土壤锗污染对土壤微生物的生态毒理效应*

林匡飞[1]　徐小清[2]　郑　利[2]　邵志慧[3]　项雅玲[3]
(1 华东理工大学危险化学物质风险评价与控制研究中心, 上海　200237)
(2 中国科学院水生生物研究所, 武汉　430072)
(3 农业部环境质检中心, 武汉　430070)

摘　要　着重讨论土壤添加 Ge 对土壤微生物的生态效应及土壤 Ge 污染临界含量。盆栽试验表明, 在土壤 Ge 含量 2~ 200 mg kg^{-1}范围, 低浓度 Ge 对土壤细菌、真菌、放线菌有刺激作用, 随着浓度增高, 而交替出现抑制和刺激作用。土壤 Ge 浓度与明亮发光杆菌 T3 发光度之间有极显著的负相关性, 按照 T3 发光度 80% 和 100% 为临界值, 计算得土壤 Ge 临界浓度分别为 50. 2 mg kg^{-1}和 5. 8 mg kg^{-1}。

关键词　Ge 污染; 微生物; 生态效应; 临界含量
中图分类号　X132　　文献标识码　A

从土壤– 植物系统污染生态毒理学的角度, 在外源性 Ge 输入到环境时, 土壤的一些性状起了变化, 土壤生态系统的保护能力受到影响。这种变化将引起污染物对作物生态效应和土壤环境容量的变化。为了较全面地揭示 Ge 污染的生态毒理效应, 不仅要研究 Ge 污染对地上部分植被的影响, 还要重视研究土壤中数量庞大、生物多样性丰富、生态功能活跃的土壤微生物的生态毒理效应, 土壤微生物不仅是土壤肥力和土壤营养元素转化的原动力, 而且对土壤金属和有机化合物污染具有较好的生物指示作用, 国内外许多学者对 Cu、Zn、Pb、Cd、Hg、As 等重金属对土壤微生物的生态毒理效应进行了广泛的研究[1~10]。但土壤 Ge 污染对土壤微生物生态影响的研究尚未见报道。根际微生物, 特别是菌根真菌对 Ge 的吸收以及 Ge 从土壤无效态转化为有效态向植物吸收、转移有着重要的影响。因此, 深入探讨根际细菌、菌根真菌以及细菌与真菌的相互作用与 Ge 在土壤植物系统中转移的关系, 对于降低土壤 Ge 的活性和生物有效性具有重要的意义。本文通过土壤 Ge 污染对土壤微生物活性影响及土壤 Ge 污染临界含量的微生物指标的研究, 为土壤锗污染的污染生态毒理学和生态风险评价提供科学依据, 为土壤环境容量应用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试土壤和材料

试验土壤取自湖北省农业科学院试验田黄棕壤土, 新鲜土样去除植物残体、砾石, 过 2 mm 孔筛, 置于塑料袋内, 放于冰箱内 4℃保存备用。土壤理化性状 pH 6. 46, 有机质 24. 11 g kg^{-1}, 全氮 1. 06 g kg^{-1}, 全磷 1. 62 g kg^{-1}, 全钾 15. 8 g kg^{-1}, CEC 11. 23 cmol kg^{-1}, 碱解 N 85. 2 mg kg^{-1}, 速效 P 55. 2 mg kg^{-1}, 速效 K 151. 2 mg kg^{-1}, 有效硅 142. 5 mg kg^{-1}, 全 Ge 0. 824 mg kg^{-1}。氧化锗(GeO_2)为光谱纯, 由中国有色金属研究总院提供, 用时按纯度配制成相应浓度。

1.2　盆栽试验

设置 Ge 浓度分别为 CK、2、4、8、10、20、50、100、150、200 mg kg^{-1}。水稻和大豆盆栽试验处理, 重复 3 次, 于水稻分蘖期、大豆收割期分别于各盆内取土样, 按 S 型路线采集深度为 0~ 5 cm 混合土样, 装入无菌纸袋, 尽快带回实验室进行微生物的测定。

1.3　微生物效应的测定方法

细菌、真菌用新鲜土样, 放线菌用风干土样(过 2 mm 孔筛)。按添加 Ge 浓度分别测定土样中真菌、放线菌、细菌和硝化细菌数量。真菌计数用马丁一

* 湖北省科技攻关计划引导项目(2001AA201C1)资助
作者简介: 林匡飞(1963~　), 男, 浙江宁波人, 博士, 副教授, 主要从事污染生态学和生态风险研究。E-mail: kflin@ ecust. edu. cn, Tel: 021– 64252978
收稿日期: 2004– 03– 15; 收到修改稿日期: 2004– 06– 26

孟加拉红培养基, 28 ℃培养 3 d; 放线菌计数用高氏一号培养基, 28 ℃培养 10 d; 细菌计数用清蛋白钠培养基, 28 ℃培养 4 d; 用 Stephonson 培养基测定亚硝酸细菌数并视为硝化细菌数, 28 ℃培养 14 d。明亮发光杆菌 T_3 变种发光度的测定用生物发光光度计法, 微生物效应的测定采用许光辉专著所述方法[11]。

2　结果与分析

2.1　土壤添加 Ge 对土壤微生物数量的影响

2.1.1　土壤添加 Ge 对土壤细菌数量的影响　由图 1 可见, 在土壤 Ge 含量 2~ 200 mg kg^{-1}范围, Ge 对细菌影响, 随着土壤 Ge 浓度变化出现不同的刺激峰和抑制谷。水稻盆栽 Ge 对细菌的数量的刺激峰浓度分别出现在 4 mg kg^{-1}和 20 mg kg^{-1}。抑制谷浓度出现在 8 mg kg^{-1}和 100 mg kg^{-1}。大豆盆栽也出现 2 个刺激峰和 2 个抑制谷。2 个刺激峰浓度分别出现在 8 mg kg^{-1}和 100 mg kg^{-1}; 2 个抑制谷浓度分别出现在 50 mg kg^{-1}和 200 mg kg^{-1}。水稻盆栽和大豆盆栽结果存在差异。

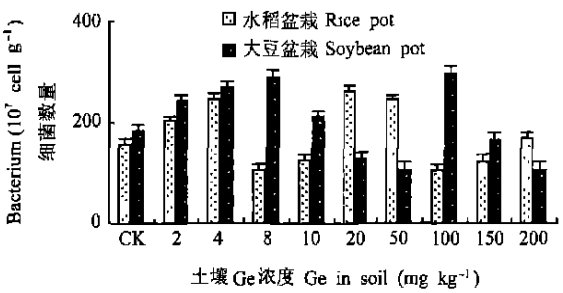

图 1　Ge 对土壤细菌数量的影响

Fig 1　Effect of Ge added to soil on bacterium population

2.1.2　土壤添加 Ge 对土壤放线菌数量的影响　由图 2 可见, 水稻盆栽试验和大豆盆栽试验结果表明, 土壤 Ge 对放线菌的影响的趋势差别较大。水稻盆栽试验结果表明, 在土壤 Ge 含量 2~ 200 mg kg^{-1}范围, Ge 对放线菌数量的影响有一个高刺激峰、一个次刺激峰和 2 个抑制谷; 高刺激峰和次刺激峰浓度分别出现在 10 mg kg^{-1}和 100 mg kg^{-1}; 2 个抑制谷浓度分别出现在 20 mg kg^{-1}和 200 mg kg^{-1}。大豆盆栽试验表明(图 2), 低浓度 2~ 4 mg kg^{-1} 时产生刺激效应; 当土壤 Ge 浓度大于 8 mg kg^{-1} 时产生抑制, 且随着 Ge 浓度增加总抑制率保持在 37% ~ 60% 之间。

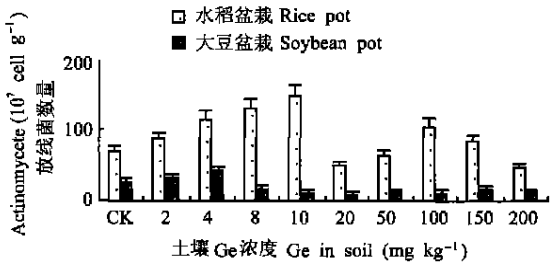

图 2　Ge 对土壤放线菌数量的影响

Fig 2　Effect of Ge added to soil on actinomycete population

2.1.3　土壤添加 Ge 对土壤真菌数量的影响　由图 3 可知, 在土壤 Ge 含量 2~ 200 mg kg^{-1}范围, 水稻盆栽试验 Ge 对真菌影响分别产生 3 个刺激峰, 浓度分别出现在 2 mg kg^{-1}、10 mg kg^{-1}和 150 mg kg^{-1}。3 个抑制谷, 浓度分别出现在 8 mg kg^{-1}、50 mg kg^{-1}和 200 mg kg^{-1}。大豆盆栽试验 Ge 对真菌出现 2 个大刺激峰和 2 个抑制谷; 刺激峰浓度分别出现在 8 mg kg^{-1}和 100 mg kg^{-1}; 抑制谷浓度分别出现在 10 mg kg^{-1}和 150 mg kg^{-1}。

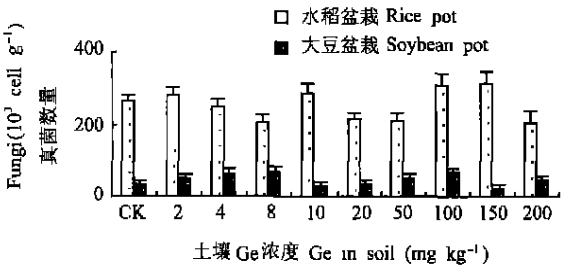

图 3　Ge 对土壤真菌数量的影响

Fig 3　Effect of Ge added to soil on fungi population

2.1.4　土壤添加 Ge 对土壤硝化细菌数量的影响　由图 4 可知, 在土壤 Ge 含量 2~ 200 mg kg^{-1}范围, 大豆土壤 Ge 浓度(2~ 8 mg kg^{-1}) 对硝化细菌代谢有轻微刺激作用。当 Ge 浓度 10 mg kg^{-1}时, 产生轻微抑制作用。当 Ge 浓度 20~ 50 mg kg^{-1}时, 对硝化细菌代谢率又有轻微刺激作用。到 100 mg kg^{-1}时, 产生显著抑制作用; 到 200 mg kg^{-1}时, 抑制率达 48.7%。水稻土壤 Ge 对硝化细菌影响结果比较明确, 低浓度 2~ 8 mg kg^{-1}有轻微刺激作用, 大于 10 mg kg^{-1}时产生抑制作用, 随着 Ge 浓度增加, 代谢率不断下降, 当 200 mg kg^{-1}时, 抑制率达 60.8%。

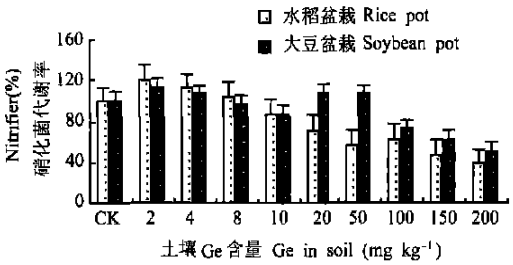

图4 Ge对土壤硝化细菌代谢率的影响

Fig. 4 Effect of Ge added to soil on nitrifier survival rate

2.1.5 土壤添加Ge对土壤明亮发光杆菌发光度影响 用明亮发光杆菌发光度法是利用土壤外加毒物会对T3发光菌细胞内部的ATP、萤光素、萤光酶发光系统发生破坏作用,影响其发光程度的原理而设计的。当T3发光菌群中一个细胞受抑制或死亡时,细胞内ATP立即消失,三要素发光系统受到破坏,该细胞即停止发光。当毒性增大时,T3发光菌群停止发光的细胞数量增多,发光度也因之下降。毒性越大,发光度下降越大。

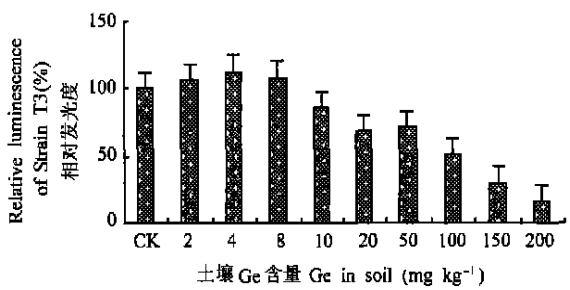

图5 大豆盆栽试验Ge对T3菌发光度的影响

Fig. 5 Effect of Ge added to soil on luminescence of Strain T3

2.2 土壤Ge含量与土壤微生物数量抑制率相关分析及临界值

在土壤Ge含量2~200 mg kg^{-1}范围,水稻盆栽试验土壤Ge含量与土壤细菌、放线菌、真菌数量之间无相关性。大豆盆栽试验Ge含量与细菌和真菌数量之间无相关性,而与放线菌数量呈现一定的相关性,但相关性不显著。回归分析表明,土壤Ge浓度与土壤硝化细菌代谢率之间相关性极显著(表1),由此得Ge的EC_{25}值,水田土壤为69.2 mg kg^{-1},旱地土壤为111 mg kg^{-1}。在土壤Ge含量2~200 mg kg^{-1}范围,土壤Ge浓度与明亮发光杆菌T3发光度之间有极显著的负相关性($P<0.01$),回归方程为$Y=-0.45X+102.6$, $n=10$, $r=-0.95$。按照T3发光度80%和100%为临界值,计算得土壤Ge临界值分别为50.2 mg kg^{-1}、5.8 mg kg^{-1}。

表1 土壤Ge含量(X)与硝化细菌代谢率(Y)相关分析及临界值

Table 1 Relationship between concentration of Ge (X) and nitrifier survival rate (Y)

	n	r	p	EC_{25}	EC_{50}
水田土壤Ge Paddy Ge	10	-0.85	0.05	69.2	142
旱地土壤Ge Dry land Ge	10	-0.91	0.01	111	203

3 讨 论

土壤微生物是土壤中的活性胶体,代谢活动旺盛。受到重金属污染的土壤,往往富集多种耐重金属的真菌和细菌,微生物可通过多种作用方式影响土壤中重金属的毒性[1~5]。微生物对土壤中金属活性的影响主要体现在以下四方面:1)生物吸附和富集作用,2)溶解和沉淀作用,3)氧化还原作用,4)菌根真菌与土壤金属有效性[4,6]。

本文着重讨论土壤添加Ge对土壤微生物的生态效应及土壤Ge污染临界含量,盆栽试验表明,在土壤Ge含量2~200 mg kg^{-1}范围,低浓度Ge对土壤细菌、真菌、放线菌有刺激作用,随着浓度增高,而交替出现抑制和刺激作用,发现"抗性"现象。这与重金属污染的土壤对土壤酶活性影响结果较一致[7]。可以认为当重金属在土壤中达到一定质量分数时,大部分微生物死亡,而一小部分微生物在有毒物质污染下能生存下来,自行繁殖,从而产生抗性,表观上活性值降低后又增大,有时还会出现多个抗性峰。本研究表明,在土壤Ge含量2~200 mg kg^{-1}范围,水稻盆栽和大豆盆栽试验中,土壤Ge含量与细菌和真菌数量之间无相关性,土壤Ge含量与放线菌数量之间无相关性。以上结论与重金属(Cd、As、Pb)对微生物影响比较一致[8,9]。由于Ge和As、Hg同属易被土壤微生物甲基化的金属,某些细菌和真菌如*E. Coli*和链孢霉菌(*Nearospora*)能还原亚硒酸为之元素硒,同时硫还细菌等细菌可以将元素锗还原成气态金属而降低Ge对微生物毒性[4,5]。

在土壤Ge含量2~200 mg kg^{-1}范围,土壤Ge浓度与土壤硝化细菌代谢抑制率之间相关性极显著($P<0.01$),由此得Ge的EC_{25}值,水田土壤为69.2 mg kg^{-1},旱地土壤为111 mg kg^{-1}。土壤发光杆菌T3发光度与土壤Ge含量之间呈现显著负相关性。

这与有关文献报道T3 发光度与重金属浓度之间关系一致[8, 10]。按照T3 发光度 80% 和 100% 为临界值, 计算得土壤 Ge 临界值分别为 50. 2 mg kg^{-1}、5. 8 mg kg^{-1}。

参 考 文 献

[1] Williams C, Thornton I. The use of soil extractants to estimate plant-available molybdenum and selenium in potentially toxic soils. Plant Soil, 1973, 39: 145~ 159

[2] Williams S E, Wollum A G. Effect of cadmium on soil bacteria and actinomycetes. J. Environ. Qual., 1981, 10: 142~ 144

[3] Somers E. Fungicidal action of metal iron. Ann. Appl. Biol., 1961, 49: 246~ 255

[4] Compeau G C, Bartha K. Sulfate-reducing bacteria: Principal methoylators of mercury in anoxic estuarine sediment. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50: 498~ 502

[5] Robert M, Berthelin J. Role of biological and biochemical factors in soil minerals weathering. In: Huang P M, Schnizer M. eds. Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. Madison: Soil Sci. Soc. Am., Special Publication, 1986, 17: 453~ 465

[6] 郭学军, 黄巧云, 赵振华, 等. 微生物对土壤环境中重金属活性的影响. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 105~ 110. Guo X J, Huang Q Y, Zhao Z H, *et al*. Effects of microorganisms on mobility of heavy metals in soil environment (In Chinese). Chinese J. Appl. Environ. Biol., 2002, 8(1): 105~ 110

[7] 沈桂琴, 廖瑞章. 重金属、矿物油对土壤酶活性的影响. 农业环境保护, 1987, 6(3): 24~ 27. Shen G Q, Liao R Z. Effect of heavy metals and mineral oil on soil enzymic activities (In Chinese). Agro-Environmental Protection, 1987, 6(3): 24~ 27

[8] 顾宗濂, 谢思琴, 吴留松, 等. 土壤中镉、砷、铅的微生物效应及其临界值. 土壤学报, 1987, 24(4): 318~ 323. Gu Z L, Xie S Q, Wu L S, *et al*. Microbial effects of cadmium, arsenic and lead in soil and their critical value (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1987, 24(4): 318~ 323

[9] Maliszewsk W, Wierzbicka H. Influence of Cd, Pb, Zn and Cu on the growth and activity of soil microflora. In: Maliszewsk W. ed. Int. Symp., Interaction of Soil Microflora and Environment Pollution, Part Ⅱ. Pulawy, Poland, 1977. 47~ 54

[10] 李　彬, 李培军, 王　晶, 等. 重金属污染土壤毒性的发光菌法诊断. 应用生态学报, 2001, 12(3): 443~ 446. Li B, Li P J, Wang J, *et al*. Photobacterium phosphoreum assay on the toxicity of soil contaminated by heavy metals (In Chinese). Chinese J. App. Ecol., 2001, 12(3): 443~ 446

[11] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986. 220~ 233. Xu G H, Zheng H Y. Handbook of Analysis Method for Soil Microorganisms (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1986. 220~ 233

ECOLOGICAL EFFECTS OF GERMANIUM-POLLUTION ON SOIL MICROORGANISMS AND THEIR CRITICAL VALUE

Lin Kuangfei[1]　Xu Xiaoqing[2]　Zheng Li[2]　Shao Zhihui[3]　Xiang Yaling[3]

(1 Research Center of Risk Assessment and Management on Hazardous Chemicals, East China University of Science and Technology, Shanghai　200237, China)

(2 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan　430072, China)

(3 Agro-Environmental Monitoring Center of Wuhan, MOA, Wuhan　430070, China)

Abstract　Ecological effects of germanium addition to soil on microorganisms and their critical value were emphatically discussed in this paper. A pot experiment was carried out with results demonstrating that low Ge concentration had stimulating effect on soil bacteria, fungi, actinomycetes, but when the content of Ge in the soil increased, the stimulating effect began to alternate with inhabiting one. In the pot experiment, the luminescence of *photobacterium phosphoreum spp*. T3 showed a strongly negative relationship to the concentration of Ge. If "100%" and "80%" of the luminescence of Strain T3 is deemed as critical values for two grades, the critical concentrations of Ge in soil were estimated to be 50. 2 mg kg^{-1} and 5. 8 mg kg^{-1}, respectively.

Key words　Germanium pollution; Microorganism; Ecological effect; Critical value