# 2 种菌联合修复农田土壤镉污染的研究

刘悦畅,李保珍,王涛,王兰

(山西大学生命科学学院,太原 030006)

摘要:采用盆栽试验,运用 BCR 四步法、火焰原子吸收法和稀释涂布平板法等方法,研究了沼泽红假单胞菌( $Rhodopseudanonas\ palustris$ )和枯草芽孢杆菌( $Bacillus\ subtilis$ )联合作用对修复农田土壤重金属镉污染盆栽种植小白菜( $Brassica\ cam\ pestris\ L$ . ssp. chinensis Makino)的效果及安全性,旨在探讨降低土壤镉生物有效性的有效途径,为新型生物菌肥研究提供理论依据。结果表明,沼泽红假单胞菌、枯草芽孢杆菌单独作用以及联合作用均能使农田土壤中镉的固定态增加,降低农田土壤中镉的生物有效性,联合菌处理组镉的生物有效性降低最显著,为 32.70%,均对农田土壤中微生物各生理类群数量有显著性影响(P<0.05),其中,细菌的数量达到  $10^5$  CFU/g;均显著降低了小白菜根、茎中镉含量,联合菌处理组根、茎中镉的去除率分别达到  $58.06\%\sim71.37\%$ 和  $73.66\%\sim76.70\%$ ;均增加了小白菜株高、茎鲜重、叶绿素 a、b 的含量和叶绿素 a/b 的比值,联合菌处理组小白菜的生物量增加  $18.13\%\sim69.55\%$ 。研究结果说明,沼泽红假单胞菌和枯草芽孢杆菌联合作用,对农田土壤镉污染的修复效果显著,且促进了小白菜的生长,具有修复农田土壤重金属污染的潜力。

关键词: 沼泽红假单胞菌; 枯草芽孢杆菌; 农田土壤修复; 小白菜; 镉污染

中图分类号:X53 文献标识码:A 文章编号:1009-2242(2020)04-0364-06

**DOI:** 10.13870/j.cnki.stbcxb.2020.04.052

### Study of Two Microbes Combined to Remediate Field Soil Cadmium Pollution

LIU Yuechang, LI Baozhen, WANG Tao, WANG Lan

(College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: This research used the potted plant approach, BCR four steps work, flame atomic absorption method, and the method of dilution coated tablet to study the joint action of Rhodopseudanonas palustris and Bacillus subtilis, as well as the efficacy and safety, for remediation of cadmium pollution in farmland soil by Chinese cabbage in order to explore its effectiveness and to provide theoretical basis for application of the new type bio-bacterial manure. The results showed that either R. palustris or B. subtilis alone, or their combination could enhance the fixation of the metal in soil by increasing insoluble state cadmium and decreasing cadmium bioavailability. The combination of two bacteria significantly reduced cadmium bioavailability by 32.70%. All bacteria treatments showed significant influence on the number of soil microorganisms (P  $\leq$ 0.05), and the amount of bacteria reached 105 CFU/g. The treatments with various microorganisms all increased the plant height and fresh weight of cabbage, the content of chlorophyll a and b, and the ratio of chlorophyll a/b, meanwhile reduced the content of cadmium in the root and stem of cabbage with removal rate of  $58.06\% \sim 71.37\%$  and  $73.66\% \sim 76.70\%$ , respectively. The combination treatment group had the highest remediating effect with the biomass of Chinese cabbage increased by  $18.13\% \sim 69.55\%$ . The results demonstrated that the combination of R. spalustris and B. subtilis had a strong ability to remove cadmium from contaminated soil, could significantly promote the growth of Chinese cabbage, and showed the potential for remediation of heavy metal pollution in farmland soil.

**Keywords:** Rhodopseudanonas palustris; Bacillus subtilis; field soil remediation; Chinese cabbage; cadmium pollution

收稿日期:2019-11-15

**资助项目:**山西省重点研发计划项目(201703D221008-3)

第一作者:刘悦畅(1995—),女,硕士研究生,主要从事微生物的开发利用研究。E-mail: 980168324@qq.com

通信作者:王兰(1960—),女,教授,博士生导师,主要从事典型重金属污染物的生物学效应与细胞分子机制研究。E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

土地作为主要资本和物质基础,为人类的生存和发展提供了重要保障。近年来,随着现代工农业生产的发展,越来越多的工业生产废水和城市污水及废弃物不断渗入农田土壤。其排放数量和速度已经超过了农田土壤的承受容量和净化速度,使污染面积逐年扩大,破坏了农田土壤的自然动态平衡,导致农田土壤质量下降[1]。其中,重金属镉的毒性大,不易降解,且易被农作物吸收,通过食物链传递,对生物有机体造成极大危害。

近年来,农田土壤镉污染修复技术已经取得了一 些进展。但是,我国的农田土壤镉污染面积仍有不断 扩大的趋势,很多切实有效的污染修复技术仍需要进 一步生产实际的检验[2]。相对于物理、化学、电动修 复等传统修复方法存在的高成本、操作复杂等不足而 言,生物修复法被认为具有绿色、经济、简单、高效的 优势。近几年,利用微生物肥料的方法被广泛应用在 农田土壤重金属污染的修复过程中[3-4]。由于微生物 容易培养,在修复重金属污染农田土壤时拥有较强的 适应能力和代谢能力,具有效果好、投资小、易操作、 不产生二次污染的优点,备受国内外研究者的关注, 具有广泛的应用前景。尽管如此,尚存在修复见效 慢、修复效果不稳定等缺点,使得利用大多数微生物 修复技术仍然局限在科研和实验室阶段,真正能够在 实际应用中的很少[5]。而且,往往都采用的单一菌 种,利用枯草芽孢杆菌和沼泽红假单胞菌联合作用修 复农田土壤重金属污染的研究国内外鲜有报道[6-7]。 鉴于此,本文针对农田土壤重金属镉的污染现状,利 用沼泽红假单胞菌(Rhodopseudanonas palustris)和 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)联合作用来修复农 田土壤镉的研究具有重要的理论意义和应用价值。

# 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

小白菜(Brassica cam pestris L. ssp. chinensis Makino)品种为"蓟农小白菜",种子购于山西省农科院;沼泽红假单胞菌<sup>[8]</sup>和枯草芽孢杆菌<sup>[9]</sup>,均来源于山西大学光合细菌研究室。

#### 1.2 试剂仪器

试剂:氯化镉(分析纯)、尿素(分析纯),三益科技生物有限公司。30%过氧化氢(分析纯),天津市天力化学试剂有限公司。

仪器:火焰原子吸收光谱仪(VARIAN, AA240FS型)、多功能酶标仪(SpectraMax, M5型)、高速冷冻离心机(Eppendorf, 5804R型)、电动匀浆仪(FLUKO, F6/10型)和电热恒温水浴锅(Eppendorf, HHS型)等。

### 1.3 试验方法

1.3.1 菌种培养 在 R. palustris 和 B. subtilis 基

础培养基<sup>[8-9]</sup>中接种一定量的指数生长期的菌体培养液,培养至 OD 值为 1.2,经 5 000 r/min 离心分离 30 min,弃上清液,加入等量超纯水制备成菌悬液( $8.0 \times 10^8 \text{ P/mL}$ ),备用。

1.3.2 土壤样品制备 土壤取自山西省太原市小店区龙城大街(112°35′17.7′N,37°47°2.1″E)农田处表层(0—20 cm)土壤。取回实验室过筛,配制模拟污染灌溉区镉污染土壤,使土壤总镉含量约为 12 mg/kg,氮、磷、钾的含量分别约为 100,80,100 mg/kg,混匀陈化 15 天,备用。

1.3.3 试验设计 试验于 2018 年 12 月 6 日至 2019 年 2 月 26 日在山西省太原市山西大学生命科学学院 6 层 天台进行。采用盆栽试验,33 个塑料花盆(直径 20 cm,高 25 cm),每盆装 2 kg 风干土壤。小白菜种子浸种、催芽后均匀种植于塑料花盆中,每盆留 5 株,放置在室外自然光下生长。用自来水浇灌并保持土壤水分为田间持水量的 60%。试验设置 3 个处理组,每个处理组设置 3 个浓度梯度,即 50,100,200 mL,每组 3 个平行。同时设置 1 个不添加任何菌液的对照组(记为 CK)、正常对照组(记为 CT)和处理组 T(分别记为 T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7、T8、T9),共 11 个组(表 1)。

表 1 盆栽试验中不同的菌悬液处理组

		不同菌悬液设计		
组别	Cd 浓度/	添加菌液/		
	$(mg \cdot kg^{-1})$	mL		
СТ	0	自来水		
T1	12	R. palustris 50		
T2	12	R. palustris 100		
Т3	12	R. palustris 200		
T4	12	B. subtilis 50		
T5	12	B. subtilis 100		
Т6	12	B. subtilis 200		
T7	12	R. palustris 与B. subtilis 1:1混合 50		
Т8	12	R. palustris 与B. subtilis 1:1混合 100		
Т9	12	R. palustris 与B. subtilis 1:1混合 200		
СК	12	自来水		

1.3.4 植物生长指标测定 小白菜株高采用长为 20 cm 的直尺测量;小白菜根、茎鲜重采用电子天平称重。

1.3.5 植物土壤中镉含量测定 植物样品采用 HNO<sub>3</sub>—HClO<sub>4</sub>湿法消解<sup>[10]</sup>,土壤中镉的各形态含量采用 BCR 四步法<sup>[11]</sup>进行分离测定。植物和土壤消解液经过滤处理后采用火焰原子吸收法<sup>[12]</sup>测定镉含量。

1.3.6 植物叶绿素含量的测定 取新鲜叶片放入研钵中,加乙醇和少量碳酸钙研磨、离心、稀释,在波长663,645 nm 下测定吸光度,根据公式[13]计算。

1.3.7 土壤中微生物种类和数量的测定 采用稀释 平板法[14] 进行微生物分离计数,细菌培养 48 h,放线

菌、真菌培养7天后分别计数。

1.3.8 数据分析 采用 Excel 软件和 SPSS 18.0 软件对所获数据进行统计分析,各组间数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)并应用 Duncan 法比较各处理组和对照组间的差异,组间不同字母表示差异显著(P < 0.05)。

## 2 结果与分析

#### 2.1 镉胁迫下不同菌悬液对土壤镉形态含量的影响

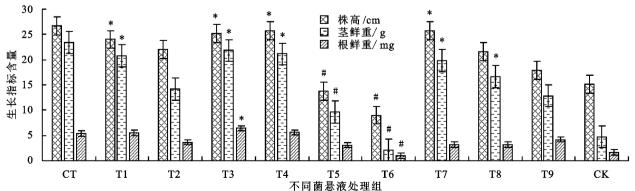
由表 2 可知,试验前各处理组土壤镉的形态含量均表现为酸溶态>可还原态>可氧化态>残渣态。投加菌悬液处理后,与污染对照组(CK)各形态含镉量相比,高浓度联合菌(T9)处理组酸溶态镉含量下降 46.21%,其他处理组变化不显著(P>0.05)。中浓度 R. palustris(T2)处理组可还原态和可氧化态镉含量变化显著,中、低浓度联合菌(T7、T8)处理组可氧化态镉含量变化显著,中、低浓度联合菌(T7、T8)处理组可氧化态镉含量变化显著(P<0.05)。低、高浓度 B. subtilis 和高浓度联合菌(T4、T6、T9)处理后残渣态镉含量分别上升 59.77%,51.17%和 93.36%。

表 2 不同菌悬液对土壤镉形态含量的影响

单位:mg/kg

处理	酸溶态	可还原态	可氧化态	残渣态
CT	$1.47 \pm 0.27a$	$0.84 \pm 0.41a$	$0.17 \pm 0.17a$	0.82±0.02a
T1	$6.16 \pm 1.42  \mathrm{bc}$	$4.54 \pm 0.29 \mathrm{bc}$	$3.31 \!\pm\! 0.13 bc$	$3.72 \pm 0.12 bc$
T2	$6.84 \pm 2.07 \mathrm{bc}$	$5.33 \pm 0.64c$	$3.08 \pm 0.02 \mathrm{b}$	$3.59 \pm 0.11  \mathrm{bc}$
Т3	$5.64 \pm 0.65 \mathrm{bc}$	$4.38 \pm 0.25 \mathrm{b}$	$3.13 \pm 0.44 \mathrm{bc}$	$2.59 \pm 0.71 \mathrm{b}$
T4	$7.48 \pm 2.05  \mathrm{bc}$	$4.48 \pm 0.04  \mathrm{bc}$	$3.26 \pm 0.09 \mathrm{bc}$	$4.09 \pm 1.65 cd$
T5	$5.48 \pm 2.30 \mathrm{bc}$	$4.02 \pm 0.59 \mathrm{b}$	$3.18 \pm 0.11 bc$	$3.69 \pm 0.34 \mathrm{bc}$
T6	$5.30 \pm 2.32 bc$	$4.00 \pm 0.47 \mathrm{b}$	$3.30 \pm 0.17 bc$	$3.87 \pm 0.46  \mathrm{cd}$
T7	$6.71 \pm 2.29 \mathrm{bc}$	$3.96 \pm 0.07 \mathrm{b}$	$2.95 \pm 0.15 \mathrm{b}$	$3.44 \pm 0.04  \mathrm{bc}$
Т8	$5.93 \pm 1.49 bc$	$4.48 \pm 0.83 \mathrm{bc}$	$3.05 \pm 0.22b$	$3.64 \pm 0.83\mathrm{bc}$
Т9	$4.61 \pm 1.58b$	$4.52 \pm 0.26 \mathrm{bc}$	$4.00 \pm 0.47 \mathrm{d}$	$4.95 \pm 0.22d$
CK	$8.57\!\pm\!1.87c$	$4.02 \pm 0.48\mathrm{b}$	$3.63 \pm 0.52 cd$	$2.56 \pm 0.74  \mathrm{b}$

注:表中数据为平均值 $\pm$ 标准差,重复数 n=3;同列不同小写字母表示各处理间差异显著(P<0.05)。下同。



注:与正常对照组比较, #表示 P < 0.05; 与污染对照组比较, \*表示 P < 0.05。

### 图 1 不同菌悬液处理下小白菜生长指标

## 2.4 镉胁迫下不同菌悬液处理对小白菜叶绿素含量 的影响

不同菌悬液处理后与 CT 组相比无显著差异。与

2.2 镉胁迫下不同菌悬液对土壤微生物区系的影响

对采集的根系土壤进行稀释涂布平板法研究各处理组中土壤微生物中的数量变化。结果显示,不同处理组对土壤微生物类群数量差异显著(P < 0.05),并且都以细菌占绝对优势,放线菌次之,真菌最少,细菌的数量达到  $10^5$  CFU/g;但与 CK 组相比,T9 处理组细菌数量明显降低 67%,其他处理组变化不显著。放线菌、真菌数量无显著性差异(P > 0.05)(表 3)。

表 3 不同菌悬液对土壤微生物区系的影响

Al TH	细菌/	放线菌/	真菌/		
处理	$(10^5 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1})(10^2 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1})(10^2 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1})$				
СТ	2.39±1.02ab	1.72±0.10a	0.39±0.19abc		
T1	$5.38\!\pm\!2.00\mathrm{abcd}$	$2.94 \pm 0.84 ab$	$1.94 \pm 0.42d$		
T2	$8.61 \pm 0.10d$	$2.50\!\pm\!0.17ab$	$1.33\!\pm\!1.30bcd$		
Т3	$5.78\!\pm\!2.83\mathrm{bcd}$	$1.56 \pm 0.42a$	$0.50\!\pm\!0.17\mathrm{abc}$		
T4	$7.56 \pm 0.25 \mathrm{cd}$	$1.78\!\pm\!0.42a$	$0.44 \!\pm\! 0.1 abc$		
T5	$4.94 \pm 3.37 abcd$	$5.67\!\pm\!5.95ab$	0.33±0ab		
Т6	$7.06 \pm 1.44 \mathrm{cd}$	$3.28\!\pm\!1.67ab$	$0.61\!\pm\!0.63\mathrm{abc}$		
T7	$6.69\!\pm\!2.55\mathrm{cd}$	$1.67 \pm 0.17a$	$0.67\!\pm\!0.33\mathrm{abc}$		
Т8	$3.90\!\pm\!1.15\mathrm{abc}$	$2.61\!\pm\!0.19ab$	$1.39 \pm 0.84 cd$		
Т9	$2.00 \pm 0.29a$	$1.94 \pm 0.25a$	$0.28 \pm 0.25a$		
CK	$6.08\!\pm\!2.92\mathrm{bcd}$	$2.22\!\pm\!0.54ab$	0.39±0.19abc		

#### 2.3 镉胁迫下不同菌悬液对小白菜生长指标的影响

经过不同菌悬液处理的小白菜生长指标有所不同(图1)。其中,T7处理组的效果最好,株高、茎鲜重分别增长69.55%,316.63%。与CT组相比,T5、T6处理组的小白菜株高、茎鲜重呈显著差异,其他处理组无显著差异。与CK组相比,T1、T3、T4和T7处理组小白菜株高显著增加,比CK组分别增加58.34%,65.99%,69.55%,69.55%;小白菜茎鲜重显著增加,分别增加336.84%,359.58%,344.84%,316.63%,差异呈显著水平(P<0.05)。与CT组相比,T3、T6组小白菜根鲜重呈显著差异,其他处理组无显著差异。与CK组相比,大多数菌悬液处理组小白菜根鲜重无显著差异。

CK 处理组相比,不同菌悬液处理后的 T8、T9 处理组小白菜叶绿素 a 含量显著增加(P<0.05),分别增加106.67%,62.20%。T5、T9 处理组处理后的小白菜叶绿

素 b 含量显著增加,分别增加 42.31%,46.15%。 T5、T8、T9 处理组对小白菜叶绿素总量变化显著,分别增加 49.30%,49.30%,83.10%。T9 处理组叶绿素 a/b 的比值变化最显著(表 4)。

表 4 不同菌悬液处理对小白菜叶绿素含量的影响

	叶绿素 a/	叶绿素 b/	a/b	总叶绿素/
处理	$(mg \cdot g^{-1})$	$(mg \cdot g^{-1})$	a/ D	$(mg \cdot g^{-1})$
CT	$0.64 \pm 0.08$	$0.31 \pm 0.02$	2.04±0.12	$0.95 \pm 0.10$
T1	$0.57 \pm 0.09$	$0.29 \pm 0.04$	$2.00 \pm 0.12$	$0.85 \pm 0.12$
T2	$0.63 \pm 0.01$	$\textbf{0.31} \!\pm\! 0$	$2.03 \pm 0.02$	$0.94 \pm 0.01$
Т3	$0.51 \pm 0.04$	$\textbf{0.27} \pm \textbf{0.07}$	$\textbf{2.02} \!\pm\! \textbf{0.64}$	$0.77 \pm 0.03$
T4	$0.53 \pm 0.24$	$\textbf{0.27} \pm \textbf{0.08}$	$1.90 \pm 0.28$	$0.79 \pm 0.33$
T5	$0.69 \pm 0.16$	$\textbf{0.37} \pm \textbf{0.04}^{*}$	$1.90 \pm 0.58$	$\textbf{1.06} \!\pm\! \textbf{0.12}^*$
T6	$\textbf{0.63} \pm \textbf{0.07}$	$0.33 \pm 0.03$	$1.93 \pm 0.23$	$0.96 \pm 0.08$
T7	$0.56 \pm 0.11$	$0.30 \pm 0.03$	$1.90 \pm 0.24$	$\textbf{0.86} \!\pm\! \textbf{0.14}$
Т8	0.73 $\pm$ 0.16 *	$0.33 \pm 0.06$	$2.19 \pm 0.09$	$\textbf{1.06} \!\pm\! \textbf{0.21}^*$
Т9	$\textbf{0.93} \!\pm\! \textbf{0.15}^{*}$	$\textbf{0.38} \!\pm\! \textbf{0.06}^*$	$2.50\!\pm\!0.43^{*}$	$1.30\!\pm\!0.20^{*}$
CK	$0.45 \pm 0.08$	$0.26 \pm 0.02$	$1.71 \pm 0.37$	0.71±0.06

注:表中数据为平均值士标准差,重复数 n=3;与正常对照组比较, #表示 P<0.05;与污染对照组比较, \*表示 P<0.05。

### 2.5 镉胁迫下不同菌悬液处理对小白菜镉含量影响

由表 5 可知,没有经过修复处理的 CK 组小白菜根、茎中镉含量均最高,且根中镉含量远大于茎中镉含量。与 CK 组相比,投加菌悬液均降低了小白菜根、茎中镉含量,联合菌处理组比单个菌处理组小白菜根、茎中镉含量降低更显著,分别降低 58.06%~71.37%和 73.66%~76.70%。联合菌处理组转移因子(TF)显著降低,投加菌悬液降低了小白菜将镉从地下部向地上部的转移,将镉固定在小白菜地下部,减少小白菜地上部对镉的吸收,促进了植物生长。与CT 组相比,联合菌处理组小白菜根、茎中镉含量无显著差异,其余处理组之间差异显著。由图 1 可知,联合菌处理组小白菜株高、茎鲜重含量显著增加,小白菜生长最好,其小白菜根、茎中镉含量最低,说明微生物可以显著降低小白菜根、茎中重金属镉含量,进而促进小白菜的生长。

# 3 讨论

R. palustris 在生长繁殖过程中,可利用其自身含有的半胱氨酸脱巯基酶的脱巯作用,将半胱氨酸生成 S²-,S²-与重金属产生化学反应,进而生成不溶于水的重金属硫化物,重金属硫化物通过沉降作用固化到土壤耕作层以下,不被植物吸收,减少对农田和农作物的污染,从而达到修复农田重金属污染的作用。信艳杰等[15]、肖根林等[16]、白红娟等[17-18]研究表明,R. palustris 可以提高植物光合作用,增加农作物的产量;提高土壤肥力,改善土壤中镉形态分布和营养状况,改善土壤微生物群落 DNA 序列的组成。B.

subtilis 广泛分布在土壤及腐败的有机物中,不仅广泛应用在饲料中,而且在污水处理及生物肥发酵中的应用也相当广泛,是一种多功能的微生物。目前,李晓晴<sup>[19]</sup>、王丽丽等<sup>[20]</sup>研究表明,它对镉耐受且对镉的吸附力比较强。因而 R. palustris 和 B. subtilis均能够作为较好的试验材料应用于修复农田土壤重金属镉的研究中。

表 5 不同菌悬液处理对小白菜镉含量的影响

 处理	茎中镉含量/	根中镉含量/	TF/
处理	$(mg \cdot kg^{-1})$	$(mg \cdot kg^{-1})$	%
CT	$\textbf{7.46} \pm \textbf{2.26} a$	$17.07 \pm 0.04$ a	44±0.04abc
T1	$23.65 \pm 3.87 \mathrm{b}$	$33.43 \pm 0.04d$	$71 \pm 0.04 \mathrm{ef}$
T2	$22.93 \pm 0.69 \mathrm{b}$	$32.35 \pm 0.16 \mathrm{cd}$	$71 \pm 0.16 \mathrm{ef}$
Т3	$26.31 \pm 4.89 \mathrm{b}$	$45.40 \pm 5.49 ef$	$58 \pm 5.49 de$
T4	$21.51 \pm 2.09 \mathrm{b}$	$28.88 \pm 0.63 \mathrm{cb}$	$75 \pm 0.63 f$
T5	$26.47 \pm 1.47 \mathrm{b}$	$47.17 \pm 3.14 f$	$56\pm3.14\mathrm{cd}$
Т6	$25.88 \pm 1.19 \mathrm{b}$	$41.70 \pm 1.27 \mathrm{e}$	$62 \pm 1.27 def$
T7	$10.22 \pm 0.53$ a	$27.35 \pm 2.02 \mathrm{b}$	$37 \pm 2.02 ab$
Т8	$\textbf{9.46} \pm \textbf{0.27} a$	$29.93 \pm 1.33 \mathrm{cbd}$	$32 \pm 1.33$ a
Т9	$9.04 \pm 0.19a$	$18.67 \pm 1.12 a$	$49\pm1.12\mathrm{bcd}$
CK	$38.80 \pm 5.03c$	$65.27 \pm 4.12g$	60±4.12de

注:表中数据形为平均值  $\pm$ 标准差,重复数 n=3;同列不同小写字母表示各处理间差异显著(P<0.05)。

镉是一种危害植物生长发育的有害元素,过量对 植物生长发育产生明显危害[21]。土壤中的重金属质 量分数是评价该土壤污染水平的关键因素[22],但尚 不能准确反映土壤中该元素的有效性,所以分析土壤 中重金属的有效性很有必要[23]。土壤中重金属的存 在形态不同,其活性、生物毒性及迁移特征也不 同[16]。重金属在土壤中的存在形态一般分为可交换 态(包括水溶态)、碳酸盐结合态、铁锰氧化物结合态、 有机物结合态和残留态等。BCR 法[11] 是欧洲参考交 流局提出的比较新的划分方法,将重金属形态分为4 种,即:酸溶态、可还原态、可氧化态、残渣态。酸溶态 重金属容易被植物吸收,而可还原态、可氧化态、残渣 态不易被植物吸收。前期的研究[15] 表明,R. palustris 可使土壤中可溶态镉向难溶态镉转化,因而该菌 株能够作为较好的试验材料应用于修复土壤重金属 镉的研究中[16]。由表 5 可知,试验前各处理组土壤 重金属镉的形态均表现为酸溶态>可还原态>可氧 化态>残渣态,说明供试土壤镉酸溶态质量分数高, 总体上镉迁移性较高;可还原态、可氧化态和残渣态 质量分数高,说明土壤中生物潜在可利用态镉含量 低,在比较强的酸性介质以及适当的环境条件下可以 增加镉的利用性。投加菌悬液处理后,与CK组各形 态含镉量相比,T4、T6、T9 处理组残渣态镉分别上升 59.77%,51.17%和93.36%,T9处理组酸溶态镉含 量下降 46.21%,说明投加菌悬液可以增加农田土壤

对镉的固定,促进农田土壤可溶态镉向难溶态镉转化,进而降低镉的生物有效性。这与肖根林等[16]研究结果呈相似变化,可能是菌株或其分泌物通过氧化还原、络合、甲基化等作用转化重金属,使重金属的化学形态发生变化,影响其在土壤中的生物有效性,从而起到解毒作用。

微生物是土壤生态系统中最具活力的组成部分<sup>[24]</sup>,微生物的数量分布不仅可以敏感地反映出土壤中的生物活性,也可以反映出土壤环境质量的变化<sup>[25-27]</sup>。由表3可知,不同菌悬液处理下土壤微生物各生理类群数量差异显著(P<0.05),并且都以细菌占绝对优势,放线菌次之,真菌最少,细菌的数量达到10<sup>5</sup> CFU/g。与 CK 组相比,T9 处理组细菌数量明显降低,其余处理组无显著变化,可能是外来微生物和土著微生物之间存在竞争关系,降低了细菌数量。放线菌、真菌数量无显著性差异,说明投加菌悬液处理对土壤放线菌和真菌生长无影响。

李晓晴[19] 研究证实, R. palustris 和 B. subtilis 均对植物生长具有促进作用。本试验中投加菌悬液 处理后,均促进了小白菜的生长。与 CK 组相比, T1、T3、T4 和 T7 处理组显著增加了小白菜株高和 茎重,这可能是因为投加菌悬液有效降低了农田土壤 镉的生物有效性,缓解了农田土壤中镉的毒性,从而 促进小白菜的生长。T9 处理组对小白菜叶绿素总量 和叶绿素 a/b 的比值变化显著,说明 R. palustris 和 B. subtilis 联合作用提高了小白菜叶绿素含量,使植 物光合作用增强,促进植物体内有机物的合成,进而 使小白菜生物量显著增加。可见,叶绿素含量的提高 是促进植物生长的内在原因之一。叶绿素 a/b 的比 值反映了植物类囊体的垛叠程度,类囊体的垛叠程度 越大,叶绿素 a/b 的比值越大,光抑制越弱[28]。因 此,叶绿素 a/b 的比值的增加,说明投加菌悬液处理 对植物免受光氧化损伤和抑制有保护作用[29]。由表 5可知,不同菌悬液处理后,小白菜根、茎中镉的含量 均明显降低,可能是因为耐重金属的微生物体内具有 抗重金属基因,其细胞能分泌出相关的物质(如酶、蛋 白质、有机酸等),增强细胞膜的通透性,将重金属沉 积或排除在细胞外,直接或间接钝化重金属,使其成 为缓效态或无效态,降低其在农田土壤中迁移[25],影 响重金属在农田土壤中的生物有效性,降低重金属在 农田土壤中的毒性,减少小白菜对镉的吸收,从而促 进小白菜的生长。其中,联合菌处理组根、茎中镉含 量最低,小白菜生长最好,可以推断 R. palustris 和 B. subtilis 联合作用于镉污染农田土壤可显著降低 镉的生物有效性,降低植物对农田土壤中镉的吸收, 促进植物的生长发育,具有良好的修复效果。

# 4 结论

(1)添加 R. palustris 和 B. subtilis 菌悬液,均显著改变了农田土壤中镉形态分布,使农田土壤中镉的可溶态向难溶态转化。联合菌处理组具有更好的修复效果,增加了镉的固定,使农田土壤中镉的生物有效性显著降低约 32.7%。

(2)添加 R. palustris 和 B. subtilis 菌悬液,均能促进小白菜的生长,且 2 种菌联合处理效果更显著。与污染对照组(CK)相比,联合菌处理组小白菜生物量增加  $18.13\%\sim69.55\%$ ,且叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素a/b 的比值和叶绿素总量均有一定量的提高。小白菜根、茎中镉去除率分别为  $58.06\%\sim71.37\%$  和  $73.66\%\sim76.70\%$ 。

(3)添加 R. palustris 和 B. subtilis 菌悬液影响了土壤微生物数量变化,微生物种类(细菌、放线菌、真菌)间数量差异显著,并且细菌占绝对优势,放线菌次之,真菌最少,细菌的数量达到 10<sup>5</sup> CFU/g。与 CK组相比,放线菌和真菌间数量变化不显著。

#### 参考文献:

- [1] Parnian A, Chorom M, Fard N J H. A potential method for remediation of Cadmium pollution in aquatic medium by hydrophyte, *Ceratophyllum demersum* L.[J]. Majallah-i āb va Khāk, 2017, 30(6):1918-1929.
- [2] 田喜强,赵宏吉,唐志国,等.土壤污染及修复方法的研究进展[J].现代农业科技,2019,738(4);162-163,167.
- [3] 肖春文,罗秀云,田云,等.重金属镉污染生物修复的研究进展[J].化学与生物工程,2013,8(2):23-25.
- [4] 俞纪翔.微生物在治理土壤重金属危害时的作用[J].世界有色金属,2018,513(21):180-181.
- [5] 李婧,周艳文,陈森,等.我国土壤镉污染现状 危害及其治理方法综述[J].安徽农学通报,2015,21(24):104-107.
- [6] Zhou N, Chen H G, Xi J T, et al. Biochars with excellent Pb (II) adsorption property produced from fresh and dehydrated banana peels via hydrothermal carbonization [J]. Bioresource Technology, 2017, 232: 204-210.
- [7] Zhang Y L, Xu X J, Chen A M, et al. Maternal urinary cadmium levels during pregnancy associated with risk of sex-dependent birth outcomes from an e-waste pollution site in China[J].Reproductive Toxicology, 2018, 75:49-55.
- [8] 姚竹云,张肇铭.几株光合细菌的表型特征及 DNA-NDA 同源性分析[J].应用与环境生物学报,1996,2(1):84-89.
- [9] 叶碧霞,左勇,傅彬,等.一株枯草芽孢杆菌培养基及培养条件的优化[J].食品科技,2017,42(1);23-28.
- [10] 范春辉,杜波,张颖超,等.湿法消解火焰原子吸收法测定黄土复合污染修复植物金盏菊幼苗中的铅和镉[J]. 光谱学与光谱分析,2016,36(8):2625-2628.
- 「11】 张永利,刘晓文,陈启敏,等.Tessier 法和改进 BCR 法

- 提取施加熟污泥后黄土中 Cd 的对比研究[J].环境工程,2019,37(5):34-38.
- [12] 李晓洁.试论土壤中的重金属检测样品前处理技术[J]. 世界有色金属,2019(7):222-223.
- [13] 胡秉芬, 黄华梨, 季元祖, 等.分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度[J]. 草业科学, 2018, 35(8): 1965-1974.
- [14] 侯建伟,邢存芳,邓晓梅,等.花椒林下土壤微生物数量和酶活性对生物质炭的响应[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(4):89-96.
- [15] 信艳杰,胡晓娟,曹煜成,等.光合细菌菌剂和沼泽红假单胞菌对实验水体氮磷营养盐和微生物群落的影响 [J].南方水产科学,2019,15(1);31-41.
- [16] 肖根林,白红娟,贾万利.光合细菌对土壤中 Cd 形态分布的影响[J].化工技术与开发,2011,40(3):43-45.
- [17] 白红娟,肖根林,贾万利.光合细菌减少蔬菜中 Pb、Cd 及呋喃丹污染的研究[J].中国土壤与肥料,2013(2):94-99.
- [18] 白红娟.光合细菌改善 Cd、Pb 及呋喃丹污染土壤的微生物群落 DNA 序列多样性的研究[J].环境污染与防治,2011,33(11):24-28.
- [19] 李晓晴.枯草芽孢杆菌对花生镉积累的影响机制研究 [D].济南:山东师范大学(山东省农业科学院试验场), 2013.
- [20] 王丽丽,杨谦.接种枯草芽孢杆菌和丛枝菌根真菌促进 红三叶修复石油污染土壤[J].江苏农业科学,2016,44 (5):526-529.
- [21] Dixit R, Wasiullah, Malaviya D, et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental

- processes [J]. Sustainability, 2015, 7(2): 2189-2212.
- [22] Paz-Ferreiro J, Lu H, Fu S, et al. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review[J].Solid Earth, 2014, 5(1):65-75.
- [23] 唐文忠,孙柳,单保庆.土壤/沉积物中重金属生物有效性和生物可利用性的研究进展[J].环境工程学报,2019,13(8):1775-1790.
- [24] 陈海涛.利用微生物肥料进行土壤生态修复治理的研究[J].化工管理,2019(3):192-193.
- [25] 黄成涛,黄位权,史鼎鼎,等.一株耐铅镉真菌 Q7 对香根草吸收累积重金属的效应[J].应用与环境生物学报,2018,24(4):901-907.
- [26] Jiang Q Y, Zhuo F, Long S H, et al. Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of Lonicera japonica grown in Cd-added soils?

  [J].Scientific Reports, 2016, 6(1):21805.
- [27] Chai L Y, Huang S H, Yang Z H, et al. Cr (VI) remediation by indigenous bacteria in soils contaminated by chromium-containing slag[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 167(1/3):516-522.
- [28] Xu J B, Feng Y Z, Wang Y L, et al. Effect of *Rhizobacterium Rhodopseudomonas palustris* inoculation on stevia rebaudiana plant growth and soil microbial community[J].Pedosphere,2018,28(5):793-803.
- [29] Cao S M, Wang W K, Wang F, et al. Drought-tolerant Streptomyces pactum Act12 assist phytoremediation of cadmium-contaminated soil by Amaranthus hypochondriacus: Great potential application in arid/semi-arid areas [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(15):14898-14907.

#### (上接第 269 页)

- [23] Geng A, Wang X, Wu L, et al. Silicon improves growth and alleviates oxidative stress in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by strengthening antioxidant defense and enhancing protein metabolism under arsanilic acid exposure[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 158; 266-273.
- [24] 韦还和,孟天瑶,李超,等.施硅量对甬优系列籼粳交超级稻产量及相关形态生理性状的影响[J].作物学报,2016,42(3):437-445.
- [25] 由高峰,张广龙,韩东来.水稻施硅肥试验总结[J].北方 水稻,2006(6):106-106.
- [26] 周青,潘国庆,施作家,等.不同时期施用硅肥对水稻群

- 体质量及产量的影响[J].耕作与栽培,2001(3):25-27.
- [27] 王艳红,邓国季,戴鹏,等.喷施叶面硅肥对 Y 两优 143 产量的影响[J].杂交水稻,2017,32(4):51-53.
- [28] Kekulandara D S, Sirisena D N, Bandaranayake P C G, et al. Variation in grain yield, and nitrogen, phosphorus and potassium nutrition of irrigated rice cultivars grown at fertile and low-fertile soils[J].Plant and Soil, 2019, 434:107-123.
- [29] 朱从桦,孙永健,杨志远,等.晒田强度和穗期氮素运筹对不同氮效率水稻根系、叶片生长及产量的影响[J].水土保持学报,2017,31(6):199-206,259.