

文章编号:1673-1689(2007)02-0092-05

高效降解氧化乐果菌的初步筛选

胡萍¹, 王一帆¹, 徐达¹, 郭泽峰¹, 严群^{1,2}, 邹华^{1,2}, 阮文权^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要: 以扬州、天津、吴江、泰州等地区施用过氧化乐果或农药厂排污口的土壤为菌源, 以氧化乐果作为惟一碳源和能源, 采用逐渐加量的驯化方式, 分离得到 10 株对氧化乐果有一定降解能力的微生物。

关键词: 氧化乐果; 生物降解; 微生物; 筛选

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Screening of Microorganisms with High Biodegrading Ability for Omethoate

HU Ping¹, WANG Yi-fan¹, XU Da¹, GUO Ze-feng¹, YAN Qun¹
ZOU Hua^{1,2}, RUAN Wen-quan^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The wide use of organophosphorus pesticide in china at present has not only caused the flourishing of agriculture but bring on serious environmental problems. Soil samples that had been fertilized with omethoate before in different places and from some issues of the pesticide factories were collected. By using omethoate as the sole carbon and energy source for bacterial growth, and gradually increasing the concentration in the media, more than ten microbes that could decompose omethoate were screened.

Key words: omethoate; biodegradation; microorganisms; screening

有机磷农药由于其防治对象多、应用范围广, 以及在环境中降解半衰期短(一般为几周至几个月), 目前已成为中国使用量最大的农药, 并已占到中国农药总产量的 70%。作为其中一种具有广谱、内吸等特点的高效、剧毒的有机磷农药, 氧化乐果(O, O-二甲基-S-甲基氨基甲酰基硫酞磷酸酯,

omethoate)已成为我国用量最大的有机磷农药之一, 其毒性为乐果的 10 倍。虽然氧化乐果残留期短, 但是它可以在动物体内产生蓄积作用, 且具有“三致”危害。因此, 此类农药的降解治理已经迫在眉睫^[1]。

目前对被农药污染的土壤、水体修复的技术有

收稿日期: 2006-07-05.

基金项目: 教育部工业生物技术重点实验室主任基金项目(KLIB-ZR-200502).

作者简介: 胡萍(1984-), 女, 江苏宝应人, 生物科学 2003 级本科生. Email: huping-1984@163.com

通讯作者: 严群(1972-), 男, 江苏泰兴人, 工学博士, 副教授, 主要从事环境微生物的研究. Email: yanqun@sytu.edu.cn

很多,大体可分为物理修复、化学修复及生物修复。由于生物修复克服了物理和化学修复的工程量大、费用高、易造成二次污染等缺点,因而已成为当今研究的热点^[2]。生物修复,即生物降解,就是通过生物(包括微生物、植物、动物)的作用将大分子分解成小分子化合物的过程。而其中的微生物降解则是农药生物降解的第一要素,具有降解和转化有机农药的巨大潜能。目前已有较多文献报道了微生物对“甲胺磷”、DDT 和“对硫磷”等有机磷农药的降解能力:如王永杰等对有机磷农药降解菌地衣芽孢杆菌进行紫外线诱变后,筛选出的突变菌株对甲胺磷的降解率比出发菌株提高了近 10%^[3];段玉梅

等研究发现一种厌氧的氢单胞菌能够多途径降解 DDT,枯草杆菌是降解对硫磷最有效的微生物等等^[4]。不过迄今尚无降解氧化乐果微生物的报道。

作者采用从不同地域采集的土壤样品,并从中筛选出具有一定降解氧化乐果能力的微生物,以期阐明微生物降解氧化乐果乃至有机磷类农药的机理奠定基础^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集 样品采集见表 1。

表 1 土壤样品的采集
Tab. 1 Collecting of soil samples

编号	性质	地点	时间
A	曾经施过氧化乐果	江苏扬州市西南城郊	2005.7.5
B	近期施过氧化乐果	江苏扬州市西南城郊	2005.7.5
C	曾经施过其他农药	江苏扬州市西南城郊	2005.7.5
D	近期施过其他农药	江苏扬州市西南城郊	2005.7.5
E	乡间土壤,农家院内	天津	2005.8.16
F	农药厂污水处理口	天津农药厂(距出水沟 50 m)	2005.8.13
G	农药厂污水处理口	天津农药厂(距出水沟 3 m)	2005.8.13
H	农药厂污水处理口	天津农药厂(距出水沟 1 m)	2005.8.13
I	农田土壤	江苏吴江	2005.8.31
J	排污口	江苏泰州市燃料化工厂	2005.8.26
K	排污口	江苏泰州永昌化工厂	2005.8.26
L	排污口	江苏泰州高伟化工厂	2005.8.26
M	排污口	江苏泰州电光源材料厂	2005.8.26

注:土样均采集土壤表面下 5~8 cm 处土壤,并装于牛皮纸袋中于冰箱 4 ℃ 冷藏保存待用。

1.1.2 培养基

1) 富集培养基(组分 g/L)^[6]:蛋白胨 10.0, NaCl 1.0, K₂HPO₄ 1.0, 葡萄糖 1.0; pH 7.0。

2) 普通培养基(组分 g/L):牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20;水 1 L, pH 7.0。

3) 基础培养基(组分 g/L):NH₄NO₃ 1.00, MgSO₄·7H₂O 0.50, (NH₄)₂SO₄ 0.50, KH₂PO₄ 0.50, NaCl 0.50, 酵母膏 0.05, K₂HPO₄ 1.5; 水 1 L, pH 7.0。

4) 斜面培养基(组分 g/L):牛肉膏 2.5, 蛋白胨 5.0, NaCl 2.5。

以上培养基待灭菌后冷却至 55 ℃ 后加入适量质量浓度的氧化乐果原液。

万方数据

1.1.3 其他试剂 氧化乐果:天津农药厂生产。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的驯化(富集) 菌种驯化采用逐渐加量的方式。取各采集的土样 2 g, 分别加入含有 50 mL 富集培养基的 250 mL 的三角瓶中。其中氧化乐果质量浓度为 100 mg/mL, 置于 30 ℃, 150 r/min 摇床培养 7 d。取上层浊液 5 mL 加入 45 mL 新鲜富集培养基, 氧化乐果质量浓度提高到 300 mg/mL, 培养条件同上, 培养 7 d。同法培养直至氧化乐果质量浓度提高到 500 mg/mL。随后用基础培养基代替富集培养基, 取驯化耐受到 500 mg/mL 氧化乐果的菌液 5 mL, 加入到含 600 mg/mL 氧化乐果的基础培养基中, 30 ℃, 150 r/min 摇床培养。

同法继续培养至氧化乐果质量浓度到 800 mg/mL。

1.2.2 菌种的分离与保存 取驯化后的菌液 1 mL 进行梯度稀释,取适合梯度 0.1 mL 稀释液在含有 800 mg/mL 氧化乐果的普通培养基上进行涂布平板分离,置 30 ℃ 培养箱进行培养,待菌落长出后挑取菌落形态不同的 2 株进行划线纯化,直至纯菌落为止。将筛选出的菌落进行斜面保藏(4 ℃)。

1.2.3 菌种降解氧化乐果能力的测定 取保藏的菌种各一环在普通培养基中活化后,取 1 mL 接种于 50 mL 含 800 mg/mL 氧化乐果的基础培养基(含 2 g/L 葡萄糖)培养 24 h,随后与未接种的基础培养基(编号 N, OD 值为 0)对照,测定其在 600 nm 处的 OD 值。

1.2.4 菌落形态观察 将保藏的菌种进行革兰氏染色^[7],随后镜检观察菌落形态。

2 实验结果

2.1 初筛菌降解能力测定结果

通过驯化,平板分离初步获得 A1、A2、B1、B2、M1、M2 等共 26 株菌。将 26 株菌进行降解氧化乐果能力测定,测定方法采用简单直观的生长量法,估计初筛菌株的降解能力,从而为进一步复筛减轻工作量,提高筛选效率。

26 株菌在含有亚适量葡萄糖的氧化乐果无机盐培养基中的生长量(OD₆₀₀ 值)见表 2。从表 2 可以看出,C2、G1、I2、A1、I1、D2、M1、D1、E2、M2 这 10 株菌株在含有亚适量葡萄糖的氧化乐果培养基内有较高的生长量,均能在 24 h 内达到 0.4 以上的浊度。由于培养基中葡萄糖含量很低,因此可以初

步断定这 10 株菌株可能有较强的将氧化乐果降解为小分子化合物的能力。

表 2 各微生物在含氧化乐果的培养基上的生长能力
Tab. 2 Growth of screened microorganisms on the omethoate containing media

菌号	24 h 后 培养液 OD 值	菌号	24 h 后 培养液 OD 值
A1	0.685	H1	0.209
A2	0.220	H2	0.083
B1	0.133	I1	0.586
B2	0.033	I2	0.796
C1	0.042	J1	0.128
C2	1.046	J2	0.339
D1	0.483	K1	0.136
D2	0.570	K2	0.101
E1	0.081	L1	0.075
E2	0.481	L2	0.023
F1	0.133	M1	0.556
F2	0.037	M2	0.418
G1	0.866	N	0
G2	0.121		

2.2 菌种形态观察结果

将初筛的 26 株菌株进行革兰氏染色,镜检,观察其形态差异。重点观察 C2、G1、I2、A1、I1、D2、M1、D1、E2、M2 这 10 个潜力菌,结果见表 3。

由表 3 可初步判断出 G1、D2、E2(图 1-A)可能为同一菌属,I2、D1(图 1-B)可能为同一菌属,A1、I1、M1、M2(图 1-C)可能为同一菌属,其形态见图 1。

表 3 各菌落形态的初步观察

Tab. 3 Morphology of screened microorganisms

菌株	革兰氏染色	菌落形态观察
C2	G ⁺ ,数量较多,呈椭圆形,排列不规则	菌落呈白色,边缘不规则,表面不光滑,有凸起,易挑起
G1	G ⁻ ,数量较多,呈椭圆形,排列不规则	菌落呈淡黄色,圆形凸起,表面光滑,湿润,易挑起
I2	G ⁻ ,呈椭圆形,排列不规则	菌落呈黄色,圆形,中央凸起,表面不光滑,易挑起
A1	G ⁺ ,呈杆状,链状排列	菌落呈白色,圆形凸起,表面不光滑,菌落较干
I1	G ⁺ ,呈杆状,链状排列	菌落呈白色,圆形凸起,表面不光滑,菌落较干
D2	G ⁻ ,呈椭圆形,数量较多,排列无规则	菌落呈淡黄色,圆形凸起,表面光滑,湿润,易挑起
M1	G ⁺ ,呈杆状,链状排列	菌落呈白色,圆形凸起,表面不光滑,菌较干
D1	G ⁻ ,数量较多,呈椭圆形,排列不规则	菌落呈黄色,圆形,中央凸起,表面不光滑,易挑起
E2	G ⁻ ,呈椭圆形,数量较多,排列不规则	菌落呈淡黄色,圆形凸起,表面光滑,湿润,易挑起
M2	G ⁺ ,呈杆状,链状排列	菌落呈白色,圆形凸起,表面不光滑,菌较干

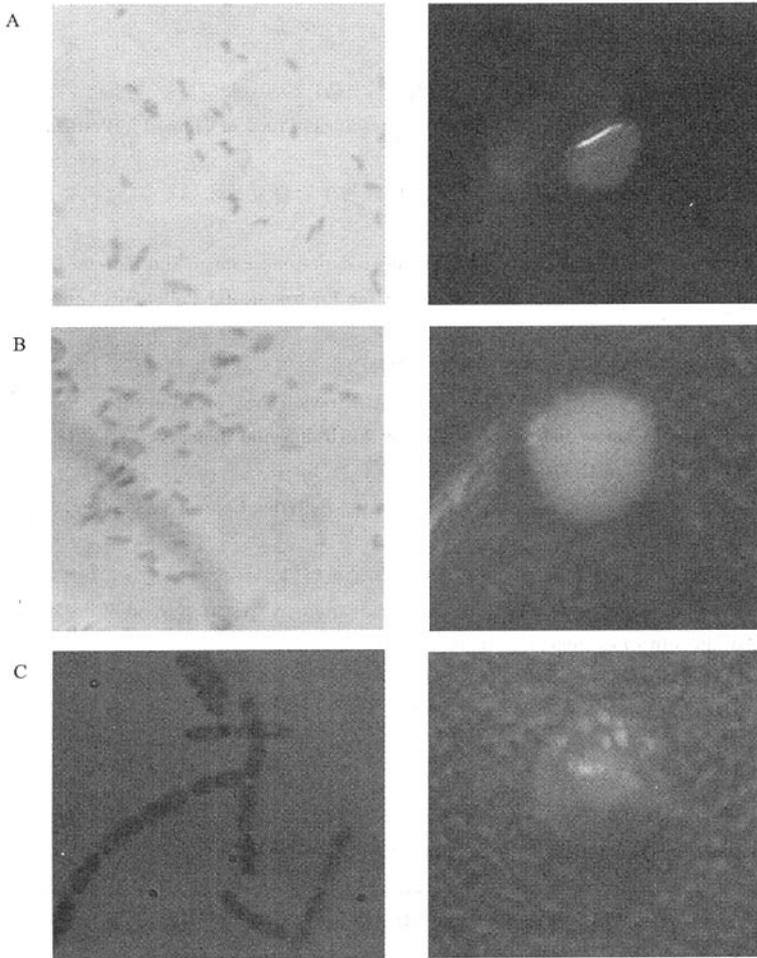


图 1 部分微生物的菌落形态

Fig. 1 Selected microbial colony morphologies

3 讨 论

从受污染严重的土壤中筛选分离具有优良性状的菌株是当今筛选环境修复菌最常用的方法,一般是利用农药厂排污口及其周围或者长期使用农药的土壤,经过富集培养,从而获得优良的菌株^[8]。作者以此为基本筛选思想,采用逐渐加量方法,先在营养丰富的富集培养基中富集可以耐受高浓度氧化乐果的菌株,随后再将富集的高耐菌株转入基础培养基,进一步筛选具有降解氧化乐果能力的目的菌。

农药降解菌之所以能够降解农药,归根结底是由其分泌的酶来完成的。农药降解酶一般分为 3 类^[9],即 1)偶发代谢的酶(微生物可以代谢农药,但不可利用农药作为能源);2)分解代谢的酶(微生物

可利用农药作为能源,或农药诱导酶利用农药作为能源);3)解毒代谢的酶(微生物降解农药不是出于利用它们作为能源,而是出于抵抗这些农药的毒性)。显然,第 2 种酶无疑是农药生物修复中最理想的酶,即这种酶是在微生物可以利用农药为能源的前提下产生的。据报道,微生物代谢分解难降解物质如农药的能力有限,但除最基本的生物转化现象外,还存在一种共代谢现象^[10],即在初级能源物质存在时大幅度提高某些难降解物质的代谢,并将其导入循环。共代谢作用在降解农药这类非天然物质中显得尤为重要。作者综合考虑微生物共代谢作用,在筛选过程中,在基础培养基里添加 2 g/L 的葡萄糖^[11],在保证有葡萄糖作为第一碳源的情况下,旨在筛选出具有共代谢能力的高降解氧化乐果菌株。

参考文献(References):

- [1] 仲维科, 郝戡, 孙梅心, 等. 我国食品的农药污染问题[J]. 农药, 2000, 39(7):1-3.
ZHONG Wei-ke, HAO Ji, SUN Min-xin, et al. Pesticides residues in food in China[J]. *Pesticides*, 2000, 39(7):1-3. (in Chinese)
- [2] 陈志良, 罗军, 王成刚, 等. 土壤有机农药污染的降解机理与生物修复技术[J]. 环境污染治理技术与设备, 2003, 4(8):73-77.
CHEN Z L, LUO Jun, WANG Cheng-gang, et al. The degradation mechanism and bioremediation technology of organic pesticide-contaminated soil[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2003, 4(8):3-77. (in Chinese)
- [3] 王永杰, 李顺鹏, 沈标. 有机磷农药降解菌的紫外诱变育种[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6):635-637.
WANG Yong-jie, LI Shun-ping, SHEN Biao. Breeding by ultraviolet ray mutaton of organophosphorous pesticides-degrading strain of bacillus[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 1999, 5(6):635-637. (in Chinese)
- [4] 段玉梅. 农药的微生物降解[J]. 污染防治技术, 2003, 16(4):167-168.
DUAN Yu-mei. Microorganism decomposing of pesticide[J]. *Pollution Control Technology*, 2003, 16(4):167-168. (in Chinese)
- [5] 虞云龙, 樊德芳, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与繁殖策略[J]. 环境科学进展, 1996, 4(3):28-36.
YU Yun-long, FAN De-fang, CHEN He-xin. The current situation and research trend of degradation of pesticides by microorganisms[J]. *Advances in Environmental Science*, 1996, 4(3):28-36. (in Chinese)
- [6] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 1996.
- [7] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994.
- [8] 王庆仁, 刘秀梅, 崔岩山. 土壤与水体有机污染物的生物修复及其应用研究进展[J]. 生态学报, 2001, 21(1):159-163.
WANG Qing-ren, LIU Xin-mei, CUI Yan-shan. Concept and advances of applied bioremediation for organic pollutants in soil and water[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(1):159-163. (in Chinese)
- [9] Matsumura F, Murti C R K. Biodegradation of Pesticides[M]. New York and London: Plenum Press, 1983.
- [10] 董春娟, 吕炳南, 陈志强, 等. 处理生物难降解物质的有效方式—共代谢[J]. 化工环保, 2003, 23(2):82-85.
DONG Chun-juan, LU Bing-nan, CHEN Zhi-qing, et al. An efficient way for biodegradation of refractory organic compounds: co-metabolism[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2003, 23(2):82-85. (in Chinese)
- [11] 张波, 王政, 杨威. 一株毛霉对氧化乐果降解作用的初步研究[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2005, 19(3):64-65.
ZHANG Bo, WANG Zheng, YANG Wei. Study on the degradation of omethoate by mucor[J]. *Journal of Beijing Union University (Natural Sciences)*, 2005, 19(3):64-65. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)