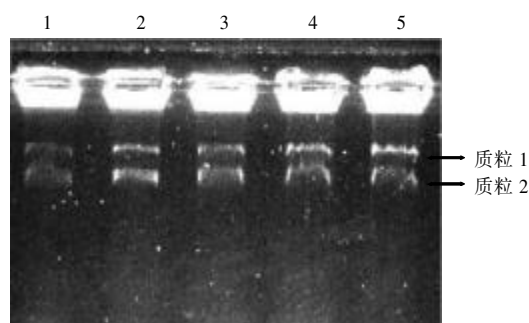
共生固氮酶活性的影响的检测结果如表 1 所示,并且对结果进行了新复极差分析(LSR)。从表 1 可以看出,土壤中添加 3 mg·kg⁻¹ 的 Cd²⁺对饭豆根瘤菌的结瘤和共生固氮能力没有影响。当土壤中的 Cd²⁺添加量达到 20 mg·kg⁻¹ 时,每株饭豆根瘤数、每株饭豆根瘤重及饭豆植株地上部分干重与没有添加 Cd²⁺的对照组相比,在 1%水平上表现出了极显著差异,但此时每克根瘤的固氮酶活性没有表现出显著差异。随着 Cd²⁺添加量的进一步增大,各项检测指标与对照组的相比,在 1%水平上均表现出了极显著差异。

2.4 土壤中 Cd²⁺胁迫对根瘤菌 JMC1402G 质粒稳定性的影响

图 4 显示了接种后第 37 d 从 Cd²⁺添加量为 0、3、20、50、100 mg·kg⁻¹ 的灭菌土壤中分离的 JMC1402G 的质粒快检情况。从图中可以看出,JMC1402G 在所有添加 Cd²⁺的各处理土壤中营腐生生活 37 d 未出现质粒丢失情况。

3 结论

(1) 从 JMC1402G 在土壤中的腐生存活情况来看,当土壤中 Cd²⁺添加量达 20 mg·kg⁻¹ 时,不管土壤灭菌与否,其数量均小于没有添加 Cd²⁺的对照处理,差异最大时可达 2 个数量级,且经 t 值检验此时其差异已达到极显著水平($P < 0.01$),说明土壤中 Cd²⁺添加量达 20 mg·kg⁻¹ 时,已对 JMC1402G 产生了生理毒性。但从饭豆盆栽结果来看,当土壤中 Cd²⁺添加量达



1~5: Plasmid profile of strains JMC1402G from soils which amended 0、3、20、50、100 mg·kg⁻¹ Cd²⁺

图 4 不同 Cd²⁺添加量的土壤中分离的饭豆根瘤菌 JMC1402G 质粒快检图谱

Figure 4 Plasmid profile of *rhizobium* strains JMC1402G screened out from soils which amended with different amount of Cd²⁺

20 mg·kg⁻¹ 时,其共生固氮能力与没有添加 Cd²⁺的对照处理相比无显著差异,只有当 Cd²⁺添加量达 50 mg·kg⁻¹ 时,与对照处理相比才产生了显著差异。分析其原因可能是盆栽试验过程中,饭豆本身对饭豆根瘤菌有一定的保护作用。

(2) 快生型根瘤菌的结瘤、固氮基因一般位于其共生大质粒上,Giller(1988)报道土壤中高浓度的重金属污染可以引起根瘤菌大质粒的丢失^[10],而本文通过根瘤菌质粒快检发现,在 Cd²⁺添加量不大于 100 mg·kg⁻¹ 的土壤中营腐生生活 37 d 的 JMC1402G 并未出现质粒丢失情况。

表 1 土壤中 Cd²⁺添加量对饭豆根瘤菌 JMC1402G 结瘤及共生固氮能力的影响

Table 1 Effects of external Cd²⁺ amendment on the nodulation and symbiotic nitrogen fixation ability of *rhizobium* strain JMC1402G in the soils

Cd ²⁺ 添加量	根瘤数/个·株 ⁻¹	根瘤重/g·株 ⁻¹	固氮酶活/C ₂ H ₄ μmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹	植株地上部分干重+Rh/g·株 ^{-1c}	植株地上部分干重-Rh/g·株 ^{-1d}
0 mg·kg ⁻¹	51.25 ^a A ^b	0.380 a A	5.03 a A	2.33 a A	1.92 a A
3 mg·kg ⁻¹	50.75 a A	0.381 a A	4.93 a A	1.84 b A	1.65 b A
20 mg·kg ⁻¹	36.50 b B	0.275 b B	4.70 a A	0.70 c B	0.56 c B
50 mg·kg ⁻¹	15.50 c C	0.083 c C	3.75 b B	0.40 cd BC	0.28 cd BC
100 mg·kg ⁻¹				0.10 d C	0.09 d C

注:a,表中每个数据为 4 个重复的平均值;b,不同小写字母表示 5%水平上有显著差异,不同大写字母表示 1%水平上有极显著差异;c,+Rh 表示接种饭豆根瘤菌 JMC1402G 处理;d,-Rh 表示不接种饭豆根瘤菌 JMC1402G 处理。

参考文献:

- [1] 茹淑华,苏德纯,王激清. 土壤镉污染特征及污染土壤的植物修复技术机理[J]. 中国生态农业学报,2006,14(4):29-33.
RU Shu-Hua, SU De-Chun, WANG Ji-Qing. Characteristics of Cd pollution in soil and the mechanisms of phytoremediation for soil contami-

- nation[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2006,14(4):29-33.
- [2] Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots [J]. *Plant Physiology*, 2001,127:887-898.
- [3] Ben Rebah F, Prévost D, Tyagi R D. Growth of alfalfa in sludge-amended soils and inoculated with rhizobia produced in sludge[J]. *Journal of*

- Environmental Quality*, 2002, 31:1339–1348.
- [4] Obbard J P, Jones K C. Measurement of symbiotic nitrogen-fixation in leguminous host-plants grown in heavy metal-contaminated soils amended with sewage sludge[J]. *Environmental pollution*, 2001, 111(2): 311–320.
- [5] 聂湘平, 蓝崇钰, 束文圣, 等. 锌对大叶相思-根瘤菌共生固氮体系影响研究[J]. 植物生态学报, 2002, 26(3):264–268.
NIE Xiang-Ping, LAN Chong-Yu, SHU Wen-Sheng, et al. Effects of zinc on *rhizobia*-*earleaf* ACACIA (*ACACIA Auriculæformis*) symbiotic association[J]. *Acta Phytoecologica Sinica*, 2002, 26(3):264–268.
- [6] 陈雯莉, 李阜棣, 周俊初, 等. 洪湖市土壤中快生型大豆根瘤菌的多样性[J]. 华中农业大学学报, 1994, 13(6):581–587.
CHEN Wen-li, LI Fu-di, ZHOU Jun-chu. Diversity of *rhizobium* FREDII strains in the soil of HongHu county[J]. *Journal of Hua Zhong Agricultural University*, 1994, 13(6):581–587.
- [7] 王 平, 王 勤, 冯新梅. 华癸根瘤菌在非豆科植物根圈定殖能力的研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(3):238–241.
WANG-Ping, WANG-Qin, FENG Xin-mei. Root colonization of non legume plants by luxAB and gusA genes marked huakuii JS5A16 [J]. *Journal of Hua Zhong Agricultural University*, 1999, 18(3):238–241.
- [8] 崔明学, 张成刚, 靳素英, 等. xylE 基因用于监测根瘤菌在土壤中存活的研究[J]. 应用生态学报, 1996, 7(3):287–292.
CUI Ming-xue, ZHANG Cheng-gang, JIN Su-ying, et al. Use of a xylE marker gene to monitor the survival of rhizobia populations in soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1996, 7(3):287–292.
- [9] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
ZHAO-Bin, HE Shao-jiang. Protocol of microbial experiments[M]. Beijing: Science press of China, 2002.
- [10] Giller K E, Grath S P, Hirsch P R. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *rhizobium*[J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1989, 21:841–848.