

BDE-209 对土壤微生物 PLFAs 特性的影响

谢登科, 符安, 林耀东, 秦华明*, 莫测辉

(暨南大学环境学院, 广东省高校水土环境毒性污染防治与生物修复重点实验室, 广州 510632)

摘要:采用室内模拟方法,分析了不同浓度 BDE-209 处理对土壤微生物磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acids, PLFAs)组成、含量、微生物群落结构和多样性的影响。结果表明,不同浓度 BDE-209 胁迫下土壤微生物包括内标 19:0 在内,共检测出 20 种磷脂脂肪酸,土壤微生物群落 PLFAs 种类较丰富,PLFAs 组成以饱和脂肪酸为主,其中脂肪酸 16:0 含量最高,单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸、支链脂肪酸和环丙烷脂肪酸含量较少。不同浓度 BDE-209 会改变微生物的组成与含量,与对照(CK)相比,1.0 mg·kg⁻¹ 处理可将不同种类 PLFAs 的增加或降低的程度分为 3 类,10 mg·kg⁻¹ 和 100 mg·kg⁻¹ 处理的分为 4 类,增加程度最大的都是细菌。BDE-209 对以 PLFAs 表征的土壤细菌、真菌、放线菌和总生物量都有显著的影响,且真菌对 BDE-209 更敏感,细菌对 BDE-209 耐受更强,其中革兰氏阴性菌对 BDE-209 污染的响应较敏感,革兰氏阳性细菌更容易存活,而含 16:1 ω 7t 的微生物比含 16:1 ω 7c 的微生物抗逆性更强。主成分分析发现,对照、1.0、10 mg·kg⁻¹ 处理和第一主成分呈显著正相关,100 mg·kg⁻¹ 处理和第二主成分呈显著正相关,其中第一主成分以含 16:0、18:0、18:1 ω 7t、18:2 ω 6,9 的微生物为优势种群,第二主成分以含 i17:0、a15:0 的微生物为优势种群。PLFAs 表征的土壤生物量和群落结构对 BDE-209 的响应敏感,可以作为 BDE-209 污染下指示土壤环境质量变化的有效生物指标。

关键词:十溴联苯醚;土壤微生物;磷脂脂肪酸;土壤环境质量

中图分类号:X154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)03-0478-07 doi:10.11654/jaes.2015.03.009

Effect of BDE-209 on Characteristics of Soil Microbial PLFAs

XIE Deng-ke, FU An, LIN Yao-dong, QIN Hua-ming*, MO Ce-hui

(Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation of Guangdong Higher Education Institutes, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Decabromodiphenyl ether (BDE-209) pollution in soils has drawn increasing concerns. However, there is little information available about its impacts on soil microorganisms. A laboratory experiment was designed to examine the composition and contents of microbial phospholipid fatty acids (PLFAs) in soil treated with different concentrations of BDE-209. A total of 20 PLFAs including internal standard 19:0 were detected in soil contaminated by BDE-209, implying relatively abundant microbial community. The compositions of microbial PLFAs were mainly saturated fatty acids, with 16:0 fatty acids being the highest content. The contents of monounsaturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, branched fatty acids and cyclopropane fatty acids were relatively low. Compared with the control, the change of microbial PLFAs was divided into three groups in 1.0 mg·kg⁻¹ BDE-209 treatment, while it was four groups in 10.0 and 100 mg·kg⁻¹ BDE-209 treatments, indicating that BDE-209 concentrations impacted microbial compositions. BDE-209 had significant impacts on the signature PLFAs of soil bacteria, fungi, and actinomycetes, and total microbial biomass. Fungi were most sensitive, but bacteria most tolerant to BDE-209, thus the greatest increases observed in bacteria. The gram-positive bacteria were more likely to survive than the gram-negative bacteria under BDE-209 stress. The microorganisms with 16:1 ω 7t signature fatty acids were stronger in stress resistance than those with 16:1 ω 7c signature fatty acids. Principal component analysis showed that the control and the treatments at 1.0 and 10 mg·kg⁻¹ were significantly positively correlated with the first principal component while the treatment at 100 mg·kg⁻¹ was significantly positively correlated with the second principal component. The microorganisms with 16:0, 18:0, 18:1 ω 7t, 18:2 ω 6, 9 signature fatty acids were dominant species in the first principal component, and those with i17:0 and a15:0 fatty acids were dominant in the second principal component. These results show that signature PLFAs were sensitive to analyze the responses of soil microbial community to BDE-209 and could be used as an efficient biological indicator of soil environment quality under BDE-209 stress.

Keywords: decabromodiphenyl ether; soil microorganisms; phospholipid fatty acids; soil environment quality

收稿日期:2014-10-18

基金项目:国家自然科学基金项目(41173101);中央高校基本科研业务专项资金项目(21612103)

作者简介:谢登科(1987—),男,湖北荆州人,硕士研究生,从事环境微生物研究。E-mail:565289902@qq.com

*通信作者:秦华明 E-mail:huamingqin@163.com

十溴联苯醚 (Decabromodiphenyl ether, BDE-209) 是一种高溴代持久性有机污染物, 它作为阻燃剂被大量添加于塑料、电子产品(印刷线路板)、家具及纺织品中^[1-2]。由于十溴联苯醚结构稳定且不易被降解, 在自然界中的衰减周期长, 并可以通过转化、运输、累积、生物放大等作用, 使得大气、水体和土壤环境中十溴联苯醚的含量越来越高^[3], 最终影响环境, 危害人体健康^[1-2, 4]。近年来, 十溴联苯醚的污染日益受到关注^[1], 对其在各种环境介质中的含量检测、对水生环境系统的作用机制、毒理等方面的研究较多^[5-6], 但对其在土壤环境微生态系统产生影响的相关研究报道并不多见。

土壤微生物群落被认为是土壤生态系统变化的预警及敏感指标, 指示土壤质量变化^[7]。磷脂脂肪酸 (Phospholipid fatty acids, PLFAs) 是构成生物细胞膜的主要成分, 只存在于活细胞膜中, 对环境因素敏感, 特定菌群 PLFAs 的变化可反映出原位土壤微生物活体生物量与菌群结构^[8], 利用磷脂脂肪酸法分析土壤微生物群落结构是一种可靠的分析方法^[9]。本文采用室内模拟的方法, 通过考察在不同浓度的 BDE-209 污染下土壤中微生物的磷脂脂肪酸的变化, 以期对污染胁迫环境生态毒理的早期诊断以及筛选污染胁迫下有效的生物标志物及环境监测提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 土壤性质

试验土壤样品采自广州市华南农业大学试验基地表层 0~20 cm 的农田水稻土。土壤性质如下: pH 值 6.54, 阳离子交换量 (CEC) 26.69 cmol·kg⁻¹, 有机质含量 18.73 g·kg⁻¹, 全 N 0.74 g·kg⁻¹, 有效 P 10.42 mg·kg⁻¹, 速效 K 92.06 mg·kg⁻¹, BDE-209 未检出。

1.2 实验设计

土壤风干磨碎过 2 mm 筛, 分装于 12 个 1 L 玻璃器皿中, 每个装入 400 g, 设置 3 个浓度梯度, 同时设置对照, 即 CK、T1、T2 和 T3 分别代表 BDE-209 的浓度为 0、1、10、100 mg·kg⁻¹, 每个处理 3 个重复。

以甲苯为溶剂, 配置浓度为 5000 mg·L⁻¹ 的十溴联苯醚母液。添加母液使各处理组污染物浓度满足上述设置, 并确保每组中甲苯的含量一致。定期搅拌使污染物混合均匀, 经测定土壤 BDE-209 含量 T1 为 (0.80±0.07) mg·kg⁻¹, T2 为 (8.45±0.35) mg·kg⁻¹, T3 为 (89.51±2.56) mg·kg⁻¹, CK 组未检出 BDE-209。定时定量添加去离子水维持烧杯中土壤含水率为田间最大

含水率的 60%, 将所有处理组置于恒温 30 °C 暗室培养。在添加污染物的第 1、7、15、28、56 d 采样测定。

1.3 测定方法

土壤磷脂脂肪酸的测定在 Schutter^[10]的方法上加以改进, 具体步骤为: 将 2 mL 的 0.2 mol·L⁻¹ 的 KOH 甲醇溶液和 500 mg 的土样加到 10 mL 的玻璃离心管中, 混合均匀, 充入氮气为保护气, 在 37 °C 下温育 1 h (脂肪酸释放, 并甲酯化, 样品 10 min 涡旋 1 次)。温育结束后, 加入 0.4 mL 1.0 mol·L⁻¹ 的醋酸溶液中和 pH 值, 充分摇匀。随后加入 2 mL 正己烷, 充分涡旋振荡, 再加入 2 mL 的去离子水, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 使磷脂脂肪酸 (PLFA) 转移到有机相中, 取上层有机相转至干净试管中, 用氮气吹干后溶解在 990 μL 正己烷: 甲基丁基醚 (1:1, V/V) 的溶液中, 并加入 10 μL 甲酯化的 C19:0 为内标。

实验检测采用岛津 GCMS-QP 2010。色谱柱为 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 石英毛细管柱, GC-MS 分析条件: 柱温 140 °C 保持 2 min, 3 °C·min⁻¹ 升温到 260 °C, 保持 1 min, 进样口温度为 250 °C, 载气为 He (1 mL·min⁻¹), 离子源温度 230 °C, 质谱仪采用电子电离方式 (EI), 电子能量为 70 eV, 质谱全扫描范围 50~500 m/z。脂肪酸定量用峰面积和内标曲线法, 通过与标准品的保留时间比对和根据谱库检索定性, PLFA 含量用 nmol·g⁻¹ 表示。

1.4 磷脂脂肪酸命名及一些特征性的 PLFAs 组分之间的比值

脂肪酸采用 Frostegard 等^[11]方法命名, 分子式以“(i/a)X:YωZ(c/t)”表示, 其中 X 代表脂肪酸分子的 C 原子总数, Y 代表不饱和烯键的数目, ω 代表烯键距离羧基的位置, Z 为烯键或环丙烷链的位置, 后缀 c 和 t 分别代表双键的顺式和反式结构, 前缀 i (iso) 代表顺式支链, a (anteiso) 代表反式支链。cy 代表环丙基, br 表示甲基链的位置未知, 10Me 表示第 10 个碳原子的甲基 (从羟基端起)。

磷脂脂肪酸与微生物生物量间存在显著的正相关关系^[12], 磷脂类化合物的量可准确地表示土壤不同类型微生物的生物量, 一些特征性的 PLFAs 组分之间的比值也常常用来表征土壤微生物在受到污染胁迫时的响应指标。本文用到了下列一些脂肪酸之比: 真菌与细菌之比 [F/B, (18:2ω6, 9/(14:0+i14:0+15:0+i15:0+a15:0+i16:0+16:0+16:1ω7t+16:1ω7c+i17:0+a17:0+cy17:0+17:0+18:1ω7t+18:1ω9t+18:0+cy19:0)] , 革兰氏阳性细菌与革兰氏阴

性细菌之比 $[(i14:0+i15:0+a15:0+i16:0+i17:0+a17:0)] / (16:1\omega7t+16:1\omega7c+18:1\omega7t+18:1\omega9t+cy17:0+cy19:0,16:1\omega7t$ 和 $16:1\omega7c$ 的比值。

1.5 数据分析

采用方差分析、主成分分析等数学统计方法,分析软件为 Microsoft Excel 2007 及 SPSS16.0 统计软件。

2 结果与分析

2.1 BDE-209 胁迫下土壤微生物 PLFAs 的组成和含量的变化

BDE-209 处理下土壤磷脂脂肪酸的类型和含量如表 1 所示。BDE-209 胁迫下土壤微生物包括内标 19:0 在内,共检测出 20 种磷脂脂肪酸,磷脂脂肪酸的碳链长度从 C14 到 C19,包含各种饱和脂肪酸,如 14:0、15:0、16:0 等,其中脂肪酸 16:0 含量最高;单不饱和脂肪酸如 16:1 ω 7t、16:1 ω 7c、18:1 ω 7t 等,多不饱和脂肪酸如 18:2 ω 6,9,分支脂肪酸如 i15:0、a15:0、i16:0 等,环化脂肪酸如 cy17:0 和 cy19:0。可见,在 BDE-209 $\leq 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 胁迫下,土壤微生物群落

PLFAs 种类还是较丰富的。

土壤中磷脂脂肪酸的组成可以表示土壤微生物群落的生物量和结构。对不同浓度 BDE-209 胁迫下土壤微生物群落结构的分析见表 2。与对照组相比,T1、T2 组在处理期内土壤总微生物量和细菌均显著增加,同一时期 T1 组的增量要高于 T2 组,其中以 T1 组第 7 d 增加的最多,比对照组增加了 25.07%;而 T3 组的土壤总微生物量和细菌较 CK 少,说明低浓度的 BDE-209 对土壤总微生物量和细菌有一定的刺激作用,促进微生物的生长,高浓度的 BDE-209 产生了毒害作用,抑制微生物的生长。在 BDE-209 不同浓度处理下,总微生物量和细菌的变化趋势相同,说明该土壤中主要的微生物类群是细菌;对于真菌和放线菌来说,在 BDE-209 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时(T1),真菌和放线菌均呈增加趋势,其中以第 7 d 增加的最多,其中真菌增加了 19.01%,放线菌增加了 42.17%。而在较高 BDE-209 浓度(T2、T3)时,真菌和放线菌均呈减少趋势,浓度越高,减少程度越大,其中以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (T3)处理最低,此时真菌在第 56 d 比对照组减少最多达 38.93%,而放线菌在第 15 d 比对照组减少最多

表 1 BDE-209 处理下土壤微生物磷脂脂肪酸的类型和含量($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)
Table 1 Effect of BDE-209 on types and concentrations of soil microbial PLFAs($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$)

PLFA	CK								T1								T2								T3							
	1 d	7 d	15 d	28 d	56 d	Mean	SD	1 d	7 d	15 d	28 d	56 d	Mean	SD	1 d	7 d	15 d	28 d	56 d	Mean	SD	1 d	7 d	15 d	28 d	56 d	Mean	SD				
14:0	0.17	0.21	0.44	0.37	0.27	0.29	0.11	0.20	0.21	0.35	0.40	0.16	0.27	0.10	0.25	0.17	0.26	0.28	0.17	0.22	0.05	0.26	0.11	0.14	0.18	0.15	0.17	0.06				
i14:0	0.53	0.55	0.49	0.00	0.00	0.31	0.29	0.41	0.02	0.37	0.52	0.23	0.31	0.19	0.56	0.03	0.23	0.41	0.24	0.30	0.20	0.54	0.03	0.07	0.23	0.13	0.20	0.21				
15:0	0.33	0.35	0.28	0.41	0.43	0.36	0.06	0.44	0.63	0.52	0.88	0.41	0.58	0.19	0.57	0.80	0.79	1.07	0.57	0.76	0.20	0.60	1.02	1.05	1.09	0.96	0.94	0.20				
i15:0	1.85	3.06	3.19	3.23	3.54	2.97	0.65	2.08	4.34	3.31	3.42	3.60	3.35	0.82	3.37	4.89	2.88	3.32	3.89	3.67	0.77	3.28	3.31	1.66	2.31	2.39	2.59	0.70				
a15:0	1.83	1.99	1.89	2.57	2.51	2.16	0.35	2.94	3.00	2.26	2.95	3.26	2.88	0.37	2.24	3.71	2.95	3.48	3.96	3.27	0.69	2.14	3.89	2.90	3.27	4.55	3.35	0.92				
16:0	9.89	9.60	7.29	10.01	11.82	9.72	1.62	12.48	11.86	9.16	13.32	16.11	12.59	2.51	9.71	10.42	7.56	10.79	10.88	9.87	1.37	7.08	7.80	5.96	7.80	7.14	7.15	0.75				
i16:0	0.10	0.13	0.24	0.22	0.23	0.18	0.06	0.21	0.29	0.29	0.30	0.31	0.28	0.04	0.21	0.32	0.38	0.46	0.38	0.35	0.09	0.28	0.58	0.40	0.62	0.41	0.46	0.14				
16:1 ω 7t	0.80	0.83	0.66	0.75	1.03	0.82	0.14	1.03	1.55	0.96	0.98	1.22	1.15	0.25	1.05	1.59	1.16	1.22	1.64	1.33	0.27	1.08	1.68	1.26	1.39	1.59	1.40	0.24				
16:1 ω 7c	1.96	1.80	1.74	1.66	1.54	1.74	0.16	2.17	2.42	1.85	1.57	1.53	1.91	0.38	1.66	1.82	1.52	1.31	1.50	1.56	0.19	1.40	1.54	1.42	1.26	1.21	1.37	0.13				
10Me16:0	2.11	2.19	2.11	2.23	2.99	2.32	0.38	2.02	2.04	1.59	2.02	2.65	2.06	0.38	1.84	2.27	1.61	1.54	3.15	2.08	0.66	1.65	1.87	0.77	1.00	2.00	1.46	0.54				
17:0	0.41	0.50	0.70	0.62	0.57	0.56	0.11	0.46	0.88	1.04	0.81	0.73	0.79	0.21	0.58	0.89	1.09	0.92	1.84	1.07	0.47	0.63	0.38	1.10	1.29	3.29	1.34	1.15				
i17:0	1.57	1.74	1.54	1.68	1.84	1.67	0.12	1.66	2.95	2.79	2.23	2.93	2.51	0.56	1.91	3.14	3.24	2.80	3.55	2.93	0.63	2.16	3.39	3.89	4.21	3.20	3.37	0.79				
a17:0	1.96	2.11	2.07	2.10	1.98	2.04	0.07	2.59	2.14	2.90	2.46	1.54	2.33	0.52	1.49	0.94	2.11	1.51	1.90	1.59	0.45	1.26	2.48	2.24	1.30	1.64	1.78	0.55				
10Me18:0	1.10	1.12	1.07	1.29	1.40	1.20	0.14	1.51	2.68	1.80	1.59	2.49	2.01	0.54	1.32	1.15	1.48	1.70	1.07	1.34	0.25	1.27	1.21	1.17	1.60	1.08	1.27	0.20				
18:0	2.50	2.88	2.64	2.60	2.72	2.67	0.14	2.61	3.27	3.17	3.52	3.05	3.13	0.34	2.50	2.41	2.53	3.78	1.62	2.57	0.77	1.37	1.09	1.07	2.22	1.61	1.47	0.47				
18:1 ω 7t	2.75	2.98	2.58	2.69	2.57	2.72	0.17	3.50	3.12	2.87	2.91	2.36	2.95	0.41	2.44	2.80	2.53	2.10	2.18	2.41	0.28	1.97	1.57	1.39	1.19	0.52	1.33	0.54				
18:1 ω 9t	1.99	2.13	2.26	2.39	2.50	2.25	0.20	2.09	2.38	3.00	2.87	3.10	2.69	0.43	2.51	2.83	3.12	3.24	3.73	3.09	0.46	2.86	3.89	3.28	3.12	3.29	3.29	0.38				
18:2 ω 6,9	3.68	2.84	2.77	2.98	2.80	3.02	0.38	4.01	3.38	3.06	3.25	3.03	3.35	0.40	2.90	2.80	2.54	2.69	2.24	2.64	0.26	2.41	2.18	2.03	2.02	1.71	2.07	0.26				
cy19:0	1.22	1.24	1.14	1.16	1.12	1.18	0.05	1.21	1.08	0.87	1.04	1.02	1.04	0.12	1.23	1.02	0.45	1.10	0.80	0.92	0.30	0.18	0.94	0.16	0.69	0.21	0.44	0.36				

注:Mean 指平均值,SD 指标准差。

Note:Mean indicates mean values;SD indicates standard deviation.

表2 BDE-209处理对土壤不同类型微生物 PLFAs 的影响(nmol·g⁻¹)Table 2 Effect of BDE-209 on PLFAs of different groups of soil microorganisms(nmol·g⁻¹)

微生物类型 Microbial group	CK					T1					T2					T3				
	1d	7d	15d	28d	56d	1d	7d	15d	28d	56d	1d	7d	15d	28d	56d	1d	7d	15d	28d	56d
总微生物量 Total PLFAs	35.77Cb	38.09Be	35.08Cc	38.58Be	41.67Abc	42.41Ca	47.64Ba	41.85Ca	46.67Ba	49.63Aa	37.96Bb	43.71Ab	38.43Bb	43.16Ab	45.34Ab	32.43Bc	38.96Ac	31.96Bd	36.77Ac	37.09Ac
细菌 Bacteria	29.88BChc	32.11ABb	29.13Cc	32.48ABe	34.68Ab	36.08Ba	40.14Aa	35.70Ba	40.20Aa	41.56Aa	32.29Bb	37.80Aa	32.80Bb	37.78Ab	38.87Aa	27.09Bc	33.70Ab	27.99Bc	32.16Ac	32.30Ab
真菌 Fungi	3.68Aa	2.84Bb	2.77Bb	2.98Ba	2.80Ba	4.01Aa	3.38ABa	3.06Ba	3.25Ba	3.03Ba	2.90Ab	2.80Ab	2.54ABb	2.69Aab	2.24Bb	2.41Ab	2.18Bc	2.03Bc	2.12Bb	1.71Cc
放线菌 Actinomycetes	3.21Cb	3.32BCb	3.18Cb	3.52Ba	4.39Ab	3.52Ca	4.72Ba	3.39Ca	3.61Ca	5.14Aa	3.16BCb	3.41Bb	3.09Cb	3.23BCb	4.23Ab	2.93Ac	3.08Ac	1.94Cc	2.60Bc	3.08Ac

注:同一行同一浓度含不同大写字母者差异显著($P<0.05$),同一行同一时间含不同小写字母者差异显著($P<0.05$)。

Note: Different uppercase letters in a row within a concentration indicate significant differences ($P<0.05$); Different lowercase letters in a row within a time indicate significant differences ($P<0.05$).

达 38.99%。

对 BDE-209 胁迫下土壤微生物 PLFAs 组成和含量的进一步分析结果如图 1 所示。与对照(CK)相比,T1 处理可将 PLFAs 的变化分为 3 类:第 1 类为下降型,包括 4 种生物标记,其中 10Me16:0 指示放线菌,cy19:0、14:0、i14:0 指示细菌;第 2 类为一般增加型(增加 50%以下),包括 11 种生物标记,其中 18:2 ω 6,9 指示真菌,其余的指示细菌;第 3 类为中等增加型(增加 50%~100%),包括 4 种生物标记,其中 i17:0、i16:0、15:0 指示细菌,10Me18:0 指示放线菌。T2 处理可将 PLFAs 的变化分为 4 类:第 1 类为下降型,包括 9 种生物标记,其中 18:2 ω 6,9 指示真菌,10Me16:0 指示放线菌,其余的指示细菌;第 2 类为一般增加型(增加 50%以下),包括 4 种生物标记,其中 10Me18:0 指示放线菌,其余的指示细菌;第 3 类为中等增加型(增加 50%~100%),包括 5 种生物标记,全部指示细菌;第 4 类为显著增加型(增加 100%以上),生物标记 15:0 指示细菌。T3 处理可将 PLFAs 的变化分为 4 类:第 1 类为下降型,包括 11 种生物标记,其中 10Me16:0 指示放线菌,18:2 ω 6,9 指示真菌,其余的指示细菌;第 2 类为一般增加型(增加 50%以下),包括 2 种生物标记,其中 10Me18:0 指示放线菌,18:1 ω 9t 指示革兰氏阴性细菌;第 3 类为中等增加型(增加 50%~100%),包括 2 种生物标记,其中 a15:0 指示革兰阳性菌,16:1 ω 7t 指示革兰氏阴性菌;第 4 类为显著增加型(增加 100%以上),包括 i17:0、17:0、i16:0 和 15:0,全部指示细菌。

结果分析表明,与对照组相比,T1、T2 和 T3 处理脂肪酸增加前五位中都含有 15:0、i16:0 和 i17:0,且它们均指示细菌,说明 BDE-209 胁迫下,对细菌可能有刺激作用,促进它们的生长。

2.2 BDE-209 胁迫下土壤微生物 PLFAs 特征性比值分析

土壤微生物 PLFAs 的一些特征性比值如真菌/细菌、G⁺/G⁻和 16:1 ω 7t/16:1 ω 7c 等可以作为反映土壤生态系统缓冲能力的重要指标,指示污染物对土壤生态系统的干扰^[13],或用来表征细胞受到胁迫时的指示指标^[14]。

对 BDE-209 胁迫下土壤微生物 PLFAs 的一些特征性比值进行分析,结果如图 2 所示。图 2(a)的结果表明,无论是否添加 BDE-209 处理,真菌/细菌值总体上均随处理时间的延长而下降,在同一时期,处理组的真菌/细菌值要比对照组小,且与 BDE-209 浓度呈负相关。这说明在此实验条件下,真菌对 BDE-209 更敏感,而细菌对 BDE-209 更耐受。图 2(b)、图 2(c)的结果表明,无论是否添加 BDE-209 处理,各样本的 G⁺/G⁻、16:1 ω 7t/16:1 ω 7c 值均随处理时间的延长总体呈增加趋势,在同一时期,处理组的 G⁺/G⁻、16:1 ω 7t/16:1 ω 7c 值要比对照组大,且与 BDE-209 浓度呈正相关,浓度越大,增加的越显著。这说明 BDE-209 浓度越高,对土壤生态系统的干扰越大,同时说明革兰氏阴性菌对 BDE-209 污染的响应更为敏感,革兰氏阳性菌更容易存活,而含 16:1 ω 7t 的微生物比含 16:1 ω 7c 的微生物抗逆性更强,更容易在高浓度的 BDE-209 环境下生存。

2.3 BDE-209 胁迫下土壤微生物磷脂脂肪酸的主成分分析

为进一步分析不同浓度 BDE-209 处理对土壤微生物群落结构的影响,对供试土壤微生物磷脂脂肪酸进行主成分分析。结果表明,第一主成分解释了微生物群落结构变异的 55.63%,第二主成分解释了微生物群落结构变异的 44.03%,并能够把不同浓度的

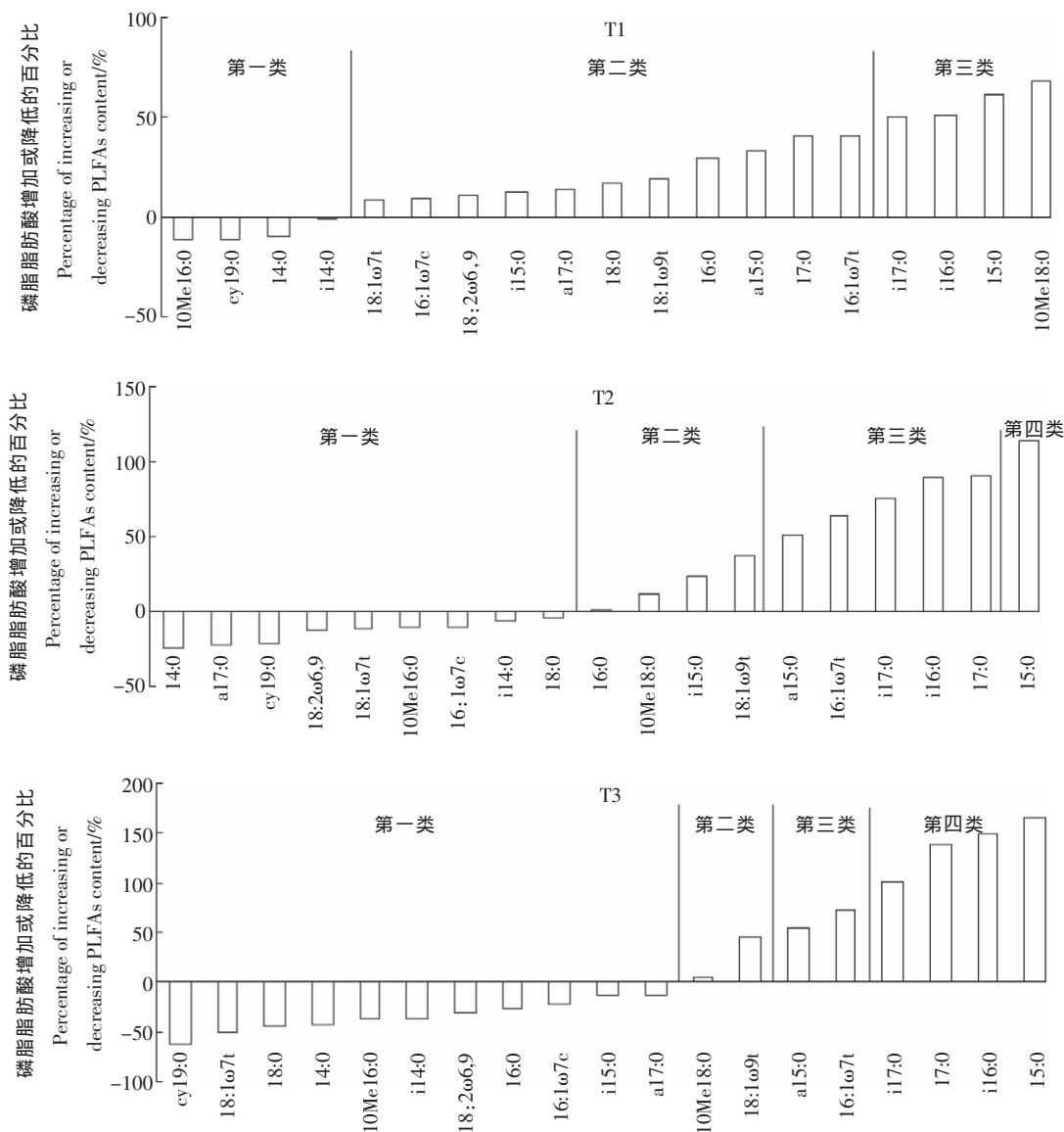


图1 BDE-209处理下土壤微生物 PLFAs 含量的变化分类

Figure 1 Effect of BDE-209 on changes of soil microbial of PLFA contents

BDE-209 区分开来,大致呈现 CK、T1、T2 和主成分一呈显著正相关,T3 和主成分二呈显著正相关。

根据主成分因子得分矩阵,将两个主成分分别表示为

$$Y1=1.088CK+0.778T1+0.069T2-1.210T3$$

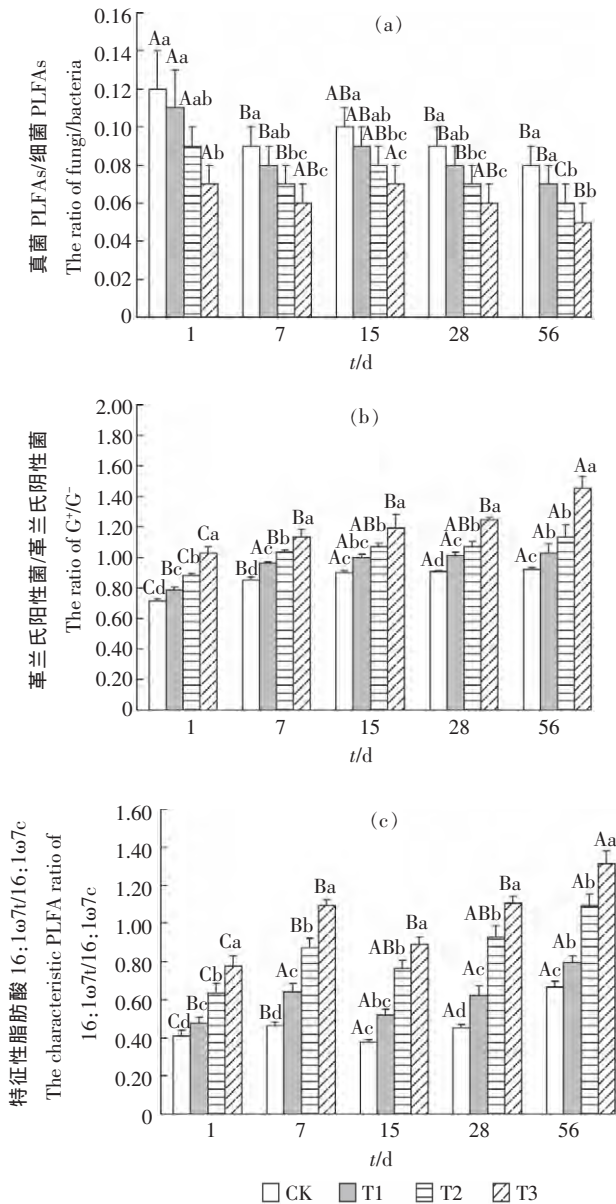
$$Y2=-0.849CK-0.493T1+0.314T2+1.747T3$$

由磷脂脂肪酸在各个 BDE-209 处理下的数值,可得出磷脂脂肪酸在 2 个主成分上面的得分,其中:16:0、18:0、18:1ω7t、18:2ω6,9 在主成分一上的得分较高,可以认为主成分一是它们的代表因子,16:0、18:0 是细菌的特征脂肪酸,18:1ω7t 是革兰氏阴性菌的特征脂肪酸,18:2ω6,9 是真菌的特征脂肪酸,说明

革兰氏阴性菌和真菌对高浓度 BDE-209 较敏感,16:0、18:0 表征的细菌在主成分一中是优势种群;i17:0、a15:0 在主成分二上的得分较高,可以认为主成分二是它们的代表因子,i17:0、a15:0 都是革兰氏阳性菌的特征脂肪酸,说明革兰氏阳性菌对高浓度的 BDE-209 抗性较强,在主成分二中是优势种群。

3 讨论

磷脂脂肪酸被广泛作为土壤微生物生物量与微生物生物群落的生物标记。本研究发现,与对照组相比,不同浓度 BDE-209 处理下土壤总微生物量都是先升高、后随着污染物浓度的增大而下降。BDE-209



同一浓度含不同大写字母者差异显著 ($P < 0.05$),
同一时间含不同小写字母者差异显著 ($P < 0.05$)

Different uppercase letters in a concentration indicate significant differences ($P < 0.05$); Different lowercase letters in a time indicate significant differences ($P < 0.05$)

图2 BDE-209处理对真菌/细菌、G⁺/G⁻和16:1ω7t/16:1ω7c的影响

Figure 2 Effect of BDE-209 on fungi/ bacteria, G⁺/G⁻ and 16:1ω7t/16:1ω7c ratios

作为一种有机污染物,在进入土壤后,低浓度的BDE-209能够作为碳源被微生物所利用,从而刺激微生物的生长,高浓度的BDE-209可以对细胞DNA造成难以修复的损伤^[15],抑制微生物的生长繁殖,甚至直接导致细胞死亡^[16]。

污染物对土壤微生物区系和群落结构的影响因不同的研究对象而不同。通过比较不同浓度BDE-209污染下微生物群落结构和一些特征性的PLFAs组分之间的比值变化发现,随着不同浓度BDE-209的添加,土壤总微生物量、细菌、真菌和放线菌的量增加或减少,但增加或减少的对应浓度不一样:在BDE-209浓度为1、10 mg·kg⁻¹时,土壤总微生物量和细菌的量增加,BDE-209浓度为100 mg·kg⁻¹土壤总微生物量和细菌的量减少,而真菌和放线菌量在BDE-209浓度为10、100 mg·kg⁻¹出现减少,是由于不同微生物对BDE-209耐受能力不同,同时F/B随着BDE-209浓度的增加而减少,也说明细菌对BDE-209的耐受能力大于真菌。这与相关研究有类似之处^[17],也可能与本研究中所测定的指示真菌的磷脂脂肪酸为18:2ω6,9有关。此外,目前直接从土壤中提取的真菌磷脂脂肪酸种类仍十分有限,由此也可能造成很多种类的真菌在土壤中并没有真正反映出来^[18]。

革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的比值(G⁺/G⁻)可作为指示环境胁迫时的指标^[19]。在本研究中,在BDE-209胁迫下,G⁺/G⁻随BDE-209浓度的增加而增加,尤其是含i17:0、a15:0的微生物明显增多,由于i17:0、a15:0指示的均为革兰氏阳性细菌,而革兰氏阳性属于多样性和种类都非常丰富的细菌类群。张新颖^[20]在研究中也发现,G⁺比G⁻对持久性有机污染物芘的耐受性更强。但是Su等^[21]的研究表明,革兰氏阳性菌对多环芳烃的毒性也很敏感,Frostegard等^[22]也发现多环芳烃耐受菌和多环芳烃降解菌很多都属于革兰氏阴性菌,说明不同环境中的不同类型的微生物对不同的污染物的响应是不同的。进一步的主成分分析表明,BDE-209浓度越低,其在主成分分布图上向X轴的正方向发展,BDE-209浓度越高,其在主成分分布图上向Y轴正方向发展,其中PC1以含16:0、18:0、18:1ω7t、18:2ω6,9的微生物为优势种群,PC2以含i17:0、a15:0的微生物为优势种群。

利用土壤微生物PLFAs可以分析BDE-209污染胁迫引起的土壤微生物生物量和群落结构的变化,为筛选有效的污染胁迫生物标志物,以及对污染胁迫环境生态毒理进行早期诊断和环境监测提供了更多参考。

4 结论

(1)在1~100 mg·kg⁻¹ BDE-209胁迫下,土壤微生物群落PLFAs种类还较丰富。

(2) BDE-209 对以 PLFAs 表征的土壤细菌、真菌、放线菌和总微生物量都有显著的影响,且真菌对 BDE-209 更敏感,细菌对 BDE-209 更耐受。细菌中 G⁻菌对 BDE-209 污染的响应更为敏感,G⁺菌更容易存活,含 16:1 ω 7t 的微生物比含 16:1 ω 7c 的微生物抗性更强。

(3) 以 PLFAs 表征的土壤微生物量和群落结构对 BDE-209 的响应非常敏感,可以作为 BDE-209 污染下指示土壤质量变化的一个有效的生物指标。

参考文献:

- [1] Jing Y F, Wang X T, Kun Z. Occurrence, compositional patterns, and possible sources of polybrominated diphenyl ethers in agricultural soil of Shanghai[J]. *China Chemosphere*, 2012, 89:936-943.
- [2] Braune B, Mallory M, Gilchrist H, et al. Levels and trends of organochlorines and brominated flame retardants in ivory gull eggs from the Canadian Arctic, 1976 to 2004[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 378(3):403-417.
- [3] Luo Y, Luo X J, Zhen L, et al. Polybrominated diphenyl ethers in road and farmland soils from an e-waste recycling region in Southern China, Concentrations, source profiles, and potential dispersion and deposition [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(3):1105-1113.
- [4] Sverdrup L E, Hartnik T, Mariussen E, et al. Toxicity of three halogenated flame retardants to nitrifying bacteria, red clover (*T5 Rifolium pratense*), and a soil invertebrate (*Enchytraeus crypticus*) [J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1):96-103.
- [5] Liu W X, Li W B, Hu J, et al. Sorption kinetic characteristics of polybrominated diphenyl ethers on natural soils[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158:2815-2820.
- [6] Zhang K, Zhang B Z, Li S M. Regional dynamics of persistent organic pollutants (POPs) in the Pearl River Delta, China: Implications and perspectives[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159:2301-2309.
- [7] 于 树,汪景宽,李双异.应用 PLFA 方法分析长期不同施肥处理对玉米地土壤微生物群落结构的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(9):4221-4227.
YU Shu, WANG Jing-kuan, LI Shuang-yi. Effect of long-term fertilization on soil microbial community structure in corn field with the method of PLFA[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(9):4221-4227.
- [8] Liu B R, Jia G M, Chen J, et al. A Review of methods for studying microbial diversity in soils[J]. *Pedosphere*, 2006, 16(1):18-24.
- [9] 赵 帅,张静妮,赖 欣,等.放牧与围栏内蒙古针茅草原土壤微生物生物量碳、氮变化及微生物群落结构 PLFA 分析[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(6):1126-1134.
ZHAO Shuai, ZHANG Jing-ni, LAI Xin, et al. Analysis of microbial biomass C, N and soil microbial community structure of stipa Steppes using PLFA at grazing and fenced in Inner Mongolia, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(6):1126-1134.
- [10] Schutter M E, Dick R P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(5):1659-1668.
- [11] Frostegard A, Baath E, Tunlid A. Shift in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25(6):723-730.
- [12] Yoshitake S, Uchida M, Nakatsubo T, et al. Characterization of soil microflora on a successional glacier foreland in the high Arctic on Ellesmere Island, Nunavut, Canada using phospholipid fatty acid analysis[J]. *Polar Bioscience*, 2006, 19:73-84.
- [13] 廖 敏,陈雪花,陈承利.土壤-青菜系统中铅污染对土壤微生物活性及多样性的影响[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(2):220-227.
LIAO Min, CHEN Xue-hua, CHEN Cheng-li. The influence of lead contamination on soil-microbial activity and community structure diversity in a soil-greenrocery system[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(2):220-227.
- [14] 陈振翔,于 鑫,夏明芳,等.磷脂脂肪酸分析方法在微生物生态学中的应用[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(7):828-832.
CHEN Zhen-xiang, YU Xin, XIA Ming-fang, et al. Application of phospholipid fatty acid (PLFA) analysis in microbial ecology[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(7):828-832.
- [15] 许超群.四溴联苯醚(BDE-47)对菲律宾蛤仔解毒代谢酶基因表达与毒性效应的研究[D].青岛:中国海洋大学,2010.
XU Chao-qun. The Primary study on gene expressions and toxic effects of BDE-47 on *Venerupis philippinarum*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [16] 宋任芳.环境中苯基缩水甘油醚和多溴联苯醚的基因和细胞毒性初步研究[D].广州:中国科学院研究生院,2007.
SONG Ren-fang. Basic investigation of the genotoxicity and cellular toxicology by environmental phenyl glycidyl ether (PGE) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) organic pollutants[D]. Guangzhou: the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2007.
- [17] 蒋 琴.电子垃圾拆解区域十溴联苯醚污染土壤的植物修复研究[D].杭州:浙江大学,2013.
JIANG Qin. The phytoremediation of decabromodiphenyl ether polluted soil in e-waste diamantling area[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [18] Calderón F J, Jackson L E, Scow K M, et al. Short-term dynamics of nitrogen, microbial activity, and phospholipid fatty acid after tillage[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2001, 65:118-126.
- [19] McKinley V L, Peacock A D, White D C. Microbial communities PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(10):1946-1958.
- [20] 张新颖. 薦草及其根际对模拟湿地中芘污染的降解机制[D].上海:上海大学,2012.
ZHANG Xin-ying. Degradation mechanism of pyrene by scripus triqueter and its rhizosphere in the simulated wetland[D]. Shanghai: Shanghai University, 2012.
- [21] Su Y H, Yang X Y. Interactions between selected PAHs and the microbial community in rhizosphere of a paddy soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(3):1027-1034.
- [22] Frostegard A, Tunlid A, Baath E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals[J]. *Applied Environmental Microbiol*, 1993, 59(11):3605-3617.