

接种根瘤菌对紫花苜蓿吸收转运 PCB28 及抗 PCB28 污染能力的影响

孙向辉¹, 滕 应², 骆永明^{2,3*}

(1. 丽江师范高等专科学校, 云南 丽江 674100; 2. 中国科学院 南京土壤研究所 土壤环境与污染修复重点实验室, 江苏 南京 210008; 3. 中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探讨豆科植物-根瘤菌共生体系对多氯联苯(PCBs)污染土壤的生物修复机制,以紫花苜蓿作为供试植物,研究了 PCB28(2,4,4'-三氯联苯)胁迫下接种根瘤菌(野生型、突变株)对紫花苜蓿吸收转运 PCB28 及抗 PCB28 污染能力的影响。结果表明,PCB28 胁迫下,接种根瘤菌可提高紫花苜蓿各部位对 PCB28 的吸收富集能力,其中 4 mg/L PCB28 处理条件下,与不接种根瘤菌处理(P)相比,接种野生型根瘤菌处理(P+R)和接种根瘤菌突变株处理(P+SMY)紫花苜蓿各部位 PCB28 含量显著增加,其中茎叶 PCB28 含量分别增加 140.9%和 91.6%;根 PCB28 含量分别增加 64.0%和 44.4%;根瘤对 PCB28 富集能力最高,分别达 1 362.10 $\mu\text{g/kg}$ 和 1 111.34 $\mu\text{g/kg}$ 。PCB28 胁迫下,接种根瘤菌可增强紫花苜蓿的固氮能力,促进其生长,提高其各部位生物量,不同处理条件下紫花苜蓿根、茎叶全氮含量均表现为 P+R>P+SMY>P,生物量表现出相同的变化趋势。在 PCB28 胁迫下接种根瘤菌尤其是野生型根瘤菌,可显著增加紫花苜蓿体内过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,从而提高紫花苜蓿对 PCBs 的抗逆性,促进 PCBs 在紫花苜蓿体内的代谢转化。

关键词: 多氯联苯; 紫花苜蓿; 根瘤菌; 吸收转运

中图分类号: S551⁺.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)03-0065-05

Effects of Rhizobia on Absorption and Transportation of PCB28 and PCB28 Tolerance of Alfalfa

SUN Xiang-hui¹, TENG Ying², LUO Yong-ming^{2,3*}

(1. Lijiang Teachers College, Lijiang 674100, China; 2. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: In order to explore the phytoremediation mechanism of Leguminosae-rhizobia symbiosis in polychlorinated biphenyls(PCBs) contaminated soil, alfalfa (*Medicago sativa* L.) was used as the experimental plant, and wild type and mutative rhizobial strains were used to investigate the effects of rhizobia on absorption, transportation of PCB28 and PCB28 tolerance of alfalfa under PCB28 stress. The results showed that the absorption and transportation ability to PCB2 was increased when alfalfa was inoculated with rhizobia. Compared with the alfalfa without rhizobia(P),

收稿日期: 2013-10-25

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(40621001, 40701080); 中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-404, CXTD-Z2005-4)

作者简介: 孙向辉(1980-), 女, 河南洛阳人, 讲师, 博士, 主要从事环境污染与修复方面的研究。

E-mail: sunxianghui0371@126.com

* 通讯作者: 骆永明(1962-), 男, 浙江义乌人, 研究员, 博士生导师, 主要从事土壤环境与修复管理方面的研究。

E-mail: ymluo@issas.ac.cn

when the alfalfa was inoculated with wild type rhizobial strains(P+R) and mutative rhizobial strains(P+SMY),the concentration of PCB28 was significantly increased by 140.9% and 91.6% in shoots,64.0% and 44.4% in roots,the concentration of PCB28 was highest in root nodules, about 1 362.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1 111.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively. The nitrogen content order in roots and shoots of alfalfa was $P+R>P+SMY>P$, the biomass of shoots and roots showed the same trend. In addition,when alfalfa was inoculated with rhizobia especially wild type rhizobial strains, the activities of peroxidase(POD) and superoxide dismutase(SOD) increased in alfalfa,and thus the tolerance and transformation ability of alfalfa to PCBs were enhanced.

Key words: polychlorinated biphenyls; alfalfa; rhizobia; absorption and transportation

多氯联苯(PCBs)是环境中存在的一类持久性有机污染物,是各国优先控制的 12 种持久性有机污染物之一,具有难降解性和致畸、致癌、致突变的“三致”效应。豆科植物接种根瘤菌对有机污染土壤具有良好的修复作用^[1],其中接种根瘤菌可明显促进紫花苜蓿的生长及其对 PCBs 的吸收和转运,提高紫花苜蓿对 PCBs 污染土壤的修复效率^[2]。然而,目前有关豆科植物-根瘤菌共生体系对有机污染物的吸收代谢机制仍不十分清楚。为此,本研究以 2,4,4'-三氯联苯(PCB28)作为疏水性有机污染物 PCBs 的代表,研究了 PCB28 胁迫下接种不同根瘤菌对紫花苜蓿吸收转运 PCB28 及抗 PCB28 污染的影响,旨在探讨紫花苜蓿-根瘤菌共生体系对 PCBs 污染土壤的生物修复机制,为发展 PCBs 污染土壤的生物修复技术体系提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)种子购于江苏省农业科学院。

PCB28 购自百灵威公司,用丙酮作助溶剂(控制丙酮浓度 $<1\%$)溶解 PCB28,配置一定浓度的储备液。正己烷为色谱纯;丙酮为分析纯,重蒸后使用;其他试剂均为分析纯。

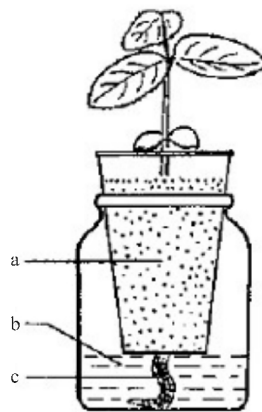
供试菌种:野生型根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti* 1021)和根瘤菌突变株(*Sinorhizobium meliloti* SmY)。先将菌种接种于 YMA 固体平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 活化,然后接入 YMA 液体培养基,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 200 r/min 黑暗培养 2 d。

1.2 试验方法

试验于人工气候室(白天温度 28 $^{\circ}\text{C}$,光照 16 h;晚上温度 25 $^{\circ}\text{C}$,黑暗 8 h)中采用双层玻璃瓶法进行,双层玻璃瓶如图 1 所示。紫花苜蓿的种植设 3 个处理,分别为:不接种根瘤菌(P)、接种野生型根瘤菌(P+R)、接种根瘤菌突变株(P+SMY);每个

处理设 0、4 mg/L 2 个 PCB28 污染水平,共计 6 个处理,每个处理 3 个重复。

选取优良的紫花苜蓿种子,对种子进行表面杀菌,浸种,催芽。待种子发芽后,选取生长一致的发芽种子,用根瘤菌液或无菌水浸泡 30 min,把浸泡过的发芽种子均匀播种于装有无菌蛭石的玻璃瓶内,待 2 叶时定苗,每瓶 8 株。向每瓶中加入 50 mL 无氮营养液,作刻度标记,以后每天浇适量的无氮营养液至标记刻度。植物生长 45 d,待其具有成熟根系和根瘤,将外层瓶中营养液更换为含 PCB28 的 50 mL 无氮营养液,之后恢复正常管理,于处理后 15 d 收获,备测。



a. 装有灭菌蛭石的玻璃瓶; b. 无氮营养液; c. 纱布条

图 1 双层玻璃瓶栽培紫花苜蓿

1.3 测定项目与方法

1.3.1 PCB28 的提取及含量 称取植物样品(根、茎叶、根瘤)2.0 g 放入玻璃离心管中,用 30 mL 正己烷-丙酮提取液(体积比为 1:1)浸提过夜,25 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 15 min,1 500 r/min 离心 5 min,收集提取液。分别用 20 mL 同样的提取液超声提取 2 次,每次 15 min,合并 3 次提取液,旋转蒸发至近干,加入 5 mL 正己烷进行溶液替换,浓缩至 2 mL 后转入复合硅胶柱中,用 25 mL 正己烷洗脱,洗脱液旋转蒸发浓缩,用正己烷定容至 5 mL 备测。

PCB28 含量测定采用带有电子俘获检测器和

自动进样器的 Varian 3800 型气相色谱仪进行。色谱柱:CP-Sil 24CB(30 m×0.25 mm×0.25 mm),进样温度为 260 ℃,检测器温度为 300 ℃。程序升温:初始温度为 120 ℃,0.5 min;10 ℃/min 梯度升温至 180 ℃,持续 1 min;然后 15 ℃/min 梯度升温至 250 ℃,持续 25 min。无分流进样 1 μL,载气为高纯氮气,流速为 1.0 mL/min,用外标法进行测定。

1.3.2 生物量 收获植物样品,按根、茎叶、根瘤分离,用去离子水冲洗干净,吸水纸浸干植物表面水分。称取植物根、茎叶、根瘤鲜质量,然后冷冻干燥,称取干质量。

1.3.3 全氮含量 根、茎叶全氮含量测定采用半微量凯氏定氮法,具体方法参见文献[3]。

1.3.4 酶活性 SOD 活性的测定采用 SOD 试剂盒(购自南京建成生物工程研究所),步骤严格按说明书进行。POD 活性测定:100 μL 酶液加入 2.9 mL 反应混合液(50 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS、0.1 mmol/L EDTA、10 mmol/L 愈创木酚、10 mmol/L H₂O₂)中,在分光光度计上测 470 nm 处吸光度,每 10 s 记录 1 次,连续记录 6 次。以每分钟 OD₄₇₀ 增加

1 为 1 个酶活单位(U)。

1.4 数据分析

所有试验数据用 Excel 2003 和 SPSS 14.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 PCB28 胁迫下不同处理紫花苜蓿各部位对 PCB28 的吸收与转运

由表 1 可以看出,不同处理间紫花苜蓿各部位 PCB28 含量有显著差异,表现为:P+R>P+SMY>P,说明接种根瘤菌有利于紫花苜蓿对 PCB28 的吸收和转运,其中接种野生型根瘤菌的促进作用明显高于接种失去固氮活性的根瘤菌突变株。

对于同一处理条件下,紫花苜蓿各部位 PCB28 含量有极显著差异($P<0.01$),紫花苜蓿根瘤、根对溶液中 PCB28 的吸收富集能力显著高于茎叶($P<0.05$)。同时不添加 PCB28 处理的植株,其茎叶中有少量 PCB28 积累,但根和根瘤中则均未检测出 PCB28 积累,说明根系吸收富集的 PCB28 可向地上部茎叶转运,并可能通过植物挥发作用进入大气,被植物地上部位吸收。

表 1 不同处理紫花苜蓿各部位的 PCB28 含量 μg/kg

处理	根瘤		根		茎叶	
	0 mg/L	4 mg/L	0 mg/L	4 mg/L	0 mg/L	4 mg/L
P	—	—	—	427.57c	15.29c	126.91c
P+SMY	—	1 111.34b	—	617.41b	34.11b	243.24b
P+R	—	1 362.10a	—	701.18a	51.95a	305.75a

注:同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

2.2 PCB28 胁迫下不同处理紫花苜蓿各部位生物量和全氮含量变化

由表 2 可知,无论是否添加 PCB28,接种根瘤菌总体上均可以显著提高紫花苜蓿各部位生物量,且接种野生型根瘤菌对植物生物量的促进作用显著高于突变株,即 P+R>P+SMY>P。PCB28 胁迫

可抑制紫花苜蓿生长,降低其各部位生物量,其中 P+SMY 处理其根和茎叶生物量分别较不添加 PCB28 处理降低 42.9%和 42.0%,而 P+R 处理则分别降低 25.5%和 39.7%。可见,接种野生型根瘤菌有利于降低 PCB28 对植物的毒害作用,缓解 PCB28 对植物生长的抑制。

表 2 不同处理紫花苜蓿各部位生物量 g

处理	根瘤		根		茎叶	
	0 mg/L	4 mg/L	0 mg/L	4 mg/L	0 mg/L	4 mg/L
P	—	—	0.36b	0.11c	0.42c	0.22c
P+SMY	0.06a	0.05a	0.35b	0.20b	0.50b	0.29b
P+R	0.11a	0.07a	0.47a	0.35a	0.63a	0.38a

注:根、茎叶生物量为干质量,根瘤生物量为鲜质量。

由表 3 可知,不论添加 PCB28 与否,不同处理条件下紫花苜蓿根、茎叶全氮含量总体上表现为:P+R>P+SMY>P,其中 P+R 和 P+SMY 处理地上部全氮含量显著高于 P 处理,与生物量表现

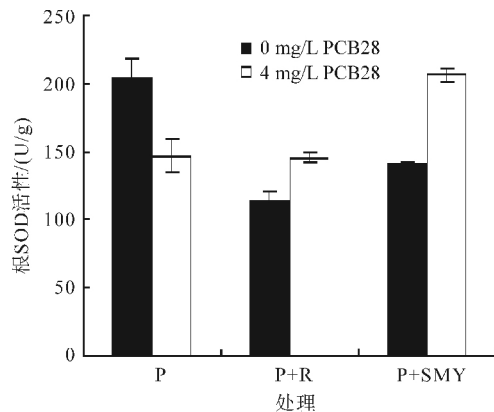
出相同的变化趋势。可见,接种根瘤菌使紫花苜蓿具有很强的固氮能力,可有效提高紫花苜蓿对环境氮素营养的吸收与利用,从而促进植物生长。

表 3 不同处理紫花苜蓿根、茎叶全氮含量 g/kg

处理	根		茎叶	
	0 mg/L	4 mg/L	0 mg/L	4 mg/L
P	16.21a	17.72a	14.51b	16.69b
P+SMY	16.32a	15.72a	19.00a	20.82a
P+R	17.70a	18.88a	21.51a	21.85a

2.3 PCB28 胁迫下不同处理紫花苜蓿体内保护酶活性的变化

从图 2 可以看出,添加 PCB28 后,P+R 和



P+SMY处理紫花苜蓿根、叶片内 SOD 活性均显著提高 ($P<0.05$),而 P 处理则明显下降。在 PCB28 胁迫下,紫花苜蓿叶片中 SOD 活性表现为: $P+R>P+SMY>P$,与 P 处理相比,P+R 和 P+SMY 处理 SOD 活性分别提高 12.39% 和 11.06%,且达到显著水平 ($P<0.05$)。紫花苜蓿根中 SOD 活性表现为 P+SMY 处理显著高于 P+R 和 P 处理 ($P<0.05$),但 P+R 和 P 处理之间无显著差异 ($P>0.05$)。

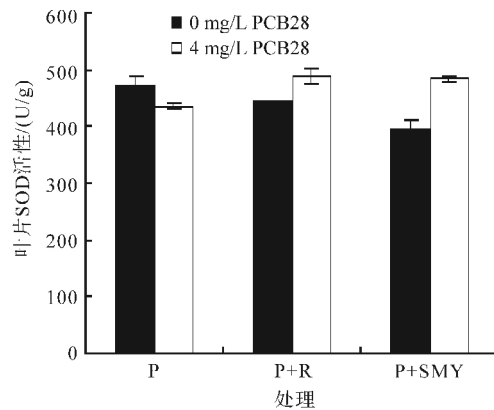


图 2 不同处理紫花苜蓿根和叶片中 SOD 活性

从图 3 可以看出,添加 PCB28 后,P+R 和 P+SMY 处理紫花苜蓿叶片、根中 POD 活性增强,而 P 处理则有所下降,与 SOD 活性呈现相同的变化趋势。在 PCB28 胁迫下,P+R 和 P+

SMY 处理紫花苜蓿根、叶片中 POD 活性均高于 P 处理,其中 P+R 处理根、叶片中 POD 活性分别增加 34.40% 和 51.40%,且达显著水平 ($P<0.05$)。

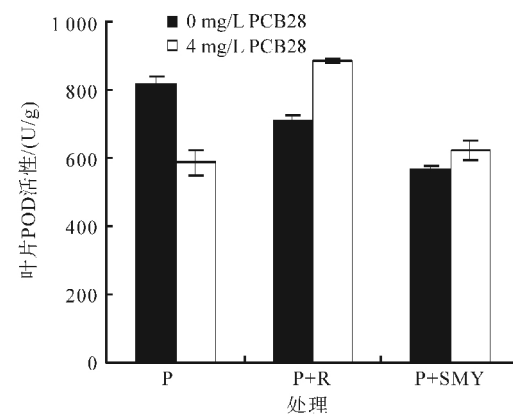
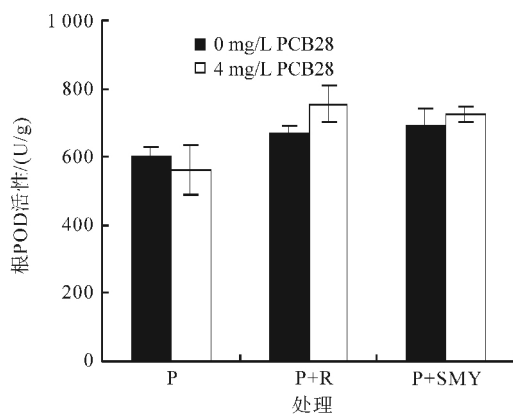


图 3 不同处理紫花苜蓿根和叶片中 POD 活性

3 结论与讨论

植物对有机污染物的直接吸收作用以及植物分泌酶类的生物降解作用是植物修复有机污染的 2 个重要机制^[4-5]。

Aken 等^[6]认为,植物能够吸收或吸附环境中的

有机污染物,植物吸收的化合物可以被植物体内的酶进一步代谢转化或者通过植物表面挥发进入大气。而植物叶片角质层中脂肪含量非常高,是脂溶性化合物进入植物的一个主要通道^[7]。本研究发现,植物地下部根和根瘤可以大量吸收富集溶液中的 PCB28,并将其吸收的一部分转移、积累到地上

部分茎叶中,这与 Asai 等^[8]的研究结果基本一致。而不添加 PCB28 处理紫花苜蓿茎叶中的 PCB28 积累,一方面可能来源于其对 PCB28 胁迫处理植物经挥发作用进入大气中 PCB28 的吸收,另一方面可能来源于其对经由试验装置本身挥发进入大气中 PCB28 的吸收。Suominen 等^[1]认为,由于根瘤菌本身的降解作用以及根瘤菌固氮对植物生长的促进作用,山羊豆接种根瘤菌后可以显著提高其对石油污染土壤的修复效应。本研究选用野生型根瘤菌和可诱导植物结瘤但无固氮活性的根瘤菌突变株为试验材料,研究发现,接种根瘤菌有助于缓解 PCB28 对植物生长的抑制作用,促进植物对 PCB28 的吸收转运,同时,接种野生型根瘤菌可有效增强紫花苜蓿的固氮能力,提高其对环境中氮素营养的吸收与利用,促进其生长,提高其各部位生物量和对 PCB28 的吸收富集量。

逆境生理学研究发现,植物在受到有机物污染、营养元素缺乏等各种逆境胁迫时会产生相应的生理响应机制,引起一系列保护酶类如 SOD、POD 等活性的变化^[9-17],而且植物 POD 还参与植物对 PCBs 的生物代谢作用^[18-20]。一般认为,植物在遭受逆境胁迫时体内氧自由基增多,为了抵抗逆境对植物造成的伤害,植物体内保护酶活性会增加,以便清除氧自由基,减少膜脂过氧化^[21]。本研究发现,紫花苜蓿受到 PCB28 胁迫后,体内 SOD、POD 活性有所降低,研究结果与 Mackova 等^[22]和刘亚云等^[23]基本一致,这可能与试验过程中采用无氮营养液培养,紫花苜蓿同时遭受氮营养元素缺乏,从而超出紫花苜蓿本身调节范围有关。但接种根瘤菌尤其是野生型根瘤菌,则可以有效诱导紫花苜蓿体内 SOD、POD 活性的提高,从而增加其对 PCBs 的抗性,促进其对 PCBs 的吸收代谢能力。

参考文献:

- [1] Suominen L, Jussila M M, Makelainen K, et al. Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil contaminated soil[J]. Environ Pollut, 2000, 107: 239-244.
- [2] 徐莉, 滕应, 张雪莲, 等. 多氯联苯污染土壤的植物-微生物联合田间原位修复[J]. 中国环境科学, 2008, 28(7): 646-650.
- [3] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [4] Aslund M L W, Rutter A, Reimer K J, et al. The effects of repeated planting, planting density, and specific transfer pathways on PCB uptake by *Cucurbita pepo* grown in field conditions[J]. Sci Total Environ, 2008, 405(1/3): 14-25.
- [5] Barber J L, Thomas G O, Kerstiens G, et al. Current issues and uncertainties in the measurement and modeling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs[J]. Environ Pollut, 2004, 128: 99-138.
- [6] Aken B V, Correa P A, Schnoor J L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls: New trends and promises[J]. Environ Sci Technol, 2010, 44: 2767-2776.
- [7] Moeckel C, Thomas G, Barber J, et al. Uptake and storage of PCBs by plant cuticles[J]. Environ Sci Technol, 2008, 42: 100-105.
- [8] Asai K, Takagi K, Shimokawa M, et al. Phytoaccumulation of coplanar PCBs by *Arabidopsis thaliana*[J]. Environ Pollut, 2002, 120: 509-511.
- [9] 米少艳, 靖姣姣, 白志英, 等. 低磷对小麦代换系幼苗根系保护酶活性和丙二醛含量的影响及染色体效应[J]. 华北农学报, 2013, 28(2): 91-95.
- [10] 卢晓丹, 高彦征, 凌婉婷, 等. 多环芳烃对黑麦草体内过氧化物酶和多酚氧化酶的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 1969-1973.
- [11] 韩启厚, 古瑜, 韩玉敏, 等. 菜豆胁迫抗性生理研究进展[J]. 天津农业科学, 2011, 17(3): 21-24.
- [12] 郭智娟, 荣发, 李莉梅. 水稻基因型间耐铝胁迫差异及其机理初探[J]. 现代农业科技, 2007(12): 95-97.
- [13] 李丹丹, 张付远. 高温胁迫对巨桉幼苗生理特性的影响[J]. 现代农业科技, 2011(23): 262, 269.
- [14] 尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 105-110.
- [15] 杨美红, 贾俊仙, 李国锋, 等. 水分胁迫对不同耐旱性品种小麦幼芽、幼苗的保护酶和淀粉酶活性的影响[J]. 山西农业科学, 2001, 29(1): 45-48.
- [16] 刘华山, 李晶新, 韩锦峰, 等. 二氯喹啉酸胁迫下 SNP 对烟苗活性氧及保护酶系统的修复效应[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 156-159.
- [17] 卢敏敏, 孙胜. 镉胁迫对小型西瓜幼苗生长及脂膜过氧化的影响[J]. 山西农业科学, 2008, 36(12): 64-66.
- [18] Macek T, Mackova M. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation[J]. Biotechnol Adv, 2000, 18(1): 23-34.
- [19] Chroma L, Mackova M, Kucerova P, et al. Enzymes in plant metabolism of PCB and PAHs[J]. Acta Biotechnol, 2002, 22: 35-41.
- [20] Kucerova P, Mackova M, Chroma L. Metabolism of polychlorinated biphenyls by *Solanum nigrum* hairy root clone CNC-90 and analysis of transformation products[J]. Plant Soil, 2000, 225: 109-115.
- [21] Wang B, Liu C Q, Wu Y. Effect of heavy metals on the activity of external carbonic anhydrase of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and microalga from Karst Lakes[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2005, 74: 227-233.
- [22] Mackova M, Macek T, Ocenaskova J, et al. Bio-degradation of polychlorinated biphenyls by plant cells[J]. Int Biodeter Biodegr, 1997, 39(4): 317-325.
- [23] 刘亚云, 陈桂珠. 植物修复多氯联苯研究进展[J]. 应用生态学报, 2006, 17(2): 325-330.