



有机磷农药广谱降解菌 A1A18 菌株(*Brevundimonas* sp.) 的筛选、鉴定与降解特性分析

顾欣, 刘文辉, 杨环羽, 柳强娟, 孙权, 王锐, 王新谱

(宁夏大学 农学院, 银川 750021)

摘要 从宁夏有机磷农药污染土壤中筛选对毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷等 3 种常用有机磷农药残留具有降解能力的菌株, 确定其降解能力的代际稳定性及其对土壤中有机磷农药的降解特性。采用选择培养法和牛津杯法筛选目标菌株, 依据细菌形态学特征、生理生化反应及分子测序结果进行分类鉴定, 气相色谱法检测液体培养环境和土壤中有机磷农药的残留量。结果表明: 分离、筛选获得 1 株有机磷农药广谱降解菌 A1A18 菌株, 鉴定为短波单胞菌属(*Brevundimonas* sp.); 在液体培养环境中, A1A18 菌株对毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷 3 种有机磷农药的降解率分别为 45.82%、9.52% 和 13.96%; 经 10 代培养, 确定该菌株对 3 种有机磷农药的降解能力具有很好的遗传稳定性。在有机磷原药质量分数为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土的土壤中施用 A1A18 菌株, 降解菌初始数量密度为 $0.2 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土, 施药后第 21 天, 土壤中毒死蜱和水胺硫磷的降解率分别达到 88.81% 和 87.75%, 较对照提高 16.24% 和 24.62%; 施药后第 7 天, 土壤中氧化乐果降解率达 86.19%, 较对照提高 12.69%。短波单胞菌 A1A18 菌株能促进土壤中毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷的降解, 具有较好的田间应用潜力。

关键词 有机磷农药; 广谱降解菌; 微生物修复; 土壤

中图分类号 X172

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)11-1896-10

有机磷农药 (Organophosphorus pesticide, OP) 是应用最广的一类有机农药^[1], 其毒性给人类、其他生物和环境带来一系列问题^[2]。农业生产中使用的 OP 大部分进入耕作环境, 其中土壤是农药残留累积的主要场所。由于农药自身物理化学性质、使用频次和土壤环境的差异, 不同 OP 的自然降解过程长短不一, 从数天到数百天^[3-4]。为了避免土壤农药残留过量累积对人类和环境造成更大的危害, 研究 OP 的加速降解技术迫在眉睫。

目前, OP 的降解主要有微生物降解、光降解和氧化降解 3 个途径^[5]。其中, 微生物降解方法以其环境友好、无二次污染、使用便捷等优点而获得人类的青睐。因此, 具有 OP 降解功能的微生物研究成为热点。目前, 已知多种 OP 降解菌, 如假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、木霉属 (*Tri-*

choderma)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*) 等微生物, 都是针对某种单一 OP 进行定向筛选分离获得的^[6-8]。在农业生产实践中, 由于耕作方式和环境变化导致不同害虫在同一田块中发生, 造成不同种类的 OP 同时或先后被施用并累积于土壤。因此, 筛选对多种 OP 都具有降解能力的广谱降解菌, 有利于提高农田土壤修复效率, 同时降低修复成本。部分学者在这方面开展了研究, 如 Pino 等^[9]通过选择富集法, 从农药污染土壤中获得对毒死蜱和甲基对硫磷都具有较好降解效果的菌系。某些真菌, 如淡紫青霉 (*Penicillium lilacinum*) BP303 菌株产生的酶可以使 OP 的 P—O 和 P=S 键发生裂解, 从而具有同时降解对氧磷、对硫磷、甲基对硫磷的功能, 其中对氧磷是该菌株的优选底物^[10]。3 株蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 对毒死蜱、甲基对硫磷和三唑磷具有不同的降解能力^[11]。1 株施氏假单胞

收稿日期: 2019-02-28 修回日期: 2019-04-25

基金项目: 宁夏自然科学基金 (NZ15051); 宁夏重点研发计划 (2018BBF33002, 2018BBF02004)。

第一作者: 顾欣, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为农业微生物资源利用。E-mail: guxin929@163.com

菌(*Pseudomonas stutzeri*)对甲基对硫磷具有较高降解率,对氧化乐果、甲拌磷和辛硫磷也具有一定降解效果^[12]。

本研究选择毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷作为目标降解物,开展 OP 广谱降解菌的分离筛选和初步鉴定,确定其对不同种类农药的降解效果及其降解功能的遗传稳定性,为 OP 高效降解菌的进一步开发和研究提供菌种资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

用于 OP 降解菌富集、筛选的土壤样品采集自银川市军马场农田、银川市区周边农田、贺兰县

菜田和果园,都曾经施用过毒死蜱、氧化乐果或水胺硫磷。取表层土 5~20 cm,剔除其中的石块、植株残体,阴凉处摊开自然风干,过 2.0 mm 筛,备用。

非耕作土壤采集自银川市军马场荒地,经过预处理后,用于 OP 加标回收试验及盆栽试验。该土壤样品质地为砂壤,酸碱度为 8.57,全盐质量分数为 0.60 g·kg⁻¹,有机质质量分数为 2.87 g·kg⁻¹,碱解氮质量分数为 1.05 g·kg⁻¹,速效磷质量分数为 32.32 g·kg⁻¹,速效钾质量分数为 203.39 g·kg⁻¹。

1.2 有机磷农药

购自银川市农资市场,基本情况见表 1。

表 1 有机磷农药基本情况

Table 1 Organophosphorus pesticides

种类 Name	剂型 Dosage	有效成分标注 质量分数/% Active component tagging mass fraction	有效成分 质量分数/% Active component mass fraction	生产厂家 Manufacturer
毒死蜱 Chlorpyrifos	乳油 Missible oil	40.0	39.62	永农生物科学有限公司 Yongnong Bioscience Co., Ltd.
氧化乐果 Folimat	乳油 Missible oil	40.0	39.78	湖北蕲农化工有限公司 Hubei Qinong Chemicals Co., Ltd.
水胺硫磷 Isocarbophos	乳油 Missible oil	35.0	34.71	湖北仙隆化工股份有限公司 Hubei Xianlong Chemical Limited Liability Company

1.3 主要培养基和试剂

牛肉膏蛋白胨液体培养基:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0~7.4,用于菌种活化。

牛肉膏蛋白胨固体培养基:在牛肉膏蛋白胨液体培养基中加琼脂 15.0~20.0 g·L⁻¹,用于菌种保存、活化和传代培养。

固体选择培养基:牛肉膏蛋白胨固体培养基经高压蒸汽灭菌后,冷却至约 40℃加入试验用 OP(毒死蜱、氧化乐果或水胺硫磷,下同),使 OP 终质量浓度为 1 g·L⁻¹,用于降解菌的初筛和纯化。

液体选择培养基:牛肉膏蛋白胨液体培养基经高压蒸汽灭菌后,冷却至约 40℃加入试验用 OP,使 OP 终质量浓度为 1 g·L⁻¹,用于降解菌的复筛。

淀粉琼脂培养基,用于淀粉水解试验。葡萄糖发酵培养基,用于葡萄糖发酵试验。葡萄糖蛋白胨水培养液,用于乙酰甲基甲醇(V-P)试验。葡萄糖蛋白胨水培养基,用于甲基红试验。柠檬酸铁铵培养基,用于硫化氢试验。硝酸盐培养基,

用于硝酸盐还原试验。营养明胶培养基,用于明胶液化试验。尿素培养基,用于脲酶试验。蛋白胨水培养基,用于吡啶试验。苯丙氨酸脱羧酶培养基,用于苯丙氨酸脱羧酶试验^[13]。

主要试剂与标准品:二氯甲烷(分析纯),石油醚(分析纯),购自国药集团化学试剂有限公司;细菌基因组提取试剂盒和 DNA 片段快速回收纯化试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司。其余试剂均为标准品,为毒死蜱、氧化乐果(纯度 99%)和水胺硫磷(纯度 98%),购自宁夏恒元创科贸有限公司。

1.4 降解菌的富集与分离纯化

采用不同的 OP 液体选择培养基,加入质量比为 1:100 的土壤样品,于 30℃、200 r·min⁻¹ 恒温避光振荡培养 6 d。将培养液以 $\varphi=10\%$ 接种量转接至新的 OP 液体选择培养基中,使其中 OP 终质量浓度逐级增加,分别为 1.5、2.0、2.5、3.0 g·L⁻¹。至培养结束,取培养液 1 mL 与 19 mL 50℃左右的 OP 固体选择培养基混匀,冷却制平板,于 30℃恒温箱避光倒置培养。对长出的菌落经 3 次划线分离纯化,获得纯培养菌种,置

于 4℃ 冰箱冷藏保存。

1.5 降解菌初筛

采用牛肉膏蛋白胨液体培养基于 30℃、200 r·min⁻¹ 振荡培养菌种,活化 18 h。摇匀后,用无菌水制备菌悬液,于 37℃、200 r·min⁻¹ 振荡 2 h,稀释后使其中细菌终数量密度为 0.2×10^8 CFU·mL⁻¹。采用固体平板培养法,在固体选择培养基表面以辐射对称方式放置 8 个无菌牛津杯,每个杯内注入 110 μL 菌悬液。于 37℃ 恒温避光培养 24 h,牛津杯内的液体几乎全部自然蒸发。取出牛津杯,于原培养条件倒置培养 2~4 d,以等量无菌水为对照,每处理设 5 个重复。观察牛津杯外侧有无降解圈,以不同角度用游标卡尺测量降解圈外径 3 次,取均值作为降解圈外径。以降解圈外径大小作为初筛依据,选择降解圈最大和较大的菌株进入复筛。

1.6 降解菌复筛

活化菌种,制备菌悬液,方法同“1.5”。取 1 mL 菌悬液接种于 99 mL OP 液体选择培养基中,37℃、200 r·min⁻¹ 恒温避光振荡培养 72 h,检测其中 OP 残留量。以不接种的液体选择培养基为空白对照,每处理设 3 个重复。降解率计算公式如下:

降解率 = (空白对照 OP 残留量 - 降解菌处理 OP 残留量) / 空白对照 OP 残留量 × 100%

比较各菌株对 3 种 OP 的降解率,以降解率较高的菌株作为目标菌株。

1.7 降解菌降解能力的遗传稳定性

活化目标菌株,方法同“1.5”。进行传代培养,分别测定初始菌、第 5 代和第 10 代对 3 种 OP 的降解率,检测方法同“1.6”。每处理设 3 个重复。以降解率较稳定的菌株为 OP 广谱降解菌株。

1.8 降解菌鉴定

1.8.1 形态学鉴定 采用平板划线法活化目标菌株,牛肉膏蛋白胨固体培养基、37℃ 恒温倒置培养 18 h,形成单一菌落。观察菌落的形态、颜色、直径大小及菌落边缘是否整齐;经革兰氏染色,镜检观察菌体形态,测量长短径,芽孢有无等。

1.8.2 生理生化鉴定 包括葡萄糖发酵试验、淀粉水解试验、明胶液化试验、硫化氢试验、吡啶试验、甲基红试验和菌膜形成试验。参照东秀珠《常见细菌系统鉴定手册》进行分类鉴定^[13]。

1.8.3 分子鉴定 提取细菌总 DNA^[14]。引物为 27F:AGAGTTTGTACCTGGCTCAG,1492R:GGT-

TACCTTGTTACGACTT。PCR 条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环;72℃ 最后延伸 8 min,16℃ 保温。PCR 产物经检测扩增效果后在 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶上做电泳分析,回收 16S rDNA,委托广州赛哲生物技术公司完成测序。

1.8.4 系统发育地位确定 将测序获得的菌株 16S rDNA 基因序列提交到 NCBI 总数据库,经 BLAST 软件在线比对,进行同源性分析。选择同源性关系比较近的序列,采用 MEGA 5.0 建立进化树。

1.9 降解菌对土壤中 OP 的降解能力

1.9.1 降解菌菌悬液制备 活化降解菌,方法同“1.5”。用无菌水制备有效活菌数量密度为 1.0×10^8 CFU·mL⁻¹ 的菌悬液。

1.9.2 土壤中 OP 降解试验 于避光处,在预处理后的非耕作土壤中,用小型喷雾器添加 3 种 OP,边喷边搅拌,充分混匀,使土壤中 3 种 OP 原药的质量分数分别达到 1.0 mg·kg⁻¹ 干土,制成试验用污染土。用同样方法喷入菌悬液,搅拌均匀,使降解菌在试验土壤中的初始数量密度为 0.2×10^8 CFU·g⁻¹ 干土。立即将混匀后的土壤装花盆。花盆上、下口直径分别为 16.0 cm 和 11.0 cm,高 14.0 cm,装土量为 1.0 kg。用无菌水调节土壤湿度为 20%。置于温室,正常光照,每日根据蒸发量补水。以不添加降解菌的 OP 污染土为对照。每处理 3 个重复。分别于装盆后的 0(装盆后 4 h)、1、3、5、7、14、21 d 取 0~10 cm 的土样,每处理采用多点混合,四分法取样,用密封袋装好,放入有冰袋的保温箱内,立即带回实验室进行 OP 质量分数检测。

1.10 菌液数量密度及土壤理化性质检测

菌液数量密度:采用梯度稀释平板培养法。用无菌生理盐水制备菌液的梯度稀释液,分别取 1 mL 稀释液倒入 50~60℃、15 mL 牛肉膏蛋白胨固体培养基中,立即混匀,静置冷却,37℃ 倒置培养 24 h,菌落计数。每个数量密度梯度 3 个重复,计算菌液的活菌数量密度。

土壤的理化性质:采用烘干法测含水量;采用电位法测 pH;采用重铬酸钾容量法测有机质质量分数^[15]。

1.11 样品中 OP 残留量的检测

1.11.1 OP 残留量的检测 参照 NY/T 761-

2008 中 OP 农药残留的提取方法处理培养液样品^[16];参照 Fang 等^[17]的方法处理土壤样品。采用气相色谱分析法。仪器条件为 Agilent 7980A-ECD;色谱柱为 HP-5 石英毛细柱,30 m×0.32 mm×0.25 μm;毒死蜱、氧化乐果检测时的进样口温度 220 ℃,检测器温度 320 ℃,柱温 270 ℃;水胺硫磷检测时的进样口温度 220 ℃,检测器温度 200 ℃,柱温 170 ℃;载气均为高纯氮气(纯度 99.999%),流速为 1.0 mL·min⁻¹。采用不分流进样,进样体积 1 μL。用外标法计算样品中 OP 的残留量。

1.11.2 土壤中 OP 加标回收试验 取预处理后的非耕作土壤样品,避光称取 3 种 OP 标品分别与之混匀,制成 OP 初始质量分数分别为 0.1、0.5、1.0、5.0 mg·kg⁻¹ 干土的含农药土壤,以不加 OP 为对照,每处理 3 个重复。按照“1.11.1”的方法检测土壤中 OP 的质量分数,分别计算 3 种 OP 的加标回收率。

1.12 统计分析

采用 Excel 2016 软件处理数据和绘图;采用

SPSS 17.0 软件进行方差分析,在 $P<0.05$ 水平上进行差异显著性检验。采用 MEGA 5.0 建立进化树。

2 结果与分析

2.1 降解菌初筛

初筛共获得菌株 12 株,见表 2。各菌株在不同培养基上形成的降解圈外径不同。牛津杯内径为 6 mm,降解圈外径越大,说明该菌株在相应 OP 选择培养基上的生长状况越好。因此,依据降解圈外径的大小可以对各菌株的农药降解性能进行初步比较。试验目标是选择对 3 种 OP 都具有一定降解能力的菌株,故选择 3 种 OP 培养基上都具有降解圈,且降解圈外径最大和较大的菌株作为目标菌株。在毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷固体选择培养基上的降解圈外径最大的菌株编号分别为 A1A18、A5C2 和 B2C6,且 3 个菌株对 3 种 OP 均有一定的降解能力,说明不同菌株对不同农药的降解性能具有差异,以这 3 个菌株作为目标菌株进入复筛。

表 2 初筛菌株的来源土壤及其在 3 种 OP 选择培养基上的降解圈外径($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Source soil and outer diameter of degradation circle of strains in three kinds of OP selection media in preliminary screening

编号 No.		来源土壤 Source soil	毒死蜱 Chlorpyrifos	氧化乐果 Folimat	水胺硫磷 Isocarbophos
A1A4	军马场农田土	Farmland soil of Junmachang	15.27±0.35 f	10.22±0.24 c	6.77±0.22 f
A1A18	军马场农田土	Farmland soil of Junmachang	25.56±0.63 a	11.85±0.41 b	12.45±0.24 b
A1B17	军马场农田土	Farmland soil of Junmachang	10.27±0.72 g	6.00±0.00 f	6.00±0.00 g
A2C21	军马场农田土	Farmland soil of Junmachang	23.62±0.32 b	6.80±0.59 e	6.23±0.32 fg
A2C25	军马场农田土	Farmland soil of Junmachang	6.00±0.00 i	6.00±0.00 f	7.96±0.65 e
A4A6	银川市周边农田土	Farmland soil around Yinchuan	6.52±0.21 i	6.00±0.00 f	6.64±0.42 fg
A4C11	银川市周边农田土	Farmland soil around Yinchuan	20.85±0.56 d	7.26±0.13 de	8.65±0.43 d
A4C12	银川市周边农田土	Farmland soil around Yinchuan	18.63±0.78 e	10.03±0.36 c	10.54±0.27 c
A5C2	银川市周边农田土	Farmland soil around Yinchuan	23.57±0.20 b	12.87±0.14 a	6.56±0.34 fg
B1C5	贺兰县果园土	Orchard soil of Helan	22.46±0.29 c	7.54±0.40 d	8.04±0.21 e
B2C6	贺兰县菜园土	Vegetable soil of Helan	21.81±0.14 cd	7.57±0.34 d	16.23±0.22 a
B2C7	贺兰县菜园土	Vegetable soil of Helan	9.14±0.93 h	6.84±0.33 e	6.28±0.43 fg

注:不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。
Note: Different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$), the same below.

2.2 降解菌复筛

将初筛获得的 3 个菌株在毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷液体选择培养基中进行培养,检测各菌株在液体环境中对农药的降解率,结果如图 1。3 个菌株对 3 种 OP 都有一定降解能力,但降解

效果具有差异。比较毒死蜱的降解率,3 个菌株由高到低是 A1A18、A5C2、B2C6,A1A18 的降解率最高,为 45.82%。比较氧化乐果的降解率,3 个菌株由高到低是 A5C2、A1A18、B2C6,A5C2 和 A1A18 的降解率分别为 9.90%和 9.52%,其

差异未达显著水平。比较水胺硫磷的降解率,3个菌株由高到低是 B2C6、A1A18、A5C2,B2C6 的降解率最高,为 24.64%,A5C2 对水胺硫磷的降解能力很低。由此可知,在 3 株细菌中菌株 A1A18 对 3 种 OP 均具有一定的降解能力,降解率分别为 45.82%、9.52% 和 13.96%。以菌株 A1A18 作为目标菌株,开展降解能力遗传稳定性研究。

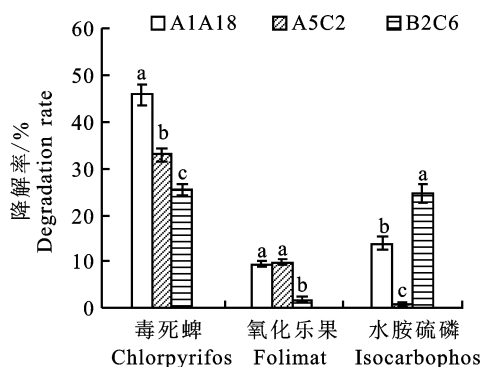


图 1 液体培养条件下目标菌株对 3 种 OP 的降解率

Fig. 1 Degradation rate of three kinds of OP by 3 strains in liquid fermentation

2.3 A1A18 菌株降解能力的遗传稳定性

对复筛获得的目标菌株 A1A18 进行传代培养。该菌株的第 1、5、10 代对试验用 3 种 OP 的降解率如图 2。菌株 A1A18 对毒死蜱和氧化乐

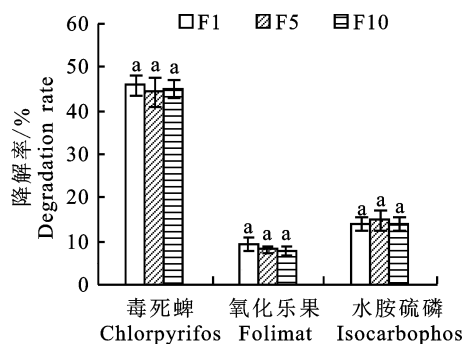


图 2 菌株 A1A18 对 3 种 OP 降解能力的遗传稳定性

Fig. 2 Degradation capacity genetic stability of strain A1A18 to five kinds of OP

果的降解能力在第 5、10 代分别较第 1 代下降 1.90%~3.40% 和 14.18%~16.18%,但各代之间差异在统计学上未达显著水平。由此可知,菌株 A1A18 对毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷的降解能力遗传稳定性较好。

2.4 A1A18 菌株鉴定

2.4.1 形态学鉴定 A1A18 菌株在琼脂培养基表面形成菌落。菌落颜色为灰白色,直径为 0.5~0.8 cm,圆形,表面光滑,不透明,侧面观似草帽状,中部具有凸起,边缘较整齐具有蜡质感。菌体为直杆状,大小为 (0.3~0.5) $\mu\text{m} \times (1.5 \sim 2.5) \mu\text{m}$,具圆端,无芽孢(图 3)。

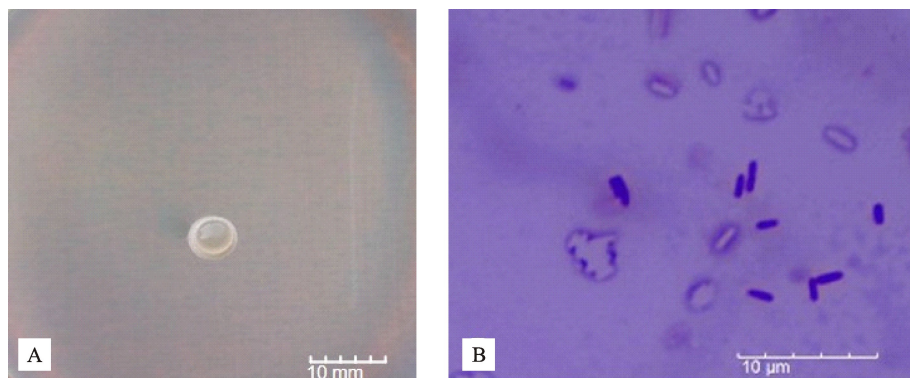


图 3 菌株 A1A18 的菌落形态(A)和菌体形态(B)

Fig. 3 Colony(A) and bacteria(B) morphology of strain A1A18

2.4.2 生理生化鉴定 依据菌株 A1A18 的形态特征及生理生化试验结果(表 3)进行鉴定,初步判断该菌株与短波单胞菌属(*Brevundimonas*)细菌的主要特征一致。

2.4.3 分子鉴定 菌株 A1A18 的 16S rDNA 基因序列长度为 1 357 bp,NCBI 系统中 GenBank 登录号为 MK110476。将该序列录入 NCBI,进行 Blast 比对,结果与短波单胞菌属(*Brevundi-*

monas sp.)相应基因序列具有 99% 的同源性。选取该基因库中同科近缘的 7 个属典型代表菌种进行 16S rDNA 序列比对,通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树(图 4)。通过对系统发育树的分析,可知该菌株为短波单胞菌(*Brevundimonas* sp.)。

2.5 A1A18 菌株对土壤中 OP 的降解能力

2.5.1 土壤中 OP 加标回收率 毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷 3 种 OP 在土壤样品中的加标回收

率见表 4。空白对照中未检测出 3 种 OP 残留。毒死蜱、氧化乐果或水胺硫磷在试验土样中的平均加标回收率分别为 91.039%~100.703%、89.215%~99.762%、87.996%~99.702%，相对标准偏差分别为 1.906%~4.415%、1.986%~3.830%、2.763%~4.718%。表明使用该方法检测试验土壤样品中的毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷，回收率较高，相对标准偏差较小，符合农药残留检测方法对加标回收率 70%~110% 的要求^[18]。

2.5.2 A1A18 菌株对土壤中 3 种有机磷农药的降解能力 试验土壤中添加降解菌 A1A18，对土壤中毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷 3 种 OP 的降解均具有促进作用(图 5)。

对添加 A1A18 菌株处理与未添加降解菌的对照进行比较，随着试验时间的增加，土壤中毒死蜱的降解率显著提高。第 3 天时，施菌处理和 CK 的毒死蜱降解率分别为 38.75%和 21.97%，增幅为 76.39%；第 5 天的降解率分别为 63.02%和 38.72%，增幅为 62.76%。随后，二者差异呈

缩小的趋势，到第 21 天，毒死蜱降解率分别为 88.81%和 76.40%，增幅为 16.24%。

表 3 菌株 A1A18 的生理生化试验结果

Table 3 Physiological and biochemical identification results of strain A1A18	
试验 Test	反应结果 Result
革兰氏染色 Gram stain	—
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+
葡萄糖发酵试验 Glucose Fermentation Test	+
乙酰甲基甲醇试验 Acetylmethyl methanol test (V-P)	—
甲基红试验 Methyl red test	—
硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	—
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	—
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	—
脲酶试验 Urease test	—
吲哚试验 Indole test	—
苯丙氨酸脱羧酶试验 Phenylalanine decarboxylase test	—
37℃生长 Growth at 37℃	+

注：“+”表示反应阳性，“—”表示反应阴性。
Note: “+” positive reaction, “—” negative reaction.

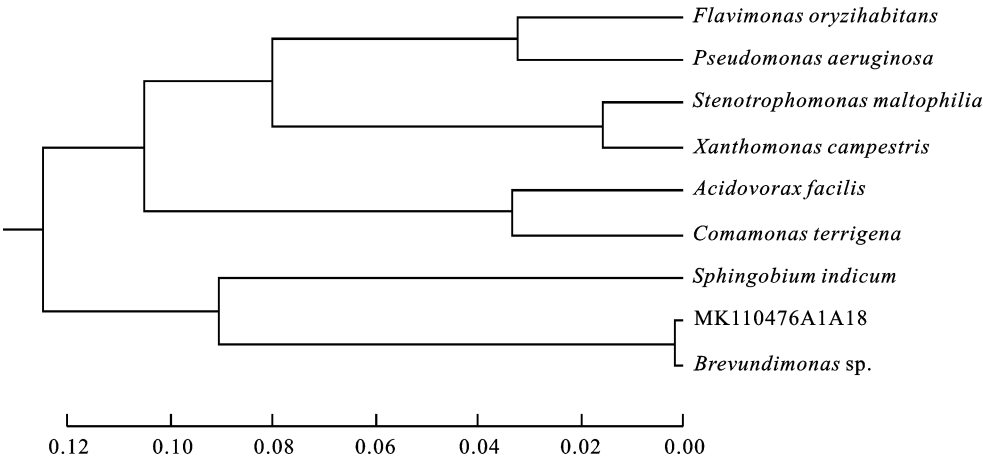


图 4 基于 A1A18 菌株 16S rDNA 序列构建系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain A1A18 based on 16S rDNA sequence analysis

表 4 土壤中 3 种 OP 的平均加标回收率

Table 4 Recovery of addition of three kinds of OP in test soil

OP 加标 质量分数/ (mg · kg ⁻¹) Mass fraction of OP	毒死蜱 Chlorpyrifos		氧化乐果 Folimat		水胺硫磷 Isocarbophos	
	平均加标回收率/% Average recovery of standard addition	相对标 准偏差/% RSD	平均加标回收率/% Average recovery of standard addition	相对标 准偏差/% RSD	平均加标回收率/% Average recovery of standard addition	相对标 准偏差/% RSD
0.1	91.039	3.012	89.215	2.740	87.996	4.718
0.5	94.642	1.906	98.709	2.861	90.459	3.291
1.0	95.757	2.644	96.374	3.830	99.702	2.763
5.0	100.703	4.415	99.762	1.986	97.668	3.184

在氧化乐果处理组中,添加 A1A18 菌株与 CK 的氧化乐果降解率进行比较,二者在前期均表现出较高的降解率,第 1 天时分别为 19.21% 和 11.98%,增幅为 60.38%,第 3 天的降解率分别为 58.29% 和 42.51%,增幅为 37.12%,第 7 天的降解率分别已达 86.19% 和 76.48%,增幅为 12.69%。随着时间的增加,两处理的差异逐渐趋于减少,至第 14 天,二者的降解率均大于 89.62%,且差异均未达显著水平。至第 21 天,两处理的降解率达到 94.59% 及以上,接近完全降解。

在水胺硫磷处理组中,施菌后显著提高土壤中农药的降解率。添加 A1A18 菌株处理的降解率为第 1 天的 11.85%,第 7 天的 51.46%,第 21 天的 87.75%;CK 的降解率为第 1 天的 6.07%,第 7 天的 29.68%,第 21 天的 70.40%。降解率的增幅从 95.25%(第 1 天)逐渐降低至 73.37%(第 7 天),进而降低至 26.64%(第 21 天)。

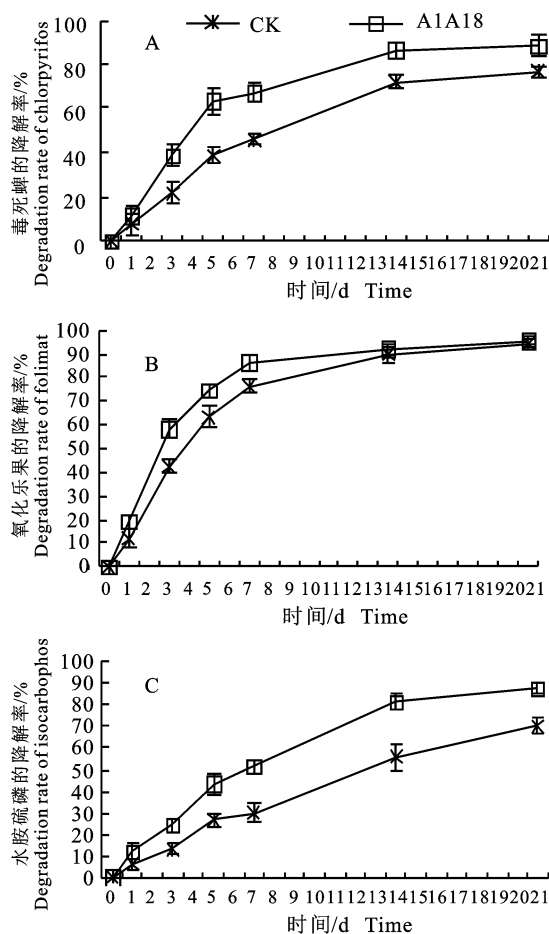


图 5 添加降解菌 A1A18 对土壤中毒死蜱(A)、氧化乐果(B)和水胺硫磷(C)降解率的影响

Fig. 5 Effects of strain A1A18 on degradation rate of chlorpyrifos(A), folimat(B) and isocarbophos(C) in tested soil

3 讨论

本试验所用土壤来自非耕地,质地为砂壤,具有偏碱性、有机质质量分数较低、组成成分较简单,3 种 OP 在该土壤中的平均加标回收率均满足农药残留检测方法的要求,表明该试验方法的精确度可用于检测试验土壤中 3 种 OP 的残留量。

不同的微生物对不同种类 OP 的降解机制具有差异^[19-20]。毒死蜱和水胺硫磷具有 P=S 双键,氧化乐果具有 P=O 双键。有的微生物利用有机磷酸水解酶、磷酸三酯酶等催化断裂磷硫键、磷氧键和磷氟键^[19,21];有的微生物采用共代谢作用、矿化作用、种间协同代谢作用等降解 OP^[22]。研究表明,短波单胞菌属细菌具有磷酸三酯酶^[23],对毒死蜱、乐果和对硫磷等多种 OP 均具有降解作用^[24-26]。分子生物学研究证明,短波单胞菌细胞有关 OP 的水解酶位于细胞质膜的周质面,其对有机磷的水解机制涉及双精氨酸转运通路^[27]。本试验菌株为短波单胞菌 A1A18,对毒死蜱、水胺硫磷和氧化乐果均具有一定的降解能力,由此推测,该菌株对 3 种 OP 的降解机制可能与此有关。

除了生物学因素,光照强度、时间,土壤的物理、化学性质,以及 OP 的自身特性均影响其在土壤中的降解率。毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷都有光降解现象^[28-30]。土壤质地砂壤较粘壤、pH 呈碱性较酸性或中性更有利于 OP 的降解^[31],有机质质量分数高有利于 OP 的吸附^[32]。本试验条件为正常温室光照,土壤为砂壤、碱性、有机质质量分数较低,加之土壤中原有土著微生物对 OP 具有一定降解作用,因此,土壤试验对照组中 3 种 OP 的降解率都较液体培养试验更高。尤其氧化乐果,施药后第 14 天,无论是否添加降解菌,降解率都高于 89.62%,至第 21 天时,几乎完全降解。这可能是由于氧化乐果中含有 P=O 双键,较毒死蜱和水胺硫磷中的 P=S 双键具有更强的极性,更易发生断裂^[33],导致氧化乐果在碱性环境中较其他 2 种 OP 更易降解。

目前,国内外对短波单胞菌属细菌降解 OP 的研究多涉及单一种类的 OP,如 *Brevundimonas* sp. Dsp-7 对毒死蜱具有一定降解功能^[24]; *Brevundimonas* sp. MCM B-427 在适宜的 pH 下对乐果具有较好的降解效果^[25];多株 *B. diminu-*

ta 具有对硫磷水解酶,降解能力较强^[26]。涉及多种 OP 底物的该属降解菌研究较少,如 *Brevundimonas* sp. MM1,可以水解苯胺磷、苯胺磷亚砷和苯胺磷砷的 P-O-C 键,对 3 种 OP 具有较好的降解能力^[34]。采用该属中的降解菌株用于毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷 3 种 OP 污染土壤的修复研究尚未见报道。试验结果表明,施药后第 7 天,添加 A1A18 菌株处理的土壤中氧化乐果降解率达 86.19%,较 CK 提高 12.69%。施药后第 21 天,该菌株处理的土壤中毒死蜱和水胺硫磷的降解率均超过 87.75%,较 CK 提高 16.24%和 24.62%;说明短波单胞菌 A1A18 菌株促进 3 种 OP 的降解,具有较好的田间应用潜力。综上所述,短波单胞菌属细菌是具有多种 OP 降解潜力的微生物,在多种 OP 底物降解机制和应用开发等诸方面有待开展进一步研究。

4 结 论

有机磷农药广谱降解菌短波单胞菌 A1A18 菌株对毒死蜱、氧化乐果和水胺硫磷具有一定降解能力。在液体培养环境中,该菌株对 3 种有机磷农药的降解率分别为 45.82%、9.52% 和 13.96%。经 10 代培养,确定其农药降解能力具有很好的遗传稳定性。在有机磷原药质量分数为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土的土壤中施用 A1A18 菌株,降解菌初始数量密度为 $0.2 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 干土,施药后第 21 天,土壤中毒死蜱和水胺硫磷的降解率分别达到 88.81%和 87.75%,较 CK 提高 16.24%和 24.62%;施药后第 7 天,土壤中氧化乐果降解率达 86.19%,较 CK 提高 12.69%。因此,短波单胞菌 A1A18 作为西北地区农药污染土壤的修复菌株具有较好的田间应用潜力。

参考文献 Reference:

- [1] ETO M. Organophosphorus Pesticides[M]. Boca Raton: CRC Press, 2018.
- [2] SULTATOS L G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1994, 43(3): 271-289.
- [3] RACKE K D, MIDLAND M I, LASKOWSKI D A, et al. Resistance of chlorpyrifos to enhanced biodegradation in soil[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1990, 38(6): 1430-1436.
- [4] KUMAR S, KAUSHIK G, VILLARREAL-CHIU J F. Scenario of organophosphate pollution and toxicity in India: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 9480-9491.
- [5] JI X, WANG Q, ZHANG W, et al. Research advances in organophosphorus pesticide degradation: a review[J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2016, 25(5): 1556-1561.
- [6] CHAUDHRY G R, ALI A N, WHEELER W B. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the *opd* gene from a *Flavobacterium* sp. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(2): 288-293.
- [7] ASWATHI S, GADE R M, SHITOLE A V, et al. Biodegradation of pesticides by soil isolates of beneficial microorganisms[J]. *Ecscan*, 2016: 9(10): 633-638.
- [8] TIAN J, DONG Q, YU C, et al. Biodegradation of the organophosphate trichlorfon and its major degradation products by a novel *Aspergillus sydowii* PAF-2[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(21): 4280-4287.
- [9] 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.
- [10] LIU Y H, YANG L, CHEN Z S, et al. Purification and characterization of a novel organophosphorus pesticide hydrolase from *Penicillium lilacinum* BP303[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2004, 34(3): 297-303.
- [11] 段海明. 蜡状芽孢杆菌不同菌株降解有机磷农药的特性分析[J]. *生态环境学报*, 2012, 21(9): 1608-1613.
DUAN H M. Analysis of the degradation characteristics of organophosphorus pesticides by different strains of *Bacillus cereus* [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(9): 1608-1613.
- [12] 王继雯, 甄 静, 刘莹莹, 等. 一株有机磷农药高效降解菌的筛选及酶学性质研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(21): 83-87.
WANG J W, ZHEN J, LIU Y Y, et al. The screening of a high-efficiency organophosphorus pesticides-degrading strain and its enzyme properties[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(21): 83-87.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
DONG X ZH, CAI M Y. Manual of Systematic Determination General Bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [14] VAIDYA J D, BOGERT B V D, EDWARDS J E, et al. The effect of DNA extraction methods on observed microbial communities from fibrous and liquid rumen fractions of dairy cows [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2018 [2019-2-28]. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00092>.
- [15] 刘凤枝, 李玉浸. 土壤监测分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015.

- LIU F ZH, LI Y J. Soil Monitoring and Analysis Technology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [16] 刘潇威, 买光熙, 李凌云, 等. NY/T 761-2008 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- LIU X W, MAI G X, LI L Y, *et al.* NY/T 761-2008 Pesticide Multiresidue Screen Methods for Determination of Organophosphorus Pesticides, Organochlorine Pesticides, Pyrethroid Pesticides and Carbamate Pesticides in Vegetables and Fruits [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2008.
- [17] FANG H, YU Y, WANG X, *et al.* Dissipation of chlorpyrifos in pakchoi-vegetated soil in a greenhouse[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2006, 18(4): 760.
- [18] 刘光学, 乔雄梧, 陶传江, 等. NY/T 788-2004 农药残留试验准则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- LIU G X, QIAO X W, TAO CH J, *et al.* NY/T 788-2004 Guideline on Pesticide Residue Trials[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004.
- [19] SINGH B K, WALKER A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(3): 428-471.
- [20] CYCON M, ZMIJOWSKA A, WOJCIK M, *et al.* Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens*, to remove other organophosphorus pesticides from soils[J]. *Journal of Environmental Management*, 2013, 117: 7-16.
- [21] JAISWAL D K, VERMA J P, YADAV J. Microbe Induced Degradation of Pesticides in Agricultural Soils [M]// SINGH S N. Microbe-induced Degradation of Pesticides. Switzerland: Springer International Publishing, 2017.
- [22] KUMARI K, KHARE A, SHAIKH S M S, *et al.* Biodegradation of Persistent Organic Pollutants[M]// KUMAR S, ZHANG Z Q, AWASTHI M K, *et al.* Biological Processing of Solid Waste. Boca Raton: CRC Press, 2019.
- [23] DUMAS D P, CALDWELL S R, WILD J R, *et al.* Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(33): 19659-19665.
- [24] LI X, JIANG J, GU L, *et al.* Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(4): 331-335.
- [25] DESHPANDE N M, SARNAIK S S, PARANIPE S A, *et al.* Optimization of dimethoate degradation by *Brevundimonas* sp. MCM B-427 using factorial design: studies on interactive effects of environmental factors[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, 20(5): 455-462.
- [26] CUNEY T M S, GIBSON D T, MUNNECKE D M, *et al.* Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1982, 44(1): 246-249.
- [27] GORLA P, PANDEY J P, PARTHASARATHY S, *et al.* Organophosphate hydrolase in *Brevundimonas diminuta* is targeted to the periplasmic face of the inner membrane by the twin arginine translocation pathway[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(20): 6292-6299.
- [28] GUPTA V K, EREN T, ATAR N, *et al.* CoFe₂O₄ TiO₂ decorated reduced graphene oxide nanocomposite for photocatalytic degradation of chlorpyrifos[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2015, 208: 122-129.
- [29] RUI L, XUN S, ZHU J, *et al.* Novel multifunctional and edible film based on phenyllactic acid grafted chitosan derivative and nano zinc oxide[J]. *Food Biophysics*, 2018, 13(4): 1-10.
- [30] LIU Y, MO R, ZHONG D, *et al.* The fate of organophosphorus pesticides during camellia oil production[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(8): 1926-1932.
- [31] GAONKAR O D, NAMBI I M, GOVINDARAJAN S K. Soil organic amendments: impacts on sorption of organophosphate pesticides on an alluvial soil [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2019, 19(2): 566-578.
- [32] SINGH B K, WALKER A, MORGAN J A, *et al.* Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5198-5206.
- [33] TALUKDER R, PHILIP A, KHAN M O F. Drug metabolism[M]// KHAN M O F, PHILIP A. Medicinal Chemistry for Pharmacy Students, Volume 1: Fundamentals of Medicinal Chemistry and Drug Metabolism. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2018.
- [34] MEGHARAJ M, SINGH N, KOOKANA R S, *et al.* Hydrolysis of fenamiphos and its oxidation products by a soil bacterium in pure culture, soil and water[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2003, 61(3): 252-256.

Screening, Identification and Degradation Characteristics of a Broad-spectrum Organophosphorus Pesticide-degrading Bacteria Strain A1A18 (*Brevundimonas* sp.)

GU Xin, LIU Wenhui, YANG Huanyu, LIU Qiangjuan,
SUN Quan, WANG Rui and WANG Xinpu

(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract In this paper, the biodegradable strains of chlorpyrifos, folimat and isocarbophos were screened from soils contaminated by organophosphorus pesticide in Ningxia. The intergenerational stability and degradation characteristics of organophosphorus pesticides in soil were determined. Organophosphorus selective culture method and oxford-cup method were used to screen the target strains. The bacteria were classified and identified by morphological characteristics, physiological and biochemical reactions and molecular sequencing. Gas chromatography was used to detect the degradation of organophosphorus pesticides by strains in liquid culture environment and soil, respectively. The results showed that a broad-spectrum biodegradable strain of organophosphorus pesticide *Brevundimonas* sp. A1A18 was obtained. In liquid culture environment, the degradation rates of three organophosphorus pesticides of strain A1A18 were chlorpyrifos 45.82%, folimat 9.52%, isocarbophos 13.96%. After ten generations of culture, it was determined that the strain had good genetic stability for the degradation of three organophosphorus pesticides. A1A18 strain was applied to test soil with organic phosphorus mass fraction of $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry soil. The initial concentration of degradation bacteria was $0.2 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ dry soil. The degradation rates of chlorpyrifos and isocarbophos were 88.81% and 87.75% respectively on the 21st day after application, which were 16.24% and 24.62% higher than CK. The degradation rates of folimat was 86.19% on the 7th day after application, which was 12.69% higher than CK. *Brevundimonas* sp. A1A18 strain can promote the degradation of chlorpyrifos, folimat and isocarbophos in soil, and has good potential for application in the field.

Key words Organophosphorus pesticide; Broad-spectrum degrading bacteria; Microbial remediation; Soil

Received 2019-02-28

Returned 2019-04-25

Foundation item Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region of China (No. NZ15051); Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region of China (No. 2018BBF33002, No. 2018BBF02004).

First author GU Xin, female, professor, master supervisor. Research area: utilization of agricultural microbial resources. E-mail: guxin929@163.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)