

文章编号: 0379-1726(2001)05-0459-06

# 用微生物对单一碳源利用方法 探讨重金属在城市土壤中积累的环境效应

杨元根<sup>1</sup>, E. Paterson<sup>2</sup>, C. Campbell<sup>2</sup>

(1. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550002; 2. 麦考莱土地利用研究所, 英国 阿伯丁, AB15 8QH)

**摘要:** Biolog 研究表明, 英国阿伯丁市城市土壤的微生物群落结构显著有别于农村土壤, 并使微生物对碳源的消耗量增加, 消耗速度加快。城市土壤中不仅重金属 Cu、Pb、Zn、Ni 的含量明显高于农村土壤, 而且其化学形态的主成分分析表明, 有效态 Pb、Zn、Cu 及有机态 Ni 和 Cu 是导致城市土壤区别于农村土壤的主要因子。相关性分析表明, Biolog 的这种变化规律与重金属的上述化学形态密切相关; 典型变量分析表明, 重金属对城市土壤微生物群落结果的这种损伤具有长期性效应及不可恢复性。

**关键词:** 城市土壤; 土壤微生物; Biolog; 能源碳

**中图分类号:** S154.3      **文献标识码:** A

## 0 引言

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的<sup>[1]</sup>, 最早由 Garland *et al.*<sup>[2]</sup> 提出, 用于测定微生物群落的功能多样性<sup>[3]</sup>, 但近年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<sup>[4-5]</sup>, 在环境微生物研究中是一种必不可少有效手段。现有研究表明, 重金属污染不仅降低了有机物质的微生物转化效率, 从而使微生物在逆境条件下维持其正常生命活动需消耗更多的能量<sup>[6]</sup>, 但对能源碳的利用率却降低<sup>[7]</sup>, 而且可导致微生物群落结构和功能多样性的改变<sup>[8]</sup>; DNA 研究表明, 这种损伤具有长期效应<sup>[9]</sup>。本文试图用 Biolog 方法对比城市土壤与农村土壤在微生物群落结构和功能上的差异性, 从而探讨重金属积累导致的环境效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品的采集

分别采集了英国阿伯丁市区的主要交通要道街

道两旁及市内主要公园的各 14 个表层土样, 为了对比, 同时用同样方法采集了 14 个邻近农村地区的土壤样品, 它们与城市土壤具有相同的成土母质, 同隶属于 Countesswells association 组<sup>[10]</sup>, 具体的采样方法见文献[11]。土样的基本参数如表 1 所示。

表 1 供试土壤的基本参数

Table 1 Basic properties of three kinds of soils

土壤基本参数		路边土(14)	公园土(14)	农村土(14)
微生物生物量 ( $\mu\text{g/g}$ )	平均值	296.12	321.11	410.84
	标准偏差	84.15	56.37	78.09
总有机碳(%)	平均值	2.49	2.58	3.41
	标准偏差	0.98	0.98	1.16
pH(H <sub>2</sub> O)	平均值	5.73	5.28	5.80
	标准偏差	0.70	0.52	0.38

注: 括号内数字为样品数。微生物生物量以单位质量土壤中含有的有机碳质量表示。

### 1.2 样品处理

样品在室内先过 6 mm 筛, 再过 2 mm 筛, 剔除所有植物碎片、根系、石子和土壤动物等后, 储存在 4 °C 的冷库中备用。取适量分样, 在 30 °C 左右的温室中风干, 在 Laborette 27 型旋转式缩分器上缩分后, 用 Pulverisette 06102 型玛瑙研磨器磨成过

收稿日期: 2000-09-04; 接受日期: 2001-01-15

基金项目: 中国科学院王宽诚留学基金(98011)

作者简介: 杨元根(1965-), 男, 研究员, 地球化学专业。

0.152 mm 筛的粉末供重金属形态分析。

### 1.3 Biolog 测试

采用修改了的 Biolog MT 盘,即污染物 MT8 盘,共可进行 15 种碳源(不包括空白)的测试。碳源设置的依据基于重金属能降低芳香化合物的代谢变异性<sup>[12,13]</sup>,主要为一些脂肪酸类和芳香化合物;Biolog 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,随微生物对能源碳利用的增加,孔的染色程度就会加深,通过测定孔的光密度值(optical density, OD)的大小而判定其染色的深浅,从而指示微生物利用能源碳的程度。具体操作时,称取 10 g 鲜土加入盛有 100 mL 灭菌去离子水的 250 mL 的三角瓶中,在手腕式振荡机上全速振荡 10 min,每取 5 mL 悬液,加入 45 mL 灭菌去离子水进行 10 倍系列的稀释,至  $10^{-3}$  稀释度,然后离心 10 min ( $1\ 500\ r/min$ ,  $15\ ^\circ C$ , brake9),小心地在 MT8 盘的每个孔中接种 150  $\mu L$  上清液,密封后放置在  $25\ ^\circ C$  的微生物培养室中,用 590 nm 波长,在英国 Crawley 产 VMAX 型自动读盘机上利用 Microlog Rel 3.5 软件(美国加州 Hayward Biolog 公司生产)进行不同时间段总计 220 h 的读数和数据收集。

### 1.4 土壤重金属形态的连续提取测定

采用修改了的 BCR 连续提取方法<sup>[14]</sup>,共进行四步提取,分别用 0.11 mol/L 醋酸溶液、用 0.5 mol/L 的盐酸羟胺溶液和被 pH 为 2 的过氧化氢消化后用 1.0 mol/L 醋酸氨溶液(预先用浓  $HNO_3$  调 pH 值至 2)提取,上述残渣再用王水消化提取,提取液中重金属含量分别用 ICP-AES 测定,其中 Cd 和 Pb 用 GFAAS 测定,提取过程用土壤标样 1-oct-97 #6 进行质量控制。以上所有实验均在英国麦考莱(Macaulay)土地利用研究所完成。

### 1.5 数据处理

所有的统计分析均由英国牛津 NAG 有限公司的 Genstat Rel 5.3 统计软件完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Biolog 结果

图 1 反映了 MT8 盘中样品的孔平均染色程度

(Average well color development,以下简称 AWCD)随培养时间的变化情况,可见在 24 h 之内 AWCD 值很小,48 h 以后,AWCD 急剧升高,反映在 24 h 之内能源碳基本未被利用,而 48 h 后碳源消耗显著增加;对比三类土壤,相同的培养时间点,以路边土的 AWCD 值最高,而农村土最低,说明路边土微生物对碳源的消耗最多,而农村土则最少;当 AWCD 值达到 0.8 时,路边土只需 97 h,而公园土、农村土则分别需 112 和 131 h,说明微生物对相同量碳源的消耗以路边土最快,农村土最慢,反映出城市土壤微生物对碳源的消耗不仅数量多而且速度快,从而反映出城市土壤中的微生物活动强、代谢快。

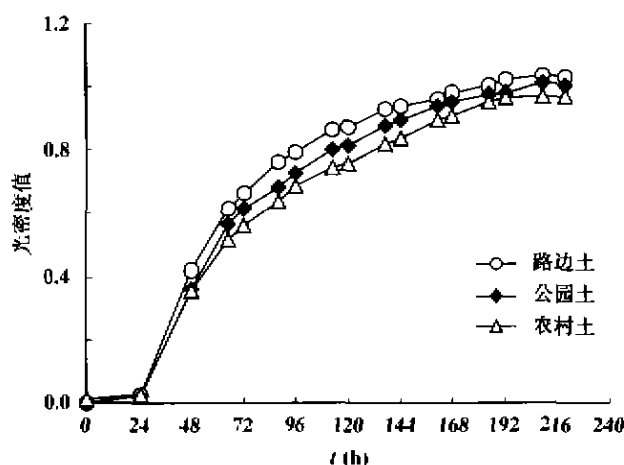


图 1 三类土壤 AWCD 值随时间的变化

Fig. 1 Variance of AWCD with time for three type soils

从图 1 可以看出,在时间点 48 h 后曲线的变化比较显著,为了探讨三类土壤微生物群落结构的变化情况,对 48 h、65 h、120 h 和 185 h 四个时间点的 Biolog 数据进行标准化变换后实施典型变量分析(canonical variate analyses),两个主因子的分析结果见图 2。由图 2 可见,在 48 h 和 65 h 时,农村土处于 CV1 因子的正端,而且最大值在 48 h 为 5.05,65 h 则为 4.88。除了个别点处于 CV1 的正端外,城市土壤样品均处于 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 h 为 -1.53,65 h 则仅为 -0.96,而城市土壤则变化较大,而且以路边土的离散更大,48 h 时从 2.38 到 -3.88,65 h 则从 3.53 到 -5.93;可见在 CV1-CV2 因子图上,三类土壤的投影点有明显的区别。时间点 120 h 和 185 h 的情况则明显不同于时间点 48 h 和 65 h。在 CV1-CV2 主因子图上,农村土处于 CV1 因子的负端,最大值从 120 h 的 -4.51 变为 185 h 的 -5.76,

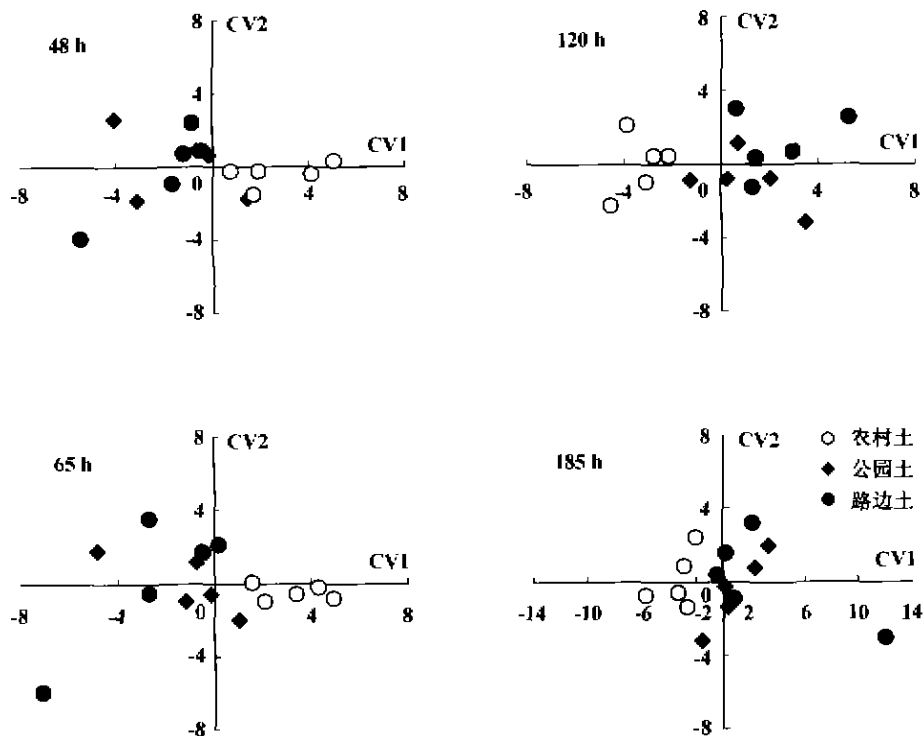


图 2 不同时间点 Biolog 结果的特征变量因子图解

Fig. 2 Canonical variate factors of Biolog data at different time points

而城市土壤则主要处于 CV1 因子的正端,且以路边土的高散更大,最大值从 120 h 的 5.27 变为 185 h 的 12.01;可见在 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。Biolog 数据的因子载荷通常反映了微生物群落的生理轮廓<sup>[15]</sup>,是其群落结构和功能多样化的具体体现。图 2 的结果很好地显示了城市土壤与农村土壤在微生物群落结构上已产生了明显的差异性,且随培养时间的增长其差别越来越显著,反映出微生物群落结构损伤的长期性效应及不可恢复性。

## 2.2 土壤中重金属的分布

土壤标样 1-oct-97 #6 的质量标准见表 2。由表 2 可见,重金属元素的实测值均在目标值的警戒上限值之内,表明测定结果符合实验室质量标准,分析数据可靠。三类土壤中 Cd 的平均含量非常接近(表 3),而且很低,在世界土壤背景值附近。与农村土壤相比,城市土壤中 Cu、Pb、Zn 和 Ni 的含量都有不同程度的升高,路边土和公园土中 Cu 的含量分别约为农村土的 4 倍和 2 倍, Pb 则分别达到约 6 倍和约 4 倍, Zn 约为 2 倍, Ni 的含量则以公园土为最高,其次为路边土。显著性 *t* 检验表明,公园土与农村土相

比, Cu、Pb、Zn 和 Ni 都达到 98% 以上的差异显著性水平,特别是 Ni 和 Zn 达 99% 以上的水平;路边土与农村土相比, Cu、Pb、Zn 和 Ni 达到 99% 以上的差异显著性水平,而 Pb 和 Zn 则达到 99.9% 以上的水

表 2 土壤标样中重金属元素的质量控制(mg/kg)

Table 2 Quality control for heavy metals in standard soil sample (mg/kg)

元素	临界下限	警戒下限	目标值	警戒上限	临界上限	实测值
Cd	0.121	0.145	0.192	0.240	0.264	0.230
Cu	13.82	14.86	16.93	19.00	20.04	17.07
Ni	9.23	10.55	13.19	15.83	17.15	15.09
Pb	26.20	29.94	37.42	44.90	48.64	43.06
Zn	45.60	49.28	56.64	64.00	67.68	59.88

表 3 三类土壤中的重金属元素含量(mg/kg)

Table 3 Heavy metal contents (mg/kg) in three type soils

元素	路边土	公园土	农村土
Cd	0.41(0.20)	0.34(0.20)	0.34(0.09)
Cu	49.35(42.02)	32.23(26.03)	13.08(4.97)
Ni	18.31(6.18)	21.20(10.16)	12.05(2.56)
Pb	180.50(99.79)	138.19(154.66)	32.36(11.80)
Zn	110.94(53.29)	100.84(68.31)	44.40(10.28)

注:括号内的数值为标准偏差值。

平。由此可见,城市土壤中 Cu、Pb、Zn 和 Ni 已有极显著的积累。

用连续提取法对重金属元素结合形态的测定见图 3, 不同的提取步骤通常相应地对应于重金属的有效态、铁锰氧化物态、有机态及残渣态。由图 3 可见, 城市土壤中不同结合形态的重金属元素含量都不同程度地大于农村土壤中的含量; 而且除残渣态外, 重金属元素含量都呈现路边土 > 公园土 > 农村土的变化规律, 反映了城市土壤中不仅重金属元素的含量明显高于农村土壤, 而且其有效性程度也相应地提高。重金属元素的有效态以 Zn 为最重要, 其次为 Pb; 铁锰氧化物态则以 Pb 最重要, 显著高于其他重金属元素; 有机态则以重金属 Ni 含量最低; 残渣态则以 Zn 和 Ni 为主。表明 Pb 主要与氧化铁有关<sup>[16]</sup>, 归因于氧化铁的表面配位作用; Cu 则主要与有机质的络合作用有关<sup>[17]</sup>; 除残渣态外, Zn 主要为有效态, 归因于土壤表面的吸附作用; 而 Ni 主要为残渣态。

为了进一步探讨三类土壤中的重金属元素的主导化学形态, 对重金属元素的化学形态数据进行主成分分析(Principal component analysis, PCA)。为了消除含量间的巨大差异导致的假效应, 首先对所有数据进行标准变换, 然后再实施主成分分析, 结果见表 4。由表 4 可见, 6 个主因子的累积方差已达到 97%, 因此这 6 个主因子已足够描述重金属化学形态间的分布规律。由表 4 可见, 对主因子 PC1、PC2

表 4 三类土壤重金属形态的主成分分析结果

Table 4 Principal component analysis results for heavy metal chemical forms

主因子	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
方差累积率 (%)	79.67	86.44	90.14	93.26	95.57	96.99
Cu1	-0.34	-0.13	-0.06	0.49	0.30	0.17
Cu2	-0.32	-0.37	0.03	0.39	0.02	-0.05
Cu3	-0.25	-0.29	0.23	-0.22	0.54	0.14
Cu4	-0.13	-0.38	-0.36	0.11	-0.21	0.02
Ni1	-0.22	-0.08	0.07	-0.15	0.10	-0.73
Ni2	-0.11	-0.16	-0.05	-0.18	-0.06	-0.17
Ni3	-0.11	-0.20	-0.23	-0.49	-0.02	-0.05
Ni4	-0.09	-0.21	-0.12	-0.10	-0.17	-0.22
Pb1	-0.50	0.64	-0.32	0.08	-0.06	-0.11
Pb2	-0.31	0.15	-0.13	-0.14	0.00	0.10
Pb3	-0.23	0.07	-0.16	-0.32	0.26	0.38
Pb4	-0.15	-0.11	-0.19	-0.10	-0.04	-0.09
Zn1	-0.32	0.12	0.67	-0.02	-0.15	-0.09
Zn2	-0.25	-0.07	0.24	0.01	-0.43	0.15
Zn3	-0.15	-0.07	0.18	-0.30	-0.25	0.32
Zn4	-0.09	-0.16	-0.12	0.06	-0.43	0.18
主成分得分平均值						
农村土	1.45	-0.13	-0.03	-0.04	0.01	0.09
公园土	-0.36	-0.03	0.03	-0.06	-0.09	-0.12
路边土	-1.09	0.16	0.00	0.10	0.08	0.02

的主要贡献成分都是 Pb1, 表明有效态 Pb 反映了三类土壤中重金属元素化学形态的主要变化规律, 其

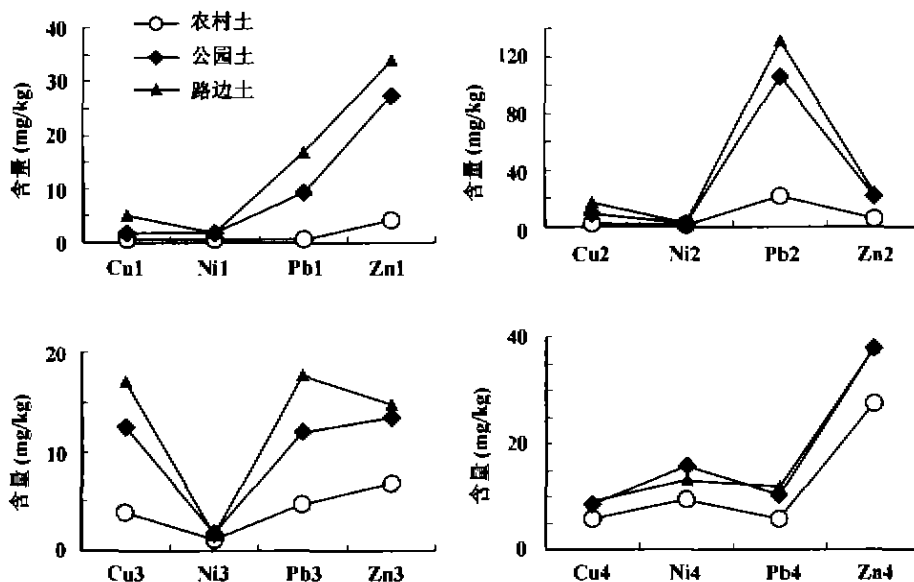


图 3 三类土壤中重金属元素的结合形态

Fig. 3 Chemical forms of heavy metals in three type soils

元素符号后的 1、2、3 和 4 分别对应于连续提取中步骤 1、2、3 和 4 的提取态, 即有效态、铁锰氧化物态、有机态和残渣态。

次为有效态 Zn, 然后为有效态 Cu 和有机态 Ni、有机态 Cu, 最后为有效态 Ni; 对比三类土壤主成分分析的得分值可知, 城市土壤以高含量的有效态 Pb 而显著区别于农村土壤, 其次为有效态 Zn, 高含量的有效态 Cu 和有机态 Cu 则主要与路边土有关, 而有机态 Ni 和有效态 Ni 则反映了公园土的特点; 可见城市土壤不仅以高的重金属元素含量而区别于农村土壤, 而且以有效态的 Pb、Zn、Cu、Ni 和有机态的 Cu、Ni 为区分农村土壤的主因子变量。

### 2.3 土壤中重金属的积累对微生物的影响

上述城市土壤中不仅以高的重金属含量而区别于农村土壤, 而且 Biolog 结果也显示差别的同样显著性, 那么是否是由于城市土壤中重金属含量的积累而导致产生 Biolog 结果的差别? 为此, 把三类土壤重金属化学形态的主成分因子得分值对样品的 Biolog 数据平均值进行作图(图 4), 从图中的投影点分布可以看出, 农村土的 Biolog 投影点分布在主因子 PC1 的正端, 而公园土及路边土特别是路边土集中在 PC1 因子的负端, 从表 3 的主成分分析结果可

知, 对 PC1 负端的主要贡献是有效态的 Pb, 可见, 影响城市土壤 Biolog 的主要因子为有效态 Pb 含量的高低; 从其他 PC3、PC5 和 PC6 因子对 Biolog 的投影点分布结合表 4 同样也可以看出, 城市土壤中的 Biolog 结果也受有效态 Zn 和 Cu 的影响, 而有效态 Ni 主要影响公园土的 Biolog 结果, 但有机态 Cu 对三类土壤 Biolog 的影响效应间差别不太明显。

可见由于城市土壤中重金属的积累, 特别是有效态重金属 Pb、Zn 和 Cu 的积累对城市土壤微生物的 Biolog 结果有严重影响, 导致微生物对碳源的消耗量增多, 消耗速率加快, 而且这种效应具有长期性。反过来, 城市土壤微生物 Biolog 结果的变异可以映射出重金属积累的严重性。

### 参考文献:

- [1] Garland J L. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization [J]. Soil Biol Biochem, 1996, 28: 213 ~ 221.
- [2] 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 [J]. Appl Environ

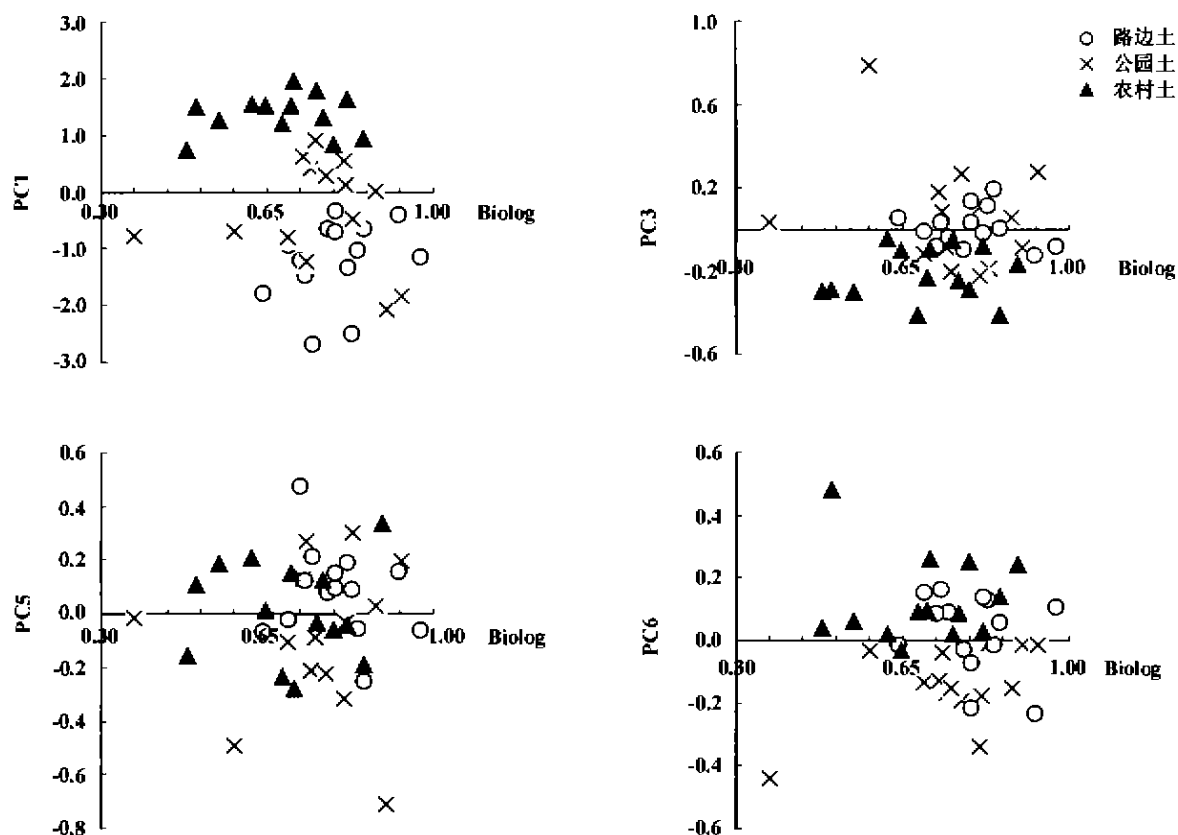


图 4 不同化学形态重金属主因子得分值与 Biolog 平均值图解

Fig. 4 Relations for principal component scores of different heavy metal forms and Biolog mean values

- Microbiol, 1991, 57: 2 351 ~ 2 359.
- [3] Zak J C, Willig M R, Moorhead D L, *et al.* Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach [J]. Soil Biol Biochem, 1994, 26: 1 101 ~ 1 108
- [4] Wuensche I, Brueggemann L, Babel W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1995, 17: 295 ~ 305
- [5] 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 [A]. Wilken R, Forstner U, Knochel A. Heavy metals in the environment [C]. Edinburgh: CEP Consultants, 1995. 447 ~ 450.
- [6] Chander K, Brookers P C. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam UK soil [J]. Soil Biol Biochem, 1991, 23: 927 ~ 932.
- [7] Bardget R D, Saggar S. Effects of heavy metal contamination on the short term decomposition of labelled <sup>14</sup>C glucose in a pasture soil [J]. Soil Biol Biochem, 1994, 26: 727 ~ 733.
- [8] Kelly L L, Tate R L. Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of zinc smelter [J]. J Environ Qual, 1998, 27(3): 609 ~ 617.
- [9] Eric S, Paula L, Karel W. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1997, 23: 249 ~ 261.
- [10] Wilson M L, Bain D C, Duthie D M L. The soil clays of Great Britain: II Scotland [J]. Clay Mineral, 1984, 19: 709 ~ 736.
- [11] Paterson E, Sanka M, Clark L. Urban soils as pollutant sinks: A case study from Aberdeen, Scotland [J]. Appl Geochem, 1996, 11(1-2): 129 ~ 131
- [12] Burkhardt C, Insam H, Hutchinson T C, *et al.* Impact of heavy metals on the degradative capabilities of soil bacterial communities [J]. Biol Fertil Soil, 1993, 16: 154 ~ 156
- [13] Campbell C D, Jones D. Effects of heavy metals on forest soil processes and mycorrhizal functioning [A]. Lepp N, Kirby K, Glimmerveen L. Heavy metals and Trees [C]. Edinburgh: Institute of Chartered Foresters, 1996. 33 ~ 49
- [14] Rauret G, Lopez-Sanchez J F, Sahuquillo A, *et al.* Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials [J]. JFM Environ Monit, 1999, 1(1): 57 ~ 61
- [15] Zabinski C A, Gannon J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities [J]. Environ Manag, 1997, 21(2): 233 ~ 238.
- [16] Lin Z X, Harsbo K, Ahlgren M, *et al.* The source and fate of Pb in contaminated soils at the urban area of Falun in central Sweden [J]. Sci Total Environ, 1998, 209(1): 47 ~ 58.
- [17] 朱永官, 铜[A]. 陈怀满等. 土壤-植物系统中的重金属污染 [C]. 北京: 科学出版社, 1996. 168 ~ 194.  
Zhu Yong-guan. Copper [A]. Chen Hua-man, *et al.* Heavy Metal Pollution in Soil-Plant System [C]. Beijing: Science Press, 1996. 168 ~ 194 (in Chinese).

## Environmental effects of heavy metal accumulation in urban soils by application of Biolog method

YANG Yuan-gen<sup>1</sup>, E. Paterson<sup>2</sup>, C. Campbell<sup>2</sup>

(1. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences Guiyang 550002, China; 2. The Marulan Land Use Research Institute Aberdeen, UK AB15 8QH)

**Abstract:** Biolog method was applied for microbial community and functional diversity studies in soils in and around Aberdeen city. The results show that an obvious shift in microbial communities and functional diversities can be observed in urban soils compared with rural soils under the press of heavy metal accumulation in urban environment, which lead to much more microbial consumption of carbon sources and faster in consumption rates in urban soils than that in rural soils. Urban soils possess high contents of heavy metals, and soluble Pb, Zn, Cu and organic Ni, Cu are the main factors to distinguish rural soils, as deduced from principal component analysis of heavy metal chemical forms. Correlation analyses give the results that variance of Biolog couples with above chemical forms of heavy metals; canonical variate loadings of Biolog data release that the harmful effects of heavy metals on urban soil microbial communities are extended and unrecoverable.

**Key words:** urban soil; soil microorganism; Biolog; carbon sources