

毒死蜱降解菌的筛选·鉴定·降解特性

罗鑫^{1,2}, 张海燕², 邵彪¹, 刘明元³ (1. 江苏省南通市产品质量监督检验所, 江苏南通 226002; 2. 江苏省常州市环境监测中心, 江苏常州 213001; 3. 常州龙环环境科技有限公司, 江苏常州 213022)

摘要 [目的]筛选毒死蜱降解菌, 了解其特性。[方法]从常年施用毒死蜱农药的水稻田土壤中筛选出1株能以毒死蜱为唯一碳源和能源的降解菌。[结果]降解菌DC1对浓度100 mg/L毒死蜱15 d的降解率可达到83.3%。通过16S rDNA序列同源性和系统发育分析, 将该毒死蜱降解菌鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。系统发育表明, 该菌和枯草芽孢杆菌的分支特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)的亲缘关系最近。[结论]降解菌DC1来源于土壤, 适应性强, 对解决土壤中毒死蜱残留有一定的应用价值。

关键词 毒死蜱; 生物降解; 16S rDNA; 枯草芽孢杆菌
中图分类号 S482.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)19-0056-02

Isolation, Identification and Degrading Characteristics of A Chlorpyrifos Degrading Bacteria DC1
LUO Xin^{1,2}, ZHANG Hai-yan², SHAO Biao¹ et al (1. Nantong Products Quality Supervision and Inspection Institute, Nantong, Jiangsu 226002; 2. Changzhou Environmental Monitoring Center, Changzhou, Jiangsu 213001)
Abstract [Objective] To screen chlorpyrifos degrading bacteria and understand their characteristics. [Method] A strain capable of utilizing chlorpyrifos as the sole carbon and energy sources was isolated from Chlorpyrifos used paddy soil. [Result] The results showed that the degradation rate of Chlorpyrifos was at 83.3% in liquid culture medium with 15 days. The phylogenetic analysis and 16S rDNA gene sequence analysis were applied to the bacteria classification, the strain was identified as *Bacillus subtilis*. The phylogenetic analysis also showed that the genetic relationship between strain DC1 and *Bacillus tequilensis* was propinquity. [Conclusion] The degrading bacteria DC1 was derived from soil and has strong adaptability, and has certain application value for solving soil poisoning ticks residue.
Key words Chlorpyrifos; Biodegradation; 16S rDNA; *Bacillus subtilis*

毒死蜱学名氯吡硫磷, 是一种高效、广谱、中等毒性的有机磷酸酯类杀虫杀螨剂, 也是目前世界上生产和销售最大的杀虫剂之一。在我国, 毒死蜱广泛应用于水稻、蔬菜、瓜果类农产品, 尤其在禁止甲胺磷、对硫磷等5种高毒农药的销售和使用后, 毒死蜱的使用更加广泛和频繁。然而, 农药的实际利用率极低, 只有1%~10%施在作物上被利用, 其余90%以上的农药或残留于植物和土壤或进入水体^[1]。毒死蜱能够通过皮肤接触或呼吸作用进入人体, 并且在人体内有累积现象, 影响人的呼吸系统、心血管系统和神经系统, 并有一定的致畸性^[2-4]。其在植物和土壤中残留可通过食物链影响人们的健康^[5]。

利用微生物降解环境中农药含量是一种高效、安全的方法, 目前国内外已有一些关于毒死蜱降解菌的报道。周淑云^[6]从山东泰安某农药厂排污口的土壤中分离到1株施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)可降解毒死蜱; 张利等^[7]从农药厂废水处理池污泥中分离到1株对毒死蜱有较强降解能力的菌株CH3, 初步鉴定为哈夫尼菌属(*Hafnia* sp.)。笔者以长期施用毒死蜱农药的稻田土壤作为菌种来源, 从中筛选出高效降解毒死蜱的菌株, 同时因菌种来源于土壤, 有较强的适应性能够适应土壤环境, 对微生物法降解毒死蜱尤其是解决土壤中毒死蜱残留有较高的应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 恒温振荡培养箱(太仓市实验设备厂); 恒温培养箱(上海实验仪器总厂); 压力蒸汽灭菌器(上海医

用核子仪器厂); 标准净化工作台(上海贺德实验设备厂); 显微镜(1 000倍); 气相色谱(安捷伦)。

1.2 培养基 分离驯化培养基(MM培养基): FeCl₃·6H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NH₄NO₃ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.4 g, Na₂HPO₄ 1.0 g, 蒸馏水1 L。富集培养基(NB培养基): 牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、琼脂20 g(固体培养基时加入)、蒸馏水1 L。所有培养基均需调节pH至7.0, 121℃高压灭菌20 min。

1.3 毒死蜱降解菌的筛选 菌种来源于江苏省南通市海安县里下河地区常年耕种水稻并频繁施用毒死蜱农药的田间, 采样深度为5~10 cm, 采样后碾散, 于4℃保存。向50 mL含毒死蜱50 mg/L MM培养基中加入5 g土壤, 于30℃120 r/min摇床培养3 d, 取该混合液2 mL转接入新鲜的MM培养基中, 提高毒死蜱浓度至100 mg/L, 3 d后再转接并提高毒死蜱浓度至200 mg/L, 继续培养3 d, 再重复转接至毒死蜱浓度200 mg/L MM培养基中。将驯化后的菌液梯度稀释1 000倍, 吸取100 μL涂布至毒死蜱浓度200 mg/L NB固体培养基上, 于30℃恒温培养3 d, 挑取单菌落连续转接3次。

1.4 分离菌株鉴定 测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成, 测序结果分别从上下游向中间进行拼接。将获得的16S rDNA菌株序列在NCBI网上进行BLAST分析, 与GenBank数据库中的基因序列进行同源性比较分析。使用MEGA 5.0软件采用邻位连接法(Neighbour Joining)绘制系统发育树。

1.5 毒死蜱的提取与检测 毒死蜱的提取与检测方法参考文献^[8]。

2 结果与分析

2.1 降解菌的分离和筛选 在对驯化后的菌液进行涂布

基金项目 南通市科技项目(HS2013057)。
作者简介 罗鑫(1986—), 女, 江苏南通人, 工程师, 硕士, 从事环境微生物与环境监测研究。
收稿日期 2017-05-05

后,固体培养基上有一些菌落生长,观察其菌落特征可知,均极为相似,挑取其中 1 株单菌落连续转接,获得 1 株纯化的毒死蜥降解菌,命名为 DC1。DC1 在 NB 平板上的菌落为乳白色,不透明,呈圆形,边缘不整齐,表面粗糙。

2.2 菌株 DC1 的系统发育

BLAST 的结果显示与菌株

DC1 最为相似的均为芽孢杆菌,相似度均超过 99%,因此确定 DC1 为芽孢杆菌属。图 1 是根据菌株 DC1 的 16S rDNA 序列与同源性最高有代表性的 15 株菌构建的系统发育树。同源性分析和系统进化表明,DC1 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*) 最为相似。

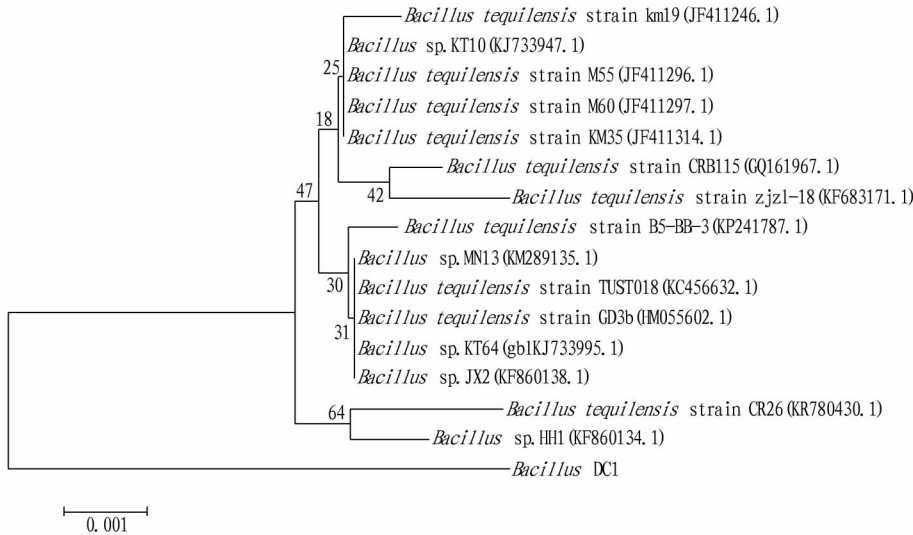


图 1 根据 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology

2.3 菌株 DC1 对毒死蜥的降解率 蘸取 NB 平板上的 DC1 单菌落至 NB 液体培养基,于 30 ℃ 120 r/min 培养 48 h,此为降解菌菌剂。向 100 mL 含毒死蜥 100 mg/L 无机盐培养基中加入 5 mL 菌剂,于 30 ℃ 120 r/min 培养 15 d,分别在第 5、10、15 天吸取 20 mL 培养基测定毒死蜥的浓度。结果表明,第 5、10、15 天培养基中毒死蜥的浓度分别为 58.9、32.4、16.7 mg/L,对毒死蜥的降解率分别为 41.1%、67.6%、83.3%。

3 结论与讨论

(1)从常年施用毒死蜥农药的水稻田土壤中筛选出 1 株能以毒死蜥为唯一碳源和能源的降解菌 DC1,该菌对浓度 100 mg/L 毒死蜥第 5、10、15 天的降解率分别达到 41.1%、67.6%、83.3%。通过 16S rDNA 序列同源性和系统发育分析,可将该毒死蜥降解菌鉴定为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。枯草芽孢杆菌实际上是一个表型相似的群体,即枯草芽孢杆菌近缘种群(简称枯草群),他们包括枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 等 10 余个亚种,特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 也是其中之一。分离菌株 DC1 的系统发育树表明,该菌和枯草芽孢杆菌的分支 *Bacillus tequilensis* 的亲缘关系最近。

(2)微生物降解被认为是农药尤其是有机磷农药降解最安全最可靠的途径,分离和筛选出毒死蜥高效降解菌是毒死蜥污染治理、土壤修复的有效措施。该研究分离菌株 DC1 来源于土壤,能够适应土壤环境,对解决土壤中毒死蜥残留有一定的应用价值。

参考文献

[1] 李阳,王玉玲,李敬苗. 有机农药对土壤的污染及生物修复技术研究[J]. 中国环境管理干部学院学报,2009,19(3):64-66.
[2] PERERA F P, RAUH V, WHYATT R M, et al. A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures[J]. Neurotoxicology, 2005, 26(4):573-587.
[3] SHERMAN J D. Chlorpyrifos (Dursban)-associated birth defects: Report of four cases[J]. Archives of environmental health, 1996, 51(1):5-8.
[4] WHITNEY K D, SEIDLER F L, SLOKIN T A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Cellular mechanism[J]. Toxicology and applied pharmacology, 1995, 134(1):53-62.
[5] KULKAMI A R, SOPPIMATH K S, DAVE A M, et al. Solubility study of hazardous pesticide (chlorpyrifos) by gas chromatography[J]. Journal of hazardous materials, 2000, 80(1/2/3):9-13.
[6] 周淑云. 毒死蜥高效降解菌的分离鉴定及其生物学特性研究[D]. 重庆:西南大学,2006.
[7] 张利,刘红玉,曾光明,等. 一株毒死蜥降解菌的分离鉴定及降解性能研究[J]. 环境工程学报,2008,2(10):1421-1424.
[8] 杨丽,赵宇华,张炳欣,等. 一株毒死蜥降解菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用[J]. 微生物学报,2005,45(6):905-909.