

贺湘睿, 裴向军, 李强, 等. 高产EPS菌株的筛选鉴定及其在渣土改良中的应用研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(6): 677-688.

HE Xiangrui, PEI Xiangjun, LI Qiang, et al. Isolation and identification of higher yield eps and its application in the improvement of arid region residue[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(6): 677-688.

## 高产EPS菌株的筛选鉴定及其在渣土改良中的应用研究

贺湘睿<sup>1,2</sup>, 裴向军<sup>1,2</sup>, 李强<sup>3</sup>, 陆建国<sup>3</sup>, 侯谦儒<sup>3</sup>, 张晓超<sup>1,2</sup>

(1. 成都理工大学生态环境学院, 成都 610059; 2. 天府永兴实验室, 成都 610059; 3. 新疆地矿局第一水文工程地质大队, 乌鲁木齐 836302)

**摘要:** 探究高产胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)菌株的渣土改良性能, 为解决客土资源缺乏的弃渣改良问题提供新的修复措施及菌种资源。从渣土中原位分离筛选出3株高产EPS土壤细菌, 并将3株菌株作为供试复合菌剂, 以渣土配比、颗粒级配、菌剂浓度和菌剂用量为正交试验因素进行干旱胁迫条件下的盆栽试验, 采用主成分分析优化种植基质配比, 遴选出土壤资源合理化利用的最优修复基质配比。结果表明: 3株菌株分别为耐寒短杆菌(*Peribacillus frigiditolerans*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。渣土改良基质的最优配比为营养土: 渣土=7:3, 渣土颗粒级配5 mm, 菌剂浓度0.6( $OD_{600}$ ), 菌剂用量150 mL·kg<sup>-1</sup>。施用高产EPS菌剂是实现干旱区渣土改良的有效措施, 但其应用效率受土壤质地及结构特征的影响。高产EPS菌剂可有效改善渣土结构、理化性质及酶活性, 并帮助植物抵御干旱胁迫影响, 在弃渣土改良方面具有良好的应用潜力。

**关键词:** 胞外多糖; 细菌; 土壤改良; 弃渣场; 生态修复

中图分类号: S158

文章编号: 1000-1700(2024)06-0677-12

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Isolation and Identification of Higher Yield EPS and Its Application in the Improvement of Arid Region Residue

HE Xiangrui<sup>1,2</sup>, PEI Xiangjun<sup>1,2</sup>, LI Qiang<sup>3</sup>, LU Jianguo<sup>3</sup>, HOU Qianru<sup>3</sup>, ZHANG Xiaochao<sup>1,2</sup>

(1. College of Ecological Environment, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China; 2. Tianfu Yongxing Laboratory, Chengdu 610059, China; 3. First Hydrogeological Engineering Team, Xinjiang Bureau of Geology and Mineral Resources, Urumqi 836302, China)

**Abstract:** This study explores the soil improvement potential of high-yield exopolysaccharide (EPS) strains for waste soil, providing new remediation strategies and microbial resources to address the shortage of topsoil. Three high-yield EPS-producing soil bacteria were isolated in situ from waste soil: *Peribacillus frigiditolerans*, *Bacillus cereus* and *Bacillus velezensis*. These strains were used as composite inoculants in pot experiments under drought stress, with soil-to-waste ratio, particle size distribution, inoculant concentration, and inoculant dosage as orthogonal test factors. Principal component analysis was employed to optimize the substrate formulation, resulting in the optimal remediation ratio: nutrient soil-to-waste soil = 7:3, particle size distribution = 5 mm, inoculant concentration = 0.6 ( $OD_{600}$ ), and inoculant dosage = 150 mL·kg<sup>-1</sup>. The application of high-yield EPS inoculants was found to be an effective strategy for improving waste soil in arid regions. However, its efficiency is influenced by soil texture and structural characteristics. EPS-producing inoculants

收稿日期: 2024-09-28

基金项目: 西天山阿吾拉勒铁矿带防灾减灾、绿色可循环再生矿山建设关键技术与应用示范项目(2023B03011-3); 四川省自然科学基金项目(2023NSFSC0378)

第一作者: 贺湘睿(1999-), 女, 博士研究生, 从事土壤改良研究, E-mail: 376458401@qq.com

通信作者: 张晓超(1978-), 女, 博士, 教授, 从事水土保持与生态修复研究, E-mail: 31685032@qq.com

significantly improved the structure, physicochemical properties, and enzyme activity of waste soil, helping plants resist drought stress. These findings highlight the strong potential of EPS inoculants for waste soil remediation.

**Key words:** EPS; bacteria; soil improvement; slag dump; ecological restoration

随着我国公路及水电工程等基础设施的不断发展,建设过程中形成的弃渣量也在逐年剧增,已经成为一个巨大的生态安全隐患,一方面这些弃渣堆积占压原生土地、破坏植被、加剧水土流失,严重威胁当地环境安全;另一方面,因弃渣土自身结构疏松、渗透性强、养分匮乏,植被自恢复能力差。为了解决渣土复垦成效低和成本高的问题,开发一种可应用于现场渣土治理的有效修复技术十分必要近年来微生物技术成为土壤改良的研究热点,在土壤环境中,EPS可以影响生物膜的形成、土壤颗粒的聚集和沉积以及土壤矿物质的溶解,为土壤微生物的生存提供理想的环境<sup>[1-5]</sup>。EPS还可以保持水分,保护微生物和环境免受干旱。此外,还报道了EPS其他如黏附、与其他微生物和植物的通讯、抗氧化、聚集、碳储存和营养物质的捕获功能<sup>[6-8]</sup>。QIU等<sup>[9]</sup>还指出EPS在保护生物膜和影响土壤细菌群落组成方面起着至关重要的作用。微生物胞外聚合物(EPS)具有构建土壤初期生物结皮、改善土壤性质和保护植物免受各种非生物胁迫的作用,通过原位筛选渣土中的高产EPS菌株,利用EPS对土壤的胶结能力和促生能力,可以改善土壤性质、结构及生境。目前的研究往往只专注于室内单一菌剂的应用,且长期以来缺少适用于弃渣土改良的功能菌剂开发研究,而并未考虑到大型修复项目需要构建大面积生物结皮的情况,限制了EPS在土壤改良领域中大规模的应用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 土壤来源 在西藏JC水电站原位弃渣场、渣场周边的生物结皮层、苔藓覆盖区域及边坡表层等位置,使用无污染采样工具(如土钻或刮刀)进行表层土壤采样。每处取样深度控制为0~5 cm,以确保采样的均匀性与代表性。采样后,将样品装入无菌采样袋中,避免污染,封口并标注取样位置、深度和时间等信息。

1.1.2 供试培养基 LB固体培养基:酵母粉5.0 g,蛋白胨10.0 g,NaCl 10.0 g,琼脂20.0 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.2;LB液体培养基:酵母粉5.0 g,蛋白胨10.0 g,NaCl 10.0 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.2;发酵培养基:葡萄糖20.0 g、蛋白胨20.0 g、MgSO<sub>4</sub> 0.05 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.0 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.0 g、pH值7.0,定容至1 000 mL。

### 1.2 研究方法

1.2.1 初筛 取5 g土样于锥形瓶中,加入200 mL蒸馏水振荡均匀后,按梯度(10<sup>-1</sup>~10<sup>-4</sup>)稀释,制成土壤悬浮液。取50 μL悬浮液涂布于LB固体培养基,28 °C倒置培养48~72 h。挑取湿润黏稠、可拉丝的单菌落,经3~4次划线纯化后接种于50 mL LB液体培养基(去琼脂),30 °C、180 r·min<sup>-1</sup>振荡24 h,制得菌液。

1.2.2 复筛 将初筛菌株接种于50 mL LB液体培养基中,30 °C条件下180 r·min<sup>-1</sup>振荡24 h,制得浓度为1×10<sup>9</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>的种子液。按5%接种量转接至100 mL LB培养基中,30 °C、200 r·min<sup>-1</sup>分别培养24,48,72 h后提取胞外多糖。采用苯酚硫酸法测定OD<sub>490</sub>值,结合葡萄糖标准曲线计算多糖产量。

1.2.3 菌株的鉴定 将菌株样本送到上海派森诺生物科技有限公司进行测序。所得序列使用Blast软件与NCBI数据库比对,得到最高同源菌,采用MEG4.0绘制系统进化树。

1.2.4 菌株的产糖能力测定 将初筛菌株接种于50 mL LB液体培养基,30 °C、180 r·min<sup>-1</sup>振荡24 h制备种子液。按5%接种量转接至100 mL LB培养基,30 °C、200 r·min<sup>-1</sup>振荡培养24,48,72 h。培养后,以10 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min取上清,加入3倍体积95%乙醇振荡后,4 °C静置过夜,再离心沉淀,用乙醇洗涤3次后溶于蒸馏水。取粗多糖与6%苯酚溶液混匀,加浓硫酸摇匀后水浴加热,测定490 nm处OD值,并根据葡萄糖标准曲线计算胞外多糖含量。

1.2.5 干旱区渣土改良的基质配比优化 将高产EPS菌株Z1-6、Y2-1和Y3-1等比例混合制备复合菌剂,设置四因素三水平试验处理。预测组5为最优渣土基质配比,将因素C和D置空作对照(CK2),并设置组10和CK2分析无营养土修复的可行性,组Y对比菌剂施加后渣土与纯营养土的种植效果。每组设置3次平行,正交试验设计见表1。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Orthogonal test factor level table

组别 Group	A 渣土配比(渣土:营养土) Proportioning of construction waste soil (construction waste soil: potting soil)	B 颗粒级配/mm Particle - size distribution	C 菌剂浓度( $OD_{600}$ ) Concentration of microbial inoculant	D 菌剂用量/(mL·kg <sup>-1</sup> ) Dosage of microbial inoculant
1	9:1	10	1.4	150
2	9:1	5	1	100
3	9:1	2	0.6	50
4	7:3	10	1	50
5	7:3	5	0.6	150
6	7:3	2	1.4	100
7	5:5	10	0.6	100
8	5:5	5	1.4	50
9	5:5	2	1	150
CK1	7:3	5	/	0
10	10:0	2	1	100
CK2	10:0	2	/	0
Y	0:10	/	/	/

盆栽试验在成都理工大学温室基地进行,选用高14.5 cm、外径23 cm的花盆,种植抗逆性紫花苜蓿。种子经消毒预发芽后,每盆梅花形均匀播种8粒,覆土10 mm。种植30 d后停止浇水,使土壤含水率低于6%,模拟干旱胁迫;30 d收获第1批样本,空白组植株萎蔫时收获第2批样本。试验测定指标如下。

(1)土壤结构。生物结皮厚度:培养60 d后,用游标卡尺测量割取结皮的厚度。生物结皮硬度:培养60 d后,在结皮中心及四角选5点,用硬度计测定硬度。生物结皮渗水性:割取1 cm×1 cm结皮,滴加200  $\mu$ L蒸馏水,用秒表计入渗时间 $t$ 。入渗速率计算公式:得到的时间记为 $t$ 。则结皮的水分入渗速率为:

$$\text{入渗速率}(\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1})=200/t \quad (1)$$

生物结皮持水性:用小刀分别在各组土壤生物结皮中割取4 cm<sup>2</sup>,待其自然干燥。取一培养皿,在培养皿中放入两层滤纸,放入干燥后的结皮,逐滴滴加蒸馏水至滤纸完全浸透,盖上培养皿盖,放置24 h。期间若滤纸干燥,需向培养皿中再次滴加蒸馏水,至滤纸完全浸透。

土壤容重与总孔隙率:将环刀托与已编号称重的环刀底部相结合,环刀内壁涂擦少量凡士林,将环刀刀口向下垂直压入土中借助小锤垂直敲打环刀柄直至环刀筒中充满土样为止。用工具小心取出已充满土的环刀,细心削平环刀两端多余的土,并擦净环刀外面的土。同时在同层取样处,用铝盒采样,测定土壤自然含水量 $\theta_m$ 。把装有土样的环刀两端立即加盖,以免水分蒸发。随即称重(精确至0.01 g),并记录。将装有土样的铝盒烘干称重(精确至0.01 g),测定土壤自然含水量,则土壤容重为:

$$BD=Ms/V \quad (2)$$

式中: $BD$ 为土壤密度( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ); $Ms$ 为环刀内土壤样品烘干质量(g), $Ms$ 可通过自然含水量计算得出,即:

$$Ms=M/(1+\theta_m) \quad (3)$$

式中: $V$ 为环刀容积( $\text{cm}^3$ ),可根据实际测定中所用规格确定。

土壤总孔隙度为:

$$\text{土壤总孔隙度 } P(\%)=(1-\text{土粒密度}/\text{土壤密度})\times 100 \quad (4)$$

(2)土壤理化性质。土壤pH值得测定采用水浸提电位法;有机质测定采用重铬酸钾容量法;全氮测定采用凯氏定氮法;全磷测定采用氢氧化钠熔融-铝锑抗比色法;全钾测定采用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消煮-火焰光度计法;铵态氮测定采用氧化镁浸提-扩散法;速效磷测定采用碳酸氢钠浸提-钼锑抗分光光度法;速效钾测定采用M3浸提法。

(3)土壤酶活性。根据不同被测物在特定波长下吸光值不同的原理测定了土壤中脲酶、 $\alpha$ -葡萄糖

苷酶、蔗糖酶及磷酸酶的活性,其中磷酸酶依据实测土壤酸碱度选择对应试剂盒。测定步骤为:将自然风干后的土样进行30~50目过筛处理,过筛后的土样使用酶联免疫试剂盒(ELISA MLbio,中国)中提供的试剂提取土壤浸取液,再通过酶标仪(VIROSKAN-LUX)测定各相应波长下,浸取液中标志物的吸光值。

### 1.3 数据处理

运用Microsoft Excel 2010和Origin 2021软件进行数据的统计制图。使用SPSS 21.0进行差异性分析、极差分析和主成分分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选

由图1可知,Z1-2、Z1-6、Y2-1、Y3-1的产糖量都随着时间的增加而增加,其中菌株Z1-6胞外多糖产量最高,在72 h达到23.51  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,选择菌株Z1-6、Y2-1、Y3-1作为目标菌株进行研究。

### 2.2 菌株的鉴定

由图2和表2可知,从研究区土壤中筛选到的菌株Y2-1、Y3-1属于芽孢杆菌属,分别为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*);菌株Z1-6属于短杆菌属,为耐寒短杆菌(*Peribacillus frigoritolerans*)。

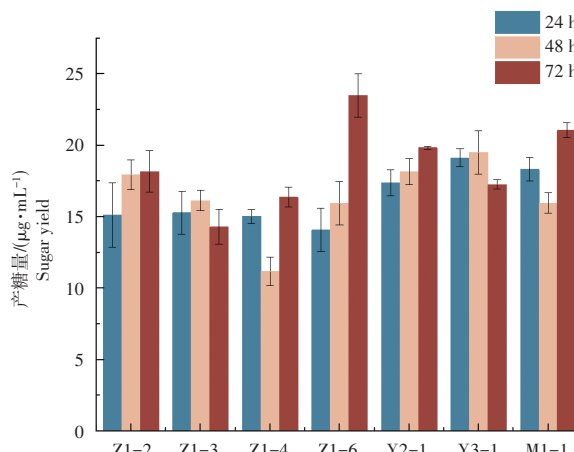


图1 7株菌产糖量随时间的变化

Figure 1 Sugar yield changes of EPS of 7 strains with time

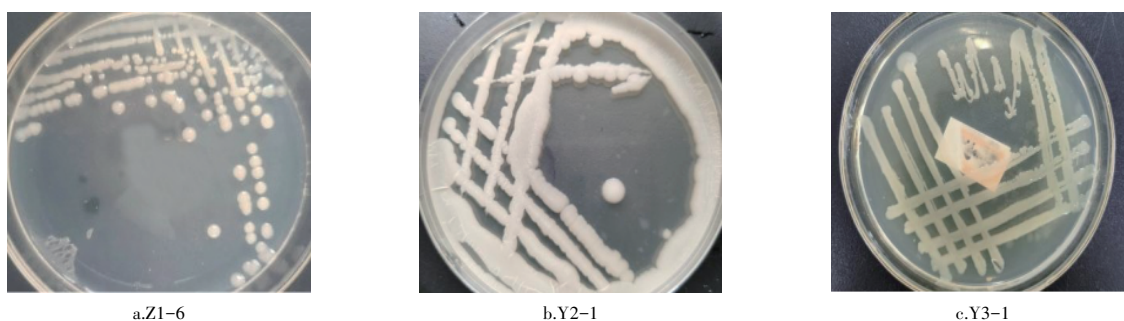


图2 3种供试菌株平板划线形态

Figure 2 Plate streaking morphology of three tested strains

表2 菌株鉴定结果

Table 2 Strain identification result

菌株 Strain No.	属名 Genus	最高同源菌 Bacteria with the highest homology	相似度/% Similarity	相关特性 Related characteristics
Z1-6	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>	耐寒短杆菌 <i>Peribacillus frigoritolerans</i>	99.66	固氮、产IAA、解磷 Nitrogen fixation, IAA production, phosphorus solubilization
Y2-1	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	99.93	固氮、产IAA、解磷、解钾 Nitrogen fixation, IAA production, phosphorus and potassium solubilization
Y3-1	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	贝莱斯芽孢杆菌 <i>Bacillus velezensis</i>	99.66	固氮、产IAA、解磷、解钾 Nitrogen fixation, IAA production, phosphorus and potassium solubilization

### 2.3 基于高产EPS菌剂的渣土改良试验研究

#### 2.3.1 正交试验

2.3.1.1 土壤结构差异分析 由图3可知,组10的总孔隙率较CK2显著提高15.6%,组5与CK1无显著差

异。菌剂施加提升混渣和纯渣的结皮硬度,组5比CK1提高110.62%,组10比CK2提高83.33%。组10的结皮硬度( $2.75 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ )与营养土处理( $2.88 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ )无显著差异。菌剂施加提高混渣和纯渣的结皮厚度,组5比CK1提高70.18%,组10比CK2提高123.33%。菌剂的施加显著提升混渣的结皮渗水性,组5较CK1提升75.41%,而在纯渣土中则截然相反,组10较CK1的结皮渗水性显著降低73.3%。

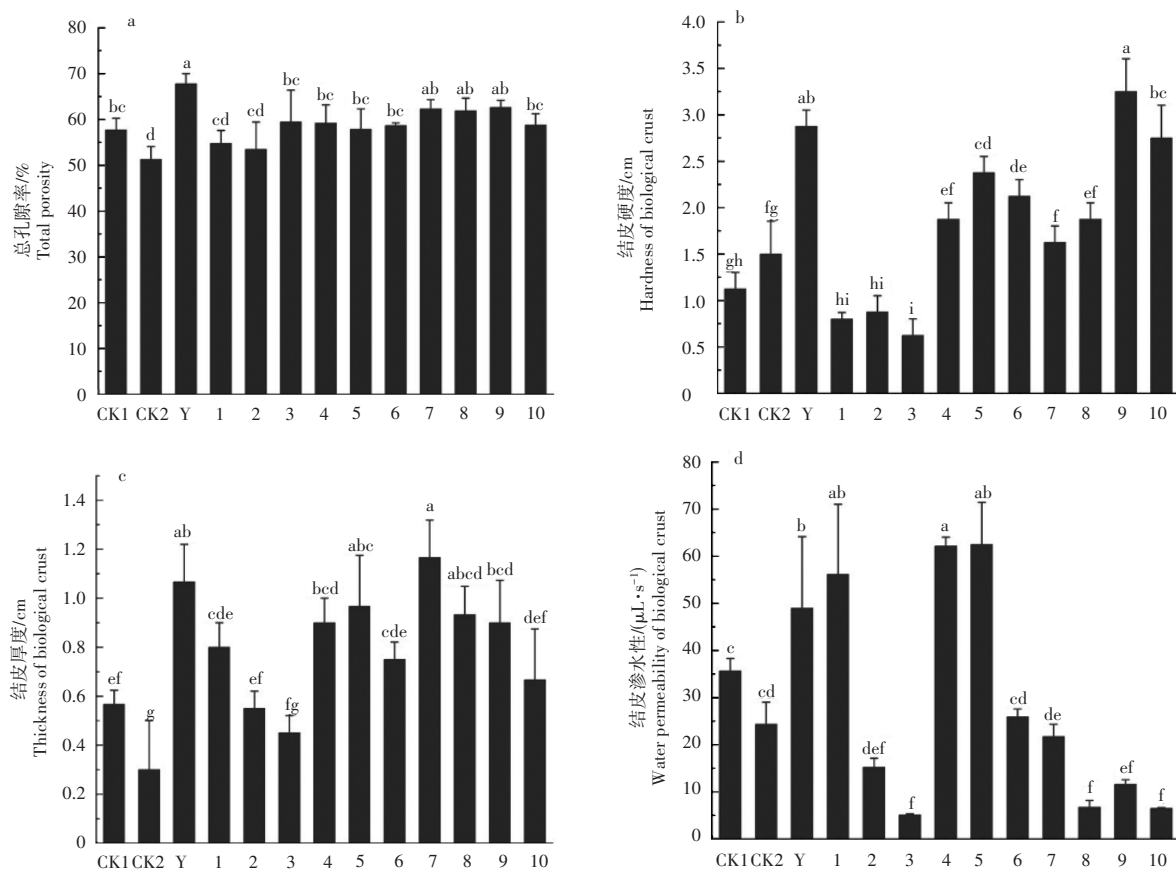


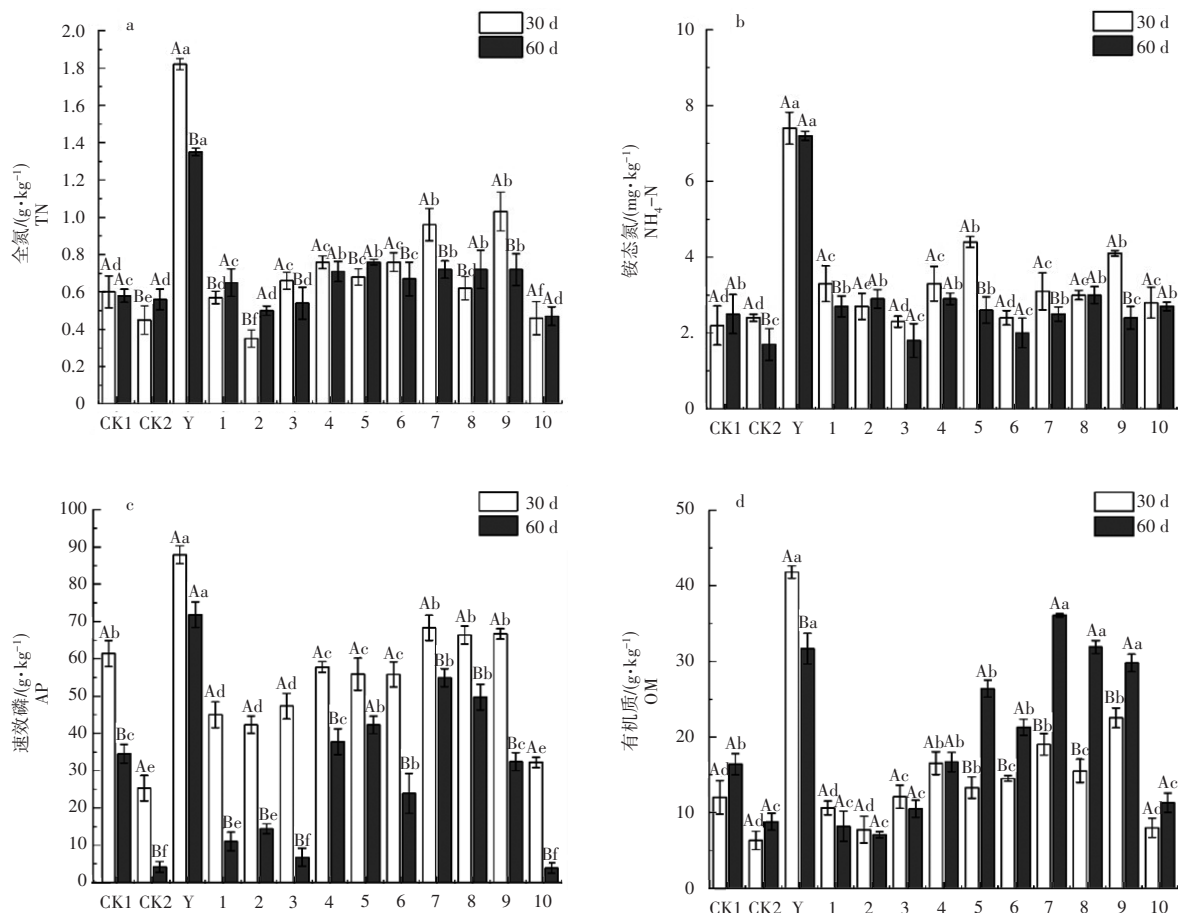
图3 土壤结构差异性分析

Figure 3 Analysis of soil structural differences

2.3.1.2 土壤理化性质差异分析 由图4可知,干旱胁迫30 d后组5较CK1的全氮、速效磷和有机质分别提升31.03%、22.27%和60.98%,而纯渣处理组10与CK2无显著差异。组10的铵态氮含量较CK2提升58.82%,组5与CK1无显著差异。

2.3.1.3 土壤酶活变化差异分析 由图5可知,修复前30 d,除组3外,其余正交处理的碱性磷酸酶活性均高于CK2,组10提升39.21%,组5与CK1无显著差异; $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性正交处理均高于CK2(增幅30.76%~367%),组5与CK1无显著差异,组10较CK2下降37.92%;蔗糖酶活性除3外均高于CK2(增幅19.71%~133.61%),组5与CK1及组10与CK2无显著差异;组5、组6、组7和组8的脲酶活性显著高于CK2(增幅19.7%~22.19%),组5较CK1提升78.95%,组10与CK2无显著差异。干旱胁迫30 d后,组4的碱性磷酸酶活性较CK2提升88.18%,组7提升51.72%,其余无显著差异,组10较CK2下降57.85%。所有正交处理的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和蔗糖酶活性较CK2显著提升(增幅34.3%~79.82%和92.3%~598.76%),其中组1的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性最高( $27.36 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ),组5的蔗糖酶活性最高( $22.71 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ )。菌剂施加显著提升 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性,组5较CK1提升43.39%,组10较CK2提升34.27%。组5的脲酶活性较CK1提升88.11%,较CK2提升108.49%,组10与CK2无显著差异。

2.3.1.4 植物生理差异分析 不同处理苜蓿种植30 d后的表型对比见图6,各处理的植物生理性状见图7。在修复期的前30 d,所有正交处理的株高较CK2均有提升,其中处理组5的株高较CK2提升54.46%,与CK1相比较并无显著性差异,但组10与CK2相较显著提升20.65%。所有正交处理的根长较



大写字母表示同一处理组不同时间之间的差异,小写字母表示同一时间内不同处理组间的差异,下同  
Capital letters indicate the differences among different time points within the same treatment group, while lowercase letters indicate the differences among different treatment groups at the same time, the same below

图4 土壤理化性质结果分析

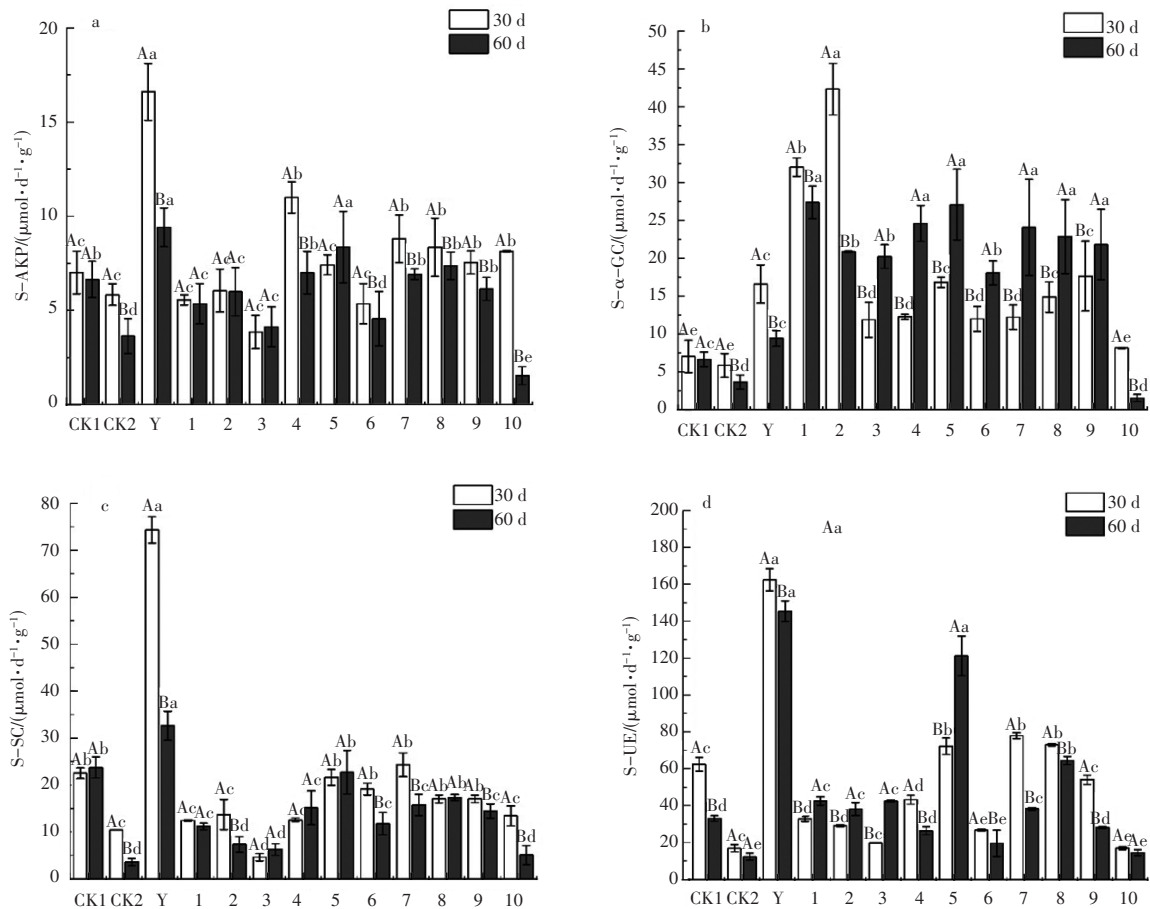
Figure 4 Results analysis of soil physical and chemical properties

CK2均有提升,其中组1和组2的根长显著高于CK2,分别为32.04 cm和42.34 cm,较CK2分别显著提升252.08%和365.33%,组5较CK1显著提升22.41%,而在组10与CK2间并无显著性差异。除组3、组5和组6外,其余所有正交处理的根冠比均高于CK2,增幅为41.17%~129.41%,组5较CK1根冠比下降33.33%,组10与CK2间无显著性差异。在干旱胁迫30 d后,组3的株高较CK2提升31.91%,其余正交处理均无显著性影响,组10相较CK2株高显著提升20.63%。组5的根长较CK1显著提升22.45%,组10和CK2间无显著性差异。所有正交处理的根冠比均高于CK2,增幅为13.63%~66.43%,组10较CK2显著提升78.7%,而组5与CK1间无显著性差异。

### 2.3.2 多因素方差分析及极差分析

2.3.2.1 土壤结构 由表3可知,各因素对指标的影响程度不同,综合F值分析:土壤水稳性大团聚体的主要影响因素为颗粒级配>渣土配比;结皮厚度为渣土配比>颗粒级配>菌剂用量;结皮硬度为渣土配比>菌剂用量>颗粒级配>菌剂浓度;结皮渗水性为渣土配比>颗粒级配>菌剂用量;结皮持水性主要受颗粒级配影响。总体来看,渣土配比和颗粒级配对渣土改良影响较大,但菌剂用量和浓度对生物结皮厚度、硬度和渗水性均有显著影响( $p < 0.05$ )。

由图8可知,生物结皮硬度和厚度均随着营养土含量的增加而提升,当渣土:营养土为5:5时生物结皮硬度和生物结皮厚度均达到最大值2.25 kg·cm<sup>-2</sup>和1 cm,较9:1时分别提升192.2%和66.67%,与渣土配比相反,生物结皮硬度和厚度随着菌剂用量的增加呈现上升趋势,当菌剂用量为150 mL时生物结皮硬度和生物结皮厚度均达到最大值2.14 kg·cm<sup>-2</sup>和0.89 cm,较50 mL时分别提升了46.58%和



a. 碱性磷酸酶 S-AKP; b.  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 S- $\alpha$ -GC; c. 蔗糖酶 S-SC; d. 脲酶 S-UE

图5 土壤酶活性结果分析

Figure 5 Analysis of soil enzyme activity

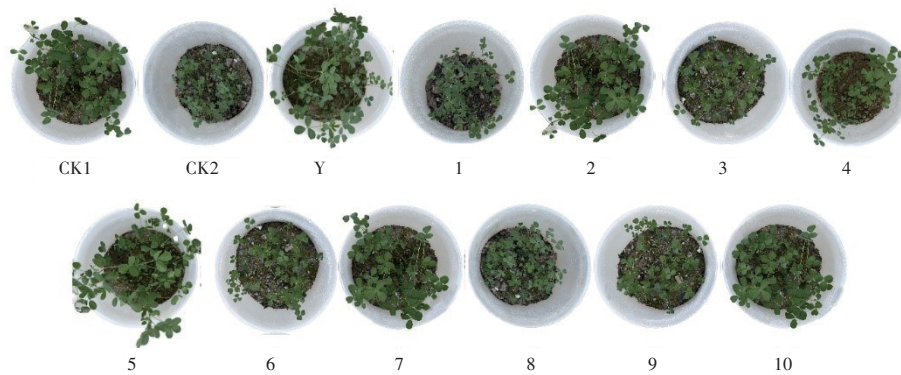
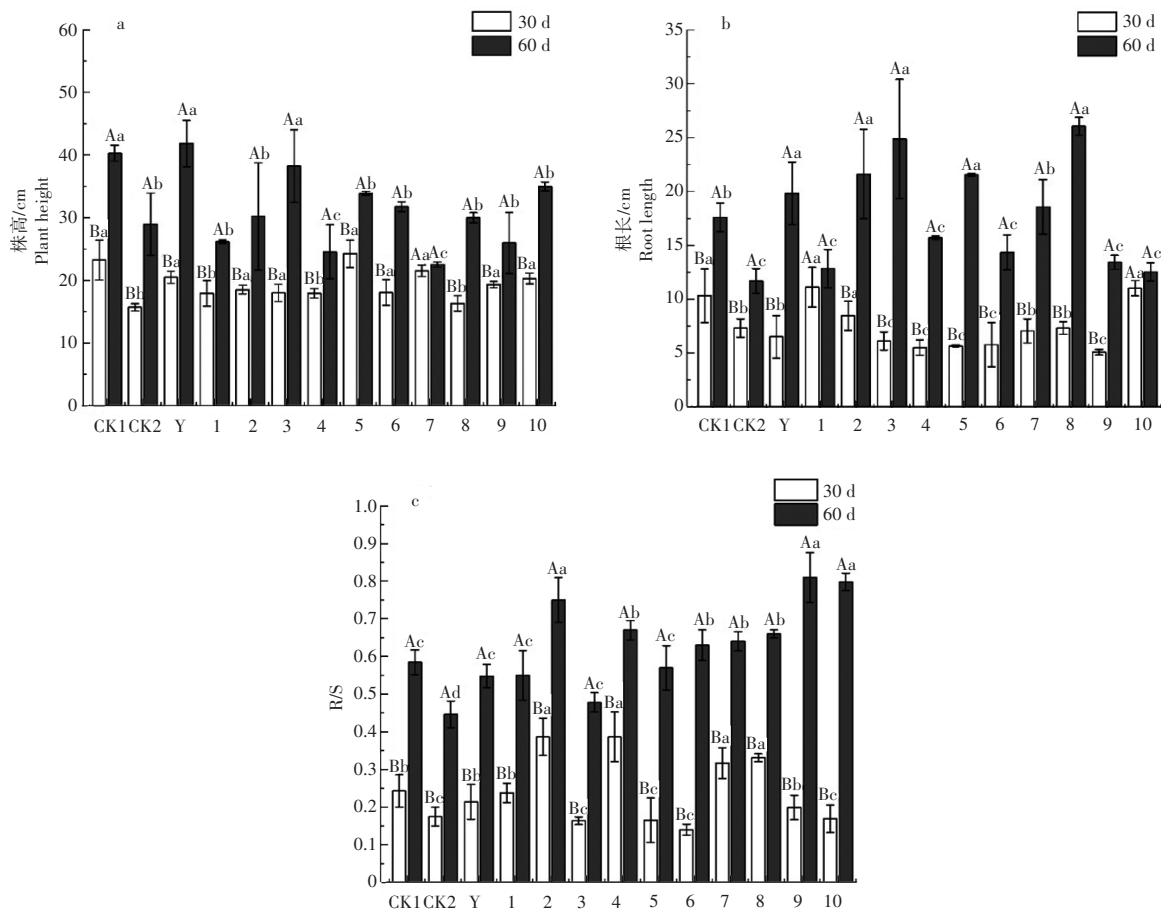


图6 不同处理的苜蓿表型对比图

Figure 6 Comparison of alfalfa phenotypes under different treatments

17.1%。生物结皮持水性在颗粒级配为2时达到最大值(36.21%)。生物结皮渗水性随着菌剂用量的增大而减小,施用150 mL的菌剂用量较50 mL时渗水性下降24.47%,50 mL时为36.41  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ 。综上,生物结皮硬度和厚度随着菌剂用量的增加而增加,菌剂用量对生物结皮渗水性的影响则呈现相反趋势,菌剂用量越多渗水性反而减小。

2.3.2.2 土壤理化性质 由表4可知,在修复期的前30 d,菌剂浓度和用量对土壤有机质和铵态氮含量均具有显著性影响,而在干旱胁迫的30 d后,菌剂浓度和用量对土壤有机质、全磷、铵态氮、速效磷含量和pH值均具有显著性影响,如EPS基质可为胞外酶提供保护性载体,以便细菌在摄取养分前裂解



a. 株高 Plant height; b. 根长 Root length; c. 根冠比 Root to shoot ratio

图7 植物生理性状结果分析

Figure 7 Result analysis of plant physiological character

表3 土壤结构影响多因素方差分析

Table 3 Multivariate analysis of soil structure effect

响应指标 Response indicator	F			
	渣土配比 Proportioning of construction waste soil	颗粒级配 Particle - size distribution	菌剂浓度 Concentration of microbial inoculant	菌剂用量 Dosage of microbial inoculant
容重 Bulk density	2.993	0.304	0.343	0.414
孔隙率 Porosity	2.993	0.304	0.343	0.414
水稳性大团聚体 Water stable macroaggregates	44.928**	148.049**	23.654	22.935
生物结皮厚度 Thickness of biological crust	32.722**	6.222*	0.222	3.556*
生物结皮硬度 Hardness of biological crust	104.799**	12.434**	9.638**	21.520**
生物结皮持水性 Water retention of biological crust	1.108	4.542*	1.490	0.390
生物结皮渗水性 Water permeability of biological crust	66.751**	53.976**	0.174	24.880**

注: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。下同。

Note: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . The same below.

高分子量的有机质,从而影响了土壤pH值。此外,影响有机质含量的主次为:土壤配比>菌剂浓度>菌剂用量>粒径级配;影响铵态氮含量的主次为:粒径级配>菌剂浓度;影响速效磷含量的主次为:土

壤配比>粒径级配>菌剂浓度;影响速效钾含量的主次为:土壤配比>粒径级配>菌剂浓度>菌剂用量。

2.3.2.3 土壤酶活 由表5可知,在修复期的前30 d,菌剂浓度和用量对土壤 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、脲酶和蔗糖酶均有显著性影响,但在干旱胁迫30 d后这种影响逐渐减小,仅菌剂用量对与微生物糖类代谢有关的土壤 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和蔗糖酶具有显著性影响。影响脲酶活性的主次为:土壤配比>粒径级配>菌剂浓度>菌剂用量。

2.3.3 供试菌剂对土壤微生物群落的影响 由表6可知,虽然本研究盆栽试验的限制性因素导致了各处理组之间的Shannon指数和Simpson指数并无显著性差异,但5处理的Chao1指数显著高于对照组CK1,而处理组10与对照组CK2并无显著性差异,这表明在混渣中施用产EPS菌剂显著增加了渣土中的物种丰富度。

2.3.4 主成分分析 由表7可知,以特征值大于1提取6个主成分,累计贡献率为92.84%,可解释土壤生态效应指标的92.84%信息。其中,第1主成分贡献率31.12%,主要由孔隙率、有机质、速效磷、结皮厚度和全氮决定;第2主成分贡献率24.20%,主要由铵态氮和pH决定;第3主成分贡献率13.02%,以结皮渗水性为主;第4主成分贡献率11.45%,由碱性磷酸酶、根长、脲酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶和蔗糖酶决定;第5主成分贡献率7.25%,由速效钾决定;第6主成分贡献率4.80%,由结皮硬度和根冠比决定。

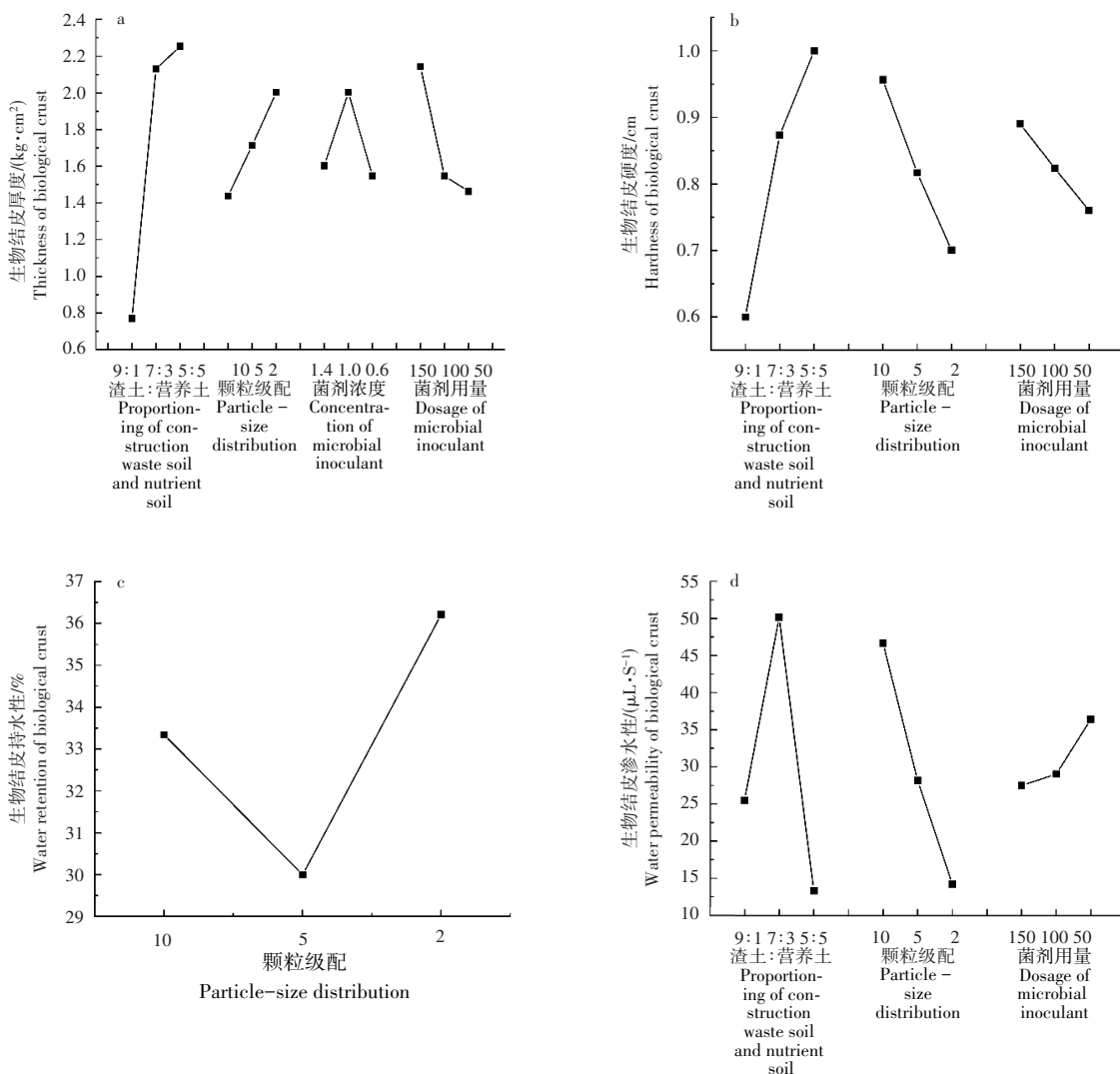


图8 不同渣土配比、颗粒级配、菌剂浓度和菌剂用量对土壤结构的影响

Figure 8 Effects of different residue ratio, particle composition, bactericide concentration and dosage on soil structure

表4 土壤理化性质影响方差分析

Table 4 Effects of soil physical and chemical properties on variance analysis

响应指标 Response indicator	F					
	渣土配比 Proportioning of construction waste soil	粒径级配 Particle - size distribution	菌剂浓度 Concentration of microbial inoculant	菌剂用量 Dosage of microbial inoculant		
土壤理化性质 (处理 30 d 后) Soil physical and chemical properties (after 30 days of treatment)	有机质 Organic matter	104.763**	25.478**	5.683**	3.998	
	全氮 TN	26.948**	17.959**	3.077	1.714	
	全磷 TP	1.928	2.991	2.243	2.519	
	全钾 TK	0.150	6.692*	0.221	0.723	
	铵态氮 Ammonium nitrogen	9.099**	3.528	4.324*	30.984***	
	速效磷 Available phosphorus	30.59**	1.154	0.004	0.044	
	速效钾 Available potassium	14.649**	0.035	0.179	0.074	
	pH	10.527**	1.706	1.225	2.820	
	土壤理化性质 (处理 60 d 后) Soil physical and chemical properties (after 60 days of treatment)	有机质 Organic matter	2 684.042**	11.771**	197.012**	19.730***
		全氮 TN	19.27**	1.591	0.937	4.074
全磷 TP		3.036	15.727*	12.741*	3.036	
全钾 TK		0.555	6.833*	2.028	0.409	
铵态氮 Ammonium nitrogen		1.046	22.555**	6.423*	0.448	
速效磷 Available phosphorus		172.059**	35.220**	7.485*	1.321	
速效钾 Available potassium		52.689**	16.912**	8.087	5.326	
pH		5.034*	0.312	0.197	5.009*	

表5 土壤酶活影响方差分析

Table 5 Effect of soil enzyme activity on variance analysis

响应指标 Response indicator	F				
	渣土配比 Proportioning of construction waste soil	粒径级配 Particle - size distribution	菌剂浓度 Concentration of microbial inoculant	菌剂用量 Dosage of microbial inoculant	
土壤酶活 Soil enzyme activity 30 d	碱性磷酸酶 S-AKP	21.775**	11.824**	3.218	3.195
	α-葡萄糖苷酶 S-α-GC	88.054**	47.267**	39.621**	40.832**
	脲酶 S-UE	8.143**	19.884**	7.155*	0.638
	蔗糖酶 S-SC	71.466**	19.13**	4.585*	57.142**
土壤酶活 Soil enzyme activity 60 d	碱性磷酸酶 S-AKP	4.453*	7.315**	0.800	0.853
	α-葡萄糖苷酶 S-α-GC	0.375	4.304*	0.101	5.818*
	脲酶 S-UE	10.597*	10.225**	4.310	4.043
	蔗糖酶 S-SC	6.488*	0.126	0.298	3.736*

表6 微生物群落多样性分析

Table 6 Microbial community diversity analysis

样本 Sample	Chao1	Observed_species	Pielou_e	Shannon	Simpson	覆盖度/% Coverage
5	3 333.88	3 006.9	0.902 829	10.431 30	0.998 377	97.1
10	1 616.29	1 572.0	0.874 287	9.283 51	0.995 532	99.4
CK1	2 028.14	2 022.8	0.920 056	10.104 20	0.998 390	99.7
CK2	1 638.08	1 579.8	0.877 246	9.321 19	0.995 964	99.3

表7 各主成分得分  
Table 7 Score of each principal component

组别 Group	PC1		PC2		PC3		PC4		PC5		PC6		综合得分 Comprehensive score	
	得分 Score	排名 Rank	得分 Score	排名 Rank	得分 Score	排名 Rank	得分 Score	排名 Rank	得分 Score	排名 Rank	得分 Score	排名 Rank	得分 Score	排名 Rank
1	-2.24	9	0.964	1	0.056	3	-0.272	8	0.017	3	0.291	1	-0.430	9
2	-1.998	10	0.696	2	0.0721	2	-0.331	9	0.021	2	0.126	4	-0.474	10
3	0.253	5	-0.871	10	0.0978	1	-0.383	10	0.025	1	-0.653	10	-0.193	7
4	0.216	6	-0.401	9	0.037	5	-0.141	6	0.009	5	-0.278	9	-0.054	6
5	0.659	4	-0.073	6	-0.045	7	0.194	4	-0.013	8	0.086	5	0.207	4
6	0.189	7	-0.054	5	-0.008	6	0.038	5	-0.002	6	-0.002	7	0.049	5
7	1.723	1	-0.236	7	-0.112	10	0.484	1	-0.031	7	0.187	3	0.527	1
8	1.044	3	0.0133	4	-0.089	9	0.378	2	-0.025	10	0.240	2	0.369	2
9	1.347	2	-0.381	8	-0.061	8	0.271	3	-0.017	9	-0.014	8	0.348	3
10	-1.194	8	0.343	3	0.053	4	-0.237	7	0.015	4	0.016	6	-0.307	8

将各项指标标准化后的数据带入函数表达式,可以得到各主成分得分(表7)。主成分综合得分由每个主成分得分与其对应贡献率乘积的总和,即

$$F_{\text{综合}}=0.311 2F_1+0.242F_2+0.130 2F_3+0.114 5F_4+0.072 5F_5+0.048F_6$$

全时期各组间在6个主成分上的综合得分排名为组7>组8>组9>组5>组6>组4>组3>组10>组1>组2。最优配比即渣土:营养土为5:5,颗粒级配为10 mm,菌剂浓度为0.6,菌剂用量为100 mg·kg<sup>-1</sup>。但综合得分前3的组7、组8和组9这3个处理的渣土配比均为5:5,因此考虑到土壤资源的稀缺性和土壤资源的再利用价值,可优先考虑5的配比处理,以实现资源合理化配置。

### 3 讨论与结论

本研究筛选出的3株供试产EPS菌剂为耐寒短杆菌(*Peribacillus frigoritolerans*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。研究发现,菌剂用量和浓度显著影响渣土生物结皮的厚度、硬度及渗水性,培养两个月后结皮厚度和硬度较空白对照分别提升70%~123%和80%~110%。混渣中结皮渗水性显著提升,而纯渣土显著下降。生物结皮对土壤入渗的影响与土壤质地、细菌及EPS特性相关,EPS既能提高土壤孔隙度增加入渗,也可能形成不透水层阻碍入渗<sup>[10-14]</sup>。干旱胁迫30 d后,菌剂浓度和用量对土壤有机质、全磷、铵态氮、速效磷及pH值产生显著影响,EPS通过调节土壤结构和酶活性(如 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、脲酶等)提升有机质和养分水平。研究表明,有机碳与生物结皮中全氮、全磷高度相关<sup>[15]</sup>,土壤酶(如磷酸酶和脲酶)活性提高促进C、N、P循环<sup>[16-17]</sup>,增加微生物数量及土壤肥力。EPS作为缓冲界面,为微生物提供碳和营养库<sup>[18]</sup>,微生物产生的EPS亦可能在土壤环境中起到碳储备的作用<sup>[19]</sup>,并通过螯合钙离子释放速效磷,提高养分供应,调节土壤pH值。

EPS菌剂在弃渣土改良方面具有良好的应用潜力,但对混渣和纯渣的作用不同,混渣主要表现为养分调节、酶活性和微生物丰富度提升,纯渣则表现为土壤结构改善和生物结皮性能提升。混渣基质因更高的沙质稳定性和养分含量,具有更快的结皮恢复速率。土壤性质是生物结皮定植的关键因素<sup>[20-22]</sup>,黏性土壤结皮覆盖率高于砂质壤土<sup>[23]</sup>,表明在评估结皮恢复时需考虑土壤特性,人工改善土壤表面稳定性有助于增强EPS菌剂的应用效率<sup>[23]</sup>。土壤基质中土壤条件(如物理化学性质)的不同,会导致生物结皮种植过程中效果的显著差异<sup>[20-21]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] BUNDELEVA I A, MÉNEZ B, AUGÉ T, et al. Effect of cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7942 on carbonation kinetics of olivine at 20 °C[J]. Minerals Engineering, 2014, 59:2-11.
- [2] ZHAO W Q, WALKER S L, HUANG Q Y, et al. Adhesion of bacterial pathogens to soil colloidal particles: Influences of cell type, natural organic matter, and solution chemistry[J]. Water Research, 2014, 53:35-46.
- [3] LIN D, MA W T, JIN Z X, et al. Interactions of EPS with soil minerals: A combination study by ITC and CLSM[J]. Colloids

- and Surfaces B, *Biointerfaces*, 2016, 138:10–16.
- [4] MA W T, PENG D H, WALKER S L, et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides[J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2017, 3:4.
- [5] COSTA O Y A, RAAIJMAKERS J M, KURAMAE E E. Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:1636.
- [6] TENG Z D, SHAO W, ZHANG K Y, et al. Pb biosorption by *Leclercia adecarboxylata*: Protective and immobilized mechanisms of extracellular polymeric substances[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 375:122113.
- [7] SANDHYA V, ALI S Z. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation[J]. *Microbiology*, 2015, 84(4):512–519.
- [8] WANG X Q, SHARP C E, JONES G M, et al. Stable-isotope probing identifies uncultured planctomycetes as primary degraders of a complex heteropolysaccharide in soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14):4607–4615.
- [9] QIU L L, WU J J, DU W C, et al. Response of soil bacterial communities to sulfadiazine present in manure: Protection and adaptation mechanisms of extracellular polymeric substances[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 408:124887.
- [10] CANTÓN Y, CHAMIZO S, RODRIGUEZ-CABALLERO E, et al. Water regulation in cyanobacterial biocrusts from drylands: Negative impacts of anthropogenic disturbance[J]. *Water*, 2020, 12(3):720.
- [11] CHAMIZO S, CANTÓN Y, LÁZARO R, et al. Crust composition and disturbance drive infiltration through biological soil crusts in semiarid ecosystems[J]. *Ecosystems*, 2012, 15(1):148–161.
- [12] ELDRIDGE D J, REED S, TRAVERS S K, et al. The pervasive and multifaceted influence of biocrusts on water in the world's drylands[J]. *Global Change Biology*, 2020, 26(10):6003–6014.
- [13] KIDRON G J, LICHNER L, FISCHER T, et al. Mechanisms for biocrust-modulated runoff generation: A review[J]. *Earth-Science Reviews*, 2022, 231:104100.
- [14] RODRÍGUEZ-CABALLERO E, CANTÓN Y, CHAMIZO S, et al. Soil loss and runoff in semiarid ecosystems: A complex interaction between biological soil crusts, micro-topography, and hydrological drivers[J]. *Ecosystems*, 2013, 16(4):529–546.
- [15] ZHANG B C, ZHANG Y Q, LI X Z, et al. Successional changes of fungal communities along the biocrust development stages[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2018, 54(2):285–294.
- [16] MIRALLES I, DOMINGO F, CANTÓN Y, et al. Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 53:124–132.
- [17] ZHAO Y M, ZHU Q K, LI P, et al. Effects of artificially cultivated biological soil crusts on soil nutrients and biological activities in the Loess Plateau[J]. *Journal of Arid Land*, 2014, 6(6):742–752.
- [18] URREA J L, COLLADO S, OULEGO P, et al. Formation and degradation of soluble biopolymers during wet oxidation of sludge[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(4):3011–3018.
- [19] CROUZET O, CONSENTINO L, PÉTRAUD J P, et al. Soil photosynthetic microbial communities mediate aggregate stability: Influence of cropping systems and herbicide use in an agricultural soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10:1319.
- [20] ANTONINKA A, BOWKER M A, BARGER N N, et al. Addressing barriers to improve biocrust colonization and establishment in dryland restoration[J]. *Restoration Ecology*, 2020, 28(S2):S150–S59.
- [21] RAUL ROMAN J, RONCERO-RAMOS B, CHAMIZO S, et al. Restoring soil functions by means of cyanobacteria inoculation: Importance of soil conditions and species selection [J]. *Land Degradation & Development*, 2018, 29(9):3184–93.
- [22] LI X R, SONG G, HUI R, et al. Precipitation and topsoil attributes determine the species diversity and distribution patterns of crustal communities in desert ecosystems[J]. *Plant and Soil*, 2017, 420(1):163–175.
- [23] CHOCK T, ANTONINKA A J, FAIST A M, et al. Responses of biological soil crusts to rehabilitation strategies[J]. *Journal of Arid Environments*, 2019, 163:77–85.

[责任编辑 李 薇]