

徐铭阳, 卢家森, 耿翔, 等. 多菌灵降解菌 djl-6 和啉虫脒降解菌 D-2 液体菌剂的研发[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 270-275.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.054

多菌灵降解菌 djl-6 和啉虫脒降解菌 D-2 液体菌剂的研发

徐铭阳¹, 卢家森¹, 耿翔², 刘卜郡¹, 何健¹, 黄星¹

(1. 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省南京市江宁区湖熟街道农业服务中心, 江苏南京 211121)

摘要:以长期受多菌灵和啉虫脒农药污染的土壤中分离筛选得到的多菌灵降解菌株庆笙红球菌(*Rhodococcus qingshengii* sp. nov.) djl-6 和啉虫脒降解菌株噬染料菌(*Pigmentiphaga* sp.) D-2 为供试菌株, 研究了降解菌菌剂的不同保存剂型与初步应用的情况。结果表明, 2 株降解菌均以苯甲酸钠作为防腐剂的处理效果最好, 能维持活菌数较高且不产生杂菌污染。降解菌 djl-6 复配保护剂的最佳使用浓度: 0.30% 柠檬酸钠、0.30% 羧甲基纤维素、0.20% CaCl_2 。降解菌 D-2 复配保护剂的最佳使用浓度: 0.20% 糊精、0.20% 柠檬酸钠、0.30% CaCl_2 。与对照相比, 添加保护剂后, 菌株 djl-6、菌株 D-2 活菌数分别够提高 32.03%、38.70%。2 株菌的液体菌剂保存 45 d 后, 降解菌 djl-6 能够在 10 d 内将土壤 5 mg/kg 多菌灵降解 95.23%, 降解菌 D-2 能够在 10 d 内将土壤 5 mg/kg 啉虫脒降解 92.75%, 有效延长了液体菌剂的保存期。

关键词:多菌灵降解菌; 啉虫脒降解菌; 液体菌剂; 保存条件

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0270-06

设施农业作为农业现代化发展的重要产业越

来越受到各国政府的重视, 设施农业不仅有效解决了我国淡季期间蔬菜短缺问题, 还促进了居民传统消费结构的改变^[1]。但是设施农业中蔬菜病虫害较多, 农药的使用率也相对较高, 以多菌灵和啉虫脒为代表的农药因其高效低毒的特点^[2-4]而被广泛应用于设施农业之中。多菌灵是一种内吸性的广谱杀菌剂, 土壤中残留的多菌灵会导致土壤微生物数量下降, 抑制土壤脱氢酶、磷酸酶活性^[5-6]。啉虫脒是一种内吸杀虫剂, 残留在土壤中会抑制土壤固

收稿日期: 2019-10-27

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2016YFD0801102); 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(18)1005]; 南京农业大学 SRT 项目(编号: 1910C01)。

作者简介: 徐铭阳(1995—), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: xumingyang0814@163.com。

通信作者: 黄星, 博士, 教授, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: huangxing@njau.edu.cn。

参考文献:

- [1] 蒋先军, 黄昭贤, 谢德体, 等. 硅酸盐细菌代谢产物对植物生长的促进作用[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 116-119.
- [2] 别运清, 胡正嘉. 硅酸盐细菌几种功能的研究[J]. 襄樊职业技术学院学报, 2002(1): 12-15.
- [3] 吴洪生, 陈佳宏, 刘正柱, 等. 钾细菌制剂对土壤钾素的影响探讨[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(3): 98-100.
- [4] 张红娟, 张朝阳, 聂刚. 钾细菌对土壤养分活化作用的研究[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(3): 4-6.
- [5] 郭勋斌, 吴洪生, 刘怀阿, 等. 钾细菌制剂对水稻生长发育的影响[J]. 江西农业大学学报, 2001, 23(3): 447-449.
- [6] 吴洪生, 郭勋斌, 刘怀阿, 等. 钾细菌制剂在花生上的应用研究[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(2): 119-121.
- [7] 薛智勇, 汤江武, 钱红, 等. 硅酸盐细菌在不同土壤中的解钾作

- 用及对甘薯的增产效果[J]. 土壤肥料, 1996(2): 23-26.
- [8] 那文志, 徐凤花, 鲍玉杰, 等. 硅酸盐菌剂的解钾作用及田间使用效果[J]. 生命科学仪器, 2009, 7(4): 38-41.
- [9] 商照熙, 刘刚, 包剑. 我国钾资源开发技术进展与展望[J]. 化肥工业, 2012, 39(4): 5-8, 49.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: b349-b384.
- [11] 蔡庆生. 植物生理学实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2013.
- [12] 吴凡, 刘训理, 张楠, 等. 桑树根际硅酸盐细菌的分离鉴定及解钾能力测定[J]. 蚕业科学, 2010, 36(2): 323-329.
- [13] 张慧, 余永昌, 黄宝灵, 等. 接种根瘤菌对直杆型大叶相思幼苗生长及土壤营养元素含量的影响[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(5): 47-48, 50.
- [14] 张亮, 黄建国, 韩玉竹, 等. 菜豆根瘤菌对土壤钾的活化作用[J]. 生态学报, 2012, 32(19): 6016-6022.

氮菌、放线菌活性,对土壤动物产生慢性毒性^[7-8]。

应用微生物修复农药残留污染是一种公认的安全有效的方法。目前,我国农药残留相关研究主要集中在高效降解菌株的筛选和培育上,在微生物菌剂的开发应用方面的研究仍然不够完善^[9-11]。微生物作为一种活体生物,其保存情况极易受到外界环境的影响,微生物液体菌剂的储存一直是阻碍降解菌菌剂的大规模应用的难题,而目前关于微生物液体菌剂保存条件的研究非常少^[12-14]。笔者所在实验室分离并保藏了多菌灵、啉虫脒降解菌株,其中多菌灵降解菌株能在 7 d 内将 5 mg/kg 多菌灵降解 80.0%,啉虫脒降解菌株在 5 d 内将 10 mg/kg 啉虫脒降解 90.0%。由于液体菌剂中的微生物易受周围环境影响从而导致菌剂保存期短,本研究首先筛选出了 2 个菌株的液体菌剂防腐剂及其使用浓度,研究了菌剂不同保藏条件对其活菌数以及降解率的影响,以期对农药降解菌菌剂的保存与应用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与培养基

多菌灵原药购自江苏省新沂农药有限公司(纯度 99.8%)。啉虫脒原药购自绿源制药集团(纯度 98.3%)。无机盐培养基:硝酸铵 1.0 g/L,磷酸二氢钾 0.5 g/L,磷酸氢二钾 1.5 g/L,氯化钠 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, pH 值 7.0。

LB 培养基:酵母浸出物 5.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L,超纯水 1 L, pH 值 7.0,固体培养基加入 1.5%~2.0% 的琼脂。

D-2 发酵培养基:葡萄糖 9 g/L,硫酸铵 0.9 g/L,酵母膏 0.3 g/L,氯化钠 0.1 g/L,碳酸钙 1 g/L,磷酸氢二钾 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, pH 值 7.0~7.2。

djl-6 发酵培养基:葡萄糖 8 g/L,硫酸铵 0.8 g/L,酵母膏 0.2 g/L,氯化钠 0.1 g/L,碳酸钙 0.5 g/L,磷酸氢二钾 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, pH 值 7.0~7.2。

1.2 供试菌株、供试作物与土壤

多菌灵降解菌株庆笙红球菌(*Rhodococcus qingshengii* sp. nov.) djl-6,啉虫脒降解菌株噬染料菌(*Pigmentiphaga* sp.) D-2,均由笔者所在实验室分离并保藏。

供试青菜品种为上海青,购自南阳青青种业。

供试土壤为黄棕壤,采集于南京农业大学牌楼试验基地。

1.3 液体菌剂防腐剂的筛选

1.3.1 防腐剂的初筛 设置菌株 djl-6、菌株 D-2 这 2 组处理,每组处理取 12 个已灭菌的 500 mL 三角瓶(共 24 个)。每种菌设置 4 个防腐剂添加处理,依次为丙酸钙、苯甲酸钠、山梨酸钾、不添加试剂(CK),每个处理 3 个平行,共 12 个。每个处理依次加入相应的已发酵的菌株发酵液 300 mL 和添加量为发酵液的 0.50% (1.5 mL) 的防腐剂,CK 为不添加防腐剂的对照组,添加等体积(1.5 mL)的无菌水。用封口膜封紧,置于常温条件下避光保存。放置 3 d 后,取样,采用稀释涂布平板法对菌株 djl-6、菌株 D-2 以及杂菌进行计数,并计算杂菌率^[15-16]。

1.3.2 防腐剂的复筛 根据防腐剂的初筛结果,分别向菌株 djl-6 和菌株 D-2 发酵液中添加苯甲酸钠作为防腐剂,添加量分别为发酵液的 0.10%、0.30%、0.50%、0.70%、1.00%,同时设置不添加苯甲酸钠的对照,后续操作同“1.3.1”节。

1.4 液体菌剂保护剂的筛选

1.4.1 单因子保护剂的筛选 分别挑取菌株 djl-6、菌株 D-2 的单菌落于 LB 液体培养基中,放置于 30℃ 摇床中 160 r/min 培养至对数生长期,以 1% 接种量接入到盛有 500 mL 液体发酵培养基的三角瓶中继续培养至对数生长期。在无菌条件下装入已高温灭菌的 50 mL 无菌管中,再分别加入预先初筛过的氯化钙、氯化镁、氯化钾、糊精、黄腐酸、羧甲基纤维素、甲酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠试剂作为助剂,使试管中的助剂添加量分别为 0.10% 和 0.20%,同时设置不加助剂的对照,并向对照加入相同体积的无菌水,每个处理设置 3 个平行。30 d 后取样,通过稀释涂布平板法计算有效活菌数。

1.4.2 液体菌剂保护剂最佳物质浓度 根据单因子助剂的试验结果,将筛选出来的 3 类助剂分为有机物质助剂(A)、稳定剂(B)、无机盐助剂(C)3 种因素,从每一种因素中取 2 种不同的物质作为 2 个水平,设计 3 因素 2 水平的 $L_4(2^3)$ 的正交试验来确定降解菌菌剂助剂的最佳物质组合。

1.4.3 液体菌剂物质组合最佳使用浓度 根据物质组合的正交试验结果,将筛选出来的 3 个助剂作为 3 种因素,从每一种因素中取 3 种不同的有效使用浓度作为 3 个水平,设计 3 因素 3 水平的 $L_9(3^3)$

的正交试验来确定降解菌菌剂助剂的最佳浓度组合。

1.5 液体菌剂的降解效果

1.5.1 液体菌剂对无机盐培养基中农药残留的降解效果 选取上述正交试验筛选出的效果较好的 4 个保护剂组合,将其加入到菌剂发酵液中保存,30 d 后在无菌条件下取保存后的菌剂,以 3% 的接种量接种到体积质量为 50 mg/L 的多菌灵和啉虫脒 20 mL 液体无机盐培养基中,然后置于 30 ℃、160 r/min 的恒温摇床中培养,3 d 后使用高效液相色谱(HPLC)法测定多菌灵、啉虫脒的体积质量,并计算降解率。

1.5.2 液体菌剂对土壤农药残留的降解效果 模拟自然环境,采集土壤时去掉表层土,将采集的土壤于自然状态下风干 3 d 后过 2 mm 筛。分别向土壤中加入多菌灵和啉虫脒水溶液,然后充分搅拌均匀,使土壤中的多菌灵含量为 5 mg/kg(干土),啉虫脒终含量为 5 mg/kg(干土)。将其分装于 2 层一次性塑料杯子(高 15 cm)中,用黑色塑料袋遮盖防止农药光解,土壤质量为 100 g/杯。向多菌灵残留土壤中加入用保护剂保存 45 d 后的 djl-6 液体菌剂 10 mL,混匀;向啉虫脒残留土塘中加入保护剂保存 45 d 后的 D-2 液体菌剂 10 mL,混匀。每个处理设 3 个重复。10 d 后提取农药残留,使用 HPLC 检测多菌灵和啉虫脒的含量,并计算降解率。

2 结果与分析

2.1 液体菌剂防腐剂的筛选

2.1.1 液体菌剂防腐剂的初筛 由表 1、表 2 可知,添加不同防腐剂处理中的总菌数及杂菌数均小于未添加防腐剂的对照(CK)。降解菌 djl-6、D-2 发酵液的对照中杂菌率分别达到了 3.88%、3.30%;而对比添加不同防腐剂的处理,2 种降解菌发酵液均以苯甲酸钠处理效果最好,因此选择苯甲酸钠作为降解菌 djl-6 与 D-2 发酵液的防腐剂进行后续的防腐剂复筛试验。

2.1.2 液体菌剂防腐剂的复筛 如表 3 所示,当苯甲酸钠添加量超过 0.50% 时,无杂菌污染,且 0.50% 苯甲酸钠处理的活菌总数最高。因此对于菌株 djl-6 而言,应选择 0.50% 苯甲酸钠作为防腐剂。如表 4 所示,当苯甲酸钠添加量超过 0.30% 时,不会出现杂菌污染,且 0.30% 苯甲酸钠处理的活菌总数最高。因此,对于菌株 D-2 而言,应选择

表 1 添加不同防腐剂对 djl-6 菌剂杂菌的影响

防腐剂	总菌数 (× 10 ⁹ CFU/mL)	杂菌数 (× 10 ⁸ CFU/mL)	杂菌率 (%)
CK	2.58 ± 0.06	1.00 ± 0.13	3.88
苯甲酸钠	2.24 ± 0.11	0.00	0.00
山梨酸钾	2.10 ± 0.10	0.11 ± 0.02	0.53
丙酸钙	2.04 ± 0.12	0.23 ± 0.03	1.12

表 2 添加不同防腐剂对 D-2 菌剂杂菌的影响

防腐剂	总菌数 (× 10 ⁹ CFU/mL)	杂菌数 (× 10 ⁷ CFU/mL)	杂菌率 (%)
CK	1.91 ± 0.04	6.30 ± 0.33	3.30
苯甲酸钠	1.76 ± 0.10	0.00	0.00
山梨酸钾	1.73 ± 0.12	0.00	0.00
丙酸钙	1.65 ± 0.16	1.20 ± 0.27	0.73

表 3 不同添加量的苯甲酸钠对 djl-6 菌剂杂菌的影响

苯甲酸钠的 添加量(%)	菌数 (× 10 ⁹ CFU/mL)	杂菌数 (× 10 ⁷ CFU/mL)	杂菌率 (%)
0(CK)	2.46 ± 0.13	9.47 ± 0.36	3.85
0.10	2.34 ± 0.11	3.16 ± 0.31	1.35
0.30	2.30 ± 0.08	1.07 ± 0.22	0.47
0.50	2.16 ± 0.16	0.00	0.00
0.70	2.01 ± 0.10	0.00	0.00
1.00	1.79 ± 0.20	0.00	0.00

表 4 不同添加量的苯甲酸钠对 D-2 菌剂杂菌的影响

苯甲酸钠的 添加量(%)	总菌数 (× 10 ⁹ CFU/mL)	杂菌数 (× 10 ⁷ CFU/mL)	杂菌率 (%)
0(CK)	2.06 ± 0.39	7.51 ± 0.41	3.64
0.10	2.01 ± 0.15	1.22 ± 0.25	0.59
0.30	1.92 ± 0.40	0.00	0.00
0.50	1.88 ± 0.13	0.00	0.00
0.70	1.80 ± 0.28	0.00	0.00
1.00	1.75 ± 0.17	0.00	0.00

0.30% 苯甲酸钠作为防腐剂。

2.2 液体菌剂保护剂的正交筛选

2.2.1 复配保护剂的最佳物质组合的筛选 单因子试验结果显示,无机盐、有机物及稳定剂均可提高降解菌的存活率。添加 0.20% CaCl₂ 与 MgCl₂ 后,菌株 djl-6 在发酵液中的存活率分别提高 12.79% 与 19.02%,菌株 D-2 在发酵液中的存活率分别提高了 13.74% 与 17.61%。添加 0.20% 乙酸钠与柠檬酸钠后,菌株 djl-6 在发酵液中的存活率分别提高 19.34% 与 26.23%,菌株 D-2 在发酵液中的存活率分别提高 11.30% 与 21.74%。添加

0.20% 糊精与羧甲基纤维素后,菌株 djl-6 在发酵液中的存活率分别提高 20.79% 与 23.68%,菌株 D-2 在发酵液中的存活率分别提高 24.57% 与 27.29%。根据单因子试验的结果,设计 3 因素 2 水平的正交表 $L_4(2^3)$ 来确定最佳物质的组合。由表 5 可知,对菌株 djl-6 存活提高率影响的主次顺序为 $A > C > B$,即有机物质对菌株 djl-6 存活率影响最大,无机盐的影响次之,稳定剂影响最小。其最佳组合为 $A_1B_2C_2$,即柠檬酸钠、羧甲基纤维素、 $CaCl_2$ 组合与其他物质组合相比,对 djl-6 的存活率影响最大。因此,选择柠檬酸钠、羧甲基纤维素、 $CaCl_2$ 作为 djl-6 液剂复配助剂进行下一步研究。由表 6 可知,对菌株 D-2 存活提高率影响的主次顺序为 $A > C > B$,即稳定剂对菌株 D-2 存活率影响最大,无机盐的影响次之,有机物影响最小。其最佳组合为 $A_1B_1C_1$,即糊精、 $CaCl_2$ 、柠檬酸钠。因此,选择糊精、 $CaCl_2$ 、柠檬酸钠作为 D-2 液剂复配助剂进行下一步研究。

表 5 菌株 djl-6 液体菌剂保护剂物质组合正交试验				
试验号	A	B	C	存活提高率 (%)
1	柠檬酸钠	糊精	$MgCl_2$	20.62
2	柠檬酸钠	羧甲基纤维素	$CaCl_2$	28.14
3	乙酸钠	糊精	$CaCl_2$	12.46
4	乙酸钠	羧甲基纤维素	$MgCl_2$	9.88
k_1	24.38	16.54	15.25	
k_2	11.17	19.01	20.30	
R	13.21	2.47	5.05	
优水平	A_1	B_2	C_2	
主次顺序		$A > C > B$		

表 6 菌株 D-2 液体菌剂保护剂物质组合正交试验				
试验号	B	A	C	存活提高率 (%)
1	糊精	柠檬酸钠	$CaCl_2$	24.38
2	糊精	乙酸钠	$MgCl_2$	18.56
3	黄腐殖酸	柠檬酸钠	$MgCl_2$	10.89
4	黄腐殖酸	乙酸钠	$CaCl_2$	12.96
k_1	21.47	17.64	18.67	
k_2	11.93	15.76	14.73	
R	9.54	1.88	3.94	
优水平	B_1	A_1	C_1	
主次顺序		$B > C > A$		

2.2.2 复配保护剂的最佳使用浓度 根据复配保

护剂组合正交试验的结果,设计 3 因素 3 水平的正交表 $L_9(3^3)$ 分别来确定 djl-6、D-2 助剂的添加量的组合。将对筛选到的柠檬酸钠添加量(D)、羧甲基纤维素添加量(E)、 $CaCl_2$ 添加量(F)及糊精添加量(G)、柠檬酸钠添加量(D)、 $CaCl_2$ 添加量(F)各自设计成 3 种因素,每种因素取 3 个添加量作为 3 种水平。由表 7 可以得出,各因子之间的主次水平为 $D > F > E$,最优水平为 $D_3E_3F_2$,因此本试验所筛选研究的降解菌 djl-6 复配保护剂的最佳添加量为:0.30% 的柠檬酸钠、0.30% 的羧甲基纤维素、0.20% 的 $CaCl_2$ 。由表 8 可以得出,各因子之间的主次水平为 $G > F > D$,最优水平为 $G_2D_2F_3$,因此降解菌 D-2 复配保护剂的最佳添加量为:0.20% 的糊精、0.20% 的柠檬酸钠、0.30% 的 $CaCl_2$ 。

表 7 菌株 djl-6 液体保护剂的添加量组合正交试验				
试验号	D (%)	E (%)	F (%)	存活提高率 (%)
1	0.10	0.10	0.10	15.67
2	0.10	0.20	0.20	18.29
3	0.10	0.30	0.30	17.47
4	0.20	0.10	0.20	22.31
5	0.20	0.20	0.30	21.52
6	0.20	0.30	0.10	20.70
7	0.30	0.10	0.30	25.61
8	0.30	0.20	0.10	27.69
9	0.30	0.30	0.20	32.03
k_1	17.14	21.20	21.35	
k_2	21.51	22.50	24.21	
k_3	28.44	23.40	21.53	
R	11.30	2.20	2.86	
优水平	D_3	E_3	F_2	
主次顺序		$D > F > E$		

2.3 液体菌剂对无机盐培养基中农药残留的降解效果

分别按照表 7、表 8 的保护剂配比将保护剂加入到 djl-6、D-2 的液体菌液中保存 30 d 后,以 3% 的接种量分别接种到 20 mL 体积质量为 50 mg/L 的多菌灵及啶虫脒无机盐液体培养基中,3 d 后使用 HPLC 分别测定培养基中多菌灵和啶虫脒的浓度,并计算降解率。如图 1、图 2 所示,对于 djl-6 液体菌剂对多菌灵的降解,正交组合 8 的降解率最高,其降解率达到了 93.65%。在 D-2 液体菌剂对啶虫脒的降解中,正交组合 5 的降解率最高,其降解率达到了 85.32%,2 种菌剂其他组合的降解

表 8 菌株 D-2 液体保护剂的浓度组合正交试验

试验号	G (%)	D (%)	F (%)	存活提高率 (%)
1	0.10	0.10	0.10	17.23
2	0.10	0.20	0.20	22.26
3	0.10	0.30	0.30	27.52
4	0.20	0.10	0.20	32.16
5	0.20	0.20	0.30	38.70
6	0.20	0.30	0.10	29.90
7	0.30	0.10	0.30	26.21
8	0.30	0.20	0.10	22.60
9	0.30	0.30	0.20	24.44
k_1	22.34	25.20	23.24	
k_2	33.59	27.85	26.29	
k_3	24.42	27.29	30.81	
R	11.25	2.65	7.57	
优水平	G_2	D_2	F_3	
主次顺序	$G > F > D$			

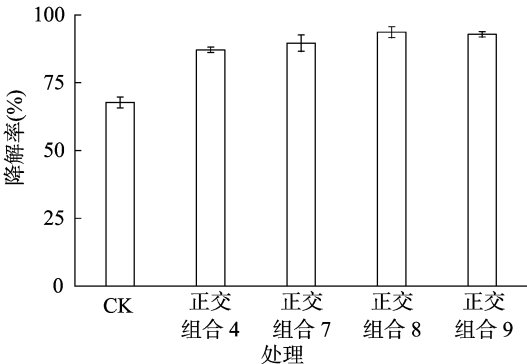


图1 dj1-6 液体菌剂对多菌灵的降解

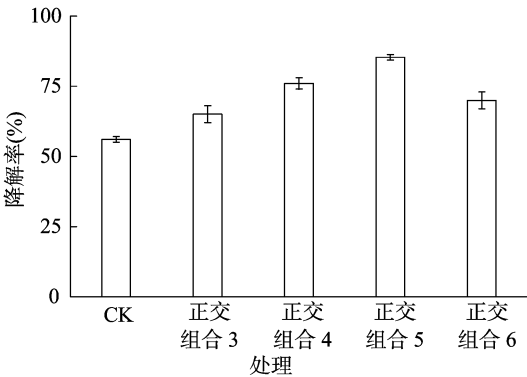


图2 D-2 液体菌剂对吡虫啉的降解

率与 CK 相比均有明显的提高。

2.4 液体菌剂对土壤中农药残留的降解效果

按照“2.2.2”节中保护剂的配比分别将保护剂加入到 dj1-6、D-2 的液体菌剂中保存 45 d 后,取 10 mL 菌剂各自加入到干土中含量为 5 mg/kg 多菌

灵及啉虫脒干土的塑料杯中,10 d 后测定土壤中农药的残留量,并计算降解率。如图 3、图 4 所示,dj1-6 液体菌剂对土壤中农药残留降解率最高的组合为正交组合 9,10 d 内降解率达 95.23%;其他组合的降解率与 CK(不加任何保护剂)相比也有明显提高,而在相同条件下 CK 降解率只能达到 48.82%。D-2 液体菌剂对土壤中农药残留降解率最高的组合为正交组合 5,10 d 内其降解率达到了 92.75%,其他组合的降解率与 CK(不加任何保护剂)相比也有明显提高,而 CK 在相同条件下降解率只能达到 41.21%。

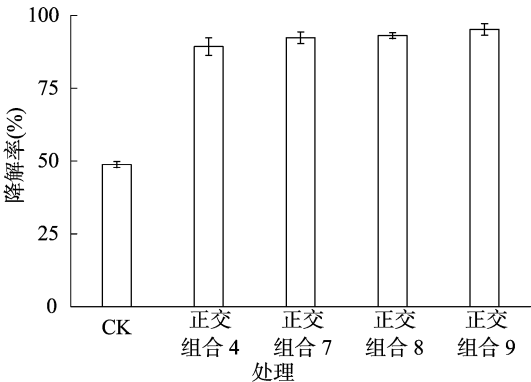


图3 dj1-6 液体菌剂对土壤中多菌灵残留的降解

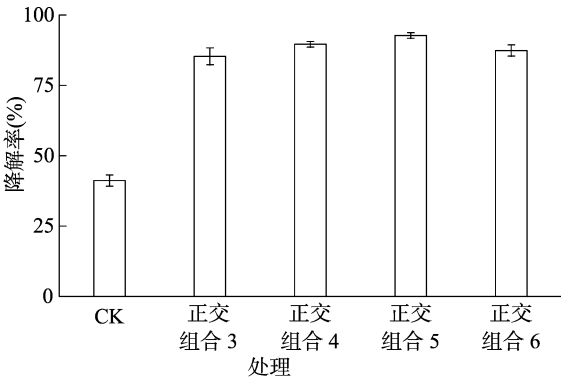


图4 D-2 液体菌剂对土壤中啉虫脒残留的降解

3 讨论与结论

微生物液体菌剂因工艺简单、制作成本低被广泛使用,但由于微生物极易受到周围环境的影响,在运输、保存、使用过程中菌剂的活性会发生变化^[17-19],如何提高菌剂的活性以及有效菌存活率成为活菌制剂亟需解决的难题。研究表明,向菌剂中添加保护剂以及抑制剂可以提高菌剂的活性,降低菌剂产品的污染率^[20]。本研究发现,加入防腐剂苯甲酸钠后,与对照组相比杂菌率大大降低。进一步研究发现,当苯甲酸钠的添加量达到一定值后,不会出现杂菌污染,这与车建美等的研究结果^[21]—

致。这说明防腐剂的加入有效地抑制了杂菌的生成,使多菌灵、啉虫脒降解菌株更好发挥功能。李剑峰等选择了青霉素作为保护剂加入到解磷菌剂中使得目标菌的增值速度变慢,提升了菌种的活力^[22]。本研究通过正交试验研究出了保护剂的最佳组合,加入保护剂后,多菌灵、啉虫脒降解菌株的活菌数增加,液体菌剂保存 30 d 仍具有明显的降解效果,这表明保护剂的加入延长了菌剂的使用期。本研究均在钵钵中进行,下一步农药残留污染土壤的修复工作将在田间进行,实时监测菌株 djl-6 和菌株 D-2 在试验田中定殖的生物量和对农药的降解。

本研究表明,通过添加苯甲酸钠、丙酸钙、山梨酸钾 3 种具有抑菌防霉作用的防腐剂,分别对菌株 djl-6 和菌株 D-2 的杂菌率进行计算,发现 2 株降解菌均以苯甲酸钠作为防腐剂效果最好。通过液体菌剂保护剂的正交筛选,降解菌 djl-6 复配保护剂的最佳添加量为 0.10% 的柠檬酸钠、0.30% 的羧甲基纤维素、0.20% 的 CaCl_2 。降解菌 D-2 复配保护剂的最佳添加量为 0.10% 的糊精、0.20% 的柠檬酸钠、0.30% 的 CaCl_2 。通过正交试验筛选的菌剂助剂能够有效提高细菌存活率,其中 djl-6 的发酵液中活菌数能够提高 32.03%,D-2 的发酵液中的活菌数能提高 38.70%。添加有保护剂保存 30 d 的菌株 djl-6 的液体菌剂在 3 d 内最多能够降解 93.65% 的 50 mg/L 多菌灵,添加有保护剂保存 30 d 的菌株 D-2 的液体菌剂在 3 d 内最多能够降解 85.32% 的 50 mg/L 啉虫脒。添加有保护剂的保存 45 d 的菌株 djl-6 的液体菌剂,在 10 d 内能将干土中含量为 5 mg/kg 的多菌灵降解 95.23%。添加有保护剂的保存 45 d 的菌株 D-2 的液体菌剂,在 10 d 内能将干土中含量为 5 mg/kg 的啉虫脒降解 92.75%。本研究为农药降解菌菌剂的生产应用及保存提供理论基础。

参考文献:

- [1] Wang Y C, Zhou Q Y. Evaluation of development of agricultural modernization in central China[J]. IERI Procedia, 2013, 4: 417 - 424.
- [2] Burrows L A, Edwards C A. The use of integrated soil microcosms to assess the impact of carbendazim on soil ecosystems [J]. Ecotoxicology, 2004, 13(1/2): 143 - 61.
- [3] Sousa J P, Gestel C A M V, Loureiro S E, et al. Ring - testing and field - validation of a terrestrial model ecosystem (TME) — an instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazim on soil microbial parameters [J]. Ecotoxicology, 2004, 13(1/2): 61 - 74.
- [4] 宋超, 周杨全, 李义强, 等. 三种新烟碱类杀虫剂在土壤中的残留降解及影响因子[J]. 农药学报, 2016, 18(6): 738 - 744.
- [5] 龚芬芬. 多菌灵降解菌的分离鉴定、生物学特性及多菌灵水解酶基因的克隆和表达研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 13 - 16.
- [6] 陈锐, 孙晓宇, 邓媛, 等. 多菌灵降解菌的生物学特性及降解能力研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(5): 187 - 194.
- [7] 刘少伟, 阮赞林. 啉虫脒超标青菜[J]. 质量与标准化, 2018, 3(79): 40 - 41.
- [8] 诸力, 王晨, 陈红平, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定茶叶中 11 种植物生长调节剂及吡虫啉、啉虫脒的残留[J]. 分析化学, 2017, 45(4): 529 - 536.
- [9] 陈扬波, 卞杰松, 刘彩霞, 等. 生物有机肥中微生物的分离鉴定及液体菌剂的构建[J]. 广东农业科学, 2019, 46(5): 54 - 59.
- [10] 张晓波. 在玉米上应用微生物菌剂(液体)效果探讨[J]. 农业开发与装备, 2016(6): 63 - 64.
- [11] Kaur T, Toor A P, Wanchoo R K. Parametric study on degradation of fungicide carbendazim in dilute aqueous solutions using nano TiO_2 [J]. Desalination & Water Treatment, 2015, 54(1): 122 - 131.
- [12] 詹伟, 王云鹏, 郭坚华. 保护剂和再水化剂对冷冻干燥保存的生防菌 YT11 的存活率及生防效果的影响[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 110 - 114.
- [13] 刘振华, 邢雪琨. 微生物农药助剂研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8): 2109 - 2113.
- [14] 胡青青, 沈文忠, 张绪美, 等. 新型微生物菌剂对小青菜生长及品质的影响[J]. 上海农业科技, 2019(2): 116 - 118.
- [15] 张安龙, 王晔, 王雪青, 等. 一株高效苯酚降解真菌的分离鉴定及其菌剂的制备[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1450 - 1461.
- [16] 吴皓琼, 沙长青, 牛彦波, 等. 保护剂与防腐剂对生物肥料保存期的影响[J]. 生物技术, 2004, 14(6): 55 - 56.
- [17] 王婧, 方蕊, 蒋秋悦, 等. 载体和保护剂对橘黄假单胞菌 JD37 微生物肥料活性的影响[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2012, 41(2): 179 - 185.
- [18] 李春光, 张建萍, 余柳青. 助剂在微生物除草剂中的应用[J]. 中国生物防治, 2006, 22(4): 265 - 267.
- [19] 高鹤南, 赵巍巍, 马晓亮, 等. 降解烟嘧磺隆微生物菌剂的制备及其稳定性[J]. 农药, 2011, 50(6): 420 - 423.
- [20] 顾真荣. 苏云金杆菌晶体毒素稳定性和发酵液保存方法的研究[J]. 微生物学通报, 1984(5): 193 - 195.
- [21] 车建美, 刘波, 刘国红, 等. 动物益生菌短芽孢杆菌 FJAT-1501-BPA 制剂的制备及其益生特性评价[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(10): 2897 - 2907.
- [22] 李剑峰, 师尚礼, 张淑卿. 不同 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量及菌种保存温度下 SL01 菌株的解磷及生长能力[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(1): 94 - 97.