

植物根际促生菌辅助红麻修复铅污染土壤

陈燕玫¹, 柏 珺¹, 杨煜曦¹, 王诗忠^{1,2*}, 杨秀虹^{1,2}, 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:通过盆栽实验研究土壤 Pb 浓度对经济作物红麻(*Hibiscus cannabinus*)生长、富集及转运 Pb 的影响,并将具有较强 Pb 抗性的植物根际促生菌(PGPR)DBM1(*Arthrobacter* sp.)接种至红麻根际,考察 Pb 胁迫下 PGPR 对红麻的促生作用,以探索利用 PGPR 辅助重金属耐性植物红麻对 Pb 污染土壤进行植物稳定修复的可行性。结果表明,土壤 Pb 浓度和接菌处理均显著影响红麻的生长。红麻对 Pb 具有较高耐性,可通过将 Pb 富集在根部,并抑制其向地上部转移,从而在中低 Pb(Pb400 和 Pb800 处理)污染土壤中良好定植和生长。土壤 Pb 浓度达到 1600 mg·kg⁻¹ 时,红麻生长开始受到 Pb 胁迫的抑制,红麻通过自身胁迫抵抗机制缓解 Pb 毒性。接种 DBM1 可有效促进红麻的生长,提高红麻叶绿素含量。DBM1 对红麻的促生作用是由胁迫诱导的特性,在高 Pb 胁迫下促生效果更显著。因此,可利用植物根际促生菌 DBM1 辅助红麻对高 Pb 污染土壤进行植物稳定修复,在促进红麻生长的同时,有效抑制 Pb 向红麻地上部的转移。

关键词:红麻;植物根际促生菌;植物稳定;Pb

中图分类号:X563.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)11-2159-09 doi:10.11654/jaes.2013.11.009

Phytoremediation of Pb Polluted Soil by Kenaf with Assistance of Plant Growth Promoting Rhizobacterium (PGPR)

CHEN Yan-mei¹, BAI Jun¹, YANG Yu-xi¹, WANG Shi-zhong^{1,2*}, YANG Xiu-hong^{1,2}, 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, Guangdong 510275, China)

Abstract: Phytoremediation is a promising option to remediate soils contaminated by heavy metals. Plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) may further enhance phytoremediation efficiency. In a pot experiment, the impact of Pb on the growth of and Pb accumulation and translocation in kenaf(*Hibiscus cannabinus*) with inoculation of a Pb resistant PGPR DBM1(*Arthrobacter* sp.) was studied. Kenaf had high resistance to Pb and could grow well upto 800 mg Pb·kg⁻¹ soils. The tolerance of kenaf to Pb could result from Pb accumulation in the roots and limited translocation to the shoots(TF<1). The growth of kenaf was inhibited at 1600 mg Pb·kg⁻¹ soil. Inoculation of DBM1 effectively increased biomass and chlorophyll contents of kenaf, with more effective at higher Pb stress. It was concluded that kenaf could be used in combination with PGPR to phytoremediate Pb severely contaminated soils.

Keywords: kenaf; plant growth promoting rhizobacteria(PGPR); phytostabilization; lead

矿山重金属污染给矿山周边居民的生活质量和重要农副产品带来污染隐患,治理和修复矿山重金属

污染是亟待解决的问题之一。随着铅矿的大规模开采,我国土壤 Pb 污染现状日渐严峻。Pb 在土壤中的溶解度小,且不易在植物体内迁移,导致利用植物提取技术修复 Pb 污染土壤难度较大。此外,已发现的超富集植物大都存在生物量小、生长缓慢等缺点,修复成本高、见效慢,相比而言,植物稳定技术表现出明显的优势。植物稳定,即利用植物根系的吸附作用或通过根系分泌物等使土壤中重金属的移动性降低,生物

收稿日期:2013-03-24

基金项目:国家杰出青年科学基金(41225004)、国家“十二五”863 重点项目(2012AA06A202)、国家自然科学基金(41101483)、教育部博士点基金(20110171120028)

作者简介:陈燕玫(1989—),女,广东揭阳人,在读博士,主要从事土壤重金属污染修复研究。

* 通信作者:王诗忠 E-mail:wshzh2@mail.sysu.edu.cn

有效性下降,从而降低其迁移和生物毒性^[1]。利用植物稳定技术修复重金属污染土壤,可以在收获经济作物的同时治理污染土壤,同时满足环境效益、经济效益及社会效益。

红麻(*Hibiscus cannabinus*)是一年生锦葵科木槿属草本植物,生长周期短,植株生物量大,在我国南北各地均可种植^[2]。国内外已有学者就红麻对重金属的耐性、吸收和积累机制展开研究,如 Mun 等^[3]研究发现,Pb 在红麻根部的富集程度达到 85%以上,主要以含 Pb 沉淀物的形态富集在根部细胞壁上。关于红麻对 Cu 富集效应的研究表明,红麻各组织中 Cu 的富集浓度依次为根>叶>茎(皮),且红麻纤维皮层内 Cu 含量低于纺织产品 Cu 含量标准^[2]。这都说明红麻具有作为植物稳定修复品种的潜能。但目前关于红麻对重金属的耐受能力仍没有定论,而如何在利用红麻修复污染土壤的过程中,提高红麻产量,同时加强红麻对重金属的抗性,也值得进一步研究。

植物根际促生菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)是指一类能够通过分泌有益物质从而直接或间接促进植物生长的细菌^[4]。有研究表明,植物根际及其根际微生物的生理活动对土壤性状、植物养分吸收及植物生长都有明显的影响^[5]。PGPR 可以通过多种形式直接或间接影响植物对重金属的吸收,而其中的作用机制也已受到许多研究者的关注。目前,利用某些 PGPR 菌提高植物对金属的提取率和植物生物量,从而强化植物提取的研究较多^[6-7]。也有研究表明,某些 PGPR 菌对土壤重金属有一定的固定作用,能减少植物对重金属的吸收或减少重金属向植物有用部位的转移。如 Madhaiyan 等^[8]研究发现,对 Ni/Cd 污染土壤中的番茄分别接种甲基营养菌属 CBMB20 和 CBMB40,番茄植株地上部及地下部对 Ni/Cd 的吸收明显减少,土壤中 Ni/Cd 有效性降低。但关于 PGPR 菌与重金属耐性植物联合应用于植物稳定修复的研究仍鲜见报道。

国内关于经济植物耐受重金属的机理与修复技术的研究较少,而利用微生物辅助提高耐性植物修复效果的研究更不多见。因此,本研究拟以具重金属耐性的经济植物红麻,及已证明具有 Pb 抗性的植物根际促生菌(PGPR)DBM1 作为研究对象,研究红麻对重金属 Pb 的耐受能力,同时探讨接种 PGPR 对红麻生长及其耐 Pb 能力的影响,以期建立重金属污染土壤的综合修复体系,为微生物-植物联合修复技术的推广应用提供一定的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 培养基与试剂

1.1.1 培养基

无氮培养基:蔗糖 10.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, $CaCO_3$ 1.0 g, 琼脂 20 g 用水洗净,蒸馏水 1000 mL, pH 值 7.2。

SM 培养基:葡萄糖 1.0 g,蔗糖 1.0 g,柠檬酸钠 1.0 g,苹果酸 1.0 g,甘露醇 1.0 g,醋酸钠 1.0 g, KH_2PO_4 0.4 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $CuSO_4$ 1 mg, $NiSO_4$ 1 mg, $ZnSO_4$ 5 mg, $FeSO_4$ 5 mg, $MnSO_4$ 3 mg, Na_2MoO_4 1 mg, H_3BO_3 2 mg, 蒸馏水 1000 mL, pH 6.4。

在 SM 培养基中加入经过滤除菌的 ACC,使其浓度为 $0.5 g \cdot L^{-1}$,得 SMA 培养基。在 SM 培养基中加入 $(NH_4)_2SO_4$,使其浓度为 $0.5 g \cdot L^{-1}$,得 SMN 培养基^[9]。

1.1.2 试剂

Sackowski's 显色剂:150 mL 浓硫酸溶于 250 mL 去离子水中,加入 7.5 mL $0.5 mol \cdot L^{-1}$ 的 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 溶液。

$0.2 mol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液:配制 $0.2 mol \cdot L^{-1}$ 磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)贮液(甲液)及 $0.2 mol \cdot L^{-1}$ 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)贮液(乙液);取甲液 39 mL 与乙液 61 mL 并充分混合。

1.2 供试菌株及菌液制备

以课题组自广东省大宝山矿区周边废弃地重金属污染土壤中筛选出的具有 Pb 抗性(培养基条件下耐性阈值为 $125 mg \cdot L^{-1}$)的根际菌作为供试菌株。该菌株经过 16S rDNA 克隆及序列测定和比较,初步确定为 *Arthrobacter* sp.(节杆菌属),命名为 DBM1。

供试菌株在牛肉膏蛋白胨培养基中振荡培养 48 h($30 \text{ }^\circ\text{C}$)后,于 $8000 r \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 10 min,弃去上清液,用磷酸缓冲液(pH 值 7.0)调成 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.6 的菌悬液,备用。

1.3 供试土壤与作物

供试无污染土壤采自华南农业大学。土壤理化性质及重金属含量见表 1。土壤风干后过 2 mm 尼龙筛备用。供试植物为红麻,红麻种子购自韶关翁源县农业科技推广服务站。

1.4 盆栽实验

实验设计 4 个 Pb 浓度水平,分别为 0、400、800、1600 $mg \cdot kg^{-1}$ (CK、Pb400、Pb800、Pb1600 处理),采用分析纯级 $Pb(NO_3)_2$ 以溶液形式均匀加入,混匀。各梯

表1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the experimental soil

pH	碱解氮/mg·kg ⁻¹	速效磷/mg·kg ⁻¹	有效钾/mg·kg ⁻¹	有机质/g·kg ⁻¹	重金属含量/mg·kg ⁻¹			
					Zn	Cu	Pb	Cd
6.00	78.17	17.95	91.87	20.35	64.67	27.24	48.48	0.19

度均设加菌(BI, bacterial inoculation)和不加菌(NBI, no bacterial inoculation)两种处理,每个处理3个重复。采用温室盆栽方法,每盆栽土500g,土壤平衡30d。每盆播种10颗,待幼苗长出2~3片叶片(约15d),留取长势较好且相近的3株,分别在植株根际接入等量的菌悬液或磷酸缓冲液10mL。实验在自然光照条件下进行,生长过程用去离子水每天浇灌。

间苗加菌15d后进行二次加菌,继续生长30d后收获。收获时测量红麻叶片数、株高、根长和生物量,并将植物分为根、茎、叶三部分。洗净后的根、茎、叶于105℃烘箱中杀青30min,75℃下烘干后粉碎备用。洗根前收集黏附在根系上的土壤作为根际土,风干待测。

1.5 分析方法

菌株分泌IAA定性测定、产ACC脱氨酶能力及固氮能力测定参考夏娟娟^[9]的方法;产铁载体能力测定参考Schwyn等^[10]的方法;菌株促生实验参考Belimov等^[6,11]的方法。

土壤重金属含量采用王水(HNO₃:HCl=2mL:6mL)消解法消解。消解样品用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES, Optima 5300DV, Perkin-Elmer, USA)测定重金属含量。以环境标准物质ESS-3红壤和ESP-1西红柿叶(中国环境监测总站提供)进行质量控制。

土壤其余基本理化性质参照鲍士旦^[12]的方法。

土壤有效态金属测定参照Gupta等^[13]的方法,样品用ICP-OES测定Pb含量。

植物样品消解步骤参照Chen等^[14]的方法,消解液用ICP-OES测定Pb含量。

红麻叶片叶绿素含量测定参照王学奎等^[15]的方法,用80%丙酮提取-分光光度法测定。

1.6 统计方法

实验数据统计分析及作图采用Origin 8.0和SPSS16.0软件完成。不同Pb处理及接菌的影响进行多因素方差分析(Univariate)。用t检验法比较各Pb浓度接菌(BI)处理与不接菌(NBI)处理。均值的多重比较用邓肯(Duncan)新复极差测验法检验($\alpha=0.05$)。根Pb含量和土壤有效态Pb含量的相关性用Pearson

法检验。

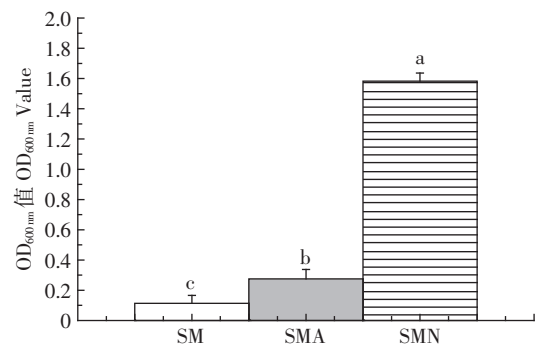
2 结果与分析

2.1 供试菌株的促生特性

吲哚乙酸(IAA)是植物体内最为普遍的生长素类物质,具有分泌IAA能力的促生菌株能够通过代谢其前体物质色氨酸生成吲哚乙酸,进而在Sackowski's显色剂的作用下使培养液变红。实验结果表明,菌株DBM1具有产植物生长素(IAA)的能力。

ACC脱氨酶能将乙烯的前体物1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic, ACC)分解成 α -丁酮酸和氨,从而抑制乙烯的生成,缓解过量乙烯对植物产生的不良反应,促进根系的生长发育,提高植物的抗逆性^[16]。由图1可知,DBM1在无氮SM液体培养基中能少量生长,而在以ACC为唯一氮源的SMA培养基中,菌株不仅能生长,且在相同接种量的条件下,长势显著优于SM培养基,由此可以排除固氮因素的影响,判断供试菌株具有产ACC脱氨酶的能力。

将DBM1点接于无氮培养基平板数天后,能够生长,说明该菌株具备利用空气中的氮气作为氮素营养的能力。此外,通过实验证明DBM1不具有合成铁载体的能力。



不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同
Different letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below

图1 不同氮源对菌株生长的影响

Figure 1 Growth of strains on a liquid SM medium supplied with different N compounds

DBM1 对平皿中红麻生长的影响见表 2。在无菌滤纸平皿中, 无论是否添加重金属 Pb, DBM1 对红麻的生长均表现出一定的促生作用, 说明 DBM1 具备一定的促生潜力。

表 2 接种菌株对平皿中红麻生长的影响
Table 2 Effect of PGPR inoculation on the growth of Kenaf in petri dish

土壤	处理	根长/mm	增加率/%	茎长/mm	增加率/%
CK	不加菌	58.38±7.72		81.13±6.78	
	加菌	67.13±4.18	+15.0%	82.8±13.26	+2.1%
Pb 处理	不加菌	38.49±4.37		61.53±12.34	
	加菌	39.89±6.06	+3.6%	76.87±8.44	+24.9%

2.2 不同处理对根际土 pH 及 Pb 有效态的影响

土壤 pH 值随 Pb 浓度增加而降低, 有效态 Pb 含量上升(图 2、3)。种植红麻显著提高了不同 Pb 处理根际土壤 pH 值, 降低了有效态 Pb 含量($P < 0.05$)。各处理与 CK 对比, 有效态 Pb 含量分别降低了 80.8%、

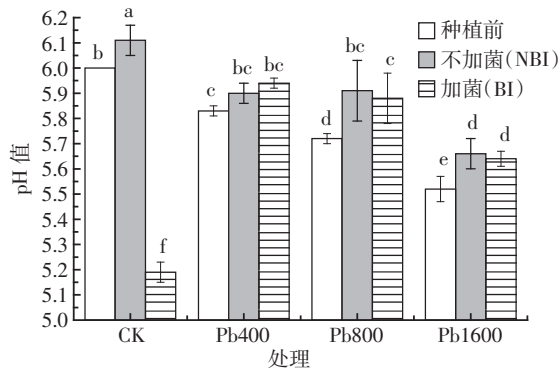


图 2 不同处理对根际土 pH 值的影响
Figure 2 Effects of different Pb treatments on pH in rhizospheric soils

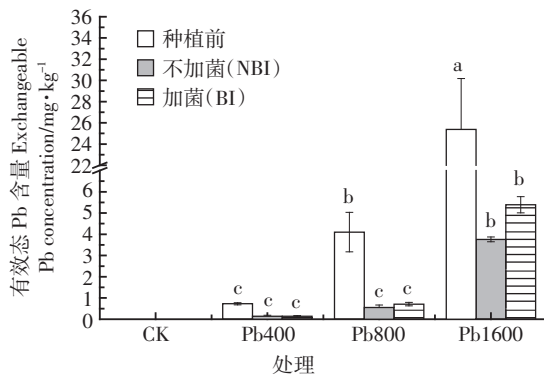
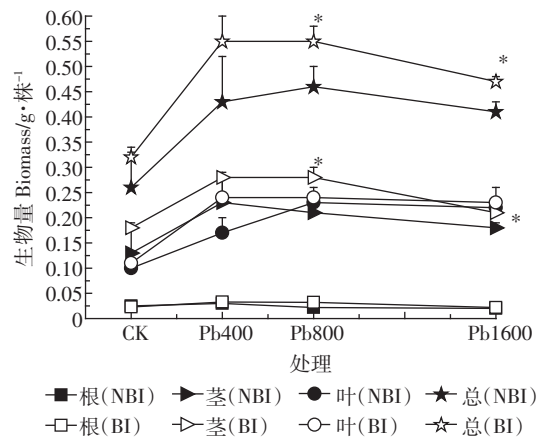
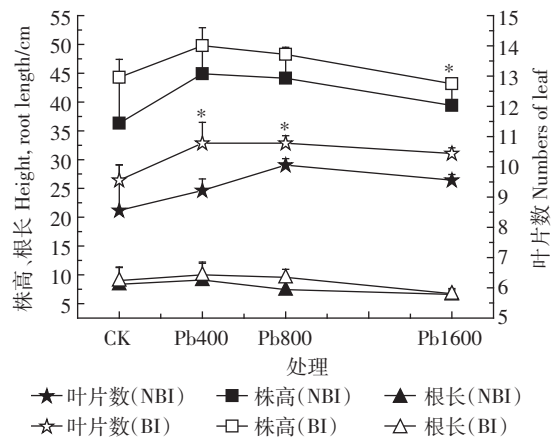


图 3 不同处理对根际土有效态 Pb 含量的影响
Figure 3 Effects of different Pb treatments on exchangeable Pb concentration in rhizospheric soils

86.6%和 85.2%, 说明红麻对其根际土中的 Pb 有良好的固定作用, 可显著降低 Pb 的生物有效性。BI 处理除显著降低 CK 土壤 pH 值外, 对各处理土壤 pH 值及有效态 Pb 含量无明显影响。

2.3 不同处理对红麻生长的影响

土壤 Pb 浓度显著影响红麻各生长指标(叶片数: $F=4.797, P=0.014$; 株高: $F=4.866, P=0.014$; 根长: $F=1.973, P=0.159$; 根生物量: $F=6.014, P=0.006$; 茎生物量: $F=15.307, P < 0.0001$; 叶生物量: $F=33.152, P < 0.0001$; 总生物量: $F=25.241, P < 0.0001$)。NBI 处理时, Pb400 和 Pb800 处理中各指标相比 CK 均有增加(图 4), 可能是由于添加的 $Pb(NO_3)_2$ 增加了土壤的 N 素含量, 在红麻不受 Pb 胁迫时反而促进了红麻生长, 同时也反应了红麻对 Pb 具有较强的耐性。这与 Mun^[3] 等的研究结果一致。当土壤 Pb 浓度达到 $1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 红麻各生长指标相对 Pb800 处理均降低, 表明该



* 表示同一 Pb 浓度下 BI 处理与 NBI 处理有显著差异, $P < 0.05$
* indicates significant difference between PGPR and Non-PGPR treatments at 0.05 level

图 4 不同处理对红麻生长的影响

Figure 4 Effects of different Pb treatments on the growth of kenaf

浓度下红麻生长开始受到抑制(图4)。

除根长外($P>0.05$),接种 DBM1 对红麻各生长指标均有显著影响(叶片数: $F=15.598, P=0.001$;株高: $F=10.653, P=0.005$;根生物量: $F=2.757, P=0.116$;茎生物量: $F=17.010, P=0.001$;叶生物量: $F=8.221, P=0.011$;总生物量: $F=16.002, P=0.001$)。不同 Pb 浓度, BI 处理与 NBI 处理对比,各项生长指标均有增加,但菌株对红麻的促生效果在高 Pb 处理下更为显著。低 Pb 浓度时(Pb400),BI 处理仅叶片数显著高于 NBI 处理;随 Pb 浓度的增加,BI 处理显著提高了红麻叶片数、株高及生物量等各项生长指标(图4)。

2.4 不同处理对红麻叶绿素含量的影响

叶绿素是植物光合作用的重要组成物质,叶绿素含量的高低能反映植物光合作用水平的强弱^[7]。植物的光合作用、光呼吸一般都与叶绿素 a/b 值、叶绿素(a+b)含量密切相关,从而使得植物的生长也与其密切相关^[8]。叶绿素 a/b 值则是衡量植物耐阴程度的一个重要指标,一般来说,a/b 值小的树种具有较强的耐阴性,即对光的利用能力更强。土壤 Pb 浓度显著影响红麻叶绿素含量(叶绿素 a: $F=5.500, P<0.009$;叶绿素 b: $F=41.953, P<0.0001$;叶绿素(a+b): $F=6.197, P=0.005$;a/b: $F=31.564, P<0.0001$)。NBI 处理中,当土壤 Pb 浓度达到 $1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,红麻叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素(a+b)含量均较明显的减少,叶绿素 a 与 b 的比值(a/b)则显著升高(图5),表明该Pb 浓度下叶绿素的合成开始受到抑制,红麻对光的利用能力下降。这可能是因为高浓度 Pb^{2+} 对植物中叶绿体光合电子的传递产生了抑制作用^[9],或与叶绿素分子中的镁

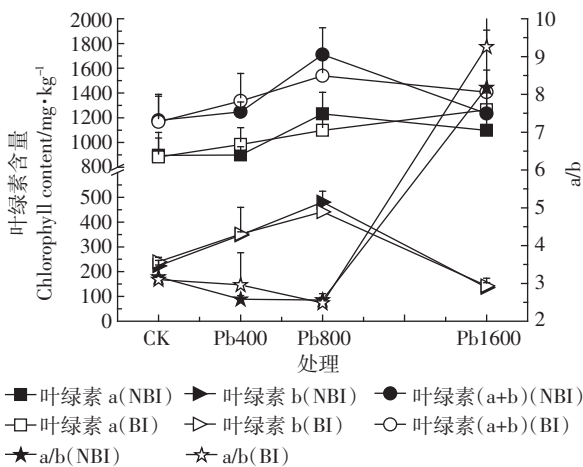


图5 不同处理对红麻叶绿素含量的影响

Figure 5 Effects of different Pb treatments on chlorophyll contents in kenaf

离子等发生置换,从而抑制了叶绿素的合成^[20-23]。

接种 DBM1 对 Pb800 和 Pb1600 处理中红麻叶绿素含量的高低起到相反效果:与 NBI 处理相比,Pb800 处理中红麻叶绿素含量降低,Pb1600 处理中反而上升(图5)。但总体上接菌对叶绿素含量影响并不显著($P>0.05$)

2.5 不同处理对红麻 Pb 含量的影响

土壤 Pb 浓度对红麻各部分 Pb 含量影响均极显著(根 Pb 浓度: $F=86.882, P<0.0001$;茎 Pb 浓度: $F=55.196, P<0.0001$;叶 Pb 浓度: $F=38.810, P<0.0001$)。NBI 处理中,红麻各部分 Pb 含量随土壤 Pb 浓度升高显著增加(图6)。这表明,红麻所含 Pb 浓度主要取决于土壤中 Pb 的含量。就红麻各器官而言,根 Pb 含量

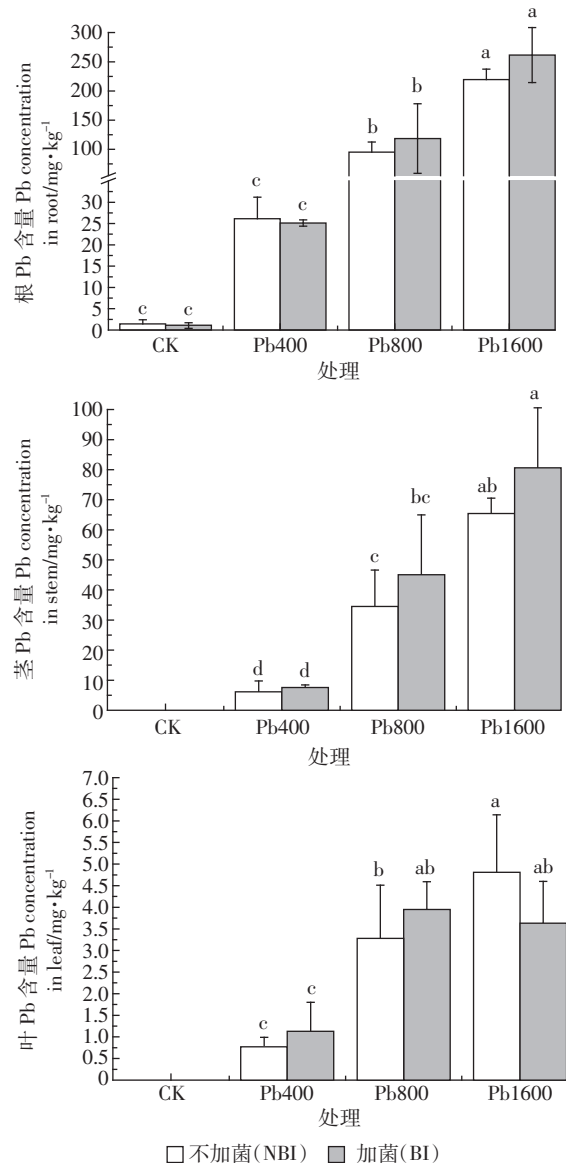


图6 接种菌株对红麻 Pb 含量的影响

Figure 6 Effects of PGPR inoculation on Pb concentrations in kenaf

远远高于其他器官,茎 Pb 含量为根 Pb 含量的 24%~36%,叶片 Pb 含量仅为根 Pb 含量的 2.2%~3.4%。红麻根 Pb 含量与土壤有效态 Pb 含量有显著正相关关系($r=0.96, P<0.05$),可见红麻吸收的 Pb 主要累积在根部,而根系对 Pb 的吸收主要受土壤中 Pb 生物有效性的影响^[3]。

对于 BI 处理,总的来看,接种 DBM1 对红麻各部分 Pb 含量影响不显著($P>0.05$)。但就各处理而言,Pb800 处理中红麻茎、叶 Pb 含量有所增加,而 Pb1600 处理中叶片 Pb 含量降低,比 NBI 处理减少了 24.5%(图 6)。DBM1 可能通过调节 Pb 在红麻体内的转运迁移,促进红麻在高 Pb 胁迫下的生长。

2.6 不同处理对 Pb 在红麻植株内分布、转运的影响

富集系数(Bioconcentration factors, BCF)是植物根部重金属浓度与土壤重金属浓度的比值,反映植物从土壤中吸收、积累重金属的能力;转移系数(Translocation factors, TF)是植物地上部重金属浓度与地下部重金属浓度的比值,反映植物内部对重金属的转运能力^[24]。BCF 和 TF 都是评估植物修复潜能的重要指标^[3]。土壤 Pb 浓度极显著影响红麻对 Pb 的富集系数及转移系数(BCF: $F=16.025, P<0.0001$; TF: $F=43.429, P<0.0001$)。NBI 处理中,红麻根部 Pb 富集系数(BCF)及转移系数(TF)随 Pb 浓度升高均呈上升趋势。当土壤 Pb 浓度达到 $1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, BCF 保持不变, TF 下降。可以猜测,此时土壤 Pb 浓度开始对红麻产生生物毒性,红麻可能通过自身的调节控制其对 Pb 的富集,并限制 Pb 向地上部的转移,这可能是红麻对 Pb 毒性抵抗机制的一种外在表现。

接菌后,对照及 Pb400 处理中,BCF 基本不变,TF 提高;对 Pb800, BCF 和 TF 均提高;Pb1600 处理中,加菌提高了 BCF,但基本保持其转移系数(TF)不变(图 7)。可见,接种 DBM1 促进了红麻根部对 Pb 的富集及其向地上部的转移,但转运效果可能受到红麻自身对 Pb 毒性抵抗机制的影响,使得接菌在总体上效果不显著($P>0.05$)。

3 讨论

改善土壤环境,实现矿山尾矿废弃地上植物群落的长期成功定植是进行植物稳定修复的主要目标。植物稳定修复通过形成一个植物的营养帽实现对尾矿的长期固定,其中植物冠层减轻了风蚀作用而植物根系则抑制了水蚀作用,并通过吸附或富集作用将金属元素固定或沉淀在根际区。与植物提取不同,植物稳

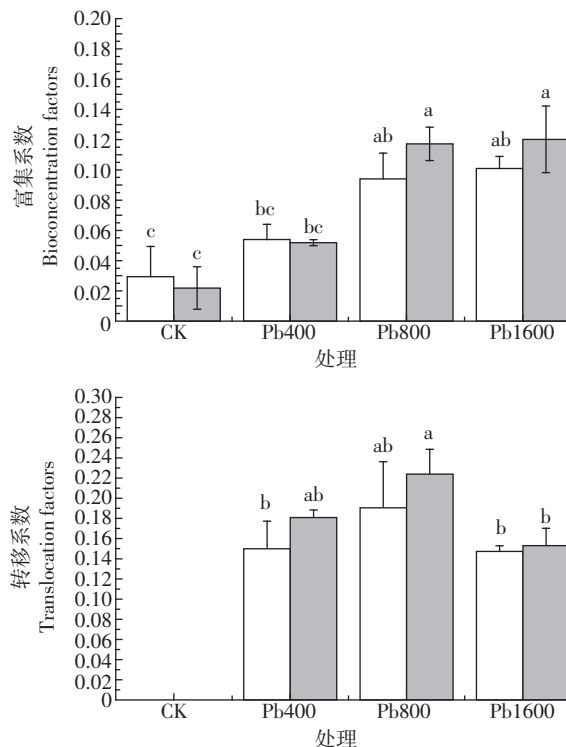


图7 不同处理中红麻体内 Pb 的富集系数和转移系数
Figure 7 Bioaccumulation factor (BCF) and translocation factor (TF) of Pb in kenaf under different Pb treatments

定关注的是将重金属隔离或固定在植物根际,不使它进入植物组织(尤其是植物地上部各组织)^[25]。因此,应用于植物稳定修复的植物要求具有较高的金属耐性和较低的金属转移系数。一般认为金属在转移系数 $TF<1$ 的植物体内不易发生迁移^[26],该类植物具有应用于植物稳定修复的潜力。

红麻在中低浓度(Pb400 和 Pb800)Pb 污染土壤中长势良好,各生长指标及叶绿素含量相比 CK 均有增加,这可能是受 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 中 N 素的影响,在红麻不受 Pb 胁迫时反而促进了红麻生长^[3],这也反应了红麻较高的 Pb 耐性。与无植物对照相比,种植红麻均显著提高了土壤 pH 值,并有效降低了土壤有效态 Pb 含量(80.8%~85.2%),与 Turpeninen^[27]等发现的松树苗对土壤中 Pb 的固定作用相当(12%~93%)。不同处理中,红麻根部生物量仅为总生物量的 5%~10%,而根部累积的 Pb 却达到红麻吸收 Pb 总量的 21%~34%。Mun^[3]等在红麻水培实验中也发现,生物量为总生物量 8%~19%的红麻根系,可以富集红麻中总 Pb 量的 38%~97%。此外,超富集植物 *Thlaspi praecox* Wulf. 可以将 80%的 Pb 固定在根部^[28],印度芥菜根部对 Pb 的富集则可达到 95%以上^[29]。以较低的生物量累积大部分的 Pb,可见根系是植物贮存 Pb 的主要部位。另有

研究指出,金属离子能够以磷酸盐、硫酸盐及碳酸盐等形态被固定在细胞的质外体和共质体中^[30]。Brown和Slingsby^[31]认为植物对Pb的耐性可能得益于细胞壁对Pb的富集,并限制其进入原生质层。利用扫描透射电子显微镜可以观察到,Pb的确存在于红麻根部细胞壁内形态、大小不同的沉积物中^[3]。本研究各处理中,红麻Pb转移系数(TF)均远小于1(0.15~0.22),Pb向红麻地上部的迁移受到明显抑制,可见红麻的高Pb耐性可能来自于根部细胞壁对Pb的固定作用,进而抑制Pb向其他组织的迁移,缓解Pb的植物毒性。

红麻的生长受土壤Pb浓度显著影响($P < 0.05$),当Pb浓度达到 $1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,红麻生长开始受到抑制,其生物量、叶绿素等各项生理指标相对Pb800处理均有所下降。此时红麻可能通过减少根部对Pb的富集(Pb800和Pb1600处理中BCF无明显差异),以及Pb向地上部的转移(Pb1600处理中TF降低)以抵抗Pb毒性的影响,表明红麻在Pb胁迫下有一套自身的胁迫抵抗机制^[3]。

以具有Pb抗性(培养基条件下对Pb耐性阈值为 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的根际菌(DBM1)对红麻进行盆栽实验。测定结果表明:DBM1具有固氮、分泌IAA、产ACC脱氨酶及促进植物生长等促生能力。接种DBM1显著促进了Pb污染土壤中红麻的生长,尤其在高Pb胁迫(Pb1600)下,促生效果更加明显。有趣的是,在Remnas等^[32]的研究中也发现,对拟南芥接种根际促生菌,在正常条件下促生菌并未表现出促生作用,而在Cd胁迫下促生效果显著。可见,根际促生菌(PG-PR)的促生作用可能有一种胁迫诱导的特性,因而只能在胁迫条件下才能表现出促生作用。红麻在Pb胁迫下可能会产生某些应激反应,如分泌大量的“逆境乙烯”,抑制红麻的生长^[33],而DBM1具有产ACC脱氨酶的能力,ACC脱氨酶能够分解乙烯的前体物ACC,从而降低红麻体内的乙烯水平。这可能是DBM1在Pb胁迫下促进红麻生长的机制之一。此外,分泌IAA也是根际促生菌促进植物生长的重要机制^[34]。一定浓度的IAA可以促进细胞伸长,刺激植物生长。研究表明,DBM1能够利用色氨酸合成IAA,而接种DBM1后红麻生物量显著提高,可以推测分泌IAA很可能也是本研究中菌株促生的主要原因。

进一步考察DBM1对红麻叶绿素含量的影响。接种DBM1对Pb800和Pb1600处理中红麻叶绿素含量起到相反效果:Pb800处理中红麻叶绿素含量减

少,Pb1600处理中反而上升(图5)。相应地,加菌提高了Pb800处理中叶片Pb浓度而降低了Pb1600处理中叶片Pb浓度(图6)。光合作用是植物最容易被Pb影响的过程之一^[35],高浓度的Pb会破坏叶绿素和叶绿体的结构,破坏叶绿素合成过程并影响叶绿素合成酶的活性^[36],这表明叶片的Pb含量可能是叶绿素含量的重要影响因素。当土壤Pb浓度对红麻生长产生胁迫时(本研究为 $1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),接种DBM1可能抑制了Pb向叶片的迁移,降低了叶片Pb含量,从而提高叶绿素含量,促进红麻在高Pb胁迫下的生长。

此外,DBM1促进了红麻根部对Pb的富集及其向植株地上部的转移(图7)。而红麻自身对Pb胁迫的抵抗响应则抑制了Pb向地上部的过度转移。因此,在DBM1及自身Pb毒性抵抗机制的联合作用下,红麻可将Pb富集在根部,同时抑制其向地上部的转移,促进红麻在高Pb污染土壤中的生长。

4 结论

(1)红麻对Pb有较高耐性,可通过改变土壤中Pb存在形态,以及将Pb固定在根部,并限制Pb向地上部的转移,以降低其生物毒性,从而在Pb污染土壤中定植和生长。

(2)土壤Pb浓度及接菌处理均显著影响红麻的生长。当土壤Pb浓度超过红麻耐性范围时,红麻生长开始受到Pb胁迫的抑制(本研究为 $1600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。此时,红麻可能通过减少根部Pb富集及Pb向地上部的转移以抵抗Pb胁迫。

(3)接种DBM1可有效促进Pb胁迫下红麻的生长,DBM1对红麻的促生作用有胁迫诱导的特性。

(4)利用植物根际促生菌DBM1辅助重金属耐性植物红麻对高Pb污染土壤进行植物稳定修复,可在促进红麻生长的同时,将Pb富集在红麻根部,并有效抑制Pb向红麻地上部的转移。

参考文献:

- [1] 敖子强,熊继海,王顺发,等.植物稳定技术在金属矿山废弃地修复中的利用[J].广东农业科学,2011,20:139-141.
AO Zi-qing, XIONG Ji-hai, WANG Shun-fa, et al. Using phytostabilization technology for the remediation of the metal mine wasteland[J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2011, 20: 139-141.
- [2] 王国庆,李敏,骆永明,等.红麻对Cu和Cu-EDDS的吸收和富集[J].土壤,2006,38(5):626-631.
WANG Guo-qing, LI Min, LUO Yong-ming, et al. Plant uptake and accumulation of Cu and Cu-EDDS by Kenaf (*Hibiscus Cannabinus* L.) [J].

- Soils*, 2006, 38(5):626–631.
- [3] Mun H W, Hoe A L, Koo L D. Assessment of Pb uptake, translocation and immobilization in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for phytoremediation of sand tailings[J]. *Journal of Environmental Sciences—China*, 2008, 20(11):1341–1347.
- [4] Schippers B, Bakker A W, Bakker P A H M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1987, 25(1):339–358.
- [5] Lucy M, Reed E, Glick B. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 86(1):1–25.
- [6] Belimov 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(2):241–250.
- [7] 江春玉, 盛下放, 何琳燕, 等. 一株铅镉抗性菌株 WS34 的生物学特性及其对植物修复铅镉污染土壤的强化作用[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(10):1961–1968.
- JIANG Chun-yu, SHENG Xia-fang, HE Lin-yan, et al. Isolation and characteristics of heavy metal-resistant strain WS34 and its effects on the phytoremediation of soils contaminated with lead and cadmium [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 28(10):1961–1968.
- [8] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.)[J]. *Chemosphere*, 2007, 69(2):220–228.
- [9] 夏娟娟. 植物促生内生细菌的筛选及其强化油菜富集土壤铅镉重金属的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2006.
- XIA Juan-juan. Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria and their effects on the accumulation of lead and cadmium from soil by rape[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University.
- [10] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1):47–56.
- [11] Belimov A A, Safronova V I, Sergeyeva 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(7):642–652.
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第三版. 北京:中国农业出版社, 2002.
- BAO Shi-dan. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- [13] Gupta A K, Sinha S. Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czenr. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 149(1):144–150.
- [14] Chen Y, Shi J, Zhang W, et al. EDTA and industrial waste water improving the bioavailability of different Cu forms in contaminated soil[J]. *Plant and Soil*, 2004, 261(1):117–125.
- [15] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 第二版. 北京:高等教育出版社, 2006.
- WANG Xue-kui. The principle and technology of plant physiology and biochemistry experiment[M]. 2nd edition. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [16] 邓振山, 李 军, 苏永杰. 植物根际促生菌作用机理的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(10):5844–5846.
- DENG Zhen-shan, LI Jun, SU Yong-jie. Research progress of mechanism of plant growth promoting rhizobacteria[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2011, 39(10):5844–5846.
- [17] 袁 敏, 铁柏清, 唐美珍, 等. 改良剂对铅锌尾矿污染土壤上龙须草生长和叶片叶绿素含量的影响[J]. *农村生态环境*, 2005, 21(4):54–57.
- YUAN Min, TIE Bai-qing, TANG Mei-zhen, et al. Effects of different-modifiers on growth and chlorophyll content of *Eulaliopsis binata* growing on soil polluted by lead /zinc gangue[J]. *Rural Eco-Environment*, 2005, 21(4):54–57.
- [18] 杨东海. 七种常用园林植物耐阴性的研究[D]. 吉林:吉林农业大学, 2011.
- YANG Dong-Hai. Study on shade tolerance of seven main landscape plants[D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2011.
- [19] 杨丹慧. 重金属离子对高等植物光合膜结构与功能的影响[J]. *植物学通报*, 1991, 8(8):26–29.
- YANG Dan-hui. The effects of heavy metals on the structure and function of photosynthetic membranes in higher plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1991, 8(8):26–29.
- [20] Küpper H, Küpper F, Spiller M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47(2):259–266.
- [21] 古龙梅, 胡述龙, 王红星. 重金属铅对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *广东农业科学*, 2011, 1:36–38.
- GU Long-mei, HU Shu-long, WANG Hong-xing. Effects of heavy metal lead on corn seed germination and seedling growth[J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2011(1):36–38.
- [22] 夏建国, 兰海霞, 吴德勇. 铅胁迫对茶树生长及叶片生理指标的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(1):43–48.
- XIA Jian-guo, LAN Hai-xia, WU De-yong. Lead stress on growth of tea trees and physiological index in leaves of tea[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(1):43–48.
- [23] 赵菲伏, 翟禄新, 陈 荃, 等. Cd、Pb 复合处理下 2 种离子在植物体内的分布及其对植物生理指标的影响[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(3):595–601.
- ZHAO Fei-yi, ZHAI Lu-xin, CHEN Quan, et al. Effect under combined treatment of cadmium and lead on their distribution of plants and physiological indications[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(3):595–601.
- [24] Yoon J, Cao X, Zhou Q, et al. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 368(2):456–464.
- [25] Mendez M O, Maier R M. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments: An emerging remediation technology[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(3):278–283.
- [26] Baker A J M. Accumulators and excluders—strategies in the response of plants to heavy metals[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1981, 3(1–4):643–654.

- [27] Turpeinen R, Salminen J, Kairesalo T. Mobility and bioavailability of lead in contaminated boreal forest soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2000, 34(24):5152-5156.
- [28] Vogel-Mikuš K, Drobne D, Regvar M. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (*Brassicaceae*) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(2):233-242.
- [29] Liu D, Jiang W, Liu C, et al. Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)][J]. *Bioresource Technology*, 2000, 71(3):273-277.
- [30] Raskin I, Smith R D, Salt D E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8(2):221-226.
- [31] Brown D, Slingsby D. The cellular location of lead and potassium in the lichen *Cladonia rangiformis* (L.) Hoffm[J]. *New Phytologist*, 1972, 71(2):297-305.
- [32] Remans T, Thijs S, Truyens S, et al. Understanding the development of roots exposed to contaminants and the potential of plant-associated bacteria for optimization of growth[J]. *Annals of Botany*, 2012, 110(2):239-252.
- [33] 陈佛保, 柏 珺, 林庆琪, 等. 植物根际促生菌(PGPR)对缓解水稻受土壤锌胁迫的作用[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(1):67-74.
- CHEN Fo-bao, BAI Jun, LIN Qing-qi, et al. Application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for reducing zinc stress on paddy rice[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(1):67-74.
- [34] Patten C L, Glick B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8):3795-3801.
- [35] 陶毅明, 陈燕珍, 梁杨琳, 等. 铅胁迫对木榄幼苗抗氧化酶的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(2):342-345.
- TAO Yi-ming, CHEN Yan-zhen, LIANG Yang-lin, et al. Effects of lead stress on antioxidant enzymes in *Bruguiera gymnorhiza* seedlings[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(2):342-345.
- [36] 何 冰, 叶海波, 杨肖娥. 铅胁迫下不同生态型东南景天叶片抗氧化酶活性及叶绿素含量变化[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3):274-278.
- HE Bing, YE Hai-bo, YANG Xiao-e. Effects of Pb on chlorophyll contents and antioxidant enzyme in leaf for Pb-accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum Alfredii* (Hance)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(3):274-278.