

# 一株能高效降解几种有机磷农药的菌株 JS018 的鉴定

江玉姬<sup>1,2</sup>, 邓优锦<sup>3</sup>, 刘新锐<sup>3</sup>, 谢宝贵<sup>3\*</sup>, 胡方平<sup>2</sup>

(福建农林大学<sup>1</sup> 食品科学学院<sup>2</sup> 植物保护学院<sup>3</sup> 生命科学院 福州 35002)

**摘 要:** 从福建三明农药厂附近的土壤分离、筛选获得一株能够高效降解甲基 1605、辛硫磷等有机磷农药的菌株 JS018。在 LB 培养基中发酵 36h, 对甲基 1605、辛硫磷、三唑磷、敌敌畏的降解率分别为 96%、99%、98.9% 和 69.0%。该菌在 LB 平板培养基上形成的菌落为粉红色, 圆形, 有光泽; 经电镜观察, 为小球状菌, 直径 0.5 $\mu$ m ~ 0.75 $\mu$ m; 革兰氏染色为阴性; 能够在 30 $^{\circ}$ C ~ 38 $^{\circ}$ C 温度范围内和 pH7.0 ~ 9.0 范围内很好的生长, 最适生长温度为 32 $^{\circ}$ C, 最适 pH7.5 ~ 8.0; 在含有 6% NaCl 以上的培养基中, 不能生长。抗生素敏感性实验表明: JS018 菌对安比西林、青霉素、林肯霉素有抗性; 对卡那霉素、四环素、庆大霉素等敏感。碳源发酵实验表明: 该菌株能发酵葡萄糖、海藻糖、松三糖、乙醇; 不能发酵阿拉伯糖、蔗糖、甘露糖、木糖、果糖、半乳糖、麦芽糖、乳糖等; 不能利用柠檬酸盐, 不能液化明胶, 不产生硫化氢, 能还原硝酸盐, 不产生吲哚, 接触酶阳性, 脲酶阳性。根据其形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列分析, 初步鉴定 JS018 为 *Roseomonas* (玫瑰单胞菌属)。

**关键词:** 有机磷农药; 降解; 菌株; 鉴定

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)03-0463-04

有机磷农药在杀虫剂中占据重要的地位, 是世界上生产和使用最多的农药品种, 是控制农作物害虫和病虫媒昆虫的重要手段。然而, 由于有机磷农药的毒性, 随着广泛使用, 也带来严重的副作用, 日益成为重要的化学环境污染物质。其中结构相似的乙基对硫磷、甲基对硫磷、杀螟松等, 虽属于禁用或慎用之列, 但由于其有高效、经济的优势, 至今仍有些地方在生产并应用, 造成生态失衡并直接影响人们的身体健康<sup>[1]</sup>。解决农残问题已成为世人共同关心的问题。本文报道从农药厂附近的土壤分离、筛选到一株具有高效降解甲基 1605、辛硫磷等几种有机磷农药的菌株 JS018 的分离、鉴定, 以期为该菌株的进一步研究与应用提供一些基础理论资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株: JS018 分离自福建三明农药厂附近的土壤。

1.1.2 农药: 50% 甲基 1605 乳液: 福建建瓯农化工有限公司; 25% 啶硫磷: 四川省化学工业研究设计院; 80% 敌敌畏: 山东农药厂; 40% 毒死蜱: 大连凯飞化学有限公司; 40% 辛硫磷: 青岛东生药业有限公司; 20% 三唑磷: 福建福安农药厂。

1.1.3 培养基: ①斜面培养基(LB): 配方见文献[2]; ②分离培养基<sup>[3]</sup>: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 提纯的甲基 1605 0.5mL, 吐温 80 1mL, 琼脂 20g, 自来水 1000mL, pH 7.0 ~ 7.2。农药在培养基冷却到 50 $^{\circ}$ C 左右时加入, 甲基 1605 的提纯采用文献[4]介绍的方法。③种子培养基: 配方见文献[3]; ④

发酵培养基: 在种子培养基中加入一定的农药。

1.1.4 主要试剂和仪器: BD pHoenix100 细菌自动化鉴定仪, 形态观察用 JEM-1010 透射电子显微镜, JSM-530LV 扫描电子显微镜,  $OD_{600}$  值测定用 UV-1600 紫外分光光度计测定, pH 值用 HANNApH211 测定, HY-211 恒温摇床。PCR 试剂由 TaKaRa 提供, 青霉素、链霉素购自北京多元合众科技发展有限公司, 安比西林、林肯霉素、金霉素、卡那霉素、红霉素、新霉素、四环素、庆大霉素均购自华美生物工程公司。

### 1.2 甲基 1605 降解菌的分离

甲基 1605 被微生物降解时, 如果是磷酸键断裂, 则其降解产物是对硝基苯酚, 它是一种黄色的物质, 肉眼可观察。

在本研究中, 将土壤经系列稀释后, 分别涂布在平板分离培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养, 观察菌落周围的颜色, 将能使其周围培养基颜色变黄的单菌落挑选出来进行划线培养纯化, 经筛选, 得到降解能力较强的 1 个菌株, 编号为 JS018。

### 1.3 降解产物的分析

参照文献[5]的方法: JS018 菌液加甲基 1605 至终浓度 50 $\mu$ L/L, 37 $^{\circ}$ C 恒温处理 2h, 离心取上清液, 在 UV-1600 紫外分光光度计 350nm ~ 800nm 波长范围进行扫描。然后将纯的对硝基苯酚配制成相同浓度溶液在同样的条件下进行波长扫描, 通过对比波形来分析降解产物, 同时确定后续研究选用的有效波长。

### 1.4 JS018 菌的形态观察

菌株 JS018 接种于 LB 平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 48h 观察

基金项目: 农业部 948 项目(2003-T17)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-591-83789277, E-mail: xbg@pub2.fz.fj.cn

作者简介: 江玉姬(1965 - ), 女, 福建建瓯市人, 博士研究生, 主要从事微生物学教学和科研。E-mail: jjj1209@163.com

其他作者: 辛 伟<sup>3</sup>

收稿日期: 2005-07-20, 接受日期: 2006-02-13, 修回日期: 2005-12-01

菌落特征,菌株 JS018 接种于 LB 斜面培养基上,37℃ 培养 24h 后制成适当浓度的菌悬液,经固定后在透射电子显微镜、扫描电子显微镜下观察形态<sup>[3]</sup>,测定其大小。

### 1.5 JS018 菌对几种有机磷农药降解能力的测定

发酵培养基中分别加入市售的喹硫磷、敌敌畏、毒死蜱、辛硫磷、甲基 1605、三唑磷配成液体培养基,每一种农药的终浓度均为 300mg/L,250mL 的三角瓶装 100mL 培养基,每种农药重复 3 瓶,接种量为 5%(空白用培养基代替种子液)<sup>[6]</sup>,接种后于 150r/min 摇床 37℃ 下培养 36h,然后将每种农药重复的 3 瓶混合均匀后取样,按 GB/T9722-1988 用气相色谱(型号为 GC7900,检验器为 FPD)测定,并计算 JS018 菌对各种农药的降解率。降解率计算公式如下:

$$\text{降解率} = (\text{对照的浓度} - \text{处理的浓度}) / \text{对照的浓度} \times 100\%$$

### 1.6 生理生化特性测定

将对数生长期菌液按 5% 的接种量接种于液体培养基,然后在 8℃、16℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃ 这 8 个温度梯度下、150min 振荡培养 24h,每个处理 5 个重复,测定  $OD_{600}$  值,以确定其生长的最适温度。为了更准确地确定 JS018 菌生长的最适温度,据上述结果,再设置 30℃、32℃、34℃、36℃、38℃、40℃ 6 个温度梯度下,其它方法同上。用 1N HCL 或 1N NaOH 调整发酵培养基的 pH,使培养基的初始 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,每个处理 5 个重复,接种量为 5% 接种后在 32℃ 下 150r/min 振荡培养 24h,测定  $OD_{600}$  值,以确定其生长的最适酸碱度。类似温度根据上一步结果,pH 再设置 7.0、7.4、7.8、8.2、8.4、8.6、9.0 进一步试验,革兰氏染色反应,接触酶、氧化酶、葡萄糖氧化发酵试验、蛋白质水解、尿酶、明胶液化、MR、VP 等生理生化试验参照文献 [7] 的方法;抗生素敏感性试验参考 Kirby-Bauer 实验方法<sup>[8]</sup>,以升汞为 CK。碳源发酵试验参考文献 [7] 和 [9] 的方法进行。

### 1.7 16S rDNA 序列分析

以基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA,扩增引物选用微生物的通用 PCR 引物进行扩增<sup>[10]</sup>,其序列为:PF:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3';PR:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCG-3'。引物合成、PCR 试剂及 PCR 产物测序均由 TaKaRa(大连)公司提供服务。

### 1.8 细菌自动鉴定系统鉴定

用 BD pHoenix100 细菌自动化鉴定仪鉴定。

## 2 结果和分析

### 2.1 农药降解菌的分离

从分离培养基平板中挑取周围呈黄色的菌落,经过筛选获得一株能使培养基变黄的菌株 JS018。

### 2.2 降解产物的鉴定

JS018 降解甲基 1605 后的产物和纯的对硝基苯酚液在 350~800nm 波长下扫描。对比扫描结果可以看出:它们的波形和峰值所在的波长基本一致,因此可以初步判定降解酶作用甲基 1605 后的产物为对硝基苯酚,有效波长为 405nm,这与相关参考文献报道的一致<sup>[11]</sup>。

### 2.3 JS018 菌的形态观察

JS018 菌落小,湿润,微凸起,边缘整齐,菌落颜色为粉红色。菌体很小,直径在 0.5~0.75 $\mu$ m 之间,球状, $G^-$ ,边缘有菌毛,无鞭毛,产生荚膜。透射电子显微镜、扫描电子显微镜下观察结果如图 1。

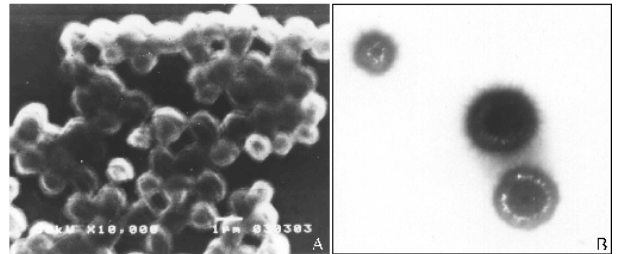


图 1 JS018 菌的电子显微镜照片

Fig. 1 Electron micrographs of strain JS018. A: Scanning electron micrograph (10000 $\times$ ); B: Transmission electron micrographs of strain JS018 (30000 $\times$ ).

### 2.4 JS018 菌抗药性测定

测定了 JS018 菌对 12 种抗生素的敏感性,实验结果表明:JS018 菌对安比西林、林肯霉素、青霉素有抗性,对金霉素、卡那霉素、红霉素、新霉素、链霉素、四环素、庆大霉素敏感。

### 2.5 JS018 菌对几种有机磷农药降解能力的测定

JS018 菌对六种有机磷农药降解能力的测定结果见表 1。实验结果表明,JS018 菌对辛硫磷、甲基 1605、三唑磷的降解率非常高,对喹硫磷、敌敌畏的降解率也很高,而对毒死蜱几乎不降解。从这 6 种有机磷农药的化学结构及甲基 1605 的降解产物来分析,JS018 主要裂解磷酸酯键,而且该键的极性越弱,降解能力越强。

表 1 JS018 对几种有机磷农药的降解率

Table 1 The degradation rates of several kinds of organophosphate pesticides degraded by strain JS018

Pesticide	Test	$\alpha$ (pesticide) ( $\mu$ g/L)	Degradation rate/%
quinalphos	Treatment	71.0	49.3
	control	140.0	
dichlorvos	Treatment	31.0	69.0
	control	100.0	
chlorpyrifos	Treatment	81.0	17.3
	control	98.0	
phoxin	Treatment	< 1.0	> 99.0
	Control	100.0	
Parathion-methyl	Treatment	< 1.0	> 96.0
	control	28.0	
hostathion	Treatment	2.7	98.9
	control	240.0	

### 2.6 生理生化特性

JS018 能够在 30℃~38℃ 范围内很好的生长,其生长最适温度为 32℃,能够在 pH7.0~9.0 范围内很好地生长,最适生长 pH 为 7.5~8.0。该菌属于需氧菌,能弱发酵葡萄糖,发酵羧糖、海藻糖、松三糖、乙醇,不能发酵阿拉伯糖、蔗糖、甘露糖、木糖、果糖、纤维二糖、麦芽糖、半乳糖、乳糖、山

梨醇、葡萄糖、赤丝草醇、水杨苷,不能利用柠檬酸盐,不能液化明胶,不产生硫化氢,能还原硝酸盐,不产生吲哚,MR 阴性,VP 阴性,氧化酶阴性,接触酶阳性,脲酶阳性,不吸收 UV 长波光,在 6% NaCl 培养基中不生长。

### 2.7 16SrDNA 序列分析

以 JS018 的 DNA 为模板进行 PCR,获得一条 1.5kb 左右的特异性片段,用 TaKaRa PCR Fragment Recovery Kit 切胶回收,溶于 10 $\mu$ L 的 dH<sub>2</sub>O 中。将切胶回收后的 PCR 产物使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的 Solution I 和载体 pMD18-T 连接后,热转化到感受态细胞 *E. coli* JM109 中,涂布平板过夜培养菌体,挑选抗性单菌落委托 TaKaRa(大连)公司测序。测序结果 JS018 的 16S rDNA 全序列长为 1560bp(在 GenBank 核酸序列数据库中的注册号为 DQ010108),将该序列提交 GenBank 进行 Blast,下载相似性较高的相关序列 27 条,采用 DNAMAN 进行同源性分析,分析结果(图 2)表明,JS018 菌与

*Roseomonas genomospecies* 4 的同源性最高,达到 99%。

*Roseomonas* 属在《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版上还没有收录<sup>[12]</sup>。据 Rihis 等<sup>[13]</sup>的研究,*Roseomonas genomospecies* 有 6 个基因种,它们主要的共同特征如下:G<sup>-</sup>,主要为球状,偶尔为杆状,成双或短链状,菌落微小,淡粉色,有光泽;吲哚氧化酶阳性(在 VAMC 试验。而在 CDC 试验时,有些是阴性);过氧化氢酶阳性,脲酶阳性,不吸收 UV 长波光,不产生 H<sub>2</sub>S,不液化明胶,不发酵葡萄糖,所有菌株都没有氧化半乳糖醇、乳糖、麦芽糖、甲醇、棉籽糖、L-鼠李糖、蔗糖的能力,不产生苯丙氨酸脱氨酶作用,不同化乙酰胺,用 Moller 的方法,不产生 L-精氨酸水解酶、L-赖氨酸脱羧酶和 L-鸟氨酸脱羧酶;在 6% NaCl 培养基中不生长,大多菌株对青霉素、呱拉西林、磺苄青霉素有抗性,对庆大霉素、妥布霉素、四环素、亚胺培南、丁胺卡那霉素诺氟沙星敏感。其它的生理生化反应,6 种类型有所差别。

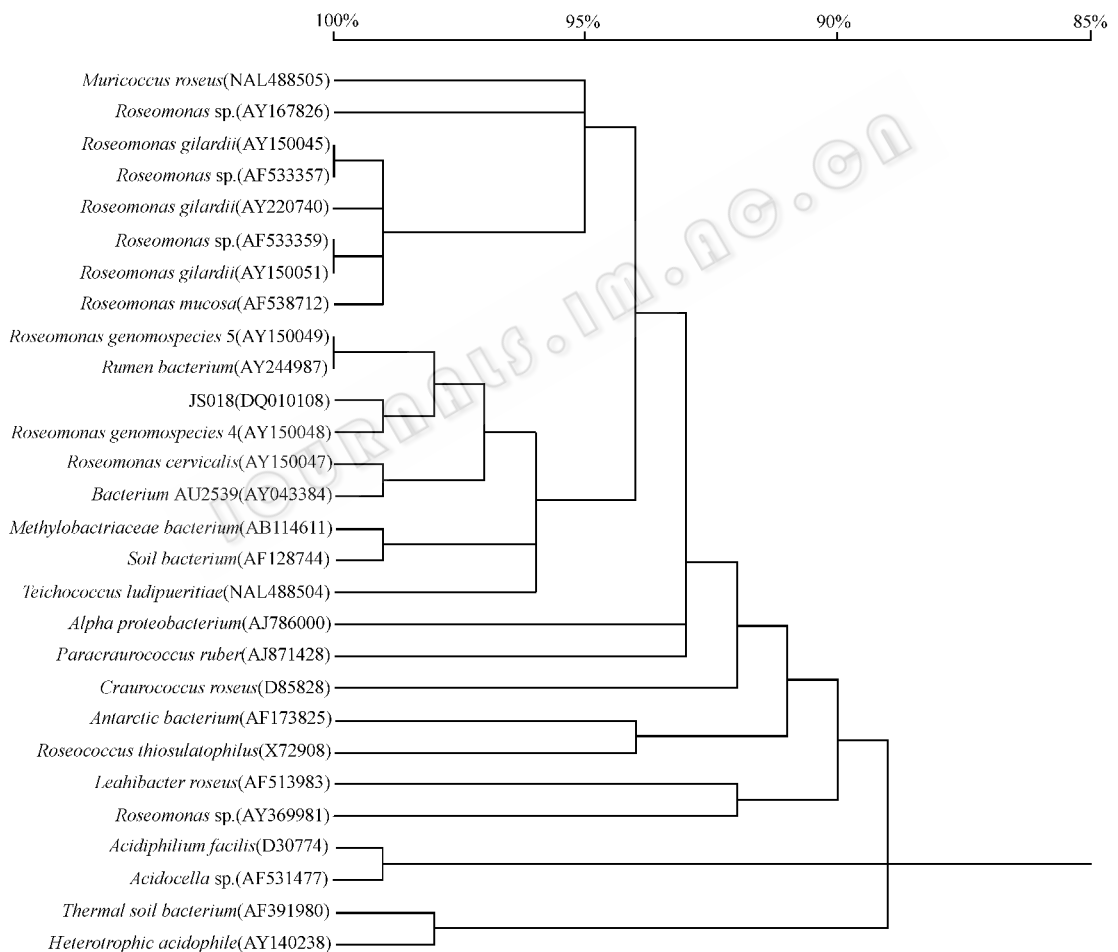


图 2 以 16S rDNA 同源性为基础构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 1560bp-fragment of 16S rDNA sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

### 2.8 细菌自动鉴定仪鉴定

BD pHoenix100 细菌自动鉴定仪鉴定的生理生化结果如下:精氨酸-精氨酸-AMC,甘氨酸-脯氨酸-AMC,戊二酰-甘氨酸-精氨酸-AMC,L-焦谷氨酸-AMC,赖氨酸-丙氨酸-AMC,甲基巴豆酸 AMU-N-乙酰-BD 氨基葡萄糖苷,PNP-BD-糖苷, $\beta$ -葡二糖,山梨醇,L-阿拉伯糖,N-乙酰-2-氨基半乳糖,鸟氨酸,D-半

乳糖,甘氨酸-AMC,L-苯丙氨酸-AMC,L-色氨酸-AMC,乙酸,D-甘露醇,丙二酸,PNP-磷酸盐,葡萄糖,蔗糖,L-鼠李糖,Maltulose,D-葡糖酸,L-精氨酸-AMC,L-亮氨酸-AMC,L-脯氨酸-AMC,核糖醇,枸橼酸, $\beta$ -阿洛糖,D-果糖,半乳糖醛酸,甲基-B-葡糖苷,七叶苷,D-密二糖均为阴性。 $\alpha$ -酮戊二酸,L-谷氨酸-AMC, $\gamma$ -谷氨酰-NA,尿素,粘菌素,多粘菌素,R.I.脯

氨酸-NA 均为阳性。自动鉴定仪无法鉴定出该菌株,一定程度上说明 JS018 菌不是一个常见的菌株。

### 3 结论

(1) JS018 菌经试验不能在以农药为唯一碳源的培养基中生长,必需在其它碳源共同存在的情况下才能生长和分解有机磷农药,故 JS018 可能是以共代谢方式降解农药或生长过程中需环境提供生长因子。

(2) 根据 16S rDNA 序列同源性分析,结合形态特征、生理生化特征、抗生素敏感性等特征,细菌自动鉴定系统的生化指标 JS018 属于 *Roseomonas*。从 16S rDNA 序列同源性分析,JS018 与 *Roseomonas genomospecies* 4 同源性最高,而从其它生理生化特征分析,尤其是对七叶苷水解、甘露糖氧化、葡萄糖发酵等方面与 *Roseomonas* 属的 6 个基因种有差别,由于目前无法获得模式菌株进一步进行相关实验,故 JS018 菌是否为 *Roseomonas* 属的一个新的种或变种,有待进一步实验。*Roseomonas* 属在《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版上还没有收录,目前尚未见合格化,这也给 JS018 菌株的鉴定带来了一定的困难。

(3) JS018 菌对几种有机磷农药降解率很高,且国内外尚未报道过 *Roseomonas* 属中有降解有机磷农药的种,该菌具有开发价值,值得进一步研究。

### 参 考 文 献

[ 1 ] 伍宇丰,梁果义,邓敏捷.有机磷农药降解酶及其基因工程研究进展.生物技术通报,2003(5):9-12.

- [ 2 ] 林稚兰,黄秀梨,主编.现代微生物学与实验技术.北京:科学出版社,2000.
- [ 3 ] 沈萍,范秀容,李广.微生物学实验.北京:高等教育出版社,2000.
- [ 4 ] 农业部农药检定所.新编农药手册.北京:农业出版社,1989.
- [ 5 ] 王保军,刘志培,杨惠芳.单甲脒农药的微生物降解代谢研究.环境科学学报,1998,18(3):296-302.
- [ 6 ] 王永杰,李顺鹏,沈标,等.有机磷农药广谱降解菌的分离及其生理特性研究.南京农业大学学报,1999,2:42-45.
- [ 7 ] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001.
- [ 8 ] Madigan MT, Martink JM, Paker J. 微生物生物学.杨文博译.第八版.北京:科学出版社,2001.
- [ 9 ] Dhanvantar BN, Dye DW, Young JM. *Pseudomonas pomi* Cole 1959 is a later subjective synonym of *Acetobacter pasteurianus* (Hansen 1879) Beijerinck 1898, and *Pseudomonas melophthora* Allen and Riker 1932 is a nomen dubium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1978, 28: 532-537.
- [ 10 ] 何琳燕,殷永娴,黄为一.一株硅酸盐细菌的鉴定及其系统发育分析.微生物学报,2003,43(2):162-163.
- [ 11 ] 蒋胜高,许斌,程梅,等.实测摩尔吸光度在酶活性测定质量控制中的应用.临床检验杂志,2000,18(6):342-344.
- [ 12 ] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Willams and Wilkin, 1994.
- [ 13 ] Rihs JD, Brenner DJ, Weaver E, et al. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(12): 3275-3283.

## Isolation and identification of a bacterial strain JS018 capable of degrading several kinds of organophosphate pesticides

JIANG Yu-ji<sup>1,2</sup>, DENG You-jin<sup>3</sup>, LIU Xin-ru<sup>3</sup>, XIE Bao-gui<sup>3\*</sup>, HU Fang-ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Food Science and Technology, <sup>2</sup> College of Plant Protection, <sup>3</sup> College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Organophosphate pesticides are used widely all over the world and play an important role in plant pest control. However these pesticides are considered as pollutants and harmful to human health. To search for microorganisms that can degrade organophosphate pesticides with high efficiency, a bacterial strain, coded as JS018, was isolated and screened from the soil in the vicinity of Shanming Pesticides Factory, Shanming, Fujian. Laboratory tests showed that the bacterium could degrade several kinds of organophosphate pesticides, such as Parathion-methyl and phoxin. The strain's degrading rates on phoxin, Parathion-methyl, hostathion and dichlorvos in LB liquid fermentation medium for 36 h were 99%, 96%, 80.4% and 69.0% respectively. The bacterial colonies on LB plate appeared shiny and pale-pink in color. The bacteria were Gram-negative coccoids, 0.5 ~ 0.7 μm in diameter. They grew well at 30 ~ 38 °C and pH 7.0 ~ 9.0. The optimal temperature and pH for cell growth was 32 °C and pH 7.5 ~ 8.0, respectively. They did not grow in medium containing 6% or more NaCl.

The antibiotic susceptibility tests showed that the strain was resistant to ampicillin, penicillin and lincomycin. It was sensitive to kanamycin, tetracycline and gentamicin. Laboratory tests also showed that the strain could ferment D-glucose, trehalose, melezitose and ethanol. It was negative in the production of indole and hydrogen sulfide. It could not liquefy gelatin, utilize citrate, nor ferment L-arabinose, sucrose, D-mannitol, D-xylose, fructose, D-galactose, maltose or lactose. The catalase, urease and nitrate reduction were positive. Based on its morphological, physiological and biochemical properties as well as the 16S rDNA sequence analysis result, the strain was tentatively identified as *Roseomonas* sp.

**Keywords:** Organophosphate pesticides; Degradation; Strain; Identification

Foundation item: The "948" Project of Chinese Agriculture Ministry (2003-T17)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-591-83789277; E-mail: xbg@pub2.fz.fj.cn

Other author: XIN Wei<sup>3</sup>

Received: 20 July 2005 / Accepted: 13 February 2006 / Revised: 1 December 2005 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn