

刘丹丹,刘 畅. 微生物去除土壤阿特拉津污染及黄瓜根系的氧化应激反应[J]. 江苏农业科学,2019,47(22):307-309.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.070

微生物去除土壤阿特拉津污染及 黄瓜根系的氧化应激反应

刘丹丹,刘 畅

(沈阳化工大学环境与安全工程学院,辽宁沈阳 110142)

摘要:以莠去津降解菌和硅藻土为试材制备修复菌剂,通过对菌体存活率的测定,研究菌剂对贮藏时间、温度和紫外线的耐受能力。同时采用盆栽试验方法,测定菌剂对莠去津的去除效果,并比较菌剂施用前后黄瓜根部丙二醛(MDA)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)等氧化应激指标的变化。结果表明,菌剂在室温条件下存放 28 d 后,菌体存活率仍高达 83%,对高温和紫外线照射也表现出较强的抗性。盆栽试验中,菌剂施用 28 d 后,莠去津的去除率最高,接近 80%。氧化应激指标变化表明,菌剂能够减少黄瓜根部 MDA 积累,提高 POD、PPO 和 SOD 活性。不难看出,以硅藻土为载体的修复菌剂性状良好,不仅能够高效去除土壤中的莠去津残留,还能减轻莠去津对敏感作物的伤害作用。

关键词:莠去津;黄瓜;生物修复;环境胁迫;PPO;SOD;POD;MDA

中图分类号: X592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)22-0307-03

莠去津是在世界范围内都有广泛应用的除草剂,应用后在环境中持久存在,且具有毒性^[1]。它在环境中的高残留量对其他作物造成毒害,带来严重的经济损失^[2]。在治理莠去津污染的过程中,生物修复以成本低廉、操作简便、处理效果好和无二次污染等优点,成为众多治理方法中的首选^[3]。但生物修复方法的应用,受环境条件限制,如温度、光照、水分、pH 值和土壤性质等,均能影响污染修复效果^[4]。选择合适的载体材料,制成生物修复菌剂技术,不仅能够提高菌体对不良环境条件的抗性,还能保证污染治理效果。硅藻土对环境友好,成本低,易获得,亦是常见的载体材料,将其与莠去津降解菌制成修复菌剂,对莠去津的污染治理具有重要意义。

有研究表明,当土壤中莠去津含量超过 0.1 mg/kg 时,将

严重影响敏感作物的生长^[5]。黄瓜是常见的蔬菜,其种植面积大,对莠去津敏感。黄瓜抗氧化防御酶活性变化与所处环境条件密切相关,其活性的提高可以增强植物对逆境的耐受能力,是降低和修复逆境伤害的重要生理生化指标^[6]。了解莠去津胁迫下敏感作物的生理响应,对于减轻植物伤害、揭示微生物修复机制都有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试药剂 莠去津,市售商品,浓度为 97%。

1.1.2 供试黄瓜 粤秀 3 号,市售商品。挑选大小均一的饱满籽粒,催芽露白后播种,待植株生长至 2~3 张复叶时进行试验。

1.1.3 试验菌株 莠去津降解菌 *Enterobacter* sp. (肠杆菌属),由沈阳化工大学环境科学实验室筛选并保存。菌株采用无机盐液体培养基(每 1 000 mL 含 K_2HPO_4 1.6 g、 KH_2PO_4 0.4 g、 $MgSO_4$ 0.2 g、NaCl 0.1 g、葡萄糖 3 g、莠去津 0.1 g)培养 24 h,并制成生物量为 2×10^8 CFU/mL 的菌液。

收稿日期:2018-08-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31400481);辽宁省博士科研启动项目(编号:20141086)。

作者简介:刘丹丹(1981—),女,辽宁盖州人,博士,讲师,主要从事环境污染治理与修复及分子生物学与植物病害防治等研究。Tel:(024)89384363;E-mail:liudandan.553@163.com。

[11] Świetlik J, Da browska A, Raczky - stanisławiak U, et al. Reactivity of natural organic matter fractions with chlorine dioxide and ozone [J]. Water Research, 2004, 38: 547-558.

[12] Korshin G V, Benjamin M M, Sletten R S. Adsorption of natural organic matter (NOM) on Iron oxide: Effects on nom composition and formation of organo - halide compounds during chlorination [J]. Water Research, 1997, 31 (7): 1643-1650.

[13] Sierra M M, Giovanela M, Parlanti E, et al. Structural description of humic substances from subtropical coastal environments using elemental analysis, FT - IR and C - 13 - solid state NMR data [J]. Journal of Coastal Research, 2005, 21 (42): 370-382.

[14] Huo S L, Xi B D, Yu H C, et al. Characteristics of dissolved organic matter (DOM) in leachate with different landfill ages [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008 (4): 492-498.

[15] Kim H C, Yu M J, Han I. Multi - method study of the characteristic chemical nature of aquatic humic substances isolated from the Han River, Korea [J]. Applied Geochemistry, 2006, 21: 1226-1239.

[16] 吴济舟. 溶解性有机质分组及各组分对花的生物有效性及其吸附解吸的影响研究 [D]. 天津:南开大学, 2012.

[17] 张耀玲. 近海环境中天然有机质的分离与表征 [D]. 上海:华东师范大学, 2013.

1.1.4 载体材料 硅藻土,市售,粒径为 3~6 mm,呈灰白色,经 121 ℃ 高压灭菌 30 min,65 ℃ 烘干备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌剂制备及性能测定 菌剂制备:向硅藻土中喷洒 2×10^8 CFU/mL 菌液并混匀,用量约为 60 mL 菌液/100 g 硅藻土,制成菌剂,并于广口瓶中避光保存。存活率测定:28 d 后,取 0.1 g 菌剂放入 100 mL 无菌水中,30 ℃ 振荡培养 2 h,进行平板涂布,测定活菌数,计算菌体存活率。温度对菌体存活的影响:在 15、25、40、60 ℃ 条件下,将菌剂放置 2、7、14、21、28 d 后,振荡培养,测定菌体存活率。紫外线照射对菌体存活的影响:将菌剂平铺,放置于紫外灯下(波长 312 nm,功率 10 W),照射 0、20、40、60、80 min,振荡培养后,测定菌体存活率。各试验均设 5 次重复,以游离菌为对照。菌体存活率 = 测得活菌数/接种细菌数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 菌剂对土壤中莠去津的去除与黄瓜根系防御酶活性的测定 取不含莠去津的农田表层土壤,过 2 mm 筛后风干备用。土壤做 3 组处理,即污染土壤(莠去津 10 mg/kg)、添加菌剂土壤(按土壤质量 1% 向污染土壤中添加菌剂)和空白对照。将处理好的土壤装入塑料花盆中,装土量约 200 g/盆,黄瓜 4 株/盆,在 25 ℃ 培养箱中避光保存,保持土壤含水率在 70% 左右,0、7、14、28、35 d 后,检测土壤中莠去津残留量和黄

瓜根系防御酶活性。粗酶提取参考薛应龙的方法^[7],丙二醛(MDA)含量测定采用 Chen 等的方法^[8],过氧化物酶(POD)活性测定采用张志良等的方法^[9],多酚氧化酶(PPO)活性测定采用段春梅等的方法^[10],超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 Giannopolitis 等的方法^[11]。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 22.0 和 Excel 2010 统计完成。

2 结果与分析

2.1 菌剂制备和性能测定结果

硅藻土具有大量微孔,其比表面积大,菌体负载能力和吸水能力强,并能吸收和分散太阳光,保护菌体免受不良环境条件伤害,保证菌体的有效活菌数。经测定,在菌剂制成并存放 28 d 后,其菌体存活率约为 80%。温度对微生物生命活动的影响很大,直接影响菌剂的施用效果,因此,要考察不同温度条件下,菌剂中有效活菌数的变化情况。从菌剂制备完成至存放 28 d,菌体存活率情况见表 1。由表 1 可知,在较低温度 15 ℃ 时,菌剂保存 28 d 后,检测其活菌率较高,约为 83%;25 ℃ 下,随着时间延长,活菌率下降,28 d 时为 80%;在较高温度 40 和 60 ℃ 时,菌剂中活菌数量显著降低,28 d 时分别降至 33% 和 12%。

表 1 温度对菌体存活率的影响

时间 (d)	存活率(%)			
	15 ℃	25 ℃	40 ℃	60 ℃
2	98 ± 1.41a	97 ± 1.22a	90 ± 1.58a	80 ± 2.12a
7	96 ± 1.22a	94 ± 2.00b	78 ± 2.00b	64 ± 1.58b
14	92 ± 2.35b	90 ± 2.00c	60 ± 2.12c	40 ± 1.58c
21	90 ± 2.35b	86 ± 1.58d	46 ± 1.41d	22 ± 1.00d
28	83 ± 2.55c	80 ± 2.55e	33 ± 1.00e	12 ± 1.41e

注:表中数据均为 5 次重复的“平均值 ± 标准差”。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

紫外线具有杀菌能力,细菌直接暴露在阳光下,其数量和功能都会降低,而硅藻土的特殊结构可以吸收分散阳光辐射,为细菌提供保护场所。本试验考察了菌剂受不同时间的紫外线照射后,菌体的存活情况。由图 1 可知,在相同处理时间,菌剂中的菌体存活率均高于游离菌。紫外线照射 20 min 后,菌剂中菌体存活率为 92%,对照中游离菌的存活率为 78%;紫外线照射 80 min 后,菌剂中菌体存活率为 22%,对照中游离菌的存活率已下降至 1.8%。不难看出,以硅藻土为载体制成的莠去津修复菌剂对紫外线的耐受力较强。

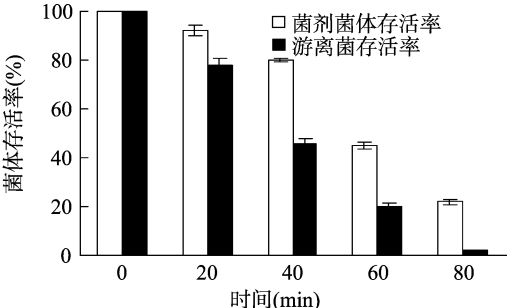


图1 紫外线对菌体存活率的影响

2.2 菌剂对土壤中莠去津的去除效果

由图 2 可知,在不同修复时间,土壤中添加菌剂后莠去津残留量一直低于不添加菌剂的污染土壤。施入菌剂 28 d 时,土壤中莠去津含量接近最低,约为 2.0 mg/kg,去除率接近 80%,而污染土壤中莠去津残留量仍高达 8.2 mg/kg。

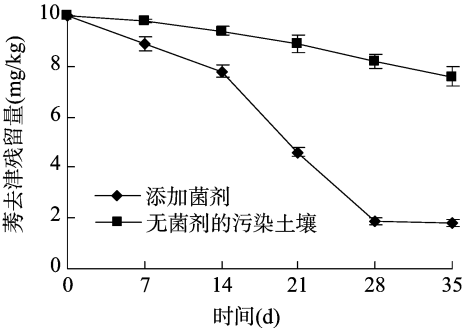


图2 土壤中莠去津残留量

2.3 菌剂对黄瓜根系防御酶的影响

不利的环境条件会刺激植物产生某些代谢反应以降低或修复逆境带来的伤害,黄瓜抗氧化防御酶活性的增强,可以提

高植物的抗逆性,抗氧化防御酶系被认为是其对环境胁迫响应的重要指标。在利用修复菌剂进行土壤污染修复的过程中,检测不同处理时间下的黄瓜根系 MDA 含量与 POD、PPO、SOD 活性。由图 3 至图 6 可知,在仅含莠去津的污染土壤中,MDA 积累量较对照明显增加,说明黄瓜根系受害严重,添加菌剂后 MDA 含量有所下降。POD、PPO 和 SOD 活性在不添加菌剂的污染土壤中最低,添加菌剂后,活性均有不同程度的升高,表明黄瓜的伤害状况得到了一定程度的缓解。

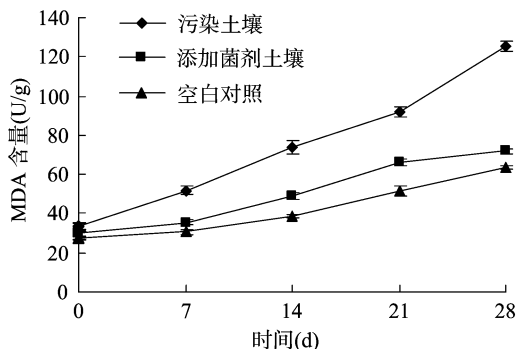


图3 黄瓜根系 MDA 含量变化

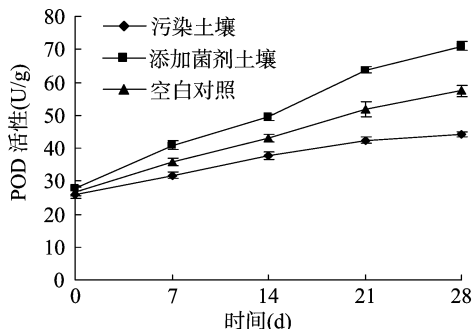


图4 黄瓜根系 POD 活性变化

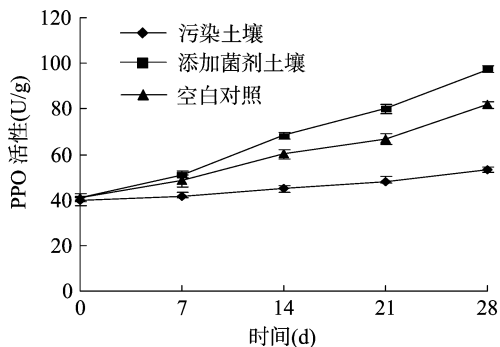


图5 黄瓜根系 PPO 活性变化

3 讨论与结论

从菌剂制备及其性能测定结果可以看出,以硅藻土为载体制备的修复菌剂,在耐贮藏、高温和紫外线等方面,性能良好,对土壤中的莠去津残留有较好的修复效果。

MDA 是膜脂过氧化过程中形成的产物,其含量能够很好地反映细胞膜损伤程度^[12]。POD 是植物中广泛存在的酶,是反映根系活力的重要指标。PPO 的作用是进行去甲基化反

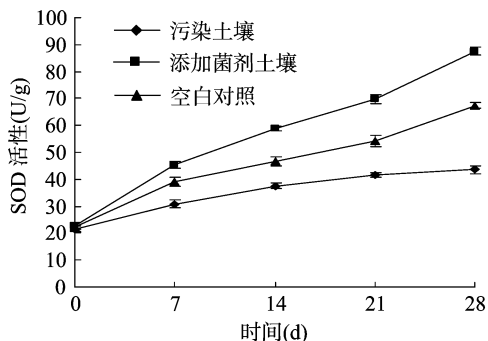


图6 黄瓜根系 SOD 活性变化

应,与生长素 (IAA) 含量和植物根系生长有关^[13]。SOD 在清除体内活性氧方面有重要作用,可避免植物的伤害作用^[14]。对比菌剂施用前后黄瓜根系氧化应激指标的变化情况可知,在菌剂处理土壤中,MDA 含量降低,POD、PPO 和 SOD 活性都有明显升高,表明莠去津对黄瓜的伤害作用得到了缓解。

参考文献:

- [1] 周宁. 除草剂莠去津污染土壤的植物修复研究[J]. 北方园艺, 2014(6): 166-168.
- [2] 宋日, 刘利, 马丽艳, 等. 阿特拉津对不同种子大小品种大豆的危害[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(2): 207-210.
- [3] Fan X X, Song F Q. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises[J]. Journal of Soils and Sediments, 2014, 14(10): 1727-1737.
- [4] Zhou X D, Wang Q F, Wang Z, et al. Nitrogen impacts on atrazine-degrading *Arthrobacter* strain and bacterial community structure in soil microcosms[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(4): 2484-2491.
- [5] 杨彩宏, 冯莉, 田兴山. 莠去津土壤残留对 4 种蔬菜生长及叶绿素荧光参数的影响[J]. 中国蔬菜, 2016(3): 53-59.
- [6] 马兵兵, 姜昭, Kehinde, 等. 狼尾草根系对阿特拉津长期胁迫的氧化应激响应[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6): 214-222.
- [7] 上海植物生理学学会. 植物生理学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [8] Chen Y S, Wu C F, Zhang H B, et al. Empirical estimation of pollution load and contamination levels of phthalate esters in agricultural soils from plastic film mulching in China[J]. Environmental Earth Sciences, 2013, 70(1): 239-247.
- [9] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [10] 段春梅, 薛泉宏, 赵娟, 等. 放线菌剂对黄瓜幼苗生长及叶片 PPO 活性的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(9): 48-54.
- [11] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiology, 1977, 59(2): 309-314.
- [12] Chiang Y J, Wu Y X, Chiang M Y, et al. Role of antioxidative system in paraquat resistance of tall fleabane (*Conyza sumatrensis*) [J]. Weed Science, 2008, 56(3): 350-355.
- [13] 高桂凤, 王俊玲, 楚海娇. 阿特拉津降解酶的提取及酶活性分析[J]. 北方园艺, 2016, 40(14): 94-96.
- [14] 窦俊辉, 喻树迅, 范术丽, 等. SOD 与植物胁迫抗性[J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 359-364.