

三唑磷降解菌的筛选及其降解途径研究

Screening of a Triazophos-degrading Strain and Pathway of its Degradation

王丽红, 张 林, 陈欢林*

WANG Li-Hong, ZHANG Lin and CHEN Huan-Lin*

浙江大学材料与化工学院, 杭州 310027

College of Materials Sci. & Chem. Eng., Zhejiang University, Hangzhou, 310027, China

摘 要 从三唑磷生产厂周围的土壤中用土壤富集的方法筛选分离出一株三唑磷降解菌 *Klebsiella* sp., 它能以三唑磷为唯一碳源、唯一氮源、唯一磷源生长同时实现对三唑磷的降解, 三唑磷作为唯一氮源时的降解速度最快, 是实现三唑磷降解的最佳营养方案。在三唑磷为唯一氮源时, 1000 mg/L 的三唑磷浓度对菌体降解无抑制作用。此降解菌首先通过水解作用实现对 TAP 的降解, 之后把水解产物进一步降解为无毒的无机物质。降解菌的这些降解特性表明了它用于生物降解消除三唑磷污染的巨大潜力。

关键词 生物降解, 三唑磷, 菌种筛选, 唯一氮源

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0954-06

Abstract A Triazophos-degrading strain, *Klebsiella* sp. E6, was identified by soil enrichment technology from the soil sampled from the vicinity of a factory manufacturing Triazophos (TAP). The nutrient requirement of the strain is simple. It can use TAP as the sole sources of carbon, nitrogen and phosphorus. Comparison of the degradation rates revealed that the strain degraded TAP most effectively when TAP was used as a sole nitrogen source. No inhibition effect occurred when TAP concentration was high as 1000mg/L in the case of TAP was used as the sole nitrogen source. Analysis of the intermediates of TAP metabolism indicated that TAP is firstly hydrolyzed into 1-phenyl-3-hydroxy-1,2,4-triazole and O,O-diethyl phosphorothioic acid. 1-phenyl-3-hydroxy-1,2,4-triazole was further mineralized into inorganic compounds. A degradation pathway of TAP was proposed. The experiment results demonstrated that the strain has potential in biodegradation of TAP pollutions.

Key words biodegradation, Triazophos, bacterial strain screening, the sole nitrogen source

农药是农业生产中防治病虫害、提高农作物产量必不可少的工业产品, 农药的广泛使用在给人类带来增产增收的利益同时也给环境造成了严重的污染, 使得农业产量和环境质量之间的矛盾日益突出。这是因为农药在使用的过程中不是只停留在施用的地点, 它可以通过土壤渗透、空气流动、水土流失等过程进入地球的生态系统^[1], 还可以通过食物残留

和改变生物种类等方式危害人类健康^[2-4]。有机磷农药(OPs)是近年来农业上使用最广泛的一类农药, 通过抑制生物体内的乙酰胆碱酯酶活性来扰乱神经冲动正常进行而产生毒性作用, OPs 的污染目前对人类的饮用水资源和生存环境造成了严重的威胁, 已经引起全世界的广泛关注。

利用微生物的降解作用来消除农药的污染是一

种理想且可行的清除环境污染的方法,此法的依据是大量的研究已表明微生物降解是土壤中农药消失的主要途径,农药被降解为完全无毒的无机物质水和二氧化碳^[5-8],虽然此法还处于初步发展阶段,很多问题还有待解决,但是由于它符合与自然界协调的发展观念,被视为最有前途的方法之一。它有传统的土壤焚烧和地下水抽出处理技术不能相比的优势,通过生物化学转化和矿化作用把有毒物质彻底转化为无毒的最终产物,不会形成二次污染或导致污染物的转移,处理条件温和,可原位操作,操作成本低。

生物降解消除 OPs 污染的前提条件是获得高效降解 OPs 的微生物,从受农药污染严重的土壤中筛选分离具有降解能力的菌种是一种有效途径。国外在 20 世纪 70 年代就开始开展对当时广泛使用的有机磷农药对硫磷和甲基对硫磷降解菌的筛选工作, Sethunathan N. 和 Serdar C. M. 分别从各自所在的对硫磷污染区域筛选出对硫磷降解菌 *Flavobacterium* sp.^[9]和 *Pseudomonas diminuta*^[10],后面的研究者们对这两种降解菌的降解性能进行了深入的研究,并发现它们都是通过水解作用实现降解的,于是也就有了从这些菌体细胞中分离纯化出来的有机磷水解酶^[11],其基因已被克隆并测序。之后,有关对硫磷和甲基对硫磷的筛选和有机磷水解酶的分离纯化的研究工作蓬勃开展起来,研究报道也逐渐增多^[12-13]。近年来,对硫磷和甲基对硫磷由于高毒性和环境残留持久等原因已经被许多国家禁用,一些低毒和环境低残留的 OPs 如毒死蜱、三唑磷、敌百虫等被广泛应用,因此筛选对这些 OPs 有降解作用的菌种也就成为消除农药污染的当务之急。作为 OPs 一种的三唑磷(TAP),是 20 世纪 60 年代以后开发出来的,化学名称为 O,O-二乙基-O(1-苯基-1,2,4-三唑-3-基)硫代磷酸酯(图 1),是一种广谱、高效的有机磷杀虫、杀螨剂,由于其良好的使用效果和经济的价格已在我国和其他国家普遍推广,其对环境的污染也在日益加剧。为此,本文从 TAP 生产车间周围的土壤中筛选出三唑磷降解菌,并对其降解性能和降解途径进行了研究,拟为生物降解消除 TAP 污染奠定基础。

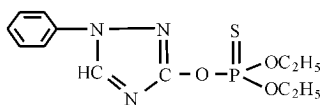


图 1 三唑磷的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Triazophos

1 实验方法

1.1 TAP 降解菌的筛选

1.1.1 筛选培养基 筛选 TAP 降解菌所用培养基为基本无机盐培养基(BSM)(1L 去离子水)($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g; CaSO_4 0.08g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0033g; MgSO_4 0.2g; K_2HPO_4 0.8g; KH_2PO_4 0.2g; pH 7.2,灭菌后加入 100mg/L TAP 作为唯一碳源。固体培养基在上述培养基中加入 1.5% 的琼脂。

1.1.2 筛选过程 TAP 降解菌的筛选采用传统的土壤富集法,土壤取自浙江新农化工有限公司的 TAP 生产车间附近。取来的土壤样品先过筛除去石子和杂草,然后取 20g 放入 100mL 上述培养基中在 THZ-C 恒温振荡器中培养,温度 30℃,转速 180r/min,培养 1d 后取出,静置 2h 后,以上面的悬浮液为种子液 20% 的接种量接种到新鲜的液体培养基中继续培养 2 周,定期观察培养液的混浊度和摇瓶底部的 TAP 液滴有无减少(TAP 在水溶液中的溶解度很低,23℃时 39mg/L,所以会在摇瓶底部形成不溶的液滴),培养基逐渐变混浊表明有菌体生长,TAP 液滴减少表明有 TAP 降解菌。观察到上述现象后便可进行平板涂布固体培养,然后取单菌落再次转入液体培养基培养,观察摇瓶底部 TAP 液滴有无减少来判断是否为 TAP 降解菌,有降解作用的单菌落再次涂布取单菌落继续传代,涂布,直至平板培养基上的菌落形态完全一致,转入液体培养基,至此得到 TAP 降解菌的纯培养,选 TAP 液滴消失速度最快的纯培养菌株作为后续的实验菌种。平板培养在 DRP-9052 型电热恒温培养箱中进行,温度 33℃。

1.1.3 菌种鉴定 菌种生物学性质测定参照 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology^[14],然后 16S rDNA 测序进行分类学鉴定。16S rDNA 测序过程中,菌种基因组 DNA 提取采用标准的 Tris 平衡酚提取法,PCR 扩增采用两种合成的通用引物(合成由上海生物工程公司完成),PCR 产物纯化后测序,纯化及测序工作由 TaKaRa 生物工程公司(大连)完成,测序结果在 NCBI 数据库中 BLAST 搜索其相似性最高的序列确定菌种分类。

1.2 降解菌对 TAP 的降解

1.2.1 降解菌以 TAP 为不同营养时的降解 设计了 TAP 为菌种生长不同营养的培养基,以研究菌体对 TAP 的降解性能。TAP 为碳源的培养基(MC):BSM, 200mg/L TAP, 20g/L 甲醇;TAP 为唯一氮源的培养基(MN):BSM 中去掉 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200mg/L TAP, 20g/L

甲醇, TAP 为唯一磷源的培养基(MP):BSM 中去除 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 200mg/L TAP 20g/L 甲醇。各培养基 pH 调至 7.2, TAP 和甲醇从 25mg/L 的 TAP 甲醇溶液中同时加入灭菌后的 BSM 中。每隔一定时间取培养液 15mL 分别分析菌体生长情况和 TAP 浓度降低情况。

1.2.2 菌体对不同浓度 TAP 的降解:为确定 TAP 对菌体生长有无抑制作用,菌体接种到一系列不同浓度的 TAP 为唯一氮源培养基中,培养基组成:BSM 中去除 $(NH_4)_2SO_4$ 20g/L 甲醇, TAP 浓度分别为:200mg/L 500mg/L 1000mg/L, TAP 和甲醇从不同 TAP 浓度的甲醇溶液中同时加入灭菌后的 BSM 中。每隔一定时间取培养液 15mL 分析 TAP 浓度降低情况。

1.2.3 培养条件:上述 1.2.1 和 1.2.2 实验中均采用如下的培养条件:菌种以 10% 的接种量接入新鲜的培养基中,恒温振荡器中培养, 33℃ 200r/min。每组实验均做空白培养作为对比,空白培养中培养基组成相同,但不加入菌种。每组实验做三组平行。

1.2.4 分析:

(1)菌体生长分析:以 600nm 处菌体培养液的吸光度 OD_{600} 值分析菌体生长情况。吸光度测量在 Spectrumlab 54 型紫外可见分光光度仪上进行。

(2)TAP 浓度分析:培养液中 TAP 浓度分析采用气相色谱法(GC),GC 分析前样品须经如下的预处理:10mL 培养液转入 100mL 分液漏斗中,用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,合并 3 次萃取液无水硫酸钠脱水后氮气浓缩,浓缩至近干用乙酸乙酯定容至 1mL 用于 GC 分析。

GC 分析在检测器为火焰光度检测器(FPD)的 Agilent model 6890 型气相色谱上进行,不分流进样,操作条件为:进样温度 240℃,检测器温度 250℃,进样量 1 μ L,柱温程序升温 80℃—50℃(1min)—160℃(1min)—15℃(1min)—220℃(5.4min)—30℃(1min)—250℃(1min);载气氮气流速 2mL/min,空气 100mL/min,氢气 75mL/min。此条件下 TAP 的停留时间为 14.57min。浓度确定采用外标测定法。

1.3 降解菌对 TAP 的降解途径

1.3.1 降解实验:菌体以 10% 的接种量接种到 TAP 为唯一氮源的培养基中,组成为:BSM 中去除 $(NH_4)_2SO_4$ 200mg/L TAP 20g/L 甲醇。33℃, 200 r/min 培养 5d,第 3 天和第 5 天分别取样,分析培养液的组分以确定降解产物。

1.3.2 培养液组分分析:培养液用气相-质谱连用(GC-MS)分析来确定其中的组分,培养液分析前的预处理如下:10mL 样品在烘箱中 40℃ 烘干除去水分,然后用 1mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,得到的溶液用于 GC-MS 分析。

GC-MS 分析在 Hewlett-Packard 6890GC-5973MS 系统上进行,操作条件如下:进样量 1 μ L;柱温程序升温, 70℃(3min)—20℃(1min)—270℃(10min)。

2 结果与讨论

2.1 TAP 降解菌的筛选

在以 TAP 为唯一碳源的筛选培养基中,共有 28 株菌株可以生存和生长,但是大多数菌株只是能在其中生存,并不能以 TAP 为营养生长,也就不具备降解 TAP 的能力,经过多次的传代和稀释涂布分离纯化,最后确定一株编号为 E6 的菌株的降解能力最强,以 TAP 为碳源的生长速度也最快,所以选定 E6 作为降解性能和降解途径研究的菌种。

E6 为短杆状细菌,革兰氏染色为阴性,能氧化葡萄糖产气,能降解硝酸盐,16S rDNA 测序结果显示,菌株与 NCBI 数据库中 *Klebsiella* sp. strain zmmo (GI:1502378)的相似性最高,达 99%。基于这些结果确定此降解菌为 *Klebsiella* sp.。

2.2 降解菌对 TAP 的降解

在实验中发现,降解菌 E6 虽然能以 TAP 为唯一的碳源生长,但是其生长速度和 TAP 的降解速度都相当缓慢,100mg/L TAP 液滴完全消失需要 7d 的时间(平均降解速度 $0.46mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$),表明 TAP 并不是 E6 的良好碳源。为提高 E6 的生长速度以便加快 TAP 的降解速率,经实验(实验数据未给出)最后确定甲醇作为 E6 的良好碳源。选甲醇的原因有二:第一,甲醇是 E6 的良好碳源,E6 在甲醇为碳源的培养基中生长良好,菌体数目多,TAP 被利用的速率快;第二,甲醇为 TAP 的良好溶剂,TAP 的甲醇溶液加入 BSM 培养基中形成乳浊液,相当于增加了 TAP 在水溶液中的溶解度,与 TAP 形成液滴沉于培养基底部相比,菌体与 TAP 的接触机会大大增加,TAP 被利用几率也会大幅增加。

依据 1.2.1 的实验结果绘制的 E6 在 TAP 为不同营养的培养基中的生长曲线(图 2)和对 TAP 的降解曲线(图 3)表明,当 TAP 为不同的营养成分时,TAP 的降解速度并不与菌体的生长速度成正比,在 MC 培养基中菌体生长最快但 TAP 的降解速度最慢,在 MN 培养基中菌体生长居中但 TAP 降解最快。

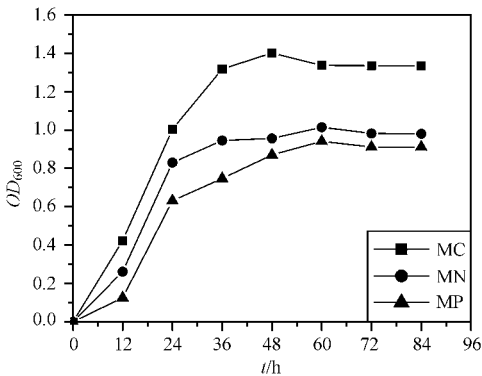


图 2 TAP 为不同营养时 E6 的生长曲线
Fig.2 Growth curves of E6 with TAP as different sole nutrient sources

这是因为 ,在 MC 培养基中 ,TAP 虽然是菌体生长的碳源但并不是唯一碳源 ,因此菌体会优先利用甲醇这一良好碳源而生长 ,致使 TAP 被利用的速度减小 ,在 MN 或 MP 培养基中 ,TAP 除作为碳源外 ,还是菌体生长的唯一氮源或唯一磷源 ,是菌体生长的必需营养 ,因此在 MN 或 MP 培养基中 TAP 降解速度大于 MC 中的。MN 和 MP 中的降解速度不同的原因主要是菌体生长所需氮量和磷量的不同。因此 ,TAP 为菌体生长唯一氮源的营养设计是获得高速 TAP 降解的最佳培养基 ,在以后的降解途径实验中即选用了此培养基。

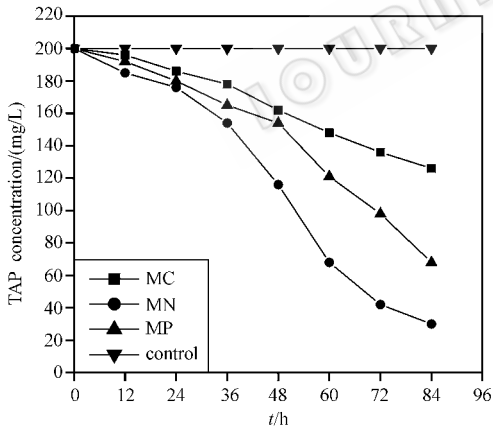


图 3 TAP 为不同营养时的降解曲线
Fig. 3 Degradation of TAP with TAP as different sole nutrient sources

当 TAP 浓度增加时 ,未发现菌体的降解作用受到抑制 (图 4) ,降解速率随 TAP 浓度增加而增加 ,表明了此菌体用于处理高浓度 TAP 污染的潜力。

2.3 降解菌对 TAP 降解的途径

E6 在 TAP 为唯一氮源的培养基中培养 3d 后的培养液 GC-MS 分析的总离子流图(TIC)见图 5。总离子流图中有两个主要峰 ,相应的质谱图和组分结

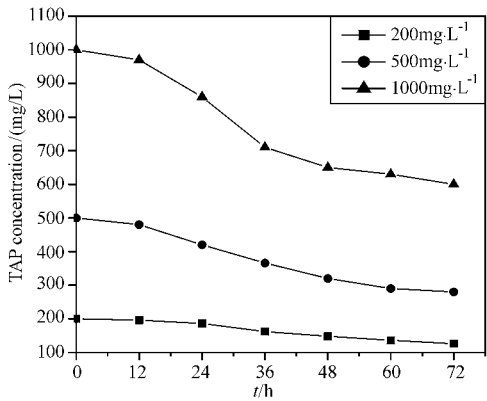


图 4 TAP 为不同初始浓度时的降解曲线
Fig.4 Degradation of TAP at different initial concentrations

构示于图 6 和图 7 ,总离子流图中的峰 1 对应降解产物 O,O-二乙基硫代磷酸 ,峰 2 对应产物 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑 ,此两种产物是 TAP 水解后的产物 ,因此可判断 E6 对 TAP 的降解是通过水解机理来完成的 ,这与国外筛选的对硫磷和甲基对硫磷降解菌的降解机理相同 ,进一步表明微生物通过水解作用降解 OPs 的现象还是比较普遍的。

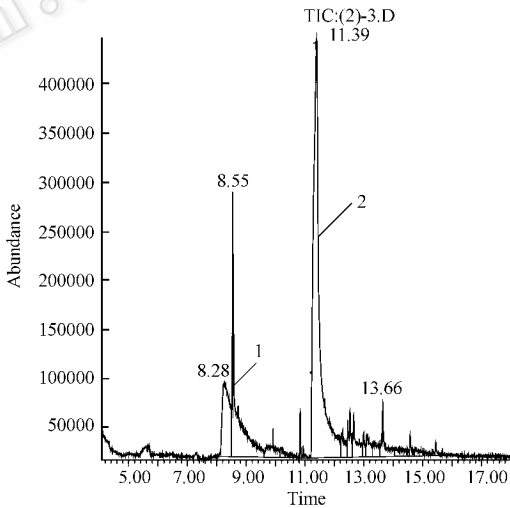


图 5 培养 3d 的培养液总离子流图
Fig.5 TIC chromatogram of culture medium after grown for 3 days

5d 后的培养液 GC-MS 分析 TIC 示于图 8 中。此时总离子流图中只有 O,O-二乙基硫代磷酸一个峰 ,其质谱图和相应的组分结构见图 9 ,说明降解中间产物 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑可被 E6 进一步降解 ,由于在培养液中未分析出其他组分 ,所以可以推断 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑被降解为无机物质 ,具体的降解途径还有待进一步研究。

综合上述 GC-MS 分析结果 ,本文给出 E6 对

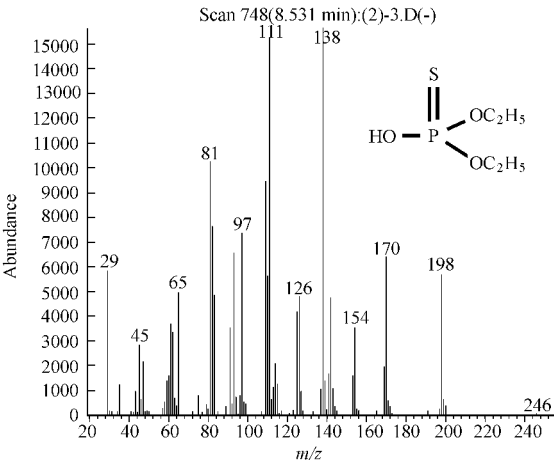


图6 图5中峰1的对应组分质谱图及结构

Fig.6 Mass spectrum and structure of the compound corresponding to peak 1 in Fig. 5

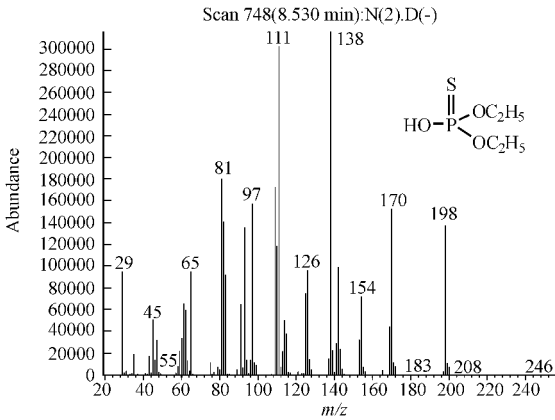


图9 图8中峰8的对应组分质谱图及结构

Fig.9 Mass spectrum and structure of the compound corresponding to the peak in Fig. 8

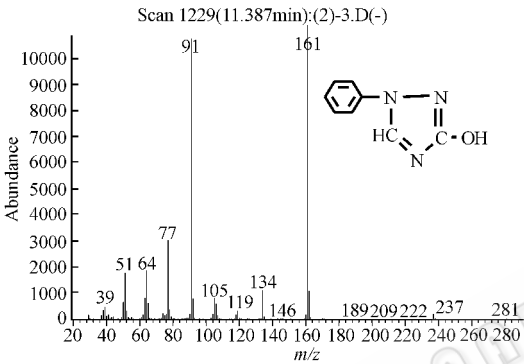


图7 图5中峰2的对应组分质谱图及结构

Fig.7 Mass spectrum and structure of the compound corresponding to peak 2 in Fig. 5

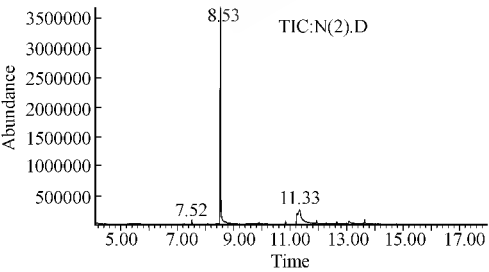


图8 培养5d的培养液的总离子流图

Fig.8 TIC chromatogram of culture medium after grown for 5 days

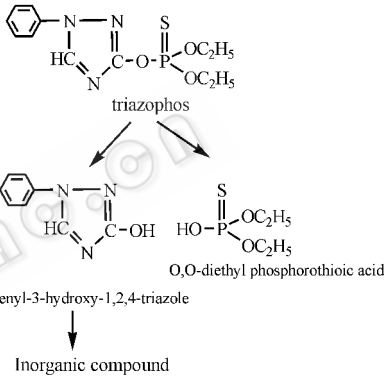


图10 E6降解菌对TAP的降解途径

Fig.10 TAP degradation pathway in *Klebsiella* sp. E6

3 结论

本文从长期接触 TAP 的土壤中分离筛选出了一株能高效降解 TAP 的细菌 *Klebsiella* sp. E6, 此细菌能以 TAP 为唯一碳源、唯一氮源、唯一磷源生长, TAP 为唯一碳源时生长和降解都非常缓慢, 以 TAP 为唯一氮源或唯一磷源时由于有甲醇为碳源, 菌体在较高的生长速率下又保持了较高的 TAP 利用率, TAP 为唯一氮源时的降解速率大于 TAP 为唯一磷源时的降解速率, 因此本文确定 TAP 为唯一氮源的培养基设计为 TAP 降解的最佳培养基。

TAP 降解途径的研究结果表明菌体 E6 首先通过水解机理实现对 TAP 的降解, 不仅如此 E6 还能以 TAP 水解后的中间产物 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑为营养生长, 因此可把 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑进一步降解, 降解的最终产物为无机物, 表明降解菌具备将 TAP 从有毒的农药完全降解为无毒物质的能力, 实验结果证明了本文筛选出来的降解菌用于生物降解 TAP 污染的巨大潜力。

TAP 的降解途径(图 10)。首先 E6 通过水解作用将 TAP 降解, 之后 E6 还可以把其中的一种中间产物 1-苯基-3-羟基-1,2,4-三唑进一步降解为无机物质, 这些性质表明 E6 用于生物降解 TAP 的巨大潜力, 能把 TAP 完全降解为无毒的无机物质的特性对于生物降解农药是至关重要的一点, 也是最具吸引力的一点。

REFERENCES(参考文献)

[1] Huber A , Bach M , Frede HG. Pollution of surface waters with pesticides in Germany : modeling non-point source inputs. *Agriculture Ecosystems and Environment* ,2000 **80** :191 – 204

[2] Skinner JA , Lewis KA , Bardon KS *et al.* An overview of the environmental impact of agriculture in the UK. *J Environ Management* ,1997 **50** :111 – 128

[3] Wajih NS , Fawzia A. Dietary intake of organophosphate pesticides in Kuwait. *Food Chemistry (Analytical , Nutritional and Clinical Methods Section)* ,2000 **69** 331 – 338

[4] Andersona BS , Hunta JW. Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California , USA). *Environmental Pollution* ,2003 ,**124** :523 – 532

[5] Laveglia J , Dahm PA. Degradation of organophosphorous and carbamate insecticides in the soil and by soil microorganisms. *Annu Rev Entomol* ,1977 ,**22** :483 – 513

[6] Dimitrios GK , Allan W. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epl to degrade ethoprophos in soil. *Biology & Biochemistry* ,2000 **32** :1753 – 1762

[7] Lehr S , Scheunert I , Beese F. Mineralization of free and cell-wall-bound isotroturon in soils in relation to soil microbial parameters. *Soil Biology & Biochemistry* ,1996 ,**28** :1 – 8

[8] Twigg LE , Socha LV. Defluorination of sodium monofluoroacetate by soil microorganisms from central Australia. *Soil Biology & Biochemistry* ,2001 ,**33** 227 – 234

[9] Sethunathan N , Yoshida T. A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol* ,1973 ,**19** 873 – 875

[10] Serdar CM , Gibson DT , Munneke DM *et al.* Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta* . *Appl Environ Microbiol* ,1982 ,**44** 246 249

[11] Mulbry WW , Kams JS , Kearney PC *et al.* Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium* sp. by Southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta* . *Appl Environ Microbiol* ,1986 **51** 926 – 930

[12] Chaudhry GR , Ali AN , Wheeler WB. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* ,1988 ,**54** :288 – 293

[13] Mulbry WW , Kams JS. Purification and characterization of three parathion hydrolases from gram-negative bacterial strains. *Appl Environ Microbiol* ,1989 ,**55** :289 – 293

[14] Kreig NR , Holt JG. Bergey 's manual of determinative bacteriology . The Williams and Wilkins Co. Baltimore , Md. 1984

科学出版社生命科学编辑部新书推介

《经济全球化与生态安全》

戴星翼 唐松江 马涛 著 科学出版社 2005 年 9 月出版 ISBN 7 - 03 - 015665 - X 定价 39.00 元

阐述了经济全球化与生态安全的关系 ,将社会热点——生物入侵作为经济全球化过程中的生态安全案例 ,探讨了中国在全球经济分工和生态安全协作中的权利和义务。可作为环境科学、生态学、经济学和国际贸易等领域教研人员和学生的参考用书。



《生态服务的价值实现》

戴星翼 俞厚未 董梅 著 科学出版社 2005 年 9 月出版 ISBN 7 - 03015666 - 8 定价 40.00 元

许多环境生态因子具有作为自然物品和生态服务提供者的复杂功能 ,这些功能在人类利用过程中会出现矛盾冲突 ,即相对稀缺 ,也会因为拥挤而使这些因子的稀缺程度同时上升 ,即绝对稀缺。由于种种原因 ,市场在应对自然物品的稀缺性时较为有效 ,而在生态服务问题上往往失灵 ,这是探讨生态服务价值实现的基本出发点。本书首先从自然科学的角度出发 ,系统梳理生态服务的性质、类型和意义 ,然后再基于价值实现的角度 ,对生态服务进行了重新分类 ,并探讨了各类生态服务要素价值实现的路径 ,书末分析了我国目前生态服务存在的两大问题 ,即大城市生态服务系统的构建和区域之间生态服务的关系。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址 :100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社科学分社 ;联系人 :阮芯 ;联系电话 010-6403462X(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> ,欢迎致电索要书目 010-64012501