

污泥堆肥对氯嘧磺隆残留及土壤中真菌群落结构的影响

孟令男, 许修宏*, 李洪涛, 孙 瑜

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:采用 PCR-DGGE 技术, 利用盆栽大豆试验研究施用污泥堆肥对氯嘧磺隆污染土壤真菌群落结构的影响。结果表明: 施用污泥堆肥(2%、4%、8%)的土壤中真菌群落多样性指数高于对照, 且大豆生长不同时期(播种期、开花期、结荚期和收获期)土壤真菌群落结构差异显著, 即开花期和结荚期真菌多样性指数显著高于播种期和收获期。当污泥堆肥施用量为 4% 时, 真菌群落多样性指数最大。同时, 施用污泥堆肥有利于促进土壤中氯嘧磺隆的降解。根据真菌 18S rDNA 的片段序列分析, 施用污泥堆肥土壤中真菌可分为 4 类: 被孢霉科(*Mortierellaceae*)、酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)、牛肝菌科(*Boletaceae*)和肉盘菌科(*Sarcosomataceae*), 其中酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)是与氯嘧磺隆降解相关的类群, 被孢霉科(*Mortierellaceae*)是土壤有机质和养分含量丰富的标志类群。

关键词:污泥堆肥; 氯嘧磺隆; 18S rDNA; PCR-DGGE; 真菌多样性

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)03-0495-07 doi:10.11654/jaes.2014.03.014

Effects of Sewage Sludge Compost on Chlorimuron-ethyl Residue and Fungal Community Structure in Soil

MENG Ling-nan, XU Xiu-hong*, LI Hong-tao, SUN Yu

(College of Resources and Environmental Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Applying sewage sludge compost to soils may promote degradation of organic pollutants via enhancing microbial activities. A pot experiment was carried out to examine the effects of sewage sludge compost applications on chlorimuron-ethyl residue and fungal community structures in soil. Compared with the control, fungal diversity indexes were increased by sewage sludge compost (2%, 4%, 8%), with the maximum effects found at 4% compost. Soil fungal community structures were significant different at different growth stages of soybean (sowing, flowering, pod and harvest), with greater diversity indexes at flowering and pod period than at sowing and harvest stages. Applying sewage sludge compost facilitated degradation of Chlorimuron-ethyl in the soil. Based on sequencing of fungal 18S rDNA fragments, the main fungal populations in the soil were *Mortierellaceae*, *Saccharomycetaceae*, *Boletaceae* and *Sarcosomataceae*. *Saccharomycetaceae* was mainly related to chlorimuron-ethyl degradation, and *Mortierellaceae* was regarded as an indicator of rich organic matter and nutrients in soil.

Keywords: sewage sludge compost; chlorimuron-ethyl; 18S rDNA; PCR-DGGE; fungal community

污泥堆肥应用于农田被认为是污泥最有发展潜力的处置方式之一。污泥堆肥中含有丰富的有机质、氮、磷等养分^[1], 施加污泥堆肥有利于土壤有机质含量提高, 且施用的时间越长, 土壤有机质含量越高^[2-4], 而且污泥堆肥本身含有丰富的微生物, 可提高土壤微生物的数量^[5], 改善土壤环境, 更有利于植物生长。然而,

污泥堆肥能否降解土壤农药残留尚有待研究。

氯嘧磺隆价格低、活性高, 对大豆高度安全, 杀草谱广, 尤其对苣荬菜、刺菜等恶性杂草清除效果好, 因而被广泛使用, 是黑龙江省应用面积较大的大豆田除草剂品种之一^[6-8]。但氯嘧磺隆是长残留除草剂, 并对后茬作物、生物酶活性以及土壤肥力等有影响^[9-11], 其在土壤中主要通过水解和微生物降解作用而消失^[12]。

利用 PCR-DGGE 分析土壤中微生物多样性及群落动态的变化, 能够较好地分子水平上分析微生物群落结构和多样性、监测微生物群落动态变化^[13-16]。将污泥堆肥添加到施加氯嘧磺隆土壤中, 利用 PCR-

收稿日期: 2013-08-06

基金项目: 国家自然科学基金(31272484, 31372351)

作者简介: 孟令男(1987—), 女, 硕士研究生。

E-mail: meng_lingnan@163.com

* 通信作者: 许修宏 E-mail: xuxiuhong@neau.edu.cn

DGGE 技术研究污泥堆肥对残留氯嘧磺隆土壤真菌群落结构,以及土壤微生物多样性变化相关报道很少见。本研究采用 PCR-DGGE 技术,将不同比例的污泥堆肥添加到施加氯嘧磺隆的黑土中,按照大豆的播种、开花、结荚和收获期采集土壤样品,以该样品的基因组 DNA 为研究对象,通过比较土壤中真核微生物的 18S rDNA,来研究施加不同比例的污泥堆肥对含有氯嘧磺隆土壤真菌群落多样性的影响,为将污泥堆肥农用进而提高施加农药土壤的肥力提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试污泥堆肥

本试验采用的污泥堆肥,是将轧碎的稻草、污泥和微生物菌剂进行强制通风静态堆肥 40 d 后到达腐熟程度的污泥堆肥。污泥堆肥基本理化性质和重金属含量见表 1。

1.2 采样

将腐熟的污泥堆肥与黑土(东北农业大学种植园内采集)按 0、2%、4%、8%重量比混合,装入直径 15 cm,高 20 cm 聚乙烯盆中,每盆 14 kg,种植大豆。按照田间施用浓度($10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)将氯嘧磺隆混入到不含氯嘧磺隆的混合土壤中,每个处理 3 次重复。

分别在播种、开花、结荚和收获期对土壤样品进行采集,采集后放入冰箱于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

1.3 氯嘧磺隆含量测定

土壤样品处理参照辛颖等^[17]的前处理方法。高效液相色谱采用岛津高效液相色谱仪,测试条件^[18]:C18 反相柱,UV 检测器,检测波长 240 nm,柱温为室温,流动相为甲醇:水:乙酸=70:30:0.1,流速为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。准确称取氯嘧磺隆标准品 0.010 g ,用流动相配制 $0.1\sim 10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 系列浓度的标准溶液,按照上述色谱条件测定,得到色谱图,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。标准曲线为 $y=228.5x-19.069$, $R^2=0.9996$ 。其中 x 为氯嘧磺隆浓度, y 为峰面积。

1.4 DNA 的提取和纯化

样品总 DNA 提取方法按照傅以钢等^[19]的方法提取,纯化使用 OMAGA Gel Extraction Kit D2500-01 试

剂盒按照说明书进行操作。

1.5 真菌 18S rDNA 目的基因的扩增

扩增样品土壤真菌 18S rDNA 目的基因,采用扩增真菌 18S rDNA 基因的通用引物带有 GC 夹子的 NS7-GC(CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGA GGC AAT AAC AGG TCTG)和 NS8(TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA)。

PCR 采用 $50 \mu\text{L}$ 反应体系:其中 $10\times\text{PCR Buffer}$ $2.5 \mu\text{L}$ 、 dNTP $2.5 \mu\text{L}$ 、DNA $1 \mu\text{L}$ 、each primer($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Super Taq DNA($5\text{U}/\mu\text{L}$)Polymerase(HaiGen)各 $0.5 \mu\text{L}$,补足灭菌的 ddH_2O 至 $50 \mu\text{L}$ 。

真菌 18S rDNA-PCR 扩增条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s, $52.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s,35 cycles; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 min。

1.6 扩增产物的 DGGE 和测序

变性梯度凝胶电泳(DGGE)使用 8%的聚丙烯酰胺凝胶[丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1(W/V)],18S rDNA 的变性剂浓度适合的范围为 20%~35%(100%变性指 $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素和 40%去离子甲酰胺)。电泳运行条件: $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液,100V 电压, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温、恒压电泳 11 h。电泳结束后用硝酸银染色法对凝胶进行染色、拍照,获得 DGGE 条带图谱。将 DGGE 图谱上的主要条带切胶回收,再次使用不带 GC 夹子的引物进行去夹子反应,PCR 产物送到测序公司进行测序。

1.7 DGGE 图谱

根据 DGGE 图谱及 Quantity One 4.6.2 软件对图谱条带的分析,由式(1)(2)计算每个土壤样品中的微生物多样性指数(Shannon-Wiener, H)、丰富度(Richness, S)和均匀度(Evenness, E),从而从多个角度对土样中的微生物分布进行研究。

$$H=-\sum P_i \ln P_i \quad (1)$$

式中: $P_i=N_i/N$, N_i 为样品上各个条带吸收峰的面积, N 为样品上所有条带吸收峰的总面积。

$$E=H/\ln S \quad (2)$$

式中: S 为丰富度,即每一条泳道的条带数目^[20]。

1.8 系统发育

将测序所得各序列数据,通过 DNAMAN 软件进

表 1 污泥堆肥基本理化性质和重金属含量

Table 1 Physical and chemical properties and heavy metal contents of sewage sludge compost used

pH	有机质/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全氮/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	硝态氮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	全磷/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效磷/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	全钾/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效钾/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	重金属/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$					
								Zn	Cu	Cr	Ni	Pb	Cd
6.92	305	31.2	36.5	11.32	714	18.6	342	0.17	0.14	0.04	1.03	0.84	0.37

行处理,将获得的各序列提交 GenBank 申请序列登录号,用 Blast 程序将各序列与 GenBank 数据库中数据进行相似性比较后,获得相近已知序列,用 MEGA 4 中 NJ(Neighbor-Joining)法构建 18S rDNA 基因的系统进化树并对其进行系统发育分析。

2 结果分析

2.1 氯嘧磺隆的降解效果

在大豆播种期、开花期、结荚期和收获期分别对样品土壤氯嘧磺隆含量进行测定,样品中测得氯嘧磺隆含量如表 2,结荚期添加污泥堆肥比例为 8%的土壤样品未检测到氯嘧磺隆,收获期添加各比例污泥堆肥土壤样品均未检测出氯嘧磺隆(最低检测值 $<3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

表 2 不同污泥堆肥对氯嘧磺隆含量的影响($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 2 Effects of sewage sludge compost applications on chlorimuron-ethyl concentrations($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) in soil

施肥比例/% Compost rate/%	播种期 Sowing period		开花期 Flowering period		结荚期 Pod period		收获期 Harvest period	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
0	9.97	0.024	6.93	0.014	4.12	0.022	—	—
2	9.98	0.014	6.06	0.008	3.65	0.037	—	—
4	9.98	0.022	5.92	0.008	3.26	0.022	—	—
8	9.99	0.014	5.76	0.014	—	—	—	—

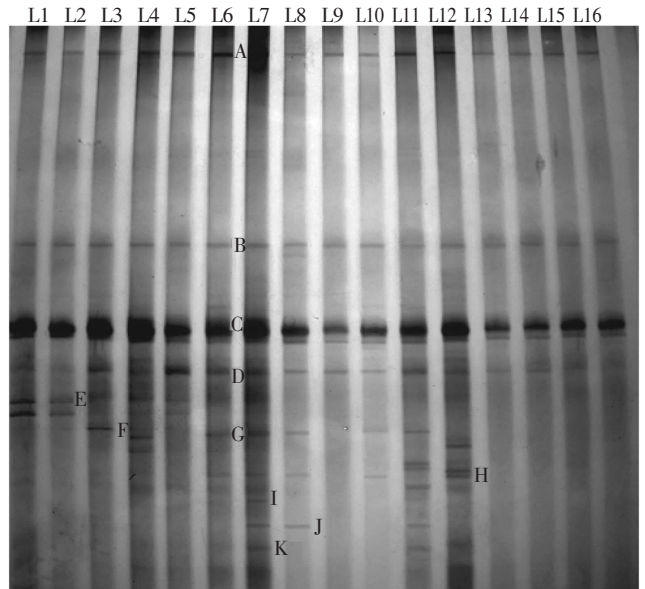
注:—表示未检出。

由表 2 可知,开花期末施加污泥堆肥样品氯嘧磺隆含量降低,说明氯嘧磺隆在土壤中存在自然降解作用。开花期和结荚期氯嘧磺隆含量与添加污泥堆肥比重成反比,说明施加污泥堆肥可以加速氯嘧磺隆降解,添加污泥堆肥比重越大氯嘧磺隆降解越多。

2.2 DGGE 图谱分析

样品真菌 18S rDNA 基因的 DGGE 图谱见图 1。所有样品中都检测到了条带 A、B、C,表明这 3 个条带指示菌可能是样品土壤真菌群落中普遍存在的优势菌群。同时,每个泳道中也存在着很多特异性的条带,表明在大豆生长不同的时期,由于养分、环境条件等的变化,样品土壤真菌群落结构发生了变化。播种期不同比例污泥堆肥的样品中,泳道 L4 中 DGGE 条带数目最多,说明该时期样品真菌数量和种类与施肥比例呈正相关,添加污泥堆肥比重增加,检测到的真菌条带数目也增加。开花期和结荚期条带数目增加,可能与该时期环境条件、营养元素均适合微生物生长繁殖有关;同时添加污泥堆肥样品 DGGE 条带数目

与添加污泥堆肥比重相关。当污泥堆肥添加比重为 4%时,样品 DGGE 条带数目最多。收获期样品 DGGE 条带数目最少,可能与环境等条件不适宜以及土壤养分消耗殆尽,不适合微生物的生长有关。



L1~L4 代表播种期;L5~L8 代表开花期;L9~L12 代表结荚期; L13~L16 代表收获期

图 1 真菌 18S rDNA 基因的 DGGE 图谱

Figure 1 DGGE profile of fungal 18S rDNA fragments from the samples

应用 Quantity one 4.6.2 软件分析真菌 18S rDNA 基因的 DGGE 图谱,得出每个泳道的多样性指数(H)、丰富度(S)和均匀度(E),结果如表 3 所示。比较各时期添加不同比例的污泥堆肥的土壤样品真菌多样性指数可知,在开花期、结荚期和收获期添加污泥堆肥比重为 4%的样品土壤真菌群落的多样性指数最高,可见适当比例的污泥堆肥有利于提高样品土壤真菌群落多样性指数。播种期土壤样品真菌多样性指数与添加污泥堆肥比重呈正相关;开花期和结荚期真菌多样性指数较高,可能与该时期环境条件等因素适宜真菌生长有关;收获期添加不同比例污泥堆肥样品土壤真菌群落多样性指数均较低,可能是土壤养分受到植物消耗、环境因素等影响,造成营养消耗殆尽,不适合真菌生长繁殖,真菌的种类减少。

2.3 系统发育分析

通过测序获得了大部分 DGGE 条带所代表的基因序列,将获得的各序列提交 GenBank 获得登录号为 KF699144 至 KF699154 的 11 个序列,通过 BLAST 比对,得到与其相似性较高的序列(表 4)。部分条带

表 3 DGGE 图谱多样性指数
Table 3 Diversity indices calculated from the DGGE banding profiles

评价指标 Evaluating indicator	播种期 Sowing period				开花期 Flowering period				结荚期 Pod period				收获期 Harvest period			
	0	2%	4%	8%	0	2%	4%	8%	0	2%	4%	8%	0	2%	4%	8%
S	9	10	12	14	10	13	15	13	8	9	16	14	6	7	8	8
H	2.09	2.19	2.28	2.46	2.37	2.56	2.71	2.56	2.18	2.29	2.48	2.40	2.04	2.06	2.08	2.07
E	0.95	0.96	0.97	0.99	0.97	0.97	0.99	0.98	0.97	0.98	0.99	0.99	0.96	0.95	0.99	0.98

表 4 DGGE 条带相似菌株
Table 4 Related neighbors of DGGE bands

克隆序列名 Clone No.	登录号 GenBank No.	最相似的已知序列及 GenBank 登录号 Most similar known sequence in Genbank and GenBank No.	相似性/% Similarity/%
A	KF699144	<i>Mortierella alpina</i> [AJ271630.1]	99
B	KF699145	Uncultured <i>Sarcosomataceae</i> clone [EF023583.1]	98
C	KF699146	<i>Mortierella elongata</i> isolate CFR-GV17 [KF568908.1]	99
D	KF699147	<i>Phaffomyces antillensis</i> strain NRRL Y-12881 [EF550400.1]	98
E	KF699148	<i>Zygomycete</i> sp. AM-2008a isolate 105 [EU428770.1]	97
F	KF699149	Uncultured <i>Boletaceae</i> clone [EF023416.1]	97
G	KF699150	<i>Tetrapisispora phaffii</i> strain NRRL Y-8282 [JQ698887.1]	96
H	KF699151	<i>Mortierella</i> sp. IS-10 [JF895929.1]	97
I	KF699152	Uncultured fungus clone LTSP_EUKA_P2F19 [FJ553119.1]	97
J	KF699153	Uncultured <i>Mortierella</i> clone LTSP_EUKA_P4O11 [FJ553914.1]	98
K	KF699154	Uncultured fungus clone LTSP_EUKA_P6J05 [FJ554362.1]	95

序列与已知序列相似性为 95%~99%，说明这些克隆序列与已知序列可能是同一个属。11 条真菌克隆片段包括 2 条真菌(*fungus*)克隆片段、4 条被孢霉属(*Mortierella*)真菌克隆片段、2 条酵母菌科(*Phaffomyces*)真菌克隆片段、1 条结合菌科(*Zygomycetes*)真菌克隆片段、1 条牛肝菌科(*Boletaceae*)真菌克隆片段、1 条肉盘菌科(*Sarcosomataceae*)真菌克隆片段。

利用软件 MEGA 4 将这些序列构建系统进化树,进行系统发育分析,如图 2 所示。将获得的 11 条序列通过 BLAST 比对和系统进化树分析后,真菌类群大致可分为 4 类:被孢霉科(*Mortierellaceae*)、酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)、牛肝菌科(*Boletaceae*)和肉盘菌科(*Sarcosomataceae*)。其中酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)主要与降解氯嘧啶隆有关系;牛肝菌科(*Boletaceae*)和被孢霉科(*Mortierellaceae*)是土壤有机质和养分含量丰富的标志,说明添加污泥堆肥有利于改善土壤养分;牛肝菌科(*Boletaceae*)个别种类与污染物的降解有关。

3 讨论

大豆生长的不同时期施加污泥堆肥,真菌群落结构发生改变。当污泥施加比例为 4%时,各时期真菌

群落结构多样性指数最大。由此可知,污泥堆肥的最适施肥比例为 4%,与 Vieira^[21]的研究相符,施加低浓度的污泥堆肥可以提高土壤肥力。然而伴随污泥施肥比例增加,真菌多样性指数未呈现上升趋势,可能与污泥中含有重金属等有关,Macdonald 等^[22]和 Gomes 等^[23]均发现污泥堆肥中重金属对微生物多样性有影响。

在本研究中,与一直存在的条带 A、B 和 C 亲缘关系较近的菌株分别为 *Mortierella alpina* (98%)、Uncultured *Sarcosomataceae* clone(99%)和 *Mortierella elongata* isolate CFR-GV17(99%),这 3 类真菌主要生长在有机质含量丰富的土壤中,添加污泥堆肥可以提高有机质含量,有利于这些真菌的生长。播种期 DGGE 条带数目与添加污泥堆肥有关系,伴随施肥比例增加,DGGE 条带数目、样品土壤真菌群落多样性指数与污泥堆肥的施加比例呈线性关系。樊晓刚等^[27]研究发现:土壤微生物多样性的变化与施肥水平密切相关,有机肥可以维持土壤微生物多样性。条带 E 只在播种期末添加污泥堆肥和添加 2%污泥堆肥的样品中出现,与其相似性较高的菌株为 *Zygomycete* sp. AM-2008a isolate 105(97%),该菌株是由 Schmidt 等^[28]在融雪后的森林土壤中分离出来的,它适合在低温条件下

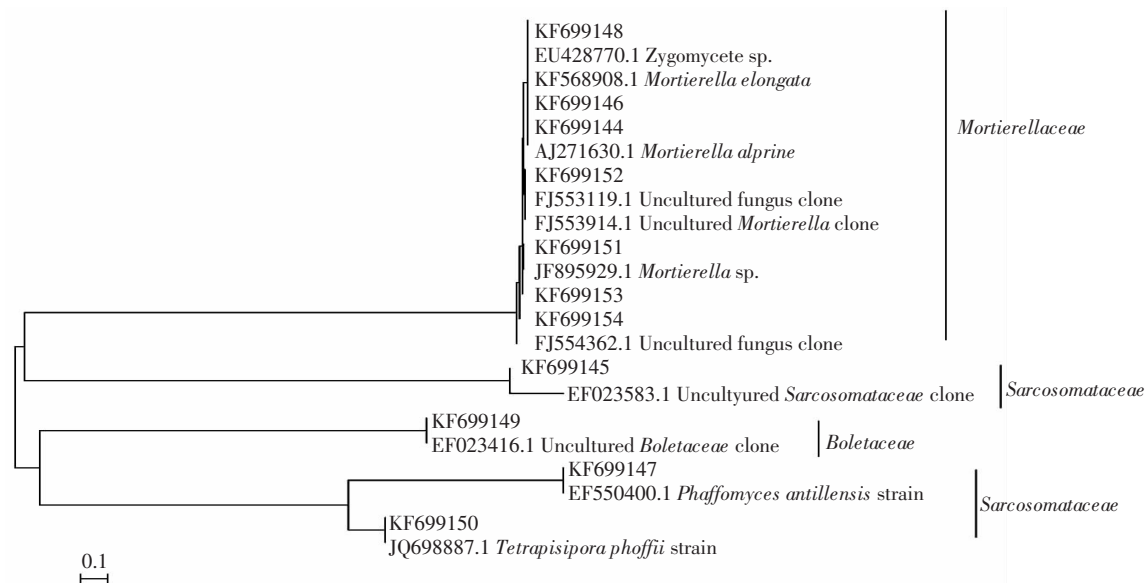


图 2 18S rDNA 序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences

生长。在本研究中该株真菌在大豆生长后期消失,可能既与添加污泥堆肥后土壤中优势菌群发生变化以及施加农药有关,也可能与温度上升不适合其生长繁殖有关。与条带 F 相似的菌株为 Uncultured *Boletaceae* clone(97%),是牛肝菌属的真菌,其中牛肝菌属中的个别菌种可以降解土壤污染物^[29]。但是该条带只在播种期添加污泥堆肥比例为 4% 的样品中出现,是否与污染物降解作用有关尚待进一步研究。

土壤中,氯嘧磺隆的消失主要是微生物降解和化学水解共同作用的结果。降解氯嘧磺隆的土壤微生物主要是细菌、放线菌和真菌^[24]。本研究主要针对土壤真菌群落进行,氯嘧磺隆的降解作用主要发生在开花期和结荚期。由表 2 可知:添加污泥堆肥有利于提高氯嘧磺隆的降解率,且随污泥堆肥添加比重的增加,降解率提高。条带 D 和 G 在开花期添加污泥堆肥土壤样品中出现,与其相似性较高的菌株为 *Phaffomyces antillensis* strain NRRL Y-12881(98%)和 *Tetrapisipora phaffii* strain NRRL Y-8282(96%)均为酵母菌。滕春红等^[25]分离出一株可以降解氯嘧磺隆真菌的 F8,经检测该株真菌为酿酒酵母;Zhang 等^[26]分离出一株具有降解氯嘧磺隆作用的真菌 *Sporobolomyces* sp. LF1,该株真菌也属于酵母纲。大量研究表明:酵母纲真菌具有降解氯嘧磺隆的作用,可以初步判定条带 D 和 G 可能与氯嘧磺隆的降解作用有关。本研究得到的氯嘧磺隆降解菌种类较少,可能与污泥堆肥过程中存在高温期,而真菌不适宜高温环境而消失有关。与此同时,添加污泥堆肥对氯嘧磺隆的降解作用并不是特别

明显,可能堆肥中降解氯嘧磺隆种类在整个真菌类群中不是最大的优势菌种,种类和数量都没有被孢霉科真菌多,所以降解作用会受到一定的限制。

开花期和结荚期 DGGE 条带数目明显增多,这可能与该时期环境条件适宜微生物生长以及添加污泥堆肥在土壤环境中起作用有关。在这两时期出现的条带 H、I、J、K 的相似菌株聚类分析发现主要是被孢霉属真菌,这可能与施加污泥堆肥养分得到改善有关,并且由于土壤环境十分复杂,样品土壤真菌种类也与植物根际活动有关系。Duineveld 等^[30]用菊花做试验材料发现:DGGE 图谱表明幼龄植株与成熟植株间根际土壤微生物群落结构差异很大,原因可归纳为与作物不同生育期根系分泌物不同有关,有待进一步研究。收获期 DGGE 条带数目达到最少,并且亮度最低,这可能与该时期土壤有机质消耗殆尽有关。

4 结论

(1)添加污泥堆肥有利于提高施用氯嘧磺隆土壤真菌群落多样性,开花期和结荚期微生物多样性指数远大于播种期和收获期。当污泥堆肥施加比例为 4% 时,真菌群落多样性指数最大,可作为最适施肥比例。

(2)氯嘧磺隆降解作用主要发生在大豆开花期和结荚期,添加污泥堆肥有利于提高氯嘧磺隆降解率,且随添加污泥堆肥比重增加,氯嘧磺隆降解率提高。

(3)对样品土壤进行真菌 18S rDNA 基因测序分析可知:真菌类群大致可分为 4 类,被孢霉科(*Mortierellaceae*)、酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)、牛肝菌

科(*Boletaceae*)和肉盘菌科(*Sarcosomataceae*)。其中酵母菌科(*Saccharomycetaceae*)主要与降解氯嘧磺隆有关;被孢霉科(*Mortierellaceae*)真菌成为主要优势菌株与添加污泥堆肥丰富土壤养分有关。

参考文献:

- [1] 冯 春, 杨 光, 杜 俊, 等. 污水污泥堆肥重金属总量及形态变化[J]. 环境科学研究, 2008, 21(1): 97-102.
FENG Chun, YANG Guang, DU Jun, et al. Study on the changes of total contents and the status of heavy metals for sewage sludge composting[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 21(1): 97-102.
- [2] 李艳霞, 陈同斌, 罗 维, 等. 中国城市污泥有机质及养分含量与土地利用[J]. 生态学报, 2003, 23(11): 2464-2474.
LI Yan-xia, CHEN Tong-bin, Luo Wei, et al. Contents of organic matter and major nutrients and the ecological effect related to land application of sewage sludge in China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(11): 2464-2474.
- [3] 刘 强, 陈 玲, 黄 游, 等. 施用污泥堆肥对土壤环境及高羊茅生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 199-203.
LIU Qiang, CHEN Ling, HUANG You, et al. Effects of application of sewage sludge compost on soil environment and *Festuca arundinacea* schreb[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1): 199-203.
- [4] Termorshuizen A J, van Rijn E, van der Gaag D J, et al. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(8): 2461-2477.
- [5] Gallardo F, Cea M, Tortella G R, et al. Effect of pulp mill sludge on soil characteristics, microbial community and vegetal production of *Lolium Perenne*[J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 95(Suppl): S193-S198.
- [6] Wang M E, Zhou Q X. Single and joint toxicity of chlorimuron-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 60: 169-175.
- [7] 盛 宇, 徐 军, 刘新刚, 等. 氯嘧磺隆对土壤微生物群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(11): 2992-2996.
SHENG Yu, XU Jun, LIU Xin-gang, et al. Effects of chlorimuron-ethyl on soil microbial community structure in soybean field[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(11): 2992-2996.
- [8] Xiong M H, Hu Z G, Zhang Y, et al. Survival of GFP-tagged *Rhodococcus* sp. D310-1 in chlorimuron-ethyl contaminated soil and its effects on the indigenous microbial community[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013(252-253): 347-354.
- [9] Wang M E, Zhou Q X. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144: 572-580.
- [10] Yang C L, Sun T H, He W X, et al. Single and joint effects of pesticides and mercury on soil urease[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 210-216.
- [11] Zhang X L, Li X, Zhang C G, et al. Ecological risk of long-term chlorimuron-ethyl application to soil microbial community: An in situ investigation in a continuously cropped soybean field in Northeast China[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2011, 18: 407-415.
- [12] Zhang W, Wang J J, Zhang Z M, et al. Adsorption-desorption characteristics of chlorimuron-ethyl in soils[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(11): 1359-1368.
- [13] 滕 应, 骆永明, 赵祥伟, 等. 重金属复合污染农田土壤 DNA 的快速提取及其 PCR-DGGE 分析[J]. 土壤学报, 2004, 41(3): 343-347.
TENG Ying, LUO Yong-ming, ZHAO Xiang-wei, et al. Rapid extraction and PCR-DGGE analysis of DNA compound pollution of heavy metals in soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3): 343-347.
- [14] Chong C W, Tan G Y A, Wong R C S, et al. DGGE fingerprinting of bacteria in soils from eight ecologically different sites around Casey Station, Antarctica[J]. *Polar Biology*, 2009, 32: 853-860.
- [15] Liu X C, Zhang Y, Yang M, et al. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19: 60-66.
- [16] 李 丹, 王秋玉. 变性梯度凝胶电泳及其在土壤微生物生态学中的应用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(3): 6-9.
LI Dan, WANG Qiu-yu. Denaturing gradient gel electrophoresis and its application in soil microbial ecology[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(3): 6-9.
- [17] 辛 颖, 纪明山, 黄媛媛. 大豆田土壤中氯嘧磺隆残留动态研究[J]. 杂草科学, 2009, 1: 29-30.
XIN Ying, JI Ming-shan, HUANG Yuan-yuan. In soybean soil chlorimuron-ethyl residue dynamic research[J]. *Weed Science*, 2009, 1: 29-30.
- [18] 秦胜红, 李新宇, 李 旭, 等. 不同土壤细菌种群结构对氯嘧磺隆胁迫的响应及降解菌系的获得[J]. 生态学杂志, 2012, 31(7): 1724-1732.
QIN Sheng-hong, LI Xin-yu, LI Xu, et al. Responses of bacterial community structure in different soils to chlorimuron-ethyl and acquisition of chlorimuron-ethyl degrading bacterial population[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(7): 1724-1732.
- [19] 傅以钢, 王 峰, 何培松, 等. DGGE 污泥堆肥工艺微生物种群结构分析[J]. 中国环境科学, 2005, 2(Suppl): 98-101.
FU Yi-gang, WANG Feng, HE Pei-song, et al. Analysis of microbial community structure with DGGE sludge compost technology[J]. *China Environmental Science*, 2005, 2(Suppl): 98-101.
- [20] 党秋玲, 刘 驰, 席北斗, 等. 生活垃圾堆肥过程中细菌群落演替规律[J]. 环境科学研究, 2011, 24(2): 236-242.
DANG Qiu-ling, LIU Chi, XI Bei-dou, et al. Dynamic succession law of bacterial communities during domestic waste composting[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(2): 236-242.
- [21] Vieira R F. Sewage sludge effects on soybean growth and nitrogen fixation[J]. *Biol Fertil Soils*, 2001, 34: 196-200.
- [22] Macdonald C A, Clark I M, Zhao F J, et al. Long-term impacts of zinc and copper enriched sewage sludge additions on bacterial, archaeal and fungal communities in arable and grassland soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43: 932-941.
- [23] 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, 73:1255-1263.
- [24] 刘祥英, 柏连阳. 土壤微生物降解磺酰脲类除草剂的研究进展[J]. 现代农药, 2006, 2(5):29-32.
- LIU Xiang-ying, BAI Lian-yang. Progress on degradation of sulfonylurea herbicides by soil microorganism[J]. *Modern Agrochemicals*, 2006, 2(5):29-32.
- [25] 滕春红, 陶 波. 氯嘧磺隆高效降解真菌 F8 的分离和鉴定[J]. 土壤通报, 2008, 10(39):1160-1163.
- TENG Chun-hong, TAO Bo. Separation and identification of chlorimuron ethyl degrading fungi F8[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 10(39):1160-1163.
- [26] Zhang X L, Zhang H W, Li X, et al. Isolation and characterization of *Sporobolomyces* sp. LF1 capable of degrading chlorimuron-ethyl[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21:1253-1260.
- [27] 樊晓刚, 金 轲, 李兆君, 等. 不同施肥和耕作制度下土壤微生物多样性研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2010, 16(3):744-751.
- FAN Xiao-gang, JIN Ke, LI Zhao-jun, et al. Soil microbial diversity under different fertilization and tillage practices: A review[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(3):744-751.
- [28] Schmidt S K, Wilson K L, Meyer A F, et al. Phylogeny and ecophysiology of opportunistic "Snow Molds" from a subalpine forest ecosystem[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56:681-687.
- [29] 魏树和, 周启星, 张凯松, 等. 根际圈在污染土壤修复中的作用与机理分析[J]. 应用生态学报, 2003, 1(14):143-147.
- WEI Shu-he, ZHOU Qi-xing, ZHANG Kai-song, et al. Roles of rhizosphere in remediation of contaminated soils and its mechanisms[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(1):143-147.
- [30] Duineveld B M, Kowalchuk G A, Keijer A, et al. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 172-178.