

Biolog 方法在区分城市土壤与农村土壤 微生物特性上的应用^{*}

杨元根¹ Paterson E² Campbell C²

(1 中国科学院地球化学研究所, 贵州贵阳 550002)

(2 The Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, UK, AB15 8QH)

摘要 通过利用环境微生物研究中比较可靠有效的 Biolog 方法研究了英国阿伯丁市城市土壤与邻近农村土壤的微生物群落结构和功能多样性, 结果表明在重金属元素胁迫下, 城市土壤的微生物群落结构与农村土壤相比已经发生了显著的改变, 从而导致城市土壤微生物在利用能源碳方面包括消耗量、消耗速度、能源碳的利用种类等发生了一系列改变, 使城市土壤显著区别于农村土壤。

关键词 城市土壤, 土壤微生物, Biolog, 能源碳

中图分类号 S154.37

城市土壤(urban soil)作为人为土的一种特殊类型, 由于其特有的生态功能近年来受到越来越多研究者的重视^[1-2], 考虑到其与城市居民的日常生活息息相关, 现有的研究大多集中在城市土壤中污染物(包括重金属元素和有机污染物)的分布、化学形态及其源区-运移途径-沉降模式等方面^[3-7], 虽然也有部分学者涉及过城市土壤与邻近农村土壤在污染物等方面的差异性比较研究^[8], 但目前尚未有涉及过从农村土壤到城市土壤由于生态功能的转变来研究城市土壤与农村土壤在微生物群落结构方面的差异性以及由此导致的土壤在转化有机质、循环养分功能及降低污染物的土壤毒性功能等等方面。

Biolog 方法是通过测试微生物对单一能源碳利用程度, 来反映微生物群体水平的生理轮廓^[9]。最早是由 Garland 和 Mills^[10]提出来的, 用于测定微生物群落的功能多样性^[11], 但近年来多用于污染物胁迫下的土地利用和扰动对土壤微生物的影响研究^[12-13], 可以区分土壤中单个微生物种群或混合群落, 并可应用于环境体系或模拟体系, 在环境微生物研究中是一种必不可少有效手段。常规的方法是用商业产品 Biolog GN 盘结合根渗出物中常见碳源而制备的 MT5 盘, 共进行 125 碳源的测试, 基本上包括了所有能源碳的种类。但是这样做的成本太高, 而且并不是所有的碳源都能被微生物显著利用, 事实上有些碳源根本不被利用; 据现有研究表明, 少至 20 种甚至 9 种碳源就足够明显地区分微生物对碳源利用生理轮廓上的变异^[14]。Biolog 方法由于其简单、利用自动测定装置能够获得大量有关微生物群落功能方面的重要信息而受到越来越多的重视, 但是它的缺点是

^{*} 中国科学院王宽诚留学基金资助

收稿日期: 2000-08-08; 收到修改稿日期: 2000-10-20

数据处理过程通常比较复杂而繁琐。本研究试图用修改的 Biolog 方法对比城市土壤与农村土壤在微生物群落结构上的差异性,从而探讨人为活动的环境效应。

1 材料与方 法

以英国苏格兰阿伯丁市为研究对象,城市土壤采样点布置在阿伯丁市市区主要交通要道街道两旁及市内主要公园,各采集 14 个土壤样品;并采集了 14 个邻近阿伯丁市市区的农村土壤样品。它们具有相同的成土母质,同属于 Countesswells association 组^[15],具体的采样方法见文献[16],所有湿样先过 6 mm 不锈钢筛,再过 2 mm 筛,并拣出所有可见碎石、植物残体、根系及土壤动物,储存在 4℃ 的冷库中备用。

表 1 MT8 盘中加入的有机碳种类和数量

Table 1 Carbon sources in MT8 plate

编号 No.	碳源 Carbon source	类别 Classification	母液浓度 Stock concentration (mol L ⁻¹)	用量 Volume (μ l)	最终浓度 Target concentration (mmol L ⁻¹)
A1	空白				
B1	葡萄糖	糖类	0.5%	60	4.00
C1	L-天门冬素	氨基酸	0.5%	60	2.94
D1	水杨酸		0.015	150	2.96
E1	甲苯酸	苯	0.015	150	2.96
F1	萘酸		0.015	125	3.56
G1	原儿茶酸	酸	0.015	130	3.42
H1	p-OH 苯甲酸		0.015	150	2.96
A2	苯甲酸		0.015	165	2.69
B2	肉豆蔻酸	饱和	0.015	90	4.94
C2	棕榈酸	脂肪酸	0.015	80	5.56
D2	硬脂酸		0.015	75	5.93
E2	棕榈油酸		0.015	80	5.56
F2	油酸	不饱和	0.015	75	5.93
G2	亚油酸	脂肪酸	0.015	75	5.93
H2	亚麻酸		0.015	75	5.93

Biolog 测试采用修改了的 Biolog MT 盘即污染物 MT8 盘,每个样品共进行 15 种碳源(不包括空白)的测试,具体的碳源组成及其含量见表 1。本方法的原理是:当土壤微生物被接种到预先注入有碳源和染色剂的 MT8 盘中的每个孔(well),培养一定的时间后,由于微生物利用碳源并使染色剂颜色改变,且随碳消耗量的增加颜色加深,通过用一定波长的光(本次研究采用的波长为 590 nm)透过 MT8 盘后产生的光密度值(optical density, OD)大小来判定其颜色的深浅,从而指示碳被利用的程度。具体操作时,称取 10 克鲜土,加入到盛有 100 ml 灭菌去离子水的 250 ml 三角瓶中,在手腕式振荡机上全速振荡 10 min,取 5 ml 上述土壤浸提液加入 45 ml 灭菌去离子水中进行如此 10 倍系列的稀释至 10⁻³ 稀释度,然后离心 10 分钟(1500 r/min, 15℃, brake9),小心地在 MT8 盘的每个孔中接种 150 μ l 上清液,盖上盖,然后用塑料袋密封后放置在 25℃ 的微生物培养室中,并在不同的时间段用 590 nm 的波长,在英国 Crawley 生产的 VMAX

自动读盘机上利用 Microlog Rel 3.5 软件(美国加州 Hayward Biolog 公司生产)进行读数和数据收集。

所有的统计分析均由英国牛津 NAG Ltd. 的 Genstat Rel 5.3 统计软件完成,所有实验均在英国麦考莱(Macaulay)土地利用研究所完成。

2 结果与讨论

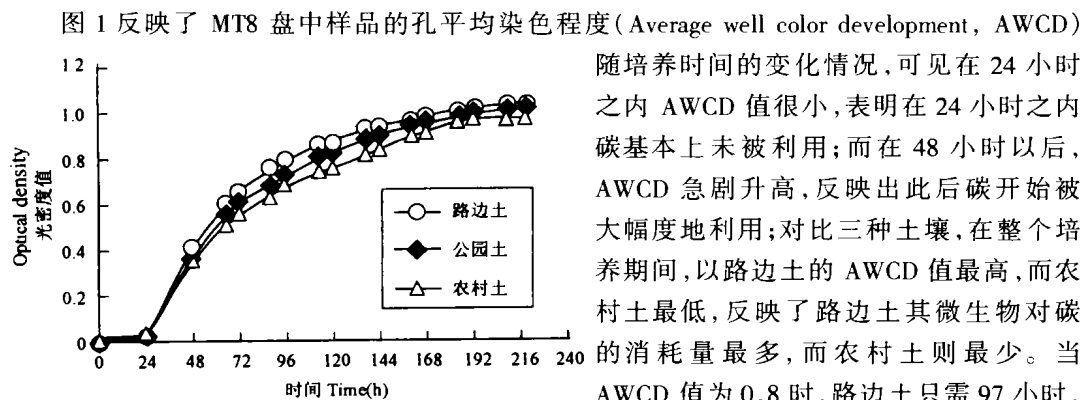


图 1 三种土壤 AWCD 值随时间的变化
(所有碳源的平均)

Fig. 1 Changes in Average Well Color Development with incubation times for three kinds of soils

不同,农村土比较低,而路边土则比较高。

三种土壤中的微生物对不同类碳源的利用程度也有差异,图 2 反映出三种土壤微生物利用四类碳源的不同变化。从图中曲线的变化情况可以分为二组,糖类和氨基酸类可归为一组,其特点是 48 小时时 OD 值急剧升高,而在 72 小时后曲线变化非常平缓,反映出碳源的消耗速度在 48~72 小时最快,但三种土壤间有差异,糖类以农村土的消耗最多,而 144 小时后则以路边土消耗最少;对于氨基酸类而言,以路边土的消耗最多,其次为农村土,而公园土则最少。苯酸、脂肪酸类可归为另一组,其特点是曲线的变化在培养时间内一直呈现升高的趋势,但三种土壤的利用情况各有特色。对苯酸类而言,在 48 小时内被利用的程度尚较低,特别是农村土在 48 小时其 OD 值很低,这种滞后效应与苯酸对某些微生物产生毒性有关^[14],而 65 小时后则突然升高,而且呈现出路边土 > 公园土 > 农村土的变化规律;对于饱和(长链)脂肪酸类而言,三种土壤微生物的利用量均很高,且在利用程度上基本没有明显差别,所以不在图 2 中列出;不饱和脂肪酸在 48 小时后的利用量突然增高,以后则呈继续攀升的趋势,但以农村土的利用程度最低。

纵观不同土壤微生物对不同碳源的利用可知,以氨基酸类、糖类和饱和脂肪酸类的 OD 值最大(>1.5),利用程度最高,而苯酸类、不饱和脂肪酸类的 OD 值最小(<0.7),利用程度最低,而且三种土壤微生物对不同碳源的优势利用选择各异。农村土主要利用糖类,其次为氨基酸类,则对不饱和脂肪酸、苯酸类的利用最少;路边土则主要利用氨基酸类、苯酸类,且对所有碳源的利用均较高;公园土则介于两者之间。可见在城市环境胁迫

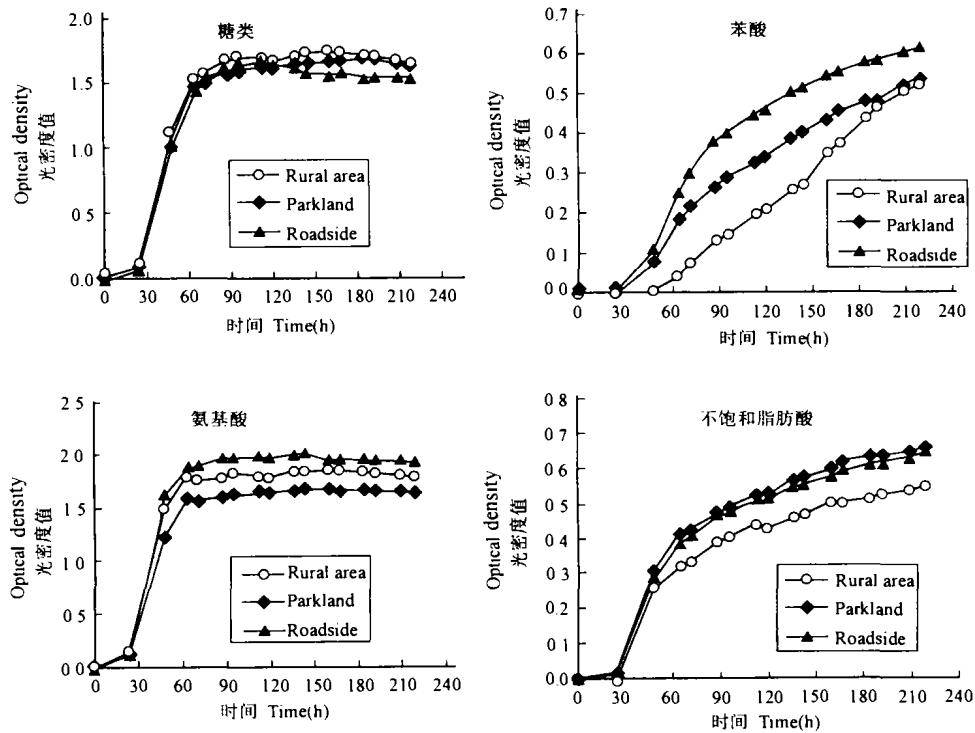


图 2 三种土壤对不同碳源的利用

Fig.2 Utilization of carbon sources by three kinds of soils

下,与农村土壤相比,城市土壤微生物对碳源的优势利用种类和利用程度呈现明显的差异性,这可能反映了土壤微生物的群落结构及其功能多样化发生了一定的改变,产生代谢变异性,从而对能源碳利用选择发生了转移;从另一个角度而言,城市土壤微生物对有机质的转化能力发生了改变,从而进一步影响其养分循环。

从图 2 可以看出,在时间点 48、65 小时曲线的变化比较显著,为了探讨三种土壤微生物群落结构的变化情况,特选 48、65 及 120 和 185 小时四个时间点,对 Biolog 数据进行标准化变换后实施典型变量分析(canonical variate analyses),分析结果所得的主因子分别表示为 CV1、CV2、CV3、CV4),分析结果见图 3。从图 3 的典型变量因子载荷可以明显看出,在 48 小时和 65 小时时,农村土处于 CV1 因子的正端,而且最大值(指的是绝对值,下同)在 48 小时为 5.05,65 小时则为 4.88;城市土壤样品除了个别点处于 CV1 的正端外,均处于 CV1 因子的负端。在 CV2 因子上,农村土主要集中在零点附近,最大值在 48 小时为 -1.53,65 小时则仅为 -0.96,而城市土壤则变化较大,而且路边土的离散更大,48 小时时从 2.38 到 -3.88,65 小时则离散更远离零点,由 3.53 到 -5.93。在 48、65 小时的 CV3 - CV4 因子载荷图上,城市土壤与农村土壤投影点的簇分布也有一定的区别。由此可见, CV1 - CV2 主因子载荷图结合 CV3 - CV4 主因子图,可以明显地区分三种不同土壤的微生物群落特征。

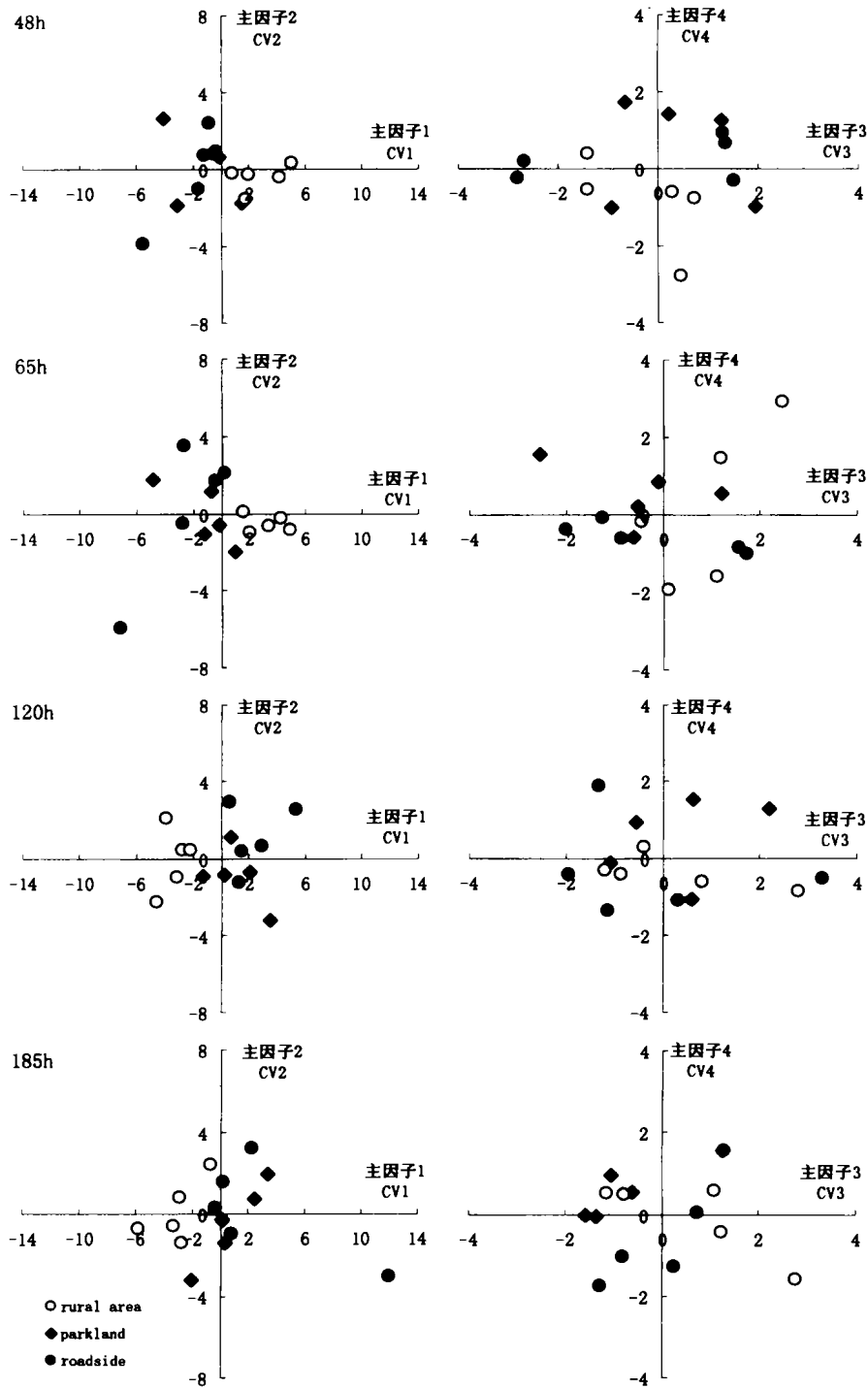


图3 三类土壤典型变量因子载荷图

Fig.3 Loadings of canonical variates for three kinds of soils

时间点 120 和 185 小时的情况则明显不同于时间点 48 小时和 65 小时,在 CV1 - CV2 因子图上,农村土处于 CV1 因子的负端,最大值从 120 小时的 -4.51 变为 185 小时的 -5.76;而城市土壤则主要处于 CV1 因子的正端,且以路边土的离散更大,最大值从 120 小时的 5.27 变为 185 小时的 12.01。在 CV3 - CV4 图上,农村土集中在 CV4 的零点附近,与 120 小时相比,185 小时时则向负端有一定程度偏移;120 小时时路边土多数点分布在 CV3 的负端,而 185 小时时则多数点分布在 CV3 的正端,且离散较小,公园土的分布与路边土恰恰相反。

可见在不同的时间点,即 48 小时、65、120 和 185 小时,农村土与城市土壤的区别越来越显著,而且同一土壤在不同时间点的区分亦更加显著。Biolog 数据的因子载荷通常反映了微生物群落的生理轮廓^[17],是其群落结构和功能多样化的具体体现。图 3 的结果很好地显示了农村土与城市土壤间微生物群落结构有明显的差异性,在 CV1 - CV2 主因子图上,农村土的投影点总是比较集中,而城市土壤则更加分散,反映出农村土中低水平、稳态的微生物群落结构,在城市环境中则呈现多样化,而且随时间的增长显示出更显著的差异性。

阿伯丁市地处英国东北部,重工业并不发达,现有研究表明:城市土壤中重金属 Cu、Pb、Zn 已有严重积累,并与交通密度密切相关^[16]。前人工作表明,城市土壤中积累的 Cu、Pb、Zn 等重金属元素是典型的人类活动成因素^[18-19]。可见,由于人为活动的影响造成了重金属元素在阿伯丁市土壤中的积累,重金属元素积累对土壤生态系统的影响前人已经做过较多的工作,特别是认识到重金属污染不仅能降低芳香族化合物的代谢变异性^[20],而且能导致微生物群落结构和功能多样性的改变^[21],因此阿伯丁市土壤中重金属元素的积累导致与农村土相比其土壤微生物的群落结构和功能多样性发生了变化,微生物活动由低水平、稳定态变为不稳定,导致微生物对能源碳的利用量增加,消耗速度加快,而且对能源碳优先利用种类由糖类转变为氨基酸、不饱和脂肪酸甚至苯酸,特别是苯酸,在 48 小时内农村土微生物对其基本上没有利用,而城市土类则已有较显著的利用,这说明与城市土壤相比,农村土对苯酸的利用,由于其本身在 Biolog 基质中具有一定的浓度,而对微生物造成一定的毒性,致使产生了滞后效应,反映出未受污染的农村土,其微生物群落结构尚不能马上适应污染物的毒性,而对城市土壤而言,其微生物群落结构受污染物的影响已发生了改变,故能较快地适应这样的毒性。典型变量因子载荷分析更进一步证实了城市环境下,土壤微生物的群落结构相对于农村土已发生了显著改变,表明在重金属胁迫下城市土壤中微生物为了维持其正常的生理需要,不仅改变了其群落结构组成,对有机质的转化能力和养分循环能力发生了改变,而且对能源碳的消耗量增多,消耗速度加快,从而显著区别于农村土壤。

由于 Biolog 方法是用微生物对碳源(有机质)的利用程度来反映微生物生理活动轮廓的,而微生物正是通过消耗有机质来维持其正常的生理活动的,生理活动越强,消耗的有机质越多;因此 Biolog 方法比平板记数法、基底呼吸、微生物生物量能更实际地、更直观地反映微生物生理活动的强度。而且它还能反映出微生物群落结构的生理轮廓以及微生物功能多样性的变化情况,对探讨污染物胁迫下的微生物生理效应具有重要的生态意义,这是上述其他方法所不能比拟的。

3 结 论

从以上的探讨可以看出 Biolog 方法不仅能有效地区分城市土壤与农村土壤在微生物群落结构方面的差异性,而且能区分微生物对能源碳的利用程度和方式,城市土壤与农村土壤相比其生态功能已经发生了转变。这些变异是由于人为活动造成重金属元素在城市土壤中的积累而产生的。

参 考 文 献

1. Bullock P and Gregory P J. Soils: a neglected resource in urban areas. In: Bullock P, Gregory PJ(Eds). Soils in the Urban Environment, Blakwell, Oxford, UK, 1991. pp1 ~ 4
2. Stroganova M N, Myagkova K D, Prokofeva T V. The role of soils in urban ecosystems. Eurasian Soil Science, 1997, 30(1): 82 ~ 96
3. Varshal G M, Velyukhanova G K, Koshcheyeva I Y, et al. Determination of coexisting forms of pollutants in soils by chemical - phase analysis. Eurasian Soil Science, 1992, 24(2):110 ~ 118
4. Lottermoser B G. Natural enrichment of topsoils with chromium and other heavy metals, Port Macquarie, New south wales, Australia. Australian Journal of Soil Research, 1997, 35:1165 ~ 1176
5. Kawano M, Ramesh A, Thao V D, et al. Persistent organochlorine insecticide residues in some paddy, upland and urban soils of india. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1992, 48(3 ~ 4):163 ~ 174
6. Racke K D, Lubinski R N, Fontaine D D, et al. Comparative fate of chlorpyrifos insecticide in urban and agricultural environments. Acs Symposium Series, 1993, 522:70 ~ 85
7. Charlesworth S M, Lees J A. The distribution of heavy metals in deposited urban dusts and sediments, coventry, England. Environmental Geochemistry and Health, 1999, 21(2):97 ~ 115
8. Pouyat R V, McDonnell, M J. Heavy - metal accumulations in forest soils along an urban - rural gradient in southeastern New - York, USA. Water Air and Soil Pollution, 1991, 57(8):797 ~ 807
9. Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential c source utilization. Soil Biology & Biochemistry, 1996, 28:213 ~ 221
10. Garland J L, Mills A L. Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Applied Environmental Microbiology, 1991, 57:2351 ~ 2359
11. Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. Soil Biology & Biochemistry, 1994, 26:1101 ~ 1108
12. Wuensche L, Brueggemann L, Babel W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbial Ecology, 1995, 17:295 ~ 305
13. Campbell C D, Gelder J V, Davidson M S, et al. Use of sole carbon source utilisation patterns to detect changes in soil microbial communities affected by Cu, Ni and Zn. In: Wilken R, Forstner U, Knochel A(Eds). Heavy Metals in the Environment. CEP consultants, Edinburgh, 1995. pp 447 ~ 450
14. Campbell C D, Grayston S J, Hirst D J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. Journal of Microbiological Methods, 1997, 30:33 ~ 41
15. Wilson M L, Bain D C, Duthie D M L. The soil clays of Great Britain: II Scotland. Clay Minerals, 1984, 19:709 ~ 736
16. Paterson E, Sanka M, Clark L. Urban soils as pollutant sinks - A case study from Aberdeen, Scotland. Applied Geochemistry, 1996, 11(1 ~ 2):129 ~ 131
17. Zabinski C A, Gannon J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. Environmental Management, 1997, 21(2):233 ~ 238

18. Willeke W, Muller S, Kanchanakool N, *et al.* Urban soil contamination in Bangkok: heavy metal and aluminium partitioning in topsoils. *Geoderma*, 1998, 86(3~4):211~228
19. Carlosena A, Andrade J M, Kubista M, *et al.* Procrustes rotation as a way to compare different sampling seasons in soils. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(14):2373~2378
20. Burkhardt C, Insam H, Hutchinson T C, *et al.* Impact of heavy metals on the degradative capabilities of soil bacterial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 1993, 16:154~156
21. Kelly L L, Tate R L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of zinc smelter. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 27(3):609~617

APPLICATION OF BIOLOG METHOD TO STUDY ON MICROBIAL FEATURES IN URBAN AND RURAL SOILS

Yang Yuan-gen¹ Paterson E² Campbell C²

(1 *Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002*)

(2 *The Macaulay Land Use Research Institute, Aberdeen, UK, AB15 8QH*)

Summary

Biolog method was applied to studies on microbial community and functional diversity in soils in and around Aberdeen City. Results show that compared with rural soils an obvious changes in microbial communities and functional diversities can be observed in urban soils under the press of heavy metal accumulation in the urbic environment. Microbial consumption of carbon sources in urban soils is much more and faster than that in rural soils. And their major carbon sources have shifted from sugar, amino acid in the rural soil to phenolic acid in the urban soil. Further more, canonical variate loadings in different incubation time point give the obvious discrimination of cluster distribution between urban and rural soils.

Key words Urban soil, Soil microorganism, Biolog, Carbon sources