

文章编号:1003-8701(2012)06-0032-03

# 抗铅微生物的筛选及EDDS螯合诱导黑麦草修复铅污染土壤的效应初探

曹铁华<sup>1</sup>,牟忠生<sup>1</sup>,王淑萍<sup>2</sup>,闫海洋<sup>1</sup>,梁烜赫<sup>1</sup>,范作伟<sup>1</sup>,金荣德<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院,长春 130033; 2. 龙井市农业技术推广中心,吉林 龙井 133400)

**摘要:**从污染的土壤中筛选出两株较高抗铅细菌(CJ1, CJ2)和两株真菌(ZJ1, ZJ2),经过菌株的液体培养对铅的去除率达到了60.6%、51.3%、78.7%、47.2%。其中选择两种去除率高的细菌CJ1和真菌ZJ1,通过黑麦草的盆栽试验,在其内添加不同种类的微生物、EDDS(乙二胺二琥珀酸)及微生物与螯合剂的复合调控,分析了黑麦草吸收铅能力。结果发现,EDDS和真菌的复合处理下黑麦草根部和叶片中的铅含量分别比对照增加了7.7倍和10.68倍。说明复合处理对铅在黑麦草体内的富集和传输上有显著的诱导作用。

**关键词:**微生物筛选;螯合剂;植物;去除率;吸收量

中图分类号:S154.3

文献标识码:A

## Screening of Lead Resistant Microorganism and Preliminary Study on the Effect of Repairing Lead Polluted Soil by EDDS Chelating Induced Ryegrass

CAO Tie-hua<sup>1</sup>, MU Zhong-sheng<sup>1</sup>, WANG Shu-ping<sup>2</sup>, YAN Hai-yang<sup>1</sup>,  
LIANG Xuan-he<sup>1</sup>, FAN Zuo-wei<sup>1</sup>, JIN Rong-de<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;

2. Longjing Agricultural Technology Extension Center, Longjing 133400, China)

**Abstract:** Two strains of bacteria (CJ1, CJ2) and fungi (ZJ1, ZJ2) were isolated from the lead-contaminated soil to investigate their efficacy in decrease lead-contamination. After liquid cultivation in the medium containing high levels of lead, the lead removal rate of each strain were reached at 60.6%, 51.3%, 78.7% and 47.2%, respectively. Then, two strains (CJ1 and fungi ZJ1) which showed the highest removal rate were selected for further study. Two strains, ryegrass, EDDS (ethylenediamine succinic acid) and chelating agent was combined at different composition to study their efficacy in lead uptake. It was found that combining EDDS with ZJ1 showed the best efficacy and the lead content in the roots and leaves of ryegrass were increased by 7.7 times and 10.68 times compared to control, respectively. In a conclusion, the application of ryegrass with combined treatment would stimulate lead uptake by absorption and transmission.

**Keywords:** Microbial screening; Chelating agents; Plants; Removal rate; Absorption

随着工业的发展及农用化学物质种类的增加,农田土壤铅污染日益严重<sup>[1]</sup>。与其他污染物相

比,铅具有累积性、难降解性和隐蔽性三大特点,因此所引起的污染问题一直是研究关注的焦点<sup>[2]</sup>。重金属在土壤中的形态决定重金属的迁移及转化特性<sup>[3]</sup>。利用修复铅富集能力强的植物,吸收土壤中的重金属,并将转运储存在顶部部分,通过收获植物,带走土壤中重金属,对污染土壤进行生态修复,是有效的污染土壤修复技术。黑麦草具有再生能力强、生长快、生物量小的特点,对铅有一定的富集能力,近几年很多学者利用黑麦草修复铅污

收稿日期:2012-08-13

基金项目:吉林省科技厅国际合作项目(20100722)

作者简介:曹铁华(1974-),男,博士,副研究员,主要从事农产品安全研究。

通讯作者:金荣德,男,博士,副研究员,

E-mail: 1961552022@qq.com

染土壤<sup>[4-6]</sup>。

同时,为了提高植物修复体系中的植物生物量和体内重金属浓度,许多研究者利用筛选抗铅微生物<sup>[7-10]</sup>、添加人工螯合剂<sup>[11-12]</sup>及微生物与螯合剂的复合调控<sup>[13-14]</sup>等措施,有效激活土壤中固相结合的重金属,实现土壤中重金属形态转化。翁高艺等报道<sup>[14]</sup>,人工化学调控剂中,EDDS 与铅的金属螯合物的稳定系数与 EDTA 相近,但 EDDS 及其金属螯合物易被生物降解,且潜在的环境风险较 EDTA 低。Huang 等<sup>[15-16]</sup>研究发现,EDDS 能提高重金属在植物根部向地上部转运的能力。微生物及螯合剂生物调控的土壤-植物修复复合处理研究结果中,佟秀春等研究表明<sup>[13]</sup>,土壤中铅投加浓度为 1800 mg/kg,镉投加浓度为 30 mg/kg,EDDS:EL 比例为 1:0,接种菌剂时龙葵对铅的吸收效果最好。

本试验从土壤中筛选 2 株较强去除铅能力的细菌,通过对植株体内铅含量的分析,揭示不同试验处理在铅污染水平下的吸收特征,比较分析了 EDDS 诱导日本黑麦草和 2 种菌株液的添加对铅的吸收积累和耐性特点,为有效揭示黑麦草的植物修复能力及菌株的推广应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试土壤采自长春市绿园区的农田土,其理化性质为有机质 18.7 g/kg,总氮 1.28 g/kg,盐基离子饱和度 CEC17.5 cmol/kg,有效钾 90.1 mg/kg,有效磷 8.7 mg/kg,pH7.2。

供试植物为日本黑麦草(*Perennial ryegrass*),是由日本埼玉县环境科学国际中心提供。

### 1.2 菌株的筛选

称取从铅污染区得到的土壤 1 g,加到含 100 mL 生理盐水的三角瓶中,在 30℃ 振荡培养 30 min,制成样品悬浮液,采用梯度稀释法进行稀释,吸取各梯度样品悬液 0.1 mL,均匀涂布含铅 [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] 浓度为 0、200、400、600、800、1 000 mg/L 的 LB 细菌基础培养基和 PDA 真菌培养基上,培养 3 d。挑取单菌落,进行划线纯化菌株。

### 1.3 培养基组成

细菌培养基(LB 培养基 g/L):酵母 5.0 g,胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,琼脂 20 g,pH 6.8~7.2。用蒸馏水定容至 1 000 mL。马铃薯琼脂培养基:(PDA 培养基 g/L)马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g。

### 1.4 试验方法

微生物筛选:取菌群落总数 CFU 为  $3.6 \times 10^8$  CFU/mL 的细菌悬浮液 1 mL,培养于相应的铅浓度为 40 mg/L 培养液中,30℃ 条件下细菌培养 3 d,真菌在 28℃ 条件下培养 7 d,测定其 660 nm 生长曲线。在 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定铅含量。真菌用蒸馏水洗涤若干次后离心,待测物烘干后,用浓硝酸消化定容至 25 mL 的容量瓶。用原子吸收分光光度法测定培养液和菌体内的铅含量,分析不同菌株对重金属的去除效果。以不加硝酸铅的为对照,每个处理做 3 次重复。

### 1.5 盆栽试验

采用温室盆栽法对黑麦草进行室温培养,平均温度为 22℃。土壤样品采集后经自然风干、锤碎、过 5 mm 筛,每盆装土 1 kg,加入 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 配制浓度为 300 g/kg 的人工污染土壤,放置 10 d。加入蒸馏水使水量保持 60%以上,将筛选得到的 2 种抗铅菌株(CJ1 和 ZJ1)接种到发酵培养液中,振荡培养最优天数。黑麦草生长 8 d,添加 20 mL 菌液。黑麦草收割前一周施用 2 mmol/kg 土(烘干土为基准)EDDS 溶液。试验设 6 个处理,分别为 Pb300;Pb300+EDDS;Pb300+CJ1;Pb300+ZJ1;Pb300+EDDS+CJ1;Pb300+EDDS+ZJ1。做 3 次重复,对照为只加蒸馏水处理,采样时间为第 7、14、22、30 d。

### 1.6 测定方法

重金属含量的测定采用原子吸收分光光度法测定。以不加硝酸铅的为对照,每个处理做 3 次重复。土壤的基本性质采用常规方法测定。

## 2 结果

### 2.1 微生物的筛选及抗铅性的测定

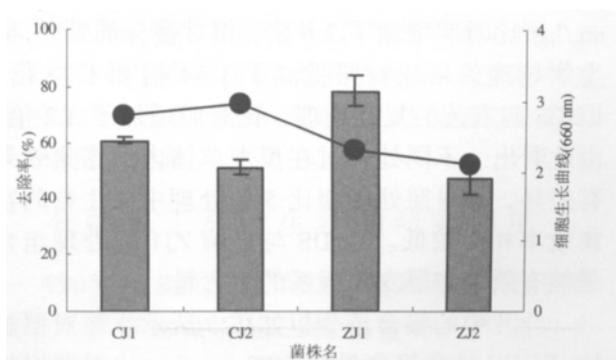


图 1 4 种微生物对培养液中铅的去除率

在不同浓度重金属含量的培养基中分离筛选到 4 种抗铅微生物。其中细菌 2 株分别命名为

CJ1 和 CJ2 真菌 2 株命名为 ZJ1 和 ZJ2。细菌 2 株耐铅的浓度分别达到了 400、600mg/kg, 真菌耐铅浓度达到了 800 mg/kg, 说明真菌的抗铅能力高于细菌。图 1 是在 LB 培养基上培养 3 d 的细菌和在 PDA 培养基上培养 7 d 的真菌, 测定对铅去除率和对细胞生长曲线的效果图。细菌中 CJ1 的去除率最高为 60.7%, 真菌中的 ZJ1 的去除率最高, 达到了 78.7%。但是从整体上, 真菌的生长率低于细菌的细胞生长率。与前人做的试验结果类似<sup>[10, 17-18]</sup>, 是因为真菌的细胞壁对金属有吸附作用, 真菌采用细胞内和细胞外的螯合物固定重金属。

## 2.2 接种菌悬液与 EDDS 的不同处理对植物吸收铅效果的影响

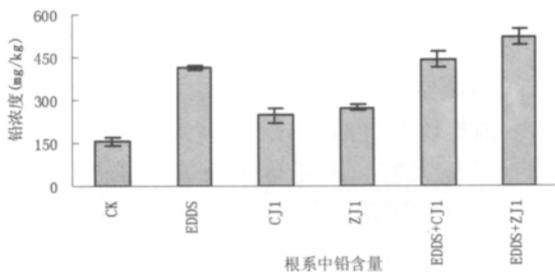


图 2 不同处理根系中铅含量

不同处理试验中, 黑麦草在供试土壤上生长良好, 说明对铅污染具有良好的耐性。图 2 结果表明, 对照处理的铅含量达到了 160 mg/kg, 根系诱导植物提取主要是利用螯合剂来提高植物富集铅的能力。但是姚婧等研究表明<sup>[5]</sup>, 低浓度 (小于 500 mg/kg) 污染时, 对黑麦草种子萌发及幼苗生长有促进作用, 高于 500 mg/kg 时, 表现出抑制和毒害作用。说明在一定范围内黑麦草能吸收土壤中的铅。由图 2 所示, EDDS 处理铅含量为 414.3 mg/kg, 比对照增加了 2.6 倍。相对螯合剂处理, 微生物处理效果比对照提高了 1.54 倍和 1.72 倍。EDDS 与真菌的复合处理, 比对照增加了 3.2 倍。由此看出, 不同处理对在黑麦草体内的富集效果有差异, 与对照处理相比 5 种处理中微生物的富集效率相对较低。EDDS 与真菌 ZJ1 的处理组合最能有效增加黑麦草根系的铅含量。

叶片中的铅含量分析如图 3 所示, 与对照相比, EDDS 处理铅含量为 58.2 mg/kg, 比对照增加了 4.89 倍, 细菌和真菌的微生物处理分别增加了 1.73 倍和 2.08 倍。相对这些处理, EDDS 和菌剂的处理增加幅度比较大。EDDS 加细菌 CJ1 和

EDDS 加真菌 ZJ1 处理铅含量分别为 131.1 mg/kg 和 127 mg/kg, 分别增加 7.7 倍和 10.68 倍。叶片中的铅含量不如根系中铅含量高, 但是与对照相比增加幅度较大。

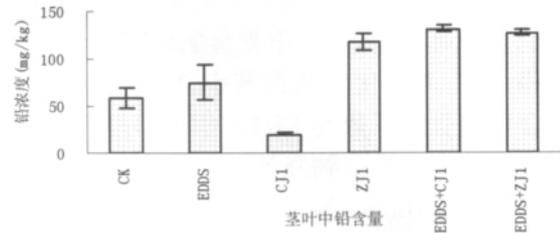


图 3 不同处理叶片中铅含量

## 2.3 接种菌悬液与 EDDS 的不同处理对土壤溶液中铅浓度的影响

植物是吸收土壤溶液中的重金属, 因此对施加不同处理的土壤, 进行了有效态铅浓度分析(图 4)。结果表明, 与对照处理相比, 5 种处理均能提高土壤溶液中铅的浓度。处理 EDDS 的土壤溶液铅含量为 164.5 mg/kg, 比对照提高了 1.47 倍, 与 EDDS 加真菌 ZJ1 处理的 1.51 倍相近。说明螯合剂有效激活了土壤中固相结合的重金属。实现了土壤中重金属形态转化, 从而增加土壤溶液中重金属的浓度。

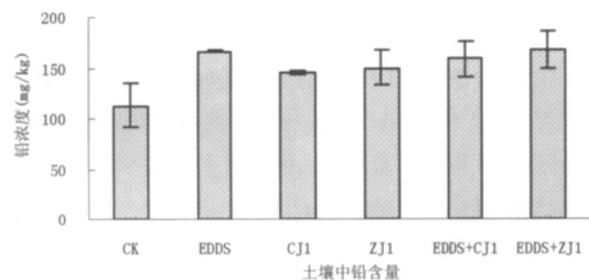


图 4 土壤溶液中铅含量

## 3 结论

本试验从铅污染的土壤中共筛选出 4 株耐高铅浓度的细菌和真菌, 其中分别选择对抗铅率为 78.7% 和 60.6% 的真菌和细菌进行了耐铅试验。通过盆栽试验, 初步了解到螯合剂 EDDS 加真菌的复合处理显著提高黑麦草根系及叶片对铅的吸收浓度。污染土壤中铅形态的转移受诸多方面因素的影响, 如土壤中微生物、有机质含量、植物种类、添加物(如螯合剂、微生物等)的类型等。本研究也发现不同处理之间对土壤铅的吸收能力也不同, 具体转化规律如转化过程中的(下转第 50 页)

次是利木赞组合,有5头牛达到中量以上,其他两个组合的等级相对较低。红安格斯属小型肉用品种。早熟,出肉率高,胴体质量好,肉呈大理石状<sup>[4]</sup>。利木赞为大型专门化肉用品种。生长强度大,肌肉纤维细,8月龄的小牛肉就具有良好的大理石纹<sup>[5]</sup>。从进一步改善肉质方面,选择红安格斯和利木赞作为父本优于夏洛莱和德国黄牛,具有明显的效果。

3.2 蛋白质营养价值高低取决于氨基酸的种类与含量,同时氨基酸又是肉中呈味物质的部分来源。氨基酸分析、检测结果表明,必需氨基酸,天冬氨酸(与鲜、咸、酸味有关)、丝氨酸(与甜、苦味有关)、谷氨酸(与鲜、酸味有关)、甘氨酸(与鲜、甜味有关)、亮氨酸和苯丙氨酸(与苦味有关)<sup>[6]</sup>,与鲜味有关的氨基酸总的趋势是利木赞组合的含量均较高,其次是安格斯组合,而德黄组合相对较低。

3.3 肉品中不饱和脂肪酸含量直接影响到肉的风味和营养价值,尤其是油酸能较好地改善牛肉的风味,并被认为是肉中主要的脂肪酸<sup>[7]</sup>。从脂肪酸分析、检验结果来看,利木赞组合的不饱和脂肪酸、油酸、必需脂肪酸的含量均较高,尤其是不饱

和脂肪酸的含量显著或极显著高于其他3个组合。而德黄组合的油酸含量和夏洛莱组合的不饱和脂肪酸及必需脂肪酸的含量均较低。

综合以上结果初步认为,利木赞和红安格斯组合肉品的营养价值优于夏洛莱和德国黄牛组合,与肉品风味有关的一些氨基酸和脂肪酸含量较高。同时也看出,不同肉牛品种组合间在肉品中某些氨基酸和脂肪酸含量上存在明显的差异。

参考文献:

- [1] 胡成华,李金龙,荣海林,等.不同肉牛品种杂交西门塔尔杂种牛效果的研究[J].黑龙江畜牧兽医,2012(15):4.
- [2] 娄佑武,谢国强.优质肉牛屠宰试验报告[J].江西畜牧兽医杂志,2000(5):8-10.
- [3] 李必胜,杨正德,谢应才,等.黎平黄牛肉质营养特性研究[J].中国牛业科学,2008,34(4):21-23.
- [4] 许尚忠,魏伍川.肉牛高效生产实用技术[M].北京:中国农业出版社,2002:6.
- [5] 胡成华,张国梁.吉林省肉牛品种选择与开发利用初探,吉林省优质肉牛产业化生产技术与发展战略[M].北京:科学出版社,1999:46.
- [6] 武书庚,齐广海.肉品风味形成及其影响因素[J].中国畜牧杂志,2001,37(3):53-55.
- [7] 滑留帅,陈宏,杨奇,等.固原地区秦川牛及其利杂群体屠宰性能的研究[J].中国牛业科学,2008,34(5):1-4.

(上接第34页)微生物所分泌的酶降解生化特征,添加EDDS螯合剂浓度及微生物添加量等有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁炬赫,曹铁华,张磊,等.吉林省农田重金属含量及其在作物中的累积[J].吉林农业科学,2011,36(6):59-62.
- [2] 朱红梅,李国华,崔静,等.重金属铅对土壤微生物活性的影响[J].南京农业大学学报,2011,34(6):125-128.
- [3] 丁竹红,尹大强.螯合剂在重金属污染土壤修复中应用研究进展[J].生态环境学报,2009,18(2):777-782.
- [4] 石汝杰,陆引罡.4种草本植物对酸性黄壤中铅的吸收特性研究[J].水土保持学报,2007,21(3):73-76.
- [5] 姚婧,王友保,李文良,等.黑麦草对土壤中Pb的富集作用及耐受性研究[J].水土保持通报,2008(2):17-21.
- [6] 邢维芹,骆永明,吴龙华,等.铅和苯并[a]芘混合污染酸性土壤上黑麦草生长及对污染物的吸取作用[J].土壤学报,2008,45(3):485-490.
- [7] 曹德菊,王方,胡海荣.抗铅菌株的筛选及对水中铅的去除效果研究[J].环境与健康杂志,2011,28(1):66-68.
- [8] 罗雅,蒋代华,夏颖,等.一株耐铅细菌J3的筛选分离及其生物学特性[J].南方农业学报,2011,42(9):1041-1044.
- [9] 王旭梅,盛楠,王红旗.铅抗性细菌的筛选及其对铅活化的研究[J].东北农业大学学报,2010,41(6):64-67.

- [10] 王俊丽,王忠,任建国.耐铅微生物的筛选及其吸附能力的初步研究[J].污染防治技术,2010,23(1):15-17,63.
- [11] 宋静,钟继承,吴龙华,等.EDTA与EDDS螯合诱导印度芥菜吸取修复重金属复合污染土壤研究[J].土壤,2006,38(5):619-625.
- [12] 王中强,龙翠玲,付宝龙,等.几种螯合剂对玉米吸收重金属的影响[J].贵州师范大学学报,2009,27(3):40-43.
- [13] 佟秀春,王旭梅,王红旗,等.可降解螯合剂及微生物强化植物吸收重金属的研究[J].东北农业大学学报,2011,42(8):101-107.
- [14] 翁高艺,汪自强,吴龙华,等.可降解络合剂及微生物调控对海州香薷修复污染土壤的效应[J].土壤,2005,37(2):152-157.
- [15] Huang J W, Chen J, Berti W B, et al. Phytoremediation of lead-contaminated soil: role of synthetic chelates in lead phytoextraction[J]. Environ Sci Technol, 1997(31):800-805.
- [16] Wu J, Hsu F C, Cunningham S. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints[J]. Environ Sci Technol, 1999,33(11):1898-1904.
- [17] Hiroki, M. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 1992(38):141-147.
- [18] 滕应,黄昌勇,龙健.铅锌银尾矿污染区土壤微生物区系及主要生理类群研究[J].农业环境科学学报,2003,22(4):408-411.