

分类号 X5

密级 _____

U D C 502

编号 _____

中国科学院地理科学与资源研究所

博士后研究工作报告

耐砷微生物对蜈蚣草富集砷的影响机制研究

合作导师 廖晓勇 副研究员
 梁涛 研究员

工作完成日期 2009年6月-2012年4月

报告提交日期 2012年4月

中国科学院地理科学与资源研究所

2012年4月

耐砷微生物对蜈蚣草富集砷的影响机制研究

Study of the impact mechanisms of Arsenic-tolerant Microorganisms on
Arsenic Accumulation of *Peteris vittata*

博 士 后 姓 名 文 一

流动站（一级学科）名称 地理学

专 业（二级学科）名称 生态学

研究工作起始时间 2009 年 6 月 28 日

研究工作期满时间 2012 年 4 月 28 日

中国科学院地理科学与资源研究所

2012 年 4 月

摘 要

全球砷污染问题突出，环境砷污染治理受到国内外环境修复领域普遍关注。微生物强化植物修复技术在砷污染土壤修复中有较大的应用潜力。本文利用高砷土壤中筛选得到的耐砷微生物（F2）和构建的具有耐砷特性的基因工程菌（F2As），研究其强化植物修复的可行性和根际调控机制，以期为微生物强化砷污染土壤植物修复技术的应用提供理论基础和科学支撑。本研究主要结果如下：

（1）供试耐砷微生物和转基因工程菌可在 100mM 的砷酸盐溶液中生长，具有较高的砷耐受性，具备了在砷污染土壤中定殖的能力。转基因工程菌在 0-40mM 范围内具有更高的砷耐受性。

（2）耐砷菌 F2 和基因工程菌 F2As 表现出了较好的促植物砷吸收作用。能显著提高蜈蚣草砷积累量，分别较对照组增加 61.62% 和 76.17%。增加了蜈蚣草对土壤的砷修复效率，施用 F2 后，修复效率从 3.94% 提高到 6.37%，而 F2As 从 4.62 提高至 8.12%。通过提高根部 P:As 比提高蜈蚣草的耐砷性能。F2 和 F2As 可作为强化砷污染土壤植物修复的微生物材料。

（3）施加耐砷微生物 F2 和转基因工程菌 F2As 后能影响蜈蚣草根际环境，通过增加蜈蚣草根际土壤 pH、DOC 含量以及微生物菌落数量，促进砷形态变化，增加砷生物可利用性，从而促进蜈蚣草对砷富集。具体表现为：促进土壤 As(V) 还原，增加土壤中移动性强的 As(III) 比例；F2 促进蜈蚣草降低根际铁、铝砷结合态以及残渣态的含量，而 F2As 能显著降低铁砷结合态和残渣态的含量；促进土壤中可溶态砷含量的增加。

关键词：砷；耐砷微生物；超富集植物；砷形态；根际

Abstract

Arsenic, well-characterized as highly toxic, mutagenic and carcinogenic, are commonly found in environmental media and have been recognized as widespread concern. The prospect of bioaugmentation-assisted phytoremediation for arsenic is attractive cost-effective alternative to traditional engineering approaches. However, to the best of knowledge, this is a lack of study to elucidate the effect and rhizosphere mediated mechanisms of plant uptake of arsenic in the presence of arsenic-tolerant microorganisms. In this study, the effect and mechanisms phytoremediation assisted by arsenic-tolerant microorganisms(F2) from arsenic contaminated soil and genetically engineered microorganism(F2As) was studied. The main results of this thesis are shown below:

1) The two microorganisms was characterized by feature of Streptomyces. They can be resistant to concentrations of 100 mM arsenate with high arsenic tolerance, which has the ability of rhizosphere colonization. F2As showed more arsenic tolerance within 0-40mM.

2) The use of F2 and F2As appeared to promote arsenic accumulation of *Pteris Vittata*. Inoculation of microorganisms significantly stimulated the arsenic enrichment in the fronds and enhanced arsenic transport capacity. There are significantly interactive effect on the amount of accumulation of plant between F2As and *Pteris Vittata*. The remediation efficiency of F2As is high than F2. Compared to control, the plant inoculated with F2 and F2As has greater P:As in the biomass, especially in the roots, helps them to tolerate arsenic. F2 and F2As may have the potential to enhance phytoremediation of arsenic-contaminated soils by *P.vittata*.

(3) Inoculation of arsenic-resistant microorganisms made effect upon rhizosphere environment of *P.vittata*. Bacterial significantly promoted the rhizosphere

As(V) reduction and metal oxide bound arsenic desorption, and increased soluble arsenic, and then enhanced the plant arsenic accumulation. The interaction mechanism of hyperaccumulator and microbe symbiosis is related to the inoculation of the arsenic-tolerant microorganisms by which increase pH, the amount of DOC and bacterial count in the rhizosphere.

Key words: Arsenic, arsenic-tolerant microorganism; hyperaccumulator; arsenic speciation; rhizosphere

目录

摘 要.....	i
Abstract.....	ii
第一章 引 言	1
1.1 选题依据.....	1
1.2 研究目标和内容.....	3
1.3 技术路线.....	4
第二章 微生物强化植物砷修复研究进展	5
2.1 土壤砷污染概况.....	5
2.2 砷污染土壤修复技术概述.....	6
2.3、土壤砷污染植物修复进展.....	7
2.3.1 砷超富集植物特点.....	8
2.3.2 砷超富集植物砷富集机制进展.....	9
2.4、微生物强化砷超富集植物修复研究进展.....	16
2.4.1 微生物强化植物重金属修复现状.....	16
2.4.2 微生物强化植物修复机制.....	18
2.5、微生物强化砷超富集植物修复的关键问题.....	23
2.5.1 高效微生物筛选.....	23
2.5.2 微生物强化植物修复研究.....	24
2.5.3 微生物强化植物修复对环境的影响.....	24
第三章 实验材料与方法	25
3.1 实验材料.....	25
3.1.1 供试盆栽土.....	25
3.1.2 蜈蚣草.....	25
3.1.3 菌种及菌液制备.....	25
3.2 实验方法.....	26

3.2.1 实验设计.....	26
3.2.2 样品采集及处理.....	26
3.3.3 分析方法.....	27
3.3 数据处理.....	29
第四章 结果与分析.....	30
4.1 耐砷微生物及基因工程菌的生物学特性研究.....	30
4.1.1 微生物的生长特性.....	30
4.1.2 微生物的耐砷性.....	31
4.1.3 小结.....	32
4.2 耐砷微生物对蜈蚣草砷富集作用的影响.....	33
4.2.1 微生物对蜈蚣草生长的影响.....	34
4.2.2 微生物对蜈蚣草砷浓度的影响.....	35
4.2.3 微生物对蜈蚣草砷累积的影响.....	36
4.2.4 微生物对蜈蚣草磷含量的影响.....	37
4.2.5 施用不同微生物后对土壤总砷的影响.....	40
4.2.6 微生物对蜈蚣草砷形态的影响.....	42
4.2.6 微生物对蜈蚣草修复效率的影响.....	43
4.2.8 小结.....	44
4.3 耐砷微生物对蜈蚣草根际砷赋存形态及根际环境影响.....	45
4.3.1 微生物对土壤砷赋存形态的影响.....	45
4.3.2 微生物对土壤根际环境的影响.....	53
4.3.3 结论.....	60
第五章 结论.....	62
5.1 论文主要结论.....	62
5.2 主要特色和创新点.....	62
5.3 问题与展望.....	63
致谢.....	72

博士生期间发表的学术论文、专著、重要科研成果.....	73
博士后期间发表的学术论文、专著、重要科研成果.....	74
个人简历.....	75
永久通信地址.....	75

第一章 引言

1.1 选题依据

近年来，砷污染已成为全球广泛关注的环境问题。砷是一种广泛存在于环境中的具有强致癌性的类金属，在美国毒物和疾病登记署（ATSDR）公布的最具危险性有毒物质中，排名第一。近年来，人为活动向环境排放的砷量逐年增加，每年向土壤中输入的砷总量为 5.2-112.2 万吨，土壤中的砷可通过水、食物、扬尘等暴露途径进入人体而产生健康危害。据统计，目前世界上有 19 个国家和地区发生过大区域砷污染危害事件，在 2006 年美国公布的超级基金计划（Superfund）2594 个待修复点中，有 564 个点存在砷污染问题（USEPA, 2006）；中国也是砷污染最为严重的国家之一，在即将出台的《重金属污染综合防治“十二五”规划》中，砷被列为重点防治对象。土壤砷污染治理已成为世界各国共同面临的一个急需解决的重要环境问题。

目前，砷污染土壤修复治理技术已成为国内外研究的热点。传统的治理方法主要有隔离法、填埋法、客土法、固化/稳定化、化学淋滤等物理、化学方法，因其工程量大、治理费用高、破坏土壤结构、二次污染风险高等弊端难以适用于大面积砷污染土壤的治理。随着蜈蚣草的发现，以超富集植物为核心的砷生物修复技术因其能永久性地从污染土壤中去除重金属，以及操作简单、不破坏土壤理化性质、二次风险低等优点，成为国际污染环境修复的热门领域之一，受到许多国家重视，在欧美发达国家，植物修复技术已进入产业化阶段，据预测，全世界植物修复技术创造的产值将达 20 多亿美元。在中国当前发展绿色产业经济及建设环境友好型社会的背景下，研究以植物修复技术为核心的生物修复重金属污染技术具有重要的现实和科学意义。

蜈蚣草为砷污染土壤的治理提供了优良的植物材料，然而超富集植物修复砷的效率常受到土壤重金属生物有效性、植物根系生长状况、植物生长速度和生物量的限制，制约了其修复效率。通过对不同来源蜈蚣草吸收富集砷的特征及植物修复效率的研究，发现蜈蚣草对砷污染土壤的植物修复效率随土壤砷含量增加而逐渐降低，蜈蚣草如要高效修复高砷污染土壤，需结合其他修复措施。大量研究发现，微生物可通过自身或其代谢产物促进植物根系发育、增加生物量，提高植物对不同环境压力的耐受力，改变土壤中重金属的形态，增加重金属的生物可利用性，来强化修复植物的修复效率。目前，砷污染土壤的微生物强化植物修复技术的研究还比较少，仅有的几项研究主要针对菌根真菌强化植物修复砷污染土壤的效果开展的工作，而对具有砷还原特性的耐砷微生物强化砷超富集植物砷吸收作用机理、影响因素等研究还比较缺乏。另外传统的微生物强化植物修复技术中所使用的微生物多为土著微生物群体经过富集分离、驯化获得，其代谢产物往往物质单一，活性有限，对外界环境适应性差、修复周期长，这一系列问题阻碍了技术在现实中的发展和应用。随着分子生物学技术的发展，利用基因工程技术筛选并克隆高效修复基因，并克隆到某一菌株中构建成新的基因工程菌，可为解决微生物修复适应差、周期长及效率低等问题提出崭新的途径。

综上所述，有必要开展耐砷菌和基因工程菌的生物学特性及耐砷等生物学性能的研究，以期明确其定殖于污染土壤中的限制因素和条件，为微生物在治理砷污染土壤的实际应用提供理论支持；同时开展微生物强化超富集植物土壤-根际系统中砷转化过程及这一过程中涉及的生理及生物化学机理研究，旨在阐明微生物促进植物生长和活化土壤重金属的机制以及强化植物修复重金属污染土壤的微生物学调控机

制，为建立高效、安全、环保的微生物强化植物修复技术提供技术支持和理论支撑。

1.2 研究目标和内容

(1) 研究目标

本文以课题组前期筛选的砷还原微生物及构建的含砷价态转化及跨膜转移的关键调控基因 *arsC* 的基因工程菌为研究对象，研究外源微生物对砷超富集植物蜈蚣草砷提取的强化作用并开展外源微生物对植物的根际效应研究。以期揭示外源微生物对砷污染土壤植物修复过程砷在根际的形态变化和运移规律，探明外源微生物对土壤砷的生物有效性及植物富集砷的影响，通过此研究明确所筛选的耐砷微生物及构建的基因工程菌作为一种强化植物修复砷污染的生物材料的可行和有效性；并揭示外源微生物对超富集植物根际土壤砷形态变化及生物有效性的影响机制。

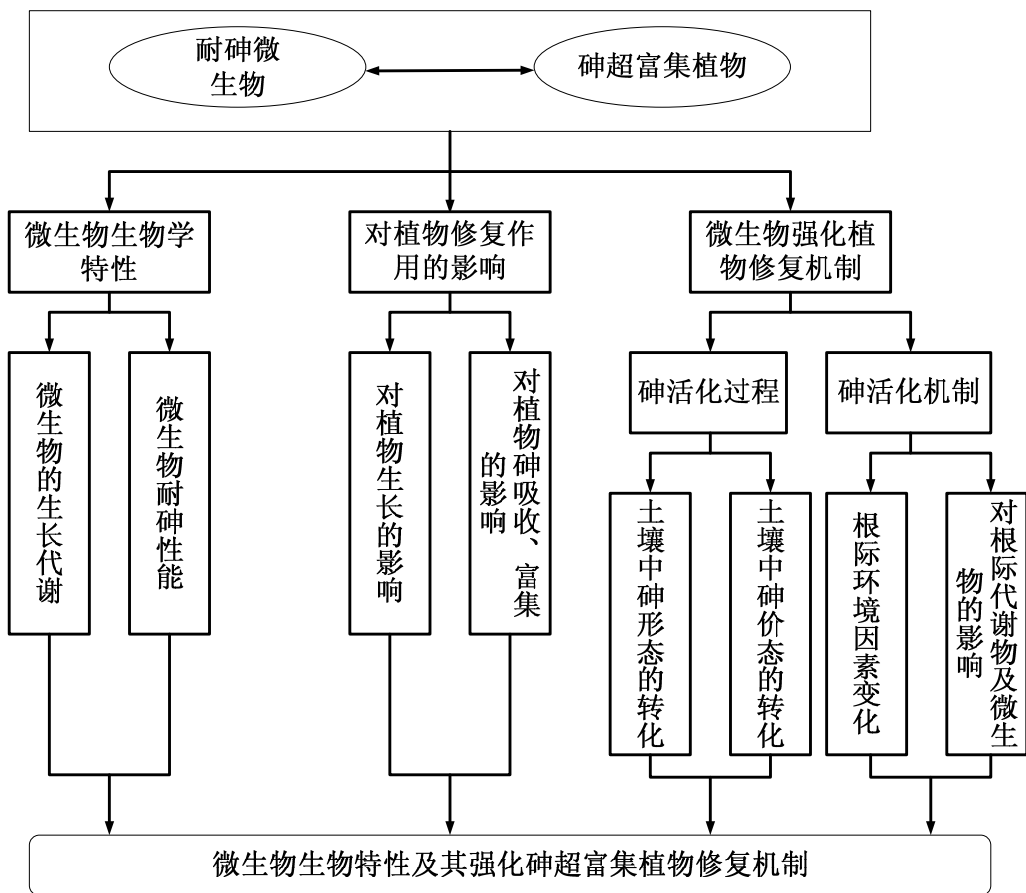
(2) 研究内容

①微生物的生物学特性研究。了解耐砷微生物以及砷还原基因工程菌的生长特性以及对砷酸盐的耐受性。

②外源微生物对于蜈蚣草提取砷的强化作用。研究外源微生物对蜈蚣草生长、砷吸收、富集及转运的影响。

③外源微生物对蜈蚣草提取砷影响的可能作用机制。研究添加外源微生物后对根际环境以及砷在根际中形态转化及分布的影响。

1.3 技术路线



第二章 微生物强化植物砷修复研究进展

2.1 土壤砷污染概况

砷是土壤中普遍存在的有毒类金属元素。在自然界中砷主要以硫化物的形式伴生于 Cu、Pb、Sn、Ni、Co、Zn、Au 等有色金属矿石中^[1]。在土壤中，As 主要以 As (III) 和 As (V) 两种价态存在，以带负电荷的砷氧阴离子 (HAsO_4^{2-} 、 H_2AsO_4^- 、 H_2AsO_3^- 、 HAsO_3^{2-}) 的形式存在^[2]。

土壤中的砷主要来源于自然源和人类生产活动。自然源主要是母岩或土壤母质的风化，它是 As 的地区性平均丰度（背景值）的决定因素。小山雄生（1976）研究结果表明，世界自然土壤的平均砷浓度为 9.36mg/kg。O'Neill（1990）研究了 2691 个未收污染的土壤，其平均砷浓度是 10.0mg/kg^[3]。人为来源包括人类的生产和生活直接或间接地排放到环境中的砷，人类活动是影响砷在环境中迁移的主要因素，如采矿、冶炼、施肥、施用杀虫剂、废水排放和废渣堆放等都可导致局部土壤砷含量升高，造成土壤砷的污染^[4]。Nrigau 和 Pacyna 认为，全球每年向土壤中输入的砷总量为 2.8-9.4 万吨^[5]。由于砷的广泛存在和施用，在环境化学污染物中，砷成为最常见、对公众健康危害最严重的污染物之一。砷在美国毒物和疾病等级署公布的最具危险性有毒物质中排列第一位^[6]。

砷是一种公认的致癌物质，它可以诱导真核生物细胞的形态和结构发生突变^[7]。据统计，目前世界上有 19 个国家发生较大区域的砷污染。在孟加拉国、印度、阿根廷和越南，由于地下水污染导致的数千万以上的人口受到不同程度的砷毒害。同时已有证据表明，该地区土

壤及农作物也遭受砷污染，并成为较重要人体暴露途径，对当地居民健康造成危害^[8]。美国 2006 年 EPA 超级基金计划 2594 个待修复点中，就有 564 个点存在砷污染问题（USEPA，2006）。在澳大利亚已经报道的砷污染场地超过 10000 个^[9]。我国也是世界上受砷危害最严重的国家之一，已出现的砷危害严重地区有贵州、内蒙古、山西、台湾、湖南以及广西等省^[10]，影响当地农产品安全乃至国际贸易，并造成地下水此生污染。因此，如何降低土壤砷污染对人体健康的风险以及修复砷污染已成为国内外土壤和环境科学界的共同关注的重要环境问题。

2.2 砷污染土壤修复技术概述

土壤砷污染的修复主要有物理、化学修复以及生物修复等方式^[11]。物理化学修复方法主要采用客土、换土和深耕翻土等工程措施、土壤淋洗法、玻璃化法和电化学法等。通过隔离、易位或降低生物有效性来减少砷污染，但并没有从根本上取出土壤中的砷。其中，工程措施、玻璃化法和电化学法等工程量大、投资费用高，容易破坏土体结构，引起土壤肥力下降，且难以适用于大面积砷污染土壤治理^[12]。生物修复包括微生物修复、植物修复和植物-微生物联合修复。与物理修复相比，生物修复操作简单、成本低、处理效果好且对环境不会造成二次污染。其中微生物修复是利用筛选、驯化的专性微生物或者构建的基因工程菌通过本身或其代谢活动改变重金属的价态、氧化还原状态以及与某些有机物和无机物的复合状态，从而改变土壤中重金属的毒性、移动性和生物可利用性，从土壤中提取或固定重金属^[13, 14]。微生物修复的局限性在于：固定重金属的微生物并不能完全去除土壤中重金属；微生物对外界环境变化响应比较强烈，环境条件的改变能大大影响微生物修复效果；外来微生物受数量和代谢活性的影响，会与土著菌株

竞争而影响修复效果。

植物修复技术被认为是治理土壤砷污染的最经济有效的途径之一^[15]。植物修复技术是利用自然生长或遗传培育植物来提取（去除）污染土壤中重金属的技术。自砷超富集植物被发现以来，人们在砷污染土壤植物修复领域开展了大量研究工作，主要集中在超富集植物砷富集作用、吸收转运机制、不同影响因素对植物修复效率影响^[16-18]。由于植物修复会受植物生长速度和生物量的限制，受土壤类型、营养状况、污染物性质与浓度以及气候条件等的影响，如何提升砷超富集植物有效去除土壤砷污染效率是目前研究的重要方向。

植物修复效率的高低不仅取决于超积累植物吸收和积累重金属的效率，而且在很大程度上依赖于重金属在土壤中的生物有效性和超积累植物的根系吸收重金属的能力，微生物是影响根际环境中重金属有效性和根系对重金属吸收能力的重要因素^[19]。近年来，利用微生物用于强化砷超富集植物耐砷过程逐渐成为国内外研究的热点。它是基于微生物促进植物生长发育、提高植物对重金属耐受性以及影响土壤中根际重金属移动性等特点，强化砷污染土壤的植物修复效率^[20]。迄今为止，研究主要集中在植物促生长细菌筛选、砷修复效果方面的研究^[21-23]，而是否能用专性微生物（如砷还原菌、砷氧化菌以及转基因菌）强化砷超富集植物砷修复及其强化机制，尚少有报道。

2.3、土壤砷污染植物修复进展

植物修复技术（Phytoremediation）是近年发展起来的一种新的土壤污染原位修复技术。是以植物积累、代谢、转化污染物的理论为基础，通过有目的的优选种植植物，利用植物及其共存土壤环境体系去除、转移、降解或固定土壤污染物，以恢复土壤系统正常功能的污染

环境治理措施^[24]。植物修复技术包括利用植物超积累或积累性功能进行的植物吸取修复^[25]、利用植物根系控制污染扩散和恢复生态功能的植物稳定修复^[26]、利用植物代谢功能的降解修复、利用植物转化功能的植物挥发修复^[27]、利用植物根系吸附的植物过滤修复等技术^[28]。

植物修复技术中除了植物挥发和植物吸取，其他几种方法均不能有效去除土壤污染物，只能在一定程度上降低土壤污染风险。植物挥发只适合于挥发性重金属污染的治理，使用范围有限。相比较，植物吸取技术使用范围更广，是目前受到最广泛关注的一种植物修复技术。植物吸取技术的关键是要求植物根部能吸收大量有毒重金属，并向地上部转运和固定的能力，同时具有生物量大、生长迅速、根系发达以及耐重金属及抗病虫害能力较强的生理特性。超富集植物的发现，为植物吸取技术修复污染土壤提供良好的植物材料^[16]，目前的植物修复主要依靠超富集植物来完成。

2.3.1 砷超富集植物特点

超富集植物是指能够大量吸收并在体内累积重金属的一类特殊植物，其是植物修复技术的基础和关键。这一概念首先由 Brooks 应用到 Ni 的超富集植物，而后随着其它重金属超富集植物的发现，这一概念扩大到其它许多重金属上^[29]。能成功运用于重金属土壤污染修复的超富集植物，需要具备以下三个特点：第一，超富集植物对重金属具有极强的富集能力，对特定的重金属的富集能力远远高于普通植物，在一般情况下，植物体内重金属含量高于生长的土壤中重金属含量，即生物富集系数（植物体内重金属含量/土壤中重金属含量） >1 。第二，具有很强的将重金属从根部转运到地上部的能力，即转运系数（地上部重金属含量/根部重金属含量） >1 。这一特点有利于通过直接收割植

物地上部达到修复土壤的目的。第三，超富集植物还需具有极强的耐受重金属毒害的能力，其体内可以耐受很高的特定重金属含量^[30]。

目前，已有文献报道的重金属超富集植物有 500 多种，占被子植物的 0.2%，广泛分布于植物界的 101 个科^[31]，植物种类从一年生草本到多年生的灌木和乔木，大多数属于十字花科植物，其中四分之三以上为镍的超积累植物，并且一些植物能同时超量吸收和积累两种或几种重金属元素，如天竺葵(*Pelargonium sp.*)可以耐受和累积多种重金属 (Cd、Ni 和 Pb)，*Aeollanthus biformifolius* (Cu 和 Co)^[32]。迄今为止，国内外已发现超过 20 多种砷超富集植物^[17]。Ma et al 和陈同斌等人在美国和中国同时独立发现了第一种能够大量富集砷的凤尾蕨属植物——蜈蚣草 (*Pteris vittata L.*)^[25]。蜈蚣草满足作为超富集植物的 3 项特点，具有极强的耐砷性，能在 23400mg/kgAs 的矿渣上正常生长；根部能吸收土壤中的砷，并通过木质部向地上部转运^[16, 25, 33, 34]，在叶片中累积的可达整株植物总砷的 93%，是根部砷含量的 25 倍。^[35]。韦朝阳对湖南省内一些高砷区植物和土壤进行了系列野外调查，发现了与蜈蚣草同属的大叶井口边草 (*Pteris cretica L.*)，能在含砷浓度为 111-299mg/kg 的土壤上生长，其地上部累积砷高达 694mg/kg^[36]。近几年来，国际上相继发现了 10 多种砷的超积累植物，如：*P. umbrosa*，*P. biaurita L.*，*P. quadriaurita Retz*，*P. ryukyensis Tagawa*、粉叶蕨 (*Pityrogramma calomelamos*)、含羞草 (*Mimosa pudica*)、马拉巴牡丹 (*Melastoma malabathricum*)、大叶凤尾蕨 (*P. cretica*)、长叶凤尾蕨 (*P. longifolia*) 等，其中大部分均是凤尾蕨属植物^[33, 37-41]。

2.3.2 砷超富集植物砷富集机制进展

蜈蚣草作为第一个被发现的砷超富集植物，已被作为研究植物砷

超富集生理和生化机制的重要模式植物。蜈蚣草可在土壤砷含量为 1500mg/kg 的砷污染土壤上正常生长，而普通植物中砷含量大于 10mg/kg 时，生长将受到限制。叶片可以累积 13800mg/kg 的砷，比生长在同样土壤的普通植物高 142 倍^[17]，在土壤砷浓度为 6mg/kg 低砷土壤中，蜈蚣草也能富集 755mg/kg 的砷^[25]。这些与一般植物之间的砷吸收、转运及富集差异均说明了蜈蚣草必然具有独特的生理生化代谢过程和耐砷等机制。随着植物生理生态学，分子生物学技术及各种微观技术的深入运用，利用蜈蚣草作为研究对象，已开展大量的关于超富集植物富集砷的砷吸收、转运和积累等过程的生理生化机理的研究，对超富集植物修复砷污染土壤的技术的应用提供了理论基础。

2.3.2.1 超富集植物具有强的根际活化能力

超积累植物能活化根际环境中的难溶态重金属，增加根际重金属的移动性，促进植物对重金属的吸收富集，这与其独特的根际环境相关。根际环境（rhizosphere）是指与植物根系发生紧密相互作用的土壤微域环境，是植物在其生长、吸收和分泌过程中形成的物理、化学和生物学性质不同于土体的，复杂和动态的涉及土壤-植物-微生物的复合生态系统。它是土壤圈、水圈、大气圈和生物圈相互作用的结果^[42]。根际环境有不同于非根际环境的 pH、Eh、土壤 DOC，这些因素均能影响土壤中砷结合状态，从而影响其生物有效性。

土壤中重金属可以水溶态、交换态、碳酸盐结合态、铁锰氧化结合态及结晶态等多种形态存在，其中水溶态和可交换态是最容易被植物吸收利用^[43]。生物有效性的重金属仅占土壤中重金属总量的很小一部分，植物为了满足对重金属吸收富集的需要，需要具备一种或多种活化土壤中非有效态重金属的能力。与一般植物相比，超积累植物具

有超强的吸收、转运和积累重金属的能力，即使在非污染或中等污染程度的土壤上也能富集高含量的重金属，表明超积累植物具有强烈活化和溶解根际环境的难溶态重金属的能力^[44]。如在重金属污染土壤上种植遏蓝菜 (*Thlaspi caerulescens*)，土壤中硝酸铵提取态锌的降低量仅占 *T.caerulescens* 总积累量的 10%，土壤孔隙水溶态锌的降低量占植物总积累量的 1%，即 *T.caerulescens* 吸收和积累的 Zn 分别有 90% 来自土壤中非可溶部分^[45]。蜈蚣草可有效去除土壤中 NaMMA、CaMMA、 K_2HAsO_4 、 Na_2HAsO_4 和 $Ca_3(AsO_4)_2$ 等形态砷^[34]。它也能有效吸收土壤中吸附、非专性吸附和无定型结合态等各种结合态的砷，但普通植物仅能降低水溶态和无定形结合态砷。Maei I (2006) 研究了砷超富集植物蜈蚣草 (*Pteris vittata* L.) 和非富集植物肾蕨 (*Nephrolepis exaltata* L.) 对土壤中不同砷形态的吸收作用，结果发现超富集植物能更有效地利用土壤不同形态 (非转性吸附态、专性结合态、无定型水合氧化态、结晶水合氧化态以及残渣态) 的砷，可较非富集植物降低 39-64% 的砷，而肾蕨仅降低 5-39%，而且蜈蚣草吸收的大量砷来源于无定型水合氧化态 (占 67-77%)，而并非来自生物有效性最高的非专性吸附态^[46]。田间试验研究结果表明，应用蜈蚣草进行 7 个月的修复，土壤总砷浓度大大降低，但土壤有效态砷的变化并不明显。这些结果证实了超积累植物必然具有独特的活化土壤中其他植物不能吸收利用的重金属能力，超积累植物的吸收和积累特性与根际独特的活化机制有关。

超富集植物对根际难溶态重金属的活化能力与其本身特殊的根际环境有关，根际环境中根系生长情况、pH、Eh、有机质、含水量及其他养分是影响根际土壤中重金属有效性和根系对重金属吸收能力的主要因素，这些因素主要受到植物根系生理生化特性及根际微生物的共

同的影响^[47]。

根系的生长和形态分布是植物根系体系吸收功能和吸收效率的重要因素之一。超积累植物为实现其特异的吸收和积累重金属能力，在根系生长和形态上产生了适应性的反应。国外对 Zn/Cd 超积累植物遏蓝菜根系的伸长规律和分布特性进行了大量研究，普遍认为其是一种嗜锌的植物，具有发达的根系和稠密的根毛，主动向土壤中的 Zn/Cd 区伸展，通过根毛接触土壤颗粒获取重金属，进一步研究发现遏蓝菜根系有主动探寻 Zn/Cd 的能力。相反，非超积累植物的根系则主要分布在非污染区，尽可能深入低污染区域^[48]。据调查，在野外（自然）下，蜈蚣草具有强大的地下部，根系聚集在 0-30cm，其中超过 50% 分布在 0-10cm^[49]。Silva 比较在砷污染土壤（砷浓度为 105mg/kg）中生长的非富集植物肾蕨和超富集植物蜈蚣草单位体积根系，后者是前者的 4 倍。因此，推测蜈蚣草庞大根系，使之能充分、大面积的接触污染土体，增加根系分泌物质，这可能对蜈蚣草富集砷有重要的意义^[46]。

根系分泌物包括植物细胞主动释放或被动渗漏到根际环境的低分子量化合物（如 CO₂、HCO₃⁻、H⁺、氨基酸、有机酸等）和高分子量化合物（植物络合素、植物高铁载体、类金属硫蛋白等）^[50]。一方面，根系分泌物可通过影响土壤化学机制直接影响土壤重金属生物有效性。根系分泌物可影响根际 pH 值，酸度是影响土壤中重金属移动性和生物有效性的主要因素之一，在氧化条件下，土壤 pH 在 3-8 之间时，增加根际 pH 可以有利于根际土壤中五价砷移动，增加其生物可利用性。调查发现，生长在酸性土壤和尾砂矿中的蜈蚣草和粉叶蕨中能增加根际土壤中的 pH，其可能是增加五价砷溶解性和促进植物吸收的重要原因。另外，在低 pH 条件下，土壤中的铁氧化/氢氧化物可发生还原性

溶解，从而使吸附在上面的砷溶出^[51]。其次，根系分泌物能影响重金属在土壤中的吸附及解析过程。根系分泌物可与土壤溶液中的重金属离子竞争土壤或土壤矿物中的吸附点，增加土壤溶液中重金属离子浓度。另外根系分泌的金属结合蛋白（类似于金属硫蛋白或植物螯合肽）和某些特殊的有机酸，可以与重金属离子形成螯合物或络合物，从而抑制土壤对重金属的吸附，提高其迁移能力^[52]。用砷含量为 50mg/L 溶液处理蜈蚣草不同组织部位，24h 后测得各浸泡组织中酸溶性硫醇类化合物大量增加，通过多元分析发现，硫醇含量与植物组织中吸收的 As 含量呈正相关^[53]。Tu 等研究发现砷超富集植物根系分泌物中含有大量植酸和草酸，而植酸对土壤中砷酸铁、砷酸铝、砷酸钙等形态的砷化合物具有很强的溶解能力，蜈蚣草分泌的有机酸种类可能是蜈蚣草超积累砷的重要机制之一^[54]。另一方面根系分泌物通过影响根际土壤中微生物的数量和活性影响土壤中重金属活性。根系分泌物能促进根际微生物生长已成为共识^[55]，根系分泌物为根际土壤中的微生物提供有效的碳源和氮源，影响根际微生物的种群、数量、活性和生态分布，而微生物在重金属元素的生物地球化学循环中扮演者重要的角色，可分泌出质子、有机物质、酶等，对重金属具有吸收富集、氧化还原、淋滤、协同植物吸收等作用。蜈蚣草根际的微生物通过影响土壤 pH、根系分泌、氧化还原电位等，影响砷在土壤中的的归趋，是控制土壤中砷生物有效性的一个重要因素^[51]。通过对野外蜈蚣草根际和非根际土壤中微生物数量分析发现，蜈蚣草根际土壤的细菌数量显著大于放线菌、真菌。3 种微生物种群为根际土壤 > 非根际土壤，分别高 4.85、3.47 和 3.31 倍^[56]。

2.3.2.2 超富集植物具有强的砷吸收和转运能力

As (V) 是土壤中主要存在的砷形态，广泛的研究结果表明，砷酸盐是蜈蚣草根细胞主要吸收的形式，其占根中总砷的 60-70%，而叶片中则以亚砷酸盐为主，占植物总砷的 70-90%。^[57] 砷酸盐通过磷的吸收通道被植物根系吸收，再通过磷的转运子进入根细胞^[37]。蜈蚣草体内的亚砷酸盐通过木质部从根中转移到叶片中，这与普通植物的砷转移机制相似^[58, 59]，不同的是，蜈蚣草对砷的转运特别有效^[60]。目前，对于亚砷酸盐从根部至叶部长距离运输机制还不清楚。推测可能与亚砷酸盐同含硫醇化合物低螯合度以及亚砷酸盐的弱外向通量有关^[17]。

由于土壤砷污染的广泛性，植物都在一定程度上进化形成了砷的抗性机制，普通植物中砷含量大于 10mg/kg 时，生长将受到限制或严重影响^[61]。许多植物都是通过减少砷的吸收来保护作物，而蜈蚣草等砷超富集植物却大量吸收砷，并将砷转运到植物的地上部^[62]。可见，砷超富集植物具有极强的砷吸收和转运能力。研究发现，水培实验中蜈蚣草暴露在砷中 8h 后，通过根部吸收的砷的超过 75% 量转运到蜈蚣草叶片中。这个复杂的调控机制保证了蜈蚣草能有效从环境中提取砷，并保护植物，避免砷中毒^[63]。Fayiga 等比较了超富集植物蜈蚣草和 *Nephrolepis exaltata* 对砷的吸收和转运能力的差异，发现相同时间内前者吸收并转移到地上部的砷约是后者的 10 倍^[64]。短时间的吸收动力学实验也表明，蜈蚣草对 As (V) 的吸收速率是非超富集植物 *P.tremula* 的 2.2 倍，而且蜈蚣草吸收的砷 76% 被转运到地上部，但 *P.tremula* 却只有少部分砷 (9%) 被转运到地上部^[65]。Poynton 等 (2004) 通过同位素标记的 ⁷³As (V) 进行吸收动力学实验进一步证明：砷超富集植物具有高效的砷吸收和转运能力，其吸收过程中的米氏常数 (Km) 显著

小于非超富集植物 *N.exaltata*, 说明超富集植物中的转运蛋白对砷有更强的亲和力^[66]。转运到地上部的砷主要储存在羽叶中 (78%-96%)。但进一步有关砷在羽叶中的分布及亚细胞分布的研究目前没有统一结果。Lombi 等实用 EDX (Energy dispersive X-ray microanalyses) 技术证明, 砷主要存在表皮细胞的液泡中, 在孢子和叶中脉有低含量的砷^[67]; Li 等 (2005) 年使用 ESEM (Environment scanning electron microscop) 和 EDX 发现, 羽叶中毛状体中砷的含量最高, 是表皮细胞的 2-4 倍, 叶肉细胞中的 3-9 倍^[68]。廖晓勇发现在无砷处理下, 蜈蚣草羽叶细胞各组分中砷分布表现为: 细胞壁 > 胞质 > 细胞器; 高砷处理下, 砷分布表现为: 胞质 > 细胞壁 > 细胞^[69]。关于砷在羽叶中的储存系统, 所有研究者一致认为储存在羽叶中的砷主要以自由的 As (III) 形态存在, 被植物络合素络合的砷仅占总砷的 1%-3% 左右。但具体的分布位置却仍存在分歧, 需要更深入的研究。

2.3.2.3 超富集植物具有强的抗氧化胁迫能力

研究发现, As(V)、As(III)、DMA 和 MMA 均能诱导植物组织活性氧的产生, 对植物产生次生氧化胁迫。用砷处理蜈蚣草时, 植物体内非酶类抗氧化物 (如 GSH、非蛋白巯基) 和抗氧化酶 (如 SOD、CAT、APX、POD) 等随砷浓度的增加而增加, 而且抗氧化酶的活性受到砷胁迫的诱导^[70], 说明砷暴露能对蜈蚣草产生氧化胁迫。蜈蚣草孢子体、配子体和愈伤组织都可以富集高浓度的砷且不表现出受害症状^[71], 具有高效的消除由于砷暴露而产生的氧化胁迫能力^[70, 72], 这也是蜈蚣草超富集砷的机制之一。通过比较超富集植物蜈蚣草与非富集植物 *P.ensiformis* 对砷胁迫的反应, 发现非超富集植物体内抗氧化酶的活性显著低于蜈蚣草, 且膜脂过氧化产物丙二醛或硫代巴比妥酸反应物质

浓度显著高于蜈蚣草，说明蜈蚣草有较强的抗氧化胁迫能力^[70]。Tu 等发现砷的胁迫会导致蜈蚣草孢子体酸溶性巯基增加，推测酸溶性巯基可能在抵抗砷引起的氧化胁迫中发挥重要的作用^[53]。研究还发现，As(III)会导致蜈蚣草愈伤组织细胞中酸溶性巯基含量增加，同时 As(III) 和 MDA 则会引起酸溶性巯基含量降低，这些结果证实酸溶性巯基在清除砷引起的活性氧过程中起着重要的作用^[73]。

2.4、微生物强化砷超富集植物修复研究进展

植物修复是近年来世界公认的非常理想的污染土壤原位治理技术，其经济有效、二次风险低，具有物理化学修复所无法比拟的优势，但因其受到自身生长特点及土壤重金属生物有效性的影响，在污染环境治理的具体应用中存在很多局限性：首先植物受到植物生长速度和生物量的限制，修复过程比物理化学过程缓慢；其次，植物修复会受到土壤类型、湿度、温度、营养等环境条件的制约；另外，土壤中重金属含量、形态等也能影响植物的吸收，重金属浓度过高会使植物表现出中毒症状，适合修复中等重金属污染的土壤；而结合紧密的，其生物利用率低的重金属也影响植物吸收。修复技术合理地周期应该低于 5 年，而是用植物修复常需要花费更多的时间^[74]。如何提升超富集植物去除土壤中重金属效率是目前植物修复领域研究的重要方向。

近几年，利用微生物促进植物修复污染土壤作为一种植物修复强化技术逐渐成为国内外研究的热点，该项技术已被广泛应用于提高土壤有机污染土壤的修复效率，并取得了一些成果^[75, 76]，但将其应用在重金属污染治理中是近几年才兴起，已取得一些进展。

2.4.1 微生物强化植物重金属修复现状

自从 1998 年，Burd 发表了关于利用含有 ACC 脱氢酸酶的耐 Ni

促植物生长微生物可以降低 Ni 对油菜作物的毒性后，近年来已有较多文献报道了微生物强化植物修复重金属研究。这些研究涉及了不同的重金属、植物、微生物，添加特性微生物后大部分都能促了植物的生长，同时增加植物重金属的吸收量^[77]。按照研究程度，利用微生物强化植物修复的重金属依次涉及 Ni、Cd、Pb、Zn、Cu、As 等。虽然实际污染常以重金属复合污染为主，然而已发表文献中关于复合重金属污染土壤的微生物强化植物修复仅占 25%，大部分是以单一重金属污染土壤为研究对象^[78]。

用于强化植物修复的微生物主要从不同重金属浓度的污染土壤以及重金属污染土壤中植物根际土壤中筛选富集得到。研究发现从根际土壤中筛选的微生物较非根际土壤中微生物具有更强的重金属耐受性。如 Lodewyckx 等发现随着土壤中 Zn 浓度增加，锌超富集植物 *T. caerulescens* 的根际微生物菌落数显著高于非根际微生物。在土壤中 Zn 浓度为 65.4mg/L 时，根际土壤中微生物存活率是对照的 88%，而非根际土壤仅为对照的 7.8%^[79]。目前所使用的微生物大部分具有以下特点：对重金属具有高耐受性；能代谢产生促进微植物生长：如 ACC 脱氨酶、铁运载体^[80]、有机酸等物质；能在根部定殖^[81]；微生物具有合成生物表面活性剂、铁运载体和有机酸等提高重金属生物有效性的物质等^[82]。影响微生物对植物修复强化的因素有：微生物在根际土壤中定殖能力、代谢活性以及土壤中重金属形态。微生物在土壤中存活及根际定殖能力是确保生物强化技术有效实施的前提条件。植物根际对重金属的提取效率同接菌量无相关性，表明微生物在土壤中的生物活性比接种量更重要^[83]。土壤中重金属形态和含量影响着根际定殖效率^[84]。当香根草生长在 300 mg/kgZn 污染土壤中时，接种的丛支菌根真菌

(*G. caledonium*) 定殖率从 70% 下降到大约为 50%^[85]。然而, 在砷超富集植物蜈蚣草中出现了不同的结果。蜈蚣草根际的丛支菌根真菌感染率随着砷浓度的增加而增加, 对照组为 26.4%, 而在砷浓度为 100mg/kg 的土壤中感染率为 40.6%。

已有的微生物强化植物修复技术所选用的植物大部分为非超富植物, 也有一小部分超富集植物。非超富集植物包括了: 紫云英属 (*Astragalus sinicus*), 印度大麻 (*Cannabis sativa*), 大麻属 (*Hordeum vulgare*), 烟草属 (*Nicotiana tabacum*), 牧豆属 (*Prosopis juliflora*), 柳属 (*Salix dasyclados*), 蔗草属 (*Scirpus robustus*), 高粱属 (*Sorghum bicolor*), 三叶草属 (*Trifolium pratense*), 豇豆属 (*Vigna unguiculata*), 玉米属 (*Z. mays*)。超富集植物有: 芸薹属植物 (*B. juncea*)、凤眼莲 (*E. crassipes*)、香薷属 (*Elsholtzia splendens*)、向日葵属 (*Helianthus annuus*)、粉叶蕨 *P. calomelanos*、蜈蚣草 (*P. vittata*)、龙葵 (*Solanum nigrum*)、以及遏蓝菜属 (*T. caerulescens*) 等^[77, 78, 86]。

大量的文献研究表明, 施用微生物如植物促生长菌 (PGPR)^[87-89] 和菌根真菌^[90-94]能提高植物的生物量以及植物重金属提取量, 已有的文献表明: PGPR 强化植物后, 植物地下部生物量增加 1.1-2.6 倍, 地上部增加 1.2-4 倍, 其对地上部促进作用更明显; 用 AMF 则为根增加 0.3-6.9, 而叶增加 0.5-4.7, 重金属提取量可提高 34 倍, 平均可提高 4 倍。PGPR 能促进植物体内重金属浓度增加, 用细菌能增加地下部中重金属浓度 1.2-5.6 倍, 用 AMF 能增加 1.1-4.2 倍, 而地上部重金属浓度, 细菌和 AMF 的作用类似, 均能提高 1.1-3.1 倍。

2.4.2 微生物强化植物修复机制

一般说来, 微生物促进植物修复技术效率提高主要通两种方式来

实现：第一，利用微生物代谢产生的活性物质，如生物表面活性剂、铁运载体以及有机酸等提高土壤中难溶解态重金属的移动性，促进植物对重金属的吸收富集；第二，通过添加植物促生长细菌和菌根真菌促进植物生长，增强植物抗病虫害性能来提高植物生物总量，增加植物对重金属的积累量^[77]。

2.4.2.1 提高土壤中重金属的生物有效性

土壤中重金属大部分以难溶态存在，其低的生物有效利用率是影响植物吸收重金属的重要因素。重金属污染土壤中存在一些特殊微生物类群，它们对有毒重金属离子不仅具有抗性，同时也可以使重金属进行生物转化。微生物转化重金属的主要方式有：（1）通过微生物对重金属的氧化-还原作用和甲基化-去甲基化作用等转化方式，改变重金属的价态和形态，从而影响毒性、移动性和生物利用性；（2）微生物产生影响重金属生物有效性的物质，如微生物新陈代谢过程中产生的有机物、铁运载体等都能络合环境中的重金属，影响重金属在土壤中的溶解性；（3）通过微生物活动，如分泌的有机酸改变环境介质中溶液的特性，如 pH、Eh 等来改变环境介质对重金属的吸附特性。研究发现，添加微生物可通过增加土壤中生物可利用形态重金属含量，增加重金属生物利用率，两者之间存在正相关^[78]。Braud 发现在土壤中添加绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 后，可交换态的铅浓度增加了 113%，同时降低了土壤中碳酸盐结合态的浓度，而和铁锰氧化物、有机质结合及残渣态结合铅保持稳定，主成分分析结果表明土壤 Cr 和 Pb 可交换态的增加量与产生铁运载体的微生物存在正相关^[82]，由根际微生物分泌产生的铁运载体可以促进 Fe (III) 和其他阳离子在土壤中的移动性^[95]，如假单胞菌可产生铁运载体，可参与土壤中重金属移动性

调控。接种假单胞菌可以促进植物对土壤中 Cd、Cr、Cu、Ni 和 Pb 的吸收^[89]。土壤中添加外生菌根真菌 (*Paxillus involutus*) 后, Cd、Cu、Pb、Zn 等 NH_4NO_3 提取态较未添加菌处理分别提高了 1.22、1.11、1.33 和 1.43 倍^[93]。固氮微生物 (*Azotobacte chroococcum*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus megaterium*, 一种磷酸盐溶解菌, *Bacillus mucilaginosus* 可能通过分泌低分子量有机酸降低土壤 pH, 从而增加 Cd、Pb 和 Zn 的生物有效利用率^[96]。

自然界中耐砷微生物存在着多种不同的砷转化机制, 包括砷的氧化、还原及甲基化等, 从而影响砷在环境中归趋。研究发现, 异养砷还原微生物能通过还原作用吸附于固体介质上的砷, 从固体矿物中释放出来, 如无定形氧化铁或氧化铝上的砷, 还原为可溶性强的 As(III)。Yamamura 等人利用异化砷还原菌 *Bacillus selenatarsenatis* 进行土壤除砷实验, 使用砷含量为 250 和 1400mg/kg 的污染土壤, 实验中同时还加入醌类物质, 对两种土壤砷去除率可达 56%和 40%, 其中醌类物质的加入可以还原土壤中的 Fe(III)并使其溶解, 释放吸附其上的 As(V), 同时实验证明除砷后土壤的其他矿质营养元素并无太大流失^[97]。赵根成将从砷污染土壤中分离的砷还原菌 *Streptomyces lividans* 施用至蜈蚣草根际土中, 结果证明接种该菌能增加蜈蚣草对砷的积累^[98]。Baum (2006) 发现, 施加微生物 6 个月后, 施菌土壤中的有效性重金属浓度依然高于未加菌土壤, 这表明接种在土壤中的微生物可以存活和代谢活性高。也有研究报道, 施加微生物后对重金属的形态未产生影响。如 Citterio 等 (2005) 将菌根真菌 (*Glomus mosseae*) 加入土壤后, 未改变 Cd、Pb 和 Zn 的形态。

2.4.2.2 提高植物生物量

定殖在植物根部的微生物对植物营养和耐受性密切相关，可以通过多种方式促进植物生长。(1) 微生物代谢可以提高植物营养物的生物利用率，如使土壤许多不溶性的无机盐转化成可溶态，促进植物吸收和利用。如，根际微生物能溶解矿物中的磷酸盐，产生铁运载体等有机络合物。(2) 根际微生物可以合成氨基酸、植物生长素和赤霉素，加快种子萌发和根毛发育；(3) 根际微生物可以通过竞争和拮抗作用抑制或杀死植物病原微生物，增强植物抗病性；目前较多研究集中在植物根际促生长菌 (PGPR) 和菌根真菌对植物生物量提高作用和机制上。

植物根际的微生物数量多而且活性高，构成了根际特有的微生物区。PGPR是根际微生物中能定殖根系，促进植物生长的微生物^[99]。PGPR影响植物生长有两种方式：第一通过抑制植物病原菌间接促生长作用；第二是通过增加植物营养和水分吸收^[86]。PGPR可以通过合成植物激素（吲哚乙酸 (IAA)、赤霉素和细胞分裂素）和产生络合 Fe^{3+} 的铁载体来促进植物生长；通过固氮、溶磷和解钾等作用增加植物对养分的吸收来实现以上作用^[100]。江春燕等从土壤中筛选得到的铅镉抗性菌株，能促进印度芥菜和油菜生长，同时增加植物铅和镉的积累量，较对照增加9%-46.4%和13.9-32.9%，该微生物具有多种重金属和抗生素抗性，具有溶磷、分泌吲哚乙酸、产生铁载体和ACC脱氨酶的能力^[101]。甘蓝型油菜的种子在耐镉的PGPR菌液中浸泡后，植物根重显著增加（从8%-20%），地上部也增加了6%-25%，同时植物体内镉累积量显著增加了16% - 74%，研究表明与PGPR合成的IAA相关^[88]。IAA的浓度与微生物种类有关，不同的微生物合成IAA的能力不同，如侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus strain B-1*) 每毫升菌液能产生4 μg IAA，而枯草芽孢杆

菌 (*B. subtilis* SJ-101) 每毫升菌液则能产生55ugIAA^[102]。土壤中接种荧光假单胞菌 (*P. fluo -rescens* *PsIA12*) 能增加玉米的生长以及植物对宏量元素 (N、P、K) 的吸收, 促进叶片生长和增加了根长。Zaidi等发现接种*B. subtilis* SJ-101, 植物的株高和根长都增加, 同时生物量也显著增加, 同时观察到溶磷现象, 随着磷酸盐的溶解, 土壤pH从7.5降至4.8, 这有助于促进重金属在土壤中的溶解, 增加植物的累积量^[78]。

菌根是土壤中真菌菌丝与高等植物营养根系形成的一种联合体。Bradle等在调查重金属含量很高的矿区时发现, 少量生存的植物中多为菌根植物, 且与非菌根植物相比较生长良好^[103]。含有大量微生物的菌根是一个复杂的群体, 包括放线菌、固氮菌核真菌, 这些菌类有一定的降解污染的能力, 同时, 菌根根际提供的微生态使菌根根际维持较高的微生物种群密度和生理活性, 从而使微生物菌群更加稳定。越来越多的研究表明, 大部分菌根真菌具有很强的酸溶和酶解能力, 可为植物传递营养物质, 并能合成植物激素, 促进植物生长; 菌根真菌的活动还可改善根际微生态环境, 增强抗病能力^[104]。Richen和Hofner研究了基因工程根瘤菌 (*Mesorhizobium huakuii*) B3对紫云英属豆科重金属吸收的影响, 研究发现, 菌根共生体能使根瘤中 Cd^{2+} 的积累量增加17% ~ 20%; 陈秀华和赵斌研究了在不同Cu污染土壤中接种菌根真菌, *Glomus intraradices*和*G.mosseae*对紫云英生长的影响, 结果表明: Cu^{2+} 污染土壤中接种*G1 intraradices*对紫云英生长具有促进作用^[105]。Yu Liu等在砷超富集植物中接种菌根真菌 (*Glomus mosseae*), 菌根定殖后地上部和地下部的重量著增加了1-2倍, 同时增加了P和As的含量^[22]。目前, 关于菌根强化重金属污染土壤植物修复的机理研究不多, 黄艺和黄志基指出了外生菌根在植物抗重金属毒害中的积极作用, 将其抗性机理概括为: 外延菌丝的吸收作用; 菌根分泌物的调节与螯合作用;

菌根真菌的疏水性作用等^[106]。

2.5、微生物强化砷超富集植物修复的关键问题

2.5.1 高效微生物筛选

微生物强化植物修复污染土壤的关键是根据土壤污染的实际情况寻找合适的匹配超富集植物的微生物。由于微生物种类众多，植物生长周期长，完全依赖植物种植实验的方法来筛选强化砷超富集植物修复的最优微生物是不现实的。高效微生物的筛选应考虑：选择目标土壤中占优势的菌落且能参与重金属生物有效性改变的微生物；对超富集植物根际定殖能力强；具有较强的环境适应力^[107]。Lebuau 建议可以利用含有人工合成植物根际分泌物组成的液体培养基对土壤微生物进行培养，验证其在模拟根际环境中的生物活性，然后将其接种于土壤中，测定其对重金属生物有效性的影响及在土壤中的存活能力^[78]。根际分泌物对微生物在根际中定殖以及微生物—植物体系的重金属修复效率起着重要的作用。预选将大大降低微生物筛选时间，可以便于多种微生物配对植物模式的选择。

目前，虽然有大量关于耐砷微生物的研究报道，主要集中在对从砷污染土壤或矿渣中耐砷微生物的耐砷特性及生物化学耐砷机制的研究^[108-111]。而对从耐砷植物根际中筛选用于强化超富集植物砷修复优势微生物的强化作用、机制及影响因素的研究还较少。实际上，从自然界中分离富集出要具备上述 3 项条件的强化植物修复的微生物并不容易，鉴于此，采用基因工程方法来提高微生物对重金属耐受能力、根际定殖能力、环境耐受力以及对增加重金属移动性的能力是可行的办法。然而相关研究报道较少。基因工程菌可以打破种属的界限，把重金属抗性基因或编码重金属结合肽的基因转移到对污染土壤适应性强

的微生物体内，构建高效菌株^[112]。

2.5.2 微生物强化植物修复研究

微生物强化植物修复技术，可提高重金属污染土壤的植物修复效率。目前，虽然取得了一些进展，但仍然存在大量问题制约着该项技术的应用，要使其发展成为一项成熟的实用修复技术，还需要开展以下方面的深入研究：（1）深入了解植物根际尤其是根际分泌物与微生物的相互作用机理，明确相互作用关系和过程。（2）研究影响微生物强化植物修复的环境因子，如土壤温度、湿度和养分状况等环境条件，选择最适的环境因子，便于对该项技术在实际环境中的应用进行调控。（3）研究促进外源微生物在植物根际定殖的影响因素及强化因子，确保在修复过程中外源微生物的活性和有效性，达到强化的目的。

2.5.3 微生物强化植物修复对环境的影响

微生物强化植物修复作为原位修复技术，必须要考虑其对环境的影响。在土壤中引入外源微生物后，促进土壤中重金属移动性增加，其增加量高于植物吸收量，可能导致污染下层土壤和地下水污染风险。这个现象已经在由表面活性剂强化植物修复的应用中观察到，在芜菁、豇豆和小麦根际中加入 EDTA，引起土壤中可移动 Pb 的显著增加，增加量高于植物吸收量^[113, 114]。另外，还需要评价微生物强化植物修复过程对于土壤生态系统的影响。尤其是如果在土壤中引入基因工程菌，可能存在潜在的生态风险，在国际上其环境安全问题仍存在很大的争议，实际应用仍受到严格限制。

第三章 实验材料与方法

3.1 实验材料

3.1.1 供试盆栽土

取自湖南郴州邓家塘砷污染土壤植物修复基地。该基地为中国科学院地理科学与资源研究所污染场地修复课题组在我国建立的第一个植物修复示范基地(北纬 24° 53' ~26° 50' ,东经 112° 50' ~114° 14' , 海拔 344m)。用土取自湖南郴州砷污染土壤, 基本理化性质为: 土壤 pH 为 7.34, 有机质含量为 18.4g/kg, CEC 为 26cmol/kg, 总砷含量为 115.74mg/kg。全磷为 22.95g/kg, 全氮为 1.61 g/kg。土壤为细砂土, 其砂粒占 59.9%, 粉粒占 24.7%, 粘粒占 15.4%。供试土壤室内自然风干, 磨碎, 过 2mm 筛, 混匀, 备用。

3.1.2 蜈蚣草

蜈蚣草来自湖南郴州无砷污染土壤的野生植株, 选择株高 5~10cm、4~5 片羽叶、根茎大小一致的植株。每盆移栽 1 株蜈蚣草。温室温度控制范围在 22~25℃, 室内相对湿度控制在 75~80%。

3.1.3 菌种及菌液制备

供试菌种由同济大学提供。F2: 来自于砷污染土壤(砷含量为 90-300mg/kg) 中土著筛选微生物 F2 (*Streptomyces* sp.); F2As: 将 F2 的重金属砷还原转化 *arsC* 基因 (Genebank 登录号: AY943951) 通过同源重组的方法整合到遗传稳定性好的变铅青链霉菌染色体 (*Streptomyces lividans*.) 内, 构建了基因工程菌 F2As。F2 和 F2As 采用 TSB 培养基, 按 10% 的接种量, 在 30℃, 220rpm 振荡培养, F2 培养 36h, F2As 培养 54 h。将上述菌的活化液加入 TSB 培养基中, 摇床

培养制备发酵种子液 300mL。发酵液共制备 3.2L。在 4℃，6000rpm 下离心 10min，弃去上清液，沉淀用无菌去离子水清洗 2 次。用无菌去离子水配制成菌悬液。将 F2 和 F2As 菌液的浓度调整为 3×10^6 cfu/mL，将一半 F2 和 F2As 的发菌液在高压灭菌锅中处理 121℃，15min 制成灭菌液。

3.2 实验方法

3.2.1 实验设计

共设 8 个处理，分别是添加灭菌 F2 的空白对照组 (CK1)、添加灭菌 F2 菌液的种植物对照组 (CK1+P)、F2 菌液处理组 (F2)、F2 菌液+蜈蚣草处理组 (F2+P)；以及添加灭菌 F2As 菌液的空白对照组 (CK2)、添加灭菌 F2As 菌液的种植物对照 (CK2+P)、F2As 菌液处理组 (F2As)、F2As 菌液+蜈蚣草处理组 (F2As+P)。每个处理设 4 个重复。蜈蚣草移栽 7d 确保成活后，分别施入灭活和活性菌悬液，菌悬液采用针头，通过根际灌注（离表层土壤为 10cm，为根系底部位置）和表层喷洒的方式施加，添加后适当翻动表层土壤，使菌液在表层土壤（0-10cm）混合均匀。每盆加入 50 mL 的菌悬液或灭菌悬液。

3.2.2 样品采集及处理

60 天时收获植物和土壤，利用晃动根部，获得非粘附的土壤，作为非根际土。用软毛刷刷下粘附在根际的土壤作为根际土。土壤样品分成 3 份，一份在室内自然风干，用于测定总砷、砷结合态及其他元素；一份保存在 4℃，用于测定微生物总数和 DOC；一份保存在 -80℃，用于测定砷形态。

植物先用自来水冲洗干净，然后用去离子水洗涤 3 遍。植株上的水珠用滤纸吸干，称取植物生物重，将植物分为地上部、地下部。地

上部和地下部的植物各分成 2 份，一份在烘箱烘干，用于总砷和磷的测定。一份保存在-80℃，用于砷形态的测定。

3.3.3 分析方法

①微生物生长曲线的测定

将筛选所得的 F2 以及 F2As 从保藏试管中取出，接种于含有灭菌的胰蛋白胨大豆肉汤（TSB）液体培养基中活化 18h，取出 1ml 转入盛有 50ml 灭菌 TSB 液体培养液的 150ml 三角瓶中，放于振荡培养起中培养，30℃，200rpm，每隔 6h，取 5ml 不同时间菌液，进行过滤，收集菌体，沥干后称重。取一定量滤纸，用滤液润湿，作为对照，均置于 100℃烘箱中，烘干至恒重。菌体的干重=菌体滤纸干重-对照滤纸干重。

②微生物耐砷性能的研究

取 1mLF2 和 F2-As 的 OD600 为 0.8（保证相似的初始细胞密度）左右的活化液（见 3.1.1），接种于含 100mL TSB 培养基的 500mL 三角锥形瓶中，24h 后。在其中加入不同浓度的砷酸钠（用无菌水配置，并过无菌滤膜，保证无菌），浓度初定为 0、20、40、60、80、100mM。在 30℃，220rpm，水浴振荡培养。24 后，收获菌液，4℃，7000rpm，离心，用蒸馏水洗涤 2 次，在 80℃烘至恒重，称取菌丝重量。每个处理 3 个重复。

③土壤微生物及耐砷微生物数量

准确称取待测土壤样品 0.5g，放入装有 99.5mL 无菌水并放有玻璃珠的 250mL 锥形瓶中，25℃振荡 1h，使微生物细胞分散，吸取 1mL 悬浮液于 9mL 无菌水中，菌液混合均匀，依次稀释到 10^{-5} 得到一系列稀释度的菌液，在 TSA 固体培养基上培养，计算总菌落数。在含 10mM

砷酸盐的 TSA 培养基上培养，计算耐砷菌落数。每个处理重复 3 次。

④土壤和植物总砷

采用硝酸-双氧水消煮土壤样品，硝酸-高氯酸消煮植物样品，AFS 测定总砷。将国标（GBW-07603）作为分析质量控制。其结果在允许误差范围内。

⑤土壤砷和植物砷形态

土壤砷形态：准确称取 2g 冷冻干燥的土壤样品于 50mL 塑料离心管中，加入 10mL 提取剂（1.0mol/L 的磷酸+0.1mol/L 抗坏血酸），振荡 2h(300r/min)，离心 15min（3000r/min），上清液过滤至 50mL 容量瓶中；再加入 5mL 提取剂进行第二次提取，方法同第一次；2 次上清液过滤至 50mL 容量瓶后，定容，摇匀；取 1mL 于 50mL 容量瓶中稀释 50 倍，定容，摇匀；取 2mL 过 0.2 微米滤膜，用原子荧光光谱-液相色谱联用（LC -AFS）测定砷形态。

植物砷形态：取植物鲜样，先用自来水冲洗，再用去离子水冲洗。把洗好的植物样，放进冷冻干燥机干燥。（或者用鲜样做，称 1g）把干燥好的样品用研钵研成粉末状。称取粉末样品（0.2g），放进 50ml 塑料离心管中。向离心管中加 10ml 的提取液（1：1 甲醇水）。把离心管放入超声机超声 1h，每隔 15 分钟拿出来震荡，易于提取。把样品放进离心机离心（4000 rpm 离心 15 min）。离心后把上清液完全无损的倒入容器中，分离出来（超声离心重复 2 次以后每次加 5ml 的甲醇水）。把三次离心液合并，残渣用 5ml 去离子水冲洗 3 次，用旋转蒸发仪把甲醇吹出（吹出体积大于加入的甲醇的体积），倒入容量瓶中，加去离子水定容。从溶液中吸取 2ml 过 0.45 的膜、按合适比例稀释。用 LC-AFS

测定砷形态。

⑥土壤结合态：土壤砷结合态分析采用武斌等（2006）分级方法连续提取^[115]。

⑦土壤 DOC 含量：定量称取 10g 土壤，置于 150mL 三角瓶中，加入 50ml 超纯水。连续振荡 2h，3500g 离心 15 分钟，过 0.45 μ m 水系滤膜。取 10mL 水样上机测定[122]。

3.3 数据处理

文中所用到的相关分析和方差分析等均通过 SPSS 统计软件进行。

第四章 结果与分析

4.1 耐砷微生物及基因工程菌的生物学特性研究

课题组前期通过对砷污染土壤（砷含量为 90-300mg/kg）微生物富集、分离、纯化，获得具有耐砷性能的微生物 F₂。通过对 F₂ 中砷盐抗性、透膜转移及价态转化相关的基因簇的分析研究，发现其含有参与砷还原转化的 *arsC* 基因。为了提高微生物在环境中的适应性，将 F₂ 的重金属砷还原转化基因通过同源重组的方法整合到遗传稳定性好的变铅青链霉菌染色体 (*Streptomyces lividans.*) 内，构建了基因工程菌 F₂As。本节实验开展耐砷菌 F₂ 和基因工程菌 F₂As 的生物学特性研究，为下一步开展微生物强化植物修复实验参数的选择提供数据支持。

4.1.1 微生物的生长特性

图 1 反映了链霉菌 F₂ 和基因工程菌 F₂As 的培养时间与菌体生长量之间的关系。链霉菌 F₂ 在 6~12h 处于延滞期，12~36h 处于对数生长期，此时菌体代谢旺盛，菌体数量和活性最大，36h 后进入稳定期和衰亡期，由于培养基中含有葡萄糖，能促使菌体二次生长，所以在 66~72h 菌体出现了二次增长。基因工程菌 F₂-As 菌体在开始时的 6~24h 菌体处于生长的迟缓期，在 24~54h 时处于对数生长期，在 66~84h 时同样出现了二次增长。根据链霉菌 F₂ 和基因工程菌 F₂As 的生长变化情况，确定用于后续强化植物修复试验的 F₂ 发酵时间为 36h，而 F₂As 为 54h。Lebeau 认为利用微生物强化植物修复时，对微生物的选择要考虑微生物在环境中的生长特性，通过生长率将微生物分为两类，定义为 r-或者 k-模式微生物。r-模式为，例如曲霉属真菌、芽孢杆菌属、假单胞菌属等，当提供合适的营养物质时，这类微生物具有高活性和

高的生长率。适用于重金属生物有效性高的新近污染，且污染面积较小的土壤。而 K-模式微生物，为革兰氏阴性菌和放线菌，在环境中显示出低的生长特性，其在一段时间内比较稳定，适合于长期受污染的土壤^[78]。实验中所采用的耐砷微生物 F2 为放线菌，基因工程菌 F2As 以放线菌为表达载体，其也具有放线菌环境适应性强的特点，而且基因工程菌的生长速率低于 F2，按照 Lebeau 的微生物筛选建议，F2As 较 F2 更利于在长期污染的土壤适用。

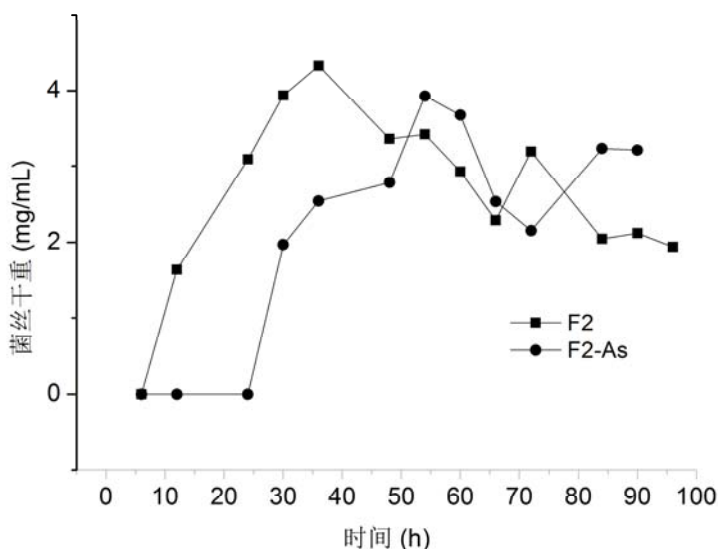


图 1 链霉菌 F₂ 和基因工程菌 F₂-As 菌体生长量的变化

4.1.2 微生物的耐砷性

随着砷酸盐浓度的增加，液体培养基中的 F2 和 F2-As 的生长受到抑制，表现为 F2 和 F2-As 的菌丝生成量随着砷酸盐浓度的增加而下降，但在高达 100mM 的砷酸盐浓度下 F2 和 F2-As 仍然能生长。添加砷酸盐 24h 后，20mM 的砷酸盐能显著抑制 F2 的生长 ($p < 0.01$)，对 F2-As 的生长影响相对较小，虽能降低生成的菌丝重量，但未达显著性差异，

表明在一定的砷浓度范围内（0~40mM）基因工程菌 F2-As 的砷耐受性优于耐砷土壤筛选菌 F2，见图 2。土壤中砷的倍强吸附于粘土矿物、铁锰氧化物和有机物质上，其生物有效性砷仅占很小的一部分，实验中所用的两种微生物，从对砷的耐性而言，具备了在砷污染土壤中存活的能力。

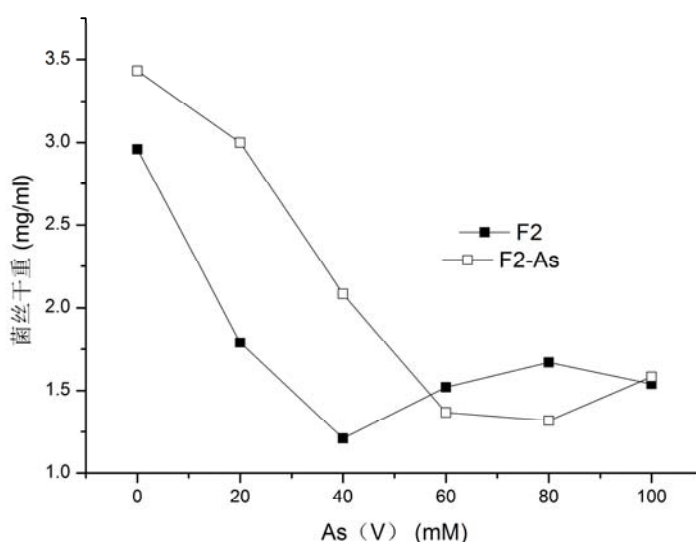


图 2 不同浓度的硝酸盐对微生物生长的影响

4.1.3 小结

(1) 耐砷微生物和转基因工程菌均具有放线菌的特性，具备用于修复污染时间长且面积大的重金属污染土壤的能力。耐砷微生物 F2 的对数生长期为 12-36h，转基因工程菌 F2-As 的对数生长期为 24-54h。转基因工程菌到达生长高峰期的时间比耐砷微生物更久，其在土壤有效作用时间更长，可能修复效果将更好。

(2) 耐砷微生物 F2 和转基因工程菌 F2As 在 100mM 的砷酸盐溶液中仍能生长，具有砷耐受性，具备了在砷污染土壤中定殖的能力。在 0-40mM 的砷酸盐溶液中，F2As 的菌丝生长量高于 F2，表明在 0-40mM 的砷酸盐的范围内，基因工程菌 F2-As 具有更高的砷耐受性。

4.2 耐砷微生物对蜈蚣草砷富集作用的影响

植物修复技术因其成本低廉、环境友好和原位修复等优点在治理重金属土壤污染领域备受关注，但是，由于修复植物通常受生长周期、土壤中重金属生物有效性的影响，修复效率难以进一步提高。近年来，如何通过强化策略进一步提高植物超富集植物修复效率方面的研究已成为植物修复技术领域的关注热点。经过研究表明，微生物可通过促进植物生长，提高植物重金属富集作用，或可通过提高土壤中重金属的生物可利用性来强化植物修复。因此，研究微生物对于促植物修复的作用及机制是植物修复重金属污染土壤的重要方向之一。

本节研究选择砷超富集植物蜈蚣草作为供试植物，利用课题组从高砷土壤中筛选的具有耐砷性的菌株以及构建的基因工程菌为微生物材料，利用温室盆栽实验，研究其对蜈蚣草生长及砷吸收作用的影响，确定微生物是否具有强化蜈蚣草砷提取作用；同时研究了蜈蚣草体内磷分布的影响，探索施加外源微生物对蜈蚣草耐砷性能的影响。

4.2.1 微生物对蜈蚣草生长的影响

表 1 不同微生物处理下对蜈蚣草的生物量（干重）的影响(g/pot)

菌剂类型	处理	生物量		
		地上部	地下部	总量
F2	CK1+P	4.99±1.69	4.02±0.84	9.06±3.06
	F2+P	5.84±1.20	4.13±1.14	9.97±2.02
F2-As	CK2+P	6.49±1.89	4.35±1.02	11.30±3.30
	F2As+P	5.72±0.30	4.80±2.65	10.21±2.94

由表 1 可知，施用砷还原菌 F2 及基因工程菌 F2-As 对蜈蚣草的生长无明显影响。施用 F2 后，蜈蚣草处理组的地上、地下部重量和生物总量均高于施用灭菌处理的 F2 菌液对照组(CK1+P)，分别升高了 17.03%、2.74% 和 10.04%，但无显著性差异。施用活性基因工程菌 F2-As 的蜈蚣草后，地上部重量及生物总量均低于灭菌处理菌液对照组，分别下降了 11.86% 和 9.65%，而地下部上升了 10.34%，但也都未达到显著水平。课题组前期研究发现，在蜈蚣草中加入 F2 和 F2-As 均能促进植物生物量显著增加，分别提高 47.81% 和 21.08^[116]，这可能与本实验中未进行施肥处理有关。微生物在土壤中生长代谢需要消耗营养物质，只有当自身的营养需求被满足时才会提高植物的养分，否则影响植物对养分的吸收和生长^[117]。实验用土采用的是郴州石灰性土壤发育的水稻土，土壤营养元素含量较低，微生物与植物竞争营养元素利用，从而导致植物生物量出现下降。微生物超富集植物的生物量是影响其修复效率的一个关键因素，因此在施用微生物强化植物修复过程中，应当注意其他强化措施如施肥、水分管理等技术相结合。

4.2.2 微生物对蜈蚣草砷浓度的影响

表 2 不同微生物处理下蜈蚣草砷含量 (mg/kg)

	CK1+P	F2+P	CK2+P	F2-As+P
地上部	529.82±42.32a	929.98±289.38b	600.25±262.09a	1300.41±454.87b
地下部	489.01±159.52a	418.53±153.66a	414.57±146.95a	491.19±261.63a

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异, 相反为达到显著性差异。

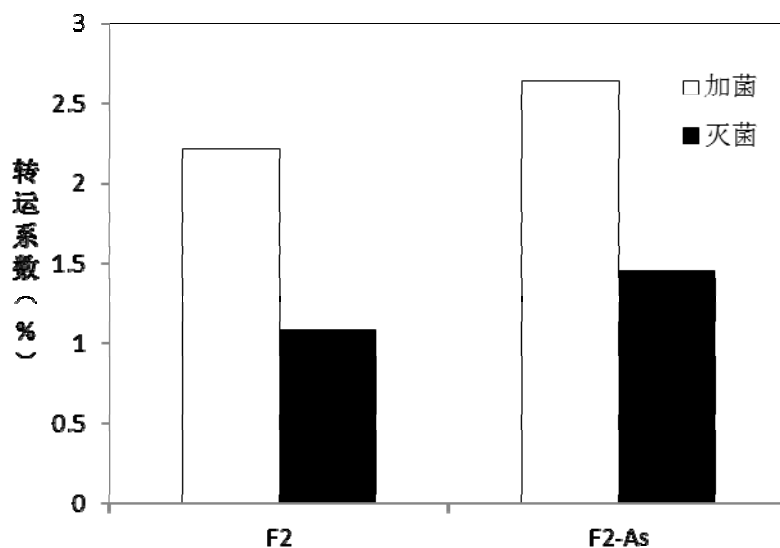


图 1 不同微生物对蜈蚣草砷转运系数的影响

施加微生物对蜈蚣草砷吸收的影响如表 1 和图 1 所示。添加 F2 和 F2-As 均能显著提高蜈蚣草地上部对砷的吸收 ($p < 0.05$), 促进蜈蚣草对土壤砷从地下部到地上部的转运, 其中 F2-As 的增效作用优于 F2

(表 2)。F2-As 处理后蜈蚣草地上部砷浓度为 1300mg/kg，是对照 (CK2+P) 的 2.17 倍，转运系数是 2.64，为对照组的 1.83 倍。F2 处理组地上部砷浓度为对照组 (CK2+P) 的 1.76 倍，其转运系数为 2.22，是对照组的 2.06 倍，见图 1。施用 F2-As 处理的蜈蚣草地下部砷浓度高于对照地下部浓度，较对照组增加 18.48%，而 F2 比对照组低 14.41%，但均未达显著性差异。蜈蚣草能将砷从根部向地上部迅速转移，这是其耐砷的重要机制。转运系数 (指蜈蚣草的地上部与地下部砷浓度的比值)，是衡量植物转运能力的重要指标，本实验中施加微生物增加了蜈蚣草的转运系数，表明 F2 和 F2-As 能提高蜈蚣草砷由地下部向地上部转移的能力，从而增强蜈蚣草的耐砷性。

4.2.3 微生物对蜈蚣草砷累积的影响

表 3 微生物对蜈蚣草累积砷的影响 (mg/pot)

菌剂类型	处理	砷累积量		
		地上部	地下部	总量
F2	CK1+P	2.58±1.22a	1.99±0.83a	4.56±1.77a
	F2+P	5.40±0.35b	1.81±0.43a	7.37±1.27b
F2-As	CK2+P	3.46±0.89a	1.73±1.02a	5.33±1.40a
	F2As+P	7.43±2.30b	2.38±0.65a	9.39±2.44b

a 小写字母表示列内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异，相反为达到显著性差异。

添加微生物后对蜈蚣草砷累积的影响如表 3 所示。与对照组比较，施用微生物能显著提高蜈蚣草地上部及整株植物的砷累积量 ($p < 0.05$)，其中 F2-As 处理的蜈蚣草有更强的促积累作用。F2-As 菌液处理的蜈蚣草地上部及整株植物砷总累积量为 7.43、9.39mg/kg，分别是 (CK2+P) 组的 2.15 和 1.76 倍； F2 菌液处理的蜈蚣草地上部及整株

植物总累积量增幅较 F2-As 处理低，分别是对照组（CK1+P）的 2.09 和 1.61 倍。F2As 处理的蜈蚣草总砷积累量较 F2 处理组增加了 27.40%，但无显著性差异。施菌处理后，由于地下部生物量以及砷浓度的影响，F2 地下部砷积累量较对照组偏低，降低了 9.04%，F2As 高于对照组，增加了 37.57%，但均无显著性差异。以上结果表明：供试微生物 F2 和 F2-As 能强化蜈蚣草对土壤中砷提取作用，可以作为强化植物砷修复的微生物材料。研究表明：微生物主要通过影响植物对营养元素吸收、增强抗病性等来提高植物生物量，或者改变土壤中重金属的移动性和生物有效性实现其对植物修复效果的影响。如 Yu Liu（2009）等发现在蜈蚣草根中接种丛支菌根真菌可以增加蜈蚣草生物量，促进蜈蚣草砷吸收^[22]。本文中添加外源微生物后，蜈蚣草生物量并未有显著改变，因此 F2 和 F2As 能促进蜈蚣草对砷吸收，可能是由于微生物影响了根际环境中砷的生物有效性。F2 和 F2As 中含有 As(V)还原基因（arsC），能将 As(V)还原成 As（III），因此可能是通过微生物对生物利用性低的 As(V)还原，促进土壤中生物利用性高的砷增加，从而增强了蜈蚣草的砷富集作用。

4.2.4 微生物对蜈蚣草磷含量的影响

图 3 和图 4 反映了不同微生物处理后，蜈蚣草地上部和地下部的磷含量以及 P:As 摩尔比。施加微生物均能促进蜈蚣草地上部和地下部的磷吸收，施用 F2 后，蜈蚣草地上部的 P 浓度为 1.91g/kg，较种植植物对照组（CK1）增加 46.92%，但无显著性差异；施用 F2-As 后，蜈蚣草地上部 P 的浓度可达 2.11g/kg，较不种植植物对照组（CK2+P）增加 74.38%，具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。施加 F2-As 后蜈蚣草地上部的磷比施加 F2 地上部增加 10.52%。F2+P 处理组地下部的磷含量为

0.95g/kg, 比 CK1 增加 51.61%; 施用 F2As 后, 蜈蚣草地下部磷浓度比对照组 (CK2+P) 提高 26.29%。已有的研究发现, 植物中磷元素营养状况与植物耐砷性能有关, 蜈蚣草可在高浓度砷的环境中也具有高效的磷吸收、储存和利用机制, 避免了进入细胞的砷在生化反应过程中取代磷而干扰正常的磷代谢过程^[118], 从而降低砷对植物的毒性。本实验中加入外源微生物后, 植物体内磷含量增加, 可能与应对施加微生物后, 植物中砷累积量增加所产生的砷毒性有关 (见表 3)。

P:As 能反应蜈蚣草中 P 和 As 的浓度和及其在植物体内的分布状态, 一般认为, 蜈蚣草根部的 P:As 是其耐砷的一种重要机制。^[119]。本实验结果表明: 添加活性微生物后, 蜈蚣草根部的 P:As 均高于叶部, 而未施加活性微生物的对照组, 则相反。施加微生物后, 均能提高根部的 P:As 比, 其中施加 F2 后, 与种植植物对照组 (CK1+P) 相比, P:As 比提高 43.94%; 而施加 F2-As 的蜈蚣草根部的 P: As 比 CK2+P 提高 6.19%。添加 F2 和 F2As 后蜈蚣草植物体内具有保持高 P:As 能力, 尤其是根部具有较高的 P:As。该结果表明: 施加外源耐砷微生物后, 可以提高植物对磷的吸收, 增加了蜈蚣草体内尤其是根部的 P: As, 从而增强植物对砷的耐受性。

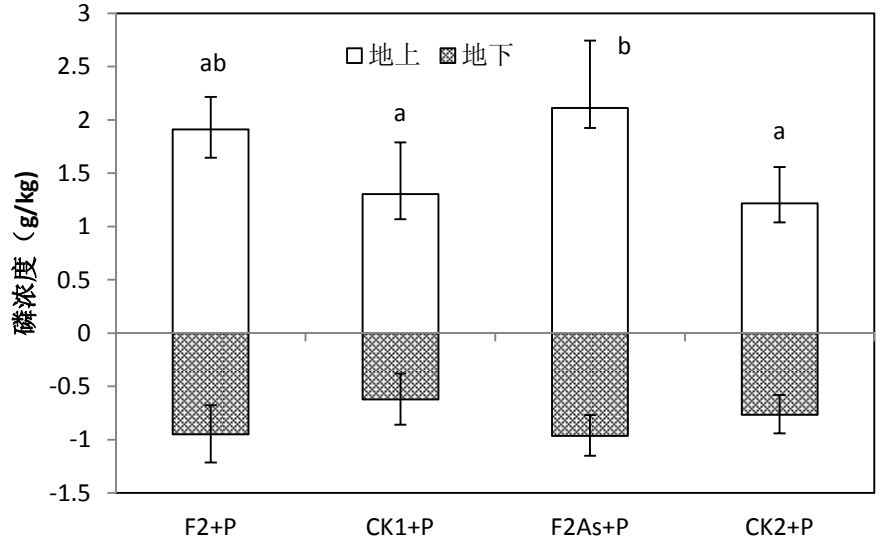


图 3 不同微生物处理后蜈蚣草地上部及地下部 P 浓度

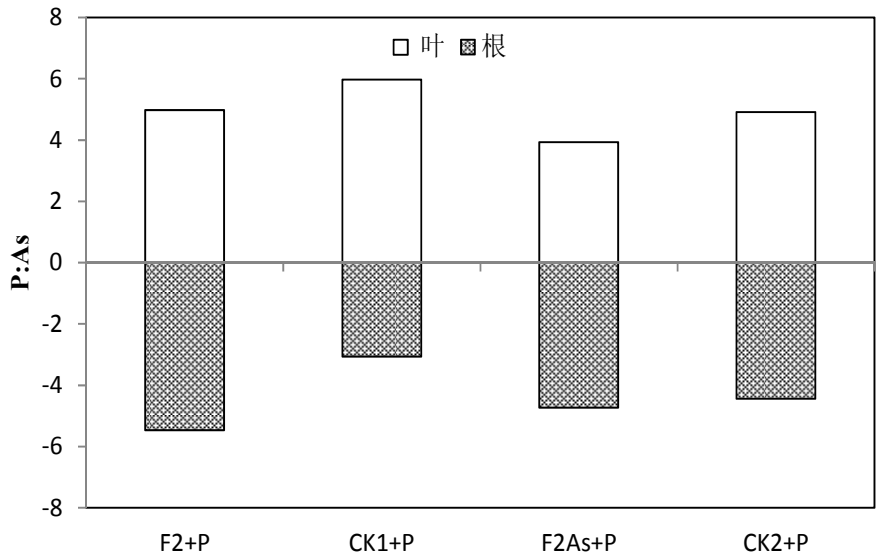


图 4 不同微生物处理后蜈蚣草 P:As 摩尔比

4.2.5 施用不同微生物后对土壤总砷的影响

添加砷酸还原菌 F2 后，蜈蚣草根际土壤的总砷浓度较其余各处理组均有显著下降 ($p < 0.05$): 与不种植物的对照组 (CK1) 及菌土 (F2) 组相比, 分别降低了 32.93% 和 33.99%; 与种植植物对照组 (CK1+P) 根际土壤相比, 下降了 22.06%。由于蜈蚣草对砷的超富集作用, 种植植物对照组 (CK1+P) 的根际土壤砷浓度与 CK1 和 F2 组比较, 表现为显著降低 ($p < 0.05$), 分别降低了 CK1 降低了 18.93% 和 18.06%, 其砷浓度下降量低于施加 F2 菌处理的蜈蚣草根际土壤。将蜈蚣草和微生物作为影响土壤总砷变化的因素, 对根际土壤进行考虑交互作用的双因素方差分析, 结果表明蜈蚣草对于土壤总砷减少产生显著性影响, 其 $p < 0.05$; 而施用砷酸还原菌 F2 及种植蜈蚣草以施用砷酸还原菌 F2 的交互作用影响均不显著。表 4 表明, 砷酸还原菌 F2 能有效增强蜈蚣草对根际土壤砷的去除能力, 但在该实验条件下, 砷酸还原菌和蜈蚣草对于根际土壤砷去除能力未出现显著交互作用。在非根际土壤砷浓度变化上, 种植植物 F2 的处理组以及对照组与不种植植物对照组 (CK1) 及菌土组 (F2) 的总砷浓度均无显著性差异, 但都显著高于 F2+P 处理组的根际土壤砷浓度 ($p < 0.05$)。

与施加土著砷还原菌 F2 后蜈蚣草根际土壤变化相类似, 施加基因工程菌 F2-As 的蜈蚣草根际土壤的砷浓度较其余各组均有显著下降 ($p < 0.05$), 分别比不种植植物对照组 (CK2)、菌土组 (F2-As) 以及种植植物对照组 (CK2+P) 根际土下降 56.18%、60.69% 及 41.72%, F2As 处理的蜈蚣草根际土壤砷浓度降低幅度高于 F2 处理组。同样进行根际土壤的考虑交互作用的方差分析, 结果表明: 蜈蚣草能对根际土壤总砷浓度减少产生显著性影响 ($p < 0.05$), 同时, 种植蜈蚣草时施用 F2-As

比单独种植蜈蚣草效果要好，其具有显著的交互作用 ($p<0.05$)。在非根际土壤砷浓度变化上，种植植物 F2-As 的处理组以及对照组的非根际土壤与不种植植物对照组 (CK1) 及菌土组 (F2) 的总砷浓度均无显著性差异，同时都显著高于 CK2+P、F2+P 处理组的根际土壤中砷浓度 ($p<0.05$)。以上结果表明：施加外源微生物后，能提高蜈蚣草对根际土壤中砷的去除能力，尤其是基因工程菌的去除效果更好，用基因工程菌后蜈蚣草对土壤砷去除具有协同作用。

表 4 微生物对土壤中砷浓度的影响 (mg/kg)

处理组	土壤总砷 (mg/kg)		处理组	土壤总砷 (mg/kg)	
CK1	107.95±3.91a		CK2	101.62±12.50a	
F2	103.32±9.66a		F2-As	113.22±6.04a	
F2+P+根际土	68.20±9.02b		F2-As +P+根际土	47.52±5.39b	
F2+P+非根际土	102.79±3.10ac		F2-As +P+非根际土	106.02±9.58a	
CK1+P+根际土	87.51±15.22c		CK2+P+根际土	76.40±17.85c	
CK1+P+非根际土	106.12±8.66a		CK2+P+非根际土	102.03±11.22a	
析因分析*					
根际土	F	P	根际土	F	P
蜈蚣草	23.48	0.0010	蜈蚣草	4.12	0.0010
F2	3.86	0.078	F2-As	46.61	0.067
蜈蚣草*F2	1.80	0.21	蜈蚣草*F2-As	14.65	0.0030

a 小写字母表示列内各处理组间的显著检验差异 ($p<0.05$)。有相同字母为无显著差异，相反为达到显著性差异。

*表示对 CK1、F2/F2-As、CK1/CK2+P+根际土壤、F2/F2-As+P+根际土壤的总砷浓度进行考虑交互作用的双因子方差分析结果。

4.2.6 微生物对蜈蚣草砷形态的影响

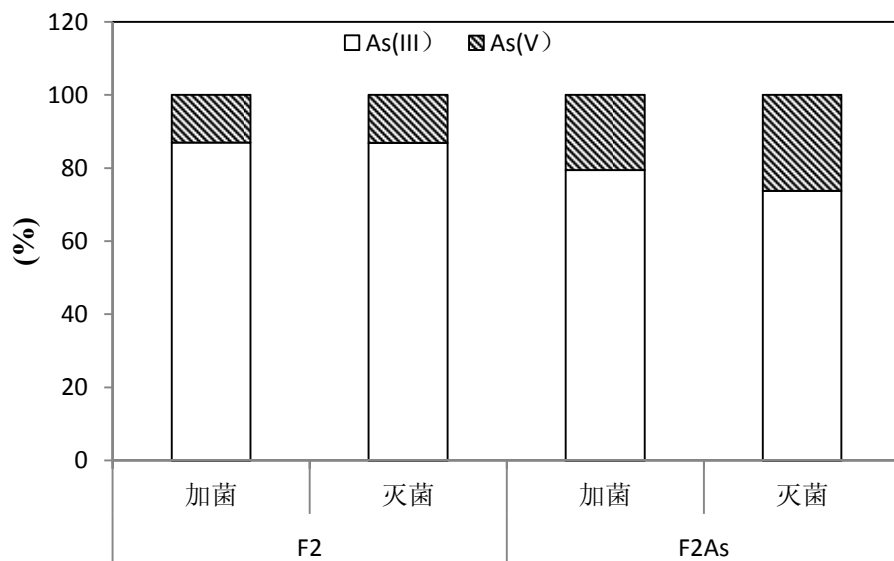


图 5 微生物对蜈蚣草地上部砷形态分布的影响

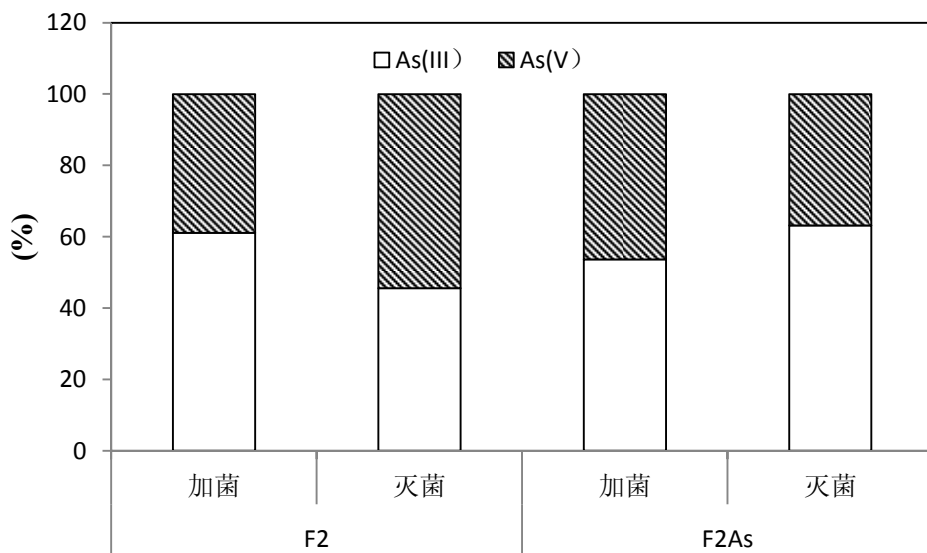


图 6 微生物对蜈蚣草下部砷形态分布的影响

图 5 和图 6 为施加外源微生物后对蜈蚣草体内砷形态变化的影响。研究发现，蜈蚣草地上部和地下部均以 As (III) 为主。添加耐砷微生物 F2 后，地下部 As (III) 比例较对照组增加 15.56%，而对地上部 As (III) 则无影响。蜈蚣草体内砷形态分布与培养介质中砷形态以及植物生理活性有关。F2 处理组蜈蚣草根部分 As (III) 增多，可能与 F2 促进土壤中 As (V) 还原成 As (III) 有关。Mathews 等 (2010) 发现蜈蚣草在一定时间内，当培养介质中三价砷占有一定比例时，蜈蚣草地下部三价砷含量显著增加。F2As 对蜈蚣草砷形态分布影响不同于 F2。添加 F2As 能增加地上部 As (III) 比例，较对照组提高 5.67%，而地下部 As (III) 比例下降了 9.48%。有研究认为：蜈蚣草吸收五价砷在地下部还原为三价砷，然后以三价砷形式转运到地上部并储存在地上部液泡里，这是蜈蚣草特有的耐砷及解毒机制，本实验中 As (III) 增多，可能与该处理下蜈蚣草高效的砷转运能力有关。Lei 等 (2012) 蜈蚣草对三价砷的转运能力显著高于五价砷。结合 F2As 转运系数，可知添加 F2As 能促进砷在蜈蚣草体内的转运，推测可能与 F2As 处理下蜈蚣草地上部三价砷所占比例增加有关。

4.2.6 微生物对蜈蚣草修复效率的影响

添加微生物后，能有效提高蜈蚣草对土壤砷的修复效率 (图 7)。实验表明：施用 F2、F2-As 灭菌处理的微生物菌液 (对照组) 后，蜈蚣草的修复效率分别为 3.94% 和 4.62%；添加活性的 F2、F2-As 菌液后，蜈蚣草的修复效率有了较大的提高，分别为 6.37% 和 8.12%，较各自对照组分别提高了 61.68% 以及 76.35%。不同微生物处理的修复效率相比较，基因工程菌 F2-As 高于土著筛选菌 F2，修复提高了 21.53%。

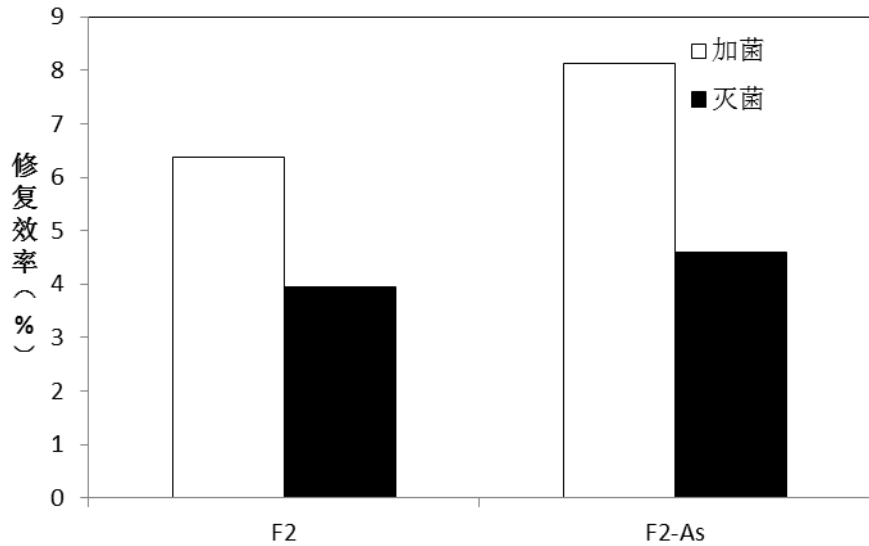


图 7 不同微生物处理下蜈蚣草的植物修复效率

4.2.8 小结

对砷超富集植物蜈蚣草而言，添加含有五价砷还原酶基因（arsC）的耐砷菌 F2 和基因工程菌 F2As 后，均能显著提高蜈蚣草地上部对砷的吸收，增强了蜈蚣草从地下向地上的砷转运能力。在对植物生物量没有显著影响的情况下，增加了植物对砷的积累量，降低根际土壤中总砷含量，有效地提高了蜈蚣草对土壤的砷修复效率。基因工程菌 F2As 的土壤砷修复效率高于耐砷菌 F2，可能于其在土壤中环境适应性强的特点有关，该结果表明在环境风险可控的情况下，转基因菌在砷强化植物修复中有着良好的应用前景。由于蜈蚣草的生物量是砷富集的一个关键因素，本文没有采用施肥处理，可能影响了植物的生长，因此微生物强化植物修复过程中，应当注意其他强化措施如施肥、水管理等技术相结合，在增强土壤重金属移动性的同时，促进蜈蚣草生物量增加，进一步增强蜈蚣草砷吸收富集作用。由于施加微生物后并没

能显著增加蜈蚣草生物量，推测供试微生物通过提高土壤中砷的移动性而促进植物对砷富集作用，另外，随着蜈蚣草砷吸收量的增加，微生物通过影响植物对磷的营养代谢，增加植物体内的磷含量，提高植物根中的 P:As 比，增强植物的耐砷性。

4.3 耐砷微生物对蜈蚣草根际砷赋存形态及根际环境影响

微生物不能降解和破坏重金属，但可通过转化作用和固定作用改变重金属在土壤中的化学形态，从而影响重金属在土壤中的移动性和生物有效性，进而可以影响植物对重金属的吸收^[13]。根际是植物-土壤-微生物交互作用的场所^[120]，是影响植物砷富集的一个关键环节。因此，研究在外源微生物作用下，污染物在根际的土壤-植物系统的迁移转化规律以及土壤-植物-微生物在根际对污染物的协同作用机理对调控微生物修复植物修复技术，提高植物修复效率有着重要的意义。目前在利用微生物强化植物修复砷污染土壤方面开展的研究主要集中在作用效果的研究上，而对于机理方面研究还比较缺乏。本项研究采用砷超富集植物蜈蚣草作为供试植物，通过研究外源微生物对蜈蚣草根际 As 砷形态转化和根际环境生物化学性质的影响，来揭示微生物强化植物砷富集根际机制，研究结果对于明确微生物强化植物根际活化效应以及深入探讨超富集植物根际效应与植物修复调控机制具有重要意义。

4.3.1 微生物对土壤砷赋存形态的影响

4.3.1.1 砷价态

微生物处理后各组土壤砷形态结果见表 5 和表 6。本实验中两种微生物处理组中的土壤中均能检测到 As(V)和 As(III)，其中以 As(V)为主，占土壤中的 86.3%-99.43%，As(III)中占总砷的 0.56%-8.15%，菌土及

加入微生物的蜈蚣草土壤中三价砷浓度较高。研究发现：土壤中的砷以 As(V)和 As(III)存在，其中以 As(V)为主[2]，这与土壤在氧化条件下以及微生物作用有关，在有氧条件下，微生物引起的五价砷还原和三价砷氧化可以共存，砷的氧化还原状态能在五价砷和三价砷之间活性循环[122]。Mathews 等（2010）认为土壤中微生物是三价砷转化的主要原因，蜈蚣草只是为根际微生物提供必要碳源等营养元素[123]。

表 5 F2 对土壤中砷价态的影响 (mg/kg)

处理组	As(III)	As(V)		
F2	0.73±0.12a	128.09±42.54a		
CK1	0.36±0.13b	107.72±25.48a		
F2+P+根际土	2.82±0.93c	79.06±19.23b		
F2+P+非根际土	1.21±0.50a	109.89±23.76a		
CK1+P+根际土	0.59±0.26ab	99.56±2.86a		
CK1+P+非根际土	0.89±0.089ab	102.08±13.38a		
析因分析*				
根际土	F	P	F	P
蜈蚣草	11.80	0.007	3.91	0.074
F2	15.20	0.004	0.00	0.99
蜈蚣草*F2	12.08	0.007	2.00	0.19

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异，相反为达到显著性差异。

*表示对 CK1、F2/F2-As、CK1/CK2+P+根际土壤、F2/F2-As+P+根际土壤的砷价态进行考虑交互作用的双因子方差分析结果。

由表 5 可知，F2 菌土组中的 As(III)浓度是不加植物对照组的 2.03

倍,具有显著性差异($P<0.05$),表明 F2 在盆栽条下能促进土壤中 As(V)的还原。耐砷微生物可以通过对重金属的氧化、还原、甲基化等转化作用,改变土壤中重金属的移动性。已经有研究报道了耐砷微生物可以将 As(V)从固体矿物中释放出来,还原为可溶性强的 As(III)。Yammura 等利用异化砷还原菌去除土壤中的砷,由于在土壤中 As(III)较 As(V)更容易在土壤中迁移,因此 As(V)转化为 As(III)可增加土壤中砷的移动性,为促进植物砷吸收提供可能^[121]。

施加 F2 后,蜈蚣草根际土壤的 As(III)浓度显著高于其它处理组($P<0.05$),是不菌土对照组(CK1)的 7.83 倍,是植物对照组根际土壤的 4.78 倍。植物对照组的非根际土壤中的 As(III)浓度显著高于菌土对照组(CK1)($P<0.05$),同时较植物对照组根际略有增加,其与 F2 菌土处理组含量相似。将蜈蚣草和微生物作为影响土壤 As(III)变化的因素,对根际土壤进行考虑交互作用的双因素方差分析,蜈蚣草和 F2 均能显著影响土壤中 As(III)变化,同时蜈蚣草*F2 对土壤中 As(III)具有显著交互作用($P<0.05$),能显著增加土壤中的 As(III)浓度。以上结果表明:加入砷还原菌 F2 菌后,能促进根际土壤中 As(V)还原成 As(III),F2 和蜈蚣草对于这一过程具有协同作用。这可能是由于植物根系分泌物协同微生物共同作用的结果,促进了耐砷菌的砷还原作用。研究认为,植物根系分泌物中含有较高浓度的碳水化合物和氨基酸等物质,为土壤微生物提供了营养物质,促进微生物活性增加^[55]。F2 菌处理的各组中,As(V)变化趋势与土壤总砷一致。F2 处理的蜈蚣草根际土壤 As(V)显著低于其余各处理组($P<0.05$),与 CK1 相比,降低 38.28%,较种植植物对照组根际土壤下降 25.93%。对根际土壤进行考虑交互作用的双因素方差分析表明,蜈蚣草和 F2 对土壤中 As(V)不存在显著的

交互作用，与土壤中总砷结果一致。

由表 6 可知，与施加 F2 菌土相似，施加 F2As 的菌土 As(III)高于较不种植植物对照组 (CK2)，但后者未有显著性差异。与施加 F2 不同的是，施加 F2-As 的蜈蚣草非根际土壤中 As(III)显著高于根际土壤及其与各处理组 ($P<0.05$)，是其根际土壤的 3.99 倍，是不种植植物的对照组 CK2 的 12.42 倍，为种植植物对照组根际土壤的 9.88 倍。F2As 蜈蚣草根际土壤中 As(III)低于非根际土壤，可能与该处理下较高的蜈蚣草砷转运系数有关。对根际土壤的交互作用分析表明：蜈蚣草、F2-As 对土壤中 As(III)浓度具有显著影响($P<0.05$)，但蜈蚣草*F2As 对 As(III)浓度的交互作用并不显著。

表 6 F2-As 对土壤中砷价态的影响 (mg/kg)

处理组	As(III)	As(V)
F2As	1.01±0.27abc	120.64±11.87a
CK2	0.74±0.17b	95.50±6.70a
F2As+P+根际土	2.30±0.96c	61.23±11.80b
F2As +P+非根际土	9.19±1.84d	103.54±37.18ac
CK2+P+根际土	0.93±0.27abc	79.48±15.26bc
CK2+P+非根际土	0.94±0.19abc	98.00±29.51a

析因分析*				
根际土	F	P	F	P
蜈蚣草	7.24	0.027	0.27	0.00
F2As	6.14	0.038	32.77	0.00
蜈蚣草*F2As	3.40	0.102	10.85	0.008

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p<0.05$)。有相同字母为无显著差异，

相反为达到显著性差异。

*表示对 CK1、F2/F2-As、CK1/CK2+P+根际土壤、F2/F2-As+P+根际土壤的砷价态进行考虑交互作用的双因子方差分析结果。

F2As 对土壤中 As(V)的影响与土壤中总砷变化一致。施加 F2As 的蜈蚣草处理组的 As(V)浓度显著低于不种植植物对照组,降低 35.88% ($P<0.05$); 低于种植植物处理组根际土壤 22.87%。对根际土壤的交互作用分析表明:蜈蚣草、F2-As 蜈蚣草*F2As 对土壤中 As(V)浓度均具有显著影响 ($P<0.05$), 与蜈蚣草和 F2-As 对土壤中总砷的交互作用一致。

4.3.1.2 砷结合态

表 7 微生物 (F2) 对土壤砷结合形态的影响 (mg/kg)

处理	CK1	F2	CK1+P		F2+P	
			根际土壤	非根际土壤	根际土壤	非根际土壤
砷形态						
L-As	1.59ab	1.70b	0.26c	1.43a	0.22c	1.47a
Al-As	7.42a	7.14a	4.86b	6.06a	2.39c	6.55a
Fe-As	14.39ac	13.89ac	11.78a	15.01ac	7.27b	16.62c
Ca-As	44.26a	45.84a	29.06bc	39.55ab	34.59ab	39.71ab
O-As	48.15ac	36.36bd	52.89a	50.70a	28.75b	40.77dc

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p<0.05$)。有相同字母为无显著差异, 相反为达到显著性差异。

实验采用改进的适合石灰性土壤砷形态分级的 SEPs 方法提取各处理组的砷形态, 其中对照组土壤 (CK1) 中的松散结合态、Ca-As、Al-As、Fe-As 以及残渣态砷含量相对比例为 1.37%、6.40%、12.43%、38.22% 及 41.58%, 其结果与武斌 (2006) 的结果基本一致, 生物利用率高的松散结合态所占比重最小, 供试土壤中以铁结合态和残渣态砷为主^[115]。

通过表 7 可知, 与不种植物对照组 (CK1) 比较, 添加砷酸还原菌 F2 后, 蜈蚣草根际土壤松散结合态、Al-As、Fe-As 以及残渣态砷等四种砷形态的含量均显著降低 ($p < 0.05$), 分别下降了 86.16%、67.79%、49.48% 以及 40.29%, 其中残渣态砷从 48.15mg/kg 下降至 28.75mg/kg, 占 F2+P 处理组根际土壤总砷含量下降的 49.74%, 另外仅添加 F2 菌液的土壤的残渣态砷显著低于 CK1, 下降了 24.49% ($p < 0.05$), 表明砷酸还原菌 F2 在土壤中可能通过促进土壤中生物有效性最低的残渣态砷的转化, 促进蜈蚣草对土壤中生物有效性低的砷的利用。以通过与种植植物对照组 (CK1+P) 相比, F2 处理组的蜈蚣草根际土壤的 Al-As、Fe-As 以及残渣态砷含量均显著降低 ($p < 0.05$), 分别下降了 50.82%、38.39% 及 45.64%, 说明砷酸还原菌 F2 能通过增强蜈蚣草对根际土壤的 Al-As、Fe-As 以及残渣态砷等生物有效性低的砷形态的吸收利用, 从而提高蜈蚣草对根际土壤砷的去除。

添加基因工程菌 F2-As 后, 蜈蚣草根际土壤中松散结合态、Al-As、Fe-As、Ca-As 以及残渣态砷含量与未种植蜈蚣草的对照土壤相比, 均表现为显著降低 ($P < 0.05$), 分别下降了 76.82%、54.74%、72.47%、35.72% 与 40.61%, 其中 Fe-As、Ca-As 及残渣态砷相比于 CK1 降低量分别占蜈蚣草根际土壤总减少量的 21.86%、25.00% 及 33.56%; 与种植蜈蚣草的对照组相比, F2-As+P 组根际土壤的 Fe-As、残渣态砷均有显著下降 ($P < 0.05$), 分别降低 54.73% 和 40.61%, 表明基因工程菌 F2-As 可以增强蜈蚣草对 Fe-As、残渣态砷的吸收利用, 从而提高蜈蚣草对土壤中砷的吸收富集能力。种植蜈蚣草土壤的对照组和 F2-As 组的非根际土壤与不种植植物对照组及菌土组之间基本无显著差异, 具体结果见表 8。

表 8 微生物 (F2-As) 对土壤砷结合形态的影响 (mg/kg)

处理	CK2	F2-As	CK2+P		F2-As+P	
			根际土壤	非根际土壤	根际土壤	非根际土壤
L-As	1.51a	1.77a	0.29b	1.48a	0.35b	1.39a
Al-As	6.01a	5.90a	2.45b	6.31a	2.72b	6.26a
Fe-As	17.22a	17.47a	10.47b	15.50ac	4.74d	12.45bc
Ca-As	39.98a	50.03ac	28.75b	59.01c	25.70b	45.43ac
O-As	47.18a	43.78a	43.24.a	37.73a	28.02b	42.89a

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异, 相反为达到显著性差异。

5.2.1.3 土壤根际水溶液砷

土壤水溶液中砷具有高的生物利用性, 易于被植物吸收利用^[122]。土壤图中图 5 反应了不同微生物处理对植物根际和非根际水溶液中可溶性砷的影响。添加菌液的处理组, 根际土壤的水溶砷低于非根际, 其中添加 F2As 的植物根际土壤水溶液中的 As 显著低于非根际土壤, 降低 73.34%, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。而添加灭菌微生物的植物对照组则与之相反, 均为根际土壤溶液高于对应的非根际土壤。根际土壤中的元素的富集或消耗取决于植物的吸收效率和固相物质补充速率^[123]。土壤溶液砷是一个动态变化的过程, 受植物吸收以及土壤中砷的解析速率等因素影响较大。Silva (2006) 研究蜈蚣草根际化学特征发现, 蜈蚣草根际土壤的可溶砷低于非根际土壤, 作者认为是由于蜈蚣草砷吸收速率高于土壤补充速率^[46]。Cattani 等 (2009)^[124]动态监测了蜈蚣草根际土壤溶液中砷的变化, 发现根际 DOC 含量明显增多, 但植物可利用态砷保持稳定, 作者认为由于植物吸收和土壤溶出砷速率

保持一致。本实验结果表明：添加外源微生物有利于促进植物砷吸收，与前面加菌后蜈蚣草有高的转运效率结果一致。在非根际土壤中，加菌处理组的土壤水溶液中可溶砷含量均高于灭菌处理，其中添加 F2As 菌液的蜈蚣草处理组的非根际土壤较种植蜈蚣草的对照处理有显著性增加 39.05% ($P < 0.05$)，结果表明加入外源性微生物后，可增加土壤中的砷生物可利用性。Lee (2009) 年研究发现，有氧条件下，未经过灭菌处理的尾矿渣较灭菌处理能淋滤出更多的 As，作者认为可能与微生物代谢产生的活性物质如低分子量有机酸、胞外聚合物物质等有关，还和耐砷性微生物砷还原解毒机制有关^[125]。

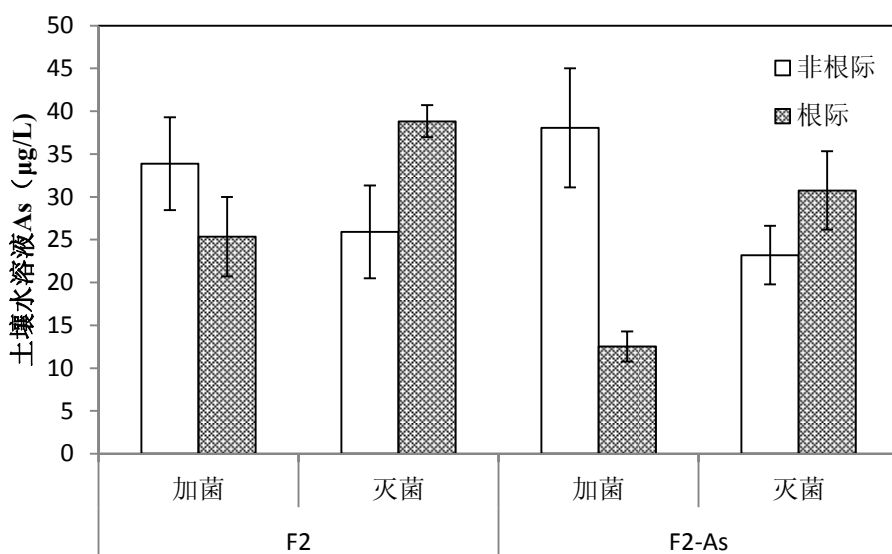
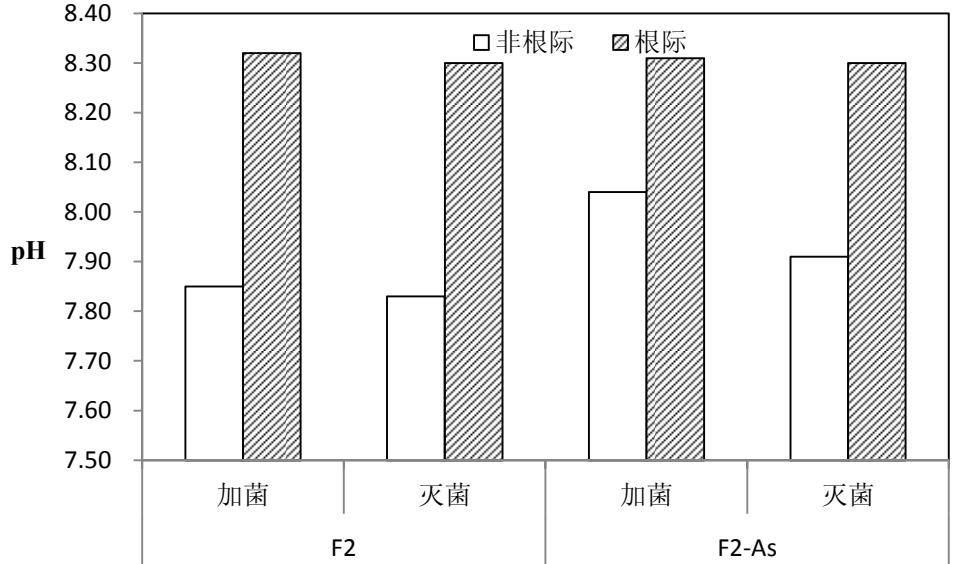


图 5 微生物对土壤水溶液中 As 的影响

4.3.2 微生物对土壤根际环境的影响

4.3.2.1 pH



#图 6 不同微生物处理中蜈蚣草根际水溶液 pH

土壤 pH 变化受根系分泌物的种类与数量、微生物数量或活性影响，是影响土壤中砷吸附的重要因素。图 6 为施加不同微生物处理后蜈蚣草根际和非根际水溶液中的 pH 值。结果表明，非根际土壤溶液的 pH 为 7.83-8.04，根际土壤溶液 pH 为 8.32-8.30，均呈弱碱性。施加活性微生物菌液处理组的非根际土壤比施加灭活菌液处理组的 pH 增加，其中 F2As 增加了 0.03 个单位。这可能与添加微生物后相关，实验中所用的微生物均为放线菌，具有嗜碱性微生物特征，在碱性环境中生长，具有 Na^+/H^+ 反向运输系统，可以摄取 H^+ ，以维持细胞 pH 处于碱性范围^[126]。添加外源微生物后土中微生物代谢活性增强，从而增加土壤 pH 有关。蜈蚣草根际土壤比非根际土壤的 pH 值均有所增加，可增加 0.27-0.49 个单位。结果与 Gonzaga (2006) 一致，盆栽实验中，蜈蚣草

根际土壤中 pH 值比非根际土壤 pH 值高出 0.5 个单位，作者认为为了应对植物强吸收砷作用而引起的电荷不平衡（砷在土壤中带负电荷），根系须分泌 OH^- 保持土壤离子平衡^[46]。加菌处理的根际土壤与种植植物对照组根际土壤 pH 相似，这可能与蜈蚣草和微生物调控机制有关，生物具有调控最佳适应生长环境的能力。土壤环境中 pH 是影响砷生物有效性的一个重要因素^[51]。研究表明：在碱性条件下，土壤中的铁、铝氧化物易带负电荷，有利于土壤砷的溶出，导致土壤中砷的有效态含量增高^[127]。因此，本研究认为，施加 F2/F2As 后的蜈蚣草根际土壤中铁、铝结合态及残渣态含量降低，与微生物和蜈蚣草联合作用下根际土壤 pH 增加有关。

4.3.2.2 DOC

添加 F2 后，蜈蚣草根际土壤中 DOC 的含量最高，为 185.42g/kg，高于其他处理组，与蜈蚣草对照组根际土壤相比，增加 27.96%，未达显著性差异；较 F2 和 CK1 组分别增加 36.94% 和 95.21%，具有显著性差异 ($P < 0.05$)。种植蜈蚣草由于植物根际分泌物的作用，其根际 DOC 的含量仍然高于 F2 和 CK1，增加量较加 F2 处理的蜈蚣草根际土壤低，分别增加 8.34% 和 54.46%。加菌蜈蚣草组的非根际土壤的 DOC 含量与菌土 (F2) 组相似，比对照蜈蚣草组的非根际土壤和对照土壤组均高，并显著高于 CK1，具有显著性差异 ($P < 0.05$)。可能与加入外源微生物能促进土壤中微生物代谢活性有关。对根际土壤 DOC 含量进行交互作用分析，结果表明：蜈蚣草、F2 对根际土壤中 DOC 具有显著影响 ($P < 0.05$)，但蜈蚣草*F2 对 DOC 浓度的交互作用并不显著，交互作用呈加和作用。

表9 微生物对土壤中 DOC 的影响 (mg/kg)

处理组	DOC		处理组	DOC	
F2	144.90±19.71a		F2As	161.81±34.58ac	
CK1	101.64±15.69b		CK2	119.72±19.05a	
F2+P+根际土	185.42±23.12c		F2-As +P+根际土	252.11±41.66b	
F2+P+ 非根际土	147.93±31.94ac		F2-As +P+非根际土	178.94±47.90c	
CK1+P+ 根际土	156.99±23.59ac		CK2+P+根际土	151.13±16.43ac	
CK1+P+ 非根际土	123.16±19.26ab		CK2+P+ 非根际土	126.24±22.05ac	
析因分析*					
根际土壤	F	P	根际土壤	F	P
蜈蚣草	9.85	0.012	蜈蚣草	6.65	0.033
F2	4.41	0.065	F2-As	9.19	0.016
蜈蚣草*F2	2.60	0.14	蜈蚣草*F2-As	1.56	0.24

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异, 相反为达到显著性差异。

*表示对 CK1、F2/F2-As、CK1/CK2+P+根际土壤、F2/F2-As+P+根际土壤 DOC 进行考虑交互作用的双因子方差分析结果。

F2As 对土壤中 DOC 的影响与 F2 一致。添加 F2-As 后, 蜈蚣草根际土壤的 DOC 含量可达 252.11mg/kg, 显著高于其它处理组, 是种植蜈蚣草对照组根际土壤的 1.67 倍, 是不种植蜈蚣草对照组土壤的 2.11 倍。菌土及加菌蜈蚣草处理组的非根际土壤高于不种植植物对照组及种植植物对照组非根际土壤的 DOC 含量, 表明添加 F2As 后, 土壤中有仍有较高的微生物活性。对根际土壤 DOC 含量进行交互作用, 结果表明: F2-As 对根际土壤中 DOC 具有显著影响 ($P < 0.05$), 蜈蚣草*F2

对 DOC 浓度的交互作用并不显著，呈加和作用。

土壤中 DOC 主要来源于许多生物过程，在上层土壤中主要是来自于土壤有机质代谢物，微生物分泌物和植物根系的分泌物[128, 129]，它是影响土壤中砷移动性的重要因素^[128]。有研究表明：土壤有机质是影响有氧条件下三价砷形态的重要因素，有机质含量可以促进微生物代谢，进一步影响砷的氧化还原作用，从而影响砷在土壤中的归趋势^[129]。Balasoiu (2001) 报道了在 CCA 污染土壤中，随着有机质含量增加，土壤中三价砷比例增加。本实验也观察到加入 F2 和 F2-As 后，菌土比不种植植物的对照组土壤中三价砷确实有所增加（见 5.2.1.1 结果），这可能是由于土壤中添加微生物后，DOC 含量增加，而促进土壤中三价砷增加^[130]。加入供试微生物后，蜈蚣草根际土壤的 DOC 在微生物代谢和根系分泌作用，显著增加，但由于蜈蚣草强的砷吸收能力，根际土壤中的三价砷反而降低。可溶性有机碳是影响土壤砷移动性的重要因素，可以通过与土壤溶液中的金属离子竞争土壤或土壤矿物中的吸附点，或与重金属离子形成螯合物阻止重金属离子的吸附，从而提高土壤砷的移动性^[131]。本实验中，对不种植植物土壤中的可溶性砷与 DOC 进行相关性分析，发现 F2As 处理中，菌土和不种植植物对照组之间存在显著相关性 ($P < 0.05$)。种植蜈蚣草根际土壤中 DOC 含量在微生物促进作用下，DOC 含量增加，能进一步促进根际土壤中砷移动性增加，促进植物砷吸收。Tu 等(2004)对比了砷超富集植物和普通耐性蕨类植物对砷的胁迫反应，证实了蜈蚣草在砷胁迫下分泌出大量的可溶解有机碳 (DOC)，且有机分泌物主要是植酸和草酸，这两种酸可促进土壤中砷酸铁 (Fe-As) 和砷酸铝 (Al-As) 矿物溶解及砷的释放^[54, 132]。本研究中添加供试微生物 F2 和 F2As 后，蜈蚣草分别显著降低

土壤中 Al、Fe 结合态以及残渣态砷含量，可以认为是外源微生物加入，促进 DOC 增加，从而导致土壤氧化物以及有机结合态砷的溶出。

4.2.2.3 微生物菌落数

表 10 反应了施用耐砷菌 F2，不同处理中各组土壤中总菌落数及耐砷菌落数。无论是否加入活性耐砷菌 F2，蜈蚣草根际土壤中的微生物菌落数都显著高于非根际土壤，表明蜈蚣草根系能促进微生物生长，具有良好促微生物生长的根际环境。添加 F2 后，蜈蚣草根际中微生物总菌落数可达 $2.84 \times 10^6 \text{cfu/g}$ ，高于其它处理组，较种植蜈蚣草处理组增加 22.70%，较不种植蜈蚣草对照组增加 88.59%，除种植蜈蚣草处理组外，其余均有显著性差异 ($P < 0.05$)。F2 组的微生物总菌落数较 CK1 增加 27.52%，可能表明在土壤中施加 F2 8 周后，仍具有一定的代谢活性。对根际土壤总微生物数量进行交互作用分析，结果表明：蜈蚣草对根际土壤中总微生物数量具有显著影响，能增加根际土壤中总微生物数量 ($P < 0.05$)，但 F2 和蜈蚣草*F2 对总微生物数量的影响并不显著，微生物和蜈蚣草对根际微生物总数的影响表现为加和作用。本实验同时测定了添加 F2 微生物后，各处理组中土壤的耐砷微生物的菌落数，结果见表 10。各处理组中耐砷微生物占总微生物的 10%-24.74%，其中添加 F2 后，蜈蚣草根际土壤中耐砷微生物菌落数为 0.47cfu/g ，占其根际总微生物的 24.74%。显著高于除种植蜈蚣草对照组根际土壤外的其余各处理组。

与土壤中总微生物菌落类似，无论是否添加活性微生物，蜈蚣草根际土壤中的耐砷微生物菌落数显著高于非根际土壤，表明蜈蚣草根际具有特定的耐砷微生物菌落，同时也可以说明 F2 能在蜈蚣草根际定殖，从而为其影响根际土壤中砷移动性，促进植物修复提供可能性。

对根际土壤总微生物数量进行交互作用分析，结果表明：蜈蚣草和 F2 对根际土壤中耐砷微生物数量具有显著影响，能增加根际土壤中耐砷微生物数量 ($P < 0.05$)，但蜈蚣草*F2 对耐砷微生物的数量的影响并不显著，微生物和蜈蚣草对耐砷微生物总数的影响表现为加和作用。

表 10 F2 处理组土壤中微生物菌落数 (cfu/g)

处理组	总菌落数 ($\times 10^6$)		耐砷菌落数 ($\times 10^6$)	
F2	1.90 ± 0.26ac		0.34 ± 0.080a	
CK1	1.49 ± 0.32a		0.20 ± 0.045bc	
F2+P+根际土	2.81 ± 0.59b		0.47 ± 0.10d	
F2+P+非根际土	1.64 ± 0.098a		0.27 ± 0.068abc	
CK1+P+根际土	2.29 ± 0.70bc		0.38 ± 0.08ad	
CK1+P+非根际土	1.22 ± 0.31a		0.19 ± 0.050b	
析因分析*				
根际土壤	F	P	F	P
蜈蚣草	9.97	0.012	13.26	0.0070
F2	2.95	0.12	6.98	0.030
蜈蚣草*F2	0.048	0.83	13.26	0.54

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异，相反为达到显著性差异。

*表示对 CK1、F2/F2-As、CK1/CK2+P+根际土壤、F2/F2-As+P+根际土壤中菌落数进行考虑交互作用的双因子方差分析结果。

F2-As 处理的各组土壤中微生物菌落数的变化情况与 F2 处理一致，见表 11。无论是否添加活性 F2-As，蜈蚣草根际土壤中的微生物数量显著高于非根际土壤 ($P < 0.05$)。添加微生物 F2-As 后，根际土壤的菌落数量达 $5.30 \times 10^6 \text{cfu/g}$ ，显著高于其它所有处理组 ($P < 0.05$)，较种植

蜈蚣草对照组增加 42.83%。添加 F2-As 的蜈蚣草根际土壤的总微生物菌落数是添加 F2 的 1.89 倍,可能表明 F2-As 的加入更能促进根际环境中微生物生长或者可能说明 F2-As 的在根部的定殖能力优于 F2,这可能与基因工程菌的菌株材料——变铅氢链酶菌具有强的环境适应性相关。对根际土壤总微生物数量进行交互作用分析,结果表明:蜈蚣草和 F2-As 对根际土壤总微生物数量具有显著影响,能增加根际土壤中总微生物数量 ($P < 0.05$),但蜈蚣草*F2As 对总微生物的数量的影响并不显著,微生物和蜈蚣草对耐砷微生物总数的影响表现为加和作用。F2-As 处理组中各土壤的耐砷微生物占总微生物的比例为 11.99-26.20%。其中,添加 F2As 的蜈蚣草处理组根际的耐砷微生物为 $0.89 \times 10^6 \text{cfu/g}$,显著高于其他处理组 ($P < 0.05$),比种植植物对照组高 45.90%。

施加 F2-As 的蜈蚣草处理组的蜈蚣草根际的耐砷微生物数量均高于非根际土壤,其中施加 F2-As 的蜈蚣草处理组根际土壤显著高于非根际土壤 ($P < 0.05$),这可能与 F2-As 在根际环境中定殖有关。根际土壤的析因分析结果与总微生物结果一致,表现为加和作用。

植物强化微生物过程中,微生物可以通过还原、氧化以及甲基化作用代谢砷,或者通过微生物代谢产物影响根际环境,影响土壤中砷的转运、迁移和毒性,从而提高植物对砷吸收^[133-136]。添加供试微生物后,加菌的植物根际土壤与对照植物根际土壤相比,总微生物数和耐砷微生物均有所提高,表明添加菌剂后改善了蜈蚣草根际环境,提高了植物根际微生物活性,从而促进根际土壤中 DOC 含量增加,相关性分析表明:添加 F2As 处理的 DOC 和总微生物和耐砷微生物均存在显著相关性 ($P=0.046$; $P=0.001$)。其中耐砷微生物的增加可以促进微生

物对砷利用和代谢，与砷在土壤中的三价砷增加有关。

表 11 F2-As 处理组土壤中总微生物菌落数 (cfu/g)

处理组	总菌落数 ($\times 10^6$)		耐砷菌落数 ($\times 10^6$)	
F2-As	2.76 \pm 0.42ac		0.53 \pm 0.11ac	
CK2	1.68 \pm 0.37c		0.44 \pm 0.11ac	
F2-As+P+根际土	5.30 \pm 1.08b		0.89 \pm 0.10b	
F2-As+P+非根际土	3.17 \pm 0.82a		0.38 \pm 0.14c	
CK2+P+根际土	3.03 \pm 0.84a		0.61 \pm 0.14a	
CK2+P+非根际土	1.84 \pm 0.25c		0.45 \pm 0.12a	
析因分析*				
根际土壤	F	P	F	P
蜈蚣草	19.50	0.002	15.52	0.004
F2	14.35	0.004	6.98	0.03
蜈蚣草*F2	1.82	0.21	2.27	0.17

a 小写字母表示行内各处理组间的显著检验差异 ($p < 0.05$)。有相同字母为无显著差异，相反为达到显著性差异。

*表示对 CK1、F2/F2-As、CK1/CK2+P+根际土壤、F2/F2-As+P+根际土壤耐砷菌落数进行考虑交互作用的双因子方差分析结果。

4.3.3 结论

(1) 施加耐砷微生物 F2 和转基因工程菌 F2As 后能影响土壤中砷形态分布：影响土壤中砷形态，促进土壤 As (V) 还原，增加移动性强的 As (III) 比例，其中 F2 和蜈蚣草对根际土壤 As (III) 有显著交互作用；改变土壤中砷结合态分布，F2 能促进蜈蚣草显著降低铁、铝砷结合态以及残渣态的含量；而 F2As 能显著降低铁砷结合态和残渣态的含量；促进土壤中可溶态砷含量的增加。

(2) 施加耐砷微生物 F2 和转基因工程菌 F2As 后均能影响蜈蚣草根际环境，通过增加蜈蚣草根际土壤 pH、DOC 数量以及微生物菌落数量，促进砷形态变化，增加砷生物可利用性。

第五章 结论

5.1 论文主要结论

(1) 耐砷微生物和转基因工程菌，可在 100mM 的砷酸盐溶液生长，具有高的砷耐受性，具备了在砷污染土壤中存活的能力。其中转基因工程菌具有更高的砷耐受性。

(2) 耐砷菌 F2 和基因工程菌 F2As 均能显著提高蜈蚣草地上部对砷的吸收，增强了蜈蚣草从地下向地上的砷转运能力，提高了蜈蚣草的耐砷性能，有效地增加了蜈蚣草对土壤的砷修复效率。其中基因工程菌 F2As 的土壤砷修复效率高于 F2。F2 和 F2As 可作为强化砷污染土壤植物修复微生化材料。

(3) 施加耐砷微生物 F2 和转基因工程菌 F2As 影响了根际砷活化过程，微生物促进土壤 As(V) 还原，增加移动性强的 As(III) 比例，其中 F2 和蜈蚣草对根际土壤 As(III) 有显著交互作用；改变土壤中砷结合态分布，F2 能促进蜈蚣草显著降低铁、铝砷结合态以及残渣态的含量；而 F2As 能显著降低铁砷结合态和残渣态的含量；促进土壤中可溶态砷含量的增加。微生物对根际砷活化与根际土壤 pH 增加，DOC 含量以及微生物菌落数量升高，可溶性砷含量增加有关。

5.2 主要特色和创新点

(1) 探明耐砷微生物和转基因工程菌强化超富集植物砷污染土壤修复效果，发现耐砷微生物能提高植物砷污染土壤修复效率，明确耐砷微生物和转基因工程菌作为强化植物修复材料的可行性。

(2) 初步探明了耐砷微生物强化超富集植物植物根际活化效应和机制，明确了耐砷微生物对根际微域环境中砷赋存的交互效应及对根际环境的影响，为微生物强化植物修复技术的应用提供了理论基础。

5.3 问题与展望

本文研究了土壤中筛选的耐砷微生物及构建的基因工程菌对超富集植物蜈蚣草砷修复强化效果的研究，并初步探明了强化过程中根际砷活化过程及根际生物化学环境的变化，为微生物强化植物修复技术提供重要的理论基础。针对本文已开展的研究结合国内外相关研究工作，可从下面几个方面进行深入研究：

(1) 进一步研究微生物强化植物修复的根际调控机制。明确影响砷移动性的微生物和植物的代谢物的种类和生理机制，并研究其环境调控因子，为技术在实际环境的应用提供理论支持。

(2) 开展微生物强化植物修复技术的环境风险评估。微生物强化植物修复能增加土壤中重金属移动性，需判定在该作用下重金属对环境（土壤及地下水）的风险；另外，外源微生物的引入对本地生态环境的影响也需要考虑。

参考文献

- [1] 石荣, 贾永锋, 王承智. 土壤矿物质吸附砷的研究进展[J]. 土壤通报. 2007, 38(3): 584-589.
- [2] 罗磊, 张淑贞, 马义兵. 土壤中砷吸附机理及其影响因素研究进展[J]. 土壤. 2008, 40(3): 351-359.
- [3] 蒋成爱, 吴启堂, 陈杖榴. 土壤中砷污染研究进展[J]. 土壤. 2004(3): 264-270.
- [4] 王金翠, 孙继朝, 荆继红, 等. 砷污染与生态环境的关系[J]. 中国人口.资源与环境. 2011(S1): 540-542.
- [5] Nriagu J O, Pacyna J M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals[J]. Nature. 1988, 333(6169): 134-139.
- [6] Ahsan T, Zehra K, Munshi A, et al. Chronic Arsenic poisoning[J]. J Pak Med Assoc. 2009, 59(2): 105-107.
- [7] Jackson R, Grainge J W. Arsenic and cancer[J]. Can Med Assoc J. 1975, 113(5): 396-401.
- [8] Das H K, Mitra A K, Sengupta P K, et al. Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study[J]. Environ Int. 2004, 30(3): 383-387.
- [9] Smith E, Naidu R, Alston A M. Chemistry of inorganic arsenic in soils: II. Effect of phosphorus, sodium, and calcium on arsenic sorption[J]. J Environ Qual. 2002, 31(2): 557-563.
- [10] 金银龙, 梁超轲, 何公理, 等. 中国地方性砷中毒分布调查(总报告)[J]. 卫生研究. 2003, 32(6): 519-540.
- [11] 骆永明. 污染土壤修复技术研究现状与趋势[J]. 化学进展. 2009(Z1): 558-565.
- [12] 王新, 贾永锋. 土壤砷污染及修复技术[J]. 环境科学与技术. 2007(2): 107-110.
- [13] 黄春晓. 重金属污染土壤原位微生物修复技术及其研究进展[J]. 中原工学院学报. 2011(03): 41-44.
- [14] Wu G, Kang H, Zhang X, et al. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities[J]. J Hazard Mater. 2010, 174(1-3): 1-8.
- [15] Cunningham S D, Ow D W. Promises and Prospects of Phytoremediation[J]. Plant Physiol. 1996, 110(3): 715-719.
- [16] 陈同斌, 韦朝阳, 黄泽春, 等. 砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征[J]. 科学通报. 2002, 47(3): 207-210.
- [17] Xie Q, Yan X, Liao X, et al. The Arsenic Hyperaccumulator Fern *Pteris vittata* L.[J]. Environmental Science & Technology. 2009, 43(22): 8488-8495.
- [18] 廖晓勇, 陈同斌, 谢华, 等. 磷肥对砷污染土壤的植物修复效率的影响:田间实例研究[J]. 环境科学学报. 2004, 24(3): 455-462.
- [19] 孙琴, 王晓蓉, 丁士明. 超积累植物吸收重金属的根际效应研究进展[J]. 生态学杂志. 2005, 24(1): 30-36.
- [20] Glick B R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation[J]. Biotechnol Adv. 2010, 28(3): 367-374.
- [21] Nie L, Shah S, Rashid A, et al. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2[J]. Plant Physiology and Biochemistry. 2002, 40(4): 355-361.

- [22] Liu Y, Christie P, Zhang J, et al. Growth and arsenic uptake by Chinese brake fern inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus[J]. *Environmental and Experimental Botany*. 2009, 66(3): 435-441.
- [23] Shilev S, Fernández A, Benlloch M, et al. Sunflower growth and tolerance to arsenic is increased by the rhizospheric bacteria *Pseudomonas fluorescens*[M]. *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, Morel J, Echevarria G, Goncharova N, Springer Netherlands, 2006: 68, 315.
- [24] 龚月桦, 王俊儒, 高俊凤. 植物修复技术及其在环境保护中的应用[J]. *农业环境保护*. 1998(6): 29-31.
- [25] Ma L Q, Komar K M, Tu C, et al. A fern that hyperaccumulates arsenic[J]. *Nature*. 2001, 409(6820): 579.
- [26] Mendez M O, Maier R M. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments--an emerging remediation technology[J]. *Environ Health Perspect*. 2008, 116(3): 278-283.
- [27] 刘世亮, 骆永明, 丁克强, 等. 土壤中有机污染物的植物修复研究进展[J]. *土壤*. 2003(3): 187-192.
- [28] Dushenkov V, Kumar P B, Motto H, et al. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams[J]. *Environ Sci Technol*. 1995, 29(5): 1239-1245.
- [29] Moffat A S. Plants proving their worth in toxic metal cleanup[J]. *Science*. 1995, 269(5222): 302-303.
- [30] Gumaelius L, Lahner B, Salt D E, et al. Arsenic hyperaccumulation in gametophytes of *Pteris vittata*. A new model system for analysis of arsenic hyperaccumulation[J]. *Plant Physiol*. 2004, 136(2): 3198-3208.
- [31] Kramer U. Metal hyperaccumulation in plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*. 2010, 61: 517-534.
- [32] Meharg A A. Variation in arsenic accumulation - hyperaccumulation in ferns and their allies[J]. *New Phytologist*. 2003, 157(1): 25-31.
- [33] Visoottiviseth P, Francesconi K, Sridokchan W. The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land[J]. *Environmental Pollution*. 2002, 118(3): 453-461.
- [34] Tu C, Ma L Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake[J]. *J Environ Qual*. 2002, 31(2): 641-647.
- [35] Tu C, Ma L Q, Bondada B. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation[J]. *J Environ Qual*. 2002, 31(5): 1671-1675.
- [36] 韦朝阳, 陈同斌, 黄泽春, 等. 大叶井口边草——一种新发现的富集砷的植物[J]. *生态学报*. 2002, 22(5): 777-778.
- [37] Zhao F J, Dunham S J, McGrath S P. Arsenic hyperaccumulation by different fern species[J]. *New Phytologist*. 2002, 156(1): 27-31.
- [38] Sriprang R, Hayashi M, Yamashita M, et al. A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia[J]. *Journal of Biotechnology*. 2002, 99(3): 279-293.
- [39] Wang F Y, Lin X G, Yin R. Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens*--a field case[J]. *Environ Pollut*. 2007, 147(1): 248-255.
- [40] Wang H B, Wong M H, Lan C Y, et al. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China[J]. *Environ Pollut*. 2007, 145(1): 225-233.

- [41] Koller C E, Patrick J W, Rose R J, et al. *Pteris umbrosa* R. Br. as an arsenic hyperaccumulator: accumulation, partitioning and comparison with the established As hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Chemosphere*. 2007, 66(7): 1256-1263.
- [42] 张太平, 潘伟斌. 根际环境与土壤污染的植物修复研究进展[J]. *生态环境*. 2003, 12(1): 76-80.
- [43] Petruzzelli G. Recycling wastes in agriculture: heavy metal bioavailability[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 1989, 27(1 - 4): 493-503.
- [44] Brown S L, Chaney R L, Angle J S, et al. Zinc and Cadmium Uptake by Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and Metal Tolerant *Silene vulgaris* Grown on Sludge-Amended Soils[J]. *Environmental Science & Technology*. 1995, 29(6): 1581-1585.
- [45] Mcgrath S P, Shen Z G, Zhao F J. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils[J]. *Plant and Soil*. 1997, 188(1): 153.
- [46] Silva G M, Santos J A, Ma L Q. Arsenic chemistry in the rhizosphere of *Pteris vittata* L. and *Nephrolepis exaltata* L.[J]. *Environ Pollut*. 2006, 143(2): 254-260.
- [47] 魏树和, 周启星, 张凯松, 等. 根际圈在污染土壤修复中的作用与机理分析[J]. *应用生态学报*. 2003(1): 143-147.
- [48] Stanhope K G, Hutchinson J J, Kamath R. Use of Isotopic Dilution Techniques To Assess the Mobilization of Nonlabile Cd by Chelating Agents in Phytoremediation[J]. *Environmental Science & Technology*. 2000, 34(19): 4123-4127.
- [49] 廖晓勇. 典型地区土壤砷污染的现状评价与植物修复[D]. 中国科学院地理科学与资源研究所, 2004.
- [50] 涂书新, 孙锦荷, 郭智芬, 等. 植物根系分泌物与根际营养关系评述[J]. *土壤与环境*. 2000(1): 64-67.
- [51] Fitz W J, Wenzel W W. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation[J]. *J Biotechnol*. 2002, 99(3): 259-278.
- [52] Kirk G J D, Santos E E, Findenegg G R. Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil[J]. *Plant and Soil*. 1999, 211(1): 11.
- [53] Tu S, Ma L Q, Macdonald G E, et al. Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L.[J]. *Environmental and Experimental Botany*. 2004, 51(2): 121-131.
- [54] Tu S, Ma L, Luongo T. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating <i>Pteris vittata</i> and non-hyperaccumulating <i>Nephrolepis exaltata</i>[J]. *Plant and Soil*. 2004, 258(1): 9.
- [55] 旷远文, 温达志, 钟传文, 等. 根系分泌物及其在植物修复中的作用[J]. *植物生态学报*. 2003(5): 709-717.
- [56] 周宝利. 蜈蚣草富集砷过程中的土壤微生物变化与钾、钙分析[D]. 西南大学, 2006.
- [57] Pickering I J, Gumaelius L, Harris H H, et al. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern[J]. *Environ Sci Technol*. 2006, 40(16): 5010-5014.
- [58] Mihucz V G, Tatar E, Virag I, et al. Arsenic speciation in xylem sap of cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *Anal Bioanal Chem*. 2005, 383(3): 461-466.
- [59] Raab A, Schat H, Meharg A A, et al. Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during

- exposure to high arsenic concentrations[J]. *New Phytol.* 2005, 168(3): 551-558.
- [60] Su Y H, Mcgrath S P, Zhu Y G, et al. Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *New Phytol.* 2008, 180(2): 434-441.
- [61] 杨倩. 微生物提高植物修复砷污染土壤的效果和机理研究[D]. 华中农业大学, 2009.
- [62] Bleeker P M, Schat H, Vooijs R, et al. Mechanisms of arsenate tolerance in *Cytisus striatus*[J]. *New Phytologist.* 2003, 157(1): 33-38.
- [63] Caille N, Swanwick S, Zhao F J, et al. Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilisation[J]. *Environmental Pollution.* 2004, 132(1): 113-120.
- [64] 张斌才.不同蜈蚣草种群(*PterisVittata*L)砷富集能力及其生理机制研究[J].内蒙古农业大学, 2005.
- [65] Caille N, Zhao F J, Mcgrath S P. Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the nonhyperaccumulator *Pteris tremula*[J]. *New Phytol.* 2005, 165(3): 755-761.
- [66] Poynton C Y, Huang J W, Blaylock M J, et al. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*; species: root As influx and translocation[J]. *Planta.* 2004, 219(6): 1080.
- [67] Lombi E, Zhao F, Fuhrmann M, et al. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *New Phytologist.* 2002, 156(2): 195-203.
- [68] Li W, Chen T, Chen Y, et al. Role of trichome of *Pteris vittata* L. in arsenic hyperaccumulation[J]. *Science in China Series C: Life Sciences.* 2005, 48(2): 148.
- [69] 廖晓勇, 谢华, 陈同斌, 等. 蜈蚣草的超微结构和砷、钙的亚细胞分布[J]. *植物营养与肥料学报.* 2007(2): 305-312.
- [70] Srivastava M, Ma L Q, Singh N, et al. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic[J]. *J Exp Bot.* 2005, 56(415): 1335-1342.
- [71] Yang X, Chen H, Xu W, et al. Hyperaccumulation of arsenic by callus, sporophytes and gametophytes of *Pteris vittata*; cultured; in vitro[J]. *Plant Cell Reports.* 2007, 26(10): 1889.
- [72] Cao X, Ma L Q, Tu C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.)[J]. *Environmental Pollution.* 2004, 128(3): 317-325.
- [73] 杨学习, 戴文韬, 陈晖, 等. 抗氧化系统在蜈蚣草细胞砷解毒机制中的作用[J]. *应用与环境生物学报.* 2010(4): 453-456.
- [74] Dickinson N M, Pulford I D. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail[J]. *Environ Int.* 2005, 31(4): 609-613.
- [75] Barac T, Taghavi S, Borremans B, et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants[J]. *Nat Biotechnol.* 2004, 22(5): 583-588.
- [76] Van Aken B, Yoon J M, Schnoor J L. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34)[J]. *Appl Environ Microbiol.* 2004, 70(1): 508-517.
- [77] Zhuang X, Chen J, Shim H, et al. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation[J]. *Environ Int.* 2007, 33(3): 406-413.
- [78] Lebeau T, Braud A, Jezequel K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction

- applied to metal contaminated soils: a review[J]. *Environ Pollut.* 2008, 153(3): 497-522.
- [79] Lodewyckx C, Mergeay M, Vangronsveld J, et al. Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*[J]. *Int J Phytoremediation.* 2002, 4(2): 101-115.
- [80] Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*[J]. *Appl Environ Microbiol.* 2004, 70(5): 2667-2677.
- [81] Wang F Y, Lin X G, Yin R. Role of microbial inoculation and chitosan in phytoextraction of Cu, Zn, Pb and Cd by *Elsholtzia splendens*--a field case[J]. *Environ Pollut.* 2007, 147(1): 248-255.
- [82] Braud A, Jézéquel K, Vieille E, et al. Changes in Extractability of Cr and Pb in a Polycontaminated Soil After Bioaugmentation With Microbial Producers of Biosurfactants, Organic Acids and Siderophores[J]. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus.* 2006, 6(3): 261.
- [83] Rai U N, Pandey K, Sinha S, et al. Revegetating fly ash landfills with *Prosopis juliflora* L.: impact of different amendments and *Rhizobium* inoculation[J]. *Environ Int.* 2004, 30(3): 293-300.
- [84] Belimov A A, Safronova V I, Sergeeva T A, et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. *Can J Microbiol.* 2001, 47(7): 642-652.
- [85] Chen Y, Shen Z, Li X. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals[J]. *Applied Geochemistry.* 2004, 19(10): 1553-1565.
- [86] Khan M S, Zaidi A, Wani P A, et al. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in the Remediation of Metal Contaminated Soils: A Review[M]. *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants*, Lichtfouse E, Springer Netherlands, 2010: 1, 319.
- [87] Whiting S N, de Souza M P, Terry N. Rhizosphere Bacteria Mobilize Zn for Hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*[J]. *Environmental Science & Technology.* 2001, 35(15): 3144-3150.
- [88] Sheng X F, Xia J J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria[J]. *Chemosphere.* 2006, 64(6): 1036-1042.
- [89] Wu S C, Cheung K C, Luo Y M, et al. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*[J]. *Environ Pollut.* 2006, 140(1): 124-135.
- [90] Davies Jr. F T, Puryear J D, Newton R J, et al. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*)[J]. *Journal of Plant Physiology.* 2001, 158(6): 777-786.
- [91] Chen B D, Li X L, Tao H Q, et al. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc[J]. *Chemosphere.* 2003, 50(6): 839-846.
- [92] Citterio S, Prato N, Fumagalli P, et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L[J]. *Chemosphere.* 2005, 59(1): 21-29.
- [93] Baum C, Hryniewicz K, Leinweber P, et al. Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix × dasyclados*)[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.* 2006, 169(4): 516-522.
- [94] Leung H M, Ye Z H, Wong M H. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils[J]. *Environmental Pollution.* 2006, 139(1): 1-8.
- [95] Diels L, van der Lelie N, Bastiaens L. New developments in treatment of heavy metal

- contaminated soils[J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2002, 1(1): 75.
- [96] Chen Y X, Wang Y P, Lin Q, et al. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*[J]. *Environment International*. 2005, 31(6): 861-866.
- [97] Yamamura S, Watanabe M, Kanzaki M, et al. Removal of arsenic from contaminated soils by microbial reduction of arsenate and quinone[J]. *Environ Sci Technol*. 2008, 42(16): 6154-6159.
- [98] 王岩 赵根成 Author 廖晓勇 Author. 微生物强化蜈蚣草累积土壤砷能力的研究[J]. *环境科学*. 2010(02): 431-436.
- [99] 胡江春, 薛德林, 马成新, 等. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. *应用生态学报*. 2004(10): 1963-1966.
- [100] Ahmad F, Ahmad I, Khan M S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. *Microbiological Research*. 2008, 163(2): 173-181.
- [101] 江春玉, 盛下放, 何琳燕, 等. 一株铅镉抗性菌株WS34的生物学特性及其对植物修复铅镉污染土壤的强化作用[J]. *环境科学学报*. 2008(10): 1961-1968.
- [102] Vivas A, Biró B, Ruíz-Lozano J M, et al. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity[J]. *Chemosphere*. 2006, 62(9): 1523-1533.
- [103] R. Bradley A J B D. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*[J]. *nature*. 1981(292): 335-337.
- [104] 于瑞莲, 胡恭任. 采矿区土壤重金属污染生态修复研究进展[J]. *中国矿业*. 2008(2): 40-43.
- [105] Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects[J]. *Mycorrhiza*. 1997, 7(3): 139.
- [106] 黄艺, 黄志基. 外生菌根与植物抗重金属胁迫机理[J]. *生态学杂志*. 2005(4): 422-427.
- [107] Thompson I P, van der Gast C J, Ciric L, et al. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection[J]. *Environ Microbiol*. 2005, 7(7): 909-915.
- [108] Chowdhury R, Sen A, Karak P, et al. Isolation and characterization of an arsenic-resistant bacterium from a bore-well in West Bengal, India[J]. *Annals of Microbiology*. 2009, 59(2): 253.
- [109] Drewniak L, Styczek A, Majder-Lopatka M, et al. Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution[J]. *Environ Pollut*. 2008, 156(3): 1069-1074.
- [110] Macur R E, Jackson C R, Botero L M, et al. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil[J]. *Environ Sci Technol*. 2004, 38(1): 104-111.
- [111] Anderson C R, Cook G M. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand[J]. *Curr Microbiol*. 2004, 48(5): 341-347.
- [112] 陈范燕. 重金属污染的微生物修复技术[J]. *现代农业科技*. 2008(24): 297-299.
- [113] Shen Z G, Li X D, Wang C C, et al. Lead phytoextraction from contaminated soil with high-biomass plant species[J]. *J Environ Qual*. 2002, 31(6): 1893-1900.
- [114] Chen Y, Shen Z, Li X. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals[J]. *Applied Geochemistry*. 2004, 19(10): 1553-1565.
- [115] 阎秀兰 武斌 廖晓勇. 石灰性土壤中砷形态分级方法的比较及其最佳方案[J]. *环境科学学报*. 2006(09): 1467-1473.
- [116] 王岩 赵根成 廖晓勇. 微生物强化蜈蚣草累积土壤砷能力的研究[J]. *环境科学*. 2010(02):

431-436.

- [117] Hodge A, Robinson D, Fitter A. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen?[J]. *Trends Plant Sci.* 2000, 5(7): 304-308.
- [118] 段桂兰, 王利红, 陈玉, 等. 植物超富集砷机制研究的最新进展[J]. *环境科学学报.* 2007, 27(5): 714-720.
- [119] Tu S, Ma L, Luongo T. Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*:[J]. *Plant and Soil.* 2004, 258(1): 9.
- [120] Anderson T A, Guthrie E A, Walton B T. Bioremediation in the rhizosphere.[J]. *Environmental Science & Technology.* 1993, 27(13): 2630-2636.
- [121] Yamamura S, Watanabe M, Yamamoto N, et al. Potential for microbially mediated redox transformations and mobilization of arsenic in uncontaminated soils[J]. *Chemosphere.* 2009, 77(2): 169-174.
- [122] Gonzaga M I S, Ma L Q, Santos J A G, et al. Rhizosphere characteristics of two arsenic hyperaccumulating *Pteris* ferns[J]. *Science of The Total Environment.* 2009, 407(16): 4711-4716.
- [123] Hinsinger P. How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the rhizosphere[J]. 1998, Volume 64: 225-265.
- [124] Cattani I, Capri E, Boccelli R, et al. Assessment of arsenic availability to roots in contaminated Tuscany soils by a diffusion gradient in thin films (DGT) method and uptake by *Pteris vittata* and *Agrostis capillaris*[J]. *European Journal of Soil Science.* 2009, 60(4): 539-548.
- [125] Lee J U, Lee S W, Chon H T, et al. Enhancement of arsenic mobility by indigenous bacteria from mine tailings as response to organic supply[J]. *Environ Int.* 2009, 35(3): 496-501.
- [126] 田新玉. 嗜碱微生物多样性及其应用[J]. *生物多样性*, 1994,2(1):49-53.
- [127] Masscheleyn P H, Delaune R D, Patrick W H. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil[J]. *Environmental Science & Technology.* 1991, 25(8): 1414-1419.
- [128] 韦婧 李士杏 Author 骆永明 Author. 红壤不同粒级组分中砷的形态——基于连续分级提取和XANES研究[J]. *环境科学学报.* 2011(12): 2733-2739.
- [129] Dobran S, Zagury G J. Arsenic speciation and mobilization in CCA-contaminated soils: influence of organic matter content[J]. *Sci Total Environ.* 2006, 364(1-3): 239-250.
- [130] Balasoio C F, Zagury G J, Deschênes L. Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition[J]. *Science of The Total Environment.* 2001, 280(1 - 3): 239-255.
- [131] Redman A D, Macalady D L, Ahmann D. Natural Organic Matter Affects Arsenic Speciation and Sorption onto Hematite[J]. *Environmental Science & Technology.* 2002, 36(13): 2889-2896.
- [132] Ghosh P, Rathinasabapathi B, Ma L Q. Arsenic-resistant bacteria solubilized arsenic in the growth media and increased growth of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L[J]. *Bioresour Technol.* 2011, 102(19): 8756-8761.
- [133] Wenzel W. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils[J]. *Plant and Soil.* 2009, 321(1): 385.
- [134] Cavalca L C A B S. Role of PGP arsenic-resistant bacteria in As mobilization and translocation in *Helianthus annuus* L[J]. 2010 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1 - 6 August 2010.
- [135] S J. Role of Rhizobacteria in Reduction of Arsenic Uptake by Plants: A Review[J]. *J Bioremed*

Biodegrad. 2011(2): 1-4.

[136] Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S, et al. Exploiting plant - microbe partnerships to improve biomass production and remediation[J]. Trends in Biotechnology. 2009, 27(10): 591-598.

致谢

本研究工作是在国家自然科学基金《砷超富集植物根际对土壤中砷的活化效应与调控》课题的资助下完成的。导师廖晓勇副研究员和梁涛研究员对本研究报告的选题、框架构建、撰写过程均提出了指导性的意见和建议；并在博士后工作的两年中，从职业发展、工作方法、生活等方面给予了无私的帮助。感谢廖老师为我提供的的良好发展平台，博士后期间每一个进步都离不开他的指导！感谢梁老师对我科研和工作提出的指导性建议，使我深受启发，非常受益！

衷心感谢中国科学院地理科学与资源研究所环境科学与人类健康室的阎秀兰老师在工作指导、论文选题及生活方面给予的无私关心和帮助。衷心感谢中国科学院地理科学与资源研究所环境科学与人类健康室污染土壤修复课题组的师弟师妹对我研究工作和生活的支持和帮组。许多老师和同仁在我的学习和工作中都给予了极大的帮助，在此一并表示衷心的感谢。

最后，我要感谢我的父母和我的丈夫，在我多年的求学生涯和工作中，他们一直给予我最坚定的支持和无私的奉献，一直是我前进道路上的坚强后盾，他们的关心和鼓励是我成功的基石和不断进步的动力。

文一

2012年4月于北京

博士生期间发表的学术论文、专著、重要科研成果

1、发表论文

- 1) 文一, 潘家荣, 魏帅. 氧化乐果对雄性大鼠生殖毒性及作用机制. 核农学报, 2009, 23(1):171~174;
- 2) 文一, 潘家荣, 魏帅. 毒死蜱对雄性生殖系统内分泌影响的研究. 农药, 2008, 8(16):22~23;
- 3) 文一, 潘家荣, 魏帅. 有机磷农药混剂急性联合毒性及评价, 卫生研究. 2008, 37(1):101 ;
- 4) 文一, 潘家荣. 有机磷农药的联合毒性研究进展, 环境与健康杂志. 2007, 7(24):553~556;

2、参与课题

(1) 主要参与国家“十五”国家科技重大专项——食品安全关键技术课题(2001BA804A42)中农产品质量安全健康风险评估研究, 确定复合有机农药污染的毒性效应及毒性机制, 协助导师完成本课题验收报告的编写。

(2) 参与国家科技支撑计划《农产品质量全程与跟踪溯源技术研究》, 参与研究同位素与矿物元素指纹溯源技术在牛肉产地来源判别中的有效性与可行性研究, 协作导师完成本项目的验收报告的编写工作。

博士后期间发表的学术论文、专著、重要科研成果

1、论文情况

Wen Yi, Liao xiao Yong, Yan Xiu Lan. The effects of microorganisms in improving the phyto-remediation of arsenic polluted soils and its mechanisms. 待发表.

Lu Sun , Liao xiao Yong, Wen Yi. Interactions of arsenic and phenanthrene on their uptake and antioxidative response in *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 2011, 12(159):3398 ~ 3405;

2、参与科研情况

(1) 编写超富集植物-微生物联合修复砷污染土壤技术，由“2010 年国家先进污染防治示范技术名录”收录。

(2) 参与国家自然科学基金《砷超富集植物根际对土壤中砷的活化效应与调控》研究工作，撰写基金结题报告。

(3) 参与国家科技支撑计划《砷污染农田的超富集植物-微生物联合修复技术》研究工作，撰写基金结题报告。

(4) 参与国家科技支撑计划《沿湖地区农业面源污染防控与综合治理技术研究》研究工作，撰写基金结题报告。

4) 参与国家科技支撑计划《城郊土壤健康质量控制与修复技术研究》的研究工作，撰写基金结题报告。

5) 参与丰台科委项目《丰台区生态破坏区的生态修复和建设规划》研究工作，撰写基金结题报告。

个人简历

文一，女，汉族，1980年12月出生，四川省资阳市人。2008年毕业于中国农业科学院农产品加工所，获得博士学位。2009年6月底，进入中国科学院地理科学与资源研究所博士后流动站，导师为廖晓勇副研究员和梁涛研究员。博士后期间主要开展重金属污染修复关键技术及机理研究。作为主要研究人员，参与了国家自然科学基金、国家支撑计划关于重金属污染场地修复技术、机理以及环境健康风险评估方面的研究。

永久通信地址

E-mail:wenyi8012@163.com