

侧孢芽孢杆菌降解水胺硫磷的条件及途径

杜春梅¹, 金术超^{1,2}, 范晶³, 杨慧¹

(1. 微生物学黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江大学 黑龙江 哈尔滨 150080 2. 北京经济技术开发区实验学校

北京 100080; 3. 黑龙江大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 采用正交试验和气质联机方法, 研究了侧孢芽孢杆菌菌株 BL-21 降解水胺硫磷的条件和途径。结果表明: 最佳碳氮源为: 蔗糖 1.5%, NH_4HCO_3 0.06%。最适降解温度、pH 和摇床转速分别为 30℃, pH 7 和 200 r/min。250 mL 三角瓶培养基装量 30 mL、接种量 10%、添加 10~20 μL 的 TritonX-100 有利于水胺硫磷降解。气质联机对水胺硫磷降解产物的分析表明, 菌株 BL-21 降解水胺硫磷产生 O, O'-二甲氧基硫代磷酸酯和水杨酸异丙酯等中间产物, O, O'-二甲氧基硫代磷酸酯可进一步分解成无机磷、硫化物、氨气等产物; 水杨酸异丙酯降解为水杨酰胺、水杨酸及其它有机酸, 进一步降解为二氧化碳和水, 毒性显著降低。

关键词: 侧孢芽孢杆菌; 水胺硫磷; 降解条件; 降解途径

中图分类号: Q 93; Q 939 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)11-0170-04

水胺硫磷(Isocarbophos)是德国拜耳公司 20 世纪 60 年代开发成功的有机磷杀虫剂。我国在 20 世纪 80 年代工业化生产, 目前国内已有十多家生产厂, 年产量达 2 万 t。水胺硫磷对海洋藻类、贝类、甲壳类动物、梭鱼和成体中国对虾具有毒性。也可经过完整的皮肤进入人体, 在未发生皮肤损伤的情况下造成机体中毒。水胺硫磷在水果中的残留量比甲基对硫磷高, 具有高残留、消解慢的特点。因此研究水胺硫磷等有机磷农药的生物降解具有重要意义^[1-3]。在国外由于水胺硫磷的高毒性, 发达国家已经禁用, 未见微生物降解方面的研究报道。国内目前仅报道黄杆菌和动性球菌属的微生物能够降解水胺硫磷^[3,4]。研究发现侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)能够降解水胺硫磷。侧孢芽孢杆菌最早由 White 等于 1912 年分离得到, 迄今已有近百年的研究历史^[1-3]。侧孢芽孢杆菌具有解磷、解钾、固氮等多种生物学功能, 能产生杀虫蛋白、抑菌物质、抗癌免疫调节物质等多种有应用潜力的代谢产物, 但国内外对侧孢芽孢杆菌的研究多集中于杀虫、保健类药物的开发及抑制肿瘤生长药物的开发, 对其降解农药方面的研究未见报道^[5-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)

第一作者简介: 杜春梅(1972-), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail: duchunmei1972@sohu.com。

基金项目: 黑龙江省科技计划资助项目(GC05B201)。

收稿日期: 2008-06-11

BL-21 由黑龙江大学生命科学学院微生物重点实验室提供。

1.1.2 水胺硫磷标准品 购自农业部质量检测中心。

1.1.3 培养基 斜面培养基为葡萄糖蛋白胨培养基, 降解培养基采用无机盐液体培养基^[9,10]。

1.2 方法

1.2.1 种子液的制备 刮取一环 BL-21 的斜面菌种, 接种于葡萄糖蛋白胨水培养基中, 30℃、180 r/min 振荡培养 12~16 h。

1.2.2 含水胺硫磷农药培养基的配制及接种 将配制好的无机盐液体培养基^[11]分装至 250 mL 的三角瓶中, 每瓶装量为 50 mL, 灭菌后待温度降到室温时, 加入水胺硫磷 50 μL , 再加入活化好的菌液 5 mL。每处理重复 3 次, 对照加入等量的不接菌的培养液。

1.2.3 水胺硫磷降解率的测定 将接种后的含药培养基于 30℃、180 r/min 培养 84 h。采用钼蓝比色法测定培养液中无机磷的含量。根据公式计算出水胺硫磷降解率。有机磷农药降解率 = (培养前有机磷含量 - 培养后有机磷含量) / 培养前有机磷总量 $\times 100\%$ 。有机磷 (mg/L) = 总磷 - 无机磷。

1.2.4 降解条件的研究 以 6 种碳源(乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、甲醇)在同一用量水平上进行农药降解试验, 选择较优碳源^[10]。以 6 种氮源(碳酸氢铵、硫酸铵、草酸铵、硝酸钠、牛肉膏、蛋白胨)在同一用量水平上进行农药降解试验, 选择较优氮源。在 250 mL 三角瓶中对中选碳源、氮源以及装液量、温度进行四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验, 进行最优条件的筛选。对试验结果进行统计分析, 将正交试验得到的优化条件与原始条件

(无机盐培养基)进行降解率的比较,测定方法同1.2.3。

1.2.5 降解产物及降解途径的研究 将活化好的菌液按 10%的接种量接种于含有 1 mg/L 水胺硫磷的液体培养基中^[10]。分别于培养 36 h 和 84 h 后取样。样品用二氯甲烷和正己烷混合萃取后,浓缩至 2 mL。采用岛津 GCMS-QP5050A 气质联机进行分析。气质联机具体条件如下: DB-1MS 石英毛细管色谱柱 30 M×0.25 mm×0.25 μm,汽化温度 280℃、电离方式 EI、离子源温度 230℃、载气: He 流速 1 mL/min、分流比 50:1,进样量: 1 μL;柱温 70℃保持 1 min, 15℃/min 升温至 230℃保持 1 min, 5℃/min 升温至 270℃保持 5 min。加速电压 1.2 Kv、扫描范围 m/z33~350。

1.2.6 氨的定性分析 将接菌的含有水胺硫磷的培养液放在摇床上培养,借助胶塞将石蕊试纸固定在摇瓶的

上部,观察试纸颜色变化。

1.2.7 硫化物的测定 采用标准碘量法测定。

2 结果与分析

2.1 菌株 BL-21 降解水胺硫磷条件的研究

2.1.1 碳源对降解率的影响 研究结果(图 1)表明,在以蔗糖为碳源时,菌株 BL-21 的降解率为 42.70%。葡萄糖次之,其它依次为乳糖、麦芽糖、甘露醇、甲醇。

2.1.2 氮源对降解率的影响 不同氮源对菌株 BL-21 降解水胺硫磷影响的研究结果表明,铵盐的降解效果好于其它氮源,以碳酸氢铵为氮源时,降解率可达 45.6%,其它依次为碳酸氢铵>硫酸铵>草酸铵>蛋白胨>硝酸钠>牛肉膏。

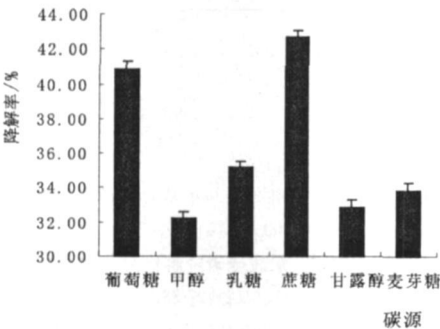


图 1 碳源对水胺硫磷降解率的影响

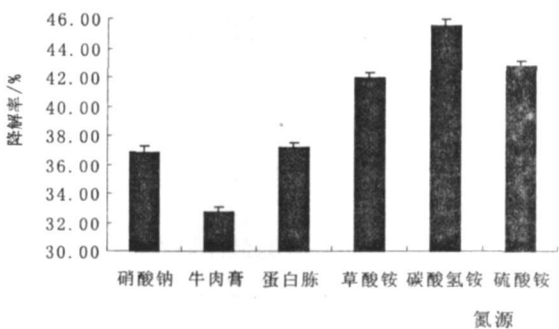


图 2 氮源对水胺硫磷降解率的影响

2.1.3 正交试验 菌株 BL-21 降解水胺硫磷的正交试验结果(表 1)表明,四个因素(蔗糖、碳酸氢铵、装液量、温度)降解水胺硫磷的差异达到显著水平($F_{装液量}0.05=77.53>F_{\alpha}0.05=19$)。装液量对降解水胺硫磷的影响最大,其次是温度和蔗糖,碳酸氢铵的影响最小。因此降解水胺硫磷的最佳条件为蔗糖 1.5%、 NH_4HCO_3 0.05%、250 mL 三角瓶装液量 30 mL,培养温度 30℃。验证试验结果表明,采用该优化条件测得的水胺硫磷降解率与原始无机盐培养基相比,降解率提高了 27%。

2.2 水胺硫磷降解产物及降解途径的研究

2.2.1 水胺硫磷降解产生的中间产物的分析 水胺硫磷标样的保留时间为 13.65 min, m/z 289。通过和水胺硫磷标样对比,结合计算机检索 NIST 谱库和图谱分析,可以初步推断培养 36 h 水胺硫磷降解产生的中间产物主要有水杨酰胺、O, O' S-三甲基磷酸酯(TMP)、丙烯酸等物质。培养 84 h 水胺硫磷降解产生的中间产物主要有双甲氧基硫代磷酸酯、己酸乙酯、苯丙酸丙酯、甲酸甲基乙酯、丁基戊酸酯、甲基丁酯等产物。

2.2.2 降解产生氨的定性分析 水胺硫磷在经过 36 h

微生物降解后,可以观察到夹在三角瓶口的石蕊试纸变蓝,这说明水胺硫磷降解过程中释放氨气。

表 1 正交试验结果分析					
试验号	影响因子				降解率
	蔗糖/%	碳酸氢铵/%	装液量/mL	温度/℃	/%
1	1(1.3)	1(0.05)	1(30)	1(28)	53.00
2	1(1.3)	2(0.06)	2(50)	2(30)	47.50
3	1(1.3)	3(0.07)	3(80)	3(35)	42.20
4	2(1.5)	1(0.05)	2(50)	3(35)	46.85
5	2(1.5)	2(0.06)	3(80)	1(28)	43.20
6	2(1.5)	3(0.07)	1(30)	2(30)	54.25
7	3(1.7)	1(0.05)	3(80)	2(30)	43.20
8	3(1.7)	2(0.06)	1(30)	3(35)	49.20
9	3(1.7)	3(0.07)	2(50)	1(28)	45.13
x1	47.57	47.68	52.15	47.11	
x2	48.13	46.63	46.49	48.30	
x3	45.84	47.20	42.90	46.08	
R	1.8	1.1	9.3	2.22	

2.2.3 培养液中无机硫的测定 由于试验过程中加入水胺硫磷的量较少,且菌株 BL-21 降解水胺硫磷产生的少量硫化物有可能被菌株再利用,所以没有检测到硫化物的存在。

2.2.4 水胺硫磷降解途径分析 根据气质联机测定结果及参阅有关资料^[10], 水胺硫磷的生物降解主要途径见图3, 首先菌株 BL-21 产生的降解酶将水胺硫磷的 P 与苯环之间的 P-O 键断裂, 生成 O,O'-二甲氧基硫代磷酸酯和水杨酰胺异丙酯; 前者经脱氨、氧化生成 O,O'-S-三甲基磷酸酯和 NH_3 ; O,O'-S-三甲基磷酸酯的 P=S 键氧化断裂得到 PO_4^{3-} 和硫化物(硫化氢); 后者在相关酶的作用下生成水杨酰胺, 进一步代谢生成水杨酸, 水杨酸

被代谢生成多种有机酯, 如乙酸乙酯、苯丙酸丙酯、甲酸甲基乙酯等, 这些酯类物质进一步被水解、氧化生成琥珀酸、乙酸等多种有机酸, 参与三羧酸循环而最终被氧化分解成二氧化碳和水。通过中间产物和降解途径分析可知, 菌株 BL-21 在培养 36 h 时已经将部分的水胺硫磷降解成毒性相对较小的物质, 在培养 84 h 时, 被进一步降解成低毒或无毒的产物, 从而达到降解的目的。

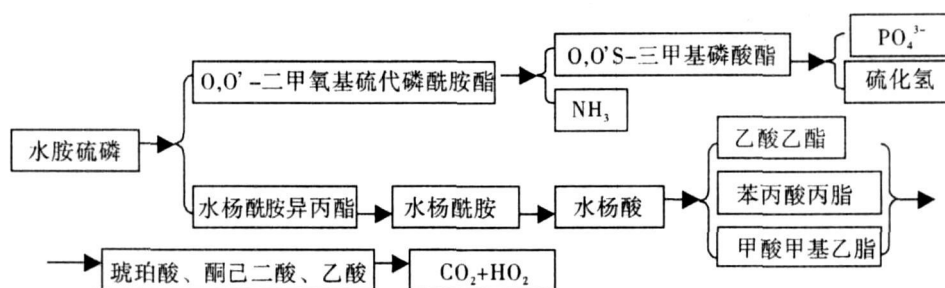


图3 水胺硫磷降解途径分析图

3 结论与讨论

菌株 BL-21 降解水胺硫磷的最佳培养基配方为: 蔗糖 1.5%, NH_4HCO_3 0.06%, NaCl , KCl , MgSO_4 均为 0.03%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 均为 0.003%。最佳降解条件为: 250 mL 三角瓶装液量 30 mL, pH 7, 30℃, 200 r/min。对正交试验结果表明通气量对降解率影响最大。这与赵金辉等^[3]报道的动性球菌属优势菌株降解水胺硫磷过程中供应氧, 有利于水胺硫磷的降解相一致。张小荷^[11]的研究也表明水胺硫磷的微生物降解是好氧的, 因此在今后的研究中应注意通气量对菌株 BL-21 降解能力的影响。

国内外对水胺硫磷的生物降解途径方面的研究较少, 在我国仅有同济大学环境医学研究所的罗启芳等人^[10]报道过, 通过比较, 该研究分析得到的水胺硫磷降解途径与罗启芳等人报道过水胺硫磷降解途径较为相似, 但是该研究菌株 BL-21 降解水胺硫磷首先得到二甲氧基硫代磷酸酯和水杨酰胺异丙酯, 而罗启芳等的报道水胺硫磷降解首先得到的是甲氧基羟基硫代磷酸酯和水杨酰胺异丙酯, 这可能是降解酶作用的化学键有差异造成的。

参考文献

[1] 杨远和, 周梅, 张恒等. 水胺硫磷对人皮肤表皮细胞膜完整性的影响[J]. 华西医科大学报, 2001, 32(4): 286-287.

- [2] 冯少, 胡卫莹, 丁峰等. 水胺硫磷与甲基对硫磷在苹果中的残留动态研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(4): 716-719.
- [3] 赵金辉, 罗启芳, 李霞等. 水胺硫磷降解优势菌的筛选及其降解条件的研究[J]. 重庆环境科学, 1995, 17(2): 27-28.
- [4] 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.
- [5] Barsby T, Kelly M T, Andersen R J. Tupuseleiamides and basiliskamides, new acyl dipeptides and antifungal polyketides produced in culture by a *Bacillus laterosporus* isolate obtained from a tropical marine habitat[J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(10): 1447-1451.
- [6] de Oliveira E, Rabinovitch L, Monnerat R. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(11): 6657-6664.
- [7] Huang X, Tian B, Niu Q et al. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes[J]. Research in microbiology, 2005, 156(5/6): 719-727.
- [8] Krachkovskij S A, Sobol A G, Ovchinnikova T V, et al. Isolation, biological properties, and spatial structure of an antibiotic lolatin A[J]. Biorganicheskaja Khimiia, 2002, 28(4): 298-302.
- [9] 戴青华, 张瑞福, 蒋建东. 一株三唑磷降解菌 mp-4 的分离鉴定及降解特性的研究[J]. 土壤学报, 2005, 42(1): 111-113.
- [10] 罗启芳, 陈敏, 汪求真. 固定化微生物对水胺硫磷降解机理的研究[J]. 环境科学, 1996, 16(6): 14-16.
- [11] 张小荷, 罗启芳, 甘泳江等. 固定化微生物小球对水胺硫磷的好氧耐受性研究[J]. 同济医科大学学报, 1996, 25(4): 294-296.

黄瓜黑星病菌原生质体制备的条件及再生菌株的致病性

王云帆¹, 王刚²

(1. 重庆科技学院 化学化工学院, 重庆 401331; 2. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475001)

摘要: 分别利用崩溃酶、溶壁酶、纤维素酶和蜗牛酶酶解黄瓜黑星病菌, 进行原生质体的制备试验。结果表明: 4 种酶均能消化该菌细胞壁, 获得一定数量的原生质体; 产生原生质体效率最高的是崩溃酶, 该酶在浓度为 18 mg/mL 时产生的原生质体数量最多, 最佳酶解时间为 2~3 h, 最适作用温度为 28℃。制备的原生质体可以再生并与原始出发菌株具有相同的致病能力。

关键词: 黑星病; 原生质体; 致病性

中图分类号: S 436.421.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)11-0173-03

由瓜枝孢霉 (*Cladosporium cucumerium* Ell. et. Arth.) 所导致的黄瓜黑星病是一种世界性病害, 其危害是毁灭性的^[1]。1889 年 Arthur J C 在美国首次报道了黄爪瓜条上受黑星病侵害的情况, 并与 Ellis J B 一起定名为 *Cladosporium cucumerium* Ellis and Arthur。国内黑星病 1959 年在吉林首次报道, 20 世纪 70 年代末, 随保护地栽培的发展, 黑星病开始在我国东北地区发生, 20 世纪 80 年代开始流行^[2]。黄瓜黑星病的疫区逐步扩大, 各地均有黄瓜黑星病发生的报道, 甚至在我国的海

南省发现了黄瓜黑星病。
国内目前仅在黑星病的田间发病情况调查、病菌的生物学特性、品种抗病性鉴定以及人工接种鉴定技术等方面做了一些研究^[3]。为了从根本上防治该病害的发生, 拟从分子水平研究其致病机制, 克隆相关致病基因。而突变体的获得是解析致病菌致病机理的有效手段, 利用原生质体通过遗传转化向病菌基因组随机插入外源 DNA, 是创造真菌突变体的常用方法^[4]。通过制备黄瓜黑星病菌的原生质体, 进而发展出有效的遗传转化体系, 有望分离出多个无毒基因和致病相关基因。该研究就制备黄瓜黑星病菌原生质体的方法和原生质体再生菌株的致病性等方面进行了探讨。

1 材料与方法

第一作者简介: 王云帆(1981-), 女, 河南安阳人, 硕士, 助教, 主要从事植物病害防治研究工作。E-mail: wangyunfan@yeah.net。
收稿日期: 2008-05-28

The Degrading Condition and Pathway of Isocarbophos by *Bacillus laterosporus*

DU Chun-mei¹, JIN Shu-chao^{1,2}, FAN Jing³, YANG Hui¹

(1. Key Laboratory of Microbiology, College of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China; 2. Beijing Economic Technological Development Area Experimental School, Beijing 100080, China; 3. College of Agriculture, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

Abstract: The degrading condition and pathway of an isocarbophos degrading bacterium, *Bacillus laterosporus* BL-21, were studied with orthogonal experiment and GC-MS. The results indicated that the optimum degrading ispcarbophos carbon and nitrogen sources of *Bacillus laterosporus* BL-21 were sucrose 1.5% and ammonium bicarbonate 0.06% respectively. The optimum temperature, pH and rotation speed were 30℃, pH 7 and 200 r/min respectively. While with 30 mL liquid in 250 mL flask, inoculum size 10%, and add 10~20 μL TritonX-100, strain BL-21 could degrade isocarbophos well. Using GC-MS, the intermediate products of biodegradation of isocarbophos by the strain BL-21 were detected. The results suggested that o, o'-s-trimethyl phosphorothioate and isopropyl salicylate were the main intermediate products. The o, o'-s-trimethyl phosphorothioate was further degraded into inorganophosphate, sulfid and the ammonia. Moreover, The isopropyl salicylate was also further degraded, and created salicylamide, salicylic acid and other organic acids, at last these materials would come into being carbon dioxide and waters. Therefore, these biodegradation productions of isocarbophos by strain BL-21 were lower toxicity and biological safety.

Key words: *Bacillus laterosporus*; Isocarbophos; Degrading condition; Degrading pathway