

鞘氨醇单胞菌株 XJ 对农药的降解效能

欧阳主才¹, 王奕恒², 李小妮³, 高永峰², 蒋刚彪², 方羽生²

(1 华南农业大学 基地管理处, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 3 广东省植保总站, 广东 广州 510500)

摘要:以筛选对有机磷、氨基甲酸酯和除虫菊酯 3 类农药具有降解作用, 能对农药污染进行生物修复的菌株为目标, 对采自广州市郊区的鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. 菌株 XJ, 经富集培养法提高其对农药的降解效能后, 用气相色谱检测了该菌株对目标农药的降解率. 结果显示该菌株对 5 种农药的降解率分别为克百威 55.58%、异丙威 62.74%、辛硫磷 77.55%、毒死蜱 56.59% 和氯氰菊酯 81.8%. 表明该菌株有很强的逆境生长潜能, 对有机磷、氨基甲酸酯和除虫菊酯等 3 类农药具有不同的降解效能, 是一株具有开发价值的细菌.

关键词:鞘氨醇单胞菌; 降解; 农药; 富集培养法

中图分类号: S431.191; S432.29

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)02-0047-03

Test of Pesticide Degradability by *Sphingomonas yanoikuyae* XJ Strain

OUYANG Zhu-cai¹, WANG Yi-heng², LI Xiao-ni³, GAO Yong-feng², JIANG Gang-biao², FANG Yu-sheng²

(1 Base Management Department, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3 Plant Protection General Station of Guangdong Province, Guangzhou 510500, China)

Abstract: In order to screen the bacteria strains that could degrade pesticides of organophosphorus, carbamate and pyrethrin, *Sphingomonas* sp. XJ was isolated from the suburbs of Guangzhou. The pesticide degradability of *Sphingomonas* sp. XJ was enhanced by enrichment culture method with inorganic salt and target pesticides by using gas chromatography. The results showed that degradation rates of *Sphingomonas* sp. XJ to carbofuran, isoprocarb, phoxim, chlorpyrifos and cypermethrin were 55.58%, 62.74%, 77.55%, 56.59% and 81.8%, respectively. It was suggested that this bacteria strain could grow under the stress conditions and degrade organophosphorus, carbamate and pyrethrin efficiently.

Key words: *Sphingomonas*; degradability; pesticides; enrichment culture

鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. 对异型化合物, 尤其是稠环芳烃和有机氯农药具有独特的降解能力, 前人对其有过一些研究^[1-8], 但其对辛硫磷、毒死蜱、异丙威、氯氰菊酯等农药的降解作用鲜见报道. 为了进一步研究这类菌对受农药污染环境的修复作用, 笔者从广州市郊区土壤中分离得到鞘氨醇单胞菌株 XJ, 经生理生化和分子鉴定后向 GenBank 提交序列并获得登录号 EU183233. 本文采用富集培养结合气相色谱法研究了该菌株在室内条件下对除

虫菊酯类农药氯氰菊酯、有机磷类农药辛硫磷和毒死蜱、氨基甲酸酯类农药克百威和异丙威的降解能力.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

鞘氨醇单胞菌株 XJ, 分离自广州市郊区受污染土壤, 菌种保藏编号为 EST#123456789, 保存于华南农业大学资源环境学院.

收稿日期: 2007-10-11

作者简介: 欧阳主才(1961—), 男, 助理研究员; 通讯作者: 方羽生(1953—) 男, 教授, E-mail: yushengf@scau.edu.cn

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2006D90501003)

1.2 供试农药

克百威($w = 97\%$)由华南农业大学农药系赠送,异丙威($w = 98\%$)、氯氰菊酯($w = 93.6\%$)、毒死蜱($w = 98\%$)和辛硫磷($w = 88\%$)由江门市农药厂提供。

1.3 对各类农药降解效能的富集培养

鞘氨醇单胞菌株 XJ 对各类农药降解效能的富集培养参照刘新等^[9]的方法进行。

1.4 富集培养液中农药的提取

富集培养液中农药的提取参照 Racke 等^[10]的方法进行。

1.5 气相色谱检测

气相色谱检测采用 Agilent 6890 气相色谱仪。克百威、异丙威、毒死蜱和辛硫磷采用的气相色谱检测条件:HP-35, 30 m × 0.32 mm × 0.5 μm 毛细管柱;进样口温度为 230 °C;分流比为 2;检测器温度为 280 °C;H₂ 为 3 mL/min(0~2.5 min);空气为 60 mL/min;尾吹气为 5 mL/min;柱流量为 3 mL/min;载气为 N₂ ($w = 99.999\%$);升温程序为 始温 150 °C(1 min),升温速率 10 °C/min,终温 250 °C(5 min);采用丙酮作为溶剂,进样量为 2 μL。

氯氰菊酯的气相色谱检测条件:HP-35, 30 m × 0.32 mm × 0.5 μm 毛细管柱,柱温采用程序升温,起始温度为 150 °C,以每分钟上升 20 °C 的速度升至 250 °C,保持 28 min,检测器(ECD)温度为 280 °C,进样口温度为 250 °C,分流比为 2,载气为 N₂ ($w = 99.999\%$),流量为 3 mL/min,阳极气为 10 mL/min;采用正己烷作为溶剂,进样量为 2 μL。

1.6 农药定量方法

农药定量采用外标法,按峰面积定量。根据所测峰面积,计算培养基中各农药的残留量 $R/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$: $R = S_2 CV_1 V / (S_1 V_2 G)$,式中, C 为标准溶液质量浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$, S_1 为注入标准溶液的峰面积, S_2 为注入样品溶液的峰面积, V 为样品溶液最终定容体积/mL, V_1 为标准溶液进样体积/μL, V_2 为样品溶液进样体积/μL, G 为取样体积/mL。

1.7 各供试农药添加回收率检测方法

在培养基中分别加入克百威、异丙威、毒死蜱、辛硫磷和氯氰菊酯标准溶液,使上述农药在培养基中的质量浓度分别为 0.5、1.0 和 5.0 mg/L,按照 1.6 的方法提取、上机检测,按下式计算上述农药的添加回收率:

$$\text{添加回收率} = \frac{\text{农药的回收质量浓度}}{\text{农药的添加质量浓度}} \times 100\%$$

1.8 对各供试农药降解率计算方法

鞘氨醇单胞菌株 XJ 对各供试农药降解率参照方玲^[3]的方法计算。

2 结果

2.1 鞘氨醇单胞菌株 XJ 对各类农药降解效能的富集培养

对克百威、异丙威、毒死蜱、辛硫磷和氯氰菊酯降解效能的富集培养最终使鞘氨醇单胞菌株 XJ 能在上述各供试农药质量浓度高达 600 mg/L 和无任何外加碳源的条件下生长。

2.2 各供试农药的添加回收率

各农药的添加回收率检测结果见表 1。从表 1 可见,5 种农药在培养基中的添加质量浓度在 0.5 ~ 5.0 mg/L 时,添加回收率为 80.33% ~ 96.51%,最大的变异系数为 7.36,符合农药残留分析标准^[11],表明以上方法可行。

表 1 各供试农药的添加回收率($X \pm SE$)及变异系数

Tab. 1 Recovery and coefficient of variability of fortified pesticides

农药 pesticide	$\rho/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	添加回收率 recovery /%	变异系数 coefficient of variability/%
克百威 carbofuran	0.5	81.13 ± 5.09	6.27
	1.0	84.89 ± 3.61	7.36
	5.0	85.66 ± 3.31	4.50
异丙威 isoprocarb	0.5	86.35 ± 1.60	2.57
	1.0	91.21 ± 1.29	2.45
	5.0	94.56 ± 1.22	2.13
毒死蜱 chlorpyrifos	0.5	86.67 ± 1.76	3.53
	1.0	86.31 ± 1.86	3.72
	5.0	88.86 ± 2.14	4.01
辛硫磷 phoxim	0.5	82.10 ± 1.91	4.04
	1.0	81.59 ± 2.52	5.35
	5.0	86.11 ± 3.23	5.63
氯氰菊酯 cypermethrin	0.5	80.33 ± 2.60	5.61
	1.0	92.01 ± 1.73	3.26
	5.0	96.51 ± 2.70	4.25

2.3 鞘氨醇单胞菌株 XJ 对各类农药的降解

鞘氨醇单胞菌株 XJ 对各类农药降解的结果见表 2。从表 2 可见,鞘氨醇单胞菌株 XJ 对所试的 5 种农药降解率在 55.58% ~ 81.80%,其中对氯氰菊酯的降解率最高 81.80%。

表2 鞘氨醇单胞菌株 XJ 对供试农药的降解结果

Tab.2 Results of pesticides degraded by *Sphingomonas* sp. XJ

农药 ¹⁾ pesticides	$\rho_{\text{处理后after treatment/}}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		降解率 degradation rate/%
	对照 control	添加 XJ fortifying XJ	
克百威 carbofuran	104.0	46.2	55.58
异丙威 isoprocarb	100.1	37.3	62.74
毒死蜱 chlorpyrifos	91.7	39.8	56.59
辛硫磷 phoxim	9.8	2.2	77.55
氯氰菊酯 cypermethrin	100.0	18.2	81.80

1)各处理农药的初始质量浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

3 讨论与结论

近年来,鞘氨醇单胞菌凭借其自身对异型化合物,尤其是对稠环芳烃具有独特的降解能力受到广泛的重视,成为一类具有潜力的新型微生物资源,对这类菌的研究热点目前主要集中在对土壤中溴氨酸、有机氯农药和菲的降解作用研究^[1-8]. 本研究结果显示,获得的鞘氨醇单胞菌株 XJ 经驯化后对克百威、异丙威、毒死蜱、辛硫磷和氯氰菊酯等农药具有一定的降解潜能,降解率分别为 55.58%、62.74%、56.59%、77.55% 和 81.8%. 克百威、异丙威和氯氰菊酯在试验期间没出现自然降解,毒死蜱仅有微弱的自然降解,而辛硫磷的自然降解率则较高,这表明各种农药自然降解情况各不相同,为此在设计农药降解检测实验时应设自然降解作为参照.

克百威和异丙威的处理浓度略高于初始浓度,这是由于处理后浓度是按农药的添加回收率来计算的,克百威和异丙威的自身降解率接近 0,处理后由这 2 种农药的添加回收率计算出的降解率稍高于初始浓度,这一偏差属于仪器的允许误差范围.

试验结果还表明鞘氨醇单胞菌株 XJ 对辛硫磷的降解率不高,而对同是有机磷类农药的毒死蜱的降解率则较高,这反映了鞘氨醇单胞菌株 XJ 在农药降解方面的特殊性.

微生物对农药的降解作用主要依靠各种酶起作用,若能明确起作用的酶及其调控基因,就可以应用生物工程技术加以改造和利用,生产出具有实际应用价值的酶. 目前的研究已证明鞘氨醇单胞菌中存在 *xyIE* 基因,该基因编码产物为儿茶酚 2,3-双加氧酶(C230),该酶能催化苯环的邻位裂解,故和其他开环酶一起对消除芳烃类化合物的污染具有重要作

用^[12];因此鞘氨醇单胞菌株 XJ 的获得为开展农药污染的生物修复研究提供了工作菌株,指示了未来研究的切入点.

参考文献:

- [1] 李莹,庄源益,蔡宝立,等. 鞘氨醇单胞菌对土壤中溴氨酸降解作用的研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(6): 1164-1167.
- [2] 曲媛媛,周集体,王竞,等. 溴氨酸降解菌株的分离鉴定及特性研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(6): 785-790.
- [3] 方玲. 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果[J]. 应用生态学报, 2000, 11(2): 249-252.
- [4] 马爱芝,武俊,汪婷,等. 六六六(HCH)降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A 的分离与降解特性的研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 728-732.
- [5] 张小凡,小柳津广志. 鞘氨醇单胞菌 PY3 非降解基因的克隆及序列分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(6): 680-685.
- [6] KIM E, ZYLSTRA G J. Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1 [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999, 23(4/5): 294-302.
- [7] KYOUNG C, ZYLSTRA K Y, GERBEN J, et al. Catabolic role of a three-component salicylate oxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1 in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2005, 327(3): 656-662.
- [8] ZYLSTRA G J, KIM E. Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1 [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1997, 19(5/6): 408-414.
- [9] 刘新,尤民生,魏英智,等. 降解毒死蜱曲霉 Y 的分离和降解效能测定[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(1): 78-80.
- [10] RACKE K D, STEELE K P, YODER R N, et al. Factors of effecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil [J]. J Agric & Food Chem, 1996, 44(6): 1582-1592.
- [11] 国家商检局 FDA-PAM 编译组. FDA—PAM 美国食品药品监督管理局农药残留量分析手册 [M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1990: 377, 422, 446.
- [12] 周德平,闵航,夏颖,等. 少动鞘氨醇单胞菌 ZX4 儿茶酚 2,3-双加氧酶基因的克隆与序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(2): 192-196.

【责任编辑 李晓卉】