

叶维雁,吴海波,刘惠民,等. 2 株番木瓜根际促生菌的解磷解钾作用[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):247-251.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.064

2 株番木瓜根际促生菌的解磷解钾作用

叶维雁^{1,2}, 吴海波¹, 刘惠民¹, 熊 智¹, 王樱潼¹

(1. 西南林业大学国家林业局西南地区生物多样性保育重点实验室, 云南昆明 650224;

2. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西南宁 530001)

摘要:用平板涂布、划线与固体平板-透明圈法从番木瓜根际土壤中筛选出 2 株解磷解钾细菌(PK-1、PK-2)。通过摇瓶培养,测定 PK-1、PK-2 发酵液中水溶性磷、水溶性钾含量和磷、钾总量;分析 PK-1、PK-2 解磷解钾能力;对 PK-1、PK-2 进行分子鉴定。结果表明,PK-1 溶解无机磷能力的溶量为 1.63 $\mu\text{g/mL}$,PK-2 溶量为 17.26 $\mu\text{g/mL}$,溶解无机磷能力表现为 PK-1 < PK-2,即 PK-2 具有更强的解无机磷能力;PK-1 溶解有机磷能力的溶量为 8.49 $\mu\text{g/mL}$,PK-2 溶量为 2.38 $\mu\text{g/mL}$,溶解有机磷能力表现为 PK-1 > PK-2,即 PK-1 的解有机磷能力更好;PK-1 溶解钾能力的溶量为 8.15 $\mu\text{g/mL}$,PK-2 溶量为 8.49 $\mu\text{g/mL}$,溶解钾能力表现为 PK-1 < PK-2,PK-1 和 PK-2 的解钾能力接近。经 16S rDNA 序列分析,初步鉴定 PK-1 为肠杆菌属(*Enterobacter*),PK-2 为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。供试菌株 PK-1 和 PK-2 具有良好的解磷解钾功能,可为进一步研制专用的番木瓜微生物肥料提供菌种资源和依据。

关键词:番木瓜;根际促生菌;解磷;解钾;鉴定;肠杆菌属;芽孢杆菌属

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0247-04

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称 PGPR)指生存于植物根际系统,并能促进或调节植物生长的一类微生物,通常具有固氮、溶磷、解钾、产生植物激素、分泌抗生素等生理活性^[1-4]。目前,研究比较多的是 PGPR 的解磷、解钾、固氮功能。磷和钾是植物生长必需的大量营养元素,而我国土壤中可供植物直接吸收利用的磷、钾资源有限,在生产实践中,为了提高作物产量,每年都要向土壤中施入大量的可溶性磷肥和钾肥,造成土壤板结、地力下降、环境污染、农产品品质下降等问题^[5]。PGPR 在其生命活动过程中通常能将土壤矿物质中难以被植物吸收的磷、钾释放出来,转化成易溶性的养分,提升有效磷、有效钾的供应水平,促进植物生长。随着人们环保意识的日益提高,应用 PGPR 的解磷解钾能力促进植物生长及提高其产量越来越受到关注,PGPR 作为一种宝贵的资源逐渐成为研究热点^[6]。番木瓜(*Carica papaya* L.)是热带、亚热带地区广泛栽培的多年生常绿大型草本植物,别称万寿果、木瓜,果实含有丰富的糖类、胡萝卜素、木瓜酶,富含钙、磷、钾等矿物质,还具有清除自由基、增强人体免疫力、抗病原体等保健作用^[7-8]。目前,PGPR 解磷解钾作用在许多作物上的应用已得到诸多报道,但在番木瓜上的应用却鲜有报道。因此,开展番木瓜 PGPR 菌株解磷解钾能力的研究,对研制新型微生物肥料以提高番木瓜的产量和质

量具有重要的现实意义。

本研究从番木瓜根际土壤中筛选出 2 株 PGPR,并对其解磷解钾作用进行分析,旨在为进一步研究番木瓜 PGPR 的生态适应性,研制番木瓜的微生物肥料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

所用仪器主要有超净工作台、电热恒温鼓风干燥箱、立式压力蒸汽灭菌器、恒温培养振荡器、原子吸收分光光度计、紫外-可见分光光度计、高速冷冻离心机、电子分析天平、纯水机、恒温水浴锅、多功能梯度 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、微波炉、乙醇灯、1 L 移液器;所用试剂主要有琼脂、琼脂糖、蛋白胨、酵母浸出汁、牛肉膏、氯化钠、葡萄糖、2 × Taq PCR MasterMix。

1.2 土样

采自云南省西双版纳州普文镇的番木瓜地,土壤系番木瓜的根际土壤。

1.3 培养基

1.3.1 菌株分离纯化培养基 菌株的分离纯化采用牛肉膏蛋白胨培养基(NA)。

1.3.2 解无机磷培养基 (1)解无机磷固体培养基:葡萄糖 10.00 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.00 g, MgCl_2 5.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0.20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.10 g,琼脂 15.00 g,溶于去离子水中,加热溶化,混匀,加去离子水定容至 1 L,调 pH 值为 7.4,分装于 250 mL 锥形瓶中,121 $^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min,分装。(2)解无机磷液体培养基:除缺少琼脂外,其他物质含量与解无机磷固体培养基相同。

1.3.3 解有机磷培养基 解有机磷固体培养基:

(1)蒙金娜基础培养基。葡萄糖 10.00 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

收稿日期:2016-06-15

基金项目:云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(编号:ZK14A101);云南省教育厅科学研究基金(编号:515006017);西南林业大学林学一级学科博士研究生创新基金。

作者简介:叶维雁(1988—),男,广西北海人,硕士,主要从事果树生物技术研究。E-mail:flyngwyw@163.com。

通信作者:吴海波,博士,讲师,主要从事森林培育、经济林栽培方面的教学与研究。E-mail:787337247@qq.com。

0.50 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30 g、 NaCl 0.30 g、 KCl 0.30 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.36 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 CaCO_3 5.00 g、琼脂 15.00 g,溶于去离子水中,加热溶化,混匀,加去离子水定容至 1.00 L,调 pH 值至 7.4,分装于 250 mL 锥形瓶中,121 ℃ 灭菌 20 min,分装。

(2)卵黄稀释液。用乙醇擦净鸡蛋外壳,用解剖刀切破鸡蛋两端,流去蛋清后将蛋黄流入已灭菌的锥形瓶中,约加入等量的无菌水,摇匀。

(3)将蒙金娜基础培养基熔化,冷却至 50 ℃ 后,立即加入卵黄液,每 100 mL 基础培养基加卵黄稀释液 3~4 mL 作为有机磷源,混匀后分装于培养皿内凝成平板。

解有机磷液体培养基:除缺少琼脂外,其他物质含量与解有机磷固体培养基相同。

1.3.4 解钾培养基 (1)解钾固体培养基:蔗糖 10.0 g,酵母膏 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, Na_2HPO_4 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCO_3 1.0 g,钾长石粉 10.0 g,琼脂 15.0 g,溶于去离子水中,加热溶化,混匀,加去离子水定容至 1.0 L,调 pH 值至 7.4,分装于 250 mL 锥形瓶中,121 ℃ 灭菌 20 min,分装。(2)解钾液体培养基:除缺少琼脂外,其他物质含量与解钾固体培养基相同。

1.4 分离及纯化菌株

取番木瓜根,用无菌去离子水轻柔冲洗,以去除外围土壤,用刷子刷取番木瓜根际土 1 g,加入装有 100 mL 无菌去离子水和若干玻璃珠的锥形瓶中,150 r/min 混合 30 min,使根际土壤中的微生物细胞充分分散,制作根际土混合液。将根际土混合液梯度稀释后,分别从 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释度中吸取 100 μL 稀释液涂布于 NA 固体培养基上,设 3 个重复。于 37 ℃ 恒温培养箱内培养,根据菌落颜色、形状、大小等特征,观察并挑取不同的单菌落在 NA 培养基上划线纯化,连续 3~5 次划线,获取纯化的菌株,4 ℃ 斜面保存,备用。

1.5 解磷能力的测定

1.5.1 解磷能力的平板测定 (1)解无机磷:将活化好的菌株点接于解无机磷固体培养基平板上,于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 7 d,观察透明圈的产生情况,并测量透明圈直径(D)和菌落直径(d),根据 D/d 值大小确定解无机磷能力的大小^[9]。(2)解有机磷:与解无机磷能力平板测定方法相同。

1.5.2 解磷能力的摇瓶测定 解无机磷:(1)种子液制备。菌株经平板划线活化后,挑取 1 环接入 40 mL NA 液体培养基中,以不接菌的 NA 培养基为对照,37 ℃、150 r/min 恒温摇床培养 2~4 d,制备菌液。用分光光度计测定各菌液的吸光度(600 nm),最后用无菌去离子水将各菌液稀释成相同吸光度作为种子液。(2)发酵液制备。按 40 mL 解无机磷液体培养基接入 1 mL 种子液接入菌种,同时接入(1)中的 NA 培养基 1 mL 作为对照,发酵液及对照在 37 ℃、150 r/min 条件下培养 7 d。(3)发酵液处理。发酵液在冷冻离心机下以 8 000 r/min 的转速离心 15 min 后取上清液 2 mL 移至 50 mL 容量瓶中,用钼锑抗比色法^[10]测定发酵液中可溶性磷含量。细菌溶解无机磷的量 = 发酵液可溶性磷含量 - 对照培养液可溶性磷含量。

发酵液静置 30 min,磷酸钙沉淀后,移取 2 mL 上清液至 50 mL 锥形瓶中,加 H_2O_2 溶液 0.5 mL,微波炉加热消解,沸

腾后改用小火维持,浓缩至 1~2 mL 后关闭微波炉用余热将溶液蒸干,以除掉过量的 H_2O_2 溶液,冷却,用 5 mL 去离子水冲洗锥形瓶内壁,加浓硫酸 2 滴(约 0.1 mL),摇匀后小心转动锥形瓶,使酸液同内壁接触,然后加热 1~2 min,使残渣溶解,溶液剩 3~4 mL 并冷却后,转入 50 mL 容量瓶中,用去离子水定容至 50 mL 作为待测液。按上述步骤处理对照。待测液 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用钼锑抗比色法测定发酵液中全磷含量。

解有机磷:与解无机磷能力的摇瓶测定方法相同。

细菌溶解有机磷的量 = 发酵液可溶性磷含量 - 对照培养液可溶性磷含量。

1.6 解钾能力的测定

1.6.1 解钾能力的平板测定 将活化好的菌株点接于解钾固体培养基平板上,于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 7 d,观察透明圈的产生情况,并测量透明圈直径(D)和菌落直径(d),根据 D/d 值大小确定菌株的解钾能力。

1.6.2 解钾能力的摇瓶测定 (1)种子液制备。菌种经平板划线活化后,挑取 1 环接入 40 mL NA 培养基中,以不接菌的 NA 培养基为对照,37 ℃、150 r/min 恒温摇床培养 2~4 d,制备菌液。用分光光度计测定各菌液的吸光度(600 nm),最后用无菌去离子水将各菌液稀释成相同吸光度为种子液。(2)发酵液制备。按 35 mL 解钾液体培养基接入 1 mL 种子液接入菌种,同时接入(1)中的 NA 培养基 1 mL 作为对照,发酵液及对照在 37 ℃、150 r/min 条件下培养 7 d。(3)发酵液处理。发酵液在冷冻离心机下以 8 000 r/min 的转速离心 8 min,取上清液 5 mL 用去离子水稀释 8 倍,使用原子吸收分光光度计测定有效钾浓度。

细菌溶解钾的量 = 发酵液可溶性钾含量 - 对照培养液可溶性钾含量。

发酵液静置 30 min,钾长石粉沉底后,移取 5 mL 上清液至 50 mL 锥形瓶中,加 H_2O_2 溶液 1.5 mL,微波炉加热消解,沸腾后改用小火维持,浓缩至 3 mL 后关闭微波炉用余热将溶液蒸干,以除掉过量的 H_2O_2 溶液,冷却,用 15 mL 去离子水冲洗锥形瓶内壁,加浓硫酸 5 滴(约 0.25 mL),摇匀后小心转动锥形瓶,使酸液同内壁接触,然后加热 1~2 min,使残渣溶解,溶液剩 6~8 mL 并冷却后,转入 50 mL 容量瓶中,用去离子水定容至 50 mL 作为待测液。按上述步骤处理对照。待测液 8 000 r/min 离心 8 min 后,取上清液,用原子吸收分光光度计测定发酵液中全钾含量。

1.7 16S rDNA 基因序列分析

斜面保存的菌株经 NA 液体培养基摇菌活化后使用离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取细菌基因组 DNA,保存于 -20 ℃ 冰箱内。以总 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物^[11]进行 PCR,扩增 16S rDNA 近乎全长片段。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其序列为 27F:5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' 和 1492R:5' - GGTTCACCTGTTACGACTT - 3'。

PCR 采用 50 μL 反应体系:2 \times Taq PCR MasterMix 25.0 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 2.5 μL ,DNA 模板 1.0 μL (20 ng 左右),灭菌去离子水补足至 50.0 μL 。

PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,

58 ℃ 复性 1 min, 72 ℃ 延伸 3 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。根据测序所得 16S rDNA 序列在 GenBank 中 Blast 搜索同源序列。通过 MEGA 6 软件, 以邻接法(Neighbour - Joining) 构建系统发育进化树, Bootstrap 值为 1 000^[12]。

2 结果与分析

2.1 解磷解钾的平板测定

从云南省西双版纳州普文镇的番木瓜根际土壤里筛选得到 2 株解磷解钾细菌, 编号为 PK - 1 和 PK - 2。通过固体平板法, 根据透明圈直径 D 与菌落直径 d 的比值, 即 D/d 值的大小初步测定菌株 PK - 1 和 PK - 2 的解磷解钾能力。由表 1 可知, 菌株 PK - 1 和 PK - 2 在解有机磷与解钾能力方面都存在一定的差异。解有机磷方面, PK - 1 和 PK - 2 的透明圈直径都超过了 12.00 mm, PK - 1 的 D/d 值达到 3.48, 大于 PK - 2 的 1.46, 说明 PK - 1 的解有机磷能力较强; 解钾方面, PK - 1 与 PK - 2 的透明圈直径都超过了 21.00 mm, PK - 2 的 D/d 值达到 1.65, 大于 PK - 1 的 1.26, 说明 PK - 2 的解钾能

力强于 PK - 1; 解无机磷方面, PK - 1 和 PK - 2 均未出现透明圈。

2.2 解磷解钾的摇瓶测定

对菌株 PK - 1 和 PK - 2 进行 7 d 的解磷解钾摇瓶培养后测得发酵液中无机磷全磷与可溶性磷含量、有机磷全磷与可溶性磷含量及全钾与可溶性钾含量(表 2)。由表 2 可知, 菌株 PK - 1 和 PK - 2 对无机磷、有机磷和钾都表现出不同的降解作用。解无机磷(磷酸钙)方面, PK - 1 和 PK - 2 发酵液中全磷的质量浓度分别为 4.30、43.65 $\mu\text{g/mL}$, 同时 PK - 1 和 PK - 2 的解磷量分别为 1.63、17.26 $\mu\text{g/mL}$, 说明 PK - 2 解无机磷的能力明显强于 PK - 1; 在解有机磷(卵磷脂)方面, PK - 1 和 PK - 2 发酵液中全磷的质量浓度分别为 32.41、10.86 $\mu\text{g/mL}$, 同时 PK - 1 和 PK - 2 的解磷量分别为 8.49、2.38 $\mu\text{g/mL}$, 说明 PK - 1 对有机磷的溶解能力明显强于 PK - 2, 与固体平板法测定的解有机磷能力的结果一致; 解钾方面, PK - 1 和 PK - 2 发酵液中全钾的质量浓度分别为 9.54、9.01 $\mu\text{g/mL}$, 同时 PK - 1 和 PK - 2 的解钾量分别为 8.15、8.49 $\mu\text{g/mL}$, 说明 PK - 2 的解钾能力略强于 PK - 1, 与固体平板法测定的解钾能力的结果一致。

表 1 固体平板解磷解钾效果测定

| 菌株编号 | 无机磷 | | | 有机磷 | | | 钾 | | |
|--------|----------------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|
| | $D(\text{mm})$ | $d(\text{mm})$ | D/d | $D(\text{mm})$ | $d(\text{mm})$ | D/d | $D(\text{mm})$ | $d(\text{mm})$ | D/d |
| PK - 1 | — | — | — | 14.53 | 4.18 | 3.48 | 21.47 | 17.10 | 1.26 |
| PK - 2 | — | — | — | 12.93 | 8.84 | 1.46 | 21.84 | 13.26 | 1.65 |

表 2 摇瓶解磷解钾效果测定

| 菌株编号 | 无机磷 | | 有机磷 | | 钾 | |
|--------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | 全磷 | 可溶性磷 | 全磷 | 可溶性磷 | 全钾 | 可溶性钾 |
| PK - 1 | 4.30 | 1.63 | 32.41 | 8.49 | 9.54 | 8.15 |
| PK - 2 | 43.65 | 17.26 | 10.86 | 2.38 | 9.01 | 8.49 |

2.3 16S rDNA 基因序列测定及分析

提取的菌株 PK - 1 和 PK - 2 基因组 DNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰, 无非特异性条带, 可用作 16S rDNA PCR 扩增的模板。菌株 PK - 1 和 PK - 2 的 16S rDNA PCR 扩增采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果在 1 485 bp 处有 1 条明亮的特征条带, 并且无其他非特异性条带(图 1)。

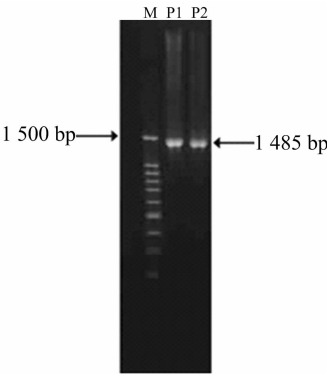


图 1 PCR 扩增菌株 PK - 1 和 PK - 2 的 16S rDNA 序列

将菌株 PK - 1 和 PK - 2 的 16S rDNA 基因测序所得序列, 采用 Blast 进行同源性比较, 与 GenBank 中的核酸数据对比分析, 选取同源性较高的代表菌株, 以 16S rDNA 基因序列

为基础, 构建系统发育树。从图 2 中可以看出菌株 PK - 1 与肠杆菌属(*Enterobacter*) 的细菌自然聚为 1 支, 它的 16S rDNA 序列与河生肠杆菌[*Enterobacter amnigenus* (JQ063000)] 有较高的同源性, 相似度达 100%, 因此可鉴定菌株 PK - 1 为肠杆菌属。菌株 PK - 2 与芽孢杆菌属(*Bacillus*) 聚为 1 群(图 3), 它的 16S rDNA 序列与同温层芽孢杆菌[*Bacillus stratosphericus* (KX262677)] 有较高的同源性, 相似度为 100%, 因此可将菌株 PK - 2 鉴定为芽孢杆菌属。

3 结论与讨论

从云南省西双版纳州普文镇番木瓜根际土壤中筛选得到 2 株解磷解钾细菌 PK - 1 和 PK - 2, 通过平板测定 D/d 值和摇瓶测定发酵液中的全磷、全钾含量和可溶性磷、可溶性钾含量评价其解磷、解钾能力。在解磷解钾能力的平板测定试验中, PK - 1 解有机磷的 D/d 值为 3.48, 大于 PK - 2 的 1.46; PK - 2 解钾的 D/d 值为 1.65, 大于 PK - 1 的 1.26; 解无机磷平板里 PK - 1 和 PK - 2 均没有出现透明圈。解磷、解钾能力的摇瓶测定试验中 PK - 2 溶解无机磷的量为 17.26 $\mu\text{g/mL}$, 明显高于 PK - 1 的 1.63 $\mu\text{g/mL}$; PK - 1 溶解有机磷的量为 8.49 $\mu\text{g/mL}$, 明显高于 PK - 2 的 2.38 $\mu\text{g/mL}$; PK - 2 溶解解钾的量为 8.49 $\mu\text{g/mL}$, 略高于 PK - 1 的 8.15 $\mu\text{g/mL}$ 。解有机磷和解钾方面, 菌株 PK - 1 和 PK - 2 在摇瓶测定试验和平板测定试验中的解磷、解钾效果基本一致, 这进一步验证了固体平板试验的结果, 说明溶解有机磷的能力为 PK - 1 > PK - 2, PK - 2 溶解钾的能力大于 PK - 1 但不显著; 解无机磷方面, 菌株 PK - 1 和 PK - 2 在平板测定试验中均无透明圈出现, 但在摇瓶测定试验中 PK - 1 和 PK - 2 表现出一定的解无机磷

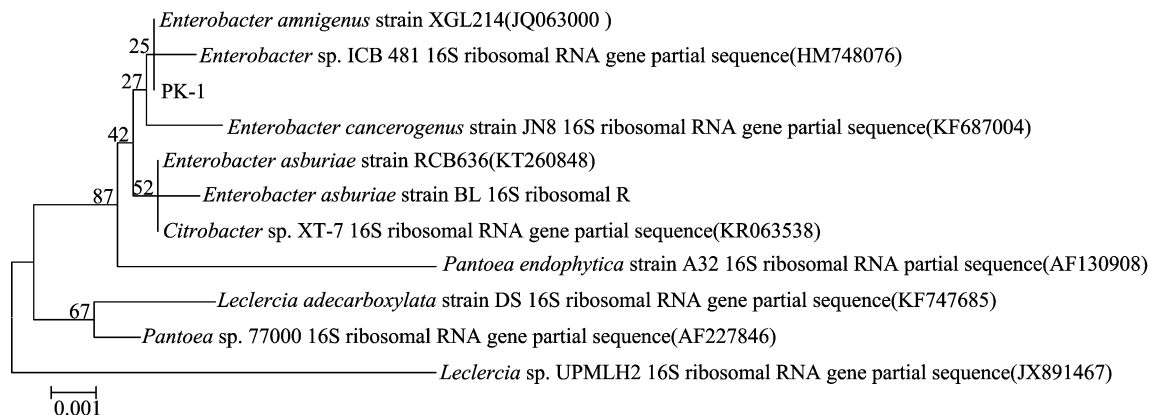


图2 菌株 PK-1 的 16S rDNA 系统发育树

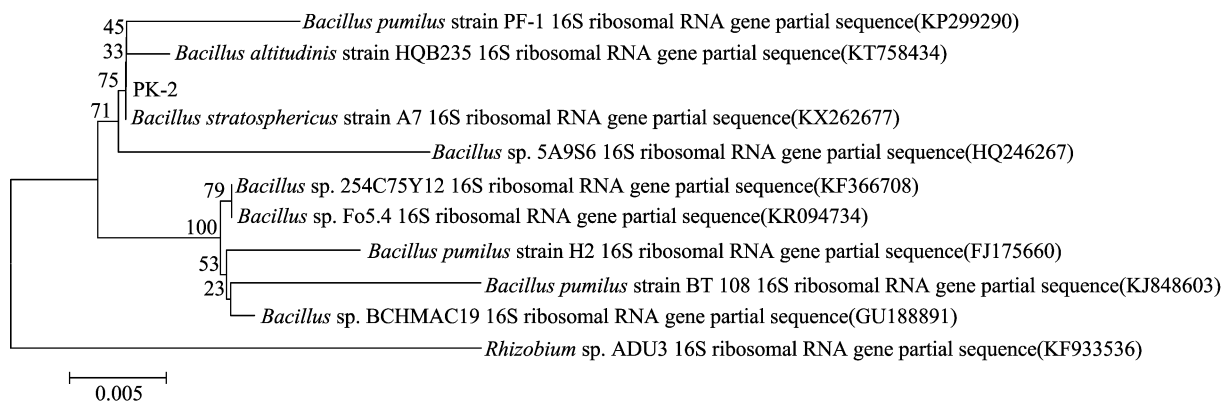


图3 菌株 PK-2 的 16S rDNA 系统发育树

能力 ($PK-2 > PK-1$), 造成这种现象的原因可能是 $PK-1$ 和 $PK-2$ 的菌株在固体和液体环境中解无机磷能力不同, 也可能是因为固体平板中磷酸钙的浓度过大, $PK-1$ 和 $PK-2$ 的菌株溶解了部分磷酸钙但还不足以形成明显的透明圈。解磷解钾细菌在生长过程中能分泌一些物质, 并向周围扩散, 使菌落周围的培养基中磷酸钙、卵磷脂和钾长石矿粉溶解呈透明状, 因而固体平板-透明圈法是判定菌株是否具有解磷、解钾能力的常用方法, 适合进行解磷解钾菌的初筛, 但存在一定的局限性, 使用摇瓶培养测定能对菌株的解磷、解钾能力进行量化, 更为准确和科学^[13-15]。

通过 16S rDNA 对菌株进行初步鉴定, 确定菌株 $PK-1$ 属于肠杆菌属, 菌株 $PK-2$ 属于芽孢杆菌属, 而肠杆菌属和芽孢杆菌属是较常见的解磷细菌和解钾细菌^[16-19]。菌株 $PK-1$ 和 $PK-2$ 同时具有较强的解磷、解钾能力, 这是一些其他的植物根际促生菌所不具备的特性, 可进一步研发成为番木瓜微生物肥料生产菌种, 具有重要的理论意义和实践价值。关于菌株 $PK-1$ 和 $PK-2$ 对番木瓜促生作用及对土壤微环境的影响等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 康貽军, 程洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 853-861.
- [2] Ahmad F, Ahmad I, Khan M S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiological Research, 2008, 163(2): 173-181.
- [3] Verma J P, Yadav J, Tiwari K N, et al. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production[J]. International Journal of Agricultural Research, 2010, 5(11): 954-983.
- [4] Sheng X F, Huang W Y. The conditions of releasing K-releasing by a silicate bacterial strain NBT[J]. Agric Sci in China, 2002, 1(6): 595-604.
- [5] Adesemoye A O, Kloepper J W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 85(1): 1-12.
- [6] 胡江春, 薛德林, 马成新. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 963-966.
- [7] Almora K, Pino J A, Hernandez M, et al. Evaluation of volatiles from ripening papaya (*Carica papaya* L., var. Maradol Roja)[J]. Food Chemistry, 2004, 86(1): 127-130.
- [8] Dawkins G, Hewitt H, Wint Y, et al. Antibacterial effects of *Carica papaya* fruit on common wound organisms[J]. The West Indian Medical Journal, 2003, 52(4): 290-292.
- [9] 万璐, 康丽华, 廖宝文, 等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 89-94.
- [10] 中国土壤学会. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [11] Bochner B R. New technologies to assess genotype-phenotype relationships[J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(4): 309-314.
- [12] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [13] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology

王晓飞,邓超冰,许桂苹,等.应用体外模拟法评价土壤中重金属的人体健康风险[J].江苏农业科学,2017,45(6):251-254.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.065

应用体外模拟法评价土壤中重金属的人体健康风险

王晓飞¹,邓超冰²,许桂苹^{1,2},魏萌萌¹

(1.广西大学轻工与食品工程学院,广西南宁 530004;2.广西壮族自治区环境监测中心站,广西南宁 530028)

摘要:对土壤重金属经土壤—人途径的人体健康风险进行评价,采集广西壮族自治区某尾矿库坍塌导致大面积农田污染区域的土壤样品,通过体外模拟法(PBET法)进行消化,采用重金属摄入量及其生物可给量进行健康风险评估。结果表明,研究区域土壤重金属Cu、Zn、Pb、Cd的平均含量分别为37.25、764.46、1 000.33、1.40 mg/kg。模拟胃阶段土壤中Cu、Zn、Pb、Cd的生物可给量均大于模拟肠阶段重金属的生物可给量,且在2个消化阶段,土壤中Cu、Zn、Pb、Cd的生物可给量均低于日耐受量。成人日摄入重金属Cu、Zn、Pb、Cd的含量分别为1.81~1.93、33.29~42.41、36.94~68.16、0.06~0.10 μg/d,儿童为7.24~7.73、133.17~169.64、147.74~272.65、0.28~0.40 μg/d,儿童Pb的摄入量已经明显超过日可耐受量。因此,土壤中重金属Pb对当地儿童的人体健康具有潜在风险,而其他重金属通过土壤—人途径的摄入量会增加人体对重金属摄入的总量,同时增加健康风险的总量。

关键词:关键词:重金属;体外模拟法;生物可给量;健康风险

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)06-0251-04

近年来,土壤重金属污染^[1-3]已经危及农业生产^[4-5]及食品安全^[6-8],严重威胁人体健康^[9-10]。环境中的重金属可以通过食物、饮水和呼吸等途径进入人体,特别是土壤中的重金属通过口腔进入人体后在人体内积累,并最终对人体(特别是低龄儿童)健康产生一定的危害^[11-12]。目前,分析与评价土壤中重金属元素含量与人体健康的关系备受关注^[13-18]。如果依据土壤重金属总量来评价其健康风险,重金属对人体健康的负面影响很有可能会被高估,因为土壤重金属总量并不能被人体全部吸收^[19],所以针对土壤重金属的生物有效性(或生物可接受性)开展研究更有意义。土壤重金属的绝对生物可接受性只能通过动物试验才能获得,而该试验具有费用高、周期长、伤害供试动物的缺点^[20],所以选择分析测定能被人体消化液溶解、易被吸收的土壤重金属是优于土壤全量评价和动物试验的更好选择,而且体外消化试验容易操作,便宜,具有可重复性。因此,模拟人体消化程序的体外消化试验

被引入环境科学,用于评价环境中污染物的生物可接受性^[21]。目前,国内已有运用体外模拟试验法来评价土壤重金属的生物可给性或健康评价的报道^[22-24]。本研究采集广西壮族自治区(简称广西)某尾矿库溃坝影响区域农田土壤样品,运用体外模拟法(PBET法)进行消化试验,测定土壤中重金属Cu、Zn、Pb、Cd的生物可给性,通过成人和儿童经土壤—人途径而摄入重金属量及其生物可给量来评价土壤中重金属所导致的健康风险,为科学评价土壤重金属的人体健康风险提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤采自广西某尾矿库溃坝影响区域农田的甘蔗地土壤,共采集16个表层(0~10 cm)土壤样品。将采集的蔗田土壤样品运回实验室,置于通风避光干燥的地方自然风干,剔除其中的碎石块和甘蔗根茎等杂质,将风干的土样粗磨后再用玛瑙研钵细磨,分别过20、100目的尼龙筛,装袋,供分析用。

1.2 土壤理化性质测定及质量控制

土壤pH值用pH计测定,土液比为1:2.5;土壤有机质含量的测定参照标准NYT 1121.6—2006《土壤检测 第6部分:土壤有机质的测定》;土壤阳离子交换量的测定参照标准LY/T 1243—1999《森林土壤阳离子交换量的测定》;土壤重

收稿日期:2016-01-06

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金(编号:2013GXNSFEA053001);广西壮族自治区突发污染事故应急技术研究特聘专家岗位项目。

作者简介:王晓飞(1984—),男,山西阳泉人,博士研究生,研究方向为糖类副产物的资源化技术及环境控制。E-mail: wangxiaofei26@163.com。

通信作者:邓超冰,教授级高级工程师。E-mail: dcb715@sina.com。

Letters, 1999, 170(1): 265-270.

[14]王舒,张林平,张扬,等.红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、鉴定及其解磷能力[J].林业科学研究,2015,28(3):409-416.

[15]罗华元,常寿荣,王绍坤,等.云烟高端品牌植烟区根际土壤高效解钾菌的筛选[J].西南农业学报,2011,24(5):1813-1817.

[16]王岳坤,于飞,唐朝荣.海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定[J].微生物学报,2009,49(1):64-71.

[17]任嘉红,刘辉,吴晓蕙,等.南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果[J].微生物学报,2012,53(3):295-303.

[18]刘璇,孔凡玉,张成省,等.烟草根际解钾菌的筛选与鉴定[J].中国烟草科学,2012,33(3):28-31.

[19]秦文旺,牧耀贵,吕利华,等.一株解钾高活性胶质芽孢杆菌的筛选与育种[J].山西农业科学,2015,43(4):434-438.