

不同培养基分离的铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌镉铅耐性研究

湛方栋,何永美,李元,祖艳群,李洁

(云南农业大学资源与环境学院,昆明 650201)

摘要:利用常规、含 Cd^{2+} 和含 Pb^{2+} 的 3 种细菌培养基,分离云南省会泽县铅锌矿区圆叶无心菜的根际细菌,采用含 Cd^{2+} 或 Pb^{2+} 的培养液培养分离物,研究和比较这 3 种培养基分离的细菌对 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的耐性,结果表明, Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 抑制 3 种细菌培养基分离的铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌的生长。 Cd^{2+} 对常规、含 Cd^{2+} 和含 Pb^{2+} 细菌培养基分离的圆叶无心菜根际细菌生长半数抑制浓度(EC_{50})平均值分别为 0.20、0.41 和 0.24 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} 最大值分别为 0.70、0.79 和 0.48 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Pb^{2+} 的 EC_{50} 平均值分别为 0.40、0.53 和 0.52 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} 最大值分别为 0.77、0.87 和 0.82 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。含 Cd^{2+} 的培养基分离的圆叶无心菜根际细菌对 Cd 和 Pb 的耐性较强。

关键词:培养基;根际细菌;镉;铅;耐性

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1672-2043(2010)增刊-0116-07

Cd and Pb Tolerance of Rhizosphere Bacteria of *Arenaria orbiculata* in Lead - zinc Mine Area Isolated by Different Media

ZHAN Fang - dong, HE Yong - mei, LI Yuan, ZU Yan - qun, LI Jie

(College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Culturable rhizosphere bacteria of *Arenaria orbiculata* in abandoned lead - zinc mine area in Huize, Yunnan, China were isolated by common, Cd^{2+} or Pb^{2+} containing media. Cd and Pb tolerance of bacteria isolated by 3 media was studied by culturing the bacteria in fluid media containing Cd^{2+} or Pb^{2+} , the results showed that: the growth of rhizosphere bacteria of *Arenaria orbiculata* in abandoned lead - zinc mine area was suppressed by Cd^{2+} or Pb^{2+} . The average EC_{50} of Cd^{2+} on inhibition of the growth of rhizosphere bacteria isolated by common, Cd^{2+} or Pb^{2+} containing media was 0.20, 0.41 and 0.24 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the maximum EC_{50} of Cd^{2+} was 0.70, 0.79 and 0.48 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. The average EC_{50} of Pb^{2+} on inhibition of the growth of rhizosphere bacteria isolated by common, Cd^{2+} or Pb^{2+} containing media was 0.40, 0.53 and 0.52 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the maximum EC_{50} of Pb^{2+} was 0.77, 0.87 and 0.82 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. Cd and Pb tolerance of *Arenaria orbiculata* rhizosphere bacteria isolated by Cd^{2+} containing media was stronger.

Keywords: media; rhizosphere bacteria; cadmium; lead; tolerance

土壤系统中有毒重金属污染和防治一直是污染生态研究的难点和热点。常用的物理化学方法由于成本较高以及对环境造成二次污染等原因而难以

投入实际应用,治理效果也不够理想^[1],而引起广泛重视的植物修复技术受到土壤重金属生物有效性低和生物量小的限制^[2]。根际微生物通过其代谢活动及代谢产物,能促进重金属的溶解,提高植物生物量,强化植物修复效率,因此发展植物-微生物联合修复技术受到了重金属治理领域的广泛关注^[3]。筛选耐受重金属的微生物是开展植物-微生物联合修复技术的重要基础之一,采用含重金属的选择性培养基分

收稿日期:2009-08-14

基金项目:国家自然科学基金项目(30560034);云南省学术带头人后备人才项目(2006 PY01-34);云南省教育厅青年科研基金项目(6Y032B0)

作者简介:湛方栋(1980—),男,江西赣县人,在读博士,讲师,主要从事污染土壤微生物生态研究。E-mail: zfd97@126.com

通讯作者:祖艳群 E-mail: zuyanqun@yahoo.com.cn

离重金属污染土壤中的微生物,是常用的分离重金属耐性微生物的方法^[4-6]。由于长期处于重金属污染胁迫下的微生物产生适应性,采用常规培养基分离重金属污染土壤中的微生物,也可能获得重金属耐性微生物。然而,重金属污染土壤通常是多种重金属共同污染造成的,因此在制备含重金属的选择培养基时,应采用哪种重金属有效分离到重金属耐性强的微生物,采用含重金属的选择性培养基和常规培养基分离获得的微生物在耐受重金属能力上是否存在巨大差异,值得进行探讨。

会泽县位于云南省东北部,东经 103°03′~103°55′,北纬 25°48′~27°04′之间,会泽铅锌矿的采矿历史最早可以追溯到西汉时期^[7]。由于长期、大面积的开矿和冶炼,留下许多 Pb 和 Cd 等重金属严重污染的采矿废弃地。圆叶无心菜是当地铅锌矿区野生的重金属耐性植物^[8],采集其根际土壤,通过细菌常规培养基和含 Pb 或 Cd 的选择性培养基分离铅锌矿区圆叶无心菜的根际细菌并采用含不同浓度 Pb 或 Cd 的液体培养基培养,研究和比较采用不同培养基分离的细菌的 Pb 和 Cd 耐性,进而研究采用哪种培养基能够有效分离获得重金属耐性强的圆叶无心菜根际细菌,可为筛选重金属耐性菌株提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

圆叶无心菜(*Arenaria orbiculata* Royle ex Edgew. et Hook. f.),石竹科无心菜属,二年生或多年生草本,在我国主要分布于云南、四川等省^[9]。

1.2 样品采集与根际土悬浊液制备

会泽县者海镇民兵应急营 Pb/Zn 矿区(海拔 2 463~2 516 m, E 103°42′44″, N 26°38′58″)土壤全氮 0.5 g·kg⁻¹,全磷 0.8 g·kg⁻¹,全钾 3.9 g·kg⁻¹,pH 6.03,全 Pb 3 156.28 mg·kg⁻¹,全 Zn 45 308.21 mg·kg⁻¹,全 Cd 55.92 mg·kg⁻¹。在该矿区随机连根带土挖取野生圆叶无心菜健壮植株 10 株,塑料纸包扎密封根部,保持湿度,带回实验室备用。

选用依然鲜活的 3 种野生植物植株,轻轻抖落粘附在根表面的土壤,混合 10 株根系为一样品,置于盛有 100 mL 无菌水的三角瓶中,振荡 15 min,获得其野生植物的根际土壤悬浊液,用于进行有关微生物的测定^[10]。

1.3 根际细菌分离与计数

常规培养基为牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,胰水解酪蛋白 1.0 g,大豆蛋白胨 1.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.2。采用分析纯固体试剂氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)和醋酸铅 $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$,配制浓度为 100 mmol·L⁻¹的 Cd²⁺和 Pb²⁺母液。细菌培养基灭菌后冷却至 50℃时,加入 Cd²⁺母液使得培养基分别含 1、2 和 5 mmol·L⁻¹的 Cd²⁺,作为含 Cd²⁺培养基;添加 Pb²⁺母液使得培养基分别含 2、4 和 10 mmol·L⁻¹的 Pb²⁺,作为含 Pb²⁺培养基^[11]。

采用稀释平板法,在细菌培养 3 d 后计数。用已经在 105℃烘箱中烘了 6~8 h、至恒重的滤纸过滤根际土悬浊液,将获得的根际土进行与滤纸相同的处理,烘干至恒重,得到根际土的干重,从而获得根际细菌计数的基本单位 cfu·g⁻¹干土(cfu, colony forming unit)^[12]。

1.4 Cd 和 Pb 处理下圆叶无心菜根际细菌生长量和 EC₅₀的测定

用牛肉膏蛋白胨液体培养基(牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.2),通过添加定量的 Cd²⁺和 Pb²⁺储备液,分别制备 Cd²⁺浓度为 0、0.01、0.1、0.5 和 2 mmol·L⁻¹,Pb²⁺浓度为 0、0.01、0.1、1 和 10 mmol·L⁻¹的培养液。试管分装,每支试管装入 9 mL 培养液,灭菌后备用。

挑取培养 2 d 的圆叶无心菜根际细菌的菌苔,接入 10 mL 无菌水中,对照浊度计,配制浓度为 3×10⁸ 的细菌菌悬液^[13]。向不同 Cd²⁺浓度的细菌培养液接入 1 mL 无菌水或圆叶无心菜根际细菌菌悬液,以添加 1 mL 无菌水为对照,接种 1 mL 细菌菌悬液为处理,对照和处理均设 3 个平行,置于 28℃培养 2 d 后,采用 721 分光光度计,600 nm 处测定培养液的 OD₆₀₀值^[5]。用直线内插法求出圆叶无心菜根际细菌培养液相对 OD₆₀₀值为 50%时所对应的 Cd²⁺和 Pb²⁺浓度,此即 Cd²⁺和 Pb²⁺对圆叶无心菜根际细菌生长半数抑制浓度 EC₅₀。

1.5 数据分析

采用统计软件 DPS6.55, Duncan 新复极差法,分析铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌的不同 Cd²⁺浓度处理间数量和培养液 OD₆₀₀值的差异显著性($n=3$),并计算 Cd²⁺和 Pb²⁺与铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌培

养液 OD₆₀₀ 值之间的相关系数。

2 结果与分析

2.1 铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌的分离与计数

在常规培养基上生长的铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌数量达到 8.37×10^7 cfu · g⁻¹ 干土;在 Cd²⁺ 浓度为 1 mmol · L⁻¹ 和 2 mmol · L⁻¹ 的选择性培养基上,数量分别为 1.06×10^7 和 4.59×10^6 cfu · g⁻¹ 干土;Pb²⁺ 浓度为 2 mmol · L⁻¹ 时,数量为 2.28×10^7 cfu · g⁻¹ 干土。可见,Cd²⁺ 和 Pb²⁺ 均极显著减少铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌生长的数量。当选择性培养基中 Cd²⁺ 浓度为 4 mmol · L⁻¹,Pb²⁺ 浓度为 5 mmol · L⁻¹ 和 10 mmol · L⁻¹ 时,完全抑制圆叶无心菜根际细菌的生长。

通过对比菌落形态,从常规培养基上挑取 12 个圆叶无心菜根际细菌菌株,从含 Cd²⁺ 的选择性培养基上挑取 9 个菌株,作为圆叶无心菜根际耐 Cd 细菌,从含 Pb²⁺ 的选择性培养基上挑取 7 个菌株,作为圆叶无心菜根际耐 Pb 细菌。铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌、根际耐 Cd 细菌和根际耐 Pb 细菌纯化后保存,备用。

2.2 常规培养基分离的根际细菌的铅镉耐性

培养液中 Cd²⁺ 浓度为 0.01 mmol · L⁻¹ 时,12 个菌株中,4 个菌株生长量显著下降;Cd²⁺ 浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 时,10 个菌株生长量显著下降;Cd²⁺ 浓度

为 0.5 mmol · L⁻¹ 和 2 mmol · L⁻¹ 时,11 个菌株生长量均极显著下降。可见,培养液中 Cd²⁺ 浓度达到 0.1 mmol · L⁻¹ 显著抑制圆叶无心菜根际细菌的生长,细菌生长量随 Cd²⁺ 浓度的升高而下降,Cd²⁺ 与铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌生长量呈极显著或显著负相关。Cd²⁺ 对 11 株圆叶无心菜根际细菌的 EC₅₀ 平均值为 0.20 mmol · L⁻¹,其中,7 株菌的 EC₅₀ 小于 0.20 mmol · L⁻¹,4 株菌的 EC₅₀ 大于 0.20 mmol · L⁻¹,最大值为 0.70 mmol · L⁻¹ (表 1)。

培养液中 Pb²⁺ 浓度为 0.01 mmol · L⁻¹ 时,12 个菌株中,3 个菌株生长量显著下降;Pb²⁺ 浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 时,5 个菌株生长量显著下降;Pb²⁺ 浓度为 1 mmol · L⁻¹ 和 10 mmol · L⁻¹ 时,11 个菌株生长量均极显著下降。可见,培养液中 Pb²⁺ 浓度达到 1 mmol · L⁻¹ 显著抑制圆叶无心菜根际细菌的生长,细菌生长量随 Pb²⁺ 浓度的升高而下降,Pb²⁺ 与铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌生长量呈极显著负相关。Pb²⁺ 对 11 株圆叶无心菜根际细菌的 EC₅₀ 平均值为 0.40 mmol · L⁻¹,其中,6 株圆叶无心菜根际细菌的 EC₅₀ 小于 0.40 mmol · L⁻¹,5 株菌的 EC₅₀ 大于 0.40 mmol · L⁻¹,最大值为 0.71 mmol · L⁻¹ (表 2)。

2.3 含 Cd²⁺ 培养基分离的根际细菌的铅镉耐性

培养液中 Cd²⁺ 浓度为 0.01 mmol · L⁻¹ 时,9 个菌株中,2 个菌株生长量显著下降;Cd²⁺ 浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 时,4 个菌株生长量显著下降;Cd²⁺ 浓度为

表 1 Cd 处理下常规培养基分离的圆叶无心菜根际细菌的 OD₆₀₀ 值、EC₅₀ 和相关系数

Table 1 OD₆₀₀ value, EC₅₀ and correlation coefficient of rhizosphere bacteria isolated by common medium of *Arenaria orbiculata* under Cd treatment

菌株 Strains	不同 Cd ²⁺ 浓度下 OD ₆₀₀ 值 value of OD ₆₀₀					EC ₅₀ / mmol · L ⁻¹	相关系数 correlation coefficient
	0 mmol · L ⁻¹	0.01 mmol · L ⁻¹	0.1 mmol · L ⁻¹	0.5 mmol · L ⁻¹	2 mmol · L ⁻¹		
YCB-1	0.642 ± 0.011a	0.592 ± 0.017a	0.271 ± 0.028b	0.136 ± 0.008c	0.109 ± 0.013c	0.08	-0.69**
YCB-2	0.517 ± 0.011a	0.506 ± 0.008a	0.404 ± 0.011b	0.121 ± 0.011d	0.155 ± 0.013e	0.25	-0.73**
YCB-3	0.671 ± 0.010a	0.658 ± 0.005a	0.347 ± 0.007b	0.153 ± 0.010c	0.066 ± 0.027d	0.12	-0.77**
YCB-4	0.838 ± 0.023a	0.751 ± 0.030b	0.074 ± 0.017d	0.204 ± 0.017c	0.092 ± 0.017d	0.03	-0.57*
YCB-5	0.724 ± 0.009a	0.595 ± 0.074b	0.204 ± 0.031c	0.055 ± 0.010d	0.139 ± 0.036cd	0.05	-0.55*
YCB-6	0.318 ± 0.009a	0.299 ± 0.012b	0.283 ± 0.014c	0.110 ± 0.013d	0.057 ± 0.012e	0.35	-0.87**
YCB-7	0.371 ± 0.007a	0.376 ± 0.046a	0.133 ± 0.007b	0.035 ± 0.011c	0.060 ± 0.005c	0.07	-0.61*
YCB-9	0.487 ± 0.020a	0.376 ± 0.027b	0.095 ± 0.006c	0.054 ± 0.008c	0.061 ± 0.007c	0.04	-0.57*
YCB-10	0.296 ± 0.024a	0.296 ± 0.011a	0.152 ± 0.023b	0.066 ± 0.010c	0.050 ± 0.001c	0.11	-0.71**
YCB-11	0.290 ± 0.008a	0.298 ± 0.008a	0.276 ± 0.007a	0.100 ± 0.008b	0.054 ± 0.013c	0.35	-0.86**
YCB-12	0.661 ± 0.007a	0.647 ± 0.009ab	0.630 ± 0.010b	0.402 ± 0.006c	0.094 ± 0.018d	0.70	-0.98**

注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。Note: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$ 。

表2 Pb处理下常规培养基分离的圆叶无心菜根际细菌的OD₆₀₀值、EC₅₀和相关系数Table 2 OD₆₀₀ value, EC₅₀ and correlation coefficient of rhizosphere bacteria isolated by common medium of *Arenaria orbiculata* under Pb treatment

菌株 Strains	不同 Pb ²⁺ 浓度下 OD ₆₀₀ 值 value of OD ₆₀₀					EC ₅₀ / mmol · L ⁻¹	相关系数 correlation coefficient
	0 mmol · L ⁻¹	0.01 mmol · L ⁻¹	0.1 mmol · L ⁻¹	1 mmol · L ⁻¹	10 mmol · L ⁻¹		
YCB-1	0.642 ± 0.011a	0.593 ± 0.052a	0.429 ± 0.012b	0.246 ± 0.027c	0.108 ± 0.064c	0.53	-0.76**
YCB-2	0.517 ± 0.011a	0.543 ± 0.034a	0.581 ± 0.037a	0.174 ± 0.043b	0 c	0.71	-0.81**
YCB-3	0.671 ± 0.010a	0.654 ± 0.007a	0.489 ± 0.029b	0.213 ± 0.014c	0.172 ± 0.048c	0.46	-0.69**
YCB-4	0.838 ± 0.023a	0.668 ± 0.050b	0.802 ± 0.038a	0.055 ± 0.014c	0.043 ± 0.022c	0.25	-0.68**
YCB-5	0.724 ± 0.009a	0.521 ± 0.024b	0.520 ± 0.043b	0.051 ± 0.016c	0c	0.16	-0.70**
YCB-6	0.318 ± 0.009a	0.309 ± 0.003a	0.324 ± 0.009a	0.030 ± 0.015b	0c	0.37	-0.73**
YCB-7	0.371 ± 0.007b	0.424 ± 0.039ab	0.478 ± 0.012a	0.049 ± 0.031c	0c	0.47	-0.72**
YCB-9	0.487 ± 0.020a	0.374 ± 0.011b	0.396 ± 0.004b	0.041 ± 0.018c	0c	0.29	-0.72**
YCB-10	0.296 ± 0.024a	0.297 ± 0.006a	0.326 ± 0.004a	0.051 ± 0.025b	0c	0.48	-0.76**
YCB-11	0.290 ± 0.008a	0.296 ± 0.001a	0.279 ± 0.004a	0.033 ± 0.051b	0b	0.38	-0.73**
YCB-12	0.661 ± 0.007a	0.648 ± 0.005a	0.627 ± 0.003b	0.050 ± 0.008c	0d	0.33	-0.72**

注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。Note: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

0.5 mmol · L⁻¹和2 mmol · L⁻¹时,9个菌株生长量全部显著下降。可见,培养液中 Cd²⁺浓度达到0.5 mmol · L⁻¹时,显著抑制圆叶无心菜根际耐Cd细菌的生长,耐Cd细菌的生长量随培养液中 Cd²⁺浓度升高而下降,Cd²⁺和9个铅锌矿区圆叶无心菜根际耐Cd细菌培养液 OD₆₀₀值呈极显著或显著负相关。Cd²⁺对9株圆叶无心菜根际耐Cd细菌的 EC₅₀平均值为0.41 mmol · L⁻¹,其中,1株圆叶无心菜根际耐Cd细菌的 EC₅₀小于0.20 mmol · L⁻¹,2株菌的 EC₅₀大于0.70 mmol · L⁻¹,最大值为0.79 mmol · L⁻¹(表3)。

培养液中 Pb²⁺浓度为0.01 mmol · L⁻¹时,9个菌株中,3个菌株生长量显著增加,1个菌株生长量显著下降;Pb²⁺浓度为0.1 mmol · L⁻¹时,1个菌株生长量显著增加,另有3个菌株生长量显著下降;Pb²⁺浓度为1 mmol · L⁻¹和10 mmol · L⁻¹时,9个菌株生长量均极显著下降。可见,培养液中低浓度 Pb²⁺促进部分耐Cd细菌的生长,浓度达到1 mmol · L⁻¹显著抑制圆叶无心菜根际细菌的生长,随加入的 Pb²⁺浓度的升高而下降,Pb²⁺与铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌生长量呈显著或极显著负相关。Pb²⁺对9株圆叶无心菜根际耐Cd细菌的 EC₅₀平均值为0.53 mmol · L⁻¹,其中,4株圆叶无心菜根际耐Cd细菌的 EC₅₀小于0.40 mmol · L⁻¹,3株菌的 EC₅₀大于0.71 mmol · L⁻¹,最大值为0.87 mmol · L⁻¹(表4)。

2.4 含 Pb²⁺培养基分离的根际细菌的铅镉耐性

培养液中 Cd²⁺浓度为0.01 mmol · L⁻¹时,7个菌株中,2个菌株生长量显著下降;Cd²⁺浓度为0.1 mmol · L⁻¹时,5个菌株生长量显著下降;Cd²⁺浓度为0.5 mmol · L⁻¹和2 mmol · L⁻¹时,7个菌株生长量均极显著下降。可见,培养液中 Cd²⁺浓度达到0.5 mmol · L⁻¹时,显著抑制圆叶无心菜根际耐Pb细菌的生长,耐Pb细菌的生长量随培养液中的 Cd²⁺浓度升高而下降,Cd²⁺和7个铅锌矿区圆叶无心菜根际耐Pb细菌培养液 OD₆₀₀值呈极显著或显著负相关。Cd²⁺对7株圆叶无心菜根际耐Pb细菌的 EC₅₀平均值为0.24 mmol · L⁻¹,其中,3株圆叶无心菜根际耐Pb细菌的 EC₅₀小于0.20 mmol · L⁻¹,2株菌的 EC₅₀大于0.40 mmol · L⁻¹,最大值为0.48 mmol · L⁻¹(表5)。

培养液中 Pb²⁺浓度为0.01 mmol · L⁻¹时,7个菌株中,分别有1个菌株生长量显著增加和下降;Pb²⁺浓度为0.1 mmol · L⁻¹时,4个菌株生长量显著下降;Pb²⁺浓度为1 mmol · L⁻¹和10 mmol · L⁻¹时,7个菌株生长量均极显著下降。可见,培养液中 Pb²⁺浓度达到1 mmol · L⁻¹显著抑制圆叶无心菜根际细菌的生长,随加入的 Pb²⁺浓度的升高而下降,Pb²⁺与铅锌矿区圆叶无心菜根际耐Pb细菌生长量呈显著或极显著负相关。Pb²⁺对7株圆叶无心菜根际耐Pb细菌的 EC₅₀平均值为0.52 mmol · L⁻¹,其中,3株圆叶无心菜根际耐Cd细菌的 EC₅₀小于0.40 mmol · L⁻¹,2株

表3 Cd处理下含Cd²⁺培养基分离的圆叶无心菜根际细菌的OD₆₀₀值、EC₅₀和相关系数

Table 3 OD₆₀₀ value, EC₅₀ and correlation coefficient of rhizosphere bacteria isolated by Cd²⁺ containing medium of *Arenaria orbiculata* under Cd treatment

菌株 Strains	不同Cd ²⁺ 浓度下OD ₆₀₀ 值 value of OD ₆₀₀					EC ₅₀ / mmol·L ⁻¹	相关系数 correlation coefficient
	0 mmol·L ⁻¹	0.01 mmol·L ⁻¹	0.1 mmol·L ⁻¹	0.5 mmol·L ⁻¹	2 mmol·L ⁻¹		
YGB-1	0.401±0.032a	0.375±0.014a	0.334±0.031a	0.071±0.007b	0.050±0.003b	0.23	-0.79**
YGB-2	0.447±0.036a	0.353±0.008b	0.111±0.006c	0.061±0.007cd	0.035±0.007d	0.05	-0.54*
YGB-4	0.160±0.004ab	0.168±0.003a	0.140±0.008b	0.089±0.003c	0.030±0.013d	0.65	-0.93**
YGB-5	0.488±0.021a	0.490±0.009a	0.441±0.008b	0.128±0.018c	0d	0.29	-0.88**
YGB-6	0.108±0.005a	0.108±0.003a	0.122±0.020a	0.064±0.004b	0.027±0.004c	0.79	-0.87**
YGB-7	0.132±0.006ab	0.138±0.004a	0.158±0.032ab	0.121±0.005b	0c	0.73	-0.92**
YGB-8	0.308±0.011a	0.220±0.012b	0.195±0.021b	0.104±0.003c	0.037±0.011d	0.25	-0.83**
YGB-9	0.330±0.044a	0.295±0.019a	0.312±0.077a	0.072±0.004b	0.027±0.005b	0.27	-0.77**
YGB-10	0.347±0.004a	0.324±0.007a	0.290±0.004b	0.157±0.003c	0.088±0.023d	0.43	-0.88**

注: *表示P<0.05, **表示P<0.01。Note: * means P<0.05, ** means P<0.01.

表4 Pb处理下含Cd²⁺培养基分离的圆叶无心菜根际细菌的OD₆₀₀值、EC₅₀和相关系数

Table 4 OD₆₀₀ value, EC₅₀ and correlation coefficient of rhizosphere bacteria isolated by Cd²⁺ containing medium of *Arenaria orbiculata* under Pb treatment

菌株 Strains	不同Pb ²⁺ 浓度下OD ₆₀₀ 值 value of OD ₆₀₀					EC ₅₀ / mmol·L ⁻¹	相关系数 correlation coefficient
	0 mmol·L ⁻¹	0.01 mmol·L ⁻¹	0.1 mmol·L ⁻¹	1 mmol·L ⁻¹	10 mmol·L ⁻¹		
YGB-1	0.401±0.032a	0.448±0.008a	0.259±0.002b	0.063±0.030c	0.011±0.009c	0.26	-0.70**
YGB-2	0.447±0.036a	0.455±0.020a	0.288±0.024b	0.036±0.009c	0c	0.21	-0.69**
YGB-4	0.160±0.004c	0.451±0.004a	0.289±0.012b	0.040±0.004d	0e	0.68	-0.62*
YGB-5	0.488±0.021a	0.361±0.009b	0.343±0.007b	0.046±0.023c	0d	0.31	-0.66**
YGB-6	0.108±0.005b	0.305±0.002a	0.142±0.027b	0.046±0.027c	0.047±0.011c	0.87	-0.52*
YGB-7	0.132±0.006b	0.307±0.024a	0.185±0.016b	0.049±0.018c	0.053±0.008c	0.78	-0.53*
YGB-8	0.308±0.011a	0.368±0.009a	0.341±0.011a	0.128±0.015b	0.070±0.039b	0.83	-0.76**
YGB-9	0.330±0.044a	0.314±0.011a	0.421±0.024a	0.080±0.029b	0.029±0.005b	0.61	-0.72**
YGB-10	0.347±0.004a	0.361±0.004a	0.342±0.037a	0.021±0.006b	0.019±0.012b	0.26	-0.68**

注: *表示P<0.05, **表示P<0.01。Note: * means P<0.05, ** means P<0.01.

菌的EC₅₀大于0.71 mmol·L⁻¹,最大值为0.82 mmol·L⁻¹(表6)。

3 讨论

采用常规培养基添加不同浓度重金属的方法,制备含重金属的选择性培养基,筛选土壤中重金属耐性微生物是较常用的一种方法^[4-6,11]。圆叶无心菜是云南会泽县铅锌矿区自然定居的野生重金属耐性植物,长期处于重金属污染胁迫环境中,重金属耐性植物及其根际细菌对重金属均产生了适应性^[14-16]。虽然通过常规培养基也能分离获得重金属耐性较强的

根际细菌,但含Cd²⁺培养基分离的圆叶无心菜根际细菌对Cd和Pb的耐性较强,这可能因为Cd生物毒性强,迁移性强,易被生物吸收和积累,生物半衰期长,Cd是限制铅锌矿区生物生存的关键因子^[17]。因此,虽然从重金属污染土壤,采用不同的培养基都可以分离得到重金属耐性微生物,但为了获得更好的分离效果,在设计分离培养基时,应了解何种重金属是该土壤限制生物生存的关键因子,并将该重金属纳入培养基成分中去。

根际是重要的土壤和植物的界面,在重金属污染土壤的生态重建和植物修复过程中有着极其重要的

表5 Cd处理下含Pb²⁺培养基分离的圆叶无心菜根际细菌的OD₆₀₀值、EC₅₀和相关系数Table 5 OD₆₀₀ value, EC₅₀ and correlation coefficient of rhizosphere bacteria isolated by Pb²⁺ containing medium of *Arenaria orbiculata* under Cd treatment

菌株 Strains	不同Cd ²⁺ 浓度下OD ₆₀₀ 值 value of OD ₆₀₀					EC ₅₀ / mmol · L ⁻¹	相关系数 correlation coefficient
	0 mmol · L ⁻¹	0.01 mmol · L ⁻¹	0.1 mmol · L ⁻¹	0.5 mmol · L ⁻¹	2 mmol · L ⁻¹		
YQB-1	0.408 ± 0.012a	0.402 ± 0.013a	0.279 ± 0.006b	0.052 ± 0.033c	0.055 ± 0.010c	0.17	-0.75**
YQB-2	0.338 ± 0.012a	0.344 ± 0.010a	0.332 ± 0.005a	0.137 ± 0.005b	0.012 ± 0.002e	0.41	-0.93**
YQB-4	0.366 ± 0.015a	0.401 ± 0.027a	0.347 ± 0.024a	0.087 ± 0.005b	0.082 ± 0.004b	0.29	-0.78**
YQB-5	0.326 ± 0.017a	0.236 ± 0.007b	0.238 ± 0.009b	0.076 ± 0.004c	0d	0.23	-0.86**
YQB-6	0.268 ± 0.075a	0.206 ± 0.017ab	0.105 ± 0.007bc	0.065 ± 0.005c	0c	0.07	-0.70**
YQB-7	0.397 ± 0.012a	0.394 ± 0.011a	0.318 ± 0.013b	0.194 ± 0.011c	0.024 ± 0.008d	0.48	-0.95**
YQB-8	0.565 ± 0.015a	0.466 ± 0.010b	0.194 ± 0.008c	0.081 ± 0.008d	0.012 ± 0.002e	0.06	-0.73**

注: *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。Note: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

表6 Pb处理下含Pb²⁺培养基分离的圆叶无心菜根际细菌的OD₆₀₀值、EC₅₀和相关系数Table 6 OD₆₀₀ value, EC₅₀ and correlation coefficient of rhizosphere bacteria isolated by Pb²⁺ containing medium of *Arenaria orbiculata* under Pb treatment

菌株 Strains	不同Pb ²⁺ 浓度下OD ₆₀₀ 值 value of OD ₆₀₀					EC ₅₀ / mmol · L ⁻¹	相关系数 correlation coefficient
	0 mmol · L ⁻¹	0.01 mmol · L ⁻¹	0.1 mmol · L ⁻¹	1 mmol · L ⁻¹	10 mmol · L ⁻¹		
YQB-1	0.408 ± 0.012a	0.425 ± 0.018a	0.227 ± 0.017b	0.152 ± 0.024c	0d	0.28	-0.80**
YQB-2	0.338 ± 0.012a	0.344 ± 0.005a	0.337 ± 0.002a	0.145 ± 0.034b	0.059 ± 0.005c	0.82	-0.82**
YQB-4	0.366 ± 0.015b	0.451 ± 0.014a	0.270 ± 0.010c	0.054 ± 0.019d	0.030 ± 0.006d	0.32	-0.67**
YQB-5	0.326 ± 0.017a	0.346 ± 0.046a	0.444 ± 0.022a	0.130 ± 0.056b	0.127 ± 0.047b	0.82	-0.60*
YQB-6	0.268 ± 0.075a	0.250 ± 0.017a	0.319 ± 0.037a	0.084 ± 0.011b	0.049 ± 0.019b	0.68	-0.66**
YQB-7	0.397 ± 0.012a	0.398 ± 0.013a	0.224 ± 0.013b	0.171 ± 0.033b	0.026 ± 0.011c	0.45	-0.80**
YQB-8	0.565 ± 0.015a	0.446 ± 0.031b	0.361 ± 0.015c	0.154 ± 0.023d	0.122 ± 0.019d	0.29	-0.67*

注: *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。Note: * means $P < 0.05$, ** means $P < 0.01$.

生态作用,其中,根际微生物通过分泌螯合物质、产酸和改变氧化还原电位等方式,改变重金属的形态,影响重金属的生物有效性,促进植物生长。接种从重金属污染土壤筛选出来的具有较强的重金属抗性和活化重金属能力的细菌,在提高生态重建和植物修复效率方面具有重大的开发潜力^[18-20]。例如,接种重金属耐性细菌,增强超累积植物东南景天(*Sedum alfredii*)对N、P、Cd和Zn的吸收,提高叶片叶绿素含量,促进东南景天的生长,提高植物的重金属耐性,促进重金属由地下部分向地上部分分配^[21-22];接种Cd耐性细菌,能够在油菜根部很好的定植,促进油菜(*Brassica napus*)的生长,提高油菜对Cd的吸收^[23]。表明重金属耐性植物的根际微生物对于植物适应重金属胁迫有重要意义,发展植物-微生物联合修复技术能够提高植物修复的效率^[24]。当然,土壤重金属、

重金属耐性植物和根际耐性微生物三者之间的相互作用非常复杂,需要更全面深入的研究,加强重金属耐性植物根际微生物的研究,了解耐性植物、微生物和重金属在根际界面中相互关系与作用,以便更有效地利用耐性植物进行生态重建和植物修复。

4 结论

Cd²⁺和Pb²⁺均极显著减少铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌在含Cd²⁺和Pb²⁺的细菌培养基上生长的数量,抑制铅锌矿区圆叶无心菜根际细菌在培养基中的生长,其生长量随加入的Cd²⁺和Pb²⁺浓度的升高而下降。

Cd²⁺和Pb²⁺对含Cd²⁺的细菌培养基分离的圆叶无心菜根际细菌EC₅₀平均值和最大值的影响均较大,本研究采用的3种细菌培养基中,含Cd²⁺的培养基

分离的圆叶无心菜根际细菌对 Cd 和 Pb 的耐性较强。

参考文献:

- [1]周启星,污染土壤修复的技术再造与展望[J]. 环境污染治理技术与设备,2002,3(8):36-40.
ZHOU Qi-xing. Technological reformation and prospect of contaminated soil remediation[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2002,3(8):36-40.
- [2]方其仙,李元,祖艳群. 重金属超累积植物与土壤重金属污染的植物修复[M]//环境保护与环境工程. 北京:原子能出版社,2004:459-464.
Fang Qi-xian, Li Yuan, ZU Yan-qun. Hyperaccumulator and phytoremediation of soil heavy metal pollution[M]//*Environmental Protection and Environmental Engineering*. Beijing: Atomic Energy Press, 2004:459-464.
- [3]Kuiper I, Lagendijk E L, Bloemberg G V, et al. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(1):6-15.
- [4]夏娟娟,盛下放,江春玉. 重金属超抗性菌株的筛选及其对镉活化作用的研究[J]. 生态学杂志. 2005,24(11):1357-1360.
XIA Juan-juan, SHENG Xia-fang, JIANG Chun-yu. Screening of cadmium resistant strains and their effects on cadmium activation[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(11):1357-1360.
- [5]刘爱民,黄为一. 耐镉菌株的分离及其对 Cd²⁺ 的吸附富集[J]. 中国环境科学,2006,26(1):91-95.
LIU Ai-min, HUANG Wei-yi. Separation of tolerant cadmium bacterium strain and its accumulation adsorption of Cd²⁺ [J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(1):91-95.
- [6]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.
SHENG Xia-fang, BAI Yu, XIA Juan-juan, et al. Screen out of cadmium-resistance strains and their effect on cadmium uptake by tomato[J]. *China Environmental Science*, 2003,23(5):467-469.
- [7]云南省曲靖地区志编纂委员会. 曲靖地区志(3)[M]. 昆明:云南人民出版社,1995:227.
Chorography compile committee of Qujing area of Yunnan Province. Chorography of Qujing area (3) [M]. Kunming: Yunnan People Press, 1995:227.
- [8]Zu Yanqun, Li Yuan, Chen Jianjun, et al. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China[J]. *Environment International*, 2005, 31(5):755-762.
- [9]吴征镒. 西藏植物志(第一卷)[M]. 北京:科学出版社,1983:685.
WU Zheng-yi. Flora of Tibet (1st Volume) [M]. Beijing: Science Press, 1985:685.
- [10]中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,1985:67-153.
Microbiology Laboratory, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, ed. Study methods of soil microbiology [M]. Beijing: Science Press, 1985:67-153.
- [11]张汉波,段昌群,骆怀仲,等. 铅锌污染耕地中重金属耐受细菌调查[J]. 农村生态环境,2003,19(2):51-54.
ZHANG Han-bo, DUAN Chang-qun, LUO Huai-zhong, et al. Heavy metal tolerant bacteria in agricultural soils contaminated by Pb and Zn[J]. *Rural Eco-environment*, 2003, 19(2):51-54.
- [12]湛方栋,陆引盟,关国经,等. 烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究[J]. 土壤学报,2005,42(3):488-494.
ZHAN Fang-dong, LU Yin-gang, GUAN Guo-jing, et al. Community structures of microorganisms and their dynamics in the rhizosphere of flue-cured tobacco[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(3):488-494.
- [13]方仲达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社,2007:190.
FANG Zhong-da. Research methods of phytopathology (3rd edition) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007:190.
- [14]Delorme T A, Gagliardi J V, Angle J S, et al. Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. and the non-metal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47:773-776.
- [15]Khan A G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005,18(4):355-364.
- [16]Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5):2667-2677.
- [17]束文圣,蓝崇钰,张志权. 凡口铅锌尾矿影响植物定居的主要因素分析[J]. 应用生态学报,1997,8(3):314-318.
SHU Wen-shen, LAN Chong-yu, ZHANG Zhi-quan. Analysis of major constraints on plant colonization at Fankou Pb/Zn mine tailings [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1997, 8(3):314-318.
- [18]Jing Yan-de, He Zhen-li, Yang Xiao-e. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2007, 8(3):192-207.
- [19]Whiting S N, de Souza M P, Terry N. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35:3144-3150.
- [20]陈素华,孙铁珩,周启星,等. 微生物与重金属的相互作用及其应用研究[J]. 应用生态学报,2002,13(2):239-242.
CHEN Su-hua, SUN Tie-heng, ZHOU Qi-xing, et al. Interaction between microorganisms and heavy metals and its application[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(2):239-242.
- [21]Li WC, Ye ZH, Wong MH. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(15-16):4173-4182.
- [22]Xiong J, He Z, Liu D, et al. The role of bacteria in the heavy metals removal and growth of *Sedum alfredii* Hance in an aqueous medium [J]. *Chemosphere*, 2008, 70(3):489-494.
- [23]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.
- [24]White P J. Phytoremediation assisted by microorganisms[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(11):502.