

两种产脲酶细菌固定Cd-As复合污染水稻土的研究

蔡倩, 李欣武, 杨雨婷, 黄金富, 罗燕, 杨润, 伍钧, 徐敏

引用本文:

蔡倩, 李欣武, 杨雨婷, 黄金富, 罗燕, 杨润, 伍钧, 徐敏. 两种产脲酶细菌固定Cd-As复合污染水稻土的研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(3): 520-528.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0624>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同形态硫对水稻吸收积累镉的影响

刘颖, 苏广权, 郭湘, 杨燕花, 姚爱军, 仇荣亮, 汤叶涛

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1208-1218 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1164>

生物炭固定化微生物对U、Cd污染土壤的原位钝化修复

戚鑫, 陈晓明, 肖诗琦, 张祥辉, 田甲, 勾佳磊, 卓驰夫, 罗学刚

农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1683-1689 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0233>

模拟酸雨条件下铁硅材料和生物炭对土壤镉砷形态及生物有效性的影响

郭娟, 罗小丽, 姚爱军, 袁鸣, 刘冲, 汤叶涛, 仇荣亮

农业环境科学学报. 2018, 37(7): 1495-1502 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0363>

生物炭对四环素污染土壤微生物群落结构的影响及环境因子关联的剂量效应分析

李慧君, 卫婷, 黄枫城, 陈艺杰, 李高洋, 张伟健, 吴伟健, 蔺中, 甄珍

农业环境科学学报. 2023, 42(1): 101-111 <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0430>

园林废弃物堆肥对铅镉污染土壤的修复效果

刘源鑫, 李维庭, 孙向阳, 李素艳, 张润哲, 马杰

农业环境科学学报. 2022, 41(4): 802-810 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0880>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

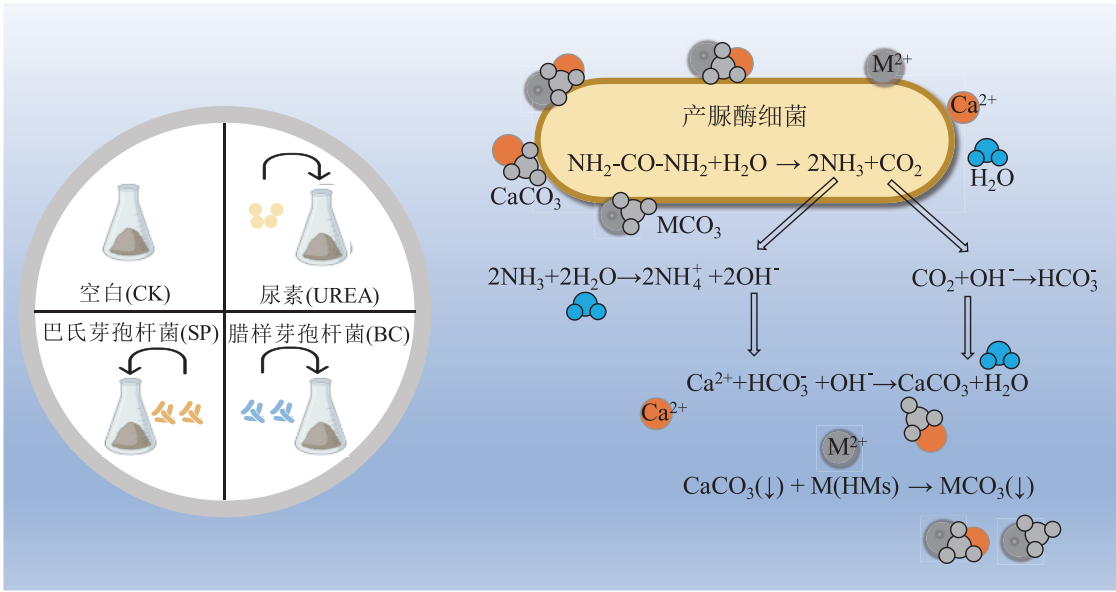
蔡倩, 李欣武, 杨雨婷, 等. 两种产脲酶细菌固定 Cd-As 复合污染水稻土的研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(3): 520–528.

CAI Q, LI X W, YANG Y T, et al. Iomonic studies of rice seedling differential responses to arsenite stresses [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(3): 520–528.

两种产脲酶细菌固定 Cd-As 复合污染水稻土的研究

蔡倩, 李欣武, 杨雨婷, 黄金富, 罗燕, 杨润, 伍钧, 徐敏*

(四川农业大学环境学院, 成都 611130)



摘要:微生物诱导碳酸盐沉淀(Microbial induced carbonate precipitation, MICP)是新兴重金属生物修复技术,具有绿色、高效的特点。本研究以镉(Cadmium, Cd)-砷(Arsenic, As)复合污染的水稻土为研究对象,以空白(CK)、尿素添加(UREA)为对照,分析巴氏芽孢杆菌(SP)和蜡样芽孢杆菌(BC)两种细菌对 Cd、As 的固定效果,并探讨修复后土壤性质及酶活性的变化。结果表明:与 CK 处理相比,BC 处理下 CaCl_2 -Cd、 CaCl_2 -As 含量分别显著降低 30.2%、9.10%。与 CK 处理相比,SP、BC 处理显著降低可氧化态 Cd 含量,且增加残渣态 Cd 含量;而仅 BC 处理显著降低可氧化态 As 含量,并显著提高残渣态 As 含量;且 UREA、SP、BC 处理下碳酸盐含量均增加。与 CK 处理相比,UREA、SP、BC 处理下脲酶活性,分别显著提高 48.0%、32.8%、11.7%,表明 3 种处理均能刺激 MICP 过程。与 CK 处理相比,SP、BC 处理可有效提高土壤全氮、全磷、全钾、铵态氮含量,降低硝态氮含量,表明 MICP 过程不仅提升土壤养分,而且刺激氨化作用,抑制硝化作用。与 CK 处理相比,BC 处理可显著提高磷酸酶、蔗糖酶活性,有效调节土壤生态功能。研究表明,蜡样芽孢杆菌在修复 Cd-As 复合污染土壤方面具有明显优势,可有效降低 Cd、As 的有效性,且提升土壤肥力和酶活性,是一种优良的生物修复材料。

关键词:微生物诱导碳酸盐沉淀;生物修复;土壤生态功能;产脲酶细菌;水稻土

中图分类号: X172; X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2023)03-0520-09 **doi:** 10.11654/jaes.2022-0624

收稿日期: 2022-06-22 录用日期: 2022-10-12

作者简介: 蔡倩 (1995—), 女, 四川资阳人, 博士研究生, 从事土壤污染治理研究。E-mail: caiqian7788@163.com

*通信作者: 徐敏 E-mail: xumin_xyz@126.com

基金项目: 成都市科技项目 (2020-YF09-00023-SN, 2020-YF09-00012-SN); 大学生创新训练计划项目

Project supported: The Key Program of Chengdu Science and Technology Bureau (2020-YF09-00023-SN, 2020-YF09-00012-SN); College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program

Cd and As immobilization in co-contaminated paddy soil using two urease-producing bacteria

CAI Qian, LI Xinwu, YANG Yuting, HUANG Jinfu, LUO Yan, YANG Run, WU Jun, XU Min*

(College of Environmental Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Microbial-induced carbonate precipitation (MICP) is a technology for heavy metal bioremediation with the main advantages of being environmentally friendly and effective. In this study, we explored the effects of *Sporosarcina pasteurii* (SP) and *Bacillus cereus* (BC) on cadmium (Cd) and arsenic (As) immobilization, soil properties, and soil enzymatic activities in a Cd and As co-contaminated paddy soil under control (CK) and urea addition (UREA) treatments. The results of this study might assist in reducing the risk of agricultural soils containing both Cd and As. CaCl_2 -Cd and CaCl_2 -As were significantly reduced by BC treatment compared to CK treatment, by 30.2% and 9.10%, respectively. Compared with CK treatment, SP treatment and BC treatment significantly reduced oxidizable Cd and increased residual Cd, while only BC treatment significantly reduced oxidizable As and increased residual As. With the addition of UREA, SP, and BC treatments, the carbonate content was increased. UREA, SP, and BC treatment significantly increased urease compared to CK treatment by 48.0%, 32.8%, and 11.7%, respectively, indicating that these treatments stimulated the process of MICP. Compared to CK treatment, SP treatment and BC treatment considerably increased soil total nitrogen, total phosphorus, total potassium, and ammonium nitrogen, but decreased nitrate-nitrogen, which implied that the MICP method helped enhance soil fertility and stimulated ammonization but inhibited nitrification. BC treatment enhanced soil phosphatase and sucrase in comparison to CK treatment, improving soil function. Taken together, *B. cereus* immobilized Cd and As, enhanced soil fertility, and increased enzyme activity, making it a promising candidate for bioremediation, particularly for soil that had been contaminated with both Cd and As.

Keywords: microbial induced carbonate precipitation; bioremediation; soil ecological function; urease-producing bacteria

农田土壤重金属污染直接影响到农产品、农田生态系统及人居环境的安全^[1-2]。重金属进入农田后不能自然降解,且可通过外源输入不断富集。土壤中的重金属不仅可破坏根系生长环境,导致作物减产,而且土壤中积累的重金属还能通过根系吸收富集在可食用部分,进而通过食物链影响人类健康^[3-6]。我国农田土壤重金属污染总体形势不容乐观,农田土壤重金属污染对粮食安全生产构成了严重威胁,其中Cd、As污染尤为严重。因此,寻求高效、环保、可持续的方法修复重金属Cd、As污染农田土壤,以确保食品安全和土壤健康,对我国经济和社会的发展具有重要意义。

目前,修复土壤Cd、As污染的方法主要包括物理法、化学法和生物法。物理方法常需消耗大量的能源,且存在对土壤扰动较大等缺点;化学方法通常向土壤输入大量药品,从而导致土壤理化性质和生态功能被破坏^[7]。与物理、化学方法相比,生物修复方法具有操作简单、耗能低、对土体扰动较小的优点,因此具有较为广泛的应用前景^[1,4,8-12]。在生物修复技术中,微生物诱导碳酸盐沉淀(Microbial induced carbonate precipitation, MICP)技术是一种新型土壤重金属污染修复技术,是近年的研究热点^[13-15]。MICP技术是利用产脲酶细菌分解尿素过程产生的碳酸盐沉淀过程来实现对重金属的固定。产脲酶细菌能分泌脲酶,降解尿素,产生 CaCO_3 沉淀;而具有与Ca类似水合半径的重金属离子(如 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 等)可通过置换晶

格中的 Ca^{2+} 或进入相邻结构而结合到沉淀晶体中,故将重金属转化为更稳定的形式,进而固定重金属离子^[16-18]。由于被固定在晶格中的金属离子再次被释放的可能性降低^[4],从而达到较稳定的修复效果。另外,产生的沉淀具有较强的吸附性能,可吸附部分重金属离子,进而降低重金属的移动性。

近年来,国内外在微生物诱导碳酸盐沉淀以去除重金属方面进行了大量的研究^[6,13,18-20]。Lyu等^[21]的研究发现,通过增加土壤pH可诱导土壤土著微生物通过MICP过程固定Cd。纵观前人研究,基于MICP技术固定重金属的研究大多集中于细菌筛选^[15,22]、沉淀表征^[23-24]和重金属修复效率^[6,25]等方面,但对于修复后土壤性质及生态功能的关注较少。而针对农田土壤,土壤修复效果除了需对重金属的固定评估外,土壤性质及生态功能的评估对其后续生产尤为重要^[26]。研究发现,巴氏芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌诱导形成的碳酸盐矿物对重金属Cd具有较好的螯合和固持作用^[6,27]。目前,关于比较不同细菌修复效果的研究较少。此外,基于MICP技术修复土壤重金属污染的研究多集中于某一种重金属,而忽略了复合污染重金属的研究。在实际应用中,土壤复合污染的情况较单一污染更为常见^[28]。

基于此,本研究选取Cd-As复合污染土壤开展试验,以巴氏芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌为研究对象,通过培养试验,分析两种产脲酶细菌对Cd-As复合污染

土壤重金属的修复效果,同时探讨生物修复对土壤性质和土壤酶活性的影响,以期有效利用产脲酶细菌修复复合重金属污染农田土壤提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试细菌为巴氏芽孢杆菌(*Sporosarcina pasteurii*, accession No. CP038012.1)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, accession No. MT611946.1),两种细菌均购买自中国通用微生物培养采集中心,菌液保存于 -80°C 冰箱。两种细菌均为革兰氏阳性的非致病菌,具有较高的脲酶产量,是最常用的菌株。将巴氏芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌菌液分别在YE-NH₄培养基(酵母提取物20 g、硫酸铵10 g、琼脂20 g、0.13 M Tris缓冲液1 L, pH=9.0)^[29]、LB培养基(胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠10 g、蒸馏水1 L, pH=7.0)^[30]中进行活化培养,两菌落均呈圆饼状,表面褶皱,微微隆起,呈乳白色。随后,在 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心5 min,获得菌体细胞,并利用无菌水清洗菌体,将菌体再悬浮于无菌水中,获得细菌溶液。采用OD₆₀₀测得巴氏芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌菌液细胞浓度分别为 $3\times 10^9\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.3\times 10^9\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。所有培养基在使用前均在 121°C 下高压灭菌20 min。

供试土壤采集自四川省绵竹市某农田($104^{\circ}15'15''\text{E}$, $31^{\circ}25'07''\text{N}$)的表层土(0~20 cm)。土壤去除植物残体、石块后风干,过2 mm尼龙筛,装袋备用。土壤类型为水稻土,其基本理化性质见表1。

1.2 试验设计

试验设置4个处理:对照组(CK)、添加尿素组(UREA)、巴氏芽孢杆菌添加组(SP)、蜡样芽孢杆菌添加组(BC),每个处理重复3次。具体操作如下:称取100 g土壤,分别加入尿素 $0.694\text{ mg}^{[31]}$ 、巴氏芽孢杆菌10 mL、蜡样芽孢杆菌10 mL,CK不做任何处理,混匀后添加蒸馏水,使土壤含水量保持在田间持水量的70%。将所有样品放在培养箱中培养,设置温度为 25°C 。采用称质量的方法每天补充流失水分。土样

在培养箱培养20 d后取出进行风干处理,随后研磨,过2、0.15 mm尼龙筛,装袋备用。

1.3 样品采集与测定

土壤测定方法参照《土壤农化分析》^[32]。采用重铬酸钾体积法-外加热法测定土壤有机质(Organic matter, OM)含量;采用六胺三氯化钴萃取分光光度法测定土壤阳离子交换量(Cation exchange capacity, CEC);采用凯氏定氮仪测定全氮(Total nitrogen, TN)含量;采用钼锑抗比色法测定土壤全磷(Total phosphorus, TP)含量;采用火焰光度法测定土壤全钾(Total potassium, TK)含量;硝态氮($\text{NO}_3^{-}\text{-N}$)和铵态氮($\text{NH}_4^{+}\text{-N}$)含量采用流动分析仪测定^[33]。

采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定脲酶^[34];3,5-二硝基水杨酸比色法测定蔗糖酶活性^[35];高锰酸钾滴定法^[36]测定过氧化氢酶活性;TTC比色法测定脱氢酶活性^[37];磷酸苯二钠比色法测定碱性磷酸酶活性^[32]。采用CaCl₂浸提法测定有效态重金属含量^[38];采用改良BCR法对土壤不同形态的Cd和As进行提取^[39]。Cd和As的形态分为可交换态、氧化物结合态、还原态和残渣态。所有提取液中的重金属采用电感耦合等离子体质谱仪(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS, NexION300X, PerkinElmer, 美国)测定;采用中和滴定法测定土壤中不溶性碳酸盐(CaCO_3)的总量^[32]。

1.4 数据处理

数据采用Excel及SPSS 26.0进行处理及统计分析,采用单因素(One-way ANOVA)方差分析和Duncan检验法,处理间显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。采用Excel及Origin 2022制图。

2 结果与分析

2.1 细菌添加对土壤重金属有效性及形态的影响

不同处理下土壤CaCl₂浸提Cd、As含量如图1所示。与CK处理相比,各处理均降低了CaCl₂-Cd含量,但仅BC处理下达显著水平($P<0.05$);与CK处理相比,SP处理显著提高了CaCl₂-As含量,而BC处理则显著降低了CaCl₂-As含量($P<0.05$)。BC处理下

表1 供试土壤基本理化性质
Table 1 The properties of tested soil

项目 Item	pH	有机质 Organic matter/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	阳离子交换量 Cation exchange capacity (CEC)/($\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全氮 Total nitrogen/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全磷 Total phosphorus/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全钾 Total potassium/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	总镉 Total cadmium/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	总砷 Total arsenic/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
含量 Content	6.73±0.78	20.6±0.01	6.40±0.16	1.18±0.09	0.23±0.01	1.74±0.01	2.74±0.72	64.1±2.60

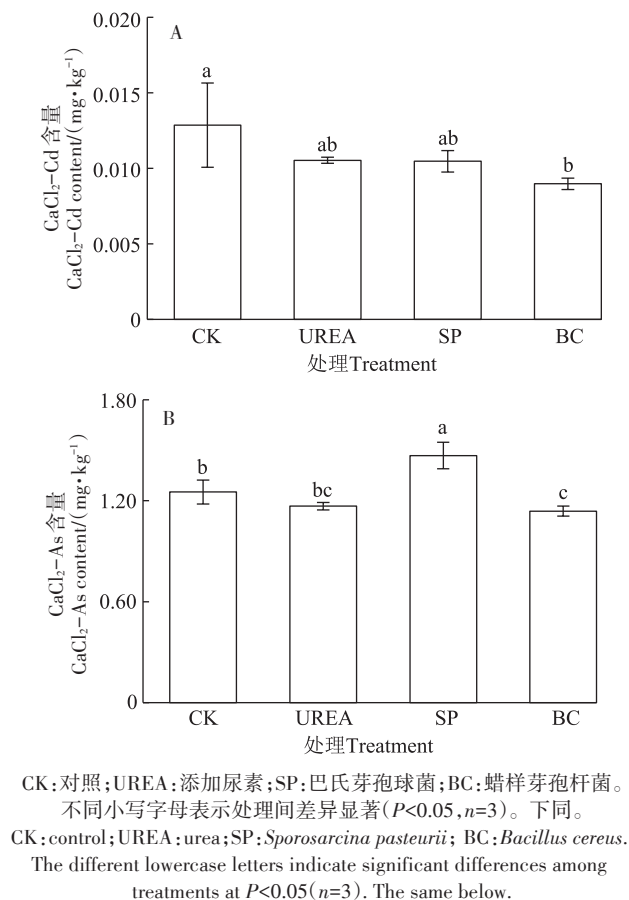
图1 不同处理下 $\text{CaCl}_2\text{-Cd}$ 和 $\text{CaCl}_2\text{-As}$ 的含量

Figure 1 $\text{CaCl}_2\text{-Cd}$ and $\text{CaCl}_2\text{-As}$ contents under different treatments

$\text{CaCl}_2\text{-Cd}$ 及 $\text{CaCl}_2\text{-As}$ 含量均最低。

不同处理下 Cd、As 各形态占比如图 2 所示。两种重金属不同形态含量整体表现为残渣态>可还原态>可交换态>可氧化态。可交换态 Cd ($F=4.18$, $P<0.05$)、可氧化态 Cd ($F=12.27$, $P<0.05$) 和残渣态 Cd 含量 ($F=5.14$, $P<0.05$) 在不同处理下差异显著。与 CK 处理相比, UREA 处理降低了 6% ($P<0.05$) 可交换态 Cd, 其余处理可交换态 Cd 含量差异不显著。与 CK 处理相比, SP、BC 处理使可氧化态 Cd 含量分别显著降低了 46.6% 和 49.1% ($P<0.05$), 而二者使残渣态 Cd 含量分别显著增加了 55.2% 和 68.0% ($P<0.05$)。不同处理下可氧化态 As ($F=4.88$, $P<0.05$) 及残渣态 As 含量 ($F=6.05$, $P<0.05$) 差异显著。与 CK 处理相比, BC 处理使可氧化态 As 含量显著降低了 44.5%, 而显著提高了残渣态 As 含量 ($P<0.05$)。其余各处理下, 不同形态 As 含量差异不显著。不同处理下的土壤 CaCO_3 含量依次为 CK 处理 (16.23%)<UREA 处理 (16.28%)<SP 处理 (16.30%)<BC 处理 (16.32%) (图 2C)。与 CK 处理相比,

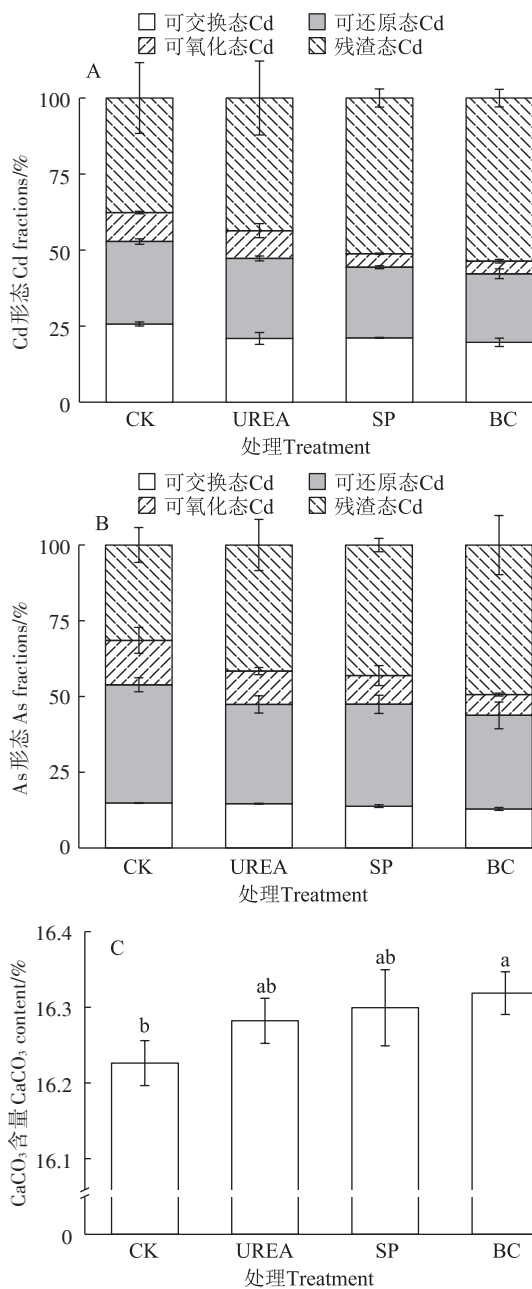
图2 不同处理土壤中Cd、As的形态特征和 CaCO_3 含量

Figure 2 The fractions of Cd, As in soil under different treatments and CaCO_3 concentrations

各处理的 CaCO_3 含量均增加, 且 BC 处理时达显著水平 ($F=3.73$, $P<0.05$)。

2.2 细菌添加对土壤理化性质的影响

培养结束后, 不同处理下土壤基本理化性质如表 2 所示。与 CK 处理相比, SP 处理显著提高了土壤 pH, 而土壤阳离子交换量和有机质含量在不同处理间差异不显著。两种细菌添加处理均能提高土壤全氮、全磷、全钾含量。与 CK 处理相比, SP、BC 处理下,

表2 不同处理对土壤理化性质的影响
Table 2 Effects of different treatments on soil properties

项目 Item	pH	阳离子交换量 CEC/ ($\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)	有机质 OM/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全氮 TN/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全磷 TP/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	全钾 TK/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	铵态氮 NH_4^+-N / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	硝态氮 NO_3^--N / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
CK	7.11±0.02b	7.43±0.38a	21.79±2.08a	1.21±0.07b	0.26±0.01b	1.60±0.34b	6.78±1.93b	527.5±13.3a
UREA	7.37±0.21b	6.81±0.26a	23.05±0.97a	1.51±0.21a	0.26±0.02b	2.19±0.23a	76.66±3.44a	373.1±38.0b
SP	7.87±0.19a	7.15±0.12a	21.44±0.74a	1.57±0.15a	0.28±0.01ab	1.72±0.30ab	75.87±0.68a	171.0±10.0c
BC	7.27±0.35b	6.94±0.18a	22.43±0.62a	1.64±0.10a	0.29±0.01a	1.87±0.18ab	78.07±0.66a	354.7±7.1b
<i>F</i>	6.354	3.268	0.978	5.318	8.888	2.667	896.842	144.747
<i>P</i>	0.016	0.080	0.450	0.026	0.006	0.119	<0.001	<0.001

全氮、全磷、全钾含量分别提高了30.0%~36.1%、5.9%~9.2%、8.0%~17.2%。UREA处理仅能显著提高全氮(25.2%, $P<0.05$)及全钾(37.3%, $P<0.05$)含量,而全磷含量与CK处理差异不显著。不同处理下 NH_4^+-N 及 NO_3^--N 含量与CK处理差异显著,UREA、SP、BC处理使 NH_4^+-N 含量分别显著提高了10.3、10.2、10.5倍,使 NO_3^--N 含量分别显著降低了29.3%、67.6%、32.8%。

2.3 细菌添加对土壤酶活性的影响

培养结束后土壤的酶活性变化如图3所示。由图3可以看出,与CK处理相比,UREA、SP处理和BC处理使脲酶活性分别显著提高了48.0%、32.8%和11.7% ($P<0.05$)。与CK处理相比,BC处理使土壤磷酸酶活性显著提高了39.8% ($P<0.05$)。与CK处理相比,3种处理均可提高土壤蔗糖酶活性,其中SP处理和BC处理下分别显著提高了92.8%和86.7% ($P<0.05$)。

2.4 土壤性质与土壤重金属有效性之间的相关关系

土壤性质、酶和重金属形态之间的相关性如图4所示。由图4可知, NH_4^+-N 含量与可交换态Cd含量及可氧化态As含量呈显著负相关关系,相关系数分别为-0.628 ($P<0.05$)、-0.693 ($P<0.05$),与残渣态Cd含量及残渣态As含量呈正相关关系,相关系数分别为0.635 ($P<0.05$)和0.708 ($P<0.01$)。同时,脲酶活性与可交换态Cd含量及可还原态As含量呈负相关关系,相关系数分别为-0.722 ($P<0.01$)和-0.586 ($P<0.05$)。

3 讨论

产脲酶细菌广泛存在于自然环境中,其可以利用自身特性产生脲酶,分解尿素,生成 CaCO_3 ,最终形成方解石,这个过程称为MICP^[40]。在MICP过程中,重金属可替代 Ca^{2+} ,从而被固定在产生的方解石晶格中,降低重金属有效性。另外,MICP过程产生的 CaCO_3 可通过吸附或共沉淀作用也可降低重金属的有

效性。此外,产脲酶细菌产生脲酶,分解尿素的过程伴随着铵盐的产生,从而可提高土壤pH,进一步降低重金属的有效性。大量研究表明产脲酶细菌可以固

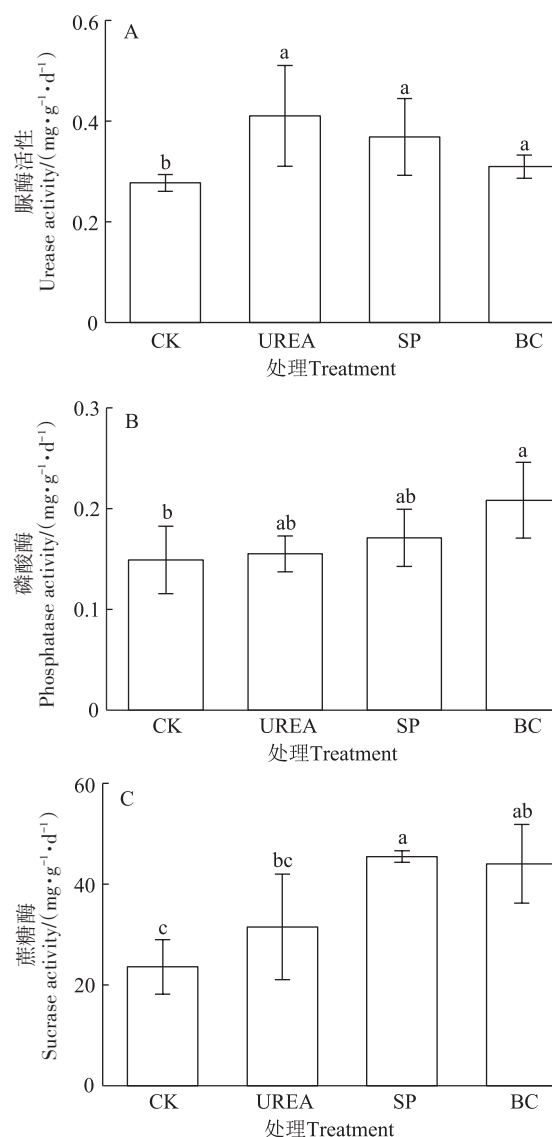


图3 不同处理对土壤中酶活性的影响

Figure 3 Effects of different treatments on soil enzymes activities

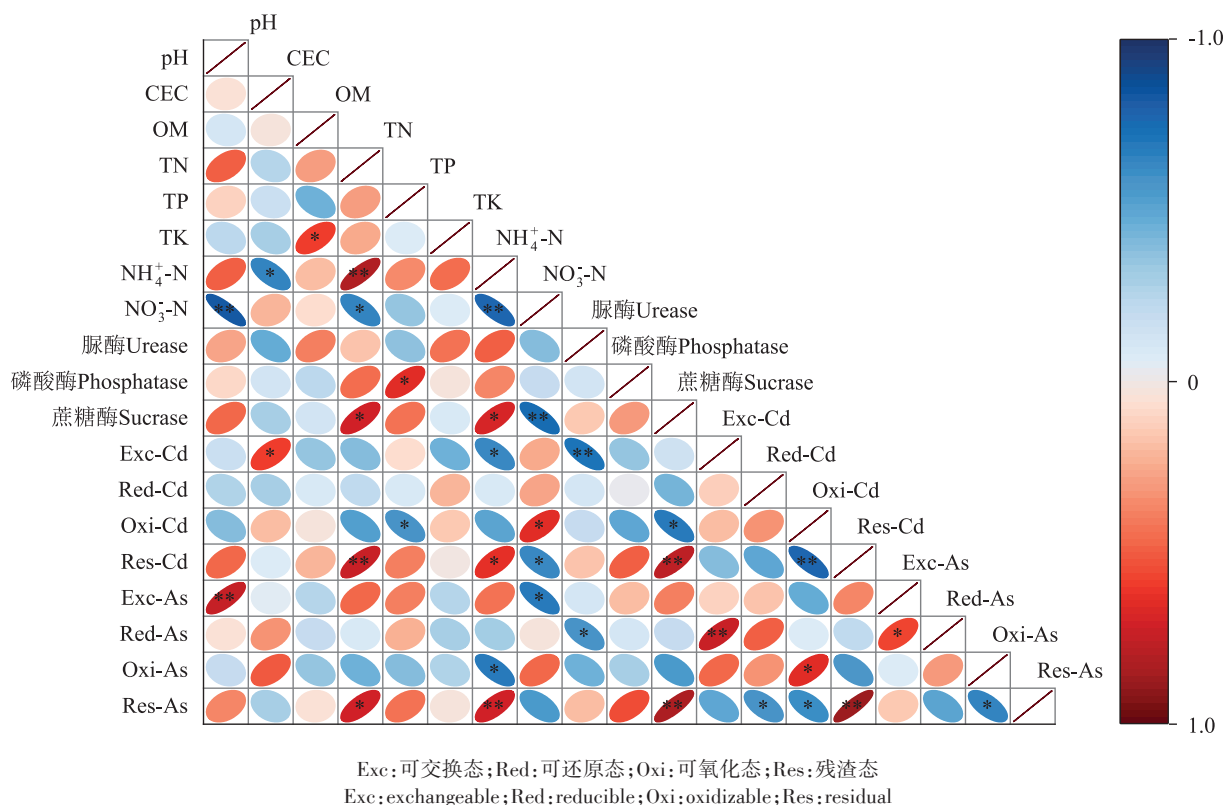


图4 土壤理化性质与重金属各形态的相关性分析

Figure 4 Correlation between soil properties and heavy metal fractions

定土壤中的重金属,且具有较高的固定率^[17,26,41]。如Chen等^[42]报道用巴氏芽孢杆菌修复Pb污染土壤,可使有效铅含量降低41.7%。本研究以空白和尿素添加作为对照,比较两种产脲酶细菌对Cd-As复合污染土壤的固定效率。结果发现,尿素和两种细菌添加均能降低土壤中Cd的有效性,表明尿素和产脲酶细菌均可诱导MICP过程的发生,且蜡样芽孢杆菌的效果更为显著。就As而言,仅蜡样芽孢杆菌处理可显著降低As的有效性,说明产脲酶细菌对重金属的固定效果受金属类型和细菌种类的影响。蜡样芽孢杆菌能有效降低As有效性与其生理生化过程密切相关。MICP固定重金属的作用机制除了代替方解石晶格中的Ca²⁺外,还包括共沉淀及吸附作用,而共沉淀及吸附作用的强弱与产生的碳酸盐晶体大小和形状等密切相关^[43-45]。本研究中仅蜡样芽孢杆菌可降低As的有效性,表明蜡样芽孢杆菌诱导产生的碳酸盐晶体能很好地吸附As或与As进行共沉淀,从而降低As的有效性。因此,诱导碳酸盐沉淀过程中,蜡样芽孢杆菌产生的碳酸盐沉淀较巴氏芽孢杆菌具有更强的吸附作用或共沉淀作用,因此可有效降低As的有效性。此外,巴氏芽孢杆菌处理下CaCl₂-As表现为增加趋势,

这可能是由于巴氏芽孢杆菌提升了土壤pH,导致土壤电负性提高,促进了As的释放。总之,两种细菌均可降低土壤Cd的有效性,且蜡样芽孢杆菌对Cd的固定作用更显著。

采用BCR分析Cd、As的形态,发现不同处理下各Cd、As形态的含量差异显著。两种重金属不同形态含量均表现为残渣态>可还原态>可交换态>可氧化态,土壤中Cd和As主要以残渣态为主。尿素处理降低了可交换态Cd含量;而产脲酶细菌处理可有效降低可氧化态Cd含量,并将其转化成难迁移和难被生物利用的残渣态Cd,从而达到固定土壤中Cd的效果。而对As而言,仅BC处理下可有效降低可氧化态As含量,并将其转化为残渣态As。此外,不同处理下土壤CaCO₃含量依次为CK<UREA<SP<BC。与CK处理相比,UREA、SP处理和BC处理下CaCO₃含量均有增加,但仅BC处理增加最显著,表明BC处理显著提高土壤CaCO₃含量,刺激了MICP过程,从而降低了重金属有效性。Lyu等^[21]的研究也得到了类似的结论,MICP过程不仅可以增加不溶性碳酸盐含量,而且可降低可溶性Cd和交换态Cd含量。综上,尿素和两种产脲酶细菌的添加均能诱导MICP过程生成不溶性碳

酸盐,从而对重金属进行固定,且蜡样芽孢杆菌固定效果更为显著。因此,针对Cd-As复合污染土壤,蜡样芽孢杆菌是有效的修复菌剂。

针对农田土壤重金属修复,探讨修复技术对土壤性质的影响对于农田生产尤为重要。培养结束后,本研究不同处理间土壤阳离子交换量和有机质含量差异不显著,这可能是培养周期较短导致的。而与CK处理相比,SP处理可显著提高土壤pH,推断是与MICP过程相关。在MICP过程中,巴氏芽孢杆菌产生铵盐,提高了土壤pH^[17,46],这可能是其不能有效降低As有效性的主要原因。As在土壤中常以阴离子形式存在,pH的增加提高了土壤的电负性,从而可促进As的释放^[47-48]。同时,可交换态As含量与pH呈显著正相关($r=0.754$, $P<0.01$,图4)也验证了此观点。与CK处理相比,两种细菌及尿素添加处理的总氮和总磷含量均显著增加,表明生物修复过程可提高土壤氮、钾养分。尿素作为一种养分,其添加也可增加土壤氮含量。此外,与CK处理相比,仅在BC处理下总磷含量显著增加,表明与巴氏芽孢杆菌相比,蜡样芽孢杆菌在土壤养分提升方面效果更优。这可能与蜡样芽孢杆菌处理具有更高的微生物活性有关。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 是土壤最为常见的有效态氮形式,其可直接被作物及微生物吸收利用。在MICP过程中,微生物的活动还与土壤氮循环密切相关。由表2可知,不同处理下 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量差异显著。与CK处理相比,3种处理均显著提高了 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量,降低了 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量,说明3种处理均可诱导MICP过程,产生铵盐。同时,可以推断MICP过程刺激了氮的氨化作用,抑制了氮的硝化作用。已有研究表明,在中性或碱性土壤中,pH上升能够抑制土壤硝化作用进行^[49]。本研究中,SP处理下pH最高,同时 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量最低,表明巴氏芽孢杆菌在MICP过程中对土壤硝化作用的抑制效果最为显著。综上可知,尿素、产脲酶细菌的添加可以诱发MICP过程,并提高土壤养分,其中蜡样芽孢杆菌对土壤养分的提升最为显著。MICP过程还可协同土壤氨化作用提高土壤 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量,抑制硝化作用,其中巴氏芽孢杆菌对硝化作用的抑制更显著。

土壤酶对土壤生化过程具有重要作用,是土壤生化过程的催化剂,也是土壤生态功能评价的重要指标^[50]。脲酶是MICP过程中的关键酶,参与尿素分解产生 NH_4^+ 和 CO_3^{2-} 的过程^[1,51]。脲酶活性强度代表着MICP过程尿素水解的反应强度。脲酶与可交换态Cd及可还原态As含量呈负相关关系,表明脲酶在

MICP过程中发挥了重要作用。与CK处理相比,3种处理均可有效提高脲酶活性,说明3种处理均可有效诱导MICP过程。另外, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 与可交换态Cd和可氧化态As含量呈显著负相关关系,与残渣态Cd及残渣态As含量呈正相关关系,表明 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在MICP过程中发挥了重要作用,可作为重金属从有效态向残渣态转变的重要标志。Peng等^[52]的研究发现,产脲酶细菌的添加可显著提高土壤脲酶活性,与本研究结论一致。3种处理均可提高磷酸酶活性,可能是促进了微生物活性导致的,其中仅BC处理达到显著水平,说明蜡样芽孢杆菌对土壤生态功能更友好。蔗糖酶活性也是重金属污染的重要指标之一^[50]。蔗糖酶活性与残渣态Cd及残渣态As含量均呈现出极显著正相关关系,说明蔗糖酶也参与了重金属的固定。与CK处理相比,两种产脲酶细菌的添加均能显著提高蔗糖酶活性,表明MICP过程不仅能有效降低重金属的有效性,还能调节土壤酶活性,添加产脲酶细菌是农田土壤理想的修复方法。

4 结论

(1)尿素、两种产脲酶细菌添加均能刺激微生物诱导碳酸盐沉淀过程,提高脲酶活性,从而降低重金属有效性。其中,蜡样芽孢杆菌可有效降低Cd和As的有效性,具有较好Cd-As复合污染水稻土的修复效果。

(2)两种产脲酶细菌可增加不溶性碳酸盐含量,促进Cd从有效态转变为残渣态,其中蜡样芽孢杆菌效果更优。

(3)两种产脲酶细菌添加均能提高土壤养分,刺激土壤氨化作用。

(4)两种产脲酶细菌添加可有效提高土壤磷酸酶和蔗糖酶活性,对土壤生态功能具有调节作用,其中蜡样芽孢杆菌的提升效果更为显著。

综上,蜡样芽孢杆菌在修复Cd-As复合污染土壤方面具有显著优点,不仅能降低两种重金属的有效性,而且可显著提升土壤肥力和酶活性,是一种优良的生物修复材料。

参考文献:

- [1] ÁLVAREZ-AYUSO E, ABAD-VALLE P. Application of different alkaline materials as polluted soil amendments: A comparative assessment of their impact on trace element mobility and microbial functions [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 227: 112927.
- [2] LIU Y, HU C, LI B, et al. Subsurface drip irrigation reduces cadmium

- accumulation of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants in upland soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 755:142650.
- [3] 庞发虎, 吴雪姣, 孔雪菲, 等. 重金属钝化剂阻控生菜Cd吸收的功能稳定性和适用性[J]. 环境科学, 2021, 42(5):2502-2511. PANG F H, WU X J, KONG X F, et al. Functional stability and applicability of heavy metal passivators in reducing Cd uptake by lettuce[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(5):2502-2511.
- [4] ZHAO C, FU Q, SONG W, et al. Calcifying cyanobacterium (*Nostoc calcicola*) reactor as a promising way to remove cadmium from water[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 81:107-114.
- [5] ALI U, SHAABAN M, BASHIR S, et al. Rice straw, biochar and calcite incorporation enhance nickel (Ni) immobilization in contaminated soil and Ni removal capacity[J]. *Chemosphere*, 2020, 244:125418.
- [6] FANG L, NIU Q, CHENG L, et al. Ca-mediated alleviation of Cd²⁺ induced toxicity and improved Cd²⁺ biomineralization by *Sporosarcina pasteurii*[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 787:147627.
- [7] 王泓博, 苟文贤, 吴玉清, 等. 重金属污染土壤修复研究进展:原理与技术[J]. 生态学杂志, 2021, 40(8):2277-2288. WANG H B, GOU W X, WU Y Q, et al. Progress in remediation technologies of heavy metals contaminated soil: Principles and technologies[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, 40(8):2277-2288.
- [8] USMANI Z, KULP M, LUKK T. Bioremediation of lindane contaminated soil: Exploring the potential of actinobacterial strains[J]. *Chemosphere*, 2021, 278:130468.
- [9] CHANG S H, WU C F, YANG C F, et al. Evaluation use of bioaugmentation and biostimulation to improve degradation of sulfoline in artificial groundwater[J]. *Chemosphere*, 2021, 263:127919.
- [10] QIAO S, ZENG G, WANG X, et al. Multiple heavy metals immobilization based on microbially induced carbonate precipitation by ureolytic bacteria and the precipitation patterns exploration[J]. *Chemosphere*, 2021, 274:129661.
- [11] CUAXINQUE-FLORES G, AGUIRRE-NOYOLA J L, HERNÁNDEZ-FLORES G, et al. Bioimmobilization of toxic metals by precipitation of carbonates using *Sporosarcina luteola*: An in vitro study and application to sulfide-bearing tailings[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 724:138124.
- [12] GOVARTHANAN M, MYTHILI R, KAMALA-KANNAN S, et al. In-vitro bio-mineralization of arsenic and lead from aqueous solution and soil by wood rot fungus, *Trichoderma* sp.[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 174:699-705.
- [13] NAVEED M, DUAN J, UDDIN S, et al. Application of microbially induced calcium carbonate precipitation with urea hydrolysis to improve the mechanical properties of soil[J]. *Ecological Engineering*, 2020, 153:105885.
- [14] PROUDFOOT D, BROOKS L, GAMMONS C H, et al. Investigating the potential for microbially induced carbonate precipitation to treat mine waste[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424:127490.
- [15] DHAMI N K, QUIRIN M E C, MUKHERJEE A. Carbonate biomineralization and heavy metal remediation by calcifying fungi isolated from karstic caves[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 103:106-117.
- [16] GUO S, ZHANG J, LI M, et al. A preliminary study of solid-waste coal gangue based biomineralization as eco-friendly underground backfill material: Material preparation and macro-micro analyses[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 770:145241.
- [17] HAN L, LI J, XUE Q, et al. Bacterial-induced mineralization (BIM) for soil solidification and heavy metal stabilization: A critical review[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 746:140967.
- [18] ACHAL V, PAN X, FU Q, et al. Biomineralization based remediation of As (Ⅲ) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 201:178-184.
- [19] DE OLIVEIRA D, HORN E J, RANDALL D G. Copper mine tailings valorization using microbial induced calcium carbonate precipitation[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 298:113440.
- [20] DO H, WANG Y, LONG Z, et al. A psychrotolerant Ni-resistant *Bacillus cereus* D2 induces carbonate precipitation of nickel at low temperature[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 198:110672.
- [21] LYU C, QIN Y, CHEN T, et al. Microbial induced carbonate precipitation contributes to the fates of Cd and Se in Cd-contaminated seleniferous soils[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:126977.
- [22] ACHAL V, PAN X, ZHANG D. Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp.[J]. *Chemosphere*, 2012, 89(6):764-768.
- [23] UPADHYAY S, SAHA A K, SINHA A. High carbon iron filings (HCIF) and metal reducing bacteria (*Serratia* sp.) co-assisted Cr (VI) reduction: Kinetics, mechanism and longevity[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 236:388-395.
- [24] QIAN C, REN X, RUI Y, et al. Characteristics of bio-CaCO₃ from microbial bio-mineralization with different bacteria species[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 176:108180.
- [25] YIN T, LIN H, DONG Y, et al. A novel constructed carbonate-mineralized functional bacterial consortium for high-efficiency cadmium biomineralization[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401:123269.
- [26] JIANG N J, LIU R, DU Y J, et al. Microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Pb contaminants: Toxic effects on bacterial activity and immobilization efficiency[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 672:722-731.
- [27] MA H, WEI M, WANG Z, et al. Bioremediation of cadmium polluted soil using a novel cadmium immobilizing plant growth promotion strain *Bacillus* sp. TZ5 loaded on biochar[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388:122065.
- [28] HAN H, CAI H, WANG X, et al. Heavy metal-immobilizing bacteria increase the biomass and reduce the Cd and Pb uptake by pakchoi (*Brassica chinensis* L.) in heavy metal-contaminated soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 195:110375.
- [29] 孙莺. 中国不同地区尿素分解菌的分离筛选及其诱导碳酸钙沉积能力的比较研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2017: 23-25. SUN Y. Isolation of ureolytic bacteria from different regions of China and the comparative study on the ability of inducing calcium carbonate precipitation[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2017: 23-25.

- [30] FERNANDES S, GOMES I B, SIMÕES M. Antimicrobial activity of glycolic acid and glyoxal against *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Food Research International*, 2020, 136:109346.
- [31] LIU P, ZHANG Y, TANG Q, et al. Bioremediation of metal-contaminated soils by microbially-induced carbonate precipitation and its effects on ecotoxicity and long-term stability[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 166:107856.
- [32] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2013: 72-75. BAO S D. Soil agricultural chemistry analysis[M]. 3th Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2013: 72-75.
- [33] BELLO A, WANG B, ZHAO Y, et al. Composted biochar affects structural dynamics, function and co-occurrence network patterns of fungi community[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 775:145672.
- [34] 王玉功, 刘婧晶, 刘貽熙, 等. 苯酚-次氯酸钠比色法测定土壤脲酶活性影响因素的研究[J]. 土壤通报, 2019, 50(5): 1166-1170. WANG Y G, LIU J J, LI Y X, et al. Effective factors of urease activities in soil by using the phenol-sodium hypochlorite colorimetric method[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2019, 50(5): 1166-1170.
- [35] YAO Z P, LI Z J, LIANG Y C, et al. Dynamic responses of soil enzymatic activities to oxytetracycline in soil[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(3): 696-700.
- [36] KANDELER E, GERBER H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1988, 6(1): 68-72.
- [37] BENEFIELD C B, HOWARD P J A, HOWARD D M. The estimation of dehydrogenase activity in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1977, 9(1): 67-70.
- [38] SENEVIRATNE M, WEERASUNDARA L, OK Y S, et al. Phytotoxicity attenuation in *Vigna radiata* under heavy metal stress at the presence of biochar and N fixing bacteria[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 186: 293-300.
- [39] RAURET G, LÓPEZ-SÁNCHEZ J F, SAHUQUILLO A, et al. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 1999, 1(1): 57-61.
- [40] 曾勇, 陈泽智, 杜亚玲, 等. 产脲酶菌株 *Sporosarcina ureilytica* ML-2 诱导方解石沉淀矿化 Pb(II)、Cd(II) 和 Cr(VI) 研究[J]. 环境科学学报, 2022, 42(5): 148-159. ZENG Y, CHEN Z Z, DU Y L, et al. The mineralization study of Pb(II), Cd(II) and Cr(VI) by induced calcite precipitation by urease producing strain *Sporosarcina ureilytica* ML-2[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2022, 42(5): 148-159.
- [41] CHUNG H, KIM S H, NAM K. Inhibition of urea hydrolysis by free Cu concentration of soil solution in microbially induced calcium carbonate precipitation[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 740: 140194.
- [42] CHEN M, LI Y, JIANG X, et al. Study on soil physical structure after the bioremediation of Pb pollution using microbial-induced carbonate precipitation methodology[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411: 125103.
- [43] RAJASEKAR A, WILKINSON S, MOY C K S. MICP as a potential sustainable technique to treat or entrap contaminants in the natural environment: A review[J]. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2021, 6: 100096.
- [44] WANG M, WU S, GUO J, et al. Immobilization and migration of arsenic during the conversion of microbially induced calcium carbonate to hydroxylapatite[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 412: 125261.
- [45] LIU R, LIAN B. Immobilisation of Cd(II) on biogenic and abiotic calcium carbonate[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 378: 120707.
- [46] ZHAO J, CSETENYI L, GADD G M. Fungal-induced CaCO_3 and SrCO_3 precipitation: A potential strategy for bioprotection of concrete [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 816: 151501.
- [47] LOPEZ A R, FUNK D H, BUCHWALTER D B. Arsenic(V) bioconcentration kinetics in freshwater macroinvertebrates and periphyton is influenced by pH[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 224: 82-88.
- [48] TABELIN C B, IGARASHI T, VILLACORTE-TABELIN M, et al. Arsenic, selenium, boron, lead, cadmium, copper, and zinc in naturally contaminated rocks: A review of their sources, modes of enrichment, mechanisms of release, and mitigation strategies[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645: 1522-1553.
- [49] 王丽娜, 于永强, 芦东旭, 等. 土壤 pH 调控固氮植物和非固氮植物间的氮转移[J]. 植物生态学报, 2022, 46(1): 1-17. WANG L N, YU Y Q, LU D X, et al. Soil pH modulates nitrogen transfer from nitrogen-fixing plants to non-nitrogen-fixing plants[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2022, 46(1): 1-17.
- [50] TU C, WEI J, GUAN F, et al. Biochar and bacteria inoculated biochar enhanced Cd and Cu immobilization and enzymatic activity in a polluted soil[J]. *Environment International*, 2020, 137: 105576.
- [51] LI H, SONG Y, LI Q, et al. Effective microbial calcite precipitation by a new mutant and precipitating regulation of extracellular urease[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 269-275.
- [52] PENG D, QIAO S, LUO Y, et al. Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 400: 123116.

(责任编辑: 朱晓昱)