第 42 卷 第 2 期
2005 年 3 月

土 壤 学 报
ACTA PEDOLOGICA SINICA

Vol. 42, No. 2
Mar., 2005

两株降解菌对阿特拉津污染土壤的修复效果研究*

胡 江 代先祝 李顺鹏†
(农业部农业环境微生物工程重点实验室, 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

BIOREMEDIATION OF ATRAINE IN UNSTERILIZED SOIL BY TWO ATRAZINE DEGRADATION STRAINS

Hu Jiang Dai Xianzhu Li Shunpeng†
(*Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultral Enviroment, Agriculture Ministry; Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

关键词 生物修复; 阿特拉津; 降解; 小麦
中图分类号 Q938.1 文献标识码 A

阿特拉津[2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-1, 3, 5-trazine], 又名莠去津, 是一种广泛使用的三嗪除草剂, 其作用方式是破坏植物体中叶绿体光系统 II(PSII), 主要用于玉米、高粱和甘蔗田杂草的防除。该除草剂在世界范围内使用已经 40 多年, 但由于其溶解性较好, 迁移率较高, 残留期长, 在世界上许多地区引起土壤和地下水的污染, 从而引起许多国家政府和科学家的重视。随着我国农业的发展和阿特拉津在我国的推广使用, 阿特拉津所带来的环境问题也日趋严重, 已经造成了许多重大损失和环境污染[1~5]。像阿特拉津这样的长效除草剂污染带来的一个直接后果就是后茬作物难以生长, 对于这样的问题, 使用微生物的原位修复是解决污染的最好的方法, 因为微生物作用干净彻底, 不会带来二次污染。本实验在实验室条件下, 对从土壤中分离到的两株能够以阿特拉津为唯一碳氮源的降解菌株在未灭菌土壤中对阿特拉津的原位修复做了初步研究, 发现通过对土壤中投加一定量的降解菌剂可以非常好的消除土壤中的除草剂, 并且解除除草剂对植物药害作用, 为进一步的应用实践提供了必要数据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和植物

菌株 BTAH1(微小杆菌属, *Exiguobacterium* sp.) 和 AG(节杆菌属, *Arthrobacter* sp.) 均为本实验室从土壤中分离得到。

实验所用植物为苏麦 7 号。

1.2 供试土壤

供试土壤为南京农业大学试验农场采集的田间表层土(0~ 30 cm), 土壤经风干, 过筛(5 mm), 备用。其基本性质如下: 土壤为重壤土, pH 为 6.94, 有机质含量 22.9 g kg^{-1}, 该土壤从未使用过阿特拉津。

1.3 培养基

实验中所用培养基为 LB 培养基稀释 10 倍, 简称 1/10 LB 培养基。

1.4 降解菌剂的制备

分别将菌株 BTAH1 和 AG 划线到含有 1 000 mg L^{-1}阿特拉津的 1/10 LB 固体平板上, 挑取具有水解圈的单菌落接种于 100 ml 的 1/10 LB 液体培养基中。30℃培养 24 h, 计数后, 6 000 r min^{-1}离心 10 min, 用新鲜的 1/10 LB 培养基洗涤菌体, 6 000

* 国家"863"项目(2001AA$_2$46081)、国家科技攻关项目(2002BA516A01)资助
† 通讯作者, E-mail: lsp@njau.edu.cn
作者简介: 胡 江(1976~), 四川江油人, 博士研究生, 主要从事环境微生物学的研究
收稿日期: 2004-02-29; 收到修改稿日期: 2004-05-12

r min^{-1}离心 10 min, 以新鲜的 1/10 LB 重悬菌体, 控制菌体浓度为每 ml 约 10^9 个, 备用。

1.5 阿特拉津的施用和降解菌的接种

实验设 4 个处理, 每处理用土 2.5 kg, 重复 3 次。4 个处理分别为: (1) 空白处理(以"空白"表示), 施用 100 ml 新鲜的 1/10 LB; (2) 对照处理(以"CK"表示), 施用 50 mg kg^{-1}的阿特拉津和 100 ml 新鲜的 1/10 LB 培养基; (3) 使用 BTAH1 菌株处理(以"BTAH1"表示), 施用 50 mg kg^{-1}的阿特拉津和 100 ml 1/10 LB 液体培养基摇瓶培养的 BTAH1 菌液; (4) 使用 AG 菌株处理(以"AG"表示), 施用 50 mg kg^{-1}的阿特拉津和 100 ml 1/10 LB 液体培养基摇瓶培养的 AG 菌液。

施用除草剂 7 d 后向处理组均匀喷洒相应的细菌培养液, 再过 7 d 播种小麦。每盆(30 cm × 40 cm)约播种 300 粒小麦, 最后定苗约 150 株, 即每组最后约 450 株。

1.6 土壤中阿特拉津的提取和测定

称取 10 g 待测土样, 加入 30 ml 甲醇, 剧烈振荡 1 h 后, 静置 24 h, 再振荡 30 min, 10 000 r min^{-1}离心 10 min, 小心取出上清液。将上清液用 Φ45 μm 的细菌滤膜过滤后, HPLC 测定。

1.7 小麦植株的检测

自小麦播种后 20 d, 取各个处理中的小麦各 50 株进行如下分析: (1) 量取小麦地上部分和根的长度, 计算平均值; (2) 称取每 10 株小麦地上部分和根的总鲜重, 进行分析。

1.8 降解菌基因组 **DNA** 的提取

菌株活化, 挑单菌落, 接 3 ml 培养基中, 于 30℃ 剧烈振荡培养过夜, 10% 接种量转接至 50 ml 1/10 LB 液体培养基培养至稳定期。离心收集菌体, 提取基因组 DNA[6], 备用。

1.9 降解基因保守片段的扩增

按照已经报道的引物序列[7], 对降解菌中阿特拉津降解基因的保守片段进行了 PCR 扩增。

2 结 果

2.1 降解菌对土壤中阿特拉津的降解效果

结果表明, 当投加菌体数量为每 g 土 10^8 个时, 8 d 后, 投加 AG 菌株的土壤中, 阿特拉津的浓度降至 1.53 mg kg^{-1}, 降解率为 96.9%; 投加 BTAH1 菌株的土壤中, 阿特拉津的浓度降至 1.79 mg kg^{-1}, 降解率为 96.4%, 并且 AG 的降解过程略快于 BTAH1。而对照土壤中阿特拉津一直维持在一个较高水平, 8 d 后为 47.1 mg kg^{-1}, 27 d 后仍然有 46.2 mg kg^{-1}(图 1)。由此可以看出, 外源降解菌的投加对于土壤中阿特拉津的快速降解有非常明显的贡献, 对照土壤由于从未使用过阿特拉津, 降解过程缓慢, 这与阿特拉津在土壤中难以降解的报道是一致的[5]。

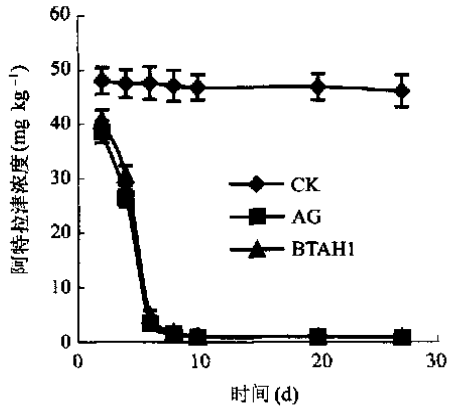


图 1 降解菌对土壤中阿特拉津的降解效果

2.2 降解菌的修复作用对小麦生长的影响

2.2.1 降解菌的修复作用对小麦长势的影响

为了进一步验证降解菌对土壤修复的作用, 在投加降解菌 7 d 后, 在各组土壤中播种了对阿特拉津比较敏感的作物——小麦, 观察降解菌的投加对消除除草剂药害的影响。结果显示, 降解菌的投加对小麦的长势有非常明显的影响(图 2)。对照小麦(每 kg 土施用 50 mg 阿特拉津的土壤中生长的小麦)植株平均高度为 16.8 cm, 平均根长为 7.6 cm, 这一结果明显小于空白小麦, 平均植株高度比空白矮 7.4 cm, 而平均根长约短 3.3 cm。投加 AG 菌株的小麦,

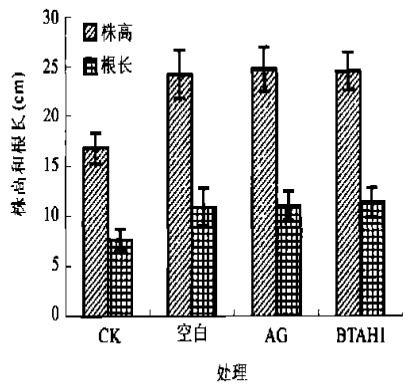


图 2 降解菌处理对小麦长势的影响

平均植株高度为 24.5 cm, 比对照高 7.7 cm, 而平均根长为 11.3 cm, 比对照长 3.7 cm; 投加 BTAH1 菌株的小麦, 平均植株高度为 24.7 cm, 比对照高 7.9 cm, 平均根长为 11.0 cm, 比对照长 3.4 cm。可以这样说, 当含有除草剂的土壤被降解菌处理 7 d 后, 小麦的生长状况就得到了明显的改善, 不论从植株的高度还是根长来看, 都基本达到空白的生长水平。为了进一步分析降解菌的施用对小麦生长状况的影响, 本研究对小麦地上部分和根的鲜重进行了比较和分析。

2.2.2　降解菌的施用对小麦鲜重的影响　　降解菌的投加对小麦各部分鲜重的影响也非常明显(图 3)。对照中小麦平均每株植株地上部分的鲜重只有 0.163 g, 而平均每株植株根的鲜重仅 0.012 g, 分别比空白低 0.078 g 和 0.031 g; 而投加 AG 的小麦平均每株植株地上部分鲜重达 0.257 g, 比对照增加了 0.094 g, 小麦平均每株根的鲜重为 0.058 g, 比对照增加 0.457 g; 投加 BTAH1 菌株的小麦平均每株植株地上部分鲜重达 0.213 g, 比对照增加 0.050 g, 小麦平均每株根的鲜重为 0.038 g, 比对照增加 0.027 g。这一结果显示, 投加降解菌 AG 的效果好于降解菌 BTAH1 的效果, 而从土壤测定的结果来看, 两个菌株的降解效果的差异不显著, 且投加降解菌 AG 的土壤中生长的小麦的植株鲜重也高于空白小麦, 显示该菌株可能具有促进植物生长的作用。

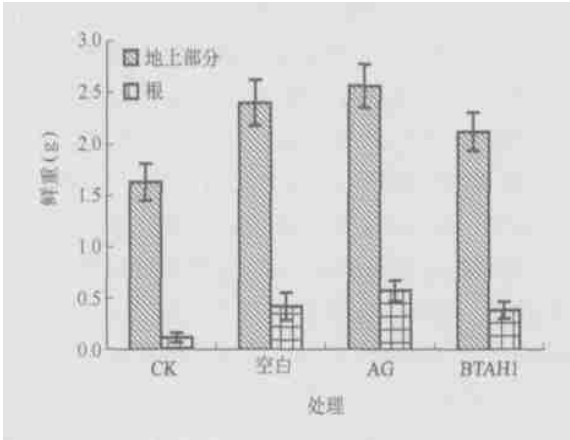
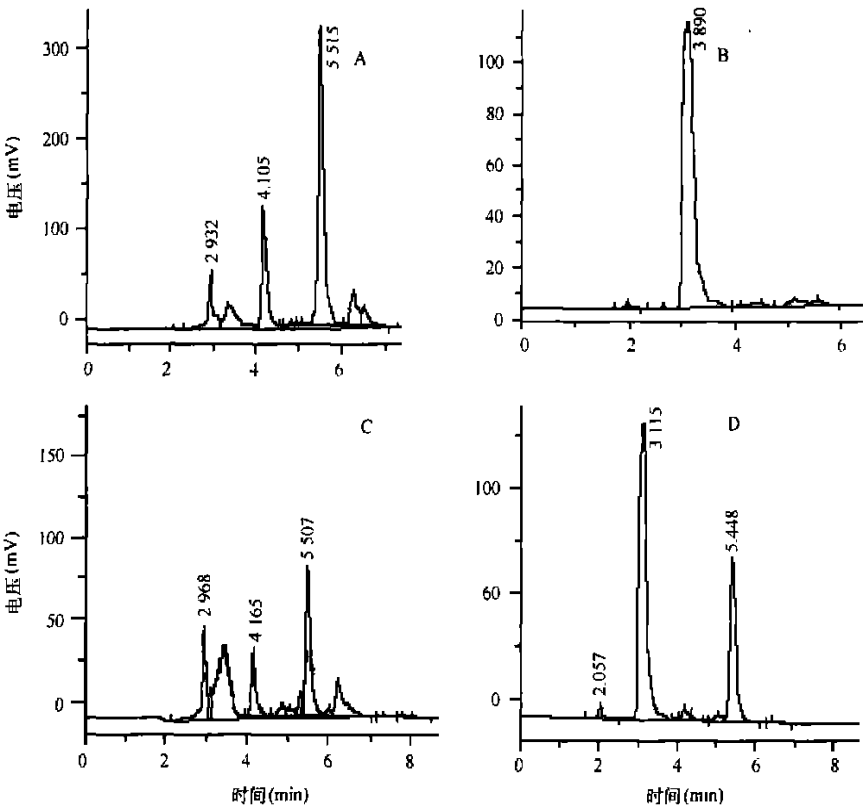


图 3　降解菌的施用对小麦鲜重的影响

2.3　两株降解菌降解中间产物的比较

实验结果显示, AG 的降解效果要略好于 BTAH1, 尤其是短期降解效果, 因此推测两个菌株在降解途径上可能存在某种差异, 我们用液相色谱对其降解中间产物做了初步研究。



A:未接菌的培养基水相;B:氰尿酸标准样品;C:接种 BTAH1 两天后的培养基水相;D:接种 AG 两天后的培养基水相

A: 未接菌的培养基水相; B: 氰尿酸标准样品; C: 接种 BTAH1 两天后的培养基水相; D: 接种 AG 两天后的培养基水相

图 4　两株降解菌降解中间产物的比较

在甲醇: 水= 80: 20、流量为 1.0 ml min^{-1}、检测波长为 226 nm 时, 阿特拉津的出峰时间约为 5.5 min 左右(图 4A), 氰尿酸的出峰时间约为 3.1 min 左右(图 4B)。由于阿特拉津在水中的溶解度较小, 因此图 4A 中看到的阿特拉津的峰高是其饱和浓度的峰高。经过两天的降解, 两个菌株的培养基中的阿特拉津浓度均大幅下降, 但是 AG 的培养基中出现了氰尿酸的累积(图 4C、图 4D)。进一步研究发现, BTAH1 始终没有出现氰尿酸的累积, 但是 AG 的培养基中随着时间的增加, 氰尿酸的量也增加。并且 BTAH1 可以利用氰尿酸为唯一氮源生长, 但是 AG 却不能。氰尿酸是阿特拉津代谢中的一个重要产物, 一般来说可以降解氰尿酸就可以将阿特拉津的三嗪环打开后彻底降解[9~11]。因此可以判断 BTAH1 可将阿特拉津彻底降解, 而 AG 却不可以。

2.4 两株降解菌降解基因保守片段的检测

为了进一步解释这一现象, 本研究对两株菌的降解基因作了初步探索。根据已报道的引物序列[7], 我们以已报道的菌株假单胞菌 ADP 的基因组 DNA 为阳性对照, 对这两个菌株的阿特拉津降解基因的保守片段进行了 PCR 扩增。从图 5 中可以看出, 菌株 AG 的基因组 DNA 没有扩增出与阿特拉津氯水解酶(atzA)同源的序列, 而 BTAH1 则具有这个特异性条带; BTAH1 和 AG 均能扩增出与阿特拉津另外两个基因的保守片段。测序结果也表明, 这些扩增出的条带是与阿特拉津代谢相关的保守片段。说明菌株 AG 中很有可能不具有阿特拉津氯水解酶, 所以它对阿特拉津的降解很有可能不从脱氯开始, 而直接从脱氮乙基开始。脱氯作用不会给微生物带来任何碳源和氮源, 而氮乙基则可直接为微生物提供生长所需要的能源和碳源等物质。而这一差异可能会在土壤中表现为, 菌株 AG 可以比 BTAH1 从阿特拉津优先得到生长所需要的物质, 这样它会比 BTAH1 更优先利用阿特拉津, 所以造成它对阿特拉津的降解快于 BTAH1。

图 5 两株降解菌降解基因保守片段的检测

3 讨 论

本研究初步探讨了两株阿特拉津降解菌在未灭菌土壤中对阿特拉津的降解状况以及降解菌的施用对植物生长的影响, 发现在实验室条件下, 降解菌可以在较短的时期内使土壤中的除草剂浓度下降至一个较低水平, 从而使敏感作物(小麦)可以良好地生长。国外很多文献报道, 也发现降解菌的投加可以加速土壤中阿特拉津的降解[12~14], 但是仍然存在很多问题, 如降解需要的时间比较长, 或者需要反复多次投加菌剂才可以有一定程度的降解, 这些都是限制降解菌使用的因素。而本实验结果表明, 在合适的环境下施用降解菌, 只需要一次投加菌剂, 在较短的时间内就可以达到比较好的降解效果, 使后茬敏感作物可以较好的生长, 而不受除草剂的抑制。实验中, 两株降解菌表现出不同的降解方式, 尤其植物的生长方面, 尚有两个问题值得探讨: (1) AG 在短期内表现出较好的降解效果, 可能与其降解途径有很大关系, 但是这也造成它不能够完全矿化阿特拉津, 虽然 BTAH1 在本实验中短期降解速度较慢, 但是由于其代谢途径完全, 可以完全矿化阿特拉津, 因

此我们认为对于土壤的原位修复来说, 它具有更为重要的意义。但是在一些需要快速解决的突发性事件中, AG 菌株则具有更加明显的优势。我们认为对于不同降解菌的不同降解特性研究对于降解菌株的推广应用也是十分必要的。(2) 实验结果显示, 经 AG 处理后的土壤中的小麦长势好于经 BTAH1 处理的小麦, 但是播种时, 以及播种后, 两种土壤中阿特拉津的残留量并没有显著差异, 由此可以推断这种优势并不是由于它的降解能力造成的。因此对于降解菌在土壤中的行为, 以及它对于植物的作用可能还因菌株的不同而有所差异, 需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] 叶常明, 雷志芳, 殷兴军等. 含莠去津和乙草胺河水灌溉对苗期水稻危害的研究. 环境科学进展, 1997, 5(5): 51~57

[2] 李萃义, 焦晓娟. 洋河下游农灌区农作物受灾与水质污染的关系. 中国环境监测, 1996, 12(4): 49~51

[3] 任晋, 蒋可, 周怀东. 官厅水库水中阿特拉津残留的分析及污染来源. 环境科学, 2002, 23(1): 126~128

[4] 任晋, 蒋可. 阿特拉津及其降解产物对张家口地区饮用水资源的影响. 科学通报, 2002, 47(10): 758~762

[5] 任理, 毛萌. 阿特拉津在饱和砂质壤土中非平衡运移的模拟. 土壤学报, 2003, 40(4): 529~537

[6] 蔡思义, 米长虹, 郑振华. 阿特拉津与农业环境. 农业环境与发展, 1994, 11(4): 22~26

[7] Miller S A, Dykes D D, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 1988, 6: 1 215

[8] de Souza M L, Seffernick J, Martinez B, *et al*. The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. J. Bacteriol., 1998, 180: 1 951~1 954

[9] Radosevich M, Traina S J, Hao Y, *et al*. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. Appl. Environ. Microbial., 1995, 61: 297~302

[10] Topp E, Mulbry W M, Zhu H, *et al*. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. Appl. Environ. Microbial., 2000, 66: 3 134~3 141

[11] Strong L C, Rosendahl C, Johnson G, *et al*. Arthrobacter aurescens TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. Appl. Environ. Microbial., 2002, 68: 5 973~5 980

[12] Struthers J K, Jayachandran K, Moorman T B. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. Appl. Environ. Microbial., 1998, 64: 3 368~3 375

[13] Munier-Lamy C, Feuvrier M P, Chone T. Degradation of ^{14}C-atrazine bound residues in brown soil and rendzina fractions. Journal of Environmental Quality, 2002, 31: 241~248

[14] Newcombe D A, Crowley D E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51: 877~882