

钼还原促生菌的筛选及对紫花苜蓿钼吸收的调控作用

杨瑞先^{1*}, 刘萍¹, 石犇¹, 王小庆¹, 乔翠翠¹, 肖静尧¹, 杨沛霖¹, 田文杰^{1,2*}

1 洛阳理工学院 环境工程与化学学院, 河南 洛阳

2 河南省绿色建筑材料制造与智能装备重点实验室, 河南 洛阳

杨瑞先, 刘萍, 石犇, 王小庆, 乔翠翠, 肖静尧, 杨沛霖, 田文杰. 钼还原促生菌的筛选及对紫花苜蓿钼吸收的调控作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 1995-2013.

YANG Ruixian, LIU Ping, SHI Ben, WANG Xiaoqing, QIAO Cuicui, XIAO Jingyao, YANG Peilin, TIAN Wenjie. Screening of molybdate-reducing bacteria capable of promoting the growth and regulating the molybdate uptake of *Medicago sativa*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 1995-2013.

摘要:【目的】根际微生物协同植物修复重金属污染土壤具有较高的应用潜力。本研究旨在强化土壤钼污染修复的理论与技术, 分析添加外源钼还原促生菌对紫花苜蓿生长和钼富集活性的影响, 为植物-微生物联合修复钼污染土壤提供理论参考。【方法】采集钼尾矿区内优势植物, 分离与筛选钼还原内生细菌; 结合形态学特征和分子生物学手段对菌株进行鉴定; 测定钼还原菌株的促生特性。通过外源添加钼还原促生菌, 研究其对紫花苜蓿生物量、生理活性及钼富集量的影响。【结果】获得2株钼还原活性强的菌株M9和M13, 结合形态特征、16S rRNA基因序列及*gyrB*基因序列分析结果, 2株细菌(M9和M13)均被鉴定为普利茅斯沙雷氏菌(*Serratia plymuthica*)。促生特性分析表明, 2株细菌均具有固氮、溶磷、解钾、产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、铁载体及1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶的能力。在钼胁迫条件下, 外源添加M9、M13及M9+M13复配菌株后对紫花苜蓿的促生作用显著。与未接菌对照组相比, 其株高、根长和鲜重均显著增加, 同时紫花苜蓿中叶绿素含量显著提高, 过氧化物酶(peroxidase, POD)活性增加, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量降低。此外, 钼还原菌株M9和M13显著影响紫花苜蓿的钼富集量, 接菌处理组紫花苜蓿地上部和地下部钼含量均显著低于未接菌处理组, 其富集因子显著降低, 表明接种钼还原菌株后减少了紫花苜蓿对土壤中钼的吸收和转运。【结论】钼还原菌株M9和M13具有显著的植物促生特性, 能够促进紫花苜蓿在钼污染土壤中的生长, 并降低其钼含量。本研究为揭示微生物强化植物钼修复的机制以及促进植物-微生物联合修复钼污染土壤的相关研究提供了参考。

关键词: 钼; 植物内生细菌; 促生特性; 紫花苜蓿; 联合修复

资助项目: 河南省科技攻关项目(232102320111); 河南省自然科学基金(242300421332)

This work was supported by the Science and Technology Research Project of Henan Province (232102320111) and the Natural Science Foundation of Henan Province (242300421332).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Ruixian, fairy19790805@163.com; TIAN Wenjie, twj7210@126.com

Received: 2024-11-04; Accepted: 2024-12-22; Published online: 2025-02-24

Screening of molybdate-reducing bacteria capable of promoting the growth and regulating the molybdate uptake of *Medicago sativa*

YANG Ruixian^{1*}, LIU Ping¹, SHI Ben¹, WANG Xiaoqing¹, QIAO Cuicui¹, XIAO Jingyao¹,
YANG Peilin¹, TIAN Wenjie^{1,2*}

¹ School of Environmental Engineering and Chemistry, Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang, Henan, China

² Henan Key Laboratory of Green Building Materials Manufacturing and Intelligent Equipment, Luoyang, Henan, China

Abstract: [Objective] The rhizosphere microorganism-plant combined approach has high application potential for the remediation of heavy metal-contaminated soil. This study observed the effects of adding exogenous plant growth-promoting bacteria (PGPB) on the growth and molybdenum (Mo) accumulation of alfalfa (*Medicago sativa*), aiming to provide theoretical references for plant-microbial remediation of Mo-contaminated soil. [Methods] The endophytic bacteria were isolated from dominant plants of Mo tailing and they were identified based on morphological characteristics and molecular evidence. The plant growth-promoting (PGP) properties of molybdate-reducing strains were determined. By adding exogenous PGPB into the soil, we investigated the effects of adding exogenous PGPB on the biomass, physiological activity, and Mo accumulation of alfalfa. [Results] Two molybdate-reducing strains M9 and M13 were obtained and identified as *Serratia plymuthica* based on morphological characteristics, 16S rRNA gene sequence, and *gyrB* sequence. M9 and M13 had the abilities to fix nitrogen, solubilize phosphorus, solubilize potassium, and secrete indole-3-acetic acid (IAA), siderophores, and 1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase. Under Mo stress, the inoculation of M9, M13, and M9+M13 significantly promoted the growth of alfalfa, increasing the plant height, root length, and fresh weight of alfalfa compared with the non-inoculation control group. At the same time, the inoculation increased the chlorophyll content and peroxidase (POD) activity while decreasing the malondialdehyde (MDA) content in alfalfa. M9 and M13 significantly affected the Mo accumulation of alfalfa. The Mo content in the above-ground and under-ground parts of alfalfa inoculated with M9, M13, and M9+M13 significantly decreased compared with that in the non-inoculation control group. The decreased enrichment factor of Mo in alfalfa indicated that inoculation with molybdate-reducing strains reduced the uptake and transport of Mo in alfalfa. [Conclusion] The molybdate-reducing strains M9 and M13 can promote the growth and reduce the Mo content of alfalfa in Mo-contaminated soil. This finding can provide theoretical reference for revealing the mechanism of microbial-enhanced Mo remediation by plants as well as the joint remediation of Mo-contaminated soil by plants and microorganisms.

Keywords: molybdenum; endophytic bacteria of plant; plant growth-promoting properties; *Medicago sativa*; joint remediation by plants and microorganisms

钼(molybdenum, Mo)是动植物生长必需的营养元素, 同时也是重要的战略资源, 在钢铁、石油、化工及航天航空等行业被广泛应用^[1]。然而, 随着钼矿及伴生钼矿的开采, 土壤钼污染问题日益严峻^[2]。我国钼矿资源约占全球钼矿资源的 1/4, 其中河南省钼矿资源最为丰富, 占全国钼矿总储量的 30.01%, 目前调查发现河南钼矿区周边土壤中钼含量(均值 784 mg/kg)已远高于我国土壤钼含量背景值(2 mg/kg), 土壤污染情况相当严重, 钼污染已成为钼矿区周边土壤中较为显著的生态环境问题^[3-4]。杨自军等^[5]研究发现, 土壤钼污染可通过食物链的传递威胁动物及人体健康, 当饲料中钼含量大于 10 mg/kg 时, 动物尤其是反刍动物会出现腹泻等中毒症状。在河南土壤高钼区域, 牛、羊等反刍动物均表现出以腹泻为主要特征的钼中毒症状; 此外, 土壤钼污染也可引起作物可食部位钼水平的大幅提高, 从而影响人类对钼的吸收, 导致人体内钼含量的积累, 过量的钼对人体健康危害极大, 能诱发心肌坏死、肾结石、尿道结石及痛风等疾病^[6-7]。目前, 与钼污染土壤关键修复技术相关的研究较少, 尤其是与钼超积累植物筛选、钼还原微生物筛选及钼还原机制等方面的研究鲜有报道。因此, 加强这一领域的研究对于解决土壤钼污染问题具有重要意义。

用于重金属污染土壤修复的方法主要包括物理修复、化学修复和植物修复。物理和化学修复技术成本较高, 且易改变土壤性质并对土壤微生物群落产生负面影响, 甚至可能导致二次污染^[8]。植物修复法因其原位、环保、成本低等特点成为去除土壤中重金属的主要修复方式^[9]。例如, 段桂兰等^[10]报道伴矿景天、东南景天、商陆、龙葵等植物均对镉(cadmium, Cd)具有较强的富集能力, 其地上部分的镉浓度可以达到 400 mg/kg。蜈蚣草对砷(arsenic, As)具有超

强的富集能力, 其地上部砷的浓度可达生物量的 1% 以上, 蜈蚣草吸收的砷能在其根部被高效还原, 并转运到地上部的羽叶中储存^[11]。这些超富集植物被认为是修复重金属污染土壤的理想选择, 尤其是豆科植物紫花苜蓿(*Medicago sativa*), 因其生长快、生物量大、适应性强等特点, 近年来被广泛应用于土壤中镉、锌、铜、铬等重金属的污染修复^[12-13]。然而, 关于紫花苜蓿对土壤钼污染的修复特性的相关报道极少。

微生物与植物联合修复技术是目前治理土壤重金属污染物的有效手段之一, 尤其是外源添加植物内生菌强化植物修复作用的方法应用广泛^[14-15]。万勇^[16]从镉的超富集植物龙葵(*Solanum nigrum*)中分离筛选出一株内生贪噬菌属(*Variovorax paradoxus*)菌株 DE5, 该菌株耐受镉的浓度可达 200 mg/L, 与对照组相比, 接种 DE5 的青苜蓿根部生物量显著增加, 其对镉的富集能力显著提高。Li 等^[17]将一株内生肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)菌株 K3-2 接种到苏丹草中, 显著增加了苏丹草的生物量和体内铜的积累量, 其对铜的吸收量与未接种内生菌相比, 从 49% 增加到 95%。因此内生菌协同超积累植物作为一种新兴的重金属污染土壤修复技术, 凭借其稳定的生存环境和独特的生理特性, 展现出极大的应用潜力。

本研究以钼还原内生菌和紫花苜蓿为研究对象, 探究钼污染地区优势植物内生菌的钼还原能力和植物促生特性, 以及外源添加钼还原促生内生菌后对紫花苜蓿生长量、钼富集能力及生理活性的影响。研究结果可为深入理解钼还原促生菌对紫花苜蓿生长和钼吸收的影响提供理论指导, 并有助于促进紫花苜蓿-微生物联合修复钼污染土壤的相关研究, 为未来构建植物-钼还原微生物修复体系提供微生物资源, 对钼污染农田土壤生物修复技术的发展具有重要的研究价值和实际意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料

2022 年采集河南省栾川县某钼尾矿区(钼浓度 96.83 mg/kg)的优 势植物高羊茅(*Festuca elata*)。采集植物全株,装入采样袋并做好标记,样品放入冰盒中带回实验室,保存于 4 °C 冰箱中。供试盆栽植物紫花苜蓿(*Medicago sativa*)种子购自洛阳市新村花卉市场。

1.1.2 培养基

NB 培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, pH 7.0。

NA 培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.0。

低磷酸盐(low phosphate agar medium, LPM)培养基^[18](g/L): 葡萄糖 10.0, 硫酸铵 3.0, 七水合硫酸镁 0.5, 氯化钠 5.0, 酵母提取物 0.5, 二水合钼酸钠 2.4, 磷酸氢二钠 0.5, pH 7.0。

1.2 钼还原内生细菌的分离与筛选

采用表面消毒法分离耐钼内生细菌。具体步骤如下:取清洗干净的高羊茅根部组织 5 g,用 75% 乙醇消毒 30 s, 5% 次氯酸钠消毒 3 min, 无菌水漂洗 5 次后,用无菌滤纸吸干水分。将根部组织放入无菌研钵中,加入 15 mL 无菌水,充分研磨后静置 15 min,取 100 μ L 上清液涂布于 LPM 固体培养基上,30 °C 培养 72 h,挑选蓝色菌落进行纯化培养^[19]。纯化后的细菌接种于 NB 培养基中,30 °C、200 r/min 培养 24 h,测量菌液的 OD_{600} 值。以 2% 的接种量将 OD_{600} 值为 1.0 的菌悬液接种于 LPM 液体培养基中,30 °C、200 r/min 培养 72 h 后,吸取 2 mL 培养液,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,测定 865 nm 处钼蓝的吸光度值。

1.3 钼还原内生细菌的鉴定

1.3.1 形态学鉴定

观察 NA 培养基上耐钼内生细菌菌株的菌落特征,并进行革兰氏染色,观察细菌的微观形态特征,具体方法参考文献[20]。

1.3.2 分子生物学鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司)提取耐钼内生细菌菌株的基因组 DNA,具体步骤参照试剂盒说明书。利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1429R (5'-CGGCTACCTTGTACGAC-3') 对 16S rRNA 基因序列进行扩增;利用引物 UP-1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') 和 UP-2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC NACRTCNGCRTCNGTCAT-3') 扩增促螺旋酶基因(*gyrB*)。具体扩增体系及程序参考文献[21]。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将获得的 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序列分别与 NCBI GenBank 数据库中的已知序列进行 BLASTn 比对,并采用 MEGA 7.0 构建系统发育树,明确菌株的分类地位。

1.4 钼还原内生细菌促生特性的分析

将保存的内生细菌菌株接种于 NA 培养基,30 °C 预培养 12 h 后进行固氮、溶磷、解钾、产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、产铁载体及 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-amino cyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶活性的测定。

固氮能力测定:将待测菌株接种于阿须贝无氮培养基(Ashby 培养基)^[22],28 °C 培养 3 d 后观察生长状况。溶磷能力测定:将待测菌株点接于 PKO 无机磷培养基和孟金娜有机磷培养基^[23],28 °C 培养 3 d 后观察菌落周围透明圈的产生情况,并测量溶磷圈直径(D)和菌落直径

(d), 计算溶磷指数(D/d)。解钾能力测定: 将待测菌株点接于解钾培养基^[24], 28 °C培养 3 d 后观察菌落生长状况。产铁载体能力测定: 将待测菌株点接于铬天青检测培养基(CAS 培养基)^[25], 28 °C培养 5 d 后观察菌落周围橙色晕圈的产生情况, 测量橙色晕圈直径(D)和菌落直径(d), 计算 D/d 值。ACC 脱氨酶活性测定: 将待测菌株接种于 5 mL DF 无氮液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h; 取 0.1 mL 培养液分别接种于 5 mL DF 培养基和 ADF 培养基中^[26], 30 °C、200 r/min 培养 48 h, 观察菌株在 2 种培养基中的生长情况。产 IAA 能力测定: 采用 Salkowski's 显色法测定待测菌株产 IAA 的能力^[27]。具体方法为: 将待测菌株接种于 5 mL 金氏(King)液体培养基中, 28 °C、120 r/min 培养 3 d 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 3 mL 上清液滴于白色陶瓷板中, 加入等体积 Salkowski 比色液, 室温黑暗放置 30 min 后观察颜色变化。

1.5 紫花苜蓿盆栽试验

1.5.1 供试盆土

采集洛阳市某村庄农耕田 0–20 cm 表层土作为供试土壤, 去除土壤中的杂物, 风干后磨碎, 160 °C消毒 2 h。采用土壤:珍珠岩为 7:3 比例混合均匀, 分装于塑料花盆中(直径 17 cm, 高 16 cm), 每盆分装 1.5 kg。盆土 pH 值为 7.2, 总钼含量为 0.22 mg/kg。将配制好的钼酸钠溶液加入供试土样中, 与盆土混合均匀, 使盆土中钼浓度(以 Mo^{6+} 计)分别为 500 mg/kg 和 800 mg/kg, 以不加钼酸钠的盆土为对照(钼处理浓度记为 0 mg/kg), 盆土室温静置老化 14 d 后备用。

1.5.2 盆栽试验

老化后的盆土浇入 500 mL 无菌水, 播入消毒后的紫花苜蓿种子, 每盆播种 30 颗种子。盆栽试验设置 4 个处理, 分别为紫花苜蓿+无菌水、紫花苜蓿+M9、紫花苜蓿+M13、紫花苜

蓿+M9+M13 (菌株按体积比 1:1 进行复配), 每个处理分别设置 3 个钼浓度(0、500、800 mg/kg), 盆栽试验共包含 12 个处理, 每处理 6 个重复。种植方法为: 紫花苜蓿播种当天每盆浇灌细菌菌液 20 mL (菌液浓度为 10^8 CFU/mL), 之后每隔 15 d 浇灌 1 次细菌菌液, 以无菌水浇灌作为对照, 75 d 后收获紫花苜蓿植株。整个培养期在顶部透光的日光温室中进行(温度 20–25 °C, 相对湿度 70%)。

1.6 细菌对紫花苜蓿生长量和生理活性的影响

1.6.1 紫花苜蓿生物量的测定

收集各处理组紫花苜蓿植株, 用自来水冲洗干净后, 再用蒸馏水冲洗, 用乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)溶液浸泡 20 min 以去除根系表面吸附的钼酸根离子, 最后用纯净水冲洗干净, 滤纸吸干水分。随机挑取各处理组紫花苜蓿 10 株, 分别测量植株的株高、根长和鲜重。

1.6.2 紫花苜蓿生理活性指标的测定

紫花苜蓿收获前 1 天, 采集相同叶龄的叶片测定各处理组紫花苜蓿植株中叶绿素含量、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性。叶绿素含量采用 95% 乙醇法测定^[28], MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定^[29], POD 活性采用愈创木酚法测定^[30]。

1.7 紫花苜蓿钼含量及钼富集因子和转运系数的测定

1.7.1 土壤样品中钼含量的测定

按照五点取样法于 10–15 cm 土层处均匀取样, 将盆土样品按不同浓度和不同处理分别混匀后作为后续测量样品, 种植前与种植后的盆土取样方法一致。分别测定紫花苜蓿种植前和种植后土壤中有有效态钼含量。土壤中有有效态钼按照农业土壤中有有效态的标准提取方法(NY/T 1121.9—2012)^[31]进行提取。具体方法如

下：分别精确称取 3.0 g 风干土壤样品，置于 250 mL 三角瓶中，加入 30 mL Tamm 溶液(每升溶液含 12.6 g 草酸+24.9 g 草酸铵)，220 r/min 振荡 30 min 后静置过夜，5 000 r/min 离心 5 min 后取上清液。消解方法按照《中华人民共和国国家环境保护标准 HJ678—2013》^[32]进行，消解液中钼含量采用 ICP-MS (Agilent 7800)测定。

1.7.2 紫花苜蓿中钼含量的检测

将收集的各处理组紫花苜蓿根、茎、叶分开，全株与植物组织于 105 °C 杀青 30 min 后，70 °C 烘干至恒重，烘干样品磨碎后过筛，用 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 法进行消解，消解液中钼含量采用 ICP-MS 测定，并计算紫花苜蓿钼富集因子(enrichment factor, BCF)和转运系数(transport coefficient, TA)。计算公式如(1)和(2)所示。

$$\text{富集因子} = A_p / A_s \quad (1)$$

式中： A_p 为植物中钼含量(mg/kg)； A_s 为土壤中剩余钼含量(mg/kg)。

$$\text{转运系数} = A_u / A_d \quad (2)$$

式中： A_u 植物地上部分钼含量(mg/kg)； A_d 为植物地下部分钼含量(mg/kg)。

1.8 数据处理

数据采用 Excel 2016 软件整理，采用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较，以分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离与钼还原能力分析

从高羊茅根部组织中分离获得 12 株具有钼还原能力的内生细菌菌株，分别命名为 M1、M2、M3、M4、M5、M6、M9、M10、M11、M12、M13 和 M14，12 株细菌分离物在 LPM 平板上均呈现深蓝色(图 1)。以 LPM 液体培养基为对照，测定 12 个菌株在 865 nm 处的钼蓝吸收值，以判断不同菌株的钼蓝产量，从而确定其钼还原能力。钼蓝吸收值越高，表明菌株的钼蓝产量越高，钼还原能力越强。结果显示，12 株细菌在 LPM 液体培养基中培养 72 h 后，

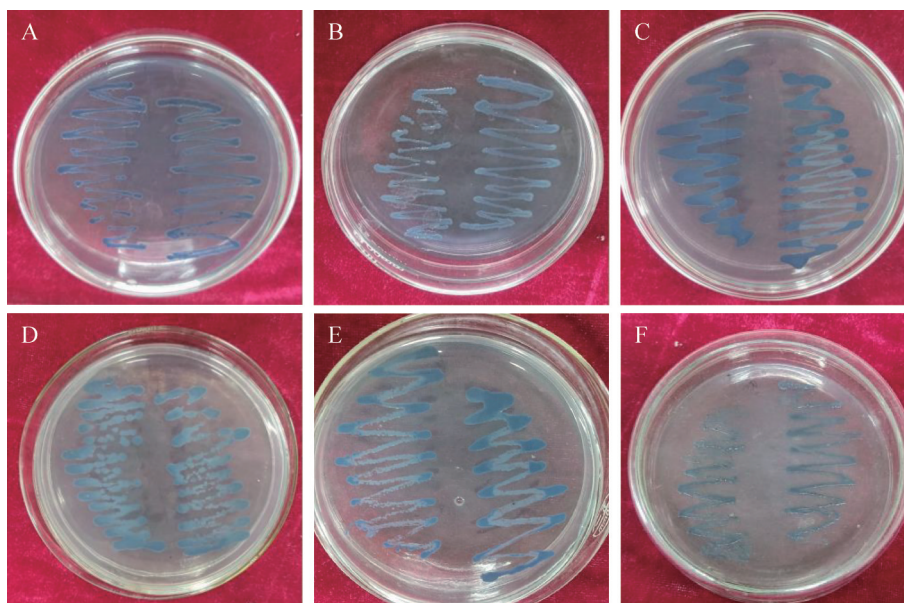


图1 部分钼还原内生细菌在LPM平板上的生长状态

Figure 1 Growth of some molybdate reducing bacterial isolates on LPM agar. A: M5; B: M6; C: M9; D: M11; E: M12; F: M13.

菌株 M9 在 865 nm 处的钼蓝吸光度值最大, 为 2.54 ± 0.15 ; 其次为菌株 M13, 吸光度值为 1.64 ± 0.01 , 与其他菌株的钼蓝吸光度值存在显著差异 (表 1)。此外, 菌株 M9 和 M13 在持续培养 168 h 后, 仍保持较高的钼蓝产量。利用紫外分光光度计对菌株 M9 和 M13 所产钼蓝的吸收光谱 (400–900 nm) 进行扫描, 发现 2 个菌株产生的钼蓝具有独特的吸收特性, 在 865 nm 处出现吸光度峰值, 在 700 nm 处出现肩峰 (图 2)。结果表明, 不同菌株的钼还原能力存在差异, 菌株 M9 和 M13 在 LPM 培养基中表现出较高的钼蓝产量和较强的钼还原能力。因此, 本研究选择菌株 M9 和 M13 作为钼还原菌株进行后续试验。

2.2 钼还原内生细菌的鉴定

菌株 M9 和 M13 在 NA 培养基上呈现乳白色, 菌落圆形, 边缘整齐, 表面湿润。革兰氏染色结果显示, 2 株细菌均为革兰氏阴性菌, 呈短杆状 (图 3)。通过 PCR 扩增菌株 M9 和 M13 的 16S rRNA 基因序列, 分别获得 1 437 bp 的片

表1 内生细菌菌株培养72 h后的钼酸盐还原能力

Table 1 Molybdate reduction ability of the bacterial strains after 72 h of incubation

Strains	Absorbance at 865 nm
M1	$0.42 \pm 0.02d$
M2	$0.44 \pm 0.02d$
M3	$0.34 \pm 0.02e$
M4	$0.47 \pm 0.03c$
M5	$0.29 \pm 0.02f$
M6	$0.42 \pm 0.15d$
M9	$2.54 \pm 0.15a$
M10	$0.34 \pm 0.01e$
M11	$0.35 \pm 0.02e$
M12	$0.35 \pm 0.15e$
M13	$1.64 \pm 0.01b$
M14	$0.32 \pm 0.02e$

The data in the table are mean $\pm$ SE ($n=3$). Different lowercase letters indicate that the same index is significantly different ($P<0.05$).

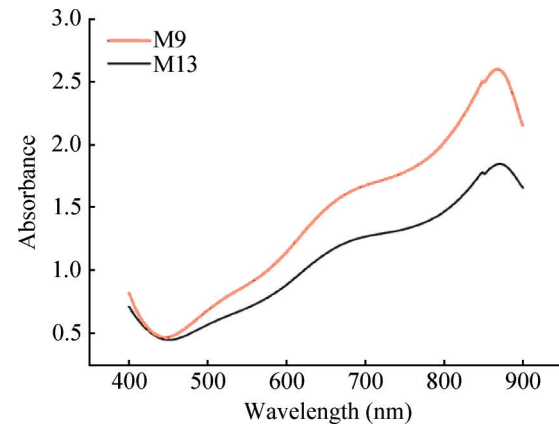


图2 菌株M9和M13培养72 h后的钼蓝扫描光谱

Figure 2 Scanning spectra of molybdenum blue of strains M9 and M13 after 72 h of incubation.

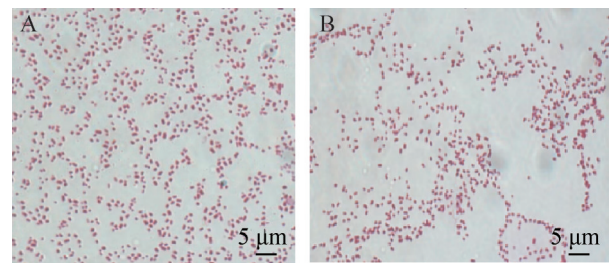


图3 钼还原菌株M9 (A)和M13 (B)的革兰氏染色

Figure 3 Gram stain of molybdate-reducing bacterial strains M9 (A) and M13 (B).

段序列, GenBank 登录号分别为 PQ333149 和 PQ333150。同时, PCR 扩增菌株 M9 和 M13 的 *gyrB* 基因, 分别获得 1 192 bp 和 1 203 bp 的片段序列, GenBank 登录号分别为 PQ365717 和 PQ365716。利用 NCBI 的 BLASTn 工具对菌株 M9 和 M13 的 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序列进行比对, 筛选出与其序列相似性高达 99% 的菌株。进一步利用 MEGA 7.0 软件, 通过邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树 (图 4A、4B), 并基于 1 000 次重复的 bootstrap 值进行置信度分析。结果显示, 菌株 M9 和 M13 的 16S rRNA 基因序列及 *gyrB* 基因序列均与普利茅斯沙雷氏菌(*Serratia plymuthica*)

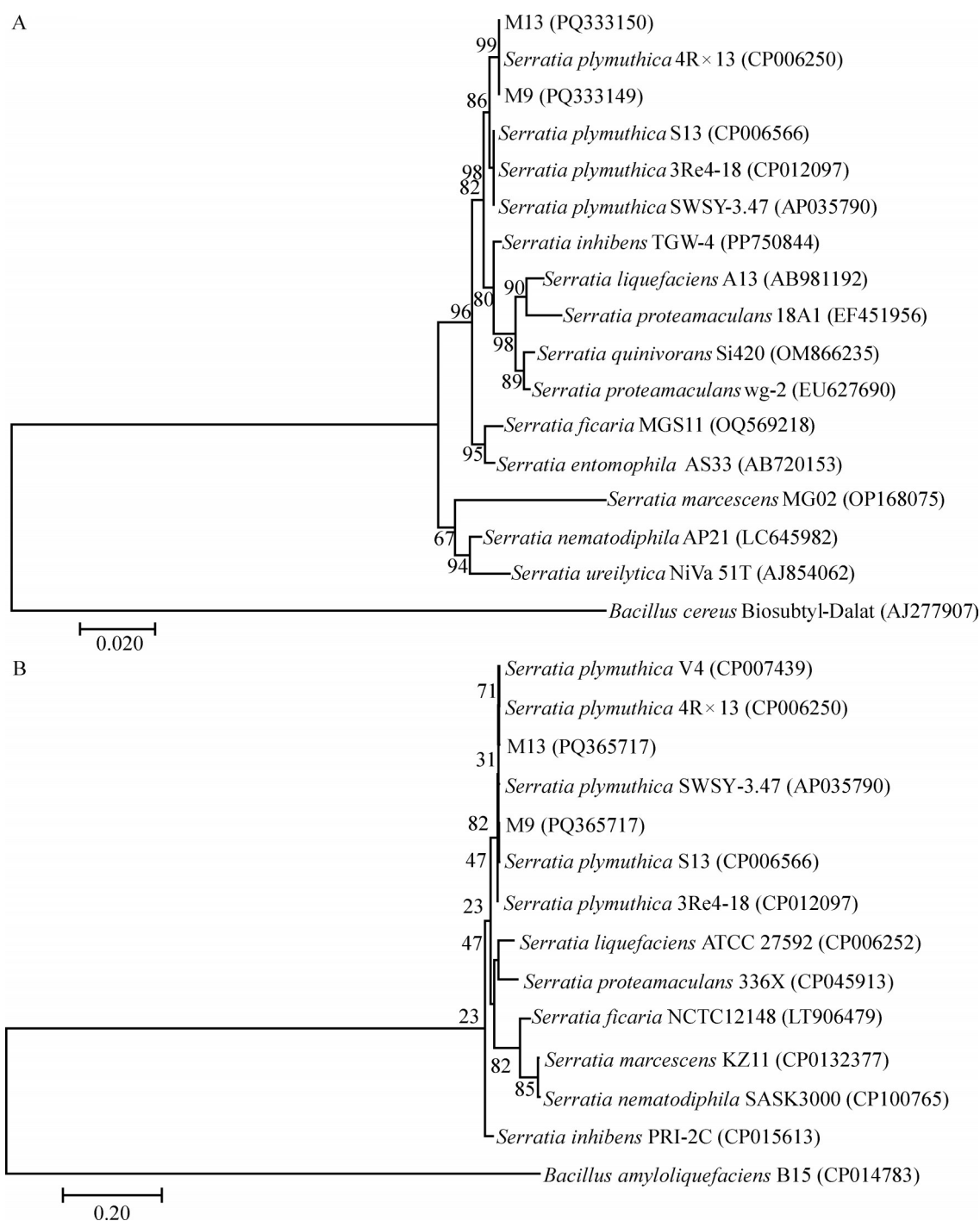


图4 基于16S rRNA基因序列(A)和*gyrB*基因序列(B)构建的钼还原细菌菌株M9和M13系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene (A) and *gyrB* gene sequences (B) of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method in MEGA 7.0 with bootstrap values based on 1 000 replications. *Bacillus cereus* and *B. amyloliquefaciens* were chosen as outgroups. Gene accession numbers of bacterial strains are indicated in parentheses. The scale bar represents the number of substitutions per base position.

聚为一类, 结合形态学特征和分子生物学特征, 将菌株 M9 和 M13 鉴定为普利茅斯沙雷氏菌(*S. plymuthica*)。

2.3 钼还原内生细菌的促生特性分析

钼还原内生细菌菌株 M9 和 M13 的促生特性测定结果表明, 2 个菌株均能在固氮培养基中生长(图 5A), 表明它们具有固氮能力。2 个菌株在无机磷培养基上均形成了半透明的解磷圈(图 5B), 菌株 M9 和 M13 的溶磷圈与菌落直径比值(D/d)分别为 1.35 ± 0.12 和 1.73 ± 0.14 , 说明 2 个菌株均具有良好的无机磷溶解能力, 且菌株 M13 的能力优于菌株 M9。在孟金娜有机磷培养

基上, 2 个菌株也形成了半透明的解磷圈(图 5C), 菌株 M9 和 M13 的溶磷圈与菌落直径比值(D/d)分别为 2.57 ± 0.69 和 1.76 ± 0.30 , 表明它们均具有良好的有机磷溶解能力, 且菌株 M9 的能力优于菌株 M13。菌株 M9 和 M13 在硅酸盐细菌培养基上均能生长, 呈现油滴状, 表明 2 个菌株均具有一定的解钾能力(图 5D)。在 CAS 培养基上, 菌株 M9 和 M13 均产生了橙黄色透明圈(图 5E), 其透明圈与菌落直径比值(D/d)分别为 1.52 ± 0.19 和 1.41 ± 0.07 , 表明它们均具有产铁载体的能力, 且菌株 M9 边缘透明圈较大, 表明 M9 产铁载体能力优于菌株 M13。在 ADF 液

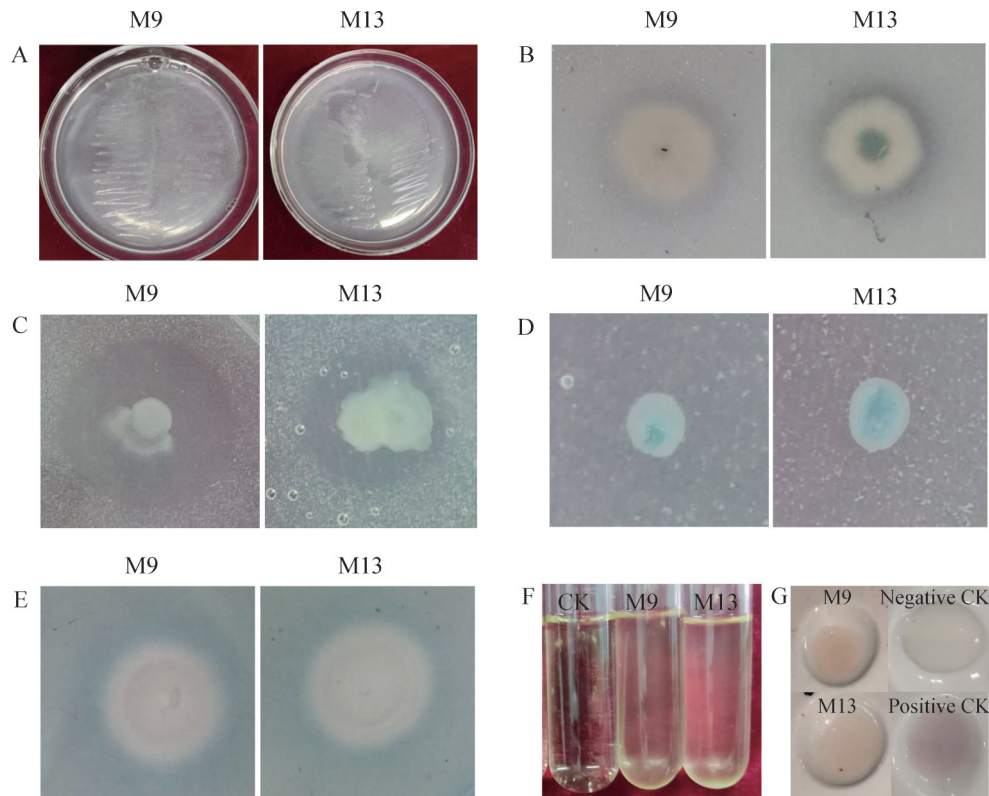


图5 钼还原菌株M9和M13的促生特性。A: 固氮能力; B: 解无机磷能力; C: 解有机磷能力; D: 解钾能力; E: 产铁载体能力; F: ACC脱氨酶活性; G: 产IAA能力。

Figure 5 Characterization of growth promoting properties of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13. A: Nitrogen fixation capacity; B: Inorganic phosphorus solubilization capacity; C: Organic phosphorus solubilization capacity; D: Potassium solubilization capacity; E: Siderophore production capacity; F: ACC deaminase activity; G: IAA production capacity.

体培养基中, 2 个菌株均能正常生长, 培养液呈现浑浊状态(图 5F), 培养 48 h 后, 其在 600 nm 处的吸光度值分别为 0.289 和 0.234, 表明 2 个菌株均具有产 ACC 脱氨酶活性。将菌株 M9 和 M13 的发酵上清液与 Salkowski 比色液混合后, 混合液均呈现粉红色, 表明 2 个菌株具有一定的产 IAA 能力(图 5G)。

2.4 钼还原菌株对紫花苜蓿的促生作用

通过测量不同处理条件下紫花苜蓿的株高、根长和鲜重, 分析钼还原菌株 M9 和 M13 对紫花苜蓿的促生作用。如表 2 所示, 菌株 M9 和 M13 对紫花苜蓿的株高、根长、鲜重产生了显著的影响。在不添加 Mo^{6+} 的条件下, 接种菌株 M9 的处理组, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重分别比对照组增加了 3.21%、11.81% 和 36.36%, 差异显著($P<0.05$)。接种菌株 M13 的处理组, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重分别比对照组增加了 3.71%、12.33% 和 45.45%, 差异显著($P<0.05$)。接种复配菌株 M9+M13 的处理组, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重分别比对照组增加了 13.67%、

26.59% 和 91.48%, 差异显著($P<0.05$) (图 6A), 表明菌株 M9 和 M13 对紫花苜蓿具有显著的促生作用, 且复配菌株的促生效果优于单一菌株。

如表 2 所示, 在添加 Mo^{6+} 的条件下, 随土壤中钼离子浓度的增加, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重均呈下降趋势。当土壤钼浓度为 800 mg/kg 时, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重显著低于 0 mg/kg 和 500 mg/kg 处理组($P<0.05$), 表明钼胁迫对紫花苜蓿的生长具有显著抑制作用, 且钼浓度越高, 抑制作用越强。在相同钼处理浓度下, 接种钼还原菌株处理组, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重显著高于未接种对照组。当钼浓度为 500 mg/kg 时, 菌株 M9 的处理组, 紫花苜蓿的株高、根长和鲜重分别增加了 24.09%、17.39% 和 24.63% ($P<0.05$); 菌株 M13 处理组分别增加了 25.11%、18.15% 和 39.13% ($P<0.05$); 复配菌株 M9+M13 处理组分别增加了 30.89%、19.33% 和 59.42% ($P<0.05$) (图 6B)。当钼浓度为 800 mg/kg 时, M9 处理组紫花苜蓿的株高、根长和鲜重分别增加了 16.58%、9.33%

表2 钼还原菌株对紫花苜蓿的促生效果

Table 2 Effect of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13 on alfalfa growth promotion

Treat (Mo^{6+} +bacteria)	Plant height (cm)	Root length (cm)	Fresh weight (g)
0 mg/kg+M9+M13	32.18±1.80a	22.18±1.75a	6.74±0.38a
0 mg/kg+M13	29.36±1.48b	19.68±1.71b	5.12±0.21b
0 mg/kg+M9	29.22±1.05bc	19.59±1.38b	4.80±0.25b
0 mg/kg	28.31±1.06bc	17.52±0.59c	3.52±0.32c
500 mg/kg+M9+M13	28.09±1.08c	17.22±0.85c	3.30±0.33c
500 mg/kg+M13	26.85±1.62d	17.05±0.57c	2.88±0.15c
500 mg/kg+M9	26.63±2.52d	16.94±0.70c	2.58±0.16d
500 mg/kg	21.46±1.53e	14.43±0.75d	2.07±0.12e
800 mg/kg+M9+M13	21.36±0.93e	14.41±0.85d	2.13±0.14e
800 mg/kg+M13	20.94±0.95e	14.14±0.97d	1.98±0.28e
800 mg/kg+M9	20.53±1.32e	14.05±0.97d	1.93±0.24e
800 mg/kg	17.61±0.77f	12.85±0.62e	1.49±0.19f

The data in the table are mean±SE ($n=3$). Different lowercase letters indicate that the same index is significantly different ($P<0.05$).

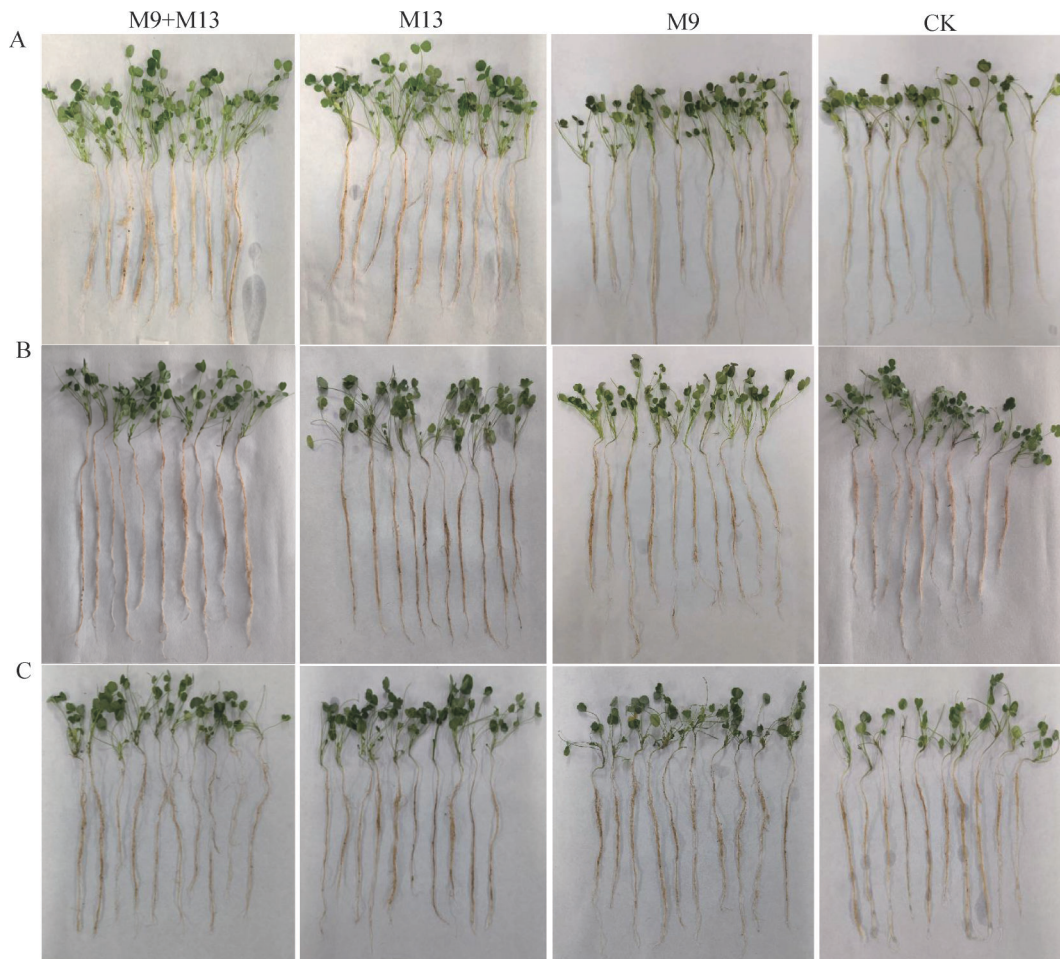


图6 钼还原菌株对紫花苜蓿的促生效果。A: 钼浓度0 mg/kg; B: 钼浓度500 mg/kg; C: 钼浓度800 mg/kg。

Figure 6 Effect of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13 on alfalfa growth promotion. A: Concentration of 0 mg/kg Mo^{6+} ; B: Concentration of 500 mg/kg Mo^{6+} ; C: Concentration of 800 mg/kg Mo^{6+} .

和 29.53% ($P<0.05$); 菌株 M13 处理组分别增加了 18.91%、10.04% 和 32.89% ($P<0.05$); 复配菌株 M9+M13 处理组分别增加了 17.91%、12.14% 和 53.78% ($P<0.05$) (图 6C)。结果表明钼还原菌株能够显著促进紫花苜蓿的生长, 提高其生物量, 并有效缓解高浓度钼对紫花苜蓿生长的抑制作用。

2.5 钼还原菌株对紫花苜蓿生理活性的影响

通过测定不同处理条件下紫花苜蓿的叶绿素含量、POD 活性和 MDA 含量, 分析钼还原

菌株对紫花苜蓿叶绿素合成及抗氧化酶活性的影响。如图 7 所示, 菌株 M9 和 M13 对紫花苜蓿的叶绿素含量、POD 活性和 MDA 含量均产生了显著影响。在不添加 Mo^{6+} 的条件下, 与未接菌对照组相比, 菌株 M9 和复配菌株 M9+M13 均提高了紫花苜蓿的叶绿素含量, 分别提高了 19.19% 和 51.29%, 差异显著 ($P<0.05$)。菌株 M13 与对照差异不显著, 复配菌株 M9+M13 对紫花苜蓿叶绿素含量的提升效果更为显著, 推测这与其促生作用密切相关。此外, 菌株

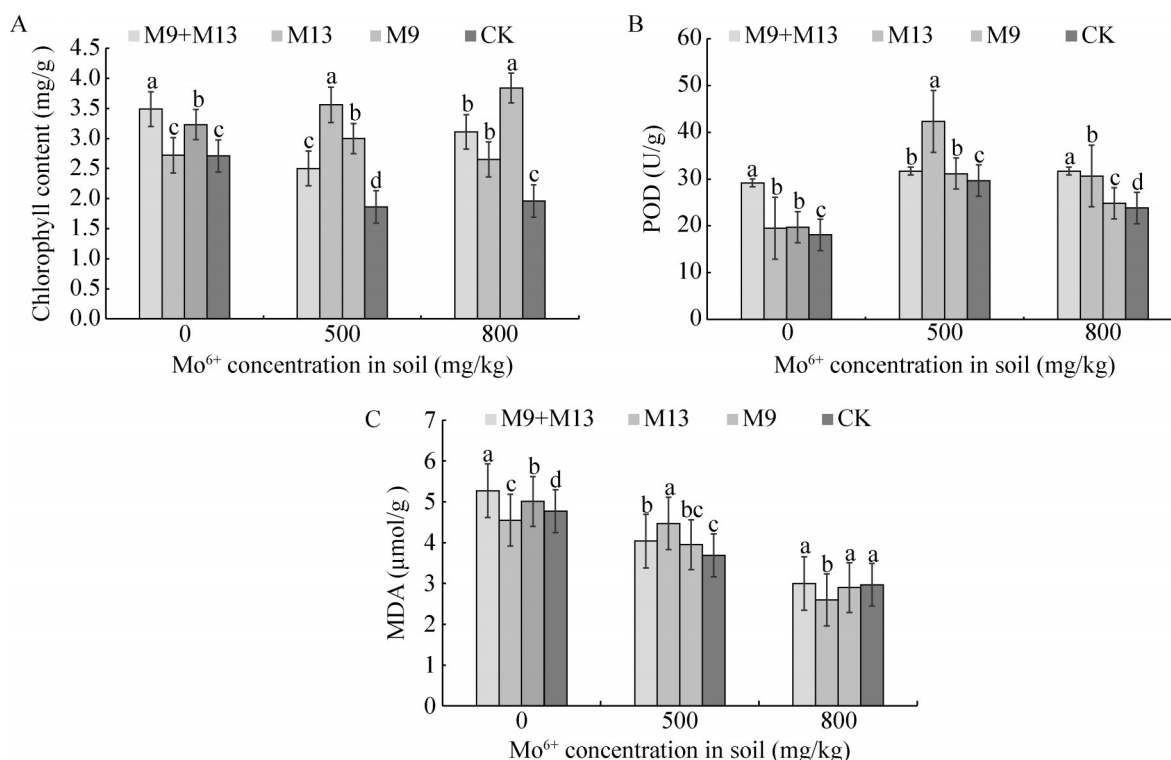


图7 钼还原菌株对紫花苜蓿生理活性的影响。A: 叶绿素含量; B: POD活性; C: MDA含量。

Figure 7 Effect of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13 on the chlorophyll contents, the activities of POD and MDA of alfalfa. A: Chlorophyll contents; B: POD activity; C: MDA content. Different lowercase letters indicate that the same index is significantly different ($P < 0.05$).

M9、M13 和复配菌株 M9+M13 均显著提高了紫花苜蓿 POD 的活性, 与未接菌对照组相比, 其 POD 活性提高了 8.85%、7.80% 和 61.40%, 差异显著($P < 0.05$), 表明接种钼还原菌株可诱导紫花苜蓿抗氧化酶活性的增强。同时, 钼还原菌株对紫花苜蓿 MDA 含量也产生了一定的影响, 菌株 M9 和复配菌株 M9+M13 增加了 MDA 的含量, 菌株 M13 与对照差异不显著。

如图 7 所示, 在添加 Mo⁶⁺ 条件下, 随土壤中钼浓度的增加, 紫花苜蓿的叶绿素含量下降, POD 活性显著增加, 而 MDA 含量逐渐降低, 表明土壤钼胁迫对紫花苜蓿的生理活性具有一定的影响。当钼浓度为 500 mg/kg 时, 接种菌株 M9、M13 和 M9+M13 的紫花苜蓿叶绿素含量均高于未接菌对照组, 其含量分别提高了 33.70%、

87.61% 和 59.89%; POD 活性分别增加了 6.40%、42.67% 和 5.09%; MDA 含量分别提高了 9.49%、21.14% 和 7.05%, 差异显著($P < 0.05$)。在钼浓度为 800 mg/kg 时, 接种菌株 M9、M13 和 M9+M13 的紫花苜蓿叶绿素含量均高于未接菌对照组, 其含量分别提高了 57.65%、44.90% 和 95.40%; POD 活性分别增加了 33.03%、22.30% 和 4.20%, 差异显著($P < 0.05$), 但 MDA 含量与对照组相比差异不显著。

2.6 紫花苜蓿钼富集因子和转运系数

钼还原菌株与紫花苜蓿联合修复对土壤钼含量的影响如表 3 所示, 土壤钼浓度随外源钼含量的增加而增加。接种钼还原菌株后对土壤中总钼含量和有效态钼含量均产生显著影响, 总体呈现降低趋势。当钼浓度为 500 mg/kg 时,

表3 钼还原菌株对土壤中钼含量的影响

Table 3 Effect of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13 on the molybdenum accumulation in soil

Treat (Mo ⁶⁺ +bacteria)	Molybdenum accumulation (mg/kg)	Available molybdenum accumulation (mg/kg)
0 mg/kg+M9+M13	0.33±0.02c	0.07±0.01d
0 mg/kg+M13	0.71±0.04b	0.28±0.02c
0 mg/kg+M9	0.81±0.03b	0.75±0.06b
0 mg/kg	1.73±0.05a	1.65±0.06a
500 mg/kg+M9+M13	188.61±0.94c	43.31±0.51c
500 mg/kg+M13	147.29±0.78d	41.22±0.75d
500 mg/kg+M9	209.44±0.59b	47.70±0.69b
500 mg/kg	222.33±0.41a	51.30±0.48a
800 mg/kg+M9+M13	221.42±0.78d	63.40±0.37d
800 mg/kg+M13	263.63±0.79c	68.35±0.88c
800 mg/kg+M9	369.54±0.70b	78.19±0.35b
800 mg/kg	381.22±0.61a	85.45±0.44a

The data in the table are mean±SE error ($n=3$). Different lowercase letters indicate that the same index is significantly different ($P<0.05$).

接种 M13 菌株后, 土壤总钼含量由 222.33 mg/kg 降至 147.29 mg/kg, 有效态钼含量由 51.30 mg/kg 降至 41.22 mg/kg。当钼浓度为 800 mg/kg 时, 接种 M9+M13 复合菌株后, 土壤总钼含量由 381.22 mg/kg 降至 221.42 mg/kg, 有效态钼含量由 85.45 mg/kg 降至 63.40 mg/kg。结果表明, 接种菌株 M9 和 M13 显著降低了紫花苜蓿根际土壤中钼的含量, 表明钼还原菌株联合紫花苜蓿显著可有效降低土壤中钼的含量。

钼还原菌株对紫花苜蓿地上部和地下部钼含量的影响如表 4 所示, 随土壤中钼浓度的增加, 紫花苜蓿接菌组和未接菌组, 其地上部和地下部钼含量均呈现增加趋势。在钼胁迫条件下, 接种钼还原菌株后对紫花苜蓿地上部和地下部钼含量均显著低于未接菌组。尤其是接种菌株 M9 后, 紫花苜蓿地上部和地下部钼含量显著降低, 与对照组差异显著。当钼浓度为 500 mg/kg 时, 接种 M9 菌株后, 紫花苜蓿地下部钼浓度由 461.63 mg/kg 降至 342.17 mg/kg, 地上部钼浓度由 489.78 mg/kg 降至 353.50 mg/kg。

当钼浓度为 800 mg/kg 时, 接种 M9 菌株后, 紫花苜蓿地下部钼浓度由 732.95 mg/kg 降至 533.86 mg/kg, 地上部钼浓度由 762.95 mg/kg 降至 516.08 mg/kg。结果表明, 菌株 M9 和 M13 对紫花苜蓿中钼的积累表现为抑制作用, 说明钼还原菌株强化紫花苜蓿生长伴随着钼的“稀释效应”进行。

钼还原菌株对紫花苜蓿钼富集因子和转运系数的影响如表 4 所示, 接菌组和未接菌组紫花苜蓿的富集因子均大于 1, 表明其对钼具有良好的富集能力, 可将土壤中的钼有效转移至植物体内。然而, 随着土壤钼浓度的增加, 紫花苜蓿的富集因子显著降低, 表明高浓度钼降低了其对钼的吸收效率。在钼胁迫条件下, 接种菌株 M9、M13 和复配菌株 M9+M13 后, 紫花苜蓿的富集因子和转运系数均显著降低, 表明接种钼还原菌株减少了紫花苜蓿对土壤钼的吸收和转运。菌株 M9 和 M13 对紫花苜蓿钼的富集表现出显著的抑制作用, 但接种菌株有利于土壤钼的去除及其向稳定态转化。

表4 钼还原菌株对紫花苜蓿钼富集因子和转运系数的影响

Table 4 Effect of molybdate-reducing bacterial strains M9 and M13 on the enrichment factor and transport coefficient of alfalfa

Treat (Mo^{6+} +bacteria)	Above-ground (mg/kg)	Below-ground (mg/kg)	Enrichment factor	Transport coefficient
0 mg/kg+M9+M13	15.77±0.13d	15.86±0.34c	—	—
0 mg/kg+M13	21.45±0.22b	21.37±0.29b	—	—
0 mg/kg+M9	12.63±0.15c	14.72±0.42c	—	—
0 mg/kg	24.50±0.23a	24.89±0.62a	—	—
500 mg/kg+M9+M13	376.38±0.86b	395.17±1.71c	6.31	1.05
500 mg/kg+M13	377.67±2.45b	460.85±1.08b	7.47	1.22
500 mg/kg+M9	342.17±1.32c	353.50±1.32d	5.35	1.03
500 mg/kg	461.63±1.34a	489.78±2.34a	8.47	1.06
800 mg/kg+M9+M13	625.47±0.87b	674.51±1.45b	4.22	1.08
800 mg/kg+M13	601.17±0.95c	459.84±0.87d	4.48	0.76
800 mg/kg+M9	533.86±1.36d	516.08±1.58c	3.32	0.97
800 mg/kg	732.95±1.23a	762.95±1.63a	5.66	1.04

The data in the table are mean±SE error ($n=3$). Different lowercase letters indicate that the same index is significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

本研究从钼尾矿区优势植物高羊茅中筛选获得 2 株具有较强钼还原能力的菌株 M9 和 M13。通过形态学特征及 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序列的综合分析, 鉴定其均为普利茅斯沙雷氏菌(*Serratia plymuthica*)。菌株 M9 和 M13 在 865 nm 处的钼蓝吸光度值分别为 2.54 ± 0.15 和 1.64 ± 0.01 , 表明这 2 个菌株能够将钼酸钠(Mo^{6+})还原为钼蓝, 具有修复土壤钼污染的应用潜力。目前, 研究者已从钼污染土壤和水源中分离获得了多株钼还原细菌, 如肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)菌株 Dr. Y13、沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)菌株 HMY1 和 MIE2、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)菌株 LM4-2、柔武氏菌属(*Raoultella* sp.)菌株 Mo1、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)菌株 Aft-7 等, 分别归属细菌 12 个属^[33-38]。其中沙雷氏菌属是一类被频繁筛选获得的钼还原细菌, 表明该属细菌可作为钼污染修复菌用于土壤修复。本研究获得的 2 株

细菌也归于沙雷氏菌属, 且属于首次从植物体内分离获得的具有钼还原能力的内生菌。植物内生菌(endophytic bacteria)定殖于植物组织内, 生存环境稳定, 在外界生物因素或非生物因素的胁迫下对植物表现出明显的促生作用, 因此在植物-微生物联合修复重金属土壤中被广泛应用^[39]。例如, Singh 等^[40]研究发现, 在砷胁迫条件下, 接种菌株缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)后, 可显著促进水稻(*Oryza sativa*)的生长, 增加植物生物量并提高其对砷胁迫环境的耐受性。Petriccione 等^[41]研究发现, 接种荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) AA27 和 MO49 后, 除有效提高紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)种子在重金属污染土壤中的萌发率、增加植株生物量外, 还显著促进了镉、铜等重金属在紫茉莉根际的累积。Li 等^[17]将一株肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)细菌 K3-2 接种于苏丹草中, 可有效增加植物的生物量和植物体内 Cu^{2+} 的积累量, 与未接菌对照组相比, 接菌植物对 Cu^{2+} 的吸收量从

49% 提升至 95%。Babu 等^[42]从樟子松根中分离获得一株内生苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) GSB-1, 该菌株可以产生促进植物生长的因子, 并提升去除潜在有毒金属的效果, 将菌株 GSB-1 植入宿主植物体内后, 植物幼苗的叶绿素含量、生物量以及铜、砷、镍、锌和铅等重金属的提取效果均有所增加。目前, 利用植物内生菌强化钼污染土壤修复的研究报道极为少见, 本研究获得的 2 株内生菌接种紫花苜蓿后, 有效增加了紫花苜蓿的生物量, 并显著降低了紫花苜蓿对土壤钼的吸收和转运, 表明植物内生菌可为钼污染修复生物强化方案的制订提供新思路和新参考。

在植物-微生物协同修复系统中, 内生菌强化植物修复机制主要通过 2 方面实现, 一是直接或间接降低植物体内重金属胁迫强度; 二是对植物的表型产生影响, 提高植物本身对重金属的耐受性^[43]。在植物体内, 内生菌可通过胞内氧化还原作用或弱作用力改变重金属的价态和存在形式, 将重金属离子转化为生物毒性更小的存在形式, 从而降低高浓度重金属对植物的毒害作用^[44]。例如, Xu 等^[45]将 1 株内生菌纳斯达短波单胞菌 (*B. nasdae*) W1-2B 接种到蜈蚣草 (*Eremochloa ciliaris*) 后发现, As^{3+} 被氧化为 As^{5+} , 抑制了蜈蚣草对 As^{3+} 的吸收。Jong 等^[46]从硒超积累植物沙漠王羽 (*Stanleya pinnata*) 中分离获得 1 株内生细菌, 该菌株对土壤中的硒酸盐 (SeO_4^{2-}) 和亚硒酸盐 (SeO_3^{2-}) 具有较强的氧化还原能力, 能将其分解为单质硒, 有效降低了土壤中亚硒酸盐的含量, 提高了植物的修复效率。在 pH 值为 7.0 的条件下, 钼在土壤中主要以 MoO_4^{2-} 形式存在, 而具有钼还原活性的细菌在一定条件下产生钼还原酶, 在钼还原酶的作用下细菌可将 Mo^{6+} 还原转化为 Mo^{5+} , 最终将 MoO_4^{2-} 转化为无毒性的钼蓝, 改变其原来的存

在形态, 降低其在环境中的生物有效性, 从而降低钼对植物的胁迫^[47]。本研究发现, 内生细菌 M9 和 M13 对紫花苜蓿根际土壤中总钼和有效态钼含量产生了一定的影响, 与未接菌的根际土壤相比, 其总钼含量和有效态钼含量均有下降。同时, 在钼胁迫条件下, 接种钼还原菌株后紫花苜蓿地上部和地下部的钼含量均显著低于未接菌对照组。结果表明, 2 株钼还原细菌强化紫花苜蓿的修复机制是将土壤中或进入植物体内的钼离子转化为无毒性的存在形式, 抑制了紫花苜蓿对钼的吸收, 阻隔了其向地上部转移, 降低了高浓度钼对紫花苜蓿的胁迫作用。然而, 菌株 M9 和 M13 产生钼还原酶的能力及解毒机理仍需进一步研究。

内生菌强化植物修复机制的另一方面主要体现在内生细菌能够促进植物光合作用、分泌铁载体、有机酸、表面活性剂、固氮酶、ACC 脱氨酶和植物生长激素等物质, 可以改善植物营养, 促进植物生长, 增加重金属胁迫条件下的植物生物量, 从而提高植物修复的效率^[48]。Mirzahossini 等^[49]将接种了内生菌 *Epichloe coenophiala* 的高羊茅 (*Festuca arundinacea*) 放置于含高浓度镍环境中, 与未接种内生菌对照组相比, 接种内生菌植株叶绿素含量显著提高。Zhang 等^[50]从超富集植物美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 的根、茎和叶中分离出耐铜内生细菌, 其中菌株 *Ralstonia* sp. J1-22-2、成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) Jp3-3 和赛维瓦尔假单胞菌 (*P. thivervalensis*) Y1-3-9 具有多种促植物生长特征, 表现出较高的 ACC 脱氨酶活性, 能够产生铁载体和吲哚乙酸, 并可溶解无机磷酸盐, 其接种后可显著促进欧洲油菜 (*Brassica napus*) 的生长, 并提高了欧洲油菜对铜的耐受性。此外, 一株分离自玉米 (*Zea mays*) 组织的耐镉内生细菌 *Rahnella* sp. JN27, 能够分泌吲哚乙酸和铁载体,

具有 ACC 脱氨酶活性和溶磷能力, 接种千穗谷 (*Amaranthus hypochondriacus*)、苋菜 (*A. mangostanus*)、龙葵 (*Solanum nigrum*) 和玉米等植物后, 可显著提高这些植物地上部和地下部的生物量^[51]。本研究获得的 2 株内生细菌 M9 和 M13 具有固氮、溶磷、解钾、产 IAA、铁载体及 ACC 脱氨酶的能力, 接种紫花苜蓿后, 能够显著提高紫花苜蓿的生物量, 表明这 2 株内生细菌强化紫花苜蓿修复钼污染的机制与促进紫花苜蓿的生长密切相关。

内生细菌强化植物修复机制除了通过直接促进植物生长外, 还可通过诱导植物产生系统抗性, 间接提高植物对土壤重金属的耐受性^[52-53]。植物在受到重金属胁迫后, 会造成活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 大量累积, 如过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 等, 从而对植物造成较大危害。内生细菌作为植物的有益共生菌, 能够调节宿主植物的抗氧化酶活性。当植物接种内生细菌后, 植物体内的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和 POD 等抗氧化酶活性显著增强, 有效减轻了重金属胁迫对植物造成的危害^[54]。Wan 等^[55]研究表明, 在 $10\ \mu\text{mol/L}$ 和 $50\ \mu\text{mol/L}$ 镉浓度条件下, 接种嗜线虫沙雷氏菌 (*S. nematodiphila*) LRE07 后, 龙葵叶片中的 SOD 活性显著高于未接菌组, 有效抵御了重金属引起的氧化胁迫, 减轻了重金属对植物的毒害程度^[1]。丙二醛 (MDA) 含量也是植物受逆境胁迫程度的重要指标之一, 过量 MDA 可破坏植物组织的渗透压平衡和细胞膜结构, 改变细胞液的 pH 值^[56]。王立等^[57]发现, 在镉污染条件下, 接种丛枝菌根真菌摩西球囊霉 (*Glomus mosseae*) 和根内球囊霉 (*G. intraradice*) 后, 水稻叶片中 MDA 含量显著降低, 而 SOD 活性和脯氨酸含量显著提高。本研究结果表明, 在钼胁迫条件

下, 紫花苜蓿接种钼还原菌株 M9 和 M13 后, 其叶片中 POD 活性增加, MDA 含量下降, 表明这 2 株内生细菌可诱导紫花苜蓿产生系统抗性, 间接提高其对土壤钼污染的耐受性, 减轻高浓度钼对紫花苜蓿的胁迫作用。

根据本研究结果及讨论, 推测菌株 M9 和 M13 促进紫花苜蓿协同修复钼污染的机制主要包含 2 个方面: 一是菌株自身可产生钼还原酶将土壤或植物体内的 Mo^{6+} 还原转化为无毒性的钼蓝, 有效降低紫花苜蓿根际土壤中总钼和有效态钼含量, 抑制紫花苜蓿对钼的吸收, 降低紫花苜蓿地上部和地下部钼的含量; 二是菌株自身具有促生长特性, 能够有效提高紫花苜蓿在钼污染土壤中的生长量, 改善钼污染胁迫下紫花苜蓿的生理活性指标, 提升紫花苜蓿对钼污染的耐受性, 减轻钼污染的胁迫作用。本研究为土壤钼污染修复提供了微生物-植物联合修复体系, 并探讨了微生物强化植物修复的机制, 对土壤钼污染修复具有一定的理论参考意义。

作者贡献声明

杨瑞先: 研究设计、数据分析和论文撰写; 刘萍: 钼还原菌株的分离、筛选及论文修订; 石桦: 钼还原菌株的鉴定; 王小庆: 土壤中钼含量的测定; 乔翠翠: 盆栽试验、钼还原菌株促生特性测定; 肖静尧: 参与盆栽试验, 负责紫花苜蓿地上部和地下部钼含量的测定; 杨沛霖: 参与论文数据分析; 田文杰: 研究设计和论文修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 李路, 胡承孝, 谭启玲, 孙学成. 植物对土壤钼污染的响应及其耐钼机制研究进展[J]. 农业环境科学学报,

- 2022, 41(4): 700-706.
- LI L, HU CX, TAN QL, SUN XC. Responses and tolerance mechanisms of plants to molybdenum pollution in soil: a review[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2022, 41(4): 700-706 (in Chinese).
- [2] GENG CN, GAO YJ, LI D, JIAN XP, HU QH. Contamination investigation and risk assessment of molybdenum on an industrial site in China[J]. Journal of Geochemical Exploration, 2014, 144: 273-281.
- [3] 曲蛟, 袁星, 丛俏, 张宏伟. 钼矿区选矿场周边农田土壤重金属污染状况分析与评价[J]. 生态环境, 2008, 17(2): 677-681.
- QU J, YUAN X, CONG Q, ZHANG HW. Analysis and assessment on the pollution condition of heavy metals in the soil in the farmland around the collection areas of molybdenum ore[J]. Ecology and Environment, 2008, 17(2): 677-681 (in Chinese).
- [4] 贾婷, 贾洋洋, 余淑娟, 屈应明, 江志凌, 陈炎辉, 王果. 闽东某钼矿周边农田土壤钼和重金属的污染状况[J]. 中国环境监测, 2015, 31(1): 45-49.
- JIA T, JIA YY, YU SJ, QU YM, JIANG ZL, CHEN YH, WANG G. Pollution of molybdenum and heavy metals of the soils and rice near a molybdenum mining site in eastern Fujian[J]. Environmental Monitoring in China, 2015, 31(1): 45-49 (in Chinese).
- [5] 杨自军, 龙塔, 冉林武, 王婷, 白东英, 温文彦. 钼的生物学功能及其在动物生产中的作用[J]. 河南科技大学学报(农学版), 2004, 24(2): 40-43.
- YANG ZJ, LONG T, RAN LW, WANG T, BAI DY, WEN WY. Molybdenum's biological function and roles in animal production[J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Agricultural Science), 2004, 24(2): 40-43 (in Chinese).
- [6] VYSKOCIL A, VIAU C. Assessment of molybdenum toxicity in humans[J]. Journal of Applied Toxicology, 1999, 19(3): 185-192.
- [7] ZHOU K, TANG MM, ZHANG W, CHEN YL, GUAN YS, HUANG R, DUAN JW, LIU ZB, JI XM, JIANG YT, HU YH, ZHANG XL, ZHOU JJ, CHEN MJ. Exposure to molybdate results in metabolic disorder: an integrated study of the urine elementome and serum metabolome in mice[J]. Toxics, 2024, 12(4): 288.
- [8] 王兴利, 王晨野, 吴晓晨, 王晶博, 穆晓东, 杨晓妹, 胡小飞, 高静. 重金属污染土壤修复技术研究进展[J]. 化学与生物工程, 2019, 36(2): 1-7, 11.
- WANG XL, WANG CY, WU XC, WANG JB, MU XD, YANG XS, HU XF, GAO J. Research progress in remediation technology of heavy metal contaminated soil[J]. Chemistry & Bioengineering, 2019, 36(2): 1-7, 11 (in Chinese).
- [9] 杨滨娟, 黄国勤. 植物种植修复土壤重金属污染的模式、技术与效果综述[J]. 生态科学, 2022, 41(4): 251-256.
- YANG BJ, HUANG GQ. Review on model, technology and effect of phytoremediation technology on remediation of heavy metal pollution[J]. Ecological Science, 2022, 41(4): 251-256 (in Chinese).
- [10] 段桂兰, 崔慧灵, 杨雨萍, 袁幸运, 朱冬, 朱永官. 重金属污染土壤中生物间相互作用及其协同修复应用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(3): 455-470.
- DUAN GL, CUI HL, YANG YP, YI XY, ZHU D, ZHU YG. Interactions among soil biota and their applications in synergistic bioremediation of heavy-metal contaminated soils[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(3): 455-470 (in Chinese).
- [11] 段桂兰, 王利红, 陈玉, 孟祥燕, 董妍, 朱永官. 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.
- DUAN GL, WANG LH, CHEN Y, MENG XY, DONG Y, ZHU YG. Recent developments in understanding the mechanisms of arsenic hyperaccumulation in plants[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(5): 714-720 (in Chinese).
- [12] 柳晓东, 余天飞, 邓振山, 范晓虹, 张薇, 杨昱, 何颖, 艾加敏, 姜影影. *Neorhizobium petrolearium* OS53 联合紫花苜蓿协同修复石油污染土壤研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 854-868.
- LIU XD, YU TF, DENG ZS, FAN XH, ZHANG W, YANG Y, HE Y, AI JM, JIANG YY. *Neorhizobium petrolearium* OS53 combined with alfalfa (*Medicago sativa* L.) for remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 854-868 (in Chinese).
- [13] 孔海明, 李开源, 高双红, 孙雯姿. 根瘤菌对紫花苜蓿生物修复镉污染功能的影响[J]. 草地学报, 2021, 29(12): 2763-2768.
- KONG HM, LI KY, GAO SH, SUN LZ. Effects of *Rhizobium* on the cadmium bioremediation function of alfalfa[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(12): 2763-2768 (in Chinese).
- [14] BASIT A, SHAH ST, ULLAH I, MUNTHA ST, MOHAMED H. Microbe-assisted phytoremediation of environmental pollutants and energy recycling in sustainable agriculture[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(10): 5859-5885.
- [15] WANG L, LIN H, DONG YB, LI B, HE YH. Effects of endophytes inoculation on rhizosphere and endosphere microecology of Indian mustard (*Brassica juncea*) grown in vanadium-contaminated soil and its enhancement on phytoremediation[J]. Chemosphere, 2020, 240: 124891.
- [16] 万勇. 内生细菌在重金属植物修复中的作用机理及应用研究[D]. 长沙: 湖南大学博士学位论文, 2013.
- WAN Y. Study on mechanism and application of endophytic bacteria in phytoremediation of heavy metals[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan University, 2013 (in Chinese).
- [17] LI Y, WANG Q, WANG L, HE LY, SHENG XF. Increased growth and root Cu accumulation of Sorghum sudanense by endophytic *Enterobacter* sp. K3-2: implications for Sorghum sudanense biomass production and phytostabilization[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2016, 124: 163-168.
- [18] HALMI M, ZUHAINIS SW, YUSOF M, SHAHARUDDIN NA, HELMI W, SHUKOR Y, SYED M, AHMAD SA. Hexavalent molybdenum reduction to mo-blue by a sodium-dodecyl-sulfate-degrading *Klebsiella oxytoca* strain DRY14[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 384541.
- [19] DARHAM S, SYED-MUHAIMIN SN, SUBRAMANIAM K, ZULKHARNAIN A, SHAHARUDDIN NA, KHALIL KA, AHMAD SA. Optimisation of various physicochemical

- variables affecting molybdenum bioremediation using Antarctic bacterium, *Arthrobacter* sp. strain AQ5-05[J]. Water, 2021, 13(17): 2367.
- [20] YANG RX, YE WY, LIU P, LI J, LU MM, WANG ZH, SHAO DK. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* Mdbg15 is a potential biocontrol agent against tree peony gray mold caused by *Botrytis cinerea*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2024, 169(2): 431-445.
- [21] YANG RX, LIU P, YE WY, CHEN YQ, WEI DW, QIAO CC, ZHOU BY, XIAO JY. Biological control of root rot of strawberry by *Bacillus amyloliquefaciens* strains CMS5 and CMR12[J]. Journal of Fungi, 2024, 10(6): 410.
- [22] SRITONGON N, BOONLUE S, MONGKOLTHANARUK W, JOGLOY S, RIDDECH N. The combination of multiple plant growth promotion and hydrolytic enzyme producing rhizobacteria and their effect on *Jerusalem artichoke* growth improvement[J]. Scientific Reports, 2023, 13: 5917.
- [23] HAMDALI H, BOUIZGARNE B, HAFIDI M, LEBRIHI A, VIROLLE MJ, OUHDOUCH Y. Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 38(1): 12-19.
- [24] 冯晓英, 周桂雄, 吴庆珊, 方正, 王玉倩, 牛晓娟, 翁庆北. 5株解钾菌解钾能力和抗旱效应的比较[J]. 河南农业科学, 2020, 49(6): 59-63.
- FENG XY, ZHOU GX, WU QS, FANG Z, WANG YQ, NIU XJ, WENG QB. Comparison of potassium solubilization ability and drought resistance of five potassium-solubilizing bacteria[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(6): 59-63 (in Chinese).
- [25] ALEXANDER DB, ZUBERER DA. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria[J]. Biology and Fertility of Soils, 1991, 12: 39-45.
- [26] 郭彦钊, 杜春辉, 于烽, 黄敏刚, 齐飞. 旱区盐生植物根际促生菌的分离鉴定及其干旱、盐胁迫下促生特性[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 610-622.
- GUO YZ, DU CH, YU F, HUANG MG, QI F. Isolation and identification of growth-promoting bacteria in halophyte rhizosphere in arid region and their growth-promoting characteristics under drought and salt stresses[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 610-622 (in Chinese).
- [27] BHATTACHARYYA C, BANERJEE S, ACHARYA U, MITRA A, MALLICK I, HALDAR A, HALDAR S, GHOSH A, GHOSH A. Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 15536.
- [28] FENG Y, CUI X, SHAN H, SHI ZS, LI FH, WANG HW, ZHU M, ZHONG XM. Effects of solar radiation on photosynthetic physiology of barren stalk differentiation in maize[J]. Plant Science, 2021, 312: 111046.
- [29] 王彩霞, 陈晓林, 李保华. 腐烂病菌侵染对苹果愈伤组织防御酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 植物生理学报, 2014, 50(7): 909-916.
- WANG CX, CHEN XL, LI BH. Effects of *Valsa Mali* var. *Mali* infection on defense enzymes activity and MDA content in apple callus[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(7): 909-916 (in Chinese).
- [30] AMOR NB, HAMED K, DEBEZ A, GRIGNON C, ABDELLY C. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity[J]. Plant Science, 2005, 168(4): 889-899.
- [31] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业行业标准: 土壤检测第9部分: 土壤有效钼的测定: NY/T 1121.9—2012[S]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Agricultural Industry Standards of the People's Republic of China: Soil testing-Part 9: Method for determination of soil available molybdenum: NY/T 1121.9—2012[S]. Beijing: China Agricultural Press, 2013.
- [32] 中华人民共和国生态环境部. 中华人民共和国国家环境保护标准: 水质金属总量的消解微波消解法: HJ678—2013[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2013.
- Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. National Environmental Protection Standards of the People's Republic of China: Water quality-digestion of total metals-microwave assisted acid digestion method: HJ678—2013[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2013.
- [33] SHUKOR MY, RAHMAN MF, SHAMAAN NA, SYED MA. Reduction of molybdate to molybdenum blue by *Enterobacter* sp. strain Dr. Y13[J]. Journal of Basic Microbiology, 2009, 49(Suppl 1): S43-S54.
- [34] YAKASAI H, KARAMBA KI, YASID NA, HALMI M, RAHMAN M, AHMAD S, SHUKOR M. Response surface-based optimization of a novel molybdenum-reducing and cyanide-degrading *Serratia* sp. strain HMY1[J]. Desalination and Water Treatment, 2019, 145: 220-231.
- [35] HALMI MIE, ABDULLAH SRS, JOHARI WLW, ALI MSM, SHAHARUDDIN NA, KHALID A, SHUKOR MY. Modelling the kinetics of hexavalent molybdenum (Mo^{6+}) reduction by the *Serratia* sp. strain MIE2 in batch culture[J]. Rendiconti Lincei, 2016, 27: 653-663.
- [36] YOU XY, WANG H, REN GY, LI JJ, DUAN X, ZHENG HJ, JIANG ZQ. Complete genome sequence of the molybdenum-resistant bacterium *Bacillus subtilis* strain LM4-2[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10: 127.
- [37] SAEED AM, SHATOURY EE, HADID R. Production of molybdenum blue by two novel molybdate-reducing bacteria belonging to the genus *Raoultella* isolated from Egypt and Iraq[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(6): 1722-1728.
- [38] MASDOR N, SHUKOR MS, KHAN AA, HALMI MIE, ABDULLAH SRS, SHAMAAN NA, SHUKOR MYA. Isolation and characterization of a molybdenum-reducing and SDS-degrading *Klebsiella oxytoca* strain Aft-7 and its bioremediation application in the environment[J]. Biodiversitas, 2015, 16(2): 238-246.
- [39] 马莹, 骆永明, 滕应, 李秀华. 内生细菌强化重金属污染土壤植物修复研究进展[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 195-202.
- MA Y, LUO YM, TENG Y, LI XH. Effects of endophytic bacteria enhancing phytoremediation of heavy metal contaminated soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2013, 50(1): 195-202 (in Chinese).

- [40] SINGH N, MARWA N, MISHRA SK, MISHRA J, SINGH N. *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L.[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 125: 25-34.
- [41] PETRICCIONE M, PATRE DD, FERRANTE P, PAPA S, BARTOLI G, FIORETTO A, SCORTICHINI M. Effects of *Pseudomonas fluorescens* seed bioinoculation on heavy metal accumulation for *Mirabilis jalapa* phytoextraction in smelter-contaminated soil[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2013, 224: 1645.
- [42] BABU AG, KIM JD, OH BT. Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 250: 477-483.
- [43] 张萌萌, 曹立东, 王仁卿, 孙瑞莲. 植物内生细菌修复重金属污染土壤作用机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(11): 42-49.
- ZHANG MM, CAO LD, WANG RQ, SUN RL. Mechanism of endophytic bacteria remediating heavy metal-contaminated soil[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(11): 42-49 (in Chinese).
- [44] 古添源, 余黄, 曾伟民, 吴学玲, 余润兰, 刘元东, 申丽, 李交昆. 功能内生菌强化超积累植物修复重金属污染土壤的研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(11): 1228-1235.
- GU TY, YU H, ZENG WM, WU XL, YU RL, LIU YD, SHEN L, LI JK. Progress on the endophyte of hyperaccumulators and their beneficial role in heavy metal phytoremediation[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(11): 1228-1235 (in Chinese).
- [45] XU JY, HAN YH, CHEN YS, ZHU LJ, MA LQ. Arsenic transformation and plant growth promotion characteristics of As-resistant endophytic bacteria from As-hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. Chemosphere, 2016, 144: 1233-1240.
- [46] JONG MS, REYNOLDS RJB, RICHTEROV K, MUSILOVA L, STAIKU L, CHOCHOLATA I, CAPP A J, TAGHAVI S, LELIE D, FRANTIK T, DOLINOVA I, STREJCEK M, COCHRAN AT, LOVECKA P, PILON-SMITS E. Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 113.
- [47] YAKASAI HM, RAHMAN MF, MANOGARAN M, YASID NA, SYED MA, SHAMAAN NA, SHUKOR MY. Microbiological reduction of molybdenum to molybdenum blue as a sustainable remediation tool for molybdenum: a comprehensive review[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(11): 5731.
- [48] SUBRAMANIAN P, KIM K, KRISHNAMOORTHY R, SUNDARAM S, SA TM. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110[J]. Plant Growth Regulation, 2015, 76: 327-332.
- [49] MIRZAHOSSEINI Z, SHABANI L, SABZALIAN MR, SHARIFI-TEHRANI M. ABC transporter and metallothionein expression affected by Ni and *Epichloe* endophyte infection in tall fescue[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 120: 13-19.
- [50] ZHANG YF, HE LY, CHEN ZJ, WANG QY, QIAN M, SHENG XF. Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*[J]. Chemosphere, 2011, 83(1): 57-62.
- [51] YUAN M, HE HD, XIAO L, ZHONG T, LIU H, LI SB, DENG PY, YE ZH, JING YX. Enhancement of Cd phytoextraction by two *Amaranthus* species with endophytic *Rahnella* sp. JN27[J]. Chemosphere, 2014, 103: 99-104.
- [52] JORQUERA MA, MARUYAMA F, OGRAM AV, NAVARRETE OU, LAGOS LM, INOSTROZA NG, ACUÑA JJ, RILLING JI, DE LA LUZ MORA M. Rhizobacterial community structures associated with native plants grown in Chilean extreme environments[J]. Microbial Ecology, 2016, 72(3): 633-646.
- [53] TIWARI S, SARANGI BK, THUL ST. Identification of arsenic resistant endophytic bacteria from *Pteris vittata* roots and characterization for arsenic remediation application[J]. Journal of Environmental Management, 2016, 180: 359-365.
- [54] YAN Z, ZHANG W, CHEN J, LI X. Methyl jasmonate alleviates cadmium toxicity in *Solanum nigrum* by regulating metal uptake and antioxidative capacity[J]. Biologia Plantarum, 2015, 59(2): 373-381.
- [55] WAN Y, LUO SL, CHEN JL, XIAO X, CHEN L, ZENG GM, LIU CB, HE YJ. Effect of endophyte-infection on growth parameters and Cd-induced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L.[J]. Chemosphere, 2012, 89(6): 743-750.
- [56] KOSOVÁ K, VÍTÁMOVÁS P, PRÁŠIL IT. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity-what can LEA-II proteins tell us about plant stress response?[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 343.
- [57] 王立, 安广楠, 马放, 吴洁婷, 张雪, 王敏. AMF对镉污染条件下水稻抗性及其根际固定性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(10): 1882-1889.
- WANG L, AN GN, MA F, WU JT, ZHANG X, WANG M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on cadmium tolerance and rhizospheric fixation of rice[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(10): 1882-1889 (in Chinese).