

DOI: 10.5846/stxb202007231938

文欢欢, 郑新宇, 肖清铁, 汪敦飞, 律其鑫, 韩博伦, 王玉洁, 樊荣荣, 游武, 郭尤睿, 钱鑫, 林瑞余. 镉污染条件下水稻对假单胞菌 TCd-1 微生物修复的生理响应. 生态学报, 2022, 42(5): 1924-1933.

Wen H H, Zheng X Y, Xiao Q T, Wang D F, Lü Q X, Han B L, Wang Y J, Fan R R, You W, Guo Y R, Qian X, Lin R Y. Physiological response of Rice (*Oryza stiva* L.) to the microbial remediation by *Pseudomonas* TCd-1 under cadmium contaminated conditions. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(5): 1924-1933.

镉污染条件下水稻对假单胞菌 TCd-1 微生物修复的生理响应

文欢欢¹, 郑新宇^{1,2}, 肖清铁^{1,2}, 汪敦飞¹, 律其鑫¹, 韩博伦¹, 王玉洁¹, 樊荣荣¹, 游武¹, 郭尤睿¹, 钱鑫¹, 林瑞余^{1,2,*}

1 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室, 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002

2 作物生态与分子生理学福建省高校重点实验室, 福建农林大学, 福州 350002

摘要:微生物在修复重金属污染土壤中发挥重要作用。为阐明假单胞菌 TCd-1 降低水稻镉吸收的机理, 通过加镉土培盆栽试验, 在 10 mg/kg 镉处理下, 对比研究了接种菌株对 2 种镉耐性不同水稻品种 (特优 671、百香 139) 镉含量、根系活力、光合作用、抗氧化酶活性及抗氧化物质含量的影响。结果表明: 与 10 mg/kg 镉处理相比, 接种假单胞菌 TCd-1 后水稻“特优 671”和“百香 139”的根、茎、叶、糙米的镉含量分别依次降低了 30.4%、39.1%、40.7%、29.2% 和 52.2%、51.7%、18.4%、38.8%; 提高了 2 种水稻的根系活力、光合作用, 促进了水稻的生长; “特优 671”、“百香 139”叶片的超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性分别提高了 7.3%、138.5%, 过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 活性提高了 82.0%、106.2%, 过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性提高了 58.8%、172.7%; 叶片的类黄酮含量提高了 139.4%、73.6%, 总酚含量提高了 27.2%、23.1%; 超氧阴离子含量降低了 44.2%、29.0%, 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量降低了 38.5%、28.9%。因此, 接种假单胞菌 TCd-1 提高了水稻抗氧化能力, 减轻了氧化胁迫, 促进了水稻的生长。

关键词:假单胞菌 TCd-1; 镉污染; 水稻; 生理特性

Physiological response of Rice (*Oryza stiva* L.) to the microbial remediation by *Pseudomonas* TCd-1 under cadmium contaminated conditions

WEN Huanhuan¹, ZHENG Xinyu^{1,2}, XIAO Qingtie^{1,2}, WANG Dunfei¹, LÜ Qixin¹, HAN Bolun¹, WANG Yujie¹, FAN Rongrong¹, YOU Wu¹, GUO Yourui¹, QIAN Xin¹, LIN Ruiyu^{1,2,*}

1 Fujian Provincial Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2 Key Laboratory of Crop Ecology and Molecular Physiology of Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: When Rice (*Oryza stiva* L.) is stressed by heavy metal, its growth and development are obviously hindered. The metabolism of rice grown in areas contaminated with heavy metal will change and its growth will slow down, resulting in a decrease in biomass. Among different heavy metals, cadmium is the most harmful to plant growth and human health. Cadmium in the soil is easily absorbed and accumulated by rice, affecting plant growth, cell division and metabolic activities, and causing its yield and quality to decline. Microorganisms play an important role in the remediation of soil

基金项目:国家重点研发计划项目 (2017YFD0800900); 福建省自然科学基金项目 (2009J01056, 2013J01083, 2015J01081)

收稿日期:2020-07-23; **网络出版日期:**2021-11-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lrylin2004@163.com

contaminated by heavy metal. In this study, *Pseudomonas* strain TCd-1 was selected from the rhizosphere soil of cadmium-tolerant rice in the early stage of the research group. The *Pseudomonas* TCd-1 has a strong tolerance to heavy metal cadmium. In this study, two rice species with different cadmium tolerance, Teyou 671 and Baixiang 139, were used as experimental subjects. To elucidate the mechanism of *Pseudomonas* TCd-1 reducing the cadmium uptake in rice, the effects of inoculated strains on the cadmium content, root vitality, photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and antioxidant content of two rice species with different cadmium tolerance were investigated under the stress of 10 mg/kg cadmium. The results suggest that the cadmium contents in the roots, stems, leaves and brown rice of the Teyou 671 decrease by 30.4%, 39.1%, 40.7%, and 29.2%, respectively, while the cadmium content in the roots, stems, leaves, and brown rice of the Baixiang 139 decrease by 52.2%, 51.7%, 18.4%, and 38.8%, respectively, after inoculation with *Pseudomonas* TCd-1. The root vitality and photosynthesis of the two rice species are improved, leading to promoting the growth of rice. Superoxide dismutase (SOD) activity in the leaves of Teyou 671 and Baixiang 139 increase by 7.3% and 138.5%, Peroxidase (POD) activity increase by 82.0% and 106.2%, Catalase (CAT) activity increase by 58.8% and 172.7%, the flavonoids content in the leaves of two rice species with different cadmium tolerance increase by 139.4% and 73.6%, the total phenol content increase by 27.2% and 23.1%, the superoxide anion content decrease by 44.2% and 29.0%, and the Malondialdehyde (MDA) content in the leaves of two rice species decrease by 38.5% and 28.9%, respectively, in comparison with the treatment of 10 mg/kg cadmium. In conclusion, for two rice species with different cadmium tolerance, after inoculation of *Pseudomonas* TCd-1 can increase the antioxidant capacity of Teyou 671 and Baixiang 139 with different cadmium tolerance, reduce the oxidative stress, and promote the growth of two rice species with different cadmium tolerance.

Key Words: *Pseudomonas* TCd-1; cadmium pollution; rice; physiological characteristics

镉(Cd)是一种人体非必需的元素,具有潜在的“致癌、致畸、致突变”效应,极易通过食物链进入人体并富集,从而危害人体健康^[1]。据《全国土壤污染状况调查公报》显示,我国耕地土壤重金属污染点位超标率高达15.5%,其中镉的点位超标率约为7%,居重金属首位^[2]。此外,水稻是我国主要粮食作物之一,但有研究表明,部分地区市售大米近10%存在镉超标,已引起人们的高度关注^[3]。稻米镉超标与我国农田土壤镉污染比较突出密切相关,利用物理、化学、生物及其复合技术修复镉污染土壤,降低稻米镉含量,将为建立安全的水稻生产系统奠定基础。

微生物修复技术主要通过微生物的细胞代谢(生物沉淀和生物转化)、生物吸附、生物积累、胞外沉淀以及外排作用对重金属污染的环境进行修复^[4-5]。柠檬酸细菌属(*Citrobacter*)具有一种抗镉的酸性磷酸酯酶,它能分解2—磷酸甘油,产生 HPO_4^{2-} 与 Cd^{2+} 形成 CdHPO_4 沉淀^[6];McLean^[7]发现的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)可以把六价铬还原为三价铬,Valenzuela等^[8]分离得到多种假单胞菌能将As(Ⅲ)氧化为更加稳定的As(Ⅴ),从而降低其毒性;嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)能将硒酸盐和亚硒酸盐还原为胶态硒,胶态硒不具毒性,且结构稳定^[9]。赵光^[10]发现凝结芽孢杆菌ZG49(*Bacillus coagulans*)对重金属污染土壤中镉、铅有明显的钝化作用,而对锌有一定的活化作用。在长期受某种重金属污染的土壤上,生存有大量能适应重金属污染环境并能氧化或还原该重金属的微生物类。微生物修复操作适应性广、金属选择性高、不受金属离子浓度的影响、具有较好的再生能力,且土壤不受扰动,生态效应好,具有广阔的研究前景。

植株长期在镉污染下生长,其根系直接受到损害,颜色变黑坏死,进而导致生长受到抑制,光合受限,代谢失调,最终死亡^[11]。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是普遍存在于植物体内含金属辅基的酶,能够清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)^[12];过氧化物酶(Peroxidase, POD)广泛存在于植物体中,与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化作用等有关,过氧化氢酶(Catalase, CAT)可清除 H_2O_2 、分解氢氧自由基($\cdot\text{OH}^-$)。植株受到重金属胁迫时激活体内相应的SOD、POD、CAT等酶协同作用来防御活性氧或其它过氧化物自由基对细胞膜系统的伤害,从而减少自由基对机体的毒害^[13-15]。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是膜脂过氧化的

最终分解产物,其含量可作为植物叶片细胞膜遭受破坏程度的指标^[16]。本研究采用的假单胞菌 TCd-1 是一种植物根际促生菌^[17],能在高达 900 mg/L Cd²⁺下生长,在 100 mg/L 镉处理下,菌株体内吸收的镉质量分数为 9.04 mg/g,镉富集系数达到 90.4,具有较强镉富集能力^[18],可在水稻根际定殖,有应用于镉污染的修复潜力但其对镉污染水稻生理生化影响的尚未见研究报道。为此,本研究通过土培盆栽试验,探讨假单胞菌 TCd-1 对镉污染水稻的生理生化的影响,为进一步阐明菌株修复镉污染水稻的相关机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为镉耐性的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) TCd-1(专利号:CN103952333A)^[18],是课题组前期从水稻品种“PI312777”的根际土壤筛选得到,保藏于武汉大学中国典型培养物保藏中心(保存号:CCTCC M2013649)。菌悬液培养条件:牛肉膏 0.5%,酵母粉 1.0%,氯化镁 0.5%,pH 6.3,温度 33℃,接菌量 1.25%,转速 160 rpm,培养 24 h 后用于接种。接种前取菌悬液 100 mL 分次在 4℃、12000 rpm 下离心 15 min,去上清液,菌株沉淀物用无菌水稀释至 100 mL,稀释后的菌液浓度测定为 $(5.33 \pm 0.24) \times 10^{10}$ 个/mL。

镉高耐性水稻“特优 671”和镉低耐性水稻“百香 139”是课题组前期从 238 份近年我国主栽的水稻品种中筛选得到。供试水稻的种子用 2.0% 的次氯酸钠溶液浸泡消毒 30 min 后,置于 30℃ 恒温培养箱培养至种子露白(期间定期补水),然后均匀播于沙盘中,待水稻长至 3 叶 1 心期时,选取长势一致水稻用于盆栽试验,每盆移栽水稻秧苗 1 株。

盆栽土壤取自福建农林大学水稻实验田,土壤镉含量为 0.18 mg/kg,土壤经自然风干、研磨,过筛 2 mm 后,分装于(直径 18 cm,高 15 cm)的深色塑料盆钵中,每盆 2.5 kg,施入氮肥(以纯 N 计)150 mg/kg、磷肥(以 P₂O₅ 计)100 mg/kg、钾肥(以 K₂O 计)100 mg/kg,并在盆栽前进行 10 mg/kg 镉添加处理,土壤混匀,保持水深 2—3 cm,每日搅动 1 次,陈化 4 周后用于水稻栽培。

1.2 盆栽管理与采样

盆栽试验于 2019 年 3 月至 8 月在福建农林大学生命科学学院玻璃房进行,设置 4 种处理:(1)CK:不加镉、不接种假单胞菌 TCd-1;(2)Cd10:添加 10 mg/kg 镉;(3)CKB:未加镉,接种假单胞菌 TCd-1;(4)Cd10B:添加 10 mg/kg 镉,接种假单胞菌 TCd-1。各处理 5 次重复。在移栽水稻返青后,进行接种,接种量 20 mL/kg(即 2%)。盆栽期间定期浇水,保持桶里水量高于土面 2—3 cm,以保证水稻正常生长。在分蘖期、抽穗期、成熟期分别测定水稻的株高、净光合速率;在抽穗期测定水稻根系活力、叶绿素含量、叶片抗氧化酶活性与抗氧化物质含量、MDA 与超氧阴离子含量;在成熟期测定水稻各部位的镉含量。

1.3 测定方法

1.3.1 水稻株高、生物量及净光合速率的测定

在水稻分蘖期、抽穗期、成熟期,采用精度 0.1 cm 的直尺测定水稻株高;在成熟期将水稻全株取出后,用去离子水洗净根部,再用吸水纸吸干,将样品分为根、茎和叶三部分,置于烘箱 105℃ 杀青 0.5 h 后,转至 72℃ 烘至恒重,测定其干重,生物量为根、茎、叶干重之和,3 次重复。净光合速率(Net photosynthetic rate, Pn)采用 LI-6400 便携式光合测定仪(LI-COR 公司,美国)测定,5 次重复。

1.3.2 根系活力和叶绿素含量测定

根系活力采用四氮唑(TTC)染色法测定^[19],结果以 TTC 还原量(mg h⁻¹ g⁻¹ FW)表示,测定 3 次重复。叶绿素含量采用分光光度法测定^[20]。

1.3.3 抗氧化酶活性测定

酶液的提取:准确称取 0.5 g 水稻倒数第二片功能叶洗净擦干后置于预冷的研钵中,加入 4 mL 50 mmol/L 预冷的磷酸缓冲液(pH 7.8)在冰浴上研磨成匀浆,转入离心管中在 4℃ 12000 r/min 下离心 20 min,上清液即酶粗提液,用于测定 SOD、POD、CAT 以及 MDA、O₂⁻ 含量。

酶活测定方法^[21]:超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑 NBT 光化还原法^[22];过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[23];过氧化氢酶(CAT)活性测定采用分光光度法^[22];可溶性蛋白测定采用 Folin—酚试剂法^[24];丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法;超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)产生速率的测定采用羟胺氧化法^[25]。

1.3.4 类黄酮和总酚含量测定

类黄酮含量测定采用甲醇提取和分光光度法^[26]。准确称取新鲜去中脉水稻叶片 0.5 g,加 5 mL 含 1% HCl 的甲醇溶液(甲醇:水:盐酸=79:20:1),反应 30 min 后,4℃提取 24 h,取 0.5 mL 提取液,稀释、定容至 25 mL,在 325 nm 处比色测定吸光度(OD)值;总酚含量测定以没食子酸标准曲线,再由 280 nm 处的 OD 值计算求得。总酚、类黄酮含量均以鲜重表示。

1.3.5 水稻镉含量的测定

镉含量测定利用原子火焰分光光度法进行^[27]。在成熟期,将水稻整株取出后,先用自来水冲洗根部土壤,再用去离子水洗净,用吸水纸吸干后,将样品分为根、茎、叶、糙米 4 个部位,装入信封,置于烘干箱 105℃杀青 1 h 后,72℃烘干 48 h,样品用玛瑙研钵研碎,过 100 目筛,待测。

1.4 数据处理与统计分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。采用单因素(one-way ANOVA)和 Duncan 法进行方差分析和多重比较($P=0.05$)。图表中数据为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 假单胞菌 TCd-1 对镉污染水稻各器官镉含量的影响

结果表明,不同处理“特优 671”各部位的镉含量高低为:根>茎>叶>糙米,不加镉处理“百香 139”表现为:叶>茎>根>糙米,加镉处理的为:茎>根>叶>糙米;水稻不同部位的镉含量在不同处理间均表现为:Cd10>Cd10B>CKB≈CK(表 1)。在镉处理下,“特优 671”根、茎、叶、糙米的镉含量分别为 35.72、9.69、4.34、0.84 mg/kg,接种菌株后依次下降了 30.5%、39.1%、40.7%、29.2%($P<0.05$);“百香 139”的分别为 13.18、31.26、6.57、1.33 mg/kg;接种菌株后,依次下降了 52.2%、51.7%、18.4%、38.8%($P<0.05$)。可见,假单胞菌 TCd-1 处理后能够显著降低 Cd10 处理水稻中各器官的镉含量($P<0.05$)。

表 1 不同处理水稻的镉含量

Table 1 The cadmium content in rice under different treatments

处理 Treatment	根 Root		茎 Stem		叶 Leaves		糙米 Brown rice	
	特优 671	百香 139	特优 671	百香 139	特优 671	百香 139	特优 671	百香 139
CK	0.28±0.04c	0.55±0.03d	0.10±0.06c	3.22±0.01c	0.05±0.013d	3.57±0.01c	0.03±0.00d	0.02±0.01d
CKB	0.33±0.03c	1.69±0.07c	0.16±0.14c	2.85±0.04d	0.08±0.008c	2.89±0.01d	0.06±0.01c	0.08±0.02c
Cd10	35.72±0.21a	13.18±0.02a	9.69±0.09a	31.26±0.16a	4.34±0.021a	6.57±0.36a	0.84±0.01a	1.33±0.01a
Cd10B	24.83±0.10b	6.30±0.06b	5.91±0.05b	15.11±0.11b	2.58±0.110b	5.36±0.29b	0.60±0.03b	0.81±0.08b

表中不同列中不同小写字母代表差异显著性($P<0.05$);CK:无添加处理 No added treatment;Cd10:添加 10mg/kg 的镉 Add 10mg/kg of cadmium;CKB:添加假单胞菌 TCd-1 Add *Pseudomonas* TCd-1;Cd10B:添加 10mg/kg 的镉和假单胞菌 TCd-1 Add 10mg/kg of cadmium and *Pseudomonas* TCd-1

2.2 假单胞菌 TCd-1 对镉污染水稻株高和生物量的影响

如图 1 所示,在分蘖期,CKB 处理“特优 671”、“百香 139”的株高分别为 58.70、48.70 cm 依次比 CK 处理提高了 7.1%、20.3%;Cd10B 处理的株高分别为 41.33、35.66 cm,依次比 Cd10 处理提高了 10.6%、17.1%。在抽穗期,CKB 处理“特优 671”、“百香 139”的株高分别为 94.19、88.33 cm,依次比 CK 处理提高了 8.4%、15.0%,Cd10B 处理的株高分别为 88.59、81.89 cm,依次比 Cd10 处理高 10.2%、4.8%。在成熟期,CKB 处理“特优 671”、“百香 139”的株高分别为 101.77、98.40 cm,依次比 CK 处理提高了 11.9%、7.5%,Cd10B 处理的

株高分别为 92.18、95.23 cm,依次比 Cd10 处理高 6.7%、12.3%。加菌处理后“特优 671”的生物量无显著性差异;CKB、Cd10B 处理“百香 139”的生物量分别显著增加了 29.72%、29.90%(图 1)。可见,镉污染抑制了不同镉耐性水稻株高的生长,降低其生物量,接种菌株可显著缓解镉污染的抑制作用。

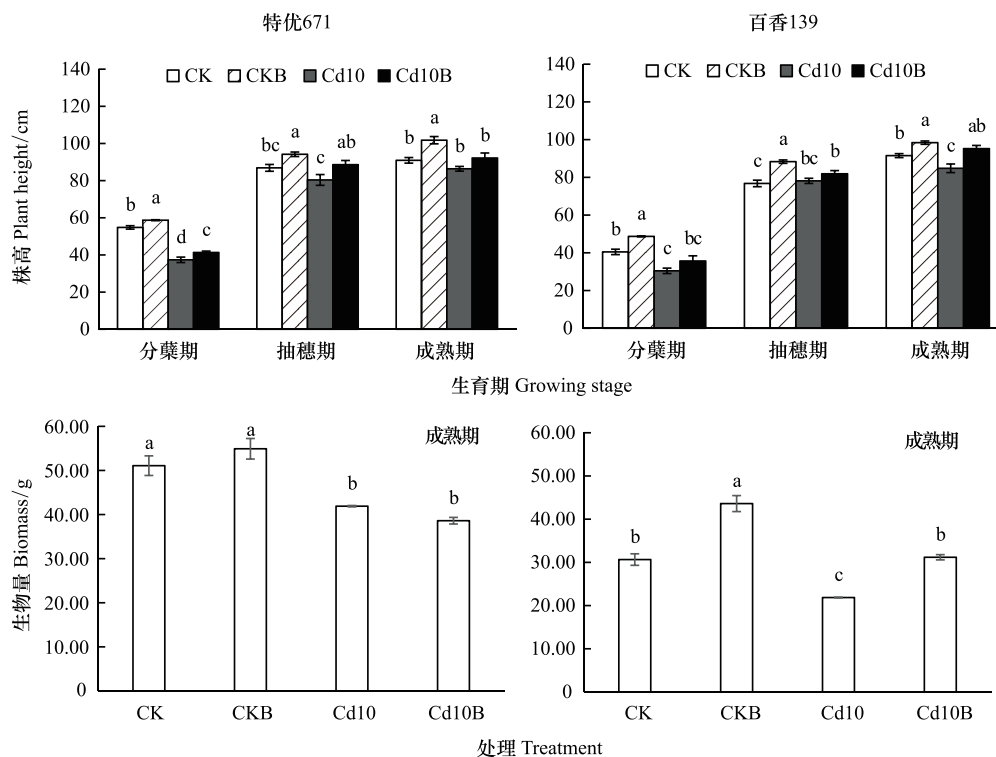


图 1 不同处理水稻“特优 671”、“百香 139”的株高和生物量

Fig.1 Plant height and biomass of rice Teyou 671 and Baixiang 139 under different treatments

图中不同小写字母代表差异显著性 ($P < 0.05$); CK: 无添加处理 No added treatment; Cd10: 添加 10mg/kg 的镉 Add 10mg/kg of cadmium; CKB: 添加假单胞菌 TCd-1 Add *Pseudomonas* TCd-1; Cd10B: 添加 10mg/kg 的镉和假单胞菌 TCd-1 Add 10mg/kg of cadmium and *Pseudomonas* TCd-1

2.3 假单胞菌 TCd-1 对镉污染水稻根系活力和叶片净光合速率 (P_n) 的影响

CKB 处理“特优 671”和“百香 139”的根系活力分别为 0.874、1.196 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 依次比 CK 处理提高了 9.3%、8.8%; Cd10B 处理的根系活力分别为 0.779、1.015 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 依次比 Cd10 处理提高了 3.5%、20.3% (图 2)。CKB 处理“特优 671”和“百香 139”的 P_n 分别为 23.1、23.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 依次比 CK 处理提高了 7.9%、33.1%; Cd10B 处理的 P_n 分别为 22.8、17.0 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, 依次比 Cd10 处理提高了 53.0%、63.5% (图 2)。可见, 镉污染降低了水稻的根系活力和 P_n , 接种菌株显著提高镉污染水稻的根系活力和光合作用能力。

2.4 假单胞菌 TCd-1 对镉污染水稻叶片叶绿素含量的影响

如图 3 所示, CKB 处理“特优 671”的叶绿素 a (Chlorophyll a, Chla)、叶绿素 b (Chlorophyll b, Chlb) 含量及叶绿素 a/叶绿素 b (Chlorophyll a/Chlorophyll b, Chla/Chlb) 分别为 2.26 mg/g、3.57 mg/g、0.64, 依次比 CK 处理高 48.2%、37.0% 和 8.2%; Cd10B 处理“特优 671”的 Chla、Chlb 含量及 Chla/Chlb 分别为 2.23 mg/g、3.34 mg/g、0.67, 依次比 CK 处理高 262.1%、224.8% 和 11.6%。CKB 处理“百香 139”的 Chla、Chlb 含量及 Chla/Chlb 分别为 1.53 mg/g、2.79 mg/g、0.55, 依次比 CK 处理高出 21.2%、28.6% 和 -6.2%; Cd10B 处理“百香 139”的 Chla、Chlb 含量及 Chla/Chlb 分别为 1.22 mg/g、2.14 mg/g、0.57, 依次比 CK 处理高 34.3%、31.8% 和 2.3%。可见, 接种菌株能够显著提高水稻的 Chla、Chlb 含量并调节 Chla/Chlb, 缓解镉污染对叶片叶绿素的伤害。

2.5 假单胞菌 TCd-1 对镉污染水稻叶片抗氧化酶系统的影响

“特优 671”和“百香 139”叶片的 MDA 含量均以 Cd10 处理最高, 分别为 1.58、1.95 $\mu\text{mol/g}$, Cd10 处理的

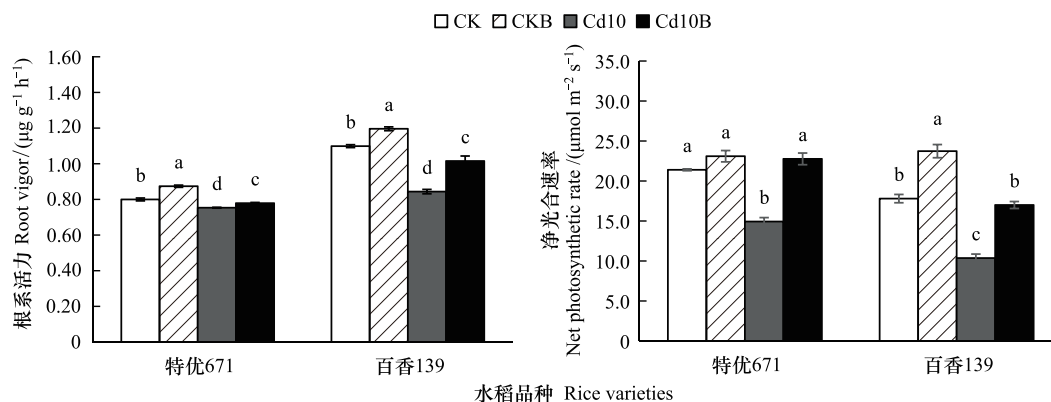


图2 不同处理水稻的根系活力和净光合速率

Fig.2 Root vigor and net photosynthetic rate of rice under different treatments

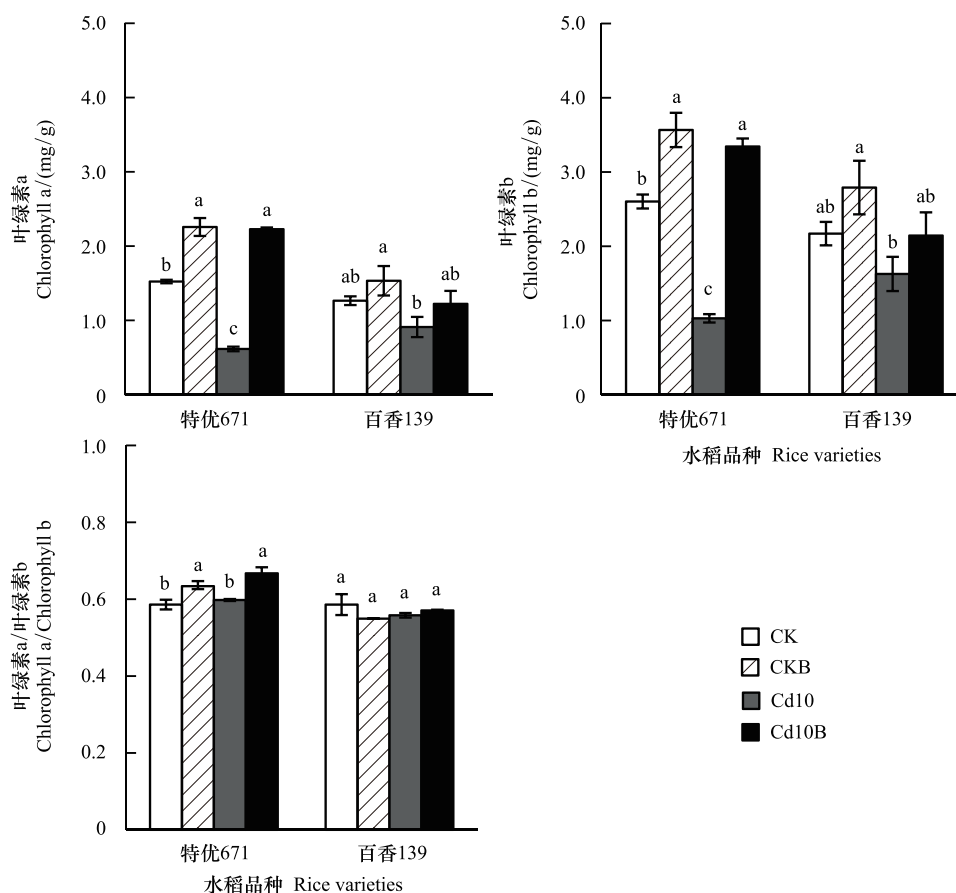
图中不同小写字母代表差异显著性 ($P < 0.05$)

图3 不同处理水稻抽穗期叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量、叶绿素 a/叶绿素 b

Fig.3 Chlorophyll a content, Chlorophyll b content and Chlorophyll a/Chlorophyll b of rice at heading stage under different treatments

图中不同小写字母代表差异显著性 ($P < 0.05$)

分别为 0.97、1.39 $\mu\text{mol/g}$, 依次比 Cd10 处理降低了 38.5%、28.9%, CKB 处理与 CK 处理间无显著差异 (图 4)。Cd10B 处理“特优 671”叶片的 SOD、POD、CAT 活性分别比 Cd10 处理高出 7.3%、82.0%、58.8%, CKB 处理的 POD、CAT 活性比 CK 处理提高了 53.8%、36.8%; Cd10B 处理“百香 139”叶片的 SOD、POD、CAT 活性分别比

Cd10 处理高出 138.5%、106.2%、172.7%,CKB 处理 SOD、POD、CAT 活性依次比 CK 处理高出 17.8%、12.5%、29.4%(图 4)。可见,Cd10 处理显著降低了水稻叶片的抗氧化能力,增强了膜质的过氧化作用,接种菌株表现出显著的缓解镉胁迫效应。

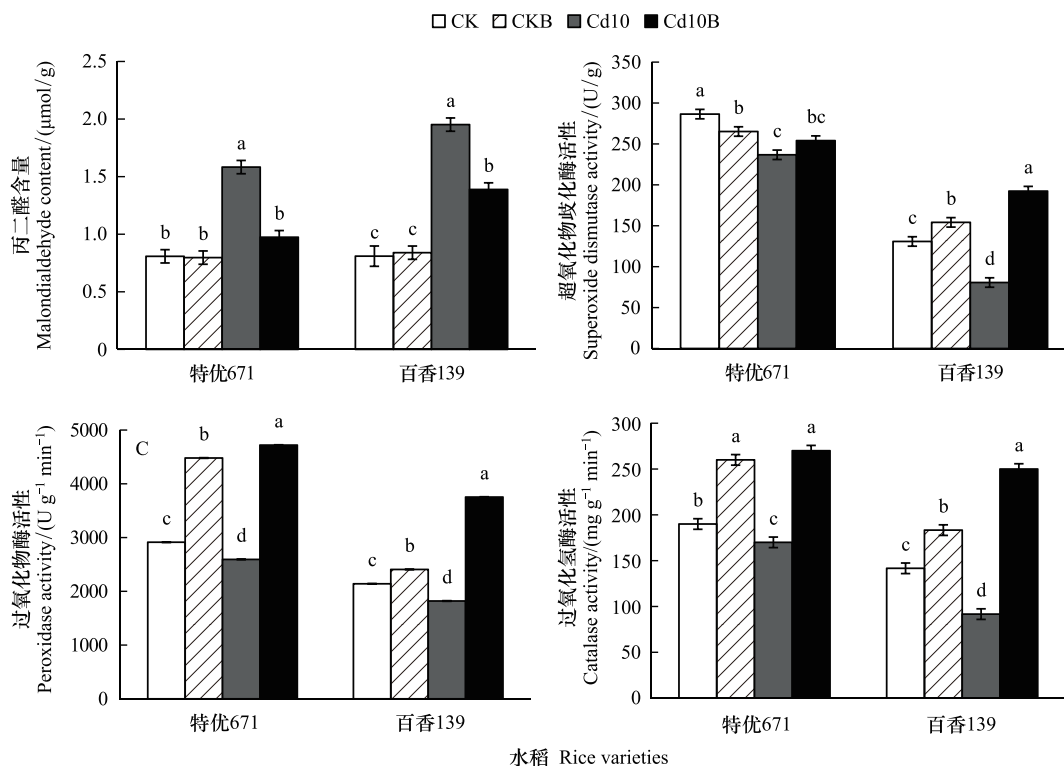


图 4 不同处理水稻叶片 MDA 含量、SOD 活性、POD 活性、CAT 活性

Fig.4 MDA content, SOD activity, POD activity and CAT activity of rice leaves under different treatments

图中不同小写字母代表差异显著性 ($P < 0.05$); MDA: 丙二醛 Malondialdehyde; SOD: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; POD: Peroxidase 过氧化物酶; CAT: Catalase 过氧化氢酶

2.6 假单胞菌 TCd-1 对抽穗期水稻叶片类黄酮、总酚和 $O_2^{\cdot-}$ 含量的影响

如图 5 所示,Cd10B 处理“特优 671”和“百香 139”叶片类黄酮含量分别为 96.044、90.576 mg/g,依次比 Cd10 处理高出 139.4%、73.6%;CKB 处理“百香 139”的类黄酮含量比 CK 处理高出 5.2%,但“特优 671”在 CK 和 CKB 处理间无显著差异;Cd10B 处理“特优 671”和“百香 139”叶片总酚含量分别为 2.017、2.143 mg/g,依次比 Cd10 处理提高了 27.2%、23.1%,CKB 处理比 CK 处理分别提高了 5.1%、2.9%。Cd10B 处理“特优 671”和“百香 139”叶片 $O_2^{\cdot-}$ 含量分别为 0.115、0.169 nmol min⁻¹ g⁻¹,依次比 Cd10 处理降低了 44.2%、29.0%;但在 CK 与 CKB 处理间无显著差异。可见,接种菌株能提高水稻的抗氧化物类黄酮和总酚的含量,降低 $O_2^{\cdot-}$ 的含量,增强水稻的镉耐性。

3 讨论

3.1 假单胞菌 TCd-1 降低了成熟期水稻的镉含量

已有研究表明,一些耐重金属的细菌可通过细胞壁吸附、胞外沉淀和整合、胞内累积和转化、以及抗氧化系统等作用,缓解重金属污染对植物的毒害作用^[5]。刘悦畅等^[28]在农田土壤中添加沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*) 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌液,发现添加的微生物能够促进小白菜的生长,其主要作用途径为添加的菌液降低了土壤中镉的生物有效性,小白菜对镉的吸收减少,减轻了镉毒害;李

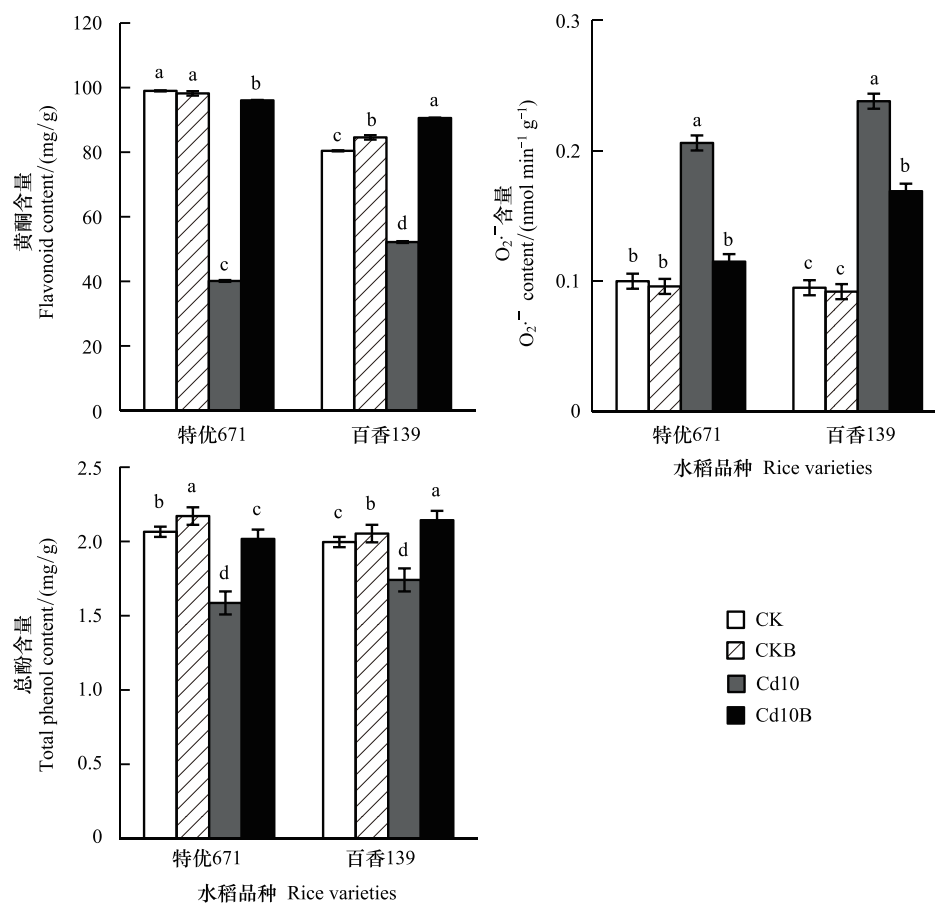


图5 不同处理水稻抽穗期类黄酮含量、总酚含量、 $O_2^{\cdot-}$ 含量

Fig.5 Flavonoid content, total phenol content, and $O_2^{\cdot-}$ content of rice at heading stage under cadmium stress

图中不同小写字母代表差异显著性($P < 0.05$)

晴晴等^[29]发现施用解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) FH-1 菌剂可显著促进大田种植水稻的生长;陆仲烟等^[30]发现伯克氏菌(*Burkholderia* sp.D54)能显著提高 10 mg/L 镉处理水稻根的鲜重。赵树民等^[31]发现巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) LY02 对镉和铜污染土壤修复具有作用,能够显著促进黑麦草的生长。本研究发现假单胞菌 TCd-1 可显著减少不同镉耐性水稻对镉的吸收,这与其分离自水稻根际土壤,能够成功在水稻根际,并且具有极强的镉耐性及镉富集能力有关。同时它是一种具有较强的根际集群能力的植物根际促生菌^[17],还可能代谢产生铁载体、分泌植物抗病物质及生长调节物质等,从而调解了水稻的生长^[14,32-33]。

3.2 假单胞菌 TCd-1 通过提高水稻根系活力和光合作用促进镉胁迫水稻的生长

研究表明,镉污染可破坏叶绿素等光合色素的合成,改变 Chla/Chlb,造成 PSI、PS II 和捕光色素—蛋白质复合体的解体或抑制其光合作用蛋白的形成,从而影响光合作用能量传递链上的电子传递等过程^[13]。 Cd^{2+} 进入植物细胞后还能取代叶绿体中存在的 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等二价阳离子,并与叶绿体中相应的蛋白结合,如含—SH 的蛋白,导致叶绿体结构破坏,抑制叶绿素前体复合物合成,促进叶绿素降解,降低植物叶绿素含量和光合作用^[14]。同时,已有研究表明假单胞菌属的菌株可分泌铁载体与重金属 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 等结合形成稳定的复合物,降低土壤中重金属的浓度,缓减重金属对植物根系的毒害作用,促进植株生长^[15]。李文华等^[34]研究发现,卡伍尔链霉菌 TJ430 (*Streptomyces cavourensis* TJ430) 和荧光假单胞菌 P32 (*Pseudomonas fluorescens* P32) 能显著提高分蘖期水稻的叶绿素含量,降低水稻的镉含量,有利于水稻生长。本研究表明,接种菌株显著提高了在镉污染水稻“特优 671”和“百香 139”的根系活力、Pn、Chla 以及 Chlb 含量,有效地缓解了镉污染

对不同镉耐性水稻的光合抑制作用。这与菌株能够改变根际土壤镉的生物有效性,抑制水稻对镉的吸收、降低根际土壤的镉毒性,减少镉自根系向地上部迁移,进而减轻镉对叶绿体的破坏,提高叶绿素含量,增强了光合作用有关。也可能与菌株通过增强次生代谢物(如植物生长素、解毒物质等)直接或间接促进根系生长、增强根系活力,促进了叶绿素合成,诱导水稻镉抗性增强有关。

3.3 假单胞菌 TCd-1 通过提高水稻抗氧化系统能力及抗氧化物质含量,增强了水稻镉耐性

一些研究表明,植物重金属毒害的重要机理是活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)引起的氧化胁迫^[13,35-36], Shah 等^[37]研究发现,低浓度镉处理可使 SOD、POD 活性提高,高浓度镉处理则相反,即表现为“低促高抑”现象。本研究发现,镉胁迫下“特优 671”和“百香 139”叶片的 SOD、POD、CAT 活性均显著下降,MDA、 $O_2^{\cdot-}$ 含量均显著上升,表明镉污染导致水稻出现明显的氧化胁迫作用,水稻抗氧化酶活性显著下降与镉诱导了植物体内活性氧产生、调节相关蛋白的降解与合成,并进一步促使细胞发生膜脂质的过氧化作用有关^[38]。本研究发现接种菌株后水稻叶片的 SOD、POD、CAT 活性显著提高,MDA 含量显著降低,这与镉胁迫时水稻叶片通过调节抗氧化物质含量应对逆境条件下带来的氧化胁迫效应有关^[39]。植物体内常见的抗氧化物质有黄酮类和总酚、 β -胡萝卜素、生育酚(维生素 E)、抗坏血酸(维生素 C)、谷胱甘肽等,其中抗氧化活性较强的总酚类和黄酮类等,在逆境条件下保护植物体内生物大分子免受氧化损伤,维持植株正常生长中发挥重要作用^[40]。这与本研究镉处理下水稻叶片的类黄酮和总酚含量均显著下降,接种菌株后其含量显著提高,同时 MDA、 $O_2^{\cdot-}$ 含量显著降低的结果一致。可见,接种菌株能明显提高水稻的抗氧化能力,这可能是由于接种假单胞菌能够吸收、固定和转化土壤中的镉,减少了土壤中镉的有效态,缓解了镉胁迫,从而降低植株体内 $O_2^{\cdot-}$ 等物质的积累,减轻活性氧或其他过氧化物自由基对水稻细胞的伤害,保护了细胞膜功能的完整性,从而缓解镉毒害。

参考文献 (References):

- [1] 张云霞,周浪,肖乃川,庞瑞,宋波. 鬼针草(*Bidens pilosa* L.)对镉污染农田的修复潜力. 生态学报, 2020, 40(16): 5805-5813.
- [2] 刘斌,黎天勇,蔡扬尧. “镉大米”的现状、危害及修复方法简述. 现代食品, 2018, 11(21): 86-89.
- [3] 刘珊珊. 大米镉含量分析及镉结合蛋白的分离纯化[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2014.
- [4] 王鹏云,晁代印. 重金属污染的植物修复及相关分子机制. 生物工程学报, 2020, 36(3): 426-435.
- [5] 陈亚刚,陈雪梅,张玉刚,龙新宪. 微生物抗重金属的生理机制. 生物技术通报, 2009, (10): 60-65.
- [6] Macaskie L E, Dean A C R, Cheetham A K, Jakeman R J B, Skarnulis A J. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp.: the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells. Microbiology, 1987, 133(3): 539-544.
- [7] Mclean J, Beveridge T J. Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(3): 1076-1084.
- [8] Valenzuela C, Campos V L, Yañez J, Zaror C A, Mondaca M A. Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-enriched sediments from Camarones River, northern Chile. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 82(5): 593-596.
- [9] Barton L L, Fekete F A, Marietta E V, Nuttall H E Jr, Jain R. Potential for bacterial remediation of waste sites containing selenium or lead// Sabatini D A, Knox R C, eds. Transport and Remediation of Subsurface Contaminants: Colloidal, Interfacial and Subsurface Phenomena. Washington: American Chemical Society, 1992: 99-107.
- [10] 赵光. 促进植物吸收土壤重金属的产酸菌的筛选鉴定及特性研究. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9696-9698.
- [11] 孙亚莉,徐庆国,贾巍. 镉胁迫对水稻的影响及其调控技术研究进展. 中国农学通报, 2017, 33(10): 1-6.
- [12] 章秀福,王丹英,储开富,杨春刚,牟仁祥,陈铭学,朱智伟,何庆富,廖西元. 镉胁迫下水稻 SOD 活性和 MDA 含量的变化及其基因型差异. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 194-198.
- [13] 秦天才,阮捷,王腊娇. 镉对植物光合作用的影响. 环境科学与技术, 2000, (S1): 33-35, 44-44.
- [14] Andresen E, Küpper H. Cadmium toxicity in plants. Metal ions in Life Sciences, 2013, 11: 395-413.
- [15] Rajkumar, Ae N, Prasad M N V, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends in Biotechnology, 2010, 28(3): 142-149.
- [16] 张清航,张永涛. 植物体内丙二醛(MDA)含量对干旱的响应. 林业勘查设计, 2019, (1): 110-112.
- [17] 何小三,王微,肖清铁,郑新宇,郑梅琴,朱静静,韩永明,汪敦飞,林瑞余,林文雄. 铜绿假单胞菌对镉胁迫水稻苗期生长与镉积累的

- 影响. 中国生态农业学报, 2018, 26(6): 884-891.
- [18] 周丽英, 叶仁杰, 林淑婷, 刘杰, 肖清铁, 林素兰, 李艺, 林文雄, 林瑞余. 水稻根际耐镉细菌的筛选与鉴定. 中国生态农业学报, 2012, 20(5): 597-603.
- [19] 段慧, 李奔仙, 魏永胜, 康靖全. 根系活力检测中保险粉用量的确定. 西北农业学报, 2019, 28(2): 267-272.
- [20] 胡秉芬, 黄华梨, 季元祖, 赵晓芳, 戚建莉, 张露荷, 张广忠. 分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度. 草业科学, 2018, 35(8): 1965-1974.
- [21] 汪敦飞, 郑新宇, 肖清铁, 王微, 林瑞余. 铜绿假单胞菌对镉胁迫苗期水稻根系活力及叶片生理特性的影响. 应用生态学报, 2019, 30(8): 2767-2774.
- [22] 李仕飞, 刘世同, 周建平, 罗天雄. 分光光度法测定植物过氧化氢酶活性的研究. 安徽农学通报, 2007, 13(2): 72-73.
- [23] 李忠光, 龚明. 愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 323-324.
- [24] 王学标, 何云侠, 刘强. 福林酚试剂法与缩二脲试剂法测定饲用蛋白酶活力的比较分析. 畜牧与兽医, 2019, 51(3): 23-28.
- [25] 汪承润, 何梅, 李月云, 姜传军, 田刘敏, 王勤英. 植物体超氧阴离子自由基不同检测方法的比较. 环境化学, 2012, 31(5): 726-730.
- [26] 邱秋金, 谢惠玲, 李圆萍, 王微, 陈珊, 肖清铁, 郑新宇, 林瑞余, 林文雄. 看麦娘根系对小麦根水提液化感作用的生理响应. 中国生态农业学报, 2015, 23(2): 233-238.
- [27] 蒙明姜, 李丽, 俞兰. 原子吸收分光光度法测定水溶液中镉含量. 中国药业, 2018, 27(16): 17-20.
- [28] 刘悦畅, 李保珍, 王涛, 王兰. 2 种菌联合修复农田土壤镉污染的研究. 水土保持学报, 2020, 34(4): 364-369.
- [29] 李晴晴, 徐松, 赵维, 杨榕, 赵思崎, 黄志勇, 王敬敬. 根际微生物组介导的解淀粉芽孢杆菌 FH-1 对水稻的促生机制. 微生物学报, 2019, 59(12): 2410-2426.
- [30] 陆仲烟, 宋正国, 郭军康, 张长波, 沈跃, 刘仲齐. 伯克氏菌对水稻种子萌发及初生幼苗耐镉性的影响. 农业资源与环境学报, 2013, 30(6): 87-90.
- [31] 赵树民. 巨大芽孢杆菌 LY02 对黑麦草修复重金属污染土壤的强化作用[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.
- [32] 刘炳花, 萨日娜, 葛蓓宇, 刘艳, 施李鸣, 阿拉坦夫, Newt T T, 张克诚. 在水分胁迫下根际促生菌 A2 对小麦萌芽期和苗期的促生效应. 中国农学通报, 2016, 32(29): 64-69.
- [33] 龙伟文, 王平, 冯新梅, 胡正嘉, 李阜棣. PGPR 与 AMF 相互关系的研究进展. 应用生态学报, 2000, 11(2): 311-314.
- [34] 李文华. 卡伍尔链霉菌 TJ430 和荧光假单胞菌 P32 的镉吸附机理及对水稻镉积累特性影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [35] Gallego S M, Pena L B, Barcia R A, Azpilicueta C E, Iannone M F, Rosales E P, Zawoznik M S, Groppa M D, Benavides M P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. Environmental and Experimental Botany, 2012, 83: 33-46.
- [36] 白红红, 章林平, 王子民, 王兴春, 邵国胜. 锰对水稻亚铁毒害的缓解作用. 中国水稻科学, 2013, 27(5): 491-502.
- [37] Shah K, Kumar R G, Verma S, Dubey R S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Science, 2001, 161(6): 1135-1144.
- [38] 肖清铁, 戎红, 周丽英, 刘杰, 林文雄, 林瑞余. 水稻叶片对镉胁迫响应的蛋白质差异表达. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1013-1019.
- [39] 史静, 潘根兴, 夏运生, 张仕颖, 张乃明. 镉胁迫对两品种水稻生长及抗氧化酶系统的影响. 生态环境学报, 2013, 22(5): 832-837.
- [40] Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13(10): 572-584.