

# 蜡状芽孢杆菌 HY-1 降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响因素研究

段海明, 王开运, 王 冕, 姜莉莉, 乔 康, 任学祥

(山东农业大学植物保护学院, 农药毒理与应用技术省级重点实验室, 山东 泰安 271018)

**摘 要:**采用富集驯化培养和紫外分光光度计定量的方法,从农药生产企业的废水处理系统中分离筛选出 1 株能够降解甲基对硫磷和毒死蜱的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)HY-1,并系统研究了影响其降解甲基对硫磷和毒死蜱的主要因素。研究表明,菌株 HY-1 能够利用甲基对硫磷和毒死蜱为唯一磷源降解农药。HY-1 降解甲基对硫磷的适宜条件为:培养温度 30~35 ℃,pH 为 6~8,甲基对硫磷初始浓度为 10~50 mg·L<sup>-1</sup>,接种量 20%(体积比,菌体密度:稀释到菌悬母液(OD<sub>600</sub>=3.0)的 0.8~1 倍),添加葡萄糖不能促进菌株对甲基对硫磷的降解。HY-1 降解毒死蜱的适宜条件为:葡萄糖浓度 6 g·L<sup>-1</sup>,培养温度 30~35 ℃,pH 为 7.0,毒死蜱初始浓度 80~200 mg·L<sup>-1</sup>,接种量 20%(体积比,菌体密度:稀释到菌悬母液(OD<sub>600</sub>=3.0)的 0.8~1 倍)。结果表明,HY-1 菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的适宜条件相类似,只是降解所需的最适葡萄糖浓度和底物浓度不同。

**关键词:**蜡状芽孢杆菌;有机磷农药;生物降解;影响因素

**中图分类号:**X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)03-0437-07

## Degradative Characteristics of *Bacillus cereus* HY-1 to Methyl-parathion and Chlorpyrifos

DUAN Hai-ming, WANG Kai-yun, WANG Mian, JIANG Li-li, QIAO Kang, REN Xue-xiang

(College of Plant Protection, Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** A bacterial strain, *Bacillus cereus* HY-1, was isolated from the treatment system of the pesticide enterprises and its degradative characteristics to methyl-parathion and chlorpyrifos were studied by using the methods of enrichment culturing and the ultraviolet spectrophotometer determination. The results showed that the bacteria could utilize the methyl-parathion or chlorpyrifos as the unique phosphorus source. The optimal conditions for degrading methyl-parathion were as follows: the temperature of 30~35 ℃, the initial pH of 6~8, the initial methyl-parathion concentration of 10~50 mg·L<sup>-1</sup> and the inoculation amount of 20% in the experiment(*v/v*). The results also indicated that the optimal conditions for degrading chlorpyrifos was similar as above, except the different concentration of glucose or the substrate concentration.

**Keywords:** *Bacillus cereus*; organophosphorus insecticides; biodegradation; influencing factors

有机磷农药历来以其高效、廉价而被广泛应用,但其对人体健康造成的危害和对环境造成的污染不容忽视。有机磷农药大多为神经毒剂,抑制人体的乙酰胆碱酯酶(AChE)或胆碱酯酶(ChE),而且有的为弱烷化剂,能与鸟嘌呤起甲基化作用,会对人等非靶

标生物产生直接或间接的毒害效应。众多研究表明,部分有机磷农药会导致哺乳动物的遗传突变性、迟发性神经毒性、内分泌和免疫系统功能紊乱以及脑发育不正常<sup>[1]</sup>。此外,由于在有机磷农药的生产和使用过程中,大部分农药散失到农业环境中,对农业生态环境造成很大危害<sup>[2]</sup>。

微生物降解去除有机磷农药污染被认为是一种安全、有效的方法。国内外已有很多关于微生物降解法处理有机磷农药污染的报道,其中甲基对硫磷降解菌主要有抗辐射不动杆菌(*Acinetobacter radioresistens*),

收稿日期:2009-07-21

基金项目:国家高技术研究发展计划(2007AA10Z404)

作者简介:段海明(1982—),男,山东临沂人,主要从事农药毒理方面的研究。E-mail:heminges88@163.com

通讯作者:王开运 E-mail:kywang@sdau.edu.cn

苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.), 节杆菌 (*Arthrobacter* sp.), 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*), 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 产碱菌 (*Alcaligenes* sp.), 邻单胞菌 (*Plesiomonas* sp.)<sup>[3-9]</sup>等; 毒死蜱降解菌主要有副球菌 (*Paracoccus* sp.), 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*), 肠杆菌 (*Enterobacter* sp.), 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*), 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*), 粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)<sup>[10-15]</sup>等。目前国内还鲜有蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 同时降解甲基对硫磷和毒死蜱特性的相关报道。

本研究从农药生产企业的废水处理系统中富集驯化分离到 1 株能够同时降解甲基对硫磷和毒死蜱的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 系统研究了影响其降解甲基对硫磷和毒死蜱的主要因素, 旨在寻找有价值的有机磷农药降解菌, 为有机磷农药单一与复合污染的环境微生物治理提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 培养基

富集培养基: 蛋白胨 10.0 g, NaCl 1.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g, 葡萄糖 1.0 g, 去离子水 1 L, pH 7.0。

基础培养基:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, NaCl 0.5 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.5 g, 酵母膏 0.05 g, 去离子水 1 L, pH 7.0。

普通培养基: 牛肉浸膏 3.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 酵母膏 1.0 g, 氯化钠 5.0 g, 去离子水 1 L, pH 7.0, 可加入 1.5% 的琼脂条制成固体培养基用于菌株的平板培养。

LB 培养基: 酵母膏 5.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 氯化钠 10.0 g, 去离子水 1 L, pH 7.0。

唯一磷源培养基: NaCl 1.0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 葡萄糖 10.0 g, 双蒸水 1 L, pH 7.0~7.5 (甲基对硫磷降解体系中不添加葡萄糖)<sup>[16]</sup>。

#### 1.1.2 药品与试剂

99.5% 甲基对硫磷 (methyl-parathion) 标准品 (CHEM SERVICE CO. LTD); 99.2% 毒死蜱 (chlorpyrifos) 标准品 (CHEM SERVICE CO. LTD); 50% 甲基对硫磷乳油 (实验室自配); 48% 毒死蜱乳油 (实验室自配), 其他试剂均为市售分析纯。

#### 1.1.3 活性污泥

采自山东某农药企业环保站生化处理池, 该企业自 20 世纪 70 年代以来长期生产甲基对硫磷、毒死蜱

等有机磷杀虫剂。

### 1.2 菌种的富集驯化、纯化与筛选

参照李卓棣等《农业微生物学实验技术》的方法进行菌株的富集驯化培养<sup>[17]</sup>, 然后将筛选出的菌株接种到甲基对硫磷和毒死蜱浓度分别为 200、400、800、1 000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的带毒普通培养基平板上, 72 h 后观察各菌株的生长情况, 选出能在较高浓度下生长的菌株, 转接到 LB 培养基中获得菌液, 分别接种到甲基对硫磷初始浓度为 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 毒死蜱初始浓度为 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的基础培养基中培养 60 h 后, 用紫外分光光度计 (UV-2201 型, 日本岛津) 在特定波长下测定甲基对硫磷和毒死蜱的残留量。最后确定 1 株菌作为研究的对象。菌种保存于  $-80^\circ\text{C}$ , 含有甲基对硫磷和毒死蜱各 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甘油生理盐水中。

### 1.3 两种农药残留量的提取与检测

培养结束后, 甲基对硫磷培养液用等体积的二氯甲烷提取 2 次, 毒死蜱培养液用等体积的石油醚提取 2 次, 分别合并 2 次提取液后用紫外分光光度计检测。利用甲基对硫磷和毒死蜱分别在  $\lambda=275 \text{ nm}$ <sup>[18]</sup> 和  $\lambda=292 \text{ nm}$ <sup>[19]</sup> 左右有特征吸收峰的特性, 分别在  $\lambda=275 \text{ nm}$  和  $\lambda=292 \text{ nm}$  处测定样品的  $\text{OD}_{275}$  与  $\text{OD}_{292}$ , 根据 2 种药剂的标准曲线计算样品中药剂的含量。经验证, 以上提取测定方法均能满足残留分析的要求。根据培养液中两种农药的残留浓度, 计算降解率。

菌株降解率的计算公式为:

$$X = \frac{C_{\text{CK1}} - C_{\text{X}}}{C_{\text{CK2}}} \times 100\%$$

式中:  $X$  为降解率;  $C_{\text{CK1}}$  为对照培养液中药剂的含量,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{X}}$  为处理培养液中药剂的含量,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{CK2}}$  为试验起始时实际测定药剂的含量,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.4 菌悬母液的制备

菌株划线培养于普通培养基平板上,  $35^\circ\text{C}$  培养 24 h 后, 转接于 LB 培养基中, 于  $35^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床恒温培养 48 h 后,  $2.6 \times 10^3 g$  离心 15 min, 弃去上清液, 收集菌体, 将菌体用基础培养基洗涤 2 次, 再用该培养基制成  $\text{OD}_{600}$  为 3.0 的菌悬母液 (唯一磷源试验时用双蒸水洗涤菌体和配制菌悬母液)<sup>[20]</sup>。

### 1.5 两种农药降解效率的测定和数据处理方法

将配制的菌悬母液, 以 20% (体积比) 的接种量接种到含有甲基对硫磷和毒死蜱的基础培养基中, 使培养液最终体积为 5 mL。每个处理设 3 个重复, 同时设不加菌液的处理为对照。降解培养结束后, 用 1.3 节的方法检测药剂的残留量。试验结果运用 SPSS13.0

和 Microsoft Excel for Windows 2003 软件进行统计分析。

## 1.6 降解菌在唯一磷源培养基中对两种农药的降解效率

以 20%(体积比,菌体密度:OD<sub>600</sub>=3.0)的接种量接种到甲基对硫磷初始浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup>、毒死蜱初始浓度为 100 mg·L<sup>-1</sup> 的唯一磷源培养基中,调节甲基对硫磷降解液的 pH 为 8.0,毒死蜱降解液的 pH 为 7.0,于 35 ℃、150 r·min<sup>-1</sup> 下恒温振荡培养,不同时间点取样测定甲基对硫磷和毒死蜱的残留量,计算降解率。

## 1.7 菌株降解有机磷农药的影响因素

### 1.7.1 葡萄糖浓度对降解率的影响

培养液以葡萄糖为外加碳源,浓度分别设置为 0、1、2、3、6 和 12 g·L<sup>-1</sup>,其中甲基对硫磷初始浓度设置为 50 mg·L<sup>-1</sup>,毒死蜱初始浓度设置为 100 mg·L<sup>-1</sup>,甲基对硫磷降解液的 pH 为 8.0,毒死蜱降解液的 pH 为 7.0,以 20%(体积比,菌体密度:OD<sub>600</sub>=3.0)的接种量接种降解菌,于 35 ℃、150 r·min<sup>-1</sup> 下恒温振荡培养,72 h 后提取测定培养液中两种药剂的残留量,计算降解率。

### 1.7.2 培养温度对降解率的影响

设定振荡培养的温度分别为 10、25、30、35 和 45 ℃,甲基对硫磷降解液中不添加葡萄糖,毒死蜱降解液中葡萄糖添加浓度为 6 g·L<sup>-1</sup>,其他培养参数同 1.7.1 节。72 h 后提取测定培养液中两种药剂的残留量,计算降解率。

### 1.7.3 初始 pH 值对降解率的影响

培养液的初始 pH 值分别设定为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0,同时每一个初始 pH 值设不加菌只加药剂的处理,培养温度为 35 ℃,其他培养参数同 1.7.2 节。72 h 后提取测定培养液中两种药剂的残留量,计算降解率。

## 1.7.4 农药初始浓度对降解率的影响

培养液中甲基对硫磷和毒死蜱的初始浓度分别设定为 10、25、50、80、100 和 200 mg·L<sup>-1</sup>,培养温度为 35 ℃,其他培养参数同 1.7.2 节。72 h 后提取测定培养液中两种药剂的残留量,计算降解率。

## 1.7.5 接种量对降解率的影响

按照 1.4 节菌悬液的制备方法,把得到的菌体先配成菌体密度为 OD<sub>600</sub>=3.0 的菌悬母液,再把所配菌悬母液稀释到原来母液的 0.05 倍、0.1 倍、0.2 倍、0.4 倍、0.8 倍和 1 倍,得到 6 种菌体密度的菌悬液。然后以 20%(体积比)的接种量接种降解菌,培养温度为 35 ℃,其他培养参数同 1.7.2 节。72 h 后提取测定培养液中两种药剂的残留量,计算降解率。

# 2 结果与讨论

## 2.1 甲基对硫磷和毒死蜱降解菌株的筛选及鉴定

从表 1 可见,经过富集驯化培养,共得到 10 株降解甲基对硫磷和毒死蜱的菌株。从菌株对甲基对硫磷的降解试验得出,HY-1、HY-2 与 HY-4 菌株对甲基对硫磷的降解率要比其他菌株高,其中 HY-1 对甲基对硫磷的降解率最高且与其他菌株之间有极显著性差异( $P<0.01$ );对毒死蜱的降解除了 HY-8 之外,其余菌株对毒死蜱的降解率无显著性差异( $P>0.01$ )。依据 HY-1 对甲基对硫磷的降解率最高,选取 HY-1 作进一步研究。菌株 HY-1 在普通培养基平板上,35 ℃培养 48 h 后,菌落近圆形,灰白色,表面白蜡状,不透明,无光泽,中央凸起,边缘不整齐,革兰氏染色呈阳性,杆状,周生鞭毛,产芽孢。经 16S rDNA 序列分析结合菌株的生理生化特征测定,初步鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)(图 1)。

## 2.2 降解菌在唯一磷源培养基中对两种农药的降解

由图 2 可见,在唯一磷源培养基中,HY-1 能够高效降解初始浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup> 的甲基对硫磷,6 h 时

表 1 甲基对硫磷、毒死蜱降解菌株的分离筛选

Table 1 Isolated methyl-parathion and chlorpyrifos degrading bacteria

| 菌株   | 降解率/(平均值±标准偏差) |             | 菌株    | 降解率/(平均值±标准偏差) |             |
|------|----------------|-------------|-------|----------------|-------------|
|      | 甲基对硫磷          | 毒死蜱         |       | 甲基对硫磷          | 毒死蜱         |
| HY-1 | 88.3±1.7A      | 42.9±9.2AB  | HY-6  | 45.5±2.0E      | 29.3±7.3BC  |
| HY-2 | 57.1±2.6C      | 53.0±6.8A   | HY-7  | 44.6±3.5E      | 50.0±9.0AB  |
| HY-3 | 57.0±7.2C      | 51.4 ±1.5AB | HY-8  | 37.7±1.6F      | 24.8±1.9C   |
| HY-4 | 81.8±2.5B      | 54.1±7.7A   | HY-9  | 34.7±2.5F      | 35.2 ±6.5AB |
| HY-5 | 51.9±2.6CD     | 45.7±9.5AB  | HY-10 | 48.5±1.4DE     | 48.5±7.4AB  |

注:表中数据后标相同大写字母者表示经 Duncan 检验,在  $P_{0.01}$  水平上差异不显著。

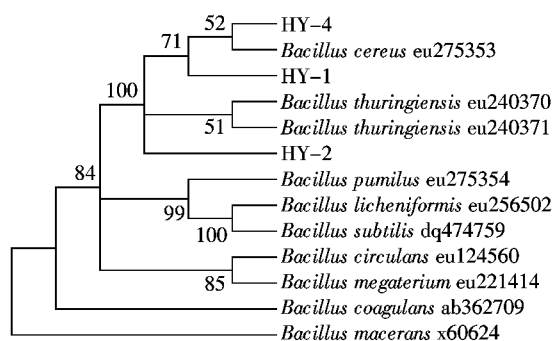
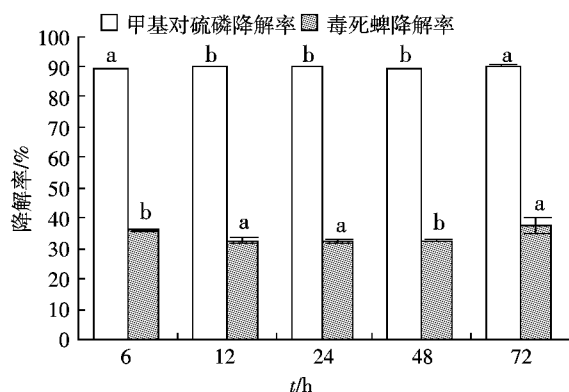


图 1 HY-1 菌株的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of the degrading bacterial strain of HY-1

降解率达到 89.1%, 随着培养时间的延长, 降解率没有显著的变化。HY-1 也能利用  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的毒死蜱为唯一磷源生长, 在降解培养 72 h 时, 降解率达到最高为 37.2%, 降解率要比菌株对甲基对硫磷的降解率低得多。



注: 数据之间的显著性差异用 Duncan 检验, 同一柱状图 (曲线) 标的字母不同表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 字母相同表示处理间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下同。

图 2 HY-1 以甲基对硫磷和毒死蜱为唯一磷源时对两种农药的降解效率

Figure 2 The degradation rates of methyl-parathion and chlorpyrifos that used as the unique phosphorus source by strain HY-1

## 2.3 菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响因素

### 2.3.1 葡萄糖浓度对降解率的影响

从图 3 可见, 当甲基对硫磷初始浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 降解菌在不同的葡萄糖浓度之间对甲基对硫磷的降解率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 表明外加葡萄糖不能够提高降解菌对甲基对硫磷的降解率, HY-1 对甲基对硫磷的降解率保持在 85% 左右。HY-1 对毒死蜱的降解率随着外加葡萄糖浓度的增加先下降后升高。当

葡萄糖浓度达到  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 对毒死蜱的降解率达到最大为 62%, 随后, 降解率又有所下降。当葡萄糖浓度为 0 和  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 降解率没有显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 在较低的葡萄糖添加浓度 ( $1$  和  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 时, 降解率也没有明显差异 ( $P > 0.05$ )。这表明在 72 h 的培养时间内, 降解菌能够在不添加葡萄糖的情况下降解毒死蜱, 但是降解率不能达到添加葡萄糖 ( $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的水平, 这可能是因为菌株在不添加葡萄糖时缺乏易于利用的碳源, 增殖受到抑制所致。在葡萄糖存在时, 降解菌优先利用易于利用的葡萄糖, 只有当葡萄糖增加到一定浓度后, 降解菌才能迅速增殖。因此, 当葡萄糖浓度低于  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 菌株增殖较慢, 菌体数量相对较少, 在有限的 72 h 培养时间内降解率达不到不添加葡萄糖和葡萄糖浓度为  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的水平。当葡萄糖浓度为 6 和  $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 降解率同样没有显著性差异而显示有所降低 ( $P > 0.05$ ), 这同时也说明, 葡萄糖浓度只有在一定的范围之内才能促进 HY-1 对毒死蜱的降解。

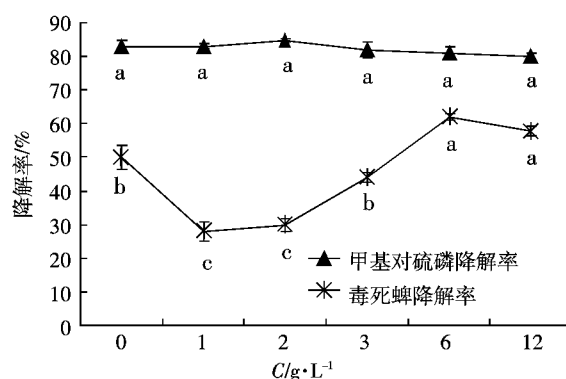


图 3 葡萄糖浓度对菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响

Figure 3 The effect of the glucose concentration on degradation rates of methyl-parathion and chlorpyrifos

### 2.3.2 培养温度对降解率的影响

从图 4 可见, 在不同的培养温度下, HY-1 对甲基对硫磷和毒死蜱的降解率先升高后降低。其中 72 h 内降解菌对  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  甲基对硫磷的降解率在  $30^\circ\text{C}$  时达到最大为 87%, 与  $35^\circ\text{C}$  时无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 与其他温度有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。在试验温度设置范围内, 都能较快的降解甲基对硫磷, 最低降解率也能达到 38.3%, 说明菌株对甲基对硫磷的降解有较宽泛的温度适应范围; 相比较而言, 降解菌在 72 h 内对  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的毒死蜱的降解率则相对较低, 在  $35^\circ\text{C}$  达到最大为 61%。从毒死蜱随温度升高的降解曲线可以

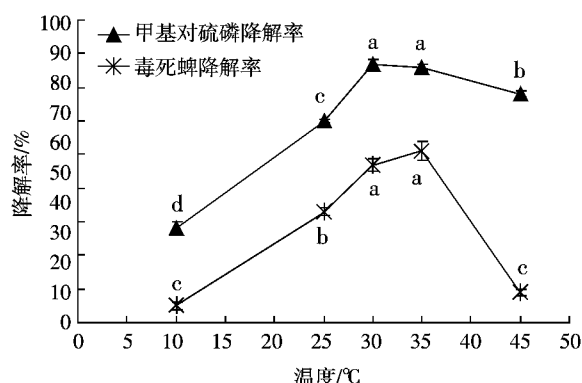


图4 温度对菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响

Figure 4 The effect of temperature on degradation rates of methyl-parathion and chlorpyrifos

看出,该菌对毒死蜱降解的最适温度范围同样为 30~35 °C,与其他温度之间有显著性差异( $P<0.05$ )。其中,当温度为 10 °C 和 45 °C 时降解率降到 20% 以下,说明低温和高温对菌株降解毒死蜱都不利。

### 2.3.3 初始 pH 值对降解率的影响

从图 5 可见,初始 pH 在 5~10 范围内,HY-1 对甲基对硫磷和毒死蜱的降解率先升高后降低,当 pH 为 7 时,对甲基对硫磷的降解率达到最大为 77%,当 pH 为 6、7、8 时,降解率无显著性差异( $P>0.05$ ),但和 pH 为 5、9、10 时有显著性差异( $P<0.05$ )。当 pH 为 7 时,对毒死蜱的降解率达到最大为 58%,并且和 pH 为 5、6、8、9、10 时差异性显著( $P<0.05$ )。这说明,pH 过小或过大都不利于菌株对甲基对硫磷和毒死蜱的生物降解,中性环境较适宜 HY-1 对这两种农药的降解。

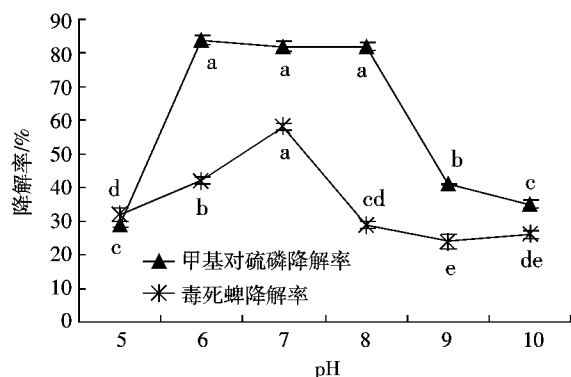


图5 pH 对菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响

Figure 5 The effect of pH on degradation rates of methyl-parathion and chlorpyrifos

### 2.3.4 农药初始浓度对降解率的影响

从图 6 可见,当甲基对硫磷浓度在 10~50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,降解率较高,各浓度降解率之间没有显著性差异( $P>0.05$ )。当甲基对硫磷的浓度为 25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到

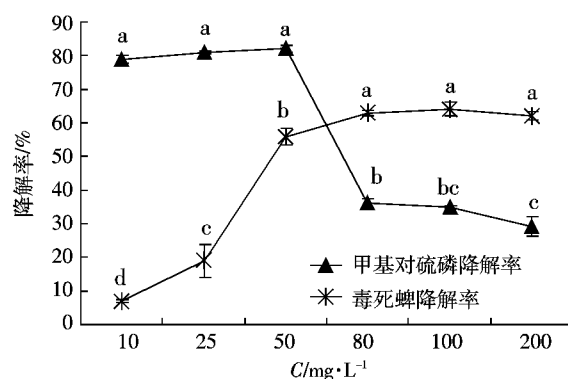


图6 农药初始浓度对菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响

Figure 6 The effect of initial concentration on degradation rates of methyl-parathion and chlorpyrifos

最高为 81%。随着甲基对硫磷浓度的增加,降解率迅速下降,当甲基对硫磷浓度达到 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,下降速率减缓,当浓度为 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,降解率达到最低为 29%,和甲基对硫磷浓度为 80、100、200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时无显著性差异( $P>0.05$ ),且和甲基对硫磷浓度为 10~50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  之间时有显著性差异( $P<0.05$ )。这说明 HY-1 能高效降解相对较低浓度的甲基对硫磷,对高浓度的甲基对硫磷降解效率较低,这可能是由于高浓度甲基对硫磷对菌株的毒性开始显现,或其降解产物对降解菌的增殖有抑制作用。HY-1 对毒死蜱的降解率随着毒死蜱浓度的增加而逐渐增大,当达到 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时增加速率减缓,当毒死蜱浓度达到 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,降解率最大达到 63%。当毒死蜱浓度为 80、100、200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,降解菌对毒死蜱的降解率较高且无显著性差异( $P>0.05$ ),和毒死蜱浓度为 10~50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时的降解率有显著性差异( $P<0.05$ ),这与菌株对甲基对硫磷的降解情况相反。这说明,毒死蜱的初始浓度过低,细菌不容易利用,导致降解率较低,随着毒死蜱浓度的提高,单位菌体对应的毒死蜱量越多,细菌的产量越大,毒死蜱的降解速率则越快。

### 2.3.5 接种量对降解率的影响

从图 7 可见,甲基对硫磷的降解率随着接种量的增加而升高,当菌体密度为所配菌悬母液的 0.8 和 1 倍时,降解率达到最大为 88%,降解率之间无显著性差异( $P>0.05$ )。毒死蜱的降解率随着接种量的增加也迅速提高,当菌体密度从所配菌悬母液的 0.05 倍增加到所配菌悬母液的 1 倍时,菌株对毒死蜱的降解率增加了 2 倍( $P<0.05$ ),当菌体密度为所配菌悬母液的 0.8 和 1 倍时,降解率无显著性差异( $P>0.05$ )。这说明以上两种菌体密度都能满足降解菌快速降解甲基对硫磷和毒死蜱的要求。

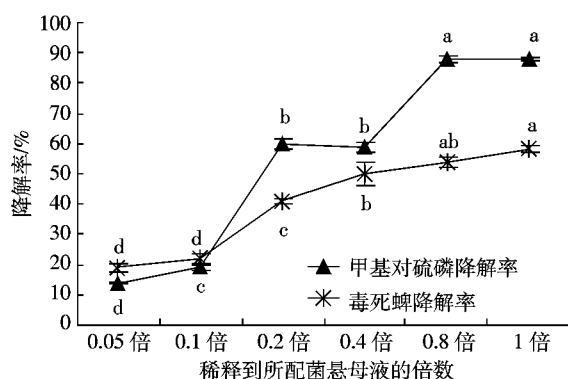


图 7 接种量对菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的影响

Figure 7 The effect of inoculation amount on degradation rates of methyl-parathion and chlorpyrifos

### 3 结论

(1)HY-1 菌株能够利用初始浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甲基对硫磷和初始浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的毒死蜱为唯一磷源降解农药,6 h 内的降解率分别达到 89.1% 和 35.9%。

(2)HY-1 菌株降解甲基对硫磷的适宜条件为:培养温度为  $30 \sim 35^\circ\text{C}$ ,初始 pH 为 6~8 之间,甲基对硫磷初始浓度  $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,接种量 20%[体积比,菌体密度:稀释到所配菌悬母液( $\text{OD}_{600}=3.0$ )的 0.8~1 倍],添加葡萄糖不能促进菌株对甲基对硫磷的降解。HY-1 降解毒死蜱的适宜条件为:葡萄糖浓度  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,培养温度  $30 \sim 35^\circ\text{C}$ ,初始 pH 为 7.0,毒死蜱初始浓度  $80 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,接种量 20%[体积比,菌体密度:稀释到所配菌悬母液( $\text{OD}_{600}=3.0$ )的 0.8~1 倍]。

(3)HY-1 菌株降解甲基对硫磷和毒死蜱的适宜条件相类似,只是降解所需的最适葡萄糖浓度和底物浓度不同。相比较而言,菌株能够高效降解浓度较低的甲基对硫磷,对毒死蜱的降解则与之相反。

#### 参考文献:

- [1] Singh B K, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30:428-471.
- [2] 梁伊丽,曾富华,卢向阳. 有机磷农药的微生物降解研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(6):51-55.  
LIANG Yi-li, ZENG Fu-hua, LU Xiang-yang. Advances in microbial degradation of organophosphorous pesticides[J]. *Journal of Microbiology*, 2004, 24(6):51-55.
- [3] Liu F Y, Hong M Z, Liu D M, et al. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04 [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19, 1257-1260.
- [4] Qiu X H, Zhong Q Z, Li M, et al. Biodegradation of p-nitrophenol by

- methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B2[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 59:297-301.
- [5] 解秀平,闫艳春,刘萍萍. 甲基对硫磷彻底降解菌 X4 的分离、降解性及系统发育研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(6):979-983.  
XIE Xiu-ping, YAN Yan-chun, LIU Ping-ping. Isolation, degradation and phylogenetic analysis of methylparathion degradative strain X4[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6):979-983.
- [6] 王彬彬,熊 丽,郑永良,等. 甲基对硫磷高效降解菌的分离鉴定及降解酶基因的克隆表达[J]. 环境科学学报, 2008, 28(10):1969-1975.  
WANG Bin-bin, XIONG Li, ZHENG Yong-liang, et al. Cloning and expression of the mpd gene from a newly isolated methyl-parathion-degrading strain of bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(10):1969-1975.
- [7] 陈亚丽,张先恩,刘 虹,等. 甲基对硫磷降解菌假单胞菌 WBC-3 的筛选及其降解性能的研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(4):490-497.  
CHEN Ya-li, ZHANG Xian-en, LIU Hong, et al. Study on *Pseudomonas* sp. WBC-3 capable of complete degradation of methylparathion [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(4):490-497.
- [8] 姜红霞,王圣惠,薛庆节,等. 甲基对硫磷降解菌 *Alcaligenes* sp. YcX-20 的分离鉴定及降解性能研究 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5):962-965.  
JIANG Hong-xia, WANG Sheng-hui, XUE Qing-jie, et al. Isolation, identification and characterization of a methyl-parathion degrading bacterium[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(5):962-965.
- [9] 周军英,林玉锁,徐亦钢,等. 邻单胞菌 DLL-1 对土壤中甲基对硫磷的降解[J]. 中国环境科学, 2002, 22(3):231-234.  
ZHOU Jun-yong, LIN Yu-suo, XU Yi-gang, et al. Degradation of parathion-methyl in soil by the *Plesiomonas* sp. DLL-1[J]. *China Environmental Science*, 2002, 22(3):231-234.
- [10] Xu G M, Zheng W, Li Y Y, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62:51-56.
- [11] Anwar S, Liaquat F, Khan Q M, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 168: 400-405.
- [12] Singh B K, Walker A, Wright D J. Bioremediation potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38:2682-2693.
- [13] Vidya L C, Kumar M, Khanna S. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62:204-209.
- [14] 兰亚红,谢 明,陈福良,等. 施氏假单胞菌 JHY01 菌株毒死蜱降解酶的定位及其提取条件的优化[J]. 中国生物防治, 2008, 24(4): 349-353.  
LAN Ya-hong, XIE Ming, CHEN Fu-liang, et al. Localization and extraction conditions of chlorpyrifos degrading enzyme from *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Chinese Journal of Biological control*, 2008, 24(4):349-353.
- [15] Yang L, Zhao Y H, Zhang B X, et al. Isolation and characterization of a

- chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 251(1):67-73.
- [16] 李 荣, 贾开志, 蒋建东, 等. 敌敌畏、敌百虫高效降解菌株 DDB-1 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 554-558.
- LI Rong, JIA Kai-zhi, JIANG Jian-dong, et al. Isolation and identification of a bacterium DDB -1 capable of degrading dichlorvos and trichlorfon Simultaneously and its degrading characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2):554-558.
- [17] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- LI Fu-di, YU Zi-niu, HE Shao-jiang. Agricultural microbiology experiment-technology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996.
- [18] 高 强, 邓灵福, 郑永良, 等. 甲基对硫磷降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 安全与环境学报, 2007, 7(3):22-25.
- GAO Qiang, DENG Ling-fu, ZHENG Yong-liang, et al. Study on isolating and characterizing HS -MP12 -a strain capable of degrading methyl parathion [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2007, 7(3): 22-25.
- [19] 王金花, 朱鲁生, 王 军, 等. 3 株真菌对毒死蜱的降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2):211-214.
- Wang J H, Zhu L S, Wang J, et al. Degradation characteristics of three fungi to chlorpyrifos[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, 11(2):211-214.
- [20] 李旭春, 刘桂芳, 马 军, 等. 1 株壬基酚降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2008, 29(1):231-236.
- LI Xu-chun, LIU Gui-fang, MA Jun, et al. Isolation, identification and biodegradation characteristics of a bacterial strain able to degrade nonylphenol[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(1):231-236.