

除草剂咪唑烟酸在土壤中的微生物降解研究*

王学东¹ 欧晓明² 王慧利³ 樊德方¹

(1 浙江大学农药环境毒理研究所, 杭州 310029)

(2 湖南化工研究院国家南方农药创制中心湖南基地, 长沙 410007)

(3 南京林业大学森林资源与环境学院, 南京 210037)

STUDY ON DEGRADATION OF IMZAPYR BY MICROORGANISM IN SOIL

Wang Xuedong¹ Ou Xiaoming² Wang Huili³ Fan Defang¹

(1 Institute of Pesticide Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(2 Hunan Branch of National Pesticide R&D South Center, Hunan Institute of Chemical Industry, Changsa 410007, China)

(3 Forestry Resources and Environmental College, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

关键词 土壤; 咪唑烟酸; 微生物降解; 优势降解菌

中图分类号 X78

文献标识码 A

咪唑烟酸(其英文通用名称为 imazapyr, 商品名有 arsenal、assault、灭草烟、阿时拉等)是由原美国氰胺公司研制的一种具有较长残留活性的广谱性苗后除草剂^[1]。它对一年生和多年生的禾本科、阔叶科、莎草科杂草及多种灌木和落叶树有活性。自 20 世纪 80 年代中期商品化后,咪唑烟酸已被广泛用于森林、铁路、公路等多种类型的非耕地除草。目前,咪唑烟酸已经在世界上 22 个国家登记使用,是目前国外使用量较大的一个灭生性除草剂品种^[2]。关于该除草剂环境归趋的研究,引起了世界各国的关注。1992 年美国 Illinois 大学 Cox 等^[3]经过研究后发现:在土壤表土层以下的咪唑烟酸其降解代谢主要是由微生物所引起,且在好气条件下,其微生物降解较快,但在厌气条件下,几乎不分解。Azzouzi^[4]和 Ismail^[5]分别用小扁豆和油菜作指示性植物;Jenkins^[6]则利用¹⁴C 标记化合物研究了咪唑烟酸在土壤中降解的动力学过程,但由于土壤种类的不同,研究结果差异较大,且对土壤中咪唑烟酸降解菌的主要种类及其微生物降解动力学等问题,国内外尚未有相关报道。本文研究了咪唑烟酸在非耕地土壤中的微生物降解动力学,并分离鉴定了土壤中降解菌的优势

种类,为该除草剂环境污染的生物治理提供了一条有效途径。

1 试验部分

1.1 主要仪器与试剂

HP1100G 型液相色谱仪(DAD 检测器,色谱工作站),国际型电动振荡机,ZFG-85A 型旋转蒸发仪,DS-1 型高速组织捣碎机,恒温培养箱,pHS-9V 型酸度计,50 μl 微量进样器等。

二氯甲烷、甲醇、无水硫酸钠均为 A. R. 级,乙腈为 HPLC 级,牛肉膏,蛋白胨,琼脂,及各种无机盐,咪唑烟酸标样由美国氰胺公司台湾新竹农药厂提供。

基础培养基(降解用无机盐培养基): NaCl 1 g, K₂HPO₄ 1 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 为 7.0~7.2。

富集培养基(筛选、驯化降解菌): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, 咪唑烟酸按需加入, 蒸馏水 1 000 ml, pH 为 7.0~7.2。

牛肉膏蛋白胨培养基(细菌生长、分离、纯化用培养基): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 为 7.0~7.2。

* 德国 BASF 公司资助项目

作者简介: 王学东(1972~), 男, 河南淮阳人, 浙江大学在读博士, 主要从事农药混剂及环境毒理方面的研究工作

收稿日期: 2002-07-17; 收到修改稿日期: 2002-10-23

1.2 样品的处理与检测

1.2.1 土样的采集与处理 土样取自浙江大学华家池校区, pH 为 6.71, 有机质含量为 19.8 g kg^{-1} , CEC 为 13.28 ml kg^{-1} , 属粘壤土。取 5~10 cm 深度土壤样品经风干后碾碎, 除去砂砾和植物残物, 过 40 目筛备用。取 20 g 处理过的土样放入 250 ml 的锥形瓶中, 共 48 瓶, 各瓶均按 10 mg kg^{-1} 的量加入咪唑烟酸, 用玻璃棒搅拌与土壤混匀, 加入适量蒸馏水, 使其含水量为田间持水量的 60%, 其中的 24 瓶灭菌采用湿热法灭菌, 将所有土样放入 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内在避光的条件下培养, 按 0、10、20、30、40、50 d 的时间间隔取样, 每次分别取灭菌及非灭菌的处理各 4 瓶, 测定咪唑烟酸的含量。

1.2.2 样品的提取与净化 (1) 土样。将取出的样品每瓶加入 100 ml 提取液, 提取液为甲醇+ $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ (体积比为 70:30, 用 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ 调至 pH 5)。在振荡器上振荡提取 1 h, 抽滤, 用 50 ml 甲醇洗残渣, 合并滤液(调 pH 为 5~6)于 250 ml 的圆底烧瓶中, 将滤液在旋转蒸发器上于 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中将甲醇浓缩掉, 剩余的水溶液转入 500 ml 的分液漏斗中, 加入 6% 氯化钠水溶液 100 ml, 用 $3 \times 50 \text{ ml}$ 的二氯甲烷萃取, 二氯甲烷相经无水硫酸钠干燥后, 收集到 250 ml 的圆底烧瓶中, 在旋转蒸发仪上(水浴的温度为 $40 \sim 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 浓缩至 1~2 ml 左右, 然后在常温下用吹风机吹干, 用乙腈准确定容至 10 ml, 待测。

(2) 水样。将三角瓶中的培养液用 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ 调至 pH 5, 然后用 $3 \times 20 \text{ ml}$ 的二氯甲烷萃取, 二氯甲烷层过无水硫酸钠过滤, 在旋转蒸发器上浓缩近干, 用乙腈准确定容至 10 ml, 摇匀, 待测。

1.2.3 高效液相色谱检测 色谱柱为长 250 mm, 涂有 YWG-C₁₈ 的不锈钢柱, 内径 4.6 mm; 流动相为乙腈+水+ $0.2\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ 水溶液(体积比为 70:25:5); 流量: 1 ml min^{-1} ; 检测波长: 234 nm; 进样量: 20 μl ; 定量方式: 外标峰面积法定量。在上述的检测条件下, 咪唑烟酸的保留时间为 3.336 min。

1.3 菌种的分离与鉴定

1.3.1 降解菌的富集、分离与纯化 参考瓶培养法富集技术^[7,8] 在 250 ml 的三角瓶中, 加入 50 ml 富集培养基(含咪唑烟酸的浓度为 200 mg L^{-1}) 加入 10 g 被污染土样, 置 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 r min^{-1} 的摇床培养,

以后每周添加 5 ml 新鲜培养基, 每次增加咪唑烟酸的浓度 100 mg L^{-1} , 富集培养时间为 2 个月。将富集培养的土样制备成 $10^{-5} \sim 10^{-9}$ 系列稀释液, 用涂布法在牛肉膏蛋白胨培养基上进行分离, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d, 然后根据其不同的外观形态挑取单菌落, 反复划线纯化, 并根据菌落和菌体形态特征合并相同菌株, 并将所得菌株分别接种于牛肉蛋白胨斜面上, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.2 高效降解菌的筛选 将上述所得菌株进行转接培养活化后, 在菌株斜面上加入无菌水至斜面顶, 用接种环刮下菌苔, 接种于含有 25 ml 富集培养基的 100 ml 三角瓶中, 过夜培养后, 培养液用 3000 r min^{-1} 离心 10 min, 去其上清液, 菌体用 pH=7, 0.2 mol L^{-1} 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 每次用 10 ml, 并以该缓冲液作对照, 测定各菌悬母液的吸光度 OD_{486} 值。将菌悬母液按一定比例稀释, 分别测定其吸光度 OD_{486} 值, 做出各菌悬母液的稀释度与吸光度之间的标准曲线。加入适量的菌悬母液(通过标准曲线得出), 使其在含 100 mg L^{-1} 咪唑烟酸的 10 ml 基础培养基中的吸光度 $\text{OD}_{486} = 0.2$, 每个处理设 4 次重复, 同时以不加菌作为对照, 置于 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 120 r min^{-1} 的摇床培养, 5 d 后取样检测, 样品的处理按上述水样的残留提取方法进行。检测结果以降解速度较快的菌株作为优势降解菌。

1.3.3 高效降解菌的鉴定(VITEK-AMS 细菌自动鉴定系统) 将上述所得优势降解菌菌株预培养 24 h 后制成菌悬液, 用浊度计调整浊度至适当范围, 根据各菌株的革兰氏反应特点, 确定采用何种试卡(革兰氏阳、阴性分别采用 GPI 和 GNI 试卡), 在试卡上填上标本号, 作好氧化酶阳、阴性标记, 取一支 L-形的吸管插在试卡上, 另一头插在装有菌落悬液的指型管中, 将准备好的试卡放入培养/读数箱内, 系统按不同时间自动读取试验结果, 并对此进行判断分析⁽¹⁾。

2 结果与分析

2.1 咪唑烟酸在土壤中的降解动力学

在土壤降解试验中, 灭菌系列的试验结果反映了非生物的降解作用(包括水解和化学降解等; 因是在避光条件下试验的, 故可排除光解作用); 非灭菌系列的试验结果反应了生物和非生物降解过程的共同作用。

(1) 红英娣. 松材线虫携带细菌的鉴定. 南京林业大学硕士论文, 2001. 19-28

因此微生物降解的试验数据应当是由未灭菌系列的测定数据减去相应时间灭菌系列试验数据,结果显示于表1。对表中的数据作浓度对时间的指数相关回归分析,发现灭菌、非灭菌及微生物降解的相关系数在0.97~0.99之间,故可以用下述优化拟合方程来描述: $y = ae^{-bx}$,式中 $y = c$ (浓度); $x = t$ (时间); $-b = k$ (降解速率常数)。运用DPS软件进行方程拟合后,咪唑烟酸在非灭菌和灭菌条件下的降解速率常数分别为0.02246、

0.004676;半衰期分别为30.9d、148.2d,灭菌条件下的半衰期是非灭菌的近5倍,说明了在土壤中咪唑烟酸的降解主要是有微生物所引起,而有水解和化学降解作用所引起的咪唑烟酸降解则较少。此结果与Cox^[3]用¹⁴C标记化合物实验所得结论基本一致,而与Azzouz^[4]测出的不同类型土壤中的非灭菌降解半衰期稍有所差异。

表1 咪唑烟酸在土壤中的降解动力学数据

时间(d)	咪唑烟酸残留量(mg kg ⁻¹)		
	非灭菌实验 A	灭菌实验 B	微生物降解的理论值 Y
0	9.47	9.39	9.75
10	7.60	9.29	8.23
20	6.87	8.57	7.09
30	4.54	8.40	6.25
40	4.44	7.85	5.63
50	3.04	7.82	5.20
60	2.48	7.01	4.91
反应速率常数 K	0.022460	0.004676	0.011429
半衰期 T _{1/2}	30.9d	148.2d	60.6d
相关系数 r	-0.9881	-0.9759	-0.9853
一级动力学方程	$C_t = 9.75 \times e^{-0.02246t}$	$C_t = 9.54 \times e^{-0.004676t}$	$C_t = 9.21 \times e^{-0.011429t}$

注:微生物降解的理论值的计算方法: $Y = 9.75 - 9.75 \times (e^{-0.004676t} - e^{-0.02246t})$

2.2 微生物降解的贡献率

根据表1的数据可计算出咪唑烟酸在灭菌、非灭菌及微生物降解三种条件下在不同时间内的降解率,有非灭菌系列数据减去灭菌系列数据,即可计算出微生物在不同时间内的降解率^[9]。从表2的计算结果可看出:微生物对咪唑烟酸的降解率随时间的增加,降解率越来越高,从10d时的18.68%升至60d的48.47%,在各个时间段均远高于灭菌条件下的降解率,其降解速率常数和半衰期分别为:0.011429和60.6d。在不同时间内,微生物降解的贡献率在65.6%~94.6%之间。

表2 土壤中咪唑烟酸的微生物降解率

时间(d)	非灭菌条件下降解率(%)	灭菌条件下的降解率(%)	微生物的降解率(%)
10	19.75	1.06	18.68
20	27.46	8.73	18.72
30	52.06	10.54	41.52
40	53.12	16.40	36.71
50	67.90	16.72	51.18
60	73.81	25.35	48.47

2.3 高效降解菌株的确定

经过富集培养,在 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9}

的稀释平板上,按不同的菌落形态特征,共挑选出14个菌株,分别计为ZJX-1、ZJX-2...ZJX-14,对各菌株染色后,在油镜(100×15倍)下初步观察其细菌形态特征。将各菌株在同样条件下按上述方法进行降解试验,根据它们对咪唑烟酸降解率的大小,来判断各菌株降解能力的强弱,结果见表3。从表3可以看出:除菌株ZJX-5号和ZJX-9号外,其它菌株在5d内的降解率均在15%以下,与对照相比差异不显著,而5号和9号的降解率分别可达89.40%和95.56%,与对照相比,达到极显著水平,可初步判断ZJX-5和ZJX-9为咪唑烟酸的主要降解菌。

2.4 高效降解菌的鉴定

按上述操作方法,用VITEK-AMS细菌自动鉴定仪进行鉴定,机器判读结果为:ZJX-5为荧光假单胞菌I型(*Pseudomonas fluorescens* biotype II);ZJX-9为腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),二者判断结果的置信度分别为89.5%和69.3%,其中ZJX-9判断结果的置信度相对较低,其原因可能是该菌株为革兰氏阳性菌,在生理盐水中难分散,菌悬液不均匀,在前处理时,需要较长的振荡时间和更剧烈的分散条件,影响了菌株的活力,进而影响下一步的鉴定结果^[10]。

表 3 ZJX 系列菌株对咪唑烟酸的降解率¹⁾ (T= 5 d)

菌株号	降解率(%)	菌株号	降解率(%)	菌株号	降解率(%)
CK	4.89	ZJX-5	89.40 ^{* * 2)}	ZJX-10	10.54
ZJX-1	4.31	ZJX-6	2.15	ZJX-11	9.87
ZJX-2	5.78	ZJX-7	6.65	ZJX-12	6.90
ZJX-3	10.36	ZJX-8	7.42	ZJX-13	7.11
ZJX-4	7.83	ZJX-9	95.56 [*]	ZJX-14	12.68

1) 上述各值为 4 次重复的平均数; 2) * * 代表与对照相比达到极显著水平

3 讨 论

1) 本文的研究所用土壤为黏壤土, 分离出的主要降解菌为荧光假单胞菌 II 型 (*Pseudomonas fluorescens* biotype II) 和腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。如果土壤类型不同优势降解菌的种类如何有待进一步探讨。

2) 在本试验中, 计算微生物降解的理论数据时是在假定土壤中的生物降解全部有微生物所引起的条件下进行的, 而忽略了土壤中其它生物如蚯蚓、土壤腐蚀性昆虫等的作用。在实际降解中, 第一部的分解代谢往往是由它们进行的, 然后才由细菌和真菌等微生物进行第二步的分解代谢, 以往的研究均证实, 90% 以上的分解代谢是由土壤微生物进行的^[11], 土壤中其他生物所引起的降解仅占生物降解总量的 10% 以下, 为研究方便, 我们可将其忽略不计。

3) 本文通过富集培养, 从土壤中分离到两株高效降解菌, 进一步说明了咪唑烟酸在土壤中被微生物的可降解性, 该菌株在基础培养基里具有强烈的降解能力, 对生物防治咪唑烟酸的污染显示出重要的潜在应用价值, 但是否能够运用于田间还有待进一步深入研究。

致 谢 本试验得到了南京林业大学森林病理实验

室的韩素芬、韩正敏及浙江大学农药环境毒理研究所虞云龙老师的指导和支持, 深表谢意!

参 考 文 献

- [1] 沙家骏, 张恒民, 姜芽君, 等. 国外新农药品种手册. 北京: 化学工业出版社, 1992. 334- 337
- [2] James H Miller, Robert J Mitchell 著. 吴德有译. 林业除草剂使用手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1997. 47- 100
- [3] Cox C. Imazapyr. Journal of Pesticide Reform., 1996, 16(3): 16- 20
- [4] Ismail B S, Ahmad A R. Attenuation of the herbicidal activities of glufosinate ammonium and imazapyr in two soils. Agriculture Ecosystem Environment, 1994, 47(4): 279- 285
- [5] Azzouzi M, Mountacer H, Mansour M. Movement and persistence of imazapyr in soil environments. Fresenius Environmental Bulletin, 1999, 8(11): 709- 717
- [6] Jenkins S R, Wehje G R, Morgan J M. Sorption and mobility of imazapyr in five Alabama soils. Water, Air and Soil Pollution, 2000, 118(1): 169- 178
- [7] Venkateswarlu K. Persistence and biodegradation of carbofuran in flooded soil. J. Agric. Food Chem., 1977, 25: 533- 538
- [8] [日]土壤微生物研究会编. 程光胜, 陈绍铭译. 土壤微生物实验法. 北京: 科学出版社, 1983. 267- 293
- [9] 叶常明, 王杏君, 弓爱常, 等. 阿特拉津在土壤中的生物降解研究. 环境化学, 2000, 29(4): 300- 305
- [10] 陈晓斌, 张炳欣, Ryder M H, 等. BIOLOG 系统鉴定根围促生菌的初步研究. 微生物学通报, 2000, 27(6): 403- 407
- [11] 薛琦摘译. 土壤微生物和农药. 农药译丛, 1994, 4: 51- 54