

假单胞菌菌株 CTN-3 对百菌清污染土壤的生物修复^{*}

王光利^{1,2} 陈宏宏¹ 毕 萌¹ 李顺鹏^{1**}

(¹南京农业大学生命科学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; ²淮北师范大学生命科学学院资源植物学安徽省重点实验室, 安徽淮北 235000)

摘 要 百菌清被美国环境保护署列为优先控制污染物, 利用微生物的降解作用修复被污染的土壤、清除环境中的污染物等具有重要的现实意义. 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 菌株 CTN-3 是一株从污染土壤中分离得到的百菌清降解菌, 考察了其在实验室条件下对百菌清污染土壤的生物修复能力及其影响因素. 结果表明: 降解菌株在灭菌土壤中的降解效果略好于未灭菌土壤; 在外源添加降解菌 10^6 CFU · g⁻¹、温度 15 ~ 30 °C 和 pH 5.8 ~ 8.3 条件下, 该菌株能有效降解土壤中 10 ~ 200 mg · kg⁻¹ 的百菌清. 菌株 CTN-3 在百菌清污染土壤的生物修复中具有良好的应用前景.

关键词 百菌清 假单胞菌 生物修复 影响因素

文章编号 1001-9332(2012)03-0807-05 **中图分类号** X53, X172 **文献标识码** A

Bioremediation of chlorothalonil-contaminated soil by utilizing *Pseudomonas* sp. strain CTN-3. WANG Guang-li^{1,2}, CHEN Hong-hong¹, BI Meng¹, LI Shun-peng¹ (¹ Ministry of Agriculture Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² Anhui Province Key Laboratory of Plant Resources and Biology, College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, Anhui, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2012, 23(3): 807-811.

Abstract: Chlorothalonil is the priority organic pollutant listed by the U. S. Environmental Protection Agency. To utilize the function of microbial degradation in the bioremediation of chlorothalonil-contaminated soil is of practical significance. In this study, a chlorothalonil-degrading *Pseudomonas* sp. strain CTN-3 isolated from pesticide-contaminated soil was used to examine the chlorothalonil-degrading capacity of the strain and related affecting factors in a microcosm. In sterilized soil, the effect of CTN-3 on chlorothalonil degradation was better than that in unsterilized soil. Various factors, including soil pH, temperature, initial chlorothalonil concentration, and inoculum size, affected the degradation of chlorothalonil by the strain. With the inoculum size of 10^6 CFU · g⁻¹ soil, the CTN-3 at 15-30 °C and pH 5.8-8.3 could effectively degrade 10-200 mg · kg⁻¹ of chlorothalonil, suggesting that the strain CTN-3 had great potential in the bioremediation of chlorothalonil-contaminated soil.

Key words: chlorothalonil; *Pseudomonas* sp.; bioremediation; affecting factor.

百菌清(四氯间苯二腈)是一种广谱的氯代苯芳香族化合物杀菌剂, 在环境中较稳定, 残效期长, 且具有明显的蓄积毒性, 被美国环境保护署列为人类潜在的致癌物质. 其在农业生产中使用已 30 年之久. 在美国, 百菌清是使用第二多的杀菌剂, 年使用

量为 5000 t^[1], 我国百菌清年产量超过 8000 t. 百菌清主要用于防治蔬菜、瓜果、花生、水稻、小麦等作物病害^[2]. 由于其使用广泛, 土壤、水体、温室大棚气体和农产品中均可检测到百菌清^[3-6], 其污染修复是科研工作者关注的话题.

百菌清可以通过光化学和臭氧等方法降解^[7-9], 然而这些方法成本较高, 不适合于面源污染的修复. 微生物是环境中污染物降解的主力军, 利用

^{*} 国家自然科学基金项目(31100083, 31070100)和中国热带农业科学院环资所重大专项(2010hzzsdx001)资助.

^{**} 通讯作者. E-mail: lsp@njau.edu.cn

2011-04-23 收稿, 2011-12-08 接受.

微生物或酶进行污染环境的修复被公认为是一种安全、有效、廉价和无二次污染的方法,具有广阔的应用前景。因此,研究百菌清农药的微生物降解与修复具有重要的意义。Zhang 等^[10]报道了一株蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) NS1 可以共代谢降解低浓度的百菌清。Sato 等^[11]发现,百菌清在土壤含水量为 60%、温度为 30 ℃ 时可以发生快速降解,并同时发现土壤中许多细菌也能够降解百菌清。Motomaga 等^[12]分离到百菌清降解菌 TBI,能在外加碳源的情况下将百菌清降解为羟基-三氯苯二腈(TPN-OH)和 Cl^- 。尽管百菌清在土壤中的代谢已有一些报道^[11,13-15],但相关菌株仅能以共代谢的方式降解低浓度的百菌清($\leq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[10,16],而不依赖于外加碳源的高效百菌清降解菌的微生物修复还未见报道。本实验室在前期工作的基础上分离到 16 株百菌清降解菌^[17-20],本文选取其中降解效率最高的菌株 CTN-3 作为研究对象,在实验室模拟条件下,研究各种环境因子对其修复百菌清污染土壤效率的影响,旨在为其在生物修复中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

中性土壤采自南京农业大学校园内菜园表层土(0~15 cm),为棕壤土,pH 6.9,有机质含量 $20.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。碱性土壤采自河南濮阳南乐县菜园表层土(0~15 cm),为碱土,pH 8.0~8.5,有机质含量 $16.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。酸性土壤采自福建漳州菜园土,为赤红壤,pH 5.5~6.0,有机质含量 $25.58 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。以上土壤均未使用过百菌清,土壤经风干、过筛(5 mm),备用。

1.2 供试菌液

菌株 CTN-3 属假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),由本实验室从长期受百菌清污染的土壤中分离得到,能不依赖于外加碳源在 12 h 内几乎完全转化 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的百菌清^[18]。

菌悬液的制备:将 CTN-3 接种在 LB 液体培养基中,于 30 ℃ $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养至对数生长后期, $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集菌体并用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,再用磷酸盐缓冲液重悬控制菌体浓度至所需浓度备用。

1.3 试验设计

将百菌清按 $10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度配成甲醇溶液备用。将供试土壤装入盆(上口径 8.5 cm、下口径 5.0 cm,高 7.5 cm)中,每盆 0.1 kg,加入 4 mL 水,使

土壤含水量达到 40% (V/W) 左右。

1.3.1 CTN-3 对灭菌和未灭菌土壤百菌清降解的影响试验 分别向灭菌和未灭菌土中施 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 百菌清,并加入 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 菌剂 CTN-3,以不加农药和菌剂 CTN-3 及加农药和灭活菌剂为对照。置于 30 ℃ 的恒温培养箱中培养。

1.3.2 土壤 pH 对 CTN-3 降解百菌清的影响试验 分别向采自不同地区不同 pH 值的土样中加入 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 百菌清,均匀加入 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 菌剂 CTN-3,对照不加菌剂。置于 30 ℃ 的恒温培养箱中培养。

1.3.3 温度对 CTN-3 降解百菌清的影响试验 将加有 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 百菌清和 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 菌剂 CTN-3 的供试土壤分别置于 15、20、25、30、35 和 40 ℃ 的恒温培养箱中培养,对照不加菌剂。

1.3.4 接种量对 CTN-3 降解百菌清的影响试验 将加有 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 百菌清的供试土壤均匀地加入 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 和 $10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 菌剂 CTN-3,置于 30 ℃ 的恒温培养箱中培养。

1.3.5 农药初始浓度对 CTN-3 降解百菌清的影响试验 向加有 10、20、50、100、150 和 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 百菌清的供试土壤中均匀地加入 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 菌株 CTN-3,置于 30 ℃ 的恒温培养箱中培养。

以上试验均 3 次重复,土壤含水量保持在 40% (V/W) 左右,黑色薄膜封口,避免农药的光解,留有少许气孔,以维持水分并通气。期间每日取 5.0 g 土壤样品进行分析。

1.4 土壤中百菌清的提取与测定

土壤中百菌清的提取参照 Motomaga 等^[12]的方法并作改进:将含有百菌清的土壤风干,称取土壤 5.0 g,加入 10 mL 丙酮/水混合溶剂(V/V=1:1)静置 30 min,充分混匀 5 min,将悬浊液过滤。取 5 mL 的过滤液分别用 5 mL 二氯甲烷提取 3 次,在室温下用旋转蒸发器浓缩至干。用色谱纯的甲醇溶解后,用孔径 0.25 μm 的有机相针头过滤器过滤,用气相色谱法测定土壤样品中百菌清的含量。气相色谱测定条件:GC-14B 气相色谱仪,ECD 检测器,25 m 长、大口径石英毛细管柱作为分离柱。空气: $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 氢气: $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 载气(N_2): $150 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 补偿气(N_2): $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测器温度: 250 ℃; 柱温: 250 ℃; 进样口温度: 190 ℃; 进样量: 1.0 μL ; 正己烷作为溶剂,外标法按峰面积定量。百菌清在土壤中的最小检测限为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.5 数据处理

试验数据采用 DPS V2.00 版软件进行统计分析和显著性检验.

2 结果与分析

2.1 CTN-3 对灭菌和未灭菌土壤中百菌清的降解

降解菌能否在自然条件下充分发挥其降解功能,是该菌株能否真正走向大田应用的关键.从图 1 可以看出,空白处理中未检测到百菌清,表明供试土壤中不存在百菌清,因此没有干扰试验结果的物质存在;对照处理中,百菌清有所降解,但降解速度缓慢,4 d 降解率约为 20%,表明百菌清在土壤中的自然降解较慢.在灭菌土和未灭菌土中百菌清都有较快的降解,能够在 5 d 内几乎完全降解 50 mg · kg⁻¹ 百菌清,且灭菌土的降解速率比未灭菌土高.这可能是由于土壤中的土著微生物对外源微生物有一定的竞争抑制作用.

2.2 土壤 pH 值对百菌清降解的影响

从图 2 可以看出,菌株 CTN-3 能够在 5 d 内较好地降解不同 pH 类型的土壤,且在 pH 6.9 土壤中的降解速率较快,这和 Liang 等^[19]有关菌株 CTN-11 降解液体中百菌清的研究结果类似.表明 CTN-3 能够对接近中性的土壤进行较好的生物修复,完全降解土壤中的百菌清.

2.3 温度对百菌清降解的影响

从图 3 可以看出,菌株 CTN-3 在 15 ~ 40 ℃ 温度条件下修复百菌清污染土壤时,前 5 d 降解速度较快,降解率在 46% ~ 99%;之后,高于 30 ℃ 温度条件下百菌清降解缓慢,这可能与菌株 CTN-3 在高于

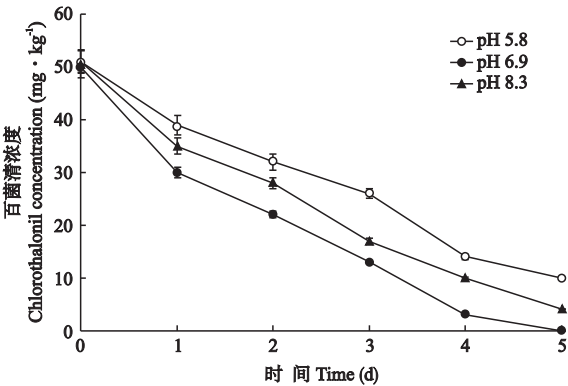


图 2 土壤 pH 值对 CTN-3 降解土壤中百菌清的影响
Fig.2 Effect of soil pH on bioremediation of chlorothalonil in the soil by CTN-3.

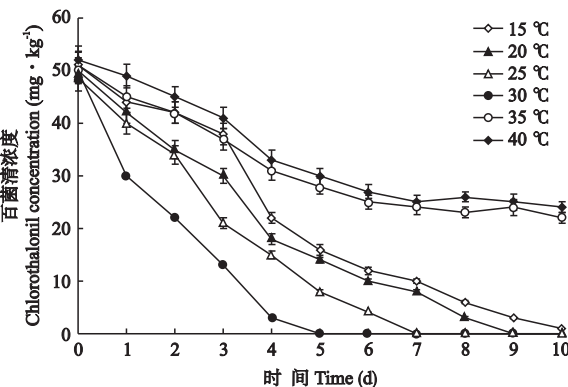


图 3 土壤温度对 CTN-3 降解百菌清的影响
Fig.3 Effect of soil temperature on chlorothalonil degradation by strain CTN-3.

30 ℃ 温度条件下的存活时间短、活性下降快有关.在温度低于 30 ℃ 时,温度越低降解速率越慢,在 15 ℃ 时需要 10 d 才能完全降解.表明菌株 CTN-3 在 15 ~ 30 ℃ 条件下能够对百菌清污染土壤进行较好的生物修复,而高于 30 ℃ 时,其生物修复作用受到抑制.

2.4 接种量对百菌清降解的影响

从图 4 可以看出,人工接种降解菌可以有效地去除土壤中百菌清的残留,接种量越大,降解效果越好.接种量与降解速率呈一定的正相关.在实际应用中,考虑到成本,选择接入 10⁶ CFU · g⁻¹ 的降解菌,就可达到较为理想的修复效果.

2.5 农药初始浓度对百菌清降解的影响

从图 5 可以看出,菌株 CTN-3 对 10 ~ 100 mg · kg⁻¹ 浓度的百菌清具有较好的降解效果,而对高于 100 mg · kg⁻¹ 的百菌清降解效果稍逊.当农药浓度达到 200 mg · kg⁻¹ 时,未投加降解菌的土壤中 10 d 农药的自然降解率仅为 16.0%,而投加降解

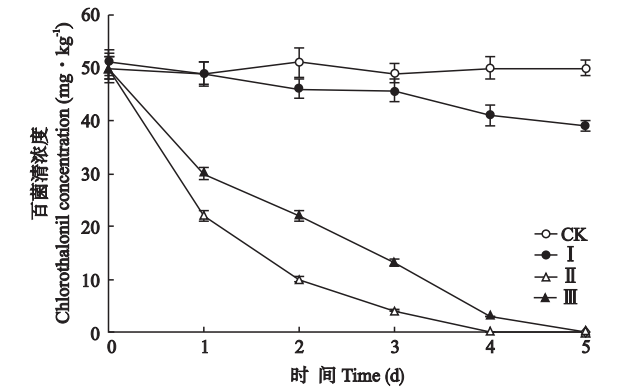


图 1 灭菌和未灭菌土壤中百菌清的降解
Fig.1 Degradation of chlorothalonil in the sterilized and unsterilized tested soils.

CK:对照 Control; I:未灭菌土+灭活菌 Unsterilized tested soil with sterilized CTN-3; II:灭菌土+降解菌 Sterilized tested soil with CTN-3; III:未灭菌土+降解菌 Unsterilized tested soil with CTN-3.

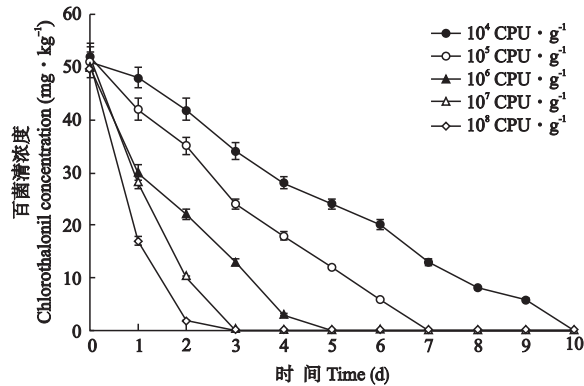


图 4 接种量对 CTN-3 降解百菌清的影响

Fig. 4 Effect of inoculum size on chlorothalonil degradation by strain CTN-3.

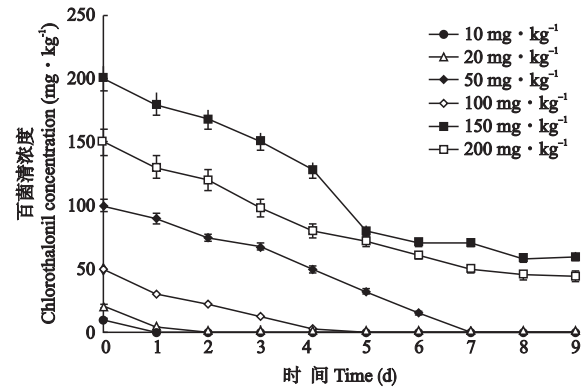


图 5 农药初始浓度对 CTN-3 降解百菌清的影响

Fig. 5 Effect of initial chlorothalonil concentration on its degradation by CTN-3.

菌的土壤中农药的残留量仅为 $60.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 生物强化降解率达到 54%, 降解率提高了 3.38 倍。

3 讨 论

污染物在土壤中的残留受到许多因素的影响, 如土著微生物的竞争作用、环境温度、pH 值、接种量和污染物的浓度等, 这些因素决定着接种菌剂是否能够在环境中发挥作用. 本研究结果表明, 接种菌株 CTN-3 能够克服土著微生物的竞争效应, 在非灭菌的风干土壤中发挥生物强化作用. 土壤 pH 对降解有毒污染物有重要影响, 因为其可能影响土著微生物的生长代谢^[21], 也可能使污染物不稳定^[19]. 本研究中 CTN-3 能够较好地降解 3 种不同 pH 类型的土壤. 温度是另一个影响生物修复效率和程度的非生物因素, Leahy 等^[22]研究表明, 降解率通常会随温度的降低而降低. 本研究中也出现了类似的现象, 菌株 CTN-3 对百菌清的降解最适温度为 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 而常温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下虽然其降解效率有所下降, 但也具有较好的

修复效果. 接种量是决定生物修复效果的重要因素. 合适的接种量不仅可以增加生物修复成功的几率^[23], 而且可以减少成本支出^[24-26]. 本研究结果表明, 当接种量为 $10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 时, 可以很好地降解百菌清. 污染物的浓度对微生物降解活性有着很大的影响. 当百菌清的浓度低于 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 菌株 CTN-3 能够完全降解百菌清. 当农药浓度高于 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 土壤中会有部分百菌清残留, 这可能是由于百菌清降解过程中所累积的代谢产物羟基化百菌清^[18], 对土壤微生物有一定的毒害作用, 从而影响到对百菌清的彻底降解.

到目前为止, 能够降解羟基化百菌清的纯培养物还未见报道^[19]. 因此, 在后续研究中, 分离、筛选能够矿化百菌清或能进一步降解羟基化百菌清的微生物菌种资源或构建多功能百菌清降解菌株, 对于百菌清污染土壤的生物修复具有重要的意义.

参考文献

[1] Cox C. Chlorothalonil. *Journal of Pesticide Reform*, 1997, **17**: 14-20

[2] Shi X-Z (史秀珍), Li S-D (李世东), Guo R-J (郭荣君), et al. Detection of the biodegradation products of chlorothalonil by *Ochrobactrum lupini* TP-D1. *Journal of Beijing University of Chemical Technology* (北京化工大学学报), 2007, **3**(suppl. II): 910-913 (in Chinese)

[3] Valverde-Garcia A, Gonzalez-Pradas E, Aguilera-Del RA, et al. Determination and degradation study of chlorothalonil residues in cucumbers, peppers, and cherry tomatoes. *Analytica Chimica Acta*, 1993, **276**: 15-23

[4] Chaves A, Shea D, Cope WG. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rican banana plantation. *Chemosphere*, 2007, **69**: 1166-1174

[5] Chaves A, Shea D, Danehower D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. *Chemosphere*, 2008, **71**: 629-638

[6] Chen J-M (陈建民), Wang X-G (王晓光), Xue J (薛健), et al. Study on determination of chlorothalonil residues in *Panax quinquefolium* by gas chromatography. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志), 1995, **15**(4): 32-35 (in Chinese)

[7] Hua R-M (花日茂), Li X-Q (李湘琼), Li X-D (李学德), et al. Photochemical degradation of butachlor in different water. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 1999, **10**(1): 57-59 (in Chinese)

[8] Li X-D (李学德), Hua R-M (花日茂), Yue Y-D (岳永德), et al. 2006. Photochemical degradation of chlorothalonil in aqueous solution. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(6): 1091-1094 (in Chinese)

- [9] Binkley RW, Kirstner GL, Opaskar VC, *et al.* Photochemical reaction of 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile. *Chemosphere*, 1977, **6**: 163–166
- [10] Zhang YQ, Lu JH, Wu LS, *et al.* Simultaneous removal of chlorothalonil and nitrate by *Bacillus cereus* strain NS1. *Science of the Total Environment*, 2007, **382**: 383–387
- [11] Sato K, Tanaka H. Degradation and metabolism of a fungicide, 2,4,5,6-tetra-chloroisophthalonitrile (TPN) in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1987, **3**: 205–209
- [12] Motonaga K, Takagi K, Matumoto S. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, **23**: 340–345
- [13] Regitano JB, Tornisiello VL, Lavorenti A, *et al.* Transformation pathways of ¹⁴C-chlorothalonil in tropical soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, **40**: 295–302
- [14] Rouchaud J, Roucourt P, Vanachter A, *et al.* Hydrolytic biodegradation of chlorothalonil in the soil and in cabbage crops. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 1988, **17**: 59–68
- [15] Yu YL, Shan M, Fang H, *et al.* Responses of soil microorganisms and enzymes to repeated applications of chlorothalonil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, **54**: 10070–10075
- [16] Katayama A, Ukai T, Nomura K, *et al.* Formation of a methylthiolated metabolite from the fungicide chlorothalonil by soil bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, **56**: 1520–1521
- [17] Wang GL, Wang L, Chen HH, *et al.* *Lysobacter ruishe-nii* sp. nov., a chlorothalonil-degrading bacterium isolated from a long-term chlorothalonil-contaminated soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, **61**: 674–679
- [18] Wang GL, Li R, Li SP, *et al.* A novel hydrolytic dehalogenase for the chlorinated aromatic compound chlorothalonil. *Journal of Bacteriology*, 2010, **192**: 2737–2745
- [19] Liang B, Li R, Jiang D, *et al.* Hydrolytic dechlorination of chlorothalonil by *Ochrobactrum* sp. CTN-11 isolated from a chlorothalonil-contaminated soil. *Current Microbiology*, 2010, **61**: 226–233
- [20] Liang B, Wang GL, Zhao YF, *et al.* Horizontal transfer of the chlorothalonil hydrolytic dehalogenase gene facilitates bacterial adaptation to chlorothalonil-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, **77**: 4268–4272
- [21] Hong Q, Zhang ZH, Hong YF, *et al.* A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia* sp. FDS-1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, **59**: 55–61
- [22] Leahy GJ, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology Reviews*, 1990, **54**: 305–315
- [23] Comeau Y, Greer CW, Samson R. Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, **38**: 681–687
- [24] Miethling R, Karlson U. Accelerated mineralization of pentachlorophenol in soil upon inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 4361–4366
- [25] Rousseaux S, Hartmann A, Lagacherie B, *et al.* Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: Effects of different inoculum densities. *Chemosphere*, 2003, **51**: 569–576
- [26] Ramadan MA, el-Tayeb OM, Alexander M. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**: 1392–1396

作者简介 王光利,男,1978年生,博士,讲师.主要从事环境污染物的微生物降解与修复研究,发表论文近20篇. E-mail: wanf-3344@163.com.

责任编辑 肖红
