

甲基对硫磷彻底降解菌 X4 的分离、降解性及系统发育研究

解秀平², 闫艳春^{1, 2*}, 刘萍萍²

(¹ 中国农业科学院研究生院 北京 100081) (² 山东农业大学生命科学学院 作物生物学国家重点实验室 泰安 271018)

摘 要: 从生产甲基对硫磷的山东华阳农药厂污水曝气池中, 分离到一株能以甲基对硫磷及其降解中间产物对硝基苯酚为唯一碳源生长, 且能够将其彻底降解为 CO₂ 和 H₂O 的细菌 X4, 经鉴定, 为节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)。用气相色谱法和分光光度法对 X4 的降解性能分析表明, X4 在 7h 内对 50mg/L 甲基对硫磷、50mg/L 对硝基苯酚的降解率为 99% 以上, 对其它有机磷农药也有良好的降解效果, 测定条件为: pH 值 7, 温度 30℃, 接种量 30%。并构建了系统发育树以了解其它菌株与 X4 之间的亲缘关系。

关键词: 甲基对硫磷; 对硝基苯酚; 节杆菌; 降解; 系统发育树

中图分类号: Q939.96 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)06-0979-05

甲基对硫磷 (methylparathion, 以下简称 MP) 又称甲基 1605, 是一类目前广泛使用的高毒有机磷农药, 其主要中间代谢产物为对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol, 以下简称 PNP), 易溶于水, 具有中等毒性。由于二者都具有苯环结构, 残留期很长, 给人类健康带来潜在的威胁。许多发达国家已经禁用或限制 MP, 但由于该类农药杀虫效果好, 见效快且成本低廉, 我国目前仍在大量生产、使用, 但常规的化学方法降解会形成二次污染, 由此引发的环境问题日益突出^[1]。PNP 是重要的化工原料, 被广泛地用作医药、染料、农药、塑料等的合成前体, 是一类重要的环境污染物质。目前发现的 MP 和 PNP 降解菌主要有假单胞菌、黄杆菌、产碱菌等, 而且大多只能部分降解 MP 和 PNP, 国内外尚未发现节杆菌对 MP 及其降解中间产物 PNP 的降解。本实验所分离到的 MP 彻底降解菌 X4 可实现对 MP 和 PNP 的同步高效降解, 将二者彻底降解成小分子物质。MP 彻底降解菌 X4 的研究对于有机磷和硝基芳香族化合物污染的生物修复提供了优良的菌株资源, 有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品和培养基: 样品即筛选菌株的污水取自山东华阳农药厂污水曝气池。基础培养基、富集培养基和普通培养基均参考文献 [2] 配制。

1.1.2 主要试剂和仪器: MP 标准品 (含量 99%, 购自成都化学试剂厂); MP 原药 (含量 80%, 购自华阳

农药厂); PNP (购自天津市天新精细化工开发中心); PCR 扩增试剂盒和 DNAMarker (TaKaRa 公司); 细菌通用引物 (上海英骏生物技术有限公司合成); GC-2010 型气相色谱仪 (日本岛津公司); 752 紫外光栅分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); JEM-1200EX 透射电镜 (日本电子公司); Fanon GIS2010 凝胶成相系统 (上海天能科技有限公司)。

1.2 细菌的富集培养与分离纯化

取华阳农药厂污水曝气池中的污水悬浊液离心, 称取 3g 污泥置于 100mL 富集培养基中, 添加 100mg/L 的 MP 于 30℃、130r/min 摇床培养。以后每周转接一次, 以 15% 的接种量接入新鲜培养基中, 每次接种需提高 MP 浓度, 以 100mg/L 的梯度递增, 直到浓度增加到 500mg/L。然后用基础培养基代替富集培养基, 每隔 1~2 周转接一次, MP 的浓度保持 500mg/L, 如此驯化 1 个月, 最后用平板涂布法在普通培养基上进行细菌分离纯化^[3]。

1.3 细菌的鉴定

将所分离菌株按照参考文献 [4] 进行鉴定。生长曲线的测定是将菌株 X4 在牛肉膏蛋白胨平板上的单菌落分别接入牛肉膏蛋白胨培养基、含 500mg/L MP 和 300mg/L PNP 的基础培养基中, 培养 24h 后分别测其 OD₆₀₀ 的值。

1.4 菌株系统发育树的构建

菌株 X4 的 16S rDNA PCR 扩增的通用引物^[5]: F primer: 5'-AGAGTTTGCATCCTGGCTCAG-3', R primer: 5'-GGCTACCTTGTTACGACT-3'。用通用引物扩增出

* 通讯作者。Tel: 86-10-68919685; E-mail: yanyan@sdau.edu.cn; yanyanchun@caus.net.cn

作者简介: 解秀平 (1978 -) 女, 山东省人, 硕士研究生, 主要从事分子环境微生物学方面的研究。E-mail: xiexiuping-2005@126.com

收稿日期: 2005-12-12; 接受日期: 2006-02-20; 修回日期: 2006-02-27

X4 16S rDNA 序列,用 pGEM Teasy vectors(Progema)连接,转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α ,蓝白斑筛选,选出呈现白色的阳性克隆,菌落 PCR 检测目的条带,将含有插入片段的产物用 T7 引物测序,序列测定由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)完成。为了研究 X4 与其它菌株之间的遗传关系,为进一步的研究打基础,从 GenBank 上搜索了 13 株与 X4 同源性较高的菌株的 16S rDNA 序列^[6~13],并用 DNAMAN4.0 和 MEGA3.0 软件构建了 X4 与这 13 株菌的系统发育分析树^[14~16]。

1.5 菌株降解性能的测定

1.5.1 气相色谱法测定 X4 对 MP 的降解率

:参照参考文献 [17] 进行,对照的标样浓度为 50mg/L,MP 在本试验条件下的出峰时间为 5.787min。

让菌株 X4 在 500mg/L MP 为唯一碳源的基础培养基平板上生长,从其水解圈的大小初步判定 X4 的降解能力。为了测定 X4 对 MP 的降解能力,采用了气相色谱法,测定底物减少和产物生成。将在牛肉膏蛋白胨培养基上培养至对数期 (OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8) 的 X4 离心收集,以 30% 接种量转接至含有 50mg/L MP 的 pH 值为 7 的基础培养基上,30 $^{\circ}$ C 振荡培养,定时取样,以加 MP 但不接菌的基础培养基为对照。样品处理如下: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 3min,静置 1h 后去上清,加入无水硫酸钠脱水,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱,一并检测。气相色谱条件:载气,99.99% 的高纯 N_2 ,压力为 73.4kpa; 氦气流量,80.0mL/min; 空气流量,120mL/min; 色谱柱型号,125-503j db-5,长度,30.0m,内径 0.53mm,膜厚,1.00 μ m; 检测器,火焰光度检测器,温度,250.0 $^{\circ}$ C; 柱温,190 $^{\circ}$ C; 进样口温度,210 $^{\circ}$ C; 直接法进样,进样量 2 μ L。

1.5.2 菌株 X4 接种量对降解能力的影响

:将在牛肉膏蛋白胨培养基上培养至对数期 (OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8) 的 X4 离心收集,转接至含有 50mg/L MP 或 50mg/L PNP 的 pH 值为 7 的基础培养基上,分别按体积比 5%、10%、15%、20%、30%、40% 接种量接种,30 $^{\circ}$ C 振荡培养,定时取样,在 273nm 处测定 MP 的降解,在 405nm 处测定 PNP 的降解,以加农药但不接菌的基础培养基为对照,分光光度计测定^[3]。

1.5.3 pH 值、温度、MP 或 PNP 浓度对 X4 降解能力的影响

:将在牛肉膏蛋白胨培养基上培养至对数期 (OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8) 的 X4 离心收集,按接种量为 30% 转接至含有 50mg/L 和 100mg/L MP 或 50mg/L 和

100mg/L PNP 的 pH 值为 6、7、8、9、10 的基础培养基上,20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 振荡培养,定时取样,以加农药但不接菌的基础培养基为对照,分光光度计测定。

1.5.4 菌株 X4 对其它有机磷农药的降解研究

:将在牛肉膏蛋白胨培养基上培养至对数期 (OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8) 的 X4 离心收集,按接种量为 30% 分别转接至含有 50mg/L 甲胺磷(Methamidophos)、毒死蜱(Chlorpyrifos)、克百威(Carbofuran)的 pH 值为 7 的基础培养基上,在 30 $^{\circ}$ C 摇床上振荡培养,定时取样,以加农药但不接菌的基础培养基为对照,分光光度计测定。

1.5.5 菌株 X4 对 MP、PNP 及其它有机磷农药的最大耐受浓度实验

:将在牛肉膏蛋白胨上生长至对数期 (OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8) 的 X4,按 30% 接种量转接入含有一定浓度的农药的 pH 值为 7 的基础培养基中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养,培养 24h 后离心收集菌体,测其 OD_{600} ,当 OD_{600} 增加时,继续增加农药的浓度培养菌株,当 OD_{600} 不再增加时,该浓度即为最大耐受浓度。

2 结果

2.1 菌株 X4 的分离

将用驯化液涂布得到的平板挑取单菌落,进行纯化划线。分离纯化得到 56 株菌,从中选出一株命名为 X4, X4 在普通培养基上 36h 后由大小均一的球状细胞组成,36h 以前是杆状。且培养时间越长,菌体越短,在培养过程中从长杆菌逐渐变短,直到变为球菌,具有明显的球杆变化周期。如图 1 所示,在不同的培养时间内 X4 呈现不同的形状。杆菌的排列彼此按一定角度呈 'V' 或 'Y' 型,有鞭毛可以运动。

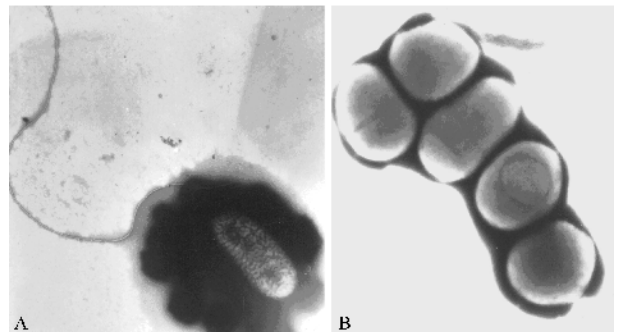


图 1 菌株 X4 透射电镜图片(20000 \times)

Fig.1 Transmission electron micrograph photographs of X4(20000 \times).

A : Incubated for 24h ; B : Incubated for more than 36h.

2.2 菌株 X4 的鉴定

2.2.1 生理生化特征

经生理生化测定,菌株 X4 不

产生芽孢,革兰氏染色阳性,液化明胶,不水解淀粉,还原硝酸盐为亚硝酸盐,氧化葡萄糖、乳糖、果糖、半乳糖、蔗糖、木糖、乙醇,不氧化山梨醇、甘露醇。脲酶实验阳性,产氨实验阳性,不产生吲哚,产生 H_2S ,无卵磷脂酶活性,酸凝牛奶。生长温度范围 $20 \sim 37^\circ C$,在 pH 值为 $6 \sim 10$ 的范围内可以生长,最适生长 pH 值为 $7 \sim 8$ 之间。生理生化水平上初步将 X4 归类为节杆菌属。

2.2.2 菌株 X4 的生长曲线的测定如图 2 所示:从图上看,X4 菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上生长良好,在基础培养基加 MP 和 PNP 时基本不生长。

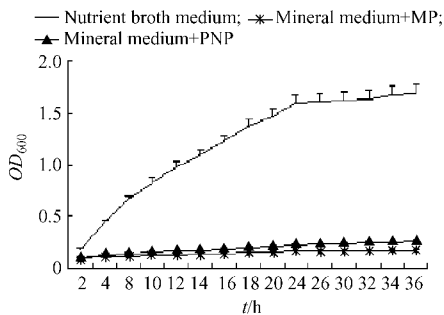


图 2 X4 生长曲线

Fig.2 Upgrowth curve of X4.

2.2.3 菌株 X4 的系统发育分析:利用 PCR 的方法获得的菌株 X4 16S rDNA 序列有 1487 个碱基,在 GenBank 中的登记注册号为 DQ202320,用 Blast 软件与 GenBank 中已注册的 16S rDNA 序列进行比较,发现与 X4 序列同源性最高的绝大多数为节杆菌,选

取部分相似序列用 NJ 法构建系统发育树(图 3)。X4 在系统发育树上与序列号为 DQ223655, DQ191322, DQ201188 的假单胞菌聚为一族。

2.3 菌株 X4 降解性能的研究

2.3.1 气相色谱法测定 X4 对 MP 的降解率:菌株 X4 在 $500mg/L$ MP 为唯一碳源的基础培养基平板上生长良好,能产生较大水解圈,初步判定 X4 有良好的降解能力。

气相色谱测定结果如图 4 所示。因 X4 可以将 MP 彻底降解为小分子物质,因此根据 MP 浓度的减少计算降解率。降解率 = (初始吸收峰面积 - 终止作用时的吸收峰面积) ÷ 初始吸收峰面积^[18],根据所测样品与对照同一出峰时间出现的峰面积大小,测得 4h 降解率为 60%,7h 降解率为 99.9%。

2.3.2 菌株 X4 接种量对降解能力的影响:当接种量为 30% 时,X4 的降解效果最好,7h 内降解率就达 99% 以上,当接种量超过 30% 时,随接种量增加降解效果却不再增加。

2.3.3 pH 值、温度、MP 或 PNP 浓度对 X4 降解能力的影响(图 5):当 pH 为 7、温度为 $30^\circ C$ 、MP 浓度为 $50mg/L$ 、PNP 为 $50mg/L$ 时,X4 的降解效果最好,7h 内降解率达 99% 以上。

2.3.4 菌株 X4 对其它有机磷农药的降解研究:20h 内,X4 对甲胺磷的降解率为 64%,对毒死蜱的降解率为 54%,对克百威的降解率为 68%。从实验结果可知 X4 对 MP、PNP、甲胺磷、毒死蜱、克百威均有良好

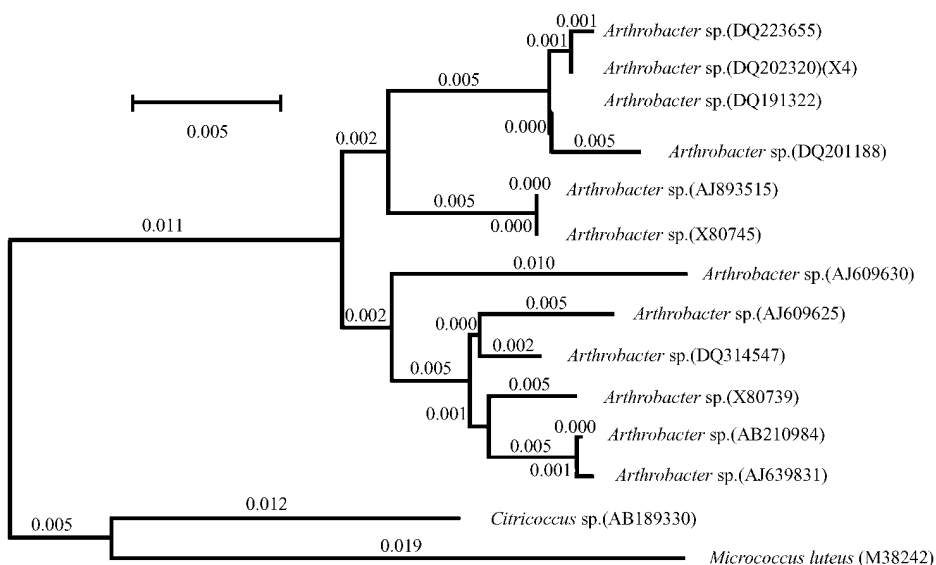


图 3 菌株 X4 的分子进化遗传分析

Fig.3 Genetical analysis of strain X4. The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap, and in parentheses after each bacterial name are 16S rDNA accession number in GenBank. Bar, 0.5% sequence divergence.

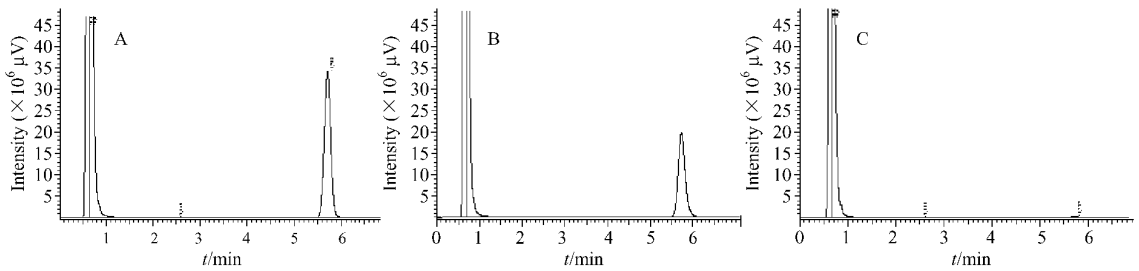


图4 X4降解MP的气相色谱图

Fig.4 Degradation to MP for X4 of GC. A : The apex area of control is 344855207 (MP 50mg/L); B : After 4 h is 136705524 (MP 16.66mg/L); C : 7 h later is 4251051 (MP 0.049mg/L).

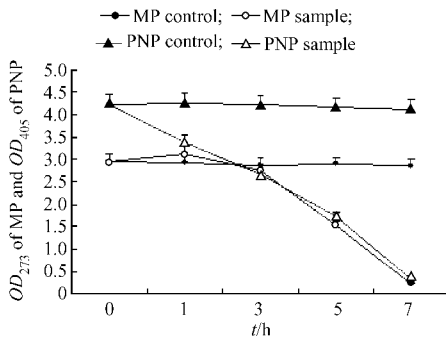


图5 X4在最适pH值、温度、MP或PNP浓度下的降解曲线

Fig.5 Degradation curve of X4 at optimum pH, temperature and concentration of MP and PNP.

的降解作用。

2.3.5 菌株 X4 对 MP、PNP 及其它有机磷农药的最大耐受浓度实验 :菌株 X4 对 MP 的最大耐受浓度是 1700mg/L 对 PNP 的最大耐受浓度为 500mg/L,对甲胺磷的最大耐受浓度为 500mg/L,对毒死蜱和克百威的最大耐受浓度为 300mg/L。

3 讨论

经形态、生理生化及 16S rDNA 分析,将 X4 鉴定为简单节杆菌,该菌株在生长过程中具有明显的球杆变化,培养初期为长杆菌,随着时间增加,逐渐变短,老龄培养物全部为球形。所有的生理生化性质均与节杆菌的相吻合。经过对 X4 降解性能的研究发现:X4 对 MP 和 PNP 有良好的降解效果,经检测 7h 内对 MP、PNP 的降解率为 99.9%;使 X4 达到最佳降解率的接种量为 30%,pH 值为 7,温度为 30℃;X4 对 MP、PNP、甲胺磷、毒死蜱、克百威的最大耐受浓度分别为 1700mg/L、500mg/L、500mg/L、300mg/L、300mg/L。由此可知,X4 是一株对有机磷农药具有强降解能力的菌株。X4 可以降解 MP,并且可以同步降解其反应的中间产物 PNP,在培养过程中几乎检测不

到 PNP 的存在,类似菌株国内外尚未见报道。

MP 和 PNP 是重要的环境污染物,治理与监测此类化合物对保证人类健康和环境清洁具有重要意义,例如松花江硝基酚污染便需要 X4 一类的高效降解菌株。利用生物修复技术处理此类化合物造成的污染具有效率高成本低的优势^[19,20]。对该类菌株进行鉴定,对其降解性能及其与其它降解农药菌株的系统发育研究,对开发新的菌株资源具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 石成春,郭养浩.环境微生物降解有机磷农药研究进展.上海环境科学,2003,22(13):863-867.
- [2] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用.第一版.北京:中国农业出版社,1995.
- [3] 崔中利,张瑞福,何健,等.对硝基苯酚降解菌 P3 的分离、降解特性及基因工程菌的构建.微生物学报,2002,42(1):19-26.
- [4] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinate Bacteriology. 8th ed. William and Wilkins: Baltimore, 1984.
- [5] Catherine MH, Ashok M, Chen W. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4):2026-2030.
- [6] Liu H, Zhang JJ, Su J, et al. Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and p-nitrophenol in Pseudomonas sp. strain WBC-3. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 334:1107-1114.
- [7] 刘宪华,冯忻,宋文华.假单胞菌 AEBL3 对呋喃丹污染土壤的生物修复.南开大学学报(自然科学版),2003,36(4):63-67.
- [8] 李培军,许华夏,张春桂.污染土壤中苯并(a)芘的微生物降解.环境污染治理技术与设备,2001,2(2):37-40.
- [9] 许育新,戴清华,李晓慧.氟氯菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究.农业环境科学学报,2004,23(5):958-963.
- [10] 邱珊莲,崔中利,王英.甲基对硫磷降解菌 DLLBR 在青菜及根际土壤中的定殖研究.土壤,2005,37(1):100-104.

- [11] 周军英,林玉锁,徐亦刚.巨大芽孢杆菌 LY-4 对土壤中杀虫单农药的降解.中国环境科学 2000,20(6):511-514.
- [12] 周军英,林玉锁,徐亦刚,等.邻单胞菌 DLL-1 对土壤中甲基对硫磷的降解.中国环境科学 2002,22(3):231-234.
- [13] 李 荷,梁卫驱,吴小映.一株新耐冷菌 SA-8 降解有机磷农药的研究.中山大学学报(自然科学版),2004,43(3):131-132.
- [14] 东秀珠,沈德龙,辛玉华.16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的亲缘关系.生物多样性 2000,8(2):146-152.
- [15] Liu Hong, Zhang JunJie, Jun Su, et al. Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and ρ -nitrophenol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 334:1107-1114.
- [16] Cui Z, Li S, Fu G. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(10):4922-4925.
- [17] 闫艳春,姚良同,宋晓妍,等.工程菌及其固定化细胞对有机磷农药的降解.中国环境科学 2001,21(5):412-416.
- [18] 周德平,夏 颖.三株菲降解细菌的分离鉴定及降解特性的研究.环境科学学报,2003,23(1):124-128.
- [19] 刘 智,洪 青,张晓舟,等.甲基对硫磷降解菌 DLL-E4 降解对-硝基苯酚特性.中国环境科学 2003,23(4):435-439.
- [20] 刘 巍.松花江有毒有机物污染特征与行为研究.水电站设计 2002,18(4):46-49.

Isolation, degradation and phylogenetic analysis of methylparathion degradative strain X4

XIE Xiu-ping², YAN Yan-chun^{1,2*}, LIU Ping-ping²

(¹ Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(² State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Science of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract :The strain X4 was isolated from polluted wastes of Shandong Huayang Pesticide Chemical Industry Group Co., Ltd. It was cultured with methylparathion and ρ -nitrophenol, a kind of intermediate during methylparathion degrading process, and used them as the sole carbon source and decomposed them into carbon dioxide and wastes. It is identified as *Arthrobacter* sp. by means of a series of tests and it has visible sphere-pole variable cycle. It is bacilliform when it is cultured in nutrient broth medium within 36h, then it become short gradually, and ultimately become uniform sphericity. Bacilliform strains array in "V" or "Y" shape. It has flagellum, moveable, no sporangium, oxidates glucose. The degradative ability to pesticides of X4 was determined by gas chromatography (GC) and spectrophotometer, and the degradative rate for methylparathion at 50mg/L and ρ -nitrophenol at 50mg/L is above 99% within 7h. Moreover, X4 also can degrade other organophosphate pesticides quickly. The degradative rate for methamidophos, chlorpyrifos and carbofuran is 64%, 54% and 68%, respectively. The maximal tolerant concentration of X4 to MP, PNP, methamidophos, chlorpyrifos and carbofuran is 1700mg/L, 500mg/L, 500mg/L, 300mg/L and 300mg/L, respectively. All of the above tests were determined at 30°C, pH7, with an inoculum of 30%. At the same time, 16S rRNA sequence of X4 is obtained, and the similar sequences to X4 were selected from GenBank by BLAST program and the phylogenetic tree with these sequences was constructed, the relationship between X4 and referenced strains was worked out. At present, methylparathion and ρ -nitrophenol degradative strains reported are mostly *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium*, *Alcaligenes* sp. and so on. Furthermore, those strains can only degrade MP and PNP partially. It is reported firstly here that *Arthrobacter* sp. can degrade both MP and PNP to small molecule synchronously and effectively. Finally, the strain X4 shows a huge potential to be used in a bioremediation application for the treatment of methparation residues, and further research may lead to an alternative route of disposal for use in agriculture or industry.

Keywords : Methylparathion; ρ -nitrophenol; *Arthrobacter* sp.; Degradation; Phylogenetic tree

* Corresponding author. Tel: 86-10-68919685; E-mail: yanyc@sdaa.edu.cn; yanyanchun@caus.net.cn