

3 株真菌对毒死蜱的降解特性*

王金花^{1,2} 朱鲁生^{1**} 王军¹ 秦坤³

(¹山东农业大学资源与环境学院 山东泰安 271018)

(²上海交通大学 上海 200030; ³泰山医学院 山东泰安 271000)

摘要 从污水排放口污泥中分离到3株以毒死蜱为唯一碳源生长的真菌 WZ-I、WZ-II、WZ-III, 鉴定均为镰孢霉属(*Fusarium* LK. ex Fx). 3株菌5 d内对50 mg L⁻¹毒死蜱的降解率分别高达93.5%、91.4%和83.5%. 测定了不同碳源、pH、温度及毒死蜱浓度对真菌降解能力和生长量的影响. 结果表明, 以毒死蜱为唯一碳源且其浓度为20~200 mg L⁻¹, pH 6.5~9.0, 温度30~40℃时, 真菌的降解效果较好; 真菌生长量随外加碳源浓度的增加而增加, 在pH 6.5~9.0时生长量较大, 且当毒死蜱浓度为50 mg L⁻¹, 温度40℃时其生长量最大. 图5表1参18

关键词 毒死蜱; 真菌; 降解

CLC X172

DEGRADATION CHARACTERISTICS OF THREE FUNGI TO CHLORPYRIFOS*

WANG Jinhua^{1,2}, ZHU Lusheng^{1**}, WANG Jun¹ & QIN Kun³

(¹College of Resource and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China)

(²Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

(³Taishan Medical College, Tai'an 271000, Shandong, China)

Abstract Three chlorpyrifos-degrading fungi, with chlorpyrifos as sole carbon source, were isolated from sludge at sewage outlet and identified as *Fusarium* LK. ex Fx. The degradation rates of chlorpyrifos by these fungi were 93.5%, 91.4% and 83.5% in 5 days, respectively. The effects of carbon source, pH, temperature and chlorpyrifos concentration on degradation were determined. The results showed that the biodegradation rates were higher when chlorpyrifos was the sole carbon source with concentration of 20~200 mg L⁻¹, pH 6.5~9.0 and temperature 30~40℃. The growth of the fungi increased with carbon source concentration increased, and was the highest when pH was 6.5~9.0, temperature 40℃ and chlorpyrifos concentration 50 mg L⁻¹. Fig 5, Tab 1, Ref 18

Keywords chlorpyrifos; fungi; degradation

CLC X172

毒死蜱(chlorpyrifos),有效成分的化学名称为O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯,是一种广谱高效的有机磷杀虫剂.作为卫生杀虫剂,可以用来防治白蚁、虱子、跳蚤和蟑螂等多种卫生害虫^[1];作为农用杀虫剂,可有效防治水稻、苹果、蔬菜等上的蚜虫、螨类、小菜蛾等百余种害虫^[2].值得注意的是,毒死蜱潜在危险性不容忽视,对鱼类及水生生物毒性较高^[3],对蚯蚓不安全,能够明显加重蚯蚓的死亡率^[4].2000年6月8日美国环境保护局官员Browner指出,毒死蜱杀虫剂对人的神经系统和脑发育可能会有潜在影响,对儿童健康有害^[5].许多国家对农产品,特别是蔬菜上的毒死蜱残留量进行了严格的规定.在对外贸易中农药残留检测项目中也包括毒死蜱.因此,毒死蜱的残留问题日益受到重视.毒死蜱

在土壤中的降解受土壤温度、湿度、毒死蜱的浓度、土质、微生物活动等影响较大^[6,7].对于毒死蜱的微生物降解,国外有许多学者报道过^[8~11],而国内有关报道较少^[12].本研究筛选出3株降解毒死蜱的真菌,并进一步优化了其降解和生长条件,为今后降解菌的应用提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验药品

97.8%毒死蜱原药,山东省华阳农药厂生产;MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄, CaSO₄, FeSO₄·7H₂O, 蛋白胨,蔗糖均为分析纯.

1.2 培养基

富集培养基、基础培养基的配制均参考文献[11].

富集培养基: MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; K₂HPO₄, 0.1 g; (NH₄)₂SO₄, 0.1 g; CaSO₄, 0.04 g; FeSO₄·7H₂O, 0.001 g; 蔗糖, 10 g; 蛋白胨, 5 g; 去离子水, 1 L; pH 7.0. 121℃灭菌20 min.

基础培养基: MgSO₄·7H₂O, 0.4 g; K₂HPO₄, 0.2 g;

收稿日期: 2004-02-18 接受日期: 2004-04-28

* 国家自然科学基金(No. 20477022), 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(03BS123)及山东农业大学博士后科研基金(22023)资助
Supported by the National Natural Science Foundation of China, the Shandong Research Fund for Excellent Young Scientists and the Research Fund of Shandong Agriculture University for Postdoctoral

** 通讯作者 Corresponding author (E-mail: lushzhu@sdau.edu.cn)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g; CaSO_4 , 0.08 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g; 去离子水, 1 L. 做降解实验时适量加入不同浓度的碳源和调节不同的 pH, 121 °C 灭菌 20 min.

1.3 真菌的富集、分离

采用液体富集培养法, 称取活性污泥 10 g 于 100 mL 富集培养基中, 培养基中毒死蜱的浓度为 200 mg L^{-1} , 于 30 °C, 120 r/min 摇床培养, 培养 1 wk 后, 以 10% 的接种量接入新鲜培养液中, 以后每周转移一次, 如此反复多次驯化. 最后, 用平板稀释法进行分离纯化, 接种斜面, 编号保存.

1.4 真菌降解培养

将培养在平板上的真菌用打孔器打孔, 定量接种到已经灭菌的液体基础培养基中, 120 r/min 摇床培养, 定期测定毒死蜱的量, 计算降解率.

1.5 真菌生长量测定方法

采用总量法测定真菌的生长量, 从培养液中收集菌体, 80 °C 烘至恒重后称量菌体计算干重^[13].

1.6 真菌的鉴定

按照参考文献[14]进行鉴定.

1.7 毒死蜱测定方法

毒死蜱的测定主要采用紫外分光光度法. 根据文献[15]报道并进一步完善此方法, 另文报道.

1.8 降解率的计算

$$\text{计算公式: } R\% = \frac{\rho_{\text{CK}} + \rho}{\rho_{\text{CK}}} \times 100\%$$

式中, R : 毒死蜱的生物降解率; ρ : 接菌处理培养液培养液中毒死蜱的浓度 (mg L^{-1}); ρ_{CK} : 未接菌对照培养液中毒死蜱的浓度 (mg L^{-1}).

2 结果与分析

2.1 真菌的鉴定

WZ - I: 菌落白色, 气生菌丝呈绒状, 生长比较旺盛, 常产生紫色色素. 分生孢子梗细长分枝有明显分隔. 分生孢子无色, 分为大小两种类型: 小型孢子数量较少, 多为单细胞, 大小大约为 $12.0 \mu\text{m} \times 3.8 \mu\text{m}$, 也有双细胞大小约为 $19.0 \mu\text{m} \times 4.4 \mu\text{m}$, 卵圆形或长圆形, 单生; 大型孢子数量多, 为 4 个细胞, 大小约为 $37.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$, 微弯, 镰刀形, 无足细胞和厚垣孢子. 由此鉴定为镰孢霉属 (*Fusarium* LK. ex Fx).

WZ - II: 菌落白色, 气生菌丝呈棉絮状, 生长极旺盛, 常产生黄色色素. 分生孢子梗细长分枝. 分生孢子无色, 分为大小两种类型: 小型孢子数量较多, 单细胞, 大小大约为 $12.0 \mu\text{m} \times 3.8 \mu\text{m}$, 也有双细胞大小约为 $22.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$, 卵圆形或长圆形, 单生; 大型孢子数量极少, 为 4 个细胞, 大小约为 $32.0 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$, 微弯, 两端钝圆, 镰刀形, 无足细胞和厚垣孢子. 由此鉴定为镰孢霉属 (*Fusarium* LK. ex Fx).

WZ - III: 菌落白色, 气生菌丝呈绒状, 生长比较旺盛, 常产生紫色色素. 分生孢子梗细长分枝. 分生孢子无色, 分为大小两种类型: 小型孢子数量较多, 多为单细胞, 大小大约为 $10.0 \mu\text{m} \times 3.8 \mu\text{m}$, 也有双细胞大小约为 $17.0 \mu\text{m} \times 3.8 \mu\text{m}$, 卵圆形或长圆形, 单生; 大型孢子数量较多, 为 3 个或 4 个细胞, 大小大约为 $28.8 \mu\text{m} \times 5.0 \mu\text{m}$, 两端较尖, 镰刀形, 无足细胞和厚垣孢

子. 由此鉴定为镰孢霉属 (*Fusarium* LK. ex Fx).

2.2 降解菌降解能力的测定

农药的降解反应可按一级动力学反应描述^[16]: $\rho_t = \rho_0 e^{-Kt}$, 即 $\ln \rho_t = \ln \rho_0 - Kt$, $t_{1/2} = \ln 2 / K$.

其中, K : 降解常数; t : 反应时间; ρ_0 : 反应开始时溶液中农药的浓度; ρ_t : 反应 t 时间时溶液中农药的浓度.

在培养温度 30 °C, 毒死蜱的初始浓度 50 mg L^{-1} , pH 7.0 条件下, 测定不同时间毒死蜱的浓度, 计算 3 种真菌对毒死蜱的降解动力学参数 K , 半衰期 $t_{1/2}$ 以及降解率, 结果见表 1 和图 1.

表 1 毒死蜱真菌降解的动力学参数
Table 1 Kinetic parameters for degradation of chlorpyrifos by the fungi

菌株 Strains	降解常数 Parameters	半衰期 Half life ($t_{1/2}/\text{h}$)	相关系数 Correlation coefficient (r)
WZ - I	0.0218	31.8	0.9826
WZ - II	0.0186	37.3	0.9618
WZ - III	0.0144	48.1	0.9102

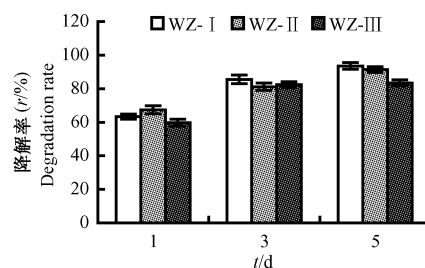


图 1 不同时间真菌对毒死蜱的降解率

Fig. 1 Degradation rate of chlorpyrifos by the fungi at different times

从表 1 的降解系数及降解半衰期可以看出, 3 株真菌对毒死蜱的降解速率为 WZ - I > WZ - II > WZ - III.

从图 1 可以看出, 在降解培养过程中, 随着培养时间的延长, 真菌对毒死蜱的降解率总体上先增大, 到 d 5 降解率分别高达 93.5%、91.4% 和 83.5%. 以后均以 5 d 为降解培养时限, 测定毒死蜱的降解率.

2.3 环境条件对真菌降解率和生长的影响

2.3.1 外加碳源浓度对真菌降解率及生长的影响 培养液以蔗糖为外加碳源, 浓度分别为 0、0.1%、0.3%、0.5%、1.0%、1.5%, 接种培养 5 d 后取样, 测定毒死蜱的降解率和真菌生长量, 结果见图 2.

由图 2 - A 可以看出, 培养基中加入不同浓度的蔗糖作为外加碳源对 3 种真菌降解率有一定的影响. 随着外加碳源浓度的增加, 降解率由高逐渐降低. 3 种菌在培养基中不加蔗糖时降解率最大, 降解率分别为 90.2%、89.1% 和 80.4%. 可见, 本实验所筛选的 3 株真菌, 都能够以毒死蜱为唯一碳源生长, 从而将其降解. 随着外加碳源的增加, 真菌的降解率降低, 这是因为易于利用的碳源浓度过高, 菌株优先利用易于利用的蔗糖, 减少了对毒死蜱的分解利用. WZ - II 菌在蔗糖浓度小于 0.5% 时, 降解率变化不大, 说明低浓度的可利用碳源对该菌的降解性能没有明显影响.

由图 2 - B 可以看出, 在不含有外加碳源或碳源浓度较低的情况下, 真菌生长量较低; 随着外加碳源浓度的升高, 真菌生

长量增加. 说明在缺乏易于利用的碳源时, 真菌的生长受到抑制; 并且真菌可以优先利用易于利用的蔗糖作为生长的碳源.

因此, 图 2 充分说明所筛选的 3 株真菌均能够以毒死蜱为唯一碳源生长.

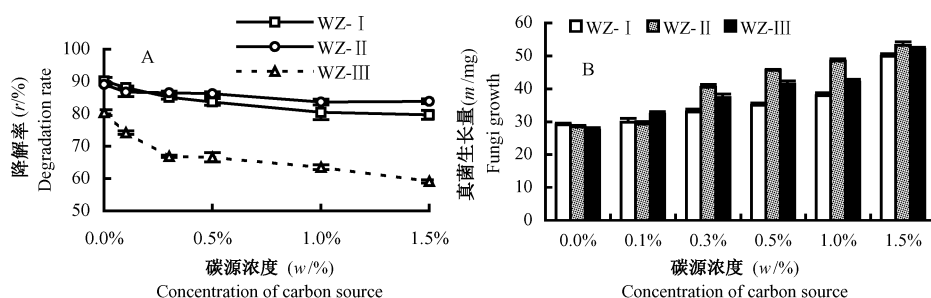


图 2 外加碳源浓度对毒死蜱降解率和真菌生长量的影响

Fig. 2 Effect of carbon source concentration on chlorpyrifos biodegradation rate and fungi growth

2.3.2 初始 pH 值对真菌降解率及生长的影响 控制培养液的初始 pH 值分别为 5.0、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0, 不含蔗糖, 接种培养 5 d 后取样, 测定毒死蜱的降解率及真菌的生长量, 结果见图 3.

图 3-A 表明, 真菌对毒死蜱的降解率受 pH 的影响. 在 pH 为 5.0 和 6.0 时, 真菌对毒死蜱的降解率较低, 而在 pH 为 6.5、7.0、8.0、9.0 时, 真菌的降解率较高, 在 pH 为 7 时, 达到最高. 以 WZ-I 为例, 在 pH 为 5.0 和 6.0 时, 降解率分别为

79.8%、87.3%, 而 pH 为 7 时, 降解率高达 93.3%. 可见, 培养液偏酸性时, 真菌对毒死蜱的降解能力较低; 而偏中性和略显碱性时, 真菌的降解能力较强. 图 3-B 表明, 随着 pH 的升高, 真菌的生长量逐渐升高, 在 pH 为 9.0 时, 3 种真菌的生长量有一定的下降; 说明酸性强和过高碱性都能够抑制菌的生长. 由图 3 还可以看出, 3 株真菌对 pH 值的要求都不太严格, 适应范围较宽, pH 为 6.5、7.0、8.0 时, 真菌的生长量均较高.

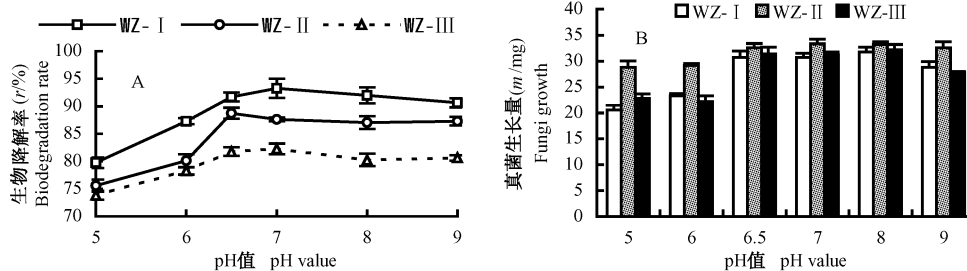


图 3 pH 对毒死蜱降解率和真菌生长量的影响

Fig. 3 Effect of pH on chlorpyrifos biodegradation rate and fungi growth

2.3.3 毒死蜱初始浓度对真菌降解率及生长的影响 使培养液中毒死蜱的初始浓度分别为 10 mg L^{-1} 、 20 mg L^{-1} 、 50 mg L^{-1} 、 100 mg L^{-1} 、 200 mg L^{-1} , 不含蔗糖, pH 为 7.0, 接种培养 5 d 后取样, 测定毒死蜱的降解率和真菌的生长量. 结果见图 4.

同. 当毒死蜱的浓度较低时, 真菌生长量较低; 随着毒死蜱浓度的升高, 真菌的生长量, 先是逐渐增加, 50 mg L^{-1} 和 100 mg L^{-1} 时达到最大; 当毒死蜱浓度过大时, 生长量又降低.

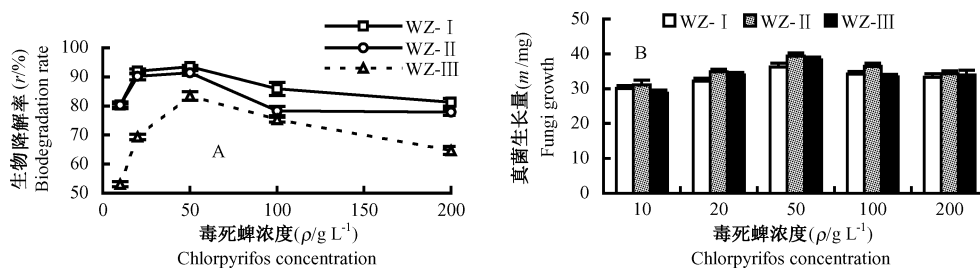


图 4 不同毒死蜱浓度下的毒死蜱降解率和真菌的生长量

Fig. 4 Chlorpyrifos biodegradation rate and fungi growth at different concentrations of chlorpyrifos

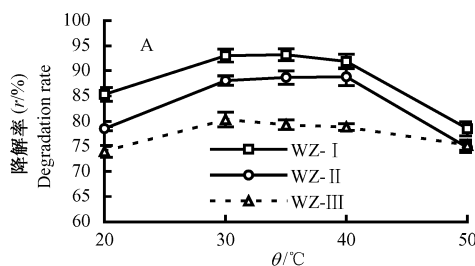
由图 4-A 可以看出, 毒死蜱浓度对 3 种降解真菌的降解率有一定影响. 毒死蜱浓度为 10 mg L^{-1} 时, 降解率较低, 因为真菌可以利用的碳源浓度过低, 影响了其生长, 从而影响其对毒死蜱的降解; 在 20 mg L^{-1} 和 50 mg L^{-1} 时, 真菌对毒死蜱的降解率较高, 最高降解率可达 93.5%; 当毒死蜱浓度为 100 mg L^{-1} 和 200 mg L^{-1} 时, 3 种真菌对毒死蜱的降解率降低了; 其中 WZ-III 菌的降解率变化较大. 对于不同的真菌, 毒死蜱对降解酶活性的影响并不相同, 所以就表现出不同的变化趋势, 这和真菌的种类有关系. 由图 4-B 可以看出, 不同毒死蜱浓度下, 真菌的生长量不

同. 当毒死蜱的浓度较低时, 真菌生长量较低; 随着毒死蜱浓度的升高, 真菌的生长量, 先是逐渐增加, 50 mg L^{-1} 和 100 mg L^{-1} 时达到最大; 当毒死蜱浓度过大时, 生长量又降低.

2.3.4 培养温度对真菌降解率及生长的影响 初始 pH 为 7.0, 不含蔗糖, 毒死蜱浓度为 50 mg L^{-1} 的培养液, 接种真菌后于 20°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C 、 50°C 下振荡培养, 5 d 后取样, 测定毒死蜱的降解率和真菌的生长量.

温度能够影响真菌对毒死蜱的降解. 图 5-A 表明, 温度过低, 如 20°C , 或过高, 如 50°C 都能降低真菌对毒死蜱的降

解;温度为 30 ℃、35 ℃、40 ℃时,降解率较高。图 5-B 的真菌生长量变化规律也充分说明真菌的较适生长温度和降解率较高的温度比较吻合。毒死蜱作为农用杀虫剂时主要使用在水果



蔬菜上,使用时田间温度一般比较高,而本实验所得的降解菌在 30~40 ℃均有较高的降解能力,为降解真菌的田间应用打下了重要的基础。

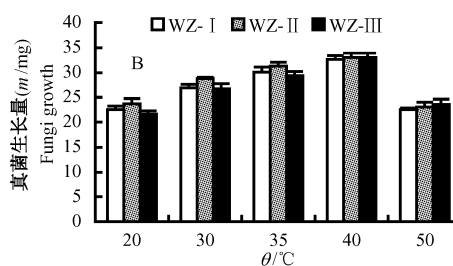


图 5 不同温度下毒死蜱的降解率和真菌生长量

Fig. 5 Chlorpyrifos biodegradation rate and fungi growth at different temperatures

3 讨论

土壤中有丰富的微生物资源,对于土壤微生物对毒死蜱的降解,国外有许多学者报道过。Omar SA^[8]从使用杀虫剂的土壤中分离出 13 种真菌,在不加 P 和 S 而加毒死蜱等 3 种有机磷杀虫剂的液体培养基中进行培养,在药剂浓度为 10 mg L⁻¹时,真菌对杀虫剂的降解水平最高。国内外学者已经找到多种能够降解二噁磷、对硫磷、甲基对硫磷以及杀螟松等有机磷杀虫剂的微生物,而毒死蜱与它们有相同的 P-O-C 链, Mallick 等^[11]将前人找到的降解对硫磷等的微生物 *Flabobacterium* sp. 和 *Arthrobacter* sp. 用来降解毒死蜱,取得了良好的效果。刘新等^[12]也分离出一株降解毒死蜱的曲霉菌 Y. Getzin LW^[7]报道在 4 种土壤中的毒死蜱降解实验中,用¹⁴C 标记毒死蜱,结果表明,毒死蜱经土壤微生物降解,初步降解产物为 3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP),最终降解产物为 CO₂。实验从灭菌和没有灭菌的土壤中都得到了吡啶酚,说明毒死蜱在土壤中的降解以水解为主,吡啶酚是唯一的降解产物。该实验还表明,毒死蜱在灭菌土壤中的降解明显低于没有灭菌的土壤,从而证明毒死蜱在土壤中的降解主要是生物降解。Racke KD 等^[10]对毒死蜱的初级代谢物 TCP 的降解和吸附进行了研究。试验采集了 25 种不同地区的土样,结果表明,TCP 的土壤降解率随土样的不同而有差异,土样之间没有明显的相关性,但与微生物成分相关;从回归模型中可以看出,微生物的组成明显提高了 TCP 的降解。从而得出,TCP 的矿化是通过微生物介质的。从国内外的研究可以确定,毒死蜱能够被微生物降解。本实验所筛选出的 3 株菌,在实验设计的浓度 20~200 mg L⁻¹范围内能够降解毒死蜱,并且 5 d 内对 50 mg L⁻¹毒死蜱的降解率分别高达 93.5%、91.4% 和 83.5%,可见本实验筛选的真菌能够有效降解毒死蜱。

培养条件对微生物降解农药的速率有很大影响,只有在适宜的环境条件下,微生物才能充分发挥其降解能力。Cink 和 Coats^[17]研究认为,土壤湿度和毒死蜱浓度严重影响其在土壤中的降解(pH=7.8);他们还发现,土壤中毒死蜱浓度为 10 μg g⁻¹时,药后 12 wk,土壤中只剩下 5%,而使用 1 000 μg g⁻¹时,有高达 57%的毒死蜱残留。本实验筛选出的 3 株真菌在毒死蜱为唯一碳源,pH 6.5、7.0、8.0、9.0,毒死蜱浓度 20~200 mg L⁻¹,温度 30 ℃、35 ℃、40 ℃时,降解效果较好。由图 4-A 可以看出,本实验所筛选的真菌对较高浓度毒死蜱,如 50 mg L⁻¹、100 mg L⁻¹有较高的去除能力,但是对于低浓度的毒死蜱,去除效果并不理想,不能达到毒死蜱残留限量标准。研究表明,降解酶往往比产生这类酶的微生物菌体更能忍受异常环境条件,特别是对低浓度农药,降解效果远胜于微生物菌体本身^[18]。因此,从所筛选的降解真菌中提取酶用来降解毒死蜱,将是今后研究的重点。

References

- Bian QL (边全乐). The safety of chlorpyrifos. *Chin Agri Sci Bull* (中国农学通报), 1997, **13** (6): 71
- Gao XW (高希武). 农药原理与应用. Peking (北京): New Time Press (新时代出版社), 1997
- Varo I, Serrano R. Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000, **65** (5): 632~630
- Potter DA, Buxton MC, Redmond CT. Toxicity of pesticides to earthworms (*Oligochaeta*: *Lumbricidae*) and effect on thatch degradation in Kentucky bluegrass turf. *J Econ Entomol*, 1999, **83** (6): 2362~2369
- Qin YH (秦钰慧), Wang YY (王以燕). The latest decision about chlorpyrifos in America. *Pesticide* (农药), 2000, **39** (8): 45
- Racke KD, Fontaine DD, Yoder RN. Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates. *Pestic Sci*, 1994, **42**: 43~51
- Getzin LW. Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. *J Econ Entomol*, 1981, **74**: 158~162
- Omar SA. Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation*, 1998, **9**(5): 327~336
- Sikora LJ, Kaufman D, Hornog LC. Enzyme activity in soils showing degradation of organophosphosphate insecticides. *Biol & Fert Soils*, 1990, **9** (1): 14~18
- Racke KD, Robbins ST. Factors affecting the degradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in soil. *ACS Symposium Series*, 1991, **459**: 93~107
- Mallick K, Bharati K, Banerji A. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1999, **62** (1): 48~54
- Liu X (刘新), You MS (尤民生), Wei YZ (魏英智), Liao JY (廖金英), Ye LL (叶绿绿), Che J (陈金). Isolation of chlorpyrifos-degrading *Aspergillus* sp. Y and measurement of degradation efficiency. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2003, **9** (1): 78~80
- Qian CR (钱存柔), Huang YX (黄仪秀), Lin ZL (林稚兰). 微生物实验教程. Beijing (北京): Beijing Univ Press, 1999. 205~224
- Wei JC (魏景超). 真菌鉴定手册. Shanghai: Shanghai Technological Press, 1979
- Syed Shahid A, Riaz UH, Mubasshirah K. Use of ultra-violet spectrophotometry for determination of insecticides and aromatic hydrocarbon pollutants. *Punjab Univ J Zool*, 1997 (12): 31~34
- Daniel RS, Michael A. A model describing pesticide bioavailability and biodegradation in soil. *Soil Sci Soc A J*, 1997, **61**: 1078~1084s
- Cink JH, Coats JR. Effect of concentration, temperature, and soil moisture on the degradation of chlorpyrifos in an Urban Iowa soil. *Pesticides Urban Environ Fate & Significance*, 1993: 62~70
- Strong LC, Tavish MH, Sadowsky MJ. Field scale remediation of Atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing Atrazine chlorohydrolase. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **2**: 91~98