一株毒死脾降解细菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用

杨丽I赵宇华1张炳欣2张昕彳

（浙江大学1生命科学院2农业与生物技术学院杭州310029）

摘 要:从蔬菜大棚土壤中分离到一株能以毒死脾为唯一碳源和能源生长的菌株DSP3,该菌在含毒死脾（100mg/L） 的酵母膏和蛋白月东与同样毒死婢含量而无酵母膏蛋白月东的无机盐培养基中，18d对毒死脾的降解率分别为98.6% 和76.2%；在土壤实验中20d对毒死婢（lOOmglg）的降解率接近100%,加入DSP3菌在蔬菜大棚新鲜土壤中能有效 促进毒死脾在土壤中的降解。根据生理生化特征、16SrDNA序列分析、（G+C）mol%测定和DNA同源性分析，将菌 株DSP3鉴定为粪产碱杆菌*CAlcaligenes faecalis*）□

关键词:毒死觀，生物降解,16S rDNA,粪产碱杆菌*（Alcaligenes faecalis*）

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 （2005） 06-0905-05

基金项目：国家自然科学基金重点项目（30230250）；浙江省科技厅重点科研项目（2003C22029）

\*通讯作者。Tel： 86^71^6971215；Email： yh^iaol958 帥hoo. con.cn

作者简介:杨 丽（1980—）,女,浙江湖州人，硕士研究生，主要从事应用微生物研究。E mail： asfel 17 （^ahoo. com. cn 收稿日期:2005 04 04,修回日期:2005 05 €9

毒死蝉（Chlorpyrifos），化学名：o, o二乙基o -（3, 5, 6三氯2毗噪基）硫代磷酸酯，是美国陶氏化学公 司（Dow. ChemicalCO.）于1965年开发并研制出来 的一种广谱性有机磷酸酯类杀虫剂，广泛用于农业 和城市害虫的防治⑴。它在植物和土壤中的残留可 通过食物链影响人们健康2引,由于其在叶面上持效 期较短，而在土壤中持效期较长同，因此，毒死蝉在 土壤中的降解情况早已受到人们的普遍关注。微生 物是影响有机磷农药在环境中降解的最主要因素, 因而微生物降解被认为是有机磷农药降解最可靠， 最高效的途径⑸。分离筛选能高效降解毒死婢的微 生物是人们进行毒死牌污染治理、土壤生物修复的 有效措施°刀。但到目前为止，关于毒死婢降解细菌 的报道尚不多见。我们从浙江大学农场蔬菜大棚土 壤中分离到一株毒死虫卑降解菌，本文报道了该菌株 的分离鉴定，以及实验室条件下该菌株在液体培养 基和土壤中对毒死婢的降解特性。

**1**材料和方法

11材料

**1.1.1**样品来源:分离样品来自浙江大学华家池校 区蔬菜大棚，毒死蝉由浙江大学农药与环境毒理研 究所提供，纯度为97.5%。供试菌株均属于粪产碱 杆菌*（Alcaligenes faecalis* 其中 *faecalis* ATCC 8750T来源于美国菌种保存中心，为模式菌株;/ *faecalis* CICC ASL 767来源于上海工业微生物研究 所,为参比菌株。DSP3由本实验室分离于浙江大学 华家池校区蔬菜大棚土壤中。

**1 1.2**主要试剂和仪器:试验中试剂均为AR级国 产试剂;用于PCR扩增的全套试剂均购自上海博亚 生物技术有限公司；16S rDNA序列扩增引物也由上 海博亚生物技术服务有限公司合成。LGR16W型 高速台式离心机（北京医用离心机厂）;PHS 3C型精 密pH计（上海精科雷磁）；HYBAID牌PCR仪（英国 Hybaid）；DY3A型稳压稳流电泳仪（江苏兴化分析 仪器厂）；岛津UV 2550型紫外分光光度计（配有加热 设备）和Shimadzu GC 9A气相色谱分析（日本岛津）。

**1 1. 3**培养基：无机盐（MM）培养基：每升含0. 4g 咽O4 °7H20, 0. 2g FeSO4 °7H20, 0. 2g K2HPO4, 0. 2g （NH4 ）2SO4, 0. 08g CaSO4, pH7. 0o 毒死蝉溶于氯仿 后抽滤灭菌，加到预先灭菌的MM培养基，设3个浓 度梯度，分别为20mg L.50mg *L.* 100mg *Lo*加富培养 基:在MM培养基中分别加lOOOrng *L*酵母膏和 lOOOmgt蛋白月东，用于菌株的平板培养和斜面保 存。分离纯化培养基:在MM培养基中再添加琼脂 20go

**1.2**毒死婢降解细菌的富集、分离、和纯化

在50mL不同浓度（20.50.lOOmgt）的毒死蝉富 集培养液中分别加入5g 土样，30 °Q 280r /nin摇床培 养4d后，吸取ImL转接到相同浓度的毒死脾无机 盐培养基中，连续富集，如此转接5次后，用接种环 蘸取少量富集培养液，在相同浓度的毒死脾分离纯

化培养基平板上划线分离，30 °C培养,待平板上出现 单菌落后，挑取单菌落转接至分离纯化斜面培养基 上，连续接种、传代5次，仍能在毒死蝉培养基上生 长的菌种选用。

**1.3**毒死蝉降解菌的降解能力和降解率的测定 **1 3. 1**毒死蝉的气相色谱条件:采用带**FPD**检测器 的Shimadzu GC9A气相色谱分析；色谱柱:5%OV - 101, 80-100 g,长 1. 5m,直径 3mm；柱温 260 °Q 进 样口和检测器温度分别为230 °C和250 °C；载气氮 气，流速为 45mL /nin，氢气 15mL /nin,空气30mL /nin； 进样量5ML；保留时间:3. 73mino

**1. 3.2**毒死蝉的提取:液体培养基中毒死婢提取： 取供测培养基20mL置于100mL分液漏斗中，加重 蒸石油醸(60 ~90 °C)20mLX 2,振摇2min,收集并合 并石油醸相，置于KD浓缩仪中蒸至近干，再用氮 气吹干，重蒸石油醸定容，后用于气相色谱测定。

土壤中的毒死婢提取:每个样品各取5g 土壤于 lOOmL的三角烧瓶中，用20mLX 2重蒸石油醸，25 °C 恒温震荡提取lh,离心,过滤,收集滤液合并在50mL 容量瓶中，滤液用无水硫酸钠干燥后，后序步骤同液 体培养基中毒死婢提取。

**1.3.3**菌株**DSP3**对毒死虫卑的降解率的测定：在 MM和加富培养基的毒死蝉降解性试验中以2%的 接种量接入菌株DSP3,即将毒死蝉MM培养基中生 长3d的DSP3菌株液培物0. 4mL，分别接入20mL的 以毒死蝉为唯一碳源和能源的MM液体培养基中和 加富培养基中(毒死蝉含量为100mg/L)，30 °C 200r/niii振荡培养，以不接菌(无菌水代替)做对照。 分别于第3、6、9、12、15、18d测定DSP3的菌体生长 CD600和培养基中的毒死婢降解率，每次3个重复， 气相色谱条件如上。

取蔬菜大棚的新鲜土，设4个处理:灭菌土(新 鲜土自然风干后，过20目筛，以无菌水调节湿度为 10%，装入瓶中，高压灭菌锅中121 °C灭菌2h)；新鲜 土;添加DSP3的灭菌土；添加DSP3的新鲜土。土 样均装在棕色瓶中，毒死婢浓度为lOOmg^go DSP3 菌株在LB平板上30 °C培养24h后，用无菌水稀释 至^600 = 1- 0,制成新鲜菌悬液，与土样均匀混和，使 得土壤DSP3细菌接种量为1()6个《土。在黑暗条 件下30 *°C每*5d测定土壤中的毒死婢残留量，培养 期间，补充喷无菌水保持土壤含水量在10%左右， 气相色谱条件如上。

**1 4**分离菌株鉴定

**1.4.1**菌株DSP3生理生化鉴定：方法参照文献

[8-10]进行。

**1. 4.2** 16S rDNA测序和系统发育分析：取培养在 LB培养基是24h的供体菌体少量，加入装有100ML 无菌重蒸HO的Eppendorf管中，漩涡混匀后，沸水 浴3min, 12000r /nin离心5min,上清液作为模板DNA 直接用于PCR扩增。

用于16S mA的PCR反应的引物为一对通用 引物。正向引物 BSF8 *5r* AGAGTTIGATCCIGGC *TCAG 3\Escherichia colt*对应位置为8〜27)；反向引 物 BSR1541 ^0： 5’AAGGAGGTGATCCAGCOGCA3' (E・e方对应位置为1541 ~1522)。PCR反应体系 (50ML)： 10 X PCR 缓冲液 5ML, MgCl2 (25nmolL) 4ML, dNTP (5nmol L) 1ML,引物 BSF8 加 和 BSR1541 / 20 各 2ML,模板 DNA 1ML, *Taq* 酶(10000U /nL)0. 5ML, 重蒸水 34. 5MLO PCR 反应条件：94 °C 2min； 94 °C lmin, 56 °C lmin, 72 °C 2min,循环 29 次;72 °C 10mino PCR产物的纯化和测序由上海博亚生物技术有限责 任公司完成，测序用引物为BSF8加。

将所得的部分长度16S r»S序列407bp (GenBank 登陆号:AY748468)与 GenBank 中核酸数 据进行BIAST分析，利用ClustalX 1. 8. 1进行比对， 通过MBGA 2. 1软件选用Kimura2 parameter距离模 型进行UPC^A分析生成系统发育树，发育树用 Bootstrap法(1000次)重复检验。

**1.4.3** ITS (G+C)mol%和 DNA DNA 杂交：*Tm* 值 和(G+C) mol %采用热变性法测定，以E・*coli* K-12 为参比菌株。缓冲液为0. lXSSC(0.015moltNaCl, 0. 0015mol L柠檬酸钠),采用带有加热装置的紫外 分光光度计测定,热变性温度法(几)。ITSDNA杂 交采用复性速率法测定"J同样利用带有加热装置 的岛津UV2550型紫外分光光度计测定变性DNA 的复性速率，通过下列公式计算不同菌株之间的 DNA同源性(H)：

H= (4Vm- (Va+Vb ) ) *k* (Va+Vb )0 5X 100 %

Va、Vb分别代表a、b菌株的复性速率，Vm代表 a、b两菌株DNA混和样品的复性速率。每组杂交重 复3次。

**2**结果

**2.1**降解菌的分离和筛选

毒死婢浓度为20、50、100mgd的分离纯化培养 基上均有菌落长出，各菌落纯培养物经革兰氏染色， 个体形态及鞭毛电镜等观察初步确定为同一菌株，命名为DSP3,对该菌株作进一步鉴定和毒死婢的降 解性研究。

2. 2菌株DSP3的表型特征

菌株DSP3能以毒死脾为单一的碳源和氮源生 长，革兰氏染色阴性，无芽泡，细胞杆状;没有鞭毛， 不能运动;在LB平板菌落乳白半透明，边缘整齐。 取其在lOOmgL的培养基上生长，作进一步鉴定和 降解性研究。其表型特征(表1),根据其氧化酶反 应阳性，好氧，动力实验为阴性，无鞭毛，不运动等性 质初步鉴定为产碱菌属*(Alcaligenes\*

表**1**菌株**DSP3**的表型特征

Table 1 Phenotypic features of DSP3

Test performed Characteristics Test performed Qiaracteristics

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Acid fron |  | TSI acid |  |
| Glucose | — | Butt | Red/- |
| 百 lose | — | Slant | RedP |
| Mannitol | — | Sellers agar |  |
| Lactose | — | Slant | Blue |
| Sucrose | — | Butt | Blue *1—* |
| Maltose | — | Pignent | — |
| Catalase | + | N2 produced | + |
| Oxidase | + | Litmus milk | - |
| Simmon s citrate | Blue /十 | Rach hydrolysis | — |
| Nitrite reduction | + | Lipid hydrolysis | — |
| Nitrate reduction | — | Indole | — |
|  |  | Urea | — |

**2.3**菌株**DSP3**的系统发育分析

图1是根据菌株DSP3的16S rDNA序列与相关 属种16S rWA构建的系统发育树。图中可见菌株 DSP3位于*Alcaligenes*分支上，经同源性比较发现菌 株DSP3与*Alcaligenes faecalis*的序列相似性为97%, 与*Alcaligenes* sp.的序列相似性也为97%，DSP3应 归属于产碱杆菌属。

2. 4 菌株 DSP3 的(G+C)mol%和 DNA DNA 杂交

将菌株DSP3进行(G + C) mol%测定和DNA- DNA杂交，所得结果见表2。

菌株DSP3的DNA的(G+C) %为56. 8 %,与文 献报道的力・*faecalis*模式菌株ATCC 875(/ (G+C) %为 54. 8% ~ 59. 2 % (Colwell and Mandel, 1964)相一 致，与参比菌株CICC ASL 767(G+C)%为55. 3也相 符。DSP3 与 *A. faecalis* 的 ATCC 8750\CICC ASL. 767的DNA同源性分别为85%和93%。根据国际 系统细菌学委员会规定的DNA同源性在70%以上 为规定种的标准，DSP3应归属与粪产碱杆菌。这和 表型特征，生理生化特征和16S rDNA系统分析结果 相一致，可确定菌株DSP3应归属于/・*faecaliso*

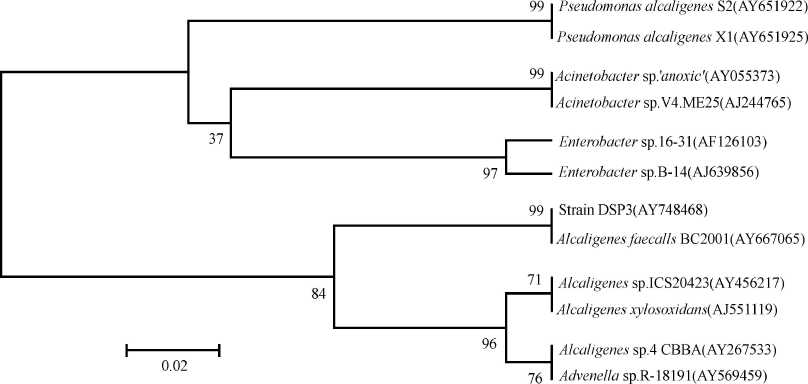
表**2 DSP3**和参比菌株间的**DNA (G+C) mol%**和  
**DNA**同源性

Table 2 DNA hanology between strain DSP3 and reference strains and  
DNA (G+C)mol%

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Strain | DNA (G+C) mol% | DNA hanology with DSP3 *1%* |
| DSP3 | 56. 8 | 100 |
| ATCC87501 | 54. 8~59.2 | 85 |
| CICC ASL. 767 | 55.3 | 93 |

t type strain.

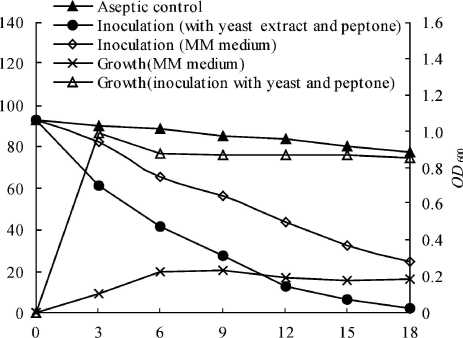
目前已报道的毒死觀降解菌主要为

*Pseudomonas*属和*flavobacterium*属，最近有人发现

图**1**基于毒死觀降解菌株**DSP3**和亲缘关系相近的毒死觀降解菌株的**16S rDNA**序列的无根系统发育树

Fig. 1 UPGMA phylopennatic tree based on 16S rDNA sequences of strain DSP3 and relating chlorpyriibs - degradating species

Bootstrap values obtained with 1000 repetitions are indicated as percentages at all branches. Numbers in parentheses represent the sequences  
accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence.



*t/d*

图**2**菌株**DSP3**在**18d**内的生长曲线和毒死蜩降解曲线 Fig. 2 The curves on degrading rate of chlorpyrifos and growth of DSP3 within 18 days

(m 旦QSOJEdJOIqo)。

**2.6**毒死脾在不同土壤中的降解情况

*Enterobacter asburiae* group」也有菌株能降解毒死 虫卑，本文报道的菌株属于*A. faecalis^*在*A. faecalis* 中有不少菌株有降解环境污染物的能力，如*A. faecalis* CCT 7145 能降解苯酚口习，*A ・ faecalis* Tl[14]具 有PHB胞外解聚酶可以降解PHB。这说明/・ *faecalis*在环境修复中有着广阔的应用前景。

**2. 5**菌株**DSP3**毒死觀的降解率

对菌株DSP3的毒死蝉降解效率进行了初步研 究。结果表明(图2)在MM培养基中菌体生长在6d 达到生长稳定期，培养18d后毒死蝉浓度从原来的 lOOrng *L*降至23. 78mg仁降解率达到76. 22%，在加 富培养基中菌体3d就出现生长高峰，培养18d后毒 死蝉浓度降至1.44mg仁降解率达到98.56%。表 明加富培养基中的蛋白月东和酵母膏促进了 DSP3对 毒死脾的降解，这也与本试验观察到的加富培养基 能有效增进供试菌的生长现象相一致。

量”在起作用M o即添加了毒死蝉降解菌DSP3的 灭菌土壤比新鲜土壤中存在着更多的可降解毒死婢 的微生物。最高的降解率出现在添加了 DSP3的新 鲜土，由这种现象可以判断DSP3在土壤中有良好 的毒死蝉降解能力，并且推测DSP3和土著微生物 间可以形成一种稳定的微生物群落结构"切o

**120**

**100**

. Sterilized soil

―□— Native soil

(a^aoUIxs 扫 JA&OI10) *0*

80

6040

20

Sterilized soil added with DSP3

Native soil added with DSP3

图3为DSP3在不同土壤处理中的毒死蝉降解 情况，可以看出在不同处理中土壤毒死蝉降解速率 存在着明显的差异，在灭菌土壤中，毒死婢的降解速 率十分缓慢,20d只降解了 10%左右,而新鲜土壤中 的毒死蝉降解速率就明显快于灭菌土壤中，20d降 解了 20%左右，这种现象可以说明微生物在毒死婢 的降解过程中起着重要作用，因为新鲜土壤比灭菌 土壤微生物数量明显占优势。新鲜土壤中的毒死蝉 降解速率又慢于添加了 DSP3菌株的灭菌土壤，灭 菌土壤中添加的DSP3浓度为1()6个念土，数量明显 小于新鲜土壤中土著微生物的数量，但毒死脾降解 速率却反而快于新鲜土壤，说明土壤中降解毒死脾 的能力并不是由微生物数量起决定性作用，而是“质

**0 5 10 15 20 25**

*t/d*

图**3**菌株**DSP3**在土壤不同处理中的毒死觀降解曲线

Fig. 3 The curve on degrading rate of chlorpyrifos in the difierent treated soils with strain DSP3

**3**讨论

分离菌株DSP3能在以毒死婢为唯一碳源和能 源的培养基上生长，培养基中加入酵母膏和蛋白月东 可明显促进菌株DSP3对毒死婢的降解，且其还能 在土壤中有效促进毒死蝉降解，大大缩短了 土壤中 毒死蝉的半衰期。

分离菌株的生理生化特性和部分长度的16S rDNA的同源性分析表明，分离菌株最接近于 *Alcaligenes faecalis^* 二者的 16S rDNA 序列相似性为 97 %,并且其(G+C) %含量为 56. 8 %，与 *Alcaligenes faecalis*模式菌株ATCC 8750T DNADNA同源性为 85 %，进一步证实 DSP3 与 *Alcaligenes faecalis* 属于同 一个种。

试验结果证明，微生物在土壤的毒死蝉降解起 着很重要作用，菌株DSP3即使在数量为106个& 数量明显小于新鲜土壤中土著微生物数量时仍能有 效促进毒死婢在土壤中的降解，说明DSP3是一种 十分高效的毒死蝉降解菌。关于DSP3在土壤中如 何降解毒死婢的机制有待进一步研究。本研究为毒 死蝉的生物降解提供了新的微生物资源。

致谢 感谢浙江大学分析测试中心为本试验提供了 GC仪器！

参考文献

1]刘乾开.新编农药使用手册.上海：上海科学技术出版社， 1993, 84-86.

1. ] Howard P H. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data

for Organic Chemical. ed.New York： Lewis Publishers, 1991, 132 -144.

1. ] Kulkami A R, Soppimath K S, Dave A M, *et al.* Solubility study of

hazardous Pesticide (chlorpyrifos) by gas chranatography. *Journal of Hazardous Materials,* 2000, **80：** *9—*13.

4]韩熹莱，钱传范，陈馥衡，等.中国农业百科全书(农药卷).北 京:农业出版社，1993,50.

1. ] Munnecke D M, Hsieh D P H. Microbial decontamination of

parathion and *P* nitrophenol in aqueous media. *Appl Environ Microbiol,* 1974, **28：** 212-217.

1. ] Al Mihanna A A, Salama A K, Abdalla M Y. Biodegradation of

chlorpyrifos by either single or combined cultures of sane soil bome plant pathogenic fiingi. *J Eniviron Sci Health*, 199& 33 (6)： 693— 704.

1. ] Robertson LN, Qiandle K J, Stickley B D A. Ehanced microbial

degradation implicated in rapid loss of chlorpyrifos fran the controlled release fbnnulation su SCO on R Blue in soil. *Crop Prot,* 1998, **17** (l)：29-33.

8]东秀珠，蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京：科学出版 社,2001.

9 ] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey s Manual of Determinative Bacteriology. 9 th ed. Baltimore： Willims & Wilkins, 1994.

1. 周德庆.微生物实验手册.上海：上海科学技术出版社， 1983.
2. 林万明.细菌分子遗传学分类鉴定法.上海:上海科学技术出 版社，1990.
3. Singh BK, Walker A, Alun J, Morgan W, *et al.* biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B -14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Apppl Environ Microbiol,* 2004, **70** (8 )： 4855-4863.
4. Bastos A E R, Cassidy M B, Trevors, J T, *et al.* Introduction of green fluorescent protein gene into phenol -degrading *Alcaligenes faecalis* cells and their monitoring in phenol -contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 2001, **56：** 255\_260.
5. Iwata T, Doi Y, Tanaka T, *et al.* En^matic degradation and adsorption on poly [ (R) B tiydroxybutyrate] single crystals with two types of extracellular PHB depolymerases fran *Comamonas* YM 1609 and *Alcaligenes faecalis* Tl. *Macromolecules,* 1997, **30：** 5290— 5296.
6. 刘 新，尤民生,廖金英，等.土壤中毒死婢和微生物相互作 用的研究.应用生态学报,2004, 15(7)： 1174—1176.
7. Lynch J M. The Rhizosphere. ed.New York： John Wiley &Sons, 1990, 458.
8. Kent A D, Triplett E W. Microbial canmunities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu Rev Microbiol, 2002,* 56：211-236.

**Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacteria  
and its bioremediation application in the soil**

YANGU1 ZHAO Yu hua1 ZHANG Bing xin ZHANG Xin

C1 *College of Life Science, 2 College of Agriculture and Biotechnology, Zhgiang University, Hangzhou* 310029, *China)*

**Abstract：** A strain DSP3 capable of utilizing chlorpyrifos as the sole carbon and energy sources was isolated. Based on the results of phenotypic features phylogenetic of 16S rDNA sequence ^DNA (G+C) mol% and DNA homology between strain DSP3 and reference strains, the strain DSP3 is identified as *Alcaligenes faecalis.* The degradation rate of chlorpyrifos was at 98. 6% (lOOmg L) in liquid culture medium within 18 days and nearly 100% (lOOmghg) in soil within 20 d弓s respectively. An addition of strain DSP3 (108 cells 石)to soil resulted in a higher degradation rate than noninoculated soils. The different degrading rate of chlorpyrifos in four types of treated soils suggests that the dissipation is mediated by the activity of the soil microorganisms ・

**Key words：** Chlorpyrifos, Biodegradation, 16S rDNA, *Alcaligenes faecalis*

Foundation item： Key Project of Chinese National Natural Science Foundation (30230250)； Key Project of Zhejiang Science and Technology Department (2003C22029)

\* Corresponding author. Tel： 86 671 £6971215； E mail： yhdiaol958 (^ahoo. can. cn

Received date： 04 04 2005