

Hyphomicrobium sp. MAP-1 菌株修复甲胺磷 乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的实验研究

王莉^{1,2}, 凌琪¹, 伍昌年¹, 李顺鹏², 蒋建东², 王敏¹

(1. 安徽建筑工业学院环境与能源工程系, 合肥 230022; 2. 南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:在实验室条件下,评估了菌株 *Hyphomicrobium* sp. MAP-1 对甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的修复能力。革兰氏阴性菌 MAP-1 在土壤中能很好的定殖,以 1×10^7 CFU·g⁻¹ soil 的浓度接种于土壤,15 d 后菌株浓度仅下降了 1 个数量级。土壤非灭菌状态下,30 °C pH 6.8,接种量为 1×10^7 CFU·g⁻¹ soil 时,9 d 内可分别将土壤 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷、100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷完全降解,13 d 内将 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷完全降解。添加甲醇和加大接种量能促进土壤中三种有机磷农药降解,土壤是否处于淹水状态对其降解影响不大。在 20~30 °C 之间,土壤中三种农药有比较好的去除效果。土壤投加菌株 MAP-1,第 10 d 可使 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷和 100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷抑制的土壤脱氢酶、蔗糖酶和脲酶活性恢复至施农药前水平,对 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷抑制的这三种土壤酶活性也有较大的恢复作用。可见将菌株 MAP-1 应用于降低甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷对土壤的潜在风险是可接受的。

关键词: *Hyphomicrobium* sp. MAP-1; 甲胺磷; 乙酰甲胺磷; 水胺硫磷; 土壤; 生物修复

中图分类号: X53 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)01-0081-07 doi:10.11654/jaes.2013.01.013

Bioremediation on the Soil Contaminated by Methamidophos, Acephate and Isocarbophos by *Hyphomicrobium* sp. MAP-1

WANG Li^{1,2}, LING Qi¹, WU Chang-nian¹, LI Shun-peng², JIANG Jian-dong², WANG Min¹

(1. Department of Environment and Energy Engineering, Anhui University of Architecture, Hefei 230022, China; 2. Department of Microbiology, Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The ability of bioremediation on contaminated soil by methamidophos, acephate, and isocarbophos for *Hyphomicrobium* sp. MAP-1 was assessed under laboratory conditions. It was found that the gram-stain-negative strain MAP-1 could well colonized in soil, and concentration of MAP-1 only decreased by one order of magnitude after 15 days, when inoculating MAP-1 into soil at the inoculum size of 1×10^7 CFU·g⁻¹ soil. Under these conditions: non-sterilization soil, 30 °C pH 6.8, the inoculum size of 1×10^7 CFU·g⁻¹ soil, the strain MAP-1 was able to completely respectively degradate 100 mg·kg⁻¹ methamidophos and 100 mg·kg⁻¹ acephate within 9 days, completely remove 50 mg·kg⁻¹ isocarbophos within 13 days. The addition of methanol or increase of inoculum of strain MAP-1 in soil, could accelerate the degradation of three organophosphorus pesticides. Whether the soil was flooded or not, no notable effect on degradation was found. Between 20 °C and 30 °C, the strain MAP-1 could efficiently remove three organophosphorus pesticides from soil. Adding the strain MAP-1 to soil, in the tenth day, the activity of dehydrogenase, invertase, and urease, inhibited by 100 mg·kg⁻¹ methamidophos or 100 mg·kg⁻¹ acephate was recovered to the level without pesticide, oppressed by 50 mg·kg⁻¹ isocarbophos was also restored to a great extent. As a result, it was feasible for applying the strain MAP-1 to reduce the potential risks on soil by methamidophos, acephate, and isocarbophos.

Keywords: *Hyphomicrobium* sp. MAP-1; methamidophos; acephate; isocarbophos; soil; bioremediation

收稿日期: 2012-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(21107002); 安徽建筑工业学院博士基金(2011); 住房和城乡建设部科学技术项目计划(2009-K6-3); 安徽省自然科学基金基金项目(11040606M99)

作者简介: 王莉(1975—), 女, 安徽合肥人, 博士, 副教授, 主要从事有机污染物的微生物降解研究。E-mail: wlyu1228@sina.com.cn

有机磷农药由于经济、高效、使用方便等原因,自上世纪80年代以来,一直被各行业广泛使用,在今后相当长的时间内,有机磷仍将是主要的农药品种。甲胺磷和水胺硫磷同属于早期发展的高效高毒有机磷农药品种,鉴于这两种农药对生物及生态的毒性作用^[1-3],我国已于2008年宣布全面禁止生产和使用甲胺磷,同时水胺硫磷也只限制在局部地区、局部行业使用。乙酰甲胺磷是作为甲胺磷的替代品逐步登上历史舞台,自甲胺磷全面禁止后使用量呈逐年增加的趋势。乙酰甲胺磷的毒性约为甲胺磷的1/30,但长期使用仍然可对生物体和环境安全造成危害^[4-5]。向污染环境中投入经驯化的高效降解菌,在适宜条件下通过菌株的代谢活动修复污染环境是一种有效的方法。自上世纪90年代以来,可降解甲胺磷的优良菌株已不断地从受农药污染的土壤和水体中筛选出来^[6-7],乙酰甲胺磷^[8]和水胺硫磷降解菌株^[9]的分离虽起步较晚也有零星报道,然而到目前为止,将分离的甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷高效降解菌应用于土壤污染修复还未见报道。在本实验室的前期工作中,我们分离到一株高效的甲胺磷降解菌 *Hyphomicrobium* sp. MAP-1,该菌能在36 h内完全清除培养液 1000 mg·kg⁻¹ 甲胺磷。有机磷农药降解谱实验发现,菌株 MAP-1 能在5 d内完全降解培养液 100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷,可将 100 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷降解掉 73.5%^[10]。本研究中,我们在实验室条件下,对菌株 MAP-1 修复甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的能力进行评估,以期为有机磷农药污染土壤的生物修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、培养基及试剂

甲胺磷高效降解菌株 MAP-1 系本实验室自行分离,经鉴定为生丝微菌属(*Hyphomicrobium* sp. MAP-1)。无机盐培养基 MSM: 5 mL CH₃OH, 1.0 g NH₄NO₃, 1.5 g K₂HPO₄·H₂O, 0.5 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 水 1000 mL, pH 7.0~7.2。70%甲胺磷乳油,购自连云港市东金化工有限公司,乙酰甲胺磷原药由南通维立科化工有限公司馈赠,水胺硫磷原药购自江苏宏泽化工实业有限公司。二氯甲烷、丙酮、甲醇等均为色谱纯试剂,购自上海化学试剂三厂。其他试剂均为分析纯。

1.1.2 供试土壤

供试土壤取自江苏省农科院,为表层土(0~10

cm)。经调查,所用土壤样品之前从未使用过有机磷农药。土壤样品取回后首先置于阴凉通风处自然风干,风干后碾磨,过200目筛,121℃湿热灭菌2 h待用。土壤的理化性质为:pH 6.80,最大持水量 40.12%,有机碳 19.40 g·kg⁻¹,全氮 0.92 g·kg⁻¹,矿质氮 65.31 mg·kg⁻¹,速效磷 24.63 μg·g⁻¹,速效钾 67.56 μg·g⁻¹;砂粒 45.54%,粘粒 23.78%,粉粒 30.68%。

1.2 方法

1.2.1 土壤前处理

灭菌土壤:称取150 g 经过预处理的土壤到三角瓶中,121℃湿热灭菌2 h,灭菌完毕取出冷却后加入有机磷农药(各农药终浓度:甲胺磷 100 mg·kg⁻¹;乙酰甲胺磷 100 mg·kg⁻¹;水胺硫磷 50 mg·kg⁻¹),加入适量的灭菌去离子水,使土壤终得水分含量达到25%,将土壤样品放于30℃暗室静置24 h,使各农药被充分吸附。

1.2.2 菌液的制备及土壤菌株的接种

取-70℃保藏的菌株 MAP-1 划线于 MSM 平板,待长出单菌落后接种到相应液体培养基,30℃ 170 r·min⁻¹ 摇床振荡培养至对数生长期,5000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集菌体,生理盐水重悬浮并调整菌液浓度为 OD₆₀₀=1.0,即为菌种。

取菌株 MAP-1 的 MSM 菌悬液经过梯度稀释后,吸取菌悬液加入到土壤中,用灭菌的涂布棒搅拌最终土壤中的菌体浓度约为 1×10⁷ CFU·g⁻¹ soil,使降解菌株均匀分布于土壤中,放于30℃暗室静置,按实验要求取样测定有机磷农药残留。每样设三个重复。

1.2.3 菌株 MAP-1 在土壤中的存活能力

取接种了 1×10⁷ CFU·g⁻¹ soil 菌株 MAP-1 的非灭菌土壤 1.0 g,加入到9 mL 生理盐水中,剧烈振荡,进行梯度稀释,稀释液在 MSM 平板上涂布,放30℃培养箱中培养10 d后,取平板计0.5~1 mm 白色、不透明、干燥菌落数,同样作不接菌的对照。

1.2.4 菌株 MA-1 降解土壤有机磷农药的特性

对土壤有机磷农药的降解:分别在灭菌和非灭菌的土壤中加入农药,取经过梯度稀释的降解菌株 MAP-1 生理盐水菌悬液接入土壤中,搅匀后于30℃暗室静置,间隔时间取样,样品取完后马上提取置于-20℃,待所有样品提完后统一检测。

碳氮源影响:在灭菌土壤中加入农药,单独加入甲醇(5 mL·kg⁻¹)或同时加入甲醇和硝酸铵(1.0 g·kg⁻¹)水溶液,接种菌株 MAP-1 菌悬液,搅匀后将锥形瓶放于30℃暗室静置,5 d后取样检测土壤农药残留量。

接种量影响:在灭菌土壤中加入农药,在土壤样品中接入菌株 MAP-1,使得土壤中的菌体浓度分别为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ soil, 搅匀后放入 30 ℃培养箱中避光静置,5 d 后取样检测土壤农药残留量。

温度影响:在灭菌土壤中加入农药,接入 MAP-1 菌悬液,搅匀后分别放于 10、20、30、37 ℃恒温培养箱避光静置,5 d 后取样检测土壤农药残留量。

淹水与非淹水影响:在灭菌土壤中加入农药,接种菌株 MAP-1 菌悬液,使土壤终得水分含量达到 25%或呈淹水状态,搅匀后置于 30 ℃暗室,5 d 后取样检测土壤农药残留量。

1.2.5 接种菌株 MAP-1 对土壤酶活性的影响

在非灭菌土壤中加入农药,接种菌株 MAP-1 的菌悬液,搅匀后置于 30 ℃暗室,10 d 后取样检测土壤脱氢酶、蔗糖酶和脲酶活性。脱氢酶活性采用三苯基四氮唑氯化物(TTC)比色法测定^[12],蔗糖酶活性采用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定^[12],脲酶活性采用靛蓝比色法测定^[12]。3 种酶活性分别以 24 h 后 1 g 土壤含有的三苯基甲脎(TPF)的微克数、葡萄糖的毫克数、NH $_4^+$ -N 的微克数表示。每个样设三个重复,并设不加农药的阴性对照。

1.2.6 土壤中有有机磷农药的提取与检测

参照文献[11]提取土壤甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷的含量。甲胺磷和乙酰甲胺磷气相检测条件:日本岛津 GC-14B 气相色谱仪,NP 检测器,色谱柱 TRB-5(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m);进样口温度 200 ℃,柱温 230 ℃,检测器 250 ℃;氮气流量 36 mL $\cdot$ min $^{-1}$,氢气流量 25 mL $\cdot$ min $^{-1}$,空气流量 150 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 。进样量为 2 μ L,采用外标法按峰面积定量。水胺硫磷液相检测条件:瑞典安玛西亚 Ettan 液相色谱仪,色谱柱 Kromasil 100-5 C18(4.6 mm $\times$ 25 cm),UV-900 检测器,检测波长 245 nm,流动相甲醇:水=80:20(V/V),流速 0.6 mL $\cdot$ min $^{-1}$,进样量 20 μ L。

1.3 数据处理

实验所得数据的统计分析采用 SPSS 软件进行。以 3 个平行组数据的平均值 $\pm$ 标准差(Means $\pm$ SD)表示。采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 检验法统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 MAP-1 在土壤中的存活能力

实验结果如表 1。在 15 d 后土壤中的活菌数只下

降了 1 个数量级,为 $(1.83\pm0.25)\times10^6$ CFU $\cdot$ g $^{-1}$ soil,说明菌株 MAP-1 在土壤中能较好的定殖。

表 1 土壤中降解菌株 MAP-1 的监测
Table 1 Monitoring of degrading strain MAP-1 in soil

取样时间/d	菌株浓度/CFU $\cdot$ g $^{-1}$ soil	
	对照组	处理组
0	0	$(0.82\pm0.05)\times10^7$
7	0	$(0.58\pm0.03)\times10^7$
10	0	$(0.37\pm0.05)\times10^7$
15	0	$(1.83\pm0.25)\times10^6$

2.2 菌株 MAP-1 对土壤有机磷农药的降解

实验结果见图 1~图 3。菌株 MAP-1 的添加显著促进了甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷在土壤中的降解。土壤非灭菌状态下,菌株 MAP-1 9 d 内可分别将土壤 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 甲胺磷和 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 乙酰甲胺磷完全降解。而将非灭菌土壤 50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 水胺硫磷完全降解,则需 13 d。另外发现,在 15 d 的实验时间里三种有机磷农药在未经灭菌的土壤处理中的浓度皆低于相同处理的灭菌土壤,可能是因为土壤添加农药诱导一定时间后,土壤土著微生物获得了部分降解能力^[13]。

2.3 添加碳氮源对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

实验结果如图 4。和不加碳氮源的对照相比,土壤单独添加甲醇后,甲胺磷和乙酰甲胺磷的降解率分别提高了 21.0%和 25.0%($P<0.01$),水胺硫磷降解率提升较低,仅为 5.3 %($P<0.05$)。和单独添加甲醇组相比,土壤中同时添加甲醇及硝酸铵后,三种农药降解

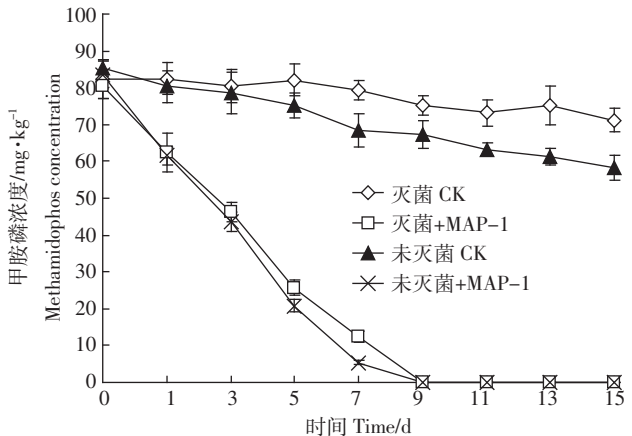


图 1 灭菌和非灭菌土壤中菌株 MAP-1 对甲胺磷的降解
Figure 1 Degradation of methamidophos by strain MAP-1 in sterilized and un-sterilized soil

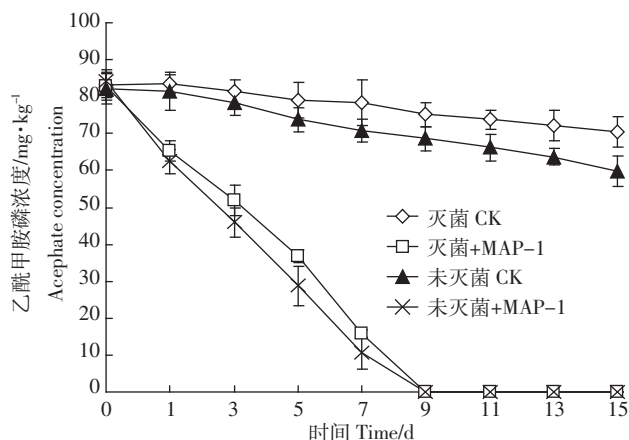


图2 灭菌和非灭菌土壤中菌株 MAP-1 对乙酰甲胺磷的降解
Figure 2 Degradation of acephate by strain MAP-1 in sterilized and un-sterilized soil

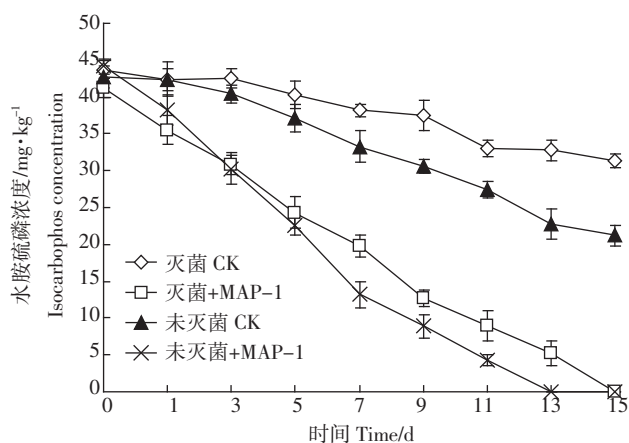
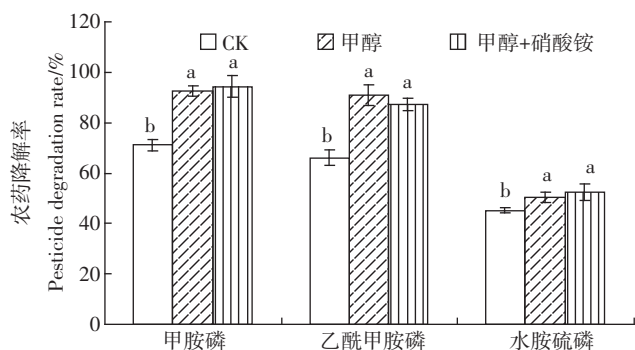


图3 灭菌和非灭菌土壤中菌株 MAP-1 对水胺硫磷的降解
Figure 3 Degradation of isocarbophos by strain MAP-1 in sterilized and un-sterilized soil



不同字母表示同一种农药不同处理组之间差异显著($P<0.05$),下同

图4 添加碳氮源对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

Figure 4 Effect of supplement of carbon only or carbon and nitrogen source simultaneously on degradation of organophosphorus pesticides by strain MAP-1 in soil

率没有明显变化 ($P>0.05$)。说明添加适于降解菌株 MAP-1 生长的碳源甲醇有利于促进三种有机磷农药

在土壤中的降解。

2.4 接种量对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

实验结果如图 5。当土壤菌体浓度在 1×10^5 CFU·g⁻¹ soil 时,5 d 时三种农药的最大降解率没超过 10.0%。当土壤菌体浓度在 1×10^6 CFU·g⁻¹ soil 时,对甲胺磷和乙酰甲胺磷降解增强较大,第 5 d 时两种农药的降解率分别达到了 28.3%和 25.2%。当土壤中的菌体浓度在 1×10^7 CFU·g⁻¹ soil 时,第 5 d 时土壤中三种农药降解率分别提升到了 71.1%、66.0%和 45.2%。当土壤中的菌体浓度在 1×10^8 CFU·g⁻¹ soil 时,三种农药降解率继续增大,其中甲胺磷和乙酰甲胺磷降解率超过 90%。说明增大菌株 MAP-1 接种量,可以促进三种农药在土壤中的降解。

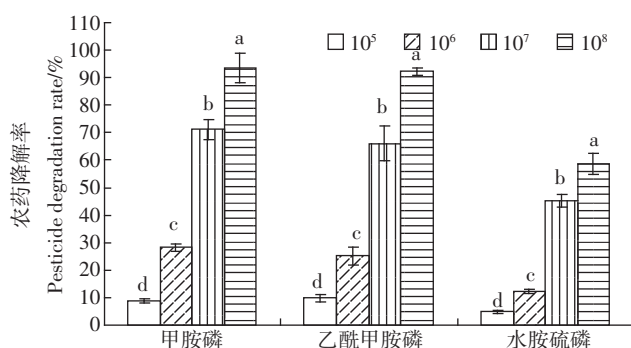


图5 菌株 MAP-1 接种量不同对土壤有机磷农药降解的影响
Figure 5 Effect of inoculum size on degradation of organophosphorus pesticides by strain MAP-1 in soil

2.5 温度对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

实验结果如图 6。20~30 ℃之间的温度,对土壤三种有机磷农药有比较好的去除效果,100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷降解率在 55.4%~71.1%之间,100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷降解率在 48.5%~66.0%之间,50 mg·kg⁻¹ 水胺硫

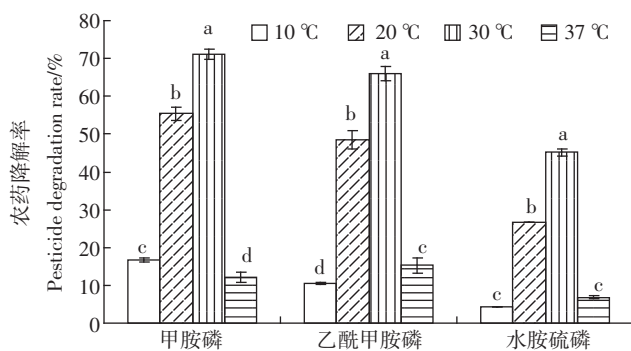


图6 温度对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

Figure 6 Effect of temperature on degradation of organophosphorus pesticides by strain MAP-1 in soil

磷降解率在 26.6%~45.2%之间。说明在实验设定的几个温度下,土壤三种农药降解的最适温度都为 30℃。

2.6 淹水和非淹水条件对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

实验结果如图 7。淹水状态和非淹水状态下,土壤 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷、100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷和 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷降解率无显著差别($P>0.05$),说明土壤是否处于淹水状态不影响菌株对三种有机磷农药的降解。

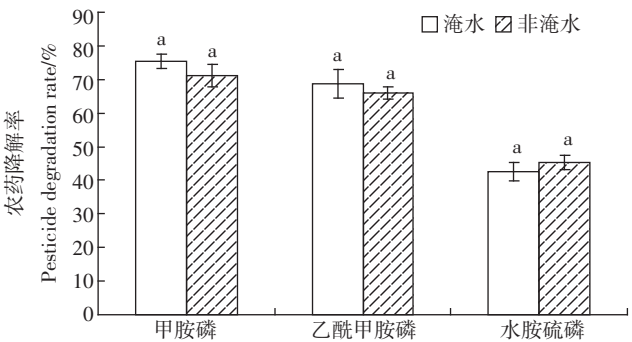


图 7 淹水和非淹水条件对菌株 MAP-1 降解土壤有机磷农药的影响

Figure 7 Difference of organophosphorus pesticides degradation by strain MAP-1 in flooded soils and non-flooded soil

2.7 菌株 MAP-1 对有机磷抵制土壤酶活性的解除

实验结果如表 2。和未加农药的阴性对照组相比,所有加农药但未加 MAP-1 的菌液组土壤脱氢酶、蔗糖酶和脲酶的活性皆出现了明显下降,说明土壤中使用 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷、100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷和 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷,在第 10 d 可显著抑制土壤三种酶的酶活。和各农药对照组相比,在土壤中加入菌株 MAP-1 都使土壤脱氢酶、蔗糖酶和脲酶的活性得到了显著提高,其中甲胺磷+MAP-1 组、乙酰甲胺磷+MAP-1 组三种土壤酶的活性已恢复至加农药前的水

平($P>0.05$)。但水胺硫磷+MAP-1 组三种土壤酶活性还未完全恢复至加农药前的水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),这可能是第 10 d 时,土壤水胺硫磷还有少量残留,因而对三种土壤酶活尚有一定的抑制作用。

3 讨论

向环境中投加高效农药残留降解菌是治理农药环境污染的一种有效方法。革兰氏阴性细菌在清除外源物质的过程中起着举足轻重的作用,但革兰氏阴性细菌在陌生环境中的存活能力通常成为影响其发挥优越修复效果的限制因素^[13]。据报道,在土壤中人为投加 1×10⁷ CFU·g⁻¹ soil 革兰氏阴性细菌近半个月后,土壤菌株浓度至少下降 2 个数量级^[14-15]。在本研究中,我们将革兰氏阴性菌 MAP-1 以 1×10⁷ CFU·g⁻¹ soil 的浓度接种于土壤,接种 15 d 后发现土壤菌株 MAP-1 浓度仅下降了 1 个数量级,说明菌株 MAP-1 在土壤中存活能力较强,这可能和菌株 MAP-1 特殊的细胞结构有关。在前期的研究中,我们发现 *Hyphomicrobium* sp. MAP-1 是一种生长缓慢的寡营养细菌^[10],而寡营养细菌对外界环境胁迫通常具有较大抗性^[16-17]。

甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷的微生物降解研究主要集中在菌种资源的分离筛选上^[6-9],而将分离的降解菌应用于三种有机磷农药污染土壤的修复研究目前还未见报道。在应用研究方面滞后的原因,可能是实验室的液体培养基环境相对简单,而土壤环境却复杂得多,所以通常分离的降解菌株在前者环境中能较好的降解污染物,而在后者环境中对污染物的去除效果却不尽人意或者根本无法发挥作用^[18-19]。本实验中,外源投加降解菌株 MAP-1 可有效促进甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷在土壤中的降解,表明菌株 MAP-1 能较好地适应土壤复杂环境并很好地发挥修复作用。

表 2 菌株 MAP-1 对甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷抑制土壤酶活性的解除

Table 2 Relief of effect of methamidophos, acephate and isocarbofos, respectively on several enzyme activity in soil by the strain MAP-1

项目	脱氢酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	蔗糖酶/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	脲酶/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
阴性对照	4.75±0.05a	2.34±0.03a	1.25±0.02a
甲胺磷对照	1.20±0.02b	1.02±0.03b	0.47±0.01b
甲胺磷+MAP-1	4.32±0.04a	2.22±0.03a	1.39±0.03a
乙酰甲胺磷对照	2.37±0.03b	1.18±0.02b	0.87±0.02b
乙酰甲胺磷+MAP-1	4.53±0.03a	2.42±0.06a	1.22±0.01a
水胺硫磷对照	1.76±0.02c	1.27±0.01c	0.66±0.01b
水胺硫磷+MAP-1	3.94±0.01b	1.98±0.02b	1.08±0.04a

注:同列数字中不同字母表示同一农药不同处理组(包括阴性对照)之间差异显著($P<0.05$)。

为进一步评估菌株 MAP-1 的修复能力,并尽可能确保菌株 MAP-1 在日后的生产实践中发挥最佳的修复效果,我们考察了碳氮源、接种量、温度和通气量对菌株 MAP-1 去除土壤三种农药的影响。实验发现,向土壤中添加甲醇作碳源和加大菌株 MAP-1 的接种量都能显著促进三种有机磷农药在土壤中的降解。菌株 MAP-1 降解土壤三种农药的最适温度为 30℃,但在较低温度 20℃ 也有较好的修复效果,说明菌株 MAP-1 能在较宽的温度范围内较好的发挥作用。值得注意的是,菌株 MAP-1 在土壤淹水和非淹水两种情况下对三种农药降解情况无明显差别,这可能和菌株 MAP-1 的兼性好氧特性有关^[20],菌株 MAP-1 的这种降解特性特别有利于确保其在通气情况不同的环境中都能有效地发挥作用。

脱氢酶、蔗糖酶和脲酶活性是评价土壤污染的三个重要指标,主要反映土壤肥力和土壤质量^[21-23]。在本实验中,土壤脱氢酶、蔗糖酶和脲酶活性对 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷、100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷或 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷均相当敏感,和未施加农药组相比其活性皆显著降低。但当向土壤投加菌株 MAP-1 后,被甲胺磷或乙酰甲胺磷抑制的三种土壤酶活性恢复至加入农药前的水平,可见菌株 MAP-1 能将这两种农药降至安全水平,使土壤肥力和土壤质量得到了较为完全的恢复与提高。对水胺硫磷抑制的三种酶活性也有较大的恢复促进作用,说明菌株 MAP-1 也能在较大程度上降低水胺硫磷引起的土壤毒性。

4 结论

在实验室条件下,对菌株 MAP-1 修复甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的能力进行评估,结论如下:

(1) 革兰氏阴性细菌 MAP-1 在土壤中存活能力较强,以 1×10⁷ CFU·g⁻¹ soil 的浓度接种于土壤,15 d 后仅下降了 1 个数量级。

(2) 首次将分离的降解菌应用于甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的修复研究。菌株 MAP-1 可有效促进甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷在土壤中的降解,9 d 内可分别将土壤 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷、100 mg·kg⁻¹ 乙酰甲胺磷完全降解,13 d 内将土壤 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷完全降解。

(3) 添加甲醇作碳源和加大接种量都能显著促进菌株 MAP-1 对土壤三种有机磷农药的降解,且降解土壤三种农药的适宜温度范围较广(20~30℃),其对农药

的降解不受土壤是否处于淹水状态的限制。

(4) 菌株 MAP-1 能完全恢复 100 mg·kg⁻¹ 甲胺磷或乙酰甲胺磷抑制的土壤脱氢酶、蔗糖酶和脲酶活性,并很大程度恢复 50 mg·kg⁻¹ 水胺硫磷抑制的这三种酶的活性。

综上所述,将高效甲胺磷降解菌株 MAP-1 应用于降低甲胺磷、乙酰甲胺磷和水胺硫磷对土壤的潜在风险是可接受的。但要将菌株 MAP-1 真正应用于生产实践,还需做大田实验,这是下一步研究工作的重点。

参考文献:

- [1] Garcí'a-dela Parra L M, Bautista-Covarrubias J C, Rivera-dela Rosaa B N, et al. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 65: 372-380.
- [2] Li X Y, Zhang H W, Wu M N, et al. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20: 619-625.
- [3] Zhang X, Jia X, Li N. Chronic toxicity and carcinogenicity of 95 % isocarbophos in rats [J]. *Toxicology Letters*, 2010, 196 (Suppl 1, 17): 174.
- [4] Spassova D, White T, Singh A K. Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2000, 126: 79-89.
- [5] Venkateswara Rao J, Srikanth K, Arepalli S K, et al. Toxic effects of acephate on *Paramecium caudatum* with special emphasis on morphology, behaviour, and generation time [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2006, 86: 131-137.
- [6] 肖华胜, 王银善. 假单胞菌 WS-5 的分离及降解甲胺磷某些性质的研究 [J]. *中国环境科学*, 1995, 15 (6): 466-469.
XIAO Hua-sheng, WANG Yin-shan. Studies on the isolation and characterization of methamidophos-degrading pseudomonas WS-5 [J]. *China Environmental Science*, 1995, 15 (6): 466-469.
- [7] 郑永良, 刘德立, 高强, 等. 甲胺磷农药降解菌 HS-A32 的分离鉴定及降解特性 [J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12 (3): 399-403.
ZHENG Yong-liang, Liu De-li, GAO Qiang, et al. Isolation and characterization of a bacterium HS-A32 capable of degrading methamidophos [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12 (3): 399-403.
- [8] 龙家茹. 乙酰甲胺磷高效降解菌的筛选与鉴定 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35 (35): 11504-11505.
LONG Jia-ru. Screening and identification of highly efficient acephate degrading bacteria [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35 (35): 11504-11505.
- [9] Li R, Guo X Q, Chen K, et al. Isolation of an isocarbophos-degrading strain of arthrobacter sp. scl-2 and identification of the degradation pathway [J]. *Journal Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19 (11): 1439-1446.

- [10] Wang L, Wen Y, Guo X Q, et al. Degradation of methamidophos by *Hyphomicrobium* species MAP-1 and the biochemical degradation pathway[J]. *Biodegradation*, 2010, 21:513-523.
- [11] 黄星, 潘继杰, 孙纪全, 等. 降解菌 S113 对甲磺隆污染土壤生物修复作用的研究[J]. 土壤学报, 2008, 45(1):150-154.
HUANG Xing, PAN Ji-jie, Sun Ji-quan, et al. Bioremediation of metsulfuron-methyl-contaminated soil by S113[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(1):150-154.
- [12] Tabatabai M A. Methods of soil analysis: Microbiological and biochemical properties[M]. Madison: Soil Science Society of American, 1994: 236-268.
- [13] 李晓慧. 毒死蜱降解菌的分离、降解菌 *mpd* 基因的克隆、定向进化及其对毒死蜱污染环境的修复研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
Li X H. Isolation of Chlorpyrifos degrading bacteria, cloning of *mpd* gene and its direct evolution, and bioremediation of Chlorpyrifos contamination[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [14] Meikle A, Amin-Hanjani S, Glover L A, et al. Matric potential and the survival and activity of a *Pseudomonas fluorescens* inoculum in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(7):881-892.
- [15] Molina L, Ramos C, Duque E, et al. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(3):315-321.
- [16] Arthur L K. Microbial physiology and ecology of slow growth[J]. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(3):305-318.
- [17] Eguchi M, Nishikawa T, MacDonald K, et al. Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1996, 62(3):1287-1294.
- [18] Joo H S, Ndegwa P M, Shoda M, et al. Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156(3):891-896.
- [19] 徐莉, 滕应, 李振高, 等. 不同强化调控措施对多氯联苯污染土壤的修复效应[J]. 土壤学报, 2010(4):646-651.
XU Li, TENG Ying, LI Zhen-gao, et al. Effects of different enhanced controlling measures on bioremediation of polychlorinated biphenyl polluted soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2010(4):646-651.
- [20] 王莉. 甲胺磷降解菌株的分离鉴定、降解特性及菌株 MAP-1 的应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
WANG Li. Isolation, identification and degradation characteristics of methamidophos degrading strains and application studies of strain MAP-1[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [21] Gu Y, Wang P, Kong C H. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2009(45):436-441.
- [22] Chaperon S, Sauvé S. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39:2329-2338.
- [23] 和文祥, 蒋新, 余贵芬. 杀虫双对土壤脲酶活性特征的影响[J]. 土壤学报, 2003, 40(5):750-755.
HE Wen-xiang, JIANG Xin, YU Gui-fen. Effect of dimehypo on soil urease activity[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(5):750-755.