

丁草胺和毒死蜱复合污染对稻田土壤 细菌群落多样性的影响

解开治, 徐培智, 陈建生, 唐拴虎, 张发宝, 黄 旭, 严 超

(广东省农业科学院土壤肥料研究所, 广东省农产品质量安全公共研究平台, 广东 广州 510640)

摘 要:采用 PCR-RFLP 法研究了丁草胺和毒死蜱复合污染对土壤细菌多样性的影响。应用试剂盒提取土壤样品总 DNA, 以细菌的 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 扩增 16S rDNA 片段, 将扩增产物与 T-载体酶连, 转化大肠杆菌, 建立 16S rDNA 克隆文库。阳性克隆子用限制性内切酶 *Hha* I-*Rsa* I 消化, 获得酶切指纹图。结果表明, 通过双酶切分型, 对照产生带型最多, 有 70 种类型, 其余处理 OTU 种类均比对照有所减少, 分别减少了 10、30 和 41 种。在不同处理中其多样性存在差异。对照土壤环境中细菌种类最丰富, 多样性最高, 且基因型中无明显的优势类群, 说明农药的外源喷洒会引起土壤细菌多样性降低。处理 III 的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和丰富度都低于单一农药的处理, 而均匀度非常高, 说明这 2 种农药的复合施用对一些细菌的丧失会起协同作用, 造成某些土壤细菌的富集。

关键词: 丁草胺; 毒死蜱; 复合污染; 细菌多样性; 16S rDNA; RFLP

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)04-0686-05

Effect of Combined Pollution of Butachlor and Chlorpyrifos on Soil Bacteria Diversity in Paddy Field

XIE Kai-zhi, XU Pei-zhi, CHEN Jian-sheng, TANG Shuan-hu, ZHANG Fa-bao, HUANG Xu, YAN Chao

(Soil and Fertilizer Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Public Research Platform of Agricultural Product Quality and Safety, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effect of combined pollution of butachlor and chlorpyrifos on the diversity of bacterial community in paddy field was studied by PCR-RFLP methods. Total DNAs of soil microorganisms were extracted by using Fast DNA SPIN Kit. The 16S rDNA fragments were amplified from the extracted soil DNAs by using bacterial universal pair primers 27F and 1492R. PCR products were ligated into the pMD 18-T Vector and transformed into *Escherichia coli* DH5 α to construct a 16S rDNA clone library of the soil microbes. The fingerprints of positive clones digested with *Rsa* I and *Hha* I were analyzed. The results indicated that the control samples reduced 70 different kinds of band by using *Hha* I-*Rsa* I double digestion. The treated samples reduced 10, 30 and 41 kinds of band, separately. There were differences in diversity of different sample processing. The kinds of bacteria and diversity in control soil samples were rich, and there were not obvious dominant groups in the genotype. The treated soil by spraying pesticide would cause low diversity to bacteria. The Shannon-Wiener index, Simpson index and the richness of the processing III were less than the single pesticide processing, and the uniformity was very high. Two kinds of pesticides together application had a synergistic effect on the loss of some bacteria and caused some soil bacteria enrichment.

Keywords: butachlor; chlorpyrifos; combined pollution; the diversity of bacterial community; 16S rDNA; RFLP

随着农药等农用化学品的大量使用, 由多种污染物所形成的环境复合污染效应及其机理已成为环境

科学领域的研究热点之一。但是由于实验手段的局限性和农药在土壤中环境行为的复杂性以及代谢产物的多样性, 甚至能够形成毒性更大的中间产物, 其相互作用的效应难以预测^[1]。因此, 对于农药复合污染的研究不容忽视。农药进入土壤后会对土壤微生物产生一定的影响, 由于土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 尤其是土壤细菌, 占土壤微生物总数的 70%~90%, 其活性对物质循环和土壤肥力的形成有

收稿日期: 2008-07-25

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2007B090400101); 广州市农业局招标项目(GZCQ0602FG001A); 广东省农业科学院土壤肥料研究所所长基金项目(2008-szjj-02)

作者简介: 解开治(1977—), 男, 硕士, 主要从事环境微生物技术研究。
E-mail: xiekzhigsau@163.com

通讯作者: 徐培智 E-mail: pzxu007@163.com

重要意义^[2]。虽然不同微生物对不同农药的敏感性不一致,但农药污染能明显影响微生物群落的生物量、活性及结构组成^[3]。但以往的研究主要集中在土壤可培养微生物数量、微生物量以及酶学的研究。因此,利用现代分子生物学技术开展农药复合污染稻田土壤微生物群落的遗传结构多样性研究,对揭示稻田土壤微生物种群间的平衡稳定机制,评价农药复合污染稻田土壤的环境质量,有着重要的科学意义和应用前景。鉴于此,本文采用分子生物学技术——末端限制性片段长度多态性(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)的方法来分析长期受丁草胺和毒死蜱不同程度复合污染的稻田土壤,对其土壤中细菌的多样性进行研究,为稻田土壤农药复合污染的风险评价提供生物学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验在广东省农科院土肥所天河区国家赤红壤监测基地进行,供试土壤为赤红壤,土壤理化性状见表1。试验药剂为90%丁草胺乳油和40%毒死蜱乳油。

1.2 试验设计

本试验共设4个处理:CK,不施农药的处理为对照;处理I,90%丁草胺乳油(用量 $1\,215\text{ g(a.i.)}\cdot\text{hm}^{-2}$);处理II,40%毒死蜱乳油(用量 $900\text{ g(a.i.)}\cdot\text{hm}^{-2}$);处理III,90%丁草胺乳油(用量 $1\,215\text{ g(a.i.)}\cdot\text{hm}^{-2}$)+40%毒死蜱乳油(用量 $900\text{ g(a.i.)}\cdot\text{hm}^{-2}$)。每个处理设3个重复,共9个小区,小区面积 12 m^2 ,随机区组排列。试验时间为2006年4月—2007年12月,种植水稻2造,水稻品种为黄华占。育秧育苗、肥水管理及其他田间管理等均按照农民种植习惯进行。每造水稻插秧第15 d施药,90%丁草胺乳油按处理用量拌沙施入,40%毒死蜱乳油按处理用量兑水稀释喷施。每个小区按“S”型路线采集混合土样,每个土样由5~8个采集点的土壤混合而成,采样深度为0~20 cm。于水稻第二造施药后第5 d采样,土壤取出后,立即放入冷藏盒内,带回实验室,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,以避免其中的细菌群落发生大的变化。

1.3 菌株、培养基与试剂

E.coli DH5 α 、pMD18-T-simple Vector、氨苄青霉

素(Amp)、丙烯酰胺、过硫酸铵(Ammonium persulfate) TEMED均购自北京博大泰恒生物技术有限责任公司;Taq酶、X-gel和IPTG购自于申能博彩;PCR引物由上海英骏生物技术有限公司合成;DNA回收试剂盒购自V-gene Biotechnology Limited;培养基配制参照分子克隆^[4]。

1.4 分析方法

1.4.1 土壤总DNA的提取

采用Fast DNA SPIN Kit for Soil试剂盒(Bio 101, Vista, CA, USA)和Fast Prep FP220核酸提取仪提取。采用核酸蛋白测定仪(Eppendorf, AG, Hamburg, Germany)测定提取液中双链DNA的浓度和 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 吸收值比值。

1.4.2 16S rDNA的PCR扩增

采用通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3')和1492R(5'-TACCTTGTACGACTT-3')直接扩增总DNA中的细菌16S rDNA片段。扩增体系为:总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,其中包括 $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 的 $10\times\text{buffer}$, $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 Mg^{2+} ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $2\text{ }\mu\text{L}$ 的dNTP($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $1\text{ }\mu\text{L}$ 的总DNA溶液(约 $30\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),引物27F和引物1492R各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ($25\text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $0.3\text{ }\mu\text{L}$ 的Taq酶, $16.2\text{ }\mu\text{L}$ 的双蒸水。扩增程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,之后进行30个循环(每个循环为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 复性30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min),然后再72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,目的是使其充分延伸。PCR产物经1.0%的琼脂糖电泳,EB染色后紫外分析仪检测。检查产物的有无及扩增量。

1.4.3 TA克隆

通过TA克隆技术将扩增的16S rDNA转移至高感受态细胞*E.coli* DH5 α 中,目的将16S rDNA分开,通过蓝-白斑筛选的方法挑取阳性克隆,把携带目标基因16S片段的*E.coli*克隆细胞挑到AMP平板上,来建立16S rDNA克隆文库,然后进行群落分析。具体步骤参照文献[4]。

1.4.4 转化子插入片段的扩增

通过菌体PCR方法用pMD18-Tsimple载体通用引物M13/pUC(P47,5'-CGCCAGGGTTTCCCAGT CACGAC-3')和M13/pUC(P48,5'-AGCGGATAA-CAATTCACACAGGA-3')重新扩增阳性克隆子中插

表1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the tested soil

有机质/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	碱解氮/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效磷(P_2O_5)/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	速效钾(K_2O)/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	pH	阳离子交换量/ $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$	质地
10.5	41.2	15.5	101.2	6.8	14.1	黏壤土

入的 16S rDNA 片段,扩增体系如下:总体积为 25 μL ,其中包括 2.5 μL 的 10 $\times$ buffer,2 μL 的 Mg^{2+} (25mmol $\cdot\text{L}^{-1}$),2 μL 的 dNTP (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$),2 μL 的 Tween20 (10%),引物 1 和引物 2 各 0.5 μL (25 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$),0.3 μL 的 Taq 酶,15.2 μL 的双蒸水,模板是挑取的少量菌体。扩增程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 8 min,之后进行 29 个循环(每个循环包括:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min),然后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,目的是使其充分延伸。PCR 产物经 0.75%的琼脂糖电泳,EB 染色后紫外分析仪检测。检查产物的有无及扩增量。

1.4.5 限制性酶切插入片段的扩增产物

PCR 产物用 *Hha* I 和 *Rsa* I 两种限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切。酶切体系为 10 μL ,其中包括 2 μL PCR 产物,1 μL 反应缓冲液,0.5 μL 限制性内切酶。6.5 μL 双蒸水。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切 8~10 h。

1.4.6 RFLP 分析

所得 DNA 带型图谱在 GIS 凝胶分析软件辅助下用人工进行比较分析。以基因片段多态图像为基础进行聚类,根据不同图像间的相似性将所有的图像聚合成一个聚类树。通过聚类分析而被聚合到一起的具有相同的基因图像的克隆再用 *Rsa* I 限制性内切酶水浴消化(37 $^{\circ}\text{C}$,8~10 h)。然后把所得 DNA 带型图谱再在 GIS 凝胶分析软件辅助下用人工进行比较分析。当第二次所获得的基因图像仍然相同时,则认为它们是相同的基因型。每一个基因型称为一个操作分类单位(OUT,Operational Taxonomic Unit)或称为唯一基因型^[9]。

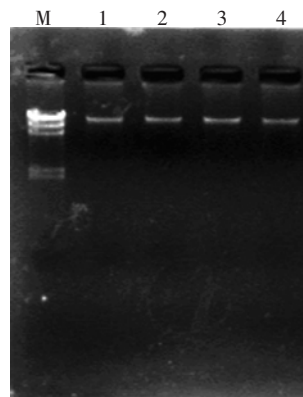
1.5 数据分析^[9]

数据分析用 DPS 8.50 进行方差分析。多样性指数计算参照以下公式(表 2)。

2 结果与分析

2.1 土壤样品总 DNA 的提取与纯化

土壤总 DNA 提取结果表明(图 1),供试土壤的 DNA 片段在 23 kb 左右,适合土壤细菌 16S rDNA 分析。表 3 表明,土壤总 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.85 到 2.01 之间,其 DNA 的纯度较好(通常情况下样本



1.CK;2.处理 I;3.处理 II;4.处理 III;M.DNA HindIII Marker

图 1 土壤微生物总 DNA 的琼脂糖电泳图谱

Figure 1 Argarose gel eletrophoresis of total microbial DNA extracted from soil

表 3 稻田土壤中总 DNA 提取的产量和纯度的比较

Table 3 The compare of products and purity of total DNA from paddy fields

土样	CK	处理 I	处理 II	处理 III
A260/A230	2.16 $\pm$ 0.09 a	1.96 $\pm$ 0.05 c	2.01 $\pm$ 0.06 b	2.00 $\pm$ 0.05 b
A260/A280	2.01 $\pm$ 0.03 a	1.94 $\pm$ 0.06 ab	1.90 $\pm$ 0.05 ab	1.85 $\pm$ 0.17 b
总 DNA 提取量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 干土	2.63 $\pm$ 0.15 a	2.42 $\pm$ 0.01 b	2.41 $\pm$ 0.07 b	2.01 $\pm$ 0.19 c

注:表中数值为平均值 $\pm$ 标准差;同一行中标有小写英文字母表示 Duncan 多重比较差异显著($P<0.05$)。

DNA 的 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0 之间),说明尽管 4 个土样受到的农药污染程度不同,但采用快速提取仪所提取的总 DNA 具有良好的可比性,可以不用单独纯化直接用于后续的分析。

2.2 细菌 16S rDNA 片段的扩增与克隆文库的构建

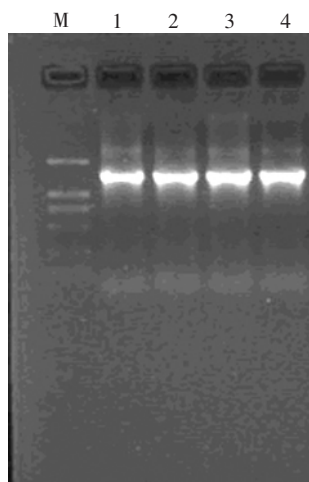
利用细菌的 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 扩增 16S rDNA 片段,PCR 扩增后 16S rDNA 基因片断大小约为 1.5 kb,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,经凝胶成像仪成像后得到图谱如图 2。PCR 产物经过割胶回收后,与 pMD18-T vector 连接,连接产物转化 *E.coli* top10 感受态细胞,在涂有 IPTG 和 X-gal 的 Amp⁺平板上培养过夜。第 2 d 观察平板上有较致密的菌落,96%以上为白色,少量为蓝色。每个处理组

表 2 土壤细菌多样性指数计算公式

Table 2 Indexes to describe the diversity of the bacterial community

Shannon-Wiener 指数	Simpson 指数	Margalef 物种丰富度指数	Evenness 均匀度指数	Coverage C 文库的库容
$H' = -\sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$	$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$	$d_M = \frac{S-1}{\ln N}$	$E = \frac{H'}{H_{\max}}$	$C = 1 - \frac{nl}{N}$

注:S 为 16S rDNA 的所有 RFLP 总类型数; n_i 为第 i 种 16S rDNA 的 RFLP 变异类型克隆数, N 为总克隆数; nl 代表在文库中仅出现一次的 OTUs(Operational Taxonomic Unit)的数量。



1.CK;2.处理 I ;3.处理 II ;4.处理 III ;M.DL2000 Marker

图 2 16S rDNA 扩增产物的琼脂糖电泳图谱

Figure 2 Argarose gel eletrophoresis of amplified products of 16S rDNA

随机挑取 30 个白色菌落保种并做活菌 PCR 反应筛选阳性克隆。克隆子的扩增产物片段大小约为 1.6 kb,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,经凝胶成像仪成像后得到图谱如图 3。从图 3 可以看出,TA 克隆的效率达到 90%。

2.3 细菌 16S rDNA 的 RFLP 分析

从 4 个处理组中随机挑取 100 个阳性克隆,其 PCR 产物经限制性内切酶 *Msp* I 和 *Rha* I 消化,获得酶切指纹图谱,直接在分子水平上对微生物多样性进行分析。4 个处理的克隆文库多样性指标见表 4。

从表 4 可以看出,通过双酶切分型,对照产生带型最多,有 70 种类型,其余处理 OTU 种类均比对照有所减少,分别减少了 10、30 和 41 种,说明农药的外

表 4 16S rDNA 克隆文库 *Hha* I -*Rsa* I 酶切类型的多样性Table 4 Diversity of *Hha* I -*Rsa* I RFLP phylotypes in 16S rDNA clone library

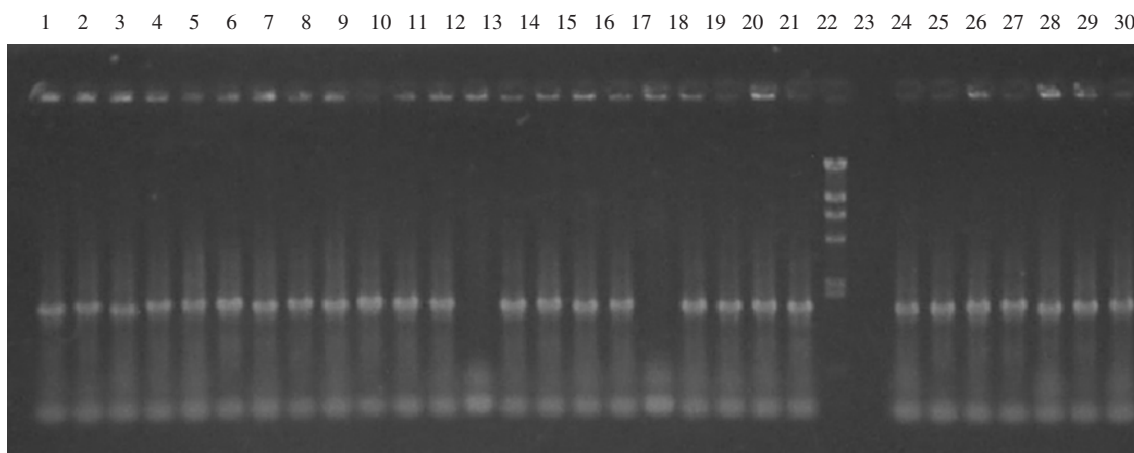
处理	OTU 种类	库容(C)	Shannon-wiener 指数(H')	Simpson 指数(D)	丰富度 (d)	均匀度 (E)
CK	70	70.34%	5.611 a	0.997 a	13.367 a	0.559 d
处理 I	60	79.12%	5.057 b	0.946 b	11.456 b	0.578 c
处理 II	40	92.45%	4.312 c	0.916 c	7.539 c	0.648 b
处理 III	29	89.46%	4.124 d	0.901 c	5.424 d	0.756 a

注:表中数据为 3 次重复之均值,同一列中标有小写英文字母表示 Duncan 多重比较差异显著($P<0.05$)。

源喷施会引起土壤细菌多样性降低。除了与处理 II 的 Simpson 指数差异不显著外,处理 III 的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和丰富度都显著低于单一农药的处理。处理 III 的 Shannon-Wiener 指数、Simpson 指数和丰富度较对照分别降低了 36.1%、10.7% 和 146.4%,而均匀度却上升了 35.2%。说明这 2 种农药的复合施用对一些细菌的丧失会起协同作用造成某些土壤细菌的富集。

3 讨论

杀虫剂、除草剂在水稻田使用,至少有 70% 进入土壤,直接影响土壤微生物的生长和代谢^[7],而土壤生物学功能的维持很大程度上依赖于土壤微生物生物量及其活性,土壤微生物是土壤生态系统物质循环的重要基础。大量研究表明,土壤微生物对农药的降解起着重要作用^[8-9]。同时,农药进入土壤后对土壤微生物生物量及其活性也会产生影响,进而影响土壤生物学功能。而从环境样品中高效地获得可进行分子生物



泳道 1~30 为随机从 4 个处理中挑选的克隆子扩增产物;M 为 λDNA Hind III Marker

图 3 克隆子扩增产物的琼脂糖电泳图谱

Figure 3 Argarose gel eletrophoresis of clones amplified products

学操作的基因组 DNA 是在基因水平上研究不可培养微生物的关键。土壤理化成分复杂,常含有腐植酸等严重影响 DNA 提取的物质^[10],因此从土壤环境中高效地获得微生物基因组 DNA 具有相当的难度^[11],也正是由于这些因素的影响,所提取的总 DNA 需进一步纯化后才可用于后续的分子生物学操作。本实验采用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取土壤总 DNA,得到质量较高的 DNA 产物,不经纯化就可用于后续的克隆鉴定。

16S rDNA 克隆文库的构建可以反映环境中微生物的种类和数量。理论上,克隆文库的库容代表样品中微生物的种类的多样性。当 Coverage C 为 100%时文库就可以代表环境样品中的微生物的种类,但最近 Kemp 等^[12]运用多种统计方法分析比较了文献报道的 225 个来自多种环境的 16S rDNA 的组成,他发现随着库容的增大,OTU 的数目总是在增加,这一结果说明几乎没有哪一个文库穷尽了样品中微生物的多样性。很显然克隆文库 Coverage C 都不能达到 100%。衡量所构建的 16S rDNA 文库的完整性,要以文库的库容是否足以包括环境中所有微生物种类或者能否代表环境中微生物的多样性为标准。通过库容值和生态多样性指数的大小可以反映克隆文库比较确切代表环境微生物的多样性。

4 结论

(1)试验采用 Fast DNA SPIN Kit for Soil 试剂盒提取土壤总 DNA,得到质量较高的 DNA 产物,不经纯化就可用于后续的克隆鉴定。

(2)试验构建的 4 个处理克隆文库中,库容值最低的为 70.34%,能较好地反映供试土壤中细菌的群落。但同时也需指明的是,由于库容不足 100%,说明环境中还有更多的细菌种类需要去分离、认识。

(3)农药的施用会引起土壤细菌多样性的降低,造成某些土壤细菌的富集和一些细菌的丧失,因此应避免长期使用某类单一农药。

参考文献:

- [1] 郭观林,周启星. 土壤-植物系统复合污染研究进展[J]. 应用生态学报, 2003, 5(14): 823-828.
- [2] Kandler E, Luftenegger G, Schwarz S. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 23(3): 299-306.
- [3] 李建政,任南琪. 污染控制微生物生态学[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 2005.
Li Jian-zheng, REN Nan-qi. Pollution control microbial ecology [M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2005.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1595-1604.
Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 1595-1604.
- [5] 夏北成, Zhou J, Tiedje J M. 土壤细菌类克隆群落及其结构的生态学特征[J]. 生态学报, 2001, 21: 574-578.
XIA Bei-cheng, Zhou J, Tiedje J M. Structures of bacteria cloning communities in the soil environment and their ecological characteristics[J]. *Acta Ecology Sinica*, 2001, 21: 574-578.
- [6] 戈 峰. 现代生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
GE Feng. Modern ecology [M]. Beijing: Science Publishing Company. 2002.
- [7] 陆贻通,朱有为. 基本农田保护区的环境污染及防治对策[J]. 上海环境科学, 1995, 14(8): 45-46.
LU Yi-tong, ZHU You-wei. Environmental pollution and control countermeasures of the basic farmland conservation area[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 1995, 14(8): 45-46.
- [8] 朱鲁生,王 军,林爱军,等. 二甲戊乐灵的土壤微生物生态效应[J]. 环境科学, 2002, 23(3): 88-91.
ZHU Lu-sheng, WANG Jun, LIN Ai-jun, et al. Ecological effect of pendimethalin on soil microbe[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2002, 23(3): 88-91.
- [9] Yu Y L, Chen Y X, Luo Y M, et al. Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 50: 771-774.
- [10] Tebbe C C, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 2657-2665.
- [11] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje A M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 316-322.
- [12] Kemp P F, Aller J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2004, 47: 161-177.

致谢: 本文英文摘要有幸得到华南农业大学农学院谭志远教授的修改,在此表示衷心的感谢!