

一株长江优势菌的降解特性研究

徐会兰, 储金宇, 柴晓娟

(江苏大学环境学院, 江苏 镇江 212013)

摘要 从长江水体中分离到一株最优功能菌株 JD1, 经初步鉴定该菌株为琼氏不动杆菌属 (*Acinetobacter junii*)。该菌株最高可耐受质量浓度 600 mg/L 的乐果, 降解乐果的最适温度为 32℃, 在 30 ~ 37℃ 的广泛温度下仍生长良好, 最适 pH 值为 7.2 左右, 具有广泛的 pH 值生长范围 (pH = 5.5 ~ 9.0)。研究发现, 装液量、接种量对菌株的降解有明显影响。装液量由 3/10 调整为 1/5 时, JD1 对质量浓度 100 mg/L 的乐果降解率从 21% 提高到 51.54%。试验表明, 该菌株可以在质量浓度高达 2 400 mg/L 的苯酚中生长良好。

关键词 优势菌; 乐果; 生物降解; 琼氏不动杆菌属

中图分类号 X131.2 **文献标识码** A **文章编号** 1004-6933(2008)01-0059-04

Degradability of a predominant bacterium isolated from Yangtse River

XU Hui-lan, CHU Jin-yu, CHAI Xiao-juan

(School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract A strain, JD1, a predominant bacterium, was isolated from Yangtse River. The preliminary identifications suggested that the strain belongs to *Acinetobacter junii*. The strain could resist to dimethoate up to 600 mg/L. The optimal conditions for degradation of dimethoate was pH 7.2 and temperature 32℃, and JD1 can degrade dimethoate under the condition of pH 5.5—9.0 and temperature 30—37℃. The changes of the liquid quantity and the quantum of inoculation could obviously impact the degradation rate. Changing the liquid quantity from 3/10 to 1/5, the degradation rate for dimethoate of 100 mg/L changed from 21% to 51.54%. The experiments also proved that the strain JD1 could resist to phenol up to 2 400 mg/L.

Key words predominant bacteria; dimethoate; biodegradation; *Acinetobacter junii*

有机磷农药是一类使用广泛、效果较好的杀虫剂。20 世纪 60 年代以来, 许多国家开始禁止或限制使用有机氯农药, 以致有机磷农药逐步发展成为目前应用广泛、品种最多的农药。就目前的科技能力, 化学农药在很长的一段时间内还是不可替代的, 有机磷农药残留问题直接威胁到人类的生存和可持续发展, 并成为发达国家设置绿色贸易壁垒的重要手段, 因此解决环境中存在的农药残留问题仍是世界各国的研究热点。乐果是目前国内产量最大的有机磷农药之一, 在害虫体内还能被氧化成为毒力更高的氧乐果^[1-3]。美国环保局和我国相继把乐果 (*dimethoate*) 列入优先控制有机污染物黑名单^[4]。

大量研究表明, 利用微生物对环境中有有机磷农药进行净化处理是行之有效的, 并显示出良好的应用前景^[5-6]。微生物的分离培养、驯化、筛选只是微生物培育中的基础, 随着诱变育种、原生质体融合技术以及 DNA 重组技术的使用, 所培育出来的微生物用于含高浓度有机磷、成分复杂的工业废水必将取得很好的效果^[7]。本试验分离出能够有效降解乐果的菌株, 对菌株的培养条件和降解特性进行相应研究, 初步探讨了对苯酚的耐受性。笔者计划以该出发菌株作为降解基因资源, 为后续研究提供实验材料, 为工业化生物处理有机磷农药提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌源

在江滨泵站溢流口分离到的长江水体中优势微生物菌群。

1.1.2 试剂

50%乐果(镇江农药厂生产)所用化学试剂均为国产分析纯(均由国药集团化学试剂有限公司提供)。

1.1.3 培养基

a. 分离培养基 :NH₄NO₃ 0.5 g ;Na₂HPO₄ 0.45 g ;MgSO₄ 0.5 g ;琼脂 15 ~ 20 g ;蒸馏水 1 000 mL ;pH = 7.0 ;使用前加入适量乐果浓缩液。

b. 富集培养基 :牛肉膏 5 g ;蛋白胨 10 g ;NaCl 5 g ;蒸馏水 1 000 mL ;pH = 7.0 ;加入适量乐果浓缩液。

c. 蒙金娜有机磷培养基 :葡萄糖 10 g , (NH₄)₂SO₄ 0.5 g ,MgSO₄·7H₂O 0.3 g ,NaCl 0.3 g ,KCl 0.3 g ,FeSO₄·7H₂O 0.03 g ,MnSO₄·H₂O 0.03 g ,CaCO₃ 5 g ,琼脂 18 ~ 20 g 加入适量卵黄稀释液。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

以无菌操作将选好的菌株接种于 50 mL 活化富集培养基中,32℃、150 r/min 好氧振荡培养 14 h,使菌液浓度 OD₄₆₀ 保持在 0.905 左右备用。

1.2.2 微生物的富集分离

将蒙金娜有机磷培养基培养出来的 JD1 制成菌悬液,取 5 mL 于 45 mL 含农药乐果的分离培养基中,32℃、150 r/min 培养 7 d。以 8% 的接种量接入新鲜的同种培养基中,乐果的浓度在传代过程中逐步从 50 mg/L 提高到 500 mg/L。取富集液 0.5 mL,在稀释倍数 10⁻¹、10⁻²、10⁻³时分别取 0.5 mL 涂布于富集培养基中。32℃培养 2 ~ 3 d。选取菌落规则的菌株分离、纯化后斜面保存。

1.2.3 菌株 JD1 对乐果的降解实验

活化斜面后,将以上分离的纯化菌株于富集培养液中培养 14 h 后,4 000 r/min 离心 10 min,用无菌水洗涤 1 次,按 8% 的接种量接入含乐果的分离培养液中,32℃、150 r/min 培养 3 d。用钼锑抗分光光度法测定降解前后乐果的含量,计算降解率。

分别测定培养前后总磷量及无机磷量,有:
降解率 = $\frac{\text{进水有机磷含量} - \text{出水有机磷含量}}{\text{进水有机磷含量}}$

式中 有机磷 = 总磷 - 无机磷。

1.2.4 分析方法

a. 菌株的鉴定 常规鉴定操作及方法参看文献

[8-10],菌株的鉴定测序分析由上海生物工程研究所完成。

b. 菌体生长测定 以波长为 460 nm 处的 OD 值表示。

c. 乐果含量测定 本试验通过测定溶液中无机磷含量来计算有机磷乐果的降解率,采用钼锑抗分光光度法^[11]测定培养液中的无机磷含量。

2 结果与分析

2.1 菌株农药耐受性试验

将纯化菌株按 8% 的接种量接入乐果浓度逐渐提高的一系列分离培养基中,32℃、150 r/min 摇床培养,24 h 后测定菌液的 OD₄₆₀ 值,结果见图 1。

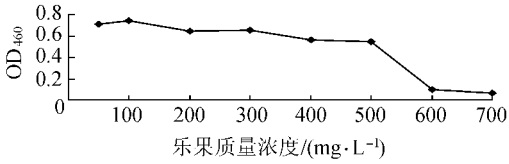


图 1 菌株的农药耐受性

由图 1 可以看出,该菌株对农药乐果的耐受力较强,在质量浓度为 600 mg/L 的乐果培养基中,菌体生长基本不受到抑制。

2.2 主要环境生存因子对 JD1 菌株的影响

2.2.1 温度

取 2 mL 的 JD1 菌悬液接种于乐果质量浓度为 100 mg/L 的富集液体培养基中,并分别置于不同温度(25℃、30℃、32℃、37℃、45℃)的摇床中振荡培养 24 h,取样测定乐果的质量浓度以及微生物的生长量。

由图 2、图 3 可知,在 30 ~ 37℃ 之间,JD1 菌株降解乐果效果较好,而且生长也较好。且在 32℃ 时乐果降解率最高达 49.54%,OD₄₆₀ 达到 0.698,生长最好。当温度小于 25℃、大于 40℃ 时,乐果降解率和生长量显著降低。

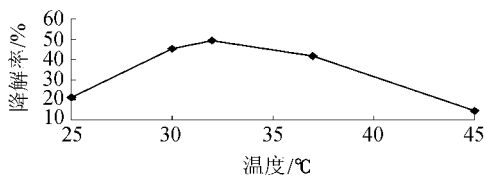


图 2 温度对 JD1 菌株降解乐果的影响

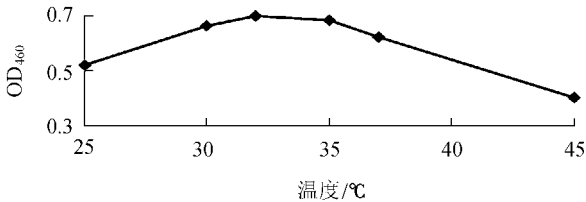


图 3 温度对 JD1 菌株生长的影响

2.2.2 pH 值

取 2 mL 的 JD1 菌悬液接种于不同的 pH 值(3, 5.5,6.4,7.0,7.2,7.5,8,9,11)且乐果质量浓度为 100 mg/L 的富集液体培养基中,在 32℃ 条件下振荡培养 24 h,取样测定乐果的浓度以及微生物的生长量。

由图 4、图 5 可知,JD1 菌株在 pH = 6 ~ 8 之间时,JD1 菌株降解乐果效果较好,而且生长也较好。在 pH = 7.2 时,乐果降解率最高达到 50.36%,而且生长最好。当 pH < 5.5 或 pH > 9 时,乐果降解率和生长量显著降低。

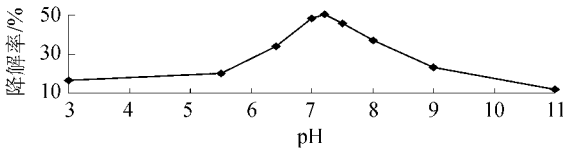


图 4 pH 值对乐果降解率的影响

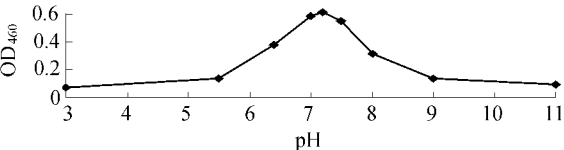


图 5 pH 值对 JD1 菌株生长的影响

2.2.3 通气条件

由于本试验的培养条件(32℃,150 r/min 摇床培养)是一定的,所以三角烧瓶中的装液量是影响通气量的主要因素。按比例将 JD1 菌悬液接种于装液量分别是 15 mL、20 mL、25 mL、30 mL、35 mL、40 mL、45 mL 的 150 mL 三角烧瓶中,乐果质量浓度为 100 mg/L,置于 32℃ 摇床中振荡 24 h 后,取样测定乐果的浓度以及微生物的生长量。

由图 6、图 7 可知,随着装液量的增加,JD1 菌株对乐果降解率逐渐减小。装液量为 30 mL 时,乐果降解率高达 51.54%;装液量为 45 mL 时,乐果降解率为 21%。同时 JD1 菌株的生长也减缓,装液量为 30 mL 时,OD₄₆₀ 高达 0.642;装液量为 45 mL 时,OD₄₆₀ 为 0.358。结果表明,菌株 JD1 的生长量和对乐果的降解率均随着摇瓶中装液量的增加即通气体积的减少而递减,装液量为 30 mL 时效果最好。

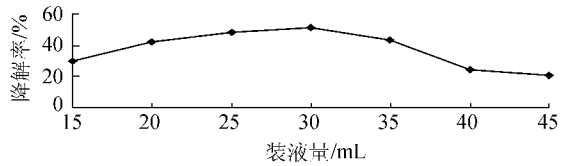


图 6 装液量对乐果降解率的影响

2.3 接种量对乐果降解率的影响

取活化后的 JD1 菌株接种到富集液体培养基进行富集,制成的菌悬液用于接种量对乐果降解影响

的研究。按 1%、2%、4%、10% 的接种量(按体积比计算)将 JD1 菌株接种到 30 mL 的富集液体培养基中,观察不同的接种量对乐果降解率的影响,其中乐果质量浓度为 100 mg/L,结果如图 8。

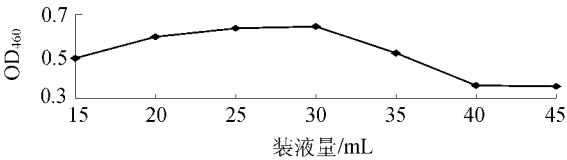


图 7 装液量对 JD1 菌株生长的影响

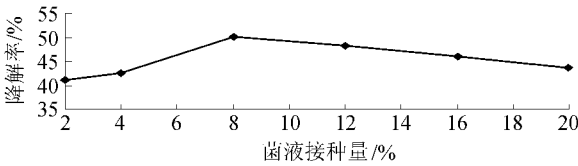


图 8 接种量对乐果降解率的影响

结果表明,提高接种量可以加快反应速率,缩短延迟期,但接种量在 6% ~ 16% 之间时,接种量对乐果的降解率影响不大。因此本次试验均统一采用 8% 的接种量。

2.4 JD1 菌株对乐果降解率的影响

2.4.1 JD1 生长过程中对乐果的降解

取活化后的 JD1 菌株接种到乐果质量浓度为 100 mg/L 的富集液体培养基中,接种量为 2 mL。置于 32℃、150 r/min 的摇床上振荡培养,每间隔 2 h 取样测定菌体的生长量和乐果的降解情况。

由图 9、图 10 可知,JD1 菌株的生长和乐果的降解是基本同步的。JD1 菌株的生长明显分为迟滞期(0 ~ 1 h)、对数期(2 ~ 12 h)、静止期(12 ~ 22 h)、衰亡期(> 22 h)。在培养时间为 16 h 的时候,JD1 菌株的 OD₄₆₀ 值最大,达到 1.005,同时乐果的降解率也达到 51.54%。

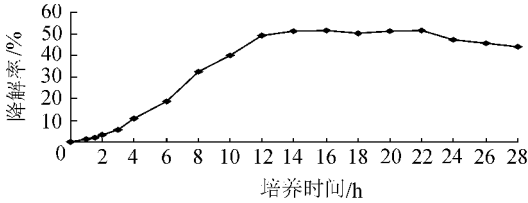


图 9 乐果降解率随时间的变化曲线

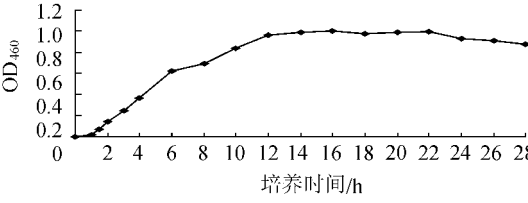


图 10 JD1 菌株的生长曲线

2.4.2 不同初始浓度乐果对降解率的影响

在富集液体培养基中,加入不同浓度的乐果,置

于 32℃、150 r/min 的摇床上振荡培养 24 h 后,取样测定 JD1 菌体的生长量和乐果的降解情况,见图 11。

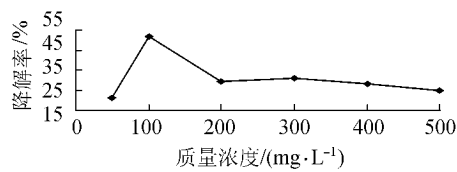


图 11 不同初始浓度乐果对降解率的影响

结果可知,在乐果质量浓度为 50 ~ 200 mg/L 之间,经过 24 h 的培养,JD1 菌株对乐果的降解率基本一致,高达 51.54%,但当质量浓度超过 200 mg/L 时,JD1 菌株对乐果的降解率急剧下降。据此可推测,JD1 菌株降解乐果的酶系统在乐果质量浓度为 100 mg/L 时活性最高。当乐果质量浓度大于 200 mg/L 时,JD1 菌株降解乐果的酶系统可能受到抑制作用,导致乐果的降解率急剧下降。由前面 JD1 菌株耐受性试验可知,在乐果质量浓度高达 600 mg/L 的培养基中菌体生长基本不受到抑制,所以这里并不是由于菌株的生长受到抑制而使降解率下降的。

2.5 JD1 菌株对苯酚耐受性试验

制备 JD1 菌悬液,按 4% 的接种量接入 5 个不同苯酚浓度、pH = 7.0、50 mL 液体富集培养基的三角烧瓶中,32℃、150 r/min 摇床培养,24 h 后于 600 nm 波长处测菌液的 OD 值。

由图 12 可以看出,该菌株对苯酚的耐受力很强,在苯酚质量浓度为 2 400 mg/L 的液体培养基中,菌体生长基本不受到抑制。

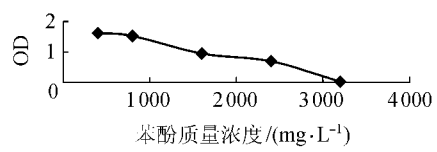


图 12 菌株的苯酚耐受性

3 结 论

a. 通过菌株农药耐受性试验可知,JD1 菌株对农药乐果的抗受力较强,在乐果质量浓度高达 500 mg/L 的培养基中,菌体生长基本不受到抑制。

b. JD1 菌株的最适生长温度为 32℃,在 30 ~ 37℃ 的温度下仍生长良好,最适 pH 值为 7.2 左右,同样具有广泛的 pH 值生长范围(5.5 ~ 9.0)。

c. 装液量影响溶解氧量,从而影响菌株的生长和对乐果的降解率。试验表明,装液量 1/5 为最佳。在实际处理农药废水或进行污染修复时需要保持良好的通气(曝气)条件。

d. 提高接种量可以加快反应速率,缩短延迟

期,但接种量在 6% ~ 16% 之间时,接种量对乐果的降解率影响不大,采用 8% 的接种量为最佳。

e. 初始乐果浓度较低有利于提高菌株的降解率,若用于含高浓度有机磷废水处理则应考虑水样的预处理。另外,实验结果发现在低浓度乐果培养液中,JD1 菌株细胞的生长和乐果的降解是同步的。

f. 试验还发现,JD1 菌株耐受苯酚质量浓度高达 2 400 mg/L,可以从分子水平上进一步研究菌株的降解片断基因,有针对性处理含高浓度有机磷、成分复杂的工业废水。

参考文献：

- [1] 余刚,牛军峰,黄俊,等.持久性有机污染物——新的全球性环境问题[M].北京:科学出版社,2005:217-225.
- [2] 王圣惠,张琛,阎艳春.有机磷农药微生物降解研究进展[J].生物技术,2006,16(3):95-98.
- [3] 林玉锁,龚瑞忠,朱忠林.农药与生态环境保护[M].北京:化学工业出版社,2000:3-12.
- [4] 张兰英,刘娜,孙立波,等.现代环境微生物技术[M].北京:清华大学出版社,2005:6-10.
- [5] 刘云焕,陈东海.微生物降解有机磷农药的研究进展[J].北方环境,2005,30(1):22-24.
- [6] 李法云,曲向荣,吴龙华,等.污染土壤生物修复理论基础与技术[M].北京:化学工业出版社,2006:96-128.
- [7] CHU C P, FENG W C, CHANG B V. Reduction of microbial density level in wastewater activated sludge via freezing and thawing[J]. Water Research, 1999, 33(16): 3532-3535.
- [8] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002:141-150.
- [9] BUCHANAN R E, GIBBONS E N. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版.中国科学院微生物研究所译.北京:科学出版社,1984:604-614.
- [10] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:128-191.
- [11] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法[M]. 4 版.北京:中国环境科学出版社,2002:246-248.

(收稿日期 2006-11-02 编辑 傅伟群)

