

土壤中镉、砷、铅的微生物效应及其临界值

顾宗谦 谢思琴 吴留松 周德智 孙汉中 李勳光

(中国科学院南京土壤研究所)

旭 军 顾淑华

(湖南省环境保护研究所)

摘 要

测试了盆栽(水稻)土壤添加 Cd, As, Pb 对土壤微生物的效应。确定了真菌、放线菌、细菌以及硝化细菌在供试浓度范围内呈现显著刺激效应或显著抑制效应的浓度范围。计算了各类菌的 ED_{50} 值, 据此确定, 三元素对菌的毒性大小顺序为: $As > Cd > Pb$ 。还测定了 Cd, As, Pb 对明亮发光杆菌 T, 变种的效应。在盆栽试验中, 发光度与土壤添加金属浓度呈显著高度负相关。在大田调查中, 发光度与土壤可提取性金属浓度呈显著高度 (Cd) 或中度 (As, Pb) 负相关。

通过盆栽试验证明, T, 发光度 100% 和 80% 可作为二个级别的临界发光度, 从而估算出相应的添加金属临界浓度。

若从 T, 临界发光度 100% 预测污染土壤可提取性金属临界浓度与容量, 可望得到满意的结果。

重金属对微生物的效应早已有研究。60 年代初, Somers 曾体外测定了 24 种金属阳离子对二种真菌的杀菌活性。至 70 年代, 人们已开始注意从生产活动中出现的环境问题研究重金属对土壤微生物的影响, 例如, Jordan 等^[6]就研究了炼锌厂散落物对森林土壤微生物区系的影响。80 年代初, Williams 等^[7]进一步对可被 DTPA-TEA 提取的土壤 Cd 浓度与微生物群体数量的相关性作了研究。

然而, 以往的研究均未以探讨土壤重金属容量为目标来求取可标志某种土壤重金属临界含量的微生物指标, 为此目的, 我们于 1983—1985 年, 对该一问题作了专门探讨。

一、材料和方法

(一) 盆栽试验 (1) 土壤 + Cd ($CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$): 取江西省全南县大吉山钨矿背景区红壤性

水稻土, 风干混合后分成若干份装盆, 每盆 3 公斤, 并按以下系列浓度加 Cd: 0, 1, 3, 5, 10, 30, 60, 100, 200 ppm (毫克/公斤土)。栽种晚稻。(2) 土壤 + As [$Ca_3(AsO_4)_2 \cdot 14H_2O$]: 用上述土壤和方法按以下系列浓度加 As: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 100, 200 ppm (毫克/公斤土)。栽种晚稻。(3) 土壤 + Pb ($PbCl_2$): 取湖南省临湘县桃林铅锌矿背景区红壤性水稻土, 同上法按以下系列浓度加 Pb: 0, 250, 750, 1000,

2000, 3000, 4000 ppm (毫克/公斤土)。栽种早稻。

各处理每一浓度重复三次。水稻分蘖期取土样, 进行微生物计数和测定发光菌毒性。

(二) 大田调查 分别在江西省全南县大吉山钨矿和湖南省临湘县桃林铅锌矿所在地的红壤性水稻土污染区和背景区进行调查, 于晚稻收割后取耕层土样, 测定土壤对发光菌的生物毒性, 并统计后者与土壤可提取性 Cd, As (江西) 和 Pb (湖南) 浓度的相关性。

土壤可提取 Cd, Pb 和糙米 Cd, Pb 含量用原子吸收分光光度计测定; 土壤可提取性 As 和糙米 As 含量用双道氢化物无色散原子荧光分析仪测定。

(三) 土壤微生物效应的测定方法 真菌计数用马丁-孟加拉红琼脂培养基^[1], 28℃ 培养 3 天。放线菌计数用高氏一号琼脂培养基^[2], 28℃ 培养 10 天。细菌计数用清蛋白钠琼脂培养基^[3], 28℃ 培养 4 天。用 Stephenson 培养基^[3]稀释法测定亚硝酸细菌数并视为硝化细菌数, 28℃ 培养 14 天。明亮发光杆菌 T₁ 变种发光度用生物发光计法^[4]测定, 土样均用水浸液(水土比为 1:1) 测定。

二、结果和讨论

(一) 土壤添加 Cd, As, Pb 对微生物的效应

在供试浓度范围内, 盆栽水稻土壤添加 Cd, As, Pb 后, 土壤真菌、放线菌、细菌、硝化细菌的数量见表 1。从该表可知, 尽管真菌、放线菌、细菌数量与 Cd, As, Pb 浓度均负相关, 但这种相关均未达到显著 ($P < 0.01$) 水平, Pb 与细菌甚至呈显著正相关, 表现 Pb 对细菌群体有显著刺激作用。

Maliszewska^[9-14] 等于 1972—1985 年, 曾先后在 6 篇文章中介绍铅、锌、铜、砷、汞五种金属对土壤微生物影响的研究成果, 同样未获得土壤中微生物数量与添加金属浓度呈显著负相关的例证。

为了对不同添加浓度下 Cd, As, Pb 对土壤三大类菌数量的效应作出评价, 特求出各元素的某一组处理与对照的差异显著系数, 找出 $P < 5\%$ 时的“显著刺激”或“显著抑制”浓度范围, 研究结果表明(表 2), (1) 显著刺激的浓度范围: Pb 对细菌为 3000—4000 ppm; Cd 对真菌、放线菌、细菌、硝化菌为 ≤ 5 ppm、但对放线菌在 30 ppm 时仍可呈显著刺激; As 对各类菌均不呈显著刺激。(2) 显著抑制的浓度范围: As 对放线菌、细菌、硝化菌为 20—200 ppm; Cd 对放线菌、细菌为 100—200 ppm、对硝化菌为 10—200 ppm; Pb 对放线菌、硝化菌为 1000—4000 ppm; As, Cd, Pb 对真菌均不呈显著抑制。(3) 如果作菌的抑制率的普罗比 (Probit) 值与金属浓度对数的关系曲线^[9], 就可求出 ED₅₀ 值——半致死剂量, 则放线菌对 Cd, As, Pb 分别为 71.1, 15.0, 999.0 ppm; 细菌对 Cd, As 分别为 26.9, 14.9 ppm。可见 ED₅₀ 值为: As < Cd < Pb。因此, 三元素对菌的毒性顺序为: As > Cd > Pb。

(二) Cd, As 和 Pb 对明亮发光杆菌 T₁ 变种的效应

盆栽试验表明(图 1), 添加 Cd, As, Pb 的盆栽水稻土壤对 T₁ 菌有明显的毒性效应。当土壤添加 Cd > 3ppm、As > 30ppm、Pb > 500ppm 时, 随着金属浓度增大, 菌发光度相应下降, 显示出土壤添加金属对 T₁ 发光菌的毒性。

由回归分析可知, T₁ 发光度与 Cd, As, Pb 浓度均呈显著高度负相关(表 3), 相关系数 $r = -0.929 \sim -0.968$, $P < 0.01$, 预示了用 T₁ 发光度表征土壤重金属污染程度的

表 1 土壤添加金属对微生物数量的影响

Table 1 Effect of metal added to soil on the count of microbial population

添加金属浓度 (ppm) Concentration of metal added		菌数平均值(万个/克干土) Average of count of population (10 ⁴ cell/g. dry soil)				抑制率(%) Ratio of inhibition		
		真菌 Fungi	放线菌 Actino- mycete	细菌 Bacterium	硝化菌 Nitrifier	真菌 Fungi	放线菌 Actino- mycete	细菌 Bacterium
Cd	200	2.67	5.33	3500	0		23.5	73.7
	100	4.33	8.33	4500	0		42.3	66.2
	60	4.00	34.3	10000	0		71.1	25.0
	30	2.33	51.3	25000	0			
	10	4.00	56.6	25000	0			
	5	2.43	53.3	63000	9			
	3	6.00	106.7	11000	40			17.5
	1	7.00	30.0	10000	450			25.0
	0	2.30	28.0	13333	4			
	r	-0.262	-0.628	-0.445				
	P	>0.1	>0.05	>0.1				
As	200	5.00	33.0	11000	0		93.7	82.0
	100	4.00	66.7	15000	0	20.0	87.2	75.4
	60	4.30	46.7	15000	0	14.0	91.0	75.4
	40	5.70	40.0	20000	0		92.3	67.2
	30	5.00	133.0	10000	0		74.4	83.6
	20	3.70	200.0	20000	0	26.0	61.5	67.2
	10	9.00	330.0	50000	4		36.5	18.0
	0	5.00	520.0	61000	4			
	r	-0.259	-0.625	-0.568				
	P	>0.1	>0.05	>0.1				
Pb	4000	2.13	3.3	4270	0		82.6	
	3000	0.20	5.0	4400	0	53.5	73.7	
	2000	0.10	7.3	1370	0	76.7	61.6	
	1000	0.40	4.7	1530	0	6.98	75.3	
	700	0.13	10.3	770	9000	69.8	45.8	
	500	0.17	9.3	330	25000	60.5	51.1	50.7
	250	0.20	4.7	300	4000	53.5	75.3	55.2
	0	0.43	19	670	150000			
	r	-0.367	-0.596	0.936				
	P	>0.1	>0.1	<0.01				

表 2 土壤添加金属对微生物影响的浓度范围¹⁾Table 2 Concentration range of the effect of metals added to soils on microbes¹⁾

微生物类型 Kinds of microbes	显著刺激浓度 ²⁾ Concentration of obvious stimulation			显著抑制浓度 ²⁾ Concentration of obvious inhibition			ED ₅₀		
	(ppm)								
	Cd	As	Pb	Cd	As	Pb	Cd	As	Pb
真 菌	1—3	无	无	无	无	无	—	—	—
放线菌	3—30	无	无	100—200	20—200	1000—4000	71.1	15.0	999.0
细 菌	5	无	3000—4000	100—200	20—200	无	26.9	14.9	—
硝化菌	1—5	无	无	10—200	20—200	1000—4000			

1) 供试浓度范围: Cd, As 为 0—200 ppm, Pb 为 0—4000 ppm。

2) 显著水平: $P < 5\%$ 。

可能性,并为以 T_3 发光度确定土壤 Cd, As, Pb 临界含量建立了基础。

对被 Cd, As, Pb 污染的大田土壤用生物发光光度计测定总体生物毒性表明,土壤可提取性 Cd, As, Pb 浓度均与 T_3 菌发光度呈显著高度 (Cd) 或中度 (As, Pb) 负相关 (表 4), 相关系数 $r = -0.612 \sim -0.718$, $P < 0.01$ 。显然,负相关的程度不及盆栽试验结果。

同样由表 4 可见,各元素背景区土样可提取性金属浓度与 T_3 菌发光度相关性均很差。可见 T_3 菌发光度仅与污染区土样中所含可提取金属浓度相关,表明仅在土壤可提取金属浓度较高水平下,才与 T_3 菌发光度相关,也才有可能以 T_3 发光度表征土壤重金属污染程度。

(三) 用 T_3 菌发光度确定土壤重金属 Cd, As, Pb 临界含量

1. T_3 菌临界发光度的确定 就微生物而言,作为土壤重金属 Cd, As, Pb 污染的一种主要生物指标,其条件是必须对 Cd, As, Pb 三者均能高度敏感,并与三元素浓度有较高的相关性。综观以上试验结果,同时具备这二者条件的,只有 T_3 发光菌 (图 1, 表 3、4)。据此,确定以 T_3 菌发光度作为土壤重金属 Cd, As, Pb 的一种主要生物指标。

用明亮发光杆菌“发光正常”(即发光度 100% 或 LD_{100}) 和“发光度轻度受抑”(即发光度 80% 或 LD_{80}) 二个级别作为其对 Cd, As, Pb 生态效应的临界值,或称临界发光度。

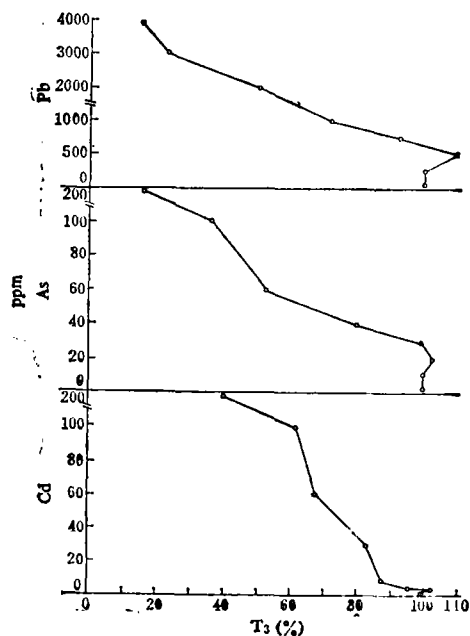
图 1 土壤添加金属对 T_3 菌发光度的影响 (盆栽)Fig. 1 Effect of metal added to soils on the luminescence of the strain T_3 (potted paddv soil)

表 3 T₃ 发光度与土壤添加金属浓度的相关性(盆栽)Table 3 Interrelation between the luminescence of strain T₃ and the concentration of metal added to soils (potted paddy soil)

	n	r	P	回归方程 Regress equation
Cd	9	-0.963	<0.01	$Y_{Cd} = 301.36 - 3.11X_{T_3}$
As	8	-0.929	<0.01	$Y_{As} = 190.30 - 1.80X_{T_3}$
Pb	8	-0.968	<0.01	$Y_{Pb} = 4098.08 - 37.81X_{T_3}$

表 4 T₃ 发光度与土壤可提取金属浓度*的相关性(大田)Table 4 Interrelation between the luminescence of strain T₃ and the concentration of extractable metal* (field soil)

污 染 区 Region of pollution				背 景 区 Region of background				
n	r	P	迴归方程 Regress equation	n	r	P	迴归方程 Regress equation	
Cd	48	-0.718	<0.01	$Y_{Cd} = 2.35 - 0.019X_{T_3}$	28	-0.367	>0.05	无意义
As	44	-0.612	<0.01	$Y_{As} = 9.07 - 0.065X_{T_3}$	28	0.275	>0.1	无意义
Pb	20	-0.604	<0.01	$Y_{Pb} = 80.58 - 0.82X_{T_3}$	18	0.244	>0.1	无意义

* Cd 用 0.1 M NaNO₃、As 用 1 N HCl、Pb 用 0.5 N HAc 提取。

2. T₃ 菌临界发光度确定土壤添加金属临界浓度 从图 1 可知, T₃ 发光度 80% 和 100% 二个级别所对应的土壤添加 Cd, As, Pb 临界浓度如表 5。

表 5 土壤添加金属的临界浓度

Table 5 Critical concentration of metal added to soils

土壤添加金属 Metal added to soils (ppm)	临界发光度 (T ₃) Critical luminescence	
	80%	100%
Cd	30	3
As	40	30
Pb	850	500

1. T₃ 发光度超过 100% 均示无毒且有刺激效应, 故可视为 100%。

2. 若以土壤添加金属临界浓度加土壤金属背景值, 可近似地代表土壤全量金属临界含量。

由表可见, T₃ 临界发光度确定的土壤添加金属临界值, 与根据盆栽作物生态效应(稻米金属含量不超过国家卫生标准或稻米减产不超过 10%) 所定的土壤添加金属临界值相近, 后者为 Cd: 1—3 ppm; As 为 40 ppm; Pb 为 500—700 ppm。这表明, 用 T₃ 临界发光度确定的土壤添加金属临界浓度有实际意义和参考价值。

3. T₃ 菌临界发光度预测污染土壤某些可提取性金属临界浓度和容量的可能性 若以上述确定的 T₃ 菌临界发光度 100% 代入表 4 所列污染区各回归方程, 则可预测污染区土壤可提取金属的临界浓度和容量。由于盆栽土壤与大田土样来自同一地区的同种土壤, 因此将盆栽试验得到的 T₃ 临界发光度套用于大田, 不会有土壤基本性状差异的问

题。

就 Cd 而言, $Y_{Cd} = 2.35 - 0.019X_{T_3}$, $X_{T_3} = 100$, 则 $Y_{Cd} = 0.45$ ppm。此即为 0.1 M NaNO₃ 可提取 Cd 的临界浓度。此值低于采样的污染区土壤 0.1 M NaNO₃ 可提取 Cd 平均浓度 0.78 ppm ($n=39$), 远高于背景区平均浓度 0.0042 ppm ($n=29$), 因而后者可以忽略不计。由此, 污染区土壤 0.1 M NaNO₃ 可提取 Cd 的静容量可确定为 0.45 ppm。

就 As 而言, $Y_{As} = 9.07 - 0.065X_{T_3}$, $X_{T_3} = 100$, 则 $Y_{As} = 2.57$ ppm。此即为 1 N HCl 可提取 As 的临界浓度。此值低于采样的污染区土壤 1 N HCl 可提取 As 平均浓度 3.18 ppm ($n=44$), 高于背景区平均浓度 0.62 ppm ($n=30$), 所以, 污染区土壤 1 N HCl 可提取 As 的静容量可确定为 $2.57 - 0.62 = 1.95$ ppm。

至于 Pb, 由于土壤可提取 Pb 采样区是个以 Pb 污染为主, 兼有 Cd, Cu, Zn 污染的复合污染区, 所测土样的 T_3 发光度应是四个元素生物毒性的总体效应。因此不能简单地依据盆栽土壤添加 Pb 试验所确定的 T_3 临界发光度来预测其中一个元素 (土壤可提取 Pb) 的临界浓度。

参 考 文 献

- [1] 陈华癸, 1958: 微生物实验。38 页, 农业出版社。
- [2] 中国科学院微生物研究所, 1980: 菌种保藏手册。科学出版社。
- [3] 中国科学院林业土壤研究所, 1960: 土壤微生物分析方法手册。23 页, 科学出版社。
- [4] 顾宗濂等, 1983: 用生物发光计测定污染水体生物毒性。环境科学, 第 4 卷 5 期, 30 页。
- [5] Somers, E., 1961: Fungicidal action of metal ion. Ann. Appl. Biol., 49: 246.
- [6] Jordan, M. J. & Lechevalier, M. P., 1975: Effects of Zinc-smelter emissions on forest soil microflora. Can. J. Microbial., 21: 1855.
- [7] Williams, S. E. & Wollum, A. G., 1981: Effect of Cadmium on Soil Bacteria and Actinomycetes. J. Environ. Qual., 10: 142.
- [8] Fred, E. B. & Waksman, S. A., 1928: Laboratory Manual of General Microbiology. p. 9 McCraw-Hill Book CO. Inc.
- [9] Maliszewska, W., 1972: Influence de certains oligo-elements sur l'activite de quelques processus microbiologiques du sol. Rev. Ecol. Biol. Sol., 9: 505—512.
- [10] Maliszewska, W. & Wierzbicka, H., 1977: Influence of Pb, Zn and Cu on the growth and activity of soil microflora. Int. Symp., Interaction of soil microflora and environment pollution, 7—10 September, Pulawy, Poland, part II, 47—54.
- [11] Maliszewska, W. & Wierzbicka, H., 1978: Wply clowiu, cynku imiedzi na rozwoj aktywnosci drobnoustrojow glebach. (Influence of lead, zinc and copper on the development and activity of the micro-organisms in soils). Proc. natn. Conf. on effects of trace element pollutants on agricultural environment quality, 1st, 4—6 May Pulawy, Poland, part 1, 135—149.
- [12] Maliszewska, W., Wierzbicka, H. & Wozniakowska, A., 1979: Wplyw roznych zwiaskow rtęci na rozwoj i aktywnosc drobnoustrojow glebowych (Influence of various mercury compounds on the development and activity of soil micro-organisms). Proc. natn. Conf. of the soil influence of microflora on the decomposition of agricultural and industrial pollutants, 6—9 May Karowice-Wisla, Poland, 34—35.
- [13] Maliszewska, W., Wozniakowska, A. & Dec, S., 1981: Wplyw niektorych metali ciezkich na proces wiazania wolnego azotu w glebie (Influence of some heavy metals on the nitrogen-fixation process). Proc. natn. Conf. on the microbial changes of the nitrogen compounds in the soil, 3—6 June Pulawy, Poland, part I, 129—138.
- [14] Wanda Maliszewska, Stanislaw Dec, Hanna Wierzbicka & Anna Wozniakowska., 1985: The Influence of Various Heavy Metal Compounds on the Development and Activity of Soil Micro-organisms. Environmental Pollution (Series A) 37: 195—215.

MICROBIAL EFFECTS OF CADMIUM, ARSENIC AND LEAD IN SOIL AND THEIR CRITICAL VALUE

Gu Zonglian, Xie Siqin, Wu Liusong, Zhou Dezhi,

Sun Hanzhong and Li Xunguang

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

Xu Jun, Gu Shuhua

(*Institute of Environmental Protection, Hunan Province*)

Summary

The effects of Cd, As and Pb added to paddy soil on microbes in soils were assayed in pot experiment. Values of ED_{50} fungi, actinomycetes, bacteria and nitrifiers were estimated. The toxicity of the three elements on microorganisms in soils tested is in the order of $As > Cd > Pb$.

In pot experiment, the luminescence of *Photobacterium phosphoreum* spp. T_s showed strongly negative relation to the concentration of the three elements. In field investigation, it is also strongly negatively related to the concentration of Cd, but moderately related to that of As and Pb.

It was defined by pot experiment that luminescence "100%" and "80%" of the strain T_s could be regarded as critical luminescence of two grades, and so the critical concentrations of metals added to the potted paddy soil corresponded with it was estimated.