

阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)对乐果降解特性的研究

林抗美¹, 官雪芳², 鲁国东³, 王宗华³, 张秋芳¹, 谢 恩³, 马丽娜¹, 刘 波¹

(1.福建省农科院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 2.福建省农科院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003; 3.福建农林大学生命科学院, 福建 福州 350002)

摘 要:从福建省福农生化有限公司排污口的土壤中筛选到一株对乐果有较好降解效果的菌株阴沟肠杆菌,为了使该菌能更好的应用于乐果残留污染的治理当中,采用室内培养方法,对该菌降解乐果的作用因素进行研究。结果表明,菌降解乐果的最佳温度为 35 ℃、pH 为 8.0、装液量 50 mL·250 mL⁻¹、摇床振数 180 r·min⁻¹、C 源为果糖、N 源为酵母浸膏、接种量 OD₂₆₅ 为 0.065、底物浓度为 200 mg·L⁻¹,对应的降解率在 28.84%~61.19%之间,采用 L₁₈(2×3⁷)正交法及 DPS 数理统计得出 Cu²⁺、Fe²⁺对菌降解乐果有显著的促进效果,Cd²⁺、Zn²⁺则在溶液中含量低水平时促进降解,高水平时抑制降解;Mg²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺等离子对菌降解乐果无促进作用。

关键词:阴沟肠杆菌;乐果;降解;优化

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)02-0398-08

Degradation Characteristics of Dimethoate by *Enterobacter cloacae*

LIN Kang-mei¹, GUAN Xue-fang², LU Guo-dong³, WANG Zong-hua³, ZHANG Qiu-fang¹, XIE En³, MA Li-na¹, LIU Bo¹

(1.Agricultural Biological Resources Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences Fuzhou 350003, China; 2.Institute of Agricultural Engineering Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 3.Life Science College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: By using selective cultural media, *Enterobacter cloacae* was isolated to degrade dimethoate from the soil around the pesticide factory. The factors affecting the degradation of dimethoate by *E. cloacae* were studied. The results showed that the optimum temperature for the degradation was 35 ℃ for the growth of the strain, the initial pH was 8.0, the conformable carbon source was fructose, the conformable nitrogen source was the yeast extract, the inoculum's size was OD₂₆₅:0.065, the density of dimethoate was 200 mg·L⁻¹, the air supply was 50 mL·250 mL⁻¹ volume in the cultural bottle with 180 r·min⁻¹ speed in the rotated shaker, in which the degrading rates to dimethoate were ranged in 28.84%~61.19%. The L₁₈(2×3⁷) orthogonal test showed that the ion Cu²⁺ and Fe²⁺ could promote the strain to degrade dimethoate, and Cd²⁺、Zn²⁺ could also promote it when it was at low level. However, Mg²⁺, Ba²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺ had no effect on the degradation of dimethoate.

Keywords: *Enterobacter cloacae*; dimethoate; degradation; optimize

农作物的生长过程受到许多病虫害的危害,防治害虫使用农药使得农产品残留量超标的问题也日益突出。近 10 年来,全球每年至少发生 2 500 万起农药中毒事件^[1],我国平均每年发生农药中毒事故约 10 万人,死亡 1 万多人。农药残留量超标还会影响农产品

的市场竞争力和国民经济的可持续发展^[2]。有机磷农药一直是我国用量最大的农药种类,每年都在 10 万 t 以上,与此同时也带来了很大的污染问题。我国农副产品因残留量超标对其出口造成了巨大的经济损失,也严重影响了我国的外贸信誉,在蔬菜、粮食等农产品中,有机磷农药超标是最常见的问题之一。

微生物降解在农药废水处理和土壤生物修复等领域具有广阔的开发应用前景,因此筛选新菌株、提高已有菌株的降解性能、研究农药的降解机制等一直是近几年来国内外研究的热点^[3-6]。目前关于农药降解菌的研究主要集中在降解菌的分离、诱变、鉴定、分类、菌特性及降解效能研究,降解酶的分离及特性

收稿日期:2008-03-20

基金项目:福建省科技厅项目:有机磷农药降解剂“降磷灵”的研制(2005Y008);福建省财政专项:福建省农业科学院科技创新团队建设基金(STIF-Y03)

作者简介:林抗美,女,研究生,长期从事害虫综合治理、生物农药、生物防治、无公害农业生产技术的示范与推广研究。

E-mail:laepth@163.com

通讯作者:刘 波 E-mail:fzliubo@163.com

研究,降解酶基因的克隆、降解机理以及基因工程菌的构建等方面^[7-12]。例如,国内外的学者曾经从细菌 *Pseudomonas*、*Flavobacterium*、*Plseiomonas* 等属中分离到有机磷农药的降解菌并对其降解特性进行了研究^[13-15];王兆守等通过将阴沟肠杆菌进行紫外线诱变后,可得到对对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率提高近 10%~20% 的新菌株^[16];刘玉焕等从曲霉菌中分离纯化出的降解酶对乐果具有较好的降解作用^[17];王圣惠等对一株能很好降解甲基对硫磷和对硝基苯酚的菌株 Ywl8 进行了系统发育研究,并用 PCR 法克隆其甲基对硫磷降解酶基 mpd,Rowland 等将源于黄杆菌 ATCC27551 的 opd 基因(对硫磷水解酶基因)片段插入质粒 pIJ702 的 Bgl II 位点,导入链霉菌,得到了稳定产生对硫磷水解酶的转化菌株等^[11]。

前人的许多研究主要集中在试验条件下液体纯培养的理论基础研究^[18-20],与田间使用为目的的研究存在较大差异。本研究以实际应用为目的以乐果为降解对象进行相关研究。在筛选菌株时不仅考虑了菌对有机磷乐果的降解作用,还考虑了该菌的适应能力。经过前期的研究工作,我们筛选到不仅对乐果有较好的降解作用、而且繁殖速度极快,并可在 pH 6~12 之间生长、可以在营养贫瘠的培养基上生长,以及在乐果浓度高达 2 000 mg·kg⁻¹ 的条件下生长的阴沟肠杆菌。基于目前将阴沟肠杆菌应用于有机磷农药乐果等降解作用的研究尚无报道的状况,也为了将该菌更好地应用于土壤、水体的乐果残留治理当中,特对该菌降解乐果的作用因素等特性进行系统的研究,皆在为该菌降解乐果的作用参数提供理论依据,为菌制剂的商品化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。

试剂:40%乐果乳油(湖南海利常德农药化工有限公司),乐果标样(Sigma-Aldrich 公司)。二氯甲烷,乙腈(色谱纯)。酸碱盐类 CdCl₂、ZnCl₂、CuCl₂、PbCl₂、MgCl₂、BaCl₂、MnCl₂、FeCl₂、氯化钠、盐酸、氢氧化钠(优级纯)、磷酸等。

仪器:Agilent1100 HPLC 仪(带 VWD 检测器及色谱工作站)(日),色谱柱:Hypersil ODS C₁₈ 反相柱(4.0 mm×250 mm,填料孔径 5 μm),真空抽滤器(2XZ-0.5 型选片真空泵,浙江黄岩真空泵厂),UV-2550 紫外分光光度计,摇床,恒温箱,pH 计,水浴锅等。

培养基,葡萄糖蛋白胨水培养基:蛋白胨 6.5 g、葡萄糖 6.5 g、K₂HPO₄ 2 g、水 1 000 mL、pH7.0(固体培养基加琼脂 20 g)。

1.2 方法^[21-23]

1.2.1 乐果含量的测定

乐果的提取方法为:吸取发酵液 4 mL,用真空抽滤器抽滤,回收滤液,在滤液中加入氯化钠至饱和,再加 12 mL 的二氯甲烷充分混匀,用分液漏斗萃取分离,取二氯甲烷部分,剩余的残液再用 8 mL 的二氯甲烷二次提取,将两次所得二氯甲烷提取液用冷风吹干,再用乙腈定容至 4 mL,液相色谱分析。最后将测得的峰面积带入乐果的浓度和峰面积关系的标准曲线方程中,求出相应的浓度。液相色谱操作条件为:V(乙腈:水)=30:70 流速:1 mL·min⁻¹,波长:210 nm,出峰时间:7.59 min。

降解率(%)=(对照样品残留量-处理样品残留量)×100%/对照样品残留量

1.2.2 温度对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

在装有 50 mL 培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 125 g·L⁻¹),使发酵液初始液乐果浓度为 500 mg·L⁻¹,接入活化的种子培养液 0.2 mL,选用 15、20、25、30、35、40 ℃等不同温度为培养温度,各个温度梯度分别以不接菌的为对照,每个处理 3 个重复,160 r·min⁻¹ 下培养 3 d,液相色谱法测定菌株在这些温度梯度的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的降解温度。

1.2.3 通气量对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

1.2.3.1 摇床振速对菌降解乐果作用的影响

在装有 50 mL 培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 125 g·L⁻¹),使发酵液初始液乐果浓度为 500 mg·L⁻¹,接入活化的种子培养液 0.2 mL,分别在 0、60、120、180、240 r·min⁻¹ 下 30 ℃培养 3 d,每一样品做 3 个重复,以未接菌的培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些摇床振速下的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的摇床振速。

1.2.3.2 装瓶量对菌降解乐果作用的影响

在 250 mL 三角锥瓶分别装入 50、100、150、200 mL 的培养基,接入活化的种子培养液 0.2、0.4、0.6、0.8 mL 于上述装有不同量培养基的三角瓶中,30 ℃、160 r·min⁻¹ 培养 3 d,每一样品做 3 个重复,以未接菌的培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些装液量的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的装液量。

1.2.4 初始 pH 对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

在装有 50 mL 培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),使发酵液初始液乐果浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,接入活化的种子培养液 0.2 mL,用稀硫酸和 NaOH 分别调 pH 至 6、7、8、9、10、11 的 pH 培养液下 30°C 培养 3 d,每一样品做 3 个重复,以未接菌的培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些 pH 的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的 pH。

1.2.5 底物浓度阴沟肠杆菌降解乐果的影响

在装有 50 mL 培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),使发酵液初始液乐果浓度分别为 50、200、500、700、1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,接入活化的种子培养液 0.2 mL 于上述培养基的三角瓶中,在 30°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 3 d,以未接菌的培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些摇床不同培养时间的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的底物浓度。

1.2.6 接菌量对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

在装有 50 mL 培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),使发酵液初始液乐果浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,接入活化的种子培养液 0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL(在 WL600.0 下 OD 值分别为 0.024、0.039、0.056、0.066、0.072、0.083)在 30°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3 d,每一样品做 3 个重复,以未接菌的培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些摇床不同接菌量的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的接菌量。

1.2.7 培养时间对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

在装有 50 mL 培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),使发酵液初始液乐果浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,接入活化的种子培养液 0.2 mL 于上述培养基的三角瓶中,分别在 30°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 12、24、36、48、60、72、84、96、108 h,每一样品做 3 个重复,以未接菌的培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些摇床不同培养时间的培养基发酵液中对乐果的降解率,确定合适的培养时间。

1.2.8 培养基成分对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

1.2.8.1 氮源对菌降解乐果的影响

培养基的配制:分别用牛肉膏、酵母浸膏及蛋白胨代替葡萄糖蛋白胨培养基中的蛋白胨,使它们的终浓度为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其他成分不变。在装有 50 mL 的以

上各培养基的 150 mL 的三角瓶中加入 40%乐果乳油稀释液(浓度为 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),使发酵液初始液乐果浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,接入活化的种子培养液 0.2 mL 于上述 3 种培养基的三角瓶中,在 30°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 3 d,以未接菌的各培养基为对照,液相色谱法测定菌株在这些培养基中对乐果的降解率,确定合适的氮源。

1.2.8.2 碳源对菌降解乐果的影响

培养基的配制:分别用葡萄糖、蔗糖、淀粉、果糖、麦芽糖代替葡萄糖蛋白胨培养基中的葡萄糖,使它们的终浓度为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,其他成分不变。接菌方法及培养条件同 1.2.8.1,液相色谱法测定各碳源条件下菌对乐果的降解作用,确定最适的碳源。

1.2.9 离子种类对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验采用 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 正交因素水平表来测定离子对菌降解乐果的影响,具体设计如表 1:根据 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 正交表及表 1 的表头设计配制各种培养基,接入稀释 10^{-1} 种子培养液 0.2 mL 于上述培养基的三角瓶中,分别在 30°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 3 d,液相色谱法测定不同离子条件下菌对乐果的降解作用,并用 DPS 数据处理系统分析各类离子对菌降解乐果产生的影响。

表 1 正交试验因素水平表($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 1 The form of orthogonal test' design($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

	CdCl ₂	ZnCl ₂	CuCl ₂	FeCl ₂	MgCl ₂	BaCl ₂	MnCl ₂	PbCl ₂
因素	1	2	3	4	5	6	7	8
水平 1	2	2	2	2	2	2	2	2
水平 2	10	6	6	6	6	6	6	6
水平 3	—	10	10	10	10	10	10	10

2 结果与分析

2.1 温度对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验测定了 15、20、25、30、35、40 $^\circ\text{C}$ 时菌对乐果的降解率,结果分别为 29.75%、45.26%、48.98%、59.93%、62.19%、49.92%(左右)。从图 1 可知,在温度 15°C 至 35°C 范围内降解率逐渐上升, 35°C 以后降解率逐渐下降,但在 30 和 35°C 时的降解率较接近,说明其最适降解温度在 $30\sim 35^\circ\text{C}$ 左右。多项式回归分析显示,降解率 $y = -0.103 4x^2 + 6.615 3x - 46.858$,其中 x 为温度, $R^2 = 0.924 6$,说明这是曲线特征具有明显的实验模型,可用这一模型预测不同温度下的菌对乐果的降解作用等。

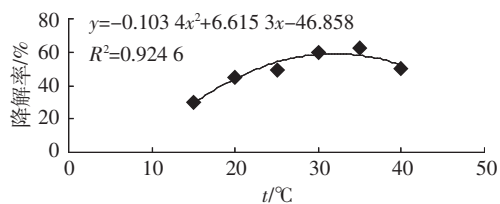


图1 不同温度下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 1 The effects of temperature on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.2 通气量对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

2.2.1 摇床振速对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验测定了摇床振速为 0、60、120、180、240 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下菌对乐果的降解率, 分别为: 10.82%、19.82%、30.10%、31.32%、24.71%(左右)。从图 2 可知, 在摇床振速为 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时降解率值最高, 在装液量为 0 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的降解率值最低, 随着摇床振速的增加, 菌株的降解率先上升后下降, 这可能是随着摇床振速的加大, 使发酵液中的溶解氧增加, 而过于剧烈的不稳定的环境使菌株的生长受到影响, 从而使降解率下降的缘故。多项式回归分析显示, 降解率 $y = -0.0008x^2 + 0.2668x + 9.6606$, 其中 x 为摇床振速, $R^2 = 0.9571$, 可用这一模型预测不同摇床振速下的菌对乐果的降解作用。

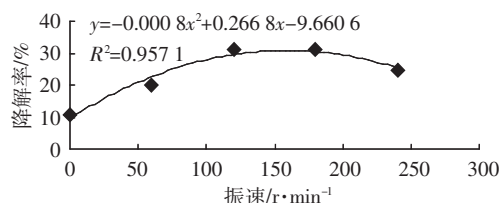


图2 不同摇床振速下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 2 The effects of rotated shaker on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.2.2 装液量对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验测定了装液量为 50、100、150、200 $\text{mL} \cdot 250 \text{ mL}^{-1}$ 时菌对乐果的降解率, 分别为 50.83%、42.84%、33.81%、31.33%(左右); 在装液量为 50 $\text{mL} \cdot 250 \text{ mL}^{-1}$ 时的降解率最高, 在装液量为 200 $\text{mL} \cdot 250 \text{ mL}^{-1}$ 的降解率最低, 可能是因为随着装液量的增大, 使发酵液中的溶解氧减少, 影响菌株的生长, 从而使菌株对乐果的降解率逐渐下降。多项式回归分析显示, 降解率 $y = 0.0006x^2 - 0.2728x + 63.473$, 其中 x 为装液量, $R^2 = 0.9879$, 该拟合曲线能够以大于 98% 地解释、涵盖了实测数据。

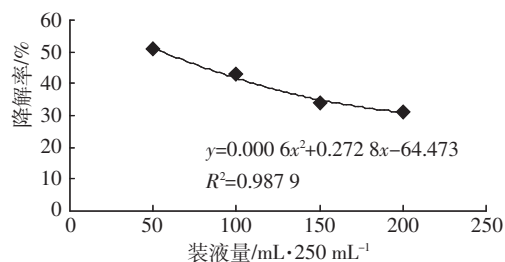


图3 不同装液量下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 3 The effects of medium volume on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.3 初始 pH 对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验测定了 pH 为 6、7、8、9、10、11 时菌对乐果的降解率, 分别为 11.57%、25.37%、39.05%、22.78%、18.04%、16.58%(左右)。从图 4 可以直观看出, 在 pH=8 的时候降解率最高, 在 pH=6 的时候降解率最低, 在 pH=8~11 逐渐升高过程中, 降解率逐渐下降。说明在酸性条件下不适合该菌降解乐果, 而在碱性条件下, 随着 pH 值的逐渐升高, 该菌的生长也受到一定程度的抑制, 从而影响降解作用。降解率 $y = -2.6604x^2 + 44.763x - 158.45$, 其中 x 为 pH 值, $R^2 = 0.5758$, 说明该拟合曲线能够以大于 57% 地解释、涵盖了实测数据。

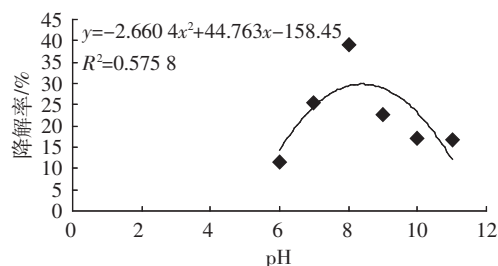


图4 不同 pH 下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 4 The effects of initial pH on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.4 底物浓度对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

底物浓度为 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是降解率最高为 45%, 而底物浓度 1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 降解率仅为 11.13%, 降解率下降为 1/4。从图 5 可直观看出, 在 50~200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 降解率逐步上升, 在 200~1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 降解率逐步下降, 且在 700~1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时降解率较低, 这可能是由于在底物浓度低的情况下, 菌对乐果的直接接触面积下降, 导致降解率下降, 而较高的乐果浓度则不利于阴沟肠杆菌的生存的原因。降解率 $y = -1 \times 10^{-5}x^2 - 0.0104x + 33.387$, 其中 x 为底物浓度,

$R^2=0.544$, 说明该拟合曲线能够以大于 54%地解释、涵盖了实测数据。

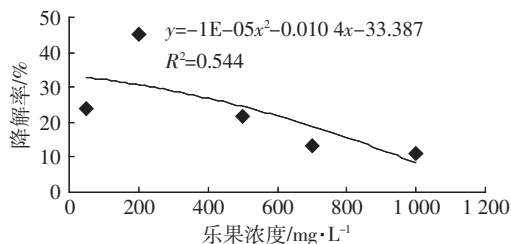


图 5 不同乐果浓度下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 5 The effects of density on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.5 接菌量对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验测定了接菌量为 0.05、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 条件下菌对乐果的降解率, 分别为 18.34%、24.11%、27.43%、28.84%、20.25%、25.26%(左右)。从图 6 中可直观看出在接菌量为 0.05 mL 到 0.60 mL 时降解率逐渐上升, 之后出现一定程度下降, 说明其最适接菌量应该在 0.4 mL 到 0.6 mL 之间。接菌量过低, 菌量较少, 分解能力有限; 接菌量过高, 可能受其他代谢原料的限制, 细菌分解能力也不能充分发挥。在 0.8 mL 接菌量时, 降解率偏低, 可能是由于误差造成的。降解率 $y = -23.955x^2 + 28.188x + 18.449$, 其中 x 为接菌量, $R^2=0.4356$, 说明该拟合曲线能够以大于 43%地解释、涵盖了实测数据。

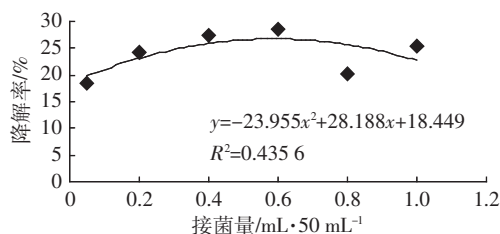


图 6 不同接菌量下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 5 The effects of inoculum size on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.6 培养时间对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

试验测定了培养时间为 12、24、36、48、60、72、84、96、108 h 时的降解率, 分别为 8.66%、14.69%、19.11%、25.27%、29.34%、32.77%、33.00%、36.02%、35.52%(左右); 在 12~72 h 范围内, 随着培养时间的增加, 降解率明显上升, 在培养 72 h 以后降解率上升缓慢。可能是由于该菌的降解能力或菌量增长达到极限了, 随着培养时间的增加, 装液量和培养基提供

的生长原料造成的限制逐渐显现出来。降解率 $y = -0.0028x^2 + 0.6302x + 1.1868$, 其中 x 为培养时间, $R^2=0.9941$, 说明该拟合曲线能够以大于 99%地解释、涵盖了实测数据。

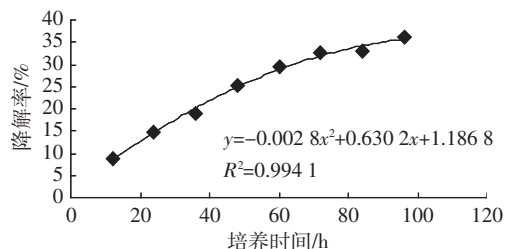


图 7 不同培养时间下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 7 The effects of culture' hour on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.7 培养基成分对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

2.7.1 培养基氮源对菌降解乐果的影响

图 8 可知, 在同样提供 0.05 g·L⁻¹ 的氮源(蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏)情况下, 酵母浸膏做氮源的培养基降解率最高, 降解率达到(37.28±1.70)%, 蛋白胨次之, 降解率为(27.04±0.93)%, 牛肉膏较差, 降解率为(14.64±2.03)%。可能是因为阴沟肠杆菌对酵母浸膏的分解利用能力高于其他氮源所致。

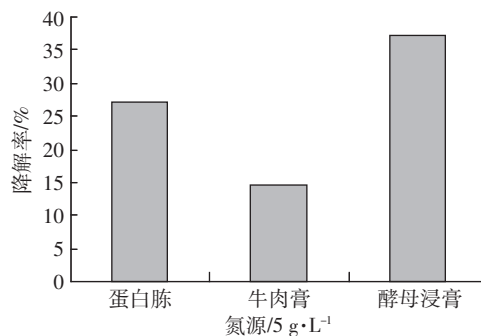


图 8 不同氮源条件下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 8 The effects of nitrogen on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

2.7.2 培养基碳源对菌降解乐果的影响

阴沟肠杆菌在碳源葡萄糖、蔗糖、淀粉、果糖、麦芽糖条件下对乐果降解率分别为 23.64%、29.2%、32.11%、33.93%、24.2%(左右), 对各降解率进行 LSD 方差分析可知除麦芽糖和葡萄糖之间无十分明显差异外, 其他各因素之间均有较显著的差异(表 2)。由图 9 可知, 阴沟肠杆菌对乐果降解率从小到大排列依次为葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、果糖。可能是由于该菌可以分解利用果糖等碳源进行很好的生长所致。

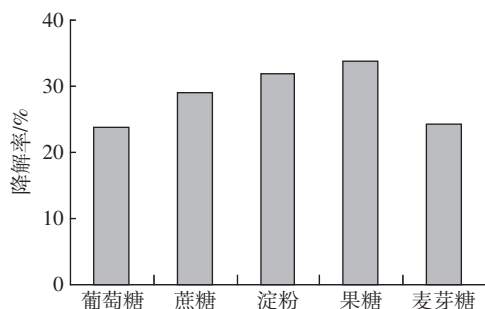


图 9 不同碳源条件下的阴沟肠杆菌降解乐果的降解率

Figure 9 The effects of carbon source on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

表 2 LSD 最小显著性差异测验结果

Table 2 The results of LSD least significant difference test

处理	平均	5%显著水平	1%极显著水平
4.果糖	0.339 200	a	A
3.淀粉	0.321 100	ab	A
2.蔗糖	0.292 000	b	AB
5.麦芽糖	0.242 000	c	BC
1.葡萄糖	0.236 400	c	C

2.8 离子种类对阴沟肠杆菌降解乐果的影响

从表 3 可知, 处理 6 的配方降解率效果最好, 处

表 3 $L_{18}(2 \times 3^7)$ 正交表——不同离子下的菌降解乐果的降解率计算结果

Table 3 The effects of ion on the efficiency of *Enterobacter cloacae* to degradate dimethoate

编号	CdCl ₂	ZnCl ₂	CuCl ₂	FeCl ₂	MgCl ₂	BaCl ₂	MnCl ₂	PbCl ₂	降解率/%
1	1	1	1	1	1	1	1	1	21.24
2	1	1	2	2	2	2	2	2	35.49
3	1	1	3	3	3	3	3	3	34.88
4	1	2	1	1	1	2	3	3	29.89
5	1	2	2	2	2	3	1	1	35.99
6	1	2	3	3	3	1	2	2	47.3
7	1	3	1	2	2	3	2	3	19.25
8	1	3	2	3	3	1	3	1	35.05
9	1	3	3	1	1	2	1	2	26.65
10	2	1	1	3	3	2	2	1	38.33
11	2	1	2	1	1	3	3	2	28.25
12	2	1	3	2	2	1	1	3	40.69
13	2	2	1	2	2	1	3	2	9.93
14	2	2	2	3	3	2	1	3	27.69
15	2	2	3	1	1	3	2	1	26.31
16	2	3	1	3	3	3	1	2	23.71
17	2	3	2	1	1	1	2	3	24.93
18	2	3	3	2	2	2	3	1	31.58

理 12 以及处理 10 效果次之。用正交试验(Duncan's 法)统计(结果如表 4 所示),显示以上各组间存在较显著差异。由表 5 的极差分析结果,观察调整 R' 值可知,CuCl₂ 和 FeCl₂ 对降解率的影响最大,分别为 13.567 4 和 11.484 8, 结合该因子在其水平上的降解率差异,得出因子 3 的第 3 水平和因子 4 的第 3 水平对乐果的降解有促进作用。不同离子不同剂量水平的培养基对乐果的降解存在显著差异(5%置信度),其中 Cu²⁺、Fe²⁺对细菌降解乐果影响较大,且有较强的促进作用;Cd²⁺、Zn²⁺的影响次之,其在溶液中含低水平时促进降解,高水平时抑制降解;Mg²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺对降解率的影响相对较小,各水平间差异不明显。

表 4 离子对菌降解乐果的 Duncan's 新复极测验的
多重比较结果

Table 4 The results of Duncan's test

处理	平均	5%显著水平
6	0.473	a
12	0.406 9	b
10	0.383 3	bc
5	0.359 9	c
2	0.354 9	cd
8	0.350 5	cd
3	0.348 8	cd
18	0.315 8	de
4	0.298 9	ef
11	0.282 5	efg
14	0.276 9	efgh
9	0.266 5	fgh
15	0.263 1	fgh
17	0.249 3	ghi
16	0.237 1	hi
1	0.212 4	ij
7	0.192 5	j
13	0.099 3	k

表 5 极差值计算结果

Table 5 Results of Poor value

因子	极小值	极大值	极差 R	调整 R'
CdCl ₂	27.857 8	31.465 6	3.607 8	7.684 6
ZnCl ₂	26.566 7	33.306 7	6.740 0	8.585 0
CuCl ₂	23.625 0	34.276 7	10.651 7	13.567 4
FeCl ₂	25.286 7	34.303 3	9.016 7	11.484 8
MgCl ₂	27.665 0	32.106 7	4.441 7	5.657 5
BaCl ₂	27.603 3	31.516 7	3.913 3	4.984 5
MnCl ₂	28.711 7	31.260 0	2.548 3	3.245 9
PbCl ₂	27.488 3	31.596 7	4.108 3	5.232 9

3 讨论

本实验对阴沟肠杆菌降解乐果的各影响因素特性进行了系统的研究,得出了菌降解乐果的最佳温度为30~35℃、初始pH为8.0、装液量50 mL·250 mL⁻¹、摇床振数180 r·min⁻¹、C源为果糖、N源为酵母浸膏、接种量OD₂₆₅为0.065、底物浓度为200 mg·L⁻¹,对应的降解率分别为61.19%、39.05%、33.81%、31.32%、33.93%、37.28%、28.84%、40%,采用L₁₈(2×3⁷)正交法及DPS数理统计得出Cu²⁺、Fe²⁺离子对细菌降解乐果有较强的促进作用,Cd²⁺、Zn²⁺在溶液中含量低水平时促进降解,高水平时抑制降解;Mg²⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Pb²⁺离子对降解率的影响相对较小。

关于前人在这一方面的研究中,有涉及乐果降解酶产生菌的筛选及产酶条件优化的研究^[24],有不动菌属在不同温度、乐果浓度条件下菌的生长状况及对乐果的降解率的研究^[25],有阴沟肠杆菌的粗酶液对氯氟氰菊酯的降解特性、作用机理^[26]及通过基因工程方法进行冻杀害虫的新型生物农药^[27]的研究等,前人的研究主要集中在对酶的特性研究,对菌降解乐果的影响因素研究未见有系统的报道,而本研究的突出特点之一是对菌降解乐果的作用因素进行了较全面系统的研究,这一系统的研究为阴沟肠杆菌降解乐果提供了理论基础,特别是不同离子对菌降解乐果的影响为菌的应用有着很好的参考作用,并且目前将离子考虑为各类菌对有机磷农药的降解作用的影响因素的研究方面的报道甚少,因此本研究也为其他有机磷降解研究,降解酶及机理的研究提供参考价值。此外在提供理论参数的同时,本研究也为菌的实际开发应用提供参考。例如,根据阴沟肠杆菌所能生长的最适条件,可以确定其在实际中的应用范围,在偏碱性的土壤或水体中,或在含有一定浓度Cu²⁺、Fe²⁺的介质中使用该菌可以达到很好的效果,或者可以在制剂中加入一定量的Cu²⁺、Fe²⁺等促进菌的降解作用等。

从结果中可知阴沟肠杆菌对乐果的降解率最高可达到61.19%,这与现有的产碱假单胞菌属^[28]、假单胞菌属^[29]、不动菌属^[30]对乐果的最高降解率分别为58%、50.25%、40.2%,以及前人筛选到的阴沟肠杆菌对有机磷农药甲胺磷、敌敌畏和毒死蜱等的降解率为10%~20%左右^[31]相比有较大的提高。由于菌对乐果的降解作用还可能受到各种因素之间的相互作用的影响,在下一步的工作中还需从设计合理的正交试验方面着手对各种因素的相互作用做进一步的探讨。另外本研究以应用为前提,以研制成降解效果好、生存能

力强的菌制剂为最终目的,因此通过诱变及基因工程菌的构建等方面来进一步提高菌的降解效能,再次提高菌的生存能力从而得到更好的菌种,或采用微生物降解酶制剂和固定化酶反应器技术来消除农药污染仍是今后研究的重点。此外,本研究虽然得到了菌降解乐果的众多参数,但与菌制剂的制成和实际中土壤与水体的应用相比,还有许多工作要做,因此如何将菌制成性能稳定的制剂,如何将其适合的应用也将是我们下一步要研究的内容。

参考文献:

- [1] 李钦云,赵玲玲.有机磷农药对食品的污染及防治[J].工业卫生与职业病,2005(4):260-263.
LI Yin-yun, ZHAO Ling-ling. The prevention pollution on food from organophosphate pesticides[J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2005(4):260-263.
- [2] Liu Hong, Zhang Jun Jie, Jun Su, et al. Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and p-nitrophenol in *Pseudomonas* sp. Strain WBC-3 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 334:1107-1109.
- [3] Mallick K, Bharati K, Banerji A, et al. Bacteria degradation of chlorpyrifos in pure culture and in soil [J]. *Bull Environ Contain Toxicol*, 1999, 62:48-54.
- [4] Nichol T D. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils [J]. *Water Air and Soil Pollution*, 1997, 95(1-4):165.
- [5] 汪小勇,张兰,姜文.被农药污染的土壤植物修复研究进展[J].中国农学通报,2005,21(7):382-384.
WANG Xiao-yong, ZHANG Lan, JIANG Wen. Research progress of pesticide contaminated soils [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(7):382-384.
- [6] 沈齐英,刘欢,张英俊.有机磷农药乐果降解菌的分离[J].农药,2004,43(12):552-554.
SHEN Qi-ying, LIU Huan, ZHANG Ying-jun. Breakdown of the organophosphorus pesticide dimethoate by bacteria isolate [J]. *Pesticides*, 2004, 43(12):552-554.
- [7] Rousseaux S, Soulas G, Hartmann A. Plasmid localisation of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains [J]. *FEMS Microbiol Eco1*, 2002, 41(1):69-75.
- [8] 明惠青,李莉.有机磷农药微生物降解的研究进展[J].江苏环境科技,2006,19(1):123-126.
MING Hui-qing, LI Li. Progress about microbial degradation of organophosphates [J]. *Jiangsu Environmental Science and Technology*, 2006, 19(1):123-126.
- [9] 李松松,李日强.有机磷农药生物降解的研究进展[J].科技情报开发与经济,2008,18(2):123-124.
LI Song-hui, LI Ri-qiang. The research progress of organophosphorus pesticide biodegradation [J]. *Sci-tech Informayion Development & Economy*, 2008, 18(2):123-124.
- [10] 颜世雷,陶玉贵,潘军.氧化乐果降解菌的分离与初步鉴定[J].中国土壤与肥料,2007(6):78-80.
YAN Shi-lei, TAO Yu-gui, PAN Jun. Isolation and identification of

- omethoate-degrading microorganisms[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2007(6):78-80.
- [11] 王圣惠, 闫艳春, 徐刚明. 一株有机磷农药降解菌的分离、鉴定及降解酶基因的克隆[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊):84-88.
- WANG Sheng-hui, YAN Yan-chun, XU Gang-ming. Isolation identification and cloning mpd gene of a strain of methylparathion-degrading microorganisms[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(sup):84-88.
- [12] 石成春, 刘用凯. 环境微生物降解有机磷农药研究进展 [J]. 上海环境科学, 2003, 22(23):863-867.
- SHI Cheng-chun, LIU Yong-kai. Study progress on environmental microbial degradation of organophosphorous pesticides [J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2003, 22(23):863-867.
- [13] Rowland S S, Speedie M K, Pogell B M. Purification and characterization of a secreted recombinant phosphotriesterase (parathion hydrolase) from *Streptomyces lividans*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(2):440-444.
- [14] CUI Zhong-li, LI Shun-pang, FU Guo-ping. Isolation of methylparathion degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10):4922-4925.
- [15] Chaudhry G R, Ali A N, Wheeler W B. Isolation of a methylparathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the gene from a *Flavobacterium* sp.[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(2):288-293.
- [16] 王兆守, 梁小虾, 林 淦, 等. 拟除虫菊酯类农药降解菌的紫外线诱变[J]. 华东昆虫报, 2003, 12(2):82-86.
- WANG Zhao-shou, LIANG Xiao-xia, LIN Gan. Mutation of synthetic pyrethroid insecticides-degrading strains by ultraviolet radiation [J]. *Entomological Journal of East China*, 2003, 12(2):82-86.
- [17] 刘玉焕, 李淑彬, 刘 芳. 曲霉 L8 对有机磷农药乐果的降解作用 [J]. 上海环境科学, 1998, 17(8):20-21.
- LIU Yu-huan, LI Shu-bin, LIU Fang. Degradation of dimethoate by *Aspergillus* sp. L8[J]. *Shanghai Environmental Science*, 1998, 17(8):20-21.
- [18] 段雪梅, 冯 胜, 王小冬. 一株分离自太湖有机聚集体上的有机磷降解细菌的鉴定及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(2):741-74.
- DUAN Xue-mei, FENG Sheng, WANG Xiao-dong. Isolation, identification and characterization of an organic phosphorus-degrading bacterial strain from organic aggregates in Taihu Lake[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(2):741-747.
- [19] 李福后, 王伟霞, 潘建梅. 有机磷分解细菌的选育及其发酵条件的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2007(6):74-77.
- LI Fu-hou, WANG Wei-xia, PAN Jian-mei. Breeding of organic phosphorus compounds decomposing bacteria and studies on fermentation conditions[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2007(6):74-77.
- [20] 柏文琴, 何凤琴, 邱星辉, 等. 有机磷农药生物降解研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(5):675-680.
- BAI Wen-qin, HE Feng-qin, QIU Xing-hui, et al. Advances in biodegradation of organophosphates[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental*, 2004, 10(5):675-680.
- [21] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京:北京大学出版社, 2000:4.
- QIAN Cun-rou, HUANG Yi-xiu. Directory of microbiology[M]. Beijing:Beijing University Press, 2000:4.
- [22] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:4.
- SHEN Ping, FAN Xiu-rong, LI Guang-wu. Microbiology experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000:4.
- [23] 严衍禄. 现代仪器分析[M]. 北京:北京农业大学出版社, 2002:2, 182-185.
- YAN Yan-lu. Analysis of modern equipment[M]. Beijing:Beijing Agricultural University Press. 2002: 2, 182-185.
- [24] 刘 芳, 钟英长. 乐果降解酶产生菌的筛选及酶条件的优化 [J]. 农业环境保护, 2000, 19(6):336-338.
- LIU Fang, ZHONG Ying-chang. Screening of a dimethoate-degrading enzyme producing strain and its optimization of the enzyme production[J]. *Agro-Environmental Protection*, 2000, 19(6):336-338.
- [25] 王永杰, 李顺鹏, 沈 标. 有机磷农药乐果降解菌的分离及其活性研究[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(2):71-74.
- WANG Yong-jie, LI Shun-peng, SHEN Biao. Isolation and activity of dimethoate-degrading strain[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2001, 24(2):71-74.
- [26] 林 淦, 姚 威. 阴沟肠杆菌 W-1 粗酶液对氯氟氰菊酯的降解效果及其作用机理[J]. 江苏农业科学, 2006(3):191-192.
- LIN Gan, YAO Wei. Degradation effect and functional mechanism of crude enzyme extracted from *Enterobacter cloacae* strain W-1 on cyhalothrin[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2006(3):191-192.
- [27] 新型生物农药“冻杀”害虫[J]. 中国科技产业, 2003(3):77.
- New biological pesticides “killing freeze” pests[J]. *Science Technology Industry of China*, 2003(3):77.
- [28] 张本兰, 周 毅, 裴 健, 等. 一株降解乐果的高效菌的分离和鉴定[J]. 环境科学进展, 1993, 5(1):69-73.
- ZHANG Ben-lan, ZHOU Yi, PEI Jian, et al. Isolation and characterization of an efficient strain which can degrade the organophosphorus synthesizing wastewater[J]. *Progress in Environmental Science*, 1993, 5(1):69-73.
- [29] 程国锋, 李顺鹏, 沈 标, 等. 微生物降解蔬菜残留农药研究[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4(1):81-84.
- CHENG Guo-feng, LI Shun-peng, SHEN Biao, et al. Microbial degradation of residual pesticides in vegetable[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 1998, 4(1):81-84.
- [30] 王永杰, 李顺鹏, 沈 标, 等. 有机磷农药广谱活性降解菌的分离及其生理特性研究[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(2):42-45.
- WANG Yong-jie, LI Shun-peng, SHEN Biao, et al. Isolation of bacteria with extensive degradation of organophosphorous insecticides and studies on its physiological characterization[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(2):42-45.
- [31] 王兆守, 林 淦, 李秀仙, 等. 拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(6):176-180.
- WANG Zhao-shou, LIN Gan, LI Xiu-xian, et al. Isolation, screening and identification of synthetic pyrethroid insecticides-degrading strains[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University(Natural Science Edition)*, 2003, 32(6):176-180.