

一株三唑磷降解菌 mp-4 的分离鉴定 及降解特性的研究*

戴青华 张瑞福 蒋建东 顾立锋 李顺鹏[†]

(南京农业大学生命科学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要 从长期经有机磷农药污染的土壤中分离到一株能高效降解三唑磷的菌株 mp-4。通过生理生化实验和 16 S rDNA 同源性序列分析将该菌鉴定为苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.)。mp-4 菌能以三唑磷为唯一碳源生长, 对三唑磷的降解率为 98.3%。在 25~37℃、pH 值为 6.6 时生长较好, 27~32℃、pH 7.5~8.8 时有较好的降解性能。在水稻大田试验中, 米壳的三唑磷残留去除率为 91.9%, 糙米的三唑磷残留去除率为 100%。

关键词 三唑磷; 降解; 生理生化

中图分类号 X172

文献标识码 A

世界上化学农药的出现和使用, 为农业生产做出了巨大的贡献, 但这些农药及其衍生物的毒性给土壤和水体造成了潜在的危险, 给自然生态系统带来了极大的压力, 给人们提出了如何消除农药残留的环境污染的课题^[1, 2]。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。生物修复技术主要是利用微生物的多样性及其代谢易变性, 筛选出高效的针对性强的降解性微生物进行人工接种来强化污染物的降解^[3]。利用微生物对农药残留进行原位生物修复已有成功报道, 尤其是有机磷农药残留污染的生物修复研究近几年进展较快^[4, 5]。

三唑磷农药是一种有机磷杀虫剂, 对粮、棉、果、蔬菜等主要农作物上的许多重要害虫, 如螟虫、稻飞虱、蚜虫、红蜘蛛、棉铃虫、菜青虫和线虫等都有良好的防治效果, 其杀卵作用明显, 对鳞翅目昆虫卵的杀灭作用尤为突出^[6]。加上它的生产工艺比较简单, 得率较高, 使用方便, 在全国各地已大量推广应用, 仅江苏省每年在水稻上的使用面积就达几百万公顷。但是, 三唑磷农药半衰期较长, 大量的使用在粮食蔬菜水果上造成的残留问题仍很严重, 这一问题迫切需要解决。目前, 国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。但是关于三唑磷农药的生物降

解未见报道, 利用三唑磷降解菌株进行田间原位生物修复更是没有先例。本文研究了三唑磷农药的微生物降解, 并应用于田间水稻上, 有效地解决了水稻生产过程中三唑磷农药残留问题, 为农业无公害生产提供新思路。

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 g L⁻¹, K_2HPO_4 1.5 g L⁻¹, KH_2PO_4 0.5 g L⁻¹, NaCl 1.0 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g L⁻¹, 水 1000 ml, pH 7.0~7.2。富集培养基: 在基础培养基中添加 100 mg L⁻¹ 酵母膏。LB TAP 培养基: LB 培养基中添加 200 mg L⁻¹ 三唑磷乳油。种子培养基为 1/2LB, 发酵培养基配方为葡萄糖 10 g L⁻¹, 酵母膏 1 g L⁻¹, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g L⁻¹, NaCl 0.5 g L⁻¹。其他参见文献[7]。

1.1.2 供试农药及试剂 20% 三唑磷乳油购自江苏省农化股份有限公司。三氯甲烷, 分析纯, 上海化学试剂厂。pMD19-Tvector 购自 TaKaRa 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选 土样取自山东省有机磷农药长期污染的农田土壤, 将土样在含 100 mg L⁻¹ 的三唑磷乳油的富集培养液中富集培养 4 周, 并逐步提

* 国家 863 项目(2003AA 241150)、国家“十五”攻关项目(2002BA516A01)、江苏科技攻关项目(BE2002345、BE2003343)资助

[†] 通讯作者, E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 戴青华(1975~), 江苏泰州人, 在读硕士研究生, 主要从事环境微生物学的研究

收稿日期: 2004-03-23; 收到修改稿日期: 2004-06-20

高三唑磷农药浓度到 200 mg L^{-1} 。取 1 ml 富集液适当稀释后涂布于 LBTAP 平板, 培养 36 h 后挑取周围出现透明水解圈的单菌落, 分离纯化后保存。

1.2.2 生理生化鉴定 方法参见文献[8]。

1.2.3 分子生物学操作 菌体染色体总 DNA 提取、纯化、回收、酶连、转化方法参见文献[11]。序列测定由 TaKaRa 公司进行。

1.2.4 16S rDNA 序列 PCR 扩增 引物设计参见文献[10]: 5' 端引物 5'-AGAGTTTGATCTG GCTCAG-3' (*Escherichia coli* bases 8 to 27) 3' 端引物 5'-TAGCTTGTACGACTT-3' (*Escherichia. coli. bases 1507 to 1492*)。扩增反应体系如下: $10 \times \text{Taq}$ 聚合酶反应缓冲液 $5 \mu\text{l}$, dNTP (20 mmol L^{-1}) $5 \mu\text{l}$, 引物 ($25 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) 各 $2 \mu\text{l}$, Mg^{2+} (25 mmol L^{-1}) $6 \mu\text{l}$, 菌体 DNA (约 $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) $1 \mu\text{l}$, Taq DNA 聚合酶 ($5 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) $0.5 \mu\text{l}$, 加 H_2O 至 $50 \mu\text{l}$ 。反应条件: 94°C 变性 2 min ; 94°C 30 s , 50°C 30 s , 72°C 1 min , 30 个循环; 最后 72°C 延伸 20 min 。

1.3 三唑磷定量分析

水样经两倍体积的三氯甲烷提取后进行紫外扫描, 测定条件为 $\lambda 200 \text{ nm} \sim \lambda 350 \text{ nm}$ 连续光谱扫描, 定量分析在 $\lambda 248 \text{ nm}$ 条件下进行。

1.4 降解谱试验

在无碳基础盐培养基中分别添加 200 mg L^{-1} 甲基对硫磷、辛硫磷、对硫磷、马拉硫磷、三唑磷、甲胺磷为唯一碳源, 按 5% 接种量接入 mp-4 菌体, 30°C 摇床培养 24 h , 三氯甲烷提取进行紫外扫描。

1.5 环境条件对菌株 mp-4 生长及降解三唑磷的影响试验

在最适碳、氮源利用试验中, 分别以 10 g L^{-1} 葡萄糖、麦芽糖、果糖、乳糖和蔗糖为唯一碳源或以 5 g 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 OD_{600} 值。

在最适温度、pH 值试验中在葡萄糖铵盐培养基, 按 3% 的接种量接入离心后以无菌水洗涤并悬浮的 mp-4 菌体, 30°C (温度试验除外) 摇床培养, 12 h 后测 OD_{600} 值。

在温度、pH 对三唑磷降解影响的试验中, 在无碳基础盐培养基中加 200 mg L^{-1} 的三唑磷, 按 5% 接种量接入离心后无菌水洗涤并悬浮的 mp-4 菌体, 设不接菌为对照, 摇床培养 24 h , 测定三唑磷的降解率。

1.6 菌株 mp-4 在水稻田间去除三唑磷残留试验

将 mp-4 菌株在 70 L 中试发酵罐 (GUJS-7-

70AUTOBIO2000 型) 发酵成菌剂 75 L , 发酵条件为: 温度 30°C , pH 值 6.8 , 气液比 (V/V) $2/5$, 转速 200 r min^{-1} 。菌数通过平板计数为 1.2×10^{11} 个 mL^{-1} , 聚乙烯桶装常温运抵常熟试验地。试验时间为水稻抽穗期至成熟收获期。

试验区布置为对照区和处理区各 3 个区, 面积各为 1.67 hm^2 。按实验区水稻田地块自然分区。对照区按照当地田间正常用药, 三唑磷共用药 7 次, 每次 1800 ml hm^{-2} , 共计 12.6 L hm^{-2} 。处理区按对照区正常用药, 最后一次用药后 3 天喷施 5 ml m^{-2} 的菌剂。

抽样检测: 水稻成熟收获期在对照区和处理区分别随机抽样稻穗 15 份。去除稻穗穗柄, 用去壳机使稻谷米壳和糙米分离, 分别取米壳和糙米 50 g 送农业部农产品质量检验监督测试中心 (济南) 测试三唑磷含量, 检测方法参见 GB/T17331-1998。

2 结果分析

2.1 菌株的分离与鉴定

2.1.1 菌株分离 在 LBTAP 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 mp-4 。菌体 (见图 2) 呈杆状 ($1.58 \mu\text{m} \times 0.79 \mu\text{m}$)、 G^- 、不产芽孢、周生鞭毛、运动。生理生化特性为: 氧化葡萄糖产酸、无胞外淀粉酶活性、氧化酶接触酶皆弱阳性、能使牛乳酸凝固、VP 反应阳性、吡

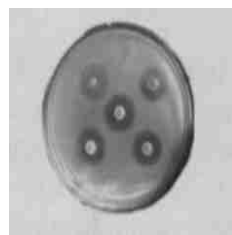


图 1 菌株 mp-4 在 LBTAP 平板上产生的水解圈

Fig. 1 Hydrolytic circles generated by strain mp-4 on the LBTAP plate

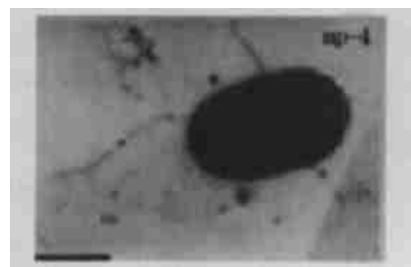


图 2 菌株 mp-4 的电镜照片 ($\times 10000$)

Fig. 2 Electronic microscopic photograph of strain mp-4 ($\times 10000$)

噪反应阴性。

2.1.2 16 S rDNA 序列分析及菌种鉴定 用 SDS 高盐法提取菌株 mp-4 的总 DNA, 以细菌 16 S rDNA

通用引物通过 PCR 扩增出 mp-4 1.5 Kb 的 16 S rDNA 片段。PCR 产物经纯化回收后, 连接到 pMD 18-T 载体上测序, 序列测定结果为:

```

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAAACGCTGCGGCAGGCTTAAACATGCAAGTCGAGCGCCCGCAAGGGGAGCG
GCAGACGGGTGAGTAAACCGTGGGAATCTACCATTGCTACGGAACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGTATGTG
CCCTTTGGGGAAAGATTTATCGGCAATGATGAGCCCGCTTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGG
CGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAG
GCTCTTCAACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAAGACCCCGCTAACCTTGGTCCAGCAGCCGCGTAAATA
CGAAGGGGGCTAGCGTTGTTGCGATTTACTGGCGTAAAGCGCAGTAAAGCGGACITTTAAAGTCAGGGGTGAAATCCC
GGGGCTCAACCCCGAACTGCCITTTGATACTGAAAGTCTGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATCCGAGTGTAGAGG
TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGCCGAAAGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCCGAGGTGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAAGATAACCTGGTGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAAATGTTAGCCGTGGGGAGTTACTCT
TCGTTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCCCTGGGAGTACGGTTCGAAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GCCCCCACAAGCGGTGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTGACATACCGTTCG
CGACACAGAGATGTGTCTTTCAGTTCGGCTGGACCCGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGAG
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGCACTCTAAGGGACTGCC
GGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTACGGGCTGGGCTACACAGTGTACAA
TGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACGGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCA
ACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGAATGCGCGGTGAATAAGTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTACACCCATGGGAGTTGTTTACCAGAAAGCGCTGTGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCAAGGTAGG
GTCAGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

```

将该序列在 GenBank 中相关数据进行同源性分析并结合生理生化特性将菌株 mp-4 鉴定为苍白杆菌属 (*Ochrobactrum* sp.)。

2.2 菌株 mp-4 对三唑磷的降解性能

从扫描图谱 (如图 3) 可知菌株 mp-4 对三唑磷的降解效率达 98% 以上, 几乎完全矿化。从菌体生长及降解进程曲线 (如图 4) 可知 mp-4 菌能在以三唑磷为唯一碳源的培养基中生长, 且当菌体生长处

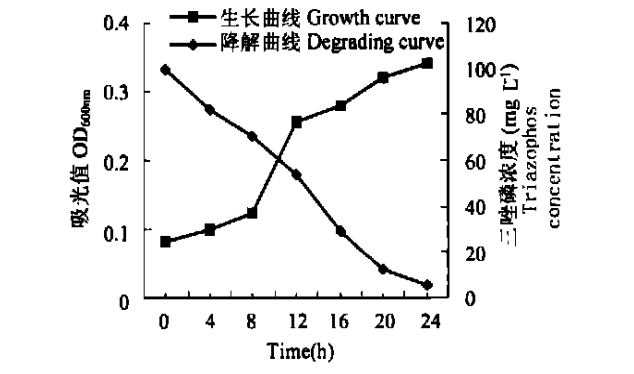


图 4 mp-4 菌株生长与降解三唑磷进程曲线
Fig. 4 Growth curve of mp-4 and degradation curve of triazophos

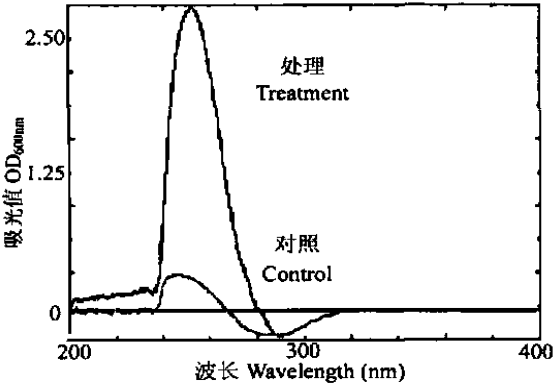


图 3 菌株 mp-4 降解三唑磷的紫外扫描图谱
Fig. 3 UV scanning of degradation of triazophos by strain mp-4

于对数期时对三唑磷的降解速度明显加快, 在 24 h 内能降解 98.5%。从试验结果可知 mp-4 菌降解三唑磷的性能很好, 可作为进一步试验和实际应用的良好材料。

2.3 菌株 mp-4 的降解谱

从表 1 可知, 菌株 mp-4 具有广谱的降解有机磷农药的性能, 能高效降解甲基对硫磷、对硫磷、辛硫磷、马拉硫磷和三唑磷, 降解率均在 90% 以上。

表1 菌株 mp-4 对不同有机磷农药的降解性

Table 1 Capability of strain mp-4 degrading different organophosphorous pesticides

底物 Substrate	甲基对硫磷 Methylparathion	辛硫磷 Phoxin	对硫磷 Parathion	马拉硫磷 Malathion	三唑磷 Triazophos	甲胺磷 Methamidophos
降解率 Degrading rate(%)	100	95.3	100	93.4	98.5	0

2.4 菌株 mp-4 的最适碳氮源

由图 5 可知 mp-4 菌能利用葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖作为碳源,几乎不利用乳糖,最适碳源为葡

萄糖。mp-4 菌对氮源的利用谱较广,以有机氮为唯一氮源时生长明显好于无机氮,最适有机氮源是酵母膏。

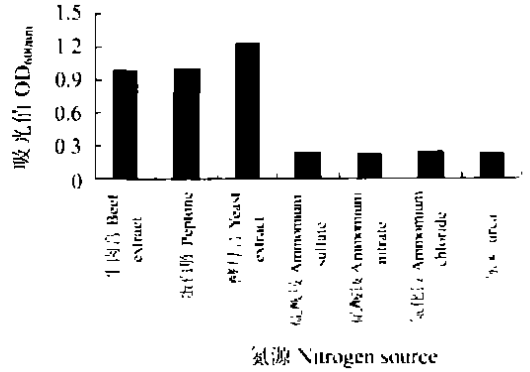
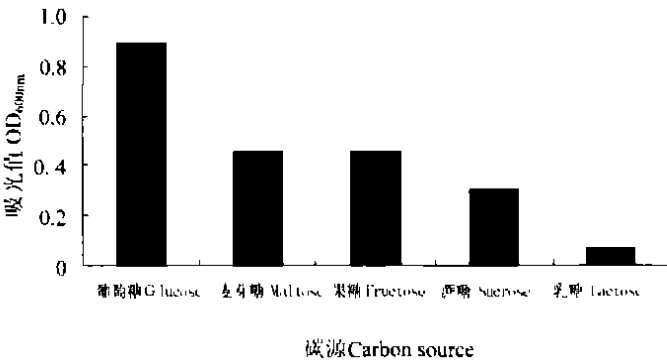


图 5 菌株 mp-4 对不同碳源和氮源的利用

Fig. 5 Utilization of different carbon and nitrogen sources by strain mp-4

2.5 温度、pH 值对 mp-4 生长和降解三唑磷的影响

从温度、pH 值试验结果可知 mp-4 菌的生长和降解温度范围都较广,在 25~ 37℃ 生长良好,在 27~ 32℃ 有较好的降解性能。mp-4 菌的最适生长 pH 值为 6.6, pH 值在 7.5~ 8.8 降解性能较好,最适 pH 值为 8.6。mp-4 菌对温度、pH 值的良好适应性有利于菌株在大田应用中较好的发挥作用。

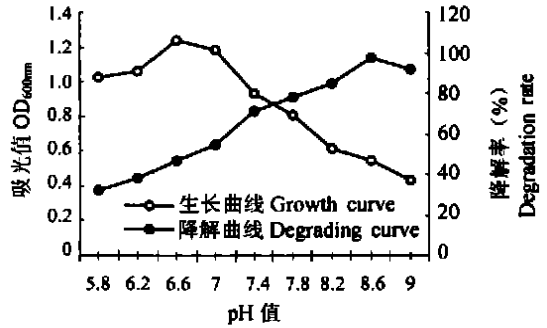


图 7 pH 值对 mp-4 菌生长和三唑磷降解的影响

Fig. 7 Effects of pH on growth of mp-4 and degradation of triazophos

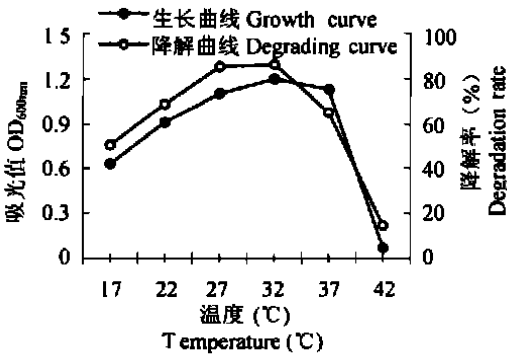


图 6 温度对 mp-4 菌生长和三唑磷降解的影响

Fig. 6 Effects of temperature on growth of mp-4 and degradation of triazophos

2.6 菌株 mp-4 在水稻田去除三唑磷残留结果

根据检测结果(见表 2)可知, mp-4 菌株在大田应用中能很好的发挥降解三唑磷的性能,米壳中的三

唑磷农药从对照的 2 503 mg kg⁻¹降为 0.203 mg kg⁻¹,降解率为 91.6%;糙米中的三唑磷农药从对照的 0.355 mg kg⁻¹降为检测不出,降解率达到了 100%。结果显示所有对照区中糙米中的三唑磷农药含量明显小于米壳,说明农药残留大部分残留于米壳中,而糙米中的残留有可能是米壳中的残留部分运输至糙米中。因此,要使糙米中农残检测不出的关键在于充分的降解米壳中的残留农药,防止农药的运输转移。实验结果表明,虽然处理区米壳中农药的检出率均为 100%,但是却有效地降低了农药残留,最终

使糙米中农残检出率为 0, 达到了 A 级食品的标准。本研究为菌株 mp-4 大规模应用于粮食、水果蔬菜的农药残留降解、生产无公害农业产品奠定了良好的基础。

表 2 菌株 mp-4 在水稻大田去除三唑磷残留结果统计

Table 2 Statistics of the test results of strain mp-4 degrading triazophos in rice field

样品	处理	三唑磷含量(mg kg ⁻¹)	检出率(%)	去除率(%)
Sample	Treatment	Triazophos concentration	Detection rate	Degradation rate
米壳	未施菌	2.503±0.3	100	
	施菌			
糙米	未施菌	0.203±0.2	100	91.6
	施菌	0.355±0.1	53	
糙米	未施菌	0.355±0.1	53	
	施菌	0±0.0	0	100

参考文献

[1] 刘智, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的诱变育种. 土壤学报, 2003, 40(2): 293~300. Liu Z, Li S P. Mutation breeding of methyl parathion degrading strain DLL-1 (*Pseudomonas* sp.) (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(2): 293~300

[2] P. Nannipieri, J. -M. Bollag. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. Environ. Qual, 1991(20): 510~517

[3] 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. 农村生态环境 2001, 17(3): 21~25. Cui Z L, Li S P, He J. Study on the isolation of methyl parathion degrading bacillus strain J5 and the characteristics of the degradation (In Chinese). Rural

Eco-Environment, 2001, 17(3): 21~25

[4] 王永杰, 李顺鹏, 严淑玲. 活性微生物与农药的降解. 中国沼气, 1999, 17(4): 10~13. Wang Y J, Li S P, Yan S L. The active microbes and the degradation of pesticides (In Chinese). China Biogas, 1999, 17(4): 10~13

[5] 李顺鹏, 沈标, 魏社林. 等. 甲基对硫磷降解菌的生态效应及应用. 土壤学报, 1996, 33(4): 380~384. Li S P, Shen B, Wei S L, et al. Ecological effect of bacterium to degrade parathion methyl (PM) and its application (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 1996, 33(4): 380~384

[6] 董竞武, 肖萍, 郑志清, 等. 三唑磷杀虫剂的亚慢性毒性研究. 环境与职业科学, 2003, 20(2): 126~128. Dong J W, Xiao P, Zhen Z Q, et al. Study on subchronic toxicity of a pesticide triazophos in rats (In Chinese). Environ Occup Med, 2003, 20(2): 126~128

[7] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江主编. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996. Li F D, Yu Z N, He S J. eds. Agricultural Microbiology Experiment-Technology (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 1996

[8] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. Dong X Z, Cai M Y, et al. eds. Manual of Common Systematic Determinative Bacteriology (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001

[9] 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. 环境科学学报, 2003, 23(3): 411~413. Zhang R F, Zhu W, Cui Z L, et al. Isolation, identification and characters of phoxim degrading bacterium (In Chinese). Acta Scientiae Circumstantiae, 2003, 23(3): 411~413

[10] William D. Hiorns, Barbara A. Methé. Bacterial diversity in Adirondack Mountain Lakes as revealed by 16srRNA gene sequences. Appl. Environ. Microbiol. 1997, 63: 2957~2960

[11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TRIAZOPHOS DEGRADING BACTERIUM mp-4

Dai Qinghua Zhang Ruifu Jiang Jiandong Gu Lifeng Li Shunpeng

(Key Laboratory of Agricultural Environment Microbiological Engineering, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract A triazophos degrading bacterium designated as mp-4 was isolated from soils that have long been subjected to organophosphate pollution. Strain mp-4 was identified as *Ochrobactrum* sp. based on its biochemical-physiological characters and the result of the 16 S rDNA homologue sequence analysis. Strain mp-4 can grow with triazophos as its sole carbon source and degrade it at a rate of 98.3%. The optimal growth temperature and pH for mp-4 are 30 °C and 6.6 respectively. At the temperature of 27~32 °C and pH of 7.5~8.8, mp-4 can degrade triazophos well. Field test results show that mp-4 can decrease the residue of triazophos in rice husk and brown rice by 91.9% and 100%, respectively.

Key words Triazophos; Degradation; Biochemical-physiological