

乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物生态效应研究

邹小明¹, 王能强², 张瑜敏¹, 钟 禄¹, 曾达芬¹, 朱立成¹

(1.江西省高校生态环境与资源重点实验室, 井冈山大学, 江西 吉安 343009; 2.湖南科技大学生命科学学院, 湖南 湘潭 411201)

摘 要: 土壤微生物数量及土壤酶活性是描述土壤的重要生物学指标。在实验室控制条件下, 研究了农药乐果、 Cd^{2+} 单一污染及乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤 3 大类群微生物数量和主要土壤酶活性的影响。结果表明, Cd^{2+} 和乐果复合处理对土壤中微生物生长存在着明显的拮抗作用, 复合抑制效应顺序为放线菌>真菌>细菌; 而对土壤酶活性均有明显的协同作用, 复合抑制效应顺序为蛋白酶>蔗糖酶>脲酶。单一污染时, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乐果的处理可不同程度地抑制这些生物学指标, 其中对土壤微生物数量的抑制效应顺序为真菌>放线菌>细菌, 对土壤酶活性的抑制效应顺序与乐果和 Cd^{2+} 复合污染顺序一致; $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度的乐果对这些指标几乎无影响。

关键词: 乐果; 镉; 土壤微生物; 土壤酶

中图分类号: X53 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)02-0348-05

Eco-toxicological Effect of Cadmium and Dimethoate Combined and Simplex Pollution on Soil Microbe

ZOU Xiao-ming¹, WANG Neng-qiang², ZHANG Yu-min¹, ZHONG Lu¹, ZENG Da-fen¹, ZHU Li-cheng¹

(1.Key Lab of Ecological Environment and Resource Development of Jiangxi Province, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China; 2.Life Science Department of Hunan University of Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: Dimethoate is an insecticide widely used on fruit trees, leaf vegetables, cotton and other horticultural crops to control sucking insects. Owing to the widely pollution of Cd^{2+} in farmland, there is a widespread belief that the phenomenon of Cd^{2+} and dimethoate Combined Pollution is existence commonly in farmland ecosystem which using dimethoate frequently. This paper aims at discussing eco-toxicological effect of Cd^{2+} and dimethoate combined pollution on soil microbe. The polluted soil enzyme activities (invertase, urease, proteinase) determined by colorimetry method and microbial population determined by the pour plate method were studied in simulative experiment condition. The results showed that there existed synergistic inhibiting effect on the soil enzyme activities; The order of inhibiting rate of soil enzyme activities under $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dimethoate simplex pollution and the compound pollution of cadmium and dimethoate were proved to be: proteinase>invertase>urease; Antagonistic inhibiting effect on the population of soil microbial under the compound pollution of cadmium and dimethoate were found in this experiment results. The order of inhibiting rate of soil microbial population under the compound pollution were proved to be: actinomycetes>fungi>bacteria; Under the $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dimethoate simplex pollution the inhibiting effect on soil enzyme activities were proved to have and the order of inhibiting rate of soil microbial population was: fungi>actinomycetes>bacteria; The results also showed that there are no inhibiting effect on the soil enzyme activities and soil microbial under $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dimethoate simplex pollution.

Keywords: dimethoate; cadmium; soil microbe; soil enzyme

土壤微生物参与着土壤中物质的转化和分解, 是生态系统的重要组成部分, 其群落的组成和相关活性对于土壤肥力的保持、土壤生态系统的物质循环等具

有重大的意义。研究表明, 重金属在高浓度下能强烈地影响土壤微生物的群落结构、生物活性等指标, 是阻碍土壤微生物生命活动的主要影响因素^[1-2]。与此类似, 化学农药进入土壤后对土壤的微生物群落和活性也会产生影响^[3-8]。环境中的大部分污染都是由于多种物质共同作用而造成的复合污染, 其中有机农药与重金属复合污染是非常普遍的, 因此关于复合污染的研究已经成为当前环境领域的研究热点之一^[9-11]。

收稿日期: 2008-05-03

基金项目: 江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007] 322); 吉安市 2007 年重点科技指导项目; 井冈山大学 2007 年度自然科学基金项目。

作者简介: 邹小明(1980—), 男, 硕士, 讲师, 主要从事环境微生物学等领域的研究。E-mail: jxzxm98@126.com

乐果是一类中等毒性的内吸性有机磷类杀虫剂,可以广泛应用于果树、棉花等农作物的害虫防治。目前我国的环境优先污染物名单中包含乐果等其他农药,但其良好的杀虫效果使在很多果树等农作物虫害的防治时,乐果的使用仍非常广泛。同时由于人们长期使用磷肥种植农作物,导致磷肥中带入的 Cd^{2+} 在土壤中的长期累积。因此在使用乐果的农田生态系统中广泛地存在着乐果与 Cd^{2+} 的复合污染情况,但目前国内外尚无此类研究。因此在实验室条件下研究乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物数量及土壤中蛋白酶、脲酶、蔗糖酶活性的动态影响,阐明乐果与 Cd^{2+} 复合污染的交互效应及单一污染对土壤微生物生态效应的影响,有助于正确评价土壤环境中乐果-镉复合污染条件下污染物质的迁移转化行为,建立复合污染生态毒理诊断指标、风险评价技术体系,帮助人们采取合理的整治措施,解决土壤的环境污染问题具有非常重要的理论和实践意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采集吉安市郊未施用农药的荒地中 2~20 cm 的新鲜土样,去除植物根及其他杂物,风干,过 0.5 mm 筛备用。土壤的理化性质为有机质 $17.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有机氮 $132.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效磷 $18.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾 $125.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,土壤 pH 7.62。

1.2 实验方法

1.2.1 土样处理及试样处理方法

乐果污染土样配制方法:量取一定体积的 100% 纯度的氧化乐果溶解于甲醇(分析纯)中,配置为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果甲醇溶液。称取适量的干土后加入乐果甲醇溶液,使得乐果浓度分别为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,混匀后置入通风橱中反复抽风,甲醇完全挥发后,土样即为受乐果污染浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的试验样。

Cd^{2+} 污染土样配制方法:将 CdCl_2 配制浓度为 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的水溶液,然后称取土样后加入适量的溶液,混合均匀,使得土壤中 Cd^{2+} 的浓度分别为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。乐果与 CdCl_2 复合污染土样配置方法:采用上述相同方法配置。

试验土样的 7 个处理见表 1,每个处理中含风干土 100 g,含水量为最大田间含水量的 60%。配置好后置于恒温培养箱 25°C 培养。每隔 2~3 d 调节土壤含水量,损失的水分通过称重法补偿。培养第 3、6、9、12、15、20、25、30 d 分别称取 5 g 处理土样测定微生

表 1 乐果污染及镉污染土壤的浓度

Table 1 The concentrations of cadmium and dimethoate in pollution soil samples

试验样	乐果浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cd^{2+} 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
对试样(空白)	0	0
A	50	0
B	100	0
C	0	5
D	0	10
E	50	5
F	100	10

物数量及土壤酶活性。

1.2.2 土壤微生物数量的测定方法^[12]

微生物数量的测定采用倒平板法计数,细菌、真菌、放线菌分别采用牛肉膏蛋白胨培养基,马丁氏培养基,高氏培养基。

1.2.3 土壤酶活性的测定方法^[13]

蔗糖酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定,蛋白酶采用茚三酮比色法,脲酶活性测定采用比色法。

1.2.4 交互作用表示方法^[9]

乐果和 Cd^{2+} 单一处理之和 > 乐果- Cd^{2+} 复合污染时为拮抗效应;乐果和 Cd^{2+} 单一处理之和 < 丁草胺- Cd^{2+} 复合污染为协同效应。

1.3 实验数据分析

实验数据均为 3 次重复的平均值,采用 SPSS 13.0 作统计处理。

2 结果与讨论

2.1 乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物数量的影响

由图 1 可知, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果处理对于土壤中细菌的数量影响较小,浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果处理在试验第 12 d 后对细菌的数量影响也不显著;试验第 12 d, A、B 两处理分别为对照细菌数量的 0.95 及 0.96 倍;对土壤中的真菌生长而言, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果处理对其有微弱的抑制效应,而 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乐果处理抑制效应更显著。试验第 15 d 处理 A 和 B 的真菌数量抑制率仍达 15.93% 及 36.95%。随着培养时间的增加,这种抑制效应被减弱,试验期内真菌平均抑制率为 27.57% 及 38.08%。结果表明,各处理的放线菌生长情况与真菌类似, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果处理中放线菌生长被明显地抑制。试验第 12 d, 放线菌的数量仅为对照的 0.55 倍;而 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果处理影响较小。以 B 处理为例,试验期内乐果对于细菌、

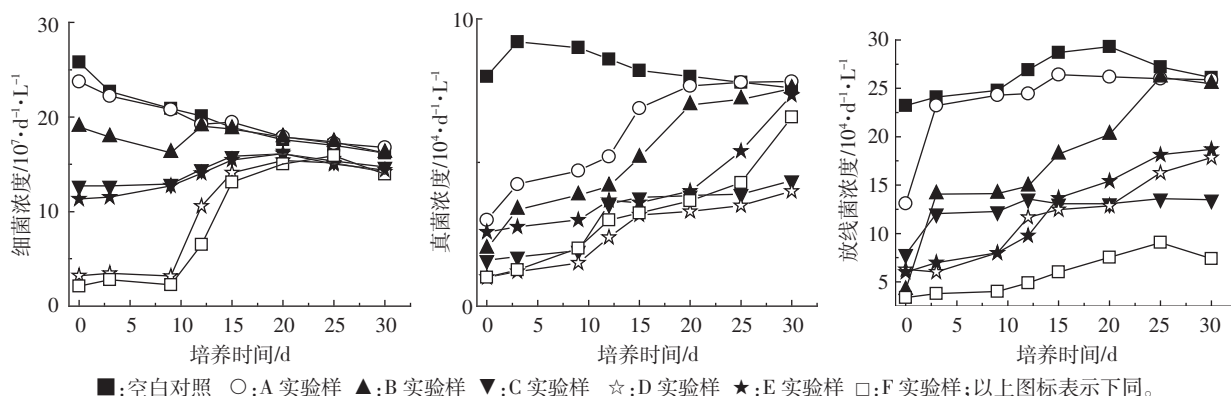
图1 乐果及 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物菌落形成单位 CFU 影响

Figure 1 Effect of cadmium and dimethoate combined pollution on microbial population in soil

放线菌、真菌的生长平均抑制率分别为 9.09%、35.63%、38.08%, 这表明乐果对土壤中微生物的抑制效应顺序为真菌>放线菌>细菌。

Cd^{2+} 的添加对土壤不同微生物的生长影响均有抑制效应, 且浓度越高这种抑制效应越明显。以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 的处理为例, 土壤在实验期内对真菌生长的平均抑制率为 69.06%, 而对细菌和放线菌的平均抑制率分别为 45.72% 和 57.10%, 即 Cd^{2+} 的添加使得土壤中微生物的抑制效应顺序为真菌>放线菌>细菌。

由图 1 可知, 乐果与 Cd^{2+} 的复合污染使得各类微生物的生长抑制效应明显, 且对于 3 类微生物 E 处理的抑制效应均小于处理 F。对处理样 F 的实验结果进行分析表明, 实验期内细菌、真菌和放线菌的平均抑制率分别为 50.23%、60.18%、73.38%, 即乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤中微生物的抑制效应顺序为放线菌>真菌>细菌。

土壤微生物种群数量和群落结构是表征土壤生态系统群落结构和稳定性的重要参数, 能较早地预测土壤环境污染状况的变化过程, 被认为是最有潜力的敏感性生物指标之一。重金属及有机污染物进入土壤环境后首先影响土壤微生物的生理生化活性, 进而对土壤微生物种群数量和种群结构会产生不同程度的影响, 这与本实验结果吻合。结合“r-K 策略”理论, 可能原因是不同地源土壤中存在可分解污染物的微生物数量差别较大, 同时不同污染物对土壤中的微生物毒害效应不一致而导致的结果^[14]。

2.2 乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤酶活性的影响

土壤蛋白酶是土壤中一种重要的胞外酶, 可水解土壤中蛋白质为短肽以及氨基酸作为植物的氮源之一, 从而参与土壤中的氮素循环, 作为反映土壤环境

质量的指标^[15]。

由图 2 可知, 所有处理的蛋白酶活性在实验早期均受到了抑制, 实验第 15 d 后该效应不明显。乐果单一污染的 A、B 两处理蛋白酶活性平均抑制率分别为 6.72% 和 18.76%, 抑制效应较弱; 复合污染的 E、F 两处理对蛋白酶活性抑制效应最强, 平均抑制率分别为 24.34% 和 32.36%。

据实验方法, 开展各处理对蔗糖酶活性的实验, 结果如图 2 所示。图 2 的结果表明, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度乐果的添加对于土壤蔗糖酶活性无显著影响, 实验期内平均酶活性的抑制率仅为 6.23%, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度的乐果对其有较明显地抑制效应; 培养第 12 d 蔗糖酶活性为对照的 0.852 7 倍; 从 E、F 两处理的曲线变化可知均比单一乐果污染和 Cd^{2+} 污染的抑制效应更明显, 实验期内平均酶活性抑制率为 18.78% 和 23.60%。

据实验方法, 测定了吸光度值(y)与 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度(x , 0.1 mg)关系的标准曲线, 相关方程为 $y=0.0059x+0.0031$ ($R^2=0.9938$)。从图 2 可知, 5 与 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 处理对于脲酶活性影响也不明显, 这与 Renella 等报道的实验结果一致^[16]。培养期间, 乐果处理的土壤脲酶活性仅受到微弱的抑制作用。培养期间该 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乐果处理样的最大抑制率仅为 7.27%, 而 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的乐果处理在实验期间脲酶活性的平均抑制率仅为 4.30%; 复合污染处理的 E、F 样对土壤脲酶活性有较好的抑制效应。培养第 6 d, 两处理的脲酶活性分别为 18.81% 和 29.03%。

5 及 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 的单一污染在试验期间对土壤中脲酶、蛋白酶、蔗糖酶活性均表现出抑制效应, 抑制效应顺序为脲酶>蔗糖酶>蛋白酶; 同时图 2 的结果

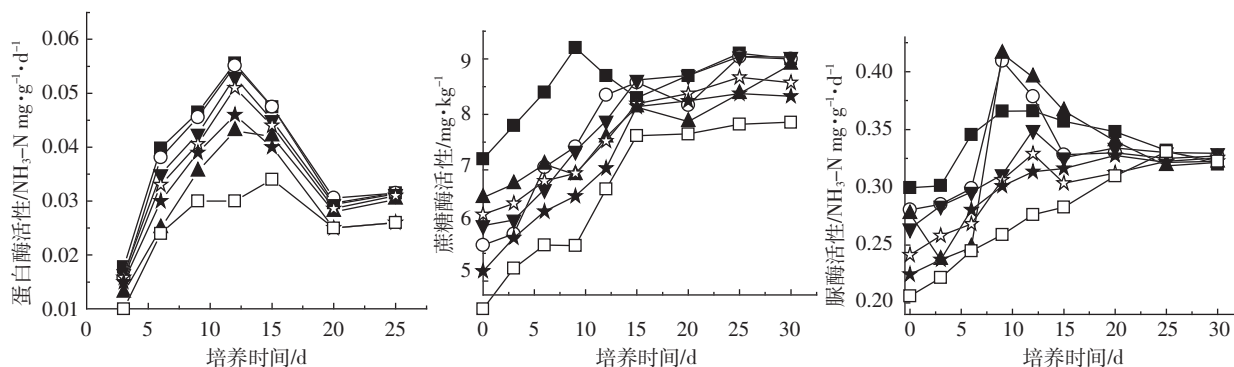
图 2 乐果及 Cd^{2+} 复合污染对土壤酶活性的影响

Figure 2 Effect of cadmium and dimethoate combined pollution on enzyme activities in soil

还表明 Cd^{2+} 对这些土壤酶活性的抑制效应随着 Cd^{2+} 浓度的提高而增强,但随着时间的增加而效应逐渐减弱。该结果的可能原因是由于重金属对土壤酶活性的抑制作用是其与酶分子中的活性部位即巯基和含咪唑的配体等结合,形成了较稳定的络合物,产生了与底物的竞争性抑制作用或者是由于重金属抑制了土壤微生物的生长和繁殖,减少体内酶的合成和分泌,最后导致了土壤酶活性下降^[17]。

2.3 乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物数量和酶活性的交互作用

复合污染中污染物的总浓度要比单一污染高,因此复合污染物的污染效应更高;但是复合污染效应不是单一污染效应的简单相加,复合污染物之间存在复杂的交互作用。因此为了掌握乐果与 Cd^{2+} 的交互作用,据实验方法采用 B、D、F 3 个处理的平均抑制率为指标来分析乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物数量和酶活性的交互作用,结果如表 2 所示。表 2 结果表明,复合污染对于土壤中的酶活性抑制顺序为蛋白酶>蔗糖酶>脲酶,对土壤微生物的抑制顺序为放线菌>真菌>细菌;对土壤微生物复合物的交互作用表现

为拮抗,而对土壤酶活性的交互作用则为协同效应。

研究认为,交互作用的原因可能与重金属和有机物形成有机络合有关,这些络合物将显著改变重金属以及有机污染物在土壤中的物理化学行为,使得土壤表面对重金属的保持能力、水溶性、生物有效性等发生一系列的影响;也可能是因为土壤微生物使污染物之间交互作用发生改变^[18]。也有学者认为一些脂溶性化合物可以同微生物细胞膜上脂溶性分子结合,从而影响了细胞膜的结构和穿透性,因此,受农药污染的土壤中重金属很容易进入微生物细胞,从而干扰其正常的功能^[19]。

3 结论

(1) 试验期内,低浓度的乐果处理中土壤微生物数量与对照差别较小,而 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 乐果处理对土壤微生物数量和酶活性有较显著的抑制效应,抑制效应顺序为真菌>放线菌>细菌,蛋白酶>蔗糖酶>脲酶。

(2) Cd^{2+} 的添加使土壤微生物数量和土壤酶活性得到抑制,且这种抑制效应随着 Cd^{2+} 的浓度增加而增强。抑制效应顺序为真菌>放线菌>细菌,脲酶>蔗糖酶>蛋白酶。

(3) Cd^{2+} 与乐果复合污染对土壤微生物的交互作用表现为拮抗,而对土壤酶活性的交互作用则为协同效应。

参考文献:

- [1] Shi W, Becker J, Bischoff M, et al. Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, 68(8):3859–3866.
- [2] Stuczynski T I, Mc Carty G W, Siebielec G. Response of soil microbiological activities to cadmium, leads, and zinc salt amendments[J]. *J En-*

表 2 乐果与 Cd^{2+} 复合污染对土壤微生物数量和酶活性的交互作用

Table 2 Interaction between cadmium and dimethoate on microbial population and enzyme activities in soil

生物学指标 平均抑制率/%	试 验 样				交互 作用
	B	D	F(测定结果)	F(理论值)	
细菌数量	9.09	45.72	50.23	54.81	拮抗
真菌数量	38.08	69.06	61.18	107.14	拮抗
放线菌数量	35.63	57.10	78.38	92.73	拮抗
蛋白酶活性	18.76	8.81	32.36	27.56	协同
蔗糖酶活性	10.77	11.5	23.60	22.25	协同
脲酶活性	4.30	12.08	16.38	19.08	协同

- viron Qual*, 2003, 32:1346–1355.
- [3] Min H, Chen Z Y, Zhao Y H, et al. Effects of trifluralin on soil microbial populations and the nitrogen fixation activities[J]. *J Environ Sci Health*, 2001, 36(5):569–579.
- [4] Valeria Labud, Carlos Garcia, Teresa Hernandez. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil[J]. *Chemosphere*, 2007, 66:1863–1871.
- [5] M Ros, M Goberna, J L Moreno, et al. Molecular and physiological bacteria diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine[J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(2–3):93–102.
- [6] Alexandre G S P, Claudio A. Effect of the pesticide 2, 4-D-micro-bial activity of the soil monitored by micocalorimetry[J]. *Thermochimica Acta*, 2000, 349:17–22.
- [7] Jose L Moreno, Asuncion Aliaga, Simon Navarro, et al. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35:120–127.
- [8] 邹小明, 朱立成, 肖春玲, 等. 三唑磷的土壤微生物生态效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1):238–242.
- ZOU Xiao-ming, ZHU Li-cheng, XIAO Chun-ling, et al. Ecological effect of triazophos on soil microbe [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1):238–242.
- [9] 沈国清, 陆贻通, 洪静波, 等. 菲和镉复合污染对土壤微生物的生态毒理效应[J]. 环境化学, 2005, 24(6):662–665.
- SHEN Guo-qing, LU Yi-tong, HONG Jing-bo, et al. Ecological effect of phenanthrene and Cd combined pollution on soil microbe[J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 24(6):662–665.
- [10] 张倩茹, 周启星, 张惠文, 等. 乙草胺-铜离子复合污染对黑土农田生态系统中土著细菌群落的影响[J]. 环境科学学报, 2004, 24(2):326–332.
- ZHANG Qian-ru, ZHOU Qi-xing, ZHANG Hui-wen, et al. Joint effects of acetochlor and Cu on indigenous bacterial communities in phaeozem[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*. 2004, 24(2):326–332.
- [11] 侯宪文, 吴建军, 徐建明. 铅-苄嘧磺隆对土壤微生物活性与群落结构的影响[J]. 中国环境科学, 2007, 27(6):738–742.
- HOU Xian-wen, WU Jian-jun, XU Jian-ming. The influence of lead-bensulfuron-methyl complex pollution on soil microbial activities and community structure[J]. *China Environmental Science*, 2007, 27(6):738–742.
- [12] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京:科学出版社, 1985:44–58.
- Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science. Research methods of soil microbe[M]. Beijing:Science Press, 1985:44–58.
- [13] 关松荫, 张德生, 张志明. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社, 1986.
- GUAN Song-yin, ZHANG De-sheng, ZHANG Zhi-ming. Soil enzymes and their study methods[M]. Beijing:Agricultural Press, 1986.
- [14] Pianka ER. On r- and K-Selection[J]. *Am Nat*, 1970, 104:592–597.
- [15] Garcia C, Hernandez T. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion[J]. *Soil Biology Biochemistry*, 1997, 29(2):171–177.
- [16] Renellaa G, Menchb M, Leliec D. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils[J]. *Soil Biol Biochem*, 2004, 36:443–451.
- [17] 刘树庆. 保定市污灌区土壤的 Pb、Cd 污染与土壤酶活性关系研究[J]. 土壤学报, 1996, 33(2):175–182.
- LIU Shu-qing. Relationship between soil Pb and Cd pollution and enzyme activities in waste water irrigated area of Baoding City[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1996, 33(2):175–182.
- [18] 周东美, 王慎强, 陈怀满. 土壤中有机污染物-重金属复合污染的交互作用[J]. 土壤与环境, 2000, 9(2):143–145.
- ZHOU Dong-mei, WANG Shen-qiang, CHEN Huai-man. Interaction of organic pollutants and heavy metal in soil[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2000, 9(2):143–145.
- [19] Sikkema J, De Bont J A M, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membrane[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269:8022–8028.