

玉米幼苗根际土壤微生物活性对芘污染的响应

许超^{1,2}, 夏北成^{1,*}

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

摘要: 用根际袋法土培试验研究了玉米幼苗根际与非根际土壤微生物量碳、微生物熵、代谢熵和土壤酶活性对不同芘污染水平(50、200、800 mg·kg⁻¹, 记为 T1、T2、T3) 的响应差异。结果表明, 较低浓度芘可适当的刺激玉米幼苗的生长, 而较高浓度芘则抑制幼苗生长, 其抑制作用随芘处理浓度的提高而增强; 芘对玉米根系的影响要大于对茎叶的影响。玉米幼苗能够明显促进土壤中芘的去除。根际和非根际土壤中芘的去除率分别为 56.67%—76.18% 和 32.64%—70.44%, 根际土壤中芘的平均去除率比非根际土壤高 16.06%。同处理中根际土壤芘含量显著低于非根际土壤, 随着芘处理浓度的提高其差异更加显著。根际土壤微生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶活性、脱氢酶活性和磷酸酶活性均高于非根际土壤, 代谢熵低于非根际土壤, 且其差异随芘处理浓度的提高而增大。在不同芘污染水平下, 微生物量碳、微生物熵和脱氢酶活性根际和非根际土壤为 T1 > T2 > T3, 代谢熵为 T3 > T2 > T1; 多酚氧化酶活性根际土壤为 T2 > T1 > T3, 非根际土壤为 T1 > T2 > T3; 磷酸酶活性根际土壤为 T3 > T1 > T2, 非根际土壤为 T1 > T2 > T3。土壤中残余芘含量与土壤微生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶、脱氢酶和磷酸酶活性呈显著负相关, 与代谢熵呈显著正相关。

关键词: 芘; 根际; 微生物活性; 玉米

Response of microbial activity in the rhizosphere of maize seedlings (*Zea mays* L.) to pyrene contamination

XU Chao^{1,2}, XIA Beicheng^{1,*}

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 soil-cultivating test, with rhizobag technique, was used to quantify the responses of microbial biomass carbon and quotient, metabolic quotient, and soil enzyme activity in rhizosphere and non-rhizosphere soil under three concentration levels of pyrene (50, 200, and 800 mg·kg⁻¹, denoted by T1, T2, and T3, respectively) after 45 days phytoremediation by maize seedlings (*Zea mays* L.). The growth of maize seedlings was slightly stimulated at lower pyrene concentration, while inhibited at higher pyrene concentration, and the effect increased with initial pyrene concentration. In addition, the effect of pyrene on maize root was more obvious than that on shoot. Maize seedlings significantly promoted pyrene dissipation in the soil. During the experimental period, 56.67%—76.18% and 32.64%—70.44% of spiked pyrene disappeared from the rhizosphere and non-rhizosphere soils respectively. The average removal rate of pyrene in rhizosphere soils was 16.06% higher than that in non-rhizosphere soils. In the same treatment, the concentration of pyrene in rhizosphere was significantly lower than that in non-rhizosphere, but the removal rate was on the contrary, and their differences were positively affected by increasing initial pyrene concentration in soil. The microbial biomass carbon and quotient, polyphenol oxidase, dehydrogenase, and phosphatase activities were higher in rhizosphere than those in non-rhizosphere. The metabolic quotients were lower in rhizosphere than that in non-rhizosphere and the corresponding differences increased with increasing pyrene concentration in soil. Under different concentrations of pyrene, the microbial biomass carbons and quotients and dehydrogenase activities in rhizosphere and non-rhizosphere were T1 > T2 > T3, while the metabolic quotients were T3 > T2

基金项目: 广东省自然科学基金团队资助项目(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

收稿日期: 2009-01-11; **修订日期:** 2009-04-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xiabch@mail.sysu.edu.cn

> T1. The polyphenol oxidase activities were $T2 > T1 > T3$ and $T1 > T2 > T3$ in rhizosphere and non-rhizosphere, respectively. The phosphatase activities were $T3 > T1 > T2$ and $T1 > T2 > T3$ in rhizosphere and non-rhizosphere, respectively. Significantly negative correlations were found between pyrene concentrations and the soil microbial biomass carbon and quotient, polyphenol oxidase, dehydrogenase, and phosphatase activity. There were significantly positive correlations between pyrene concentrations and the metabolic quotient.

Key Words: pyrene; rhizosphere; microbial activity; maize (*Z. mays* L.)

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是一类广泛分布于环境中的持久性有机污染物,有强烈的“三致”毒性,严重影响人类健康和生态环境,其中 16 种被美国环保署^[1]和欧盟^[2]列为优先控制的有机污染物。环境中的多环芳烃主要来源于化石燃料的不完全燃烧^[3],并且不断地被排放到环境中去。土壤是多环芳烃的储藏库,环境中 90% 以上多环芳烃都存在于土壤中^[2]。因此 PAHs 污染土壤及其修复已成为国内外共同关注的一个前沿热点问题之一^[4-5]。

植物根际修复具有经济、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。植物不仅能从环境中直接吸收、积累、降解多环芳烃,而且通过根际效应促进土壤微生物对多环芳烃的降解,微生物在根际土壤和非根际土壤中的差别很大,微生物在数量和活动上的增长,是根际去除 PAHs 的主要作用之一^[6-15]。

在植物修复过程中,酶对土壤污染物的修复作用优势明显,其主要机理是微生物源酶的分解转化土壤中的有机污染物成为简单的无机物,以达到净化土壤的目的^[16]。植物的存在促进了生物化学反应中酶的能力。土壤微生物量碳、微生物熵和代谢熵是反映土壤质量与土壤退化的重要微生物学指标,其相应变化能反映土壤环境的变化^[17-18]。目前,土壤酶活性在有机污染物植物根际修复过程中的作用多集中于多酚氧化酶的研究^[19-21],其他土壤酶活性对多环芳烃污染的响应及土壤微生物熵及代谢熵对多环芳烃污染的响应的报道较少。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研究一直是土壤和环境工作者所关注的内容。

本研究以修复 PAHs 效果较好的玉米^[22-24]为供试植物,以茚为 PAHs 的典型代表,研究根际修复过程中,微生物生物量碳、微生物活性、酶活性对不同浓度茚的响应规律,以期揭示表征茚污染土壤根际修复过程的敏感土壤生态参数,为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—20cm),为潜育型水稻土(铁聚水耕人为土),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 $17.38\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, pH 为 4.63,全氮含量为 $1.07\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、有效磷含量为 $137.7\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、速效钾含量为 $80.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,未检测到茚。土壤风干后过 2mm 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。供试药品茚(Pyrene,纯度 > 98%),为 Aldrich 公司产品。试验用盆为 16cm × 15cm 的塑料盆钵。

1.2 试验方法

采用温室土培试验,通过根际袋采集不同处理的根际与非根际土壤。取少量上述过 2mm 筛土壤均匀加入茚的丙酮溶液,待丙酮挥发后,用未污染土不断稀释,多次搅拌后过 2mm 筛、混匀,制得初始 4 个不同茚污染水平土壤, $0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (T0)、 $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (T1)、 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (T2)、 $800\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (T3)的试验土壤。各处理均拌入氮 $120\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、磷 $40\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 和钾 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{K}_2\text{SO}_4$ 作底肥,每个处理重复 3 次。每盆共装土 500g,其中 200g 装在 300 目的尼龙网袋中,尼龙网袋放在盆的中央,袋周围及底部为相同处理的 300g 土,并保持袋内外土壤高度相同,60% 田间持水量于温室中平衡 5d 使用。玉米浸种后,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播于尼龙根际袋中,每袋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。试验期间,土壤水分通过每2d称重维持在田间持水量的60%^[24],每2d随机交换盆钵在温室中的位置。播种日记为0d,玉米生长45d后收获。玉米根和茎叶采集后,用蒸馏水充分淋洗,再用滤纸吸干表面水分,70℃烘箱中烘48h后称重、测定生物量。玉米收获后分别采集不同处理的根际土和非根际土,尼龙网袋内土壤视为根际土,袋外离尼龙网袋1cm以外的土壤视为非根际土,非根际土取样深度与根袋内土壤相同。

充分混匀采集土壤,装入封口袋,放置于低温冰箱中待分析。部分土壤样品冷冻干燥后,过1mm筛后保存于-20℃低温冰箱中以供分析用,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过1mm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^[25]的方法略作改进。取2g上述制备的土壤样品于25ml玻璃离心管中,加入10ml二氯甲烷,盖紧后超声萃取1h;恒温振荡30min,以4000 r min⁻¹离心10min;取2ml上清液过1g硅胶柱净化,并用5ml 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2ml,过0.45μm孔径滤膜,GC-MS(TRACE GC ULTRA-DSQ)以外标定量法分析。色谱条件为:30m×0.25mm(内径直径)×0.25μm(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1min,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15min。质谱条件为:EI电子源70eV,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,土壤样品茚的回收率为96.9%(n=5, RSD<3.85%)。

微生物生物量碳(C_{mic})采用氯仿熏蒸-0.5mol L⁻¹K₂SO₄提取^[26],采用总有机碳分析仪(TOC-V_{CSH})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-1mol L⁻¹NaOH碱液吸收法测定^[26];微生物熵(C_{mic}/C_{org})为微生物量碳与总有机碳的比值,土壤微生物代谢熵(qCO_2)即土壤微生物基础呼吸与土壤微生物生物量之间的比值。

多酚氧化酶采用邻苯三酚比色法测定^[27],脱氢酶采用TTC还原法测定^[28],过氧化氢酶采用KMnO₄滴定法^[28],蔗糖酶活性以3,5-二硝基水杨酸比色法测定^[28],脲酶采用靛酚蓝比色法测定^[28],磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法测定^[28]。

土壤pH值(水土比2.5:1)用pH计测定,有机质水合热重铬酸钾氧化-比色法测定,全氮用半微量凯氏法测定^[26]。

1.4 数据分析

数据采用SPSS13.0进行统计分析,新复极差法(Duncan's)作多重比较和差异显著性检验。盆栽试验中茚的去除率(R)为: $R = (C_0 - C_t) \times 100 / C_0$, C_0 代表土壤茚最初的添加浓度, C_t 表示试验结束后土壤中茚的浓度。

2 结果

2.1 不同浓度茚处理下玉米的生物量

不同浓度条件下,玉米茎叶和根的生物量(干重)都受到茚的影响(图1),但是这种影响的程度随着茚处理浓度不同而不同,茎叶和根对不同茚处理浓度的响应不同。与T0处理(对照)相比,T1处理玉米根的生物量有所降低、茎叶生物量有所增加,但均无显著差异($P>0.05$);T2处理根生物量显著降低($P<0.05$),茎叶生物量有一定程度的降低、但差异不显著($P>0.05$);T3处理根生物量和茎叶生物量均显著降低($P<0.05$)(图1)。由此可知,低浓度茚处理时玉米的生长没有受到影响,较低浓度茚可适当的刺激玉米的生长;茚处理浓度超过一定范围时,茚处理抑制了玉米的生长,并且抑制作用随茚处理浓度的提高而增强;茚对玉米根系的影响要大于对茎叶的影响。

2.2 土壤中可提取态茚含量和去除率

种植玉米45d后,根际和非根际土壤茚的含量变化趋势基本一致,即随着初始浓度增加,土壤茚含量增

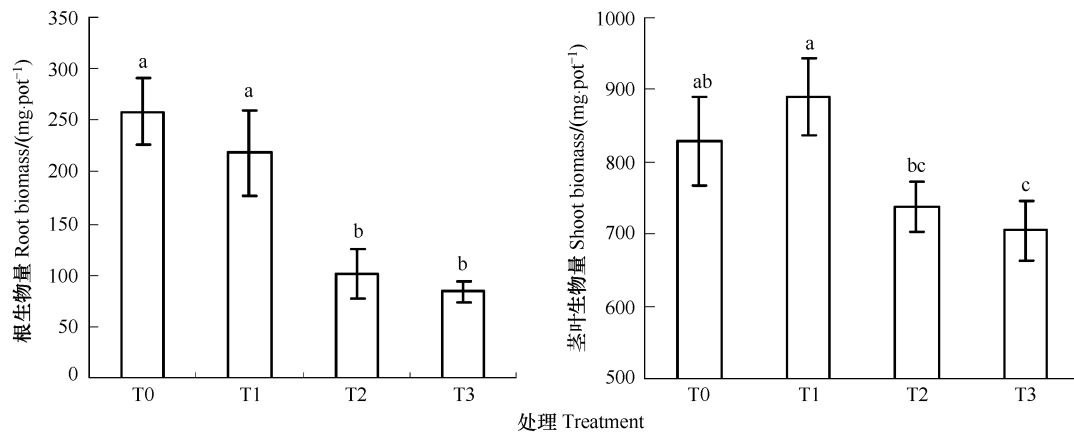


图1 不同浓度芘处理土壤中玉米的生物量

Fig. 1 Biomass of maize growing in the soil contaminated with different contents of pyrene

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

大。T1、T2 和 T3 处理根际和非根际土壤芘含量占初始芘添加量的比率分别为 23.82%、29.56%、32.46%、50.97%、43.43%、67.36% (图 2)。土壤中芘的去除率随初始浓度增大而降低,不同浓度处理根际土壤中芘的去除率分别为 76.18%、67.54%、56.67%,平均为 66.77%;非根际土壤中芘的去除率分别为 70.44%、49.03%、32.64%,平均为 50.71% (图 2)。根际土壤中芘的去除率平均比非根际土壤高 16.06%。不同浓度处理根际和非根际土壤芘含量和芘去除率的差异均达到显著水平 ($P < 0.05$) (图 2)。以上结果表明,植物根系及其根系分泌物营造的根际环境加速促进了芘在土壤中的降解。

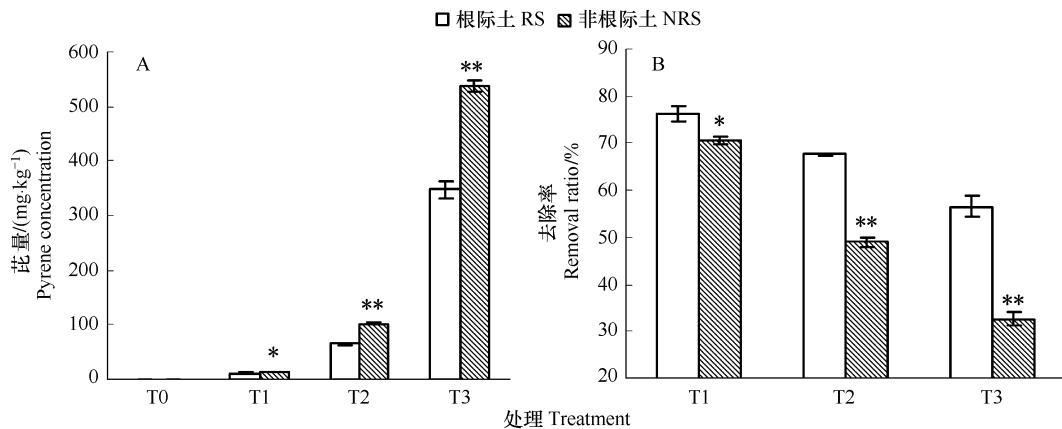


图2 土壤芘含量(A)和芘的去除率(B)

Fig. 2 Content (A) and removal ratio of pyrene (B) in soil

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

2.3 土壤微生物生物量碳、微生物熵和代谢熵

根际和非根际土壤微生物生物量碳和微生物熵随芘处理浓度的增大呈现先升高后降低的变化趋势,T1 处理下最大 (表 1)。T1 处理根际和非根际土壤微生物生物量碳和微生物熵均显著高于 T0 和 T3 处理土壤,T2 处理根际和非根际土壤微生物熵均显著高于 T0 处理土壤 ($P < 0.05$)。根际和非根际土壤微生物代谢熵随芘处理浓度的增大呈逐渐增大的变化趋势 (表 1)。与 T0 处理 (对照) 相比,根际土壤的 $q\text{CO}_2$ 分别上升了 12.5%、59.4% 和 150%,非根际土壤的 $q\text{CO}_2$ 分别上升了 15.2%、72.7% 和 209%。上述情况说明,在相对高浓度的芘污染下,土壤微生物群落处于胁迫状态。T3 处理根际和非根际土壤的 $q\text{CO}_2$ 均显著高于 T0、T1 和 T2 处理土壤 ($P < 0.05$),T2 处理根际和非根际土壤 $q\text{CO}_2$ 均显著高于 T0 和 T1 处理土壤 ($P < 0.05$)。

各浓度芘处理下根际土壤微生物量碳和微生物熵均高于非根际土壤,但差异不显著($P > 0.05$) (表 1)。根际和非根际土壤代谢熵的差异在 T1 处理时较小,随着处理浓度的增大其差异越大,其中 T3 处理下代谢熵的差异在 $P < 0.05$ 水平显著(表 1)。

表 1 不同芘污染水平下土壤微生物量碳、微生物熵和代谢熵

Table 1 Microbial biomass C (C_{mic}), microbial quotient and metabolic quotient in soil contaminated with different contents of pyrene

处理 Treatment	微生物量碳 Microbial biomass C/ ($\mu\text{g g}^{-1}$)		微生物熵 Microbial quotient/%		代谢熵 Metabolic quotient/h $^{-1}$	
	根际土 RS	非根际土 NRS	根际土 RS	非根际土 NRS	根际土 RS	非根际土 NRS
T0	281.1 $\pm$ 13.8	245.7 $\pm$ 13.8	3.163 $\pm$ 0.156	2.788 $\pm$ 0.156	0.032 $\pm$ 0.002	0.033 $\pm$ 0.002
T1	339.7 $\pm$ 15.7	320.2 $\pm$ 38.0	4.695 $\pm$ 0.359	4.339 $\pm$ 0.515	0.036 $\pm$ 0.003	0.038 $\pm$ 0.005
T2	318.3 $\pm$ 16.1	275.2 $\pm$ 21.5	4.448 $\pm$ 0.225	4.113 $\pm$ 0.322	0.051 $\pm$ 0.003	0.057 $\pm$ 0.005
T3	289.0 $\pm$ 19.9	226.1 $\pm$ 9.1	3.892 $\pm$ 0.267	3.171 $\pm$ 0.127	0.080 $\pm$ 0.006	0.102 $\pm$ 0.004 *

* 表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

2.4 土壤酶活性

随着芘处理浓度的增大,根际土壤多酚氧化酶活性和脲酶活性呈现先升高后降低的变化趋势,脱氢酶活性呈现降低的趋势,过氧化氢酶活性和蔗糖酶活性呈现升高的趋势,磷酸酶活性呈现先降低后升高的趋势;非根际土壤多酚氧化酶活性、过氧化氢酶活性、蔗糖酶活性和脲酶活性呈现先升高后降低的变化趋势,脱氢酶活性和磷酸酶活性呈现降低的趋势(图 3)。

T1、T2、T3 处理根际和非根际土壤多酚氧化酶活性、过氧化氢酶活性、蔗糖酶活性和脲酶活性均显著高于 T0(对照)处理土壤($P < 0.05$),脱氢酶活性显著低于 T0 处理土壤($P < 0.05$);T1、T2、T3 处理根际土壤磷酸酶活性均低于 T0 处理,T1、T2、T3 处理非根际土壤磷酸酶活性显著低于 T0 处理($P < 0.05$)(图 3)。由此说明试验设置芘处理浓度对土壤中多酚氧化酶活性、过氧化氢酶活性、蔗糖酶活性和脲酶活性有一定的激活作用,而对脱氢酶活性和磷酸酶活性有一定的抑制作用、且芘处理浓度越高对脱氢酶活性的抑制作用越明显。

在不同芘污染水平下根际和非根际土壤酶活性有明显差异。根际土壤多酚氧化酶活性表现为 T2 > T1 > T3、且 T1 和 T2 显著高于 T3($P < 0.05$),脱氢酶活性表现为 T1 > T2 > T3,过氧化氢酶活性表现为 T3 > T2 > T1、且 T1 显著低于 T2 和 T3($P < 0.05$),蔗糖酶活性表现为 T3 > T2 > T1,脲酶活性表现为 T2 > T3 > T1、且 T1 显著低于 T2($P < 0.05$),磷酸酶活性表现为 T3 > T1 > T2。非根际土壤多酚氧化酶活性表现为 T1 > T2 > T3、且 T1 和 T2 与 T3 间差异显著($P < 0.05$),脱氢酶活性表现为 T1 > T2 > T3、且 T1 显著高于 T3($P < 0.05$),过氧化氢酶活性表现为 T1 > T2 > T3,蔗糖酶活性表现为 T2 > T1 > T3,脲酶活性表现为 T2 > T1 > T3、且 T1 和 T2 显著高于 T3($P < 0.05$),磷酸酶活性表现为 T1 > T2 > T3、且 T1 和 T2 显著高于 T3($P < 0.05$)。

T1 处理下根际土壤脱氢酶和磷酸酶活性显著高于非根际土壤,T2 处理下根际土壤脱氢酶和脲酶活性显著高于非根际土壤,T3 处理下根际土壤多酚氧化酶活性、脱氢酶活性、过氧化氢酶活性、脲酶活性和磷酸酶活性显著高于非根际土壤(图 3)。从整体上看,芘各浓度处理根际土壤多酚氧化酶活性、脱氢酶活性、过氧化氢酶活性、蔗糖酶活性、脲酶活性和磷酸酶活性均大于非根际土壤,且随着处理浓度的增大差异基本上呈现增大的趋势(图 3)。

2.5 土壤芘含量与各微生物参数间的相关性

土壤芘含量与各微生物参数间的相关性分析结果表明,土壤芘含量与微生物代谢熵呈显著正相关($P < 0.01$),与土壤微生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶活性、脱氢酶活性及磷酸酶活性呈显著负相关($P < 0.05$)(表 2)。土壤微生物生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶活性、脱氢酶活性和磷酸酶活性越高,土壤中芘含量越低;微生物代谢熵越大,芘含量越高。

2.6 土壤芘含量与各微生物学参数的多元回归分析

为进一步揭示微生物量碳、微生物熵、代谢熵及土壤酶(多酚氧化酶、脱氢酶、过氧化氢酶、蔗糖酶、脲酶

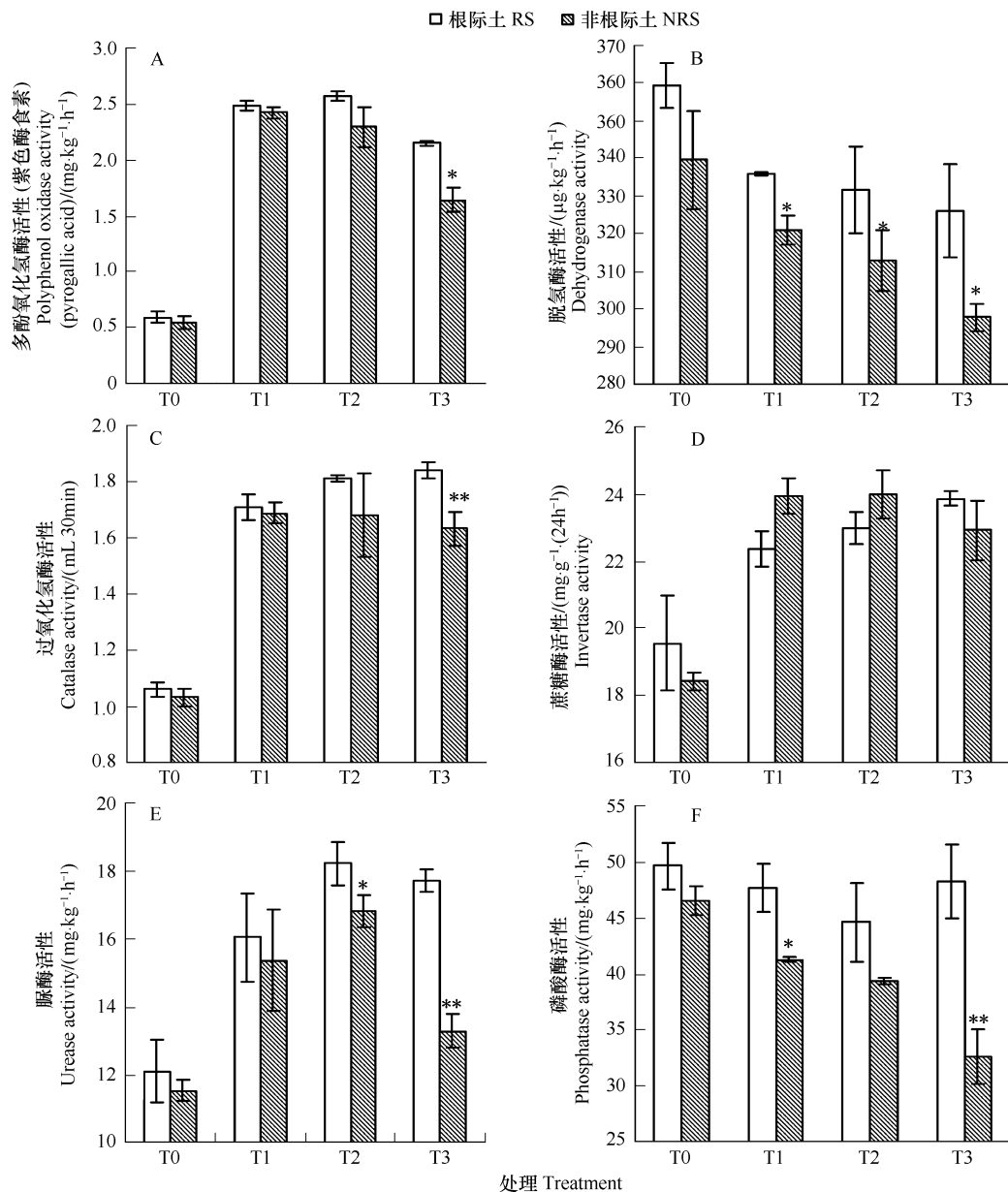


图3 不同浓度茚处理土壤多酚氧化酶(A)、脱氢酶(B)、过氧化氢酶(C)、蔗糖酶(D)、脲酶(E)、磷酸酶活性(F)

Fig.3 Polyphenol oxidase activity (A), dehydrogenase activity (B), catalase activity (C), invertase activity (D), urease activity (E), and phosphatase activity (F) in the soil contaminated with different contents of pyrene

* 和 ** 表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著

和磷酸酶)活性对茚污染的反应,根据实测数据,对土壤茚含量与上述土壤环境生态因子关系进行了统计分析。以上述土壤环境生态因子为自变量,土壤茚含量为因变量,进行多元线性回归,采用逐步回归的方法,设定进入方程变量的显著水平为0.05,从方程中剔除变量的显著水平为0.10,所建模型见表3。回归方程的 F 检验值在 $P < 0.01$ 水平显著,充分反映了所建模型的可靠性;进入回归方程的自变量偏相关系数的 T 值检验也均达到显著水平($P < 0.05$),表明各自变量对因变量均存在显著的影响。因此,可将其作为表征茚污染根际修复中环境质量友好演变过程敏感微生物学指标的筛选依据。

土壤微生物量碳、微生物熵和代谢熵是反映土壤质量与土壤退化的重要微生物学指标,其相应变化能反映土壤环境的变化^[17-18];土壤代谢熵是微生物活性的重要指标之一,即用来定量表征单位生物量的微生物在单位时间里代谢能力的大小,土壤微生物生物量碳、微生物熵和代谢熵显著地影响土壤中茚的降解残留,并呈

现极显著相关($P < 0.01$)。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^[12, 21],多酚氧化酶能够参与芳香族类化合物的分解转化过程^[28]并能直接降解多环芳烃^[19-21, 29],显著地影响土壤中芘的降解残留,并呈现极显著相关($P < 0.01$)。因此,可应用上述 4 指标评价芘污染土壤的根际修复。

表 2 土壤芘含量与土壤微生物参数的相关关系

Table 2 The linear regression analysis between content of pyrene and soil microbial parameters

微生物参数 Microbial parameters	<i>a</i>	<i>b</i>	相关系数 Correlation coefficient <i>R</i>
微生物生物量碳 Microbial biomass C	1399.969	-4.141	0.830 **
微生物熵 Microbial quotient, C_{mic}/C_{org}	1564.982	-337.031	0.894 **
代谢熵 Metabolic quotient, qCO_2	-317.042	8179.055	0.983 **
多酚氧化酶活性 Polyphenol oxidase activity	1455.775	-565.209	0.914 **
脱氢酶活性 Dehydrogenase activity	1708.895	-4.765	0.470 *
过氧化氢酶活性 Catalase activity	586.048	-235.134	0.113
蔗糖酶活性 Invertase activity	280.215	-4.296	0.018
脲酶活性 Urease activity	937.393	-46.607	0.426
磷酸酶活性 Phosphatase activity	883.881	-16.649	0.484 *

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

表 3 芘含量与土壤微生物参数的逐步线性回归模型

Table 3 Stepwise regression model for predicting content of pyrene in soil based on the soil microbial parameters

回归模型 Stepwise regression model	R^2	<i>F</i>	各变量偏回归系数 <i>T</i> 值及 <i>R</i> <i>T</i> value and <i>R</i> of the partial regression coefficient of variables		
			变量 Variable	<i>T</i>	<i>R</i>
$Y = -118.055 + 2.259X_1 - 113.568X_2 + 7371.477X_3 - 154.519X_4$	0.994	519.932 **	X_1	5.086 **	0.816
			X_2	2.782 *	-0.611
			X_3	13.646 **	0.967
			X_4	5.283 **	-0.826

注:*, ** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著 *Y*: 土壤可提取态芘含量; X_1 : 微生物量碳 C_{mic} ; X_2 : 微生物熵 C_{mic}/C_{org} ; X_3 : 代谢熵; X_4 : 多酚氧化酶活性

3 讨论

许多研究已经证明植物的存在能够促进土壤中多环芳烃的降解。Liste 等^[30]应用 9 种植物进行芘污染土壤的修复实验,结果表明种植 9 种植物的土壤中芘的降解率均高于无植物对照土壤。Fan 等^[14]用紫花苜蓿进行芘污染土壤的修复试验,结果表明芘的平均去除率根际土壤比非根际土壤高 6%。本研究表明玉米幼苗能明显地促进污染土壤中芘的去除。一般来说,植物根系对有机污染物的吸收强度不如对无机污染物的吸收强度大。Gao 等^[31]研究指出植物吸收对多环芳烃菲和芘去除的贡献率小于 0.54%。可见植物吸收和积累并不是植物促进土壤中多环芳烃去除的主要原因,与此相比多环芳烃的降解主要是植物的存在促进了根际微生物的降解作用^[32],但是这种相互作用机理还有待进一步深入研究。

玉米幼苗表现出具有强化修复芘污染土壤的作用,并且根际土壤中芘的去除效果显著高于非根际土壤。根际是受植物根系影响的根-土界面的一个微区,也是植物-土壤-微生物与环境条件相互作用的场所,这个区域与无根系土体的区别是根系的影响。根际环境具有较高水平的微生物活性、多样性与生物量,这对于提高土壤中污染物的降解速率具有重要作用,因为根际微生物具有降解多种有机污染物的能力^[33]。根际环境中的根系分泌物能够促进降解菌增长进而增强对有机污染物的降解。Yoshitomi 等^[22]通过模拟根际环境,研究根系分泌物对根际微生物降解¹⁴C 标记芘的影响,发现玉米根系分泌物通过促进根际微生物群落的生长而促进了芘的矿化。Rentz 等^[34]也证明添加根系提取物和分泌物可以促进苯并[a]芘的降解。所以,植物与微生物联合作用将更有利于提高多环芳烃污染土壤修复的效果。本试验中,根际土壤中芘的去除率比非根际土壤高,可能是植物与土壤微生物联合作用的结果。

植物能够通过根际微生物数量而促进多环芳烃的降解^[12, 21]。本试验表明,不同茚处理浓度下根际土壤微生物生物量碳高于非根际土壤(表1)。土壤茚含量与土壤微生物生物量显著负相关,微生物生物量越高土壤茚含量越低,即茚的去除率越高。种植玉米增加了茚污染土壤微生物群体数量,促进了茚的降解,这是根际土壤中茚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变化的敏感生理指标。高 C_{mic}/C_{org} 比值表明微生物利用有机质的效率高^[35],也表明土壤中活性有机质高,土壤有机质更易发生改变^[36]。土壤微生物代谢熵(即土壤微生物基础呼吸与土壤微生物量之间的比值, 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^[37]。Ding 等^[38]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。本研究结果表明,茚各浓度处理下根际土壤微生物熵均高于非根际土壤(表1)。由此说明,茚各浓度处理下根际土壤微生物利用有机质的效率高,低浓度茚处理下微生物利用有机质的效率最高。根际和非根际土壤的代谢熵 qCO_2 随着茚处理浓度的提高逐渐显著增大,根际土壤 qCO_2 低于非根际土壤, T3 ($800mg \cdot kg^{-1}$) 处理下其差异在 $P < 0.05$ 水平显著(表2)。土壤茚含量与微生物熵显著负相关,与微生物代谢熵呈正相关。由此表明,种植玉米提高了土壤微生物利用有机质的效率、促进了茚污染土壤生态系统的演替过程,形成了更有利的土壤环境条件,这也是根际土壤中茚的去除率高于非根际土壤的一个重要原因。

酶是土壤的重要组成部分,是土壤中生物化学反应的直接参与者,其活性高低可反映土壤营养物质转化、能量代谢、污染物降解等能力的强弱。多酚氧化酶和脱氢酶是土壤中重要的氧化还原酶,多酚氧化酶能够参与芳香族类化合物的分解转化过程^[28],脱氢酶是典型胞内酶,能催化有机物质的脱氢反应,在环状有机化合物的分解转化过程中起到重要作用,是对土壤解毒能力的定量表征^[27]。土壤中多酚氧化酶能直接降解多环芳烃^[19-21, 29]。Fan 等^[14]研究表明,苜蓿(*Medicago sativa*)对茚污染土壤的修复作用中根际土壤中茚残留浓度低于非根际土壤,而脱氢酶活性高于非根际土壤,且脱氢酶活性与茚降解率显著正相关。本研究结果表明,土壤茚含量与多酚氧化酶和脱氢酶活性显著负相关($P < 0.05$)(表2)。同处理中根际土壤多酚氧化酶活性和脱氢酶活性均高于非根际土壤,而根际土壤茚含量显著低于非根际土壤,种植玉米加快了土壤中茚的降解。这说明种植玉米提高了土壤中多酚氧化酶和脱氢酶的活性,形成了更有利的可降解茚的根际修复环境,证明多酚氧化酶和脱氢酶参与了土壤中茚的分解转化过程,其活性的提高加速了茚的降解,从而提高了茚污染土壤的生物修复能力。土壤脲酶和磷酸酶同样是表征土壤微生物活性的生物学指标,可反映污染物降解的强弱^[39]。本研究结果表明,土壤茚含量与磷酸酶活性呈显著负相关($P < 0.05$),与脲酶活性呈负相关、但相关性不显著($P > 0.05$)。不同浓度处理下根际土壤茚含量显著低于非根际土壤,脲酶和磷酸酶活性均高于非根际土壤,由此可见,种植玉米提高了土壤脲酶和磷酸酶活性,促进了茚的降解。在玉米修复茚污染的过程中,其生长会发生变化,酶活性也可能随之发生变化,本研究只反映了特定生长阶段酶活性,其长期的变化规律有待进一步研究。

4 结论

(1)多环芳烃茚对玉米幼苗的生长具有抑制作用。低浓度茚对玉米幼苗生物量的影响较小,高浓度茚严重抑制玉米幼苗生物量的积累。

(2)玉米幼苗具有强化修复茚污染土壤的作用,玉米幼苗能够显著地促进土壤中茚的去除。玉米幼苗根际土壤茚含量显著低于非根际土壤,茚去除率显著高于非根际土壤,且随着茚处理浓度的提高其差异更加明显。

(3)土壤茚含量与土壤微生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶活性、脱氢酶活性和磷酸酶活性显著负相关,与微生物代谢熵显著正相关。根际土壤微生物量碳、微生物熵、多酚氧化酶活性、脱氢酶活性和磷酸酶活性均高于非根际土壤,代谢熵低于非根际土壤,且其差异随茚处理浓度的提高而增大。微生物量碳、微生物熵、代

谢楠和多酚氧化酶活性可作为表征芘污染根际修复中环境质量友好演变过程的敏感微生物学指标。

(4) 种植玉米可以通过根际效应增加土壤微生物生物量碳、提高微生物活性和土壤酶活性来促进土壤微生物对芘的降解。

References:

- [1] Yan J, Wang L, Peter P F, Yu H T. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutation Research*, 2004, 557(1): 99-108.
- [2] Wild S R, Jones K C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment; a preliminary source inventory and budget. *Environment Pollution*, 1995, 88(1): 91-108.
- [3] Maila M P, Cloete T E. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2002, 50(2), 107-113.
- [4] Simonich S L, Hites R A. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 1994, 28(5): 939-943.
- [5] Reilley K A, Bank M K, Schwab A P. Disipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, 1996, 25(2): 212-219.
- [6] Banks M K, Lee E, Schwab A P. Evaluation of dissipation of mechanisms for benzo[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue. *Journal of Environmental Quality*, 1999, 28(1): 294-298.
- [7] Krutz L J, Beyrouy C A, Gentry T J, Wolf D C, Reynolds C M. Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 41 (5): 359-364.
- [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. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(1): 207-216.
- [9] Miya R K, Firestone M K. Enhanced phenanthrene biodegradation in soils by slender oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality*, 2001, 30(6): 1911-1918.
- [10] Joner E J, Jonansen A, Loibner A P, Cruz M A D, Szolar O H J, Portal J M, Leyval C. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35 (13): 2773-2777.
- [11] Johnson D L, Anderson D R, McGrath S P. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37(12): 2334-2336.
- [12] Li H, Luo Y M, Song J, Wu L H, Christie P. Degradation of benzo[a]pyrene in an experimentally contaminated paddy soil by vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*). *Environmental Geochemistry and Health*, 2006, 28(1/2): 183-188.
- [13] Lee S H, Lee W S, Lee C H, Kim J G. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153(1/2): 892-898.
- [14] Fan S X, Li P J, Gong Z Q, Ren W X, He Na. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*, 2008, 71(8): 1593-1598.
- [15] Pan S W, Wei S Q, Yuan X, Cao S. Mechanisms of the removal and remediation of phenanthrene and pyrene in soil by dwarf lilyturf. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 (8): 3654-3661.
- [16] Chen Y C. Engineers of bioremediation to polluted environment. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 137-165.
- [17] Giller K E, Witter E, McGrath S P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils; a review. *Soil Biology & Biochemistry*, 1998, 30(10/11): 1389-1414.
- [18] Zogg G P, Zak D R, Ringleberg D B, White D C, MacDonald N W, Pregitzer K S. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Science Society American Journal*, 1997, 61(2): 475-481.
- [19] Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, Song J, Wu L H, Xing W Q, Li Z G. Dynamics in benzo[a]pyrene concentrations in soil as influenced by ryegrass plants. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41 (3): 348-352.
- [20] Liu S L, Luo Y M, Cao Z H, Wu L H, Ding K Q, Christie P. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*, 2004, 26 (2): 285-293.
- [21] Liu S L, Luo Y M, Ding K Q, Li H, Wu L H. Rhizosphere remediation and its mechanism of benzo[a]pyrene-contaminated soil by growing ryegrass. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26 (2): 526-532.
- [22] Yoshitomi K J, Shann J R. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on ¹⁴C-pyrene mineralization. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001,

- 33(12/13): 1769-1776.
- [23] Xu S Y, Chen Y X, Wu W X, Wang K X, Lin Q, Liang X Q. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Science of the Total Environment*, 2006, 363: 206-215.
- [24] Xu S Y, Chen Y X, Lin Q, Wu W Q, Wang D, Xue S G, Shen G F. Remediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil by growing maize (*Zea mays* L.). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(2): 226-232.
- [25] Gao Y Z, Zhu L Z, Ling W T, Xiong W. Analysis method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plant and soil samples. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(5): 1003-1006.
- [26] Lu R K. Assay on agro-chemical properties of soil. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000: 228-247.
- [27] Microbial Room of Institute of Soil CAS. Research methods on soil microbial. Beijing: Science Press, 1985. 260-275.
- [28] Guan S Y. Soil enzyme and research Method. Beijing: Agricultural Press, 1986: 274-328.
- [29] Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, Li Z G. Remediation of phenanthrene contaminated soil by growing *Lolium multiflorum* Lam. *Soils*, 2002, 34(4): 233-236.
- [30] Liste H H, Alexander M. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, 2000, 40(1): 7-10.
- [31] Gao Y Z, Zhu L Z. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, 2004, 55(9): 1169-1178.
- [32] Johnson D L, Maguire K L, Anderson D R, McGrath S P. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil; the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology & Biochemistry*, 2004, 36(1): 33-38.
- [33] Siciliano S D, Germida J J. Enhanced phytoremediation of chlorobenzoates in rhizosphere soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999, 31(2): 299-305.
- [34] Rentz J A, Alvarez P J J, Schnoor J L. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution*, 2005, 136(3): 477-484.
- [35] Anderson J M, Domsch K H. Application of eco-physiological quotients ($q\text{CO}_2$ and $q\text{D}$) on microbial biomass from soils of different cropping histories. *Soil Biology & Biochemistry*, 1990, 22(2): 251-255.
- [36] Sparling G P. Ratio of microbial biomass carbons to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, 1992, 30(2): 195-207.
- [37] Wardle D A, Ghani A. A critique of the microbial metabolic quotient ($q\text{CO}_2$) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, 27(12): 1601-1610.
- [38] Ding M M, Yi W M, Liao L Y, Martens R, Insam H. Effects of afforestation on microbial biomass and activity in soils of tropical China. *Soil Biology & Biochemistry*, 1992, 24(9): 865-872.
- [39] Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. *Journal of Environmental Quality*, 1991, 20(2): 510-517.

参考文献:

- [15] 潘声旺, 魏世强, 袁馨, 曹生亮. 沿阶草(*Ophiopogon japonicus*)对土壤中菲的修复作用. *生态学报*, 2008, 28(8): 3654-3661.
- [16] 陈玉成. 污染环境生物修复工程. 北京: 化学工业出版社, 2003: 137-165.
- [19] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 宋静, 吴龙华, 邢维芹, 李振高. 黑麦草对土壤中苯并[a]芘动态变化的影响. *土壤学报*, 2004, 41(3): 348-352.
- [21] 刘世亮, 骆永明, 丁克强, 李华, 吴龙华. 黑麦草对苯并[a]芘污染土壤的根际修复及其酶学机理研究. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 526-532.
- [24] 徐圣友, 陈英旭, 林琦, 吴伟祥, 王冬, 薛生国, 沈超峰. 玉米对土壤中菲的修复作用的初步研究. *土壤学报*, 2006, 43: 226-232.
- [25] 高彦征, 朱利中, 凌婉婷, 熊巍. 土壤和植物样品的多环芳烃分析方法研究. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5): 1003-1006.
- [26] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2000: 228-247.
- [27] 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. 北京: 科学出版社, 1985: 260-275.
- [28] 关松荫. 土壤酶及其研究法. 北京: 农业出版社, 1986: 274-328.
- [29] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 李振高. 黑麦草对非污染土壤修复的初步研究. *土壤*, 2002, 34(4): 233-236.