

土壤食细菌线虫对菲降解的影响^①

井永苹, 赵莉, 陈小云, 刘满强*, 胡锋, 李辉信

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 以菲作为多环芳烃污染物的代表, 通过室内培养试验研究了在菲降解菌恶臭假单胞菌存在与否的条件下, 接种食细菌线虫对未灭菌土壤中菲去除的影响。析因设计包括 4 个处理: 单独接种恶臭假单胞菌 (B), 单独接种食细菌线虫 (N), 同时接种食细菌线虫和恶臭假单胞菌 (BN) 以及未接种线虫和细菌的对照 (CK); 分别在培养后第 0、5、14、28 天进行破坏性采样, 测定土壤中菲的残留量, 食细菌线虫和恶臭假单胞菌的数量, 土壤 FDA (荧光素二乙酸酯) 水解酶、过氧化氢酶的活性。结果显示, 相比 CK, 在培养前期 (0 ~ 14 天), 处理 N 提高土壤中菲的去除率; 而在培养后期 (14 ~ 28 天), BN 处理降解菲的优势逐渐显现出来。在培养结束 (28 天) 时, 各处理菲的去除率依次为 BN (48.2%) > B (45.1%) > N (44.4%) > CK (43.5%)。BN (48.2%) > B (45.1%) > N (44.4%) > CK (43.5%)。试验结果还表明, 接种食细菌线虫能显著 ($p < 0.05$) 促进细菌以及土壤酶活性。总之, 食细菌线虫和细菌的交互作用可能促进土壤中菲的降解。

关键词: 菲; 食细菌线虫; 恶臭假单胞菌; 土壤酶活性

中图分类号: S154.38*; X171.5

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) 是环境中普遍存在的一类由两个或两个以上的苯环结合在一起的化合物^[1], 具有较高的稳定性, 可通过食物链等途径分配到生物体内。土壤中多环芳烃的污染呈日益严重的趋势, 在某些重污染区, 其浓度也可达到数百毫克每千克。菲因具有一个“湾”区 (bay region) 和一个 K 区 (kregion), 使其成为多环芳烃的典型代表物, 因此以菲作为底物研究有重要意义。

环境中菲的去除途径主要包括挥发、光氧化、化学氧化、生物积累、生物降解等。其中微生物降解是去除环境中菲的主要途径^[2]。接种专性降解菌是一种常用的生物修复方法, 但专性降解菌对多环芳烃污染的修复能力不仅仅依赖于其降解能力本身, 而且依赖于降解菌与土著微生物间的竞争关系及在捕食压力下的存活能力等^[3-4]。因此, 针对菲污染土壤的微生物修复工程, 不仅需要考虑降解菌的修复能力, 而且还要综合考虑土壤碎屑食物网中复杂的生物相互作用, 而有关这方面的研究却非常缺乏。

土壤动物尤其是土壤食微动物, 如原生动物和土壤食细菌线虫, 是土壤食物网中的重要类群^[5]。最近的某些研究发现, 原生动物的取食对有机污染物的降

解有很明显的促进作用^[5-7]。例如, 在 BTEX (苯、甲

基金项目: 国家环保部和江苏省环保厅项目 (江苏省污染土壤调查) 资助。

作者简介: 井永苹 (1982—), 女, 山东济南人, 博士研究生, 主要从事土壤环境污染修

的比例关系, 表明细菌和原生动物的交互作用可能与烃类的生物降解有关^[6]。此外, Mattison 等^[7]研究发现原生动物纤毛虫对多环芳烃的降解有很明显的促进效应。由于土壤食细菌线虫与原生动物有类似的食性, 所以基于上述原生动物的研究结果可能也适用于土壤食细菌线虫, 不过现有的研究却几乎没有涉及^[8]。

线虫是土壤中数量最多、种类最丰富的多细胞动物, 食细菌线虫是其主要功能类群, 可占土壤线虫总数的 80%^[9]。食细菌线虫的个体小、世代短、代谢活性高, 在土壤中具有同原生动物相近的生态功能。现有的大量研究证明食细菌线虫通过取食作用刺激细菌的生长繁殖^[10-12], 数的 80%^[9]。食细菌线虫的个体小、世代短、代谢活性高, 在土壤中具有同原生动物相近的生态功能。现有的大量研究证明食细菌线虫通过取食作用刺激细菌的生长繁殖^[10-12], 促进土壤微生物活性及土壤酶活性; 并且通过自身代谢周转释放出养分和活性物质, 从而调节土壤生态系统的养分转化和有机物分解功能^[11-12]。然而, 食细菌线虫对菲污染土壤中菲的去除作用尚未见报道。为深入了解多环芳烃的

①基金项目: 国家环保部和江苏省环保厅项目 (江苏省污染土壤调查) 资助。

作者简介: 井永苹 (1982—), 女, 山东济南人, 博士研究生, 主要从事土壤环境污染修复研究。E-mail: 2006103075@njau.edu.cn

菲去除的影响。

基金项目：国家环保部和江苏省环保厅项目（江苏省污染土壤调查）资助。

作者简介：井永苹（1982—），女，山东济南人，博士研究生，主要从事土壤环境污染修复研究，E-mail: 2006103075@njau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试土壤及其预处理

土壤采自雨花台区板桥镇长江南岸冲积地潮土（美国制土壤质地分类为砂质壤土），鲜土采集后过 2 mm 筛备用。土壤中未检测出菲，其基本性状为：pH 值 6.43，全 N 0.89 g/kg，有机 C 10.87 g/kg， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 5.42 mg/kg， $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 27.17 mg/kg，微生物生物量碳 162.38 mg/kg。

预处理：将溶于丙酮的菲（购自德国 Fluka 公司，纯度 $\geq 97.0\%$ ）与上述过筛备用土样充分搅拌均匀，在黑暗条件下置于通风橱处放置 24 h，待丙酮挥发完毕后，于黑暗处老化 7 天^[13]。

鉴于本实验室前人的研究经验，土壤中菲的浓度为 50 mg/kg 时，菲在土壤中的生物有效性太低，不能达到预期的效果，浓度为 150 mg/kg 时又太高，会影响土壤生物的存活，因此土壤中菲的浓度设置为 100 mg/kg。本试验旨在初步探讨食细菌线虫与细菌的相互作用对菲降解的影响，因此只设 100 mg/kg 这一个浓度梯度。

1.2 供试细菌和线虫

选择恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）作为菲降解细菌，购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。将购买菌种在无菌操作下接入牛肉膏蛋白胨液体培养基，28℃ 恒温摇床振荡培养 24 h，至均匀浑浊。吸取菌悬液转至马铃薯固体培养基培养，保持与线虫富集条件一致，因为线虫在马铃薯培养基上比牛肉膏蛋白胨培养基上更易存活繁殖^[14]。

供试线虫是经过菲驯化过的原小杆属线虫（*Protorhabditis*），具体驯化步骤：20% 的马铃薯培养基灭菌后加入菲，使培养基中的菲浓度达到 10

mg/L，接种恶臭假单胞菌，24 h 后接种线虫，待线虫存活并繁殖生长约一个世代后，再提高培养基中菲的浓度至 20 mg/L，由此得到的线虫具有耐菲的特性。

1.3 研究方案

设 4 个处理，分别为对照（CK）、接种恶臭假单胞菌（B）、接种食细菌线虫（N）、接种食细菌线虫加

条成虫/g 土。土壤水分调节为田间最大持水量的 60%（实际含水量为 204.09 g/kg），保鲜膜封口保持湿度，随机排列于 22℃ 恒温培养箱中黑暗培养，分别在培养第 0、5、14、28 天进行破坏性采样。

1.4 分析方法

菲的提取：先将 2.00 g 土样冷冻干燥 10 h，而后用二氯甲烷-超声波萃取 1 h，离心吸取上清液 3 ml 过硅胶柱。11 ml 二氯甲烷正己烷（1:1）混合溶液洗脱，收集滤液在 40℃ 恒温下浓缩至干，用甲醇定容到 2 ml，过 0.22 μm 孔径滤膜。滤液用 HPLC/UV 分析，室温 25℃，检测波长 254 nm，流速 1 ml/min^[15]。本试验中菲的回收率为 91.50%，检测限为 44.1 pg。由于菲易挥发，所以试验中用冷冻干燥处理提取菲的土样，提取过程中菲的损失甚微可忽略不计。

细菌计数：采用稀释平板计数法，以 20% 的马铃薯培养基作为培养基质，28℃ 恒温培养 24 h，计数细菌菌落。

FDA 水解酶活性（荧光素二乙酸酯的水解速率）的测定参见文献[16]，过氧化氢酶活性的测定参见文献[17]。

1.5 数据分析

数据经 SPSS13.0 软件处理分析，单因素方差分析后采用 Duncan 法检验处理间的差异显著性，以 $p < 0.05$ 作为显著性差异水平。

2 试验结果

2.1 土壤菲的残留

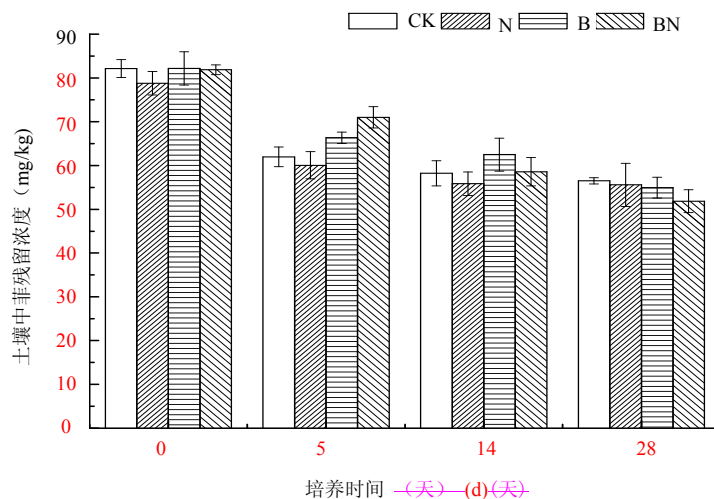
在培养期间，所有处理中菲的残留浓度都随着培养时间的延长而减少（图 1）。虽然各处理之间菲的去除率未达显著差异，但接种食细菌线虫有促进菲去除的趋势。在培养前半期（0 ~ 14 天）单接种食细菌线虫的处理（N）土壤中菲的残留最少，在培养结束（28 天）时，接种食细菌线虫和恶臭假单胞菌处理（BN）中土壤菲的残留最少，此时各处理土壤中菲的去除率依次为 BN（48.2%）> B（45.1%）> N（44.4%）>

CK (43.5%)。

2.2 土壤酶活性

随着培养时间的延长各处理 FDA 水解酶活性不断升高,第 14 天时,BN 及 N 处理 FDA 水解酶活性显著高于 CK 及 B 处理(图 2b)。而各处理过氧化氢酶活性随培养时间呈先升高再降低的趋势(图 2a)。BN 处理中过氧化氢酶活性从第 5 天开

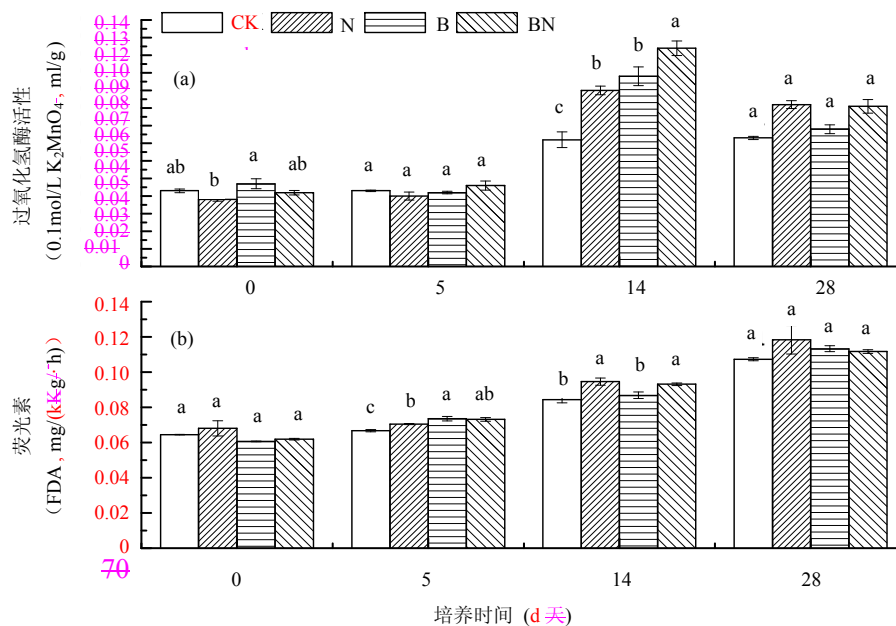
始逐渐高于其他处理,培养至第 14 天时与其他处理达到显著差异,BN、B 和 N 处理中过氧化氢酶活性分别比对照 CK 高 72.2%、50.0% 和 38.9%,而随培养时间的延长,B 处理过氧化氢酶活性迅速降低,BN 及 N 处理中过氧化氢酶活性仍显著高于 B 及 CK。



(误差线以标准误表示 ($n=4$), 下图同)

图 1 接种食细菌线虫和细菌对土壤中菲残留的影响

Fig.1 Residual concentrations of phenanthrene in soil inoculated with bacterial-feeding nematodes and bacteria



(图中 a、b、c 表示同一培养时间内处理间差异达显著水平 ($p<0.05$))

图 2 接种食细菌线虫和细菌对土壤中过氧化氢酶 (a)、FDA 水解酶 (b) 活性的影响。

Fig. 2 Activities of catalase (a) and fluorescein diacetate (b) in soil inoculated with bacterial-feeding nematodes and bacteria

2.3 土壤恶臭假单胞菌及食细菌线虫数量

随着培养时间的延长线虫数量呈逐渐下降趋势，在 0 ~ 14 天，N 处理线虫数量比 BN 处理略高，但在培养结束时（28 天）BN 处理的高于 N 处理（图 3a）。

在整个培养过程中恶臭假单胞菌的数量呈先增

高再降低的趋势，第 14 天时达到最大值，接种恶臭假单胞菌的处理（B、BN）恶臭假单胞菌的数量显著高于未接种处理（N、CK）（ $p < 0.05$ ），然而接种食细菌线虫对恶臭假单胞菌的数量并没有显著影响（图 3b）。

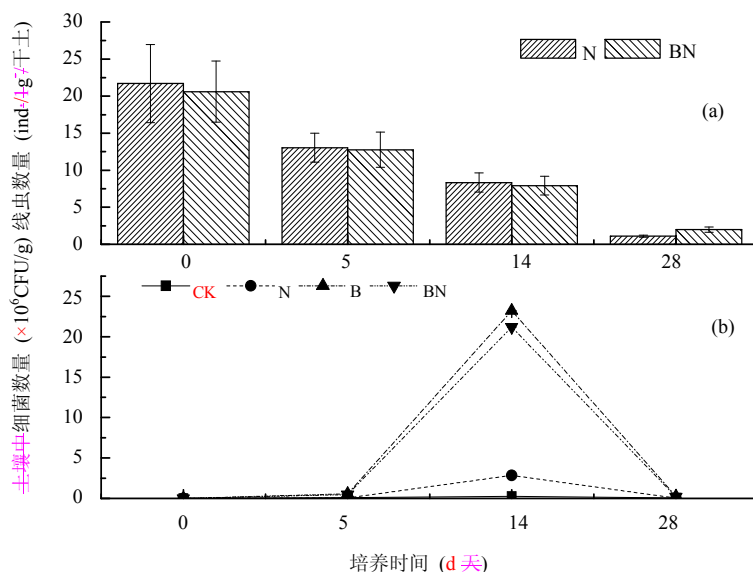


图 3 土壤食细菌线虫 (a) 及恶臭假单胞菌 (b) 数量的变化

Fig. 3 Bacterial-feeding nematode (a) and *Pseudomonas putida* (b) numbers in treatments

1 材料与方法

1.1 供试土壤及其预处理

土壤采自雨花台区板桥镇长江南岸冲积地潮土(美国制土壤质地分类为砂质壤土),鲜土采集后过 2 mm 筛备用。土壤中未检测出菲,其基本性状为: pH 值 6.43, 全 N 0.89 g/kg, 有机 C 10.87 g/kg, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 5.42 mg/kg, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 27.17 mg/kg, 微生物生物量碳 162.38 mg/kg。

预处理: 将溶于丙酮的菲(购自德国 Fluka 公司, 纯度 $\geq 97.0\%$)与上述过筛备用土样充分搅拌均匀, 在黑暗条件下置于通风橱处放置 24 h, 待丙酮挥发完毕后, 于黑暗处老化 7 天^[3]。

鉴于本实验室前人的研究经验, 土壤中菲的浓度为 50 mg/kg 时, 菲在土壤中的生物有效性太低, 不能达到预期的效果, 浓度为 150 mg/kg 时又太高, 会影响土壤生物的存活, 因此土壤中菲的浓度设置为 100 mg/kg。本试验旨在初步探讨食细菌线虫与细菌的相互作用对菲降解的影响, 因此只设 100 mg/kg 这一个浓度梯度。

1.2 供试细菌和线虫

选择恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)作为菲降解细菌, 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。将购买菌种在无菌操作下接入牛肉膏蛋白胨液体培养基, 28℃ 恒温摇床振荡培养 24 h, 至均匀浑浊。吸取菌悬液转至马铃薯固体培养基培养, 保持与线虫富集条件一致, 因为线虫在马铃薯培养基上比牛肉膏蛋白胨培养基上更易存活繁殖^[4]。

供试线虫是经过菲驯化过的原小杆属线虫(*Protorhabditis*), 具体驯化步骤: 20% 的马铃薯培养基灭菌后加入菲, 使培养基中的菲浓度达到 10 mg/L, 接种恶臭假单胞菌, 24 h 后接种线虫, 待线虫存活并繁殖生长约一

个世代后，再提高培养基中菲的浓度至 20 mg/L，由此得到的线虫具有耐菲的特性。

1.3 研究方案

设 4 个处理，分别为对照 (CK)、接种恶臭假单胞菌 (B)、接种食细菌线虫 (N)、接种食细菌线虫加恶臭假单胞菌 (BN)，每个处理设 4 个重复。

将 85.0 g 土壤加入 150 ml 的三角瓶中, 接种细菌的密度为 10^8 CFU/g 土, 接种食细菌线虫的密度为 20 条成虫/g 土。土壤水分调节为田间最大持水量的 60% (实际含水量为 204.09g/kg), 保鲜膜封口保持湿度, 随机排列于 22℃ 恒温培养箱中黑暗培养, 分别在培养第 0、5、14、28 天进行破坏性采样。

1.4 分析方法

~~菲的提取：先将 2.00 g 主样冷冻干燥 10 h，而后用二氯甲烷 超声波萃取 1 h，离心吸取上清液 3 ml 过硅胶柱。11 ml 二氯甲烷正己烷（1:1）混合溶液洗脱，收集滤液在 40℃ 恒温下浓缩至干，用甲醇定容到 2 ml，过 0.22 μm 孔径滤膜。滤液用 HPLC/UV 分析，室温 25℃，检测波长 254 nm，流速 1 ml/min^[15]。本试验中菲的回收率为 91.50%，检测限为 44.1 pg。由于菲易挥发，所以试验中用冷冻干燥处理提取菲的主样，提取过程中菲的损失其微可忽略不计。~~

~~细菌计数：采用稀释平板计数法，以20%的马铃薯培养基作为培养基质，28℃恒温培养24 h，计数细菌菌落。~~

~~FDA 水解酶活性(荧光素二乙酸酯的水解速率)的测定参见文献[16], 过氧化氢酶活性的测定参见文献[17]。~~

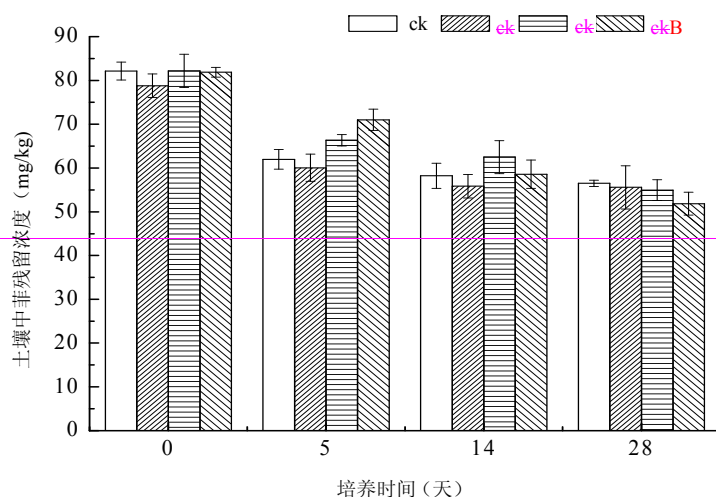
1.5 数据分析

数据经 SPSS13.0 软件处理分析,单因素方差分析后采用 Duncan 法检验处理间的差异显著性,以 $p<0.05$ 作为显著性差异水平。

2 试验结果

2.1 土壤菲的残留

从上述结果可知,随着处理时间基的残留浓度都随着培养时间的延长而减少(图1)。虽然各种处理之间基的去除率不同,但随着时间的增加,各种处理之间的差异在减小。当培养时间为96 h时,各种处理的基的残留浓度均接近于0。



~~(误差线以标准误表示 ($n=4$), 下图同)~~

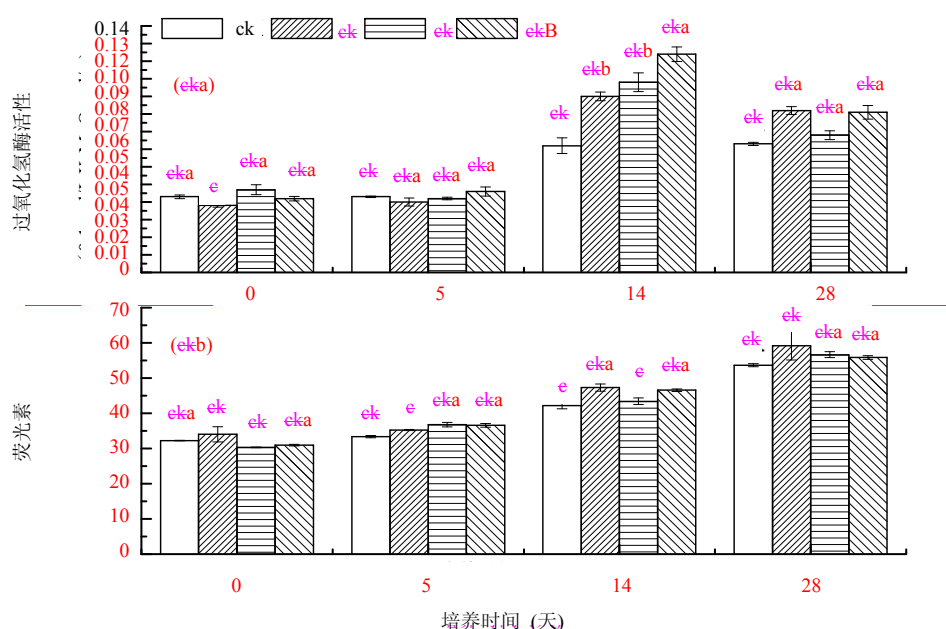
图 1 接种食细菌线虫和细菌对土壤中菲残留的影响

~~Fig.1 Residual concentrations of phenanthrene in soil inoculated with bacteria-feeding nematodes and bacteria~~

2.2 土壤酶活性

随着培养时间的延长各处理 FDA 水解酶活性不断升高, 第 14 天时, BN 及 N 处理 FDA 水解酶活性显著高于 CK 及 B 处理 (图 3b)。而各处理过氧化氢酶活性随培养时间呈先升高再降低的趋势 (图 3a)。

BN 处理中过氧化氢酶活性从第 5 天开始逐渐高于其他处理,培养至第 14 天时与其他处理达到显著差异, BN、B 和 N 处理中过氧化氢酶活性分别比对照 CK 高 72.2%、50.0%和 38.9%, 而随培养时间的延长, B 处理过氧化氢酶活性迅速降低, BN 及 N 处理中过氧化氢酶活性仍显著高于 B 及 CK。



(图中 a、b、e 表示同一培养时间内处理间差异达显著水平 ($p < 0.05$))

图 2 接种食细菌线虫和细菌对土壤中过氧化氢酶 (a)、FDA 水解酶 (b) 活性的影响。

Fig.2 Activities of catalase (a) and fluorescein diacetate (b) in soil inoculated with bacteria-feeding nematodes and bacteria

2.3 土壤恶臭假单胞菌及食细菌线虫数量

随着培养时间的延长线虫数量呈逐渐下降趋势, 在 0~14 天, N 处理线虫数量比 BN 处理略高, 但在培养结束时 (28 天) BN 处理的高于 N 处理 (图 3a)。

在整个培养过程中恶臭假单胞菌的数量呈先增高再降低的趋势, 第 14 天时达到最大值, 接种恶臭假单胞菌的处理 (B、BN) 恶臭假单胞菌的数量显著高于未接种处理 (N、CK) ($p < 0.05$), 然而接种食细菌线虫对恶臭假单胞菌的数量并没有显著影响 (图 3b)。

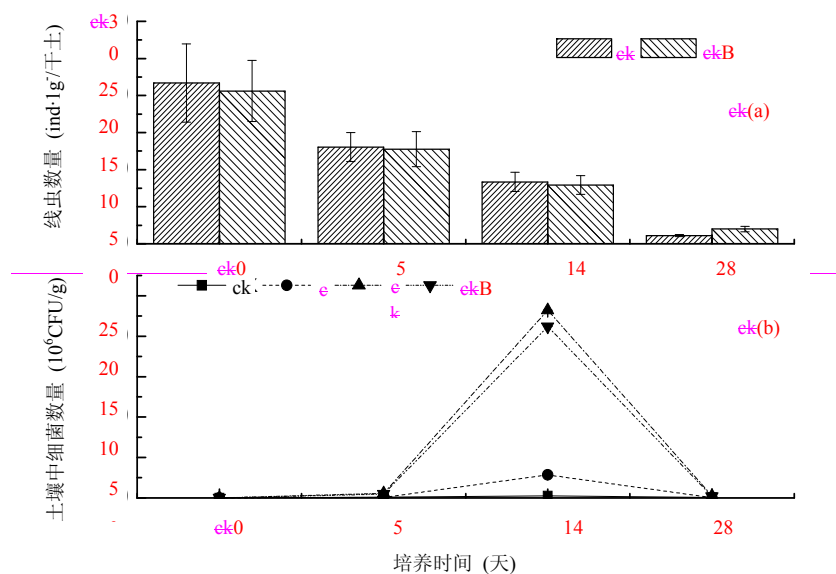


图 3—土壤恶臭假单胞菌及食细菌线虫数量的变化

Fig. 3—*Pseudomonas putida* (a) and bacteria-feeding nematode (b) numbers in treatments

3 讨论

本试验结果显示, 食细菌线虫与细菌的相互作用有促进菲去除的趋势。食细菌线虫与原生动物的食性相似, 因此推测食细菌线虫在修复菲污染土壤中的作用类似于原生动物。初步研究发现原生动物对细菌的取食能明显促进有机污染物的降解^[7,18], 与没有原生动物的处理相比, 纤毛虫能够使萘的降解速率提高 4 倍, 而在鞭毛虫种群对数生长期时, 细菌对苯和甲苯的降解速率分别提高到原来的 7.5 倍。食细菌线虫对菲降解的促进机制可能有以下 3 点^[4, 18-19]: ①直接取食作用, 捕食者对微生物的取食能加快限制性养分的循环、去除衰老的细胞、降低细菌对生存空间及能源的竞争; ②间接促进作用, 捕食者的排泄物、分泌物以及死后尸体分解释放物中都可能含有刺激细菌生长的生物活性物质; ③物理扰动作用, 捕食者在土壤中的活动, 不仅可以促进微生物的传播, 而且还可以使土壤中的表面暴露出来供微生物利用。

土壤酶活性是土壤污染修复中的关键因素, 反映土壤中的生化环境。过氧化氢酶活性反映了土壤中的氧化还原强度, 而 FDA 能够被许多酶 (如脂肪酶, 蛋白酶和酯酶) 和土壤生物水解, 因此 FDA 水解酶是指示土壤酶活性的总体指标^[20]。本试验中, 从测得的土壤过氧化氢酶和 FDA 综合水解酶活性来看, 接种食细菌线虫能显著促进酶活性的增强。过氧化氢酶活性的

增强表明土壤中的氧化还原反应增强, 即接种食细菌线虫为菲降解提供了有利的生化反应环境; FDA 综合水解酶显著高于其他处理, 表明了接种线虫能刺激土壤中整体酶活性的增强, 因此接种食细菌线虫有促进土壤中菲去除的趋势和潜力。菲降解的本质是一系列酶系反应。接种食细菌线虫通过影响土壤中过氧化氢酶和 FDA 综合水解酶活性来影响微生物对菲的降解, 原因可能是食细菌线虫的分泌物、排泄物及死后尸体释放物中含有细菌所能利用的养分和刺激性物质^[21-23], 使细菌控制在数量较低但处于对数生长期的低活性水平, 从而进一步影响了土壤中微生物的酶活性。另外, 食细菌线虫还可能直接分泌某些降解酶类如纤维素酶等^[24], 以促进菲的降解。

此外, 食细菌线虫的分泌物、排泄物及线虫死亡后所释放出的富含营养和某些生物活性物质, 可能类似于生物表面活性剂, 能增强菲的溶解性^[25-26], 促进菲与细菌间的有效接触, 使菲更容易被土壤微生物利用, 整个培养过程中 BN 和 N 处理中死亡的线虫相当于向土壤中加入的生物活性物质累计量分别约为 3.1 mg 和 3.429 mg (线虫生物量 = $LW^2/1.6 \times 10^6$, L: 体长 (μm), W: 体宽 (μm)); 并且食细菌线虫的取食作用能促进可溶性有机碳 (DOC) 的释放^[3], DOC 中的低分子化合物能够相对较快地被细菌重新吸收利用, 为细菌提供了碳源和能源, 使菲通过共代谢作用进一步去除。

取食微生物的食微土壤动物和微生物之间的相互作用对土壤生态系统结构和功能起着重要的调节作用^[27]。目前, 接种降解菌或工程菌是土壤污染微生物修复的主要途径^[26,28-29], 然而, 由于土壤生物之间存在交互作用, 一方面是接种菌与土著微生物间的生存竞争, 另一方面则是捕食者对土壤微生物种群的调控作用。因此, 在进行土壤污染修复时既要考虑接种菌与土著微生物的竞争存活能力, 更要了解捕食者对微生物种群和功能的调控作用。综合考虑土壤动物在土壤生态过程及调控机制中的作用, 对于提高土壤污染的修复效率具有重要意义^[3,18]。土壤动物与微生物间的相互作用在土壤污染修复过程中的作用不可忽视。

4 结论

随着培养时间的延长, 各处理中菲的残留浓度均呈下降趋势, 从整个培养过程观察, 接种食细菌线虫显著提高了土壤中过氧化氢酶、FDA 水解酶以及细菌的活性, 理论上有助于促进土壤中菲的降解。由于食细菌线虫与细菌的相互作用对有机污染物降解的影响因素和机制非常复杂, 接种食细菌线虫对土壤中菲降解的影响及其机制还需做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Wilcke W. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in soil: A review. *Plant Nutrtrion. Soil Science*, 2000, 63: 229-248
- [2] 周乐, 盛下放, 张士晋, 刘静. 一株高效菲降解菌的筛选及降解条件研究. *应用生态学报*, 2005, 16(12): 2 399-2 402
- [3] Tso SF, Taghon GL. Protozoan grazing increases mineralization of naphthalene in marine sediment. *Microbial Ecology*, 2006, 51: 460-469
- [4] Zhou QX, Song YF, Sun TH. Progress of study and application of bioremediation. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(7): 721-728
- [5] Bonkowski M, Cheng WX, Griffiths BS, Alphei J, Scheu S. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 2000, 36: 135-147
- [6] Mattison RG, Taki H, Harayama S. The soil flagellate heteromita globosa accelerates bacterial degradation of alkyl benzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. *Microbial Ecology*, 49: 142-150
- [7] Zarda B, Mattison G, Hess A, Hahn D, Höhener P, Zeyer J. Analysis of bacterial and protozoan communities in an aquifer contaminated with monoaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 27: 141-152
- [8] 陈小云, 刘满强, 胡锋, 毛小芳, 李辉信. 根际微型土壤动物-原生动物和线虫的生态功能. *生态学报*, 2007, 27(8): 3 132-3 143
- [9] 李辉信, 毛小芳, 胡锋, 马吉平. 食真菌线虫与真菌的相互作用及其对土壤氮素矿化的影响. *应用生态学报*, 2004, 15(12): 2 304-2 308
- [10] 毛小芳, 胡锋, 陈小云, 李辉信. 不同土壤水分条件下华美新小杆线虫对枯草芽孢杆菌数量、活性及土壤氮素矿化的影响. *应用生态学报*, 2007, 18(2): 405-410
- [11] 胡锋, 李辉信, 谢连琪, 吴珊眉. 土壤食细菌线虫与细菌的相互作用及其对 N、P 矿化生物固定的影响及机理. *生态学报*, 1999, 19(6): 914-920
- [12] 陈小云, 李辉信, 胡锋, 刘满强. 食细菌线虫对土壤微生物量和微生物群落结构的影响. *生态学报*, 2004, 24(12): 2 825-2 831
- [13] Manilal VB, Alexander M. Factors effecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Applied Environmental Microbial*, 1991, 35: 401-405
- [14] 李辉信, 陈小云, 胡锋. 土壤食细菌线虫的分离和富集培养方法. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 71-74
- [15] 高彦征, 朱利中, 凌婉婷, 熊巍. 土壤和植物样品的多环芳烃分析方法研究. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5): 1 003-1 006
- [16] Alef K, Nannipieri P. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. New York: Academic Press, 1995
- [17] Dike RP, Pnakhurs C, Doube BM. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health // Pankhurst C, Gupta VVSR. *Biological Indicators of Soil Health*. Wallingford, USA: Cab Inetnrtional, 1997
- [18] Mattison RG, Taki H, Harayama S. The soil flagellate *Heteromita globosa* accelerates bacterial degradation of alkylbenzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. *Microbial Ecology*, 49: 142-150
- [19] Ratsak CH, Maarsen KA, Kooijman SA L. Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. *Water Research*, 1996, 30(1): 1-12
- [20] Perucci PU, Bonciarelli U, Santilocchi R, Bianchi AA. Effect of rotation, nitrogen fertilization and management of crop residues on some chemical, microbiological properties of soil. *Biology and Fertility of Soils*, 1997, 24: 311-316
- [21] Ekschmitt K, Bakonyi G, Bongers M, Bongers T, Boström S, Dogan H, Harrison A, Kallimanis A, Nagy P, O'Donnell AG, Sohlenius B, Stamou GP, Wolters V. Effects of the nematofauna on microbial energy and matter transformation rates in European

- grassland soils. *Plant and Soil*, 1999, 212: 45–61
- [22] Riemann F, Helmke E. Symbiotic relations of sediment-agglutinating nematodes and bacteria in detrital habitats: The enzyme-sharing concept. *Marine Ecology*, 2002, 23: 93–113
- [23] Moens T, Dos Santos GAP, Thompson F, Swings F, Fonsêca-Genevois V, Vincx M, Mesel ID. Do nematode mucus secretions affect bacterial growth? *Aquatic Microbial Ecology*, 2005, 40: 77–83
- [24] Kojima K, Kamijyo A, Masumori M, Sasaki S. Cellulase activities of pine wood-nematode isolate with different virulences. *Journal of the Japanese Forestry Society*, 1994, 76: 258–262
- [25] 占新华, 周立祥, 万寅婧, 蒋廷惠. 水溶性有机物对植物吸收菲的影响及其机制研究. *环境科学学报*, 2006, 26(1): 105–110
- [26] 姜霞, 井欣, 高学晟, 区自清. 表面活性剂对土壤中多环芳烃生物有效性影响的研究进展. *应用生态学报*, 2002, 13(9): 1 179–1 186
- [27] Bonkowski M. Protozoa and plant growth: The microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*, 2004, 162: 617–631
- [28] 邹德勋, 骆永明, 滕应, 平立凤, 刘五星, 李振高. 多环芳烃长期污染土壤的微生物强化修复初步研究. *土壤*, 2006, 38(5): 652–656
- [29] 李培军, 郭书海, 孙铁珩, 台培东, 张春桂, 白玉兴, 孙强, 生平. 不同类型原油污染土壤生物修复技术研究. *应用生态学报*, 2002, 13(1): 1 455–1 458

Effects of Bacterial-Feeding Nematode on Phenanthrene Degradation in Soil

JING Yong-ping, ZHAO Li, CHEN Xiao-yun, LIU Man-qiang, HU Feng, LI Hui-xin
(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A microcosm incubation experiment was conducted to study the effects of bacteria-feeding nematodes, which feed phenanthrene-degrading bacteria (*Pseudomonas putida*), on phenanthrene removal from the un-sterilized soil. Phenanthrene was selected as a model of aromatic hydrocarbon (PAH). The factorial experimental design include four treatments, i.e., soil inoculated with bacteria only (B), bacteria-feeding nematodes only (N), both B and N (BN), and neither B nor N (CK). Soil was sampled destructively at 0 d, 5 d, 14 d and 28 d after the initiation of incubation. Selected indices include the residual concentrations of phenanthrene, the abundance of bacteria-feeding nematodes and enzyme activities of the catalase, hydrolysis rate of fluorescein diacetate (FDA). The results demonstrated that bacteria-feeding nematodes inoculated only (N) treatment stimulated phenanthrene removal during the incubation period of 0–14 days, however, the stimulation of BN on phenanthrene removal increased gradually, especially obvious at later incubation period (14–28 days). At the end of the incubation period, the sequence of phenanthrene removal was: BN (48.15%) > B (45.06%) > N (44.43%) > CK (43.52%). The results also showed that the inoculation of bacteria-feeding nematodes could significantly ($p < 0.5$) increase bacteria and soil enzyme activities with the incubation time. In conclusion, the interaction between bacterial-feeding nematodes and bacteria could possibly accelerate phenanthrene degradation in soil.

Key words: Phenanthrene, Bacterial-feeding nematodes, *Pseudomonas putida*, Soil enzyme activity