

李 珣,尚建超,蓝 潇,等. 毒死蜥降解菌的筛选及降解特性[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):479-481.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.134

毒死蜥降解菌的筛选及降解特性

李 珣,尚建超,蓝 潇,田学军,沈登荣

(红河学院生命科学与技术学院/云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室,云南蒙自 661199)

摘要:为寻找有机磷农药的快速降解途径,采集污染严重的土样,以毒死蜥为底物,采用梯度驯化法筛选得到菌株 CJC-3,并研究该菌株对毒死蜥及其他 4 种常用有机磷农药(敌敌畏、辛硫磷、乙酰甲胺磷、草甘膦)的降解特性。结果表明,CJC-3 对毒死蜥的最佳降解条件:温度为 28 ℃,培养时间为 48 h,农药浓度为 2 000 mg/L,降解率达 76.03%。优化 CJC-3 对其他有机磷农药的降解条件后,降解率分别为敌敌畏 50.47%、辛硫磷 65.29%、乙酰甲胺磷 26.15%、草甘膦 36.12%,表明该菌株对有机磷杀虫剂和有机磷除草剂均有一定的降解效果,适用于有机磷农药的普遍降解。

关键词:毒死蜥;有机磷农药;降解菌;降解特性

中图分类号: X592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0479-03

据报道,2013 年我国农药总使用量达到 12 万 t,其中有有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类农药使用量分别为 86 300、5 800、3 600 t^[1]。有机磷类农药已成为三大支柱之一,在世界的农药市场上有着十分重要的地位^[2]。其中,毒死蜥是当今有机磷农药中的代表性品种,在我国约有 15% 的农药厂家拥有毒死蜥相关产品,按每个品种的平均原药需求量 10~15 t 计算,我国约有 6 000~9 000 t 的原药需求量^[3]。农药的使用在带来农业增产、农民增收的同时,农药残留已成为严重危害人类生命健康的主要因素之一,如何消除其对生态环境造成的不良影响就成为了不得不考虑的问题。目前根据国内外的研究,认为微生物降解是解决其残留污染的有效途径^[4],如董庆龙等通过改良定向培育法,驯化筛选到毒死蜥降解菌 CAS17,当毒死蜥浓度为 100 mg/L 以下时,降解率可达到 67% 左右^[5]。冯发运等从农药厂废液池旁采集小飞蓬植物,提取植物汁液后以毒死蜥作为唯一碳源的无机盐培养基连续筛选,得到 1 株高效降解菌 XFP-gy,当毒死蜥浓度为 10 mg/L 时,9 d 可完全降解毒死蜥,实现无残留^[6]。本试验通过驯化、筛选得到毒死蜥降解菌,并探索其降解特性以提高对毒死蜥的降解率,同时还研究了该菌株对其他常用有机磷农药包括杀虫剂和除草剂的降解效果,期望为有机磷农药的广泛修复提供一定参考^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样 云南曲靖蔡家冲复合化肥厂周边土壤,采用五点采样法。

收稿日期:2015-07-27

基金项目:红河学院科研基金(编号:XJ15Y23);大学生创新创业训练计划(编号:DCXL1307);云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费;红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介:李 珣(1986—),女,云南个旧人,硕士,助教,主要从事农药学方向研究。E-mail:xun_76776@126.com。

1.1.2 培养基 (1)基本培养基:葡萄糖 2.5 g、柠檬酸三钠 0.5 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g、 KH_2PO_4 3.0 g、 K_2HPO_4 7.0 g、 MgSO_4 0.1 g、 H_2O 500 mL、琼脂 10.0 g,121 ℃高压蒸气灭菌 30 min。(2)无机盐培养基: MgSO_4 0.2 g、 NH_4NO_3 1.0 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 CaCl_2 0.1 g、 KH_2PO_4 0.5 g、NaCl 0.2 g、 MnSO_4 痕量、 FeCl_2 痕量、 H_2O 1000.0 mL,121 ℃高压蒸气灭菌 30 min。(3)富集培养基:蛋白胨 10.0 g、氯化钠 5.0 g、牛肉膏 5.0 g、琼脂 20.0 g、 H_2O 1000.0 mL,121 ℃高压蒸气灭菌 30 min^[8-10]。

1.2 方法

1.2.1 菌种驯化 取 5.0 g 土样,用含毒死蜥 4 mg/L 的无机磷培养基于 30 ℃、170 r/min 条件下振荡培养 48 h;取 10% 转接至新鲜无机磷培养基中并将农药浓度提高 1 倍,再继续培养 48 h;随后加入 5 mL 含有机磷农药的原液,培养 5 个周期,共 240 h^[9-10]。

1.2.2 菌种分离纯化 取 100 μL 驯化得到的土壤悬浊液涂布于基本培养基表面,经培养后观察,挑取不同形态的菌落,分离纯化。配置毒死蜥浓度为 8 mg/mL 选择培养基,将分离纯化后的降解菌菌株接种于选择培养基上,保存备用^[9-10]。

1.2.3 CJC-3 菌株形态特征和主要生理生化特征 参照《伯杰氏细菌鉴定手册》对 CJC-3 的菌落形态特征及主要生理生化特征进行试验和观察记录^[11-12]。

1.2.4 CJC-3 对毒死蜥的降解特性研究 分别研究培养时间、温度、毒死蜥浓度、接种量对 CJC-3 降解的影响因素,以确定其最佳降解条件与最大降解率。设置时间梯度分别是 6、12、18、24、36、48、60、72 h;温度梯度分别是 25、28、30、35、40 ℃;毒死蜥农药浓度分别是 500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000 mg/L;接种量分别为 0.5%、1%、5%、10%、20%。按上述条件将培养管置于恒温摇床中 170 r/min 培养,得出最佳降解条件,利用钼锑抗法测定复合菌剂的降解率^[9-10,13]。

1.2.5 CJC-3 对其他常用有机磷农药的降解特性研究 分别设置培养时间 24、36、48、60、72 h;培养温度 20、24、28、32、36 ℃;敌敌畏浓度 20、40、60、80、160、240、320、400、480 mg/L;辛硫磷浓度 100、140、180、220、260、300、340、

380 mg/L;乙酰甲胺磷浓度 60、120、180、240、300、360、420、480、540 mg/L;草甘膦浓度 40、80、120、160、200、240、280、320 mg/L。将培养管置于恒温摇床中 170 r/min 培养,测定降解效率,得出最佳降解条件^[7,10,13]。

2 结果与分析

2.1 降解菌的分离纯化

经过分离、纯化得到 1 株高效降解菌,编号为 CJC-3。

2.2 CJC-3 菌株形态特征和主要生理生化特征

经初步生理生化鉴定后,CJC-3 于选择培养基上的单菌落呈圆形,表面光滑湿润,菌体隆起,边缘整齐不透明。初生时为白色,生长时间较长后为乳白色,菌体挑取时有黏着性,划线时不易划开,菌体常多个连在一起,呈短杆状,菌体平均直径为 4.70 μm ,革兰氏反应呈阳性,存在芽孢和荚膜,为好氧菌。

2.3 CJC-3 菌株对毒死蜱的降解特性

2.3.1 毒死蜱降解时间优化 如图 1 所示,当降解时间较短时,CJC-3 菌株数量少、生长缓慢,菌株降解活性低,随着降

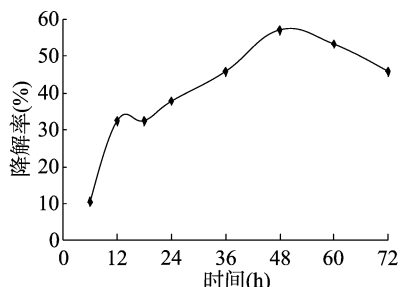


图1 CJC-3降解菌株降解毒死蜱时间优化

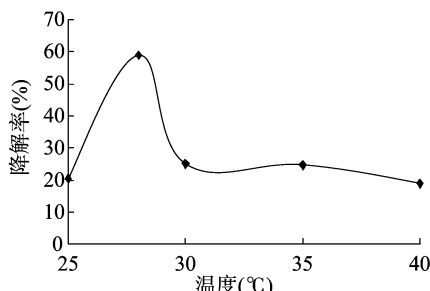


图2 CJC-3降解菌株降解毒死蜱温度优化

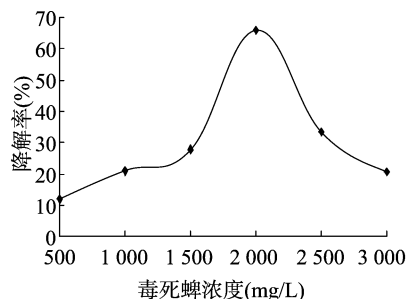


图3 CJC-3降解菌株降解毒死蜱浓度优化

2.3.4 降解菌最佳接种量 如图 4 所示,CJC-3 降解菌株接种量为 0.5%~5% 时降解率迅速提升,接种量至 5% 后,继续增加接种量降解率提升效率变化不明显,因此最适接种量为 5%。

综合上述最优条件,在温度 28 $^{\circ}\text{C}$ 、培养时间 48 h、农药浓度为 2 000 mg/L、接种量为 5% ($D_{600\text{nm}}=1$) 的条件下,CJC-3 菌株的降解率最高值可达到 76.03%。

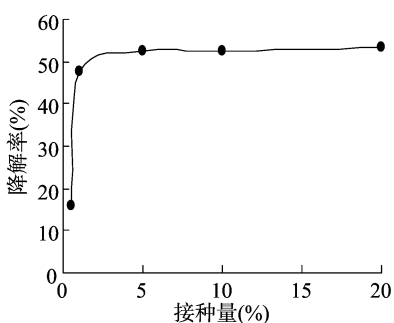


图4 CJC-3降解菌株降解毒死蜱接种量优化

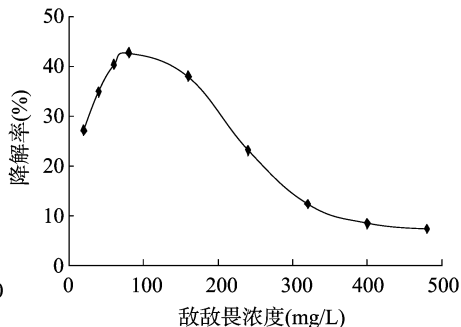


图5 敌敌畏浓度对CJC-3降解率的影响

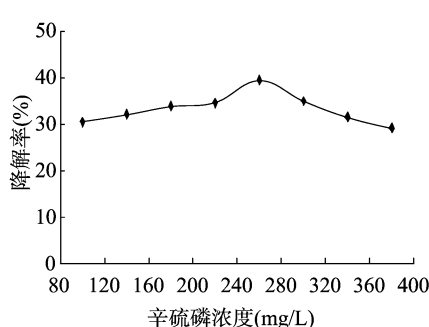


图6 辛硫磷浓度对CJC-3降解率的影响

如图 7 所示,乙酰甲胺磷浓度在 240 mg/L 时 CJC-3 菌株对乙酰甲胺磷的降解率最佳,为 24.15%。

如图 8 所示,草甘膦浓度在 120 mg/L 时 CJC-3 菌株对草甘膦的降解效果最佳,为 15.32%。

综合上述,农药浓度对 CJC-3 菌株降解效果有显著的

影响。CJC-3 菌株对这 4 种农药的降解率,随着农药浓度的升高降解率逐渐升高,当农药浓度达到最适浓度时,降解率达到最大,最后随着农药浓度升高而逐渐减小。当农药浓度超过菌体所能承受的浓度后,菌体逐渐裂解死亡,降解率逐渐减小。

2.3.2 毒死蜱降解温度优化 如图 2 所示,CJC-3 降解菌株在低温和高温时降解率低至 18.90%,分析可能因高温和低温环境下抑制酶活性,不能有效地降解毒死蜱,在温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 时降解率最高,温度达 30 $^{\circ}\text{C}$ 时降解率骤降。最终温度优化试验结果显示:当降解温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 时,降解率最高,为 58.80%。

2.3.3 毒死蜱浓度优化 如图 3 所示,低浓度毒死蜱培养时,CJC-3 降解菌株菌体降解能力弱,当毒死蜱浓度自 500 mg/L 逐渐上升至 2 000 mg/L 时,降解率达到最高,当毒死蜱浓度再升高时,降解率下降,毒死蜱浓度优化试验结果:CJC-3 降解菌株在毒死蜱浓度为 2 000 mg/L 时,降解率最高,为 65.85%。

2.4 CJC-3 对其他常用有机磷农药的降解特性

2.4.1 有机磷农药浓度对 CJC-3 降解效果的影响 设置敌敌畏浓度分别是 20、40、60、80、160、240、320、400、480 mg/L。如图 5 所示,敌敌畏浓度在 80 mg/L 时 CJC-3 菌株降解敌敌畏效果最好,降解率为 42.72%。

如图 6 所示,辛硫磷浓度在 260 mg/L 时 CJC-3 菌株对辛硫磷的降解最好,为 39.54%。

影响。CJC-3 菌株对这 4 种农药的降解率,随着农药浓度的升高降解率逐渐升高,当农药浓度达到最适浓度时,降解率达到最大,最后随着农药浓度升高而逐渐减小。当农药浓度超过菌体所能承受的浓度后,菌体逐渐裂解死亡,降解率逐渐减小。

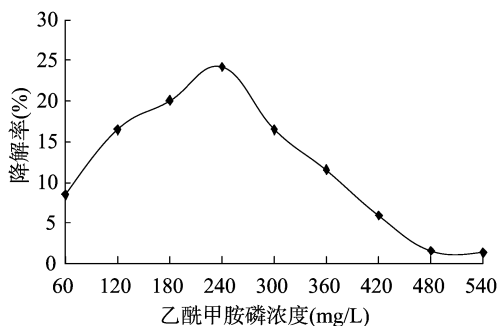


图7 乙酰甲胺磷浓度对CJC-3降解率的影响

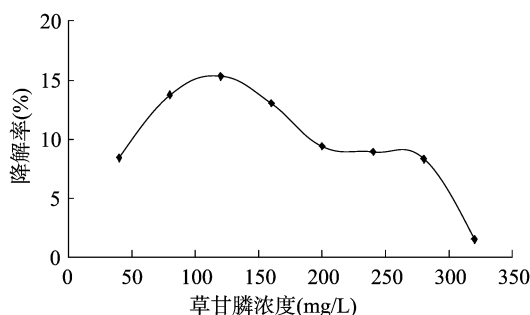


图8 草甘膦浓度对CJC-3降解率的影响

2.4.2 温度对CJC-3降解效果的影响 每种有机磷农药分别设置了5个温度梯度:20、24、28、32、36℃,通过测定培养温度对CJC-3菌株降解4种有机磷农药的降解率变化和影响,如图9所示。

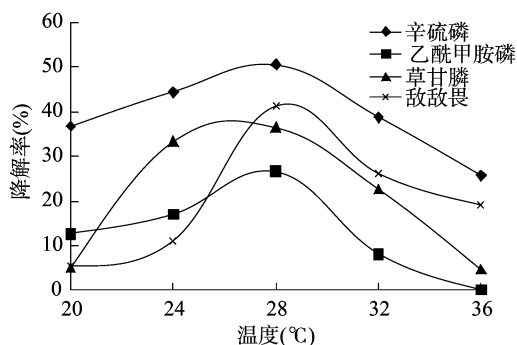


图9 培养温度对CJC-3降解率的影响

CJC-3菌株在4种有机磷农药中表现一致,在20~28℃之间随着温度升高而逐渐增大。在28℃时达到最大,在28~36℃之间随着温度升高而降低。在28℃下,4种农药降解率分别为:草甘膦36.12%、敌敌畏41.54%、辛硫磷50.95%、乙酰甲胺磷26.15%。

2.4.3 培养时间对CJC-3降解效果的影响 分别测定4种有机磷农药条件下,培养时间对CJC-3降解效果的影响。试验结果表明,CJC-3菌株对草甘膦、敌敌畏、乙酰甲胺磷的降解率,随着培养时间的增加降解率逐渐增大。在48h降解率达到最大,分别为:草甘膦35.21%、敌敌畏50.47%、乙酰甲胺磷23.4%,之后随着培养时间的增加降解率逐渐减小,辛硫磷在60h降解率达到最大,为65.29%(图10)。

3 结论与讨论

以毒死蜱为底物,采用梯度驯化法筛选得到菌株CJC-

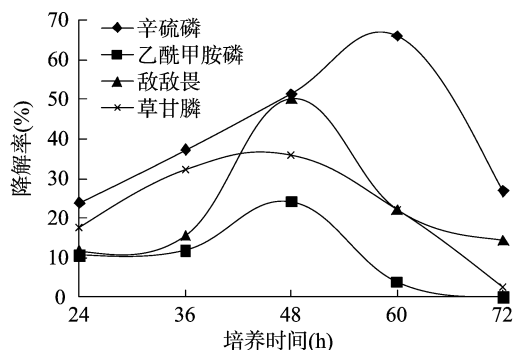


图10 培养时间对CJC-3降解率的影响

3。通过降解特性研究,CJC-3对毒死蜱的最佳降解条件为:温度28℃、培养时间48h、农药浓度为2000mg/L,降解率达76.03%。然而,在实际农业生产中,为保证有效防治有害生物,常常施用多种农药。为更好地发挥CJC-3降解菌的广泛应用性,试验还研究了CJC-3对敌敌畏、辛硫磷、乙酰甲胺磷3种有机磷杀虫剂以及1种有机磷除草剂草甘膦的降解特性。结果表明,CJC-3菌株对4种农药的降解率从大到小依次为:辛硫磷65.29%、敌敌畏50.47%、草甘膦36.12%、乙酰甲胺磷24.15%,证明该菌株对有机磷农药具有广泛的降解特性,除可降解有机磷杀虫剂外,对有机磷除草剂也有一定降解作用,可作为农药残留控制的新途径,为修复有机磷农药污染的土壤提供了有效参考。

参考文献:

- [1]李慧珍,韦燕莉,游静.我国南方不同功能区域水体沉积物中常见农药的分布及毒性风险[J].吉林大学学报:地球科学版,2015,45(1):1508-1527.
- [2]贺红武.有机磷农药产业的现状与发展趋势[J].中国农药,2008,30(6):29-33.
- [3]姜书凯.毒死蜱产业发展现状和前景[J].农化新世纪,2008(6):23-24.
- [4]郑永权.农药残留研究进展与展望[J].植物保护,2013,39(5):90-98.
- [5]董庆龙,刘嘉芬,安森,等.嗜铁细菌CAS17的分离鉴定及其对毒死蜱的降解特性研究[J].环境科学学报,2014,34(1):136-142.
- [6]冯发运,朱宏,李俊领,等.一株小飞蓬内生毒死蜱降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J].农药学报,2015,17(1):89-96.
- [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]曹锐.毒死蜱及TCP对生物DNA损伤和土壤微生物多样性的影响[D].泰安:山东农业大学,2009.
- [9]唐亮.降解有机磷农药微生物的筛选及降解条件研究[D].重庆:西南大学,2008.
- [10]明惠青.有机磷农药降解菌的筛选及降解特性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2006.
- [11]布瑞德.伯杰细菌鉴定手册[M].8版.北京:科学出版社,1984.
- [12]叶磊,杨学敏.微生物检测技术[M].北京:化学工业出版社,2009:141-142.
- [13]李依韦,银玲,薛兰兰.甲磺隆降解菌的降解特性及降解体系[J].江苏农业科学,2011,39(6):614-616.