

微生物对植物修复重金属污染土壤的促进效果*

杨 卓^{1,2} 王占利³ 李博文^{2**} 张瑞芳⁴

(¹ 中国环境管理干部学院, 河北 秦皇岛 066004 ; ² 河北农业大学资源与环境科学学院, 河北 保定 071001 ; ³ 保定学院资源与环境系, 河北 保定 071000 ; ⁴ 河北农业大学河北省山区研究所, 河北 保定 071001)

摘 要 以印度芥菜作为超富集植物, 通过盆栽试验研究了巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂、黑曲霉 30177 发酵液对植物修复 Cd、Pb、Zn 污染土壤的作用. 结果表明: 巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂不仅可以促进超富集植物的生长, 增强超富集植物对土壤 Cd、Pb、Zn 的吸收, 而且大幅度提高了植物的修复效率. 在添加外源可溶性 Cd、Pb、Zn 的污染土壤上, 可分别使印度芥菜提取量(以植物干质量计)提高 1.18、1.54 和 0.85 倍. 在添加底泥 Cd、Pb、Zn 污染的土壤上, 可分别使印度芥菜提取量提高 4.00、0.64 和 0.65 倍. 在底泥污染的土壤上的促进效果明显强于外源添加污染的土壤. 黑曲霉 30177 发酵液能显著促进印度芥菜对土壤 Cd、Pb、Zn 的吸收. 在添加外源可溶性 Cd、Pb、Zn 的污染土壤上, 印度芥菜地上部 Cd、Pb、Zn 的吸收量分别比对照提高了 88.82%、129.04% 和 16.80%; 在添加底泥 Cd、Pb、Zn 污染的土壤上, 可分别比对照提高 78.95%、113.63% 和 33.85%; 但它可导致印度芥菜生物量的大幅度降低, 起不到提高植物修复提取量的效果. 经反相高效液相色谱初步分析发现, 胶质芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌发酵液中含有草酸、柠檬酸等有机酸, 有机酸对重金属有一定的溶解作用, 从而提高了重金属的生物有效性.

关键词 植物修复 微生物促进 土壤污染 镉 铅 锌

文章编号 1001-9332(2009)08-2025-07 **中图分类号** X53 **文献标识码** A

Promotion effects of microorganisms on phytoremediation of heavy metals-contaminated soil. YANG Zhuo^{1,2}, WANG Zhan-li³, LI Bo-wen², ZHANG Rui-fang⁴(¹ *Environment Management College of China, Qinhuangdao 066004, Hebei, China*; ² *College of Resources and Environmental Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China*; ³ *Department of Resources and Environment, Baoding University, Baoding 071000, Hebei, China*; ⁴ *Mountainous Area Search Institute, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.* 2009 20(8): 2025-2031.

Abstract: Taking *Brassica juncea* as a hyperaccumulator, a pot experiment was conducted to study the effects of *Bacillus gaterium* - *Bacillus mucilaginosus* mixed agent and *Aspergillus niger* 30177 fermentation liquor on the phytoremediation of Cd, Pb, and Zn-contaminated soil. The *B. gaterium* - *B. mucilaginosus* mixed agent not only promoted the growth of *B. juncea*, but also increased the soil Cd, Pb, and Zn uptake by the hyperaccumulator, with the phytoremediation efficiency enhanced greatly. The enrichment amount of Cd, Pb and Zn in *B. juncea* on the soil added with soluble Cd, Pb and Zn increased by 1.18, 1.54 and 0.85 folds, while that on the soil added with Cd, Pb and Zn-contaminated sediment increased by 4.00, 0.64 and 0.65 folds, respectively, compared with the control. *A. niger* 30177 fermentation liquor increased the soil Cd, Pb, and Zn uptake by *B. juncea*. Comparing with the control, the enrichment amount of Cd, Pb and Zn in aboveground part of *B. juncea* on the soil added with soluble Cd, Pb and Zn increased by 88.82%, 129.04% and 16.80%, while that on the soil added with Cd, Pb and Zn-contaminated sediment increased by 78.95%, 113.63% and 33.85%, respectively. However, *A. niger* 30177 fermentation liquor decreased the *B. juncea* biomass greatly, having less effect in the enhancement of phytoremediation efficiency. The analysis of reversed-phase high performance liquid chromatography showed that the

* 河北省自然科学基金项目(C2007000459)资助.
** 通讯作者. E-mail: kjli@hebau.edu.cn
2008-12-10 收稿, 2009-06-12 接受.

fermentation liquor of *B. gaterium* and *B. mucilaginosus* contained some organic acids such as oxalic acid and citric acid. These acids could dissolve the heavy metals to some degree ,and accordingly , enhance the bioavailability of the metals.

Key words : phytoremediation ; microbial promotion ; soil contamination ; cadmium ; lead ; zinc.

土壤重金属污染是指人类活动使重金属进入到土壤 ,致使土壤中重金属含量明显高于背景值 ,并造成生态环境恶化的现象. 随着工业“ 三废 ”和生活污水排放的与日俱增 ,土壤重金属污染日益严重 ,已严重影响我国农产品生产和食品安全^[1]. 土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分 ,它不仅可以指示污染土壤的生态系统稳定性 ,而且还具有巨大的潜在环境修复功能. 由此 ,污染土壤的微生物修复理论及修复技术便应运而生^[2]. 微生物的生物活性能够影响重金属的生物有效性 ,可强化植物修复效果. 微生物-植物联合修复是土壤重金属污染治理的一条重要途径 ,但其应用难度较大 ,至今尚未获得突破性进展.

土壤中重金属的生物有效性低是制约植物修复技术发展的瓶颈. 土壤微生物代谢能产生多种低分子有机酸 ,如甲酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸等^[3]. 低分子有机酸在土壤环境中可参与成土作用 ,促进矿物溶解 ,改变根际土壤理化性状 ,缓解植物根系缺氧症状 ,促进植物对养分的吸收^[4] ;同时 ,还能促进土壤中重金属的溶解^[5] ,有助于超富集植物对重金属的吸收和清除. Siegel 等^[7]报道 ,真菌可以通过分泌氨基酸、有机酸及其他代谢产物 ,溶解重金属化合物和含重金属的矿物. 因此 ,可通过微生物活动产生的代谢产物调控土壤重金属的化学行为 ,提高植物修复重金属污染土壤的效率 ,从而达到修复土壤重金属污染的目的.

印度芥菜(*Brassica juncea*)对 Cd、Pb、Zn 等具有较强的抗耐性和富集能力^[8-11] ,是目前筛选出的一种生长快、生物量大的土壤 Cd、Pb、Zn 富集植物^[12-13] ,在植物修复中具有较大的应用潜力. 黑曲

霉是工业生产柠檬酸的菌株 ,而柠檬酸对土壤重金属有较强的活化作用 ,如果能够通过黑曲霉将柠檬酸引入“ 植物-土壤 ”系统 ,将大大降低污染土壤修复的成本和风险. 巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌在代谢过程中可产生有机酸 ,对土壤矿物和重金属有一定的溶解活化作用. 本研究将产酸菌黑曲霉 (30177)及巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂投放到种植印度芥菜的 Cd、Pb、Zn 污染土壤中 ,研究其对植物修复污染土壤的活化促进效果 ,为土壤重金属污染的植物修复提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

以 Wild Garden Pangent Mix 品种印度芥菜作为本研究的重金属超富集植物 ,其种子购自于美国俄勒冈州“ Wild Garden Seed ”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 ,土壤理化性质见表 1. 供试底泥取自安新县北际头乡保定府河末梢入淀口处 ,取 0 ~ 20 cm 深的底泥 ,其理化性质见表 1 ,底泥中有效态 Cd、Pb、Zn 含量分别为 1. 70、16. 80 和 61. 50 mg · kg⁻¹.

试验用微生物黑曲霉 30177 购自中国农业微生物保藏与管理中心. 巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂由河北省微生物研究所提供.

1.2 试验设计

1.2.1 黑曲霉的活化与培养 斜面培养基 :土豆培养基 取去皮马铃薯 200 g ,切成小块 ,加水 1000 ml 煮沸 30 min ,滤去马铃薯块 ,将滤液补足至 1000 ml ,加葡萄糖 20 g、琼脂 15 g ,溶化后分装 ,121 ℃ 灭菌

表 1 供试土壤和底泥的理化性质
Tab. 1 Physical and chemical properties of tested soil and sediment

土壤类型 Soil type	重金属含量 Content of heavy metal (mg · kg ⁻¹)			有机质 Organic mater (g · kg ⁻¹)	全氮 Total N (g · kg ⁻¹)	碱解氮 Alkali- hydrolysis N (mg · kg ⁻¹)	速效磷 Available P (mg · kg ⁻¹)	速效钾 Available K (mg · kg ⁻¹)	pH	<0. 01 mm 粘粒 <0. 01 mm clay particle
	Cd	Pb	Zn							
潮褐土 Cinnamon soil	0. 83	30. 54	75. 88	10. 89	0. 63	22. 71	14. 02	98. 04	7. 4	38. 78%
底泥 Sediment	6. 86	63. 67	234. 42	24. 99	1. 56	46. 76	29. 69	107. 42	7. 9	28. 97%

30 min. 液体发酵培养基 :察氏培养基 ,121 ℃ 灭菌 45 min^[14]. 将安培瓶转移到斜面培养基上培养活化 1~2 次(28 ℃、4 d) ,将活化好的真菌转接到三角瓶液体培养(28 ℃、180 r · min⁻¹、4 d)做种子液 ,按照 10% 的接种量接种到发酵液体培养基中(28 ℃、180 r · min⁻¹) ,摇瓶中加入少量灭菌的玻璃珠以防止真菌生长时生成菌团. 7 d 左右时作简单染色观察 ,如果发酵液中已经产生大量孢子则立即停止培养 ,过滤除去发酵液 ,将菌体打碎后用无菌水稀释成菌悬液备用.

1.2.2 温室盆栽试验 盆栽试验在河北农业大学东校区日光温室中进行. 试验用塑料盆上缘直径 10 cm ,底面直径 9 cm ,高 14 cm. 将供试土壤、底泥风干后过 3 mm 筛 ,每盆装土 1 kg(以烘干土计) ,按供试底泥和土壤 1:1(质量比)混合装盆(底泥中有含量较高的长期自然状态下累积的形态各异的重金属元素) ,分两组进行试验. 第一组试验 :添加外源可溶性重金属 Cd(Ac)₂ · 2H₂O、Pb(Ac)₂ · 3H₂O 和 Zn (Ac)₂ · 2H₂O 的固体粉末 ,制成 Cd、Pb、Zn 添加量分别为 100、500 和 800 mg · kg⁻¹ 的污染土壤 ,以代表重度污染土壤 ;第二组不添加重金属 ,以代表轻度污染土壤. 每组试验设 4 个处理 ,3 次重复 ,具体的试验设计见表 2. 添加外源可溶性重金属的处理代表外源污染土壤 ,不添加外源可溶性重金属的处理代表自然污染土壤. 同时 ,每盆加入 0.2 g 尿素和 0.4 g 磷酸二氨作肥底 ,与土壤一并混合均匀装盆.

表 2 试验设计
Tab.2 Experimental design

处 理 Treatment	重金属 Heavy metal	印度芥菜 Brassica juncea	菌液 Ferment
Aa1	+	+	A
Aa2	+	-	A
Ab1	-	+	A
Ab2	-	-	A
Ba1	+	+	B
Ba2	+	-	B
Bb1	-	+	B
Bb2	-	-	B
Ca1	+	+	C
Ca2	+	-	C
Cb1	-	+	C
Ch2	-	-	C

A 接种巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂 Added *B. gaterium* and *B. mucilaginosus* compound ferment ; B :接种黑曲霉 30177 发酵液 Added *A. niger* ferment 30177 ; C :不接种微生物菌液 CK ; a)添加外源可溶性重金属 Added soluble heavy metal ; b)不添加外源可溶性重金属 Not added soluble heavy metal ; 1)种植印度芥菜 Planting *B. juncea* ; 2)不种植印度芥菜 Not planting *B. juncea*. 下同 The same below.

加蒸馏水使土壤含水量为田间持水量的 60% ,10 d 后播种印度芥菜种子 ,出苗 1 周后间苗 ,每盆保留 10 株 ,生长 30 d 接种微生物(将发酵液 200 ml 浇入土壤). 在生长的第 86 天收获 ,沿土面剪取地上部 ,测量株高、鲜质量. 植物样品在 105 ℃ 下杀青 0.5 h ,80 ℃ 下烘干至恒量 ,烘干后粉碎 ,测定植物 Cd、Pb、Zn 含量 ,同时取土测定土壤 Cd、Pb、Zn 的有效态含量. 植株体内 Cd、Pb、Zn 含量采用硝酸-高氯酸联合消煮 ,原子吸收分光光度法测定 ;土壤中有效态 Cd、Pb、Zn 含量采用 DTPA 浸提 ,原子吸收分光光度法测定.

1.2.3 巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌发酵液中有有机酸种类 采用反相高效液相色谱法测定 ,仪器 :Waters600 高效液相色谱仪 ,Waters2996 紫外吸收检测器 ,Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司) ;R201 旋转蒸发仪(上海申科机械研究所) ;Sartorius 电子微量分析天平(北京赛多利斯天平有限公司) ;PHS-25(数显)酸度计(上海精密科学仪器有限公司) ,水相针孔滤器(直径 13 mm、孔径 0.45 μm). 试剂 :试验用有机酸试剂为国产优级纯 ,试验用水为超纯水. 根据试验需要和紫外吸收情况 ,将草酸、酒石酸、甲酸、苹果酸、丙二酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、丙酸按照 0.01:0.5:1:1:1:0.5:1:1:1:1 的比例配制混合标准样品.

色谱条件 :色谱柱为反相 C18 柱 CAP Cell PAK C18 MG 4.6 mm × 250 mm 5 μm(资生堂 ,日本) ,流速 1.0 ml · min⁻¹ ,柱温 37 ℃ ,检测波长 210 nm ,进样量 20 μl ,柱温 35 ℃. 流动相 :含 0.1% 磷酸的去离子水和乙腈 ,比例(V/V)98:2 ,经孔径为 0.45 μm 的针孔滤器过滤及超声脱气后备用. pH 2~10.

在相同的色谱条件下 ,将巨大芽胞杆菌发酵液和胶质芽胞杆菌发酵液分别经针孔滤器多次过滤上机测定 ,将获得的色谱图与有机酸标准液色谱图进行对照 ,根据保留时间确定样品中的有机酸种类.

1.3 数据处理

用 SPSS 软件对数据进行处理 ,用 Duncan 方法对数据进行差异显著性分析.

植物重金属提取量(用 *Q* 表示)是印度芥菜地上部干物质量与该种植物单位干物质量吸收重金属量的乘积 ,单位为 mg · pot⁻¹ ;植物重金属富集率(用 *P* 表示)是印度芥菜重金属提取量与土壤中该种重金属总量的比值.

表 3 微生物对印度芥菜生长发育的影响
Tab. 3 Effects of microorganism on growth of *Brassica juncea*

处理 Treat- ment	生物量 Biomass (g)	平均株高 Average height (cm)	生长情况 Grow condition
Aa1	53. 64 ± 3. 28e	41. 56 ± 2. 92c	植株高大 , 陆续有黄叶
Ba1	20. 62 ± 1. 08a	22. 88 ± 1. 06a	叶黄 , 萎蔫 , 细弱
Ca1	35. 54 ± 2. 38c	37. 75 ± 2. 79c	长势一般
Ab1	60. 86 ± 3. 36f	49. 27 ± 3. 05d	生长健壮 , 开花打籽
Bb1	26. 11 ± 1. 28b	27. 04 ± 1. 98b	植株细弱 , 不健康
Cb1	42. 09 ± 2. 94d	40. 59 ± 2. 85c	长势一般

同列数据不同字母表示处理间差异显著($P < 0. 05$) Different letters in the same line meant significant difference at 0. 05 level. 下同 The same below.

2 结果与分析

2. 1 微生物处理对印度芥菜生长发育的影响

从收获时印度芥菜的生物学指标来看(表 3) , A 处理印度芥菜长势旺盛 , 顺利进入生殖生长阶段 , 开花打籽 , 其生物量和平均株高在 4 个处理中最大 ; B 处理印度芥菜生物量和平均株高均明显降低 , 生长缓慢 , 出现叶黄、植株细弱、萎蔫等现象. 这可能是黑曲霉 30177 的侵入给植物生长带来了不良影响 ; 或者是黑曲霉 30177 促进了植物对 Cd、Pb、Zn 的大量吸收 , 从而影响了其生长. 在外源污染土壤试验中 , 与对照相比 , A 处理印度芥菜生物量提高了 50. 93% , B 处理降低了 42. 99% . 在自然污染土壤试验中 , 与对照相比 , A 处理印度芥菜生物量提高了 44. 59% , B 处理降低了 37. 97% . 同时发现 , 外源污染土壤处理的印度芥菜生物量比自然污染土壤处理普遍降低 , 一般降低 4. 34% ~ 10. 63% .

2. 2 微生物处理对印度芥菜重金属吸收量的影响

从表 4 可以看出 , 受印度芥菜吸收的影响 , 土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量的变化幅度并不是很大 , 但不同处理对印度芥菜 Cd、Pb、Zn 吸收量产生了显著的影响. 在微生物诱导促进植物修复的研究中 , 土壤

重金属有效态含量随植物吸收处于一种动态变化中 , 单凭土壤中重金属有效态含量的变化 , 并不足以说明其对超富集植物的富集效果. 在外源污染土壤试验中 , A 和 B 处理印度芥菜地上部 Cd 吸收量分别比对照提高了 44. 57% 和 88. 82% , 地上部 Pb 吸收量分别比对照提高了 68. 54% 和 129. 04% , 地上部 Zn 吸收量分别比对照提高了 22. 87% 和 21. 58% . 在自然污染土壤试验中 , A 和 B 处理印度芥菜地上部 Cd 吸收量分别比对照提高了 220. 39% 和 78. 95% , 地上部 Pb 吸收量分别比对照提高了 11. 63% 和 113. 63% , 地上部 Zn 吸收量分别比对照提高了 13. 95% 和 33. 85% . 可见 , A 和 B 处理对印度芥菜富集土壤 Cd、Pb、Zn 有促进作用 , 其中对 Cd、Pb 的促进作用要强于对 Zn 的促进作用 , 并且在自然污染土壤上的促进作用要强于外源污染土壤 , 说明这两种微生物对自然污染土壤中无效态 Cd、Pb、Zn 有较强的活化作用. 土壤有效态重金属含量升高并不意味着植物吸收量同时升高 , 这主要是由于土壤有效态重金属含量一直处于动态变化过程中 , 植物根系吸收一些 , 重金属各形态之间的平衡就会被打破 , 从而释放一些 , 监测数据只是反映某一瞬间的情况 , 因此 , 不能用土壤重金属有效态含量的高低去描述植物吸收量的多少 , 二者之间并不存在正比例关系.

2. 3 微生物处理对土壤重金属有效态含量的影响

在不种植印度芥菜的条件下 , 研究接种微生物对土壤重金属有效态含量的影响. 从表 5 可以看出 , A 和 B 处理土壤 Cd、Pb、Zn 有效态含量显著增加. 在外源污染土壤试验中 , A 处理土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量分别比对照提高了 6. 13%、5. 96%、2. 65% ; B 处理土壤有效态 Cd、Pb、Zn 含量分别比对照提高了 25. 55%、2. 28%、8. 76% . 在自然污染土壤试验中 , 土壤有效态 Cd 含量变化幅度较大 , A 和 B 处理分别比对照提高了 1. 16 倍和 0. 20 倍. 说明巨大芽

表 4 微生物对印度芥菜重金属吸收量的影响
Tab. 4 Effects of microorganism on accumulation of heavy metals in *Brassica juncea*

处理 Treatment	土壤有效态含量			印度芥菜地上部吸收量		
	Content of available heavy metal in the soil (mg · kg ⁻¹)			Content of heavy metal in the shoot of <i>B. juncea</i> (mg · kg ⁻¹)		
	Cd	Pb	Zn	Cd	Pb	Zn
Aa1	36. 30 ± 3. 16b	11. 39 ± 1. 38ab	86. 20 ± 5. 98a	114. 83 ± 9. 24b	63. 42 ± 4. 55b	620. 15 ± 22. 55c
Ba1	29. 19 ± 2. 72a	15. 00 ± 1. 47c	94. 18 ± 7. 03c	149. 98 ± 9. 87c	86. 19 ± 5. 72c	613. 62 ± 20. 47b
Ca1	38. 04 ± 3. 28b	10. 00 ± 1. 34a	90. 71 ± 6. 92b	79. 43 ± 5. 07a	37. 63 ± 3. 18a	504. 72 ± 17. 26a
Ab1	0. 97 ± 0. 18a	1. 94 ± 0. 54b	8. 06 ± 1. 28b	4. 87 ± 0. 77c	5. 95 ± 1. 08b	147. 34 ± 9. 76b
Bb1	1. 20 ± 0. 26c	3. 06 ± 0. 77c	6. 96 ± 1. 09a	2. 72 ± 0. 69b	11. 28 ± 1. 27c	173. 07 ± 11. 34c
Cb1	1. 06 ± 0. 21b	0. 56 ± 0. 28a	8. 66 ± 1. 37c	1. 52 ± 0. 41a	5. 33 ± 0. 86a	129. 30 ± 8. 72a

表 5 微生物对土壤重金属有效态含量的影响
Tab.5 Effects of microorganism on contents of available heavy metal in soil (mg · kg⁻¹)

处理 Treat-ment	Cd	Pb	Zn
Aa2	32. 73 ± 3. 05a	9. 78 ± 1. 57a	87. 93 ± 5. 92b
Ba2	38. 72 ± 3. 32b	9. 44 ± 1. 46a	93. 16 ± 6. 32c
Ca2	30. 84 ± 2. 99a	9. 23 ± 1. 48a	85. 66 ± 5. 94ab
Ab2	0. 97 ± 0. 21c	1. 95 ± 0. 32b	16. 22 ± 1. 67c
Bb2	0. 54 ± 0. 19b	1. 67 ± 0. 29a	14. 10 ± 1. 52b
Cb2	0. 45 ± 0. 15a	1. 94 ± 0. 33b	11. 23 ± 1. 50a

表 6 微生物对印度芥菜 Cd、Pb、Zn 提取量的影响
Tab.6 Effects of microorganism on *Brassica juncea* extracting amount of Cd , Pb and Zn from soil

处理 Treat-ment	Cd		Pb		Zn	
	Q	P	Q	P	Q	P
Aa1	0. 616	0. 593	0. 340	0. 062	3. 326	0. 358
Ba1	0. 309	0. 298	0. 178	0. 032	1. 265	0. 130
Ca1	0. 282	0. 272	0. 134	0. 024	1. 794	0. 198
Ab1	0. 030	0. 770	0. 036	0. 077	0. 897	0. 578
Bb1	0. 007	0. 184	0. 029	0. 063	0. 452	0. 291
Cb1	0. 006	0. 166	0. 022	0. 048	0. 544	0. 351

Q :植物重金属提取量 Heavy metal extracts amounts of the plant (mg · pot⁻¹) ; P :植物重金属富集率 Heavy metal beneficiation leads of the plant.

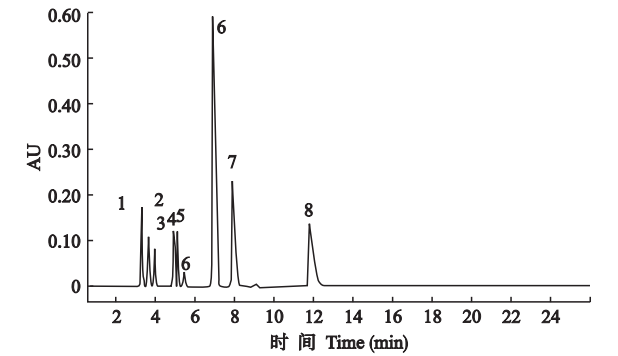


图 1 有机酸混合标准样品的色谱图
Fig.1 Chromatogram of organic acids excreted from standard solution.

1)草酸 Oxalic acid 2)酒石酸 Tartaric acid 3)甲酸 Formic acid 4)柠檬酸 Citric acid 5)乳酸 Lactic acid 6)琥珀酸 Succinic acid 7)苹果酸 Malic acid 8)丙酸 Propionic acid. 下同 The same below.

胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂对土壤 Cd 有很强的活化作用.有效态 Pb 除 B 处理有所下降外其余处理均无明显变化 ;与对照相比 A 和 B 处理土壤有效态 Zn 含量分别比对照提高了 0. 44 和 0. 26 倍.

2. 4 微生物处理对印度芥菜重金属提取量的影响

超富集植物的重金属提取量是描述植物修复土壤重金属污染效果最直观的指标之一.用植物地上部生物量干物质量与该种植物单位干物质量吸收重金属量的乘积来表示.经检测印度芥菜体内含水量

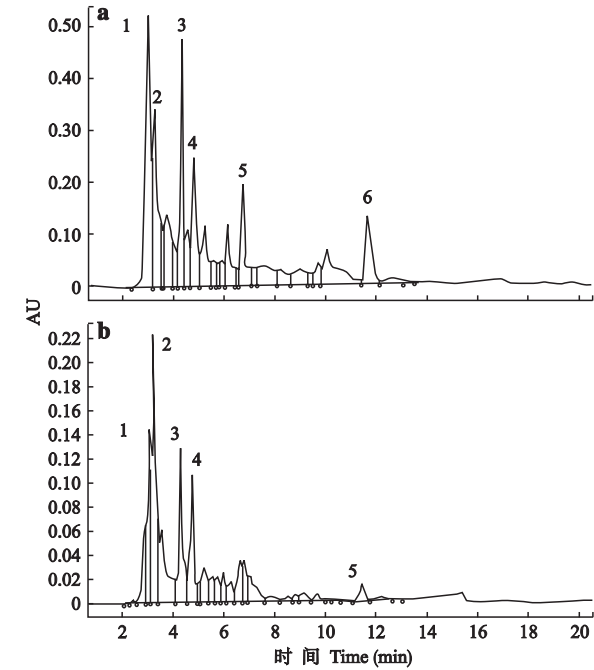


图 2 巨大芽胞杆菌(a)和胶质芽胞杆菌(b)发酵液中有机的色谱图
Fig.2 Chromatogram of organic acids excreted from *Bacillus megaterium* and *Bacillus mucilaginosus* ferment liquid.

为 90% ,由此得到表 6 ,在外源污染土壤试验中 ,A 处理印度芥菜对土壤 Cd、Pb、Zn 的提取量最高 ,分别是对照的 2. 18、2. 54 和 1. 85 倍 ;B 处理的提取量受其生物量降低的影响与对照相差不大 ,其中 Cd、Pb 的提取量略有提高 ,Zn 的提取量有所下降.在自然污染土壤试验中 ,A 处理印度芥菜对土壤 Cd、Pb、Zn 的提取量显著提高 ,分别是对照的 5. 00、1. 64 和 1. 65 倍 ;B 处理 Cd 的提取量与对照相差不大 ,Pb 提取量是对照的 1. 32 倍 ,Zn 提取量有所下降.微生物处理下印度芥菜对土壤 Cd、Pb、Zn 的提取率和提取量基本相同.可见 ,巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂在印度芥菜修复 Cd、Pb、Zn 污染土壤中具有较高的利用价值 ,可显著提高修复效率.

2. 5 巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌发酵液中有机的测定

利用反相高效液相色谱方法对巨大芽胞杆菌、胶质芽胞杆菌发酵液中有机的测定结果表明 ,巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌发酵液中含有大量浓度、成份不同的有机酸 ,巨大芽胞杆菌较胶质芽胞杆菌发酵液中有机的种类多、含量高.在两者的色谱峰图中 ,有很多峰的出峰时间相同 ,如 2. 5、2. 7、3. 8、11. 0 s 等 ,说明两者发酵液中有很多相同的有

机酸成分 ;与已知的标准样品进行比对发现 ,巨大芽胞杆菌发酵液中可能含有草酸、柠檬酸、苹果酸等 ,胶质芽胞杆菌发酵液中可能含有草酸、柠檬酸等 (图 1~2)。

3 结论与讨论

土壤微生物种类繁多、数量庞大 ,是土壤的活性有机胶体 ,比表面大、带电荷和代谢活动旺盛 ,在重金属污染的土壤生物地球化学循环过程中起到了积极作用。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。重金属污染土壤的微生物修复原理主要包括生物富集(如生物积累、生物吸着)和生物转化(如生物氧化还原、甲基化与去甲基化以及重金属的溶解和有机络合配位降解)等作用方式。微生物对重金属的溶解主要是通过各种代谢活动直接或间接地进行。土壤微生物的代谢作用能产生多种低分子量的有机酸 ,如甲酸、乙酸、丙酸和丁酸等。目前 ,低分子量有机酸分子被放在更具应用性的背景下进行研究 ,如促进土壤中重金属的溶解^[15]。土壤低分子量有机酸是微生物生长繁殖的重要能源 ,它直接影响到土壤微生物的种类和数量 ;而土壤微生物也一直进行着合成和分解有机酸的活动 ,其次生代谢产物 ,也能抑制或刺激植物根系分泌有机酸 ,从而影响有机酸的组成和含量^[16~17]。因此 ,土壤微生物同时充当着低分子量有机酸的源和库。Chanmugathas 等^[18]报道 ,在营养充分的条件下 ,微生物可以促进 Cd 的溶解 ,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。土壤低分子量有机酸在原生矿物和次生矿物风化中具有重要作用^[4,19]。土壤有机酸对矿物的溶解能力一般比雨水强 2~4 倍 ,具体情况主要依赖于矿物类型及其 Al 含量、土壤 pH 值和有机酸类型等^[20]。当有机酸存在时 ,Fe、Al 的氢氧化物能够得到显著的溶解^[20]。草酸比其他有机酸甚至盐酸更能风化黑云母 , α -酮葡酸、柠檬酸、草酸溶解硅酸盐矿物最有效^[21]。糖酸特别是 2-D-醛糖酸通过螯合碱性阳离子能显著促进磷酸盐矿石溶解^[22]。

本试验中所选取的微生物是能够在代谢过程中分泌有机酸的微生物。接种巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌的混合微生物制剂可以促进植物生长 ,使植

物生物量提高 ,生育期提前 ,并能很好地促进土壤中重金属的活化和植物对重金属元素的吸收和累积 ,这主要是由于它不仅将根际周围的重金属活化出来 ,利于植物吸收 ,同时还活化了磷、钾等土壤养分 ,利于植物生长。接种黑曲霉也会使土壤中重金属得到活化 ,增加植物对重金属元素的吸收 ,但却给植物生长带来一定的影响 ,这可能是因为黑曲霉的加入在较短时间内改变了植物的生长环境 ,如 pH 值等 ,使植物难以适应所致。本文结论如下 :

1) 巨大芽胞杆菌和胶质芽胞杆菌混合微生物制剂 ,是具有解磷释钾功效的微生物肥料的典型代表 ,在本试验中发现其不仅能促进印度芥菜对 Cd、Pb、Zn 的富集吸收 ,而且促进了印度芥菜生长发育 ,增加其生物量 ,能显著提高植物修复 Cd、Pb、Zn 污染土壤的修复效率 ,是一种有助于植物修复 Cd、Pb、Zn 污染土壤的微生物制剂 ,在植物修复领域有较高的利用价值。另外 ,在作为肥料利用时 ,要在无重金属污染的土壤中的应用 ,以免使农作物品质受到影响。

2) 黑曲霉(30177)发酵液能促进印度芥菜对 Cd、Pb、Zn 的富集吸收 ,但显著降低超富集植物的生物量 ,对印度芥菜 Cd、Pb、Zn 提取量或提取率的影响不显著 ,建议辅以植物营养诱导提高植物的生物量 ,进一步研究它的应用价值。

3) 在微生物诱导促进植物修复的研究中 ,土壤重金属有效态含量随植物吸收处于一种动态变化 ,单凭土壤中重金属有效态含量的变化 ,并不足以说明促进超富集植物的富集效果。

4) 巨大芽胞杆菌发酵液和胶质芽胞杆菌发酵液中含有大量浓度、成分不同的有机酸 ,巨大芽胞杆菌较胶质芽胞杆菌发酵液中有有机酸种类多、含量高 ;两者中有很多相同的有机酸成分 ;与已知的标准样品比对 ,发现 ,巨大芽胞杆菌发酵液中可能含有草酸、柠檬酸、苹果酸等 ,胶质芽胞杆菌发酵液中可能含有草酸、柠檬酸等。这些微生物代谢产物(有机酸)使土壤重金属得到活化 ,从而促进了植物吸收 ,提高了植物修复的效率。

参考文献

- [1] Chen H-M (陈怀满). The Heavy Metal Pollution in Soil-plant System. Beijing : Science Press , 1996 (in Chinese)
- [2] Teng Y (滕 应) , Luo Y-M (骆永明) , Li Z-G (李振高). Principles and techniques of microbial remediation of polluted soils. *Soils (土壤)* , 2007 , 39(4) :

- 497-502 (in Chinese)
- [3] Yan X-M (阎晓明), He J-Z (何金柱). The research progress and mechanic on microbe restore heavy metal pollution. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* (安徽农业科学), 2002, **30**(6): 877-879 (in Chinese)
- [4] Jones DL. Organic acids in the rhizosphere—A critical review. *Plant and Soil*, 1998, **205**: 25-44
- [5] Fischer F, Bipp HP. Removal of heavy metals from soil components and soils by natural chelating agents. II. Soil extraction by sugar acids. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2002, **138**: 271-288
- [6] Interjit K. Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review*, 1996, **62**: 186-202
- [7] Patterson, JW, Passino R. Metal speciation, separation and recovery. Chelsea, MI: Lewis Publishers, 1990: 77-94
- [8] Wang H-X (王焕校). Pollution Ecology. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese)
- [9] Cai M-F (蔡美芳), Liu Y-R (刘玉荣), Dang Z (党志). The latest development about phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chongqing Environmental Science* (重庆环境科学) 2003, **25**(11): 174-180 (in Chinese)
- [10] Ren X-X (任旭喜). The heavy metal pollution in soil and the prevention measurement. *Environmental Protection Science* (环境保护科学), 1999, **25**(5): 31-33 (in Chinese)
- [11] Zhou Z-Y (周泽义). The studies of controlling the pollution heavy metal vegetables of China. *Development of Research Network for Natural Resources Environment and Ecology* (资源生态环境网络研究动态), 1999, **10**(3): 21-27 (in Chinese)
- [12] Chen Z-L (陈志良), Qiu R-L (仇荣亮). Removed technology of heavy metal pollution in soil. *Environmental Protection Science* (环境保护科学), 2004, **21**(4): 6-9 (in Chinese)
- [13] Zhang C-G (张春桂), Xu H-X (许化夏), Jiang Q-N (姜晴楠). The technology of phytoremediation for pollution soil. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), 1997, **27**(8): 16-19 (in Chinese)
- [14] Shen P (沈 萍), Fan X-R (范秀容), Li G-W (李广武). Experiment of Microbiology. Beijing: Higher Education Press, 1996 (in Chinese)
- [15] Fischer F, Bipp HP. Removal of heavy metals from soil components and soils by natural chelating agents. II. Soil extraction by sugar acids. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2002, **138**: 271-288
- [16] Rózycki H. Production of organic acids by bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Acta Microbiologica Polonica* 1987, **34**: 301-308
- [17] Rózycki H, Strzelezyk E. Organic acids production by *Streptomyces* spp isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant and Soil*, 1986, **96**: 337-345
- [18] Chanmugathas P, Bollag JM. Microbial role in immobilization and subsequent mobilization of cadmium in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 1987, **51**: 1184-1191
- [19] Lundstrom US, Ohman LO. Dissolution of feldspars in the presence of natural organic solutes. *Journal of Soil Science*, 1990, **41**: 359-369
- [20] Jones DL, Kochian LV. Aluminum-organic acid interactions in acid soils. 1. Effect of root-derived organic-acids on the kinetics of Al dissolution. *Plant and Soil*, 1996, **182**: 221-228
- [21] Mo S-X (莫淑勋). Studies on production and transformation of organic acids in soils and its influence on soil properties. *Progress in Soil Science* (土壤学进展), 1986, **14**(4): 1-10 (In Chinese)
- [22] Moghimi A, Lewis DG, Oades JM. Release of phosphate from calcium phosphates by rhizosphere product. *Soil Biology & Biochemistry*, 1978, **10**: 289-292

作者简介 杨 卓,女,1980年生,博士.主要从事土壤重金属污染与植物修复研究,发表论文 10 篇. E-mail: yang-zhuo315566@126.com

责任编辑 张凤丽