

# 重金属污染土壤的微生物学评价<sup>①</sup>

蒋先军 骆永明 赵其国

(中国科学院南京土壤研究所 南京 210008)

**摘 要** 随着研究方法的改进,采用微生物学指标评价土壤重金属污染越来越受人们关注。比较敏感的指标有:对重金属敏感细菌与耐性细菌之比,脱氢酶活性与土壤有机碳之比,代谢商,微生物生物量碳与土壤有机碳之比,异养固氮菌的固氮作用。但微生物的生物量及其活性在受重金属影响的同时也受土壤性质及自然条件的影响,应当把微生物学性质的变化与重金属的形态、植物吸收联系起来评价污染土壤。

**关键词** 重金属;污染;微生物;评价

重金属污染土壤的修复必须以科学的评价为基础。评价的指标应该是严格可控的,便于评价者对一种土壤是否被污染以及污染的程度作出判断。采用化学方法来评价土壤已有数十年的历史。化学评价的优点在于可提供土壤中污染物浓度的绝对值,并可与背景值相比较。但化学方法不能提供一个土壤中金属浓度的允许标准<sup>[1]</sup>;其次,评价土壤中重金属的毒性必须以其生物有效量而不是总量为标准<sup>[2-3]</sup>。土壤中重金属浓度有一个很宽的范围,但金属总量与其生物效应之间常常没有联系,一种土壤中高浓度的某种金属对土壤不一定有很大的影响,而对另一种土壤较低的浓度影响可能更大。很清楚,起决定作用的是金属的生物有效性,土壤溶液中的可溶态及可提取态最为重要。但直到现在,区分测定金属形态仍难以办到<sup>[4]</sup>。

微生物在土壤功能及重要土壤过程中直接或间接地起重要作用,包括对动植物残体的分解、养分的贮藏转化、水分入渗、气体交换、土壤结构的形成与稳定、有机物的合成及异源生物的降解等<sup>[5]</sup>。因此,微生物学参数可作为监测土壤污染的早期的、敏感的指标。

有许多微生物生理学性质可作为指标来评价土壤重金属污染。Brookes认为要具备以下条件:1.对于大多数的土壤类型和在不同的土壤条件下都可准确测定;2.由于要分析的土壤样品数量较大,测定方法应经济、简单;3.背景值或对照值也易于测定;4.指标要足够灵敏,同时也要稳定;5.这些指标在现有科学基础上真实可靠<sup>[6]</sup>。这些指标大致可分为两类:一是微生物的生物量,二是微生物的活性。

## 1 评价指标

### 1.1 生物量

微生物的生物量能代表参与调控土壤中能量和养分循环以及有机质转化的对应微生物的数量,与土壤有机质含量密切相关。而且土壤微生物量碳或氮转化迅速能在检测到土壤总碳或总氮变化之前表现出较大差异,是比较敏感的指标。

<sup>①</sup> 国家自然科学基金项目(编号 49831070、49871042)、国家重点基础发展规划项目(G1999011807)、中国科学院南京土壤研究所土壤圈物质循环开放研究实验室基金和土壤与环境联合开放研究实验室基金项目资助。

Brookes 等采用氯仿熏蒸法测定了施用含重金属的污泥达 20 年的农业土壤中微生物的总量, 认为重金属对土壤微生物总量有抑制作用, 与土壤 ATP 法测定结果一致<sup>[7]</sup>。其后 Brookes 等采用直接显微计数法测定的结果与此相似。Chander 与 Brookes 采用氯仿熏蒸法测定了不同金属浓度对微生物生物量的影响, 研究认为在 EC (欧盟) 标准附近的重金属浓度对微生物生物量没有大的影响, EC 标准 2.5 倍的 Cu、Zn 使生物量下降 40%, EC 标准 2 倍的 Cd、2~3 倍的 Ni 对微生物的生物量没有影响<sup>[8]</sup>。Fliebbach 等研究了长期施用含重金属 (Cu、Zn、Cd、Ni) 的污泥土壤中微生物数量与重金属浓度的关系, 认为低浓度的重金属能刺激微生物的生长与微生物的活性<sup>[9]</sup>。

采用微生物的总量作为指标有两个问题, 一是微生物生物量与重金属浓度的反应曲线通常都呈“S”形, 很难确定标准; 另一个问题在于怎样评价生物量的变化, 生物量的下降并不意味着种群有灭绝的危险, 理论上会有两种或几种更具耐性的种来填补, 从而丰富了微生态系统<sup>[10]</sup>。此外, 由于其他的变化如有机质含量、pH、粉砂含量、温度、水分、氧气及养分供应等哪怕很小的变化都会导致微生物的数量和活性极大的波动<sup>[11]</sup>。所以采用总的生物量来评价土壤的重金属污染有相当的难度。近年来的研究发现了 2 个较为敏感的指标。

### 1.1.1 重金属敏感细菌与耐性细菌之比

Arnebrant 等研究发现重金属污染水平与真菌总量相关性不好, 但在加入 200mg/kg Cu 的麦芽琼脂培养基上能够生长的真菌 (耐性真菌), 其数量与重金属的浓度有相关性, 未污染的对照处理, 耐性真菌占 3.1%, 而加重金属处理的耐性真菌占 24%<sup>[12]</sup>。Jordan 和 Lechevalier 也发现在 Zn 污染的土壤中, 耐性真菌占总量的 24%而对照为 4.5%。

原核生物 (细菌、放线菌) 比真核生物 (真菌) 对重金属更敏感, 细菌比放线菌更敏感, 而格兰氏阳性菌对重金属的敏感性又强于格兰氏阴性菌<sup>[13, 14]</sup>。Duxbury 和 Bicknell 研究了自然土与重金属污染土壤中的细菌种群, 发现每种土壤中的细菌种群都包括两类, 其中一种比另一种能忍耐更大浓度范围的重金属。研究还发现污染重的土壤 (Cd、Cu、Ni、Pb 分别为 12、82、199、207mg/kg) 比污染轻的土壤 (Cd、Cu、Ni、Pb 分别为 2、11、48、13mg/kg) 中耐性细菌的数量多 15 倍<sup>[15]</sup>。

以重金属敏感细菌与耐性细菌之比作为指标来评价土壤重金属污染早在 1983 年就已提出<sup>[15]</sup>, 但测定时需从土壤中分离培养、再用稀释平板计数, 由于在现在的科学水平下, 土壤微生物中能被分离培养的还不到 1%<sup>[16, 17]</sup>。更何况微生物从土壤中分离出来后可能会发生一些变化, 这就使得其应用受到限制。后来 Doleman、Baath 等分别对测定方法进行改进。Doleman 在研究不同浓度 Cd 对微生物的影响时发现, 随 Cd 浓度的增加, 细菌的总量并没有明显的变化, 但敏感菌与耐性菌的数量之比却发生了明显的变化<sup>[6]</sup>。Baath 采用 [<sup>3</sup>H]—胸腺嘧啶来标记合成到细菌 DNA 的量来测定细菌的数量, 这种方法被更多的研究者所接受<sup>[18, 19]</sup>。Kubat 也采用敏感菌与耐性菌的数量之比来评价捷克耕作土的质量, 认为这一指标对重金属比较敏感<sup>[20]</sup>。

### 1.1.2 微生物的生物量碳与土壤有机碳之比 ( $C_{mic}/C_{org}$ )

( $C_{mic}/C_{org}$ ) 是反映土壤生态系统中碳平衡的指标。当外界环境发生改变时 (如耕作、气候及各种污染物进入土壤),  $C_{mic}/C_{org}$  的变化可以早于其它指标被检测出来。Insam 等通过长期田间试验研究了气候对土壤微生物生物量的影响。采用基质诱导呼吸法测生物量, 发

现气候变化与生物量的相关性不好,而与  $C_{mic}/C_{org}$  有较好的相关性<sup>[21]</sup>。通常情况下,微生物的生物量碳占土壤有机碳的  $1 \sim 4\%$ <sup>[22]</sup>。Chander 和 Brookes 在同一试验场对同一对象的研究认为,未加含重金属污染处理的土壤或加入不含重金属的污泥处理的土壤,  $C_{mic}/C_{org}$  为  $1.5 \sim 2.0\%$ , 约是含重金属污泥处理的两倍 ( $0.7 \sim 1.0\%$ ), 而高浓度的 Cu、Zn 处理的 ( $C_{mic}/C_{org}$ ) 只有  $0.4 \sim 0.7\%$ <sup>[8, 23]</sup>。Fliebbach 等在德国的长期试验站作了同样的研究,认为含重金属污泥处理的  $C_{mic}/C_{org}$  比对照下降了  $32\%$ <sup>[9]</sup>。可能是由于重金属降低了微生物对有机质的矿化率。

## 1.2 微生物活性

采用微生物活性指标,如呼吸作用,脱氢酶、脲酶、磷酸酶活性,纤维素分解作用,碳、氮矿化作用及固氮作用来评价重金属污染已有多年历史。但许多研究结果是相互矛盾的<sup>[12, 15]</sup>。近年的研究表明,在生物活性受重金属影响发生明显变化之前,整个微生物区系已经发生了质的变化<sup>[11]</sup>。无论如何,微生物的活性对土壤 C、N、P、S 的循环起着决定作用,近年的研究结果中,有 3 个指标相对较为敏感。

**1.2.1 微生物的代谢商 ( $qCO_2$ ), 即单位生物量的微生物在单位时间里的呼吸作用** 环境胁迫下,微生物维持生存可能需要更多的能量。Killham 等采用  $^{14}C$  标记的葡萄糖为基质研究认为  $q^{14}CO_2$  的变化是土壤呼吸作用或脱氢酶活性变化值的两倍<sup>[24]</sup>。Brookes 和 McGrath 研究认为重金属污染土壤的  $qCO_2$  是未污染土壤的两倍<sup>[7]</sup>。Chander 和 Brookes 采用  $^{14}C$  标记的葡萄糖和玉米为基质,研究土壤微生物对不同浓度重金属的反应。发现未加入标记基质时,高浓度处理的  $qCO_2$  为  $51[CO_2 - Cmg/g \text{ 生物量} \cdot \text{天}, \text{下同}]$ ,低浓度处理的  $qCO_2$  为 35;加入  $^{14}C$  标记的葡萄糖基质后,高浓度处理的  $qCO_2$  为 764,低浓度处理的  $qCO_2$  为 463;加入  $^{14}C$  标记的玉米基质后,高浓度处理的  $qCO_2$  为 520,低浓度处理的  $qCO_2$  为  $250$ <sup>[23]</sup>;进一步的研究表明,含高浓度重金属的土壤中微生物利用有机碳更多地作为能量代谢,以  $CO_2$  的形式释放,而低浓度重金属的土壤中微生物能更有效地利用有机碳转化为生物量碳,  $C_{mic}/C_{org}$  的分析也得出同样的结论<sup>[25]</sup>。Giovanni 等研究认为土壤中重金属含量与土壤呼吸作用呈正相关,当采用代谢商时相关性更好。Fliebbach 等的研究也有类似的结果,认为代谢商 ( $qCO_2$ ) 是评价重金属微生物效应的敏感指标<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 异氧生物固氮作用** 固氮菌有自养、异养与光合固氮三类。多数土壤中异养固氮作用由于固氮速率慢而难以作为土壤污染的指标。Rother 等发现甚至在重金属浓度高出 EC 标准很多倍时,重金属浓度与乙炔还原量都没有相关性<sup>[26]</sup>。但后来 Brookes、Lorenz 等的研究认为在 EC 标准附近的重金属浓度可降低异养固氮率  $90\%$ <sup>[17, 27]</sup>。出现这种差异的原因在于后者在分析前 50 小时向土壤中加入  $2000mg/kg$  的葡萄糖。这种技术的应用提高了重金属对异养固氮的敏感性,但要把这种方法作为标准方法,则需要进一步的研究。

Brookes 等在实验室严格控制条件下研究了不同重金属浓度对生物固氮的影响。采用两种方法,一是乙炔还原法,二是用  $^{15}N$  标记。两种方法有较好的相关性,结果认为固氮作用与重金属浓度有显著负相关。低浓度的重金属 (EDTA 浸提, Zn  $30mg/kg$ , Cu  $15mg/kg$ , Ni  $2mg/kg$ , Cd  $2mg/kg$ ) 可降低蓝绿藻固氮  $50\%$ ,且含低浓度重金属的土壤中微生物的固氮量是含高浓度重金属土壤的 10 倍<sup>[28, 29]</sup>。Skujins 等发现实验室条件下 Cu、Cr 污染对生物固氮极灵敏,其灵敏度是土壤呼吸作用、脲酶活性或硝酸盐合成率的 10 倍。Lorenz 等测定了

污染土壤与未污染土壤中蓝细菌的固氮作用。他们把污染土壤与未污染土壤按不同比例混合,制成有浓度梯度的污染土样,结果表明重金属对蓝细菌固氮有抑制,但不及 Brookes 等的结果显著<sup>[27]</sup>。

**1.2.3 脱氢酶活性与土壤有机碳之比** Brookes 等研究认为重金属污染引起脱氢酶活性下降而对磷酸酶没有影响。磷酸酶是胞外酶而脱氢酶是胞内酶,只存在于活的细胞内。所以以脱氢酶活性作为重金属污染的指标比磷酸酶活性更灵敏<sup>[7]</sup>。

常用可溶性四唑盐类如三苯基四唑氯化物(TTC)、2-对碘苯-3-对硝基苯-5-苯基-四唑氯化物(INT)作为 H 的受体,还原产物提取后用分光光度计测定。采用三苯基四唑氯化物(TTC)为基质有两个问题。一是 Cu 对脱氢酶活性的测定有影响,因为 Cu 对反应最终产物三苯基甲 (TPF) 的红色形成有影响。当 Cu 被加入到土壤中或以离子形态存在于土壤溶液中时,这种非生理上的反应可能被误认为是 Cu 导致脱氢酶活性下降;二是 TTC 的还原作用容易受 O<sub>2</sub> 所抑制,样品中 O<sub>2</sub> 常常导致结果的重现性差。Von Mersi 等研究发现采用 INT 为受体,1:1 的 N,N-二乙基甲酰胺和乙醇为浸提剂,生成物的颜色稳定,且不受 O<sub>2</sub> 影响,无论厌氧或好氧条件下,INT 的还原量都大于 TTC<sup>[30]</sup>。研究认为这是一种快速、准确、重现性好的测定脱氢酶活性的方法。Aoyama 等采用这一方法研究认为单位土壤有机碳的脱氢酶活性与 Cu 浓度的对数呈显著负相关,并与 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub> 浸提的 Cu 相关系数最高<sup>[31, 32]</sup>。

## 2 存在的问题

采用微生物学性质作为土壤污染的评价指标,原则上值得推荐。土壤微生物的量及其行为在许多方面的都是土壤污染理想的监测者。1998年8月在法国召开的第16届国际土壤学会上,提出以生物学指标评价土壤质量占70%,物理、化学等指标只占30%<sup>[33]</sup>。但采用生物学指标仍然存在一些问题。

首先是数据的变异问题。文献中关于金属对微生物过程及种群的毒性有着很大的变异。Baath 采用“没有影响的最高金属浓度”(HNOEC)和“产生影响的最低金属浓度”(LOEC),总结了实验室及田间条件下的研究结果,发现 HNOEC、LOEC 值的变异达 100~1000 倍。这种变异难以用剂量的增加或误差来解释。同一研究中不同土壤上同一生物指标的变异也达 10~100 倍<sup>[12]</sup>。

其次是研究方法。许多研究者对同样因子的研究结果相差很大,甚至是相互矛盾的,一个很重要的原因就是研究方法。近年来许多学者对传统方法作出改进,尽量避免分离培养,如测定微生物群落的磷酸脂脂肪酸法、利用 SIR 的差异测微生物群落的分解代谢,采用 [<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶来标记合成到细菌 DNA 的量来测定细菌的数量,以及一些分子生物学的方法<sup>[34-36]</sup>。但所有这些都还只是一种尝试,要作为标准方法还需大量的研究。

第三,这些微生物学性质在受重金属影响的同时,也受其它因素的影响。如蓝细菌的固氮作用受 pH 影响的程度可能大于重金属。Dahlin 等对许多被认为对重金属敏感和微生物学性质进行研究后认为,这些性质与重金属浓度相关的同时也与土壤有机碳、pH 相关,而且由于土壤各个化学因子之间的相互作用影响太大,难以判断是什么因子引起微生物性质改变的<sup>[37]</sup>。

随着对微生物研究方法以及金属形态研究方法的改进<sup>[38, 39]</sup>, 可能的办法是将微生物学性的变化与金属形态特别是生物有效态以及植物的吸收联系起来研究, 采用两个或多个相对独立的指标来综合评价重金属污染土壤。

### 参 考 文 献

- 1 Kurakov A. Iyaginsev D. G. Umarov M. et al. Assessment of soil quality by biological methods; Experience from arable soils in Gech Republic. Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science. Montpellier, France. 1998
- 2 Allen H. E., Yin Y. Combining chemistry and biology to derive soil quality criteria for pollutants. Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science. Montpellier, France. 1998
- 3 Sauv S. Derivation of soil quality criteria using chemical speciation of Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science. Montpellier, France. 1998.
- 4 McGrath S. P. Brookes P. C. Giller K. E. Soil Biol. Biochem. 1998, 20: 415 ~ 424
- 5 Dick. R. P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. Pp. 121 - 156. In: Biological indicators of soil health. In: Biological indicators of soil health. C. Pankhurst et. al. (eds) CAB international. New York, 1997, 121 ~ 156
- 6 Brookes P. C., Soil. Fertil. Soils 1995, 19: 269 ~ 279
- 7 Brookes P. C., McGrath S. P. Journal of soil science, 1984, 35: 341 ~ 346
- 8 Chander K, Brookes P. C. Soil Biol. Biochem. 1991, 23: 917 ~ 925
- 9 Fliebbach A. Martens R. Reber H. H. Soil Biol. Biochem. 1994, 26: 1201 ~ 1205
- 10 Tyler G. Balsberg Pahlsson A. M. Giles J. et al. Water, Air and Soil Pollution. 1989, 47: 189 ~ 215
- 11 Doleman P., Janson E. Michels M. et. al. Biol. Fertil. Soils, 1994, 17: 177 ~ 184
- 12 Baath E. Water, Air and Soil Pollution. 1989, 47: 189 ~ 215
- 13 Babich H. Stotzky G. Environ. Health Prospect. 1983, 49: 247 ~ 260
- 14 Doleman P. Resistance of soil microbial communities to heavy metals. In: Jensen V. Kjoller A. Sorensen L. H. (eds) Microbial communities in soil Elsevier. London New York. 1985, 369 ~ 383
- 15 Duxbery T. Bicknell B Soil Biol. Biochem. 1983, 15: 243 ~ 250
- 16 Fagri A. Torsvik V. L. Goksoyr J. Soil Biol. Biochem. 1977, 9: 105 ~ 112
- 17 Gray T. R. G., Methods for studying the microbial ecology of soil. In: Methods in microbiology. (Grigorovia R. and Norris J. R. Eds), Academic Press. Lon Don. 1990, vol. 22, 309 ~ 342
- 18 Baath E. Soil Biol. Biochem. 1992, 24: 1167 ~ 1172
- 19 Diaz-Ravina M. Baath E. Frostegard ASA. Appl. and Environ. Microbiol 1994, 2238 ~ 2247
- 20 Kubat J. Mikanova O. Novakova J. et al. Assessment of soil quality by biological methods; Experience from arable soils in Gech Republic. Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of Soil Science. Montpellier, France. 1998.
- 21 Insam H. Parkinson D. Domsch K. H. Soil Biol. Biochem. 1989, 21: 211 ~ 221
- 22 Jenkinson D. S. Ladd J. N. Microbial biomass in soils; measurement and turnover, In: Paul E. A., Ladd J. N. (eds) Soil Biochemistry, Marcel Dekker, New York, 1981, vol 5, 415 ~ 471
- 23 Chander K, Brookes P. C. Soil Biol. Biochem. 1991, 23: 927 ~ 932
- 24 Killham K., Environ. Pollu. (serA) 1985, 38: 204 ~ 283
- 25 Chander K, Brookes P. C. Soil Biol. Biochem. 1991, 23: 909 ~ 915
- 26 Rother J. A. Milbank J. W. Thornton J. Journal of Soil Sci. 1982, 33: 101 ~ 113
- 27 Lorenz S. McGrath S. P. Giller K. E. Soil Biol. Biochem. 1992, 24: 601 ~ 606
- 28 Brookes P. C., McGrath S. P., Heijnen C. E. Soil Biol. Biochem. 1986, 18: 345 ~ 353
- 29 Brookes P. C. Heijnen C. E., McGrath S. P. Soil Biol. Biochem. 1986, 18: 383 ~ 388
- 30 Von Mersi W. Schinner F. Biol. Fertil. Soils. 1991, 11: 216 ~ 220
- 31 Aoyama M. Nagumo T. Soil Sci. Plant Nutr. 1996, 42: 821 ~ 831
- 32 Aoyama M. Nagumo T. Soil Sci. Plant Nutr. 1997, 43: 601 ~ 60
- 33 赵其国. 土壤与环境问题国际研究概况及其发展趋向. 土壤, 1998, 30(6): 281 ~ 290
- 34 Degens B. P. Harris J. A. Soil Biol. Biochem. 1997, 29: 1309 ~ 1320
- 35 Torsvik V. L. Goksoyr J. Dane F. L., Appl. Environ. Micro. 1990, 56: 782 ~ 787
- 36 Ritz K. Griffiths B. S. Soil Biol. Biochem. 1994, 26: 963 ~ 971
- 37 Dahin S. Witer E., Martensson A. et al. Soil Biol. Biochem. 1997, 29: 1405 ~ 1415
- 38 Holm P. E. Christensen T. H. Tjill J. C. and McGrath S. P. J. Environ. Qual. 1995, 24: 183 ~ 190
- 39 Luo Y. M. and Christie P. Intern. J. Environ. Anal. Chem 1998, 72: 59 ~ 75