

不动杆菌 D10 对土壤中对硫磷的降解

姜莉¹, 史艳芳², 刘鑫¹, 李志明², 张雪雨², 姜彬慧²

1. 沈阳出入境检验检疫局, 沈阳 110016

2. 东北大学资源与土木工程学院, 沈阳 110004

摘要 为了考查微生物对农药污染土壤的修复作用, 本文从受农药污染的土壤中筛选出一株对对硫磷有降解作用的菌株 D10。采用室内培养方法, 根据其形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析, 鉴定 D10 为不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 的微生物。通过分光光度比浊法研究其最佳生长条件, 结果表明, D10 的最佳生长温度为 28℃, 最佳培养初始 pH 值为 6.0—7.0。D10 生长周期较短, 在营养培养基中培养 24h 就可达到最大生物量, 其培养的最佳 C、N 源, 分别为柠檬酸钠和酵母粉。利用气相色谱检测菌株 D10 对对硫磷的降解作用, 其 24h 的对硫磷降解率达到 83.1%。通过对模拟污染土壤中对硫磷的降解效果的研究, 结果表明, 在农药污染的土壤中对硫磷浓度为 100mg/kg 时, D10 对对硫磷农药 7d 的降解率达到 66.7%, 显示 D10 对对硫磷污染土壤具有较强的修复作用。

关键词 环境生物学; 对硫磷; 不动杆菌属; 生物降解

中图分类号 X172

文献标识码 A

doi 10.3891/j.issn.1000-7857.2011.13.004

Biodegradation of Parathion in Soil by *Acinetobacter* sp. D10

JIANG Li¹, SHI Yanfang², LIU Xin¹, LI Zhiming², ZHANG Xueyu², JIANG Binhui²

1. Shenyang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenyang 110016, China

2. College of Resources and Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110004, China

Abstract Organophosphorus pesticides are worldwide widely used to control agricultural and household pests. Overall, organophosphorus compounds account for the 38% of total pesticides used globally. Parathion is a virulent organophosphate insecticide with perfect insecticidal efficiency. However, it is also highly toxic and harmful to human and other creatures. In order to investigate microbial remediation of soil polluted by pesticides, a strain D10 of parathion-degrading is obtained by selective enrichment culture from the pesticides-contaminated soil. Parathion could be used by D10 as a sole carbon source. D10 is identified as *Acinetobacter* sp. based on the morphological, physiochemical characters and 16S rDNA sequence analyses. The optimal growth temperature for D10 in shaking flasks is 28℃, and the optimal pH is 6.0—7.0. The optimal carbon and nitrogen source are sodium citrate and yeast powder, respectively. D10 grows fast and reaches at the maximum biomass after 24 hours incubation in nutrient medium. The D10-degradation rate of parathion is determined by using the Gas Chromatography (GC), and is 83.1% after 24 hours. The bio-degradation rate of parathion in simulated and sterilized contamination soils with 100 mg·kg⁻¹ parathion concentration reaches at 66.7% after seven days inoculation. The result shows that the D10 has a great practical value in the remediation of contaminated soils by parathion.

Keywords environmental biology; parathion; *Acinetobacter* sp.; biodegradation

0 引言

对硫磷 (Parathion, PT), 化学名称为 O,O-二乙基-O-(4-硝基苯基) 硫代磷酸酯, 俗称 1605, C₁₀H₁₄NO₃PS, 分子量为

291.26。水中溶解度为 24mg/L (25℃)。PT 纯品外观为无色针状结晶, 工业品为无色或浅黄色油状液体, 蒸汽压 5.04mPa (20℃), 熔点 6.1℃, 沸点 157—162℃/80Pa。微溶于石油, 难溶

收稿日期: 2011-02-14; 修回日期: 2011-04-11

基金项目: 2008 年辽宁省科技计划重大、重点项目 (2008215002); 2008 沈阳市大型科学仪器设备共享服务专项 (2008gx-019)

作者简介: 姜莉, 研究员, 研究方向为环境化学, 电子信箱: z88588@126.com; 姜彬慧 (通信作者), 副教授, 研究方向为环境生物技术, 电子信箱: jiangbinhui@mail.neu.edu.cn

于水;能溶于苯、甲苯、醇、酮、二氯乙烷、氯仿、四氯化碳、乙醚、二氧六环等多种有机溶剂,与浓硫酸能完全混合。PT 在环境中易受光、空气、水的影响,而分解为无毒物质,但比其他有机磷农药稳定。PT 为农业广谱杀虫剂,属高毒类有机磷农药,其在环境中的残留期为 3 周。目前,中国有机磷农药使用量大,其中 PT、甲基对硫磷(MP)等高毒剧毒品种约占农药总用量的一半以上^[1]。农业部已明文规定于 2007 年 1 月 1 日起全面禁止该类农药的使用,但是近几年农业部组织进行的蔬菜农药残留例行检测中,PT 和甲胺磷等高毒、剧毒农药的残留仍然是农残超标的主要种类^[2-3],由于其长期的不规范使用,已经给人们生活和土壤环境等带来了严重的危害^[4-7]。目前农药污染的处理方法很多,但是与其他化学、物理以及动植物降解去除方法相比较,微生物具有降解速度快、降解彻底、不易产生二次污染的优势。因此,PT 农药污染土壤的微生物修复一直是人们研究的热点问题之一。筛选高效 PT 农药降解微生物,具有很大的研究和应用价值^[6-9]。近年来,国内外学者利用微生物降解有机磷农药的研究多集中在甲基对硫磷和甲胺磷等降解方面。段海明等^[10]从农药生产企业的废水处理系统中分离筛选出能够降解甲基对硫磷和毒死蜱的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)HY-1,并系统研究了影响降解甲基对硫磷和毒死蜱的主要因素。结果表明,在以甲基对硫磷为唯一磷源培养基中,HY-1 能够高效降解初始浓度为 50 mg/L 的甲基对硫磷,6h 的降解率可达 89.1%。随着降解时间的增加,其降解率无显著变化。而 HY-1 也能利用 100mg/L 的毒死蜱为唯一磷源,对甲基对硫磷降解 72h,其降解率可达到 37.2%。王彬彬等^[11]从农药厂污水处理池的活性污泥中分离的施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)HS-D36,其菌株可以分别以甲基对硫磷或对硝基苯酚(PNP)为唯一碳源,对 MP 和 PNP 进行降解,在 3h 内,对浓度为 50mg/L 的 MP 的降解率为 90%。另外,还有研究者分离出甲基对硫磷降解菌 YcX-20^[12]和有机磷农药降解菌 HS-A32^[13]。其中,HS-A32 能以甲胺磷作为唯一的碳源和氮源,在 30℃和最适 pH 值为 7.0 的条件下,对浓度为 1000mg/L 的甲胺磷的降解率可达 82%。但是,目前有机磷农药降解菌的研究还只局限于实验室和小规模的研究中,为了消除土壤中 PT 的污染,本研究通过定向筛选,得到 PT 降解菌 D10,并对其菌株进行分类学、生长因子与降解效率关系的研究。通过利用 D10 对模拟农药污染土壤中 PT 降解的研究,为 PT 土壤污染的微生物修复提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样

菌种筛选土样取自河北省石家庄栾城县某村长期受有机磷农药(氧化乐果、甲基对硫磷及对硫磷)污染的农田(麦地)土壤。

模拟土壤修复实验土样取自东北大学未喷洒过农药的校园花园土。经检测该样地土样质地为黏性土壤,含水率

0.213%,有机质含量 2.43%(分析采用水合热法),pH 值为 6.98。

1.1.2 仪器设备

SW-CJ-2FD 无菌洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、HP6890 气相色谱仪(美国惠普公司)、SHZ-82A 恒温振荡器(江苏国华仪器有限公司)、MLS-3780 灭菌锅、LRH-250-A 生化培养箱(广东省医疗器械厂)、721 分光光度计(上海实博实业有限公司)、RE52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、JB/T 5374-1991 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)等。

1.1.3 药品和试剂

PT 农药:50%PT 乳油(天津红星制药厂);二氯甲烷色谱纯(天津市外环化工有限公司),正己烷色谱纯(天津市外环化工有限公司)。

1.1.4 培养基

营养培养基:牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,蒸馏水 1000mL,pH 值为 7.2—7.4。

营养半固体培养基:牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,琼脂 10g,蒸馏水 1000mL,pH 值为 7.2—7.4。

营养固体培养基:牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,琼脂 15—20g,蒸馏水 1000mL,pH 值为 7.2—7.4。

无机盐培养基^[8]:Na₂HPO₄ 1.0g,KH₂PO₄ 0.5g,MgSO₄ 0.5g,NH₄Cl 0.5g,CaCl₂ 0.05g,FeSO₄ 0.01g,蒸馏水 1000mL,pH 值为 7.2—7.4。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物的筛选与驯化

1.2.1.1 土样的采集

先将表层土(0—20cm)铲去约 1—2cm,采集表层土样。自样地的上、下、左、右、中共取样约 30g,混合后将土样装入无菌袋备用。

1.2.1.2 初筛

称取 3.0g 土样于三角瓶中,加入 50mL 无菌水,于恒温振荡器中 28℃,120r/min 振荡 24h。取上层菌液 0.1mL 于营养培养基中培养 24h。取 1.0mL 菌液加入无菌水中逐步稀释至体积比为 10⁻²、10⁻⁴、10⁻⁶ 共 3 个浓度级,分别取 0.1mL 倒平板,每个浓度级设 3 个平行样。待长出菌落后观察、编号、镜检,挑取菌落数较多、长势较好的不同菌落分别接入斜面保藏。

1.2.1.3 驯化及复筛

挑取上述保藏的菌株分别接入含有 5mg/L PT 的无机盐培养基中,28℃,120r/min 培养 48h 后无菌水稀释至体积比为 10⁻²、10⁻⁴ 倒平板,待菌落长出后选择长势较好的单个菌落编号后接入含有 10mg/L PT 的无机盐培养基中进入下一轮的筛选和驯化,同步倒平板观察长势。逐步增加培养基中 PT 浓度,淘汰对 PT 耐受性差的菌株。

1.2.2 菌种鉴定

(1) 培养特征观察

观察菌株在营养培养基、营养半固体培养基和营养固体

平板培养基中的培养特征^[14]。

(2) 形态学观察

对菌株进行简单染色、革兰氏染色、鞭毛染色、荚膜染色和芽孢染色,观察细胞的形态特征^[13]。

(3) 生理生化特性

菌株生理生化特性的鉴定参考文献[15-16]。

(4) 16S rDNA 序列分析的测定

细菌总 DNA 的提取及 16S rDNA PCR 扩增试验参考文献[17]。

1.2.3 最适生长条件的确定

根据微生物所需营养物质和生长条件选择以下指标开展研究,实验结果为 3 个平行样的平均值。

(1) 生长曲线的测定

挑取经斜面活化后的 D10 接入营养培养基中,分别设对照样品(不加菌株的培养基)。于 28℃,初始 pH 值 7.0,120 r/min 培养 2、4、8、24、48、72h 分别取样,于 600nm 处测其吸光度,绘制生长曲线。

(2) 最佳生长温度和初始 pH 值确定

吸取同量的 D10 菌液于装有 50mL 营养培养基的三角瓶中,分别考查温度(18℃、28℃、37℃、45℃)、初始 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)。每组分别设对照样,于 28℃(温度试验除外),120r/min 培养 24h 后于 600nm 分别测其吸光度,确定最佳生长条件。

(3) 最佳 C 源的确定

准确称取质量分数为 0.1%的不同 C 源(葡萄糖、淀粉、蔗糖和柠檬酸钠),分别加入含无机盐培养基 50mL 的三角瓶中,灭菌后加入同量的菌液,于 28℃,初始 pH 值 7.0,120r/min 培养 24h 后分别测其 600nm 处吸光度,确定最佳 C 源。

(4) 最佳 N 源的确定

准确称取质量分数为 0.05%的不同 N 源(酵母粉、蛋白胨、氯化铵和硝酸钾),分别加入以柠檬酸钠(质量分数为 0.1%)为碳源的无机盐培养基(不添加氯化铵)中,于 28℃,初始 pH 值 7.0,120r/min,培养 24h 后分别测其 600nm 处吸光度,确定最佳 N 源。

1.2.4 D10 对 PT 降解作用研究

(1) D10 对 PT 的降解作用

经筛选与驯化菌株 D10 对 PT 的最大耐受质量浓度为 1800mg/L,但对 PT 的降解率仅为 25%。经诱变复壮后的 D10 对 PT 的降解率提高至 82.2%^[18]。因此,本文利用诱变复壮后的 D10 开展后续实验。将 D10 接入营养培养基活化 24h,取 5mL 接入含 44mL 无机盐培养基和 1mL PT 的三角瓶中,使 PT 最终浓度为 100mg/L,反应 24h 后取样,提取培养基中残留 PT,用气相色谱仪测样品中 PT 的残留量,计算降解率。

$$\text{降解率}(\%) = \frac{\text{对照品峰面积} - \text{样品峰面积}}{\text{对照品峰面积}} \times 100\%$$

(2) 提取培养基中残留 PT 的方法

培养基中残留 PT 的提取方法见参考文献[18],用正己烷

定容至 1mL,气相色谱仪检测。

(3) 气相色谱仪检测条件

柱温采用程序升温,起始温度为 50℃,保持 1min,以 15℃/min 上升至 240℃,保持 25min。检测器(FPD)温度为 250℃,汽化室温度为 240℃。进样量 2.0μL。载气为 N₂ 气(99.999%),压力为 73.4kPa,氢气的流量为 80mL/min,空气的流量为 120mL/min。

1.2.5 模拟土壤的微生物修复实验

模拟土壤修复试验土样取自东北大学未喷洒过农药的校园花园土,土样采集方法同 1.2.1.1。

(1) 添加回收率实验

取适量上述土样灭菌后,加入 15mL 稀释后的 PT 农药,使土样中 PT 的理论浓度达到 100mg/kg,补充一定水分,使得土样含水量在 15%左右,搅拌均匀。取一定量的 PT 原药,用正己烷稀释至浓度为 100mg/L,取 5mL 备用。称取一定量的上述土样 3 份,使得每份土样中农药含量为 0.5mg。分别用丙酮、正己烷、二氯甲烷萃取,层析柱脱水脱色,旋转蒸干,正己烷定容至 5mL。每种萃取剂设两个平行样。选取回收率较高的萃取剂进行后续实验。

(2) 菌悬液制备

将斜面保存的菌种接种至 200mL 营养培养基内,28℃、120r/min 恒温振荡培养箱培养 24h,3000r/min 离心 20min,收集菌体加入 30mL 无菌水,充分振荡,混匀。

(3) 层析柱制备

先在玻璃层析柱(20cm×1.5cm)底部垫少量吸脂棉,再从下至上依次装入 1cm 无水硫酸钠,3g 氟罗里硅土,0.3g 活性炭,1cm 无水硫酸钠。轻轻敲击管壁使其充实,用 10mL 二氯甲烷预淋洗层析柱,通过调节活塞控制流出速度,弃去预淋液,待无水硫酸钠表面刚露出液面时,关闭活塞,待用。

(4) D10 对农药污染土壤的降解作用

将东北大学未喷洒过农药的校园花园土,风干过筛(0.5mm)后,各取 100.0g 装入 6 个 250mL 的烧杯中密封,121℃下间歇灭菌 3 次,每次 30min,制备 6 个无菌土样。分别加入 15mL 稀释后的 PT 农药,使每 2 个土样内 PT 的理论浓度达到 10、50、100mg/kg。向 3 个浓度梯度土样的分别加入 5mL 菌液,5mL 无菌水,搅拌均匀,于 28℃恒温培养箱中培养。每天补足一定量水分,使得每个土样的含水率维持在 15%左右。方法同上制备 3 组 PT 浓度为 10、50、100mg/kg 的对照样,每组加入 10mL 无菌水作对照。分别在 1、3、7d 后取样,气相色谱法检测 PT 含量,计算降解率。

(5) 土样中农药的萃取

取 10.0g 土样(1.2.5(4)处理过的),加入二氯甲烷进行超声萃取两次,静置,收集上清液,将两次萃取上清液合并,在 35±2℃下旋转蒸发至 5mL,通过层析柱脱水脱色。再用二氯甲烷淋洗层析柱 3 次,将收集的过滤液旋转蒸干,正己烷定容至 5mL,备用。

2 结果与分析

2.1 初筛、复筛及驯化结果

经过初步筛选,共得到 6 株长势较好的菌株,其编号为 D4—D9。复筛后从编号为 D5 的菌株中又分离出了两种菌株,最终共得 7 株菌,其编号为 D4—D10,而 D10 为其中之一。同步增加试验农药浓度,驯化后淘汰其中 D4—D7 的 4 株,在剩余 3 株中选择性状较稳定的 D10 进行进一步驯化,并进行后续试验。菌株 D10 最终驯化浓度为 1800mg/L。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的微生物学特性

D10 的菌落为乳白色、边缘整齐、表面较湿润,中部凸起明显。光学显微镜下观察其个体形态呈周期性杆—球变化(图 1),最初筛选出来未经过高浓度农药驯化的 D10 菌株个体形态为杆状,随着驯化农药浓度的加大,菌体形态球状多于杆状,最后呈球状。经研究表明,D10 菌体形态为球—杆混合态,随模拟农药浓度的增加,D10 从杆状转变为球状,形成球—杆混合态。由此可见球状为 D10 的应激态。

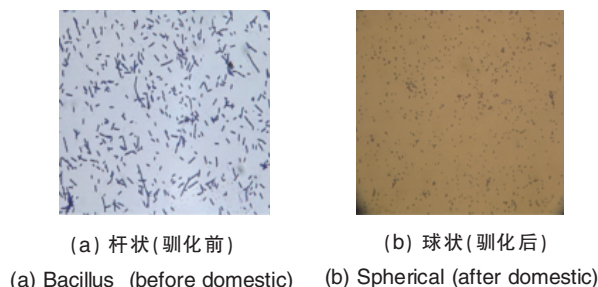


图 1 D10 个体形态

Fig. 1 Individual morphology of D10

为了进一步研究 D10 的生理生化特征,选择 8 种常规的检测指标进行检测,其结果见表 1。此外,D10 还能利用糖原、Tween40、Tween80、L-阿拉伯糖、丙酮酸甲酯、丁二酸-甲酯、 α -羟基丁酸、 β -羟基丁酸、丙酸、D,L-乳酸、D,L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-脯氨酸、D,L-丝氨酸、D,L-肉碱和 L-苏氨酸等有机物。

表 1 D10 生理生化特征汇总表

Table 1 List of physiological characteristics of D10 bacterium

检测项目	结果	检测项目	结果
革兰氏染色	阴性	M.R.实验	阴性
荚膜染色	无荚膜	V.P.实验	阴性
芽孢染色	无芽孢	淀粉水解实验	阴性
接触酶实验	阳性	葡萄糖氧化发酵	发酵型

2.2.2 16S rDNA 序列分析

用 PCR 扩增 D10 的 16S rDNA 并作测序分析。结果表明,D10 菌的 16S rDNA 序列长度为 1417bp。碱基序列为 GGTAGCGTCCTCCTTACGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAACTCCCATGG……GTCCGCCGCTAGGTCAGTTACCGA

AGCAACCTTCCCCGCTCGACTTGCATGTGTAAAGC。BLAST 检索分析表明,D10 菌与不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)的同源性为 100%,由此可确定 D10 为不动杆菌属微生物。

2.3 最适生长条件的确定

2.3.1 D10 的生长曲线

D10 的生长曲线见图 2,从中可以看出 D10 生长周期较短,大约为 24h,其生长的延缓期仅 2h,在营养培养基中培养 4h 进入对数增长期,15h 达到最大生物量。所以在后续试验中尤其是降解 PT 试验中采取的菌液均培养 24h,此时菌液具有最大活性。

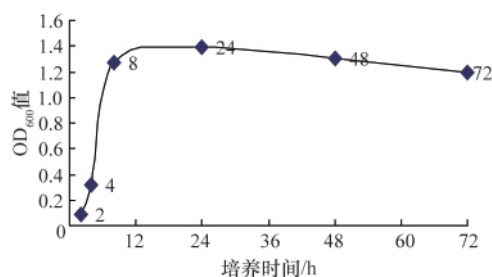


图 2 D10 在营养培养基中的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of strain D10 in nutrient media

2.3.2 最佳生长条件的选择

由图 3、图 4 可以看出,D10 在 18℃—37℃范围内均能较好生长,其中 28℃为其生长的最佳温度,超过 37℃对 D10 生长抑制作用较明显。D10 在初始 pH 值 5.0—8.0 的范围内均

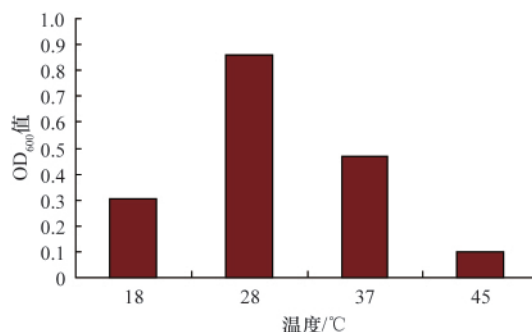


图 3 温度对 D10 生长影响

Fig. 3 Effect of temperature on growth of D10 strain

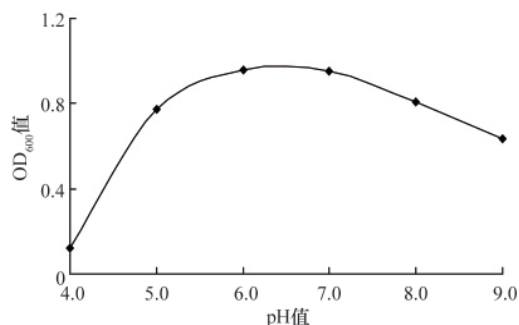


图 4 pH 值对 D10 生长影响

Fig. 4 Effect of pH on growth of D10 strain

能较好生长,最佳初始 pH 值在 6.0—7.0 之间,D10 不适合在 pH 值低于 5.0 和高于 8.0 的环境中生存。

2.3.3 最佳 C、N 源测定

图 5 和图 6 结果表明,D10 以葡萄糖、淀粉和蔗糖为 C 源时,生长情况基本相同,而以柠檬酸钠为 C 源时生长较好,说明 D10 利用小分子有机碳源好于大分子有机碳源(图 5)。以酵母粉、蛋白胨、氯化铵、硝酸钾为 N 源时均能较好地生长,其中以酵母粉为 N 源时生长最好,以尿素为 N 源时生长较差(图 6)。

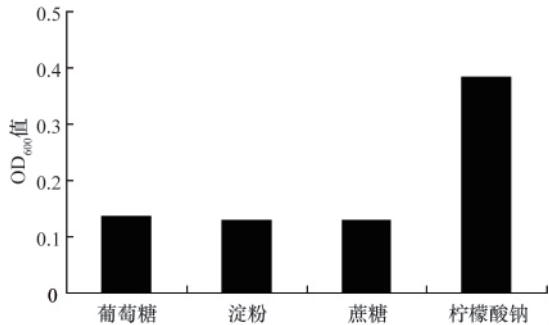


图 5 不同 C 源对 D10 生长影响

Fig. 5 Effect of carbon source on growth of D10 strain

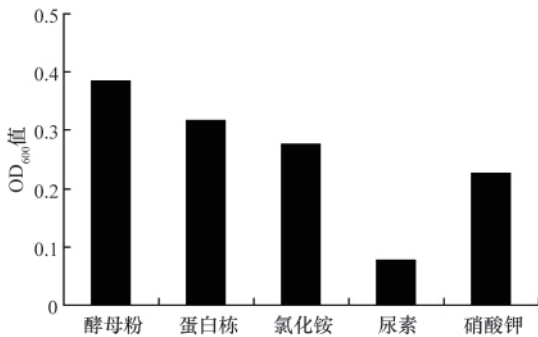


图 6 不同 N 源对 D10 生长影响

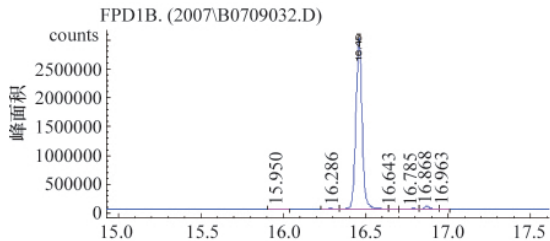
Fig. 6 Effect of nitrogen source on growth of D10 strain

2.4 D10 降解 PT 的作用

经过筛选与驯化的 D10 对 PT 有一定的降解作用,复合诱变后菌株 D10 对农药 PT 24h 降解作用有所提高^[18],其降解 PT 的色谱图见图 7,其中(a)是 PT 标准品的色谱图,(b)是反应 24h 时对照样品的 PT 气相色谱图,(c)是 D10 降解 24h 时的 PT 气相色谱图。从实验结果可以看出,菌株 D10 对 PT 具有明显的降解作用,其降解率为 83.1%。

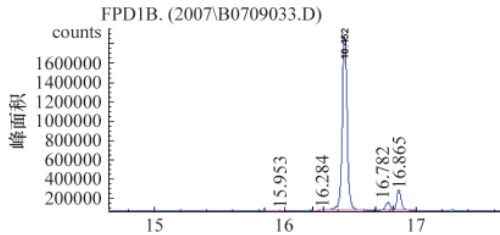
2.5 土壤中 PT 的添加回收分析

土壤中 PT 的添加回收率实验结果见表 2。根据文献报道^[12-13,19]和实验室现有有机溶剂的基础上,选用丙酮、二氯甲烷、正己烷作为土壤中残留 PT 的萃取剂。从表 2 可以看出 3 种萃取剂对土壤中 PT 的回收率:正己烷仅为 19%,丙酮为 31%,而二氯甲烷为 106%,所以选择二氯甲烷为萃取剂应用于模拟土壤降解研究的实验。



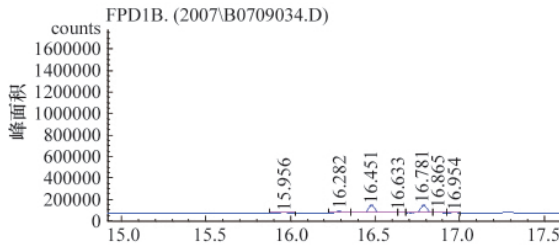
(a) PT 标准品气相色谱图

(a) Chromatogram map of PT standard



(b) 24h 时对照样品中 PT 气相色谱图

(b) Chromatogram map of parathion in a control group after 24 hours



(c) D10 降解 24h 的 PT 气相色谱图

(c) Chromatogram map of parathion in a test group after 24 hours degradation by D10 strain

图 7 标准品、对照组和实验组中 PT 气相色谱图比较
Fig. 7 Chromatogram comparison among standard, control and test group of parathion by HP 6890

表 2 土壤中 PT 的回收率

Table 2 Additive recovery rate of parathion in soil

实验次数	丙酮	二氯甲烷	正己烷	对照
1	0.061	0.233	0.041	0.213
2	0.069	0.234	0.039	0.213
3	0.066	0.219	0.040	0.213
回收率	31%	106%	19%	—

2.6 模拟 PT 污染土壤的微生物修复作用

菌株 D10 修复 PT 污染土壤的实验结果如表 3 所示。总降解率包括土壤对 PT 的吸附、土壤中 PT 的光解以及微生物降解的共同作用。而微生物降解率为总降解率减去对照组的降解率即菌株 D10 对 PT 的降解作用,可以看出在降解 1、3d 时,菌株 D10 对土壤中浓度为 10—50mg/kg PT 仅有微量降解。对浓度为 100 mg/kg 的 PT 3d 的降解率也只有 23.4%。但

在 7d 时,D10 对浓度为 10、50、100mg/kg 的 PT 降解率分别为 16.7%、33.6%和 66.7%。当 PT 浓度较低时,不利于 D10 对 PT 的获取,土壤对 PT 的吸附及 PT 的光解作用占主导地位,所以 PT 的降解率较低。随着 PT 浓度增高,微生物的降解作用逐渐加大。比较微生物降解率和总降解率可以看出,微生物降解 PT 的作用十分明显。

表 3 经 1、3、7d 反应后 D10 在土壤中对 PT 的降解作用
Table 3 D10 degradation to parathion in soil within one day, three days and seven days, respectively

PT 浓度/(mg·kg ⁻¹)	降解时间/d	微生物降解率/%	总降解率/%
10	1	0.8	1.3
10	3	1.5	2.2
10	7	16.7	22.9
50	1	0.5	0.7
50	3	1.3	1.9
50	7	33.6	37.7
100	1	0.3	0.6
100	3	23.4	25.6
100	7	66.7	70.6

3 讨论

由前面分析可以看出,微生物降解是被农药污染的土壤
中农药去除的主要途径。利用微生物修复农药污染的土壤
时,会受到多种因素的影响,但最重要的是降解时间、微生物
接种量及农药浓度。当微生物被接种到土壤中时,因需要适
应新环境,所以会有一段生长滞留期,不同的微生物滞留期
不同。本实验中菌株 D10 在土壤中的生长滞留期大约为 2d。
微生物的接种量在一定程度上影响着滞留期的长短及降解
率的高低。当农药浓度较低时,不利于微生物对农药的获取,
而农药浓度过高又会抑制菌株生长,可见选择合适的农药浓
度是进行微生物修复成败的关键,本文研究结果与其他学者
的结果相似。周军英等^[19]的研究结果表明,杀虫单高效降解菌
LY-4 的接种量、农药浓度、土壤湿度、土壤 pH 值、农药与土
壤的混合程度以及外加有机物均可影响微生物对农药的降
解作用。王华^[20]对铜绿假单胞菌 L-b 进行田间小区实验,结果
表明,菌株 L-b 液体摇瓶发酵菌制剂在土壤中对有机磷农药
乐果有明显的降解效果,对乐果 (15.0mg/kg·7d) 去除率为
63.6%。本研究中菌株 D10 在含有较高浓度 (100mg/kg)PT 污
染的土壤中具有较高活性,7d 的降解率可达 66.7%。

4 结论

在农药污染环境治理的实践中,高效、无二次污染以及低成本生物降解越来越体现出了应用的优势。微生物及其降解酶的降解作用是环境中化学农药分解与转化的重要途径,利用微生物及其产生的降解酶进行土壤和水体中化学农药的去毒与净化是治理化学农药污染的有效方法,并已显示

出良好的应用前景。本文对筛选分离出的野生菌株 D10 的最佳生长条件及对 PT 的降解作用进行研究, 获得如下结论。

(1)从 PT 污染土壤中筛选出的野生菌株 D10,在营养培养基中培养 4h 即进入对数增长期,24h 达到最大生长率,D10 的快速生长为以后 PT 农药污染土壤修复奠定了良好的研究基础。

(2)D10 对模拟 PT 污染土壤具有显著的降解作用。在 PT 农药浓度为 100mg/kg 的污染土壤中,7d 对 PT 农药的降解率达到了 66.7%。利用 D10 类菌株对模拟农药 PT 污染土壤降解作用的研究尚属首次报道。研究结果显示,D10 在微生物修复农药污染土壤中具有较好的实用价值与广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] 毛英明. 有机磷农药在土壤中的降解转化过程及影响因素研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2003, 2-3.
- [2] Mao Yingming. Study on the degradation process and environmental factors of organophosphorus pesticides in soil [D]. Nanjing: Nanjing University of Science, 2003, 2-3.
- [3] 张兴旺. 云南省蔬菜中有机磷农药残留现状分析[J]. 农业环境与发展, 2009(4): 85-88.
- [4] Zhang Xingwang. *Agro-Environment & Development*, 2009(4): 85-88.
- [5] 唐瑾, 王进忠, 杨宝东, 等. 对硫磷在油菜不同生育期上的残留和降解动态分析[J]. 北京农学院学报, 2006, 24(2): 51-53.
- [6] Tang Jin, Wang Jinzhong, Yang Baodong, *et al.* *Journal of Beijing Agricultural College*, 2006, 24(2): 51-53.
- [7] 宋春华, 景立新. 对硫磷对雌性大鼠的亚急性毒性探讨 [J]. 工业卫生与职业病, 2009, 35(5): 266-268.
- [8] Song Chunhua, Jing Lixin. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2009, 35(5): 266-268.
- [9] Buratti F M, Leoni C, Testai E. The human metabolism of organophosphorothionate pesticides: Consequences for toxicological risk assessment [J]. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2007, 2 (1): 37-44.
- [10] 刘勇, 付荣恕, 任宗明. 2 种有机磷农药联合胁迫下日本青鳉的逐级行为响应[J]. 环境科学, 2010, 31(5): 1328-1332.
- [11] Liu Yong, Fu Rongshu, Ren Zongming. *Environmental Science*, 2010, 31 (5): 1328-1332.
- [12] Karanth S, Olivier K, Liu J, *et al.* *In vivo* interaction between chlorpyrifos and parathion in adult rats sequence of administration can markedly influence toxic outcome [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, 177(9): 247-255.
- [13] Yang C, Dong M, Yuan Y, *et al.* Reductive transformation of parathion and methyl parathion by *Bacillus* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(3): 487-493.
- [14] 梁伊丽, 曾富华, 卢向阳. 有机磷农药的微生物降解研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(6): 51-55.
- [15] Liang Yili, Zeng Fuhua, Lu Xiangyang. *Journal of Microbiology*, 2004, 24 (6): 51-55.
- [16] 段海明, 王开运, 王冕, 等. 蜡状芽孢杆菌 HY-1 降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响因素研究 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29 (3): 437-443.
- [17] Duan Haiming, Wang Kaiyun, Wang Mian, *et al.* *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(3): 437-443.
- [18] 王彬彬, 熊丽, 郑永良, 等. 甲基对硫磷高效降解菌的分离鉴定及降解

- 解酶基因的克隆表达[J]. 环境科学学报, 2008, 28(10): 1969-1975.
- Wang Binbin, Xiong Li, Zheng Yongliang, et al. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(10): 1969-1975.
- [12] 姜红霞, 王圣惠, 薛庆节, 等. 甲基对硫磷降解菌 *Alcaligenes*. sp. YcX-20 的分离鉴定及降解性能研究 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 962-965.
- Jiang Hongxia, Wang Shenghui, Xue Qingjie, et al. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(5): 962-965.
- [13] 郑永良, 刘德立, 高强, 等. 甲胺磷农药降解菌 HS-A32 的分离鉴定及降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 399-403.
- Zheng Yongliang, Liu Deli, Gao Qiang, et al. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2006, 12(3): 399-403.
- [14] 周群英, 王士芬. 环境工程微生物学 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2008, 294-330.
- Zhou Qunying, Wang Shifen. *Environmental engineering microbiology* [M]. 3rd edition. Beijing: Higher Education Press, 2008, 294-330.
- [15] 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, 353-364.
- Dong Xiuzhu, Cai Miaoying. *Identification of common bacterial system manual*[M]. Beijing: Science Press, 2001, 53-364.
- [16] 赵斌, 何绍红. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 141-158.

- Zhao Bin, He Shaohong. *Experimentation of microbiolog* [M]. Beijing: Science Press, 2002, 141-158.
- [17] 金由辛, 包慧中, 赵丽云, 译. 精编分子生物学实验指南 [M]. 第 5 版. 北京: 科学出版社, 2008, 587-591.
- Jin Youxin, Bao Huizhong, Zhao Liyun trans. *Short protocols in molecular biology* [M]. 5th edition. Beijing: Science Press, 2008, 587-591.
- [18] 姜彬慧, 史艳芳, 李志明, 等. 一株对硫磷降解菌的诱变复壮研究[J]. 安全与环境学报, 2008, 8(6): 13-17.
- Jiang Binhui, Shi Yanfang, Li Zhiming, et al. *Journal of Safety and Environment*, 2008, 8(6): 13-17.
- [19] 周军英, 林玉锁, 徐亦刚, 等. 巨大芽孢杆菌 LY-4 对土壤中杀虫单农药的降解[J]. 中国环境科学, 2000, 20(6): 511-514.
- Zhou Junying, Lin Yusuo, Xu Yigang, et al. *China Environmental Science*, 2000, 20(6): 511-514.
- [20] 王华. 有机磷农药降解菌的筛选及其特性的初步研究[D]. 海口: 华南热带农业大学, 2005, 48.
- Wang Hua. *Isolation of degrading microbe of organophosphorous pesticides and studies in its properties* [D]. Haikou: South China University of Tropical Agriculture, 2005, 48.

(责任编辑 吴晓丽)

· 学术动态 ·



“2011 年中国建筑学会 建筑史学分会年会暨学术研讨会”征文

中国建筑学会、中国科学技术史学会将于 2011 年 10 月 14—16 日在兰州召开“2011 年中国建筑学会建筑史学分会年会暨学术研讨会”,会议主题为“建筑历史与地区文化”。

征文范围:地区城市与建筑历史研究与规划设计智慧挖掘;地区建筑史研究与现代地域建筑创作;传统建筑地域生态技术研究;地区建筑历史研究与文化遗产保护;建筑遗产保护与地区人居环境可持续发展

全文截止日期:2011 年 6 月 20 日。

通信地址:兰州市七里河区兰工坪路 287 号(730050)孟祥武;联系电话:0931-2976093;传真:0931-2976034;电子信箱:CAHC2011@163.com。

《科技导报》征集“封面文章”



为快速反映我国最新科技研究成果,《科技导报》开设“封面文章”栏目,将最新科研成果第一时间在我刊最显著位置——封面上突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域我国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过 300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。