

# 重金属复合污染对水稻土微生物 生物量和群落结构的影响<sup>\*</sup>

吴建军 蒋艳梅 吴愉萍 徐建明<sup>†</sup>

(浙江大学环境与资源学院, 浙江省亚热带土壤与植物营养重点实验室, 杭州 310029)

**摘要** 以浙江富阳小冶炼厂附近水稻土为例, 采用氯仿熏蒸法、稀释平板培养法和磷脂脂肪酸 (PLFA) 技术研究了重金属复合污染对水稻土微生物生物量和群落结构的影响。结果表明, 自然状态下铜、锌、镉、铅复合污染降低了土壤微生物量。土壤微生物群落结构对重金属复合污染产生了响应, 约 41.82% 的土壤微生物群落结构的改变可由重金属污染来解释。污染程度高的土壤中, 含脂肪酸 12 0, i15 0, i17 0, 18 0, i16 0, 19 0 相对较高的微生物占优势, 而在污染程度低的土壤中, 含脂肪酸 20 2 6, 9c, 20 0, 16 1 9c, a15 0, a16 0, 18 1 7, 10Me16 0, 10Me19 0 的相对含量较高的微生物占优势。反映在具体类群上, 随着污染程度的增加, 微生物向着  $C_{mic}/N_{mic}$  低、真菌相对含量增加, 放线菌与革兰氏阴性菌含量相对减少的趋势发展。

**关键词** 重金属; 微生物群落; PLFA; 水稻土  
**中图分类号** Q938.1 **文献标识码** A

水稻土主要分布在我国广大南方地区, 部分水田由于其间零星分布的一些小冶炼厂违规排放废水、废气, 受到了重金属的严重污染, 使食品安全和生态健康受到了重大威胁。有关研究表明, 土壤重金属复合污染能够明显降低土壤微生物生物量<sup>[1]</sup>, 降低活性细菌菌落的数量<sup>[2]</sup>等等, 从而影响土壤微生物群落结构和功能<sup>[3]</sup>。但是, 目前国内复合污染的研究主要通过人工大剂量添加重金属, 由此带来的由于重金属一次性大量施入对土壤微生物产生的短期“触杀”<sup>[4]</sup>和吸附效应, 使这些人为试验结果与“自然”污染土壤结果存在较大差异。并且, 在研究手段上多采用传统的培养技术、Biolog技术或是 16S rDNA 技术对土壤微生物群落功能多样性和遗传多样性进行研究<sup>[5, 6]</sup>。我国近年来运用磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acid, PLFA) 技术在土壤微生物鉴定<sup>[7]</sup>以及水稻土壤水分管理<sup>[8]</sup>等方面做了一些研究, 但在分析重金属复合污染土壤微生物群落结构变化方面的研究尚未见报道, 因而采用 PLFA 技术对重金属长期、缓慢积累下农田土壤微生物的响应进行研究是对国内重金属污染土壤微生物效

应研究方法的一个重要补充。

磷脂脂肪酸分析技术是一种不需要经过培养就能获得土壤中微生物信息的方法。它存在于活细胞的细胞膜中, 具有属的特异性, 不同属的微生物通过不同生化途径而形成不同的 PLFA s<sup>[7]</sup>。因此, 土壤中的 PLFA s 组成和含量的变化在一定程度上可反映土壤中微生物量和群落的动态变化。对其进行提取, 并依据其中的特征脂肪酸指示的微生物种类, 如细菌、真菌、放线菌及革兰氏阳 (阴) 细菌等, 可对土壤中微生物群落结构及其数量进行表征<sup>[9]</sup>。与微生物量等传统土壤生化指标相比, PLFA 法分析得到的信息, 不仅可以表征活体微生物在量上的变化, 还可以依据其中特征脂肪酸所指示的特定微生物类型的变化, 揭示微生物群落结构伴随外界环境变化的响应动态。

有鉴于此, 本文对浙江富阳某乡长期受重金属污染的铜锌冶炼厂附近的水稻土进行了采集, 采用传统的方法和磷脂脂肪酸分析法对土壤微生物生物量及群落结构进行研究, 以探索长期自然条件下重金属污染对土壤微生物的影响, 旨在探索重金属

<sup>\*</sup> 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (No. 2005CB121104)、浙江省自然科学基金项目 (No. Y504128) 和浙江省重大重点科技项目 (No. 2006C1207 和 2005E10004) 资助

<sup>†</sup> 通讯作者, Tel. 0571-86971955, E-mail: jnxu@zju.edu.cn

作者简介: 吴建军 (1956~), 男, 浙江余杭人, 硕士, 教授, 主要从事土壤生态、土壤化学与环境的研究。E-mail: wujianjun@zju.edu.cn

收稿日期: 2007-04-28; 收到修改稿日期: 2007-08-20

污染与土壤生物学指标之间的内在联系,以期为重  
金属污染农田的生态调节和修复提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试土壤理化性状和重金属含量测定

供试土壤采集于浙江省富阳市某乡小冶炼厂  
附近的水田,土壤类型为河流冲积物培沙泥田(属  
水稻土土类),按中国土壤系统分类属普通筒育水  
耕人为土。以冶炼厂为中心,在距离 50 m、100 m、

150 m、200 m、250 m、350 m直线上共采集 6个土样  
(编号分别为 1~6)。每个土样采 3个重复样,每个  
重复样由 5点 0~20 cm表层土壤混匀而成。新鲜  
土样采集后拣去植物残体,一部分土样过 2 mm尼  
龙网筛后,装入无菌袋中放置于 4℃冰箱中,供微生  
物指标分析;一部分土样于室内自然风干后研磨过  
筛,供土壤基本理化性状测定<sup>[9]</sup>,结果列于表 1。土  
壤铜、锌、镉、铅全量分析采用氢氟酸-硝酸-高氯酸消  
煮-原子吸收分光光度法测定,有效态铜、锌、镉、铅  
采用 DTPA 浸提-原子吸收分光光度法测定<sup>[10]</sup>。

表 1 供试土壤的基本理化性状

Table 1 Basic physico-chemical properties of the sampled soils

土样号 Soil No.	离冶炼 厂距离 Distance (m)	pH (H <sub>2</sub> O)	有机碳 Org. C (g kg <sup>-1</sup> )	全氮 Total N (g kg <sup>-1</sup> )	水解氮 Aailable N (mg kg <sup>-1</sup> )	CEC (cmol kg <sup>-1</sup> )	颗粒组成 Particle composition (%)		
							2~0.05 mm	0.05~0.002 mm	<0.002 mm
1	50	7.87	26.87	2.87	171.3	11.67	23.5	56.5	20.0
2	100	7.88	30.29	3.05	157.3	15.03	11.1	68.4	20.4
3	150	7.86	27.89	3.19	236.7	12.23	18.5	65.7	15.8
4	200	7.80	29.55	3.50	230.3	10.57	15.0	67.7	17.3
5	250	7.81	28.31	2.99	214.7	16.07	14.7	67.0	18.3
6	350	7.27	30.87	3.48	187.3	14.87	21.4	62.3	16.4

### 1.2 土壤微生物培养及微生物量碳、氮的测定

土壤微生物采用稀释平板培养法,细菌用牛肉膏  
蛋白胨培养基、放线菌用改良高氏培养基、真菌用马  
丁氏培养基。微生物量碳和氮均用氯仿熏蒸、0.5  
mol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>提取,TOC-500自动分析仪分析<sup>[11]</sup>。

### 1.3 磷酸脂肪酸(PLFA)测定

1959年 Bligh和 Dyer率先提出了土壤中 PLFA  
样品提取方法<sup>[12]</sup>。本方法在早期方法的基础上,进  
行了部分改进。经冷冻干燥的土样 3.00 g,加入  
Bligh和 Dyer提取液振荡 2 h反复提取上清液,加  
柠檬酸缓冲液和氯仿至上清液中,静置过夜后将下

层有机相转移至试管中,氮气吹干。将提取的脂类  
用氯仿转移至 SPE硅胶柱中。加氯仿、丙酮及甲  
醇,洗脱中性酯、醚酯及磷脂。收集洗脱液用氮气  
吹干。加入甲醇甲苯混合液,溶解磷脂之后加 1 ml  
0.2 mol L<sup>-1</sup>的氢氧化钾甲醇溶液 37℃水浴 15 min,  
再加入 2 ml正己烷氯仿混合液、0.3 ml 1 mol L<sup>-1</sup>的  
醋酸及 2 ml去离子水,经涡旋振荡离心分离后转移  
上层有机相经氮吹后供 GC测定。实验使用的色谱  
柱为 Agilent19091B-102。气相色谱各峰值通过  
MDI软件进行识别、各参数由 MDI Sherbock 程序  
(MDI, Inc. Newark, DE)设置调用。

表 2 用于表征微生物类型的 PLFA

Table 2 Common phospholipids biomarkers representing different types of microbes

名称 Name	特征 PLFA s Characteristic PLFA s	参考文献 Reference
细菌 Bacteria	i15 0, a15 0, 15 0, i16 0, 16 1 7c, i17 0, a17 0, 17 0, cy17 0, 18 1 7c, cy19 0	[13], [14]
真菌 Fungi	18 1 9c	[15]
放线菌 Actinomycete	10Me16 0, 10Me17 0, 10Me18 0, 10Me19 0	[13]
革兰氏阳性菌	i14 0, i15 0, a15 0, i16 0, i17 0, a17 0	[13], [15]
革兰氏阴性菌	16 1 7c, 16 1 9c, cy17 0, 18 1 7c, 19 1 11c, cy19 0	[13], [15]

Gram-positive bacteria (G+); Gram-negative bacteria (G-)

特定脂肪酸采用简写符号命名,即 (a/i) X Y Z。其中, X表示脂肪酸中碳原子的数目, Y表示双键的数目,碳原子数和双键数之间以冒号隔开;表示双键的位置(甲基端起), Z表示双键的位置在第 Z个碳原子上; c、t分别表示顺式及反式脂肪酸, a和 i分别指反式支链脂肪酸及异式支链脂肪酸, cy表示环状脂肪酸, 10Me表示脂肪酸分子中在距离羧基末端第 10个碳原子上有一个甲基团。

本文中,用于表征不同类群土壤微生物的 PLFA见表 2。

#### 1.4 数据表达及统计分析

实验数据采用 Microsoft Excel 2003 处理,主成分分析(Principal component analysis, PCA)和相关性分析等采用统计软件 SPSS 11.5 实现。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤重金属污染概况

供试土壤中全铜、全锌、全镉、全铅的变化范围分别为 66.67 ~ 1 848 mg kg<sup>-1</sup>、81.60 ~ 1 579 mg kg<sup>-1</sup>、4.33 ~ 11.55 mg kg<sup>-1</sup>、51.84 ~ 1 185 mg kg<sup>-1</sup>,土壤有效铜、有效锌、有效镉、有效铅的含量范围为 6.51 ~ 120.3 mg kg<sup>-1</sup>、10.93 ~ 75.74 mg kg<sup>-1</sup>、0.38 ~ 1.53 mg kg<sup>-1</sup>、9.47 ~ 67.36 mg kg<sup>-1</sup>(表 3)。浙江省土壤中铜、锌、镉、铅的背景值分别为 21.0 mg kg<sup>-1</sup>、74.9 mg kg<sup>-1</sup>、0.065 mg kg<sup>-1</sup>、24.0

mg kg<sup>-1</sup>[16],这表明供试土壤均受到铜、锌、镉、铅一定程度的污染,与中华人民共和国土壤环境质量标准(GB15618-1995)比较可知,所有供试土壤镉含量均超标,1~4号土壤铜、锌含量超标,铜、锌、镉是最主要污染物。随着采样点离冶炼厂距离的增加,土壤铜、锌、铅全量和有效态含量均明显降低(表 3)。土壤镉全量和有效态在离冶炼厂最近(50 m)的采样点中含量为其他距离采样点的 2倍~4倍左右(表 3)。

### 2.2 重金属污染对土壤微生物生物量的影响

本文测定了土壤微生物生物量碳、氮和总磷脂含量,用于表征土壤微生物生物量,结果列于表 4。污染土壤的微生物生态效应受污染物、土壤理化性状等多种因素的影响。鉴于本文各采样点的基本理化性状及其他条件基本一致(表 1),故主要分析污染物对土壤微生物的影响。由表 4可知,重金属胁迫对土壤微生物生物量的影响与重金属含量有密切关系,随着采样点离冶炼厂距离的增加,污染程度下降,土壤微生物生物量碳、氮及总磷脂的含量均有明显的增加趋势。微生物生物量碳、氮和总磷脂分别在 183 ~ 518 mg kg<sup>-1</sup>、88.0 ~ 130 mg kg<sup>-1</sup>和 220 ~ 764 nmol g<sup>-1</sup>之间变动。相关分析表明,微生物生物量碳、总磷脂与土壤有效铜、锌、铅、镉呈极显著负相关( $p < 0.01$ ),微生物生物量氮与土壤有效铜、锌、铅、镉呈显著负相关( $p < 0.05$ )(表 5),重金属污染降低了土壤微生物生物量。

表 3 供试土壤的重金属含量

Table 3 Heavy metal contents of the soils tested (mg kg<sup>-1</sup>)

土样号 Soil No.	全铜 Total Cu	全锌 Total Zn	全镉 Total Cd	全铅 Total Pb	有效铜 Avail. Cu	有效锌 Avail. Zn	有效镉 Avail. Cd	有效铅 Avail. Pb
1	1 848	1 579	11.55	1 185	120.3	75.74	1.53	67.36
2	281.7	783.4	5.03	264.6	38.93	27.61	0.68	26.52
3	122.7	324.6	4.33	141.1	19.18	13.02	0.59	17.06
4	141.8	266.0	5.00	112.7	15.40	12.40	0.38	13.55
5	80.31	104.8	5.21	68.17	8.03	10.93	0.42	9.47
6	66.67	81.60	6.05	51.84	6.51	11.99	0.42	10.54

### 2.3 重金属污染对土壤微生物群落结构的影响

用菌落平板计数法测定了细菌、真菌、放线菌的菌落数,结果列于表 6。由表 6可见,供试土壤的细菌菌落的范围为 0.14 × 10<sup>7</sup> ~ 2.37 × 10<sup>7</sup> CFU g<sup>-1</sup>土,真菌的菌落范围为 2.07 × 10<sup>4</sup> ~ 6.71 × 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup>土,放线菌的范围为 0.82 × 10<sup>5</sup> ~ 2.81 × 10<sup>5</sup> CFU g<sup>-1</sup>土。并且细菌、真菌和放线菌的菌落数随着重金属污染程度的下降而增加。以磷脂脂肪酸表征的

细菌、真菌与放线菌含量范围分别为 94.1 ~ 315 nmol g<sup>-1</sup>、6.79 ~ 20.1 nmol g<sup>-1</sup>和 27.7 ~ 122 nmol g<sup>-1</sup>,随着采样点离冶炼厂距离的增加,重金属污染程度的减轻,各类群微生物 PLFA 含量增加,其分布趋势与以菌落平板计数法表征的微生物含量分布趋势一致。本试验中,传统的培养技术与非培养的 PLFA 技术在表征重金属污染土壤细菌、真菌和放线菌的响应上具有一致性。

表 4 供试土壤微生物生物量

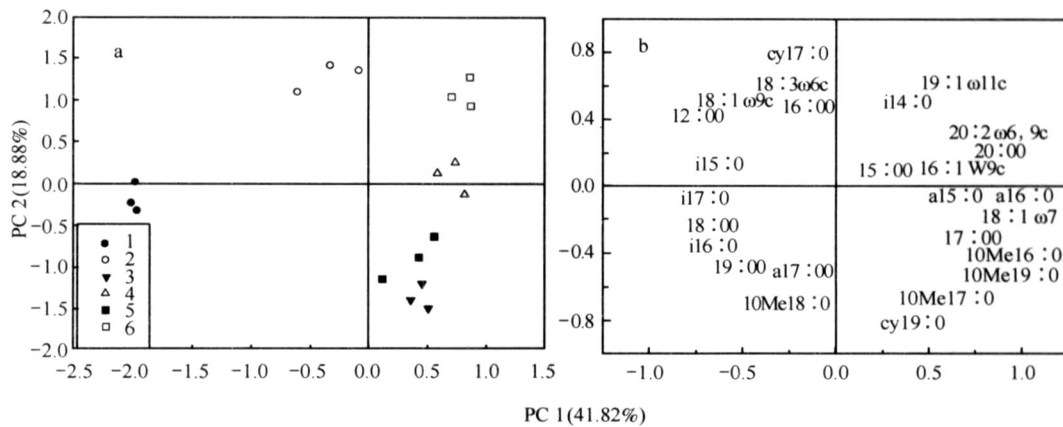
Table 4 Soil microbial biomass

土样号 Soil No.	离冶炼厂距离 Distance (m)	微生物生物量碳 Microbial biomass carbon ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	微生物生物量氮 Microbial biomass nitrogen ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	微生物 C/N $C_{\text{mic}}/N_{\text{mic}}$	总磷脂 Total phospholipid ( $\text{nmol g}^{-1}$ )
1	50	183 $\pm 17^{1)}$	88.0 $\pm 9.4^{1)}$	2.08	220 $\pm 11^{1)}$
2	100	324 $\pm 28$	91.4 $\pm 16.9$	3.54	382 $\pm 15$
3	150	391 $\pm 38$	93.3 $\pm 6.9$	4.19	487 $\pm 83$
4	200	428 $\pm 38$	116 $\pm 4$	4.46	500 $\pm 38$
5	250	432 $\pm 23$	130 $\pm 9$	3.29	638 $\pm 78$
6	350	518 $\pm 32$	110 $\pm 23$	3.95	764 $\pm 23$

1) 均值  $\pm$  标准差 Mean  $\pm$  S.D.

对供试土壤磷脂脂肪酸百分含量进行的主成分分析结果见图 1。图中 PC1 解释了微生物群落结构变化中的 41.82% 的变异, PC2 解释了 18.88% 的变异, 并将离污染源不同距离的采样点明显区分, 大致呈现距污染源越近, PC1 值越小及距污染源越远, PC1 值越大的趋势 (图 1a)。将两主成分值与土壤有效态重金属含量做相关分析, 结果列于表 5。结果表明 PC1 与有效铜、锌、镉、铅呈极显著负相关水平, 相关系数分别为 -0.933\*\*、-0.934\*\*、-0.908\*\*、-0.881\*\*, PC2 与土壤有效铜、锌、镉、铅含量均未达到显著相关水平, 铜、锌、镉、铅重金属复合污染对土壤微生物群落结构的影响在第一

主成分上得到了很好的表征: 随着污染程度的加重, 土壤微生物群落结构发生了演替。相应地, 各特征脂肪酸的相对丰度也发生规律性变化: 在距离污染源近、污染程度高的土壤中, 脂肪酸 12:0, i15:0, i17:0, 18:0, i16:0, 19:0 的含量相对较高, 这些脂肪酸多为细菌的指示性脂肪酸, 而在距离污染源远、污染程度低的土壤中, 脂肪酸 20:2 $\omega$ 6, 9c, 20:0, 16:1 $\omega$ 9c, a15:0, a16:0, 18:1 $\omega$ 7, 10Me16:0, 10Me19:0 的相对含量较高 (图 1b), 这些脂肪酸多为放线菌和革兰氏阴性菌的指示性脂肪酸。说明放线菌和革兰氏阴性菌对于重金属的污染较为敏感。



a. 以各采样点土壤进行表征。1~6 分别表示距离冶炼厂 50 m、100 m、150 m、200 m、250 m、350 m 上的采样点。b. 以各脂肪酸在 PC1 和 PC2 上的因子载荷值进行结果表征  
a. Characterization of soils from sampling points. The numbers from 1 to 6 denote distance (50 m, 100 m, 150 m, 200 m, 250 m, 350 m) from the smeltery respectively. b. Characterization of factor loadings of the individual PLFA at PC1 and PC2

图 1 供试土壤 PLFAs 的 PCA 分析

Fig. 1 PCA of soil phospholipid fatty acids (PLFAs)

为更清楚地揭示重金属污染对土壤微生物群落结构的影响, 将微生物生物量碳、氮比 ( $C_{\text{mic}}/N_{\text{mic}}$ ), 以磷脂脂肪酸相对含量表征的细菌、真菌、革

兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌分别与土壤重金属有效态含量进行相关分析 (表 5)。结果表明  $C_{\text{mic}}/N_{\text{mic}}$  与有效铜、锌、铅、镉呈极显著负相关, 说明了重金

属污染改变了土壤微生物群落,使得土壤微生物随着污染程度的升高,向  $C_{mic}/N_{mic}$  低的微生物优势群落转化。以 PLFA 表征的真菌、放线菌和革兰氏阴性菌的相对含量与土壤有效态重金属的含量分别呈现显著正相关、显著负相关和显著或极显著负相

关,说明随着有效态铜、锌、铅、镉含量的增加,土壤中微生物群落向着真菌相对含量增加,放线菌与革兰氏阴性菌含量减少的趋势发展,而细菌和革兰氏阳性菌的相对含量则变化不大。

表 5 土壤有效铜、锌、镉、铅与土壤生物学指标之间的相关系数

Table 5 Correlation coefficients of soil biological indicators with soil available Cu, Zn, Cd, Pb

项目 Items	有效铜 Avail. Cu	有效锌 Avail. Zn	有效镉 Avail. Cd	有效铅 Avail. Pb
微生物生物量碳 $C_{mic}$	-0.893 **	-0.870 **	-0.840 **	-0.845 **
微生物生物量氮 $N_{mic}$	-0.542 *	-0.521 *	-0.564 *	-0.527 *
总磷脂 Total PLFA	-0.808 **	-0.764 **	-0.747 **	-0.752 **
微生物生物量碳氮比 $C_{mic}/N_{mic}$	-0.674 **	-0.661 **	-0.599 **	-0.632 **
第一主成分 PC1	-0.933 **	-0.934 **	-0.908 **	-0.881 **
第二主成分 PC2	0.022	0.071	-0.033	0.043
细菌 PLFA Bacteria PLFA	0.057	0.028	0.097	0.068
真菌 PLFA Fungi PLFA	0.502 *	0.545 *	0.505 *	0.502 *
放线菌 PLFA Actinomyce PLFA	-0.543 *	-0.552 *	-0.487 *	-0.498 *
革兰氏阴性菌 G-	-0.672 **	-0.696 **	-0.545 *	-0.679 **
革兰氏阳性菌 G+	0.255	0.238	0.24	0.269

注:  $n=18$ ; \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$  Note:  $n=18$ ; \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ .

表 6 土壤细菌、真菌与放线菌的含量

Table 6 Counts and PLFA contents of soil bacteria, fungi and actinomyce

土样号 Soil No.	菌落数 Number (CFU $g^{-1}$ 土)			PLFA 表征含量 PLFA content (nmol $g^{-1}$ )		
	细菌 Bacteria ( $\times 10^7$ )	真菌 Fungi ( $\times 10^4$ )	放线菌 Actinomyce ( $\times 10^5$ )	细菌 Bacteria	真菌 Fungi	放线菌 Actinomyce
1	0.14	2.07	0.82	94.1 $\pm$ 4.65	6.79 $\pm$ 1.16	27.7 $\pm$ 2.56
2	0.58	2.93	1.89	185 $\pm$ 24.0	7.31 $\pm$ 3.71	44.6 $\pm$ 0.93
3	0.50	2.11	1.78	225 $\pm$ 32.9	7.83 $\pm$ 1.80	83.8 $\pm$ 12.9
4	1.13	4.38	2.35	203 $\pm$ 15.7	10.1 $\pm$ 6.15	81.6 $\pm$ 6.07
5	2.37	4.17	2.23	269 $\pm$ 43.9	11.3 $\pm$ 5.03	102 $\pm$ 30.8
6	1.80	6.71	2.81	315 $\pm$ 18.3	20.1 $\pm$ 0.24	122 $\pm$ 4.17

注: PLFA 含量为平均值  $\pm$  标准差 Note: PLFA contents are mean  $\pm$  S.D

### 3 讨论

土壤微生物生物量通常以熏蒸法测定的生物量碳、氮的含量来表示。磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析则是通过提取微生物细胞膜中的磷脂成分,定量后得到总磷脂含量 (单位:  $nmol g^{-1}$ ),用于表征土壤微生物生物量,是新兴起来的一种表征微生物生物量的方法。对 PLFA 法与熏蒸法得到的数据进行相关分

析,表明总磷脂与  $C_{mic}$  达到了极显著的相关水平 ( $R^2 = 0.8856, p < 0.01$ ),与  $N_{mic}$  达到了显著相关水平 ( $R^2 = 0.2834, p < 0.05$ ),说明这两种用于表征土壤微生物生物量的方法,在用于重金属污染土壤微生物的响应时,可得到一致的结果。Fierer 等<sup>[17]</sup>在研究微生物生物量随土层深度变化时也得出 PLFA 法与熏蒸法得到的生物量相关。因此,用熏蒸法测定土壤微生物生物量仍不失为一种实用和经济有效的方法。

重金属对微生物生物量有显著的影响。本文研究表明,在长期受重金属铜、锌、镉、铅复合污染的水稻土中,污染程度越高,微生物生物量越低。王秀丽等<sup>[18]</sup>的研究也表明重金属能够降低土壤微生物生物量碳、氮和微生物商。Fritze等<sup>[19]</sup>在研究Cu-Ni矿山土壤中发现,Cu-Ni复合污染地区的土壤微生物生物量较对照区下降20%以上。Frøstegård等<sup>[20]</sup>以PLFA含量作为测定微生物生物量的指标,也表明森林和旱地土壤微生物生物量随着外源镉浓度的增加而下降。重金属污染引起微生物生物量的减少,具体反映在细菌、真菌和放线菌数量的减少上。本文用菌落计数法和PLFA法的测定结果表明,随着污染程度的提高,细菌、真菌和放线菌的菌落数和PLFA值均有一定程度的降低趋势(表4),两种方法具有一致性。但是,用平板计数法进行总量分析不能揭示哪些微生物对重金属胁迫更为敏感,PLFA法则能提供更多的相关信息。

本文采用PLFA相对含量对微生物群落结构进行研究,发现微生物群落结构在离污染源不同距离的采样点上有很大区别(图1)。采用主成分分析法能够明显区分不同污染浓度的土壤,具体表现在随着污染程度的降低,其在主成分分布图上向X轴的正方向发展。相关分析也表明第一主成分值与有效铜、锌、镉、铅含量相关,本试验中微生物群落结构的变化约有41.82%的变异是由重金属胁迫引起的。Suhadolc等<sup>[21]</sup>采用土壤随机扩增多态性分析技术(Total soil DNA-RAPD)和PLFA技术研究了重金属长期污染草地土壤中模拟增加重金属活性对土壤微生物群落结构及微生物降解除草剂的影响,结果表明随着土壤中重金属生物有效性的提高,土壤微生物群落结构无论在基因型还是表型上均发生了改变。本文研究的水稻土中,哪些微生物物种及其基因型发生了改变,尚有待于进一步深入研究。

重金属污染对微生物群落结构的改变作用可以通过 $C_{mic}/N_{mic}$ 的变化看出,随着污染程度的升高,土壤微生物向 $C_{mic}/N_{mic}$ 低的优势群落转化。另一方面,本文也发现随着有效态铜、锌、铅、镉含量的增加,土壤微生物群落向着真菌相对含量增加的趋势发展。有报道指出大多数真菌的碳氮比要较细菌高<sup>[22]</sup>,则通过PLFA表征的真菌相对含量随着污染程度的提高,原则上应该增加土壤 $C_{mic}/N_{mic}$ ,而上述结果与此相左,可能原因是:以PLFA表征的真菌数量相对于细菌而言太小,仅为细菌的1/14~1/28,以至于真菌相对含量增加不能够达到改变土壤

$C_{mic}/N_{mic}$ 的程度。微生物群落对重金属的响应机理,可能是一定程度的重金属污染改变了原有种群内部、种群之间的竞争关系,导致原有优势种群失去其优势作用<sup>[5]</sup>,或者一部分微生物产生的重金属抗性保护了其他种群的微生物,使群落多样性发生改变<sup>[23]</sup>。本文的结果表明,放线菌与革兰氏阴性菌对重金属污染最敏感,易受抑制,而革兰氏阳性菌则较不敏感。Tupeinen等<sup>[24]</sup>采用废弃木头防腐厂附近荒地土壤,通过<sup>14</sup>C葡萄糖矿化试验和TRFLP技术表明重金属铜、砷、铬污染导致的微生物群落多样性降低,随着时间的延长可以得到补偿,并且这种补偿作用不是恢复到未污染状态,而是产生新的优势种群。本文的结果也表明,不同污染程度水田土壤中优势微生物的种类也不同。

## 4 结 论

本试验中,自然状态下水田土壤铜、锌、镉、铅长期复合污染降低了土壤微生物生物量,并改变了土壤微生物的群落结构。以微生物生物量碳、氮和总磷脂含量表征的土壤微生物生物量与土壤有效铜、锌、铅、镉呈显著负相关( $p < 0.05$ ),随着污染程度下降,生物量明显增加。重金属污染改变了土壤微生物群落结构,其变化约有41.82%的变异由重金属胁迫引起。在污染程度高的土壤中,细菌的指示性脂肪酸含量相对较高,而在污染程度低的土壤中,放线菌和革兰氏阴性菌的指示性脂肪酸相对含量较高;随着污染程度提高,微生物向着 $C_{mic}/N_{mic}$ 低、真菌相对含量增加,放线菌与革兰氏阴性菌含量相对减少的趋势发展。上述土壤微生物生物量、微生物群落结构变化的过程、耐性和机理,以及由此引起的微生物矿化有机质、降解污染物等功能的变化,今后需要进一步加强研究,以便为重金属污染土壤的修复提供科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] Li Y T, Becquer T, Quantin C, *et al* Microbial activity indices: Sensitive soil quality indicators for trace metal stress *Pedosphere*, 2005, 15 (4): 409 ~ 416
- [2] Jordan M J, LeChevalier M P. Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora *Canada Journal of Microbiology*, 1975, 21: 1 855 ~ 1 865
- [3] Pennance T, Frøstgard A, Fritze H, *et al* Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal polluted gradients in coniferous forests *Applied Environmental and Microbiology*, 1996, 62:

- 420~428
- [4] 俞慎,何振立,黄昌勇. 重金属胁迫下土壤微生物和微生物过程研究进展. 应用生态学报, 2003, 14(4): 618~622. Yu S, He ZL, Huang C Y. Advances in the research of soil microorganisms and their mediated processes under heavy metal stress (In Chinese). Chin J Appl Ecol, 2003, 14(4): 618~622
- [5] 赵祥伟, 骆永明, 滕应, 等. 重金属复合污染农田土壤的微生物群落遗传多样性研究. 环境科学学报, 2005, 25(2): 186~191. Zhao XW, Luo YM, Teng Y, *et al*. Genetic diversity of microbial communities in farmland soils contaminated with mixed heavy metals (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(2): 186~191
- [6] 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 等. 重金属复合污染下红壤微生物活性及其群落结构的变化. 土壤学报, 2005, 42(5): 819~828. Teng Y, Huang C Y, Luo YM, *et al*. Changes in microbial activities and its community structure of red earths polluted with heavy metals (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(5): 819~828
- [7] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. Sherlock MIS系统应用于土壤细菌鉴定的研究. 土壤学报, 2006, 43(4): 642~647. Wu Y P, Xu J M, Wang H Z, *et al*. Application of Sherlock MIS in identification of soil bacteria (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(4): 642~647
- [8] 刘岳燕, 姚槐应, 黄昌勇. 水分条件对水稻土微生物群落多样性及活性的影响. 土壤学报, 2006, 43(5): 828~834. Liu Y Y, Yao H Y, Huang C Y. Influence of soil moisture regime on microbial community diversity and activity in a paddy soil (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 828~834
- [9] Peterson S O, Klug M J. Effect of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 2421~2430
- [10] 鲁如坤主编. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999. 107~240. Lu R K ed. Analytical Methods of Soil and Agro-chemistry Analysis (In Chinese). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1999. 107~204
- [11] Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biol Biochem., 1987, 19: 703~707
- [12] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 1959, 37: 911~917
- [13] Frostegard A, Baath E, Tunlid A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25: 723~730
- [14] Tunlid A, Hoitink H A J, Low C, *et al*. Characterization of bacteria that suppress rhizoctonia damping-off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55: 1368~1374
- [15] Smithwick E A H, Tumer M G, Metzger K L, *et al*. Variation in  $\text{NH}_4^+$  mineralization and microbial communities with standage in lodgepole pine (*Pinus contorta*) forests, Yellowstone National Park (USA). Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37: 1546~1559
- [16] 程街亮, 史舟, 朱有为, 等. 浙江省优势农产区土壤重金属分异特征及评价. 水土保持学报, 2006, 20(1): 103~107. Cheng J L, Shi Z, Zhu Y W, *et al*. Differential characteristics and appraisal of heavy metals in agricultural soils of Zhejiang Province (In Chinese). Journal of Soil and Water Conservation, 2006, 20(1): 103~107
- [17] Fierer N, Schimel J P, Holden P A. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35: 167~176
- [18] 王秀丽, 徐建明, 谢正苗, 等. 重金属铜和锌污染对土壤环境质量生物学指标的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(2): 190~194. Wang X L, Xu J M, Xie Z M, *et al*. Effects of Cu and Zn contamination on soil biological indicators of environmental quality (In Chinese). Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci. Edition), 2002, 28(2): 190~194
- [19] Fritze H, Niini S, Mikkola K, *et al*. Soil microbial effects of a Cu-Ni smelter in southwestern Finland. Biol Fertil Soils, 1989, 8: 87~94
- [20] Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59: 3605~3617
- [21] Suhadolc M, Schroll R, Gättinger A, *et al*. Effects of modified Pb-, Zn-, and Cd-availability on the microbial communities and on the degradation of isoproturon in a heavy metal contaminated soil. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36: 193~195
- [22] Sarathchandra S U, Perrott K W, Boase M R, *et al*. Seasonal changes and the effects of fertilizer on some chemical, biochemical and microbiological characteristics of high-producing pastoral soil. Biol Fertil Soils, 1988, 6: 328~335
- [23] Stephen J R, Chang Y, Macnaughton S J, *et al*. Effect of toxic metal on indigenous soil subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(1): 95~101
- [24] Tupeinen R, Kairesalo T, Häggblom M M. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(1): 39~50

## EFFECTS OF COMPLEX HEAVY METAL POLLUTION ON BIOMASS AND COMMUNITY STRUCTURE OF SOIL MICROBES IN PADDY SOIL

Wu Jianjun Jiang Yanmei Wu Yuping Xu Jianming<sup>†</sup>

(College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University; Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropical Soil and Plant Nutrition, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** Effects of complex heavy metal pollution on biomass and community structure of soil microbes in paddy soil were studied with the aid of the chloroform fumigation-extraction, diluted agar plate cultivation and phospholipid fatty acid (PLFA) techniques, using soil samples collected from paddy fields in the vicinity of a small smeltery in Fuyang County, Zhejiang Province. Results show that soil microbial biomass was reduced in paddy fields polluted by Cu, Zn, Cd and Pb together. Soil microbial community structure was also affected by complex pollution and about 41.82% of the change was attributed to the pollution. Soils high in heavy metal pollution were dominated with microbes high in fatty acids of 12:0, i15:0, i17:0, 18:0, i16:0 and 19:0, while soils low in heavy metal pollution with microbes high in fatty acids of 20:2, 6,9c, 20:0, 16:1, 9c, a15:0, a16:0, 18:1, 7, 10Me16:0 and 10Me19:0. With pollution rising in degree, soil microbes decreased in  $C_{mic}/N_{mic}$ , fungi increased relatively, and the amount of actinomyces and G-bacteria decreased relatively.

**Key words** Heavy metals; Microbial community; PLFA; Paddy soil