

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211116001

杨雅杰, 褚玲珑, 宋新山, 等. 2种微米级聚苯乙烯颗粒对菘蓝幼苗生长及土壤群落结构的影响[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(6): 244-255

Yang Y J, Chu L L, Song X S, et al. Effects of two micron-sized polystyrene particles on *Isatis indigotica* seedlings growth and soil community structure [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(6): 244-255 (in Chinese)

2种微米级聚苯乙烯颗粒对菘蓝幼苗生长及土壤群落结构的影响

杨雅杰, 褚玲珑, 宋新山, 赵晓祥*

东华大学环境科学与工程学院, 上海 201620

收稿日期: 2021-11-16 录用日期: 2022-01-14

摘要: 微塑料由于其粒径小、比表面积高、难降解等特性对土壤环境、农作物的生长都带来了危害。以菘蓝为供试植物, 探究了(775.90±61.66) nm 和(50.07±1.29) μm (分别命名为 S 组和 B 组)的聚苯乙烯微塑料(PS-NPs)对菘蓝种子和幼苗生长及根际土壤微生物组成的影响。结果显示, 2种粒径的 PS-NPs 对菘蓝种子发芽率和幼苗生物量均有促进作用, S 组对菘蓝叶片细胞膜的伤害率大于 B 组。PS-NPs 的添加使菘蓝叶片中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和过氧化物酶(POD)活性升高, 且微塑料浓度越高, 影响越大。较高浓度(1 000 mg·kg⁻¹)的微塑料胁迫下, B 组菘蓝叶片中 3 种酶活性均分别比 S 组高出 46.99%(SOD)、61.56%(CAT)、14.91%(POD)。此外高通量测序结果表明 PS-NPs 的添加增加了菘蓝根际土壤微生物群落多样性, 群落多样性大小为: S 组>B 组>CK, 处理组与对照组相比优势菌门相同但丰度有所变化, PS-NPs 的添加使放线菌门(Actinobacteria)和变形菌门(Proteobacteria)丰度升高, 而绿弯菌门(Chloroflexi)丰度降低。

关键词: 微塑料; 聚苯乙烯; 菘蓝; 群落结构

文章编号: 1673-5897(2022)6-244-12 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Two Micron-sized Polystyrene Particles on *Isatis indigotica* Seedlings Growth and Soil Community Structure

Yang Yajie, Chu Linglong, Song Xinshan, Zhao Xiaoxiang*

College of Environmental Science and Technology, Donghua University, Shanghai 201620, China

Received 16 November 2021 accepted 14 January 2022

Abstract: Due to its small particle size, high specific surface area, and resistance to degradation, microplastics have brought harm to the soil environment and the growth of crops. In this study, *Isatis indigotica* was used as the test plant, and polystyrene microplastics (PS-NPs) with diameters of (775.90±61.66) nm and (50.07±1.29) μm (named group S and group B, respectively) were used as microplastic model pollutants. Effects of microplastic on *Isatis indigotica* seed germination, seedlings growth, and rhizosphere soil microbial composition were investigated. The results showed that PS-NPs with two particle sizes promoted the seed germination rate and seedling biomass of *Isatis indigotica*, and the damage rate to the cell membrane of *Isatis indica* leaves in group S was higher than that of B group, and the higher the plastic concentration, the greater impact. The existence of PS-NPs increased malondialde-

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC0408604)

第一作者: 杨雅杰(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微塑料对土培植物的影响, E-mail: ysust2015@163.com

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: zxx@dhu.edu.cn

hyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, and peroxidase (POD) activity in *Isatis indigotica* leaves. At higher concentration ($1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the activities of three enzymes in *Isatis indigotica* leaves in group B were 46.99% (SOD), 61.56% (CAT), 14.91% (POD) higher than those in group S, respectively. In addition, the high-throughput sequencing results showed that PS-NPs increased the microbial communities diversity in the rhizosphere soil of *Isatis indigotica*, and the community diversity was as follows: group S>group B>CK. Compared with the control group, the dominant bacterial phyla in the treatment group was the same but the abundance changed, as shown in that PS-NPs increased the abundance of Actinobacteria and Proteobacteria, while the abundance of Chloroflexi decreased.

Keywords: microplastic; polystyrene; *Isatis indigotica*; community structure

微塑料(microplastics)是指粒径<5 mm的塑料颗粒和碎片,目前对微塑料的研究已逐步从海洋环境转向土壤环境^[1],Boyle和Örmeci^[2]的研究表明陆地中微塑料的聚集量有可能达到海洋中的4倍~23倍,微塑料难降解会在土壤中长期存在,此外还会释放增塑剂等污染物^[3],微塑料对土壤微生物的运输、代谢等均有影响^[4-5]。尤其是微塑料可以进入食物链^[6],从而对作物和人体健康产生威胁。塑料地膜覆盖和污泥的土地利用是土壤中微塑料最主要的两大来源^[7]。聚苯乙烯被广泛应用于各行各业,但其残余价值低,不易循环再生,会对环境以及其中的动植物和微生物造成极大的影响^[8]。

纳米塑料已被证明可以穿透植物细胞壁^[9],每种植物对微塑料的吸收取决于多种因素,如根体积、密度和表面积,木质部体积和表面积、汁液酸碱度、蒸腾作用、细胞质和液泡的酸碱度^[10-11]。目前一些与微塑料尺寸、形状和表面官能团相似的工程碳质纳米颗粒的研究已经在植物中开展^[12],研究表明微塑料可能是通过胞间连丝的内吞作用、离子转运通道、载体蛋白或水通道蛋白以及土壤碳^[13]或根际分泌物的调节进入植物体内^[9,14]。菘蓝是十字花科草本植物,俗称“板蓝根”,有很好的清热解毒功效,被广泛使用在医疗领域。目前关于聚苯乙烯纳米塑料对菘蓝的影响探究较少。本研究拟通过盆栽实验研究聚苯乙烯微塑料(PS-NPs)对菘蓝幼苗的生长特性、生理指标的影响,及土培植物根际土壤微生物群落对PS-NPs胁迫的响应。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 供试材料

供试聚苯乙烯微塑料(PS-NPs)购买自东莞市樟木头广弘高分子材料公司,对材料进行扫描电子显微镜(SEM)表征,其粒径分别为(775.90 ± 61.66) nm (S组)与(50.07 ± 1.29) μm (B组),S组PS-NPs表面

较为光滑,B组PS-NPs颗粒表面粗糙程度较高(图1)。2种粒径的供试材料都分布均匀,且形貌规则、无杂质,纯度较高,故视为纯品。实验前将2种微粒进行超声处理(33 kHz,1 h),使其均匀分散在超纯水中。

供试菘蓝(*Isatis indigotica*)种子购自安国市万草同源苗木花卉有限公司,挑选大小均一,颗粒饱满的种子用体积分数为10%的次氯酸钠溶液浸泡10 min后冲洗3~5次,再置于超纯水中浸泡30 min,用滤纸吸干表面水份后均匀放置在土样中,种子埋深约为2 cm,用霍格兰营养液保持土壤含水量60%左右,模拟室温条件(26 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,发芽期间避光培养,发芽后的生长阶段采用光谱植物生长灯对植物进行光照(12 h:12 h;辐射量(30 ± 5) $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$)。

1.2 供试土壤

土壤采集于上海市松江区农田的表层土(采样深度约为20~25 cm),除去可见植物残渣后过2 mm筛,采用常规方法^[15]测定土壤理化性质,结果如表1所示。

1.3 实验设计

针对2种粒径的PS-NPs分别设置4个浓度的污染土壤(10、100、500和 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)(标号为B10、B100、B500、B1000;S10、S100、S500、S1000),以不添加PS-NPs的土壤为对照(CK)。将处理后的菘蓝种子播种在配制好PS-NPs土样里,对照实验中将种子固定在不含PS-NPs的土壤中,每组重复3次。

1.3.1 种子发芽实验

发芽试验每盆设置300 g土,每盆播种种子50粒,当胚芽均超过2 mm时视为发芽,连续3 d没有新芽时视为发芽结束。实验结束后计算种子发芽率。

1.3.2 植株表型实验

菘蓝种子发芽后继续培养,共暴露70 d,培养结束后将植株从土壤中小心取出,用自来水冲洗后再

用去离子水冲洗 3 次,滤纸擦干后摆放整齐进行拍照,用 image J 软件测量不同处理下菰蓝的株高,称量鲜质量,再将新鲜植株置于 65 ℃ 烘箱 24 h 后取出,称量质量得到干质量数据。计算各处理下的幼苗含水率和抑制率。

$$\text{含水率}=\frac{\text{鲜质量}-\text{干质量}}{\text{鲜质量}}\times 100\%$$

$$\text{抑制率}=\frac{\text{实验组测定值}-\text{空白组测定值}}{\text{空白组测定值}}\times 100\%$$

1.3.3 指标测定

生长试验每盆设置 500 g 土,待菰蓝种子长出四片真叶后再暴露 14 d 收样。取菰蓝叶片用去离子水再冲洗 3 次后用滤纸拭干表面水份,剩余叶片置于-80 ℃ 冰箱保存待测。

用电导仪测定外渗液的电解质含量,以表征胁迫对植物细胞膜的伤害。可溶性蛋白测定用考马

斯亮蓝 G-250 染色法^[16]、超氧阴离子含量测定参考高俊凤^[16]等的方法,丙二醛(MDA)含量测定用硫代巴比妥酸法^[17]。叶片抗氧化酶活性测定^[18]中,SOD 活性测定用氮蓝四唑法,POD 活性测定用愈创木酚分光光度法,CAT 活性测定用高锰酸钾滴定法。

分别取 PS-NPs 处理下的土壤(S100、S1000 和 B100、B1000)及不添加塑料微粒的空白组(CK)土壤,委托上海派森诺生物科技有限公司在 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行二代双端(Paired-end)测序,测序引物为 F: ACTCCTACGGGAGGCAGCA;R: TCGGACTACHVGGGTWTCTAAT,测序区域为 16S_V3V4,选用 Silva_132 数据库,原始数据以 FASTQ 格式保存,进行 DADA2 序列去噪和 Vsearch 聚类,获得 OTU 代表序列后对其长度分布进行统计,再进行物种分类学注释。

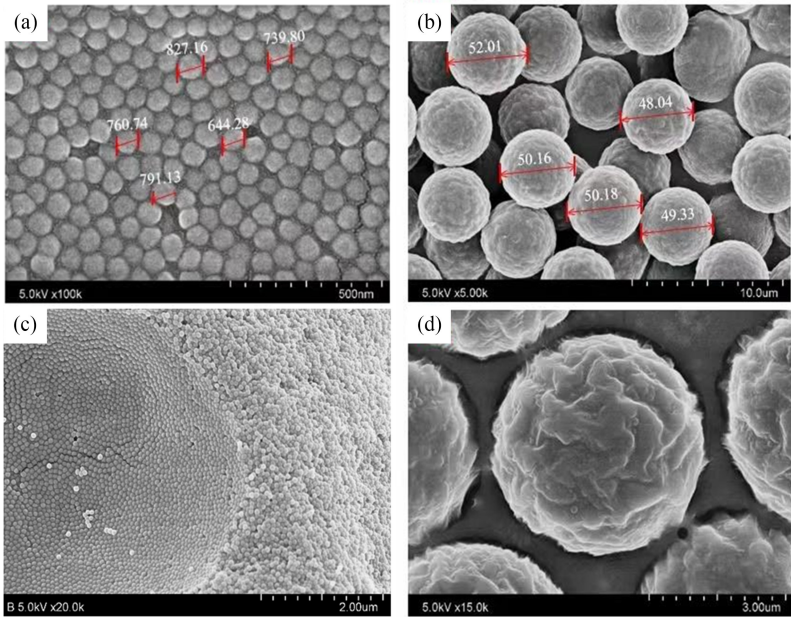


图 1 2 种聚苯乙烯微塑料(PS-NPs)扫描电子显微镜(SEM)表征图

注:(a) S 组 PS-NPs(放大×100 k);(b) B 组 PS-NPs(放大×5.00 k);(c). S 组 PS-NPs(放大×20.00 k);(d) B 组 PS-NPs(放大×15.00 k)。

Fig. 1 Scanning electron microscope (SEM) characterization images of polystyrene microplastics (PS-NPs)

Note: (a) S group PS-NPs (×100 k); (b) B group PS-NPs (×5.00 k); (c) S group PS-NPs (×20.00 k); (d) B group PS-NPs (×15.00 k).

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of experimental soil

土壤 pH	含水率/%	速效磷/(g·kg ⁻¹)	速效钾/(g·kg ⁻¹)	硝态氮/(mg·kg ⁻¹)
Soil pH	Moisture content/%	Olsen-P/(g·kg ⁻¹)	Effective K/(g·kg ⁻¹)	Nitrate/(mg·kg ⁻¹)
8.13±0.004	5.56±0.502	0.55±0.012	70.05±0.005	10.33±0.011

1.3.4 数据统计分析

所有试验数据均进行单因素方差分析,并用误差棒表示标准误差,用 Microsoft Excel 和 SPSS13.0 进行处理,用 Origin 2018 作图,图中所示数据均为 3 组平行实验的平均值。

2 结果 (Results)

2.1 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝种子发芽率和生长表型的影响

2.1.1 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝种子发芽率的影响

种子萌发是指种子从吸胀作用开始的一系列的生理过程,了解种子的萌发情况对播种后早出苗、出全苗极为重要。在为期 25 d 的发芽过程里,2 种 PS-NPs 添加下菘蓝种子的发芽率如图 2 所示。可见 PS-NPs 对菘蓝种子的发芽有显著促进作用,10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ B 组 PS-NPs 对发芽的促进作用最明显,其发芽率比 CK 高约 30.00%。1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 胁迫浓度下 S 组、B 组之间对发芽的促进无显著差异,约比 CK 高出 20.00%。

实验中菘蓝种子日发芽情况如图 3 所示,将发芽过程分为初(3~9 d)、中(11~19 d)、后(19~25 d)3 个时期。与 CK 相比,S 处理中发芽初期 1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的促进作用明显,中期 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的处理组发

芽数最多;B 处理组中发芽初期 PS-NPs 对发芽率影响不明显,中后期 10、100、1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理下种子的发芽数接近,均高于 CK 组。

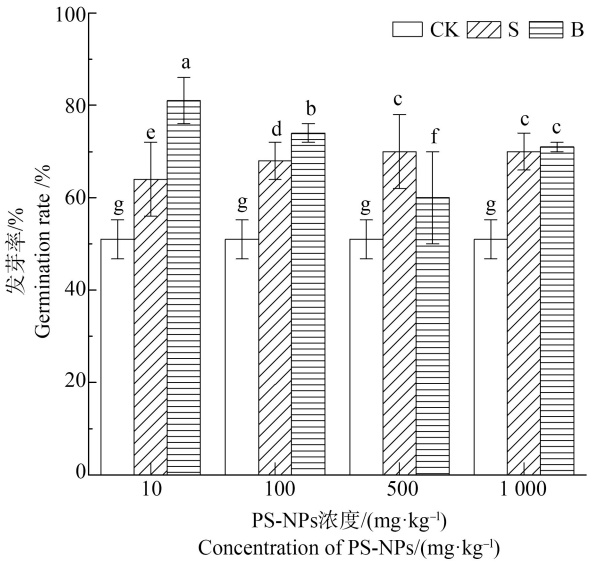


图 2 PS-NPs 对菘蓝种子发芽率的影响

注:字母不同表示差异显著, $P<0.05$ 。

Fig. 2 The germination rate of *Isatis indigotica* seeds treated with different particle sizes of PS-NPs

Note: Different letters indicate significant differences, $P<0.05$.

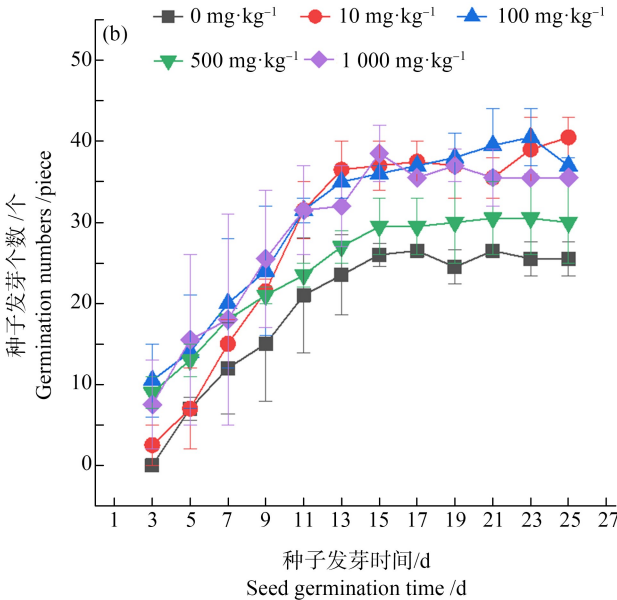
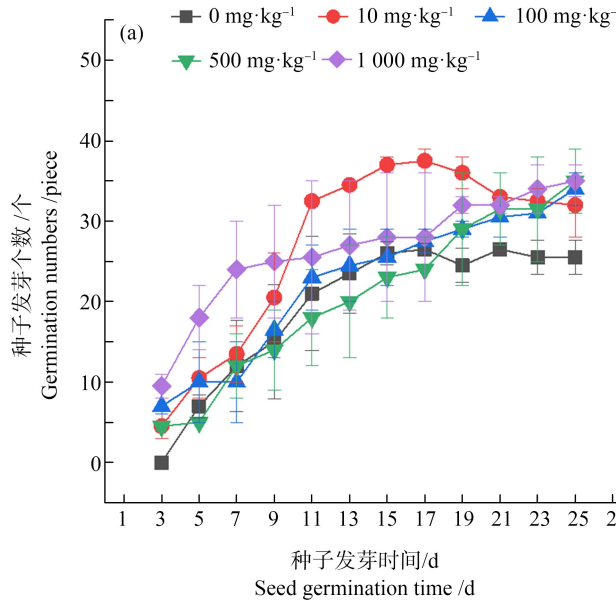


图 3 不同 PS-NPs 处理下菘蓝种子日发芽情况

注:(a)S 组 PS-NPs 处理下菘蓝的日发芽数;(b)B 组 PS-NPs 处理下菘蓝的日发芽数;字母不同表示差异显著, $P<0.05$ 。

Fig. 3 Daily germination of *Isatis indigotica* seeds treated with different PS-NPs

Note: (a) Daily germination numbers of *Isatis indigotica* with treat-S PS-NPs; (b) Daily germination numbers of *Isatis indigotica* with treat-B PS-NPs; different letters indicate significant differences, $P<0.05$.

2.1.2 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝植株株高、质量和含水率的影响

株高和鲜质量、干质量是植物学形态调查的基本要素。如表 2 所示,不同浓度 S 处理均促进了幼苗株高、鲜质量和干质量,随着胁迫浓度的升高,促进效果减弱;如表 3 所示,100、500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 的 B 处理抑制了幼苗株高,但 1 000 mg·kg⁻¹ 处理对鲜质量的促进率低于 500 mg·kg⁻¹;2 种 PS-NPs 对含水率都几乎无影响。

2.2 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝幼苗抗逆性的影响

2.2.1 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝叶片细胞膜伤害率的影响

由图 4 可知,处理组植株叶片细胞膜伤害率均显著高于 CK,且 S 处理对菘蓝叶片细胞膜的伤害率均大于 B 处理,10、100 和 500 mg·kg⁻¹ 的 S 组 PS-NPs 比 B 组对细胞膜的伤害率分别高出 11.48%、5.55% 和 5.24%,此外随着浓度的增加微塑料对细胞膜的伤害率逐步增加,当 PS-NPs 的浓度为 1 000 mg·kg⁻¹ 时,S 组、B 组对细胞膜的伤害率达到最大,分别为 76.97% 和 76.30%,约为 CK 的 2.53

倍和 2.51 倍。

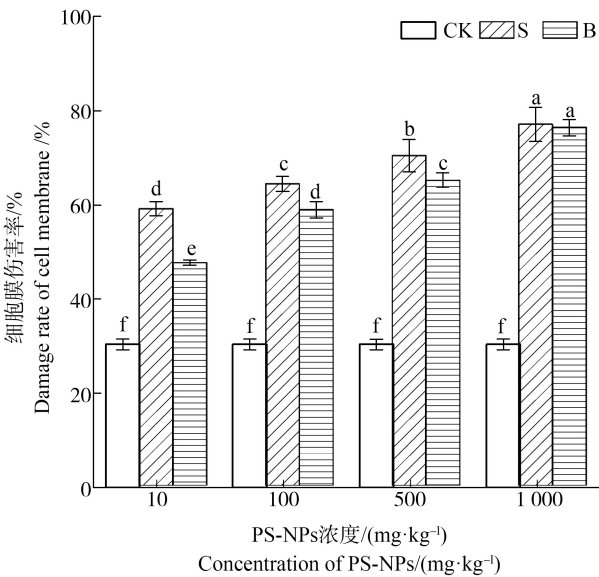


图 4 PS-NPs 对菘蓝叶片细胞膜伤害率的影响
注:字母不同表示差异显著, $P<0.05$ 。
Fig. 4 Effects of PS-NPs on cell membrane damage rate of *Isatis indigotica* leaves
Note: Different letters indicate significant differences, $P<0.05$.

表 2 S 组 PS-NPs 处理对菘蓝幼苗生物量的影响
Table 2 Effects of S group PS-NPs treatments on biomass of *Isatis indigotica* seedlings

PS-NPs 添加量/(mg·kg ⁻¹) Mass of PS-NPs /(mg·kg ⁻¹)	株高/cm Plant height/cm	促进率/% Promotion rate/%	鲜质量/g Fresh mass/g	促进率/% Promotion rate/%	干质量/g Dry mass/g	促进率/% Promotion rate/%
0	2.24±0.048	—	1.16±0.875	—	0.10±0.006	91.39
10	4.37±0.192	94.92	1.89±0.132	63.33	0.16±0.006	91.29
100	4.00±0.227	78.59	1.58±0.087	35.91	0.16±0.008	89.79
500	3.37±0.072	50.45	2.18±0.182	87.51	0.23±0.011	89.44
1 000	3.52±0.076	57.09	2.17±0.173	87.17	0.18±0.036	91.67

表 3 B 组 PS-NPs 处理对菘蓝幼苗生物量的影响
Table 3 Effects of B group PS-NPs treatments on biomass of *Isatis indigotica* seedlings

PS-NPs 添加量/(mg·kg ⁻¹) Mass of PS-NPs /(mg·kg ⁻¹)	株高/cm Plant height/cm	促进率/% Promotion rate/%	鲜质量/g Fresh mass/g	促进率/% Promotion rate/%	干质量/g Dry mass/g	促进率/% Promotion rate/%
0	2.24±0.048	—	1.16±0.875	—	0.10±0.006	91.38
10	4.21±0.151	23.88	2.89±0.335	149.27	0.19±0.055	93.40
100	2.35±0.051	-30.90	2.04±0.419	76.06	0.18±0.168	91.24
500	1.91±0.017	-43.91	1.87±0.372	60.72	0.17±0.030	90.73
1 000	2.12±0.203	-37.62	1.89±0.131	62.53	0.12±0.022	93.54

2.2.2 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝叶片可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白是重要的调节物质和营养物质,其积累可以提高细胞的保水能力,对细胞的生命物质及生物膜起到保护作用。如图5所示,10、100和500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 不同PS-NPs胁迫下的菘蓝叶片可溶性蛋白含量与CK无显著差异;PS-NPs浓度为1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时S处理可溶性蛋白含量为2.54 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,B处理为2.90 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,分别比CK高出29.81%和48.25%。

2.2.3 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝叶片丙二醛含量的影响

如图6所示,与CK相比PS-NPs胁迫下菘蓝叶片的MDA含量显著升高,并与胁迫浓度呈正相关,在0~500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度范围内S组显著高于B组,1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时S组、B组MDA含量无显著差异,并且可以看出B组植株在500~1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的胁迫浓度范围里MDA含量由0.22 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加至0.39 $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$,此阶段升高了76.16%,1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下MDA含量约是CK的7.05倍。

2.2.4 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝叶片抗氧化酶活性的影响

如图7所示,处理组菘蓝叶片中SOD、CAT、POD活性均高于CK。10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下S组、B组的SOD活性无显著性差异,CAT、POD活性S组显著高于B组;500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下B组SOD、POD活性分别约为S组的1.36倍、1.47倍和3.59倍、4.55倍。S组POD活性在试验期间上下波动,1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下达到最大,约为CK的3.57倍;B组CAT活性在500~1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 从136.13 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 跃增至289.08 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,增长了1.12倍。

2.3 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝根际土壤细菌群落结构的影响

2.3.1 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝根际土壤细菌群落多样性指数的影响

如表4所示,对PS-NPs处理后的植物根系土壤微生物群落多样性进行分析,Shannon指数、Simpson指数反映样品中微生物多样性,Chao 1指数反映样品群落丰富度,Pielou指数反映样品物种均匀度。处理组的Shannon指数均高于CK,说明PS-NPs的添加可以增加样品微生物群落的多样性。胁迫浓度为1 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,B组样品微生物群落

Shannon指数、Pielou指数和Chao 1指数分别高出S组7.52%、3.42%和73.06%,而胁迫浓度为100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时S组分别高出B组17.94%(Shannon指数)、0.11%(Pielou指数)和67.89%(Chao1指数)。

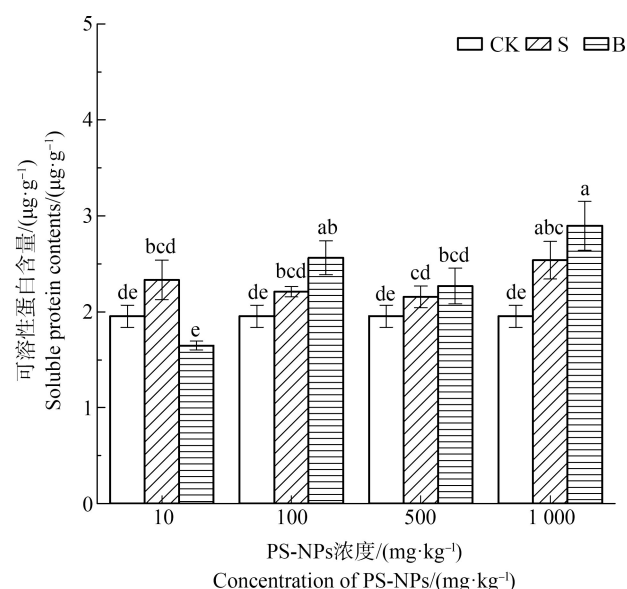


图5 PS-NPs对菘蓝叶片可溶性蛋白含量的影响

注:字母不同表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Fig. 5 Effects of PS-NPs on soluble protein content of *Isatis indigotica* leaves

Note: Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

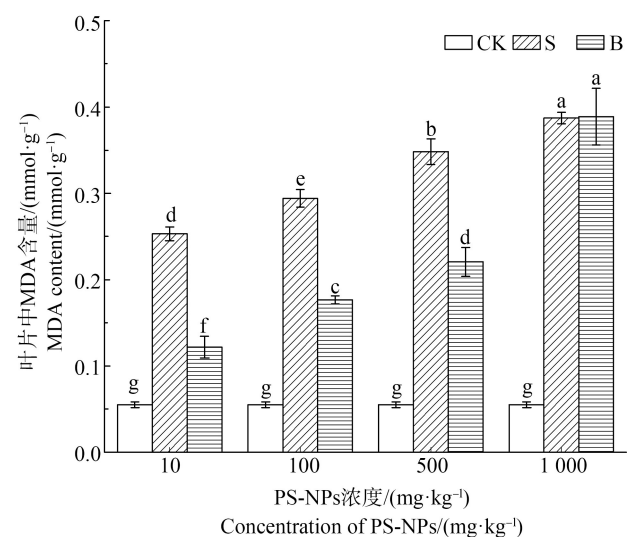


图6 PS-NPs对菘蓝叶片的丙二醛(MDA)含量的影响

注:字母不同表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Effects of PS-NPs on malondialdehyde (MDA) content of *Isatis indigotica* leaves

Note: Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

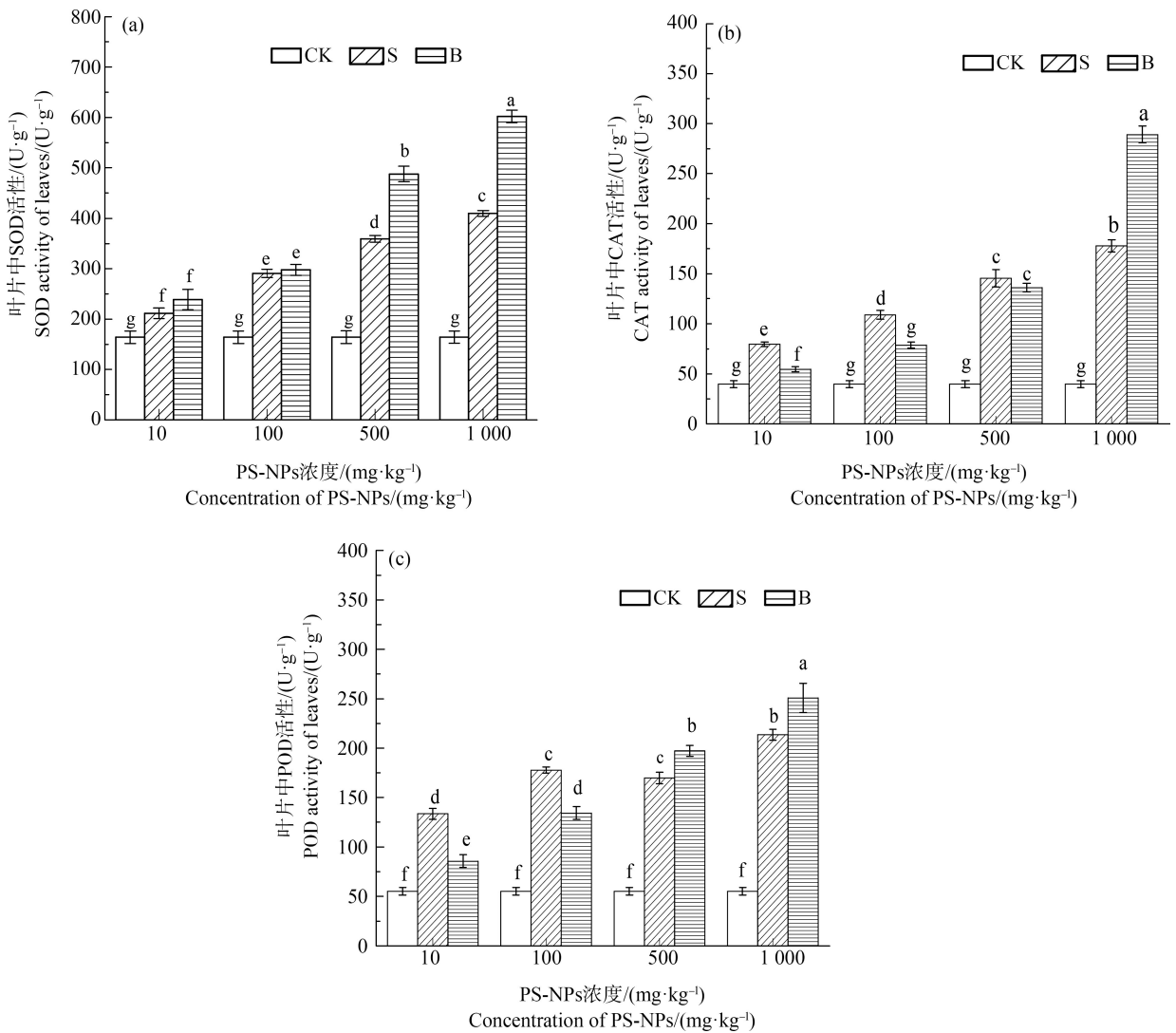


图 7 PS-NPs 对菘蓝叶片抗氧化酶活性的影响

注:字母不同表示差异显著, $P<0.05$ 。

Fig. 7 Effects of PS-NPs on antioxidant enzymes activity of *Isatis indigotica* leaves

Note: Different letters indicate significant differences, $P<0.05$.

表 4 样品生物多样性指数
Table 4 Sample biodiversity index

多样性指数 Diversity index	CK	S1000	S100	B1000	B100
香农指数 Shannon index	10.46	10.88	10.97	11.70	10.77
辛普森指数 Simpson index	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Pielou 均匀度指数 Pielou-e	0.88	0.91	0.89	0.91	0.89
Chao 1 指数 Chao 1 index	4 168.85	4 464.72	4 903.75	7 726.47	4 592.02
测序深度指数 Goods coverage	0.98	0.99	0.99	0.96	0.98

如图 8 所示,CK 组样品中有 2 949 个 OTUs,S 组样品中有 5 950 个 OTUs,B 组样品中有 8 341 个 OTUs。3 个样品共有 OTUs 数为 1 476 个,分别占各自 OTUs 总数的 50.05% (CK)、24.81% (S 组) 和

17.70% (B 组),可见 B 组 OTUs 数目较多且有更多特有的 OTUs。由图 9 可知,处理组样品中的物种丰富度高于 CK,3 个样品稀释曲线随序列数的增加均趋于平缓,表明测序数据量合理,测序结果真实可信。

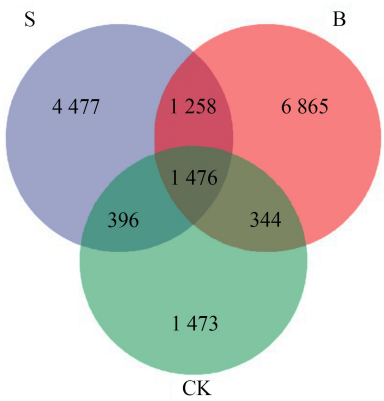


图 8 样品中 OTUs 分布 Venn 图

Fig. 8 Venn diagram on OTUs distribution in sample

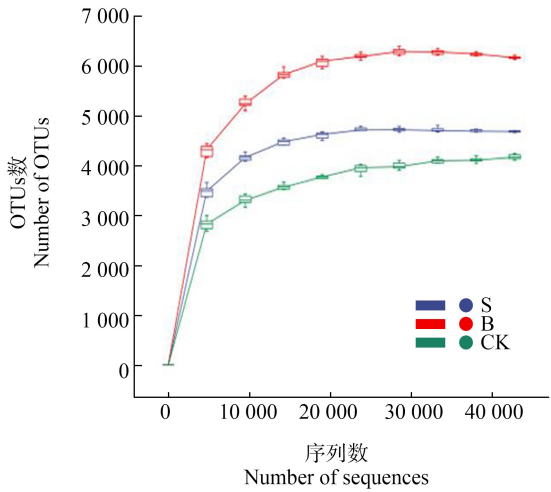


图 9 样品中 OTUs 的稀释曲线

Fig. 9 Rarefaction curve of OTUs in sample

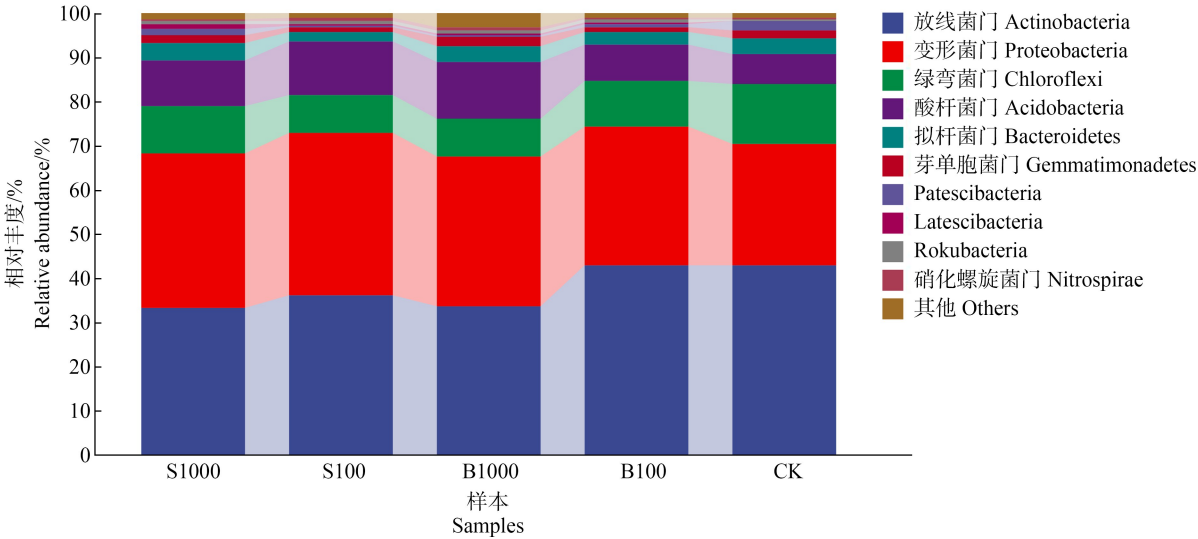


图 10 根际土壤微生物门水平物种相对丰度

Fig. 10 Relative abundance of horizontal species of rhizosphere soil bacterial flora

2.3.2 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝根际土壤细菌群落组成的影响

如图 10 所示,根据物种注释结果,不同微塑料添加下供试土样门水平上相对丰度大于 1% 的有 8 个,分别为放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、酸杆菌门(Acidobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、Patescibacteria 和 Latescibacteria。CK 组中放线菌门、变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门相对丰度分别为 42.78%、27.69%、13.64%、6.73%;与 CK 相比,S100、S1000、B1000 处理中放线菌门丰度分别降低了 15.30%、21.87%、21.21%;处理组变形菌门丰度均高于 CK,分别提高了 31.80%(S100)、25.73%(S1000)、12.64%(B100)、21.68%(B1000)。

3 讨论 (Discussion)

3.1 不同浓度聚苯乙烯对菘蓝种子发芽率和生长表型的影响

当 PS-NPs 添加量较高时激发了种皮对种子的保护机制,在胚胎与周围环境之间形成了屏障,故 1 000 mg·kg⁻¹下 S 组与 B 组对发芽率的促进作用无显著差异。

处理组植物的形态学指标比 CK 均有增加,也有研究表明 PS-NPs 并不会对小麦的根系生长产生抑制^[19],徐荣乐和海热提^[20]在塑料地膜对小麦种子萌发影响的研究中发现,相同浓度下厚度为 0.03 mm 的地膜对小麦芽长的影响大于 0.08 mm 地膜,这也和本实验研究结果一致。

3.2 不同浓度聚苯乙烯对菰蓝叶片细胞膜伤害率的影响

本研究中 PS-NPs 对菰蓝叶片细胞膜的伤害率均显著高于 CK, 有研究表明 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PS-NPs 会显著增加小麦叶片中的电解质外渗率^[19]。有研究表明较小粒径的微塑料更容易对细胞膜产生伤害, 100 nm 和 300 nm PS-NPs 微球中的大分子键在植物茎中发生了断裂^[21], 小粒径 PS-NPs 运输至叶片时已经是小分子键, 内聚力降低, 对叶片细胞膜的伤害程度加深^[21]。当胁迫浓度为 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 过多的 PS-NPs 已经对叶片表皮、叶肉和叶脉的正常生理过程均产生了影响, 此时不同粒径下 PS-NPs 对叶片细胞膜伤害率无显著差异。

3.3 不同浓度聚苯乙烯对菰蓝叶片抗氧化能力的影响

可溶性蛋白是细胞渗透调节物质, 本研究中由于过氧化物酶起到的保护作用过强, 导致处理组可溶性蛋白含量虽几乎均略高于 CK, 但无显著性差异。

植物体内 MDA 含量的变化可以反映逆境条件下植物细胞膜脱脂化程度和超氧自由基对组织损伤的严重程度^[23]。本研究中处理组 MDA 含量显著高于 CK, 有研究表明水华微囊藻与蛋白核小球藻细胞内 MDA 含量在 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米聚氯乙烯、纳米聚丙烯胁迫下显著升高^[24]。此外较小粒径的 PS-NPs 会穿透根系进入植物^[25], 并在蒸腾作用下通过导管吸收, 随营养物质一起进入可利用部位(根、叶)^[26]。同时本实验中小粒径 PS-NPs 表面比大粒径更为光滑, 因此可以更容易地进入植物中引起较严重的脂质过氧化。当 PS-NPs 浓度为 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, S 组、B 组的 MDA 含量无显著差异, 表明此时微塑料粒径不再是影响 MDA 含量的主要因素。相比之下, 菰蓝叶片 MDA 含量对 PS-NPs 的敏感性高于可溶性蛋白。

3.4 不同浓度聚苯乙烯对菰蓝叶片抗氧化酶的影响

外在胁迫使植物产生更多的活性氧自由基(ROS), SOD、CAT 和 POD 都是植物体内清除活性氧自由基的保护酶, SOD 作为清除 ROS 的第一道防线可催化超氧化物自由基将其歧化为 H_2O_2 和 O_2 , 随后 CAT 和 POD 将 H_2O_2 歧化为 H_2O 和 O_2 ^[27-28], 这也可以解释本实验中 SOD 活性均相应地高于相同处理下的 CAT 和 POD 活性。

胁迫浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, S 组

与 B 组 SOD 活性无显著差异, 当胁迫浓度为 $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 大粒径的 PS-NPs 增强了 SOD 编码基因的表达^[29], 故 B 组 SOD 活性高于 S 组。Jiang 等^[30]的研究表明蚕豆在聚苯乙烯微塑料的胁迫下其 SOD 活性增加, 并且通过遗传学证明 100 nm 的 PS-NPs 比 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的 PS-NPs 对蚕豆有更强的氧化损伤, 这和本次实验结果一致。

处理组 CAT 活性均显著高于 CK, 有研究表明在塑料微珠对铜绿微囊藻胁迫的 $1\sim 9\text{ d}$ 内, 藻细胞 CAT 活性显著增高^[31]。 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度下 S 组 CAT、POD 活性均大于 B 组, $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度下 S 组 CAT、POD 活性小于 B 组, 这与高浓度胁迫下 SOD 歧化产生的 H_2O_2 更多有关。此外 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 下 S 组与 B 组 POD 的活性差值小于 CAT 的活性差值, 因为 POD 是 ROS 清除同工酶, 会通过多种不同的调节机制应对环境压力, 其生物体耐受阈值低于 CAT^[32]。

Li 等^[21]研究了 100 、 300 、 500 和 700 nm 的 PS-NPs 微粒对黄瓜幼苗的抗氧化酶系统影响, 结果表明 SOD 和 CAT 的相关基因表达量与颗粒大小呈显著负相关, 这与本实验结果相反, 这由于本实验中聚苯乙烯微粒粒径较之更大, 材料表面形貌、胁迫浓度均不相同等因素导致。

3.5 不同浓度聚苯乙烯对菰蓝根际土壤微生物群落结构的影响

Zhang 等^[26]在对新疆棉田微生物群落多样性和组成的研究中发现微塑料存在的土壤中放线菌门和变形菌门丰度最高, 这与本实验得到的结果一致。添加 PS-NPs 的土壤与 CK 优势菌门相同, 但丰富度有所变化。与 CK 相比, 添加 PS-NPs 后土壤中变形菌门、酸杆菌门丰度升高。变形菌门通常生活在较松弛的土壤中, PS-NPs 本身具有一定的柔韧性, 有利于其与土壤结合, 因此影响了土壤容重。此外碳作为 PS-NPs 的主要成分, 其添加也会影响土壤中碳的形态与含量, 使变形菌门丰度变高^[33]。有研究表明添加聚乙烯微塑料会影响土壤酸碱性, 即微塑料的长期存在会使土壤酸化^[34], 而酸杆菌门的丰度与 pH 呈负相关, 故本研究中 PS-NPs 添加组土壤酸杆菌门丰度高于 CK。

与 CK 相比 PS-NPs 添加使土壤的绿弯菌门丰度降低, 研究表明, 微塑料会影响土壤含水率和铵态氮含量, 而绿弯菌门丰度受此二者影响, 故微塑料的添加不利于绿弯菌门生长^[35]。

与CK相比 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PS-NPs 降低了拟杆菌门的丰度, $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PS-NPs 则增加了其相对丰度,芽单胞菌门有相同的变化特征。因为较高浓度的微塑料提高了土壤中荧光素二乙酸水解酶(FDAse)和酚氧化酶的活性^[36],植物的愈伤反应会使呼吸作用增强并释放酚类物质,酚类物质可被酚氧化酶氧化为具有提高微生物的自我保护能力的醌类物质^[12, 37]。

有研究表明微塑料可以通过直接吸附影响土壤酶活性,从而改变土壤的物理性质和微环境^[36]。在本研究中S组材料粒径更小更容易团聚,团聚体的结合力更大;B组材料排列整齐紧密且表面凹凸不平。此外二者在土壤中不同的降解性能会进一步影响微生物群落结构,但具体的降解性能、降解产物还有待进一步探究。结果显示 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度下S组群落多样性大于B组,由图1可知S组材料的结构比表面积更大,为微生物提供了更多的栖息位点;但当胁迫浓度为 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时B组群落多样性大于S组,因为高浓度刺激了某些微塑料的微生物降解过程,目前大量研究表明在陆地环境中放线菌门的某些种可以通过合成水解酶来生物降解微塑料。

综上,在2种粒径PS-NPs对菘蓝的胁迫研究中,胁迫浓度 $>10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时B组会抑制幼苗株高,不同浓度下S组、B组对鲜质量均有促进作用;随着胁迫浓度的增加不同粒径的PS-NPs对叶片细胞膜的伤害程度趋于一致;不同处理下SOD活性均高于CAT、POD活性,3种酶的活性都与胁迫浓度呈正相关, $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 下粒径对其影响更为显著。添加PS-NPs的土壤与CK优势菌门相同但丰度不同,处理组变形菌门、酸杆菌门丰度升高,而绿弯菌门丰度降低,微生物群落丰度与材料表型有关。但聚苯乙烯微塑料在环境中由于降解形成的单体,以及塑料添加剂给植物与土壤带来的影响还有待进一步研究。

通信作者简介:赵晓祥(1960—),男,博士,研究员,主要研究方向为环境生物学。

参考文献(References):

- [1] Zhou Q, Zhang H B, Fu C C, et al. The distribution and morphology of microplastics in coastal soils adjacent to the Bohai Sea and the Yellow Sea [J]. *Geoderma*, 2018, 322: 201-208
- [2] Boyle K, Örmeci B. Microplastics and nanoplastics in the freshwater and terrestrial environment: A review [J]. *Water*, 2020, 12(9): 26-33
- [3] 骆永明, 施华宏, 涂晨, 等. 环境中微塑料研究进展与展望[J]. *科学通报*, 2021, 66(13): 1547-1562
Luo Y M, Shi H H, Tu C, et al. Research progresses and prospects of microplastics in the environment [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(13): 1547-1562 (in Chinese)
- [4] Rillig M C, Ingraffia R, de Souza Machado A A. Microplastic incorporation into soil in agroecosystems [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1805
- [5] Zhang J J, Chen Y H, Wang X X, et al. A review of microplastics in the soil environment [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(6): 937-952
- [6] Yang L, Zhang Y L, Kang S C, et al. Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 780: 146-154
- [7] 杨杰, 李连祯, 周倩, 等. 土壤环境中微塑料污染: 来源、过程及风险[J]. *土壤学报*, 2021, 58(2): 281-298
Yang J, Li L Z, Zhou Q, et al. Microplastics contamination of soil environment: Sources, processes and risks [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021, 58(2): 281-298 (in Chinese)
- [8] Yu Y J, Chen H B, Dang Y, et al. Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 726: 138679
- [9] Ng E L, Lwanga E H, Eldridge S M, et al. An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 627: 1377-1388
- [10] Yang W W, Ceng P, Adams C, et al. Effects of microplastics on plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities in a soil spiked with ZnO nanoparticles [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 155: 108179
- [11] Ziajahromi S, Kumar A, Neale P, et al. Effects of polyethylene microplastics on the acute toxicity of a synthetic pyrethroid to midge larvae (*Chironomus tepperi*) in synthetic and river water [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 971-975
- [12] de Souza Machado A A, Lau C W, Kloas W, et al. Microplastics can change soil properties and affect plant performance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(10): 6044-6052
- [13] Mbachu O, Jenkins G, Kaparaju P, et al. The rise of artificial soil carbon inputs: Reviewing microplastic pollution effects in the soil environment [J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 780: 146569

- [14] Lozano Y M, Lehnert T, Linck L T, et al. Microplastic shape, polymer type, and concentration affect soil properties and plant biomass [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 616645
- [15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 23-106
- [16] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 21-22
- [17] 梁晓华, 施娅云, 张燕. 干旱胁迫对三种蕨类植物生理生化的影响[J]. *楚雄师范学院学报*, 2020, 35(6): 55-61
Liang X H, Shi Y Y, Zhang Y. Effects of drought stress on physiological and biochemical changes of several pteridophytes [J]. *Journal of Chuxiong Normal University*, 2020, 35(6): 55-61 (in Chinese)
- [18] 张蜀秋. 植物生理学实验技术教程[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 211-217
- [19] 连加攀. 聚苯乙烯纳米塑料(PSNPs)对小麦单一及镉联合毒性研究[D]. 天津: 南开大学, 2020: 29-34
Lian J P. Single and combined toxicity of polystyrene nanoparticles (PSNPs) and cadmium to wheat (*Triticum aestivum* L.) [D]. Tianjin: Nankai University, 2020: 29-34 (in Chinese)
- [20] 徐荣乐, 海热提. 塑料地膜对小麦种子萌发及幼苗抗氧化酶系统的影响[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(11): 2702-2707
Xu R L, Hai R T. Effects of plastic film on seed germination and the activities of antioxidant enzyme of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(11): 2702-2707 (in Chinese)
- [21] Li Z X, Li R, Li Q, et al. Physiological response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves to polystyrene nanoparticles pollution [J]. *Chemosphere*, 2020, 255: 127041
- [22] 项洪涛, 郑殿峰, 何宁, 等. 植物对低温胁迫的生理响应及外源脱落酸缓解胁迫效应的研究进展[J]. *草业学报*, 2021, 30(1): 208-219
Xiang H T, Zheng D F, He N, et al. Research progress on the physiological response of plants to low temperature and the amelioration effectiveness of exogenous ABA [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(1): 208-219 (in Chinese)
- [23] 张丽萍, 刘志强, 金竹萍, 等. H_2S 对镉胁迫下白菜幼苗根系渗透胁迫的调节作用[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(2): 247-252
Zhang L P, Liu Z Q, Jin Z P, et al. Regulation of H_2S on Cd-induced osmotic stress in roots of Chinese cabbage seedling [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(2): 247-252 (in Chinese)
- [24] 吴艳梅. 淡水微藻对水体微(纳米)塑料胁迫的响应研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2019: 26
Wu Y M. Study the response of freshwater microalgae to micro (nano) plastics in water stress [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2019: 26 (in Chinese)
- [25] 李连祯, 周倩, 尹娜, 等. 食用蔬菜能吸收和积累微塑料[J]. *科学通报*, 2019, 64(9): 928-934
Li L Z, Zhou Q, Yin N, et al. Uptake and accumulation of microplastics in an edible plant [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(9): 928-934 (in Chinese)
- [26] Zhang M J, Zhao Y, Qin X, et al. Microplastics from mulching film is a distinct habitat for bacteria in farmland soil [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 688: 470-478
- [27] 胡均如, 张敏. 热处理提高采后果蔬低温贮藏期间活性氧清除能力的机制[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(12): 269-276
Hu J R, Zhang M. Mechanism of heat treatment to improve the active oxygen scavenging ability of postharvest vegetables during low temperature storage [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(12): 269-276 (in Chinese)
- [28] Ziajahromi S, Kumar A, Neale P, et al. Effects of polyethylene microplastics on the acute toxicity of a synthetic pyrethroid to midge larvae (*Chironomus tepperi*) in synthetic and river water [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 971-975
- [29] Li Y, Zhang S S, Jiang W S, et al. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2013, 20(2): 1117-1123
- [30] Jiang X F, Chen H, Liao Y C, et al. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba* [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 250: 831-838
- [31] 王婷. 上海市河道水体微塑料分布特征及塑料微珠对铜绿微囊藻的毒理研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021: 45
Wang T. The distribution characteristics of microplastics in river water bodies of Shanghai and the toxicological study of plastic microbeads on *Microcystis aeruginosa* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021: 45 (in Chinese)
- [32] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405-410
- [33] 李汶璐, 王志超, 杨文焕, 等. 微塑料对沉积物细菌群落组成和多样性的影响[J]. *环境科学*, 2022, 43(5): 2606-2613
Li W L, Wang Z C, Yang W H, et al. Effects of micro-

- plastics on bacterial community composition and diversity in sediments [J]. *Environmental Science*, 2022, 43 (5): 2606-2613 (in Chinese)
- [34] 侯军华. 聚乙烯微塑料对土壤团聚体性质及微生物多样性影响研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2020: 42
- Hou J H. Effects of polyethylene microplastics on soil aggregate properties and microbial diversity [D]. Lanzhou: Lanzhou Jiatong University, 2020: 42 (in Chinese)
- [35] 张强. 高温堆肥降解污泥微塑料及微生物代谢耦合机制[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2021: 42
- Zhang Q. High-temperature composting degradation of sludge microplastics and microbial metabolism coupling mechanism [D]. Lanzhou: Lanzhou Jiatong University, 2021: 42 (in Chinese)
- [36] Carson H S, Nerheim M S, Carroll K A, et al. The plastic-associated microorganisms of the north Pacific gyre [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 75(1-2): 126-132
- [37] Liu H F, Yang X M, Liu G B, et al. Response of soil dissolved organic matter to microplastic addition in Chinese loess soil [J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 907-917 ◆