

Cd胁迫对淹水稻田土壤微生物种群数量的影响

段学军¹, 盛清涛², 闵 航³

(1.中原工学院能源与环境工程系, 河南 郑州 450007;2.太原理工大学, 山西 太原 030024;3.浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘 要:采用传统培养方法及改良的亨格特(Hungate)厌氧技术,在实验室条件下,通过液体培养 MPN 法及滚管固体培养法系统研究了不同浓度重金属 Cd 对稻田土壤中各好氧、厌氧微生物类群的种群数量影响及其动态变化过程。结果表明,好氧微生物中以放线菌所受抑制最大,真菌次之,细菌最小,在最大抑制期其抑制率分别为 71.65%、60.62%、50.73%。在厌氧微生物类群中,各类菌群的变化趋势不尽相同,以产甲烷细菌对 Cd 最为敏感,厌氧固氮菌、产氢产乙酸细菌次之,而反硝化细菌、水解发酵性细菌影响相对较小。针对淹水稻田土壤特殊的生态环境,可以选择敏感厌氧菌群产甲烷细菌、厌氧固氮菌、产氢产乙酸细菌作为稻田土壤受重金属 Cd 胁迫的指标。

关键词:Cd 污染; 稻田土壤; 微生物种群数量

中图分类号:X171.1; S154.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)03-0432-06

Effects of Cd²⁺ on Microbial Populations in Submerged Paddy Soil

DUAN Xue-jun¹, SHENG Qing-tao², MIN Hang³

(1.Department of Energy and Environment Engineering, Zhongyuan Institute of Technology, Zhengzhou 450007, China;

2. Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 3. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract:With traditional culture method and improved Hungate anaerobic technique, the influence of Cd²⁺ on the numbers of anaerobic and aerobic microbial populations in submerged paddy soil was studied by the MPN (the Most Probable Number) method and the roll tube method. The results showed that the order of the aerobic microorganisms inhibited by cadmium was actinomycetes>fungi>bacteria, with the maximum inhibition rates of 71.65%, 60.62% and 50.73, respectively. Among the anaerobic bacteria populations, the methane-producing bacteria were most sensitive to Cd²⁺, the second was the anaerobic nitrogen-fixing bacteria and the hydrogen-producing acetogenic bacteria. The inhibition of Cd²⁺ to the denitrifying and the hydrolytic-fermentative bacteria was slightly weaker. Hydrogen-producing acetogenic bacteria, anaerobic nitrogen-fixing bacteria and methane-producing bacteria could be known as the sensitive anaerobic bacteria population indexes to indicate the contamination degree of paddy soil by Cd²⁺.

Keywords: cadmium; submerged paddy soil; microbial population

随着人们对重金属胁迫下的土壤微生物变化的了解日渐加深,应用微生物学指标评价重金属污染土壤的质量已成为当今土壤环境生物学的一个热点^[1,8]。稻田土壤由于其独特的厌氧生态环境,微生物受重金属胁迫的类型与程度均异于旱地农田生态系统。研究者多专注于不同重金属污染胁迫对旱地土壤微

生物种群数量数量的影响,但对淹水土壤中厌氧微生物的系统研究国内外均少见报道^[1,2,7,10,11]。

本文报道不同程度的外源重金属 Cd 胁迫对淹水稻田土壤微生物主要是厌氧微生物种群的数量动态变化过程的影响,为稻田土壤重金属环境质量指标的确定和以厌氧微生物作为判断稻田土壤重金属 Cd 污染程度的早期预测预报指标提供基础资料,同时通过对 Cd 胁迫下厌氧微生物种群变化的了解,也可为Cd 污染稻田土的生物修复提供依据。

收稿日期:2004-09-06

基金项目:国家科技部社会公益研究专项资金项目(177-2-3)

作者简介:段学军(1969—),男,山西祁县人,副教授,博士,主要从事土壤与环境微生物学的研究。E-mail:djxsqy@163.com

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本研究所用土壤为发育于第四纪红粘土母质的黄棕稻田土,采自中国农科院江西国家黄棕土肥力与肥料效益监测基地,它们的有关理化性状见表 1。取回风干,过 3 mm 筛,充分混匀后备用。

1.2 试验设计与实施

试验采用 10 cm×15 cm 塑料桶,每盆装土 1.3 kg,加水使土壤保持淹水状态,置于 28 ℃恒温预培养

表 1 供试土壤的理化性状

Table 1 Physic-chemical properties of the soil

全 N /g · kg ⁻¹	碱解 N /mg · kg ⁻¹	全 K /g · kg ⁻¹	速效 P /mg · kg ⁻¹	全 K /g · kg ⁻¹	速效 K /mg · kg ⁻¹	有机质 /g · kg ⁻¹	pH
0.966	78.4	1.1	15.37	19.6	147.3	25.1	5.9

细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基;真菌采用加有氯霉素和孟加拉红的马丁氏培养基;放线菌采用淀粉铵盐培养基^[3]。

反硝化细菌(DNB)基础培养基组成:酒石酸钾钠 20 g, K₂HPO₄ 0.6 g, KNO₃ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

水解发酵性细菌(AFB)基础培养基组成:葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 3g, 半胱氨酸 0.5 g, 刃天青 0.002 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

产氢产乙酸细菌 (HPAB) 基础培养基组成: CH₃CH₂COONa 30 mmol, CH₃(CH₂)₂COONa 30 mmol, 乳酸钠 30 mmol, 琥珀酸钠 30 mmol, CH₃CH₂OH 30 mmol, 酵母膏 2 g, MgCl₂ 0.1 g, NH₄Cl 1 g, K₂HPO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 0.4 g, 半胱氨酸 0.5 g, 刃天青 0.002 g, 微量元素 10 mL, 土壤浸出液 300 mL, 蒸馏水 690 mL, pH 7.0~7.3。

产甲烷细菌基础培养基组成:HCOONa 5 g, CH₃COONa 5 g, CH₃OH 5 mL, H₂/CO₂ 80/20 体积比充满试管空间, MgCl₂ 0.1 g, NH₄Cl 1 g, K₂HPO₄ 0.4 g, KH₂PO₄ 0.4 g, 土壤浸出液 300 mL, 半胱氨酸 0.5 g, 刃天青 0.002 g, 微量元素 10 mL, 蒸馏水 690 mL, pH 7.0~7.3。

厌氧固氮细菌基础培养基组成: KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.8 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, FeCl₃ 微量, Na₂MoO₄·2H₂O 微量, CaSO₄·2H₂O 0.1 g, 甘露醇 10.0 g, 琼脂(进口)20 g, 蒸馏水 1 000 mL^[6]。

1.3.2 培养基的配制和计数

好氧细菌、真菌、放线菌采用固体平板稀释涂布

两周,进行微生物特别是厌氧微生物的复壮,之后加入不同浓度的 Cd。试剂为分析纯 CdCl₂·5H₂O。试验设 5 个处理, Cd²⁺含量分别为 0.5、1.0、3.0、5.0 mg·kg⁻¹ 土, Cd²⁺以溶液形式分别按用量加入土样中,充分搅拌均匀,分别在培养 7、14、21、28、42 和 84 d 时,取样测定稻田土的好氧及厌氧微生物种群数量。在整个培养时期内,随时补加水,使水位始终保持高于土壤 1~2 cm,以模拟水田中的厌氧环境。

1.3 测定及计算方法

1.3.1 计数微生物基础培养基组成

培养计数法^[3]。

厌氧培养基按各自配方采用亨格特厌氧装置配制, AFB、HPAB、产甲烷细菌、DNB 采用液体培养 MPN 法, 厌氧固氮菌采用滚管法固体培养计数法。计数用土壤以 10 倍系列稀释法接种, 28 ℃培养。DNB、AFB、厌氧固氮菌培养时间为 7 d, HPAB 培养时间为 14 d, 产甲烷细菌培养时间为 30 d。DNB 以观察杜氏小管内有无气泡计数, AFB、HPAB、产甲烷细菌的生长指标以肉眼观察其混浊度, 同时辅以 102G 型气相色谱仪定性检测有无 H₂、CH₄ 产生, 用 MPN 法计数, 厌氧固氮细菌直接对试管内菌落进行计数^[4,5]。

1.4 数据分析

所有试验数据均为 3 次重复的平均值, 数据分析用 SPSS 10.0 for windows 分析软件, 北京希望电子出版社电子版。

2 结果与讨论

2.1 Cd 处理不同时期土壤全 Cd 及有效 Cd 的变化

表 2、表 3 所示为不同浓度 Cd 处理后淹水稻田土壤土壤培养不同时期土壤全 Cd 及有效 Cd 的含量, 土壤全 Cd 含量在整个培养期内变化不大, 基本维持在同一水平, 仅由于土壤水分及 pH 值的变化在一个很小的范围波动; 而土壤有效态 Cd 则随着培养时间的延长而逐渐下降, 与旱地土壤相似, 但在 21 d 以后下降幅度明显减小, 至 42 d 时基本达到稳定, 相对于旱地土壤其形态转换时间缩短。

2.2 Cd²⁺胁迫对好氧微生物种群数量的影响

3 大类群微生物在受到 Cd 胁迫时其原有的生态

表 2 不同处理土壤全 Cd 含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 2 The total Cd contents of different treatment soils

培养时间/d	CK	A	B	C	D
7	0.218	0.72	1.32	3.78	4.92
14	0.237	0.754	1.18	3.64	4.8
21	0.241	0.706	1.14	4.08	5.18
28	0.205	0.714	1.26	3.44	5.08
42	0.221	0.699	1.15	2.92	5.22
84	0.226	0.682	1.17	0.948	5.09

注:表中 CK、A、B、C、D 分别表示 Cd^{2+} 添加量为 0、0.5、1.0、3.0、5.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 干土 5 个处理。

表 3 不同处理土壤速效 Cd 含量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 3 The available Cd contents of different treatment soils

培养时间/d	CK	A	B	C	D
7	0.098 3	0.123 8	0.130 6	0.128 9	0.139 8
14	0.095 0	0.123 7	0.126 8	0.127 8	0.131 8
21	0.090 3	0.113 7	0.126 9	0.127 3	0.131 5
28	0.094 5	0.111 6	0.118 2	0.124 3	0.127 5
42	0.094 6	0.108 2	0.098 2	0.111 8	0.130 5
84	0.091 9	0.108 7	0.107 6	0.112 8	0.121 5

状况会发生变化,并表现出一定的受害现象^[2,10]。图 1~3 表明,土壤好气微生物受重金属 Cd 胁迫的程度随着 Cd 添加浓度的不同而有一定差异。低浓度 Cd 对土壤细菌有一定的刺激作用,随着 Cd 浓度的增加,细菌数量开始受到抑制,真菌、放线菌则在整个 Cd 添加浓度内均呈现抑制效应。抑制程度各有不同,放线菌最大,真菌次之,细菌最小,最大抑制率分别为 71.65%、60.62%、50.73%。这与旱田土壤相关研究报道有一定差异^[1]。判断与淹水稻田土特殊的生态环境有关,淹水初期 3 大类群微生物数量都有下降,之后细菌数量相对较为稳定,而真菌、放线菌由于其好氧性的特性,其数量在经过一个稳定期后会持续降低,这一特征在一定程度上掩盖了 Cd 对细菌的数量影响,致使重金属对细菌的影响弱于真菌。同时,三者抑制率与土壤添加 Cd 的某些浓度并不呈绝对的正相关关系,在一定的浓度范围内会出现 Cd 浓度增大而抑制率减小的现象。这与已有的重金属对旱田土壤微生物种群数量的影响研究结果相一致^[2],统计分析表明,不同处理间的微生物数量差异在处理前期均达到极显著水平 ($P<0.01$)。随着时间的推移,3 大类群微生物均有不同程度的数量回升,时间一般出现在土壤重金属处理后的

14~28 d,之后逐渐稳定,不同处理间的微生物数量差异在处理前期均达显著水平 ($P<0.05$)。对不同处理土壤有效 Cd 含量与各种群数量进行相关性分析,结果表明 Cd 对放线菌数量的影响与其有效态浓度相关:

$$Y=-121.68X+35.634,r^2=0.879\ 6$$

对真菌与细菌的影响也与有效 Cd 浓度有一定相关性。

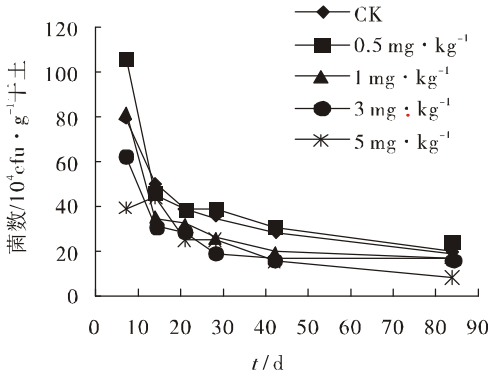


图 1 Cd^{2+} 对稻田土壤细菌数量的影响
Figure 1 Effect of Cd^{2+} on the amount of bacteria in paddy soil

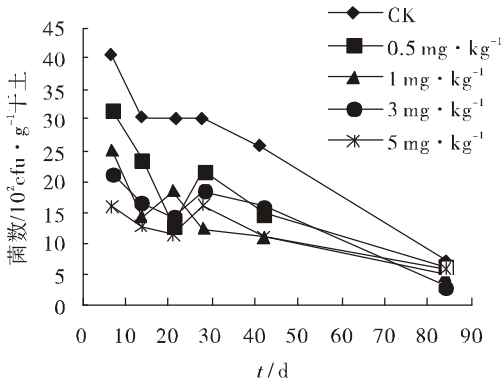


图 2 Cd^{2+} 对稻田土壤真菌数量的影响
Figure 2 Effect of Cd^{2+} on the amount of fungi in paddy soil

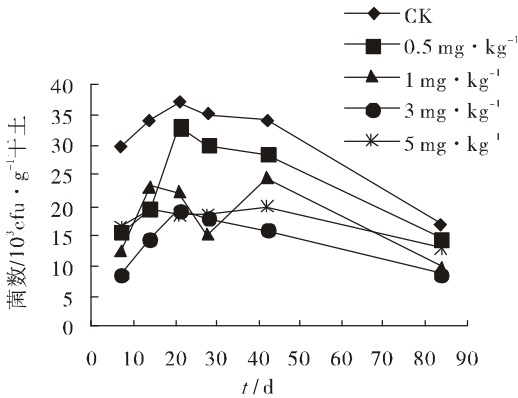


图 3 Cd^{2+} 对稻田土壤放线菌数量的影响
Figure 3 Effect of Cd^{2+} on the amount of actinomycetes in paddy soil

2.3 Cd²⁺胁迫对水解发酵性细菌(AFB)种群数量的影响

由图 4 可见,在处理初期,AFB 数量明显下降,表明 Cd 浓度对 AFB 数量的影响比较大,初期数量与 Cd 添加浓度成反比,随后数量又渐增。土壤处理 14 d 后随着有效态 Cd 浓度的降低,抑制程度会有所减弱,至 28 d 时,最大抑制率已由原来的 83.76% 下降为 39.34%。同时低浓度 Cd 对 AFB 呈现一定的刺激作用。至土壤处理后后期,当所有变化趋于稳定时,仍呈现出细菌数量随 Cd 添加浓度的增加而下降的趋势,仅在 Cd 浓度为 5 mg·kg⁻¹ 时抑制率明显降低。对 AFB 试验数据进行方差分析结果显示,按 0.05 检验水平,各处理土样 AFB 数量的均数之间无明显差异,表明 Cd 对水解发酵性细菌具有一定的影响,但同时也会有 Cd 抗性菌株的出现。

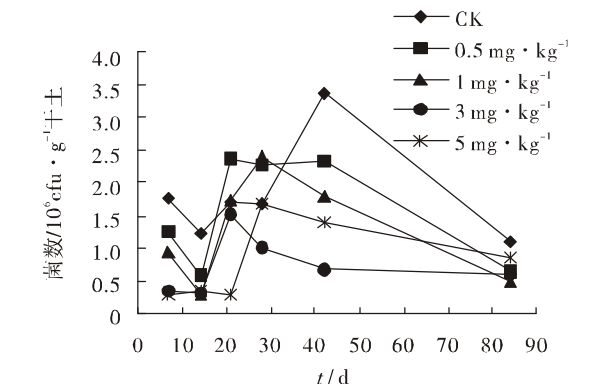


图 4 Cd²⁺对稻田土壤水解发酵性细菌数量的影响
Figure 4 Effect of Cd²⁺ on the number of the hydrolytic-fermentative bacteria in paddy soil

2.4 Cd²⁺胁迫对反硝化细菌(DNB)种群数量的影响

图 5 表明,Cd 胁迫稻田土壤 DNB 的数量与 AFB 具有相似的变化趋势,均为处理前期随着 Cd 浓度增加,细菌数量逐渐减小,但 Cd 对 DNB 的抑制要高于 AFB,Cd 浓度为 5 mg·kg⁻¹ 干土时,其抑制率达 87.51%,之后随着有效 Cd 含量的减小,抑制逐渐减轻。在土壤处理 21~42 d 时,DNB 数量呈现明显增加的态势。至 84 d 时 Cd 对其数量仍有明显影响,Cd 浓度为 5 mg·kg⁻¹ 干土时抑制率仍维持在 30.07%。在处理 21~42 d,Cd 浓度为 0.5 及 1.0 mg·kg⁻¹ 干土时 DNB 数量要高于对照,可见微量的有效 Cd 对其有一定刺激作用,且对 Cd 浓度的变化较为敏感。经 *t* 检验表明,各处理土样与对照土样 DNB 数量相比,在 *P*=0.05 水平下差异显著。

2.5 Cd²⁺胁迫对产氢产乙酸细菌种群数量的影响

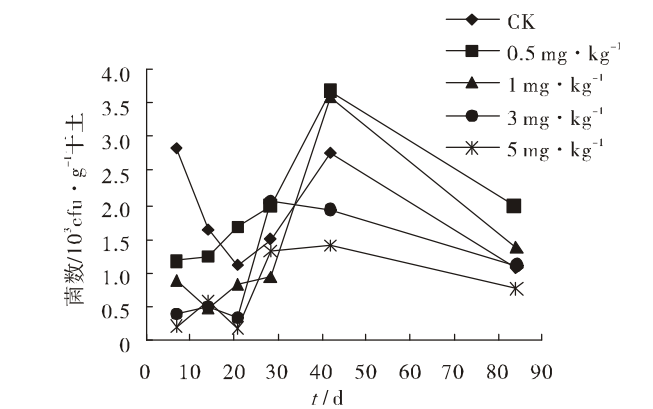


图 5 Cd²⁺对稻田土壤反硝化细菌数量的影响
Figure 5 Effect of Cd²⁺ on the amount of denitrifying bacteria in paddy soil

产氢产乙酸细菌(HPAB)对 Cd 非常敏感,Cd 添加量仅为 0.5 mg·kg⁻¹ 干土时即呈现较为强烈的抑制作用,其数量仅为对照的 41.52%。但随着 Cd 浓度的增加,抑制作用减缓,Cd 浓度为 5 mg·kg⁻¹ 干土时出现负抑制。随着培养时间的延长(14~28 d),菌数均有一定的增加,推测为有效态 Cd 浓度变化及抗性细菌数量增长所致,其后细菌数量相对较为稳定。Cd 浓度为 5 mg·

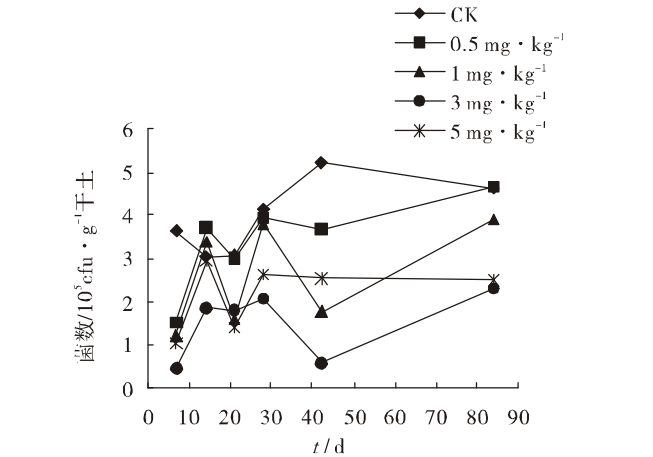


图 6 Cd²⁺对稻田土壤产氢产乙酸细菌数量的影响
Figure 6 Effect of Cd²⁺ on the amount of hydrogen-producing acetogenic bacteria in paddy soil

kg⁻¹ 时抑制率一直保持在 46.48%~51.37%之间,见图 6。各处理土样与对照相比差异达极显著水平 (*P*=0.01),表明以 HPAB 来表征稻田土壤 Cd 污染是一个较为稳定的指标,可能有较好的实际应用价值。

2.6 Cd²⁺胁迫对产甲烷细菌种群数量的影响

图 7 显示出稻田土壤产甲烷细菌在不同浓度 Cd 胁迫下的数量变化。处理前期,随着 Cd 添加量的逐步增多,产甲烷细菌数量急剧下降,至 5 mg·kg⁻¹ 时抑制率可达 92.03%,说明 Cd 对产甲烷细菌具有极强的毒

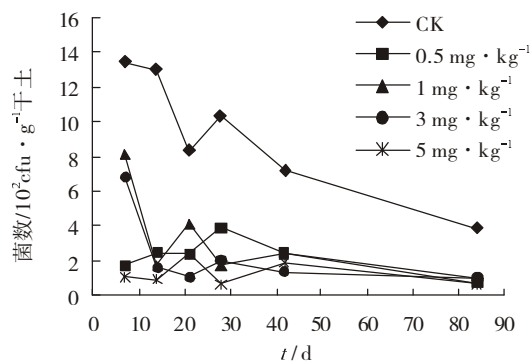


图 7 Cd²⁺对稻田土壤产甲烷细菌数量的影响

Figure 7 Effect of Cd²⁺ on the number of methane producing bacteria in paddy soil

性。随着时间的延长,对照土壤产甲烷细菌数量缓慢下降,各处理土样在处理 14~42 d 时虽有数量的小幅回升,但都仍明显小于对照,抑制率基本保持在 71.66% 以上,至处理 84 d 时,仍是如此,差异极显著 ($P<0.01$) 水平。可以认为,产甲烷细菌作为稻田土壤中一种典型的厌氧微生物类群,是一类对 Cd 污染非常敏感的适合指示菌群。

2.7 Cd²⁺胁迫对厌氧固氮细菌种群数量的影响

大量研究结果表明,固氮菌是旱地土壤中一种对重金属较为敏感的微生物类群,可作为有效的诊断指标用于表征土壤的重金属胁迫程度^[2,7,10]。图 8 显示,在稻田厌氧环境下,厌氧固氮菌同样对 Cd 胁迫较为敏感。在整个培养期间,固氮菌数量虽然也经历一个由于有效 Cd 浓度变化导致的数量增长,但抑制率未发生明显改变,维持在 67.24%~76.39% 之间。而且由于厌氧固氮菌在维持土壤正常的氮素循环中具有重要作用,进一步研究其在 Cd 胁迫下的生理变化及毒性机理将具有一定现实意义。

2.8 Cd²⁺胁迫下各微生物种群的综合因子分析

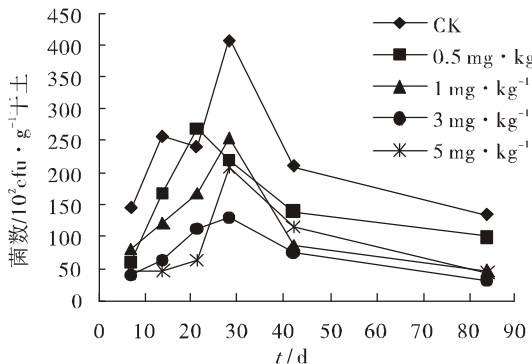


图 8 Cd²⁺对稻田土壤厌氧固氮细菌数量的影响

Figure 8 Effect of Cd²⁺ on the number of anaerobic nitrogen-fixing bacteria in paddy soil

表 4 土壤微生物种群数量与重金属含量的相关关系分析

项目	metals in soil	
	全 Cd	有效 Cd
细菌	-0.3578	-0.6501*
真菌	-0.4866	-0.6632*
放线菌	-0.6290*	-0.8419**
水解发酵性细菌	-0.3502	-0.5133
反硝化细菌	-0.2988	-0.4695
产氢产乙酸细菌	-0.5312	-0.7845**
产甲烷细菌	-0.5677	-0.8988**
厌氧固氮菌	-0.6059	-0.8544**

注: $r_{0.05}=0.629^*(P<0.05)$; $r_{0.01}=0.783^{**}(P<0.01)$ 。

为了进一步确定可以敏感的表征淹水稻田土壤 Cd 胁迫的微生物指标,进行了土壤全 Cd、有效 Cd 含量与各好氧、厌氧微生物数量之间的相关关系分析,其结果如表 4 所示。不同微生物对土壤 Cd 胁迫的反应具有比较明显的差异,土壤放线菌、产甲烷细菌、厌氧固氮菌、产氢产乙酸细菌与土壤全 Cd、有效 Cd 含量之间呈现显著或极显著的负相关关系,能较灵敏的反应土壤重金属 Cd 的污染状况,可以作为淹水条件下 Cd 污染的生物学指标,为污染环境生物监测提供依据。综合上述指标与相应的土壤 Cd 含量数据,以对各敏感微生物种群数量抑制率大于 50% 为指标^[11],确定本试验条件下,淹水稻田土壤 Cd 胁迫的临界值为 1~5 mg · kg⁻¹。

3 结论

综上所述,淹水条件下稻田土壤各微生物类群对不同浓度的 Cd 胁迫具有各自不同的反应。好氧微生物中以放线菌所受抑制最大,真菌次之,细菌最小,最大抑制期时抑制率分别为 71.65%、60.62%、50.73%。在厌氧微生物类群中,各菌群的变化趋势不尽相同, Cd 对稻田土壤各微生物类群的影响在污染初期最大,随着时间的延长,在处理 14~28 d,各处理土壤菌群数量都有幅度不同的回升,至微生物种群数量达到稳定时,以产甲烷细菌对 Cd 最为敏感,厌氧固氮菌、产氢产乙酸细菌次之,而反硝化细菌、水解发酵性细菌影响相对较小。土壤中敏感微生物种群数量的变化在很大程度上可以反映出淹水条件下重金属污染水稻田土壤的微生物生态变化,可以较为灵敏地指示环境质量的变化,利用其作为确定淹水稻田土中 Cd 的生物毒性及临界浓度是可行的,建议选择产甲烷细菌、厌氧固氮菌、产氢产乙酸细菌等敏感厌氧菌群的数量变化作为稻田土壤受重金属 Cd 胁迫的指标。

参考文献:

- [1] Giller K E,Witter E,Mcgrath S.Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review[J].*Soil Biochemistry*,1998,30: 1389–1414.
- [2] Hattori H.Influence of heavy metals on soil microbial activities[J].*Soil Science and Plant Nutrition*,1992,38:93–100.
- [3] 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996.28–37.
- [4] Min H,Chen M–C,Zhao Y–H.Anaerobic Microbiology[M].Hangzhou:Zhejiang University Press,1993.8–23.
- [5] Min hang.Microbiol Research Techniques[N].Beijing:Science press,1999.
- [6] Min Y–F, Ye Zh–Y.Effects of butachlor on microbial populations and enzyme activities in paddy soil[J].*J Environ Sci Health*,2001,B36(5): 581–595.
- [7] Ruth–Anne S,Vigdis T.Analysis of bacterial communities in heavy metal–contaminated soils at deferent levels of resolution[J].*Microbiology Ecology*,1999,30:237–251.
- [8] Wenderoth D F,Reber H H.Development and comparison of methods to estimate the catabolic versatility of metal–affected soil microbial communities[J].*Soil Biology Biochemistry*,1999,31:1793–1802
- [9] Wong,S C,Li X D,Zhang G,et al.Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China[J].*Environmental Pollution*,2002,119:33–44.
- [10] 夏增禄主编.中国土壤环境容量[M].北京:地震出版社,1992.
- [11] 张美庆,王幼珊.土壤重金属污染指示菌的研究[A].土壤环境容量及其信息系统[C].北京:气象出版社,1991.