

# 小白菜联合铜绿假单胞菌对田间 铅污染土壤的修复

金 羽<sup>1,2</sup>, 曲娟娟<sup>1</sup>, 闫立龙<sup>1</sup>, 孙兴滨<sup>3</sup>

(1. 东北农业大学 资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨工业大学 市政与环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**针对土壤中铅(Pb)污染的生物修复,在种植小白菜的田间 Pb 处理土壤中,接种 1 株耐 Pb 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) M2 菌株,研究其对小白菜吸收 Pb 的影响。结果表明:接种 M2 可以降低土壤 Pb 污染对小白菜生长的抑制作用,促进小白菜对土壤 Pb 的吸收,使接种组小白菜生物量和株高分别增加 7% 和 12%,根际土壤 Pb 残留量降低 7% 左右;接种处理的土壤脲酶和转化酶活性在小白菜整个生长期均较未接种组高。结合前期盆栽试验结果得出,接种耐铅铜绿假单胞菌 M2,可以促进小白菜对 Pb 污染土壤的修复。

**关键词:**小白菜;铜绿假单胞菌;Pb 污染;生物修复

**中图分类号:**X53

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2013)08-0032-05

目前,我国土壤重金属污染问题严峻,土壤的生态环境受到了极大影响,不仅损失大量可利用土地,还通过生物富集作用严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。研究表明,汽车尾气排放、农药施用、生活垃圾的处理、采矿及冶炼过程等都会向环境释放大量 Pb 元素,使土壤 Pb 污染最为普遍<sup>[3]</sup>。近些年,土壤重金属污染的预防和修复工作成为研究热点,而土壤生物修复方法,以其投资少、环境友好以及无二次污染等优势而备受关注<sup>[4]</sup>。

超富集植物以其高效的重金属吸收能力被广泛关注,随着国内外大量超富集植物的发现,植物修复技术研究的重心逐渐由筛选和发现超富集植物向提高其修复效率转变<sup>[5-6]</sup>。细菌可以分泌有益代谢产物,如有机酸、酶等物质,对土壤重金属具有活化作用,并且对植物生长具有促进作用。有试验表明,菌株 WS34(*Burkholderia* sp.) 能明显提高供试植物的生物量和 Pb、Cd 吸收量<sup>[7]</sup>;向 Cu 污染土壤中接种 MS3 菌株能够有效促进植物对 Cu 的吸收<sup>[8]</sup>;接种耐 Zn 细菌可以提高遏蓝菜植株地上部鲜重和 Zn 含量<sup>[11]</sup>。有研究认为,耐

重金属细菌可能分泌某些小分子酸性有机物质,提高某些金属元素的生物活性,使植物更有效地利用土壤中的 P、K 等元素。同时这些酸性物质也会改变重金属元素的存在状态,从而促进植物对 Pb 的吸收<sup>[12-13]</sup>。已有研究表明,Pb 对脲酶、蔗糖酶活性均有抑制作用<sup>[18]</sup>,土壤脲酶、碱性磷酸酶对铅锌矿较为敏感,而蔗糖酶和过氧化氢酶受到的抑制作用不明显<sup>[19]</sup>。在前期盆栽试验的基础上<sup>[9]</sup>,进行田间试验,在 Pb 处理的田间土壤中种植小白菜,然后向土壤中接种耐 Pb 细菌(*Pseudomonas aeruginosa* M2),通过测定处理组与对照组小白菜植株生物量、植株以及根际土壤 Pb 含量,土壤酶活性等指标,考查接种耐铅细菌 M2 对小白菜吸收土壤中 Pb 的影响,以期对土壤 Pb 污染的生物修复提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试土壤 黑土,有机质含量为 2.13%,全氮为 2.24 g·kg<sup>-1</sup>,全磷为 2.14 g·kg<sup>-1</sup>,全钾为 3.23 g·kg<sup>-1</sup>,碱解氮为 239 mg·kg<sup>-1</sup>,速效磷为 110 mg·kg<sup>-1</sup>,速效钾为 204 mg·kg<sup>-1</sup>,pH 为 6.3,土壤铅含量为 46 mg·kg<sup>-1</sup>。

1.1.2 供试植物 小白菜,扬州青 1 号,由东北农业大学园艺学院提供。

1.1.3 供试菌株 铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) M2,由该课题组实验室保存。

收稿日期:2013-07-01

基金项目:环保公益性行业科研专项资助项目(2010467038)

第一作者简介:金羽(1979-),女,黑龙江省伊春市人,博士,讲师,从事环境生物技术研究。E-mail: jinyu1022@126.com。

通讯作者:曲娟娟(1974-),女,山东省龙口市人,博士,教授,博士生导师,从事生物修复、废弃物处理与资源化研究。E-mail: juanjuanqu@126.com。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备 将铜绿假单胞菌 M2 接种至细菌液体培养基中,在 30℃振荡培养 48 h 后离心收集菌体,用无菌生理盐水洗涤沉淀,重新悬浮后将菌悬液稀释至  $10^8$  个 $\cdot$ mL $^{-1}$ ,待用。

1.2.2 土壤的处理 用 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 作为土壤 Pb 污染物,首先将 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶解至一定量的水中,均匀喷洒到过 3 mm 筛的试验土壤里,用混匀机混匀,控制土壤 Pb 质量分数为 600 mg $\cdot$ kg $^{-1}$  左右,以不添加 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的土壤为对照。含 Pb 土壤及对照土壤均以 15 cm 高度分别做畦,小区面积 1 m<sup>2</sup>。

1.2.3 试验设计 田间试验在东北农业大学温室内进行,试验设 3 个处理。处理 A:小白菜种植于用 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 处理的土壤中,不接种铜绿假单胞菌 M2;处理 B:小白菜种植于用 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 处理的土壤中,移栽后第 3 天(植株已缓苗)接种铜绿假单胞菌 M2,每小区施入菌液 1 000 mL;对照(CK):小白菜种植于不添加 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 的土壤中,不接种铜绿假单胞 M2。

将 2 片真叶期的小白菜植株移栽到相应的畦中,株距 10 cm,行距 20 cm,每小区种植 50 株,常规管理。各小区随机区组排列,小区之间采用苯板隔断,以减少水肥互渗带来的试验误差。

1.2.4 样品采集及分析 植株移栽后第 7 天开始采样,每 7 d 随机采样一次,连续采样 6 次。采样时沿土壤平面剪下小白菜地上部分,测量植株高度、鲜重,同时洗出根系,将样品于 105℃杀青 30 min 后在 70℃下烘干到恒重。烘干样品全部粉碎,采用混合酸法(HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub>)消解,通过

火焰原子吸收光谱仪(岛津,AA-6300)测定地上部、地下部及根际土壤中 Pb 含量。

土壤样品脲酶、磷酸酶、转化酶及过氧化氢酶活性的测定,均采用标准方法进行<sup>[10]</sup>。脲酶活性以 24 h 后 1 g 干土中含 NH<sub>3</sub>-N 的毫克数来表示;磷酸酶的活性以 1 g 土壤 2 h 产生的 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的毫克数来表示;转化酶活性以每 5 g 干土 24 h 生成葡萄糖的毫克数来表示;过氧化氢酶活性以 1 g 干土 20 min 内消耗 0.02 mol $\cdot$ L $^{-1}$  KMnO<sub>4</sub> 的毫升数表示。

1.2.5 数据统计与分析 数据测量结果均为 3 次重复的平均值,用 SPSS 20.0 软件对所测数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 小白菜生物量及 Pb 含量

不同处理条件下,小白菜生物量和 Pb 含量见表 1,随着生长时间的延长,处理组 A、B 和对照组 CK 的小白菜地上部和根部生物量均呈现增加的趋势,在第 42 天时均达到最高;而对于每个取样期,B 组生物量均高于 A 组,但二者生物量均低于 CK。可见 Pb 污染对小白菜生长有抑制作用。在整个取样期内,CK 的生物量较处理组高 6.5%~21.0%,未接种 M2 的 A 组小白菜生物量最低,其平均值较 CK 低了 15%,接种 M2 的 B 组生物量平均值较 CK 低了 8%。小白菜植株高度变化与生物量变化的趋势相同,处理组的植株高度较 CK 低 3%~22%,未接种 A 组平均值比 CK 低 18%,而接种组 B 组较 CK 平均低 6%。可见,菌株 M2 可以降低重金属 Pb 对小白菜的影响。

表 1 不同处理下小白菜的生物量和 Pb 含量分析

Table 1 The analysis of pakchoi biomass and Pb content on different treatment

采样时间/d Sampling time	处理 Treatment	植株生物量/g Plant biomass	植株高度/cm Plant height	地上部 Pb 含量/mg $\cdot$ kg $^{-1}$ Pb content in aboveground tissues	根部 Pb 含量/mg $\cdot$ kg $^{-1}$ Pb content in root
7	CK	5.2 $\pm$ 1.39 a	6.9 $\pm$ 0.71 a	5.06 $\pm$ 0.39 c	6.01 $\pm$ 0.15 c
	A	4.7 $\pm$ 1.25 a	5.4 $\pm$ 0.79 a	56.20 $\pm$ 1.21 b	78.90 $\pm$ 1.26 b
	B	5.1 $\pm$ 1.76 a	6.1 $\pm$ 1.11 a	79.31 $\pm$ 0.91 a	107.04 $\pm$ 2.21 a
14	CK	10.8 $\pm$ 1.72 a	9.3 $\pm$ 0.62 a	5.26 $\pm$ 0.63 c	6.39 $\pm$ 0.29 c
	A	8.7 $\pm$ 1.10 a	8.1 $\pm$ 1.04 a	77.52 $\pm$ 0.76 b	94.13 $\pm$ 1.45 b
	B	9.9 $\pm$ 1.51 a	9.1 $\pm$ 1.92 a	91.37 $\pm$ 1.54 a	118.51 $\pm$ 1.82 a

续表 1

Continuing Table 1

采样时间/d Sampling time	处理 Treatment	植株生物量/g Plant biomass	植株高度/cm Plant height	地上部 Pb 含量/mg·kg <sup>-1</sup> Pb content in aboveground tissues	根部 Pb 含量/mg·kg <sup>-1</sup> Pb content in root
21	CK	18.2±1.45 a	14.9±2.37 a	5.74±0.66 c	6.65±0.59 c
	A	15.6±1.65 a	12.7±1.13 b	83.72±1.59 b	114.65±1.29 b
	B	16.5±1.37 a	14.2±1.42 a	118.55±1.38 a	136.38±2.44 a
28	CK	24.7±1.52 a	19.4±2.05 a	6.56±0.35 c	7.15±0.42 c
	A	21.4±1.91 a	15.2±1.44 b	95.97±0.82 b	125.45±1.36 b
	B	22.8±1.73 a	18.8±0.71 a	126.21±1.37 a	142.76±1.67 a
35	CK	30.3±1.46 c	22.1±1.83 a	7.23±0.64 c	7.46±0.22 c
	A	24.0±1.39 b	18.5±1.13 b	111.24±2.52 b	138.35±2.36 b
	B	27.1±1.20 a	20.2±0.89 a	134.53±1.79 a	161.16±1.72 a
42	CK	38.8±1.52 c	27.8±1.79 a	7.75±0.37 c	8.15±1.16 c
	A	30.7±1.01 b	22.4±1.21 b	124.63±2.41 b	147.62±1.14 b
	B	33.7±1.23 a	25.6±1.02 a	156.47±1.51 a	176.55±2.39 a

注:表中的数据形式是均值±方差,平行测量 3 次;小写字母(a,b,c)代表差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: The data in form is mean value ± variance, three parallel measurements; lowercases(a,b,c) represent significant difference( $P<0.05$ ). The same below.

处理组小白菜植株 Pb 浓度也随生长时间的延长而增加,且 B 组高于 A 组,与 CK 显著差异,以第 42 天采集样品为例,A 组地上部和根部 Pb 浓度分别比 CK 高 117 和 130 mg·kg<sup>-1</sup>;B 组地上部和根部 Pb 浓度分别比 CK 高 148 和 168 mg·kg<sup>-1</sup>。小白菜具有吸收土壤中重金属 Pb 的能力,接种菌株 M2 促进了小白菜对 Pb 的吸收。另外,小白菜根部所含 Pb 浓度略高于地上部分,可见,小白菜通过根系吸收土壤中的 Pb,并将其从根部转移到地上部分。由显著性分析可知,CK 的小白菜 Pb 浓度与处理组差异极显著,而处理组中 B 组和 A 组之间差异显著。在为期 42 d 的取样期内,与未接种

M2 的 A 组相比,接种的 B 组小白菜地上部 Pb 浓度平均增加了 11%,而根部 Pb 浓度平均增加了 22%。

## 2.2 土壤 Pb 残留量

不同采样时间根际土壤 Pb 残留量见表 2,可以看出,无论是否接种菌株 M2,种植小白菜均可吸收土壤中的 Pb,且土壤 Pb 背景值较高时,生物修复后土壤 Pb 残留量也较高,但从吸附率的计算可以看出,经过 42 d 修复,CK 的土壤 Pb 含量降低了 17%,而未接种 M2 的 A 组和接种 M2 的 B 组分别降低了 21%和 28%,接种 M2 可以使土壤 Pb 残留减少 7%。不同采样期,接种 M2 的 B

表 2 不同采样时间的根际土壤 Pb 残留量分析

Table 2 The Pb residual quantity in rhizosphere soil of different sampling time

处理 Treatment	采样时间 Sampling time/d					
	7	14	21	28	35	42
CK	42.74±0.15 c	41.03±0.47 c	40.62±0.98 c	39.10±0.05 c	38.07±0.13 c	37.99±0.35 c
A	560.67±2.43 b	526.50±3.76 b	511.68±2.42 b	503.45±3.65 b	483.65±4.18 b	472.04±2.53 b
B	534.61±4.36 a	492.98±2.56 a	482.63±3.22 a	469.76±2.06 a	455.59±3.04 a	429.70±3.08 a

组根际土壤。Pb 残留浓度均低于未接种的 A 组,6 次采样的土壤 Pb 残留浓度平均值,B 组较 A 组低了 29 mg·kg<sup>-1</sup>,可见,在 Pb 浓度为 600 mg·kg<sup>-1</sup>的土壤中,小白菜可以有效修复土壤 Pb 污染,且 M2 能够有效促进小白菜对 Pb 的吸收,使接种菌株 M2 的 B 组较未接种的 A 组根际土壤 Pb 去除率平均提高 7%左右。

表 3 不同采样时间土壤酶活性分析

Table 3 The analysis of soil enzyme activity on different sampling time

采样时间/d Sampling time	处理 Treatment	脲酶 Urease	中性磷酸酶 Phosphatase	转化酶 Invertase	过氧化氢酶 Catalase
7	CK	10.12±0.39 b	1.38±0.08 a	46.06±1.39 a	2.14±0.15 a
	A	8.03±0.73 c	1.24±0.07 a	43.24±1.21 b	1.87±0.06 b
	B	12.43±0.28 a	1.31±0.11 a	48.31±2.07 a	2.26±0.21 a
14	CK	11.33±0.12 b	1.43±0.17 ab	46.96±1.63 a	2.39±0.02 a
	A	8.79±0.36 c	1.31±0.04 b	43.88±2.76 b	1.93±0.05 b
	B	13.95±0.88 a	1.54±0.12 a	48.37±0.54 c	2.43±0.11 a
21	CK	11.92±0.44 b	1.49±0.37 a	47.63±1.66 a	2.42±0.03 b
	A	9.16±0.71 c	1.37±0.13 a	45.31±2.59 b	2.07±0.09 c
	B	14.51±0.83 a	1.62±0.42 a	49.89±1.38 b	2.65±0.04 a
28	CK	12.76±0.95 b	1.58±0.05 a	48.25±2.35 a	2.45±0.02 b
	A	9.94±0.51 c	1.39±0.04 b	47.97±0.82 a	2.16±0.07 c
	B	15.86±0.22 a	1.68±0.21 a	53.21±1.73 b	2.73±0.08 a
35	CK	13.37±0.19 b	1.61±0.32 ab	50.23±1.08 a	2.46±0.07 b
	A	11.15±0.47 c	1.45±0.13 b	49.14±1.52 a	2.19±0.05 c
	B	17.10±0.93 a	1.72±0.07 a	56.42±2.79 b	2.68±0.11 a
42	CK	14.85±0.88 b	1.70±0.19 a	53.75±1.37 a	2.54±0.09 b
	A	12.47±0.76 c	1.41±0.21 a	51.44±1.86 b	2.23±0.06 c
	B	18.77±0.41 a	1.83±0.32 a	60.75±2.33 c	2.97±0.09 a

试验结果表明,土壤中 Pb 对土壤酶活性具有抑制作用,接种耐 Pb 菌株 M2 可以降低 Pb 对土壤酶活的影响。另外,土壤不同酶活随着小白菜生长时间变化的趋势各不相同。接种耐 Pb 菌株 M2 的 B 组样品土壤脲酶活性最高,6 次取样测定平均值显示,接种菌株 M2 的 B 组根际土壤脲酶活性比未接种的 A 组提高 5.51 mg(1 g 干土 24 h 产生 NH<sub>3</sub>-N 的毫克数);同样 B 组土壤转化酶较 A 组提高 5.99 mg(5 g 干土 24 h 产生葡萄糖的毫克数)。B 组与 A 组的过氧化氢酶和中性磷酸酶活性差异较小,但 B 组与 A 组的中性磷酸酶在第 14 天、第 28 天和第 35 天时出现显著差异,而第 14 天和第 35 天时,A 组、B 组与 CK 差

2.3 不同处理土壤酶活性分析

土壤酶是评价土壤状态的主要指标<sup>[14]</sup>。脱氢酶、脲酶和磷酸酶主要来自于土壤微生物、植物根系和原生动物,对植物养分转化尤为重要<sup>[15]</sup>。因此,通过测定土壤主要酶活性变化,可以分析耐 Pb 菌株 M2 对 Pb 污染土壤产生的影响。表 3 为不同采样时间土壤酶活性变化情况。

异分别不显著。各处理在第 21 天至第 42 天时,过氧化氢酶活性存在显著差异( $P<0.05$ ),而其它时期 CK 和 B 组没有显著差异,但是二者均与 A 组差异显著。由此可见,接种耐 Pb 菌株 M2 对土壤的酶活产生了影响,其中,脲酶及转化酶受其影响显著,其它两种酶只在小白菜某个生长期出现显著差异,可见植物所处的生长期也会对土壤酶活产生影响,这与该课题组另外盆栽试验的研究结果<sup>[9]</sup>相符。

3 结论

通过田间栽培试验可知,接种耐铅铜绿假单胞菌 M2 可以降低土壤 Pb 污染对小白菜生长的抑制作用,使小白菜植株生物量和株高分别增加

7%和12%;同时促进小白菜对土壤 Pb 的吸收,使根际土壤 Pb 残留量较未接种降低 7%左右;接种铜绿假单胞菌 M2,在整个生长期均提高了土壤脲酶和转化酶活性。结合前期盆栽试验结果,认为接种耐铅铜绿假单胞菌 M2 可以促进小白菜对 Pb 污染土壤的修复。

#### 参考文献:

- [1] 黄鸿翔. 我国土壤资源现状、问题及对策[J]. 土壤肥料, 2005(1):3-6.
- [2] 赵庆龄,张乃弟,路文如. 土壤重金属污染研究回顾与展望Ⅱ:基于三大学科的研究热点与前沿分析[J]. 环境科学与技术,2010,33(7):102-106.
- [3] 崔德杰,张玉龙. 土壤重金属污染现状与修复技术研究进展[J]. 土壤通报,2004,35(3):366-370.
- [4] 腾应,骆永明,李振高. 污染土壤的微生物修复原理与技术进展[J]. 土壤,2007,39(4):497-502.
- [5] Sun R L, Zhou Q X, Jin C X. Cadmium accumulation in relation to organic acid in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator[J]. Plant and Soil, 2006,185,125-134.
- [6] 廖晓勇,陈同斌,阎秀兰,等. 提高植物修复效率的技术途径与强化措施[J]. 环境科学学报,2007,27(6):881-893.
- [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.
- [8] 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.
- [9] 陈宝,徐晓萌,曲娟娟,等. 铜绿假单胞菌 M2 联合小白菜对 Pb 污染土壤的生物修复[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2012,38(6):732-740.
- [10] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社,1986:45-60.
- [11] Whiting S N, De S, Terry N. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35 (15): 3144-3150.
- [12] 陈素华,孙铁珩,周启星,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.
- [13] De Souza M, Huang C, Chee N, et al. Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants[J]. Planta, 1999, 209(2): 259-263.
- [14] 刘敬武,单爱琴,揣小明. 重金属离子 Cd<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> 污染对土壤酶活的影响[J]. 污染防治技术,2008,21(1):19-22.
- [15] 段学军,闵航. Cd 胁迫下稻田土壤生物活性与酶活性综合研究[J]. 农业环境科学学报,2004,23(3):422-427.
- [16] 李廷强,朱恩,杨肖娥,等. 超积累植物东南景天根际土壤酶活性研究[J]. 水土保持学报,2007,21(3):112-117.
- [17] 王建坤,张小平,周薇. 铅锌矿区土壤微生物区系及酶活性调查[J]. 环境监测管理与技术,2009,21(4):23-27.

## Field Test of Bio-remediation of Lead Polluted Soil by *Pseudomonas aeruginosa* Strain M2 Combined with Pakchoi

JIN Yu<sup>1,2</sup>, QU Juan-juan<sup>1</sup>, YAN Li-long<sup>1</sup>, SUN Xing-bin<sup>3</sup>

(1. College of Resources and Environmental science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090; 3. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

**Abstract:** For the bio-remediation of Pb pollution in soil, a strain of Pb tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* M2 was inoculated to field cultivated pakchoi and its effects on the lead absorption by pakchoi in Pb contaminated soil was investigated. The results showed that: M2 vaccination could reduce the inhibition of soil Pb pollution on the growth of pakchoi and promote absorption of Pb in soil, the plant biomass and height were increased by 7% and 12%, respectively. At the same time, the soil Pb residual quantity in rhizosphere reduced about 7% compared with non-inoculated groups. Throughout the growth period of pakchoi, for the inoculated groups, the soil urease and invertase activities were increased. In conclusion, inoculating with Pb tolerant bacterium *Pseudomonas aeruginosa* M2 to Pb polluted soil could promote the bio-remediation of Pb by pakchoi in soil.

**Key words:** pakchoi; *Pseudomonas aeruginosa*; Pb pollution; bio-remediation