

羟基磷灰石-植物联合修复对 Cu/Cd 污染植物根际土壤微生物群落的影响^①

孙婷婷^{1,3}, 徐磊^{1,3}, 周静^{1,2,4}, 樊剑波¹, 陈晏^{1,2*}

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 2 中国科学院红壤生态实验站, 江西鹰潭 335211;

3 中国科学院大学, 北京 100049; 4 江西省科学院生物资源研究所, 南昌 330096)

摘要:针对江西贵溪 Cu、Cd 重金属污染土壤,通过田间试验,比较无机生物材料羟基磷灰石及 3 种植物(海州香薷、巨菌草、伴矿景天)与羟基磷灰石联合修复对土壤总 Cu、Cd 的吸收及对活性 Cu、Cd 的钝化吸收能力差异。采用磷脂脂肪酸(PLFA)分析法,比较不同修复模式对土壤微生物群落结构的影响,以评估土壤微生态环境对不同修复措施的响应。研究结果表明:羟基磷灰石的施加可显著提高土壤 pH,并有效钝化土壤活性 Cu、Cd 含量,但对土壤总 Cu、Cd 的含量影响较小。植物与羟基磷灰石的联合修复在显著降低土壤活性 Cu、Cd ($P<0.05$) 的同时,减少了植物根际土壤总 Cu、Cd 的含量 ($P<0.05$)。不同修复措施对土壤微生物群落组成影响差异明显。单独施加羟基磷灰石与土壤真菌群落呈显著正相关,使土壤真菌生物量提高,从而引起真菌/细菌(F/B)的升高。植物与羟基磷灰石的联合修复可有效缓解土壤真菌化的趋势,其中巨菌草与羟基磷灰石的联合修复可有效提高土壤革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌生物量及多样性,降低 F/B 值,从而降低土壤真菌病害的风险。不同植物根系活性代谢引起有机质的积累促进植物与羟基磷灰石处理中根际有机碳含量显著提高。聚类增强树(Aggregated boosted tree, ABT)分析结果表明:不同修复模式是影响土壤微生物群落的重要因素,其次土壤 pH 和 Cu 的含量及活性也是改变重金属污染区域微生物群落的因子。该研究从微生物群落结构角度解释了植物与羟基磷灰石联合修复对土壤微生态体系的作用,为开展 Cu、Cd 等重金属污染地植物与无机生物材料的联合修复方式的筛选及实施提供可靠的理论依据。

关键词:铜;镉;巨菌草;海州香薷;伴矿景天;羟基磷灰石;微生物群落

中图分类号: X53

随着工农业生产和城市化水平的推进,我国土地污染,特别是重金属污染俨然成为危害土壤生态环境和人类健康的关键问题而日益受到关注^[1]。以江西省北部贵溪市为例,其冶炼厂周边至少 260 hm² 种植土壤因长期大气沉降、水源灌溉、废渣倾倒而导致铜(Cu)、镉(Cd)等重金属含量严重超标,土壤生态体系遭到严重破坏^[2]。因此,选择合理有效的修复措施,降低重金属积累的危害风险,是重金属污染区亟待解决的问题。

相比物理、化学的传统修复技术,近年来,采用超积累植物或耐受性植物的修复技术因其对土壤微生态扰动小、治理成本低、原位治理等优势在国内外许多低、中污染场地得到关注与应用^[3]。伴矿景天(*Sedum plumbizincicola*)、海州香薷(*Elsholtzia splendens*)

是目前国内用于 Cd 与 Cu 污染场地修复的重要超积累植物。然而,由于其生长速度和植物生物量的固有缺陷,使其在应用过程中受限^[4]。崔红标等^[5]针对江西贵溪地区 Cu、Cd 污染片区,使用生物量大且生长快速的超积累植物巨菌草(*Pennisetum* sp.),盆栽模式下分析了重金属提取修复效率,发现其对 Cu、Cd 的吸收量受到土壤 pH 的调控。Leitenmaier 等^[3]发现,多数 HM-积累性及 HM-耐受性植物的修复效率不同程度地受到土壤环境,如 pH、土壤其他重金属含量等的影响。因此,合理优化修复植物生长土壤环境,是促进植物修复的有效途径。

无机生物材料羟基磷灰石 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAP) 因其高比表面积及优良的生物学特性被广泛应用于医药合成、骨移植作为生物催化剂和吸附剂。

基金项目:国家自然科学基金项目(41471237)和中国科学院 STS 项目(KFJ-EW-ST-016)资助。

* 通讯作者(chenyan@issas.ac.cn)

作者简介:孙婷婷(1990—),女,安徽安庆人,硕士研究生,主要从事土壤微生物生态学研究。E-mail: ttsun@issas.ac.cn

基于羟基磷灰石在氧化、还原条件下的高稳定性和对重金属的广泛高吸附量的特性,使其在长期污染水体和土壤中成为理想的重金属治理材料^[6]。Cui 等^[7]研究发现,羟基磷灰石的添加可提高土壤 pH,一方面有效钝化有效 Cu、Cd 含量,另一方面改善土壤功能酶活性,促进耐 Cu、Cd 类植物地上生物量的提高,从而提高植物对土壤重金属的吸收量。

作为土壤质量评价不可缺少的生物学指标,土壤微生物维持着土壤生物活性,保证土壤养分循环和土壤结构的形成。微生物群落结构的变化能敏感地反映出土壤质量和健康状况,是评价自然或人为干扰引起的土壤变化的重要指示因子。滕应等^[8]研究指出,土壤微生物群落多样性能较好地反映红壤地区污染场地修复体系中微生态体系的稳定性。因此,明确微生物群落的作用、深入了解其群落功能和结构变化对于整个生态系统的研究具有重要意义。

本研究拟通过综合比较羟基磷灰石与植物(巨菌草、伴矿景天、海州香薷)联合修复江西贵溪 Cu 冶炼厂周边重金属 Cu、Cd 污染土地,植物根际土壤中 Cu、Cd 全量及有效 Cu、Cd 的残留量,不同植物生物量及对重金属的吸收量,以及不同联合修复作用对土壤微生物群落结构的影响。综合以上修复参数,评价羟基磷灰石与不同植物的联合修复措施对土壤 Cu、Cd 的钝化效果,为筛选联合修复方式进行场地原位修复重金属污染土壤提供技术指导和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地点

试验地位于江西贵溪某 Cu 冶炼厂污水和废气污染的农田,主要污染物是 Cu、Cd,而且由于常年污水、废气和酸雨的累积污染以及江西地区土壤酸性较强等特性,该地区的重金属污染情况十分严峻,本土植物难以生长,有些更严重的地方甚至寸草不生,严重危害到了当地人们的正常生产生活。在试验开始前,测定土壤有机质为 27.34 g/kg,碱解氮为 169.5 mg/kg,速效磷为 78.2 mg/kg, pH 为 4.35,速效钾为 142.5 mg/kg,全 Cu 为 596.45 mg/kg,全 Cd 为 1.324 mg/kg。

1.2 试验材料

所用土壤改良剂为羟基磷灰石(纯度>96%),采购于南京埃普瑞纳米材料公司,粒径为 3 μm,比表面积 45.7 m²/g, pH 为 7.71, Ca/P 的摩尔比为 1.72, Cu 和 Cd 含量分别为 5.85 mg/kg 和 38.3 μg/kg。巨菌草购于当地村民;海州香薷、伴矿景天均在室内育苗。

1.3 试验设计

试验设计了 5 个处理,分别为不施微米羟基磷灰石(CK)、微米羟基磷灰石+杂草(MW,不种修复植物,自然生长的杂草)、微米羟基磷灰石+巨菌草(MP)、微米羟基磷灰石+海州香薷(ME)、微米羟基磷灰石+伴矿景天(MS)。每个处理 3 个重复,随机排列,小区面积为 4 m×5 m,每个小区用水泥墙隔开(水泥墙地上部分 20 cm,地下部分 30 cm)。除了 CK,其他处理小区植物在种植前统一施加 36 t/hm² 微米羟基磷灰石。海州香薷和伴矿景天间距为 20 cm×20 cm,巨菌草间距为 50 cm×50 cm,于 2014 年 5 月 6 日统一栽种,各个处理田间管理与施肥模式保持一致。

1.4 样品采集

2014 年 7 月 15 日收获伴矿景天,12 月 5 日收获其他处理植物。在收获的同时,取植物联合修复处理组植物地上部分样品,以及各处理 0~20 cm 的土壤样品。每个小区取 3 个重复样,过 2 mm 筛,一部分用于土壤基本养分测定,另一部分 -20℃ 冷冻,一周内测定 PLFA。植物样品用蒸馏水洗净 70℃ 烘干至恒重,测定其生物量以及植株 Cu、Cd 的测定。

1.5 基本养分测定

土壤的基本理化性质按照常规分析测试方法测定^[9]。土壤 pH 按 1:2.5 土水比, pH 计测定; Cu、Cd 全量前处理为 HF-HClO₄-HNO₃ 消煮,之后采用原子吸收分光光度法(火焰和石墨炉)测定^[10-11];有效态 Cu、Cd 前处理为首先采用 0.1 mol/L CaCl₂ 以 1:5 的土水比振荡提取 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 过滤后测定^[9]。植物地上部分 Cu、Cd 含量测定:采用 HNO₃-HClO₄ 消煮,原子吸收分光光度法测定。土壤有机质:采用重铬酸钾外加热法测定^[9]。

1.6 土壤的 PLFA 分析

土壤微生物 PLFA 提取主要参考 Bligh 和 Dyer 等^[12-13]的方法。称取 2 g 土样,置于 50 ml 三角烧瓶中,加入 15 ml 氯仿:甲醇:柠檬酸盐缓冲液(1:2:0.8, v/v/v),震荡 2 h, 3 800 r/min 离心 10 min;将上清液移入一干净的 50 ml 试管中;再加入 7 ml 氯仿:甲醇:柠檬酸盐缓冲液(1:2:0.8, v/v/v),混匀,倒入离心管,涡旋,震荡提取,离心 10 min,倒出上清液,即将两次上清液合并;加入 3.6 ml 柠檬酸缓冲液和 4 ml 氯仿,振荡,封口,暗处静置过夜;用长滴管吸出下层液体至 10 ml 螺口管中,用氮气吹干 -20℃ 保存。过硅胶柱:依次用正己烷、氯仿、丙酮、甲醇洗涤柱子。皂化:加入 1 ml NaOH:甲醇:蒸馏水(1:3.3:3.3, m/v/v),涡旋振荡,沸水

浴 5 min, 振荡, 再置于沸水浴中 25 min, 退火。甲基化: 加入 2 ml 盐酸: 甲醇(1.2: 1, v/v), 涡旋振荡, 于 80°C ± 1°C 水浴锅加热保温 10 min ± 1 min, 退火。萃取: 加入 3 ml 正己烷: 甲基叔丁醚(1: 1, v/v), 振荡, 吸取上层正己烷相于另一干净试管。洗涤: 加 3 ml NaOH 溶液(1: 83, m/v), 上下摇动 5 min, 吸取 2/3 上层溶液, 转入气相色谱瓶(GC 瓶, 约 1 ml), 加入 50 μl 内标, 吹干。用 100 μl 的正己烷溶解 GC 瓶中的待测样品, 转移到内插管中, 测定。酯化 C19:0 为内标, 用 Agilent 7890 气相(GC)色谱仪测定。色谱条件: 色谱柱型号为安捷伦 19091B-102E Ultra 25% Phenyl Methyl Siloxane 25.0 m × 200 μm × 0.33 μm。进样量 2 μl, 进样口温度 250°C, 载气(氢气)流量为 30.0 ml/min。恒压 21 psi, 分流比 30: 1。程序升温: 190°C, 0.00 min; 10°C/min 升温至 285°C, 0.00 min; 60°C/min 升温至 310°C, 2.00 min; 190°C, 2.00 min; 火焰离子检测器(FID)检测。脂肪酸种类通过脂肪酸 Sherlock 微生物鉴定系统(MIDI Inc, Newark, DE, USA) 来鉴定。PLFAs 总量(Total PLFA, PLFAT)及单体脂肪酸的含量基于 19:0 内标计算, 分析中仅包括碳链数低于 20、摩尔百分比含量大于 1%、且在多数样品中都有出现的脂肪酸。细菌(Bac)以 i13:0、i14:0、i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、i18:0、i19:0、a16:0、a17:0、a19:0、13:1ω3c、16:1ω6c、16:1ω7c、17:1ω8c、18:1ω3c、18:1ω5c、18:1ω6c、18:1ω7c、cy17:0、cy19:0、19:1ω6c、20:1ω9c、21:1ω3c、21:1ω8c、22:1ω3c、22:1ω9c、24:1ω7c 等 28 种脂肪酸表示; 真菌(Fun)用 18:2ω6c、16:1ω5c 脂肪酸来表示; 真菌: 细菌通过 F/B 来计算; 放线菌(Act)以 10Me16:0、10Me17:0、10Me18:0、10Me18:1ω7c 表示; 革兰氏阳性细菌(G⁺)用支链、饱和脂肪酸 i13:0、i14:0、i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、i18:0、i19:0、a16:0、a17:0、a19:0 表示; 革兰氏阴性细菌(G⁻)用单不饱和脂肪酸和环式脂肪酸 13:1ω3c、16:1ω6c、16:1ω7c、17:1ω8c、18:1ω3c、18:1ω5c、18:1ω6c、18:1ω7c、cy17:0、cy19:0、19:1ω6c、20:1ω9c、21:1ω3c、21:1ω8c、

22:1ω3c、22:1ω9c、24:1ω7c 表示; 革兰氏阳性与阴性细菌比通过 G⁺/G⁻ 计算^[14-15]。

1.7 数据处理

试验数据采用 Excel 2007、SigmaPlot 12.5 和 SPSS17.0 进行处理和分析。PLFA 数据采用 ArcGIS 10 和 VB 程序进行整理分析。

2 结果与分析

2.1 不同植物与羟基磷灰石联合修复对土壤 Cu、Cd 含量的影响

如表 1 所示, 植物与羟基磷灰石联合修复对根际土壤中 Cu、Cd 含量及活性影响巨大。相比于 CK, 土壤施加磷灰石(MW 处理组), 全 Cu 含量下降并不明显, 但当与海州香薷、伴矿景天、巨菌草联合修复时, 根际土壤全 Cu 含量分别下降了 52.63、37.67 和 19.38 mg/kg。然而羟基磷灰石对土壤有效 Cu 含量影响明显: 单一施加磷灰石使土壤有效 Cu 含量降低了 54.27%, 而 3 种植物和磷灰石联合处理中土壤有效 Cu 含量降低了 70.9% ~ 73.04%。不同处理组中全 Cd 及有效 Cd 含量的变化趋势类似于 Cu。羟基磷灰石的施加并不显著改变土壤总 Cd 含量, 但明显钝化了有效 Cd: 其活性 Cd 含量为对照的 65.49%。植物的联合修复在降低根际总 Cd 的同时, 也有效减少了有效 Cd 的含量。其中伴矿景天和巨菌草处理最为显著, 相比对照, 其有效 Cd 含量为对照的 49.69% 和 51.76%。Raicevic 等^[16]证明羟基磷灰石强大的吸附及离子交换能力, 促使土壤中大量活性 Cu 与 Cd 被吸附络合, 另外, 崔红标等^[17]的研究结果表明羟基磷灰石提高土壤溶液的 pH, 而 pH 的升高为 Cu、Cd 含量降低的重要驱动因子, 从而降低重金属的污染风险, 改良植物根系的生长环境, 同时由于不同修复植物在生长过程中, 通过根系吸收并向地上部分转运重金属离子, 从而降低根系周围重金属的含量^[18]。而由于不同修复植物对 Cu 与 Cd 的吸收转化能力不同, 导致土壤不同形态 Cu 与 Cd 的含量存在差异。

表 1 不同联合修复处理对土壤 Cu、Cd 含量影响
Table 1 Effects of different combined remediations on soil Cu and Cd

处理	Cu 全量(mg/kg)	有效态 Cu(mg/kg)	Cd 全量(mg/kg)	有效态 Cd(μg/kg)
CK	658.38 ± 5.33 a	76.53 ± 2.32 a	379.36 ± 2.27 a	122.79 ± 4.41 a
MW	648.04 ± 5.51 ab	35.00 ± 3.62 b	362.81 ± 2.08 a	80.42 ± 0.25 b
MP	639.00 ± 7.42 b	21.10 ± 1.15 c	326.03 ± 7.10 c	63.55 ± 3.81 d
ME	605.75 ± 8.89 c	22.27 ± 3.61 c	342.98 ± 3.66 b	70.24 ± 0.10 c
MS	620.71 ± 7.89 c	20.63 ± 41.08 c	329.40 ± 6.76 c	61.02 ± 0.90 d

注: 表中数据为平均值 ± 标准差(n = 3), 同列数据小写字母不同表示差异达到 P < 0.05 显著水平, 下同。

2.2 不同植物与微米羟基磷灰石联合修复对植物的影响

如表 2 所示,不同植物单位地上部分分别对 Cu 与 Cd 的吸收能力表现出了一致性,均为 MS>ME>MP>MW。其中伴矿景天处理表现出明显的优势;其单位地上部吸收的 Cu、Cd 含量分别是生长杂草 MW 处理的 17.21 和 10.69 倍。伴矿景天作为多种重金属的超积累植物,单位植物体内重金属含量明显高于巨菌草非超积累植物和海州香薷^[19]。相比较而言,巨菌草地上部分吸收 Cu 含量的能力分别为伴矿景天 (MS) 和海州香薷 (ME) 组的 19.41% 和 45.37%,吸收 Cd 含量的能力分别是伴矿景天 (MS) 和海州香薷 (ME) 组的 9.73% 和 49.06%。但在 3 种植物处理中,巨菌草的生物量优势显著,分别比海州香薷和伴矿景天高出 16.03 mg/kg 和 41.36 mg/kg。正是基于巨菌草生物量的提高,使其地上部分对 Cu 总吸收量显著高于 MS 处理组;对 Cd 总吸收量与 MS 组持平。海州香薷地上部分对

Cu、Cd 的吸收量低于伴矿景天,但也因其生物量的优势,使其地上部分对 Cu、Cd 重金属的总吸收量在 4 种不同处理中最大。尽管伴矿景天自身对重金属的吸收能力强,但因其固有的缺陷:植株矮小、生物量低,给场地实际的修复技术带来很大的限制^[20]。海州香薷是土壤耐 Cu 指示性植物,其根系细胞壁中的果胶和纤维素是固定活性 Cu^{2+} 的主要组分^[21]。姜理英等^[22]发现香薷属植物对 Zn 也具有较好的积累作用。本研究中,基于羟基磷灰石的施加条件下,海州香薷还具有较好的吸收活性 Cd 的能力。巨菌草具有耐受土壤较高 Cu、Cd 含量的能力,且植株生物量高,因此其根系对土壤 Cu、Cd 的吸收效果明显。研究发现,羟基磷灰石的添加降低了土壤活性重金属含量,保障了植物的生长;相对于 MW 处理,植物与羟基磷灰石的联合修复对 Cu、Cd 的吸收效果显著,而在探究不同联合修复处理对 Cu、Cd 的吸收效果时,植物吸收重金属能力特性和植物生物量需要综合考虑。

表 2 不同联合修复处理对植物生物量和 Cu、Cd 含量
Table 2 Effects of different combined remediations on biomass and contents of Cu and Cd of different plants

处理	地上部生物量 (kg)	地上部 Cu 含量 (mg/kg)	地上部 Cd 含量 (mg/kg)	累积吸收量(mg)	
				Cu	Cd
CK	-	-	-	-	-
MW	20.94 ± 0.57 c	27.02 ± 4.00 d	1.25 ± 0.23 d	566.12 d	26.04 c
MP	45.86 ± 1.25 a	90.28 ± 0.05 c	1.30 ± 0.06 c	4 140.07 b	59.80 b
ME	29.83 ± 1.25 b	198.92 ± 2.18 b	2.65 ± 0.21 b	5 932.25 a	79.32 a
MS	4.50 ± 0.69 d	464.96 ± 2.50 a	13.36 ± 0.53 a	2 090.52 c	59.90 b

注：“-”表示无植物生长。

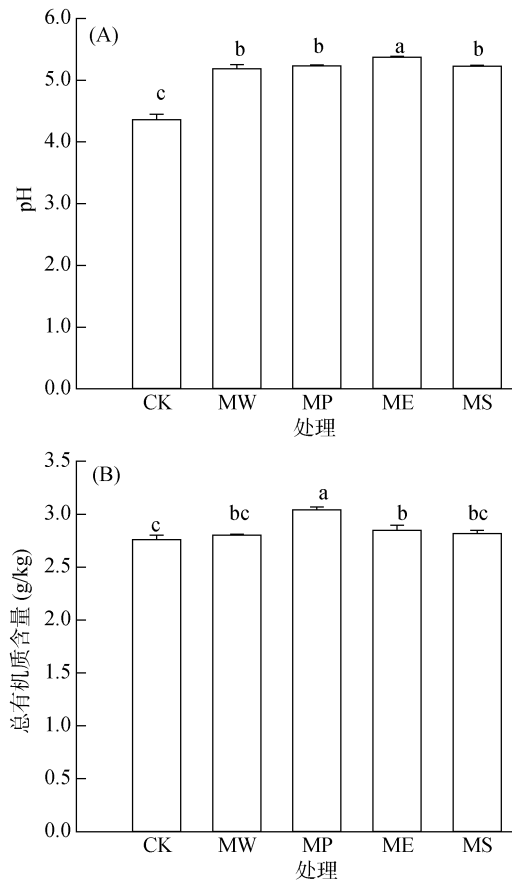
2.3 不同植物与羟基磷灰石联合修复对土壤 pH 影响

如图 1A 所示,施加羟基磷灰石显著提高土壤 pH 至 5.19,此结果与 Cui 等^[7]研究一致。羟基磷灰石原材料偏碱性(pH 为 7.71),加之其溶解作用可有效提高土壤 pH^[6]。羟基磷灰石与植物联合修复对土壤 pH 的提升程度更大,其中海州香薷 (ME) 处理下 pH 可达 5.37,比 CK 处理的 pH 升高了 1 个单位。植物与无机材料的联合修复下土壤 pH 的改变是植物根系分泌物和无机材料交互作用的结果,尽管相比羟基磷灰石提高 pH 程度,不同植物的种植对 pH 的提升空间较小,但其对 pH 的影响是基于根系分泌物对根际环境的主动改变。根系产生的弱有机酸离子、糖类、氨基酸、维生素、无机离子(HCO_3^- 、 OH^- 、 H^+)及活性酶在改变 pH 的同时,为根际微域提供了丰富的碳、氮类物质^[23]。这些化合物为改善

土壤微生物群落提供了良好的能量物质基础。如图 1B 所示,相比海州香薷与伴矿景天,巨菌草根际土壤中总有机碳含量明显升高,意味着植物根际土壤中有利于微生物代谢利用的养分供应增加。

2.4 植物与羟基磷灰石联合修复对土壤微生物群落结构的影响

微生物群落是土壤生物活性的重要指标,且易受环境因子影响,重金属含量高低能够改变微生物群落组成和丰度^[24]。谢学辉等^[24]曾采用 PCR-DGGE 方法研究污染土壤微生物多样性的影响,但由于 PCR-DGGE 仅对特定微生物的优势菌群检测灵敏,因此在应用上具有一定的局限性。磷脂脂肪酸(PLFA)是所有活细胞细胞膜的重要组成部分,而不同的微生物菌群通过各自的生化途径合成的 PLFA 也有所差异。此外,由于 PLFA 在有机体生物量中所占比例保持相对恒定,因此也作为一个至关重要的生物标记



(图中小写字母不同表示不同处理间的差异达 $P < 0.05$ 显著水平)

图 1 不同联合修复处理对植物根际土壤 pH 及有机碳含量的影响

Fig. 1 Effects of different combined remediations on pH and total organic carbon of plant rhizosphere soil

物。磷脂图谱的变化通常与微生物组群丰度变化密切相关,且可以通过参考纯培养学和已知生化合成途径的数据库进行分析。磷脂脂肪酸(PLFA)技术在分析土壤微生物丰度和群落变化上应用广泛,大量的研究采用 PLFA 技术分析微生物群落组成对生物因子的响应^[25],吴建军等^[26]就通过 PLFA 技术研究重金属复合污染对水稻土微生物的生物量和群落组成变化。

为了进一步探讨 Cu、Cd 重金属污染土壤微生物

群落结构对不同植物与羟基磷灰石的联合修复措施的响应,本研究采用磷脂脂肪酸分析法(PLFA)对土壤细菌、真菌和放线菌进行表征(表 3)。数据结果表明,除了 ME 处理组,污染土壤中羟基磷灰石的施加可提高总 PLFA 的含量,其中 MW 和 MP 处理组最为显著,这与阎妹等^[27]研究污染土壤和未污染土壤 PLFA 总量变化结果类似。然而, MW 和 MP 处理在微生物 PLFA 提高的组分上有着明显的差异:巨菌草与羟基磷灰石(MP)的联合修复明显提高了土壤中革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌的 PLFA,而对真菌 PLFA 的作用甚微,因此表现在真菌/细菌(F/B)数值的明显下降;而羟基磷灰石(MW)处理组主要提高了土壤中真菌群落 PLFA,因此即使其细菌 PLFA 有一定的增加,但真菌/细菌(F/B)数值最高,是 MP 处理对应数值的 2 倍。伴矿景天与羟基磷灰石(MS)及海州香薷与羟基磷灰石(ME)的联合修复在一定程度上,也能促进土壤中革兰氏阳性细菌群落的 PLFA 量的提高,引起真菌/细菌(F/B)数值降低,但其效应没有巨菌草处理的作用明显, Belén Hinojosa 等^[28]研究结果也表明污染土壤真菌细菌比值下降。土壤细菌与真菌的 PLFA 总量及细菌/真菌比值是衡量土壤微生物功能的重要指标^[29]。重金属污染土壤单独施加羟基磷灰石显著提高土壤 pH,从而引起有效 Cu、Cd 含量的降低,然而这种无生物体系缓冲的土壤生境会导致土壤真菌化趋势严重,不利于微生物群落多样性的形成(表 3)。植物与羟基磷灰石的联合修复模式有效增加了土壤细菌群落的多样性及生物量,缓解了土壤真菌化趋势的发展。相较于海州香薷和伴矿景天,巨菌草植株高大,根系在土壤分布面积大,因此土壤根际效应更为明显,表现为细菌群落及生物量的提高。Pearson 相关系数显示土壤总有机碳的含量与土壤细菌 PLFA 呈显著相关($r = 0.714, P = 0.03$),说明植物的根系代谢分泌,具有富集土壤细菌微生物群落的潜力。

表 3 不同联合修复处理对土壤微生物 PLFA 的影响

Table 3 Effects of different combined remediations on soil microbial PLFA

处理	总 PLFA (nmol/g 干土)	细菌 (nmol/g 干土)	GP (nmol/g 干土)	GN (nmol/g 干土)	GP/GN	真菌 (nmol/g 干土)	真菌/细菌	放线菌 (nmol/g 干土)
CK	36.27 ± 1.82 b	26.93 ± 1.68 c	19.97 ± 1.15 c	6.55 ± 0.54 b	3.10 ± 0.33 a	5.00 ± 0.40 b	0.18 ± 0.02 b	4.34 ± 0.41 c
MW	45.83 ± 2.67 a	32.20 ± 2.02 ab	23.61 ± 0.93 b	8.59 ± 1.27 ab	2.75 ± 0.35 a	7.66 ± 0.77 a	0.24 ± 0.02 a	5.97 ± 0.17 ab
ME	38.12 ± 2.24 b	29.00 ± 1.22 bc	21.53 ± 0.47 bc	7.47 ± 0.77 b	2.90 ± 0.23 a	4.38 ± 0.35 b	0.15 ± 0.01 bc	4.74 ± 0.68 bc
MP	47.08 ± 3.08 a	36.48 ± 2.19 a	27.40 ± 1.79 a	9.08 ± 0.96 a	3.04 ± 0.36 a	4.10 ± 0.45 b	0.12 ± 0.01 c	6.19 ± 0.51 a
MS	41.81 ± 0.80 ab	32.06 ± 0.29 b	23.83 ± 0.37 ab	8.23 ± 0.09 ab	2.89 ± 0.08 a	4.78 ± 0.52 b	0.15 ± 0.02 bc	4.97 ± 0.48 bc

二维的典型对应分析(CCA)更直接地显示出不同处理组与微生物 PLFA 因子间的相互关系(图 2A)。

典型对应的坐标轴总共解释了微生物群落 89.3% 的变异。单一羟基磷灰石修复的微生物群落与植物和

羟基磷灰石联合修复的微生物群落,以及污染土壤(CK)的微生物群落产生了明显的区分。土壤细菌和真菌群落对重金属污染敏感,与CK呈明显的负相关。添加羟基磷灰石的修复措施与土壤真菌群落呈显著正相关。植物与羟基磷灰石的联合修复可改变土壤微生物群落,特别是巨菌草与羟基磷灰石的联合修复方式,与土壤革兰氏阳性、阴性细菌呈显著正相关,说明在羟基磷灰石修复基础上巨菌草的种植可有效缓解土壤真菌化趋势,而促进细菌群落和生物量的提高,从而丰富土壤生态功能。ABT (Aggregated boosted

tree) 聚类分析结果表明(图 2B),不同的修复措施对土壤微生物群落的影响比例超过 50%,成为主导因子;其次为土壤 pH 及 Cu 的含量及活性,共同对土壤微生物群落影响解释量达 33.13%,而土壤 Cd 的含量及活性对微生物群落影响程度较小。作为能源植物,耐 Cu、Cd 的巨菌草因其地上地下部分巨大的生物量,其用于重金属修复潜力越加受到关注^[30],本研究发现巨菌草对污染土壤微生态体系的恢复效果显著。因此,筛选合适的植物例如巨菌草与羟基磷灰石联合修复重金属,更有利于土壤微生物多样性的构成。

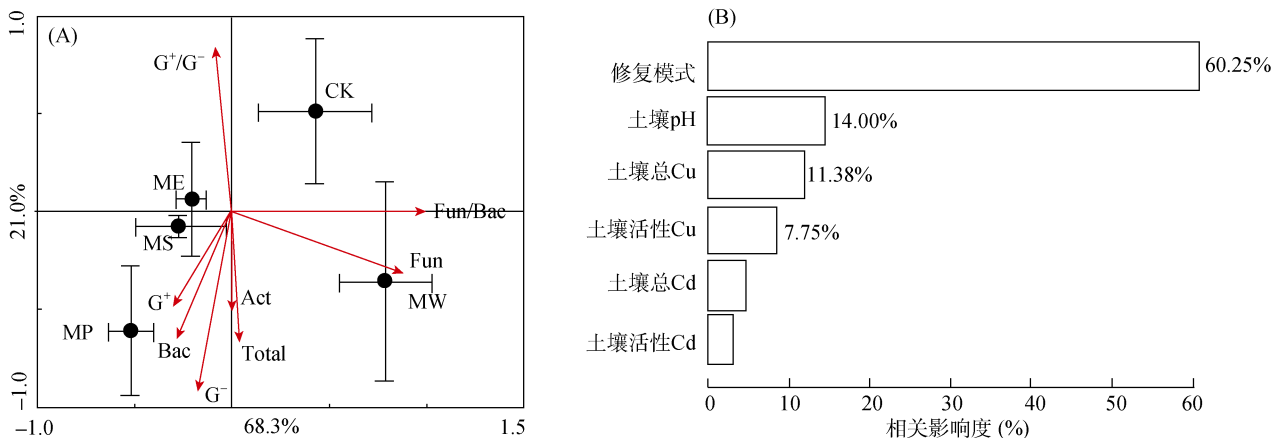


图 2 典型对应分析 PLFA 组分对不同修复措施响应(A)及环境因子对微生物 PLFA 的影响度(B)

Fig. 2 CCA of PLFAs composition response to different remediations (A) and influence of environmental factors on microbe PLFAs (B)

3 结论

针对我国南方 Cu、Cd 等重金属污染区域,土壤施加无机生物材料羟基磷灰石,可显著提高土壤 pH,并降低土壤活性 Cu、活性 Cd 的含量。但无机材料对土壤化学特性的扰动易导致土壤微生物群落结构的失衡,使得真菌生物量显著提升。修复植物巨菌草和海州香薷分别与羟基磷灰石的联合修复表现出较好的对重金属的吸收效果:不仅可降低土壤 Cu、Cd 活性,并可通过植株地上部分的生长吸收总 Cu、Cd,以减少土壤 Cu、Cd 的积累。磷脂脂肪酸分析显示,巨菌草与羟基磷灰石的联合修复方式更有利于土壤微生物特别是细菌群落多样性的形成和微生态体系的恢复。因此,选择并推广合适的环境友好型植物与无机生物材料进行联合修复,可视为改善重金属污染地区土壤微生态环境的有效途径。同时,该研究也还存在一定问题需要继续挖掘,由于本试验为种植一季结果,植物与羟基磷灰石的持续性 Cu、Cd 污染修复效果仍未可知,在今后的研究中,需要开展长期试验,研究不同植物与羟基磷灰石联合修复对土壤 Cu、Cd 污染的长期修复作用。

参考文献:

- [1] Kumpiene J, Lagerkvist A, Maurice C. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments- A review [J]. Waste Management, 2008, 28(1): 215-225
- [2] 周静, 崔红标, 梁家妮, 等. 重金属污染土壤修复技术的选择和面临的问题——以江铜贵冶九牛岗土壤修复示范工程项目为例[J]. 土壤, 2015, 47(2): 283-288
- [3] Leitenmaier B, Kupper H. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4(374): 1-13
- [4] 胡鹏杰, 李柱, 钟道旭, 等. 我国土壤重金属污染植物吸收修复研究进展[J]. 植物生理学报, 2014, 50(5): 577-584
- [5] 崔红标, 梁家妮, 周静, 等. 磷灰石和石灰联合巨菌草对重金属污染土壤的改良修复[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7): 1334-1340
- [6] Chen J H, Wang Y J, Zhou D M, et al. Adsorption and desorption of Cu(II), Zn(II), Pb(II), and Cd(II) on the soils amended with nanoscale hydroxyapatite[J]. Environmental Progress Sustainable Energy, 2010, 29(2): 233-241
- [7] 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 Sediments, 2013, 13(4): 742-752

- [8] 滕应, 骆永明, 李振高. 污染土壤的微生物多样性研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(6): 1 018-1 026
- [9] 鲁如坤. 土壤农业化学分析法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000
- [10] 中国环境保护局. 土壤质量 铜、锌的测定 火焰原子吸收分光光度法(GB/T 17138-1997)[R]. 北京: 中国标准出版社, 1997
- [11] 中国环境保护局. 土壤质量 铅、镉的测定 石墨炉原子吸收分光光度法(GB/T 17141-1997)[R]. 北京: 中国标准出版社, 1997
- [12] White D C, Stair J O, Ringelberg D B. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis[J]. Journal of Industry Microbiology, 1996, 17(3): 185-196
- [13] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37(8): 911-917
- [14] Fronsegard A, Tunlid A, Baath 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(11): 3 605-3 617
- [15] Kourtev P S, Ehrenfeld J G, Haggblom M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil[J]. Ecology, 2002, 83(11): 3 152-3 166
- [16] Raicevic S, Kaludjerovic-Radoicic T, Zouboulis A I. In situ stabilization of toxic metals in polluted soil using phosphates: Theoretical prediction and experimental verification[J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 117(1): 41-53
- [17] 崔红标, 周静, 杜志敏, 等. 磷灰石等改良剂对重金属铜镉污染土壤的田间修复研究[J]. 土壤, 2010, 42 (4): 611-617
- [18] 王晓娟, 王文斌, 杨龙, 等. 重金属镉(Cd)在植物体内的转运途径及其调控机制[J]. 生态学报, 2015, 35(23): 1-9
- [19] 潘澄, 滕应, 骆永明, 等. 紫花苜蓿、海州香薷及伴矿景天对多氯联苯与重金属复合污染土壤的修复作用[J]. 土壤学报, 2012, 49(5): 1 062-1 067
- [20] 苗欣宇, 周启星. 污染土壤植物修复效率影响因素研究进展[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 870-877
- [21] 刘婷婷, 彭程, 王梦, 等. 海州香薷根细胞壁对铜的吸附固定机制研究[J]. 环境科学学报, 2014, 34(2): 514-523
- [22] 姜理英, 杨肖娥, 叶正钱, 等. 海州香薷和紫花香薷对 Cu、Zn 的吸收和积累[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(5): 524-528
- [23] Haichar F E, Santaella C, Heulin T, et al. Root exudates mediated interactions belowground[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 77: 69-80
- [24] 谢学辉, 范凤霞, 袁学武, 等. 德兴铜矿尾矿重金属污染对土壤中微生物多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 624-637
- [25] Dai C C, Chen Y, Wang X X, et al. Effects of intercropping of peanut with the medicinal plant *Atractylodes lancea* on soil microecology and peanut yield in subtropical China[J]. Agroforestry Systems, 2013, 87(2): 417-426
- [26] 吴建军, 蒋艳梅, 吴愉萍, 等. 重金属复合污染对水稻土微生物生物量和群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1 102-1 109
- [27] 阎姝, 潘根兴, 李恋卿. 重金属污染降低水稻土微生物商并改变 PLFA 群落结构——苏南某地污染稻田的案例研究. 生态环境, 2008, 17(5): 1 828-1 832
- [28] Hinojosa M B, Carreira J A, Garcia-Ruiz R, et al. Microbial response to heavy metal-polluted soils[J]. Journal Environment Quality, 2005, 34(5): 1 789-1 800
- [29] Griffiths B S, Philippot L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community[J]. FEMS Microbiology Reviews, 37(2): 112-129
- [30] 徐磊, 周静, 梁家妮, 等. 巨菌草对 Cu、Cd 污染土壤的修复潜力[J]. 生态学报, 2014, 34(18): 5 342-5 348

Effects of Combined Remediation of Hydroxyapatite-Plants on Rhizosphere Microbial Community of Cu/Cd Contaminated Soil

SUN Tingting^{1,3}, XU Lei^{1,3}, ZHOU Jing^{1,2,4}, FAN Jianbo¹, CHEN Yan^{1,2*}

(1 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 Red Soil Ecological Experiment Station, Chinese Academy of Sciences, Yingtan, Jiangxi 335211, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4 Institute of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

Abstract: Via field experiments, the different effects of inorganic biological material hydroxyapatite and the combined remediations of three kind of plants (*Elsholtzia Splendens*, *Pennisetum* sp., *Sedum plumbizincicola*) with hydroxyapatite on the absorption of soil total Cu and Cd, the passivation and absorptive ability for available Cu and Cd derived from Cu and Cd contaminated soils in Guixi was compared. PLFA method was used to study the effects of different remediations on soil microbial community, aiming to assess the response of soil micro-ecological environment to various remediations. The results showed that the application of hydroxyapatite increased soil pH value significantly and passivate available Cu and Cd in soil, while had little influence on total Cu and Cd contents in soil. The combined remediations of plants and hydroxyapatite not only reduced soil available Cu and Cd significantly ($P < 0.05$), but also decreased soil total Cu and Cd contents in plant rhizosphere ($P < 0.05$), mainly due to plant tissues absorption and fixation for metals, particularly the aboveground fractions. The effects of different remediations were significantly different on the composition of soil microbial community, sole hydroxyapatite application was positively correlated with soil fungi community and increased soil fungi biomass, which increased fungi/bacteria ratio, while the combined remediation of plant and hydroxyapatite could alleviate the trend of soil fungi enrichment effectively, the combined remediation of *Pennisetum* sp. and hydroxyapatite increased the biomass and diversity of soil Gram positive and Gram negative bacteria and decreased F/B ratio, thus reduced the risk of soil fungi diseases. In addition, organic matter accumulation caused by different plants root metabolism significantly improved rhizosphere organic C of the combined remediation treatments. ABT analysis indicated that different remediations were most important influential factor on soil microbial community, other factors included soil pH value, the content and availability of Cu. The above results explained the combined remediation of plant and hydroxyapatite on soil micro-ecosystem from the perspective of microbial community composition, thus can provide reliable theory bases for the screening and conducting of combined remediation of plant and inorganic biological materials in Cu and Cd contaminated regions.

Key words: Cu; Cd; *Pennisetum* sp.; *Elsholtzia Splendens*; *Sedum plumbizincicola*; Hydroxyapatite; Microbial community