

Cd 对欧美杂交杨生长紫色土和冲积土微生物多样性的影响

王奥, 吴福忠, 杨万勤*, 周利强, 王旭熙, 韩雨

(四川农业大学林学院, 雅安 625014)

摘要:研究了现实环境中 Cd 污染水平对长江流域典型土壤微生物多样性的影响, 分析了现实 Cd 浓度胁迫对盆栽欧美杂交杨 (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) 生长的紫色土和冲积土中可培养的微生物数量、生物量和细菌群落多样性的影响。结果表明, Cd 处理显著增加了栽植杨树的紫色土中可培养细菌和放线菌数量, 降低了可培养真菌的数量和微生物生物量 N 含量。DGGE 图谱显示细菌群落结构在不同 Cd 胁迫处理下也发生了明显改变。相反, 栽植杨树的冲积土中可培养的细菌和真菌数量在较低浓度的 Cd 处理中表现出增加的趋势, 而高浓度的 Cd 胁迫均显著降低各类可培养微生物数量及微生物生物量 N 含量, 且不同 Cd 胁迫处理下的细菌群落结构差异较小。另外, 施加 Cd 处理对冲积土和紫色土微生物生物量 C 含量均无显著影响。本研究结果为认识现实 Cd 污染水平下土壤微生物特征提供了一定的基础数据。

关键词:镉; 紫色土; 冲积土; 可培养微生物; 微生物生物量 C、N; 细菌群落结构; PCR-DGGE

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)07-2138-06

Effects of Cadmium Stress on the Microbial Biodiversity in Purple Soil and Alluvial Soil Potted with a Poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*)

WANG Ao, WU Fu-zhong, YANG Wan-qin, ZHOU Li-qiang, WANG Xu-xi, HAN Yu

(Faculty of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Effects of current Cd contamination levels on microbial biodiversity were studied under the typical Cd contaminated soils in the Yangtze Basin. Purple soil and alluvial soil potted with a poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) were selected, and the culturable soil microbial amounts by flat method, microbial biomass and bacterial community structure by PCR-DGGE were investigated. Cd supplies significantly increased the culturable amounts of bacteria and actinomycetes in purple soil, but decreased the culturable amounts of fungi and the content of microbial biomass N. Fingerprint of DGGE also showed that bacterial community structure have obviously changed under different Cd supplies. In contrast, the lower Cd supplies slightly increased the culturable amounts of bacteria and fungi in alluvial soil, but higher Cd supply treatment decreased the culturable amounts of bacteria, actinomycetes and fungi, and the content of microbial biomass N. However, only a slight change was observed under different Cd supplies by DGGE fingerprint. Additionally, there were few effects of Cd supplies on the content of microbial biomass C in both purple soil and alluvial soil. The results provided basic data to understand the effects of present Cd contamination levels on soil microbial characteristics.

Key words: Cd contamination; purple soil; alluvial soil; culturable microorganism; microbial biomass C and N; bacterial community structure; PCR-DGGE

工业化、城市化的快速发展以及农业生产中化肥、农药和除草剂的大量使用, 导致了全球范围内严重的重金属污染^[1,2], 并造成了巨大的经济损失和不可估量的生态风险^[3]。紫色土和冲积土是长江上游 2 种典型土壤类型, 由于相对较高的镉 (cadmium, Cd) 背景值和人类工农业活动的加剧, 越来越多的证据表明区域镉污染水平正在不断增加^[4-6]。土壤中存在的大量 Cd 可以直接导致部分土壤微生物死亡, 影响部分土壤微生物的活性^[7,8], 改变微生物群落结构和功能, 进而影响土壤有效资源的转化和循环^[9-11], 危害土壤生态系统的健康。然而, 自然环境条件下重金属的浓度及其生物有效性、不同微生物的细胞结构组成差异等复杂性等因素导

致不同类型土壤微生物对重金属的敏感性存在较大差异^[12,13]。更为重要的是, 现实土壤环境中 Cd 的含量常常处于国家环境质量 III 级标准以内^[4], 而已有的模拟控制实验主要基于相对较高的 Cd 胁迫水平。因此, 已有的实验结果难以反映现实的土壤 Cd 污染水平下土壤微生物群落结构特征。

欧美杂交杨 (*Populus deltoides* × *Populus nigra*)

收稿日期: 2010-07-18; 修订日期: 2010-08-27

基金项目: 四川省重点公益性项目 (2007NGY006); 国家科技支撑计划项目 (2008BAD98B03-07); 四川省杰出青年科技基金项目 (07ZQ026-022); 四川高等学校科技创新重大培育计划项目 (2007ZZ024, 09ZZ023)

作者简介: 王奥 (1986~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为土壤微生物生态学, E-mail: wangaoen@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: scyangwq@163.com

是常用的造林速生丰产树种,在长江流域典型的紫色土和冲积土上均表现出较强适应性^[14].不断增加的 Cd 污染水平将严重影响杨树的生长和矿质代谢^[3],这与 Cd 污染条件下土壤微生物群落结构的改变密切相关,但一直缺乏必要的研究.因此,为深入了解现实 Cd 污染条件下土壤微生物群落结构特征,采用传统稀释平板计数与 DGGE 技术^[15]相结合的方法,研究了现实环境不同 Cd 胁迫条件下栽植杨树的紫色土和冲积土中土壤微生物数量、微生物生物量和细菌群落结构特征,以期为深入认识土壤微生物群落主导的土壤生态过程对现实 Cd 污染水

表 1 紫色土和冲积土的基本理化性质

Table 1 Physic-chemical properties of purple soil and alluvium soil

类型	pH	全氮/ $g \cdot kg^{-1}$	全磷/ $g \cdot kg^{-1}$	全钾/ $g \cdot kg^{-1}$	有机质/ $g \cdot kg^{-1}$	Cd/ $mg \cdot kg^{-1}$
紫色土	4.85	1.280	0.446	3.054	20.028	2.95
冲积土	8.02	0.324	0.618	3.586	8.733	2.87

1.2 实验设计

根据国家土壤环境质量标准(GB 15618-1995),实验设置 4 个浓度水平(0、0.5、1.0、1.5 mg/kg),分别记为 CK、T1、T2、T3,每处理 3 个重复.实验选用陶盆(上口径为 36 cm,下口径 25 cm,高 25 cm),每盆装土 20 kg(以干土计),并施入相应处理浓度的 $CdCl_2 \cdot 2.5 H_2O$ (分析纯)溶液.2008 年 3 月在杨树萌动前采集插条,选取粗细均匀、生长良好的插条,扦插于盆中.2008 年 10 月于生长良好、长势均一的杨树盆栽中多点采集土壤,充分混匀后冷藏带回实验室,并立即进行理化性质等分析和 DNA 提取.

1.3 可培养微生物数量与微生物生物量

供试土壤的基本理化性质均采用常规方法测定^[17],土壤可培养微生物数量(colony forming units, CFU)用稀释平板法计数.细菌、放线菌、真菌的活菌技术培养基分别采用牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 1 号培养基和马丁氏孟加拉红培养基^[18].土壤微生物生物量 C(MBC)和生物量 N(MBN)采用氯仿熏蒸- K_2SO_4 浸提法制取待测液^[19],分别采用 $K_2Cr_2O_7$ 氧化- $FeSO_4$ 滴定法和半微量凯氏定 N 法测定 MBC 和 MBN 含量, MBC 和 MBN 的转换系数分别为 K_C (0.38)和 K_N (0.45).

1.4 土壤总 DNA 的提取与纯化

参照 Zhou 等^[20]的方法提取土壤微生物总 DNA.取 5.0 g 样品,加入 13.5 mL pH 8.0 的磷酸钠提取缓冲液和 50 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),于 37 $^{\circ}C$ 、225 r/min 振荡 30 min 后,加入 1.5 mL 20%

平的响应提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本研究所用紫色土采自四川农业大学读书公园,冲积土采自雅安青衣江上游滩地^[16].供试土壤基本理化性质见表 1.样品采回后经自然风干、并过筛,充分混匀后备用.土壤样品中镉含量的测定: HNO_3 - $HClO_4$ -HF 三酸消解,ICP-AES 法(IRIS Intrepid II XSP 型电感耦合等离子体原子发射光谱仪)测定^[14].

SDS,65 $^{\circ}C$ 水浴 2 h;13 000 r/min 离心 10 min,将上清液移入新的离心管,将沉淀重复抽提 2 次.收集 3 次抽提的上清液于同一管中,然后加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)轻轻混匀,13 000 r/min 离心 10 min,将上层水相移入新的离心管,加入 0.6 倍体积的异丙醇沉淀,16 000 r/min 条件下离心 10 min,弃上清液,沉淀用 75% 乙醇清洗 2 次,室温下晾干后加入 50 μ L TE 缓冲液.用 Omega Gel Extraction kit 以琼脂糖凝胶电泳纯化得到的总 DNA,以 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测片段大小和纯度.

1.5 PCR-DGGE 分析

PCR 扩增引物采用 16S rDNA V3 区特异性引物 341f 和 534r^[21],其序列如下:341f, 5'-CGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCGCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 534r, 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.经 PCR 扩增后可得的产物长约 200 bp. PCR 反应的体系为 50 μ L,包括 25 μ L Takara Premix Ex Taq,上、下游引物各 1 μ L(20 mmol/L),约 100 ng 模板,最终以去离子水补足 50 μ L. PCR 扩增反应条件为:预变性 94 $^{\circ}C$ 5 min,前 20 个循环为 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,65~55 $^{\circ}C$ 退火 1 min 和 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min(每个循环后退火温度下降 0.5 $^{\circ}C$),后 10 个循环为 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,55 $^{\circ}C$ 退火 1 min 和 72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}C$ 再延伸 5 min^[22],PCR 反应在 Bio-Rad iCycle 热循环仪中进行.采用 Bio-Rad Dcode system 对 PCR 产物进行电泳分离.变性剂浓度为 35%~65%,于 100 V,60 $^{\circ}C$ 下电泳 16 h.电泳结束后经硝酸银染色^[23],Bio-Rad GS-800 光密度仪

成像.

1.6 数据分析

DGGE 凝胶上的每一个条带都代表一个单独的序列类型或系统发育类型,采用 Bio-rad Quantity One 4.62 软件、以非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic averages, UPGMA) 方法对电泳图像进行聚类分析. 通过条带的相对位置和相对强度计算 Shannon-Wiener 指数 (H) 和 Simpson 指数 (D)^[24] 来评价样品中微生物的多样性.

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad D = \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中, n 表示每个样品中检测到的条带数, s 表示 DGGE 检测到的不同条带的总和 ($s \geq n_{\max}$), P_i 表示样品中各个条带的强度占样品总强度的百分含量. 这些指数可以用来评价土壤微生物群落的基因多样

表 2 不同土壤类型下 Cd 对可培养的土壤微生物数量的影响¹⁾

Table 2 Effects of different Cd supplies on culturable soil microbial amounts

类型	处理	细菌 $\times 10^4$ /CFU·g ⁻¹	真菌 $\times 10^3$ /CFU·g ⁻¹	放线菌 $\times 10^4$ /CFU·g ⁻¹	真菌/细菌数量比 $\times 10^{-2}$
紫色土	CK	88.52 ± 0.50 a	17.67 ± 5.20 a	14.00 ± 2.05 a	1.99 ± 0.60 a
	T1	201.14 ± 1.00 b	8.67 ± 2.45 b	58.00 ± 7.48 ab	0.46 ± 0.30 b
	T2	158.49 ± 7.50 c	7.33 ± 4.99 b	45.00 ± 4.78 b	0.43 ± 0.10 b
	T3	257.75 ± 0.50 d	4.03 ± 0.82 b	70.67 ± 15.87 c	0.16 ± 0.20 b
冲积土	CK	70.42 ± 8.11 a	4.5 ± 0.41 a	272.31 ± 5.28 a	0.6 ± 0.06 a
	T1	132.52 ± 9.52 b	5.01 ± 0.82 ab	167.5 ± 5.5 b	0.5 ± 0.06 ab
	T2	78.58 ± 10.39 c	6.14 ± 1.12 b	213.41 ± 6.32 c	0.8 ± 0.13 c
	T3	62.14 ± 7.19 c	3.21 ± 0.82 c	169.34 ± 10.67 b	0.4 ± 0.13 b

1) CK、T1、T2 和 T3 分别表示施加 0、0.5、1.0 和 1.5 mg/kg (以 Cd/干土计) 处理, 下同; 同列不同字母表示相同土壤不同处理间的显著差异 ($p < 0.05$)

2.2 土壤细菌群落结构

各处理细菌 16S rDNA V3 区片段 DGGE 分析显示 (图 1), Cd 胁迫明显增加了紫色土土壤细菌群落条带数, 并出现了一些特有的条带, 各处理间相似性较低. 然而, Cd 胁迫明显降低了冲积土土壤细菌群落条带数, 且各处理间共有条带较多. 施 Cd 处理下冲积土细菌群落条带相似度达 0.73, T1 和 T3 处理下相似度达 0.88 (图 2).

尽管 2 种类型土壤各处理间细菌群落 Shannon-Wiener 指数无显著差异 (图 3), 但在紫色土上表现出随 Cd 浓度增加而增加的趋势, 在冲积土上表现出随 Cd 浓度增加而下降的趋势. 施加 Cd 处理明显增加了冲积土细菌群落的 Simpson 指数, 紫色土中以 T1 处理也有显著增加, 而冲积土中以 T2 处理最高.

2.3 微生物生物量 C 和 N

紫色土 MBC 明显小于相应处理下冲积土, 而 MBN 明显大于冲积土 (图 4). 施加 Cd 处理并不显

性^[24]. 数据的分析采用 SPSS 18.0 软件进行, 以 LSD 法检测不同处理间的差异显著性 ($p < 0.05$).

2 结果与分析

2.1 可培养微生物计数

紫色土可培养细菌和真菌数量均大于相应处理条件下冲积土, 但可培养放线菌数量小于冲积土. 施加 Cd 处理显著增加了紫色土中可培养细菌和放线菌数量, 二者在 3 个处理条件下表现为 T3 > T1 > T2, 但可培养真菌数量和真菌/细菌表现出随 Cd 浓度的增加而降低的趋势 (表 2). 相对于不施 Cd 处理, T1 和 T2 处理表现出冲积土可增加培养细菌和真菌数量的趋势, 但 T3 处理降低了细菌和真菌数量. 施加 Cd 处理显著降低了冲积土可培养放线菌数量.

表 2 不同土壤类型下 Cd 对可培养的土壤微生物数量的影响¹⁾

Table 2 Effects of different Cd supplies on culturable soil microbial amounts

类型	处理	细菌 $\times 10^4$ /CFU·g ⁻¹	真菌 $\times 10^3$ /CFU·g ⁻¹	放线菌 $\times 10^4$ /CFU·g ⁻¹	真菌/细菌数量比 $\times 10^{-2}$
紫色土	CK	88.52 ± 0.50 a	17.67 ± 5.20 a	14.00 ± 2.05 a	1.99 ± 0.60 a
	T1	201.14 ± 1.00 b	8.67 ± 2.45 b	58.00 ± 7.48 ab	0.46 ± 0.30 b
	T2	158.49 ± 7.50 c	7.33 ± 4.99 b	45.00 ± 4.78 b	0.43 ± 0.10 b
	T3	257.75 ± 0.50 d	4.03 ± 0.82 b	70.67 ± 15.87 c	0.16 ± 0.20 b
冲积土	CK	70.42 ± 8.11 a	4.5 ± 0.41 a	272.31 ± 5.28 a	0.6 ± 0.06 a
	T1	132.52 ± 9.52 b	5.01 ± 0.82 ab	167.5 ± 5.5 b	0.5 ± 0.06 ab
	T2	78.58 ± 10.39 c	6.14 ± 1.12 b	213.41 ± 6.32 c	0.8 ± 0.13 c
	T3	62.14 ± 7.19 c	3.21 ± 0.82 c	169.34 ± 10.67 b	0.4 ± 0.13 b

1) CK、T1、T2 和 T3 分别表示施加 0、0.5、1.0 和 1.5 mg/kg (以 Cd/干土计) 处理, 下同; 同列不同字母表示相同土壤不同处理间的显著差异 ($p < 0.05$)

著影响紫色土 MBC, 但显著降低 MBN, 并显著增加 MBC/MBN. 相对于不施 Cd 处理, T2 显著降低冲积土 MBC 和 MBN, 但 T1 显著增加冲积土 MBN, 降低 MBC/MBN.

3 讨论

微生物群落结构的变化能够较早地预测环境质量的变化, 是最有潜力的敏感性生物指标之一^[25]. 本研究结果表明不同土壤环境条件下微生物群落对 Cd 胁迫的响应存在明显的差异. 施加 Cd 处理明显增加了栽植杨树的紫色土中可培养细菌和放线菌数量, 出现了一些特异性的细菌类群, 降低了可培养真菌的数量和 MBN 含量. 相反, 栽植杨树的冲积土中可培养的细菌和真菌数量在较低浓度的 Cd 处理中表现出增加的趋势, 而高浓度的 Cd 胁迫显著降低各类可培养微生物数量和 MBN, 且各处理下细菌群落结构的相似度较大. 这一方面说明现实环境浓度的 Cd 污染对土壤微生物群落结构具有一定程度

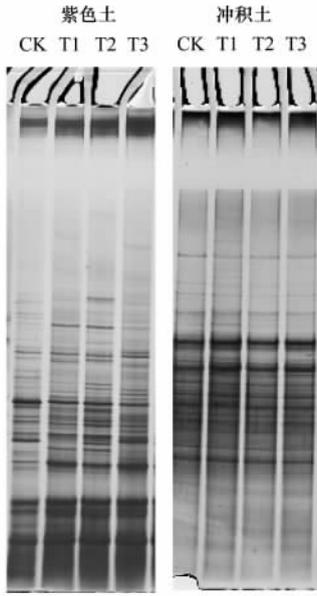
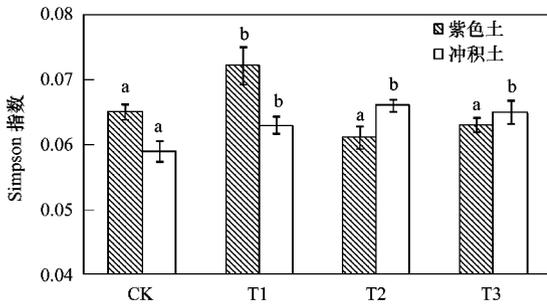


图1 不同 Cd 处理下紫色土和冲积土土壤细菌群落的 DGGE 分析结果

Fig. 1 DGGE profiles of amplified 16S rDNA gene of purple soil and alluvium soil with different Cd supplies



不同字母表示相同土壤不同处理间的显著差异 ($p < 0.05$), 下同

图3 不同土壤类型下 Cd 对细菌多样性的影响

Fig. 3 Effects of different Cd supplies on bacterial biodiversity

可以认为是具有活性和正常功能的耐受性优势微生物类群,在土壤物质转化等过程中具有十分重要的意义. 本研究中,低浓度 Cd 处理后 2 种土壤类型下细菌数量均表现出增加的趋势,这可能是由于可培养部分的细菌对 Cd 有较强耐性,且低浓度 Cd 的存在可以刺激植物的生长^[27],为土壤微生物提供更多的底物. 这与已有的研究结果基本一致^[28]. 但 Cd 处理浓度进一步升高,达到甚至超出微生物最大耐受度时,种群正常的生理活动就会受到影响或改变,最终表现为明显的毒害作用. 本研究中高浓度 Cd 处理显著降低了冲积土各类可培养微生物数量也充分说明了这一点. 一般地,酸性环境下 Cd 的有效性相对较高,其生物毒性也相对较高,可能对土壤微生物

的影响,进而改变土壤物质循环与能量流动等过程;另一方面也表明这种影响与土壤环境背景密切相关.

采用平板计数的传统方法可以很好地了解可培养微生物的群落结构特征^[26]. 这部分可培养微生物

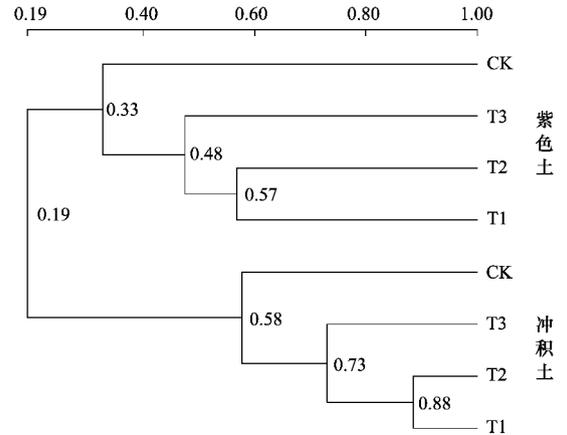
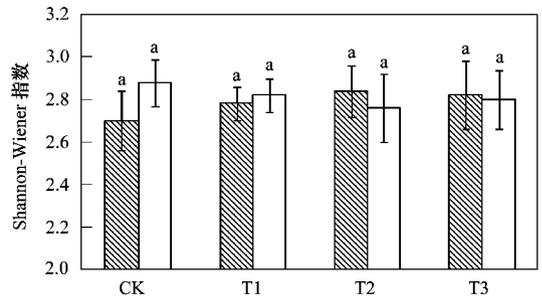


图2 基于 DGGE 分析结果的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of DGGE profile of amplified 16S rDNA gene from purple and alluvium soil



的伤害作用更强. 然而,本研究结果中,不同浓度 Cd 处理下酸性紫色土中可培养细菌和真菌数量均显著大于碱性冲积土. 这主要与紫色土肥力较高、有机质含量丰富、微生物底物有效性相对较高密切相关(表 1). 相对于真菌,细菌和放线菌的敏感性、耐受性和变异性相对较大^[29]. 尽管受到相似的环境干扰,细菌和放线菌可以通过改变自身群落结构较好地适应新的环境,且施加 Cd 处理可能增加部分微生物的底物有效性,从而表现出可培养细菌和放线菌数目在紫色土中增加的趋势. Cd 在一定程度上也可以刺激部分细菌的生长,在 PCR-DGGE 条带分析中也发现了一些特异性条带. Lorenza^[10] 和 Fileßbach^[30] 等也观察到相似的现象. 但是,冲积土

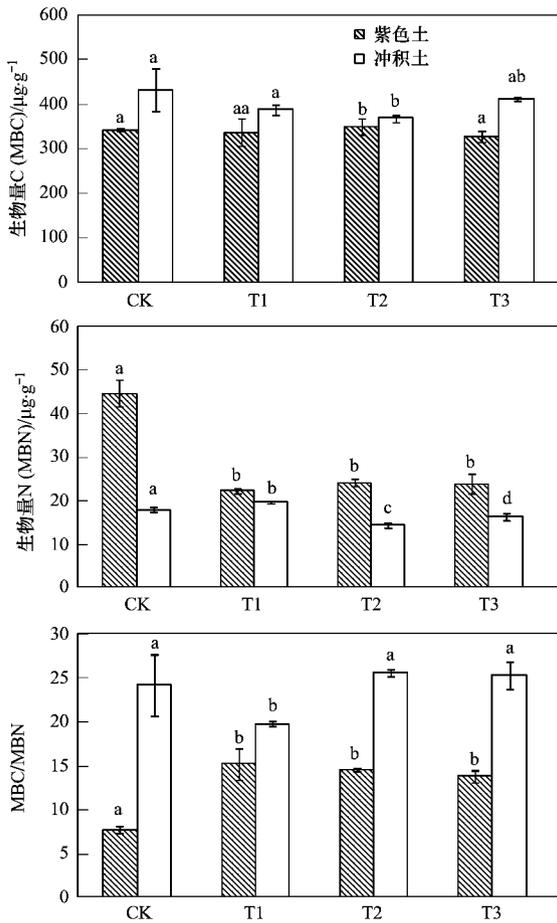


图4 不同土壤类型下 Cd 对土壤微生物生物量的影响

Fig. 4 Effects of different Cd supplies on soil microbial biomass

中微生物群落结构相对简单,较强的环境干扰可能一定程度上影响可培养微生物的数量.这从细菌 PCR-DGGE 条带相似度分析也可得出相似结论,紫色土各处理间细菌群落结构相似度明显小于冲积土.

PCR-DGGE 是近年来较为常用检测微生物群落结构的手段之一,可以一定程度上弥补传统平板培养法对现存微生物计数不完整的缺陷.对 2 类土壤不同浓度 Cd 处理间 PCR-DGGE 条带分析表明,Cd 胁迫显著增加了紫色土细菌群落条带数目,但降低了冲积土细菌群落条带数目.这与可培养细菌计数结果基本一致.主要的原因可能是紫色土具有相对较好的微生物底物条件,具有相对丰富的细菌群落类型,在接受环境干扰下具有相对较高的缓冲性.不仅如此,施加 Cd 一定程度上促进了部分耐受性细菌的生长和发展,改变了细菌群落结构,这和段学军等^[15]的结果一致.一些特异性条带的发现和相对较小的相似度可以充分证明这一观点.另外,根据 Shannon-Wiener 和 Simpson 多样性指数的变化,也可

以看出 Cd 对紫色土中的细菌表现出一定的刺激作用,提高了土壤细菌的多样性,但优势度有一定的降低.而冲积土中则表现出相反的规律.这主要与土壤中土著细菌群落及其对 Cd 的耐受性差异、以及 Cd 胁迫条件下某些优势类群的出现与消亡密切相关.

微生物生物量可以一定程度上表征土壤现存微生物生长和存活状况,是评价重金属影响土壤微生物的最为敏感的指标之一^[12].尽管可培养微生物数量在各处理间表现出明显差异,但是 2 类土壤中不同处理间 MBC 并无显著差异.这可能是土壤中 Cd 敏感类群与耐性类群之比发生了明显的变化,土壤微生物群落结构发生改变,但总的数量和生物量并没有发生明显的变化^[31].Dar 等^[32]发现 10 mg/kg 的 Cd 处理没有明显影响土壤微生物生物量也充分证明了这一点.然而,MBN 表示土壤微生物利用 N 元素的能力和效率,在本研究中并未随着 MBC 的变化而变化.Cd 处理显著降低了 2 种土壤中 MBN,这充分说明 Cd 处理已经影响了土壤-植物系统中微生物对 N 元素的转化和利用.已有的研究也观察到相似的结论^[32~34].这些结果表明现有 Cd 胁迫条件改变了微生物群落结构,影响了微生物的生理生长活动,改变了其应有的功能.

4 结论

(1) 现实环境浓度 Cd 胁迫明显改变了栽植杨树紫色土和冲积土可培养微生物数目、细菌群落结构特征和微生物生物量特征,但不同土壤间由于不同的微生物底物条件、生活环境及土著类群,表现出对 Cd 胁迫不同的响应特征.

(2) 施加 Cd 处理明显增加紫色土可培养细菌和放线菌数量,降低可培养真菌数量,并导致一些特异性条带的出现,改变了细菌群落结构.

(3) 尽管施加低浓度 Cd 处理也明显增加冲积土可培养细菌和真菌数量,但较高浓度 Cd 处理明显降低了各可培养微生物类群数量,降低了细菌群落条带数.

参考文献:

- [1] Folgar S, Torres E, Pérez-Rama M, et al. *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, **165** (1-3): 486-493.
- [2] Zacchini M, Pietrini F, Mugnozza G S, et al. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics[J]. *Water Air and Soil Pollution*,

- 2009, **197**(1-4): 23-34.
- [3] Wu G, Kang H B, Zhang X Y, *et al.* A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **174**(1-3): 1-8.
- [4] 杜波, 杨万勤, 张健. 山丘平原过渡区土壤重金属污染特征及评价——以四川省五通桥区为例[J]. *山地学报*, 2006, **24**(B10): 82-87.
- [5] 简毅, 杨万勤, 张健, 等. 岷江下游(五通桥段)土壤污染特征及生态风险评价[J]. *农业环境科学学报*, 2009, **28**(2): 256-262.
- [6] 郭晋君, 吴小平, 罗岳平, 等. 根据主要污染因素建立土壤中镉的污染预测模型[J]. *污染防治技术*, 2008, **21**(5): 17-20, 30.
- [7] Gomes N C M, Landi L, Smalla K, *et al.* Effects of Cd-and Zn-enriched sewage sludge on soil bacterial and fungal communities [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.027.
- [8] 马新明, 李春明, 祖丽, 等. 镉和铅污染对烤烟根区土壤微生物及烟叶品质的影响[J]. *应用生态学报*, 2005, **16**(11): 2182-2186.
- [9] Anderson I C, Parkin P I, Campbell C D. DNA-and RNA-derived assessments of fungal community composition in soil amended with sewage sludge rich in cadmium, copper and zinc [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, **40**(9): 2358-2365.
- [10] Lorenza N, Hintemann T, Kramarewa T, *et al.* Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, **38**(6): 1430-1437.
- [11] Bååth E. Effects of heavy metals in soils on microbial processes and populations: A review [J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1989, **47**(3-4): 335-379.
- [12] 蒋先军, 骆永明, 赵其国. 重金属污染土壤的微生物学评价[J]. *土壤*, 2000, **32**(3): 130-134.
- [13] Doleman P. Resistance of soil microbial communities to heavy metals [A]. In: Jensen V, Kjoller A, Sorensen L H. *Microbial communities in soil* [M]. London, New York: Elsevier, 1985. 369-383.
- [14] Wu F Z, Yang W Q, Zhang J, *et al.* Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoids* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **177**(1-3): 268-273.
- [15] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析[J]. *环境科学*, 2004, **25**(5): 122-126.
- [16] 沈迪玉, 杨万勤, 张健, 等. 镉胁迫对欧美杂交杨 (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) 光合作用与生物量生产的影响[J]. *四川农业大学学报*, 2010, **28**(1): 61-66.
- [17] 鲍士旦. *土壤农化分析* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [18] 许光辉. *土壤微生物分析方法手册* [M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [19] 吴金水. *土壤微生物生物量测定方法及其应用* [M]. 北京: 气象出版社, 2006.
- [20] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(2): 316-322.
- [21] 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 encoding for 16S rRNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**(3): 695-700.
- [22] Kousuke I, Manabu F. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **67**(8): 3753-3755.
- [23] Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels [J]. *Clinical Chemistry*, 2000, **46**(6): 883-884.
- [24] Luo H F, Qi H Y, Zhang H X. Assessment of the bacterial diversity in fenvalerate-treated soil [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, **20**(5): 509-515.
- [25] 孙波. 土壤质量与持续环境 [J]. *土壤*, 1997, **29**(4): 169-224.
- [26] Donachie S P, Foster J S, Brown M V. Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity [J]. *The ISME Journal*, 2007, **1**(2): 97-99.
- [27] 曹玲, 王庆成, 崔东海. 土壤镉污染对四种阔叶树苗木叶绿素荧光特性和生长的影响 [J]. *应用生态学报*, 2006, **17**(5): 769-772.
- [28] 李勇, 黄占斌, 王文萍. 重金属铅镉对玉米生长及土壤微生物的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2009, **28**(11): 2241-2245.
- [29] 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.
- [30] Fließbach A, Martens R. Soil microbial biomass and activity in soil treated with heavy metal contaminated sewage sludge [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, **26**(9): 1201-1205.
- [31] Chander K, Brookes P C, Harding S A. Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, **27**(11): 1409-1421.
- [32] Dar G H, Mishra M M. Influence of cadmium on carbon and nitrogen mineralization in sewage sludge amended soils [J]. *Environmental Pollution*, 1994, **84**(3): 285-290.
- [33] Vig K, Megharaj M. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review [J]. *Advances in Environmental Research*, 2003, **8**(1): 121-135.
- [34] Khan K S, Xie Z M, Huang C Y. Effects of cadmium, lead, and zinc on size of microbial biomass in red soil [J]. *Pedosphere*, 1998, **8**(1): 27-32.