

# 用土壤微生物方法评价重金属 Cu 的毒性 及其时间效应

杨元根<sup>1</sup> Paterson E<sup>2</sup> Campbell C<sup>2</sup>

1. 中国科学院地球化学研究所, 贵阳 550002; 2. The Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen AB15 8QH, UK

**摘要** 从微生物特征及其群落结构等方面研究了重金属 Cu 的土壤毒性及其时间效应。结果表明, Cu 进入土壤早期阶段, 低浓度对土壤微生物生物量有刺激作用, 高浓度起抑制作用; 微生物呼吸强度迅速增加, 微生物生理生态参数  $q\text{CO}_2$  升高,  $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$  降低; 土壤溶液中 Cu 浓度很低, 对发光菌 *E. Coli* 有轻度抑制作用, 但随时间延长而更不显著; Biolog 结果显示, 在 Cu 胁迫下, 微生物的群落结构有所改变, 对碳源的消耗量增加, 速度变快, 这种损伤具有长期效应。

**关键词** 土壤 Cu 污染 微生物特征 时间效应

重金属污染是目前较突出的环境污染问题之一, 如何限制重金属元素进入环境体系成了人们日益关注的问题, 一些国家和组织制定了各自的土壤重金属污染标准(表 1)。

表 1 一些国家和机构对土壤中重金属元素污染分级及限量( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

元素	荷兰 <sup>[1]</sup>			波兰 <sup>[2]</sup>						MAFF <sup>a)</sup> [3]	欧共体 <sup>[4]</sup>
	A	B	C	0	I	II	III	IV	V		
Pb	50	150	600	0~30	30~70	70~100	100~500	500~2500	>2500		50~300
Zn	200	500	3000	0~50	50~100	100~300	300~700	700~3000	>3000	200~300	150~300
Cd	1	5	20	0~0.3	0.3~1	1~2	2~3	3~5	>5	3	1~3
As	20	30	50								
Ni	50	100	500	0~10	10~30	30~50	50~100	100~400	>400		30~75
Cu	50	100	500	0~15	15~30	30~50	50~80	80~300	>300	80~200	50~140

a) 苏格兰农林渔业部

表 1 中这些标准主要以元素的土壤背景值作为参考标准, 即重金属元素含量超过  $X + 2S$  时( $X$  为背景值,  $S$  为标准偏差)即认为已产生了污染, 从对生态系统的危害程度考察重金属污染程度<sup>[5]</sup>。而这些方法主要是从宏观效应来考虑的, 近年来许多学者逐渐重视从微观角度特别是土壤微生物效应来研究重金属的污染行为, 并呼吁限定重金属在土壤中污染浓度时必须考虑其对微生物的影响<sup>[6]</sup>, 欧洲几个国家亦以土壤微生物生物量下降 60% 作为重金属元素的临界浓度<sup>[7]</sup>。许多研究表明, 重金属元素进入土壤后, 微生物群落结构组成和功能多样性明显改变<sup>[8~10]</sup>, 导致微生物生物量<sup>[11,12]</sup>和微生物呼吸速率降低<sup>[11,13]</sup>或呼吸速率显著增加<sup>[14,15]</sup>, 酶

2000-05-24 收稿, 2000-08-07 收修改稿

的活性受严重损害<sup>[16]</sup>,微生物生理生态参数  $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$  降低,而代谢商  $q\text{CO}_2$  则明显升高<sup>[17,18]</sup>,土壤微生物需要消耗更多的能源以维持其生理需要,但对能源碳的利用效率降低<sup>[18]</sup>. 本文试图利用多种微生物手段研究重金属元素 Cu 的剂量反应及其时间效应,评价微生物群落对重金属荷载的敏感性及其在群落大小、活性方面的恢复能力.

## 1 材料与方 法

采自 The Macaulay Land Use Research Institute 牧场的表土样(属 Countesswells 组)过 6mm 筛后,再过 2 mm 筛,剔除所有植物碎片、根系、石子和土壤动物等,储存在 4℃ 的冷库中备用. 土壤含水量、田间持水量、pH 值、有机质含量及其机械组成用常规土壤化学方法测定.

取约 10 kg 土样各 4 份,装入圆桶后在滚筒机上滚动,用喷雾瓶均匀地喷施硝酸铜溶液,使 Cu 的最终加入浓度达到 0(对照),50,100,200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  土,维持 50% 的田间持水量,用 Parafilm 膜封住桶口,使之能发生气体交换但没有水分损失,在 25℃ 的微生物培养室中培养 2 周和 4 周后测定其微生物活性指标.

土壤微生物基底呼吸用 Baath 等的方法测定<sup>[8]</sup>. 微生物生物量用氯仿熏蒸 - 0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{SO}_4$  溶液提取法测定<sup>[19]</sup>. 土壤孔隙水用离心法在 3600 r/min, 27℃, Brake 9 条件下离心 30 min 提取,提取液中 Cu 的浓度用 ICP 测定,并测得其 pH 值,然后用 *E. Coli* pUCD607 发光菌在 Microtox 仪上检测土壤孔隙水的毒性反应<sup>[20]</sup>. 土壤微生物对碳源利用测试采用常规的 Biolog 方法<sup>[21,22]</sup>,共测试 125 种碳源(不包括空白),几乎包括了所有能源碳的类别<sup>[22]</sup>;接种后密封置于 25℃ 微生物培养室中,每天用 590 nm 波长,在 Crawley 生产的 VMAX 自动读盘机上用 Microlog Rel 3.5 软件(美国加州 Hayward Biolog 公司生产)进行读数 10d 和数据收集.

所有样品均设 3 个重复,数据结果统计分析利用英国牛津(Oxford)NAG Ltd. 的 Genstat Rel 5.3 软件完成;实验工作在英国 Macaulay 土地利用研究所完成.

## 2 结果与讨论

供试土壤为近中性、中等有机质含量的砂壤土,基本性质测定结果如表 2.

表 2 供试土壤的基本理化性质

pH(CaCl <sub>2</sub> )	有机质/%	含水量/%	田间持水量(WHC)/%	机械组成/%		
				粘粒	粉砂	细砂
5.0	7.6	23.16	51.40	10	24	61

### 2.1 微生物参数

从图 1 可看出,培养 2 周后,土壤微生物的呼吸速率随 Cu 浓度的升高逐渐升高;培养 4 周后,Cu 浓度为 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,土壤微生物的呼吸速率高于对照,但随 Cu 浓度的继续升高而迅速下降. 培养 4 周后的土壤微生物呼吸量与呼吸速率明显低于培养 2 周后的,表明土壤加入重金属 Cu 培养 2 周后微生物的呼吸强度增加,且随 Cu 浓度的升高而升高,在 4 周后,则明显减弱,且随 Cu 浓度升高而降低.

图 1 还可以看出,培养 2 周后,在 Cu 浓度为 50  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,微生物生物量显著增高,但随

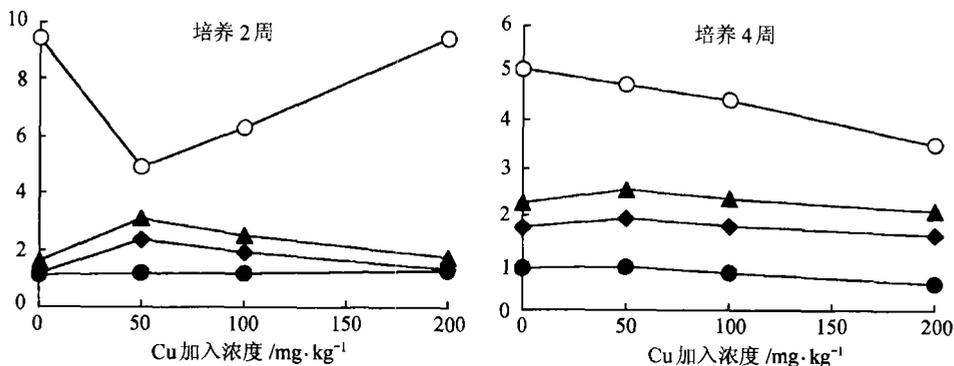


图1 不同处理土壤微生物参数的变化

◆为微生物生物量/100/ $\mu\text{gC}\cdot\text{g}^{-1}$ ; ○为呼吸速率/ $\mu\text{gCO}_2\cdot\text{C}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ;▲为  $q\text{CO}_2/\mu\text{gCO}_2\cdot\text{C}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{gC}^{-1}$ ; ●为  $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$ 值/ $\text{mgC}\cdot\text{g}^{-1}$ 

Cu 浓度的进一步升高显著下降;培养 4 周后微生物生物量有类似的变化,但程度没有培养 2 周后那样明显,这表明低浓度 Cu( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )对土壤微生物生物量有显著刺激作用,高浓度 Cu 有抑制作用,作用主要发生在 Cu 加入土壤后的初期阶段,随着时间的延长,这种效应越不显著。

微生物生理生态参数  $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$  的变化规律与微生物生物量的变化非常一致,即在低浓度时的刺激作用和在高浓度时的抑制作用。两种处理后代谢商  $q\text{CO}_2$  的变化差异显著,培养 2 周后,  $q\text{CO}_2$  值在  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu 条件下明显低于对照,但随着 Cu 浓度的升高,  $q\text{CO}_2$  值直线上升;培养 4 周后,与对照相比,  $q\text{CO}_2$  值一直下降,这表明在重金属胁迫下,微生物的生理活动在早期阶段随 Cu 浓度的升高而加强,但随着时间的延长而减弱,这与土壤微生物呼吸作用的强度基本相对应。

## 2.2 土壤孔隙溶液中 Cu 的浓度及其毒性

表 3 所见,当 Cu 加入浓度达  $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,土壤孔隙溶液中 Cu 的浓度才  $0.531\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,虽随 Cu 加入浓度的升高而升高,但与培养 2 周的相比,培养 4 周后其浓度都小于 Cu 加入浓度相对应的土壤,表明 Cu 加入土壤后游离态铜的含量非常低,且随着时间的延长而更低;发光菌 *E. Coli* 发光度的下降率很低,虽随加 Cu 浓度的升高而升高,但最大下降率仅为 36.95%,远未达到半抑制量  $\text{EC}_{50}$  的程度,且随着培养时间延长下降率更小,表明土壤孔隙溶液对发光菌只有轻度抑制作用,毒性很弱,并随培养时间延长而更弱。

表3 培养不同时间后土壤孔隙溶液中 Cu 的浓度及其生物毒性

Cu 加入浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	培养 2 周		培养 4 周	
	Cu 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>E. Coli</i> 发光度下降率/%	Cu 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>E. Coli</i> 发光度下降率/%
0	0.050	2.06	0.022	0.92
50	0.068	22.93	0.028	1.03
100	0.213	26.15	0.069	23.15
200	0.531	36.95	0.419	31.16

### 2.3 Biolog 结果

Biolog 是反映土壤微生物生理轮廓和微生物群落结构的有效手段<sup>[23]</sup>. 本实验是用两种 Cu 培养土样进行的. 图 2 反映了培养不同时间后土壤微生物对所有 125 种碳源的平均利用程度, 微生物对能源碳的利用从第 2 d 开始, 并随时间而增加; 加入 Cu 培养 2 周后的土样, 6 d 内不同 Cu 处理土壤对能源碳的利用顺序为  $100 > 50 > 0 > 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 6 d 后的顺序变为  $100 > 200 > 50 > 0$ ; 加入 Cu 培养 4 周后的土样, 微生物对能源碳的利用顺序为  $100 > 200 > 50 > 0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . 培养 2 周对碳源的利用程度高些, 在 2 d 内对碳源的利用较高; 但培养 4 周后的土样微生物在 2 d 内对能源碳的利用很小; 不同 Cu 处理对能源碳的利用顺序在 6 d 内差别较大, 6 d 后则完全一致, 除  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu 处理外, 其他 Cu 处理土样对能源碳的利用顺序培养 4 周后的土样明显低于培育 2 周后的土样, 且对照土样更明显.

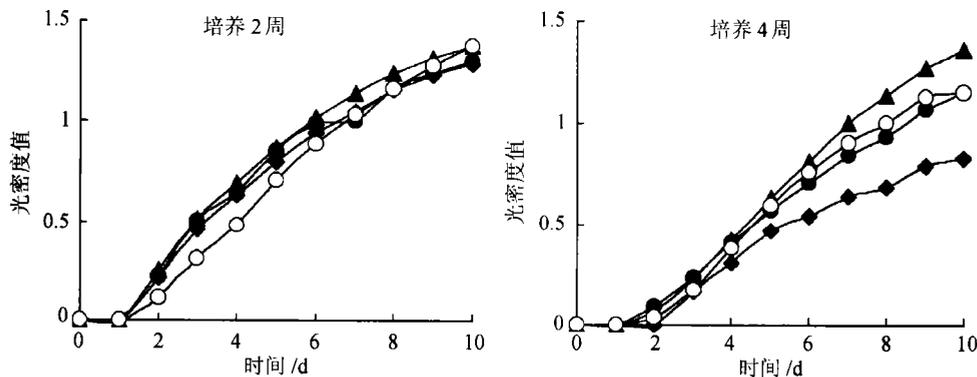


图 2 Cu 加入土壤培养不同时间后土壤微生物对所有碳源的平均利用程度

◆为对照; ●为  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu; ▲为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu; ○为  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu

微生物对根渗出物中常见碳源的利用程度以 Cu 处理培养 4 周后的土样在利用量和利用速度上明显低于培养 2 周后的土样, 当利用量达光密度值 1 时, 培养 2 周后不同 Cu 处理样品所需时间分别为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 5.9 d; 对照, 6.5 d;  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 7.5 d 和  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 8.3 d, 而培养 4 周后的土样则分别为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 7.5 d; 对照, 8.5 d;  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 8.9 d 和  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 9.2 d, 即相同 Cu 处理所需时间更长, 培养 2 周后的土样对碳源的消耗更多, 更快. 微生物对根渗出物中不可见碳源利用的变化情况与之类似.

图 2 中曲线的变化在时间点 2 d 后比较显著, 为了探讨 Cu 加入后土壤微生物群落结构的变化, 现选 3, 6, 9 d 三个时间点, 对 Biolog 数据进行标准化变换后实施典型变量分析, 分析结果见图 3(限于篇幅仅列出主因子 CV1-CV2 图). 可见, Cu 加入土壤培养 2 周后 Biolog 数据在因子载荷图上的载荷量都比较小, 主因子 CV1, CV2 的载荷量均小于 2. 在 3 d 的因子图上, 对照样主要分布在 CV1 因子的正端, Cu 处理  $50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的投影点主要在零点附近向四周扩散,  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  处理的载荷量最大, 据此可将对照与不同浓度 Cu 处理区分; 而 CV3-CV4 图则可明显区分  $50, 100$  和  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu 处理. 与 3 d 相比, 6 d, 9 d 因子图上 Cu 处理间的差别更加显著, 载荷量也更大. Cu 处理培养 4 周后 Biolog 数据的因子载荷量比培养 2 周后的明显增大, Cu 处理间的差异也更显著.

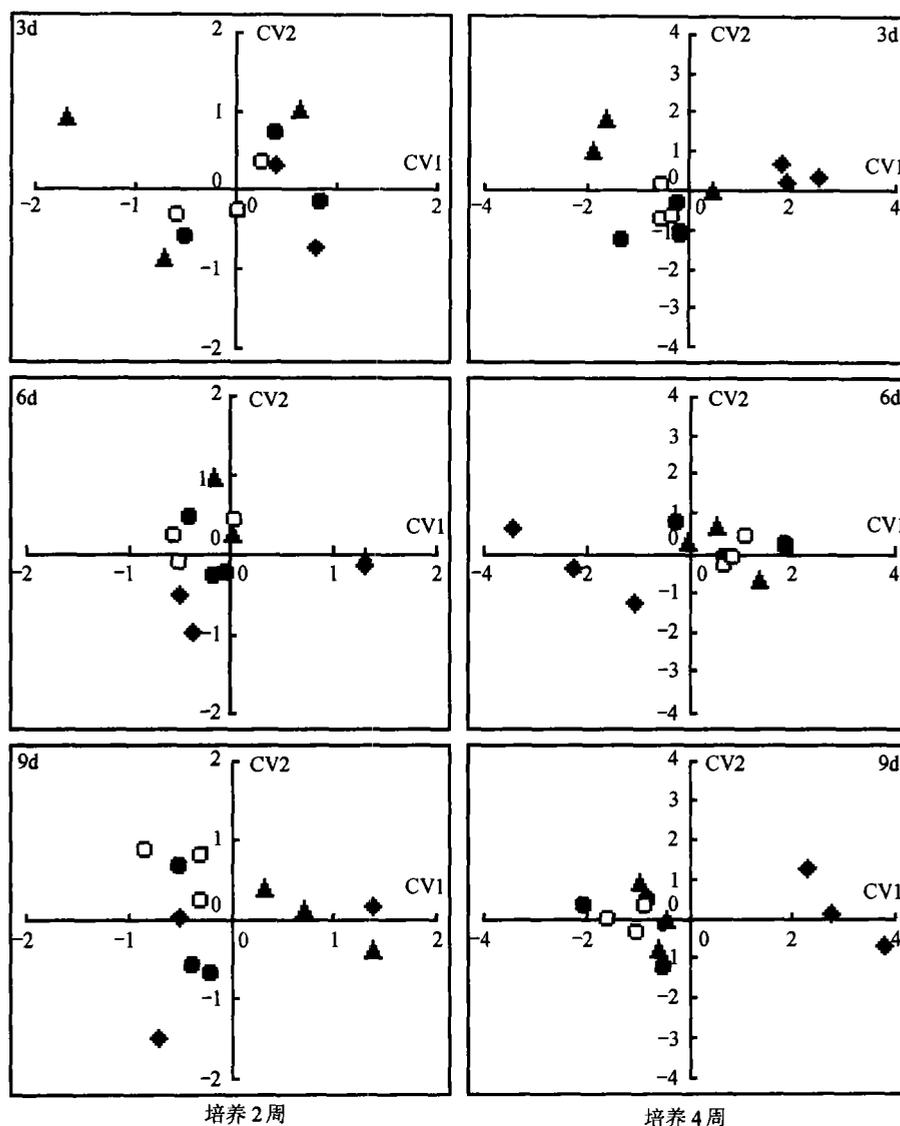


图3 Cu加入后土壤微生物 Biolog 结果的典型变量主因子荷载

◆为对照,●为  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu,○为  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu,▲为  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Cu

随着加入 Cu 处理后培养时间的延长和 Biolog 读数时间的增长,不同处理在因子荷载图上的区别越来越显著. Biolog 数据的因子荷载通常反映了微生物群落的生理轮廓,是其群落结构和功能多样化的具体体现<sup>[24]</sup>,因此图 3 的结果显示了加入不同浓度 Cu 处理后土壤微生物的群落结构发生了明显的改变,且随时间延长越来越明显,反映了 Cu 污染对土壤微生物原有群落结构的损伤是长期性的,这与 Eric 等<sup>[10]</sup>用 DNA 方法研究 Cu 污染的结果相一致.

#### 2.4 讨论

污染物进入土壤后,可以溶解于土壤溶液、吸附于胶体的表面、闭蓄于土壤矿物之中、或与

其他物质发生反应产生沉淀,使其化学形态发生转变,有效性降低,毒性减小. 土壤对重金属元素的这种自净能力受土壤与其结合强度的控制,可用土壤结合容量(Binding Capacity, BC)来描述,结合容量大,结合强度大,自净能力强. 土壤对重金属的结合容量主要受土壤 pH 值,有机质含量,质地及三氧化二物含量的控制<sup>[25]</sup>,按强度可分 6 级,即 0:无,1:很弱,2:弱,3:中等,4:强,5:很强. 按照 Blume 和 Brummer 介绍的方法<sup>[25]</sup>,供试土壤对 Cu 的结合容量的计算结果为

$$BC_{\text{tot.}} = BC_{\text{pH}} + BC_{\text{org.}} + BC_{\text{text.}} + BC_{\text{ox.}} = 6$$

式中下标 tot., org., text., ox. 分别表示总量,有机质,质地,氧化物. 供试土壤对 Cu 的结合强度很大,这就是为什么 Cu 加入土壤后土壤溶液中 Cu 的含量很低;土壤 Cu 除残渣态外,主要结合形态为有机态和铁锰氧化物结合态<sup>[26]</sup>. 我们的测定表明,供试土壤 Cu 的平均含量为  $18.59 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,其中有机态占 16%,铁锰氧化物结合态占 24%,Cu 进入土壤后很容易被有机质及铁锰氧化物固定,游离态 Cu 显著减少,随着时间的增长,Cu 固定作用越来越明显,所以 Cu 对微生物的作用主要在 Cu 进入土壤后的早期阶段,后期作用越来越不明显. 在重金属胁迫下,微生物生物量在高浓度 Cu 处理时明显降低, $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$ 值亦明显减小,但由于逆抗性,土壤微生物为了维持其生理活性,便相应地增加呼吸强度,提高呼吸速率,而消耗更多的能源碳,所以对碳源的平均利用以  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu 处理土样为最高,对照为最低.  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cu 处理可能由于过高的 Cu 浓度抑制了微生物正常的生理活动,所以其对能源碳的利用亦很低. 为了适应这样的逆境,微生物调整其群落结构,因此与对照相比,不同浓度 Cu 处理土样的微生物群落结构发生改变,无法恢复到原有的群落轮廓,使 Biolog 因子载荷图上的差异越来越明显.

### 3 结论

土壤微生物特征随重金属 Cu 进入土壤而发生一系列的变化,如微生物生物量随 Cu 浓度升高而降低,呼吸速率升高,微生物生理活动增强,消耗的能源碳更多. 为了适应这种胁迫环境,微生物的群落结构发生变异. 尽管重金属 Cu 对微生物的这种损伤具有长期性,但这些作用主要发生在污染物进入土壤的早期阶段,随着时间的推移,由于供试土壤对 Cu 的固定作用越来越显著,因此土壤溶液中游离态的 Cu 含量很低,对发光菌只有轻度的抑制作用.

### 参 考 文 献

- 1 Vermer J F, et al. Heavy metal contamination of soils around a Pb-Zn smelter in Bukowno, Poland. *Applied Geochemistry*, 1996, 11: 11
- 2 Kabata-pendias A, et al. Assessment of soil and plant pollution with heavy metals and sulphur, Insitute of Soil Science and Plant Cultivation, Pulawy, 1993: 5
- 3 MAFF/DoE. Review of the rules for sewage sludge application to agricultural land-soil fertility aspects of potentially toxic elements. Report of the Independent Scientific Committee, 1993, London: MAFF publications
- 4 Official Journal of the European communities, No. L 181/10, 1986. 4.7, Annex 1A
- 5 Rauta C, et al. 罗马尼亚土壤污染研究状况(郑春荣译), *土壤学进展*, 1988, 16(2): 35
- 6 McGrath S P, et al. Long term effects of land application of sewage sludge: soils, microorganisms and plants. *Trans 15th World Congr Soil Sci, Acapulco, Mexico*, 1994, V3a: 517

- 7 何振立. 土壤微生物量及其在养分循环和环境质量评价中的意义. 土壤, 1997, 1: 8
- 8 Baath E, et al. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 238
- 9 Kelly J J, et al. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. Journal of Environmental Quality, 1998, 27(3): 609
- 10 Eric S, et al. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contaminatin using amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 23: 249
- 11 Fritze H, et al. Vitality fertilization of Scots pine stands growing along a gradient heavy metal pollution: Short-term effects on microbial biomass and respiration rate of the humus layer. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1996, 354(5-6): 750
- 12 Kaperman R G, et al. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grass land ecosystem. Soil Bioloty & Biochemistry, 1997, 29(2): 179
- 13 Bogomolov D M, et al. An ecosystem approach to soil toxicity testing-A study of copper contamination in laboratory soil microcosms. Applied Soil Ecology, 1996, 4(2): 95
- 14 Brookes P C, et al. Effects of heavy metals at around current permitted EC limits on the synthesis and turnover of the soil microbial biomass. Trans 15th World Congr Soil Sci, Acapulco, Mexico, 1994, V4b: 58
- 15 Barajas M, et al. Effects of heavy metals from a mine in Gipuzkoa, Spain on soil microbial biomass and organic matter dynamics. Trans 15th World Congr Soil Sci, Acapulco, Mexico, 1994, V4b: 60
- 16 Kandler E, et al. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. Biology and Fertility of Soils, 1996, 23(3): 299
- 17 Fliessbach A, et al. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy-metal contaminated sewage-sludge. Soil Biology & Biochemistry, 1994, 26(9): 1201
- 18 Bardgett R D, et al. Effects of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labelled C-14 glucose in a pasture soil. Soil Biology & Biochemistry, 1994, 26(6): 727
- 19 Wu J, et al. Measurement of soil microbial biomass by fumigation-extraction-an automated procedure. Soil Biology & Biochemistry, 1990, 22: 1167
- 20 Paton G I, et al. Use of genetically modified microbial biosensors for soil ecotoxicity testing. In: Pankhurs C E, Doube B M and Gupta V S R, eds. Bioindicators of Soil Health, Wallingford: CAB international, 397
- 21 Garland J L, et al. Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. Applied Environmental Microbiology, 1991, 57: 2351
- 22 Campbell C D, et al. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon sources tests to discriminate soil microbial communities. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30: 33
- 23 Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. Soil Biology & Biochemistry, 1996, 28: 213
- 24 Zabinaki C A, et al. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. Environmental Management, 1997, 21(2): 233
- 25 Blume H P, et al. Prediction of heavy metal behavior in soil by means of simple field tests. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1991, 22: 161
- 26 朱永官. 铜. 见: 陈怀满等著. 土壤-植物系统中的重金属污染, 北京: 科学出版社, 1996. 168