

江 伟,于小飞,田永兰,等. 镉污染对文冠果土壤微生物的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):228-231.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.059

镉污染对文冠果土壤微生物的影响

江 伟,于小飞,田永兰,柴 阳,熊元武,钟 馨,张化永

(华北电力大学工程生态学与非线性科学研究中心,北京 102206)

摘要:为了研究镉添加对文冠果土壤微生物的影响,基于 0、10、50、100 mg/kg 等 4 个不同浓度镉污染条件下文冠果的盆栽试验,采用 Biolog Eco 微平板研究不同镉浓度添加处理下土壤微生物多样性的差异,并运用统计学上的主成分分析方法研究镉污染对文冠果土壤微生物代谢图谱的影响。结果表明,(1)高浓度的镉污染增加了文冠果根系土壤微生物的多样性,低浓度的镉污染则降低了微生物的多样性;(2)文冠果土壤微生物群落受到镉污染和生长期的影响,并且在镉浓度为 10 mg/kg 时,发现土壤中存在镉抗性微生物种群;(3)低浓度 10 mg/kg 的镉污染可以提高文冠果土壤微生物的代谢活性,在第 2 生长期表现最明显,与空白处理相比平均颜色变化率(average well color development,简称 AWCD)提高 172.20%;高浓度 50、100 mg/kg 的镉污染对土壤微生物的代谢活性具有一定的抑制作用,但并不明显。综合分析认为,第 2 生长期时,文冠果土壤微生物受镉污染影响最大,这一结论为实现能源木本植物修复镉污染土壤提供了理论基础。

关键词:镉污染;文冠果;土壤微生物多样性;Biolog Eco 微平板;主成分分析法

中图分类号: Q145;S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0228-04

土壤重金属污染已经成为一个世界性问题,在当代科学领域备受关注^[1-2]。据报道,由于工业废水不合理排放、农业化学药品不合理使用、含镉磷肥的使用以及汽车尾气排放等,我国农业主产区土壤中的镉含量已经有明显的积累现象^[3]。镉污染对我国农业生产有重要影响,首先,农作物从受污染土地中吸收镉,农作物生长发育受到抑制,产量大幅降低^[4]。其次,土壤镉污染也会使农产品中的重金属镉含量超标,而使植物蛋白质、叶绿素、糖、维生素 C 等含量降低^[5]。因此,如何有效地处理土壤中的镉污染,已经成为近年来环境保护领域的突出问题。

文冠果(*Xanthoceras sorbifolium* Bunge)属于无患子科文冠果属,落叶小乔木,适应性强,在草沙地、撂荒地、多石的山区、黄土丘陵和沟壑等处,甚至在崖畔上都能正常生长发育。我国的分布范围为 8°37'~47°20'N、73°20'~120°25'E,遍布华北、华东及西北地区。其种子含油率高达 74%,由文冠

果籽油制备的生物柴油相关烃脂类成分含量高,内含 18C 的烃类占 93.4%,且无硫、氮等因子污染环境,符合现行的优质生物柴油指标,是北方理想的木本油料树种^[6]。

针对镉污染日益严重的现状,植物修复技术成为一种新型的、低成本的、环境友好的解决土壤镉污染问题的手段,尤其适合发展中国家。利用文冠果来修复重金属镉污染土壤,再将收获的文冠果果实用于生物柴油的生产,既可以改善环境质量,又可以实现资源化。有研究表明,文冠果对镉污染具有较高的耐受性,其生长过程中的株高、茎粗、生物量等仅在土壤中镉达到 200 mg/kg 时才受到显著抑制^[7]。截至目前,对文冠果生长过程中土壤微生物的变化与重金属之间关系的研究尚未见报道,而文冠果种植地区的土壤污染却不容忽视,其在生物能源产出和土壤污染修复方面的作用会在未来能源环境领域逐渐凸显。

本研究采用温室盆栽试验,通过长期试验,考察不同生长期下的文冠果土壤微生物对重金属镉的响应,采用 Biolog Eco 微平板研究人工污染土壤中外源镉不同浓度对土壤微生物活性与功能多样性的影响,以期为实现能源木本植物修复镉污染土壤提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选取的文冠果购自河南省洛阳市嵩县绿源绿化种苗科研有限公司。

收稿日期:2016-10-02

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项(编号:2009ZX07210-009、2015ZX07203-011、2015ZX07204-007);国家自然科学基金(编号:39560023);山东省环境瓶颈解析与突破(编号:SDHBPJ-ZB-08)。

作者简介:江 伟(1992—),男,安徽安庆人,硕士,主要从事生物能源和生态信息等研究。E-mail:w4356y@163.com。

通信作者:张化永,博士,教授,主要从事能源与污染控制生物学等方向研究。Tel:(010)61773250;E-mail:rceens@ncepu.edu.cn。

[18] Tessier J T, Raynal D J. Use of nitrogen to phosphorus ratios in plant tissue as an indicator of nutrient limitation and nitrogen saturation [J]. Journal of Applied Ecology, 2003, 40(3): 523-534.

[19] 刘旻霞. 高寒草甸坡向梯度上植物群落组成及其氮磷化学计量学特征的研究[D]. 兰州:兰州大学,2013.

[20] 祁 建, 马克明, 张育新. 北京东灵山不同坡位辽东栎(*Quercus liaotungensis*)叶属性的比较[J]. 生态学报, 2008, 28(1): 122-128.

[21] 施 宇, 温仲明, 龚时慧, 等. 黄土丘陵区植物功能性状沿气候梯度的变化规律[J]. 水土保持研究, 2012, 19(1): 107-111.

供试土壤采自北京农学院试验田,土壤为黄褐土。取 0~20 cm 表层土壤,新鲜土样去除植物残体、砾石等,自然风干,过 2 mm 筛备用,土壤基本理化性质见表 1。

表 1 土壤基本理化性质

土壤类型	镉背景值 (mg/kg)	pH 值	总氮含量 (mg/kg)	总磷含量 (mg/kg)
黄褐土	0.001	7.1	372.13	511.73

1.2 试验设计

试验设置 4 个镉浓度梯度:0、10、50、100 mg/kg(以纯镉计),文冠果种子经浸泡发芽后移栽到装有 7 kg 含有不同浓度的镉污染土壤的花盆中,每盆定苗 2 株,每个处理 3 个重复,温室中培养,整个生长过程用自来水浇灌以维持田间持水量约为 60%。盆栽试验于 2009 年 5 月中旬开始,在 2009 年 7 月 19 日、2009 年 9 月 14 日、2009 年 11 月 12 日等 3 个生长期时间点取样。样品采集时,在距植株主干 8 cm 处挖取 2 个直径为 2.5 cm、深 12 cm 的土样,混合组成样品。采集的新鲜土样过 2 mm 网筛,一部分土样放在 4 ℃ 冰箱保存,供微生物指标分析;另一部分土样自然风干,供土壤基本理化性状测定。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤微生物群落功能多样性分析 本试验采用 Shannon 指数(H)和 Gini 系数(G)反映不同处理下土壤微生物多样性的差异。Shannon 指数是反映群落丰富度和分布均匀程度的综合指标,是目前应用最为广泛的群落多样性指数之一。Gini 系数表示微生物的均匀度, G 介于 0~1 之间,当 $G=0$ 时表示微生物群落分布绝对均匀,当 $G=1$ 时表示微生物群落分布绝对不均匀。

1.3.2 Biolog Eco 微平板 本研究中功能多样性的测定采用基于 Biolog Eco 微平板的碳源利用法,具体操作过程如下:将 Biolog Eco 微平板从冰箱内取出,25 ℃ 预热 15 min。称取相当于 5 g 烘干土壤质量的新鲜土样,加入内有 45 mL 0.85% NaCl 溶液(质量浓度)的三角瓶中,用 8 层纱布封口,在 200 r/min 摇床中振荡 30 min。手摇数秒后,迅速用灭菌的吸

管吸取 1 mL 土壤悬液,加入内有 9 mL 0.85% NaCl 溶液的试管中,手摇数秒后,迅速用灭菌的吸管吸取 2 mL 土壤悬液,加入内有 18 mL 0.85% NaCl 溶液的试管中得到 10^{-3} 稀释液。用自动多头移液器接种,接种量为 150 μ L/孔。将接种好的测试板加盖在 25 ℃ 下保湿暗培养 10 d,每隔 12 h 用 Biolog 自动读数装置在 590 nm 下测定吸光度^[8]。

平均颜色变化率^[9](average well color development,简称 AWCD)的表达式为 $AWCD = [\sum (C_i - R)]/31$,其中 C_i 是除对照孔外所测得 31 个反应孔的吸光度, R 是对照孔的吸光度。

1.4 数据分析

为了避免接种密度带来的差异,本研究运用 AWCD 接近 0.6 时的数据计算多样性指数,进行主成分分析。试验数据采用 Microsoft Excel 2007 处理,相关性分析、方差分析以及主成分分析等多元统计分析采用软件 SPSS 16.0 及 Matlab 7.0 实现。本试验中,对数据先进行泰勒转换或对数转换,再进行主成分分析。

2 结果与分析

2.1 镉污染对文冠果土壤微生物活性的影响

土壤微生物接种到 Biolog Eco 微平板后,微生物利用板中的碳源使指示剂变色,随着碳源消耗量的增加指示剂颜色加深,从而相应碳源的吸光度增大。AWCD 表征微生物群落碳源利用率,是土壤微生物群落利用单一碳源能力的一个重要指标,反映了土壤微生物的整体活性。

AWCD 的变化曲线分 3 个变化阶段,滞后期、对数增长期和稳定期。由图 1 可知,在文冠果的第 1 生长期(或拔节期),与空白对照相比,10 mg/kg 镉对土壤微生物群落总体活性影响不大,50、100 mg/kg 镉使土壤微生物活性降低。在第 2 生长期,10 mg/kg 镉使微生物活性明显增加,而 50、100 mg/kg 镉对其影响不大。在第 3 生长期,各处理组表现出与第 1 生长期相似的趋势。

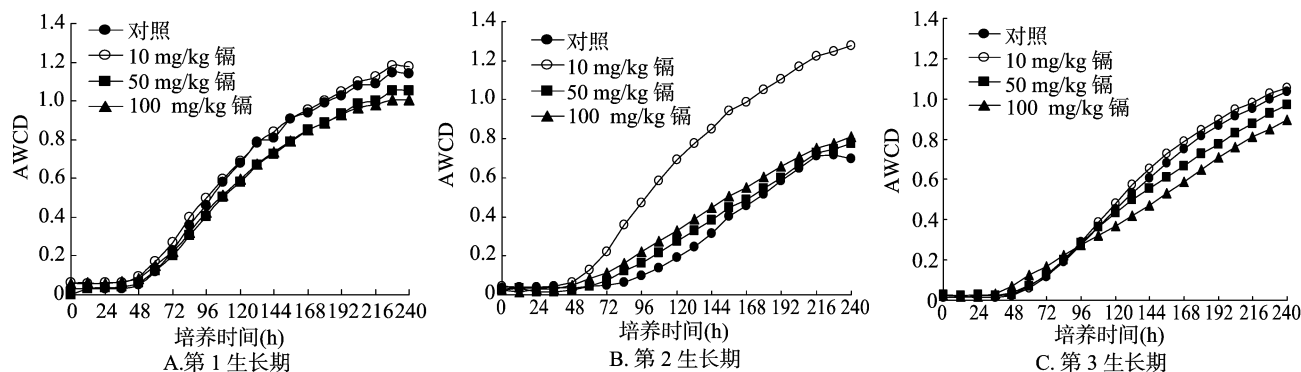


图 1 不同生长期文冠果土壤 AWCD 随培养时间的变化

生长期对微生物的活性也有一定的影响,随着生长时间的延长,空白对照及 50、100 mg/kg 镉处理中土壤微生物的活性变化趋势均表现为先下降后上升,10 mg/kg 镉处理的趋势与之相反,表现为先上升后下降。镉污染浓度为 10 mg/kg 时,第 2 生长期的 AWCD 最高,而其他处理则表现为第 1 生长期的 AWCD 最高,第 2 生长期的 AWCD 低于其他 2 个生长期。

2.2 镉污染对文冠果土壤微生物多样性的影响

从表 2 可以看出,在文冠果的整个生长过程中,当镉的浓度为 100 mg/kg 时,Shannon 指数(土壤微生物的丰富度、均匀度)最高,方差分析结果表明,这种差异并不显著。对文冠果 Gini 指数(土壤微生物活性)的分析发现,在第 2 生长期,当镉的浓度为 10 mg/kg 时,土壤微生物活性最高,而此时微生物的丰富度、均匀度最低,表明在该浓度镉污染下,微生物的

表 2 不同处理下文冠果土壤微生物功能多样性指数

镉浓度 (mg/kg)	Shannon 指数			Gini 指数		
	第 1 生长期	第 2 生长期	第 3 生长期	第 1 生长期	第 2 生长期	第 3 生长期
0	2.824Aa	2.843Aa	2.779Aa	0.565Aa	0.566Aa	0.596Aa
10	2.869Aa	2.822Aa	2.804Aa	0.562Aa	0.579Aa	0.587Aa
50	2.830Aa	2.881Aa	2.832Aa	0.572Aa	0.555Aa	0.576Aa
100	2.964Aa	2.934Aa	2.912Aa	0.512Aa	0.518Aa	0.541Aa

注:表中数据为 3 个样品的平均值。每列数据后不同大写字母、每行数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

群落结构发生了改变,镉耐性微生物成为优势种,镉敏感微生物种群降低。

2.3 镉污染对文冠果土壤微生物代谢图谱的影响

由图 2 - A 可知,应用主成分分析法在 31 个主成分中提

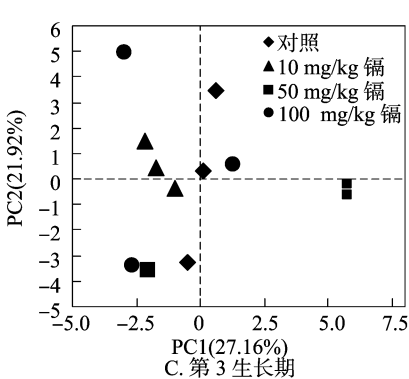
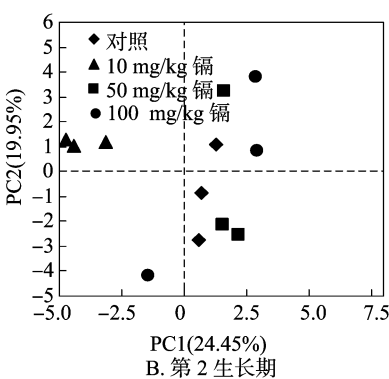
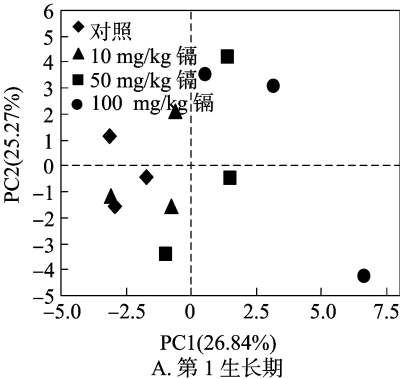


图2 文冠果 Biolog 数据的主成分分析

文冠果第 2 生长期土壤中微生物的代谢特征见图 2 - B, 得分系数的方差分析结果表明,PC1 得分系数差异极显著 ($F_{3,8} = 12.556, P = 0.002 < 0.01$)。这种差异主要表现在图 2 - B 中 10 mg/kg 镉处理的微生物群落落在 PC1 负方向,对照及 50 mg/kg 镉处理的微生物群落位于 PC1 的正方向,说明 10 mg/kg 镉处理与对照及 50 mg/kg 镉处理之间差异极显著,而对照及 50,100 mg/kg 镉处理之间并无显著性差异,以上结果表明与空白对照相比,高浓度的镉污染并没有改变微生物群落碳源利用的功能多样性,证明文冠果土壤微生物对镉污染具有一定的耐受性,在镉污染条件下仍可以保持特定的活性能力。通过主成分分析发现, α -D-乳糖、D-木糖/戊醛糖、i-赤藓糖醇、D-甘露醇、N-乙酰-D-葡萄糖氨、D-葡萄糖胺酸、L-丝氨酸等与 PC1 正相关,说明 10 mg/kg 镉浓度的土壤中,微生物降低了对上述碳源的利用率。而衣康酸、糖苷与 PC1 负相关,表明 10 mg/kg 镉浓度的土壤中,微生物增加了对这些碳源的利用率。

文冠果第 3 生长期土壤中微生物的代谢特征见图 2 - C, PC1、PC2 得分系数的方差分析结果表明,各处理之间得分系数差异不显著 (PC1: $F_{3,8} = 2.197, P = 0.166 > 0.05$, PC2: $F_{3,8} = 0.328, P = 0.810 > 0.05$)。说明在第 3 生长期土壤微生物群落没有显著变化,这与 AWCD 变化一致,这可能是由于交换态镉会随时间的延续而逐渐减小所造成的。

3 结论与讨论

微生物是土壤中生物量最大、种类最丰富的类群,对于重

取的 2 个主成分因子,分别可以解释原变量特征的 26.84%、25.27%。用第 1 主成分(PC1)和第 2 主成分(PC2)作图表征文冠果第 1 生长期土壤中微生物的代谢特征。主成分得分系数的方差分析结果表明,PC1 得分系数差异显著 ($F_{3,8} = 6.196, P = 0.018 < 0.05$)。这种差异主要表现在图 2 - A 中 100 mg/kg 镉处理的微生物群落落在 PC1 正方向,对照、10 mg/kg 镉处理的微生物群落位于 PC1 的负方向,50 mg/kg 镉处理的微生物群落居中,说明 100 mg/kg 镉处理与对照及 10 mg/kg 镉处理差异显著。通过主成分分析发现,D-纤维二糖、 α -D-乳糖、i-赤藓糖醇、D,L- α -磷酸甘油、 α -丁酮酸、甘氨酸-L-谷氨酸、2-羟基苯甲酸、苯乙胺等与 PC1 正相关,衣康酸、丙酮酸甲酯、L-天门冬酰胺、吐温-80 等与 PC1 负相关。

金属污染,土壤微生物与其直接接触、关系密切,与植物相比微生物对污染物的反应更加灵敏。曾路生等在水稻盆栽条件下,添加外源镉,发现镉浓度较低时,土壤微生物量碳和氮与镉浓度呈正相关关系,而较高的镉浓度使二者呈负相关关系,镉浓度的转折点因土壤性质有所差异^[10]。本试验中发现的当镉浓度为 10 mg/kg 时可以提高微生物的生物量,增加微生物代谢活性的结论与之相一致。本研究中,高浓度的镉污染对文冠果土壤微生物的影响不大,说明文冠果对重金属镉具有一定的耐受性。随着生长期的延长,在第 3 生长期,镉污染对文冠果土壤微生物的影响有减弱的趋势,主要是由于重金属元素在土壤中的活性或有效性会随其存在的时间发生变化,交换态镉会随时间的延续而逐渐减小^[11]。Ipsilantis 等通过盆栽试验对高浓度铬污染下芥菜根际微生物群落进行研究,4 周后,土壤中铬的有效态明显降低,微生物的多样性提高,可能是由于重金属使优势种的优势度降低,从而消除了优势种对其他物种的竞争抑制作用,使微生物的多样性有所提高^[12]。本研究中发现的镉浓度为 100 mg/kg 时微生物丰富度、均匀度最高,而镉浓度为 10 mg/kg 时微生物丰富度、均匀度最低这一结论与之相似。另外,段学军等采用现代分子生物学技术,探讨重金属镉污染条件下稻田土壤微生物种群的基因多样性,证明低浓度镉对某些微生物类群具有一定的刺激作用,个别种群对镉胁迫较为敏感,种群数量大大降低^[13]。

环境微生物研究中,Biolog Eco 微平板由于操作简单得到广泛应用,且这种方法能够获得丰富的数据,从而能直观反映微生物种群的整体活性。彭芳芳等利用 Biolog Eco 微平板技

术探索铀污染与土壤微生物群落结构和功能的关系,通过计算各样品的 AWCD、Shannon 指数和 Simpson 指数等来指示微生物的结构和功能变化,得到最终结论,不同浓度的铀污染会使土壤微生物的 AWCD 降低 37.6% ~ 92.0%^[14]。对 Biolog Eco 数值进行主成分分析发现,土壤微生物群落代谢多样性表现出差异的主要碳源为碳水化合物类,其次是氨基酸类以及胺类^[14]。目前,关于这些大分子与微生物之间的相互调节作用,国内主要利用 Biolog Eco 微平板试验,但须要新的方法、新的思路补充进来以便更深入地研究。鲁顺保等引用国外的 MicroResp 方法研究了澳大利亚 3 种类型森林(湿地松、南洋杉、贝壳杉)土壤微生物的功能多样性,结果发现土壤 pH 值对微生物利用 *L*-丙氨酸、精氨酸、*D*-(+)-葡萄糖、*N*-乙酰基-氨基葡萄糖的影响较大,这些类群的微生物主要分布在贝壳杉林地;分布在南洋杉林地的微生物对柠檬酸、*L*-苹果酸和 γ -酪氨酸的利用率较大,且主要是受总磷含量的影响;*D*-(+)-果糖、柠檬酸和 *L*-半胱氨酸-盐酸等受水分、总氮含量、总碳含量等的影响较大,这类微生物类群主要分布在湿地松林地^[15]。MicroResp 方法结合了 Biolog 和底物诱导呼吸 2 种方法的优点,可以研究整个土壤中微生物的代谢功能,且耗费低、研究周期短^[16],可以作为将来试验设计的一种参考。另一方面,为了了解镉等重金属污染与微生物群落结构变化之间的关系,可以深入利用分子生物学技术研究微生物群落组成^[17-18]。微生物代谢周期较短,从遗传学或进化学角度考虑,微生物群落结构变化过程是一个优胜劣汰的过程,镉添加过程作为外界刺激会造成微生物遗传信息的变化,更深一步,可以考虑从基因、蛋白质组学或基因组学角度来解释这种变化发生的根本原因^[19]。

本研究利用主成分分析法研究了镉添加条件下微生物对碳源利用的变化,可以从侧面反映微生物群落变化和微生物活性变化,例如,在第 1 生长期,100 mg/kg 镉促进了以 *D*-纤维二糖、 α -丁酮酸、甘氨酸-*L*-谷氨酸、2-羟基苯甲酸、苯乙胺等为营养的微生物的生存,而抑制了以衣康酸和糖苷为碳源的微生物的存活。从图 1 和表 2 来看,镉添加对微生物活性的影响在第 2 生长周期表现的最明显,土壤微生物活性升高,多样性降低,利用碳水化合物的土壤微生物种群降低,能利用多聚物的微生物种群增加。这很可能是重金属镉的选择性所致,利用碳水化合物的微生物对镉敏感,在镉的作用下种群数降低;能利用衣康酸、肝糖的微生物对重金属镉有耐受性,种群数升高。Roane 等通过 DNA 分析,检测镉污染及无污染土壤中的微生物组成,结果发现,镉污染的土壤中可培养的微生物数量减少,但能分离出抗性微生物^[20]。镉抗性微生物成为优势种,镉敏感微生物种群降低,因此文冠果第 2 周期应该是对镉添加最敏感的时期,在今后研究镉对文冠果土壤微生物影响时应格外关注。

参考文献:

- [1] Rajkumar M, Sandhya S, Prasad M N V, et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(6): 1562-1574.
- [2] Ali H, Khan E, Sajad M A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. [J]. Chemosphere, 2013, 91(7): 869-881.
- [3] 曾希柏, 徐建明, 黄巧云, 等. 中国农田重金属问题的若干思考 [J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 186-194.
- [4] 吴鹏, 周青. 镉与酸雨交叉胁迫对大豆种子萌发过程中膜脂过氧化的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(5): 1145-1147.
- [5] 谢建治, 张书廷, 刘树庆, 等. 潮褐土重金属 Cd 污染对小白菜营养品质指标的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(4): 678-682.
- [6] 敖妍, 段劼, 于海燕, 等. 文冠果研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(6): 197-203.
- [7] 于学静. 污染元素镉对能源植物文冠果和荆条生长的影响 [D]. 北京: 华北电力大学, 2010: 23-35.
- [8] 区余端, 苏志尧, 彭桂香, 等. 车八岭山地常绿阔叶林冰灾后土壤微生物群落功能多样性 [J]. 生态学报, 2009, 29(11): 6156-6164.
- [9] 安韶山, 李国辉, 陈利顶. 宁南山区典型植物根际与非根际土壤微生物功能多样性 [J]. 生态学报, 2011, 31(18): 5225-5234.
- [10] 曾路生, 廖敏, 黄昌勇, 等. 镉污染对水稻土微生物量、酶活性及水稻生理指标的影响 [J]. 应用生态学报, 2005, 16(11): 2162-2167.
- [11] Wong S C, Li X D, Zhang G, et al. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China. [J]. Environmental Pollution, 2002, 119(1): 33-44.
- [12] Ipsilantis I, Coyne M S. Soil microbial community response to hexavalent chromium in planted and unplanted soil [J]. Journal of Environmental Quality, 2007, 36(3): 638-45.
- [13] 段学军, 闵航. 镉胁迫下稻田土壤微生物基因多样性的 DGGE 分子指纹分析 [J]. 环境科学, 2004, 25(5): 122-126.
- [14] 彭芳芳, 罗学刚, 王丽超, 等. 铀尾矿周边污染土壤微生物群落结构与功能研究 [J]. 农业环境科学学报, 2013(11): 2192-2198.
- [15] 鲁顺保, 郭晓敏, 芮亦超, 等. 澳大利亚亚热带不同森林土壤微生物群落对碳源的利用 [J]. 生态学报, 2012, 32(9): 2819-2826.
- [16] Yan W, Rebekkar A, David J. Species-specific effects of plants colonising cutover peatlands on patterns of carbon source utilisation by soil microorganisms [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(2): 544-549.
- [17] Su H J, Luo L, Wang S J, et al. Semi-continuous anaerobic digestion for biogas production: influence of ammonium acetate supplement and structure of the microbial community [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 1-11.
- [18] 刘绍雄, 王明月, 王娟, 等. 基于 PCR-DGGE 技术的剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性分析 [J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(7): 1405-1412.
- [19] Tripathi B M, Song W, Slik J W F, et al. Distinctive tropical forest variants have unique soil microbial communities, but not always low microbial diversity [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(165): 376.
- [20] Roane T M, Pepper I L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium [J]. Microbial Ecology, 1999, 38(4): 358-364.