处理重金属废水人工湿地中微生物群落结构和酶活性 变化

靳振江,刘杰,肖瑜,李金城,田海涛,吴蕾

(桂林理工大学广西环境工程与保护评价重点实验室,桂林 541004)

摘要:研究了处理含铜、铬与镍废水的三阶段波形潜流人工湿地中微生物群落结构和酶活性的空间变化.用稀释平板菌落计数法研究了微生物的数量变化,用PCR-DGGE结合测序研究了微生物群落结构变化,并用比色法测定了土壤酶活性.结果表明,在人工湿地中,细菌数量为(4.10 ± 0.72)×10⁶~(1.61 ± 0.10)×10⁷,真菌数量为(7.21 ± 1.60)×10⁴~(1.29 ± 0.02)×10⁵;放线菌数量为(1.41 ± 0.27)×10⁶~(3.38 ± 0.11)×10⁶. 回收自 DGGE 凝胶中的 8 个不同的条带均为特异的 16S rRNA 序列或 18S rRNA 序列,说明微生物群落结构发生了显著变化.最大的脲酶活性[(0.67 ± 0.2) mg/(g·24 h)]、蔗糖酶活性[(40.15 ± 0.14) mg/(g·24 h)]和碱性磷酸酶活性[(1.03 ± 0.16) mg/(g·2 h)]分别出现在第1、第3和第1阶段.相关性分析表明,真菌数与全量铬含量、有效态铬含量和铬的活化率均呈显著负相关,蔗糖酶活性与全量铜、全量镍和有效态镍也均呈显著负相关.

关键词:重金属;人工湿地;微生物群落;PCR-DGGE;酶活性;相关性中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)04-1202-08

Spatial Difference of Microbial Community Structure and Enzyme Activity in Constructed Wetlands Receiving Wastewater Containing Heavy Metals

JIN Zhen-jiang, LIU Jie, XIAO Yu, LI Jin-cheng, TIAN Hai-tao, WU Lei

(Guangxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Protection and Assessment, Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract: The microbial community structure and enzyme activity were investigated in the three-stage wavy subsurface constructed wetland (W-SFCW) receiving wastewater containing heavy metals (Cr, Cu and Ni). Colony forming units (CFU) abundance of microbes was calculated by using plate culture. The microbial community structure was investigated by using PCR-DGGE and sequencing. Enzyme activity was detected by using colorimetry. The results showed that the CFU of bacteria ranged from $(4.10 \pm 0.72) \times 10^6$ to $(1.61 \pm 0.10) \times 10^7$, fungi ranged from $(7.21 \pm 1.60) \times 10^4$ to $(1.29 \pm 0.02) \times 10^5$ and actinomycetes ranged from $(1.41 \pm 0.27) \times 10^6$ to $(3.38 \pm 0.11) \times 10^6$. All of 8 bands retrieved from DGGE gels were unique 16S rRNA or 18S rRNA sequences and revealed that the microbial community structures had changed spatially. Maximum urease $[(0.67 \pm 0.2) \text{ mg/(g·24 h)}]$, invertase $[(40.15 \pm 0.14) \text{ mg/(g·24 h)}]$ and alkaline phosphatase $[(1.03 \pm 0.16) \text{ mg/(g·2 h)}]$ activities were at first stage, third stage and first stage, respectively. A negative correlation between fungi CFU abundance and the total content of Cr, available Cr content and activation rate of Cr was detected, a negative correlation was also found between the invertase activity and total Cu and Ni contents and the Ni activation rate.

Key words: heavy metals; constructed wetland; microbial community; PCR-DGGE; enzyme activity; correlation

目前,湿地越来越多地用在处理含重金属的废水 上^[1-4].微生物是湿地净化功能的主要承担者,微生 物的群落结构和酶活性可能在决定有毒重金属的环 境归趋中具有重要的作用^[5-7],因此,近年来人工湿 地中重金属与微生物之间的关系研究渐受重视.Yu 等^[4]用微生物群落变化作为指标评价了处理含铅和 锌矿山废水的湿地生态系统;Hallberg等^[8]研究了处 理酸性矿山废水中人工湿地中的微生物学特性特别 是嗜酸微生物的变化,Sheoran等^[6]综合阐述湿地微 生物在酸性矿山废水重金属的去除过程中的重要作 用和可能机制.然而,重金属与微生物之间的相互影 响机制至今并不十分明了,所以研究人工湿地中重金属影响下微生物的群落结构和酶活性的变化对于指导人工湿地的设计、运行和管理^[9],提高湿地土壤-植物-微生物系统对重金属的去除效率具有重要的研究意义和应用价值.为此,用对含重金属废水铬、铜和 镍等重金属有较强修复潜力的湿生植物李氏禾

- 收稿日期:2010-06-04;修订日期:2010-08-23
- 基金项目:广西环境工程与保护评价重点实验室研究基金项目(桂 科能 0701K012);广西高校人才小高地建设"环境工程" 创新团队资助计划项目(桂教人[2007]71号);国家自然 科学基金项目(41001186);广西自然科学基金项目 (2010GXNSFA013018)
- **作者简介:**靳振江(1974~),男,博士研究生,讲师,主要研究方向为生态学和环境微生物学, E-mail:zhenjiangjinjin@163.com

(Leersia hexandra Swartz)^[10]构建了三阶段波形潜流 人工湿地,对湿地中微生物群落结构和酶活性的空间 变化进行了研究,以期为提高湿地生态系统中重金属 的去处效率提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 波形潜流人工湿地

以 PVC(Polyvinylchloride)板材粘合成长×宽× 高=2.00 m×1.00 m×0.70 m的波形潜流人工湿 地(wavy subsurface constructed wetland, W-SFCW), (图1),其中进水区长 0.20 m,湿地长 1.80 m,湿地 平分为 3 段,每段长 0.60 m.设计水力负荷为 0.20 m³·(m²·d)⁻¹,日最大进水量为 0.36 m³,水力坡度 取 0.5%,基质深度定为 0.40 m,其中下层为 0.10 m 的砾石,上层为 0.30 m 的沸石与水稻土的混合基 质.进水区基质采用粒径为 1 cm 左右的砾石,高为 0.50 m.进水中的重金属含量依据某电镀厂废水中 的重金属含量用自来水和重金属配制而成,废水从 进水区依次流经人工湿地第 1、第 2 和第 3 阶段,最 后出水.采样期进水和出水水质情况见表 1.





图1 三阶段波形潜流人工湿地示意



表1 人工湿地试验水质/mg·L⁻¹

Table 1	Wastewater quality	of constructed	wetland/mg·L ⁻¹
项目	Cr	Cu	Ni

项目	Cr	Cu	Ni	
进水	10.00	5.00	2.50	
出水	1.80	0.16	0.15	

1.2 样品的采集与前处理

人工湿地出水浓度处于稳定时在不同的阶段中 随机选取 2 个采样点,采集 0 ~ 15 cm 的表层土壤带 回实验室后去掉植物根系和小石块,过 2 mm 筛后 混合均匀分成 2 份,一份置于 4℃冰箱短暂保存后 立即进行微生物特性分析,一份自然风干用于重金 属指标的分析.

1.3 重金属含量的测定

重金属全量的提取采用 HNO₃ + HClO₄ + HF 消煮法,重金属有效态的提取采用 0.1 mol/L HCl 溶液(液:土 = 5:1)提取. 待测液用原子吸收分光 光度法测定. 重金属的活化率用重金属有效态与全 量之间的比值表征.

1.4 微生物数量分析

平板菌落计数法,其中细菌、真菌和放线菌分别 使用牛肉膏蛋白胨(NA)培养基、马丁(Martin)培养 基和高氏一号(Gause'l)培养基,分别以每g干土中 的菌落数表示.

1.5 土壤微生物基因组 DNA 提取

土壤微生物总 DNA 的提取采用购自 MoBIO 公司 DNA 快速提取试剂盒(power soil),按操作说明进行.

1.6 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

PCR 用于扩增的引物采用对大多数细菌的 16S rRNA的特异性引物对^[11],正向引物 F338-GC 为:5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3',反向引物 R518 为:5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'. 扩增产物片段长约 200 bp;25 μ L PCR 反应体系组成如下:2 × Master Mix 12.5 μ L,去离 子水 9.5 μ L,DNA 模板(genomic DNA,10 ng/ μ L) 1 μ L,浓度为 20 μ mol/ μ L正向引物和反向引物各 1 μ L;PCR 反应采用降落(touch down)PCR 程序^[12], 具体如下:94℃预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,退火 温度从 65℃ 开始,每两个循环降低 1℃,一直到 55℃,延伸温度为 72℃,再在退火温度 55℃下作 15 个循环;最后在 72℃完全延伸 5 min. 扩增后的 PCR 产物用 1. 2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量. 真菌 18S rRNA 引物对^[13]的正向引物 NS1 为 5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3'和反向引物 Fungi - GC 为 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CAT TCC CCG TTA CCC GTT G-3',扩增产物片段长约 400 bp;PCR 反应体系组成 与细菌相同;反应条件为: 95℃预变性 15 min,91℃ 变性 1 min,57℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,共 35 个循环;然后在 68℃完全延伸 10 min. 扩增后的 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量.

1.7 变性梯度凝胶电泳(denature gradient gel electrophoresis, DGGE)

变性梯度凝胶的制备使用 Bio-Rad 公司 475 型 梯度灌胶系统(Model 475 Gradient Delivery System).对于细菌,变性梯度从上到下是 35% ~ 60%,聚丙烯酰胺凝胶浓度是 8%.先在 200 V 的电 压下,60℃电泳4 min,然后在 90 V 的电压下,60℃ 电泳9 h;对于真菌,变性梯度从上到下是 15% ~ 30%,先在 200 V 的电压下,60℃电泳4 min,然后电 压为 100 V,时间为7 h.电泳完毕后,将凝胶在固定 液中固定 3 min,用银染液染色 10 min,然后用蒸馏 水洗涤 2 次,再加显影液在显影 3 min;将染色后的 凝胶用 Bio-Rad 的 Gel Doc-2000 凝胶影像分析系统 拍照;在 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)帮助确定 样品电泳条带的多少、亮度峰值和相似性值,香农指 数计算方法参考文献[14]进行.

1.8 克隆和测序

从 DGGE 凝胶上切下如图 6 和图 7 中所标记的 DNA 条带,置于 1.5 mL 的离心管中,加适量的无菌 水,4℃静置过夜让 DNA 流出.以流出液为模版进 行 PCR,PCR 反应条件均与原来的相同. PCR 产物 用 DNA 纯化试剂盒(EZgene cycle pure kit,Biomiga) 进行纯化后,用基因克隆试剂盒(pEASY-T3 cloning kit, TransGen)对基因进行克隆.含有正确的克隆送 交上海 Invitrogen 公司进行测序.

1.9 进化树和核酸序列登录号

将测序所得的序列在 NCBI 中进行同源性比对 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi),挑选出与 每个测定序列最相似的 2 个序列,利用 Mega 4.1 软 件构建系统发育树.把获得核酸序列及其最相似的 2 个序列对齐后确定它们进化上大概的从属关系,用邻 接法构建进化树,每个节点基于核酸序列的1 000次重 复.将本研究中产生的序列提交到 GenBank 核酸数 据库中,细菌和真菌的登记号分别为 HQ009744 ~ HQ009747 和 HQ009748 ~ HQ009751.

1.10 土壤酶活性的测定

土壤酶活性的测定参考关松荫^[15]的方法进行, 其中蔗糖酶采用3,5-二硝基水杨酸比色法,活性用 24 h 后每g土中葡萄糖的 mg数表示;脲酶采用苯 酚-次氯酸钠比色法,用 24 h 后每g土中铵态氮的 mg数表示;碱性磷酸酶分别磷酸苯二钠比色法,活 性用 2 h 后每g土中苯酚的 mg数表示.

1.11 数据处理

数据处理用 Microsoft Excel 2000 进行,相关性和显著性检测均采用 SPSS 13.0 软件进行.

2 结果与分析

2.1 土壤重金属的含量

从表 2 中可以看到,全量铬的含量在前 2 个阶 段没有显著差异,但在第 3 个阶段中显著降低;而全 量铜与全量镍的含量在第 2 个阶段最高,第 3 个阶 段最低.有效态铬、有效态铜与有效态镍的含量在 前 2 个阶段没有显著差异,只在第 3 个阶段中显著 降低.铬的活化率在第 2 阶段最高,在第 3 段中降 低;但铜和镍的活化率在 3 个阶段中没有显著差异. 这说明在人工湿地中重金属铬、铜与镍的变化规律 并不十分一致.

表 2 人工湿地不同阶段重金属的变化¹⁾

Table 2	Change of	heavy	metals i	n different	stages of	constructed	wetland

全量重金属/mg·kg ⁻¹		有效态重金属/mg·kg ⁻¹		重金属活化率/%					
的权	Cr	Cu	Ni	Cr	Cu	Ni	Cr	Cu	Ni
S1	$169.10 \pm 98.02a$	47.78 $\pm10.71{\rm b}$	56.79 $\pm 0.03 {\rm b}$	$3.64 \pm 2.43a$	$6.56\pm5.31\mathrm{ab}$	$3.15 \pm 0.57a$	$2.09\pm0.23\mathrm{b}$	$17.37 \pm 0.85a$	$5.54 \pm 1.00a$
S2	202. 30 \pm 36. 85a	57. 00 $\pm 1.56a$	78.36 $\pm 0.66a$	$5.85 \pm 1.74a$	8.46 $\pm 0.14a$	3.96 ±1.32a	2.86 $\pm 0.34a$	14.83 $\pm 0.65a$	$5.04 \pm 1.64a$
S3	$54.94\pm 4.61\mathrm{b}$	$29.83\pm0.32\mathrm{c}$	$29.24\pm0.41\mathrm{c}$	$0.23\pm0.05\mathrm{b}$	$6.97\pm0.48\mathrm{b}$	$2.22\pm0.05\mathrm{b}$	$0.42\pm0.05\mathrm{c}$	23.37 $\pm 1.37a$	$7.61 \pm 0.29a$

1) S1、S2 和 S3 表示人工湿地的第1、第2 和第3 阶段,不同的小写字母表示重金属在不同阶段中的差异性(p<0.05),下同

2.2 微生物结构和功能的变化

2.2.1 微生物数量的变化

从图 2 中可以看出,人工湿地中不同阶段微生物数 量的变化规律不一致.从第1~3 阶段,细菌数量从(4.10 ±0.72)×10⁶增加为(1.61±0.10)×10⁷,然后减少为 (1.26±0.16)×10⁷;真菌数量在前2个阶段没有差异,分 别为(7.97±0.24)×10⁴和(7.21±1.60)×10⁴,在第3个 阶段增加为(1.29±0.02)×10⁵;放线菌数量从(3.38± 0.11)×10⁶减少为(2.47±0.51)×10⁶和(1.41±0.27) ×10⁶;真细菌比(F/B)从(1.97±0.29)×10⁻²减少为





S1-1 S1-2 S2-1 S2-2 S3-1 S3-2

S1-1和 S1-2、S2-1和 S2-2与 S3-1和 S3-2分别 表示人工湿地 S1、S2和 S3阶段中样品的 2个重复,下同

> 图 3 18S rRNA DGGE 图谱 Fig. 3 DGGE profile of 18S rRNA

(4.52±1.29)×10⁻³,然后升高为(1.03±0.14)×10⁻².
2.2.2 微生物多样性变化

对图 3 的 18S rRNA DGGE 图谱和图 4 的 16S rRNA DGGE 图谱进行聚类分析得到图 5 和图 6. 从 图 5 中可以看到,细菌 DGGE 图谱中 S1 和 S2 阶段 明显聚为一类,而从图 6 真菌 DGGE 图谱中可以看到,S2 和 S3 阶段明显聚为一类,这说明在人工湿地中,细菌和真菌群落结构的变化规律并不一致.

从表 3 中可以看到,细菌与真菌的香农指数在人 工湿地的不同阶段没有明显的变化.在 DGGE 图谱中, 细菌的条带数在人工湿地的第1个阶段中较少,在后 2 个阶段土壤中显著增加,而真菌的条带数在人工湿地 的第1个阶段中较多,在后 2 个阶段土壤中显著降低.

从图 3 真菌的 DGGE 图谱中可以看出,条带 F 是第 1 阶段的特有带、条带 E 和 G 是第 2 阶段的特 有带,条带 H 是第 3 阶段的特有带,序列分析表明, 条带 E、F、G 和 H 均为单一的 18S rRNA 部分序列; 从图 4 细菌的 DGGE 图谱中可以看出,在第 2 阶段 出现了一个特有条带 D,在第 3 阶段出现了特有条 带 A、B 和 C,序列分析表明,条带 A、B、C 和 D 均为 单一的 16S rRNA 部分序列. 这些序列与 GenGank 中的部分 16S rRNA 或 18S rRNA 序列均有较高的 相似性(图 7 和图 8),这说明人工湿地的 3 个阶段 中微生物菌落结构已经了显著变化.



图 4 16S rRNA DGGE 图谱 Fig. 4 DGGE profile of 16S rRNA



图 5 细菌 DGGE 图谱的聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of bacteria DGGE profile





Fig. 6 Cluster analysis of fungi DGGE profile

表 3 人工湿地不同的阶段细菌和真菌香农 指数和条带数的变化

Table 3 Change of band number from DGGE profile and Shannon

index in different stages of constructed wetland						
阶	细	菌	真菌			
段	条带数	香农指数	条带数	香农指数		
S1	41.51 $\pm 0.50~\mathrm{b}$	3.38 ± 0.02 a	32.00 ± 0.00 a	$3.\ 64\ \pm 0.\ 05\ a$		
S2	44.00 $\pm 0.00~{\rm a}$	3.33 ± 0.05 a	29.50 ± 0.50 b	$3.\ 72\ \pm 0.\ 05\ a$		
S3	$45.00\pm 1.00~a$	$3.\ 29\ \pm 0.\ 08\ a$	30.00 ± 0.00 b	3.86 ± 0.11 a		



图 7 用回收自 DGGE 凝胶中 DNA 序列 构构建的 16S rRNA 的系统发育树

(粗体部分)

Fig. 7 Phylogenetic tree based on partial sequences of 16S rRNA retrieved from DGGE bands (shown in bold)



图 8 用回收自 DGGE 凝胶中 DNA 序列 构建的 18S rRNA 的系统发育树(粗体部分)

Fig. 8 Phylogenetic tree based on partial sequences of 18S rRNA retrieved from DGGE bands (shown in bold)

2.2.3 土壤酶活性的变化

从表 4 中可以看到,不用的酶活性在不同的阶段变化规律不一致. 蔗糖酶活性表现为先降低后升高,第 3 阶段最高,为(40.15 ±0.14) mg/(g·24 h); 脲酶活性也表现为先降低后升高,第 1 和第 3 阶段 没有差异,分别为(0.67 ± 0.25) mg/(g·24 h)和

表 4 人工湿地不同的阶段土壤酶活性的变化/mg·(g·24 h)	- 1
-----------------------------------	-----

	Table 4 Change of soil enzyme activity in different stages of constructed wetland/mg \cdot (g \cdot 24 h) $^{-1}$				
土壤酶	S1	S2	S3		
蔗糖酶	32.49 ± 3.53 b	23. 64 \pm 3. 74 c	40.15 ±0.14 a		
脲酶	0.67 ± 0.25 a	0.40 \pm 0.04 b	0.58 ± 0.12 a		
碱性磷酸酶	1.03 ±0.16 a	$0.\ 52\ \pm 0.\ 04\ \mathrm{b}$	0.05 ± 0.00 c		

(0.58±0.12) mg/(g·24 h), 而碱性磷酸酶活性在 第1阶段最高, 为(1.03±0.16) mg/(g·24 h), 一直 降低到第3阶段的(0.05±0.00) mg/(g·24 h).

3 讨论

3.1 人工湿地中微生物数量的变化

湿地生态系统功能取决于植物、土壤、水质、微

生物与运行状态之间的相互作用^[16],而在人工湿地中,微生物特性的变化主要取决于水力状况和废水特性^[17].在本研究中湿地3个阶段中的水力状况 基本是一致的,重金属特性的变化可能是引起微生物群落结构和功能的变化的重要动因.

在本研究中,真菌数与全量铬、有效态铬和铬的 活化率均呈显著负相关(*R*²分别为 - 0.733^{*}、

-0.867*和-0.733*,*表示 p<0.05,下同),可能 说明重金属铬的对真菌的毒害更大一些. 细菌、真 菌和放线菌是土壤微生物研究常见的三大类群,它 们对重金属污染的耐性也不一样,通常最强为真菌, 其次为细菌,放线菌最弱^[18].李廷强等^[19]通过盆栽 方法发现,在矿山土壤、重污染土和轻污染土中,三 大类群微生物数量均以轻污染土壤(重金属全量和 有效态含量均为最低)居多,并且认为这与土壤重 金属污染程度低,对微生物胁迫相对较小有关^[20]. Kuperman 等^[21]的研究表明,在Cr、Cu和Ni等7种 重金属总量从共 658.7 mg·kg⁻¹上升到3446.6 mg·kg⁻¹复合污染的土壤中,相对于对照(121.0 mg·kg⁻¹)土壤而言,具有 FDA 水解酶的细菌和真菌 生物量从 70.8% 和 54.5% 分别下降为 18.8% 和 14.6%,因此重金属对参与养分循环的微生物的丰 富性具有明显毒害作用. 蔡信德等^[22]的研究表明, 在种植植物为 Alyssum corsicum、Alyssum murale 和芥 菜 Brassica juncea 的土壤中,镍含量低于 100 mg·kg⁻¹时,对土壤中细菌、真菌和放线菌有一定的 促进作用:然而随着添加镍含量的增加,土壤微生物 总数呈下降趋势. 在本研究中,重金属与微生物数 量之间关系的变化规律并没有这样明显,可能是3 个阶段中重金属的变化幅度不大,而且含量较低,对 三大菌群数量造成的胁迫效应不明显造成的.

3.2 人工湿地中土壤微生物群落结构的变化

在人工湿地运行的过程中,随着时间的延长,含 重金属的废水经过人工湿地处理后,出水中重金属 含量基本达到稳定.相应于这种达到稳定的过程, 土壤微生物也处于一个相对稳定的状态,是一个能 够适应环境的特定的群落.

PCR-DGGE 是近年来研究环境样品中微生物群 落结构与多样性变化常用的方法^[23,24].从细菌和真 菌的 DGGE 图谱和测序结果看,在人工湿地的不同 阶段,土壤微生物群落结构发生明显改变.但微生 物的香农多样性指数没有明显变化,这可能与废水 中重金属浓度较低有关.Gao等^[25]的研究也从侧面 证实了这一点,即在重金属复合污染和重金属浓度 升高时,土壤微生物消失的 RAPD 带会逐渐增多,所 以多样性降低.微生物与重金属之间的关系会随相 互作用时间长短的变化而变化.Wang等^[26]就重金 属对微生物的短期效应进行了研究发现,当土壤接 触到复合重金属时,细菌和真菌数量随着保温时间 的延长而减少,而且细菌数量减少更快,这是因为相 比真菌而言,在进化上细菌更为原始和低等,所以对 重金属更为敏感. Bouskill 等^[27]对矿区河流沉积物 中微生物与重金属的关系进行了长达 12 个月的连 续研究,发现微生物群落组成与铜、砷和锌呈显著正 相关,这正好与李永涛等^[28]的研究结果一致,即土 壤金属浓度长期普遍较高时,微生物群落被少数耐 受性较高的种群所主导,并处于相对稳定状态. 从 笔者对功能细菌菌群的研究来看,不同的阶段的多 样性差异是比较大的(结果未发表),这可能提示人 们,重金属毒害造成了少数耐受性较低的种群消失 或减少,迅速被重金属耐受性较高的微生物替代,但 这些微生物的变化在土壤复杂和多变微生物群落结 构中依然处于"被淹没状态",所以,短时间内微生 物的群落结构发生了改变,但还不足以发生多样性 的变化.

3.3 人工湿地中土壤酶活性的变化

由于重金属存在而对土壤理化性质的改变必然 影响到以微生物为主导的土壤酶活性. 蔗糖酶、脲 酶和碱性磷酸酶是3个与碳、氮和磷素养分循环相 关的土壤酶,它们的活性变化可以表征土壤养分循 环的变化. 在本研究中,相关性分析表明,蔗糖酶活 性与全量铜、全量镍与有效态镍均呈显著负相关 (R²分别为-0.867*、-0.733*与-0.733*),表明 全量铜、全量镍与有效态镍含量对蔗糖酶活性有明 显的抑制作用. 脲酶活性与蔗糖酶活性呈显著正相 关(R²=0.733^{*}),表明重金属复合污染下参与碳氮 循环微生物功能之间具有内在的偶联性并没有改 变. Zhang 等^[29]对西藏中部矿区污染土壤微生物研 究发现,在铜、锌、铅和镉的复合污染下,蔗糖酶、脲 酶和酸性磷酸酶活性明显降低,这与本研究的结果 基本是一致的.碱性磷酸酶活性与放线菌数呈显著 正相关($R^2 = 0.828^*$),很可能表明放线菌在磷素循 环中具有重要的作用. 滕应等^[30]用 BIOLOG 的测试 方法发现,铜是影响红壤微生物活性及群落功能多 样性变化的主控因子之一. Huang 等^[31]研究发现总 铬显著激活碱性磷酸酶活性,但和文祥等^[32]的研究 结果却恰好相反,即铬显著抑制土壤碱性磷酸酶活 性,这可能是土壤性质差异造成的. 在本研究中蔗 糖酶活性与全量铜、全量镍与有效态镍的含量均呈 显著负相关,这说明全量铜、全量镍与有效态镍抑制 了土壤微生物对碳源的利用,改变了土壤微生物的 功能. 这与 Kuperman 等^[21]的研究结果是一致的, 即土壤重金属污染严重影响了参与有机质的降解和 养分循环微生物的活性.由此笔者推断这种对养分 利用的抑制很可能反过来抑制了李氏禾根系对重金

属的吸收,从而影响到对重金属废水的净化效率,但 这种假设还有待于进一步验证.从本研究的结果来 看,在复合重金属污染下人工湿地的3个阶段中,不 同重金属与土壤酶活性的变化规律并不完全一致; 而且,尽管它们之间存在着一定的表观相关性,但由 于土壤性质本身的复杂性与变异性,再加上重金属 与微生物之间相互作用机制目前并不十分明了,其 内在的实质联系还有待于更深入的验证,因此在复 合污染土壤中应慎重对待土壤酶指标^[33].

4 结论

(1)不同阶段细菌表现为先升高后降低,真菌 数量表现为一直下降,放线菌数量与真细菌比均表 现为先降低后升高.

(2)不同阶段中细菌和真菌群落结构已经发生 了显著变化.

(3)不同阶段中蔗糖酶和脲酶活性表现出先下 降后升高,碱性磷酸酶活性表现为一直下降.

(4) 真菌数与全量铬含量、有效态铬含量和铬的活化率呈显著负相关, 蔗糖酶活性与全量铜、全量 镍和有效态镍呈显著负相关.

参考文献:

- [1] Aisling D OS, Declan A M, Marinus L O. Removal of sulfate, zinc, and lead from alkaline mine wastewater using pilot-scale surface-flow wetlands at Tara Mines, Ireland [J]. Water and the Environment, 2004, 23(2): 58-65.
- [2] Donna L J, Marinus L O. Conflicting process in the wetland plant rhizosphere: metal retention or mobilization? [J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2003, 3(1): 91-104.
- [3] Sardar K, Irshad A, Shah M T, et al. Use of constructed wetland for the removal of heavy metals from industrial wastewater [J]. Journal of Environmental Management, 2009, 90(3): 451-457.
- Yu Y H, Fang W S, Shen Y F, et al. Use of microbial community to evaluate performance of a wetland system in treating Pb/Zn mine drainage [J]. Environmental Management 2005, 36 (6): 842-848.
- [5] Brookes P C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals [J]. Biology and Fertility of Soils, 1995, 19(4): 269-279.
- [6] Sheoran A S, Sheoran V. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review [J]. Minerals Engineering, 2006, 19(2): 105-116.
- [7] Chen Y X, Wang Y P, Wu W X, et al. Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator [J]. Soil Science of the Total Environment, 2008, 40(5): 1167-1177.
- [8] Hallberg K B, Johnson D B. Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine

[J]. Science of the Total Environment. 2005, **338**(1-2): 53-66.

- [9] 殷峻,闻岳,周琪.人工湿地中微生物生态的研究进展[J]. 环境科学与技术,2007,30(1):108-110
- [10] 陈俊,王敦球,张学洪,等.李氏禾修复重金属(Cr、Cu、Ni)
 污染水体的潜力研究[J].农业环境科学学报,2008,27
 (4):1514-1518.
- [11] Yao S R, Merwin I A, Abawi G S, et al. Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(3): 587-599.
- [12] Muyzer G, Dewaal 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.
- [13] Hoshino Y T, Morimoto S. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Soil Science and Plant Nutriention, 2008, 54(5): 701-710.
- Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 1-11.
- [15] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社, 1986.
- [16] Aguilar J R M, Cabriales J J P, Vega M M. Identification and characterization of sulfur-oxidizing bacteria in an artificial wetland that treats wastewater from a tannery [J]. International Journal of Phytoremediation, 2008, 10(5): 359-370.
- [17] Truu M, Juhanson J, Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands [J]. Science of the Total Environment. 2009, 407(13): 3958-3971.
- [18] Hiroki M. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population [J]. Soil Science and Plant Nutriention, 1992, 38: 141-147.
- [19] 李廷强,舒钦红,杨肖娥.不同程度重金属污染土壤对东南 景天根际土壤微生物特征的影响[J].浙江大学学报(农业 与生命科学版),2008,34(6):692-698.
- [20] Fliebbach A, Martens R, Reber H. Soil microbial biomass and activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26 (9): 1201-1205.
- [21] Kuperman R G, Carreiro M M. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29(2): 179-190.
- [22] 蔡信德,仇荣亮,陈桂珠,等.植物修复对重金属镍污染土壤 微生物群落的影响[J].土壤学报,2006,43(6):919-925.
- [23] Dong X L, Reddy G B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1175-1182.
- [24] Nicomrat D, Dick W A, Tuovinen O H. Assessment of the microbial

community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage [J]. Microbial Ecology, 2006, **51**(1): 83-89.

- [25] Gao Y, Zhou P, Mao L, et al. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure modified ecological dose-response model and response model and PCR- RAPD [J]. Environmental Earth Science, 2010, 60(3): 603-610.
- [26] Wang F, Yao J, Si Y, et al. Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 173(1-3): 510-516.
- [27] Bouskill N J, Finkel J B, Galloway T S, et al. Temporal bacterial diversity associated with metal-contaminated river sediments [J]. Ecotoxicology, 2010, 19(2): 317-328.
- [28] 李永涛, Thierry B, Cécile Q,等.酸性矿山废水污染的水稻 田土壤中重金属的微生物学效应[J].生态学报,2004,24 (11):2430-2436.
- [29] Zhang F P, Li C F, Tong L G, et al. Response of microbial

characteristics to heavy metal pollution of mining soils in central Tibet, China[J]. Applied Soil Ecology, 2010, **45**(3): 144-151.

- [30] 滕应,黄昌勇,骆永明,等.重金属复合污染下红壤微生物 活性及其群落结构的变化[J].土壤学报,2005,42(5): 819-828.
- [31] Huang S H, Peng B, Yang Z H, et al. Chromium accumulation, microorganism population and enzyme activities in soils around chromium- containing slagheap of steel alloy factory [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2009, 19 (1): 241-248.
- [32] 和文祥, 王娟, 高亚军, 等. 不同价态铬的土壤碱性磷酸酶 效应模拟研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(1): 104-109.
- [33] 王涵,高树芳,陈炎辉,等.重金属污染区土壤酶活性变化——以福建龙岩新罗区特钢厂污水灌溉区为例[J].应用 生态学报,2009,20(12):3034-3042.