

甲胺磷降解真菌的研究

刘玉焕, 钟英长 (中山大学生命科学学院生化系, 广东 广州 510275)

摘要: 从受甲胺磷长期污染的土壤样品中通过富集培养, 亚硝基胍(NTG)诱变处理, 从中分离筛选到一株降解甲胺磷活性较高的 L_{48} 菌株。该菌株可以利用甲胺磷作为碳源和能源而生长, 降解甲胺磷的最适温度为 30℃, 最适宜 pH 值为 7.0, 其完整细胞悬液对 3000mg/L 左右甲胺磷的降解率最高可达 83%。经初步鉴定该菌株为华丽曲霉 *Aspergillus .orantus*。

关键词: 华丽曲霉; 甲胺磷; 生物降解

中图分类号: X70

文献标识码: A

文章编号: 1000-6923(1999)02-0172-04

Study on methamidophos-degrading fungus. LIU Yu-huan, ZHONG Ying-chang (Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China). *China Environmental Science*. 1999, 19(2): 172~175

Abstract: By using selective media and mutagenesis of Nitrosoguanidine(NTG), a strain of mold L_{48} was isolated and selected from samples contaminated by methamidophos. The strain was able to utilize methamidophos as the carbon and energy sources for growth. The optimum temperature and pH for degradation of methamidophos by strain L_{48} were 30℃ and 7.0, respectively. The biodegradation rate of methamidophos at the concentration about 3000mg/L by intact cell was 83%. Strain L_{48} was identified as *Aspergillus .orantus*.

Key words: *Aspergillus .orantus*; methamidophos; biodegradation

有机磷农药在保证农作物丰收, 病虫害的防治中起到十分重要作用^[1]。它具有药效高、品种多、防治对象广泛、作用方式多样等特点, 所以我国生产的杀虫剂还是以有机磷类为主。由于长期大规模的生产和使用, 严重影响生态环境。

甲胺磷是一种高效剧毒的有机磷农药, 属一硫代磷酸酯。是一种生产和使用非常广泛的杀虫剂^[2], 属难降解的合成有机物, 自然状态下放置 2 年仍然稳定。对它的降解国内外已有一些学者进行研究, 但都集中在以细菌为研究对象^[3,4]。对于与细菌具有同样生态系统, 对农药分解起同样重要作用的真菌, 其降解特性以及降解酶和遗传水平的研究则几乎没有^[5,6]。为了全面了解生态系统中农药分解情况, 必须进行真菌相关方面的研究, 本文旨在研究一种高效降解真菌对甲胺磷分解的特性。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品取自广州农药厂、湖南农药厂甲胺磷

生产车间及受甲胺磷长期污染的稻田土壤中。

1.2 查氏(Czapek)培养基

用于真菌的一般培养和保存。

1.3 甲胺磷选择培养基

甲胺磷 3.0mL, NaNO_3 2.0g, KCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, MnSO_4 0.02g, CaCl_2 0.04g, 蒸馏水 1000mL, pH 值 6.8, 121℃ 灭菌 15min。需要时加入 2% 的琼脂配成固体培养基。

1.4 甲胺磷降解菌的富集、筛选和纯化

将样品配制成 20% 土壤悬浮液, 然后以 5% 接种量接到甲胺磷无机盐培养基中, 并加适量的玻璃珠适温培养一段时间, 待菌长出, 取 1mL 菌液于同样培养基中培养, 但是甲胺磷的浓度应逐级提高, 直到 0.5% 为止, 然后采用平板稀释进行分离纯化, 接种编号保存供实验使用。

1.5 甲胺磷降解率的测定

将筛选的高效菌株接种在甲胺磷无机盐培养基中培养, 30℃ 的温度下摇床培养(150r/min)

收稿日期: 1998-07-27

120h 后离心获得菌体,将菌体用 20 倍体积蒸馏水洗涤 2 次,然后将菌体配制成一定浓度的溶液,其中一份作对照,另一份配制一定甲胺磷浓度溶液,处理2h 后测定 OD₇₇₀ 光密度,求出有机磷转化成无机磷的降解率.

1.6 无机磷的测定见文献[7]

1.7 菌种鉴定

按《常见与常用真菌》^[8]的方法进行鉴定.

2 结果

2.1 菌株的诱变和筛选

将采集的土壤样品通过富集、分离,共筛选出菌株45 株,然后分别测定菌株对甲胺磷的降解能力,结果表明,9 号菌株降解能力最强,降解率达 53%.然后以 9 号菌株为出发菌株,通过亚硝基胍(NTG)反复诱变处理,其浓度为 500μg/L,处理时间为 45min.通过甲胺磷选择固体培养基进行梯度稀释倒平板,筛选那些生长速度快、菌落规则的菌株,转接编号保存,共 97 株菌株.再分批通过液体培养,收集菌体,测定 OD₇₇₀,得出各自的降解率,其中 L₁₇、L₂₆、L₄₈、L₅₉、L₇₈ 的降解率最高,分别为 81%、87%、83%、88%、84%.进一步实验上述 5 株菌的降解能力稳定性,将 L₁₇、L₂₆、L₄₈、L₅₉、L₇₈ 菌株在查氏培养基中连续转接 10 代后测定各菌株的降解能力,发现只有 L₄₈ 菌株能保持其降解能力,其余 4 株菌的降解能力很不稳定,降解能力有较大程度的下降.确定 L₄₈ 为高效稳定的降解甲胺磷菌株.通过查阅近几十年的国内外文献,发现他们都以细菌为研究对象,其降解率介于 60%~75%之间^[2,3],测定降解率的方法是以甲胺磷的减少量为基准,而作者是以降解的最终代谢产物无机磷的含量为标准,两者之间存在差异.有关真菌对甲胺磷降解,目前未见报道.

2.2 菌株的鉴定

将菌株 L₄₈ 点种于查氏培养基平板上,30℃ 下培养 3~15d,观察该菌株的生长情况和个体形态.结果表明,菌株 L₄₈ 的营养菌丝体由具横隔的分枝菌丝构成,基部有后膜足细胞.其分生孢子

顶端膨大,具横隔,壁光滑.孢子头呈疏松柱形,孢子团呈暗绿色,根据菌株的培养特征及个体形态,菌株 L₄₈ 初步鉴定为曲霉属的华丽曲霉组 (*Aspergillus .orantus*).

2.3 菌株生长曲线的测定

将高效降解甲胺磷菌株 L₄₈ 接种于甲胺磷无机盐液体培养基中,在 30℃ 下培养 6d 后,收集菌体,称干重.图 1 表明菌株 L₄₈ 在第 4d 达到生长的高峰,并维持到第 5d,之后开始进入衰退期.因此以后实验的培养时间选择 120h.

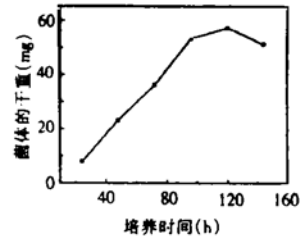


图 1 菌株 L₄₈ 的生长曲线

Fig.1 Time course of growth by strain L₄₈

2.4 甲胺磷的浓度对甲胺磷降解的影响

将高效降解甲胺磷菌株 L₄₈ 接种于 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 的甲胺磷无机盐液体培养基中.在 30℃ 下培养 5d ,收集菌体,测定各自的 OD₇₇₀,求出其降解率,结果见图 2.甲胺磷浓度为 0.3%时菌株的降解率最高,主要原因是菌株在该培养基中无其它碳源,只有甲胺磷.因此.在低浓度时由于碳源不足导致菌体的生长量较少,相应菌体中所含的酶活较低,所以降解率不高;相反在高浓度时由于甲胺磷的毒性,严重抑制了菌体的生长,同样,菌体的生长量也较少,导致降解率也较低.

2.5 pH 值对菌株降解率的影响

将菌株 L₄₈ 接种于 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的甲胺磷无机磷选择培养基中,在 30℃ 下摇床培养 120h 后,通过离心、洗涤、再离心收集菌体,分别测定其 OD₇₇₀,求出降解率,结果见图 3.由图 3 可看出,菌株的降解率在 pH 为 6~8 之间较高,这种情况与菌株的生长较好有关.

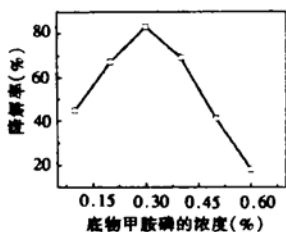


图2 甲胺磷的浓度对菌株 L₄₈ 降解率的影响
Fig.2 Effect of methamidophos concentration on degradation rate by strain L₄₈

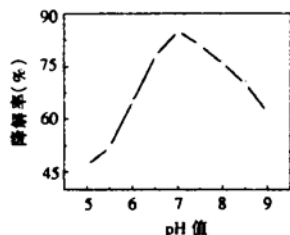


图3 pH 值对菌株 L₄₈ 降解率的影响
Fig.3 Effect of pH on degradation rate of methamidophos by strain L₄₈

2.6 温度对菌株生长的影响

将菌株 L₄₈ 接种于甲胺磷液体培养基中,分别于 15、20、25、30、35、40、45、50℃ 的条件下培养 5d,收集菌体,测定各自的 OD₇₇₀,求出降解率,结果表明,菌株在 20℃ 以下生长较差,降解率较低,25~40℃ 之间生长较好,降解率较高,45℃ 以上由于生长受到抑制导致降解率低。

2.7 金属离子对菌株降解率的影响

表1 金属离子对菌种降解率的影响
Table 1 Effect of metal ions on degrading rates

试剂	降解活性 OD ₇₇₀	抑制作用 (%)	试剂	降解活性 D ₇₇₀	抑制作用 (%)
对照	0.45	—	Cr ²⁺	0.25	44
Ba ²⁺	0.49	0	Ag ⁺	0.21	53.3
Cu ²⁺	0.37	16.8	Hg ²⁺	0.19	57.8
Al ³⁺	0.39	13.3	Fe ³⁺	0.42	6.7
Zn ²⁺	0.42	6.7	Cd ²⁺	0.38	15.6
Co ²⁺	0.40	11	邻菲罗琳	0.15	67
Li ⁺	0.38	15.6	联吡啶	0.16	64.4
Pb ²⁺	0.23	48.9	EDTA	0.18	60

2.9 菌株 L₄₈ 甲胺磷降解酶的定位

将菌株 L₄₈ 接种于甲胺磷无机盐液体培养

将菌株 L₄₈ 接种于含 0.01% 的 Ba²⁺、Cu²⁺、Al³⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Pb²⁺、Cr²⁺、Ag⁺、Hg²⁺、Fe³⁺、Cd²⁺、Li⁺ 以及金属络合剂(邻菲罗琳、联吡啶、和 EDTA) 的甲胺磷液体培养基中,30℃ 下培养 120h,按上述方法处理测定 OD₇₇₀,结果见表 1,金属络合剂对菌株的降解率有明显的抑制作用,除 Ba²⁺ 外,其它所试金属离子都有不同程度的抑制作用。在此基础上进行 Ba²⁺ 的不同浓度对菌株降解率的影响实验。将菌株 L₄₈ 接种于 Ba²⁺ 浓度为 0.001%、0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、0.03%、0.04%、0.05% 的甲胺磷液体培养基中,30℃ 下培养 120h 后测定 OD₇₇₀,从图 4 可看出,在低浓度时,随着 Ba²⁺ 浓度的增加,Ba²⁺ 对菌株的降解有明显的促进作用,直到 0.025% 为止,但是 Ba²⁺ 浓度为 0.03% 时已开始对菌株降解有抑制作用。

2.8 菌株对其它有机磷农药的降解

选择二硫代磷酸酯(乐果)、一硫代磷酸酯(对硫磷)与甲胺磷进行比较实验。将菌株 L₄₈ 接种于甲胺磷液体培养基中,30℃ 下培养 120h,经离心、洗涤、收集菌体后,将菌体分成 4 份,1 份作对照,另外 3 份分别加入农药中处理。测定 OD₇₇₀,结果表明(图 5),该菌株所产生的有机磷农药降解酶不但能降解甲胺磷,同样能有效地降解其它有机磷农药,显示其降解酶的降解作用具有广谱性。

基中,在 30℃ 下摇床培养 120h 后,通过离心,收集菌体和上清液,分别测定它们对甲胺磷的降解能

力,结果表明,只有菌体存在时才具有降解活性,而菌体的上清液对甲胺磷没有降解活性,故可推测降解甲胺磷的酶系存在于细胞内,即胞内酶。

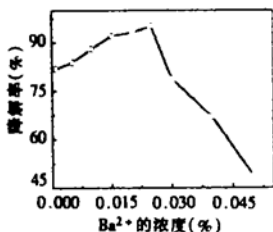


图4 Ba^{2+} 浓度对菌株降解率的影响

Fig.4 Effect of Ba^{2+} concentration on the degradation rate of methamidophos

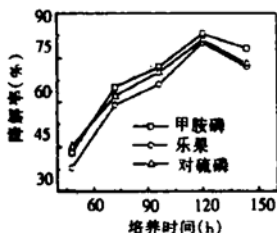


图5 菌株 L_{48} 对其它有机磷农药的降解

Fig.5 Degradation of other organophosphorus insecticides by strain L_{48}

3 结语

3.1 分离的华丽曲霉不仅能降解甲胺磷,也能降解乐果、对硫磷等其它有机磷农药。

3.2 华丽曲霉 L_{48} 具有易培养、性能稳定、营养要求简单等特点,这对将来采用工业发酵法获得大量菌体较为方便,为进一步研究胞内的降解

酶特性,探索使用固定化细胞或固定化酶来降解有机磷农药所引起的污染^[9]是一种新的尝试。

参考文献:

- [1] 冯化成译.土壤细菌和农药分解 [J].农药译丛,1994,16(4): 47-50.
- [2] 鲍强.中国水污染防治政策目标和技术选择 [J].环境科学进展,1993,1(16):1-14.
- [3] 王倩如.甲胺磷农药废水生化处理高效菌株选育的研究 [J].化工环保,1995,4(15):206-211.
- [4] 肖华胜 王银善.假单胞菌 WS-5 的分离及降解甲胺磷某些性质的研究 [J].中国环境科学,1995,15(6):464-469.
- [5] Munnecke D M. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides:a possible disposal method [J].Application and Environmental Microbiology, 1976, 32(1):7-13.
- [6] Mulbry W W, Karus J. Purification and characterization of three parathion hydrolase from gram negative bacterial strains [J]. Application and Environmental Microbiology,1989,55(2):289-294.
- [7] 美国公共卫生协会等.宋仁元译.水与废水标准检验法 [M].第15版.北京:中国建筑工业出版社,1983.
- [8] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组.常见与常用真菌 [M].北京:科学出版社,1973.
- [9] Munnecke D M. Hydrolysis of organophosphate insecticides by an immobilized enzyme system [J].Biotechnol.Biochem.,1982, 14:257-263.

作者简介:刘玉焕(1964-),男,湖南澧县人,现为中山大学生化系微生物教研室讲师,在职博士生,主要从事环境微生物学的教学和科研工作.先后参加“冰核微生物的研究”、“微生物发酵棉菜籽饼生产饲料蛋白的研究”、“微生物发酵透明质酸的研究和应用”等研究工作.发表论文4篇。