

新疆南疆梨树叶表面敌敌畏降解菌的分离及特性研究

杨瑞红¹, 王海燕¹, 孙霞², 施宠²

(1. 新疆教育学院 理学院, 新疆 乌鲁木齐 830043; 2. 新疆农业大学, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:从南疆长期使用有机磷农药的梨园采集叶片, 分离出 3 株具有降解敌敌畏(DDVP)能力的细菌。经过 16S rDNA 的鉴定均为假单胞菌, 进一步研究了 PP-Y1 对 DDVP 的最佳降解条件。结果表明: PP-Y1 在 pH 6.5、培养 7 d, DDVP 降解率达 53.4%; 26~35℃ 对降解 DDVP 的影响不大; 降解 DDVP 的为胞内酶。将 PP-Y1 随机接种到梨树叶表面和果实表面, 10 d 后再分离到该菌的几率为 87% 和 79%, 说明该菌较容易定植于梨叶片和果实表面, 为开发可应用的有机磷降解微生物提供资源和支持。

关键词:生物降解; 敌敌畏(DDVP); 假单胞菌

中图分类号:S 661.2(245) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0158-03

化学农药的广泛使用造成严重的环境污染和食品安全问题, 从而直接威胁人类生存和可持续发展, 同时也是造成我国农产品遭受发达国家设置的贸易壁垒的主要原因之一。尽管近年来国家限定了很多有机磷农药(Organophosphorus pesticides, Ops)的使用, 由于农药的发展滞后及实际需要, 部分地区仍然在使用 Ops 类农药。Ops 组分的降解可由生物学因子介导^[1], 有报道 Ops 杀虫剂的降解受到生物作用而加速降解, 并且在其中起重要作用的不同种类的微生物被发现^[2]。敌敌畏(Dichlorvos, DDVP)主要成分 2,2-二氯乙烯基二甲基磷酸酯, 是一种具有广谱、内吸、触杀等特点的高效、中等毒性有机磷农药, 对各种口器害虫均有较好的杀灭效果, 因此在农业生产中一直倍受广大农民的青睐。国内外对 DDVP 的研究报道主要集中在其环境毒理方面, 对 DDVP 的降解方法主要包括化学方法和光催化法, 如沸石负载 TiO₂^[3-4]。DDVP 在自然条件下也可由于环境因素降解, 然而降解效率不高, 而且不能完全降解。近年来, 研究者试图结合微生物降解的方法来提高有机磷农药残留的降解率, 对于敌敌畏的微生物降解已有报道, 已报道的降解菌包括木霉^[5]、尼古丁节杆菌^[6]、鞘氨醇单胞菌等^[7]等。不同的菌株具有不同的特性, 降解的能力和特性有所不同, 适用的范围也有所不同。

新疆库尔勒香梨因其独特的风味深受广大消费者

的欢迎, 然而由于近年来引种不当及连作等因素, 病虫害不断地加重, 各类有机磷农药的不断施入, 进而引起农药残留等问题, 并影响到香梨的出口与创汇。由于南疆气候干燥, 雨水稀少, 已有的研究表明南疆微生物群落结构较为特殊。现以新疆库尔勒地区和静县多年使用有机磷农药梨园叶片为研究对象, 分离 DDVP 降解细菌, 并进行大田的回接定殖试验, 评价其应用潜力, 以期后续的实际应用提供菌株支持和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集时间为 2010 年 9 月, 采集地点为新疆库尔勒和静县 8 a 梨园, 该果园已多年连续使用有机磷农药, 主要品种包括乐果、敌敌畏等。采集时施用敌敌畏制剂第 5 天。筛选用 DDVP 为化学纯试剂(下文称 DDVP)。

1.2 试验方法

1.2.1 叶表面 DDVP 降解菌的分离培养 称取约 10 g 梨树叶片于置于 50 mL 无菌水(内含 100 μg/mL DDVP)的三角瓶中, 恒温摇床(120×g, 30℃)驯化培养 48 h。取 300 μL 涂布于选择培养基(内含 100 μg/mL DDVP)中, 培养 3 d, 将获得的培养物纯化后, 接种至液体 LB 培养基中。培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 后, 按 1% 接种量转接至液体 LB 培养基(分别含 100 μg/mL DDVP 和 1 g/L 敌敌畏制剂)中, 置于恒温摇床(60×g, 30℃培养), 3 次重复, 所有培养均避光进行。在培养 1、2、3、4、5、6、7、8、9 d 后分别取出 400 μL 样品, 加入 1 600 μL 甲醇。混合液过滤(滤纸孔径为 0.4 μm)后转移至 HPLC 小瓶, DDVP 浓度测定分别取样品 20 μL 进行高效液相色谱(HPLC)分析。所用仪器为安捷伦液相色谱 1100。

1.2.2 形态学鉴定 生理生化鉴定方法参见文献[8]。

第一作者简介:杨瑞红(1980-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为环境微生物学。E-mail: yangruihong99@163.com。

基金项目:新疆自治区高校科研计划资助项目(XJEDU2010S17); 土壤学自治区重点学科资助项目。

收稿日期:2012-03-15

1.2.3 微生物分子鉴定 细菌基因组 DNA 提取采用 SDS 进行。利用细菌的 16S rDNA 通用引物 F27: 5'-AGAGTTTGTATCTMTGGCTCA-3'; R1522: 5'-AAG-GAGGTGATCCAGCCGCA-3' 扩增, 引物由上海生工合成。PCR 扩增反应在 Bio-Rad 公司生产的 iCyclerTm PCR 仪中进行, 反应体系为 20 μ L: 模板 DNA 1 ng, 10 \times buffer 2 μ L, 镁离子 (25 mM) 2 μ L, 引物 (10 μ M) 各 0.2 μ L, dNTPs (各 10 mM) 0.3 μ L, *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 补齐至 20 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 46 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共循环 38 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, Maker 用 DL 2000。

1.2.4 降解酶定位 分离菌株接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基 (NA), 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 48 h。之后将液体培养物在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 6 000 r/min 离心 15 min, 分别收集菌体及培养液, 菌体用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液洗涤、重悬, 超声破碎后离心, 分别收集碎片及上清, 其中上清液即为胞内粗酶液。将发酵液、上清液、菌体碎片分别添加到含有 200 μ g/mL DDVP 的无菌水的三角瓶中, 置于恒温摇床中 (30 $^{\circ}$ C, 120 r/min), 24 h 后测定 DDVP 降解率, 3 次重复。

1.2.5 田间回接定殖试验 田间随机选择 100 株梨树, 选择标记 15 片叶片和 3 个果实分别用无菌水反复冲洗 3 遍, 再用 70% 乙醇脱脂棉球温和擦拭表面。接种时间为 2011 年 8 月 22 日, 将细菌培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 用灭菌水稀释 100 倍喷洒。10 d 后, 按 1.2.1 所述方法分离表面细菌, 镜检观察形态。

2 结果与分析

2.1 降解菌的分离与鉴定

共分离获得 3 株可降解 DDVP 的细菌, 培养 7 d 后, DDVP 的降解效率分别为 53.4%、52.9% 和 51.6%。16S rDNA 鉴定发现这 3 株菌为同种细菌, 与假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 的同源性均高达 97%, 菌株编号分别为 PP-Y1、PP-Y2、PP-Y3。选择降解率最高的菌株 PP-Y1 作进一步研究。其生理生化特点: 革兰氏染色阴性, 杆状; 硝酸盐还原和葡萄糖发酵产酸反应为阳性; 亚硝酸盐还原反应、过氧化氢酶反应、甲基红反应、明胶水解、氧化酶、V.P. 反应、吡啶反应为阴性; 可利用柠檬酸, 不可利用酒石酸和丙酸盐, 不能水解淀粉。

2.2 最佳降解条件

菌株 PP-Y1 的生长温度范围较大, 可在 22~44 $^{\circ}$ C 生长。不同 pH 值培养条件对 DDVP 的降解效果如图 1 所示 (培养温度为 30 $^{\circ}$ C), 培养 7 d、pH 6.5 时, 菌株 PP-Y1 对 DDVP 的降解效果最好, 此时降解率达 56.21%, 继续提高 pH 值, 降解率随之降低, pH 7.5 时

DDVP 的降解率降至不到 15%。培养温度对 PP-Y1 降解 DDVP 效率的影响见图 2 (pH 6.5), 在 26~35 $^{\circ}$ C 时, 培养 7 d, PP-Y1 对 DDVP 的降解效果较好。超过 37 $^{\circ}$ C 降解率明显下降, 40 $^{\circ}$ C 时降解率仅为 12.10%。培养温度是影响微生物自身生长和代谢的重要因素之一, 温度对降解菌降解效率的影响可能由于对微生物生长量的影响, 同时造成了降解菌分泌酶的能力下降。

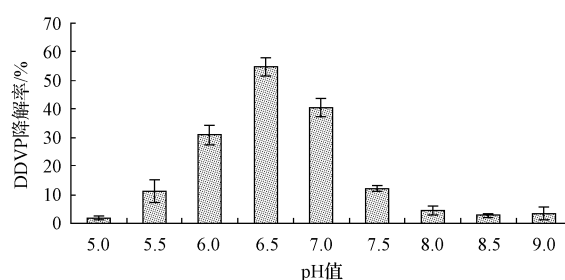


图 1 不同 pH 值对 DDVP 降解率的影响

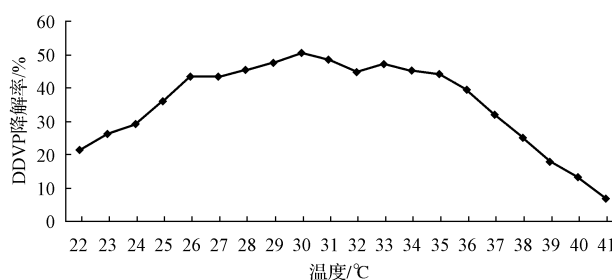


图 2 不同温度值对 PP-Y1 生长及 DDVP 降解率的影响

2.3 降解酶定位

由图 3 可知, 24 h 后测定发酵液、菌体碎片、细胞裂解液及菌体对敌敌畏的降解率分别为 0.4%、3.93%、27.20%、7.26%, 由于细胞裂解液中的 DDVP 降解率最高, 推断对 DDVP 降解发挥作用的为胞内酶。

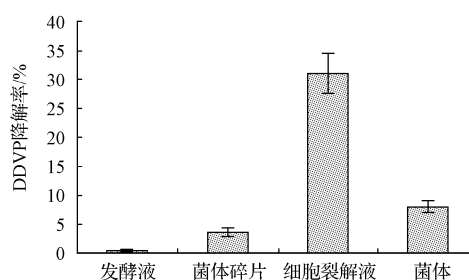


图 3 不同处理对 DDVP 降解率的影响

2.4 回接定殖

回接 10 d 后分别采集标记接种的叶片和果实, 用含有 100 μ g/mL DDVP 选择培养基上进行分离培养, 生理生化鉴定。结果发现叶片和果实上分离到 PP-Y1 的比例为 87% 和 79%。可以初步断定 PP-Y1 在梨树叶片和

果实上均有很好的定殖能力。

3 讨论与结论

该试验从梨树叶表面筛选到 3 株可降解 DDVP 的细菌,均属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。自然界中假单胞菌属的物种较多,在很多有机物污染方面都显示着极大的用途和巨大的潜力,并且分布的范围也比较广泛。该属的物种在很多污染物的降解方面都起着很重要的作用,如甲胺磷^[9]、4-氯硝基苯^[10]、酚类化合物^[11]等。对 PP-Y1 进行了相关研究,发现该菌株能很好地定殖于梨树叶表面和果实表面,在微生物降解 DDVP 残留方面有良好的应用前景。目前很多研究发现了多种微生物能够降解污染物或农药残留,但是如何兼顾定殖和环境安全是值得注意的问题,而该试验直接从叶片表面分离到菌株在回接试验中表现出良好的定殖能力,值得进一步研究其环境中 DDVP 降解能力。

降解特性的研究表明,菌株 PP-Y1 在 26~35℃ 范围内降解 DDVP 能力较强,且降解能力在该温度范围内差别不大;该菌能够在 pH 5.5~7.5 降解 DDVP,然而 DDVP 降解能力受 pH 影响较大,可能由于不同的 pH 对细菌降解 DDVP 酶的表达有很大的影响;酶定位试验表明,该菌产生的 DDVP 的降解酶为胞内酶。已有的研究显示有些菌株能通过有机渗透机制来降解 DDVP^[12],还有研究认为细胞色素 CYP201A2 在有机磷生物降解中发挥着重要作用^[13]。该试验中分离的菌株对 DDVP 降解主要是由胞内酶作用,推测该菌对 DDVP 的降解作用主要通过利用 DDVP 作为营养物质进行代谢。

尽管该试验中获得的菌株相对于其它同类研究的降解效率并不突出,然而该菌株在回接定殖方面表现出

良好的适应性,根据最佳降解的 pH 值和温度,可在实际使用中进一步探索相应的条件,使其在生产中应用的发挥出更大的潜力。

参考文献

- [1] Singh B K. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7: 156-164.
- [2] Singh B K, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds [J]. FEMS Microbiol Rev. 2006, 30: 428-471.
- [3] 孔繁翔,严国安,尹大强,等. 环境生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2000.
- [4] 王一惠,向述荣,张银定,等. 微生物降解苯酚的研究进展及其工程菌的应用前景[J]. 高技术通信, 2001, 12(4): 98-100.
- [5] 余水静,李杰庆,宋秋华,等. 两株苯酚降解菌的分离及降解特性的初步研究[J]. 生物技术, 2005, 15(3): 62-64.
- [6] 徐玉泉,张维,陈明,等. 一株苯酚降解的分离和鉴定[J]. 环境科学学报, 2000, 20(4): 450-455.
- [7] 龚斌,刘津,赵斌,等. 一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2006, 12: 2008-2012.
- [8] 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: 267-294.
- [9] 李淑彬,钟英长. 固定化假单胞菌降解甲胺磷的研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(4): 422-466.
- [10] 赫荣乔. 探索假单胞菌降解 4-氯硝基苯代谢新途径[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 363.
- [11] 孙纪全,汤岳琴,刘伟强,等. 两株假单胞菌降解酚类化合物的特性[J]. 中国环境科学, 2010, 30(12): 1633-1638.
- [12] 段雪梅,冯胜,王小冬,等. 一株分离自太湖有机聚集体上的有机磷降解细菌的鉴定及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 741-747.
- [13] Tatiana O, Petruta O, Madalin Enache, et al. Halophilic bacteria are able to decontaminat e dichlorvos, a pest icide, from saline environments [J]. Central European Journal of Biology, 2007, 2(4): 563-573.

Isolation and Degrading Characteristic of Bacteria from Pear Leaf Surfaces in Southern Xinjiang

YANG Rui-hong¹, WANG Hai-yan¹, SUN Xia², SHI Chong²

(1. Xinjiang Education College, Urumqi, Xinjiang 840043; 2. Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

Abstract: 3 bacteria capable of degrading DDVP were isolated from the pear leaves, which collected from the pear orchards with long-term application of the organophosphorus pesticides in Southern Xinjiang. All the three isolates were identified to be *Pseudomonas* sp. with the help of 16S rDNA. The optimal conditions for degrading DDVP of the strain PP-Y1 were as pH 6.0 and 7 days, as the degradation rate reached to 53.4%. There was no significant differences to degradation rate at 26~35℃. The intracellular enzymatic could degrade DDVP. The strain PP-Y1 was used for inoculating pear leaves and fruits, and re-isolated rates were 87% and 79% at day 10, respectively. The above results suggested the strain PP-Y1 could easily colonized on the surface of pear leaves and fruits, and it provided the resources and supports for developing and applicating the degrading DDVP microbial.

Key words: biodegradation; dichlorvos; *Pseudomonas* sp.