

氯氟菊酯污染土壤的微生物修复及对土著微生物的影响*

许育新^{1,2†} 李晓慧² 滕齐辉² 陈义¹ 吴春艳¹ 李顺鹏²

(1 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021)

(2 南京农业大学生命科学学院微生物学系, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要 在实验室条件下, 在含有氯氟菊酯的土壤中添加氯氟菊酯和 3-苯氧基苯甲酸 (3-PBA) 降解菌 CDT3 (*Rhodococcus* sp.) 和 PBM11 (*Pseudomonas* sp.), 同时设不加菌的对照。分别于 0、3、7、15、30 d 取样, 测定土壤中氯氟菊酯和 3-PBA 的残留, 同时用平板计数和变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 方法分析土壤微生物群落的变化。结果显示: CDT3 和 PBM11 在土壤中协同作用能够更好地降解氯氟菊酯及其中间产物 3-PBA。氯氟菊酯对土著微生物有较强的抑制作用。投加降解菌可以消除农药对土壤微生物的抑制, 有助于土著微生物种群的恢复, 但短期内无法改变农药对土壤微生物结构的破坏。

关键词 氯氟菊酯; 3-PBA; 降解菌; 土壤微生物; DGGE

中图分类号 Q938

文献标识码 A

氯氟菊酯是拟除虫菊酯类农药的一种, 具有对光、热稳定的特点, 在环境中的半衰期较长, 很难在自然条件下快速降解。在土壤中, 经过水解和光解, 主要代谢产物是 3-苯氧基苯甲酸 (3-PBA) 和二氯菊酸 (DCVA)^[1,2]。3-PBA 与拟除虫菊酯不同, 它可以在土壤中迁移, 它对环境的危险性较菊酯大, 与 3-PBA 类似具有二苯醚醛键的物质广泛存在于自然界中, 如霉菌的次生代谢产物、木质素、甲状腺素、二苯呋喃等其他杀虫剂, 它们对环境存在着潜在的威胁^[3]。对氯氟菊酯的微生物降解已有报道^[4], 但对污染土壤的微生物原位修复, 尤其是两株菌协同降解研究未见报道。

降解菌能否在自然环境中发挥降解作用, 是降解菌投入实际应用的关键, 也是生物修复技术成功的关键^[5-7]。外源投加的微生物本身在环境中的行为和对环境的影响如何, 也是关系到降解菌使用的一个重要问题, 目前也越来越受到关注^[8,9]。土壤是农药残留最集中和最严重的地方, 农药的残留必然会对土壤微生物群落造成破坏。然而土壤也是一个复杂的生态系统, 既要充分发挥降解菌的降解作用, 同时又要防止破坏土壤自然的生态结构, 就有必要研究降解菌对土壤中土著微生物的影响和农药降解的关系。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

取未受氯氟菊酯污染的麦田表层土壤 (0~30 cm), 土壤类型属水稻土类, 潴育型水稻土亚类, 黄泥田土属。土样经风干, 过 20 目筛, 备用。其基本性质为: pH 为 6.9, 有机质含量 22.8 g kg⁻¹。

1.2 菌液

挑取 CDT3 和 PBM11 单菌落接种于 LB 培养基试管中, 30℃ 培养过夜, 转接至 LB 液体培养基中。继续培养至对数生长后期, 平板法计数, 6 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 用无菌水洗涤菌体, 6 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 以适量无菌水重悬菌体, 将菌体浓度调整至 10¹⁰ cfu ml⁻¹, 备用。

1.3 培养基

常用牛肉膏蛋白胨细菌培养基; 高氏 1 号放线菌培养基; 马丁氏真菌培养基; PBA 基础盐培养基 (分离 PBM11 用); 1 L 基础盐培养基中加入 PBA 0.1 g。

1.4 试剂和仪器

10% 氯氟菊酯乳油, 江苏农药研究所农药厂生产; 3-PBA, 纯度 99%, 德国 Merck 公司生产。其他试

* 浙江省科技厅重大科技项目“浙江省主要农产品产地环境质量评价与控制关键技术研究”(2006C12027)、“新型多功能生物肥料创制关键技术研究与产品开发”(2006C12035)资助

† 通讯作者, E-mail: lux_xu@yahoo.com.cn

作者简介: 许育新 (1971~), 男, 江苏南京人, 博士, 主要从事环境微生物技术研究

收稿日期: 2007-01-17; 收到修改稿日期: 2007-04-10

剂均为分析纯, HPLC检测为色谱纯。

SHMADZU GC-14B (ECD)气相色谱; Waters 600液相色谱

1.5 降解菌协同降解土壤中残留农药实验

将土样分为空白、对照、处理 和处理 四组 (编号为空白、CK 和), 每组设 3 个重复, 每个土样 1 000 g, 加入无菌水调节土壤含水量至最大持水量的 60%。空白中不加农药, 其他样品加入农药使土壤中氯氰菊酯的含量为 20 mg kg^{-1} , 喷药 24 h 后, 处理、中施加 10^8 CFU g^{-1} 土的 CDT3 菌, 其他土样喷加等量的无菌水, 在 3 d 后, 处理 中再施加 10^8 CFU g^{-1} 土的 PBM11 菌, 分别于 0, 3, 7, 15, 30 d 取样检测残留的氯氰菊酯和中间产物 (3-PBA) 的含量。

1.6 农药的提取和检测

氯氰菊酯提取: 取 2 g 土样, 加入 10 ml 乙腈, $5 000 \text{ r min}^{-1}$ 振荡 2 min, 离心 10 min, 取上清液 2 ml, 吹干, 正己烷定容至 1 ml, 气相色谱检测, 方法参照文献 [10]。

3-PBA 提取: 取 2 g 土样, 加入 5 ml 甲醇, $5 000 \text{ r min}^{-1}$ 振荡 2 min, 离心 10 min, 取上清, 用 $0.25 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后 HPLC 检测, 方法参照文献 [11]。

1.7 土壤中微生物结构的分析

采用平板活菌计数法, 每个处理土壤分别进行系列稀释, 取合适稀释度的土壤悬液 0.1 ml 分别涂布相应菌群的培养基平板。细菌平板在 30 培养 24 h 后计数 (减去 CDT3 和 PBM11), 真菌在 28 培养 3 d 后计数, 放线菌平板在 30 培养 3 d 后计数。

1.8 土壤细菌 16S rDNA V3 区变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析

土壤总 DNA 的提取参照文献 [12], 土壤细菌 16S rDNA V3 区的扩增和 DGGE 方法参照文献

[13]。PCR 引物为 338F: 5-CGCCCCGCCGCGCGC-GGGCGGGGCGGGGACCGGGGACTCCTACGGGA-GGCAGCAG-3; 518R 5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3, 由上海生工公司合成。DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (含丙酰胺 / 二丙酰胺 (37.5/1)、尿素、甲酰胺和甘油), 其中尿素浓度梯度为 30%~60%。电泳采用 DcodeDGGE 系统 (Bio-Rad), 200 V 电压预电泳 10 min, 然后在 85 V 固定电压下电泳 12 h。电泳结束后进行硝酸银染色, 用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 进行聚类分析, 采用 UPGMA 方法。

2 结果与分析

2.1 土壤中氯氰菊酯和 3-PBA 的降解

分别检测降解 0, 3, 7, 15, 30 d 各组样品中残留的氯氰菊酯和中间产物 (3-PBA) 的含量, 结果见图 1 和图 2。空白没有氯氰菊酯, 图中未列出。

可以看出, 无论是否加入 PBM11 或 CDT3 均可以在 15 d 内降解土壤中 20 mg kg^{-1} 氯氰菊酯, 说明 CDT3 不仅可以在摇瓶中降解氯氰菊酯, 在土壤中同样可以有效地发挥作用, 这就为生物修复的实际应用提供了理论依据。同时, 加入 PBM11 后, 明显加速了氯氰菊酯的降解, 降解时间从 15 d 缩短至 7 d, 速度提高了 1 倍。结合图 2 的结果发现, 在处理组中, 随着氯氰菊酯的降解, 3-PBA 的量也在增加, 且在处理 中, 由于土壤中缺少降解 3-PBA 的细菌, 造成 3-PBA 的积累, 而在处理 中, 由于 PBM11 的加入, 使氯氰菊酯降解过程中产生的 3-PBA 几乎没有积累。分析认为, 3-PBA 的积累可能影响了 CDT3 对氯氰菊酯的降解。

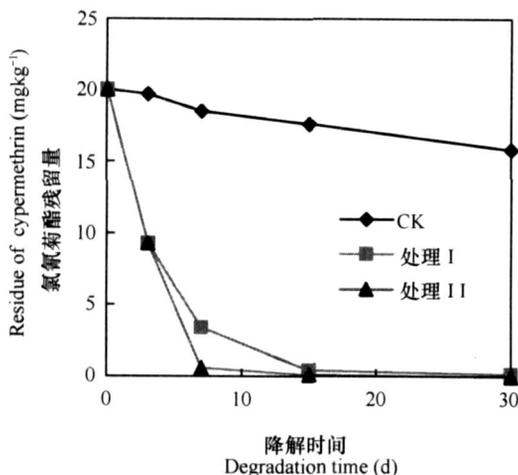


图 1 土壤中氯氰菊酯降解曲线

Fig. 1 Degradation curve of cypermethrin in soil

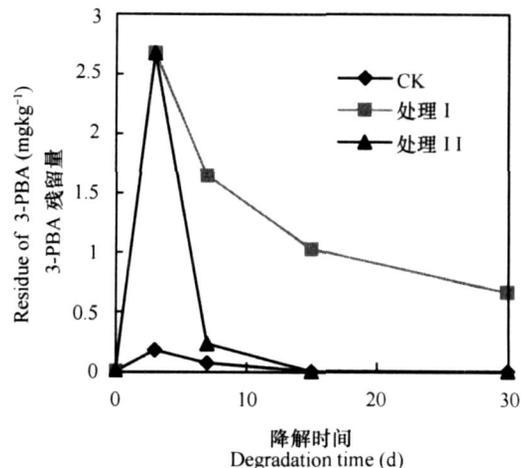


图 2 土壤中 3-PBA 的消长变化曲线

Fig. 2 Variation curve of 3-PBA in soil

2.2 氯氟菊酯污染和施加降解菌对土壤微生物群落结构的影响

采用平板活菌计数法,三大菌群种类根据菌落形态结合镜检,结果见表 1。

从三大菌群的数量上看,施入氯氟菊酯 3 d后,对土壤微生物数量的影响很明显,尤其是细菌,下降了两个数量级,种类也减少了约 1/3。同时真菌种类也明显减少,放线菌也下降了一个数量级,种类也有所减少。处理组中,当加入 CDT3菌 2 d后,土壤中微生物的数量和种类均有所恢复。加入农

药 7 d后,对照组中的细菌和放线菌的种类和数量进一步减少,真菌有所恢复。处理(加 CDT3)中加入 CDT3菌 6 d后,结果也与对照组一样,细菌和放线菌的数量出现了下降。处理(加入 CDT3和 PBM11)加入 PBM11菌 4 d后,细菌种类较降解 3 d时的数量有所下降,但不像对照组和处理组那么明显。当加入农药 15 d后,对照组中微生物数量和种类均有所恢复,与空白比较处理、处理中的微生物种类和数量却没有显著恢复,处理中的细菌甚至出现了下降。

表 1 土壤中细菌、真菌、放线菌的数量

Table 1 Populations of microorganisms in soil(CFU g⁻¹)

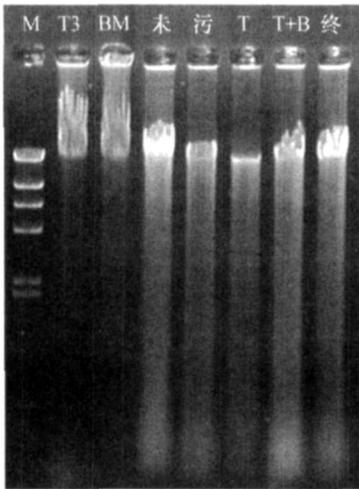
降解时间 Degradation time (d)	加 CDT3 时间 Time CDT3 added (d)	加 PBM11 时间 Time PBM11 added (d)	处理编号 Treatment No.	细菌 Bacteria		真菌 Fungi		放线菌 Actinomycetes	
				数量 Count	种类 Species	数量 Count	种类 Species	数量 Count	种类 Species
				0	—	—	空白 CK	3.8 ×10 ⁸ 6.0 ×10 ⁶	15 10
3	2	0	CK	1.0 ×10 ⁸ 1.0 ×10 ⁸ 1.0 ×10 ⁷	12 12 2	8.0 ×10 ⁴ 8.0 ×10 ⁴ 1.1 ×10 ⁵	2 2 4	6.0 ×10 ⁴ 6.0 ×10 ⁴ 2.5 ×10 ⁴	6 6 2
7	6	4	CK	3.0 ×10 ⁷ 3.4 ×10 ⁸	3 5	3.0 ×10 ⁴ 3.0 ×10 ⁴	4 4	2.0 ×10 ⁴ 6.0 ×10 ⁴	2 5
15	14	12	CK	1.6 ×10 ⁸ 5.0 ×10 ⁸ 4.3 ×10 ⁷	10 3 3	6.0 ×10 ⁴ 5.0 ×10 ⁴ 2.5 ×10 ⁴	5 4 5	1.2 ×10 ⁵ 4.0 ×10 ⁴ 1.5 ×10 ⁵	4 3 3

图 3和图 4为土壤细菌总 DNA的 DGGE谱带。从图 3中可以看到,提取的土壤细菌总 DNA的浓度和纯度较高,完全可以满足 PCR扩增的要求。由图 4结果可见,每一个样品中均扩增出了细菌 16S rDNA V3区的条带。除添加农药 3 d后的样品中条带浓度较低外,其他样品的浓度均较高,这可能由于氯氟菊酯的加入影响了 PCR扩增。从图 5 DGGE的谱带和聚类分析显示,氯氟菊酯能够显著改变土壤微生物的群落结构,土壤微生物种群数量有所降低,在加入降解菌 CDT3和 PBM11后,种群数量逐步增加。两种降解菌单独或共同加入土壤后,对土壤微生物群落组成的影响是相似的,但是短期内不能恢复到农药加入之前的群落结构。

3 讨论与结论

以上结果表明,CDT3和 PBM11在土壤中协同作用能够更好地降解氯氟菊酯及其中间产物。本研究发现在土壤降解过程中能检测到的 3-PBA 较理论含量要低,这可能是由于在复杂的土壤生态环境中氯氟菊酯的降解产物并非仅有 3-PBA 一种,也有可能被土壤中的土著微生物转化为其他结构的物质,并进一步利用,从而检出的含量较低。但是即使是低含量的 3-PBA 积累,也对 CDT3产生了反馈抑制作用。

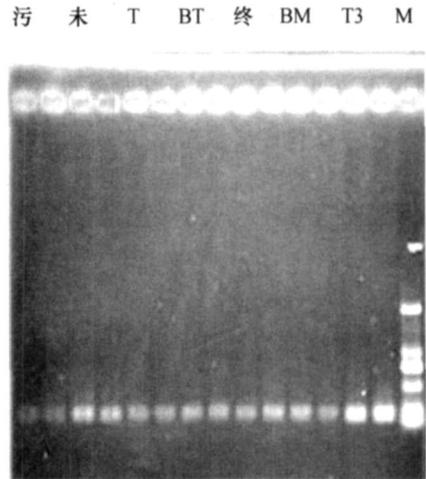
本研究以可培养的微生物为对象,研究了农药



M: λ -Hind III 分子量标准; 未: 初始; 污: 加农药 3d; T: 加 CDT3 后 3 d; T + B: 加 PBM11 后 3 d; 终: 加 CDT3 & PBM11 后 20 d
M: λ -Hind III marker; T3: CDT3; BM: PBM11; 未: Initial; 污: D3 of addition of pesticide; T: D3 of addition of CDT3; T + B: D3 of addition of CDT3 & PBM11; 终: D20 of addition of CDT3 & PBM11

图3 土壤细菌总 DNA

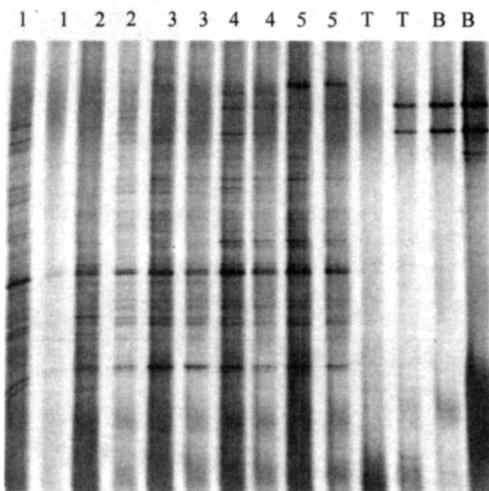
Fig. 3 Total DNA of bacteria extracted from soils



未: 初始; 污: 加农药 3 d; T: 加 CDT3 3 d; BT: 加 CDT3 & PBM11 3 d; 终: 加 CDT3 & PBM11 20 d; BM: PBM11; T3: CDT3; M: 分子量标准
未: Initial; 污: D3 of addition of pesticide; T: D3 addition of CDT3; BT: D3 of addition of CDT3 & PBM11; 终: D20 of addition of CDT3 & PBM11; M: DL2000 marker

图4 土壤细菌 16S rDNA V3 区 PCR 产物

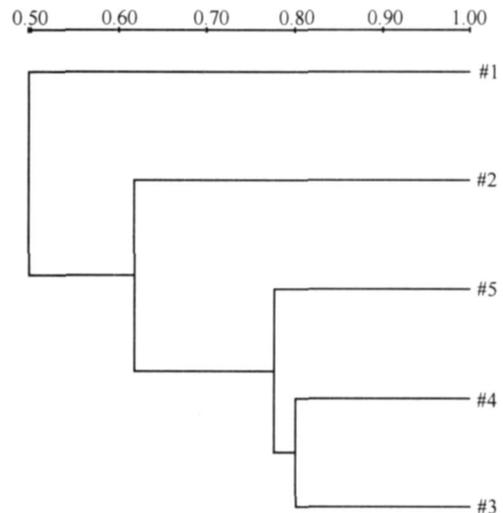
Fig. 4 PCR amplification of 16S rDNA V3 region



1: 初始; 2: 加农药 3 d; 3: 加 CDT3 3 d; 4: 加 CDT3 & PBM11 3 d; 5: 加 CDT3 & PBM11 20 d
1: Initial; 2: D3 of addition of pesticide; 3: D3 of addition of CDT3; 4: D3 of addition of CDT3 & PBM11; 5: D20 of addition of CDT3 & PBM11

图5 土壤细菌 16Sr DNA V3 区 DGGE 图谱和相似性分析

Fig. 5 DGGE pattern and similarities of the 16S rDNA V3 fragments of the bacteria in soil



和降解菌的使用对土壤微生物群落的影响,尤其是两菌株协同作用的影响。而目前公认可培养微生物只占微生物总量的 1% 左右^[14],因此又用分子生态学的方法 (DGGE) 作进一步研究和分析^[15]。结果表明,两种方法得出的结论基本是一致的。从微生物群落变化结果来看,本研究可以得出以下初步

结论: (1) 氯氰菊酯对土著微生物有较强的抑制作用,但这种抑制可以通过土著微生物的适应而慢慢消除; (2) 投加 CDT3 和 PBM11,开始时可以消除农药对土著微生物的抑制,有助于土著微生物种群的恢复,但即使农药被基本降解,土著微生物的种群在短时间仍无法恢复到初始的水平,可见农药对土

著微生物有较强的伤害作用; (3) 根据分离培养计数的结果结合显微镜观察, 本研究认为氯氰菊酯的抑制作用同样是有选择性的, 敏感类群受到抑制, 能耐受或能降解该农药的微生物类群由于营养和生态位竞争者减少而增殖, 如细菌中的假单胞菌和真菌中的某种酵母和白霉等。表现为土壤微生物的总数影响不大, 但组成结构却发生了改变。当然, 这只是可培养微生物的表现, 至于其他未培养土著微生物的变化情况, 还要通过序列测定等分析方法来做进一步研究。

致谢 衷心感谢中国科学院南京土壤研究所滕应博士、秦华硕士在 DGGE 分析中给予的大力帮助。

参考文献

- [1] Mabny S E, Maule A, Smith A R W. Microbial transformation of the pyrethroid insecticide: Permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluralinate Appl Environ Microbiol, 1988, 54(11): 2 874 ~ 2 876
- [2] 张宗炳主编. 杀虫药剂的环境毒理学. 北京: 农业出版社, 1989. Zhang Z B. Environmental Toxicology of Pesticides (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1989
- [3] Elliott M, Janes N F, Potter C. The future of pyrethroids in insect control Annu Rev Entomol, 1978, 23: 443 ~ 469
- [4] 丁海涛, 李顺鹏, 沈标, 等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究. 土壤学报, 2003, 40(1): 124 ~ 129. Ding H T, Li S P, Shen B, et al Isolation of pyrethroids degrading strain and its physiological characteristics (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(1): 124 ~ 129
- [5] 顾继东. 国外环境生物技术的发展 and 展望. 生物技术通报, 1999, (6): 8 ~ 12. Gu J D. Environmental biotechnology: Development and perspectives (In Chinese). Biotechnology Information, 1999, (6): 8 ~ 12
- [6] 林力, 杨惠芳. 生物整治技术进展. 环境科学, 1997, 18(3): 67 ~ 71. Lin L, Yang H F. Progresses of bioremediation studies and applications (In Chinese). Chinese Journal of Environmental Science, 1997, 18(3): 67 ~ 71
- [7] 张甲耀, 李静, 夏威林, 等. 生物修复技术研究进展. 应用与环境生物学报, 1996, 2(2): 193 ~ 199. Zhang J Y, Li J, Xia W L, et al Bioremediation researches (In Chinese). Chin J Appl Environ Biol, 1996, 2(2): 193 ~ 199
- [8] 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展. 土壤, 2004, 36(6): 577 ~ 583. Li S P, Jiang J D. Microbial remediation of pesticide-contaminated soil (In Chinese). Soils, 2004, 36(6): 577 ~ 583
- [9] 叶央芳, 闵航. 代谢指纹评估苯噻草胺对水稻土微生物群落的短期影响. 土壤学报, 2006, 43(2): 287 ~ 294. Ye Y F, Min H. Monitoring of short-term impact of mefenacet treatment on paddy soil microbial communities with metabolic fingerprinting (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(2): 287 ~ 294
- [10] 秦曙, 乔雄梧, 朱九生, 等. 实验室条件下氯氰菊酯在土壤中的降解. 农药学学报, 2000, 12(9): 68 ~ 73. Qin S, Qiao X W, Zhu J S, et al Degradation of cypermethrin in soils under laboratory conditions (In Chinese). Chinese Journal of Pesticide Science, 2000, 12(9): 68 ~ 73
- [11] Rolf U H, Tepp S, Barbara G H, et al Degradation of 3-Phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (pPOB) and two modified pseudomonas strains Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3 354 ~ 3 359
- [12] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 316 ~ 322
- [13] Muyzer G, de Weal E C, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 695 ~ 700
- [14] Newman D K, Banfield J F. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems Science, 2002, 296: 1 071 ~ 1 077
- [15] 张惠文, 张倩茹, 周启星, 等. 分子微生物生态学及其研究进展. 应用生态学报, 2003, 14(2): 286 ~ 292. Zhang H W, Zhang Q R, Zhou Q X, et al Introduction and progress of molecular microbial ecology (In Chinese). Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(2): 286 ~ 292

M I C R O B I A L R E M E D I A T I O N O F C Y P E R M E T H R I N - C O N T A M I N A T E D S O I L A N D E F F E C T O N S O I L M I C R O B I A L C O M M U N I T I E S

Xu Yuxin^{1,2†} Li Xiaohui² Teng Qihui² Chen Yi¹ Wu Chunyan¹ Li Shunpeng²

(1 Environmental Resources and Soil Fertilizer Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

(2 Department of Microbiology, College of Life Science, Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract An experiment was conducted in lab by inoculating cypermethrin-contaminated soil, separately, with cypermethrin, 3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA)-degrading bacteria CDT3 (*Rhodococcus* sp.) and PBM11 (*Pseudomonas*

sp.) to study their effects on microbial remediation of the contaminated soil and soil microbial communities. Samples were collected from the inoculated soils and CK (uninoculated) on D0, D3, D7, D15, and D30 for analysis of residues of cypemethrin and 3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA) in the soil as well as monitoring of dynamics of the microbial communities in the soil, using the plate counting method and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method. The analysis results show that the cooperation of CDT3 and PBM11 promoted the degradation of cypemethrin and its metabolite 3-PBA in the soil. As cypemethrin inhibits significantly native edaphon in soil, inoculation of these degrading-bacteria could eliminate the inhibitive effect of cypemethrin on edaphon, thus promoting restoration of indigenous microbial population and communities. But it could not be expected that the damage cypemethrin brings to the soil microbial structure could be removed within a short period of time.

Key words Cypemethrin; 3-PBA; Degrading-bacteria; Soil microbes; DGGE