

菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 对酞酸酯污染沉积物的净化作用*

迟 杰, 郝雪龙

(天津大学环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘 要: 酞酸酯是一类典型的内分泌干扰物, 在我国城区河湖中污染超标相对严重, 且污染呈上升趋势. 本文采用根袋法, 模拟海河干流水体建立了室内菹草微宇宙, 同时设置无菹草微宇宙为对照, 研究了沉水植物菹草对沉积物中酞酸二丁酯 (DBP) 和酞酸二异辛酯 (DEHP) 的去除作用. 实验连续运行 27 d. 结果表明: 系统运行结束时, 菹草体内 DBP 和 DEHP 含量分别升高了 133% 和 68%; 水中, 有草组和对照组中 DBP 的浓度始终低于定量限 ($8 \mu\text{g/L}$), 而 DEHP 的浓度则由初始的 $65 \mu\text{g/L}$ 和 $70 \mu\text{g/L}$ 逐渐降低, 至第 3 d 后低于定量限 ($8 \mu\text{g/L}$); 对照组和有草组非根际沉积物中 DBP 浓度差异不显著, 结束时去除率为 32.2% ~ 36.5%, 根际沉积物中 DBP 去除率达 50.0%; 对照组和非根际沉积物中 DEHP 浓度差异也不显著, 始终在一定范围内波动, 结束时去除率为 10.3% ~ 11.4%, 根际沉积物中 DEHP 则在第 27 d 时迅速下降, 去除率达 80.9%. 微生物的结果进一步表明, 实验过程中根际土中微生物量明显高于对照组和非根际沉积物, 实验后期根际沉积物中微生物群落结构变化较大, 这与根际中这两种酞酸酯的去除数据相一致. 可见, 沉水植物菹草可以通过根际效应有效去除沉积物中酞酸酯类化合物.

关键词: 菹草; 酞酸酯; 净化; 根际沉积物

Purification of sediments contaminated with phthalate acid esters by *Potamogeton crispus* L.

CHI Jie & HAO Xuelong

(School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, P. R. China)

Abstract: Phthalic acid esters (PAEs) are a typical kind of endocrine disrupting compounds. The levels of PAEs in urban rivers and lakes have already exceeded the national standards and their pollution is getting more and more serious. Resorting to root bags, removal of dibutyl phthalate (DBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) was studied by an indoor *Potamogeton crispus* L. microcosm simulating the mainstream of Haihe River. An unplanted microcosm was set as a contrast. The experiments lasted for 27 d. Results indicated that the contents of DBP and DEHP in *Potamogeton crispus* L. increased by 133% and 68% at the end of the experiments. Concentrations of DBP in water were lower than the quantification limit ($8 \mu\text{g/L}$), while the contents of DEHP in water of planted and unplanted microcosms gradually decreased from the original values 65 and $70 \mu\text{g/L}$ to the quantification limit on the third day. Difference in the contents of DBP between non-rhizosphere sediments and sediments in the unplanted microcosm was not significant, and their removal efficiencies were 32.2% ~ 36.5% at the end of experiments, while it was 50.0% in the rhizosphere sediments. The difference in concentrations of DEHP between non-rhizosphere sediments and sediments in the unplanted microcosm was also insignificant and their removal efficiencies were 10.3% ~ 11.4% at the end of experiments. The contents of DEHP in rhizosphere sediments declined rapidly after 27th day and the removal efficiency was 80.9% at the end of experiments. Microbial results further revealed that the amount of microbial biomass in rhizosphere sediments were significantly higher than those in both non-rhizosphere sediments and sediments in unplanted microcosm. In the later experiment period, changes in microbial community structure in rhizosphere sediments were remarkable, which is consistent with the removal of the two PAEs in the rhizosphere. This suggests that submerged plants *Potamogeton crispus* L. can effectively remove the phthalate esters from sediments through the rhizosphere effect.

Keywords: *Potamogeton crispus* L.; phthalic acid esters; purification; rhizosphere sediment

* 2012-07-05 收稿; 2012-09-14 收修改稿. 迟杰, 女, 1964 年生, 博士, 教授; E-mail: cjiechi@yahoo.com.

邻苯二甲酸酯(Phthalic Acid Esters, 简称 PAEs), 别名酞酸酯, 在化学工业中被普遍用作塑料的增塑剂和软化剂. 研究表明, PAEs 具有致癌、致畸和致突变性, 在生物体内会产生多种扰乱动物内分泌的生化效应^[1]. 世界卫生组织已于 1995 年将 PAEs 列为必须控制的能扰乱人体内分泌功能的化学物质; 美国环保局和我国也将其列为优先控制污染物. 我国水体中 PAEs 污染相对严重, 大部分水体沉积物中酞酸二丁酯(DBP)和酞酸二异辛酯(DEHP)的浓度已超过美国华盛顿州的警戒值^[2].

植物修复是目前水体生物修复技术的一种, 因其经济、对环境破坏性小等优点被人们广泛应用^[3]. 沉水植物一方面能够通过茎叶富集降解水中有机污染物^[4]; 另一方面由于根生底质, 根系分泌的营养物质可以提高根际微生物的数量和降解活性, 从而提高微生物对沉积物的修复作用^[5]. 其中, 微生物降解是沉积物中污染物的主要消减途径^[6]. 磷脂是构成生物细胞膜的主要成分, 不同种类微生物体内磷脂脂肪酸(PLFA)的组成及含量差异显著, 可反映微生物的生物量及群落结构信息, 已被广泛用于微生物生态研究^[7]. 目前, 有关沉水植物的研究主要集中在氮、磷元素的去除, 鲜见对沉积物中有机污染物去除作用的报道.

菹草是春季浅水湖泊、河流和水库中占据主体的沉水植物, 覆盖面积可达 20% ~ 70%^[8]. 本论文利用菹草作为受试植物, 模拟海河水环境建立菹草微宇宙, 研究菹草对沉积物中酞酸酯的去除作用, 以及根际和非根际沉积物中微生物数量和群落结构的变化, 分析去除作用机制. 研究结果可为沉水植物根际污染物修复机理提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 沉积物前处理与植株的获得

采集海河表层 15 cm 的沉积物, 于通风处自然阴干, 压碎, 过 2 mm 筛. 用丙酮溶解一定量的 DBP 和 DEHP, 喷洒于 1/6 的沉积物中. 翻动沉积物使溶剂挥发, 然后喷洒蒸馏水, 使其含水量为 60%, 再经湿法灭菌后(每天 1 次, 连续 3 d)置于 25℃ 恒温培养箱中一个月, 中间定期补充水分. 取出染毒沉积物, 摊开, 快速风干后, 与剩余 5/6 未染毒沉积物混合并再次过 2 mm 筛, 备用.

从天津大学敬业湖采集菹草, 组织培养繁殖后^[9], 放入经过曝气的自来水中备用.

1.2 微宇宙系统的建立和样品采集

为研究菹草对沉积物中 DBP 和 DEHP 去除作用, 实验采用 2 组微宇宙系统, 即有草组和无草对照组. 具体方法是: 取 30 cm × 60 cm × 40 cm 的玻璃水族箱 2 个, 底部铺约 3 cm 厚已染毒的海河沉积物. 采用根袋法^[10]区分根际土与非根际土, 根袋直径 2 cm, 2 个根袋间隔 2.5 cm, 一个水族箱放置 21 个根袋, 每个根袋栽种 5 g 菹草. 向每个缸中加入约 20 L 经曝气的自来水, 稳定 2 d 开始计时. 实验期间光照强度为 2200 ± 100 lx, 光暗比为 12 h: 12 h, 温度为 25 ± 1℃. 实验连续运行 27 d. 每隔一定时间采集水、沉积物(根际和非根际)和菹草的样品, 并在实验结束时收集菹草根系, 分析 DBP 与 DEHP 的浓度. 取 1、15 和 27 d 的沉积物测定磷脂脂肪酸(PLFA)含量.

1.3 样品的制备和分析

1.3.1 酞酸酯的分析 水样: 用虹吸法取水表面下 10 cm 左右的水样 10 ml, 置于 25 ml 具塞比色管中, 加入 1 ml 二氯甲烷, 充分振摇 10 min, 静置分层, 共萃取 3 次, 合并有机相后 N₂吹定容.

植物样: 取植物的茎叶或根系部分, 蒸馏水冲洗后吸干表面水分, 称取 1 g(鲜重), 剪碎后放入组织研磨器, 加 5 ml 二氯甲烷, 研磨 5 min. 移出植物匀浆至 40 ml 离心管中, 4000 转/min 离心 10 min. 吸取二氯甲烷层至 K-D 浓缩器后 N₂吹定容.

沉积物样: 取 1 g 沉积物(冷冻干燥后过 80 目筛)于 10 ml 离心管中, 加 3 ml 二氯甲烷, 超声萃取 10 min, 然后 4000 转/min 离心 5 min, 重复 3 次合并有机相, N₂吹定容.

以上每个样品均做 3 个平行, 不同样品数据进行显著性差异分析. 样品分析采用 Agilent 6890 N 型气相色谱仪, 配 FID 检测器; 色谱柱为 HP-5 型石英毛细管柱(30.0 m × 320 μm × 0.25 μm); 进样口 250℃, 检测器 250℃; N₂ 流量 25 ml/min, H₂ 流量 45 ml/min, 空气流量 450 ml/min; 进样量 1 μl; 程序升温: 130℃(1 min) → 25℃/min → 280℃(3 min). DBP 和 DEHP 的加标回收率分别为: 水样 100.5% 和 93.2%; 沉积物样品 87.0% 和 78.8%; 菹草样品 95.6% 和 81.2%.

1.3.2 磷脂脂肪酸的分析 采用王爱丽^[11]的方法提取分离1、15和27 d沉积物中的PLFAs. 样品分析采用Agilent 6890 N型气相色谱仪,5975 C质谱检测器,HP-5 ms 5%石英毛细管柱(30.0 m × 250 μm × 0.25 μm). 选用全扫描方式进行分析,升温程序:初始温度80℃,以30℃/min升到150℃,再以3℃/min升至230℃,保持1 min,再以10℃/min升至280℃,保持2 min,总用时37 min. 载气为He,流量1.0 ml/min,不分流进样,进样口温度为250℃,检测器温度为250℃,接口温度为280℃,四级杆为150℃,离子源为230℃,EI源70 eV.

根据文献^[7]将所有PLFAs之和作为总量;i15:0、a15:0、i16:0、i17:0、a17:0作为革兰氏阳性菌的标记PLFAs,其和作为革兰氏阳性菌的总量;cy17:0、cy19:0、16:1ω7、16:1ω9、18:1ω7、18:1ω9作为革兰氏阴性菌的标记PLFAs,其和作为革兰氏阴性菌总量;革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、15:0、17:0作为细菌的标记PLFAs,其和作为细菌总的生物量;18:2ω6,9是真菌的标记PLFAs.

根据所测得的PLFA数据计算多样性指数(H),计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad (1)$$

式中, P_i 为样品中某一种PLFA的摩尔百分含量; S 为某一土壤样品中所有PLFA种类的数目. 不同样品的PLFA数据使用SPSS(Statistics 20.0)进行聚类分析,聚类方法为Hierarchical cluster analysis,采用Between-groups linkage方法.

2 结果

2.1 酞酸酯在微宇宙中的浓度变化

系统运行过程中,水中DBP浓度始终低于定量限(8 μg/L). DEHP的浓度则由初始的65 μg/L和70 μg/L逐渐降低,至第3 d后低于定量限(8 μg/L),两个系统中DEHP浓度除第3 d外,均无显著差异.

菹草茎叶中DBP和DEHP的浓度在实验初始阶段含量变化不显著,第7 d之后逐渐上升,系统运行结束时含量分别升高133%和68%. 整个实验过程中,菹草体内DEHP的浓度平均是DBP的6倍左右. 实验结束时测定了菹草根系DBP和DEHP浓度,分别为73.9和75.9 mg/kg,约为茎叶含量的200倍(图1).

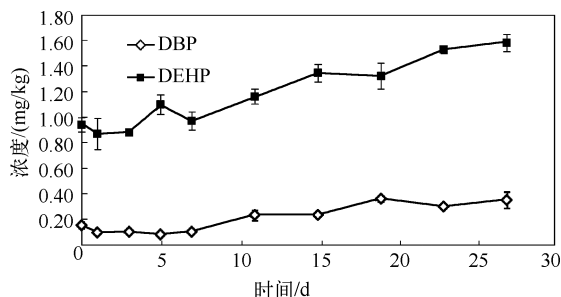


图1 菹草中DBP和DEHP的浓度
Fig. 1 Concentrations of DBP and DEHP in *Potamogeton crispus* L.

对照土和非根际土中DBP浓度变化趋势基本一致,11 d后逐渐下降,结束时降解率为32.2%~36.5%;根际土中DBP浓度总体呈下降趋势,0~15 d波动较大,最终降解率达50.0%. 对照组沉积物和非根际沉积物中DEHP浓度变化趋势总体一致,0~23 d时无显著变化,始终在9.80~10.31 mg/kg范围内波动,23 d后浓度开始明显降低,实验结束时对照组沉积物和非根际沉积物中DEHP降解率达10.3%~11.4%;根际沉积物中DEHP在0~23 d于7.26~8.95 mg/kg范围内波动,23 d后迅速下降,降解率达80.9%(图2).

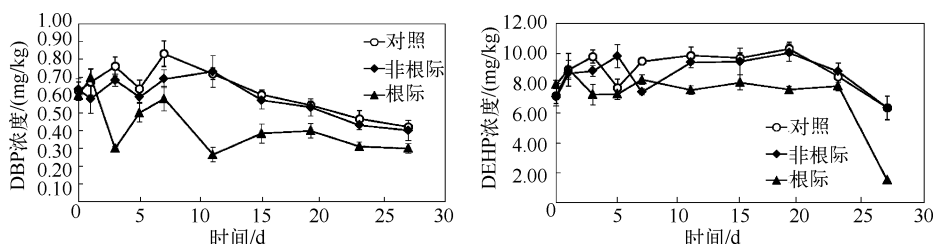


图2 沉积物中DBP和DEHP的浓度

Fig. 2 Concentrations of DBP and DEHP in sediment samples

2.2 沉积物中磷脂脂肪酸的含量和聚类分析结果

经测定,从沉积物中检出 12~17 种 PLFA,包括饱和脂肪酸、支链脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸,未检测到环丙烷脂肪酸和带羟基的脂肪酸. 偶数碳饱和脂肪酸的相对含量为 18.3%~47.3%,是沉积物中含量最丰富的脂肪酸种类,其次是单不饱和脂肪酸,相对含量为 17.9%~43.2%. 其中,饱和脂肪酸 16:0 和 18:0、单不饱和脂肪酸 18:1 ω 9 和 18:1 ω 6、双不饱和脂肪酸 18:2 ω 6,9 为优势脂肪酸. 支链脂肪酸和奇数碳饱和脂肪酸的相对含量较低,在有些沉积物中未检出(图 3).

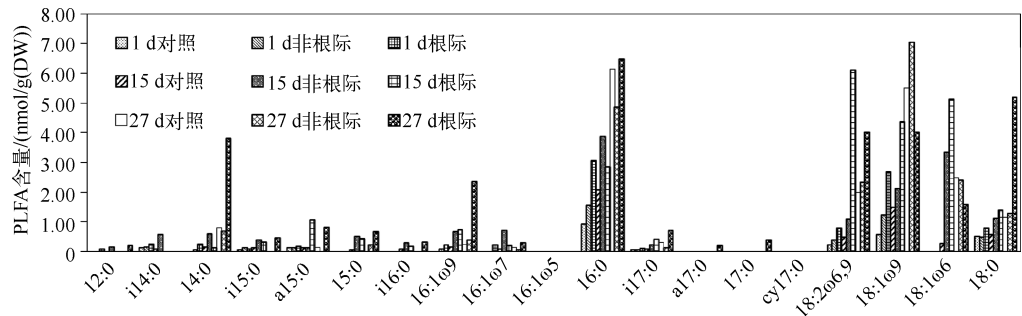


图 3 沉积物中的 PLFAs 组成
Fig. 3 Composition of PLFAs in sediment samples

在对照、非根际和根际沉积物中微生物总量、细菌总量、真菌总量以及革兰氏阳性菌(G+)和革兰氏阴性菌(G-)的含量这五个指标总体上呈现出依次升高的趋势(27 d 时 G+ 除外,非根际浓度高于根际),且随着系统运行时间的增长这 3 种沉积物中微生物量均呈现不同程度的增加(表 1).

表 1 沉积物中 PLFAs 含量(nmol/g(DW))及多样性指数(H)
Tab. 1 Contents of PLFAs and biological diversity index in sediment samples

	1 d			15 d			27 d		
	对照	非根际	根际	对照	非根际	根际	对照	非根际	根际
微生物总量	6.24	7.82	12.57	9.42	19.69	27.08	22.21	23.03	35.86
革兰氏阳性菌(G+)总量	0.32	0.38	0.46	0.48	1.09	2.03	0.44	0.20	2.57
革兰氏阴性菌(G-)总量	0.70	1.40	3.16	2.05	6.92	10.50	8.36	9.95	8.31
细菌总量	1.02	1.79	3.63	2.60	8.52	12.97	8.80	10.39	11.57
真菌总量	0.24	0.40	0.81	0.50	1.10	6.13	1.99	2.34	4.05
H	1.67	1.80	2.00	2.00	2.20	2.21	1.91	1.93	2.44

将对照、非根际和根际沉积物中 PLFA 进行聚类分析,结果表明可聚为 4 类(图 4):第 1 d 的 3 种沉积物(即对照、非根际和根际沉积物)和第 15 d 的对照和非根际沉积物聚为一类;第 27 d 对照和非根际沉积物为一类;第 15 d 根际和第 27 d 根际沉积物各单独为一类.

3 讨论

3.1 菹草对沉积物中微生物特征的影响

沉积物中微生物量在对照、非根际和根际沉积物中依次升高(表 1),说明种植菹草能够显著提高沉积物中微生物的数量. 影响根际微生物量的因素较复杂:根系分泌物可为根际微生物提供碳源和能源,使得根际沉积物中微生物量要高于非根际沉积物^[5];根系分泌物对微生物具有趋化作用,使微生物在根际聚集^[12]. 非根际沉积物中微生物含量略高于对照组,这可能是由于菹草的促淤作用增加了非根际沉积物中的营养物质,从而促进了微生物的生长^[13].

菹草对沉积物中微生物的群落结构影响也很大. 系统运行初期(第 1 d),微生物群落结构差异不大;随

着时间的增长,与非根际和对照沉积物相比,根际沉积物的微生物群落结构变化较大(图4),表明植物的生长对沉积物中微生物群落结构产生显著影响.这与陆生植物的研究结果一致^[14].

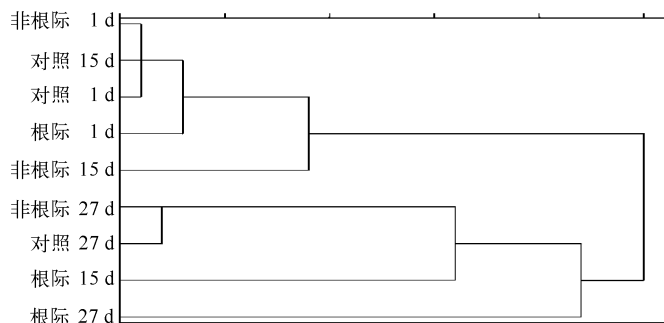


图4 沉积物中 PLFA 数据聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of PLFA data from sediment samples

根据 PLFA 数据计算微生物群落的多样性指数发现,实验过程中根际沉积物的生物多样性高于非根际和对照组沉积物(表1),表明根系分泌物不仅影响根际微生物的数量而且影响微生物群落的多样性.

3.2 菹草对沉积物中酞酸酯消减作用的影响

系统运行期间水体中 DBP 和 DEHP 浓度始终很低;菹草体内这 2 种 PAEs 浓度第 7 d 后逐渐升高,说明菹草可以从沉积物中富集这 2 种污染物.通过计算,系统运行结束时菹草对 DBP 和 DEHP 的富集量约增加 0.15 和 0.28 mg,不足沉积物中这 2 种 PAEs 去除量的 1/8.可见,虽然菹草可以对污染物起一定的富集作用,但微生物的降解起主要作用.

系统运行初期,根际、非根际和对照沉积物中这 2 种 PAEs 的浓度总体上差异并不显著,此时微生物数量相对较少,群落结构也较相似.这主要是系统运行初期,沉积物中微生物需要一个增殖的过程,根际作用尚不显著,因此使得沉积物中污染物浓度差异不大.系统运行中后期,根际沉积物中 2 种 PAEs 浓度始终低于对照组和非根际沉积物,此时不仅根际沉积物中微生物量高于其他两组,且微生物群落结构也发生了明显变化.这是由于菹草根系分泌物为微生物提供了大量的碳源和营养物质,促进了根际微生物的生长^[5],同时改变了微生物的群落结构^[14],形成的根际环境有效提高了 PAEs 的降解速率.

沉积物中 DBP 的浓度始终低于 DEHP,并且在实验过程中始终呈下降趋势.据报道^[15],PAEs 的生物降解性由化合物分子大小决定,而这类化合物分子的大小由支链组成决定.与 DEHP 相比,DBP 支链小,化合物空间位阻小,因此易于被微生物利用.DEHP 则在系统运行 23 d 前浓度变化不显著,其原因可能是一方面 DEHP 分子量大,较难降解,另一方面 DEHP 的浓度较高,抑制了微生物的降解作用^[16].23 d 后 DEHP 浓度才开始明显下降,尤其是根际沉积物中 DEHP 的浓度在第 27 d 迅速下降,而此时根际微生物群落结构变化也较大,与 DEHP 的去除数据相吻合,说明微生物群落结构是影响这类污染物降解的重要因素.

4 结论

1) PLFA 结果表明沉积物中微生物量和多样性指数在根际、非根际和对照沉积物中依次降低.利用 PLFAs 数据进行聚类,分析沉积物中微生物群落结构,表明实验中后期根际沉积物中微生物群落结构发生显著变化.

2) 实验过程中水中 DBP 和 DEHP 浓度始终较低.菹草能够富集沉积物中这 2 种 PAEs,但沉积物中这类物质的降解主要依靠微生物的作用.根际沉积物中这 2 种 PAEs 的浓度始终低于对照组和非根际沉积物,与 PLFA 的结果相吻合.计算得出,根际沉积物中 DBP 和 DEHP 的降解率分别为 50.0% 和 80.9%,均高于对照组和非根际沉积物(DBP:32.2%~36.5%;DEHP:10.3%~11.4%).

菹草扎根于沉积物,能够通过根际作用促进根际微生物生长,改变微生物群落结构,进而提高对这 2 种 PAEs 的降解能力.污染物在根际环境中的降解是一个复杂的过程,根系分泌物是产生根际效应的关键因

素,今后应加强这方面的研究,为利用沉水植物修复受 PAEs 污染沉积物提供科学依据.

5 参考文献

- [1] Cao XL. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, **9**: 21-43.
- [2] 崔学慧,李炳华,陈鸿汉等. 中国土壤与沉积物中邻苯二甲酸酯污染水平及其吸附研究进展. *生态环境学报*, 2010, **19**(2): 472-479.
- [3] Louisa WP. *In situ* and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **177**: 81-89.
- [4] Chi J. Phthalate acid esters in *Potamogeton crispus* L. from Haihe River, China. *Chemosphere*, 2009, **77**(1): 48-52.
- [5] Fan SX, Li PJ, Gong ZQ *et al.* Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*, 2008, **71**(8): 1593-1598.
- [6] Mallavarapu M, Balasubramanian R, Kadiyala V *et al.* Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 2011, **37**: 1362-1375.
- [7] Xue D, Yao HY, Ge DY *et al.* Soil microbial community structure in diverse land use system: A comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses. *Pedosphere*, 2008, **18**(5): 653-663.
- [8] 杨文斌,王国祥. 南京玄武湖菹草种群的效应. *湖泊科学*, 2007, **19**(5): 572-576.
- [9] Zhou CF, An SQ, Jiang JH *et al.* An in vitro propagation protocol of two submerged macrophytes for lake revegetation in east China. *Aquatic Botany*, 2006, **85**(1): 44-52.
- [10] 弋良朋,张 辉. 滨海4种盐生植物根际土壤酶活性特征与主要养分的关系. *生态环境学报*, 2011, **20**(2): 270-275.
- [11] 王爱丽. 酞酸酯在湿地植物根际环境中的消减行为[学位论文]. 天津:天津大学, 2011.
- [12] 贾 永,宋福强. 丛枝菌根(AM)对根瘤菌趋化作用研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(5): 743-747.
- [13] Barko JW, Gunnison D, Carpenter SR. Sediment interactions with submersed macrophyte growth and community dynamics. *Aquatic Botany*, 1991, **41**(1/2/3): 41-65.
- [14] 夏北城. 植被对土壤微生物群落结构的影响. *应用生态学报*, 1998, **9**(3): 296-300.
- [15] Xu G, Li FS, Wang QH. Occurrence and degradation characteristics of dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in typical agricultural soils of China. *Science of the Total Environment*, 2008, **393**(2/3): 333-340.
- [16] Liang DW, Zhang T, Fang HHP *et al.* Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **80**(2): 183-198.