

土壤中黑曲霉降解氧化乐果的研究

石成春¹, 许 升², 郭养浩³

(1.福建省福州市环境科学研究所, 福建 福州 350011; 2.福建省工程学院, 福建 福州 350014; 3.福州大学化学化工学院, 福建 福州 350001)

摘 要:在实验室模拟条件下,选择砂壤土和粉黏土为环境介质,研究在不同氧化乐果初始浓度条件下黑曲霉(*Aspergillus niger*)降解土壤中氧化乐果的特性,评价黑曲霉对受污染土壤的生物修复能力,结果表明,在灭菌土壤中,黑曲霉可有效降解氧化乐果。在氧化乐果浓度较低(15 mg·kg⁻¹ dried soil)的受污染非灭菌土中,投加黑曲霉的生物修复强化作用不明显,但在污染浓度较高时(150~500 mg·kg⁻¹ dried soil),投加黑曲霉可明显加快氧化乐果降解速率,在氧化乐果初始浓度为 500 mg·kg⁻¹ dried soil 条件下,非灭菌粉黏土中氧化乐果的降解半衰期由 8.9 d 缩短到 4.9 d,氧化乐果生物降解速率提高 10.9 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹。黑曲霉具有耐受并降解较高浓度氧化乐果能力,适合中高浓度(或污染事故)氧化乐果污染土壤的生物修复。

关键词:黑曲霉;氧化乐果;降解;土壤污染;生物修复

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-0948-05

Study on the Degradation of Omethoate in Soils by Fungus *Aspergillus niger*

SHI Cheng-chun¹, XU Sheng², GUO Yang-hao³

(1. Institute of Environmental Science of Fuzhou, Fuzhou 350011, China; 2. Institute of Engineering Fujian, Fuzhou, 350014, China; 3. Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350001, China)

Abstract: Currently, bioremediation of the contaminated soil is one of the hottest research fields of environmental protection. In this paper, we evaluated fungus *Aspergillus niger*'s bioremediation in the polluted soil by studying the degradation of the omethoate by the fungus in sterilized and unsterilized soils at different initial concentrations of the contaminant, under laboratory simulated conditions with sidehill sand clay and paddyfield silt clay as the medium. We measured the degradation rate of the omethoate and calculated its half-life time by fitting the degradation process by the first order kinetic equation. We also measured the fraction of degraded omethoate to value the bioremediation efficiency. Our studies show that in the sterilized soil, fungus *Aspergillus niger* can degrade the omethoate efficiently. In the unsterilized soil, the efficiency of degradation depends on the concentrations of the contaminant. At low concentrations of omethoate (e.g. 15 mg·kg⁻¹ dried soil), the bioremediation of the fungus is not obvious; At high concentrations (e.g. 150~500 mg·kg⁻¹ dried soil), the added fungus accelerates the degradation of omethoate remarkably. For example, at 500 mg·kg⁻¹ dried soil, the half-life time of omethoate decreases to 4.9 days from 8.9 days, and the degradation rate increases to 10.9 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹. While at extremely high concentrations of omethoate (e.g. 1 000 mg·kg⁻¹ dried soil), the bioremediation of the fungus is restrained badly with bioremediation efficiency 3.5%, which is lower than that of pure fungus 5.7%. Therefore, fungus *Aspergillus niger* can tolerate and degrade high concentrations of omethoate and it can be applicable to mass bioremediation of the soil polluted by the omethoate.

Keywords: *Aspergillus niger*; omethoate; biodegradation; contaminated soil; bioremediation

污染物进入环境后可被农作物吸收,并通过食物链进入人体内富集。如何降低土壤中污染物残留,对

于保护土壤生态环境,减少农作物产品中污染物含量及其对人体的健康危害具有至关重要的作用,也是国内外环境保护领域关注的焦点。生物修复是指利用生物的生命代谢活动来减少环境中有毒有害物的浓度或使其无害化,从而使受污染环境能够部分或完全地

收稿日期:2007-09-27

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(D0210007)

作者简介:石成春(1973—),男,博士,高级工程师,主要研究方向为环境生物技术。E-mail:stonerainman@126.com

恢复到原初状态的过程。目前研究较多的是针对特定的污染物从环境中筛选出高效降解菌株,并将其投放到受污染环境,达到生物修复强化效果^[1-2]。国外曾报道接种假单胞菌株到土壤或污水中降解芳香化合物有较好的效果^[3-5]。周军英等研究了邻单胞菌 DLL-1 对土壤中甲基对硫磷的降解^[6]。郭明等从受污染的土壤中富集筛选出联苯菊酯的高效降解菌,并将其应用于受联苯菊酯农药污染土壤的生物修复^[2]。研究受农药污染土壤生物修复,特别是事故性污染条件下的污染土壤生物修复,对于提高土壤污染事故应急处理能力,保护土壤环境质量有重要科学指导意义。本文在实验室模拟条件下研究黑曲霉降解土壤中氧化乐果的动态过程,探讨黑曲霉降解土壤中的氧化乐果特性,评价其对污染土壤的生物修复效果。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和药剂

主要实验仪器:高效液相色谱(HPLC,日本岛津,UV 检测器),C18 柱 (φ4.6 mm×250 mm,Backman 公司),pH 计(Mettler Toled320-S,Mettler 公司),Backman Aggegra 64R 高速离心机,压力灭菌锅(YSQ-LS-50SI)。

主要药剂:40%氧化乐果乳油(杭州庆丰农化有限公司),甲醇(色谱纯,江苏汉邦),察氏培养基。

1.2 黑曲霉的驯化和筛选

课题组从福建省三农集团股份有限公司废水处理装置的活性污泥中筛选到一株可以氧化乐果为惟一磷源的曲霉,经鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*),见参考文献[7]。

1.3 土样预处理

两种类型土壤样品采自福建农林大学水稻田耕层粉黏土和后山树林表土层砂壤土,采样深度为 2~15 cm。自然风干土样,去除植物根系等杂物,过 20 目筛,取 60 g 土壤装入 250 mL 三角瓶中,棉花塞封口。土壤分装后置压力灭菌锅中灭菌处理 30 min。供试土壤的理化性质见表 1,两种土样理化性质差别较大,粉黏土中的有机质、氮、磷等营养元素水平高于砂壤土。

1.4 土壤中氧化乐果降解实验

将黑曲霉接种于含氧化乐果 500 mg·L⁻¹ 的固体培养基,培养 6 d,孢子成熟后用灭菌的惟一磷源培养基冲洗平板,配制成密度约 3×10⁸ 个·mL⁻¹ 的悬浮液。将孢子悬浮液于 30 ℃培养,6 h 后孢子萌发。根据实验浓度要求配制氧化乐果水溶液,均匀喷入 60 g 经预处理的土样,混合均匀,再取 10 mL 菌液接入实验土壤中。调节含水量,使之达到土壤饱和含水量的 60%。将各组土壤置于 30 ℃条件下培养,每隔一定时间取样测定氧乐果残留量。培养过程中定期加入无菌水,以保持较稳定的土壤湿度。

1.5 土壤样品中氧化乐果残留量测定

取 10 g 土样测定土壤含水量,另取出 30 g 土样测定土壤中氧化乐果含量。提取方法为:将土样装入三角瓶中,加入 75 mL 丙酮,塞上玻璃具塞,混匀,静置过夜,然后振荡 2 h,抽滤,用 15 mL 丙酮清洗滤饼层,合并滤液,在旋转浓缩器内浓缩(35 ℃),定容至 5 mL。按文献[7]采用高效液相色谱法。两种土样的平均回收率分别在 88.7%~97.8%和 87.4%~96.4%,变异系数分别为 1.0%~3.7%和 1.5%~5.9%,符合文献[8]农残定量分析精度要求。每组实验重复 3 次,分别测定氧化乐果浓度,计算平均值,绘制浓度随时间变化曲线,计算降解速率。

1.6 统计方法和计算公式

采用 EXCEL 进行数据统计和分析。生物降解速率:单位干重干土中,单位时间内由生物作用导致的目标污染物的降解量,单位为:mg 污染物·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹,其数学表示为:

生物降解速率=[生物作用导致的降解量-空白对照样品(化学和光作用等)降解量]/(生物处理时间×干土重量)

2 结果与讨论

2.1 不同土壤介质中黑曲霉降解氧化乐果特性

在氧化乐果初始浓度为 15 mg·kg⁻¹ dried soil 条件下,将黑曲霉菌液分别加到经灭菌与非灭菌的砂壤土和粉黏土中,样品置于阴暗处以避免光降解作用,30 ℃培养,保持自然通风,于处理后第 3、8、14、21 d

表 1 供试土壤的基本性质
Table1 Characteristic of soil for experiment

土样	土壤类型	pH	有机质/%	全氮/%	全磷/%	全钾/%
山坡土	砂壤土	4.95	0.887	0.049	0.072	3.498
水稻田土	粉黏土	5.26	2.150	0.128	0.097	2.858

取样分析氧化乐果残留量,实验结果见图 1。

有机磷农药在土壤中的降解过程可用一级反应动力学方程进行模拟^[9],土壤中氧化乐果曲霉降解动力学关系式见表 2。砂壤土和粉黏土 pH 值均偏酸性。灭菌土壤中,虽然由于化学、光等降解作用,氧化乐果的残留量逐渐降低,但降解速率缓慢,半衰期分别为 23.0 d 和 21.0 d,这表明氧化乐果在两种灭菌土壤介质中相对较稳定。向灭菌砂壤土和粉黏土介质中投加黑曲霉,氧化乐果的半衰期明显缩短,分别降至 7.1 d 和 6.2 d,说明在土壤介质中,黑曲霉可以有效的降解氧化乐果。非灭菌土壤中投加黑曲霉的生物修复作用

不显著,非灭菌粉黏土中氧化乐果半衰期仅缩短了 0.5 d。

2.2 初始浓度 500 mg·kg⁻¹ dried soil 条件下粉黏土中曲霉降解氧化乐果特性

将粉黏土中氧化乐果初始浓度提高至 500 mg·kg⁻¹ dried soil,按表 3 实验条件进行生物修复实验,考察黑曲霉生物修复受较高浓度氧化乐果污染土壤的特性,结果见图 2 和表 3。实验 A 灭菌土壤中氧化乐果降解缓慢,半衰期为 30.0 d,到第 10 d 降解率仅为 21.8%。实验 B 中,由于黑曲霉的生物降解作用,氧化乐果的降解速率比实验 A 有明显加快,半衰期缩短了 17.4 d。

大量研究表明^[10,11],从实验室筛选出的高效降解菌株能否在自然环境微生物群落中成为优势菌群并发挥降解作用,是生物修复实验室研究成果向工程应用转化的关键。非灭菌粉黏土中初始浓度为 500 mg·kg⁻¹ dried soil 的氧化乐果降解半衰期为 8.9 d,10 d 氧化乐果降解率为 54.0%,生物降解率为 32.2%;在非灭菌土中投加黑曲霉,氧化乐果降解速率显著提高,10 d 氧化乐果降解率为 76.0%,其中生物降解率为 54.2%,氧化乐果的半衰期从 8.9 d 缩短至 4.9 d,表明投加黑曲霉在较高浓度氧化乐果(500 mg·kg⁻¹ dried

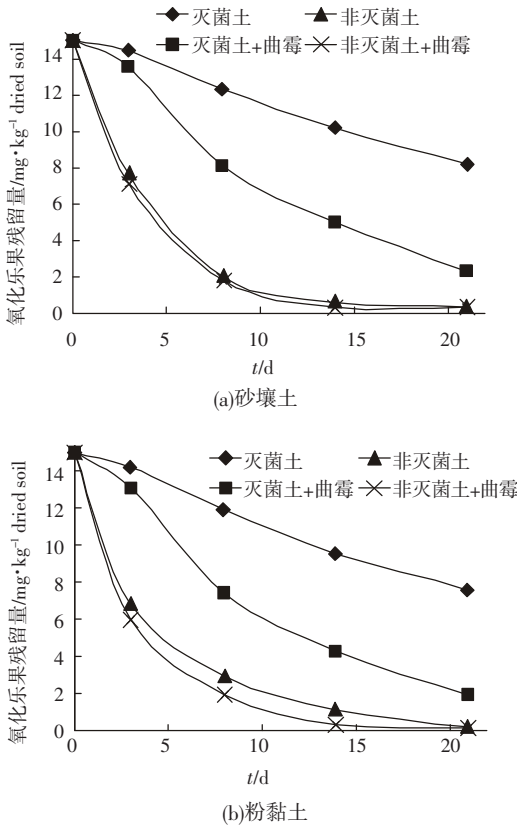


图 1 砂壤土(a)和粉黏土(b)中不同处理条件下氧化乐果降解曲线

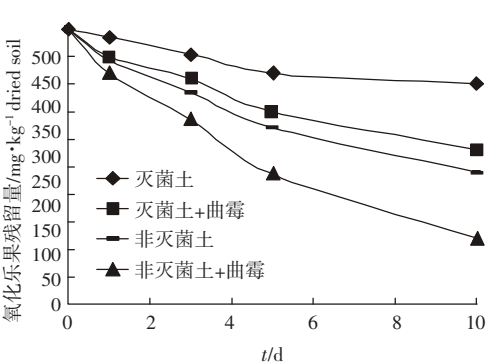


图 2 不同处理条件下粉黏土中氧化乐果(500 mg·kg⁻¹ dried soil)降解动态

Figure 1 Degradation of omethoate in sidehill sand clay(a) and paddyfield silt clay(b) at different treatment condition

Figure 2 Degradation trend of omethoate(500 mg·kg⁻¹ dried soil) in paddy soil under different treatment condition

表 2 不同土壤中氧化乐果降解趋势

实验条件	砂壤土			粉黏土		
	回归方程	r^2	$t_{1/2}/d$	回归方程	r^2	$t_{1/2}/d$
灭菌土	$C_t=15.40e^{-0.030 t}$	0.993	23.0	$C_t=15.36e^{-0.033 t}$	0.996	21.0
灭菌土+黑曲霉	$C_t=16.86e^{-0.097 t}$	0.987	7.1	$C_t=17.26e^{-0.112 t}$	0.983	6.2
非灭菌土	$C_t=13.93e^{0.208 t}$	0.991	3.3	$C_t=14.81e^{0.210 t}$	0.989	3.3
非灭菌土+黑曲霉	$C_t=12.72e^{-0.215 t}$	0.963	3.2	$C_t=12.72e^{-0.244 t}$	0.985	2.8

soil)污染的土壤修复过程中发挥较显著生物强化作用。

2.3 黑曲霉土壤生物修复效果综合评价

在不同的氧化乐果初始浓度条件下,利用黑曲霉生物降解作用修复粉黏土中氧化乐果污染的实验结果见表 4,降解时间为 10 d。在灭菌土壤中,氧化乐果的生物降解主要依靠曲霉的生物代谢作用,氧化乐果初始浓度由 15 mg·kg⁻¹ dried soil 提高到 500 mg·kg⁻¹ dried soil, 氧化乐果生物降解速率由 0.58 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹ 提高到 27.0 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹; 当氧化乐果浓度达 1 000 mg·kg⁻¹ dried soil 时,氧化乐果生物降解速率下降至 11.7 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹。结果表明, 黑曲霉具有耐受并降解较高浓度氧化乐果的能力,但氧化乐果浓度太高时,其降解活性将受到抑制。在非灭菌土生态系统中, 氧化乐果浓度较低时(15 mg·kg⁻¹ dried soil), 非灭菌土中土著微生物对氧化乐

果的生物降解速率高于黑曲霉纯菌株,非灭菌土中投加黑曲霉进行生物修复作用的效果不明显,氧化乐果生物降解速率仅提高 0.07 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹;在中浓度条件下(150 mg·kg⁻¹ dried soil),外加菌株黑曲霉后氧化乐果生物降解速率明显增加, 与非灭菌土相比, 氧化乐果生物降解速率提高 2.3 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹; 将氧化乐果浓度进一步提高到 500 mg·kg⁻¹ dried soil,非灭菌土中投加黑曲霉后氧化乐果生物降解速率显著增加,与非灭菌土相比,氧化乐果生物降解速率提高 10.9 mg·kg⁻¹ dried soil·d⁻¹;当氧化乐果浓度高达 1 000 mg·kg⁻¹ dried soil 时,在实验期间土著微生物的生物降解作用受到严重的抑制,10 d 生物降解率仅 3.5%,低于黑曲霉纯菌株的生物降解率(5.7%),说明黑曲霉具有耐受并降解较高浓度氧化乐果的能力,对于中高浓度(150~500 mg·kg⁻¹ dried soil)氧化乐果污染土壤的生物修复强化作用效果较明显。

表 3 粉黏土中氧化乐果(500 mg·kg⁻¹ dried soil)降解动力学方程

Table 3 Kinetic equation of omethoate(500 mg·kg⁻¹ dried soil) in paddy soil under different treatment condition

实验编号	实验条件	回归方程	r ²	t _{1/2} /d
实验 A	灭菌土	C _t =488 e ^{-0.023 t}	0.966	30.0
实验 B	灭菌土+黑曲霉	C _t =482 e ^{-0.055 t}	0.975	12.6
实验 C	非灭菌土	C _t =485 e ^{-0.078 t}	0.966	8.9
实验 D	非灭菌土+黑曲霉	C _t =491 e ^{-0.261 t}	0.996	4.9

表 4 不同氧化乐果初始浓度条件下的黑曲霉生物降解率

Table 4 Degradation of omethoate in soils at different initial concentration by *Aspegillus niger*

处理	浓度/mg · kg ⁻¹ dried soil · d ¹ ±SD		生物降解率/%	生物降解速率/mg · kg ⁻¹ dried soil · d ⁻¹
	初始	实验结束		
灭菌土	15	10.8±1.0	—	—
灭菌土+黑曲霉	15	5.0±0.6	38.7	0.58
非灭菌土	15	1.8±0.2	60.0	0.90
非灭菌土+黑曲霉	15	1.1±0.2	64.7	0.97
灭菌土	150	121.5±11.1	—	—
灭菌土+黑曲霉	150	81.0±7.2	27.0	4.1
非灭菌土	150	34.9±2.0	57.7	8.7
非灭菌土+黑曲霉	150	11.7±1.1	73.2	11.0
灭菌土	500	391.0±20.3	—	—
灭菌土+黑曲霉	500	285.9±18.9	21.0	10.5
非灭菌土	500	230.0±19.0	32.2	16.1
非灭菌土+黑曲霉	500	120.9±13.1	54.0	27.0
灭菌土	1 000	867.2±45.5	—	—
灭菌土+黑曲霉	1 000	810.4±50.2	5.7	5.7
非灭菌土	1 000	832.2±42.4	3.5	3.5
非灭菌土+黑曲霉	1 000	750.4±40.5	11.7	11.7

注:生物降解时间为 10 d,土壤类型为粉黏土。

3 结论

(1) 黑曲霉具有耐受并降解高浓度氧化乐果的能力。在灭菌砂壤土和粉黏土中投加黑曲霉可有效加快土壤介质中氧化乐果的降解速率。黑曲霉对受低浓度氧化乐果污染的土壤生物修复作用不明显。

(2) 在氧化乐果浓度为 $150\sim 500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dried soil 条件下,投加黑曲霉可明显地加快氧化乐果生物降解速率。在氧化乐果初始浓度为 $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dried soil 时,灭菌粉黏土中氧化乐果半衰期缩短 17.4 d,非灭菌粉黏土中氧化乐果的半衰期缩短 4.0 d。

(3)黑曲霉对于氧化乐果污染程度较重($150\sim 500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dried soil) 的土壤表现出较强的生物修复作用,适用于中高浓度(或事故性)氧化乐果污染土壤的大规模生物修复工作。

参考文献:

[1] 黄国强,李 凌,李鑫钢. 农药在土壤中迁移转化及模型方法研究进展[J]. 农业环境保护, 2002,21(4):375-377.
[2] 郭 明,龚明福,闫志顺,等. 土壤农药残留的生物修复初探[J]. 农业

环境科学学报, 2003,22(2):228-231.
[3] Papmond D G M, Alexander M. Microbial metabolism and cometabolism of nitrophenol[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1971,1: 123-130.
[4] Rubin H E, Alexander M. Effect of nutrients on the rates of mineralization of trace concentration of phenol and P-nitrophenol [J]. *Environ Sci Techol*, 1983,17: 104-107.
[5] Li Tseou, Anil Sharma. Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and abacillus sp isolation from different soils [J]. *Agric Food Chem*, 1989,37: 1514-1518.
[6] 周军英,林玉锁,徐亦钢,等. 邻单胞菌 DLL-1 对土壤中甲基对硫磷的降解[J]. 中国环境科学, 2002,22(3):231-234.
[7] 石成春,徐 升,傅彦斌,等. 氧化乐果曲霉降解特性和中间产物的研究[J]. 中国环境科学,2004,24(2):180-183.
[8] 全国农药残留试验研究协作组编. 农药残留量实用检测方法手册(第二卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.434-435.
[9] 刘多森,张水铭,李振高,等. 关于土壤中农药降解动力学模型的研究[J]. 土壤学报, 1993,30(2):199-207.
[10] 许宝泉,孔致祥,张树蔚,等. 有机磷农药氧化乐果在土壤中降解规律的实验研究[J]. 农业环境保护, 2001,20(4):249-251.
[11] 孙洁梅,崔中利,李顺鹏,等. LuxAB 基因标记甲基对硫磷降解菌 DLL-1 在土壤和植株根部的生态行为研究 [J]. 农村生态环境, 2003,17(1):43-46.