

• 研究论文 •

降解菌 2N3对被氯嘧磺隆污染土壤的生物修复

汪佳秀¹, 张祥辉², 穆文辉², 张浩^{*1}

(1. 吉林农业大学 资源与环境学院, 长春 130118; 2. 吉林大学 植物科学学院, 长春 130062)

摘要: 在实验室条件下, 研究了高效降解菌 2N3(克雷伯氏菌属, *Klebsiella* sp.) 对被氯嘧磺隆污染土壤的修复作用及其影响因素。当土壤中氯嘧磺隆的添加浓度为 20 mg/kg 每 1 克土壤中 2N3 的接菌量为 1×10^6 个菌体时, 第 30 d 时土壤中氯嘧磺隆的降解率为 84.6%, 对照仅为 13.4%; 相同 2N3 接菌浓度下, 当土壤中氯嘧磺隆浓度为 100 mg/kg 时, 其降解率为 31.1%。以小麦、玉米、黄瓜为供试作物, 在土壤中施加 20 mg/kg 的氯嘧磺隆, 当每 1 克土壤中 2N3 的接菌量为 1×10^6 个菌体时, 小麦、玉米、黄瓜的出苗率分别为 85%, 82% 和 79%, 且处理组株高高于对照, 表明降解菌 2N3 具有明显减轻氯嘧磺隆药害的作用。研究表明, 人工接种降解菌 2N3 可提高土壤中氯嘧磺隆的降解率, 有效降低其在土壤中的残留。

关键词: 降解菌; 氯嘧磺隆; 残留; 生物修复

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.01.07

中图分类号: X172 S481.8

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)01-0049-05

Bioremediation of chlorimuron-ethyl contaminated soil by strain 2N3

WANG Jia-xiu¹, ZHANG Xiang-hui², MU Wen-hui², ZHANG Hao^{*1}

(1. College of Resource and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract Bioremediation of *Klebsiella* sp. 2N3 strain in chlorimuron-ethyl contaminated soil was examined under laboratory conditions. When 2N3 was inoculated into the soil at the density of 1×10^6 mycelium/g dry soil, chlorimuron-ethyl (20 mg/kg dry soil) in soil was degraded by 84.6% after incubated for 30 days, with blank control of 13.4% degradation rate. When chlorimuron-ethyl was increased by 100 mg/kg in soil, chlorimuron-ethyl degradation rate was below 31.1%. With addition of chlorimuron-ethyl of 20 mg/kg in soil and amount of strain 2N3 in 1×10^6 mycelium/g dry soil, emergence rates of wheat, corn and cucumber were 85%, 82% and 79%, respectively. Plant heights were observed to increase in comparison with control plant. It's indicated that phytotoxicity effect of chlorimuron-ethyl could be retarded by strain 2N3. The current study showed that the hand-actuated inoculation of 2N3's strain could effectively increase degradation rate of chlorimuron-ethyl in contaminated soil.

Key words degrading strain; chlorimuron-ethyl residue; bioremediation

收稿日期: 2009-08-25 修回日期: 2009-11-11

作者简介: 汪佳秀 (1983-), 女, 吉林人, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 张浩 (1964-), 女, 吉林人, 硕士, 教授, 主要从事农药专业教学和农药残留检测研究工作, 电话: 0431-84532955, E-mail: haozhang100@163.com

基金项目: 吉林省科技发展计划 (20070568); 长春市科技计划项目 (09GH14)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生物修复 (bioremediation) 是利用微生物所具有的广泛代谢途径对污染物进行处理的一种环境生物技术, 投加高效降解菌株是最常见而有效的一种方法^[1]。微生物对于农药的降解具有重要作用, 目前已分离得到许多能降解或转化农药的微生物类群, 并对其作用方式和降解机制等进行了研究, 证实了微生物降解是环境污染治理的重要途径之一, 具有良好的应用前景^[2-7]。氯嘧磺隆是 1984 年由美国杜邦公司研制成功的磺酰脲类除草剂^[8], 主要用于大豆田防除莎草、阔叶杂草及某些禾本科杂草。其在土壤中的残留时间较长, 对后茬敏感作物如玉米、高粱、油菜、瓜类、马铃薯、甜菜等具有明显的药害作用, 因而限制了该药剂的使用。研究解决氯嘧磺隆残留毒害问题对扩大其生产上的应用, 减少对后茬作物的药害及对环境的污染均具有重要意义。目前已有研究者分离得到可降解氯嘧磺隆的巨大芽孢杆菌属和假单胞菌属菌株, 并研究了其在实验室纯培养条件下的降解特性^[9-10], 但尚未进入到生物修复研究阶段; 对于克雷伯氏菌属降解氯嘧磺隆的研究也尚未见报道。

笔者以本实验室分离得到的一株氯嘧磺隆降解菌 2N3 为对象, 在实验室条件下研究了其对被氯嘧磺隆污染土壤的生物修复作用, 并以小麦、玉米、黄瓜为供试植物, 研究了 2N3 对氯嘧磺隆药害的缓解作用, 以期对被氯嘧磺隆污染土壤的生物修复及减轻土壤中残留氯嘧磺隆对后茬作物的药害提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和植物

菌株 2N3 (克雷伯氏菌属, *Klebsiella* sp.) 由本实验室分离保存; 玉米品种为吉甜 6 号, 黄瓜品种为津优 32 号, 小麦品种为吉麦 3 号。

1.2 药剂、仪器与培养基

氯嘧磺隆 (chlorimuron-ethyl) 原药 (97.5%) 由沈阳化工研究院提供; 试剂为色谱纯或分析纯。

主要仪器: 高效液相色谱仪 (岛津 2010), UV-2550 紫外分光光度计, HZQ-F100 振荡培养箱, SW-CJ-IF 型超净工作台等。

无氮培养基: 葡萄糖 5 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.2 g, 加 1 000 mL 蒸馏水。

LB 培养基: 氯化钠 10 g, 酵母粉 5 g, 胰蛋白胨 5 g, 加入 1 000 mL 蒸馏水, pH 7.0~7.4。

1.3 供试土壤

供试土壤取自吉林农业大学教学实验中心, 取 0~30 cm 深耕层土壤, 过筛 (孔径 2 mm)、风干后备用。土壤类型为草甸黑土, pH 6.8, 有机质含量为 23.9 g/kg, 该土壤未使用过氯嘧磺隆。

1.4 降解菌悬浮液的制备

将 2N3 单菌落接种于 50 mL 的 LB 液体培养基中, 于 30℃、200 r/min 下振荡培养 12 h, 取适量菌液离心, 弃去上清液, 用等量磷酸缓冲溶液洗涤沉淀, 用 50 mL 的磷酸缓冲溶液悬浮备用。

1.5 氯嘧磺隆降解速度与 2N3 生长速度测定

在 20 mg/L 的氯嘧磺隆无氮培养基中, 以体积分数为 2% 的接种量接入制备好的菌悬液, 于 30℃、200 r/min 下摇床培养 48 h, 定时取样, 分别测定溶液中氯嘧磺隆的含量和 600 nm 处的吸光度值。

1.6 土壤中残留氯嘧磺隆的提取与测定

取土样 20 g 于具塞三角瓶中, 加入甲醇-水 (8:2 体积比) 40 mL, 振荡提取 30 min, 移出上清液, 残渣再用 40 mL 甲醇-水提取 1 次, 合并提取液, 于 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 20 mL, 用 20 mL 二氯甲烷提取, 重复 3 次。合并有机相, 旋转浓缩至近干, 氮气吹干, 用甲醇定容至 1 mL, 供液相色谱测定。

液相色谱仪测定条件: 岛津 2010 高效液相色谱仪, C_{18} 色谱柱 (10 cm × 4.6 mm), 进样量 20 μL , 流动相为甲醇-水-乙酸 (70:30:0.3 体积比), 流速 1.0 mL/min, PDA 检测器, 波长 256 nm, 柱温 30℃。在上述测定条件下, 氯嘧磺隆的添加回收率在 83.9%~94.8% 之间, 相对标准偏差为 0.69%~0.79%, 变异系数为 0.78%~0.89%, 符合农药残留检测标准^[11]要求。

1.7 土壤中氯嘧磺隆的降解

处理一: 取风干过 2 mm 筛的土壤样本 20 g 加入氯嘧磺隆, 使土壤中氯嘧磺隆浓度为 20 mg/kg, 以每 1 克土中含 1×10^6 个菌体的浓度接入菌悬液, 混匀备用。同时设加药但不加菌悬液的土壤为对照。

处理二: 取 20 g 土壤样本, 于 121℃ 湿热条件下灭菌 20 min, 加入氯嘧磺隆, 氯嘧磺隆浓度及接菌量同处理一, 混匀备用。并设灭菌、加药但不加菌悬液的土壤为对照。

每处理重复 3 次。将各处理置于 25℃、黑暗条件下培养, 每隔 5 d 取样测定土壤中氯嘧磺隆的残

留量^[12]。

1.8 不同接菌量对土壤中氯嘧磺隆降解的影响

制备氯嘧磺隆浓度为 20 mg/kg 的土壤样本, 分别按每 1 克土中含 2×10^4 个和 1×10^6 个菌体的浓度接入 2N3 菌悬液。同时设加药但不加菌悬液的处理为对照。每处理重复 3 次, 于 25℃、黑暗条件下培养, 每隔 5 d 取样测定土壤中氯嘧磺隆的残留量。

1.9 不同初始浓度对土壤中氯嘧磺隆降解的影响

分别配制氯嘧磺隆浓度为 10、20、50、100 mg/kg 的土壤样本, 按每 1 克土中含 1×10^6 个菌体的浓度接入菌悬液。每处理重复 3 次, 于 25℃、黑暗条件下培养, 每隔 5 d 取样测定土壤中氯嘧磺隆的残留量。

1.10 降解菌的生物修复作用及对敏感作物生长发育的影响

处理一: 取供试土壤样本 1.0 kg 加水使其含水量为 20% (质量分数) 左右; 处理二: 取供试土壤样本 1.0 kg 加入氯嘧磺隆使其浓度为 20 mg/kg 土壤含水量为 20% 左右, 按每 1 克土中含 1×10^6 个菌体的浓度接入菌悬液; 处理三: 取供试土壤样本 1.0 kg 加入氯嘧磺隆使其浓度为 20 mg/kg 土壤含水量为 20% 左右。各处理培养 15 d 后, 选取经清水浸种、催芽, 萌发一致的小麦、玉米、黄瓜种子, 分别播种于各处理土壤中, 每盆 10 粒, 每处理重复 4 次。于 25℃、光照条件下培养, 第 3 d 时测定出苗率, 之后每隔 5 d 测定株高, 每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 氯嘧磺隆降解速度与 2N3 生长速度的关系

结果见图 1。开始时降解菌 2N3 的生长处于延迟期, 对氯嘧磺隆的降解非常缓慢, 随着该菌进入对

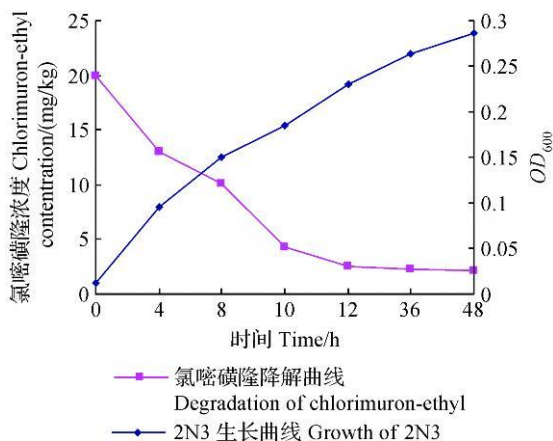


图 1 2N3 的生长及对氯嘧磺隆的降解曲线

Fig 1 Degradation of chlorimuron-ethyl and growth curve of strain 2N3

数生长期, 氯嘧磺隆的降解率也随之增加, 而当其到了稳定期和衰亡期时, 氯嘧磺隆的降解速度又趋于缓慢。12 h 时氯嘧磺隆的浓度由 20 mg/kg 下降为 2.5 mg/kg, 降解率高达 83.5%。同时, 在降解过程中, 2N3 的 OD_{600} 值达到了 0.287, 表明 2N3 能够利用氯嘧磺隆作为氮源生长。

2.2 2N3 对土壤中氯嘧磺隆的降解

结果见图 2。在未灭菌且未加菌悬液的土壤中, 30 d 时氯嘧磺隆的浓度由 20 mg/kg 下降为 12.6 mg/kg, 降解率为 15.3%; 而在未灭菌且接种菌悬液的土壤中, 30 d 时氯嘧磺隆的浓度由 20 mg/kg 下降到 3.1 mg/kg, 降解率为 78.6%。表明投加外源降解菌 2N3 可提高土壤中氯嘧磺隆的降解率。

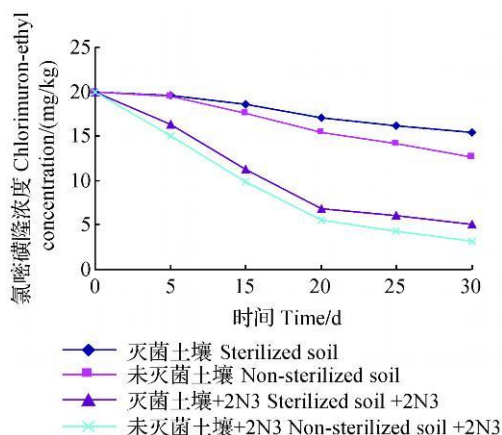


图 2 不同条件下氯嘧磺隆在土壤中的降解

Fig 2 Degradation of chlorimuron-ethyl in soil under various conditions

在灭菌但不加菌悬液的土壤中, 30 d 时氯嘧磺隆的降解率为 13.4%; 而在灭菌且接入菌悬液的土壤中, 氯嘧磺隆的降解率为 64.5%; 表明投加降解菌可提高氯嘧磺隆的降解率。同时发现, 未灭菌土壤中氯嘧磺隆的降解率高于灭菌土壤, 其原因可能是未灭菌土壤中的土著微生物参与了对氯嘧磺隆的降解, 其协同作用的方式提高了氯嘧磺隆的降解率。

2.3 不同接菌量对土壤中氯嘧磺隆降解的影响

由图 3 可知, 当接菌量分别为每 1 克土中含 2×10^4 个和 1×10^6 个菌体时, 第 30 d 时氯嘧磺隆的浓度分别由 20 mg/kg 下降为 14.5 和 5.01 mg/kg, 降解率分别为 35.7%, 84.6%。表明随着接菌量的增加, 氯嘧磺隆的降解率逐渐提高。

2.4 不同初始浓度对土壤中氯嘧磺隆降解的影响

结果见图 4。按照每 1 克土中含 1×10^6 个菌

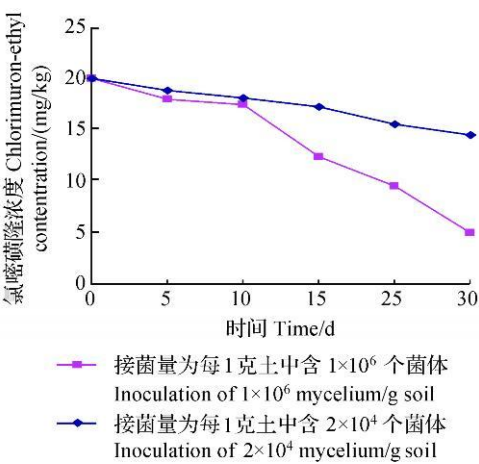


图 3 接菌量对 2N3降解氯嘧磺隆的影响
Fig 3 Influence of 2N3 inoculation rate on chlorimuron-ethyl degradation in soil

体的浓度接种 2N3 菌悬液, 培养 30 d 当土壤中氯嘧磺隆浓度为 20 mg/kg 时, 其降解率为 84. 6%, 而当土壤中氯嘧磺隆浓度达到 100 mg/kg 时, 降解率为 31. 1%, 表明高浓度的氯嘧磺隆可能会对降解菌 2N3 产生抑制作用, 从而导致其降解能力下降。

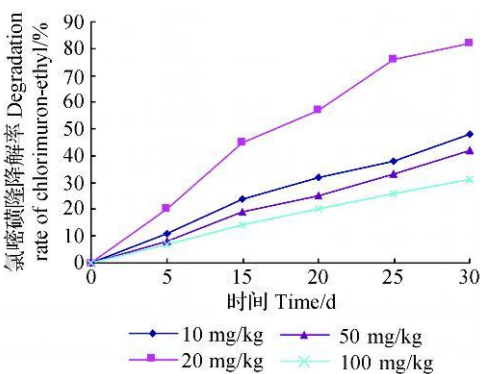


图 4 不同初始浓度对 2N3降解土壤中氯嘧磺隆的影响
Fig 4 Effects of different initial concentrations of substrate on chlorimuron-ethyl degradation by 2N3 in soil

土壤中氯嘧磺隆的降解符合一级动力学方程 $C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$ 。如表 1 所示, 当土壤中氯嘧磺隆浓度为 20 mg/kg 接菌量为每 1 克土中含 1×10^6 个菌体时, 半衰期为 5 d 此时降解菌 2N3 对氯嘧磺隆的降解效果最好。

表 1 降解菌 2N3对土壤中氯嘧磺隆的降解动力学参数

Table 1 Kinetic date of degradation of chlorimuron-ethyl by 2N3 in soil

氯嘧磺隆初始浓度/(mg/kg) Initial conc. of chlorimuron-ethyl	一级动力学方程 First-order kinetic equation	相关系数 Correlation coefficient(r)	半衰期 Half-life/d
10	$\ln Y = -0.0488x + 11.013$	0.9220	14.2
20	$\ln Y = -0.1386x + 31.946$	0.9947	5.0
50	$\ln Y = -0.0353x + 59.736$	0.9613	19.6
100	$\ln Y = -0.2720x + 105.74$	0.9017	25.4

2.5 2N3的修复作用及对小麦、玉米、黄瓜生长发育的影响

土壤中施加降解菌 2N3 后对小麦、玉米和黄瓜的出苗率及株高均有明显影响 (见表 2)。当土壤中氯嘧磺隆浓度为 20 mg/kg 接菌量为每 1 克土中含 1×10^6 个菌体时, 小麦、玉米、黄瓜的出苗率分别比

对照清水处理组低 13%, 7% 和 16%, 而比含相同浓度氯嘧磺隆、未接菌组分别高 42%, 32% 和 44%, 即降解菌可提高小麦、玉米、黄瓜的出苗率。同时加菌处理组小麦、玉米和黄瓜的株高均明显高于未加菌处理组, 表明降解菌能够促进土壤中残留氯嘧磺隆的降解, 减轻其对小麦、玉米和黄瓜的药害。

表 2 降解菌 2N3对氯嘧磺隆残留土壤上小麦、玉米、黄瓜生长发育的影响

Table 2 Strain 2N3 on growth of wheat corn cucumber in chlorimuron-ethyl residual soil

氯嘧磺隆浓度 Concentration of chlorimuron-ethyl/(20mg/kg)	出苗率(播种后 3 d) Emergence of seedling(3 d after planted) %			株高(播种后 15 d) Height(15 d after planted) /cm		
	小麦 Wheat	玉米 Corn	黄瓜 Cucumber	小麦 Wheat	玉米 Corn	黄瓜 Cucumber
对照 Control	98 Aa	99 Aa	95 Aa	25 Aa	37 Aa	15 Aa
加菌加药 chlorimuron-ethyl+ 2N3	85 Bb	82 Bb	79 Bb	20 Bb	30 Bb	13 Bb
加药 chlorimuron-ethyl	43 Cc	50 Cc	35 Cc	15 Cc	20 Cc	11 Cc

注: a, b, c 表示在 5% 水平下差异显著, A, B, C 表示在 1% 水平下差异极显著。

Note: a, b, c represent significant differences at 5% level, A, B, C represent significant differences at 1% level

3 小结与讨论

生物修复是利用微生物将土壤、地下水和海洋中的有毒有害物质“就地”降解成二氧化碳和水,或转化为其他无害物质的方法。磺酰脲类除草剂残效期较长,应用广泛,目前其残留药害问题已严重影响了作物的合理布局和正常耕作制度的执行,生产上迫切需要解决这一问题。已有研究表明,引入外源的磺酰脲类除草剂降解菌是消除其在环境中残留的有效途径^[13-14]。但目前仅见滕春红^[15]等利用投加真菌的方式降解土壤中氯嘧磺隆的报道,而有关利用氯嘧磺隆降解细菌进行土壤修复的研究则未见报道。

本研究通过室内模拟土壤降解实验,初步探讨了降解菌 2N3对土壤中氯嘧磺隆降解的作用。结果表明:添加降解菌 2N3可明显促进氯嘧磺隆的降解,降解半衰期最短为 5 d,降解率最高达到 84.6%;未灭菌土壤中氯嘧磺隆的降解速度比灭菌土壤中快;不同氯嘧磺隆初始浓度对其降解有很大影响,这可能是由于高浓度氯嘧磺隆对微生物产生了一定的抑制作用。

初步的室内盆栽试验表明,人工接种降解菌 2N3能够有效降低土壤中氯嘧磺隆的残留,减轻对小麦、黄瓜和玉米的药害作用,使小麦、黄瓜、玉米的出苗率和株高都能接近清水对照的水平,表明降解菌 2N3对于被氯嘧磺隆污染的土壤具有较好的修复作用,具体还有待田间试验进一步验证。

参考文献:

- [1] LIU Lei(刘磊), LIX i-wu(李习武), LIU Shuang-jiang(刘双江), et al. 降解多环芳烃的菌株 *Ordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在菲污染土壤修复过程中的动态变化 [J]. *J Environ Sci (环境科学)*, 2007, 28(3): 617- 622
- [2] GU J G, QIAO C, GU J D. Biodegradation of the herbicides atrazine, cyanazine, and dicamba by methanogenic enrichment cultures from selective soils of China [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2003, 71(5): 924- 932
- [3] PHILLIPS T M, SEECH A G, LEE H, et al. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms [J]. *Biodegradation*, 2005, 16(4): 363- 392
- [4] GAULTIER J, FARENHORST A, CATHCART J, et al.

Degradation of [carboxy-¹⁴C] 2,4-D in 114 agricultural soil as affected by soil organic carbon content [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(1): 217- 227.

- [5] YOU M in-sheng(尤民生), LIU X in(刘新). 农药污染的生物降解与生物修复 [J]. *Chin J Ecology (生态学杂志)*, 2004, 23(1): 73- 77
- [6] TENG Chun-hong(滕春红), SU Shao-quan(苏少泉). 除草剂在土壤中的微生物降解及污染土壤的生物修复 [J]. *Agrochemicals(农药)*, 2006, 45(8): 6- 8.
- [7] BRIAN J R, FERM OR T R, SEM PLE K T. Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil-associated phenanthrene [J]. *Environmental Pollution*, 2002, 118(1): 65- 73.
- [8] W ANG M in-qiang(王敏强), LI Y uan-xiang(李远想). 玉米对磺酰脲类除草剂敏感性及土壤残留的研究 [J]. *J M aize Sci (玉米科学)*, 2006, 14(2): 84- 86
- [9] MA J P, WANG Z, LU P, et al. Biodegradation of the sulfonylurea herbicide chlormuron-ethyl by the strain *Pseudomonas* sp. LW 3 [J]. *Fems Microbiol Lett*, 2009, 296(2): 203- 209.
- [10] W ANG Zhe(王哲), SUN Ji-quan(孙纪全), MA Ji-ping(马吉平), et al. 氯嘧磺隆降解菌菌株 LW-3 的分离及生物学特性研究 [J]. *Microbiology (微生物学学报)*, 2008, 35(12): 1899- 1904
- [11] The Institute for Control of Agricultural Chemicals Ministry of Agriculture (农业部农药检定所). 农药残留量实用检测方法手册 (第一卷) [M]. Beijing(北京): Agriculture Science Press(中国农业科技出版社), 1995: 391
- [12] HUANG X ing(黄星), PANG Ji-jie(潘继杰), SUN Ji-quan(孙纪全), et al. 降解菌 S113 对甲磺隆污染土壤生物修复作用的研究 [J]. *Acta Pedologica (土壤学报)*, 2008, 45(1): 150- 154
- [13] SOLTANIN, SIKKEMA P H, ROBINSON D E. Vegetable crop responses to chlormuron-ethyl applied in the previous year [J]. *Crop Protection*, 2005, 24(7): 685- 688.
- [14] ZABLOTOW ICZ R M, WEAVEM A, LOCKE M A. Microbial adaptation for accelerated atrazine mineralization degradation in Mississippi Delta soils [J]. *Weed Science*, 2006, 54(3): 538- 547
- [15] TENG Chun-hong(滕春红), TAO Bo(陶波), ZHAO Shi-jun(赵世君). 高效降解真菌对大豆田除草剂氯嘧磺隆的降解特性研究 [J]. *Soybean Science(大豆科学)*, 2006, 25(1): 58- 61

(责任编辑: 唐 静)