

微生物对土壤 Cd Pb 和 Zn 生物有效性的影响研究

芦小军¹, 李博文¹, 杨卓², 贾莹¹, 李术娜³

(1.河北农业大学资源与环境科学学院,河北 保定 071001;2.中国环境管理干部学院,河北 秦皇岛 066004;3.河北农业大学生命科学学院,河北 保定 071001)

摘要 采用土壤盆栽模拟试验方法,研究了接种不同微生物对重金属富集植物——印度芥菜修复土壤中 Cd、Pb、Zn 的作用效果。结果表明,接入菌株 JA27、JC55、JC40 不仅显著促进植物的生长,提高印度芥菜的生物量,降低了土壤 pH,并且对土壤 Cd、Pb、Zn 产生活化作用,使土壤 Cd、Pb、Zn 有效态含量显著增加,增强印度芥菜对土壤 Cd、Pb、Zn 吸收量,显著提高了富集植物的修复效果。以上 3 个处理使印度芥菜地上部 Cd、Pb、Zn 吸收量分别提高了 117%~137%、37%~62%、9%~15.1%。接种 JB37 对土壤 Cd、Pb、Zn 产生钝化作用,并且抑制印度芥菜对土壤 Cd、Pb、Zn 的吸收。JB37 处理印度芥菜地上部 Pb、Zn 吸收量分别降低了 72.5%、27%,对 Cd 吸收量无显著影响。

关键词 印度芥菜 植物修复 活化 钝化 镉 铅 锌

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)07-1315-05

Effects of Microorganisms on the Bioavailability of Cadmium, Lead and Zinc in Soil

LU Xiao-jun¹, LI Bo-wen¹, YANG Zhuo², JIA Ying¹, LI Shu-na³

(1. College of Resources & Environmental Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Environment Management College of China, Qinhuangdao 066004, China; 3. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract The study was conducted to investigate the effects of microbial inoculation on bioavailability of Cd, Pb and Zn in soil when *Brassica juncea* as a hyperaccumulator growing using a pot experiment. The results showed that strains JA27, JC55 and JC40 not only promoted plant growth markedly and decreased soil pH, but also improved the bioavailability of Cd, Pb, Zn in the soil, which significantly enhanced the phytoremediation efficiency of three heavy metals eventually. Furthermore, the concentrations of Cd, Pb and Zn in shoot of *Brassica juncea* increased by 117% to 137%, 37% to 62% and 9% to 15.1% when strains JA27, JC55 and JC40 inoculated in soil, respectively. However, strain JB37 inhibited Cd, Pb, Zn uptake from soil, and decreased the concentrations of Cd, Pb, Zn in *Brassica juncea*. The concentrations of Pb and Zn in shoot of *Brassica juncea* decreased by 72.5% and 27% in treatment of strain JB37 inoculation, but had no significant effect on Cd concentrations.

Keywords *Brassica juncea*; phytoremediation; mobilization; phytostabilization; cadmium; lead; zinc

随着工业化、城市化和农村集约化进程的加快,人为地排入大气、水体和土壤的重金属和有害化合物日益增多,环境污染引起的问题日益突出,受不同程度重金属污染的土壤和水体面积在不断扩大^[1]。如何修复并提高重金属污染土壤的生产力,已成为当今农

业可持续发展和环境质量改善中多学科共同感兴趣的问题。

传统的物理、化学方法存在修复成本高,环境风险大的缺点,而且破坏土壤结构、降低土壤生物活性和土壤肥力。植物修复重金属污染土壤技术由于其显著的优越性而受到人们广泛的关注^[2],但是其又受到土壤重金属低生物有效性的限制^[3],且超富集植物生长速度慢、生物量低对难溶态的重金属吸收低,制约了其广泛的应用。

土壤中重金属的生物有效性低是制约植物修复

收稿日期 2010-01-06

基金项目 河北省自然科学基金项目(C2007000459)

作者简介 芦小军(1982—),男,河北邢台人,硕士研究生,主要从事土壤重金属污染与植物修复方面的研究。

E-mail: kelante123@163.com

通讯作者 李博文 E-mail: kjli@hebau.edu.cn

技术发展的瓶颈^[4]。除了继续寻找超富集植物种类外,如何提高植物富集土壤重金属的能力成为近几年的研究热点,而植物微生物联合修复是近年来研究的新领域。微生物能通过其代谢活动及代谢产物改变环境介质中溶液的特性(如 pH 值等),从而改变环境介质对重金属的吸附特征^[5]。土壤微生物代谢能产生多种低分子量有机酸,如甲酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸等,许多研究表明,微生物有机酸的分泌可以增加重金属的生物有效性^[6-7]。一方面微生物能促进重金属的溶解,使土壤中呈固定态的重金属活化成为可溶态或交换态,提高重金属在土壤中的生物有效性,便于植物吸收富集,以增强植物修复的效果;另一方面微生物本身及其代谢产物能够固定重金属离子,如微生物新陈代谢过程中产生的简单有机化合物、大分子腐植酸和富里酸或微生物渗出物等都能络合环境中的重金属,实现不同重金属形态间的转化^[8],从而影响重金属的生物有效性。

本研究将已从污灌土壤中筛选出的能产酸的 4 种菌株加入到土壤中,通过盆栽试验种植印度芥菜来验证其对重金属 Cd、Pb 和 Zn 的作用,为阐明微生物活化和钝化土壤重金属的规律、强化植物修复土壤重金属污染应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试作物和土壤

供试植物:印度芥菜 *Brassica juncea* 的 Wild Garden Pungent Mix 品种,种子来自于美国俄勒冈州名为 Wild Garden Seed 的农场。

供试土壤:采自河北农业大学西校区标本园 0~40 cm 的潮褐土,理化性质特征见表 1。

1.2 供试菌株筛选及鉴定

培养基:蛋白胨 1%,牛肉膏 0.3%,NaCl 0.5%,琼脂 2%,pH 7.2~7.4。

将取自污灌土壤的样品,按梯度稀释法将制备的菌悬液涂布在固体培养基表面,30℃培养 3 d,待长出菌落后选择生长丰满的单菌落进行划线纯化直至出现单菌落,将分离出的细菌于 4℃保存于斜面培养

基上备用。加入酚红试液到培养基中,接种菌株于 30℃培养 1 d。挑选产生颜色圈较好的菌株 JA27、JC55、JC40 和 JB37。根据微生物常用鉴定方法对筛选出来的菌株进行鉴定^[9]。

1.3 试验设计

盆栽试验在河北农业大学东校区日光温室中进行。试验用塑料小盆钵,其上缘直径 10 cm,底面直径 9 cm,高 14 cm。每盆装土 500 g(以风干土计),供试土壤风干后过 3 mm 筛。重金属 Cd、Pb 和 Zn 分别以 Cd (Ac)₂·2H₂O、Pb (Ac)₂·3H₂O 和 Zn (Ac)₂·2H₂O 固体粉末形式,按各自的处理量均匀混入土壤中,使土壤中外源 Cd、Pb 和 Zn 的浓度分别为 50、500 和 500 mg·kg⁻¹。同时每盆加入 0.1 g 尿素和 0.2 g 磷酸二铵 (NH)₂HPO₄ 作基肥,均采用分析纯试剂。污染土壤混合具体方法为,取 20 kg 标本园土壤加入相应量的重金属和肥料混匀后在塑料薄膜上摊匀,喷洒去离子水平衡 1 个月后混匀制成外源污染土壤,然后再分别装盆。加入蒸馏水使含水量为田间持水量的 60%,平衡 30 d 后播种,生长 1 周后间苗,每盆保留 6 株苗。总计 4 个处理,每个处理设 3 次重复,同时设只加培养基的对照。印度芥菜生长 20 d 进行微生物接种处理,取稀释为 2.1×10⁷ 个·mL⁻¹ 的供试菌株 JA27、JC55、JC40 和 JB37 各 100 mL,加入土壤中,同时在对照处理中加入 100 mL 培养基,生长 76 d 后收获。

1.4 样品采集

收获时沿土面剪取地上部,测量株高、鲜重,同时洗出根系,植物样品在 105℃条件下,杀青 0.5 h,并在 70℃条件下烘至恒重。烘干样品全部粉碎、混匀并装袋备用。

1.5 分析方法

印度芥菜中 Cd、Pb 和 Zn 含量采用湿法 (HNO₃-HClO₄) 消解,日立 Z-5000 型原子吸收分光光度计测定。同时采用 DTPA 浸提 (0.005 mol·L⁻¹ DTPA-0.01 mol·L⁻¹ CaCl₂-0.1 mol·L⁻¹ TEA,二乙基三胺五乙酸) 测定土壤中有效态 Cd、Pb 和 Zn 含量,用 pH 计测定土壤 pH 值 (1:2.5 土水比)。

表 1 供试土壤的理化性质特征

Table 1 Characteristics of physical and chemical properties in tested soil

土壤类型	重金属含量/mg·kg ⁻¹			有机质/ g·kg ⁻¹	全 N/ g·kg ⁻¹	碱解 N/ mg·kg ⁻¹	速效 P/ mg·kg ⁻¹	速效 K/ mg·kg ⁻¹	pH	<0.01 mm 物理性粘粒/%
	Cd	Pb	Zn							
潮褐土	0.83	30.54	75.88	10.89	0.63	30.71	14.02	98.04	8.2	38.78

1.6 数据处理

用 SPSS17.0 软件对数据进行处理,文中数据均用“平均值±标准差”表示,采用 Duncan 方法对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 供试菌株的鉴定

对照常见细菌鉴定手册,经形态学特征分析初步鉴定 4 菌株为反硝化利斯特氏菌 *Listeria denitrificans* (JC40),环状芽孢杆菌 *Bacillus cirallans* (JA27),格氏利斯特氏菌 *Listeria grayi* (JC55),干燥奈瑟氏球菌 *Neisseria sicca* (JB37)。

2.2 微生物对印度芥菜生长的影响

从表 2 可以看出微生物对印度芥菜生长的影响。经菌株 JA27、JC55、JC40 处理的植株,其生物量和株高与对照相比都有显著的提高,表明其促进印度芥菜的生长,但 3 株菌株之间并无显著差异。经菌株 JB37 处理的植株其生物量与对照相比降低了 32.60%。

表 2 接种微生物对印度芥菜生长的影响

Table 2 Effect of microbial inoculation on growth of the tested plants

处理	生物量/g·plot ⁻¹	株高/cm	长势情况
CK	64.23±3.71b	34.71±1.79a	开花未长穗
JA27	74.87±4.30c	42.87±3.00b	开花结籽
JB37	43.29±2.13a	33.97±2.04a	开花未长穗
JC55	72.51±3.21c	45.09±2.01d	开花结籽
JC40	66.90±2.12b	40.49±1.81b	开花结籽

注:数据之间的显著性差异用 Duncan 检验, $P<0.05$,同列字母不同表示处理间有显著差异,字母相同表示处理间无显著差异,下同。
Note: Significance of difference between treatments were tested by One-way AVOVA. Number which in the same column followed by different letters were significantly different at $P<0.05$. The same below.

2.3 微生物对印度芥菜重金属吸收量的影响

从表 3 可以看出,4 种菌株对印度芥菜地上部重金属 Cd、Pb 和 Zn 的含量有不同程度的影响。除 JB37

处理外,不同处理下印度芥菜地上部 Cd 吸收量均有所提高,JA27、JC55、JC40 处理印度芥菜地上部 Cd 吸收量分别较对照提高了 137%、117%和 136%,而 JB37 处理 Cd 含量无显著影响。JA27、JC40 处理印度芥菜地上部 Pb 吸收量分别较对照提高了 62%、37%,而 JB37 处理 Pb 吸收量降低了 72.5%,JC55 处理无显著影响。JA27、JC55、JC40 处理印度芥菜地上部 Zn 含量分别比对照提高了 9.8%、9%和 15.1%,而 JB37 处理 Zn 吸收量降低了 27%。

JA27、JC55、JC40 处理印度芥菜地下部 Cd 含量较对照分别提高了 68%、74%和 79%;印度芥菜地下部 Pb 含量较对照分别提高了 44%、24%和 27%。印度芥菜地下部 Zn 含量较对照分别提高了 7%、9.8%和 10%。而 JB37 处理印度芥菜地下部 Cd、Pb、Zn 含量较对照分别下降了 5%、16%和 15%。由此可见,JA27、JC55、JC40 处理中的微生物有助于植株对重金属的吸收,而 JB37 处理抑制了植株对重金属的吸收。

2.4 微生物对土壤重金属有效态含量的影响

由表 4 可以看出,加入菌株使土壤重金属有效态的含量发生了相应的变化。接 JA27 菌株处理的土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量较对照分别提高了 1.76%、6.20%和 15.35%,其中对 Zn 的活化作用最强。JC55 菌株处理的土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量较对照分别提高了 12.22%、4.45%和 7.58%,其中对 Cd 的活化作用最强。JC40 菌株处理的土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量较对照分别提高了 18.76%、8.79%和 17.86%,对 Cd

表 4 土壤重金属有效态含量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 4 Contents of available heavy metals in the soil ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

处理编号	Cd	Pb	Zn
CK	15.30±0.95ab	165.01±3.10b	57.1±2.28a
JA27	15.57±1.00ab	175.24±0.90cb	65.86±1.24c
JB37	14.23±1.10a	145.06±2.54a	54.11±2.63a
JC55	17.17±1.81b	172.35±3.18c	61.43±0.75b
JC40	18.17±2.21b	179.51±3.54b	67.30±2.03c

表 3 印度芥菜的重金属吸收量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DW)

Tabel 3 Heavy metal uptake by *Brassica juncea* ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DW)

处理编号	印度芥菜地上部吸收量			印度芥菜地下部吸收量		
	Cd	Pb	Zn	Cd	Pb	Zn
CK	26.03±1.05a	7.85±0.30b	307.05±2.22b	36.32±0.23a	15.54±0.54b	410.1±1.14b
JA27	55.63±2.45b	12.71±1.62c	337.12±1.08c	62.15±0.59b	22.38±0.51d	439.5±0.20c
JB37	24.26±1.87a	2.16±0.45a	224.15±0.77a	34.65±0.35a	13.02±0.89a	350.2±1.76a
JC55	56.52±2.49b	8.23±0.72b	334.74±1.50c	63.28±1.06bc	19.23±0.50c	450.3±1.17d
JC40	61.69±0.40c	10.73±2.16c	353.37±0.58d	65.04±1.27c	19.71±0.17c	452.6±0.87d

和 Zn 都有较强的活化作用。JB37 菌株处理的土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量较对照分别降低了 6.99%、12.09%和 5.23%，表明 JB37 菌株对土壤 Cd、Pb、Zn 均有较明显的钝化作用。

2.5 微生物对土壤 pH 的影响

从图 1 可以看出,对照处理的土壤 pH 为 8.2,加入微生物处理的土壤 pH 均有所降低。JC40 处理的 pH 降低的程度最大,其土壤 pH 降低到了 7.74;其次是 JA27 处理,pH 为 7.8;JC55 处理 pH 为 7.87;JB37 处理 pH 降低的程度最小,pH 为 7.98。与对照相比 pH 分别降低了 0.46、0.4、0.33、0.22。这可能是由于产酸菌在生长代谢过程中产生了大量的低分子量有机酸,低分子量有机酸对土壤的 pH 产生了一定影响,使土壤环境发生了变化,从而也会影响土壤中重金属存在的形态。

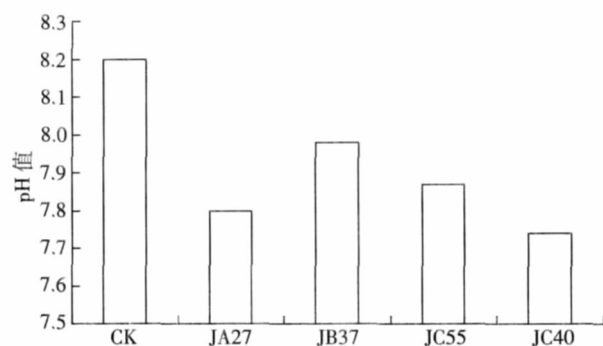


图 1 接种微生物对土壤 pH 的影响

Figure 1 Effect of microbial inoculation on soil pH

3 讨论

土壤微生物是土壤中的活性胶体,它们的比表面大,带电荷和代谢活动旺盛。受到重金属污染的土壤,往往富集多种耐重金属的真菌和细菌^[10]。微生物可以对土壤中重金属进行固定、移动或转化,改变它们在土壤中的化学行为,可促进有毒、有害物质解毒或降低毒性,从而达到生物修复的目的。微生物通过各种代谢活动(如其代谢产物低分子量的有机酸)对重金属溶解,从而增加土壤中重金属的生物有效性。Chanmugathas 和 Bollag^[11]报道,在营养充分的条件下微生物可以促进 Cd 的淋溶。如果不加营养物质,灭菌处理和不灭菌处理从土柱中淋溶出来的 Cd 分别为 6%和 9%。加入葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、NaNO₃ 等营养物质时,Cd 的淋溶可分别达 16%和 36%。从土壤中溶解出来的 Cd 主要是和低分子量的有机酸结合在

一起。许多研究已证实土壤微生物可以改变重金属的生物有效性,而且土壤微生物影响植物对重金属的吸收主要是通过改变土壤中重金属的生物有效性而实现的^[12-13]。

本试验加入的微生物是筛选出的能够在代谢过程中分泌低分子量有机酸的菌株,在土壤中接种产酸微生物 JA27、JC55、JC40 主要是为了提高土壤中低分子量有机酸的含量,其在一定程度上影响了土壤 pH,从而促进重金属的溶解,增加了土壤重金属有效态的含量,最终促进超富集植物对重金属的吸收,强化植物修复的效果。JA27、JC55、JC40 处理使印度芥菜地上部 Cd 吸收量分别较对照提高了 1 倍以上。JB37 处理抑制了植物对重金属的吸收,并且对土壤中重金属产生钝化作用,微生物 JB37 在土壤原位修复领域有一定的应用价值。

4 结论

本研究筛选的 4 种菌株初步鉴定为反硝化利斯特氏菌(JC40)、环状芽孢杆菌(JA27)、格氏利斯特氏菌(JC55)、干燥奈瑟氏球菌(JB37)。

通过盆栽试验验证,本试验筛选 4 种菌株的代谢产物均降低土壤 pH。接种 JA27、JC55、JC40 菌株的处理能显著促进植株生长,增加土壤中重金属有效态的含量,并且对印度芥菜吸收重金属有很好的促进作用。尤其 JC40 菌株处理的土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量较对照分别提高了 18.76%、8.79%和 17.86%。接种 JC40 菌株显著促进了印度芥菜吸收 Cd、Pb、Zn 的含量,JC40 菌株不仅促进了土壤中 Cd、Pb、Zn 的活化,也使其增加了植物重金属的吸收量,提高了修复的效果。接种 JB37 菌株的处理降低了土壤中重金属有效态的含量,对印度芥菜吸收重金属有显著抑制作用,使植物难以吸收。

参考文献:

- [1] 李荣林,沈寿国,陈浩,等.微生物对土壤 Pb Cd 的溶解作用研究[J].农业环境科学学报,2006,25:124-126.
LI Rong-lin, SHEN Shou-guo, CHEN Hao, et al. Solubility of lead (Pb) and cadmium (Cd) in soil by microorganisms[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25: 124-126.
- [2] 骆永明.重金属污染土壤的植物修复[J].土壤,1999,31(5):261-265.
LUO Yong-ming. Phytoremediation of soils contaminated [J]. *Soils*, 1999, 31(5): 261-265.
- [3] 龙新宪,杨肖娥,倪吾钟.重金属元素土壤修复技术研究的现状与展望[J].应用生态学报,2002,13(6):757-762.
LONG Xin-xian, YANG Xiao-e, NI Wu-zhong. Current situation and

- prospect on the remediation of soils contaminated by heavy metals[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13 (6) :757-762.
- [4] 杨 卓, 李术娜, 李博文, 等. 接种微生物对土壤中 Cd、Pb、Zn 生物有效性的影响[J]. *土壤学报*, 2009, 46 (4) :670-675.
- YANG Zhuo, LI Shu-na, LI Bo-wen, et al. Effects of microbial inoculation on bio-availability of cadmium, lead and zinc in soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46 (4) :670-675.
- [5] 陈素华, 孙铁珩, 周后星, 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.
- [6] De Souza M P, Huang C A P, Chee N, et al. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants[J]. *Planta*, 1999, 209 :259-263.
- [7] Wang C L, Maratukulam P D, Lum A M, et al. Metabolic engineering of an aerobic sulfate reduction path way and its application to precipitation of cadmium on the cell surface[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 :4497-4502.
- [8] Leng CC, Phyllis BT, Franklin RL. Use of the micro-toxicity assay system for environmental samples[J]. *Bull Contam Toxicol*, 1981, 26 :150-156.
- [9] 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [10] Robert M, Berthelin J. Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering[M]//Huang PM, Schnitzer M ed. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. Madison: Soil Sci Soc Am, Special Publication, 1986, 17 :453-465.
- [11] Channugathas P, Bollag J M. Microbial role in immobilization and subsequent mobilization of cadmium in soil Arch[J]. *Environ Contamin Toxicol*, 1988, 17 :229-235.
- [12] 杜爱雪, 曹理想, 张仁铎. 青霉菌 A1 对土壤中 Cu^{2+} 化学形态的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27 (5) :1786-1790.
- DU Ai-xue, CAO Li-xiang, ZHANG Ren-duo. Effect of penicillium strain A1 on chemical forms of copper in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27 (5) :1786-1790.
- [13] 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]. *Environment International*, 2005, 31 :861-866.