

改良剂对土壤铜镉有效性和微生物群落结构的影响

崔红标^{1,2}, 范玉超¹, 周静^{2*}, 时玉², 徐磊², 郭学涛¹, 胡友彪¹, 高良敏¹ (1.安徽理工大学地球与环境学院,安徽淮南 232001; 2.中国科学院南京土壤研究所,江苏南京 210008)

摘要:以一次性添加木炭、石灰和磷灰石稳定化修复 4 年后的土壤为研究对象,探讨了土壤中铜镉有效性和土壤微生物群落结构的变化。结果表明,3 种改良剂的添加提高了土壤 pH 值,降低了土壤交换性酸和交换性铝的含量,使铜镉由活性态向非活性态和潜在活性态转化,其中磷灰石和石灰的处理效果优于木炭处理; Biolog 测试发现,培养 192h,木炭、石灰和磷灰石处理土壤 AWCD 值(0.61、0.76 和 0.70)分别是对照的 1.33、1.65 和 1.52 倍;且 Shannon 和 McIntosh 指数均较对照有所提高,表现为:石灰>磷灰石>木炭,表明改良剂处理后增加了土壤微生物对碳源的利用能力,提高了其功能多样性。PCR-DGGE 分析结果显示,改良剂处理后土壤细菌优势群的数量显著增加,木炭、石灰和磷灰石处理 Shannon 指数分别比对照提高了 0.22、0.39 和 0.24。相关性分析表明,土壤酸度和重金属有效性是影响稳定化修复重金属污染土壤细菌结构多样性差异的主要因素。

关键词: 重金属; 有效性; Biolog; PCR-DGGE; 微生物群落结构

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2016)01-0197-09

Availability of soil Cu and Cd and microbial community structure as affected by applications of amendments. CUI Hong-biao^{1,2}, FAN Yu-chao¹, ZHOU Jing^{2*}, SHI Yu², XU Lei², GUO Xue-tao¹, HU You-biao¹, GAO Liang-min¹ (1.School of Earth and Environment, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; 2.Institute of Soil Science, Chinese Academy Sciences, Nanjing 210008, China). *China Environment Science*, 2016,36(1): 197~205

Abstract: Concentrations of available Cu and Cd, soil microbial community structure were investigated with one-time application of charcoal, lime, and apatite after four years in a heavy metal contaminated soil. Results showed that incorporation of amendments significantly increased soil pH, and decreased the concentrations of exchangeable acidity and aluminum. Lime and apatite were more effective than charcoal on transforming Cu and Cd from active to inactive fractions. The Biolog analysis showed that AWCD (average well color development) of charcoal (0.61), lime (0.76), and apatite (0.70) were 1.33, 1.65 and 1.52 times higher than that in the untreated soil at 192h. Moreover, the Shannon index, McIntosh index of soil microbes were higher in the amended soils compared with the control, and followed the order of lime > apatite > charcoal. The results indicated amendments treated soils all increased the abilities of the microbes to use carbon sources. Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) analysis showed that the amounts of dominant bacterial were significantly increased with the application of amendments. The Shannon index of soil microbes were increased 0.22, 0.39 and 0.24 in charcoal, lime and apatite compared with the control, respectively. Correlation analysis indicated that soil acidity and availability of Cu and Cd may be the main factors affecting the community structure of soil microbes in the soils.

Key words: heavy metal; availability; biolig; PCR-DGGE; microbial community structure

随着我国现代工农业的迅猛发展,有毒化学污染物尤其是重金属通过多种途径进入到农业生态环境中,造成土壤重金属污染,并对人体健康构成严重威胁。因此,对重金属污染土壤进行修复已成为当前国内外研究的热点。稳定化是指通过向土壤中添加改良材料使重金属向低溶解、被固定、低毒形态转化,达到降低污染土壤重金属有

效性和环境风险的方法^[1]。因为具有操作简便、低成本优势,稳定化方法已成为当前治理重金属污

收稿日期: 2015-05-25

基金项目: 国家“973”项目(2013CB934302);安徽理工大学博士、硕士基金(11276);中国科学院“STS”项目(KFJ-EW-STS-016);国家科技支撑计划课题(2015BAD05B01)

* 责任作者, 研究员, zhoujing@issas.ac.cn

染土壤最有效的途径之一.研究表明,磷酸盐、石灰性物质和有机物等在降低土壤重金属活性,减少污染物向其他介质迁移风险方面具有较好的效果^[2-4].近年来,我国的科研工作者在广西环江、江西省贵溪市冶炼厂周边区域、湖南湘江流域等^[5-8]开展了不同规模的重金属污染农田修复,取得了较好的稳定化效果.但这些工作主要关注土壤重金属活性的变化及其在食物链的迁移,极少有对长期原位稳定化修复多年后土壤微生物的响应进行研究.

重金属污染土壤的修复不仅仅在于土壤重金属总量及有效性的降低,土壤生物多样性的恢复也是一个重要的方面^[9-10].微生物是土壤最活跃的组成,大量研究表明,土壤微生物对重金属污染物的响应十分敏感^[11-13].因为重金属在土壤微生物的生命过程中扮演重要的角色,如 Co、Cu、Mn、Zn 和 Ni 等是微生物生长的必需元素,它们在微生物生化反应中起到催化作用,对蛋白质结构和细胞壁具有保护功能,并参与一些氧化还原过程^[14].另外,当土壤中存在较高浓度的重金属时,对土壤微生物会产生显著的效应:一是不适应新环境的微生物数量的减少或绝灭;二是适应新环境的微生物数量的增加和积累^[15].因此,土壤长期遭受重金属污染后,土壤微生物的群落结构、微生物数量、土壤酶活性可能发生显著的变化.如李小林等^[16]研究表明四川省汉源县福泉乡万顺铅锌矿区尾矿区(DTPA 提取态 Zn、Pb 和 Cd 含量分别为 790、883 和 8mg/kg)比对照(DTPA 提取态 Zn、Pb 和 Cd 含量分别为 16、8 和 1mg/kg)中细菌、真菌和放线菌数量分别降低了 98.6%、92.2%和 99.0%.

基于此,本文对江西省贵溪冶炼厂周边重金属污染土壤,采用一次性添加木炭、石灰和磷灰石联合植物提取的修复方法,对修复 4 年后土壤铜镉有效性和微生物群落多样性进行分析,研究结果可为重金属污染土壤长期稳定化修复微生物多样性的变化提供基础资料.

1 材料与方法

1.1 区域概况

研究区域位于江西省贵溪市,属于亚热带季风型气候,温暖湿润,年平均降水量为 1808mm.由于农民使用企业排放含有重金属的污水进行灌溉,导致周边 130 多 hm^2 农田遭受重金属污染(主要污染物是 Cu 和 Cd)并导致水稻减产及稻米 Cd 含量超标^[17-18].目前,大部分区域处于抛荒状态,且在周边严重污染区域,寸草不生,并出现沙化现象^[18].

1.2 实验设计

根据梁家妮^[19]的研究结果,选择木炭、石灰和磷灰石 3 种材料为改良剂.其中木炭(粒径 0.80mm,比表面积 $1155\text{m}^2/\text{g}$,购自上海海诺炭业有限公司)、石灰(粒径 0.16mm,购自江西鹰潭建材大市场)和磷灰石(粒径 0.25mm,购自湖北南漳县鑫泰磷化工厂的 pH 值分别为 9.96、12.2 和 8.40,石灰和磷灰石的 Cu 含量分别为:1.36、9.54mg/kg;Cd 含量分别为:0.87、1.18mg/kg).

2009 年 11 月,采用随机区组设计,每个处理重复 3 次,4 个处理分别为:(1)对照(不加任何改良剂);(2)1%(w/w,土壤 0~17cm 表层质量百分比)磷灰石处理 ($22.3\text{t}/\text{hm}^2$);(3)0.2%(W/W)石灰处理 ($4.45\text{t}/\text{hm}^2$);(4)3%(W/W)木炭处理 ($66.9\text{t}/\text{hm}^2$).采用人工翻耕、耙匀,反复 2 次,使改良剂与 0~17cm 表层土壤充分混匀.每个小区长 3m,宽 2m.各小区间田埂采用防渗聚乙烯塑料薄膜(30cm 高)包裹,防止因雨水径流影响实验结果.

1.3 样品采集

在 2013 年 6 月收获小区中生长的土著植物金黄狗尾草(木炭、石灰和磷灰石处理每小区植物干生物量均值分别为 538、1210 和 2759g)后使用铁铲在每个小区采集表层 0~17cm 土壤(剥离靠近铁铲内壁的土壤),并将部分样品装于无菌自封袋中,分两部分用冰块冷却保存,其中一份带回实验室后置于 -40 冰箱,用于提取土壤 DNA 分析;另一份保存在 0~4 冰箱,用于土壤微生物群落功能多样性和理化性质的测定.

1.4 测定方法

1.4.1 土壤重金属化学形态分析 土壤重金属化学形态分级程序建立在 Tessier 方法^[20]的基础

之上,具体实验操作参照 Cui 等^[18]的方法。

1.4.2 土壤微生物群落功能多样性测定 土壤微生物量碳氮含量采用氯仿熏蒸-浸提方法测定^[21]。称取过 10 目筛的新鲜土壤 15g 于玻璃培养皿中,将培养皿置于装有 50mL 无乙醇氯仿的小烧杯及一个装有蒸馏水的小烧杯的干燥器内。然后,用真空泵抽至氯仿沸腾并保持 2min,将干燥器放入 25 的恒温室或恒温箱中熏蒸 24h。待氯仿去除干净后,称取 10g 熏蒸后土壤于 80mL 带内盖的塑料瓶中,加 25mL 0.5mol/L 的 K_2SO_4 溶液,在往复式震荡机上振荡提取 30min,过滤。滤液保存在 4 冰箱中备用。同时做不熏蒸样品的提取。所得滤液用 TOC 仪测定微生物生物量碳、氮:

$$\text{微生物碳}=(\text{熏蒸碳}-\text{未熏蒸碳})\times 2.64$$

$$\text{微生物氮}=(\text{熏蒸氮}-\text{未熏蒸氮})\times 1.85$$

土壤微生物群落功能多样性的测定采用 Biolog 平板分析法^[22]。称取 10g 过 2mm 筛的新鲜土壤置于装有 100mL 0.5mol/L 磷酸缓冲液灭菌的 250mL 三角瓶中,振荡 20min;静置 25min 后,在超净台上用灭菌的 0.5mol/L 磷酸缓冲液将上述溶液稀释到 10^{-3} 倍,然后用 8 通道的加样器向 Biolog GN 96 孔板中分别添加 150 μ L 稀释后的悬液。28 培养 9d,每隔 24h 用 Biolog 自动读数装置在 590nm 下测定其吸光值。

1.4.3 土壤 DNA 提取和 PCR-DGGE 测定 土壤总 DNA 用 FastDNAR SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA)试剂盒提取。每个土壤样品准确称取 0.5g 土壤,按照试剂盒提取步骤提取土壤总 DNA。提取后的土壤总 DNA 溶解在 70 μ L TE 缓冲液中,用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. USA)分光光度计测定总 DNA 的浓度。由于土壤有机质含量较高,提取的总 DNA 颜色较深,会影响 PCR 扩增,因此采用 Mobio DNA 纯化试剂盒对提取的总 DNA 进行纯化,接着用 50 μ L TE 缓冲液溶解纯化后总 DNA;最后使用分光光度计测定纯化后总 DNA 的浓度,并于 -20 保存。

PCR 扩增:以纯化后的土壤 DNA 作为聚合酶链反应(PCR)的模板,在 Hybaid Omni Gene

Temperature Cycler 热循环仪(Hybaid, Teddington, United Kingdom)上 PCR 扩增。扩增引物为(细菌通用引物):GC-341F/9 07R,片段长度大约 560bp,分别为 :341F(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), GC-clamp(341F)(5'-CCCCGCCGCGCGCGGC-GGGCGGGGCGGGGGCACGGGCCG-3'),907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')。

扩增反应体系(25 μ L):11.5 μ L ddH₂O, 12.5 μ L Premix Tap DNA 聚合酶,0.5 μ L DNA 模板,0.25 μ L 正向引物(20ng/ μ L),0.25 μ L 反向引物(20ng/ μ L)。

扩增反应条件:94 预变性 5min,(94 /35s, 56 /30s,72 /45s) \times 30 个循环,72 延伸 10min,PCR 反应的产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

DGGE 分析:采用 Bio-Rad 公司 Dcode TM 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分析。主要参数为:变性剂浓度梯度为 45%~70%(变性剂为尿素和去离子甲酰胺),6%的聚丙烯酰胺凝胶,点样量为 10 μ L PCR 产物,温度为 60 ,电压 75V,电泳时间为 15h。电泳完毕后,在 SYBR Green 中染色 30min,然后用 Bio-Rad 凝胶成像系统的 Quantity One 4.4.0 软件分析染色后的凝胶,观察样品的电泳条带数量并拍照。

1.5 数据处理

相关分析(Pearson 相关)、T-检验、主成分分析等都在 SPSS 19 上实现。使用 Quantity One 软件对 DGGE 图谱进行解析,并进行聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 土壤性质与重金属形态的变化

如表 1 所示,木炭、石灰和磷灰石处理 4 年后土壤 pH 值比对照提高 0.37、0.70 和 1.04 个单位。对于交换性酸来说,木炭、石灰和磷灰石处理比对照显著降低了 1.26、1.90 和 2.78cmol/kg。与交换性酸相似,木炭、石灰和磷灰石处理交换性铝分别比对照降低了 1.17、1.84 和 2.50cmol/kg。另外,木炭、石灰和磷灰石处理 4 年后土壤交换性钙含量分别较对照显著提高了 1.54、1.98 和 2.44cmol/kg。修复 4 年后,改良剂的修复对土壤微生物量碳影响显著大于土壤微生物量氮,其中木炭、石灰和磷灰石处理中微生物量碳的含量分别

比对照提高了 6.0、35.9 和 20.6mg/kg,增幅分别为 10.8%、64.3%和 36.9%;微生物量氮的含量分别比对照提高了 0.06、1.37 和 0.96mg/kg,增幅分别为 1.08%、24.7%和 17.3%。

表 1 修复 4 年后土壤主要化学性质变化

Table 1 Changes of soil chemical characteristics after four-year immobilization

处理	pH 值	有机碳 (g/kg)	阳离子交换量 (cmol/kg)	交换性酸 (cmol/kg)	交换性铝 (cmol/kg)	交换性钙 (cmol/kg)	微生物量碳 (mg/kg)	微生物量氮 (mg/kg)
对照	3.96±0.06d	14.5±2.53b	7.30±0.12a	3.63±0.18a	3.02±0.27a	1.18±0.04b	55.8±11.4b	5.54±1.31a
木炭	4.33±0.12c	19.7±1.86a	7.61±0.32a	2.37±0.20b	1.85±0.20b	2.72±0.46ab	61.8±13.3b	5.6±1.01a
石灰	4.66±0.04b	15.1±1.22b	7.30±0.06a	1.73±0.81bc	1.18±0.30bc	3.16±1.27a	91.7±10.5a	6.91±0.63a
磷灰石	5.00±0.06a	16.8±0.72ab	7.47±0.51a	0.85±0.19c	0.52±0.14c	3.62±0.39a	76.4±13ab	6.5±0.54a

注:字母不同表示处理在 $P<0.05$ 水平上差异性显著。

如表 2 所示,对照处理 Cu 主要聚集于残渣态(227mg/kg),且 5 种形态 Cu 的分布规律为:RES(残渣态)> EXC(离子交换态)> Fe-Mn(铁锰氧化物结合态)> OM(有机结合态)> CA(碳酸盐结合态)。改良剂修复四年后,最显著的变化是木炭、石灰和磷灰石处理离子交换态 Cu 含量较对照分别降低了 25、39 和 86mg/kg,铁锰氧化物结合态 Cu 含量分别增加了 60、64 和 103mg/kg。对于有机结合态和残渣态,各处理间未有显著性差异。与 Cu 相似,改良剂的应用均降低了离子交换态 Cd 的含量,增加了铁锰氧化物结合态 Cd 的含量。另外,改良剂的应用不同程度地提高了残渣态 Cd 的含量。

总体上,木炭、石灰和磷灰石添加后,显著提高了土壤 pH 值,土壤 Cu 和 Cd 由活性态逐渐转变为非活性态,降低了土壤中 Cu 和 Cd 的有效活性,且磷灰石和石灰的稳定化效果好于木炭处理。土壤重金属活性的降低可能是由于改良剂显著提高了土壤 pH 值,这有助于提高粘土矿物、有机质和铁锰氧化物等变价胶体的负电荷,增加土壤对重金属的吸附能力^[23]。另外,Bolan 等^[24]也发现石灰的添加促进了活性 Cu 向非活性和潜在活性形态转变。石灰对 Cu 和 Cd 的固定主要涉及形成碳酸盐或氢氧化物沉淀^[25]以及离子交换等^[24]。对于磷灰石来说,其对 Cu 和 Cd 的固定主要通过表面络合、共沉淀、离子交换和固体的溶解作用等^[26-28]。如 Shahid 等^[29]研究表明溶解性磷和固体的磷材料均能有效降低土壤中 Pb 和 Cd 的生物

有效性。木炭对 Cu 和 Cd 的固定主要通过吸附、络合和离子交换等方式^[30]。同样,Uchimiya 等^[31]用肉鸡粪便制作的生物炭能有效降低水溶液中 Cd、Pb 和 Ni 的含量,并显著降低模拟酸雨下土壤中 Pb 的淋出。

表 2 改良剂对土壤 Cu 和 Cd 化学形态的影响

Table 2 Effects of amendments on fractions of soil Cu and Cd

重金属	处理	EXC	CA	Fe-Mn	OM	RES
Cu	对照	161±31a	79±20b	125±25b	122±26a	227±20a
	木炭	136±18b	116±17ab	185±29ab	120±38a	188±94a
	石灰	122±12b	116±23ab	189±25ab	116±33a	226±48a
	磷灰石	75±13c	154±15a	222±38a	127±30a	178±22a
Cd	对照	372±42a	135±31a	124±34b	31.6±7.3a	502±23b
	木炭	350±48ab	136±39a	154±42a	41.6±10a	574±37ab
	石灰	288±32b	169±22a	233±23a	46.8±8a	622±47a
	磷灰石	310±30ab	162±41a	238±49a	41.7±8.8a	646±84a

注:Cu为mg/kg; Cd为 $\mu\text{g}/\text{kg}$;字母不同表示处理在 $P<0.05$ 水平上差异性显著。

2.2 改良剂对土壤微生物群落功能多样性的影响
利用 Biolog 测试系统研究重金属胁迫环境下,土壤微生物群落功能多样性已广泛应用^[32-33]。Biolog 盘中每孔的平均吸光值(AWCD) 对土壤环境胁迫的反应比较敏感,可作为微生物整体有效性的有效指标,反映微生物群落对碳源利用总的的能力^[34]。Biolog 生态测试板动态测定结果(图 1)表明,在 24h 之前,各处理土壤微生物群落的 AWCD 值未表现出明显的变化;当培养到 48h 时

开始出现变化,并在 192h 时发生明显变化,且各处理 AWCD 值大小表现为:石灰>磷灰石>木炭>对照.

根据图 1 各处理 AWCD 变化特点,选择培养 192h 时的 AWCD 值计算微生物群落功能多样性指数(表 3).结果表明,与对照相比,木炭、石灰和磷灰石处理土壤 AWCD 值(0.61、0.76 和 0.70)分别是对照的 1.33、1.65 和 1.52 倍.这表明改良剂处理后增加了土壤中能利用有关单一碳源底物的微生物数量.作为当前研究土壤微生物群落多样性应用最为广泛的指数之一,Shannon 指数是研究群落物种数及其个体数和分布均匀程度的综合指标,能用来表征群落物种丰富度^[35]. Simpson 指数常用来反映群落中最常见物种的优势度,而 McIntosh 指数是群落内物种均一性的度量^[36].

指数影响较小,这表明磷灰石和石灰处理土壤增加了土壤微生物群落的丰富度和均匀度,但是对常见微生物群落优势度影响较小.同样, Fernández 等^[37]发现,改良剂的添加,增加了土壤微生物量和微生物群落结构多样性.这可能是由于改良剂的添加,不同程度地降低了土壤重金属的有效性,减少了对微生物的毒性;提高了土壤 pH 值和有机碳的含量,降低了土壤交换性酸、交换性铝,有利于微生物群落结构多样性的恢复^[32].此外,3 种材料的应用均能够有效降低土壤重金属活性,使得植物(金黄狗尾草)能够生长,而对照处理无任何植物生长.植被的建立(凋落物、根系分泌物等)有助于土壤微生物数量和功能多样性的恢复^[38-39],这可能是导致改良剂处理后的土壤提高了微生物对碳源的利用能力主要原因.另外,木炭是一种有机改良剂,前人的研究表明其不仅能较好的吸附固定重金属,还可以作为微生物生长的良好载体^[40].

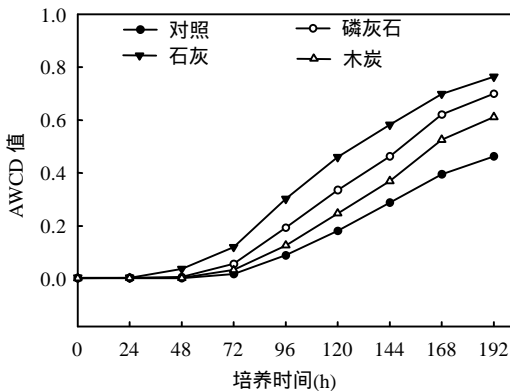


图 1 土壤微生物在培养过程中平均吸光值(AWCD)变化
Fig.1 Changes in average well color development (AWCD) of microbial during incubation

本研究中,改良剂处理均提高了 Shannon 和 Simpson 指数,但是均未与对照处理达到显著性差异,其中木炭、石灰和磷灰石处理 Shannon 指数分别比对照提高了 0.08、0.23 和 0.14.与此相同,Humid 等^[32]研究表明,橄榄废物制作的生物碳添加到土壤中,能够提高重金属污染土壤微生物的 Shannon 指数.对于 McIntosh 指数,磷灰石和石灰处理与对照相比达到显著性差异,分别比对照提高了 1.29 和 1.67.总体来看,改良剂的添加对 Shannon 和 McIntosh 指数影响较大,对 Simpson

表 3 土壤 AWCD 值和微生物群落功能多样性指数
Table 3 Soil microbial AWCD and microbial community diversity indeices

处理	AWCD 值	Shannon 指数	Simpson 指数	McIntosh 指数
对照	0.46±0.10b	2.82±0.11a	0.93±0.01a	3.78±0.64b
木炭	0.61±0.07ab	2.90±0.02a	0.94±0a	4.77±0.51ab
石灰	0.76±0.05a	3.05±0.03a	0.95±0a	5.45±0.25a
磷灰石	0.70±0.24ab	2.96±0.24a	0.94±0.02a	5.07±1.15a

注:字母不同表示处理间在 P < 0.05 水平上显著性差异.

根据张燕燕等^[41]研究,AWCD 值和微生物群落功能多样性仅是从“量”的角度对碳源利用模式进行分析,未能从“质”的角度对微生物碳源利用模式进行解读.为进一步分析不同改良剂处理重金属污染土壤微生物群落对碳源的利用情况,实验选取 192h 的 Biolog 测定结果,并对数据进行标准化变换;然后实施典型变量分析,并提取 2 个主成分因子作载荷图.由图 2 可知,第 1 主成分(PC1)可以解释所有变量方差的 28.1%,第 2 主成分(PC2)可以解释所有变量方差的 20.9%;而且不同处理土壤微生物群落在主成分 1 和主成分 2

的得分系数均差异显著,表明不同改良剂处理土壤微生物群落在碳源代谢上存在明显的差异.另外,从主成分分析的相关矩阵结果可知,与主成分1正相关程度较高(>0.60)的碳源有 β -甲基D-葡萄糖苷、吐温40、吐温80、 α -环式糊精和D-纤维二糖,这表明不同改良剂处理土壤微生物群落在上述碳源的利用能力上存在一定的差异.

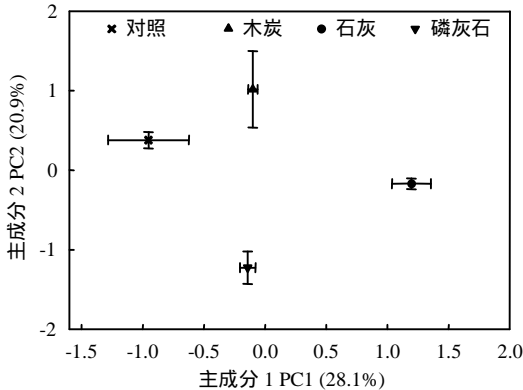


图2 不同改良剂处理土壤培养192h的主成分分析因子载荷

Fig.2 Loadings of principal component analysis after 192h culturing of soils treated by different amendments

2.3 改良剂对土壤细菌结构多样性的影响

Biolog 技术只能表征土壤中快速生长或富营养的微生物活性,但是可培养的微生物种类仅占土壤微生物种类总数的0.1%~1%^[42],无法反映土壤中缓慢生长以及不可培养的微生物活性^[43].PCR-DGGE技术是基于核酸序列的不同,将片段大小相同的DNA序列分开的一种技术方法^[44].该技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优势,且已经在环境微生物研究中得到较多的应用^[45-46].本研究提取了土壤DNA,并进行了纯化,然后16SrDNA基因V3区PCR扩增,最后进行DGGE变性梯度凝胶电泳)分析.

不同改良剂处理后土壤细菌DGGE分析结果如图3所示.从电泳条带数目来看,与对照相比,改良剂处理后的土壤显著增加了电泳条带数,如图中标示的条带2、5和6.另外,在对照处理中出现的较高亮度的条带1均未在改良后的土壤中

出现.由于条带的数目反映了细菌优势群的数量^[47],因此,本研究中改良剂处理后的土壤总体上增加了土壤中细菌优势群的数量,表明为了适应新的土壤环境的变化(重金属活性及土壤性质等),细菌群落也随之发生变化^[48].另外,从条带的亮度来看,在磷灰石、石灰和木炭处理中条带3的亮度明显低于在对照中的亮度,而条带4的亮度均高于对照处理.本研究发现所有处理中出现了一些共有的条带,这表明供试土壤中可能存在一些共有的细菌优势群;而且这些共有条带的强度也不相同,如在磷灰石和石灰处理中,条带7和条带8的亮度明显强于对照处理,这表明磷灰石和石灰处理土壤增加了该细菌优势群的数量.与此类似,Kan等^[49]发现磷灰石和甲壳素改良重金属污染土壤与对照相比,更有利于土壤细菌优势群和群落多样性的增加.

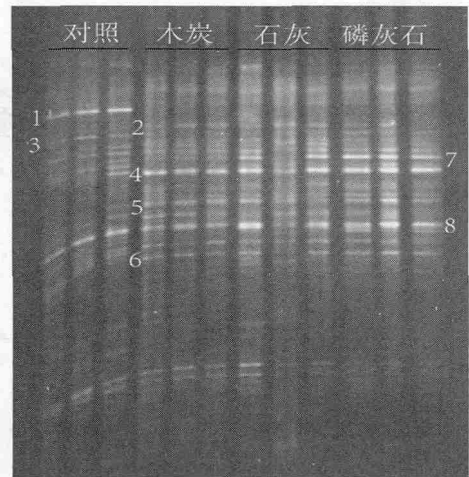


图3 不同处理土壤微生物16S rDNA片段的DGGE图谱
Fig.3 DGGE patterns of 16S rDNA fragments in soils treated by different amendments

同时,根据Quantity One得到通过DGGE的条带配对图,在条带出现的地方定义1,未出现的地方记为0,得到DGGE条带配对的二次矩阵,利用PAST计算各处理的Shannon(H)指数来分析各处理土壤细菌结构多样性(未列出).结果表明,木炭、石灰和磷灰石处理分别使Shannon(H)指数从对照的2.27提高到2.49、2.66和2.51,分别比对照提高了0.22、0.39和0.24,表明改良剂处

理后提高了土壤细菌结构多样性,且石灰处理的土壤细菌结构多样性最高.为了进一步揭示供试土壤中细菌群落的同源性,采用非加权成对算术平均法(UPGMA)对土样 DGGE 指纹图谱作相似性聚类分析.由图 4 可知,所有供试土壤的遗传相似性为 45%,在 84%的相似性水平上可以将 4 个处理土壤区分开来.可见,不同改良剂处理土壤细菌群落结构存在一定差异.通过将土壤微生物群落结构多样性 Shannon(H)指数与土壤化学性质进行相关分析发现(数据未列出),Shannon(H)指数与土壤 pH 值呈极显著正相关关系,相关系数为 0.72($P < 0.01$),与土壤交换性酸、交换性铝呈显著的负相关关系.因为土壤 pH 值可用来表示土壤活性酸度,是土壤溶液中 H^+ 浓度的直接反映;交换性酸、交换性铝可用来表达土壤潜性酸度,是土壤胶体吸附的可代换性 H^+ 和 Al^{3+} .可见,土壤酸度是影响土壤细菌结构多样性的主要因素.另外,Shannon(H)指数与离子交换态 Cu 和 Cd 呈负相关关系,说明重金属有效性的降低,有利于土壤细菌结构多样性的增加.

和 Cd 由活性态向潜在活性态和非活性态转化,降低了土壤重金属的有效性.

3.2 改良剂处理后的土壤微生物群落平均吸光值(AWCD)以及 Shannon 和 McIntosh 指数均较对照有所提高,表现为:石灰>磷灰石>木炭>对照,表明改良剂处理后提高了土壤微生物利用碳源的能力,增加了土壤中能利用有关单一碳源底物的微生物数量.

3.3 改良剂处理后的土壤总体上增加了土壤细菌优势群的数量,并增加了土壤细菌结构多样性,相关性分析表明,土壤酸度和重金属有效性是影响稳定化修复重金属污染土壤细菌结构多样性差异的主要因素.

参考文献：

[1] Khan F I, Husain T, Hejazi R. An overview and analysis of site remediation technologies [J]. Journal of Environmental Management, 2004,71(2):95-122.

[2] Karami N, Clemente R, Moreno-Jimenez E, et al. Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011,191(1-3):41-48.

[3] Madej N P, Perez-de-mora A, Burgos P, et al. Do amended, polluted soils require re-treatment for sustainable risk reduction? — Evidence from field experiments [J]. Geoderma, 2010,159(1): 174-181.

[4] 周航,周歆,曾敏,等.2 种组配改良剂对稻田土壤重金属有效性的效果 [J]. 中国环境科学, 2014,34(2):437-444.

[5] 黄益宗,郝晓伟,雷鸣,等.重金属污染土壤修复技术及其修复实践 [J]. 农业环境科学学报, 2013,32(3):409-417.

[6] 曾希柏,徐建明,黄巧云,等.中国农田重金属问题的若干思考 [J]. 土壤学报, 2013,50(1):186-194.

[7] 宓彦彦,谭长银,黄道友,等.湘江流域矿区 Cd 污染土壤的修复及其综合利用 [J]. 湖南农业科学, 2011,(8):56-59.

[8] 周静,崔红标.规模化治理土壤重金属污染技术工程应用与展望--以江铜贵州周边区域九牛岗土壤修复示范工程为例 [J]. 中国科学院院刊, 2014,29(3):336-343.

[9] 时雷雷,傅声雷.土壤生物多样性研究:历史,现状与挑战 [J]. 科学通报, 2014,(6):493-509.

[10] Brim H, Heuer H, Krögerrecklenfort E, et al. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999,45(4):326-338.

[11] Brookes P. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals [J]. Biology and Fertility of Soils, 1995,19(4):269-279.

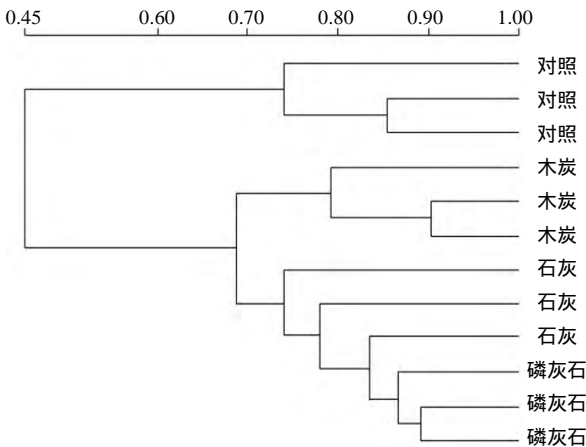


图 4 不同改良剂处理 DGGE 图谱聚类分析
Fig.4 Cluster analysis of DGGE profile for bacterial communities treated by different amendments

3 结论

3.1 木炭、石灰和磷灰石的添加,提高了土壤 pH 值,降低了土壤交换性酸及交换性铝含量,使 Cu

- [12] Perez-de-mora A, Burgos P, Madejon E, et al. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006,38(2):327-341.
- [13] Zhou D N, Zhang F P, Duan Z Y, et al. Effects of heavy metal pollution on microbial communities and activities of mining soils in Central Tibet, China [J]. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 2013,11(1):676-681.
- [14] Ji G, Silver S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995,14(2):61-75.
- [15] 滕应,黄昌勇.重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展 [J]. *土壤与环境*, 2002,11(1):85-89.
- [16] 李小林,颜森,张小平,等.铅锌矿区重金属污染对微生物数量及放线菌群落结构的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2011,30(3):468-475.
- [17] Li P, Wang X X, Zhang T L, et al. Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil [J]. *Journal of Environmental Sciences-China*, 2008,20(4):449-455.
- [18] Cui H B, Zhou J, Zhao Q G, et al. Fractions of Cu, Cd, and enzyme activities in a contaminated soil as affected by applications of micro-and nanohydroxyapatite [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2013,13(4):742-752.
- [19] 梁家妮.土壤重金属 Cu、Cd 和 F 复合污染评价及修复技术探讨 [D]. 合肥:安徽农业大学, 2009.
- [20] Tessier A, Campell P G, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals [J]. *Analytical Chemistry*, 1979,51(7):844-851.
- [21] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1987,19(6):703-707.
- [22] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991,57(8):2351-2359.
- [23] Gray C W, McLaren R G, Roberts A H C, et al. Sorption and desorption of cadmium from some New Zealand soils: effect of pH and contact time [J]. *Australian Journal of Soil Research*, 1998,36(2):199-216.
- [24] Bolan N S, Adriano D C, Mani P A, et al. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. II. Effect of lime addition [J]. *Plant and Soil*, 2003,251(2):187-198.
- [25] Gray C W, Dunham S J, Dennis P G, et al. Field evaluation of in situ remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud [J]. *Environmental Pollution*, 2006,142(3):530-539.
- [26] Chen X B, Wright J V, Conca J L, et al. Evaluation of heavy metal remediation using mineral apatite [J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1997,98(1/2):57-78.
- [27] Cao X D, Ma L Q, Rhue D R, et al. Mechanisms of lead, copper, and zinc retention by phosphate rock [J]. *Environmental Pollution*, 2004,131(3):435-444.
- [28] Xu Y P, Schwartz F W, Traina S J. Sorption of Zn^{2+} and Cd^{2+} on hydroxyapatite surfaces [J]. *Environmental Science & Technology*, 1994,28:1472-1480.
- [29] Shahid M, Xiong T, Masood N, et al. Influence of plant species and phosphorus amendments on metal speciation and bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food-chain contamination [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2014, 14(4):655-665.
- [30] Demirbas A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 157(2/3):220-229.
- [31] Uchimiya M, Lima I M, Klasson K T, et al. Immobilization of Heavy Metal Ions (Cu-II, Cd-II, Ni-II, and Pb-II) by Broiler Litter-Derived Biochars in Water and Soil [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010,58(9):5538-5544.
- [32] Hmid A, Chami Z A, Sillen W, et al. Olive mill waste biochar: a promising soil amendment for metal immobilization in contaminated soils [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2015,22(2):1444-1456.
- [33] Epelde L, Lanz N A, Blanco F, et al. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015,91(1):1-11.
- [34] Zabinski C A, Gannon J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities [J]. *Environmental Management*, 1997, 21(2):233-238.
- [35] Zhong W, Cai Z. Long-term effects of inorganic fertilizers on microbial biomass and community functional diversity in a paddy soil derived from quaternary red clay [J]. *Applied Soil Ecology*, 2007,36(2):84-91.
- [36] 胡君利,林先贵,尹睿,等.浙江慈溪不同利用年限水稻土主要微生物过程强度的比较 [J]. *环境科学学报*, 2008,28(1):174-179.
- [37] Fernández D A, Luque A R, Azcón R, et al. Effects of water stress, organic amendment and mycorrhizal inoculation on soil microbial community structure and activity during the establishment of two heavy metal-tolerant native plant species [J]. *Microbial Ecology*, 2012,63(4):794-803.
- [38] Wang Y P, Li Q B, Shi J Y, et al. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008,40(5):1167-1177.

- [39] Kowalchuk G A, Buma D S, de Boer W, et al. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002,81:509-520.
- [40] Kolb S E, Fermanich K J, Dornbush M E. Effect of charcoal quantity on microbial biomass and activity in temperate soils [J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2009,73(4):1173-1181.
- [41] 张燕燕,曲来叶,陈利顶.Biolog EcoPlate(TM)实验信息提取方法改进 [J]. *微生物学通报*, 2009,36(7):1083-1091.
- [42] 罗海峰,齐鸿雁,薛凯,等.PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用 [J]. *生态学报*, 2003,23(8):1570-1575.
- [43] Joynt J, Bischoff M, Turco R, et al. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons [J]. *Microbial Ecology*, 2006,51(2):209-219.
- [44] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3):695-700.
- [45] Khan S, Hesham A E L, Qiao M, et al. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010,17(2):288-296.
- [46] Ellis R J, Morgan P, Weightman A J, et al. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003,69(6):3223-3230.
- [47] 陈红歌,胡元森,贾新成,等.垃圾填埋场细菌种群空间分布及组成多样性研究 [J]. *环境科学学报*, 2005,25(6):809-815.
- [48] Bååth E. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review) [J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1989,47(3/4):335-379.
- [49] Kan J, Obratzsova A, Wang Y, et al. Apatite and chitin amendments promote microbial activity and augment metal removal in marine sediments [J]. *Open Journal of Metal*, 2013, 3(2):51-61.

作者简介：崔红标(1985-),男,安徽凤台人,讲师,博士,主要从事土壤重金属污染修复研究.发表论文 8 篇.

第五次全国荒漠化和沙化状况公报发布 荒漠化土地面积持续缩减

国家林业局 2015 年 12 月 29 日发布的第五次全国荒漠化和沙化状况公报显示,我国荒漠化与沙化土地第五次监测结果比第四次监测结果呈现出整体遏制、持续缩减、功能增强的良好态势.与此同时,我国沙尘天气显著减少,2009 年~2014 年 5 年间,平均每年出现沙尘天气 9.4 次,较上一个监测期减少了 20.34%,北京地区平均每年出现两次,较上次监测期减少 63%.这些都显示出我国荒漠化和沙化土地的治理取得显著成效.但我国土地荒漠化和沙化问题依然严重,如何改善沙区生态环境、促进区域协调发展,仍有一些问题需要探讨.

摘自《中国环境报》

2015-12-30