

农药浓度、共代谢底物和接种量对 *Sphingobium indicum* B90A 降解六六六效率的影响

陈 婷, 杨新萍, 刘玉娇, 王世梅*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘 要:有机氯农药六六六曾被广泛用于卫生防疫和对抗农业病虫害,但由于其毒性和持久性引发了一系列环境问题。鉴于微生物降解方法在农药污染场地的修复中具有重要作用,采用摇瓶培养法研究了在 α -、 β -、 γ -和 δ -六六六(HCH)异构体混合体系中,农药浓度、共代谢底物和接种量对 *Sphingobium indicum* B90A 降解 4 种 HCH 异构体的影响。研究结果表明:*S. indicum* B90A 对 α -和 β -HCH 的利用较好,其次是 γ -和 δ -HCH。在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合 HCH 的无机盐培养液中,30 °C 下反应 72 h, *S. indicum* B90A 对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH 的降解率分别为 99%、86%、53%和 33%。随着 HCH 浓度的增加, *S. indicum* B90A 对 4 种 HCH 异构体降解率均逐渐降低。在共代谢底物的研究中,添加葡萄糖或酵母粉均能明显地提高 *S. indicum* B90A 对 HCH 的降解能力,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合无机盐培养液中,添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖或添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母粉,30 °C 下反应 84 h, *S. indicum* B90A 对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH 的降解率均接近 100%。*S. indicum* B90A 对 HCH 的降解率随着菌体接种量的增加而相应提高,适宜接种量为 5%。

关键词:六六六; *Sphingobium indicum* B90A; 农药浓度; 共代谢底物; 接种量

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)02-0345-06

Effects of Pesticide Concentration, Co-metabolic Substrates and Inoculum Size on the Biodegradation of Hexachlorocyclohexane(HCH) Isomers by *Sphingobium indicum* B90A

CHEN Ting, YANG Xin-ping, LIU Yu-jiao, WANG Shi-mei*

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: HCH is one of the most extensively used organochlorine pesticides for public health and agricultural pests control. Soil pollution with HCH has caused serious environmental problems because of its toxicity and long persistence. Biodegradation has been suggested as a safe and effective way to remediate HCH contaminated soils. In our study, a bottle culture was used to investigate the effects of pesticides concentration, co-metabolic substrates and inoculum size on the degradation of mixed HCH isomers(α -, β -, γ - and δ -HCH) by *Sphingobium indicum* B90A. The results showed that the utilization of α - and β -HCH by *S. indicum* B90A was higher than that of γ - and δ -HCH. In the culture solution of $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ mixed HCH, the degradation rates of α -, β -, γ - and δ -HCH with *S. indicum* B90A at 30 °C after 72 h were 99%, 86%, 53% and 33%, respectively. With the increase of HCH concentration, the biodegradation rates of α -, β -, γ - and δ -HCH all gradually declined. In the study of co-metabolic substrates, it was found that $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose or $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract added in the culture solution of $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCH could promote biodegradation of HCH by *S. indicum* B90A close to 100%. With increase of inoculum size from 2% to 10%, the degradation rate of HCH isomers with *S. indicum* B90A increased. The most optimum inoculum size was 5%.

Keywords: hexachlorocyclohexane; *S. indicum* B90A; concentration of pesticides; co-metabolic substrates; inoculum size

六六六(hexachlorocyclohexane, HCH), 化学名为

收稿日期:2011-05-30

基金项目:国家自然科学基金(21077054); 国家 863 计划项目(2009AA063103)

作者简介:陈 婷(1987—),女,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事环境微生物方面的研究。E-mail:chenting816@tom.com

* 通讯作者:王世梅 E-mail:smwang@njau.edu.cn

六氯环己烷,是 8 种异构体的混合物,由于其中 γ 异构体(林丹)的广谱杀虫性,曾被广泛用于植物保护和卫生防疫^[1],HCH 工业品中主要含有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种异构体。HCH 可在生物体中高度富集,具有生物毒性。虽然我国于 1983 年禁止生产 HCH 农药,但由于其化学结构稳定、脂溶性高,在自然条件下很难降解等特

性造成了 HCH 在环境中的长时间残留^[2]。目前,随着我国城市化建设的发展,越来越多的土地利用类型发生了改变,许多老工业企业群等陆续进行了搬迁,在这些场地的土地功能发生转换时,遗留在土壤中的污染物,尤其是有机污染物,如不及时修复,将严重影响和危害城镇居民的身体健康。

污染土壤修复的理论与技术已成为当前环境科学与技术研究的前沿,在农药污染场地的修复中,微生物修复是最重要的处理方法之一。高效降解菌株的获取,降解条件的优化及降解效率的提高,在难降解农药的污染修复中具有重要作用。*Sphingobium indicum* B90A 是 1990 年印度学者 Sahu 等^[3-5]从甘蔗根部土壤中分离得到的一株 HCH 降解菌,研究表明该菌株能分别以 α -、 γ -HCH 为唯一碳源进行生长繁殖。从文献报道已知该菌株是中温型细菌,可以在 24 h 内完全降解浓度分别为 3.61 、 $4.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 α -、 γ -HCH,72 h 内完全降解浓度为 $6.71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 β -HCH^[6],8 d 内完全降解 $36.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 δ -HCH,反应体系中检测不到 HCH 异构体的存在^[5]。当前研究大多集中在 *S.indicum* B90A 对单个异构体的降解及 HCH 相关降解基因的调控上,对于 HCH 多种异构体混合物的降解效率研究鲜有报道。而实际污染土壤多是混合型污染,本课题组承担一环境污染治理项目(有机氯农药污染场地的生物修复),准备以菌株 B90A 为材料,修复含有混合型 HCH 污染的土壤。故本文研究了菌株 B90A 在不同条件下对混合型 HCH 的 4 种异构体的降解性能,为下一步用该菌株修复 HCH 污染场地做技术准备。前期的预试验发现菌株 B90A 培养在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH } 7.0$ 的中性环境中生长活性最好,虽然弱碱的环境有利于 HCH 的开环降解,但考虑到中性环境更有利于细菌的生长代谢,故将降解试验的 pH 条件设定为中性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株:*Sphingobium indicum* B90A (CCM 7286^T,购自 CCM:捷克斯洛伐克微生物保藏中心)

农药:六六六(HCH)混合溶液,其中 HCH 的 4 种异构体含量为: α -HCH,28.4%; β -HCH,7.7%; γ -HCH,26.1%; δ -HCH,37.8%。

1.2 *S. indicum* B90A 菌悬液制备方法

S.indicum B90A 在 LB 液体培养基中培养至对数期($10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$), $8\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 2 min,弃上清液,

用灭菌的无机盐培养液^[6](K_2HPO_4 1.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, NH_4NO_3 1.0 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 去离子水 1 000 mL, $\text{pH } 7.0$)洗涤 3 次,离心收集菌体,制成等体积的菌悬液备用。

1.3 HCH 的提取及测定方法

取待测样 1 mL,按 1:10 的比例加入正己烷,涡旋混匀,静置后取有机相,加入无水 Na_2SO_4 除水,过 $0.22 \mu\text{m}$ 有机滤膜,用气相色谱仪(Agilent 7890,GC)分析测定。

GC 测定条件:进样量 $1.0 \mu\text{L}$,载气流量 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,ECD 检测器;程序升温:初始 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温到 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温到 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$,再以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温到 $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min;色谱柱:HP-5, $30.0 \text{ m}\times 0.32 \text{ mm}\times 0.25 \mu\text{m}$ 。

1.4 菌株降解性能的测定

1.4.1 *S. indicum* B90A 对不同浓度 HCH 的降解率

按 2% 的接种量将菌含量为 $10^9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 *S. indicum* B90A 菌悬液,接种到 HCH 总浓度分别为 10、30、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机盐培养液中,于 250 mL 三角瓶装液量 50 mL,以未接菌的培养液做对照,每个处理设置 3 次重复, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养,定时取样测定 HCH 的 4 种异构体的含量,计算其降解率。

1.4.2 不同共代谢底物对 HCH 降解率的影响

在 HCH 含量为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机盐培养液中,分别添加葡萄糖和酵母粉为共代谢底物,设置葡萄糖的添加浓度为 25、100、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,酵母粉的添加浓度分别为 10、20、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按 2% 的接种量将制备好的菌悬液分别接种到培养液中,设不接菌为对照,每个处理 3 次重复,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养,定时取样测定 HCH 的 4 种异构体的降解率。

1.4.3 *S. indicum* B90A 接种量对 HCH 降解率的影响

将 *S. indicum* B90A 菌悬液分别按 2%、5%、10% 接种量接入到 HCH 总浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机盐培养液中,250 mL 三角瓶装液量 50 mL,以无机盐培养液补齐体积。未接菌的培养液做对照,每个处理设置 3 次重复, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 12 h 取样,测定 HCH 的 4 种异构体的降解率。

2 结果与讨论

2.1 *S. indicum* B90A 对不同浓度 HCH 的降解率

在给定 HCH 的浓度范围内的无机盐培养液中,*S. indicum* B90A 能首先利用 α -和 β -HCH,然后利用 γ -和 δ -HCH,如图 1 所示。随着 HCH 浓度的增加,*S.*

indicum B90A 对 4 种 HCH 异构体的降解率均呈现逐渐降低的趋势。随着反应时间的延长,对 4 种 HCH 异构体的降解率均先上升后基本趋于稳定。

菌株 B90A 对低浓度的 HCH 降解率较高,如在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCH 的体系中,反应 72 h, α -、 β -、 γ -和 δ -HCH 的降解率分别为 99%、86%、53%和 33%;在含较高浓度的 HCH 反应液中,菌株 B90A 对其降解率相对较低,如在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCH 体系中,反应 120 h,菌株 B90A 对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH 的降解率分别仅为 47%、43%、6%和 10%。Rekha 等^[7]在克隆并研究降解 HCH 异构体的 *lin* 基因中提到,在 HCH(文献中未说明异构体类型)浓度大于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时菌株对异构体的降解不完全。虽然也有研究表明 γ -HCH 同样可以作为 B90A 的唯一碳源^[4],且 α -、 γ -HCH 可以作 B90A 降解 β -、 δ -异构体的共代谢底物^[8],但是本试验结果表明在 4 种混合 HCH 异构体体系中,HCH 浓度的增加影响了菌株 B90A 对 γ -HCH 的利用,仅当对 α -HCH 的利用不足时,可共代谢降解 β -和 δ -HCH。这可能是由于 2%的接种量提供的菌体数量有限,对碳源的获取不足导致细菌不能很好地生长繁殖,混合体系中细菌对异构体的降解产生了竞争,农药浓度的

提高对细菌产生了毒性等原因,抑制了细菌对 HCH 异构体的利用和降解。

在其他有机污染物降解过程中,也发现了类似规律,邓晓等^[9]在研究乐果浓度对降解菌 LXG1 降解的影响时发现,提高乐果初始浓度对菌株降解性能的影响较大,高浓度乐果抑制菌株生长从而使农药降解效果变差。唐玉斌等^[10]在研究茚浓度对降解菌的影响时也有类似报道,高浓度的茚对降解菌产生毒害作用,超过一定浓度后,增加茚浓度,细菌对茚的降解率降低。

2.2 不同共代谢底物对 HCH 降解率的影响

共代谢(cometabolism)是指在有其他碳源和能源存在的条件下,微生物酶活性增强提高降解非生长基质的效率^[11]。酵母粉中含有丰富的各种氨基酸和 B 族维生素,它的主要作用是补充氮源和提供细菌生长的各种维生素及氨基酸;而葡萄糖来源广泛,是自然界中最简单的单糖碳源^[12]。本试验选用不同浓度的葡萄糖和酵母粉作为菌株 B90A 的共代谢底物,研究其对 HCH 异构体的共代谢作用。同样发现 α -HCH 最易于降解,添加少量葡萄糖和酵母粉,反应 12 h, α -HCH 基本上被完全降解,如图 2、图 3 所示。与对照相比,

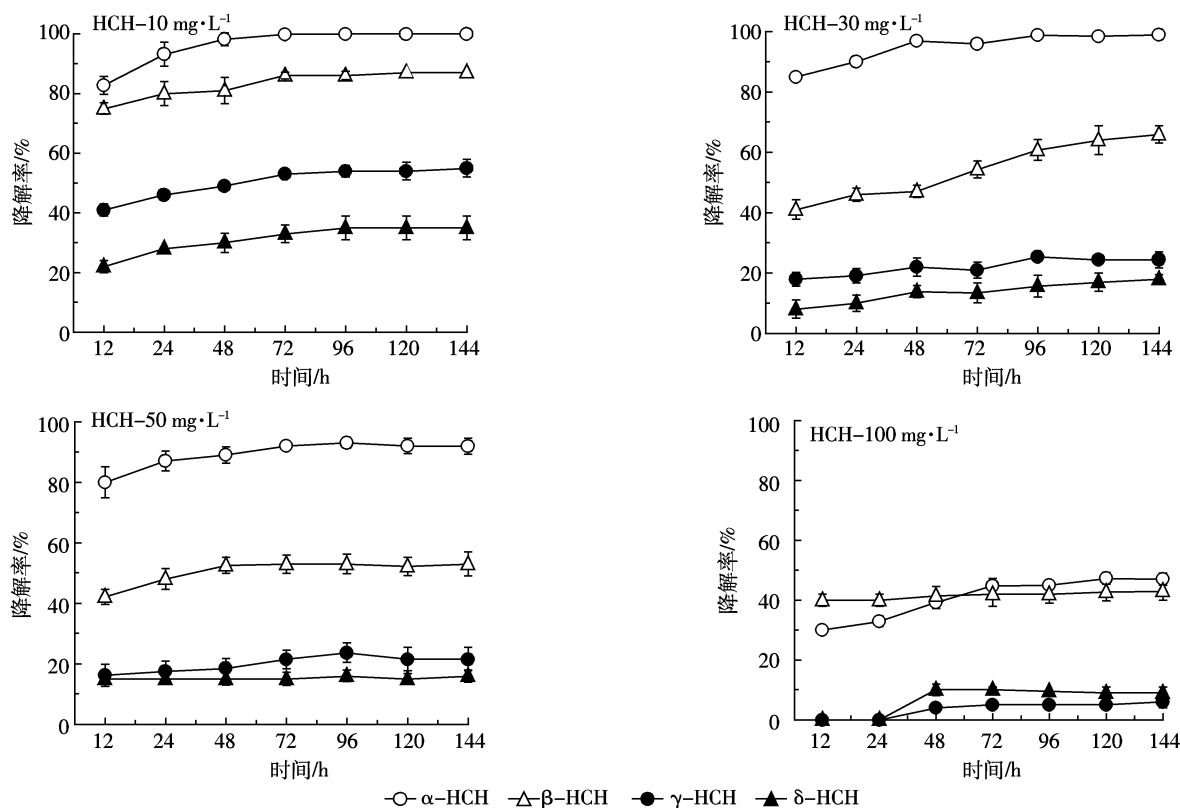
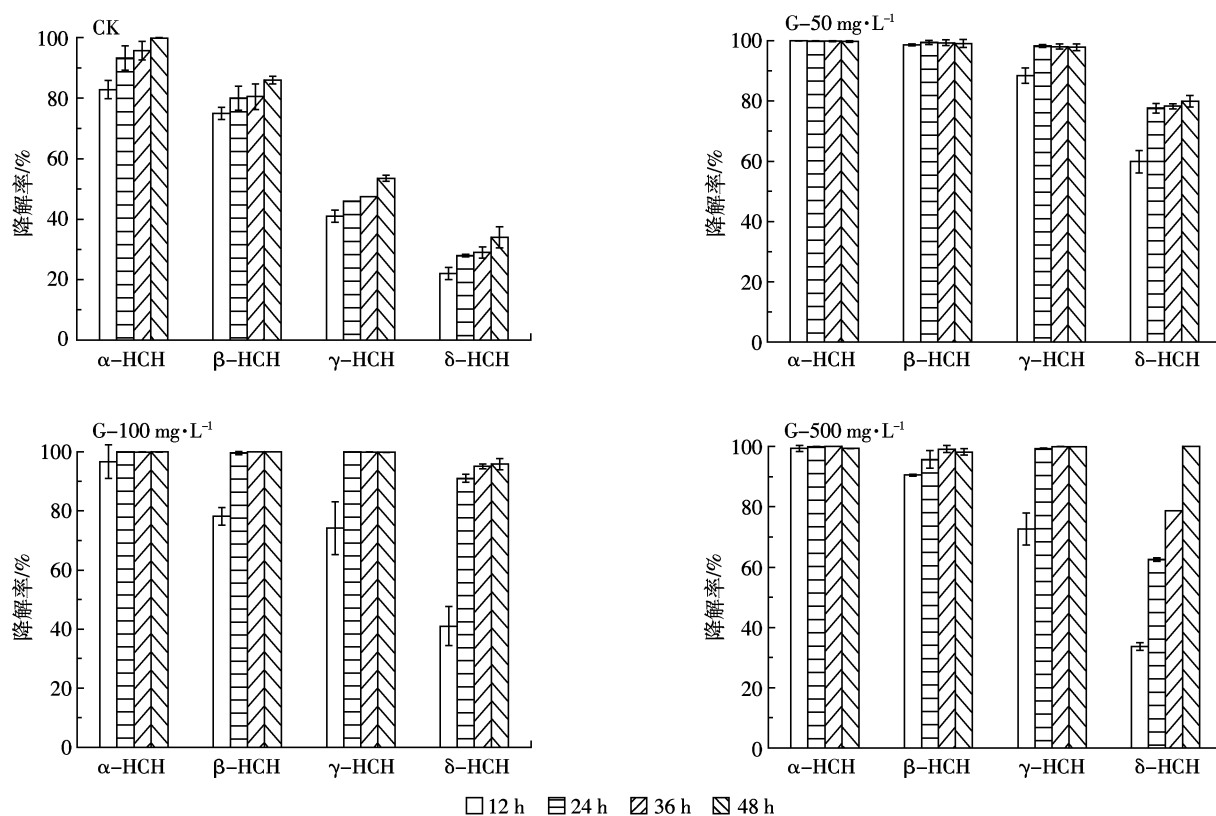
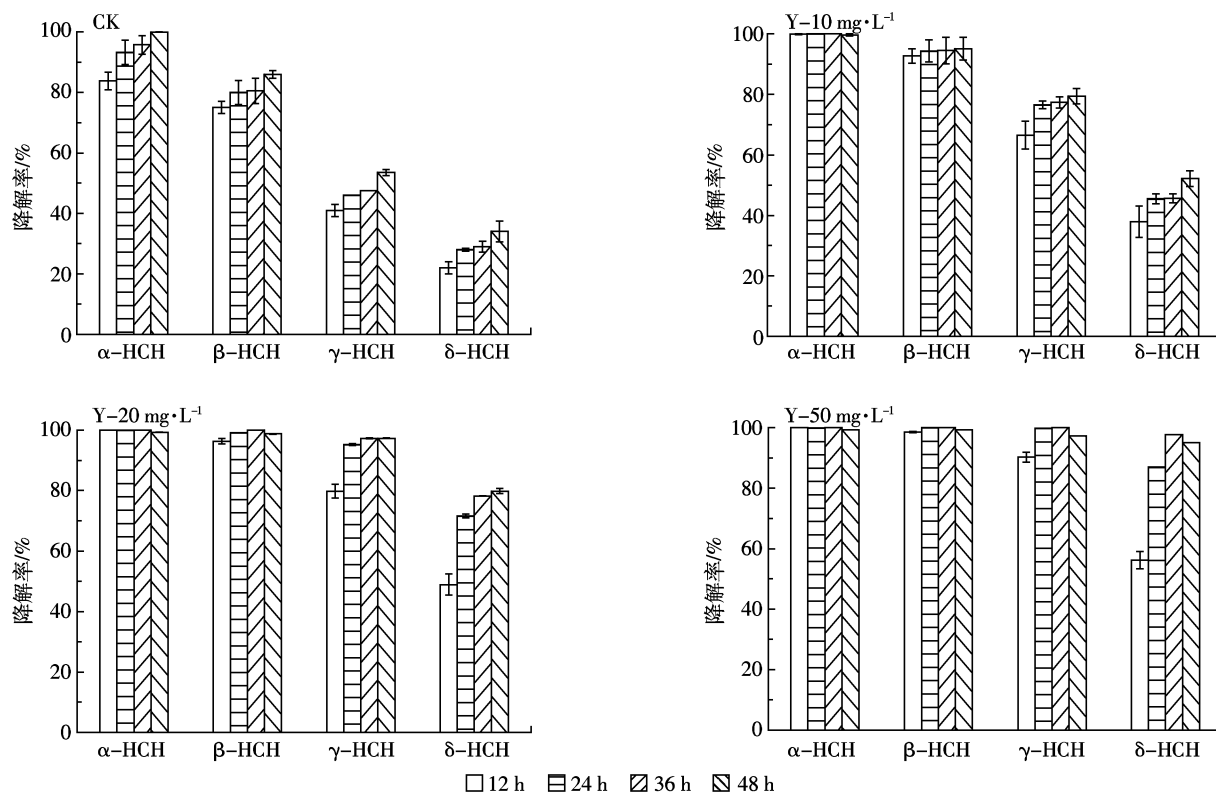


图1 农药初始浓度对 *S. indicum* B90A 降解 HCH 异构体的影响

Figure 1 Effect of initial concentration of pesticides on the biodegradation of HCH isomers by *S. indicum* B90A

图 2 不同浓度葡萄糖(G)对 *S. indicum* B90A 降解 HCH 异构体的影响Figure 2 Effect of concentration of glucose on the biodegradation of HCH isomers by *S. indicum* B90A图 3 不同浓度酵母粉(Y)对 *S. indicum* B90A 降解 HCH 异构体的影响Figure 3 Effect of concentration of yeast extract on the biodegradation of HCH isomers by *S. indicum* B90A

添加少量的葡萄糖和酵母粉明显地促进了 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解。

由图2可见,当葡萄糖添加量为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,能明显提高菌株对4种HCH异构体的降解率;当葡萄糖添加量为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,反应36 h,4种HCH异构体降解率接近100%;添加高浓度的葡萄糖如 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,反而不利 δ 异构体的降解。

如图3所示,反应体系中随着酵母粉添加量的增加,*S. indicum* B90A对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解率逐步提高。当酵母粉添加量为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,反应12 h, β -、 γ -和 δ -HCH的降解率分别为96%、80%、49%;反应36 h, β -、 γ -和 δ -HCH的降解率分别为100%、97%、78%。当酵母粉添加量为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,反应12 h, β -、 γ -和 δ -HCH的降解率分别为98%、90%、56%,到反应36 h,三者的降解率均接近100%。

从图中看出反应体系中添加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖或添加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉,菌株B90A对HCH的降解效率最高。

2.3 *S. indicum* B90A 接种量对HCH降解率的影响

实验采用HCH的混合液,将不同量的*S. indicum* B90A接入到含HCH无机盐培养液中,反应12 h取样,检测反应液中 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解率,结果见图4。

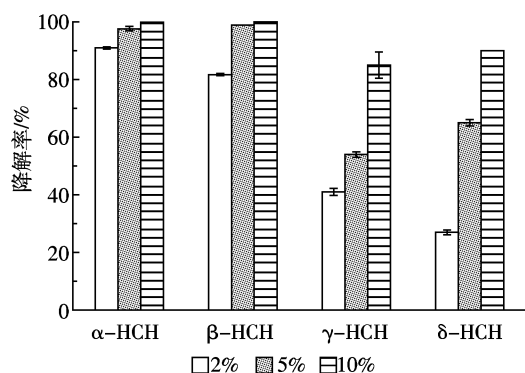


图4 不同接种量对*S. indicum* B90A降解HCH异构体的影响

Figure 4 Effect of inoculums on the biodegradation of HCH isomers by *S. indicum* B90A

从图4可以看出,随着接种量的增大,菌株B90A对HCH的降解率也相应提高。接种量为10%时,菌株B90A对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解率明显提高, α -HCH和 β -HCH降解率为100%, γ -HCH和 δ -HCH降解率分别达85%和90%,相比接种量为2%时的降解率分别提高10%、19%、44%和63%。

Atuk等^[13]在研究菌株*S. paucimobilis*降解HCH

异构体的降解效率时,也发现了类似的现象,即将接种量从 10^2 提高到 10^8 (细胞数 $\cdot\text{mL}^{-1}$),反应72 h, α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解率均明显提高。结合本次实验结果并考虑到实际应用时降解菌的接种量不可能过高,将接种量控制在5%左右。

3 结论

(1)在 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH 4种异构体的混合体系中,*S. indicum* B90A对 α -、 β -HCH降解效率较高,其次是 γ -、 δ -HCH,随着HCH浓度的提高,菌株B90A对4种HCH异构体降解效率逐渐降低。在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合HCH的无机盐培养液中, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应72 h,*S. indicum* B90A对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解率分别为99%、86%、53%和33%。

(2)添加少量葡萄糖或酵母粉均能明显地提高*S. indicum* B90A对HCH的降解效率。在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 混合无机盐培养液中,添加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖或添加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应36 h,*S. indicum* B90A对 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的降解率均接近100%。

(3)在 α -、 β -、 γ -和 δ -HCH的混合体系中,*S. indicum* B90A对这4种异构体的降解率随着接种量的增大相应提高,适宜接种量为5%。

参考文献:

- [1] Kumar M, Chaudhary P, Dwivedi M, et al. Enhanced biodegradation of β - and δ -hexachlorocyclohexane in the presence of α - and γ -isomers in contaminated soils[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39:4005-4011.
- [2] 王晓华,尹元琴,张卫东,等. 环境中有机氯农药残留与女性乳腺癌[J]. *农药*, 2005, 44(12):555-557.
WANG Xiao-hua, YIN Yuan-qin, ZHANG Wei-dong, et al. Correlation between organochlorines pesticides residues and breast cancer[J]. *Chinese Journal of Pesticides*, 2005, 44(12):555-557.
- [3] Sahu S K, Patnaik K K, Sethunathan N. Degradation of α -, β - and γ -isomers of hexachlorocyclohexane by rhizosphere soil suspension from sugarcane[J]. *Proceedings of Indian Academy of Science (Plant Sciences)*, 1990, 100:165-172.
- [4] Sahu S K, Patnaik K K, Sharmila M, et al. Degradation of α -, β -, and γ -hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56:3620-3622.
- [5] Sahu S K, Patnaik K K, Sethunathan N. Dehydrochlorination of δ -isomer of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium, *Pseudomonas* sp. [J]. *Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 48:265-268.
- [6] 张国顺. 六六六降解富集液的获得、降解相关基因的克隆及脱氯酶基因的表达[D]. 南京:南京农业大学, 2005.
ZHANG Guo-shun. Acquire of HCH degrading enrichment, cloning of

- genes involved in HCH degrading and expressing of dehydrochlorinase gene[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.
- [7] Kumari R, Subudhi S, Suar M, et al. Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* Strain B90A[J]. *Microbiology*, 2002, 68: 6021–6028.
- [8] Sahu S K, Patnaik K K, Bhuyan S, et al. Mineralization of α -, γ -, and β -isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43: 833–837.
- [9] 邓 晓, 李勤奋, 侯宪文, 等. 乐果降解菌 LGX1 的筛选及其降解特性研究[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(5): 1034–1039.
- DENG Xiao, LI Qin-fen, HOU Xian-wen, et al. Study on screening and characteristics of a dimethoate-degrading bacterium strain LGX1[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(5): 1034–1039.
- [10] 唐玉斌, 马姗姗, 王晓朝, 等. 一株苄的高效降解菌的选育及其降解性能研究[J]. *环境工程学报*, 2011, 5(1): 48–54.
- TANG Yu-bin, MA Shan-shan, WANG Xiao-chao, et al. Breeding of a high-performance pyrene-degrading strain and its biodegradation performance[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(1): 48–54.
- [11] Jensen H L. Carbon nutrition of some microorganisms decomposing halogen-substituted aliphatic acids[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 1963, 13: 404–412.
- [12] 钟 磊. 菲高效降解菌的分离、鉴定及其在非污染土壤修复中的应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- ZHONG Lei. Isolation, identification of phenanthrene-degrading bacteria and its application in mediating phenanthrene polluted soil[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.
- [13] Johri A K, Dua M, Saxena D M, et al. Enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis*[J]. *Current Microbiology*, 2000, 41: 309–311.