生物技术通报

*Biotechnology Bulletin*

ISSN 1002-5464,CN 11-2396/Q



题目：

作者：

DOI： 收稿日期： 网络首发日期： 引用格式：

**生物技术通报》网络首发论文**

*Microbacterium* sp.BD6在Cr（W）污染农田土壤修复中的应用研究

杨宗政，赵晓宇，刘丹，许文帅，吴志国

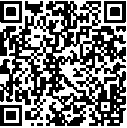
10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0194

2021-02-18

2021-05-17

杨宗政，赵晓宇，刘丹，许文帅，吴志国.Microbacterium sp.BD6在Cr（W） 污染农田土壤修复中的应用研究[J/OL].生物技术通报**.**

<https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0194>



Gna啊新洌

VCx [www.cnki.net](http://www.cnki.net)

**网络首发**：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶 段。录用定稿指内容己经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期 刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出 版年、卷、期、页码均己确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出 版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编 辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、 出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。 为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认**：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国 学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷 出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出 版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首 发论文视为正式出版。

网络首发时间：2021-05-17 12:38:01

网络首发地址：<https://kns.cnki.net/kcms/detail/112396Q20210517.0853.002.html>

生物技术通报

BIOTECHNOLOGY BULLETIN

-研究报告-

***Microbacterium* sp. BD6** 在 **Cr** ( **VI**)污染农田土壤修复  
中的应用研究

杨宗政・2,3赵晓宇2刘丹2许文帅2吴志国・2,3

1. 天津科技大学化工与材料学院，天津 300457 ；2. 天津科技大学海洋与环境学院，天津 300457 ；3. 天津市卤水化工与资源生态化利用重  
点实验室，天津 300457)

摘 要：【目的】旨在探究Cr(VI)还原菌在Cr(VI)污染土壤中的修复条件及效果，为实际Cr(VI)污染农田土壤的修 复提供借鉴。【方法】采用单因素实验、盆栽实验、高通量测序及qPCR等方法研究了菌株*Microbacterium* sp. BD6修复Cr(VI)污 染土壤的最佳条件、修复前后对于植物的毒性以及对土壤中微生物群落的影响。【结果】实验表明菌株BD6在土壤含水率为30% 及以上，温度为25-401的条件下，96 h对土壤中100 mg Cr(VI)/kg 土壤的Cr(vi)还原率可达90%以上。菌株BD6在其它重 金属离子存在的条件下仍然可以对Cr(VI)进行还原，但还原效果会受到影响°Cr(VI)会对黄豆植株高度、发芽率等指标产生 负面作用；经菌株BD6修复后的土壤，降低了 Cr(VI)的毒性，明显改善植株的生长状况.且植株体内铬含量显著降低°Cr(VI) 污染土壤中微生物丰度和多样性明显低于未污染的土壤；经菌株BD6修复后的Cr(VI)污染土壤，微生物多样性随着修复时间的 增长呈恢复趋势。【结论】因此，菌株BD6可作为修复Cr(VI)污染土壤潜在候选菌株,在今后的实际污染土壤修复中具有一定 的应用价值 。

关键词 ： *Microbacterium* sp. BD6 ；Cr(VI) 污染土壤 ； 生物修复 ； 微生物群落 ； 电子供体

DOI ：10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0194

Bioremediation of Cr(VI)-contaminated Farmland Soil by  
*Microbacterium* sp.BD6

YANG Zong-zheng1，2，3 ZHAO Xiao-yu2 LIU Dan2 XU Wen-shuai2 WU Zhi-guo1，2，3

(*LCoUege of Chemical and Materials Science*， *Tiartjin University of Science & Technology， Tianjin* 300457 ； *2.CoUege of Marine and  
Environmental Sciences*，*Tianjin University of Science & Technology*，*Tianjin* 300457 ；3*.Tianjin Key Laboratory of Brine Chemical  
Engineering and Resource Eco*-*utilization*，*Tianjin* 300457)

Abstract: The purpose of this paper is to optimize the conditions and investigate the effects in bioremediation of Cr(VI)-contaminated soil by Cr(VI)-reducing bacteria，and to provide reference in practical remediation of Cr(VI)-contaminated soil. The single factor experiments，the pot experiments，high-throughput sequencing and qPCR methods were used to study the optimal conditions for the bioremediation of Cr(VI)-contaminated soil by *Microbacterium* sp. BD6，the toxicity to plants before and after remediation，and the effects on soil microbial community in the soil. The experiments showed that the Cr(VI)reduction rate of 100 mg Cr(VI)/kg contaminated soil by strain BD6 was above 90% in 96 h under the conditions of soil moisture content 30% and temperature 25咒-40咒.Strain BD6 still reduced Cr(VI)in presence of other heavy metal ions，but the reduction effects were impacted. Cr(VI)restrained the height，germination rate and other indicators of soybean plant. The toxicity of the soil remediated by strain BD6 was reduced，the growth of plants was significantly improved，and the chromium content in plants significantly decreased. The microbial abundance and diversity in Cr(VI)-contaminated soil were significantly lower than those in non-contaminated soil. The microbial abundance and diversity of Cr(VI)-contaminated soil after remediation by strain BD6 increased with the bioremediation proceeded continuously. In conclusion，strain BD6 can be used as a potential candidate strain for the remediation of Cr(VI)-contaminated soil in the future.

Key words: *Microbacterium* sp. BD6 ；Cr(VI)contaminated soil ；bioremediation ；microbial community ；electron donor

收稿日期 ：2021-02-18

基金项目 ：广东省环境污染控制与修复技术重点实验室开放基金重点项目(202001)

作者简介 ：杨宗政，男，博士，教授，研究方向 ：土壤污染治理 ；E-mail ：[yzz3520@163.com](mailto:yzz3520@163.com)

通讯作者 ：吴志国，男，博士，副教授，研究方向 ：环境微生物及环境污染的生物修复 ；E-mail ：[wzhg@tust.edu.cn](mailto:wzhg@tust.edu.cn)

铬被广泛应用于金属电镀、冶金、铬酸盐制造、 印染等行业［1-2］，当工业生产中各类废水流入土壤， 就会造成严重的土壤铬污染问题，尤其是Cr(VI) 污染。Cr(VI )的毒性对土壤中的动植物以及微生 物都会产生严重的影响 ^。土壤中的Cr(VI )不 仅会造成植物减产，还会在植物中发生生物积累后 进入食物链，进而影响动物及人类的健康。因此， 对Cr(VI )污染农田进行安全且有效地修复已成为 亟待解决的难题［5］。

在众多土壤修复方法中，微生物修复具有 经济环保等优势，是重要的土壤修复手段之一。 Srivastava等⑹通过实验证明，Cr(VI )胁迫会对植 物系统造成破坏，堆肥及黑曲霉的共同作用可去除 土壤中Cr(VI )污染，从而显著改善小麦植株的生 长情况。陈土凤等［7］利用 Exiguobacterium sp. 对土 壤中的Cr (VI )进行还原，小白菜的生长情况及受 到的氧化应激情况明显改善。可见，通过微生物修 复Cr(VI )污染土壤，可缓解其对植物的毒性及氧 化胁迫，并减少植株对Cr (VI )的吸收，对植物无 公害化具有重大意义。微生物群落特征是表征土壤 质量变化的最敏感及最具潜力的指标之一。土壤中 的微生物多样性及群落结构会在受到重金属胁迫后 发生变化，因此，通过微生物多样性的变化反映土 壤污染程度被广泛采用［8-10］。

由于土壤环境复杂，对微生物适应能力要求 较高，因此，利用微生物修复Cr(VI )污染土壤 还大多处于研究阶段。本研究尝试将课题组前期 分离筛选的具有较好Cr(VI)还原特性的菌株 *Microbacterium* sp. BD6,11」用于 Cr (VI)污染土壤修 复中，对菌株BD6去除土壤中Cr (VI )的影响因素 进行了研究，并通过盆栽实验及土壤微生物群落分 析等试验对Cr(VI)的毒性及菌株BD6对Cr(VI) 污染土壤的修复效果进行表征，以期为实际修复Cr (VI)污染农田土壤提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1材料

1. 菌株来源 菌株是本课题组分离自福建省 厦门市某电镀厂下水道的淤泥，菌株BD6的16S rRNA部分基因序列保存于GenBank，登陆号为

MK611086。

1.1.2培养基LB培养基：蛋白胨10.0 g/L,酵母 浸粉 5.0 g/L，NaCl 10.0 g/L，pH 7.0 ；在 LB 液体培 养基中加入琼脂2 g/100 mL即成LB固体培养基。所 有培养基121T高压湿热灭菌20 min后使用。含Cr (VI)培养基是根据所需Cr(VI )浓度向LB培养基 中添加相应量的Cr(VI )标准溶液⑴〕。

1. 供试土壤来源 供试农田土取自河南省安阳 市黄县某农田(北纬35°95'，东经 114°86')。土壤 有机质含量为 9.63 g/kg，pH 值为7.2，全氮 0.31 g/kg， 总磷11.61 mg/kg，未检测到Cr(VI)。土壤经自然 风干后，过孔径为2 mm的筛网，含水率为6.1%。
2. 方法

1.2.1菌液制备 挑取划线纯化后的BD6菌株单菌 落接入LB培养基中，于180 r/min、30t的恒温摇 床培养24 h后，离心后重悬于无菌水中制得浓度为 3x108 CFU/mL的菌悬液备用。

1.2.2配制Cr(VI )标准溶液 配制5 g/L Cr(VI) 的标准溶液：将重铬酸钾在120T烘干2 h,称取 14.1446 g溶于1 L去离子水中，过0.22 pm滤膜以 除菌，置于4T冰箱中备用。

1. 土壤中Cr (VI )含量测定 消解按照《危险 废物鉴定标准浸出毒性鉴别》(GB 5085.3-2007 )中 《附录D固体废物六价铬分析的样品前处理碱消解 法》的方法进行°Cr(VI)测定按照文献［12］进行。
2. Cr(VI)还原率计算方法:

1)

式中，n : Cr(VI)还原率％ ; Co : 土壤中Cr(VI) 初始浓度，mg/kg ; C1 ： Cr(VI)还原后，按照1.2.3 步骤测定得到的土壤中Cr(VI)浓度，mg/kg。

1. 土壤条件对菌株BD6还原Cr(VI)的影响
2. 土壤含水率的影响 按 16% 的接种量(16

mL菌液/100 g 土，将菌液于土壤表面多点投加后进 行搅拌使其与土样充分混合，下同)向Cr(VI )浓 度为 100 mg/kg 的土壤(100 mg C( VI)/ kg含水率6.1% 的自然风干土，下同)中接种制备的菌液，向土壤 中补充去离子水使土壤含水率分别为25%、30%、

40%和50%，每组设置3平行，将样品置于30T培 养箱培养，定时测定其中Cr (VI )含量，考察土壤 含水率对修复Cr(VI )污染土壤的影响。

1. 温度的影响 同1.2.5.1步骤和接种量接种 菌液，设置土壤含水率为30%，将土样分别置于 15、20、25、30、35和40T培养箱中培养，每组设 置3个平行，定时测定土壤中Cr(VI)含量，考察 温度对修复Cr(VI )污染土壤的影响。
2. 老化时间的影响 同 1.2.5.1 步骤和接种量 接种菌液，其中Cr (VI )老化土壤时间分别为新鲜 制备土壤(0 h)、老化20 d 土壤、老化60 d 土壤， 设置土壤含水率为30%，将土样置于30T培养箱中 培养，每组设置 3 个平行，定时测定土壤中 Cr(VI) 含量，考察Cr (VI )老化土壤时间对修复Cr(Vl) 污染土壤的影响。
3. 其它重金属离子的影响 向含 Cr(VI)100 mg/kg 的土壤中分别投加氯化铜、氯化锌、氯化锰、 氯化镉、氯化镍配制的溶液，使Cu2+、Zn2+、Mn2\*、 Cd2+、Ni2+在土壤中的浓度分别达到50 mg/kg 土。同 1.2.5.1步骤和接种量接种菌液，以只含 Cr(VI)100 mg/kg 的土壤作为对照，设置土壤含水率为30%， 将土样置于30T培养箱中培养，每组设置3个平行， 定时测定土壤中Cr(VI)含量，考察重金属离子对 修复Cr(VI )污染土壤的影响。
4. 接种量的影响 将制备的菌液分别按6%、 12%、16%和26%的接种量向Cr(VI)浓度为100 mg/kg的土壤中接种，设置土壤含水率为30%,将 土样置于30T培养箱中培养，每组设置3个平行， 定时测定土壤中Cr (VI)含量，考察接种量对修复 Cr(VI)污染土壤的影响。
5. Cr(VI)初始浓度的影响 同125.1向Cr (VI)浓度分别为50、100、150和300 mg/kg 土壤中 接种菌株BD6，设置土壤含水率为30%，将土样置 于30T培养箱中培养，每组设置3个平行，定时测 定Cr(VI)含量，考察Cr(VI)初始浓度对修复Cr (VI)污染土壤的影响。
6. 电子供体的选择以及菌株还原能力的测 定 向Cr(VI)浓度为100 mg/kg的土壤中分别投 加果糖、乳糖、葡萄糖、丙三醇和丙酮酸钠(20 g 电子供体/kg 土)。将菌液同1.2.5.1步骤和接种量接 种于以上土壤中，以不投加电子供体的Cr (VI )浓 度为 100 mg/kg 的土壤作为对照，设置土壤含水率为 30%，将土样置于30T培养箱中培养，每组设置3 个平行，定时测定土壤中Cr(VI)含量，考察不同 电子供体对修复Cr(VI )污染土壤的影响。

1.2.7盆栽实验 按照1.2.5.1步骤和接种量向含Cr (VI)100 mg/kg 土壤中接种菌株BD6,设置土壤含 水率为30%，置于30%培养箱恒温培养。将处理96 h的土壤含水率调节为20%，与Cr(VI )含量分别 为 0、5、10、20、30、50、80 和 100 mg/kg 土 壤， 含水率为20% 的土壤一起进行盆栽实验。挑选颗粒 饱满、形状、质量、大小均匀的黄豆播种于花盆中。 每盆装土 30 g (含水率20%)，播种2粒黄豆，每个 土样6盆平行，定时浇水，25 d 后收获。观察植株 生长形态，计算种子发芽率方法同文献［13］，测定植 株鲜重方法同文献［14］，株高及植株内总铬含量测定 方法同文献［15］。

1. 土壤微生物群落分析

1.2.8.1 土壤取样及方法 取原土、100 mg/kg C(r VI) 老化 12 h 土壤、菌株 BD6 修复 100 mg/kg Cr(VI) 污染土壤的修复组土壤及投加20 g丙三醇/kg 土壤 的菌株BD6修复100 mg/kg Cr ( VI)污染土壤的修 复组土壤(修复组土壤取修复时间为96 h、10 d、 15 d的土壤)进行高通量测序。取样方法：(1)去 除土壤表面覆盖物。(2)用酒精棉擦拭采样器，待 酒精挥发完全后，使用采样样方处土壤浸润采样器。 后续每次更换样方均需重复此步骤。(3)采用梅花 型五点取样法进行混合取样。(4)将混合好的土壤 样本分装多份，每份5-10 g,置于-80%冰箱保存, 用于高通量测序。

1.2.8.2高通量测序及数据分析以土壤样本DNA 为模板，采用包含“CTACGGRRBGCASCAGKVRV- GAAT”序列的上游引物和包含“GGACTACNVGG- GTWTCTAATCC”序列的下游引物扩增原核生物16S rDNA 的 V3 和 V4 高变区，进行 Illumina MiSeq 测 序。经过质量过滤，去除嵌合体序列，最终得到的 序列进行OTU聚类(序列相似性设为97% )然后 对OTU的代表性序列进行物种分类学分析，并在不 同物种分类水平下统计每个样本的群落组成。基于 OTU得到分析结果，采用对样本序列进行随机抽平 的方法，分别计算 Ace、Chao1、Simpson、Shannon 等a多样性指数，反映群落的物种丰度和多样性。 通过RDP分类鉴定OUT代表性序列的微生物分类 相对丰度。

1. 菌株 BD6 在土壤中的定殖情况
2. 土壤取样及方法

取修复时间为0 h、96 h、10 d及15 d的含100 mg/kg Cr(VI /的修复组土壤(与高通量测序土样修 复组取自同一处)，采用荧光定量PCR法，考察菌 株 BD6 在土壤中的定殖情况。取样方法同 1.2.8.1。

1. 荧光定量 PCR

以提取的土壤样品的总DNA为模板，扩增的目 标基因为菌株BD6的16S rRNA基因部分序列。所 使用的引物为 16S-F(5'- AAGTGACGGTACCTGC- AGAA- 3')及 16S-R(5'-GTTGAGCCTCGGGATTTC- AC-3')。于 ABI 7900 Real-time PCR system(Applied Biosystems)扩增仪上进行绝对定量PCR分析。每个 样品设3次重复，并设不加模板的反应管为阴性对 照。反应体系为20 pL：ddH2O 12.8 pL，10xBuffer 2 pL，Template 3 pL,正反向引物各 0.5 口L.dNTPs 0.5 pL，DMSO 0.5 pL，TransStart Taq Polymerase 0.2 pL。反应程序为：95°C 5 min ； 95°C 30 s，55°C 30 s， 72°C 30 s，30个循环；72C 5 min。稀释相应的质粒 浓度从 10-1 到 10-8，并绘制标准曲线。

1. 数据处理与统计分析 数据采用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 23.0 软件对相关数据进行处理和 差异显著性分析。

2 结果

2.1不同条件对菌株BD6还原Cr(VI /的影响

不同土壤条件对菌株BD6还原Cr (VI /的影响 如图1所示。菌株BD6对土壤中Cr(VI)的还原率 随着含水率的升高而增加，当含水率达到30%及以 上,菌株BD6对Cr(VI /还原效果较好。菌株BD6 在不同温度下对Cr (VI /的还原实验中，96 h时菌 株BD6在25-40C范围内对土壤中Cr(VI /的还原 率均可达到90%以上，且去除效率随着温度的升高 而提升，当温度低于25C，菌株BD6对土壤中Cr (VI)的还原率则明显降低。Cr(VI /老化土壤时间 对菌株BD6还原土壤中Cr(VI /的影响并不显著， 如图1所示，菌株BD6对新制Cr (VI)污染土壤及 Cr(VI)老化20 d、60 d的土壤的Cr(VI)还原率 分别为 90.8%、92.7% 和 91.5%。菌株 BD6 在分别 含 50 mg/kg 土的 Zn2+、Mn2+、Cu2+、Ni2+、Cd2+ 的土 壤中均可以对Cr (VI /进行还原，但是还原效率会 受到不同程度的抑制。与对照组相比，Cu2+、Cd2+、 Ni2+较明显抑制了还原效果，Zn2+的抑制作用较轻, Mn2+影响最小。接种量对菌株BD6还原土壤中Cr (VI)的影响如图1所示，随着接种量增加，BD6对 土壤中Cr(VI )还原率提高。综合考虑修复效果及 经济成本，选择16 mL 菌液/100 g 土为最佳接种量。 Cr(VI)初始浓度对菌株BD6还原Cr(VI)的影响 如图1 所示，菌株BD6在48 h内即可对初始浓度为 50 mg/kg 的 土壤中 Cr(VI)还原 90% 以上。96 h, 菌株BD6可对初始浓度为100 mg/kg 土壤中Cr(VI) 还原90%以上。菌株BD6对Cr(VI)的96 h去除 率随着Cr(VI /初始浓度增加而降低。菌株BD6对 土壤中浓度为100 mg/kg及以下的Cr(VI)有着较 好还原效果。

1. 不同电子供体对土壤修复的影响

添加电子供体能加快菌株 BD6 在液体培养基中 还原Cr(VI /的速率，因此本研究对土壤修复中电 子供体利用情况也进行了测试。如图2所示，投加 果糖、乳糖、葡萄糖、丙三醇、丙酮酸钠等均会对 菌株BD6还原土壤中Cr(VI /有促进作用。其中添 加丙酮酸钠作为电子供体的促进效果最好，36 h对 Cr (VI /的还原率即可达到90% ;其次为添加丙三 醇作为电子供体，48 h对Cr(VI /的还原率可达到 90%。综合考虑经济和实际使用因素，本研究依然 使用丙三醇作为土壤修复中的外加电子供体。

1. Cr(VI /污染土壤修复前后对植株的影响

含不同浓度Cr(VI /土壤中种植黄豆25 d后黄 豆植株的生长情况，从图3可以看出，对照组黄豆 生长良好，株高较高，根部较为发达。随着 Cr(VI) 浓度增大，植株高度、根系发达程度及发芽率明显 受到越来越严重的抑制，叶茎发黄且叶片稀少，当 Cr(VI /浓度达到100 mg/kg时豆子在土壤中发芽率 也受到较大影响，而Cr (VI /浓度为100 mg/kg 土 壤经菌株BD6修复的处理组中生长的黄豆植株则生 长情况良好。

%、<U1EJ UOPQnpua

槪M民

时间Time/h

对照 Control 一十 Cu2+

亠 Zn2+

-千 Mn2+

+Cd2+

-+Ni2+

C

%、<U1EJ UOPQnpua

MMSH

100

80

60

40

20

%、SEJ uoponpoa

Mi

F

o0

24

4872

时间Time/h

96

%、<U1EJ UOPQnpua

槪M珍

时间Time/h

%、UO 卫 Qnpoa

50 mg/kg

-e-100 mg/kg

-\*-150 mg/kg

-l300 mg/kg

100

80

60

40

20

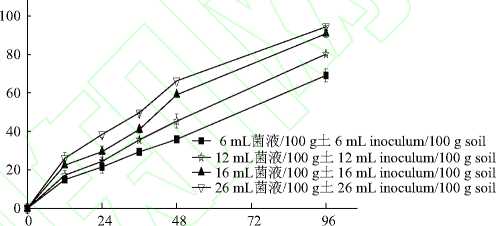
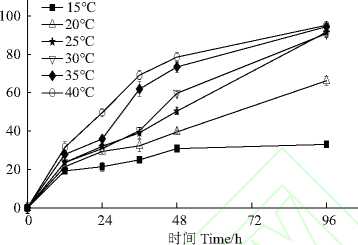
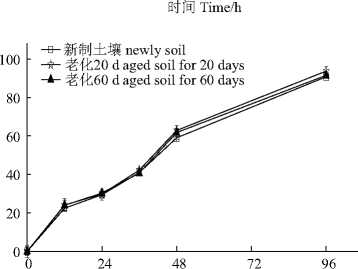
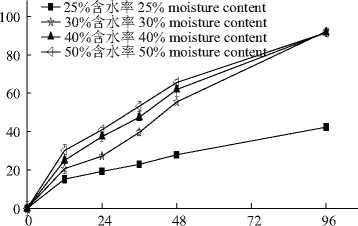
0

02448

72

96

时间Time/h



A :含水率；B :温度；C ：老化时间；D :金属离子；E :接种量；F ： Cr(VI)初始浓度

A ：Moisture content. B ：Temperature. C ：Aging time. D ：Metal ions. E ：Inoculation. F ：Initial concentration of Cr(VI)

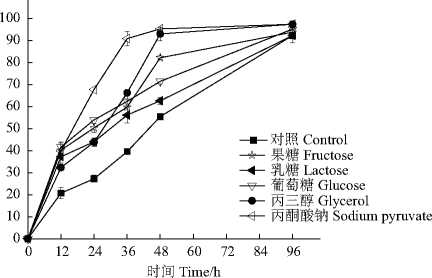
图 **1** 不同条件对菌株 **BD6** 还原 **Cr**(**VI**) 的影响

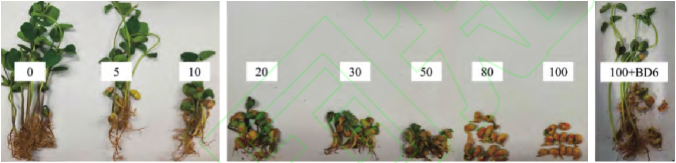
**Fig.1 Effects of factors on Cr**(**VI**)**reduction by strain BD6**

表1 数据反映了植株各项生长指标受土壤中 Cr (VI)的影响。虽然当Cr( VI)浓度达到100 mg/kg时， 才会对发芽率产生一定影响，但较低Cr (VI )浓度 已经会对植株生长产生抑制作用，Cr (VI )含量分 别为 5、10、20、30、50、80 和 100 mg/kg 的土壤中 生长的黄豆植株相较于不含Cr ( VI )的土壤中生长 的黄豆植株，植株高度和重量随Cr (VI )浓度升高 而逐渐降低。本研究还对植株体内吸收的铬含量进 行了测定，随着土壤中Cr (VI )浓度增大，植株内 的铬含量也显著增加。未经处理的含Cr ( VI ) 100 mg/kg 土壤中生长的黄豆植株体内铬含量为5 mg/kg, 含 Cr(VI)100 mg/kg 的土壤经 BD6 处理后，植株 中并未检出铬。以上结果表明，Cr (VI )对黄豆植 株生长会产生明显的毒性作用，菌株BD6对土壤的 修复极大缓解了 Cr(VI )对黄豆植株的植物毒性, 也降低了植株对铬的吸收。

1. Cr(VI)污染土壤修复对土壤微生物群落的 影响

2.4.1菌株BD6修复Cr (VI)污染土壤对微生物 群落影响 通过16S rRNA基因V3+V4区域高通量

图 **2** 不同电子供体对菌株 **BD6** 还原土壤中 **Cr**(**VI**) 的 影响

测序分析土壤样品，能够反映样品中细菌群落的种 类和结构的变化。空白土壤（Y）、含Cr（VI）100 mg/kg 土壤（Cr）、菌株 BD6 修复含 Cr（VI）100 mg/kg 96 h 土壤（未加丙三醇A-96 h,添加丙三醇 G-96 h）、修复10 d 土壤（未加丙三醇A-10 d,添加 丙三醇G-10 d）、修复15 d 土壤（未加丙三醇A-15 d,添加丙三醇G-15 d）等样品的微生物*a*多样性如 表2所示。在所有多样性指数中，Ace与Chao1指 数反映出无Cr对照组微生物丰度最高，含Cr组较低, 在投加菌株BD6修复后微生物丰度指数普遍呈增大 趋势；Shannon和Simpson指数反映了微生物群落的 多样性，多样性96h时降到最低,而后又呈增大趋势,

**Fig.2 Effect of different electron donors on Cr**(**VI**) **reduction in soil by strain BD6**

0-100标识为盆栽土壤Cr(VI)浓度，单位为mg CriV!)/ kg 土壤;100+BDo :菌株BD6修复含Cr(VI)100 mg/k g 土壤组 0-100 are the concentrations of Cr(VI)in potted soil，and the unit is mg Cr(VI)/ kg soil. 100 + BD6 is the remediated sample containing 100 mg Cr(VI)/ kg soil by strain BD6

图 **3** 黄豆盆栽实验

**Fig.3 Soybean pot experiments**

表 **1** 植株各项生长指标

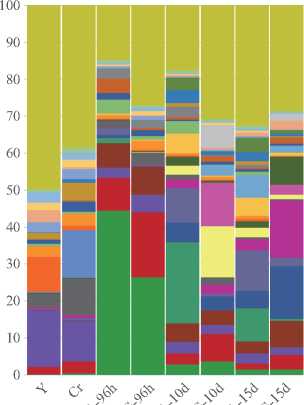
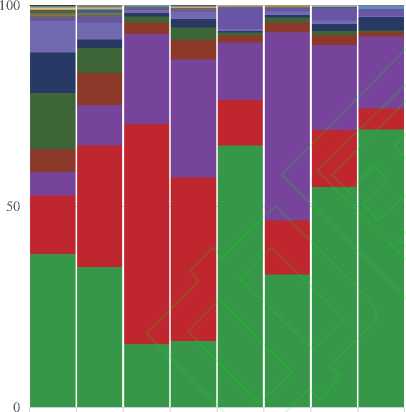
**Table 1 Growth indicators of plants**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 土壤修复情况 Soil remediation | 土壤Cr（VI /含量 | | 发芽率  Germination rate/% | 植株高度  Hight of plants/mm | 植株鲜重 g/ 株  Fresh weight of plants g/seed | 植株铬含量Chromium content in plants/(mg・kg-1 / |
| Cr(VI) | Content in soil mg/kg |
|  | 0 |  | 100.0 a | 104±2.1 a | 0.64±0.04 a | 未检出 g |
|  | 5 |  | 100.0 a | 89±0.42 b | 0.51±0.02 c | 0.8±0.1 f |
|  | 10 |  | 100.0 a | 55±1.6 c | 0.49±0.02 c | 1.1±0.3 f |
|  | 20 |  | 100.0 a | 30±0.9 d | 0.37±0.02 d | 1.6±0.1 e |
| 未修复  Non-remediation | 30 |  | 100.0 a | 29±0.8 d | 0.36±0.01 de | 2.1±0.1 d |
| 50 |  | 100.0 a | 25±1.2 e | 0.33±0.02 ef | 2.6±0.3 c |
|  | 80 |  | 100.0 a | 15±0.3 f | 0.30±0.01 f | 3.8±0.1 b |
|  | 100 |  | 88.9±4.84 b | 12±0.1 g | 0.26±0.01g | 5.0±0.4 a |
| 已修复 Remediation | 100 |  | 100.0 a | 87±0.9 b | 0.56±0.03 b | 未检出 g |

注 ：同组处理同列数据后小写英文字母不同者表示经 Ducan's 检验差异显著( *P*<0.05)

Notes ：Different lowercase letters in the same column of same group refer to significant differences by Ducan's test( *P*<0.05)

且外加丙三醇组在微生物丰度和多样性方面在同等 条件下略大于未添加组或基本持平。表2中数据反 映出Cr （VI /对微生物的毒性作用使土壤中微生物 多样性显著降低，随着菌株BD6对Cr （VI /污染土 壤修复的时间增加，微生物丰度和多样性相对于污 染土壤有了显著恢复



YCr A-96h G-96h A-10d G-10d A-15d G-15d

%、<uQUBPlmqE<uAgE«^

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表**2 a**多样性指数  **Table 2 a diversity index** | | | | | |
| Sample ID | Ace | Chao1 | Shannon | Simpson | coverage |
| Y | 2527.894±43.237 a | 2500±70.335 a | 9.284±0.035 a | 0.991±0.001 a | 0.987±0.002 |
| Cr | 1785.987±91.525 e | 1811.426±77.381 de | 8.336±0.368 b | 0.972±0.004 ab | 0.994±0.006 |
| A-96h | 1974.381±83.318 cd | 1887.949±47.887 cd | 5.209±0.837 e | 0.796±0.071 d | 0.982±0.001 |
| G-96h | 2317.543±142.074 b | 2262.373±90.249 b | 6.911±0.386 cd | 0.921±0.009 c | 0.982±0.001 |
| A-10d | 1850.619±60.012 de | 1691.645±54.171 e | 6.071±0.265 de | 0.936±0.011 bc | 0.983±0.001 |
| G-10d | 2001.833±81.225 cd | 1878.924±93.194 cd | 6.791±0.078 cd | 0.971±0.005 ab | 0.983±0.000 |
| A-15d | 2079.836±96.326 c | 1963.311±68.010 c | 7.228±0.368 c | 0.977±0.002 ab | 0.981±0.003 |
| G-15d | 1548.096±74.238 f | 1482.651±72.5451 f | 6.522±1.014 cd | 0.965±0.003 abc | 0.986±0.002 |

注：同组处理同列数据后小写英文字母不同者表示经Ducan's检验差异显著(**P**<0.05)

Notes ：Different lowercase letters in the same column of same group refer tosignificant differences by Ducan's test(*P*<0.05)

Phylum  
■Proteobacteria

* Actinobacteria

■Firmicutes

* Chloroflexi

■A ci dobacteria\

* Bacteroidetes
* Gemmatimonadetes
* Patescibacteria
* Rokubacteria
* Nitrospirae
* k\_Bacteria\_Unclassified
* Cyanobacteria

■Halanaerobiaeota

■Deinococcus-Thermus

* Dependentiae

Genus

* Others

JJG30-KF-CM45\_Unclassif!ed

f\_Gemmatimonadaceae\_Unclassified

* Marmoricola

Clostridium\_sensu\_stricto\_12

f\_Sphingomonadaceae\_Unclassified

* f\_\_uncultured\_bacterium\_Unclassified
* f\_\_Pseudomonadaceae\_Unclassified
* f\_Saccharimonadaceae\_Unclassified
* Lysobacter
* Paenisporosarcina
* Lysinibacillus
* Streptomyces
* f\_\_Planococcaceae\_Unclassified
* Sedimentibacter

(A )门水平微生物群落结构；(B)属水平微生 物群落结构

1. Microbial community structure at phylum level,
2. Microbial community structure at genus level 图 **4** 土壤微生物群落结构组成 **Fig.4 Structure composition of soil**

**microbial community**

在土壤微生物群落结构方面，如图4-A所示为 门水平的物种分布柱状图，在菌株BD6修复Cr(VI) 96 h后,优势菌门为Actinobacteria(放线菌门),次 优势菌门为Firmicutes (厚壁菌门)，与原土微生物 群落结构显著不同，当修复时间达到10 d,已将 Cr(VI /从土壤中基本去除的情况下，土壤中优势 菌门为Proteobacteria(变形菌门)，次优势菌门为 Firmicutes(厚壁菌门)，与原土优势菌门相同。

在门水平上，优势菌一直是 Proteobacteria， Firmicutes和Actinobacteria,但是相对丰度则是有 较大变化；对比是否添加丙三醇，微生物群落结构 在 10 d时有着较大差异。对比Y和Cr样品，虽然 门水平看不出显著差异，但从属水平的菌落结构来 看 *Ramlibacter* 相对丰度迅速上升，该菌属也是在重 金属环境下报道较多的一个优势种属。在修复组中， 随着*Microbacterium* sp. BD6的加入，土壤微生物群 落结构会发生较大变化，从图4-B中可以看到随着 修复时间延长，菌属*Microbacterium*的相对丰度是不 断下降的。

2.4.2菌株BD6在Cr ( VI)污染土壤修复中的定 殖 通过对菌株BD6在土壤中的qPCR检测显示， 在最初48 h内BD6在土壤中的数量会急剧减少，之 后一直处于持续下降状态，到15 d时，降低为最初 接种量的3%以下，说明菌株BD6在土壤中并不会 成为优势菌。这与属水平的微生物群落结构(图4-B) 中显示的微杆菌属在群落中相对丰度持续下降的情 况一致。

3 讨论

Cr (VI /污染土壤的生物修复具有经济且环境 友好等优势，多种微生物已被报道用于土壤 Cr(VI) 修复，如硫酸盐还原菌［16］、黑曲霉［6］、蜡样芽胞杆 菌等。本课题组通过前期实验发现菌株BD6在 液体培养基中具有高效Cr(VI /还原能力，于是本 研究尝试将该菌株用于土壤修复。菌株BD6为微杆 菌属，该菌属应用于Cr (VI /污染土壤修复还少见 报道。由于土壤环境复杂，当使用微生物修复土壤 时，各方面因素都会对微生物修复土壤的效果产生 影响，如接种量、Cr (VI /初始浓度、温度和金属 离子等［18-19］0本研究在考察菌株BD6在液体培养 基中还原特性基础上［11］，通过单因素实验进一步确 定了菌株在土壤中还原Cr(VI /的特性和条件，与 菌株BD6在液体中的Cr(VI /还原条件相比，随着 温度升高在液体或土壤中都有着还原率升高的趋势， 但40C时土壤中还原率明显好于液体还原；重金属 离子在液体还原中对还原的抑制大小排序为Mn2+ > Cd2+ > Zn2+ > Ni2+,Cu2+有促进还原的作用，而在 土壤中对还原的抑制效果没有液体中明显且抑制大 小顺序为 Cu2+ > Cd2+ > Ni2+ > Mn2+ > Zn2+。这可 能与微生物所处的不同环境介质有关。Cr(VI /在 土壤中的老化时间也可能会影响铬在土壤中的形 态⑵」，而微生物对不同形态的Cr(VI /去除效率可 能不同L21<本研究中菌株BD6对不同老化时间的 土壤还原效率相近，由此可见，其可适用于长时间 受到Cr(VI)污染的场地中。

在Cr( VI /污染土壤生物修复中，有研究表明 外源电子供体类物质添加会起到较好的促进 Cr(VI) 还原的作用L22-23」。各种电子供体存在情况下微生物 对铬还原活性不同，可能是因为还原酶对不同电子 供体的电子接受能力不同①」。微生物会对更有利 于其生长的电子供体进行优先利用，因此提高菌株 Cr(VI)还原能力需选择合适的电子供体L25-26〕。本 研究根据菌株BD6在液体培养基中可以通过添加电 子供体来提升Cr (VI /还原效率的特点，在土壤修 复中也尝试了相应的各种电子供体。通过比较发现 在土壤中添加丙酮酸钠作为电子供体效果最好，而 在液体培养基中使用丙三醇作为电子供体效果更佳， 这可能跟土壤环境中丙酮酸钠更易被菌株利用有关。 因此，应选用易分散、溶解性较好的物质作为微生 物还原土壤中Cr (VI /的外源电子供体。但是考虑 到修复成本等原因，本研究在土壤修复中依旧使用 丙三醇作为电子供体。

在土壤修复中也要考虑外源物质添加后对土壤 长远的影响，特别是对土著微生物群落的影响。本 研究发现在Cr (VI /污染土壤中添加菌株BD6的修 复过程中，若添加丙三醇则会对土壤微生物群落产 生一定影响，短时间内能提高微生物丰度和多样性， 可能一方面作为电子供体加快了 Cr (VI /的还原从 而降低土壤毒性，另一方面丙三醇作为外加碳源也 能够促进微生物的生长。同时，从群落结构角度看， 是否添加电子供体也有着较大的影响，在门水平上 10 d时有无电子供体添加显示出较大差异，15 d则 两者有趋向一致的趋势；在属水平上，96 h两者群 落结构由于 BD6 作为优势菌存在，两者差异不显著， 而当10 d后，随着菌株BD6丰度逐渐减少，是否添 加电子供体则对群落结构有较大影响。由图4-B可 以看出菌株 BD6 在 96 h 左右的短期内一直是优势菌 群，起到了重要的修复作用，而随着时间延长菌株 BD6迅速减少变为非优势菌，通过qPCR也进一步 证实了菌株BD6在土壤中的这种定殖规律和变化趋 势，说明利用菌BD6修复土壤并不会使菌株长期存 活于土壤中并与土著微生物产生竞争。

盆栽实验能够比较直观地反映出污染土壤的毒 性，本研究以黄豆这种常见的经济作物作为盆栽研 究对象，发现不同浓度Cr(VI)污染土壤会对黄豆 生长产生影响，黄豆植株会将铬吸收入体内，且与 土壤的Cr(VI )浓度呈正相关，这一结果与文献[15； 得出的结论相似。本研究将BD6用于土壤污染修复， 最终得到了良好的修复效果，即植株生长良好，体 内吸收铬的量显著降低，分析原因应该是Cr(VI) 被还原为低毒性的Cr(III), Cr(III )更易被沉淀和 固化下来而不易被植物吸收。

4 结论

本研究通过土壤中的Cr (VI)还原实验考察了 菌株BD6在Cr(VI )污染土壤中的最优化修复条件 和修复特点。菌株BD6修复Cr(VI)污染土壤可以 明显改善黄豆植株生长情况，且降低植株体内铬含 量，能够提升土壤中微生物多样性，对土壤质量有 明显的改善作用。菌株BD6数量在修复土壤Cr(VI) 污染过程中一直呈下降趋势，不会一直成为土壤中 的优势菌，对土著微生物群落造成持续影响。因此， 菌株 *Microbacterium* sp. BD6 可用于今后的 Cr(VI) 污染农田土壤的生物修复。

参 考 文 献

1. Jobby R, Jha P, Yadav A, et al. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium[Cr(VI)]：A comprehensive review[J]. Chemosphere, 2018, 207 ：255-266.
2. Pradhan D, Sukla L, Sawyer M, et al. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment ：A review[J]. Journal of Industrial & Engineering Chemistry, 2017, 55 ：1-20.
3. Shanker A, Cervantes C, Loza T, et al. Chromium toxicity in plants[J]. Environment International, 2005, 31(5)：739-753.
4. 张宇虹.重金属铬对植物生长影响的研究进展[J].科技风, 2016, 2016(7)：195.

Zhang YH. Research progress on the effect of chromium on plant growth[J]. Technology Wind, 2016, 2016(7)：195.

1. 胡双庆，沈根祥,顾海蓉，等.菲和铬(VI )单一及复合暴露 对土壤微生物多样性的影响[J].生态毒理学报，2017, 12(3)： 535-543.

Hu SQ, Shen GX, Gu HR, et al. Effects of single and combined exposure of phenanthrene and chromium(VI)on soil microbial diversity[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3)： 535-543.

6 ] Srivastava S, Thakur I, Shekhar. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(7)：1904-1911.

；/7]陈土凤,谢光炎,许燕滨,陈鹏程.一株C( VI)还原菌对C( VI) 胁迫下小白菜幼苗植物毒性及植物有效性的缓解效应[J].广 东农业科学 , 2020, 47(1)：77-86.

Chen TF, Xie GY, Xu YB, et al. Mitigative effects of a Cr(VI) reducing bacterium on plant phytotoxicity and phytoavailability of *Pakchoi* seedlings under Cr(VI)stress[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(1)：77-86.

1. An FQ, Li HH, Diao Z, et al. The soil bacterial community in cropland is vulnerable to Cd contamination in winter rather than in summer[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 26 ：114-125.
2. Yu ZS, He ZL, Tao XY, et al. The shifts of sediment microbial community phylogenetic and functional structures during chromium (VI)reduction[J]. Ecotoxicology, 2016, 25(10)：1759-1770.
3. 张雪晴, 张琴, 程园园, 等.铜矿重金属污染对土壤微生物群 落多样性和酶活力的影响[J].生态环境学报,2016, 25 (3)： 517-522.

Zhang XQ, Zhang Q, Cheng Y, et al. Effects of heavy metal pollution in copper mine on soil microbial community diversity and enzyme activity[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2016, 25(3)：517-522.

[11]刘爱霖，吴志国，江鑫，等.Cr(VI)还原菌*Micfobacterium* sp. BD6的分离鉴定及还原特性[J].微生物学报,2020, 6( 1 )： 95-105.

Liu AL, Wu ZG, Jiang X, et al. Isolation, identification and reduc­tion characteristics of Cr(VI)reducing bacteria *Microbacterium* sp. BD6LJ]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(1)：95- 105.

1. 陈育翔. 二苯碳酰二肼分光光度法测定电镀废水中六价铬的 改进研究LJ].化学工程与装备,2008 (6)： 121-123.

Chen YX. Improvement of determination of hexavalent chromium in electroplating wastewater by diphenylcarbazide spectrophotome- tryLJ]. Chemical Engineering & Equipment, 2008(6)：121-123.

1. 杨文玲, 岳丹丹 , 李冠杰, 等. 铅铬胁迫对小麦种子萌发及幼 苗脯氨酸含量的影响LJ].生物技术通报，2015, 31(12)： 110-114.

Yang WL, Yue DD, Li GJ, et al. Effects of lead and chromium stress on seed germination and proline content of wheat seedlingsLJ].

Biotechnology Bulletin, 2015, 31(12)：110-114.

1. 王碧霞, 肖娟, 冯旭, 等. 铬胁迫对葎草雌雄植株光合生理特 性的不同影响LJ].草业学报，2016, 25 (7)： 131-139.

Wang BX, Xiao J, Feng X, et al. Different effects of chromium stress on photosynthetic physiological characteristics of male and female humulus scandens plantsLJ]. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(7)：131-139.

[15 ]赵鲁，李旭军,穆真，等.Cr(III)胁迫对大豆，小麦生长及 铬吸收和转运的影响LJ].中国土壤与肥料，2015(1) ： 63- 67.

Zhao L, Li XJ, Mu Z, et al. Effects of Cr(III)stress on growth, Cr uptake and transport of soybean and wheatLJ]. Soils and Fertilizers Sciences in China, 2015(1)：63-67.

1. 韩建均, 柴陆军 , 张娟, 等.硫酸盐还原菌原位修复六价铬污 染土壤 LJ].化工环保,2020, 40 (6)： 613-618.

Han JJ, Chai LJ, Zhang J, et al. In situ remediation of hexavalent chromium contaminated soil by sulfate reducing bacteriaLJ].

Environmental Protection of Chemical Industry, 2020, 40(6)： 613-618.

1. 邓红艳, 陈刚才, 叶姜瑜. 一株抗铬细菌的分离鉴定及其还原 特性研究LJ].安全与环境学报,2015, 15(3)： 234-237.

Deng HY, Chen GC, Ye JY. Isolation, identification and its reduc­tion characteristics research of a chromium resistant bacterium

LJ]. Journal of Safety and Environment, 2015, 15(3)：234-237.

1. Ma ZM, Zhu WJ, Long HZ, et al. Chromate reduction by resting cells of *Achromobacter* sp. Ch-1 under aerobic conditionsLJ]. Process Biochemistry, 2007, 42(6)：1028-1032.

19 ] Philip L, Iyengar L, Venkobachar C. Cr(VI)reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soilsLJ]. Journal of Environmental Engineering, 1998, 124(12)：1165-1170.

[20 ]陈冉.粉粘土中Cr(VI /的吸附特性及水溶性有机质对铬吸 附和形态的影响L D].上海：华东师范大学,2016.

Chen R. Adsorption characteristics of the Cr(VI)and the effect of dissolved organic matter on chromium adsorption and form in silty clayLD]. Shanghai ： East China Normal University, 2016.

1. 黄顺红.土著微生物对土壤不同形态C( VI)修复效果研究[J]. 矿产与地质, 2013,(S1)：75-77.

Huang SH. Remediation effect of different forms of Cr(VI)in soil by indigenous microorganismsLJ]. Mineral Resources and Geology, 2013,(S1)：75-77.

1. 常文越，陈晓东，王磊.土著微生物修复铬(VI)污染土壤的 条件实验研究LJ].环境保护科学,2007 ( 1)： 42-44.

Chang WY, Chen XD, Wang L. Experimental study on conditions of chromium(VI)- contaminated soil remediation by abor iginal microbeLJ]. Environmental Protection Science, 2007(1)：42- 44.

1. 邓红艳.某工厂厂区土壤铬污染及其微生物修复研究L D ]. 重庆：重庆大学, 2016.

Deng HY. Chromium pollution and research on bioremediation of chromium contaminated soil in a plantLD]. Chongqing ： Chongqing University, 2016

24 ] Shi Y, Chai LY, Yang ZH, et al. Identification and hexavalent chromium reduction characteristics of *Pannonibacter phragmite*- *tus*LJ]. Bioprocess Biosyst Eng, 2012, 5 ：843-850.

1. 杨宇, 高宇 , 程潜, 等.一株铬还原菌的分离鉴定及铬还原特 性研究LJ].生态环境学报,2018, 27 (2)： 322-329.

Yang Y, Gao Y, Cheng Q, et al. Isolation, identification and C(r VI) reducing characteristics of a chromium-reducing bacteriaLJ]. Ecology and Environmental Sciences, 2018, 27(2)：322-329.

1. Xu L, Luo MF, Li WL, et al. Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditionsLJ]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185(2-3)：1169-1176.

(责任编辑狄艳红)