

红树林土壤微生物对甲胺磷的降解

庄铁诚 张瑜斌 林 鹏

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘 要 连续3年(a)的试验结果表明:红树林土壤微生物对农药甲胺磷有较强的降解能力,其降解率是同潮带无红树林土壤微生物的2~3倍;红树林土壤存在着降解甲胺磷的优势细菌类群,从中筛选得一株高效降解菌,其降解率可达70%以上(12 d);混合菌的降解能力优于单株菌;优势降解菌在一定浓度的甲胺磷、适宜的通气、温度和光照等条件下,可发挥更佳的降解作用;在降解过程中,降解优势细菌类群有着明显菌群变化,那种一直占优势的菌株可选育为“工程菌”;红树林土壤微生物具有多功能的环境效应和经济效益。图5表5参4

关键词 土壤微生物;甲胺磷降解;红树林

CLC S154.34 : X592

DEGRADATION OF METHAMIDOPHOS BY MANGROVE SOIL MICROBES

ZHUANG Tiecheng, ZHANG Yubin & LIN Peng

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Degradation of methamidophos by mangrove soil microbes was studied for successive three years. The results indicated: ① Mangrove soil microbes had a better ability of methamidophos degradation, and their degradation rate is 2~3 times higher than that of non-mangrove soil microbes. ② There were some dominant populations in mangrove soil, from which a high efficient strain was isolated; the degradation rate of the strain might be as high as 70% (after 12 days), however, the rate of mixed bacteria was higher than that of single strain. ③ The dominant bacteria had stronger degradation ability under a certain concentration of methamidophos, adaptive ventilation, temperature, and light. ④ The obvious changes of strains in dominant populations could be observed during the course of degradation, of which the "engineering strain" can be sifted out of the dominant strains from beginning to end. ⑤ Multiple environmental effects and economic benefits could be further verified in mangrove soil microbes as well. Fig 5. Tab 5. Ref 4

Keywords soil microbes; methamidophos degradation; mangrove

CLC S154.34 : X592

红树林是处于热带、亚热带海洋潮间带特殊生境的木本植物群落。业已证明,它有着巨大的经济、社会和生态效益,因而愈来愈引起人们的重视。在该生境起了非常重要作用的土壤微生物是红树林生态系统的组成部分之一,几年来的研究工作,使我们认识到红树林土壤微生物对环境的影响是“多功能”的^[1,2,3]。

地处九龙江口的红树林区,是工农业高速发展区域,沿江工农业和生活污水多流经排泄于此,环境不断遭受破坏,承受的干扰和胁迫越来越大,为了保护红树林,管好红树林,利用红树林,发展和提高它的经济、社会和生态效益,多年来我们进行了多学科的综合研究。本文报道“红树林土壤微生物的环境功能”研究的部分结果。

甲胺磷($C_2H_8NO_2PS$)是当前国内外应用最广,使用量很大,残留期较长的有机磷杀虫剂。污染渠道源于上游及两岸农田的排放水。研究着重红树林与无红树林海滩土壤微生物对这一污染物的降解作用。

1 材料和方法

1.1 供试土壤样品

1.1.1 红树林土壤 取自龙海市浮宫镇草埔头红树林区中潮带林下上层土壤的混合样品,退潮后剔除表面

收稿日期: 1999-07-01 接受日期: 1999-10-15

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

薄层(约 1 cm), 取深 1~5 cm 土样. 用已作灭菌处理的采样工具, 随机多点采样, 每点样重 250 g 左右. 最后把各点样品均匀混合. 当天带回实验室, 置冰箱保存(4℃), 隔天上午处理.

1.1.2 无红树林土壤 距上述红树林约 70 m 以远, 同一潮带无红树林光滩土壤, 采样方法同上.

1.2 培养基

1.2.1 无机盐培养基(降解用基础培养基)($\rho/g L^{-1}$) 1 号 NaCl 0.2, KCl 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NH_4NO_3 1.0, 自来水 1 L, pH 7.0; 2 号: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2, $CaSO_4$ 0.08, 陈海水 1 L, pH 7.0.

1.2.2 细菌生长培养基(计数、分离和鉴定)($\rho/g L^{-1}$) 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 15, 琼脂 15~20, 自来水 1 L, pH 7.2.

1.2.3 驯化培养基(筛选驯化降解菌)($\rho/g L^{-1}$) 牛肉膏 3, 蛋白胨 3, 50%的甲胺磷乳剂 100 φ (甲胺磷)/ 10^{-6} , 陈海水 1 L, pH 7.0.

1.3 仪器及试剂

气相色谱仪(GC-9A 日本岛津公司), 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂), 恒温调速摇床(江苏太仓医疗仪器厂), 恒温培养箱(厦门建江医疗器械厂); 50%甲胺磷乳剂(福建三明农药厂), 定磷试剂等所用化学药品均为国产 C.P 和 AR.

1.4 土壤微生物对甲胺磷的降解

1.4.1 固体培养 A 组: 红树林土壤+甲胺磷; B 组: 无红树林土壤+甲胺磷; C 组: 高压灭菌土壤+甲胺磷. A、B、C 3 组的 φ (甲胺磷)均为 100×10^{-6} , 每组作 6 个重复(培养皿), 静置于培养箱内 28℃培养, 定时观察、测定.

1.4.2 液体培养 A 组: 红树林土壤微生物悬浮液+无机盐培养基 1 号+甲胺磷; B 组: 无红树林土壤微生物悬浮液+无机盐培养基 1 号+甲胺磷; C 组: 无菌水+无机盐培养基 1 号+甲胺磷. A、B、C 3 组的 φ (甲胺磷)均为 100×10^{-6} , 每组 2 个重复(250 mL 三角瓶), 置恒温调速摇床(θ 30℃, $n=75$ r/min), 定时观察、测定.

1.5 优势细菌对甲胺磷的降解

1.5.1 优势降解细菌筛选 于 90 mL 驯化培养基中接入事先制备好的红树林土壤微生物悬浮液 10 mL 置恒温调速摇床(θ 30℃, $n=150$ r/min)培养 15 d, 然后用平板分离法, 从稀释度(土壤悬浮液)为 10^{-6} 的平板中挑出细菌菌株定为优势降解菌.

1.5.2 降解处理 摇床培养(θ 28℃, $n=150$ r/min), A 组: 在 φ (甲胺磷)= 100×10^{-6} , φ (甲胺磷)= 500×10^{-6} 和 φ (甲胺磷) 1000×10^{-6} 的 50%甲胺磷无机盐培养基 2 号的三角瓶中(95 mL), 分别加入 M(混合菌)菌液 1 mL(菌液浓度 $n=10 \sim 11$ mL $^{-1}$). B 组: 如 A 组三个甲胺磷浓度, 分别加入 S(单株菌)菌悬液 1 mL(n 同 A 组). C 组: 选用浓度为 500×10^{-6} 的 50%甲胺磷, 接种无菌水 1 mL, 作 CK. 静止培养(室温 θ 22~28℃), A 组: 在含 500×10^{-6} 的 50%甲胺磷和 500×10^{-6} 甲胺磷的无机盐 2 号培养基的三角瓶中, 分别加入 M 菌液 1 mL(菌液浓度 $n=10 \sim 11$ mL $^{-1}$). B 组: 与 A 组一样培养基, 但加入 S 菌液 1 mL(n 同 A 组). C 组: 无菌水 1 mL, 作 CK.

1.5.3 优势菌株的降解条件 黑暗培养(恒温 θ 28 \pm 1℃); 同上述静止培养处理, 只是培养物置于恒温培养箱黑暗培养; 不同浓度: 分别在含 φ (甲胺磷) 100×10^{-6} 、 500×10^{-6} 、 1000×10^{-6} 浓度的甲胺磷无机盐培养基中接种 S 和 M 菌株于 θ 28 \pm 1℃振荡培养, 同种培养方式均做 2 个重复, 定时观察、测定.

1.6 测定方法

1.6.1 微生物及细菌数量的测定 采用常规平板计数法[n (CFU)] 和浊度法[$D_{600\text{nm}}$].

1.6.2 无机磷和总磷的测定 钼酸铵分光光度法.

1.6.3 甲胺磷含量的测定 气相色谱法.

2 结果与讨论

农药进入土壤后, 可被淋溶、蒸发、吸附和降解(转化), 而影响最大的是其降解程度. 土壤微生物则是农药转化降毒最主要角色. 故是研究的重点之一. 下面为 1996~1998 年连续 3 年(a)研究的部分结果.

2.1 红树林土壤微生物对甲胺磷降解

试验比较了红树林土壤微生物和无红树林(光滩)土壤微生物对甲胺磷降解作用。结果列于表 1、2 和图 1、2。

表 1、2 和图 1、2 表明:以土壤固体静止培养的方式,红树林土壤微生物对甲胺磷的降解率高于无红树林土壤微生物。随时间延长降解率增加。整个降解过程可明显分为三个时期:1 d 前是缓慢降解期;1~3 d 曲线几乎成线性上升,为迅速降解期;3 d 后再趋缓慢降解,至 12 d 降解率达 74.30%,也是本试验时间内的最高值。无红树林土壤微生物,1 d 前也是缓慢降解,然而降解率较红树林土壤微生物略大;1~3 d 后其降解率维持慢速增长,至 12 d

表 1 土壤固体培养的微生物甲胺磷降解率($r_D/\%$)

Table 1 Degradation rate of Methamidophos by Microbial cultured by soil solid($r_D/\%$)

土壤微生物类型 Microbial type of soil	时间 Time (t/d)					
	0	1	3	6	9	12
红树林土壤微生物 Mangrove soil microbes	0	7.50	66.74	69.56	73.32	74.30
无红树林土壤微生物 Non-mangrove soil microbes	0	17.0	24.44	30.08	35.48	40.42

表 2 液体振荡培养微生物降解形成的无机磷含量($\rho/\text{mg L}^{-1}$)

Table 2 Concentration of inorganic phosphate produced by microbes cultured by liquid shake($\rho/\text{mg L}^{-1}$)

土壤微生物类型 Microbial type of soil	时间 Time (t/d)					
	1	3	4	8	10	12
红树林土壤微生物 Mangrove soil microbes	0.48	1.03	1.75	2.72	4.85	6.20
无红树林土壤微生物 Non-mangrove soil microbes	0.39	1.15	1.10	0.98	1.00	0.95

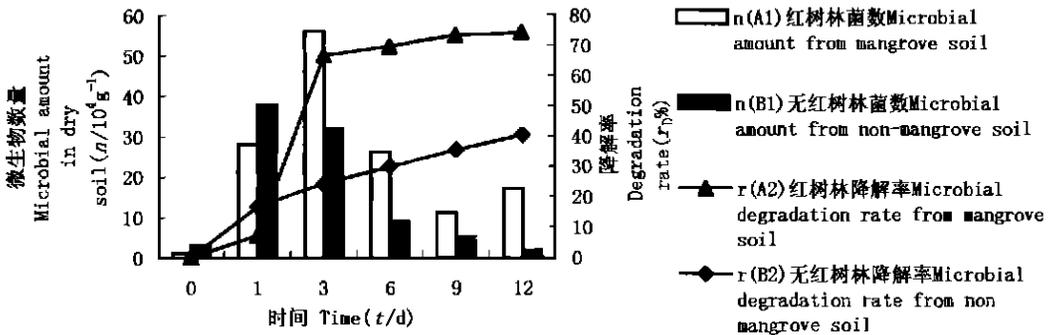


图1 1996年土壤固体培养的微生物甲胺磷降解和微生物数量变化

Fig. 1 Degradation rate of methamidophos and microbial amount dynamics cultured by soil solid in 1996. 降解率达 40.42%。以接种土壤微生物悬浮液的振荡培养方式,红树林土壤微生物对甲胺磷的降解速率高于无红树林土壤微生物。其无机磷含量的增加极显著高于无红树林土壤微生物,降解速率一直持续直线上升,没有如上述出现的 3 个时期,无机磷含量 ρ 从 d 1 的 0.48 mg L^{-1} , 至 d 12 的 6.20 mg L^{-1} , 增加了近 13 倍。无红树林土壤微生物在 d 3 出现降解高峰(无机磷含量 1.15 mg L^{-1}), d 4 以后减缓,变幅在 $1.10 \sim 0.95 \text{ mg L}^{-1}$ 。红树林土壤微生物对甲胺磷降解能力明显高于无红树林土壤微生物,推测其原因是:红树林土壤微生物中存在着较多优势降解菌。在培养过程中释放出较丰富的降解酶类,使甲胺磷得到持续降解,而无红树林土壤微生物则降解菌少,缺乏相关的降解酶类。在土壤固体静止培养条件下,无论是红树林土壤微生物或无红树林土壤微生物在 d 1、3 时降解率与微生物数量呈正相关, d 6~12 则为负相关。究其原因,可能是菌体在此时营养等各方面生长条件已变得不适应其生长、繁殖而死亡的结果。而在接种土壤微生物悬浮液的振荡培养条件下,红树林土壤微生物在高峰期(d 1, 3, 4)无机磷在低浓度时,降解速度与微生物数量成正相关,后期(d 8, 10, 12)为负相关——菌数减少,降解速度仍增快;无红树林土壤微生物亦然,但后期(8 d 以后)菌数增多,降解速度反而减慢。推测其原因可能是红树林土壤微生物中优势降解菌多于无红树林土壤微生物,降解过程中非优势降解菌逐步死亡,而优势降解菌仍然存活之故。

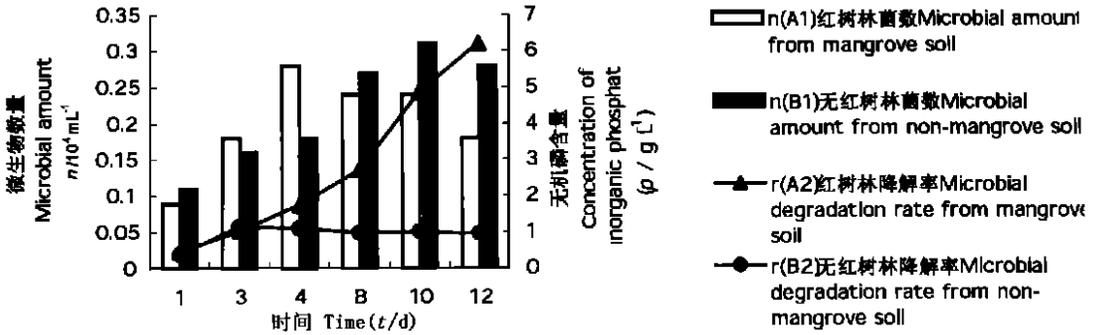


图2 1997年液体振荡培养的甲胺磷降解和微生物数量变化

Fig.2 Degradation rate of methamidophos and microbial amount dynamics cultured by shaken in 1997

2.2 降解过程中红树林土壤微生物优势细菌菌群的演替

试验着重研究降解过程中细菌类群的变化,我们以高稀释度(10⁻⁶)降解液分离得到的菌株定为优势降解菌,测定结果列于表3和图3.

表3 降解过程中优势细菌群的变化 (n/10⁶mL⁻¹)

Table 3 Changes of dominant populations of bacteria during degradation

优势菌株代号 Number of dominant populations	初期 Start (d 1)	中期 Middle (d 6)	末期 End (d 12)
N ₁	1	0	0
N ₂	3	1	1
N ₃	2	0	0
N ₄	1	1	1
N ₅	1	0	0
N ₆	1	0	0
N ₇	3	2	1
N ₈	1	0	0

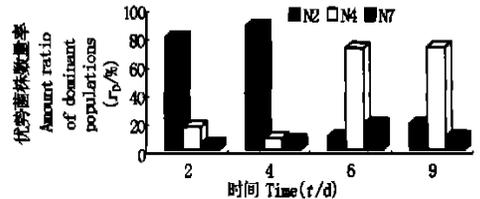


图3 三种优势降解菌株在降解过程中的数量比率变化

Fig.3 Amount dynamics of three dominant populations during degradation

从表3和图3可见:降解过程中细菌类群有明显的菌群演替:开始(初、中期)占绝对优势的2号菌,

至后期显著减少;而4号菌由次优势菌跃升为绝对优势菌.除3株优势菌一直保持到降解后期仍属优势菌外,其余5株至中后期的数量均大大减少,以致在高稀释度情况下无法检出.由此说明:红树林土壤微生物中存在着对甲胺磷有降解能力的细菌菌群,在本实验中至少有3种降解能力强的细菌;在降解过程中一直占优势的菌株,经过筛选,定向培育,有望成为“工程菌”;进一步研究降解过程中菌群演替,既有助于阐明降解机理,也是定向筛选“工程菌”的重要依据之一.

2.3 单株菌(S)和混合菌(M)的降解能力比较

分别用分光光度法和气相色谱法测定了S和M对甲胺磷的降解能力,其结果见图4和图5.

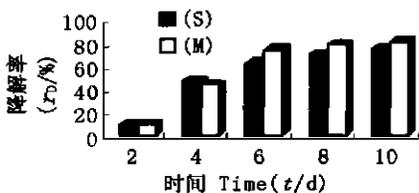


图4 分光光度法测定S和M的甲胺磷降解率

Fig.4 Degradation rate of methamidophos by S and M (spectrophotometry)

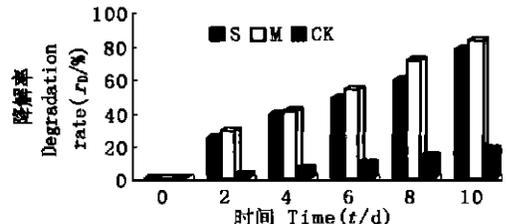


图5 气相色谱法测定的甲胺磷降解率

Fig.5 Degradation rate of methamidophos by S and M (chromatography)

从图4可见:降解菌对甲胺磷降解表现出一定规律:2d前降解缓慢,降解率9.73%;2d后至6d迅速呈直线上升,降解率增高至17.0~62.2;6d以后以缓慢降解上升,d10(本试验最后时间)降解率最高达74.1%;所筛选单株菌(S-4号)对甲胺磷有强烈降解能力;d10降解率达70%以上;单株菌与混合菌在降解过程中还有些差

别. 单菌株 2 d 时降解率略高于混合菌; d 2~4 为其对数降解期; 混合菌的对数降解期从 d 2 延至 d 6. 这可能与降解菌在初期对含甲胺磷的生境有一个较短的适应期, 适应后能快速降解甲胺磷, 此后由于菌数增加, 加剧了对其它生存条件的竞争而导致降解能力下降有关. 从图 4 和 5 均可见: 混合菌株降解能力优于单一菌株. 说明几种优势降解菌在降解过程中具协同效应. 已有研究表明, 有“互生与共生机制”的混合菌的存在能对降解发挥更大的作用^[4]. 这里也进一步论证了上述“红树林土壤微生物对甲胺磷降解能力大于无红树林土壤微生物”的结论. 以上菌株我们已做了初步鉴定.

2.4 降解菌株降解条件初探

对筛选得到的降解细菌进一步研究它们对不同甲胺磷浓度, 不同培养状态等条件降解能力, 结果列于表 4 和表 5.

从表 4 可见: 无论是单菌株或混合菌, 对 3 种浓度甲胺磷降解能力次序: $500 \times 10^{-6} > 100 \times 10^{-6} > 1000 \times 10^{-6}$; 但在较低浓度时 (100×10^{-6} 和 500×10^{-6}) 降解率差异较小 (不显著), 浓度升高至 1000×10^{-6} 时, 明显影响降解菌的降解率; 对 3 种浓度的甲胺磷, 混合菌的降解能力大于单菌株, 尤其处在低浓度 100×10^{-6} 时, 混合菌降解率显著高于单株降解率; 在三种浓度下, 混合菌或单菌株, 初期降解率都是低的, 尤其是 1000×10^{-6} 时. 从表 5 可见: 降解菌 (单株或混合) 以振荡、光照条件的降解效果最好; 其次是静止、光照; 最差是静止、黑暗; 混合菌仍表现出优于单菌株; 无论那一种培养状态降解菌初始的降解率都是低的. 由此说明: 经过筛选的降解菌 (无论单菌株或混合菌) 对甲胺磷的降解能力, 受环境中甲胺磷的浓度所制约, 低浓度时效果好, 高浓度时 (本实验 1000×10^{-6}) 差, 这符合微生物的营养规律, 进

一步说明这些降解菌可利用甲胺磷作为营养促进它生长繁殖, 消除环境污染; 虽然混合菌的降解率较单菌株降解率差异不很显著, 但从降解速度来看, 还是混合菌好, 这启示人们: 在实践中选用混合菌株进行降解处理是优于单株菌株的, 如“细菌生长规律”所示, 所得的降解菌, 初进入培养时, 都要经过一个适应期后, 才进入快速降解. 本试验也符合这规律; 振荡培养 (光照) 条件有利于甲胺磷降解, 这一特性阐明了所得菌株均是好氧性细菌, 通气 (供 O_2), 是提高降解率的重要条件之一. 此外, 试验还证明 当培养物中甲胺磷浓度为 $500 \text{ } \mu\text{g}/10^{-6}$, 静止培养温度为 35°C 时的降解率最高.

鸣谢 参加本项研究的柯金和, 徐美珠, 吴敏华, 李华等同志.

参考文献

- Zhuang TC (庄铁诚), Lin P (林鹏). Environmental effects from the process of natural decomposition of litter leaves in Kandelia candel mangrove forest. In: Fan HQ, Liang SC ed. Research and management on China mangrove, Beijing: Science Press, 1995. 21~26
- Zhuang TC (庄铁诚), Lin P (林鹏). Soil microbial function of Kandelia candel mangrove forest. A Asia-pacific Symposium on Mangrove Ecosystems (Programme and Abstracts). Hong Kong: Hong Kong University of Science and Technology Press, 1995. 41~42
- Zhuang TC (庄铁诚), Lin P (林鹏). The degradation of diesel oil by microorganisms in mangrove soil (1993-1994). In: Movton B ed. The Marine Biology of the south China sea III. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1998. 389~396
- 张蔚文. 混合培养在生物降解中的意义. 环境科学与技术, 1993, 60(1): 16~20

表 4 混合菌(M)和单菌株(S)对不同浓度甲胺磷的降解率($\gamma_D/\%$)

菌株 Strains	甲胺磷浓度 Concentration of methamidophos ($\mu\text{g}/10^{-6}$)	时间 Time (t/d)				
		2	4	6	8	10
混合菌 (M)	100	14.3	47.6	66.7	73.8	78.6
	500	9.0	43.3	73.1	78.1	80.3
	1000	6.5	22.9	44.4	50.5	54.2
单菌株(S)	100	9.8	39.0	53.7	63.4	68.3
	500	9.7	47.0	62.2	69.2	74.1
	1000	4.8	19.0	35.7	54.2	50.0

表 5 混合菌(M)和单菌株(S)不同培养条件下的甲胺磷降解率($\gamma_D/\%$)

菌株 Strains	培养条件 Culture conditions	时间 Time (t/d)				
		2	4	6	8	10
混合菌 (M)	振荡+光照 Shake+light	9.0	43.3	73.6	78.1	80.3
	静止+光照 Static+light	6.0	16.4	34.4	59.6	66.1
	静止+黑暗 Static+dark	4.3	13.3	26.6	52.1	58.5
单菌株 (S)	振荡+光照 Shake+light	9.7	47.0	62.2	69.2	74.1
	静止+光照 Static+light	3.7	12.8	28.9	55.1	59.9
	静止+黑暗 Static+dark	3.2	11.3	24.7	50.5	53.8