

玉米幼苗对芘污染土壤微生物活性及多样性的影响

许超^{1,2}, 夏北成¹, 黄雄飞¹

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275; 2. 华南农业大学资源与环境学院, 广东 广州 510642)

摘要 通过盆栽土培试验研究了玉米幼苗生长期间对芘污染土壤微生物活性及多样性的影响。结果表明,玉米加快了土壤中芘的降解,提高了芘在土壤中的降解速率。试验期间,根际土中可提取态芘含量显著低于非根际土,根际土微生物生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶和脱氢酶活性均高于非根际土,代谢熵低于非根际土。脂肪酸(FAME)分析结果表明,与非根际土相比,芘污染玉米根际土微生物群落结构发生了显著的变化,主要表现在真菌特征脂肪酸以及真菌/细菌的比值显著升高,细菌和GN⁻细菌特征脂肪酸显著降低,且这种效应随着培养时间的推移在 $P<0.01$ 水平显著。根际土和非根际土中丛枝菌根真菌、GN⁺细菌和放线菌特征脂肪酸差异随着培养时间的延长逐渐加大,45 d 时其差异均在 $P<0.05$ 水平显著。

关键词 芘 微生物活性 微生物群落结构 脂肪酸 玉米

中图分类号 X172 文献标志码 A 文章编号 1672-2043(2009)06-1106-09

Influence of Young Maize (*Zea Mays* L.) on Soil Microbial Activity and Community Structure Diversity in a Pyrene Contaminated Soil

XU Chao^{1,2}, XIA Bei-cheng¹, HUANG Xiong-fei¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract A greenhouse pot experiment was conducted to study the influence of young maize (*Z. mays* L.) on soil microbial activity and community structure diversity in a pyrene contaminated soil. Results showed that maize could promote pyrene degradation and increase degradation rate of pyrene in the soil. During the experimental period, the concentration of extractable pyrene in rhizosphere soil was significantly lower than that in nonrhizosphere soil. A relatively large amount of microbial biomass carbon (C_{mic}), high ratio of microbial biomass carbon/organic carbon (C_{mic}/C_{org}), and high activities of enzymes (dehydrogenase and polyphenol oxidase) were detected in rhizospheric soil. But metabolic quotient was lower in rhizospheric soil than in nonrhizospheric soil at the whole experimental period. Soil microbial communities in rhizospheric soil and nonrhizospheric soil were characterized using fatty acid methyl ester (FAME) analysis. Fatty acid profiles demonstrated that soil microbial community structure was significantly altered in pyrene contaminated soil with maize. Fatty acid indicators for fungi and the ratio of fungi to bacteria significantly increased, and fatty acid indicators for bacteria and Gram-negative bacteria significantly decreased. The effect gradually increased and became significant ($P<0.01$) with time extending. The differences of fatty acid indicators for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), Gram-positive bacteria and actinomycetes gradually increased, and the differences reached significant level ($P<0.05$) at the end of the experiment (45 d).

Keywords pyrene; microbial activity; microbial community structure; fatty acid methyl ester (FAME); maize (*Z. mays* L.)

多环芳烃(PAHs)是一类广泛分布于环境中的持久性有机污染物,主要来源于化石燃料的不完全燃烧。多环芳烃进入大气环境后,绝大部分通过沉降进

入土壤,污染土壤环境,据估计,有90%以上的多环芳烃在土壤表面残留^[1]。多环芳烃具有致癌和致突变作用,在土壤中普遍存在,并且由于其性质稳定、难于降解,在土壤中呈不断积累的趋势,严重危害着土壤的生产和生态功能、农产品质量和人类健康。修复土壤多环芳烃污染已成为国内外土壤和环境科学界共同关注的一个前沿热点问题之一。

根际修复具有经济、有效、实用、美观、原位非破坏性、无二次污染、可大面积应用等独特优点而越来越

收稿日期 2008-10-31

基金项目 广东省自然科学基金团队项目(06202438) 中山大学985工程环境污染控制与修复技术创新平台项目

作者简介 许超(1978—),男,博士,主要从事污染控制与修复技术研究。E-mail: xuchao1388@126.com

通讯作者 夏北成 E-mail: xiabch@mail.sysu.edu.cn

越受到人们的重视,是目前最具潜力的土壤生物修复技术之一。植物能够通过根际效应促进土壤微生物对多环芳烃的降解^[2-11]。然而,植物产生这种促进作用的机制和某些过程尚待深入研究^[5,12]。植物修复过程中微生物活性和多样性是两个非常重要的因素,而有关植物修复多环芳烃过程中微生物活性和多样性方面的报道很少。此外,由于土壤-植物系统的复杂性,对不同地区、不同植物的特定多环芳烃的根际修复过程中生物效应的研究一直是土壤和环境工作者所关注的内容。

芘是 PAHs 中 4 个苯环的代表物,在环境中广泛存在,是检测 PAHs 污染的指示物^[13-14]。鉴于此,本试验以芘为 PAHs 的典型代表,以修复芘效果较好的玉米^[15-17]为供试植物,就玉米幼苗对芘污染土壤微生物生物量碳、生理生态指标、酶活性以及微生物群落结构动态影响进行研究,以期多环芳烃污染土壤的根际修复技术发展及应用提供科学依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤采自广东省广州市神山镇水稻地的表层(0~20 cm),为潴育型水稻土,砂粒、粉粒和粘粒含量分别为 76.3%、8.75% 和 15.0%,有机质含量为 17.38 g·kg⁻¹,pH 为 4.63,全氮含量为 1.07 g·kg⁻¹,有效磷含量为 137.7 mg·kg⁻¹,速效钾含量为 80.5 mg·kg⁻¹,未检测到芘。土壤风干后过 2 mm 筛,备用。

供试植物为玉米(*Zea mays* L.),购自广州市农业科学研究所。

供试药品芘(Pyrene,纯度>98%),为 Aldrich 公司产品。

1.2 盆栽试验

取少量土壤样品均匀加入芘的丙酮溶液,待丙酮挥发后,用未污染土不断稀释,多次搅拌、混匀,制得芘含量为 800 mg·kg⁻¹ 的污染土样^[18],保持 60% 的田间持水量于温室中平衡 5 d 使用。分别称取 300 g 土样于内径 8.4 cm、高 9.5 cm 的盆钵中,拌入 CO(NH)₂、Ca(H₂PO₄)₂·H₂O 和 K₂SO₄ 作底肥,用量为氮 120 mg·kg⁻¹、磷 40 mg·kg⁻¹ 和钾 100 mg·kg⁻¹。玉米种子浸种后,于滤纸上恒温培养箱中催芽(37℃),露白时,选取饱满、大小均匀一致的玉米种子在土样平衡 5 d 后播于盆钵中,每盆 3 颗,置于温室中,温室的日间温度为 25℃,夜间温度 18℃,自然光照条件。同时设置未

加芘土壤种植玉米处理(对照处理),各处理重复 9 次。播种玉米前,采集土壤样品供土壤芘含量分析。播种日记作第 0 d。土壤水分通过每 2 d 称重维持在田间持水量的 60%^[15],每 2 d 随机交换盆在温室中的位置,以保证生长条件一致。在试验的第 15、30 和 45 d 分批取样,采集植物样品和土壤样品,每次每处理 3 次重复。玉米样品分根和茎叶两部分取样,用去离子水洗净、滤纸吸干后,80℃烘干至恒重。依据 Binet 等^[19]文献,由于盆栽植物根系密度非常大,去掉表层 5 mm 土壤后,剩下的土壤全部作为根际土壤,而无植物的土壤作为非根际土壤。植物样品干燥后用研磨机粉碎、混匀后装入小封口袋,放入冰柜内备用。部分土壤样品冷冻干燥后,过 1 mm 筛保存于-20℃低温冰箱中以供芘分析及 FAME 分析用,部分土壤样品存放在 4℃冰箱中供微生物生物量、土壤基础呼吸强度分析,部分土壤样品经风干后、过 1 mm 筛存放于 4℃冰箱中供土壤酶活性分析。

1.3 分析方法

土壤多环芳烃的提取参照高彦征等^[20]的方法略作改进。取 2 g 上述制备的土壤样品于 25 mL 玻璃离心管中,加入 10 mL 二氯甲烷,盖紧后超声萃取 1 h;恒温振荡 30 min,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取 2 mL 上清液过 1 g 硅胶柱净化,并用 5 mL 1:1 二氯甲烷和正乙烷溶液洗脱。洗脱液收集至玻璃试管中,用高纯氮气将溶液吹至近干,用正乙烷定容至 2 mL,过 0.45 μm 孔径滤膜,GC-MS (TRACE GC ULTRA-DSQ) 以外标定量法分析。

植物样品多环芳烃的提取分析参照高彦征等^[20]的方法进行,提取后用 GC-MS 分析。GC-MS 分析条件为 30 m×0.25 mm (内径直径)×0.25 μm (液膜厚度),TR-5MS 色谱柱载气 He,进样口温度 250℃,不分流进样,初始温度 35℃,保持 1 min,以 30℃·min⁻¹ 速度升温至 150℃,接着以 10℃·min⁻¹ 速度升温至 290℃,并在此温度下保持 15 min。质谱条件为 EI 电子源 70 eV,离子源温度 230℃,传输线温度 280℃,扫描方式 SIM。本研究测定样品均为干样,样品芘的回收率为 96.9% (n=5, RSD<3.85%)。

微生物生物量碳采用氯仿熏蒸-0.5 mol·L⁻¹ K₂SO₄ 提取测定^[21],采用总有机碳分析仪(TOC-V_{CSL})测定提取液中的有机碳含量;土壤基础呼吸采用室内密闭培养-1 mol·L⁻¹ NaOH 碱液吸收法测定^[21]。多酚氧化酶采用邻苯三酚比色法测定^[22]。脱氢酶采用 TTC 还原法测定^[23]。土壤的基本理化性质采用常规分析方法进行测

定^[21]。

土壤微生物脂肪酸的甲脂化和提取^[24] 将 15 mL 的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KOH 甲醇溶液和 3 g 冷冻干燥土壤加到 50 mL 的离心管中,混合均匀,在 37°C 下温育 1 h (脂肪酸释放,并甲脂化,每 10 min 涡悬样品 1 次),加 3 mL $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸溶液中和 pH 值,加 10 mL 正己烷,混匀,使 FAMES 转到正己烷相中, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min;将正己烷相转移到干净试管中,在 N_2 气流下挥发掉溶剂。将提取的 FAMES 溶解在 0.5 mL 1:1 (V/V) 的正己烷:甲基叔丁基醚 (methyl-tert butyl ether) 中,作 GC 和 GC-MS 分析。GC 和 GC-MS 测试采用美国 HP6890GC/5973MS。色谱柱为 $20 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ (内径直径) $\times 0.33 \mu\text{m}$ (液膜厚度) SE-30,柱温 $100\sim 270^\circ\text{C}$, $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,进样口温度 250°C ,离子源温度 230°C ,柱前压 40 kPa。不同样品测定之间,在 270°C 下清洗柱子 2 min,质谱图的确认采用 Wiley 275.L。各脂肪酸采用简写符号命名,即 (a/i) X:Y ω Z。其中,X 表示脂肪酸中的总碳原子数,Y 表示双键数,总碳原子数和双键数之间以冒号隔开; ω 表示双键的位置,从甲基末端开始计算 Z 表示双键的位置在第 Z 个碳原子上;a 和 i 分别表示支链的反异构 (antesio) 和异构 (iso);10Me 表示脂肪酸分子中在距离羧基末端的第 10 个碳原子上有一个甲基团; αOH 表示在距离羧基末端 α 个碳原子上有一个羟基;cy 表示环丙基脂肪酸^[25]。脂肪酸含量测定采用峰面积定量和 C19:0 内标法。各脂肪酸数量信息用各脂肪酸含量/总脂肪酸量的质量分数 (%) 表示。FAMES 可作为总细菌数、革兰氏阳性菌 (GN^+)、革兰氏阴性菌 (GN^-) 和真菌等的生物标记物,其中 16:0 是土壤最丰富的脂肪酸,与总微生物量呈高度相关性,可作为衡量总群落生物量的指标^[26]。细菌总数:15:0、i15:0、a15:0、i16:0、16:1 ω 7、17:0、a17:0、i17:0、cy17:0、18:1 ω 7、cy19:0; GN^- 细菌:16:1 ω 7、cy17:0、18:1 ω 7、cy19:0; GN^+ 细菌:15:0、i15:0、a15:0、i16:0、17:0、i17:0、a17:0;革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌之比通过 15:0、i15:0、a15:0、i16:0、17:0、i17:0 及 a17:0 脂肪酸之和与 16:1 ω 7、cy17:0、18:1 ω 7、cy19:0 脂肪酸之和之间的比值进行估算;真菌:18:2 ω 6,9c;18:2 ω 6,9/总细菌 FAMES 量可代表真菌/细菌生物量比值^[27]。丛枝菌根真菌:16:1 ω 5^[28-29],放线菌 10Me18:0、10Me19:0^[30]。

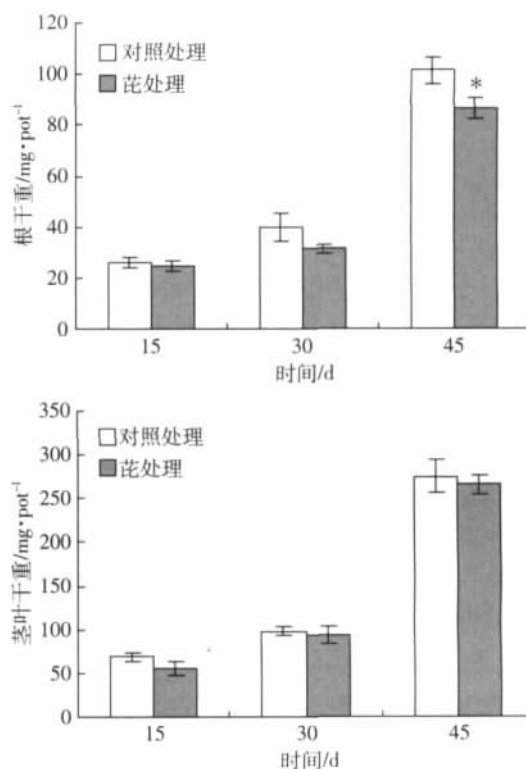
1.4 数据分析

数据采用 SPSS 13.0 进行统计分析,新复极差法作多重比较。

2 结果与分析

2.1 玉米生物量的动态变化

试验期间,砒处理玉米茎叶干重低于对照处理,但差异不显著 ($P>0.05$)。砒处理玉米根干重低于对照处理,且随着培养时间的延长其差异增大,45 d 时差异在 $P<0.05$ 水平显著 (图 1)。由此可见,试验设计砒浓度处理对玉米根生长有明显的抑制作用。



* 和 ** 分别表示 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上差异显著,下同。

图 1 玉米生物量动态

Figure 1 Dynamics of biomass of maize

2.2 土壤中可提取态砒含量的动态变化

对照处理土壤中未检测到可提取态砒。随着培养时间延长,根际土和非根际土可提取态砒的含量逐渐降低,根际土可提取态砒的含量低于非根际土,并且随着时间的推移,其差异更大,15 d 时差异在 $P<0.05$ 水平显著,30 d 和 45 d 时差异在 $P<0.01$ 水平显著。至第 45 d,根际土和非根际土砒去除率分别为 61.25% 和 35.58%,可见,根际环境加快了砒在土壤中的去除 (图 2)。

2.3 玉米中砒累积量的动态变化

随着时间的延长,玉米中砒累积量呈增加趋势。对照处理玉米茎叶中能检测到有砒的累积,而根中

未能检测到有芘的累积(图2),说明茎叶的芘来源于大气沉降,或者是污染盆中的土壤挥发。芘处理茎叶中芘累积量小于根的累积量(图2),芘处理玉米茎叶累积芘所占比例较小,芘处理玉米体内芘主要来自植物根系吸收和运输。45 d时,芘处理根和茎叶的累积总量为 $110 \mu\text{g} \cdot \text{pot}^{-1}$, 占土壤添加总量的0.05%以下。

2.4 土壤微生物生物量碳、生理生态参数和酶活性动态变化

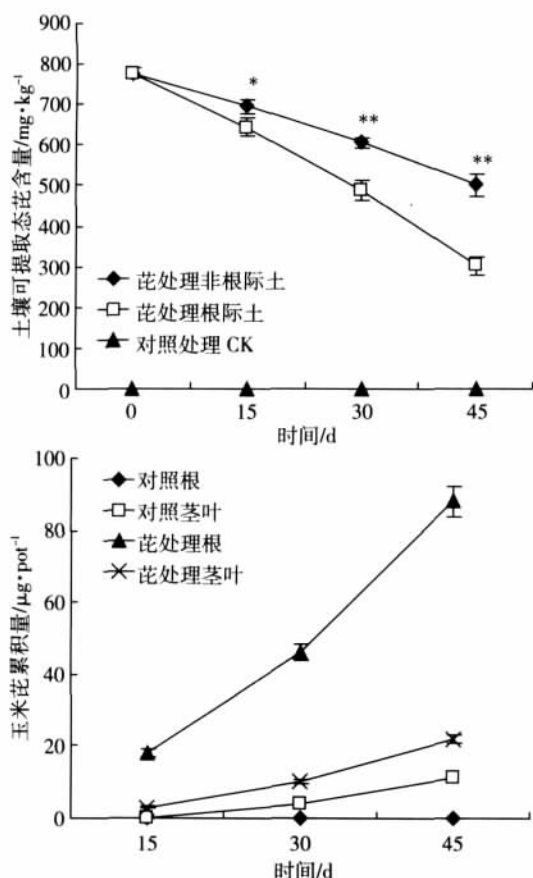


图2 土壤可提取态芘含量和玉米中动态芘累积量动态

Figure 2 Dynamics of concentration of extractable pyrene in soil and accumulative content of pyrene in maize plants

土壤微生物生物量碳在试验期间呈升高趋势,试验期间根际土微生物生物量碳高于非根际土,且在45 d时两者差异在 $P<0.05$ 水平显著(表1)。土壤微生物熵(C_{mic}/C_{org})的变化规律与微生物量碳的变化情况相一致,15、30、45 d时根际土微生物熵在 $P<0.01$ 水平显著高于非根际土(表1)。土壤微生物代谢熵(即土壤微生物基础呼吸与土壤微生物生物量之间的比值, qCO_2)在试验期间呈降低趋势,试验期间根际土代谢熵低于非根际土(表1)。多酚氧化酶和脱氢酶活性在试验期间呈先升高后降低的趋势。试验期间,根际土土壤多酚氧化酶和脱氢酶活性高于非根际土(表1)。第15和30 d时,根际土多酚氧化酶和脱氢酶活性高于非根际土,但差异不显著;第45 d时,根际土多酚氧化酶和脱氢酶活性与非根际土相比其差异分别在 $P<0.01$ 水平显著和 $P<0.05$ 水平显著(表1)。

2.5 污染土壤微生物群落结构的变化

微生物脂肪酸含量图表明试验期间芘污染的根际土和非根际土微生物群落结构发生了变化,存在一定的差异,且这种变化随着培养时间的延长,差异更加明显(图3)。15 d时,真菌特征脂肪酸18:2 ω 6,9占总脂肪酸的质量分数根际土在 $P<0.05$ 水平显著高于非根际土。30 d时,革兰氏阴性菌特征脂肪酸16:1 ω 7占总脂肪酸的质量分数根际土在 $P<0.05$ 水平显著低于非根际土,而革兰氏阳性菌特征脂肪酸a17:0、17:0和真菌特征脂肪酸18:2 ω 6,9以及脂肪酸18:1 ω 9占总脂肪酸的质量分数根际土在 $P<0.05$ 水平显著高于非根际土。45 d时,根际土中革兰氏阳性菌特征脂肪酸a15:0、i16:0、i17:0、a17:0和革兰氏阴性菌特征脂肪酸16:1 ω 7、cy17:0占总脂肪酸的质量分数与非根际土相比在 $P<0.05$ 水平显著降低,其中a15:0、16:1 ω 7、a17:0和cy17:0降低程度更是在 $P<0.01$ 水平显著;革兰氏阳性菌特征脂肪酸15:0,革兰氏阴性菌特征脂肪酸18:1 ω 7,丛枝菌根真菌特征脂肪酸16:1 ω 5,真菌特

表1 土壤微生物量碳、生理参数和酶活性动态变化

Table 1 Dynamic of soil microbial biomass C (C_{mic}), ecophysiological parameters, and enzyme activities in soil

时间/d	项目	微生物量碳/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	微生物熵/%	代谢熵/ h^{-1}	多酚氧化酶/红紫培精/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	脱氢酶/TPF $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
15	非根际土	100 ± 15.2	1.36 ± 0.01	0.135 ± 0.012	0.180 ± 0.017	516 ± 16.1
	根际土	148 ± 15.3	$1.81 \pm 0.06^{**}$	0.128 ± 0.011	0.211 ± 0.017	551 ± 17.1
30	非根际土	148 ± 15.0	1.62 ± 0.08	0.124 ± 0.006	0.824 ± 0.064	578 ± 23.9
	根际土	214 ± 28.9	$2.28 \pm 0.11^{**}$	0.115 ± 0.007	0.901 ± 0.026	625 ± 27.1
45	非根际土	269 ± 22.5	3.11 ± 0.19	0.085 ± 0.010	0.430 ± 0.021	496 ± 10.9
	根际土	$374 \pm 11.7^*$	$3.97 \pm 0.21^{**}$	0.075 ± 0.005	$0.642 \pm 0.065^{**}$	$564 \pm 26.2^*$

注 * 和 ** 分别表示 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平上差异显著,下同。

征脂肪酸 18:2 ω 6,9,放线菌特征脂肪酸 10Me19:0 和脂肪酸 14:0、16:0 占总脂肪酸的质量分数根际土在 $P<0.05$ 水平显著高于非根际土,其中 14:0、16:1 ω 5 和 18:1 ω 7 差异在 $P<0.01$ 水平显著(图 3)。表征微生物生物量的特征脂肪酸 16:0 质量分数根际土要高于非根际土,且这种差异随着培养时间的延长增大,至试验结束时(45 d) 差异在 $P<0.05$ 水平显著(图 3),这与

微生物生物量碳的结果相一致。

15 d 时,细菌、GN-细菌脂肪酸质量分数非根际土在 $P<0.05$ 水平显著高于根际土,而真菌脂肪酸质量分数和真菌/细菌比值根际土在 $P<0.05$ 水平显著高于非根际土。30 d 时,非根际土细菌脂肪酸质量分数在 $P<0.01$ 水平显著高于根际土、GN-细菌脂肪酸质量分数在 $P<0.05$ 水平显著高于根际土;而真菌脂肪

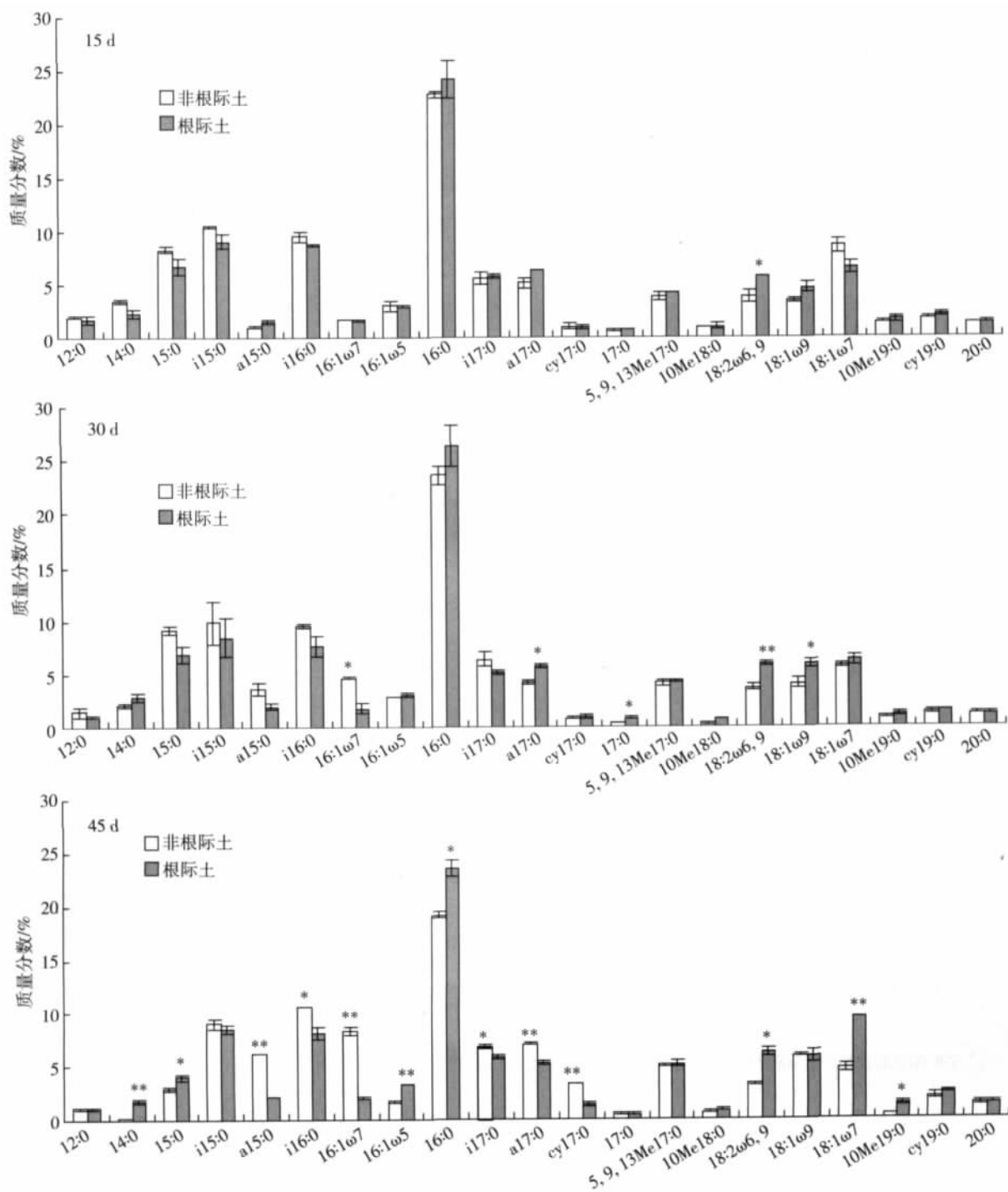


图 3 土壤微生物脂肪酸含量

Figure 3 The amounts of FAMES of soil microbial community

酸质量分数和真菌/细菌比值根际土在 $P<0.01$ 水平显著高于非根际土。45 d 时,非根际土细菌、GN⁺细菌脂肪酸质量分数在 $P<0.01$ 水平显著高于根际土、GN⁺细菌脂肪酸质量分数在 $P<0.05$ 水平显著高于根际土;真菌、丛枝菌根脂肪酸质量分数和真菌/细菌比值根际土在 $P<0.01$ 水平显著高于非根际土、放线菌脂肪酸质量分数根际土在 $P<0.05$ 水平显著高于非根际土(表 2)。试验期间,根际土和非根际土细菌、GN⁺细菌、GN⁻细菌、真菌、放线菌和丛枝菌根真菌脂肪酸质量分数,以及真菌脂肪酸/细菌脂肪酸比值的差异表明根际土和非根际土微生物群落结构存在明显的差异。这也表明在玉米根系及其根系分泌物的作用下,芘污染土壤微生物群落结构发生了显著的变化,主要表现在真菌特征脂肪酸质量分数以及真菌/细菌的比值显著升高,细菌和 GN⁻细菌特征脂肪酸质量分数显著降低,且这种效应随着培养时间的推移,差异在 $P<0.01$ 水平显著。此外,丛枝菌根真菌、GN⁺细菌和放线菌特征脂肪酸质量分数差异随着培养时间的延长逐渐加大,到培养结束时(45 d)其差异均在 $P<0.05$ 水平显著也是其重要表现之一。

为了揭示受玉米生长影响后芘污染土壤微生物群落结构发生的变化,我们对根际土和非根际土各取样时间下各特征脂肪酸进行了主成分分析(PCA)。图中第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)分别解释了 44.21%和 24.46%的变异,两者共同解释了微生物群落结构 68.67%的变异,并将根际土和非根际土各取样时间下的差异明显区分(图 4)。从土壤微生物 FAME 主成分分析图中可以清楚地看出,根际土壤和非根际土壤的微生物群落结构有明显的不同。15 d 时根际土和非根际土微生物群落结构在 PC1 轴上的差异不明显,而在 PC2 轴上的差异明显;30 d 时根际土

和非根际土微生物群落结构在 PC1 轴和 PC2 轴上的差异加大,并且差异更加明显,在 PC2 轴上的差异大于在 PC1 轴上的差异;45 d 时根际土和非根际土微生物群落结构在 PC1 轴上的差异加大,且差异更加明显,而在 PC2 轴上的差异减小,在 PC1 轴上的差异大于在 PC2 轴上的差异(图 4)。试验期间,根际土和非根际土微生物群落结构在 PC1 轴上的差异呈现逐渐增大的趋势,在 PC2 轴上的差异呈现先增大后减小的趋势。

3 讨论

植物能够通过增加根际微生物生物量碳而促进多环芳烃的降解^[6,31]。本研究表明,试验期间根际土微生物生物量碳高于非根际土,且在 45 d 时两者差异在 $P<0.05$ 水平显著(表 1)表征微生物生物量的特征脂肪酸 16:0 质量分数根际土要高于非根际土,且这

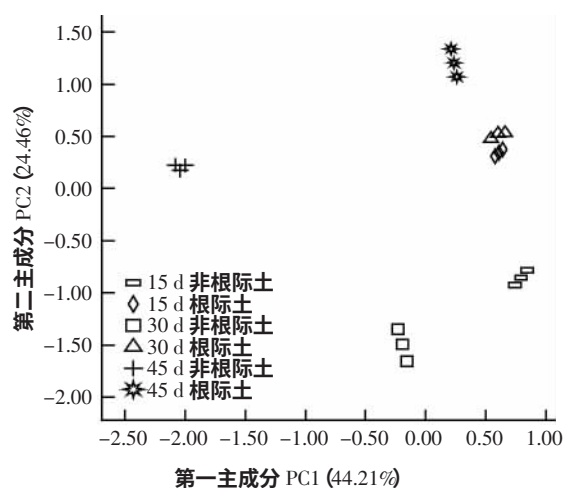


图 4 土壤微生物 FAME 主成分分析图

Figure 4 The plot of principal components analysis (PCA) of FAME composition of soil microbial community

表 2 土壤微生物脂肪酸标记物的比较

Table 2 Comparison of FAME biomarkers in soil microbial community

项目	15 d		30 d		45 d	
	非根际土	根际土	非根际土	根际土	非根际土	根际土
细菌	53.97±1.22*	50.07±0.13	55.65±1.48**	47.72±3.16	61.40±0.42**	49.74±0.48
GN ⁺ 细菌	40.87±1.37	38.93±0.04	43.18±1.95	36.80±3.27	43.06±0.64*	34.41±0.58
GN ⁻ 细菌	13.15±0.22*	11.14±0.09	12.47±0.47*	10.62±0.11	18.34±0.23**	15.20±0.28
GN ⁺ 细菌/GN ⁻ 细菌	3.12±0.15	3.50±0.03	3.47±0.28	3.45±0.34	2.35±0.06	2.24±0.06
真菌	3.85±0.57	5.71±0.03*	3.68±0.18	5.92±0.67**	3.24±0.15	6.20±0.40**
真菌/细菌	0.07±0.01	0.11±0.01*	0.07±0.01	0.12±0.03**	0.05±0.00	0.12±0.02**
放线菌	2.33±0.11	2.71±0.14	1.16±0.23	1.93±0.20	1.08±0.11	2.18±0.13*
丛枝菌根真菌	3.00±0.41	2.97±0.04	2.90±0.06	3.00±0.17	1.66±0.06	3.29±0.03**

种差异随着培养时间的延长逐渐增大,至试验结束时(45 d)差异在 $P<0.05$ 水平显著(图3)。由此表明,种植玉米增加了砒污染土壤微生物生物量碳,促进了砒的降解,这是根际土壤中砒的去除率高于非根际土壤的一个重要原因。

土壤微生物熵是土壤微生物生物量碳与总有机碳的比值(C_{mic}/C_{org}),已被认为是环境胁迫下土壤微生物量或土壤微生物多样性变化的敏感生理指标。试验过程中 C_{mic}/C_{org} 呈上升趋势,且根际土 C_{mic}/C_{org} 在 $P<0.01$ 水平显著高于非根际土(表1)。高 C_{mic}/C_{org} 比值表明微生物利用有机质的效率越高^[32]。土壤微生物代谢熵 qCO_2 将微生物生物量的大小与微生物的生物活性和功能有机地联系起来,可对微生物的能量利用效率进行度量^[33]。Ding 等^[34]认为, qCO_2 伴随着生态系统由初级向高级的演替而呈下降的趋势,在 qCO_2 较低的土壤中微生物对碳的利用效率较高,维持相同微生物量所需的能量越少,土壤质量越好。 qCO_2 在试验期间呈降低趋势,且试验期间根际土代谢熵低于非根际土(表1)。由此表明,种植玉米改善了土壤砒污染环境,更有利于土壤环境的好转。

土壤中多酚氧化酶能直接降解多环芳烃^[11,31,35-39]。Fan 等^[11]研究表明,苜蓿(*Medicago sativa*)对砒污染土壤的修复作用中根际土壤砒残留浓度低于非根际土壤,而脱氢酶活性高于非根际土壤,且脱氢酶活性与砒降解率显著正相关。本研究结果表明,根际土与非根际土多酚氧化酶和脱氢酶的差异随着玉米的生长越来越大,根际土和非根际土中可提取态砒的浓度差异越大,也即根际土和非根际土砒的降解差异越大,由此表明,种植玉米加快了土壤中砒的降解。这说明种植玉米提高了土壤中酶的活性,形成了更有利的可降解砒的根际修复环境,从而提高了砒污染土壤的生物修复能力。对于多酚氧化酶和脱氢酶如何促进土壤中砒降解的内在机制还有待进一步探索。

16:1 ω 5 被普遍视为丛枝菌根真菌的特征脂肪酸^[28-29],丛枝菌根真菌是菌根真菌中最普遍、最重要组成部分,菌根真菌在提高植物抗逆性、促进 PAHs 的植物修复等方面的贡献已被大量研究证实^[4,35,40-41]。本试验结果表明,根际土和非根际土丛枝菌根真菌 16:1 ω 5 特征脂肪酸质量分数的差异随着培养时间的延长逐渐加大,到培养结束时(45 d)其差异均在 $P<0.01$ 水平显著(图3和表2)。真菌氧化芳香烃的能力是普遍的,真菌中的白腐菌等对土壤中多环芳烃降解效果非常好^[42-43]。本试验结果表明,与非根际

土相比,根际土真菌特征脂肪酸 18:2 ω 6,9 质量分数显著升高,且这种效应随着培养时间的延长差异在 $P<0.01$ 水平显著(图3和表2)。种植玉米,在玉米根系及其根系分泌物的作用下,对多环芳烃有降解作用的丛枝菌根真菌和真菌增多,直接导致了根际土壤与非根际土壤中砒的降解存在显著差异,也说明了植物可通过根系分泌物来改变微生物群落结构而加快多环芳烃的降解。何种丛枝菌根真菌、何种真菌数量在砒污染的玉米修复的根际土中得到较大程度的增加,还需进一步的深入研究。

本试验结果表明,根际土中 GN^+ 细菌的质量分数逐渐降低,而非根际土中 GN^+ 细菌的质量分数逐渐升高,这与 Miya 等^[44]的研究结果相一致。与非根际土相比,根际土壤细菌和 GN^- 细菌特征脂肪酸显著降低,且这种效应随着培养时间的推移差异在 $P<0.01$ 水平显著。根际土和非根际土中 GN^+ 细菌和放线菌特征脂肪酸差异随着培养时间的延长逐渐加大,到培养结束时(45 d)其差异均在 $P<0.05$ 水平显著(表2)。根际土与非根际土在细菌、 GN^- 细菌、 GN^+ 细菌和放线菌上的差异与砒降解之间的关系以及这些差异导致根际土砒降解加快的贡献率大小等都还需进一步深入研究。种植玉米,砒污染土壤微生物群落结构发生了显著的变化,土壤微生物群落结构的变化是否引起土壤微生物功能多样性的变化,需要进一步深入研究。开展土壤微生物功能多样性的研究,将有助于更深入地理解根际修复多环芳烃污染的机理,促进多环芳烃污染土壤植物修复技术的发展。

本试验条件下,未种玉米的土壤中砒的含量减少(图2),这是由于土壤中微生物对砒的降解所致。在种植玉米的土壤中砒含量进一步减少,45 d 时,根际土中砒含量在 $P<0.01$ 水平显著低于非根际土。45 d 试验中,种植玉米可实现 60%以上砒的去除(图2)。本研究结果表明玉米吸收和积累对砒的去除的贡献小于 0.05%,玉米吸收和积累并不是植物促进砒去除的主要原因,这与 Gao 等^[12]的研究结果是一致的。本试验结果表明,试验期间根际土砒降解高于非根际土,土壤微生物生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶和脱氢酶活性根际土均高于非根际土,代谢熵低于非根际土。与非根际土壤相比,砒污染玉米修复的根际土壤微生物群落结构发生了显著的变化,主要表现在真菌特征脂肪酸以及真菌/细菌的比值显著升高,细菌和 GN^- 细菌特征脂肪酸显著降低,且这种效应随着培养时间的推移差异在 $P<0.01$ 水平显著。根际土和非根际

土中丛枝菌根真菌、GN⁺细菌和放线菌特征脂肪酸差异随着培养时间的延长逐渐加大,到培养结束时(45 d)其差异均在 $P<0.05$ 水平显著。由此说明,种植玉米可以通过根际效应增加土壤微生物生物量碳、提高其活性、改变微生物群落结构来促进土壤微生物对芘的降解。

4 结论

种植玉米可显著加快土壤中芘的去除。试验期间根际土芘降解高于非根际土,土壤微生物生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶和脱氢酶活性根际土均高于非根际土,代谢熵低于非根际土。种植玉米增加了土壤中微生物生物量、提高其活性,形成了更有利的可降解芘的根际修复环境。与非根际土壤相比,芘污染玉米修复过程中根际土壤微生物群落结构发生了显著的变化。种植玉米可以通过根际效应增加土壤微生物生物量碳、提高其活性、改变微生物群落结构来促进土壤微生物对芘的降解。

参考文献:

- [1] Wild S R, Jones K C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget[J]. *Environment Pollution*, 1995, 88 (1): 91-108.
- [2] Banks M K, Lee E, Schwab A P. Evaluation of dissipation of mechanisms for benzo[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1999, 28 (1): 294-298.
- [3] Johnson D L, Anderson D R, McGrath S P. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37 (12): 2334-2336.
- [4] Joner E J, Jonansen A, Loibner A P, et al. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35 (13): 2773-2777.
- [5] Krutz L J, Beyrouy C A, Gentry T J, et al. Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 41 (5): 359-364.
- [6] Li H, Luo Y M, Song J, et al. Degradation of benzo[a]pyrene in an experimentally contaminated paddy soil by vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) [J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2006, 28 (1-2): 183-188.
- [7] Miya R K, Firestone M K. Enhanced phenanthrene biodegradation in soils by slender oat root exudates and root debris[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2001, 30 (6): 1911-1918.
- [8] Parrish Z D, Banks M K, Schwab A P. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34 (1): 207-216.
- [9] Rezek J, Wiesche C, Mackova M, et al. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2008, 70 (9): 1603-1608.
- [10] Lee S H, Lee W S, Lee C H, et al. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153: 892-898.
- [11] Fan S X, Li P J, Gong Z Q, et al. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Chemosphere*, 2008, 71 (8): 1593-1598.
- [12] Gao Y Z, Zhu L Z. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils[J]. *Chemosphere*, 2005, 55 (9): 1169-1178.
- [13] Ravelet C, Krivobok S, SAGE L, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi[J]. *Chemosphere*, 2000, 40 (5): 557-563.
- [14] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 芘在土壤中的代谢降解研究[J]. *应用生态学报*, 2001, 12 (3): 447-450.
GONG Zong-qiang, LI Pei-jun, WANG xin, et al. Co-metabolic degradation of pyrene in soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12 (3): 447-450.
- [15] 徐圣友, 陈英旭, 林琦, 等. 玉米对土壤中菲芘修复作用的初步研究[J]. *土壤学报*, 2006, 43 (2): 226-232.
XU Sheng-you, CHEN Ying-xu, LIN Qi, et al. Remediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil by growing maize (*Zea mays* L.) [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43 (2): 226-232.
- [16] Xu S Y, Chen Y X, Wu W X, et al. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 363 (1-3): 206-215.
- [17] Yoshitomi K J, Shann J R. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on ¹⁴C-pyrene mineralization[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33 (12-13): 1769-1776.
- [18] Chen Y C. Phytoremediation of pyrene by tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.): Fate of pyrene and bacterial community analyses[D]. Purdue University, 2002.
- [19] Binet P, Portal J M, Leyval C. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass[J]. *Organic Geochemistry*, 2001, 32 (2): 217-222.
- [20] 高彦征, 朱利中, 凌婉婷, 等. 土壤和植物样品的多环芳烃分析方法研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24 (5): 1003-1006.
GAO Yan-zheng, ZHU Li-zhong, LING Wan-ting, et al. Analysis method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plant and soil samples[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24 (5): 1003-1006.
- [21] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000.
LU Ru-kun. Analysis on agro-chemical properties of soil[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [22] 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
Microbial Room of Institute of Soil CAS. Research methods on soil microbial[M]. Beijing: Science Press, 1985.
- [23] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.

- GUAN Song-yin. Soil enzyme and research method[M]. Beijing: Agricultural Press, 1986.
- [24] Cai Y F, Zhao S Q, Liao Z W, et al. Effect of fertilization on tomato bacterial wilt biocontrolling and soil health restoration using FAME analysis[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 2 (7): 779-785.
- [25] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (1): 3605-3617.
- [26] Mummey D L, Stahj P D, Buyer J S. Microbial biomarkers as an indicators of ecosystem recovery following surface mine reclamation[J]. *Applied Soil Ecology*, 2002, 21 (3): 251-259.
- [27] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review[J]. *Biology Fertility of Soils*, 1999, 29 (2): 111-129.
- [28] Olsson P A, Bååth E, Jakobsen I, et al. The use of phospholipids and neutral lipid fatty acids to estimate biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in soil[J]. *Mycological Research*, 1995, 99 (5): 623-629.
- [29] Olsson P A, Tingstrup I, Jakobsen I, et al. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31 (13): 1879-1887.
- [30] 颜慧, 蔡祖聪, 钟文辉. 磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用[J]. *土壤学报*, 2006, 43 (5): 851-859.
- YAN Hui, CAI Zu-cong, ZHONG Wen-hui. PLFA analysis and its applications in the study of soil microbial diversity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43 (5): 851-859.
- [31] 刘世亮, 骆永明, 丁克强, 等. 黑麦草对砒并[a]蒽污染土壤的根际修复及其酶学机理研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26 (2): 526-532.
- LIU Shi-liang, LUO Yong-ming, DING Ke-qiang, et al. Rhizosphere remediation and its mechanism of benzo[a]pyrene-contaminated soil by growing ryegrass[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26 (2): 526-532.
- [32] Anderson J M, Domsch K H. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1990, 22: 251-255.
- [33] Wardle D A, Ghani A. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, 26: 105-185.
- [34] Ding M M, Yi W M, Liao L Y, et al. Effects of afforestation on microbial biomass and activity in soils of tropical China [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24: 865-872.
- [35] Liu S L, Luo Y M, Cao Z H, et al. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa[J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2004, 26 (2): 285-293.
- [36] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 黑麦草对砒污染土壤修复的初步研究[J]. *土壤*, 2002, 34 (4): 233-236.
- DING Ke-qiang, LUO Yong-ming, LIU Shi-liang, et al. Remediation of phenanthrene contaminated soil by growing *Lolium multiflorum* Lam[J]. *Soils*, 2002, 34 (4): 233-236.
- [37] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 黑麦草对土壤中砒并[a]蒽动态变化的影响[J]. *土壤学报*, 2004, 41 (3): 348-352.
- DING Ke-qiang, LUO Yong-ming, LIU Shi-liang, et al. Dynamics in benzo[a]pyrene concentrations in soil as influenced by ryegrass plants[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41 (3): 348-352.
- [38] 刘世亮, 骆永明, 丁克强, 等. 砒并[a]蒽污染土壤的丛枝菌根真菌强化植物修复作用研究[J]. *土壤学报*, 2004, 41 (3): 336-342.
- LIU Shi-liang, LUO Yong-ming, DING Ke-qiang, et al. Enhanced phytoremediation of benzo[a]pyrene contaminated soil with arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41 (3): 336-342.
- [39] 范淑秀, 李培军, 巩宗强, 等. 苜蓿对多环芳烃砒污染土壤的修复作用研究[J]. *环境科学*, 2007, 28 (9): 2080-2084.
- FAN Shu-xiu, LI Pei-jun, GONG Zong-qiang, et al. Study on phytoremediation of phenanthrene-contaminated soil with alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. *Environmental Science*, 2007, 28 (9): 2080-2084.
- [40] Johnson D L, Maguire K L, Anderson D R, et al. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36 (1): 33-38.
- [41] Leyval C, Binet P. Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 27 (2): 402-407.
- [42] Andersson B E, Welinder L, Olsson P A, et al. Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipids fatty acids[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 73 (1): 29-36.
- [43] 陈静, 胡俊栋, 王学军, 等. 白腐真菌对土壤中多环芳烃(PAHs)降解的研究[J]. *环境化学*, 2005, 24 (3): 270-274.
- CHEN Jing, HU Jun-dong, WANG Xue-jun, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by white-rot fungi[J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 24 (3): 270-274.
- [44] Miya R K, Firestone M K. Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2000, 29 (2): 584-592.