

田连生. 温室大棚土壤生物修复剂的菌种选育及应用效果[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(12): 246–249.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.050

温室大棚土壤生物修复剂的菌种选育及应用效果

田连生

(扬州工业职业技术学院, 江苏扬州 225127)

摘要:采用紫外线诱导和化学诱变相结合的方法,对生防木霉 T11 菌株进行选育得到 T11-5-2 变异菌株。该菌株在多菌灵浓度为 100 mg/L 的无机盐培养基中,于 25 ℃,200 r/min 条件下振荡培养,用 HPLC-MS 检测显示,处理 2 d 的培养液中检测出多菌灵和 3 种代谢产物;处理 5 d 的培养液经检测未发现多菌灵和代谢产物;以玉米秸秆为原料,在温度为 25 ℃ 条件下固体发酵 6 d,制成生物修复剂。该修复剂可有效降解 5 种常用农药,并对黄瓜灰霉病的活体防治效果达到 79.5%,优于化学农药多菌灵。

关键词:温室大棚;木霉;生物修复;代谢物;多菌灵

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0246-03

由于温室大棚的不易迁移和常年重茬种植同一种作物,土壤中大量土传病原菌滋生繁殖,易引发植物病害。而病害的频繁发生,又促使农民用药次数增加,致使土壤中农药残留升高,形成恶性循环,导致棚内土壤生态平衡受到严重破坏。笔者对蔬菜大棚内土壤采用多点采样进行检测分析,然后与同一地未建大棚的耕地土壤检测数据比较,发现棚内土壤中的农药残留量是非大棚耕地的 3.6 倍,而细菌、放线菌、霉菌等微生物种群却减少 4~6 倍。可见,化学农药的大量、重复使用,使土壤中的农药残留量大幅增加,不仅使生产的农产品残留超标,而且还破坏了土壤的微生态平衡,导致微生物数量大幅减少。随着人们生活水平的提高,对食品安全和环境安全也提出了更高要求。无药物残留、无副作用的绿色农副产品越发受到人们青睐。因此,对温室大棚内的土壤进行生物修复意义重大。目前,国内外对多菌灵降解菌的研究多集中于细菌,且均为液体降解研究^[1-9]。

木霉(*Trichoderma* sp.) T11 菌株,是笔者所在实验室分离出的高效生防真菌菌株,对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、镰刀菌(*Fusarium* spp.)等多种土传病原菌具有良好的抑制作用;通过药物驯化、紫外线诱导和化学诱导相结合的方法,对筛选出的生

防木霉 T11 菌株进行改良,得到 T11-5-2 木霉变异菌株。使其在保持对多种病原菌有良好拮抗性的同时,对速克灵、多菌灵等化学农药残留有显著的降解效果,可使生产的蔬菜等农产品有害残留量大幅降低,达到绿色食品标准。农药残留被降解为二氧化碳和水,对环境不会造成二次污染,同时,还可以防治农作物灰霉病、枯萎病、霜霉病等常见和多发病害,使土壤修复、农药残留降解和土传病害的防治有机结合,从而大幅提高劳动生产效率、降低成本,有效提高大棚蔬菜的经济效益,有较高的应用前景和推广价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料主要有木霉(*Trichoderma* sp.) T11 降解菌株,由笔者所在实验室在农药厂土壤中分离、选育得到;50%多菌灵可湿性粉剂,由江苏靖江农药厂提供;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,15 g 琼脂,1 000 mL 水,pH 值自然;PDA 药物培养基:把 PDA 培养基熔化后,加入一定量多菌灵粉剂混合均匀后倒入平板制得;无机盐培养基:5.710 g K_2HPO_4 , 1.700 g KH_2PO_4 , 2.630 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.095 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.050 g $MnSO_4$, 0.05 g $FeSO_4$, 0.003 g $CaCl_2$, 1 000 mL 水,pH 值为 7.0;甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone,简称 EMS),由上海艾研生物科技有限公司提供。

1.2 紫外线多重诱导及药物驯化处理

在接种木霉菌株 T11 于 25 ℃ 恒温培养 5 d 的

收稿日期:2019-07-03

基金项目:扬州市科技局现代农业项目(编号:YZ2016037)。

作者简介:田连生(1962—),男,河北保定人,教授,主要从事生物农药及农药生物降解方面的工作。E-mail:lianshengt@163.com。

PDA 培养基平板上,加入 50 mL 无菌水,轻轻洗刷绿色分生孢子,制成 10^7 个/mL 孢子悬浮液。在含多菌灵 10 mg/L 的 PDA 药物培养基上涂抹 0.1 mL 上述孢子悬浮液。去盖在 20 W、波长为 253.7 nm 的紫外灯管下 30 cm 处,避光照射后立即用黑纸包好,放入 25 ℃ 恒温箱中培养。每次照射时间为 60 min。每个处理重复 3 次。统计平板上菌落数并将其转接到含 10 mg/L 多菌灵的 PDA 药物培养基上。选取生长迅速的变异木霉菌株,待产生大量绿色分生孢子后,再按上述方法配制孢子悬浮液,涂抹在含 20 mg/L 多菌灵 PDA 药物培养基上,进行第 2 次紫外线重复诱导和驯化处理。依此类推,逐步提高多菌灵浓度达到 1 500 mg/L,获降解性变异菌株 T11-5。

1.3 化学诱导处理

在接种木霉菌株 T11-5 于 25 ℃ 恒温培养 5 d 的 PDA 培养基平板上,刮取少量绿色分生孢子,用无菌生理盐水和 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲溶液(pH 值为 5.0)各洗涤 1~2 次后,将洗好的 T11-5 菌株分生孢子悬浮于含有 10 g/L 甲基磺酸乙酯的磷酸钾溶液(pH 值 = 5.0)中,25 ℃ 振荡处理 1~2 h。取 10 mL 处理后的悬液用 0.16 mol/L 硫代硫酸钠溶液稀释 10 倍终止反应,离心收集孢子,用无菌生理盐水洗涤后,加入无菌水,制成 10^7 个/mL 孢子悬浮液,取 0.1 mL 上述孢子悬浮液均匀涂在 PDA 培养基平板上,于 25 ℃ 恒温培养,从平板上挑取菌落较大的进行纯化。最后得到能在多菌灵浓度达到 2 000 mg/L 的 PDA 平板上良好生长的变异菌株 T11-5-2。

1.4 菌株 T11-5-2 对多菌灵降解

在无机盐培养基中加入 100 mg/L 多菌灵,以 5% 接种量接入木霉 T11-5-2 种子液,于 25 ℃、200 r/min 振荡培养。2、5 d 后分别取样 1 次,用液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)检测培养液中多菌灵及代谢产物含量^[10]。

1.5 对其他几种常用农药的降解

在 pH 值为 6.0 的无机盐培养基中分别加入 100 mg/L 多菌灵、速克灵、扑海因、甲基托布津、三唑酮,以 5% 接种量接入种子液,于 25 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 5 d,取样分别测定各自农药的残留量^[11]并计算降解率。每个处理重复 3 次。

多菌灵降解率计算公式如下:

$$N = (A - B) / A \times 100\%$$

式中: N 表示降解率; A 表示未接种子液的多菌灵含量; B 表示接种子液的多菌灵含量。

1.6 制备种子液

液体培养基:8~10 mL 马铃薯浸出液,0.2~0.4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.2~0.3 g K_2HPO_4 ,1 g CaCO_3 ,补加水至 1 000 mL,调节 pH 值至 6.0~6.5。取上述培养液 100 mL,高压灭菌 20~30 min。冷却后接入已活化好的木霉菌 T11-5-2 菌株,于 25~26 ℃、200 r/min 振荡培养,用分光光度计测量 $D_{600\text{nm}}$ 达到 0.30~0.35 停止液体发酵。发酵液作为种子液备用。

1.7 固体发酵

固体培养基:10 g 玉米秸秆粉(粉碎至 30~40 目),3 g 麸皮,0.8~0.9 g 葡萄糖,0.20~0.40 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.10~0.20 g KH_2PO_4 ,0.08~0.10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,1 000 mL 水,调节 pH 值至 6.0~6.5。高压灭菌 30 min,冷却后接入上述 T11-5-2 菌株种子液 100~130 mL,搅拌均匀,放在 25~26 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d,用血球计数板测量固体发酵物的分生孢子量达到 10^{10} 个/g,即可结束固体发酵出料,常温风干或使用真空干燥器控制温度在 45 ℃ 左右干燥。即可得到复合生物修复剂。

1.8 生物防效试验

经过固体培养基发酵获得木霉 T11-5-2 菌株分生孢子粉,把孢子粉和多菌灵可湿性粉剂用无菌水稀释 800 倍,各取一定量药液与等量灰霉菌孢子悬浮液(孢子浓度为 10^5 个/mL)混合均匀,然后喷施在盆栽黄瓜苗上。每盆种植 8 株津青 1 号黄瓜,每株留 3 片复叶,用药 10 mL/株。并喷施等量无菌水作空白对照。于 20 ℃ 恒温保湿 3 d,调查叶片发病情况,计算发病率和防治效果。每个处理 4 盆,重复 3 次。

发病率 = 感病株数 / 总株数 $\times 100\%$;

防治效果 = (对照发病率 - 用药发病率) / 对照发病率 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株 T11-5-2 对多菌灵的降解试验

对处理多菌灵 2 d 的培养液采用 HPLC-MS 分析,结果出现 4 个峰(图 1),结合相应的质谱分析认为,代谢产物 A 为 2-氨基苯腈、B 为 2-氨基苯并咪唑、C 为苯并咪唑、D 为未降解的残留多菌灵,保留时间分别为 1.42、1.81、2.42、3.14 min。而在对

T11-5-2 菌株处理多菌灵 5 d 的培养液进行 HPLC-MS 分析时,却未再检测出代谢产物和多菌灵残留(图 2)。说明 T11-5-2 菌株 5 d 已完全降解 100 mg/L 的多菌灵,且经过 10 次继代转接后降解效果仍较稳定。

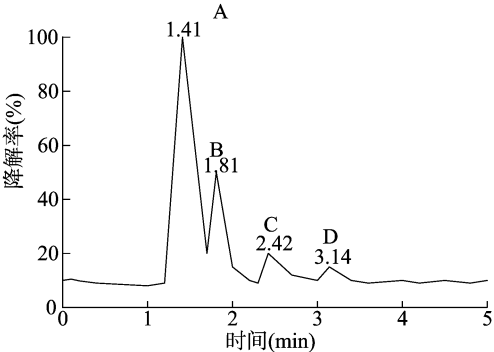


图1 T11-5-2 菌株降解多菌灵 2 d 的培养液 HPLC 色谱图

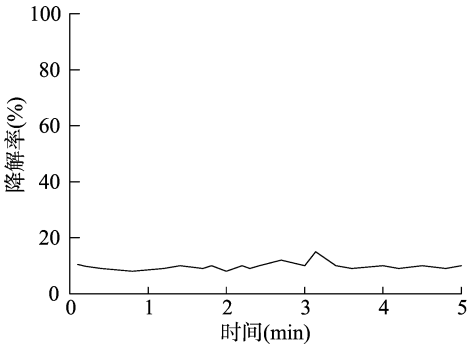


图2 T11-5-2 菌株降解多菌灵 5 d 的培养液 HPLC 色谱图

对多菌灵经过 5 d 处理,通过 HPLC-MS 分析,已经检测不到多菌灵及其降解物的存在,已经被彻底转化为成二氧化碳和水,对环境不会产生二次污染。

2.2 对其他几种常用农药的降解

由图 3 可知,降解菌对速克灵、多菌灵的降解率分别高达 98.1%、90.4%,对扑海因、甲基托布津、三唑酮的降解率分别达到 86.5%、40.1%、55.3%。表明该降解菌株对 5 种不同类型的化学农药均具较好的降解作用,表明 T11-5-2 菌株具有较广泛的降解能力,这在降解菌的研究中还未见报道过。

由于农作物病害种类繁多,施用 1 种农药已不能完全达到防病效果,为保证稳产、高产,往往会在田间施用多种农药,因此降解菌株能够对多种农药具有降解特性是十分必要且应用价值极高的。

2.3 生物防效试验

试验前应把盆栽黄瓜用水浇透,然后喷施各处理 800 倍药液。于 20 ℃ 恒温保湿处理 3 d,调查感

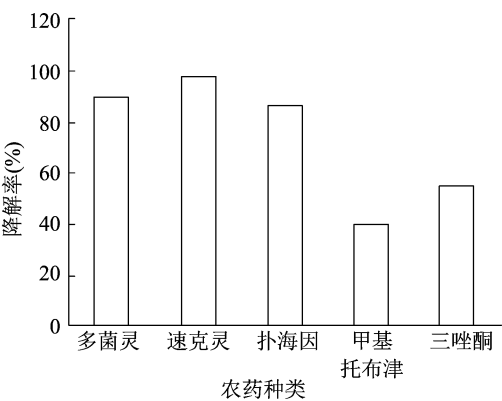


图3 菌株 T11-5-2 对几种农药的降解率

病叶片数。

活体拮抗性试验结果(表 1)表明,木霉菌对黄瓜灰霉病的防治效果可达到 79.5%,优于化学农药多菌灵的防治效果(71.7%),且差异明显。这充分表明木霉 T11-5-2 菌株除具有良好的降解效果外,还具有优良的对土传病害防治效果。

表 1 木霉 T11-5-2 菌株对黄瓜灰霉病防治结果

药剂处理	总叶数 (张)	病叶数 (张)	发病率 (%)	防效 (%)
木霉 T11-5-2	96	15.3	15.9	79.5
多菌灵	96	21.2	22.1	71.7
CK	96	75.0	78.1	

3 结论

通过药物驯化、紫外线诱导、化学诱导相结合的方法,人工选育出木霉变异菌株 T11-5-2,在多菌灵浓度为 100 mg/L 条件下,于 25 ℃、200 r/min 振荡培养 5 d,可完全降解多菌灵。以玉米秸秆为主要原料,通过固体发酵 6 d,制备的修复剂分生孢子数达到 1.4×10^{10} CFU/g。木霉菌株 T11-5-2 对浓度为 100 mg/L 的速克灵、多菌灵、扑海因、三唑酮、甲基托布津在最适条件下处理 5 d,降解率分别达到 98.1%、90.4%、86.5%、55.3%、40.1%。木霉菌对黄瓜灰霉病的防治效果可达到 79.5%,优于化学农药多菌灵的防治效果(71.7%),且差异明显。

参考文献:

[1] Chiba M, Singh R P. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of benomyl and carbendazim in aqueous media[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1986, 34(1): 108-112.

[2] 许敬亮,王志春,李顺鹏,等. 多菌灵降解菌株 dj-6-1 的分离、鉴定及降解特性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(3): 307-310.

宋林韩,金 鹏,吴 桐,等. 陕北黄土高原耕地生态安全的时空格局[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):249-257.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.051

陕北黄土高原耕地生态安全的时空格局

宋林韩¹,金 鹏²,吴 桐¹,卫新东^{1,2,3}

(1. 长安大学地球科学与资源学院,陕西西安 710054; 2. 长安大学土地工程学院,陕西西安 710054;
3. 自然资源部退化及未利用土地整治工程重点实验室/陕西省土地整治重点实验室,陕西西安 710075)

摘要:研究陕北黄土高原耕地生态安全的时空格局,加强耕地数量、质量和生态三位一体管护,提升耕地可持续利用水平。基于压力-状态-响应(PSR)模型建立评价指标体系,用熵值法计算指标权重,多目标综合评价法研究陕北黄土高原 2013、2017 年耕地生态安全时空格局,在此基础上,利用障碍度模型计算障碍因子及障碍度。研究结果显示:(1)与 2013 年比较,2017 年陕北黄土高原耕地生态安全水平空间格局呈现发展较好的趋势。(2)2017 年陕北黄土高原 25 个县(区、市)耕地生态安全障碍度存在差异。(3)2017 年耕地生态安全分布情况为南部>西部>中部>北部>东部。可见,陕北黄土高原耕地生态安全整体上向更安全的方向发展,未来更应从“惠民惠农”政策保护、生态安全知识普及、土地整治等方面来进一步提高研究区耕地生态安全。

关键词:耕地生态安全;压力-状态-响应(PSR)模型;障碍度模型;熵值法;障碍因子;陕北黄土高原

中图分类号: F323.211;X826 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)12-0249-09

耕地是土地资源的精华部分,是粮食安全的基础,其可持续利用是影响区域可持续发展的关键问题^[1]。耕地保护是国家的头等大事,事关经济平稳健康发展、政治昌明、社会稳定、生态文明和文化遗产^[2]。在新时期、新形势下,耕地保护重点推进国

土资源数量、质量、生态三位一体综合管理。耕地占补平衡制度作为耕地保护制度的“牛鼻子”^[3],自确立实施以来,基本上保证了耕地数量动态平衡和质量的相对稳定和提升,而耕地生态管护成为当今耕地管护研究的前沿和热点问题。党中央、国务院高度重视生态环境保护,党的十八大将生态文明建设提升到“五位一体”的发展高度,在党的十九大会议中,习总书记提出生态文明建设,提高生态安全度,而耕地生态安全作为建设生态文明的必经之路,耕地生态安全问题随之越来越受到重视。研究耕地生态安全问题对指导新时期合理利用耕地,促进耕地可持续利用水平,保障国家粮食安全、生态安全和社会稳定意义重大。

收稿日期:2019-06-23

基金项目:自然资源部退化及未利用整治工程重点实验室开放基金(编号:0031/211927180139);陕西省土地整治重点实验室开放基金(编号:0031/211927180170)。

作者简介:宋林韩(1995—),女,河南安阳人,硕士研究生,研究方向为土地资源利用与管理。E-mail:2316400397@qq.com。

通信作者:卫新东,博士,副教授,研究方向为土地资源管理。E-mail:weixindong@126.com。

[3] Holtman M A, Kobayashi D Y. Identification of rhodococcus thropolis isolates capable of degrading the fungicide carbendazim[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 47(5): 578-582.

[4] 程洁红,李慧蓉. 高效降解菌处理多菌灵农药生产废水的研究[J]. 上海环境科学,2003,22(10):690-694.

[5] 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.

[6] Mazellier P, Leroy E, de Laat J, et al. Degradation of carbendazim by UV/H₂O₂ investigated by kinetic modelling[J]. Environmental Chemistry Letters, 2003, 1(1): 68-72.

[7] Pattanasupong A, Nagase H, Inoue M, et al. Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(5): 517-522.

[8] 张丽珍,乔雄梧,马利平,等. 多菌灵降解菌 NY97-1 的鉴定及降解条件[J]. 环境科学学报,2006,26(9):1440-1444.

[9] Zhang G S, Jia X M, Ma X H, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of carbendazim-degrading bacterium strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(4): 417-421.

[10] 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.

[11] 中国农业科学院植物保护研究所. 农药分析[M]. 8 版. 北京:化学工业出版社,1988.