

DOI: 10.5846/stxb202104170997

孙乐妮, 吴兵兵, 徐志豪, 李泽龙, 张胜全, 杨恩东, 周佳慧. 两种镉积累型小麦根际微生物群落结构及功能多样性. 生态学报, 2022, 42(8): 3366-3376.

Sun L N, Wu B B, Xu Z H, Li Z L, Zhang S Q, Yang E D, Zhou J H. Rhizosphere microbial community structure and functional diversity in two Cd-accumulating wheat cultivars. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(8): 3366-3376.

## 两种镉积累型小麦根际微生物群落结构及功能多样性

孙乐妮<sup>1,\*</sup>, 吴兵兵<sup>1</sup>, 徐志豪<sup>1</sup>, 李泽龙<sup>1</sup>, 张胜全<sup>2</sup>, 杨恩东<sup>1</sup>, 周佳慧<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036

<sup>2</sup> 北京市农林科学院北京杂交小麦工程技术研究中心, 北京 100097

**摘要:** 为探究不同积累型小麦品种对根际微生物群落结构及功能多样性的影响, 以镉低积累型小麦济麦 22 和镉高积累型小麦冀 5265 为研究材料, 采用分离培养法和 Biolog-Eco 微平板法分析根际细菌数量、可培养优势群落结构以及微生物群落功能多样性。结果表明: 污染土壤济麦 22 根际总细菌数量和抗 Cd 细菌数量均显著高于冀 5265, 而非污染土壤中两品种间无差异。污染土济麦 22 根际发现较多产脲酶和高镉抗性菌株 (200 mg/L)。污染土济麦 22 根际优势菌多为 *Arthrobacter* sp. 和 *Bacillus* sp., 冀 5265 根际优势菌主要为 *Streptomyces* sp.; 非污染土济麦 22 与冀 5265 根际优势菌群相似, 均以 *Bacillus* sp. 为主。Biolog 试验结果表明, 两个小麦品种根际微生物群落对碳源的利用能力存在差异, 济麦 22 根际微生物 AWCD 值、Mc Intosh 指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数在污染土和无污染土中均显著高于冀 5265。因此, 污染土壤中不同积累型小麦品种根际微生物群落结构及功能多样性均存在差异, 该研究结果对于揭示高低积累型小麦根际微生物机制提供了重要参考依据。

**关键词:** 小麦; 镉高低积累型; Biolog-Eco 微平板; 根际微生物群落结构; 功能多样性

## Rhizosphere microbial community structure and functional diversity in two Cd-accumulating wheat cultivars

SUN Leni<sup>1,\*</sup>, WU Bingbing<sup>1</sup>, XU Zhihao<sup>1</sup>, LI Zelong<sup>1</sup>, ZHANG Shengquan<sup>2</sup>, YANG Endong<sup>1</sup>, ZHOU Jiahui<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

<sup>2</sup> Beijing Engineering Research Center for Hybrid Wheat, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

**Abstract:** In order to investigate the effects of the different accumulating wheat cultivars on rhizosphere microorganism community structure and functional diversity, low Cd-accumulating wheat Jimai 22 (JM22) and high Cd-accumulating wheat Ji 5265 (JI5265) were planted in pots filled with contaminated soil and non-contaminated soil and collected at the tillering stage of wheat. In total, four experimental treatments were set up, containing JM22 grown in contaminated soil (CJM), JI5265 grown in contaminated soil (CJI), JM22 grown in non-contaminated soil (NJM) and JI5265 grown in non-contaminated soil (NJI). The number of rhizosphere bacteria, community structure of culturable dominant bacteria and microbial community functional diversity were analyzed by traditional dilution plate culture method and Biolog-Eco microplate method. The results from the standard spread-plate method showed that the population of total bacteria and Cd-resistant bacteria in rhizosphere soil of JM22 were significantly higher than those of JI5265 in contaminated soil, but there was no significant difference in the population of total bacteria and Cd-resistant bacteria of rhizosphere soil between the two different accumulating wheat cultivars in non-contaminated soil. Studies on the biological characteristics of the isolated strains showed that more urease producing bacterial strains and Cd-resistant bacterial strains (200 mg/L) in rhizosphere soil

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (2008085MD120); 北京市农林科学院创新能力建设专项 (KJCX20210439)

收稿日期: 2021-04-17; 网络出版日期: 2021-12-17

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: sunleni@126.com

of JM22 grown in contaminated soil were isolated than those of JI5265 grown in contaminated soil. Based on 16S rRNA gene sequences analysis, bacterial community composition was different in rhizosphere soil between cultivar JM22 and cultivar JI5265 in contaminated soil. Most of the dominant rhizosphere bacteria in JM22 were identified as *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp., while *Streptomyces* sp. predominated in rhizosphere soil of wheat JI5265 in contaminated soil. The dominant rhizosphere bacteria in JM22 and JI5265 grown in non-contaminated soil were similar, and they were mainly *Bacillus* sp. The Biolog-Eco plate experiment results showed that there were differences in the utilization of carbon sources between the two wheat cultivars, and the average well color development (AWCD) values, Mc Intosh index, Shannon-Wiener index and Simpson index of rhizosphere microbes of wheat cultivar JM22 were significantly higher than those of cultivar JI5265 in both contaminated soil and non-contaminated soil after 120 h of incubation. Taken together, the community structure and functional diversity of rhizosphere microorganisms in the two Cd-accumulating wheat cultivars grown in contaminated soil were different. The results provide an important reference for understanding the rhizosphere microbial mechanism in high and low accumulating wheats.

**Key Words:** wheat; high and low Cd-accumulating type; Biolog-Eco microplate; rhizosphere microbial community structure; functional diversity

随着工业化的发展,矿山开采、燃煤发电和工业废水排放等大量工业活动,导致土壤重金属污染日益严重,直接或间接地影响了土壤质量<sup>[1]</sup>。2014年,国家发布的《全国土壤污染状况调查公报》显示,我国土壤总体污染较为严重,主要受到了Cd、Cr、Pb和Cu等重金属污染<sup>[2]</sup>。重金属镉毒性较大,迁移性强,对于农作物的生长发育有毒害作用,进而通过食物链直接或间接影响人体健康。长期食用含Cd的食物,会导致人体代谢异常,钙及磷元素缺失,危害人体肺和肝等重要器官,影响身体健康。

小麦是世界上最主要的粮食作物之一,在世界农业生产中占据重要地位。农田重金属污染对小麦安全生产已产生潜在危害,一些地区小麦籽粒重金属含量存在超过中国国家食品安全标准(GB2762—2017)现象<sup>[3-4]</sup>。研究者们发现不同小麦品种耐受重金属及吸收积累重金属能力存在差异<sup>[5-8]</sup>。利用小麦吸收积累重金属在不同品种间的差异性,筛选用于作物安全生产的低积累型品种,是应对农田重金属污染的解决策略之一<sup>[9]</sup>。

根际微生物作为土壤-植物生态系统的重要连接载体,不仅参与土壤物质循环、保持土壤肥力,而且对土壤中重金属的迁移、转化以及植物生长发育、对环境的适应性起重要作用。接种根际微生物 *Streptomyces pactum* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 能通过活化或钝化土壤重金属,改变重金属的生物有效性,提高或降低小麦对重金属的吸收<sup>[10-11]</sup>。接种微生物也能调节小麦生理生化特性,改善对不良环境的抗氧化胁迫能力<sup>[12-13]</sup>。由此可见,小麦根际微生物菌群在提高或阻控小麦吸收重金属、增强环境适应性方面发挥重要作用,有必要加强小麦根际微生物菌群研究,以加深对微生物-小麦相互作用机制的理解。小麦根际微生物群落结构虽已见报道,但相关研究仅限于单一品种或重金属胁迫对单一品种根际微生物的研究<sup>[14-16]</sup>。随着作物品种在安全生产中重要作用的充分体现,不同积累型作物重金属吸收富集能力、亚细胞分布、根际化学特点比较已见报道<sup>[7,17-18]</sup>,但重金属高低不同积累型小麦根际微生物群落结构与功能研究鲜见报道。本研究采用菌株分离培养技术结合 Biolog 微平板技术分析两种不同镉积累型小麦根际微生物群落结构与功能多样性差异,研究结果有利于深入理解镉低积累型小麦根际微生物菌群特征,为在中低污染土壤中利用微生物调控小麦安全生产提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

重金属Cd污染土壤采自安徽庐江岳山矿区周边农田,非污染土壤采自安徽农业大学农萃园农田。小麦

品种为镉高积累型冀 5265(JI5265)和镉低积累型济麦 22(JM22)<sup>[8]</sup>。

LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl10 g,蒸馏水 1000 mL,琼脂 20 g,pH 7.2。重金属抗性细菌筛选固体培养基:分别配制重金属母液和 LB 培养基,单独灭菌后,取不同量重金属母液加入到 LB 培养基中,得到不同浓度梯度的重金属抗性固体培养基。脲酶培养基<sup>[19]</sup>:蛋白胨 1 g,葡萄糖 1 g,氯化钠 5 g,磷酸二氢钾 2 g,酚红 0.012 g,2%尿素,蒸馏水 1000 mL,琼脂 20 g,pH 7.0。其中,尿素水溶后过滤除菌加入灭菌后的培养基。

## 1.2 小麦盆栽试验

将土壤风干过筛后分别装入盆中(h18 cm×Φ26 cm),每盆装土 3.0 kg。盆栽试验设置 4 个处理:污染土济麦 22(CJM)、污染土冀 5265(CJI)、非污染土济麦 22(NJM)和非污染土冀 5265(NJI),每个处理设置 3 个重复,共 12 盆。每盆播种 12 粒小麦种子,各盆随机放置于室外。待小麦长至分蘖期,采收小麦,收集根际 1—2 mm 范围内的根际土,用于根际土壤微生物分析。

## 1.3 根际可培养细菌分离及数量测定

取小麦根际土壤各 1 g,分别加入到装有 99 mL 无菌蒸馏水的三角瓶中,放置于 28℃ 摇床内振荡 30 min。取样做十倍梯度系列稀释,得到  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  土壤悬液,分别取 100 μL 稀释液涂布在不含  $\text{Cd}^{2+}$  和含  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 25 mg/L( $\text{CdCl}_2$ )的 LB 固体平板上,置于 28℃ 生化培养箱中培养 72 h 后对平板上菌落进行计数,并计算每克土壤中具有抗 Cd 细菌数量和总细菌数量。挑取高稀释度平板上的优势菌落进行多次划线分离纯化,并将菌种保存于 -80℃ 备用。

## 1.4 菌株 16S rDNA 序列分析

对分离菌株参照《DNA-EZ Reagents V All-DNA-Fast-Out》试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA,保存于 -80℃ 冰箱。PCR 反应参考文献<sup>[20]</sup>方法进行。正向引物为 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 1492R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3',以细菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系(50 μL):10 × buffer 5 μL,25 mM  $\text{MgCl}_2$  3 μL,上游引物 27F 和下游引物 1492R 各 2 μL,2.5 mM dNTP 1 μL,Taq DNA polymerase 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。取 2 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物送上海生工进行测序。将序列提交 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 Blast 比对,确定物种信息。序列用 BLAST 程序与 GenBank 数据库中的典型菌株序列进行比对分析,选取相似性较高的典型菌株 16S rDNA 序列,经 Clustal X1.83 进行自动排序比对后,用 MEGA7.0 软件 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

## 1.5 根际优势可培养细菌生物学特性

菌株脲酶活性测定:将目标菌株划线接种到脲酶培养基上,28℃ 培养 48 h 后观察现象,若菌苔周围培养基变红,则该菌株产脲酶活性为阳性<sup>[19]</sup>。菌株的镉抗性测定:将菌种接种到不同重金属浓度的固体培养基上(重金属终浓度如下: $\text{Cd}^{2+}$  50、100、200 mg/L),28℃ 培养 3—5 d,观察菌株是否能够生长,若能生长,则该菌株对重金属镉有抗性<sup>[21]</sup>。

## 1.6 Biolog-Eco 微平板分析

利用 Biolog-Eco 微平板法评价根际土壤微生物的功能多样性。将  $10^{-3}$  根际土壤稀释液接种 Biolog-Eco 生态测试板,每孔接种 150 μL,每个样品三个重复,加盖置于 25℃ 的培养箱中保湿避光培养 8 d,定时用酶标仪读取 590 nm 吸光值。

Biolog-Eco 微平板法测定的每孔平均颜色变化率(average well color development, AWCD)是土壤微生物代谢活性的重要指标。土壤微生物群落功能多样性指数采用 Shannon-Wiener 指数(H)、Mc Intosh 指数(U)、Simpson 指数(D)和 Pielou 指数(J)。

$$AWCD = \sum_{i=1}^n (C_i - R)/n$$

$$H = - \sum P_i \ln P_i$$

$$U = \sqrt{\sum n_i^2}$$

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

$$J = H/\ln S$$

式中,  $P_i$  为第  $i$  孔的相对吸光值与整个微平板所有相对吸光值总和的比值  $(C_i - R) / \sum (C_i - R)$ ;  $S$  为被利用的碳源总数, 即  $C_i - R > 0$  的孔的数目;  $n_i$  为第  $i$  孔的相对吸光值, 即  $(C_i - R)$ ;  $C_i$  为第  $i$  个非对照孔的吸光值;  $R$  为对照孔的吸光值;  $n$  为培养基碳源种类数 31。

### 1.7 数据处理

数据采用 Microsoft Excel Office 2019 进行处理并作图; 采用 SPSS17.0 进行数据单因素方差分析, Duncan 检验方法进行数据差异显著性分析 ( $P < 0.05$  差异显著)。采用 Canoco for Windows 5.0 软件, 利用培养 120 h AWCD 值对不同土壤中小麦根际微生物碳源代谢多样性进行主成分分析 (PCA)。

## 2 结果与分析

### 2.1 根际可培养细菌数量

不同小麦品种根际细菌数量如表 1 所示。污染土壤和非污染土壤中济麦 22 根际总细菌数量分别是冀 5265 的 6.4 倍和 1.57 倍。污染土中济麦 22 抗 Cd 细菌数量最高, 为  $8.25 \times 10^6$  cfu/g, 占总细菌数的 51%。污染土壤中济麦 22 根际总细菌数量和抗 Cd 细菌数量均显著高于冀 5265 ( $P < 0.05$ ), 而两者于非污染土壤中无显著差异。对不同土壤而言, 污染土中济麦 22 根际总细菌数量、抗性细菌数量以及抗性细菌比例均显著高于非污染土; 污染土中冀 5265 根际抗性细菌数量以及抗性细菌比例均高于非污染土。镉污染土壤中抗性细菌数量以及抗性细菌比例均明显高于非污染土壤。

表 1 不同土壤栽培下小麦根际细菌数量

Table 1 The number of rhizosphere bacteria in wheat under different soil cultivation

| 处理<br>Treatment | 总细菌<br>Total bacteria/( $10^6$ cfu/g) | 镉抗性细菌<br>Cd resistant bacteria/( $10^6$ cfu/g) | 抗性细菌比例<br>Proportion of resistant bacteria/% |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| CJM             | 16.00a                                | 8.25a                                          | 51.56                                        |
| CJI             | 2.51b                                 | 2.19b                                          | 87.60                                        |
| NJM             | 5.50b                                 | 0.47c                                          | 8.45                                         |
| NJI             | 3.54b                                 | 0.23c                                          | 6.57                                         |

CJM: 污染土济麦 22 JM22 grown in contaminated soil; CJI: 污染土冀 5265 JI5265 grown in contaminated soil; NJM: 非污染土济麦 22 JM22 grown in non-contaminated soil; NJI: 非污染土冀 5265 JI5265 grown in non-contaminated soil; 同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

### 2.2 根际优势可培养细菌鉴定及生物学特性

采用稀释涂布平板法分离获得小麦根际优势细菌总计 34 株 (表 2), 经鉴定属于 4 个菌门、9 个属, 产脲酶细菌 14 株, 占总细菌数 41.2%, 镉抗性细菌 (200 mg/L) 7 株, 以邻接法构建的系统发育树如图 1。研究发现, 污染土济麦 22 的根际细菌鉴定为 Actinobacteria 门 *Arthrobacter* spp. (4 株)、*Pseudarthrobacter* spp. (2 株)、*Paenarthrobacter* sp. (1 株) 和 Firmicutes 门 *Bacillus aerophilus* (1 株)、*Bacillus megaterium* (1 株) 和 *Bacillus* sp. (1 株), 其中产脲酶菌株 7 株, 镉抗性细菌 5 株; 污染土冀 5265 小麦根际细菌为 Actinobacteria 门 *Streptomyces* spp. (3 株)、*Microbacterium marinum* (1 株)、*Pseudarthrobacter* sp. (1 株) 以及 Alphaproteobacteria 门 *Agrobacterium* spp. (2 株) 和 Firmicutes 门 *Bacillus* sp. (1 株), 其中产脲酶菌株 2 株, 镉抗性细菌 2 株; 非污染土济麦 22 的根际细菌为 *Bacillus aerophilus* (4 株)、*Bacillus* sp. (1 株)、*Agrobacterium* spp. (2 株)、*Ensifer adhaerens* (1 株), 产脲酶菌株 4 株; 非污染土冀 5265 小麦根际细菌为 *Bacillus aerophilus* (4 株)、*Bacillus* sp. (1 株)、*Agrobacterium* spp. (2 株) 和 *Pantoea dispersa* (1 株), 产脲酶菌株 1 株。

小麦根际微生物优势菌存在品种间和土壤间差异。污染土中济麦 22 根际细菌以放线菌门节杆菌属 (*Arthrobacter*) 和厚壁菌门芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为主, 冀 5265 根际优势菌以放线菌门链霉菌属 (*Streptomyces*) 为主, 污染土中两者根际优势菌群差异较大, 而非污染土中两者根际优势菌群较相似。污染胁迫使小麦根际

优势菌发生变化,但都以放线菌门为主。污染土中济麦、冀麦及非污染土中济麦、冀麦根际细菌产脲酶比例分别为 70%、25%、50%、12.5%。济麦根际产脲酶细菌比例高于冀麦,污染土小麦根际产脲酶细菌比例高于非污染土根际。污染土根际细菌中 38.9% (7 株) 菌株耐受 200 mg/L Cd,而非污染土根际细菌菌株均不耐受 200 mg/L Cd。污染土济麦根际与冀麦根际耐受 200 mg/L Cd 的菌株分别占 50% 和 25%。根际产脲酶细菌和重金属抗性细菌受小麦品种和土壤污染程度影响。

表 2 分离菌株的鉴定及生物学特性

Table 2 Identification and biological characteristics of isolated strains

| 菌株编号<br>Strain number | 门<br>Phylum         | 最相近物种<br>Closest similarity species                            | 相似度<br>Similarity/% | 脲酶<br>Urease | Cd 耐受性<br>Tolerance to<br>Cd/(200 mg/L) |
|-----------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------|--------------|-----------------------------------------|
| CJ1                   | Actinobacteria      | <i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 <sup>T</sup>                 | 99.57               | +            | +                                       |
| CJ3                   |                     | <i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545 <sup>T</sup>             | 98.70               | +            | +                                       |
| CJ5                   |                     | <i>Pseudarthrobacter niigatensis</i> LC4 <sup>T</sup>          | 99.86               | -            | -                                       |
| CJ8                   |                     | <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 <sup>T</sup>    | 99.64               | +            | +                                       |
| CJ10                  |                     | <i>Arthrobacter enclensis</i> NIO-1008 <sup>T</sup>            | 98.43               | +            | +                                       |
| CJ11                  |                     | <i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545 <sup>T</sup>             | 98.71               | +            | -                                       |
| CJ12                  |                     | <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> Sphe3 <sup>T</sup> | 98.78               | -            | +                                       |
| CJ2                   | Firmicutes          | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | -            | -                                       |
| CJ6                   |                     | <i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 <sup>T</sup>            | 100                 | +            | -                                       |
| CJ61                  |                     | <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 <sup>T</sup>             | 99.93               | +            | -                                       |
| NJ1                   |                     | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | -            | -                                       |
| NJ5                   | Firmicutes          | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | +            | -                                       |
| NJ6                   |                     | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | -            | -                                       |
| NJ8                   |                     | <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <sup>T</sup>                 | 99.93               | -            | -                                       |
| NJ9                   |                     | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 100                 | -            | -                                       |
| NJ4                   |                     | <i>Ensifer adhaerens</i> NBRC 100388 <sup>T</sup>              | 99.93               | +            | -                                       |
| NJ7                   |                     | <i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup>              | 99.85               | +            | -                                       |
| NJ10                  |                     | <i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup>              | 99.56               | +            | -                                       |
| CG1                   | Actinobacteria      | <i>Streptomyces panaciradicis</i> 1MR-8 <sup>T</sup>           | 99.93               | -            | -                                       |
| CG2                   |                     | <i>Streptomyces gilvifuscus</i> T113 <sup>T</sup>              | 99.93               | +            | -                                       |
| CG5                   |                     | <i>Streptomyces panaciradicis</i> 1MR-8 <sup>T</sup>           | 99.85               | -            | -                                       |
| CG10                  |                     | <i>Microbacterium marinum</i> H101 <sup>T</sup>                | 100                 | -            | -                                       |
| CG12                  |                     | <i>Pseudarthrobacter defluvi</i> 4C1-a <sup>T</sup>            | 99.42               | -            | +                                       |
| CG3                   | Alphaproteobacteria | <i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup>              | 99.71               | -            | -                                       |
| CG7                   |                     | <i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup>              | 99.85               | -            | -                                       |
| CG4                   | Firmicutes          | <i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 <sup>T</sup>            | 99.89               | +            | +                                       |
| NG1                   | Firmicutes          | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | -            | -                                       |
| NG2                   |                     | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 100                 | -            | -                                       |
| NG6                   |                     | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | -            | -                                       |
| NG8                   |                     | <i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 <sup>T</sup>            | 99.79               | -            | -                                       |
| NG9                   |                     | <i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup>                    | 99.93               | -            | -                                       |
| NG10                  |                     | <i>Agrobacterium</i> sp. RZME10 <sup>T</sup>                   | 99.41               | -            | -                                       |
| NG11                  |                     | <i>Agrobacterium pusense</i> NRCPB10 <sup>T</sup>              | 99.85               | +            | -                                       |
| NG12                  |                     | <i>Pantoea dispersa</i> DSM 30073 <sup>T</sup>                 | 99.79               | -            | -                                       |

CG、CJ、NG 和 NJ 分别表示相应的菌株分离自污染土冀 5265、污染土济麦 22、非污染土冀 5265 和非污染土济麦 22;+,表示脲酶阳性或耐受相应浓度镉

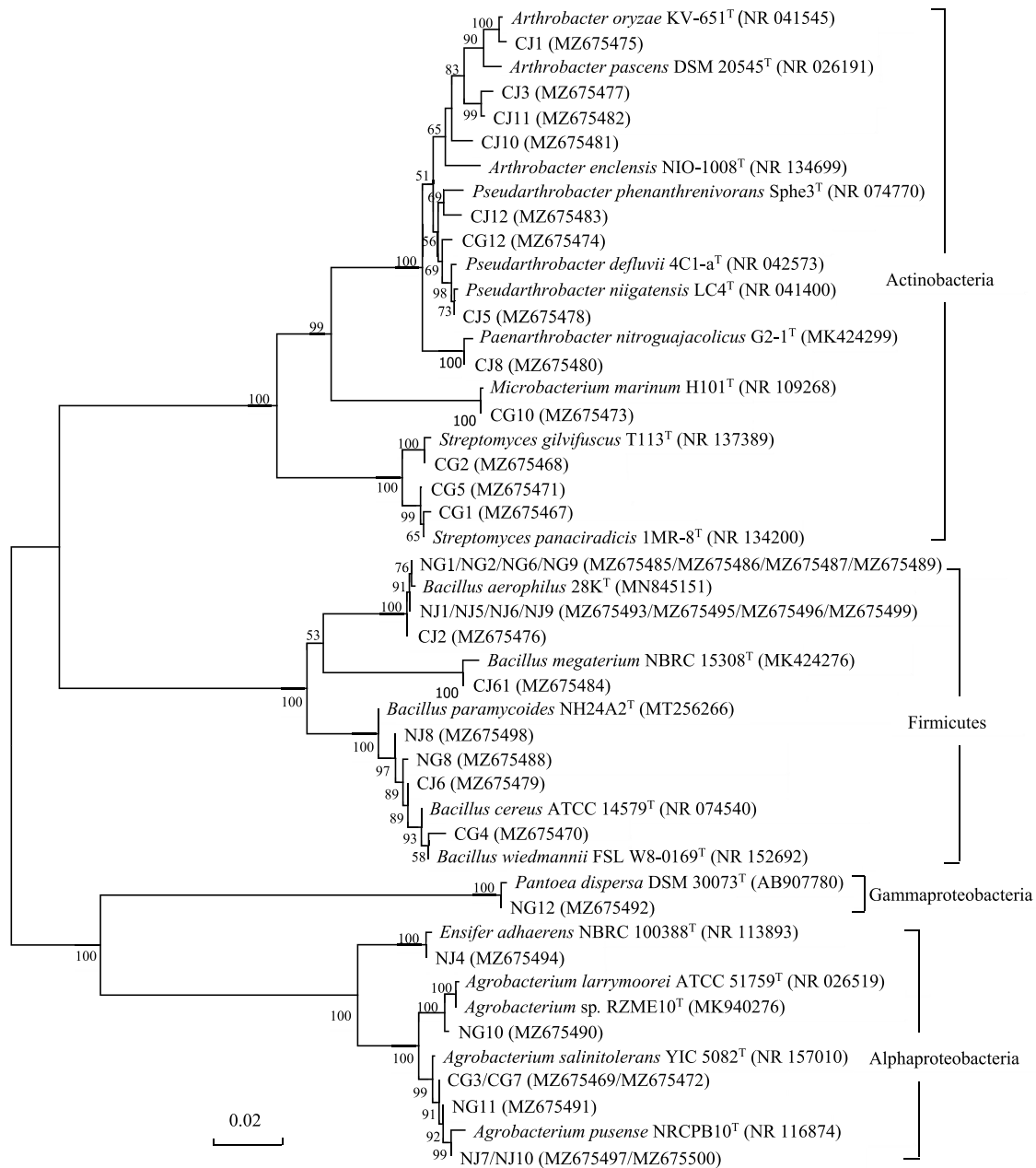


图1 小麦根际细菌 16S rRNA 基因系统发育树

Fig.1 Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships of wheat rhizobacteria based on 16S rRNA gene sequences

分支点数字为 Bootstrap 值,代表分类单位被聚在一起的几率;比例尺显示水平线的长度,代表碱基替换数;括号里的内容为 GenBank 登录号

## 2.3 小麦根际微生物群落碳源代谢利用能力分析

### 2.3.1 碳源代谢活性动力学分析

平均颜色变化率(AWCD)表示土壤微生物群落对 31 种碳源的利用能力和代谢活性变化,体现了土壤微生物群落生理功能多样性。由图 2 可知,不同土壤栽培的小麦根际微生物 AWCD 值随着培养时间的延长而逐渐升高。24 h 之前 AWCD 值几乎保持不变,表明碳源没有被微生物利用。在 24—120 h 之间 AWCD 值增长速率较快,表明碳源被快速利用,微生物代谢活性明显增强。120 h 以后增长速率减缓并于 144 h 后趋于稳定。对于小麦品种济麦 22,24—120 h 污染土壤 AWCD 值高于非污染土壤,而 144 h 以后非污染土 AWCD 值高于污染土。济麦 22 的污染土壤 AWCD 值与非污染土壤有显著差异( $P<0.05$ ),表明同一种小麦,根际微生物

物组成会受栽培土壤影响。在整个培养过程中,冀 5265 的污染土与非污染土 AWCD 值无显著差异,说明这种小麦的两种根际土壤微生物碳源代谢能力几乎相同,几乎不受土壤类型影响。污染土壤和非污染土壤中济麦 22 AWCD 值均显著大于冀 5265,表明济麦 22 根际微生物对碳源的利用能力大于冀 5265,济麦 22 根际微生物代谢活性更强。

### 2.3.2 碳源类型利用特征

将 Biolog-Eco 板 31 种碳源分为 6 大类,根据 120 h 测定的 31 个孔 AWCD 值进行碳源利用分析。由图 3 可知,污染土壤栽培的济麦 22 根际微生物对碳水化合物类、氨基酸类、羧酸类、多聚物类、酚酸类、胺类 6 类碳源的利用强度均很高,且都显著高于污染土壤中冀 5265 ( $P<0.05$ ),其中,对胺类化合物的利用差异极显著 ( $P<0.001$ )。非污染土中济麦 22 仅对羧酸类碳源利用强度显著高于冀 5265,而其它碳源间无显著差异,说明非污染土壤中济麦 22 根际微生物菌群与冀 5265 较相近。对于济麦 22,污染土壤中对各类碳源利用强度均高于非污染土壤,且在氨基酸类、酚酸类、多聚物类和胺类这 4 大类碳源上存在显著差异 ( $P<0.05$ )。冀 5265 在污染土壤中对酚酸类利用强度与非污染土壤存在差异,其他各类碳源利用强度与非污染土壤无差异。同一品种小麦根际微生物对不同碳源的利用程度不同,对碳源利用水平总体上较高的是碳水化合物类、氨基酸类、羧酸类和多聚类。仅污染土壤中济麦 22 根际微生物对胺类有较高利用,而冀 5265 对胺类化合物利用基本趋于零。根际微生物对碳源利用能力不同可以反映根际微生物群落结构不同。

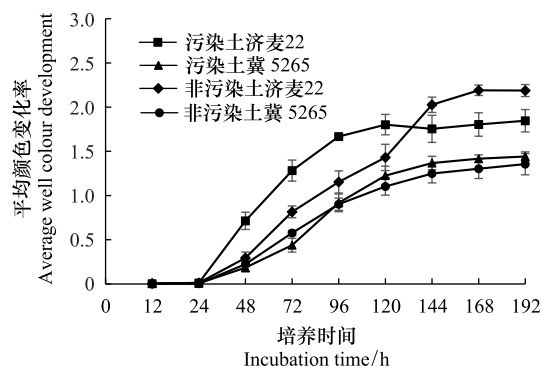


图2 不同土壤栽培下不同小麦根际微生物群落平均颜色变化率 AWCD 随时间的动态变化

Fig.2 Dynamics of AWCD of different wheat rhizosphere microorganisms in different soils

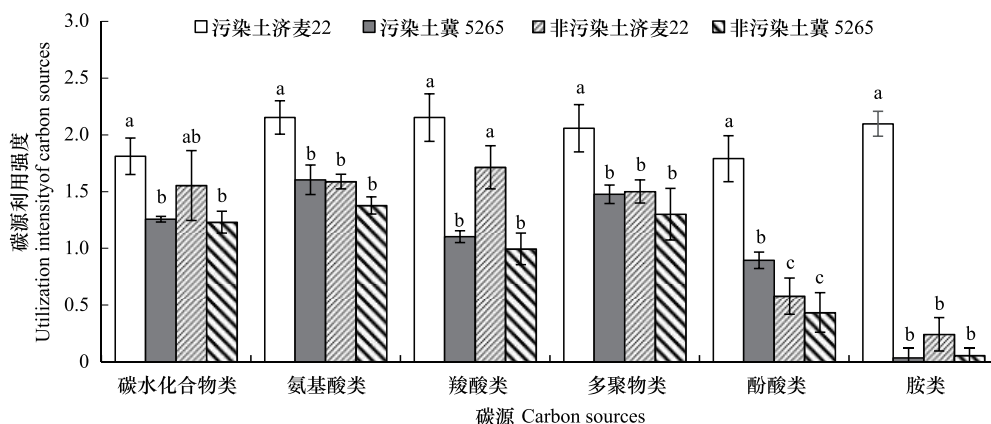


图3 不同土壤栽培下小麦根际微生物对六类碳源利用强度

Fig.3 Utilization intensities of six types of carbon sources by wheat rhizosphere microorganisms under different soil cultivation

同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

### 2.3.3 根际微生物群落代谢功能多样性指数

Mc Intosh 指数(U)用于描述基于群落物种多维空间上 Euclidian 距离的多样性指数,Simpson 指数(D)用于评估某些常见物种的优势度,Shannon-Wiener 指数(H)和 Pielou 指数(J)分别用于评估微生物群落的物种丰富度和物种均匀度。由表 3 可知,在两种土壤中济麦 22 的根际微生物 Mc Intosh 指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数均显著高于冀 5265 ( $P<0.05$ ),表明小麦根际微生物物种丰富度和优势度受到不同积累型小

麦品种影响。济麦 22 的 Mc Intosh 指数、Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数均表现为污染土壤明显高于非污染土壤,而冀 5265 则无显著差异。Pielou 指数在各处理间无显著差异,说明不同积累型小麦根际微生物均一性相似。冀 5265 根际微生物的 Mc Intosh 指数(U)、Shannon-Wiener 指数(H)、Simpson 指数(D)、Pielou 指数(J)均为最小,表明非污染土壤栽培的冀 5265 根际微生物均匀度和丰富度最小。

表 3 不同土壤栽培下不同小麦根际微生物 120 h AWCD 和多样性指数

Table 3 120 h AWCD and diversity index of wheat rhizosphere microorganism under different soil cultivation

| 处理<br>Treatment | 平均颜色变化率<br>AWCD | Mc Intosh<br>指数(U) | Shannon-Wiener<br>指数(H) | Simpson<br>指数(D) | Pielou<br>指数(J) |
|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------------|------------------|-----------------|
| CJM             | 1.98±0.11a      | 11.59±0.44a        | 3.37±0.03a              | 0.97±0.00a       | 0.99±0.00a      |
| CJI             | 1.23±0.11bc     | 8.15±0.59bc        | 3.21±0.06bc             | 0.95±0.00c       | 0.99±0.02a      |
| NJM             | 1.43±0.15b      | 8.94±0.70b         | 3.26±0.05b              | 0.96±0.00b       | 0.99±0.01a      |
| NJI             | 1.10±0.10c      | 7.33±0.64c         | 3.17±0.01c              | 0.95±0.00c       | 0.98±0.01a      |

AWCD: 平均颜色变化率 Average well color development; 同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

## 2.4 根际微生物碳源利用主成分分析

为了进一步明确不同小麦根际微生物群落功能和结构的差异,研究选取 120 h 各处理根际微生物对 31 种碳源的 AWCD 数据进行主成分分析。由图 4 可知,第一主成分(PC1)贡献率为 37.85%,第二主成分(PC2)贡献率为 15.53%。四组处理中,CJI 和 NJI 点阵主要集中于一三侧象限,CJM 和 NJM 点阵主要分布于右侧象限,表明小麦品种明显影响菌群结构。NJM 和 NJI 点阵主要集中于第一象限,相距较近,表明在非污染土中济麦 22 与冀 5265 菌群碳源代谢相似、菌群较相近;污染土壤中 CJM 与 CJI 分别偏离 NJM 和 NJI 点阵,表明污染土壤两种小麦根际微生物菌群与非污染相比均发生变化。

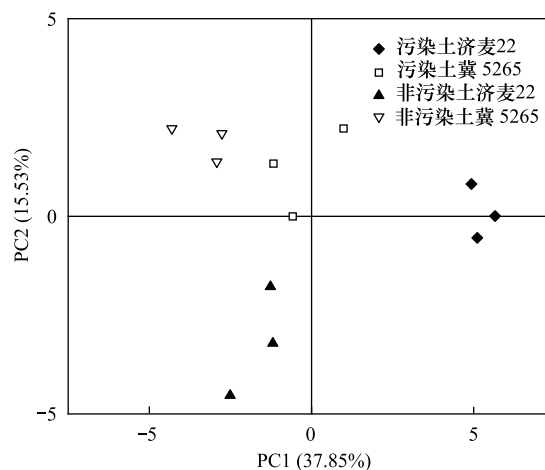


图 4 基于小麦根际微生物碳源利用的主成分分析

Fig.4 Principal components analysis (PCA) based on carbon source utilization of rhizosphere microorganism in wheat

## 3 讨论

土壤微生物是土壤生态系统中物质转化的重要驱动力,对植物生长发育具有重要作用。重金属污染对根际微生物的影响是复杂的,它会打破植物根际原有的微生物物种生态平衡,一方面会使不适应重金属的物种数量减少,另一方面会使适应生长的微生物种类数量增多<sup>[22-23]</sup>。本研究发现污染土壤中低积累型济麦 22 根际总细菌数量、抗 Cd 细菌数量显著高于非污染土壤济麦 22 和污染土壤高积累型冀 5265,同时济麦 22 的 AWCD 值高于冀 5265,这表明污染土壤中低积累型小麦根际细菌数量多、代谢活性更强,重金属污染刺激了济麦 22 根际细菌数量增长。产生这一结果的原因可能是,一方面重金属对根际微生物物种的选择性刺激或抑制作用,另一方面高低不同积累型小麦根系分泌物种类和数量存在差异<sup>[18]</sup>,导致了明显不同的根际效应。低积累型济麦 22 根际微生物的转变可能更有利于该小麦适应重金属污染环境。龚玉莲等<sup>[24]</sup>研究发现高低镉积累蔬菜根际微生物群落结构和功能差异显著,低积累型蔬菜 QLQ 根际微生物群落代谢活性明显高于高积累型蔬菜 T308,这与本研究结果相一致,但其根际细菌数量却低于高积累型蔬菜。本研究关于细菌数量结果与蔬菜不完全一致,这可能是由于不同植物种类根际效应不同,对重金属的吸收、耐受性以及根际化学环境的敏感程度不同。

根际微生物菌群多样性指数也表现出济麦 22 明显高于冀 5265,表明低积累型小麦根际微生物群落物种丰富度和优势度上存在明显优势。16S rDNA 序列分析表明,污染土壤中两种小麦品种根际优势细菌群落

组成也存在较多品种间差异。这些结果均表明两种不同积累型小麦品种根际微生物菌群多样性和组成存在差异,这与 Zhu 等<sup>[25]</sup>利用磷脂脂肪酸技术分析发现 7 种杂交水稻品种根际特异性微生物群落存在差异结果相一致。同一土壤中高低积累型小麦根际微生物代谢活性、多样性、组成及数量等差异可能与植物根系分泌物有关<sup>[26]</sup>。根系分泌物为微生物生长提供重要的营养来源,对根际定殖微生物种类具有选择作用。不同生态型植物及重金属胁迫使根系分泌物组成和数量会存在差异<sup>[27-28]</sup>,这种差异会吸引不同的根际微生物聚集于植物根际<sup>[29-31]</sup>。根系分泌物-微生物-重金属三者间存在复杂的相互作用关系。

通过对可培养优势菌群 16S rDNA 序列分析,发现污染土壤中济麦 22 与冀 5265 根际优势菌物种差异较大,主要表现为济麦 22 以放线菌门的 *Arthrobacter* 和厚壁菌门 *Bacillus* 为主,冀 5265 根际优势菌以放线菌门 *Streptomyces* 为主,但非污染土壤中二者差异较小。根际微生物对植物根际环境变化较为敏感,在特定的胁迫环境中植物会招募能够缓解植物自身胁迫压力的特定微生物种群聚集于根际<sup>[32-33]</sup>。本研究发现在遭受重金属胁迫后两种小麦根际优势菌群分别发生改变,但都以放线菌门为主,这与邵宗圆等<sup>[34]</sup>研究相一致。*Arthrobacter* sp. 能吸附重金属,减少环境中重金属生物有效性<sup>[35]</sup>。*Bacillus* sp. 能提高小麦抗氧化防御系统,减轻重金属胁迫产生的氧化损伤<sup>[36]</sup>,并能减少植物对重金属的吸收积累<sup>[37]</sup>。Ali 等<sup>[10]</sup>发现接种 *Streptomyces* sp. 能增强小麦对重金属的吸收积累。*Arthrobacter*<sup>[38-39]</sup>,*Bacillus*<sup>[40-41]</sup>,*Streptomyces*<sup>[42]</sup>等菌都是重金属污染土壤及耐性植物根际的优势菌群,这些细菌对调节植物耐受重金属及吸收积累重金属具有重要作用。*Bacillus* 和 *Streptomyces* 分别能通过产生内生芽孢和孢子增强对外界不良环境的耐受性。本研究中重金属胁迫使两种小麦分别招募这些特定的微生物类群,可能对帮助其应对重金属胁迫具有重要作用。

根际功能微生物在调节植物吸收积累重金属中发挥重要作用。产脲酶细菌通过生物矿化作用降低重金属生物有效性及作物对重金属吸收积累,保障作物安全生产已引起关注<sup>[43-44]</sup>。产脲酶细菌能分解尿素为  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{CO}_3^{2-}$ ,一方面能提高土壤 pH 值,同时  $\text{CO}_3^{2-}$  能与重金属离子形成碳酸盐沉淀,减少重金属生物有效性,钝化土壤重金属。本研究对分离菌株产脲酶情况进行初步研究,发现济麦根际分离出产脲酶菌株较多,且污染土壤会刺激产脲酶菌比例升高。高比例产脲酶细菌会导致小麦根际 pH 升高,根际有效态重金属减少,致使植物吸收积累重金属减少<sup>[45]</sup>,这与济麦的低积累能力相一致。根际重金属有效性和赋存状态可能是导致污染土壤中济麦和冀麦根际微生物群落结构不同的原因之一。此外,研究发现污染土中济麦根际微生物对胺类碳源利用明显高于其他处理,这可能是由于植物应对环境的适应性,根系分泌物组成发生改变产生较多胺类物质,以及根际较多脲酶细菌分解尿素产生  $\text{NH}_4^+$ ,形成更多胺类物质,刺激了根际微生物菌群向能利用该类物质转变。低积累型小麦与产脲酶菌株及胺类物质间可能存在复杂的互作关系,还有待进一步深入研究。

### 3 结论

(1) 土壤污染胁迫促使不同积累型小麦根际抗性细菌数量及所占比例提高,低积累型济麦 22 根际抗性细菌数量高于高积累型冀 5265。

(2) 土壤污染胁迫使小麦根际优势菌群发生改变,济麦 22 根际优势菌以 *Arthrobacter* sp. 和 *Bacillus* sp. 为主,冀 5265 以 *Streptomyces* sp. 为主,而非污染土中两者根际优势菌群较相似。

(3) 低积累型小麦在污染土壤胁迫下根际会聚集大量产脲酶细菌和重金属抗性细菌,可能与小麦低量吸收积累重金属及其耐受性有关。

(4) 两种不同积累型小麦品种根际微生物群落功能多样性存在显著差异,低积累型小麦根际微生物代谢活性较强。

### 参考文献 (References):

- [1] 杨子鹏,肖荣波,陈玉萍,邓一荣,韩存亮,刘楚藩,高中原,黄淑婷,戴伟杰. 华南地区典型燃煤电厂周边土壤重金属分布、风险评估及来源分析. 生态学报, 2020, 40(14): 4823-4835.
- [2] 陈能场,郑煜基,何晓峰,李小飞,张晓霞. 《全国土壤污染状况调查公报》探析. 农业环境科学学报, 2017, 36(9): 1689-1692.
- [3] 刘海涛,陈一兵,田静,林超文. 成都平原不同种植模式下重金属镉污染风险和经济效益评价. 农业资源与环境学报, 2019, 36(2):

184-191.

- [ 4 ] Dai X P, Feng L, Ma X W, Zhang Y M. Concentration level of heavy metals in wheat grains and the health risk assessment to local inhabitants from Baiyin, Gansu, China. *Advanced Materials Research*, 2012, 518-523: 951-956.
- [ 5 ] 潘建清, 陆敏, 杨肖娥. 不同小麦品种灌浆期生长和镉积累的差异研究. *农业环境科学学报*, 2021, 40(4): 756-765.
- [ 6 ] 张欣, 王华忠, 王利, 岳洁瑜. 不同品种小麦幼苗耐镉差异. *江苏农业科学*, 2018, 46(7): 61-65.
- [ 7 ] Shi G L, Zhu S, Bai S N, Xia Y, Lou L Q, Cai Q S. The transportation and accumulation of arsenic, cadmium, and phosphorus in 12 wheat cultivars and their relationships with each other. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 299: 94-102.
- [ 8 ] Liu N, Huang X M, Sun L M, Li S S, Chen Y H, Cao X Y, Wang W X, Dai J L, Rinnan R. Screening stably low cadmium and moderately high micronutrients wheat cultivars under three different agricultural environments of China. *Chemosphere*, 2020, 241: 125065.
- [ 9 ] Wang L, Zhang Q Y, Liao X Y, Li X H, Zheng S N, Zhao F H. Phytoexclusion of heavy metals using low heavy metal accumulating cultivars: a green technology. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413: 125427.
- [ 10 ] Ali A, Guo D, Li Y M, Shaheen S M, Wahid F, Antoniadis V, Abdelrahman H, Al-Solaimani S G, Li R H, Tsang D C W, Rinklebe J, Zhang Z Q. *Streptomyces pactum* addition to contaminated mining soils improved soil quality and enhanced metals phytoextraction by wheat in a green remediation trial. *Chemosphere*, 2021, 273: 129692.
- [ 11 ] Rizvi A, Khan M S. Biotoxic impact of heavy metals on growth, oxidative stress and morphological changes in root structure of wheat (*Triticum aestivum* L.) and stress alleviation by *Pseudomonas aeruginosa* strain CPSB1. *Chemosphere*, 2017, 185: 942-952.
- [ 12 ] Lastochkina O, Pusenkova L, Yuldashev R, Babaev M, Garipova S, Blagova D, Khairullin R, Aliniaiefard S. Effects of *Bacillus subtilis* on some physiological and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. (wheat) under salinity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 121: 80-88.
- [ 13 ] Islam F, Yasmeen T, Ali Q, Ali S, Arif M S, Hussain S, Rizvi H. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104: 285-293.
- [ 14 ] 葛艺, 徐民民, 徐绍辉, 徐艳. 铜胁迫对小麦根系微域微生物群落的影响. *环境科学*, 2021, 42(2): 996-1003.
- [ 15 ] Latif S, Bibi S, Kouser R, Fatimah H, Farooq S, Naseer S, Kousar R. Characterization of bacterial community structure in the rhizosphere of *Triticum aestivum* L. *Genomics*, 2020, 112(6): 4760-4768.
- [ 16 ] 王宁, 姚晨, 贾瑞, 李本银, 马诗毓, 马闯, 张世敏, 李烜桢. 镉胁迫对苗期小麦镉吸收及其根际细菌群落的影响. *河南农业大学学报*. 2021, 55(3): 414-421.
- [ 17 ] 万敏, 周卫, 林葆. 镉积累不同类型的小麦细胞镉的亚细胞和分子分布. *中国农业科学*, 2003, 36(6): 671-675.
- [ 18 ] 万敏, 周卫, 林葆. 不同镉积累类型小麦根际土壤低分子量有机酸与镉的生物积累. *植物营养与肥料学报*, 2003, 9(3): 331-336.
- [ 19 ] Phang I R K, Chan Y S, Wong K S, Lau S Y. Isolation and characterization of urease-producing bacteria from tropical peat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 13: 168-175.
- [ 20 ] 孙乐妮, 何琳燕, 张艳峰, 张文辉, 王琪, 盛下放. 海州香薷 (*Elsholtzia splendens*) 根际铜抗性细菌的筛选及生物多样性. *微生物学报*, 2009, 49(10): 1360-1366.
- [ 21 ] 夏娟娟, 盛下放, 江春玉. 重金属镉抗性菌株的筛选及其对镉活化作用的研究. *生态学杂志*, 2005, 24(11): 1357-1360.
- [ 22 ] 孙瑞波, 盛下放, 李娅, 何琳燕. 南京栖霞重金属污染区植物富集重金属效应及其根际微生物特性分析. *土壤学报*, 2011, 48(5): 1013-1020.
- [ 23 ] 吴建军, 蒋艳梅, 吴愉萍, 徐建明. 重金属复合污染对水稻土微生物生物量和群落结构的影响. *土壤学报*, 2008, 45(6): 1102-1109.
- [ 24 ] 龚玉莲, 曾小龙, 曾碧健, 吕保玉, 王俊丽. 蔬菜镉积累典型品种根际微生物群落特征研究. *生态科学*, 2014, 33(1): 25-31.
- [ 25 ] Zhu Y J, Hu G P, Liu B, Xie H A, Zheng X F, Zhang J F. Using phospholipid fatty acid technique to analysis the rhizosphere specific microbial community of seven hybrid rice cultivars. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, 11(11): 1817-1827.
- [ 26 ] 杨阳, 刘守伟, 潘凯, 吴凤芝. 分蘖洋葱根系分泌物对黄瓜幼苗生长及根际土壤微生物的影响. *应用生态学报*, 2013, 24(4): 1109-1117.
- [ 27 ] 王艳红, 龙新宪, 吴启堂. 两种生态型东南景天根系分泌物的差异性. *生态环境*, 2008, 17(2): 751-757.
- [ 28 ] Sun L J, Cao X Y, Tan C Y, Deng Y Q, Cai R Z, Peng X, Bai J. Analysis of the effect of cadmium stress on root exudates of *Sedum plumbizincicola* based on metabolomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205: 111152.
- [ 29 ] Rudrappa T, Czymbek K J, Pare P W, Bais H P. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1547-1556.
- [ 30 ] Neal A L, Ahmad S, Gordon-Weeks R, Ton J. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35498.
- [ 31 ] el Zahar Haichar F, Marol C, Berge O, Rangel-Castro J I, Prosser J I, Balesdent J, Heulin T, Achouak W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2008, 2(12): 1221-1230.
- [ 32 ] Rodriguez P A, Rothballer M, Chowdhury S P, Nussbaumer T, Gutjahr C, Falter-Braun P. Systems biology of plant-microbiome interactions.

- Molecular Plant, 2019, 12(6): 804-821.
- [33] Wang G B, Zhang Q Q, Du W C, Ai F X, Yin Y, Ji R, Guo H Y. Microbial communities in the rhizosphere of different willow genotypes affect phytoremediation potential in Cd contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 2021, 769: 145224.
- [34] 邵宗圆, 王悦, 张菊, 杨程, 周刚, 杨如意. 耐铜植物茵陈蒿根际细菌群落结构及影响因素. *生态学报*, 2017, 37(22): 7679-7688.
- [35] 金羽, 曲娟娟, 李影, 顾海东, 闫立龙, 孙兴滨. 一株耐铅细菌的分离鉴定及其吸附特性研究. *环境科学学报*, 2013, 33(8): 2248-2255.
- [36] Wang H O, Xu R, You L M, Zhong G R. Characterization of Cu-tolerant bacteria and definition of their role in promotion of growth, Cu accumulation and reduction of Cu toxicity in *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 94: 1-7.
- [37] 范美玉, 黎妮, 贾雨田, 张超, 王伟平, 杨志伟. 耐镉阿氏芽孢杆菌缓解水稻受镉胁迫的研究. *农业环境科学学报*, 2021, 40(2): 279-286.
- [38] Zhang W H, Huang Z, He L Y, Sheng X F. Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead-zinc mine tailings. *Chemosphere*, 2012, 87(10): 1171-1178.
- [39] 张汉波, 任维敏, 邵启雍, 段昌群. 重金属污染环境中的节杆菌群体遗传结构分化. *生态学报*, 2005, 25(10): 2569-2573.
- [40] Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H, Matsumoto S. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *European Journal of Soil Biology*, 2001, 37(2): 95-102.
- [41] Rosatto S, Rocciotello E, Di Piazza S, Cecchi G, Greco G, Zotti M, Vezzulli L, Mariotti M. Rhizosphere response to nickel in a facultative hyperaccumulator. *Chemosphere*, 2019, 232: 243-253.
- [42] Álvarez A, Catalano S A, Amoroso M J. Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 66(3): 1083-1088.
- [43] Cheng C, Han H, Wang Y P, He L Y, Sheng X F. Metal-immobilizing and urease-producing bacteria increase the biomass and reduce metal accumulation in potato tubers under field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 203: 111017.
- [44] 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). *Journal of Environmental Management*, 2018, 215: 143-152.
- [45] 蔡红, 王晓宇, 韩辉. 产脲酶细菌矿化修复 Cd 和 Pb 污染土壤效应和机制. *中国环境科学*, 2020, 40(11): 4883-4892.