

接种 *Penicillium* sp. 和根际分泌物对土壤甲磺隆的协同降解研究

胡立芳, 沈东升*, 贺永华

(浙江大学环境与资源学院, 杭州 310029)

摘要: 通过接种 *Penicillium* sp. 和模拟小麦根际环境的方法, 研究了甲磺隆在 *Penicillium* sp. 和小麦根际分泌物协同作用下的生物降解特性. 结果表明, 根系分泌物丰富了土著微生物和外源微生物, 对甲磺隆的降解具有显著的促进作用. 接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤中甲磺隆降解半衰期为 8.6 d, 其降解速率是接种 *Penicillium* sp. 的非根际土壤的 1.8 倍, 是普通根际土壤的 2.7 倍. 继续追加甲磺隆的试验表明, 接种菌株 *Penicillium* sp. 对甲磺隆的降解具有可持续性.

关键词: 甲磺隆; 生物降解; *Penicillium* sp.; 根际分泌物

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)01-0199-05

Synergistic Degradation of Metsulfuron-Methyl in *Penicillium* sp. Inoculated Wheat Rhizosphere Soil

HU Li-fang, SHEN Dong-sheng, HE Yong-hua

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Research on the synergistic biodegradation of metsulfuron-methyl in *Penicillium* sp. inoculated wheat rhizosphere soil was discussed in this paper. *Penicillium* sp., a high-effective degrading fungi, was inoculated in the soils and root exudates were irrigated during the trial. The degradative characteristics of metsulfuron-methyl and microbial population dynamics of cultivable microorganisms capable of metsulfuron-methyl were investigated in the samples. A larger microbial population is measured in the inoculated rhizosphere soil, which enhances biodegradation of metsulfuron-methyl. The half-life of degradation metsulfuron-methyl in the inoculated wheat-rhizosphere soil is 8.6d, the degradative rate of which is 1.8 times of that in inoculated non-rhizosphere sample, and 2.7 times of that in non-inoculated rhizosphere sample. Add metsulfuron-methyl to the samples again, the soil microorganisms can degrade metsulfuron-methyl sustainably.

Key words: metsulfuron-methyl; bioremediation; *Penicillium* sp.; root exudates

甲磺隆是一种杀草谱较广, 药效高, 用量少的磺酰脲类除草剂, 自问世 20 a 来在世界各地被广泛使用于小麦、玉米、水稻等作物的阔叶杂草防治^[1]. 但该类除草剂在土壤中的残留对后茬敏感作物的安全性等问题引起了人们的普遍关注^[2~5], 2000 年中国的部分省份相继颁布了禁止甲磺隆销售和施用的法令. 由于甲磺隆具有极高的活性和极强的选择性等特点, 2005-05 中华人民共和国农业部公告甲磺隆可以在长江流域及其以南地区的酸性土壤($\text{pH} < 7$)稻麦轮作区的小麦田使用. 因此如何降低甲磺隆在土壤中的残留量、减轻其对后茬作物的危害是该类除草剂安全使用的关键之一.

国内外研究表明磺酰脲类除草剂在水及土壤中的降解方式主要有 2 种: 非酶化学水解和微生物分解降解, 而光解和挥发很少. Joshi^[6]研究表明在酸性土壤中磺酰脲除草剂的消失是微生物和化学水解共同作用的结果; 而在碱性土壤中, 主要是微生物的作用. 对土壤中甲磺隆的降解和改善植株根际微生物

环境起着主要作用的微生物是细菌、真菌和放线菌^[7].

国内外研究者已对甲磺隆在土壤中的行为进行了较多研究, 基本探明了土壤温度、水分和有机质水平对甲磺隆残留的影响, 也进行了微生物降解及分离了一些高效降解菌类影响的研究^[8~15]. 已有研究表明, 有机毒物胁迫可引起根际微生物类群的变化并对有机毒物残留产生影响^[6~15]. 事实上根际分泌物改变了根际土壤的物理性质和化学性质^[15,16], 这种改变可能有利于土著微生物和外源微生物的生长繁殖, 但根际分泌物和外源微生物相互作用对有机毒物降解的影响, 及接种外源微生物对土壤生态平衡的影响则鲜见报道. 本试验在分离筛选获得土壤

收稿日期: 2006-01-14; 修订日期: 2006-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(20077024)

作者简介: 胡立芳(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: huli127@zju.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: shends@zju.edu.cn

中甲磺隆高效降解菌降解菌株 *Penicillium* sp. 的基础上^[10],模拟根际环境进一步研究其对根际环境中甲磺隆的降解特性,以期为此类除草剂的快速降解和农业生产应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验土壤来源及理化性质

土壤取自浙江大学华家池校区桑园(华家池潮土),为粉砂土,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,直接过 20 目筛,作为对照非根际土壤和实验用土.

1.2 供试菌株的接种

选用本实验室优选获得的甲磺隆高效降解菌 *Penicillium* sp.,接种于 100 mL 修改的查彼克氏培养基中,摇床120 r/min培养 48 h,测定得到的菌悬液的细胞干物质含量.离心分离后的细胞在重新悬浮于无菌水中作为试验接种液,以约10⁵ cells/g接种.

1.3 甲磺隆母土的配制

表 1 试验土壤的基本理化性质							
Table 1 Physical and chemical properties of the tested soil							
pH	离子交换量 CEC/cmole·kg ⁻¹	有机质 /g·kg ⁻¹	总氮 /g·kg ⁻¹	总磷 /g·kg ⁻¹	总钾 /g·kg ⁻¹	每 g 干土总菌数 对数值	每 g 干土真菌数 对数值
7.2	14.7	1.52	1.80	5.00	1.80	9.40	6.48

甲磺隆由江苏省激素研究所提供,纯度≥92%. 1 000 mg 甲磺隆先以 100 mL 甲醇溶解,再到 1 000 g 过 100 目筛孔的土样中,充分混匀,在干净器皿中自然风干,配制成甲磺隆含量为1 000 mg/kg的甲磺隆母土,4℃冰箱保存,备用.

1.4 小麦根系分泌物的收集

将发芽后的小麦培养在玻璃珠基质上,(20±1)℃并保持通风,培养液每 3 d 换 1 次.五分之一浓度的 Hoagland-Aron 营养液成分: HNO₃ 1.0 mmol/L; Ca(NO₃)₂ 1.0 mmol/L; MgSO₄ 0.4 mmol/L; (NH₄) H₂PO₄ 0.2 mmol/L; NaFeEDTA 20 μmol/L; H₃BO₃ 3 μmol/L; MnCl₂ 0.5 μmol/L; CuSO₄ 0.2 μmol/L; ZnSO₄ 0.4 μmol/L; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 1 μmol/L.

当小麦长到两叶一心时开始收集根系分泌物,每 2 d 收集 1 次.收集时先用无菌水淋洗小麦根系,后用 100 mL 灭菌蒸馏水连续淋洗,收集 6 h.

1.5 根系分泌物与 *Penicillium* sp. 的施用

将供试土壤分为 3 组:灭菌土壤、未灭菌土壤(自然土壤)和灭菌后接种 *Penicillium* sp. 的土壤.在每组土壤中分别加入甲磺隆(母土)使其浓度为 2 mg/kg.每组土壤同时设浇灌根际分泌物和不浇灌根际分泌物 2 个处理,每 1 处理设 2 个重复.在浇灌根际分泌物的处理中加入小麦根际收集液(图 1),每次加 100 mL;在不浇灌根际分泌物的处理中加入 100 mL 无菌水作为参照.当甲磺隆降解到较低浓度时,继续追加甲磺隆(母土),使浓度达 2 mg/kg 再进行第 2 次试验.

1.6 测定方法

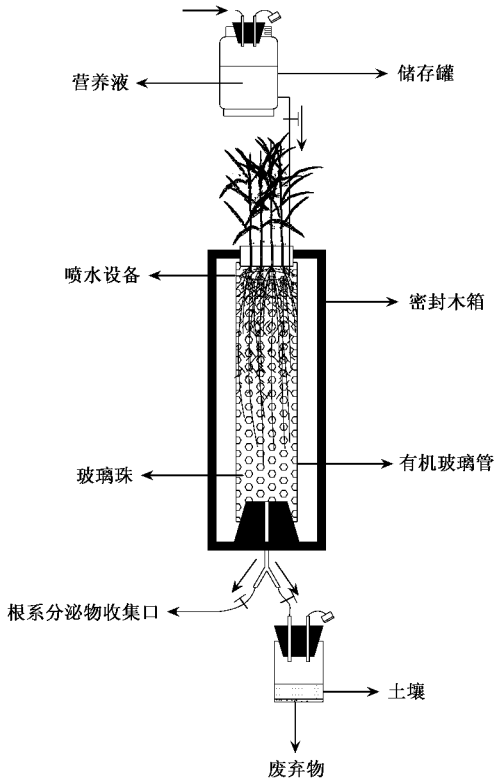


图 1 根际分泌物和微生物联合修复污染土壤生物反应器
Fig.1 Bioreactor of polluted soil remediated by root exudates and microorganisms

土壤中甲磺隆浓度用 Shodex RSpak KC-811 高效液相色谱仪(HPLC)测定.测定条件:1 mL/min,流动相:甲醇:水=70:30(体积比),检测波长:254 nm,保留时间:8 min,柱温:30℃.

土壤微生物数量采用平板计数法计数.甲磺隆

蔗糖琼脂培养基配方(以 g/L 计): NaNO_3 2; K_2HPO_4 1; KCl 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01; 甲磺隆 0.1; 蔗糖 10; pH 7.0; 250 mL 土壤浸出液,用自来水补充到1 000 mL; 琼脂 18 g. 灭菌后备用. 临用时在每个培养皿的培养基中加入 1% 链霉素 2~3 滴.

2 结果与讨论

2.1 根际分泌物对根际微生物的影响

根系分泌物如糖类、氨基酸、脂肪和芳香族化合物,植物表皮组织的不断死亡和脱落改变了根际土壤的物理性质和化学性质,这种改变使根际微生物不仅种类和数量远高于非根际土壤,而且其代谢活动也比非根际微生物高,同时也有利于提高化合物的溶解性.

在2 mg/kg的甲磺隆浓度胁迫下的土壤中,普通细菌生长受到抑制,根际真菌对甲磺隆有很强的耐受能力和降解能力,成为甲磺隆胁迫下的优势菌种. 实验中用平板计数法测得不同土壤中真菌数量随甲磺隆的变化动态如图 2 和图 3. 在非根际环境下,接种 *Penicillium* sp. 的非根际土壤(IN)与未接种的土壤(ON)降解菌的生长高峰均出现在第 12 d 左右,但未接种的土壤(ON)降解菌的数量和速度的变化明显比较缓和. 在根际环境下,未接种的土壤(OP)中甲磺隆降解菌生长良好,生长高峰大约出现在第 12 d,而接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤(IP)中甲磺隆降解菌生长高峰提前至第 8 d 左右,且在生长高峰前降解菌的数量高于未接种土壤(OP),之后 *Penicillium* sp. 的数量随着甲磺隆的降解生物量急剧下降. 在接种情况下,根际土壤(IP)的降解菌的生长高峰比非根际土壤(IN)提前 4 d 左右,而且在生长高峰前 *Penicillium* sp. 的数量也远远大于非根际土壤(IN). 这说明前期 *Penicillium* sp. 在根系分泌物的刺激下,在土壤环境中具有较强的竞争能力,可与土著微生物呈共生长,而且接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤(IP)培养到第 8 d 时,根际土壤(IP)70% 以上的微生物是 *Penicillium* sp., *Penicillium* sp. 竞争为优势种群,由此可以推测甲磺隆对其它真菌有显著的抑制作用,但对接种的 *Penicillium* sp. 基本没有影响. 在甲磺隆的降解后期,可能是由于 C 源和能源等受到限制,使种群间的竞争性加强,抑制了 *Penicillium* sp. 和其它耐受真菌的生长,特别是 *Penicillium* sp. 生物量急剧下降,基本上能恢复到试验土壤原有水平,这表明筛选出来的优势降解菌 *Penicillium* sp. 不会对土壤生态平衡造成破坏.

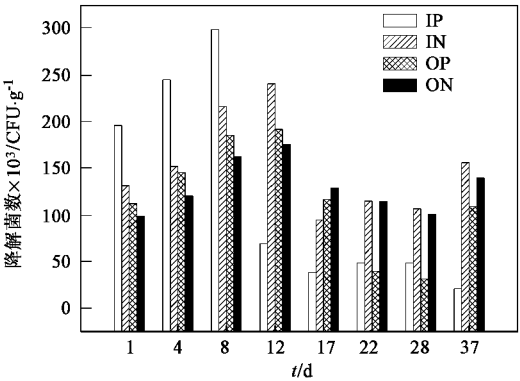


图 2 一期修复不同处理土样中真菌总数的变化动态
Fig.2 Population dynamics of cultivable microbes in different treated soils

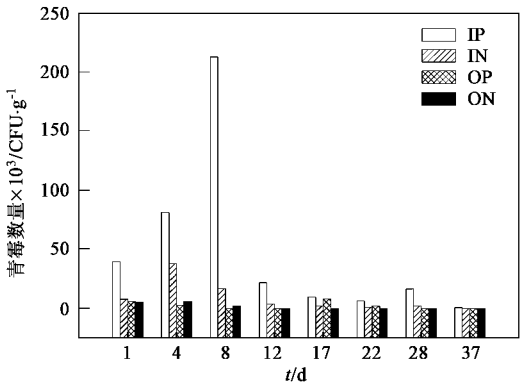


图 3 一期修复不同处理土样中 *Penicillium* sp. 变化动态
Fig.3 Population dynamics of *Penicillium* sp. in different treated soils in the first remediation

2.2 甲磺隆在不同土壤中的降解动态

甲磺隆在接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤(IP)、接种 *Penicillium* sp. 的非根际土壤(IN)、非接种根际土壤(OP)、非接种非根际土壤(ON)、根际灭菌土壤(SP)、非根际灭菌土壤(SN)的降解曲线呈一级动力学特征: $c = c_0 e^{-kt}$, c_0 为甲磺隆初始浓度, k 为降解速率常数(1/d), t 为时间(d). 根据一级动力学方程经 SPSS 统计分析,接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤(IP)中甲磺隆的降解半衰期为 8.6 d(表 2),其降解速率是对照未接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤(OP)的 2.7 倍,根际灭菌土壤(SP)的 10.13 倍. 非根际土壤接种 *Penicillium* sp. 后甲磺隆的降解速率也明显提高,接种 *Penicillium* sp. 非根际土壤(IN)的降解速率分别是未接种 *Penicillium* sp. 非根际土壤(ON)、非根际灭菌土壤(SN)的 2.05、11.25 倍. 这说明土壤接

表 2 一期修复甲磺隆在不同处理土壤中降解的动力学特征

Table 2 Degradation of metsulfuron-methyl in different treated soil in the first remediation

土壤	$c_0/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	k	R^2	半衰期/d
接种根际土壤(IP)	$2.05\pm0.02^{1)}$	0.081 ± 0.004	$0.930^{**2)}$	8.6
接种非根际土壤(IN)	2.00 ± 0.05	0.045 ± 0.001	0.975^{**}	15.4
非接种根际土壤(OP)	2.05 ± 0.04	0.030 ± 0.001	0.967^{**}	23.1
非接种非根际土壤(ON)	2.03 ± 0.02	0.022 ± 0.001	0.980^{**}	31.5
根际灭菌土壤(SP)	2.02 ± 0.03	0.008 ± 0.000	0.960^{**}	86.6
非根际灭菌土壤(SN)	2.02 ± 0.02	0.004 ± 0.000	0.982^{**}	173.2

1)平均值±标准差;2)**表示达到1%水平显著相关

种 *Penicillium* sp. 处理后,由于接种菌 *Penicillium* sp. 对于甲磺隆较强的降解能力和耐受能力,对土壤中甲磺隆的降解具有促进作用.

根际土壤中甲磺隆的降解速率 IP、OP、SP 分别是对照 IN、ON、SN 的 1.8、1.36、2.0 倍,相应的半衰期缩短为对照的 55.8%、73.3%、50.0%. 其主要原因可能是由于根分泌物为土壤微生物提供大量的营养和能源物质,因而根际是微生物代谢活动特别旺盛的场所,微生物活动能加快土壤中有机磷、有机氮的分解及其它矿质元素的活化,从而提高了养分的有效性和根际土壤中甲磺隆的降解速率.

2.3 青霉的可持续降解作用

高效降解菌 *Penicillium* sp. 可以在较短的时期内使土壤中的除草剂浓度下降至0.12 mg(每 kg 干土). 在接种 *Penicillium* sp. 的根际土壤(IP)、接种 *Penicillium* sp. 的非根际土壤(IN)处理样中继续追加甲磺隆, *Penicillium* sp. 数量上升(图 4), IP、IN 中甲磺隆的半衰期分别为 13.9 d、22.4 d, 是对照样 OP、ON 的 50.2%、64.6%. 结果表明,在合适的环境下施用降解菌,只需要 1 次投加菌剂,甲磺隆不仅在较短的时间内就可以达到比较好的降解效果,而且在二次修复中半衰期明显低于其它处理土壤. 这说明了接种土壤中高效菌株 *Penicillium* sp. 对甲磺隆的降解具有可持续性,有利于实际生产的应用,使后茬敏

表 3 二期修复甲磺隆在不同处理土壤中降解的动力学特征

Table 3 Degradation of metsulfuron-methyl in different treated soil in the second remediation

土壤	$c_0/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	k	R^2	半衰期/d
接种根际土壤(IP)	2.11 ± 0.03	0.050 ± 0.001	0.984^{**}	13.9
接种非根际土壤(IN)	2.38 ± 0.02	0.031 ± 0.001	0.986^{**}	22.4
非接种根际土壤(OP)	2.66 ± 0.02	0.025 ± 0.001	0.983^{**}	27.7
非接种非根际土壤(ON)	2.83 ± 0.02	0.020 ± 0.001	0.981^{**}	34.7

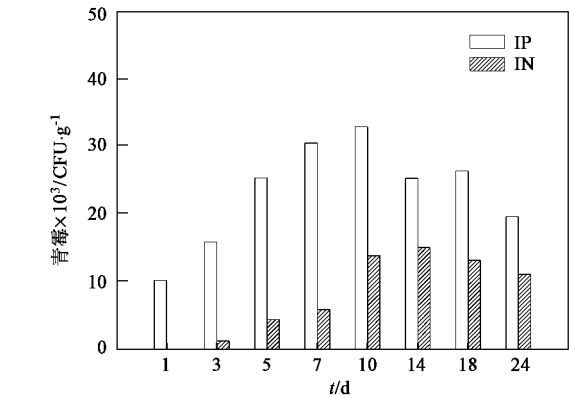


图 4 二期修复不同处理样中青霉变化动态

Fig.4 Population dynamics of *Penicillium* sp. in different treated soils in the second remediation

3 结论

甲磺隆在根际土壤 OP、SP 的降解速率分别是非根际土壤 ON、SN 的 73.3%、50.0%, 小麦根际环境对甲磺隆的降解具有显著的促进作用, 这种促进作用主要来源于根际环境所包含的丰富的微生物和根际分泌物对微生物的自然驯化作用. 甲磺隆在小麦根际分泌物与高效降解菌 *Penicillium* sp. 的协同作用下可快速降解, 半衰期缩短为 8.6 ~ 13.9 d; 随着甲磺隆浓度的降低, *Penicillium* sp. 数量恢复到普通土壤水平, 接种 *Penicillium* sp. 对土壤的生态平衡不会产生影响. 同时, *Penicillium* sp. 具有持续降解作用, 如果在作物根际环境接种除草剂降解菌, 将是加速农田土壤中除草剂降解, 降低作物中除草剂残留的有效途径, 在实际农业生产中具有较好的应用前景.

感作物可以较好地生长, 而不受除草剂的抑制.

参考文献:

[1] 范志金,刘丰茂,钱传范.磺酰脲除草剂的现状和发展趋势分析[J].农药,1999,38(5):6~9.

[2] Pons N, Barriuso E. Fate of metsulfuron-methyl in soils in relation to pedo-climatic conditions[J]. Pestic. Sci., 1998, 53: 311 ~ 323.

[3] Ghani A, Wardle D A. Fate of 14C from glucose and the herbicide metsulfuron-methyl in a plant-soil microcosm system[J]. Soil Biol. Biochem., 2001, 33: 777 ~ 785.

[4] Kotoula S E, Eleftherohorinos I G, Gagianas A A, et al. Phytotoxicity and persistence of chlorsulfuron, metsulfuronmethyl, triasulfuron and tribenuron-methyl in three soils[J]. Weed Res., 1993, 33: 355 ~ 367.

[5] Li Y, Zimmerman W T, Gorman M K, et al. Aerobic soil metabolism of metsulfuron-methyl[J]. Pestic. Sci., 1999, 55: 434 ~ 445.

[6] Joshi M M, Brown H M, Romesser J A. Degradation of chlorsulfron by soil microorganisms [J]. Weed Sci., 1984, 33: 888 ~ 893.

[7] 沈东升,方程冉,周旭辉. 土壤中降解甲磺隆除草剂的微生物的分离与筛选[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2002, 20(3): 186 ~ 189.

[8] Ghani A, Wardle D A. Fate of 14C from glucose and the herbicide metsulfron-methyl in a plant-soil microcosm system [J]. Soil. Bio. Biochem., 2001, 33: 71 ~ 76.

[9] Abdullah A R, Sinnakkannu S, Tahir N M. Adsorption, desorption, and mobility of metsulfuron-methyl in Malaysian agricultural soil [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 66: 762 ~ 769.

[10] 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[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, 28(5): 542 ~ 546.

[11] Yu Y L, Wang X. Fungal degradation of metsulfuron-methyl in pure cultures and soil [J]. Chemosphere, 2005, 60: 460 ~ 466.

[12] Zanardini E, Arnoldi A, Boschin G, et al. Degradation pathways of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by a *Pseudomonas fluorescens* strain [J]. Ann. Microbiol., 2002, 52: 25 ~ 37.

[13] Boschin G, Agostina A D, Arnoldi A, et al. Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by *Aspergillus niger* in laboratory conditions [J]. Environ. Sci. Health B., 2003, 38: 737 ~ 746.

[14] Yu Y L, Chen Y X, Luo Y M. Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil [J]. Chemosphere, 2003, 50: 771 ~ 774.

[15] Chaineau C H, Model J L, Oudot J. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize[J]. Environ. Qual., 2000, 29: 569 ~ 578.

[16] Lena Ström, Owen A G, Godbols D L, et al. Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37: 2046 ~ 2054.