

植物根际促生菌(PGPR)对缓解水稻受土壤锌胁迫的作用

陈佛保¹, 柏 珺¹, 林庆祺¹, 王诗忠^{1,2}, 杨秀虹¹, 仇荣亮^{1,2*}

(1.中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275; 2. 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室, 广州 510275)

摘 要:为解决农田重金属污染的严重环境问题,提出利用植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)来缓解农作物受重金属胁迫的科学设想。研究从大宝山污染土壤中筛选出的 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 耐性菌株,经鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus sp.* DBM),菌株 DBM 具有产吲哚乙酸(IAA)和 ACC 脱氨酶能力,但无产铁载体能力。盆栽试验结果表明,菌株 DBM 在水稻受重金属 Zn($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)胁迫时能有效保护并促进水稻的生长,使其地上部和地下部干重比不加菌处理对照分别提高 97.8% 和 77.2%。另外,菌株 DBM 可以增加土壤中 Zn 的有效态含量,但不能增强水稻对土壤 Zn 的吸收能力。相反,在 Zn600 处理下,水稻地上部和地下部 Zn 浓度分别比不加菌处理对照减少 15.1% 和 19.9%。但由于促生效果也极为显著,其地上部和地下部 Zn 总量仍分别比不加菌处理对照增加 74.2% 和 48.6%。

关键词:植物根际促生菌(PGPR);水稻;重金属

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)01-0067-08

Application of Plant Growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) for Reducing Zinc Stress on Paddy Rice

CHEN Fo-bao¹, BAI Jun¹, LIN Qing-qi¹, WANG Shi-zhong^{1,2}, YANG Xiu-hong¹, QIU Rong-liang^{1,2*}

(1.School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2.Guangdong Provincial Key Lab of Environmental Pollution Control and Remediation Technology, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The heavy metal pollution in soils has become an increasing problem in China. This study focused on the application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to reduce heavy metal stress on crops. One Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} resistant bacteria, *Bacillus sp.* DBM, was isolated from contaminated soils of Dabao Mountain. Strain DBM showed some plant growth promoting properties such as producing indole-3-acetic acid (IAA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, but it could not produce siderophores. A pot experiment was conducted to study the effects of strain DBM on the plant growth and heavy metal uptake of paddy rice grown in different levels of Zn-contaminated soils. Results showed that the inoculation with strain DBM remarkably increased the growth of host plant, but did not enhance Zn extraction by rice. Growing in the soils with $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Zn, the dry weights of shoot and root of rice treated with strain DBM increased by 97.8% and 77.2%, respectively, and the Zn concentrations in the shoot and root were reduced by 15.1% and 19.9%, respectively, compared to the non-inoculated control. However, total Zn uptakes both in the shoot and root of rice still increased by 74.2% and 48.6%, respectively, which mostly attributed to the remarkable promotion of plant growth by strain DBM.

Keywords: plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR); paddy rice; heavy metal

重金属 Cd、Pb、Zn、Cu、Hg、Ni 等曾被美国环保署 (EPA) 列为土壤中首要的有毒污染物^[1]。中国农田的重金属污染已经成为一个严重的问题。农业部的一项调查表明:中国各大污灌区面积约 140 万 hm^2 ,但遭

受重金属污染的土地面积占污染总面积的 64.8%,其中轻度污染占 46.7%,中度污染占 9.7%,严重污染占 8.4%^[2]。据调查统计,目前中国污灌区所生产大米几乎全都遭受不同程度的重金属污染,中国每年因重金属污染导致的粮食减产超过 1 000 万 t,被重金属污染的粮食多达 1 200 万 t,合计经济损失超过 200 亿元人民币^[3]。更严重的是,一旦超标重金属进入作物的可食部位,并通过食物链进入人体,将对人类健康产生极大的危害。

收稿日期:2011-06-14

基金项目:国家自然科学基金-广东联合基金重点项目(U0833004)

作者简介:陈佛保(1988—),男,广东河源人,环境科学专业本科生。

E-mail: chenfobao@foxmail.com

* 通讯作者:仇荣亮 E-mail: eesqrl@mail.sysu.edu.cn

科学家发现植物根际分泌物可以促使土壤微生物在植物的根系周围定殖,从而影响植物的生长^[4]。由于这些分泌物为微生物提供了充足的营养,植物根际微区的微生物浓度要比非根际土壤中高出10~1 000倍^[5]。有些土壤细菌可以促进植物的健康生长^[4],加强其根系的伸长和发展^[6],或提高植物对逆境的耐受性^[7]。这种细菌我们一般称之为植物根际促生菌(Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)。接种PGPR是缓解农作物受土壤重金属胁迫的有效方式之一^[8-10]。

关于PGPR的促生原理,目前普遍认为它们可以固定大气中的氮并提供给植物,合成铁载体帮助植物截获土壤中的铁离子,合成长生素、细胞分裂素等可以促进植物生长的植物激素,溶解磷等土壤矿物质使植物更容易吸收,合成能降低植物体内乙烯水平的1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶,从而达到提高植物生物量的效果^[11-14]。

但是作为根际菌,PGPR除了可以促进植物生长以外,还会影响植物对土壤重金属的吸收。目前关于这方面的研究很多,但是结论尚不统一,主要有以下几种机制。

(1) Zaidi et al^[15]认为PGPR所产的吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)在促进植物根系生长的同时间接增强了其对土壤重金属的吸收能力。Haahtela et al^[16-17]和Dubrovsky et al^[18]也证明植物积累重金属的增加与接种根际菌后植物的根系发育有关。

(2) Hu和Boyer^[19]则认为PGPR所产的铁载体在络合 Fe^{3+} 的同时也溶出了土壤中其他重金属,从而使得土壤中有效态重金属增加。Kalinowski et al^[20]的实验也得出类似的结论。但Kuffner et al^[21]研究了多种根际菌对重金属超累积植物柳树的影响,却发现铁载体对柳树吸收Zn、Cd没有促进作用,反而降低了对二者的吸收。因此Kuffner认为铁载体的存在对柳树吸收重金属不起作用或有抑制作用。

(3) Whiting et al^[22]通过实验证明根际菌溶解了土壤中部分不能移动的Zn,从而促进遏蓝菜对Zn的积累。Kuffner et al^[21]也认为根际菌代谢所产的有机酸或其他络合物可以增加土壤中重金属Zn和Cd的可溶性。

总之,PGPR可以通过多种形式间接(通过促进植物生长发育)或直接(通过改变土壤中重金属的形态)影响植物对土壤重金属的吸收。但由于植物、微生物和重金属之间的相互作用极其复杂,关于PGPR

影响植物吸收重金属的具体作用机制尚未能被完全阐述。

本研究选取水稻作为供试植物,从大宝山的污染土壤中筛选出对重金属Zn具有较强抗性的菌株,重点探究抗性菌株对水稻生长以及吸收重金属Zn的影响,以期进一步阐明PGPR促进植物生长和影响植物对土壤重金属的吸收、转运和积累的作用机制,从而为利用PGPR来缓解农作物受重金属胁迫的科学设想提供理论依据和试验基础。

1 材料与方法

1.1 多金属耐性菌株的分离筛选与鉴定

污染土壤采自广东省大宝山的污染水稻农田。将土壤悬液接种到添加 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等重金属的固体培养基上。选取在含Cd浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、Cu浓度为 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、Pb浓度为 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、Zn浓度为 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的平板上分离较好、生长丰满的细菌单菌落,划线以获得纯培养,并对菌株进行驯化培养。

提取供试菌株的总DNA,利用上游引物F27(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),下游引物R1522(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行PCR扩增。PCR产物委托上海生工生物工程有限公司测序。测序结果通过Blast程序与GenBank中核酸数据进行比对分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

1.2 供试菌株的促生特性的定性鉴定

细菌产IAA能力定性检测参照Bric et al^[23]的方法。将色氨酸配制成 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,过滤除菌。将LB液体培养基分装于试管中,每管4 mL,121℃灭菌后加入无菌色氨酸溶液1 mL。接入24 h培养菌液0.1 mL,培养12 h后,吸取2 mL菌液并加入4 mL显色液(1 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ 和50 mL 35% HClO_4 混合)观察。呈粉红色者者为阳性,否则为阴性,以确定该菌株有无产生IAA的能力。

细菌产铁载体能力测定参考Schwyn et al^[24]的方法。将0.012 g CAS(铬天青S)溶于10 mL双蒸水,并与2 mL $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ 溶液混匀,得到溶液a;取0.015 g HDTMA(十六烷基三甲基溴化铵)溶于8 mL双蒸水中,得溶液b;将a液缓慢加入b液中,充分混匀即得溶液c。将10×MM9盐溶液20 mL、哌嗪二乙醇磺酸6.04 g加入盛有150 mL双蒸水的洁净三角瓶中,混匀后用50% NaOH调节pH至6.8,再加入琼脂粉3.2 g,得培养基d。将染液c、培养基d及 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

CaCl₂ 1 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、20%葡萄糖、10%酪蛋白氨基酸,分别灭菌(115 ℃、20 min)后置于 50 ℃水浴锅内保温待用。分别量取上述 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 0.2 mL、1 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O 4 mL、20%葡萄糖溶液 2 mL、10%酪蛋白氨基酸 6 mL 加入培养基 d 中。再沿瓶壁加入染液 c,充分摇匀,即得蓝色检测培养基。将菌株点接于检测培养基平板中,置(30±1)℃培养 48 h。观察菌落周围有无黄色晕圈,出现晕圈时说明有铁载体产生。

细菌 ACC 脱氨酶活性的定性检测参照李清飞^[25]的方法。在无氮的 DF 培养基表面涂上 ACC 溶液,然后接种细菌,观察能否生长。DF 培养基:4.0 g KH₂PO₄, 6.0 g Na₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 2.0 g 葡萄糖, 2.0 g 葡萄糖酸, 2.0 g 柠檬酸, 2.0 g (NH₄)₂SO₄, 痕量元素包括 1 mg FeSO₄·7H₂O, 10 mg H₃BO₃, 11.19 mg MnSO₄·H₂O, 124.6 mg ZnSO₄·7H₂O, 78.22 mg CuSO₄·5H₂O, 10 mg MoO₃, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2。

1.3 盆栽试验

供试干净土壤采自华南农业大学,其基本理化性质见表 1。风干后过 2 mm 筛备用,试验设 3 个 Zn 水平,即 0、200、600 mg·kg⁻¹(烘干土计)。每个 Zn 水平下的土壤分别设加菌和不加菌两种处理,每个处理重复 4 次,每盆装土 300 g,共 24 盆。重金属以溶液态(分析纯 ZnCl₂)加入,与土壤充分混合并驯化 1 个月。驯化后空白、Zn200 和 Zn600 处理的土壤实际 Zn 含量分别为 98.8、288.7 mg·kg⁻¹ 和 675.0 mg·kg⁻¹。

供试植物为水稻,其种子购自广州市蔬菜研究所。将水稻种子育苗后,待长出 3 至 4 片叶后移苗,移苗处理参照 Kuffner et al^[26]的方法。供试菌株在培养基培养 48 h 后于 4 ℃下离心 10 min (3 200 r·min⁻¹),弃去上清液,加入磷酸缓冲液(pH7)调解使其成为在 600 nm 下吸光度为 0.6 的菌悬液。所有待移苗的水稻用去离子水洗净根后,一部分浸泡在菌悬液中,另一部分浸泡在磷酸缓冲液中。30 min 后移苗至盆中,每盆 3 株,并相应地加入 10 mL 菌悬液或磷酸缓冲液。试验在自然光照条件下进行,生长过程中用去离子水浇灌。植物生长 30 d 后,分别收获地上部(茎叶)和地

下部(根),并各取部分土壤风干待测。植物先用自来水洗净,用根基扫描仪扫描根系,再用去离子水冲洗 3 遍后分别称地上部和地下部鲜重,105 ℃下烘 30 min,然后在 75 ℃下烘干至恒重,测定干重。同时测定各植物样品中 Zn 的含量。

1.4 土壤和植物样品的分析方法

土壤 pH 值测定参照 Pérez-de-Mora et al^[27]的方法。将风干后的土壤样品过 20 目塑料筛。称取土壤样品 4 g 于离心管中,加入 1 mol·L⁻¹ KCl 溶液 10 mL,在 25 ℃、200 r·min⁻¹ 条件下振荡 1 h,放置 30 min,用校正后的 pH 计测定。

有效态重金属测定参照 Conesa et al^[28]的方法。将风干后的土壤样品过 20 目塑料筛。称取土壤样品 4 g 于离心管中,加入 20 mL 提取剂(1 mol·L⁻¹ NH₄NO₃),在 25 ℃、200 r·min⁻¹ 条件下振荡 2 h。浸提后的样品在 6 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min,过滤后待测。

全量重金属测定参照 Pérez-de-Mora et al^[27]的方法。将风干后的土壤样品过 100 目塑料筛,称取 0.200 0 g 于聚四氟乙烯管中,加入 8 mL 王水(HNO₃:HCl=1:3, V/V),用微波消解仪进行消解。消解好的样品用 5%的硝酸冲洗,并定容到 25 mL,待测。有效态重金属和全量重金属含量用电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES, Optima 5300DV, PerkinElmer, USA)测定。分析全过程用中国环境监测总站标准样品研究所提供的红壤(ESP-2)进行质量控制。土壤其他相关理化性质测定参照鲍士旦^[29]的方法完成。

植物体内的重金属含量测定参照 Qiu et al^[30]的方法。将植物样品磨碎,地上部和地下部样品各称取 0.5 g 和 0.05 g(干重,精确到 0.000 1 g)于三角瓶中,加入 10 mL 混合酸(优级纯 HNO₃:优级纯 HClO₄=4:1)消解完全后定容到 25 mL,待测。同时做空白实验。所有样品用上述电感耦合等离子体发射光谱测定。分析全过程用中国环境监测总站标准样品研究所提供的西红柿叶(ESP-1)进行质量控制。

1.5 数据分析

利用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析和作图。差异显著性用单因素方差分析中 LSD 方法检验。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the experimental soil

pH	含水率/%	碱解氮/ mg·kg ⁻¹	速效磷/ mg·kg ⁻¹	有效钾/ mg·kg ⁻¹	有机质/ g·kg ⁻¹	重金属全量/mg·kg ⁻¹			
						Zn	Cu	Pb	Cd
6.57	1.5	78.2	51.7	50.2	20.6	98.8	59.9	104.1	0.5

2 结果

2.1 供试菌株的筛选及其促生特性鉴定结果

对大宝山污染土壤中的细菌进行 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 耐性筛选, 结果得到一株耐性较好的菌株。由 16S rDNA 序列与 Genbank 中已登录的基因序列进行比对分析得知, 所筛选得到的菌株与 *Bacillus sp.* (芽孢杆菌属) 有 99% 的相似性, 本研究中命名为 *Bacillus sp.* DBM。在本文中简化为菌株 DBM。

对菌株 DBM 的促生特性进行了定性鉴定。结果显示, 菌株 DBM 可以合成吲哚乙酸(IAA)。另外 DBM 也表现出 ACC 脱氨酶活性, ACC 脱氨酶能将乙烯的前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)转变成 α -丁酮酸和氨, 从而降低植物体内乙烯合成, 促进植物的持续生长。但是 DBM 没有合成铁载体的能力, 即不能通过络合 Fe^{3+} 来促进植物生长和根基竞争能力。

2.2 菌株 DBM 对水稻生长的影响

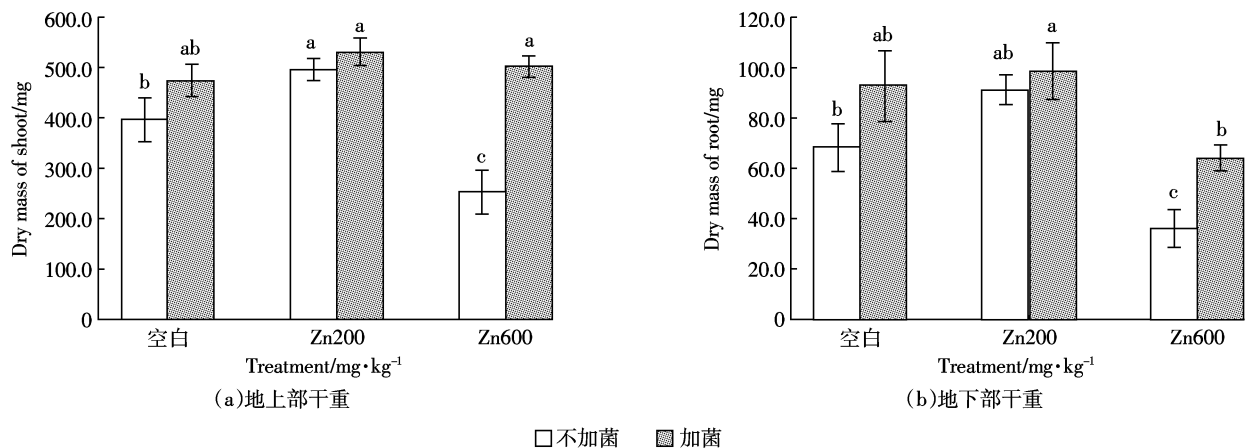
由图 1 可以看出, 在不加菌的情况下, Zn200 处理下的土壤中生长的水稻其地上部和地下部生物量(干重)均显著高于空白处理($P<0.05$)。其中地上部比对照高 25.3%, 地下部比对照高 33.5%。但在 Zn600 处理下, 水稻的生长明显受到了抑制, 其地上部和地下部干重分别比对照降低了 36.0% 和 46.9% (差异显著, $P<0.05$)。直观上, Zn600 处理的水稻亦长得矮小, 毒害症状明显, 且有一株苗在生长期死亡。可见, 低浓度的 Zn 对水稻的生长有刺激作用, 而高浓度的 Zn 对水稻的生长有抑制作用。该结果符合一般植物对重金属的抗氧化调节机制^[3]。

考察菌株 DBM 对水稻生长的影响。在空白处理下, 加菌处理后的水稻的生物量有较明显的提高, 其地上部和地下部干重分别比对照增加了 19.5% 和 35.6%。在 Zn200 处理下, 加菌比不加菌处理的水稻的生物量仅略有提高(增幅 $<10\%$), 没有显著性差异($P>0.05$)。但在 Zn600 处理下, 不加菌处理的水稻受到明显抑制, 加菌处理的水稻则生长良好, 其地上部干重比不加菌处理增长 97.8%, 与空白对照同比增长也达到 26.5%。这表明菌株 DBM 确实能达到促进水稻生长的效果, 尤其是在水稻受到重金属胁迫(Zn600 处理)的情况下, DBM 的促生效果极为显著。

2.3 菌株 DBM 对水稻吸收 Zn 的影响

由图 2(a)、(b)可知, 当土壤中所含金属 Zn 浓度较低(空白和 Zn200)时, 加菌处理对水稻中的 Zn 浓度几乎没有影响, 但当土壤中所含 Zn 浓度较高(Zn600)时, 加菌处理可以显著降低水稻中的 Zn 浓度($P<0.05$)。如表 2, 在 Zn600 处理下, 加菌处理后水稻中地上部和地下部的 Zn 浓度分别比不加菌对照减少 15.1% 和 19.9%。其原因可能是在 Zn600 处理下, 菌株 DBM 对水稻有最明显的促生作用, 水稻生物量的显著增加很大程度上稀释了其重金属浓度。但值得注意的是, 不管加菌还是不加菌处理, 在所有人为添污处理后的土壤中生长的水稻中的重金属浓度均远远高于空白处理(12~44 倍)。这表明, 水稻中所含重金属的浓度仍主要取决于土壤中的重金属含量。

进一步考察菌株 DBM 对水稻中积累 Zn 总量的影响。如图 2(c)、(d)所示, 在 Zn600 处理下, 加菌处理后水稻中地上部和地下部积累的重金属 Zn 总量分



不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$), 下同

图 1 不同处理下水稻的地上部和地下部干重

Figure 1 Dry weight of shoot and root of rice

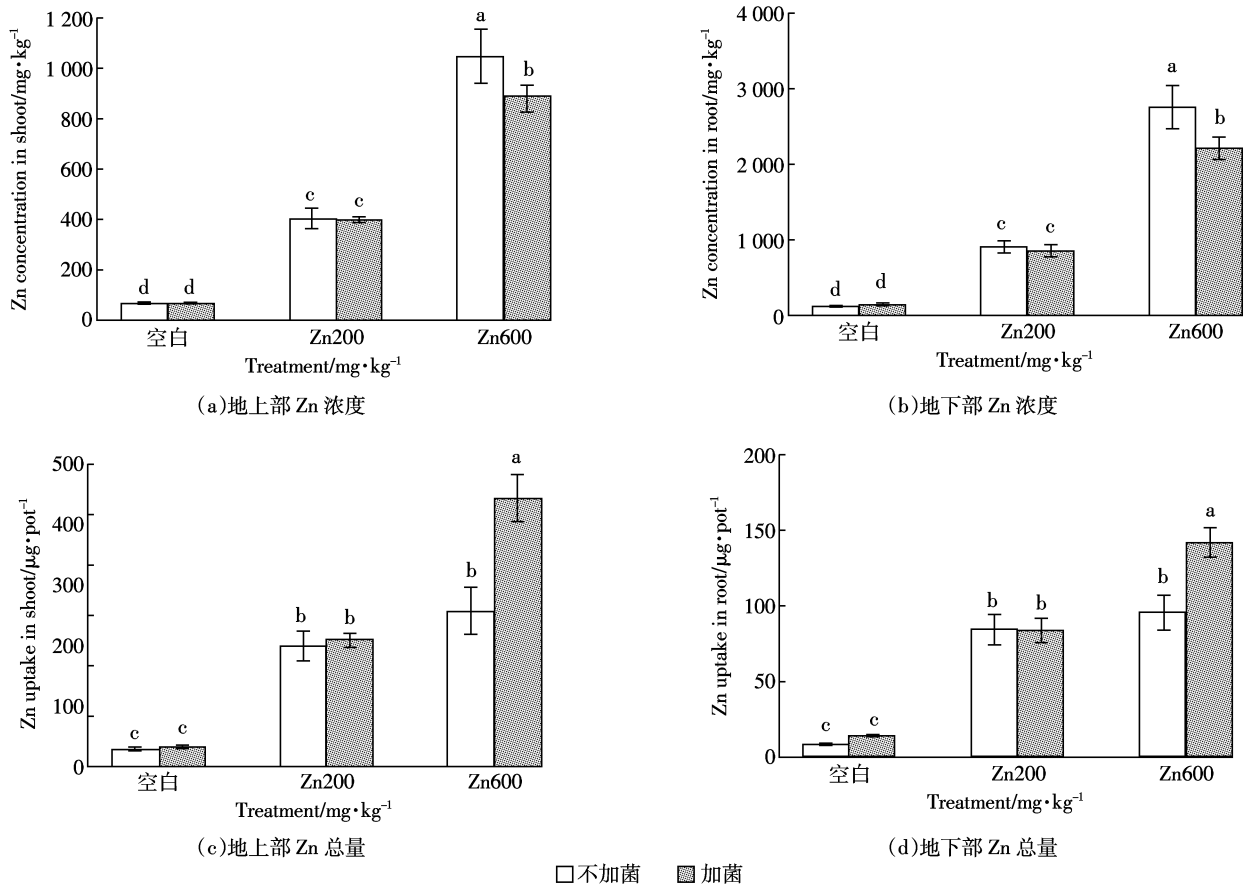


图 2 不同处理下水稻植株的 Zn 含量

Figure 2 The Zn concentration and uptake of rice

别增加了 74.2%和 48.6%,且差异性显著($P<0.05$)。其余处理下,加菌处理后的水稻中积累的重金属总量变化不大,但总体有增加的趋势(如表 2)。由于菌株 DBM 对空白和 Zn200 处理下水稻中的重金属浓度影响较小,其水稻中积累的重金属总量增加可能主要是生物量提高的结果。

转移系数(TF)是植物地上部重金属浓度与地下部重金属浓度的比值,可以反映植物将重金属从地下

部转移到地上部的能力大小。表 2 显示加菌处理后水稻中的转移系数总体表现出增长趋势,但差异不显著($P>0.05$)。富集系数(BF)是植物地上部重金属浓度与土壤重金属浓度的比值。从表 2 可以看出,随着土壤中 Zn 浓度的增加,水稻的 BF 也在增大,在 Zn200 和 Zn600 处理下,其 BF 均大于 1,显示了水稻较强的 Zn 富集能力。但加菌处理后,其 BF 较不加菌处理要小,差异也不显著($P>0.05$)。

表 2 菌株 DBM 对水稻生长及其吸收 Zn 的影响

Table 2 Effects of DBM on plant growth and Zn uptake by rice

处理		干重/mg		Zn 浓度/mg·kg ⁻¹		Zn 总量/μg·pot ⁻¹		转移系数 TF	富集系数 BF
		地上部	地下部	地上部	地下部	地上部	地下部		
空白	不加菌	396.4±86.6b	69.3±19.5b	68.7±6.9d	124.3±25.4d	27.3±6.8c	8.3±1.4c	0.57a	0.69b
	加菌	473.6±65.1ab	94.0±28.4ab	68.3±5.7d	148.6±39.8d	32.4±5.2c	13.3±2.3c	0.48ab	0.69b
Zn200	不加菌	496.6±43.6a	92.5±12.2ab	403.9±81.5c	908.6±160.7c	201.5±50.7b	84.2±20.4b	0.45ab	1.40a
	加菌	530.3±54.5a	100.0±22.6a	399.0±19.3c	853.0±169.3c	211.3±20.4b	83.3±16.4b	0.48ab	1.38a
Zn600	不加菌	253.5±84.0c	36.8±15.1c	1 046.1±215.2a	2 749.4±578.6a	257.1±71.7b	95.5±23.3b	0.38b	1.55a
	加菌	501.5±42.1a	65.2±10.3b	888.5±84.7b	2 201.2±296.7b	447.8±78.8a	141.9±19.2a	0.41b	1.32a

注:同一列中不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著,下同。

2.4 菌株 DBM 对土壤中 Zn 有效态的影响

首先考察土壤 pH 的变化。由表 3 可以看出,经水稻种植后,土壤 pH 值均有一定程度的提高,这可能与水稻生长期间长期处于淹水状态有关^[32]。但是加菌与不加菌处理种植水稻后,土壤的 pH 值变化不一致。加菌处理的 pH 值较不加菌处理变小。由于 pH 值的大小取决于土壤中的多种因素,而这一变化涉及土壤(重金属)-植物-微生物系统的复杂反映,因此 pH 值的变化可能不是由单一因素引起的,但与相应的金属有效态密切相关。

表 3 菌株 DBM 对土壤 pH 和重金属有效态的影响
Table 3 Effects of DBM on pH and soluble heavy metals in soil

处理		pH		重金属 Zn 的有效态/mg·kg ⁻¹	
		种植前	种植后	种植前	种植后
空白	不加菌	6.79±0.08	7.19±0.06a	0.3±0	0.2±0.1d
	加菌		7.12±0.03a		0.2±0.0d
Zn200	不加菌	6.29±0.09	6.55±0.05b	7.2±0.1	3.9±0.7c
	加菌		6.45±0.03c		4.2±0.2c
Zn600	不加菌	5.84±0.09	6.08±0.08d	53.1±1.5	41.0±12.9b
	加菌		5.80±0.04e		61.0±3.5a

在 Zn600 处理下,加菌处理后 pH 值的变化幅度最大,下降了 0.28 个单位,而其他处理变化在 0.07~0.11 之间。pH 值的变小可能与 Zn 的有效态显著增加有关。如表 3 所示,加菌处理种植水稻后,土壤中的有效态 Zn 含量为 $61.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而不加菌对照为 $41.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,加菌比不加菌高出 48.8%。更有意思的是,这一值($61.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)比种植前的 $53.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 不仅未减少反而增加了 14.9%。这表明菌株 DBM 可能通过某种机制活化了土壤中部分难移动的 Zn。

3 讨论

近年来,土壤重金属污染的植物-微生物联合修复技术受到了广泛关注。植物根际促生菌(PGPR)可以通过一种或多种机制促进植物的健康生长,增强植物对逆境的耐受性,因此可以用来缓解植物受重金属的胁迫。但 PGPR 在促进植物生长的同时,也影响了植物对土壤重金属的吸收,而这一问题至今尚未有明确的解释机制。

本研究从大宝山污染土壤中筛选出一株多金属耐性菌株 *Bacillus sp.* DBM,并利用菌株 DBM 对水稻进行盆栽试验。试验结果显示菌株 DBM 能够有效缓解水稻受重金属胁迫,保护并促进水稻的健康生长。

在 Zn600 处理下,菌株 DBM 使水稻的地上部和地下部干重比不加菌处理对照分别提高 97.8%和 77.2%,效果极为显著($P<0.05$)。而在 Zn200 处理下,这种促生效果并不显著($P>0.05$)。其原因可能是在高浓度的金属 Zn 胁迫下,不加菌处理的水稻会由于生理应激反应产生大量的“逆境乙烯”抑制了水稻的生长,而菌株 DBM 所产的 ACC 脱氨酶能够分解乙烯的前驱物 ACC,从而降低水稻体内的乙烯水平。以减小这种“逆境乙烯”对植物的抑制作用。但低浓度的 Zn 对水稻不仅没有产生胁迫,反而刺激了水稻的生长,因而功能菌株本身的促生效果不明显。Burd et al^[11]最早发现菌株 *K. ascorbata* SUD165 可能通过 ACC 脱氨酶降低乙烯水平来促进油菜的根系伸长和生长。Belimov et al^[12]和 Glick et al^[13]通过实验证明 ACC 脱氨酶活性细菌可以协助植物抵制包括重金属胁迫的逆境对植物生长产生的不利影响。另外,菌株 DBM 具有产 IAA 能力,前人认为 IAA 可以促进植物横向和不定根的发育^[33-34],但本研究发现加菌处理后水稻的根系表面积与不加菌处理对照并没有显著性差异(Zn600 处理除外,数据未显示),因而 IAA 可能不是菌株 DBM 促进水稻生长的主要机制。同时,菌株 DBM 不具产铁载体能力,因此也不是菌株 DBM 的促生机制。此外,也有学者^[21]认为,通常所讨论的 IAA、ACC 脱氨酶以及铁载体的作用均不包含在根际菌的促生效果中。具体机理尚需进一步研究。

PGPR 不仅能通过产 ACC 脱氨酶或 IAA 等作用来促进植物生长,达到提高植物生物量的效果,也能通过自身代谢活动溶解、络合、氧化、还原土壤中的重金属及其矿物,从而改变重金属与土壤的结合形态^[35-36]。本研究发现种植水稻后,加菌处理的土壤中 Zn 的有效态($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ 提取)比不加菌处理要高。在 Zn600 处理时,两者具有显著性差异($P<0.05$)。这说明菌株 DBM 可能通过某种机制活化了土壤中部分难以移动的 Zn。该结果与 Whiting et al^[22]实验结果一致。另外,Sheng et al^[37]研究也发现菌株 RJ16 能溶解根际土壤中的有效态 Cd。土壤 Zn、Cd 的活化机制可能具有相似性,主要与细菌分泌的有机酸和其他配位体有关,而与铁载体无关^[21]。由于菌株 DBM 不具产铁载体能力,本研究中 Zn 的溶解也不是铁载体引起的,这点与 Whiting et al^[22]和 Kalinowski et al^[20]的推测不同。

一般说来,土壤有效态重金属的增加有利于提高植物对土壤重金属的提取效率。大量的实验也表明,

接种 PGPR 能提高 *Brassica napus* 对 Cd 的吸收^[37]、*Thlaspi caerulescens* 对 Zn 的富集^[22]、*Alyssum murale* 对 Ni 的积累^[14]和 *Brassica napus* 对 As 的提取^[38]。然而本研究发现菌株 DBM 并没有提高水稻对 Zn 的吸收,这至少可以从两点看出:一是加菌处理后水稻的地下部和地上部所含 Zn 浓度均没有明显提高甚至出现下降,二是加菌处理后水稻的生物富集系数(BF)也出现不升反降的趋势。这点与 Whiting et al^[22]的结果相反,Whiting 等发现根际菌使得遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*)在地上部干重提高 70%的同时其 Zn 浓度增至不加菌处理的 2 倍。这可能是因为遏蓝菜是 Zn 的超富集植物,在其对 Zn 处于“饥渴”状态时增加土壤有效态 Zn,可以显著提高其对 Zn 的提取效率,而水稻对 Zn 的吸收能力有限,在 Zn600 处理时土壤有效态 Zn 已经处于“过饱和”状态,因此即使菌株 DBM 继续溶解出 Zn 也不能增加水稻对 Zn 的吸收。这也从一个方面证明了菌株 DBM 并没有如其他学者^[15-18]所认为的通过改变根系形态增强植物对土壤金属的吸收能力。另外一个证据是根系扫描,发现加菌处理后水稻的根系表面积并未发生显著性变化。至于 Zn600 处理下,加菌处理后水稻积累的 Zn 总量显著增加,这是水稻生物量大幅提高的结果,并不能说明水稻对 Zn 的吸收能力得以加强。不过,从实际应用角度来说,水稻所含的 Zn 浓度不升反降反而有利于降低可食部位重金属超标的风险。这点与超富集植物的应用目的恰好相反。

4 结论

(1)本试验从大宝山的污染土壤中筛选出一株 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 耐性菌株,经 16S rDNA 序列与 Genbank 中已登陆的基因序列分析鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus sp.* DBM)。对菌株 DBM 的促生特性的鉴定结果表明,菌株 DBM 具有产吲哚乙酸(IAA)和 ACC 脱氨酶能力,但无产铁载体能力。

(2)盆栽试验结果表明,低浓度 Zn(200 $mg \cdot kg^{-1}$)对水稻的生长有显著促进作用,而高浓度的 Zn(600 $mg \cdot kg^{-1}$)对水稻的生长有显著抑制作用。菌株 DBM 在水稻受重金属 Zn(600 $mg \cdot kg^{-1}$)胁迫时能有效保护并促进水稻的生长,使其地上部和地下部的干重比不加菌处理对照分别提高 97.8%和 77.2%。可见,菌株 DBM 可以有效缓解水稻受重金属 Zn 的胁迫。

(3)盆栽试验还发现,菌株 DBM 可以溶解根际土壤中 Zn 的有效态含量(1 $mol \cdot L^{-1}$ NH_4NO_3 提取)。但水

稻地上部和地下部 Zn 浓度比不加菌处理对照分别减少 15.1%和 19.9%。而由于促生效果也极为显著,其地上部和地下部 Zn 总量仍比不加菌处理对照分别增加 74.2%和 48.6%。

参考文献:

- [1] Cameron R E. A guide for site and soil description in hazardous waste site characterization//Hoddinott K B, ed. Superfund Risk Assessment in Soil Contamination Studies[M]. Los Angeles ASTM Publication, 1992.
- [2] 陈怀满,郑春荣. 中国土壤重金属污染现状与防治对策[J]. 人类环境杂志, 1999, 28(2): 130-134.
CHEN Huai-man, ZHENG Chun-rong. Heavy metal pollution in soils in China: Status and countermeasures[J]. *A Journal of the Human Environment*, 1999, 28(2): 130-134.
- [3] 杨科壁. 中国农田土壤重金属污染与其植物修复研究[J]. 世界农业, 2007, 8: 58-61.
YANG Ke-bi. Study on heavy metal contamination in soils in China and its phytoremediation[J]. *World Agriculture*, 2007, 8: 58-61.
- [4] Glick B R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 41(2): 109-117.
- [5] Glick B R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(3): 367-374.
- [6] Gamalero E, Martinotti M G, Trotta A, et al. Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions[J]. *New Phytologist*, 2002, 155(2): 293-300.
- [7] Glick B R. Bacterial ACC Deaminase and the alleviation of plant stress//Allen I. Laskin J W B, Geoffrey M G, eds. *Advances in Applied Microbiology*[M]. Academic Press, 2004: 291-312.
- [8] Tripathi M, Munot H P, Shouche Y, et al. Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9[J]. *Current Microbiology*, 2005, 50(5): 233-237.
- [9] Rani A, Shouche Y, Goel R. Declination of copper toxicity in pigeon pea and soil system by growth-promoting *Proteus vulgaris* KNP3 strain[J]. *Current Microbiology*, 2008, 57(1): 78-82.
- [10] Ganesan V. Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad[J]. *Current Microbiology*, 2008, 56(4): 403-407.
- [11] Burd G I, Dixon D G, Glick B R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3663-3668.
- [12] Belimov A A, Safronova V I, Sergeeva T A, et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47: 642-652.
- [13] Glick B, Cheng Z, Czarny J, et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 119(3): 329-339.
- [14] Abou-Shanab R A, Angle J S, Delorme T A, et al. Rhizobacterial ef-

- fects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*[J]. *New Phytologist*, 2003, 158(1):219–224.
- [15] Zaidi S, Usmani S, Singh B R, et al. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(6):991–997.
- [16] Haahtela K, Laakso T, Korhonen T K. Associative nitrogen fixation by *Klebsiella* spp.: Adhesion sites and inoculation effects on grass roots [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1986, 52(5):1074–1079.
- [17] Haahtela K, Laakso T, Nurmiaho-Lassila E-L, et al. Effects of inoculation of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* with root-associated, N₂-fixing *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Azospirillum*[J]. *Plant and Soil*, 1988, 106(2):239–248.
- [18] Dubrovsky J G, Puente M E, Bashan Y. Arabidopsis thaliana as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hair growth[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26(12):1657–1664.
- [19] Hu X, Boyer G. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(11):4044–4048.
- [20] Kalinowski B E, Oskarsson A, Albinsson Y, et al. Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad [J]. *Geoderma*, 2004, 122(2–4):177–194.
- [21] Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, et al. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows [J]. *Plant and Soil*, 2008, 304(1):35–44.
- [22] Whiting S N, de Souza M P, Terry N. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(15):3144–3150.
- [23] Bric J M, Bostock R M, Silverstone S E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1991, 57(2):535–538.
- [24] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1):47–56.
- [25] 李清飞. 麻疯树复垦大宝山矿区及周边多金属酸性污染土壤的技术与机理研究[D]. 广州:中山大学, 2009.
- LI Qing-fei. *Jatropha curcas* L. reclamation of acid soils contaminated by mine multi-metal[D]. Guangzhou. Sun Yat-sen University, 2009.
- [26] Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, et al. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows [J]. *Plant Soil*, 2008, 304:35–44.
- [27] Pérez-de-Mora A, Burgos P, Madejón E, et al. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: Effects of plant growth and different amendments[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(2):327–341.
- [28] Conesa H M, Faz Á, Arnaldos R. Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union Mining District(SE Spain)[J]. *Chemosphere*, 2007, 66(1):38–44.
- [29] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第三版. 北京:中国农业出版社, 2005.
- BAO Shi-dan. Agricultural soil analysis[M]. Beijing. China Agricultural Press, 2005.
- [30] Qiu R L, Thangavel P, Hu P J, et al. Interaction of cadmium and zinc on accumulation and sub-cellular distribution in leaves of hyperaccumulator *Potentilla griffithii* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(2–3):1425–1430.
- [31] Schützendübel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372):1351–1365.
- [32] 唐罗忠, 生原喜久雄, 户田浩人, 等. 湿地林土壤的 Fe²⁺, Eh 及 pH 值的变化[J]. 生态学报, 2005, 25(1):103–107.
- TANG Luo-zhong, HAIBARA Kikuo, TODA Hirota, et al. Dynamics of ferrous iron, redox potential and pH of forest wetland soils[J]. *Acta Ecological Sinica*, 2005, 25(1):103–107.
- [33] Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, et al. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat[J]. *Plant and Soil*, 1999, 212(2):153–162.
- [34] Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2007, 31(4):425–448.
- [35] Kalinowski B E, Liermann L J, Brantley S L, et al. X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64(8):1331–1343.
- [36] Francis A J, Dodge C J. Anaerobic microbial dissolution of transition and heavy metal oxides [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1988, 54(4):1009–1014.
- [37] Sheng X F, Xia J J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(6):1036–1042.
- [38] Nie L, Shah S, Rashid A, et al. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40(4):355–361.