

一株毒死蜱降解细菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用

杨 丽¹ 赵宇华^{1*} 张炳欣² 张 昕²

(浙江大學 ¹ 生命科學院 ² 農業與生物技術學院 杭州 310029)

摘 要 :从蔬菜大棚土壤中分离到一株能以毒死蜱为唯一碳源和能源生长的菌株 DSP3,该菌在含毒死蜱(100mg/L)的酵母膏和蛋白胨与同样毒死蜱含量而无酵母膏蛋白胨的无机盐培养基中,18d 对毒死蜱的降解率分别为 98.6% 和 76.2%,在土壤实验中 20d 对毒死蜱(100mg/kg)的降解率接近 100%。加入 DSP3 菌在蔬菜大棚新鲜土壤中能有效促进毒死蜱在土壤中的降解。根据生理生化特征、16S rDNA 序列分析、(G+C)mol% 测定和 DNA 同源性分析,将菌株 DSP3 鉴定为粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)。

关键词 :毒死蜱,生物降解,16S rDNA,粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)

中图分类号 :Q938 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2005)06-0905-05

毒死蜱(Chlorpyrifos),化学名:0,0-二乙基-o(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸酯,是美国陶氏化学公司(Dow Chemical CO.)于 1965 年开发并研制出来的一种广谱性有机磷酸酯类杀虫剂,广泛用于农业和城市害虫的防治^[1]。它在植物和土壤中的残留可通过食物链影响人们健康^[2,3],由于其在叶面上持效期较短,而在土壤中持效期较长^[4],因此,毒死蜱在土壤中的降解情况早已受到人们的普遍关注。微生物是影响有机磷农药在环境中降解的最主要因素,因而微生物降解被认为是有机磷农药降解最可靠,最高效的途径^[5]。分离筛选能高效降解毒死蜱的微生物是人们进行毒死蜱污染治理、土壤生物修复的有效措施^[6,7]。但到目前为止,关于毒死蜱降解细菌的报道尚不多见。我们从浙江大学农场蔬菜大棚土壤中分离到一株毒死蜱降解菌,本文报道了该菌株的分离鉴定,以及实验室条件下该菌株在液体培养基和土壤中对毒死蜱的降解特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 :分离样品来自浙江大学华家池校区蔬菜大棚,毒死蜱由浙江大学农药与环境毒理研究所提供,纯度为 97.5%。供试菌株均属于粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*),其中 *A. faecalis* ATCC 8750T 来源于美国菌种保存中心,为模式菌株;*A. faecalis* CICC ASL 767 来源于上海工业微生物研究

所,为参比菌株。DSP3 由本实验室分离于浙江大学华家池校区蔬菜大棚土壤中。

1.1.2 主要试剂和仪器 :试验中试剂均为 AR 级国产试剂;用于 PCR 扩增的全套试剂均购自上海博亚生物技术有限公司;16S rDNA 序列扩增引物也由上海博亚生物技术有限公司合成。LGR16-W 型高速台式离心机(北京医用离心机厂);PHS-3C 型精密 pH 计(上海精科雷磁);HYBAID 牌 PCR 仪(英国 Hybaid);DY-3A 型稳压稳流电泳仪(江苏兴化分析仪器厂);岛津 UV-2550 型紫外分光光度计(配有加热设备)和 Shimadzu GC-9A 气相色谱分析(日本岛津)。

1.1.3 培养基 :无机盐(MM)培养基:每升含 0.4g MgSO₄·7H₂O,0.2g FeSO₄·7H₂O,0.2g K₂HPO₄,0.2g (NH₄)₂SO₄,0.08g CaSO₄,pH7.0。毒死蜱溶于氯仿后抽滤灭菌,加到预先灭菌的 MM 培养基,设 3 个浓度梯度,分别为 20mg/L、50mg/L、100mg/L。加富培养基:在 MM 培养基中分别加 1000mg/L 酵母膏和 1000mg/L 蛋白胨,用于菌株的平板培养和斜面保存。分离纯化培养基:在 MM 培养基中再添加琼脂 20g。

1.2 毒死蜱降解细菌的富集、分离、和纯化

在 50mL 不同浓度(20、50、100mg/L)的毒死蜱富集培养液中分别加入 5g 土样,30℃,280r/min 摇床培养 4d 后,吸取 1mL 转接到相同浓度的毒死蜱无机盐培养基中,连续富集,如此转接 5 次后,用接种环蘸取少量富集培养液,在相同浓度的毒死蜱分离纯

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30230250),浙江省科技厅重点科研项目(2003C22029)

* 通讯作者。Tel:86-571-86971215;E-mail:yhzhao1958@yahoo.com.cn

作者简介:杨丽(1980-),女,浙江湖州人,硕士研究生,主要从事应用微生物研究。E-mail:asfe117@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-04-04,修回日期:2005-05-09

化培养基平板上划线分离, 30℃培养, 待平板上出现单菌落后, 挑取单菌落转接至分离纯化斜面培养基上, 连续接种、传代 5 次, 仍能在毒死蜱培养基上生长的菌种选用。

1.3 毒死蜱降解菌的降解能力和降解率的测定

1.3.1 毒死蜱的气相色谱条件: 采用带 FPD 检测器的 Shimadzu GC-9A 气相色谱分析; 色谱柱: 5% OV-101 80~100 目, 长 1.5m, 直径 3mm; 柱温 260℃; 进样口和检测器温度分别为 230℃ 和 250℃; 载气: 氮气, 流速为 45mL/min, 氢气 15mL/min, 空气 30mL/min; 进样量 5 μ L, 保留时间 3.73min。

1.3.2 毒死蜱的提取: 液体培养基中毒死蜱提取: 取供测培养基 20mL 置于 100mL 分液漏斗中, 加重蒸石油醚 (60~90℃) 20mL \times 2, 振摇 2min, 收集并合并石油醚相, 置于 K-D 浓缩仪中蒸至近干, 再用氮气吹干, 重蒸石油醚定容, 后用于气相色谱测定。

土壤中的毒死蜱提取: 每个样品各取 5g 土壤于 100mL 的三角烧瓶中, 用 20mL \times 2 重蒸石油醚, 25℃ 恒温震荡提取 1h, 离心, 过滤, 收集滤液并在 50mL 容量瓶中, 滤液用无水硫酸钠干燥后, 后序步骤同液体培养基中毒死蜱提取。

1.3.3 菌株 DSP3 对毒死蜱的降解率的测定: 在 MM 和加富培养基的毒死蜱降解性试验中以 2% 的接种量接入菌株 DSP3, 即将毒死蜱 MM 培养基中生长 3d 的 DSP3 菌株液培物 0.4mL, 分别接入 20mL 的以毒死蜱为唯一碳源和能源的 MM 液体培养基中和加富培养基中 (毒死蜱含量为 100mg/L), 30℃, 200r/min 振荡培养, 以不接菌 (无菌水代替) 做对照。分别于第 3、6、9、12、15、18d 测定 DSP3 的菌体生长 OD_{600} 和培养基中的毒死蜱降解率, 每次 3 个重复, 气相色谱条件如上。

取蔬菜大棚的新鲜土, 设 4 个处理: 灭菌土 (新鲜土自然风干后, 过 20 目筛, 以无菌水调节湿度为 10%, 装入瓶中, 高压灭菌锅中 121℃ 灭菌 2h); 新鲜土; 添加 DSP3 的灭菌土; 添加 DSP3 的新鲜土。土样均装在棕色瓶中, 毒死蜱浓度为 100mg/kg。DSP3 菌株在 LB 平板上 30℃ 培养 24h 后, 用无菌水稀释至 $A_{600} = 1.0$, 制成新鲜菌悬液, 与土样均匀混和, 使得土壤 DSP3 细菌接种量为 10^6 个/g 土。在黑暗条件下 30℃ 每 5d 测定土壤中的毒死蜱残留量, 培养期间, 补充喷无菌水保持土壤含水量在 10% 左右, 气相色谱条件如上。

1.4 分离菌株鉴定

1.4.1 菌株 DSP3 生理生化鉴定: 方法参照文献

[8~10] 进行。

1.4.2 16S rDNA 测序和系统发育分析: 取培养在 LB 培养基是 24h 的供体菌体少量, 加入装有 100 μ L 无菌重蒸 H₂O 的 Eppendorf 管中, 漩涡混匀后, 沸水浴 3min, 12000r/min 离心 5min, 上清液作为模板 DNA 直接用于 PCR 扩增。

用于 16S rDNA 的 PCR 反应的引物为一对通用引物。正向引物 BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3' (*Escherichia coli* 对应位置为 8~27); 反向引物 BSR1541/20: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (*E. coli* 对应位置为 1541~1522)。PCR 反应体系 (50 μ L): 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, MgCl₂ (25mmol/L) 4 μ L, dNTP (5mmol/L) 1 μ L, 引物 BSF8/20 和 BSR1541/20 各 2 μ L, 模板 DNA 1 μ L, Taq 酶 (10000U/mL) 0.5 μ L, 重蒸水 34.5 μ L。PCR 反应条件: 94℃ 2min; 94℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 2min, 循环 29 次; 72℃ 10min。PCR 产物的纯化和测序由上海博亚生物技术有限责任公司完成, 测序用引物为 BSF8/20。

将所得的部分长度 16S rDNA 序列 407bp (GenBank 登陆号: AY748468) 与 GenBank 中核酸数据进行 BLAST 分析, 利用 ClustalX 1.8.1 进行比对, 通过 MEGA 2.1 软件选用 Kimura2-parameter 距离模型进行 UPGMA 分析生成系统发育树, 发育树用 Bootstrap 法 (1000 次) 重复检验。

1.4.3 DNA (G+C) mol% 和 DNA-DNA 杂交: T_m 值和 (G+C) mol% 采用热变性法测定, 以 *E. coli* K-12 为参比菌株。缓冲液为 0.1 \times SSC (0.015mol/L NaCl, 0.0015mol/L 柠檬酸钠), 采用带有加热装置的紫外分光光度计测定, 热变性温度法 (T_m)。DNA-DNA 杂交采用复性速率法测定^[11], 同样利用带有加热装置的岛津 UV-2550 型紫外分光光度计测定变性 DNA 的复性速率, 通过下列公式计算不同菌株之间的 DNA 同源性 (H):

$$H = (4V_m - (V_a + V_b)) / (V_a + V_b)^{0.5} \times 100\%$$

V_a 、 V_b 分别代表 a、b 菌株的复性速率, V_m 代表 a、b 两菌株 DNA 混和样品的复性速率。每组杂交重复 3 次。

2 结果

2.1 降解菌的分离和筛选

毒死蜱浓度为 20、50、100mg/L 的分离纯化培养基上均有菌落长出, 各菌落纯培养物经革兰氏染色, 个体形态及鞭毛电镜等观察初步确定为同一菌株。

命名为 DSP3 ,对该菌株作进一步鉴定和毒死蜱的降解性研究。

2.2 菌株 DSP3 的表型特征

菌株 DSP3 能以毒死蜱为单一的碳源和氮源生长 ,革兰氏染色阴性 ,无芽孢 ,细胞杆状 ;没有鞭毛 ,不能运动 ;在 LB 平板菌落乳白半透明 ,边缘整齐。取其在 100mg/L 的培养基上生长 ,作进一步鉴定和降解性研究。其表型特征(表 1)根据其氧化酶反应阳性 ,好氧 动力实验为阴性 ,无鞭毛 ,不运动等性质初步鉴定为产碱菌属(*Alcaligenes*)。

表 1 菌株 DSP3 的表型特征

Table 1 Phenotypic features of DSP3

Test performed	Characteristics	Test performed	Characteristics
Acid from		TSI acid	
Glucose	-	Butt	Red/ -
Xylose	-	Slant	Red/ -
Mannitol	-	Sellers agar	
Lactose	-	Slant	Blue
Sucrose	-	Butt	Blue/ -
Maltose	-	Pigment	-
Catalase	+	N ₂ produced	+
Oxidase	+	Litmus milk	-
Simmon's citrate	Blue/ +	Rach hydrolysis	-
Nitrite reduction	+	Lipid hydrolysis	-
Nitrate reduction	-	Indole	-
		Urea	-

2.3 菌株 DSP3 的系统发育分析

图 1 是根据菌株 DSP3 的 16S rDNA 序列与相关属种 16S rDNA 构建的系统发育树。图中可见菌株

DSP3 位于 *Alcaligenes* 分支上 ,经同源性比较发现菌株 DSP3 与 *Alcaligenes faecalis* 的序列相似性为 97% ,与 *Alcaligenes* sp. 的序列相似性也为 97% ,DSP3 应归属于产碱杆菌属。

2.4 菌株 DSP3 的 (G + C)mol% 和 DNA-DNA 杂交

将菌株 DSP3 进行 (G + C) mol% 测定和 DNA-DNA 杂交 ,所得结果见表 2。

菌株 DSP3 的 DNA 的 (G + C)% 为 56.8% ,与文献报道的 *A. faecalis* 模式菌株 ATCC 8750^T (G + C) % 为 54.8% ~ 59.2% (Colwell and Mandel , 1964) 相一致 ,与参比菌株 CICC ASL 767 (G + C)% 为 55.3 也相符。DSP3 与 *A. faecalis* 的 ATCC 8750^T、CICC ASL 767 的 DNA 同源性分别为 85% 和 93%。根据国际系统细菌学委员会规定的 DNA 同源性在 70% 以上为规定种的标准 ,DSP3 应归属与粪产碱杆菌。这和表型特征 ,生理生化特征和 16S rDNA 系统分析结果相一致 ,可确定菌株 DSP3 应归属于 *A. faecalis*。

表 2 DSP3 和参比菌株间的 DNA (G + C) mol% 和 DNA 同源性

Table 2 DNA homology between strain DSP3 and reference strains and

Strain	DNA (G + C) mol%	
	DNA (G + C) mol%	DNA homology with DSP3/ %
DSP3	56.8	100
ATCC8750 ^T	54.8 ~ 59.2	85
CICC ASL. 767	55.3	93

^T type strain.

目前已报道的毒死蜱降解菌主要为 *Pseudomonas* 属和 *flavobacterium* 属 ,最近有人发现

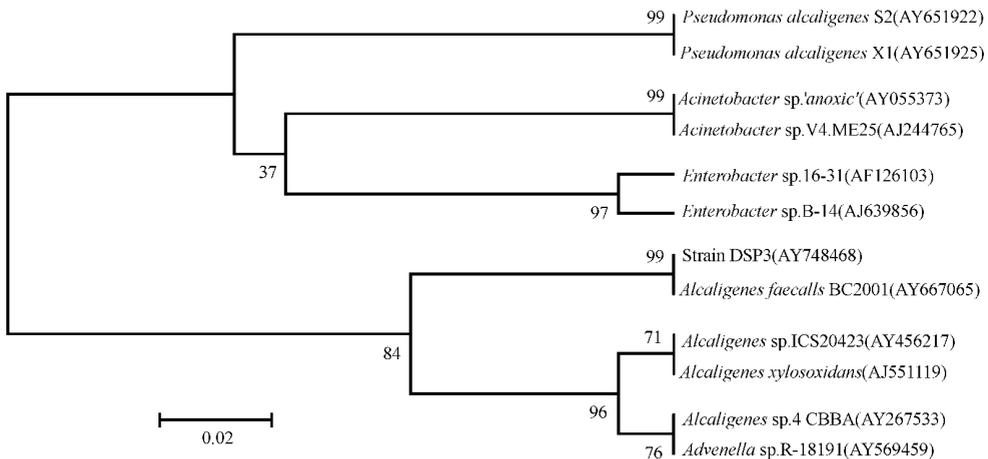


图 1 基于毒死蜱降解菌株 DSP3 和亲缘关系相近的毒死蜱降解菌株的 16S rDNA 序列的无根系统发育树

Fig.1 UPGMA phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain DSP3 and relating chlorpyrifos- degrading species Bootstrap values obtained with 1000 repetitions are indicated as percentages at all branches. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 2% sequence divergence.

Enterobacter asburiae group^[12]也有菌株能降解毒死蜱。本文报道的菌株属于 *A. faecalis*, 在 *A. faecalis* 中有不少菌株有降解环境污染物的能力, 如 *A. faecalis* CCT 7145 能降解苯酚^[13], *A. faecalis* T1^[14]具有 PHB 胞外解聚酶可以降解 PHB。这说明 *A. faecalis* 在环境修复中有着广阔的应用前景。

2.5 菌株 DSP3 毒死蜱的降解率

对菌株 DSP3 的毒死蜱降解效率进行了初步研究。结果表明(图 2)在 MM 培养基中菌体生长在 6d 达到生长稳定期, 培养 18d 后毒死蜱浓度从原来的 100mg/L 降至 23.78mg/L, 降解率达到 76.22%, 在加富培养基中菌体 3d 就出现生长高峰, 培养 18d 后毒死蜱浓度降至 1.44mg/L, 降解率达到 98.56%。表明加富培养基中的蛋白胨和酵母膏促进了 DSP3 对毒死蜱的降解, 这也与本试验观察到的加富培养基能有效增进供试菌的生长现象相一致。

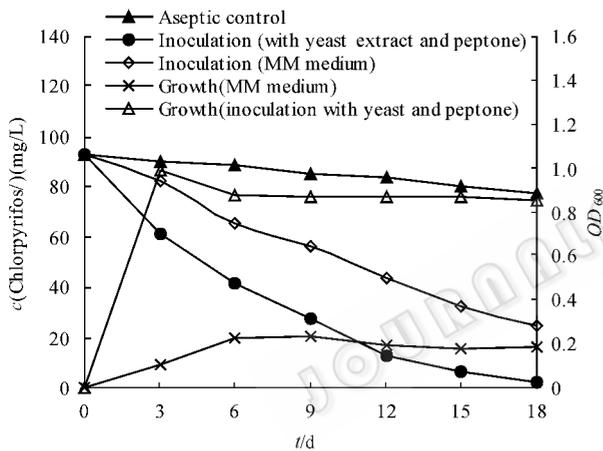


图 2 菌株 DSP3 在 18d 内的生长曲线和毒死蜱降解曲线

Fig. 2 The curves on degrading rate of chlorpyrifos and growth of DSP3 within 18 days

2.6 毒死蜱在不同土壤中的降解情况

图 3 为 DSP3 在不同土壤处理中的毒死蜱降解情况, 可以看出在不同处理中土壤毒死蜱降解速率存在着明显的差异, 在灭菌土壤中, 毒死蜱的降解速率十分缓慢, 20d 只降解了 10% 左右, 而新鲜土壤中的毒死蜱降解速率就明显快于灭菌土壤中, 20d 降解了 20% 左右, 这种现象可以说明微生物在毒死蜱的降解过程中起着重要作用, 因为新鲜土壤比灭菌土壤微生物数量明显占优势。新鲜土壤中的毒死蜱降解速率又慢于添加了 DSP3 菌株的灭菌土壤, 灭菌土壤中添加的 DSP3 浓度为 10^6 个/g 土, 数量明显小于新鲜土壤中土著微生物的数量, 但毒死蜱降解速率却反而快于新鲜土壤, 说明土壤中降解毒死蜱的能力并不是由微生物数量起决定性作用, 而是“质

量”在起作用^[15]。即添加了毒死蜱降解菌 DSP3 的灭菌土壤比新鲜土壤中存在更多的可降解毒死蜱的微生物。最高的降解率出现在添加了 DSP3 的新鲜土, 由这种现象可以判断 DSP3 在土壤中有良好的毒死蜱降解能力, 并且推测 DSP3 和土著微生物间可以形成一种稳定的微生物群落结构^[16, 17]。

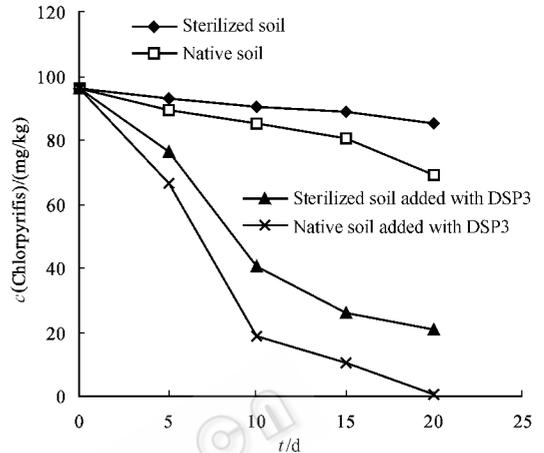


图 3 菌株 DSP3 在土壤不同处理中的毒死蜱降解曲线

Fig. 3 The curve on degrading rate of chlorpyrifos in the different treated soils with strain DSP3

3 讨论

分离菌株 DSP3 能在以毒死蜱为唯一碳源和能源的培养基上生长, 培养基中加入酵母膏和蛋白胨可明显促进菌株 DSP3 对毒死蜱的降解, 且其还能在土壤中有效促进毒死蜱降解, 大大缩短了土壤中毒死蜱的半衰期。

分离菌株的生理生化特性和部分长度的 16S rDNA 的同源性分析表明, 分离菌株最接近于 *Alcaligenes faecalis*, 二者的 16S rDNA 序列相似性为 97% 并且其 (G + C)% 含量为 56.8%, 与 *Alcaligenes faecalis* 模式菌株 ATCC 8750^T DNA-DNA 同源性为 85%, 进一步证实 DSP3 与 *Alcaligenes faecalis* 属于同一个种。

试验结果证明, 微生物在土壤的毒死蜱降解起着很重要作用, 菌株 DSP3 即使在数量为 10^6 个/g, 数量明显小于新鲜土壤中土著微生物数量时仍能有效促进毒死蜱在土壤中的降解, 说明 DSP3 是一种十分高效的毒死蜱降解菌。关于 DSP3 在土壤中如何降解毒死蜱的机制有待进一步研究。本研究为毒死蜱的生物降解提供了新的微生物资源。

致谢 感谢浙江大学分析测试中心为本试验提供了 GC 仪器!

参 考 文 献

- [1] 刘乾开. 新编农药使用手册. 上海:上海科学技术出版社, 1993, 84-86.
- [2] Howard P H. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemical. ed. New York: Lewis Publishers, 1991, 132-144.
- [3] Kulkarni A R, Soppimath K S, Dave A M, *et al.* Solubility study of hazardous Pesticide (chlorpyrifos) by gas chromatography. *Journal of Hazardous Materials* 2000 **80**: 9-13.
- [4] 韩熹莱, 钱传范, 陈馥衡, 等. 中国农业百科全书(农药卷). 北京: 农业出版社, 1993, 50.
- [5] Munnecke D M, Hsieh D P H. Microbial decontamination of parathion and *p*-nitrophenol in aqueous media. *Appl Environ Microbiol*, 1974, **28**: 212-217.
- [6] Al-Mihanna A A, Salama A K, Abdalla M Y. Biodegradation of chlorpyrifos by either single or combined cultures of some soil borne plant pathogenic fungi. *J Environ Sci Health*, 1998, **33**(6): 693-704.
- [7] Robertson L N, Chandle K J, Stickley B D A. Enhanced microbial degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos from the controlled release formulation su SCO on R Blue in soil. *Crop Prot*, 1998, **17**(1): 29-33.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Willims & Wilkins, 1994.
- [10] 周德庆. 微生物实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983.
- [11] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [12] Singh B K, Walker A, Alun J, Morgan W, *et al.* biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(8): 4855-4863.
- [13] Bastos A E R, Cassidy M B, Trevors, J T, *et al.* Introduction of green fluorescent protein gene into phenol-degrading *Alcaligenes faecalis* cells and their monitoring in phenol-contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **56**: 255-260.
- [14] Iwata T, Doi Y, Tanaka T, *et al.* Enzymatic degradation and adsorption on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystals with two types of extracellular PHB depolymerases from *Comamonas* YM 1609 and *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolecules*, 1997, **30**: 5290-5296.
- [15] 刘 新, 尤民生, 廖金英, 等. 土壤中毒死蜱和微生物相互作用的研究. *应用生态学报* 2004, **15**(7): 1174-1176.
- [16] Lynch J M. The Rhizosphere. ed. New York: John Wiley & Sons, 1990, 458.
- [17] Kent A D, Triplett E W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol*, 2002 **56**: 211-236.

Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacteria and its bioremediation application in the soil

YANG Li¹ ZHAO Yu-hua¹ ZHANG Bing-xin² ZHANG Xin²

(¹ College of Life Science, ² College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: A strain DSP3 capable of utilizing chlorpyrifos as the sole carbon and energy sources was isolated. Based on the results of phenotypic features, phylogenetic of 16S rDNA sequence, DNA (G + C) mol% and DNA homology between strain DSP3 and reference strains, the strain DSP3 is identified as *Alcaligenes faecalis*. The degradation rate of chlorpyrifos was at 98.6% (100mg/L) in liquid culture medium within 18 days and nearly 100% (100mg/kg) in soil within 20 days respectively. An addition of strain DSP3 (10⁸ cells/g) to soil resulted in a higher degradation rate than noninoculated soils. The different degrading rate of chlorpyrifos in four types of treated soils suggests that the dissipation is mediated by the activity of the soil microorganisms.

Key words: Chlorpyrifos, Biodegradation, 16S rDNA, *Alcaligenes faecalis*

Foundation item: Key Project of Chinese National Natural Science Foundation(30230250); Key Project of Zhejiang Science and Technology Department (2003C22029)

* Corresponding author. Tel 86-571-86971215, E-mail: yhzhaol1958@yahoo.com.cn

Received date: 04-04-2005