

Cd、Zn、菲和多效唑复合污染土壤的微生物生态毒理效应*

龚 平 李培军 孙铁珩
(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015)

文 摘 以土壤脱氢酶、呼吸强度和微生物生物量作为生态毒理指标,通过正交实验,在室内培养条件下考察了 4 种不同性质的有机与无机污染物(Cd、Zn、菲和多效唑)复合污染的土壤微生物生态效应。复合投加这 4 种污染物能使土壤微生物活性受到不同程度的抑制,且抑制率随时间的推移而下降;3 种微生物生态毒理指标之间存在着很好的相关性,但脱氢酶活性在三者中最敏感;影响土壤微生物活性的主要因子依次为:菲> Cd> Zn> Zn 与菲的交互作用> Zn 与多效唑的交互作用;实验表明,Zn 与菲的交互作用为拮抗作用,但 Zn 与多效唑的复合效应机制仍不明确。
关键词 复合污染,生态毒理效应,土壤脱氢酶活性,微生物生物量,呼吸强度。

污染物的复合效应已被人们所广泛认识。其实早在 1939 年 Bliss 研究两种毒物联合作用的毒性时,就提出了拮抗作用、加和作用 and 协同的概念。后来这些概念逐渐被推广应用到化学污染物的复合污染研究中。

目前,对于复合污染的生态毒理研究,不仅仅停留在探索无机污染物(重金属)之间的交互作用关系⁽¹⁾,也不只是试验两种以上有机污染物同时存在时的联合毒性⁽²⁾,而且还追踪无机污染物与有机污染物之间的复合效应⁽³⁾。然而,纵观有关的文献报道,绝大多数复合污染生态毒理研究的受试生物为水生生物(如蚤类、藻类、鱼类等),而与土壤复合污染有关的研究也多以植物为对象⁽⁴⁾。以土壤微生物活性为测试终点的复合污染研究至今仅见 Wilke⁽⁵⁾ 的报道。

本文采用 3 类不同性质的 4 种污染物(即重金属 Cd 和 Zn,多环芳烃菲及植物生长调节剂多效唑),研究它们对土壤生物的联合生态毒理效应。为减少实验次数,节省人力和物力消耗,同时也为了考察污染物间的交互作用效应,本实验采用有交互作用的 L₂₇3¹³ 正交设计⁽⁶⁾。

1 材料与amp;方法

1.1 供试土壤

于 1994 年 10 月 12 日采自沈阳生态站一块玉米地表层,该土壤理化性质见表 1。鲜土湿度为 50% WHC,于室温下暗处凉置 2 天,部分干燥后(水分含量约为 35% WHC)过 2mm 筛,然后置 4℃ 冰箱中保存备用。

表 1 供试土壤的基本理化性质									
有机质 (C%)	总氮 (%)	阳离子交换量 (meq/100g 干土)	pH 值	质 地 (%)			重金属(μg/g)		
				砂粒	粉粒	粘粒	Cd	Zn	
1.47	0.09	16.9	6.3	28	58	14	0.27	60	

1.2 供试污染物

醋酸镉 [Cd(CH₃COO)₂·2H₂O] 和醋酸锌 [Zn(CH₃COO)₂·2H₂O] 均为国产分析纯试剂,菲(C₁₄H₁₀) 为纯度 98% 的进口分装试剂,多效唑 (Multi-Effects-Triazole 或 MET) 含 15% 有效成分 (即 paclobutrazol, (2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1, 2, 4-triazol-1-yl)-pentan-3-ol(C. A.)), 购自江苏农药研究所。

1.3 实验设计

采用有交互作用的正交表 L₂₇3¹³ 安排实

收稿日期: 1995-11-14
* 中国科学院 KJ85-06-06 课题“我国农林牧渔业持续发展综合研究及若干生态过程人类生产活动影响联网研究”的部分内容

验^{〔6〕},加对照共28个处理。每种污染物均设置3个浓度水平,即低浓度(Cd 2.5,Zn 50,菲 10,MET 0.45μg/g)、中浓度(Cd 10,Zn 150,菲 50,MET 2.25μg/g)和高浓度(Cd 50,Zn 500,菲 250,MET 11.25μg/g)。Cd和Zn均以醋酸盐水溶液形式投加,菲和多效唑则先与10g石英砂研磨混和均匀,再投加到土壤中,然后反复搅拌,充分混和,使污染物在土壤中分布均匀。每个处理用容积1000mL左右的罐头瓶,加入相当于干重600g的过筛鲜土,添加4种污染物后,将土壤水分含量调至50%WHC。样品置20℃生化培养箱中,8周培养期间始终保持这一湿度,每2~3天调节一次土壤湿度。由于各处理所用土壤为同一次采集并混和均匀的同样土壤,加之处理数目很大,因此,每个处理仅设置两次重复。

1.4 样品采集与土壤微生物活性分析

投加污染物后,待其在土壤中平衡一周后开始采样,以后每周采样一次,共采样8次。第1~8次样品均分析脱氢酶活性,第6、8次样品还分析呼吸强度,第4、6、7次样品分析土壤微生物生

物量。所有结果均以每克土壤干重表示,鲜重按照烘干法测得的湿度换算成干重。

- 1.4.1 土壤呼吸强度:采用CO₂碱吸收法测定^{〔7〕}。
- 1.4.2 土壤脱氢酶活性:按照TTC法^{〔8〕}。
- 1.4.3 土壤微生物生物量:按照氯仿熏蒸提取(FE)-TOC定碳法^{〔9,10〕}。

2 结果与讨论

2.1 土壤微生物活性抑制率动态

表2列出了全部实验分析结果,基于此分析结果,可计算出每个处理相对于对照的抑制率(图1~3)。

从图1、2和3可知,土壤脱氢酶的抑制率随采样的时间变化最明显。从第2周开始,DHA的抑制率明显呈下降趋势(图1);同样的趋势在大多数处理的生物量抑制率的变化(图2)中也可以观察到(27个处理中有19个第8周低于第6周);而从图3显示的呼吸强度抑制率可见,在总共27个处理中,有14个处理第6周的抑制率明

表2 Cd、Zn、菲和多效唑复合污染生态效应正交实验结果

处理	呼吸强度 (μgCO ₂ /g土)		微生物生物量 (μgC/g土)			脱氢酶 (nmolTPF/g土·h)							
	S-6-R	S-8-B	S-4-B	S-6-B	S-8-B	S-1-D	S-2-D	S-3-D	S-4-D	S-5-D	S-6-D	S-7-D	S-8-D
1	50.2	35.4	290.5	132.1	146.3	10.73	6.42	9.34	12.09	8.78	11.82	9.75	9.76
2	60.6	30.4	285.5	164.2	153.5	7.60	6.89	9.34	10.85	10.35	10.58	10.02	10.35
3	53.5	33.0	257.0	164.2	135.6	5.62	5.74	7.48	10.79	10.64	10.18	10.53	12.09
4	62.0	39.6	271.2	153.5	139.2	7.10	6.65	8.52	12.86	11.38	11.91	12.25	13.13
5	53.0	37.2	171.3	146.3	178.4	6.42	6.36	6.56	11.53	10.53	12.03	12.08	11.86
6	49.1	31.1	264.3	149.9	132.1	3.43	4.88	6.06	9.46	7.54	9.26	8.21	9.31
7	55.7	36.1	264.1	153.5	174.9	4.41	6.09	7.84	12.06	10.41	11.69	12.62	12.74
8	52.6	44.6	253.4	146.3	153.5	3.96	6.12	10.14	12.27	10.94	12.03	13.32	14.04
9	53.5	46.7	207.0	153.5	146.3	3.43	5.14	8.01	9.76	9.61	10.98	9.92	11.68
10	49.1	47.4	249.8	167.7	135.6	6.06	7.84	10.56	12.71	10.79	13.57	12.98	13.81
11	56.4	38.5	267.7	149.9	153.5	6.62	7.63	9.46	12.98	11.41	13.33	12.66	14.16
12	50.5	42.4	182.0	114.5	142.8	5.47	6.24	9.31	11.74	9.73	12.28	12.13	12.33
13	52.0	37.8	239.1	142.8	207.0	7.39	7.33	9.79	13.69	11.68	14.47	13.11	14.40
14	46.4	38.2	199.9	153.5	164.2	8.49	6.71	9.14	13.28	10.56	13.48	12.54	13.30
15	43.5	46.7	224.8	121.3	157.0	6.21	5.68	6.39	11.86	9.52	10.40	10.61	11.12
16	41.8	38.3	271.2	171.3	174.9	5.35	5.85	7.39	11.80	12.06	12.65	11.88	12.80
17	41.8	28.6	246.3	139.2	157.0	5.32	5.59	7.57	11.32	11.71	12.71	10.68	12.09
18	36.6	28.7	249.8	153.5	128.5	4.79	4.97	5.94	9.20	7.86	9.75	9.48	9.76
19	41.8	34.7	278.4	128.5	189.2	7.92	5.17	6.89	10.58	9.82	11.57	11.20	11.97
20	38.8	26.9	253.4	171.3	192.7	7.95	4.91	6.71	12.36	9.28	10.95	10.46	12.27
21	30.8	26.7	232.0	128.5	185.6	8.01	3.81	5.26	8.99	8.60	9.04	9.19	10.70
22	39.1	26.6	253.4	120.9	111.4	8.52	4.55	7.69	10.47	9.31	10.47	9.87	11.89
23	39.8	24.3	235.6	139.2	159.2	8.34	5.17	7.60	10.64	9.40	9.56	9.43	9.93
24	33.0	15.6	232.0	143.6	107.1	6.80	5.00	6.24	8.43	6.98	7.71	11.88	7.84
25	27.1	30.0	241.5	107.0	117.8	3.19	2.10	3.37	6.36	5.71	6.63	7.84	8.31
26	29.3	22.8	210.8	98.7	128.5	4.23	2.45	4.94	7.92	7.84	9.29	9.41	9.34
27	33.0	20.1	210.7	122.9	135.6	5.91	4.38	4.82	7.42	7.33	7.99	8.21	8.25
28*	64.3	50.8	354.8	257.0	243.6	9.73	9.58	9.31	13.54	12.60	13.45	12.37	14.25

注: S-6-R: 第六周样品呼吸强度测定结果, 余同; * 对照

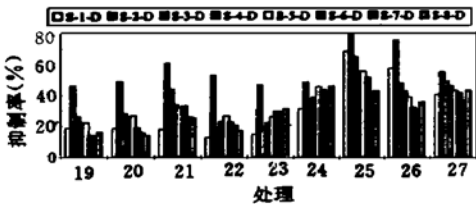


图1 脱氢酶活性抑制率动态变化(处理19-27)

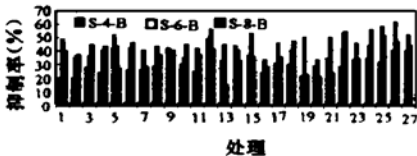


图2 微生物生物量抑制率动态变化

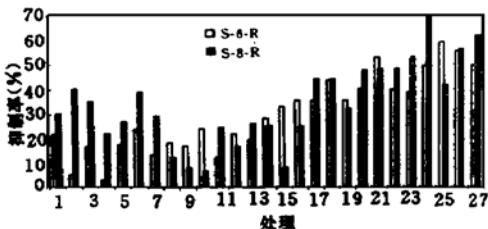


图3 呼吸强度抑制率动态变化

强度采样次数过少,无法确认这两种指标在整个培养期间的变化趋势。总之,从脱氢酶的抑制率明显下降可以得出,随培养时间的推移,各处理土壤微生物对污染物逐渐产生抗性,且污染物被矿化(如菲和多效唑可能被微生物降解)或固定(如Cd和Zn可能被土壤胶体颗粒吸附或被微生物所固定),而部分丧失其有效生物毒性。

2.2 实验结果的相关性分析

通过对表2中的结果进行相关性分析,可以看出(表3),除第1周的脱氢酶和第4周的Bc与绝大多数其它结果之间的相关性较差外,其余结果之间的相关性都达到显著水平。由此可知,这三项生态毒理指标之间存在极好的相关性。

表3的相关分析结果还表明,随着培养时间的延长,虽然各处理土壤微生物活性变化很大,如脱氢酶活性随培养时间的延长而增强,抑制率呈降低趋势,但它们的变化规律是相似的。这是由于室内受控实验条件比较严格,无其它环境因素干扰;在这种条件下,对土壤微生物产生作用的4种污染物在同一种土壤中的行为应该是一致的。

显高于第8周的抑制率,有10个处理第6周低于第8周,3个处理不明显。由于生物量和呼吸

表3 正交实验结果的相关分析

样品编号	S-6-R	S-8-R	S-4-B	S-6-B	S-8-B	S-1-D	S-2-D	S-3-D	S-4-D	S-5-D	S-6-D	S-7-D	S-8-D
S-6-R	1.00												
S-8-R	0.69*	1.00											
S-4-B	0.38	0.20	1.00										
S-6-B	0.60*	0.44*	0.63*	1.00									
S-8-B	0.38	0.42*	0.36	0.58*	1.00								
S-1-D	0.17	-0.02	0.39*	0.29	0.42*	1.00							
S-2-D	0.83*	0.66*	0.43*	0.72*	0.52*	0.43*	1.00						
S-3-D	0.77*	0.62*	0.31	0.44*	0.29	0.35	0.84*	1.00					
S-4-D	0.74*	0.67*	0.31	0.53*	0.57*	0.44*	0.86*	0.84*	1.00				
S-5-D	0.72*	0.63*	0.35	0.58*	0.60*	0.28	0.80*	0.75*	0.86*	1.00			
S-6-D	0.67*	0.69*	0.22	0.45*	0.55*	0.31	0.81*	0.83*	0.92*	0.89*	1.00		
S-7-D	0.58*	0.57*	0.12	0.40*	0.40*	0.17	0.74*	0.74*	0.79*	0.75*	0.79*	1.00	
S-8-D	0.65*	0.73*	0.26	0.49*	0.57*	0.18	0.72*	0.75*	0.87*	0.89*	0.90*	0.81*	1.00

注: * 显著(p= 0.05)

2.3 实验结果的正交分析

从表4的正交分析结果可以看出,影响土壤微生物活性的因子按作用大小排列为:C(菲)>A(Cd)>B(Zn)>BXC(Zn与菲的交互作用)>BXD(Zn与多效唑的交互作用)。所以可确认,Zn与两种有机污染物之间均存在交互作用,而Cd与Zn、菲和多效唑之间及菲与多效唑之间的交互作用均不明显。

表4 实验结果的正交分析

因子	A	B	C	D	AXB	AXC	AXD	BXC	BXD	CXD
序号	2	3	1	-	-	-	-	4	5	-

注: D: MET; -: 影响不显著

2.4 交互作用机制分析

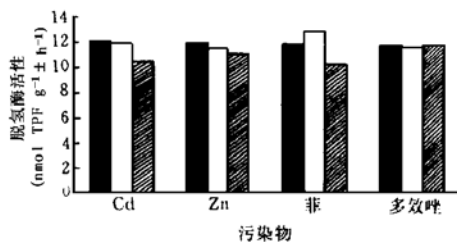
重金属污染土壤中Cd与Zn的交互作用已为许多研究者所证实。例如,周启星^[11]根据沈阳张士污灌区和沈阳十里河地区两类作物(玉米和

大豆)籽实中 Cd、Zn 含量的调查分析发现, Cd-Zn 之间的交互作用因作物种类而异。在玉米籽实中, Cd-Zn 之间表现为相互抑制作用, 而在大豆籽实中却表现为协同作用。Christensen⁽¹²⁾指出, Cd-Zn 之间之所以存在交互作用, 是因为有研究表明, 在 Cd 污染土壤中, Cd 与吸附于土壤胶体上的 Zn 竞争吸附点, 致使 Zn 从土壤向土壤溶液中释放, 从而大大提高了土壤中 Zn 的有效性。而在本实验中, Cd-Zn 之间的交互作用却没有得到证实, 这可能是由于受过高的 Cd 和菲浓度及 Zn 与菲之间的交互作用的影响而表现不明显。

由于复合污染的作用机制受污染物种类与浓度、污染物结构与性质、生物种类及环境条件等多种因素的影响, 因而其研究的难度很大, 国内外目前的工作都仅仅停留在由生理生态效应进行推测和假说的阶段⁽¹²⁾, 而缺乏系统、细致的研究, 尤其对于有机和无机污染物之间的交互作用研究更少。

仅有的文献表明, Cd 与石油烃及 Cu 与石油烃对水稻的复合效应为拮抗作用⁽¹³⁾; 抗坏血酸及其代谢产物能结合重金属等无机物, 阻止其通过生物膜, 从而拮抗 Cr 和 Pb 对生物的毒性⁽¹⁴⁾; Bonnemain 和 Dive⁽³⁾ 研究发现, Cu 和二巯代氨基酸之间存在协同作用。这些文献报道及本实验结果均证实, 重金属与有机污染物之间也可能存在交互作用, 作用机制因污染物种类、性质和浓度的不同而不同。

污染物浓度是影响交互作用关系的重要因子。在本实验中, Zn 与菲的交互作用也受浓度因子的影响, 从中等浓度水平的菲处理土壤脱氢酶活性高于低浓度和高浓度菲可以看出(图 4), Zn 与中等浓度的菲(50ppm)之间存在拮抗作用, 此时 Zn 能使菲的抑制作用减弱。然而 Zn 与多效唑之间的交互作用却不受浓度的影响(至少本实验浓度范围内是如此), 两者间也可能存在拮抗作用关系, 这是由于随多效唑浓度增高, 其土壤微生物活性不受影响, 但也可能存在其它机制。



3 结论

本研究通过室内受控条件下的正交实验, 考察了 4 种性质不同的有机、无机污染物对土壤微生物的生态毒理效应, 得出如下初步结论:

3.1 复合投加 4 种污染物使土壤微生物活性受到不同程度的抑制, 随培养时间的推移, 抑制率降低, 土壤微生物活性上升。这可能是由于污染物(特别是有机污染物)被微生物分解或固定(如 Cd 和 Zn 可能被土壤胶体吸附)而丧失其有效生物毒性; 土壤微生物对污染物逐渐产生抗性。

3.2 相关分析表明, 3 种微生物生态毒理指标之间相关性很好, 它们存在一定的内在联系, 均反映土壤微生物的整体活性。

3.3 通过对实验结果的正交分析发现, 影响土壤微生物活性的因子按作用从大到小依次为: 菲、Cd、Zn、Zn 与菲的交互作用和 Zn 与多效唑的交互作用, 其它交互作用均不明显。

3.4 通过交互作用机制分析初步发现, Zn 与菲之间的交互作用为拮抗作用, Zn 与多效唑之间的复合效应可能是拮抗作用, 也可能有其它机制。

3.5 由于复合污染存在的普遍性与多样性, 近年来多种污染物共存的复合生态毒理效应的研究已经成为污染生态学和生态毒理学最活跃的领域之一。其研究不仅有助于深入了解真实环境条件下污染物相互作用的机制, 更能为决策部门制定切实可行的环境标准提供值得依赖的理论依据。然而, 复合污染物之间全组合数目极其庞大, 显然不可能将每种组合统统加以研究, 因而, 复合污染方法学的研究显得尤为重要。本研究所采用的正交设计不失为一种省时、省力的可靠方法, 值得在复合污染研究中广泛推广。

参考文献

- 1 Romero F, Elejalde C, Azpiaz M N. Water, Air, Soil Pollution., 1987, 34: 347~ 352
- 2 McCarty L S, Ozburn G W, Smith A D, et al. Environ. Toxicol. Chem., 1992, 11: 1037~ 1047
- 3 Bonnemain H and Dive D. Ecotoxicol. Environ. Safe., 1990, 19: 320~ 326
- 4 Mansfield T A, McCune D C. Problems of crop loss assessment when there is exposure to two or more gaseous pollutants. In: Heek W W, et al. (eds). Assessment of crop loss from pollutants. New York: Elsevier Applied Science, 1988. 317~ 344
- 5 Wilke B M. Landwirsch. Forsch., 1988, 41: 194~ 200
- 6 中国现场统计研究会三次设计组, 全国总工会电教中心. 正交法和三次设计. 北京: 科学出版社, 1985
- 7 郑洪元, 张德生. 土壤动态生物化学研究法. 北京: 科学出版社, 1982
- 8 Thalmann A. Landwirtsch. Forsch., 1968, 21: 249~ 257
- 9 Vance E D, Brookes P C, Jenkinson D S. Soil Biol. Biochem., 1987, 19: 703~ 707
- 10 Jordan D and Beare M H. Agric. Ecosys. Environ., 1991, 34: 35~ 41
- 11 周启星. 镉的生物地球化学循环和污染生态学研究, 中科院沈阳应用生态研究所博士论文, 1992
- 12 Christensen T H. Water, Air, Soil Pollut., 1987, 34: 293~ 303
- 13 Verriopoulous G. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1987, 38: 483~ 490
- 14 Rai L C. Ecotoxicol. Environ. Safe., 1988, 15: 195~ 205

作者简介

龚 平 男, 1968 年 9 月生. 博士, 助理研究员. 1989 年于北京大学生物系获学士学位, 1995 年于中国科学院沈阳应用生态研究所获博士学位. 曾先后赴日本、德国和俄罗斯进行访问学习和合作研究. 曾主要参加城市污水生态学处理、污染土壤的生物修复和土壤复合污染的微生物生态效应等课题. 发表论文 10 余篇。

Ecotoxicological effects of Cd, Zn, phenanthrene and MET combined pollution on soil microbe

Gong Ping, Li Peijun and Sun Tieheng

Shenyang Institute of Applied Ecology, Academia Sinica, Shenyang 110015

Abstract—Interaction between four chemicals, i. e. Cd, Zn, phenanthrene and multi-effects-triazole (MET), was investigated through an orthogonal laboratory-incubation experiment. During 8 weeks of incubation, 27 combinations of these four chemicals all caused inhibition of soil dehydrogenase, respiration and microbial biomass to different degrees, and the inhibition rates decreased with time. These three ecotoxicological parameters correlated very well throughout the experiment. Dehydrogenase appeared to be the most sensitive indicator among these three parameters. Prominent factors affecting microbial activities were proved to be: phenanthrene > Cd > Zn > Zn-phenanthrene > Zn-MET. It was derived from this study that there existed antagonistic Zn-phenanthrene interaction; but Zn-MET interaction could not be clarified here.

Key words: combined pollution, ecotoxicological effects, soil dehydrogenase activity, microbial biomass, respiration.