

# 降解菌 HD 接种和非接种根围土壤中 丁草胺的降解动力学研究\*

虞云龙<sup>1</sup> 陈英旭<sup>2</sup> 潘学冬<sup>1</sup>

(浙江大学 1 农业与生物技术学院植保系; 2 环境与资源学院环境工程系, 杭州 310029)

**摘 要** 测定了小麦、棉花、水稻和玉米根围土壤和非根围土壤中丁草胺的降解特征和降解菌变化动态。结果表明, 种植作物丰富了土壤微生物, 根围土壤丰富的微生物对丁草胺的降解具有显著的促进作用。根围土壤中丁草胺的降解是非根围土壤的 1.63 ~ 2.34 倍, 相应的半衰期缩短为非根围土壤的 42.2% ~ 72.8%。根围土壤接种处理后这种促进作用得到进一步加强, 其降解速率是非根围土壤的 1.68 ~ 2.83 倍, 半衰期为非根围土壤的 34.4% ~ 59.4%。试验结果表明, 作物根围是丁草胺残留快速降解的微环境, 作物根围接种处理可以强化丁草胺残留的微生物降解。

**关键词** 丁草胺, 生物修复, 根围土壤

**中图分类号** X172

农药是毒性较高、环境释放率较大、影响面广的有机污染物质, 我国平均每年发生病虫害  $1.8 \times 10^8 \text{ km}^2$ , 施用农药的面积达  $1.5 \times 10^8 \text{ km}^2$ <sup>[1,2]</sup>。农药品种繁多, 生产量和使用量可观, 在田间施用后, 对作物进行保护的仅占施用量的 10% ~ 30%, 其余的 20% ~ 30% 进入大气和水体, 50% ~ 60% 残留于土壤, 对后茬作物的生长和农产品安全、生态环境、人畜健康均构成了严重的潜在危害。植物根围丰富的微生物对有机污染物的降解具有较好的促进作用<sup>[3-10]</sup>。近些年来, 植物根围微生物对有机污染物的降解作为一种消除有机污染的有效途径, 成为有机污染生物修复的重要研究方向并受到广泛关注。已报道的相关研究主要侧重于根际效应对农药等有机污染物微生物降解的促进作用, 以期揭示农药等有机污染快速降解的机理, 探索土壤有机污染的生物修复途径和方法<sup>[11,12]</sup>。根围土壤是作物赖以生存的直接基质, 也是土壤中农药残留进入作物体危及作物生长和农产品安全的路径。如何在保证农作物生长的同时利用并强化作物根围环境的自净功能, 实现农药污染的原位修复, 阻断农药残留进入作物、保障作物生长和农产品的安全是有待探索的问题。

丁草胺是一种杀草活性高, 选择性强, 多年来一直是我国使用面广、时间长、量大的除草剂, 它在土壤中的消失主要是微生物降解<sup>[13-15]</sup>。本试验以丁草胺为模型化合物, 作者分离的丁草胺、乙草胺、甲磺隆等除草剂的混合降解菌 HD 为接种物, 测定作物接种根围和非接种根围土壤中丁草胺的降解动力学特征及其差异机理, 探讨残留农药在土壤中快

\* 国家自然科学基金(39870504)和浙江省自然科学基金(399487、301050)资助项目

收稿日期: 2002-01-10; 收到修改稿日期: 2002-03-01

速降解的途径,为农田土壤农药污染的生物修复提供理论和方法基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 接种物的培养

以本实验室自行分离的降解丁草胺、乙草胺、甲磺隆等除草剂的混合降解菌 HD 为接种物,降解菌 HD 在含有  $100 \text{ mg L}^{-1}$  丁草胺的普通培养基中,在  $30^\circ\text{C}$  温度下培养 3 天,  $4\,000 \text{ r min}^{-1}$  离心 15 min, 收集菌体,用 pH7.0 的  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  磷酸钠缓冲液洗涤两次,悬浮于同一缓冲液中,制成吸光度 ( $\text{OD}_{610}$ ) 为 0.2 的细胞悬浮液并用平板计数法测定菌量,备用。

### 1.2 土壤采集

供试土壤为浙江大学华家池校区试验农场田间土壤,土壤基本性状见表 1。采集未种植作物田间 0~15 cm 表层土壤于保鲜袋中带回实验室,直接过 20 目筛,作为对照非根围土壤。作物种植田间以作物为中心 10 cm 半径范围铲出整个土块,抖落大块土壤后的作物根系连同与之紧密黏附的土壤置于保鲜袋带回实验室,仔细刷下并收集黏附于作物根系的土壤,直接过 20 目筛,作为根围土壤供试。

表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the tested soil

pH	离子交换量 CEC $\text{cmol}(+) \cdot \text{kg}^{-1}$	有机质 OM $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	全氮 Total N $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	全磷 Total P $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	全钾 Total K $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	颗粒组成 (%)		
						Particle composition (%)		
						0.002 ~ 0.02 mm	0.02 ~ 0.2 mm	0.2 ~ 2 mm
6.5	14.7	25.0	2.7	0.62	19.5	31.3	46.3	22.4

### 1.3 丁草胺降解试验

称取当天新鲜土壤 50 g 于 250 ml 三角烧瓶,加入丁草胺至其含量为  $1.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ,充分混匀,加水至土壤持水量的 80%,分接种 ( $1.3 \times 10^5 \text{ CFU g}^{-1}$ ,以鲜土计) 和不接种两种处理,然后用棉花塞封口,于  $30^\circ\text{C}$  恒温培养箱中黑暗培养,培养期间定期称重并加入蒸馏水以保持土壤含水量。培养 0、1、3、5、7、14、21、35、50 天分别取样测定土壤中丁草胺的残留,同时用最大可能数法 (MPN)<sup>[16]</sup> 测定降解菌变化动态。每一处理设三个重复。

### 1.4 丁草胺残留测定

含 50 g 土样的 250 mL 三角瓶中分别加入蒸馏水 30 ml、丙酮 50 ml,置于摇床充分振荡 1 h,抽滤并用 15 ml 丙酮-蒸馏水 (2:1) 洗涤两次,收集滤液,滤液在旋转蒸发器上蒸去丙酮,冷却,分别加入少许助滤剂 Celite 545、 $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{H}_3\text{PO}_4$  凝结液 5 ml,充分振荡后静置 10 min,抽滤并以凝结液洗涤,收集滤液,分别以 50、30、30 ml 石油醚 3 次萃取丁草胺,合并萃取液过无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  脱水后收集于 250 ml 烧瓶,于旋转蒸发器浓缩并定容至 10 ml,用气相色谱法测定丁草胺含量。

上述方法测得三次试验的丁草胺平均添加回收率为  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ , 92.5%, 变异系数 6.7%;  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , 93.6%, 变异系数 8.7%。

### 1.5 丁草胺气相色谱测定

Shimadzu GC-19A 气相色谱仪,电子俘获检测器;色谱柱,HP-5 毛细管柱,  $0.25 \text{ mm i. d} \times 25 \text{ m}$ ;柱温,  $200^\circ\text{C}$ ;进样口温度,  $230^\circ\text{C}$ ;检测器温度,  $230^\circ\text{C}$ ;载气,  $\text{N}_2$   $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$ ;分流比, 1/20。

## 2 结果与讨论

### 2.1 非根围土壤中丁草胺的降解

丁草胺在对照土壤即非根围土壤中的降解动态如图 1 所示。降解曲线呈一级动力学特征:  $C = C_0 e^{-kt}$ ,  $C$  为丁草胺在土壤中的残留浓度,  $C_0$  为丁草胺初始浓度,  $k$  为降解速率常数,  $t$  为时间。根据一级动力学方程经 Excel 统计分析, 非根围土壤中丁草胺的降解速率常数为 0.0385, 计算出相应的半衰期为 18.0 天(表 2)。同时, 用最大可能数法(MPN)测得非根围土壤中丁草胺可培养降解菌的变化动态如图 2, 利用丁草胺的微生物在 14 天左右达到生长高峰, 相应的土壤中丁草胺降解菌生物量为  $2.80 \times 10^8 \text{ CFU g}^{-1}$ 。

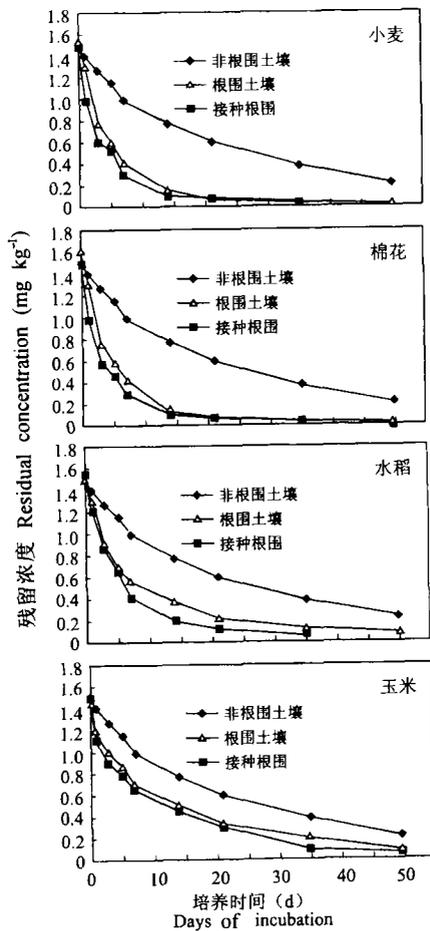


图 1 丁草胺在不同土壤中的降解动态

Fig. 1 Degradation of butachlor in the root-zone soils

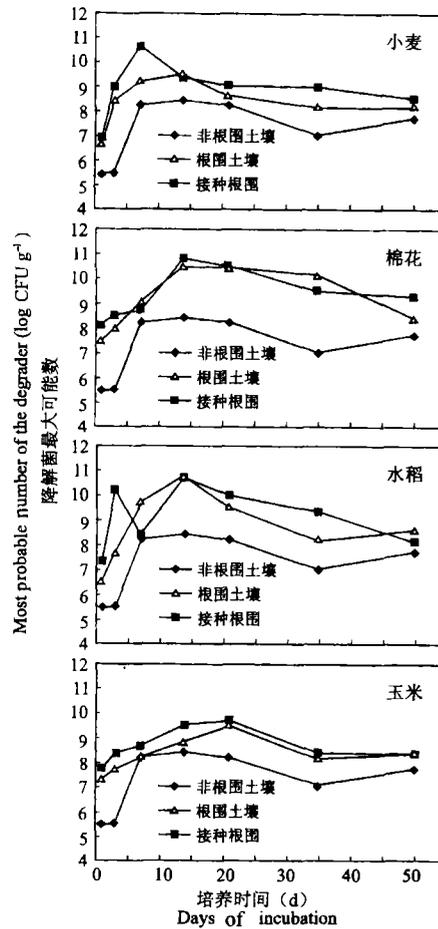


图 2 在不同土壤中的丁草胺降解菌变化动态

Fig. 2 Population dynamics of culturable microbes utilizing butachlor in the root-zone soils

表 2 丁草胺在不同作物根围土壤中降解的动力学特征

Table 2 The degradation kinetics of butachlor in the root-zone soils of different crops

作物 Crop	土壤 Soil	降解动力学方程 Kinetic equation	$R^2$	半衰期(d) Half-life
小麦	根围土壤	$C = 0.912e^{-0.0902t}$	0.9047	7.6
	接种根围土壤	$C = 0.872e^{-0.109t}$	0.9173	6.3
棉花	根围土壤	$C = 0.901e^{-0.0866t}$	0.9017	8.0
	接种根围土壤	$C = 0.814e^{-0.104t}$	0.9257	6.6
水稻	根围土壤	$C = 1.08e^{-0.0664t}$	0.9631	10.4
	接种根围土壤	$C = 1.16e^{-0.111t}$	0.9750	6.2
玉米	根围土壤	$C = 1.18e^{-0.0531t}$	0.9819	13.1
	接种根围土壤	$C = 1.13e^{-0.0648t}$	0.9678	10.7
对照	对照	$C = 1.40e^{-0.0385t}$	0.9948	18.0

## 2.2 丁草胺在根围土壤中的降解

作物根系在土壤中的分泌物如糖类、氨基酸、脂肪和芳香族化合物、及表皮组织的不断死亡和脱落改变了根围土壤的物理性质和化学性质,这种改变有利于微生物在根围土壤中的生存和繁殖,同时也有利于提高化合物的溶解性<sup>[5]</sup>。实验中用最大可能数法(MPN)测得的小麦、棉花、水稻、玉米根围土壤中降解菌数量随丁草胺降解的变化动态如图2。从图中可以看出作物根围土壤中丁草胺降解菌的数量明显超过非根围土壤,小麦、棉花、水稻、玉米根围降解菌最大生物量(MPN<sub>max</sub>)分别为  $3.50 \times 10^9$ 、 $3.20 \times 10^{10}$ 、 $6.20 \times 10^{10}$ 和  $2.80 \times 10^9$ CFU g<sup>-1</sup>。作物之间根围微生物生长特征和生物量存在差异,小麦、棉花、水稻根围丁草胺降解菌的生长高峰均出现在14天左右,玉米根围的则相对延长,出现在21天左右,这可能与不同作物分泌物的差异有关<sup>[17]</sup>。

同期测定的根围土壤中除草剂丁草胺的降解曲线与非根围土壤中的降解动态基本类同,但降解速率显著提高,经一级动力学方程回归分析(表2),小麦、棉花、水稻、玉米根围土壤中丁草胺的降解速率常数为0.0902、0.0866、0.0664、0.0531,分别是对照非根围土壤的2.34、2.24、1.72、1.63倍,相应的降解半衰期缩短为非根围土壤的42.2、44.4、57.7和72.8%,说明作物根围丰富的微生物对丁草胺的降解具有明显的促进作用。

## 2.3 丁草胺在接种根围土壤中的降解

丁草胺在接种根围土壤中的降解动态如图2。接种后小麦、棉花、水稻、玉米根围土壤中丁草胺的降解速率常数提高到0.109、0.104、0.111和0.0648(表2),为根围土壤的1.21、1.20、1.67、1.22倍,是非根围土壤的2.83、2.70、1.72、1.68倍。相应的半衰期缩短为根围土壤的82.8%、82.5%、59.6%和81.7%,是非根围土壤的35.0%、36.7%、34.4%和59.4%。这说明,根围土壤接种处理后,由于接种菌HD对丁草胺较强的降解能力,对土壤中丁草胺的降解具有促进作用。

与降解试验同步测定的丁草胺可培养降解菌最大可能数(MPN)变化动态如图2。小麦根围接种后丁草胺降解菌生长接好,生长高峰提前至第7天左右,随后生物量下降,除14天略低于根围土壤外均高于根围土壤。玉米根围土壤接种后降解菌生物量在培养期间一直高于根围土壤。棉花接种和不接种之间差异不大。水稻根围接种后,初期丁草胺

含量相对较高,降解菌利用丁草胺快速生长,随着丁草胺的被降解,生物量下降后再次上升,这说明接种菌 HD 在水稻根围的生长需要一个适应期,这与根围土壤的有机质、pH 以及与土著微生物的竞争等多种因子有关<sup>[18,19]</sup>。由此可见,利用外源微生物强化土壤中农药丁草胺微生物降解必须重视外源微生物在土壤中生存和繁殖的稳定性。

值得指出的是,试验中测定的丁草胺降解菌数量只是可培养部分,其数量变化尚不足以定量描述丁草胺在根围和非根围土壤中降解的差异,其主要原因在于土壤中绝大部分微生物是用传统方法不可培养的<sup>[20]</sup>,而这些不可培养微生物在农药等有机化合物的降解过程中起着不可忽视的作用<sup>[21,22]</sup>。此外,不同作物根围环境土壤吸附/解吸等行为的改变改变了丁草胺生物有效性,其结果也会导致丁草胺在不同作物根围土壤中降解的差异。

### 3 结 论

作物根围由于含有丰富的微生物,丁草胺在作物根围的降解明显快于非根围土壤,根围土壤接种降解菌处理可以强化丁草胺的降解。作物根围是实现残留农药丁草胺快速降解的微环境。丁草胺降解菌在不同作物根围生长的差异表明,加强外源降解菌在污染土壤中生存和繁殖的稳定性和提高降解效率是利用微生物修复丁草胺等农药污染土壤的重要途径。

### 参 考 文 献

1. 华小梅,单正军.我国农药的生产、施用及其污染环境因子分析.环境科学进展,1996,4(2):33~35
2. 单正军,朱志林,华小梅等.我国农药环境污染及管理现状.环境保护,1997,6:35~38
3. Nichols T D, Wolf D C, Rogers H B, *et al.* Rhizosphere microbial population in contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1997, 95:165~178
4. Holden P A, Firestone M K. Soil microorganisms in soil cleanup: How can we improve our understanding? *J. Environ. Qual.*, 1997, 26:32~40
5. Anderson T A, Guthrie E A, Walton B T. Bioremediation in the rhizosphere: Plant roots and associated microbes clean contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27:2631~2636
6. Boyle J J, Shann J R. Biodegradation of phenol, 2,4 - DCP, 2,4 - D, and 2,4,5 - T in field - collected rhizosphere and non-rhizosphere soils. *J. Environ. Qual.*, 1995, 24:782~785
7. Grayston S T, Wang S, Campbell C D, Edwards A C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30(3):369~378
8. Knaebel D B, Vestal J R. Effects of intact rhizosphere microbial communities on the mineralization of surfactants in surface soils. *Can. J. Microbiol.*, 1992, 38:643~653
9. Walton B T, Anderson T A. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: Potential application to biological remediation of waste sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56:1012~1016
10. Reilley K A, Banks M K, Schwab A P. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.*, 1996, 25:212~219
11. Schnoor J L, Licht L A, Meutcheon S C, *et al.* Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29(7):318A~323A
12. Gleba D, Borisjuk N B, Borisjuk L B, *et al.* Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96:5973~5977

13. 郑和辉,叶常明.甲草胺和丁草胺等除草剂在多介质环境中环境行为综述.环境科学进展,1999,7(3):1~10
14. 陈忠孝,樊德方.丁草胺在土壤中渗漏、残留与降解的动态研究.环境化学,1988,7(2):30~36
15. 王一茹,刘长崑,牛成玉等.丁草胺在水体中的光解和稻田中归趋的研究.环境科学学报,1996,16(4):475~481
16. Alexander M. Most - probable number method for microbial population. In: Black C. A. *et al.* Methods for the Soil Analysis. Part 2. ASA, Madison, WI. 1965. 1647 ~ 1472
17. Alvey S, Crowley D E. Survival and activity of an atrazine - mineralization bacterial consortium in rhizosphere soil. Environ. Sci. Technol., 1996, 30:1596 ~ 1603
18. Nanniperi P, Bollag J M. Use of enzyme to detoxify pesticide - contaminated soils and waters. J. Environ. Qual., 1991, 20: 510 ~ 517
19. Marshner P, Yang C H, Lieberei R, Crowley D E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem., 2001, 33:1437 ~ 1445
20. Marilley L, Vogt G, Blance M, Aragno M. Bacterial diversity in the bulk soil and rhizosphere fractions of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* as revealed by PCR restriction analysis of 16S rDNA. Plant and Soil, 1998, 198:219 ~ 224
21. Forlani G, Manigiagalli A, Nielson E, Suardi C M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: Evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. Soil Biol. Biochem., 1999, 31:991 ~ 997
22. Shi Y, Zwolinski M D, Schreiber M E, *et al.* Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: Field and laboratory microcosm experiments. Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(5):2143 ~ 2150

## DYNAMICS OF BUTACHLOR BIODEGRADATION IN THE ROOT – ZONE SOILS AND THE SOIL INOCULATED WITH A MIXTURE HD OF BACTERIAL STRAINS DEGRADING BUTACHLOR

Yu Yun-long<sup>1</sup> Chen Ying-xu<sup>2</sup> Pan Xue-dong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Plant Protection, College of Agriculture and Biotechnology;

<sup>2</sup> Department of Environmental Engineering, College of Environment and Resources, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

### Summary

The degradative characteristics of butachlor in the root-zone soils of different crops such as wheat, cotton, rice, maize and the bulk soils, and microbial population dynamics of culturable microorganisms capable of utilizing butachlor were investigated. A larger microbial population was measured in these crop rhizosphere soils compared to the non-rhizosphere soils. The increased population enhanced biodegradation of butachlor in the rhizosphere soils as compared to that in the non-rhizosphere soils. The degradative rates of butachlor in the wheat-, cotton-, rice-, or maize-rhizospheres were 1.63 ~ 2.34 times of those in non-rhizospheres, and the corresponding half-lives were shorten to be 42.2% ~ 72.8% of those in the non-rhizosphere. The enhancement in biodegradation was further strengthened by the inoculation of a bacterial strain mixture capable of utilizing butachlor as sole carbon and energy sources. Compared with those in the non-rhizosphere, the degradative rates in the rhizospheres increased up to 1.68 ~ 2.83 times after the inoculation. The microcosm in crop root-zone soil may be the optimal site for rapid degradation of residual pesticides butachlor.

**Key words** Butachlor, Bioremediation, Rhizosphere soil