# 及业环境计算报 JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE

### 中文核心期刊/CSCD

请通过网上投稿系统投稿 网址: http://www.aes.org.cn

#### 毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化

杜晓敏, 王金花, 朱鲁生, 王军, 杨莉莉, 林琳

#### 引用本文:

杜晓敏, 王金花, 朱鲁生, 等. 毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2437-2445.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0212

#### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 土壤中毒死蜱及主要代谢产物的降解与生态风险

刘寒冰, 王冬琦, 薛南冬, 邓艳玲, 袁雪红

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2446-2454 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0184

#### 红壤性水稻田土壤-水-植物系统中毒死蜱的迁移转化和分布特征

姚莹雷, 刘慧云, 程建华, 唐翔宇, 耿春女, 关卓

农业环境科学学报. 2020, 39(10): 2455-2464 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0118

#### 盐胁迫下甲维盐・毒死蜱对菜田土壤微生物生态效应研究

袁敏, 唐美珍, 罗彦鹤, 常文韬, 闫佩, 宋兵魁, 邢志杰, 赵晶磊, 廖光龙农业环境科学学报. 2015(10): 1936-1942 https://doi.org/10.11654/jaes.2015.10.014

#### 太湖水体中毒死蜱的污染特征及其生态风险评估

曹莹, 张亚辉, 闫振广, 朱岩, 刘征涛

农业环境科学学报. 2016, 35(12): 2413-2419 https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0884

#### 盐胁迫作用下甲维盐・毒死蜱对小白菜生理生化效应研究

张凤凤,魏建宏,罗琳,张嘉超,刘玉玲,唐美珍

农业环境科学学报. 2016, 35(5): 850-857 https://doi.org/10.11654/jaes.2016.05.005



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

2020,39(10): 2437-2445

杜晓敏, 王金花, 朱鲁生, 等. 毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(10): 2437-2445.

DU Xiao-min, WANG Jin-hua, ZHU Lu-sheng, et al. Characteristics of a chlorpyrifos-degrading bacterial strain and optimization of its degradation conditions by response surface methodology[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(10): 2437-2445.



开放科学OSID

### 毒死蜱降解菌降解特性及其降解条件优化

杜晓敏, 王金花\*, 朱鲁生, 王军, 杨莉莉, 林琳

(山东农业大学资源与环境学院,山东省高校农业环境重点实验室,山东 泰安 271018)

摘 要:为获得用于修复毒死蜱(Chlorpyrifos, CP)污染环境的高效降解菌,从大田土壤中分离、筛选出 1 株能降解毒死蜱的菌株,经形态特征和 16S rDNA 序列分析,该菌株为 Bacillus 属细菌,命名为 H27。单因素降解条件实验初步获得毒死蜱降解的最适时间为 48 h,最适温度为 25 ℃,最适 pH 为 7.0。降解酶定位实验结果表明,该降解菌产生的降解毒死蜱的代谢酶主要是胞内酶。为了提高降解率,采用 Box—Behnken 实验设计及响应面法分析,确定毒死蜱初始浓度为 25  $mg\cdot L^{-1}$ 时,其最优降解条件为降解时间 54 h、pH 为 7.2、温度为 24 ℃,在此实验条件下毒死蜱的降解率为 88.96%。

关键词:毒死蜱;降解菌;降解特性;单因素试验;响应面分析法

中图分类号:X172;X592 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2020)10-2437-09 doi:10.11654/jaes.2020-0212

## Characteristics of a chlorpyrifos-degrading bacterial strain and optimization of its degradation conditions by response surface methodology

DU Xiao-min, WANG Jin-hua\*, ZHU Lu-sheng, WANG Jun, YANG Li-li, LIN Lin

(College of Resources and Environment, Key Laboratory of Agricultural Environment in Universities of Shandong, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: In order to obtain a bacterial strain for bioremediating chlorpyrifos contamination, a bacterial strain capable of degrading chlorpyrifos was isolated from field soil. Based on its morphological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the strain was identified as *Bacillus* and named H27. Through single-factor degradation condition experiments, the results showed that its optimal degradation time was 48 h, optimal temperature was 25 °C, and optimal pH was 7.0. Localization of the chlorpyrifos-degrading enzyme was conducted, and the results showed that chlorpyrifos-degrading enzymes were mainly intracellular enzymes. In order to improve the chlorpyrifos degradation rate, three factors were further optimized using the Box-Behnken design and response surface analysis. When the initial concentration of chlorpyrifos was 25 mg · L<sup>-1</sup>, the optimal conditions were as follows: Time of 54 h, pH of 7.2, and temperature of 24 °C. Under these optimal conditions, the chlorpyrifos degradation rate reached 88.96%. This study provides information for the effective treatment of chlorpyrifos-contaminated soil.

Keywords: chlorpyrifos; bacterial strain; degradation characteristics; single-factor experiment; response surface methodology

毒死蜱作为广谱性有机磷杀虫剂具有高效、中等毒性等优点,是目前全球范围内应用最广泛的5种杀虫剂之一,广泛应用于蔬菜、棉花等作物[1-3]。 毒死蜱在农业生产上大量使用,其残留问题也引起 了人们的关注。随着使用量的增加,毒死蜱有可能通过多种途径进入地表水、地下水,对水生生物存在高风险,并最终影响环境生物和人体健康[4-5]。 Smalling等[6]发现在加利福尼亚州沿海中心河口处,

收稿日期:2020-02-27 录用日期:2020-04-15

作者简介:杜晓敏(1994—),女,山东潍坊人,硕士研究生,研究方向为环境污染治理与修复。E-mail:wfduxiaomin94@163.com

\*通信作者:王金花 E-mail:wjh@sdau.edu.cn

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0800703,2016YFD0201203);山东省自然科学基金项目(ZR2016JL029,JQ201711);泰山学者工程专项 Project supported: National Key R&D Program of China(2017YFD0800703,2016YFD0201203); The Natural Science Foundation of Shandong Province, China(ZR2016JL029,JQ201711); The Special Funds of Taishan Scholar of Shandong Province, China 鱼类和无脊椎动物体内频繁检测出毒死蜱的存在。Campillo等「在地中海沿海的一个流入湾湖的永久性河道口中发现,毒死蜱含量在所监测到杀虫剂中最高。毒死蜱在全球范围内的广泛使用,导致其在全球很多地区都可以被检测到,虽然这种残留量还不会导致水生生物养殖区和自然水体中水生生物的大量死亡或灭绝,但是会通过生物富集或者其他方式间接进入人体,最终影响人类健康「BI。有研究表明,日常暴露在毒死蜱污染环境下的人群的呼吸系统患癌率要高于其他人群「BII。调查显示,农业生产中使用的毒死蜱大部分最终会进入土壤环境,对土壤环境产生负面影响,毒死蜱施用到水稻土中,土壤中真菌数量明显减少,土壤酶活性也受到一定影响「IDII。因此,毒死蜱污染土壤修复需求越来越迫切。

微生物修复技术是目前应用最广的农药污染土 壤生物修复技术。自20世纪70年代以来,已分离并 鉴定出多株以毒死蜱为碳源和能源的真菌和细菌,其 中黄杆菌(Flavobacterium sp.)[11]是最早发现并被报道 的毒死蜱降解菌。另外,已报道的毒死蜱降解菌主要 有青枯菌(Ralstonia sp.)[12]、镰孢霉属(Fusarium LK.ex Fx)[13]和粪产碱杆菌(Alcaligenes faecalis)[14]等。Yadav 等[15]筛选获得的一株假单胞菌(Pseudomonas sp.)可以 有效降解高浓度毒死蜱,毒死蜱浓度为500 mg·L-1时 的24 h降解率为60%。张群等[16]筛选出一株寡养单 胞菌(Stenotrophoomonas sp.),在100 mg·L-1毒死蜱溶 液中,pH 7.0、温度30 ℃培养条件下,4 d内毒死蜱降 解率为59%。尽管目前对毒死蜱生物降解的研究已 经取得了明显进步,但仍需要分离更多降解菌以适应 不同环境的需要。为进一步丰富毒死蜱降解菌菌种 资源,优化菌株降解条件,本研究从大田土壤中筛选 分离出1株毒死蜱高效降解菌,并对其进行鉴定,采 用响应面分析法对菌株降解条件进行优化以提高降 解效率,以期为毒死蜱污染土壤原位生物修复提供材 料和方法基础。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

毒死蜱原药(97%)由山东华阳集团提供。气相 色谱分析所用试剂为分析纯。

LB液体培养基: NaCl 10.0 g,蛋白胨 10.0 g,酵母粉 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,调节 pH 到 7.0 左右,在 121 ℃下高压灭菌 20 min。

LB 固体培养基: NaCl 10.0 g,蛋白胨 10.0 g,酵母粉 5.0 g,琼脂粉 15.0 g,蒸馏水 1 000 mL,调节 pH 到 7.0左右,在121 ℃条件下高压灭菌 20 min。

毒死蜱母液:取1g毒死蜱,以丙酮为溶剂,定容到100 mL容量瓶中,充分摇匀,配成10000 mg·L<sup>-1</sup>母液。

毒死蜱溶液:取0.25 mL毒死蜱母液放入100 mL无机盐溶液中,使其浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 1.2 毒死蜱降解菌的富集与分离

取5g土壤加入到50 mL 100 mg·L⁻的毒死蜱无机盐富集培养液中,置于30℃、150 r·min⁻恒温摇床培养7d,以后每隔7d按10%接种量取培养液接入新鲜毒死蜱无机盐基础培养基中,以一定浓度梯度提高毒死蜱用量,至培养液浓度达到1000 mg·L⁻,如此驯化约2个月。采用平板划线法,将最后一次培养液进行分离,4℃冰箱保存。

#### 1.3 高效毒死蜱降解菌的筛选

将保存的纯化菌株接种至LB固体培养基中,划线分离单菌落。挑取单菌落至LB液体培养基中,30℃、150 r·min<sup>-1</sup>恒温振荡培养至对数生长期后期。连续活化2代后,用生理盐水将培养液离心洗涤两次并使菌体重悬。以3%接种量接种至毒死蜱无机盐基础培养基中,振荡培养24 h后检测毒死蜱含量,从中挑选降解毒死蜱能力最强的菌株。

#### 1.4 形态特征鉴定

肉眼观察降解菌的菌落形状、颜色、透明度、隆起和边缘特征,利用扫描电镜观察菌体大小和表面形态。

#### 1.5 16S rDNA 基因序列的测定

细菌基因组 DNA 采用 EasyPure Genomic DNA Kit 试剂盒进行 DNA 提取和纯化,对菌株的 16S rDNA 基因进行 PCR 扩增,细菌通用引物序列 F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;R: 5′-GGCTACC TTGTTACGACT-3′<sup>[17]</sup>。PCR 反应程序: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1 min,循环 30次; 72 ℃终延伸 10 min。待反应结束后,取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,于凝胶图像成像仪中观察凝胶电泳结果。由生工生物工程(上海)股份有限公司完成后续 PCR 扩增产物测序。

#### 1.6 毒死蜱降解菌降解率的测定

毒死蜱浓度采用安捷伦7890B气相色谱仪测定。 检测器为FID,检测器温度为300 ℃,进样口温度为 260 ℃: 柱温为程序升温, 初始温度为140 ℃, 以 15 ℃·min<sup>-1</sup>升到 200 ℃,保持 1 min;载气流量为 7 mL· min<sup>-1</sup>; 压力为 209 kPa, 恒压模式; 空气流量为 300 mL·min<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>流量为40 mL·min<sup>-1</sup>; 尾吹流量为10 mL· min<sup>-1</sup>;进样量为1 μL,保留时间4.6 min。本研究采用 外标法,方法检出限为0.05 μg·L<sup>-1</sup>,定量限为1.7 μg· L-1。 毒死蜱降解率计算公式:

#### 降解率=(A<sub>0</sub>-A)/A<sub>0</sub>×100%

式中:A。为未接菌对照培养液中毒死蜱的浓度,mg·  $L^{-1}$ ; A 为接菌处理培养液中毒死蜱的浓度, mg· $L^{-1}$ 。

#### 1.7 毒死蜱降解菌降解特性

#### 1.7.1 环境条件对菌株降解毒死蜱的影响

#### (1)时间对毒死蜱降解率的影响

以3%接种量将菌悬液接种至50 mL毒死蜱无 机盐培养液中,培养时间为12、24、48、72、96 h,pH为 7.0, 恒温培养箱 25 ℃、150 r·min<sup>-1</sup>振荡培养,底物浓度 为25 mg·L<sup>-1</sup>条件下,取样测定,计算毒死蜱降解率。

#### (2)温度对毒死蜱降解率的影响

以3%接种量将菌悬液接种至50 mL毒死蜱无机 盐培养液中,底物浓度为25 mg·L<sup>-1</sup>,pH 为7.0,调整培 养温度分别为15、20、25、30、35 ℃,150 r·min<sup>-1</sup>条件下 振荡培养,48h后分别取样测定并计算毒死蜱降解率。

#### (3)pH对毒死蜱降解率的影响

将毒死蜱浓度为25 mg·L<sup>-1</sup>的无机盐培养液调整 pH 为 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0, 高温灭菌后接种降解菌, 接种量为3%,在25 ℃、150 r·min<sup>-1</sup>条件下振荡培养, 48 h 后取样测定并计算毒死蜱降解率。

#### 1.7.2 响应面实验

在单因素试验基础上,利用Design-Expert 8.0.6 软件中Box-Behnken design(BBD)模型进行3因素3 水平实验设计,以培养时间(A)、pH(B)、温度(C)为 自变量,以降解率为唯一响应值,实验设计因素水平 见表1。

#### 1.7.3 降解酶定位实验

#### (1)降解酶提取方法

培养 24 h 的菌 H27 培养液于 4 ℃ 、8 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 6 min, 将下层菌体冷冻保存, 加入适量的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>于上清液中,混匀后使饱和度达到90%以 上,4℃盐析过夜,离心后收集下层沉淀,加入0.05 mol·L<sup>-1</sup>、pH为7.5的PBS缓冲液重悬,用相同缓冲液

表1 实验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of experiment design

因素	水平Level		
Factor	-1	0	1
时间(A)/h	24	48	72
pH(B)	6	7	8
温度(℃)/℃	20	25	30

透析至无SO<sup>2</sup>, 收集透析液即为胞外酶[18]。

将上一步保存的菌体溶于 10 mL 0.005 mol·L<sup>-1</sup>、 pH 为 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中, 25 ℃振荡 20 min, 再 次4℃、8000 r·min<sup>-1</sup>离心6 min,下层菌体重悬于冷 超纯水中,冰浴振荡6 min 后离心,上清液即为细胞周 质酶。

用现配的 0.05 mol·L<sup>-1</sup>、pH 为 7.5 的 PBS 缓冲液将 保存收集的菌体洗涤3次,收集的菌体按3 mL·g-1缓 冲液重悬,超声破碎480 s(功率300 W,工作时间4 s, 间隔2 s),将破碎细胞液于4 ℃、8 000 r·min<sup>-1</sup>条件下 离心 10 min,上清液即为胞内酶[18]。

#### (2)降解酶定位

将试验提取的3种粗酶液各取1 mL加入到50 mL毒死蜱降解培养液中,30 ℃、150 r·min<sup>-1</sup>培养6 h, 并设不加酶液的对照组,测定体系中毒死蜱浓度,并 计算降解率及酶活力,进而确定酶在细胞中的分布情 况。定义毒死蜱活力单位(U)为30℃条件下,1 mL 酶液1h转化1mol毒死蜱所需酶量。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 菌株的分离及鉴定

经分离和纯化获得一株毒死蜱高效降解菌,降解 率在80%以上,命名为H27。菌株H27菌落培养特征 和扫描电镜图如图1所示。其形态学特征如下:细胞 呈杆状,能产生芽孢;无鞭毛,不能运动。在LB平板 上的菌落形态:圆形,乳白色半透明,边缘整齐,中间 隆起,较黏稠。

通过将菌株 16S rDNA 序列与 GenBank 上其他 16S rDNA 序列进行 Blast 分析(图 2), 发现菌株 H27 与枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)的相似性为100%。 综合菌株形态特征以及16SrDNA序列分析结果,初 步鉴定菌株H27为枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)。

#### 2.2 环境因素对菌株 H27 降解毒死蜱效果的影响

图 3 为不同时间、不同温度和不同 pH 对菌株 H27 降解毒死蜱效果的影响。降解菌 H27 对毒死蜱

2440 农业环境科学学报 第39卷第10期







扫描电镜照片(×28 500) Scanning electron micrograph

#### 图1 菌株 H27 菌落形态及扫描电镜图

Figure 1 Colony of strain H27 and scanning electron microscopic

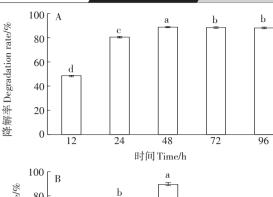
的降解随培养时间的变化如图3A所示。从图中可以 看出,随着培养时间的延长,降解菌对毒死蜱的降解 率不断增大,在第24h时降解已经趋于稳定状态,平 均降解率在80%以上,说明H27对毒死蜱具有高效 降解效果。

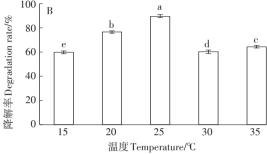
降解菌 H27 对毒死蜱的降解随温度的变化如图 3B 所示。从图中可以看出,随着培养温度的升高,降 解菌对毒死蜱的降解率不断增大,在25℃时达到最 大值,随着温度继续升高,毒死蜱的降解速率受到明 显抑制。

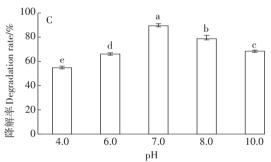
降解菌 H27 对毒死蜱的降解随 pH 的变化如图 3C 所示。从图中可以看出,降解菌对毒死蜱的降解 率随pH增大先增大后减小,在pH为7.0时达到最大 值,为87.2%。

#### 2.3 菌株 H27 降解毒死蜱条件的优化

综合考虑各因素对菌 H27 毒死蜱降解率的影响, 在单因素降解试验基础上,利用响应面分析法对降解 时间、温度、pH 3个因素分析得到菌 H27的最佳降解 条件。菌H27响应面分析实验设计及结果如表2所 示,对表2中的数据进行多元回归拟合,获得菌H27 对自变量温度、时间、pH的二元多次回归方程为:降 解率=88.46+0.90A+3.06B-0.80C-1.40AB+0.18AC-







不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05) The different lowercase letters indicate significant differences among treatments(P < 0.05)

图 3 时间、温度、pH 对菌株 H27 降解毒死蜱的影响 Figure 3 Effects of time, temperature and pH on chlorpyrifos degradation by H27

0.43BC-1.03A<sup>2</sup>-5.99B<sup>2</sup>-5.60C<sup>2</sup>。由表2可以看出零点 实验点的降解率较稳定,均在88%左右。

实验结果的回归分析见表3。对菌 H27 降解率 的回归方程进行检验,建立的模型是否有意义取决于 P值大小,P值远小于0.01,说明建立的模型有意义;失 拟误差P值为0.2546,不显著,说明方程对实验拟合

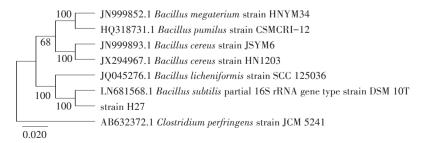


图 2 菌株 H27 的 16S rDNA 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain H27 on the 16S rDNA sequence

情况较好,误差小;模型校正决定系数 R<sup>2</sup>为 0.998 5, 说明此模型能解释99.85%的响应值变化,即此模型 与数据拟合度很高,实验误差小;标准偏差(Std)为 0.29, 平均数为82.52, 变异系数(CV)为0.35%, 表明 该模型具有较高的置信度,能够有效反映真实值的情 况。因此,该模型对菌H27降解毒死蜱条件的优化合 理而有效。

根据回归方程绘制响应面和等高线图,结果如图 4所示。由图4和表3可知,降解时间(A)和pH(B)的 交互作用显著,B影响显著性大于A,AB的交互作用 显著。A和C、B和C对降解菌的降解率影响显著,但 AC、BC的交互作用不显著。

通过 Box-Behnken 响应面优化得到枯草芽孢杆 菌 H27 降解毒死蜱的最佳降解条件为:降解时间 54 h,pH为7.2、温度为24℃时,毒死蜱降解率理论最优 值为88.96%。在此条件下进行实际毒死蜱降解实 验,得到实际毒死蜱降解率为88.16%(3次重复平均 值),与理论最优值拟合度达到99.20%,表明通过响 应面法对菌H27降解毒死蜱条件的优化合理有效,并 具有实际意义。

#### 2.4 毒死蜱降解酶的定位

提取毒死蜱降解酶,分别测定胞外酶、胞内酶和 细胞周质酶对毒死蜱降解效果的影响,实验结果如表 4所示。结果表明, 胞外粗酶液与毒死蜱反应, 30 min 内毒死蜱降解率为23.9%; 胞内粗酶液的酶活性较 强,降解率为49.6%;细胞周质酶活性略有减小,降解 率为35.2%。由此推断出降解菌产生降解毒死蜱的

表 2 菌 H27 的响应面分析试验设计及结果

Table 2 Experimental design for response surface analysis and corresponding experimental data

实验序号	时间	рН	温度	降解率
Codes	Time/h	pm	Temperature/℃	Biodegradation rate/%
1	0	0	0	88.75
2	-1	0	-1	81.82
3	0	1	1	78.58
4	-1	-1	0	76.05
5	0	0	0	88.08
6	0	0	0	88.49
7	0	1	-1	81.40
8	0	-1	1	73.18
9	0	0	0	88.42
10	0	-1	-1	74.30
11	-1	1	0	84.84
12	1	1	0	84.01
13	1	-1	0	80.83
14	1	0	1	82.18
15	1	0	-1	83.08
16	-1	0	1	80.22
17	0	0	0	88.55

关键酶是胞内酶。

#### 讨论

本研究成功分离出一株能降解毒死蜱的菌株,经 鉴定为枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)。目前从不同 地方分离出属于芽孢杆菌属的毒死蜱降解菌已有很 多,如侧芽孢杆菌 DSP<sup>[19]</sup>、Dsp-1 和 Dsp-3<sup>[20]</sup>,蜡状芽孢

表 3 菌 H27 响应分析试验回归分析结果

Table 3 Results of the regression analysis of response analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值 Paralar
Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	406.05	9	45.12	526.36	< 0.000 1
时间(A)	6.43	1	6.43	74.97	< 0.000 1
pH(B)	74.85	1	74.85	873.21	< 0.000 1
温度(C)	5.18	1	5.18	60.48	0.000 1
AB	7.87	1	7.87	91.79	< 0.000 1
AC	0.12	1	0.12	1.43	0.270 8
BC	0.72	1	0.72	8.43	0.022 9
$A^2$	4.49	1	4.49	52.39	0.000 2
$\mathrm{B}^2$	151.21	1	151.21	1 764.14	< 0.000 1
$C^2$	132.05	1	132.05	1 540.62	< 0.000 1
总残差Residual	0.60	7	0.086		
失拟误差 Lack of fit	0.36	3	0.12	2.01	0.254 6
纯误差 Pure error	0.24	4	0.060		
总和 Cor total	406.65	16			

2442 农业环境科学学报 第 39 卷第 10 期

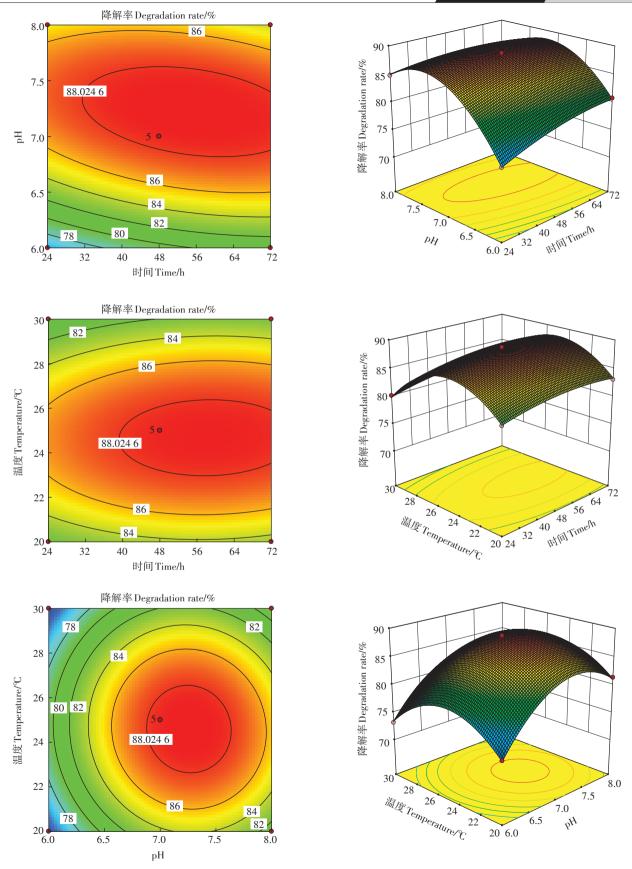


图4 时间、温度和pH及其交互作用对毒死蜱降解率影响的曲面图和等高线图

Figure 4 Response surface and contour plot of time, temperature, pH and their interactions on degradation of chlorpyrifos

#### 表 4 菌 H27 不同组分对毒死蜱的降解

Table 4 Biodegradation of chlorpyrifos in the different component of strain H27

组分Component	降解率 Biodegradation rate/%
胞外酶	23.9
胞内酶	49.6
细胞周质酶	35.2

杆菌 HY-1<sup>[21]</sup>、HY-4<sup>[22]</sup>和 FO-36bT<sup>[23]</sup>等。有报道指出, 该属细菌能降解许多污染物,如石油烃、苯酚、有机磷 农药等[24-25]。已有研究显示芽孢杆菌属菌株在污染 物微生物修复方面具有巨大潜力。但报道也指出,多 数毒死蜱降解菌环境适应性较差,例如侧芽孢杆菌 DSP在其降解最适 pH 为 7.0 时,降解率在 60% 以上, 而pH为5.0和9.0时,毒死蜱降解率仅为20%和30%, 说明该毒死蜱降解菌受pH影响较大,环境适应性较 差。本研究中降解菌 H27 为枯草芽孢杆菌,属于典型 的有益细菌,具有控制不同类型细胞发育的能力。因 此其对外界有害因子抵抗力强,分布于土壤环境、水 环境、大气环境及动物肠道等处。降解菌H27在中性 或弱碱性的条件下都具有较高的活性,在pH为4.0以 及pH为10.0的条件下依然具有明显的降解效果,即 使最低的降解率也达到了54.81%, 所以该菌对pH具 有较高的耐受性,可以适应比较宽范围的pH变化。

响应面分析法是结合实验设计和数学建模的一 种方法,目的是寻找多因素系统中的最佳条件,已被 广泛应用到微生物培养基优化中,但利用响应面分析 法优化降解条件的研究较少。已报道的降解菌降解 特性研究大部分都以单因素实验为主,例如范瑞娟 等[26]研究了不同盐度和 pH 条件下菌株对多环芳烃 (PAHs)的降解特性;钱娜等[27]研究了不同pH、温度和 NaCl浓度对降解菌株生长的影响: 贺强礼等[28]运用单 因素实验初步确定苯酚降解的最适条件,在此基础上 利用响应面分析法确定其最优降解条件,优化后的最 佳降解条件可使菌株对苯酚降解率提高7%左右;王 博等[29]在响应面法优化氨氮降解菌净化高原地区污 水研究中发现,降解时间、pH和接种量对降解率有显 著影响,且3因素交互作用对响应值有一定影响,响 应面分析法所得最佳降解条件比单因素实验降解条 件下提高8.12%。由此可以看出,与单因素实验相 比,在响应面分析优化后的降解条件下菌株降解率会 有一定提高。本研究利用响应面法优化设计,研究了 时间、pH和温度3个因素对菌株降解毒死蜱效果的 影响,得到最佳降解条件下降解率有一定提高,且实

际降解率与预测值接近,说明此方法能有效预测并优 化菌株对污染物的降解。在后续研究中可利用研究 所得模型与实际农药降解相结合,最大程度地去除环 境中的农药污染。在研究中发现,通过响应面实验优 化降解条件,一定程度上提高了降解菌降解率,但仍 不能达到100%,推测可能是毒死蜱降解产物对毒死 蜱降解过程产生了影响。有研究表明毒死蜱初级代 谢产物为3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP),累积的TCP 会对环境中细菌、真菌和放线菌产生一定抑制作用, 不仅影响微生物自身生长繁殖,还会抑制毒死蜱降

生物降解是通过生物作用,将大分子物质转化成 小分子化合物的过程。生物降解农药主要通过微生 物及有关酶来进行。目前研究普遍认为毒死蜱主要 通过共代谢和矿化作用进行微生物降解[32]。微生物 降解化学农药的作用方式有两大类:一类是通过酶 促反应。首先微生物细胞表面吸附农药,此过程是 动态平衡,降解初期出现"迟缓期";然后农药进入细 胞内;最后农药在细胞膜内发生酶促反应,此过程较 快。微生物通过酶促反应降解农药的方式主要有氧 化、脱氢、还原和水解等类型[33]。另一类是通过微生 物活动改变环境的理化特性,间接作用于农药[34]。 大多数微生物降解农药反应属于酶促反应。降解物 种类不同,降解酶在微生物细胞中分布位置也不同。 已有报道指出,一些降解酶属于胞内酶和胞外酶,还 有一些分布在细胞周质中。刘亚光等[35]研究发现降 解菌 W2 降解异噁草松关键酶是胞内酶; 王卓娅等[36] 研究发现克雷伯氏菌ZD112降解氯氰菊酯的关键酶 位于细胞内;汤鸣强等[37]发现一株降解三唑磷农药 的降解菌,其降解关键酶为胞内酶;任明[38]分离出一 株高效降解毒死蜱的不动杆菌(Acinetobacter sp.),通 过降解酶定位研究发现其降解关键酶是胞内酶;徐 莲等[39]发现降解功夫菊酯的芽孢杆菌 GF-3 的降解 酶是胞外酶。由此可见,微生物不同位置的降解酶 可能与污染物降解过程有关[40]。由于微生物对毒死 蜱降解过程的复杂性,且芽孢杆菌属降解毒死蜱的 微生物酶定位还不明确。因此,本研究以毒死蜱为 研究对象,通过室内实验研究毒死蜱微生物芽孢杆 菌降解酶定域,为降解酶的进一步研究提供了理论 基础。后续研究中应加强对降解机理的研究,开发 出更高效的降解酶资源。同时,毒死蜱降解酶基因 工程将是今后研究方向之一,通过基因工程技术将 毒死蜱降解酶基因克隆到宿主菌中使其高效表达,

构建高效农药降解菌,对于生态农业发展、保护生态 环境有着重要的意义。

#### 4 结论

- (1)本研究筛选出一株毒死蜱高效降解菌,将 其命名为H27。经菌落形态分析和16SrDNA基因 序列鉴定,确定菌株H27为枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)。
- (2)通过单因素实验确定毒死蜱降解的最适时间为48 h,最适温度为25 ℃,最适 pH为7.0。采用中心组合实验设计,结合 Box-Behnken 及响应面分析,优化菌株 H27降解条件为:降解时间54 h、pH7.2、温度24 ℃,在此条件下该毒死蜱高效降解菌对毒死蜱的降解率可达88.96%。
  - (3) 菌株 H27 降解毒死蜱的关键酶是胞内酶。

#### 参考文献:

- [1] Ferre D M, Luduena H R, Romano R R, et al. Evaluation of the genotoxic potential of cypermethrin, chlorpyrifos and their subsequent mixture, on cultured bovine lymphocytes[J]. Chemosphere, 2020, 243: 125341
- [2] Saha S, Mondal A, Mandal T. Study of formation of valuable organic products from bioremediation of chlorpyrifos by bacteria catalyzed by molybdenum and zinc salt[J]. *Bioremediation Journal*, 2019, 23 (2): 118-129.
- [3] Chara-Serna A M, Richardson J S. Chlorpyrifos interacts with other agricultural stressors to alter stream communities in laboratory microcosms[J]. Ecological Applications, 2018, 28(1):162-176.
- [4] Wang Y, Zhu Y, Li W. Comparative examination on synergistic toxicities of chlorpyrifos, acephate, or tetraconazole mixed with pyrethroid insecticides to honey bees (Apis mellifera L.) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(7):6971-6980.
- [5] Sumon K A, Rashid H, Peeters E T H M, et al. Environmental monitoring and risk assessment of organophosphate pesticides in aquatic ecosystems of north-west Bangladesh[J]. Chemosphere, 2018, 206:92-100.
- [6] Smalling K L, Kuivila K M, Orlando J L, et al. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 73(1):144-153.
- [7] Campillo J A, Albentosa M, Valdes N J, et al. Impact assessment of agricultural inputs into a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain) on transplanted clams (*Ruditapes decussatus*) by biochemical and physiological responses[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 142/143: 365-379.
- [8] 徐吉洋. 毒死蜱对小型组合系统中浮游动物的影响[D]. 杭州:浙江大学, 2015:8-9.
  - XU Ji-yang. Impact of chlopyrifos on zooplanktons in small-sized recombinant systems[D]. Hangzhou; Zhejiang University, 2015:8-9.
- [9] 刘瑾. 利用细菌生物氧化作用制备锰基键电池电极材料及降解毒死蜱的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2017:15-16.

- LIU Jin. Biofabrication of novel MnO based electrode materials for lithium ion batteries and complete biodegradation of chlorpyrifos through bacterial biooxidation approaches[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017:15–16.
- [10] 袁敏, 唐美珍, 罗彦鹤, 等. 盐胁迫下甲维盐·毒死蜱对菜田土壤微生物生态效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(10):1936-1942
  - YUAN Min, TANG Mei-zhen, LUO Yan-he, et al. Effects of salt and emamectin benzoate-chlorpyrifos mix on ecological characteristics of microorganisms in vegetable soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(10):1936–1942.
- [11] Pino N, Penuela G. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(6):827-831.
- [12] 王艳. 不同有机物料对有机磷农药污染土壤酶活性及土壤微生物量的影响[J]. 生态环境学报, 2014, 23(7):1205-1209. WANG Yan. Effect of organic materials on soil microbial biomass and soil enzyme in the soils contaminated by organophosphorus pesticides [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2014, 23(7):1205-1209.
- [13] 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):84-87.

  WANG Jin-hua, ZHU Lu-sheng, WANG Jun, et al. Degradation characteristics of three fungi to chlorpyrifos[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11(2):84-87.
- [14] 杨丽, 赵宇华, 张炳欣, 等. 一株毒死蜱降解细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):89-93.
  YANG Li, ZHAO Yu-hua, ZHANG Bing-xin, et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacteria and its bioremediation application in the soil[J]. Acta Microbiological Sinica, 2005, 45
- [15] Yadav M, Srivastva N S, Ram S, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. in a continuous packed bed bioreactor[J]. *Biore-source Technology*, 2014, 165:265–269.
- [16] 张群, 马晨, 张月, 等. 一株可同时降解毒死蜱和联苯菊酯降解菌的筛选鉴定及其降解特性初探[J]. 农药, 2017, 56(10);733-738. ZHANG Qun, MA Chen, ZHANG Yue, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of *Stenotrophomonas* sp. strain able to simultaneous degrade chlorpyrifos and bifenthrin[J]. *Agrochemicals*, 2017, 56(10);733-738.
- [17] Toru S, Tang Y, Hiromi K, et al. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(6):547-558.
- [18] 钱博. 毒死蜱高效降解细菌的筛选及其降解特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007:17-18.
  QIAN Bo. Isolation and degrading characters of chlorpyrifos degrading bacteria[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2007:17-18
- [19] 王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜱降解菌株 *Bacillus latersprorus* DSP 的降解特性及其功能定位[J]. 土壤学报, 2006, 43(4):648-654.

- WANG Xiao, CHU Xiao-qiang, YU Yun-long, et al. Characteristics and function of *Bacillus latersprorus* DSP in degrading chlorpyrifos[J]. *Acta Pedological Sinica*, 2006, 43(4):648-654.
- [20] Li X, Jiang J, Gu L, et al. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples[J]. *International Bio*deterioration & Biodegradation, 2008, 62(4):331-335.
- [21] 段海明, 王开运, 朱玉坤. 蜡状芽孢杆菌 HY-1 的生长及对毒死蜱的酶促降解特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5):668-676. DUAN Hai-ming, WANG Kai-yun, ZHU Yu-kun. The growth pattern of the *Bacillus* cereus HY-1 and the enzymatic degradation characteristics of insecticide chlorpyrifos[J]. *Microbiology China*, 2011, 38 (5):668-676.
- [22] Yu L, Duan H. Degradation characteristics of *Bacillus* cereus HY-4 to organic phosphorus pesticide chlorpyrifos[J]. *Journal of Anhui Science and Technology University*, 2017, 31(5):81-87.
- [23] Ishag A E S A, Abdelbagi A O, Hammad A M A, et al. Biodegradation of endosulfan and pendimethalin by three strains of bacteria isolated from pesticides-polluted soils in the Sudan[J]. Applied Biological Chemistry, 2017, 60(3):287-297.
- [24] 黄学, 伍晓林, 侯兆伟. 短短芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌降解原油烃机制研究[J]. 石油学报, 2006, 27(5):92-95.

  HUANG Xue, WU Xiao-lin, HOU Zhao-wei. Mechanismof degradation for petroleumhydrocarbon by *Brevibacillus* brevis and *Bacillus* cereus[J]. *Acta Petrolei Sinica*, 2006, 27(5):92-95.
- [25] 葛启隆, 王国英, 岳秀萍. 波茨坦短芽孢杆菌降解苯酚特性及动力 学研究[J]. 生物技术通报, 2014, 22(3):117-122. GE Qi-long, WANG Guo-ying, YUE Xiu-ping. Phenol degradation by *Brevibacillus* borstelensis and kinetic analysis[J]. *Biotechnology* Bulletin, 2014, 22(3):117-122.
- [26] 范瑞娟, 刘雅琴, 张琇. 嗜盐碱高环 PAHs 降解菌的分离及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(6):1280-1287. FAN Rui-juan, LIU Ya-qin, ZHANG Xiu. Isolation and degradation characteristics of haloalkaliphilic high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(6):1280-1287.
- [27] 钱娜, 王小兵, 汪晓丽, 等. 花生化感物质降解菌的筛选、鉴定与降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(6):1288-1295.

  QIAN Na, WANG Xiao-bing, WANG Xiao-li, et al. Isolation, identification, and degrading properties of allelochemicals-degrading bacteria of peanuts[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(6): 1288-1295.
- [28] 贺强礼, 刘文斌, 杨海君, 等. 一株苯酚降解菌的筛选鉴定及响应面法优化其降解[J]. 环境科学学报, 2016, 36(1):112-123.

  HE Qiang-li, LIU Wen-bin, YANG Hai-jun, et al. Isolation, identification of a phenol-degrading strain and optimization for phenol degradation using response surface methodology[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(1):112-123.
- [29] 王博, 王虹, 欧阳晓芳, 等. 响应面法优化氨氮降解菌净化高原地 区污水的研究[J]. 环境科技, 2017, 30(4):13-16. WANG Bo, WANG Hong, OUYANG Xiao-fang, et al. Optimizing the purification of wastewater in plateau area from ammonia-degrading bacteria by response surface methodology[J]. *Environmental Science*

- and Technology, 2017, 30(4):13-16.
- [30] Racker K D, Fontaine D D, Yoder R N, et al. Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates[J]. Pest Management Science, 2010, 42(1):43-51.
- [31] Singh B K, Walker A, Morgan J A W, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (8):4855-4863
- [32] Seyoum Y G, Marc W B. Effects of drain-fill cycling on chlorpyrifos mineralization in wetland sediment-water microcosms[J]. *Chemosphere*, 2010, 78(11):1337-1341.
- [33] 张娜娜, 姜博, 邢奕, 等. 有机磷农药污染土壤的微生物降解研究进展[J]. 土壤, 2018, 50(4):645-655.

  ZHANG Na-na, JIANG Bo, XING Yi, et al. Microbial degradation of organophosphorus pesticider contaminated soil[J]. Soils, 2018, 50(4):645-655.
- [34] 钱博, 朱鲁生, 谢慧, 等. 毒死蜱降解细菌 XZ-3 的分离及降解特性 研究[J]. 环境科学, 2007, 28(12);2827-2832.

  QIAN Bo, ZHU Lu-sheng, XIE Hui, et al. Isolation and degrading characters of chlorpyrifos degrading bacteria XZ-3[J]. Environmental Science, 2007, 28(12);2827-2832.
- [35] 刘亚光, 冯蕾, 步金宝, 等. 异噁草松降解酶的定位及酶学性质研究[J]. 植物保护, 2012, 38(6):80-85. LIU Ya-guang, FENG Lei, BU Jin-bao, et al. Localization and properties of clomazone-degrading enzyme[J]. *Plant Protection*, 2012, 38 (6):80-85.
- [36] 王卓娅, 刘玉焕, 李荷. 克雷伯氏菌 ZD112 氯氰菊酯降解酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3):277-281.
  - WANG Zhuo-ya, LIU Yu-huan, LI He. Molecular cloning and bioinformatic analysis of a novel pyrethroid hydrolyzing esterase from *Klebsiella* sp. strain ZD112[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2008, 24 (3):277-281.
- [37] 汤鸣强, 陈淑贤. 三唑磷农药降解酶的定位及酶学性质研究[J]. 广东农业科学, 2017, 44(1):115-121.

  TANG Ming-qiang, CHEN Shu-xian. Distribution and properties of triazophos degrading enzyme[J]. Guangdong Agriculture Sciences, 2017, 44(1):115-121.
- [38] 任明. 毒死蜱农药降解菌及其降解特性的研究[D]. 济南:山东师范大学, 2010:12-13.

  REN Ming. Isolation, identification and degrading characters of chlorpyrifos degrading bacteria[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2010:12-13.
- [39] 徐莲, 张丽萍, 刘怡辰, 等. 功夫菊酯降解菌 GF-3 的筛选鉴定及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7):1545-1551.

  XU Lian, ZHANG Li-ping, LIU Yi-chen, et al. Isolation, identification and characteristics of a cyhalothrin-degrading bacterium GF-3

  [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(7):1545-1551.
- [40] Miyazaki K, Martin J C, Marinsek-Logar R, et al. Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B14[J]. *Anaerobe*, 1997, 3(6):373-381.