

邻氨基苯甲醚对土壤微生物多样性的影响

陈志坚, 潘鲁燕, 张慧, 张惠娟, 李加友* (嘉兴学院生物与化学工程学院, 浙江嘉兴 314001)

摘要 研究土壤中污染物含量与微生物多样性之间的关系, 评估污染物对土壤生态的影响, 实现土地资源的可持续发展。以邻氨基苯甲醚污染土壤为研究对象, 利用氯仿熏蒸法测定土壤中生物量(Bc), 并采用培养和形态分类法测定可培养土壤微生物种类, 建立邻氨基苯甲醚含量与土壤中微生物多样性关系的数学模型。研究表明, Bc与邻氨基苯甲醚含量呈现负相关, 并且它对不同种类微生物的影响不同, 其中对真菌有显著抑制作用, 而所检测土样中不能检测到可培养放线菌。因此, 通过考察土壤中微生物多样性的变化, 可以评估土壤受邻氨基苯甲醚影响的程度。

关键词 邻氨基苯甲醚; 微生物多样性; 可持续发展; 土壤污染

中图分类号 S154.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)05-02058-03

Effects of 2-Methoxy-Benzenamine on Diversity of Microorganisms in Soil

CHEN Zhi-jian et al (Biological and Chemical Engineering Institute of Jiaying University, Jiaying, Zhejiang 314001)

Abstract The relationship between concentration of pollutant and diversity of microorganisms was investigated to estimate the ecological impact of pollutant and to promote the sustainable development of soil. The soil samples were polluted with 2-Methoxy-Benzenamine. The soil microbial biomass carbon (Bc) was detected with chloroform fumigation and the cultivable microorganisms were identified with morphology methods. The mathematic model about the relationship between the pollutant, 2-Methoxy-Benzenamine, and the diversity of microorganism was established. The results showed that the Bc and 2-Methoxy-Benzenamine content was negatively related to the present, and various microorganisms were affected by the pollutant differently. The fungi was inhabited remarkably and the actinomycete was not detected in the culture. Based on the above study, we could estimate the influence of pollutant on the soil with the change of microbiologic diversity.

Key words 2-Methoxy-Benzenamine; Diversity of microorganism; Sustainable development; Soil pollution

随着工业化进程的加快、工业污染的加剧以及农用化学物质种类、数量的增加, 大量的芳香族有机化合物进入生态环境。由于芳香族化合物具有“致畸、致癌、致死”三致性、生物累积性和化学稳定性, 它可以长期影响植物生态和水环境, 进而威胁人类食品、饮水安全。因此, 由有机污染物引起的环境问题成为一个棘手的世界性难题^[1-3]。土壤微生物在土壤生态系统中具有重要的功能。它是土壤质量的重要估计指标, 是推动土壤物质循环的动力, 因此有机污染物对土壤微生物多样性的研究受到广泛的关注。彭静静等^[4]利用直接从污染土壤中提取微生物 DNA 进行聚合酶链式反应(PCR)扩增和片段多态性分子(T-RFLP)分析, 发现多环芳烃(PHAs)浓度高的土壤中微生物群落多样性明显低于PHAs浓度低的土壤。王菲等^[5]借助室内模拟的方法, 发现土壤微生物多样性与土壤中 PHAs 浓度呈现负相关关系。邻氨基苯甲醚是一种重要的染料和某些医药的中间体, 常用于偶氮染料、冰染染料、色酚 ASOL 愈创木酚(Guaigcol)、安痢平(Phanquinone)香兰素等产品的生产^[6-7]。邻氨基苯甲醚是一种芳香族化合物。在工业生产过程中, 它可以通过水体、大气等进入土壤, 进而随着食物链进入植物, 最终进入人体, 影响人类生命健康。因此, 研究邻氨基苯甲醚对土壤微生物多样性的影响, 对生态环境保护、治理以及人类生命安全具有十分重要的意义。

1 材料与方法

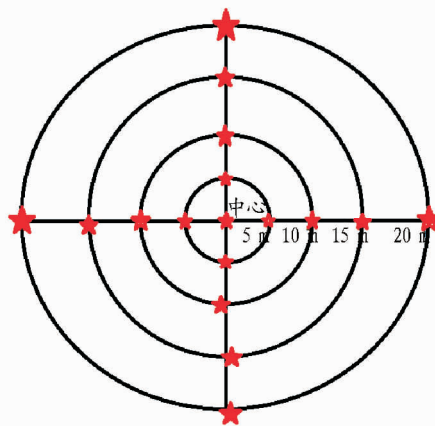
1.1 研究区概况

试验样地选在浙江省嘉兴市某化工厂

基金项目 江苏省自主创新项目 CX(12)1002; 生物工程专业教学团队项目。
作者简介 陈志坚(1991-), 男, 浙江金华人, 本科生, 专业: 环境生态学。*通讯作者, 副教授, 博士, 从事木质纤维生物降解及其利用方面的研究, E-mail: lijiaoyou@mail.zjxu.edu.cn。
收稿日期 2013-01-15

(30°17'N, 120°22'E)。该区域地势平坦, 土壤以黄斑田、半青紫泥田为主。平均海拔为 3.7 m, 年平均气温为 15.9 °C, 降水量为 1 185.2 mm, 相对湿度为 81%, 日照时数为 1 954.2 h, 各季节分配均匀, 年蒸发量为 1 271.5 mm。

1.2 样品采集 在嘉兴市某化工厂旧址上按照离中心污染源距离的不同呈现辐射状采样, 各样点分布见图 1。除去 1 cm 的表层土以及植物根系(采样深度 10~15 cm), 取土 200 g, 将土样用样品袋装好, 标号, 记录采样时间、地点、天气状况和植物根系等情况。



注: ★为采样点。

图 1 采样示意

1.3 试验方法 土壤 pH 的测定用精密 pH 计; 土壤中邻氨基苯甲醚含量的测定采用 RP-HPLC 法^[8]; 土壤生物量 C (Bc) 的测定采用氯仿熏蒸-K₂SO₄ 提取法^[9-10]。细菌分离采用加制霉菌素的牛肉膏蛋白胨培养基; 放线菌分离采用加有重铬酸钾的高氏 I 号培养基; 采用孟加拉红培养基^[11]。采用镜检法, 鉴定真菌所属的属和种^[12]。采用牛奶、马铃薯、

淀粉琼胶培养基培养,结合镜检与菌落形态观察,鉴定放线菌所属的属和种^[13]。

1.4 数据处理 数据采用 Excel 2007 和 Origin 软件整理,结合土壤理化性质,对比分析微生物菌落形成单位数(CFU)、土壤生物量碳与邻氨基苯甲醚含量之间的关系。

2 结果与分析

2.1 邻氨基苯甲醚工作曲线 利用 RP-HPLC 法测定各浓度(0.001、 5×10^{-4} 、 2.5×10^{-5} 、 1.25×10^{-5} 、 6.25×10^{-6} 、 3.125×10^{-6} 、 1.5625×10^{-6} 、 7.8×10^{-8} mol/L)邻氨基苯甲醚标准液的峰面积,然后利用 Excel-2007 软件处理所获得的数据,得到邻氨基苯甲醚含量和峰面积相关性的工作曲线(图2),回归方程为 $y = 5.4E7x + 1026.5$,回归系数为 0.9988。该工作曲线的可信程度较高。

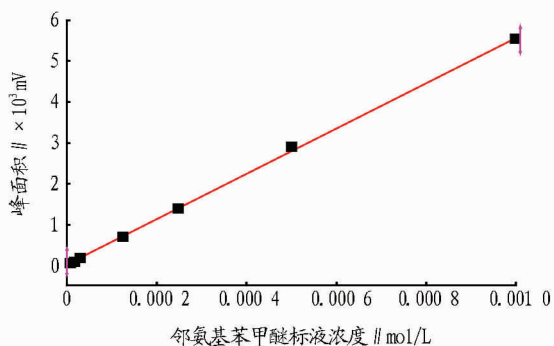


图2 邻氨基苯甲醚工作曲线

2.2 Bc 及邻氨基苯甲醚含量 由图3可知,所有土样 pH 均大于 7.0,且从中心点(1号)往外(5号)土样 pH 逐渐减小。由于邻氨基苯甲醚为碱性,pH 的变化表现出与土壤样品中邻氨基苯甲醚污染的相关性,pH 的变化可以看作土壤中邻氨基苯甲醚分布的规律。由此可知,土样中邻氨基苯甲醚含量呈现梯度降低的趋势,离中心点越远,邻氨基苯甲醚含量越少。该结果与土壤 pH 测定结果不一致,表明土壤 pH 的变化与邻氨基苯甲醚含量有直接关系。

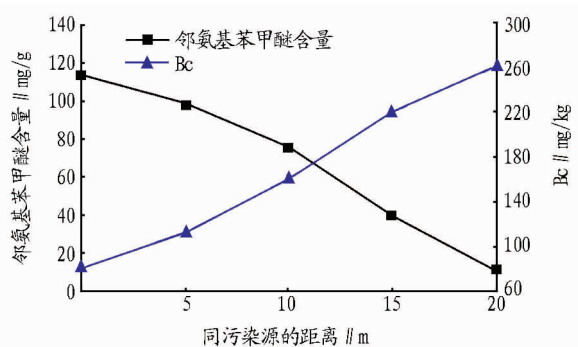


图3 Bc 及邻氨基苯甲醚含量

Bc 可反映微生物在土壤中的实际含量和作用,具有灵敏、准确的优点,现已成为近年来国内外土壤学研究的热点之一^[14]。Bc 的大小直接代表土壤中微生物数量的多少。Bc 值越大,说明其中的微生物数量和种类相对较多。研究表明,土样 Bc 随着距污染中心距离的增加而增加,说明 Bc 与邻氨基苯甲醚含量呈反相关性,邻氨基苯甲醚可能会对土壤

微生物的多样性产生负面影响。

2.3 土样微生物多样性 土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,是土壤质量评估的一项重要指标,也是土壤内在物质循环的主要驱动力,其代谢产物更是植物的营养物质^[15]。环境有毒污染物的存在对土壤微生物有一定的选择性和生存胁迫作用^[16-18]。因此,通过考察邻氨基苯甲醚污染土样中微生物的多样性来研究它对生态系统的影响。

表1 土样浸提液稀释 1 000 倍后各土样微生物菌落形成单位数

编号	细菌	真菌
1	58	24
2	49	36
3	60	46
4	59	58
5	52	71

表2 真菌鉴定结果

编号	属数	种类	属
1	8	8	梨孢帚霉属、黑葱花霉属、曲霉属、轮枝霉属、单梗曲霉属、红曲霉属、团丝核菌属、多枝瘤座霉属
2	9	11	镰孢霉属、曲霉属、亚笔束梗霉属、黑葱花霉属、链孢霉属、青霉属、聚端孢霉属、小卵孢霉属、筒梗孢霉属
3	7	12	曲霉属、串珠霉属、喙孢霉属、黑葱花霉属、丝核菌属、单梗曲霉属、链孢霉属、
4	11	15	束梗霉属、瘤座霉属、拟内串生孢霉属、根菌索菌属、棒孢霉属、小卵孢霉属、链孢霉属、团丝核菌属、曲霉属、亚笔束梗霉属、聚端孢霉属
5	5	20	丝核菌属、枝梗茎点菌属、穗霉属、聚端孢霉属、青霉属

由表1可知,在培养微生物时发现,无论浸取液是否稀释均未有菌落形成,说明所研究土壤中不含可培养放线菌;细菌的 CFU 几乎不随着邻氨基苯甲醚含量的变化而发生变化;真菌的 CFU 则随着邻氨基苯甲醚含量的增加而逐渐减小。这说明邻氨基苯甲醚含量对不同种类的微生物具有不同的作用。初步研究表明,邻氨基苯甲醚对放线菌有杀灭作用,其最小致死浓度小于或等于 11.08 mg/g,具体数值还有待于进一步研究;它对真菌则有生存胁迫作用;它对细菌的作用还尚不清楚。

由表2可知,曲霉科真菌出现频率最高,其次是青霉属,酵母菌没有出现。酵母菌不存在的最主要原因是土样中邻氨基苯甲醚含量过高。青霉属菌也较多,可能是因为取土制取菌悬液的过程中由于操作失误,从空气中带入大量霉菌的孢子,而空气中绝大多数的是青霉属的孢子。至于曲霉科这么多,可能是由于长期受土壤中邻氨基苯甲醚的影响而发生抗性突变,导致其产生抗性。但是,这种抗性在不同的霉菌中存在差异。曲霉科菌的大量出现很可能是由于对邻氨基苯甲醚产生很强的耐受作用。

2.4 邻氨基苯甲醚浓度与生物多样性间的相关性分析 利用 Excel 软件对试验中的数据分析。由图4可知,细菌 CFU 与样品中邻氨基苯甲醚含量之间不存在数学关系,但是真菌 CFU、Bc 与样品中邻氨基苯甲醚含量分别可以用 $y = -0.4301x + 76.229$, $y = -1.7545x + 285.95$ 定量描述,且这

两者的回归系数均大于 0.98。该数学模型可以直观地反映样品中邻氨基苯甲醚含量对土壤微生物多样性影响的结果。

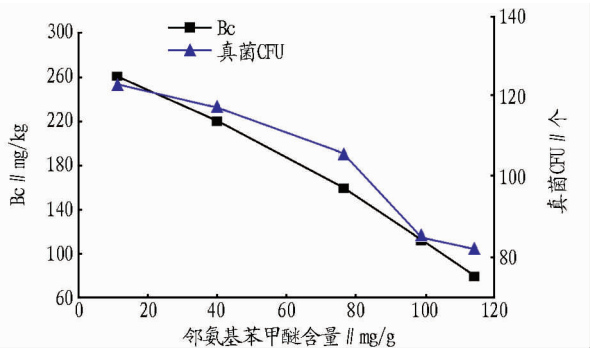


图4 邻氨基苯甲醚含量与生物多样性之间的关系

3 讨论

土壤生物量 C 是反映土壤有机质含量以及微生物数量的直接指标。试验土壤中生物量 C 随着邻氨基苯甲醚含量的增加而减小。这与周玲莉等^[19]研究结果一致。由于土壤中仅有 1% 左右的微生物在人工条件下培养,采用 Liu 等^[20-21]于 1997 年首次应用于微生物群落结构分析的 T-RPLF 法(综合 PCR 技术、DNA 限制酶切技术、DNA 自动序列检测)鉴定土壤中微生物的种类,进一步比较样品中邻氨基苯甲醚含量对土壤微生物的影响。样品的基因组 DNA 电泳检测结果表明,污染严重样品中 DNA 含量较少,进一步表明样品中生物总量较少。这与微生物培养试验和生物量 C 试验的结论相同。因此,土壤样品中微生物多样性受邻氨基苯甲醚含量的影响显著。长期的邻氨基苯甲醚污染对土壤中微生物群落产生一定的选择作用。

参考文献

[1] 林颖,蔡容华. 芳香族化合物生物降解的研究进展[J]. 福建轻纺,2006, 2(2):6-11.

[2] 时召俊,李兵,李昌文,等. 加氢还原法制备邻氨基苯甲醚的研究[J]. 广东化工,2010,37(8):116-129.

[3] 张甘霖,赵玉国,杨金玲,等. 城市土壤环境问题及其研究进展[J]. 土壤学报,2007,44(5):927-932.

[4] 彭静静,张又弛,侯艳伟,等. 炼油厂周边 PAHs 污染土壤中微生物群落结构多样性研究[J]. 生态环境学报,2011,20(5):962-965.

[5] 王菲,苏振成,杨辉,等. 土壤中多环芳烃的微生物降解及细菌种群多样性[J]. 应用生态学报,2009,20(12):3020-3026.

[6] 司航. 有机化工原料[M]. 3 版. 北京:化学工业出版社,1999:180-210.

[7] 曹晓群,张成金,王萍,等. 加氢还原法合成邻氨基苯甲醚的工艺研究[J]. 化工环保,2005,24(7):767-769.

[8] 龙梅,谢孟侠,刘媛. 应用 RP-HPLC 对芳香胺定量分析方法的研究[J]. 北京师范大学学报,2000,36(1):77-81.

[9] JOERGENSEN R G. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass:calibration of the kEc-value[J]. Soil Biol Biochem,1996, 1:25-31.

[10] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京:高等教育出版社,2010:60-85.

[11] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社,2007:15-20.

[12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:1-780.

[13] WAKSMAN S A. 放线菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1974:1-480.

[14] 彭佩钦,吴金水,黄道友,等. 洞庭湖区不同的利用方式对土壤微生物生物量碳氮磷的影响[J]. 生态学报,2006,26(7):2261-2267.

[15] 白清云. 土壤微生物群落结构的化学估价方法[J]. 农业环境保护,1997,16(6):252-256.

[16] 王辰,王翠苹,刘海彬,等. 微生物对芘和苯并[a]芘污染土壤的修复[J]. 环境科学与技术,2011,34(3):23-28.

[17] 荆瑞勇,王丽艳,王彦杰,等. 乙草胺对土壤微生物数量和酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报,2010,18(6):1302-1305.

[18] 呼秀智,薛占永,王绥华,等. 氟苯尼考对土壤微生物活动影响[J]. 山东畜牧兽医,2011,32(2):3-5.

[19] 周玲莉,姚斌,向仰州,等. 五氯酚胁迫对杨树生长及根际微生物群落的响应特征[J]. 林业科学,2010,46(10):62-68.

[20] LIU W T, MARSH T L, CHENG H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol,1997,11:4516-4522.

[21] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2007:75-82.

(上接第 2039 页)

[8] 吕贻忠,李保国. 土壤学[M]. 北京:中国农业出版社,2006.

[9] 肖国举,张强,王强. 全球气候变化对农业生态系统的影响研究进展[J]. 应用生态学报,2007,18(8):1877-1884.

[10] 黄昌勇. 土壤学[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[11] 张百平,张雪芹,郑度. 西北干旱区不宜作为我国耕地后备资源基地[J]. 干旱区研究,2010,27(1):1-5.

[12] 张本家,高岚. 辽宁土壤之土层厚度与抗蚀年限[J]. 水土保持研究,1997,4(4):57-59.

[13] 石岩,位东斌,于振文,等. 土层厚度对旱地小麦氮素分配利用及产量的影响[J]. 土壤学报,2001,38(1):128-130.

[14] DOMZAI H, HODARA J, TURSK R. The effects of agricultural use on the structure and physical properties of three soil types[J]. Soil and Tillage Research,1993,27:365-375.

[15] 邹连敏. 土地开发整理项目规划设计实用技术[M]. 北京:中国水利水电出版社,2011.

[16] 杨子生. 中国山区生态友好型土地整理模式初探[C]//刘彦随,杨子生,赵乔贵. 中国山区土地资源开发利用与人地协调发展研究. 北京:中国科学技术出版社,2010.

[17] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,1999:30-106.

[18] 石岩,位东斌,于振文,等. 土层厚度对旱地小麦氮素分配利用及产量的影响[J]. 土壤学报,2001,38(1):128-130.

[19] 朱波,祝福虹,高美荣,等. 土层厚度对紫色土坡地生产力的影响[J]. 山地学报,2009,27(6):735-739.

[20] 刘会平,严家平. 不同覆土厚度的煤矸石填充复垦区土壤生产力评价[J]. 能源环境保护,2010,24(1):52-55.

[21] 冯全洲,徐恒力. 土地复垦的覆土厚度及覆土基质确定[J]. 农业科学和技术,2009,10(4):183-188.