

砷对土壤微生物碳、氮代谢的影响*

陈同斌

(中国科学院地理研究所农业生态与环境技术试验站, 北京 100101)

Struwe S Kjoller A

(Department of General Microbiology, University of Copenhagen, DK-1307 Copenhagen, Denmark)

摘要 通过微生物嫌气培养实验,探讨了砷污染对土壤呼吸作用、反硝化作用、挥发性脂肪酸形成和氮素形态转化等微生物活动过程的影响,以助于理解砷对土壤生态系统中碳(C)、氮(N)的生物地球化学(biogeochemistry)影响. 研究结果表明,砷不仅明显抑制微生物活动中 CO_2 的产生,而且显著降低反硝化细菌的活性. 在供试土壤中,砷既促进 $\text{NO}_3\text{—N}$ 的消失,同时又减少 $\text{NO}_2\text{—N}$ 和 $\text{NH}_4\text{—N}$ 的产生,因此,砷可以使 $\text{NO}_3\text{—N}$ 转化成除 $\text{NH}_4\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2\text{—N}$ 和 $\text{N}_2\text{O—N}$ 之外的其他形态的氮,也可以抑制乙酸形成,但促进异丁酸形成.

关键词 砷 土壤微生物 CO_2 释放 N_2O 释放 挥发性脂肪酸 氮素转化

碳(C)、氮(N)代谢是土壤微生物活动中2个最基本的代谢过程. 微生物呼吸作用需要大量的C、N化合物作为底物. 在土壤生态系统中,微生物活动需要有充足的C源和N源;而且在绝大多数情况下,C和N常常是决定土壤中微生物活性强弱的关键因素^[1]. 因此,在研究中,通常都通过添加C源和(或)N源来提高微生物活性.

反硝化作用产生 N_2O 和 N_2 ^[1]. 在土壤中, N_2O 的产生和释放不仅导致N素的损失,降低氮肥的肥效和利用率;在大气中, N_2O 是一种污染环境的温室气体^[2]. 因此,最近几年来,国际上对 N_2O 产生、释放的研究十分活跃. 大量的文献曾研究了添加N和有机C对反硝化作用和 N_2O 释放的影响^[3~5].

砷在土壤中具有很强的毒性,因此,砷污染对微生物活动影响很大. 含砷化合物曾作为杀虫剂、除草剂、落叶剂和杀雄剂等广泛用于农田中;此外,工业生产(尤其是矿山开采)也会向土壤中排放砷,因此,砷的污染在世界各地都较普遍^[6]. 在农田生态系统中,由于同时使用含砷农药和含N肥料可致使土壤中砷和 NO_3^- 浓度同时偏高^[7].

As(III) 和 As(V) 可抑制微生物和真菌的生长(Adriano, 1986). 研究砷对土壤中微生物C、N代谢的影响,将有助于揭示砷与C、N生物地球化学循环的关系. 关于土壤环境中砷的研究,虽然早在30年代后期就有人探索,但至今仍甚少有人探讨砷污染对土壤微生物C、N代谢的影响^[7].

本研究旨在通过添加砷和控制土壤中N源供应情况,在室内培养试验中模拟施氮肥和不施氮肥的条件下,砷污染对土壤的呼吸作用、反硝化作用、挥发性脂肪酸产生和氮素

1995-11-30 收稿,1996-05-10 收修改稿

* 本研究受国家自然科学基金和中国-欧共体合作项目资助

转化等微生物活动过程的影响.

1 材料与方法

1.1 供试土壤及实验方法

供试土壤(表 1)取自丹麦 Roskilde 的农田耕作层(0~10cm). 土壤经风干、过 2mm 筛. 取 30g 土壤及 30ml 溶液,放入 125ml 广口瓶中,用橡皮管将流动的纯 N₂ 气导入瓶的上部,并持续 2~3min,以置换瓶中的空气,从而创造出嫌气培养环境. 将具橡皮塞隔膜(septum)的瓶盖(瓶盖的橡皮塞外层用带孔的铝质密封圈固定以防漏气)盖紧. 为采用 C₂H₂ 抑制法测定过程中的反硝化活性,用针筒从橡皮注入 C₂H₂ 气体,使瓶上部(headspace)空气中 C₂H₂ 的浓度为 10%. 然后置于 25℃ 的避光恒温室中振荡培养^[6]. 试验共设 4 个处理:

- (1) OM 处理:30g 土壤+0.75g 黑麦秸秆+30ml 蒸馏水;
- (2) OM+As 处理:30g 土壤+0.75g 黑麦秸秆+30ml 含 15mg As 的 NaH₂AsO₄ 溶液;
- (3) OM+N 处理:30g 土壤+0.75g 黑麦秸秆+30ml 含 15mg N 的 KNO₃ 溶液;
- (4) OM+N+As 处理:30g 土壤+0.75g 黑麦秸秆+30ml 含 15mg N(KNO₃)和 15mg As(NaH₂AsO₄)的溶液.

1.2 化学分析

在土壤培养过程中,定期用针筒从广口瓶上的橡皮隔膜采取气体样品,然后用 HP5890 气相色谱仪分析 CO₂ 和 N₂O 浓度(分别使用 TCD 和 ECD 检测器). 培养结束时,用 0.1mol·L⁻¹ KCl 浸提土壤(土:液=3:8),离心,然后分别用 HP5890 Series II 和 Aquatec 5400 Analyzer 测定清液中的挥发性脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸)和无机氮(NO₂-N、NO₃-N、NH₄-N)^[3].

表 1 供试土壤基础化学性质
Table 1 Selected chemical properties of the soil studied

pH	全量(g/kg)		用 0.1mol·L ⁻¹ KCl 浸提的 N(mg/kg)		
	C	N	NH ₄ -N	NO ₃ -N	NO ₂ -N
6.9	13.8	1.53	0.10	27.0	0.084

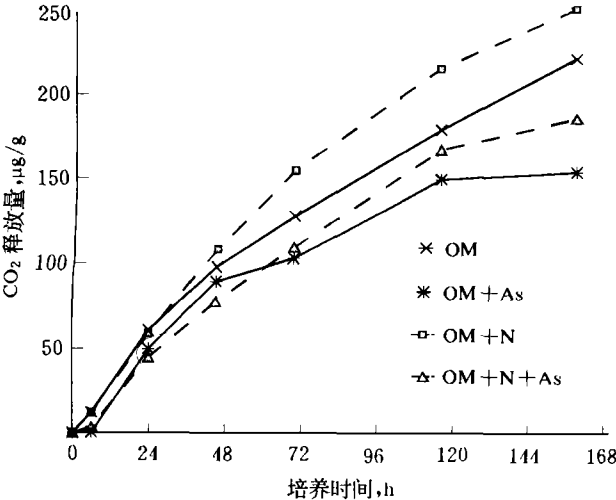


图 1 砷对土壤中 CO₂ 释放的影响
Fig. 1 Effect of arsenate on CO₂ emitted from soil slurries

2 结果与讨论

2.1 砷对土壤中 CO₂ 和挥发性脂肪酸产生的影响

CO₂ 是异养微生物能量代谢的主要产物^[8],因此 CO₂ 产生量是评价土壤中微生物呼吸作用的重要指标^[9].许多人都通过测定 CO₂ 的产生量来评价有毒化学物质对土壤生物的毒害水平^[10~12].

从图 1 可以看出,无论是在提供 N 源的情况下还是不提供 N 源的情况下,添加砷的处理中 CO_2 的释放量均明显低于相应的不加砷处理;因此,在本试验中砷对微生物活动有明显的抑制作用。

小分子的挥发性脂肪酸(VFA)是嫌气条件下土壤中微生物代谢的常见产物^[13~15],尤其是乙酸,它是有机质嫌气降解中最先积累的有机酸和关键性中间产物^[16]. 因此,微生物活动对土壤中 VFA 含量具有明显的影响^[13~16]. 在各个处理中,4 种 VFA 的浓度为:丁酸(butyrate) $\approx$ 乙酸(acetate) $\gg$ 丙酸(propionate) $\gg$ 异丁酸(isobutyrate)(图 2). 其浓度范围也与 Westerman 报道的沼泽泥浆(swamp slurry)中的 VFA 浓度非常接近^[17],与其他人的结果也很类似^[16,18]. 有人认为^[15,19],添加 $\text{NO}_3\text{-N}$ 对土壤中 VFA 的形成和积累有抑制作用,在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 没有被还原而消失之前,它们并不会累积. 然而,图 2 的结果确表明,在添加 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的 2 个处理中,其 4 种 VFA 的产生量并未明显低于 2 个不施 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的处理,而且在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度仍然很高的 OM、OM+N 和 OM+N+As 处理中(图 4),4 种 VFA 的产生量也非常高. 因此上述文献中报道的结果可能并不具有普遍意义。

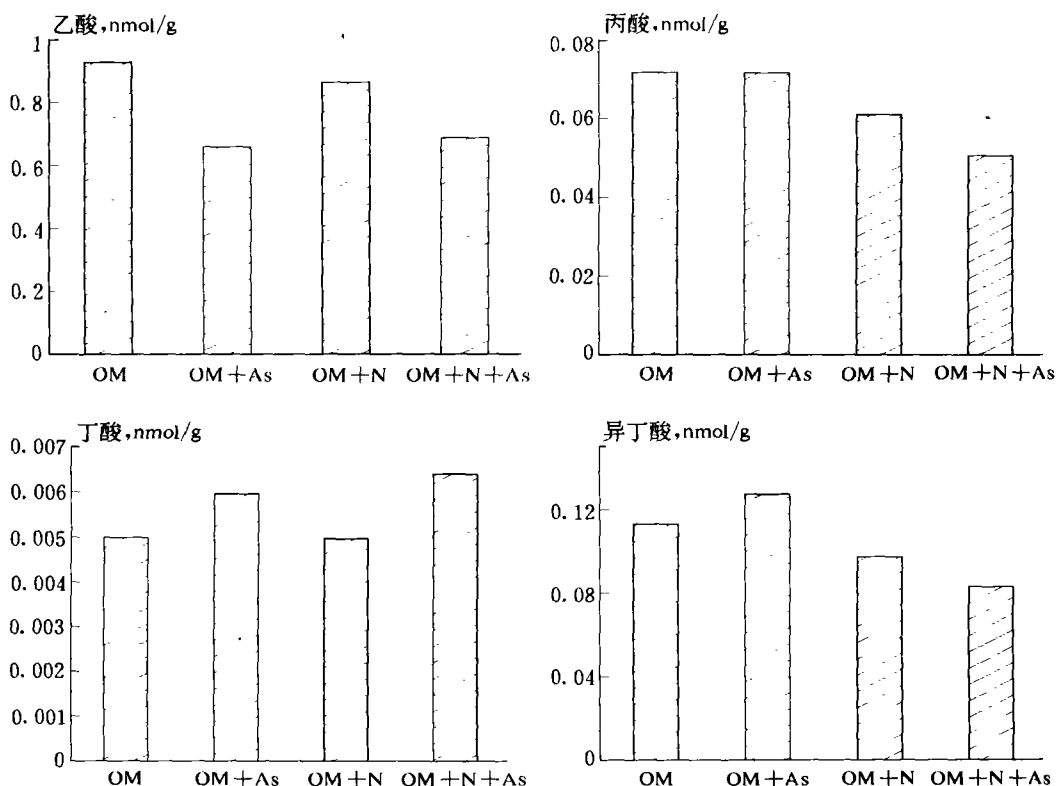


图 2 砷对土壤中挥发性脂肪酸(VFA)含量的影响

Fig. 2 Effect of arsenate on volatile fatty acid (VFA) concentrations in soil slurries

从图2的结果还可看出,添加砷的处理中,乙酸的产生量均低于相应的不加砷的处理;而异丁酸的产生量则均高于相应的不加砷的处理. 因此,砷可能具有抑制乙酸的产生和促进异丁酸形成的作用.

2.2 砷对土壤中氮素形态转化的影响

与 CO_2 释放情况相似,砷对 N_2O 释放也具有一定的抑制作用(图3). 但是,在不提供 N 源的 OM 与 OM+As 两个处理中,由于 N_2O 的产生主要受 N 源的限制,其数量都比较少,因此不提供 N 源(即 OM+As 处理)时,As 对 N_2O 释放的抑制作用并不象相应的提供 N 源(OM+N+As 处理)时那样明显. 这表明,砷污染会影响土壤的反硝化细菌的活性——尤其是提供 N 源时这种效果更加明显.

图4表明,无论是否提供 N 源,培养2周后土壤中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量,都是添加砷的处理低于相应的不加砷的处理. 培养前供试土壤中的无机氮主

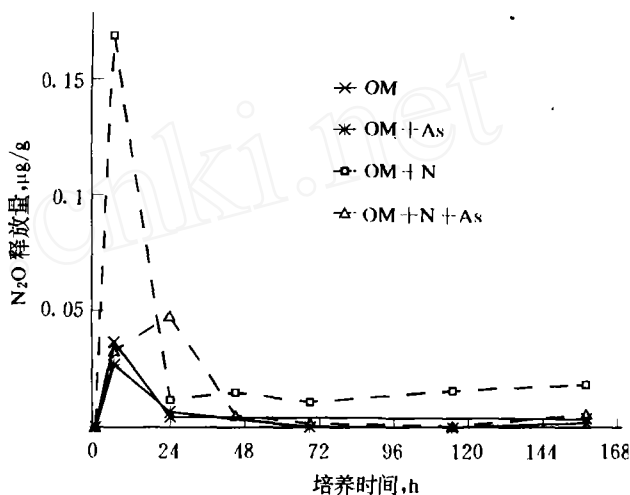


图3 砷对土壤中 N_2O 释放的影响

Fig. 3 Effect of arsenate on N_2O emitted from soil slurries

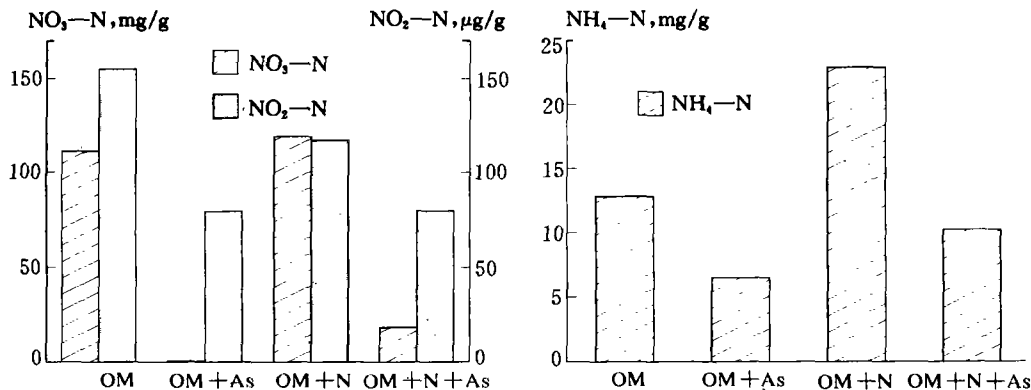


图4 砷对土壤中无机氮含量的影响

Fig. 4 Effect of arsenate on forms and concentrations of inorganic nitrogen in soil slurries

要是 $\text{NO}_3\text{-N}$ (表1),而人为添加的 N 源也是 $\text{NO}_3\text{-N}$. 在添加砷的处理(OM+As 和 OM+N+As)中, $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4\text{-N}$ 含量分别低于相应的不加砷的处理(OM 和 OM+N); 这说明与不加砷的处理相比,添加的砷阻碍了土壤中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 转化为 $\text{N}_2\text{O-N}$ 的过程和

$\text{NH}_4\text{—N}$ 的产生或累积过程. 然而, 培养结束时, 添加砷的处理中 $\text{NO}_3\text{—N}$ 的含量也分别低于不加砷的对照处理(图 4). 因此, 这一结果表明, 砷促进了培养前土壤中所含的 $\text{NO}_3\text{—N}$ (27mg/kg 土壤) 和人为添加的 $\text{NO}_3\text{—N}$ (500mg/kg 土壤) 转化为除 $\text{NO}_2\text{—N}$ 、 $\text{NH}_4\text{—N}$ 和 $\text{N}_2\text{O—N}$ 之外的其他形态的氮. 而在添加砷的处理中, 多消失的 $\text{NO}_3\text{—N}$ 也可能是被转化成 N_2 、有机氮或其他除 $\text{NH}_4\text{—N}$ 、 $\text{NO}_2\text{—N}$ 和 $\text{N}_2\text{O—N}$ 之外的氮素. 前人的一些研究曾发现, 在土壤中加入一定量的砷对生物活动具有促进作用, 但加入高浓度的砷则会抑制微生物活动^[2]. 在本实验中, 添加砷一方面表现为抑制 $\text{NO}_2\text{—N}$ 、 $\text{NH}_4\text{—N}$ 和 $\text{N}_2\text{O—N}$ 的产生, 但另一方面却又促进 $\text{NO}_3\text{—N}$ 的转化(即 $\text{NO}_3\text{—N}$ 消失得较多). 这也许与参与不同氮素形态转化的微生物忍耐砷毒能力的存在差异有关, 但其机理仍有待深入探讨.

参考文献

- 1 Tiedje J M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Zehnder A J B (ed), *Biology of Anaerobic Microorganisms*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1988, 179~244
- 2 陈同斌. 施用氮肥对土壤中温室气体 N_2O 释放的影响. 气候变化对中国农业的影响. 北京: 科学技术出版社, 1994, 158~164
- 3 Chen T B, Struwe S, Kjoller A. Effect of acetylene concentration of some microbial processes and inorganic nitrogen transformation in anaerobically incubated slurries. *Pedosphere*, 1996, vol. 4 (in press)
- 4 de Catanzaro J B, Beauchamp E G, Drury C F. Denitrification vs dissimilatory nitrate reduction in soil with alfalfa, straw, glucose and sulfide treatments. *Soil Biol Biochem*, 1987, 19(5): 583~587
- 5 Mummey D L, Smith J L, Bolton Jr H. Nitrous oxide from a shrub-steppe ecosystem: sources and regulation. *Soil Biol Biochem*, 1994, 26(2): 279~286
- 6 陈同斌, 刘更另. 砷对水稻生长发育的影响及其原因. *中国农业科学*, 1993, 26(6): 50~58
- 7 Bradley P M, Chapell F M. Arsenate inhibition of denitrification in nitrate contaminated sediments. *Soil Biol Biochem*, 1993, 25(10): 1459~1462
- 8 Brock T D, Madigan M T, Martink J M *et al.* Metabolic diversity among the microorganisms. In: *Biology of Microorganism* (7th edition). Prentice-Hall International, Inc, 1994, 575~622
- 9 Anderson J P E. Soil respiration. In: Page A L (ed.). *Methods of Soil Analysis-Chemical and Microbiological Properties* (2nd edition). Madison: ASA-SSSA Publisher, 1982
- 10 Kazano H, Kearney P C, Kaufman D D. Metabolism of methylcarbamate insecticide in soils. *J Agric Food Chem*, 1972, 20: 975~979
- 11 Kearney P C, Kontson A. A simple system to simultaneously measure volatilization and metabolism of pesticides from soils. *J Agric Food Chem*, 1976, 24: 424~426
- 12 Landa C L, Fang S C. Effects of mercuric chloride on carbon mineralization in soils. *Plant and Soil*, 1978, 49: 179~183
- 13 Balba T M, Nedwell D B. Microbial metabolism of acetate, propionate, and butyrate in anoxic sediment from the colne Point Saltmarsh, Essex, U K *J Gen Microbiol*, 1982, 128: 1415~1422
- 14 Lowe S E, Jain M K, Zeikus J G. Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbiological Reviews*, 1993, 57(2): 451~509
- 15 Paul J W, Beauchamp E G, Trevors J T. Acetate, propionate, butyrate, glucose, and sucrose as carbon sources for denitrifying bacteria in soil. *Can J Microbiol*, 1989, 35: 754~759
- 16 Ljungdahl L G. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1986, 40: 415~450
- 17 Westerman P. The effect of incubation temperature on steady-state concentration of hydrogen and volatile fatty acids

- during anaerobic degradation in slurries from wetland sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 13: 295~302
- 18 Flather D H, Beauchamp E G. Inhibition of the fermentation process in soil by acetylene. *Soil Biol Biochem*, 1992, 24 (9): 905~911
- 19 Paul J W, Beauchamp E G. Effect of carbon constituents in manure on denitrification in soil. *Can J Soil Sci*, 1989, 69 (1): 49~61

Effect of Arsenate on Microbiological Metabolisms of Carbon and Nitrogen in Anaerobically Incubated Soil Slurries

CHEN Tongbin

(Station for Agroecology and Environmental Technology, Institute
of Geography, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

STRUWE S KJOLLER A

(Department of General Microbiology, University of Copenhagen, DK-1307 Copenhagen, Denmark)

Abstract

To understand effects of arsenic pollution on microbial metabolism of carbon and nitrogen in soil, studies on soil respiration, denitrification, volatile fatty acid production and nitrogen transformation as influenced by arsenate were conducted using anaerobically incubated slurries of Danish agricultural soil. Soil respiration (CO_2 emission) and denitrification activity (N_2O emission) were markedly inhibited by the addition of arsenate (500mg/kg). It is found that addition of arsenate stimulated $\text{NO}_3\text{--N}$ depletion and depressed $\text{NO}_2\text{--N}$ and $\text{NH}_4\text{--N}$ productions in the soil slurries. Therefore, the transformation of $\text{NO}_3\text{--N}$ into nitrogen forms other than $\text{NH}_4\text{--N}$, $\text{NO}_2\text{--N}$ and $\text{N}_2\text{O--N}$ was stimulated by the addition of arsenate. Arsenate increased acetate production and decreased isobutyrate production.

Keywords: arsenic, soil micro-organism, CO_2 emission, N_2O emission, volatile fatty acids, nitrogen transformation