农业环境科学学报 2005,24(5):962-965
Journal of Agro-Environment Science

甲基对硫磷降解菌 *Alcaligenes*.sp.YcX-20 的分离鉴定及降解性能研究

姜红霞[1,2]，王圣惠[2]，薛庆节[2]，闫艳春[2]

(1.泰山医学院药学院，山东 泰安 271016；2.山东农业大学生命科学学院，山东 泰安 271018)

摘 要：采用室内培养方法，对分离到的一株具有降解甲基对硫磷活性的细菌进行了鉴定，并对其降解性能进行了研究。通过形态观察、生理生化特征及 16S rDNA 同源性分析将其初步鉴定到属，并确定为产碱菌属的一个新种，命名为 *Alcaligenes*.sp.YcX-20，16S rDNA 序列在 GenBank 中注册号为 AY628412。其酯酶活性随菌液浓度和培养时间的增加呈上升趋势；在基础培养基中可耐受 700 mg·L^{-1} 的甲基对硫磷，在普通培养基中耐受浓度达 2 500 mg·L^{-1}；X-20 可降解甲基对硫磷形成对硝基苯酚；以甲基对硫磷为惟一碳源时，30 ℃培养 30 h 降解率达 60%。

关键词：甲基对硫磷；降解；Alcaligenes.sp.；16S rDNA
中图分类号：X172 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-2043(2005)05-0962-04

Isolation, Identification and Characterization of a Methyl-Parathion Degrading Bacterium

JIANG Hong-xia[1,2], WANG Sheng-hui[2], XUE Qing-jie[2], YAN Yan-chun[2]
(1. Pharmacy Department of Taishan Medical University Tai´ an 271016, China; 2.Life Science Department of Shan Dong Agricultural University, Tai´ an, Shan dong 271018, China)

Abstract: The present study isolated a bacterium strain X-20 from activated sludge of Huayang Pesticide Factory by liquid enrichment culture. The bacteria were found to be able to use methyl parathion as sole carbon source and degrade it to p-nitrophenol, leading reduction of its toxicity by 100~200 times. The strain is characterized by its short rod-shaped gram-negative bacterium, with no flagella, barely moving, the optimum temperature of grow is at 30 ℃ but can tolerant at 40 ℃. Through chemotaxonomic characterizations and phylogenetic inference based on 16S rDNA sequence and analysis, the strain was identified as a member of the genus and was named as Alcaligenes.sp.YcX-20, GenBank accession number of the 16S rDNA sequence is AY628412. The strain can tolerant high concentration of methyl parathion at 700 mg·L^{-1} in basic medium and up to 2 500 mg·L^{-1} in ordinary medium. Activity of the esterase increase with the increasing of the bacterium concentration, which is useful to degrade methyl parathion . Using 50 mg·L^{-1} methyl parathion as sole carbon source, the strain was able to degrade 60% of the pesticide in 30 hours at 30℃, pH7.0.

Keywords: methyl parathion; degradation; Alcaligenes.sp; 16S rDNA

有机磷农药是目前使用最广泛的一类农药，它们的大量使用带来了严重的环境污染问题。甲基对硫磷(MP)是其中的高毒品种，能抑制乙酰胆碱酯酶的活性，对人和哺乳动物、鱼类及鸟类等易产生急慢性中毒[1]，而且对动物和人体有三致作用。该农药已被列入联合国 PIC (Prior Informed Consent，预先通知同意)公约，在许多国家已经禁用或限用。但由于这类农药杀虫效果好、见效快且价格便宜，目前许多发展中国家仍在大量生产和使用，由此而引发的环境污染问题日益突出。

大量研究证明，化学农药作为一种生物外源性物质，经过长期的自然选择，可以被很多微生物降解。本实验室从农药废水的曝气池中分离筛选出一组能降解 MP 的细菌，包括 X-8、X-9、X-10、X-11、X-13、X-20，本文选择其中一株即 X-20 进行研究。

收稿日期：2004-10-18
作者简介：姜红霞(1977—)，女，硕士研究生。
联 系 人：闫艳春 E-mail:yanyc@sdau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料与主要仪器

活性污泥取自山东华阳农药厂农药污水曝气池；甲基对硫磷(MP)50%乳油，华阳农药厂提供；99%标准品，山东农业大学中心实验室提供。

基础培养基：NH_4NO_3 1.0 g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.50 g，$(NH_4)_2SO_4$ 0.50g，KH_2PO_4 0.50 g ，NaCl 0.50 g，K_2HPO_4 1.50 g，酵母膏 0.05 g，双蒸水 1 000 mL，pH7.0。

富集培养基：蛋白胨 10 g，NaCl 1.0 g，$K_2HPO_4$1. 0 g，葡萄糖 1.0 g，双蒸水 1 000 mL，pH7.0。

普通培养基：牛肉膏 3 g，蛋白胨 10 g，NaCl5.0 g，双蒸水 1 000 mL，pH7.0。

岛津 GC-14C 气相色谱仪，FPD 检测器，N2000 色谱工作站。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离

取一定量的活性污泥与污水的混合样，离心收集活性污泥 2 g，置于 100 mL 富集培养基中，同时添加 50%甲基对硫磷乳油使其终浓度为 100 mg·L^{-1}，并于 30 ℃，180 r·min^{-1} 摇床培养，每 8 d 移种 1 次，MP 浓度逐次递增为 300 mg·L^{-1}、500 mg·L^{-1}。然后将培养液加入以 MP(500 mg·L^{-1})为唯一碳源的基础培养基中驯化 2 周，最后用涂抹平板法在普通培养基上进行细菌分离[2]。

1.2.2 形态特征观察及生理生化特征测定

参照文献[3]进行。

1.2.3 16SrDNA 同源性分析[4]

以 CTAB 法提取细菌基因组为模板，设计引物 PCR 扩增。引物序列：F，5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'；R，5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT-3'。PCR 反应程序：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30s，54 ℃ 50s、72 ℃ 1.5 min，34 个循环；72℃ 8 min。PCR 产物连接 pGEM-T Easy vector，转化 E.coli DH5α，在加有 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板上筛选阳性白斑，提取质粒并测序。将所得基因片段在 GenBank 中比较并注册。

1.2.4 酶活测定[5]

细菌中参与甲基对硫磷水解的酶属磷酸酯酶，酯酶与其特异性底物 α-乙酸萘酯(α-NA)或 β-乙酸萘酯(β-NA)作用后，反应产物的量与 OD 值成正比，细菌中含酯酶量愈多，则 OD 值愈高，据此可推测细菌酯酶活性的高低。

挑取 X-20 单菌落，转入 20 mL 普通培养基中，30 ℃、180 r·min^{-1} 摇床培养至对数生长期，按表 1、表 2 加样处理，向各试管中加入 0.5 mLDBLS(10 g·L^{-1} 的固兰 B 盐与 50 g·L^{-1} 的 SDS 以 2∶5 的体积混合均匀，现配现用)，室温静置 15 min，测定 OD_{600} (β-NA 为 OD_{555})吸收值。分别测定不同时间与不同菌液浓度的酶活。

表 1 培养不同时间 X-20 酶活分析体系组成

Table 1 Enzymatic analysis system of X-20 with different time

试管编号	磷酸缓冲液/mL	α-NA*(β-NA)/μL	菌液/mL	培养时间/h
1	1.3	50	1.2	1
2	1.3	50	1.2	2
3	1.3	50	1.2	3
4	1.3	50	1.2	4
5	1.3	50	1.2	5
6	1.3	50	1.2	6

表 2 不同浓度 X-20 酶活分析体系组成

Table 2 Enzymatic analysis system of X-20 at different concentrations

试管编号	磷酸缓冲液/mL	α-NA*(β-NA)/μL	菌液/mL	培养时间/h
1	1.5	50	1.0	1.5
2	1.3	50	1.2	1.5
3	1,1	50	1.4	1.5
4	0.9	50	1.6	1.5
5	0.7	50	1.8	1.5
6	0.5	50	2.0	1.5

注：* 浓度为 0.011 17 g·mL^{-1}。

1.2.5 降解性能及 MP 含量测定

将 X-20 分别在含有 MP 的普通培养基和基础培养基上划线培养，逐步提高 MP 浓度，直到细菌被抑制生长，观察培养现象。

气相色谱法[6]检测 MP 含量：将灭菌的无机盐培养基置于容量瓶中，加入适量 MP 使终浓度达 50 mg·L^{-1}，定容摇匀后分装至试管中备用；从普通培养基平板上刮取生长至对数生长期的菌苔制成菌悬液，定量加到试管中，同时以不加菌的试管作对照，30 ℃，180 r·min^{-1} 摇床黑暗培养；定时取出试管(每次 3 个处理，3 个对照)，加入相同体积的二氯甲烷震荡提取 2 min，静置分层后弃去上层水相，有机相加适量无水硫酸钠干燥，用封口膜封好，放入冰箱，一并检测，检测前用二氯甲烷稀释 50 倍，进样量 1 μL。岛津 GC-14C 气相色谱仪带 FPD 检测器，大口径毛细管柱内涂 OV101(30 m×0.53 mm i.d.)；柱温 240 ℃，检测温 260 ℃，汽化温 260 ℃；载气(N_2)90 kPa，尾吹 60 kPa；空气 75 kPa，H_2 75 kPa。

2 结果与分析

2.1 细菌的鉴定

2.1.1 形态学特征

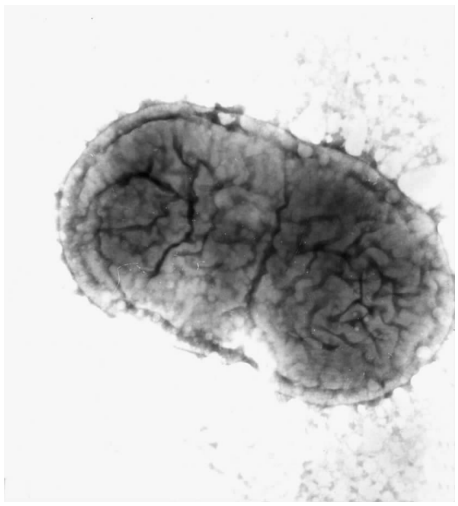

图 1 X-20 的电镜照片

Figure 1 Electron micrograph of strain X-20(48000×)

图 2 X-20 在普通培养基(含 MP)上的水解圈

Figure 2 Appearance of X-20 degrade MP on plate

X-20 呈球杆状,无芽孢,无鞭毛,运动性差,多数成对或成团存在,G^-,菌落圆形,菌落边缘整齐,粉白色,光滑,透明。在含有 MP 的培养基上生长时,可形成黄色的水解圈。见图 1、图 2。

2.1.2 生理生化特征

X-20 不能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、半乳糖发酵产酸和作为惟一碳源,能利用甘露醇、色氨酸,过氧化氢酶、硝酸还原,柠檬酸盐利用、丙二酸盐利用均为阳性,牛奶石蕊产碱,能在 pH5.7 营养肉汤上生长,不产生吲哚,最高生长温度为 40 ℃。

2.1.3 16S rDNA 片段序列分析

PCR 扩增得到 1.5kb 的 16S rDNA 片段,测序结果在 GenBank 中 BLAST,发现与产碱菌属同源性达 99%以上,结合菌株的生理生化特征,将菌株 X-20 初步鉴定为产碱菌属,命名为 *Alcaligenes*.sp.YcX-20。16S rDNA 基因在 GenBank 中注册号为 AY628412。

2.2 酶活测定

由图 3 可以看出,酶活在最初几个小时内为上升趋势,但随着培养时间的延长,酯酶活性趋于稳定或略有下降。因为细菌在达到对数生长期时,生长最旺盛,菌量增加很快,从而形成的酯酶量也逐步增加,酶活上升;细菌生长到对数生长后期,菌量不再增加并有老化、自融趋势,酶活也相应趋于稳定甚至略有下降。由图 4 可以看出,随着菌液浓度的增加,酯酶量亦增加,因此酶活呈上升趋势。

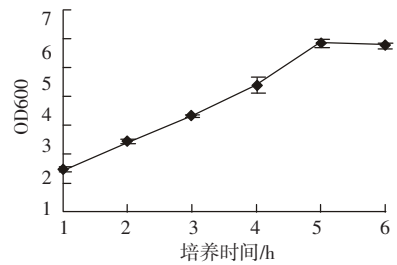

图 3 X-20 不同培养时间酶活

Figure 3 Enzyme activity of X-20 for different time

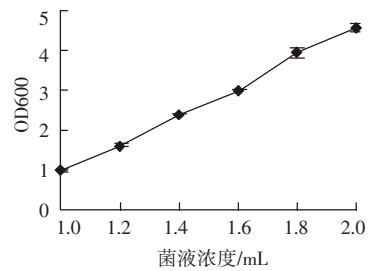

图 4 X-20 不同菌液浓度酶活

Figure 4 Enzyme activity of X-20 for different concentration

2.3 降解性能

2.3.1 X-20 对甲基对硫磷的耐受浓度及降解途径

在含有 MP 的固体培养基上划线培养,逐步提高 MP 浓度,X-20 在以 MP 为唯一碳源的基础培养基上可以耐受 700 $mg\cdot L^{-1}$ 的 MP,在普通培养基上耐受可达 2 500 $mg\cdot L^{-1}$,且生长速度快,生长量大。说明在营养丰富的条件下,X-20 能更好的利用 MP。

在固体培养基上的菌落形成黄色的水解圈且随培养时间的延长黄色不消失。据文献报道,MP 被不完

全降解可以生成对硝基苯酚和二甲基硫代磷酸,前者是一种黄色的化合物,继续降解可生成硝酸盐使黄色消失[7,8]。由此我们可以推测,X-20 可以将 MP 降解为对硝基苯酚。对于 X-20 确切的降解途径尚需进一步研究证实。

2.3.2 降解率

在以 MP 为惟一碳源的培养基中接入 X-20 菌悬液,使菌液浓度达 10^9 个·mL^{-1},定时取样,用气相色谱法测定 MP 的残留量。由图 5 可以看出, 在开始 6 h 和 18~24 h 之间降解较快,这可能因为从营养丰富的普通培养基转入基础培养基后, 细菌生长有所抑制, 但在开始培养时,细菌利用上一生长阶段所生成的酶降解部分 MP;18 h 后细菌进入生长期, 从而形成第二个降解高峰;24 h 后,菌体生长至稳定期,对 MP 的降解也趋于稳定。培养至 30 h 降解率达 60%。

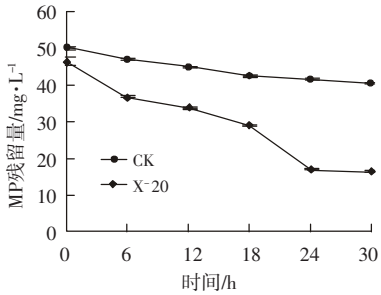

图 5　X-20 对 MP 的降解

Figure 5　Degradation of Methyl Parathion by X-20

3　结论

通过富集分离与涂抹平板法分离到一组具有降解甲基对硫磷活性的细菌, 本文研究了其中一株即 X-20,通过种属鉴定确定为产碱菌属的一个新种,命名为 *Alcaligenes*.sp.YcX-20, 为可降解有机磷微生物家族增加了新的成员。该菌株可降解甲基对硫磷形成对硝基苯酚;在营养物质丰富时能更好的耐受和降解 MP。把握 X-20 最适宜的降解条件,如最佳作用温度,最适 pH 值,最佳 MP 浓度以及菌液浓度等,可以充分发挥其降解潜力。本文初步测定了菌株在普通条件下的降解率,30℃、pH7.0、以 50 mg·mL^{-1} 甲基对硫磷为唯一碳源时,培养 30 h 降解率达 60%。

甲基对硫磷被水解能够生成产生二甲基硫代磷酸和对硝基苯酚,使毒性降低 100~120 倍,由于二甲基硫代磷酸和对硝基苯酚的水溶性较好,在环境中可以被其他微生物降解,从而实现甲基对硫磷的完全去毒[9]。环境微生物的生命活动往往是相互影响、相互作用的,继续研究其他几株降解菌的降解特性,有望发现一株能够和 X-20 联合作用而彻底降解甲基对硫磷的菌株。

参考文献:

[1] Dayananda Siddavattam, Syed Khajamohiddin, Bramanandam Manavathi, et al. Transposon-Like Organization of the Plasmid-Borne ganophosphate Degradation (opd) Gene Cluster Found in Flavobacterium sp[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003,69 (5): 2533-2539.

[2] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海: 上海科学技术出版社,1986. 137.

[3] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰氏细菌鉴定手册.(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.48-183.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[5] 闫艳春,等.工程菌及其固定化细胞对有机磷农药的降解[J].中国环境科学,2001,21(5):412-416.

[6] 朱鲁生,林爱军,等.二甲戊乐灵降解细菌 HB-7 的分离及降解特性研究[J].环境科学学报, 2004,24(2):360-365.

[7] Munnecke D M, Hsieh D P. Pathways of microbial metabolism of parathion[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1976,31:63-69.

[8] Zhongli Cui, Shunpeng Li. Isolation of Methyl Parathion-Degrading Strain M6 and Cloning of the Methyl Parathion Hydrolase Gene[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:4922-4925.

[9] 傅国平,崔中利,等.微生物降解有机磷类毒剂的酶学研究进展[J].微生物学通报,2004,31(2):138-143.