

# 接种泡囊假单胞菌对土壤生物性质及 *A. corsicum* 吸收 Ni 的影响

蔡信德<sup>2</sup>, 仇荣亮<sup>1,\*</sup>, 陈桂珠<sup>1</sup>, 曾晓雯<sup>1</sup>, 刘 雯<sup>1</sup>

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275; 2. 国家环境保护总局华南环境科学研究所, 广州 510655)

**摘要:** 采用室内模拟试验方法, 研究了在水稻土、元江土和墨江土中添加泡囊假单胞菌 (*Pseudomonas vesicularis*) 后土壤中微生物种群数量、土壤酶活性和镍超积累植物 *Alyssum corsicum* 对土壤镍的富集效果。土壤接种泡囊假单胞菌 70d 后, 水稻土中 DTPA 提取态镍较对照土中的明显减少, 元江土和墨江土中的有所减少; 土壤中细菌、真菌和放线菌数量增加, 5 种土壤酶活性提高。试验结果表明, 水稻土、元江土、墨江土添加泡囊假单胞菌后植物地上部生物量较对照分别增加了 29%、309% 和 43%, 进而提高了 *A. corsicum* 自土壤中富集镍的效率: 水稻土中增加 54%, 元江土中增加 306%, 墨江土中增加 32%。泡囊假单胞菌这一新用途的发现, 可为植物修复微生物制剂和基因工程菌的开发提供本土的微生物的菌种资源。

**关键词:** 土壤; 镍; 植物修复; 微生物

文章编号: 1000-0933(2006)05-1405-09 中图分类号: Q143, Q938, X503.231 文献标识码: A

## Effect of soil inoculation with *Pseudomonas vesicularis* on biological properties of three nickel-contaminated soils and on Ni accumulation by the hyperaccumulator *Alyssum corsicum*

CAI Xin-De<sup>2</sup>, QIU Rong-Liang<sup>1,\*</sup>, CHEN Gui-Zhu<sup>1</sup>, ZENG Xiao-Wen<sup>1</sup>, LIU Wen<sup>1</sup> (1. School of Environmental Science & Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. South China Institute for Environmental Science, SEPA, Guangzhou 510655, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1405 ~ 1413.

**Abstract:** In recent years, phytoremediation using metal hyperaccumulators has been proposed as a cost-effective and environmentally-friendly solution to the problem of heavy metal contaminated soils. Despite their ability to accumulate high levels of metals in the shoot, however, most hyperaccumulators are of limited usefulness for commercial-scale soil remediation because of their small size and slow growth. Finding ways to improve the phytoremediation performance of hyperaccumulators will contribute to the development of phytoremediation as a commercial technology. We studied phytoremediation by the Ni hyperaccumulator *Alyssum corsicum* in three soils (a paddy soil, Yuangjing soil, and Mojing soil) with and without inoculation of the soil with the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Pseudomonas vesicularis*. After 70 days of incubation, several plant and soil indices, including soil nickel concentration, soil bacteria, soil fungus, soil actinomyces, soil microbial biomass and soil enzyme activity, were studied. DTPA-extractable Ni concentration in the paddy soil with added *P. vesicularis* was significantly lower than

**基金项目:** 国家 863 计划资助项目(2001-AA-640501-03); 国家自然科学基金资助项目(20177035); 广东省自然科学基金重点资助项目(05101824); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET04-0790)

**收稿日期:** 2005-07-23; **修订日期:** 2006-01-20

**作者简介:** 蔡信德(1965~), 男, 广东人, 博士, 高级工程师, 主要从事土壤重金属污染生物修复研究. E-mail: xindecai@scies.com.cn

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: eesqrl@zsu.edu.cn

**致谢** 感谢 Li Y M 博士提供试验用植物种子

**Foundation Item:** The project was supported by National 863 Plan Program (No. 2001-AA-640501-03), National Natural Science Foundation of China (No. 20177035), Provincial Natural Science Foundation of Guangdong (No. 0510824) and New Century Excellent Talents Plan Program of National Education Ministry (No. NCET04-0790)

**Received date:** 2005-07-23; **Accepted date:** 2006-01-20

**Biography:** CAI Xin-De, Ph. D., Senior Engineer, mainly engaged in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. E-mail: xindecai@scies.com.cn

it was in the control treatment, and there was some reduction of DTPA-Ni in the inoculated Yuanjiang and Mojiang soils. In all three soil types, microorganism population and microbial biomass were elevated in the inoculated treatments, suggesting that *P. vesicularis* had colonized the tested soils successfully. Amplification of microbial DNA from the tested soils with five primers showed that the Shannon-Weaver index of microbial DNA sequence diversity was higher in control soils than that in treated soils. Activities of soil enzymes, including urease, alkaline phosphatase, acid phosphatase, polyphenol oxidase and catalase, were generally higher in treated soils than in control soils. In the inoculated treatments, the biomass of *A. corsicum* was increased by 29% in the paddy soil, 309% in Yuanjiang soil and 43% in Mojiang soil compared to the control treatments. Phytoremediation efficiency was also improved, by 54% in the paddy soil, 306% in Yuanjiang soil and 32% in Mojiang soil. The nickel concentration in *A. corsicum* shoots, however, was not significantly affected by inoculation with *P. vesicularis*. In conclusion, the PGPR *P. vesicularis* promoted the growth of the Ni hyperaccumulator *A. corsicum* and increased its phytoremediation efficiency.

**Key words:** soil; nickel; phytoremediation; microorganism

以植物修复技术为核心的生态恢复技术是以植物耐受和富集某种或某些有机或无机污染物为基础,利用植物与微生物的共生体系,清除环境中污染物的一种环境污染治理技术。植物修复技术具有成本低、不改变土壤组成、重金属循环再用等优点,逐步成为当今环境科学领域一个研究热点,越来越受到政府、学术界和企业的重视。

目前已发现 400 余种超积累植物<sup>[1]</sup>,我国已报道的超积累植物有 5 种。在寻找新的超积累植物种质资源的同时,超积累植物对重金属的吸收、运输和解毒等方面的机理研究也取得了一些进展,但超积累植物富集重金属的生物学机制尚未完全清楚<sup>[2-4]</sup>。利用超积累植物进行重金属污染土壤的治理工作虽然有一些成功的案例,但由于这种植物是在长期受重金属胁迫的土壤条件、气候条件下产生的突变体,绝大多数生长慢、生物量小,这在一定程度上降低了土壤修复的效率,也限制了超积累植物大规模的商业化利用。许多研究者在致力于超积累植物富集机理研究的同时<sup>[5-7]</sup>,也相应地开展了提高超积累植物的吸收能力和修复效率等方面的研究<sup>[8,9]</sup>。采用丛枝菌根<sup>[10,11]</sup>或根际细菌<sup>[12]</sup>促进植物对重金属吸收,以及 *Kluyvera ascorbata* SUD165 菌株显著提高镍污染土壤中印度芥菜的发芽率和生物量<sup>[13]</sup>等的研究,表明微生物强化污染土壤植物修复技术有着巨大的应用前景。

作为最早发现的镍超积累植物之一, *Alyssum corsicum* 已经被成功应用于 Ni 污染土壤的植物修复<sup>[14]</sup>,但采用微生物强化镍超积累植物对镍吸收的研究尚未见报道。本文采用室内模拟试验,研究了泡囊假单胞菌在 3 种土壤中对镍超积累植物 *A. corsicum* 富集镍的效果,旨在寻找可促进植物富集重金属的本土的微生物的种质资源。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验材料

(1) 试验菌种 泡囊假单胞菌(*P. vesicularis*),由本试验室筛选、纯化。此菌株可分泌铁载体、可利用 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)作为唯一氮源,属于植物根际促长细菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)。

(2) 试验植物 庭荠属 *A. corsicum*,来自美国。

(3) 试验土壤 供试水稻土采自广东省农业科学研究院水稻研究所的试验田(耕作层土),水稻土加  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  处理后(添加镍的质量分数为  $400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),加去离子水保持土壤湿润,然后置于带盖的小型塑料桶内密封驯化培养,经过 12 周后,风干备用。元江土和墨江土采自云南蛇纹岩发育形成的镍含量较高的土壤。土壤(原土)基本组成见表 1。

### 1.2 种植和管理

(1) 种苗准备 分菌液处理和对照 2 组。一组种子用乙醇消毒,1%次氯酸钠溶液浸泡 10~20min 后用无菌水冲洗干净;再用菌液浸泡。另一组种子直接用去离子水浸泡。随后转入营养土中发芽和育苗,等幼苗长

到 4~5 片叶后移栽。

表 1 供试土壤的基本理化性质和镍含量

Table 1 Chemical properties and Ni concentration in tested soils

土壤类型 Soil types	pH	总氮 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Total N	总碳 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Total C	总镍 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Total Ni	DTPA-Ni ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	CEC ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
水稻土 Paddy soils	6.37	1.42	18.43	12.51	1.75	1.74
元江土 Yuangjiang soils	6.73	2.60	17.60	3532	15.2	1.28
墨江土 Mojiang soils	6.67	0.76	7.50	5400	39.5	3.60

(2) 土壤的准备 采用 3 种不同的土壤进行试验。种植物的处理和对照设 3 次重复,不种植物的土壤(非根区土)未设重复,共 21 盆。每盆土壤用量为 500g。

(3) 移栽和管理 每盆栽 4 株苗,穴植。植物移栽前,先将少量菌液接种到土壤中。植株移栽后,每日浇去离子水,用水量根据实际需要量确定。每月施肥 1 次,采用复合肥(N 15, P 15, K 15),每盆用量为  $0.4\text{g} \cdot \text{次}^{-1}$ 。植株移栽后的生长期为 70d。试验期间,定期对株高进行测量(每 2 周测量 1 次)。

### 1.3 样品采集

供微生物分离研究用的土壤样品为盆栽试验结束时的新鲜土壤。从 3 种类型的土壤中,分别取非根区土壤样品混合样、对照土壤混合样和菌处理土壤混合样各 1 个,共 9 个。分析项目为:细菌总数,真菌总数,放线菌总数,微生物生物量碳,土壤微生物群落 DNA 序列多样性等。盆内其它土壤,室内风干,分别过 0.84mm 和 0.15mm 尼龙筛后用于测定土壤重金属含量。植物样品先用自来水冲洗植物表面粘着的土壤后,将植物分成地上部分和地下部分两部分,再用去离子水浸泡、淋洗,80℃烘干、粉碎,用于重金属含量测定。

### 1.4 室内分析

1.4.1 土壤性质和重金属含量测定<sup>[15,16]</sup> 土壤 pH 采用土:水 = 1:2.5 测定。土壤镍总量采用 2ml  $\text{HNO}_3$ 、1ml  $\text{HClO}_4$ 、1ml HF 消煮。有效态镍用  $0.005\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTPA +  $0.01\text{CaCl}_2$  +  $0.1\text{TEA}$  在  $150\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  室温振荡浸提(土水比为 1:10)2h。植物用 10ml  $\text{HNO}_3$ 、5ml  $\text{HCl}$ 、1ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  消煮。土壤和植物镍含量用原子吸收分光光度法(Hitachi Z-5000)测定。总氮用半微量凯氏法。总碳用重铬酸钾氧化-油浴加热法。阳离子交换量用乙酸铵交换法。

1.4.2 微生物分析<sup>[17,18]</sup> 微生物分离方法和培养基为:细菌总数,牛肉膏蛋白胨琼脂平板混菌法;真菌总数,查彼克氏培养基平板混菌法;放线菌总数,改良高氏 1 号培养基平板混菌法。

微生物碳的测定采用熏蒸浸提法。10ml  $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{SO}_4$  浸提液,加入  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液,于 180℃油浴 10min,冷却后溶液全部转入 150ml 三角瓶中,使总体积为 80ml,加入 1 滴邻啡罗啉指示剂,用  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4$  溶液滴定至终点。浸提液作平衡分析。同时测定不熏蒸土壤和空白。

土壤微生物总 DNA 序列多样性的测定采用 RAPD-PCR 法。本实验选用北京赛百盛基因公司的 RAPD 系列引物中的一套引物(SBS A)进行引物的筛选,从中筛选出 SBS A02、SBS A03、SBS A11、SBS A19、SBS A20 等 5 条扩增条带较清晰的引物用于 PCR 的扩增。电泳胶在电脑成像系统(UVP, INC.)判读,然后计算 DNA 序列的 Shannon-Weaver 多样性指数。

1.4.3 土壤酶活性分析 土壤中过氧化氢酶(EC 1.11.1.6)、多酚氧化酶(EC 1.10.3.1)、脲酶(EC 3.5.1.5)、碱性磷酸酶(EC 3.1.3.1)和酸性磷酸酶(EC 3.1.3.2)活性的测定参照文献<sup>[17]</sup>进行。在酶活性的表达单位上作了修改,具体是:过氧化氢酶为  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{mg} \cdot (\text{g} \cdot \text{min})^{-1}$ ,脲酶为  $\text{NH}_3\text{-N mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ,多酚氧化酶为红紫椴精  $\text{mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ ,碱性磷酸酶和酸性磷酸酶为  $\text{P}_2\text{O}_5 \text{mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$ 。

### 1.5 计算和数据统计

Shannon-Weaver 指数(SWI)计算公式如下<sup>[19]</sup>:

$$D_{sh} = - \sum_{i=1}^n (N_i/N) \ln(N_i/N)$$

式中,  $D_{ih}$  为 SWI,  $N_i$  为第  $i$  个 RAPD 条带的扩增量,  $N$  为土壤微生物群落 DNA 的 RAPD 条带的扩增总量。

2 结果与分析

2.1 对土壤镍含量的影响

试验处理与对照土壤中总镍含量和 DTPA 提取态镍含量见表 2。3 种土壤中的总镍量, 处理较对照略有减少, 但它们之间的差异程度未达到显著水平 ( $p > 0.05$ )。对于水稻土, 处理土壤 DTPA 提取态镍含量较对照土壤中的低, 处理与对照之间的差异程度达到显著水平 ( $p < 0.05$ ); 对于元江土壤和墨江土, 处理略低于对照, 但差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

一般认为, 采用  $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTPA 提取的土壤重金属含量可反映出土壤重金属的有效性<sup>[20]</sup>。水稻土中添加的硫酸镍, 虽然与土壤中各组分相互作用后会发生形态的再分配<sup>[21]</sup>, 但 DTPA 提取态的含量仍较高; 元江土和墨江土是由富镍的蛇纹岩发育形成的, 土壤中镍的主要存在形态为残渣态<sup>[22]</sup>, 故这 2 种土壤 DTPA 提取态镍含量不高。处理土壤较对照土壤的 DTPA 提取态镍含量低, 在一定程度上可以表明在处理土壤中植物吸收了较多的镍。但是, 由于土壤中镍的有效性不同, 植物吸收提取的镍量亦有差异。

表 2 试验土壤中总镍含量和 DTPA 提取态镍含量

Table 2 Total Ni concentration and available Ni concentration extracted by DTPA in tested soils

土壤类型 Soils type and treatment		总镍含量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Total Ni concentration	DTPA 提取态镍含量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) DTPA-Ni concentration
水稻土 Paddy soils	非根区土 Soils without plants	$475.5 \pm 35.6a$	$183.8 \pm 12.7a$
	对照土 Control soils	$464.4 \pm 67.6a$	$138.0 \pm 7.8b$
	处理土 Treated soils	$457.9 \pm 69.3a$	$110.8 \pm 4.3c$
元江土 Yuanjiang soils	非根区土 Soils without plants	$3435.1 \pm 37.9a$	$14.0 \pm 1.7a$
	对照土 Control soils	$3329.0 \pm 226.7a$	$12.2 \pm 1.6 \text{ ab}$
	处理土 Treated soils	$3142.2 \pm 23.3a$	$11.2 \pm 0.8 \text{ b}$
墨江土 Mojiang soils	非根区土 Soils without plants	$5373.0 \pm 101.2a$	$33.8 \pm 0.4a$
	对照土 Control soils	$5223.4 \pm 64.1b$	$24.7 \pm 4.5b$
	处理土 Treated soils	$5168.7 \pm 66.4b$	$24.3 \pm 1.8b$

\* 表中数据为平均值  $\pm$  标准差, 不相同的字母表示两者之间有显著差异 ( $p < 0.05$ ) Data are means  $\pm$  SD. The different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

2.2 对土壤微生物的影响

(1) 对细菌、真菌和放线菌数量的影响 试验土壤中细菌、真菌和放线菌的数量见图 1~图 3。细菌总数, 接种后水稻土为  $157.4 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ 、元江土为  $17.6 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ 、墨江土为  $98.7 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ , 较对照土分别增加 401%、272%、2015%, 差异均达到显著水平 ( $p < 0.05$ )。真菌总数, 接种后水稻土、元江土和墨江土中分别为  $65.5 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ 、 $56.1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ 、 $23.6 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ , 较对照土分别增加 38%、229%、265%, 水稻土、元江土中有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。放线菌总数, 接种后水稻土、元江土和墨江土中分别为  $43.9 \times 10^6$  个  $\cdot \text{g}^{-1}$ 、

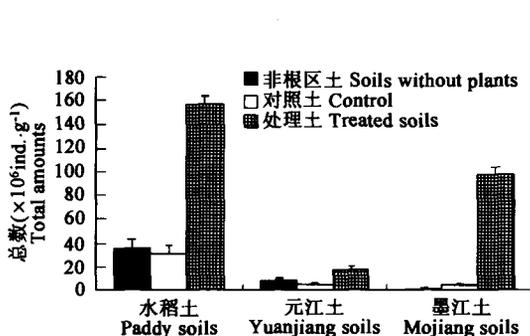


图 1 试验土壤中细菌的数量

Fig. 1 Population of bacteria in tested soils. Results are the mean  $\pm$  SD

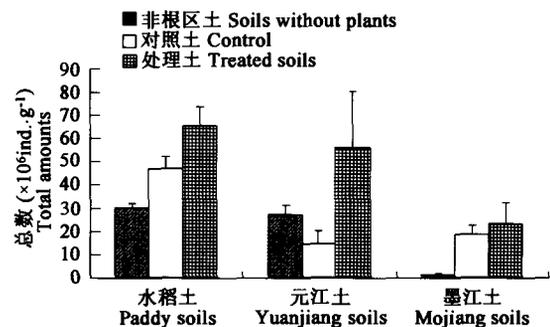


图 2 试验土壤中真菌的数量

Fig. 2 Population of fungus in tested soils. Results are the mean  $\pm$  SD

$62.0 \times 10^6$  个  $\cdot g^{-1}$ 、 $20.6 \times 10^6$  个  $\cdot g^{-1}$ , 较对照土分别增加 14%、320%、57%, 元江土中有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

(2) 对土壤微生物生物量碳的影响 不同处理(非根区土、对照和处理)土壤中微生物生物量碳见图 4。水稻土为  $38.9 \sim 64.0 mg \cdot kg^{-1}$ , 元江土为  $28.6 \sim 47.1 mg \cdot kg^{-1}$ , 墨江土为  $11.9 \sim 44.6 mg \cdot kg^{-1}$ 。接种后水稻土、元江土和墨江土中微生物生物量碳较对照土增加 14%、9% 和 271%, 水稻土和墨江土中差异达到显著水平 ( $p < 0.05$ )。

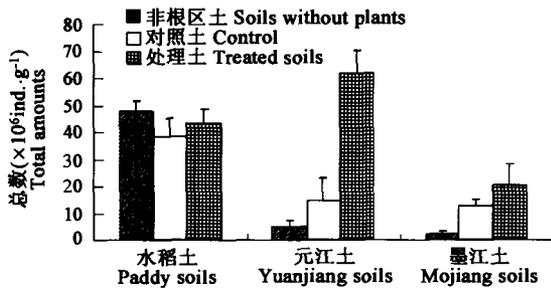


图 3 试验土壤中放线菌的数量

Fig. 3 Population of actinomycetes in tested soils. Results are the mean  $\pm$  SD

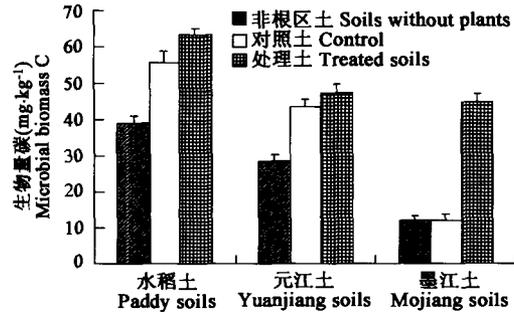


图 4 试验土壤中的微生物生物量碳

Fig. 4 Amounts of microbial biomass in tested soils. Results are the mean  $\pm$  SD

(3) 对土壤微生物总 DNA 序列多样性的影响 9 个土壤样品中提取的总 DNA 采用 5 种引物进行扩增获得扩增条带数为 370 条(见表 3), 其中 244 条为多态性条带, 占 66%; 非多态性条带为 126 条, 占 34%。

3 种类型土壤样品总 DNA 的扩增条带数见表 4。3 种土壤的扩增条带数大小顺序为: 元江土(134 条) > 墨江土(131 条) > 水稻土(105 条)。处理土壤中微生物总 DNA 的扩增条带数与对照比, 水稻土中减少了 11 条、元江土中减少了 8 条、墨江土中相同。同一土壤扩增条带数多少顺序为: 对照 > 处理 > 非根区土。

表 3 5 种引物对试验土微生物群落总 DNA 的扩增结果

Table 3 Amplified results of microbial DNA from tested soils with 5 primers

引物 Primers	扩增条带数 <sup>a</sup>	多态性条带数 <sup>b</sup>	非多态性条带数 <sup>c</sup>	多态性条带所占比例(%) <sup>d</sup>
SBS A2	66	54	12	82
SBS A3	65	44	21	68
SBS A11	51	48	3	94
SBS A19	94	52	42	55
SBS A20	94	46	48	48
合计 Total	370	244	126	66

a: Amplified band; b: Non-polymorphic amplified band; c: Polymorphic band; d: Ratio of polymorphic bands to total bands

表 4 不同土壤中微生物总 DNA 的扩增结果

Table 4 RAPD results of microbial communities in tested soils with 5 primers

土壤 Soils type and treatment		SBS A2	SBS A3	SBS A11	SBS A19	SBS A20	合计 Total
水稻土 Paddy soils	非根区土 Soils without plants	6	6	2	7	5	26
	对照土 Control soils	8	8	7	11	12	46
	处理土 Treated soils	7	8	4	8	6	33
元江土 Yuanjiang soils	非根区土 Soils without plants	7	1	7	10	13	38
	对照土 Control soils	8	11	9	16	8	52
	处理土 Treated soils	4	11	3	13	13	44
墨江土 Mojiang soils	非根区土 Soils without plants	7	5	7	3	15	37
	对照土 Control soils	11		4	11	12	47
	处理土 Treated soils	8	6	8	15	10	47
合计 Total	66	65	51	94	94	370	

试验土壤中微生物总 DNA 序列多样性的 SWI 见图 5。从图中可见, 非根区土壤中的 SWI 均低于对照土的和处理土的, 而对照土的 SWI 一般高于处理土的。

### 2.3 对土壤酶活性的影响

处理与对照土壤中 5 种土壤酶活性见表 5。水稻土中, 处理后 5 种土壤酶活性均较对照土的有所提高, 过

氧化氢酶、脲酶和碱性磷酸酶的差异达到显著水平 ( $p < 0.05$ )。元江土中,除碱性磷酸酶活性低于对照土的外,其它 4 种土壤酶活性均高于对照土中的,脲酶和酸性磷酸酶的差异达到显著水平 ( $p < 0.05$ )。墨江土中,除酸性磷酸酶活性低于对照土的外,其它 4 种土壤酶活性均高于对照土中的,脲酶、碱性磷酸酶和多酚氧化酶的差异达到显著水平 ( $p < 0.05$ )。

2.4 对植物修复效果的影响

(1) 对植物生长和生物量的影响

植株生长调查结果见表 6。从生长速度看,水稻土、墨江土处理与对照之间无显著差异 ( $p > 0.05$ ); 而元江土则不同,土壤经菌液处理后,植株的高度增长较快,处理与对照之间有显著差异 ( $p < 0.05$ )。从收获时植株高度看,水稻土和墨江土处理与对照之间的株高无显著差异,而元江土处理与对照的株高有极显著差异 ( $p < 0.01$ )。

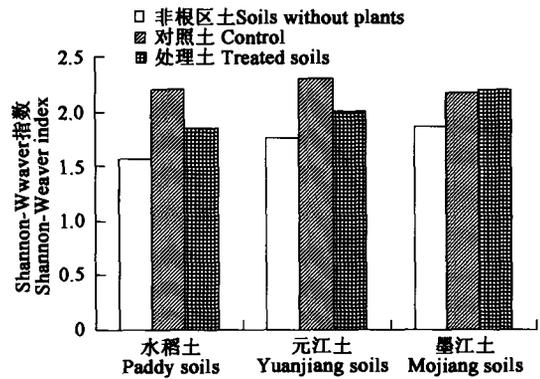


图 5 试验土壤中微生物 DNA 序列的 Shannon-Weaver 指数

Fig.5 Shannon-Weaver index of microbial DNA sequence diversity in tested soils

表 5 试验土壤中 5 种土壤酶活性

Table 5 Soil enzyme activity in tested soils

土壤酶 Type of soil enzyme	土壤 Soils	水稻土 Paddy soils	元江土 Yuanjiang soils	墨江土 Mojiang soils
脲酶 Urease activity	非根区土 Soils without plants	20.29 ± 1.43a	35.97 ± 2.16b	4.53 ± 0.96b
	对照土 Control soil	4.84 ± 1.17b	82.48 ± 7.97b	1.03 ± 0.49b
	处理土 Treated soils	26.64 ± 2.94a	203.92 ± 2.34a	42.12 ± 4.25a
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase activity	非根区土 Soils without plants	2.26 ± 1.12b	2.49 ± 0.56a	1.22 ± 0.11b
	对照土 Control soils	2.37 ± 0.39b	2.23 ± 0.59ab	1.46 ± 0.57b
	处理土 Treated soils	6.43 ± 1.54a	1.30 ± 0.24b	9.36 ± 0.86a
酸性磷酸酶 Acid phosphatase activity	非根区土 Soils without plants	32.31 ± 4.78b	21.07 ± 3.74a	61.07 ± 2.39a
	对照土 Control soils	59.38 ± 3.57a	7.29 ± 1.00b	60.50 ± 5.17a
	处理土 Treated soils	64.45 ± 6.74b	17.05 ± 4.46a	11.11 ± 2.32b
多酚氧化酶 Polyphenol oxidase activity	非根区土 Soils without plants	2.46 ± 0.95a	8.53 ± 0.68a	3.47 ± 2.02c
	对照土 Control soils	2.74 ± 0.07a	7.86 ± 0.93a	6.94 ± 0.70b
	处理土 Treated soils	2.85 ± 0.24a	8.37 ± 2.16a	11.21 ± 0.24a
过氧化氢酶 Catalase activity	非根区土 Soils without plants	0.80 ± 0.03a	1.72 ± 0.05a	1.93 ± 0.07b
	对照土 Control soils	0.98 ± 0.04b	1.67 ± 0.22a	2.10 ± 0.07a
	处理土 Treated soils	1.41 ± 0.03a	1.79 ± 0.18a	2.18 ± 0.03a

\* 表中数据为平均值 ± 标准差,不相同的字母表示两者之间有显著差异 ( $p < 0.05$ ) Data are means ± SD. The different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

表 6 植株增高速度和收获时株高

Table 6 Growth rate of plants and plant high

调查时间 Times		第 4 周 Fourth week (cm·week <sup>-1</sup> )	第 6 周 Sixth week (cm·week <sup>-1</sup> )	第 8 周 Eighth week (cm·week <sup>-1</sup> )	第 10 周 Tenth week (cm·week <sup>-1</sup> )	收获时株高 Plant high (cm)
水稻土 Paddy soils	对照土 Control	0.87 ± 0.17a	0.93 ± 0.04a	0.98 ± 0.07a	1.16 ± 0.34a	9.64 ± 0.41a
	处理土 Treated soils	0.47 ± 0.19a	0.78 ± 0.17a	1.13 ± 0.32a	1.64 ± 0.44a	9.69 ± 0.92a
元江土 Yuanjiang soil	对照土 Control	0.05 ± 0.04a	0.10 ± 0.01a	0.16 ± 0.02a	0.25 ± 0.09a	2.81 ± 0.14A
	处理土 Treated soils	0.25 ± 0.03b	0.29 ± 0.10b	0.24 ± 0.03b	0.62 ± 0.01b	4.81 ± 0.25B
墨江土 Mojiang soils	对照土 Control	0.06 ± 0.07a	0.05 ± 0.05a	0.18 ± 0.05a	0.20 ± 0.11a	2.64 ± 0.08a
	处理土 Treated soils	0.26 ± 0.06b	0.19 ± 0.10a	0.11 ± 0.11a	0.22 ± 0.20a	3.51 ± 0.81a

\* 表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差,不相同的字母表示两者之间有显著差异 ( $p < 0.05$ ) Data are means ± SD. The different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

处理与对照土中植株的生物量见表 7。处理后,3 种土壤中 *A. corsicum* 的单株生物量(地上部分,干重)分别为  $558\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ (水稻土)、 $45\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ (元江土)和  $20\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ (墨江土),较对照增加 29%(水稻土)、309%(元江土)和 43%(墨江土)。

(2) 对植物镍含量的影响 植物地上部分和地下部分镍含量见表 8。从表 8 植物地上部镍含量看,水稻土的最高,为  $14037.8\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;其次是墨江土,为  $1825.1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;再次是元江土,为  $1418.0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。检验表明,3 种土壤中地上部分镍含量在处理与对照之间的差异均不显著( $p > 0.05$ )。

根据植物地上部分镍含量和地上部分生物量,计算出植株地上部分提取镍量(见表 8)。经过加菌处理后,植株自水稻土中提取镍量为  $7.831\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ 、较对照增加 54%;元江土中为  $0.065\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ 、较对照增加 306%;墨江土中为  $0.037\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ 、较对照增加 32%。

表 7 植株生物量测定结果

Table 7 Results of biomass of plants

土壤类型 Type of soils	处理 Treatment	地上部生物量 ( $\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ ) Shoot biomass	地下部生物量 ( $\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ ) Root biomass
水稻土 Paddy soils	对照土 Control soils	$431 \pm 6\text{b}$	$32 \pm 4\text{a}$
	处理土 Treated soils	$558 \pm 98\text{a}$	$29 \pm 6\text{a}$
元江土 Yuanjiang soils	对照土 Control soils	$11 \pm 2\text{b}$	$2 \pm 1\text{b}$
	处理土 Treated soils	$45 \pm 11\text{a}$	$7 \pm 2\text{a}$
墨江土 Mojiang soils	对照土 Control soils	$14 \pm 4\text{a}$	$2 \pm 1\text{a}$
	处理土 Treated soils	$20 \pm 6\text{a}$	$2 \pm 1\text{a}$

\* 表中数据为 3 次重复的平均值  $\pm$  标准差,不相同的字母表示两者之间有显著差异( $p < 0.05$ ) Data are means  $\pm$  SD. The different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

表 8 植株地上部和地下部镍含量

Table 8 Ni concentration in shoot and root

土壤类型 Type of soils	处理 Treatment	地上部分( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Shoot	地下部分( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) Root	$C_{\text{shoot}}/C_{\text{root}}$	提取镍量( $\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$ ) Extracted Ni
水稻土 Paddy soils	对照土 Control soils	$11822.7 \pm 150.3\text{a}$	$9176.8 \pm 1289.5\text{a}$	1.3	5.092
	处理土 Treated soils	$14037.8 \pm 2724.1\text{a}$	$11282.0 \pm 2157.2\text{a}$	1.2	7.831
元江土 Yuanjiang soils	对照土 Control soils	$1492.9 \pm 137.5\text{a}$	$380.6 \pm 213.7\text{a}$	3.9	0.016
	处理土 Treated soils	$1418.0 \pm 78.2\text{a}$	$506.0 \pm 140.8\text{a}$	2.8	0.065
墨江土 Mojiang soils	对照土 Control soils	$2002.7 \pm 415.9\text{a}$	$1351.3 \pm 582.9\text{a}$	1.5	0.028
	处理土 Treated soils	$1825.1 \pm 145.2\text{a}$	$304.4 \pm 219.0\text{a}$	6.0	0.037

\* 表中数据为 3 次重复的平均值  $\pm$  标准差,不相同的字母表示两者之间有显著差异( $p < 0.05$ ) Data are means  $\pm$  SD. The different letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments

### 3 讨论

#### 3.1 接种菌提高了土壤微生物种群数量和土壤酶活性

土壤微生物种群结构是表征土壤微生态系统群落结构和稳定性的重要参数之一。通常情况下,重金属污染对微生物有两种效应:一是不适应生长的微生物种类数量的减少或灭绝;二是适应生长的微生物种类数量增大与优势化<sup>[23]</sup>。Kozdroj 等<sup>[24]</sup>认为,植物根际分泌物中某些特殊的有机酸成分可能降低根际微生物多样性、形成少数的优势种。本试验中所用的泡囊假单胞菌来自于镍污染土壤植物的根际,对土壤镍污染的胁迫环境有一定的适应能力。本试验中,处理土壤中细菌总数、真菌总数和放线菌总数均较对照土壤中的高,土壤微生物生物量也较对照土壤中的大,这些结果表明处理土壤中微生物的种群数量较对照土壤中的大。另外,处理土壤中 DTPA 提取态镍的含量小于对照土壤中的,镍在处理土壤中对微生物的胁迫作用较对照土壤中的小,这也有利于土壤微生物种群的发展。处理土壤中脲酶活性、酸性磷酸酶活性等与对照土壤中的有显著性差异,进一步证明了接种后土壤微生物种群数量的增加。但从土壤微生物总 DNA 序列多样性来看,处理土壤中微生物总 DNA 序列多样性的 SWI 较对照土壤中的小,是否因接种泡囊假单胞菌后抑制了土壤中其它种类的微生物的发展,有待进一步的分析。

#### 3.2 接种菌提高 *A. corsicum* 对土壤镍污染修复效果的机制

从试验获得植株增高速度结果(表 6)和生物量结果(表 7)来看,接种后 3 种土壤中生长的 *A. corsicum*,在试验的中后期株高增长速度较对照土的生长快,元江土壤中处理与对照的差异达到了显著水平。这种现象可能的机制包括:一是本试验菌株具有分泌铁载体的能力。当土壤中接种能分泌铁载体的泡囊假单胞菌后,在

土壤中可利用铁离子的含量较低的情况下可诱导这种细菌分泌铁载体<sup>[13]</sup>,铁载体与  $\text{Fe}^{3+}$  有高亲和力,其与  $\text{Fe}^{3+}$  结合后形成亲脂性的螯合物,这种亲脂性的螯合物可被植物和细菌直接吸收,从而提高了土壤中铁的有效性,有利于植物各项生理生化功能的进行。二是本试验菌株可以利用合成乙烯的前驱物质 ACC 作为唯一氮源。近年来的研究发现,PGPR 可以调节高等植物体内乙烯水平,调节的方式是通过减少合成乙烯的前驱物质 ACC 来实现的<sup>[13,25]</sup>。在这一调节过程中,ACC 在 ACC 脱氨酶的作用下分解成  $\alpha$ -丁酮酸和氨,植物体内 ACC 水平下降,进而减少了乙烯的合成。植物体内乙烯含量下降,乙烯对植物生长的“三重反应”<sup>[26]</sup>减轻,有利于植物的生长。因此,土壤接种试验菌后促进了供试植物的生长。

### 3.3 植物重金属含量与土壤重金属有效性的关系

Burd 等<sup>[27]</sup>认为,添加 PGPR 对每克植物干重吸收的重金属的数量没有影响。本试验结果与 Burd 等的研究结果是一致的。在 3 种类型土壤中,添加泡囊假单胞菌处理与对照比较,植物体内镍的含量并没有显著的差异。但从植物体内镍含量看(表 8),同种植物在 3 种不同土壤中的结果存在一定的差异,这种差异主要与供试土壤的性质有关。Robinson 等<sup>[28]</sup>曾报道 *A. bertolonii* 的生长时间与它体内的镍含量之间没有相关性,Lombini<sup>[29]</sup>和 Ernst 等<sup>[30]</sup>认为植物吸收金属的数量受土壤中金属的生物可利用性和植物本身的生理功能影响。本试验水稻土中有效态镍含量最高、其次为墨江土、再次为元江土(见表 2),与植物镍含量的高低顺序完全一致。因此,在重金属污染土壤的植复修复过程中,提高土壤中金属的有效性也是非常重要的。

综合上所述,在土壤中接种泡囊假单胞菌后,水稻土中 *A. corsicum* 生物量提高了 29%、元江土中提高了 309%、墨江土中提高了 43%,证明泡囊假单胞菌可以在镍污染土壤中提高 *A. corsicum* 的生物量;进而提高了植物自土壤中提取镍的效率。

### References:

- [ 1 ] Brooks R R, Chambers M F, Nicks L J, *et al.* Phytomining. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(9): 359 ~ 362.
- [ 2 ] Wei C Y, Chen T B. Hyperaccumulators and phytoremediation of heavy metal contaminated soil: a review of studies in China and abroad. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(7): 1196 ~ 1203.
- [ 3 ] Yang X E, Long X X, Ni W Z. Physiological and molecular mechanisms of heavy metal uptake by hyperaccumulating plants. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2002, 8(1): 8 ~ 15.
- [ 4 ] Sun R L, Zhou Q X. Heavy metal tolerance and hyperaccumulation of higher plants and their molecular mechanisms: a review. *Acta Phytocologica Sinica*, 2005, 29(3): 497 ~ 504.
- [ 5 ] Nedelkoska T V, Doran P M. Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Engineering*, 2000, 13(5): 549 ~ 561.
- [ 6 ] Mihucz V G, Tatar E, Varga A, *et al.* Application of total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and high-performance liquid chromatography for the chemical characterization of xylem saps of nickel contaminated cucumber plants. *Spectrochimica Acta Part B*, 2001, 56(11): 2235 ~ 2246.
- [ 7 ] Cobbett C S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3(3): 211 ~ 216.
- [ 8 ] Wan Y B, Qiu R L, Chen Z L, *et al.* On efficient improvement of phytoextraction of heavy metals from contaminated soil. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2002, 3(4): 56 ~ 59.
- [ 9 ] Li W X, Chen T B, Liu Y R. Effects of harvesting on As accumulation and removal efficiency of As by Chinese brake (*Pteris vittata* L.). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(3): 538 ~ 542.
- [ 10 ] Tao H Q, Li X L, Zhang J L. Uptake of Zn and Cd by hyphae of an arbuscular mycorrhizal funai (*G. mosseae*) associated with red clover. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1998, 18(5): 545 ~ 548.
- [ 11 ] Liao J P, Lin X G, Cao Z H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on bioavailability of copper in sewage-sludge-amended red soil. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(6): 929 ~ 936.
- [ 12 ] White P J. Phytoremediation assisted by microorganisms. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(11): 502.
- [ 13 ] Glick B R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 2003, 21(5): 383 ~ 393.
- [ 14 ] Li YM, Chaney R, Brewer E, *et al.* Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant and Soil*, 2003, 249(1): 107 ~ 115.
- [ 15 ] Wang P X, QU E F. A study on the extracting method of available nickel in manured loessial soil. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1993, 13(2): 223 ~

- 232.
- [16] Bao S D. Soil and Agricultural Chemistry Analysis(3<sup>rd</sup> edition). Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [17] Microorganism Lab, Institute of Soil Science of Nanjin, Chinese Academy of Sciences. Soils of Research Method of Soil Microorganism. Beijing: Science Press, 1985.
- [18] Lin Q M, Wu Y G, Liu H L. Modification of Fumigation Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass Carbon. Chinese Journal of Ecology, 1999, 18(2): 63 ~ 66.
- [19] Yao J, Yang Y H, Shen X R, *et al.* A preliminary study on DNA sequence diversity of soil microbial community affected by agricultural chemicals. Acta Ecologica Sinica, 2000, 20(6): 1021 ~ 1027.
- [20] Zhu B, Qing C L, Mu S S. Bioavailability of exotic zinc and cadmium in purple soil. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(5): 555 ~ 558.
- [21] Cai X D, Qiu R L, Chen G Z. Speciation and redistribution of nickel added in soil. Ecology and Environment, 2005, 14(3): 341 ~ 344.
- [22] Li Z B, Shuman L M. Redistribution of forms of zinc, cadmium and nickel in soils treated with EDTA. The Science of the Total Environment, 1996, 191(1): 95 ~ 107.
- [23] Wang X H. Pollution Ecology(2<sup>nd</sup> ed.). Beijing: Higher Education Press, 2002.
- [24] Kozdroj J, Van E, Jan D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. Soil Biology & Biochemistry, 2000, 32(10): 1405 ~ 1417.
- [25] Campbell B G, Thomson J A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. FEMS Microbiology Letters, 1996, 138(1): 207 ~ 210.
- [26] Wang Z. Plant Physiology. Beijing: China Agricultural Press, 2000. 293.
- [27] Burd G I, Dixon D G, Glick B R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(3): 237 ~ 245.
- [28] Robinson B H, Chiarucci A, Brooks R R, *et al.* The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. Journal of Geochemical Exploration, 1997, 59(2): 75 ~ 86.
- [29] Lombini A, Dinelli E, Ferrari C, *et al.* Plant-soil relationships in the serpentinite screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). Journal of Geochemical Exploration, 1998, 64(1-3): 19 ~ 33.
- [30] Ernst W H O. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. Applied Geochemistry, 1996, 11(1-2): 163 ~ 167.

#### 参考文献:

- [2] 韦朝阳, 陈同斌. 重金属超富集植物及植物修复技术研究进展. 生态学报, 2001, 21(7): 1196 ~ 1203.
- [3] 杨肖娥, 龙新亮, 倪吾钟. 超积累植物吸收重金属的生理及分子机制. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(1): 8 ~ 15.
- [4] 孙瑞莲, 周启星. 高等植物重金属耐性与超积累特性及其分子机理研究. 植物生态学报, 2005, 29(3): 497 ~ 504.
- [8] 万云兵, 仇荣亮, 陈志良, 等. 重金属污染土壤中提高植物提取修复功效的探讨. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(4): 56 ~ 59.
- [9] 李文学, 陈同斌, 刘颖茹. 刈割对蜈蚣草的砷吸收和植物修复效率的影响. 生态学报, 2005, 25(3): 538 ~ 542.
- [10] 陶红群, 李晓林, 张俊伶. 丛枝根菌丝对重金属元素 Zn 和 Cd 吸收的研究. 环境科学学报, 1998, 18(5): 545 ~ 548.
- [11] 廖继佩, 林先贵, 曹志洪. 红壤中丛枝菌根真菌对污泥态铜生物有效性的影响. 土壤学报, 2003, 40(6): 929 ~ 936.
- [15] 王新鹏, 曲尔复. 壤土中可给态镍浸提方法的研究. 环境科学学报, 1993, 13(2): 223 ~ 232.
- [16] 鲍士旦. 土壤农化分析(第3版). 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [17] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.
- [18] 林启美, 吴玉光, 刘焕龙. 熏蒸法测定土壤微生物碳的改进. 生态学杂志, 1999, 18(2): 63 ~ 66.
- [19] 姚健, 杨永华, 沈晓蓉, 等. 农用化学品污染对土壤微生物群落 DNA 序列多样性影响研究. 生态学报, 2000, 20(6): 1021 ~ 1027.
- [20] 朱波, 青长乐, 牟树森. 紫色土外源锌、镉形态的生物有效性. 应用生态学报, 2002, 13(5): 555 ~ 558.
- [21] 蔡信德, 仇荣亮, 陈桂珠. 外加镍在土壤中的形态与再分配. 生态环境, 2005, 14(3): 341 ~ 344.
- [23] 王校焕. 污染生态学(第2版). 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [26] 王忠. 植物生理学. 北京: 中国农业出版社, 2000, 293.