

一株毒死蜱降解菌株 *Sphingomonas* sp. Dsp-2 的分离鉴定及降解特性*

李晓慧 贾开志 何健 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 从长期受毒死蜱污染的污水处理池中分离到一株毒死蜱高效降解菌株,命名为 Dsp-2。经生理生化和 16S rDNA 序列同源性分析,鉴定其为鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.) 细菌。该菌株能在 24 h 内完全降解 100 mg L⁻¹ 的毒死蜱,降解特性的研究表明:随着农药浓度的加大,绝对降解量也增大,但高浓度的毒死蜱会导致不能完全降解;起始接种量和降解毒死蜱的速率呈正相关;外加氮源营养能够明显促进降解;1 mmol L⁻¹ 的 Fe³⁺ 和 Ni²⁺ 等对其降解性能有抑制作用。研究了 Dsp-2 在土壤中降解毒死蜱的效果。结果表明,Dsp-2 在三种供试土壤中都能有效的降解毒死蜱,其中在潮土中降解的速率最快,且当毒死蜱的浓度范围在 1~100 mg kg⁻¹ 内 Dsp-2 都能有效的降解毒死蜱,7 d 降解率达到 85%~98%。

关键词 毒死蜱;鞘氨醇单胞菌;降解特性;土壤

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

随着农业生产的发展,农药的使用量越来越大,由此造成了严重的环境污染问题。有关微生物降解农药污染的研究很多,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^[1~3]。

毒死蜱 (Chlorpyrifos) 是一种高效、广谱、中等毒性的有机磷类杀虫剂。在我国,毒死蜱广泛用于防治多种作物上的螟虫、粘虫、介壳虫、蚜虫、棉铃虫、蓟马、叶蝉和螨类等害虫。毒死蜱于粮食蔬菜水果上的广泛应用造成了严重的残留问题。由于其在土壤中持效期较长,半衰期从几天到几百天不等^[4~6],同时也对农田环境及其有益生物产生了影响。这些都是迫切需要解决的问题。而毒死蜱作为一种有机磷水解酶难以利用的底物^[7],分离其高效降解菌株存在一定的困难。国内外有关毒死蜱的微生物降解的研究并不多见,目前仅报道了 2 株细菌和一些真菌,降解的速度和效果与对硫磷、甲基对硫磷等相比还不甚理想^[8~12]。因此,分离纯化出高效的毒死蜱降解菌株,深入研究其降解特性,最终用于田间原位生物修复,具有较高的理论意义和应用价值。

本研究分离、鉴定了一株毒死蜱高效降解菌株,命名为 Dsp-2,研究了实验室条件下其生物学特性和降解特性,包括营养及金属离子对该菌株降解毒死

蜱的影响,并采用室内模拟方法,对该菌株在土壤中对毒死蜱的降解效果进行了初步研究,为该菌株最终应用于生产实践,特别是应用于修复毒死蜱污染的生态环境提供理论依据和微生物资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 *Sphingomonas* sp. Dsp-2 由本实验室分离。

1.1.2 供试土壤 潮土、高沙土和红壤,土壤性质见表 1。供试土壤经风干,过 20 目筛,备用。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Primary physico-chemical properties of the tested soils

土壤类型 Type of soil	pH	有机碳	全氮	矿质氮
		Organic carbon (g kg ⁻¹)	Total nitrogen (g kg ⁻¹)	Mineral nitrogen (μg kg ⁻¹)
潮土 Brown soil	6.32	12.74	0.89	52.15
红壤 Red soil	4.80	9.20	0.77	16.60
高沙土 Sandy soil	8.75	5.86	0.79	56.02

* 国家“863”计划项目(2004AA246070,2004AA214102,2003AA241150)资助

[†] 通讯作者, E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介:李晓慧(1980~),女,河北邯郸人,博士研究生,主要从事环境微生物方面的研究

收稿日期:2006-03-30;收到修改稿日期:2006-07-31

1.1.3 培养基与药品 MSMN 培养基:磷酸氢二钾 1.0 g,磷酸二氢钾 0.3 g,硫酸镁 0.1 g,氯化钠 1.0 g,蛋白胨 1.0 g,去离子水 1 000 ml,pH 7.0。

LB 培养基:酵母粉 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,去离子水 1 000 ml,pH 7.0,固体培养基加琼脂 2%,121 °C、25 min 高压蒸汽灭菌。

毒死蜱降解菌分离培养基:以毒死蜱(浓度为 100 mg L⁻¹)为唯一碳源的 MSMN 固体培养基。

毒死蜱:原药,化学名称:O,O-二乙基-O-3,5,6-三氯-2-吡啶基硫逐磷酸酯,纯度 96%,南通染化厂生产。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离与鉴定 取农药厂污水处理池中的水样直接涂布毒死蜱降解菌分离培养基,于 30 °C 倒置培养 3 d,挑取有明显透明圈的菌落,在 LB 固体平板上纯化,菌株形态及生理生化特性测定参照文献[13]进行鉴定,菌株 16S rDNA 的克隆及序列测定和比较,参照文献[14]的方法,提取菌株的总 DNA,进行 16S rDNA 的扩增。测序由上海英骏生物技术公司完成。将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较,鉴定到属。

1.2.2 降解特性研究 菌种的制备:在 LB 培养基中接种 Dsp-2 振荡培养至对数期(OD₆₀₀ = 2.0),离心收集菌体,用生理盐水洗涤 2 次后重悬,作为降解试验的菌液。

除非特别说明,降解试验中毒死蜱浓度为 100 mg L⁻¹,接种量为 5%。培养条件均为 30 °C,160 r min⁻¹摇床振荡培养,定时取样,气相色谱检测。菌体生长量采用比浊法,即检测 600 nm 的吸光值。

在浓度对毒死蜱降解的影响试验中设置 10、50、100、200 mg L⁻¹四个浓度。

在接种量对毒死蜱降解的影响试验中设置 1%、5%、10%三个接种量。

在营养条件对毒死蜱降解的影响试验中设置 5 种培养基:1)基础盐,2)基础盐加 100 mg L⁻¹的酵母粉,3)基础盐加 100 mg L⁻¹的蛋白胨,4)基础盐加 1 000 mg L⁻¹的葡萄糖,5)基础盐加 1 000 mg L⁻¹的蛋白胨。

在金属离子对毒死蜱降解的影响中设置 11 种供试的金属离子,浓度均为 1 mmol L⁻¹。

1.2.3 土壤降解试验 参考文献[4,15,16],称 20.00 g 土壤到 50 ml 三角瓶中,均匀加入毒死蜱甲醇液使终浓度约为 100 mg kg⁻¹干土,吸附 24 h 后即模拟污染土壤。试验设对照和处理组,处理组定

量加入 Dsp-2 菌液,使土壤中菌浓度为 10⁷CFU g⁻¹干土,调整各组土壤水含量为土壤最大持水量的 50%,暗处培养。定期取样,测定土壤中毒死蜱的含量。

1.2.4 样品中毒死蜱的提取 土壤:称取土样 10.00 g 倒入相应的锥形三角瓶中,加入 20 ml 氯仿,置摇床剧烈振荡 2 h,取 5 ml 土壤悬液,12 000 r min⁻¹离心 5 min,取上清,将氯仿用氮气吹干后,用正己烷定容,加入无水硫酸钠,吸净残水后检测。培养基:取 2 ml 培养液至相应的刻度试管中,加入 4 ml 氯仿,振荡器剧烈振荡 2 min,吸出上层水相,将氯仿用氮气吹干后,用正己烷定容,加入无水硫酸钠,吸净残水后检测。

1.2.5 毒死蜱的检测方法 仪器:岛津 GC-14B 气相色谱仪,ECD 检测器,色谱柱:SPB-5 石英毛细管柱(30 m ×0.53 mm ×0.1 μm)。温度条件:检测器温度 280 °C,进样口温度 260 °C,采取程序升温,起始温度 100 °C,保持 1 min,20 °C min⁻¹升至 210 °C,保持 2 min。载气为氮气(纯度 99.99%),恒压 160 kPa,不分流进样,进样量 0.4 μl。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

从长期自然驯化的水样中直接分离培养,避免了实验室条件下人为造成的原有样品中的优势降解菌群的改变。在获得的六株毒死蜱降解菌中,选取降解性能最好的菌株,命名为 Dsp-2。Dsp-2 是革兰氏阴性,无芽孢的直杆状,极生鞭毛(图 1)。接触酶阳性,氧化酶阴性,不能水解淀粉,不能液化明胶,伏-普反应阳性,甲基红反应阴性,不产生吡嗪,水解吐温 80。根据 16s rDNA 同源性比较,再结合生理生化特征,将该菌鉴定为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)。Genebank 登录号为 AY994060。鞘氨醇单胞菌和假单胞菌一样,是一类降解能力很强的细菌。近年来报道的很多污染物的降解菌株都是鞘氨醇单胞菌,如本实验室分离的降解呋喃丹、六六六^[17,18]等环境污染物的菌株。作为革兰氏阴性的细菌,无论是后续的基因克隆,还是发酵应用,都有良好的可操作性。

2.2 毒死蜱浓度对 Dsp-2 降解的影响

从图 2 中可以发现,Dsp-2 对浓度小于 100 mg L⁻¹的毒死蜱有较好的降解效果,100 mg L⁻¹的毒死蜱在 24 h 内几乎被完全降解,这也是现有报道的降解速度最快的菌株^[8~12]。随着农药浓度的增加,绝对

降解量也增大,但高浓度的毒死蜱最终导致不能完全降解,这可能是由于其中间代谢产物3,5,6-三氯吡啶醇(TCP)对微生物有明显的抑制作用^[4~6,8]。Dsp-2对TCP的降解比毒死蜱本身要缓慢的多,它的过量积累,对菌体产生毒害作用,反馈抑制了对毒死蜱的降解。

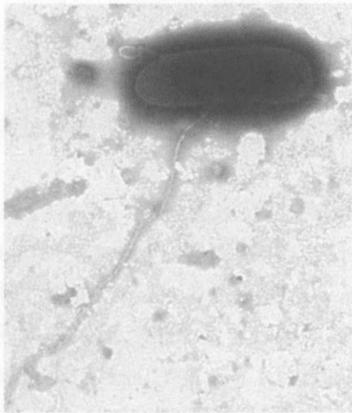


图1 Dsp-2菌株的电镜照片

Fig. 1 Electron micrograph of strain Dsp-2 (×19 000)

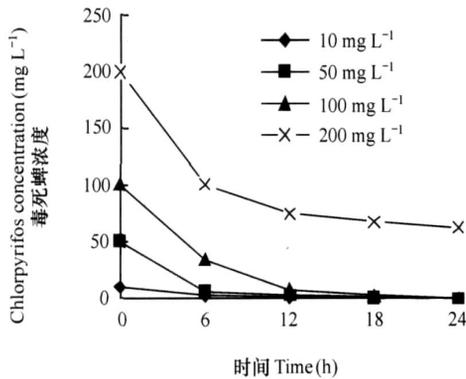


图2 浓度对Dsp-2降解毒死蜱的影响

Fig. 2 Effect of concentration on CP degradation by strain Dsp-2

2.3 接种量对Dsp-2降解毒死蜱的影响

由图3可见,降解毒死蜱的速率和起始接种量呈正相关,随着接种量的增加,前12h的降解速率明显加快。较大的接种量缩短了菌体生长的延滞期,从而相应的加快了前期的降解。但是24h后,接种量5%和10%的处理降解率相差不大,所以从节约的角度看,5%的接种量已经能够保证在短时间内容达到良好的降解效果。

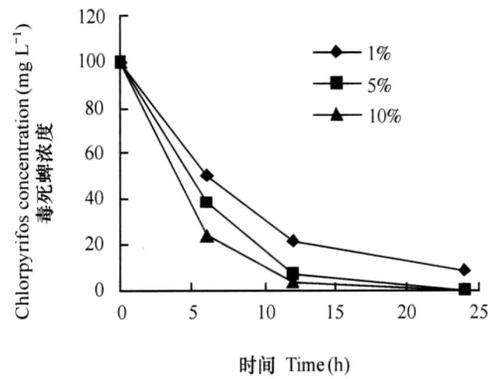


图3 接种量对Dsp-2降解毒死蜱的影响

Fig. 3 Effect of inoculum size on CP degradation by strain Dsp-2

2.4 不同营养条件对Dsp-2降解毒死蜱的影响

图4的结果表明,添加少量的酵母粉和蛋白胨对降解的促进作用不大,添加大量易利用的碳源(葡萄糖)虽然细菌的生长量有所增加,降解率反而下降。这是因为菌株优先利用易于利用的葡萄糖,减少了对毒死蜱的利用。但当添加蛋白胨的浓度达到1 000 mg L⁻¹时,菌体生长量增加明显,降解率也明显提高。可见一定程度上较高的氮源对Dsp-2降解毒死蜱的影响有明显的促进作用。总之,微生物降解农药,需要合适的外加碳、氮源浓度,过低则影响微生物正常的生长,导致代谢缓慢,过高则降低菌株对农药的利用或抑制降解酶的产生,只有适量添加外加碳、氮源,才能既保证细胞的正常生理功能,又满足降解酶产生的要求。

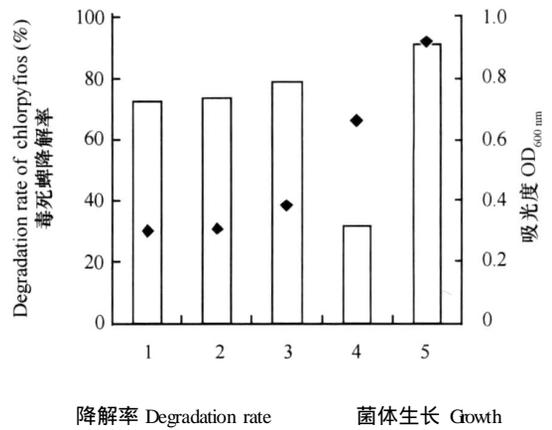


图4 不同营养条件对Dsp-2降解毒死蜱的影响

Fig. 4 Effect of nutrients on CP degradation by strain Dsp-2

2.5 金属离子对 Dsp-2 降解毒死蜱的影响

部分结果见图 5,在供试的 11 种离子中, Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 对降解有明显的抑制,其他离子对降解则没有明显的抑制或促进作用。其中 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 同时对菌体的生长也产生了明显的抑制的作用,而 Fe^{3+} 对菌体生长量的影响不大,可能抑制了降解酶的活性。

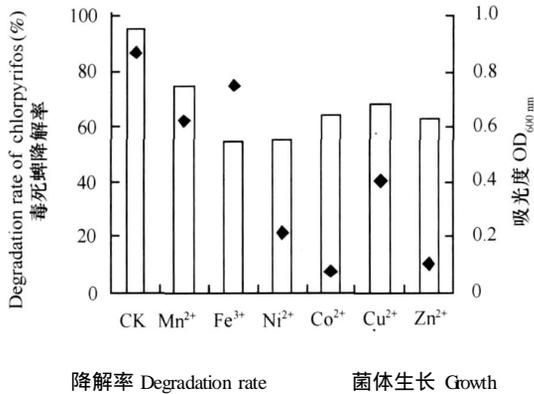


图 5 部分金属离子对 Dsp-2 降解毒死蜱的影响

Fig. 5 Effect of some metal ions on CP degradation by strain Dsp-2

2.6 Dsp-2 在不同土壤中降解毒死蜱的效果

从图 6 可以看出,Dsp-2 在 3 种土壤中都能有效降解毒死蜱,接菌 7 d 后土壤中毒死蜱浓度分别降低到 15.7 mg kg^{-1} 、 41.9 mg kg^{-1} 和 1.3 mg kg^{-1} 干土,对照土壤中毒死蜱浓度分别为 89.7 mg kg^{-1} 、 100.0 mg kg^{-1} 和 42.8 mg kg^{-1} 干土。进一步分析可以发现,土壤 pH 值对降解效率的影响十分显著,在中性的潮土中,绝对降解率达到了 85.3%,而在酸性的红壤中只有 58.1%,在碱性条件下毒死蜱不稳定,易分解,所以在高沙土中,毒死蜱的降解除了生物作用外,理化因素也起了重要的作用。Dsp-2 在潮土中降解毒死蜱的速率最快,除了其中性环境适合菌体生长外,相对较高的有机碳、氮含量也有利于菌体降解活力的保持,从而进一步加大了降解速率的差异。这也说明一定程度上偏高的有机质含量可以促进生物降解作用。

选择潮土作为试验土壤,进一步调整对照及相应的处理土壤中毒死蜱含量分别为 1、20、 100 mg kg^{-1} ,培养 7 d 后取样检测毒死蜱含量。结果见表 2,可以看出 Dsp-2 在 $1 \sim 100 \text{ mg kg}^{-1}$ 的浓度范围内都能有效降解毒死蜱,对低浓度的降解效果更好 ($> 90\%$),没有出现低浓度不降解的现象。Dsp-2 的这种特性有利于确保在污染程度不同的土壤中都能有效地发挥作用。

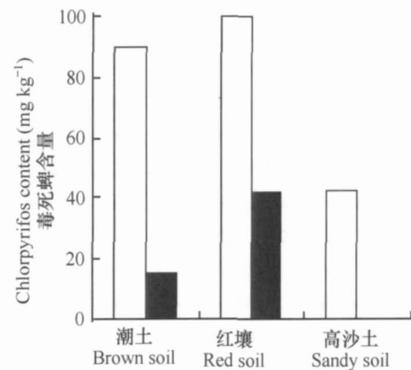


图 6 不同土壤中 Dsp-2 降解毒死蜱的效果

Fig. 6 Degradation of CP by strain Dsp-2 in different soils

表 2 Dsp-2 对不同浓度毒死蜱的降解

Table 2 Degradation of chlorpyrifos different in content by strain Dsp-2

浓度 Content (mg kg^{-1})	对照残留浓度 Residual content of control (mg kg^{-1})	处理残留浓度 Residual content in treatments (mg kg^{-1})	降解率 Degradation rate (%)
100	90.1	15.0	85.0
20	17.9	1.3	93.5
1	0.97	0.02	98.0

3 结 论

1) 分离得到一株高效降解毒死蜱的菌株,鉴定为鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas* sp.)。

2) 该菌在 24 h 内对 100 mg L^{-1} 的毒死蜱降解率达到 99% 以上,接种量为 5% 时有较高降解速率;随着农药浓度的增加,绝对降解率也增大,但过高浓度最终会抑制降解;外加氮源有利于降解, 1 mmol L^{-1} 的 Fe^{3+} 、 Ni^{+} 对降解产生明显的抑制作用。

3) Dsp-2 在不同 pH、不同污染程度的土壤中都能有效的降解毒死蜱,土壤的 pH 值和有机碳、氮含量对降解速率影响显著。在潮土 Dsp-2 中降解毒死蜱的速率最快,除了潮土的中性环境适合菌体生长外,相对较高的有机质含量也有利于菌体降解活力的保持。

参 考 文 献

- [1] 李顺鹏,蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展. 土壤, 2004, 36(6): 577~583. Li S P Jiang J D. Microbial remediation of pesticide-contaminated soil (In Chinese). Soils, 2004, 36(6): 577~583

- [2] Zhang X H, Zhang G S, Zhang Z H, *et al.* Isolation and characterization of a Dichlorvos-degrading strain DDV-1 of ochrobactrum sp. Pedosphere, 2006, 16(1) : 64 ~ 71
- [3] 戴青华, 张瑞福, 蒋建东, 等. 一株三唑磷降解菌 mp-4 的分离鉴定及降解特性的研究. 土壤学报, 2005, 42(1) : 111 ~ 115. Dai Q H, Zhang R F, Jiang J D, *et al.* Isolation, identification and characterization of triazophos degrading bacterium mp-4 (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(1) : 111 ~ 115
- [4] Racke K D, Steele K P, Yöder R N, *et al.* Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil. J. Agric. and Food Chem., 1996, 44(6) : 1582 ~ 1592
- [5] Yücel U, Yilm M, Gökç K, *et al.* Chlorpyrifos degradation in Turkish soil. J. Environ. Sci. and Health, 1999, 34(1) : 75 ~ 95
- [6] Getzin L W, Degradation of chlorpyrifos in soil : Influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. J. Econ. Entomol., 1981, 74 : 158 ~ 162
- [7] Cho C M H, Mulchandani A, Chen W, Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70 : 4681 ~ 4685
- [8] Brajesh K, Allan W J, Alun W M, *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
- [9] Yang L, Zhao Y H, Xin B, *et al.* Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. FEMS Microbiology Letters, 2005, 251 : 67 ~ 73
- [10] 刘新, 尤民生, 魏英智, 等. 降解毒死蜱曲霉 Y 的分离和降解效能测定. 应用与环境生物报, 2003, 9(1) : 78 ~ 80. Liu X, You M S, Wei Y Z, *et al.* Isolation of chlorpyrifos-degrading *Aspergillus* sp. Y and measurement of degradation efficiency (In Chinese). Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2003, 9(1) : 78 ~ 80
- [11] 谢慧, 朱鲁生, 王军, 等. 真菌 WZ 对有机磷杀虫剂毒死蜱的酶促降解. 环境科学, 2005, 26(6) : 164 ~ 168. Xie H, Zhu L S, Wang J, *et al.* Enzymatic degradation of organophosphorus insecticide chlorpyrifos by fungus WZ-1 (In Chinese). Environmental Science, 2005, 26(6) : 164 ~ 168
- [12] 王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜱降解菌株 *Bacillus laterisporus* DSP 的降解特性及其功能定位. 土壤学报, 2006, 43(4) : 648 ~ 654. Wang X, Chu X Q, Yu Y L, *et al.* Characteristic and function of *Bacillus laterisporus* DSP in degrading chlorpyrifos (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(4) : 648 ~ 654
- [13] 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
- [14] 张忠辉, 洪青, 张国顺, 等. 杀螟硫磷降解菌 FDS-1 的分离鉴定及其降解特性. 中国环境科学, 2005, 25(1) : 52 ~ 56. Zhang Z H, Hong Q, Zhang G S, *et al.* Studies on isolation identification of fenitrothion degradation bacteria FDS-1 and its degradation characteristics (In Chinese). China Environmental Science, 2005, 25(1) : 52 ~ 56
- [15] Clotaire Y K, Nikolaus G. Mineralization of the Herbicide Atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas* Strain. J. Agric. and Food Chem., 1995, 43(8) : 2291 ~ 2294
- [16] Brajesh K S, Allan W J, Alun W M, *et al.* Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(9) : 5198 ~ 5206
- [17] 马爱芝, 武俊, 汪婷, 等. 六六六 (HCH) 降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A 的分离与降解特性的研究. 微生物学报, 2005, 45(5) : 728 ~ 732. Ma A Z, Wu J, Wang T, *et al.* Isolation and characterization of a HCH degradation *Sphingomonas* sp. stain BHC-A (In Chinese). Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5) : 728 ~ 732
- [18] 张明星, 洪青, 何健, 等. BHC-A 与降解菌对六六六、呋喃丹污染土壤的原位生物修复. 土壤学报, 2006, 43(4) : 693 ~ 696. Zhang M X, Hong Q, He J, *et al.* In situ biodegradation of carbonfuran and HCH contaminated soil using degrading bacteria BHC-A and CDS-1 (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(4) : 693 ~ 696

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CHLORPYRIFOS DEGRADING STRAIN SPHINGOMONAS SP. Dsp-2 AND ITS CHLORPYRIFOS DEGRADATION CHARACTERISTICS

Li Xiaohui Jia Kaizhi He Jian Li Shunpeng[†]

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiological Engineering, Nanjing 210095, China)

Abstract A strain of bacterium designated as Strain Dsp-2, capable of degrading chlorpyrifos efficiently, was isolated from sludge in a wastewater treatment installation that has long been treating chlorpyrifos polluted water. Strain Dsp-2 was identified preliminarily as *Sphingomonas* sp based on its physiological and biochemical characters and the result of the 16 S rDNA homologue sequence analysis. Strain Dsp-2 can grow with chlorpyrifos as its sole carbon source, degrading 100 mg L⁻¹ of chlorpyrifos completely within 24 h. Results of its degradation characteristics show that the degradation rate of chlorpyrifos was increased considerably with the concentration. But when the chlprpyrifos concentration was higher than 200 mg L⁻¹, the strain Dsp-2 stopped degrading. Effects of initial inoculum size, yeast extract, glucose, peptone and metal ion on degradation of chlorpyrifos by Dsp-2

were also studied. Results show that large initial inoculum size and a proper amount of peptone could promote its degradation of chlorpyrifos. 1 mmol L^{-1} of Fe^{3+} and Ni^{2+} could restrain its degradation rate of chlorpyrifos. Addition of strain Dsp-2 to three test soils treated with chlorpyrifos resulted in a higher degradation rate of chlorpyrifos than in the control, soils without inoculation. However, the highest rate was showed in brown soil, which indicated moderate pH, moisture and nutrients could promote the degradation. The degradation rate reached to 85% ~ 98% at 7th day when the concentration of chlorpyrifos ranged in $1 \sim 100 \text{ mg kg}^{-1}$.

Key words Chlorpyrifos; *Sphingomonas* sp.; Degradation characteristics; Soil