

添加外源耐砷菌与零价铁对土壤砷有效性和形态的影响

刘云璐, 李莲芳*, 曾希柏, 刘小诗, 苏世鸣, 段然, 王亚男, 吴翠霞

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所/农业部农业环境重点实验室, 北京 100081)

摘要:采用室内土壤培养试验,探讨了外源添加耐砷真菌棘孢木霉(*Trichoderma asperellum* L.)和零价铁对土壤砷的有效性和形态转化的影响。结果表明:向污染土壤中添加耐砷真菌棘孢木霉后,随着培养时间的延长,土壤中水溶态砷和 NaHCO₃ 提取态砷含量均呈稳定增加趋势,耐砷真菌促进了土壤中砷的溶出和释放;培养 30 d 时,耐砷菌处理土壤有效砷含量比同期对照增幅达 3.9%~10.7%,水溶态砷以 As(V) 为主,未检测到 As(III)、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)等其他形态的砷;随着外源零价铁的加入,土壤中砷的活性大大降低,其有效砷含量降幅为 76.5%~90.4%;在耐砷菌与零价铁联合作用下,相比于单纯的零价铁处理,土壤有效砷含量显著增加($P<0.05$),因耐砷真菌棘孢木霉的加入导致零价铁对土壤砷的固定效率下降 7.0%~11.1%。耐砷菌导致土壤砷活化可能主要与残渣态向非专性吸附态砷的转化等过程有关,外源零价铁对土壤砷的固定作用可能与非专性吸附态向无定形及弱晶质氧化物结合态、残渣态砷等转化过程相关;耐砷菌的加入抵消了零价铁对土壤砷的部分固定效果,但短期内(<30 d)不会构成大的影响。

关键词:砷污染;微生物;零价铁;效应

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2013)11-2175-10 **doi:**10.11654/jaes.2013.11.011

Arsenic Availability and Speciation in Soils Treated with Exogenous Arsenic-resistant Fungi and Zero-valent Iron

LIU Yun-lu, LI Lian-fang*, ZENG Xi-bai, LIU Xiao-shi, SU Shi-ming, DUAN Ran, WANG Ya-nan, WU Cui-xia

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ The Key Laboratory for Agro-Environment, Ministry of Agriculture PRC, Beijing 100081, China)

Abstract: Through indoor soil incubation experiment, arsenic availability and speciation in soil treated with exogenous arsenic-resistant fungi (*Trichoderma asperellum* L.) and zero-valent iron were explored. The results showed that when the exogenous arsenic-resistant fungi was added into soils, both the content of water soluble arsenic and the of content NaHCO₃ extractable arsenic increased steadily with the prolonging incubation time, indicating that the arsenic-resistant fungi promoted the release and dissolution of arsenic from soils, and when the experiment lasted for 30 days, the increasing percentage of soluble arsenic content in soils ranged from 3.9% to 10.7% compared to the control treatment. Only arsenate[As(V)] was found out, and arsenic of other species including arsenite[As(III)], dimethylarsinic acid(DMA), monomethylarsonic acid(MMA) was not detected. With exogenous zero-valent iron added into soils, the reduced percentage of available arsenic in soils extracted by NaHCO₃ ranged from 76.5% to 90.4%. Compared to the zero-valent iron treatment, the available arsenic in soils increased significantly ($P<0.05$) under the treatment of exogenous arsenic-resistant fungi and zero-valent iron, and the stabilization efficiency decreased 7.0%~11.1% due to more available arsenic absorbed. The mechanism of activated arsenic in soils resulted from exogenous arsenic-resistant fungi maybe connected with the transformation from residual phase of arsenic to non-specifically sorbed one. The stabilization of arsenic due to the addition of exogenous zero-valent iron into soils may be related to the transformation process from non-specifically sorbed arsenic to residual phase and amorphous and poorly-crystalline hydrous oxides of Fe and Al phase. The addition of arsenic-resistant fungi *T. asperellum* resulted in the enhancement of available arsenic of soils treated with iron power in certain degree, which is not so obvious in short term.

Keywords: arsenic contamination; microbe; zero-valent iron; effect

收稿日期:2013-05-03

基金项目:国家自然科学基金(41001187);国家“十二五”支撑计划(2012BAD14B02)

作者简介:刘云璐(1989—),女,硕士研究生,主要从事土壤污染修复及其调控研究。

*通信作者:李莲芳 E-mail:lilianfang@ieda.org.cn

砷是环境中重要的污染物之一,具有极强的生物毒性以及致癌、致畸危害,世界卫生组织建议人体对砷的平均摄入量不超过 $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ [1],WHO 规定饮用水中砷的最大允许限量值由原来的 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 下调至 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [2]。据统计,世界上包括美国、波兰、智利、泰国、越南、尼泊尔等(以东南亚为主)约 19 个国家发生过重大的砷污染事件,其中孟加拉国由于天然地质成因,约 1300 万人口长期饮用砷污染的水源,当地农田因含砷地下水灌溉导致大面积的污染[3]。目前,全球至少 5000 多万人口面临砷中毒的威胁[4],仅孟加拉国每年因饮用水砷超标导致的癌症死亡人数高达 27 万人[5]。中国是砷污染严重的国家之一,湖南、广西、云南、内蒙古、台湾等地均有地方性砷中毒的报道,一些地区出现了严重的土壤污染,仅湖南郴州有约 1000 km^2 的土地受到砷污染[6]。Nrigau 的研究发现,全球每年以各种途径进入土壤中的砷总量约为 $0.94\times 10^8 \text{ kg}$ [7]。因此,对砷污染土壤的修复已成为当前各国政府和民众关注的焦点。

真正成功的土壤污染修复技术必须达到经济效益、社会效益和环境效益的统一。在重金属污染区,农民需要在维持正常的农业生产产出前提下,保持家庭经济收入的持续稳定增长。相比于依靠种植超富集植物修复污染农田而言,由于采用的是“边生产边修复”的治理模式,化学稳定技术作为重金属污染修复的一种常用而且很有前景的方法[8],也是砷污染原位修复最有效的技术途径之一,而钝化材料的选择成为该项技术的关键。研究表明,除石灰、飞灰、高岭土、蒙脱石和伊利石等可作为砷固化/稳定化的材料之外[9-10],利用外源添加含铁化学物质的方法可有效降低污染土壤中砷的移动性和活性[11-13]。根据 Warren 等的研究[14],在砷污染土壤中施用 FeSO_4 ,当施用量相当于土壤表层铁氧化物含量的 0.2% 时,植物所吸收的砷可减少 22%。零价铁作为高效渗透反应墙基质,成功应用于现场修复砷污染地下水。Zhu 等的研究表明,纳米零价铁/活性炭复合制剂对水体砷具有较好的去除效果[15]。但将零价铁用于土壤砷污染修复的研究尚不多见。与此同时,微生物作为土壤生态系统参与物能转化循环中异常活跃的组分,可对砷的地球化学循环过程产生影响,通过参与砷的氧化/还原、甲基化/去甲基化等作用,在土壤砷的累积、固定、迁移转化方面发挥着重要作用。据了解,自然界某些微生物能长期生存在砷含量较高的环境中,且具有土壤污染修复的潜力,例如:Čerňanský 等从砷污染的矿区土壤中分离得到 8 株具

有生物累积、固定与挥发砷能力的真菌[16];Visoottiviset & Panviroj 从含砷量为 $700 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的土壤样品中分离得到一株青霉(*Penicillium* sp.),培养 5 d 后,其对砷累积量为 $17.46\sim 39.97 \mu\text{g}$,对砷的挥发量为 $25.82\sim 43.94 \mu\text{g}$ [17]。已有研究表明,土壤中用真菌进行生物累积的砷可被生物体“固定”,降低土壤环境中砷的生物有效性和毒性[18],在土壤污染修复方面具有潜在的应用价值。根据我们前期的研究,2011 年从矿区污染土壤中分离筛选出的一株特殊功能菌棘孢木霉菌(*Trichoderma asperellum*) [19],该菌对砷具有较强的累积和挥发性能,但此种特性是否可以直接用于砷污染土壤的修复并降低农田砷污染风险,尚不得而知。

基于零价铁作为固定剂的化学钝化技术和以耐砷菌为基础的微生物调控措施在农田砷污染修复方面存在潜力,笔者拟探讨零价铁对土壤砷的固定效应,同时明确耐砷菌对土壤砷的调控效果以及在两种措施结合前提下的综合影响。一般来说,零价铁进入土壤后,易在多种环境因素的影响下发生环境行为上的变化,而微生物可参与各种元素的物理、化学和生物化学反应,进而影响元素的迁移转化,成为重要的影响因素之一。在耐砷微生物影响下,零价铁固定砷的效果可能会遇到挑战,耐砷菌对零价铁钝化土壤砷效果的稳定性和可持续固定能力的影响如何,是化学钝化技术值得重点关注的科学问题。直至当前,将零价铁和耐砷菌棘孢木霉菌用于土壤砷污染修复的研究尚不多见,尤其是在高耐砷菌棘孢木霉菌影响下,零价铁对土壤砷的固定能力影响的相关研究尚未见报道,本研究立足于此,拟为明确零价铁和耐砷菌棘孢木霉菌对土壤砷活性调控效果,同时揭示耐砷菌对零价铁固定土壤砷能力的影响,为开展砷污染修复及相关辅助技术的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤为取自湖南石门县鹤山村雄黄矿区砷污染土。土样采集后经风干、研磨后过 2 mm 和 100 目筛,备用。土壤基本性质为:总砷含量 $472.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, NaHCO_3 提取态砷 $5.03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,非专性吸附态砷 $3.55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,专性吸附态砷 $5.37 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,无定形及弱晶质氧化物结合态砷 $119.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,晶质氧化物结合态砷 $184.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,残渣态砷 $160.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。土壤镉、铜、镍、铅的含量分别为 0.38 、 23.6 、 23.8 、 $32.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 值 5.42,阳离子交换量 $10.4 \text{ cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$,有机质含量

1.25 g·kg⁻¹。土壤机械组成中, 粒径 2.0~0.2 mm 占 34.9%, 粒径 0.2~0.02 mm 占 17.9%, 0.02~0.002 mm 占 30.2%, <0.002 mm 占 17.0%。

耐砷真菌采用本课题组在高砷土壤中分离的棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)^[20]。棘孢木霉为从石门砷污染矿区采集的土壤样品经梯度稀释后涂布于含砷浓度为 500 mg As(V)·L⁻¹ 的马丁培养基上进行真菌的分离纯化所得。该菌菌落中央绿色絮状, 边缘白色絮状向外延伸。分生孢子梗细长, 顶端多为 2~3 个轮生的产孢瓶梗; 分生孢子无色到浅绿色, 近球形至球形, 在产孢细胞顶端聚集成团。当培养环境中砷浓度范围为 0~50 mg·L⁻¹ 时, 真菌的生物量表现出随砷浓度增加而增加的趋势, 且当砷浓度在 50 mg·L⁻¹ 时, 该菌株的生物量与不加砷的对照相比均达到显著水平。经过 2 d 的培养, 当培养溶液中砷浓度达到 30~200 mg·L⁻¹ 时, 其孢子数量为 10⁴~10⁵ cfu·mL⁻¹。在砷浓度为 20 000 mg·L⁻¹ 的胁迫条件下, 该菌表现出较好的菌落生长状况^[20]。

本研究采用的零价铁为购买于天津市福晨化学试剂厂的还原铁粉(分析纯, 符合 HG/T 3473—2003 XK13-011-00017 标准), 其 Fe 含量不少于 98.0%, 杂质的最高含量依次为: 硫酸不溶物 0.1%、硫化物(以 SO₄ 计) 0.06%、氮化合物(以 N 计) 0.005%、铜(Cu) 0.0005%、水溶物 0.03%。

1.2 试验处理

本研究采用自然砷污染土壤, 探讨耐砷微生物参与下零价铁对土壤砷生物有效性的调控效果。试验共设计 8 个处理: ①自然土 CK, ②自然土+菌, ③自然土+零价铁(铁粉), ④自然土+零价铁(铁粉)+菌, ⑤灭菌土 CK, ⑥灭菌土+菌, ⑦灭菌土+零价铁(铁粉), ⑧灭菌土+零价铁(铁粉)+菌。每处理重复 3 次。称取 100.0 g 土样入 200 mL 的烧杯, 将预先制备好的高耐砷真菌棘孢木霉的孢子悬液接种入土壤中, 接入菌数量为 1.5×10⁶ cfu·mL⁻¹, 灭菌土用高压灭菌器连续灭菌 2 h 制得, 不接种处理加入等量的灭菌菌剂, 其中零价铁处理的铁元素加入量为土壤干重的 1%, 保持所有处理土壤含水量为田间持水量的 75%, 在生化培养箱 28 ℃下培养, 试验时间为 30 d, 当培养进行至 0(2 h)、5、10、15、20、25、30 d 时取样, 分析不同处理下土壤中 As(Ⅲ)、As(V) 等化学形态砷的含量。

1.3 指标分析测定

土壤水提取液化学形态砷含量的分析^[22]: 称取相

当于 1.000 0 g 风干土的新鲜土, 加入去离子水 10 mL, 振荡 30 min, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 重复 3 次, 合并上清液, 0.22 μm 膜过滤, 采用高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光仪(HPLC-HG-FAS, 型号 SA-10, 北京吉天)对提取液中的砷形态 As(Ⅲ)、一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)及 As(V) 进行分析, 仪器的检出限为 As 0.02 μg·L⁻¹。配制 7% 的盐酸, 并以 1.5% KBH₄+0.35% KOH 作为还原剂, 0.02 mol·L⁻¹ NH₄H₂PO₄ (用甲酸调 pH 值为 6) 作为流动相, 其他仪器条件为: 灯电流 90 mA, 负高压 295 V, 辅阴极电流 40 mA, 屏蔽气流量 600 mL·min⁻¹。所有样品均需过 0.22 μm 的微孔滤膜, 具体可参考 José 等采用的方法^[23]。

土壤 NaHCO₃ 提取态砷的测定^[24-25]: 称取新鲜土样 5.00 g, 用 0.5 mol·L⁻¹ 的 NaHCO₃ 溶液 50 mL 振荡 2 h, 过滤, 吸取滤液, 用抗坏血酸+硫脲还原剂还原, 待测。土壤总砷样品的分析采用美国国家环保局(USEPA)推荐的 HNO₃-H₂O₂ 消煮法, 砷含量采用氢化物发生-原子荧光仪(HG-FAS, 型号 9120, 北京吉天)进行测定, 仪器最低检出限为 0.02 μg As·L⁻¹。

土壤砷结合形态的测定^[21]: 取相当于 1.000 0 g 土样, 风干研磨过 2 mm 土筛, 用 Wenzel 连续提取法提取。0.05 mol·L⁻¹ 的 (NH₄)₂SO₄ 溶液振荡 4 h 提取, 离心过滤, 得到土壤非专性吸附态砷; 再用 0.05 mol·L⁻¹ 的 (NH₄)₂HPO₄ 溶液振荡 16 h 提取, 离心过滤, 得到土壤专性吸附态砷; 用 0.2 mol·L⁻¹ 草酸铵缓冲液(pH 3.25) 黑暗振荡 4 h 提取, 离心过滤, 洗涤用 0.2 mol·L⁻¹ 草酸铵缓冲液(pH 值 3.25) 黑暗振荡 10 min, 得到土壤无定形及弱晶质氧化物结合态砷; 用 0.2 mol·L⁻¹ 草酸铵+0.1 mol·L⁻¹ 抗坏血酸溶液水浴加热 30 min, 离心过滤, 洗涤用 0.2 mol·L⁻¹ 草酸铵缓冲液(pH 值 3.25) 黑暗振荡 10 min, 得到土壤晶质氧化物结合态砷, 最后烘干土壤, 研磨过筛, 加入 3 mL HNO₃、9 mL HCl, 消煮至样品呈灰白色, 定容到 50 mL, 过滤, 得到残渣态砷。吸取滤液用抗坏血酸+硫脲还原剂还原, 采用氢化物发生-原子荧光仪(HG-FAS, 型号 9120, 北京吉天)进行分析。

1.4 数据质量控制

本研究采用砷标准物质的水样(GBWZ50004—1988, 国家环境保护部环境标准物质研究所)、不同形态砷 As(Ⅲ)、As(V)、DMA、MMA 的标准物质 GBW08666、GBW08667、GBW08668、GBW08668(中国计量科学研究院)进行标准曲线绘制及分析测定, 标准曲线相关系数为 0.999 9; 采用土壤标准物质

GBW07405 GSS-5 进行土壤消毒,方法的回收率均在93.5%以上;试验过程采用添加试剂空白,15%抽样分析检验方法的重现性,平行样品间的误差低于5%,达到质量控制要求。

1.5 统计分析

本文的数据统计及 ANOVA 分析采用 SPSS 14.0 软件,作图采用 Office 2007 的 Excel 软件完成。

2 结果与分析

2.1 接种抗砷微生物和添加零价铁对土壤水溶性砷形态的影响

在各处理下,土壤水提取态 As(V) 随着时间的变化趋势如图 1 所示。可以看出,对于灭菌和不灭菌的处理,土壤水溶性砷主要以 As(V) 为主,没有检测出 As(III)、MMA 及 DMA 的存在,且土壤中 As(V) 的含量均随着培养时间的延长呈现不断升高的趋势。

在加入抗砷微生物后,自然土中砷的活性在不同时期明显增加。当培养时间为 5 d 时,加菌后自然土中的水提取态 As(V) 含量比自然土增加了 8.69%;至 20 d 时,土壤中水提取态 As(V) 增加比例为 9.65%;25 d 时自然土中水溶态 As(V) 含量为 $2.245 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,加抗砷菌后增加为 $2.508 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,增幅 11.7%;当培养

至 30 d 时,加菌处理相比于不加菌对照处理情况下土壤中水溶态 As(V) 的含量增幅达 14.0%。相比于灭菌土系列而言,加入耐砷菌后的自然土处理,各培养时期土壤中水提取态 As(V) 含量均略高于灭菌土。

添加零价铁后,土壤中水提取态 As(V) 含量大幅降低。在加入零价铁 2 h 后对土壤取样分析,发现自然土壤中水提取态 As(V) 含量由原来的 $1.132 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 降低至 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,下降幅度达 90.4%。随着培养时间的延长,土壤中水提取态 As(V) 含量呈升高趋势,但均显著低于未添加零价铁的对照处理 ($P < 0.05$)。至 15 d 时,添加零价铁后土壤中水提取态 As(V) 含量已检测不出,而同期对照水提取态 As(V) 含量为 $1.942 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;至 30 d 时,添加零价铁后的土壤中水提取态 As(V) 含量依然低于检出限,远远低于同期对照处理。灭菌土系列的情况与自然土的情况相似。随着零价铁的加入,灭菌土中水提取态 As(V) 含量亦大大降低,显著低于灭菌土对照处理 ($P < 0.05$)。

加入零价铁和抗砷微生物后,自然土壤中水提取态 As(V) 的含量比自然土对照明显降低,在第 1 d 培养 2 h 的结果表明,土壤中水提取态 As(V) 由对照的 $1.132 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下降为 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,降低幅度为 94.7%,与单纯的零价铁处理下土壤水提取态 As(V) 含量基本相当,当培养时间进行至 25、30 d 时,零价铁与抗砷微生物联合处理下土壤水提取态 As(V) 含量分别为 0.014 、 $0.022 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,比同期对照处理显著降低 ($P < 0.05$),相应的降幅分别为 99.4%、99.0%,但同期零价铁处理下土壤水提取态 As(V) 含量均检测不出,显著低于零价铁和抗砷微生物的联合处理。而对于灭菌土+铁粉+菌的处理,在加入菌及零价铁后 2 h 时,土壤中水提取态 As(V) 含量已低于 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 检出限,而后随着培养时间的延长,其含量有所上升,但均远远低于灭菌土对照处理 ($P < 0.05$)。

2.2 接种抗砷微生物和添加零价铁对土壤有效态砷含量的影响

在不同的处理下土壤有效砷含量随着时间的动态变化趋势如图 2 所示。可以看出,随着培养时间的延长,无论对灭菌土系列还是自然土系列的处理,土壤有效砷含量均呈现连续快速上升的趋势,其中以自然土+菌的处理增加幅度最大。

随着耐砷菌加入土壤,自然土和灭菌土中有效砷含量均有一定程度的增加,尤其在试验后期,增加的幅度更为明显。从自然土系列来看,自然土+菌处理在培养 2 h 后,其有效态含量比原土 ($6.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 增

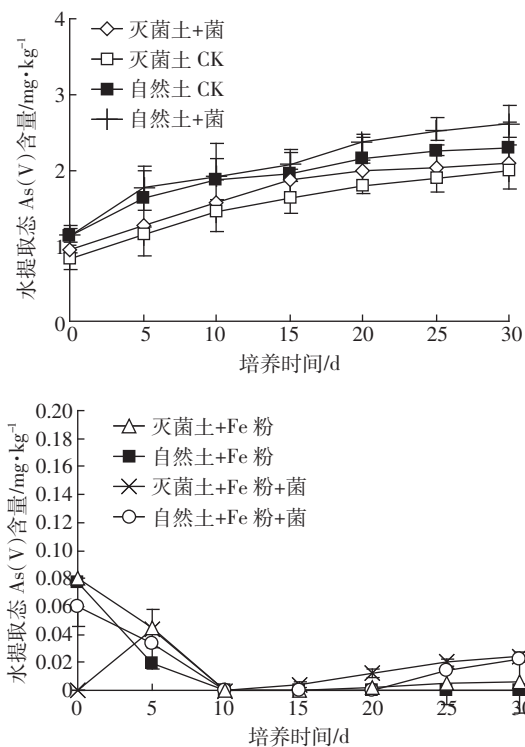


图1 土壤中化学形态砷随着时间的变化

Figure 1 Change on arsenic of different species in soils with time prolonged

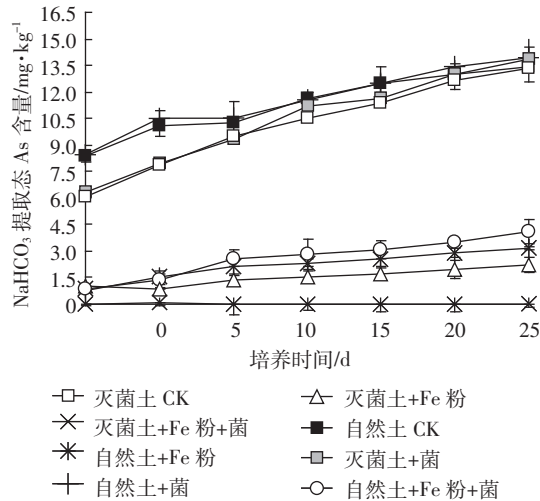


图2 土壤中 NaHCO₃ 提取态砷随培养时间的变化

Figure 2 Change on arsenic extracted with NaHCO₃ in soils with time prolonged

加了 2.40 mg·kg⁻¹, 增幅为 39.9%, 当培养 30 d 时, 比原土增加 8.9 mg·kg⁻¹, 增加了 1.48 倍, 比同期自然土的有效砷增加了 10.7%。从灭菌土系列的情况看, 当培养进行 2 h 时, 灭菌土有效砷比原土增加 1.1%, 而加入耐砷菌的灭菌土处理同比增加 4.7%; 当培养进行至 30 d 时, 灭菌土壤有效砷相比于原土增幅 121.0%, 而加耐砷菌后的增幅为 126.6%, 加菌土的有效砷含量同比增加了 3.9%, 但两处理间无显著差异。

向高砷土中添加零价铁后, 土壤有效砷含量显著降低 ($P < 0.05$), 根据培养初期 (2 h) 取样分析结果, 灭菌土+零价铁处理比灭菌土的有效砷含量降低了 83.8%, 自然土+零价铁处理比自然土的有效砷含量降低了 90.4%, 随着培养时间的延长, 各处理下土壤有效砷含量均随着培养时间的延长呈现稳定增加的趋势, 至 30 d 时, 灭菌土+零价铁处理的土壤有效砷含量为 2.216 mg·kg⁻¹, 比灭菌土同期对照处理降低 83.4%, 而自然土+零价铁处理土壤有效砷含量为 3.158 mg·kg⁻¹, 比同期自然土降低幅度为 76.5%。不难看出, 无论对灭菌土还是自然土而言, 零价铁对土壤中活性砷的固定作用均十分明显。

在耐砷菌和零价铁双因素作用下, 无论对灭菌土还是自然土的情况, 土壤中有效砷含量均比灭菌土和自然土对照处理大大降低。当培养试验进行 2 h 后, 自然土+零价铁+菌、灭菌土+零价铁+菌的两处理土壤有效砷含量分别为 0.892、0.640 mg·kg⁻¹, 比相应的对照处理降低了 89.3%、89.5%; 至 15 d 时此两处理土壤有效态分别升至 2.837、1.951 mg·kg⁻¹, 至 30 d

时其值分别为 4.103、2.749 mg·kg⁻¹, 比同期的自然土+零价铁、灭菌土+零价铁处理分别增加了 19.4%、23.0%, 与同期的自然土、灭菌土处理相比, 含量分别降低了 80.2%、72.5%, 且总体上均远远低于对照处理下的有效砷含量水平。

由此看来, 无论是单纯的零价铁处理还是零价铁与耐砷菌联合作用处理, 其土壤有效砷含量均比对照处理显著降低 ($P < 0.05$), 但在耐砷菌与铁粉的联合作用下, 土壤 NaHCO₃ 提取态砷含量比单纯的零价铁处理升高 24.1%~29.9%, 导致零价铁对土壤砷的固定效率同比下降 7.02%~11.1%, 使零价铁对土壤砷的固定作用受到一定程度的影响。耐砷菌的加入导致相应零价铁施用土壤的有效砷含量小幅增加, 尤其是自然土+铁+菌处理与单纯的零价铁处理间差异显著 ($P < 0.05$), 而灭菌土的相应处理差异不明显。这表明零价铁的加入有利于土壤中砷的固定, 而耐砷菌的存在会对零价铁固定土壤活性砷存在一定程度的抵消作用。

2.3 接种抗砷微生物和添加零价铁对土壤中砷化学形态的影响

在耐砷菌及零价铁的作用下, 土壤中结合形态砷呈现不同的变化规律, 如图 3 所示。

向土壤中加入耐砷菌后, 土壤中各种形态的砷发生了相互转化。从非专性吸附态砷的情况看, 随着培养时间的延长, 其含量呈现不断增加的趋势, 灭菌土和自然土加入耐砷菌后, 土壤中非专性吸附态砷的含量均有不同程度的增加, 培养 30 d 时, 灭菌土+菌、自然土+菌比同期对照分别增加了 11.1%、5.80%, 且加菌和不加菌处理间差异显著 ($P < 0.05$)。对自然土而言, 无论加菌还是不加菌对照处理, 其无定形及弱晶质氧化物结合态、晶质氧化物结合态的砷大致呈现随时间而降低的趋势, 而残渣态砷含量则先增加后又维持相对稳定的状态。对灭菌土而言, 在接种耐砷菌和对照处理下, 随着时间的推移, 土壤中非专性吸附态砷含量明显升高。与此同时, 专性吸附态砷和残渣态砷含量稳定下降, 无定形及非晶质氧化物结合态砷含量不断升高, 而晶质氧化物结合态砷含量则略有降低。这表明土壤中砷的活化与残渣态、晶体氧化结合态等形态砷向非专性吸附态砷的转化有关。

向土壤中加入零价铁后, 土壤中非专性吸附态砷含量显著下降 ($P < 0.05$), 当培养试验进行 30 d 时, 自然土+铁、灭菌土+铁两处理的非专性吸附态砷含量分别为 0.418、0.384 mg·kg⁻¹, 比同期的对照处理分别降低 93.6%、92.2%, 随着时间的推移, 土壤中非专性吸

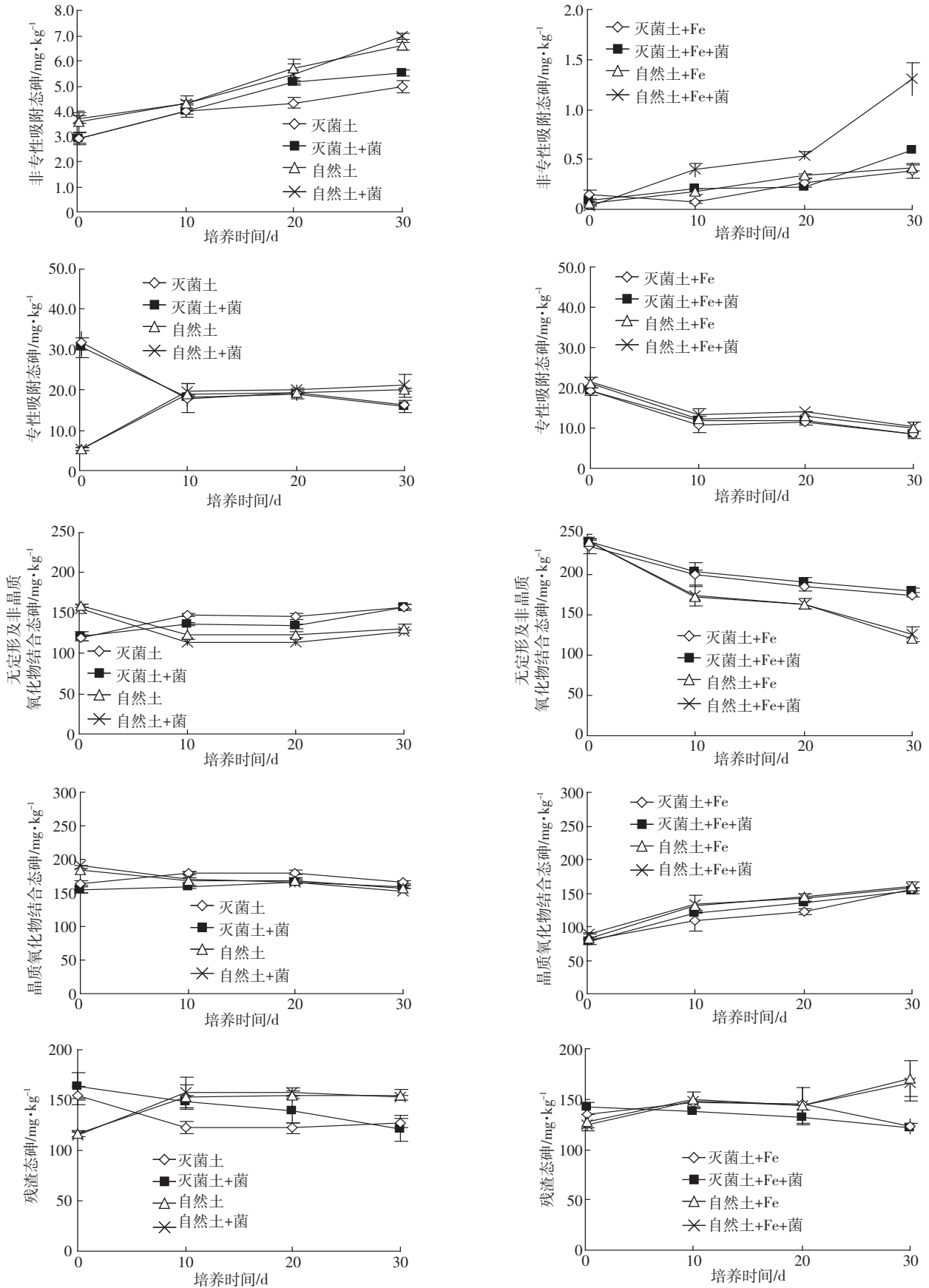


图 3 土壤结合形态砷随时间的变化

Figure 3 Change of arsenic with various form in soils at different time

附态砷含量呈现不断升高的趋势;专性吸附态、无定形及弱晶质氧化物结合态呈现稳定降低的趋势,在试验末期明显低于对照土壤;晶质氧化物结合态砷含量在试验开始后 2 h 与对照同期相比的值已显著降低 ($P<0.05$),而后持续稳定升高;自然土加铁处理的土壤残渣态砷含量持续上升,在 30 d 时的土壤残渣态砷含量已显著高于对照土壤 ($P<0.05$)。这表明零价铁的加入导致土壤中非专性吸附态、专性吸附态向残渣态等形态砷的转化过程明显。

随着零价铁和耐砷菌同时进入土壤,土壤中各形态砷的含量及比例相对于对照处理而言,发生了较大的变化。从非专性吸附态砷的情况看,和对照处理比较,至 30 d 时,自然土+Fe+菌、灭菌土+Fe+菌处理下该形态砷含量比自然土对照处理同期分别降低了 5.28、4.36 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,降低幅度分别为 80.2%、87.8%,与对照处理间差异显著 ($P<0.05$)。但与自然土+Fe、灭菌土+Fe 的两处理比较,土壤非专性吸附态砷含量却明显增加,其增幅分别为 54.8%、211%。从自然土同时加入零价铁和耐砷菌后其他四种形态砷的情况看,随着培养时间的推移,土壤专性吸附态、无定形及弱晶质氧化物结合态砷的含量均呈明显下降的趋势,晶质氧化物结合态砷和残渣态砷含量则有不断升高的趋势。在抗砷菌和零价铁的联合作用下,伴随着土壤专性吸附态、无定形及弱晶质氧化物结合态砷的溶解和零价铁对砷的固定作用,自然土中发生了非专性吸附态、专性吸附态、无定形及弱晶质氧化物结合态砷向晶质氧化物结合态及残渣态砷的形态转化过程。随着耐砷菌对土壤砷活化的影响加大,零价铁对土壤砷的固定效果不断降低,但灭菌土和自然土间存在差异。推测其原因,可能与灭菌过程导致的微生物的种类和特性差异有关,灭菌土中微生物主要是耐砷菌,而自然土中微生物更丰富多样,土壤残渣态比例的升高可能与耐砷菌累积砷、零价铁固定砷等过程有关。

3 讨论

3.1 耐砷菌对土壤砷的活化

土壤中砷的活性及形态受土壤生物化学因素的影响,比如与土壤氧化还原电位、pH、土壤质地、竞争性离子及微生物等因素直接相关^[26]。从本研究的情况来看,耐砷菌的加入可导致水溶态 As(V) 含量明显增加。根据 Cullen 和 Reimer 的研究报道^[27],土壤中的砷主要以 As(V) 和 As(III) 的无机砷为主,且 As(V) 是主要的存在形态。本研究中,仅仅发现 As(V) ,而

未检测到 As(III) 及一甲基砷(MMA)、二甲基砷(DMA)的存在,可能与土壤含水率偏低导致的氧化还原电位较低有关。另根据苏世鸣的研究结果^[28],该耐砷菌在 As(V) 的培养液中培养 2、5、10 d 后,真菌细胞内砷形态主要以 As(V) 为主,同时,细胞内检测到少量的 As(III) 、MMA、DMA,溶液中也发现了 As(III) ,随着培养时间的延长,氧化还原电位却有降低。一般来说,淹水条件较易发生 As(V) 向 As(III) 的转化,而本研究土壤培养试验采用 70% 的田间持水量,与旱地环境相似,且本研究所用耐砷菌在培养条件下会降低氧化还原电位,加之本研究测定的是土壤水提取态砷,该方法的提取效率一般都在 5% 以下,而 As(III) 、MMA、DMA 含量的测定结果均低于仪器检出限,因而本研究中,耐砷菌将土壤 As(V) 向 As(III) 等其他形态砷的转化作用并不十分明显。

从土壤有效砷随时间的变化趋势看,随着培养时间的延长,各处理土壤有效砷含量均呈不断升高趋势。这可能存在两方面的原因^[29]:一是土壤中的砷在好氧的情况下移动性差,在 pH 低于 8.5 时, As(V) 被铁铝氧化物及其水化物及硅酸盐矿物组分强烈吸附,随着厌氧程度的增加,砷的移动性增强,本研究中土壤的有效砷含量均显著高于原始的风干土,亦证实了这一点。二是土壤中普遍存在铁还原菌,在该菌的参与下,铁的氧化物及其水合物会发生溶解,吸附于其上的砷由于固相的缺失而释放至土壤溶液中,这是揭示南亚地区地下水中高浓度砷的存在的发生机制^[30],本研究中土壤有效砷含量随着培养时间的延长而升高的规律可能也与此机制有关。根据苏世鸣的研究结果^[28],随着耐砷菌在 As(V) 溶液中培养时间的延长,培养初期,培养环境中的 pH 均表现出下降的趋势,培养 72 h 后, pH 均随着培养时间的增加而上升,当培养至 168 h 时,又显著下降。鉴于此,对试验结束后各处理的土壤 pH 值进行了测定,发现土壤 pH 值和 NaHCO_3 提取态含量间呈显著负相关,其关系式可表达为 $y=-2.5817x+18.49$ ($R^2=0.8931$, $P<0.01$)。灭菌土系列在试验结束时,各处理下土壤 pH 值由低至高的顺序为:灭菌土+菌 (6.19 ± 0.04) < 灭菌土 CK (6.38 ± 0.06) < 灭菌土+铁+菌 (7.06 ± 0.04) < 灭菌土+铁 (7.12 ± 0.06); 自然土系列的顺序为:自然土+菌 (6.33 ± 0.04) < 自然土 CK (6.36 ± 0.03) < 自然土+铁+菌 (7.13 ± 0.06) < 自然土+铁 (7.21 ± 0.21),与土壤 NaHCO_3 提取态含量的变化规律刚好相反。此规律与 Zhang 等研究贵州红壤砷在释放过程中,有效砷、 As(V) 、 As(III) 随着 pH 的升

高而降低的趋势一致^[31]。

此外,从本研究中耐砷菌的作用看,将自然土和灭菌土比较,耐砷菌接入自然土导致了土壤砷的活化作用更为明显。这可能由于自然土中微生物的多样性更为丰富,而经灭菌处理的土壤微生物种类和数量大大减少,微生物对土壤砷的活化作用非常有限,而向灭菌土中加入耐砷菌后,其活性明显增强,且随时间的推移土壤砷活性增强,高耐砷菌的加入显然驱动了土壤砷的活化。此外,根据国际上的同类研究结果^[32],无论是对灭菌土还是将目标微生物接入已灭菌的土壤,均发现土壤中的砷随着培养时间的延长被不断活化,并认为砷的物理化学淋洗过程加上生物学的淋溶是土壤中砷活化的重要机制,且土壤溶液中的磷酸盐、碳酸盐及氯离子均可通过离子交换机制使土壤砷活化^[33]。显然,本研究中土壤砷的活化,可归结为上述多种因素的综合影响,是多种物理、化学及生物学过程联合作用的结果。

国际上利用微生物对土壤砷的活化作用^[34]探讨通过添加微生物来强化植物修复的技术,取得了良好的进展。根据赵根成等的研究结果^[35],施用放线菌 *shf2* 后,无论是蜈蚣草的生物量还是其吸收砷的总量比同期 CK 处理高出 136%,并证明施用微生物可有效提高蜈蚣草累积砷的能力。Liu 等对砷污染土壤接种菌根真菌 (*Glanus mosseae*) 后^[36],发现在其土壤上种植的蜈蚣草累积砷量提高了 43%。Leung 等研究发现接种 AM 菌根能促进蜈蚣草对砷的富集^[37]。这显示,利用耐砷菌的活化功能,研发植物修复的强化措施以提高植物修复的效率,应具有良好的应用潜力和前景。

3.2 耐砷菌参与下外源零价铁固定土壤砷的稳定性

利用化学固定剂进行砷污染土壤调控已有不少报道,是当前进行砷污染土壤修复与砷高风险农田安全利用的发展趋势之一。刘云芝等研究了改良剂对降低三七中砷残留量的效果^[38],结果表明,采用粉煤灰、石灰、碳酸氢铵等改良剂进行土壤处理后,明显降低了三七块根样品中砷的含量。Tyrovola & Nikolaidis 的研究表明外源铁粉对土壤活性砷具有良好的固定作用^[39],一些含铁矿物及铁精粉对水体砷具有较好的去除效果。在本研究中,外源零价铁对土壤砷的钝化与固定作用明显,对加入零价铁后的处理来说,其土壤 NaHCO_3 提取态砷含量大幅下降,而残渣态含量比例则有所上升。这可能由于零价铁进入土壤后,伴随着铁氧化过程的进行,导致铁表面 Fe(II) 、 Fe(III) 及其氧化物膜的形成,包括生成铁氧化物/氢氧化物、磁铁

矿、磁赤铁矿及纤铁矿的复合物,这些物质在零价铁表面形成了许多砷的吸附位点,通过与砷形成内部双齿型球状复合物或通过表面沉淀作用覆盖于零价铁的表面,从而降低了土壤中砷的活性^[40]。与此同时,加入耐砷菌后则导致土壤中非专性吸附态砷大大增加,据 Wenzel 等的研究报道^[21],以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提取的土壤非专性吸附态作为土壤中的可交换态砷,为最活跃的砷化学形态。本研究中土壤非专性吸附态砷与土壤有效砷的变化规律具有良好的一致性,土壤中被耐砷菌活化的砷可能主要来自于残渣态及晶质氧化物结合态砷的溶解和释放。该过程可能与砷还原菌 *Comamonas* sp. Ts37 和 *Delftia* sp. Ts41 能够显著减少闭蓄态砷含量等过程有关^[41]。

在固定剂铁粉作用下,土壤砷的活性大大降低,导致相应的砷环境风险降低。在向土壤中加入耐砷菌后,会导致外源铁固定土壤砷的效果略有下降。但总体来说,耐砷菌的加入在试验期间对外源铁粉固定土壤砷的影响不大,外源铁粉已在水处理技术上成功应用^[42],其作为土壤砷的固定剂调控土壤砷风险短期内 (<30 d) 是完全可行的,但在耐砷菌影响下经历更长时间后铁粉固定砷效果的稳定持续性如何,有待今后进一步深入研究。

4 结论

本研究采用土壤培养试验,探讨了外源添加耐砷真菌棘孢木霉与零价铁对土壤砷活性的调控效应,主要结论如下:

(1) 向土壤中接种高耐砷菌棘孢木霉后,可导致土壤中 NaHCO_3 提取态砷含量大幅增加,且随着时间的推移,土壤 NaHCO_3 提取态砷含量呈稳定增加趋势,水溶态砷的变化与此类似,耐砷菌促进了土壤砷的活化,水溶态砷以 As(V) 为主要形式存在。

(2) 加入外源铁粉后,导致土壤中有效砷含量明显降低,根据试验结束时取样分析结果,在不加菌只加零价铁的情况下,土壤有效砷含量明显降低,并与对照处理间差异显著 ($P < 0.05$),在耐砷菌参与下,零价铁对土壤砷的固定效果显著下降 ($P < 0.05$),相应土壤砷固定效率下降幅度最高达 11.1%。

(3) 耐砷菌导致土壤砷的活化主要与土壤非专性吸附态砷比例的升高有关,而零价铁对土壤砷的固定作用,则与土壤中残渣态、无定形及弱晶质氧化物结合态等形态砷比例的增加,非专性吸附态及专性吸附态砷比例的减少有关,耐砷菌的加入导致零价铁对土

壤砷的固定效率下降,但在短期内其影响不大。

参考文献:

- [1] Chang A C, Pan G, Page A L, et al. Developing human health-related chemical guidelines for reclaimed waster and sewage sludge applications in agriculture[R]. Geneva: Report for World Health Organization, 2002.
- [2] WHO. Guidelines for drinking water quality, Vol. 1[Z]. Geneva: World Health Organization, 1994.
- [3] Das H K, Mitra A K, Sengupta P K, et al. Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: A preliminary study[J]. *Environment International*, 2004, 30: 383-387.
- [4] Berg M, Tran H C, Nguyen T C, et al. Arsenic contamination of ground water and drinking water in Vietnam: A human health threat[J]. *Environment Science & Technology*, 2001, 35: 2621-2626.
- [5] WHO 2001 Arsenic in Drinking water. URL: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact210.html>.
- [6] Liao X Y, Chen T B, Xie H, et al. Soil As contamination and its risk assessment in areas near the industrial districts of Chenzhou City, Southern China[J]. *Environment International*, 2005, 31: 791-798.
- [7] Nriagu J O, Pacyna J M. Quantitative assessment of world wide contamination of air water and soils by trace metals[J]. *Nature*, 1988, 333: 134-139.
- [8] Zhu Y G, Chen S B, Yang J C. Effects of soil amendments on lead uptake by two vegetable crops from a lead contaminated soil from Anhui, China [J]. *Environment International*, 2004, 30: 351-356.
- [9] Moon D H, Dermatas D. Arsenic and lead release from fly ash stabilized/solidified soils under modified semi-dynamic leaching conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 141: 388-394.
- [10] Giménez J, Martínez M, Pablo J, et al. Arsenic sorption onto natural hematite, magnetite, and goethite[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 141: 575-580.
- [11] Yang L, Donahoe R J, Redwine J C. In situ chemical fixation of arsenic-contaminated soils: An experimental study[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 387: 28-41.
- [12] Hale J R, Foos A, Zubrow J S, et al. Better characterization of arsenic and chromium in soils: A field-scale example[J]. *Journal of Soil Contamination*, 1997, 6: 371-389.
- [13] 夏运生, 陈保冬, 朱永官, 等. 外加不同铁源和丛枝菌根对砷污染土壤上玉米生长及磷、砷吸收的影响[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(3): 516-524.
XIA Yun-sheng, CHEN Bao-dong, ZHU Yong-guan, et al. Effects of different iron sources and arbuscularmycorrhiza on the growth and phosphorus and arsenic uptake by maize plants (*Zea mays* L.) in As contaminated soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(3): 516-524.
- [14] Warren G P, Alloway B J, Lepp N W, et al. Field trials to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soils and soil remediation with iron oxides[J]. *Science of the Total Environment*, 2003, 311: 19-33.
- [15] Zhu H J, Jia Y F, Wu X, et al. Removal of arsenic from water by supported nano zero-valent iron on activated carbon[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(2-3): 1591-1596.
- [16] Čerňanský S, Urík M, Ševc J, et al. Biosorption and biovolatilization of arsenic by heat-resistant fungi[J]. *Environmental Science Pollution and Research*, 2007, 14: 31-35.
- [17] Visoottiviseth P, Panviroj N. Selection of fungi capable of removing toxic arsenic compounds from liquid medium[J]. *Science Asia*, 2001, 27: 83-92.
- [18] Bizily S P, Rugh C L, Meagher R B. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 213-217.
- [19] Su S M, Zeng X B, Bai L Y, et al. Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409: 5057-5062.
- [20] 苏世鸣, 曾希柏, 蒋细良, 等. 高耐砷真菌的分离及其耐砷能力[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(12): 3225-3230.
SU Shi-ming, ZENG Xi-bai, JIANG Xi-liang, et al. High arsenic-tolerant fungi: Their isolation and tolerant ability[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(12): 3225-3230.
- [21] Wenzel W W, Kirchbaumer N, Prohaska T, et al. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 436: 309-323.
- [22] Montperrus M, Bohari Y, Bueno M, et al. Comparison of extraction procedures for arsenic speciation in environmental solid reference materials by high-performance liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectroscopy speciation[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2002, 16: 347-354.
- [23] José Ruize-Chancho M, Sabé R, Fermin L S J, et al. New approaches to the extraction of arsenic species from soils[J]. *Microchim Acta*, 2005, 151: 241-248.
- [24] 涂从, 苗金燕, 何峰. 土壤砷有效性研究[J]. *西南农业大学学报*, 1992, 14(6): 477-482.
TU Cong, MIAO Jin-yan, HE Feng. A study of availability of soil arsenic[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1992, 14(6): 477-482.
- [25] 肖玲, 赵允格. 石灰性土壤中有效砷提取剂的选择[J]. *陕西环境*, 1996, 3(3): 17-27.
XIAO Ling, ZHAO Yun-ge. Selection of chemical materials for extracting available arsenic in limable soils[J]. *Shaanxi Environment*, 1996, 3(3): 17-27.
- [26] Adriano D C. Trace elements in the terrestrial environment; biogeochemistry, bioavailability and risks of metals[M]. Springer, New York, NY. 1995.
- [27] Cullen W R, Reimer K J. Arsenic speciation in the environment[J]. *Chemical Reviews*, 1989, 89: 713-764.
- [28] 苏世鸣. 耐砷真菌的分离鉴定及其砷累积与挥发机理[D]. 北京: 中国农业科学院. 2010.
SU Shi-ming. Isolation and identification of arsenic resistant fungi and its mechanisms of arsenic accumulation and volatilization[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.

- [29] Goldberg S. Competitive adsorption of arsenate and arsenite on oxides and clay minerals[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2002, 66: 413-42.
- [30] Nickson R T, McArthur J M, Ravenscroft P, et al. Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal[J]. *Applied Geochemistry*, 2000, 15: 403-413.
- [31] Zhang Shu-zhen, Li Wei, Shan Xiao-quan, et al. Effects of low molecular weight organic anions on the release of arsenite and arsenate from a contaminated soil[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 2005, 167: 111-122.
- [32] Turpeinen R, Pansar-Kallio U M, Haggblom M, et al. Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil[J]. *The Science of the Total Environment*, 1999, 236: 173-180.
- [33] Pansar-Kallio M, Manninen P K G. Speciation of mobile arsenic in soil samples as a function of pH[J]. *Science of the Total Environment*, 1997, 204: 193-200.
- [34] Chopra B K, Bhat S, Mikheenko I P, et al. The characteristic of rhizosphere microbes as associated with plants in arsenic-contaminated soils from cattle dip sites[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 378: 331-342.
- [35] 赵根成, 廖晓勇, 阎秀兰, 等. 微生物强化蜈蚣草累积土壤砷能力的研究[J]. *环境科学*, 2010, 31(2): 431-436.
ZHAO Gen-cheng, LIAO Xiao-yong, YAN Xiu-lan, et al. Enhancement of As-accumulation by *Pteris vittata* L. affected by microorganisms[J]. *Environmental Science*, 2010, 31(2): 431-436.
- [36] Liu Y, Zhu Y G, Chen B D, et al. Influence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on uptake of arsenate by the As hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L.[J]. *Mycorrhiza*, 2005, 15: 187-192.
- [37] Leung H, Ye Z, Wong M. Interactions of mycorrhizal fungi with *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) in As-contaminated soils[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 139(1): 1-8.
- [38] 刘云芝, 张文斌, 冯光泉, 等. 改良剂对降低三七中重金属残留量作用的研究[J]. *云南农业大学学报*. 2008, 23(1): 118-121.
LIU Yun-zhi, ZHANG Wen-bin, FENG Guang-quan, et al. The effect of the ameliorants on debasing the hangover contents of heavy metals in Sanqi[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2008, 23(1): 118-121.
- [39] Tyrovala K, Nikolaidis N P. Arsenic mobility and stabilization in topsoils[J]. *Water Research*, 2009, 43: 1589-1596.
- [40] Nikolaidis N P, Tyrovala K. Removal of arsenic from groundwater - mechanisms, kinetics, field/pilot and modeling studies[M]//Irene MC Lo, et al (Eds). *Zero-valent Iron reactive materials for hazardous waste and inorganics removal*. Reston, VA: ASCE Publications, 2006: 151-164.
- [41] 吴佳, 谢明吉, 杨倩, 等. 砷污染微生物修复的进展研究[J]. *环境科学*, 2011, 32(3): 817-824.
WU Jia, XIE Ming-ji, YANG Qian, et al. Outlook on remediation of arsenic contamination using microorganisms[J]. *Environmental Sciences*, 2011, 32(3): 817-824.
- [42] Cornejo Lorena, Lienqueo Hugo, Arenas María, et al. In field arsenic removal from natural water by zero-valent iron assisted by solar radiation[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156: 827-831.