

文章编号: 1005-8893 (2006) 03-0027-04

一株甲基异柳磷降解菌 HLZ 的分离及其降解特性的研究*

戴青华, 李英柳, 雷春生

(江苏工业学院 环境与安全工程系, 江苏 常州 213164)

摘要: 从长期经有机磷农药污染的土壤中分离出一株能高效降解甲基异柳磷的菌株 HLZ, 通过生理生化试验初步鉴定为邻单胞菌属 (*Plesiomonas* sp.)。HLZ 菌株对甲基异柳磷的降解率为 96%。HLZ 菌株的降解谱较广, 最适碳氮源分别是葡萄糖和蛋白胨, 最适生长温度和 pH 分别是 30 °C, 7.0, 在 28~35 °C 和 pH 7.4~8.6 降解性能较好。

关键词: 降解; 甲基异柳磷; 分离

中图分类号: X 172

文献标识码: A

Isolation and Characterization of Isufenphos-methyl Degrading Bacterium HLZ

DAI Qing-hua, LI Ying-liu, LEI Chun-sheng

(Department of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu Polytechnic University, Changzhou 213164, China)

Abstract: An isorenphos-methyl degrading bacterium strain designated as HLZ was isolated from soils that had long been subjected to organophosphate pollution. Strain HLZ was preliminarily identified as *Plesiomonas* sp. based on its biochemical-physiological characters. Strain HLZ could degrade isorenphos-methyl at a rate of 96%. The degrading spectrum of strain HLZ was broad. The optimal carbon and nitrogen sources were glucose and peptone respectively. The optimal growth temperature and pH for strain HLZ were 30 °C and 7.0 respectively. At the temperature of 28~35 °C and pH of 7.4~8.6, strain HLZ could degrade isorenphos-methyl well.

Key words: degradation; isufenphos-methyl; isolation

化学农药的大量使用给农业生产做出巨大贡献的同时也对环境造成了极大的污染, 农药在农作物和土壤里的残留也给人类及牲畜健康产生很大负面影响, 所以如何消除农药残留已成为日益被全世界重视、迫切需要解决的问题^[1~3]。近几十年出现的生物修复技术已经成为消除面源污染物的有效方

法^[4,5]。

甲基异柳磷是一种新型土壤杀虫剂, 杀虫谱广, 残效期较长。据农业部门统计全国农药需求量, 杀虫剂略有下降, 但甲基异柳磷属于上升幅度较大的品种类型。该农药的大量使用对土壤及农作物造成的残留问题很严重, 急需解决。目前, 国

* 收稿日期: 2006-04-06

作者简介: 戴青华 (1975-), 女, 江苏泰州人, 硕士, 主要从事环境微生物工程的教学与科研工作。

内外研究工作者已经分离筛选了大量的降解农药的微生物,并成功的进行了原位生物修复研究。但是关于甲基异柳磷农药的生物降解还未见报道。本文研究了甲基异柳磷农药的微生物降解,分离到一株高效降解菌并对其降解特性作了初步研究,为进一步研究污染土壤的生物修复提供了实验依据和材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 培养基

基础盐培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 水 1000 mL , $\text{pH} 7.0 \sim 7.2$ 。富集培养基: 在基础培养基中添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母膏。LBIPM 培养基: LB 培养基中添加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲基异柳磷乳油。其他参见文献 [6]。

1.1.2 供试农药及试剂

20% 甲基异柳磷乳油、50% 辛硫磷乳油、50% 对硫磷乳油、45% 马拉硫磷乳油, 均为市售。三氯甲烷, 分析纯, 上海化学试剂厂。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选

将长期经有机磷农药污染的土样在含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基异柳磷乳油的富集培养液中富集培养 4 周, 并逐步提高甲基异柳磷农药质量浓度到 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 1 mL 富集液适当稀释后涂布于 LBIPM 平板, 培养 36 h 后挑取周围出现透明水解圈的单菌落, 分离纯化后定名为 HLZ, 并保存。

1.2.2 生理生化鉴定

方法参见文献 [7]。

1.2.3 菌株 HLZ 对的甲基异柳磷降解试验

葡萄糖铵盐培养基中加入 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基异柳磷, 然后按 10% 的接种量接入离心后以无菌水洗涤并悬浮的 HLZ 菌株, 设不接菌的为对照。30 °C 摇床避光培养 24 h 后, 水样经两倍体积的三氯甲烷萃取^[8], 静置分层后用 108 °C 烘干的无水硫酸钠过滤后在 $\lambda 200 \text{ nm} \sim \lambda 350 \text{ nm}$ 连续光谱扫描甲基异柳磷的吸收峰, 定量分析在 $\lambda 272 \text{ nm}$ 条件下进行。

1.2.4 降解谱试验

在无碳基础盐培养基中分别添加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 辛硫磷、对硫磷、马拉硫磷、甲基异柳磷为唯一碳源, 按 10% 接种量接入 HLZ 菌体, 30 °C 摇床培养 24 h, 三氯甲烷提取进行紫外扫描。

1.2.5 环境条件对 HLZ 菌生长及降解的影响试验

在最适碳、氮源利用试验中, 分别以 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖、木糖、果糖、乳糖、半乳糖和蔗糖为唯一碳源或以 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛肉膏、蛋白胨、酵母膏和硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、尿素为唯一氮源, 检测菌体培养 12 h 时的 OD600 值。

在最适温度、pH 试验中在葡萄糖铵盐培养基, 按 5% 的接种量接入离心后以无菌水洗涤并悬浮的 HLZ 菌体。30 °C (温度试验除外) 摇床培养, 12 h 后测 OD600 值。

在温度、pH 对甲基异柳磷降解影响的实验中, 在无碳基础盐培养基中加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基异柳磷, 按 10% 接种量接入离心后以无菌水洗涤并悬浮的 HLZ 菌体, 设不接菌为对照, 摇床培养 24 h, 测定甲基异柳磷的降解率。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

在 LBIPM 平板挑取到一个周围出现透明水解圈的单菌落 (见图 1), 分离纯化后定名为 HLZ。HLZ 菌体短杆状 ($1.28 \mu\text{m} \times 0.76 \mu\text{m}$), 革兰氏染色阴性, 不产芽孢, 不产非水溶性色素, 氧化、发酵葡萄糖皆产酸不产气, 无胞外淀粉酶活性, 氧化酶、接触酶皆阳性, 初步鉴定为邻单胞菌属 (*Plesiomonas* sp.) (图 2)。

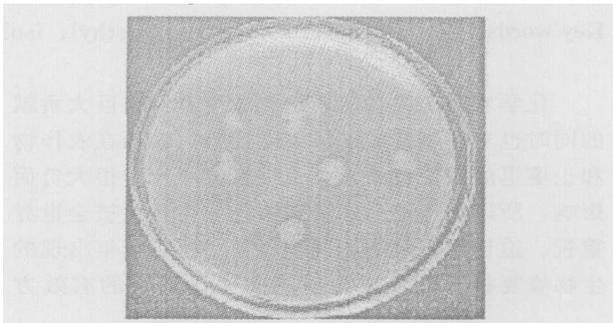


图 1 菌株 HLZ 在 LBIPM 平板上产生的水解圈

Fig 1 Hydrolytic circles generated by strain HLZ on the LBIPM plate

2.2 菌株 HLZ 对甲基异柳磷的降解性能

甲基异柳磷是含有苯环结构的有机化合物, 在

波长 272 nm 处有明显的吸收峰 (图 3), 在初始甲基异柳磷质量浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与不接菌的对照相比, 菌株 HLZ 能在 24 h 内, 降解 96% 的甲基异柳磷。从试验结果可知 HLZ 菌降解甲基异柳磷的性能很好, 可作为进一步试验和实际应用的良好材料。

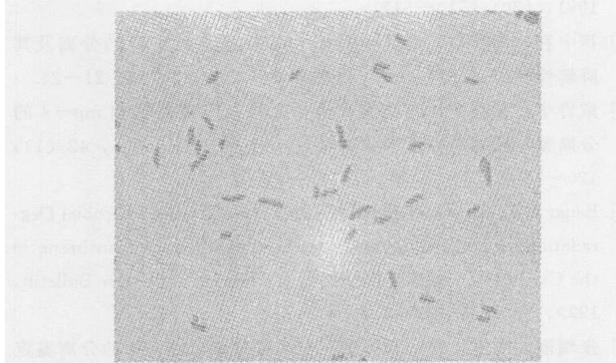


图 2 菌株 HLZ 的显微照片 (1 000×)

Fig 2 Microscopic photograph of strain HLZ (1 000×)

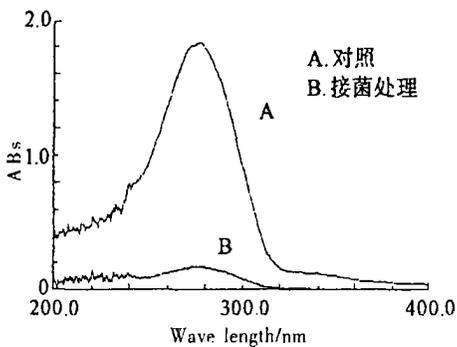


图 3 菌株 HLZ 降解甲基异柳磷的紫外扫描图谱

Fig 3 UV sanning of degradation of isofenphos-methyl by strain HLZ

2.3 菌株 HLZ 的降解谱

从表 1 可知, 菌株 HLZ 具有广谱的降解有机磷农药的性能, 能高效降解对硫磷、辛硫磷、马拉硫磷和甲基异柳磷, 降解率均在 90% 以上。

表 1 菌株 HLZ 对不同有机磷农药的降解性

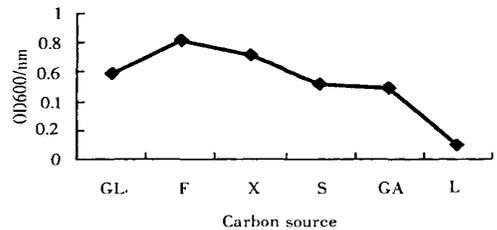
Table 1 Capability of strain HLZ degrading different organophosphorous pesticides

底物	辛硫磷	对硫磷	马拉硫磷	甲基异柳磷
降解率/%	95.3	100	93.4	96

2.4 菌株 HLZ 的最适碳氮源

从图 4 可知菌株 HLZ 能利用的碳源是葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、木糖, 不能利用乳糖。HLZ 是邻单胞菌, 也无淀粉酶活性, 故也不能利用淀粉。最适碳源是果糖。菌株 HLZ 对氮源表现

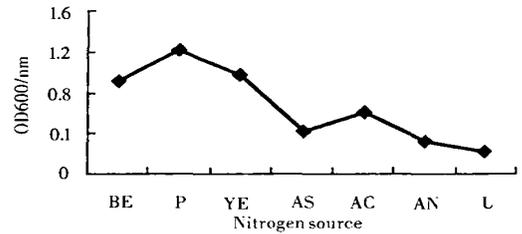
出广泛的适应性 (图 5)。总体上看, 菌株 HLZ 在有机氮源培养基中比无机氮源培养基上生长的较好, 其最适有机氮源是蛋白胨, 最适无机氮源是氯化铵。菌株 HLZ 对碳、氮源的利用谱较广泛, 有利于其在土壤等自然环境中的存活, 为农药污染土壤的生物修复提供了应用前景。



GL—glucose F—fructose X—xylose S—sucrose GA—galactose L—lactose

图 4 菌株 HLZ 对不同碳源的利用

Fig 4 Utilization of different carbon sources by strain HLZ



BE—beef extract, P—peptone, YE—yeast extract, AS—ammonium sulfate, AC—ammonium chloride, AN—ammonium nitrate, U—urea

图 5 菌株 HLZ 对不同氮源的利用

Fig 5 Utilization of different nitrogen sources by strain HLZ

2.5 温度、pH 对 HLZ 菌生长和降解的影响

从温度、pH 试验结果可知 HLZ 菌的生长和降解温度范围都较广 (图 6, 图 7), 在 $25 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 生长良好, 最适生长温度为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 在 $28 \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 有较好的降解性能。HLZ 菌的最适生长 pH 为 7.0, pH 在 7.4~8.6 降解性能较好, 最适 pH 为 7.8。HLZ 菌对温度、pH 的良好适应性有利于菌株在实际应用中较好的发挥作用。

3 结论

①分离到一株高效降解甲基异柳磷的菌株 HLZ, 初步鉴定为邻单胞菌属 (*Plesiomonas* sp.)。②菌株 HLZ 降解谱较广。③菌株 HLZ 的碳、氮源利用谱较广, 对生长和降解的温度和 pH 的适应范围也较广, 具有很好的应用前景。

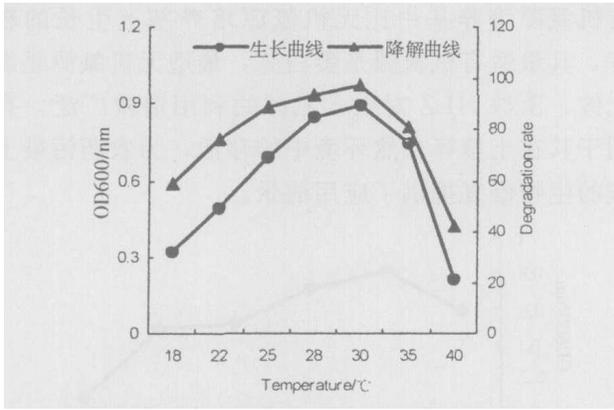


图6 温度对HLZ菌生长和甲基异柳磷降解的影响

Fig 6 Effects of temperature on growth of HLZ and degradation of isofenphos-methyl

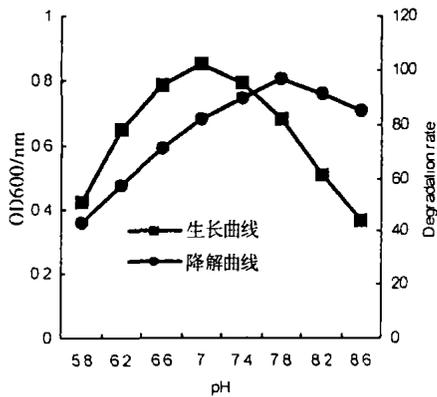


图7 pH对HLZ菌生长和甲基异柳磷降解的影响

Fig 7 Effects of pH on growth of HLZ and degradation of isofenphos-methyl

参考文献:

[1] Nannipieri P, Bollag J-M. Use of Enzymes to Detoxify Pesticide-Contaminated Soils and Waters [J]. Environ Qual, 1991, (20): 510-517.

[2] 崔中利, 李顺鹏, 何健. 甲基一六零五降解菌 J5 的分离及其降解性状研究 [J]. 农村生态环境, 2001, 1 (3): 21-25.

[3] 戴青华, 张瑞福, 蒋建东, 等. 一株三唑磷降解菌 mp-4 的分离鉴定及降解特性的研究 [J]. 土壤学报, 2005, 42 (1): 120-124.

[4] Baqar R Zaidi, Syed H IMA. Factors Affecting Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Phenanthrene in the Caribbean Coastal Water [J]. Marine Pollution Bulletin, 1999, 38 (8): 737-742.

[5] 张瑞福, 朱卫, 崔中利, 等. 辛硫磷降解菌 X-1 的分离鉴定及降解性状的初步研究 [J]. 环境科学学报, 2003, 23 (3): 411-413.

[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] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[8] 吕斌, 樊德方. 甲基异柳磷在蒸馏水中的光解途径 [J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23 (4): 453-454.