

有机磷农药降解菌的筛选及降解能力测定

张广志¹, 张新建¹, 扈进冬¹, 王贻莲¹, 杨合同^{1,2,3*}

(1. 山东省科学院 中日友好生物技术研究中心, 山东省应用微生物重点实验室, 山东 济南 250014;

2. 山东省科学院 生物研究所, 山东 济南 250014; 3. 山东理工大学 生命科学学院, 山东 淄博 255049)

摘要: 从长期受有机磷农药污染的土壤中分离到 4 株能降解甲胺磷和甲基对硫磷的降解菌, 初步鉴定: 2 株为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 分别为 BM1 和 BM2, 1 株为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) BL4, 1 株为假单胞菌属菌 (*Pseudomonas*) P3。摇床培养 7 d 后, 除 BM1 外, BM2、P3、BL4 菌株对甲胺磷和甲基对硫磷的降解率均在 90% 以上。盆栽试验表明: 菌剂处理 30 d 后, 对土壤中 2 种有机磷农药的降解率均在 78% 以上。

关键词: 甲胺磷; 甲基对硫磷; 降解菌; 筛选

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)03-0063-03

Screening and Bioactivities of Bacteria Degrading Organophosphorus Pesticides

ZHANG Guang-zhi¹, ZHANG Xin-jian¹, HU Jin-dong¹,
WANG Yi-lian¹, YANG He-tong^{1,2,3*}

(1. SINO-Japanese Friendship Biotechnology Research Center of Shandong Academy of Sciences, Shandong Provincial Key Lab for Applied Microbiology, Jinan 250014, China; 2. Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences Jinan 250014, China; 3. College of Life Science Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract: Four bacterium strains degrading methamidophos and methylparathion were isolated from contaminated soil by organophosphorus pesticide. Two isolates were identified as *Bacillus megaterium*, one was *B. licheniformis*, and one belonged to the genus *Pseudomonas*. The degradation rate of two organophosphorus pesticides by the four isolates were over 90% in culture after 7 days and the degradation rates were over 78% in soil after 30 days.

Key words: Methamidophos; Methylparathion; Degrading bacterium; Screening

有机磷农药是造成土壤农药污染最主要的种类之一。目前, 世界上的有机磷农药多达上百种, 在我国使用的约有 30 余种, 其中 80% 以上是剧毒农药, 如甲胺磷、甲基对硫磷、对硫磷、久效磷等^[1]。目前, 我国有机磷农药占据农药主导地位的局面难以在短期内改变, 仍将长期使用, 有机磷农药的广泛使用造成的环境污染和食品污染问题已直接威胁人类生存

和农业的可持续发展, 且农药残留业已超出了自然生态系统自身修复能力, 寻求降解有机磷农药的方法, 消除其引起的污染问题成为亟待解决的问题。大量研究证明, 微生物对土壤和水中的有机磷农药均有很好的降解作用, 且不会造成二次污染, 因此, 筛选高效、广谱的有机磷降解菌株具有重要意义^[2]。

本试验对从长期受有机磷农药污染严重的土壤

收稿日期: 2008-08-13

基金项目: 国家“863”计划现代农业技术领域重大项目(2006AA10A211); 山东省科技攻关重点项目(2005GG3209057); 山东省科学院博士基金项目(200607)

作者简介: 张广志(1978-), 男, 山东临朐人, 助理研究员, 硕士, 主要从事农业微生物应用等方面的研究。

通讯作者: 杨合同(1966-), 男, 山东高唐人, 研究员, 教授, 博士, 主要从事应用微生物方面的研究。

中分离的有机磷农药高效降解菌的生理生化特性进行了初步鉴定,并对该菌降解甲胺磷、甲基对硫磷的降解能力进行了测定,旨在为筛选有机磷农药高效广谱降解菌提供理论依据和菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料

土样采集于农药厂排污口被污染的土壤。

1.2 方法

1.2.1 降解菌的分离及筛选 取被农药污染的土样 2.0 g,放入装有 100 mL 无机盐培养基的 500 mL 三角瓶中,其中甲胺磷、甲基对硫磷浓度均为 0.01%,置于 28~30℃,150 r/min 条件下摇床培养,以后按 10%接种量每周移种 1 次,逐渐提高至 0.1%,最后在无机盐培养基平板上划线,挑取生长快的细菌菌落,在平板上划线分离单菌落,并结合镜检至菌体形态单一为止^[3]。

将筛选的甲胺磷降解菌株转接到甲基对硫磷降解菌无机盐培养基上,选择在 2 种培养基上均能生长的菌株,即同时降解甲胺磷和甲基对硫磷的菌株,保存备用。

甲胺磷降解菌无机盐培养基: NaCl 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, Na₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, 微量元素溶液 1.5 mL (CaSO₄ · 2H₂O 4.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.7 g, FeCl₃ · 7H₂O 7.0 g, CoCl₃ · 6H₂O 0.2 g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 3.4 g, CaCl₂ · 2H₂O 2.0 g, 蒸馏水 1000 mL); 1 mL/L 甲胺磷,琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

甲基对硫磷降解菌无机盐培养基: NH₄Cl 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, NaCl 0.5 g, 甲基对硫磷 1 mL, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

1.2.2 菌株鉴定 参考《常见细菌系统鉴定手册》做生理生化试验,对分离菌株进行初步鉴定^[4]。

1.2.3 对甲胺磷降解活性的测定 配制 LB 液体培养基 50 mL 于 250 mL 三角瓶中,分别接种分离到的菌株 BM1、BM2、P3、BL4,在 35℃、120 r/min 摇床培养过夜作为种子液。配无机盐液体培养基 50 mL 于 250 mL 三角瓶中,灭菌后无菌条件下加甲胺磷,使其浓度至 1000 mg/L。按 5%的接种量接种种子液,以不接菌为对照,在 35℃、120 r/min 摇床培养 7 d,取降解菌液,8000 r/min 离心 5 min,取上清加入等体积乙酸乙酯,剧烈振荡 5 min,静置 1 h,取上层有机相加入少量无水硫酸钠脱水。

采用 C18 反相柱 (2.5 cm × 15 cm) 高效液相色谱测定甲胺磷含量,流动相为乙腈:水 = 4:96,流速为 1.5 mL/min,检测波长为 210 nm,进样量为 20 μL^[5]。

1.2.4 对甲基对硫磷降解活性测定 方法如 1.2.3,培养 7 d,离心培养液,取上清加入 2.5 倍体积二氯甲烷,涡旋器上混匀 3 min,静置 1 h 后去上清,加入无水硫酸钠脱水,置 4℃冰箱。

气相色谱条件:载气,99.99%的高纯 N₂,压力为 73.4 kPa;氢气流量 80.0 mL/min;空气流量 120 mL/min;检测器,火焰光度检测器,温度 250℃;柱温 190℃;进样口温度 210℃;直接法进样,进样量 2 μL^[6]。

1.2.5 盆栽试验 测定降解菌对土壤中 2 种有机磷农药的降解活性,以草炭土作为菌剂的载体,将各降解菌按比例均匀拌入,调整菌数 5 × 10⁸ cfu/g。试验土采自生物中心试验田,过筛后 121℃灭菌 2 h,自然风干后,装入塑料盆中,每盆 1 kg。播种时,均匀拌入各供试菌剂 (每盆 10 g),每盆播种棉花种子 10 粒,每盆浇水量保持一致 (每升水含甲胺磷、甲基对硫磷 1000 mL),浇入的水量以不从盆底流出为准。共设 BM1、BM2、P3、BL4、CK 5 个处理,每处理重复 6 次,温室随机摆放。出苗后,疏为每盆 5 棵,以后按常规操作进行管理。

播种后,于 7 d、15 d、20 d、30 d 各取样 1 次,测定土壤和植株内的农药残留,计算降解菌对 2 种有机磷农药的降解率。

2 结果与分析

2.1 降解菌株鉴定结果

利用含甲胺磷农药的无机盐培养基,共分离有机磷降解菌 13 个,多次划线纯化,得性状稳定的优良降解菌菌株 7 个,进一步转接于含甲胺对硫磷的无机盐培养基上,仅 4 个菌株在此培养基上生长良好,表明其有潜在的同时降解 2 种有机磷农药的能力,标号 Y1、Y2、Y3、Y4。根据伯杰氏系统细菌鉴定手册,鉴定 Y1、Y2 为巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*),编号 BM1、BM2; Y3 为假单胞菌属 (*Pseudomonas*),编号为 P3, Y4 为地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*),编号为 BL4。

2.2 摇瓶条件下降解菌株对 2 种有机磷农药的降解活性

摇瓶试验结果表明 (表 1),菌株 BM1、BM2、P3、BL4 均有明显降解甲胺磷和甲基对硫磷的活

性,其中 BM2、P3、BL4 3 个菌株培养 7d 后,降解率均达到 90% 以上;BM1 对甲胺磷和甲基对硫磷的降解率稍低,分别为 75.26%、79.13%。

表 1 降解菌株对 2 种有机磷农药降解活性测定结果

菌株	BM1	BM2	P3	BL4	CK
甲胺磷(mg/L)	213.6	65.2	72.3	30.8	863.3
降解率(%)	75.26	92.45	91.63	96.43	—
甲基对硫磷(mg/L)	151.6	41.1	53.8	15.3	726.4
降解率(%)	79.13	94.34	92.59	97.89	—

2.3 降解菌对盆栽土壤中 2 种有机磷农药的降解效果

盆栽试验结果表明,4 种菌剂均能有效降解甲胺磷和甲基对硫磷。在降解甲胺磷的试验中,菌剂处理 20d 后,BM1、BM2、P3、BL4 四个处理的甲胺磷残留量(图 1)分别为 25.0mg/kg、25.3mg/kg、18.0mg/kg、8.6mg/kg,相对于对照 75mg/kg 的残留,4 个处理的降解率均达到 65% 以上,其中 BL4 降解率达到 88.54%;30d 后,除 BM1 降解率略低外,其他 3 个菌株对甲胺磷的降解率均超过 85%。

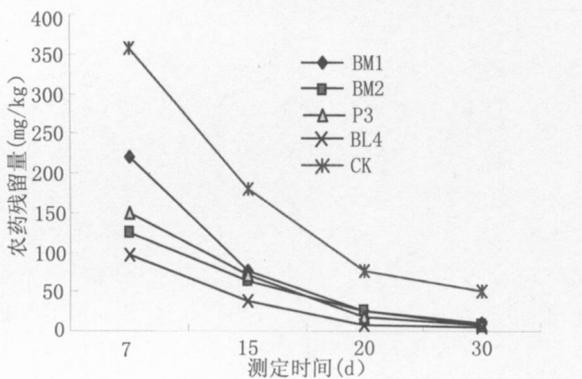


图 1 降解菌株对甲胺磷有机磷农药的降解效果

从图 2 可以看出,甲基对硫磷在土壤中自然降解较快,处理 20d 后,对照农药的残留量降为 21.4mg/kg;施入 4 种菌剂进一步促进农药残留的降解,20d 后,甲基对硫磷的残留量分别降为 6.1mg/kg、2.5mg/kg、

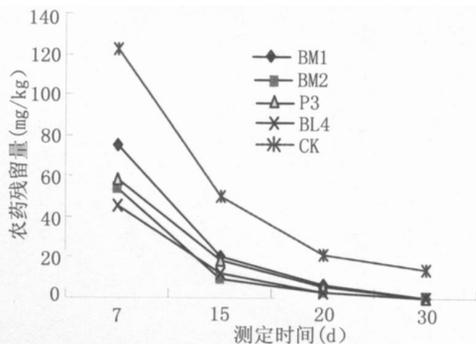


图 2 降解菌株对甲基对硫磷的降解效果

5.6mg/kg、3.2mg/kg,降解率均在 71.50%。30d 后,菌剂处理的土壤中几乎检测不到甲基对硫磷残留。经统计,2 种菌的降解率均在 78% 以上。

3 讨论

关于农药的微生物降解菌,国内外已经进行了较多的研究,已报道的主要包括细菌、真菌和放线菌。目前,对有机磷农药降解细菌的研究包括降解菌的获得、降解酶的分离纯化、降解酶基因的克隆以及降解菌的田间应用等,报道的种属主要有假单胞菌属、芽孢杆菌属、黄杆菌属等,但多是针对一种有机磷农药有效,缺少广谱的有机磷农药降解菌^[7]。本试验分离筛选的 4 株降解菌,2 株是巨大芽孢杆菌,1 株是地衣芽孢杆菌,1 株属于假单胞菌属。摇瓶和盆栽试验结果表明,4 株细菌均有明显的降解甲胺磷和甲基对硫磷的效果,这为研制土壤修复剂及构建高效广谱基因工程菌提供良好的菌种资源。

但是,本试验筛选的降解菌株主要针对甲胺磷和甲基对硫磷,对其他常用有机磷农药没有进行测定,还有待于进一步研究。此外,还应对降解菌降解有机磷农药的酶学机理等进行摸索和探讨。

参考文献:

- [1] 刘云焕,陈东海.微生物降解有机磷农药的研究进展[J].北方环境,2005,30(1):22-24.
- [2] 郭荣君,李世东,章力建.土壤农药污染与生物修复研究进展[J].中国生物防治,2005,21(3):129-135.
- [3] 郑永良,刘德立,高强,等.甲胺磷农药降解菌 HS2A32 的分离鉴定及降解特性[J].应用与环境生物学报,2006,12(3):399-403.
- [4] 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.
- [5] 谭芙蓉,李佳楠,杨志荣.甲胺磷降解菌的生长特性及其降解活性的研究[J].四川大学学报(自然科学版),2001,38(5):728-731.
- [6] 解秀平,闫艳春,刘萍萍.甲基对硫磷彻底降解菌 X4 的分离、降解性及系统发育研究[J].微生物学报,2006,46(6):979-983.
- [7] 仪美芹,王开运,姜兴印,等.微生物降解农药的研究进展[J].山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(4):519-524.