

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2024.04.016

王金坪, 费藏乐, 邵梦迪, 等. 外源 Ca^{2+} 对两种产脲酶细菌修复 Cd-As 复合污染水稻土的影响. 土壤, 2024, 56(4): 826–832.

外源 Ca^{2+} 对两种产脲酶细菌修复 Cd-As 复合污染水稻土的影响^①

王金坪, 费藏乐, 邵梦迪, 杨润, 罗燕, 黄金富, 蔡倩, 伍钧, 徐敏*

(四川农业大学环境学院, 成都 611130)

摘要: 微生物诱导碳酸盐沉淀(Microbially induced carbonate precipitation, MICP)技术已被广泛应用于土壤重金属污染修复。为促进 MICP 过程, 提高土壤修复效果, 以 Cd-As 复合污染的水稻土为研究对象, 利用巴氏八叠球菌(*Octococcus pasteurii*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)两种产脲酶细菌, 分析比较了外源添加氯化钙(CaCl_2)对两种菌株固定土壤中 Cd、As 效果的影响, 并对修复后土壤理化性质、酶活性及微生物多样性的变化进行了检测。结果表明: 两种菌株均能固定土壤 Cd、As, 其中, 蜡样芽孢杆菌对土壤 Cd、As 的固定效果更佳, 与巴氏八叠球菌处理相比, 蜡样芽孢杆菌处理下土壤有效态 Cd、As 含量分别降低了 16.7%、11.1%; 添加外源 Ca^{2+} 后, 在两种细菌处理下有效态 Cd、As 含量均发生显著变化, 分别降低了 17.3%~22.2%、16.8%~26.7%, 可见 Ca^{2+} 的添加能有效促进 MICP 过程, 促进对 Cd、As 的固定。此外, 与未添加 Ca^{2+} 处理相比, 添加 Ca^{2+} 后, 两种细菌处理下显著提高了土壤脲酶活性(52.6%~113.3%)、蔗糖酶活性(13.1%~28.9%)、碱解氮含量(3.4%~25.5%)、速效钾含量(2.1%~34.1%)以及微生物多样性, 表明外源 Ca^{2+} 可有效提高土壤肥力及土壤生态功能。综上, 基于 MICP 作用, 可通过添加外源 Ca^{2+} 来增强产脲酶细菌对 Cd-As 复合污染土壤的修复效果, 其中, 蜡样芽孢杆菌修复效果更佳。

关键词: 微生物诱导碳酸盐沉淀(MICP); 外源 Ca^{2+} ; 产脲酶细菌; 土壤修复

中图分类号: X53 文献标志码: A

Effect of Exogenous Ca^{2+} on Remediation of Cd-As Co-contaminated Paddy Soil by Two Urease-producing Bacteria

WANG Jinping, FEI Cangle, SHAO Mengdi, YANG Run, LUO Yan, HUANG Jinfu, CAI Qian, WU Jun, XU Min*

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

Abstract: Microbial-induced carbonate precipitation (MICP) has been widely used in the remediation of heavy metal contaminated soil. Two urease-producing bacteria, *Octococcus pasteurii* and *Bacillus cereus*, with or without exogenous Ca^{2+} were introduced to Cd-As co-contaminated paddy soil in order to optimize the process of MICP and improve remediation efficiency. The impact of exogenous CaCl_2 on the efficacy of Cd and As remediation in the soil under two strains treatments, as well as the changes of soil properties, enzyme activities and microbial diversity after remediation were studied. Results showed that two strains were able to immobilize Cd and As in soil, compared with *Octococcus pasteurii*, *Bacillus cereus* reduced available Cd and As contents by 16.7% and 11.1%, respectively. The addition of exogenous Ca^{2+} reduced available Cd and As by 17.3%–22.2% and 16.8%–26.7% in both bacterial treatments, respectively, indicating that the addition of Ca^{2+} accelerated MICP process and immobilized Cd and As. Compared with the treatment without Ca^{2+} , the addition of Ca^{2+} significantly increased soil urease (52.6%–113.3%), sucrase activity (13.1%–28.9%), alkaline hydrolysis nitrogen (3.4%–25.5%), available potassium (2.1%–34.1%) and microbial diversities in both bacterial treated soils, implying that the addition of exogenous Ca^{2+} effectively enhanced soil fertility and soil ecological functions. In conclusion, the remediation efficiency of Cd-As co-contaminated soil by urease producing bacteria can be improved by the addition of Ca^{2+} , with *Bacillus cereus* offering a higher efficiency for reducing the phytoavailability of heavy metals in soil.

Key words: Microbial induced carbonate precipitation; Ca^{2+} from exogenous sources; Urease-producing bacteria; Soil remediation

①基金项目: 国家自然科学基金项目(42107017)、成都市科技项目(2020-YF09-00023-SN 和 2020-YF09-00012-SN)和大学生创新训练计划项目资助。

* 通讯作者(xumin_xyz@126.com)

作者简介: 王金坪(1998—), 女, 四川泸州人, 硕士研究生, 研究方向为土壤污染治理。E-mail: wjp18483108175@163.com

随着工业化和城市化进程的加快,我国农田土壤重金属污染日益严重,尤其是 Cd、As 污染,这严重影响了粮食安全和人类健康^[1-2]。根据 2014 年《全国土壤污染状况调查公报》^[3],我国农业污染土壤中 Cd、As 两种污染物点位超标率分别为 7.0%和 2.7%。土壤 Cd、As 污染不仅破坏农田生态系统,还会随食物链危害人类健康。Cd 和 As 已被国际癌症机构认定为对人类具有致癌性^[4]。Cd 可造成大脑、肾脏和骨骼等重要器官受到严重损害^[5],而 As 则会导致人体患上心血管疾病、神经系统疾病^[6]。目前,我国有 60%的人口以大米为主食^[7],而水稻是 Cd、As 进入人体的主要途径之一^[8]。因此,对 Cd、As 污染土壤的修复至关重要,特别是针对水稻土,这对保障粮食安全和促进农业发展具有重要意义。

微生物诱导碳酸盐沉淀(Microbially induced carbonate precipitation, MICP)被广泛认为是一种新兴的环境重金属污染生物修复技术^[9-10]。MICP 过程通过产脲酶细菌必要的代谢活动进行。在 MICP 过程中,尿素被产脲酶细菌分泌的脲酶水解成 NH_4^+ 和 CO_3^{2-} ,释放的 CO_3^{2-} 可以结合环境中的 Ca^{2+} ,并以 CaCO_3 的形式沉淀^[11]。在生成 CaCO_3 沉淀的过程中,重金属离子以类质同象置换或共结晶的方式,进一步转化为重金属沉淀物或重金属共沉淀^[12],从而固定重金属。

近年来, MICP 技术已被成功应用于 Cd、As、Pb 和 Zn 等多种重金属修复^[9,13-14]。前人研究表明,巴氏八叠球菌和蜡样芽孢杆菌对重金属具有良好的固定效果^[15-16]。但在自然条件下,土壤中的重金属在一定程度上会抑制菌株生长,导致菌株难以高效地产生脲酶,从而影响重金属的修复效率。然而,可通过添加外源物质的方式,为产脲酶细菌补充必要的物质,从而促进其生长,促进 MICP 过程,提高修复效果。当前关于利用 MICP 技术修复重金属的研究大多关注于通过微生物自身修复方面,修复效率低,忽视了添加外源物质提高修复效率的可能性。有研究表明, Ca^{2+} 添加可以缓解重金属对微生物的毒性,进而强化 MICP 过程^[17]。由此可见, Ca^{2+} 在 MICP 过程中起着重要作用。氯化钙(CaCl_2)具有易溶于水、廉价易得等特点,是 MICP 技术的首选钙源。目前,已有较多研究将 CaCl_2

作为钙源应用于水溶液试验条件下,诱导微生物形成碳酸钙沉淀,并证实了 CaCl_2 能有效促进 MICP 过程,从而提高对重金属的固定效果^[14,18]。但 MICP 技术中以 CaCl_2 为钙源,在农田土壤中探究重金属固定效果的研究还较少。对于农田土壤重金属污染,不仅要关注重金属的固定效果,还需对土壤肥力以及生态功能进行评估,这对后续生产极为重要^[19]。此外,大部分基于 MICP 技术修复重金属污染土壤的研究多针对于一种重金属,对于复合污染土壤的研究相对较少。因此,进一步探究外源 Ca^{2+} 对 MICP 技术修复 Cd-As 复合污染农田土壤的效果及其对土壤生态功能的影响,对农田生产及食品安全具有重要意义。

基于此,本研究以 Cd-As 复合污染水稻土为研究对象,分别添加巴氏八叠球菌和蜡样芽孢杆菌,对比分析 CaCl_2 添加对两种产脲酶细菌固定土壤中 Cd、As 效果的影响,同时探讨对土壤性质、土壤酶活性和微生物多样性的影响,以期更为有效地修复土壤重金属 Cd-As 复合污染提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究采用的产脲酶细菌为巴氏八叠球菌(*Octococcus pasteurii*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),均为非致病菌。将巴氏八叠球菌和蜡样芽孢杆菌的菌液分别在 YE- NH_4 培养基(酵母提取物 20 g/L、硫酸铵 10 g/L、Tris 15.75 g/L、尿素 0.025 g/mL)、LB 培养基(肽 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L)中进行恒温培养,随后以 6 000 r/min 离心 5 min,获得菌体细胞,用无菌水冲洗 2~3 次,使菌体悬浮于无菌水,获得菌悬液。采用 OD600 测得细胞浓度分别为 3×10^9 、 0.3×10^9 cfu/mL,用于后续试验。所有培养基使用前均进行 121℃ 高压灭菌 20 min。

供试土壤采自于四川省绵竹市某农田(31°41'86" N, 104°25'42" E)0~20 cm 表层,为 Cd-As 复合污染土壤,土壤类型为水稻土,其基本性质见表 1。

1.2 试验方案

设置 4 个处理组: BCK(添加巴氏八叠球菌 10%, V/m)、BCa(添加巴氏八叠球菌 10%, V/m)和 CaCl_2 0.001 25%, m/m)、LCK(添加蜡样芽孢杆菌 10%, V/m)、

表 1 供试土壤基本性质
Table 1 Properties of tested soil

pH	有机质(g/kg)	阳离子交换量(cmol/kg)	全氮(g/kg)	全磷(g/kg)	全钾(g/kg)	总镉(mg/kg)	总砷(mg/kg)
6.73 ± 0.78	20.6 ± 0.00	6.40 ± 0.16	1.18 ± 0.09	0.23 ± 0.00	1.74 ± 0.01	2.74 ± 0.72	64.10 ± 2.60

LCa(添加蜡样芽孢杆菌 10%, V/m)和 CaCl_2 0.001 25%, m/m)^[17]。每个处理重复 3 次。试验中,称取土壤 100 g,加入尿素 0.694 mg,按照处理组设置,添加菌悬液 10 mL 或 CaCl_2 1.25 mg,搅拌均匀后加入蒸馏水,保持水土质量比为 1:5。将所有土壤样品放入 25 °C 的培养箱恒温培养,期间采用重量法补充流失水分。培养 20 d 后,采集样品。土壤样品进行风干,研磨,过 2 mm 尼龙筛,装袋备用。

1.3 样品测定

采用 CaCl_2 浸提法测定有效态 Cd、As 含量^[20];采用 BCR 顺序提取法对 Cd 和 As 的不同形态进行提取,土壤中的 Cd 和 As 形态分为可交换态、可还原态、可氧化态和残渣态 4 种形态^[21]。采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, NexION300X, PerkinElmer, USA)测定提取液中的重金属^[22]。

土壤理化性质参照《土壤农化分析》^[23]进行测定。采用外加热-重铬酸钾氧化法测定土壤有机质含量(OM);采用六胺三氯化钴萃取分光光度法测定土壤阳离子交换量(CEC);采用凯氏定氮蒸馏法测定碱解氮含量(AN);采用 NaHCO_3 浸提-钼锑抗比色法测定土壤有效磷含量(AP);采用乙酸铵浸提-火焰光度法测定速效钾含量(AK)。

采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定脲酶活性^[24];采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定蔗糖酶活性^[25];采

用磷酸苯二钠比色法测定磷酸酶活性^[26]。

通过高通量测序技术对土壤微生物群落进行分析^[27]。土壤样品 DNA 提取采用 PowerSoil 试剂盒。使用引物 27F(5'-AGTTTGATCMTGGCTAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因扩增。扩增产物送往北京青科生物技术有限公司(成都)测序。测序完成,统计各样本的群落组成。

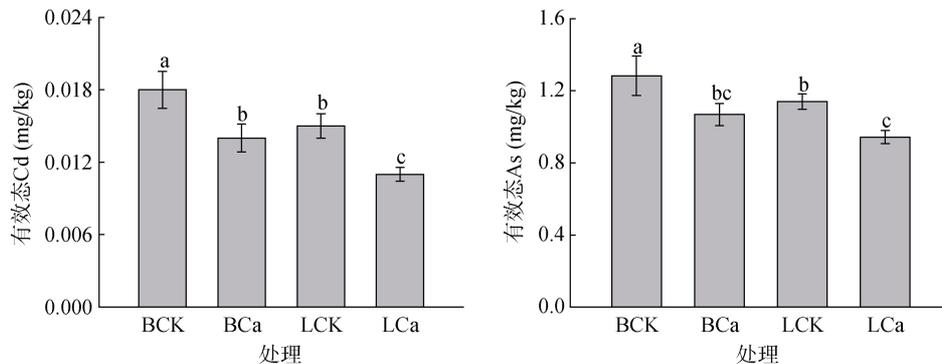
1.4 数据处理

采用 Excel 2021 及 SPSS 26.0 软件对数据进行处理及统计分析,并采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Duncan 法多重比较进行处理间差异性检验,显著性水平为 $P < 0.05$ 。使用 Origin 2022 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对土壤中 Cd、As 有效性及形态的影响

不同处理下土壤中 Cd、As 有效性的变化如图 1 所示。整体上,与 BCK 处理相比,所有处理均能显著降低 Cd、As 的有效性($P < 0.05$)。与 BCK 处理相比,BCa 处理的有效态 Cd、As 含量分别降低了 22.2%、16.8%($P < 0.05$);与 LCK 处理相比,LCa 处理的有效态 Cd、As 含量分别降低了 17.3%、26.7%($P < 0.05$);与 BCK 处理相比,LCK 处理的有效态 Cd、As 含量分别降低了 16.7%、11.1%($P < 0.05$)。



(图中不同小写字母表示处理间差异在 $P < 0.05$ 水平上显著;下同)

图 1 不同处理下土壤有效态 Cd 和 As 的含量

Fig. 1 Available Cd and As concentrations in soils under different treatments

不同处理下 Cd、As 在土壤中的赋存形态如图 2 所示。整体上,土壤中 Cd、As 的残渣态占比均最大。与 BCK 处理相比,BCa 处理下土壤可交换态 Cd、As 含量分别降低 4.50%、3.51%,残渣态 Cd、As 含量分别增加 11.67%、14.9%;与 LCK 处理相比,LCa 处理下土壤可交换态 Cd、As 含量分别降低 6.57%、0.17%,残渣态 Cd、As 含量分别增加

1.77%、0.37%。与 BCK 处理相比,LCK 处理下可交换态 Cd 含量降低了 2.84%,而残渣态 Cd 含量增加了 5.34%。

2.2 不同处理对土壤理化性质的影响

不同处理下土壤理化性质如表 2 所示。与 LCK 处理相比,LCa 处理显著提高了土壤 pH。与 BCK 处理相比,BCa 处理下土壤碱解氮含量提高了 25.5%

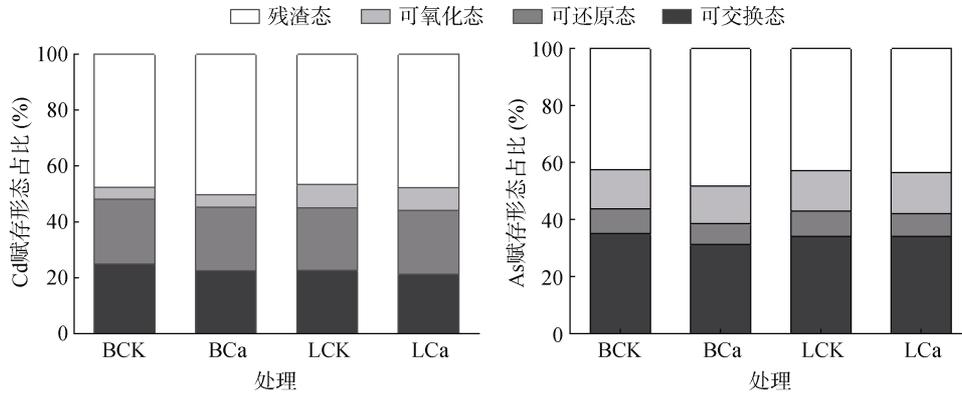


图 2 不同处理下土壤 Cd、As 的赋存形态
Fig. 2 Fractions of Cd and As in soils under different treatments

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

处理	pH	有机质(g/kg)	阳离子交换量(cmol/kg)	碱解氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	速效钾(mg/kg)
BCK	7.68 ± 0.46 b	24.6 ± 0.3 a	6.14 ± 0.33 a	74.9 ± 0.0 a	18.9 ± 1.0 a	23.3 ± 1.4 c
BCa	7.91 ± 0.11 ab	25.9 ± 1.1 a	6.60 ± 0.26 a	94.0 ± 3.1 b	14.9 ± 0.6 b	23.8 ± 1.7 c
LCK	7.48 ± 0.40 b	23.9 ± 2.5 a	7.02 ± 1.42 a	77.5 ± 5.8 b	12.6 ± 1.8 b	34.9 ± 7.8 b
LCa	8.36 ± 0.24 a	25.3 ± 1.2 a	7.44 ± 0.11 a	80.1 ± 2.8 b	15.2 ± 2.1 b	46.8 ± 3.1 a

注：表中同列不同小写字母表示处理间差异在 $P < 0.05$ 水平上显著；下同。

($P < 0.05$)，有效磷含量降低了 21.2% ($P < 0.05$)。与 LCK 处理相比，LCa 处理下土壤速效钾含量提高了 34.1% ($P < 0.05$)；与 BCK 相比，LCK 处理下土壤速效钾含量提高了 49.8% ($P < 0.05$)。不同处理下土壤有机质含量、阳离子交换量无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.3 不同处理对土壤酶活性的影响

不同处理下土壤脲酶、蔗糖酶、磷酸酶活性变化

如图 3 所示。与 BCK 处理相比，BCa、LCK 处理下土壤脲酶活性分别提高了 113.3%、153.3% ($P < 0.05$)，且 LCa 处理下的脲酶活性最高，与 LCK 处理相比，LCa 处理的脲酶活性提高了 52.6% ($P < 0.05$)。与 BCK 处理相比，BCa 处理可显著提高土壤蔗糖酶活性，提高了 28.9% ($P < 0.05$)。土壤磷酸酶活性在不同处理下无显著性差异 ($P > 0.05$)。

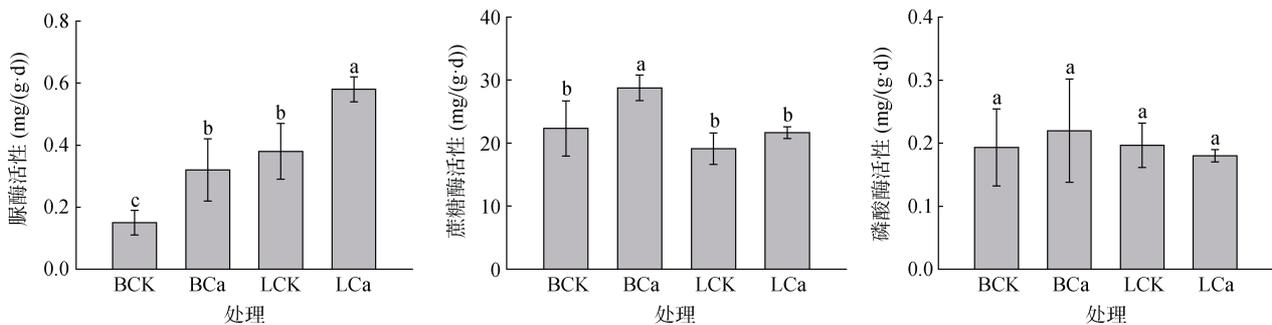


图 3 不同处理下土壤酶活性差异
Fig. 3 Soil enzyme activities under different treatments

2.4 不同处理对土壤微生物多样性的影响

采用操作分类单元(OTU)水平方法计算不同处理的微生物群落多样性，结果如表 3 所示。与 BCK 处理相比，BCa 处理的 Chao1 指数显著上升；且 LCa 处理下土壤微生物 Chao1、Faith_pd 指数显著高于 LCK 处理；与 BCK、BCa 处理相比，LCK、LCa 处

理下 Chao1、Faith_pd 均显著增加。其中，LCa 处理下土壤微生物多样性及丰度指数均最高。

3 讨论

3.1 不同处理对土壤 Cd、As 固定效果的影响

在 MICP 过程中，产脲酶细菌代谢产生脲酶，促

表 3 不同处理对微生物多样性及丰度的影响
Table 3 Effects of different treatments on microbial diversities and richness

处理	Chao1	Faith_pd	Shannon	Simpson
BCK	865 ± 50 d	63.0 ± 3.0 c	7.56 ± 0.62 b	0.98 ± 0.01 ab
BCa	1 006 ± 6 c	68.6 ± 2.5 bc	7.92 ± 0.36 b	0.98 ± 0.02 b
LCK	1 253 ± 35 b	72.3 ± 5.4 b	9.20 ± 0.18 a	1.00 ± 0.01 a
LCa	1 361 ± 10 a	80.9 ± 3.5 a	9.22 ± 0.12 a	1.00 ± 0.00 a

进尿素水解产生 NH_4^+ 、 OH^- 和 CO_3^{2-} ，产生的 CO_3^{2-} 可以与 Ca^{2+} 反应形成 CaCO_3 沉淀^[28]。在这个过程中重金属离子以同晶置换或共结晶的方式与 CaCO_3 结合，从而被固定在沉淀中，降低其有效性^[8,12]。而 CaCO_3 沉淀的形成受底物 Ca^{2+} 含量的影响，进而影响土壤重金属的修复效果。本研究以不添加 Ca^{2+} 作为对照，通过外源添加 Ca^{2+} ，比较巴氏八叠球菌和蜡样芽孢杆菌两种产脲酶细菌对土壤 Cd、As 的固定效果，结果表明，在引入 Ca^{2+} 后，两种菌株处理下土壤有效态 Cd 和 As 含量均显著降低， Ca^{2+} 的添加可显著提升 Cd、As 的固定效率。王晖等^[29]研究表明，添加 20 mmol/L 的 Ca^{2+} 后，芽孢杆菌对 Cd^{2+} 的去除率上升，本研究结果与其一致。外源 Ca^{2+} 的添加显著影响 MICP 技术固定 Cd、As 的效率，这可能是因为：一方面 Ca^{2+} 的添加增强了细菌对重金属胁迫的耐受性，提高细菌的活性，促进脲酶产生，促进 MICP 过程，从而提高对 Cd、As 的固定效果^[30]。与不添加 Ca^{2+} 相比，添加 Ca^{2+} 后，巴氏八叠球菌、蜡样芽孢杆菌处理的脲酶活性分别提高了 113.3%、46.9% (图 3)。另一方面，在 MICP 过程中，产生的 CaCO_3 具有较为致密的空隙结构，可为 Cd、As 的固定提供位点。而 Ca^{2+} 添加可以为 CaCO_3 产生提供充足的底物，使得更多的具有特殊网状晶格体的 CaCO_3 晶体生成，为 Cd、As 的固定提供更多结合位点，从而提升 Cd、As 的固定效率^[31-32]。另外，与巴氏八叠球菌对 Cd、As 的固定效果相比，蜡样芽孢杆菌对 Cd、As 的修复更具优势。综上， Ca^{2+} 的添加能促进 MICP 过程，提高脲酶活性，同时促进更多碳酸盐生成，从而提高产脲酶细菌对土壤中 Cd、As 的固定效率。

重金属的不同赋存形态决定其在土壤中的迁移能力，其中可交换态的活性较大，在土壤中的迁移性更强，而残渣态属于难溶态，迁移能力较弱^[15]。4 种处理下，土壤中大部分 Cd 和 As 均以残渣态的形态存在。添加 Ca^{2+} 后，土壤有效态 Cd、As 含量显著降低，残渣态 Cd、As 含量显著升高，表明 Cd、As 的形态由活跃的有效态向稳定的残渣态转化，从而降

低其在土壤中的迁移能力，这主要与土壤脲酶的活性显著提高有关。添加 Ca^{2+} 后，提高了产脲酶细菌的活性，增加了 CaCO_3 沉淀，从而提高了 Cd、As 固定率。此外，重金属 Cd、As 还可与 CaCO_3 形成共沉淀^[33]，降低其在土壤中的有效性。因此，添加 Ca^{2+} 可有效促进重金属的固定过程，将更多活性较高的可交换态 Cd、As 转变为稳定的残渣态 Cd、As，且蜡样芽孢杆菌较巴氏八叠球菌对 Cd、As 的固定效果更佳。

3.2 不同处理对土壤性质的影响

在农田土壤重金属污染修复过程中，土壤理化性质变化对农田土壤的后续生产尤为重要。因此，关注土壤性质的变化是农田土壤重金属修复效果的重要内容。 Ca^{2+} 添加后，土壤 pH 上升了 0.23~0.88 个单位，其中 LCa 处理下土壤 pH 最高，这可能是因为 Ca^{2+} 添加后，促进了 MICP 过程，刺激了尿素的分解和 CO_3^{2-} 的产生，从而提高土壤 pH^[34]。pH 提高的过程中，可为土壤形成局部碱性环境，为 CaCO_3 的结晶提供成核位点，从而利于金属及 CaCO_3 沉淀或其复合物形成。因此，与 BCK 处理相比，BCa 处理下有效态 Cd 及 As 的含量均显著降低(图 1)。与 BCK 处理相比，BCa 处理下土壤碱解氮含量显著提高，这可能是巴氏八叠球菌在 Ca^{2+} 刺激下可更有利于促进尿素降解分解，其反应过程为： $(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$ ； $2\text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^-$ ^[12]。然而，与 LCa 处理相比，BCa 处理下碱解氮含量更高，这可能是因为 LCa 处理下蜡样芽孢杆菌进行 MICP 过程时会消耗更多的氮素。在 Ca^{2+} 刺激下，蜡样芽孢杆菌处理下 MICP 过程更加强烈可证明此观点。与 BCK 处理相比，LCK 处理的速效钾含量显著增加，表明与巴氏八叠球菌相比，蜡样芽孢杆菌更有利于提高土壤钾素。与 LCK 处理相比，LCa 处理下土壤速效钾含量显著提高，表明蜡样芽孢杆菌处理下 Ca^{2+} 的介入有利于其对土壤钾素的矿化作用。此外，与 BCK 处理相比，BCa 处理下土壤有效磷含量降低了 21.2%，这可能是因为巴氏八叠球菌处理下 Ca^{2+} 的添加导致磷素与钙结合生成沉淀所致，这也可能是巴氏八叠球菌处理下重金属固定效果不如蜡样芽孢杆

菌的原因之一。综上, 对比菌株添加和不加 Ca^{2+} 的处理结果, 可以得出, 补充外源 Ca^{2+} 后, 能够促进 MICP 过程, 提高土壤碱解氮、速效钾含量, 这在一定程度上能起到改善土壤肥力的效果。

3.3 不同处理对土壤酶活性的影响

土壤酶在农田土壤及生态系统中发挥着重要作用^[35]。脲酶是 MICP 过程中的关键酶^[34], 重金属的去除率与脲酶活性水平有关^[36]。本研究中, 巴氏八叠球菌和蜡样芽孢杆菌均能产生脲酶, 且蜡样芽孢杆菌处理下脲酶活性更高。在两种菌株处理下, 添加 Ca^{2+} 后产生的脲酶活性均得到提高, 再次表明 Ca^{2+} 可促进 MICP 过程。Fang 等^[17]利用巴氏孢子球菌固定 Cd^{2+} , 发现添加 Ca^{2+} 后, 脲酶活性增加了约 3 倍, 与本研究结果一致。此外, 蔗糖酶活性在 Ca^{2+} 添加后也有所增加, 这可能是 Ca^{2+} 的添加为微生物提供了营养物质和能量, 促进了微生物的生长代谢, 从而提高了蔗糖酶活性。此外, Ca^{2+} 添加能缓解重金属对微生物的胁迫, 良好的生存环境可以刺激微生物活动, 促进蔗糖酶的分泌^[17]。综上, 外源 Ca^{2+} 添加不仅能促进脲酶活性提高, 还可以提高土壤蔗糖酶活性, 有效改善土壤生态功能。

3.4 不同处理对土壤微生物多样性的影响

土壤微生物对环境条件的变化极其敏感, 对环境变化能迅速做出响应。土壤微生物的丰度和多样性一定程度上可以反映土壤质量。对于农田土壤, 土壤质量的提升可以为提高农田生产提供重要的保障。因此, 关注修复后土壤微生物的丰度及多样性, 对农田土壤的修复评价更为重要。在本研究中, 不同处理下土壤微生物多样性差异显著。与巴氏八叠球菌处理相比, 蜡样芽孢杆菌处理下微生物的丰度更高, 表明蜡样芽孢杆菌在 Cd-As 复合污染土壤条件下更具有耐受性, 利于维护土壤微生态。添加 Ca^{2+} 后, Chao1 和 Faith_pd 指数均显著上升, 表明土壤微生物的多样性增加, 这可能是因为添加 Ca^{2+} 后有效降低了重金属的有效性, 抑制了重金属对微生物的胁迫。此外, Ca^{2+} 的添加可以缓解微生物对重金属的生物吸附和生物积累, 从而降低细菌在重金属胁迫下的伤害^[37], 促进微生物的生长^[17, 38]。综上所述, 外源 Ca^{2+} 的添加, 不仅能促进 MICP 过程降低土壤重金属 Cd、As 的有效性, 还能有效缓解重金属对微生物的胁迫, 提高微生物的丰度及多样性, 维持土壤生态功能。

4 结论

1) 在 MICP 技术固定重金属过程中, 蜡样芽孢杆

菌相比于巴氏八叠球菌产脲酶的活性更强, 对土壤中 Cd、As 的固定效果更佳。

2) Ca^{2+} 的添加可有效促进重金属的固定过程, 促进可交换态 Cd、As 转变为残渣态 Cd、As, 有效降低土壤中 Cd、As 的有效性。

3) Ca^{2+} 的添加能提高土壤脲酶和蔗糖酶活性, 增加土壤碱解氮、有效磷的含量, 有效改善土壤养分。

4) Ca^{2+} 的添加可缓解重金属对土壤微生物的胁迫, 提高土壤微生物多样性, 维持土壤生态功能。

参考文献:

- [1] Yuan X H, Xue N D, Han Z G. A meta-analysis of heavy metals pollution in farmland and urban soils in China over the past 20 years[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2021, 101: 217–226.
- [2] Qin G W, Niu Z D, Yu J D, et al. Soil heavy metal pollution and food safety in China: Effects, sources and removing technology[J]. *Chemosphere*, 2021, 267: 129205.
- [3] 彭瑜, 王海娟, 王宏斌. 农田土壤砷、镉协同钝化修复的研究进展[J]. *土壤*, 2021, 53(4): 692–699.
- [4] Giordano D, Blandino M. Arsenic, lead and cadmium distribution in the pearled fractions of different winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Journal of Cereal Science*, 2018, 80: 94–101.
- [5] Wu J Z, Li Z T, Huang D, et al. A novel calcium-based magnetic biochar is effective in stabilization of arsenic and cadmium co-contamination in aerobic soils[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387: 122010.
- [6] Kumar S, Choudhary A K, Suyal D C, et al. Leveraging arsenic resistant plant growth-promoting rhizobacteria for arsenic abatement in crops[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425: 127965.
- [7] 胡贤巧, 张卫星, 邵雅芳, 等. 我国近 20 年稻米品质优质率状况分析[J]. *中国稻米*, 2021, 27(4): 84–87.
- [8] Chen X Y, Achal V. Biostimulation of carbonate precipitation process in soil for copper immobilization[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 368: 705–713.
- [9] Peng D H, Qiao S Y, Luo Y, et al. Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 400: 123116.
- [10] 王新花, 赵晨曦, 潘响亮. 基于微生物诱导碳酸钙沉淀 (MICP) 的铅污染生物修复[J]. *地球与环境*, 2015, 43(1): 80–85.
- [11] Song H W, Kumar A, Zhang Y L. Microbial-induced carbonate precipitation prevents Cd^{2+} migration through the soil profile[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 844: 157167.
- [12] Liu P, Zhang Y, Tang Q, et al. Bioremediation of metal-contaminated soils by microbially-induced carbonate precipitation and its effects on ecotoxicity and long-term stability[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 166: 107856.

- [13] Lyu C H, Qin Y J, Chen T, et al. Microbial induced carbonate precipitation contributes to the fates of Cd and Se in Cd-contaminated seleniferous soils[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423(Pt A): 126977.
- [14] Song M Z, Ju T Y, Meng Y, et al. A review on the applications of microbially induced calcium carbonate precipitation in solid waste treatment and soil remediation[J]. *Chemosphere*, 2022, 290: 133229.
- [15] Ma H, Wei M Y, Wang Z R, et al. Bioremediation of cadmium polluted soil using a novel cadmium immobilizing plant growth promotion strain *Bacillus* sp. TZ5 loaded on biochar[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122065.
- [16] 李倩, 张平, 廖柏寒, 等. 一株耐 Cd 菌株的分离、鉴定及基本特性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(1): 11–24.
- [17] Fang L Y, Niu Q J, Cheng L, et al. Ca-mediated alleviation of Cd²⁺ induced toxicity and improved Cd²⁺ biomineralization by *Sporosarcina pasteurii*[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 787: 147627.
- [18] Achal V, Pan X L. Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 173(1): 307–317.
- [19] 刘娟, 张乃明, 于泓, 等. 重金属污染对水稻土微生物及酶活性影响研究进展[J]. *土壤*, 2021, 53(6): 1152–1159.
- [20] Pueyo M, López-Sánchez J F, Rauret G. Assessment of CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃ extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 504(2): 217–226.
- [21] Ghorbanzadeh N, Abdulrahimi S, Forghani A, et al. Bioremediation of cadmium in a sandy and a clay soil by microbially induced calcium carbonate precipitation after one week incubation[J]. *Arid Land Research and Management*, 2020, 34(3): 319–335.
- [22] Li X D, Ma H, Li L L, et al. Subcellular distribution, chemical forms and physiological responses involved in cadmium tolerance and detoxification in *Agrocybe Aegerita*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 66–74.
- [23] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [24] Achal V, Pan X L. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 894–902.
- [25] 姚志鹏, 李兆君, 梁永超, 等. 土壤酶活性对土壤中土霉素的动态响应[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(3): 696–700.
- [26] Yu P J, Tang X G, Zhang A C, et al. Responses of soil specific enzyme activities to short-term land use conversions in a salt-affected region, northeastern China[J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 687: 939–945.
- [27] Konstantinou C, Wang Y Z, Biscontin G, et al. The role of bacterial urease activity on the uniformity of carbonate precipitation profiles of bio-treated coarse sand specimens[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 6161.
- [28] 叶文玲, 周于杰, 晏士玮, 等. 微生物成矿技术在环境砷污染治理中的应用研究进展[J]. *土壤学报*, 2021, 58(4): 862–875.
- [29] 王晖, 王敏, 汤鼎, 等. Ca²⁺ 添加对微生物矿化固结 Cd²⁺ 的影响[J]. *环境化学*, 2021, 40(3): 859–867.
- [30] Yi H H, Zheng T W, Jia Z R, et al. Study on the influencing factors and mechanism of calcium carbonate precipitation induced by urease bacteria[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2021, 564: 126113.
- [31] 龚伟, 王伯初. 钙离子在植物抵抗非生物胁迫中的作用[J]. *生命的化学*, 2011, 31(1): 107–111.
- [32] 李成杰, 魏桃员, 季斌, 等. 不同钙源及 Ca²⁺ 浓度对 MICP 的影响[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(3): 30–34.
- [33] Xu X C, Guo H X, Li M, et al. Bio-cementation improvement via CaCO₃ cementation pattern and crystal polymorph: A review[J]. *Construction and Building Materials*, 2021, 297: 123478.
- [34] Kang C H, Shin Y, Anbu P, et al. Biosequestration of copper by bacteria isolated from an abandoned mine by using microbially induced calcite precipitation[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2016, 62(4): 206–212.
- [35] 谭向平, 何金红, 郭志明, 等. 土壤酶对重金属污染的响应及指示研究进展[J]. *土壤学报*, 2023, 60(1): 50–62.
- [36] Bhattacharya A, Naik S N, Khare S K. Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB19 for remediation of heavy metal cadmium (II)[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 215: 143–152.
- [37] Zhao Y, Yao J, Yuan Z M, et al. Bioremediation of Cd by strain GZ-22 isolated from mine soil based on biosorption and microbially induced carbonate precipitation[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(1): 372–380.
- [38] Carafoli E, Krebs J. Why calcium? how calcium became the best communicator[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(40): 20849–20857.