

土壤中结合残留态甲磺隆的微生物降解研究*

沈东升 方程冉 周旭辉

(浙江大学环资学院, 杭州 310029)

摘要 主要进行了优选菌株青霉(*Penicillium sp.*)对土壤中结合残留态甲磺隆的降解研究,结果表明,优选菌株的引入对土壤中可提态甲磺隆的影响不大,但对结合残留态甲磺隆的降解和矿化有较大影响。在结合残留态甲磺隆中,优选菌株青霉的引入有利于松结态甲磺隆尤其是松结态富里酸甲磺隆的降解。

关键词 甲磺隆, 结合残留, 微生物降解

中图分类号 S482.4⁺4

磺酰脲类除草剂是近 20 年来新开发的高效、广谱、低毒、高选择性除草剂,它能有效抑制乙酰乳酸合成酶(ALS),阻碍细胞分裂而达到杀草目的^[1]。但由于对这类除草剂的特性了解不足,存在着盲目推广和扩大应用等问题,致使施用后对当茬及后茬轮种作物造成一定的药害,从而使得磺酰脲类除草剂在农田土壤中的残留降解及影响因素问题受到普遍关注。一般,磺酰脲类除草剂在土壤中主要通过水解和微生物降解两种途径消失^[2,3]。化学水解是由酸催化的非酶促反应,除草剂分子经水解后转变成无活性化合物,但更多的研究则认为微生物代谢在磺酰脲类除草剂降解中起了重要作用。业已证明,土壤微生物降解是醚苯磺隆在土壤中消失的主要原因^[4,5]。

氯磺隆、甲磺隆等磺酰脲类除草剂通常适用于麦类、水稻等作物的阔叶杂草的防治,预计将成为当今除草剂的重要种类。由于甲磺隆具有比氯磺隆用药量少、残留期短等特点而前景更广阔,但残留在土壤中的甲磺隆仍可导致某些敏感后茬作物受害。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影响因素的研究^[6-10],但至今未见有关土壤中结合残留态甲磺隆的微生物降解研究。为此,本文在筛选获得土壤中甲磺隆高效降解菌株的基础上,重点进行结合残留态甲磺隆的微生物降解研究,以为受甲磺隆残留污染土壤的修复提供科学依据。

* 国家自然科学基金资助项目(20077024)

收稿日期:2001-08-07;收到修改稿日期:2002-02-25

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验土壤来源及主要理化性质 本试验土壤取自嘉善, 为水稻土(黄斑田), 粉土, 比重 2.636。其主要理化性质为 pH6.22, 有机质 31.53 g kg⁻¹, 全氮 3.36 g kg⁻¹, 水解氮 292.6 mg kg⁻¹, 阳离子交换量其中 K 0.614 cmol kg⁻¹, Na 2.845 cmol kg⁻¹, Ca 76.384 cmol kg⁻¹, Mg 25.296 cmol kg⁻¹。

1.1.2 甲磺隆来源及纯度 本试验所用甲磺隆全采用 ¹⁴C-甲磺隆, 由中国农业科学院原子能研究所标记合成, 放射性活度 4.55 × 10⁴ Bq mg⁻¹, 放射化学纯度 > 98%, 化学纯度 96.23%。

1.1.3 试验用菌株的来源 本试验所用菌株为本实验室分离获得的优选菌株, 初步鉴定为青霉菌的一个种(*Penicillium sp.*)。

1.2 试验及测定方法

1.2.1 试验方法 取 2~15 cm 表层的嘉善斑田土, 风干, 磨细, 过 20 目筛, 分别取三份, 每份 60 g, 各加入 ¹⁴C-甲磺隆标准溶液, 使最终浓度约为 10 mg kg⁻¹, 然后再进行如下处理: 0[#] 为对照; 1[#] 添加土重 10% 的菌液; 2[#] 添加有机肥和土重 10% 的菌液。分别装入三个 250 ml 的三角瓶中, 调节含水量至最大田间持水量的 50%, 于 25℃ 生化培养箱中培养。每个处理设三个重复, 分别在 0, 14 和 28 天取两个平行样, 分析测定土壤中 ¹⁴C-甲磺隆的可提态和结合态。其中结合态包括松结态、稳结态、紧结态(胡敏素), 而松结态和稳结态又分别包括富里酸和胡敏酸。

1.2.2 不同形态 ¹⁴C-甲磺隆的提取与测定 可提态和结合态甲磺隆的测定。根据 FAO/IAEA 关于结合残留测定的统一方案^[4,11], 将经过不同时间培养的土壤(10 g) 分别用滤纸包好, 置于索氏提取器, 用甲醇(100 ml) 连续抽提 24 h, 取甲醇抽提液 1 ml, 加入 5 ml 闪烁液(PPQ POPOP 乙二醇乙醚 二甲苯= 5 g : 0.4 g : 400 ml : 600 ml), 用 Wallac 1414 Winspectral LRC 液体闪烁计数器测定放射性活度, 由标样活度转算为可提取态甲磺隆残留量。经甲醇抽提后的土壤, 室温下挥发甲醇至土壤完全干燥后, 测定其结合残留量, 即称取 1 g 置于氧化燃烧仪中燃烧, 用 10 ml 乙醇胺甲醇液(乙醇胺 甲醇= 125 ml : 875 ml) 吸收¹⁴CO₂, 然后测定吸收液中的放射性活度, 由标样活度转算为结合残留量, 方法同可提态残留量测定。

结合态中各形态甲磺隆的测定^[12]

①松结态: 取 1.2.2 剩余 ¹⁴C-甲磺隆结合态残留土壤 5 g, 放入 100 ml 离心管中, 加 0.1 mol L⁻¹ NaOH 溶液 50 ml, 用玻棒搅拌, 于 30℃ 保温箱内放置过夜, 次日离心 15 分钟(3 000 r min⁻¹) 收集提取液至塑料瓶中, 再加 0.1 mol L⁻¹ NaOH 溶液 50 ml, 再离心, 如此反复 4 次, 定容至 200 ml, 吸 1 ml 0.1 mol L⁻¹ NaOH 提取液, 测定松结态总量, 方法同可提取态残留测定; 再取 40 ml NaOH 提取液, 用 1.0 mol L⁻¹ H₂SO₄ 调 pH 至 1~1.5(混浊), 于 80℃ 恒温箱 30 分钟, 取出静置过夜后分离, 定容 50 ml, 取 1 ml 测定松结态胡敏酸; 而松结态富里酸= 松结态总量- 松结态胡敏酸。

②稳结态: 取 1.2.2 提取松结态后剩余土壤, 加 50 ml 0.1 mol L⁻¹ NaOH 和 0.1 mol L⁻¹ Na₄P₂O₇ 的混合液(pH 约 13), 搅匀, 于 30℃ 保温箱内放置过夜, 次日离心 15 分钟(3 000 r min⁻¹) 收集提取液至塑料瓶中, 再加 0.1 mol L⁻¹ NaOH 和 0.1 mol L⁻¹ Na₄P₂O₇ 溶液 50 ml, 再离心, 如此反复 4 次, 定容至 200 ml。吸 40 ml 0.1 mol L⁻¹ NaOH 和 0.1 mol L⁻¹ Na₄P₂O₇ 提取液, 用 1.0 mol L⁻¹ H₂SO₄ 调 pH 至 1~1.5(混浊), 于 80℃ 恒温箱 30 分钟, 取出静置过夜后分离, 定容至 50 ml, 取 1 ml 测定稳结态中胡敏酸含量。

③紧结态: 取提取松结态和稳结态后剩余土壤, 按结合态总量方法测定胡敏素结合量(即紧结态含量), 则:

矿化量= ¹⁴C-甲磺隆加入量- 可提态- 结合态

稳结态总量= 结合态- 松结态- 紧结态

稳结态富里酸= 稳结态总量- 稳结态胡敏酸

2 结果讨论

2.1 不同处理土壤中 ^{14}C 甲磺隆可提态、结合态和矿化量的变化动态

表1列出了0d、14d和28d在不同处理土壤中的可提态、结合态和矿化量 ^{14}C 甲磺隆的浓度。结果表明: 培养初期, 土壤中可提态甲磺隆浓度下降非常明显, 但随着培养时间的延长, 各处理土壤与对照相比, 相差不大。这可能是由于部分可提态甲磺隆水解, 微生物降解或转化为结合态引起的。

表1 不同处理土壤中 ^{14}C 甲磺隆可提态、结合态和矿化量的变化动态

Table 1 Dynamic change of extractable, bound and mineralized ^{14}C -metsulfuron-methyl in soils with different treatments

时间 Time (d)	形态 Form	不同处理土壤中 ^{14}C 甲磺隆含量(mg kg^{-1} 干土) Concentration of ^{14}C -metsulfuron-methyl in soils with different treatments		
		0 [#] 对照 Control	1 [#] (+ 10% 菌液) 10% Bacterial suspension	2 [#] (+ 有机肥+ 10% 菌液) Organic manure+ 10% bacterial suspension
0d	可提态	9.451		
	结合态	0.398		
	矿化量	0.151		
14d	可提态	6.489A	6.416A	6.293A
	结合态	2.528A	0.970B	0.936B
	矿化量	0.979A	2.614B	2.742B
28d	可提态	6.003A	5.805A	5.746A
	结合态	3.307A	1.449B	1.316B
	矿化量	0.689A	2.746B	2.938B

注: A, B 表示 1[#] (2[#]) 与 0[#] 的差异达 1% 水平差异显著

表1结果还表明土壤中结合态甲磺隆则随培养时间的延长而有显著增加, 而且对照和各处理间的差异均非常明显(达 1% 显著性水平), 但有机肥处理的影响(1[#] 和 2[#]) 则不显著, 这可能是由于 *Penicillium sp.* 的加入促进了结合态甲磺隆的降解, 从而也减少了结合态甲磺隆的形成。这从甲磺隆的矿化量也可以得到进一步的证实: 培养 14d 和 28d 的对照(0[#]) 矿化量基本不变, 但各不同处理土壤(1[#] 和 2[#]) 培养 14 天后的矿化量明显高于对照, 最高已占总量的 27.71%(而对照仅为 9.83%), 且各不同处理土壤培养 28 天后的矿化量与对照的差异进一步扩大。

2.2 不同处理土壤中结合态 ^{14}C 甲磺隆的不同形态(松结态、稳结态和紧结态)变化动态

表2列出了不同处理土壤中结合态 ^{14}C 甲磺隆的不同形态(松结态、稳结态和紧结态)浓度随培养时间的变化动态。表2结果表明: 优选菌株的引入主要是对结合态甲磺隆中的松结态甲磺隆有较好的降解作用(0[#] 与 1[#], 2[#] 差异分别达 1% 显著性水平显著), 而

有机肥的加入在一定程度上可促进松结态甲磺隆的减少(1[#]与2[#]差异显著),且这种差异还会随着培养时间的延长而进一步增加。但是优选菌株青霉和有机肥的加入对结合残留态甲磺隆中的稳结态和紧结态甲磺隆含量则没有明显的降解作用和影响。

表 2 不同处理土壤中结合态 ¹⁴C 甲磺隆的不同形态(松结态、稳结态和紧结态)变化动态

Table 2 Dynamic change of various forms of bound ¹⁴C-metsulfuron-methyl (loose combined, stable combined and tight combined) in soils with different treatments

时间 Time (d)	形态 Form	不同处理土壤中结合态 ¹⁴ C-甲磺隆含量(mg kg ⁻¹ 干土) Concentration of bound ¹⁴ C-metsulfuron-methyl in soils with different treatments		
		0 [#] 对照 Control	1 [#] (+ 10% 菌液) 10% Bacterial suspension	2 [#] (+ 有机肥+ 10% 菌液) Organic manure+ 10% bacterial suspension
0d	松结态	0.391		
	稳结态	0.002		
	紧结态	0.004		
14d	松结态	1.940Aa	0.540Bb	0.411Bc
	稳结态	0.310a	0.234a	0.289a
	紧结态	0.279a	0.196a	0.236a
28d	松结态	2.575Aa	0.762Bb	0.594Bc
	稳结态	0.386a	0.384a	0.360a
	紧结态	0.456a	0.303a	0.362a

注: A, B 表示 1[#] (2[#]) 与 0[#] 的差异达 1% 水平差异显著; a, b, c 表示 0[#], 1[#], 2[#] 差异达 5% 水平差异显著

2.3 不同处理土壤中松结态 ¹⁴C-甲磺隆的不同形态(富里酸、胡敏酸)变化动态

表 3 列出了不同处理土壤中松结态 ¹⁴C-甲磺隆的不同形态(富里酸、胡敏酸)浓度随时间的变化动态。由表 3 可知:

表 3 不同处理土壤中松结态 ¹⁴C-甲磺隆的不同形态(富里酸、胡敏酸)变化动态

Table 3 Dynamic change of various forms of loose combined ¹⁴C-metsulfuron-methyl (fulvic acid, humic acid) in soils with different treatments

时间 Time (d)	形态 Form	不同处理土壤中松结态 ¹⁴ C-甲磺隆含量(mg kg ⁻¹ 干土) Concentration of loose combined ¹⁴ C-metsulfuron-methyl in soils with different treatments		
		0 [#] 对照 Control	1 [#] (+ 10% 菌液) 10% Bacterial suspension	2 [#] (+ 有机肥+ 10% 菌液) Organic manure+ 10% bacterial suspension
0d	富里酸	0.341		
	胡敏酸	0.050		
14d	富里酸	1.826Aa	0.518Bb	0.396Bc
	胡敏酸	0.069A	0.020B	0.015B
28d	富里酸	2.512Aa	0.706Bb	0.434Bc
	胡敏酸	0.119A	0.056B	0.160B

注: A, B 表示 1[#] (2[#]) 与 0[#] 的差异达 1% 水平差异显著; a, b, c 表示 0[#], 1[#], 2[#] 差异达 5% 水平差异显著

在培养初期(0d), 松结态富里酸甲磺隆占了松结态甲磺隆的绝大部分(87.21%), 而松结态胡敏酸甲磺隆则较少, 且随着培养时间的延长, 松结态富里酸甲磺隆的含量进一步增加。但是, 优选菌株青霉的加入则主要是促进了处理土壤中松结态富里酸甲磺隆的降解和减少(0[#]与1[#]差异显著)。表 3 结果还表明, 有机肥的加入也可在一定程度上促进松

结合态富里酸甲磺隆的降解和减少(1[#]与2[#]差异显著)。

2.4 不同处理土壤中稳结合态¹⁴C-甲磺隆的不同形态(富里酸、胡敏酸)变化动态

表4列出了培养0d、14d和28d后在不同处理土壤中稳结合态甲磺隆的不同形式(富里酸、胡敏酸)浓度,由表4结果可知:试验初期(0d)的土壤中稳结合态甲磺隆含量很少,仅占总量的0.02%,且全是富里酸甲磺隆;但随着培养时间的延长,各土壤样品中的稳结合态富里酸均有较大程度的增加,各处理土壤与对照的稳结合态胡敏酸甲磺隆含量也有一定的增加,但添加优选菌株青霉及有机物对稳结合态富里酸和胡敏酸甲磺隆减少影响并不显著,这再一次说明了优选菌株青霉可以促进松结合态残留甲磺隆的降解和减少,但对稳结合态各形态及紧结合态甲磺隆的降解作用并不明显(0[#]与1[#],2[#]差异不显著)。

表4 不同处理土壤中稳结合态¹⁴C-甲磺隆的不同形态(富里酸、胡敏酸)变化动态

Table 4 Dynamic change of various forms of stable combined ¹⁴C-metsulfuron-methyl (fulvic acid, humic acid) in soils with different treatments

时间 Time (d)	形态 Form	不同处理土壤中稳结合态 ¹⁴ C-甲磺隆含量(mg kg ⁻¹ 干土) Concentration of stable combined ¹⁴ C-metsulfuron-methyl in soils with different treatments		
		0 [#] 对照 Control	1 [#] (+ 10% 菌液) 10% Bacterial suspension	2 [#] (+ 有机肥+ 10% 菌液) Organic manure+ 10% bacterial suspension
		0d	富里酸 0.002	胡敏酸 0
14d	富里酸	0.289a	0.219a	0.275a
	胡敏酸	0.021a	0.014a	0.014a
28d	富里酸	0.365a	0.368a	0.340a
	胡敏酸	0.022a	0.017a	0.020a

注: a 表示0[#], 1[#], 2[#]三者之间5%水平差异不显著

3 结 论

优选菌株(*Penicillium* sp.)或/和有机肥的加入对可提态甲磺隆含量影响不大,而对结合态甲磺隆的降解和矿化有较大的作用。在加入菌液或/和有机肥的土壤中,结合态甲磺隆含量明显低于对照土壤,甲磺隆的矿化量则明显高于对照土壤,这说明了优选微生物(*Penicillium* sp.)的引入,不但可以促进可提态甲磺隆的降解,而且还可显著地促进结合态甲磺隆,尤其是松结合态甲磺隆的降解,从而减少了结合态甲磺隆的生成,且这种影响作用还会随培养时间的延续而逐步增加。同时有机肥的加入也可在一定程度上促进矿化,减少结合态,但对稳结合态和紧结合态甲磺隆的影响及降解作用则并不显著。

鉴于松结合态甲磺隆占结合残留态甲磺隆绝大部分,而优选微生物青霉又对松结合态甲磺隆有较好的降解作用,因此通过加入优选菌株和有机肥的方法来修复受甲磺隆残留污染的土壤,值得进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 黄明智, 邓金保. 磺酰脲类除草剂的作用方式及其对作物的选择性. 农药译丛, 1997, 19(3): 24-31

2. 范志金等. 磺酰脲类除草剂的现状和发展趋势分析. 农药, 1999, 38(5): 6~ 9
3. 孙丙耀等. 磺酰脲类除草剂在土壤中的行为. 农药译丛, 1996, 18(2): 35~ 39
4. 陈祖义等. ^{14}C -氯磺隆的土壤结合残留及其有效性. 南京农业大学学报, 1996, 19(2): 78~ 83
5. 王楼明等. 甲磺隆钠盐在表田土壤中残留动态的研究. 农药, 1995, 34(6): 25~ 26
6. Joshi M M, Brown H M, Romesser J A. Degradation of chlorsulfuron by soil microorganisms. Weed Sci., 1985, 33(6): 888~ 893
7. Andetson R L, *et al.* Environmental effects on metsulfuron and chlorsulfuron bioactivity in soil. J. Environ. Qual., 1985, 14(4): 517~ 521
8. Blair A M, Martin T D. A review of the activity, fate, and mode of action of sulfonylurea herbicides. Pesti. Sci., 1988, 22(2): 195~ 219
9. James T K, Klaffenbach P, Holland P T, *et al.* Degradation of prinisulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in soil. Weed Res., 1995, 35(2): 113~ 120
10. Vega D Bastide J, Poulain C. Chemical or microbial degradation of sulfonylureas in the soil II. Metsulfuron-methyl. Weed Res., 1992, 32(1): 149~ 155
11. FAO/IAEA. Quantification, Nature and Bioavailability of bound ^{14}C -pesticide residues in Soil, Plants and Foods. Vienna: IAEA. 1986, 155~ 185
12. 熊毅等编著. 土壤胶体(第二册): 土壤胶体研究. 北京: 科学出版社, 1985

STUDY ON MICROBIAL DEGRADATION OF BOUND RESIDUES OF METSULFURON-METHYL IN SOIL

Shen Dong-sheng Fang Cheng-ran Zhou Xi-hui

(Department of Environment and Resource, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Summary

Microbial degradation of metsulfuron-methyl by selective *penicillium sp.* was studied. The results were shown as follows: During the degradation of various forms of ^{14}C -metsulfuron-methyl in soil, the effect of *penicillium sp.* was not obvious to degradation of extractable metsulfuron-methyl, but the effect was very clear to degradation and mineralization of bound residues of metsulfuron-methyl and mineralized metsulfuron-methyl. On bound residues of metsulfuron-methyl, *penicillium sp.* selected made the decrease concentration of loose combined metsulfuron-methyl especially to the fulvic acid in it. But organic manure might increase the concentration of loose combined metsulfuron-methyl in some degree.

Key words Metsulfuron-methyl, Bound residues, Microbial degradation