

耕地受多效唑农药污染后的再生修复技术

裘 娟 萍

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014)

摘 要 通过循环富集法筛得多效唑高效降解菌—假单胞杆菌和芽孢杆菌; 通过研究环境条件对降解菌降解效果的影响发现: 在液体无菌培养基中振荡 35d 多效唑自然降解率达 98.7%。在液体有菌培养基中振荡 35d 多效唑降解率达 99.8%。混合菌群能彻底降解多效唑产生 CO₂。建立了受多效唑污染土壤的再生修复技术: 投放降解菌、勤松土少积水、多光照多通气, 35d 土壤中多效唑的降解效果达 86.2%, 土壤中微生物含量恢复到正常值的 89%。

关键词 多效唑, 降解菌, 土壤修复技术

中图分类号 S156

多效唑(Paclobutrazol)是八十年代开始应用的植物生长阻滞剂和杀菌剂。多效唑用于小麦、大麦和水稻可使植物的茎缩短以减少倒伏增加产量。用于果树可控制果树长势、促进发芽、减少修剪、改善果树透光性提高水果的质量和光泽, 同时也可用于防治锈病和白粉病^[1]。由于多效唑有控制生长、促进分蘖、防止败苗、抑制稗草增穗增产、广谱杀菌等作用, 国内正在大范围地使用, 特别是江浙赣地区。由于多效唑在水中的溶解度低、水解稳定性强, 在正常情况下在土壤中半衰期为 0.5~1.0 年, 所以常出现在多效唑污染的土壤中后茬作物生长不良的情况。国内有人研究多效唑在土壤中降解以及降解产物的致突变作用^[2,3], 但被多效唑污染土壤的修复技术未见报道。本文研究微生物快速降解多效唑的环境条件, 为土壤修复技术的建立提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品 多效唑(Paclobutrazol), 化学名称: 2RS, 3RS- 1- (4 氯苯基) - 4, 4- 二甲基- 2- (1- H - 1, 2, 4- 三唑- 1- 基) 戊- 3- 醇, 分子式 C₁₅H₂₀CN₃O, 分子量 293.8, 15% 可湿性粉剂, 浙江兰溪农药厂提供。

1.1.2 土样来源 土样采自兰溪农药厂排污口附近的黑潮土。菜地、稻田黑土。

1.1.3 培养基 高氏 1 号培养基^[4], 无机盐培养基^[5], HCMM2 胰蛋白胨培养基^[3]。

1.2 方 法

1.2.1 降解菌的富集 从多效唑生产厂家废水排放口旁取土壤样, 制成悬液, 用含 20~50 μg mL⁻¹ 多效唑的各种培养基进行循环培养。培养条件: 30 °C, 150 r min⁻¹。镜检观察微生物生长情况。

1.2.2 生长过程中气体变化的测定 瓦勃氏呼吸器测定法, 从培养了 7d 的培养液中分别移取 1ml 放

入瓦氏呼吸器的反应瓶中。不同的反应瓶中分别加入相应的样品。在 30℃ 恒温水浴下继续培养, 每 8 小时记录其气压变化^[7]。

1.2.3 多效唑含量测定 紫外分光光度计法, 样品处理参见文献^[8]。

1.2.4 微生物生物量的测定 土壤熏蒸法^[6]。

1.2.5 微生物含量的测定 平板稀释法^[4]。

1.2.6 土壤修复效果的测定 在 24 只 250ml 三角瓶中分别装 100g 多效唑 ($500\mu\text{g g}^{-1}$) 污染的土, 不灭菌的三角瓶标记“土壤自然菌”、“灭菌的三角瓶标记“无菌”、灭菌接入降解菌的三角瓶标记“降解菌”, 在光照和避光、翻土和不翻土的条件下, 30℃, 培养 35d, 测定土壤中微生物的含量和多效唑的降解率。

2 结果与讨论

2.1 多效唑对耕作土壤的危害

2.1.1 影响土壤微生物含量 土壤中微生物的含量与土壤中植物可利用的营养物质存在着正相关性, 因此用平板稀释法分析土壤受多效唑污染前后微生物含量的变化可以看出多效唑对土壤的危害。结果见表 1。

表 1 多效唑对土壤中微生物及其生物量的影响

Table 1 Effect of pacloutrazol on the microbes in soil and their biomass

土壤 Soil	生物量 Biomass (C mg kg^{-1} , dry soil)	微生物数量 Microbial number (cells g^{-1} dry soil)			
		霉菌 Mold	酵母 Yeast	放线菌 Actinomycetes	细菌 Bacteria
加多效唑	120	71	3	2.1×10^3	4.8×10^4
无多效唑	168	2.6×10^5	200	5.7×10^4	9.2×10^6

由表 1 可见多效唑污染土壤可杀死土壤中的微生物, 从而降低土壤微生物生物量; 这说明多效唑长期和反复使用可导致多效唑的积累, 降低土壤的肥力、降低土壤的质量。

2.1.2 增加土壤中致癌物质 多效唑在土壤中经微生物的降解作用可分解产生一些具致突变作用的中间物^[3]; 目前尚未知晓这些物质是否通过一定的途径影响人类。因此本文筛选降解菌的目标是彻底分解多效唑成为 CO_2 。

2.2 降解菌的筛选

2.2.1 降解菌的富集培养 通过显微镜跟踪观察发现: (1) 在含 $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 多效唑的无

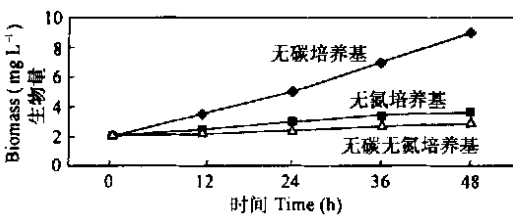


图 1 微生物生物量与时间的关系图

Fig. 1 The relationship between biomass and time

C 高氏 1 号培养基、无机盐培养基中微生物生长快、数量多; 在含 $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 多效唑的无 N 或无 C、N 高氏 1 号培养基中微生物几乎不生长。可见多效唑可以作微生物的碳源但不能作氮源(见图 1)。(2) 在含大于 $20\mu\text{g ml}^{-1}$ 多效唑的培养基中微生物生长受抑制。(3) 在相同培养基中的不同土壤中微生物生长情况有差异。兰溪农药厂和附近香菜地因常年

受多效唑污染, 土样中的微生物在多效唑培养基中增长较快, 有利于对多效唑的降解, 因此选用这两种土分离多效唑降解菌。

2.2.2 降解菌的分离纯化及鉴定 降解菌经分离纯化获得 4 种培养物, 按《伯杰氏细

菌鉴定手册》第八版鉴定, 有 2 株假单胞杆菌编号为 A1、A2 和 2 株芽孢杆菌编号为 B1、B2。

2.2.3 降解菌对多效唑降解彻底的研究 如果微生物能彻底降解多效唑, 生长过程中必定有 CO₂ 放出。因此通过瓦勃氏呼吸器测定生长过程中反应瓶中气体的变化可判断微生物是否利用氧来分解农药产生二氧化碳。

在含 50μg ml⁻¹ 多效唑的无 C 高氏 1 号培养基中培养 10 天后取出培养液, 按表 2 向反应瓶中分别加样, 定时记录测压管的数据。以时间为横坐标, 测压管压差的数据为纵坐标作图, 见图 2~ 3。

表 2 测定微生物生长过程中气体变化的加样表

Table 2 A Sheet of adding samples for determining the gas variety in the process of bacterial growth

瓶号 Flask No.	菌种 Species	KOH
1	A1	+
2	A1	-
3	A2	+
4	A2	-
5	B1	+
6	B1	-
7	B2	+
8	B2	-
9	混合菌 1	+
10	混合菌 1	-
11	混合菌 2	+
12	混合菌 2	-

注: “+”表示加 KOH, “-”表示不加 KOH

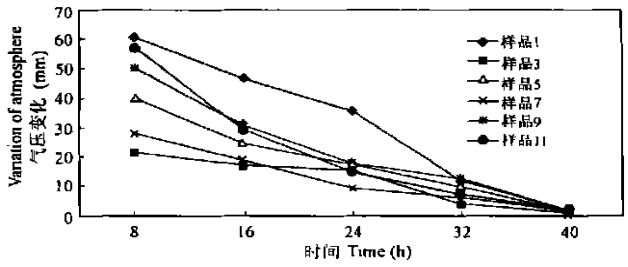


图 2 各种菌消耗氧气量的气压变化图

Fig. 2 The variation of atmosphere caused by O₂ consumption of different microbes

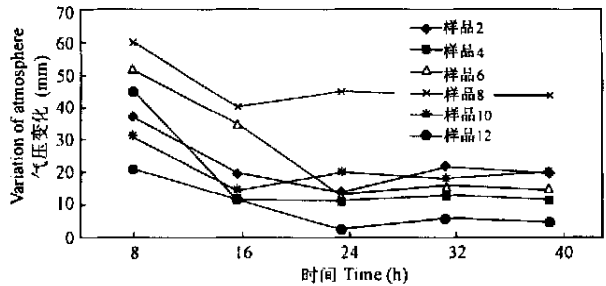


图 3 各种菌消耗氧气、产生二氧化碳引起的气压变化图

Fig. 3 The variation of atmosphere caused by O₂ and CO₂ consumption of different microorganisms

由图 2 可以看出: 反应体系中二氧化碳已被 KOH 吸收, 反应过程中曲线的下降说明微生物在生长过程中消耗氧气。

从图 2、图 3 可见: (1) 16h 前, 图 3 中各曲线的斜率分别与图 2 相似, 说明反应体系中只有 O₂ 的消耗, 24h 后曲线的斜率不再下降, 说明微生物在耗氧的同时有气体生成, 可见微生物分解多效唑产生二氧化碳。(2) 24h 左右才有气体产生, 说明微生物降解多效唑时, 先以体内积累为主, 然后再代谢降解。

2.3 环境条件对降解多效唑的影响

2.3.1 通气量的影响 降解菌在含 50μg ml⁻¹ 多效唑的液体培养基中振荡培养和静止培养 35d, 测定培养基中多效唑的含量, 振荡培养的降解率为 99.8%, 静止培养的降解率为 63%。这说明微生物降解多效唑需要大量的氧气。

2.3.2 培养基的影响 无 C 高氏 1 号培养基、无机盐培养基、HCMM2 胰蛋白胨培养基中加入多效唑 50μg ml⁻¹ 作 C 源, 振荡培养 10d, 测定多效唑的含量, 结果见表 3。

由表 3 可见 培养基影响降解菌降解多效唑的效果。降解菌中的假单胞菌是兼性自

养微生物,在 HCMM2 胰蛋白胨培养基中有胰蛋白胨可作 C、N 源,降解菌就先利用胰蛋白胨,多效唑的降解率就低。这说明当土壤中富含有机质时会影响微生物对多效唑的降解。

表 3 培养基对降解菌降解多效唑效果的影响

Table 3 Effect of medium on the microbial degradation of pacloutrazol

培养基 Medium	降解率 Percent of degradation
无 C 高氏 1 号培养基 Gause's No. 1 without C	63%
无机盐培养基 Mineral medium	59%
HCMM2 胰蛋白胨培养基 Tryptone medium	47%

2.3.3 温度的影响 降解菌在含多效唑 $50\mu\text{g ml}^{-1}$ 的液体培养基中振荡培养 35d, 培养温度不同降解效果也不同, 结果见表 4。

表 4 温度对降解菌降解多效唑效果的影响

Table 4 Effect of temperature on the microbial degradation of pacloutrazol

温度 Temperature $^{\circ}\text{C}$	降解率 Degradative efficiency(%)	温度 Temperature $^{\circ}\text{C}$	降解率 Degradative efficiency(%)
10	23	25	73
15	41	30	84
20	60	35	88

由表 4 可见: 在降解菌的生长温度范围内, 温度提高有利于降解菌生长, 从而也利于降解菌对多效唑的降解。这说明土壤中多效唑在冬季降解较慢。因此秋委作物应控制使用多效唑, 这样可避免影响早春作物的生长。

2.3.4 光照的影响 降解菌在含 $50\mu\text{g ml}^{-1}$ 多效唑的液体培养基中见光或避光培养 35d, 结果有光培养的降解率比避光培养高 21%。可见光照有利于多效唑的分解。

2.3.5 含水量的影响 土壤中加入不同量的水试验含水量对降解菌降解多效唑的影响, 结果见表 5。

表 5 含水量对降解菌降解多效唑效果的影响

Table 5 Effect of water content on the microbial degradation of pacloutrazol

含水量 Water content (g kg^{-1})	降解率 Degradative efficiency(%)
350	31
450	41
550	33

由表 5 可见: 土壤中含水量过低, 土壤中水活度低, 微生物生长受影响; 含水量过高土壤粘结成块影响通气, 从而影响降解菌降解多效唑的效果。

2.4 微生物对受多效唑污染土壤的修复作用

综合以上研究, 探讨受多效唑污染土壤的修复技术, 结果见表 6。

由表 6 可见: (1) 降解菌对多效唑的最大降解率为 86.2%, 其中由光照、翻动等非生物因素引起的降解比例为 48%, 真正由降解菌降解的比例为 52%。

分析比较表 6 可见: 在光照条件下各类土壤中总菌数低于避光条件, 而多效唑的降解

率则高于避光条件; 计算光照条件比避光条件下土壤中总菌数的降低率和多效唑降解率的增加率, 得表 7。以同样的方式计算通气条件比不通气条件下、降解菌修复比自然菌修复土壤中细胞数的增加率和多效唑降解率的增加率得表 8、表 9。

表 6 土壤的修复效果

Table 6 The regenerative efficiency of soil

通气 Aerate	光照 Illumination						避光 Unillumination					
	微生物 Microbes		降解菌 Degrading bacteria		无菌 Asepsis		微生物 Microbes		降解菌 Degrading bacteria		无菌 Asepsis	
	TN	DE	TN	DE	TN	DE	TN	DE	TN	DE	TN	DE
翻动	1.1	78.1	5.2	86.2	0	41.4	1.4	59.4	5.7	70.7	0	27.4
不翻动	3.2	53.3	8.9	73.3	0	27.1	5.4	47.3	4.3	58.4	0	18.9

注: TN: 总菌数 $\times 10^7$; DE: 降解率%

表 7 光照条件比避光条件下土壤中总菌数的降低率、多效唑降解率的增加率

Table 7 The decrease rate of cells in soil and increase rate of pacloutrazol degradation under illumination condition as compared to unillumination condition (%)

处理 Treatment	土壤自然菌 Microbes in soil		降解菌 Degrading bacteria		无菌 Asepsis	
	细胞数降低率 Decrease rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation	细胞数降低率 Decrease rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation	细胞数降低率 Decrease rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation
	松土	21.4	31.4	9.6	228.0	0
不松土	40.7	12.7	382	15.0	0	43.3

由表 6~7 可见 (1) 避光有利于土壤中微生物的生长繁殖。(2) 在光照条件下微生物对多效唑的降解率均有提高, 特别是在松土中降解菌的降解率提高 228%, 这说明光照有利于微生物对多效唑的分解。(3) 在无菌土壤中, 光照比避光条件下多效唑的降解率高 51.1%~43.3%, 这说明光可以分解多效唑。(4) 表 6 指出: 在光照条件下由于非生物因素的作用, 多效唑的降解率为 41.4%~27.1%, 而在避光条件下降解率只有 27.4%~18.9%, 这说明非生物因素的作用中有 30%~34% 的比例是光分解作用。

表 8 通气条件比不通气条件下土壤中细胞数增加率、多效唑降解率增加率

Table 8 The increase rates of cells in soil and pacloutrazol degradation under aerating condition as compared to anaerating condition (%)

处理 Treatment	土壤自然菌 Microbes in soil		降解菌 Degrading bacteria		无菌 Asepsis	
	细胞数增加率 Increase rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation	细胞数增加率 Increase rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation	细胞数增加率 Increase rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation
	光照	243	46.5	431	28.5	0
不光照	157	25.6	33	20.2	0	45.0

由表 6~8 可见 (1) 在无菌条件下, 翻动土壤增加通气比不翻动土壤多效唑降解率提高 52.8%~45.0%, 这说明 O_2 对多效唑具较强的氧化作用。(2) 表 6 指出: 在松土中由于非生物因素的作用多效唑的降解率为 41.4%~27.4%, 而在不松土条件下降解率只有 27.1%~18.9%, 这说明非生物因素的作用中有 31%~34% 的比例是氧分解作用。(3) 松

土后土壤中微生物的含量明显增加,这说明通气有利于土壤微生物的生长。由于降解菌假单胞杆菌和芽孢杆菌均为好氧菌,通气有利于降解菌的生长。(4)据文献[1]报道:多效唑的蒸汽压为 1×10^6 Pa(20℃),50℃下至少稳定6个月。在实验中作者发现:在30℃温度下振荡能嗅到少量的农药气味。所以松土、通气也有利于多效唑的挥发。因此松土、通气有利于土壤的再生修复。

表9 降解菌修复比土壤中自然菌修复的细胞数增加率、多效唑降解率的增加率

Table 9 The increase rates of cells in soil and pacloutrazol degradation under degradative bacteria condition as compared to natural bacteria condition (%)

处理 Treatment	光照 Illumination		不光照 Unillumination	
	细胞数增加率 Increase rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation	细胞数增加率 Increase rate of cells	降解的增加率 Increase rate of degradation
	松土	372	10.4	307
不松土	178	25.9	376	23.5

由表9可见:在相同条件下降解菌比土壤中天然存在的微生物降解效果高10%~26%;生物降解比理化降解效果高108.2%。

因此土壤受多效唑污染后的修复技术为:把人工培养的高效降解菌接入土壤,勤松土使好氧的降解菌迅速生长繁殖;勤松土、多光照,充分利用光和氧的氧化作用、微生物的分解作用彻底降解多效唑。使用人工修复技术,35d土壤中多效唑的降解效果达86.2%,土壤中微生物含量恢复到正常值的89%。

致 谢 本研究承蒙沈寅初院士的悉心指导,在此表示衷心的感谢!

参 考 文 献

1. Lever B G, Shearing S J, Batch J J. 新的广谱性植物生长阻滞剂—P333. 农药译丛, 1985, 7(4): 60~ 63
2. 徐瑞薇, 胡钦红, 靳伟等. 多效唑在土壤中降解、吸附、淋溶作用. 环境化学, 1994, 13(1): 53~ 58
3. 刘征涛, 马文漪, 周风帆. 生长调节剂多效唑经微生物降解后的致突变效应. 环境科学学报, 1994, 14(2): 251~ 254
4. 陈声明, 刘丽丽. 微生物学研究法. 北京: 中国农业科技出版社, 1996
5. Ridgway H F. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 3565~ 3575
6. 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业科学出版社, 1996
7. 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997
8. 陶龙兴, 王 熹, 俞美云等. 环境条件对烯效唑及多效唑在土壤中降解的影响. 浙江农业学报, 1997, 9(5): 246~ 250

THE REPARATIVE REGENERATION TECHNOLOGY OF SOIL THAT WAS CONTAMINATED BY PACLOUTRAZOL

Qiu Juan-ping

(Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Summary

The high efficiency degrading bacteria *Pseudomonas* and *Bacillus* were obtained by circulation culture. The conditions that influence degradative efficiency were studied. 98.7% of paclofural can be degraded naturally in sterile medium under vibration condition 99.8% of paclofural can be degraded by degrading bacteria. Paclofural can be degraded down to CO₂ by mixed degrading bacteria. If plenty of oxygen and light are adsorbed by soil, after 35d about 86.2% of paclofural can be degraded and biomass can reach 89% of general level in soil.

Key words Paclofural, Degrading bacteria, Regenerative technology of soil