

DEHP 对土壤脱氢酶活性及微生物功能多样性的影响*

秦 华^{1,2,3} 林先贵^{1,2†} 陈瑞蕊^{1,2} 尹 睿^{1,2}

(1 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

(2 中国科学院南京土壤研究所-香港浸会大学土壤与环境联合开放实验室, 南京 210008)

(3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要 选用肥熟早耕人为土(黄棕壤), 设置了在土壤中施加 100 mg kg^{-1} DEHP 与不施加 DEHP 两个水平, 盆栽试验研究了 DEHP 对土壤脱氢酶活性以及土壤微生物群落功能多样性的影响, 以及植物在污染土壤中的修复作用。结果表明, 施加 DEHP 显著抑制了土壤脱氢酶活性, 30 d 时与对照相比降低了约 30%, 第 60 d 时尽管有缓慢的回升, 但仍明显低于对照 ($p < 0.05$)。从 BIOLOG 反应的结果可以看出, DEHP 也显著影响土壤微生物的功能多样性, 土壤微生物群落的 Shannon 指数、Simpson 指数、McIntosh 指数和均度均显著低于无污染的对照, 说明 DEHP 的污染导致了土壤微生物群落功能多样性的下降。种植植物对土壤脱氢酶和微生物活性有很明显的促进作用, 并且在一定程度上缓解了 DEHP 的毒害作用, 但并未消除 DEHP 对土壤微生物的影响。

关键词 DEHP; 土壤脱氢酶; 微生物功能多样性; 绿豆

中图分类号 X172 **文献标识码** A

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)是一种工业上使用最广泛的酞酸酯, 主要用作聚氯乙烯的增塑剂, 约占增塑剂总量的 80% ~ 85%, 在终产品中含量可达到 50% 左右。已有研究表明 DEHP 可以致癌并具有较强的生殖毒性, 尤其会导致雄性哺乳动物的睾丸受损, 另外还具有致畸性和胚胎毒性^[1]。我国农膜年产量达百万吨, 且以每年 10% 的速度递增, 随着农膜产量的增加, 使用面积也在大幅度扩展, 几乎所有的覆膜土壤都有残膜。据统计, 我国农膜年残留量高达 35 万 t, 残膜率高达 42%, 而作为其主要成分的酞酸酯类化合物进入环境后, 对农田生态系统造成了难以估量的后果^[2]。

脱氢酶是土壤中的主要酶类之一, 其活性可以看作是土壤微生物活性和功能多样性的重要指标。有研究表明, 不同环境下不同土壤的脱氢酶活性有一定的差异, 并且不同的农用化学物质或者污染物等也可能会影响土壤脱氢酶的活性^[3]。化学物质同样也可能影响土壤微生物多样性, 姚斌等报道以 10 mg kg^{-1} 含量施入水稻土中的甲磺隆在施用后导

致土壤微生物整体活性下降, 随培养时间的推移, 甲磺隆除草剂对污染水稻土的微生物碳源利用多样性的影响也逐渐加剧^[4]。

目前, 国内外已经大量研究了多环芳烃类化合物、有机农药以及石油等有机污染物对土壤微生物多样性的影响^[5,6], 但对于酞酸酯类化合物的研究尚没有报道。本试验研究了在栽种绿豆和无植物条件下 DEHP 污染土壤的脱氢酶活性及微生物群落整体活性的变化情况, 以探索 DEHP 对土壤微生物群落结构和功能多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤为肥熟早耕人为土(黄棕壤), 采自江苏省句容市蔬菜地的表层土(0 ~ 20 cm), 新鲜土样除去植物残体, 过 2 mm 筛。理化性质: pH 6.95, 有机碳 31.6 g kg^{-1} , 全氮 2.02 g kg^{-1} , 全磷 (P_2O_5) 3.06 g kg^{-1} , 速效磷 280.1 mg kg^{-1} 。

* 国家自然科学基金青年基金项目(40101015)资助

† 通讯作者, E-mail: xghn@issas.ac.cn

作者简介: 秦 华(1981 ~), 男, 江苏泰兴人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究

收稿日期: 2004 - 11 - 18; 收到修改稿日期: 2005 - 03 - 31

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)为分析纯,购自苏州工业园区正兴化工研究院,纯度 $\geq 98.5\%$ 。

供试植物为绿豆(*Semen Phaseoli Radiati*)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设置和土壤处理 试验设计分为不施用 DEHP 的 CK 和 DEHP 浓度为 100 mg kg^{-1} 两个水平,在每个水平的盆栽中,又分为栽种绿豆和不栽种绿豆两部分,共计 4 个处理,分别为无绿豆的对照土壤(CK)、种绿豆的对照土壤(CK+P)、无绿豆的添加 DEHP 的土壤(100)以及种绿豆的添加 DEHP 的土壤(100+P),每个处理 4 个重复。

供试土壤混匀风干,准确量取浓度为 1000 mg L^{-1} 的 DEHP 石油醚溶液 20 ml 加入土壤中,拌匀,待石油醚挥发完全后播种绿豆,放置于温室中培养。以后进行正常的田间管理,在培养后第 1、30、60 天取样进行土壤脱氢酶及微生物多样性分析

1.2.2 脱氢酶测定 土壤脱氢酶活性测定采用 TTC 还原法,方法见参考文献[7]。

1.2.3 土壤微生物群落功能多样性分析 微生物群落功能多样性应用 BIOLOG GN 微平板测定。称取 10 g 新鲜土样加入装有 100 ml 无菌水的三角瓶中,高速振荡 20 min,梯度稀释法稀释到 10^{-3} 浓度。通过排孔加样器将 10^{-3} 稀释液接种到 BIOLOG 微平板上,接种量 $150 \mu\text{l}$, 25°C 下恒温培养 7 d,每隔

12 h 用 BIOLOG 自动读板仪在 590 nm 下读数。

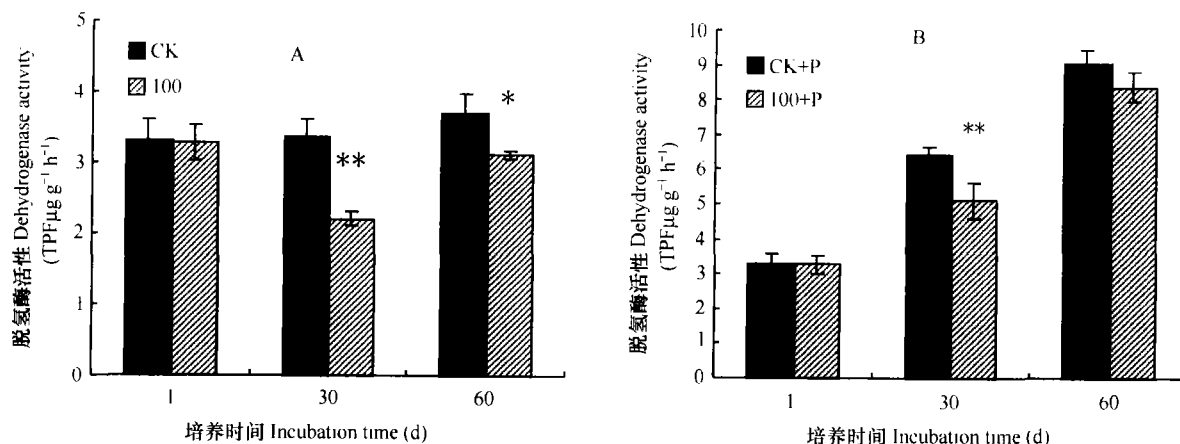
1.3 数据处理

所有的实验数据应用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS 10.0 完成。微生物整体活性指标采用微平板每孔颜色平均变化率(Average Well Color Development, AWCD)来描述,Shannon, Simpson 和 McIntosh 等多样性指数被应用于本研究中土壤微生物碳源利用多样性的计算^[8]。

2 结果与分析

2.1 DEHP 对土壤脱氢酶活性的影响

DEHP 对土壤脱氢酶活性的影响如图 1 所示。在施用之初 DEHP 对土壤脱氢酶并没有显示出明显的抑制作用。经 30 d 培养后,添加 100 mg kg^{-1} DEHP 的处理中无论是否种植了绿豆,与对照相比都有明显的差异,脱氢酶活性减少了约 30%,说明 DEHP 对土壤脱氢酶活性具有破坏作用。在 60 d 时,可能由于土壤自身的修复作用,土壤脱氢酶活性有一定程度的回升,但仍明显低于对照,种植绿豆的处理土壤脱氢酶活性已经基本与对照持平,这可能与植物根际分泌物对土壤微生物的刺激作用有关。而在整个培养过程中,种植绿豆的处理土壤脱氢酶活性整体水平比同浓度的无植物处理土壤显著增加,表明植物对土壤脱氢酶活性有较重要的影响。



注:处理与对照在 * $p < 0.05$ 和 ** $p < 0.01$ 水平上差异显著 Note: Significant differences between control and treatments are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

图 1 DEHP 对土壤脱氢酶活性的影响

Fig. 1 Effects of DEHP on soil dehydrogenase activity

2.2 DEHP 对土壤微生物活性的影响

BIOLOG GN 微平板 95 个孔吸光度的平均值,即平均吸光值 (Average Well Color Development, AWCD),其随时间的变化可以作为评价微生物整体活性高低的一个有效指标,最终的 AWCD 值与土壤微生物群落中能利用单一碳源的微生物的数目和种类有关^[9]。培养过程中各处理的 AWCD 变化曲线如图 2 所示。

图中可以看出,施加 DEHP 的土壤和对照土壤中的微生物群落结构在培养过程中有明显的区别,对照土壤的 AWCD 值较施用 DEHP 土壤者高,说明 DEHP 降低了土壤微生物的整体活性,污染土壤中的微生物群落对微平板上碳底物利用的能力低于对照土壤。与没有植物影响的处理相比,种植绿豆的土壤 AWCD 值明显升高。因此可以看出,DEHP 显著抑制了土壤微生物的整体活性,而种植植物也可以明显提高土壤微生物的整体活性,其结果与土壤脱氢酶结果相吻合。

2.3 土壤微生物群落功能多样性分析

不同的多样性指数可以用来分析土壤微生物群落的功能多样性,其反映了土壤微生物群落多样性的不同方面。Shannon 指数主要反映了群落中的物种丰富度,Simpson 指数较多的反映群落中最常见的物种,而 McIntosh 指数则是群落物种均一性的衡量^[8,10]。本实验中采用 96 h 的数据,通过 Shannon、Simpson 和 McIntosh 多样性指数模型计算得到底物利用多样性指数。三次取样 96 h 土壤微生物多样性指数计算数据见表 1。

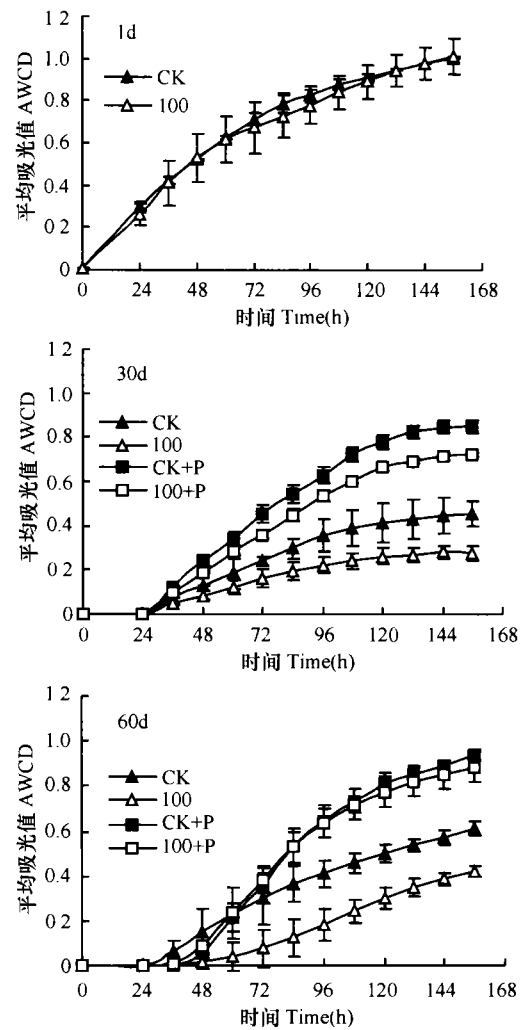


图 2 土壤微生物培养过程中 AWCD 变化

Fig.2 AWCD changes during incubation of soil microbial communities

表 1 土壤微生物多样性指数

Table 1 Diversity and evenness indices of soil microbial communities

时间 Time (d)	处理 Treatment	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index	McIntosh 指数 McIntosh index
1	CK	59.72 ± 0.00	4.20 ± 0.03	9.30 ± 0.99
	100	67.41 ± 0.00	4.30 ± 0.03	9.59 ± 0.86
30	CK	22.94 ± 0.00	3.36 ± 0.05	3.15 ± 0.26
	100	15.39 ± 0.00 *	3.03 ± 0.06 *	2.19 ± 0.18
	CK + P	43.19 ± 0.00	3.94 ± 0.04	5.70 ± 0.56
	100 + P	39.36 ± 0.00 *	3.85 ± 0.04 *	5.26 ± 0.50
60	CK	38.74 ± 0.00	3.83 ± 0.04	6.23 ± 0.71
	100	26.77 ± 0.00 *	3.57 ± 0.05	3.65 ± 0.38 *
	CK + P	58.20 ± 0.00	4.18 ± 0.03	8.02 ± 0.75
	100 + P	57.45 ± 0.00	4.17 ± 0.03	8.16 ± 0.76

注:表中数据为测定样本的平均值;处理与对照在 * $p < 0.05$ 水平上差异显著 Note: Average values in the table. Significant differences between control and treatments are indicated by * $p < 0.05$

单因素方差分析显示,第 1 天取样时施加 DEHP 的土壤与对照的多样性指数之间都没有显著差异。第 30 天取样时,施加 DEHP 的土壤与相对应的对照土壤之间在 Shannon 和 Simpson 指数之间都存在着显著差异($p < 0.05$),此结果表明经过一段时间的培养后,DEHP 破坏了土壤微生物群落的物种丰富度,并对土壤微生物群落中最常见的物种产生了明显的抑制作用。第 60 天后,在没有植物的处理中,施加 DEHP 土壤 Simpson 指数和 McIntosh 指数与对照之间有显著差异($p < 0.05$),说明长时间的 DEHP 污染破坏了土壤微生物群落的物种均一性。而种植了绿豆的处理由于植物根系的作用,土壤微生物群落的多样性指数与对照已经基本没有区别,并且对土壤微生物群落的物种均一性也没有产生明显的影响。

2.4 土壤微生物多样性的主成分分析

95 种碳源的测定结果形成了描述微生物群落代谢特征的多元向量,不易直观比较,因此应用主成分分析(PCA)来分析施加 DEHP 的土壤中的微生物在不同培养时期对 BIOLOG GN 微平板上 95 种碳源的利用情况^[11],采用 96 h 时的读数进行分析,结果如图 3。

图中可以看出,在培养过程中,施加 DEHP 的土壤与对照在主成分 PCA 1 上一直有很好的分离,表明 DEHP 对土壤微生物利用不同的碳源产生了很大的影响,这说明有机污染物对不同微生物的影响是不同的,对某些能利用污染物作碳源和能源的微生物来说,污染可能会刺激这些微生物的生长繁殖,而对那些缺乏耐性的微生物来说,污染势必会产生抑制作用,而是否种植植物对土壤微生物的碳源利用特性并没有很大的影响。

3 讨论

土壤脱氢酶活性是一种很好的评价土壤微生物活性的指标,因为脱氢酶不像其他的酶那样可以在细胞外显示出活性,它只存在于活细胞的内部^[12]。据 Megheraj 等报道,在 DDT 含量为 50 mg kg^{-1} 的土壤中,土壤脱氢酶活性受到抑制,但土壤磷酸酶活性并没有受到影响^[13];沈标等研究了对硝基酚对土壤脱氢酶、脲酶活性的影响,证明有机农药对土壤酶活性具有很大的影响^[14]。本实验结果显示,DEHP 对土壤脱氢酶活性的影响较大,但在初期并没有明显的降低,在施用的第 30 天后,脱氢酶活性与对照土

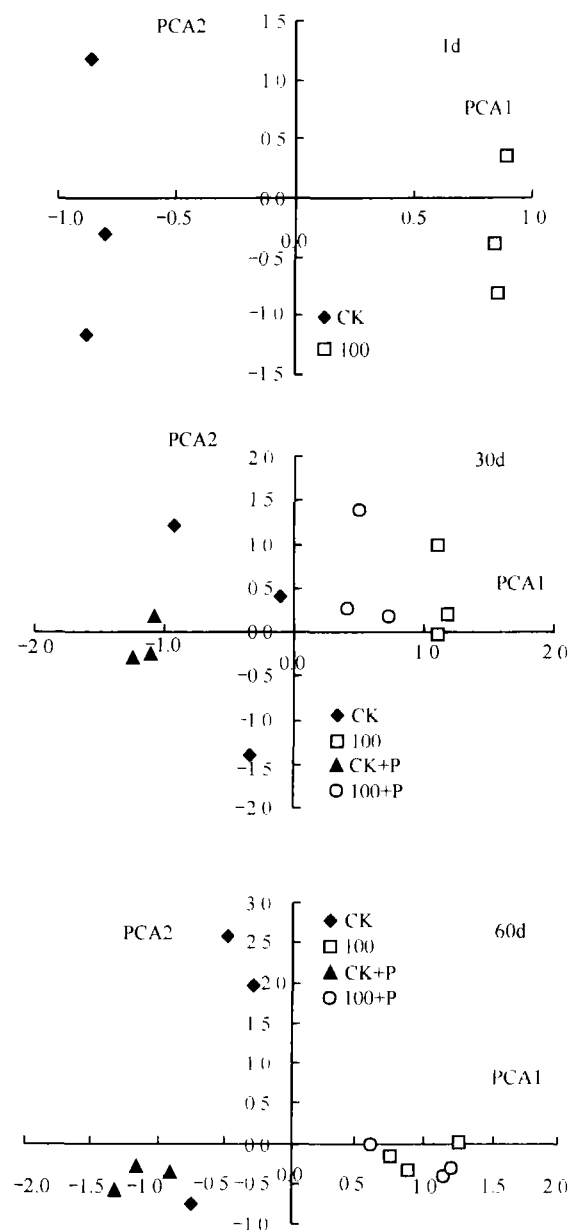


图 3 土壤微生物碳源利用特性的主成分分析(PCA)

Fig. 3 Principal component analyses (PCA) of carbon utilization of soil microbial communities

壤相比明显降低,达到了极显著水平($p < 0.01$),虽然到第 60 天后有回复的趋势,但仍然差异显著($p < 0.05$),应用 BIOLOG 系统研究土壤微生物多样性的结果也显示了类似的趋势。证明施用 DEHP 明显降低了土壤脱氢酶活性以及土壤微生物多样性,并且随着时间的推移,影响效果也发生变化,即初期影响不显著,中期强烈抑制,然后又缓慢的自身修复,其原因可能是由于 DEHP 作为一种可被某些微生物利用的碳源逐渐的被降解,同时也促进了这类微生物的生长。值得注意的是本实验中采用的栽种绿豆修

复的方法也对土壤微生物产生了很大的影响,从结果来看,植物可以显著提高土壤的脱氢酶活性和微生物的整体活性并加速土壤的自身修复,其原因可能是植物根系分泌物的作用影响了土壤微生物的生长,或者是由于植物对土壤中 DEHP 的吸收作用导致对微生物的毒害减小,这些都导致了在某些方面减轻了 DEHP 的毒害作用。美国的 Fang 等也曾利用 BIOLOG 方法研究了植物根际微生物降解土壤中阿特拉津和菲的效果,但其具体的影响机制还有待于进一步研究^[15]。

BIOLOG 方法用于环境微生物结构和功能多样性的研究具有灵敏度高、分辨率强、测定简便等优点,而且由于不需要分离培养纯种微生物,可最大限度的保留微生物群落原有的代谢特征^[16,17]。但是由于 BIOLOG 微平板具有一定的选择性,而且应用功能多样性指数的差异来反映物种的多样性差异也常常会导致低估物种上的不同,这些都会对分析的准确性造成一定的干扰。Muller 等利用 DGGE 分析发现泰乐菌素污染的土壤中微生物多样性与对照稍有差异,而 BIOLOG 分析没有发现差异^[18]。但利用 BIOLOG 系统研究土壤微生物群落对碳底物利用能力的方法目前仍然是一个快速简便的好途径。

参 考 文 献

- [1] Parks L G, Ostby J S, Lambright C R, *et al.* The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological Science*, 2000, 58(2):339 ~ 349
- [2] 杨晓涛. 农膜污染的防治对策. *农业环境与发展*, 2000, 17(1):28 ~ 29. Yang X T The agro-plastic sheeting pollution and counter measure (In Chinese). *Agro-Environment and Development*, 2000, 17(1):28 ~ 29
- [3] 郭明,陈红军,王春蕾,等. 4 种农药对土壤脱氢酶活性的影响. *环境化学*, 2000, 19(6):524 ~ 527. Guo M, Chen H J, Wang C L, *et al.* Effect on soil dehydrogenase of four pesticides (In Chinese). *Environmental Chemistry*, 2000, 19(6):524 ~ 527
- [4] 姚斌,徐建民,张超兰,等. 甲磺隆对土壤微生物多样性的影响. *土壤学报*, 2004, 41(2):320 ~ 322. Yao B, Xu J M, Zhang C L, *et al.* Effect of metsulfuron-methyl on microbial diversity in paddy soil (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(2):320 ~ 322
- [5] Katayama A, Funasaka K, Fujie K. Changes in respiratory quinone profile of a soil applied with pesticides. *Biology and Fertility of Soils*, 2001, 33(6):454 ~ 459
- [6] Aislabie J M, Balks M R, Foght J M, *et al.* Hydrocarbon spills on Antarctic soils: Effects and management. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(5):1265 ~ 1274
- [7] Casida L C, Klein D A, Santoro T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, 1964, 98:371 ~ 376
- [8] Magurran A E. *Ecological Diversity and its Measurement*. New Jersey: Princeton University Press. 1988:141 ~ 162
- [9] Choi K H, Dobbs F C. Comparison of two kinds of biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(3):203 ~ 213
- [10] Atlas R M. Diversity of microbial community. *Advanced Microbiology Ecology*, 1984, 7:1 ~ 47
- [11] Hackett C A, Griffiths B S. Statistical analysis of the time-course of biolog substrate utilization. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, 30(1):63 ~ 69
- [12] Chu H Y, Zhu J G, Xie Z B, *et al.* Effects of lanthanum on dehydrogenase activity and carbon dioxide evolution in a Haplic Acrisol. *Australian Journal of Soil Research*, 2003, 41:731 ~ 739
- [13] Megheraj M, Boul H L, Thiele J H. Effects of DDT and its metabolites on soil algae and enzymatic activity. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29:130 ~ 134
- [14] 沈标,李顺鹏,赵硕伟,等. 氯苯、对硝基酚对土壤生物活性的影响. *土壤学报*, 1997, 34(3):309 ~ 314. Shen B, Li S P, Zhao S W, *et al.* Effect of chlorobenzene and nitrophenol on soil biological activity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 1997, 34(3):309 ~ 314
- [15] Fang C W, Radosevich M, Fuhrmann J J. Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using FAME and BIOLOG analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(4/5):679 ~ 682
- [16] 席劲瑛,胡洪营,钱易,等. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用. *微生物学报*, 2003, 43(1):138 ~ 141. Xi J Y, Hu H Y, Qian Y, *et al.* Application of Biolog system in the study of microbial community (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1):138 ~ 141
- [17] 郑华,欧阳志云,方治国,等. Biolog 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. *土壤学报*, 2004, 41(3):456 ~ 461. Zheng H, Ou'yang Z Y, Fang Z G, *et al.* Application of Biolog to study on soil microbial community functional diversity (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(3):456 ~ 461
- [18] Muller A K, Westergaard K, Christensen S, *et al.* The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology*, 2002, 44(1):49 ~ 58

EFFECTS OF DEHP ON DEHYDROGENASE ACTIVITY AND MICROBIAL FUNCTIONAL DIVERSITY IN SOIL

Qin Hua^{1,2,3} Lin Xiangui^{1,2†} Chen Ruirui^{1,2} Yin Rui^{1,2}

(1 *Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

(2 *Joint Open Laboratory of Soil and the Environment, Institute of Soil Science and Hongkong Baptist University, Nanjing 210008, China*)

(3 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract A pot culture experiment was carried out to study effects of 100 mg kg^{-1} DEHP on dehydrogenase activity and microbial diversity in Fimi-Orthic Anthrosols, as well as effects of mung bean planting on DEHP toxicity. DEHP-treatment significantly depressed dehydrogenase activity, which decreased by about 30% after 30 days, and then increased slightly after 60 days, but was still lower than that in the control ($p < 0.05$). The BIOLOG results show that Shannon index, Simpson index, McIntosh index and evenness of soil microbial communities were all significantly lower in the DEHP-treated soil than in the control, which indicated that DEHP pollution decreased functional diversity of the soil microbial communities. Mung bean planting enhanced dehydrogenase activity and soil microbial activity, alleviated but did not completely eliminate the toxicity of DEHP.

Key words DEHP; Dehydrogenase activity; Microbial functional diversity; Mung bean