

分类号：
密 级：

单位代码：10193
学 号：20211225



吉林农业大学

硕士学位论文

复合功能微生物联合体的构建与作用机制研究

Study on the construction and mechanism of multi-functional microbial consortium

作者姓名：_____ 车松昊 _____

专 业：_____ 生物化学与分子生物学 _____

研究方向：_____ 微生物生物化学与分子生物学 _____

指导教师：_____ 吴雷 _____

所在学院：_____ 生命科学学院 _____

2024 年 5 月

摘 要

随着农业现代化的推进,农业废弃物堆积、土壤磷素匮乏和重金属污染等一系列问题日益严重,在一定程度上制约了我国农业的可持续发展。整合传统农业结构,实现植物和微生物资源结合的新型农业发展模式,是实现经济效益、社会效益和生态效益最大化的有效途径。微生物技术具有经济成本低、环保性能好、处理效率高的特点,可以加快农业废弃物资源化利用,促进土壤磷素循环,提高重金属污染土壤的修复效率,在农业生产以及污染防治中具有重要作用。研究表明,单一的微生物存在功能不全、稳定性差、修复效率效果不明显等问题,构建生态结构相对稳定、具有多功能的高效微生物联合体是近年研究的新趋势。本研究首先将秸秆降解菌与解磷菌组合培养,以秸秆降解率、解磷量和重金属去除率为指标构建微生物联合体,然后根据微生物联合体生长体系中的主要物质(糖和有机酸)、pH 和代谢途径中的关键酶活力的变化情况,阐释两种菌株之间的协同作用机制,最后将微生物联合体应用于水稻生长盆栽实验,验证微生物联合体对水稻根际土壤营养环境、水稻生长情况和 Cd、Pb 重金属毒害修复作用的影响,为促进秸秆资源的有效利用、提高磷肥的使用效率,改善土壤重金属污染问题提供理论基础和参考依据,主要研究结果如下:

(1) 筛选并构建了由秸秆降解菌:伊朗纤维素单胞菌 (*Cellulomonas iranensis*) ZJW-6 和解磷菌:油菜假单胞菌 (*Pseudomonas brassicacearum*) wj1 组成的微生物联合体 ZJW-6+wj1,微生物联合体 7 天的秸秆降解率为 48.33%,解磷量为 117.54 mg/L,对 Cd、Pb 的耐受程度分别为 900 mg/L 和 2500 mg/L,对 Pb 的去除率为 74%,对 Cd 的去除率为 94.25%。

(2) 微生物联合体 ZJW-6+wj1 的碳源消耗速度明显高于 ZJW-6 和 wj1,可以快速造成生长环境的碳源短缺情况,加快降解秸秆的速度。微生物联合体生长环境中磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、己糖激酶、 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶等糖类代谢途径(糖酵解(KEGG: map00010)及碳水化合物的消化与吸收(KEGG: map04973))的关键酶活性明显提高,环境的 pH 降低,证明分解秸秆产生的糖类物质可以通过微生物联合体代谢过程转化生成更多的有机酸进而促进难溶性磷的增溶。

(3) 微生物联合体 ZJW-6+wj1 可以分泌更多有机酸类物质进行解磷并整合重金属,并且将重金属吸附于菌体表面来完成对可溶性态重金属的去除,联合体丰富了土壤中大团聚体的含量,大团聚体通过直接吸附重金属在其表面的方式去除 Cd 和 Pb。

(4) 微生物联合体 ZJW-6+wj1 丰富了水稻盆栽土壤中的有机质与速效 N、P、K，在 60 天的土壤有机质含量可达到 22.67 mg/kg，速效 N、P 和 K 的含量分别达到 214.36 mg/kg、14.14 mg/kg 和 163.48 mg/kg；显著提升了水稻根活力，净光合速率及叶绿素含量，促进水稻地上部与根系的生长。

(5) 微生物联合体应用于 Cd、Pb 污染的盆栽水稻中，在 60 天时，联合体对水稻根际外土壤中 Pb 去除率达到 98.8%，Cd 去除率达到 99.1%；根际土壤中 Cd 去除率达到 91.2%，Pb 去除率达到 97.8%；同时降低了水稻组织中的重金属含量，Cd、Pb 去除率分别为 99.5%、96.3%。微生物组学结果显示微生物联合体可以提高 *Ramlibacter*、*Sphingomonas* 为代表的功能微生物丰度，促进甲基乙二醛的降解减轻其在植物体内积累引起的毒害作用，并且抑制乙酸生成甲烷和乙酰辅酶 a，保持有机酸螯合重金属的功能专一性，进而提高降解秸秆、解磷，有机酸螯合重金属的效率。

关键词：微生物联合体、秸秆降解、解磷、重金属污染修复、土壤改良、水稻促生

Abstract

With the advancement of agricultural modernization, a series of problems such as agricultural waste accumulation, soil phosphorus deficiency and heavy metal pollution are becoming more and more serious, which restrict the sustainable development of China's agriculture to a certain extent. Integrating traditional agricultural structure and realizing new agriculture combining plant and microbial resources is an effective way to maximize economic, social and ecological benefits. Microbial technology has the characteristics of low economic cost, good environmental protection performance and high treatment efficiency. It can accelerate the utilization of agricultural waste resources, promote soil phosphorus cycle, and improve the remediation efficiency of heavy metal contaminated soil. It plays an important role in agricultural production and pollution prevention and control. Studies have shown that a single microorganism has problems such as incomplete function, poor stability, and ineffective remediation efficiency. The construction of an efficient microbial consortium with relatively stable ecological structure and multiple functions is a new trend in recent years. In this study, the microbial consortium was firstly constructed with the degradation rate of straw, the amount of phosphate solubilization and the removal rate of heavy metals as indicators. Then, the synergistic mechanism between the two strains was explained according to the changes of the main substances (sugars and organic acids), pH and key enzyme activities in the metabolic pathway in the growth system of the microbial consortium. Finally, the microbial consortium was applied to the pot experiment of rice growth to verify the effects of microbial consortium on the nutrient environment of rice rhizosphere soil, rice growth and the remediation of Cd and Pb heavy metal toxicity, so as to promote the effective utilization of straw resources and improve the efficiency of phosphate fertilizer. It provides a theoretical basis and reference for improving soil heavy metal pollution. The main research results are as follows:

(1) A microbial consortium ZJW-6+wj1 consisting of a straw-degrading bacterium *Cellulomonas iranensis* ZJW-6 and a phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas brassicacearum* wj1 was screened and constructed. The straw degradation rate of the microbial consortium was 48.33% after 7 days, and the phosphate-solubilizing amount was 117.54 mg/L. The tolerance of Cd and Pb was 900 mg/L and 2500 mg/L, respectively. The removal rate of Pb

was 74 %. The removal rate of Cd was 94.25%.

(2) The carbon source consumption rate of microbial consortium ZJW-6+wj1 was significantly higher than that of ZJW-6 and wj1, which could cause carbon source stress in the growth environment and accelerate the degradation of straw. The key enzyme activities of carbohydrate metabolic pathways (Glycolysis (KEGG: map00010) and Carbohydrate digestion and absorption (KEGG: map04973)) such as phosphofructokinase, pyruvate kinase, hexokinase, β -glucosidase and endoglucanase in the growth environment of microbial consortium were significantly improved, and the pH of the environment was reduced. It was proved that the carbohydrates produced by decomposing straw could be transformed into more organic acids through the metabolic process of microbial consortium to promote the solubilization of insoluble phosphorus.

(3) The microbial consortium ZJW-6+wj1 can secrete more organic acids to solubilize phosphorus and chelate heavy metals, and adsorb heavy metals on the surface of the bacteria to complete the removal of soluble heavy metals. The consortium enriches the content of macroaggregates in the soil, and the macroaggregates remove Cd and Pb by directly adsorbing heavy metals on their surface.

(4) The microbial consortium ZJW-6+wj1 enriched the organic matter and available N, P and K in the rice pot soil. The soil organic matter content could reach 22.67 mg/kg in 60 days, and the contents of available N, P and K reached 214.36 mg/kg, 14.14 mg/kg and 163.48 mg/kg, respectively. It significantly increased the root activity, net photosynthetic rate and chlorophyll content of rice, and promoted the growth of shoot and root of rice.

(5) The microbial consortium was applied to Cd and Pb contaminated rice pots. At 60 days, the removal rate of Pb in the rhizosphere soil of rice reached 98.8%, and the removal rate of Cd reached 99.1%. The removal rates of Cd and Pb in rhizosphere soil were 91.2% and 97.8%, respectively. At the same time, the content of heavy metals in rice tissues was reduced, and the removal rates of Cd and Pb were 99.5% and 96.3%, respectively. The results of microbial omics showed that the microbial consortium could increase the number of functional microorganisms represented by *Ramlibacter* and *Sphingomonas*, promote the degradation of methylglyoxal to reduce the toxic effect caused by its accumulation in plants, and inhibit acetic acid to produce methane and acetyl coenzyme a, maintain the functional specificity of organic acid chelating heavy metals, and then improve the efficiency of degradation of straw, phosphate solubilization

and organic acid chelating heavy metals.

Keywords: Microbial consortium; Straw degradation; Phosphate solubilization; Heavy metal pollution remediation; Soil improvement; Rice growth promotion

目 录

第一章 前言.....	1
1.1 农田土壤面临的问题及解决方法	1
1.1.1 土壤秸秆堆弃及利用现状.....	1
1.1.2 土壤有效磷素匮乏及处理策略.....	2
1.1.3 土壤重金属污染及修复方式.....	3
1.2 农业微生物在土壤改良中的作用	4
1.2.1 秸秆降解微生物.....	4
1.2.2 解磷微生物.....	5
1.2.3 重金属污染修复微生物.....	5
1.2.4 微生物联合体在土壤改良中的作用.....	6
1.3 本研究的目的与意义.....	6
第二章 微生物联合体的筛选与构建	7
2.1 材料与方法.....	7
2.1.1 供试菌株.....	7
2.1.2 试剂与培养基质.....	7
2.1.3 微生物联合体构建策略.....	8
2.1.4 供试菌株拮抗实验.....	8
2.1.5 微生物联合体解磷能力测定.....	8
2.1.6 微生物联合体秸秆降解能力测定.....	9
2.1.7 微生物联合体重金属去除能力及耐受能力测定	9
2.2 结果与分析.....	9
2.2.1 微生物联合体成员菌拮抗结果分析.....	9
2.2.2 微生物联合体的解磷能力.....	11
2.2.3 微生物联合体的秸秆降解能力.....	11
2.2.4 微生物联合体的重金属去除能力及耐受能力	12
2.3 讨论.....	13
2.4 小结.....	14
第三章 微生物联合体作用机制	15
3.1 材料与方法.....	15
3.1.1 微生物联合体成员菌的协同作用机制	15
3.1.2 微生物联合体对 Cd、Pb 的去除机制.....	16
3.2 结果与分析.....	17
3.2.1 微生物联合体总还原糖与 pH 变化.....	17
3.2.2 微生物联合体对秸秆的转化及糖类代谢物分析	17

3.2.3 微生物联合体酸类代谢产物分析.....	21
3.2.4 微生物联合体酶活力分析.....	23
3.2.5 重金属吸附、固定联合分析.....	26
3.3 讨论.....	27
3.4 小结.....	28
第四章 微生物联合体对水稻生长及土壤营养环境的影响.....	30
4.1 材料与方法.....	30
4.1.1 实验试剂.....	30
4.1.2 供试土壤来源及水稻品种.....	30
4.1.3 水稻培养方法.....	31
4.1.4 水稻分蘖末期的表型与根系生长情况测定.....	31
4.1.5 水稻生理指标的测定.....	31
4.1.6 土壤中速效 N、P、K 和有机质的测定.....	31
4.2 结果与分析.....	32
4.2.1 不同处理下水稻分蘖末期的表型分析.....	32
4.2.2 不同处理对水稻生理特性的影响.....	33
4.2.3 菌剂对土壤的中速效 N、P、K 和有机质含量的影响.....	35
4.3 讨论.....	37
4.4 小结.....	37
第五章 微生物联合体对 Cd、Pb 污染土壤的修复.....	38
5.1 材料与方法.....	38
5.1.1 实验试剂.....	38
5.1.2 供试土壤来源、水稻品种及培养方法.....	38
5.1.3 Cd、Pb 污染土壤模拟实验.....	38
5.1.4 水稻根系与地上部组织中 Cd、Pb 含量测定.....	38
5.1.5 菌剂处理下 Cd、Pb 污染土壤性状测定.....	39
5.1.6 土壤微生物多样性分析.....	39
5.1.7 数据统计分析.....	40
5.2 结果与分析.....	40
5.2.1 菌剂对重金属污染下水稻的影响.....	40
5.2.2 土壤中有机质含量测定和团聚体分布情况.....	40
5.2.3 水稻根系与地上部组织中 Cd、Pb 含量分析.....	42
5.2.4 土壤总 Cd、Pb 含量及团聚体吸附 Cd、Pb 含量.....	42
5.2.5 土壤微生物群落结构分析.....	43
5.3 讨论.....	47
5.4 小结.....	48
第六章 结论.....	49
参考文献.....	50

第一章 前言

随着全球农业与工业的快速发展，导致大量农弃物的产出，秸秆占其中很大比重，秸秆燃烧等传统处理方式污染大气环境，加重温室效应^[1]。现代农业为了提高产量，大量的磷素化肥的施用导致土壤营养环境失衡、水体富营养化和土壤板结等问题，土壤本身的有效磷素日益匮乏^[2]。工业污水灌溉，工业残留物的堆积，过度使用化肥和除草剂导致重金属过量积累在土壤中，影响着农作物的生长与人类的健康^[3,4,5]。因此，研究科学合理的利用秸秆资源，增加土壤中有效磷素含量以及高效修复土壤中重金属污染对农业的绿色可持续发展具有重要意义。

1.1 农田土壤面临问题及解决方法

1.1.1 土壤秸秆堆弃及利用现状

秸秆资源占我国农业废弃物很大比重，农田中仍有大量秸秆堆弃在农田土壤表面，对播种、收获效率和农作物的生长环境造成严重影响；因此，科学有效地利用秸秆资源是目前需要解决的关键问题。秸秆是成熟农作物收获籽实后去根留下的剩余部分^[6]，具有高含量的木质纤维素，也含植物生长所需的 N、P、K 和有机质等重要营养物质，可应用于工农业的生产的多个领域，是一种“环境友好型”资源^[7,8]。目前，秸秆资源的利用主要有以下几种途径：

(1) 饲料化：秸秆含丰富的碳水化合物，也含有蛋白质和脂肪等营养物质。赵等^[9]研究表明通过氨化、青贮，发酵等方式对秸秆进行处理，产出的饲料对反刍家畜的适口性强，易被其消化，将秸秆中的木质纤维素转化为脂肪酸和其他能量物质，利于家畜对饲料的吸收。秸秆饲料化利于畜牧业的发展，具有较高的经济效益，Chen 等^[10]研究显示玉米秸秆固态发酵使总氨基酸含量提高 41.69%。发酵玉米秸秆干重和真蛋白质的绝对消化率分别为 34.34%和 45.29%，高效利用玉米秸秆，为秸秆饲料化提供一条可行性途径^[11]。

(2) 肥料化：肥料化利用包括将秸秆还田或制成有机肥等方式，可有效提升土壤的有机质含量，改善土壤营养环境，也能提高土壤颗粒粒径^[12]，Wang 等^[13]将秸秆制成农田肥料，肥料强化了土壤中含氮官能团，增强了酸性 pH 的溶解性，提高了孔隙率，在农业生产应用中显示出优势。此外，秸秆肥料有利于水土保持，促进农作物的生长。一定程度

上减少了化肥施用与农作物病害^[14]。

(3) 燃料化: 秸秆可通过秸秆气化发电和秸秆燃烧发电等方式产出电能, 其中, 秸秆燃烧直接发电可初步实现规模化应用^[15]。另外, 秸秆作为底物在缺氧条件下能产出含 CH_4 、 H_2 等可燃性气体, 也可作为原料生产乙醇, 耿等^[16]采用水稻和玉米秸秆制成水热碳, 用于秸秆的厌氧发酵中, 产甲烷速率显著提升, 同时在发酵体系中富集了 *Firmicutes*、*Synergistota* 等产酸功能菌与 *Methanosarcina*、*Methanospirillum* 等产甲烷菌。秸秆产能在日益严重的能源问题上发挥重大作用^[17]。

(4) 原料化: 秸秆原料具结构致密, 纤维度高等特点^[18]。在建筑板材、造纸行业、家居制品、食品餐具等方面具有较好的应用价值。减少秸秆废弃, 降低木材等其他原料消耗, 降低成本, 提高各行业经济效益。闻等^[19]研究发现, 使用秸秆制备建筑材料可减轻秸秆综合利用的问题, 减少环境污染和能源损耗, 助力“碳中和”。

(5) 基料化: 秸秆基料化是秸秆综合利用的重要途径, 秸秆基料(基质)是指以秸秆为主要原料, 加工或制备的主要为动物、植物及微生物生长提供良好条件, 同时也能为动物、植物及微生物生长提供一定营养的有机固体物料^[20]。目前, 基料化研究多在食用菌生产领域, 刘等^[21]研究表明秸秆食用菌生产技术包括秸秆栽培草腐菌类技术和秸秆栽培木腐菌类技术两大类: 利用秸秆生产的草腐菌主要有双孢蘑菇、草菇、鸡腿菇、大球盖菇等; 利用秸秆生产的木腐菌主要有香菇、平菇、金针菇、茶树菇等。采用的秸秆原料主要为水稻、玉米、油菜等秸秆。

上述秸秆利用途径有效的解决了秸秆过度产出导致的废弃问题, 可在环保和秸秆利用度方面进行进一步研究与挖掘。

1.1.2 土壤有效磷素匮乏及处理策略

目前, 日益严峻的土壤磷资源问题影响着土壤农作物的生长环境, 对整体粮食产量与品质均产生影响^[22], 改善土壤磷资源缺乏问题主要具有以下几种方式:

(1) 精确施肥: 施用化肥是目前最主要的改善手段, 主要包括过磷酸钙, 磷酸铵等成分^[23]。施肥时注意施用适度, 按农作物需求施用, 达到合理利用资源, 减少污染的目的; 过度施用磷化肥会导致土壤有害元素的积累, 导致土壤理化性质失衡, 缺锌、钼等严重问题^[24]除化学肥料外, 人类、家畜的粪便也可制成有机肥料, 含丰富的磷元素, 施用有机肥料, 可有效改善土壤磷问题, 提高土壤肥力, 方等人^[25]研究表明: 有机肥料可用以改良和调理土壤理化性状, 改善土壤的团粒结构, 以防止土壤板结和蓄水保墒, 从而保证农产品稳定的增产增收。

(2) 农田改良：过酸性土壤可改善 pH 至适宜范围，提高磷的有效性；也可通过增加土壤有机质，减轻磷的固定作用，提升磷的释放效率。LUDEWIG 等研究表明^[26]土壤化境由过酸化向偏酸化改善，有助于提高磷的循环有效性，减少磷损失。

(3) 开发新技术：目前采用较多的为生物处理技术（微生物处理方法），如：利用具溶解难溶性磷作用的微生物制成菌剂施用于土壤中，解磷菌通过分泌有机酸或产磷酸酶等方式溶解土壤中难溶性磷源，释放更多速效磷，改善土壤营养环境，动员更多的土壤解磷微生物解磷^[27]。Negi^[28] 等人筛选出 36 株解磷菌，最优的解磷菌鉴定为 *Bacillus tropicus* EU-ARP-44，被用作微生物菌剂接入土壤中，提升速效磷含量，植物芽/根长度、鲜/干重和叶绿素、类胡萝卜素、总可溶性糖含量、酚类和类黄酮含量。

(4) 规范与监管：开发高质量肥料并建立科学的施肥标准与策略，实现经济环保和可持续发展等要求^[29]。

微生物法较传统的施肥或其他技术相比，经济成本低、环保性高，效率较高，具有较好的研究潜力。

1.1.3 土壤重金属污染及修复方式

重金属污染指由重金属或其化合物造成的环境污染。重金属不易被分解，容易累积，对土壤微生物，农作物具有较强的毒害作用，并随着食物链最终会对人类生命安全造成威胁^[30]。土壤中重金属污染物主要包括铬、汞、镉、锌、铜、砷、镍、铁、锰、铅等^[31]。其中，镉和铅对土壤微生物和农作物的毒害作用更强。土壤镉污染主要来自矿产资源以及冶炼厂的废水不当排放与灌溉，部分镉污染还来自于磷肥的过度施用^[32,33]，镉在土壤中大多以自由离子或者可溶性状态分布^[34]，通过作物根系吸收进入作物体内，阻碍作物本身的生理代谢，影响植株的各器官发育，并且最终累积于农产品中，威胁人类健康^[35]；土壤铅污染，主要来自工厂铅尘和燃料燃烧后产生的大气沉降^[36,37]。铅被植株吸收后，免疫能力降低，易染植物病虫害^[38]。过多的铅会引起植物细胞产生氧化应激，导致植株枯萎，最终影响农作物的品质与产量^[39]。

目前，修复土壤重金属污染的方式主要有以下几种：

(1) 物理法：物理修复方法包括深翻换土法、分离修复法和热力修复法。深翻换土法和分离修复法均对土壤结构有着严重影响，且成本较高^[40]；热力修复法，主要以热传导的方式对土壤进行修复，对土壤微生物群落造成不可逆的破坏，且专一性较强，只能针对少部分的重金属污染^[41]。

(2) 化学法：化学修复方法包括化学固定、土壤淋洗和电修复法^[42,43]。化学固定主要

为改变土壤 pH 环境，将重金属游离态转变为不溶性的螯合态，加入石灰、堆肥等固定物进行固定，阻碍植物的吸收^[44]；土壤淋洗通过将土壤与土壤提取剂混合，将土壤中的重金属处理至安全水平时，再正常使用土壤；电修复法是将直流电极插入土壤中，使重金属向电极迁移富集的方法，但作用土壤有限，仅限淤泥或粘土。化学方法整体修复效率较低，成本适中，对土壤环境的破坏性较大^[45,46]。

(3) 生物法：生物修复方法主要包括土壤动物修复法和微生物修复法^[47]。土壤动物主要包括对重金属产生耐受并可以富集的动物，例如：蚯蚓、蜘蛛等^[48]。使用土壤动物修复除了动物本身的直接富集外，也可与植物，土壤微生物互作，实现更高效的修复效果^[49]，但成本较高，还需进一步研究；微生物修复实质将对耐受重金属，并具有螯合重金属功能的功能微生物（群），通过载体或直接接种到土壤中，微生物（群）通过分泌特殊物质或酶实现对重金属的螯合，并吸附螯合物，目前研究较多的去除重金属的微生物有解磷菌、解钾菌等^[50,51,52]。微生物修复具备效率高，经济成本低等特点，是近年来研究较多的修复方向^[53]。

1.2 农业微生物在土壤改良中的作用

1.2.1 秸秆降解微生物

秸秆降解微生物是具有降解木质纤维素能力的微生物，主要包括真菌、细菌两大部分，目前研究的秸秆降解真菌为：毛壳霉属(*Chaetomium*)、球孢枝孢菌(*Cladosporium sporum*)、漆斑霉属(*Myrothecium*)、分枝孢属(*Cladosporium*)等，真菌通过产生菌丝体的方式与秸秆中的木质纤维素接触，再由降解酶系完成对秸秆的分解^[54]；秸秆降解细菌有：纤维单胞菌(*Cellulomonas*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、厚壁菌(*Firmicutes*)等，细菌通过高速繁殖，产生大量秸秆降解酶，完成对秸秆的分解^[55]。秸秆降解微生物的主要对象是秸秆中的纤维素、半纤维素、木质素。其中，木质素的结构最为复杂，且与纤维素和半纤维素相互交联，是微生物降解秸秆的主要限速因素^[56]。微生物降解木质纤维素主要依靠一系列木质纤维素降解酶系，包含的酶主要有： β -葡萄糖苷酶、内切葡聚糖酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶等^[57]。

1.2.1.1 微生物降解木质素

主要降解木质素的微生物包括细菌与真菌^[58]，具有较强的木质素酶分泌能力，其中包括：木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶^[59]。在木质素降解细菌的研究中，Mei 等发现了一株高效降解木质素的细菌 SL-7 (*Bacillus amyloliquefaciens*)，锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和漆酶最高可达到 258.57 U/L, 422.68 U/L 和 55.95 U/L，15 天最高可降解秸

秆 28.55% 的木质素^[60]。李等人晒算出一株高效降解木质素的真菌 DT-2 (*Bacillus subtilis*), DT-2 分泌的锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和漆酶最高可达到 35.56 U/mL、38.44 U/mL 和 26.78 U/mL, 3 天可降解近 80% 的木质素^[61]。

1.2.1.2 微生物降解纤维素

细菌与真菌的纤维素降解酶系包含内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶等。其中, 内切葡聚糖酶通过水解 β -1,4-糖苷键, 破坏长链纤维素, 产生游离的链末端基^[62,63]; 外切葡聚糖酶作用于纤维素长链末端, 破坏糖苷键, 分离纤维二糖; β -葡萄糖苷酶可以分解纤维素二糖, 产生葡萄糖^[64]。张等筛选出一株高效降解纤维素的细菌 DC-15 (*Bacillus tequilensis*), 纤维素内切酶 (CMCase)、纤维素外切酶 (CBH) 最高酶活力分别可达 11.66 U/mL、10.01 U/mL, 在第 6 天, 纤维素降解率为 71.2%^[65]。

1.2.1.3 微生物降解半纤维素

细菌与真菌的半纤维素降解酶系包含木聚糖酶、 β -木糖苷酶和 α -L-阿拉伯糖苷酶等^[66]。木聚糖酶通过水解 β -1,4-糖苷键, 将木聚糖水解为低聚木糖; β -木糖苷酶通过水解低聚木糖的末端来释放木糖残基^[67]。Paul 等人研究表明, 半纤维素的分解起主要作用的酶类主要是木聚糖酶、 β -木糖苷酶, 降解产物包括脂肪酸等物质^[68]。

1.2.2 解磷微生物

解磷微生物是指可以将不溶性磷酸盐和土壤有机磷转化为可溶性磷酸盐的一类功能微生物。解磷微生物也包含了细菌和真菌。解磷菌的解磷机制目前主要研究的有:

(1) 解磷菌水解有机磷: 有机解磷菌在缺磷条件下, 可分泌植酸酶、核酸酶和磷酸酶等, 将土壤有机磷水解为无机磷酸盐, 冯等^[69]筛选出三种丛枝菌根真菌, 并测定其中含高活性碱性磷酸酶, 接种至土壤中, 显著提高土壤全磷含量, 促进玉米植株生长。

(2) 解磷菌溶解无机难溶性磷: 无机解磷菌在缺磷条件下, 通过分泌有机酸的形式溶解难溶性无机磷酸盐为可溶性磷酸盐。解磷菌主要分泌的有机酸有: 乳酸、延胡索酸、琥珀酸和葡萄糖酸等, Sun 等^[70]研究表明, 解磷菌以分泌有机酸的形式促进难溶性磷的增溶, 接种于堆肥中更有利于磷素获取, 提高堆肥利用率。

目前, 解磷菌作为理想的微生物菌剂, 广泛用于农业生产中。Sun 等人研究显示, 接种解磷菌制剂于堆肥中可有效增加堆肥中基料的磷转化、丰富腐殖质并改变了堆肥中的微生物组成, 有效提升堆肥磷转化能力, 在农业生产中具有较高的应用价值^[71]。

1.2.3 重金属污染修复微生物

在微生物修复重金属污染的研究中,解磷菌是目前主要研究的对象之一^[72]。因其可以将不溶的磷酸盐转化为可溶的磷酸盐,后者可与重金属螯合为更稳定的磷酸盐-重金属化合物,此类化合物不易被植物吸收,实现降低污染的作用^[73]。部分微生物也可通过带电荷的细胞表面直接吸附重金属离子,降低重金属的移动性^[74]。此外,微生物也可协同植物共同修复重金属污染,裴等^[75]采用乳酸菌处理黑麦草,经协同作用减轻了 Pb 在植物组织内的迁移和积累,并螯合土壤中的 Pb,实现对污染土壤的高效修复;Zhang 等筛选出高效的解磷菌,以海藻酸钠和 CaCl_2 为载体, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为主要内容物的微生物胶囊,在高效解磷的同时,也通过胶囊减少了重金属对解磷菌的毒害作用;研究表明, Pb^{2+} 的去除效率可达 98%,在铅修复中具广阔的应用前景^[76]。

1.2.4 微生物联合体在土壤改良中的作用

微生物解决上述问题具有显著效果,但单一微生物处理存在着功能专一,与环境产生拮抗等问题,微生物联合体可改善上述现象;微生物联合体是指天然的微生物菌群或人为地将多种微生物联合培养的体系,具体作用为:微生物间的功能补全、微生物分泌物质补全和提高微生物对作用对象的抗逆性^[77]。Wang 等人研究发现,通过 *Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Phanerochaete chrysosporium*、*Trichoderma koningii*、*Saccharomyces cerevisiae* 和 *Bacillus amyloliquefaciens*。组成的微生物联合体接种于厨余垃圾组成的堆肥中,既改善了 pH 值,促进了本地细菌的腐殖化,又富集嗜热菌,有助于有机降解和腐殖化,解决了单一菌株功能和效果不足的缺陷,制成的堆肥有利于农作物生长^[78]。Wang 等综述表明,在重金属修复方面,微生物联合体相较于单一的微生物处理有着以下优势:降低重金属在土壤中的生物利用度(如生物积累和生物转化)、提高作物对重金属污染的抗性(如促进养分的吸收)和微生物之间的协同作用等^[79]。微生物联合体具有经济成本低、环保和高效等优势,有着较好的研究潜力^[80]。

1.3 本研究的目与意义

秸秆堆弃、磷素缺乏和重金属污染等问题日益严重,制约了现代农业的可持续性发展,甚至威胁了人类的健康,探索科学的解决方法已经迫在眉睫。微生物技术经济成本低、环保性能好、处理效率高,可以加快秸秆资源利用,促进土壤磷素循环,提高重金属污染土壤的修复效率,在促进农业生产和防治面源污染方面具有很高的应用潜力。本研究构建由秸秆降解菌与解磷菌组成具有复合功能的微生物联合体,在降解秸秆与解磷的同时,又可以去除重金属,通过对微生物联合体功能和性质的研究,探索其在农业生产中的应用前景,为开发可以高效利用秸秆,提高土壤有效磷素,降低重金属污染的微生物资源提供理论和技术基础,对于农业的绿色可持续发展具有重要意义。

第二章 微生物联合体的筛选与构建

构建秸秆降解菌与解磷菌组合，根据微生物联合体间的解磷能力、秸秆降解能力和重金属去除能力，筛选最优的微生物联合体进行后续实验。

2.1 材料与方法

2.1.1 供试菌株

本实验供试菌株由实验室前期分离鉴定并保藏于吉林农业大学生命科学学院。秸秆降解菌：ZJW-6、ZLZ-3 和 DA-24；解磷菌：wj1、wj5、wj6。

2.1.2 试剂与培养基质

实验所用试剂如下：

(1) 钼锑贮存液：量取 126 mL 浓硫酸，缓慢加入至 100 mL 蒸馏水中，搅拌并冷却。取 10 g 钼酸铵溶于温度约 60℃，300 mL 蒸馏水中，待冷却后将硫酸溶液缓缓倒入钼酸铵溶液中。再加入 0.5% 酒石酸锑钾溶液 100 mL，冷却后，加水定容至 1000 mL，摇匀，贮于棕色试剂瓶中，常温保存。

(2) 钼锑显色剂：取 1.5 g 抗坏血酸溶于钼锑贮备液中，定容至 100 mL，此试剂现用现配。

(3) 二硝基酚指示剂：取 0.2 g 二硝基酚，加水定容至 100 mL，贮于棕色试剂瓶中，常温保存。

表 2-1 实验用培养基及配方
Table 2-1 experimental medium and formula

培养基名称	培养基成分
LB 培养基	胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L 和琼脂 15 g/L
微生物联合体共培养基	秸秆 5 g/L、蛋白胨 5 g/L、七水硫酸镁 0.25 g/L、硫酸铵 1 g/L、磷酸三钙 5 g/L、氯化钾 0.2 g/L、六水氯化镁 0.5 g/L、氯化钠 0.3 g/L、水和硫酸锰 0.03 g/L、硝酸镉 6.3 g/L, 硝酸铅 8.0 g/L
重金属抗性测定培养基	秸秆 5 g/L、蛋白胨 5 g/L、七水硫酸镁 0.25 g/L、硫酸铵 1 g/L、磷酸三钙 5 g/L、氯化钾 0.2 g/L、六水氯化镁 0.5 g/L、氯化钠 0.3 g/L、水和硫酸锰 0.03 g/L、硝酸镉 6.3 g/L, 硝酸铅 8.0 g/L。 向培养基中加入不同浓度的 Cd (100-700 mg/L, 递增梯度为 100 mg/L) 和铅 (100-2100 mg/L, 递增梯度为 300 mg/L)

2.1.3 微生物联合体构建策略

本实验采用三种秸秆降解菌与三种解磷菌两两组合的方式构建微生物联合体, 共组建九种微生物联合体, 上述秸秆降解菌与解磷菌均为实验室前期分离出, 具较强能力菌株。

2.1.4 供试菌株拮抗实验

挑取各菌株单菌落于 200 mL 液体 LB 培养基中, 在恒温震荡培养箱中培养, 条件为 180 rpm, 30℃。种子液 OD₆₀₀ 至 0.8 时取样, 以 1% 接种量至 200 mL LB 培养基中, OD₆₀₀ = 0.8 时, 将各个微生物联合体的成员菌种子液稀释到 10⁻⁶ 在 LB 平板进行单独涂布和混合涂布, 48 h 后观察, 单独涂布与混合后涂布的单菌落数量。

2.1.5 微生物联合体解磷能力测定

微生物联合体的解磷能力测定方法如下: 取 5 mL 种子液, 进行超声破碎 (破碎条件为: 功率 350 W, 破碎时间 5 s, 破碎间隔 10 s, 破碎时间 30 min), 破碎完成后, 将样品进行离心 (转速 12,000 rpm, 离心 10 min, 离心两次), 取样品上清, 加无菌水稀释体系

为 20 mL，加入 5-6 滴二硝基酚指示剂，加入 2 mol/L 氢氧化钠，使溶液颜色至黄色，再加入 0.5 mol/L 硫酸，使溶液颜色退色至微黄色，此时加入 5 mL 钼锑显色剂，室温放置 30 min 后，加无菌水定容至 50 mL 于 700 nm 处测量吸光度。

2.1.6 微生物联合体秸秆降解能力测定

微生物联合体的秸秆降解能力测定方法如下：记录微生物联合体处理前后共培养中秸秆的重量。重量的测定方法是将共培养中的秸秆滤出洗净，在 60℃ 下干燥至质量恒定。降解率公式如下：

$$\text{秸秆降解率} = (\text{秸秆初始重量} - \text{降解后秸秆重量}) / \text{秸秆初始重量} \times 100\%$$

2.1.7 微生物联合体重金属去除能力及耐受能力测定

取 0-7 天培养基菌液 20 mL，取样点为培养的第 1，3，5 和 7 天，待测样品在离心机中 12000 rpm，离心 5 min，离心两次，取 1 mL 上清液，使用原子吸收光谱仪对各处理的 Pb 和 Cd 的含量进行测定。pH 值使用超精度 pH 计（FiveEasy Plus，METTLER TOLEDO，瑞士）测定。微生物联合体对 Pb 和 Cd 的耐受能力测定方法如下：

向微生物联合体共培养基中加入不同浓度的 Cd(100-900 mg/L，递增梯度为 100 mg/L) 和 Pb (100-2100 mg/L，递增梯度为 300 mg/L) 测定各菌株不和微生物联合体能生长的最低重金属浓度来表示微生物联合体的耐受能力。

2.2 结果与分析

2.2.1 微生物联合体成员菌拮抗结果分析

秸秆降解菌 ZLZ-3 与解磷菌 wj1、wj5 和 wj6 的涂布情况表明，ZLZ-3 和 wj5 共培养时，菌落数较混合前有所下降（混合前总菌落数：35 个，混合后总菌落数：29 个），其他两组在组合后菌落数有略微提升。

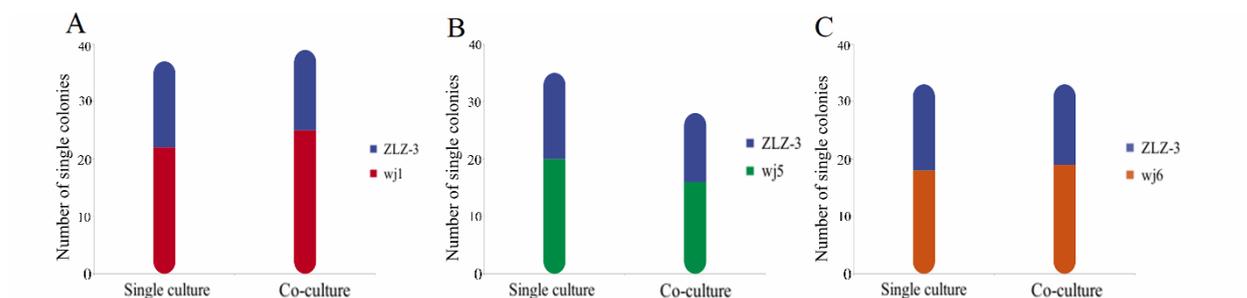


图 2-1 秸秆降解菌 ZLZ-3 与解磷菌 wj1、wj5 和 wj6 的拮抗关系

Fig. 2-1 Antagonistic relationship between ZLZ-3 and phosphate solubilizing bacteria wj1, wj5 and wj6

秸秆降解菌 ZJW-6 与解磷菌 wj1、wj5 和 wj6 无拮抗关系，且共培养后，各成员菌单菌落个数均有提升（图 2-2A：组合前总菌落数为 52 个，组合后为总菌落数为 59 个；图 2-2B：组合前总菌落数为 49 个，组合后为总菌落数为 52 个；图 2-2C：组合前总菌落数为 47 个，组合后为总菌落数为 53 个）。

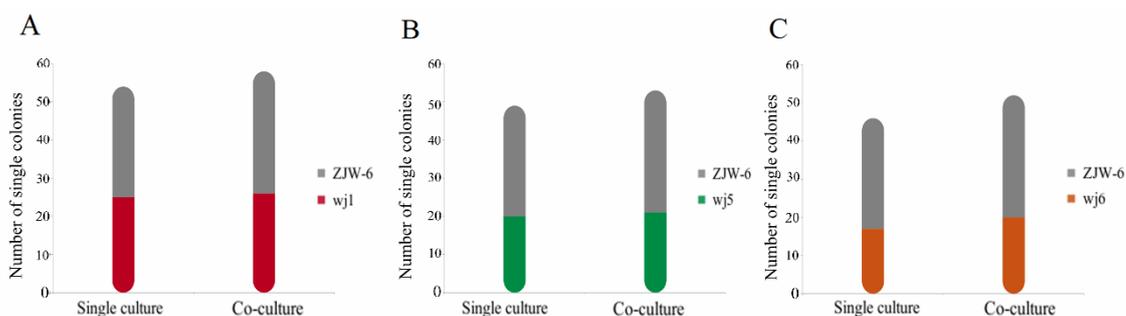


图 2-2 秸秆降解菌 ZJW-6 与解磷菌 wj1、wj5 和 wj6 的拮抗关系

Fig.2-2 The antagonistic relationship between ZJW-6 and phosphorus-solubilizing bacteria wj1, wj5 and wj6

秸秆降解菌 DA-24 与解磷菌 wj1、wj5 和 wj6 无拮抗关系，共培养后，各成员菌单菌落个数均有提升。（图 2-3A：组合前总菌落数为 44 个，组合后为总菌落数为 46 个；图 2-3B：组合前总菌落数为 37 个，组合后为总菌落数为 38 个；图 2-3C：组合前总菌落数为 38 个，组合后为总菌落数为 39 个）。

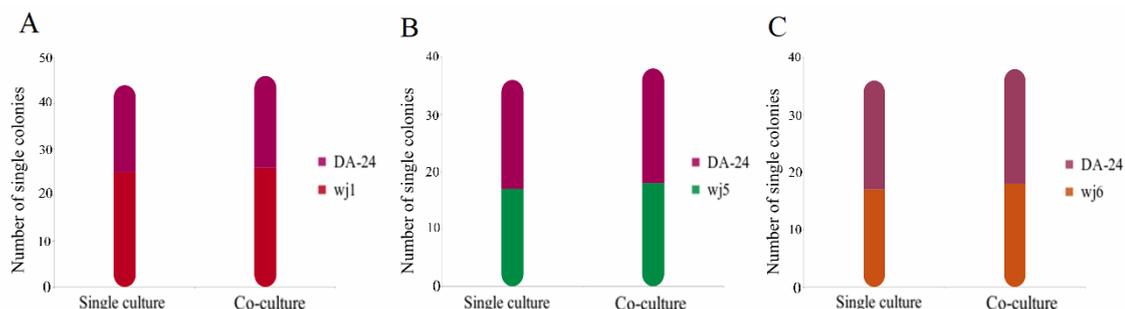


图 2-3 秸秆降解菌 DA-24 与解磷菌 wj1、wj5 和 wj6 的拮抗关系

Fig.2-3 Antagonistic relationship between DA-24 and phosphorus-solubilizing bacteria wj1, wj5 and wj6

2. 2. 2 微生物联合体的解磷能力

微生物联合体 ZJW-6+wj1 具最好的解磷能力，在前 3 天时高效解磷。第 6 天时，微生物联合体 ZJW-6+wj1 的解磷量达到最高值，为 117.54 mg/L，较其他处理的解磷量高出 15.5%-27%。

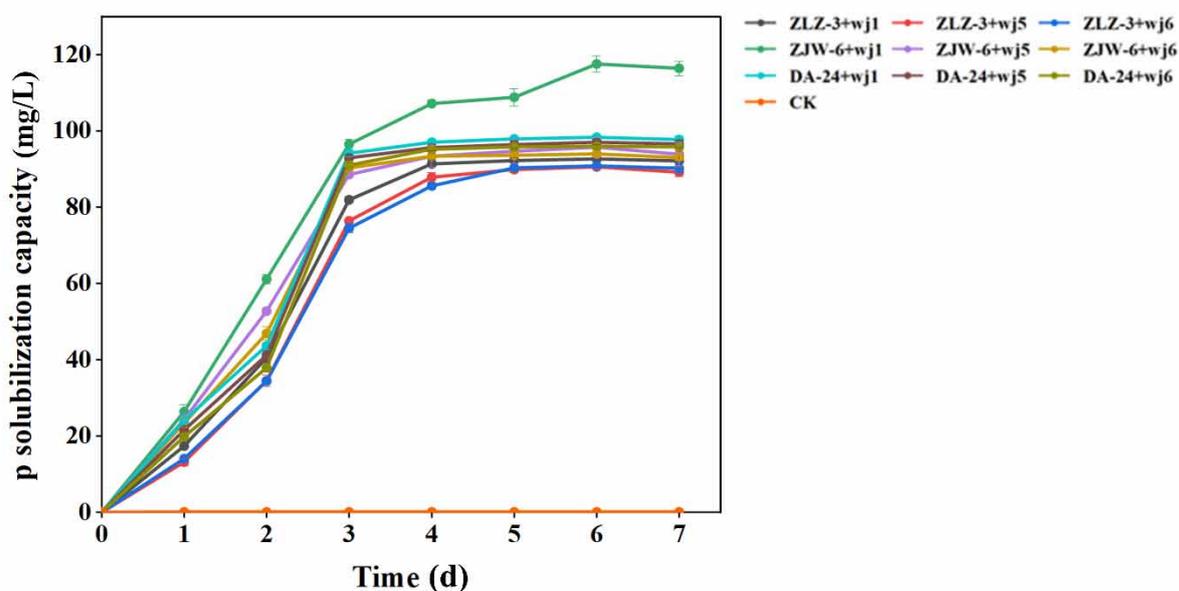


图 2-4 微生物联合体的解磷能力

Fig.2-4 Phosphate-solubilizing ability of microbial consortium

2. 2. 3 微生物联合体的秸秆降解能力

微生物联合体 ZJW-6+wj1 在第 7 天时的秸秆降解率在九组微生物联合体中最高，降解率为 48.33%。秸秆降解菌 ZJW-6 作为成员菌组成的三个微生物联合体的秸秆降解率均高于其他联合体处理；微生物联合体 ZJW-6+wj1 秸秆降解率在第七天高于空白处理 99.3%。

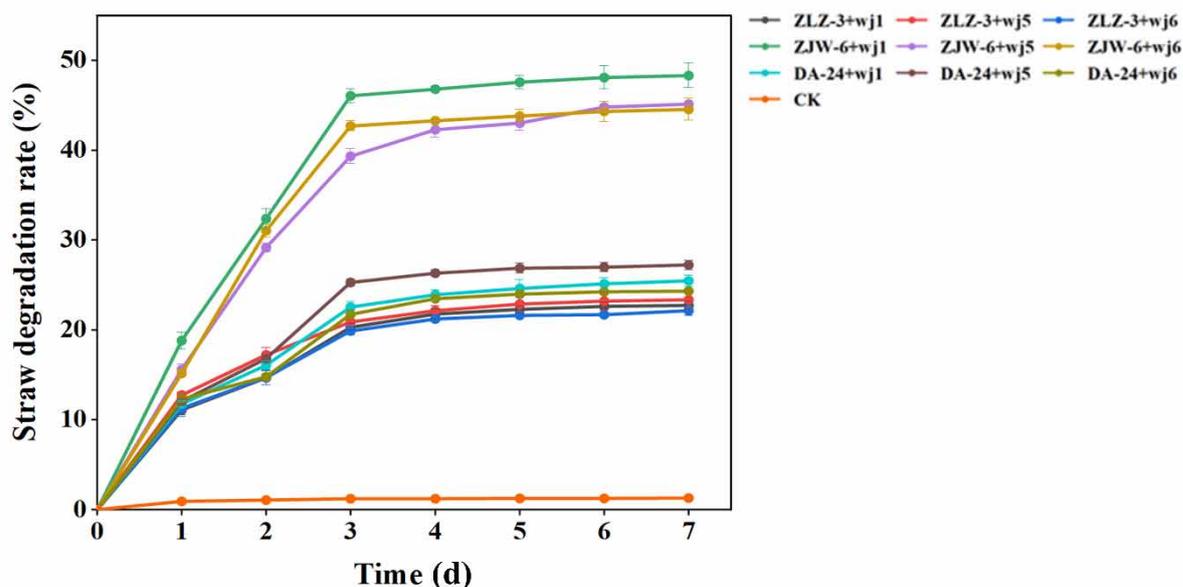


图 2-5 微生物联合体的秸秆降解能力

Fig.2-5 Straw degradation ability of microbial consortium

2. 2. 4 微生物联合体的重金属去除能力及耐受能力

培养的 7 天内，各处理对 Pb, Cd 的去除能力如图 2-6 所示，CK 处理 7 天内重金属含量维持稳定，无去除作用。微生物联合体处理 ZJW-6+wj1 的 Pb 浓度在第 7 天下降了 74%，Cd 浓度在第 7 天下降了 94.25%。微生物联合体 ZJW-6+wj1 较其他处理有显著的 Cd、Pb 去除效果。

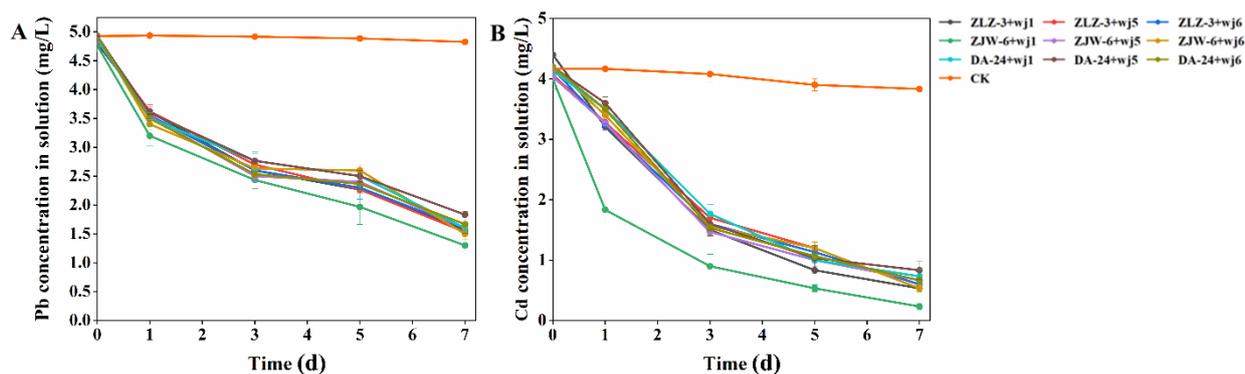


图 2-6 微生物联合体重金属去除能力

A: 微生物联合体对 Cd 的去除能力; B: 微生物联合体对 Pb 的去除能力

Fig. 2-5 Heavy metal removal ability of microbial consortium

A: The ability of microbial consortium to remove Cd; B: Pb removal ability of microbial consortiums

如表 2-2 所示,微生物联合体 ZJW-6+wj1 对 Cd、Pb 的耐受能力最强,可以在含 900 mg/L Cd、2500 mg/L Pb 中生长,其他微生物联合体对 Cd、Pb 的耐受能力较差。

表 2-2 微生物联合体对 Cd、Pb 的耐受能力

Table 2-2 The tolerance of microbial consortium to Cd and Pb

微生物联合体	Cd (mg/L)	Pb (mg/L)
ZLZ-3+wj1	200	600
ZLZ-3+wj5	100	400
ZLZ-3+wj6	100	500
ZJW-6+wj1	900	2500
ZJW-6+wj5	500	1600
ZJW-6+wj6	100	800
DA-24+wj1	300	700
DA-24+wj5	100	500
DA-24+wj6	200	600

2.3 讨论

目前研究表明微生物联合体可发挥多功能的优异效果,可能得益于菌株间的协同作用,如代谢产物的消耗与利用,多种酶的互相协作和代谢通路上调等^[81,82]; Li 等人研究发现微生物联合体与乳酸菌相互联系,在增强秸秆降解的同时,还能促进相关酶的水解,增强甲烷的产出,在秸秆利用产能方面具有重要意义^[83]; Li 研究发现将解磷菌与聚磷菌组成多功能体系,加速磷矿增溶,又能促进土壤微生物体内磷的积累量,减少可溶性磷的淋失,提高植物对磷的吸收,对土壤磷素保持、促进农作物生长有着显著作用^[84]。Zhao 等使用三种植物生长促进根际细菌(PGPR),由解磷菌 G1 (PSB)、解硅菌 YS1 (SSB) 和解钾菌 HL18 (KSB) 组成,对 Cd (500 mg/L)、Pb (600 mg/L) 和 Zn (600 mg/L) 具有一定耐受性,将联合体作用于矿区发现联合体增加了土壤氧化还原电位、脲酶、蔗糖酶和酸性磷酸酶活性、以及生物可利用的 P、Si 和 K 含量,改善土壤质量,辅助植物修复,促进矿区植被的重新绿化,同时修复重金属污染^[85]。

构建并筛选微生物联合体的过程中，微生物联合体 ZJW-6+wj1 在九组微生物联合体中具有最佳的秸秆降解能力，解磷能力和重金属清除能力，对 Cd、Pb 表现出高耐受能力且无拮抗作用，后续将对本联合体的作用机制进行研究。

2.4 小结

构建并筛选了一种微生物联合体 ZJW-6+wj1，联合体具有秸秆降解能力、解磷能力和重金属去除能力，微生物联合体 7 天的秸秆降解率为 48.33%，解磷量为 117.54 mg/L,对 Pb 的去除率为 74%，对 Cd 的去除率为 94.25%。

第三章 微生物联合体作用机制

微生物联合体 ZJW-6+wj1 具有高效的秸秆降解能力、解磷能力和重金属去除能力。但其机制尚未可知，还需进一步的发掘。本部分以分析糖和有机酸类物质为基础，检测微生物联合体在关键时期糖和酸的代谢情况并推测主要的代谢通路，通过研究代谢过程中关键酶的活性变化来验证微生物联合体秸秆降解与解磷的机制。同时，通过扫描电镜，能谱分析和红外光谱分析等技术联合分析微生物联合体在去除重金属过程中的作用机制。

3.1 材料与方法

3.1.1 微生物联合体成员菌的协同作用机制

3.1.1.1 总还原糖及 pH 测定

测定 7 天内微生物联合体的总还原糖与 pH 的变化情况。总还原糖采用 3,5-二硝基水杨酸法（DNS 法）测定，pH 采用超精度 pH 计测定。测样点为每天一次。

3.1.1.2 微生物联合体对秸秆的转化及糖类物质测定

采用北京 boxbio 生工科技有限公司的 Cellulose Content Assay Kit 纤维素含量检测试剂盒（比色法）测定纤维素含量；用 Themicellulose Content Assay Kit 半纤维素含量检测试剂盒（比色法）测定半纤维素含量；用 Lignin Content Assay Kit 木质素含量检测试剂盒（紫外比色法）测定木质素含量。

微生物联合体培养体系中的糖类物质检测使用 AB Triple TOF 6600 质谱仪（AB SCIEX）、Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪（Agilent）、Vanquish UHPLC 超高压液相色谱仪（Thermo）、低温高速离心机（Eppendorf 5430R）、色谱柱: Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm column、乙腈（Merck,1499230-935）、乙酸铵（Sigma,70221）进行定性、定量分析。

3.1.1.3 微生物联合体有机酸类代谢产物测定

微生物联合体的有机酸类代谢物检测方式同 3.1.1.2 糖类代谢物的检测方式相同。

3.1.1.4 微生物联合体酶系测定

（1）秸秆降解酶系分析采用北京 boxbio 生工科技有限公司的 Lignin Peroxidase (LIP)

Activity Assay Kit 木质素过氧化物酶活性检测试剂盒（比色法）测定木质素过氧化物酶活力；Manganese Peroxidase (Mnp) Activity Assay Kit 锰过氧化物酶活性检测试剂盒（比色法）测定锰过氧化物酶活力；Laccase Activity Assay Kit 漆酶活性检测试剂盒（比色法）测定漆酶活力； β -Glucosidase (β -GC) Activity Assay Kit β -葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（比色法）测定 β -葡萄糖苷酶活力；Inscribe- β -1,4-Glucanase (Cx) Activity Assay Kit 内切- β -1,4-葡聚糖酶活性检测试剂盒（比色法）测定内切葡聚糖酶活力； β -Glucosidase (β -GC) Activity Assay Kit β -葡萄糖苷酶活性检测试剂盒（比色法）测定 β -葡萄糖苷酶活力。

（2）代谢通路关键酶活力测定采用德国默克公司的磷酸果糖激酶(PFK)活性检测试剂盒（比色法）检测磷酸果糖激酶活力；丙酮酸激酶（PK）活性测定试剂盒检测丙酮酸激酶活力；己糖激酶活性测定试剂盒（HK）检测己糖激酶； β -葡萄糖苷酶活性检测试剂盒检测 β -葡萄糖苷酶活力；内-1,4- β -D-葡聚糖酶检测内切葡聚糖酶活力。

3.1.2 微生物联合体对 Cd、Pb 的去除机制

3.1.2.1 扫描电镜观察

将微生物联合体分别在微生物联合体共培养基及去除 Cd、Pb 的联合体共培养基中培养至 $OD_{600} = 0.8$ ，取 1 mL 种子液进行离心（转速：12000 rpm、离心时间：5 min、离心次数：2 次）。离心后去上清液，使用 2.5%戊二醛重悬菌体细胞，固定 24 h（环境温度 4℃）；再次离心（转速：12000 rpm、离心时间：5 min、离心次数：2 次），离心后去上清，用 PBS 溶液（pH = 7.0）洗涤细胞 3 次，离心（转速：12000 rpm、离心时间：5 min、离心次数：1 次），去上清。采用 30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，95%，100%乙醇溶液脱水，脱水时间为 10 min，去上清放入真空浓缩旋蒸仪蒸发 1 h，将得到的菌体样品涂抹在 SEM 用载物台上，扫描透射电子显微镜（SU8010，日立株式会社，日本）进行形态观察与分析。

3.1.2.2 能谱电子衍射分析

菌体处理方式同 3.1.2.1，使用 X 射线能谱仪（Horiba 7021-H，HORIBA Scientific，法国）检测细胞表面元素组成。

3.1.2.3 傅里叶红外光谱分析

菌体处理方式同 3.1.2.1，使用傅里叶变换红外光谱仪（912A0972，Thermo Fisher Scientific，美国）分析 Cd 和 Pb 固定的沉淀物，进一步阐明细菌对重金属的去除机理。

3.2 结果与分析

3.2.1 微生物联合体总还原糖与 pH 变化

7 天内 wj1 纯培养总还原糖含量与 CK 处理无明显差异, 说明 wj1 无秸秆降解能力, 不能产生还原糖, wj1 纯培养与 CK 处理含少量还原糖是由于秸秆经高温灭菌微量降解导致。微生物联合体和 ZJW-6 在第 3 天还原糖含量达到最高, 分别为 36.26 mg/L、26.67 mg/L。

微生物联合体 ZJW-6+wj1 与 wj1 在第 2 天与第 3 天 pH 下降最快, 最低值分别为 4.78、5.05。CK 处理无明显变化, 菌株 ZJW-6 的 pH 值有下降趋势, 但相比微生物联合体 ZJW-6+wj1 变化趋势和 wj1 变化趋势不大。微生物联合体 pH 变化较大说明微生物联合体 ZJW-6+wj1 代谢生成的有机酸含量高于其他处理。

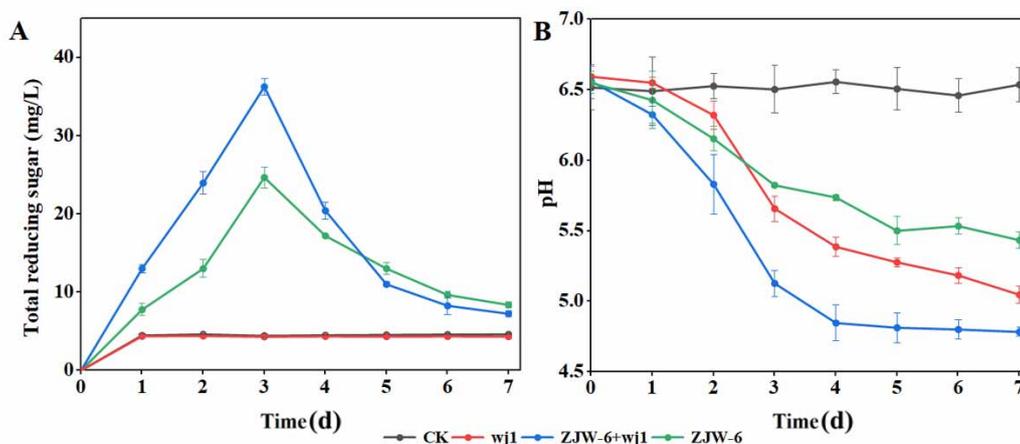


图 3-1 微生物联合体总还原糖与 pH 变化

A: 微生物联合体总还原糖含量; B: 微生物联合体 pH 变化

Fig.3-1 Total reducing sugar and pH change of microbial consortium

A: Total reducing sugar content of microbial consortium; B: pH change of microbial consortium

3.2.2 微生物联合体对秸秆的转化及糖类代谢物分析

分析了 12 天内微生物联合体降解的秸秆成分变化: 空白对照处理中, 秸秆的纤维素、半纤维素和木质素的含量在 7 天内无显著变化, 微生物联合体 ZJW-6+wj1 降解纤维素、半纤维素和木质素的降解率分别为 53.25%、59.34%和 17.91%。微生物联合体 ZJW-6+wj1 降解秸秆主要降解纤维素、半纤维素, 对木质素的降解效果不显著。

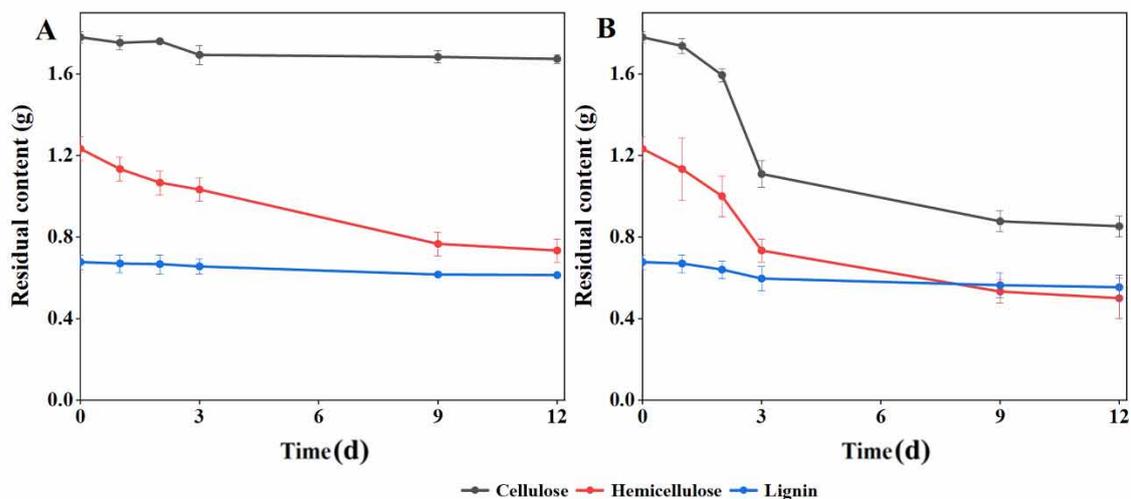


图 3-2 微生物联合体降解秸秆成分分析

A: 空白秸秆成分分析; B: 微生物联合体秸秆成分分析

Fig.3-2 Analysis of straw degradation components by microbial consortium

A: Blank straw composition analysis; B: Analysis of straw composition of microbial consortium

微生物联合体与成员菌的糖类主要代谢产物如表 3-1 所示, 结果显示葡萄糖、乳糖和木糖的含量变化最为明显。

表 3-1 微生物联合体与成员菌的糖类主要代谢产物

注：表中 a、ab、b、c 代表在 $p < 0.05$ 条件下存在显著性差异

Table 3-1 The main carbohydrate metabolites of microbial consortium and member bacteria

Note: In the table, a, ab, b, and c represent significant differences under $p < 0.05$ conditions

Compounds	ZJW-6 (3 天) (mg/L)	ZJW-6+wj1 (3 天) (mg/L)	wj1 (3 天) (mg/L)	ZJW-6+wj1 (5 天) (mg/L)
Glucose	15.04 ^b	27.27 ^a	1.76 ^c	6.97 ^c
Xylose	7.16 ^a	7.20 ^a	1.22 ^c	4.96 ^b
Lactose	2.15 ^a	2.53 ^a	0.49 ^b	1.17 ^b
D-fructose	1.43 ^{ab}	2.03 ^a	1.04 ^b	2.02 ^a
Chitobiose	0.76 ^a	0.99 ^a	0.45 ^b	0.24 ^b
Gentianose	0.63 ^{ab}	1.02 ^a	0.28 ^b	0.98 ^a
1, 4-d-xylobiose	0.66 ^a	0.87 ^a	0.52 ^b	0.45 ^b
Acarbose	0.45 ^b	0.72 ^a	0.64 ^a	0.32 ^b
Laminaritetraose	0.44 ^b	0.75 ^a	0.32 ^b	0.58 ^a
Melezitose	0.37 ^b	0.82 ^a	0.22 ^b	0.80 ^a

如图 3-1A 所示，联合体总还原糖含量第 3 天至第 5 天下降明显，第 5 天后趋于平稳。在糖类代谢产物中，主要以葡萄糖、乳糖、木糖的形式产出，微生物联合体 ZJW-6+wj1 在第 3 天产生最多的糖是葡萄糖，含量为 27.27 mg/L，在第 5 天时葡萄糖含量为 6.97 mg/L，此过程中消耗最多的糖类为葡萄糖，消耗率达到 74.44%。葡萄糖作为秸秆降解的终产物之一，在反应体系中也是产量最多的还原糖类。微生物联合体 ZJW-6+wj1 较 ZJW-6 产出的更多，也展示出联合体 ZJW-6+wj1 具有更强的秸秆降解能力。

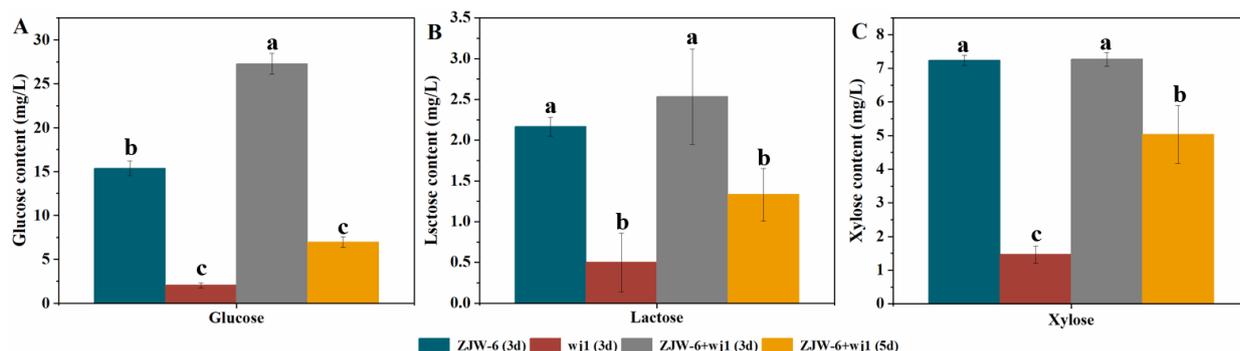


图 3-3 微生物联合体主要糖类代谢物分析

A: 葡萄糖; B: 乳糖; C: 木糖

Fig. 3-3 Analysis of main carbohydrate metabolites in microbial consortium

A: Glucose; B: Lactose; C: Xylose

在微生物联合体 ZJW-6+wj1 处理的样品中含量变化最为明显的是葡萄糖，葡萄糖作为微生物可直接利用的碳源，在微生物联合体的代谢过程中起到了非常重要的作用。为了探究环境中的葡萄糖含量是否与微生物联合体秸秆降解性能有关，设计了葡萄糖对微生物联合体降解秸秆影响的实验。图 3-4A 表明微生物联合体 ZJW-6+wj1 较成员菌 ZJW-6, wj1 具有着更高的葡萄糖消耗速率，图 3-4B 结果显示微生物联合体 ZJW-6+wj1 随着培养基中初始葡萄糖含量的升高，秸秆降解能力受到严重抑制，图 3-4C 结果显示微生物联合体 ZJW-6+wj1 具有更快的秸秆降解能力，在 3 天内对于秸秆的降解率就可以达到 46.2%，明显高于 ZJW-6 处理的样品。

综合上述分析表明，微生物联合体 ZJW-6+wj1 可以通过高速消耗碳源，造成碳源短缺，促使微生物联合体更快地降解秸秆，进而提高秸秆的降解效率。

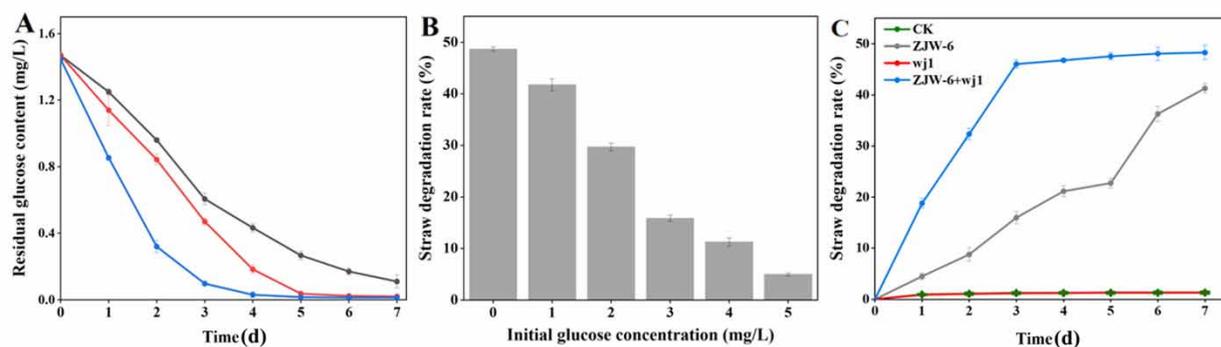


图 3-4 葡萄糖对微生物联合体秸秆降解影响

A: 联合体、ZJW-6 和 wj1 的葡萄糖消耗速率; B: 不同葡萄糖浓度对联合体降解秸秆速率的影响; C: 联合体与成员菌 ZJW-6, wj1 的秸秆降解能力比较

Fig.3-4 Analysis of the effect of glucose on the degradation of microbial consortium straw

A: Glucose consumption rate of consortium, ZJW-6 and wj1; B: The effect of different glucose concentrations on the degradation rate of straw by the consortium; C: Comparison of straw degradation ability between consortium and member bacteria ZJW-6, wj1

3. 2. 3 微生物联合体酸类代谢产物分析

微生物联合体与成员菌的有机酸类代谢产物（前十名）如表 3-2 所示，其中丙酮酸、乙酸、柠檬酸、丙酸的含量变化最为明显。

表 3-2 微生物联合体与成员菌的有机酸类主要代谢产物

注：表中 a、ab、b、c 代表在 $p < 0.05$ 条件下存在显著性差异

Table 3-2 Main metabolites of organic acids in microbial consortium and member bacteria

Note: a, ab, b, c in the table represent a significant difference under the condition of $p < 0.05$

Compounds	ZJW-6 (3 天) (mg/L)	ZJW-6+wj1 (3 天) (mg/L)	wj1 (3 天) (mg/L)	ZJW-6+wj1 (5 天) (mg/L)
Pyruvate	7.21 ^c	22.40 ^b	7.24 ^c	36.86 ^a
Acetic acid	4.91 ^b	14.86 ^{ab}	5.02 ^b	24.98 ^a
Citric acid	6.57 ^b	13.16 ^{ab}	9.93 ^b	17.35 ^a
Propionic acid	5.89 ^b	11.74 ^a	9.72 ^{ab}	13.41 ^a
Succinic acid	5.32 ^b	8.65 ^{ab}	9.88 ^{ab}	12.19 ^a
fumaric acid	5.36 ^b	11.23 ^a	8.54 ^{ab}	12.23 ^a
Tartaric acid	2.25 ^b	9.24 ^a	8.53 ^a	9.23 ^a
Malic acid	2.79 ^b	9.06 ^a	3.62 ^b	10.14 ^a
Sulfamic acid	1.24 ^b	4.41 ^a	3.47 ^a	5.81 ^a
Glycolic acid	1.48 ^c	4.69 ^a	3.51 ^b	5.16 ^a

在有机酸类代谢产物中，微生物联合体 ZJW-6+wj1 产生上述有机酸均比 wj1 纯培养要多，尤其是丙酮酸，在第 3 天高达 22.40 mg/L，产生大量丙酮酸可能是因为微生物联合体 ZJW-6+wj1 中 ZJW-6 通过降解秸秆产生大量的葡萄糖并被联合体 ZJW-6+wj1 利用通过糖酵解所得。wj1 产生在第 3 天产生最多的是柠檬酸，含量为 9.93 mg/L。联合体 ZJW-6+wj1 产生更多的丙酮酸、乙酸等有机酸，更加有利于对磷酸三钙的增溶。

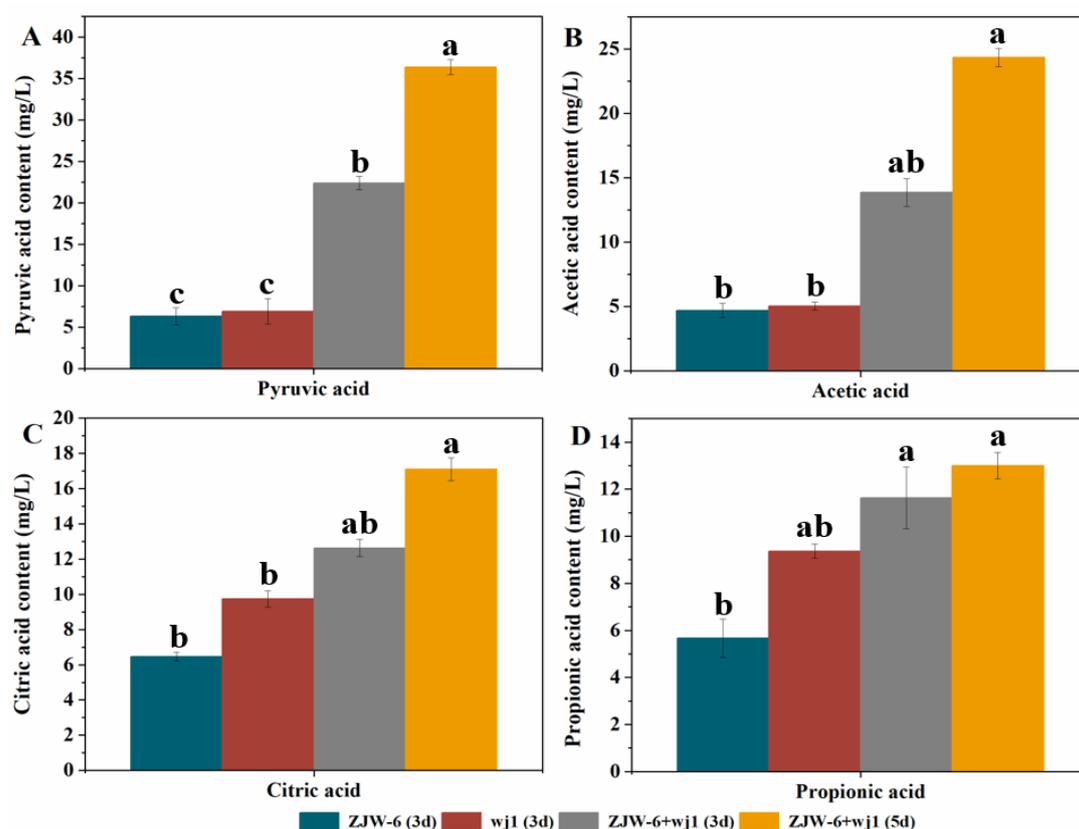


图 3-5 微生物联合体主要酸类代谢物分析

A: 丙酮酸; B: 乙酸; C: 柠檬酸; D: 丙酸

Fig.3-5 Analysis of main acid metabolites in microbial consortium

A: Pyruvic acid; B: Acetic acid; C: Citric acid; D: Propionic acid

3.2.4 微生物联合体酶活力分析

根据微生物联合体在代谢过程中主要消耗了葡萄糖，并产生了大量的丙酮酸和乙酸等代谢产物的结果，预测微生物联合体主要通过糖酵解（KEGG: map00010）及碳水化合物的消化与吸收（KEGG: map04973）两个通路完成糖类物质转化生成有机酸类物质。为了印证微生物联合体与上述两个代谢通路的相关性。本实验测定了微生物联合体 ZJW-6+wj1 及成员菌 ZJW-6 各自培养体系中上述通路的关键酶（磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、己糖激酶、 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶）的活力情况。如图 3-6 所示：wj1 的关键酶活力较低，微生物联合体 ZJW-6+wj1 的关键酶均表现出较高的酶活力，成员菌 ZJW-6 次之。

表 3-3 预测代谢通路及关键酶

Table 3-3 Prediction of key pathways and key enzymes

KEGG pathway: description	Key enzymes
map00010: Glycolysis	Phosphofructokinase, Pyruvate kinase, Hexokinase
map04973: Carbohydrate digestion and absorption	β -glucosidase, Endoglucanase

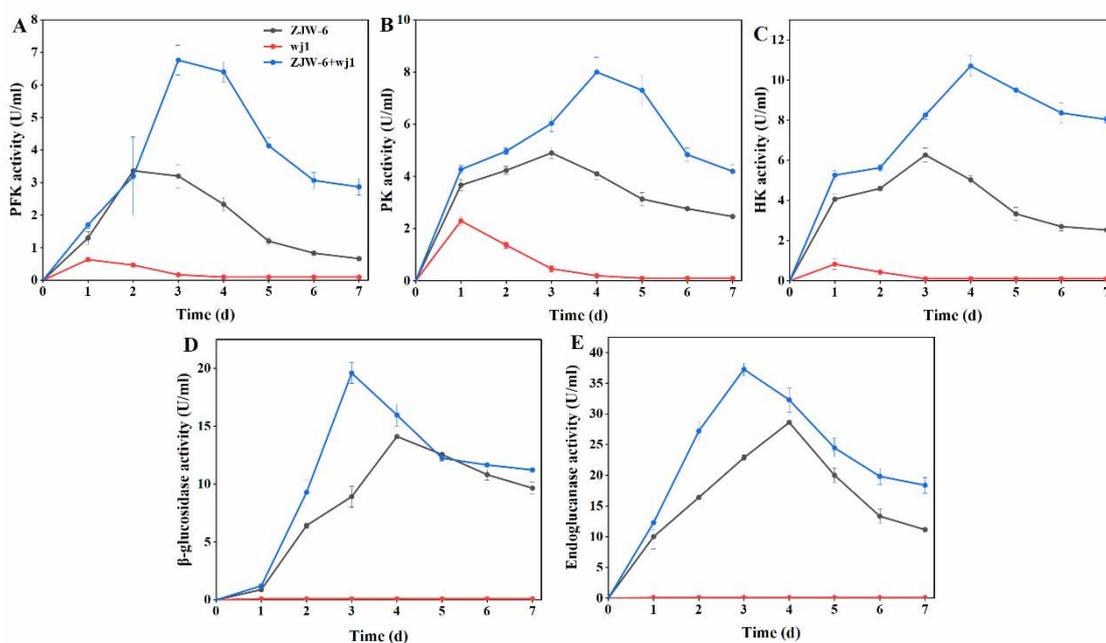


图 3-6 微生物联合体的通路关键酶分析

A: 磷酸果糖激酶; B: 丙酮酸激酶; C: 己糖激酶; D: β -葡萄糖苷酶; E: 内切葡聚糖酶

Fig. 3-6 Pathway key enzyme analysis of microbial consortium

A: Phosphofructokinase; B: Pyruvate kinase; C: Hexokinase; D: β -glucosidase; E: Endoglucanase

微生物联合体在第 3 天时的内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶全部达到峰值，分别为 37.27 U/mL、19.60 U/mL、21.66 U/mL、15.27 U/mL、7.53 U/mL、0.16 U/MmL。微生物联合体 ZJW-6+wj1 在秸秆降解酶系在第 3 天活性最高，与其第 3 天还原糖含量最高的趋势一致。ZJW-6 的内切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、木质素过氧化物酶、漆酶在第 4 天最高达到 28.64 U/ mL、14.11 U/ mL、15.41 U/mL、17.11 U/mL、0.11 U/MmL，锰过氧化物酶在第 5 天活性最高，达到 6.13 U/mL。微生物联合体 ZJW-6+wj1 除木质素过氧化物酶外，所有的酶活力均高于 ZJW-6 纯培养。

在本实验中，微生物联合体 ZJW-6+wj1 在第 3 天秸秆降解酶系活性和总还原糖含量最高，pH 值在此时下降速度也达到最快，微生物联合体 ZJW-6+wj1 的溶磷效率达到最高。直至第 5 天 pH 达到最低，溶磷效率也趋于稳定，秸秆降解酶系的活性变化也趋于稳定。

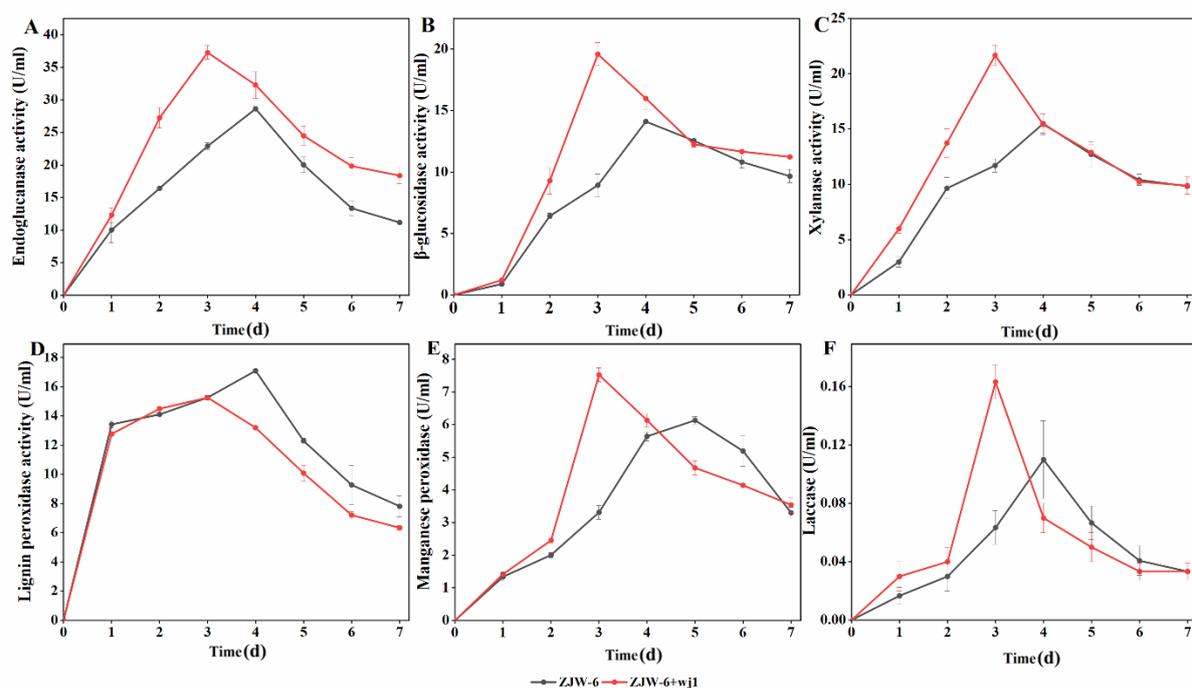


图 3-7 微生物联合体秸秆降解酶系分析

A: 内切葡聚糖酶; B: β -葡萄糖苷酶; C: 木聚糖酶; D: 木质素过氧化物酶; E: 锰过氧化物酶; F: 漆酶

Fig. 3-7 Microbial consortium straw degradation enzyme system analysis

A: Endoglucanase; B: β -glucosidase; C: Xylanase; D: Lignin peroxidase; E: Lignin peroxidase; F: Laccase

3.2.5 重金属吸附、固定联合分析

扫描电镜图像表明,微生物联合体在加入重金属后表面附着一层白色物质,通过能谱分析显示,白色物质中含有 Pb 和 Cd,证明了微生物联合体细胞壁可以吸附 Pb, Cd 重金属。FITR 结果显示,微生物联合体均存在的条件下,与 CK*(不加入 Pb, Cd)相比, Repair 处理的光谱在 3400 cm^{-1} (O-H), 2880 cm^{-1} (C-H), 和 870 cm^{-1} (C-O) 的谱峰位置发生移动,表明 Pb 和 Cd 的固定化与羟基、酰胺、烯酮和酰基卤化物有关。此外, 1900 cm^{-1} - 1650 cm^{-1} (C=O) 为含碳和氧的双键官能团伸缩振动区,较 CK*相比 Repair 处理促进了 C=O 的转变,此类官能团稳定性较好,对重金属的相容度高,有利于固定重金属 Pb 和 Cd^[86]。

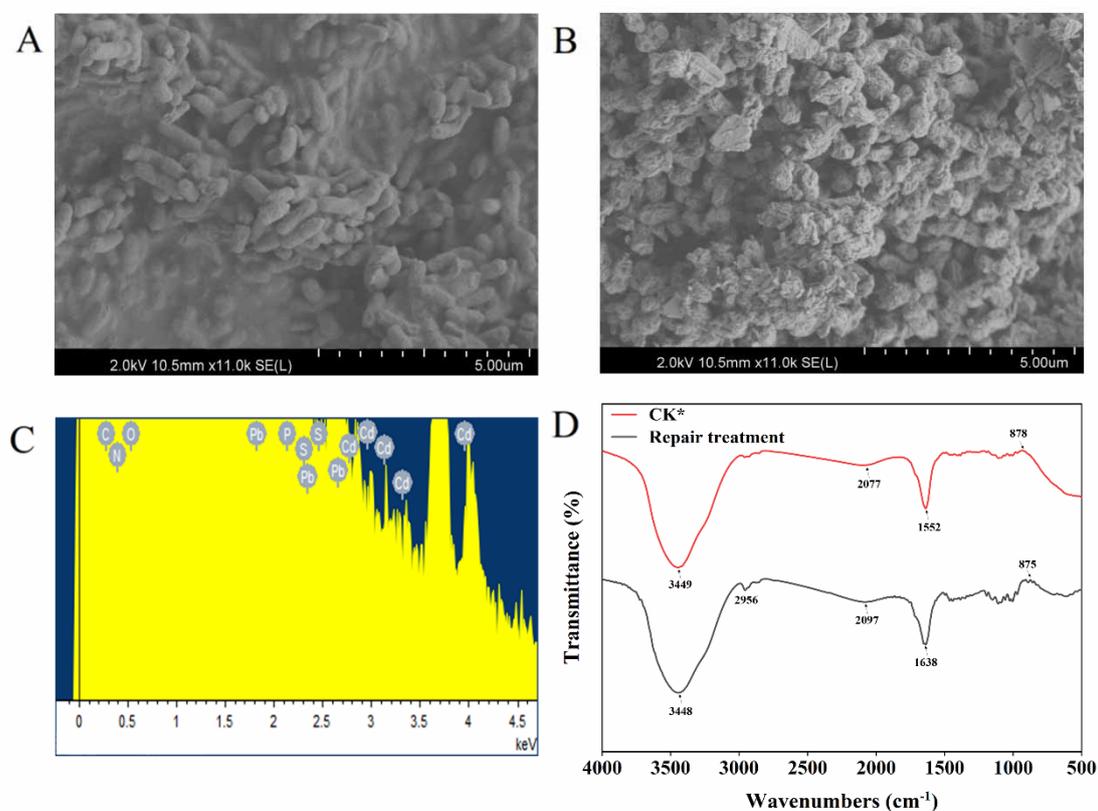


图3-8 微生物联合体对Cd和Pd的固定化特性:A 无重金属污染下微生物联合体的扫描电镜图片; B: Pb, Cd 污染下微生物联合体的扫描电镜图像; C: Pb, Cd 污染下微生物联合体的能谱图像; D: FITR 图像 (A: CK*:无污染处理; B: Repair treatment: Pb, Cd 污染处理)

Fig.3-8 The immobilization characteristics of Cd and Pd by microbial consortium: A: Scanning electron microscopy images of microbial consortium without heavy metal pollution; B: Scanning electron microscope images of microbial consortiums under Pb and Cd pollution; C: The energy spectrum image of microbial consortium under Pb, Cd pollution; D: FITR image (A: CK *: no pollution treatment; B: Repair treatment: Pb, Cd pollution treatment)

3.3 讨论

微生物联合体 ZJW-6+wj1 的秸秆降解与溶磷能力较组合前的单一菌株成员均有提高,说明两种成员菌株之间存在协同作用。秸秆降解能力的促进:微生物联合体的木质纤维素降解酶系中除木质素过氧化物酶略低于 ZJW-6 外,其他均高于 ZJW-6,增加纤维素在反应体系的可及性,使酶更易接触纤维素进行分解,从而实现整体更高效的降解^[87, 88]。而木质素过氧化物酶略微降低可能是因为较低的 pH 环境导致。除此之外,微生物联合体 ZJW-6+wj1 的碳源消耗速度也要远高于两种成员菌,使得联合体 ZJW-6+wj1 受到更强碳源胁迫,迫使其在同一时间段内更快分解唯一碳源(秸秆),使秸秆降解的速度更快,达到促进降解的作用,也产生了更多的还原糖类物质^[89]。这种增加特定胁迫条件促使微生物工作现象也存在与其他领域中:Allsup 等人研究表明,接种特定胁迫条件下具有抗性的微生物联合体于特定胁迫条件的植物中,也可以增加植物对胁迫条件的耐受性,说明特定胁迫条件可使微生物产生靶向的抗性活动,并可介导于其他生物或体系中^[90]。

在混合培养的前 3 天,联合体 ZJW-6+wj1 产生了较 ZJW-6 单独培养处理更多的糖,其中以葡萄糖、乳糖和木糖变化最为明显。随着以葡萄糖为主要糖类物质的消耗,有机酸类物质产出最多的是丙酮酸和乙酸等。这些糖的去路除了被联合体 ZJW-6+wj1 直接消耗和解磷作用外,也可能通过碳水化合物的消化与吸收(KEGG: map04973)及糖酵解(KEGG: map00010)使联合体 ZJW-6+wj1 产生了更多的有机酸类物质,产生了更低的 pH 环境,有利于难溶性磷的增溶^[91],通过测定上述通路的关键酶活力已印证预测通路的可行性。

微生物联合体钝化并固定重金属的机制:扫描电镜图像和 EDS 能谱分析表明,微生物联合体将重金属螯合物通过直接吸附在菌体表面来较少毒害作用^[92],FTIR 可推断出微生物联合体吸附重金属螯合物后微生物联合体显著促进了重金属相容度高,稳定性强的官能团的转变,加强对重金属 Pb 和 Cd 的固定^[93],联合体产生更多有机酸也利于对重金属的钝化作用。

综上所述,推测微生物联合体的作用机制如下:微生物联合体 ZJW-6+wj1 由于消耗碳源的速度较快,反应体系对微生物联合体 ZJW-6+wj1 产生了更强的碳源胁迫,促使联合体高效降解秸秆。微生物联合体在前 3 天产生了较 ZJW-6 纯培养处理更多的糖,主要是葡萄糖、乳糖和木糖。消耗最多的糖类为葡萄糖;随着葡萄糖的快速消耗,微生物联合体 ZJW-6+wj1 也产生了更多的有机酸类物质:丙酮酸、乙酸、柠檬酸和丙酸。可见,这些糖的去路除了被联合体 ZJW-6+wj1 直接消耗外,也通过糖酵解(KEGG: map00010)及碳水化合物的消化与吸收(KEGG: map04973)等代谢通路使联合体 ZJW-6+wj1 产生了更多的有机酸类物质,产生了更低的 pH 环境,有利于难溶性磷的增溶和对重金属的去除。

3.4 小结

(1) 微生物联合体 ZJW-6+wj1 较成员菌 ZJW-6 有着更好的秸秆降解能力：微生物联合体消耗碳源的速率较快，产生的碳源短缺情况更早，迫使微生物联合体更加高效降解秸秆产糖以供生命活动。

(2) 微生物联合体 ZJW-6+wj1 通过糖酵解 (KEGG: map00010) 及碳水化合物的消化与吸收 (KEGG: map04973) 来消耗碳源并转化有机酸类物质，较成员菌表达更高的磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、己糖激酶、 β -葡萄糖苷酶和内切葡聚糖酶活力。

(3) 微生物联合体 ZJW-6+wj1 通过螯合重金属并吸附于菌体表面来完成对可溶性重金属的去除。随着吸附的进行，菌体表面也发生了一系列变化，表明 Pb 和 Cd 的固定化与羟基、酰胺、烯酮和酰基卤化物有关；微生物联合体也促进了 C=O 的转变，更有利于固定 Pb 和 Cd。

第四章 微生物联合体对水稻生长及土壤营养环境的影响

了解微生物联合体 ZJW-6+wj1 的性能测定及作用机制后,进一步探究微生物联合体的秸秆降解和解磷性能在水稻田地土壤改良及促进水稻生长方面的应用情况。

4.1 材料与方法

4.1.1 实验试剂

(1) 1%氯化三苯基四氮唑 (TTC) 溶液:准确称取 TTC 1.0 g,溶于少量水中,定容到 100mL,用时稀释至需要的浓度。

(2) 1 mol/L 硫酸:取浓硫酸 55 mL,边搅拌边加入盛有 500 mL 蒸馏水的烧杯中,冷却后定容至 1000 mL。

(3) 乙酸乙酯 (分析纯)。

(4) 次硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 分析纯), 粉末。

(5) 磷酸缓冲液 (pH=7)。

(6) 0.4mol/L 琥珀酸溶液:称取琥珀酸 4.72 g 溶于水中,定容至 100 mL。

(7) 2%硼酸溶液:称取 20 g 硼酸,60℃水浴下溶解,冷却后定容至 1 L,调节 pH 至 4.5。

(8) 阿拉伯胶:称取 50 g 阿拉伯胶粉,于烧杯中与 50 mL 蒸馏水搅拌促溶 (70℃),1 h 后冷却放置。加入 20 mL 甘油和 20 mL 碳酸钾水溶液,搅拌并冷却。

(9) 甲基红-溴甲酚绿混合指示剂:0.1 g 甲基红和 0.5 g 溴甲酚绿溶于 100 mL 乙醇中。

(10) 1.8 mol/L 的氢氧化钠溶液:称取 72 g 氢氧化钠,溶于 1 L 蒸馏水中。

(11) 0.01 mol/L 盐酸溶液:用量筒准确量取量 0.83 mL 的浓盐酸,倒入烧杯中,用水稀释并冷却至室温,将冷却的盐酸溶液转移到 1000 mL 的容量瓶中。

(12) 0.08 mol/L ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 标准溶液:烘干后的重铬酸钾 39.22 g 溶于 1 L 蒸馏水中。

4.1.2 供试土壤来源及水稻品种

供试土壤来自吉林农业大学水稻田用土壤;水稻品种取自吉林农业大学粳稻常规水稻

JINONG 667, 长春 (中国吉林)。

4.1.3 水稻培养方法

选用直径 15 cm、高 30 cm 的圆柱形不透明塑料桶, 每桶装满底土 5 kg。设置 5 个不同的重复, 即: ZJW-6, wj1, 微生物联合体 ZJW-6+wj1, 仅施用腐植酸 (CK*) 和无特殊处理 (CK)。将干秸秆切成 10 cm 长的段, 在尼龙网袋中各填充 5 g, 每盆装 3 袋。在 10-15 cm 土层中接种菌剂 (活菌数>10 亿/盆)。每盆取三个施种点, 每个点中施 8 粒水稻种子, 将过筛后的细土均匀铺在盆栽顶部。彻底浇水后每 2 天进行一次灌溉并每天人工除草 (5 个处理×2 个时期×10 次重复)。

4.1.4 水稻分蘖末期的表型与根系生长情况测定

在 60 天, 水稻培养至分蘖末期时, 取出各处理完整水稻植株, 使用根系扫描仪扫描根系生长情况 (i800plus, MICROTEK, Shanghai) 并拍摄水稻生长图片。

4.1.5 水稻生理指标的测定

根活力使用三苯基氯化四唑 (TTC) 测定根活力: 把 1%TTC 溶液、0.4 mol/L 的琥珀酸和磷酸缓冲液按 1:5:4 比例混合以配置反应液, 取出水稻完整组织, 迅速切除地上部, 保留根系, 洗净, 倒入反应液, 于 37°C 暗处放置 1h, 观察着色情况, 变色后, 进行后续操作: 称取根尖样品 0.5 g, 放入 10 mL 烧杯中, 加入 TTC 溶液和磷酸缓冲液的混合液 10 mL (等量混合), 把根充分浸没在溶液内, 在 37°C 下暗处放置 1 h, 此后加入 1 mol/L 硫酸 2 mL, 以停止反应。把根取出, 吸干水分后与乙酸乙酯 3 mL 一起在研钵内磨碎, 红色提取液移入试管后用少量乙酸乙酯把残渣洗涤三次, 皆移入试管, 保持乙酸乙酯添加量, 使总量为 10 mL, 用分光光度计在波长 485 nm 下比色。

在地上部分, 截取完整的地上组织和水稻根, 并用蒸馏水洗涤。根部和地上部分的地表水用滤纸吸干, 干燥, 称取 65°C, 测量根冠比 (R/S)。使用便携式光合作用测量系统 (LI-6400XT, LI-COR, USA) 计算地上部分的净光合速率, 并使用叶绿素分析仪 (SPAD-502PLUS, 柯尼卡美能达, 日本) 测量叶绿素, 用于记录叶片上、中、下部的叶绿素含量。

4.1.6 土壤中速效 N、P、K 和有机质的测定

(1) 土壤速效 N 测定: 取各处理土样风干, 并过 1mm 筛后, 取 2g 样品和 1 g 硫酸亚铁粉末混匀后并置于扩散皿外室部分, 取 2 mL 2% 硼酸溶液, 迅速加入到内室部分, 滴加甲基红-溴甲酚绿混合指示剂 2 滴, 并迅速在扩散皿边缘涂抹阿拉伯胶, 用毛玻璃盖片

紧密贴合扩散皿。打开扩散皿，加入 10 mL，1.8 mol/L 的氢氧化钠溶液并盖上毛玻璃盖，置于 40℃ 恒温箱中反应 24 h，打开扩散皿后，用 0.01 mol/L 盐酸溶液对扩散皿内室部分进行滴定，内室溶液颜色由蓝色滴定至微红色时，记录 0.01 mol/L 盐酸溶液的使用量。

(2) 土壤速效 P 测定：取各处理土样风干，过 0.9 mm 筛后，取 2.5 g 样品，置于 150 mL 锥形瓶中，加入 0.5 mol/L，50 mL 碳酸氢钠溶液，加入少量活性炭，震荡处理 30 min，用无磷滤纸过滤后，取 10 mL 滤液样品，倒入 150 mL 锥形瓶中并加 35 mL 蒸馏水，再加入 5 mL 钼锑显色剂，摇匀后静止反应 30 min 后于 700 nm 测吸光度。

(3) 土壤速效 K 测定：取各处理土样风干，过 1 mm 筛后，取 5 g 样品，置于 100 mL 三角瓶中，加入 50 mL，1 mol/L 中性乙酸铵溶液，震荡 30 min，用定性滤纸过滤。将滤液置入三角瓶中，在火焰光度计上进行测定，记录其读数。

(4) 土壤有机质测定：取各处理土样风干，过 0.15 mm 筛后，取 1 g 样品，置于试管中，加入 5 mL 0.08 mol/L ($K_2Cr_2O_7$) 标准溶液和 5 mL 浓硫酸，摇匀。在试管口放置漏斗。将试管置入 185-190℃ 的油浴锅中，控制油浴锅温度 170-180℃，看到试管内液体沸腾出现气泡时开始计时，煮沸 5 min，取出试管。待试管冷却后，将 70 mL 的管中液体倒入 250 mL 锥形瓶中，加入邻啡罗啉指示剂 2-3 滴后用 0.2 mol/L 的硫酸亚铁溶液进行滴定，溶液颜色由橙黄到蓝绿到砖红色时，记录硫酸亚铁试剂滴定使用量。

4.2 结果与分析

4.2.1 不同处理下水稻分蘖末期的表型分析

在不同处理的水稻分蘖末期生长情况如图 4-1 所示：CK 处理生长情况最差，微生物联合体 ZJW-6+wj1 对水稻的促生效果明显，地上部的茎长，叶长和叶片数及根系的壮度、长度、根数均有显著提升，从表型上观察微生物联合体 ZJW-6+wj1 处理对水稻生长具显著的促进效果。

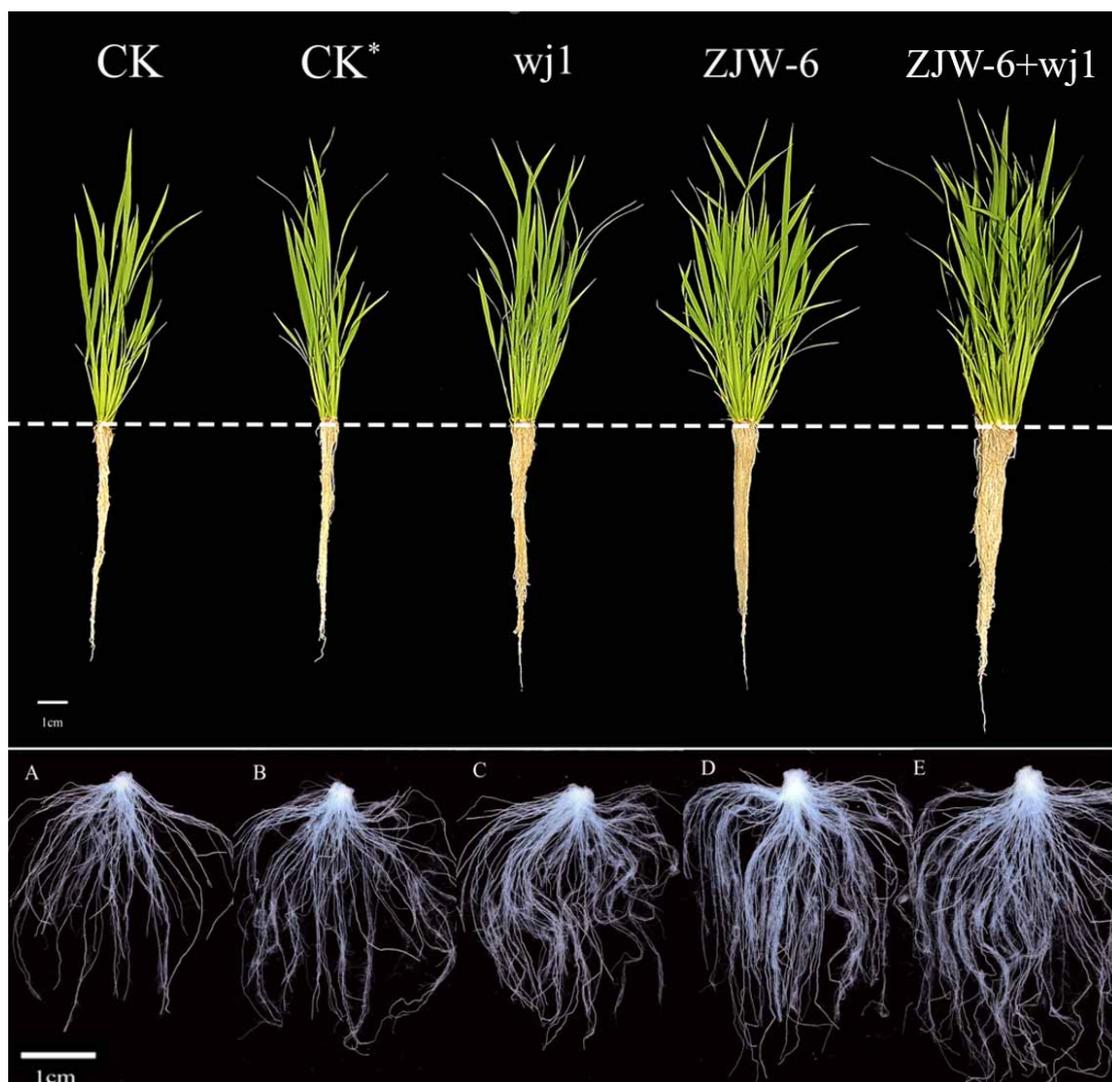


图 4-1 不同处理下水稻分蘖末期生长表型

A: CK 处理根系扫描照片; B: CK*处理根系扫描照片; C: wj1 处理根系扫描照片; D: ZJW-6 处理根系扫描照片; E: 微生物联合体处理根系扫描照片

Fig.4-1 Growth phenotype of rice at late tillering stage under different treatments

A: CK treatment root scanning photo; B: CK * treatment root scanning photos; C: Root scanning photo of wj1 treatment; D: Root scanning photo of ZJW-6 treatment; E: Root scanning photo of microbial consortium treatment

4. 2. 2 不同处理对水稻生理特性的影响

根系活力是评估根系生长比较直观的指标^[94]，在幼苗和分蘖阶段，水稻植株在 wj1 和微生物联合体处理下的根系活力分别为 565.88 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 、582.96 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 、585.54 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 630.97 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ，如图 4-2A 所示。微生物联合体转化了大量的速效磷、速效氮和有机质，促进了根系生长和根系活力。

如图 4-2B 所示,水稻在苗期 ZJW-6+wj1、CK 和 CK*微生物组合根干重分别为 8.06 g、9 g 和 16.54 g, 比幼苗期末 CK 和 CK*高 52.3%和 46.4%。分蘖结束时, ZJW-6+wj1 组合根系干重分别比 CK 和 CK*高 61%和 39%; 分蘖末期, 微生物联合体处理条件下根系干重比苗期增加高达 45.93%。

每种处理的平均根直径如图 4-2C 所示。苗期 ZJW-6+wj1 组合平均根系直径最高, 为 0.92 mm, 分别比 CK (0.42 mm) 和 CK* (0.58 mm) 高 55%和 34%; 分蘖结束时, 微生物联合体处理 (1.94 mm) 分别比 CK (0.87 mm) 和 CK* (0.98 mm) 高 55%和 50%。在根尖数统计 (图 4-2D) 中, ZJW-6+wj1 组合在苗期和分蘖期 5 个处理中根尖数最多, 分别为 847 和 1837 个, 分蘖末期与其他处理的差异更显著。5 个处理的根冠比 (图 4-2E) 显示, wj1 和 ZJW-6+wj1 组合在苗期和分蘖期最为显著, 分别为 0.48、0.49、0.55 和 0.58。ZJW-6+wj1 组合的根冠比比分蘖末期比空白对照高 18%, 较高的根冠百分比在一定程度上反映了根系和地上部分的生长。较高的根冠比回顾了水稻在苗期和分蘖期的根系 较高的根冠比反映了水稻根系在育苗和分蘖阶段发育较好, 养分供应充足^[95]。

微生物联合体在净光合速率图 4-2F 和叶绿素含量图 4-2G 方面效果最为明显, 分蘖结束时分别为 $15.33 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $26.67 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 和 37.57 mg/g 和 40.3 mg/g , 分蘖结束时比空白对照高 40%和 15%。较高的叶绿素含量和净光合速率反映了植物可以产生和积累更多的有机物^[96]。

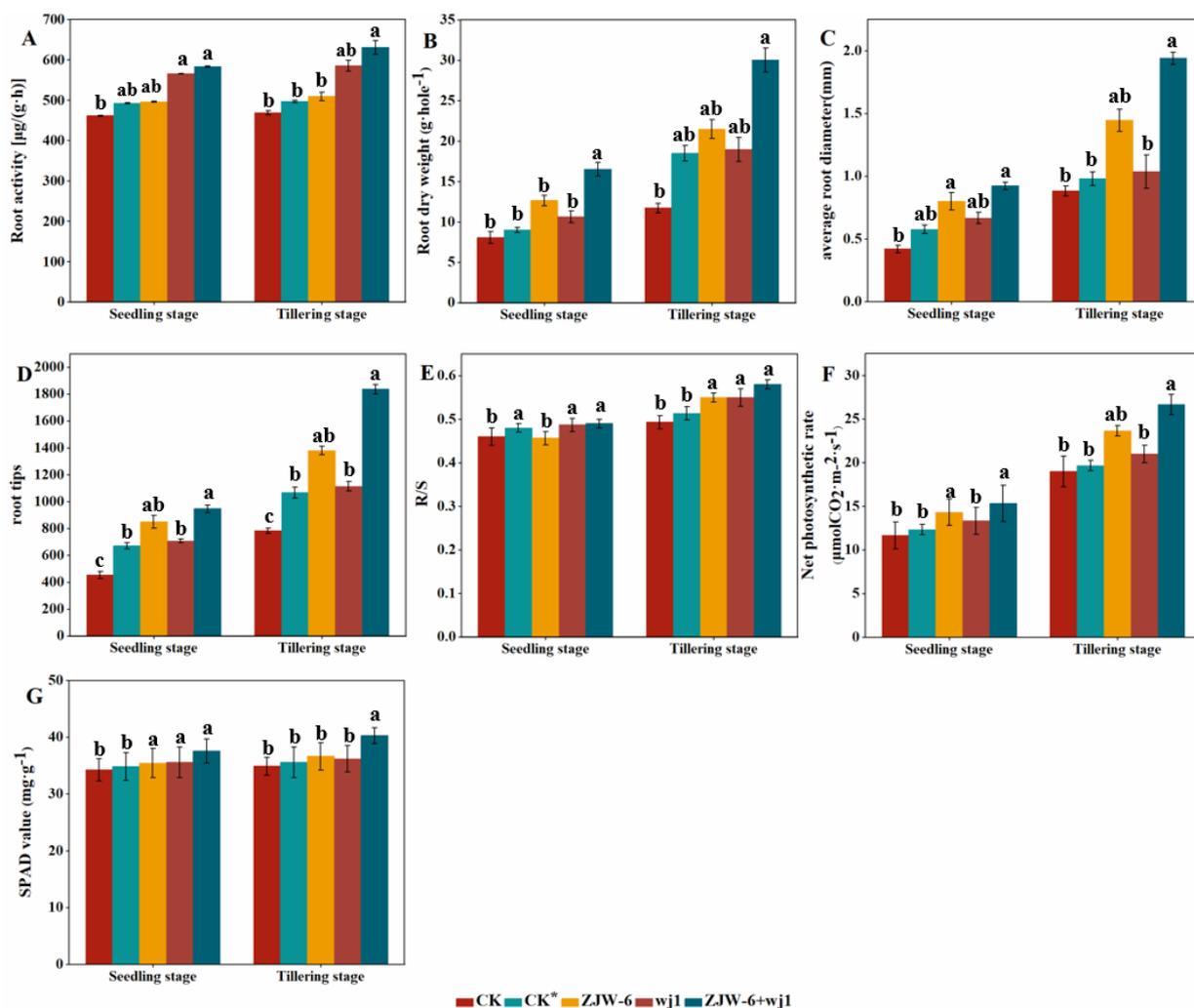


图 4-2 各处理对水稻生理指标的影响

A: 根活力; B: 根干重; C: 平均根直径; D: 根尖数; E: 根冠比; F: 净光合速率; G: 叶绿素含量

Fig.4-2 Effects of different treatments on physiological indexes of rice

A: Root vigor; B: Root dry weight; C: Average root diameter; D: Number of root tips; E: Root-shoot ratio; F: Net photosynthetic rate; G: Chlorophyll content

4. 2. 3 菌剂对土壤的中速效 N、P、K 和有机质含量的影响

30 天和 60 天各处理土壤有机质含量如图 4-3A 所示, 其中对照 (CK)、腐植酸处理 (CK*) 和 wj1 处理在 30 天和 60 天分别达到 11.67 mg/kg、12.33 mg/kg、13.33 mg/kg 和 13.33 mg/kg、13.67 mg/kg、14.67 mg/kg。添加腐植酸和 wj1 菌剂对土壤有机质含量变化无显著影响。ZJW-6 处理和微生物联合体处理在苗期和分蘖期有机质含量变化较大, 分别为 14.33 mg/kg、15.33 mg/kg 和 16.33 mg/kg、22.67 mg/kg。ZJW-6 和 ZJW-6+wj1 组合产生葡萄糖苷酶、木聚糖酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶。木聚糖酶、木质素过氧化物酶

和锰过氧化物酶是转化土壤有机质的关键酶^[97]。基于两个时期有机质含量的变化,微生物联合体 ZJW-6+wj1 中 ZJW-6 在转化有机质中发挥了主要作用。30 天和 60 天各处理土壤的速效氮含量如图 4-3B 所示,ZJW-6 和 wj1 碱性氮含量分别为 190.33 mg/kg、192.67 mg/kg 和 197.76 mg/kg、203.98 mg/kg,与空白对照和腐植酸处理相比有效增加。微生物联合体 ZJW-6+wj1 两个时期的速效氮含量分别为 201.07 mg/kg 和 214.36 mg/kg,在 60 天显著高于其他处理。在速效磷含量测定过程中,CK、CK*和 ZJW-6 处理在 30 天和 60 天无显著差异,分别为 6.79 mg/kg、7.21 mg/kg、7.3Fmg/kg 和 7.03 mg/kg、7.76 mg/kg、7.9 mg/kg 图 4-3C。CK*和 ZJW-6 的有效磷含量均高于 CK 的原因与添加腐植酸和微生物菌剂促进土壤微生物活性有关。结果表明,wj1 处理和微生物联合体在苗期和分蘖期的有效磷含量显著提高,分别为 8.78 mg/kg、12.01 mg/kg 和 11.84 mg/kg、14.14 mg/kg。土壤的 pH 变化中,CK、CK*和 ZJW-6 处理在 60 天内无显著变化,wj1 和微生物联合体 ZJW-6+wj1 的 pH 值有所降低。wj1 处理和微生物联合体产生有机酸,促进磷增溶的同时,也略微降低了土壤 pH。四种菌剂对速效钾的影响最显著,其中 CK*、ZJW-6、wj1 和微生物联合体处理的土壤在 30 天和 60 天的速效钾含量分别为 119.04 mg/kg、126.06 mg/kg、132.37 mg/kg、145.61 mg/kg 和 125.63 mg/kg、130.50 mg/kg、140.02 mg/kg、163.48 mg/kg,远高于同时期的 CK 处理。

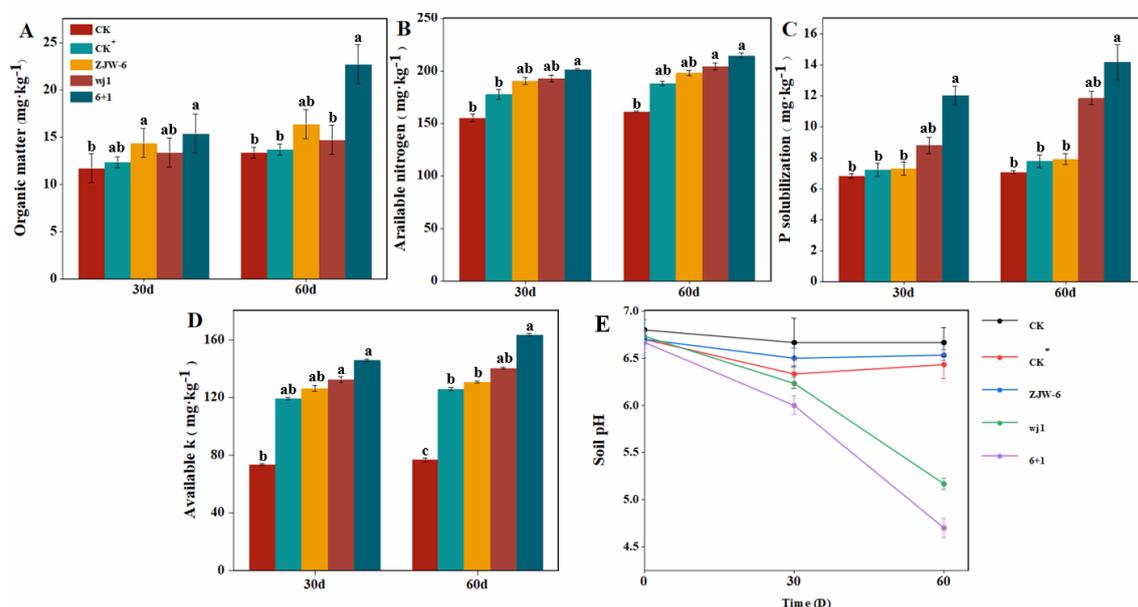


图 4-3 各处理对水稻土壤的影响

A: 有机质含量; B: 速效氮; C: 速效磷; D: 速效钾; E: 土壤 pH

Fig.4-3 Effects of different treatments on rice soil

A: Organic matter content; B: Available nitrogen; C: Available phosphorus; D: Available potassium; E: Soil pH

4.3 讨论

微生物联合体较成员菌、市面上常售肥料（腐殖酸）有着更加显著的促生效果，对土壤速效 N、P、K 和有机质较其他处理均有显著提升。有机质含量的提升主要来自秸秆在土壤中的降解作用；速效 N、P、K 则因解磷菌分泌有机酸、胞外酶及其他微生物的动员，含量因此升高，对水稻所在的生长环境提供更多营养元素，促进植株生长^[98]。秸秆降解菌、解磷菌均属于植物生长促进菌（Plant growth-promoting bacteria），其作用是动员土壤微生物或与植物互作，丰富土壤营养元素，促进植物生长。目前植物生长促进菌已得到广泛研究并应用：Shiva Rahnama 等人研究表明植物生长促进菌（*P. aeruginosa*, *A. chroococcum* 和 *A. lipoferum*）可促进山黑麦生长，并有效地提升山黑麦地耐旱性，有利于干旱牧场的恢复^[99]。Christian Adler Phares 等人将植物生长促进菌（*Bacillus* spp 和 *Pseudomonas* spp）、生物炭和氮磷钾肥联合作用于土壤，提高玉米籽粒产量并增加玉米对无机肥的利用效率，此实验于热带酸性土壤中，化肥的使用效率较低，将植物生长促进菌、生物炭和氮磷钾肥联合作用利于改善土壤生化性状、玉米对氮、磷和钾的吸收和利用效率以及玉米籽粒产量，而且此研究表明，加入芽孢杆菌和假单胞菌属是一种具有成本效益的策略，因为它可以减少推荐用于热带土壤玉米生产的无机氮磷钾肥料的用量，增加了此策略的应用价值^[100]。

4.4 小结

（1）微生物联合体 ZJW-6+wj1 对水稻具促生作用，显著提升根活力、根干重、平均根直径、根尖数等根系生长指标，丰富了水稻组织的叶绿素含量并提高水稻的净光合速率，促生效果更加明显。

（2）微生物联合体 ZJW-6+wj1 显著增加了土壤中速效 N、P、K 和有机质的含量，改善了土壤营养环境。

第五章 微生物联合体对 Cd、Pb 污染土壤的修复

微生物联合体对正常水稻田地土壤的营养环境具显著的改善作用，促进水稻生长。本部分将微生物联合体应用于 Cd、Pb 污染土壤中，分析微生物联合体对 Cd、Pb 污染土壤的修复、植物生长及土壤微生物的影响。

5.1 材料与方法

5.1.1 实验试剂

所用试剂同 4.1.1，额外所需试剂如下：

(1) DTPA 提取剂：称取 1.967 g DTPA（二乙三胺五乙酸）溶于 14.92 g（13.3 mL）TEA（三乙醇胺）和少量水中，再将 1.47g 结晶氯化钙（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）溶于水中，一并转至 1L 的容量瓶中，加水至 950 mL，摇匀，将溶液于 pH 计上调节溶液的 pH 为 7.3，加水定容至刻度，充分摇匀后备用。

5.1.2 供试土壤来源、水稻品种及培养方法

与 4.1.2 使用的土壤及水稻品种相同。培养方法如下：取吉林农业大学水稻实验地的土壤，选用直径 15 cm、高 30 cm 的圆柱形不透明塑料桶，每桶装满底土 5 kg，将秸秆切成 10 cm 长的段，在尼龙网袋中各填充 5 g，每盆装 3 袋。在 10-15 cm 土层中接种菌剂（活菌数 >10 亿/盆）。分为以下四种处理：无任何施加处理的正常土壤环境处理（CK），仅施加微生物联合体菌剂处理的正常土壤环境处理（MA），重金属污染的土壤环境处理（CK1），施加微生物联合体菌剂在重金属污染的土壤环境处理（CT）。每盆取三个施种点，每个点中施 8 粒水稻种子，将过筛后的细土均匀铺在盆栽顶部。彻底浇水后每 2 天进行一次灌溉并每天人工除草，培养周期为 60 天，每个处理有十次重复。

5.1.3 Cd、Pb 污染土壤模拟实验

重金属污染处理的土壤由人工制备含镉（10 mg/kg）和铅（300 mg/kg）的土壤样品，模拟污染环境。

5.1.4 水稻根系与地上部组织中 Cd、Pb 含量测定

每个处理取 3 个穴点的水稻植株，取出后用去离子水洗净、凉干，105℃杀青 30 min，

杀青后 70℃ 下烘干至恒重，使用非金属器械粉碎，过 0.15 mm 尼龙筛待测。准确称量样品 1 g 于瓷坩锅中，置通风橱内，用电热板慢加热炭化（加热前加入 2 mL HNO₃ 以受热均匀），直至无烟。转置马弗炉内灰化，缓慢升温至 500℃，灰化 9 h，冷却后取出，加入 2 mL HNO₃。溶解灰状物，转到 50 mL 容量瓶，用去离子水定容。并使用原子吸收分光光度计（AA-7000，日本岛津）测定 Cd、Pb 含量。

5.1.5 菌剂处理下 Cd、Pb 污染土壤性状测定

5.1.5.1 土壤有机质含量测定

测量方法同 4.1.6（4）。

5.1.5.2 土壤团聚体分析

将采集土壤样品并风干，然后使用不同孔径的套筛（5 mm，2 mm 和 0.25 mm）对土壤进行筛分。接着，将筛分的土壤样品取 5 g 放入土壤团聚体分析仪（LD-TRTL，山东莱恩德智能科技有限公司）的分析桶中，沿壁注入水，使土样逐渐达到饱和状态，排出闭塞空气。静止 15 min，反转分析筒，使土壤团聚体在水中震荡分散。将分散的土壤团聚体通过不同孔径的筛子，使各级团聚体分离。最后，将留在各级筛网上的土粒烘干并称重，分析各级团聚体的分布情况。

5.1.5.3 土壤中 Cd、Pb 含量测定

采用 DTPA 提取剂浸提-原子吸收法测定。称取并过 2 mm 筛的风干土壤 5 g 放入 100 mL 锥形瓶中，加入 DTPA 提取剂 25 mL，在室温下（25 ± 2℃）以 180 rpm 的速率振荡 2 h 取下过滤取得清液，并使用原子吸收分光光度计（AA-7000，日本岛津）测定 Cd、Pb 含量。

5.1.6 土壤微生物多样性分析

土壤样本取自盆栽深度的 2-15 cm 土壤，土壤样本取六份，利用 DNA 试剂盒（Shanghai Starvio Biotechnology Company Limited）从土壤样品中提取全部 DNA。琼脂糖凝胶电泳用于评估回收的基因组 DNA 的浓度和纯度。正向引物 338 F（5'-actcctacgggaggca 3'）和反向引物 806 r（5'-GGACTACHVGGT-WTCTAAT 3'）用于扩增 16Sr RNA 的可变区，根据先前研究的方法进行 PCR 扩增，纯化 PCR 产物并进行高通量测序。采用 QIIME2（2019.4），R（4.2.3），ggplot2 计算了 Shannon、Simpson、Chao1 和 Observed_species 指数并制作 ASV/OTU 韦恩图，在距离矩阵上进行微生物群落的主坐标分析（PCoA），统计了 CK1 与 CT 的代谢通路差异分析并统计了其重要差异代谢通路的物种组成。

5.1.7 数据统计分析

图像处理软件使用 Origin2021 和 Excel2019, 数据统计分析使用 SPSS Statistics 27, 细菌群落结构数据在云平台 (<https://www.genescloud.cn>) 进行分析。

5.2 结果与分析

5.2.1 菌剂对重金属污染下水稻的影响

Cd、Pb 污染下的土壤对水稻植株产生了严重影响 (图 5-1): CK1 处理较 CK 相比, 水稻地上部生长及根系长度与壮度均受到生长抑制, 加入微生物联合体处理 CT 后 (图 5-1D), 显著减轻重金属的毒害作用并且起到了促生作用。但生长效果最好的仍为 MA 处理 (图 5-1B)。从生长表型来看, 微生物联合体一定程度上减轻了重金属对水稻的影响, 并促进水稻生长。

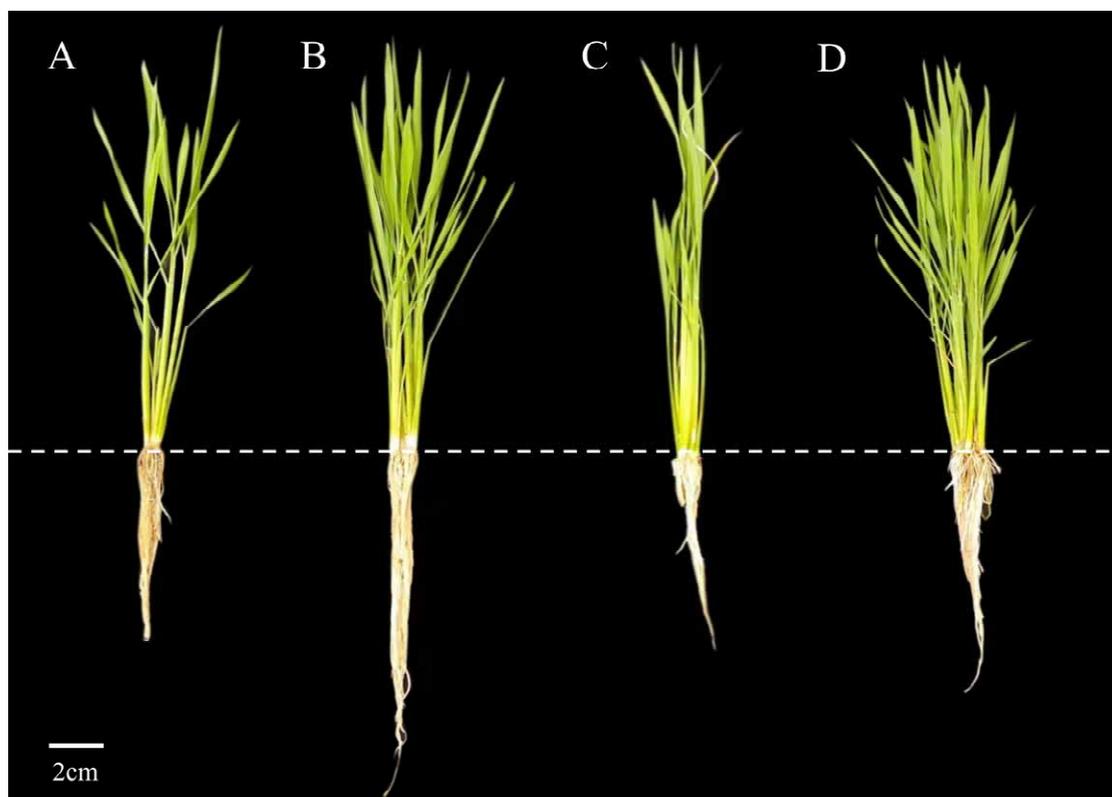


图 5-1 各处理对水稻生长的影响

A: CK; B: MA; C: CK1; D: CT

Fig.5-1 Effects of different treatments on rice growth

A: CK; B: MA; C: CK1; D: CT

5.2.2 土壤中有机质含量测定和团聚体分布情况

如图 5-2 所示, 随着培养的进行, CK 处理与 CK1 处理在初始阶段, 30 天和 60 天无明显涨幅趋势, 均维持在 4.25 mg/kg-16.56 mg/kg 范围内。MA 处理明显促进土壤中有机质的形成, 在 0 天、30 天和 60 天的有机质含量分别为 7.26 mg/kg, 17.65 mg/kg 和 29.94 mg/kg。在 Cd 和 Pb 的作用下, CT 处理的土壤在 0 天, 30 天和 60 天的有机质含量分别为 7.18 mg/kg, 14.92 mg/kg 和 24.65 mg/kg。土壤大团聚体 (粒径 >2 mm) 的分布与各处理的有机质含量呈正比, CK 比 CK1 处理的土壤的大团聚体含量高出 15.82%, CT 处理的大团聚体含量占总团聚体含量的 60.2%, 而 MA 处理大团聚体含量高出 CT 处理 10.45%。结果表明, 使用微生物联合体处理的土壤, 显著提高了土壤有机质和大团聚体含量并降低游离态的重金属离子含量。

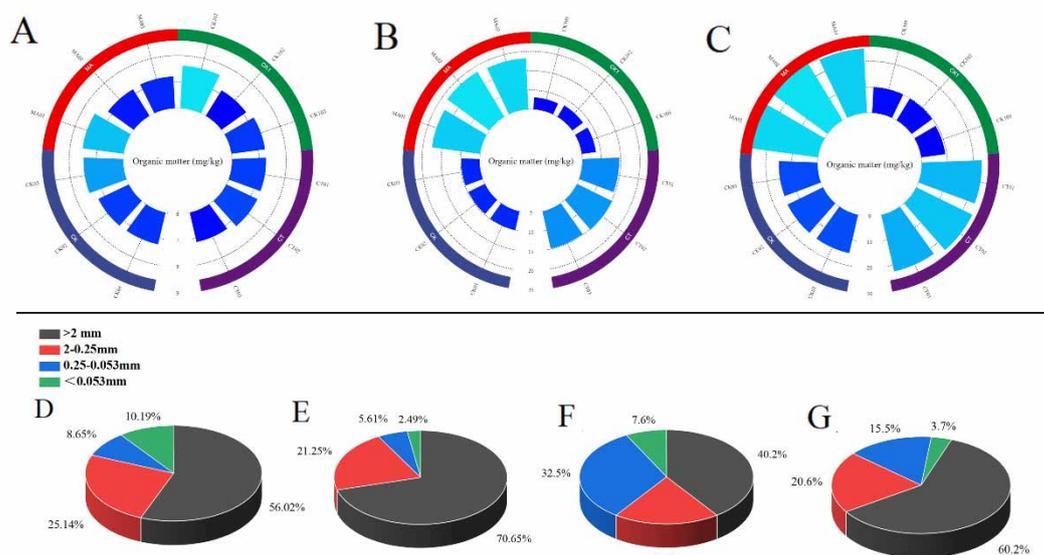


图 5-2 各处理对土壤中有机质含量和团聚体分布的影响

A: 初始各处理有机质含量; B: 30 天各处理有机质含量; C: 60 天各处理有机质含量; D: CK 处理的土壤团聚体统计; E: MA 处理的土壤团聚体统计; F: CK1 处理的土壤团聚体统计; G: CT 处理的土壤团聚体统计 (图中团聚体统计情况的取样时间为 60 天)

Fig.5-2 Effects of different treatments on soil organic matter content and aggregate distribution. A: Initial organic matter content of each treatment; B: The organic matter content of each treatment on the 30 th day; C: The organic matter content of each treatment on the 60th day; D: Soil aggregate statistics of CK treatment; E: Statistics of soil aggregates treated with MA; F: Soil aggregate statistics of CK1 treatment; G: Statistics of soil aggregates treated with CT; (The sampling time for the statistics of aggregates in the figure is the 60th day). The sampling time of aggregate statistics in the figure is the 60th day

5.2.3 水稻根系与地上部组织中 Cd、Pb 含量分析

水稻根系与地上部组织内的 Cd, Pb 含量与各处理干重如图 5-3 所示, 在 60 天, CK1 处理的地上部与地下部分植物组织的 Cd 含量分别为 3.39 mg/kg 和 3.90 mg/kg, CT 处理有效降低了两个部分的 Cd 含量, 在地上部与地下部分分别降低了 99.5%和 98.8%。60 天 CK1 的地上部与地下部分植物组织的 Pb 含量分别为 2.21 mg/kg 和 1.25 mg/kg, CT 处理在两个部分的 Pb 含量较 CK1 处理分别降低了 96.3%和 30.0%。30 天各处理的根干重如图 5-3C 所示, CK 和 CK1 在 30 天和 60 天的根干重为 8.79 g, 6.89 g 和 11.73 g, 9.56 g, 与上述两个处理相比 MA 和 CT 两个处理的根的生长情况良好, 在 30 天和 60 天的根干重为 17.63 g, 16.10 g 和 30.55 g, 26.83 g, 结果显示微生物联合体有效地缓解了 Cd 和 Pb 对植株的生长的影响, 促进水稻的生长。

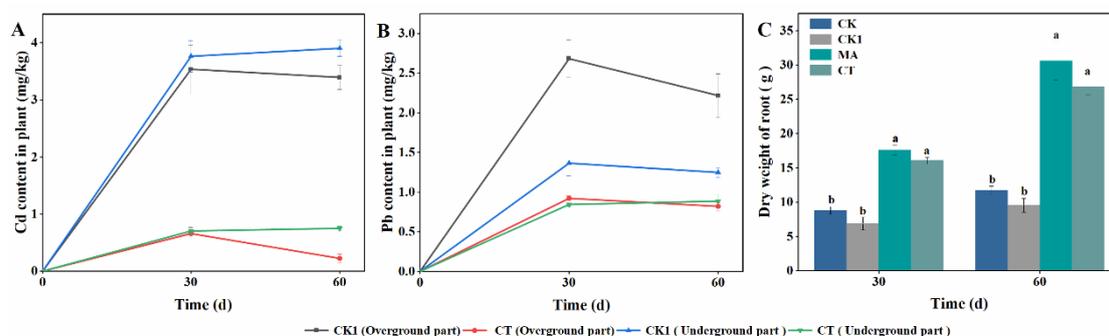


图 5-3 各处理对水稻生长的影响

A: 水稻根际与地上部分中的 Cd 含量; B: 水稻根际与地上部分中的 Pb 含量; C: 根干重

Fig. 5-3 Effects of different treatments on rice growth

A: Cd content in rice rhizosphere and aboveground parts; B: Pb content in rice rhizosphere and aboveground parts; C: Root dry weight

5.2.4 土壤总 Cd、Pb 含量及团聚体吸附 Cd、Pb 含量

统计并分析盆栽水稻在初始阶段 (0 d), 苗期 (30 天) 和分蘖期 (60 天) 微生物联合体对土壤的影响。根际与根际外 Cd 和 Pb 含量随着时间变化, 如图 5-4 所示。在 30 天, CK1 处理下水稻的根际和根际外 Cd 含量略有下降, 两个处理无明显差异, 分别为 9.52 mg/kg 和 9.57 mg/kg。CT 处理在根际外土壤去除了更多的 Cd, 去除率为 56.8%, 根际土壤 Cd 去除率为 36.3%。60 天时, CK1 处理下水稻的根际土壤和根际外土壤 Cd 含量无明显变化, CT 处理去除 Cd 的效率显著提高, 根际外土壤 Cd 去除率 99.1%, 根际土壤 Cd 去除率 91.2%。微生物联合体在土壤中对 Pb 的去除趋势与去除 Cd 的趋势相同, 30 天时, 根际土壤和根际外土壤剩余 Pb 含量分别为 183.8 mg/kg 和 200.4 mg/kg, 60 天根际土壤和根际外土壤剩余 Pb 含量分别为 3.67 mg/kg 和 6.33 mg/kg。30 天的 CK1 处理的根际土壤和

根际外土壤速效磷含量分别为 7.21 mg/kg 和 7.30 mg/kg。CT 处理的根际土壤和根际外土壤速效磷含量分别为 8.78 mg/kg 和 12.03 mg/kg。CT 处理下土壤中的有效磷含量在 60 天急剧上升, 在根际土壤和根际外土壤分别为: 11.84 mg/kg 和 24.14 mg/kg。另外, 团聚体也吸附了部分 Cd 和 Pb, 在 30 天, Cd 和 Pb 在 CK1 处理的大团聚体含量分别为 0.64 mg/kg 和 5.21 mg/kg, 60 天分别为 1.50 mg/kg 和 40.00 mg/kg。CT 处理的大团聚体固定 Cd 和 Pb 的效果更好, 30 天 Cd 和 Pb 在 CT 处理的大团聚体含量分别为 0.92 mg/kg 和 16.23 mg/kg, 60 天分别为 3.35 mg/kg 和 86.57 mg/kg。

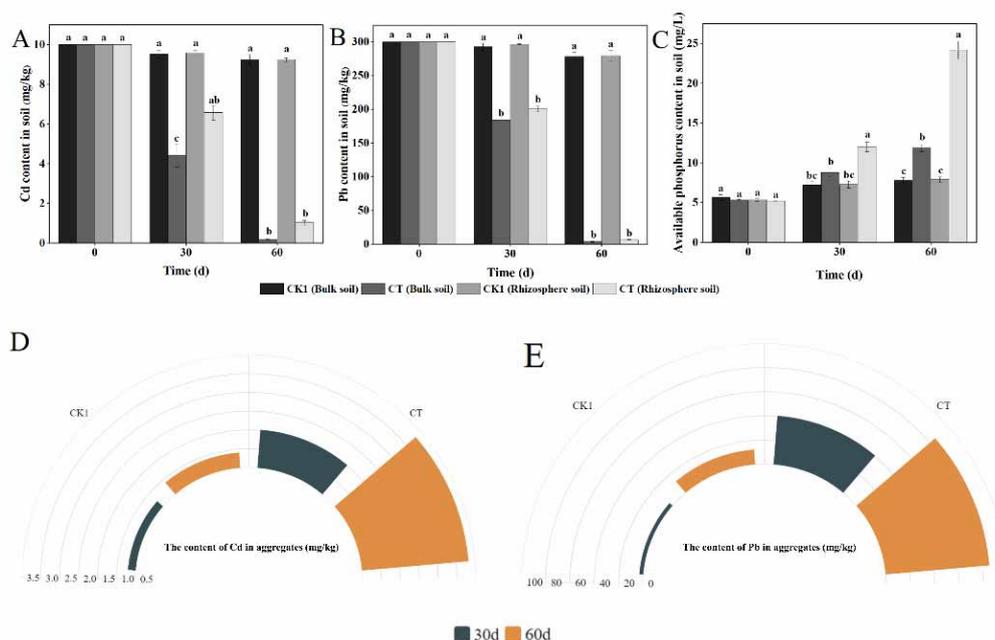


图 5-4 土壤总 Cd、Pb 含量及团聚体吸附 Cd、Pb 含量

A: 根际土壤与根际外土壤中的 Cd 含量; B: 根际土壤与根际外土壤中的 Pb 含量; C: 土壤有效磷含量; D: 团聚体 Cd 含量; E: 团聚体 Pb 含量

Fig.5-4 The contents of total Cd and Pb in soil and the contents of Cd and Pb adsorbed by aggregates A: Cd content in rhizosphere soil and extra-rhizosphere soil; B: Pb content in rhizosphere soil and extra-rhizosphere soil; C: Soil available phosphorus content; D: Cd content in aggregates; E: Aggregate Pb content

5. 2. 5 土壤微生物群落结构分析

5. 2. 5. 1 土壤微生物多样性指数分析

微生物联合体对土壤微生物群落多样性和结构组成的影响如图 5-5 所示, 为了直观分析各个处理间群落组成的差异, 基于 UPGMA 算法构建层次聚类树(图 5-5A), CK 与 MA 处理无明显差异仅加入 Cd 和 Pb 的 CK1 处理(D1-D6)与其他三个处理, 存在明显差异,

CT 处理起到明显的处理重金属的作用，保持了土壤环境中的微生物组成，同样与 CK 和 MA 无明显差异。采用 QIIME2 (2019) 分析软件计算了每个处理相关的阿尔法多样性指数 (图 5-5B)，MA 处理下的土壤微生物群落 Shannon 指数较 CK 处理显著提升 ($P < 0.05$)，说明微生物联合体有利于丰富土壤环境的多样性，而 CK1 处理下较上述两个处理有明显的下降 ($P < 0.05$)，表明加入 Cd 和 Pb 可对土壤微生物群落产生严重的毒害作用，极大的降低了土壤微生物的丰富度。CT 处理的 Chao1 指数较 CK1 有着显著提升 ($P < 0.05$)，说明在一定程度上加入微生物联合体可减轻 Cd 和 Pb 的毒害作用。在 Simpson, Shannon 这两个表征微生物多样性的重要指标中也可看到相同的趋势，Observed_species 这一分析微生物多样性的直观指标也表明了上述变化，同时也印证了基于 UPGMA 算法构建层次聚类树 (图 5-5A) 中各个处理在土壤微生物多样性上具有显著性差异的现象。采用 QIIME2 (2019) 分析软件和 R (4.2.3)，对各个处理进行主坐标分析，CK 和 MA 组之间的距离相对较近，这表明两种处理条件下的微生物群落结构只有微小的差异，CK1 远离 RA 和 RD 群，说明随 Cd 和 Pb 的添加，这三种处理的种类组成和相对丰度存在显著差异，CT 与 CK、MA 两个处理之间的距离较近。四种处理的 ASV/OTU 韦恩图如图 5-5D 所示，除去不同处理集合的共同组成外，丰度由高到低依次为：MA，CK，CT 和 CK1。

综上所述，加入 Cd 和 Pb 产生的重金属毒害严重降低土壤微生物组成，微生物联合体降低了土壤中游离重金属浓度，显著降低了 Cd, Pb 对土壤微生物的影响，有利于土壤微生物丰富度的恢复、提高；有利于修复土壤微生物群落的组成，减轻重金属毒害作用。

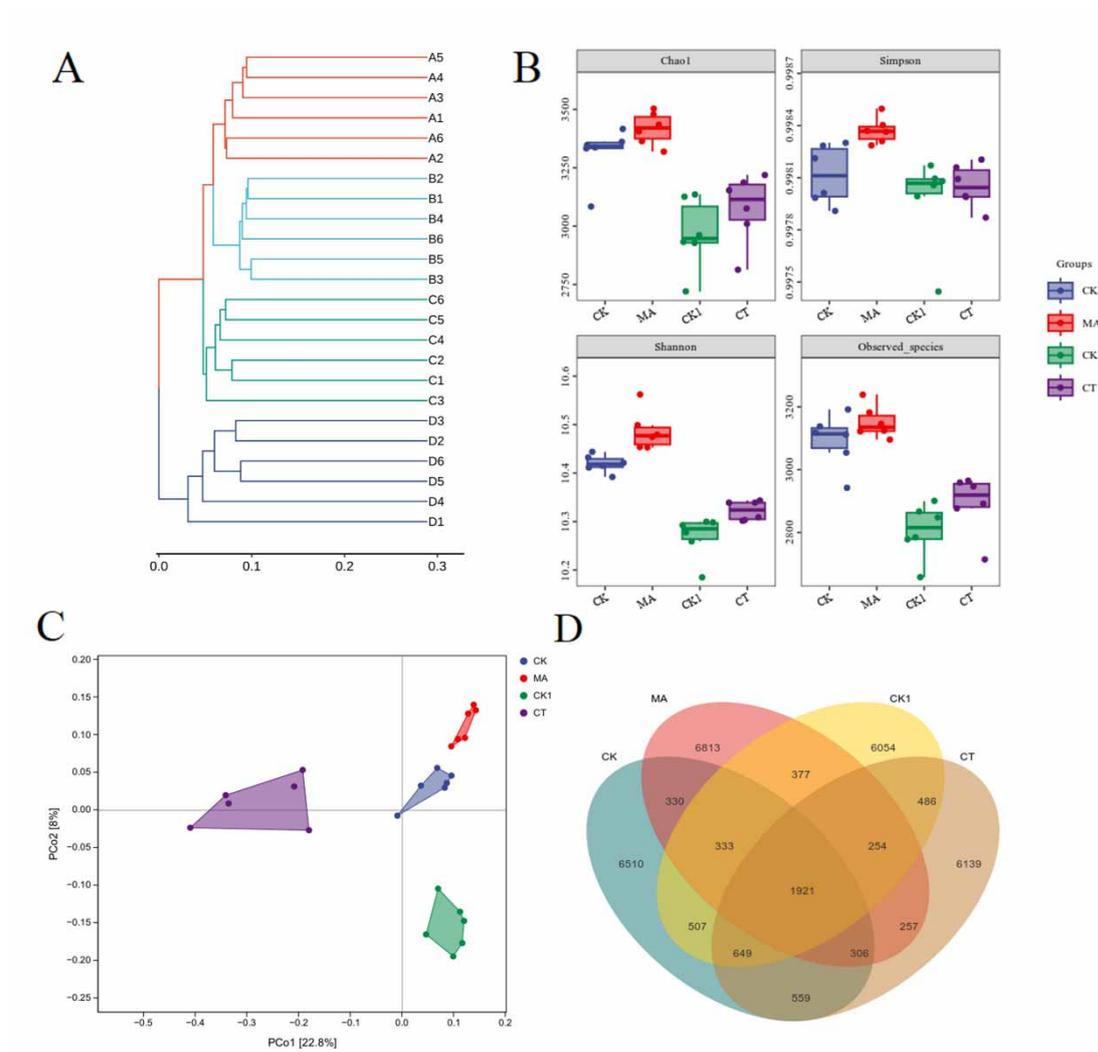


图 5-5 各处理对土壤微生物多样性的影响

A: UPGMA 树 (图中 A,B,C 和 D 分别表示 CK, MA,CT 和 CK1);B: Alpha 多样性指数; C: PCoA 分析; D: ASV/OTU 韦恩图

Fig.5-5 Effects of different treatments on soil microbial diversity

A: UPGMA tree (A, B, C and D represent CK, MA, CT and CK1, respectively); B: Alpha diversity index; C: PCoA analysis; D: ASV / OTU Venn diagram

5. 2. 5. 2 菌剂对重金属污染土壤微生物代谢途径的影响

为了进一步阐释微生物联合体通过影响土壤微生物群落修复土壤微环境促进植物生长的机理,研究了 CK1 与 CT 在两种处理下的土壤中微生物菌群的代谢差异。在修复重金属毒害的土壤环境中,加入微生物联合体(CT)使土壤微生物群落的 METH-ACETATE-PWY(乙酸生成甲烷)和 CODH-PW(乙酰辅酶 a 途径)下调,抑制了乙酸向甲烷与乙酰辅酶 a 的转化,提高了乙酸螯合重金属的专一性。而且, LIPASYN-PWY

(磷脂酶途径)的上调有利于磷脂水解解为脂肪酸,重金属离子与脂肪酸根结合为螯合物,减少重金属毒害。

同时,CT处理与CK1处理相比,通路上调最明显的为METHGLYUT-PWY(甲基乙二醛的降解),由于实验的土壤中含有利于增加土壤大团聚体的秸秆,微生物降解秸秆产生的大量糖类物质长期积累,造成土壤的高糖环境,这种环境也会产生糖衍生毒物,其中主要为甲基乙二醛(Methylglyoxal, MG),MG会被植物大量吸收,在植物体内毒害细胞并诱发植物病症。微生物联合体的加入有利于土壤微生物在重金属环境下大量降解甲基乙二醛,丰富土壤营养环境的同时,减轻糖衍生毒物对植株的危害。

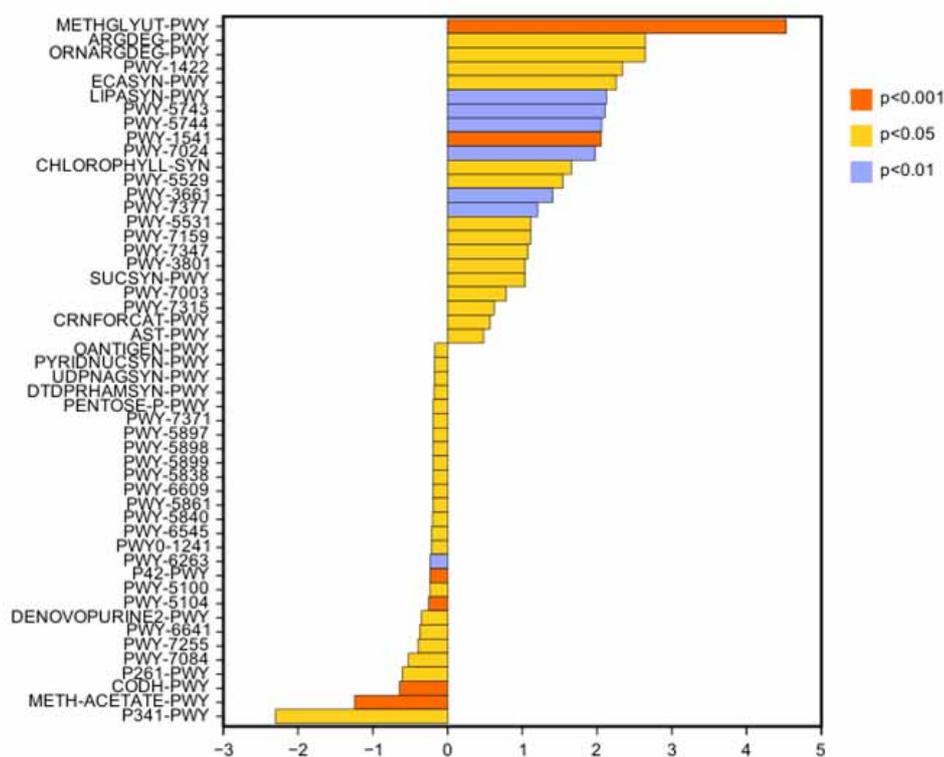


图 5-6 基于 MetaCyc 代谢途径数据库的土壤中微生物菌群的代谢差异, 对照组: CK1, 实验组: CT
Fig.5-6 Metabolism differences of microbial flora in soil based on MetaCyc metabolic pathway database, Control group: CK1, Experimental group: CT

分析代谢对土壤环境与植物促生的机制, 如图 5-7 结果显示, METH-ACETATE-PWY (乙酸生成甲烷) 中 (图 5-7A), *Ramlibacter*、*Sphingomonas* 在 CK 与 MA 处理下无明显差异, 在 CK1 处理中显著减少, CT 处理较其他三个处理显著提升, 在 METHGLYUT-PWY (甲基乙二醛的降解) 中 (图 5-7B), 发现 *Sphingomonas* 较其他三个处理显著提升。

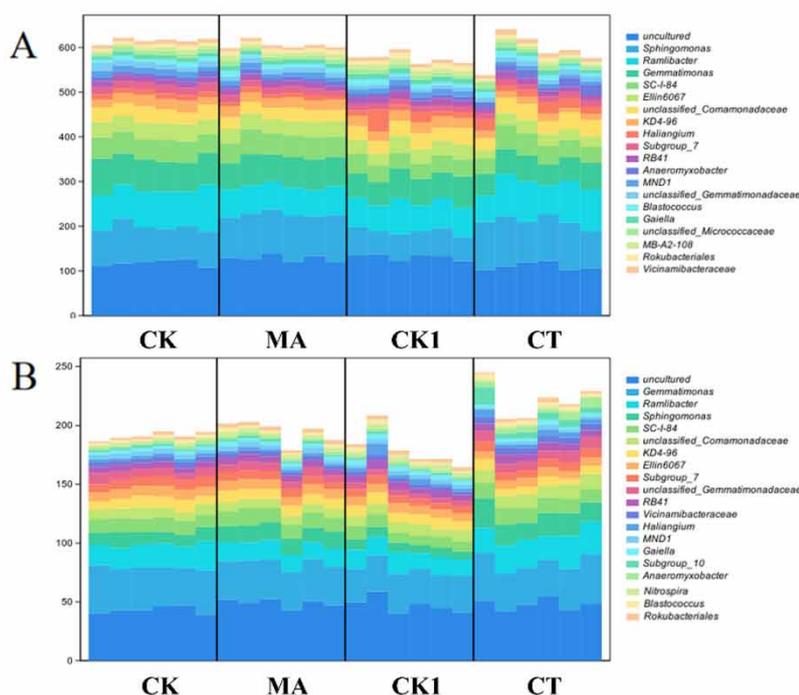


图 5-7 基于 MetaCyc 代谢途径数据库的土壤中微生物菌群的差异代谢通路的物种组成: A: METH-ACETATE-PWY 物种组成; B: METHGLYUT-PWY 物种组成, 对照组: CK1, 实验组: CT
Fig.5-7 Species composition of differential metabolic pathways of microbial flora in soil based on MetaCyc metabolic pathway database: A: METH-ACETATE-PWY species composition; B: METHGLYUT-PWY species composition, Control group: CK1, Experimental group: CT

5.3 讨论

微生物联合体可促进水稻植株整体的生长, 极大减轻重金属毒害作用。加入微生物联合体丰富了土壤有机质含量, 随着有机质含量的增加, 土壤中大团聚体的含量也得到提高, 最终大团聚体吸附的重金属含量显著增加, 直接地印证了加入 ZJW-6 作为去除重金属的功能补全菌的可行性。此外, 除大团聚体 (粒径 > 2 mm) 外, 其他粒径的团聚体均无显著的吸附重金属效果。

生物修复土壤, 并促进作物生长已被广泛研究, He 等人通过筛选具有解磷和解钾功能菌, 修复土壤肥力, 减少磷矿堆积并促进植物的生长^[101]。Yu 等人接种解磷菌于土壤中, 减少 P 渗滤液损失, 同时显著促进植物对土壤 P 的吸收和利用^[102]。Zhang 研制了解磷菌以球磨共改性生物炭 (PBC) 为载体, 可高效修复 Cd 污染^[103]。本实验的微生物联合体显著修复了 Cd、Pb 对土壤微生物群落的毒害, 相较于没有微生物联合体处理的重金属污染土壤, Chao1、Simpson 和 Shannon 都得到了提高, PCoA 等分析也进一步证实了微生物联合体对重金属污染土壤的修复作用^[104]。微生物联合体修复 Cd 和 Pb 污染土壤, 统计了

MetaCyc 代谢途径数据库的土壤中微生物菌群的代谢差异，微生物联合体主要促进 LIPASYN-PWY（磷脂酶途径）和 METHGLYUT-PWY（甲基乙二醛的降解）代谢通路，促进磷脂水解为脂肪酸螯合重金属并减少甲基乙二醛在植物组织中的积累来修复土壤，促进植株生长^[105]。抑制了 METH-ACETATE-PWY（乙酸生成甲烷）和 CODH-PW（乙酰辅酶 a 途径）代谢通路，抑制了乙酸分解为其他产物，促进更多乙酸螯合重金属^[106]。METH-ACETATE-PWY（乙酸生成甲烷）和 METHGLYUT-PWY（甲基乙二醛的降解）的物种组成，发现微生物联合体显著增加了 *Ramlibacter*、*Sphingomonas* 的丰度。研究表明，*Ramlibacter* 产生分裂形式的包囊，从而合成细胞结合的胞外多糖，丰富土壤营养环境，利于微生物生命活动^[107]，Kang 等人研究表明，*Ramlibacter* 也可高效降解木质纤维素，丰富有机质，有利于生成更多土壤大团聚体并吸附重金属^[108]。*Sphingomonas* 可分泌大量碱性磷酸酶，释放更多磷酸根与重金属螯合，达到去除重金属离子目的^[109]。据研究，*Sphingomonas* 在辅助植物修复方面具有多种作用机制，如促进生物吸附、促进主动外排运输和降低毒性等^[110]，也可与微生物协同修复重金属污染，促进植物生长。此外，*Sphingomonas* 也是植物生长促进剂微生物的标志菌，目前，鞘氨醇单胞菌已被证明具有促进植物生长和提高植物抗逆性的作用，这些作用被认为是由于它们具有固氮、溶磷、产生植物生长激素等功能。值得注意的是，一些鞘氨醇单胞菌还具有作为植物内生和根际细菌的培养性，与植物具有相互作用的模式^[111]。

5.4 小结

(1) 微生物联合体可有效减轻 Cd、Pb 对水稻的毒害作用，并且具有一定的促生效果。

(2) 在 Cd、Pb 污染条件下，加入微生物联合体保持了土壤微生物丰度，抑制了 METH-ACETATE-PWY（乙酸生成甲烷）和 CODH-PW（乙酰辅酶 a 途径）代谢通路，促进了 METHGLYUT-PWY（甲基乙二醛的降解）代谢通路。并动员了以 *Ramlibacter*、*Sphingomonas* 为代表的功能微生物，降解更多秸秆，并钝化、固定重金属。

第六章 结论

(1) 构建并筛选出微生物联合体 ZJW-6+wj1, 由秸秆降解菌 ZJW-6 和解磷菌 wj1 组成, 具有高效的秸秆降解能力、解磷能力和重金属去除能力。

(2) 两种菌株之间存在协同作用, 联合体更快的碳源消耗速度, 造成碳源胁迫环境, 促使其更快的降解秸秆, 产生的糖类物质可以转化并生成更多的有机酸促进难溶性磷的增溶。

(3) 通过扫描电镜、能谱分析和红外光谱分析进一步明确其去除重金属的机制: 分泌有机酸与重金属形成不溶性结晶螯合物, 被菌体吸附到表面, 吸附的过程中, 羟基、酰胺、烯酮和酰基卤化物均参与其中。此外, 吸附过程还促进了 C=O 的转变有利于固定重金属 Pb 和 Cd。

(4) 微生物联合体对正常的土壤营养环境及水稻生长具明显的改善效果: 联合体丰富了速效 N、P、K 和土壤有机质含量以促进水稻地上部与根系的生长。同时, 微生物联合体作用到 Cd、Pb 污染土壤中可有效减轻重金属对水稻的毒害作用, 促进土壤中甲基乙二醛的降解以减轻毒素在植物体内的积累并抑制乙酸生成甲烷、乙酰辅酶 a 的通路, 提高有机酸螯合重金属的效率来修复重金属污染土壤。

参考文献

- [1] Wang J, Wang X, A triumph of reducing carbon emission by banning open straw burning [J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2023, 68: 18-20.
- [2] Xu S, Jia K, Zheng Y, et al. Phosphorus transformation behavior and phosphorus cycling genes expression in food waste composting with hydroxyapatite enhanced by phosphate-solubilizing bacteria[J]. *Bioresour Technol*, 2023, 376: 128882.
- [3] Li M, Shi Q, Song N, et al. Current trends in the detection and removal of heavy metal ions using functional materials[J]. *Chem Soc Rev*, 2023, 52: 5827-5860.
- [4] Van Genuchten CM, Hamaekers H, Fraiquin D, et al. Heavy metal removal potential of olivine[J]. *Water Res*, 2023, 245: 120583.
- [5] 周德来, 马春旭, 姚晓玲, 等. 植物类中药中重金属及有害元素来源及危害的研究进展[J]. *华西药学杂志*, 2023, 38(05): 593-598.
- [6] 邱琛, 韩晓增, 陆欣春, 等. 秸秆还田对农田黑土团聚体稳定性及孔隙结构的影响[J]. *土壤与作物*, 2023, 12(02): 170-178.
- [7] Yang W, Li X, Zhang Y, et al. Research Progress and the Development Trend of the Utilization of Crop Straw Biomass Resources in China [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 904660.
- [8] Mu G, Xu L, Zhang J, et al. Study of the utilization of main crop straw resources in Southern China and its potential as a replacement for chemical fertilizers [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1172689.
- [9] 赵宴奇, 顾铮, 张璐, 等. 农业秸秆废物生产动物饲料的研究现状与发展趋势[J]. *工业安全与环保*, 2024: 1-5.
- [10] Chen J, Cai Y, Wang Z, et al. Solid-state fermentation of corn straw using synthetic microbiome to produce fermented feed: The feed quality and conversion mechanism[J]. *Sci Total Environ*, 2024, 920: 171034.
- [11] 赵贵宝, 田树娟. 浅谈秸秆饲料化的推广应用[J]. *中国畜牧业*, 2024(01): 70-71.
- [12] 姚爱萍, 朱一丹, 童一宁, 等. 农业废弃物资源化利用路径研究[J]. *农业开发与装备*,

- 2023(12): 97-99.
- [13] Wang R, Li D, Deng F, et al. Production of artificial humic acid from rice straw for fertilizer production and soil improvement[J]. *Sci Total Environ*, 2024, 906: 167548.
- [14] Liu W, Tang J, Zhang D, et al. Improvement of straw decomposition and rice growth through co-application of straw-decomposing inoculants and ammonium nitrogen fertilizer[J]. *BMC Plant Biol*, 2023, 23: 244.
- [15] 王占武. 秸秆发电供应链评价及政策设计研究[D]. 河南农业大学, 2023.
- [16] 耿涛, 赵立欣, 姚宗路, 等. 水热炭强化秸秆厌氧发酵产甲烷效能及作用机制研究[J]. *中国环境科学*, 2024: 1-11.
- [17] Sivagurunathan P, Sahoo P C, Kumar M, et al. Effect of nano-metal doped calcium peroxide on biomass pretreatment and green hydrogen production from rice straw [J]. *Bioresour Technol*, 2023, 386: 129489.
- [18] Xu S, Chen N, Qin H, et al. Biomimetic Study of a Honeycomb Energy Absorption Structure Based on Straw Micro-Porous Structure [J]. *Biomimetics (Basel)*, 2024, 9.
- [19] 闻艺, 徐锐, 李彦, 等. 秸秆建筑材料应用及研究进展[C]//中国环境科学学会环境工程分会. 中国环境科学学会 2022 年科学技术年会-环境工程技术创新与应用分会场论文集(二). 2022: 6.
- [20] 石祖梁, 王飞, 李想, 等. 秸秆“五料化”中基料化的概念和定义探讨[J]. *中国土壤与肥料*, 2016 (06) : 152-155.
- [21] 刘琳. 农作物秸秆基料化利用技术探讨[J]. *农业科技与装备*, 2023 (06) : 102-103+106.
- [22] Li J, Zhang K, Li L, et al. Phosphorus nutrition strategies in a Symbiodiniacean species: Implications in coral-alga symbiosis facing increasing phosphorus deficiency in future warmer oceans[J]. *Glob Chang Biol*. 2023, 29 (23): 6558-6571.
- [23] Li H, Li Y, Xu Y, et al. Biochar phosphorus fertilizer effects on soil phosphorus availability. *Chemosphere*[J]. 2020, 244: 125471.
- [24] 师祖姣. 冬小麦—夏玉米旱作二熟粮田长期氮磷肥配施的增产培肥效应研究[D]. 西北农林科技大学, 2023.
- [25] 方萍, 赵积坤, 李娜, 等. 有机肥料中总磷和总钾含量测定样品前处理方法研究[J]. *化*

- 工设计通讯, 2023, 49(12): 188-190.
- [26] Ludewig U, Yuan L, Neumann G. Improving the efficiency and effectiveness of global phosphorus use: Focus on root and rhizosphere levels in the agronomic system[J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2019, 6(04), 357-365.
- [27] Gai S, Gaur AC. Impact of fly ash and phosphate solubilising bacteria on soybean productivity[J]. *Bioresour Technol*. 2002, 85 (3): 313-5.
- [28] Negi R, Kaur T, Devi R, et al. Assessment of nitrogen-fixing endophytic and mineral solubilizing rhizospheric bacteria as multifunctional microbial consortium for growth promotion of wheat and wild wheat relative *Aegilops kotschyi*[J]. *Heliyon*. 2022, 8 (12): e12579.
- [29] 张伟, 陈轩敬, 马林, 等. 再论中国磷肥需求预测——基于农业绿色发展视角[J]. *土壤学报*, 2023, 60(05): 1389-1397.
- [30] 胡怀金. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. *黑龙江环境通报*, 2024, 37(03): 92-94.
- [31] Sun Y, Lei S, Zhao Y, et al. Spatial distribution prediction of soil heavy metals based on sparse sampling and multi-source environmental data[J]. *J Hazard Mater*. 2024, 465: 133114.
- [32] Ren K, Yang X, Li J, et al. Alleviating the adverse effects of Cd-Pb contamination through the application of silicon fertilizer: Enhancing soil microbial diversity and mitigating heavy metal contamination[J]. *Chemosphere*. 2024, 352:141414.
- [33] Lin L, Chen Y, Qu L, et al. Cd heavy metal and plants, rather than soil nutrient conditions, affect soil arbuscular mycorrhizal fungal diversity in green spaces during urbanization[J]. *Sci Total Environ*. 2020, 726: 138594.
- [34] Zhu Z, Tian H, Tang X, et al. NPs-Ca promotes Cd accumulation and enhances Cd tolerance of rapeseed shoots by affecting Cd transfer and Cd fixation in pectin. *Chemosphere*[J]. 2023, 341: 140001.
- [35] Yuan Z, Luo T, Liu X, et al. Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution[J]. *Sci Total Environ*. 2019, 676: 87-96.
- [36] 裴佳楠. 微生物强化植物修复铅污染土壤研究[J]. *工业微生物*, 2024, 54(01): 54-56.

- [37] 杨昱, 许洁. 贵州省环境中重金属污染特征及来源[J]. 环境与职业医学, 2023, 40(11): 1347-1353.
- [38] 李林. 铅对大豆幼苗生长和生理生化特性影响的初步研究[D]. 四川师范大学, 2010.
- [39] Ilyas MZ, Sa K J, Ali MW, et al. Toxic effects of lead on plants: integrating multi-omics with bioinformatics to develop Pb-tolerant crops. *Planta*[J]. 2023, 259 (1): 18.
- [40] 何川黔, 高波, 张杏锋, 等. 外源物质对杂交狼尾草和油葵植物修复重金属污染土壤及温室气体排放的影响[J]. 环境科学, 2023: 1-20.
- [41] 胡怀金. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. 黑龙江环境通报, 2024, 37(03): 92-94.
- [42] Huang X, Huang C, Zhou L, et al. Allosteric switch for electrochemical aptasensor toward heavy metals pollution of *Lentinus edodes* sensitized with porphyrinic metal-organic frameworks[J]. *Anal Chim Acta*. 2023, 1278: 341752.
- [43] Uchimiya M, Bannon D, Nakanishi H, et al. Chemical Speciation, Plant Uptake, and Toxicity of Heavy Metals in Agricultural Soils. *J Agric Food Chem*[J]. 2020, 68 (46): 12856-12869.
- [44] Hu J, Zhao J, Zheng X, et al. Removal of heavy metals from sewage sludge by chemical leaching with biodegradable chelator methyl glycine diacetic acid[J]. *Chemosphere*. 2022, 300: 134496.
- [45] Xu D, Wang Z, Tan X, et al. Integrated assessment of the pollution and risk of heavy metals in soils near chemical industry parks along the middle Yangtze River[J]. *Sci Total Environ*. 2024, 917: 170431.
- [46] Chien SC, Wang HH, Chen YM, et al. Removal of heavy metals from contaminated paddy soils using chemical reductants coupled with dissolved organic carbon solutions[J]. *J Hazard Mater*. 2021, 403: 123549.
- [47] Gudeta K, Kumar V, Bhagat A, et al. Ecological adaptation of earthworms for coping with plant polyphenols, heavy metals, and microplastics in the soil: A review[J]. *Heliyon*. 2023, 9 (3): e14572.
- [48] Ahadi N, Sharifi Z, Hossaini SMT, et al. Remediation of heavy metals and enhancement of fertilizing potential of a sewage sludge by the synergistic interaction of woodlice and

- earthworms[J]. *J Hazard Mater.* 2020, 385: 121573.
- [49] Wang L, Zheng Z, Zhang Y, et al. Biostabilization enhancement of heavy metals during the vermiremediation of sewage sludge with passivant[J]. *J Hazard Mater.* 2013, 244-245: 1-9.
- [50] Qin S, Zhang H, He Y, et al. Improving radish phosphorus utilization efficiency and inhibiting Cd and Pb uptake by using heavy metal-immobilizing and phosphate-solubilizing bacteria[J]. *Sci Total Environ.* 2023, 868:161685.
- [51] Wang XY, Han H. Effects of heavy metal-immobilizing bacteria on reducing wheat uptake Cd by regulation soil iron oxides[J]. *Huan Jing Ke Xue.* 2020, 41 (11): 5160-5167.
- [52] Han H, Wu X, Yao L, et al. Heavy metal-immobilizing bacteria combined with calcium polypeptides reduced the uptake of Cd in wheat and shifted the rhizosphere bacterial communities[J]. *Environ Pollut.* 2020, 267: 115432.
- [53] Li XZ, Qin SM, Chen ZJ, et al. Polyamine-producing bacteria regulated the community structure of rhizosphere bacteria and reduced the absorption of Cd in wheat[J]. *Huan Jing Ke Xue.* 2022, 43 (2): 1031-1039.
- [54] Yang J, Wang S, Bai F, et al. Achieving efficient pretreatment of corn straw at elevated temperatures via constraining cellulose degradation. *Chemical Engineering Journal.* 2023, 454 (0):140480-140480.
- [55] 刘瑞, 郭琪, 曹颖, 等. 一株竹木质素降解菌的筛选及降解效果[J]. *微生物学通报*, 2024: 1-17.
- [56] Qu F, Cheng H, Han Z, et al. Identification of driving factors of lignocellulose degrading enzyme genes in different microbial communities during rice straw composting[J]. *Bioresour Technol.* 2023, 381: 129109.
- [57] Wei Y, Wu D, Wei D, et al. Improved lignocellulose-degrading performance during straw composting from diverse sources with actinomycetes inoculation by regulating the key enzyme activities[J]. *Bioresour Technol.* 2019, 271: 66-74.
- [58] Wang Y, Zhang X, Lou Z, et al. The effects of adding exogenous lignocellulose degrading bacteria during straw incorporation in cold regions on degradation characteristics and soil indigenous bacteria communities[J]. *Front Microbiol.* 2023, 14: 1141545.
- [59] Zhang Q, Wang Q, Chen H, et al. Lignin-degrading enzyme production was enhanced by

- the novel transcription factor Ptf6 in synergistic microbial co-culture[J]. *Microbiol Res.* 2024, 280: 127575.
- [60] Mei J, Shen X, Gang L, et al. A novel lignin degradation bacteria-*Bacillus amyloliquefaciens* SL-7 used to degrade straw lignin efficiently[J]. *Bioresour Technol.* 2020, 310: 123445.
- [61] 李文才, 战利, 韩月颖, 等. 一株高效木质素降解菌的筛选、鉴定及降解效果评价[J]. *东北农业科学*, 2023, 48(06): 125-131.
- [62] Ren J, Wang JR, Gao MY, et al. Decreased cellulose-degrading enzyme activity causes pod hardening of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) [J]. *Plant Physiol Biochem.* 2021, 162: 624-633.
- [63] Scheffer G, Rachel NM, Ng KKS, et al. Preparation and identification of carboxymethyl cellulose-degrading enzyme candidates for oilfield applications[J]. *J Biotechnol.* 2022, 347: 18-25.
- [64] Bai Y, Zhou X, Li N, et al. In vitro fermentation characteristics and fiber-degrading enzyme kinetics of cellulose, arabinoxylan, β -glucan and glucomannan by pig fecal microbiota[J]. *Microorganisms.* 2021, 9 (5).
- [65] 张元昊, 李豪, 张敏琪, 等. 一株蚕沙纤维素降解菌的鉴定及产酶优化和生物强化效果[J]. *蚕业科学*, 2023, 49(06): 551-559.
- [66] Broeker J, Mechelke M, Baudrexl M, et al. The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases[J]. *Biotechnol Biofuels.* 2018, 11: 229.
- [67] López MJ, Jurado MM, López-González JA, et al. Characterization of thermophilic lignocellulolytic microorganisms in composting[J]. *Front Microbiol.* 2021, 12: 697480.
- [68] Paul J. Weimer. Degradation of Cellulose and Hemicellulose by Ruminant Microorganisms. *Microorganisms.* 2022, 10 (12): 2345-2345.
- [69] 冯海艳, 冯固, 宋建兰, 等. 丛枝菌根真菌根内菌丝碱性磷酸酶活性与菌根共生效应的研究[J]. *中国生态农业学报*, 2004(02): 129-132.
- [70] 李庆天. 延胡索根际解磷菌解钾菌的分离纯化与鉴定[D]. 重庆三峡学院, 2024.

- [71] Sun L, Tao Z, Liu X, et al. Effects of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus components, humus and bacterial community metabolism during spent mushroom substrate composting[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2023, 103341.
- [72] 李益斌. 解磷菌改良典型重金属污染土壤的应用研究[D]. 北京有色金属研究总院, 2019.
- [73] 姚倩, 朱晓丽, 李梦. 一株解磷菌 ID-a 修复重金属污染土壤效应分析[J]. *化学工程*, 2016, 44(07): 6-10.
- [74] 吕冰欣. 解有机磷菌对酸性土壤铅镉铜钝化效应和机理研究[D]. 西北大学, 2020.
- [75] 裴佳楠. 微生物强化植物修复铅污染土壤研究[J]. *工业微生物*, 2024, 54(01): 54-56.
- [76] Zhang K, Teng Z, Shao W, et al. Effective passivation of lead by phosphate solubilizing bacteria capsules containing tricalcium phosphate[J]. *J Hazard Mater*. 2020, 397: 122754.
- [77] 李康. 多环芳烃降解微生态菌系的构建及其对菲和芘的降解研究[D]. 中国矿业大学, 2020.
- [78] Wang Q, Li N, Jiang S, et al. Composting of post-consumption food waste enhanced by bioaugmentation with microbial consortium[J]. *Sci Total Environ*. 2024, 907: 168107.
- [79] Wang N, Wang X, Chen L, et al. Biological roles of soil microbial consortium on promoting safe crop production in heavy metal(loid) contaminated soil: A systematic review[J]. *Sci Total Environ*. 2024, 912: 168994.
- [80] Ke X, Sun JC, Liu C, et al. Fed-in-situ biological reduction treatment of food waste via high-temperature-resistant oil degrading microbial consortium[J]. *Bioresour Technol*. 2021, 340: 125635.
- [81] Komal A, Chandarana, N, Amaresan. Predation pressure regulates plant growth promoting (PGP) attributes of bacterial species[J]. *Journal of Applied Microbiology*. 2023, 134 (4).
- [82] Wang B, Sun M, Wang Y, et al. Cadmium-Tolerant *Bacterium* strain Cdb8-1 contributed to the remediation of cadmium pollution through increasing the growth and cadmium uptake of Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.) in cadmium-polluted soils[J]. *Plants (Basel)*. 2023; 13 (1).
- [83] Li J, Wu Y, Zhao J, et al. Bioaugmented degradation of rice straw combining two novel

- microbial consortia and lactic acid bacteria for enhancing the methane production[J]. *Bioresource Technology*. 2022, 344 (0): 126148-126148.
- [84] Li Z, Wang Y, Liu Z, et al. Integrated application of phosphorus-accumulating bacteria and phosphorus-solubilizing bacteria to achieve sustainable phosphorus management in saline soils[J]. *Science of The Total Environment*. 2023, 885 (0): 163971-163971.
- [85] Zhao Y, Yao J, Li H, et al. Effects of three plant growth-promoting bacterial symbiosis with ryegrass for remediation of Cd, Pb, and Zn soil in a mining area[J]. *Journal of Environmental Management*, 2024, 120167.
- [86] Qin S, Zhang H, He Y, et al. Improving radish phosphorus utilization efficiency and inhibiting Cd and Pb uptake by using heavy metal-immobilizing and phosphate-solubilizing bacteria[J]. *Science of The Total Environment*. 2023, 868 (0):161685-161685.
- [87] Huang L, Zhu Y, Liu H, et al. Assessing the contribution of open crop straw burning to ground-level ozone and associated health impacts in China and the effectiveness of straw burning bans[J]. *Environment International*. 2023, 171 (0): 107710-107710.
- [88] Nguyen ATQ, Nguyen MN. Straw phytolith for less hazardous open burning of paddy straw[J]. *Sci Rep*. 2019, 9 (1): 20043.
- [89] Wang X, Tian L, Li Y, et al. Effects of exogenous cellulose-degrading bacteria on humus formation and bacterial community stability during composting[J]. *Bioresour Technol*. 2022, 359: 127458.
- [90] Allsup CM, George I, Lankau RA. Shifting microbial communities can enhance tree tolerance to changing climates[J]. *Science*, 2023, 380 (6647): 835-840.
- [91] Cao J, Wang Z, Wu J, et al. Phosphorus accumulation aggravates potato common scab and to be controlled by phosphorus-solubilizing bacteria[J]. *Sci Bull (Beijing)*. 2023, 68 (20): 2316-2320.
- [92] Ergönül MB, Nassouhi D, Atasağun S. Modeling of the bioaccumulative efficiency of *Pistia stratiotes* exposed to Pb, Cd, and Pb+Cd mixtures in nutrient-poor media[J]. *Int J Phytoremediation*. 2020, 22 (2): 201-209.
- [93] Chen H, Min F, Hu X, et al. Biochar assists phosphate solubilizing bacteria to resist

- combined Pb and Cd stress by promoting acid secretion and extracellular electron transfer[J]. *J Hazard Mater.* 2023, 452: 131176.
- [94] Han M, Chen Y, Li R, et al. Root phosphatase activity aligns with the collaboration gradient of the root economics space[J]. *New Phytol.* 2021, 234 (3): 837-849.
- [95] Lopez G, Ahmadi SH, Amelung W, et al. Nutrient deficiency effects on root architecture and root-to-shoot ratio in arable crops[J]. *Front Plant Sci.* 2022, 13: 1067498.
- [96] Zhang G, Liu Q, Zhang Z, et al. Effect of reducing nitrogen fertilization and adding organic fertilizer on net photosynthetic rate, root nodules and yield in peanut[J]. *Plants (Basel).* 2023, 12 (16).
- [97] Shabtai IA, Wilhelm RC, Schweizer SA, et al. Calcium promotes persistent soil organic matter by altering microbial transformation of plant litter[J]. *Nat Commun.* 2023, 14 (1): 6609.
- [98] Chen L, Ma J, Xiang S, et al. Promotion of rice seedlings growth and enhancement of cadmium immobilization under cadmium stress with two types of organic fertilizer[J]. *Environ Pollut.* 2024, 346: 123619.
- [99] Rahnama S, Ghehsareh Ardestani E, Ebrahimi A, et al. Seed priming with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves growth and water stress tolerance of *Secale montanum*[J]. *Heliyon.* 2023, 9 (4): e15498.
- [100] Christian Adler Phares, Emmanuel Amoakwah, Andrews Danquah, et al. Biochar and NPK fertilizer co-applied with plant growth promoting bacteria (PGPB) enhanced maize grain yield and nutrient use efficiency of inorganic fertilizer[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2022, 100434.
- [101] He D, Wan W. Distribution of culturable phosphate-solubilizing bacteria in soil aggregates and their potential for phosphorus acquisition[J]. *Microbiol Spectr.* 2022, 10 (3): e0029022.
- [102] Yu H, Wu X, Zhang G, et al. Identification of the phosphorus-solubilizing bacteria strain JP233 and its effects on soil phosphorus leaching loss and crop growth[J]. *Front Microbiol.* 2022, 13: 892533.
- [103] Zhang T, Li T, Zhou Z, et al. Cadmium-resistant phosphate-solubilizing bacteria immobilized on phosphoric acid-ball milling modified biochar enhances soil cadmium

- passivation and phosphorus bioavailability[J]. *Sci Total Environ.* 2023, 877: 162812.
- [104] Zhang C, Chen H, Dai Y, et al. Isolation and screening of phosphorus solubilizing bacteria from saline alkali soil and their potential for Pb pollution remediation[J]. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023, 11: 1134310.
- [105] Huang J Q, Fang X, Tian X, et al. Aromatization of natural products by a specialized detoxification enzyme[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(3): 250-256.
- [106] Ding J, Holzwarth G, Penner MH, et al. Overexpression of acetyl-CoA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* increases acetic acid tolerance[J]. *FEMS Microbiol Lett.* 2015, 362 (3): 1-7.
- [107] Jivkova D, Sathiyarayanan G, Harir M, et al. Production and characterization of a novel exopolysaccharide from *Ramlibacter tataouinensis*[J]. *Molecules.* 2022, 27 (21).
- [108] Kang M, Chhetri G, Kim I, et al. Comparative genomic analyses of four novel *Ramlibacter* species and the cellulose-degrading properties of *Ramlibacter cellulosityticus* sp. nov[J]. *Sci Rep.* 2022, 12 (1): 21233.
- [109] Bilal S, Shahzad R, Khan AL, et al. Endophytic microbial consortia of phytohormones-producing fungus *Paecilomyces formosus* LHL10 and bacteria *Sphingomonas* sp. LK11 to *Glycine max L.* regulates physio-hormonal changes to attenuate aluminum and zinc Stresses[J]. *Front Plant Sci.* 2018, 9: 1273.
- [110] Kim YJ, Park JY, Balusamy SR, et al. Comprehensive genome analysis on the novel species *Sphingomonas panacis* DCY99 T reveals insights into iron tolerance of Ginseng[J]. *Int J Mol Sci.* 2020, 21 (6).
- [111] Gatheru Waigi M, Sun K, Gao Y. *Sphingomonads* in microbe-assisted phytoremediation: tackling soil pollution[J]. *Trends Biotechnol.* 2017, 35 (9): 883-899