

六种有机污染物对土壤微生物的影响

曹幼琴 叶定一

(南京大学, 210008)

摘 要

为排除实验误差的干扰,得出较为可靠的分析,本文用数理统计中“方差分析”方法研究了苯乙烯、间-二氯苯、邻-二氯苯、氯苯、邻苯二甲酸二丁酯、十六烷等六种有机污染物对自行分离鉴定的褐球固氮细菌 (*Azotobacter chroococcum*)、纤维单胞菌 (*Cellulomonas* sp.) 以及土壤中放线菌、霉菌、酵母菌的影响。结果表明,邻苯二甲酸二丁酯在 10ppm、50ppm 两种浓度均使纤维单胞菌无一存活,其它五种污染物在两种受试浓度对土壤微生物效应各不相同。有的无显著影响,有的刺激土壤中霉菌,有的使酵母菌数量增加,有的则有一定的抑制作用。

有关农药和其他环境污染物对土壤微生物的影响,国内外已有较多报道^[1,7,8],因为微生物是土壤的重要组成部分,对土壤肥力、土壤团粒结构的形成等有重要意义。此外,微生物是土壤生态系统的分解者,在土壤生态系统的物质循环过程中起着重要作用。影响微生物生命活动的因素很多,作用方式也复杂,各种实验因子及实验操作都会造成不同的误差。用数理统计方法处理所得的实验数据,以排除各种实验误差的干扰,得出较为可靠的分析。

本文用数理统计中“方差分析”^[2]方法研究了苯乙烯等六种有机污染物对固氮细菌、分解纤维素细菌,以及放线菌、霉菌、酵母菌等土壤微生物的影响,旨在通过这一研究考察含有这六种有机污染物的常州大通河水灌溉农田,对灌区土壤微生物可能造成的影响,并预测是否会由于影响微生物这一土壤生态系统的分解者而对灌区土壤产生潜在的生态效应。有关这六种有机污染物对土壤微生物的影响,未见报道。

一、材料和方法

(一) 实验材料

1. 土壤样品: 土样采自江苏常州市郊大通河灌区。土类: 黄泥土¹⁾。pH(H₂O): 6.5。机械组成: 砂粒 14.7%, 粉粒 47.1%, 粘粒 38.2%。有机质: 2.25%。全氮: 0.129%, 全磷: 0.143%。
2. 试剂: 苯乙烯、间-二氯苯、邻-二氯苯、氯苯、邻苯二甲酸二丁酯、十六烷。
3. 菌种: 均系作者自行分离鉴定^[9](样品采自大通河灌区土壤)。

(二) 实验方法

本文工作是“六五”国家科技攻关项目65-37-2(2-1)研究课题的一个组成部分,该项目已通过技术鉴定,并获江苏省重大科技成果三等奖。

1) 土壤理化数据承南大赵培道副教授提供,特此致谢。

1. 对固氮细菌和分解纤维素细菌的影响: 采用将受试化合物加到培养基中, 然后接种纯菌株菌悬液并培养、计数的方法。

实验步骤: 培养基冷至适当温度后加入化合物, 使浓度分别为 50ppm、10ppm, 摇匀、倒平板。以不加化合物的培养基为对照组。固氮细菌用阿须贝培养基^[3], 分解纤维素细菌用赫琴逊食纤维菌基础培养基^[3](加菌液后每皿加 9 厘米无菌滤纸一张)。固氮细菌 28℃ 培养一星期, 分解纤维素细菌 28℃ 培养 10 天计数。

2. 对放线菌、霉菌和酵母菌的影响: 化合物加至土壤, 28℃ 放置 24 小时后制成土壤悬液, 进行分菌培养, 并计数。

实验步骤: 取灭过菌的 100 毫升锥形瓶, 每瓶装 20 克土。化合物用丙酮稀释至 0.5 毫克/毫升和 0.1 毫克/毫升, 处理组每瓶加入 2 毫升化合物丙酮混合液, 使瓶内土壤中化合物浓度分别为 50ppm、10ppm, 对照组加 2 毫升丙酮。待溶剂挥发后将土样混匀, 盖棉塞, 28℃ 放置 24 小时后制土壤悬液。接种并培养计数。放线菌用高氏一号培养基^[4], 28℃ 培养一周, 酵母菌用 PDA 培养基^[4], 霉菌用马丁培养基^[4], 均 28℃ 培养 5 天。

3. 数据处理^[2]: (1) 用 Bartlett 检验法进行多个方差齐性的检验。

$$K^2 = 2.3026 \frac{q}{c}$$

式中 q 差数为标准误的若干倍, c 为校正项。若 $K^2 < \chi_{0.05}^2$, 则方差具齐性。

(2) 用 F 检验法进行方差的显著性检验。

$$F = \frac{MS_A}{MS_e}$$

式中 MS_A 为处理间均方, MS_e 为误差均方。若无显著性差异, 则检验结束。若差异显著或极显著, 分别用 * 或 ** 表示。

(3) 用成组数据 t 检验(或 LSD 检验)进行多重比较, 将各处理组的均数分别与对照组均数比较, 查出有显著性差异的处理组。

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{MS_e \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

式中 $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ 为差数, n 为观察次数。当 $t > t_{0.05}$ 时, 差异显著; 当 $t > t_{0.01}$ 时, 则差异极其显著。

二、结果和讨论

对实验数据进行多个方差齐性的检验结果见表 1。

从表 1 表明, 各实验单元中各组方差都具齐性, 因此对各实验单元均可进行方差分析。

(一) 对褐球固氮细菌 (*Azotobacter chroococcum*) 的影响(见表 2)

经气相色谱测定具固氮酶活力的菌种鉴定^[9]: 革兰氏染色阴性, 细胞近球状, 大小为 2.7—4.1×3.3—12.5 微米(电镜下), 单个, 常成对。有孢囊, 不生芽孢, 荚膜明显, 周生鞭毛。氧化酶阴性, 接触酶阳性, 吡噪试验阴性, 利用淀粉、甘露醇, 不利用鼠李糖。在普通肉汁胨上生长, 在液体培养基中表面形成菌膜。在有钙盐的阿须贝(Ashby)无氮培养基^[3]上生长快速。在有钼或钒的 Döbereiner^[10] 氏苹果酸钠或琥珀酸钠培养基上均有固氮酶活性。菌苔粘稠, 糊状。幼培养菌苔透明转乳白色, 老培养菌苔呈褐色, 保存时间越

表 1 对不同微生物多个方差齐性的检验结果

Table 1 Results of tests for homogeneity of several variances to different microbes

污染物浓度 (ppm) Pollutant concentration (ppm)	对褐球固氮细菌的影响 Influence on <i>Azotobacter chroococcum</i>	对纤维单胞菌的影响 Influence on <i>Cellulomonas sp.</i>	对放线菌的影响 Influence on actinomycetes	对霉菌的影响 Influence on molds	对酵母菌的影响 Influence on yeasts
10	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 3.799$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 9.940$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 8.439$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 3.843$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 5.273$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)
50	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 5.824$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 9.432$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 7.433$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 8.452$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)	$K^2 < \chi_{0.05}^2$ ($K^2 = 5.990$) ($\chi_{2,0.05}^2 = 12.592$)

久,非水溶性色素越深,呈暗褐色。接种时易挑起。综合以上结果经鉴定为褐球固氮细菌(*Azotobacter chroococcum*)。

表 2 六种有机污染物对褐球固氮细菌 (*Azotobacter chroococcum*) 的影响

Table 2 Influence of six organic pollutants on *Azotobacter chroococcum*

项 目 Items	对 照 Control	处 理 Treatment							
		苯乙烯 Styrene	间-二氯苯 m-Dichloro- benzene	邻-二氯苯 o-Dichloro- benzene	氯苯 Chlorob- ecane	邻苯二甲酸 二丁酯 Dibutyl phthalate	十六烷 Hexad- enzene		
污 染 物 浓 度 ppm	10	菌落数	65,95, 88,81, 72	46,39, 51	82,69, 102	78,61, 78	74,92, 49	56,69, 53	78,74, 92
		标本数 (n)	5	3	3	3	3	3	3
	F	3.68*							
	t		3.708**	0.439	0.837	0.907	2.219*	0.120	
50	菌落数	65,95, 88,81, 72	6,15, 9	54,96, 59	77,60, 91	70,40, 63	40,28, 35	68,52, 57	
		标本数 (n)	5	3	3	3	3	3	3
	F	11.42**							
	t		7.188**	1.078	0.601	2.307*	4.697**	2.171*	

注: $n_1 = 6, n_2 = 16$ 时, $F_{0.05} = 2.74, F_{0.01} = 4.20, t_{16,0.05}(\text{双侧}) = 2.120, t_{16,0.01}(\text{双侧}) = 2.921$ 。

表 2 结果表明,苯乙烯与邻苯二甲酸二丁酯在 10ppm 时对褐球固氮细菌有抑制作

表3 刺槐固氮量与土壤理化因素和交互因素的简单相关

Table 3 Simple correlation between locust N_2 -fixation amount on the one hand and soil physico-chemical factors and interactive factors on the other

因素 Factor	方程 Optimum equation	总R Total R	总F Total F	S(e)
pH = x_1	$y = -400.3196 + 143.9212x - 10.9283x^2$	0.5662	9.2014**	27.7146
CaCO ₃ = x_2	$y = -2.4305x + 55.6047$	-0.3464	5.4528*	31.2950
CO ₂ = x_3	$y = 235.5799e^{\frac{-35.342x}{x}}$	0.5757	19.8293**	34.2821
全P(P ₂ O ₅) = x_4	$y = 81.0852e^{\frac{-0.1031}{x}}$	0.3768	6.6201*	35.7898
有效P = x_5	$y = 79.8826\log x + 3.0284$	0.6388	27.5742**	25.6664
有效K = x_6	$y = 98.3655e^{\frac{-7.6188}{x}}$	0.4140	8.2723**	37.7141
有效Mo = x_7	$y = 73.8169e^{\frac{-1.0870}{x}}$	0.3977	7.5161**	30.6080
$x_1 + x_2$	$y = 37.8072e^{\frac{-0.0107}{x}}$	0.8677	121.9287**	34.6083
x_1x_3	$y = 42.4743e^{\frac{-0.0074}{x}}$	0.8389	95.0493**	32.3143
x_1x_4	$y = 41.4174e^{\frac{-0.0072}{x}}$	0.8225	83.6369**	32.9993
$\sqrt{x_1x_5}$	$y = 82.3816x^{0.9674}$	0.7350	47.0047**	26.7748
$x_1 + x_6$	$y = 37.6966e^{\frac{-0.0108}{x}}$	0.8788	135.7241**	34.3309
x_1x_7	$y = 42.9081e^{\frac{-0.0061}{x}}$	0.7236	43.9697**	32.2607
$x_2 + x_6$	$y = 55.1099x^{0.4787}$	0.3253	4.7330*	40.3169
x_3x_4	$y = 160.7385x^{0.8042}$	0.5437	16.7876**	37.3102
x_3x_5	$y = 32.7311\log x + 86.9543$	0.6443	28.3948**	25.5119
$\sqrt{x_3x_7}$	$y = -9.2543 + 277.7372x - 242.3311x^2$	0.6029	11.1347**	26.9547
x_4x_5	$y = 79.8731x + 27.4493$	0.6405	27.8182**	25.6202
$\sqrt{x_4x_7}$	$y = -0.3965 + 218.4596x - 186.9907x^2$	0.5032	6.6118*	29.1959
$\sqrt{x_5x_6}$	$y = 84.1569x + 14.4565$	0.5724	19.4969**	27.3532
$\sqrt{x_5x_7}$	$y = 0.7442 + 236.3908x - 180.1270x^2$	0.6280	12.6957*	26.2931
$\sqrt{x_6x_7}$	$y = 10.1265 + 222.3010x - 222.9837x^2$	0.4685	5.4825*	29.8485

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 临界值 $F: F_{0.05} = 4.08, F_{0.01} = 7.31$.

用,这种抑制作用在 50ppm 时增强。氯苯与十六烷在 50ppm 时对 *Azotobacter chroococcum* 有抑制作用,在 10ppm 时无此抑制作用。两种二氯苯则在两种受试浓度对 *Azotobacter chroococcum* 均无显著影响。

(二) 对纤维单胞菌 (*Cellulomonas* sp.) 的影响(见表 3)

以纤维素为唯一碳源的菌种鉴定^[9]: 革兰氏染色弱阳性,无芽孢,不运动。幼龄菌为不规则的杆菌,有时可见“V”字型,栅栏状等棒状菌形式的排列。大小为 $0.6 \times 0.8 - 2.1$ 微米左右。老龄菌变短,甚至近球状。氧化酶阴性,接触酶阳性,甲基红试验阳性。VP 试验阴性,水解淀粉。在营养洋菜的培养基上产生黄色非扩散性色素。在赫琴逊 (Hutchison) 食纤维菌基础培养基^[3]上生长良好。接种于 0.5% 胨水滤纸条培养基和 Dubos^[4] 纤维素培养基中均使滤纸强度减弱,轻摇,纤维则散开。在脱脂牛奶中加热 63°C , 30 分钟不存活。经鉴定为纤维单胞菌 (*Cellulomonas* sp.)。

邻苯二甲酸二丁酯在 10 ppm、50 ppm 两种浓度均使纤维单胞菌 (*Cellulomonas* sp.) 无一存活,可见其对 *Cellulomonas* sp. 的代谢有很强的抑制作用。但这一结果是化合物直接加到培养基中对 *Cellulomonas* sp. 纯菌的作用,污染物进入土壤后,土壤胶体的吸附或水解这两个过程,曾使进入土壤的污染物活性降低或失效^[5,6]。此外,土壤中生活着各种类群的微生物,其中有的微生物或许能代谢邻苯二甲酸二丁酯或与其它微生物一起

表 5 六种有机污染物对土壤中霉菌 (Molds) 的影响

Table 5 Influences of six organic pollutants on molds in the soil

项 目 Items	对 照 Control	处 理 Treatment							
		苯乙烯 Styrene	间-二氯苯 m-Dichlorobenzene	邻-二氯苯 o-Dichlorobenzene	氯苯 Chlorobenzene	邻苯二甲酸 二丁酯 Dibutyl phthalate	十六烷 Hexadecane		
污 染 物 浓 度 ppm	菌 落 数	9,5,	6	25,30	54,54,	25	15,8,	5	
		13,6,	13			11	8		
		16	5	18	68	14	21	5	
	10	标本数 (n)	5	3	3	3	3	3	3
		F	31.20**						
	50	t		0.429	3.465**	11.655**	1.638	1.161	0.906
		菌 落 数	20,6,	15,9,	21,32,	24,30	18		6,4
			11,13,	11	47	26	23	16,8,11	8
		7				12			
	50	标本数 (n)	5	3	3	3	3	3	3
F		7.79**							
50	t		0.060	4.885**	3.402**	1.397	0.060	1.203	

注: $n_1 = 6, n_2 = 16$ 时, $F_{0.05} = 2.74, F_{0.01} = 4.20, t_{16,0.05}(\text{双侧}) = 2.120, t_{16,0.01}(\text{双侧}) = 2.921$

对其进行协同代谢。这些都降低其对 *Cellulomonas* sp. 的抑制作用。

50 ppm 的十六烷与邻-二氯苯亦对 *Cellulomonas* sp. 有抑制作用。其它三种污染物对 *Cellulomonas* sp. 无显著影响。

(三) 对土壤中放线菌的影响(见表 4)

苯乙烯在 10ppm, 50ppm 两种受试浓度均对土壤中放线菌有抑制作用。十六烷在 50ppm 时亦对放线菌有抑制作用。其它四种污染物在 10ppm、50ppm 两种受试浓度对土壤中放线菌数量无显著影响。

(四) 对土壤中霉菌的影响(见表 5)

间-二氯苯与邻-二氯苯无论在 10ppm 还是 50ppm 均对霉菌有刺激作用, 估计可能有刺激霉菌孢子数增加的效应。其它四种污染物在 10ppm、50ppm 两浓度均对土壤中霉菌数量无显著影响。

(五) 对土壤中酵母菌的影响(见表 6)

浓度为 50ppm 的六种污染物作用过的土壤, 与对照土壤中酵母菌数量无显著性差异, 这表明六种污染物在 50ppm 时对土壤中的酵母菌数量无影响, 各处理组与对照组的均数之差只是抽样误差。

10ppm 的苯乙烯有刺激土壤中酵母菌数量增加的作用。浓度为 10ppm 的其它五种

表 6 六种有机污染物对土壤中酵母菌 (Yeasts) 的影响

Table 6 Influence of six organic pollutants on yeasts in soil

项目 Items	对照 Control	处 理 Treatment							
		苯乙烯 Styrene	间-二氯苯 m-Dichlorobenzene	邻-二氯苯 o-Dichlorobenzene	氯苯 Chlorobenzene	邻苯二甲酸 二丁酯 Dibutyl phthalate	十六烷 Hexadecane		
污 染 物 浓 度 ppm	10	菌落数	81,65, 110	215 167 223	59,91, 77	78,86, 74	95 87 68	133,121, 79	62 52 41
		标本数 (n)	3	3	3	3	3	3	3
		F	17.61**						
		t		7.075**	0.587	0.365	0.122	1.561	2.047
	50	菌落数	81,65, 110	83 52 90	95,104, 49	32,10, 76	89 60 88	122,64, 71	40,34, 33
		标本数 (n)	3	3	3	3	3	3	3
		F	2.37						
		t							

注: $n'_1 = 6$, $n'_2 = 14$ 时, $F_{0.05} = 2.85$, $F_{0.01} = 4.46$, $t_{14;0.05}(\text{双侧}) = 2.145$, $t_{14;0.01}(\text{双侧}) = 2.977$

污染物对土壤中的酵母菌数量无显著影响。

三、结 论

1. 浓度为 10ppm、50ppm 的苯乙烯等六种有机污染物对土壤中的霉菌、酵母菌均无抑制作用,相反,间-二氯苯和邻-二氯苯刺激土壤中霉菌数量增加,10 ppm 苯乙烯刺激土壤中酵母菌数量增加。邻苯二甲酸二丁酯在两种受试浓度下均使纤维单胞菌(*Cellulomonas* sp.) 无一存活。其它五种污染物在两种受试浓度下对褐球固氮细菌(*Azotobacter chroococcum*)、纤维单胞菌(*Cellulomonas* sp.) 以及土壤中放线菌的效应各不相同:有的无显著影响,有的则有一定的抑制作用,但均无 100% 的抑菌率。

2. 邻苯二甲酸二丁酯对纤维单胞菌(*Cellulomonas* sp.) 的 100% 抑菌率是化合物直接作用于纯菌的实验结果。田间条件下土壤胶体的吸附、水解,以及其它微生物类群的代谢作用等都可能降低这一抑制作用^[5,6];此外,土壤中还存在其它类型的纤维素分解菌,对它们的作用各不相同,但均无 100% 的抑菌率,而存活的抗性菌会很快繁殖,故不致对土壤微生物数量有严重影响。

参 考 文 献

- [1] 汤树德等,1984: 化学除草剂对土壤中微生物生态和物质转化过程的影响。土壤学报,第 21 卷 1 期,96—104 页。
- [2] 杜荣燾,1985: 生物统计学。164—187 页,高等教育出版社。
- [3] 陈华癸,1962: 微生物学实验。134—135 页,农业出版社。
- [4] [日]土壤微生物研究会编,1983: 土壤微生物实验法,645,647,665 页,科学出版社。
- [5] [美] M. Alexander (广西农学院农业微生物学教研组译),1983: 土壤微生物学导论。270页,科学出版社。
- [6] 陈华癸等,1981: 土壤微生物学。311 页,上海科学技术出版社。
- [7] Hellina. C. S. et al, 1971: Influence of chemical herbicides on microbes in soils; *Advan. Agron.* 23:147—240.
- [8] Venkataraman, G.S. et al.1971:The different effects of the types of pesticides on soil microbes; *Indian J. exptl. Biol.*, 9:512—522.
- [9] Buchanan. R.E. &N.E. Gibbons. 1974;*Bergry's Manual of Determinative Bacteriology* 8ed. p. 254,255,257,258,288,599,621,623,629,630.
- [10] Döbereiner. J. et al. 1976;Ecological distribution of *Spirillum lipoferuns* Beijerinck; *Microbiol.* 22 (10):1464—1473.

INFLUENCE OF SIX ORGANIC POLLUTANTS ON SOIL MICROBES

Cao Youqin and Ye Dingyi

(Nanjing University, 210008)

Summary

Influences of six organic pollutants (styrene, m-dichlorobenzene, o-Dichlorobenzene, Chlorobenzene, Dibutyl phthalate, and Hexadecane) on pure cultured *Azotobacter chroococcum* and *Cellulomonas* sp., as well as on actinomycetes, molds and yeasts in the soil were studied. These microbes were collected, isolated and identified by the authors from the upland soils irrigated with the water from the Datong river in Changzhou region of Jiangsu province. The experiment data were processed by the means of variance analysis in order to get rid of the disturbance of the experimental errors and make more reliable analysis. The results showed that these pollutants had different effects on different microbes at concentrations of both 10ppm and 50ppm: they either decrease the counts of *Azotobacter chroococcum*, *Cellulomonas* sp. and actinomycetes or increase the counts of molds and yeasts, otherwise they had no significant effect on soil microbes. Among these effects *Cellulomonas* sp. could not be alive after dibutyl phthalate treatment at concentrations of 10 ppm and 50 ppm.

Based on these experiments, the results are as follows: among six compounds, dibutyl phthalate showed some inhibitory effects on the decomposition of cellulose in irrigated soil. The others at a concentration below 50 ppm had no significant effect on soil microorganisms; and no potential ecological effect on C and N cycles of soil ecosystem.