

异噻唑啉酮对土壤微生物杀灭效果及其影响因素初探^①刘国明^{1,2}, 万梦雪^{1,2}, 贾萌萌^{1,2}, 王慧峰^{1,2}, 胡文友¹, 黄 标^{1*}

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 异噻唑啉酮杀菌剂是一类新型的高效杀菌剂, 广泛应用于个人洗护用品、制药、水处理等领域, 但是目前其对土壤微生物的杀灭效果和影响因素尚不明确。本文将异噻唑啉酮杀菌剂卡松(Kathon)CG 用于土壤灭菌, 采用稀释平板计数法测定了供试土壤加入卡松 CG 前后细菌、真菌和放线菌的数量变化, 以评估卡松 CG 对土壤微生物杀灭效果, 并考察了卡松 CG 浓度、pH、温度、时间等对杀灭效果的影响。结果表明: 卡松 CG 对两种土壤中放线菌杀灭率均为 100%, 对细菌、真菌的杀灭率随卡松 CG 浓度的升高而增大, 当卡松 CG 浓度由 0.5 ml/L 升至 3.0 ml/L 时, 对风干土壤中细菌、真菌的杀灭率分别由 84.1%、78.0% 升至 98.7%、99.6%, 卡松 CG 浓度升至 5.0 ml/L 时, 对细菌和真菌杀灭率接近 100%; 当卡松 CG 浓度较低(<3.0 ml/L)时对新鲜土壤中细菌和真菌杀灭率与风干土壤相比有所下降, 此时过高的 pH 也会降低细菌和真菌的杀灭率, 但当卡松 CG 浓度>3.0 ml/L 时, 对风干土壤和新鲜土壤中细菌、真菌杀灭率均>99.0%, pH 对杀灭率影响较小; 土壤温度(25~50℃)对土壤细菌杀灭效果没有影响, 且卡松 CG 对土壤细菌杀灭作用持续时效>72 h。本研究表明, 卡松 CG 可以在较低浓度下有效杀灭土壤中细菌、真菌和放线菌, 杀灭效果在 25~50℃内保持稳定, 受土壤 pH 影响较小。采用卡松 CG 可以作为土壤研究中控制生物因素的备选方法之一。

关键词: 异噻唑啉酮; 卡松 CG; 土壤微生物; 土壤灭菌

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A

土壤灭菌是指杀灭或清除土壤中微生物的过程, 通常用于土壤微生物量、酶活性、土壤呼吸作用的测定^[1-2], 土壤微生物学检验, 以及土壤中外源物质的降解、吸附试验等过程中对生物与非生物反应过程的区分^[3]。目前实验室常用的土壤灭菌方法主要有物理方法和化学方法。物理方法主要有高压蒸汽灭菌、 γ 射线灭菌、干热灭菌、微波灭菌等, 化学方法主要有氯仿(或溴甲烷、环氧乙烷、环氧丙烷等)熏蒸灭菌, 以及向土壤中加入 NaN_3 或 HgCl_2 等^[1, 3-6]。针对不同的研究目的, 上述灭菌方法各有利弊。

研究显示, 土壤灭菌过程通常会导致土壤理化性质的改变^[4], 从而影响对土壤中生物因素和非生物因素的区分^[7]。高压蒸汽灭菌和 γ 射线灭菌会改变土壤团聚体团聚状态, 导致土壤表面积增加和土壤有机质中碳水化合物和烷基氮含量降低^[3]; γ 射线灭菌还会导致土壤中硝态氮和氨态氮含量的变化, 其灭菌效果也会受到土壤含水量和 γ 射线辐射剂量的影响^[8-9]; 高压蒸汽灭菌对土壤性质的改变程度受土壤类型的

影响, 例如砂质潮土和红壤高温高压灭菌会造成土壤有机质显著增加, 而对其他类型土壤影响不大^[10]。此外, 高压蒸汽灭菌等物理方法通常需要对土壤多次处理, 处理时间长, 操作复杂^[6]; γ 射线灭菌也存在辐射时间较长等不足^[6]; 干热灭菌会造成土壤可溶性有机质的浓度增加和土壤 pH 改变^[4]。有研究指出, CaCl_2 介质中的土壤 pH 会随着土壤干燥温度的升高而降低^[11]; Razavi 和 Lakzian^[7]比较了不同灭菌方法对土壤理化性质的影响, 结果发现高压蒸汽灭菌、氯仿熏蒸、紫外和微波灭菌 4 种方法均造成土壤 pH、电导率、阳离子交换量、土壤有机质、土壤全氮等指标的变化。化学灭菌方法中, 环氧乙烷和环氧丙烷熏蒸灭菌会导致土壤 pH 升高^[12], 熏蒸时间较长, 同时也会破坏大气臭氧层^[13-14]。与高压蒸汽灭菌等物理方法相比, 向土壤加入 HgCl_2 、 NaN_3 等杀菌剂抑制土壤微生物活性可能更加便于操作, 但土壤中加入 HgCl_2 会引入重金属元素 Hg, 而加入 NaN_3 (或 KN_3) 会导致土壤 pH 升高, 土壤中的叠氮化物也会转变成

基金项目: 国家自然科学基金项目(41473073)资助。

* 通讯作者(bhuang@issas.ac.cn)

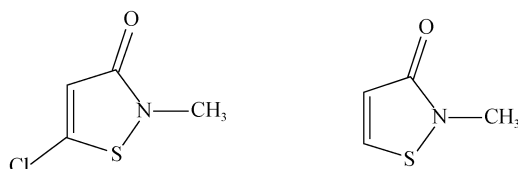
作者简介: 刘国明(1988—), 男, 山东临沂人, 博士研究生, 主要从事土壤地球化学研究。E-mail: gmlu15@issas.ac.cn

有毒的叠氮酸^[2], 这些均会造成土壤性质的变化。Wolf 等^[6]也比较了多种灭菌方法对土壤性质的影响, 发现环氧丙烷处理后会使得土壤表面积显著减小, 环氧丙烷和 NaN_3 会造成土壤 pH 的升高。综上所述, 土壤灭菌过程均可能引起土壤性质的改变^[4,5,12], 因此, 根据研究目的选择合适的灭菌方法, 减少灭菌过程对土壤其他性质和目标物的影响成为土壤灭菌方法选择的关键点^[3-4]。

合适的土壤灭菌方法需满足以下要求: 灭菌效果好; 对土壤物理、化学和结构等性质改变程度小;

灭菌方法操作简便; 材料廉价、易得且环境友好。异噻唑啉酮是指含有异噻唑啉酮杂环的一系列化合物, 是一类新型的高效杀菌剂。卡松(Kathon)CG 是活性成分为 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(CMI)和 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(MI)(化学结构式如图 1 所示)的杀菌剂的商品名称^[15-17], 卡松 CG 具有以下特点: 对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、霉菌及酵母菌均有杀灭作用, 活性强, pH 适应范围广, 环境友好^[18], 在洗化用品、药业、涂料、水处理等领域应用广泛^[19]。文献表明, Gandhi 等^[20]运用生物增强型反应墙处理复合污染的地下水, 以及 Silva 等^[21]在研究苯系物自然衰减过程中, 将卡松 CG 用于区分反应中的生物因素, 此后, Du 等^[22]在饮用水处理时也将加入卡松的水溶液作为对照试验。但是, 目前卡松 CG 对土壤微生物杀灭效果尚不明确。本文选择风干土壤和新鲜土壤样品为代表, 采用稀释平板计数法考察了不同

条件下卡松 CG 处理前后土壤中细菌、真菌和放线菌数量变化, 旨在进一步了解卡松 CG 对土壤微生物的杀灭效果和影响因素, 为卡松 CG 在土壤灭菌中的应用提供科学依据。



5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(CMI) 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(MI)

图 1 卡松 CG 中有效成分化学结构式

Fig.1 Chemical structural formula of effective constituents in Kathon CG

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤: 供试土壤为风干土壤和新鲜土壤样品, 风干土壤样品采自中国科学院封丘农田生态系统试验站表层(0 ~ 15 cm)小麦-玉米轮作农田土壤, 土壤类型为潮土, 土壤样品按照蛇形法取 5 个点, 采样土壤剔除杂物及残留根系, 混合均匀, 采用四分法取土样 1 kg, 在室温下风干, 然后将土样压碎过 2 mm 筛放于密封袋中保存备用; 新鲜土壤样品采自南京城郊表层(0 ~ 15 cm)草地土壤, 采集的新鲜土壤样品剔除杂物及残留根系, 混合均匀, 采用四分法取土样 1.5 kg, 将样品过 2 mm 筛后置于 4℃ 条件下保存备用。供试土壤的基本性质见表 1。

表 1 供试土壤基本属性
Table 1 Basic properties of tested soils

土壤	0.02 ~ 2 mm 砂粒(%)	0.002 ~ 0.02 mm 粉粒(%)	<0.002 mm 黏粒(%)	pH	含水量(g/kg)
农田土壤	73.1	12.3	14.6	8.66	15.7
草地土壤	35.2	46.5	18.3	7.56	229.8

卡松 CG 及培养基: 卡松 CG 由广州敏航化工科技有限公司提供; LB 营养琼脂培养基、改良马丁琼脂培养基、改良高氏 1 号培养基由青岛海博生物技术有限公司提供。

1.2 试验设计

1.2.1 不同浓度卡松 CG 对土壤微生物的杀灭效果 每个处理称取 5.0 g 风干土壤(和相当于 5.0 g 风干土壤质量的新鲜土壤)置于 100 ml 锥形瓶中, 加入 45 ml 去离子水; 将锥形瓶置于摇床以 200 r/min, 25℃ 充分振荡 20 min 后取出, 静置过夜; 去除土壤悬液表面漂浮的草木屑等杂物, 分别向其中加入 0.5、1.0、3.0、5.0、7.0 mL/L 5 个浓度的卡松 CG; 再次置于摇床上 200 r/min 振荡 20 min, 然后取 0.1 ml 土壤

悬液分别涂布于 LB 营养琼脂培养基、改良马丁琼脂培养基和改良高氏 1 号培养基中, 在 28 ~ 30℃ 条件下培养一定时间, 测定微生物数量。对照组不加卡松 CG, 其余处理步骤均与试验组处理方法相同。每个处理重复 3 次。

1.2.2 不同 pH 条件下卡松 CG 对土壤微生物的杀灭效果 每个处理称取 5.0 g 风干土壤置于 100 ml 锥形瓶中, 加入 45 ml 去离子水; 置于摇床以 200 r/min, 25℃ 充分振荡 20 min 后取出, 静置过夜; 去除土壤悬液表面漂浮的草木屑等杂物, 取其中一份测定土壤悬液 pH 为 8.12, 然后将其余土壤悬液用 1.0 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液调节 pH 至 3.07、9.93 和 10.97 稳定后, 向上述土壤悬液中分别加入 0.5、1.0、

3.0、5.0、7.0 ml/L 的卡松 CG；再次置于摇床以 200 r/min 振荡 20 min，然后取 0.1 ml 土壤悬液涂布于和 1.2.1 中相同的 3 种培养基中培养一定时间，测定微生物数量。每个土壤样品重复 3 次。

1.2.3 不同温度条件下卡松 CG 对土壤细菌的杀灭效果 每个处理称取 5.0 g 风干土壤置于 100 ml 锥形瓶中，加入 45 ml 去离子水，置于摇床 200 r/min，25℃充分振荡 20 min 后取出，静置过夜；去除土壤悬液表面漂浮的草木屑等杂物，将 4 份土壤悬液分别放置于在 25、35、45 和 50℃环境中，然后分别加入 3.0、5.0 ml/L 的卡松 CG，置于摇床以 200 r/min 分别在 25、35、45 和 50℃条件下振荡 20 min，然后取 0.1 ml 土壤悬液涂布于 LB 营养琼脂培养基中培养一定时间，测定微生物数量。每个处理重复 3 次。

1.2.4 卡松 CG 对土壤细菌的杀灭时效 将 1.2.2 中加入卡松 CG 的土壤悬液在室温下静置 72 h 后，再次摇床以 200 r/min 振荡 20 min，然后接种培养，比较卡松 CG 处理后立即接种(时间<2 h)培养与静置 72 h 接种培养后菌落数量的不同。

1.3 分析方法

1.3.1 微生物数量测定方法 微生物计数采用稀释平板计数法^[23]。细菌采用 LB 营养琼脂培养基，在 28~30℃条件下培养 24 h；真菌采用改良马丁琼脂培养基，在 28~30℃条件下培养 24 h，放线菌采用改良高氏 1 号培养基，在 28~30℃条件下培养 120 h，然后对平板进行计数。试验中，发现与不加卡松 CG 土壤悬液接种培养的培养基相比，加入卡松 CG 后的土壤悬液接种培养的培养基中菌落数量大幅减少，卡松 CG 浓度为 0.5 ml/L 时，LB 营养琼脂培养基中最高菌落数量为 353 CFU，当卡松 CG 浓度高于 0.5 ml/L 时，3 种培养基中的菌落数量均小于 300 CFU，因此，对加入卡松 CG 的 10⁻¹ 稀释度的土壤悬液可直接涂布，培养，计数测定残留菌落数量。

1.3.2 土壤基本性质测定方法 土壤 pH(水土比为 2.5:1)采用电位法测定(NY/T1121.2-2006)；土壤质地采用激光粒度仪(Beckman Coulter, Inc. LS-13320)测定；土壤含水量采用烘干法测定。

1.4 数据处理

卡松 CG 对土壤中细菌、真菌和放线菌杀灭率(killing rate, KR)的计算公式如下：

$$KR = \frac{N_a - N}{N_a} \times 100\% \quad (1)$$

式中：KR 为杀灭率，%；N 为试验组中残留菌落数，CFU/ml；N_a 为对照组中菌落数，CFU/ml。试验中，发现与 pH 为 8.12 时土壤悬液相比，当 pH 调节至

3.07、9.93 和 10.97 时土壤悬液接种后平板中菌落数量相应减少，因此，本文扣除了土壤 pH 变化对土壤中菌落数量的影响，然后计算杀灭率。

参考 SN/T 3229-2012 行业标准，3 种平板中菌落数量计算公式如下：

$$\text{菌落数量} = \frac{c}{n \times d \times V} \quad (2)$$

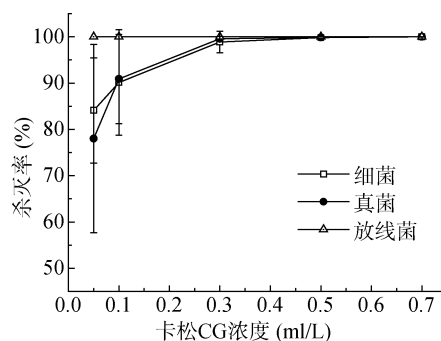
式中：c 为全部平板上的菌落总数之和；n 为用于计数的平板数量；d 为稀释因子，土壤悬液的稀释因子为 10⁻¹；V 为接种样品的体积，ml。

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析，杀灭率经过平方根反正弦转换后再做方差分析(ANOVA)，处理平均数采用最小显著差数法(LSD)进行差异显著性检验(α=0.05)，采用 OriginPro 9.1 绘图。

2 结果与分析

2.1 卡松 CG 浓度对土壤中微生物杀灭效果的影响

卡松 CG 浓度对风干土壤中细菌、真菌和放线菌杀灭率的影响如图 2 所示，卡松 CG 在试验浓度范围内对土壤中放线菌杀灭率均为 100%，杀灭率不受卡松 CG 浓度和 pH 的影响。卡松 CG 对土壤中细菌、真菌杀灭率随卡松 CG 浓度的增加而升高，卡松 CG 浓度达到 3.0 ml/L 时，卡松 CG 对风干土壤中细菌、真菌杀灭率基本达到稳定，杀灭率>98%，当卡松 CG 浓度达到 5.0 ml/L 以上时，卡松 CG 对土壤中细菌和真菌杀灭率>99.8%。可见，卡松 CG 对土壤中细菌、真菌和放线菌均具有良好的杀灭效果。



(图中不同卡松 CG 浓度下的杀灭率为 pH=3.07、8.12、9.93、10.97 时的平均杀灭率)

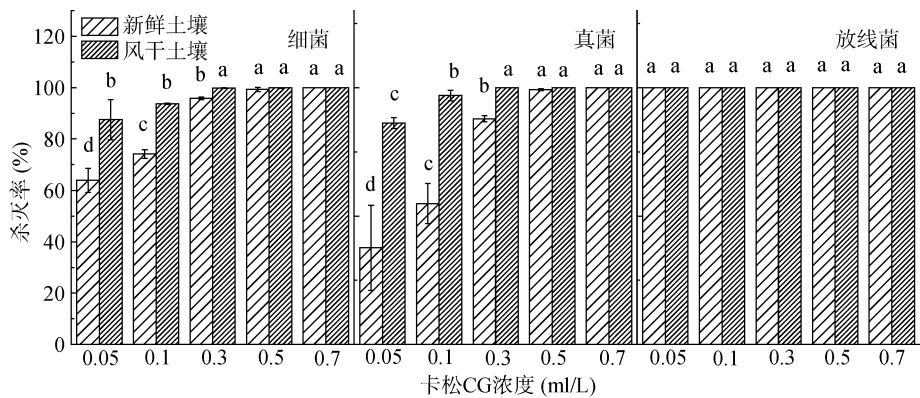
图 2 卡松 CG 浓度对风干土壤微生物杀灭率的影响
Fig. 2 Effect of Kathon CG concentrations on killing rates of soil microbes in air-dried soils

通过对两种土壤中微生物杀灭率的比较，发现卡松 CG 对土壤中细菌和真菌杀灭率均随卡松 CG 浓度的增加而升高(图 3)，卡松 CG 浓度由 0.5 ml/L 升至 1.0 ml/L 时，对风干土壤和新鲜土壤中细菌杀灭率分

别由 87.6% 和 64.0% 升至 93.7% 和 74.2%；卡松 CG 浓度为 0.5 ml/L 和 1.0 ml/L 时，卡松 CG 对风干土壤中细菌和真菌杀灭率显著高于对新鲜土壤中细菌和真菌的杀灭率($P<0.01$)；当卡松 CG 浓度增至 3.0 ml/L 时，卡松 CG 对风干土壤中真菌杀灭率仍然高于新鲜土壤($P<0.05$)，卡松 CG 浓度 >5.0 ml/L 时对两种土壤中细菌和真菌杀灭率均 $>99\%$ ，此时卡松 CG 对新鲜土壤和风干土壤中细菌、真菌杀灭率不存在显著差异，当增加卡松 CG 浓度至 7.0 ml/L 时，对两种土壤中细菌、真菌的杀灭率均为 100%。卡松 CG 在 5.0~7.0 ml/L 范围内时，对土壤中的放线菌杀灭率均达到 100%，这进一步表明卡松 CG 对放线菌的杀灭率不受土壤条件和卡松 CG 浓度的影响。

2.2 pH 对卡松 CG 杀灭土壤微生物效果的影响
pH 对卡松 CG 杀灭土壤微生物效果的影响结果见表 2。可以看出，当卡松 CG 浓度较低(<3.0 ml/L)时，土壤悬液过低的 pH($pH=3.07$)对土壤中细菌和真菌的杀灭率影响均不显著，而过高的 pH($pH=10.97$)

会显著降低卡松 CG 对土壤中细菌和真菌的杀灭率($P<0.05$)；当卡松 CG 浓度较高(>3.0 ml/L)时，卡松 CG 对细菌杀灭率在 pH 为 3.07、8.12、9.93 和 10.97 时不存在显著差异。卡松 CG 浓度为 0.5 ml/L 和 1.0 ml/L，土壤悬液 pH 为 10.97 时，卡松 CG 对细菌的杀灭率比 pH 为 8.12 时分别下降了 21.23% 和 18.46%，此时卡松 CG 对细菌杀灭率显著低于 pH 为 3.07、8.12、9.93 时，而卡松 CG 对细菌的杀灭率在 pH 为 3.07、8.12、9.93 时不存在显著差异。当卡松 CG 浓度高于 3.0 ml/L 时，不同 pH 对细菌杀灭率的影响均不存在显著差异。由表 2 可知，卡松 CG 对土壤中真菌杀灭率受到土壤悬液高 pH 的影响较大，卡松 CG 浓度为 0.5 ml/L 和 1.0 ml/L 时，pH 为 10.97 时卡松 CG 对真菌的杀灭率比 pH 为 8.12 时分别下降了 46.12% 和 21.57%，此时卡松 CG 对真菌杀灭率显著低于 pH 为 3.07、8.12、9.93 时对真菌杀灭率；当卡松 CG 浓度高于 3.0 ml/L 时对土壤中真菌的杀灭率均 $>99\%$ 。



(图中不同小写字母表示相同土壤不同卡松 CG 浓度处理间差异在 $P<0.05$ 水平显著)

图 3 卡松 CG 对风干土壤和新鲜土壤微生物杀灭效果的对比
Fig. 3 Comparison of killing rates of soil microbes between air-dried and fresh soils

表 2 不同处理对卡松 CG 杀灭细菌和真菌效果的影响(%)
Table 2 Effects of Kathon CG on killing rates of bacteria and fungi under different treatments

微生物	pH	卡松 CG 浓度(ml/L)				
		0.5	1.0	3.0	5.0	7.0
细菌	3.07	86.8 ± 4.1 a	90.8 ± 4.2 ab	99.6 ± 0.2 a	100.0 a	100.0 a
	8.12	87.6 ± 7.8 a	93.7 ± 0.2 a	99.9 ± 0.1 a	99.9 ± 0.2 a	100.0 a
	9.93	89.4 ± 0.3 a	95.4 ± 0.3 a	99.6 ± 0.4 a	100.0 a	100.0 a
	10.97	69.0 ± 13.7 b	76.4 ± 18.2 b	96.4 ± 4.2 a	99.5 ± 1 a	100.0 a
真菌	3.07	87.2 ± 1.2 a	95.5 ± 0.7 a	99.0 ± 0.5 a	99.7 ± 0.1a	100.0 a
	8.12	86.3 ± 2.2 a	96.9 ± 2.1 a	100.0 b	100.0 b	100.0 a
	9.93	92.1 ± 0.2 a	95.2 ± 0.1 a	99.3 ± 0.3 a	99.7 ± 0.2 a	100.0 a
	10.97	46.5 ± 16.1 b	76.0 ± 7.5 b	100.0 b	100.0 b	100.0 a

注：同一列中不同小写字母表示相同卡松 CG 浓度时不同 pH 处理间的差异显著($P<0.05$)；下同。卡松 CG 对放线菌杀灭率均为 100%，数据未显示。

2.3 温度对卡松 CG 杀灭土壤细菌效果的影响

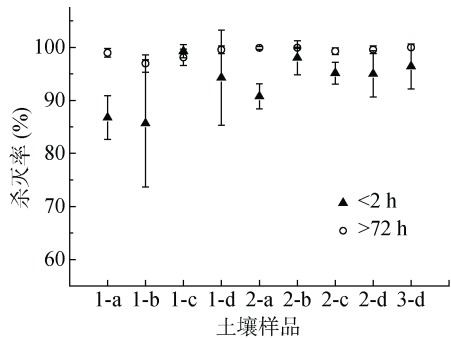
由图 3 可知，当卡松 CG 浓度为 0.5、1.0 和 3.0 ml/L 时对风干土壤中细菌杀灭率菌分别为 87.6%、93.7% 和 99.9%，当卡松 CG 浓度为 0.5 ml/L 和 1.0 ml/L 时不能满足杀灭土壤微生物的要求，因此，考察温度对土壤中细菌杀灭效果的影响时选择卡松 CG 浓度为 3.0 ml/L 和 5.0 ml/L。由表 3 可知，与 25℃ 时相比，在 45、50℃ 时卡松 CG 对细菌杀灭率均高于 99.9%，此时，不同温度处理间卡松 CG 对杀灭率的影响不存在显著差异，卡松 CG 对土壤中细菌杀灭率不受温度的影响。

表 3 不同温度处理卡松 CG 对土壤细菌的杀灭效果
Table 3 Effects of Kathon CG on killing rates of bacteria under different ambient temperatures

温度(℃)	卡松 CG(ml/L)	杀灭率(%)
25	3.0	99.9 ± 0.1
	5.0	99.9 ± 0.2
45	3.0	100.0
	5.0	100.0
50	3.0	100.0 ± 0.1
	5.0	100.0

2.4 卡松 CG 对土壤中细菌的杀灭时效

卡松 CG 对土壤中细菌杀灭效果的持续时间如图 4 所示。随着土壤中加入卡松 CG 后作用时间的延长，卡松 CG 对土壤中细菌的杀灭率升高，卡松 CG 浓度为 0.5、1.0 和 3.0 ml/L 土壤悬液 pH 分别为 3.07、8.12、9.93 和 10.97 时，同一土壤样品加入卡松 CG 作用 72 h 后与作用时间小于 2 h 相比，卡松 CG 对土壤中细菌杀灭率有显著提高，在试验的卡松 CG 浓度和土壤悬液 pH 范围内，卡松 CG 对土壤中细菌的杀灭效果有效时间维持在 72 h 以上。



(图中土壤样品编号中数字 1、2 和 3 依次代表卡松 CG 浓度为 0.5、1.0、3.0 ml/L，字母 a、b、c 和 d 分别表示土壤 pH 为 3.07、8.12、9.93 和 10.97)

图 4 卡松 CG 对土壤中细菌杀灭效果的持续时间
Fig. 4 Effective duration of germicidal effect of Kathon CG on bacteria

3 讨论

3.1 卡松 CG 浓度对土壤微生物杀灭效果的影响

随着卡松 CG 浓度的增加，其对土壤中细菌和真菌的杀灭率呈显著增加的趋势，当卡松 CG 浓度为 0.5 ml/L 和 1.0 ml/L 时，卡松 CG 对风干土壤中细菌和真菌杀灭率显著高于新鲜土壤，可能的原因是卡松 CG 浓度较低时不能完全杀灭土壤中的细菌和真菌，而新鲜土壤比风干土壤中蕴含的细菌和真菌数量更多，造成低浓度卡松 CG 处理的新鲜土壤悬液中残留更多数量的微生物；卡松 CG 对放线菌杀灭率均为 100%，不受卡松 CG 浓度的影响。

与卡松 CG 相比，HgCl₂ 作为土壤杀菌剂时通常加入浓度是 500 mg/kg 土壤^[24]，也有研究者采用的 HgCl₂ 浓度为 50、90 或 176 mg/L^[25]，Wolf 等^[6]认为 HgCl₂ 控制土壤微生物活性对土壤的物理和化学性质改变最小。NaN₃ 用于控制土壤微生物活动时，不同研究者添加的浓度范围相差较大，添加浓度一般在 0.002% ~ 2%^[26-28]，但是许多文献中并未说明所使用的 NaN₃ 浓度是否足以抑制土壤中微生物活性^[29-30]。有研究指出，当 NaN₃ 添加浓度为 100、200、500 或 650 mg/L 时，可以有效降低土壤中微生物活性，其中 650 mg/L 为常用浓度。Chefetz 等^[27]研究发现，在 NaN₃ 共存条件下，除草剂阿特拉津的浓度会随时间显著下降，NaN₃ 对阿特拉津的转化会显著影响土壤中除草剂的吸附，因此他们认为在吸附/解吸试验中应该仔细评估使用 NaN₃ 作为土壤杀菌剂的可行性，这也可能会影响 NaN₃ 在土壤的吸附/解吸等研究中作为控制生物因素方法的应用。卡松 CG 中含有一定量的硝酸铜和硝酸镁作为稳定剂，但与研究者采用 NaN₃ 控制土壤微生物活性相比^[29]，在本研究中采用卡松 CG 浓度 3.0 ml/L 时，卡松 CG 中 NO₃⁻ 浓度为 136.67 mg/L，小于采用 NaN₃ 时的浓度，可见卡松 CG 杀灭土壤微生物时使用的浓度较低。实际使用卡松 CG 杀灭土壤微生物时，卡松 CG 中硝酸铜和硝酸镁在土壤悬液中会被大大稀释，但在控制土壤中生物因素时也应考虑其对研究目标的影响。

3.2 pH 对卡松 CG 杀灭土壤微生物性能的影响

卡松 CG 具有较大的 pH 适用范围^[31]，但是目前尚未见考察土壤 pH 变化时对其杀灭土壤微生物性能影响的报道，此外，采用 NaN₃、HgCl₂ 对土壤灭菌的方法中，也很少考虑土壤 pH 变化可能对土壤微生物杀灭效果的影响^[24,32]。有研究指出 MCI 和 MI 在环境中会发生水解和光解作用，体系较高的 pH 会缩短 MCI 和 MI 的半衰期^[33]，由表 2 可知，当卡松 CG 浓

度为 0.5、1.0 ml/L, 土壤悬液 pH 为 10.97 时卡松 CG 对土壤中细菌和真菌杀灭率明显降低, 这可能有以下原因: 较高的 pH 可能会抑制卡松 CG 对土壤中细菌、真菌的杀灭性能, 或者较高的 pH 促进了卡松 CG 中 MCI 和 MI 的水解, 降低了其对土壤中细菌、真菌的杀灭作用。当卡松 CG 浓度增加至 3.0 ml/L 时, 卡松 CG 对 4 个不同 pH 土壤悬液中细菌杀灭率不存在显著差异, 表明增加卡松 CG 浓度可以减少高 pH 对其杀灭效果的影响。Rozycki 和 Bartha^[34]研究表明, KN_3 (或 NaN_3) 在抑制土壤中微生物活性时会造成土壤 CO_2 释放量测定错误, KN_3 (或 NaN_3) 浓度的变化, 会造成土壤 pH 的升高, 同时在酸性环境下产生的叠氮酸是挥发性毒物, 并且当达到一定浓度时会有爆炸危险, 而 HgCl_2 与 KN_3 (或 NaN_3) 共同使用时会形成高爆炸性的叠氮化汞, 与此相比, 卡松 CG 具有使用安全、环境友好的特征, 其在浓度 >3.0 ml/L 时可以在较大的 pH 范围内保持对土壤微生物杀灭活性。

3.3 温度和时间对卡松杀灭土壤中细菌的影响

异噻唑啉酮在环境中会发生挥发、降解^[33,35], Rafoth 等^[16]研究了异噻唑啉酮衍生物在不同水环境中的稳定性, 结果发现将异噻唑啉酮加入河水和自来水中保存在室温(23℃)环境中时与 4℃保存时相比降解得更快, 升高温度可能会促进异噻唑啉酮的挥发和降解, 因此, 温度可能影响卡松 CG 对土壤微生物的杀灭效果。本研究表明, 在卡松 CG 浓度为 3.0 ml/L 和 5.0 ml/L 时, 土壤分别在 25、45 和 50℃条件下处理时, 卡松 CG 对土壤中细菌杀灭率均 >99%。同时, 土壤悬液在加入卡松 CG 放置 72 h 后, 卡松 CG 对土壤中细菌的杀灭效果并没有随时间延长而降低, 说明卡松 CG 具有持效性。有研究指出, 土壤中加入 KN_3 后, 挥发是导致其损耗的一个重要因素, 在酸性环境中可能由于快速转化为 HN_3 而增大 KN_3 的挥发性, 升高温度也会加快 KN_3 的损耗^[36], NaN_3 与 KN_3 性质相似, 因此, 当使用 NaN_3 抑制土壤中微生物活性时, 不同土壤环境条件下 NaN_3 的损耗可能会影响其在土壤灭菌中的效果。

4 结论

卡松 CG 对土壤中细菌、真菌的杀灭率随卡松 CG 浓度的增加而升高。当卡松 CG 浓度 >3.0 ml/L 时, 对风干土壤和新鲜土壤中细菌、真菌杀灭率 >98%; 当卡松 CG 浓度在 0.5 ~ 7.0 ml/L 时对两种土壤中放线菌杀灭率均为 100%。在卡松 CG 浓度为 0.5 ~ 1.0 ml/L 时, 过高的土壤 pH 会导致卡松 CG 对土壤细菌、真

菌的杀灭效果有所降低, 但是当卡松 CG 浓度 >3.0 ml/L 时, pH 对卡松 CG 杀灭土壤细菌、真菌的影响较小。在 25 ~ 50℃范围内, 卡松 CG 对土壤中细菌的杀灭效果不受土壤温度的影响, 杀灭效果持续时效 >72 h, 并对土壤 pH 有较大的适应范围。总体而言, 本研究使用的卡松 CG 对土壤中微生物具有良好的杀灭效果, 卡松 CG 可以作为土壤研究中控制生物因素的备选方法之一。

参考文献:

- [1] Mahmood T, Mehnaz S, Fleischmann F, et al. Soil sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings[J]. *Pedobiologia*, 2014, 57(3): 123–130
- [2] Trevors J T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 26(1/2): 53–59
- [3] Berns A E, Philipp H, Narres H D, et al. Effect of gamma-sterilization and autoclaving on soil organic matter structure as studied by solid state NMR, UV and fluorescence spectroscopy[J]. *European Journal of Soil Science*, 2008, 59(3): 540–550
- [4] Perkins L B, Blank R R, Ferguson S D, et al. Quick start guide to soil methods for ecologists[J]. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 2013, 15(4): 237–244
- [5] Buchan D, Moeskops B, Ameloot N, et al. Selective sterilisation of undisturbed soil cores by gamma irradiation: Effects on free-living nematodes, microbial community and nitrogen dynamics[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 47: 10–13
- [6] Wolf D C, Dao T H, Scott H D, et al. Influence of Sterilization Methods on Selected Soil Microbiological, Physical, and Chemical Properties[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1989, 18: 39–44
- [7] Razavi S, Lakzian A. Evaluation of chemical and biological consequences of soil sterilization methods[J]. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 2007, 5(2): 87–91
- [8] Gebremikael M T, De Waele J, Buchan D, et al. The effect of varying gamma irradiation doses and soil moisture content on nematodes, the microbial communities and mineral nitrogen[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 92: 1–13
- [9] Wang C, Wang F, Wang T, et al. Effects of autoclaving and mercuric chloride sterilization on PAHs dissipation in a two-liquid-phase soil slurry[J]. *Pedosphere*, 2011, 21(1): 56–64
- [10] 张辉, 张佳宝, 赵炳梓, 等. 高温高压间歇灭菌对中国典型土壤性质的影响[J]. *土壤学报*, 2011, 48(3): 540–548
- [11] 朴河春, 袁芷云, 刘广深, 等. 非生物应力对土壤性质的影响[J]. *土壤肥料*, 1998(3): 17–21
- [12] Blankinship J C, Becerra C A, Schaeffer S M, et al. Separating cellular metabolism from exoenzyme activity in

- soil organic matter decomposition[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 71: 68–75
- [13] 蔡祖聪, 张金波, 黄新琦, 等. 强还原土壤灭菌防控作物土传病的应用研究[J]. *土壤学报*, 2015, 52(3): 469–476
- [14] 钟书堂, 吕娜娜, 孙逸飞, 等. 连作香蕉园生态熏蒸剂的筛选及其对土壤微生物群落结构的影响[J]. *土壤*, 2015, 47(6): 1092–1100
- [15] Lores M, Llompart M, Alvarez-Rivera G, et al. Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls-A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 915: 1–26
- [16] Rafoth A, Gabriel S, Sacher F, et al. Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1164(1/2): 74–81
- [17] Reinhard E, Waeber R, Niederer M, et al. Preservation of products with MCI/MI in Switzerland[J]. *Contact Dermatitis*, 2001, 45(5): 257–264
- [18] 邹炳国, 章德宏. 异噻唑啉酮衍生物凯松 CG 系列产品应用及前景[J]. *广州化工*, 2007, 35(5): 22–24
- [19] 张佩玉, 喻秀, 陈智勇, 等. 新型异噻唑啉酮化合物的合成和抑菌活性研究[J]. *有机化学*, 2005, 25(9): 1142–1146
- [20] Gandhi S, Oh B, Schnoor J L, et al. Degradation of TCE, Cr(VI), sulfate, and nitrate mixtures by granular iron in flow-through columns under different microbial conditions[J]. *Water Research*, 2002, 36(8): 1973–1982
- [21] Da Silva M L B, Gomez D E, Alvarez P J J. Analytical model for BTEX natural attenuation in the presence of fuel ethanol and its anaerobic metabolite acetate[J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2013, 146: 1–7
- [22] Du J R, Peldszus S, Huck P M, et al. Modification of membrane surfaces via microswelling for fouling control in drinking water treatment[J]. *Journal of Membrane Science*, 2015, 475: 488–495
- [23] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 54–59
- [24] Helassa N, M Charek A, Quiquampoix H, et al. Effects of physicochemical interactions and microbial activity on the persistence of Cry1Aa Bt (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(5): 1089–1097
- [25] Tuominen L, Kairesalo T, Hartikainen H. Comparison of methods for inhibiting bacterial activity in sediment[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 60(9): 3454–3457
- [26] Salanitro J P, Dorn P B, Huesemann M H, et al. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment[J]. *Environmental Science & Technology*, 1997, 31(6): 1769–1776
- [27] Chefetz B, Stimler K, Shechter M, et al. Interactions of sodium azide with triazine herbicides: Effect on sorption to soils[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(2): 352–357
- [28] Miller M J, Critchley M M, Hutson J, et al. The adsorption of cyanobacterial hepatotoxins from water onto soil during batch experiments[J]. *Water Research*, 2001, 35(6): 1461–1468
- [29] Drahota P, Falteisek L, Redlich A, et al. Microbial effects on the release and attenuation of arsenic in the shallow subsurface of a natural geochemical anomaly[J]. *Environmental Pollution*, 2013, 180: 84–91
- [30] Xiang L, Sun T, Zheng M, et al. Sorption of dodecyltrimethylammonium chloride (DTAC) to agricultural soils[J]. *Science of The Total Environment*, 2016, 560/561: 197–203
- [31] Preservatives for Household and Industrial Use. http://www.dow.com/assets/attachments/business/biocides/preservatives_for_household_and_I-and-I/kathon_cg-icp_and_cg-icpii/tds/kathon_cg-icp-and-ii.pdf
- [32] Fernandez-Sanchez J M, Sawvel E J, Alvarez P J J. Effect of Fe0 quantity on the efficiency of integrated microbial-Fe0 treatment processes[J]. *Chemosphere*, 2004, 54(7): 823–829
- [33] 王向辉, 贺永宁, 盘茂东, 等. 异噻唑啉酮类衍生物的合成及应用研究进展[J]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2008(4): 372–377
- [34] Rozycki M, Bartha R. Problems associated with the use of azide as an inhibitor of microbial activity in soil[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1981, 41(3): 833–836
- [35] Park S, Kwon J. The fate of two isothiazolinone biocides, 5-chloro-2-methylisothiazol-3(2H)-one (CMI) and 2-methylisothiazol-3(2H)-one (MI), in liquid air fresheners and assessment of inhalation exposure[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 2270–2276
- [36] Parochetti J V, Warren G F. Behavior of Potassium Azide in the Soil[J]. *Weed Science*, 1970, 18(5): 555–560

Effectiveness and Influence Factors of Isothiazolinones in Soil Sterilization

LIU Guoming^{1,2}, WAN Mengxue^{1,2}, JIA Mengmeng^{1,2}, WANG Huifeng^{1,2}, HU Wenyu¹, HUANG Biao^{1*}

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Isothiazolinones are a group of effective biocides, which are widely used in personal hygiene, pharmaceutical and water treatment products, but their application effects for soil sterilization are still unclear. In this paper, a commercially sold isothiazolinone biocides Kathon CG was tested for soil sterilization. The populations of bacteria, fungi and actinomycetes in tested soil were determined before and after isothiazolinone application at different concentrations, soil suspension pH values and temperatures for two durations of equilibration time. The results showed that the killing rates of actinomycetes in the tested soils were 100%, and the killing rates of bacteria and fungi in the tested soils increased with the increase of Kathon CG concentration. When Kathon CG concentration enhanced from 0.5 ml/L to 3.0 ml/L, the killing rate of bacteria and fungi in air-dried soil increased from 84.1% and 78.0% to 98.7% and 99.6%, respectively, the killing rate of bacteria and fungi was close to 100% when Kathon CG concentration reached to 5.0 ml/L or above. When the concentration of Kathon CG was 0.5 ml/L and 1.0 ml/L, the killing rates of bacteria and fungi for fresh soil declined compared that of the air-dried soil, and in this case, excessive alkaline soil suspension pH also reduced the killing rate of bacteria and fungi. When Kathon CG concentration reached to 3.0 ml/L or above, the killing rate of bacteria and fungi in air-dried soil and fresh soil was over 99.0%, and soil suspension pH had little effect on the killing rate of bacteria and fungi. The ambient temperature (25–50°C) had no influence on the germicidal effect of soil bacteria, and the duration of the bactericidal effect was longer than 72 h. This study shows that Kathon CG can effectively kill bacteria, fungi and actinomycetes in the soil at a low concentration. The germicidal effect remains stable at 25–50°C, less affected by pH of soil suspension. The use of Kathon CG may be one of the alternative methods in inhibiting soil microbial processes.

Key words: Isothiazolinones; Kathon CG; Soil microbes; Soil sterilization