

甲氰菊酯降解菌 *Sphingomonas* sp. JQL4-5 对污染土壤的生物修复

洪源范¹, 洪青^{1,2}, 沈雨佳¹, 李顺鹏^{1*}

(1. 南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: JQL4-5 (*Sphingomonas* sp.) 是 1 株从长期受农药污染土壤中分离的甲氰菊酯降解菌, 考察了其在实验室模拟条件下对甲氰菊酯污染土壤的生物修复能力及其影响因素. 结果表明, 降解菌株在灭菌土壤中的降解效果要略好于未灭菌土壤, 在土壤外源添加降解菌 10^6 CFU $\cdot$ g⁻¹, 温度 20~40 ℃, pH 为 6.5~7.5 的条件下, 该菌株能有效降解土壤中 10~200 mg $\cdot$ kg⁻¹ 的甲氰菊酯. 可以将其应用于甲氰菊酯污染土壤的生物修复.

关键词: 甲氰菊酯; 降解菌 JQL4-5; 生物修复

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)05-1121-05

Bioremediation of Fenpropathrin-Contaminated Soil by *Sphingomonas* sp. JQL4-5

HONG Yuan-fan¹, HONG Qing^{1,2}, SHEN Yu-jia¹, LI Shun-peng¹

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: JQL4-5 (*Sphingomonas* sp.), a fenpropathrin-degrading strain isolated from soils exposed to repeated pesticides contamination, was used in this work to study factors affecting its degrading capacity of fenpropathrin in soil microcosms. In sterilized soil, the degradation rates of fenpropathrin by JQL4-5 were faster than those in unsterilized soil. Various factors, including soil pH, temperature, initial fenitrothion concentration, and inoculum size influenced its degradation efficiency. The addition of 10^6 CFU $\cdot$ g⁻¹ was able to degrade varying concentrations (10~200 mg $\cdot$ kg⁻¹ soil) of fenpropathrin over a temperature range of 20~40 ℃ and pH range (6.5~7.5). The results indicated that strain JQL4-5 has potential use in bioremediation of fenpropathrin-contaminated soil.

Key words: fenpropathrin; degrading-bacterium JQL4-5; bioremediation

甲氰菊酯(fenpropathrin)是一种广谱高效的拟除虫菊酯类杀虫剂, 一直用于农业病虫害的防治, 主要用在果树、茶树、蔬菜等农作物上^[1]. 由于其具有高效、低毒、在土壤中不易移动、难以挥发等特点, 在今后相当长的时间内, 仍将是世界杀虫剂市场的重要支柱之一^[2]. 然而几十年来, 各类田间药效结果表明, 农药喷施到农田后, 只有 5% 左右的农药到达目标害虫, 而 95% 的农药残留在水体、土壤和农业生态系统中, 这些残留的农药成为影响面最广、与人类生活关系最密切的污染物, 它会通过食物链的富集, 最终进入生物体内, 严重影响人类的身体健康^[3]. 生物修复是一种低成本的环境友好型去除污染物的方法^[4]. 美国环保局在处理阿拉斯加 EXXon Vadez 石油泄漏事故中, 通过投加石油降解微生物的方法, 短时间内消除了污染, 为生物修复提供了第一个成功的例证^[5]. 以后该技术一直应用于污染物的处理^[6~8]. 目前已有研究者分离到一些拟除虫菊酯类农药的降解菌并在实验室纯培养条件下研究了其降

解特性^[9~11]. 但没有进入到生物修复阶段. 本研究以实验室分离的 1 株甲氰菊酯降解菌 JQL4-5 为对象, 在实验室模拟条件下研究各种环境因子对其修复甲氰菊酯污染土壤的影响, 以期为其在生物修复中的应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土壤为棕壤耕作土, 取自南京农业大学菜园表层土(0~15 cm), 含有机质 14.5 g $\cdot$ kg⁻¹, 含氮 1.2 g $\cdot$ kg⁻¹, pH 值为 6.9. 土壤经风干, 过 20 目筛.

1.2 供试菌液

收稿日期: 2006-07-11; 修订日期: 2006-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400013, 40471073); 江苏省科技厅项目(BG2005322); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金项目(055112); 中国博士后基金项目(2005037747)

作者简介: 洪源范(1980~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: lsp@njau.edu.cn

JQL4-5 菌株属鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.), 由南京农业大学微生物学系实验室分离, 能利用甲氰菊酯为唯一碳源进行生长, 在 24 h 内对 20 mg/L 的甲氰菊酯的降解率达到 99.8%^[11]. 菌悬液的制备: 将 JQL4-5 接种在 LB 液体培养基中, 于 30 ℃, 200 r/min 摇床培养至对数生长后期, 6 000 r·min⁻¹ 离心收集菌体并用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次, 再用磷酸盐缓冲液重悬控制菌体浓度至所需浓度备用.

1.3 甲氰菊酯的施用

将甲氰菊酯按 10⁴ mg/L 的浓度配成甲醇溶液, 以 20 mg·kg⁻¹ 施用于供试土壤搅拌均匀, 同时设置不加农药的空白对照. 每盆装土 0.1 kg (盆上口径 8.5 cm, 下口径 5.0 cm 高 7.5 cm), 加入 4 mL 水, 使土壤中含水量达到 40% 左右. 黑色薄膜封口, 留有少许气孔, 以维持水分和通气量, 避免农药的光解.

1.4 土壤中甲氰菊酯的提取与测定

参照文献[12]方法做如下修改: 称取土样 5 g, 于 40 ℃ 下烘干 24 h, 置于具塞试管中, 加入 10 mL 正己烷和丙酮 (体积比为 1:1) 的混合液, 剧烈振荡 30 s, 放入超声波水浴中混匀 10 min; 重复此操作 1 次. 上层有机相用移液器小心取出; 残渣再用 10 mL 正己烷 + 丙酮 (体积比为 1:1) 混合液提取 1 次. 合并 2 次提取液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取出上清液在旋转蒸发仪上蒸干后, 用色谱纯正己烷溶解, 用孔径 0.45 μm 的有机相针头过滤器过滤后, 用气相色谱测定样液中甲氰菊酯的含量.

气相色谱条件: 气相色谱仪为 SHIMADZU-GC14B, 检测器为 ECD, SPB-5 毛细管柱 (30.0 mm × 0.530 mm × 1.5 μm), 载气为 99.999% N₂, 流量为 40 mL/min, 进样量为 0.4 μL, 以外标法定量; 进样口温度 260 ℃, ECD 检测器温度 280 ℃, 柱温 240 ℃.

利用上述提取方法, 制备 3 个添加水平分别为 200 mg·kg⁻¹、20 mg·kg⁻¹、2 mg·kg⁻¹ 的加标土壤样品, 每个添加水平做 5 个平行样, 得到土壤中甲氰菊酯的平均回收率为 89.2% ~ 108.3%, 相对标准偏差小于 6%. 甲氰菊酯的最小检出量为 0.002 mg·kg⁻¹.

土壤中甲氰菊酯生物强化降解率的计算公式:
生物强化降解率 % = (对照土壤中的甲氰菊酯浓度 - 接种土壤中的甲氰菊酯浓度) × 100 / 土壤中起始的甲氰菊酯浓度

2 结果与分析

2.1 *Sphingomonas* sp. JQL4-5 对灭菌和未灭菌土壤中甲氰菊酯的降解

为了研究土著微生物对外源接种的 *Sphingomonas* sp. JQL4-5 降解甲氰菊酯的影响, 首先进行了如下实验. 设置 4 组, 分别为: ①空白 (不加农药和降解菌); ②对照 (施 20 mg·kg⁻¹ 农药 + 灭活降解菌剂); ③处理 1 (灭菌土, 施 20 mg·kg⁻¹ 农药 + 降解菌剂); ④处理 2 (未灭菌土, 施 20 mg·kg⁻¹ 农药 + 降解菌剂). 降解菌剂的加入量为 10⁶ CFU·g⁻¹, 于 30 ℃ 下培养, 每天喷洒适当的水, 使土壤含水量维持在 40% 左右. 每 3 d 取样 1 次进行测定. 经过 12 d 的培养, 结果如图 1 所示, 空白土壤中未检测到甲氰菊酯, 表明供试土壤不存在甲氰菊酯的背景值; 在对照中, 土著微生物对甲氰菊酯的降解十分缓慢, 施用 20 mg·kg⁻¹ 农药 12 d 后, 残留量仍为 15.81 mg·kg⁻¹, 降解率仅为 20.95%. 对处理 1 和处理 2 而言, 在前 9 d 中处理 1 的降解速率更快, 效果更好. 这可能是由于外源添加的微生物在接种初期与土著微生物之间相互竞争, 导致外源微生物的生理状况受到一定的冲击, 从而对其降解速率产生了轻微的影响; 但是到第 12 d 时, 处理 1 和处理 2 中的甲氰菊酯降解率均达到了 90% 以上. 表明土著微生物的存在对于 JQL4-5 菌株的降解能力影响很小. 由于本研究的目的是为了研究 JQL4-5 菌株在自然土壤中降解甲氰菊酯的情况, 为该菌株的生物修复提供理论依据, 所以后续研究都选择未灭菌的自然土壤作为研究对象.

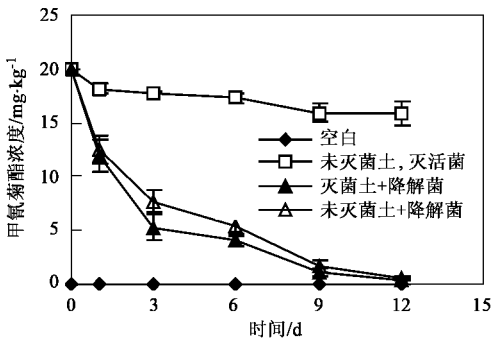


图 1 灭菌和未灭菌土壤中甲氰菊酯的降解
Fig.1 Degradation of fenprothrin in the sterilized and unsterilized tested soils

2.2 土壤 pH 对甲氰菊酯降解的影响

通过向试验土壤中添加 2 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH, 使土壤的 pH 分别达到 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5, 此步骤于 10 d 内重复 3 次, 务必使土壤的 pH 稳定在预期值. 然后加入甲氰菊酯混匀, 使农药终浓度为 20 mg·kg⁻¹. 试验土壤分为 2 组, 每

组设 3 个重复, 1 组加入 10^6 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 的降解菌剂, 另 1 组为对照, 每 100 g 土加入 4 mL 水, 于 30 ℃ 下培养, 每天喷洒适当的水, 使土壤含水量维持在 40% 左右. 每 3 d 取样 1 次进行测定. 经过 12 d 的培养, 结果见图 2, 在 pH 3.5、pH 4.5 土壤中, 降解菌处于偏酸性环境, 菌株的生长受到很大影响, 农药的降解以自然降解为主, 生物强化作用很弱. 随 pH 值的升高强化作用逐渐增强. 土壤 pH 为 5.5 时, 生物强化降解率已经增加到 65.3%. pH 6.5、pH 7.5 中性土壤中生物修复效果最好, 在 pH 7.5 时, 12 d 时土壤样品中未能检测到甲氰菊酯的存在. pH 8.5、pH 9.5 偏碱性土样中, 由于该农药在碱性条件下容易分解, 因此到 6 d 后生物强化降解率就逐渐呈现下降的趋势.

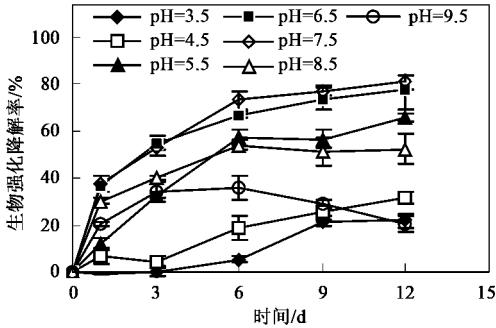


图 2 土壤 pH 值对 JQL4-5 降解甲氰菊酯的影响

Fig.2 Effect of soil pH on fenpropathrin degradation by strain JQL4-5

2.3 温度对甲氰菊酯降解的影响

将加有终浓度为 20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 甲氰菊酯的试验土壤分为 2 组, 每组设 3 个重复, 1 组加入 10^6 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 的降解菌剂, 另 1 组为对照, 每 100 g 土加入 4 mL 水, 分别于 20、25、30、35、40 ℃ 培养, 每天给土壤补充相应的水分. 每 3 d 取样 1 次进行测定. 结果见图 3, 该菌在进行土壤修复时, 对温度的适用范围较广, 其中在 30 ℃ 时对甲氰菊酯的降解效果最好, 12 d 时已检测不到农药的存在, 生物强化降解率高达 77.83%. 而在 20、25、35、40 ℃ 条件下培养 12 d 后, 生物强化降解率差别不大, 最低也达到了 57.71%.

2.4 接种量对甲氰菊酯降解的影响

将加有终浓度为 20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 甲氰菊酯的试验土壤分为 2 组, 每组设 3 个重复, 1 组分别接入 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 土壤, 另 1 组为对照, 每 100 g 土加入 4 mL 水, 于 30 ℃ 培养, 每天给土壤补充相应的水分. 每 3 d 取样 1 次进行测定. 结果见图 4, 接种量与甲氰菊酯的降解速率呈正相关. 在实际应用

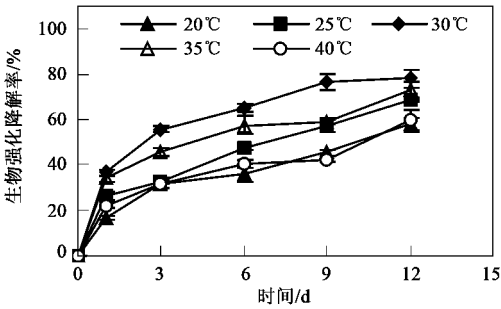


图 3 土壤温度对 JQL4-5 降解甲氰菊酯的影响

Fig.3 Effect of soil temperature on fenpropathrin degradation by strain JQL4-5

中, 考虑到成本, 选择接入 10^6 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 土壤的降解菌, 就可达到较为理想的修复效果.

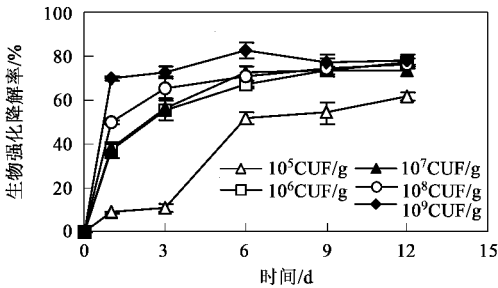


图 4 接种量对 JQL4-5 降解甲氰菊酯的影响

Fig.4 Effect of inoculum on fenpropathrin degradation by strain JQL4-5

2.5 农药初始浓度对甲氰菊酯降解的影响

试验土壤中加入甲氰菊酯, 使其终浓度分别为 10、20、50、100、200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 土壤, 将含有农药的土壤分为 2 组, 每组设 3 个重复, 1 组加入 10^6 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 的降解菌剂, 另 1 组为对照, 每 100 g 土加入 4 mL 水, 于 30 ℃ 培养, 每天给土壤补充相应的水分. 每 3 d 取样 1 次进行测定. 结果见图 5, 在土壤中该降解菌不仅对 10~20 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 浓度的甲氰菊酯具有较好的降解效果, 而且对 50~200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 高浓度的甲氰菊酯的降解效果也相当显著. 当农药浓度达到 200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, 12 d 时, 自然降解率仅为 15.4%. 而投加降解菌的土壤中农药的残留量仅为 19.63 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, 生物强化降解率达到 67.28%, 降解率提高了 5.8 倍.

3 讨论

应用接种微生物的生物强化作用来修复污染环境, 需要考虑生物和非生物因素的影响, 如土著微生物的竞争作用、环境温度、pH、接种量和污染物的浓度等, 因为这些因素决定接种菌剂是否能够在环境

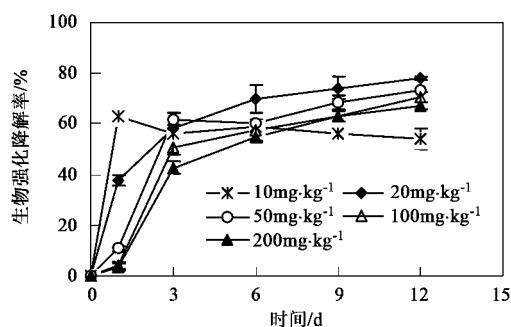


图5 农药初始浓度对 JQL4-5 降解甲氰菊酯的影响

Fig.5 Effect of initial fenpropathrin concentration on its degradation by JQL4-5

中发挥作用. 本研究结果表明, 接种菌株 JQL4-5 能够克服土著微生物的竞争效应, 在非灭菌的风干土壤中发挥生物强化作用. 土壤 pH 对降解有毒污染物是一个非常重要的影响因素, 例如有研究表明在中性和碱性条件下接种微生物能够更好的降解毒死蜱^[13]. 本研究中 JQL4-5 在较低的 pH 条件下也不起作用, 在 pH 6.5、pH 7.5 时生物修复效果较好, 在 pH 7.5 时, 12 d 时土壤样品中未检测到甲氰菊酯的存在. 温度是另一个影响生物修复效率和非生物因素, 因为温度会影响微生物活性. Leahy 等研究表明降解率通常会随温度的降低而降低^[14]. 本研究中, 降解的最适温度为 30 ℃, 而常温 25 ℃ 也是一个比较理想的降解温度. 接种量是决定生物修复效果的 1 个重要影响因素. 当外源微生物加入到土壤中时, 它就必须受到很多威胁, 例如与土著微生物竞争生长, 受到原生动物的吞食等. 合适接种量不仅可以增加生物修复的成功几率^[15], 而且可以减少成本的支出^[16-18]. 本研究中, 当接种量达到 10^6 CFU·g⁻¹ 时, 可以很好的降解甲氰菊酯. 污染物的浓度对微生物降解活性有着很大的影响. 当甲氰菊酯的浓度低于 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 菌株 JQL4-5 能够完全降解甲氰菊酯. 当农药浓度达 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 土壤中还有部分甲氰菊酯残留, 这可能是由于甲氰菊酯降解过程中, 由于酯键的裂解而累积中间体 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA), 3-PBA 是拟除虫菊酯杀虫剂在土壤中的降解产物^[19], 对一些微生物仍有一定的毒害作用, 中间体积聚到一定水平可能对降解菌株 JQL4-5 的生长和降解活性起到一定的抑制作用. 有研究报道表明降解芳香族化合物的基因表达是诱导表达而非组成表达^[20,21]. 因此当有毒化合物的浓度较低时, 很可能会导致不能诱导降解菌株的降解活性, 而本研究中的降解菌株 JQL4-5 可以在 10 mg/kg 的浓度时, 也能

很好地降解目标污染物. 总之, 本研究为拟除虫菊酯类杀虫剂污染土壤的生物修复系统提供了理论依据, 也可以作为一个模式, 用于研究和设计其它有毒化合物的生物修复策略.

4 结论

(1) 降解菌株 JQL4-5 在实验室模拟条件下, 能够很好的降解土壤中的甲氰菊酯, 且在灭菌土壤中的降解效果略好于未灭菌土壤.

(2) 在土壤 pH 处于中性即 6.5 ~ 7.5 范围内, 环境温度在 20 ~ 40 ℃ 范围内, 菌株 JQL4-5 都能很好地降解土壤中的甲氰菊酯.

(3) 在外源接种量为 10^6 CFU·g⁻¹, 土壤中甲氰菊酯的浓度为 $10 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 菌株都能表现出很高的降解率.

参考文献:

- [1] 应松鹤. 拟除虫菊酯类农药的应用技术[M]. 北京: 化工工业出版社, 1988. 113 ~ 114.
- [2] 张一宾. 世界拟除虫菊酯类杀虫剂的发展概况[J]. 中国农药, 2005, 4(11): 25 ~ 27.
- [3] 郭荣君, 李世东, 章力建, 等. 土壤农药污染与生物修复研究进展[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 129 ~ 135.
- [4] Torma A E. The basis of bioremediation[J]. Pollution Engineering, 1994, 26(6): 46 ~ 47.
- [5] Pritchard P H, Mueller J G, Rogers J C. Oil spill bioremediation experiences: lessons and results from the Exxon valdex oil spill in Alaska[J]. Biodegradation, 1992, 3(23): 315 ~ 335.
- [6] Madsen E L. Determining in situ biodegradation: Facts and Challenges[J]. Environ Sci Technol, 1991, 25(10): 1663 ~ 1672.
- [7] Fredrickson J K, Bolton H, Brockmon F J. Ex situ and on-site bioreclamation[J]. Environ Sci Technol, 1993, 27(9): 1711 ~ 1716.
- [8] Chino H, Tsuji, Isikawa Y. Study on bioremediation of oil contaminated soil (par3): Properties of bioremediated soil and applicability for greenery in Kuwait[J]. Obayashiguni Gijustu kenkyushoho, 1998, 57: 111 ~ 114.
- [9] 虞云龙, 盛国英, 傅家谟, 等. 杀灭菊酯的微生物降解及酶促降解[J]. 环境科学, 1997, 18(2): 5 ~ 8.
- [10] 许育新, 戴青华, 李晓慧, 等. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 958 ~ 963.
- [11] 洪源范, 洪青, 武俊, 等. 甲氰菊酯降解菌 JQL4-5 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学, 2006, 27(10): 2100 ~ 2104.
- [12] 朱鲁生, 王军, 樊德方, 等. 甲氰菊酯和辛硫磷及其混剂的土壤微生物降解[J]. 应用生态学报, 2003, 14(6): 1023 ~ 1025.
- [13] Singh B K, Walker A, Morgan J A W, et al. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(9): 3385 ~ 3390.

5198 ~ 5206.

[14] Leahy G J, Colwell R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment[J]. Microbiol Rev, 1990, **54**(3): 305 ~ 315.

[15] Comeau Y, Greer C W, Samson R. Role of inoculum preparation and desity on the bioremediation of 2, 4-D contaminated soils[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, **38**(5): 681 ~ 687.

[16] Miethling R, Karlson U. Accelerated mineralization of pentachlorophenol in soil upon inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, **62**(12): 4361 ~ 4366.

[17] Rousseaux S, Hartmann A, Lagacherie B, *et al.* Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities [J]. Chemosphere, 2003, **51**(7): 569 ~ 576.

[18] Ramadan M A, el-Tayeb O M, Alexander M. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, **56**(5): 1392 ~ 1396.

[19] Malony S E, Maule A, Smith A R W. Microbial Transformation of the pyrethroid Insecticide: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate[J]. Appl Environ Microbol, 1988, **54**(11): 2874 ~ 2876.

[20] Bayle R C, Barbour M G. The degradation of aromatic compounds by the *meta* and gentisate pathways[A]. In: Gibson DT (ed) Microbial degradation of organic compounds [M]. New York: Dekker, 1984. 253 ~ 294.

[21] Nishino S F, Spain J C. Cell density-dependent adaptation of *Pseudomonas putida* to biodegradation of *p*-nitrophenol[J]. Environ Sci Technol, 1993, **27**(3): 489 ~ 494.