

氧化乐果降解菌的筛选及其培养条件的优化

高小鹏¹, 王海虹², 郑 荣¹, 苏翠翠¹

(1. 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000; 2. 子长中学, 陕西 子长 717300)

摘要: 为了利用微生物法修复氧化乐果污染的土壤, 从陕北长期施用氧化乐果的土壤中筛选氧化乐果降解菌。经过富集、分离、纯化, 得到 10 株能在含氧化乐果的培养基上生长的菌株, 其中 ZS-4、ZS-7、ZS-8 在含氧化乐果培养基中有较高的生长量, 24 h 时 OD₆₀₀ 均超过 0.6。通过钼蓝比色法测定, 菌株 ZS-7 对氧化乐果的降解率最高, 达 72.1%, 因此选择 ZS-7 作为氧化乐果高效降解菌。其对氧化乐果的降解与菌体生长呈正相关, 降解途径可能是利用葡萄糖以共代谢方式将氧化乐果中的有机磷降解成无机磷。利用正交试验对 ZS-7 的培养条件进行了优化, 结果显示: pH 7.5、转速 150 r/min、温度 30℃ 时, 菌体产量比优化前 (pH 7.0、转速 180 r/min、温度 30℃) 提高了 22.06%。

关键词: 氧化乐果; 菌株; 降解; 筛选; 优化

中图分类号: S482.3⁺3 Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)08-0145-04

Screening for Omethoate-degrading Strains and Optimizing of Culture Conditions

GAO Xiaopeng¹, WANG Haihong², ZHENG Rong¹, SU Cuicui¹

(1. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an 716000, China;

2. Zichang Middle School, Zichang 717300, China)

Abstract: In order to use microorganisms for remediation of soil polluted by omethoate, ten strains were isolated from soil sprayed by omethoate for a long time in northern region of Shaanxi, which could grow on the medium containing omethoate. The ZS-4, ZS-7 and ZS-8 grew obviously better than others in the culture medium with omethoate, and OD₆₀₀ was more than 0.6 after 24 hours. The degradation rate of omethoate was 72.1% for ZS-7. The ZS-7 strain was selected as effective omethoate-degradating strain. The omethoate-degradation was positively related with the strain growth. The biodegradation pathway might be degradation of organic phosphorus in omethoate to inorganic phosphorus by way of co-metabolism using glucose. The culture conditions of the strain ZS-7 were also optimized by orthogonal test, and the result showed that the ZS-7 production was increased by 22.06% at the condition of pH 7.5, rotational speed of 150 r/min and 30℃.

Key words: Omethoate; Strains; Degradation; Screen; Optimization

氧化乐果 (O, O-二甲基-S-[2-(甲氨基)-2-氧代乙基]硫代磷酸酯, omethoate), 属二硫代磷酸酯, 是我国目前用量最大且难降解的有机磷农

药之一^[1-2], 其毒性强, 普通微生物难以降解, 目前仍在大量使用, 造成了严重的环境污染, 因此, 这类残留农药的降解显得尤为重要^[3-4]。有机磷农药的微

生物降解国内外已有报道^[5-6],但关于陕北地区土著菌降解氧化乐果还没有较为系统的研究。鉴此,从陕北地区长期施用氧化乐果的土壤中分离筛选氧化乐果降解菌,测定其降解率,并对其培养条件进行了优化,以期为该地区残留氧化乐果污染的修复奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样 2010 年 6 月,采用 5 点采样法在宝塔区枣园长期施用氧化乐果农药的菜地采集 5 份土样备用。

1.1.2 培养基 富集培养基^[7]、肉膏蛋白胨培养基、基础培养基^[8]、LB 培养基。

1.1.3 试剂 氧化乐果乳油(40%)由天津制药厂生产,钼酸铵、亚硫酸钠等均为分析纯。

1.1.4 仪器 紫外分光光度计(UVmin+1240、日本岛津公司)、气浴式振荡器(ZJS-1320、科大创新股份有限公司中佳分公司)、高速离心机(HG-3518、科大创新股份有限公司中佳分公司)等。

1.2 方法

1.2.1 高效降解菌的筛选 (1)富集、分离:取供试土样 2.0g,加入 50 mL 富集培养基中,30℃、180 r/min 培养 7 d;取第 1 次的培养液按 5% 的接种量再次接入富集培养基中,30℃、180 r/min 培养 7 d,如此再重复 4 次。取最后 1 次富集培养液,在含 2% 氧化乐果的基础培养基平板上划线分离,得到单菌落,转管于 4℃保存备用。

(2)初筛:采用生长量法^[9]筛选。取分离得到的纯菌株活化,之后按 2% 的接种量接入含 2% 氧化乐果的基础培养基(含 2 g/L 葡萄糖)中,30℃、180 r/min 培养 24 h 后,测定培养液的 OD₆₀₀。选择生长情况好的菌株进行复筛。

(3)复筛:取初筛得到的菌株活化,之后按 5% 接种量接入含 2% 氧化乐果、2 g/L 葡萄糖的基础培养基中,以相同培养基不接菌作为对照组,30℃、180 r/min 培养 4 d,3 000 r/min 离心 30 min,取上清用钼蓝比色法^[10]测定其中无机磷含量,同时测定总磷含量^[11],计算各菌株的降解率。

1.2.2 高效降解菌降解规律的探讨 取筛选得到的高效降解菌,按 2% 的接种量接入含 2% 氧化乐果的基础培养基(含 2 g/L 葡萄糖)中,30℃、180 r/min 培养 7 d,从接种开始,每隔 24 h 取样 1 次,按照初筛和复筛的方法,分别测定同一时刻各样品中菌体的 OD₆₀₀ 和氧化乐果含量。以时间为横坐标,

以菌体 OD₆₀₀ 和氧化乐果含量为纵坐标,绘制曲线。

1.2.3 高效降解菌对氧化乐果代谢方式的探讨 将高效降解菌活化后,以 5% 的接种量分别接种于 A(含 2% 氧化乐果的基础培养基)和 B(含 2% 氧化乐果、2 g/L 葡萄糖的基础培养基) 2 种培养基中,30℃、180 r/min 培养 4 d,测定 2 种培养基中氧化乐果的残留量,由此推测高效降解菌利用氧化乐果的方式。

1.2.4 高效降解菌生长规律的探讨及培养条件的优化

1.2.4.1 生长曲线的制作 取活化后的高效降解菌按 5% 的接种量接入 LB 液体培养基中,(30±1)℃、180 r/min 培养。从培养开始,每隔一定时间取样 1 次,测定 OD₆₀₀,直至 OD₆₀₀ 开始下降时停止。以培养时间为横坐标,以菌体 OD₆₀₀ 为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.4.2 培养条件的优化 菌体的生长受多种因素影响,本试验以高效降解菌在 LB 培养基中的生长量为指标,对培养温度、初始 pH、摇床转速 3 个因素利用正交试验 L₉(3⁴) 进行优化,具体因素及水平见表 1。

表 1 L₉(3⁴)正交试验的因素水平

水平	因素		
	A(初始 pH)	B(转速, r/min)	C(培养温度,℃)
1	5.5	100	20
2	6.5	130	30
3	7.5	150	40

1.2.4.3 优化结果验证 取活化后的高效降解菌,以 5% 的接种量接入 LB 液体培养基,分别按优化前后的条件培养一定时间,测定菌体 OD₆₀₀。

2 结果与分析

2.1 氧化乐果高效降解菌的筛选结果

2.1.1 富集、分离结果 经过富集、分离、纯化,共得到 10 株能在含 2% 氧化乐果的基础培养基平板上生长的菌株,分别编号为 ZS-1、ZS-2、ZS-3、ZS-4、ZS-5、ZS-6、ZS-7、ZS-8、ZS-9、ZS-10。

2.1.2 初筛结果 将纯化得到的 10 株纯菌株在含 2 g/L 葡萄糖、2% 氧化乐果的基础培养基中,30℃、180 r/min 培养 24 h,各菌株的 OD₆₀₀ 见表 2。从表 2 可以看出:ZS-4、ZS-7、ZS-8 这 3 株菌在含 2% 氧化乐果的基础培养基中有较高的生长量,24 h 时 OD₆₀₀ 均超过 0.6。由于培养基中只含少量葡萄糖,因此,可以初步断定这 3 株菌株有较强的降解氧化乐果的能力。

表 2 各菌株在含氧化乐果的基础培养基中的生长量			
菌株编号	生长量(OD ₆₀₀)	菌株编号	生长量(OD ₆₀₀)
ZS-1	0.280	ZS-6	0.215
ZS-2	0.171	ZS-7	0.627
ZS-3	0.267	ZS-8	0.604
ZS-4	0.607	ZS-9	0.318
ZS-5	0.131	ZS-10	0.127

2.1.3 复筛结果 将 ZS-4、ZS-7、ZS-8 这 3 株试验菌株接入含 2% 氧化乐果、2g/L 葡萄糖的基础培养基中, 30℃、180 r/min 培养 4 d 后, 测定 3 株菌对氧化乐果的降解率, 结果见图 1。从图 1 可知, 菌株 ZS-7 对氧化乐果的降解能力最强, 4 d 时其降解率可达 72.1%, 因此, 选择 ZS-7 作为氧化乐果高效降解菌, 进行后续试验。

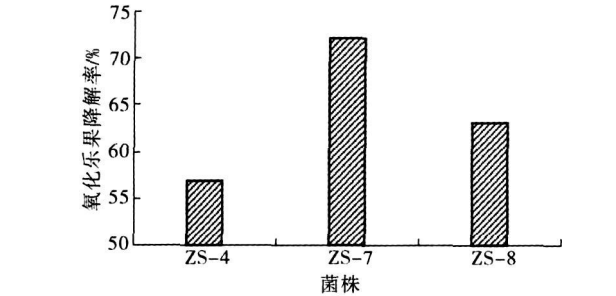


图 1 不同菌株对氧化乐果的降解率

2.2 高效降解菌的降解规律

高效降解菌 ZS-7 的生长情况及其对氧化乐果的降解情况见图 2。由图 2 可知, 菌株 ZS-7 在含有氧化乐果的培养基中生长时, 适应期相对较长, 从第 2 天开始, 菌体的 OD₆₀₀ 开始增加, 与此同时, 氧化乐果的含量在下降, 到第 4 天时, 菌体生长到了稳定期, 氧化乐果含量也降至最低。由此说明, 氧化乐果的降解和高效降解菌 ZS-7 的生长有一定的相关性。

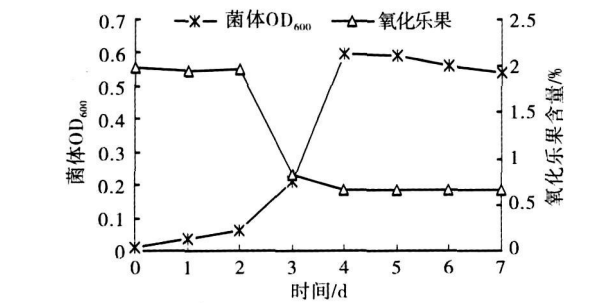


图 2 菌株 ZS-7 生长及氧化乐果降解曲线

2.3 高效降解菌利用氧化乐果的途径和方式

由表 3 可知, 高效降解菌 ZS-7 在培养基 A 中培养 4 d, OD₆₀₀ 为 0.063, 说明菌体没有明显生长, 同时氧化乐果含量为 1.76%, 也没有明显降低; 而在

培养基 B 中, 4 d 时 OD₆₀₀ 达 0.548, 氧化乐果含量降至 0.65%。由此可知, 菌株 ZS-7 对氧化乐果的分解利用与葡萄糖的存在有关, 其原因可能是菌株 ZS-7 利用葡萄糖以共代谢方式将氧化乐果中的有机磷降解成无机磷。

表 3 ZS-7 在不同培养基中培养后 OD ₆₀₀ 值和氧化乐果含量		
培养基	ZS-7 的 OD ₆₀₀	氧化乐果含量/%
A	0.063	1.76
B	0.548	0.65

2.4 高效降解菌的生长规律

高效降解菌 ZS-7 在 LB 培养基中的生长曲线见图 3。由图 3 可知, 0~ 3 h 为 ZS-7 的潜伏期; 3~ 11 h 为对数生长期, 这一阶段菌体快速增殖; 11~ 25 h 为平稳生长期, 25 h 以后, 进入衰亡期。因此, 在后续优化试验中, 取样的时间选择在菌体细胞最多的 11~ 12 h。

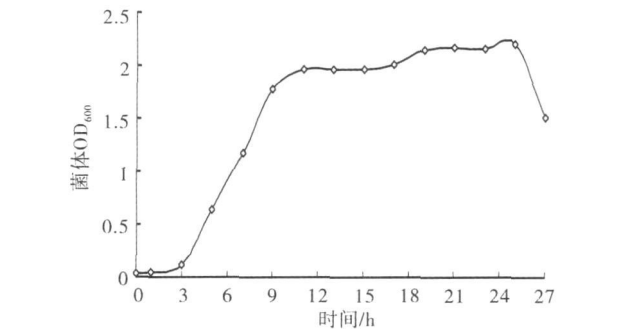


图 3 ZS-7 在 LB 培养基中的生长曲线

2.5 高效降解菌的优化培养条件

2.5.1 高效降解菌培养条件的优化结果 按照表 1 正交试验 L₉ (3⁴) 方案, 以菌株在 LB 培养基中培养 12 h 的生长量 (OD₆₀₀) 为指标对 ZS-7 的培养条件进行优化, 结果见表 4。对极差 R 值分析可知,

表 4 ZS-7 培养条件正交试验优化结果				
试验序号	因素			OD ₆₀₀
	A	B	C	
1	1	1	1	0.299
2	1	2	2	0.490
3	1	3	3	0.374
4	2	1	2	0.353
5	2	2	3	0.309
6	2	3	1	0.583
7	3	1	3	0.229
8	3	2	1	0.484
9	3	3	2	0.607
K ₁	0.388	0.294	0.455	
K ₂	0.415	0.428	0.483	
K ₃	0.440	0.521	0.304	
R	0.052	0.227	0.179	

3 个因素对菌体生长影响的程度依次是: B> C> A, 说明转速对菌体生长的影响最大, 温度次之, 初始 pH 最不明显。

表 4 的结果只能进行直观分析, 为了了解各因素影响之间的差异是否显著, 对结果进行了方差分析, 其结果(表 5) 也说明, 培养温度和转速对菌体 ZS-7 的生长有极显著影响。通过分析可知, 适合 ZS-7 生长的最佳条件是 A₃B₃C₂, 即初始 pH 为 7. 5, 转速为 150 r/min, 温度为 30℃。

表 5 ZS-7 培养条件正交试验方差分析结果			
变异来源	偏差平方和	自由度	F 值
pH	0. 004	2	2. 000
转速	0. 079	2	39. 500**
温度	0. 056	2	28. 000**
误差	0. 020	2	
总和	0. 141	8	

注: 在此过程中, 以空白项为误差项, $F_{2,8,0.05}=4.459$, $F_{2,8,0.01}=8.649$, ** 表示差异极显著

2. 5. 2 验证试验结果 将 ZS-7 接种于 LB 培养基中, 分别在优化后条件(pH 7. 5、转速 150 r/min、温度 30℃) 和优化前条件(pH 7. 0、转速 180 r/min、温度 30℃) 下培养 12h, 测定 OD₆₀₀ 分别为 2. 49 和 2. 04, 培养条件优化后产量提高了 22. 06%。

3 结论与讨论

1) 从受农药污染的土壤中分离筛选具有优良降解性能的菌株是筛选环境修复菌最常用的方法^[12]。本试验从陕北地区长期施用氧化乐果的土壤中, 经富集、分离、纯化, 初步筛选得到氧化乐果降解菌, 使用钼蓝比色法测定其降解率, 其中菌株 ZS-7 的降解率最高, 达 72. 1%, 因此, 选择 ZS-7 作为氧化乐果高效降解菌。同时发现, 氧化乐果的降解和菌体的生长有一定的同步性, 这可能是高效降解菌在对数期后才能产生氧化乐果降解酶, 因此, 氧化乐果降解的高峰期与 ZS-7 生长高峰期一致。

2) 本试验利用正交法对氧化乐果高效降解菌 ZS-7 的培养条件进行了优化, 结果显示: pH 7. 5、转速 150 r/min、温度 30℃条件下, 菌体产量比优化前提高了 22. 06%。同时可知, 转速是影响菌体生长的关键因素, 150 r/min 的效果优于 180 r/min, 表明

该菌可能是好氧菌, 但过多的氧可能会抑制相关的酶活性。

3) 微生物对农药的转化作用有 2 种方式: 一是矿化作用, 农药可以作为微生物的营养源而被微生物分解利用, 生成无机物、二氧化碳和水; 二是共代谢作用, 有些化合物不能被微生物分解利用, 但若有碳源和能源的辅助基质存在时, 则有可能被部分降解^[13]。本试验结果表明, 高效降解菌 ZS-7 对氧化乐果的降解过程中可能存在共代谢作用。

参考文献:

[1] 刘芳, 钟英长. 乐果降解酶产生菌的筛选及产酶条件的优化[J]. 农业环境保护, 2000, 19(6) : 336-338.

[2] 胡萍, 王一帆, 徐达, 等. 高效降解氧化乐果菌的初步筛选[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2) : 92-96.

[3] 杨小蓉, 宗浩, 郑鸽, 等. 一株降解氧化乐果的高效菌的分离和鉴定[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2001, 24(4) : 392-394.

[4] 韩梅, 易盛国, 侯雪. 结球甘蓝中氧化乐果残留量的测定[J]. 现代农业科技, 2010(5) : 147-148.

[5] 王永杰, 李顺鹏, 严淑玲, 等. 活性微生物与农药降解[J]. 中国沼气, 1999, 17(4) : 10-13.

[6] Singh S, Singh D K. Utilization of monocrotophos as phosphorus source by *Pseudomonas aeruginosa* F10B and *Clavibacter michiganese* subsp. *insidiosum* SBL 11 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(2) : 101-109.

[7] 刘新, 尤民生, 廖金英, 等. 甲胺磷降解菌的分离与降解效能测定[J]. 武夷科学, 2001, 17(1) : 51-55.

[8] 袁永成. 农药乐果降解菌株的分离鉴定[J]. 科技经济市场, 2006(6) : 61-62.

[9] 胡萍, 王一帆, 徐达, 等. 高效降解氧化乐果菌的初步筛选[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2) : 92-96.

[10] 王苏闽. 植物油中磷脂含量的比色法[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(3) : 39-40.

[11] 宫占元, 王艳杰, 李永鹏, 等. 侧孢芽孢杆菌降解有机磷能力的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(1) : 12-14.

[12] Wan Q, Liu X, Cui Y. Concept and advances of applied bioremediation for organic pollutants in soil and water [J]. Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(1) : 159-163.

[13] 王伟东, 牛俊玲, 崔宗均. 农药的微生物降解综述[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2005, 17(2) : 18-22.