

# 旱地加水可促进微生物对 $\gamma$ -666 的降解

顾宗濂 谢思琴 张水铭

(中国科学院南京土壤研究所)

$\gamma$ -666 在含水率低的旱地土壤中滞留期可长达 3—11 年之久,并可引起水质、土壤和植物的污染<sup>[1]</sup>。从 60 年代以来,许多学者对渍水土壤中微生物对  $\gamma$ -666 的降解作用已作了大量研究<sup>[1-7]</sup>。确定渍水土壤中  $\gamma$ -666 的降解比旱地土壤容易得多<sup>[1-3]</sup>,并先后分离到了二株嫌气性降解菌<sup>[2,4,7]</sup>。

旱地土壤中微生物对  $\gamma$ -666 的降解作用以往研究得很少。有人曾把麦地土壤水分调至 32.1%,培养 84 天, $\gamma$ -666 降低了 52%<sup>[8]</sup>。在含水率保持在 20% 的一种土壤中,经六个月后, $\gamma$ -666 降解为  $\gamma$ -五氯环己烯,并从中分离到二株降解菌:蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和未定名的芽孢杆菌<sup>[9]</sup>。有人把二种土壤含水率保持在各自田间持水量的三分之二,培养八周,从中测出了  $\gamma$ -666 的七种代谢产物,但  $\gamma$ -666 的降解率仅 11—16%<sup>[5]</sup>。

本文目的是试图通过提高旱地土壤湿度,促进土壤中微生物活动,以提高其降解  $\gamma$ -666 的效果,并分离降解菌,确证微生物的降解作用。

## 一、材料和方法

### (一) 土壤微生物群体对 $\gamma$ -666 的降解能力

从辽宁省兴城县等地果园及江苏省海门县等地麦地施用 666 多年的地方采集土样,风干过筛。用电极法测得各土样 pH 范围为 6.61—7.89。

按每份 10 克土样加  $\gamma$ -666 至 70 微克/克土,加水量略低于 Yoshida 和 Castro<sup>[3]</sup> 试验所取水平,土壤含水率分别调至 30% (砂壤土) 和 35% (轻壤土)。当土样含水率降至 15% 时,即行补水。将土样置于 25℃ 培养,分别于 14、28、56、84 天后经提取、纯化后,用气相色谱仪(电子捕获鉴定器)测定土内  $\gamma$ -666 含量。

### (二) $\gamma$ -666 降解菌的分离

按好气条件对供试土样进行  $\gamma$ -666 降解菌的分离计数。采用以  $\gamma$ -666 为唯一碳源的无机盐培养基<sup>[10]</sup> (28℃ 培养)。斜面培养基则添加 0.1% 葡萄糖。对长出的菌落纯化后,按大体每半月换一代斜面的方法保存菌种。

### (三) 分离菌降解 $\gamma$ -666 的能力

用摇瓶接种培养法测试土壤分离菌体外降解  $\gamma$ -666 的能力。培养液配方与斜面相同。所加  $\gamma$ -666 浓度分 10,000、700、70 微克/20 毫升三组。于旋转式摇床 28℃ 培养,转速 210 转/分。21 天后,同前法测定培养液内  $\gamma$ -666 含量。

用三角瓶灭菌土接种培养法测试上述菌株,在灭菌土壤中降解  $\gamma$ -666 的能力。具体做法基本与(一)同。

## 二、结果和讨论

微生物对农药的降解过程是微生物适应农药而生长的过程<sup>[1]</sup>。多年施用某种农药的土壤中一般含有能适应该种农药而生长的微生物。因此,从施用多年 666 的果园及麦地取土样布置降解试验。土样经过培养后,其内微生物对加入的  $\gamma$ -666 发生了强烈降解。从表 1 看出,供试果园土样(37号、23号、35号)和麦地土样(3号),在培养 56 天后, $\gamma$ -666 已全部降解,尤其是 37号、23号土样,在培养 28 天后即降解完毕。

表 1 土壤微生物群体对  $\gamma$ -666 的降解  
Table 1 Degradation of  $\gamma$ -BHC by microbial population in soils

培养天数 days of incubation	果 园 土 Orchard soil					麦 地 土 Field soil wheat	灭 菌 土 Soil sterilized
	37 号		23 号		35 号	3 号	
	试验 1 Test 1	试验 2 Test 2	试验 1 Test 1	试验 2 Test 2	试验 1 Test 1	试验 1 Test 1	
	$\gamma$ -666 回收量 recovery of $\gamma$ -BHC					微克/10 克土 $\mu\text{g}/10 \text{ g. soil}$	
0	766	635	680	610	610	690	750
14	40	95	0	250	510	212	640
28	0	0	0	0	30	46	660
56	0	0	0	0	0	0	630
84	0	0	0	0	0	0	612

注: 1. 实验 1 为三份土样平均值, 实验 2 为二份土样平均值。

2. 土壤 pH 6.61—7.89。

Note: 1. Value in Test 1 is the average of three soil samples;  
value in Test 2 is the average of two soil samples.

2. Soil pH: 6.61—7.89.

这一实验结果表明: 在适当温度下, 改善土壤水分条件, 可以加强土壤内  $\gamma$ -666 降解菌的生命活动, 从而提高对  $\gamma$ -666 的降解效果。因而可以设想: 如果在温度较高的季节里, 对被  $\gamma$ -666 污染的果园或麦地土壤定期灌水, 应能促进土壤中  $\gamma$ -666 的降解并有助于污染的消除。

为了从上述类型土壤中分离具有分解  $\gamma$ -666 活性的微生物并验证其降解该种农药的能力, 我们选取果园土样 23 号、37 号、35 号、67 号, 麦地土样 7 号(均为表土), 在好气条件下, 对这些土壤中能以 100 ppm  $\gamma$ -666 为唯一营养碳源的微生物分离计数。结果证明, 这些多年施用 666 的果园、麦地土壤均栖有一定数量的具有上述活性的微生物, 从所测的 5 个土样看, 每克风干土的菌数为 64—238 万。可以认为, 这些菌正是促成这些土样在培养过程中

表 2 具有降解  $\gamma$ -666 能力的三株分离菌的特征Table 2 Characteristics of three bacterial strains isolated possessing capability of  $\gamma$ -BHC degradation

项 目 Item	70 号	350 号	670 号	附 注 Annotation
菌落形态 Colonial morphology	圆、边缘整齐、表面低凸, 半透明, 无色素 Round, uniform edge, low convex surface, translucent, non-pigment	圆、边缘整齐、表面低凸, 不透明, 淡黄色素 Round, uniform edge, low convex surface, opaque, light yellowish pigment	圆、边缘整齐, 光滑, 表面扩展, 半透明, 无色素 Round, uniform edge, smooth, spreaded surface, translucent, non-pigment	
斜面培养物形态 Form on slant cultures	丝 状 Filiform	丝 状 Filiform	丝 状 Filiform	
菌体大小(微米) Size of cell ( $\mu\text{m}$ )	0.6×1.5	0.8×1.5	1×2.1	
菌体形态 Morphology of cell	无芽孢、短杆 Non-spore, short rods	无芽孢、短杆 Non-spore, short rods	无芽孢、短杆 Non-spore, short rods	
鞭 毛 Flagella	周 毛 Peritrichous flagella	周 毛 Peritrichous flagella	周 毛 Peritrichous flagella	
胞外多糖粘液或荚膜 Extracellular polysaccharide slime or capsule	+	+	+	
格兰氏染色 Gram staining	-	-	-	
氧化酶 Oxidase	+	-	+	
葡萄糖产酸 Acid produced from glucose	+(氧化) (Oxidation)	-	-	
硝酸盐还原 Nitrates reduction	-	+	-	
石蕊牛奶 Litmus milk	碱 性 Alkaline	还 原 Reduction	碱 性 Alkaline	
氧的需要 Oxygen requirement	好 氧 Aerobes	好 氧 Aerobes	严格好氧 Strict aerobes	
过氧化物酶 Catalase	-	+	+	
3-酮基乳糖产生 3-ketolactose formation	+	-	-	

续表 2

项 目 Item	70 号	350 号	670 号	附 注 Annotation
氨盐为唯一氮源 Ammonium salts as sole nitrogen source	+	+	+	
长在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源的培养液 中浊度 Turbidity of liquid media with ammo- nium sulfate as sole nitrogen source	-	+	+++	70 号菌细胞于液 面凝聚成絮状物, 培 养液不混浊 No.70 cells aggre- gation of flocci on liquid surface, li- quid media clear.
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	-	-	
酪朊水解 Casein hydrolysis	-	-	-	
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	-	-	-	
在 DL-精氨酸为 唯一氮源的培养基上 生长 Growth on me- dium with DL-Argi- nine as sole nitrogen source	+++	+	-	
细胞内聚- $\beta$ -羟基 丁酸盐颗粒的存在 Existence of gra- nules of poly- $\beta$ -hy- droxybutyrate	-	-	-	
对大气氮素的固定 (毫克/瓶) Fixation of atmos- pheric nitrogen (mg/bottle)	- (0.155)	- (0.127)	- (0.143)	空白: (0.152) 圆褐固氮菌: (2.73) Blank assay: (0.152) <i>Azotobacter chro- ococum</i> : (2.73)
在肉汤蛋白胨中生长 Growth in broth and peptone	+	+	+	
鉴 定 Identification	土壤杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i>	产碱杆菌属 <i>Alcaligenes</i>	

$\gamma$ -666 降解得较快的动力。正如有人证明的,是具有降解能力的优势菌生理群控制着一种化合物的降解过程<sup>[12]</sup>。

当化学药剂可作为一种营养碳源而为微生物所利用时,微生物就可分解该化合物<sup>[13]</sup>。因此,上述分离到的能以  $\gamma$ -666 为唯一营养碳源的菌株,理应能够降解  $\gamma$ -666,为确证此点,从中挑选了三株细菌(编号:70号、350号、670号),对它们降解  $\gamma$ -666 的能力作了观测试验。

这三株细菌按 Bergey 细菌鉴定手册(八版)<sup>[14]</sup>鉴定为:70号为土壤杆菌属的一个种 (*Agrobacterium* sp.),350号为黄杆菌属的一个种 (*Flavobacterium* sp.),670号为产碱杆菌属的一个种 (*Alcaligenes* sp.)。它们的特征见表2。

表3 三株分离菌对摇瓶培养液内  $\gamma$ -666 的降解

Table 3 Degradation of  $\gamma$ -BHC by the three bacterial strains isolated in shaking cultures

菌 号 Bacterial strains	培养前 $\gamma$ -666 含量 微克/20 毫升 Amount of $\gamma$ -BHC before incubation $\mu\text{g}/20\text{ ml}$		
	10,000	700	70
培养三个星期后 $\gamma$ -666 的回收量 微克/20 毫升 Recovery of $\gamma$ -BHC after an incubation of 3 weeks $\mu\text{g}/20\text{ ml}$			
黄杆菌 350 号 <i>Flavobacterium</i> 350 号	8150	470	21
产碱杆菌 670 号 <i>Alcaligenes</i> 670 号	8150	326	30
土壤杆菌 70 号 <i>Agrobacterium</i> 70 号	8350	440	40
对 照 CK	8350	615	57

注:本表为二份摇瓶培养液平均值,培养21天。

Note: Value in the table is the average of two shaking cultures. Incubating for 21 days.

表4 土壤分离菌对灭菌土中  $\gamma$ -666 的降解

Table 4 Degradation of  $\gamma$ -BHC by three bacterial strains isolated in sterilized soils

培养天数 Days of incubation	菌 号 Bacterial strains	黄杆菌 350 号 <i>Flavobacterium</i> 350 号	土壤杆菌 70 号 <i>Agrobacterium</i> 70 号	产碱杆菌 670 号 <i>Alcaligenes</i> 670 号	灭菌土 CK <i>Sterilized</i> soil, CK
	$\gamma$ -666 回收量 微克/10 克土 Recovery of $\gamma$ -BHC $\mu\text{g}/10\text{ g. soil}$				
0		650	800	756	750
14		474	506	596	640
28		368	496	470	665
56		300	352	404	636
84		240	307	384	612

注:本表为二份培养土样平均值。

Note: Value in the table is the average of two shaking cultures.

通过摇瓶接种培养试验观察了三株菌体外降解  $\gamma$ -666 的能力, 结果表明(表 3), 在高浓度(10,000 微克/20 毫升)  $\gamma$ -666 培养液中, 三株菌对  $\gamma$ -666 几乎不能降解, 经培养 21 天, 回收的  $\gamma$ -666 量与对照相差无几, 这显然与以往有人测定细菌对酚的降解作用时<sup>[12]</sup>, 所用酚浓度超过了细菌所能忍耐的极限, 使菌体生长受抑而无降解效果是同一道理。在中浓度(700 微克/20 毫升)及低浓度(70 微克/20 毫升)  $\gamma$ -666 培养液中, 三株菌

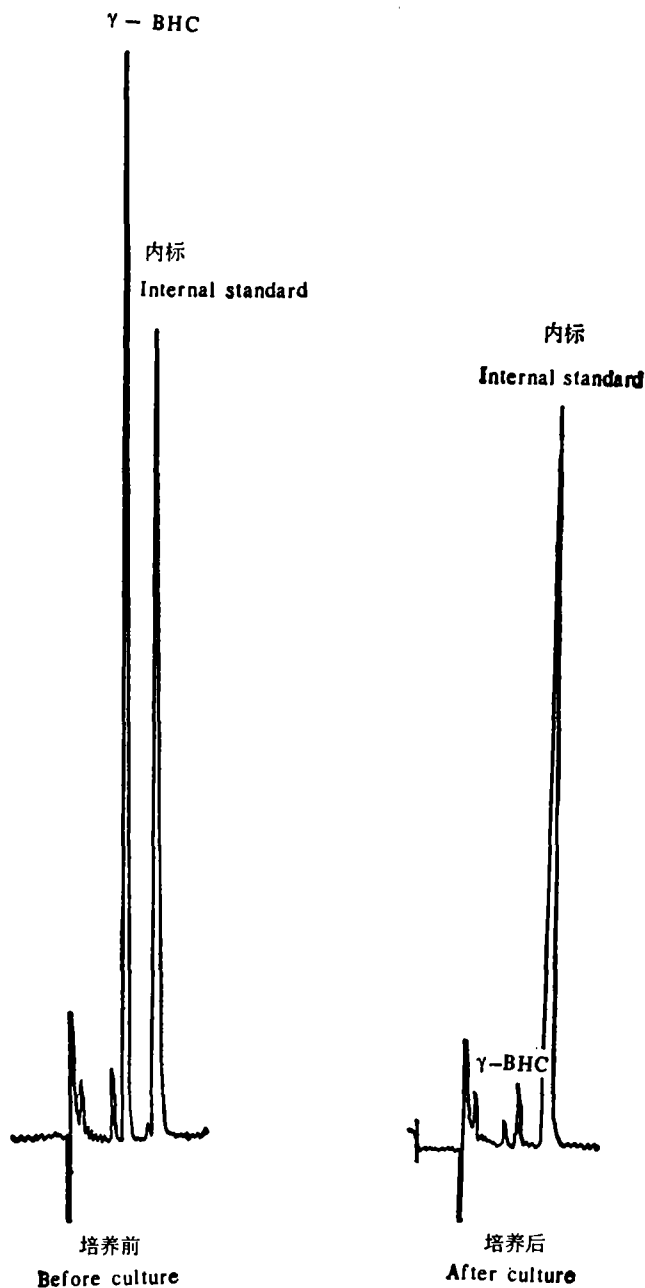


图 1 培养前与培养后基质中  $\gamma$ -666 的气相色谱图(无  $\beta$ -BHC 出现)

Fig. 1 Gas chromatograms of  $\gamma$ -BHC in media before and after incubation (no  $\beta$ -BHC occurred)

对  $\gamma$ -666 均表现出不同程度的降解。在同一培养期间, 加入的 700 微克  $\gamma$ -666 降低到 326—470 微克, 而对照仅降低到 615 微克, 加入的 70 微克  $\gamma$ -666 降低到 21—40 微克, 而对照降低到 57 微克。

为进一步了解以上三株细菌在土壤内降解  $\gamma$ -666 的能力, 把各株细菌回接到无菌的、水分条件与前述相同的土样中, 测定土样内所加  $\gamma$ -666 含量的变化(表 4)。从表 4 看出, 三株细菌在培养过程中均逐步降解  $\gamma$ -666, 当培养到 84 天时, 土样中  $\gamma$ -666 含量已从最初加入的 650—800 微克下降到 240—384 微克, 而同期内不接种的灭菌土样仅从 750 微克降到 612 微克, 证明三株菌均有明显的降解  $\gamma$ -666 作用, 其中降解活性最强的是黄杆菌 350 号, 使所加  $\gamma$ -666 减少了 63.1%。表 1 和表 4 中灭菌土样在培养期间  $\gamma$ -666 含量也有所降低, 其原因在于一般土壤经一次高压灭菌, 只能消除其降解酶活性的 90%<sup>[16]</sup>, 至于  $\gamma$ -666 在这种无淹水层的土壤中通过土面蒸发损失的数量, 前人早已证明, 是非常小的<sup>[8, 15]</sup>。

将表 4 与表 1 的结果加以比较, 可发现, 从土壤分离的单一菌株降解  $\gamma$ -666 的能力比之土壤微生物群体的降解能力小, 前者培养 84 天后至多能降解所加  $\gamma$ -666 的 63.1% (黄杆菌 350 号), 而后者各土样培养 56 天后所加  $\gamma$ -666 即已全部降解。这可以解释为各种能够降解某一化合物的微生物的混合培养体 (或土壤中具有降解该化合物能力的优势菌生理群), 它们的降解能力要比单种菌株培养体大得多<sup>[17]</sup>。

本试验注意到无论在不灭菌土和所分离的降解菌培养过程中, 微生物均未把  $\gamma$ -666 转化为对人体有害的  $\beta$ -666 (图 1), 这就为今后由普通 666 商品(包含  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四个异构体)转为生产和使用  $\gamma$ -666 商品(即灵丹)提供了良好的前提。

### 参 考 文 献

- [1] Baghu, K. & MacRae, J. C., 1969: Biodegradation of the Gamma isomer of Benzene Hexachloride in submerged soils. *Science*, 154:263.
- [2] Sethunathun, N., Bautista, E. M. and Yoshida, T., 1969: Degradation of Benzene Hexachloride by a soil bacterium. *Can. J. Microbiol.*, 15:1348.
- [3] Yoshida, T. & Castro, T. F., 1970: Degradation of  $\gamma$ -BHC in rice soils. *Soil. Sci. Socie. Amer. Proc.*, 34: 440.
- [4] Allen, J., 1955: Loss of biological efficiency of Cattedipping wash containing benzene hexachloride. *Nature*, 175: 1131.
- [5] Mathur, S. H. & Saha, J. G., 1977: Degradation of <sup>14</sup>C-Lindane in mineral and humus soils. *Bull. Environ. Contam. Toxic.*, 17: 424.
- [6] Engst, R., Macholz, R. M. & Kujawa, M., 1977: Recent state of Lindane metabolism. *Residue Reviews*, 68: 59.
- [7] MacRae, I. C., Baghu, K. & Bautista, E. M., 1969: Anerobic degradation of the insecticide Lindane by *Clostridium* sp., *Nature*, 221: 859.
- [8] Bradbury, F. R., 1963: The systemic action of Benzene Hexachloride seed dressings. *Ann. Appl. Biol.*, 52: 361.
- [9] Yule, W. N., Chiba, M. & Morley, H. V., 1967: Fate of insecticide residues, decomposition of Lindane in soil. *J. Agr. Food Chem.*, 15: 1000.
- [10] Tonomura, K., Futai, F., Tanabe, O. & Yomaka, T., 1965: Defluorination of monofluoroacetate by bacteria, Part I. *Agr. Biol. Chem. (TOKYO)*, 29: 124.
- [11] Audus, L. J., 1951: The biological detoxication of hormone herbicides in soil. *Plant and Soil*, 3: 170.
- [12] Colwell, R. R. & Sayler, G. S., 1978: Microbial Degradation of Industrial Chemicals. in *Water*

- Pollution Microbiology, V. 2, p. 111. Edited by Mitchell, R., A wiley-interscience publication, N. Y.
- [13] Walker, N., 1975: Microbial Degradation of Plant Protection Chemicals, in Soil Microbiology, p. 181. Edited by Walker, N., Butterworths, London & Boston.
- [14] Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E., 1974: Bergey's Manual of Determination Bacteriology. Eighth edition, The William & Wilkins Company, Baltimore.
- [15] Guenje, W. D. & Beard, W. E., 1970: Volatilization of Lindane and DDT from soils. Soil. Sci. Socie. Amer. Proc., 34: 443.
- [16] Getzin, L. W. & Rozefeld, Q., 1968: Organophosphorus insecticide degradation by heat-labile substances in soil. J. Agr. Food chem., 16:598.
- [17] Walker, J. D. & Colwell, R. R., 1974: Microbial petroleum degradation: Use of mixed hydrocarbon substrates. Appl. Microbiol., 27: 1053.

## MICROBIAL DEGRADATION OF $\gamma$ -BHC IN SOILS WITH ADEQUATE MOISTURE CONTENT

Gu Zong-lian, Xie Si-qin and Zhang Shui-ming

(*Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing*)

### Summary

An experiment on the degradation of  $\gamma$ -BHC (r-hexachlorocyclohexane) by microbial populations was carried out using soil samples from orchards and wheat fields in which BHC applied for many years. It was found that  $\gamma$ -BHC in soils could be degraded more rapidly by soil microbes under the optimum temperature and adequate soil moisture conditions. All of the  $\gamma$ -BHC added in soil (700  $\mu$ g/10g soil) were completely degraded within 56 days under favorable moisture conditions. Microorganisms being able to use  $\gamma$ -BHC as their sole carbon source for growth were isolated and counted on a selected medium. It was shown that both in shaking culture and sterilized soil culture  $\gamma$ -BHC was degraded obviously by *Flavobacterium sp.* 350\*, *Agrobacterium sp.* 70\* and *Alcaligenes sp.* 670\*. 63.1% of the  $\gamma$ -BHC applied were degraded by *Flavobacterium sp.* 350\* within 84 days. It was noticed that the microbes did not transform the  $\gamma$ -BHC into  $\beta$ -BHC which is more harmful to human being either in soil culture or in pure culture.