

# 1,3-二氯苯对芦苇湿地土壤生物活性的影响

梁慧星<sup>1,2</sup> 陈爱辉<sup>2</sup> 丁成<sup>2\*</sup> 李朝霞<sup>2</sup> 吴小芹<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院 江苏 南京 210000)

(2. 盐城工学院环境科学与工程学院 江苏 盐城 224051)

**摘要:** 采用传统微生物培养及酶学方法, 研究了 1,3-二氯苯(1,3-DCB)对芦苇湿地土壤微生物及酶活的影响。结果表明, 1,3-DCB 处理芦苇湿地土壤对微生物不同类群影响不同, 其中对细菌和放线菌生长具有抑制作用, 各浓度 1,3-DCB 处理对放线菌的抑制较为显著, 浓度高于 120  $\mu\text{g/g}$  显著抑制对细菌的生长。1,3-DCB 对真菌表现为先刺激后抑制。在实验过程中, 1,3-DCB 可显著抑制湿地土壤过氧化氢酶和多酚氧化酶的活性, 表明这 2 种酶是 1,3-DCB 污染芦苇湿地土壤的敏感指标。

**关键词:** 1,3-二氯苯, 微生物种群, 过氧化氢酶, 多酚氧化酶

## Influences of 1,3-dichlorobenzene on biological activity in reed wetland soil

LIANG Hui-Xing<sup>1,2</sup> CHEN Ai-Hui<sup>2</sup> DING Cheng<sup>2\*</sup> LI Zhao-Xia<sup>2</sup> WU Xiao-Qin<sup>1</sup>

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

(2. School of Environmental Science and Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng, Jiangsu 224051, China)

**Abstract:** With traditional microbiological culture and enzyme method, the effect of 1,3-dichlorobenzene (1,3-DCB) on reed wetland soil microbial and enzyme activities was studied. Results demonstrated that different groups of oil microorganisms have different responses to 1,3-DCB, in which the actinomycetes was significantly inhibited. When the 1,3-DCB concentration was higher than 120  $\mu\text{g/g}$ , the bacterial amounts were significantly inhibited. The soil fungi amounts were initially increased at the beginning of the experiment but inhibited with time. During the experiment, 1,3-DCB treatment could significantly inhibit the soil catalase and polyphenol oxidase activity. Results indicated that these two enzymes are sensitive to 1,3-DCB contamination.

**Keywords:** 1,3-dichlorobenzene, Microbial community, Catalase, Polyphenol oxidase

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20607018); 江苏省自然科学基金项目(No. BK2009171); 盐城市农业科技发展项目(No. YK2009066); 盐城工学院应用化学重点学科基金项目(No. XKY2010002)

\* 通讯作者: Tel: 86-515-88298191; ✉ dna1980311@163.com, dingc@163.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>  
收稿日期: 2010-11-14; 接受日期: 2011-01-30

土壤微生物是土壤生态系统中的重要组成部分,土壤微生物群落的稳定具有重要意义。微生物生理生态参数可作为检测土壤污染状况的早期、敏感的生物学指标。由于土壤微生物以及酶活性对外来物质的快速响应,应用微生物及酶的动态变化来评价污染土壤的质量也成为环境微生物学研究的一个重要手段<sup>[1-4]</sup>。

氯苯类污染物是化学性质比较稳定的一类化合物,一般都具有“三致”作用毒性,对人体健康危害大,而且在环境中多数难降解。1,3-二氯苯是氯苯类化合物<sup>[5]</sup>中的一种,是许多化工产品的合成原料和中间体。1,3-二氯苯(1,3-DCB)具有高毒性和化学稳定性,在环境中能够长期滞留,对环境造成了严重的危害,被美国环保局(EPA)列入优先控制污染物和65种有毒污染物名单中,我国也把它列入中国环境优先污染物黑名单之中<sup>[6]</sup>。有关氯苯类有机污染物的生态毒理研究主要集中在一些动植物类群,对土壤微生物的毒理学研究非常有限,近年也鲜有报道<sup>[7-10]</sup>。

湿地被称为“地球之肾”,具有蓄洪防旱、调节气候、保护生物多样性、降解环境污染物等功能。但由于地球变暖、酸雨、臭氧层破坏、有毒有害物质的污染等问题,从组织结构到功能过程、从基因到种群群落,湿地生态系统正遭受前所未有的冲击<sup>[11-12]</sup>。Lee 等人<sup>[13]</sup>证实吸附和解吸特性对氯苯类污染在人工湿地土壤的降解有影响,Nishino<sup>[14]</sup>对比了土著菌与添加氯苯降解菌对氯苯降解速率,但是尚未见有关氯苯类污染物对湿地土壤微生物生态影响的研究报道。本文研究了1,3-二氯苯对芦苇湿地土壤微生物数量和土壤酶活性的影响,旨在了解其对湿地土壤微生物的生态效应,为湿地环境毒性评价提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料与试剂

土壤为江苏射阳丹顶鹤国家自然保护区附近芦苇湿地,属于湿地土壤,取芦苇根系附近土壤。新鲜

土样采集后拣去植物残体,样品自然风干、研磨过2 mm 筛,备用。供试土壤理化性质为:pH 7.9,有机质含量 37.45 g/kg,全氮 0.92 g/kg,全磷 1.23 g/kg,全钾 0.63 g/kg。

1,3-DCB 购自上海国药试剂有限公司。

### 1.2 实验设置

试验设 1 个对照组和 4 个 1,3-DCB 处理组,对照组不加 1,3-DCB,处理组 1,3-DCB 的浓度分别为 120、240、360 和 600  $\mu\text{g/g}$  干土。

取经上述处理的新鲜风干土,称取 1.5 kg,分别装入相同的塑料小桶中加自来水使土壤保持水淹状态,以模拟湿地环境,于 28  $^{\circ}\text{C}$ -30  $^{\circ}\text{C}$  预培养 2 周。随后分别加入不同剂量的 1,3-DCB,使终浓度为 120、240、360 和 600  $\mu\text{g/g}$  干土。

继续培养,定期取样分别测定土壤微生物数量及土壤酶活性。在整个试验阶段,适时补水,以补充蒸发散失水分。

### 1.3 分析方法

微生物数量测定采用稀释涂布平板计数法<sup>[15]</sup>。微生物的数量分别以每克干土中细菌、放线菌和真菌数量的对数值计。

土壤中过氧化氢酶活性测定采用高锰酸钾滴定法,以消耗的 0.1 mol/L 高锰酸钾溶液的量表示(mL 0.1 mol/L  $\text{KMnO}_4/\text{g}$ )<sup>[16]</sup>,多酚氧化酶活性采用比色法测定,以产生紫色没食子素的毫克数表示<sup>[16]</sup>。

### 1.4 数据分析

所有试验数据用 Excel 2003 和 SPSS (V10.0) 统计软件进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 1,3-DCB 对微生物数量的影响

**2.1.1 1,3-DCB 对细菌数量的影响:** 土样微生物数量以相对值表示,即不同浓度 1,3-DCB 处理土样与对照微生物数量的比值表示(下同)。1,3-DCB 对芦苇湿地土壤细菌数量影响见图 1。结果表明,1,3-DCB 处理土壤,各浓度 1,3-DCB 都抑制了细菌生长,1,3-DCB 各处理组细菌数量均低于对照土样。经相

相关性分析, 7 d 和 28 d 时对细菌的抑制作用与 1,3-DCB 浓度成正相关。7–35 d 时, 1,3-DCB 对土壤细菌抑制率逐渐加大, 抑制率为 8%–64%, 平均抑制率为 30%。50 d 时, 1,3-DCB 各处理组细菌数量有所恢复, 但仍低于对照水平。经 *t*-检验分析, 在本实验 14–50 d 时, 1,3-DCB 处理浓度高于 120  $\mu\text{g/g}$  干土组细菌数量显著均低于对照组土样 ( $P < 0.05$ )。

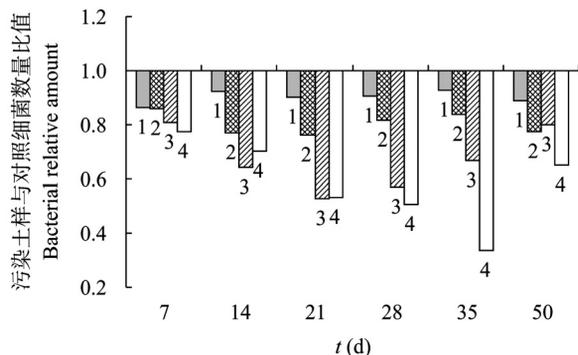


图 1 1,3-DCB 对细菌数量的影响

Fig. 1 Effect of 1,3-dichlorobenzene on bacterial amounts

注: 1: 120  $\mu\text{g/g}$  干土; 2: 240  $\mu\text{g/g}$  干土; 3: 360  $\mu\text{g/g}$  干土; 4: 600  $\mu\text{g/g}$  干土。以下同。

Note: 1: 120  $\mu\text{g/g}$  dried soil; 2: 240  $\mu\text{g/g}$  dried soil; 3: 360  $\mu\text{g/g}$  dried soil; 4: 600  $\mu\text{g/g}$  dried soil. The same below.

**2.1.2 1,3-DCB 对真菌数量的影响:** 由图 2 可见, 在本实验条件下, 1,3-DCB 对湿地土壤真菌生长的作用表现为先刺激后抑制。前 14 天, 各 1,3-DCB 处理土壤真菌数量高于对照组, 真菌数量增长为对照的 5%–21%。随后真菌数量开始减少, 21 d 时数量基本恢复至对照水平。28 d 时, 除 120  $\mu\text{g/g}$  干土浓度外, 其余处理真菌数量都显著低于对照 ( $P < 0.05$ )。35–50 d, 各 1,3-DCB 处理组土壤真菌数量均低于对照组, 1,3-DCB 处理浓度高于 120  $\mu\text{g/g}$  干土组真菌数量显著低于对照组土样 ( $P < 0.05$ )。这种抑制作用可能与 1,3-DCB 在土壤中的代谢有关。

**2.1.3 1,3-DCB 对放线菌数量的影响:** 由图 3 可见, 芦苇湿地土壤放线菌对 1,3-DCB 比较敏感, 经 *t*-检验分析, 各浓度处理对放线菌数量均显著抑制 ( $P < 0.05$ )。经相关性分析, 7 d 和 50 d 时对放线菌的抑制作用与 1,3-DCB 浓度有一定正相关。

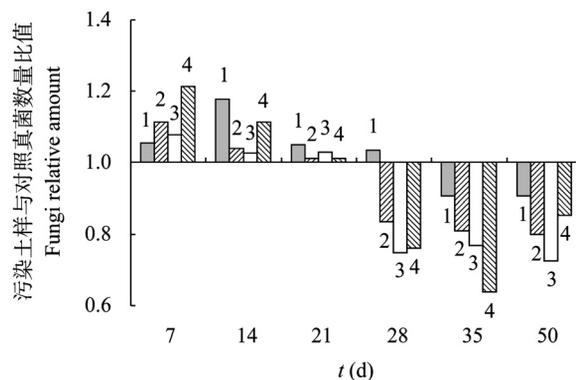


图 2 1,3-DCB 对真菌数量的影响

Fig. 2 Effect of 1,3-dichlorobenzene on fungi amounts

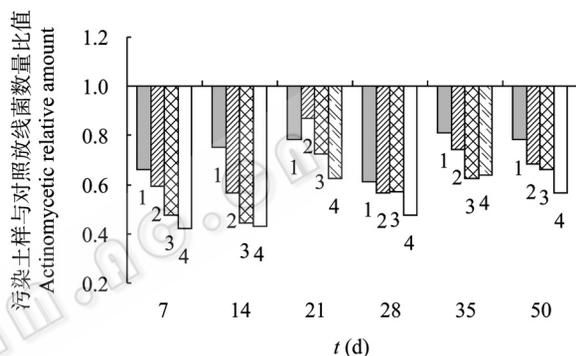


图 3 1,3-DCB 对放线菌数量的影响

Fig. 3 Effect of 1,3-dichlorobenzene on actinomycetic amounts

## 2.2 1,3-DCB 对土壤酶活性的影响

**2.2.1 1,3-DCB 对过氧化氢酶活性的影响:** 土壤酶活性以相对酶活性值, 即不同浓度 1,3-DCB 处理土样与对照土样酶活性的比值表示(下同)。1,3-DCB 对土壤过氧化氢酶影响见图 4。从图 4 中可见, 整个培养周期内, 除最低处理浓度外, 1,3-DCB 对过氧化氢酶整体上表现为抑制作用。污染第 7–14 天, 除最低浓度土样外, 其他土样过氧化氢酶都受到不同程度抑制, 1,3-DCB 浓度越高, 受抑制程度越强, 抑制率达到 18%–49%; 经相关性分析, 抑制作用与 1,3-DCB 浓度成正相关。前 28 天, 经 *t*-检验分析, 浓度高于 120  $\mu\text{g/g}$  处理土壤过氧化氢酶活性被显著抑制 ( $P < 0.05$ )。由图 4 中趋势可见, 本实验过程中, 最低浓度 1,3-DCB 对芦苇湿地土壤过氧化氢酶有轻微刺激作用, 前 14 d, 高浓度污染的抑制作用较为明显, 之后抑制程度减弱。至 50 d 时, 各处理均恢复

至对照水平。说明 1,3-DCB 在本实验中对土壤过氧化氢酶有一定的急性毒性效应,但这种毒性效应可以在一定时间内恢复。

**2.2.2 1,3-DCB 对多酚氧化酶活性的影响:**从图 5 可见,第 7 和 14 天时,经相关性分析,1,3-DCB 对土壤多酚氧化酶抑制作用与 1,3-DCB 浓度成正相关。前 21 天,1,3-DCB 对多酚氧化酶活性是表现出持续加重抑制状态,对多酚氧化酶活性抑制达到 5%–30%,在 21 d 时达到最大抑制;经 *t*-检验分析,浓度大于 240  $\mu\text{g/g}$  干土的 1,3-DCB 显著抑制了多酚氧化酶活性( $P<0.05$ )。21 d 后,各处理土壤多酚氧化酶活性开始回升,35–50 d 时,120  $\mu\text{g/g}$  和 240  $\mu\text{g/g}$  干土处理对多酚氧化酶有一定刺激作用,其他处理组多酚氧化酶活仍显著低于对照。

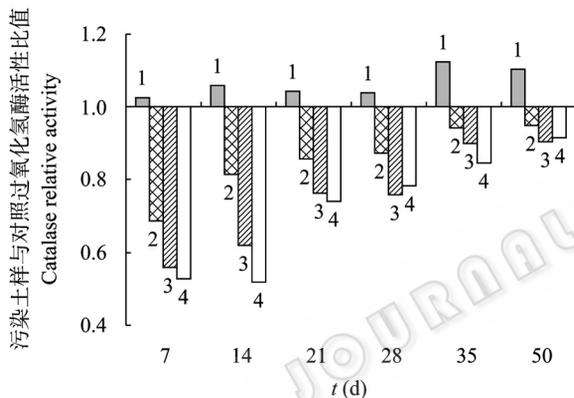


图 4 1,3-DCB 对过氧化氢酶活性的影响  
Fig. 4 Effect of 1,3-dichlorobenzene on the activity of catalase

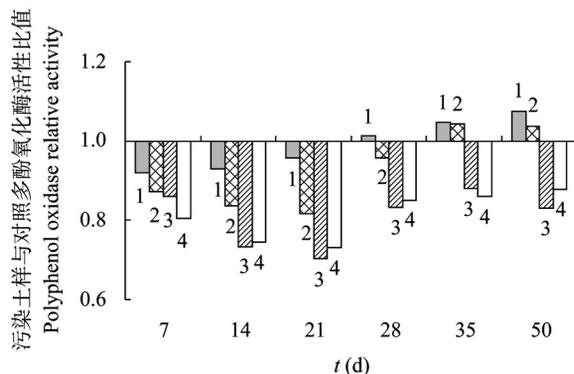


图 5 1,3-DCB 对多酚氧化酶活性的影响  
Fig. 5 Effect of 1,3-dichlorobenzene on the activity of polyphenol oxidase

### 3 讨论

土壤微生物生态系统中微生物种群的数量、结构组成及其活性是一个随着环境条件不断变化的动态过程,其中微生物活细胞数量是环境变化最敏感的生物指标之一<sup>[17]</sup>。二氯苯污染对土壤微生物数量影响鲜有报道,本研究中,1,3-DCB 的浓度是湿地土壤细菌和真菌数量影响的重要因素。低于 120  $\mu\text{g/g}$  的 1,3-DCB 对细菌和真菌影响较小,高于此浓度对生长抑制较明显。在本实验条件下 1,3-DCB 对土壤中放线菌毒害作用比较严重。王梅等研究了石油污染对土壤生态系统影响,结果表明石油烃含量对 3 大类微生物类群变化的影响,以放线菌最为显著,当土壤石油烃含量为 500  $\mu\text{g/g}$  时,潮土、褐土和棕壤的放线菌总数分别下降了 80%、85%和 89%,并且短时间内很难恢复<sup>[18]</sup>。已有研究表明,采用传统的微生物培养方法,土壤中大多数的微生物无法被培养,土壤中可培养微生物一般只占微生物总量的 0.1%–1%<sup>[19–20]</sup>。因此作者认为有必要采取其他非培养方法,例如磷脂脂肪酸图谱分析法(PLFA)、Biolog 法和基于分子生物学的方法(PCR-DGGE、PCR-RFLP)等手段来深入研究二氯苯对土壤微生物种群结构的影响。

土壤中的酶是土壤新陈代谢的重要因素,它们主要来自微生物细胞,也可来自动植物残体。土壤酶与微生物细胞一起推动着有机物的分解和无机物的转化<sup>[21]</sup>。沈标等研究发现,氯苯在 200  $\mu\text{g/g}$  以下对土壤脲酶、脱氢酶具有刺激作用,对蔗糖酶活性则具有轻微的抑制,对硝基苯酚对上述几种酶活性表现出抑制作用<sup>[22]</sup>。宫旋等研究表明菲对土壤脲酶抑制作用随浓度增大而增强,对过氧化氢酶活性没有显著影响,脲酶可以作为菲污染的生态毒理指标<sup>[23]</sup>。吕镇梅等研究了二氯喹磷酸对土壤酶的影响,结果表明使用初期高浓度对水稻田土壤蛋白酶、过氧化氢酶、脲酶活性均有一定抑制作用,而且施药浓度越高,受抑制程度越强,且高浓度施用后需要较长时间酶活性才得以恢复<sup>[24]</sup>。王梅等的研究表明潮土和褐土的淀粉酶活性受石油烃含量影响显著,可以作为这两类土壤石油污染程度的

敏感生化指标<sup>[18]</sup>。刘树庆的研究结果表明过氧化氢酶的活性与 Pb、Cd 的相关显著性最好, 所以用过氧化氢酶的活性作为判别土壤重金属 Pb、Cd 污染程度的主要生化指标是可行的<sup>[25]</sup>。孙红斌等研究了多氯联苯对红树林沉积物微生物及酶活性的影响, 结果表明多氯联苯处理红树林沉积物可提高多酚氧化酶活性<sup>[26]</sup>。本研究中低浓度 1,3-DCB 在后期对多酚氧化酶有一定刺激作用, 高浓度表现为显著抑制, 可能与高浓度 1,3-DCB 对微生物生长的抑制作用有关。

从实验结果看, 1,3-DCB 处理芦苇湿地土壤对细菌和放线菌生长整体表现为抑制作用, 1,3-DCB 浓度高于 120  $\mu\text{g/g}$  显著抑制细菌的生长, 而各浓度处理在整个实验过程中都表现出对放线菌数量的显著抑制作用, 说明 1,3-DCB 对放线菌具有急性毒性效应。1,3-DCB 对湿地土壤真菌生长的作用表现为先刺激后抑制。1,3-DCB 处理芦苇湿地土壤可抑制过氧化氢酶和多酚氧化酶的活性, 表明过氧化氢酶和多酚氧化酶是 1,3-DCB 污染的敏感指标。本研究时间为 50 d, 1,3-DCB 污染对土壤生物活性的长期效应和影响还有待深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物样品中多环芳烃 (PAHs) 分析方法研究[J]. 应用生态学报, 1995, 6(1): 92-96.
- [2] 杨万勤, 王开运. 土壤酶研究动态与展望[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 564-570.
- [3] 曹慧, 孙辉, 杨浩, 等. 土壤酶活性及其对土壤质量的指示研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(1): 105-109.
- [4] Verrhiest GJ, Clément B, Volat B, et al. Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment[J]. Chemosphere, 2002, 46(2): 187-196.
- [5] 陈春云, 岳珂, 陈振明, 等. 微生物降解多环芳烃的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(6): 100-103.
- [6] 金相灿, 程振华, 徐南妮, 等. 有机化合物污染化学——有毒有机物污染化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1990: 22-24.
- [7] 周宇, 于红霞, 丁翔, 等. 氯代苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效应的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3): 340-344.
- [8] 王玉芬, 张肇铭, 胡筱敏, 等. 微生物法去除水中氯苯类化合物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 949-954.
- [9] 李玉梅, 陆光华. 氯代苯类化合物对江水细菌的毒性及 QSAR 研究[J]. 环境科学研究, 2005, 18(6): 116-119.
- [10] 徐应明, 袁志华, 李军幸, 等. 二氯苯胁迫对小麦种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 灌溉排水学报, 2005, 24(4): 11-14.
- [11] 崔保山, 杨志峰. 湿地生态系统健康研究进展[J]. 生态学杂志, 2001, 20(3): 31-36.
- [12] Carter J. Wetlands ecosystems in Asia: function and management[J]. Ecological Engineering, 2006, 28(4): 382-383.
- [13] Lee S, Pardue JH, Moe WM, et al. Effect of sorption and desorption-resistance on biodegradation of chlorobenzene in two wetland soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(1): 492-498.
- [14] Nishino SF, Spain JC, Pettigrew CA. Biodegradation of chlorobenzene by indigenous bacteria[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1994, 13(6): 871-877.
- [15] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 69-71.
- [16] 严昶升. 土壤肥力研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1988: 267-279.
- [17] 李慧, 陈冠雄, 杨涛, 等. 沈抚灌区含油污水灌溉对稻田土壤微生物种群及土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(7): 1355-1359.
- [18] 王梅, 江丽华, 刘兆辉, 等. 石油污染物对山东省三种类型土壤微生物种群及土壤酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2010, 47(2): 341-346.
- [19] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 59(1): 143-169.
- [20] Lu ZM, Min H, Ye YF. Influences of quinclorac on culturable microorganisms and soil respiration in flooded paddy soil[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2003, 16(4): 314-322.
- [21] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 323-328.

- [22] 沈标, 李顺鹏, 赵硕伟, 等. 氯苯、对硝基酚对土壤生物活性的影响[J]. 土壤学报, 1997, 34(3): 309-314.
- [23] 宫璇, 李培军, 张海荣, 等. 菲对土壤酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 981-984.
- [24] Lu ZM, Min H, Ye YF. Short-term influences of herbicide quinclorac on enzyme activities in flooded paddy soil[J]. Pedosphere, 2004, 14(1): 71-76.
- [25] 刘树庆. 保定市污灌区土壤的 Pb、Cd 污染与土壤酶活性关系研究[J]. 土壤学报, 1996, 33(2): 175-182.
- [26] 孙红斌, 刘亚云, 陈桂珠. PCBs 对红树林沉积物中微生物及酶活性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(12): 5398-5407.

## 沉痛悼念周俊初教授



周俊初, 男, 汉族, 祖籍浙江省嵊州县, 1941 年生于四川省綦江县, 中国共产党党员, 华中农业大学教授, 博士生导师。1963 年从四川农学院本科毕业, 随后考入湖北武汉的原华中农学院土化系。师从著名微生物学家陈华癸院士, 攻读土壤微生物专业研究生。1968 年毕业留校, 1981-1983 年赴澳大利亚悉尼大学进修。归国后, 长期从事根瘤菌共生固氮研究和微生物学教学工作。2011 年 3 月 11 日, 周俊初教授因病医治无效, 在武汉逝世。

周俊初教授是我国微生物固氮研究领域的专家, 在根瘤菌共生固氮体系的分子遗传学、根瘤菌生物多样性和重组根瘤菌构建等方面做出了重要贡献。他先后主持了国家高技术发展研究计划(863)、国家自然科学基金、国家重点基础研究计划(973)、欧盟国际合作计划等多项课题。先后获农业部科技进步一等奖和二等奖。1986 年被国家科委授予“国家级有突出贡献的中、青年专家”称号, 1991 年获国务院政府特殊津贴。

周俊初教授治学严谨, 桃李满园。他对学生和年轻教师既严格要求, 又平易近人。他培养的 50 余名硕士和博士研究生现已遍布海内外。周俊初教授长期为《微生物学通报》等微生物学专业期刊审稿。他本着严谨、负责的态度, 对送审稿件一贯认真审阅, 从不敷衍。

周俊初教授的去世, 使我们失去了一位知识渊博的学者和严以律己、宽以待人的师长。在周俊初教授住院及去世治丧期间, 有多位国内微生物学专家和大专院校、科研单位以多种形式表示了慰问或悼念。在此向他们表示衷心感谢!

愿周俊初教授音容常在, 风范永存。

华中农业大学生命科技学院  
农业微生物学国家重点实验室