

林 辉, 孙万春, 王 飞, 等. 有机肥中重金属对菜田土壤微生物群落代谢的影响. 题目[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(11):2123-2130.

LIN Hui, SUN Wan-chun, WANG Fei, et al. Effects of heavy metal within organic fertilizers on the microbial community metabolic profile of a vegetable soil after land application[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(11):2123-2130.

有机肥中重金属对菜田土壤微生物群落代谢的影响

林 辉¹, 孙万春¹, 王 飞², 王 斌³, 翁 颖⁴, 马军伟^{1*}, 符建荣¹

(1.浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021; 2.宁波市种植业管理总站, 浙江 宁波 315012; 3.鄞州区农林局, 浙江 宁波 315100; 4.慈溪市农业监测中心, 浙江 宁波 315310)

摘 要:基于慈溪掌起镇的蔬菜施肥试验,结合常规理化分析和 MicroRESP™ 方法,在 2 年 4 次施肥后,分析不施肥(CK)、重金属达标商品有机肥(T1)和 Pb-As-Cu-Zn 添加有机肥(T2)施用土壤的基本理化性质、重金属累积以及微生物群落代谢特征,探讨重金属对施用有机肥土壤微生物群落代谢特征的影响。结果表明,T1 和 T2 显著提高了旱地蔬菜轮作土壤有机质和部分养分含量,且二者无显著差异。但从重金属含量上看,T2 土壤 Cu、Zn 全量以及有效态 Cu、Zn、As 含量显著高于 T1 和 CK 土壤。基于 MicroRESP™ 的微生物群落代谢特征分析指出,与 CK 相比,T1 显著促进了土壤基础呼吸作用和微生物代谢功能多样性,T2 却无类似的促进效果,可见 T2 土壤 Cu、Zn 和有效态 As 含量的大幅增加削弱了有机肥中有机质等养分对土壤微生物的促进作用。主成分和聚类分析进一步表明,T1 与 T2 土壤的微生物群落水平生理指纹图谱(CLPP)存在明显差异,T2 土壤中重金属及其有效性的增加诱导柠檬酸、苹果酸和草酸等羧酸代谢利用增强。综上,畜禽粪便有机肥对菜田土壤微生物群落代谢的作用同时受到有机肥本身及其残留重金属的影响,有机肥中过高的重金属残留会改变有机肥养分对土壤微生物代谢的影响。

关键词:畜禽粪便;有机肥;菜田土壤;重金属;土壤微生物群落功能

中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2016)11-2123-08 doi:10.11654/jaes.2016-0674

Effects of heavy metal within organic fertilizers on the microbial community metabolic profile of a vegetable soil after land application

LIN Hui¹, SUN Wan-chun¹, WANG Fei², WANG Bin³, WENG Ying⁴, MA Jun-wei^{1*}, FU Jian-rong¹

(1.Institute of Environment, Resources, Soil and Fertilizers, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2.Plant Management Bureau of Ningbo, Ningbo 315012, China; 3.Agriculture and Forestry Bureau of Yinzhou District, Ningbo 315100, China; 4.Agricultural Monitoring Center of Cixi City, Ningbo 315310, China)

Abstract: This study investigated the effect of heavy metals in organic fertilizer on the metabolic characteristics of soil microbial community on the basis of a vegetable fertilization experiment, which was carried out in Zhangqi Town, Cixi City. Vegetable planting and fertilization were performed twice each year. Three fertilization treatments were included: CK treatment with no fertilizer; T1 treatment with a manure fertilizer having heavy metal levels within the safe limit set by China; T2 treatment with a manure fertilizer having an increased level of Pb, As, Cu and Zn. After two years, soil physic-chemical properties, soil heavy metals and metabolic characteristic of soil microbial community were measured by using both conventional soil analysis method and MicroRESP™ technology. Results indicated that both T1 and T2 significantly increased the soil content of organic matter, available phosphorus and available potassium. Although there is insignificant difference

收稿日期:2016-05-15

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY14C150002);宁波市科技计划项目(2013C11024);2013 年鄞州区省农科院合作项目;公益性行业(农业)专项(201303091)

作者简介:林 辉(1986—),女,博士,助理研究员,主要研究方向为农业环境微生物。E-mail:lin82774872@163.com

* 通信作者:马军伟 E-mail:majw@mail.zaas.ac.cn

in soil physic-chemical properties between T1 and T2, T2 had significantly higher contents of total Cu, total Zn, available Cu, available Zn and available As in soil. Microbial community metabolic profile analysis based on the MicroRESP™ method showed that T1 significantly enhanced the basal respiration and the functional diversity of microbial community in soil; but T2 did not show similar enhancement. Thus, the increased level of Cu, Zn and available As in T2 soil might reduce the positive effect of nutrients within manure on soil microbial community. Principle component analysis and cluster analysis results further showed that the community level physiological profile (CLPP) in T1 soil was apparently different from that in T2 soil. The highly accumulated heavy metals and their increased availability in T2 soil enhanced the utilization of citric acid, malic acid and oxalic acid in soil. In conclusion, the effect of manure fertilizer on the metabolic function of soil microbial community was related to both manure nutrients and its residual heavy metal. The application of manure fertilizer with excessive residual heavy metal would change the effect of manure nutrients on soil microbial community.

Keywords: livestock manure; organic fertilizer; vegetable soil; heavy metal; soil microbial community function

现代养殖生产中,饲料添加剂的大量使用,使得大规模集约化养殖的畜禽粪便与传统分散养殖的畜禽粪便在成分、性质等方面都有了较大的改变,甚至导致有机肥料质量发生根本性的转变,其中畜禽养殖源有机肥料中重金属污染值得高度关注^[1-2]。2005年,刘荣乐等^[3]、黄鸿翔等^[4]对我国8省市有机肥中重金属的调研报告指出,与20世纪90年代初相比,当前部分有机废弃物中的重金属含量增加显著,例如鸡粪和猪粪中Zn、Cu、Cr、Cd、As、Hg以及牛粪中Zn、Cu、As、Hg,猪鸡粪中的Cu、Zn含量甚至增加了将近12倍^[5]。伴随有机肥的施用,这些重金属可以在土壤中累积、迁移。在通常情况下,土壤中的重金属保持在一定浓度范围内,并不表现出对环境或者作物的明显影响,但是重金属含量超过土壤的承载能力时,就会表现出一系列的危害,例如在作物中累积,降低土壤质量等^[6-8]。

土壤微生态是土壤的重要组成部分,也是土壤健康的主要内容,是评价土壤质量的生物学指标之一。土壤微生物的代谢行为可以在一定程度上反映土壤活力和质量,也与土壤生态系统平衡维系密切相关^[9]。相对于土壤动物和植物,土壤微生物对重金属胁迫更加敏感^[10]。重金属对土壤微生物生物量^[11-12]、生理生态参数^[13-14]、呼吸强度^[13]、微生物群落代谢功能^[12]以及结构^[11,15]的影响均有报道,总的来讲,重金属对土壤微生物多样性及代谢的影响多为抑制效应。Sheik等^[16]分析不同制革厂周边采集的土壤样品,发现重金属污染土壤的细菌群落多样性显著低于对照土壤。值得注意的是,以往多数的重金属土壤微生态效应研究只是在重金属单独作用条件下得出的,较少考虑到其载体介质如污泥、有机肥的作用。但是对于农田土壤微生态系统而言,畜禽粪便及其有机肥的施用是农田土壤重金属的主要来源^[17]。因此,伴随有机肥进入土壤的

重金属对土壤微生态的影响应该是有机肥和重金属的综合效应。有机肥对土壤微生物的积极作用一直是得到认可的^[18-19]。在Zhen等^[20]的研究报道中,复合施用有机肥和微生物肥料能够帮助提高被破坏的低等耕地土壤质量,快速改善其土壤微生物结构,增加土壤微生物多样性。但是在目前畜禽粪便有机肥重金属残留量日益增加的情况下,有机肥的土壤微生物效应又会发生何种改变却少有报道。农业部发布的有机肥行业标准NY525—2012明确规定了商品有机肥中As、Pb等5种重金属的限量指标,然而,重金属达标和超标有机肥对农田土壤微生态的影响及其差异却不明确,国内外也鲜有相关研究。事实上,以上结果的探明对于指导畜禽粪便有机肥的安全施用,评价其农用的生态风险,甚至对有机肥产业未来的发展都具有重要意义和参考价值。

本文基于慈溪掌起镇的旱地蔬菜试验,以经过2年4季施肥处理的土壤为研究对象,结合土壤理化分析、重金属测定和MicroRESP™方法,以不施肥(CK)处理为对照,分析重金属达标商品有机肥(T1)和高重金属残留有机肥(T2)处理菜田土壤的基本理化性质、重金属含量以及微生物群落代谢特征变化,研究不同重金属残留水平有机肥施用土壤微生物群落代谢特征差异,旨在为畜禽粪便有机肥的安全施用和生态风险评价提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

施肥定位试验设在慈溪市掌起镇绿佳果蔬农场,该地属于亚热带气候。土壤属于粉砂土,pH 8.04,电导率(EC)142.0 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$,有机质 10.07 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全氮 1.10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,有效磷 15.61 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效钾 73.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

试验始于2014年,本文涉及3个试验处理:

不施肥处理(CK);重金属达标商品有机肥,施用量 $7.50 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ (T1);重金属添加有机肥,施用量 $7.50 \text{ t} \cdot \text{hm}^{-2}$ (T2)。每处理小区面积 20 m^2 ,随机排列,每处理3个重复。蔬菜连作,1年2季:2014年为结球甘蓝-糯玉米轮作;2015年为雪菜-结球甘蓝轮作。每季蔬菜种植前,施入有机肥,所有有机肥均作基肥施用,均匀撒施到土壤耕层(0~20 cm)。按照当地施肥习惯和作物生长情况,追施无机肥。

供试有机肥为慈溪市中慈生态肥料有限公司生产的商品有机肥和自制的重金属添加有机肥。商品有机肥以鸡粪为主要原料,其中 $\text{Cu } 85.44 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{Zn } 478.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{Pb } 5.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{As } 2.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,低于有机肥行业标准 NY 525—2012 规定的最高重金属限量值,为重金属达标有机肥。重金属添加有机肥以添加了一定量重金属的鸡粪为主要原料,采用与商品有机肥相同的制备方法,经过堆肥发酵、后熟和烘干等流程。重金属添加方法为:在鸡粪原料(干基计)中添加 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Pb 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ As,使得添加后鸡粪中的 Pb 和 As 含量比商品有机肥重金属限量标准规定提高1~2倍;考虑到在现代集约化畜禽养殖业中,超剂量使用 Cu、Zn 等微量元素添加剂非常普遍^[5],畜禽粪便已成为土壤中 Cu、Zn 的一个主要来源^[7],其对 Cu、Zn 在土壤中累积的年贡献率可以达到40%和17%^[7],因此在鸡粪中同时添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cu 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Zn,使得添加后鸡粪中的 Cu 含量比未添加前增加1~2倍;制得重金属超标鸡粪。以上述重金属超标鸡粪制备获得的有机肥含 $\text{Cu } 718.48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{Zn } 1356.38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{Pb } 50.48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\text{As } 9.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,4种重金属全量均显著增加,对照 NY 525—2012 规定的重金属限量要求,Pb 略超标,本文将其描述为重金属添加有机肥(Pb-As-Cu-Zn 添加有机肥)。

1.2 样品采集及处理

经2年4季作物栽培,在2015年结球甘蓝收获后,按照土壤采样规则,在每试验小区按照S形多点法采集0~20 cm的耕层土壤,同一小区土壤混合均匀形成一个土壤样品。土壤样品去除石砾、植物残体等后,分成3份。一份土样风干后用于土壤理化指标测定,另一份土样先采用四分法取压碎样,过孔径20目尼龙筛,随后继续研磨至过100目筛用于土壤元素全量分析。最后一份新鲜土样采集后立即于4℃冷藏保存,一周内完成 MicroRESP™ 分析。

1.3 土壤基本理化性状

土壤基本理化性质指标测定参照《土壤理化分

析》^[21]。新鲜样本用于测定含水率、pH 值、电导率(EC)。含水率采用烘箱干燥法测定;pH 值和 EC 按 1:2.5 固液比浸提,滤液分别用 pH 计和电导仪测定。风干样品用于测定总碳、总氮等其他养分参数。总有机碳和总氮采用元素分析仪测定;总磷采用钒钼黄比色法测定;总钾采用火焰光度计法测定。

1.4 重金属测定

土壤重金属全量测定严格按照《中华人民共和国农业行业标准》(NY/T 1613—2008),采用王水回流消解法进行消解。土壤有效态 Cu、Pb、Zn 采用 DTPA(二乙三胺五乙酸)提取剂浸提后进行含量测定(GB/T 23739—2009),土壤有效态 As 采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸^[22]浸提后进行含量测定。采用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)测定 Pb、Cu、Zn 含量。按照《中华人民共和国国家标准》(GB/T 22105.2—2008),采用原子荧光法测定 As 含量。

1.5 MicroRESP™ 方法

MicroRESP™ 技术是一种基于土壤微生物代谢功能研究土壤微生物生态的方法,其利用土壤在不同碳源诱导下的 CO_2 产生情况来表征土壤微生物群落水平的生理特征^[23]。与传统微生物平板培养法、Biolog 微平板法和多重底物诱导呼吸法相比具有明显优势。MicroRESP™ 技术可克服微生物平板法只能测定可培养微生物、Biolog 微平板法依赖土壤悬浮液提取物和细胞后续生长情况、多重底物诱导呼吸自动化程度低等缺点,是研究原位土壤微生物群落水平生理特征的一种较为灵敏、快捷的测定方法^[24]。操作步骤如下:

(1)4℃冷藏保存的土壤样品必须预培养活化微生物:均匀称取50 g新鲜土壤于烧杯中,根据土壤样品含水率明确土壤湿度,将所有土壤湿度调至一致(20%~30%之间),保鲜膜封口后,25℃预培养4 d。

(2)检测板配制:在900 mL超纯水中依次加入18.75 mg甲酚红,16.77 g氯化钾和0.315 g碳酸氢钠,溶解后形成指示剂。同时配制3%的纯化琼脂(Sigma),121℃灭菌20 min充分溶解,冷却到60℃,加入2倍胶体体积的指示剂,混合均匀后取150 μL 指示琼脂添加到检测板的微孔中,配制好的检测微孔板存放在含有碱石灰的避光干燥器里待用。

(3)检测:将待测土壤样品均匀添加到96孔深孔板中,并在每个深孔板中添加16种碳源底物($\text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{g}^{-1} \text{ soil water}$),分别为:水,0;L-丙氨酸,30;L-阿拉伯糖,30;精氨酸,30;半胱氨酸盐酸盐,30;柠檬酸,30;D-果糖,30;D-半乳糖,30;D-葡萄糖,30; γ -氨基丁

酸,30;L-赖氨酸,30;L-苹果酸,30;N-乙酰葡萄糖胺,7.5;草酸,30;原儿茶酸,7.5;海藻糖,30。将检测板倒扣在深孔板上,用夹子固定,在25℃下培养6h。采用酶标仪读取570nm波长下检测板在土壤样品培养前和培养后6h的吸光值,利用吸光值差异计算CO₂产生率(%)。

CO₂产生率和吸光度数据标准化计算公式^[23]为:

$$Ai=(At_6/At_0)\times\text{Average}(At_0)$$

$$CO_2(\%)=A+B/(1+D\times Ai)$$

$$W_{CO_2}=[CO_2(\%)/100]\times L\times(44/22.4)\times 12/44\times [273/(273+T)]/(W\times U)/t$$

式中:At₆为检测板在培养6h后的A₅₇₀;At₀为培养前(0h)的A₅₇₀;A=-0.2265;B=-1.606;D=-6.771;W_{CO₂}为CO₂产生率,μg·g⁻¹·h⁻¹;T为培养温度,25℃;L为检测板孔体积,945μL;W为土壤鲜重;U为土壤含水率;t为培养时间,6h。

1.6 数据处理

利用多样性指数分析不同施肥处理对土壤微生物群落多样性的影响。Shannon-Winner 香农多样性指数(H')表示整个生态系统土壤微生物群落利用碳源类型的多与少,即功能多样性。生态系统香农多样性指数值越大,该系统的土壤微生物群落功能多样性越高,反之则多样性越低。Simpson 辛普森多样性指数(D)也可用于判断细菌群落多样性,群落中物种越多、各种个体分配越均匀则辛普森多样性指数越高,群落多样性越好。Simpson 多样性指数中稀有物种所起的作用较小,而普遍物种所起的作用较大。均匀度指数(E)是通过 Shannon 多样性指数计算出来的均度,包含两个因素,其一是种类数目,即丰富度,其二是种类中个体分布的均匀性。种类数目越多,多样性越大;同样,种类之间个体分配的均匀性增加也会使多样性提高。

$$\text{Shannon-Winner index: } H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

$$\text{Pielou's evenness index: } E = \frac{H'}{\ln S}$$

$$\text{Simpson's Index of Diversity: } 1-D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

试验数据采用 Microsoft Excel 2004 和 SPSS 15.0 统计软件处理。不同处理差异显著性分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA,最小显著差法 LSD)。采用 SigmaPlot 10.0 作图,SPSS 15.0 作主成分分析和聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 不同施肥处理土壤理化性状和重金属累积差异

由表1可知,T1和T2土壤有机质、有效磷和速效钾含量显著高于CK,无论是重金属达标商品有机肥还是Pb-As-Cu-Zn添加有机肥的施用均可以提高土壤有机质和部分养分含量,与以往的研究报道基本一致^[18,25]。不同施肥处理土壤中的重金属全量和有效态含量大小基本为T2>T1>CK。与CK土壤相比,T1土壤Cu、Pb、Zn、As全量无显著变化,但有效Zn含量显著增加。T2土壤中的Cu、Zn全量显著高于CK和T1,但Pb和As全量在3个处理间无显著差异。T2土壤中的有效Cu、有效Zn和有效As含量也显著高于其他两个处理。总体来说,2年4季的重金属达标商品有机肥施用仅显著增加菜地土壤有效Zn含量;同样情况下,供试重金属添加有机肥施用不仅显著增加了土壤Cu、Zn全量,且使得土壤有效Cu、Zn、As含量显著上升。

2.2 重金属对有机肥施用土壤基础呼吸的影响

土壤基础呼吸可以表征土壤碳素的周转速率及微生物的总体活性,在一定程度上反映环境胁迫情况^[10,26]。图1表示不同施肥处理下土壤微生物在不添加外源底物下的基础呼吸。T1显著增加了土壤基础呼吸,而T2与CK的土壤基础代谢无显著差异。

有机肥对土壤基础呼吸作用的促进早有报道,其

表1 不同施肥处理土壤的基本理化性质和重金属含量
Table 1 The basal physic-chemical properties and heavy metal contents of soil samples from different fertilization treatments

处理	CK	T1	T2
pH	8.20a	8.04a	8.14a
EC/μS·cm ⁻¹	133.33a	169.33a	125.33a
全氮/g·kg ⁻¹	0.53a	0.55a	0.52a
有机质/g·kg ⁻¹	9.29b	9.76a	9.86a
有效磷/mg·kg ⁻¹	13.45b	21.07a	29.59a
速效钾/mg·kg ⁻¹	97.67b	150.50a	138.83a
全Cu/mg·kg ⁻¹	11.43b	10.13b	14.14a
全Zn/mg·kg ⁻¹	55.51b	60.27b	67.39a
全Pb/mg·kg ⁻¹	17.99a	16.31a	18.34a
全As/mg·kg ⁻¹	5.62a	6.44a	5.07a
有效态Cu/mg·kg ⁻¹	4.10b	3.91b	5.53a
有效态Zn/mg·kg ⁻¹	1.06c	1.76b	2.81a
有效态Pb/mg·kg ⁻¹	1.25a	1.25a	1.31a
有效态As/mg·kg ⁻¹	0.13b	0.15b	0.20a

注:不同字母表示各施肥处理间差异显著(P<0.05,n=3)。

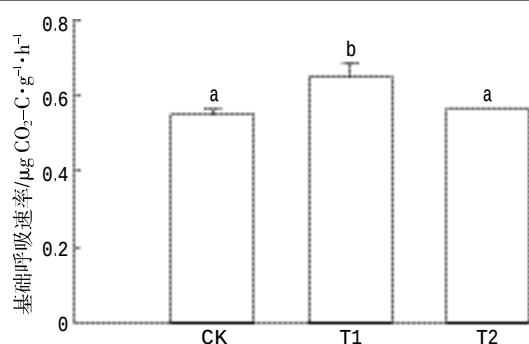


图 1 不同施肥处理对土壤基础呼吸的影响

Figure 1 Effects of different fertilization treatments on the soil basal respiration

一般通过增加土壤有机碳来提高土壤微生物量、土壤活性,进而增加土壤呼吸强度^[27]。本文中商品有机肥施用土壤后基础呼吸作用的增强也支持了这一结论。但是目前获得的土壤理化和重金属指标中(表 1),我们发现 T1 与 T2 土壤仅在部分重金属含量上存在显著差异,T1 处理刺激土壤基础呼吸,T2 处理则无明显影响,二者的差异暗示了有机肥中重金属残留会改变有机肥对土壤基础呼吸的影响。研究表明,重金属对土壤呼吸的影响存在浓度效应,例如,低浓度的重金属可以刺激土壤 CO₂ 释放。这种效应的产生主要是因为污染胁迫下,土壤微生物为了维持正常的生命活性需要更多的能量维持生理需要,最终表现为重金属胁迫下呼吸强度增加^[15]。但是,过高浓度的重金属也可以与碳源结合形成复合物,抑制微生物代谢或者直接杀死微生物^[28],因而表现为重金属浓度增加,呼吸强度降低。例如,在杨元根等^[14]的研究中,长期暴露于低浓度 Cu 中的土壤微生物具有较高的呼吸速率,而暴露于高浓度 Cu 中的土壤微生物呼吸速率较低。因此,T1 土壤中的重金属可能由于全量或其有效态含量较低而未达到抑制浓度或者重金属的抑制活性被有机肥中有机质等所缓解。

已有研究证实,外源有机质进入土壤可以在一定程度上缓解重金属胁迫导致的微生物活性、数量^[15]以及微生物功能多样性的下降^[29]。相反,T2 土壤中重金属污染水平可认为已达到抑制水平,因而掩盖或者削弱了有机肥本身对土壤基础呼吸的促进作用。重金属的形态与其生物毒性密切相关,一般来说,伴随重金属形态从不稳定向稳定迁移,其生物活性降低^[30]。Ghosh 等^[31]研究证实,有效 As 对土壤基础呼吸的抑制远大于全 As,因而 T2 处理所带来的土壤有效 As 含量的显著增加不容小觑,其可能是 T2 与 T1 土壤基

础呼吸差异的重要原因之一。此外,值得格外关注的是,T2 土壤中 Cu、Zn 有效态含量和全量的显著大幅增加。虽然 Zn 和 Cu 是植物生长必需的微量元素,但当它们在土壤中的含量超过一定限度时,也可对土壤微生物产生毒性效应。

2.3 重金属对有机肥施用土壤微生物群落功能多样性的影响

微生物有多种多样的代谢方式和生理功能,可以适应各种生态环境并与其他生物相互作用。土壤微生物群落功能多样性可以表征土壤微生物群落利用碳源类型的差异,同时在一定程度上反映土壤微生物的种类和分布情况。由表 2 可知,T1 的 Shannon 指数、均匀度指数和 Simpson 指数最大,表明达标重金属商品有机肥施用土壤的微生物种类最多、分布较均匀,且对碳源利用程度最高。T2 土壤微生物功能多样性指数显著低于 T1,且略低于 CK。因此,施用重金属达标商品有机肥可以增加菜田土壤的微生物群落功能多样性,而施用重金属高残留有机肥无类似效应。

正如以往报道^[32],有机肥养分本身可以增加土壤微生物群落代谢多样性。但与土壤基础呼吸结果一致,目前商品有机肥对土壤微生物群落代谢的积极影响往往受到有机肥中残留重金属的制约。因此有机肥对土壤微生物群落代谢功能的影响是有机肥中有机质等养分和重金属的综合效应,其中 T2 土壤中 Cu、Zn 的显著累积活化以及有效 As 含量上升可能掩盖或削弱了有机肥中有机质等对微生物群落功能多样性的促进作用。Sheik 等^[16]研究指出,As 含量总体和微生物群落多样性呈负相关。Li 等^[33]的研究表明,与健康土壤相比,Cu 污染土壤的微生物群落代谢多样性明显下降,从而使得 Cu 污染土壤微生物在抵抗干湿交替变化的能力低于无 Cu 残留的健康土壤。此外,高浓度 Zn 的生物毒性同样不容忽视,在相同浓度下,Zn 对红壤微生物代谢多样性等各项微生物学指标的

表 2 基于 MicroResp™ 分析下菜地土壤微生物群落代谢多样性指数

Table 2 Diversity indices of soil microbial metabolism in vegetable soil based on MicroResp™ analysis

处理	Shannon 指数 (H')	均匀度指数 Evenness(E)	Simpson 指数 (D)
CK	2.19b	0.79b	0.85ab
T1	2.36a	0.85a	0.87a
T2	2.15b	0.77b	0.84b

注:不同字母表示各处理间差异显著(P<0.05)。

抑制能力甚至可以高于 $Pb^{[34]}$ 。因此,土壤中 Cu 、 Zn 、 As 含量显著上升均可抑制土壤微生物代谢功能。综上所述,在 Pb - As - Cu - Zn 添加有机肥中的重金属残留水平下,2年4季的有机肥施用就可对菜田土壤造成一定风险,重金属添加有机肥中 Cu 、 Zn 和 As 浓度过高是主要原因。

2.4 不同施肥处理土壤微生物群落代谢结构

为了探讨不同施肥处理菜田土壤微生物群落结构变化,对不同碳源底物诱导呼吸(SIR)数据进行聚类分析,并绘制主成分分析图谱,获得不同处理土壤微生物群落水平的生理指纹图谱(CLPP),结果见图2。 CK 、 $T1$ 和 $T2$ 各聚为一类,表明不同施肥处理土壤的 CLPP 存在差异,即不同处理土壤具有不同的碳源利用代谢模式。相较 $T2$ 与 CK 土壤, $T1$ 与 CK 土壤之间碳源底物利用模式相似性更高。由此可知,有机肥养分本身可以改变土壤微生物代谢结构,同时有机肥中重金属残留水平又会影响有机肥自身养分对土壤微生物代谢结构的作用。杨元根等^[14]就曾指出,高浓度重金属胁迫,例如 Cu 胁迫,会驱动土壤微生物对碳源的优先利用种类发生转移。因此,有机肥及其重金属残留水平同时影响土壤微生物碳源利用格局。微生物不同碳源利用方式暗示着其不同的群落结构和代谢功能,必然影响土壤养分转化和循环过程,从而影响土壤养分数量与形态。

图3进一步比较了 $T1$ 和 $T2$ 处理土壤微生物群落的15种底物诱导呼吸强度(SIR 碳源),发现 $T2$ 土壤中 SIR 柠檬酸、SIRL-苹果酸和 SIR 草酸大幅高于 $T2$ 处理组,表明 $T2$ 处理土壤中重金属增加了土壤微生物对柠檬酸、苹果酸和草酸等羧酸的代谢利用。参

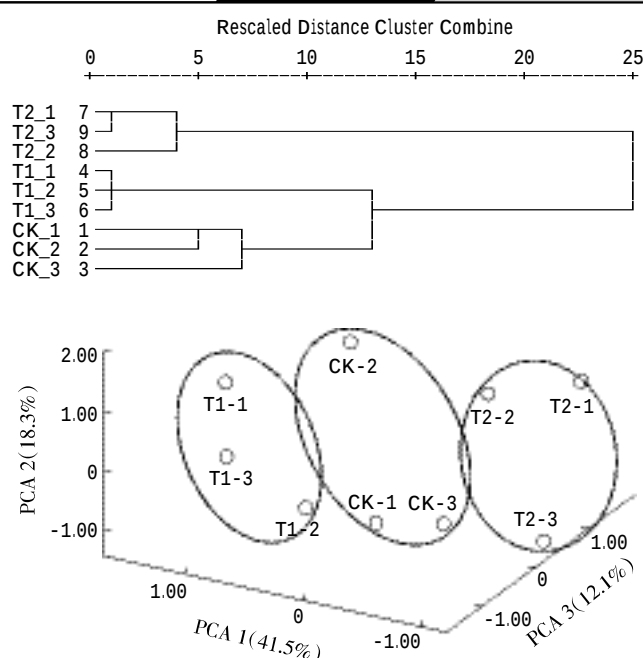


图2 基于 MicroRESP™ 底物诱导呼吸数据主成分分析和聚类分析下的不同施肥处理土壤微生物群落结构差异

Figure 2 Differences in soil microbial community structure among different fertilization treatments based on principle component analysis and cluster analysis of the substrate-induced respiration data from MicroRESP™ analysis

考关于 Cu 、 Zn 、 As 土壤微生物效应的相关文献,我们发现本结果与杨元根等^[14]、郭星亮等^[35]研究不同浓度 Cu 对微生物碳源代谢的影响结果较为吻合。杨元根等^[14]指出,高浓度 Cu 处理土壤微生物对氨基酸、羧酸的利用基本高于低浓度 Cu 处理;郭星亮等^[35]以 Biolog 方法为检测手段研究 Cu 对堆肥微生物群落代谢能力的影响,也证实低剂量 Cu 能提高微生物群落对

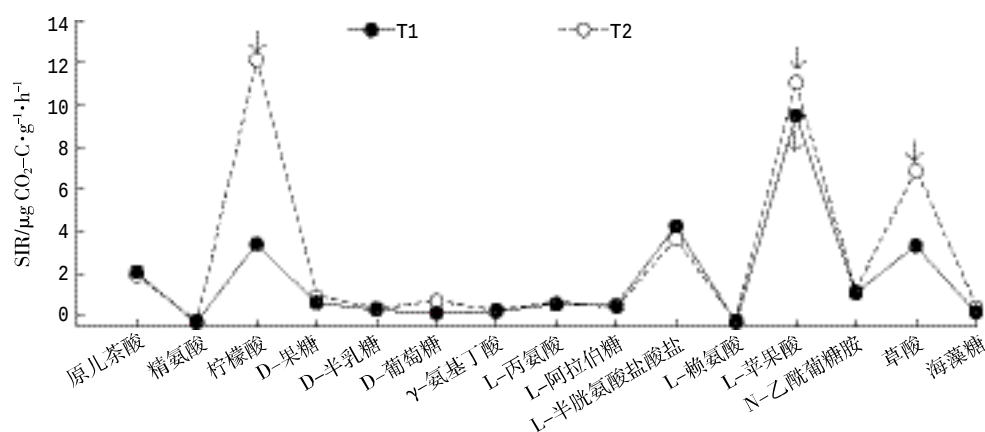


图3 不同处理土壤中15种碳源底物的诱导呼吸

Figure 3 The 15 substrate-induced respirations in different soil treatments

高聚物类碳源的转化而利用,而高剂量 Cu 则产生一定的抑制作用。相关羧酸的代谢可能是土壤微生物应答 Cu 胁迫的一种机制。当然,土壤中 Zn 和有效 As 含量变化也会改变土壤微生物群落代谢利用行为,但其与土壤微生物羧酸代谢之间的关系还不明确,具体影响行为亟待进一步探索。

3 结论

本试验条件下,2年4季的商品有机肥和 Pb-As-Cu-Zn 添加有机肥施用显著提高了旱地蔬菜轮作土壤有机质和部分养分含量,但仅有商品有机肥施用显著促进了土壤基础呼吸作用和微生物代谢功能多样性。土壤 Cu、Zn 和有效态 As 含量是不同有机肥处理微生物群落代谢产生差异的主要原因,其大量添加削弱了有机肥中有机质等养分对土壤微生物的积极作用,并改变了有机肥本身对土壤微生物群落代谢结构的影响,极大刺激了土壤微生物对柠檬酸、苹果酸和草酸的代谢。综上,2年4季的重金属添加有机肥施用已对菜田土壤造成风险,减少和控制有机肥中的重金属残留才能保证有机肥的安全施用,最大程度地发挥土壤培肥及养分替代等积极作用,同时建议在未来的有机肥标准中规定 Cu 和 Zn 的限量参考值。

参考文献:

- [1] Wang H, Dong Y, Yang Y, et al. Changes in heavy metal contents in animal feeds and manures in an intensive animal production region of China[J]. J Environ Sci, 2013, 25(12):2435-2442.
- [2] 覃丽霞, 马军伟, 孙万春, 等. 浙江省畜禽有机肥重金属及养分含量特征研究[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(4):604-610.
QIN Li-xia, MA Jun-wei, SUN Wan-chun, et al. Characteristics of heavy metal and nutrient contents in livestock manure in Zhejiang Province[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(4):604-610.
- [3] 刘荣乐, 李书田, 王秀斌, 等. 我国商品有机肥料和有机废弃物中重金属的含量状况与分析[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(2):392-397.
LIU Rong-le, LI Shu-tian, WANG Xiu-bin, et al. Contents of heavy metal in commercial organic fertilizer and organic wastes[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24(2):392-397.
- [4] 黄鸿翔, 李书田, 李向林, 等. 我国有机肥的现状与发展前景分析[J]. 土壤肥料, 2006(1):3-8.
HUANG Hong-xiang, LI Shu-tian, LI Xiang-lin, et al. Analysis on the status of organic fertilizer and its development strategies in China[J]. Soil Fertilizer, 2006(1):3-8.
- [5] 李书田, 刘荣乐, 陕 红. 我国主要畜禽粪便养分含量及变化分析[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1):179-184.
LI Shu-tian, LIU Rong-le, SHAN Hong. Nutrient contents in main animal manures in China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(1):179-184.
- [6] Oliveira A, Pampulha M E. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics[J]. J Biosci Bioeng, 2006, 102(3):157-161.
- [7] Kumar S R, Agrawal M, Marshall F. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2007, 66(2):258-266.
- [8] 杨 军, 郑袁明, 陈同斌, 等. 中水灌溉下重金属在土壤中的垂直迁移及其对地下水的污染风险[J]. 地理研究, 2006, 25(3):449-456.
YANG Jun, ZHENG Yuan-ming, CHEN Tong-bin, et al. Leaching of heavy metals in soil column under irrigation reclaimed water: A simulation experiment[J]. Geographical Research, 2006, 25(3):449-456.
- [9] 孙 波, 赵其国, 张桃林, 等. 土壤质量与持续环境 III [J]. 土壤, 1997, 29(5):225-234.
SUN Bo, ZHAO Qi-guo, ZHANG Tao-lin, et al. Defining soil quality for a sustainable environment III [J]. Soils, 1997, 29(5):225-234.
- [10] Gillera K E, Witterb E, Mcgrath S P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review[J]. Soil Biol Biochem, 1998, 30(10/11):1389-1414.
- [11] Zhang C, Nie S, Liang J, et al. Effects of heavy metals and soil physico-chemical properties on wetland soil microbial biomass and bacterial community structure[J]. Sci Total Environ, 2016, 557/558:785-790.
- [12] Bhattacharyya P, Mitra A, Chakrabarti K, et al. Effect of heavy metals on microbial biomass and activities in century old landfill soil[J]. Environ Monit Assess, 2008, 136(1/2/3):299-306.
- [13] Liao M, Xie X M. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2007, 66(2):217-223.
- [14] 杨元根, Paterson E, Campbell C. 重金属 Cu 的土壤微生物毒性研究[J]. 土壤通报, 2002, 33(2):137-141.
YANG Yuan-gen, Paterson E, Campbell C. Study on microbial toxicity of heavy metal copper[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2002, 33(2):137-141.
- [15] 蒋艳梅. 重金属 Cu、Zn、Cd、Pb 复合污染对稻田土壤微生物群落结构与功能的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
JIANG Yan-mei. Effect of the combined pollution of heavy metals microbial community structure and function in paddy soil[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.
- [16] Sheik C S, Mitchell T W, Rizvi F Z, et al. Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure[J]. PloS One, 2012, 7(6):e40059.
- [17] Nicholson F A, Smith S R, Alloway B J, et al. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales[J]. Sci Total Environ, 2003, 311(1/2/3):205-219.
- [18] Lynch D H, Voroney R P, Warman P R. Soil physical properties and organic matter fractions under forages receiving composts, manure or fertilizer[J]. Compost Sci Util, 2005, 13(4):252-261.
- [19] 祝 英, 王治业, 彭铁楠, 等. 有机肥替代部分化肥对土壤肥力和微生物特征的影响[J]. 土壤通报, 2015, 46(5):1161-1167.
ZHU Ying, WANG Zhi-ye, PENG Yi-nan, et al. Changes of soil nutri-

- ents and microbial communities under the condition of organic fertilizers replacing part of chemical fertilizers[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2015, 46(5):1161-1167.
- [20] Zhen Z, Liu H, Wang N, et al. Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e108555.
- [21] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1978.
- Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Analytical methods of soil physical and chemical properties[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1978.
- [22] 张传琦, 程丽娅, 黄勤, 等. ICP-MS法测定土壤中有效态砷的研究[J]. 分析试验室, 2011, 30(7):83-86.
- ZHANG Chuan-qi, CHENG Li-ya, HUANG Qin, et al. Study on determination of available arsenic in soil by ICP-MS[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2011, 30(7):83-86.
- [23] Campbell C D, Chapman S J, Cameron C M, et al. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6):3593-3599.
- [24] 陈晓娟, 袁圆, 吴小红, 等. 不同耕地利用方式下土壤微生物活性及群落结构特性分析:基于 PLFA 和 MicroRESP™ 方法[J]. 环境科学, 2013, 34(6):2375-2382.
- CHEN Xiao-juan, YUAN Yuan, WU Xiao-hong, et al. Microbial activity and community structure analysis under the different land use patterns in farmland soils: Based on the methods PLFA and MicroResp™[J]. Environmental Science, 2013, 34(6):2375-2382.
- [25] 张淑香, 张文菊, 沈仁芳, 等. 我国典型农田长期施肥土壤肥力变化与研究展望[J]. 植物营养与肥科学报, 2016, 21(6):1389-1393.
- ZHANG Shu-xiang, ZHANG Wen-ju, SHEN Ren-fang, et al. Variation of soil quality in typical farmlands in China under long-term fertilization and research expedition[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2016, 21(6):1389-1393.
- [26] Page A L, Miller R H. Methods of soil analysis, Part 2: Chemical and microbiological properties[M]. Madison, WI: American Society of Agronomy, 1982: 831-871.
- [27] Peacock A D, Mullen M D, Ringelberg D B, et al. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications[J]. Soil Biol Biochem, 2001, 33(7/8):1011-1019.
- [28] Landi L, Renella G, Moreno J L, et al. Influence of cadmium on the metabolic quotient, L/D : D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions[J]. Biol Fert Soils, 2000, 32(1):8-16.
- [29] 谢文军, 周健民, 王火焰. 重金属 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 及氯氰菊酯对不同施肥模式土壤微生物功能多样性的影响[J]. 环境科学, 2008, 29(10):2919-2924.
- XIE Wen-jun, ZHOU Jian-min, WANG Huo-yan. Influence of Cu^{2+} , Cd^{2+} and cypermethrin on microbial functional diversity in different fertilization soils[J]. Environmental Science, 2008, 29(10):2919-2924.
- [30] 刘清, 王子健, 汤鸿霄. 重金属形态与生物毒性及生物有效性关系的研究进展[J]. 环境科学, 1996, 17(1):89-92.
- LIU Qing, WANG Zi-jian, TANG Hong-xiao. Process in research on relationship between heavy metal species and its biotoxicity and bioavailability[J]. Environmental Science, 1996, 17(1):89-92.
- [31] Ghosh A K, Bhattacharyya P, Pal R. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India[J]. Environ Int, 2004, 30(4):491-499.
- [32] Zhong W H, Gu T, Wang W, et al. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity[J]. Plant Soil, 2010, 326(1/2):511-522.
- [33] Li J, Wang J T, Hu H W, et al. Copper pollution decreases the resistance of soil microbial community to subsequent dry-rewetting disturbance[J]. J Environ Sci, 2016, 39:155-164.
- [34] 滕应. 重金属污染下红壤微生物生态特征及生物学指标研究[D]. 杭州:浙江大学, 2003.
- TENG Ying. Study on microbial ecological characteristics and biological indexes in red soils polluted by heavy metals[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003.
- [35] 郭星亮. 重金属 Cu、Zn 对堆肥过程中微生物群落代谢和水解酶活性的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2011.
- GUO Xing-liang. Effects of heavy metal Cu and Zn on microbial community metabolic profiles and hydrolytic enzyme activities in composting[D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University, 2011.