中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture
中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国精品科技期刊
百种中国杰出学术期刊
中国科学引文数据库源刊

聚乙烯微塑料对玉米根际土壤微生物群落结构的影响

丁峰，赖金龙，季晓晖，罗学刚

引用本文:
丁峰, 赖金龙, 季晓晖, 等. 聚乙烯微塑料对玉米根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(6): 970–978.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.200677

(向下翻页，阅读全文)

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

铅胁迫下接种AM真菌对龙葵根际土壤微生物群落代谢特征的影响

Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on metabolic characteristics of microbial community in Solanum nigrum rhizosphere soil with lead stress

中国生态农业学报(中英文). 2019, 27(4): 545–553 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.181036

盐碱胁迫对黄瓜嫁接苗根际土壤细菌和真菌群落结构及丰度的影响

Effects of saline–alkali stress on structure and abundance of bacteria/fungi community in rhizosphere soil of grafted cucumber seedlings

中国生态农业学报. 2017, 25(11): 1626–1635 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.170302

玉米秸秆生物炭对褐土微生物功能多样性及细菌群落的影响

Effect of corn–stalk biochar on soil microbial functional diversity and bacterial community in cinnamon soils

中国生态农业学报. 2016, 24(6): 736–743 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.151212

甘蔗间作玉米对甘蔗根际微生物代谢功能多样性的影响

Effects of sugarcane and maize intercropping on sugarcane rhizosphere microbe metabolic function diversity

中国生态农业学报. 2016, 24(5): 618–627 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.151149

磷供应对玉米根际微生物碳源利用和功能多样性的影响

Effects of phosphorus supply on microbial carbon source utilization and functional diversity of maize rhizosphere

中国生态农业学报. 2015, 23(10): 1312–1319 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.150515

中国生态农业学报(中英文) 2021 年 6 月 第 29 卷 第 6 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Jun. 2021, 29(6): 970−978

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.200677

丁峰, 赖金龙, 季晓晖, 罗学刚. 聚乙烯微塑料对玉米根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(6): 970−978
DING F, LAI J L, JI X H, LUO X G. Effects of polyethylene microplastics on the microbial community structure of maize rhizosphere soil[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2021, 29(6): 970−978

聚乙烯微塑料对玉米根际土壤微生物群落结构的影响*

丁 峰[1], 赖金龙[2], 季晓晖[3], 罗学刚[1,2**]

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621010; 2. 西南科技大学生物质材料教育部工程研究中心 绵阳 621000; 3. 陕西理工大学化学与环境科学学院 汉中 723000)

摘 要: 为了研究聚乙烯类微塑料对玉米根际土壤微生物群落结构的影响, 以玉米为试材, 以平均分子量为 2000、5000、10 万的聚乙烯粉末模拟土壤中的微塑料污染, 设置 5 个处理: 不添加聚乙烯(CK)、添加分子量为 2000(T1)、5000(T2)、10 万以上(T3)的聚乙烯且种植玉米、未添加聚乙烯未种植玉米(CK0), 分析玉米抽穗期各部位矿质元素代谢和根际土壤微生物群落结构差异。结果显示, 矿质元素含量在玉米各部位存在差异, Fe、Cu 主要集中在玉米根部, Ca、Mn、Mg 在叶中分布最多, K 主要集中在茎中; 添加不同分子量聚乙烯微塑料后, 不同部位的矿质元素较 CK 增加, 且 T1 处理下增加最多。微生物多样性分析显示, 不同分子量聚乙烯微塑料对玉米根际微生物群落组成影响不同。T1 处理下除变形杆菌纲、伯克氏菌科细菌丰度增加外, 其他细菌丰度较 CK 均减少; T3 处理下, 细菌和真菌的丰度较 CK 都有较大幅度的增加。总体来看, 添加聚乙烯后, 玉米不同部位矿质元素含量较 CK 显著增加, 2000 分子量聚乙烯能够显著降低土壤中细菌和真菌的丰度, 10 万以上分子量聚乙烯使得土壤中细菌和真菌丰度增加, 各处理中与环境污染物降解相关的微生物增多。

关键词: 微塑料; 聚乙烯; 分子量; 根际微生物; 群落结构; 矿质元素; 玉米

中图分类号: S154.31 开放科学码(资源服务)标识码(OSID):

Effects of polyethylene microplastics on the microbial community structure of maize rhizosphere soil*

DING Feng[1], LAI Jinlong[2], JI Xiaohui[3], LUO Xuegang[1,2**]

(1. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 2. Engineering Research Center of Biological Materials, Ministry of Education, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China; 3. College of Chemical & Environment Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Abstract: The use of agricultural polyethylene films results in polyethylene microplastic accumulation in the soil, causing microplastic pollution, which has attracted the attention of scholars worldwide. To study the effects of polyethylene microplastics on the microbial community structure of crop rhizosphere soil, corn was grown with different polyethylene pow-

* 国民核生化灾害防护国家重点实验室公开基金项目(SKLNBC2019-21)资助
** 通信作者: 罗学刚, 主要研究方向为环境污染生物效应与生物修复研究。E-mail: lxg@swust.edu.cn
丁峰, 主要研究方向为环境污染生物效应与生物修复研究。E-mail: 1946533708@qq.com
收稿日期: 2020-08-17 接受日期: 2021-01-17
* The study was supported by the Open Fund Project of the National Key Laboratory of National Nuclear and Biochemical Disaster Protection (SKLNBC2019-21).
** Corresponding author, E-mail: lxg@swust.edu.cn
Received Aug. 17, 2020; accepted Jan. 17, 2021

ders (average molecular weights: 2000, 5000, and ≥100 000) to simulate microplastic pollution in agricultural soil. There were five treatments in this experiment: planting maize without polyethylene (CK), planting maize with 2000 (T1), 5000 (T2), and ≥100 000 (T3) molecular weight polyethylene powder, and non-planting maize without polyethylene (CK0). Differences in mineral element metabolism in different parts of maize plant at the heading stage and variation in the rhizosphere soil microbial community structure were analyzed. The results showed that the mineral element content differed in different parts of maize. Iron and copper were mainly concentrated in the roots; calcium, manganese, and magnesium were most abundant in the leaves; and potassium was mainly concentrated in the stems. After adding the polyethylene microplastics of different molecular weights, the mineral elements in different parts of the plant increased compared with CK; the increase was greatest under the 2000 molecular weight polyethylene treatment. Microbial diversity analysis showed that the polyethylene microplastics had different effects on the microbial community composition in the maize rhizosphere. Except for Proteobacteria and Burkholderiaceae, the abundance of bacteria decreased under the 2000 molecular weight polyethylene treatment compared to CK. The abundance of bacteria and fungi increased under the ≥100 000 molecular weight polyethylene treatment compared to CK. In general, the mineral elements contents in different parts of the maize plant increased compared with CK after the addition of polyethylene. Two-thousand molecular weight polyethylene reduced the abundance of bacteria and fungi in the soil, whereas ≥100 000 molecular weight polyethylene increased the abundance of bacteria and fungi in the soil; the number of microorganisms related to the degradation of environmental pollutants in each treatment increased, which helped the soil cope with microplastics stress.

Keywords: Microplastics; Polyethylene; Molecular weight; Rhizosphere microorganism; Community structure; Mineral elements; Corn

微塑料(<5 mm)作为一种新型的环境污染物越来越受到人们的关注，其种类包括聚乙烯(polyethylene, PE)、聚丙烯(polypropylene, PP)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)、聚酯类(polyethylene terephthalate, PET)及聚酰胺(polyamide, PA)等[1-2]。根据微塑料来源可分为初生微塑料和次生微塑料。其中，次生微塑料的来源主要包括农用地膜的降解、污泥的沉积以及大气中的微塑料颗粒的沉降。据调查陆地生态系统中的微塑料主要来源于农用地膜的降解[3-4]。农用地膜经过 1 季或多季使用后会降解，逐渐粉化后残留在土壤中导致土壤中聚乙烯微塑料残留量明显增加，已对土壤环境造成严重污染[5]。

研究表明，微塑料进入土壤后可能会影响土壤理化性质和功能[6]，并随土壤中微塑料的迁移而影响土壤微生态系统。此外，微塑料颗粒可以吸附重金属、有机污染物等，当这些吸附了污染物的微塑料被土壤里的生物摄食后，可转移到更高级的营养体并蓄积，进而对动植物产生不利影响[7-8]。例如，Laganà 等[9]研究发现微塑料可以作为载体，吸附多种对抗生素具有耐受性的细菌，从而使污染物更加容易对动植物和人体造成危害。Wang 等[10]使用含 2000 $mg \cdot kg^{-1}$ PVC 的土壤培养加州蚯蚓(*Metaphire californica*)时发现，PVC 能够显著降低蚯蚓肠道中的绿湾菌门(Chloroflexi)和酸杆菌门(Acidobacteria)细菌的丰度。罗小凤等[11]对土壤白符跳(*Folsomia candida*)的研究发现，微塑料对土壤白符跳的成长率、繁殖率以及成活率有显著影响，通过影响跳虫的死亡、繁殖和体长等降低土壤中跳虫的生物量。陈玉玲[12]的研究证明低密度聚乙烯微塑料能引起蚯蚓的氧化应激反应，并且能够影响赤字爱胜蚯蚓(*Eisenia foetida*)的正常生长。Liu 等[13]的研究表明，在向土壤中添加两种不同浓度的微塑料颗粒后，30 d 后微塑料对土壤酶活性、有机碳含量等化学性质产生影响，且高浓度微塑料影响更大。微塑料沉积在土壤中，将土壤中的有害物质吸附在表面，会使土壤的理化性质发生改变，与土壤中的难溶颗粒结合在一起，形成土壤团聚体，进而影响土壤微环境[14]。

目前，有关农田土壤聚乙烯微塑料的环境生物学效应研究主要集中在以下几个方面：1)微塑料对农作物，例如小麦(*Triticum aestivum*)、绿豆(*Phaseolus minimus*)等的发芽和幼苗的毒理作用以及作物的农艺性状[15-16]；2)微塑料在作物种植季对土壤酶活性、理化性质及微生物群落结构等的影响；3)土壤中聚乙烯微塑料的提取、降解特性研究以及一些能够降解聚乙烯微塑料的微生物筛选和降解特性研究。例如，张祯明等[17-18]以 L9(3^4)设计正交试验，发现微塑料分子量因素对土壤理化性质有显著影响，土壤自身性质对土壤微生物群落结构的影响大于聚乙烯微塑料；樊有国[5]研究发现聚乙烯 2000 (分子量)和 LLDPE 对土壤酶活性影响较大。然而，有关不同分子量微塑料对作物根际土壤微生物多样性的影响却鲜有报道。因此，本研究在前期

研究基础上，以玉米(*Zea mays*)为试材，采用外源添加 3 种分子量聚乙烯微塑料模拟土壤微塑料污染，分析添加聚乙烯微塑料后玉米根际微生物群落结构的变化，为评估聚乙烯微塑料对土壤环境的影响提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

试验所用玉米品种为‘成单 19’，购自于四川省绵阳市龙门农贸市场。选用分子量为 2000、5000 和 10 万以上的聚乙烯粉末(分子量分别为 1952、5014 和 101 282，粒径 0.15~0.20 mm；购自中国石油化工有限公司茂名分公司)模拟聚乙烯微塑料。据估算，农业生产地膜覆盖使用量为 90 $kg·hm^{-2}$，模拟覆膜 50 年，折算出土壤聚乙烯微塑料污染浓度为 2.12 $g·kg^{-1}$[5]。因此，本研究共设置 5 个处理，分别为未添加聚乙烯也未种植玉米的对照(CK0)、未添加聚乙烯但种植玉米的对照(CK)、添加 2000 分子量聚乙烯种植玉米(T1)、添加 5000 分子量聚乙烯种植玉米(T2)和添加 10 万以上分子量聚乙烯种植玉米(T3)。采用 5 号加仑盆(27.5 cm×31 cm×22 cm)，盆底预留孔径，每盆装 15 kg 土壤；分别称取所需的聚乙烯粉末 95.4 g 与土壤混匀，再装盆，保持最大持水量，静置 1 周后播种。每盆土壤播种玉米 10 粒，待玉米长至两叶一心时，进行匀苗，每盆留苗 5 株，每隔两天浇水 1 次。常规田间管理，每隔 20 d 施 1 次肥料，玉米生长 120 d 时取样。每个处理设置 3 个重复。

1.2 测定方法

1.2.1 玉米矿质元素含量测定

于玉米抽穗期取样，每盆中选取长势相近的 3 株玉米，洗掉根部土壤，按根、茎、叶处理，装信封，带回实验室。将样品在 105 ℃下杀青 15 min，随后在 85 ℃烘干至恒重，并测定各部位干重。使用样品粉碎机粉碎玉米各部位，分装。取 0.100 g 粉碎好的玉米各部位样品，加入 10 mL 浓 HNO_3 和 1 mL 30% H_2O_2 在微波消解仪(意大利 Milestone 公司)消解，消解好的各部位样品使用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，使用 TAS-990AFG 原子吸收分光光度计测定玉米各部位元素含量。

1.2.2 土壤微生物群落的高通量分析

玉米抽穗期采集根际土壤样品。将玉米整株从土壤中挖出后，抖掉与根系结合松散的土，用刷子将与根际结合紧密的土壤刷下来作为根际土壤样品。将土壤样品混匀后用灭菌的密封袋装好密封保存，迅速带回实验室。采用 DNA 抽提试剂盒提取土壤基因组 DNA，之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和浓度，取适量的样品于离心管中[19]。以稀释后的基因组 DNA 为模板，根据测序区域的选择，使用带 Barcode 的特异引物[20]，Takara 公司的 Takara Ex Taq 高保真酶进行 PCR，确保扩增效率和准确性[21]。细菌多样性鉴定对应区域为 16S V3-V4 区(前段引物为 343F-5′- TACGGRAGGCAGCAG-3′；后端引物：798R-5′- AGGGTATCTAATCCT-3′)，真菌 ITS 多样性鉴定对应区域：ITS(前端引物：ITS1F-5′-CTTGGTCA TTTAGAGGAAGTAA-3′；后端引物：ITS2-5′-GCT GCGTTCTTCATCGATGC-3′)[22]。

PCR 产物在上海欧易生物医学科技有限公司进行双端测序，使用 Trimmomatic 软件对原始双端序列去杂。去杂后的双端序列利用 FLASH 软件拼接，测序数据进行预处理生成优质序列。采用 Vsearch 软件，根据序列的相似性，将序列归为多个 OTU，参数为序列相似度大于或等于 97%被归为一个 OTU 单元。使用 QIIME 软件包挑选出各 OTU 的代表序列，并将所有代表序列与数据库进行比对注释。16S 使用 Silva (version123)数据库比对，物种比对注释使用 RDP classifier 软件，保留置信区间大于 0.7 的注释结果。ITS 使用 Unite 数据库比对，物种比对注释使用 blast 软件[23-24]。

1.3 数据处理与分析

采用 QIIME 软件对测序数据进行分析、计算土壤微生物的多样性[25-26]，利用 SPSS 22.0 对玉米各部位矿质元素含量进行分析，使用 Origin 2017 绘图，采用 Adobe lllustrator CS6 进行图片排版。

2 结果与分析

2.1 聚乙烯微塑料对玉米矿质元素含量的影响

不同分子量聚乙烯微塑料污染对玉米不同部位矿质元素含量影响如表 1 所示。结果显示，随着聚乙烯分子量的增加，不同部位矿质元素含量基本呈上升的趋势。

K 含量在根和茎中呈现相似趋势，均为 T1>T2>T3>CK；在叶中为 T1>T3>T2>CK。各部位 T1、T2、T3 间存在显著差异；不同部位 K 含量表现为茎>根>叶；不同处理下，玉米 K 含量在根、茎、叶间存在显著差异。

Ca 含量在根、茎、叶中变化趋势不同，根为 T3>T1>T2>CK，茎为 T2>T1=CK>T3，叶为 T1>T3>CK>T2。各部位 T1、T2、T3 间存在显著差异。不同部

位 Ca 含量为叶>根>茎, 根和叶中各处理与 CK 之间存在显著差异, 茎 T2 处理与 CK 差异显著; 不同处理下玉米 Ca 含量在根、茎、叶间存在显著差异。

Mg 含量在根、茎、叶中变化趋势各不相同。根中 T3 处理的 Mg 含量最大, 较 CK 显著增加 41.9%; 茎中 T2 处理 Mg 含量最高, 叶中 T1 处理 Mg 含量最高。各部位 Mg 含量由高到底为叶>根>茎。不同部位 T1、T2、T3 间存在显著差异, 不同处理下根、茎、叶间差异显著。

玉米根、茎、叶 Fe 含量在不同处理下差异显著。根中 T1 处理 Fe 含量最大, 较 CK 显著增加 48.2%; 茎中 T3 处理 Fe 含量最大; 叶中 T2 处理 Fe 含量最大, 较 CK 显著增加 59.3%。各部位 Fe 含量为根>叶>茎。不同处理下玉米 Fe 含量在根、茎、叶间存在显著差异。

Cu 在玉米根、茎、叶中含量各不相同。根中 T2 处理 Cu 含量最大, 较 CK 显著增加 38.6%; 茎中 T3 处理对 Cu 含量影响最大, 较 CK 增加 26.3%; 叶中 T3 处理 Cu 含量最大。不同部位 Cu 含量表现为根>茎>叶。根中各处理对 Cu 含量有显著影响, 茎、叶中的影响不显著。玉米根中, T1、T2、T3 之间 Cu 含量存在显著差异; 茎中 T2、T3 之间差异不显著, 但均与 T1 间差异显著; 叶中 T1、T2 之间和 T2 与 T3 之间差异不显著, 但 T1 和 T3 差异显著。T1 和 T3 处理下, 根与茎和叶中 Cu 含量均存在显著差异, 但茎和叶间差异不显著, T2 处理下, Cu 含量在根、茎、叶中存在显著差异。

玉米根、茎、叶 Mn 含量 T1、T2、T3 处理与 CK 差异显著。根中 T1 处理最大, 茎中 T2 最大, 叶中 T2 最大; 不同部位 Mn 含量表现为叶>根>茎。不同部位 T1、T2、T3 间存在显著差异, 各处理下玉米 Mn 含量在根、茎、叶间存在显著差异。

表 1　不同分子量聚乙烯微塑料对玉米不同部位矿质元素含量的影响

Table 1　Effect of polyethylene microplastics with different molecular weights on mineral elements contents of different organs of corn　　$mg \cdot kg^{-1}$

器官 Organ	处理 Treatment	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn
根 Roots	CK	8090.75±1.03d	876.75±1.03d	1909.88±2.68d	1113.13±1.34d	51.61±0.16d	61.50±0.35d
	T1	8987.75±1.15aB	1260.63±3.86bB	2109.63±5.82cB	1649.63±1.08aA	61.04±0.22cA	124.39±0.17aA
	T2	8505.75±3.51bB	1160.25±1.65cB	2168.75±1.95bB	1474.25±0.60bA	71.51±0.22aA	118.73±0.18bB
	T3	8319.88±1.75cB	1361.50±1.65aB	2710.75±3.40aB	1382.5±1.77cA	68.91±0.18bA	106.70±0.20cB
茎 Stems	CK	8509.00±3.47d	415.25±2.84b	173.89±1.95d	361.63±0.65d	5.25±0.25b	19.50±0.04d
	T1	10 102.50±1.47aA	415.25±2.65bC	234.21±2.41cC	693.88±4.04bB	4.75±0.25bB	47.79±0.18cC
	T2	9152.13±1.89bA	422.63±2.56aC	369.04±3.07aC	571.45±0.05cC	6.38±0.41aB	67.38±0.22aC
	T3	8528.50±0.62cA	413.50±1.46bC	279.10±2.72bC	782.38±1.88aB	6.63±0.41aB	49.63±0.85bC
叶 Leaves	CK	6152.38±1.78d	2825.75±2.84c	3705.00±7.91b	575.50±0.61d	5.63±0.41ab	140.00±1.41c
	T1	7430.00±2.47aC	2967.25±3.11aA	4458.75±5.44aA	657.88±1.47bC	5.13±0.22bB	119.38±0.54dB
	T2	6621.50±1.97cC	2633.25±3.12dA	3638.75±2.16cA	916.75±1.44aB	5.25±0.25abC	176.63±0.96aA
	T3	6852.00±2.03bC	2865.38±2.75bA	3567.50±7.50dA	608.00±1.06cC	6.00±0.35aB	144.63±1.88bA

CK 为未添加微塑料处理, T1、T2 和 T3 为添加分子量为 2000、5000 和 10 万以上的微塑料处理。不同小写字母表示同一部位下各处理在 $P<0.05$ 水平差异显著, 不同大写字母表示在同一处理中不同部位间在 $P<0.05$ 水平差异显著。CK is treatment of no-adding microplastic; T1, T2 and T3 are treatments of adding microplastic with molecular weight of 2000, 5000 and above 100-thousand, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences at $P<0.05$ level among different treatments in the same organ, and different capital letters indicate significant differences at $P<0.05$ level among different organs in the same treatment.

2.2　微塑料对土壤微生物群落多样性的影响

结果显示, 5 个处理中, 细菌丰度远大于真菌丰度。玉米土壤共含有 51 902 个细菌有效序列, 其中共同 OTU(操作分类单元)为 891。Coverage 指数均>0.9(表 2), 说明样品中的细菌序列基本上被测出, 即本次测序结果能反映出样本的真实结果。由表 2 可知, CK 处理的物种丰度最高, T1 处理的有效 OTU 数最少, 各处理有效 OTU 数不存在显著差异。Chao1 指数越大, 代表样品中菌群的丰富度越高。本研究中, T1 处理的 Chao1 指数最小, T3 处理最大。Shannon 指数和 Simpson 指数越高, 说明微生物群落多样性越高。本研究中, 各处理的 Simpson 指数相同, 而 Shannon 指数 T1 处理最小, 说明 T1 处理细菌群落多样性最低。各处理的 Shannon 指数和 Simpson 指数与 CK 间无显著差异。5 种处理下土壤中细菌 OTU 主成分分析结果(图 1A)显示, 除 CK 外, 其他 4 个处理的 3 个重复分别聚在一起, 具有较高的重复性。5 个处理间彼此相距较远, 且 T1 处理与其他处理间相距最远, 说明添加聚乙烯微塑料后, 土壤中细菌群落结构发生了较大差异, 添加不同分子量的聚乙烯微塑料对土壤细菌群落结构具有较大的影响, 且添加分子量为 2000 的聚乙烯微塑料的影

响最大。

所有玉米土壤样本共获得 18 295 个真菌有效序列，依据 97%序列相似性对所有序列进行聚类后发现，5 个处理共有序列 282 个。Coverage 指数均>0.97，说明样品中的真菌序列已基本被测出，即本次测序结果能反映出样本的真实结果。T3 处理下的 Chao1 指数、Shannon 指数较 CK 增加，Simpson 指数相同，说明 T3 处理下微生物多样性增加，且各处理的 Shannon 指数和 Simpson 指数与 CK 相比不存在显著差异。5 种处理下土壤中真菌 OTU 主成分分析结果(图 1B)显示，5 个处理间彼此相距较远，说明在添加不同分子量的聚乙烯微塑料后，土壤中真菌群落发生了差异，且 10 万以上分子量的聚乙烯微塑料影响最大。

表 2　不同分子量聚乙烯微塑料对玉米土壤细菌和真菌多样性的影响

Table 2　Effects of polyethylene microplastics with different molecular weights on diversity indexes of soil bacteria and fungi of corn

微生物 Microbia	处理 Treatment	OTU	Chao1	Shannon	Simpson	Coverage
细菌 Bacteria	CK0	3464±90	5040.50±143.31	10.19±0.06	0.99	0.94
	CK	3495±139	5090.49±191.62	10.27±0.08	0.99	0.94
	T1	3231±195	4669.13±276.69	9.86±0.30	0.99	0.94
	T2	3401±19	5012.52±41.76	10.02±0.01	0.99	0.94
	T3	3474±67	5117.35±82.72	10.18±0.03	0.99	0.94
真菌 Fungus	CK0	1167±65	1569.83±33.48	6.88±0.20	0.97	0.98
	CK	1210±52	1636.88±63.11	6.84±0.32	0.97	0.97
	T1	1198±19	1567.52±14.41	6.85±0.05	0.97	0.98
	T2	1229±17	1618.75±43.95	6.85±0.17	0.96	0.98
	T3	1244±20	1621.71±33.99	6.92±0.08	0.97	0.98

CK0 为既未添加微塑料也未种植植物处理，CK 为未添加微塑料处理，T1、T2 和 T3 为添加分子量为 2000、5000 和 10 万以上的微塑料处理。CK0 is treatment of not-planting corn without microplastics; CK is treatment of no adding microplastic; T1, T2 and T3 are treatments of adding microplastic with molecular weight of 2000, 5000 and above 100-thousand, respectively.

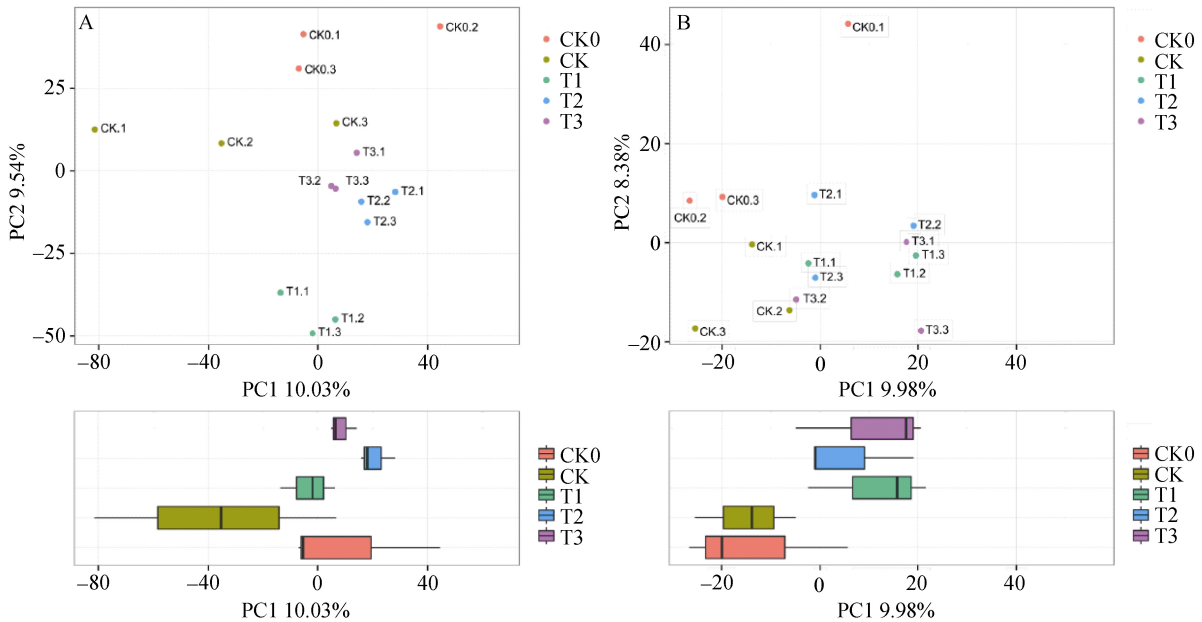

图 1　不同分子量聚乙烯微塑料处理下玉米土壤细菌(A)和真菌(B)主成分分析

Fig. 1　Principal component analysis of bacteria (A) and fungus (B) of corn soil containing polyethylene microplastics with different molecular weights

CK0 为既未添加微塑料也未种植植物处理，CK 为未添加微塑料处理，T1、T2 和 T3 为添加分子量为 2000、5000 和 10 万以上的微塑料处理。CK0 is treatment of not-planting corn without microplastics; CK is treatment of no adding microplastic; T1, T2 and T3 are treatments of adding microplastic with molecular weight of 2000, 5000 and above 100-thousand, respectively.

2.3　微塑料对土壤微生物群落纲水平组成的影响

由图 2A 可知，土壤细菌群落主要由 γ-变形杆菌纲(Gammaproteobacteria)、α-变形杆菌纲(Alphaproteobacteria)、δ 变形菌纲(Deltaproteobacteria)、拟杆菌纲(Bacteroidia)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、放线菌纲(Actinobacteria)、酸微菌纲(Acidimicro-

biia)、Acidobacteriia、Thermoleophilia、Nitrospira、Ignavibacteria、Thermoanaerobaculia 等组成。不同处理土壤样品中细菌菌纲构成相似。进一步分析发现, γ-变形杆菌纲在各处理中均占有较大的优势, 最大丰度为 42.7%, 出现在 T1 处理; 最小丰度出现在 CK 中, 为 33.3%; 除 T1 与 CK 之间存在差异较大外, T2 和 T3 与 CK 间及 T1、T2、T3 间差异也不明显。其次是 α-变形杆菌纲, 最大丰度为 19.3%, 出现在 CK 中; 最小丰度出现在 T1 中, 为 15.6%; 除 T1 与 CK 之间存在差异较大外, T2 和 T3 与 CK 间及 T1、T2、T3 间差异也不明显。δ 变形菌纲最大丰度为 12.5%, 出现在 CK; 最小丰度出现在 T1, 为 9.0%, T1、T2 与 CK 之间差异较大, T3 与 CK 相似, T1、T2、T3 之间无明显差异。从图 2A 可以看出, T1 处理除 γ-变形杆菌纲外, 其余菌纲较 CK 丰度减少, 表明 2000 分子量聚乙烯对土壤细菌群落影响最大。

通过对测序结果分析、归类, 得出土壤真菌群落在纲水平上的分布特征(图 2B)。结果显示土壤真菌群落主要由粪壳菌纲(Sordariomycetes)、座囊菌纲(Dothideomycetes)、伞菌纲(Agaricomycetes)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、被孢霉纲(Mortierellomycotina cls Incertae sedis)、球囊菌纲(Glomeromycetes)、银耳纲(Tremellomycetes)、盘菌纲(Pezizomycetes)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)、Wallemiomycetes、壶菌纲(Chytridiomycetes)、Archaeorhizomycetes、茶渍纲(Lecanoromycetes)、酵母菌(Saccharomycetes)、李基那地衣纲(Lichinomycetes)等组成。不同处理土壤样品中真菌菌纲构成相似。进一步分析发现, 粪壳菌纲在各处理中均占有较大的优势, 最大丰度为 26.9%, 出现在 T3; 最小丰度出现在 CK, 为 22.6%, T1、T2、T3 间及其与 CK 之间差异不明显。其次是座囊菌纲, 最大丰度为 14.8%, 出现在 T1; 最小丰度出现在 CK, 为 12.3%, T2 和 T3 处理也增加了粪壳菌纲的丰度; T1、T2、T3 之间及其与 CK 之间差异不明显。

2.4　微塑料对土壤微生物群落科水平组成的影响

通过对测序结果分析、归类, 得出土壤细菌群落在科水平的分布特征(图 3A)。结果显示土壤细菌群落主要由伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae)、芽单胞菌科(Gemmatimonadaceae)、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)、Microscillaceae、Solimonadaceae、Dongiaceae 等组成, 不同处理土壤细菌菌科构成相似。伯克氏菌科在每个处理中都是最多的, 除 T1 处理外, T2 和 T3 与 CK 间及 T1、T2、T3 间相近。其次是亚硝化单胞菌科, 最大丰度为 9.1%, 出现在 T1; 除 T1 外, T2 和 T3 与 CK 间及 T1、T2、T3 间相近。

通过对测序结果分析、归类, 得出土壤真菌群落在科水平上的分布特征(图 3B)。结果显示土壤真菌群落主要由丛赤壳科(Nectriaceae)、孢菌科(Pleosporaceae)、粉褶菌科(Entolomataceae)、被孢霉科(Mortierellaceae)、球囊霉科(Glomeraceae)、角担菌科(Ceratobasidiaceae)、毛球壳科(Lasiosphaeriaceae)、蜡伞科(Hygrophoraceae)、毛壳菌科(Chaetomiaceae)、节担菌科(Wallemiaceae)、排腔科(Dothioraceae)、伏革菌科(Corticiaceae)、盘菌科(Pezizaceae)等组成。各处理优势科均为丛赤壳科、孢菌科和粉褶菌科, 不同处理土壤真菌菌科构成相似。每个处理丰度最高的是丛赤壳科真菌, 最高的是 T3 处理, 相对丰度为 10.4%; CK 处理丰度最低, 为 8.9%; 除 T3 外, T1 和 T2 与 CK 间及 T1、T2、T3 间相近。其次是孢菌科, 相对丰度最多的是 T3 处理, 为 4.7%; 最小为 CK, 相对丰度为 4.4%; 除 T3 外, T1 和 T2 与 CK 间及 T1、T2、T3 之间差异不明显。T3 处理下丛赤壳科真菌、孢菌科较 CK 显著增加。

3　讨论

本研究发现, 玉米矿质元素如 Fe、Cu 在根中最多, 这与詹爱军等[27]的研究一致。Ca、Mn、Mg 叶中积累最多, 这与沈涛等[28]关于云南薯蓣属(*Dioscorea*)矿质元素指纹图谱研究相似。Liu 等[13]研究发现微塑料通过影响土壤微生物活动, 促进矿质元素在植物-土壤之间的迁移。本研究中, 添加不同分子量聚乙烯微塑料后, 玉米各部位矿质元素含量较 CK 增加, 这主要是因为微塑料添加改变了土壤理化性质, 适应微塑料的土壤微生物活动增强, 使微生物胞外酶的分泌增加[29], 促进土壤的 K、Ca、Mg 等矿质元素的释放, 加速了矿质元素在土壤-植物体之间的迁移转化[13], 因此植物体各部位的矿质元素含量较 CK 显著增加。

一般来讲, 微生物群落多样性指数越高, 群落结构越复杂, 稳定性越好[30]。Huang 等[31]在研究 LDPE 对微生物群落组成和酶活力的影响中发现,

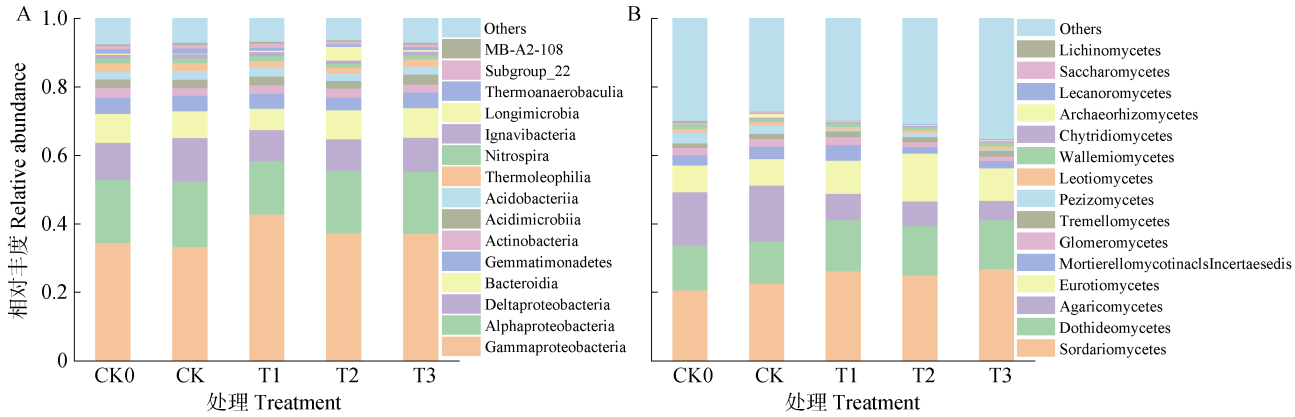

图 2　不同分子量聚乙烯微塑料处理下玉米土壤细菌群落(A)和真菌群落(B)基于纲水平的分布

Fig. 2　Distribution of bacterial community (A) and fungal community (B) at class level in corn soils containing polyethylene microplastics with different molecular weights

CK0 为既未添加微塑料也未种植植物处理, CK 为未添加微塑料处理, T1、T2 和 T3 为添加分子量为 2000、5000 和 10 万以上的微塑料处理。CK0 is treatment of not-planting corn without microplastics; CK is treatment of no adding microplastic; T1, T2 and T3 are treatments of adding microplastic with molecular weight of 2000, 5000 and above 100-thousand, respectively.

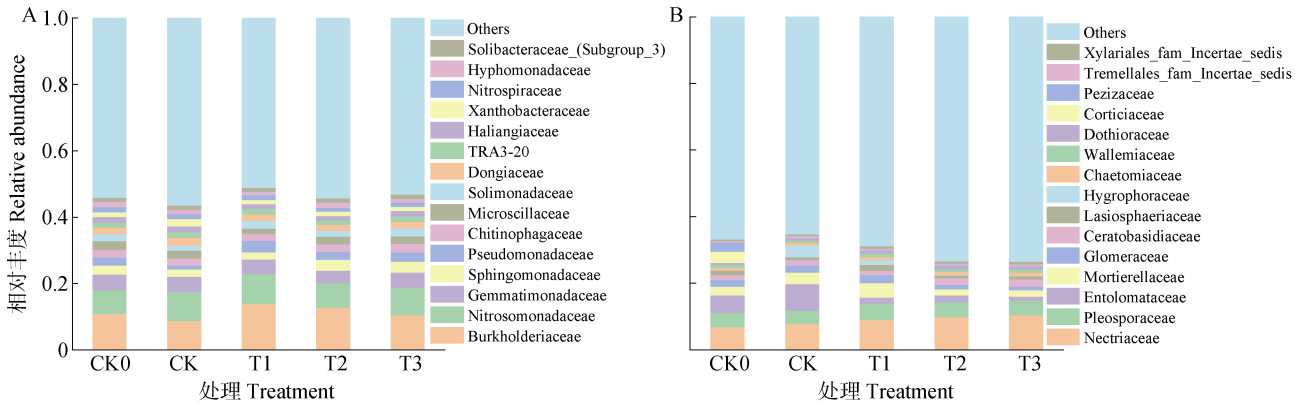

图 3　不同分子量聚乙烯微塑料处理下土壤细菌群落(A)和真菌群落(B)基于科水平的分布

Fig. 3　Distribution of bacterial community (A) and fungal community (B) at family level of in corn soils containing polyethylene microplastics with different molecular weights

CK0 为既未添加微塑料也未种植植物处理, CK 为未添加微塑料处理, T1、T2 和 T3 为添加分子量为 2000、5000 和 10 万以上的微塑料处理。CK0 is treatment of not-planting corn without microplastics; CK is treatment of no adding microplastic; T1, T2 and T3 are treatments of adding microplastic with molecular weight of 2000, 5000 and above 100-thousand, respectively.

聚乙烯的加入能显著提高土壤中脲酶和过氧化氢酶的酶活性, 16S-rRNA 高通量测序结果显示土壤微生物的多样性并没有显著变化, 但微生物多样性明显低于对照组。本研究中发现在添加聚乙烯微塑料后, 细菌群落数较 CK 减少, 但不存在显著差异, 各处理 Shannon 指数和 Simpson 指数与 CK 并无显著差异, 这说明聚乙烯微塑料能够改变土壤细菌群落结构; 真菌群落除 T1 外, 其余处理较 CK 增加, 各处理之间不存在差异显著性, 各处理 Shannon 指数和 Simpson 指数与 CK 并无显著差异, 这说明高分子量聚乙烯微塑料对土壤真菌具有促进作用。

本试验发现, 在聚乙烯微塑料污染的土壤中, 细菌丰度远大于真菌丰度, 这与 Yang 等[32]的土壤中微生物以细菌为主的结论相同。玉米根际微生物在不同处理下群落纲水平和科水平组成具有一定的相似性。纲分类水平上, 细菌优势菌纲为 γ-变形杆菌纲、α-变形杆菌纲、δ 变形菌纲等, 真菌优势菌纲为粪壳菌纲、座囊菌纲、伞菌纲等。科分类水平上, 细菌优势菌科为伯克氏菌科、亚硝化单胞菌科、芽单胞菌科等, 真菌优势菌科为丛赤壳科、孢菌科、粉褶菌科等。T1 处理下除变形杆菌纲、伯克氏菌科细菌丰度增加外, 其他细菌科的丰度较 CK 大幅度减少。这主要是因为低分子量聚乙烯微塑料发生了降解, 聚乙烯中所含的增塑剂、稳定剂等有害物质释放到土壤中, 使细菌生长活动受抑[33]。而变形杆菌纲产生的次生代谢物或植物激素可以有效防治病

虫害, 促进植物正常生长[34], 在玉米应对聚乙烯微塑料胁迫中有至关重要作用; 伯克氏菌科为生物降解、生物控制及促进植物生长的根圈微生物[35], 因此这两类细菌受到的危害较低, 丰度较 CK 增加。T3 处理下土壤细菌和真菌的丰度较 CK 都较大幅度增加, 主要是因为高分子量聚乙烯微塑料不容易发生降解, 且降解过程中由于链的分子量、结晶度不同而存在差异, 低分子量的聚乙烯可以穿过微生物的生物膜, 从而被微生物吸收和降解[33], 土壤中高分子量微塑料在降解过程中由于分子链较大不能直接穿过细胞膜进入微生物体内, 经过一系列的非生物因素如光、温度以及生物因素等的作用下, 逐步转化成小分子, 经过降解的小分子或者是乙烯单体被微生物细胞吸收降解, 生成可被植物吸收利用的能源如 CO_2 和 CH_4 等[36], 因此 T3 处理的土壤微生物丰度较 CK 增加。

4　结论

本试验以玉米为研究对象, 分析了添加不同分子量聚乙烯微塑料下玉米矿质元素含量变化及微生物群落的变化特征。矿质元素含量在玉米各部位存在差异, Fe、Cu 主要集中在玉米根部, Ca、Mn、Mg 在叶中分布最多, K 主要集中在茎中; 且在添加不同分子量聚乙烯微塑料后, 不同部位的矿质元素较 CK 增加, 更多的表现为 2000 分子量聚乙烯处理的影响最大。

利用高通量测序方法分析玉米根际微生物群落结构的差异, 发现添加 2000 分子量聚乙烯微塑料对玉米根际微生物影响最大, 除变形杆菌纲、伯克氏菌科细菌丰度增加外, 其他细菌科的丰度较 CK 大幅度减少; 而添加 10 万以上分子量聚乙烯微塑料微生物群落较 CK 增加。添加聚乙烯微塑料使变形杆菌类、粪壳菌纲、伯克氏菌科、丛赤壳科等较 CK 大幅度增加, 这有利于植物土壤微生态系统应对聚乙烯微塑料的胁迫。本试验为研究微塑料对农用土壤的安全性评价提供了一定的参考依据, 同时也为农用土壤中微塑料降解菌的筛选提供了方向。

参考文献 References

[1] 侯军华, 檀文炳, 余红, 等. 土壤环境中微塑料的污染现状及其影响研究进展[J]. 环境工程, 2020, 38(2): 16–27
HOU J H, TAN W B, YU H, et al. Microplastics in soil ecosystem: a review on sources, fate and ecological impact[J]. Environmental Engineering, 2020, 38(2): 16–27

[2] 刘旭. 典型黑土区耕地土壤微塑料空间分布特征[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019: 1–9
LIU X. Spatial distribution of microplastics in mollisol farmland of northeast China[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019: 1–9

[3] RILLIG M C. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil?[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(12): 6453–6454

[4] 罗文雅. 长三角地区不同水域环境中微塑料污染特征研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2019: 1–5
LUO W Y. Microplastic pollution in different waters from Yangtze River Delta, China[D]. Shanghai: East China Normal University, 2019: 1–5

[5] 樊有国. 环境降解地膜残余组分对土壤环境的影响[D]. 绵阳: 西南科技大学, 2014: 12–14
FAN Y G. Effects resides of components of degradable plastic film on soil environment[D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2014: 12–14

[6] 朱莹, 曹淼, 罗景阳, 等. 微塑料的环境影响行为及其在我国的分布状况[J]. 环境科学研究, 2019, 32(9): 1437–1447
ZHU Y, CAO M, LUO J Y, et al. Distribution and potential risks of microplastics in China: a review[J]. Research of Environmental Sciences, 2019, 32(9): 1437–1447

[7] 徐湘博, 孙明星, 张林秀, 等. 土壤微塑料污染研究进展与展望[J]. 农业资源与环境学报, 2021, 38(1): 1–9
XU X B, SUN M X, ZHANG L X, et al. Research progress and prospect of soil microplastic pollution[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2021, 38(1): 1–9

[8] 孟青. 河套灌区土壤中微塑料的赋存特征及其对草甘膦的吸附性能研究[D]. 包头: 内蒙古科技大学, 2020: 10–11
MENG Q. Study on the occurrence characteristics in Hetao irrigated area and the adsorption properties of glyphosate onto microplastics[D]. Baotou: Inner Mongolia University of Science & Technology, 2020: 10–11

[9] LAGANÀ P, CARUSO G, CORSI I, et al. Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica)[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2019, 222(1): 89–100

[10] WANG H T, DING J, XIONG C, et al. Exposure to microplastics lowers arsenic accumulation and alters gut bacterial communities of earthworm *Metaphire* californica[J]. Environmental Pollution, 2019, 251: 110–116

[11] 罗小凤, 朱玲珑, 徐国良, 等. 次微塑料食物暴露对土壤白符跳(*Folsomia candida*)毒性的初步研究[J/OL]. 环境工程, 2020, https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20200725.1648.016.html
LUO X F, ZHU L L, XU G L, et al. Toxicity submicroplastic food exposure to soil collembolans (*Folsomia candida*)[J/OL]. Environmental Engineering, 2020, https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20200725.1648.016.html

[12] 陈玉玲. 微塑料在武汉城郊菜地土壤中的污染现状及其对赤子爱胜蚓的生态毒理研究[D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院武汉植物园), 2020: 7–8
CHEN Y L. A study on microplastics pollution in the vegetable farmlands of suburban Wuhan and the ecotoxicology response of microplastics on earthworms (*Eisenia fetida*)[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020: 7–8

[13] 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

[14] HUERTA LWANGA E, GERTSEN H, GOOREN H, et al. Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*[J]. Environmental Pollution, 2017, 220: 523–531

[15] 连加攀, 沈玫玫, 刘维涛. 微塑料对小麦种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(4): 737–745
LIAN J P, SHEN M M, LIU W T. Effects of microplastics on wheat seed germination and seedling growth[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(4): 737–745

[16] 刘莹莹, 张旗, 崔文智, 等. 聚乙烯微塑料对绿豆发芽的毒性研究[J]. 环境与发展, 2019, 31(5): 123–125
LIU Y Y, ZHANG Q, CUI W Z, et al. Toxicity of polyethylene microplastics to seed germination of mung bean[J]. Environment and Development, 2019, 31(5): 123–125

[17] 张祯明, 罗学刚, 樊有国, 等. 聚乙烯颗粒粉末对土壤化学性质的累积效应[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(11): 115–119
ZHANG Z M, LUO X G, FAN Y G, et al. Cumulative effects of powders of degraded PE mulching-films on chemical properties of soil[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 38(11): 115–119

[18] 张祯明, 罗学刚, 樊有国, 等. 地膜降解物对土壤微生物群落结构和多样性的影响[J]. 水土保持通报, 2016, 36(2): 181–184
ZHANG Z M, LUO X G, FAN Y G, et al. Effects of membrane degradation production on community structure and diversity of soil microorganisms[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2016, 36(2): 181–184

[19] 梁晋刚, 刘鹏程, 张秀杰. 基于 16S rDNA 高通量测序技术研究转基因作物对根际细菌群落结构的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 5–8
LIANG J G, LIU P C, ZHANG X J. Impact of genetically modified crops on rhizosphere bacterial community structure based on 16S rDNA high-throughput sequencing[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(6): 5–8

[20] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics: Oxford, England, 2014, 30(15): 2114–2120

[21] GREGORY CAPORASO J, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335–336

[22] REYON D, TSAI S Q, KHAYTER C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 460–465

[23] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 215(3): 403–410

[24] 孙倩, 吴宏亮, 陈阜, 等. 基于高通量测序的几种不同作物根际土壤细菌群落结构和多样性分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(8): 1490–1498
SUN Q, WU H L, CHEN F, et al. Analysis of bacterial community structure and diversity in rhizosphere soil of several different crops based on high-throughput sequencing[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(8): 1490–1498

[25] 王伟, 布丽根·加冷别克, 胡晓东, 等. 基于高通量测序技术的酿酒葡萄产区土壤微生物多样性[J]. 新疆农业科学, 2020, 57(5): 859–868
WANG W, BULIGEN J, HU X D, et al. Analysis of the microbial community diversity of soil from wine grape productiing area in Xinjiang based on high-throughput sequencing[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2020, 57(5): 859–868

[26] 李丹, 靳鲲鹏, 李小霞, 等. 基于高通量测序技术的玉米不同生育时期土壤细菌多样性变化[J]. 山西农业科学, 2019, 47(9): 1569–1572
LI D, JIN K P, LI X X, et al. Variations of soil bacterial diversity at different growth stages in maize based on high-throughput sequencing[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2019, 47(9): 1569–1572

[27] 詹爱军, 李兆华. 神农箭竹开花前后植物体内矿质元素之动态[J]. 世界竹藤通讯, 2007, 5(1): 12–15
ZHAN A J, LI Z H. Dynamic of mineral elements in umbrella bamboo (*Fargesia murielae*) before and after flowering[J]. World Bamboo and Rattan, 2007, 5(1): 12–15

[28] 沈涛, 贾琳, 杨亚丽, 等. 云南薯蓣属植物矿质元素指纹图谱研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(12): 2332–2339
SHEN T, JIA L, YANG Y L, et al. Mineral elemental fingerprint of *Dioscorea* L. species from Yunnan, China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(12): 2332–2339

[29] BURNS R G, DEFOREST J L, MARXSEN J, et al. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 58: 216–234

[30] ZHANG M J, ZHAO Y R, QIN X, et al. Microplastics from mulching film is a distinct habitat for bacteria in farmland soil[J]. Science of the Total Environment, 2019, 688: 470–478

[31] HUANG Y, ZHAO Y R, WANG J, et al. LDPE microplastic films alter microbial community composition and enzymatic activities in soil[J]. Environmental Pollution, 2019, 254: 112983

[32] YANG S, XING S, LIU C, et al. Effects of root pruning on the vegetative growth and fruit quality of Zhanhuadongzao trees[J]. Horticultural Science, 2010, 37(1): 14–21

[33] DE SOUZA MACHADO A A, KLOAS W, ZARFL C, et al. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems[J]. Global Change Biology, 2018, 24(4): 1405–1416

[34] WU W Z, YANG L H, WANG J L. Denitrification performance and microbial diversity in a packed-bed bioreactor using PCL as carbon source and biofilm carrier[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2725–2733

[35] JIANG P L, ZHAO S Y, ZHU L X, et al. Microplastic-associated bacterial assemblages in the intertidal zone of the Yangtze Estuary[J]. Science of the Total Environment, 2018, 624: 48–54

[36] 康秦宝, 郭见誉, 阮艳军. 低密度聚乙烯生物降解的研究进展[J]. 神华科技, 2016, 14(6): 75–77
KANG Q B, GUO J Y, RUAN Y J. Research progress in microbial degradation of low density polyethylene[J]. Shenhua Science and Technology, 2016, 14(6): 75–77