

中条山铜尾矿坝面土壤细菌群落的结构特征*

景炬辉¹ 刘晋仙² 李 磊³ 贾 彤² 王小云² 柴宝峰^{2**}

¹山西大学生物技术研究所 太原 030006

²山西大学黄土高原研究所 太原 030006

³山西财经大学环境经济学院 太原 030006

摘要 微生物在尾矿废弃地土壤发育、营养物质循环、有毒物质降解等生态恢复过程中发挥重要作用. 采用Illumina MiSeq测序的方法, 分析中条山十八河尾矿废弃地不同恢复阶段(1-45年)的细菌群落结构, 并结合植物群落、土壤理化性质和土壤酶活性, 探讨细菌群落结构与功能变化的调控机制. 结果表明, 不同恢复年限的尾矿坝, 土壤理化性质、土壤酶活性和植物群落结构发生梯度变化. 在这一环境梯度下, 不同恢复年限的细菌群落结构具有显著差异, 其中优势细菌主要有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteri)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes). 细菌群落组成与环境因子和植物群落多样性显著相关. 细菌优势科的相对丰度主要与重金属(Cu、Mn、Pb、Zn)含量相关, 鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)的相对丰度与重金属(Cd、Cu、Pb、Zn)含量极显著正相关. 恢复45年、15年的土壤中细菌多样性最高, 且群落组成相似, 恢复1年的土壤中细菌丰度较高, 而多样性最低. 本研究表明, 土壤理化因子、重金属含量和植物群落结构是造成土壤中细菌群落结构变化的关键因素; 鞘脂单胞菌科对重金属具有一定的耐受性, 因此可作为重金属污染区域生态恢复的理想菌种. (图3 表4 参38)

关键词 铜尾矿地; 微生物群落; 植物群落多样性; 环境因子; 重金属; 土壤酶

CLC Q154.36

The structural characteristics of a soil bacterial community in a dam of copper mine tailings in Zhongtiaoshan mountains, Shanxi*

JING Juhui¹, LIU Jinxian², LI Cui³, JIA Tong², WANG Xiaoyun² & CHAI Baofeng^{2**}

¹Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

²Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

³Department of Environmental Economics, Shanxi University of Finance and Economics, Taiyuan 030006, China

Abstract Microorganisms play a key role in soil development, nutrient cycling, and degradation of toxic substances during reclamation processes of wastelands containing mine tailings. In this study, the Illumina MiSeq method was applied to analyze the bacterial community structure in a dam of Shibahe mine tailing wastelands at different restoration stages (1–45 years). Meanwhile, the data on plant community, soil physicochemical properties, and soil enzymes were collected to be used for studying the mechanisms regulating the structure and function of the bacterial community. The results indicated that soil physicochemical properties, soil enzymes, and the soil plant community formed a gradient process on the dam of copper mine tailings. Under these conditions, the structures of bacterial communities were significantly different at different restoration stages of the dam land, where Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes were dominant phyla at different proportions. The composition of a bacterial community significantly correlated with environmental factors and plant diversity. The relative abundance of dominant families of bacteria was mainly related to concentrations of heavy metals (Cu, Mn, Pb, and Zn), and the relative abundance of Sphingomonadaceae positively correlated with heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn). The diversity of bacteria was higher and the composition of the community was similar in the 45-year and 15-year dam land, whereas the abundance of bacteria was the highest and diversity was the lowest in the 1-year dam land. The results showed that soil physicochemical factors, heavy metal content, and plant community structure were the key factors affecting the structure of the soil bacterial community. Sphingomonadaceae showed certain tolerance to heavy metals; consequently, these microbes can be used as an alternative taxon for ecological restoration in a mining area.

Keywords copper tailing dam; bacteria community; plant community diversity; environmental factor; heavy metal; soil enzyme

收稿日期 Received: 2016-12-14 修订日期 Accepted: 2017-01-21

*山西省科技攻关项目(20150313001-3)、山西省回国留学人员科研项目(2012-059)和国家自然科学基金青年科学基金项目(31600308)资助 Supported by the Key Sci-tech Project of Shanxi (20150313001-3), the Project for Returned Overseas Researchers of Shanxi (2012-059) and the Young Scientist Fund of National Natural Science Foundation of China (31600308)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: bfchai@sxu.edu.cn)

尾矿废弃地对环境影响巨大, 不仅占用大量土地, 而且容易造成水土流失、环境污染、植被破坏等^[1]. 该环境营养贫乏, 重金属含量高, 生态恢复极其困难, 往往需要几十到上百年的时间^[1-3]. 在污染土壤恢复过程中, 微生物起到很重要的作用, 包括分解有机质、降解有毒物质、促进营养物质循环等, 且由于土壤微生物群落对于环境的变化极为敏感, 具有广泛的遗传多样性和快速鉴别的特点^[4], 因此, 微生物群落多样性、丰度和生态功能的动态可以作为污染环境生态恢复的重要指标^[5-6]. 另一方面, 尾矿废弃地极端的生态环境可以作为研究微生物群落结构动态的理想场地^[2]. 微生物的群落组成和功能变化受到环境因子的影响, 尾矿废弃地重金属(铅Pb、铬Cr、铜Cu、砷As等)含量^[4]、营养元素以及pH^[7]的变化具有一定的特殊性, 这些环境因子如何驱动微生物群落结构的形成和功能的变化都有待研究.

植物的定植为微生物提供稳定的生存环境和光合作用产物^[8]. 植物和微生物产生的各种土壤酶, 参与土壤生物化学过程^[9], 在土壤物质循环和能量代谢过程中起着重要作用, 可作为反映土壤环境质量变化的重要指示物^[10]. 土壤呼吸主要包括植物根的呼吸和土壤微生物的呼吸^[11], 土壤酶分解有机物也是土壤呼吸的一个主要方面, 因此土壤呼吸是土壤质量的一个重要的指标. 之前的研究主要关注矿区土壤理化性质、重金属含量、矿区植物和动物区系的恢复^[12-14]以及酸性尾矿废水(Acid mine drainage, AMD)中微生物的群落组成以及对土壤恢复的影响^[15]. 北方金属尾矿库大多为碱性, 对碱性尾矿坝污染环境下微生物的群落结构和多样性及其生态功能的研究还鲜见报道.

我们以北方铜尾矿废弃地不同恢复年限的尾矿砂为研究对象, 探讨重金属污染环境尾矿砂土壤中(1)细菌群落结构的时空动态,(2)细菌群落的结构和功能与环境因子、植被群落结构的关系及其调控机制, 旨在为尾矿废弃地生态

恢复措施的制定提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 研究区概况和样品采集

十八河尾矿库(35°26'-35°27'N, 111°66'-111°67'E)位于山西省运城市垣曲县境内, 1969年开始建设, 1972年投入使用. 尾矿库初期坝为均质土坝, 坝底标高486 m, 坝顶标高509 m, 在初期坝上已堆筑14道子坝, 堆积高度84 m, 总坡比1:6. 后期子坝采用机械堆筑方式, 将粗颗粒尾矿推至坝前, 通过碾压处理将其压实, 形成坝体. 该区属大陆性季风气候, 四季分明, 春季干旱多风, 夏季雨量集中, 冬季少雪干燥, 年均降雨量为780 mm, 年均气温14 °C, 无霜期大于200 d.

2015年7-10月进行野外调查取样. 样地设置如图1所示, 植被样地设置分3个梯度: 45-40年前的尾矿初期坝(长时间恢复), 主要植被有白茅(*Imperata cylindrica*)、披碱草(*Elymus dahuricus* Turcz.)、木贼(*Equisetum hyemale*)、牡荊(*Vitex negundo*)、艾(*Artemisia argyi*)等; 30-15年前堆筑的子坝(较长时间恢复), 主要植被有白羊草(*Bothriochloa ischaemum*)、猪毛蒿(*Artemisia scoparia*)、铁杆蒿(*Artemisia sacrorum*)等; 5年恢复与1年前新排出的矿砂(短时间恢复), 主要植被有狗尾草(*Setaria viridis*)、猪毛蒿、白羊草等. 沿梯度设置3条采样带, 间隔40-50 m; 每个梯度设置3个1 m × 1 m的样方. 调查植物群落的物种、高度、盖度、多度、生物量等. 土壤及土壤微生物样品的采集分为6个梯度, 分别为1、5、15、30、40、45年. 样方内采集土壤样品, 深度为0-20 cm, 每个样方的3个土壤样品混合. 密封于塑料自封袋中, 置于冰盒, 快速运回实验室. 样品分成两份, 一份置于-20 °C冰箱, 用于提取基因组; 另一份风干处理, 用于土壤理化性质的测定.



图1 研究区样方设置. A: 研究区全景图; B: 尾矿坝样方分布和年限. 红色方块代表1-45年样地的样方; 蓝色圆圈代表细菌群落高通量测序的样方.
Fig. 1 The profile of the sampling plots of study area. A: The panorama of study area; B: The quadrat distribution and restoration year on dam. Red squares indicate all quadrats and blue dots indicate the quadrats for bacterium high throughput sequencing.

1.2 样品理化性质

土壤pH用HANNA HI3221测定 ($m_{\pm}/m_{\text{水}} = 1:2.5$); 总氮(TN)、总碳(TC)和总硫(TS)含量用元素分析仪(Elementar Vario MACRO.Ger)测定; 孔隙度(Por)由土壤容重和比重计算得出; 土壤呼吸(SR)用美国PP Systems公司的CIRAS-2光合作用测定仪测定; 土壤粒径用激光衍射粒度分析仪(Mastersizer 3000 Laser Diffraction Particle Size Analyzer, UK)测定; 重金属元素(As、镉Cd、Cr、Cu、锰Mn、镍Ni、Pb、锌Zn)含量用(ICP-AES)(iCAP 6000, Thermo Fisher, UK)测定。

1.3 植物多样性指数和土壤酶活性

矿区植被多样性测度方法采用了Pielou均匀度指数、Shannon-Wiener多样性指数及Simpson优势度指数^[16]。过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法测定, 土壤蔗糖酶活性采用3,5-二硝基水杨酸比色法测定, 土壤脲酶活性采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定^[17]。

1.4 样品DNA提取及高通量组测序

利用土壤基因组提取试剂盒(Felix bio-tech, USA)提取45年、15年及1年的矿砂样本微生物的宏基因组DNA。扩增细菌的16S rRNA V3区片段, 采用通用引物: 正向338F(5'-ACTCCT ACG GGAGGCAGCA-3'), 反向534R(5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3')。PCR产物胶回收后进行定量, 构建克隆文库, 定量并质检后, 采用Illumina MiSeq平台进行测序, 通常在97%的相似水平下对序列进行OTU的聚类 and 后续的生物信息分析^[18]。本研究的测序和生物信息服务在上海派森诺生物科技有限公司完成。

1.5 数据分析

数据采用SPSS17.0、Excel和Canoco4.5软件处理和分析; 用主成分分析(Principle component analysis, PCA)方法分析

土壤理化性质、土壤酶活性、植物群落多样性随生态梯度的变化趋势。不同恢复年限样品理化性质的均值比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析, 多重比较采用Tukey检验。用样地细菌优势科相对丰度的Bray-Curtis相似性矩阵进行土壤细菌群落结构与环境因子关系的Mantel分析。高通量测序结果运用Mothur软件中uchime的方法去除嵌合体序列。应用软件Mothur中的summary.single命令, 计算4种常用的生物多样性指数。

2 结果与分析

2.1 尾矿坝植物群落多样性和土壤理化性质呈明显的生态梯度

不同恢复年限坝面植物群落依次为: 1-5年为狗尾草+猪毛蒿+白羊草, 15-30年为白羊草+猪毛蒿+铁杆蒿, 40-45年为牡荊<白茅+披碱草+艾。随恢复年限的增加, 土壤趋向于中性的生境, 由适宜耐盐碱植物如猪毛蒿、狗尾草、苍耳(*Xanthium sibiricum*)和抱茎苦苣菜(*Ixeris sonchifolia*)等生长的碱性土壤(pH 8.7), 逐渐变为弱碱性(pH 7.9), 适宜多种植物的生长, 如禾本科植物白茅、无芒雀麦(*Bromus inermis*)、茅叶荩草(*Arthraxon prionodes*)和早熟禾(*Poa annua*), 蔷薇科植物莓叶委陵菜(*Potentilla fragarioides*)和朝天委陵菜(*P. supina*), 堇菜科早开堇菜(*Viola prionantha*)和紫花地丁(*Viola philippica*), 豆科野大豆(*Glycine soja*)、黄香草木樨(*Melilotus officinalis*)和木贼等。土壤酸碱性和土壤肥力、土壤养分和植物的生长具有显著性的影响。尾矿坝不同恢复年限样地植物群落多样性、土壤理化性质、土壤重金属含量、土壤酶活性和土壤呼吸的变化如表1所示。随着恢复年限的增加, 植物群落生物量显著提高, 第45年是第5年的24倍。土壤TC在第45年的坝面是第5年的2倍以上, 第40年坝

表1 不同恢复年限尾矿坝土壤特征和植被多样性

Table 1 The soil characteristics and plant diversity in the dam soil along recovery time

| 环境因子 Environmental factor | 恢复年限 Restoration period (t/a) | | | | | |
|---|-------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | 45 | 40 | 30 | 15 | 5 | 1 |
| pH | 7.970 ± 0.116c | 7.900 ± 0.173c | 8.360 ± 0.123b | 8.760 ± 0.051a | 8.210 ± 0.064c | 8.600 ± 0.033ab |
| 总碳 TC (w/mg kg ⁻¹) | 15 701 ± 3719a | 16 162 ± 503.3a | 9 228 ± 1667b | 7 614 ± 974.1b | 7 183 ± 574.0b | 6 080.9 ± 24.30b |
| 总氮 TN (w/mg kg ⁻¹) | 523.2 ± 65.84ab | 668.2 ± 230.3a | 257.2 ± 43.36bc | 129.4 ± 30.15c | 208.5 ± 88.48bc | 89.34 ± 7.050c |
| 总硫 TS (w/mg kg ⁻¹) | 444.2 ± 48.91bc | 554.5 ± 86.05b | 400.8 ± 41.96bc | 443.9 ± 56.03bc | 373.0 ± 21.17c | 876.8 ± 5.046a |
| 碳氮比 C/N | 30.75 ± 8.727ab | 26.66 ± 7.234b | 38.00 ± 9.221ab | 59.38 ± 16.17ab | 41.01 ± 15.28ab | 68.45 ± 5.980a |
| 植被生物量 PB (m/g) | 481.1 ± 124.9a | 377.1 ± 93.95a | 226.7 ± 87.96ab | 42.77 ± 8.037b | 18.99 ± 4.268b | nd |
| Simpson指数 Simpson index | 0.218 ± 0.086 | 0.198 ± 0.042 | 0.376 ± 0.035 | 0.486 ± 0.177 | 0.387 ± 0.097 | nd |
| Shannon指数 Shannon index | 1.936 ± 0.306 | 1.920 ± 0.285 | 1.230 ± 0.141 | 1.026 ± 0.421 | 1.189 ± 0.269 | nd |
| Pielou指数 Pielou index | 0.830 ± 0.0734 | 0.849 ± 0.009 | 0.809 ± 0.022 | 0.730 ± 0.0715 | 0.788 ± 0.032 | nd |
| H ₂ O ₂ 酶 Catalase (λ/mg g ⁻¹ (20 min) ⁻¹) | 2.160 ± 0.339a | 2.200 ± 0.574a | 0.76 ± 0.314b | 0.720 ± 0.098b | 1.160 ± 0.204ab | nd |
| 脲酶 Urease (λ/mg g ⁻¹ d ⁻¹) | 0.22 ± 0.031b | 0.428 ± 0.128a | 0.053 ± 0.034b | 0.018 ± 0.01b | 0.190 ± 0.030b | nd |
| 蔗糖酶 Sucrase (λ/mg g ⁻¹ d ⁻¹) | 0.690 ± 0.048a | 0.747 ± 0.069a | 0.139 ± 0.043b | 0.130 ± 0.023b | 0.258 ± 0.040b | nd |
| 土壤呼吸 (SR/g m ⁻² h ⁻¹) | 0.560 ± 0.08a | 0.642 ± 0.106a | 0.202 ± 0.022b | 0.180 ± 0.018b | 0.286 ± 0.032b | nd |
| 土壤粒径 PS (d/μm) | 50.90 ± 5.855c | 53.23 ± 6.650c | 164.5 ± 1.224a | 131.3 ± 46.23ab | 74.50 ± 9.716bc | 71.53 ± 3.137bc |
| 土壤孔隙度 Pority | 0.47 ± 0.015ab | 0.50 ± 0.018ab | 0.50 ± 0.022a | 0.42 ± 0.022bc | 0.36 ± 0.023c | 0.51 ± 0.033a |
| 砷 As (w/mg kg ⁻¹) | 25.32 ± 4.336 | 32.56 ± 4.328 | 27.13 ± 4.207 | 16.65 ± 2.469 | 32.98 ± 5.571 | 16.42 ± 3.380 |
| 镉 Cd (w/mg kg ⁻¹) | 1.29 ± 0.976abc | 2.78 ± 1.566abc | 4.31 ± 0.729a | 3.30 ± 1.067ab | 1.09 ± 0.667bc | 0.00 ± 0.00c |
| 铬 Cr (w/mg kg ⁻¹) | 65.17 ± 1.871 | 87.23 ± 4.186 | 67.20 ± 2.636 | 66.61 ± 2.846 | 82.64 ± 2.311 | 72.19 ± 6.324 |
| 铜 Cu (w/mg kg ⁻¹) | 325.0 ± 6.809ab | 293.2 ± 77.53ab | 380.9 ± 35.32a | 330.9 ± 26.76ab | 272.1 ± 78.28ab | 168.0 ± 14.17b |
| 锰 Mn (w/mg kg ⁻¹) | 564.2 ± 51.10b | 870.5 ± 94.22a | 533.5 ± 17.03b | 483.5 ± 10.19bc | 616.4 ± 108.8b | 318.5 ± 6.190c |
| 镍 Ni (w/mg kg ⁻¹) | 46.49 ± 3.228 | 50.91 ± 4.097 | 47.23 ± 3.407 | 44.02 ± 4.993 | 44.70 ± 0.043 | 38.66 ± 4.052 |
| 铅 Pb (w/mg kg ⁻¹) | 1 249 ± 41.23a | 1 338 ± 47.17a | 1 336 ± 65.91a | 1 323 ± 60.93a | 1 371 ± 44.31a | 173.3 ± 45.27b |
| 锌 Zn (w/mg kg ⁻¹) | 73.50 ± 3.751bc | 131.7 ± 11.36a | 87.11 ± 21.52ab | 84.20 ± 11.73abc | 102.5 ± 20.43ab | 38.69 ± 7.848c |

TC: Total carbon; TN: Total nitrogen; TS: Total sulphur; PB: Plant biomass; SR: Soil respiration; PS: Particle size. nd: No data.

面的土壤TN是第5年的3倍以上, TS也呈上升趋势. 土壤过氧化氢酶、脲酶和蔗糖酶活性以及土壤呼吸强度(土壤质量)随恢复时间都有显著性的提高. 植物群落多样性(Shannon指数)和均匀度(Pielou指数)明显提高. 根据中华人民共和国国家标准“土壤环境质量标准值(GB15618-1995)”, 参阅pH值>7.5的二级标准, 研究区土壤重金属含量Cu超标1.7-3.8倍, Pb超标3.5-3.9倍, Cd超标1.8-7.2倍, As超标不明显, Cr、Ni、Zn均不超标. 随恢复年限的延长, 土壤Cd和Pb含量有减少趋势. 进一步用主成分分析方法分析坝面植被、土壤理化性质、酶活性等沿样带的变化梯度, 结果如图2所示. PCA结果反映了沿样带的土壤和植被特征, 其参数沿样带(恢复年限)形成环境因子梯度, 第一、二轴分别解释数据的92.9%和5.2%. PCA的第一轴反映植物群落生物量、多样性、均匀度、土壤过氧化氢酶活性、Ni、Zn、Pb等. 第二轴与土壤粒径、孔隙度、Cr、脲酶活性等有关. 30年、40年和45年恢复样地位于第一轴负侧, 与植物群落多样性、土壤TC、TN、土壤酶活性和土壤呼吸等相关. 植物多样性、土壤质量、土壤养分含量随恢复时间而增加. 恢复1年、5年和15年样地位于第一轴正侧. 总得来看, 尾矿坝面土壤理化性质和植物群落特征沿样带形成了一定的生态梯度, 可以据此研究植物和微生物群落结构的演替动态及其与环境因子的关系.

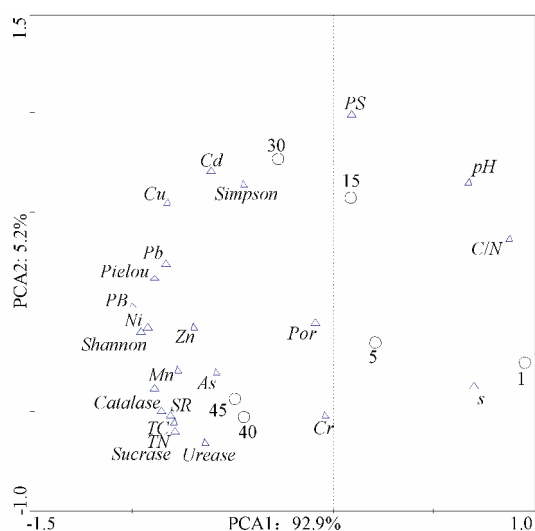


图2 不同恢复年限的样地、植物群落多样性指数与环境因子的PCA分析. 圆圈代表不同恢复年限的样地, 数字代表恢复年限; 空心三角代表植物多样性指数和土壤环境因子.

Fig. 2 Principal component analysis of the sampling plots, plant community biodiversity index and soil environmental factors along a chronosequence of reclamation. Circles represent sampling plots with different restoration period, where numbers represent restoration periods; hollow triangles represent biodiversity index of plant communities and soil environmental factors.

表2 不同样品细菌克隆文库及其多样性指数

Table 2 Bacterial clone library and biodiversity index of different samples

| 恢复年限 (t/a) Restoration period | 序列 Sequence | 科 Family | 多样性指数 Diversity index | | | | |
|----------------------------------|----------------|-------------|-----------------------|----------|----------|---------|---------|
| | | | OTUs | Chao1 | ACE | Shannon | Simpson |
| 45 | 30572 | 177 | 6118 | 17664.19 | 18054.41 | 9.9914 | 0.9934 |
| 15 | 31267 | 167 | 4697 | 11675.25 | 11682.02 | 9.3180 | 0.9870 |
| 1 | 32885 | 95 | 364 | 447.02 | 424.76 | 3.8508 | 0.8156 |

2.2 尾矿库坝面土壤细菌群落结构

2.2.1 不同恢复年限细菌群落 尾矿库坝面植物和土壤理化性质在时间序列上形成了明显的生态梯度, 在此基础上, 探讨微生物群落结构和功能的差异及其影响因子. 选择恢复45年、15年和1年样地的细菌群落进行高通量测序. 样品序列数、OTU数、细菌科的数目和多样性指数如表2所示. 可以看出随着恢复年限增加, 尽管序列数呈逐渐减小趋势, 而OTU数、细菌科的数目、群落丰富度指数(Chao1和ACE)、群落多样性指数(Shannon和Simpson)均呈显著升高趋势, 表明随着恢复年限的增加细菌丰富度和多样性显著增加.

2.2.2 不同恢复年限细菌群落结构及相对丰度 不同恢复年限的土壤细菌门的组成具有一定的差异(图3A), 恢复45年、15年和1年的土壤中优势细菌有(丰度 $\geq 1\%$)变形菌门(Proteobacteria)分别占46.1%、39.7%、63.4%, 放线菌门(Actinobacteria)分别占20.6%、28.9%、21.4%, 厚壁菌门(Firmicutes)分别占1.6%、1.8%、12.7%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)分别占2%、1.5%、1%. 恢复45年的土壤细菌群落中还有酸杆菌门(Acidobacteria)占到10.8%、绿弯菌门(Chloroflexi)占7.9%、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)占4.2%、TM7占2%、浮霉菌门(Planctomycetes)占1.2%; 恢复15年的细菌群落中酸杆菌门占10.2%、绿弯菌门占9.1%、芽单胞菌门占3.6%、TM7占1.1%. 恢复45年、15年和1年土壤的细菌群落的优势科(丰度 $\geq 1\%$)(图3B)主要是变形菌门的柄杆菌科(Caulobacteraceae), 分别占8.9%、12.8%、47.4%; 鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)分别占3.7%、5.2%、2.2%; 丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)分别占2.6%、2.1%、1.7%; 甲基杆菌科(Methylobacteriaceae)分别占1.4%、2.0%、9.0%. 放线菌门的微球菌科(Micrococcaceae)分别占2.3%、1.7%、3.5%, 微杆菌科(Microbacteriaceae)分别占1.5%、1.5%、6.2%, 类诺卡氏菌科(Nocardioideae)分别占3.0%、3.4%、10.8%. 此外, 优势细菌科还有红螺菌科(Rhodospirillaceae)、慢生根瘤菌科(Bradyrhizobiaceae)、生丝微菌科(Hyphomicrobiaceae)、链霉菌科(Streptomycetaceae)、链球菌科(Streptococcaceae)等.

2.3 尾矿库坝面细菌群落结构与土壤特征、植物多样性的相互关系

细菌群落组成受到土壤环境因子、植物多样性的影响. Mantel test用来分析细菌群落结构(23个优势科)与土壤理化性质、重金属含量、土壤质量(土壤呼吸)以及植物多样性的相关性. 如表3所示, 细菌群落组成与环境因子极显著或显著相关, 重金属含量($r = 0.7932$, $P = 0.003$)、植物群落多样性($r = 0.8682$, $P = 0.002$)对细菌群落结构影响更为明显. 因此, 在本研究中, 土壤特征、植物多样性影响土壤细菌群落结构的形成.

表3 土壤细菌群落结构 (B) 与土壤理化性质 (Sp)、土壤重金属含量 (H)、植物群落多样性 (P) 及土壤质量 (Sq) 的Mantel分析

Table 3 The Mantel analysis of the relationship between soil bacterial community (B) and soil physicochemical property (Sp), soil heavy metal content (H), plant diversity (P) and soil quality (Sq)

| 关系 Relationship | r | P |
|-----------------|--------|-------|
| B-Sp | 0.641 | 0.011 |
| B-H | 0.7932 | 0.003 |
| B-P | 0.8682 | 0.002 |
| B-Sq | 0.4772 | 0.025 |

不同恢复年限的土壤细菌群落组成具有一定的差异, 据此, 分析细菌群落共有的7个优势科相对丰度与环境因子和植物群落的相关性. 结果如表4所示, 土壤pH与细菌优势科

相对丰度的相关性均不显著. 土壤养分 (TC和TN) 含量仅与丛毛单胞菌科相对丰度显著相关, TS与所有优势科均相关. 植物生物量与微球菌科相对丰度极显著正相关, 与类诺卡氏菌科和鞘脂单胞菌科相对丰度负相关. 土壤酶活性、土壤呼吸主要影响柄杆菌科、鞘脂单胞菌科的丰度变化, 对微球菌科和甲基杆菌科也有影响. 鞘脂单胞菌科相对丰度受到土壤粒径、土壤孔隙度的影响. 重金属Cu、Pb、Zn和Mn主要影响细菌相对丰度变化, Cu、Pb、Zn和Cd与鞘脂单胞菌科相对丰度极显著正相关, 其他优势科与Cu、Pb、Zn和Mn显著负相关 (丛毛单胞菌科仅与Pb正相关).

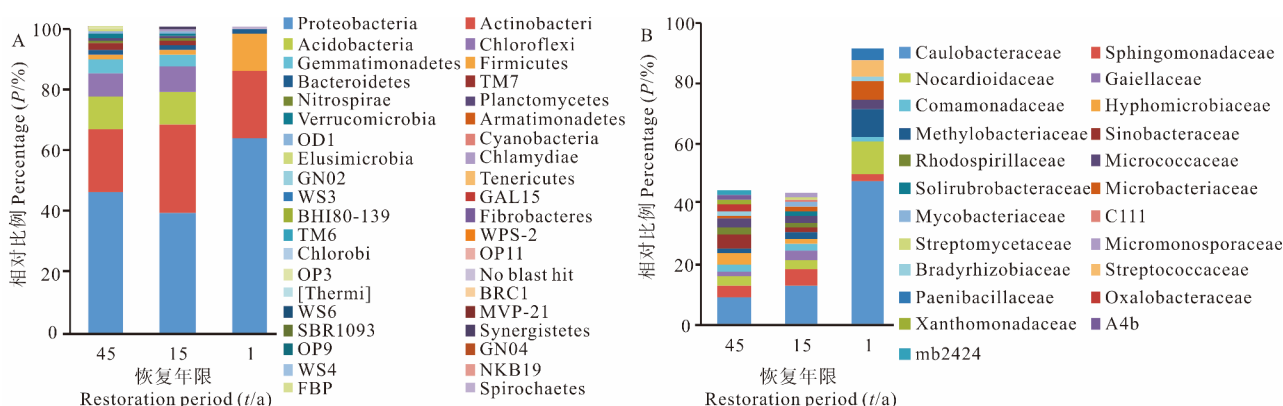


图3 坝面土壤细菌群落组成. A: 细菌群落在门水平组成; B: 细菌群落优势科相对丰度.

Fig. 3 Composition of soil bacterial community in the dam. A: Bacterial community composition at the phyla level; B: Relative abundance of dominant families of bacteria communities.

表4 样地7个共有优势细菌科的丰度与环境因子的相关性

Table 4 The correlations between environmental factors and 7 dominant families of bacteria

| 环境因子 Environment factor | 微球菌科 Micrococaceae | 微杆菌科 Microbacteriaceae | 类诺卡氏菌科 Nocardiodaceae | 柄杆菌科 Caulobacteraceae | 甲基杆菌科 Methylobacteriaceae | 鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae | 丛毛单胞菌科 Comamonadaceae |
|--|-----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| pH | 0.041 | 0.291 | 0.332 | 0.399 | 0.359 | 0.186 | -0.674 |
| 总碳 TC (w/mg kg ⁻¹) | -0.270 | -0.425 | -0.484 | -0.544 | -0.521 | 0.055 | 0.788* |
| 总氮 TN (w/mg kg ⁻¹) | -0.305 | -0.544 | -0.584 | -0.628 | -0.606 | 0.094 | 0.773* |
| 总硫 TS (w/mg kg ⁻¹) | 0.914** | 0.967** | 0.964** | 0.966** | 0.979** | -0.848** | -0.692* |
| 碳氮比 C/N | 0.433 | 0.564 | 0.592 | 0.633 | 0.614 | -0.286 | -0.519 |
| 植被生物量 PB (mg) | 0.936** | -0.132 | -0.855* | -0.806 | -0.630 | -0.972** | 0.489 |
| Simpson指数 Simpson index | -0.656 | 0.215 | 0.175 | 0.847* | 0.352 | 0.728 | -0.766 |
| Shannon指数 Shannon index | 0.662 | -0.071 | -0.252 | -0.885* | -0.493 | -0.778 | 0.803 |
| Pielou指数 Pielou index | 0.442 | -0.022 | 0.044 | -0.759 | -0.330 | -0.568 | 0.779 |
| 过氧化氢酶 Catalase (λ/mg g ⁻¹ (20 min) ⁻¹) | 0.774 | -0.107 | -0.603 | -0.906* | -0.728 | -0.906* | 0.761 |
| 脲酶 Urease (λ/mg g ⁻¹ d ⁻¹) | 0.812* | 0.104 | -0.639 | -0.920** | -0.757 | -0.957** | 0.726 |
| 蔗糖酶 Sucrase (λ/mg g ⁻¹ d ⁻¹) | 0.753 | 0.137 | -0.577 | -0.952** | -0.815* | -0.933** | 0.824* |
| 土壤呼吸 (SR/g m ⁻² h ⁻¹) | 0.722 | 0.245 | -0.621 | -0.876* | -0.826* | -0.904 | 0.713 |
| 土壤粒径 PS (d/μm) | -0.606 | -0.385 | -0.374 | -0.610 | -0.368 | 0.732* | -0.203 |
| 土壤孔隙度 Pority | 0.697* | 0.664 | 0.628 | 0.613 | 0.615 | -0.767* | 0.236 |
| 砷 As (w/mg kg ⁻¹) | -0.140 | -0.420 | -0.454 | -0.477 | -0.440 | 0.003 | 0.477 |
| 镉 Cd (w/mg kg ⁻¹) | -0.726* | -0.681* | -0.659 | -0.616 | -0.643 | 0.809** | 0.120 |
| 铬 Cr (w/mg kg ⁻¹) | 0.523 | 0.472 | 0.445 | 0.565 | 0.499 | -0.436 | -0.397 |
| 铜 Cu (w/mg kg ⁻¹) | -0.919** | -0.953** | -0.951** | -0.955** | -0.969** | 0.857** | 0.632 |
| 锰 Mn (w/mg kg ⁻¹) | -0.709* | -0.909 | -0.925** | -0.926** | -0.923** | 0.598 | 0.725* |
| 镍 Ni (w/mg kg ⁻¹) | -0.399 | -0.624 | -0.689* | -0.548 | -0.630 | 0.360 | 0.413 |
| 铅 Pb (w/kg ⁻¹) | -0.926** | -0.990** | -0.978** | -0.978** | -0.990** | 0.872** | 0.731* |
| 锌 Zn (w/mg kg ⁻¹) | -0.907** | -0.873** | -0.873** | -0.893** | -0.872** | 0.872** | 0.524 |

TC: total carbon; TN: total nitrogen; TS: total sulphur; PB: plant biomass; SR: soil respiration; PS: particle size. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

3.1 尾矿坝环境因子变化

铜尾矿的矿砂堆积而成的尾矿坝土壤营养贫瘠, 有机质含量极低, 在人为干扰和长期的自然恢复过程中, 先锋植物和微生物首先定植, 土壤有机质含量逐渐增加. 随着恢复年限的增加, 尾矿坝面的植物群落形成了一个演替序列. 本研究中尾矿坝面土壤呈碱性 (pH 7.97-8.76), 植物群落多样性与pH相关性不明显 (图2). 有研究认为植物物种多样性受到土壤pH的影响, 当pH处于较高水平时 (盐碱地), 呈线性负相关^[19-20]. 本研究中植物多样性指数、土壤质量、土壤养分含量均与样地恢复时间 (45年和40年) 相关, 表明坝面土壤的理化性质随恢复年限的增加发生了显著性的变化, 土壤有机质含量显著提高, 坝面植物生物量、植被多样性随着恢复时间的增加而增加 (表1).

3.2 微生物群落结构与功能

土壤微生物可以作为土壤肥力的生物学指标. 在污染土壤恢复过程中, 微生物群落的结构和功能可以为矿区土壤的恢复和发育评价提供具体的量化指标. 本研究中, 随着恢复年限的增加, 土壤细菌群落的丰富度和多样性指数显著提高 (表2). 由于生长在尾矿区的原有微生物发生变异, 能耐受高pH、高重金属含量的极端环境^[21]. 在微生物受到重金属影响之前, 土壤细菌群落结构已经发生改变, 有一些耐重金属的种补充进来; 另一方面, 随着恢复年限增加, 重金属会发生迁移和转化, 会降低生态毒性^[22], 同时细菌胞外聚合物可通过配位、吸附、吸收和凝絮等作用去除重金属^[23]. 随着恢复时间的增加植被生长茂盛, 营养增加, 细菌群落的丰富度和多样性增加, 而短时间恢复的样地, 细菌多样性低, 物种间竞争少, 所以相对丰度较高.

微生物群落的生态功能由群落结构决定^[24]. 在不同恢复阶段变形菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门均属于优势菌门 (图3A), 这4类细菌在重金属污染的尾矿区普遍占优势^[1-2], 说明这些细菌有耐重金属的特性, 可以通过各种方法减轻重金属的毒害^[25-26]. 滕应等研究发现变形菌门、放线菌门和厚壁菌门的一些细菌可以通过生物转化作用降低重金属的毒害^[27], 并且可以降解有机污染物^[28]. 在恢复1年的土壤中, 变形菌门和厚壁菌门的相对丰度均比45年和15年高, 与之前的研究^[6]不同, 说明本研究区变形菌门和厚壁菌门在营养物质循环中起主要作用, 变形菌门的伯克氏菌目 (Burkholderiales) 既分解烃类的有机物, 还具有固氮能力^[29]. 在恢复45年和15年的土壤中, 酸杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门和芽单胞菌门也是优势门, 与Pereira等的研究结果^[3]相同, 酸杆菌门和芽单胞菌门的一些菌群, 可以通过分解有机质、光合固氮^[30]等获得营养物质, 这些细菌也能较好地适应矿区极端的环境.

细菌群落结构受环境因子、植物多样性的影响 (表3). 在本研究中, 细菌群落形成受到重金属含量变化的影响, 细菌优势科的组成与重金属含量极显著相关, 与先前的结果^[31]相同, 此外, 重金属含量还影响矿区生物功能基因^[32]的组成 (包括碳、氮、硫代谢和重金属抗性等). 土壤细菌可以凝聚土壤颗粒为植物提供营养物质^[33], 固氮菌在植物根部形成根

瘤^[8], 为植物提供营养, 反过来, 植物也为土壤细菌提供稳定的环境和光合作用产物, 土壤细菌与先锋植物在尾矿坝极端环境下紧密相关. 土壤细菌受土壤理化性质的影响, 在碱性尾矿坝极端环境中, 细菌群落组成和多样性沿土壤理化梯度发生变化^[34].

7个优势细菌科中只有丛毛单胞菌科的相对丰度与土壤TC显著正相关 (表4), 其他优势科均与TC和TN相关性不显著, 根瘤菌目 (Rhizobiales) 的甲基杆菌科在1年样地 (养分含量低) 中含量最高, 对于尾矿坝贫瘠环境的改善发挥重要作用. 细菌相对丰度与植被多样性指数 (均匀度指数、Simpson指数和Shannon指数)、植物生物量没有显著相关性, 与之前研究结果^[35]一致. 细菌群落优势科相对丰度与重金属含量的相关性较强, 7个优势菌科中鞘脂单胞菌科相对丰度与重金属Cu、Pb、Cr和Zn的含量极显著正相关, 因为鞘脂单胞菌科属于先锋物种, 能耐受较高的重金属, 也能分解难分解的有机物, 可以在碱性的贫瘠环境中分解石油烃类化合物^[36], 为其他微生物的生长提供营养. 丛毛单胞菌科相对丰度只与土壤Mn和Pb含量显著正相关, 有研究发现丛毛单胞菌科的一些物种可以降解生产废水中产生的氯代硝基苯等芳香族有毒化合物^[37]. 其余5个科均与Cu、Pb和Zn等重金属含量极显著负相关^[38]. 说明细菌群落丰度主要受Cu、Pb和Zn等重金属含量影响.

4 结论

研究区尾矿库坝面土壤理化性质和土壤酶活性沿恢复年限形成了一定的生态梯度, 植物群落结构形成了明显的演替过程. 在这一环境梯度下, 尾矿库坝面土壤不同恢复年限的细菌群落结构和多样性差异显著, 细菌群落的组成受到环境因子和先锋植物的影响, 其中重金属含量和植被多样性起主要作用. 土壤细菌优势科的相对丰度受土壤pH影响较小, 主要与重金属含量变化相关, 鞘脂单胞菌科相对丰度与重金属含量显著正相关, 该科细菌对重金属具有一定的耐受性, 可作为重金属污染区域生态恢复的理想菌种.

致谢 感谢中条山有色金属集团有限公司刘兴港、胡岳明, 垣曲县环保局王艳等在采样过程中提供大力协助.

参考文献 [References]

- Li Y, Wen H, Chen L, Yin T. Succession of bacterial community structure and diversity in soil along a chronosequence of reclamation and re-vegetation on coal mine spoils in China [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (12): 1-24
- Huang L, Tang F, Song Y, Wan C, Wang S, Liu W, Shu W. Biodiversity, abundance, and activity of nitrogen-fixing bacteria during primary succession on a copper mine tailings [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, **78** (3): 439-450
- Pereira LB, Vicentini R, Ottoboni LMM. Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (5): e96605
- Bier RL, Voss KA, Bernhardt ES. Bacterial community responses to a

- gradient of alkaline mountaintop mine drainage in Central Appalachian streams [J]. *ISME J*, 2014, **9**(9): 1378-1390
- 5 Dangi SR, Stahl PD, Wick AF, Ingram LJ, Buyer JS. Soil microbial community recovery in reclaimed soils on a surface coal mine site [J]. *Soil Sci Soc Am J*, 2012, **76** (3): 915-924
- 6 Lewis DE, Chauhan A, White JR, Overholt W, Green SJ, Jasrotia P, Wafula D, Jagoe C. Microbial and geochemical assessment of bauxitic un-mined and post-mined chronosequence soils from Mocho Mountains, Jamaica [J]. *Microb Ecol*, 2012, **64** (3): 738-749
- 7 Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil [J]. *ISME J*, 2010, **4** (10): 1340-1351
- 8 Callender KL, Roy S, Khasa DP, Whyte LG, Greer CW. Actinorhizal Alder phytostabilization alters microbial community dynamics in gold mine waste rock from northern Quebec: a greenhouse study [J]. *PLoS ONE*, 2016, **11** (2): e150181
- 9 沈国清, 陆貽通, 洪静波. 重金属和多环芳烃复合污染对土壤酶活性的影响及定量表征[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, **11** (4): 479-482 [Shen GQ, Lu YT, Hong JB. Quantitative expression and effect of combined pollution of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on soil enzyme [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11** (4): 479-482
- 10 Zhan J, Sun Q. Development of microbial properties and enzyme activities in copper mine wasteland during natural restoration [J]. *Catena*, 2014, **116**: 86-94
- 11 Gomez-Casanovas N, Matamala R, Cook DR, Gonzalez-Meler MA. Net ecosystem exchange modifies the relationship between the autotrophic and heterotrophic components of soil respiration with abiotic factors in prairie grasslands [J]. *Global Change Biol*, 2012, **18** (8): 2532-2545
- 12 Li J, Pu L, Zhu M, Zhang J, Li P, Dai X, Xu Y, Liu L. Evolution of soil properties following reclamation in coastal areas: a review [J]. *Geoderma*, 2014, **226**: 130-139
- 13 Cuia J, Liu C, Li Z, Wang L, Chen X, Ye Z, Fang C. Long-term changes in topsoil chemical properties under centuries of cultivation after reclamation of coastal wetlands in the Yangtze Estuary, China [J]. *Soil Till Res*, 2012, **123**: 50-60
- 14 朱永恒, 张平究, 张衡, 韩斐, 陆林. 铜尾矿自然废弃地土壤动物的迁居与恢复[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, **19** (3): 459-465 [Zhu YH, Zhang PJ, Zhang H, Han F, Lu L. Immigration and rehabilitation of soil fauna in the natural abandoned land of copper-mine-tailing [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19** (3): 459-465
- 15 Kuang J, Huang L, Chen L, Hua Z, Li S, Hu M, Li J, Shu W. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage [J]. *ISME J*, 2013, **7** (5): 1038-1050
- 16 李旭华, 邓永利, 张峰. 山西庞泉沟自然保护区森林群落物种多样性[J]. *生态学杂志*, 2013, **32** (7): 1667-1673 [Li XH, Deng YL, Zhang F. Species diversity of forest communities in Pangquangou Nature Reserve, Shanxi of China [J]. *Chin J Ecol*, 2013, **32** (7): 1667-1673
- 17 胡君利, 林先贵, 尹睿, 褚海燕, 王俊华, 张华勇, 曹志洪. 浙江慈溪不同利用年限水稻土微生物生物量与酶活性比较[J]. *生态学报*, 2008, **28** (4): 1552-1557 [Hu JL, Lin XG, Yin R, Chu HY, Wang JH, Zhang HY, Cao ZH. Comparison of microbial biomass and enzyme activities in paddy soils with different utilized years in Cixi, Zhejiang Province [J]. *Acta Ecol Sin*, 2008, **28** (4): 1552-1557
- 18 Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data [J]. *Philos T R Soc B*, 2005, **360** (1462): 1935-1943
- 19 贺强, 崔保山, 赵欣胜, 付华龄, 廖晓琳. 黄河河口盐沼植被分布、多样性与土壤化学因子的相关关系[J]. *生态学报*, 2009, **29** (2): 676-687 [He Q, Cui BS, Zhao XS, Fu HL, Liao XL. Relationships between salt marsh vegetation distribution/diversity and soil chemical factors in the Yellow River Estuary, China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2009, **29** (2): 676-687
- 20 Schuster B, Diekmann M. Species richness and environmental correlates in deciduous forests of Northwest Germany [J]. *For Ecol Manage*, 2005, **206** (1-3): 197-205
- 21 邱成书, 张举成, 李河. 矿区土壤部分微生物生物学指标的研究[J]. *环境科学与技术*, 2008, **31** (7): 18-20 [Qiu CS, Zhang JC, Li H. Some microbial indicators in a soil investigation of mining area [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, **31** (7): 18-20
- 22 Xie XH, Zhu WX, Liu N. Bacterial community composition in reclaimed and unreclaimed tailings of Dexing copper mine, China [J]. *Afr J Biotechnol*, 2013, **12** (30): 4841-4849
- 23 康福星, 龙健, 王倩, 齐瑞环, 朱健. 微生物胞外聚合物对水体重金属和富营养元素的环境生化效应研究展望[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, **16** (1): 129-134 [Kang FX, Long J, Wang Q, Qi RH, Zhu J. Environmental & biochemical effects of microbial extracellular polymeric substances on the heavy metals and eutrophic elements in water areas: a review [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, **16** (1): 129-134
- 24 Loreau M, Naeem S, Inchausti P, Bengtsson J, Grime JP, Hector A, Hooper DU, Huston MA, Raffaelli D, Schmid B, Tilman D, Wardle DA. Ecology - Biodiversity and ecosystem functioning: Current knowledge and future challenges [J]. *Science*, 2001, **294** (5543): 804-808
- 25 Mounaouer B, Nesrine A, Abdennaceur H. Identification and characterization of heavy metal-resistant bacteria selected from different polluted sources [J]. *Desalin Water Treat*, 2014, **52** (37-39): 7037-7052
- 26 Brueck WM, Brueck TB, Self WT, Reed JK, Nitecki SS, Mccarthy PJ. Comparison of the anaerobic microbiota of deep-water *Geodia* spp. and sandy sediments in the Straits of Florida [J]. *ISME J*, 2010, **4** (5): 686-699
- 27 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 [Teng Y, Huang CY. Ecological effect of heavy metals on soil microbes and research advances on the mechanisms of bioremediation [J]. *Soil Environ Sci*, 2002, **11** (1): 85-89
- 28 黎霞, 承磊, 邓宇. 石油烃厌氧生物降解研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, **14** (2): 283-289 [Li X, Cheng L, Deng Y. Advances in anaerobic biodegradation of hydrocarbon [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14** (2): 283-289
- 29 Saito T, Ishii S, Otsuka S, Nishiyama M, Senoo K. Identification of novel beta-proteobacteria in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing [J]. *Microbes Environ*, 2008, **23** (3): 192-200
- 30 Hemp J, Luecker S, Schott J, Pace LA, Johnson JE, Schink B, Daims H, Fischer WW. Genomics of a phototrophic nitrite oxidizer: insights into the evolution of photosynthesis and nitrification [J]. *ISME*, 2016, **10** (11): 2669-2678
- 31 Xiao Y, Liu X, Ma L, Liang Y, Niu J, Gu Y, Zhang X, Hao X, Dong

- W, She S, Yin H. Microbial communities from different subsystems in biological heap leaching system play different roles in iron and sulfur metabolisms [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2016, **100** (15): 6871-6880
- 32 Xie J, He Z, Liu X, Liu X, Van Nostrand JD, Deng Y, Wu L, Zhou J, Qiu G. GeoChip-Based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage [J]. *Appl Environ Microb*, 2011, **77** (3): 991-999
- 33 Harris J. Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers? [J]. *Science*, 2009, **325** (5940): 573-574
- 34 Bier RL, Voss KA, Bernhardt ES. Bacterial community responses to a gradient of alkaline mountaintop mine drainage in Central Appalachian streams [J]. *ISME J*, 2015, **9** (6): 1378-1390
- 35 黄元元, 曲来叶, 曲秀春, 杜淑芹. 镜泊湖岩溶台地不同植被类型土壤微生物群落特征[J]. *生态学报*, 2012, **32** (9): 2827-2836 [Huang YY, Qu LY, Qu XC, Du SQ. Soil microbial community characteristics under different vegetation types at the Holocene-basalt Platform, Jingpo Lake area, Northeast China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2012, **32** (9): 2827-2836
- 36 Perez-Pantoja D, Leiva-Novoa P, Donoso RA, Little C, Godoy M, Pieper DH, Gonzalez B. Hierarchy of carbon source utilization in soil bacteria: hegemonic preference for benzoate in complex aromatic compound mixtures degraded by *Cupriavidus pinatubonensis* strain JMP134 [J]. *Appl Environ Microb*, 2015, **81** (12): 3914-3924
- 37 吴建峰, 沈锡辉, 周宇光, 刘双江. 一株降解对氯硝基苯的 *Comamonas* sp.CNB1的分离鉴定及其降解特性[J]. *微生物学报*, 2004, **44** (1): 8-12 [Wu JF, Shen XH, Zhou YG, Liu SJ. Characterization of p-chloronitrobenzene-degrading *Comamonas* sp. CNB1 and its degradation of p-chloronitrobenzene [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2004, **44** (1): 8-12
- 38 Izquierdo I, Caravaca F, Alguacil MM, Hernandez G, Roldan A. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions [J]. *Appl Soil Ecol*, 2005, **30** (1): 3-10