

BHC-A 与 CDS-1 降解菌对六六六、呋喃丹 污染土壤的原位生物修复*

张明星 洪青 何健 管晓进 虞方伯 郭鹏 李顺鹏[†]

(南京农业大学生命科学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

IN-SITU BIOREMEDIATION OF CARBONFURAN AND HCH CONTAMINATED SOIL USING DEGRADING BACTERIA BHC-A AND CDS-1

Zhang Mingxing Hong Qing He Jian Guan Xiaojing

Yu Fangbo Guo Peng Li Shunpeng[†]

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, MOA, Nanjing 210095, China)

关键词 六六六; 呋喃丹; 农药残留; 降解菌株 (BHC-A 和 CDS-1); 降解率; 原位生物修复

中图分类号 S154.39 文献标识码 A

河北省某地区是我国特种作物—金丝小枣的主要产区, 由于农药的大量使用, 导致农药残留污染影响农产品品质, 而且会造成地水的严重污染, 直接危害身体健康。微生物由于种类丰富, 代谢途径多样, 其转化、降解各种化合物潜力巨大^[1,2]。从 20 世纪 60 年代开始, 国内外就开展严重污染环境的异生物质的微生物降解研究, 筛选分离了大量降解性微生物^[3~5], 并且开发了各种微生物降解制剂及配套产品应用于原位生物修复^[6~8]。六六六 (HCH) 是有机氯类高毒、持久性污染物, 虽然在我国已禁用 20 多年, 但在该地区的土壤中仍然存在; 呋喃丹是氨基甲酸酯类农药, 由于其毒性大、残留高, 近年虽已控制使用但残留情况仍然严重。本文报道通过使用两株农药降解菌株 BHC-A 与 CDS-1 对土壤中严重超标、广泛存在的六六六、呋喃丹的农药残留原位生物修复情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试土壤 实验地点位于河北省某地

区, 土壤类型为轻盐二合土; 选择土壤中农药残留相对较严重且田间栽培管理措施一致的多年种植枣树的地块。各实验小区面积为 667 m², 对照与处理小区各 3 块。BHC-A、CDS-1 发酵液的使用量均确定为 6 kg 每 667 m²。喷施菌剂前 2 d 对试验区进行漫灌以提高实验区土壤的水分含量, 将试验菌株的发酵液兑水稀释 500~1 000 倍后, 分别于 2004 年 5 月 12 日 16 点左右均匀喷施于降解菌处理小区, 喷施完毕后采用机械翻耕地表 20 cm 左右使菌液与土壤充分混匀。

1.1.2 供试菌株 六六六降解菌株 BHC-A (*Sphingomonas* sp. BHC-A)、呋喃丹降解菌株 CDS-1 (*Sphingomonas* sp. CDS-1) 由农业部农业环境微生物工程重点开放实验室分别从六六六、呋喃丹污染的土壤中富集筛选分离且均能降解靶标农药。

1.1.3 菌剂 所用菌剂由农业部农业环境微生物工程重点开放实验室发酵生产, 发酵方法参见文献[9], 发酵液菌体浓度分别为 BHC-A: 9.3×10^9 个 ml⁻¹, CDS-1: 1.5×10^{10} 个 ml⁻¹。

1.1.4 供试农药标样 六六六 (98.7%, Sigma 公司), 呋喃丹 (99.8%, 苏州农药厂)。

* 国家自然科学基金项目 (40471073, 30400013)、国家“863”计划 (2003AA241150, 2004AA246070, 2004AA214102) 和江苏省科技攻关项目 (BE2002345, BE200334, BG2005322) 项目资助

[†] 通讯作者, Tel: 86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 张明星 (1978~), 男, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究

收稿日期: 2005-01-03; 收到修改稿日期: 2005-04-22

1.1.5 仪器 气相色谱仪(HP6890), ZD-88-3 恒温振荡器(太仓市光明实验分析仪器厂), 发酵罐(GUJS-7-70AUTOBIO2000型)。

1.2 土壤理化性质及重金属含量的测定

参见文献[10]。表1列出了实验区土壤的主要理化性质

表1 实验区土壤主要理化性质

| 实验区 | 土壤质地 | pH | 水分含量 (g kg ⁻¹) | 有机质 (g kg ⁻¹) | 有机氮 (g kg ⁻¹) | 速效磷 (mg kg ⁻¹) | 速效钾 (mg kg ⁻¹) |
|-----|------|-----|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照区 | 砂质壤土 | 7.3 | 413 | 32 | 3.4 | 6.54 | 105.8 |
| 处理区 | 砂质壤土 | 7.4 | 427 | 29 | 3.7 | 6.79 | 108.4 |

1.3 土壤中微生物数量的测定

分别在自然条件下于施菌前及施菌后2周内采用五点取样法取各处理实验小区地表0~20 cm土壤,自然风干过40目筛备用,测定各处理小区土壤中微生物数量,测定方法参见文献[11]。

1.4 土壤中农药残留测定

分别在自然条件下于施菌前及施菌后3、7、15 d采用五点取样法取各实验小区地表0~20 cm土壤,自然风干过40目筛备用,测定各对照及处理小区土壤中靶标农药的含量。

1.4.1 六六六土样的提取及净化 取10 g风干土壤样品,取5 g无水硫酸钠及150 ml(丙酮:正己烷的体积比为1:1)于经预处理的索氏抽提器中,回流提取,冷却后浓缩定容至10 ml,过佛罗里硅土柱净化。

1.4.2 六六六的气相色谱测定及其检测条件 配HP-5色谱柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm),汽化室温度290,检测器温度300,流速1.8 ml min⁻¹,ECD检测器。

1.4.3 呋喃丹土样的提取及净化 取20 g风干土壤样品与4 ml 0.25 mol L⁻¹盐酸、160 ml二氯甲烷于索氏抽提器,回流提取,冷却后浓缩定容至10 ml,过佛罗里硅土柱净化。

1.4.4 呋喃丹测定的气相色谱及其检测条件 毛细管柱(15 m × 0.32 mm),汽化室温度220,检测器温度220,色谱柱温度170,流速1.5 ml min⁻¹,氮磷检测器。

2 结果与分析

2.1 实验区土壤重金属含量

表2结果表明,实验区土壤中各项重金属的含量

化性质,可以看出,实验区土壤的水分含量相对较高,是漫灌后的测定值,因而其值相比平常含量高。而土壤有机质、有机氮、速效磷的值则相对偏低,pH值结果表明实验区土壤偏碱性。结合供试菌株相关性质,实验区土壤的相关性质符合试验菌株降解条件。

均低于国家相关标准,其中锌含量相对较高,这可能与该地区广泛大量使用杀菌剂代森锰锌有关。待试菌株的生物学特性研究结果表明在测定的金属离子浓度值下不会影响实验菌株对靶标农药的降解作用。

表2 实验区土壤中重金属含量

| 实验区 | Cd | Zn | Cu | Pb | Hg | Cr |
|-----|------------------------|-------|-------|----|-------|-------|
| | (mg kg ⁻¹) | | | | | |
| 对照区 | ND | 4.701 | 0.271 | ND | 0.003 | 0.002 |
| 处理区 | ND | 4.683 | 0.201 | ND | 0.006 | 0.001 |

注:ND表示在测定条件下未检测出

2.2 实验区土壤中六六六的农药残留及施用降解菌 BHC-A 后的降解

表3表明,六六六在当地土壤中污染严重,虽然六六六已在当地禁用多年,但是由于六六六在土壤环境中的自然条件下降解非常困难,其在自然环境中的半衰期长达30 a左右。通过对土壤施用降解菌 BHC-A 后7 d农药降解率达到86.16%,土壤中的六六六残留量降至0.31 mg kg⁻¹,15 d后降至0.22 mg kg⁻¹降解率达90.18%,其含量符合农业生产的生态环境标准。在本实验期间(15 d),对照区土壤中六六六的残留量变化差异不显著,土著微生物对农药残留的降解率可以忽略。由此可见在自然环境条件下相当长的时间内六六六在土壤中的污染仍然难以解决。因此通过人工投加农药高效降解菌株 BHC-A 实施原位生物修复技术可以有效降解本地区大田土壤中的六六六残留污染,改善土壤质量。

表 3 六六六在对照区与 BHC-A 处理区土壤中残留量及降解率

| 实验区 | 施菌前 | 施菌 3 d 后 | | 施菌 7 d 后 | | 施菌 15 d 后 | |
|-----|---------------------------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|
| | 浓度(mg kg^{-1}) | 浓度(mg kg^{-1}) | 降解率 | 浓度(mg kg^{-1}) | 降解率 | 浓度(mg kg^{-1}) | 降解率 |
| 对照区 | 2.43 \pm 0.23 | 2.20 \pm 0.13 | 9.47 % | 2.45 \pm 0.11 | — | 2.72 \pm 0.23 | — |
| 处理区 | 2.24 \pm 0.10 | 1.72 \pm 0.17 | 23.21 % | 0.31 \pm 0.13 | 86.16 % | 0.22 \pm 0.16 | 90.18 % |

注:表中降解率的计算方法为,各实验小区施菌前农药残留量的算术平均值减去施菌后农药残留量的算术平均值的差值再除以施菌前农药残留量的算术平均值

2.3 实验区土壤中呋喃丹的农药残留及施用降解菌 CDS-1 后的降解

从表 4 可以看出,实验区土壤中呋喃丹的残留量严重超出国家相关生产标准,主要原因可能是当地地下害虫危害严重,呋喃丹对地下害虫的防治效果较好,在当地长期广泛使用,而呋喃丹在自然环境中的半衰期为 30~60 d,在实验 15 d 的总降解率只

有 8.68%,这样就造成了呋喃丹在土壤中的残留量不断累积,成为当地土壤中主要的污染物之一。对土壤施用 CDS-1 后,7 d 农药降解率达到 98.10%,15 d 达到 98.90%,比对照中的农药降解提高率 90.22%。土壤中的农药残留显著降低,达到绿色食品生产相关标准。因此通过降解菌实施原位生物修复技术可以短期内治理本地区大田环境中土壤中的

表 4 呋喃丹在对照区与 CDS-1 处理区土壤中残留量及降解率

| 实验区 | 施菌前 | 施菌 3 d 后 | | 施菌 7 d 后 | | 施菌 15 d 后 | |
|-----|---------------------------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|---------------------------|---------|
| | 浓度(mg kg^{-1}) | 浓度(mg kg^{-1}) | 降解率 | 浓度(mg kg^{-1}) | 降解率 | 浓度(mg kg^{-1}) | 降解率 |
| 对照区 | 11.69 \pm 1.45 | 11.10 \pm 1.76 | 5.07 % | 11.61 \pm 1.44 | 0.75 % | 10.68 \pm 1.37 | 8.68 % |
| 处理区 | 11.74 \pm 1.44 | 3.07 \pm 0.78 | 73.84 % | 0.22 \pm 0.23 | 98.10 % | 0.13 \pm 0.19 | 98.90 % |

注:表中降解率的计算方法为,各实验小区施菌前农药残留量的算术平均值减去施菌后农药残留量的算术平均值的差值再除以施菌前农药残留量的算术平均值

呋喃丹残留污染,改善农业生态环境。

2.4 BHC-A 与 CDS-1 在实验区土壤中数量

从图 1、图 2 结合表 3、表 4 分析可以看出,在本实验处理小区的土壤中以一定量的浓度施用农药降解菌 BHC-A 及 CDS-1 后,农药降解菌在自然土壤环境中的浓度与土壤中靶标农药的浓度成正相关,降解菌以一定浓度施入土壤中的一段时间内,由于降解菌需要适应新环境土壤中的各种生理条件使得降解菌数量会有所下降,随着降解菌对外界环境条件

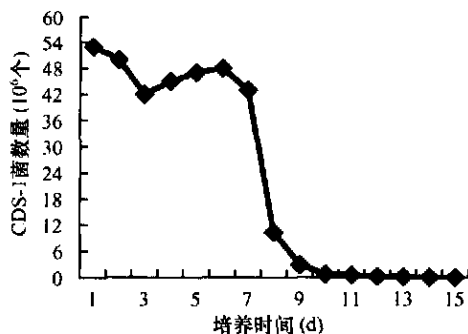


图 1 施菌土壤中 CDS-1 菌株在呋喃丹选择性培养基平板上的计数曲线

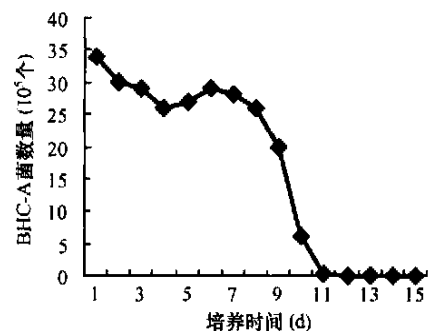


图 2 施菌土壤中 BHC-A 菌株在六六六选择性培养基平板上的计数曲线

的适应降解菌浓度会维持在一定水平。当土壤中降解菌的浓度维持一定水平时,土壤中的农药残留在降解菌作用下快速降解。结合表 1、表 2 数值可以看出随着土壤中相应靶标农药浓度的下降,农药降解菌的碳源浓度也急剧下降,进而影响了该降解菌的生存,其在土壤中的浓度很快下降直至消失。因此在农药污染土壤中喷施农药降解菌后,农药降解菌不会长期在土壤中存在而破坏当地的土壤微生物

生态系统,土壤微生物生态系统在短期内即可恢复。

农药残留的土壤原位生物修复是近年来发展的一项将生物技术用于解决生态环境农药污染的方法,有效解决土壤中农药残留。该方法使用分离自土壤中能降解特定农药的自然菌株,通过实验室研究经大规模发酵后用于农药污染土壤的生物修复。原位生物修复克服了物理、化学方法可能带来的二次污染等问题,而且在经济方面也具有其他方法无可比拟的优势,适合于大田推广应用。土壤中农药残留原位生物修复的效果与实验地区土壤的相关性质尤为重要,如土壤的重金属含量、水分含量、pH值等,因此本试验在确定了试验地区土壤相关性质的条件下,使用六六六降解菌株 BHC-A 及呋喃丹降解菌株 CDS-1 降解了土壤中靶标农药的残留,为土壤中农药残留的原位生物修复提供了依据。

参考文献

- [1] 王学东,欧晓明,王慧利,等. 除草剂咪唑烟酸在土壤中的微生物降解研究. 土壤学报,2004,41(1):156~159
- [2] Shelton D R, Dohery M A. A model describing pesticide bioavailability and biodegradation in soil. Soil Sci. Soc. Am. J., 1997, (4): 1 078 ~ 1 084
- [3] 李顺鹏,蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展. 土壤,2004,36(6):577~583
- [4] Cui Z L, Li S P, Fu G P, *et al.* Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67(10):4 922~4 925
- [5] Crawford R L, Mohn W W. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using flavobacterium. Enzyme Microb. Technol., 1985, 7: 617~620
- [6] Munnecke D M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides: A possible pesticide disposal method. Appl. Environ. Microbiol., 1976, 32:7~13
- [7] 刘智,张晓舟,何建,等. 营养物质及金属离子对 DLL-E4 菌降解对硝基苯酚的影响. 土壤学报,2004,6(2):292~297
- [8] 何翊,魏薇,吴海. 菌剂-菌根联合修复石油污染土壤的实验研究. 土壤,2004,36(6):675~677
- [9] 陈坚,堵国成,李寅,等. 发酵工程实验技术. 北京:化学工业出版社,2003. 28~34
- [10] 中国土壤学会. 土壤农业化学分析方法. 北京:中国农业科技出版社,2000. 1~226
- [11] 沈萍,范秀荣,李广武,等. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社,1999. 92~95