

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2015.0093

王冬莹, 吴文成, 李霞, 等. 2015. 一株能同时降解邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和氰戊菊酯真菌的分离、鉴定及降解特性的初步研究 [J]. 环境科学学报, 35(11): 3493-3499

Wang D Y, Wu W C, Li X, et al. 2015. Isolation, identification and degradation characteristics of a dibutyl phthalate and fenvalerate degrading fungal strain [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 35(11): 3493-3499

一株能同时降解邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和氰戊菊酯真菌的分离、鉴定及降解特性的初步研究

王冬莹¹, 吴文成², 李霞², 蔡信德^{2,*}

1. 济南市环境研究院, 济南 250100

2. 环境保护部华南环境科学研究所, 广州 510655

收稿日期: 2014-12-30

修回日期: 2015-03-06

录用日期: 2015-03-12

摘要: 采用富集培养法从农田土壤中筛选出 1 株可同时降解邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和氰戊菊酯的真菌 DY4, 经形态、生理生化特征及 26S rDNA 序列分析, 初步鉴定为地霉属 (*Geotrichum* sp.) 霉菌, 并在纯培养条件下研究了该菌株的最优降解条件和降解特性。结果表明, 菌株 DY4 可利用 DBP 或氰戊菊酯作为唯一碳源, DBP、氰戊菊酯单一存在时, 7 d 对 50 mg·L⁻¹ DBP 的降解率 (84.13%) 高于氰戊菊酯 (37.07%) 的; DBP、氰戊菊酯共存时, 对 DBP 的降解率明显降低, 可能是农药对微生物的毒害作用所致。正交试验得到菌株 DY4 的最优降解条件为无外加碳源、DBP 和氰戊菊酯的初始浓度 25 mg·L⁻¹, pH 7.5, 在此条件下, 7 d 对 DBP 和氰戊菊酯的降解率达到 65.36% 和 55.77%, 降解反应符合一级动力学方程模型, 两者的半衰期为 4.46 和 6.88 d。

关键词: DBP; 氰戊菊酯; 复合污染; 真菌; 生物降解

文章编号: 0253-2468(2015)11-3493-07

中图分类号: X172

文献标识码: A

Isolation, identification and degradation characteristics of a dibutyl phthalate and fenvalerate degrading fungal strain

WANG Dongying¹, WU Wencheng², LI Xia², CAI Xinde^{2,*}

1. Jinan Environmental Research Institute, Jinan 250100

2. South China Institute of Environmental Sciences, MEP, Guangzhou 510655

Received 30 December 2014;

received in revised form 6 March 2015;

accepted 12 March 2015

Abstract: A fungal strain, named DY4, capable of simultaneously degrading dibutyl phthalate (DBP) and fenvalerate was isolated by culture enrichment method from farmland soil. Based on the morphology, physio-biochemical characteristics, and 26S rDNA sequence analysis, strain DY4 was preliminarily identified as *Geotrichum* sp.. The optimal degradation conditions and degradation characteristics of strain DY4 were studied in pure culture incubation assays. The results showed that strain DY4 could utilize DBP and fenvalerate, respectively, as its sole carbon sources. The degradation rate of DBP and fenvalerate with the concentration of 50 mg·L⁻¹ by strain DY4 was 84.13% and 37.07%, respectively, within 7 days of incubation. However, the degradation of DBP was significantly reduced when DBP and fenvalerate coexisted, which might be attributed to the toxicity of fenvalerate (as pesticide) on fungus. The optimal degradation conditions were determined by orthogonal test as follows: initial concentration of either DBP or fenvalerate, 25 mg·L⁻¹; pH 7.5; and without additional carbon source. Under these conditions, the degradation rate of DBP and fenvalerate was 65.36% and 55.77%, respectively. Moreover, the degradation followed first-order kinetics and the half time ($t_{1/2}$) of DBP and fenvalerate were 4.46 and 6.88 d, respectively.

Keywords: DBP; fenvalerate; combined pollution; fungus; biodegradation

基金项目: 国家环保公益科研专项 (No. 201109020)

Supported by the Special Scientific Research Funds for Environment Protection Commonweal Section (No. 201109020)

作者简介: 王冬莹 (1988—), 女, 助理工程师, E-mail: wangdongying_2007@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: xindecai@scies.org

Biography: WANG Dongying (1988—), female, assistant engineer, E-mail: wangdongying_2007@163.com; * Corresponding author, E-mail: xindecai@scies.org

1 引言 (Introduction)

目前农业生产中广泛使用地膜、农药、化肥等农用化学品,造成多种有机物对农田土壤的复合污染.邻苯二甲酸酯 (PAEs) 是一类环境内分泌物质,作为地膜增塑剂,易从地膜中释出而造成土壤污染.邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 是最常见的 PAEs 之一,在各类环境中广泛存在,为优先控制污染物 (高军和陈伯清, 2008). 氰戊菊酯是一种常见的拟除虫菊酯类农药,在农业生产中广泛使用,造成其在土壤中大量残留.据研究,氰戊菊酯在蔬菜中的检出率较高 (李雪飞等, 2006), 对水生生物的危害也比较大 (赵玉琴等, 2008). 因此,如何修复复合污染农田土壤,以减少污染物对环境的危害和提高农产品品质和安全,是当前研究的热点.

DBP 和氰戊菊酯都是农田土壤中典型的常见有机污染物,其光解和自然化学降解都非常缓慢,生物降解是其在环境中降解的主要途径.近年来,关于细菌降解 DBP 和氰戊菊酯的报道比较多 (Chen, 2011; 陈少华等, 2011a; 段星春等, 2007; 李俊等, 2005; Liao *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2009; 汤鸣强等, 2010), 但关于真菌降解的报道较少.有研究表明,白腐真菌可以高效降解 DBP (Lee *et al.*, 2004); 黑曲霉、芽枝霉属可以降解氰戊菊酯 (Liang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011). 上述这些研究,主要针对 DBP 或氰戊菊酯单独研究,关于真菌同时降解两者的研究尚未见报道.实际农田土壤中往往是 DBP、氰戊菊酯同时存在,它们共存时产生的相互作用使得生物降解过程更加复杂.本研究筛选到 1 株可同时降解 DBP 和氰戊菊酯的真菌菌株并研究其降解特性,以期为同类污染土壤的修复提供种质资源和理论依据.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 试验材料

培养基:富集培养基 (马丁氏真菌培养基), 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, H_2O 1000 mL, 调节 pH 7.0, 115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 后冷却至 55 ~ 60 °C, 加入 0.02% 的氯霉素, 固体培养基需加琼脂 1.5% ~ 2.0%; 基础培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCl_2 0.1 g, FeCl_3 0.01 g, H_2O 1000 mL, 调节 pH 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min.

主要试剂:DBP 和氰戊菊酯标准品 (纯品), 购自上海安谱科学仪器有限公司; 丙酮、石油醚 (30 ~ 60 °C), 正己烷均为色谱纯, 购自北京迪科马试剂有限公司; 其余试剂为国产分析纯, 购自广州市东征化玻有限公司.

主要仪器:HYQ-180 型生物摇床 (武汉汇城科技仪器有限公司)、RE-5299 旋转蒸发器 (河南巩义予华仪器有限责任公司)、Spectrumlab 752SP 紫外可见光分光光度计 (上海棱光技术有限公司)、Pulverisette 2 土壤臼式研磨机 (广州予康科学仪器有限公司)、Centrifuge 5804R 离心机 (Eppendorf, 德国)、GC-17A 气相色谱仪 (Shimadzu, 日本).

2.2 试验方法

2.2.1 降解真菌的富集筛选 供试土壤样品采自广东省西部某市水稻田的耕作层, 土样各项指标如下:有机质 $23.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 总氮 $1300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有效磷 $193 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾 $126.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 5.06. 取土样 10 g, 装入有 90 mL 富集培养基, 4 ~ 5 粒玻璃珠的 250 mL 三角瓶, 28 °C, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 30 min, 静置 30 min. 取 10 mL 上清液加入 140 mL 含 DBP 和氰戊菊酯的基础培养基中进行 3 次梯度驯化. 每个梯度 DBP 和氰戊菊酯的浓度分别为 100、200 和 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每次取 10 mL 菌液转入 140 mL 新鲜培养基中, 28 °C, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 7 d, 加入 0.02% 氯霉素抑制细菌生长. 最后取 1 mL 菌液平板涂布到真菌培养基, 28 °C 培养 7 d, 将不同形态的菌落分别平板划线得到单菌落, 斜面保存. 以上操作均在无菌条件下进行.

2.2.2 分离菌株对 DBP 和氰戊菊酯的降解能力测定 将分离纯化后的不同菌种以菌量 $D_{660 \text{ nm}} = 0.5$ (约为 $0.16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别接种到含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP、氰戊菊酯及 DBP 和氰戊菊酯复合的 100 mL 无菌液体基础培养基, 28 °C, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 7 d, 以不接种基础培养基为非生物降解对照, 检测 DBP 和氰戊菊酯的降解率和菌丝体干重, 确定最佳降解菌种. DBP 和氰戊菊酯的提取与分析参考文献 (韩蕊等, 2013), 采用正己烷和石油醚 1:1 萃取 3 次, 有机滤液并入梨形瓶, 38 °C 下旋蒸近干, 用正己烷定容到色谱瓶中至 1 mL, GC 检测分析. 检测条件如下:毛细管色谱柱, DB-5 (30 m × 0.32 mm); 载气, 氮气 (纯度 $\geq 99.999\%$); 进样口温度 240 °C, 检测器 (ECD) 温度 320 °C; 分流进样, 分流比为 10:1, 进样量 $1 \mu\text{L}$; 升温程序, 起始温度 150 °C, 保持 2 min, 以

6 °C·min⁻¹升温至 270 °C,保持 20 min.

2.2.3 菌种鉴定 形态学鉴定主要通过培养特征观察和电镜扫描技术观察生长期的个体形态及菌落特征等方法进行,生理生化特性鉴定参考真菌鉴定手册(魏景超, 1979),菌种的 26S rDNA 序列测定及系统发育分析委托广东省微生物分析检测中心鉴定.

2.2.4 菌株降解条件优化 对 2.2.2 节确定的菌株,考察外加碳源(葡萄糖)、有机物浓度和 pH 值对降解效果的影响.按照正交试验(表 1)进行,采用基础培养基,每瓶 100 mL,接菌量 OD_{660 nm} = 0.5,表中浓度为 2 种有机物分别的浓度值,通过添加 1 mol·L⁻¹的 NaOH 调节 pH 值,28 °C,120 r·min⁻¹培养 7 d,用未接种的基础培养基为对照.测定 DBP、氰戊菊酯含量和菌液 pH 值,计算降解率,确定最优降解条件.

表 1 正交试验的因子水平表
Table 1 Factor levels for orthogonal experiment

序号	A	B	C pH 值
	w(葡萄糖)/ (g·L ⁻¹)	w(有机物)/ (mg·L ⁻¹)	
1	0	20	5.5
2	0.01	50	6.5
3	0.05	100	7.5
4	0.1	200	8.5

2.2.5 分离菌株对 DBP 和氰戊菊酯的降解特性研究 配制 DBP 和氰戊菊酯的浓度梯度分别为 0、25、

50、75、100 mg·L⁻¹基础培养基,1 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 值至 7.0~7.5 左右.对 2.2.2 节确定菌株,扩大培养制成试验菌液.吸取 10 mL 菌液 (OD_{660 nm} = 0.5),加入 90 mL 含不同浓度梯度 DBP 和氰戊菊酯的基础培养基中,28 °C,120 r·min⁻¹培养 7 d,对照组加入 10 mL 灭菌水作为自然降解对照,研究 DBP 和氰戊菊酯的降解效果.另外,采用同样的培养方法,将菌液加入到含 50 mg·L⁻¹的 DBP 和氰戊菊酯的基础培养基中,培养 10 d,分别在 0、2、4、6、8 和 10 d 时取样,分析 DBP 和氰戊菊酯的残留量,对 DBP 和氰戊菊酯的降解动力学进行线性拟合.DBP 和氰戊菊酯的检测分析参照 2.2.2 节.

3 结果与分析(Results and analysis)

3.1 降解真菌的分离和筛选

通过富集培养、分离、纯化,共得到 4 株降解效果较好的真菌,分别命名为: DY1, DY2, DY3 和 DY4.由表 2 可以看出,对 DBP 和氰戊菊酯降解率最高且生物量最大的菌种为 DY4,其对 50 mg·L⁻¹的 DBP 和氰戊菊酯的降解率分别为 84.13%和37.07%. 4 种真菌对 DBP 的降解率一般较氰戊菊酯的高, DBP 和氰戊菊酯共存时, DBP 的降解率大大降低(由 84.13%降为 47.97%),说明氰戊菊酯的加入会对 DY4 产生一定的毒害作用,进而影响到 DY4 对 DBP 的降解,这可能是由于氰戊菊酯化学结构中所含的氯苯基和氰基会对微生物产生较大的毒害作用,降低微生物的活性,使其降解能力下降.

表 2 4 株真菌对 DBP 和氰戊菊酯的降解率

Table 2 Degradation rate of DBP and fenvalerate by four fungi

菌种	DBP		氰戊菊酯		DBP 和氰戊菊酯		
	降解率	菌丝体干重/ (g·L ⁻¹)	降解率	菌丝体干重/ (g·L ⁻¹)	DBP 降解率	氰戊菊酯降解率	菌丝体干重/ (g·L ⁻¹)
DY1	80.55%±0.12% ^a	0.079±0.004 ^b	3.72%±1.37% ^d	0.032%±0.008% ^b	49.03±0.28 ^d	23.26%±0.29% ^d	0.031±0.005 ^b
DY2	64.52%±0.66% ^b	0.064±0.005 ^b	12.82%±0.01% ^b	0.044%±0.003% ^b	14.19±0.45 ^b	18.59%±0.24% ^b	0.056±0.004 ^b
DY3	54.96%±0.93% ^b	0.103±0.001 ^b	8.77%±0.90% ^c	0.127%±0.250% ^{ba}	28.81±0.39 ^c	23.87%±0.35% ^c	0.115±0.022 ^{ba}
DY4	84.13%±0.13% ^a	0.330±0.008 ^a	37.07%±0.56% ^a	0.236%±0.00% ^{6a}	47.97±0.29 ^a	42.12%±0.26% ^a	0.327±0.006 ^a

3.2 菌种鉴定结果

3.2.1 菌株形态特征 菌株 DY4 的液体培养基中培养液混浊,形成絮状物,表面形成膜.固体平板上菌落形态观察,菌落成平板扩散,生长快,乳白色,绒毛状并带粉状,中心突起,有放射线纹(图 1).高倍显微镜及电镜观察,具有真菌菌隔菌丝和节孢子,无出芽细胞,电镜下观察菌丝裂殖为圆柱形或圆筒

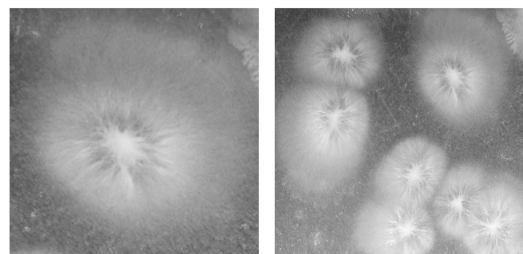


图 1 DY4 菌落形态

Fig.1 Colonial morphology of DY4

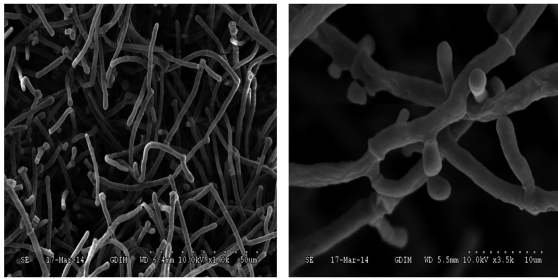


图2 DY4 电镜照片

Fig.2 Electron microscopy images of DY4

形的节孢子.形成有隔膜真菌丝,有的有二叉分枝,无子囊孢子(图2).

3.2.2 菌株 DNA 序列测序结果 DY4 的 26S rDNA 序列与地霉属(*Geotrichum* sp.)的同源性达 99.8%,将菌株的 26S rDNA 基因序列与 GenBank 中的已知序列进行了分析比对,从 GenBank 中取得相关序列作为参考菌株序列,首先使用 Clustal X 将序列进行完全比对,然后使用程序 Mega 的 Neighbor-joining 法对其作系统进化树(图3).数据自展重抽样次数 1000 次.

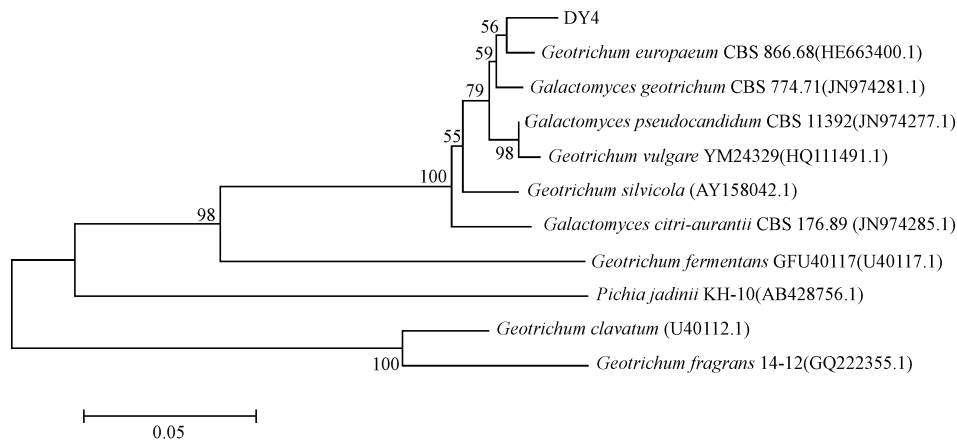


图3 根据菌株 DY4 及相关菌株的 26S rDNA 构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 26S rDNA sequences of strain DY4 and the related strains

3.2.3 菌株生理生化试验结果 葡萄糖发酵试验 杜氏管中无气体产生,硝酸盐试验中硝酸钾含量几乎没有下降,尿素分解试验中培养基不呈红色,说明没有脲酶产生;以上试验 DY4 均呈阴性,结合抗放线菌酮测试、碳源利用试验等生理生化试验,可知菌株 DY4 与地霉属(*Geotrichum* sp.)最相似.

3.3 菌株 DY4 降解条件优化

正交试验的降解结果见表3.考虑外加碳源(葡萄糖)浓度、有机物浓度和 pH 值对降解率的影响,用正交试验极差分析,根据试验获得的 DBP 和氰戊菊酯降解率计算 K 、 k 和 R 值(表4).其中, K 为同一因素各水平的试验结果相加之和, k 为 K 的平均值,

表3 正交试验设计及试验结果

Table 3 Orthogonal experiment design and results

试验编号	葡萄糖浓度/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	有机物浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	pH 值	DBP 降解率	氰戊菊酯 降解率	试验终 pH 值
1	0	25	5.5	82.93%	50.74%	5.45
2	0	50	6.5	43.27%	36.31%	6.26
3	0	100	7.5	70.57%	54.36%	7.19
4	0	200	8.5	62.29%	53.79%	7.79
5	0.01	25	5.5	46.29%	34.98%	3.51
6	0.01	50	6.5	44.46%	38.70%	3.18
7	0.01	100	7.5	64.94%	52.95%	7.25
8	0.01	200	8.5	59.76%	57.71%	6.74
9	0.05	25	5.5	72.09%	57.36%	3.06
10	0.05	50	6.5	64.14%	39.67%	3.52

续表3

试验编号	葡萄糖浓度/ (g·L ⁻¹)	有机物浓度/ (mg·L ⁻¹)	pH 值	DBP 降解率	氰戊菊酯 降解率	试验终 pH 值
11	0.05	100	7.5	34.90%	48.15%	3.24
12	0.05	200	8.5	54.11%	50.59%	3.06
13	0.1	25	5.5	60.32%	39.88%	3.17
14	0.1	50	6.5	63.86%	47.68%	2.77
15	0.1	100	7.5	42.18%	48.03%	3.05
16	0.1	200	8.5	51.06%	47.67%	3.14

表 4 不同因素不同水平计算得出的 K、k 和 R 值

Table 4 K, k and R value calculated by different levels of factors

因素 A(葡萄糖浓度)				因素 B(有机物浓度)				因素 C(pH 值)			
水平/ (g·L ⁻¹)	DBP 和 氰戊菊酯降解率			水平/ (mg·L ⁻¹)	DBP 和 氰戊菊酯降解率			水平	DBP 和 氰戊菊酯降解率		
	K	k	R		K	k	R		K	k	R
0	454.26%	113.56%	13.61%	25	444.60%	111.15%	16.63%	5.5	398.61%	99.65%	31.91%
0.01	399.81%	99.95%		50	378.09%	94.52%		6.5	355.75%	88.94%	
0.05	421.01%	105.25%		100	416.08%	104.02%		7.5	483.38%	120.85%	
0.1	400.67%	100.17%		200	436.99%	109.25%		8.5	438.01%	109.50%	

R 为极差值,即同一因素中 k 最大值减 k 最小值.R 值越大说明该因素对试验的影响越大,反之越小;K 值越大说明在同一因素中该水平对试验的影响越大,反之越小.

结合表 4,比较 R 值,可以看出 pH 值对 DBP 和 氰戊菊酯的降解试验结果影响最大,外加碳源(葡萄糖)浓度对降解试验结果影响最小;比较 K 值,可以得出正交试验的最优降解条件是葡萄糖浓度为 0 g·L⁻¹,有机物浓度为 25 mg·L⁻¹,pH 值为 7.5.当葡萄糖浓度为 0.5% 和 1% 时,试验终止时的 pH 值下降至 3~3.5(表 3),可能是因为降解过程中葡萄糖的加入,使得微生物优先降解葡萄糖,产生小分子有机酸,酸性物质积累,对微生物造成危害,打破了降解平衡,不利于真菌的生长和有机物的降解.

3.4 菌株 DY4 降解特性研究

3.4.1 DY4 对不同浓度的 DBP 和 氰戊菊酯的降解效果 如图 4 所示,在不同浓度条件下,DBP 的降解率均大于 氰戊菊酯的,可能与分子的大小和结构复杂程度有关.氰戊菊酯分子量大于 DBP,分子结构中含有氰基、苯氧基及氯苯基等,较 DBP 复杂,且 氰戊菊酯的辛醇-水分配系数($K_{ow} = 6.20$)大于 DBP ($K_{ow} = 4.45$)的(Fan *et al.*, 1997; 隆兴兴等, 2006),疏水性较强,较难被微生物利用.DBP 和 氰戊菊酯的降解规律一致,均是 25 mg·L⁻¹ > 75 mg·L⁻¹ > 50 mg·L⁻¹ > 100 mg·L⁻¹,在 25 mg·L⁻¹ 时的降解率最高,分别达到 65.36% 和 55.77%,此处理组的菌液

OD 值也最高,说明真菌生长状态也最好.随着处理浓度的增加,DBP 和 氰戊菊酯降解率下降,菌液 OD 值也呈下降趋势,但两者没有相关关系;DBP 和 氰戊菊酯在 100 mg·L⁻¹ 时的降解率最低,分别为 36.83% 和 34.89%,但此时菌液的 OD 值并不是最低,说明菌株 DY4 可以耐受较高浓度的 DBP 和 氰戊菊酯.

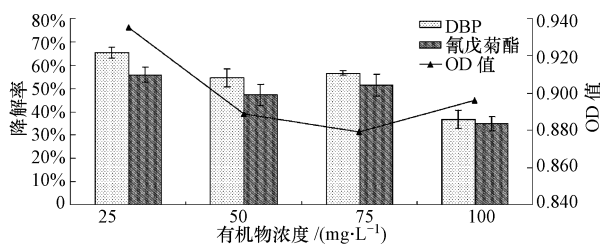


图 4 DBP 和 氰戊菊酯在液体培养基中的降解效果及菌液 OD 值

Fig.4 Degradation rate of DBP and fenvalerate and OD value in culture medium

3.4.2 DY4 对 DBP 和 氰戊菊酯的降解动力学特性

为了解菌株 DY4 在 DBP 和 氰戊菊酯共存时的降解行为,采用一级动力学模型,对 0、2、4、6、8 和 10 d 的农药残留量(c) 和时间(t) 进行拟合,降解动力学方程为 $C_t = C_0 \times e^{-kt}$,其中 C_t 代表降解后某时间点有机污染物的浓度, C_0 代表有机污染物的初始浓度, k 代表降解速率常数, t 代表降解时间,半衰期 $t_{1/2} = \ln 2/k$,方程的拟合度由可决系数(R^2) 进行评价.拟合的结果见表 5,从中可知,菌株 DY4 对 50 mg·L⁻¹

DBP 和氰戊菊酯的同时降解反应符合一级动力学方程,可决系数(R^2)分别为 0.9878 和 0.9947,拟合

相关度较好.在最优降解条件下,DBP 和氰戊菊酯的半衰期分别为 4.46 和 6.88 d.

表 5 DBP 和氰戊菊酯降解的一级动力学拟合结果

Table 5 The curve fitting results of the first-order kinetic model for DBP and fenvalerate degradation

有机物	初始浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	模型参数	动力学参数	统计指标	一级动力学 模型方程
		k	$t_{(1/2)}/\text{d}$	R^2	
DBP	46.11	0.1386	4.46	0.9878	$C_t = 46.38e^{-0.1386t}$
氰戊菊酯	43.65	0.0811	6.88	0.9947	$C_t = 43.67e^{-0.0811t}$

4 讨论 (Discussion)

微生物降解是去除农田土壤中复合有机污染物的主要途径,筛选出可以同时高效降解 PAEs 和农药的土著微生物是开展典型有机物复合污染农田土壤生物修复工作的重要前提.本研究从长期受 PAEs 和农药污染的农田土壤中筛选出 1 株高效并同时降解 DBP 和氰戊菊酯的真菌 DY4,经鉴定为地霉属(*Geotrichum* sp.)种,该菌株能够分别以 DBP 和氰戊菊酯为唯一碳源,7 d 内对 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DBP 和氰戊菊酯的降解率分别为 84.13% 和 37.07%,将 DBP 和氰戊菊酯复合在一起,降解率分别为 47.97% 和 42.12%,说明农药较难降解且影响微生物的降解功能.农药分子结构中所含的卤素、氮、氢等原子,会影响到生物降解,再加上苯环、类苯环的出现,生物降解会更加困难(王乃亮和杜斌,2010),农药中的个别基团或其代谢中间产物对微生物具有毒害作用,有的中间产物甚至毒性更大,比如毒死蜱,降解中间产物 3,5,6-三氯-2-吡啶(TCP)的毒性就远远大于毒死蜱(Sardar *et al.*, 2005).

正交设计是研究多因素多水平的一种试验设计方法,被广泛应用于微生物降解试验.有正交试验研究得出微杆菌(*Microbacterium* sp.)对氯氰菊酯降解的最适培养温度、加菌量、培养基、底物浓度和装液量(杨娜,2007);爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)对 PAEs 的最优降解条件是 C:N 为 20:1, pH 为 7.0, PAEs 初始浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (韩蕊等,2013);本试验得出菌株 DY4 的最优降解条件为有机物浓度 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.5 和无外加碳源.当培养液中外加碳源(葡萄糖)浓度较高时,由于可利用的碳源十分充足,真菌能够充分生长,但作为碳源,葡萄糖比 DBP 和氰戊菊酯更易于被真菌利用从而减少了真菌对 DBP 和氰戊菊酯的降解,使降解率降低(秦坤,2010),这与陈莉等(2008)的研究结果相反,他们认为适量外加碳源葡萄糖的加入对氰戊菊

酯的降解有刺激作用.

有研究表明,假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)在以 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氰戊菊酯农药为唯一碳源的基础培养基中培养 5 d,对氰戊菊酯的降解率达 64.32%,对氰戊菊酯的耐受度最高可达 $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (田盼,2009),戴尔福特菌(*Delftia tsuruhatensis*)对 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氰戊菊酯、溴氰菊酯、高效氯氟氰菊酯的降解率分别为 30.87%、33.90% 和 45.69%,且戴尔福特菌能够耐受 $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的联苯菊酯浓度(景岳龙,2010),说明假单胞菌和戴尔福特菌对农药的降解率不高,但均属于高浓度耐受农药菌种.本试验筛菌过程中,有机污染物的最高浓度达到 $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,DY4 仍能存活且能降解 DBP 和氰戊菊酯;在菌株的降解特性试验中,DY4 对 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DBP 和氰戊菊酯降解率最低,但菌量并不是最低,说明菌株 DY4 也可以耐受较高浓度的 DBP 和氰戊菊酯.

目前国内外在有关 PAEs 和农药的研究中,很多学者认为可用一级动力学方程来描述其降解过程.据报道,5 种 PAEs (DMP、DEP、DBP、DAP 和 DOP)的生物降解反应符合一级降解动力学方程,最终降解的半衰期为 0.5~18 d(叶常明和田康,1989);苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)对高效氯氟氰菊酯、高效氯氟氰菊酯和氰戊菊酯的降解反应也均符合一级降解动力学模型方程,且 R^2 值在 0.9481~0.9650 之间,其降解半衰期为 30~40 h(陈少华等,2011b);假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)对土壤中甲基对硫磷和毒死蜱的降解也均符合一级动力学方程(元文静,2010).本试验中菌株 DY4 对 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DBP 和氰戊菊酯的降解反应符合一级动力学方程,且 R^2 拟合相关度较好.有报道称,PAEs 在土壤中的半衰期在数小时到数月之间,拟除虫菊酯类农药在土壤中降解的半衰期一般在几天到几十天之间(汪军等,2013;张婷,2013),而本试验中菌株 DY4 对 DBP 和氰戊菊酯的降解半衰期分别为 4.46 和 6.88 d,说明菌株 DY4 在

控制土壤中 PAEs 和菊酯类农药残留方面具有一定应用潜力。

5 结论(Conclusions)

1) 通过富集培养法,从长期受 PAEs 和农药污染的农田土壤中筛选出一真菌菌株 DY4,属于地霉属(*Geotrichum* sp.),能利用 DBP 和氰戊菊酯作为唯一碳源,对 DBP 和氰戊菊酯具有较强的耐性,可同时降解 DBP 和氰戊菊酯。

2) 通过正交试验确定菌株 DY4 的最优降解条件为无外加碳源、DBP 和氰戊菊酯初始浓度为 25 mg·L⁻¹、pH 值为 7.5。

3) 在最优降解条件下,菌株 DY4 在 7 d 内对 25 mg·L⁻¹ 的 DBP 和氰戊菊酯降解率分别达到 65.36% 和 55.77%,对 DBP 和氰戊菊酯的降解反应符合一级动力学方程,两者的半衰期分别为 4.46 d 和 6.88 d。

责任作者简介:蔡信德(1965—),男,研究员,主要从事土壤污染与修复方面的工作,E-mail: xindecai@scies.org。

参考文献(References):

- 陈莉,章钢娅,胡锋. 2008. 氰戊菊酯在土壤中的降解及其影响因素研究[J]. 土壤学报, 45(1): 90-97
- Chen S H, Hu Q B, Hu M Y, *et al.* 2011. Isolation and characterization of a fungus able to degrade pyrethroids and 3-phenoxybenzaldehyde [J]. *Bioresource Technology*, 102(17): 8110-8116
- 陈少华, 罗建军, 胡美英, 等. 2011a. 一株拟除虫菊酯农药降解菌的分离鉴定及其降解特性与途径[J]. 环境科学学报, 31(8): 1616-1626
- 陈少华, 李亚楠, 赖开平, 等. 2011b. 降解菌株 DG-S-01 对菜薹和土壤中 3 种拟除虫菊酯类农药降解动力学的影响[J]. 农药学学报, 13(4): 381-386
- 段星春, 易筱筠, 杨晓为, 等. 2007. 两株邻苯二甲酸二丁酯降解菌的分离鉴定及降解特性的研究[J]. 农业环境科学学报, 26(5): 1937-1941
- Fan G T, Burnision B K, Solomon K R. 1997. The partitioning of fenvalerate to natural dissolved organic matter [J]. *Water Research*, 31(10): 2429-2434
- 高军, 陈伯清. 2008. 酞酸酯污染土壤微生物效应与过氧化氢酶活性的变化特征[J]. 水土保持学报, 22(6): 166-169
- 韩蕊, 王冬莹, 芮洋, 等. 2013. 一株降解邻苯二甲酸酯真菌的筛选及其降解特性研究[J]. 环境科学学报, 33(11): 2941-2946
- 景岳龙. 2010. 拟除虫菊酯降解菌的筛选、鉴定及降解性能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学. 28-30
- Lee S M, Koo B W, Lee S S, *et al.* 2004. Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(5): 417-423
- 李俊, 舒为群, 陈济安, 等. 2005. 降解 DBP 菌株 CQ0302 的分离鉴定及其降解特性[J]. 中国环境科学, 25(1): 47-51
- 李雪飞, 杨艳刚, 孙胜龙, 等. 2006. 蔬菜中有机磷、拟除虫菊酯类农药残留调查[J]. 环境与健康杂志, 23(5): 418-420
- Liang W Q, Wang Z Y, Li H, *et al.* 2005. Purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11 [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19): 7415-7420
- Liao C S, Chen L C, Chen B S, *et al.* 2010. Bioremediation of endocrine disrupter di-*n*-butyl phthalate ester by *Deinococcus radiodurans* and *Pseudomonas stutzeri* [J]. *Chemosphere*, 78(3): 342-346
- Lu Y, Tang F, Wang Y, *et al.* 2009. Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and di-*n*-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. L4 isolated from activated sludge [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2/3): 938-943
- 秦坤. 2010. 氯氰菊酯降解真菌的筛选及其降解特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学. 35-37
- Sardar D, Kole R K. 2005. Metabolism of chlorpyrifos in relation to its effect on the availability of some plant nutrients in soil [J]. *Chemosphere*, 61(9): 1273-1280
- 汤鸣强, 田盼, 尤民生. 2010. 氰戊菊酯降解菌 FDB 的分离鉴定及其生长特性[J]. 微生物学通报, 37(5): 682-688
- 田盼. 2009. 氰戊菊酯降解菌的筛选及其降解酶的初步纯化[D]. 福州: 福建农林大学. 42-45
- 汪军, 骆永明, 马文亭, 等. 2013. 典型设施农业土壤酞酸酯污染特征及其健康风险[J]. 中国环境科学, 33(12): 2235-2242
- 王乃亮, 杜斌. 2010. 微生物对环境中农药的降解作用[J]. 甘肃科技, 26(21): 93-95
- 魏景超. 1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社
- 杨娜. 2007. 氯氰菊酯降解菌的分离筛选鉴定与特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学. 21-24
- 叶常明, 田康. 1989. 邻苯二甲酸酯类化合物生物降解动力学[J]. 环境科学学报, 9(1): 37-41
- 元文静. 2010. 有机磷农药降解菌的筛选、分离鉴定及其降解动力学特性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学. 18-24
- 张婷. 2013. 甲氰菊酯对鲤鳃、肝、肾组织损伤的研究[D]. 武汉: 华中农业大学. 3-6
- 赵玉琴, 李丽娜, 李建华. 2008. 常见拟除虫菊酯和有机磷农药对鱼类的急性及其联合毒性研究[J]. 环境污染与防治, 30(11): 53-57