

张 虹,阳 辉,代金霞. 多菌灵降解细菌降解能力的影响因素[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):374-376.

多菌灵降解细菌降解能力的影响因素

张 虹,阳 辉,代金霞

(宁夏大学生命科学学院,宁夏银川 750021)

摘要:采用富集培养及划线纯化法,从长期喷洒多菌灵的花卉土壤中筛选到 1 株有效降解多菌灵的细菌。经形态观察和生理生化试验,鉴定该菌为副球菌属 djj-1。在最适接种量 3%~5%、温度为 25~30℃、pH 值为 7 的条件下,多菌灵降解率可达 90.34%。在初始 pH 值为 5、9 的多菌灵无机盐培养基中培养 6 d 后,测得降解后的培养液 pH 值均为 7。

关键词:多菌灵;分离鉴定;降解能力

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002Q939.96-1302(2013)11-0374-03

多菌灵(carbendazim)化学名称为苯并咪唑-2-氨基甲酸甲酯,是一种广谱、内吸性苯并咪唑类杀菌剂,被广泛用于蔬菜、果树等多种作物的病害防治^[1]。多菌灵化学性质稳定,降解过程缓慢,易产生累积效应。研究表明,即使是少量的多菌灵也可直接或间接威胁动物和人,对哺乳动物产生致癌、致畸作用^[2-3];过量的多菌灵还会导致植物酚类物质积累,降低植物对病原物的防御能力^[4]。微生物降解是去除多菌灵的主要方法^[5],目前关于多菌灵降解微生物的报道还较少。本研究探讨多菌灵高效降解菌的降解能力、降解条件,旨在为降解多菌灵提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2013-04-23
基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金(编号:NZ12152)。
作者简介:张 虹(1981—),女,宁夏中宁人,硕士,讲师,从事微生物学研究。E-mail:cxbnh@126.com。

采自长期喷洒多菌灵的花卉培养土层(2~6 cm)的多菌灵供试样品,纯度为 98%的多菌灵标准品(Adamas 公司),50%多菌灵悬浮剂(河南省金亮精细化工有限公司)。富集培养基、降解试验用培养基参照文献[6]的方法,分离纯化培养基另加(NH₄)₂SO₄ 2.000 g、琼脂 16~20 g,蒸馏水 1 000 mL,多菌灵按需加入。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与鉴定 在 100 mL 多菌灵浓度为 100 mg/L 的富集培养基中加入 5 g 新鲜土样,30℃ 150 r/min 摇床培养 5 d,吸取上清液 5 mL,接到 100 mL 多菌灵浓度为 200 mg/L 的富集培养基中,相同条件下培养 5 d,如此按每次 100 mg/L 的提高量增加多菌灵浓度,直至多菌灵浓度为 500 mg/L。取最后一次的富集培养液进行梯度稀释,涂布于多菌灵浓度为 400 mg/L 的分离纯化培养基平板上,30℃ 下培养至平板出现单菌落,挑选有透明圈的菌落,在分离纯化培养基平板上划线分离,得到纯种菌株,4℃ 保存斜面。对分离纯化培养基上透明圈较大的纯种菌株充分活化后

续表 1

目	科	种
螳螂目 Mantodea	螳螂科 Mantidae	中华大刀螳 <i>Paratenodera sinensis</i> (Saussure) 巨斧螳螂 <i>Hierodula patellifera</i> Serville 棕污斑螳 <i>Statilia maculata</i> (Thunberg) 小刀螳 <i>Statilia</i> sp.
半翅目 Hemiptera	盲蝽科 Miridae	黑肩绿盲蝽 <i>Cyrtorhinus lividipennis</i> Reuter
	猎蝽科 Reduviidae	黄足猎蝽 <i>Sirthena flavipes</i> (Stål)
	花蝽科 Anthoridae	黑红猎蝽 <i>Haematoloecha nigrorufa</i> (Stål) 微小花蝽 <i>Oriu minuius</i> Linnaeus

[6]中国科学院动物研究所. 中国农业昆虫[M]. 北京:农业出版社,1986.

[7]萧刚柔. 中国森林昆虫[M]. 2 版. 北京:中国林业出版社,1992.

[8]严静君,徐崇华,李广武,等. 林木害虫天敌昆虫[M]. 北京:中国林业出版社,1989.

[9]赵建铭. 中国动物志·昆虫纲(第二十三卷)双翅目:寄蝇科(一)[M]. 北京:科学出版社,2001.

[10]林永范. 中国主要农作物害虫天敌种类[M]. 北京:中国农业出版社,1998.

[11]陈善齐,齐兆生. 中国农作物病虫害[M]. 北京:农业出版社,1991.

[12]郑乐怡,归 鸿. 昆虫分类学[M]. 南京:南京师范大学出版社,1999.

[13]黄其林,田立新,杨莲芳. 农业昆虫鉴定[M]. 上海:上海科学技术出版社,1984.

[14]万方浩,王 韧,叶正楚. 我国天敌昆虫产品产业化的前景分析[J]. 中国生物防治,1999,15(3):135-138.

进行菌体形态鉴定和生理生化试验^[7]。

1.2.2 生长曲线测定 从含多菌灵的分离纯化培养基上挑取单菌落接入 100 mL 牛肉膏蛋白胨培养基中, 30 ℃ 150 r/min 培养 24 h, 作为母液。制备 10 瓶牛肉膏蛋白胨培养基, 每瓶含有 100 mL 培养基, 1 瓶不加菌作对照, 另外 9 瓶分别加 3 mL 母液, 30 ℃ 150 r/min 培养, 定时按顺序取样, 测定不同培养时间下培养基的 $D_{600\text{ nm}}$, 每处理重复 3 次, 绘制菌株生长曲线。取处于稳定生长期的液体菌种作为种子液, 进行多菌灵降解试验。

1.2.3 不同因素对 djj-1 多菌灵降解菌降解能力的影响 采用单因素试验, 分析培养时间、接种量、培养液初始 pH 值、温度、碳氮源等各因素对 djj-1 多菌灵降解菌降解能力的影响。应用三波长校正法^[8], 测定 278、281、290 nm 下培养液中多菌灵吸光度, 计算校正吸光度, 绘制多菌灵浓度标准曲线。

1.3 数据处理

运用 DPS 14.5 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

用 400 mg/L 多菌灵的分离纯化培养基进行分离纯化, 利用透明圈法筛选出 4 株菌, 其中细菌 3 株, 真菌 1 株, 将透明圈较大的菌株命名为 djj-1。djj-1 菌株在牛肉膏蛋白胨平板培养基上培养 24 h 后, 菌落直径较小, 呈奶白色, 表面光滑、湿润, 边缘整齐、圆形。显微镜下菌体呈杆状, 单个存在或成对存在, 静止期呈球形, 无芽孢, 好氧, 革兰氏染色为 G^- , 接触酶反应阳性, 甲基红阴性, 明胶不液化, 不能利用糖类, 可利用柠檬酸盐, 初步鉴定为副球菌属。

2.2 降解菌的生长曲线

将 djj-1 单菌落接种于牛肉膏蛋白胨培养基中, 每隔 2 h 取样 1 次, 用紫外分光光度计测定其 $D_{600\text{ nm}}$, 连续测定 12 h, 绘制菌株生长曲线。由图 1 可知, djj-1 菌接入新鲜培养液 1 h 后进入对数生长期, 7 h 后达到稳定期。由此可知, djj-1 菌株处于稳定生长期的时间为 7~10 h。

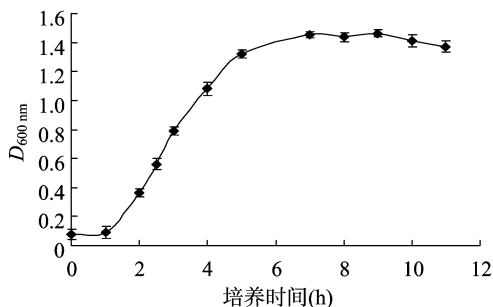


图1 djj-1菌株生长曲线

2.3 培养时间对菌株降解能力的影响

将培养至稳定期的 djj-1 种子液按 5% 接种量接入 200 mg/L 多菌灵降解培养基中, 30 ℃ 150 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 取样 1 次, 采用三波长校正法测定降解液中多菌灵浓度。由图 2 可知, 前 2 h 是 djj-1 菌株的延滞期, 培养 3 d 时多菌灵降解率达 21.36%, 培养 5 d 时多菌灵降解率达 87.92%, 培养 5 d 后降解率不再变化。

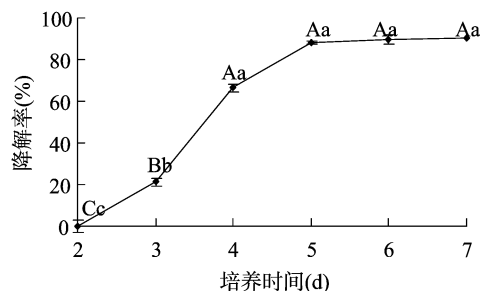


图2 培养时间对降解率的影响

2.4 接种量对菌株降解能力的影响

分别按 1%、3%、5%、7%、10% 接种量将 djj-1 菌种子液接入降解培养基中, 30 ℃ 150 r/min 振荡培养 6 d。由图 3 可知, 当接种量为 3%~5% 时, 多菌灵降解率最高, 为 90.35%。当接种量为 1%、3%、5% 时, 多菌灵降解率均极显著高于 7%、10% 的降解率; 当接种量为 7% 时, 多菌灵降解率极显著高于 10% 的降解率; 当接种量为 3%、5% 时, 多菌灵降解率显著高于 1% 的降解率。

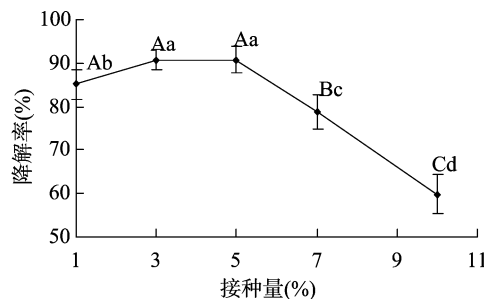


图3 接种量对多菌灵降解率的影响

2.5 初始 pH 值对菌株降解能力的影响

将 djj-1 种子液按 5% 接种量分别接入初始 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10 的降解培养基中培养 6 d。由图 4 可知, 当初始 pH 值为 4~9 时, 多菌灵降解率为 83.61%~90.35%。当初始 pH 值为 6 时, 多菌灵降解率极显著高于 4、9、10 组; 当初始 pH 值为 7 时, 多菌灵降解率极显著高于 9、10 组 ($P < 0.01$), 显著高于 4 组 ($P < 0.05$); 当初始 pH 值为 5 时, 多菌灵降解率极显著高于 10 组 ($P < 0.01$), 显著高于 9 组 ($P < 0.05$); 当初始 pH 值为 4、8、9 时, 多菌灵降解率极显著高于 10 组 ($P < 0.01$)。由此可知, 初始 pH 值对 djj-1 菌株降解多菌灵能力影响不大。

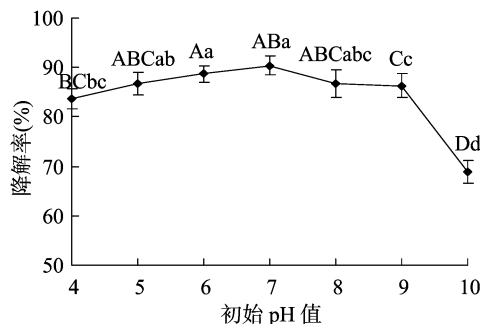


图4 初始 pH 值对多菌灵降解率的影响

2.6 培养温度对菌株降解能力的影响

按 5% 接种量将 djj-1 种子液接入降解培养基中, 分别

在 20、25、30、35、40、45 ℃ 下 150 r/min 振荡培养 6 d。由图 5 可知,25~30 ℃ 时,多菌灵降解率最高达 90.35%。25、30 ℃ 下,多菌灵降解率极显著高于其他各组 ($P < 0.01$);35、40 ℃ 下,多菌灵降解率极显著高于 45、20 ℃ 组 ($P < 0.01$);45 ℃ 下,多菌灵降解率极显著高于 20 ℃ 组 ($P < 0.01$)。

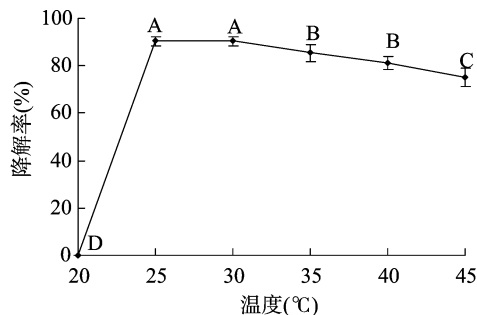


图5 温度对多菌灵降解率的影响

2.7 碳氮源对菌株降解能力的影响

向降解培养基中分别加入 4% 尿素、淀粉、葡萄糖、酵母,培养 3 d。由图 6 可知,向降解培养基中加入碳氮源,能够诱导该菌种降解多菌灵,添加酵母提取物后,多菌灵降解率培养 3 d 时为 93.65%,显著高于淀粉组 ($P < 0.05$),其他各组之间差异不显著。

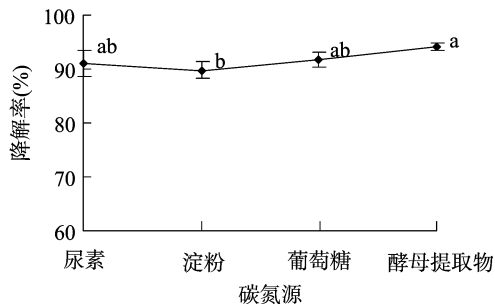


图6 外加碳氮源对多菌灵降解率的影响

2.8 djj-1 菌株与其他菌株混合培养后对多菌灵降解率的影响

将乳白杆菌、黄色球菌、真菌 3 株菌株分别与 djj-1 菌株混合培养后接入降解培养基中培养 6 d。由图 7 可知,3 种菌株与 djj-1 菌株混合培养后,多菌灵降解率都有所下降,尤其当 4 种菌株同时混合培养后,多菌灵降解率明显下降,极显著低于其他各组 ($P < 0.01$),其他各组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。说明混合菌降解多菌灵可能存在拮抗作用。

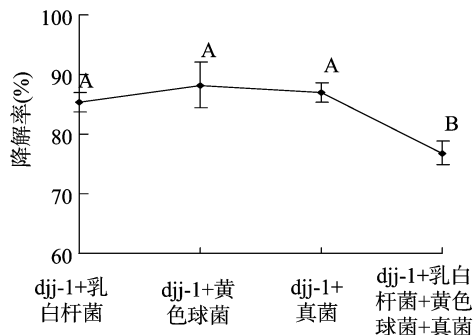


图7 其他菌株与 djj-1 菌株混合处理对多菌灵降解率的影响

3 结论与讨论

微生物降解是消除多菌灵污染的有效手段。张世恒等报道了 1 株多菌灵高效降解菌,该菌株在 30 ℃、pH 值为 7.0 条件下培养 64 h 后,对多菌灵的降解率可达 100%^[9]。王军玲等分离到 1 株红平球菌,在 30 ℃、pH 值为 6.0、补加葡萄糖和酵母粉作碳氮源的条件培养 72 h 后,对多菌灵的降解率达 90.07%^[10]。林秀等分离得到 1 株红串球菌,在多菌灵无机盐培养基中培养 11 d 后,对多菌灵的降解率为 99%,但未报道其 pH 值、温度适应性^[11]。本研究筛选出的菌株 djj-1 对多菌灵的降解效率相对较高且更为稳定,pH 值和温度适应性更好。该菌株在以多菌灵为唯一碳氮源时,培养 3 d 后,多菌灵降解率为 21.36%;当添加尿素、淀粉、葡萄糖、酵母提取物作为额外碳氮源时,培养 3 d 后,多菌灵降解率分别为 91.05%、89.04%、92.39%、93.65%,由此可见外加碳氮源可明显缩短降解时间,提高降解效率。多菌灵的降解是由多种微生物协调完成的,这些微生物相互共生,形成一个降解多菌灵的微生物体系。本试验将 djj-1 菌株与分离得到的其他 3 种菌株分别按 1:1 比例混合接入降解培养基中,3 种菌株与 djj-1 菌株混合培养 6 d 后,多菌灵降解率都有所下降,尤其当 4 种菌株同时混合培养后,多菌灵降解率明显下降。采用多种微生物复配高效稳定降解多菌灵还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 冯 坚. 英汉农药名称对照[M]. 北京:化学工业出版社,2003: 67-79.
- [2] Pattanasupong A, Nagase H, Sugimoto E, et al. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2004, 98(1): 28-33.
- [3] Sarraf A M, Arce G T, Krahn D F, et al. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the *Salmonella*/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities[J]. Mutation Research, 1994, 321(1/2): 43-56.
- [4] García P C, Ruiz J M, Rivero R M, et al. Is the application of carbendazim harmful to healthy plants? Evidence of weak phytotoxicity in tobacco[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(2): 279-283.
- [5] Yarden O, Salomon R, Katan J, et al. Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1990, 36(1): 15-23.
- [6] 黄玉杰, 张新建, 任 艳, 等. 多菌灵降解菌的分离、鉴定及其降解特性研究[J]. 山东科学, 2011, 24(2): 28-34.
- [7] 田连生, 陈 菲. 多菌灵降解菌 T8-2 的分离及其降解条件研究[J]. 江苏农业科学, 2008(6): 271-274.
- [8] 于彦彬, 苗在京, 万述伟, 等. 三波长校正光度法测定水果蔬菜中多菌灵残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2005, 41(5): 353-354, 357.
- [9] 张世恒, 张建新, 钟 丹. 多菌灵降解菌的分离与降解特性研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(2): 262-265.
- [10] 王军玲, 秦宝福, 呼世斌, 等. 多菌灵降解菌的筛选及降解特性初步研究[J]. 中国土壤与肥料, 2010(3): 73-77.
- [11] 林 秀, 侯振安, 赵思峰, 等. 多菌灵降解菌 XJ-D 的分离鉴定及特性研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(16): 220-226.