

新疆梨园有机磷降解菌的分离及其降解谱研究

杨瑞红^{1,2}, 施 宠², 王纯利²

(1. 新疆教育学院 科学教育学院, 新疆 乌鲁木齐 830043; 2. 新疆农业大学 草业与环境科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以新疆南疆长期使用有机磷农药的果园土壤为研究对象, 分离其中能够完全降解氧化乐果有效成分的细菌, 利用 16S rDNA 对其进行分子鉴定, 并对其降解有机磷农药的降解谱和降解能力进行了分析。结果表明: 试验共分离得到 3 株能够完全降解氧化乐果有效成分的细菌, 这 3 株菌株分别为假单胞菌、芽孢杆菌和土壤杆菌; 不同菌株对有机磷农药的降解谱存在差异, 其中假单胞菌 DYY-3 的降解能力较其它 2 株菌高。该研究结果为今后关于菌株复配制剂及其田间应用奠定了良好的基础。

关键词:生物降解; 有机磷; 土壤细菌; 降解谱

中图分类号:S 661. 2(245) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0123-04

有机磷农药(Organophosphorus pesticides, Ops)因其具有高效、选择性低、成本低等特点被广泛地用作农业杀虫剂、杀菌剂、除草剂等。然而由于其毒性与不合理的使用, 给环境和人类健康带来了极大的危害^[1]。有机磷化合物是一类与人类和昆虫中枢神经系统有关的胆碱酯酶的抑制剂, 而胆碱酯酶与神经递质乙酰胆碱的形成有关^[2]。如果体内缺乏胆碱酯酶, 则失去分解乙酰胆碱的能力, 进而造成乙酰胆碱的积累, 引起神经功能紊乱, 最终危害人体健康。近年来, 尽管国家限定了很多 Ops 类农药的使用, 然而由于农药的发展滞后, 部分地区仍然在使用许多 Ops 类农药。有机磷农药的种类很多, 毒性及残留期因种类而有所不同。Ops 组分的降解可由生物学因子介导^[2], 如 Ops 杀虫剂的降解受到生物作用而加速降解, 在其中起重要作用的不同种类的微生物已被发现^[3]。有机磷在自然条件下可通过环境降解, 然而降解效率不高, 而且不能完全降解^[4-5]。近几年来, 人们试图通过结合微生物降解的方法来提高土壤中有机磷农药残留的降解效率, 对于有机磷农药的微生物降解已有报道, 降解菌包括木霉^[6]、尼古丁节杆菌^[7]、鞘氨醇单胞菌等^[8], 不同的菌株降解的能力及特性不同, 并且适用范围及环境条件有所不同。

第一作者简介:杨瑞红(1980-), 女, 博士研究生, 讲师, 现主要从事生物学等基础教育研究工作。E-mail: yangruihong99@163.com.

责任作者:王纯利(1959-), 男, 副教授, 现主要从事环境微生物研究工作。E-mail: wangchunli;59@yahoo.com.cn.

基金项目:国家重点学科博士基金资助项目(XJCYB-2011-01); 新疆草地资源与生态自治区重点实验室对外开放课题资助项目(XJDX0209-2011-02)。

收稿日期:2013-04-15

近几来, 新疆南疆病虫害的发生逐年加重, 有机磷农药的使用也比较普遍。南疆气候干燥, 雨水稀少, 有研究表明南疆土壤微生物群落结构较为特殊。该研究以南疆常年使用有机磷农药的梨园土壤为研究对象, 分离其中对有机磷农药有降解作用的细菌, 同时检测所获得的微生物对几种有机磷农药制剂及有效成分降解能力的差异, 以期今后实际应用提供菌株支持与理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试土样于 2012 年 6 月 22~25 日采集自新疆库勒和静县 8 a 梨园, 去除表层植物残渣, 取上层 0~20 cm 处土壤, 沙壤土, pH 为 7.57(水中测定), 此处已连续多年使用有机磷农药, 主要有敌敌畏、乐果、氧化乐果等, 采集土样 4℃保存至分离。

O,O-二甲基-S-[2-(甲胺基)-2-氧代乙基]硫代磷酸酯(氧化乐果的有效成分, 简称 Ops1)、2,2-二氯乙烯基二甲基磷酸酯(敌敌畏的有效成分, 简称 Ops2)、O,O-二甲基-S-[N-甲基氨基甲酰甲基]二硫代磷酸酯(乐果的主要成分, 简称 Ops3)、O,O-二乙基-S-(乙硫基甲基)二硫代磷酸酯(甲拌磷有效成分, 简称 Ops4)、O,O-二乙基-O-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯(对硫磷有效成分, 简称 Ops5)、O,O-二甲基-S-[1,2-二(乙氧基羰基)乙基]二硫代磷酸酯(马拉硫磷的有效成分, 简称 Ops6), 上述试剂均为化学纯试剂, 购自中化国际(控股)股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤细菌的分离培养 将 10 g 土样倒入 100 mL 无菌水(含 100 μg/mL Ops1)中, 置于恒温摇床(120 r/min, 30℃), 驯化培养 48 h。取 200 μL 涂布于含 100 μg/mL 氧化乐果化学纯试剂的 LB 培养基,

30℃培养 3 d 后,将获得的菌落纯化后,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,置于恒温摇床(60 r/min,30℃培养),每个样品重复 3 次,并设有接菌的空白对照。所有的培养均避光进行。各培养基分别含有浓度为 100 μg/mL 的 Ops1、Ops2、Ops3、Ops4、Ops5、Ops6,在培养 2、4、6、8、10、12、16 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,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。计算降解率,降解率(%)=(初始含量-剩余含量)/初始含量×100%。分离获得的菌株保存于新疆教育学院理学院生化实验室。

1.2.2 土壤细菌的分子鉴定 细菌基因组 DNA 提取采用纯化后的细菌菌落适量,悬于盛有 TE 的无菌离心管中,涡旋使其均匀悬浮,加入溶菌酶混匀后置于 37℃ 水浴 30 min。随后加入 10% SDS 混匀,65℃ 水浴 1 h,再加终浓度为 0.5 mol/L NaClO 与菌体混合后,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)溶液抽提,12 000 r/min 离心 10 min,取上清加入等体积的-20℃ 预冷的异丙醇,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,70%乙醇洗涤沉淀,自然晾干,将沉淀溶于 ddH₂O。利用细菌的 16S rDNA 通用引物 F27:5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCA-3'; R1522:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-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 μL:模板 DNA 1 ng,10×buffer 2 μL,镁离子(25 mM)2 μL,引物(10 μM)各 0.2 μL,dNTPs(各 10 mM)0.3 μL,Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL,ddH₂O 补齐至 20 μL。PCR 程序:94℃ 4 min;94℃ 40 s,46℃ 40 s,72℃ 40 s,共循环 38 次;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,Marker 用 DL 2 000,序列分析利用 NCBI 数据库的 Blast 程序进行比对。

2 结果与分析

2.1 氧化乐果降解细菌的分子鉴定

试验共分离获得 17 株细菌,经选择性培养及形态学鉴定,有 3 株可完全降解氧化乐果有效成分细菌菌株。对获得菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,由图 1 可知,扩增结果与通用引物预计的结果符合。将所获得 PCR 片段测定序列,在 NCBI 数据库进行 Blast 分析,对比结果表明,3 株菌分别为:菌株 DYY-3 与假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)具 96.5%的序列相似性;菌株 DYY-9 与芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)具 96%的序列相似性;菌株 DYY-17 与土壤杆菌属(*Agrobacterium* sp.)具有 95.5%的序列相似性。

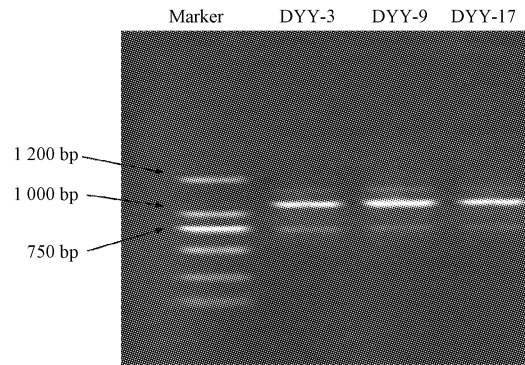


图 1 Ops1 降解细菌 16S rDNA 扩增结果
Fig. 1 Amplification result of Ops1 degrading
16S rDNA of strain

2.2 假单胞菌 DYY-3 对 6 种有机磷农药有效成分的降解作用

由图 2 可知,DYY-3 对 6 种有机磷农药有效成分 Ops1、Ops2、Ops3、Ops4、Ops5、Ops6 均有降解作用,其中对 Ops1、Ops2、Ops3 的降解效果均较好,培养 6 d 的降解率达到 50%,其次对 Ops4 的降解效率 8 d 可达到 50%,对 Ops5、Ops6 的降解较前 4 种缓慢,10 d 可达到 50%。

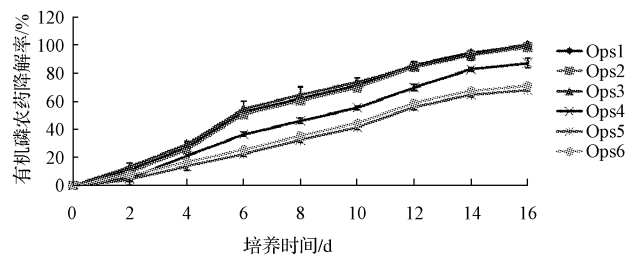


图 2 假单胞菌 DYY-3 对不同种类有机磷农药的降解率
Fig. 2 Degradation rate of *Pseudomonas* sp. DYY-3 for
different kinds of organophosphorus pesticide

2.3 芽孢杆菌 DYY-9 对 6 种有机磷农药有效成分的降解作用

由图 3 可知,芽孢杆菌 DYY-9 对 6 种有机磷农药中的有效成分 Ops1、Ops2、Ops3、Ops4、Ops6 均有较好的降解作用,其中对 Ops5 的降解较其它 5 种缓慢一些。培养第 10 天时降解率达 50%,且继续培养至第 16 天降解率并没有提高。Ops5 为硫磷有效成分,O,O-二乙基-O-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯,对于芽孢杆菌能特异的降解 O,O-二乙基-O-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯的报道还未见到,芽孢杆菌是农田土壤中普遍存在的菌株,在有关对有机磷农药的降解中报道的也比较多,但降解谱系都比较单一。DYY-9 相对降解的种类较多,但也并不是对所有的有机磷农药均有降解作用,若要彻底的降解 O,O-二乙基-O-(4-硝基苯基)硫代磷酸酯需要较长的时间或者其它菌株的共同作用才可。

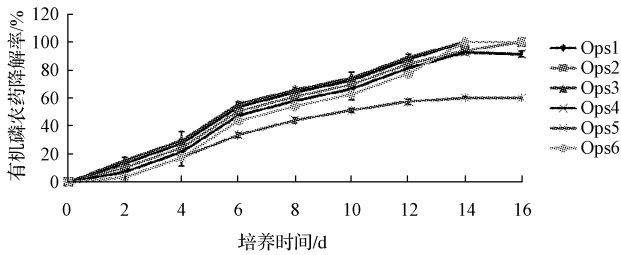


图3 芽孢杆菌 DYY-9 对不同种类有机磷农药的降解率

Fig. 3 Degradation rate of *Bacillus* spp. DYY-9 for different kinds of organophosphorus pesticide

2.4 土壤杆菌 DYY-17 对 6 种有机磷农药有效成分的降解作用

由图 4 可知, DYY-17 对 6 种有机磷农药有效成分 Ops1、Ops2、Ops3、Ops5 均有较好的降解作用, 而对 Ops4 降解较前 4 种缓慢, 尤其是对 Ops6 的降解最慢, 培养 16 d 的降解率仅达到 43%。与前 2 种细菌相比, DYY-17 的降解的效率普遍弱一些, 并且降解的周期稍长一些。

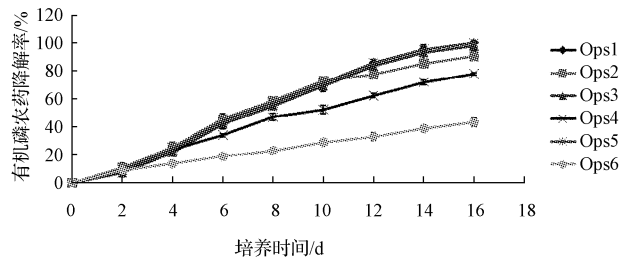


图4 土壤杆菌 DYY-17 对不同种类有机磷农药的降解率

Fig. 4 Degradation rate of the *Agrobacterium* sp. DYY-17 for different kinds of organophosphorus pesticide

3 讨论

对分离到的可完全降解氧化乐果有效成分的 3 株不同的菌进行了鉴定, 分别为假单胞菌、芽孢杆菌和土壤杆菌。假单胞菌属物种分布范围广泛, 许多物种在很多污染物的降解方面发挥着重要作用, 如甲胺磷^[9]、4-氯硝基苯^[10]、酚类化合物^[11]等, 在很多有机物污染方面均表现出极大的用途与巨大的潜力。芽孢杆菌包括多种类型, 在降解有机物方面的研究也已开展, 如有研究表明芽孢杆菌对水胺硫磷^[12]、氧化乐果^[13]、无机磷^[14]等均有较好的降解作用。另外, 土壤杆菌可降解非类化合物^[15], 但是在有机磷降解方面还鲜见研究和应用。

该研究发现, 假单胞菌 DYY-3 对有机磷农药的降

解谱及降解能力较其它 2 株菌强。对这 3 株菌的有机磷类农药有效成分降解谱的初步分析发现, 不同菌株作用的对象有所差异, 降解能力则存在明显差别。该研究所用菌株对氧化乐果、敌敌畏、乐果的有效成分的降解能力均较强, 可能是由于近年来主要施用这 3 种农药, 土壤细菌经过了类似于驯化的过程, 其降解能力增强。不同菌株对其它 3 种有机磷农药的降解特性存在差异, 可能这 3 种菌本属于不同的种, 其降解的机制不同, 导致对其它农药降解功能的差异。如芽孢杆菌 DYY-9 对马拉硫磷主要成分降解作用缓慢, 且至后期无明显降解作用, 可能是由于降解过程中细胞中的积累的某些物质, 对该菌株菌体的生长产生抑制或者毒害作用。通过筛选与比较不同菌株的降解谱, 对今后关于菌株复配制剂及其在田间应用奠定良好的基础。

参考文献

- [1] 付广云, 韩长秀. 有机磷农药及其危害[J]. 化学教育, 2005(1): 9-10.
- [2] Singh B K. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications[J]. Nat Rev Microbiol, 2009(7): 156-164.
- [3] Singh B K, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. FEMS Microbiol Rev, 2006(30): 428-471.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 徐玉泉, 张维, 陈明, 等. 一株苯酚降解的分离和鉴定[J]. 环境科学导报, 2000, 20(4): 450-455.
- [8] 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.
- [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] 杜春梅, 金术超, 范晶, 等. 侧孢芽孢杆菌降解水胺硫磷的条件及途径[J]. 北方园艺, 2008(11): 170-173.
- [13] 宫占元, 王艳杰, 李永鹏, 等. 侧孢芽孢杆菌降解有机磷能力的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2005, 17(5): 14-17.
- [14] 宫占元, 王艳杰, 李永鹏, 等. 侧孢芽孢杆菌降解无机磷能力的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2006, 18(1): 12-14.
- [15] 仇磊, 袁红莉, 汪双清, 等. 一株土壤杆菌降解非的代谢途径初探[J]. 中国科学(地球科学), 2005, 35(增D): 226-232.

Study on the Isolation and Degradation Spectrum of Organophosphorus-degradation Bacteria in Pear Orchard of Southern Xinjiang

YANG Rui-hong^{1,2}, SHI Chong², WANG Chun-li²

(1. Institute of Science Education, Xinjiang Education Institute, Urumqi, Xinjiang 840043; 2. College of Grassland and Environmental Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052)

新疆红枣缩果病菌生物学特性及室内药剂筛选研究

孙 洁, 池 振 江, 赵 思 峰

(石河子大学 农学院, 新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用自治区高校重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘 要:在室内模拟条件下研究了温度、pH 值和湿度对新疆地区 3 株枣缩果病菌 *Alternaria alternata* 代表菌菌丝生长和孢子萌发的影响, 并采用菌丝生长速率法测定了 8 种杀菌剂对该病菌的致死中浓度。结果表明: 3 株病菌生长的适宜温度为 25~30℃, 适宜 pH 为 6~10; 分生孢子萌发最适温度为 28℃, pH 为 10, 随着湿度增加, 3 株菌的分生孢子萌发率不断增加, AKS6T-1、KRL34T11L 和 KS44T14L 在空气相对湿度为 100% 时孢子萌发率均最高, 分别为 88.33%、95.00% 和 92.00%。供试的 8 种杀菌剂中, 70% 代森锰锌 WP 对 3 株 *A. alternata* 菌丝生长抑制效果最好, 抑制菌丝生长的 EC₅₀ 分别为 0.074、0.098、0.034 g/L, 故 70% 代森锰锌 WP 可作为防治枣缩果病的首选药剂。

关键词: 红枣; 枣缩果病; 链格孢菌; 生物学特性; 药剂筛选

中图分类号: S 665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)24-0126-04

枣 (*Ziziphus jujube* Mill.) 属鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属植物, 原产于中国, 是我国第一大干果树种和第七大果树^[1], 在我国已有 8 000 多年的种植历史^[2]。新疆光热资源丰富, 干旱少雨, 为优质红枣生长提供了优良的自然条件, 截止到 2011 年底, 全疆红枣种植面积已超过 40 万 hm²^[3]。然而随着红枣面积的不断增长, 枣缩果病发生日趋严重, 对红枣的产量和品质造成严重影响, 该病在南疆红枣种植区普遍发生, 一般发病率在 5%~10%, 发病严重枣园可达 20% 以上^[4]。枣果感病后, 病果逐渐干缩凹陷, 果皮皱缩, 脱落, 整个病果呈无光泽的暗红色且萎缩, 病部果肉呈海绵状坏死, 味苦, 不堪食用^[5]。对造成缩果病的病原菌中国内地已有报道^[6-7], 然

而新疆自 2005 年才开始大面积种植红枣, 对枣缩果病原研究很少, 目前少见有效防治该病病菌的杀菌剂。为了有效控制该病害的发生, 该研究对该病病菌的生物学特性进行了研究, 并对有效抑制该菌生长的杀菌剂进行了筛选, 旨在为该病的防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试菌株: 枣缩果病菌链格孢 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, AKS6T-1 采自阿克苏地区一师 6 团; KRL34T11L 采自巴音郭楞蒙古自治州二师 34 团; KS44T14L 采自喀什地区三师 44 团。3 株代表菌株均进行了鉴定并经致病性测定确定为枣缩果病的致病菌。

供试培养基为 PDA 培养基, 按方中达^[8]的方法配制。

供试药剂: 70% 代森锰锌 WP (江苏利民化工股份有限公司)、75% 百菌清 WP (西安瑞特农药有限公司)、70% 甲基硫菌灵 WP (山东科大创业生物有限公司)、25% 阿米西达 SC (先正达 <中国> 投资有限公司)、15%

第一作者简介: 孙洁 (1988-), 女, 甘肃武威人, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail: zkysj@sina.cn.

责任作者: 赵思峰 (1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物病害安全防治。E-mail: zhaosifengly@sina.com.

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2011BAD48B02)。

收稿日期: 2013-09-16

Abstract: Taking the pear orchards soils in Southern Xinjiang as research object, bacteria strains were isolated from them which could degrade the effective components of omethoate completely. The degrading strains were identified using 16S rDNA sequences. The degradation spectrum and degradation capabilities of them were studied. The results showed that 3 strains were isolated which could degrade the effective components of omethoate completely, and they were identified as *Pseudomonadales* sp., *Bacillus* spp. and *Agrobacterium* sp. There were differences among different strains. Of the three bacteria strains, the strain of *Pseudomonas* sp. DYY-3 exhibited higher degradation capabilities. The data of this study provided the solid foundation for microbial-insecticide mixtures and its field application.

Key words: biodegradation; organophosphorus; soil bacteria; spectrum of degradation