

辛硫磷降解菌 XSP-1 的分离、鉴定及其降解特性研究

沈雨佳¹, 洪源范¹, 洪青^{1,2*}, 蒋新², 李顺鹏¹

(1. 南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘要: 从农药厂污泥中分离到 1 株能以辛硫磷为唯一碳源生长的细菌, 命名为 XSP-1. 根据其生理生化特征和 16S rRNA 基因序列相似性分析, 将该菌株初步鉴定为戴尔福特菌属(*Delftia* sp.). 该菌株能在 7 h 内完全降解 100 mg/L 的辛硫磷. XSP-1 降解辛硫磷的最适 pH 为 7.0, 最适温度为 35℃, 降解速率与初始接种量呈正相关, 该菌株对甲基对硫磷、毒死蜱、杀螟硫磷也有较好的降解能力. 根据已报道有机磷农药降解基因 *mpd* 的保守序列设计引物, 未从该菌株中扩增到目标条带, 但是该菌株是否带有新的有机磷农药降解基因仍需要进一步研究.

关键词: 辛硫磷; 生物降解; 戴尔福特菌属; XSP-1

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2833-05

Isolation, Identification and Characteristics of a Phoxim-Degrading Bacterium XSP-1

SHEN Yu-jia¹, HONG Yuan-fan¹, HONG Qing^{1,2}, JIANG Xin², LI Shun-peng¹

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: A bacteria strain XSP-1 capable of utilizing phoxim as sole carbon source was isolated from sludge collected from a pesticide manufacturer. It was preliminarily identified as *Delftia* sp. according to its physiological-biochemical analysis and the similarity analysis of its 16S rRNA gene sequence (GenBank Accession No. EF061135). Strain XSP-1 could degrade 100 mg/L phoxim within 7 h completely. The optimal pH and temperature for degradation were 7.0 and 35℃ respectively. The degrading rate showed a positive correlation to the initial inoculum size. Strain XSP-1 also showed good degrading performance against methyl parathion, chlorpyrifos and fenitrothion. PCR detection with degenerated primers designed according to the conserved sequences of reported *mpd* gene did not find target band, but it needs further study to verify whether strain XSP-1 harbors a new *mpd* gene.

Key words: phoxim; biodegradation; *Delftia* sp.; XSP-1

有机磷农药曾是我国使用最广泛的农药, 但是由于其对环境、人畜都有较大的毒性, 许多种的有机磷农药都已被禁止使用, 但一些种类如辛硫磷、甲基异硫磷等目前仍在使用的^[1,2]. 它们在环境中的残留使人们面临愈加严重的大气、土壤和水资源的污染问题^[3,4]. 有机磷农药是乙酰胆碱酯酶抑制剂, 对人毒性较高, 威胁人类健康. 大量研究表明, 土壤微生物对环境中的农药降解起着重要作用, 目前已报道的有机磷农药降解菌主要有邻单胞菌属(*Plesiomonas* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和玫瑰单胞菌属(*Roseomonas* sp.)^[5], 对它们降解基因和酶学方面的研究也有报道^[6-11]. 本研究首次从戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)中分离到 1 株以有机磷农药辛硫磷为唯一碳源生长的细菌, 并对其降解特性进行了初步研究. 该菌株的获得丰富了有机磷农药降解菌株的多样性, 并为有机磷农药污染土壤的生物修复提供了菌株资源.

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

基础盐培养基(MSM, g/L): NaCl 1.00, NH₄NO₃ 1.00, K₂HPO₄ 1.50, KH₂PO₄ 0.50, MgSO₄ · 7H₂O 0.10, pH 7.0, 以辛硫磷作为碳源, 浓度视需要添加 LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00(固体加 1.5%的琼脂), pH 7.0.

1.2 菌株的分离与鉴定

取河南某有机磷农药生产厂废水排放口的污泥

收稿日期: 2007-01-04; 修订日期: 2007-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400013); 江苏省科技厅项目(BC2005322); 江苏省教育厅项目(JHZD06-2); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金项目(055112); 中国博士后基金项目(2005037747); 江苏省博士后科研计划项目

作者简介: 沈雨佳(1983~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: hongqing@njau.edu.cn

3.00 g, 置于 100 mL 辛硫磷浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中, 于 30℃, 180 r/min 培养 3 d, 然后每 3 d 以 2% 的接种量转接到相同的培养基中, 连续转接 3 次. 然后取 0.5 mL 富集液梯度稀释, 取 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 稀释度的液体各 0.1 mL 涂布于加有 100 mg/L 辛硫磷的固体基础盐平板上, 30℃ 培养 3 d 后, 挑取有透明水解圈的单菌落接种于含 100 mg/L 辛硫磷的基础盐液体培养基中, 30℃, 180 r/min 摇床培养 2 d, 验证其降解效果.

1.3 菌株的鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献[12]进行. 菌株 16S rRNA 基因的克隆及序列测定和比较参照文献[13], 提取 XSP-1 的基因组 DNA 作为模板, 进行 16S rRNA 基因的扩增. 一对引物分别为: 正向引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'; 25 μ L 体系为: 模板 1 μ L, dNTP(25 mmol/L)2 μ L, 引物(1 mmol/L)各 1 μ L, $10 \times$ Taq 缓冲液 2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)1.5 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.3 μ L, 超纯水 15.7 μ L. 聚合酶链式反应条件: 95℃, 5 min; 94℃, 0.5 min; 52℃, 1 min; 72℃, 1 min; 循环 30 次, 72℃ 延伸 10 min. 采用 PCR 回收试剂盒回收 16S rRNA 的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小(1.5 kb 左右)后, 将其 TA 克隆后进行测序(由 BIOAISA 公司完成). 测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较.

1.4 辛硫磷含量的测定

采用高效液相色谱法, 取培养液 1 mL, 置于具塞的刻度试管中, 加入 5 mL 二氯甲烷, 剧烈振荡后静置分层, 弃去上层水相, 有机相经无水硫酸钠脱水后, 取 1 mL 于微量离心管中, 氮气吹干后加入 1 mL 甲醇溶解(色谱纯). 测定条件如下, 流动相为甲醇:水 = 70:30, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10 μ L, 可变波长检测器的工作波长为 277 nm, 采用外标法定量.

1.5 菌株 XSP-1 质粒及 *mpd* 基因的检测

采取碱裂解法和煮沸裂解法检测菌株 XSP-1 的质粒. 以菌株 XSP-1 的基因组 DNA 为模板, 进行 *mpd* 基因的扩增. 根据 GenBank 上已登录的 *mpd* 基因的保守序列设计一对引物分别为: 正向引物 5'-CGCggatccGCAGCACCGCAGGTGCGCACCTCG-3', 反向引物: 5'-CGCggtaccTCACTG GTGACGACCGAGTA-3'; 进行 *mpd* 基因的扩增 25 μ L 体系为: 模板 1 μ L,

dNTP(25 mmol/L)2 μ L, 引物(1 mmol/L)各 1 μ L, $10 \times$ Taq 缓冲液 2.5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L)1.5 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.3 μ L, 超纯水 15.7 μ L. 聚合酶链式反应条件: 95℃, 5 min; 94℃, 0.5 min; 60℃, 0.5 min; 72℃, 1 min; 循环 30 次, 72℃ 延伸 10 min, 10℃ 冷却 5 min. 同时设置阳性及阴性对照.

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离及其生理生化特性

经过富集培养和纯化获得了 1 株能以辛硫磷为唯一碳源生长的细菌, 并能形成透明圈(图 1). 将其命名为 XSP-1. 该菌株为革兰氏阴性, 杆状、端生鞭毛(图 2). 不能水解淀粉, 不能液化明胶, V.P. 实验、苯丙氨酸脱氨酶实验、3-酮基乳糖测定均呈阴性, 硝酸盐还原实验、柠檬酸盐实验均为阳性.

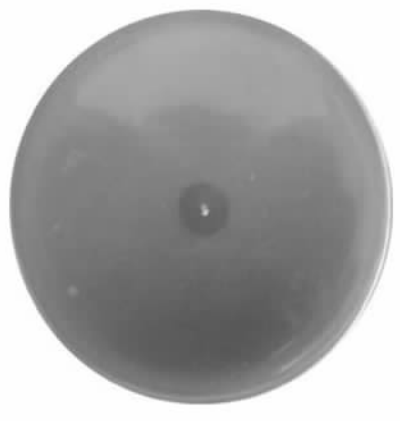


图 1 菌株 XSP-1 在基础盐培养基上产生的水解圈

Fig.1 Hydrolytic halos generated by strain XSP-1 on the mineral salt medium with phoxim as sole source of carbon

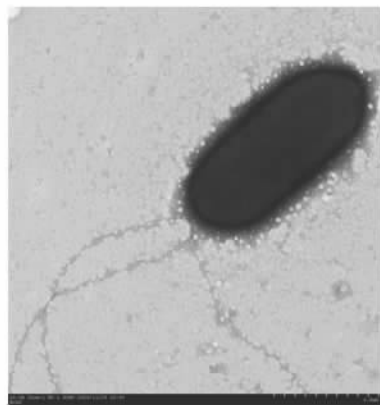


图 2 菌株 XSP-1 的透射电镜照片

Fig.2 Electronic microscopy photo of strain XSP-1

2.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析

以菌株 XSP-1 的基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物. 测序后在 GenBank 上登录, 序列号为 EF061135. 和其他菌株 16S rRNA 基因的同源性比较结果显示, 菌株 XSP-1 与 *Delftia* sp. LFJ11-1 (GenBank Accession No. DQ140182) 同源性为 100%, 与 *Delftia tsuruhatensis*^T T7 (GenBank Accession No. AB075017) 同源性为 99%, 与 *Delftia tsuruhatensis* TKW3 (GeneBank Accession No. AY738262) 同源性为 99%. 目前公认, 当某 2 个细菌的 16S rRNA 同源性大于 95% 时, 可将其归为同一属^[14]. 再结合生理生化特征将该菌鉴定为戴尔福特菌属 (*Delftia* sp.), 应用 Bioedit 和 MEGA 软件作系统发育树(图 3).

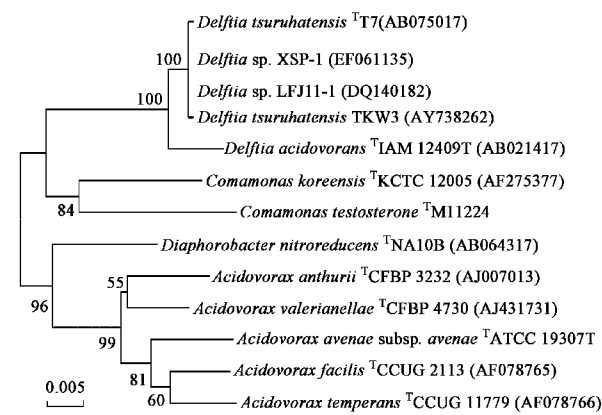


图 3 菌株 XSP-1 基于 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain XSP-1 based on the 16S rRNA gene homology

2.3 菌株生长和辛硫磷降解的关系

在辛硫磷浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中, 以 3% 的接种量接入, 用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 在 LB 培养基中培养的 XSP-1 种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于 30℃, 180 r/min 摇床培养, 每隔一定时间取样, 测定 $A_{600\text{nm}}$ 及辛硫磷的浓度. 从图 4 中可以看出, XSP-1 能以辛硫磷为唯一碳源进行生长, 并可将其在 7 h 内完全降解. 在最初的一段时间内, 菌株主要降解辛硫磷中的一硫代磷酸酯键, 生长较缓慢, 此后以中间代谢产物为唯一碳源进行生长.

2.4 农药起始浓度对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

在基础盐培养基中加入辛硫磷, 使其终浓度分别为 100、200、500、600、800、1 000 mg/L. 以 3% 的接

种量接入在 LB 培养基中培养的 XSP-1 种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于 30℃, 180 r/min 摇床培养, 每隔一定时间取样, 测定辛硫磷的浓度. 图 5 的结果显示, XSP-1 对较高和较低浓度的辛硫磷都有较好的降解效果, 35 h 内能完全降解 800 mg/L 以下的辛硫磷, 但对 1 000 mg/L 的辛硫磷降解速率较慢.

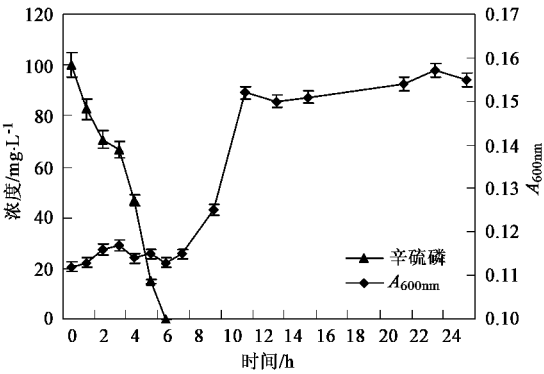


图 4 菌株 XSP-1 以辛硫磷为唯一碳源的生长情况
Fig.4 Utilization of phoxim as sole carbon source for growth by strain XSP-1

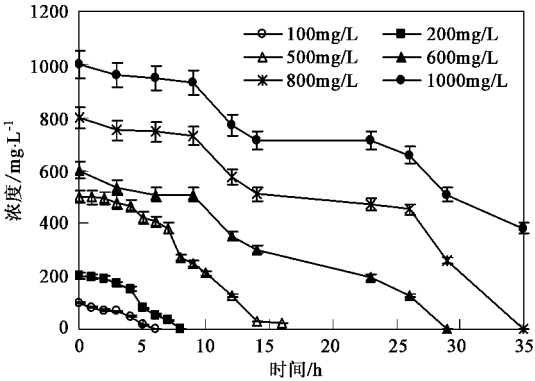


图 5 农药初始浓度对 XSP-1 降解辛硫磷的影响
Fig.5 Effect of initial concentration on phoxim degradation by strain XSP-1

2.5 pH 值对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

在 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 辛硫磷浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中, 以 3% 的接种量分别接入在 LB 培养基中培养的 XSP-1 种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 2.00$), 于 30℃, 180 r/min 摇床培养, 每 1 h 取 1 次样, 测定辛硫磷的浓度, 结果见图 6. XSP-1 在酸性条件下对辛硫磷的降解效果较差, 碱性条件下较好, 在 pH 7.0 时降解效果最好.

2.6 温度对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

在辛硫磷浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中,

以 3% 的接种量分别接入在 LB 培养基中培养的 XSP-1 种子液($A_{600\text{ nm}} \approx 2.00$), 在不同的温度下, 180 r/min 摇床培养, 每 1 h 取 1 次样, 测定辛硫磷的浓度, 结果见图 7. 菌株 XSP-1 在较低或较高温度下对辛硫磷的降解效果较差, 在 35℃ 对辛硫磷的降解效果最好.

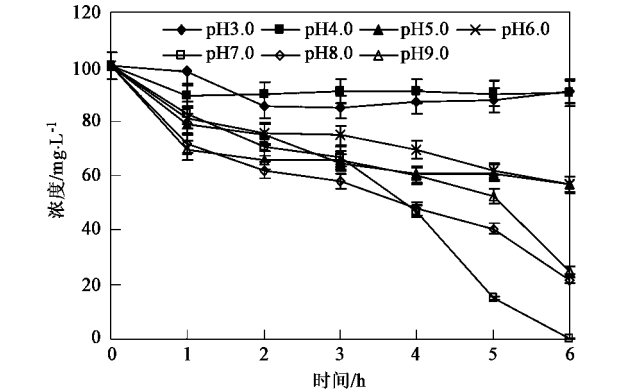


图 6 pH 值对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

Fig.6 Effect of pH on phoxim degradation by strain XSP-1

2.7 接种量对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

在辛硫磷浓度为 100 mg/L 的基础盐培养基中, 以 1%、3%、5%、10%、15% 的接种量接入在 LB 培养基中培养的 XSP-1 种子液($A_{600\text{ nm}} \approx 2.00$), 于 30℃, 180 r/min 摇床培养, 每 0.5 h 取 1 次样, 测定辛硫磷的浓度, 结果见图 8. 接种量与辛硫磷的降解速率成正比, 但当接种量达到 10% 或以上时, 降解速率差别不大.

2.8 XSP-1 对不同有机磷农药的降解情况

在基础盐培养基中分别加入辛硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、毒死蜱、倍硫磷、三唑磷, 终浓度为

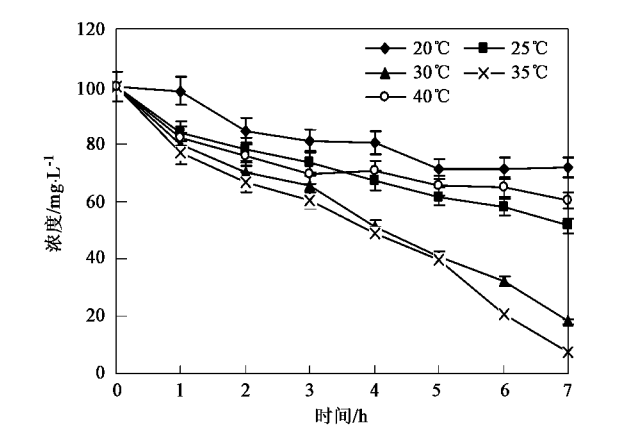


图 7 温度对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

Fig.7 Effect of temperature on phoxim degradation by strain XSP-1

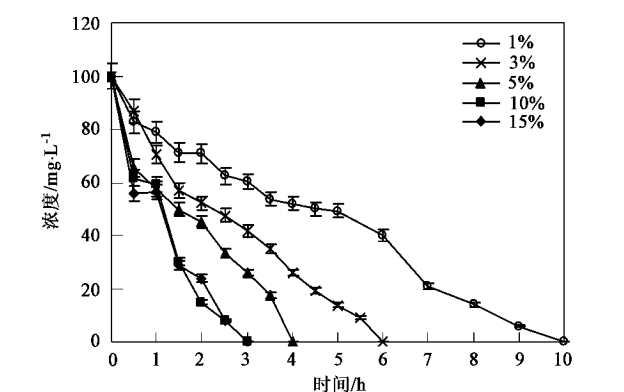


图 8 接种量对 XSP-1 降解辛硫磷的影响

Fig.8 Effect of inoculum on phoxim degradation by strain XSP-1

100 mg/L, 以 3% 的接种量接入在 LB 培养基中培养的 XSP-1 种子液($A_{600\text{ nm}} \approx 2.00$), 于 30℃, 180 r/min 摇床培养, 7 h 后取样测定它们的残留浓度, 结果见表 1. XSP-1 对甲基对硫磷、倍硫磷、杀螟硫磷都有

表 1 菌株 XSP-1 对其它有机磷农药的降解/%

Table 1 Degradation of other organophosphorus pesticides by strain XSP-1/%

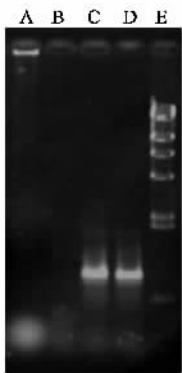
供试农药	甲基对硫磷	杀螟硫磷	辛硫磷	毒死蜱	倍硫磷	三唑磷
降解效果	99 ± 1.07	99 ± 1.13	99 ± 0.91	47.93 ± 1.06	92.91 ± 0.87	81.85 ± 1.27

较好的降解能力, 对三唑磷、毒死蜱降解能力较差.

2.9 菌株 XSP-1 质粒和 *mpd* 基因的检测

mpd 基因首先由本实验室于 2001 年在菌株 *Plesiomonas* sp. M6 中发现, 在目前已报道的带有该基因的不同种属的菌株中, *mpd* 基因的保守性都很高^[15~18], 并且该基因定位于染色体上, 但也有一个例外, 菌株 *Pseudomonas* sp. WBC-3 中的 *mpd* 基因位于质粒上^[16]. 经过 2 种方法多次提取均未发现菌

株 XSP-1 中有质粒存在, 故该菌株的降解基因可能定位在染色体上. 以菌株 DLL-1 和 FDS-1^[17,18] 的基因组 DNA 作为阳性对照, 进行 *mpd* 基因的扩增, 阳性对照菌中获得了相应大小的条带, 而没有从 XSP-1 中检测到目的条带(图 9), 因此该菌的有机磷农药降解基因可能不同于目前已报道一些基因, 很有可能是一个新的有机磷农药降解基因, 但仍需进一步研究.



A: 阴性对照菌株的 *mpd* 基因扩增结果; B: XSP-1 的 *mpd* 基因扩增结果; C: 菌株 DLL-1 的 *mpd* 基因扩增结果; D: 菌株 FDS-1 的 *mpd* 基因扩增结果; E: λ /HindIII marker

图 9 菌株 XSP-1 的 *mpd* 基因检测结果

Fig.9 Electrophoresis map of cloning *mpd* gene and plasmid detection of strain XSP-1

3 结论

(1)本研究首次从戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)中分离到 1 株以辛硫磷为唯一碳源生长的细菌 XSP-1.

(2)XSP-1 降解辛硫磷的最适条件为 35℃、pH 为 7.0. 该菌株还能降解甲基对硫磷、杀螟硫磷、毒死蜱等有机磷农药.

(3)对 XSP-1 菌株有机磷农药降解基因(*mpd*)的 PCR 检测没有发现目标条带,但是该菌株是否带有新的有机磷农药降解基因仍需要进一步研究.

参考文献:

[1] Xie X P, Yan Y C, Liu P P. Isolation, degradation and characterization of methylparathion degradative strain L4[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, **26**(10): 1637 ~ 1642.

[2] Yang C, Liu N, Guo X M. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, **265**: 118 ~ 125.

[3] Nannipieri P, Bollag J M. Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters[J]. Environ Qual, 1991, **20**: 510 ~ 517.

[4] 崔中利, 李顺鹏, 何健. 甲基一六零五降解菌 J5 的分离及其

降解性状研究[J]. 农村生态环境, 2001, **1**(3): 21 ~ 25.

[5] 江玉姬, 邓优锦, 刘新锐, 等. 一株能高效降解几种有机磷农药的菌株 JS018 的鉴定[J]. 微生物学报, 2006, **46**(3): 463 ~ 466.

[6] Cui Z L, Li S P, Fu G P. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(10): 4922 ~ 4925.

[7] 张瑞福, 朱卫, 崔中利, 等. 辛硫磷降解菌 X-1 的分离鉴定及降解性状的初步研究[J]. 环境科学学报, 2003, **23**(3): 411 ~ 413.

[8] Rani N L, Latithakumari D. Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*[J]. Can J Microbiol, 1994, **40**: 1000 ~ 1006.

[9] Yanze K C, Gschwind N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, **60**(12): 4297 ~ 4302.

[10] Chaudhry G, Ali A N, Wheeler W B. Isolation of a metnlyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA Homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp.[J]. Appl Environ Microbiol, 1988, **54**(2): 288 ~ 293.

[11] Mulbry W, Kams S. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacteium* sp. by Southern Hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta*[J]. Appl Environ Microbiol, 1986, **51**(5): 926 ~ 930.

[12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 370 ~ 410.

[13] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 著, 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 39 ~ 40.

[14] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 1 ~ 7.

[15] Liu H, Zhang J J, Wang S J, *et al.* Plasmid borne catabolism of methyl parathion and *p*-nitrophenol in *Pesudomonas* sp. Strain WBC-3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, **334**: 1107 ~ 1114.

[16] Zhang R F, Cui Z L, Jiang J D, *et al.* Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes[J]. Can J Microbiol, 2005, **51**: 337 ~ 343.

[17] 刘智, 洪青, 徐剑宏, 等. 甲基对硫磷水解酶基因的克隆和融合表达[J]. 遗传学报, 2003, **30**(11): 1020 ~ 1026.

[18] Zhang Z H, Hong Q, Xu J H, *et al.* Isolation of Fenitrothion-degrading strain *Burholderia* sp. FDS-1 and cloning of *mpd* gene [J]. Biodegradation, 2006, **17**(3): 275 ~ 283.