

降解菌 S113 对甲磺隆污染土壤生物修复作用的研究*

黄 星 潘继杰 孙纪全 孙笑非 李顺鹏[†]

(南京农业大学生命科学院,农业部农业环境微生物工程重点开放实验室,南京 210095)

摘 要 在室内条件下,研究了降解菌 S113 (*Methylophila* sp.) 对甲磺隆污染土壤的修复作用。S113 能够以甲磺隆为唯一碳源生长,72 h 对 50 mg L⁻¹ 甲磺隆的降解率达 98.38%。投加降解菌 S113 可显著提高土壤中甲磺隆的降解速率。当甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹ 干土, S113 接种量为 10⁸ 个 g⁻¹ 土时,第 30 天土壤中甲磺隆降解率为 76.9%,对照土壤中甲磺隆降解率仅为 11.9%。S113 降解甲磺隆的速率和接种量呈正相关,当接种量减少为 10⁵ 个 g⁻¹ 干土时,降解菌对甲磺隆的降解作用微弱。在土壤中甲磺隆浓度较低条件下, S113 的降解效果显著,而当土壤中甲磺隆浓度达到 50 mg kg⁻¹ 时,甲磺隆降解率仅为 39.6%。S113 降解土壤中甲磺隆的最适温度为 30℃,第 30 天的降解率可达 75.9%。当温度为 25℃、20℃ 时,第 30 天甲磺隆降解率仅为 53.5% 和 23.9%。S113 菌剂灌根,能不同程度地缓解土壤中浓度为 40、80 μg kg⁻¹ 的甲磺隆对玉米生长的抑制作用,但当甲磺隆浓度增加到 120 μg kg⁻¹ 时,接种 S113 对药害解除作用不显著。结果表明,人工接种降解菌 S113,能有效去除土壤中甲磺隆残留。

关键词 S113;甲磺隆;生物修复

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

除草剂甲磺隆具有杀草谱广和活性高的优点,推广使用已有 20 多年历史,对农业生产起到了积极作用^[1,2]。但该除草剂残效期长,土壤中少量的残留即对后茬敏感作物产生药害,造成经济损失,因此甲磺隆药害的问题受到广泛关注^[3,4]。向环境中投加高效农药残留降解菌是治理农药环境污染的一种有效方法,且已有成功的报道^[5,6]。沈标等^[7]在修复甲基对硫磷污染土壤时发现,投加降解菌 DLL-1 能够去除土壤中甲基对硫磷的残留。杨基峰等^[8]、Yu 等^[9]发现,向甲磺隆污染土壤中投加真菌降解菌株 MD 可以有效地加速土壤中甲磺隆的降解。胡江等^[10]研究表明通过向土壤中投加降解菌剂可以消除土壤中残留的阿特拉津,并可解除阿特拉津对植物的药害作用。

本实验室在磺酰脲类除草剂降解菌的筛选工作中获得一株甲磺隆降解细菌 S113 (*Methylophila* sp.), 该菌能够以甲磺隆为唯一碳源生长。本文在实验室条件下研究了 S113 对甲磺隆污染土壤的原位生物修复作用,并以玉米为供试植物,研究了 S113 对甲磺隆药害的解除作用,以期对甲磺隆污染土壤的生

物修复与土壤中残留甲磺隆对后茬作物的药害解除提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和植物

菌株 S113 (*Methylophila* sp.) 为本实验室从甲磺隆长期污染的土壤中分离得到。供试玉米品种鲜糯 1 号,江苏省农业科学院粮食研究所提供。

1.2 试剂与培养基

甲磺隆原药购自江苏省常州农药厂(纯度为 98.7%)。基础盐培养基: NH₄NO₃ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0。TY 培养基: CaCl₂ 0.067 g, 酵母膏 3.0 g, 蛋白胨 5 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0。

1.3 供试土壤

供试土壤为南京农业大学校园内采集的表层土(0~30 cm), 土壤经风干, 过筛(2 mm), 备用。土壤基本性质如下: 土壤为重壤土, pH 为 6.95, 有机质含量 22.8 g kg⁻¹, 该土壤未使用过甲磺隆。

*国家自然科学基金项目(30500010)、国家“863”计划项目(2006AA10Z402)、江苏省社会发展项目(BS2007056)

[†] 通讯作者, Tel: 025-84396314, E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 黄 星(1977~), 男, 江苏南京人, 从事长残效除草剂微生物降解研究

收稿日期: 2006-04-12; 收到修改稿日期: 2006-11-14

1.4 甲磺隆降解速度与 S113 生长速度测定

挑取 S113 单菌落于 3 ml 的 TY 液体培养基中, 30 振荡培养 48 h, 获得新鲜菌液。在 50 mg L⁻¹ 甲磺隆基础盐液体培养基中, 接入 1% 的新鲜菌液, 于 30 摇床培养 (150 r min⁻¹), 定时取样, 测定甲磺隆的含量及菌体生长量。

1.5 降解菌剂的制备

将 S113 单菌落接种于 TY 液体培养基中, 30 摇培 48 h, 6 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 用去离子水洗涤菌体, 6 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 以去离子水重悬浮菌体, 控制菌体浓度为每 ml 约 10⁹ 个, 备用。

1.6 土壤中残留甲磺隆的测定

参考 Rossana 的提取方法^[11]。取 10 g 待测土壤, 加入 20 ml 提取溶剂 PBS-乙腈 (80:20, v/v), 150 r min⁻¹ 振荡提取 60 min, 6 000 r min⁻¹ 离心 20 min, 小心取出上清液, 转入刻度试管, 用 20 ml 二氯甲烷抽提, 弃水相收集有机相, 过无水硫酸钠柱除去残留水份, 氮气吹干, 用甲醇定容至 1 ml, 用直径 45 μm 的细菌滤膜过滤, 待测。液相色谱条件, 高效液相色谱仪 (Waters600), 分离柱长为 25 cm, 内填有 C18 的反相柱。流动相为甲醇/水 (70:30, v/v), 流速 1 ml min⁻¹, 紫外检测器的工作波长 254 nm, 进样量 20 μl, 按峰面积定量。在上述条件下, 10 mg kg⁻¹ 和 1 mg kg⁻¹ 甲磺隆的添加回收率分别为 91.2 ± 3.8% 和 95.3 ± 2.1%, 变异系数分别为 4.1% 和 3.2%, 符合农药残留检测标准。

1.7 土壤降解实验

处理一: 取风干过筛 (2 mm) 土 1.0 kg, 加入甲磺隆药液, 充分拌匀后制成甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹ 的含药土壤。向含药土壤中加入 100 ml 降解菌 S113 菌液, 混匀, 以含药土壤不加 S113 菌液为对照。

处理二: 将供试土壤湿热灭菌, 制成甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹ 的含药土壤, 加入 100 ml 降解菌 S113 菌液, 混匀, 以灭菌含药土壤不加 S113 菌液为对照。

将各处理置于 30 培养箱中黑暗条件下恒温培养, 定时取样测定甲磺隆在土壤中的残留。

1.8 不同接种量对土壤中甲磺隆降解的影响

甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹ 的含药土壤接种 S113 菌液, 使土壤中含菌量分别为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ 个 g⁻¹ 干土, 将各处理置于 30 培养箱中黑暗条件下恒温培养, 定时取样测定甲磺隆在土壤中的残留。

1.9 不同初始甲磺隆浓度对土壤中甲磺隆降解的影响

分别配制甲磺隆浓度为 1、10、50 mg kg⁻¹ 的含药土壤, 接种 S113 菌液, 使土壤中含菌量为 10⁸

个 g⁻¹ 干土, 将各处理置于 30 培养箱中黑暗条件下恒温培养, 定时取样测定甲磺隆在土壤中的残留。

1.10 不同温度对土壤中甲磺隆降解的影响

向甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹ 的含药土壤接种 S113 菌液, 使土壤中含菌量为 10⁸ 个 g⁻¹ 干土, 将各处理分别置于 20、25、30 培养箱中黑暗条件下恒温培养, 定时取样测定甲磺隆在土壤中的残留。

1.11 S113 灌根对玉米甲磺隆药害的解除作用

分别配制甲磺隆浓度为 40、80、120 μg kg⁻¹ 的含药土壤。在直径 15 cm、高 10 cm 的塑料杯中, 加入 200 g 含药土壤, 加入 S113 菌液 40 ml, 制成甲磺隆 + S113 土壤。玉米种子清水浸种 24 h, 催芽, 待玉米种破胸露白后, 取萌发度一致的玉米种子, 播种于不同处理土壤中, 每杯播 5 粒, 每处理重复 5 次, 以不加甲磺隆不加降解菌土壤培养的玉米为对照。室温培养, 适时喷水保湿, 培养 7 d 后, 用水洗净根上的泥土, 吸水纸吸取植株表面水分, 分别测量不同处理玉米的苗长、根长、苗重、根重。

1.12 数据处理

实验所得数据, 由 DPSV2.00 版软件进行统计分析和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 甲磺隆降解速度与 S113 生长速度的关系

由图 1 可知, 以甲磺隆为唯一碳源, 开始时 S113 生长处于延迟期, 对甲磺隆的降解非常缓慢, 随着菌株进入对数生长期, 甲磺隆的降解速率也增加, 而到稳定期和衰亡期时, 降解速度又趋于缓慢, 72 h 时甲磺隆的降解率可达 98.38%。在降解过程中, S113

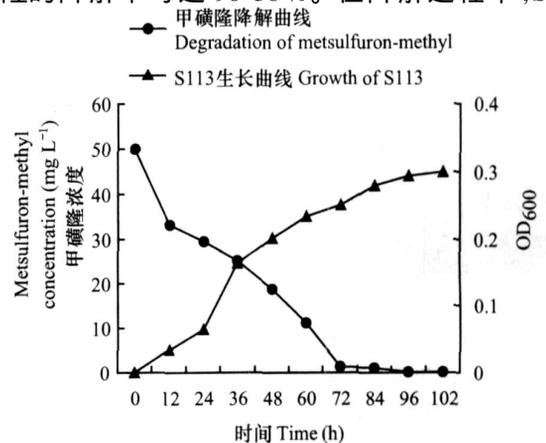


图 1 S113 的生长及其对甲磺隆的降解曲线

Fig. 1 Degradation of metsulfuron-methyl and growth of strain S113

的OD₆₀₀也从 0.01 升到 0.3,表明 S113 可以利用甲磺隆生长。

2.2 S113 对土壤中甲磺隆的降解效果

土壤降解实验结果见图 2。甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹的未灭菌土壤不加 S113 处理 30 d,土壤中甲磺隆的浓度为 8.81 mg kg⁻¹,降解率为 11.9%,而未灭菌土壤接种降解菌后,30 d 时土壤中甲磺隆的浓度为 2.31 mg kg⁻¹,降解率可达 76.9%,由此可看出,投加外源降解菌 S113 可显著提高土壤中甲磺隆的降解速率。

甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹灭菌土壤不加降解菌,土壤中甲磺隆 30 d 的降解率为 4.8%,加入 S113 后,30 d 的降解率为 64.8%,表明加入降解菌后甲磺隆的降解速率加快。同时可发现相同接种降解菌的条件下,未灭菌土壤中甲磺隆的降解率为 76.9%,高于灭菌土壤中 64.8%的降解率。分析原因,是未灭菌土壤中本身含有土著微生物,这些土著微生物也参与了甲磺隆的微生物降解,土著微生物与外源投加的降解菌以协同作用的方式降解甲磺隆,提高了土壤中甲磺隆的降解速率。

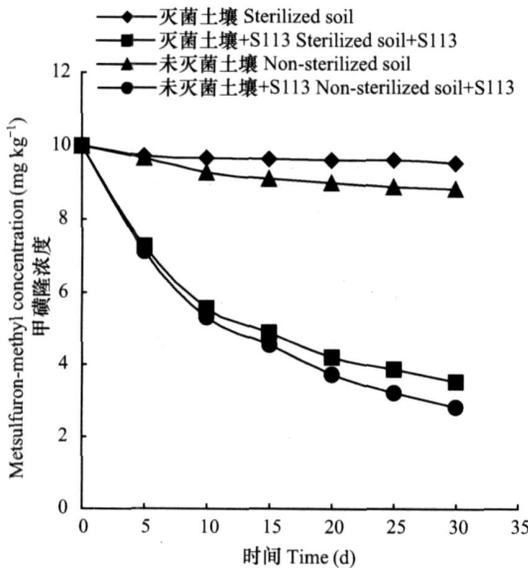


图 2 不同条件下甲磺隆在土壤中的降解

Fig. 2 Degradation of metsulfuron-methyl in soil under various conditions

2.3 不同接种量对土壤中甲磺隆降解的影响

由图 3 可知,甲磺隆浓度为 10 mg kg⁻¹的土壤,接种 S113 菌悬液使土壤中含菌量分别为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵个 g⁻¹干土,第 30 天甲磺隆的降解率分别为 71.9%、58.8%、37.9%、19.9%。可见,土壤中甲磺隆降解效果与降解菌接种量呈正相关,土壤中含菌

量为 10⁸个 g⁻¹干土时,降解效果最好,而当接种量为 10⁵个 g⁻¹干土时,降解菌对甲磺隆的降解作用微弱。

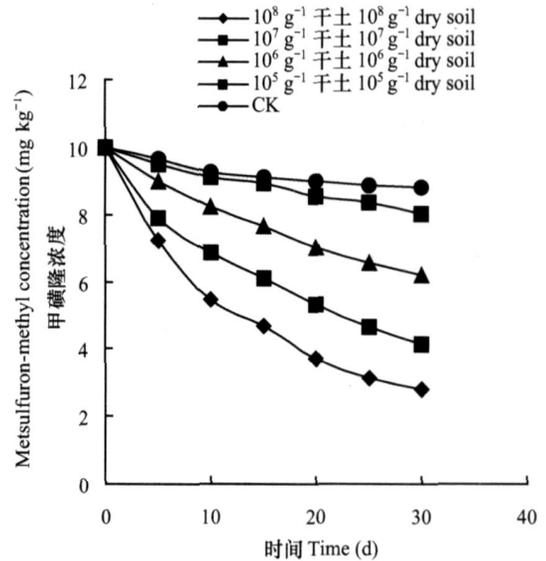


图 3 接种量对 S113 降解甲磺隆的影响

Fig. 3 Influence of S113 inoculation rate on metsulfuron-methyl degradation in soil

2.4 不同初始浓度对土壤中甲磺隆降解的影响

由图 4 可知,土壤中甲磺隆浓度分别为 1、10、50 mg kg⁻¹时,接种相同量的 S113 菌悬液,第 30 天的甲磺隆的降解率分别为 90.2%、73.2%、39.6%。在土壤中甲磺隆浓度较低的情况下,S113 的降解效果显著,而当土壤中甲磺隆浓度达到 50 mg kg⁻¹时,S113 的降解效果降低,甲磺隆降解率仅为 39.6%,分析原因是由于土壤中高浓度的甲磺隆会对降解菌

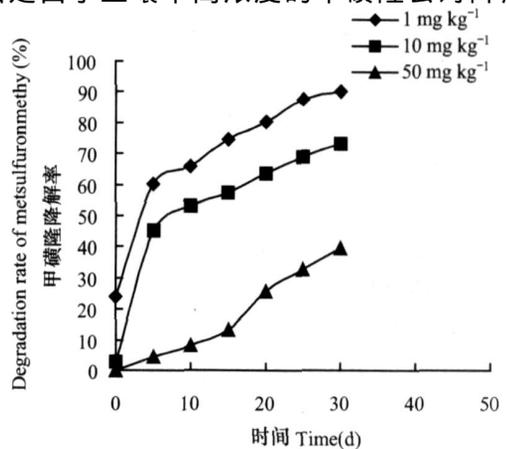


图 4 不同初始浓度对 S113 降解土壤中甲磺隆的影响

Fig. 4 Influence of different initial concentrations of substrate on metsulfuron-methyl degradation by S113 in soil

S113 产生抑制作用,导致降解能力下降。

2.5 不同温度对土壤中甲磺隆降解的影响

如图 5 所示,S113 在 30 ℃ 时对甲磺隆的降解效果最好,第 30 天的降解率可达 75.9%。在 25 ℃、20 ℃ 降解效果有所下降,第 30 天的降解率分别为 53.5%和 23.9%。当环境温度为 30 ℃ 时,S113 生长

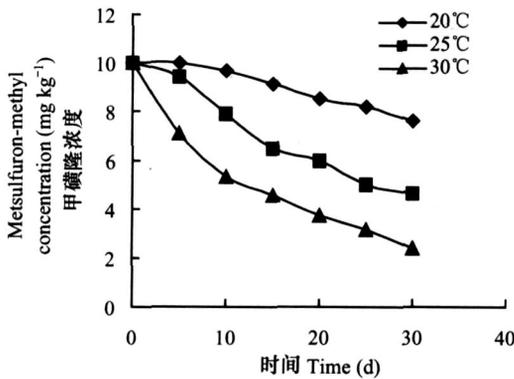


图 5 温度对 S113 降解土壤中甲磺隆的影响

Fig. 5 Influence of temperature on metsulfuron-methyl degradation by S113 in soil

表 1 S113 灌根对玉米甲磺隆药害的解除作用

Table 1 Effect of root irrigation with S113 solution on phytotoxicity of metsulfuron-methyl (SM) to maize

处理 Treatment	苗长 Length of seedlings (cm)	根长 Length of root (cm)	苗重 Weight of seedlings (g)	根重 Weight of root (g)
120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SM + S113	22.06 \pm 1.56 B	6.76 \pm 0.97 B	4.64 \pm 0.15 B	1.60 \pm 0.04 B
80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SM + S113	26.98 \pm 2.41 A	14.40 \pm 1.56 A	5.90 \pm 0.09 AB	3.04 \pm 0.11 A
40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SM + S113	27.01 \pm 2.80 A	14.90 \pm 1.58 A	6.20 \pm 0.12 A	3.44 \pm 0.12 A
120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SM	5.40 \pm 0.74 D	4.54 \pm 0.51 C	1.94 \pm 0.13 C	0.93 \pm 0.07 D
80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SM	6.10 \pm 0.58 D	4.66 \pm 0.64 C	2.00 \pm 0.08 C	1.22 \pm 0.05 C
40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ SM	10.65 \pm 1.20 C	5.52 \pm 0.65 BC	3.18 \pm 0.11 C	1.46 \pm 0.09 BC
CK	27.03 \pm 2.77 A	15.67 \pm 1.56 A	6.90 \pm 0.82 A	3.22 \pm 0.15 A

表中数据为平均值 \pm 标准差;大写字母表示最小显著差异测验在 $p=0.01$ 的差异水平。Data in the table are shown as means \pm SE. Capital letters affixed to the data mean significant differences ($p=0.01$), respectively, according to a least significant difference test

3 讨 论

以甲磺隆为代表的磺酰脲类除草剂易对后茬作物产生药害,造成经济损失。目前,国内外对于利用微生物解除甲磺隆药害的研究较少,分离获得的能够降解甲磺隆的菌株不多,而真正向受污染的田块中投加高效菌株用于微生物修复的则更少,仅有杨基峰^[8]、Yu^[9]、沈东升^[12]、汪海珍^[13]等利用投加真菌降解菌修复甲磺隆污染土壤,而对于甲磺隆降解细菌的应用研究则未见报道。本研究初步探讨了甲磺隆降解菌 S113 在土壤中对甲磺隆的降解状况。

旺盛,对土壤中甲磺隆降解能力强,而当温度降低为 20 ℃,则不利于 S113 的生长,表现为对土壤中甲磺隆降解能力下降。

2.6 S113 灌根对玉米药害的解除作用

S113 灌根对玉米药害的解除作用结果见表 1。采用土培法,甲磺隆浓度为 40、80、120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的土壤对玉米幼苗的生长有抑制作用,且抑制率随着甲磺隆浓度的提高而升高。如 40、80、120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的含药土壤生长的玉米苗长分别为 10.6、6.1、5.4 cm,与对照苗长 27.03 cm 相比差异显著。但当含药土壤中接种降解菌 S113 后,可有效的解除药害作用。如 40、80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 含药土壤加入降解菌后,苗长可分别恢复生长至 27.01 cm、26.98 cm,与对照相比无显著性差异。同样,对于根长、苗重、根重等指标,在 40、80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 甲磺隆浓度下,接种降解菌,都可恢复至与对照相同的生长水平。在甲磺隆含量为 120 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 条件下,接种 S113,虽不能恢复至与对照相同水平,但与不使用降解菌相比,也表现出显著的解除药害的作用。

与已有报导的甲磺隆降解真菌相比,降解细菌 S113 的降解性质优良。如沈东升等^[12]分离获得的 *Penicillium* sp.,以甲磺隆为唯一碳源,对甲磺隆的降解最大值为 50%,而 S113 对甲磺隆的降解率可达 98%以上。外源投加降解菌株 S113 可以有效地促进土壤中甲磺隆的降解,土壤中甲磺隆降解率由 11.9%提高为 76.9%,而沈东升等^[12]将甲磺隆降解菌 *Penicillium* sp. 投加土壤可使甲磺隆降解速率提高约 14.08%。本研究还以玉米为供试植物,研究了 S113 对玉米药害的解除作用,发现 S113 灌根有较好的解除药害效果。研究结果表明,甲磺隆降解菌 S113 是一株性质优良的甲磺隆降解菌,土壤中人

工接种 S113 能有效去除甲磺隆残留,并可解除甲磺隆对玉米的药害作用,对于甲磺隆污染土壤的生物修复具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] James V H. Chemistry of sulfonylurea herbicides. *Pestle Sci.*, 1990, 29:247 ~ 248
- [2] Dastghei F, Andrews M, Mrtton J D. Mode of action of chlorsulfuron in a sensitive wheat (*Triticum awstivum*) cultivar: Primary and secondary effect on nitrogen assimilation. *Ann. Appl. Biol.*, 1995, 127:125 ~ 135
- [3] John S F, Thomas G P, Human C R. Potential environmental risks associated with the new sulfonylurea herbicides. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27:2 250 ~ 2 254
- [4] Kotou S E, Elefther I G, Gagianas A A. Phytotoxicity and persistence of chlorsulfuron, metsulfuron-methyl, triasulfuron and tribenuron-methyl in three soils. *Weed Res.*, 1993, 33(2): 355 ~ 367
- [5] 卢桂宁,陶雪琴,杨琛,等. 土壤中有机农药的自然降解行为. *土壤*, 2006, 38(2):130 ~ 135. Lu GN, Tao X Q, Yang C, et al. Behavior of organic pesticides in natural degradation in soils (In Chinese). *Soils*, 2006, 38(2):130 ~ 135
- [6] Zhang X H, Zhang G S, Zhang Z H, et al. Isolation and characterization of a dichlorvos-degrading strain DDV-1 of *Ochrobactrum* sp. *Pedosphere*, 2006, 16(1):64 ~ 71
- [7] 沈标,邵劲松,李顺鹏,等. 假单胞菌 DLL-1 在土壤生物修复中的作用. *中国环境科学*, 2002, 22(4):365 ~ 369. Shen B, Shao J S, Li S P, et al. Function of *Pseudomonas* sp. DLL-1 in soil bioremediation (In Chinese). *China Environmental Science*, 2002, 22(4):365 ~ 369
- [8] 杨基峰,虞云龙,方华,等. 甲磺隆污染土壤的生物修复. *环境化学*, 2006, 25(1):76 ~ 79. Yang J F, Yu Y L, Fang H, et al. Bioremediation of soil polluted with metsulfuron-methyl (In Chinese). *Environmental Chemistry*, 2006, 25(1):76 ~ 79
- [9] Yu Y L, Wang X, Luo Y M, et al. Fungal degradation of metsulfuron-methyl in pure cultures and soil. *Chemosphere*, 2005, 60(4):460 ~ 466
- [10] 胡江,代先祝,李顺鹏. 两株降解菌对阿特拉津污染土壤的修复效果研究. *土壤学报*, 2005, 42(2):323 ~ 327. Hu J, Dai X Z, Li S P. Bioremediation of atrazine in unsterilized soil by two atrazine degradation strains (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(2):323 ~ 327
- [11] Rossana B K, Carsten S J. Determination of sulfonylurea degradation products in soil by liquide chromatography-ultravet detection followed by confirmatory liquide chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1999, 855:575 ~ 582
- [12] 沈东升,方程冉,周旭辉. 一株甲磺隆降解真菌 (*Penicillium* sp.) 的降解特性研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2002, 28(5):542 ~ 546. Shen D S, Fang C R, Zhou X H. Study on degradation characteristics of a *Penicillium* sp. degrading metsulfuron-methyl (In Chinese). *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci. Edition)*, 2002, 28(5):542 ~ 546
- [13] 汪海珍,徐建民,谢正苗. 甲磺隆污染土壤生物修复的初步探索. *农药学报*, 2003, 5(4):54 ~ 58. Wang H Z, Xu J M, Xie Z M. Preliminary study on bioremediation of metsulfuron-methyl in soi (In Chinese). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2003, 5(4):54 ~ 58

BIOREMEDIATION OF METSULFUON-METHYL-CONTAMINATED SOIL BY S113

Huang Xing Pan Jijie Sun Jiquan Sun Xiaofei Li Shunpeng[†]

(Department of Microbiology, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Bioremediation of metsulfuron-methyl contaminated soil with S113 (*Methylophila* sp.) was studied under laboratory conditions. S113 was capable of utilizing metsulfuron-methyl as its sole carbon source for growth and degrading 98.38% of the 50 mg L⁻¹ metsulfuron-methyl within 72 h. Addition of S113 could prominently accelerate degrading of metsulfuron-methyl. When S113 was inoculated into the soil at a rate of 10⁸ cells g⁻¹ dry soil, 76.9% of the metsulfuron-methyl (10 mg kg⁻¹ dry soil) in the soil was degraded after 30 days, whereas only 11.9% was degraded in CK. When inoculation rate decreased to 10⁵ g⁻¹ dry soil, the action of S113 degrading metsulfuron-methyl in soil was not distinct, showing that degradation rate was related positively to the amount of inoculation, When metsulfuron-methyl was low in concentration, S113 was effective. When the concentration of metsulfuron-methyl was increased to 50 mg kg⁻¹, metsulfuron-methyl degradation rate was only 39.6%. Soil temperature also affected metsulfuron-methyl degradation rate. When it was 30 °C, the rate reached 75.9% in 30 days, whereas when it was 25 °C and 20 °C, the rate was lower to 53.5% and 23.9%, respectively. Pouring S113 solution around the roots with S113 solution could mitigate the inhibitive effect of metsulfuron-methyl at 40 or 80 µg kg⁻¹ on maize growth to a varying degree. When the concentration of metsulfuron-methyl increased to 120 µg kg⁻¹, the mitigating effects were not distinct. The findings suggest that artificial inoculation of S113 could effectively degrade metsulfuron-methyl in soil.

Key words S113; Metsulfuron-methyl; Bioremediation