

金属抗性促生菌对玉米的生长和累积镉的影响

唐 飞, 陈亚刚, 龙新宪*

(华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

摘 要:在 LB 培养基中添加不同浓度 Cd^{2+} 后, 促生菌 IV_8R_3 、 II_2R_3 不仅能正常生长繁殖, 而且具有较强吸附、积累 Cd 的能力。在不同 Cd 污染水平的土壤上, 单独接种促生菌 IV_8R_3 或 II_2R_3 均显著促进了第一季玉米的生长, 但在 Cd 添加量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 或 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤上, 同时接种 $\text{IV}_8\text{R}_3 + \text{II}_2\text{R}_3$ 反而抑制了玉米的生长; 然而, 单独或同时接种促生菌 IV_8R_3 或 II_2R_3 对第二季玉米的生长均没有产生显著影响。接种促生菌 IV_8R_3 、 II_2R_3 在一定程度上可以升高土壤 pH 和降低土壤有效 Cd 含量, 在 Cd 污染水平较高的土壤表现更为显著。当土壤 Cd 含量较高时 (Cd 添加量为 5 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 单独或同时接种菌株 II_2R_3 、 IV_8R_3 能显著抑制玉米对 Cd 的吸收或向地上部转运, 地上部 Cd 含量显著降低; 而当土壤 Cd 含量较低时 (对照土壤和 Cd 添加量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤), 单独或同时接种 II_2R_3 、 IV_8R_3 反而促进了玉米对 Cd 的吸收。

关键词: 镉; 金属抗性促生菌; 玉米

中图分类号: X53 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)10-1941-09 doi:10.11654/jaes.2013.10.006

Effects of Metal-Resistant Plant Growth Promoting Bacteria on Growth and Cadmium Accumulation of Corn

TANG Fei, CHEN Ya-gang, LONG Xin-xian*

(College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Plant growth promoting bacteria (PGPB) might play a certain role in phytoremediation. A greenhouse experiment was carried out to study plant growth and Cd uptake of corn inoculated with two Cd-resistant PGPB, II_2R_3 and IV_8R_3 , in soils spiked with Cd at 0 , 1 , $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Strains II_2R_3 and IV_8R_3 not only grew well in Luria broth (LB) media added with different concentrations of Cd, but also accumulated Cd from the medium. In the first season, corn growth was promoted by individual inoculation of strains II_2R_3 or IV_8R_3 , but inhibited by simultaneous inoculation in soils with $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd or $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd addition. In the second season, however, all inoculation treatments had no significant effects on corn growth. Compared to the control, all inoculations increased Cd uptake by corn in soils with low Cd levels ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd addition), while decreased Cd absorption and transportation in corn in high Cd soils ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ or $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd addition). To some extent, inoculation of the strains II_2R_3 and IV_8R_3 increased soil pH, but decreased soil bioavailable Cd. Our results indicate that inoculation with metal-resistant PGPB to heavy Cd-contaminated soils promotes plant growth and inhibits the uptake and transportation of Cd in corn.

Keywords: cadmium; metal resistant plant growth promoting bacteria; corn

近年来, 工业“三废”不合理的排放、农业化学品的不合理使用、汽车尾气排放等, 导致我国农田重金属累积和超标等环境问题日显突出, 农产品重金属含量超标现象时有发生。据报道, 我国农业主产区耕地土壤的重金属污染状况总体较好, 但农田重金属含量有了明显增加, 尤其土壤中 Cd 有明显的累积现象^[1]。

Cd 对农作物的毒害, 不仅表现在外在的危害症状, 如生长缓慢、矮小、减产等, 还可以影响农产品的卫生和营养品质, 如重金属含量超标, 植物蛋白质、叶绿素、糖、维生素 C 含量降低等^[2-3]。因此, 有效地治理和安全利用镉污染土壤对于保障农产品品质和人体健康具有重要意义。

当前, 国内外研究者对重金属污染土壤的化学改良、植物稳定、植物提取和低积累作物筛选和利用等开展了大量的研究工作, 在理论和实践方面均取得了一些进展^[4-7], 土壤微生物-植物联合修复技术也引起研究者的广泛兴趣和重视^[8-9]。研究表明, 某些微生物

收稿日期: 2013-01-28

基金项目: 国家自然科学基金 (40973055); 国家自然科学基金-广东省联合基金 (U0833004)

作者简介: 唐 飞 (1989—), 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事重金属污染土壤修复技术研究。E-mail: tangfei890816@163.com

* 通信作者: 龙新宪 E-mail: longxx@scau.edu.cn

可以通过细胞组分或胞外聚合物对金属的吸附作用、细胞对金属的生物吸收和胞内积累作用、微生物的代谢活动或代谢产物直接或间接促进土壤中的金属发生沉淀反应,形成金属磷酸盐、金属氧化物和金属硫化物等,这些生物代谢过程均可降低土壤中金属的溶解性和移动性,从而减轻金属对植物的毒害作用,促进植物的生长发育^[10]。例如, Madhaiyan 等发现金属抗性细菌 *Methylobacterium oryzae* 和 *Burkholderia* sp. 可降低镉对番茄的毒性,减少重金属吸收,促进植物生长^[11]。Wei 等研究显示,野生豆类根部的根瘤菌土壤杆菌对镉具有抗性,可富集重金属,促进植物生长^[12]。研究表明,植物根际细菌或内生细菌中很多属于促植物生长细菌(Plant growth-promoting bacteria, PGPB)。PGPB 可直接(分泌植物生长激素、固氮作用、溶磷作用、促进铁的吸收)或间接(增强植物的抗病性)促进植物的生长,增强植物对生物与非生物胁迫的适应能力^[13-15],如内生细菌可调节植物体内乙烯以及其他激素类物质含量^[16],分泌吲哚乙酸,生成含铁载体以及其他有利于植株适应环境胁迫的酶等^[17-18]。因此,如果能够充分发挥土壤中的金属抗性促生细菌的作用,不仅可以改善土壤生态环境,而且可促进农作物的生长和减少重金属在农作物中的积累,从而为重金属污染土壤的治理和安全利用提供新的研究思路。本研究采用盆栽试验,探讨接种 Cd 抗性促生细菌是否能促进低积累玉米在 Cd 污染土壤上的生长并降低玉米对 Cd 的吸收和积累,以期 Cd 污染土壤的安全农用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

本研究室从东南景天根系中分离的两株镉抗性促生菌 II₂R₃ 和 IV₈R₃^[19],菌株的生物学特征见表 1。

1.1.2 供试植物

华南农业大学筛选的重金属低积累品种玉米凌单四号^[6]。

1.1.3 供试土壤

采用模拟镉污染土壤,即向华南农业大学农场的水稻土(风干,过 5 mm 筛)中人工添加 3CdSO₄·8H₂O,土壤 Cd 添加浓度为 0、1、5、10 mg·kg⁻¹。补加双蒸水至最大田间持水量的 60%,每隔 5 d 翻动 1 次,平衡 2 个月开始盆栽试验。水稻土的理化性质如下:pH(土:水=1:2.5)6.27、有机质 3.05%、全氮 1.12 g·kg⁻¹、碱解

表 1 供试菌株的生物学特性

Table 1 The biological characteristics of the strain

测定指标	菌株 II ₂ R ₃	菌株 IV ₈ R ₃
Cd 最小致死浓度/mmole·L ⁻¹	2	5
是否分泌吲哚乙酸	是	是
是否溶解无机磷	是	否
是否有固氮作用	否	否
是否分泌高铁载体	否	是
分子鉴定结果	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus pumilus</i> (醋酸钙不动杆菌) (短小芽孢杆菌)	

氮 96.8 mg·kg⁻¹、全磷 1.192 g·kg⁻¹、有效磷 86.09 mg·kg⁻¹、有效钾 126.29 mg·kg⁻¹、总 Cd 0.23 mg·kg⁻¹。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株对镉的吸收积累作用

从甘油管中取少量菌液 IV₈R₃ 和 II₂R₃, 划线接种到 LB 固体培养基。从平板上挑选单个菌落,分别接种到已经灭菌的 50 mL LB 液体培养基中,于摇床 160 r·min⁻¹、30 ℃培养 24 h。在盛有 200 mL LB 液体培养基的三角瓶中加入不同体积的已用膜过滤灭菌的 Cd 母液(0.25 mol·L⁻¹),使菌株 IV₈R₃ 培养液的最终 Cd²⁺浓度分别为 0、0.25、0.5、1.0 mmol·L⁻¹,菌株 II₂R₃ 培养液最终 Cd²⁺浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3 mmol·L⁻¹。接种 2 mL 的预培养菌液,置摇床 160 r·min⁻¹、30 ℃振荡,以未接种的 LB 液体培养基为空白对照,每个处理重复 3 次。菌株培养 6、12、20、32、48、72、84、108、132、156 h 后,分别用无菌枪头取 3 mL 菌液,比色法测定细菌悬浮液的 OD₆₀₀ 值;同时取 5 mL 菌液置于 50 mL 的离心管中,8000 r·min⁻¹ 离心,上清液转移到干净的塑料瓶,滴加 1 滴优级纯的硝酸,置于低温冰箱中保存,原子吸收光谱(Z-2300)测定 Cd 浓度。

1.2.2 盆栽试验

采用双因素完全随机区组试验设计:A 因素为接种促生菌,共 4 个处理水平,即不接种的对照(CK)、单独接种菌株 II₂R₃、单独接种菌株 IV₈R₃、接种菌株 II₂R₃+IV₈R₃;B 因素为土壤 Cd 污染水平,即土壤 Cd 添加浓度分别为 0、1、5、10 mg·kg⁻¹(Cd0、Cd1、Cd5、Cd10)。每个处理重复 4 次,每盆土壤重 4 kg(以干土计)。

连续种植两季玉米,第一季于 2009 年 10 月 15 日播种,挑选籽粒饱满的玉米种子进行表面消毒[自来水冲洗→99%酒精(1 min)→35%双氧水和 3%次氯酸钠的混合溶液(30 min)→无菌水冲洗 3 次]后,每盆播种 5 颗玉米种子,15 d 后间苗,每盆保留 2 株幼苗。同时,进行接种促生菌处理,每盆接种 50 mL 菌体浓

度为 10^7 cfu·mL⁻¹ 的菌体悬浮物,以无菌水作为对照。促生菌在 LB 液体培养基上培养至对数生长期,离心收集菌体,0.89%生理盐水清洗 3 遍,用无菌的双蒸水把菌体稀释成约 10^7 cfu·mL⁻¹ 菌体悬浮物,平板计数法确定菌体的浓度。植物生长期间,根据植物生长需要从花盆托盘加单蒸水,以保持盆中土壤湿度。播种 90 d 后收获植物样品(地上部和根系)和土壤样品。植物样品先用自来水冲洗干净,再用去离子水冲洗 3 次,自然晾干。晾干的植物样品先在 105 °C 杀青 30 min,然后于 65 °C 烘干至恒重,称量地上部和根系的干重。土壤样品自然风干,过 20 目筛后待分析。

收获第一季玉米后,将剩余的土壤自然风干,施加底肥,每盆按 N:P:K=120:100:125 比例以尿素(CON_2H_4)和 KH_2PO_4 施入,平衡 1 周。重新装盆,种植第二季玉米。第二季于 2010 年 3 月 14 日播种,每盆播种 5 颗已消毒的玉米种子,15 d 后间苗,每盆保留 1 株幼苗,玉米接种菌株、管理方式、植物样品和土壤样品的处理与第一季玉米一致。

植株地上部和根系 Cd 含量测定采用干灰化-原子吸收光谱法。将植物样品用粉碎机磨碎后称取 0.300 0 g 于 50 mL 的坩锅,电炉上进行碳化,于马福炉中(500 ± 5)°C 灰化约 8 h 后,取出坩锅,冷却后加 6 mol·L⁻¹ 盐酸溶解,定容到 50 mL,火焰原子吸收分光光度计(Z-2300)测定 Cd 含量^[20]。

土壤 pH 值测定采用玻璃电极法(水土质量比为 2.5:1.0)。土壤有效 Cd 含量采用 0.01 mol·L⁻¹ CaCl_2 提取,土液比为 1:2.5,90 °C 水浴振荡 2 h,过滤,火焰原子吸收分光光度计(Z-2300)测定滤液中的 Cd 浓度。

1.3 统计分析

应用 SAS 9.0 软件对试验数据进行方差分析,多重比较采用新复极差法(Duncan 法),采用 $P=0.05$ 的显著水平。

2 结果与分析

2.1 不同镉浓度下菌株的生长曲线

根据菌株 IV₈R₃、II₂R₃ 在 LB 固体培养基上的 Cd 最小致死浓度(表 1),分别选取不同 Cd 浓度梯度进行液体培养试验,进一步了解两个菌株对 Cd 的抗性作用。由图 1 可知,培养基加入 Cd 对菌株 IV₈R₃、II₂R₃ 的生长有一定的影响。虽然菌株 IV₈R₃ 和 II₂R₃ 在添加不同浓度 Cd 的培养基中都能生长繁殖,但与对照相比较,其生长延滞期延长,最大生物量有所减少,尤其是菌株 II₂R₃,而 3 个不同 Cd 处理水平之间没有显著

差异(图 1)。这进一步证明菌株 IV₈R₃ 和 II₂R₃ 对 Cd 有很强的抗性能力,尤其是菌株 IV₈R₃。

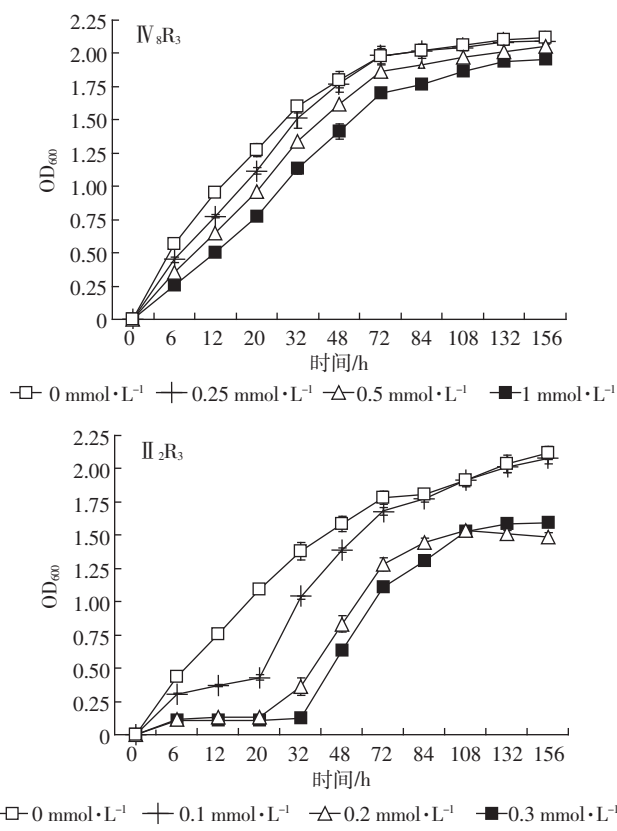


图 1 LB 培养基中不同浓度镉对菌株 IV₈R₃ 和 II₂R₃ 生长的影响
Figure 1 Effects of increasing Cd²⁺ concentrations on the growth curve of strain IV₈R₃ and II₂R₃ in Luria Broth media

2.2 菌株对镉的吸收作用

由图 2 可知,随着菌株 IV₈R₃、II₂R₃ 的生长繁殖, LB 培养基中 Cd 的剩余浓度均呈现递减趋势。菌株 IV₈R₃ 分别在含有 0.25、0.50、1 mmol·L⁻¹ Cd 的培养液中培养 156 h 后,培养基中的 Cd 浓度分别降低了 18.0%、14.0%、31.6%;菌株 II₂R₃ 在含有 0.1、0.2、0.3 mmol·L⁻¹ Cd 的培养基中培养 156 h 后,培养基中的 Cd 浓度分别降低了 43.6%、37.2%、31.6%。这表明菌株 IV₈R₃ 和 II₂R₃ 有较强吸收 Cd 的能力(图 2)。

2.3 接种促生菌对玉米生长的影响

表 2 显示,第一季玉米的地上部的生物量显著低于第二季,原因可能在于第一季玉米生长在冬季(当年 10 月至次年 1 月),气温偏低,且土壤中没有施加基肥,第二季玉米生长在春季(3 月至 6 月),且种植前土壤中施加了 N、P、K 肥。

在没有添加 Cd 的土壤中,接种促生菌 II₂R₃、IV₈R₃ 促进了第一季玉米的生长。土壤接种菌株 II₂R₃ 后,玉

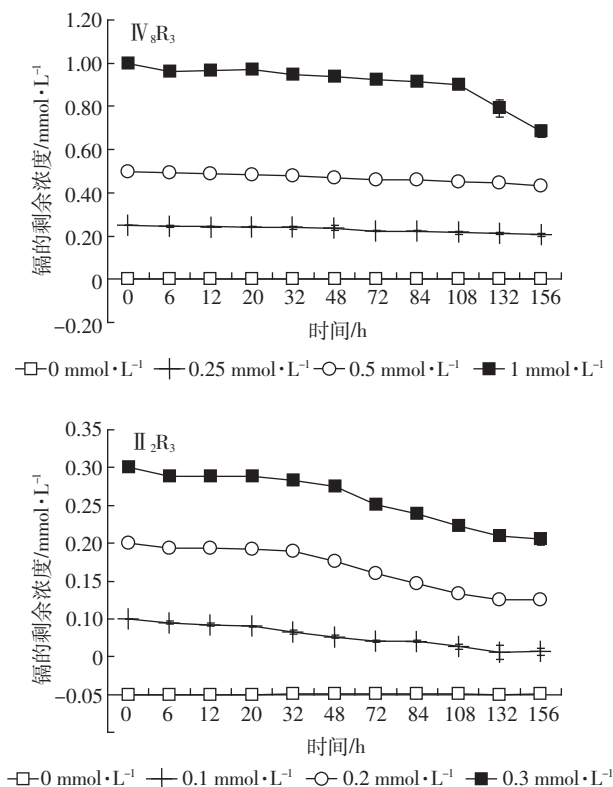


图2 菌株IV₈R₃和II₂R₃培养液中镉的剩余浓度的变化
Figure 2 Effects of the growth of strain IV₈R₃ or II₂R₃ on the changes of remaining Cd²⁺ concentration in Luria Broth media

米地上部和根系的干重分别比对照增加 31.0%和 43.8%,单独接种IV₈R₃和同时接种菌株II₂R₃+IV₈R₃使玉米根系干重分别比对照增加了 48.9%和 19.6%;然而,单独或同时接种促生菌II₂R₃和IV₈R₃对第二季玉米的生长均没有产生显著影响(表2)。

在Cd添加量为1 mg·kg⁻¹的土壤上,接种菌株IV₈R₃明显促进了第一季玉米的生长,地上部和根系的干重比对照分别增加 27.0%和 21.3%,但是同时接种菌株II₂R₃+IV₈R₃反而抑制了植物的生长,其地上部和根系生物量分别比对照降低 21.0%和 37.5%;对于第二季玉米,单独或同时接种菌株II₂R₃、IV₈R₃均显著促进了玉米的生长,其地上部的干重比对照分别增加 12.0%、24.6%和 16.6%,根系干重比对照分别增加 21.5%、15.3%和 15.3%(表2)。

在Cd添加量为5 mg·kg⁻¹的土壤上,单独接种菌株II₂R₃或IV₈R₃均促进了第一季玉米的生长,地上部干重比对照分别增加 21.3%和 28.2%,根系干重比对照分别增加 27.8%和 61.7%;然而,同时接种菌株II₂R₃+IV₈R₃使玉米地上部干重比对照降低 54.9%。3种接种处理对第二季玉米的生长影响则不显著(表2)。

在Cd添加量为10 mg·kg⁻¹的土壤上,同时接种菌株II₂R₃+IV₈R₃显著促进了第一季玉米的生长,地

表2 不同处理的玉米植株地上部和根系干物质质量(g·pot⁻¹)

Table 2 Effects of inoculation with PGPB on the biomass of corn growing on soils with increasing levels of Cd contamination(g·pot⁻¹)

镉添加量/mg·kg ⁻¹	接种处理	第一季玉米生物量(干重)		第二季玉米生物量(干重)	
		地上部分	根系	地上部分	根系
0	CK	7.30±0.46b	1.78±0.09b	16.67±0.58a	1.68±0.08a
	II ₂ R ₃	9.56±0.57a	2.56±0.28ab	16.15±0.87a	1.60±0.12a
	IV ₈ R ₃	7.44±0.34b	2.65±0.34a	16.67±0.75a	1.66±0.08a
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	6.42±0.36b	2.13±0.16ab	17.10±0.77a	1.71±0.11a
1	CK	4.85±0.30b	1.60±0.06b	14.62±0.84c	1.44±0.08b
	II ₂ R ₃	4.27±0.47bc	1.58±0.07b	16.38±0.65b	1.75±0.06a
	IV ₈ R ₃	6.16±0.03a	1.94±0.11a	18.21±0.40a	1.66±0.03a
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	3.83±0.13c	1.18±0.05c	17.05±0.37ab	1.66±0.07a
5	CK	4.79±0.05b	1.33±0.04b	18.33±0.78a	1.21±0.08a
	II ₂ R ₃	5.81±0.40a	1.70±0.06ab	16.51±0.30a	1.63±0.12a
	IV ₈ R ₃	6.14±0.37a	2.15±0.29a	15.13±1.99a	1.39±0.19a
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	2.16±0.10c	1.38±0.32b	17.57±0.57a	1.52±0.03a
10	CK	4.35±0.31b	1.46±0.07b	15.87±1.40a	1.35±0.05b
	II ₂ R ₃	3.57±0.10b	1.35±0.10b	16.04±2.42a	2.45±0.23a
	IV ₈ R ₃	3.60±0.29b	1.25±0.10b	17.16±0.86a	1.41±0.10b
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	5.82±0.26a	2.05±0.21a	18.01±0.34a	1.96±0.08a

注:数据为平均值±标准差(n=4);采用 Duncan 多重比较对同一 Cd 水平不同接种处理之间进行比较,具有相同字母的数据间无显著差异(P>0.05)。

上部和根系的干重比对照分别增加 33.8%和 40.4%;单独接种菌株 II₂R₃ 或菌株 IV₈R₃ 对玉米生长的影响不显著。在第二季玉米中,接种促生菌对玉米的生长有一定促进作用,但效果不显著(表 2)。

2.4 促生菌对玉米吸收土壤镉的影响

玉米的地上部和根系 Cd 含量随土壤 Cd 污染水平的增加而增加,且根系 Cd 含量显著高于地上部。在没有添加 Cd 的土壤中,第二季玉米地上部 Cd 含量大于第一季,而在添加 Cd 的土壤中,第一季玉米地上部的镉含量大于第二季(表 3)。

在没有添加 Cd 的土壤中,接种菌株 IV₈R₃ 和同时接种菌株 II₂R₃+IV₈R₃ 降低了第一季玉米地上部 Cd 含量,比对照分别降低 7.69%和 23.1%,根系 Cd 含量与对照之间的差异不显著。然而,接种菌株 II₂R₃ 反而促进玉米对 Cd 的吸收和转运,其地上部和根系 Cd 含量分别比对照增加 38.5%和 356%。3 种接种处理对第二季玉米的地上部和根系 Cd 含量均没有显著影响(表 3)。

在 Cd 添加量为 1 mg·kg⁻¹ 的土壤上,单独接种菌株 II₂R₃ 或 IV₈R₃ 促进了第一季玉米吸收和向地上部转运 Cd,地上部 Cd 含量分别比对照增加 22.6%和 19.9%,根系 Cd 含量分别比对照增加 107%和

36.1%;但接种菌株 II₂R₃+IV₈R₃ 对玉米吸收和转运 Cd 没有显著影响(表 3)。单独或同时接种菌株 II₂R₃ 和 IV₈R₃ 均抑制了第二季玉米对 Cd 的吸收和转运,地上部 Cd 含量比对照分别降低了 40.0%、13.3%和 43.3%,根系 Cd 含量比对照分别降低了 26.8%、15.0%和 40.4%(表 3)。

在 Cd 添加量为 5 mg·kg⁻¹ 的土壤上,单独或同时接种菌株 II₂R₃ 和 IV₈R₃ 均抑制了第一季玉米根系对 Cd 的吸收,根系 Cd 含量比对照分别降低 65.6%、46.9%和 45.4%;然而,同时接种菌株 II₂R₃+IV₈R₃ 后,玉米地上部 Cd 含量比对照增加 1.56 倍。对于第二季玉米,接种菌株 IV₈R₃ 抑制了玉米根系对 Cd 的吸收,根系 Cd 含量比对照降低 21.5%,但单独接种菌株 II₂R₃ 和同时接种菌株 II₂R₃+IV₈R₃ 对玉米根系和地上部 Cd 含量均没有显著影响(表 3)。

在 Cd 添加量为 10 mg·kg⁻¹ 的土壤上,虽然同时接种菌株 II₂R₃+IV₈R₃ 促进了第一季玉米根系对 Cd 的吸收,但是显著抑制了 Cd 向地上部转运,地上部 Cd 含量比对照降低 20.7%;单独接种菌株 II₂R₃ 或 IV₈R₃ 增加了根系对 Cd 的吸收,根系 Cd 含量分别比对照增加 99.8%和 118%。对于第二季玉米,3 种接种处理对玉米根系和地上部 Cd 含量均没有显著影响(表 3)。

表 3 不同处理的玉米植株地上部和根系 Cd 含量

Table 3 Effects of different inoculation treatments on the shoot and root Cd concentrations of corn in soils with increasing levels of Cd contamination

镉添加量/mg·kg ⁻¹	接种处理	第一季玉米 Cd 含量/mg·kg ⁻¹		第二季玉米 Cd 含量/mg·kg ⁻¹	
		地上部分	根系	地上部分	根系
0	CK	0.13±0.00b	2.59±0.29b	0.39±0.10a	0.87±0.27a
	II ₂ R ₃	0.18±0.01a	11.82±1.44a	0.31±0.03a	0.63±0.15a
	IV ₈ R ₃	0.12±0.00bc	3.15±0.46b	0.40±0.05a	0.35±0.04a
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	0.10±0.01c	2.52±0.11b	0.54±0.06a	0.89±0.23a
1	CK	0.93±0.08b	14.62±1.03b	0.60±0.06a	3.39±0.35a
	II ₂ R ₃	1.14±0.16ab	30.29±3.43a	0.36±0.02b	2.48±0.18bc
	IV ₈ R ₃	1.62±0.25a	19.89±1.60b	0.52±0.05a	2.88±0.05ab
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	0.96±0.12b	21.57±2.17b	0.34±0.04b	2.02±0.09c
5	CK	5.25±0.97b	11.61±0.53a	1.68±0.13a	15.61±1.27ab
	II ₂ R ₃	6.07±0.46b	3.99±0.14c	1.72±0.04a	16.25±0.87a
	IV ₈ R ₃	7.06±0.58b	6.16±0.57b	1.60±0.11a	12.26±1.42b
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	13.43±2.11a	6.34±0.61b	1.87±0.13a	17.93±0.95a
10	CK	13.54±1.77ab	11.16±2.00b	1.91±0.28a	38.38±1.93a
	II ₂ R ₃	17.46±1.92a	22.30±2.69a	1.68±0.17a	37.10±3.62a
	IV ₈ R ₃	12.87±1.61ab	24.38±4.28a	1.70±0.13a	35.59±3.19a
	II ₂ R ₃ +IV ₈ R ₃	10.74±0.53b	15.58±1.91ab	1.68±0.14a	36.87±3.04a

注:数据为平均值±标准差(n=3);采用 Duncan 多重比较对接种菌株和对照进行比较,具有相同字母的数据间无显著差异(P>0.05)。

2.5 接种促生菌对土壤 pH 的影响

从表 4 可知, 土壤 pH 值随着土壤中 Cd 添加量的增加而增加。在没有添加 Cd 的土壤上, 收获第一季玉米后, 接种促生菌的土壤 pH 值略有降低, 但与对照之间的差异不显著; 收获第二季玉米后, 同时接种菌株 $II_2R_3+IV_8R_3$ 的土壤 pH 值比对照上升 0.11 个单位, 但单独接种菌株 II_2R_3 或 IV_8R_3 的土壤的 pH 值分别比对照降低 0.07 和 0.14 个单位。在 Cd 添加量为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤上, 接种菌株 IV_8R_3 使收获第一季和第二季玉米后的土壤 pH 值分别比对照上升 0.22 和 0.11 个单位; 同时接种菌株 $II_2R_3+IV_8R_3$ 使收获第一季后的土壤 pH 值比对照上升 0.23 个单位, 收获第二季后, 使土壤 pH 值略有上升, 但上升不显著。在 Cd 添加量为 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤上, 收获第一季玉米后, 接种菌株 II_2R_3 的土壤 pH 值比对照上升了 0.13 个单位, 但收获第二季后对土壤 pH 值没有显著影响。在 Cd 添加量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤上, 收获第一季玉米后, 同时接种 $II_2R_3+IV_8R_3$ 的土壤 pH 值显著上升, 比对照增加 0.25 个单位; 接种菌株 IV_8R_3 的土壤 pH 值略有上升, 但增加不明显; 收获第二季玉米后, 3 种接种处理对土壤 pH 值影响不显著。

2.6 接种菌株对土壤有效态镉含量的影响

收获植物后, 采集土壤样品, 测定土壤中的氯化钙提取态 Cd 含量, 结果发现(表 4), 土壤有效态 Cd 含量随土壤中镉添加量的增加而增加, 种植第二季玉米后的土壤有效 Cd 含量比第一季高。

在没有添加 Cd 的土壤中, 收获第一季玉米后, 3 种接种处理对土壤有效 Cd 含量均没有显著影响; 收获第二季玉米后, 单独接种菌株 II_2R_3 或 IV_8R_3 的土壤有效 Cd 含量比未接种的对照土壤分别降低了 35.9% 和 49.8%, 同时接种菌株 $II_2R_3+IV_8R_3$ 的土壤有效 Cd 含量反而比对照土壤增加了 80.2%。在 Cd 添加量为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 土壤上, 3 种接种处理使土壤有效 Cd 含量均有所增加, 但与未接种的对照土壤之间的差异不显著。在 Cd 添加量为 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 土壤上, 收获第一季玉米后, 单独接种菌株 IV_8R_3 和同时接种菌株 $II_2R_3+IV_8R_3$ 的土壤有效 Cd 含量比对照土壤略有降低, 但差异不明显; 收获第二季玉米后, 3 种接种处理均使土壤 Cd 有效含量有所降低, 但效果不显著。在 Cd 添加量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 土壤上, 同时接种菌株 $II_2R_3+IV_8R_3$ 使收获第一季和第二季玉米的土壤有效 Cd 含量比对照土壤分别降低 21.6% 和 37.3%; 收获第二季玉米后, 单

表 4 收获玉米后不同处理土壤的 pH 值和氯化钙提取态镉含量

Table 4 Effects of different inoculation treatments on pH and the bioavailable cadmium concentration extracted by CaCl_2 in soils with increasing levels of Cd contamination

镉添加量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	接种处理	第一季		第二季	
		pH	镉含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	pH	镉含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
0	CK	7.28±0.02a	1.92±0.42a	7.37±0.05ab	3.95±0.14b
	II_2R_3	7.26±0.06a	1.92±0.33a	7.30±0.08b	2.53±0.24b
	IV_8R_3	7.24±0.08a	1.58±0.33a	7.23±0.04b	1.98±0.09b
	$II_2R_3+IV_8R_3$	7.23±0.07a	1.75±0.95a	7.48±0.03a	7.12±1.73a
1	CK	7.16±0.03b	5.00±0.33a	7.28±0.04a	11.81±2.23a
	II_2R_3	7.17±0.01b	5.17±0.33a	7.26±0.08a	12.23±2.73a
	IV_8R_3	7.38±0.07a	5.25±0.75a	7.39±0.02a	14.22±2.10a
	$II_2R_3+IV_8R_3$	7.39±0.01a	5.63±0.75a	7.34±0.03a	12.35±1.18a
5	CK	7.54±0.05b	13.92±0.67a	7.41±0.08a	21.08±1.17a
	II_2R_3	7.67±0.01a	14.25±0.58a	7.41±0.05a	19.92±1.86a
	IV_8R_3	7.55±0.02b	12.83±0.42a	7.43±0.06a	17.67±1.06a
	$II_2R_3+IV_8R_3$	7.50±0.03b	12.42±0.96a	7.45±0.08a	18.25±2.92a
10	CK	7.49±0.06b	36.58±1.42a	7.48±0.04a	40.42±5.91a
	II_2R_3	7.47±0.01b	34.08±0.67a	7.28±0.07a	29.44±1.01b
	IV_8R_3	7.54±0.07b	34.83±2.24a	7.34±0.10a	24.17±0.58b
	$II_2R_3+IV_8R_3$	7.74±0.01a	28.67±0.96b	7.40±0.11a	25.33±0.98b

注: 数据为平均值±标准差($n=3$); 采用 Duncan 多重比较对接种菌株和对照进行比较, 具有相同字母的数据间无显著差异($P>0.05$)。

独接种菌株 II_2R_3 或 IV_8R_3 的土壤有效 Cd 含量分别比对照土壤降低 27.1% 和 40.2% (表 4)。

3 讨论

由于重金属 Cd 的毒性较大,生物累积性强,近年来我国频繁发生 Cd 污染事件,农业土壤 Cd 的污染问题引起了我国学者的高度关注^[21]。刘景红等^[22]调查了我国主要城市蔬菜重金属污染的情况,结果发现南方地区蔬菜重金属污染较北方严重,以 Cd 的污染形势最为严峻。据报道,华南地区部分城市有 50% 的农地遭受 Cd 污染^[23]。杨国义等^[24]在广东省典型区域(湛江市、中山市、珠海市、东莞市、惠州市和佛山市顺德区)调查研究发现,Cd 是蔬菜中主要污染元素。本研究结果也表明,土壤受到 Cd 污染后,即使是低积累玉米品种,其地上部和根系 Cd 含量均显著增加,说明 Cd 生物迁移能力很强,土壤中 Cd 很容易转移到农产品(表 3)。因此,Cd 污染土壤的治理和安全农作已显得十分迫切。

研究表明,土壤微生物代谢活动可使重金属发生吸收、沉淀、氧化还原等作用,降低土壤重金属的流动性和生物有效性,抑制植物对土壤重金属的吸收和积累^[10];同时,促生菌通过分泌吡啶乙酸等激素促进植物生长,或者通过固氮、溶磷、分泌高铁载体等作用促进植物对土壤养分的吸收,从而促进植物在重金属胁迫条件下的生长^[25-26]。本研究发现(表 2),金属抗性促生菌 II_2R_3 、 IV_8R_3 能促进玉米的生长,而且随着土壤 Cd 污染水平的增加,其促生作用更加明显,与 Belimov^[27]的研究结果一致,其原因可能在于^[25]:一方面,金属抗性细菌通过促进植物对 P、Fe 等营养元素的吸收,分泌 IAA 等植物激素促进植物的生长;另一方面,金属抗性细菌在通过胞外沉淀、细胞表面吸附或胞内积累等降低土壤重金属的生物有效性,从而减轻镉对植物的毒害和促进植物的生长发育。本研究的供试菌株 IV_8R_3 具有分泌吡啶乙酸和高铁载体的能力,菌株 II_2R_3 能分泌 IAA 和溶磷作用(表 1),这可能是接种促生菌 IV_8R_3 和 II_2R_3 促进玉米生长的原因(表 2);另外,菌株 IV_8R_3 、 II_2R_3 对金属 Cd 有较强吸附吸收能力(图 2),将其接种到土壤后,可能通过吸附或吸收作用,降低土壤溶液中 Cd 的浓度(表 4),从而减轻 Cd 对玉米的毒害作用,促进了玉米的生长(表 2)。

一般来说,土壤微生物可以通过细胞组分或胞外聚合物对金属的吸附作用、细胞对金属的生物吸收和胞内积累作用、微生物的代谢活动或代谢产物直接或

间接促进金属发生沉淀反应,形成金属磷酸盐、金属氧化物、金属硫化物等降低土壤中金属的溶解性和移动性,从而减轻金属对植物的毒害作用^[28]。土壤 pH 对重金属的溶解性和移动性具有显著影响,pH 升高,其溶解性和移动性降低;pH 下降,其溶解性和移动性上升。本研究发现,菌株 IV_8R_3 、 II_2R_3 不仅有较强吸附/吸收 Cd^{2+} 的能力(图 2),土壤接种 II_2R_3 或 IV_8R_3 还在一定程度上提高土壤的 pH 值,降低土壤有效 Cd 含量(表 4),从而抑制玉米对土壤 Cd 的吸收和转运。单独或同时接种菌株 IV_8R_3 或 II_2R_3 到 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 污染水平的土壤,第二季玉米的地上部和根系 Cd 含量均明显降低;在 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 污染水平的土壤上,3 种接种处理均使第一季玉米的根系 Cd 含量显著降低;同时接种菌株 II_2R_3 + IV_8R_3 到 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 污染水平的土壤,第一季玉米的地上部 Cd 含量也显著降低(表 3),然而,单独接种菌株 II_2R_3 或 IV_8R_3 到轻度 Cd 污染($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)土壤,玉米的地上部 Cd 含量反而比对照高(表 3),其原因可能在于菌株 II_2R_3 、 IV_8R_3 通过分泌 IAA、溶磷或分泌高铁载体的作用,改善玉米的营养状况而促进了玉米的生长^[25-26](表 2)。因此,接种菌株 II_2R_3 或 IV_8R_3 反而促进了玉米对 Cd 的吸收和转运。研究还发现,同时接种菌株 II_2R_3 + IV_8R_3 到中度 Cd 污染($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)土壤,第一季玉米的地上部 Cd 含量也比对照处理高(表 3),原因可能在于该处理的玉米地上部生物量显著降低(表 2),从而对地上部的 Cd 产生了一定的浓缩作用。这也表明,土壤接种促生菌的效果不仅与土壤重金属污染水平有关,而且受到植物生长状况的影响。

研究发现,在不添加 Cd 的土壤上,第二季玉米的地上部 Cd 含量大于第一季,而在添加 Cd 的土壤中,第一季玉米地上部的镉含量大于第二季(表 3)。这是因为第一季玉米生长在冬季,生长速率减慢,第二季玉米在春季播种,气温不断回升,且种植第二季玉米前,土壤施加了 N、P、K 肥作为基肥,玉米的生长速率快,地上部生物量均显著大于第一季玉米(表 2)。当土壤中 Cd 含量比较低时,发达的根系促进玉米对土壤 Cd 的吸收,同时玉米生长旺盛,蒸腾作用强,促进 Cd 向玉米地上部转运,因此在不添加 Cd 的土壤上,第二季玉米的地上部 Cd 含量大于第一季。然而,当土壤中添加外源 Cd,土壤中 Cd 总量和有效含量增加,虽然玉米根系吸收的 Cd 也增加,但由于研究采用的是低积累的玉米品种,其吸收的 Cd 主要被固定在根部,不容易转运到地上部,同时第二季玉

米地上部的生物量远远大于第一季玉米,其对地上部 Cd 起到了一定的稀释作用。因此,在添加 Cd 的土壤中,第一季玉米地上部的 Cd 含量大于第二季(表3)。

4 结论

(1)在镉胁迫条件下,促生菌Ⅳ₈R₃、Ⅱ₂R₃的生长延滞期延长,最大生物量降低。

(2)促生菌Ⅳ₈R₃、Ⅱ₂R₃有较强的吸附或吸收 Cd 的能力,从而使其具有较高的抗 Cd 胁迫的能力。

(3)接种金属抗性促生菌Ⅱ₂R₃、Ⅳ₈R₃能不同程度地促进第一季玉米的生长,且随着土壤 Cd 污染水平的增加,其促进植物生长的效果更加明显。当土壤 Cd 添加水平 $\leq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,单独接种促生菌Ⅱ₂R₃或Ⅳ₈R₃的效果比二者同时接种好,但土壤 Cd 污染水平为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,同时接种两种促生菌的效果比单独接种好。

(4)接种促生菌菌株Ⅱ₂R₃、Ⅳ₈R₃能一定程度降低玉米地上部 Cd 含量,但其效果受到土壤 Cd 污染水平、土壤肥力和种植季节的影响。

(5)接种金属抗性促生细菌Ⅱ₂R₃、Ⅳ₈R₃后,模拟镉污染土壤 pH 值影响不显著,土壤有效镉含量呈降低趋势。

参考文献:

- [1] 曾希柏,徐建明,黄巧云,等.中国农田重金属问题的若干思考[J].土壤学报,2013,50(1):189-197.
ZENG Xi-bai, XU Jian-ming, HUANG Qiao-yun, et al. Some deliberations on the issues of heavy metals in farmlands of China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(1):189-197.
- [2] 谢建治,刘树庆,刘玉柱,等.保定市郊土壤重金属污染对蔬菜营养品质的影响[J].农业环境保护,2002,21(4):325-327.
XIE Jian-zhi, LIU Shu-qing, LIU Yu-zhu, et al. Effects of heavy metal pollution in soil on nutrition, quality of vegetable in Baoding[J]. *Agro-environmental Protection*, 2002, 21(4):325-327.
- [3] 谢建治,张书廷,刘树庆,等.潮褐土重金属 Cd 污染对小白菜营养品质指标的影响[J].农业环境科学学报,2004,23(4):678-682.
XIE Jian-zhi, ZHANG Shu-ting, LIU Shu-qing, et al. A effects of heavy metal cadmium on nutrition quality indicators of non-heading Chinese cabbage in a polluted cinnamon soil[J]. *Journal of Agro-Environmental Science*, 2004, 23(4):678-682.
- [4] Vangronsveld J, et al. Proceedings of Extended Abstracts of 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, 1999, 1: 16-17.
- [5] 杨肖娥,龙新宪,倪国钟,等.古老铅锌矿山生态型东南景天对镉毒性及超积累特性的研究[J].植物生态学报,2001,25(6):665-672.
YANG Xiao-e, LONG Xin-xian, NI Wu-zhong, et al. Zinc tolerance and hyperaccumulation in a new ecotype of *Sedum alfredii* Hance[J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 2001, 25(6):665-672.
- [6] 郭晓方,卫泽斌,丘锦荣,等.玉米对重金属累积与转运的品种间差异[J].生态与农村环境学报,2010,26(4):367-371.
GUO Xiao-fang, WEI Ze-bin, QIU Jin-rong, et al. Differences between corn cultivars in accumulation and translocation of heavy metals[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2010, 26(4):367-371.
- [7] 卫泽斌,郭晓方,吴启堂.化学淋洗和深层土壤固定联合技术修复重金属污染土壤[J].农业环境科学学报,2010,29(2):407-408.
WEI Ze-bin, GUO Xiao-fang, WU Qi-tang. Remediation of heavy metals contaminated soils by combined technology of chemical washing and fixation in deep soil layer[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2):407-408.
- [8] Wu S C, Luo Y M, Cheng K C, et al. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: A laboratory study[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144(3):765-773.
- [9] Long X X, Chen X M, Chen Y G, et al. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(5):1197-1207.
- [10] Arandhati Pal A K Paul. Microbial extracellular polymeric substances: Central elements in heavy metal bioremediation[J]. *Indian Journal Microbial*, 2008, 48:49-64.
- [11] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Tongmin S. Metal tolerating methylo-trophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) [J]. *Chemosphere*, 2007, 69:220-228.
- [12] Wei G H, Fan L M, Zhu W F, et al. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 162:50-56.
- [13] Bashan Y, de-Bashan L E. Bacteria/plant growth-promotion[J]. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 2005, 1:103-115.
- [14] Frommel M I, Nowak J, Lazarovits G. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* sp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. [J]. *Plant Physiol*, 1991, 96:928-936.
- [15] 何红,邱思鑫,胡方平,等.植物内生细菌生物学作用研究进展[J].微生物学杂志,2004,24(3):40-45.
HE Hong, QIU Si-xin, HU Fang-ping, et al. Advance in biological effects of endophytic bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(3):40-45.
- [16] Hardoim P R, van Overbeek L S, van Elsas J D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16:463-471.
- [17] Li J H, Wang E T, Chen W F, et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang Province of China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40:238-246.
- [18] Sheng X F, Xia J J, Jiang C Y, et al. Characterization of heavy-metal resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their

- potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156:1164–1170.
- [19] 陈雪梅. 东南景天内生细菌的分离及其强化植物修复锌污染土壤的研究[D]. 广州:华南农业大学, 2010.
- CHEN Xue-mei. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Sedum alfredii* Hance and their potential in promoting the growth of zinc accumulation of *Sedum alfredii*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2010.
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社, 2000.
- BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.
- [21] 黄益宗, 郝晓伟, 雷 鸣, 等. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3):409–417.
- HUANG Yi-zong, HAO Xiao-wei, LEI Ming, et al. The remediation technology and remediation practices of heavy metals-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(3):409–417.
- [22] 刘景红, 陈玉成. 中国主要城市蔬菜重金属污染格局的初步分析[J]. 微量元素与健康研究, 2004, 21(5):42–44.
- LIU Jing-hong, CHEN Yu-cheng. Primary investigation on contamination pattern of vegetables by heavy metals in Chinese cities[J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2004, 21(5):42–44.
- [23] 杨苏才, 南忠仁, 曾静静. 土壤重金属污染现状与治理途径研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3):549–552.
- YANG Su-cai, NAN Zhong-ren, ZENG Jing-jing. Current situation of soil contaminated by heavy metals and research advances on the remediation techniques[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2006, 34(3):549–552.
- [24] 杨国义, 罗 薇, 高家俊, 等. 广东省典型区域蔬菜重金属含量特征与污染评价[J]. 土壤通报, 2008, 39(1):133–136.
- YANG Guo-yi, LUO Wei, GAO Jia-jun, et al. Heavy metal contents and pollution evaluation in vegetables in Guangdong Province[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(1):133–136.
- [25] Belimova A A, Hontzeas N, Safronova V I, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37:241–250.
- [26] 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.
- [27] Belimov A A, Hontzeas N, Safronova V I, et al. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium[J]. *Microbiology*, 2004, 73:99–106.
- [28] Dary M, Chamber-Pérez M A, Palomares A J, et al. In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria[J]. *Journal of Hazard Mater*, 2010, 177(1–3):323–330.