

降解毒死蜱的高效复合微生物菌剂的制备及研究

牛明芬, 刘知远, 李卓坪, 崔伟, 庞小平, 张迪

(沈阳建筑大学市政与环境工程学院, 沈阳 110168)

摘要:将菌株 D1、D2 分别与小克银汉按一定比例富集培养制成两种复合微生物菌剂(I、II),在充分供氧的条件下,通过气相色谱法研究两种复合菌剂的生长条件并筛选一种对毒死蜱有较好降解效果的高效复合微生物菌剂。结果表明,当接种量菌浓度为 $OD_{560}=0.906$ 时,两种菌剂生长的最适温度均为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,最适 pH 均为 7.0;当毒死蜱浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养 5 d 后两种复合菌剂的降解效率分别为 81.21%和 86.57%,当温度为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 为 6.0~8.0、毒死蜱浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对毒死蜱的降解效率最高。本研究工作为复合菌剂的大规模生产提供了理论参数,为利用微生物进行有机磷农药土壤修复提供了理论依据。

关键词:毒死蜱;生物修复;高效复合微生物菌剂;拮抗作用

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)02-0381-05

Preparing and Researching the Efficient Comple Microbial Community for Degradating Chlorpyrifos

NIU Ming-fen, LIU Zhi-yuan, LI Zhuo-ping, CUI Wei, PANG Xiao-ping, ZHANG Di

(School of Municipal & Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang 110168, China)

Abstract: The purpose of this research was to study the growth conditions of two complex microbial community I, II, which composed upon D1 and D2 between Cunninghamella respectively, and to select the one with better effect on degrading chlorpyrifos and to measure its degrading effect, under adequate oxygen condition. The result showed: when the concentration of microorganism is 0.906(OD_{560} value), the optimum temperature of them were the same $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, and the optimum pH value were the same 7.0. When the chlorpyrifos concentration was $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the degradation rate of them after 5 days were 81.21% and 86.57%. Under the condition of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH varying between 6.0 and 8.0 and chlorpyrifos concentration of $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the degradation rate was maximum. The results showed that its figures could offer theoretical figures in complex microbial community large-scale. Fermentation production and the bacterial might potentially be used in bioremediation of the soil which polluted by organic phosphorus pesticides.

Keywords: chlorpyrifos; bioremediation; complex microbial community; antagonistic effect

农药是指用于防治危害农作物及林业产品的害虫、病菌、杂草、螨类、线虫、鼠类等和调节植物生长的药剂,还包括提高这些药剂效力的辅助剂、增效剂等。农药的使用提高了成本,大幅度降低了病虫害造成的损失,创造了极大的经济效益,但同时也对生态系统造成巨大的不良影响,导致环境污染^[1]。

毒死蜱(chlorpyrifos),又名:白蚁清,乐斯本,有效化学成份的化学名称为 O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)磷逐硫酸酯,自 1965 年以来被美国陶氏益农化学公司开发以来,一直被广泛地应用于防治水稻、麦类、甘蔗、玉米、棉花、茶叶、果树、蔬菜、花

卉、畜牧等方面^[2],通过触杀、胃毒熏蒸等作用方式对螟虫、卷叶虫、粘虫、介壳虫、蚜虫、棉铃虫、叶蝉和螨类等害虫有显著作用,被认为是取代甲胺磷、对硫磷、甲基对硫磷等高毒有机磷农药的最好选择^[3]。因此,毒死蜱成为近几年来广为使用的农药之一^[4-6],但随着毒死蜱的大量使用,随之而来的是对环境严重的污染,因此,寻求一种能够有效降解毒死蜱农药的降解菌是一个亟待解决的问题。本文报道了利用复合微生物菌剂去除农药残留的试验结果,为进一步探索农药污染土壤生物修复技术提供了试验依据。

1 材料和方法

1.1 培养基、试剂及主要仪器

1.1.1 菌种来源

选取小克银汉和菌株 D1、D2 作为受试菌种,很多文献显示小克银汉具有很强的土壤修复能力,能够

收稿日期:2009-09-01

基金项目:陆地生态过程与生态安全重点实验室开放基金(1-1-2-5-0531);辽宁省自然科学基金(1-1-2-4-0586)

作者简介:牛明芬(1967—),女,辽宁省本溪市人,博士,副教授,研究方向为污染生态学。E-mail:niumingfen@sina.com

通讯作者:刘知远 E-mail:54105222@163.com

高效降解土壤中的农药及石油污染^[7]。菌种 D1、D2 由沈阳建筑大学市政与环境工程实验室提取;小克银汉来源于中国科学院沈阳应用生态研究所。

1.1.2 培养基^[7]

无机盐培养基:K₂HPO₄, 10.5 g; KH₂PO₄, 4.5 g; (NH₄)₂SO₄, 1 g; 柠檬酸钠·2H₂O, 0.5 g; 蒸馏水, 1 000 mL (121 ℃ 灭菌 20 min); 选择培养基:在无机盐培养基中添加 100 mg·L⁻¹ 的毒死蜱;富集培养基:牛肉膏, 3 g; 蛋白胨, 10 g; NaCl, 5 g; 琼脂, 15~20 g; 蒸馏水, 1 000 mL; pH 7.0~7.2 (121 ℃ 灭菌 20 min)。

1.1.3 主要试剂

毒死蜱(美国陶氏益农公司),剂型:乳油,有效成分含量:480 g·L⁻¹。

乙腈(分析纯);丙酮(分析纯)。

1.1.4 仪器

恒温培养箱,恒温振荡培养箱,分光光度计,HP 5890 气相色谱仪,L-128 试管氮吹浓缩仪 L-119A,高速离心机,电子天平。

1.2 高效复合降解菌剂的制备方法

3 种菌的拮抗效能:将小可银汉接种于琼脂培养基平板中央,采用对峙培养测定法,在培养皿的 4 个角分别接 D1、D2 菌,以不接细菌作对照,3 次重复。28 ℃ 下培养 3 d,测量抑菌距离,选出不发生拮抗作用的菌株制备复合微生物菌剂。

1.3 复合菌剂的生长特性研究

主要进行了生物量、生长温度、培养基 pH 值试验。

1.4 复合菌剂降解效率的研究

主要对不同温度、pH 值、毒死蜱的初始浓度、接种量等因素进行研究。

1.5 分析方法

菌种生长量使用分光光度计于波长 560 nm 下测定吸光度。

农药残留检测参考中华人民共和国国家标准 GB/T14552—2003《水、土中有机磷农药测定的气象色谱法》。农药残留量检测在中国科学院沈阳应用生态研究所检测中心完成。

分析条件:色谱柱为 DB-1701 (30 mm×0.25 mm×0.25 μm), 进样口温度为 240 ℃,ECD 检测器温度为 300 ℃,程序升温为 150 ℃,保持 2 min,以 5 ℃·min⁻¹ 的速度升温至 260 ℃,保持 6 min;进样量为 1 μL,进样方式为不分流进样。

1.6 降解率的计算^[10]

计算公式: $R = (C_{CK} - C) / C_{CK} \times 100\%$

式中: R 为毒死蜱降解酶的降解率; C 为接菌液处理缓冲液中毒死蜱的浓度,mg·L⁻¹; C_{CK} 为对照缓冲液中毒死蜱的浓度,mg·L⁻¹。

2 结果与分析

2.1 高效复合降解菌剂的制备

根据琼脂平板划线法观察 3 种菌的拮抗效果,由结果可知:菌种 D1、D2 与小克银汉的抑菌圈分别为 1.0 和 1.3 mm,由此可以看出各种菌均不产生拮抗效果,因此 3 种菌可两两配伍,制成复合微生物菌剂。本试验选用菌种 D1、D2 分别与小克银汉配伍,制成复合微生物菌剂 I (小克银汉+D1)与复合微生物菌剂 II (小克银汉+D2)两种对毒死蜱有降解效果的复合菌剂,其配比如表 1 所示^[11]。

表 1 复合菌剂配比(mL)

Table 1 The preparation ratio of complex microbial community(mL)

复合菌剂	小克银汉	D1	D2
I	1	1	
II	1		1

2.2 复合菌剂的生长特性

2.2.1 复合菌剂生长量的测定

在 100 mL 选择培养基中接种复合菌剂 2 mL,于 30 ℃、150 r·min⁻¹ 恒温振荡培养箱中培养,每隔 24 h 取样 1 次,连续取样 8 d,从而确定其生长曲线的各个阶段。如图 1 所示,两种复合菌剂均在第 3 d 达到稳定期,生长量分别从第 4 d 和第 5 d 起开始下降,到达第 6 d 时降为最低,然后均缓慢生长。这可能是由于两种复合菌剂中小克银汉和所加菌剂在生长的过程中某些代谢产物的产生影响了菌剂的正常生长,在某一时产生拮抗反应,抑制了菌剂的生长,但随后该产物消耗殆尽,两种菌剂生长恢复正常。

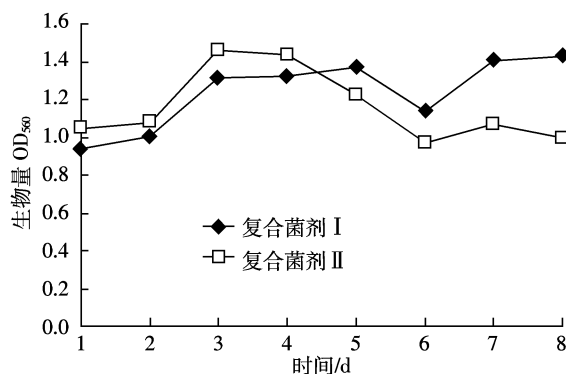


图 1 菌种在培养基中生长量的测定

Figure 1 The biomass of the bacterial in liquid media

2.2.2 温度对复合菌剂生长的影响

温度是影响微生物生长和生存的重要的环境因素之一^[12]。本试验对复合微生物菌剂在 20、25、30、35℃时的生长状况进行了观察,如图 2 所示,在所试的温度范围内,两种复合菌剂均有不同程度的生长,温度为 30℃时的生长状况最佳,温度过高或过低都不利于其生长。

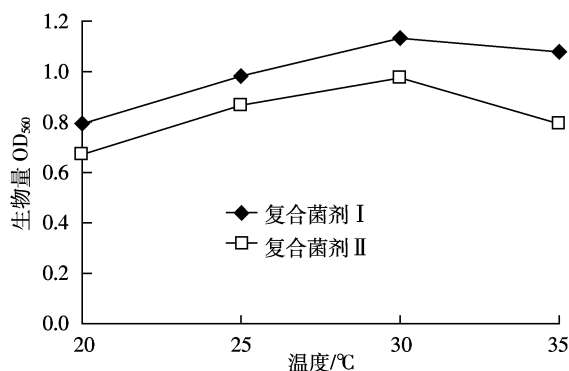


图2 温度对菌株生长的影响

Figure 2 The growth ability of the bacterial in different temperature

2.2.3 pH 值对复合菌剂生长的影响

本试验选取培养液的 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。在 30℃, 150 r·min⁻¹ 条件下培养 5 d 后于 560 nm 下测定吸光度,如图 3 所示,复合菌剂的最适 pH 值为 7.0,在偏酸或偏碱条件下(6.0~8.0)均有一定的生长能力,但 pH 值低于 6.0 或高于 8.0 时,生长明显受到抑制。

2.3 复合菌降解效果的测定

2.3.1 复合菌剂降解能力的测定

于选择培养基中分别接种菌种 D1、D2、小克银汉、复合菌剂 I、II,以含 100 mg·L⁻¹ 的毒死蜱不含菌的培养液作对照,30℃、150 r·min⁻¹ 恒温振荡培养箱

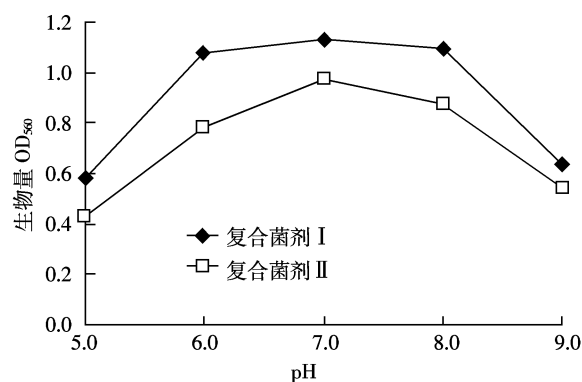


图3 pH 值对菌株生长的影响

Figure 3 The growth ability of the bacterial in different pH

培养,连续 5 d 测定毒死蜱的残留量。由图 4 中空白 CK 可以看出,毒死蜱在有氧、光照条件下经过 5 d,有少量的毒死蜱降解,可见光照和氧气对毒死蜱有一定降解效果,但作用不大;5 种菌剂对毒死蜱均有不同程度的降解能力,但复合菌剂 I、II 降解率分别为 81.21% 和 86.57%,明显高于纯种降解菌小克银汉、D1、D2 的降解率。经试验研究复合微生物菌剂 II 对毒死蜱的降解效果优于菌剂 I。

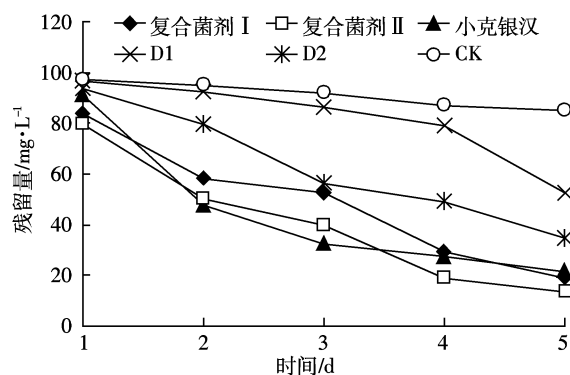


图4 菌剂对毒死蜱的降解能力

Figure 4 The chlorpyrifos degradation ability of the bacterials

2.3.2 温度对降解率的影响

控制 100 mL 选择培养基的初始温度分别为 20、25、30、35℃,其中毒死蜱的浓度为 100 mg·L⁻¹,接种复合菌剂 I、II 2 mL (菌悬液浓度为 50 g·L⁻¹),pH 7.0,150 r·min⁻¹ 振荡培养,72 h 后取样,测定复合菌剂对毒死蜱降解率,结果如图 5 所示。

由图 5 可知,培养温度对复合菌剂降解毒死蜱的影响和对生长的影响是相同的,也是随着温度升高降解率先增加,在 30℃达到最大,然后随着温度的升高降解率有所下降。这是因为培养温度影响细菌的生长,并通过影响生长来影响其对毒死蜱的降解。毒死

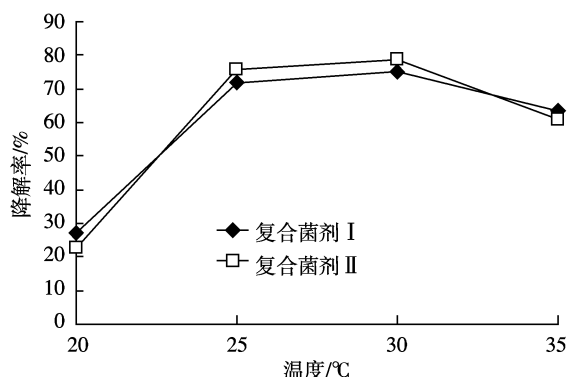


图5 温度对毒死蜱降解率的影响

Figure 5 Effects of different temperature on chlorpyrifos degradation

蜱作为农用杀虫剂时主要使用在水果和蔬菜上,使用时田间温度一般比较高,而本试验所得的降解菌在 25~35 ℃均有较高的降解能力,此降解范围广泛适用于东北地区夏季农作物生长,为研究降解菌剂的田间应用起到了重要的作用。

2.3.3 pH 值对降解率的影响

控制 100 mL 选择培养基初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,分别接种复合菌剂 I、II 2 mL(菌悬液浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),30 ℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,72 h 后取样,测定复合菌剂对毒死蜱降解率,结果如图 6 所示。

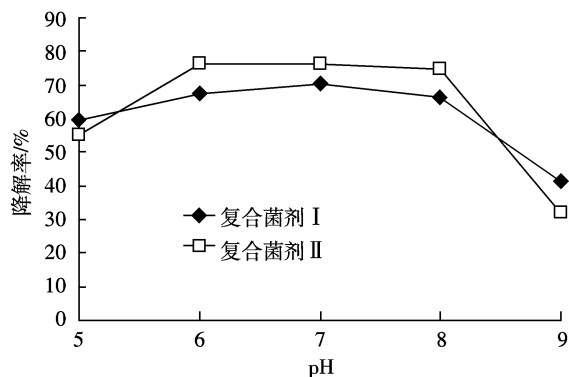


图 6 pH 对毒死蜱降解率的影响

Figure 6 Effects of different pH on chlorpyrifos degradation

由图 6 可以看出,在 pH 5.0~9.0 的范围内,pH 值对细菌的降解率有一定的影响。在 pH 6.0~8.0 时的降解率较高,pH 9.0 时降解率最低。在酸性条件下,从 pH 6.0~5.0,随着 pH 值的降低,降解率减小,复合菌剂 II 的减小幅度明显大于复合菌剂 I,复合菌剂 I 在 pH 7.0 时降解率达到最大;复合菌剂 II 在 pH 6.0 时,降解率达到最大,pH 值升高,降解率下降,但变化幅度不大;在碱性条件下,从 pH 7.0~9.0,随着 pH 值的升高,二者的降解率均减小。综上所述,两种复合菌剂在 pH 6.0~8.0 范围内有较高的降解能力,但复合菌剂 II 的降解效率略高于复合菌剂 I,在 pH<6.0 或 pH>8.0 时,其降解效率受到明显的抑制。

2.3.4 浓度对降解率的影响

使培养液中初始毒死蜱浓度分别为 10、20、50、100 和 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,定量接种复合菌剂 I、II 2 mL(菌悬液浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),pH 7.0、30 ℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,72 h 后取样测定复合菌剂对毒死蜱降解效果,如图 7 所示。

由图 7 可以看出,不同毒死蜱浓度下,复合菌剂对毒死蜱的降解效果不同。当毒死蜱浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

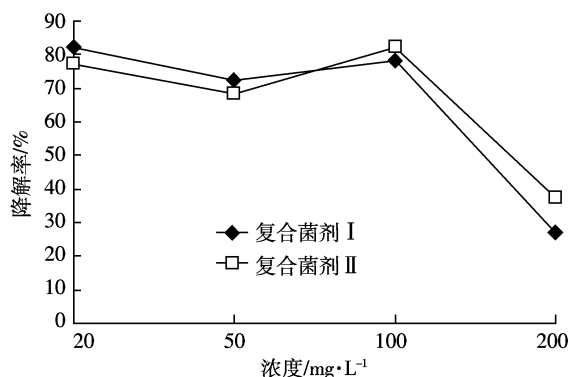


图 7 毒死蜱浓度对降解率的影响

Figure 7 Effects of different concentration on chlorpyrifos degradation

时,3 d 后测毒死蜱残留量均已达到检出限下。随着培养液中毒死蜱浓度的升高,降解率先降低,到达 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后又微弱的升高后再降低。复合菌剂 I,当毒死蜱浓度为 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,降解率最高为 82.1%;当毒死蜱浓度继续增加到达 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,降解率降低为 72.1%,当毒死蜱的浓度达到 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该菌的降解率又上升至 78.4%,当毒死蜱的浓度上升至 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该菌的降解率骤降至 27.1%,说明该菌株对较高浓度的毒死蜱仍有一定的降解能力;当毒死蜱的浓度达到 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,复合菌剂 II 降解率可达到 78.4%,说明复合菌剂 II 对较高浓度的毒死蜱溶液具有很强的降解能力。两种复合菌剂进行比较可知,在毒死蜱浓度低于 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,复合菌剂 I 的降解效果优于菌剂 II;但当毒死蜱浓度高于 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,复合菌剂 II 的降解效果更好,所以研究两种复合菌剂对高浓度毒死蜱的废水处理具有十分重要的意义,但这两种菌剂是否能够在土壤中存在如此高的降解效果仍需进一步研究。

2.3.5 接种量对降解率的影响

设置培养液中毒死蜱浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,接种复合菌剂(菌悬液浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)分别为 1、2、3、4 mL,pH 7.0、30 ℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,72 h 后取样测定不同接种量的复合菌剂对毒死蜱降解效果(图 8)。

随着接种量的增加,复合菌剂对毒死蜱的降解效果逐渐增强,到达 30 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降解率较高,以后随着接种量的增加,降解率反而有所降低。由图 8 可以看出,不同的接种量对细菌的降解率有一定的影响。这是由于细菌的量超过一定限度时,相互之间产生竞争,共同争夺水分、养料等营养物质,一部分细菌在竞争中处于劣势,生长受到抑制,从而降低了细菌生长的数量,最终导致对降解效率的影响。此结论为日后

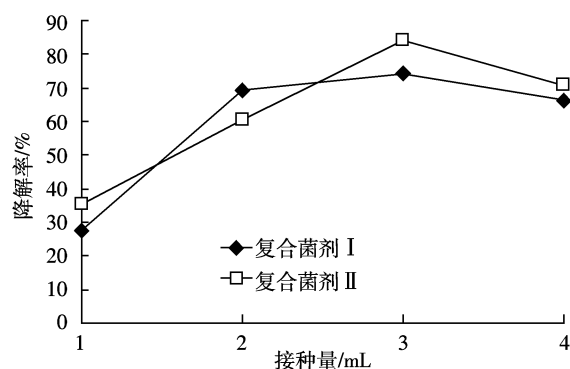


图8 菌剂接种量对毒死蜱降解率的影响

Figure 8 Effects of different inoculum on chlorpyrifos degradation

复合菌剂在农田中适用的施用量设置提供了重要的理论依据。

3 结论

(1)将菌株 D1、D2 分别与小克银汉按一定比例富集培养制成 2 种复合微生物菌剂(I 、 II),在充分供氧的条件下,当接种量为菌浓度 $OD_{560}=0.906$ 时,两种菌剂的最适温度均为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,最适 pH 均为 7.0。

(2)复合菌剂 I 、 II ,在毒死蜱浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温振荡培养箱培养,5 d 后测定毒死蜱的残留量分别为 81.21%和 86.57%,由此可见复合菌剂 II 对毒死蜱的降解效果高于复合菌剂 I。

(3)复合菌剂 I 、 II 在 $25\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0~8.0,毒死蜱浓度低于 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,接种量为 3 mL(菌悬液浓度为 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)时,对毒死蜱具有较强的降解效果,但经试验研究复合菌剂 II 在各种条件下的降解效率均优于复合菌剂 I。

(4)两种复合菌剂在基础培养基中对毒死蜱均有较强的降解能力,对于加快水中毒死蜱的去除具有重要意义,但其能否应用于自然土壤中加速毒死蜱的降解等问题仍需试验探讨。

参考文献:

- [1] 王圣惠,张琛,闫艳春,等.有机磷农药微生物降解研究进展[J].生物技术,2006,16(3):95-98.
WANG Sheng-hui, ZHANG Chen, YAN Yan-chun, et al. Advances in microbial degradation of organophosphorous pesticides[J]. *Biotechnology (Harbin)*, 2006, 16(3):95-98.
- [2] 刘乾开.新编农药使用手册[M].上海:上海科技出版社,1993:84-86.
LIU Qian-kai. New pesticide manual[M]. Shanghai: Science and Technology Publish, 1993:84-86.
- [3] 李晓慧,贾开志,何健,等.一株毒死蜱降解菌 *sphingomonas* sp. DSP-2 的分离鉴定及降解特性[J].土壤学报,2007,44(4):734-739.
LI Xiao-hui, JIA Kai-zhi, HE Jian, et al. Isolation and identification of chlorpyrifos degrading strain *sphingomonas* sp. DSP-2 and its chlorpyrifos degradation characteristics[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(4):734-739.
- [4] 王晓,楚小强,等.毒死蜱降解菌株 *Bacillus laterosporus* DSP 的降解特性及其功能定位[J].土壤学报,2006,43(4):648-654.
WANG Xiao, CHU Xiao-qiang, et al. Characteristics and function of *Bacillus laterosporus* DSP in degrading chlorpyrifos [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(4):648-654.
- [5] 陈振德,陈雪峰,冯明祥,等.毒死蜱在菠菜残留中的动态研究[J].农业环境科学学报,2005,24(4):728-731.
CHEN Zhen-de, CHEN Xue-feng, FENG Ming-xiang, et al. Chlorpyrifos residues in spinach dynamic research[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(4):728-731.
- [6] 张悦周,吴耀国,胡思海,等.微生物降解有机磷农药的研究进展[J].化工环保,2007,27(6):514-519.
ZHANG Yu-zhou, WU Yao-guo, HU Si-hai, et al. Microbial degradation of organic phosphorus pesticide research[J]. *Chemical Environmental Protection*, 2007, 27(6):514-519.
- [7] 钦松,周长林.小克银汉霉属的微生物转化在体外药物代谢模型研究中的应用[J].海峡药学,2004,16(1):5-8.
QIN Song, ZHOU Chang-lin. Application of microbial transformation in medicine metabolism model in vitro by *cunninghamella matrucot* [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2004, 16(1):5-8.
- [8] 郭书海,张海荣,张春桂.陈化石油污污染物降解菌的筛选[J].农业环境科学学报,2005,24(1):161-164.
GUO Shu-hai, ZHANG Hai-rong, ZHANG Chun-gui. Screening for degradation fungi of persistent petroleum hydrocarbon[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(1):161-164.
- [9] 范秀容,李广武,等.微生物学实验[M].第三版.北京:高等教育出版社,2004:214-221.
FAN Xiu-rong, LI Guang-wu, et al. Environmental microbiology experiments[M]. Third Edition. Beijing: Higher Education Press, 2004:214-221.
- [10] 钱博,朱鲁生,等.毒死蜱降解细菌 XZ-3 的分离及降解特性研究[J].环境科学,2007,28(12):2827-2832.
QIAN Bo, ZHU Lu-sheng, et al. Isolation and degrading characters of chlorpyrifos degrading bacteria XZ-3[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(12):2827-2832.
- [11] 席北斗,刘鸿亮,孟伟.垃圾堆肥高效复合微生物菌剂的制备[J].环境科学研究,2003,16(2):58-60.
XI Bei-dou, LIU Hong-liang, MENG Wei. Study on preparation technology of complex microbial community in composting process [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2003, 16(2):58-60.
- [12] 王家玲,李顺鹏,黄正.环境微生物学[M].第二版.北京:高等教育出版社,2004:294-295.
WANG Jia-ling, LI Sun-peng, HUANG Zheng. Environmental microbiology[M]. Second Edition. Beijing: Higher Education Press, 2004:294-295.