

# 外源微生物强化蓖麻对铅的吸收与积累研究

谭贵娥, 何池全, 陆晓怡

(上海大学 环境科学与工程系, 上海 200072)

**摘要:**采用温室盆栽(土壤 Pb 浓度为  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )试验,将 3 株 Pb 抗性菌株——蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)分别接种于蓖麻根际,研究铅抗性菌株对蓖麻吸收积累铅的影响。结果表明,蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌处理的植物地上部 Pb 吸收量分别比对照增加 40%、18% 和 19% ( $P < 0.05$ )。这说明上述细菌对蓖麻积累 Pb 均有促进作用,外源微生物对强化蓖麻修复铅污染土壤具有一定的潜力。

**关键词:**铅;蓖麻;抗性菌株;植物修复

**中图分类号:**X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)01-0082-04

## Effect of Lead-tolerant Bacteria on Lead Uptake and Accumulation by *Ricinus communis* L.

TAN Gui-e, HE Chi-quan, LU Xiao-yi

(School of Environmental Science & Engineering, Shanghai University, Shanghai 200072, China)

**Abstract:** A pot experiment with soil amended with  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $300 \text{ mg Pb} \cdot \text{kg}^{-1} \text{soil}$ ) was carried out to study the effect of three Pb-tolerant bacterial strains, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* on Pb uptake and accumulation by *Ricinus communis* L. The results showed that *B. subtilis* and *P. aeruginosa* did not significantly change the shoot biomass of *R. communis*, but *B. cereus* increased the shoot biomass of plant compared to non-inoculated plants ( $P < 0.05$ ). However, Pb accumulation in shoots of *R. communis* inoculated with *B. cereus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa* increased by 40%, 18% and 19% ( $P < 0.05$ ) respectively compared with non-inoculated plants. It was suggested that the Pb-tolerant bacteria improved Pb uptake by *R. communis* and the inoculation of tolerant bacteria could potentially enhance *R. communis* the remediation efficiency of Pb contaminated soil.

**Keywords:** lead; *Ricinus communis* L.; tolerant bacteria; phytoremediation

植物修复技术因具有成本低、污染少、操作简单及不破坏土壤结构等显著优点而受到人们广泛的关注,它主要应用于受重金属等无机污染物污染的土壤修复<sup>[1,2]</sup>。成功的植物修复主要依靠土壤中重金属的可利用性。然而对于植物来说,重金属的可利用性经常受金属与土壤络合的限制。在植物修复中使用合成的螯合剂,如 EDTA,虽然能够提高重金属在土壤中的溶解度,增加重金属的植物可利用性,但许多合成的

螯合剂太贵,而且会影响土壤结构和污染地下水,从而在修复实践中很难大面积使用<sup>[3,4]</sup>。土壤微生物被认为是微生物螯合剂,因为其活性强体积小表面积大,故与植物修复联合应用具有广泛前景<sup>[5-7]</sup>。

细菌是根际圈中数量最大、种类最多的微生物,其个体虽小但却是最活跃的生物因素<sup>[5,18]</sup>。据报道,某些细菌可分泌出质子、有机酸、酶等,对土壤中重金属有活化作用,可促进植物对重金属的吸收<sup>[8,9]</sup>。盛下放等<sup>[10]</sup>研究发现,镉抗性菌株芽孢杆菌属 RJ16 接种处理的番茄吸收的镉含量比不接菌对照增加 107.8%,提高了 Cd 向植株地上部的转移。de Souza 等<sup>[11]</sup>发现 Se 和 Hg 耐性细菌促进了湿地植物 saltmarsh bulrush 和 rabbitfoot grass 对重金属 Se 和 Hg 的富集。另外,细菌可以改善植物生长环境,提高植物的生物量。如将

收稿日期:2007-02-08

基金项目:上海市科委科技攻关项目(06dz12301);上海市教委重点学科建设基金资助项目(G642);上海市第二期重点学科(T0105)

作者简介:谭贵娥(1981—),女,在读硕士,主要从事环境微生物和生物修复方面的研究。E-mail:Tanzhi0020@tom.com

通讯作者:何池全 E-mail:cqhe@shu.edu.cn

空气中游离的分子氮以及土壤中被固定的磷、钾元素转化为植物有效营养供植物吸收利用<sup>[12]</sup>;抑制植物体内乙烯的合成,有利于植物定居、根的伸长;合成多种不同的植物激素(如生长素、细胞分裂素等),促进植物生长<sup>[13]</sup>。Wu等<sup>[21]</sup>将铅锌尾矿中分离的细菌接种到 *Brassica juncea* 根际,发现根际细菌刺激了植物的生长,提高了植物提取重金属 Cu、Cd、Pb 和 Zn 的效率。

据报道,蓖麻(*Ricinus communis* L.)对 Cu、Cd、Zn 等重金属有较强的耐性和吸收能力<sup>[14-16]</sup>。蓖麻由于生长周期短,生物量较大,且不易进入食物链,因此在重金属污染土壤修复中有潜在的应用价值。为提高蓖麻的修复效率,本试验筛选铅的耐性细菌并将其接种到蓖麻根际,研究铅耐性细菌对蓖麻吸收积累铅的影响,为确定提高重金属污染土壤植物修复效率的途径和筛选微生物调节剂提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 土壤样品

土壤采自上海市宝山区农田。将供试土样(0-20 cm)风干后过 2 mm 筛。土壤基本性质如下:pH(H<sub>2</sub>O)8.3,全 N 1.69 mg·kg<sup>-1</sup>,全 P 0.93 mg·kg<sup>-1</sup>,全 K 3.5 g·kg<sup>-1</sup>,有机质 37.4 g·kg<sup>-1</sup>,土壤 Pb 含量 176 mg·kg<sup>-1</sup>。

### 1.2 铅抗性菌株的筛选及鉴定

污泥样采自上海桃浦污水厂,污泥菌的分离纯化用平板划线接种。另外试验所用的 3 个已知菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)来自上海大学环境微生物实验室。将分离纯化的两个污泥菌和 3 个已知菌分别转接到含不同浓度 Pb(Pb 终浓度为:200、400、600 mg·L<sup>-1</sup>)牛肉膏蛋白胨琼脂培养基中斜面培养观察,以耐受铅浓度高为筛选依据。

### 1.3 菌悬液制备及种子包衣

将筛选出的铅耐性细菌转接到 LB 液体培养基中,在(29±1)℃下摇床培养 24 h 后,在冷冻离心机上 8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清液,用灭菌的磷酸盐缓冲液冲洗菌体两次,最后将菌体溶解在 10 mL 无菌水中<sup>[9]</sup>,即为备用的菌悬液。采用稀释平板计数法测定菌悬液浓度。LB 液体培养基的组成为:胰蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>,酵母粉 5 g·L<sup>-1</sup>,NaCl 5 g·L<sup>-1</sup>,用 NaOH 调 pH 到 7.0。

蓖麻种子在包衣前先用 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 20 min,

表面消毒,用无菌水冲洗后将其置于浓度为 10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>(CFU(colony forming units)为菌落形成单位)菌悬液中包衣 30 min,种子包衣量的测定采用稀释平板计数法。

### 1.4 盆栽试验

称取上述过筛风干土,每盆 1 000 g,拌入细砂 150 g,有机肥 50 g 作为基肥,共 1 200 g·盆<sup>-1</sup>。然后以溶液态加入 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,制成 Pb 污染土壤,其处理浓度均为 300 mg·kg<sup>-1</sup>(不含土壤背景值)。土样混合均匀后,加入蒸馏水使土壤含水量为田间持水量的 60% 左右,保持一周。待上述包衣的蓖麻种子阴干后在 300 mg·kg<sup>-1</sup> 的铅污染土壤中播种,每盆 4 颗。以不经过菌种悬浮液包衣的种子在同样浓度的铅污染土壤中播种的盆栽为对照,每个处理 3 次重复。播种 5-7 d,大部分种子发芽。试验在人工气候室内完成,温度控制在 20-25℃,每天光照 12 h,相对湿度控制在 65%~75%,浇水以保持土壤持水量在 60% 左右。

### 1.5 测定方法

蓖麻播种 60 d 后收获,沿土面剪取植株地上部,测株高,同时洗出根系,在 105℃ 下杀青,70℃ 烘干(48 h),分根、茎、叶称干重。各部分植物样品经磨碎后,用硝酸-高氯酸消解,原子吸收仪测定植物各部分 Pb 的含量。用 SPSS 13.0 软件处理试验数据,Duncan 多重比较各处理之间的差异显著性(P<0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 Pb 抗性菌株的筛选结果

由表 1 可知,污泥分离菌 1 号、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌在 Pb<sup>2+</sup> 浓度达到 600 mg·L<sup>-1</sup> 仍然能生长,表明该 3 种菌对 Pb 有很强的耐性,故选择污泥菌 1 号、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌为盆栽试验菌。污泥菌 1 号经上海市疾控中心鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。经铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌包衣的蓖麻种子平均带菌量分别为 0.75×10<sup>5</sup> CFU·粒<sup>-1</sup>,0.83×10<sup>5</sup> CFU·粒<sup>-1</sup>,0.68×10<sup>5</sup> CFU·粒<sup>-1</sup>。

### 2.2 Pb 抗性菌株对蓖麻生长的影响

Pb 抗性菌株对蓖麻生长的影响见表 2。蜡样芽孢杆菌处理的植株植高和根干重与对照不加菌植株相比

表 1 不同浓度的铅溶液的抑菌效果

Table 1 Effect of different Pb concentration on bacteria growth

细菌名称	培养液中铅的浓度/mg · L <sup>-1</sup>			
	0	200	400	600
污泥菌 1 号	+	+	+	+
污泥菌 2 号	+	+	-	-
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+
铜绿假单胞菌	+	+	+	+
嗜麦芽假单胞菌	+	+	+	-

注:以“+”表示有细菌生长,以“-”表示无细菌生长。

表 2 Pb 抗性菌株对蓖麻生长的影响

Table 2 Effect of Pb-tolerant strains on growth of *R. communis*

接种处理	株高 cm	干重/g · 株 <sup>-1</sup>	
		根	地上部
CK	26.9±3.4a	0.11±0.01a	0.59±0.02b
LY	27.1±2.6a	0.11±0.01a	0.85±0.04a
KC	21.0±1.9b	0.09±0.01a	0.56±0.03b
TL	22.4±2.0ab	0.10±0.01a	0.53±0.02b

注:①表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误差,同一列数据后字母不同表示处理间有显著差异 ( $P<0.05$ ),字母相同表示处理间无显著差异。②CK 代表不加菌;LY 代表蜡样芽孢杆菌;KC 代表枯草芽孢杆菌;TL 代表铜绿假单胞菌,下表同。

Note: ① Data in the table are means of three replicates ± SD, values with different letters in the same column are significantly different ( $P<0.05$ ), and values with same letter are not significantly different. ② CK: not inoculated with bacteria; LY: *Bacillus cereus*; KC: *Bacillus subtilis*; TL: *Pseudomonas aeruginosa*. The same below.

无显著变化 ( $P<0.05$ );但其地上部干重达到  $0.85 \text{ g} \cdot \text{株}^{-1}$ ,比对照增加了 45%,这说明蜡样芽孢杆菌的引入能够促进蓖麻地上部的生长。枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌处理的植株株高均有所减少 ( $P<0.05$ );其根干重和地上部干重也均有所减少,但与对照相比无显著变化 ( $P<0.05$ )。由此可知,不同的菌株对蓖麻的生长影响不一样。

### 2.3 Pb 抗性菌株对蓖麻吸收积累铅的影响

Pb 抗性菌株对蓖麻根、茎、叶中铅浓度的影响见

表 3 Pb 抗性菌株对蓖麻植株中铅浓度和铅吸收量的影响

Table 3 Effect of Pb-tolerant strains on Pb concentration and uptake by *R. communis*

接种处理	植株各部分铅浓度/mg · kg <sup>-1</sup>			每株植物吸铅量/mg · 株 <sup>-1</sup>	
	根	茎	叶	根	地上部
CK	186.0±2.6c	20.2±0.9c	12.2±0.5b	19.27±1.05a	9.40±0.13c
LY	199.4±1.5b	21.9±0.4c	10.7±1.0c	21.58±1.31a	13.18±0.33a
KC	252.6±2.1a	25.6±1.6b	15.3±0.7a	21.96±1.80a	11.11±0.06b
TL	159.4±0.7d	42.0±2.0a	10.9±0.7c	15.89±0.96b	11.17±0.13b

表 3。与对照相比,蜡样芽孢杆菌处理的蓖麻仅根中 Pb 浓度增加,茎中 Pb 浓度无明显变化,叶中 Pb 浓度有所减少;枯草芽孢杆菌的处理的蓖麻根、茎、叶中 Pb 浓度均有明显的增加,与对照相比差异性显著 ( $P<0.05$ );其根中 Pb 浓度为  $252.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,是对照的 1.36 倍;铜绿假单胞菌处理的蓖麻茎中 Pb 浓度最大,达  $42 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,是对照的 2 倍,但根中 Pb 浓度明显减少,这说明铜绿假单胞菌能促使蓖麻将 Pb 从地下部转移到地上部。

植物对重金属的吸收量通常用来衡量植物对重金属污染土壤的修复能力。由表 3 可知,蜡样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌处理的植株根部对铅的吸收量有所增加,与对照相比无显著变化,铜绿假单胞菌处理的植株根部铅的吸收量明显减少 ( $P<0.05$ )。蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌处理的植株地上部对铅的吸收量均明显增加,与对照相比差异性显著 ( $P<0.05$ )。其中蜡样芽孢杆菌处理的植株地上部对铅的吸收量最大,达  $13.18 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$ ,比对照增加了 40%;枯草芽孢杆菌和铜绿假单胞菌处理的植株地上部对铅的吸收量分别比对照增加 18% 和 19%。

### 3 讨论

植物根系为微生物提供了适宜的营养条件,从而提高了根区微生物的活性;反过来,微生物的旺盛生长,提高了根区有机物的降解及无机物的生物可利用性,也使植物更利于吸收和利用根区的营养物质,这种植物-微生物联合体系能促进植物对重金属污染的固定、积累或转化,从而减轻了土壤中重金属污染<sup>[7]</sup>。据报道,接种镉抗性菌株荧光假单胞菌 (*fluorescent pseudomonads*) 能有效增加高粱 (*Sorghum bicolor*) 的生物量,提高植株地上部 Cd 的吸收量。Duponnois 等<sup>[8]</sup>认为是由于荧光假单胞菌促进了植物对土壤营养元素的吸收,增强了植物抗性;二是荧光假单胞菌在代谢过程中产生柠檬酸,提高了 Cd 的生物可利用性,增加了植物对 Cd 的吸收。本试验引入的 3 株细

菌对蓖麻积累 Pb 均有不同程度的促进作用,其中蜡样芽孢杆菌对蓖麻修复铅的效果最好,蜡样芽孢杆菌处理的蓖麻地上部干重和地上部铅积累量较对照分别增加了 45%和 40%。这可能是由于微生物在蓖麻根际环境中刺激植物根系分泌次生代谢产物(有机酸等),提高根际环境中有效态的铅含量,促进了植物对铅的吸收。Steven Whiting 等<sup>[20]</sup>发现根际细菌接种到 Zn 的超积累植物遏兰菜(*Thlaspi caerulescens*)的根部,会促使植株地上部的鲜重和 Zn 含量增加一倍,地上部对 Zn 的吸收量增加 3 倍,并认为是细菌产生了一种能被根系吸收的 Zn-螯合载体。铜绿假单胞菌的引入有利于蓖麻根部吸收的铅向地上部转运,减少根部铅积累量而增加地上部铅的积累量。这也可能是由于植物根系微生物或其相互作用向根际环境中分泌了更多的铅离子载体、运输蛋白和向地上部的转运载体,促进了蓖麻根系吸收和向地上部对铅运输和积累。至于运输载体的论证和具体机理还需要针对根际土壤指标和植物生理生化指标作进一步的分析研究。

#### 4 结论

从植物地上部对 Pb 的积累看,本试验引入的 3 株细菌对蓖麻积累 Pb 均有不同程度的促进作用,与对照相比差异性显著( $P < 0.05$ )。其中蜡样芽孢杆菌对蓖麻修复铅的效果最好,蜡样芽孢杆菌处理的蓖麻地上部干重和地上部铅积累量较对照分别增加了 45%和 40%。

#### 参考文献:

- [1] Kumar P, Dushenkov V, Motto H, et al. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils [J]. *Environ Sci Technol*, 1995, 29: 1232-1238.
- [2] 王红旗,李 华,陆泗进.羽叶鬼针草对 Pb 的吸收特性及修复潜力[J]. *环境科学*, 2005, 26(6):143-137.
- [3] Huang J W, Chen J, Berti W R, et al. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoremediation [J]. *Environ Sci Technol*, 1997, 31:800-805.
- [4] Kos B, Lestan D. Induced phytoextraction/soil washing of lead using biodegradable chelate and permeable barriers [J]. *Environ Sci Technol*, 2003;37(3):624-629.
- [5] Chen Y X, Wang Y P, Lin Q, et al. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens* [J]. *Environ Int*, 2005, 31:861-866.
- [6] Burd G L, Dixon B R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants [J]. *Can J Microbiol*, 2000, 46: 237-245.
- [7] Sitaula B K, Almas A, Bakken L R, et al. Assessment of heavy metals associated with bacteria in soil[J]. *Soil Biol Biochem*, 1999, 31: 315-316.
- [8] Whiting S N. Rhizospherebacteria Mobilize Zn for Hyperaccumulation by *Thlaspi Caerulescens*[J]. *Technol*, 2001, 35 (15):3144-3150.
- [9] 蔡信德,仇荣亮,陈桂珠.微生物在镍污染土壤修复中的作用[J].*云南地理环境研究*, 2005, 17(3):9-14.
- [10] 盛下放,白 玉,夏娟娟,等.镉抗性菌株的筛选及对番茄吸收镉的影响[J]. *中国环境科学*, 2003, 23(5):467-469.
- [11] De Souza M P, Huang C P A, Chee N, et al. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants [J]. *Planta*, 1999, 209:259-263.
- [12] Glick B R. Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment [J]. *Biotechnology Advances*, 2003, 21(5): 383-393.
- [13] Lucy M, Reed E, Glick B R. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 86:1-25.
- [14] 陆晓怡,何池全.蓖麻对重金属锌的耐性与吸收积累研究[J]. *环境污染与防治*, 2005, 27(6):414-416.
- [15] 陆晓怡,何池全.蓖麻对重金属 Cd 的耐性与吸收积累研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(4):674-677.
- [16] 渠荣遴,李德森,杜荣莺,等.水体重金属污染的植物修复研究(IV)-种苗过滤去除水中重金属铜[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(2): 167-169.
- [17] 马溪平,付保荣,李法云,等.植物-微生物联合修复污染土壤的研究[J].*中国公共卫生*, 2005, 21(5):572-573.
- [18] 魏树和,周启星,张凯松,等.根际圈在污染土壤修复中的作用与机理分析[J].*应用生态学报*, 2003, 14(1):143-147.
- [19] Duponnois M, Kisa M, Assigbetse K, et al. Fluorescent pseudomonads occurring in *Macrotermes subhyalinus* mound structures decrease Cd toxicity and improve its accumulation in sorghum plants [J]. *Sci Total Environ*, 2006, 370: 391-400.
- [20] White P J. Phytoremediation assisted by microorganisms [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 502.
- [21] Wu S C, Cheung K C, Luo Y M, et al. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea* [J]. *Environmental Pollution*, 2006, 140:124-135.