

生物有机肥对核桃园土壤细菌群落结构的影响

张凯煜,谷 洁,王小娟,高 华

(西北农林科技大学资源环境学院,陕西 杨凌 712100)

摘 要:为了探究生物有机肥对核桃园土壤细菌群落的影响,采用 16s rRNA 高通量测序技术,研究了不施肥(CK)、常规施肥(TN)和施生物有机肥(TB)3 个处理土壤细菌群落多样性和结构组成。结果表明,TB 处理中土壤有机质、全氮、全磷比 CK 处理分别提高了 46.3%、30.6%和 50.8%。TB 处理 α -多样性指数均为最高,而 TN 处理中香浓指数和 ACE 指数较 CK 处理分别降低了 0.5% 和 1.2%。在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)为优势类群,共占细菌总量的 85.2%~90.6%。鞘脂单细胞菌属(*Sphingomonas*)和节杆菌属(*Arthrobacter*)为主要属,其相对丰度在 TB 处理较 CK 处理分别增加了 17.6%和 56.6%,较 TN 处理分别增加了 51.5%和 104.3%。冗余分析结果表明,环境因子解释了细菌群落变化的 94.6%,土壤有机质、碱解氮和速效钾含量是造成核桃园土壤细菌群落结构差异的主要原因。

关键词:生物有机肥;细菌群落;高通量测序;核桃园土壤

中图分类号:S154.3;S144 **文献标志码:**A

Effects of bio-organic fertilizer on soil bacterial community structure in walnut orchard

ZHANG Kaiyu, GU Jie, WANG Xiaojuan, GAO Hua

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shannxi 712100, China)

Abstract: A field experiment was conducted to investigate the effect of bio-organic fertilizer on the bacterial community diversity in walnut orchard. High-throughput sequencing was used to study the bacteria diversity and composition in different fertilization treatments. An analysis of the relationship between bacterial community and environmental factors was conducted as well. There were three treatments including control (CK), conventional fertilizer treatment (TN) and bio-organic fertilizer (TB). The results indicated that soil organic matter, total nitrogen and total phosphorus of TB were 46.3%, 30.6% and 50.8% higher than those of CK, respectively. The α -diversity index of TB was higher than that of TN and CK. While the ACE index and Shannon index of TN were 0.5% and 1.2% lower than that of CK treatment, respectively. At the phylum level, Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and Gemmatimonadetes were the predominant phyla, accounting for 85.2%~90.6% of the total reads. At the genera level, *Sphingomonas* and *Arthrobacter* were predominant genus. The relative abundance of *Sphingomonas* and *Arthrobacter* in TB were increased by 17.6% and 56.6% than that in CK, and 51.5% and 104.3% than that in TN, respectively. Redundancy analysis showed that environmental factors explained 94.6% of bacterial community changes. Soil organic matter, alkali-hydrolyzable nitrogen and potassium contents were the main factors for the bacterial community changes in walnut garden.

Keywords: Bio-organic fertilizer; bacterial community; high-throughput sequencing; walnut orchard soil

土壤微生物是土壤生态系统中的重要组成部分,对土壤物质转化和养分循环,维持土壤肥力和可持续利用至关重要,在农业土壤生态系统中的作用越来越受到关注^[1-2]。核桃在黄龙县栽培历史悠

久^[3]。近年来,农民粗放式的施肥管理模式存在盲目性,长期大量施用化肥也会影响土壤微生物活性,进而降低作物的产量和品质,并造成一定的环境问题^[4-5]。

生物有机肥是将外源功能菌接种到堆肥产品,即以畜禽粪便、农作物秸秆等为原料,经腐熟的有机肥产品。具有生物肥料和有机肥效应,有利于增产增收,还能培肥土壤,减少化肥的用量,同时实现农业废弃物资源化利用^[6-7]。张婷婷^[8]研究了不同施肥对核桃生长和品质的影响,提出施用生物菌肥和骨粉可有效提高核桃园土壤中有机质含量。杨建荣等^[9]发现,生物有机肥的应用能显著提高核桃产量,改善土壤保水性和供肥能力。研究表明,施用生物有机肥能调节土壤中微生物组成^[10],提高作物抗病性^[11-12],使土壤健康发展。杜滢鑫等^[13]利用 PCR-DGGE 和 Biolog 发现不同植物根际土壤微生物组成不同。Araújo 等^[14]通过 T-RFLP 方法发现,土地退化降低了土壤细菌的多样性,影响了细菌群落结构组成。由于高通量测序技术具有测序深度深和获得数据量大等优点,可揭示复杂微生物群落的多样性,加快了环境中不可培养和痕量微生物的研究^[15],已成为研究微生物群落变化的主要方法之一。朱金山等^[16]利用高通量测序技术对不同沼灌年限稻田土壤的微生物群落结构进行了分析,从门、纲、目、科、属 5 个水平上全面展示了稻田土壤微生物群落结构的分布。在化肥和生物有机肥处理下,土壤细菌群落的响应差异,不同处理土壤微生物区系的差异如何?哪些关键因素能够影响微生物进而调控土壤养分循环,还需要进一步研究。

本研究在试验区设置了不同施肥处理试验,采用高通量测序法比较不同施肥种类对土壤细菌群落结构和多样性的影响,并结合土壤性状揭示细菌群落变化的驱动因子,旨在从土壤微生物生态的角度丰富生物有机肥的促生理论,阐明施肥管理措施影响土壤肥力的生物学机制,为指导核桃合理施肥提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2016 年 9 月在陕西省延安市黄龙县三岔乡进行(109°83' N, 35°58'E),供试品种为香铃。供试的生物有机肥由西北农林科技大学自制(添加的主要功能菌为解磷菌和解钾菌,有效活菌数达 2.8×10^8 cfu · g⁻¹),有机质含量 28.3%、氮(N) 3.8%、磷(P₂O₅) 2.6%、钾(K₂O) 3.1%。试验设置 3 个处理,

CK(不施肥),TN(常规施肥,施肥量为复合肥 1 350 kg · hm⁻²,含 N 15%、P₂O₅ 15%、K₂O 15%),TB(施生物有机肥,施肥量为 5 325 kg · hm⁻²,以化肥养分氮含量折算即 N 202.5 kg · hm⁻²、P₂O₅ 138 kg · hm⁻²、K₂O 165 kg · hm⁻²)。一年两次施肥,即基肥、追肥,施肥量各占 50%。

1.2 土壤样品采集

于 2017 年 9 月沿种植行,树干周围 50 cm 的根系密集分布区,使用“S 形”五点法采集土壤样品。采样时去掉易受水分及各种环境因素影响的表层干土后,取 5~20 cm 土壤样品,用无菌镊子去除残留根系后装入无菌自封袋,用冰盒迅速带回实验室。取 1 份样品经冷冻干燥后,用于微生物群落结构分析,另 1 份风干过筛,用来测定理化指标。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 土壤 DNA 提取 土壤样品 DNA 使用 FastDNA SPIN Kit for Soil(MP Biomedicals,美国)进行提取。利用 Nanodrop Spectrophotometer ND-1000(Thermo Fisher Scientific,美国)检测 DNA 浓度和纯度,确保样品浓度和纯度合格后,保存于-80℃冰箱。

1.3.2 高通量测序 将土壤 DNA 样品寄送至北京诺禾致源科技股份有限公司,进行 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区高通量测序。通过 UPARSE 将序列在 97%相似水平下进行聚类,获得可操作分类单元(OTUs)。利用 QIIME 进行抽平、RDP 分类,得到样品 OTUs 详细的注释结果,进行后续分析。

1.3.3 土壤理化性质的测定 测定方法参考土壤农化分析^[17]。

1.4 数据处理与分析

数据采用 SPSSv 19.0 进行统计分析和方差分析(LSD, $P < 0.05$),用 Microsoft Excel 2013 进行绘图。利用 CANOCO 4.5 软件进行冗余分析,R 软件绘制热度图。

2 结果与分析

2.1 土壤化学性质

从表 1 可以看出,与 CK 处理相比,TB 处理中有机质、全氮、全磷分别增加了 46.3%、30.6%和 50.8%。生物有机肥的施用显著提高了核桃园土壤中全磷、全氮和有机质含量($P < 0.05$)。全钾含量在不同处理间无显著差异,在 14.3~14.6 g · kg⁻¹波动。各处理速效养分含量大小顺序为:TB>TN>CK,其中 TB 处理速效磷和速效钾含量分别达 CK 处理 1.76 倍和 1.78 倍。

2.2 土壤细菌群落多样性

高通量测序结果显示每个样品 OTUs 稀释性曲线均趋于平坦(图 1),说明测序数据量和测序深度合理,可包括土壤样品中的大部分的细菌类型。分析了代表微生物群落 α-多样性的辛普森指数、Chao1、香浓指数和 ACE 指数,其值越高表示微生物多样性、物种丰富度越高^[18]。由图 2 可见,TB 处理 α-多样性指数均高于 CK 和 TN 处理,而 TN 处理香浓指数和 ACE 指数有所降低。

2.3 土壤细菌群落结构

基于门水平,分析了不同土壤样本序列(图 3),共得到 35 个门水平类群。结果显示优势类群包括变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、

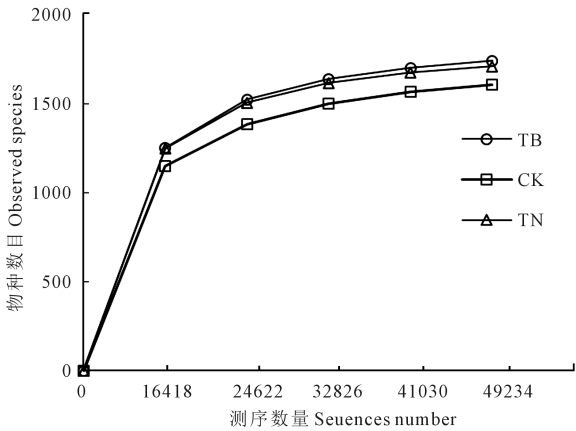


图 1 土壤样本稀释曲线
Fig.1 Rarefaction curves of soil samples

表 1 不同施肥处理下的土壤化学性质

Table 1 Soil chemical properties in different fertilization treatments

处理 Treatment	pH	有机质 Organic matter /(g · kg ⁻¹)	全氮 Total nitrogen /(g · kg ⁻¹)	全磷 Total phosphorus /(g · kg ⁻¹)	全钾 Total potassium /(g · kg ⁻¹)	碱解氮 Alkali-hydrolyzable N /(mg · kg ⁻¹)	速效磷 Available P /(mg · kg ⁻¹)	速效钾 Available K /(mg · kg ⁻¹)
CK	8.03±0.005a	10.8±0.446a	0.62±0.002b	0.59±0.002b	14.6±0.429a	33.9±0.689b	29.8±0.522b	190±0.653c
TN	8.02±0.005a	12.1±0.212b	0.70±0.005b	0.81±0.010a	14.5±0.060a	38.3±0.155ab	30.4±0.208b	230±1.562b
TB	7.98±0.008a	15.8±0.126c	0.81±0.008a	0.89±0.008a	14.3±0.170a	40.7±0.286a	52.4±0.314a	338±0.287a

注:平均值±标准误(mean±SD),n=3; 同一行不同字母表示差异显著(P<0.05)。
Note:Mean±SD,n=3. Different letters on the same line indicate significant difference (P<0.05).

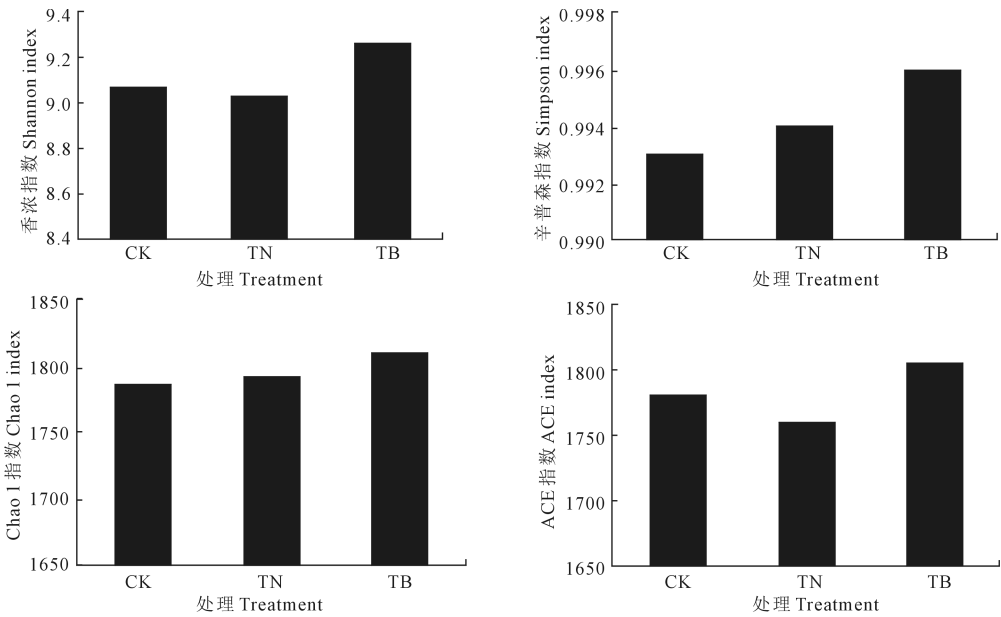


图 2 不同施肥处理下的土壤细菌群落 α-多样性指数

Fig.2 Abundances of bacterial community α-diversity indexes under different fertilizer treatment

酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes),共占细菌总量的85.2%~90.6%。进一步比对分析,共得到 291 个属水平类群,其中鞘脂单细胞菌属(Sphingomonas, phylum-Proteobacteria, 6.6%~10.0%)节杆菌属(Ar-

throbacter, phylum-Actinobacteria, 2.3%~4.7%)为优势类群(图 4),TB 处理较 CK 处理分别增加了 17.6%和 56.6%,较 TN 处理分别增加了 51.5%和 104.3%。
以门水平上细菌相对丰度和与土壤 pH、有机质、碱解氮、全氮、速效磷、全磷、速效钾、全钾进行冗

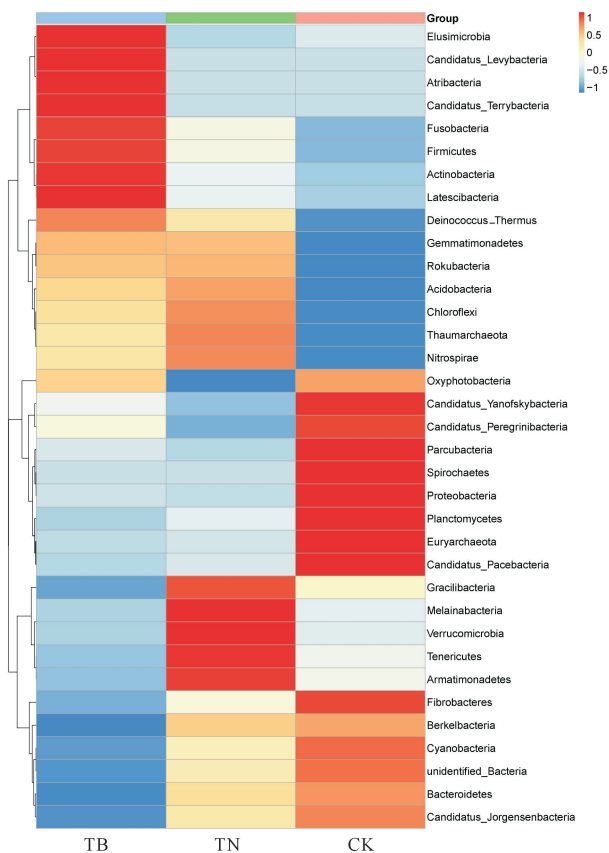


图 3 基于门水平的不同施肥处理下土壤细菌群落组成

Fig.3 Soil bacterial community composition in different fertilization treatments at phylum level

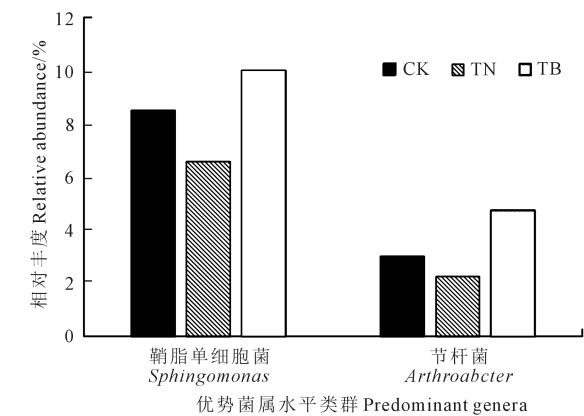
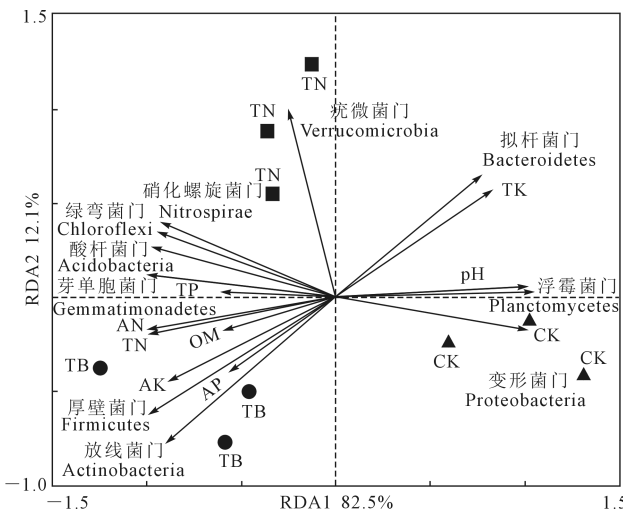


图 4 不同施肥处理下的土壤细菌群落优势菌属

Fig.4 Predominant genera of soil bacterial community in different fertilization treatments

余分析(图 5),可分析细菌群落和多个响应变量(土壤理化性质)之间的关系^[19]。结果显示,所选取的环境因子共解释细菌群落变化的 94.6%,RD1 轴解释了 82.5%,RD2 轴解释了 12.1%。其中土壤有机质、碱解氮和速效钾含量为不同施肥处理间细菌群落差异的主要驱动因子。



注:TP:全磷;AN:碱解氮;OM:有机质;AK:速效钾;AP:速效磷;TK:全钾;TN:全氮。

Note: TP: Total phosphorus; AN: Alkali-hydrolyzable N; OM: Organic matter; AK: Available K; AP: Available P; TK: Total potassium; TN: Total nitrogen.

图 5 不同施肥处理下的环境因子对细菌群落结构的 RDA 排序图

Fig.5 Redundancy analysis between soil properties and the bacterial community structure

3 讨 论

生态系统稳定性及土壤肥力发生变化的关键因素是人为向土壤中大量输入外源物质,尤其是肥料^[20-21],不同的施肥方式和肥料类型影响又有所不同。生物有机肥的施用能够提高土壤有机质和全氮含量,这与前人研究结果相似^[22]。常规施肥对土壤速效养分的提高效果不如生物有机肥,尤其是土壤中速效钾和速效磷含量。这可能主要是因为生物有机肥中含有解磷菌、解钾菌可作用于土壤中难溶的磷和钾,释放出大量速效磷、速效钾。生物有机肥既能在作物生长前期快速提供一定的速效养分,又可在作物生长过程中通过微生物分解有机质和矿物质释放养分,发挥速效和长效兼有的作用,养分的缓慢释放还可为微生物提供更稳定的栖息环境,起到“接种”和“导入”作用^[23-24]。

土壤细菌在土壤养分循环和系统维稳中起重要作用^[25]。本研究结果表明,施用生物有机肥显著增加了土壤细菌群落多样性,可能是因为施肥处理中较高的有机质和养分,为更多的微生物提供了生长和繁殖的条件,其中包括生物有机肥中本来携带的大量功能菌^[26]。与不施肥相比,常规施肥却降低

了细菌群落香浓指数和 ACE 指数,这与苏婷婷等^[11]的研究结果相似。Liu 等^[27]通过 Biolog 方法发现施用有机肥处理香浓指数显著高于化肥处理,Chen 等^[28]发现接种微生物菌剂能够显著提高土壤丰富度指数。综上表明,生物有机肥优于常规肥料的关键因素就在于这些功能菌的生命活动。

通过对不同施肥处理对细菌群落结构的分析,得到 35 个门水平和 291 个属水平的类群。结果表明,不同处理中优势的门、纲和目水平上优势物种相似,但不同处理处理间,门、纲和目水平物种相对丰度不尽相同。变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门为优势门类,这与某些前期研究结果相似^[16, 29]。而不同研究中物种丰度差异较大,说明农田土壤中细菌群落优势物种种类相似,但其相对丰度会受土壤类型、种植作物类型以及施肥灌溉方式等的影响^[30-31]。放线菌门在土壤氮素循环中起重要作用,还能促进土壤中植物残体的腐烂。本研究中,各处理放线菌门丰度大小为 TB>TN>CK,与全氮和碱解氮趋势一致,这与王伏伟等^[32]研究相似。他研究了施肥和秸秆还田对砂浆黑土细菌群落的影响,发现施肥和秸秆还田显著提高了放线菌门的相对丰度,并且土壤全氮含量是提高其相对丰度的重要原因。而杨亚东等^[29]研究结果表明在 OTUs 水平上细菌群落结构与全氮含量显著相关,但门水平上则相关性不显著。这表明全氮含量对细菌不同分类学水平上的群落结构影响存在差异。在属水平上,不同处理中,鞘脂单细胞菌属和节杆菌属菌为优势物种,但在不同处理中相对丰度不同(TB>CK>TN)。鞘脂单细胞菌属可以促进根际营养吸收,抵抗多种病原菌,是降解土壤有毒物质最有效的微生物菌属之一。也有研究发现,鞘脂单细胞菌属中部分菌株具有固氮特性,在土壤氮素转化方面起重要作用^[33]。节杆菌属可以通过固氮作用产生多种植物激素,以促进水分和矿质元素的吸收。由此可见,施用生物有机肥可以促进优势菌的富集,促进营养和水分等吸收,其是否能提高根际微生物抗病抗毒害能力,还需要今后长期试验来证实。

土壤微生物群落组成会受到环境变化的影响,可以作为土壤质量变化的指标。武发思^[34]研究发现有机肥对根际土壤细菌多样性的增加和群落结构的改变作用明显。本文采用冗余分析(RDA)来研究环境因子对微生物群落的影响,将 RDA 分析加

入高通量生物信息分析,能够更直观地表达影响研究区土壤细菌群落特征的主要土壤环境因素,是分析土壤微生物信息的有效方法,能够为土壤环境评价以及土地利用管理提供科学依据。RDA 结果表明,施肥处理即 TB 和 TN 处理在 RD1 轴上与 CK 处理显著区分,有机质、碱解氮和速效钾是土壤细菌群落结构改变的主要驱动因子。有机质改变了土壤孔隙度、通气度与土壤团粒结构^[35],具有一定的缓冲作用,作为土壤酶的重要载体,为土壤微生态环境提供化学反应场所,为细菌活动提供适宜条件。而碱解氮和速效钾对细菌群落结构影响较大,可能和核桃本身养分需求相关。

4 结 论

施生物有机肥可显著提高核桃园土壤养分,使土壤理化性质得到改善,且生物有机肥效果优于常规施肥。施生物有机肥增加了土壤细菌群落多样性,在一定程度上还提高了土壤中优势菌属的相对丰度。不同施肥处理改变了细菌群落结构和组成,冗余分析结果表明,土壤有机质、碱解氮和速效钾含量是影响细菌群落变化的主要驱动因子。本研究采用了高通量测序的方法,结合环境因子对土壤细菌群落对不同施肥处理的响应进行了分析,后续可以利用宏基因组和宏转录组的方法,对参与碳、氮、磷循环功能微生物的表达、代谢途径进行深入研究。

参 考 文 献:

[1] Karolien D, Mihiri C W, Manimel W, et al. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils[J]. Soil Biology Biochemistry, 2009,41(1): 144-153.

[2] Sturz AV, Christie B R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria[J]. Soil Tillage Research, 2003,72(2):107-123.

[3] 秦延辉.黄龙县核桃产业发展问题初探[J].中国科技纵横, 2010, (2):184-185.

[4] 张瑞龙,吕家珑,刁展.秦岭北麓两种土地利用下土壤磷素淋溶风险预测[J].农业环境科学学报, 2014,33(1):121-127.

[5] 赵佐平,闫莎,刘芬,等.陕西果园主要分布区氮素投入特点及氮负荷风险分析[J].生态学报, 2014,34(19):5642-5649.

[6] Liu L, Li T, Wei X, et al. Effects of a nutrient additive on the density of functional bacteria and the microbial community structure of bioorganic fertilizer[J].Bioresource Technology, 2014,172(172):328-334.

[7] 孙家骏,付青霞,谷洁,等.生物有机肥对猕猴桃土壤酶活性和微生物群落的影响[J].应用生态学报, 2016,27(3):829-837.

- [8] 张婷婷.不同施肥处理对核桃生长、产量和坚果品质的影响[D].咸阳:西北农林科技大学, 2016.
- [9] 杨建荣,查天伟,唐永奉,等.临沧核桃专用生物有机肥的配制与施用研究[J].林业科技通讯, 2016,(11):9-11.
- [10] 王丽丽,石俊雄,袁赛飞,等.微生物有机肥结合土壤改良剂防治烟草青枯病[J].土壤学报, 2013,50(1):150-156.
- [11] 苏婷婷,周鑫斌,张跃强,等.生物有机肥和磷肥配施对新整理黄壤烟田细菌群落组成的影响[J].烟草科技, 2016,49(5):8-15.
- [12] 李双喜,沈其荣,郑宪清,等.施用微生物有机肥对连作条件下西瓜的生物效应及土壤生物性状的影响[J].中国生态农业学报, 2012,20(2):169-174.
- [13] 杜滢鑫,谢宝明,蔡洪生,等.大庆盐碱地九种植物根际土壤微生物群落结构及功能多样性[J].生态学报, 2016,36(3):740-747.
- [14] Araújo AS, Borges CD, Tsai SM, et al. Soil bacterial diversity in degraded and restored lands of Northeast Brazil[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2014,106(5):891-899.
- [15] Shokralla S, Spall J L, Gibson J F, et al. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research[J]. Molecular Ecology, 2012,21(8):1794-1805.
- [16] 朱金山,张慧,马连杰,等.不同沼灌年限稻田土壤微生物群落分析[J].环境科学, 2018,(5):2400-2411.
- [17] 鲍士旦.土壤农化分析.3版[M].北京:中国农业出版社, 2000, 35-99.
- [18] Shen J P, Zhang L M, Zhu Y G, et al. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam[J]. Environmental Microbiology, 2008,10(6):1601-1611.
- [19] Šmilauer P, Lepš J. Multivariate analysis of ecological data using Canoco5[M].Cambridge:Cambridge University Press, 2003:43-58.
- [20] Abbott Lynette K, Murphy Daniel V. Soil Biological Fertility[M]. Australia:Springer Netherlands, 2007:37-59.
- [21] Ndayegamiye A, Cote D. Effect of long-term pig slurry and solid cattle manure application on soil chemical and biological properties[J]. Canadian Journal of Soil Science, 1989,69(1):39-47.
- [22] 陈晓芬,李忠佩,刘明,等.不同施肥处理对红壤水稻土团聚体有机碳、氮分布和微生物生物量的影响[J].中国农业科学, 2013,46(5):950-960.
- [23] 王慧颖,徐明岗,周宝库,等.黑土细菌及真菌群落对长期施肥响应的差异及其驱动因素[J]. 中国农业科学, 2018,51(5):914-925.
- [24] 郭芸,孙本华,王颖,等.长期施用不同肥壤土 PLFA 指纹特征[J]. 中国农业科学, 2017,50(1):94-103.
- [25] Girvan M S, Campbell CD, Killham K, et al. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation[J]. Environmental Microbiology, 2005,7(3):301-313.
- [26] 付琳,阮云泽,沈宗专,等.生物有机肥对连作香蕉根际土壤可培养细菌区系的影响[J]. 南京农业大学学报, 2012,35(6):82-88.
- [27] Liu B, Cong T, Hu S J, et al. Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight[J]. Applied Soil Ecology, 2007,37(3):202-214.
- [28] Chen S N, Gu J, Gao H, et al. Effect of microbial fertilizer on microbial activity and microbial community diversity in the rhizosphere of wheat growing on the Loess Plateau[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011,5(2):137-143.
- [29] 杨亚东,王志敏,曾昭海.长期施肥和灌溉对土壤细菌数量、多样性和群落结构的影响[J].中国农业科学, 2018,51(2):290-301.
- [30] Chu H, Fierer N, Lauber C L, et al. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes[J]. Environmental Microbiology, 2010,12(11):2998-3006.
- [31] Lauber C L, Strickland M S, Bradford M A, et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008,40(9):2407-2415.
- [32] 王伏伟,王晓波,李金才,等.施肥及秸秆还田对砂姜黑土细菌群落的影响[J].中国生态农业学报, 2015,23(10):1302-1311.
- [33] 胡杰,何晓红,李大平,等.鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007,13(3):431-437.
- [34] 武发思.长期定位施肥对黄土高原土壤微生物群落结构的影响[D]. 兰州:兰州大学, 2009.
- [35] 贾曼莉,郭宏,李会科.渭北生草果园土壤有机碳矿化及其与土壤酶活性的关系[J].环境科学, 2014,35(7):2777-2784.