

大豆杀虫剂氧化乐果降解菌的分离

李玉梅^{1,3,4}, 王根林², 于洪久¹, 马凤鸣³, 杨慧⁴, 杜春梅⁴

(¹黑龙江省农业科学院农村能源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; ²黑龙江省农业科学院土肥所, 黑龙江 哈尔滨 150086; ³东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; ⁴黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150084)

摘要:采用富集驯化培养方法,从哈尔滨农药厂污水处理池的活性污泥中筛选获得2株能彻底降解氧化乐果的菌株。氧化乐果浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两株菌在1 d内可完成降解,氧化乐果浓度为 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两株菌在3 d内可完成降解,浓度在 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时7 d内可完成降解,浓度达 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时7 d内降解率可分别达到75.28%和72.42%;当农药浓度较高时,菌株生长速度表现为延后。降解谱实验表明:菌株具有较宽的有机磷农药降解谱;通过生理生化分析及16S同源分析发现,这两株菌与假单胞菌属和气球菌属极其相似。

关键词:氧化乐果;生物降解;假单胞菌属;气球菌属

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)01-0126-04

Separating Bacterium Strains to Degrade Soybean Pesticide Omethoate

LI Yu-mei^{1,3,4}, WANG Gen-lin², YU Hong-jiu¹, MA Feng-ming³, YANG Hui⁴, DU Chun-mei⁴

(¹County Resource Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; ²Soil and Fertilizer Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; ³Agronomy College of Northeast Agricultural University, Harbin 150010; ⁴Life and Science College of Heilongjiang University, Harbin 150084, Heilongjiang, China)

Abstract: In this research, two strains which had the ability to degrade omethoate were isolated from the activated sludge polluted sampled in pesticide factory in Harbin city. The omethoate at the concentration of $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ could be degraded absolutely in 1 d, while the concentration of $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ could be degraded absolutely in 3 d; when the concentration of omethoate were up to $2000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, it could be degraded in 7 d and the degradation rate was 75.28% and 72.42% respectively. The growth rate of stains was postponed under higher concentration of pesticides. The research also showed that two strains did well in biodegradation other organ phosphate pesticides. They were identified as *Pseudomonas* and *Aerococcus* based on their physiological and biochemical properties and the sequence analysis of their 16SrDNA.

Key words: Omethoate; Biodegradation; *Pseudomonas*; *Aerococcus*

氧化乐果是一种具有广谱、内吸等特点的高效、高毒性的有机磷农药,作为大田及蔬菜杀虫剂其世界销售量位于有机磷农药的前10位,是目前我国用量最大的高毒有机磷农药之一。因此筛选出高效的降解菌株对于生物降解农田内氧化乐果残留,解决农药污染严重问题具有较大的现实意义。目前,国内外研究微生物降解马拉硫磷、对硫磷、乐果等品种已有相关报道^[1],而有关氧化乐果农药的研究则少见报导,石成春研究在氧化乐果和葡萄糖共基质条件下曲霉G21降解氧化乐果,分析了中间产物的生成及积累效应,在4 d后降解率达到40%^[2]。

从哈尔滨农药厂污水处理池的活性污泥中筛选获得多株能彻底降解氧化乐果的菌株。其中菌株

HDMJ-2和HDMJ-23具有较好的降解性能。通过生理生化分析和16SrDNA同源分析发现,这两株菌与假单胞菌属和气球菌属及其相似,将HDMJ-2暂定为假单胞属,命名为*Pseudomonas sp.* HDMJ-2,将HDMJ-23鉴定为气球菌属*Aerococcus sp.* HDMJ-23。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤样品 采自哈尔滨化工六厂车间及其周围被污染的土壤。

1.1.2 培养基 LB培养基:牛肉膏5 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、蒸馏水1 000 mL、pH值7.0~7.2。

收稿日期:2008-10-17

作者简介:李玉梅(1971-),女,副研究员,博士研究生,主要从事土壤微生物、植物营养等方面的研究。E-mail:liyumeiwxy1@126.com。

葡萄糖铵盐培养基:葡萄糖 10 g、 NH_4Cl 2 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 1.5 g、 MgSO_4 0.2 g、 NaCl 0.5 g、蒸馏水 1 000 mL、pH7.0~7.2。

1.1.3 试剂 50 × TAE:242 g Tris,57.1 mL 冰乙酸,100 mL 0.5 mol · L⁻¹ EDTA (pH8.0);1 × TA:取 10 mL 50 × TAE 置于 500 mL 容量瓶中,用去离子水定容至 500 mL;6 × Loadingbuffer:0.25% 溴酚蓝,40% (m/v) 蔗糖水溶液,4℃ 保藏。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离与筛选 取土样 2.0 g 放入装有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,其中氧化乐果浓度为 1 000 mg · L⁻¹,置于 30℃,180 r · min⁻¹ 摇床培养。每周移接一次,按 5% 接菌量接入新鲜培养液中,并逐渐提高氧化乐果浓度,至培养液中氧化乐果浓度达到 4 000 mg · L⁻¹,采用平板划线培养,根据菌落形态和大小进行纯种分离,并转入普通培养基斜面,4℃ 保藏。

1.2.2 气相色谱法测定有机磷农药 取培养液 50 mL 于 250 mL 分液漏斗中,加 NaCl 5 g,溶解后加入 100 mL 1:1 (体积比) 的二氯甲烷和正己烷混合萃取剂,充分振摇,待静置分层后收集有机相,再用 50 mL 混合萃取剂重复萃取 2 次;将合并的萃取液通过盛有无水硫酸钠的漏斗,然后用二氯甲烷洗涤硫酸钠,收集洗涤液并与萃取液合并;将收集的有机溶液用氮气浓缩至 2 mL。

气相色谱条件:氮气(载气)215 mL · min⁻¹,氢气 75 mL · min⁻¹,空气 100 mL · min⁻¹;进样口温度 220℃,检测器温度 250℃。

1.2.3 菌株在不同浓度氧化乐果中的生长量 将保藏的菌株 HDMJ-2,HDMJ-23 活化过夜,分别接种于牛肉膏蛋白胨水培养基中,培养 16~18 h 后,按照 5% 接种量接种于 50 mL 含氧化乐果浓度分别为 0 mg · L⁻¹、1 000 mg · L⁻¹、2 000 mg · L⁻¹ 的葡萄糖铵盐液体培养基中,每隔 24 h 比色测定菌体 OD₆₀₀ 值。

1.2.4 降解菌的有机磷农药抗性谱及降解谱 将过夜活化的菌株 HDMJ-2,HDMJ-23 分别接种于含有水胺硫磷、辛硫磷、甲拌磷、氧化乐果、敌敌畏、毒死蜱(浓度为 150 mg · L⁻¹) 等有机磷农药的葡萄糖铵盐培养基中,12 h 后测定各种有机磷农药含量,并逐渐提高各种有机磷农药浓度,测定菌株对有机磷农药耐受程度。

$$\text{降解率} = \frac{\text{加入量} - \text{剩余量}}{\text{加入量}} \times 100\%$$

1.2.5 菌株 DNA 提取及 16SrDNA 扩增 按照文

献方法进行基因提取^[3],回收克隆的 DNA 片段以质粒形式送交上海生物工程公司测序。

2 结果与分析

2.1 氧化乐果降解菌的分离

通过富集驯化培养,从农药污水处理池的活性污泥中筛选获得 2 株能彻底降解氧化乐果的菌株,命名为 HDMJ-2 和 HDMJ-23。氧化乐果浓度为 100 mg · L⁻¹ 时,两株菌在 1 d 内可完成降解,氧化乐果浓度为 200 mg · L⁻¹ 时,两株菌在 3 d 内可完成降解,浓度在 1 000 mg · L⁻¹ 时 7 d 内可完成降解,浓度达 2 000 mg · L⁻¹ 时 7 d 内降解率可分别达到 75.28% 和 72.42%。

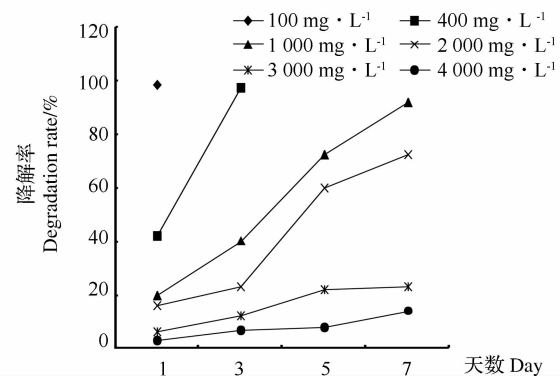


图1 HDMJ-2 对不同浓度氧化乐果的降解

Fig.1 degradation rate of different concentration of omethoate

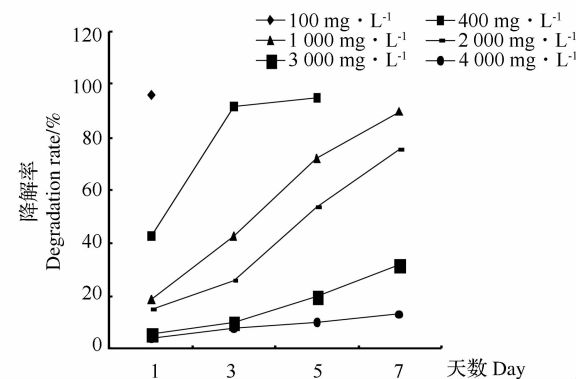


图2 HDMJ-23 对不同浓度氧化乐果的降解

Fig.2 Degradation rate of different concentration of omethoate

2.2 菌株在氧化乐果不同浓度条件下的生长曲线

由图3、4可见,氧化乐果浓度在 1 000 mg · L⁻¹ 以下变化时,菌体的生长基本不受影响,约 19 h 时进入生长最高峰;在氧化乐果达到 2 000 mg · L⁻¹ 时,两株菌的生长明显受到了抑制,直到 23 h 后才

达到生长最高峰,对数生长期后延明显,并且菌体生长量明显下降,这可能与氧化乐果的毒性、菌株对氧化乐果的耐受性与适应性有关。 $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度已经很高,自然土壤中的有机磷农药残留量远低于此值,所以两株菌具有一定的实际应用的潜力和价值。

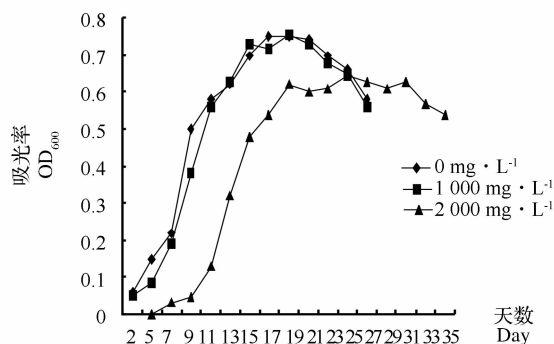


图3 菌株 HDMJ-2 在不同氧化乐果浓度中的生长曲线

Fig.3 Growth curve of strain HDMJ-2 in different concentration of omethoate

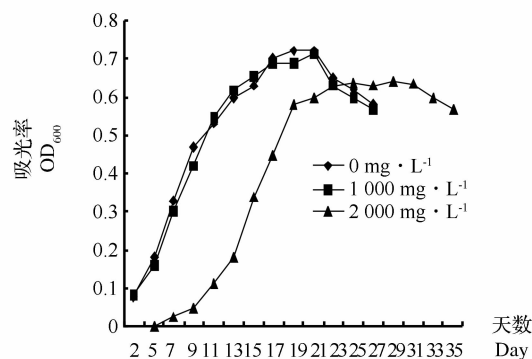


图4 菌株 HDMJ-23 在不同氧化乐果浓度中的生长曲线

Fig.4 Growth curve of strain HDMJ-23 in different concentration of omethoate

2.3 菌株对有机磷农药的耐受谱

菌株 HDMJ-2、HDMJ-23 对不同有机磷农药的耐受性与有机磷农药的毒性成正比关系,对低毒性的毒死蜱其耐受性分别达到 15% 和 13%;对于中毒性的水胺硫磷耐受性分别为 10%、5%,对高毒的辛硫磷耐受性为 2.5% 和 1.5%;对同样高毒的氧化乐果耐受性均为 2%;而对于剧毒的敌敌畏均为 0.5%。菌株对多种有机磷农药的耐受性与降解效果虽无直接关系,但是自然环境复杂,其对菌株的适用范围影响较大。

在 Ops 降解谱试验中($150\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),两株菌对五种有机磷农药的降解效果相近,维持在 55% ~ 80% 之间;对于耐受性较差的敌敌畏的降解效果分别达到 57.3% 和 56%,与其他种类有机磷农药的降

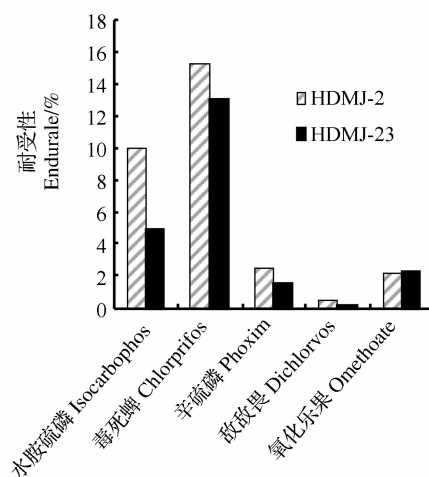


图5 菌株对有机磷农药的耐受谱

Fig.5 The endurable ability of the strains to omethoate

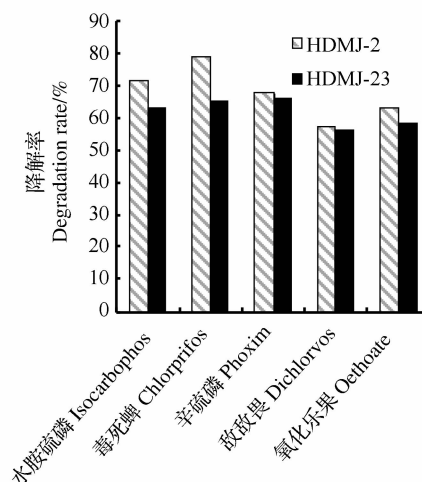


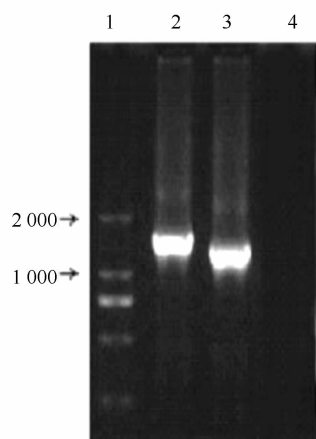
图6 菌株对有机磷农药的降解率

Fig.6 The degradation rate of the strains to omethoate

解效果差距不大,这更进一步说明了菌株对农药的耐受性与降解率不成正比关系,只与酶种类和产量相关^[6]。

2.4 降解菌的 16SrDNA 序列分析

以水煮法提取的基因组 DNA 为模板,用引物 A 和 B 进行 PCR 扩增,得到约 1.5 kb 和 1.2 kb 的 PCR 产物。将 PCR 扩增产物进行胶回收、连接到 pG M - T 载体上,并转化到 DH5 α 热击感受态细胞中,在含 $75\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性转化子,并且用 T7, SP6 直接扩增白色菌落进行验证,结果见图 7。16SrDNA 序列同源比对表明菌株 HDMJ-2 为 *Pseudomonas* sp, HDMJ-23 为 *Aerococcus* sp。



1: D 2000 Marker; 2: HDMJ-2; 3: HDMJ-23; 4: 水 CK

图 7 16SrDNA 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR detection of positive clones

3 讨论

大豆蚜虫、食心虫是目前黑龙江省大豆生育期内主要虫害,尤其是近几年虫害发生频繁,危害面积之大已严重影响到粮食的产量和质量。在防治这类害虫上主要以乐果、氧化乐果、敌敌畏、氯氰菊酯等农药为主,并多为内吸性药剂,因此造成土壤和植株中农药残留严重。生物降解是消除农药污染物并且二次污染低的有效方式,也是目前研究农药残留降

解的主要方向。通过对剧毒农药氧化乐果降解菌的筛选和分离,获得降解效率较高且具有广谱降解效果的两株菌株,关于菌株复配制剂及其在田间应用还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 柏文琴,何凤琴,邱星辉. 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. (Bo W Q, He F Q, Qiu X H. The researching progress on biodegradation organ phosphorus pesticide[J]. Application and Environment Biology Journal, 2004,10(5):675-680.)
- [2] 石成春,徐升,傅彦斌. 氧化乐果曲霉降解特性和中间产物的研究[J]. 中国环境科学,2004,24(2):180-183 (Shi C C, Xu S, Fu Y B. Researching on characteristics and middle production of aspergilli on biodegradation omethoate [J]. China Environment Science, 2004,24(2):180-183.)
- [3] 沈德新,封志纯,杜江. 细菌 DNA 提取方法比较[J]. 中原医刊, 2006,31(10):20-22. (Shen D X, Feng Z C, Du J. Comparison on extracting bacterium DNA [J]. Central Plain Medicine Journal, 2006,31(10):20-22.)
- [4] Mulberry W, Kames J. Parathion hydrolyses specified by the Flavobacterium pod gene[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 6740-6746.
- [5] Ramirez M, Carrion Gigabitobi Y, Nava Acampo A. Theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organ phosphorus pesticide[J]. Toxicology, 2000, 149:63-68.
- [6] Neck D M. Enzymatic detoxify fiction of waste organ phosphate pesticide[J]. Agricultural Food, 1980, 28:10-11.
- [7] 张文明,娄远来,江荣昌. 选择性除草剂对不同龄期豚草的防除研究[J]. 植物保护, 1993, 19(2):37-38. (Zhang W M, Lou Y L, Jiang R C. Research on control of different age ragweed using selectivity herbicide[J]. Plant Protection, 1993, 19(2):37-38.)
- [8] 孙备,李建东. 豚草防治研究进展[J]. 农业现代化研究. 2005, 26(7):317-320. (Sun B, Li J D. Research advance on control of ragweed[J]. Research of Agricultural Modernization. 2005, 26(7):317-320.)
- [9] 祝心如,王威,赵国镇,等. 三裂叶豚草 (*Ambrosia trifida*) 对大豆根系生长及结瘤的影响[J]. 生态学报, 1997, 17(4):407-410. (Zhu X R, Wang W, Zhao G Z. Effect Of Ambrosia trifida on root growth and nodulation of soybean[J]. Acta Ecologica Sinica, 1997, 17(4):407-410.)
- [10] 孙漫红,刘杏忠. 淡紫拟青霉在大豆根际的定殖及对根际微生物的影响[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3):133-136. (Sun M H, Liu X Z. Colonization of *Paecilomyces lilacinus* on soybean root and its effect on Rhizosphere micro-organisms [J]. Microbiology, 1998, 25(3):133-136.)
- [11] Valerie M W, Cynthia A G. Plant - nematode interactions [J]. Plant Biology, 2003, 6:327-333.
- [12] Wang B, Wu W P, Liu X Z. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematocidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*[J]. Mycopathologia, 2007, 163:169-176.
- [13] 孙漫红,刘杏忠. 淡紫拟青霉在大豆根际的定殖及对根际微生物的影响[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3):133-136. (Sun M H, Liu X Z. Colonization of *Paecilomyces lilacinus* on soybean root and its effect on Rhizosphere micro-organisms [J]. Microbiology, 1998, 25(3):133-136.)
- [14] Sun M H, Gao L, Shi Y X, et al. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their bio-control potential [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2006, 93:22-28.
- [15] Chen S Y. Infection of *Heterodera glycines* by *Hirsutella rhossiliensis* in a Minnesota soybean field[J]. Journal of Nematology, 1997, 29:573.
- [4] 李秀梅. 恶性害草豚草的综合防治研究进展[J]. 杂草科学. 1997(1):7-9. (Li X M. The progress of the study on comprehensive control of ragweed which is the malignant damage grass[J]. Weed Science, 1997(1):7-9.)
- [5] 刘培廷,汪海洋,汪中遗. 山区豚草的发生及其防除技术[J]. 植物检疫, 1996, 10(6):374-375. (Liu P T, Wang H Y, Wang Z Y. Occurrence and control technology of ragweed in mountain area[J]. Plant Quaaantine, 1996, 10(6):374-375.)
- [6] 陈贤兴,何献武. 浙江省南麂岛豚草生物学特性及防除研究[J]. 河南科学, 2003, 21(1):51-53. (Chen X X, He X W. Research on biological characters and elimination of *Ambrosia artemisiifolia* in Nanji island, Zhejiang province[J]. Henan Science, 2003, 21(1):51-53.)