

产多胺细菌阻控空心菜富集 Cd 和 Pb 效应

韩 辉^{1,2}, 蔡 红¹, 王晓宇¹, 刘慧娴¹, 陈兆进^{1,2}, 姚伦广^{1,2*} (1. 南阳师范学院农业工程学院, 南水北调中线水源区水安全河南省协同创新中心, 河南 南阳 473061; 2. 河南省南水北调中线水源区水安全院士工作站, 河南 南阳 473061)

摘要: 通过产多胺筛选培养基, 借助超高效液相色谱技术, 本研究从重金属污染农田空心菜根际土壤中筛选具有钝化重金属的产多胺细菌, 并通过水培试验研究功能菌株对空心菜生长、多胺含量和抗氧化酶活性以及 Cd 和 Pb 吸收的影响。结果显示, 从空心菜根际土壤中共分离到 9 株高产多胺的细菌菌株, 其中 *Enterobacter bugandensis* YX6 能够分泌精胺和亚精胺, *Klebsiella quasivariicola* YX8 能够分泌腐胺。在 LB 培养基中, 菌株 YX6 和 YX8 对 Cd 和 Pb 吸附去除率均大于 80%。水培试验表明菌株 YX6 和 YX8 能够显著提高空心菜地上部和根部多胺(29.3%~180%)的含量以及可食用部分超氧化物歧化酶(18.5%~42.7%)和过氧化物酶(46.2%~100%)的活性, 进而显著提高了空心菜地上部(21.2%~40.9%)和根部(43.3%~68.2%)的干重, 同时降低了空心菜地上部和根部 Cd(45.8%~69.5%)和 Pb(42.4%~63.6%)的含量。产多胺细菌 *E. bugandensis* YX6 和 *K. quasivariicola* YX8 不仅能够提高空心菜生物量和抗氧化酶活性, 还能降低空心菜对 Cd 和 Pb 的吸收, 为重金属超标农田安全利用和减少蔬菜中的重金属含量提供菌种资源。

关键词: 产多胺细菌; 钝化; 重金属; 多胺; 空心菜

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2020)06-2692-08

Screening of polyamine-producing bacteria and their effects on reducing Cd and Pb accumulation in *Ipomoea aquatica*. HAN Hui^{1,2}, CAI Hong¹, WANG Xiao-yu¹, LIU Hui-xian¹, CHEN Zhao-jin^{1,2}, YAO Lun-guang^{1,2*} (1. Collaborative Innovation Center of Water Security for Water Source Region of Mid-route Project of South-North Water Diversion of Henan Province, School of Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China; 2. Henan Provincial Academician Workstation of Water Security for Water Source Region of Mid-line of South-to-North Diversion Project. Nanyang 473061, China). *China Environmental Science*, 2020, 40(6): 2692~2699

Abstract: Polyamine-production screening media and ultra performance liquid chromatography (UPLC) were used to isolate polyamine-producing bacteria from Cd- and Pb-polluted rhizosphere soil of *Ipomoea aquatica*. The effects of functional strains on the growth, polyamine content, antioxidant enzyme activity and Cd and Pb accumulation of *I. aquatica* were studied by hydroponics experiment. Results showed that nine high polyamine-production strains were isolated from the rhizosphere soil of *I. aquatica*. Among them, strain *Enterobacter bugandensis* YX6 secreted spermine and spermidine, strain *Klebsiella quasivariicola* YX8 secreted putrescine. The adsorption rates for strains YX6 and YX8 to Cd and Pb were more than 80% in LB medium solution. Hydroponics experiment showed that strain YX6 and YX8 significantly increased the content of polyamines (29.3%~180%) and the activities of superoxide dismutase (18.5%~42.7%) and peroxidase (46.2%~100%) in *I. aquatica* shoots and roots, and significantly increased the dry weight of shoots (21.2%~40.9%) and roots (43.3%~68.2%), and reduced the Cd (45.8%~69.5%) and Pb (42.5%~63.6%) contents in *I. aquatica* shoots and roots. Polyamine-production bacteria *E. bugandensis* YX6 and *K. quasivariicola* YX8 not only improved the biomass and antioxidant enzyme activity of *I. aquatica*, but also reduced the absorption of Cd and Pb by *I. aquatica*, which provides bacterial resources for the safe utilization of heavy metals in farmland and the reduction of heavy metals content in vegetables.

Key words: polyamine-producing bacteria; immobilization; heavy metal; polyamine; *Ipomoea aquatica*

随着城镇化的快速发展, 采矿和冶炼等造成农田和水体中重金属污染日益加重^[1-2]。大量的 Cd 和 Pb 进入土壤中, 不仅会造成粮食减产和经济损失, 并可经水和植物等介质进入人体, 严重威胁着人类的身体健康^[3-5]。在我国空心菜是广受喜爱的蔬菜之一, 有报道部分地区的空心菜 Cd 和 Pb 含量严重超标^[6], 因此必须要采取必要的措施对土壤重金属污染进行修复。利用功能微生物钝化土壤中的重金属并且阻控作物对重金属的吸收和累积是目前治理

中轻度重金属污染农田和保障食品安全的有效途径之一。目前, 用于重金属污染土壤修复的微生物涵盖了细菌、真菌(根霉菌、青霉菌、木霉菌等)^[7-9], 其中研究最多且应用最广泛的是重金属固定植物促生细菌。研究表明重金属固定细菌能够通过细胞

收稿日期: 2019-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41907143, 41601332); 河南省高等学校重点科研项目(20A180023); 南阳市科技攻关项目(KJGG106)

* 责任作者, 教授, lunguangyao@163.com

壁吸附作用、螯合作用(多糖、糖蛋白)、胞内富集作用、沉淀作用(CO_3^{2-} 、 S^{2-})和氧化还原作用(有毒 Cr^{5+} 还原为无毒 Cr^{3+})等固定钝化土壤中重金属的含量^[10-13],降低其生物有效性,从而减少作物对重金属的吸收.此外,重金属固定细菌还能通过分泌 IAA、铁载体和 ACC 脱氨酶以及溶磷固氮作用等提高植物耐受重金属胁迫的能力,促进植物生长,提高其产量^[14-15].重金属固定植物促生细菌作为优良的重金属固定钝化剂,克服了传统的无机、有机钝化剂的大量使用会造成土壤板结、水体富营养化等的缺点,具有菌种的来源丰富、低成本、无二次污染、环境友好和有益于可持续发展等优点等方面的优势^[16].目前,部分学者已发现施用重金属固定植物促生细菌能够降低辣椒^[17]、生菜^[18]和萝卜^[19]等作物中的重金属含量.而关于利用重金属固定细菌阻控空心菜、菠菜和上海青等常见蔬菜品种吸收重金属的相关研究未见报道.

多胺是生物代谢过程中产生的一类化学结构中含有两个及以上氨基的低分子量脂肪族含氮碱^[20].常见的多胺主要有腐胺、亚精胺和精胺.多胺被普遍认为是植物生长调节物质,并能够起到激素的“第二信使”的作用,参与了植物的形态建成、生长发育和休眠等过程,在刺激细胞分裂、促进植物生长、延缓植株衰老和提高种子活力等方面发挥着重要作用^[21-23].自然界中很多细菌都能分泌多胺,产多胺细菌分泌的多胺能够促进植物细胞的增殖和分化,促进植物生长,在基因表达、抵抗衰老和应对重金属胁迫等方面都具有重要的作用^[24].虽然有学者研究外源多胺能够缓解重金属对植物造成的伤害,且多胺本身也具有一定的固定钝化重金属的作用,关于产多胺细菌对蔬菜生长和吸收 Cd 和 Pb 的影响尚不清楚.因此本研究从重金属污染土壤中筛选产多胺细菌并研究其对空心菜生长和 Cd 和 Pb 的影响,

此外也进一步探讨蔬菜体内多胺和抗氧化酶对蔬菜吸收 Cd 和 Pb 的影响.从济源市金属冶炼厂附近农田中采集空心菜根际土壤,通过产多胺筛选培养基,借助超高效液相色谱技术筛选高产多胺的菌株,并研究其对 Cd 和 Pb 的钝化固定效果.通过水培试验研究功能菌株对空心菜各组织生物量、多胺含量和抗氧化酶活性以及 Cd 和 Pb 吸收的影响,以期为重金属污染农田生态整治与安全高效利用提供菌种资源和理论依.

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

于 2019 年 4 月在河南省济源市河南豫光金铅股份有限公司以西青多村农田(35°13'N, 112°54'E)采集空心菜根际土壤,带回实验室.取部分土壤样品室温下晾干,然后采用电热消解法消解土壤,使用电感耦合等离子发射光谱仪^[17](Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES) (SHIMADZ ICPE-9820,日本)测定 Cd 和 Pb 的含量.根据鲍士旦^[25]的方法测定空心菜根际土壤 pH 值、有机质、总氮、总磷和总钾等土壤理化性质.空心菜根际土壤理化性质进行测定,结果如表 1 所示.空心菜根际土壤 pH 值为 6.67,为偏中性土壤,而 Cd 含量为 3.82mg/kg、Pb 含量为 928mg/kg.根据土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准(GB 15618-2018)^[26],在 pH 为 6.5~7.5 之间时,旱地中 Cd 含量超过 0.3mg/kg、Pb 含量超过 120mg/kg 时达到农用地土壤污染风险筛选值,应当采取必要措施进行土壤安全利用.所以本试验所采集的空心菜根际土壤为 Cd 和 Pb 污染超标土壤.由于长期生活在高浓度重金属土壤中的微生物会进化出较高的重金属抗性和解毒特性,因此本研究采集的空心菜根际土壤比较适合筛选具有重金属固定特性的功能菌株.

表 1 空心菜根际土壤样品主要理化参数
Table 1 Somephysio-chemical properties of of*I. aquaticarhizosphere* soil

项目	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	pH 值	有机质(g/kg)	总氮(g/kg)	总磷(g/kg)	总钾(g/kg)
参数值	3.82±0.45	928±25	6.67±0.03	19.3±0.87	6.9±0.24	3.42±0.68	4.68±0.65

1.2 产多胺细菌的筛选

采用产多胺筛选培养基进行功能菌株的初筛^[27].称取新鲜空心菜根际土壤 1.0g 放到含有 50mL

无菌去离子水的摇瓶内,28℃,160r/min 振荡 30min,然后取 1mL 震荡液加入含有 50mLPAF 培养基(蛋白胨 10g/L、酪蛋白水解物 10g/L、MgSO₄ 1.5g/L、

K₂HPO₄ 1.5g/L、甘油 10mL,pH 7.0)的摇瓶内,28℃, 160r/min 培养 24h;第 2d 从 PAF 培养液中转移 1mL 菌悬液至含有 50mL DF 培养基(KH₂PO₄ 4g/L、Na₂HPO₄ 6g/L、MgSO₄ 0.2g/L、葡萄糖 2g/L、葡萄糖酸 2g/L、柠檬酸 2g/L、(NH₄)₂SO₄ 2g/L,pH 7.2)的摇瓶中,同等条件下培养 24h;第 3d 从 DF 培养基中转移 1mL 菌悬液至含有 50mL ADF 培养基(KH₂PO₄ 4g/L、Na₂HPO₄ 6g/L、MgSO₄ 0.2g/L、葡萄糖 2g/L、葡萄糖酸 2g/L、柠檬酸 2g/L、精氨酸 2g/L,pH 7.2)的摇瓶中,同等条件下继续培养 24h;最后从 ADF 培养液中取 1mL 菌悬液梯度稀释成 10⁻⁴ 和 10⁻⁵,涂布于含有 100mg/L Cd 和 1500mg/L Pb 的 LB 固体平板上,28℃培养 3d,然后用牙签依据菌落大小、颜色和形状等特征随机挑取部分菌落,进行纯化和保藏。

利用超高效液相色谱法^[28]定量测定供试菌株的产多胺能力.采用 LB 液体培养基活化各个菌株,按照 2%的接种量接种到含有 50mL LB 液体培养基的摇瓶中,28℃, 160r/min 振荡 24h, 5000r/min 离心 10min,然后取 2mL 上清液,加入 2mL 10% (V/V)的高氯酸,混匀置于 4℃冰箱中浸提 2h;然后 10000r/min 4℃下离心 30min,吸取 500μL 上清液到 10mL 离心管中,加入 100μL 苯甲酰氯,再加入 2mL 2mol/L 的 NaOH 后涡旋 20s,在 37℃烘箱中反应 20min 后加入 2mL 饱和 NaCl 溶液,颠倒混匀后加入 2mL 乙醚萃取,然后 4℃、1500r/min 离心 5min,取 1mL 醚相到 2mL 离心管中,真空干燥后用 1mL 甲醇涡旋溶解,过 0.45μm 滤膜,滤液进行高效液相测定.选用色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3 (100mm×2.1mm×1.8μm),流动相为乙腈和水(体积比为 44:56),柱温为 30℃,流速为 0.45mL/min,等度洗脱,检测紫外波长为 230nm,进样体积为 2μL.

1.3 菌株吸附固定 Cd 和 Pb 能力测定

配制含有 Cd 质量浓度为 5mg/L,Pb 质量浓度为 10mg/L 的 LB 液体培养基,分装到三角瓶中,每瓶 50mL.将培养 18h 左右的产多胺细菌制备成菌悬液,按 1%的比例接入上述培养基中,28℃,160r/min 振荡培养 24h.培养结束后,取 5mL 发酵液,5000r/min 离心 5min,采用 ICP-AES 测定上清液中 Cd 和 Pb 的质量浓度.通过计算得出各个菌株对 Cd 和 Pb 的吸附率,计算公式如下:

$$\text{吸附率}(\%) = \frac{C_0 - C_s}{C_0} \times 100\%$$

式中:C₀ 表示-溶液中重金属的初始质量浓度,mg/L; C_s 表示-供试菌株上清液中重金属质量浓度,mg/L.

1.4 产多胺细菌的重金属抗性和促生特性测定及种属鉴定

配制含有不同浓度 Cd(50~500mg/L,每隔 50mg/L 一个梯度)和 Pb(500~2000mg/L,每隔 100mg/L 一个梯度)的 LB 固体平板,用接种环挑取供试菌株至每个平板上,28℃,培养 3d.若平板上能长出菌株,继续接种到相应浓度的平板上进行验证,连续两次均能长出单菌落的,说明该菌株对该浓度重金属具有抗性.参考 Jiang 等^[29]的方法测定功能菌株产 IAA 的能力.参考 Rajkumar 等^[30]的方法测定功能菌株产铁载体的能力.利用刘瑞等^[31]的方法,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取每个菌株的 DNA,采用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因扩增,扩增产物送到上海生工进行测序.

1.5 空心菜水培试验

取若干空心菜(*Ipomoea aquatica*,柳叶空心菜)种子,用 5%次氯酸钠进行消毒 3min,再用无菌去离子水漂洗 3 次,然后置于水琼脂(0.4%)平板上,室温下培养.待到空心菜种子长出两片小叶后,挑取大小一致的小苗移栽于盆钵(上层装有 500g 石英砂,起固定植物作物,下层则为霍格兰氏营养液(Ca(NO₃)₂ 945mg/L; KNO₃ 607mg/L; NH₄·H₂PO₄ 115mg/L; MgSO₄·7H₂O 493mg/L; MnSO₄ 2.13mg/L; CuSO₄ 0.08mg/L; ZnSO₄ 0.22mg/L; H₃BO₃ 2.86mg/L; H₂MoO₄ 0.02mg/L; 螯合铁 40mg/L)上层的石英砂中,每盆 4 颗苗.空心菜幼苗长出 5 片叶子后,添加重金属使 Cd 浓度为 3mg/L,Pb 浓度为 5mg/L.采用菌悬液浸根 2h 的方式对空心菜根部进行接种,同时以不接种处理作为对照.接菌完成后继续培养 30d,进行收获处理.空心菜各组织生物量和重金属含量的测定:将培养完成后的空心菜从盆钵中取出,根部用 0.01mol/LEDTA-2Na 溶液浸泡 10min,以除去根部表面吸附的重金属离子,然后用剪刀将空心菜分为地上部和根部,分别平均分成两份,一份放入-80℃冰箱中暂时保存,另一份置于烘箱 80℃烘干,测量其干重.将烘干的空心菜样品用粉碎机磨碎,准确称取 0.5g 进行

微波消解,采用 ICP-AES 测定消解液中 Pb 和 Cd 的质量浓度,进而计算出空心菜各组织 Cd 和 Pb 的含量。

参考林绍艳等^[28]的方法测定新鲜空心菜地上部和根部多胺的含量。新鲜空心菜地上部和根部的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)的活性参照 Meng 等^[32]的方法进行测定。超氧化物歧化酶活力以抑制氮蓝四唑光还原的 50%为一个酶活力单位(U/g),过氧化物酶活力以每分钟光密度(OD₄₇₀)变化 0.01 为一个过氧化物酶活力单位(U/g)。

1.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,用 Microsoft Excel 2010 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 产多胺细菌的筛选

采用产多胺筛选培养基从生菜根际土壤中分离筛选功能菌株,根据颜色和大小等从固体平板上获得 9 株纯培养细菌菌株。借助超高效液相色谱技术定量检测这 9 株菌株的产多胺能力,结果如图 1 所示。菌株 YX1、YX2、YX4、YX5 和 YX9 均能够产生腐胺(7.6~18.3mg/L)、精胺(5.7~18.6mg/L)和亚精胺(5.7~14.3mg/L)。菌株 YX7 和 YX8 只能够产生腐胺,分别为 24.6mg/L 和 53.5mg/L。菌株 YX3 和 YX6 只能够产生精胺(12.8~24.2mg/L)和亚精胺(11.2~19.5mg/L)。综合来看,菌株 YX6 和 YX8 产生的多胺总量(腐胺+精胺+亚精胺)比较高,分别为 43.7mg/L 和 53.5mg/L。

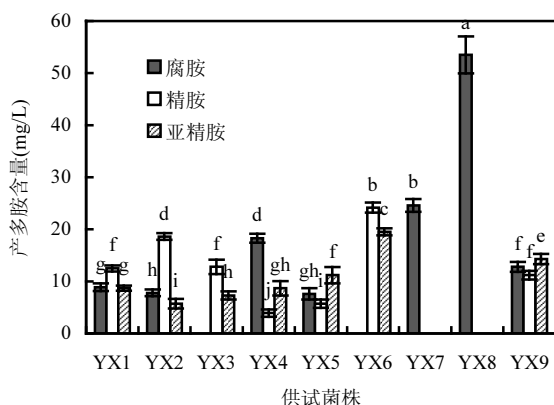


图 1 供试菌株产多胺能力的测定

Fig.1 Determination of polyamine production capacity of the strains

不同小写字母表示处理之间有显著差异($P < 0.05$)

2.2 功能菌株吸附 Cd 和 Pb 能力测定

采用摇瓶振荡培养法对 9 株产多胺细菌进行了吸附固定 Cd 和 Pb 能力的测定,结果如图 2 所示。这 9 株菌株对 Cd 的吸附率在 18.3%~89.6%之间,其中吸附率大于 80%的菌株有 2 株,为 YX6 和 YX8,分别为 89.6%和 82.5%。这 9 株菌株对 Pb 的吸附率在 17.4%~93.7%之间,其中吸附率大于 80%的菌株有 2 株,为 YX6 和 YX8,分别为 93.7%和 87.8%。由此可知,菌株 YX6 和 YX8 具有很强的固定吸附 Cd 和 Pb 的能力。结合产多胺能力,选取菌株 YX6 和 YX8 作为供试菌株进行后续研究。

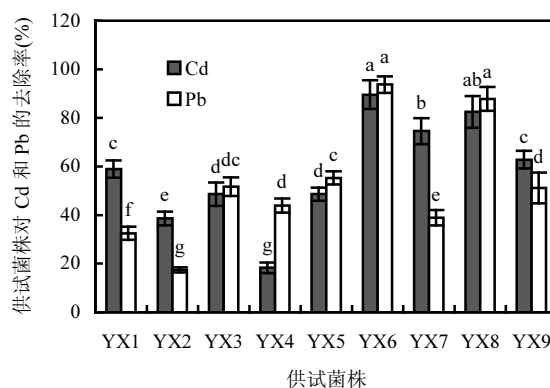


图 2 菌株在溶液中对镉和铅的去除效果

Fig.2 Efficiency of strains to remove Cd and Pb in liquid
不同小写字母表示处理之间有显著差异($P < 0.05$)

2.3 供试菌株促生特性和重金属抗性测定

采用固体平板培养法研究对菌株 YX6 和 YX8 对 Cd 和 Pb 的抗性,结果如表 2 所示。这 2 株产多胺细菌均能耐受高浓度的 Cd 和 Pb,其中菌株 YX6 的 Cd 致死浓度为 550mg/L, Pb 致死浓度为 1800mg/L。菌株 YX8 的 Cd 致死浓度为 500mg/L, Pb 致死浓度为 1600mg/L。此外这两株功能菌株还能分泌 IAA (78.65mg/L 和 55.26mg/L)和铁载体,具有促进植物生长的潜力。通过细菌 16S rRNA 序列分析,菌株 YX6 属于肠杆菌属(*Enterobacterbugandensis*),菌株 YX8 克雷伯菌属(*Klebsiellaquasivariicola*)。

2.4 供试菌株对空心菜生长和 Cd 和 Pb 吸收的影响

通过空心菜水培试验,研究产多胺细菌 YX6 和 YX8 对空心菜生长和 Cd 和 Pb 吸收的影响,结果如图 3 和 4 所示。与不接菌对照相比,接菌 YX6 和 YX8 处理显著促进空心菜根部和地上部的干重。其中,菌株 YX6 使空心菜根部干重提高了 68.2%,地上部干

重提高了 40.9%.菌株 YX8 使空心菜根部干重提高了 43.3%,地上部干重提高了 21.2%.这说明这两株功能菌株均具有促进空心菜生长的能力.

与不接菌对照相比,菌株 YX6 和 YX8 均能够显著降低空心菜根部和地上部 Cd 和 Pb 的含量.菌株 YX6 使空心菜根部 Cd 含量降低了 66.9%,Pb 含量降低了 59.8%;地上部 Cd 含量降低了 69.5%,Pb 含量降低了 63.6%.菌株 YX8 使空心菜根部 Cd 含量降低了 50.3%,Pb 含量降低了 50.8%;地上部 Cd 含量降低了 45.8%,Pb 含量降低了 42.4%.这说明两株功能菌株均具有阻控空心菜富集 Cd 和 Pb 的能力.此外,菌株 YX6 阻控空心菜吸收 Cd 和 Pb 的能力要好于菌株 YX8 的能力.

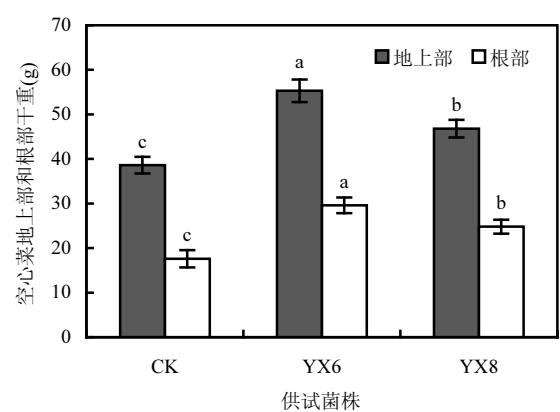


图3 不同处理对空心菜干重的影响
Fig.3 Effect of the strains on the tissue dry weight of *I. aquatica*

空心菜同一部位不同小写字母表示处理之间有显著差异($P < 0.05$)

表 2 菌株的促生特性和重金属抗性

Table 2 Growth promotion characteristics and heavy metal resistance of the isolated strains

菌株	Cd 致死浓度(mg/L)	Pb 致死浓度(mg/L)	IAA(mg/L)	铁载体	种属鉴定
YX6	550	1800	78.65	++++	<i>Enterobacterbugandensis</i>
YX8	500	1600	55.26	+++	<i>Klebsiellaquasvariicola</i>

注:第三列中“+”越多,表示菌株产铁载体的能力越强.

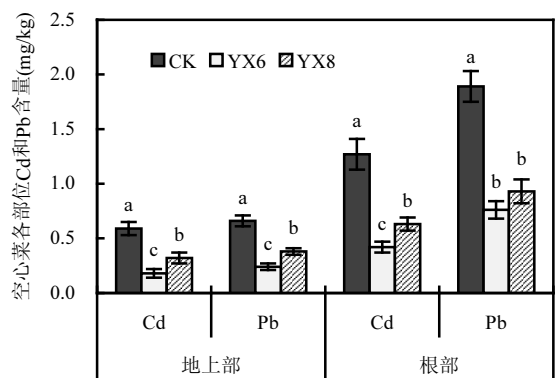


图4 供试菌株对空心菜各部位镉和铅含量的影响
Fig.4 Effect of the strains on the Cd and Pb contents in *I. aquatica*

同一部位同一重金属下不同小写字母表示处理之间有显著差异($P < 0.05$)

2.5 供试菌株对空心菜根部和地上部多胺含量的影响
不同处理对空心菜根部和地上部腐胺、精胺和亚

精胺含量的影响如表 3 所示.不接菌对照处理组中.空心菜根部腐胺、精胺和亚精胺的含量分别为 8.41mg/kg、12.3mg/kg 和 10.5mg/kg.与对照相比,菌株 YX6 显著提高了空心菜根部精胺(75.6%)和亚精胺(67.6%)的含量,而对腐胺的含量无显著影响.菌株 YX8 显著提高了空心菜根部腐胺(180%)的含量,而对精胺和亚精胺的含量无显著影响.不接菌对照处理组中,空心菜地上部腐胺、精胺和亚精胺的含量分别为 7.12mg/kg、5.36mg/kg 和 3.65mg/kg.与对照相比,菌株 YX6 和 YX8 显著提高了空心菜地上部腐胺(61.1%~119%)、精胺(41%~91.4%)和亚精胺(29.3%~109%)的含量.由于多胺具有缓解逆境胁迫对植物造成的伤害,并且能够钝化和螯合重金属,因此两株产多胺细菌能够分泌多胺,提高空心菜体内多胺的含量进而缓解重金属对空心菜的伤害,并且阻控了空心菜对重金属的吸收.

表 3 不同处理对空心菜根部和地上部腐胺、精胺和亚精胺含量的影响

Table 3 Effects of different treatments on the contents of putrescine, spermine and spermidine in root and shoot of *I. aquatica*

处理	根部			地上部		
	腐胺(mg/kg)	精胺(mg/kg)	亚精胺(mg/kg)	腐胺(mg/kg)	精胺(mg/kg)	亚精胺(mg/kg)
CK	8.41±0.32b	12.3±0.75b	10.5±0.67b	7.12±0.19c	5.36±0.15c	3.65±0.11c
YX6	8.64±0.23b	21.6±1.15a	17.6±0.98a	11.47±0.47b	10.26±0.68a	7.63±0.24a
YX8	23.6±1.29a	13.68±0.77b	11.98±0.83b	15.63±0.87a	7.56±0.22b	4.72±0.13b

注:同列不同字母表示处理之间有显著差异($P < 0.05$).

2.7 供试菌株对空心菜可食用部分抗氧化酶活性的影响

由图 5 可知,与不接菌对照相比,菌株 YX6 和 YX8 均能显著提高空心菜可食用部分 SOD (18.5%~42.7%) 和 POD (46.2%~100%) 的活性.此外与菌株 YX8 相比,菌株 YX6 具有更高的提高空心菜可食用部分 SOD 和 POD 的活性的能力.SOD 具有消除植物体在新陈代谢过程中产生的有害物质的能力,同时也能够缓解外界有毒有害物质对植物体造成的损伤.POD 能够催化 H_2O_2 氧化,以清除 H_2O_2 对植物细胞生物功能分子的破坏作用,同时也具备提高植物对外界逆境胁迫的抵抗能力.研究结果表明两株产多胺细菌通过提高空心菜可食用部分的抗氧化酶活力,增强了空心菜对重金属毒害的抵抗能力,从而促进了其生长.

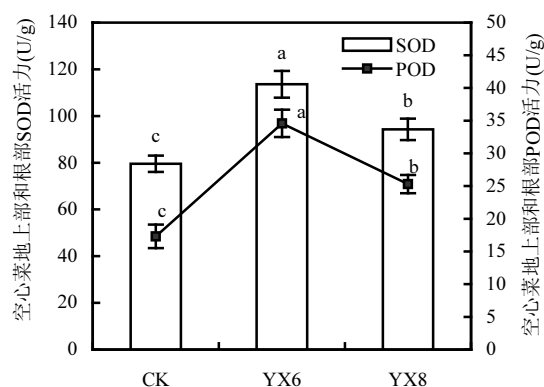


图 5 供试菌株对空心菜可食用部分抗氧化酶活性影响

Fig.5 Effect of the strains on the activity of antioxidant enzymes in edible part of *I. aquatic*

同一指标不同小写字母表示处理之间有显著差异($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 产多胺细菌对空心菜生长的影响

多胺是生物代谢过程中产生的一类化学结构中含有两个及以上氨基的低分子量脂肪族含氮碱,常见的多胺主要有腐胺、亚精胺和精胺.多胺能够促进植物细胞的增殖和分化,促进植物生长,在基因表达、抵抗衰老、应对胁迫环境等方面也具有重要的作用^[28,33].研究表明,当植物受到如干旱、冷害、盐碱、营养物质缺乏、重金属等胁迫时,体内的多胺会积累,对稳定核酸和蛋白质以及细胞膜物质的构象起着重要的作用,进而缓解重金属对植物体造成的

毒害^[34].而施加外源多胺的研究表明,多胺在植物抵御环境胁迫时具有缓解作用.Hsu 等^[35]发现外源多胺的添加可以提高水稻对重金属胁迫,水稻抗氧化酶系统的活性和可溶性蛋白含量显著提高,从而降低 ROS 的危害和膜脂过氧化程度.Sun 等^[36]报道指出产精氨酸脱羧酶的细菌在重金属污染土壤修复中占有十分重要的地位.在本文研究中,产多胺细菌 YX6 和 YX8 能够显著提高空心菜地上部和根部多胺(腐胺、亚精胺和精胺)的含量,以及可食用部分超氧化物歧化酶和过氧化物酶的活性,从而显著提高了空心菜各组织的生物量.此外,外源多胺对禾谷类作物籽粒灌浆具有显著影响,籽粒中多胺含量与籽粒灌浆之间存在密切联系.刘杨等^[37]试验表明,外源 Spd 和 Spm 处理能够显著促进冬小麦籽粒灌浆,提高小麦灌浆速率和籽粒重,而外源 Put 处理对籽粒灌浆的影响不显著.供试菌株 YX6 和 YX8 还能分泌大量的 IAA 和铁载体,而这些物质也是供试菌株能够促进植物生长的关键因子.IAA 能够通过促进细胞的分裂和伸长来促进植物的生长.例如,细菌产生的吲哚乙酸能够促进盐胁迫下小麦幼苗根和茎的伸长^[38].铁载体能够与 Fe^{3+} 特异性结合,从环境中螯合大量 Fe^{3+} 后可以被植物根系所吸收,从而增加了植物对铁的吸收,可以缓解重金属污染环境中植物常有的缺铁现象,从另一方面来促进植物的正常生长^[39].

3.2 产多胺细菌阻控空心菜对 Cd 和 Pb 的吸收

由于工矿业等的发展,土壤和水体中的重金属污染事件频发,如血铅事件和镉大米事件等,给人类的健康带来了潜在的危害.微生物修复方法在治理重金属污染方面展现出其菌种的来源丰富、低成本和无二次污染等方面的优势,具有较大的应用前景.外源多胺不仅能够提高植物生长,还具有固定钝化重金属的作用.重金属胁迫下,多胺可作为螯合剂与重金属离子结合,降低环境中重金属的含量.Xu 等^[40]研究表明外源亚精胺和精胺的应用能降低空心莲子草叶片中 Cu 的含量.Han 等^[41]研究发现 *Serratia liquefaciens* CL-1 分泌的腐胺显著增强了其对 Pb 的抗性以及阻控油菜吸收 Pb 的能力.在本文研究中,产多胺细菌 YX6 和 YX8 能够显著空心菜地上部和根部 Cd 和 Pb 的含量.此外细菌还可以通过细胞壁吸附固定重金属,细胞壁富含羧基阴离子和

磷酸阴离子,使得细菌表面具有阴离子的性质,因而金属很容易结合到细菌的表面^[10]。细菌细胞吸附重金属离子的组分主要是肽聚糖、脂多糖、磷壁酸和胞外多糖。细菌还可以通过自身细胞壁的吸附、与磷酸盐络合、或通过细菌代谢产生的其他阴离子与重金属发生沉淀或吸附反应,从而达到重金属固定的作用。有关研究表明细菌能够通过吸附重金属离子降低其生物有效性或降低溶液中重金属的浓度^[42]。因此可以通过测定供试菌株对重金属离子的吸附能力判定供试菌株钝化重金属的能力。本文研究中的两株供试菌株 YX6 和 YX8 均能耐受高浓度的 Cd 和 Pb,且在 Cd 质量浓度为 3mg/L, Pb 质量浓度为 10mg/L 的 LB 液体培养基中,对 Cd 和 Pb 的吸附率均大于 80%。

4 结论

4.1 从铅镉污染农田空心菜根际土壤中共分离出 9 株具有产多胺能力的细菌菌株,其中 *E.bugandensis* YX6 能够分泌精胺和亚精胺, *K.quasivariicola* YX8 能够分泌腐胺。这两株菌均能耐受高浓度的 Cd 和 Pb,且在 Cd 质量浓度为 3mg/L, Pb 质量浓度为 10mg/L 的 LB 液体培养基中,对 Cd 和 Pb 的吸附率均大于 80%。

4.2 产多胺细菌 *E.bugandensis* YX6 和 *K.quasivariicola* YX8 不仅能够显著提高空心菜生物量,还能显著降低空心菜 Cd、Pb 含量。

4.3 产多胺细菌 *E.bugandensis* YX6 和 *K.quasivariicola* YX8 能够显著提高空心菜的多胺的含量,以及可食用部分超氧化物歧化酶和过氧化物酶的活性。

参考文献:

- [1] Kim S W, Chae Y, Moon J, et al. In situ evaluation of crop productivity and bioaccumulation of heavy metals in paddy soils after remediation of metal-contaminated soils [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017,65(6):1239-1246.
- [2] 余 志,陈 凤,张军方,等. 锌冶炼区菜地土壤和蔬菜重金属污染状况及风险评价 [J]. 中国环境科学, 2019,39(5):2086-2094.
Yu Z, Chen F, Zhang J F, et al. Contamination and risk of heavy metals in soils and vegetables from zinc smelting area. [J]. China Environmental Science, 2019,39(5):2086-2094.
- [3] Franca F, Albuquerique A M A, Almeida A C, et al. Heavy metals deposited in the culture of lettuce (*Lactuca sativa* L.) by the influence of vehicular traffic in Pernambuco, Brazil [J]. Food Chemistry, 2017, 215:171-176.
- [4] León-Cañedo J A, Alarcón-Silvas S G, Fierro-Sañudo J F, et al. Mercury and other trace metals in lettuce (*Lactuca sativa*) grown with two low-salinity shrimp effluents: accumulation and human health risk assessment [J]. Science of the Total Environment, 2019,650:2535-2544.
- [5] 彭 惠,邓华健,徐浩然,等. 石灰对生物炭和腐殖酸阻控水稻 Cd 吸收的效应 [J]. 中国环境科学, 2020,40(1):329-337.
Peng H, Deng H J, Xu H R, et al. Effect of lime on biochar and humic acid controlling cadmium uptake in rice [J]. China Environmental Science, 2020,40(1):329-337.
- [6] 郭天荣,陈丽萍,冯其芳,等. 铝、镉胁迫对空心菜生长及抗氧化特性的影响 [J]. 核农学报, 2015,29(3):0571-0576.
Guo T R, Chen L P, Feng Q F, et al. Effect of aluminum and cadmium treatments on the growth and antioxidant property of water spinach [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2015,29(3):0571-0576.
- [7] 曾希柏,徐建明,黄巧云,等. 中国农田重金属问题的若干思考 [J]. 土壤学报, 2013,50(1):186-195.
Zeng X B, Xu J M, Huang Q Y, et al. Some thoughts on heavy metals in farmland in China [J]. Acta Pedologica Sinica, 2013,50(1):186-195.
- [8] 于方明,余秋平,刘可慧,等. 肠杆菌 FM-1 强化积雪草修复镉污染土壤机理 [J]. 中国环境科学, 2018,38(12):4625-4630.
Yu F M, Yu Q P, Liu K H, et al. Improvement of cadmium-contaminated soil phytoremediation by *Centella asiatica* L. through bioaugmentation of *Enterobacter* sp. FM-1 [J]. China Environmental Science, 2018,38(12):4625-4630.
- [9] Tomasz J, Jerzy D, Mariusz K. Detoxification and simultaneous removal of phenolic xenobiotics and heavy metals with endocrine-disrupting activity by the non-ligninolytic fungus *Umbelopsis isabellina* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018,360:661-669.
- [10] 燕传明,贺 卓,葛占标,等. 两株重金属抗性细菌对铅镉吸附特性的比较研究 [J]. 环境科学学报, 2018,38(9):3597-3604.
Yan C M, He Z, Ge Z B, et al. Comparative study on adsorption characteristics of lead and cadmium by two heavy metal resistant bacteria [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018,38(9):3597-3604.
- [11] Mota R, Rossi F, Andrenelli L, et al. Released polysaccharides (RPS) from *Cyanospora* sp. CCY 0110as biosorbent for heavy metals bioremediation: interactions between metals and RPS binding sites [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016,100:7765-7775.
- [12] Sinha A, Kumar S, Khare S K, et al. Biochemical basis of mercury remediation and bioaccumulation by *Enterobacter* sp. EMB21 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013,169(1):256-267.
- [13] Lu W B, Shi J J, Wang C H, et al. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006,134: 80-86.
- [14] 韩 辉,王晓宇,蔡 红,等. 重金属固定植物促生细菌的筛选及其阻控小麦富集重金属效应 [J]. 环境科学, 2019,40(7):3339-3346.
Han H, Wang X Y, Cai H, et al. Isolation of heavy metal immobilizing and plant growth-promoting bacteria and its effects on reducing heavy metal accumulation in wheat [J]. Environmental Science, 2019,40(7): 3339-3346.
- [15] Wang Q, Chen L, He L Y, et al. Increased biomass and reduced heavy metal accumulation of edible tissues of vegetable crops in the presence

- of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and biochar [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2016, 228: 9–18.
- [16] Etesami H. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 175–191.
- [17] Chen L, He L Y, Wang Q, et al. Synergistic effects of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and immobilizers on the growth and heavy metal accumulation of edible tissues of hot pepper [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 312: 123–131.
- [18] 王铁军, 苏楠楠, 雷 鹏, 等. 重金属污染农田生菜根际重金属固定细菌群落组成及其阻控效应 [J]. 环境科学, 2019, 40(11): 5133–5141.
- Wang T J, Su N N, Lei P, et al. Community structure of the heavy metal immobilized bacteria in the Lettuce (*Lactuca sativa* L.) rhizosphere soil polluted by heavy metals and its effects on reducing heavy metal accumulation in Lettuce [J]. Environmental Science, 2019, 40(11): 5133–5141.
- [19] Han H, Sheng X F, Hu J W, et al. Metal-immobilizing *Serratia liquefaciens* CL-1 and *Bacillus thuringiensis* X30 increase biomass and reduce heavy metal accumulation of radish under field conditions [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 161: 526–533.
- [20] Lenis Y Y, Elmetwally M A, Maldonado-Estrada J G, et al. Physiological importance of polyamines [J]. Zygote, 2017, 25: 244–255.
- [21] Qiao K, Liang S, Wang F H, et al. Effects of cadmium toxicity on diploid wheat (*Triticum urartu*) and the molecular mechanism of the cadmium response [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 374: 1–10.
- [22] 黄作喜, 谢寅峰, 胥 伟, 等. 黄瓜去根苗离体培养条件下多胺对雌花形成的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 32(4): 147–150.
- Huang Z X, Xie Y F, Xu W, et al. The effects of polyamines on formation of female flowers in derooted seedlings of *Cucumis sativus* L. in vitro [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2008, 2(4): 147–150.
- [23] 王晓云, 邹 琦. 多胺与植物衰老关系研究进展 [J]. 植物学通报, 2002, 19(1): 11–20.
- Wang X Y, Zou Q. Advances in studies on relationship between polyamines and plant senescence [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002, 19(1): 11–20.
- [24] Podlešáková K, Ugena L, Spíchal L, et al. Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway [J]. New Biotechnology, 2019, 48: 53–65.
- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2008: 86–115.
- Bao Shidan. Agrochemical analysis of soil [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2008: 86–115.
- [26] Abbas-Zadeh P, Saleh-Rastin N, Asadi-Rahmani H. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils [J]. Acta Physiol Plant, 2010, 32: 281–288.
- [27] 林绍艳, 张 芳, 徐颖洁. 植物中多胺含量超高效液相色谱法的建立 [J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(3): 358–365.
- Lin S Y, Zhang F, Xu Y G. The establishment of UPLC method for measuring polyamines content in plants [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(3): 358–365.
- [28] Jiang C Y, Sheng X F, Qian M, et al. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil [J]. Chemosphere, 2008, 72: 157–64.
- [29] Rajkumar M, Nagendran R, Lee K J. Influence of plant growth promoting bacteria and Cr^{6+} on the growth of Indian mustard [J]. Chemosphere, 2006, 62: 741–748.
- [30] 刘 瑞, 于章龙, 薛 冲, 等. 市售豆芽携带细菌种属鉴定及酸性电解水的杀菌效果 [J]. 食品科学, 2017, 38(17): 168–173.
- Liu R, Yu Z L, Xue C, et al. Identification of bacterial species and microbial inactivation by acidic electrolyzed water on commercial bean sprouts [J]. Food Science, 2017, 38(17): 168–173.
- [31] Meng Y, Zhang L, Wang L, et al. Antioxidative enzymes activity and thiol metabolism in three leafy vegetables under Cd stress [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 173: 214–224.
- [32] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines [J]. Plant Science, 2000, 151: 59–66.
- [33] 舒 艳, 李 冰, 汤春芳. 外源物质对植物积累重金属的调控作用 [J]. 湖北理工学院学报, 2016, 32(1): 8–12.
- Shu Y, Li B, Tang C F. Regulation of heavy metal accumulation in plants by exogenous materials [J]. Journal of Hubei Polytechnic University, 2016, 32(1): 8–12.
- [34] Hsu Y T, Kao C H. Cadmium-induced oxidative damage in rice leaves is reduced by polyamines [J]. Plant and Soil, 2007, 291: 27–37.
- [35] Sun L N, Zhang Y F, He L Y, et al. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 501–509.
- [36] 刘 杨, 温晓霞, 顾丹丹, 等. 多胺对冬小麦籽粒灌浆的影响及其生理机制 [J]. 作物学报, 2013, 39(4): 712–719.
- Liu Y, Wen X X, Gu D D, et al. Effect of polyamine on grain filling of winter wheat and its physiological mechanism [J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(4): 712–719.
- [37] Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2009, 31: 861–864.
- [38] Burd G I, Dixon D G, Glick B R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46: 237–245.
- [39] Xu X, Shi G, Ding C, et al. Regulation of exogenous spermidine on the reactive oxygen species level and polyamine metabolism in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb under copper stress [J]. Plant Growth Regulation, 2011, 63(3): 251–258.
- [40] Han H, Wang Q, He L Y, et al. Increased biomass and reduced rapeseed Cd accumulation of oilseed rape in the presence of Cd-immobilizing and polyamine-producing bacteria [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 353: 280–289.
- [41] Wang J, Li Q, Li M M, et al. Competitive adsorption of heavy metal by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sulfate reducing bacteria [J]. Bioresource technology, 2014, 163: 374–376.

作者简介: 韩 辉(1988–), 男, 安徽阜阳人, 讲师, 博士, 主要从事微生物植物联合修复重金属污染农田. 发表论文 10 余篇.