

蜡状芽孢杆菌不同菌株降解有机磷农药的特性分析

段海明^{1,2}

1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 安徽科技学院植物科学学院, 安徽 凤阳 233100

摘要: 筛选分离降解微生物解决有机磷农药残留给水体和土壤环境带来的污染问题是一项可行的生物修复技术。采用富集培养和定时取样分析有机磷农药残留的方法, 分离驯化出三株能够降解有机磷农药的细菌, 研究了其形态特征和生理生化特性并对其 16SrDNA 序列进行了分析, 同时比较了三菌株对甲基对硫磷(Methyl-parathion)、毒死蜱(Chlorpyrifos)和三唑磷(Triazophos)的降解特性。结果表明: 通过富集培养得到 10 菌株具有降解甲基对硫磷和毒死蜱的能力, 比较确定 HY-1、HY-2 和 HY-4 三菌株作为研究对象, 经鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的不同菌株, 三菌株在 Genbank 上的登录号分别为: eu915687、eu915686 和 eu915688。在甲基对硫磷质量浓度为 50 mg·L⁻¹ 时, 三菌株 72 h 的降解率分别为 91.7%、87.7% 与 92.4%, 降解率无显著性差异 ($P>0.05$), 当甲基对硫磷质量浓度增加到 100 mg·L⁻¹ 时, 三菌株对甲基对硫磷的降解率有所下降, 其中 HY-2 对甲基对硫磷的降解率下降最大达 23%, 且和其他两菌株有显著性差异 ($P<0.05$)。三菌株 72 h 对 100 mg·L⁻¹ 毒死蜱的降解率分别达到 64.8%、53.7% 和 56.5%, 在不同的毒死蜱初始质量浓度下, HY-1 和 HY-4 两菌株对毒死蜱的降解率无显著性差异 ($P>0.05$), HY-2 与 HY-1、HY-4 两菌株有显著性差异 ($P<0.05$)。三菌株对三唑磷的降解率均较低, 其中 HY-2 对初始质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 三唑磷的降解率最高仅为 20.7%, 其余两菌株对三唑磷的降解率比 HY-2 低且无显著性差异 ($P>0.05$)。可以得出本研究分离得到的蜡状芽孢杆菌不同菌株对有机磷农药的降解存在多态性。

关键词: 蜡状芽孢杆菌; 有机磷农药; 富集培养; 生物降解

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5906 (2012) 09-1608-06

引用格式: 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 Haiming. Analysis of the degradation characteristics of organophosphorus pesticides by different strains of *Bacillus cereus* [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(9): 1608-1613.

有机磷农药历来以其高效、廉价而被广泛应用, 但是由其对人体健康的危害和造成的环境污染不容忽视^[1]。目前国内外关于微生物降解法处理有机磷农药污染已有很多成功的报道, 其中甲基对硫磷降解菌主要有 *Pseudomonas* sp.、*Flavobacterium* sp.、*Alcaligenes* sp. 和 *Arthrobacte* sp. 等^[2]; 降解毒死蜱的微生物主要有 *Enterobacter asburiae*、*Sphingomonas* sp.、*Rhodococcus rhodochrous*、*Acremonium* sp. 等^[3-6], 三唑磷降解细菌主要有 *Klebsiella* sp. E6、*Pseudomonas* sp.、*Ochrobactrum* sp. 等^[7-8, 14]。但是已报道的细菌由于环境适应性不强等原因, 还不能满足实际污染控制的要求, 因此仍需筛选更加高效的专性或兼性降解菌, 有关同一细菌的不同菌株对有机磷农药的降解差异性还鲜有报道。

本研究分离到了三株降解有机磷农药蜡状芽孢杆菌的不同菌株, 比较了不同菌株对有机磷农药降解特性的差异, 并对三菌株降解有机磷农药的多态性进行了探讨, 以期分离筛选到高效、多功能的农药污染降解菌提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与培养基

99.5% 甲基对硫磷(Methyl-parathion)标准品, 99.2% 毒死蜱(Chlorpyrifos)标准品, 50% 甲基对硫磷乳油, 48% 毒死蜱乳油, 20% 三唑磷乳油, 其他试剂均为市售分析纯。

基础培养基: MgSO₄·7H₂O 0.4 g, K₂HPO₄ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, CaSO₄ 0.08 g, FeSO₄·7H₂O 0.08 g, 酵母膏 0.05 g, 去离子水 1 L, pH 7.0。

富集培养基: MgSO₄·7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, CaSO₄ 0.04 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g, 葡萄糖 10.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 去离子水 1 L, pH 7.0。

普通培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 酵母膏 1.0 g, NaCl 5.0 g, 去离子水 1 L, pH 7.0。可加入 1.5% 的琼脂条制成固体培养基用于菌株的平板培养。

1.2 活性污泥

取自山东某农药企业环保站生化处理池, 该企业自 20 世纪 70 年代以来长期生产毒死蜱、甲基对

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2007AA10Z404); 安徽科技学院预研项目(ZRC2012311)

作者简介: 段海明(1982年生), 男, 讲师, 博士, 主要从事农药毒理与应用技术研究。E-mail: heminges88@163.com

收稿日期: 2012-07-17

硫磷等有机磷杀虫剂。

1.3 菌种富集与纯化

参照李阜棣等^[9]《农业微生物学实验技术》的方法进行菌株富集培养。然后将筛选的菌株接种到甲基对硫磷和毒死蜱质量浓度分别为 200、400、800 和 1 000 mg·L⁻¹ 的带毒平板上, 72 h 后观察各菌株的生长情况, 选出能在较高药剂质量浓度下生长的菌株。然后将筛选出的菌株转接在甲基对硫磷初始质量浓度为 100 mg·L⁻¹, 毒死蜱初始质量浓度为 200 mg·L⁻¹ 的基础培养基中培养 60 h, 用紫外分光光度计在特定波长下测定甲基对硫磷和毒死蜱的残留量。最终确定三株菌作为下一步研究的对象, 分别命名为 HY-1、HY-2 和 HY-4。

1.4 3 株降解细菌的鉴定

1.4.1 生理生化指标测定

菌株传统鉴定方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[10]。观察各菌株的形态特征, 并对菌株进行革兰氏染色、接触酶、磷酸酯酶、七叶灵水解、硝酸盐还原与糖醇利用等生理生化指标与温度、pH 值适应范围及耐盐性的测定。

1.4.2 16S rDNA 及 16S-23S rDNA ITS PCR 扩增、序列测定及同源性比较

PCR 扩增正向引物为 F: 5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3', 反向引物为 R: 5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3'。经 PCR 扩增的凝胶回收纯化后与 pMD18-T 载体酶连接过夜, 酶连产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ^[11], 挑取白斑菌落扩大培养后委托北京博尚生物技术有限公司测序。从 Genbank 中搜索类似细菌的 16S rDNA 序列, 并用 DNAMAN 4.0 和 MEGA 3.1 软件构建系统发育树。

1.5 2 种有机磷农药残留量的提取与检测

培养结束之后, 甲基对硫磷培养液用等体积的二氯甲烷提取 2 次, 毒死蜱培养液用等体积的石油醚提取 2 次, 合并 2 次提取液后检测。利用甲基对硫磷在 $\lambda=270$ nm^[12] 左右与毒死蜱在 $\lambda=290$ nm^[13] 左右处有紫外特征吸收峰, 进一步通过紫外分光光度计扫描确定在 $\lambda=275$ nm 和 $\lambda=292$ nm 测定样品的 OD₂₇₅ 与 OD₂₉₂, 计算样品中甲基对硫磷和毒死蜱的含量, 得出 2 种有机磷农药的降解率。方法的标准添加回收率分布在 87%~107% 之间, 标准偏差为: 2.8%~7.4%, 满足残留分析的要求。降解率的计算公式为:

$$X = \frac{C_{ck} - C_x}{C_{ck}}$$

式中: X 为降解率, C_{ck} 为对照样品中药剂的含量 (mg·L⁻¹), C_x 为处理样品中药剂的质量浓度 (mg·L⁻¹)。

1.6 2 种有机磷农药降解效率的测定

将分离到的菌株先在普通培养基平板上培养 24 h, 挑取单菌落菌苔转接到普通培养基中, 于 35 °C、150 r·min⁻¹ 摇培 24 h 后, 以 $\phi=10\%$ 的接种量接种到不同质量浓度的基础培养基中, 使最终培养液的体积为 5 mL。甲基对硫磷的初始质量浓度设置为 50 和 100 mg·L⁻¹, 毒死蜱的初始质量浓度设置为 50、100 和 200 mg·L⁻¹。每个处理设 3 个重复, 以不接种降解菌的作为对照。接种的培养液于 35 °C、150 r·min⁻¹ 摇培 72 h 后, 用 1.5 的方法提取和检测两种药剂的残留量。

1.7 降解菌对其它有机磷农药的降解能力测定

选取与毒死蜱结构相似的三唑磷, 初始质量浓度设置为 100 mg·L⁻¹, 培养条件以及药剂的提取检测方法与上述 2 种农药相同。根据三唑磷在 $\lambda=248$ nm 处有特征吸收峰的特性, 测定培养液中三唑磷的含量^[14]。得出降解菌对三唑磷的降解能力, 每一处理重复 3 次。

1.8 数据分析方法

试验数据运用 SPSS 13.0 软件和 Microsoft Excel 2003 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的分离与鉴定

2.1.1 高效降解菌株的确立

富集培养驯化结束之后, 通过稀释涂平板、划线分离的方法分离纯化细菌。然后逐一检测各个菌株的降解能力。经降解试验发现有 10 株菌具有降解甲基对硫磷和毒死蜱的能力。从表 1 可见, 除菌株 HY-8 之外, 其余的 9 株菌对毒死蜱的降解率无显著性差异 ($P>0.01$)。从菌株对甲基对硫磷的降解试验得出, HY-1、HY-2 与 HY-4 三菌株对甲基对硫磷的降解率比其它菌株高 ($P<0.01$)。因此, 确定 HY-1、HY-2 与 HY-4 作为下一步研究的对象。

表 1 甲基对硫磷与毒死蜱降解细菌的分离筛选

Table 1 Isolation of methyl-parathion and chlorpyrifos degrading bacteria

菌株	降解率/%		菌株	降解率/%	
	甲基对硫磷	毒死蜱		甲基对硫磷	毒死蜱
HY-1	88.3 A	42.9 AB	HY-6	45.5 E	29.3 AB
HY-2	80.1 B	53.0 A	HY-7	44.6 E	50.0 AB
HY-3	57.0 C	51.4 AB	HY-8	37.7 F	24.8 B
HY-4	81.8 B	54.1 A	HY-9	34.7 F	35.2 AB
HY-5	51.9 CD	45.7 AB	HY-10	48.5 DE	48.5 AB

图中数据为 3 个重复的平均值。字母不同表示对同一种农药的降解率在 0.01 水平上差异显著 (Duncan 检验)

2.1.2 降解菌株的形态特征及生理生化特性

三菌株在含 200 mg·L⁻¹ 毒死蜱的普通培养基平板上 33 °C 培养 48 h 后, 在 Olympus 显微镜下观察发现, HY-1 和 HY-4 为细长杆状, HY-2 则相对杆状较粗。HY-1 菌落近圆形, 致密, 淡黄色, 无光泽,

隆起,边缘不整齐;HY-2菌落近圆形,黄色,粗糙无光泽,中央凸起,边缘不整齐;HY-4菌落近圆形,灰白色,粗糙无光泽,中央稍凸起,边缘不整齐,有的呈缺刻状。三菌株的革兰氏染色反应均呈阳性,周生鞭毛,产生芽孢。好气性试验表明三菌株均为

表2 降解菌株的温度适应范围

Table 2 Temperature range of the degrading bacteria

菌株	t/°C						
	5	10	20	30	37	42	55
HY-1	-	+	+	+	+	+	-
HY-2	-	+	+	+	+	+	-
HY-4	-	-	+	+	+	+	-

(+)表示菌株能够生长,(-)表示菌株不能够生长。下同

表3 降解菌株的pH值适应范围

Table 3 pH value area of the degrading bacteria

菌株	pH值				
	3	5	7	9	11
HY-1	-	+	+	+	+
HY-2	-	+	+	+	+
HY-4	-	+	+	+	+

表4 降解菌株的耐盐性

Table 4 Salt-tolerance of the degrading bacteria

菌株	$\rho(\text{氯化钠})(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$			
	2	5	7	10
HY-1	+	+	+	-
HY-2	+	+	+	-
HY-4	+	+	+	+

表5 降解细菌的生理生化特征

Table 5 Physiological and biochemical characteristics of the degrading bacteria

项目	A	B	C	项目	A	B	C
磷酸酯酶	+	+	+	柠檬酸钠	+	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	葡萄糖	+	+	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	蔗糖	-	-	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	+	麦芽糖	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	+	+	+	乳糖	-	-	+
脲酶	-	-	-	D-纤维二糖	-	-	+
精氨酸双水解酶	-	-	-	木糖	-	-	-
纤维素水解酶	-	-	-	D-半乳糖	-	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	L-鼠李糖	+	-	+
H ₂ S产生	+	-	-	海藻糖	-	-	+
吲哚产生	-	-	-	L-阿拉伯糖	-	-	-
M.R试验	+	+	+	棉籽糖	-	-	+
V.P试验	-	-	-	甜醇	-	-	+
明胶液化	+	-	+	肌醇	-	-	+
山梨醇	-	-	+	甘露醇	-	-	-
D-果糖	+	+	+	七叶灵水解	-	-	-
丙二酸钠	-	+	+	淀粉水解	+	+	+

(+)表示阳性反应,(-)表示阴性反应。A、B、C分别代表菌株HY-1、HY-2和HY-4

兼性厌氧菌。表2~表5分别表示三菌株的温度、pH值适应范围,菌株耐盐性以及生理生化特征的测定结果。

2.1.3 降解菌株PCR扩增与分析

PCR扩增的片段经0.8%琼脂糖凝胶电泳检测验证表明,三菌株的PCR扩增产物都为一大约2.0 kb的片段(图1)。将所得三菌株的16S rDNA序列结果通过Blast程序与Genbank中核酸数据进行比对分析构建系统进化树。结果表明菌株HY-1(Genbank登录号: eu915687)、HY-2(Genbank登录号: eu915686)与HY-4(Genbank登录号: eu915688)的16S rDNA序列和*Bacillus cereus*菌株的同源性都在99%以上。结合菌株的生理生化特性和序列比对分析结果,初步鉴定菌株HY-1、HY-2和HY-4为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的不同菌株。从菌株的系统发育树可以看出(图2),HY-1和HY-4两菌株比较相似,HY-2在亲缘关系上与HY-1和HY-4相距较远。

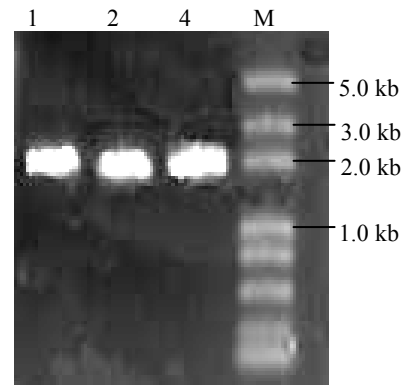


图1 三菌株16S rDNA及16S-23S rDNA ITS PCR扩增片段电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA and ITS PCR products 1. HY-1; 2. HY-2; 4. HY-4; M. DL2000 Plus DNA Marker

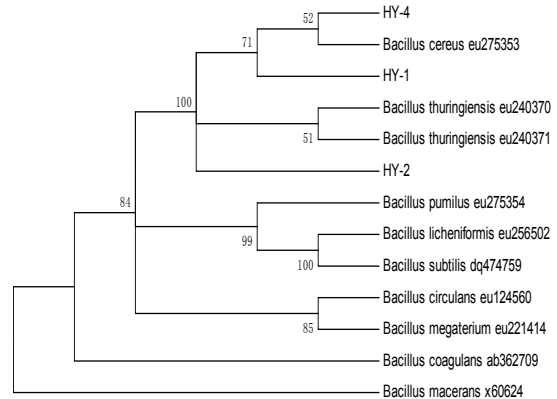


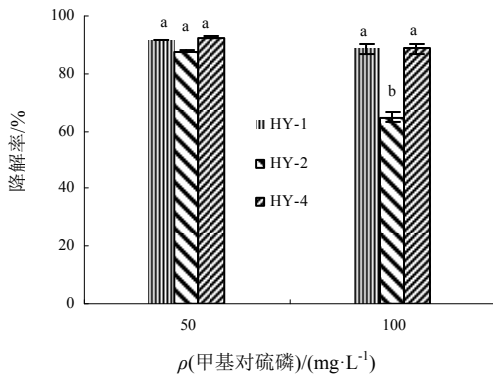
图2 菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the isolated strains

2.2 降解菌对有机磷农药的降解特性

2.2.1 降解菌对甲基对硫磷的降解特性

从图 3 可见, 在甲基对硫磷质量浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 三菌株在 72 h 的降解率分别为 91.7%、87.7%与 92.4%, 菌株之间无显著性差异 ($P>0.05$)。当甲基对硫磷质量浓度增加到 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 三菌株对甲基对硫磷的降解能力都有所下降, 其中 HY-1 与 HY-4 两菌株的下降幅度较小 ($\leq 3.7\%$), HY-2 对甲基对硫磷的降解率下降最大达 23%, HY-2 与 HY-1、HY-4 有显著性差异 ($P<0.05$)。这表明 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲基对硫磷对 HY-2 的降解有一定的抑制作用。



图中数据为 3 个重复的平均值。柱状图上方标不同小写字母表示在相同药剂质量浓度下, 不同菌株的降解率在 0.05 水平上差异显著 (Duncan 检验)。下同

图 3 降解菌对甲基对硫磷的降解效果

Fig. 3 Degradation rates of methyl-parathion by three strains

2.2.2 降解菌对毒死蜱的降解特性

从图 4 可见, 随着毒死蜱的初始质量浓度由 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 三菌株对不同质量浓度的毒死蜱表现出了不同的降解规律。HY-1 对毒死蜱的降解率先升高后降低, HY-2 呈现了逐渐增大的趋

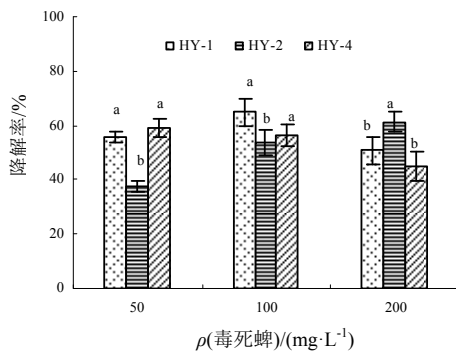


图 4 降解菌对毒死蜱的降解效果

Fig. 4 Degradation rates of chlorpyrifos by three strains

势, HY-4 的降解率则随着毒死蜱质量浓度的增大而减小。三菌株 72 h 对 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率分别为 64.8%、53.7%和 56.5%, 三菌株对 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率分别达到 50.7%、61.3%和 44.8%。从图中还可以看出, 在不同的毒死蜱初始质量浓度下, HY-1 与 HY-4 两菌株对毒死蜱的降解率无显著性差异 ($P>0.05$), HY-2 与 HY-1、HY-4 两菌株有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.2.3 降解菌对三唑磷的降解能力

接种培养 72 h 后, 三唑磷培养液用等体积的三氯甲烷连续萃取 2 次, 合并提取液检测。结果表明三菌株对三唑磷的降解能力较弱, 其中 HY-2 对初始质量浓度为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三唑磷降解率最高仅为 20.7%, 其余两菌株对三唑磷的降解率比 HY-2 低且无显著性差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

目前, 已筛选到可降解各种有机农药的微生物至少包括 25 个以上细菌属和 20 多个真菌属, 很多种微生物具有广谱的降解能力。由于多数降解菌分离自长期接触农药的土壤和活性污泥等特殊生态环境中, 可筛选出降解同一农药的不同菌株和降解不同农药的同种菌株, 说明功能微生物在环境中具有广泛的适应性和较快的进化速度, 这为环境污染修复提供了大量的菌种资源、基因资源和相关活性组分。如何全面搜集整理降解性菌种资源, 充分利用其基因资源和活性组分, 更好的解决环境中有机农药残留给水体和土壤环境带来的污染问题, 形成新的产业, 还需大量深入的研究和实践验证^[15]。本研究所分离到的三菌株经鉴定均为蜡状芽孢杆菌, 其中 HY-1 与 HY-4 亲缘关系较近, 这两菌株对不同质量浓度的甲基对硫磷、毒死蜱和三唑磷的降解率差异性都不显著 ($P>0.05$)。对于 HY-2, 在亲缘关系上与 HY-1 和 HY-4 相距较远, 从降解率上也可以看出 HY-2 和 HY-1、HY-4 两菌株差异性显著 ($P<0.05$)。这充分说明了降解菌的本身性质对降解能力的决定性作用, 菌株亲缘关系的远近可以在降解菌对农药的降解特性上有所体现。微生物自然生存环境的复杂多变造就了微生物的多样性, 这包括结构多样性、代谢多样性、行为多样性、进化多样性和生态多样性等^[16]。本研究从同一受污染地区的样品中分离筛选到三菌株, 又经过实验室同一条件的驯化培养, 筛选到蜡状芽孢杆菌的不同菌株对上述有机磷农药的降解效率存在一定的差异性, 这就说明了菌株进化的不定向性和不同步性, 会受到菌株本身和各种环境条件的制约, 同一菌株不同个体之间所处的微环境会有很大的差异, 从而导致了其遗传进化的多样性, 同时也致使各菌株降解有机磷农药的能力产生较大的

变化。这也就从一个侧面反映了只从增加目标污染物的浓度,加大驯化强度这一单一因素来提高菌株的降解效率不一定能够取得预期的效果。本研究曾对以上所分离的HY-4菌株进行毒死蜱的强化高浓度驯化处理以提高降解效率,并没有得到预期的效果。

在有机磷农药微生物降解过程中,生物化学是最主要的关键因素,分别包括底物类型与化学结构、底物浓度和微生物类型及活性等几个方面。有机磷农药不同品种由于分子结构及理化性质上的不同,对生物降解的敏感性差别很大。农药的化学结构决定了其溶解性、分子排列和空间结构、分子间的吸引和排斥等特征并影响农药能否被微生物所摄取和降解^[17]。Singh等^[18]、Brown^[19]研究发现降解菌能够降解结构相似的一类化合物,本研究也发现分离到的三株降解菌对3种有机磷农药都有一定的降解能力,但是对其他有机磷农药的降解效果还有待于进一步研究。多位学者研究了有机磷农药中的烷氧基和芳氧基对生物降解的影响,Adhya等^[20]研究发现一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)能够降解对硫磷与二嗪磷,但是不能够降解甲基对硫磷,说明有机物的烷氧基比芳氧基结构更能影响菌株的高效降解能力。本研究所涉及的3种农药都属于硫逐磷酸酯类,其中毒死蜱与三唑磷除了三氯吡啶基和苯基三唑基结构不同之外,烷氧基完全相同,但是菌株对二者的降解率却相差很大,分析其原因可能是降解菌本身的差异或者未对降解菌进行三唑磷的针对性驯化培养有关。

参考文献:

- [1] SINGH B K, WALKER A. Microbial degradation of organophosphorus compounds[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(3): 428-471.
- [2] 刘萍萍, 闫艳春, 解秀平. 降解甲基对硫磷菌株YL8的分离、纯化及降解机理[J]. 中国环境科学, 2006, 26(2): 206-209.
- [3] SINGH B K, WALKER A, MORGAN J A, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4855-4863.
- [4] LI X H, HE J, LI S P. Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(2): 143-149.
- [5] 吴祥为, 花日茂, 操海群, 等. 毒死蜱降解菌的分离鉴定与降解效能测定[J]. 环境科学学报, 2006, 26(9): 1433-1439.
- [6] KULSHRESTHA G, KUMARI A. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(2): 219-225.
- [7] WANG L H, Zhang L, Chen H L, et al. Isolation of a triazophos-degrading strain *Klebsiella* sp. E6 effectively utilizing triazophos as sole nitrogen source [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 25(3): 259-265.
- [8] 朱立成, 邹小明, 刘江华, 等. 三唑磷降解菌的筛选、鉴定及其系统发育分析[J]. 井冈山大学学报: 自然科学版: 2011, 32(1): 45-49.
- [9] 李卓棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 140-141.
- [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: 353-390.
- [11] 于晓庆, 郝丽君, 刘永光, 等. 洋葱伯克霍尔德氏菌株Lyc2的鉴定及对棉苗的防病促生作用[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 426-432.
- [12] 高强, 邓灵福, 郑永良, 等. 甲基对硫磷降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 安全与环境学报, 2007, 7(3): 22-25.
- [13] 王金花, 朱鲁生, 王军, 等. 3株真菌对毒死蜱的降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 211-214.
- [14] 戴青华, 张瑞福, 蒋建东, 等. 一株三唑磷降解菌mp-4的分离鉴定及降解特性的研究[J]. 土壤学报, 2005, 42(11): 111-115.
- [15] 张薇, 魏海雷, 高洪文, 等. 土壤微生物多样性及其环境影响因子研究进展[J]. 生态学杂志, 2005, 24(1): 48-52.
- [16] 张瑞福, 吴旭平, 樊奔, 等. 污染土壤中有有机磷农药降解菌的分离及其多样性[J]. 生态学报, 2005, 25(6): 1502-1508.
- [17] OHSHIRO K, KAKUTA T, SAKAI T, et al. Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from Turf Green Soil[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(3): 299-305.
- [18] SINGH B K, WALKER A, WRIGHT D J. Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37(9), 1675-1682.
- [19] BROWN K A. Phosphotriesterases of *Flavobacterium* sp.[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1980, 12(2): 105-112.
- [20] ADHYA T K, BARIK S, SETHUNATHAN N. Hydrolysis of selected organophosphorus insecticides by two bacteria isolated from flooded soil [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1981, 50(1): 167-172.

Analysis of the degradation characteristics of organophosphorus pesticides by different strains of *Bacillus cereus*

DUAN Haiming^{1,2}

1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Xi'an 271018, China;

2. College of Plant Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China

Abstract: A feasible way to remediate organophosphorus pesticides contaminated water and soil environment is to screen degrading

microorganisms because of its important significance in the biodegradation of pesticide residue. The degrading bacteria were isolated from the wastewater treatment system of the pesticide enterprises by the method of enrichment culturing and analyzing the residue of organophosphorus pesticides at the definite time. The traditional morphology, physiological-biochemical properties as well as 16S rDNA gene sequence analysis were applied to the bacteria classification. Simultaneously, the degrading characteristics of methyl-parathion, chlorpyrifos and triazophos by the bacteria were also studied. The results indicated that 10 bacteria with the ability of degrading methyl-parathion and chlorpyrifos were separated from the liquid enriched culture and HY-1, HY-2 and HY-4 strain were determined as the research object. The three strains were identified as different strains of *Bacillus cereus* and the Genbank registration numbers were eu915687, eu915686 and eu915688, respectively. The degradation rates of HY-1, HY-2 and HY-4 reached 91.7%, 87.7% and 92.4% within 72 h when the medium contained 50 mg·L⁻¹ of methyl-parathion and the degradation rates among three strains had no significant difference at 0.05 level. When the concentration of methyl-parathion was 100 mg·L⁻¹, the degradation rates declined and the degradation rate by HY-2 dropped by 23% and had significant difference with the other two strains. When the concentration of chlorpyrifos were 100 mg·L⁻¹, the degradation rates of HY-1, HY-2 and HY-4 reached 64.8%, 53.7% and 56.5% within 72 h, respectively. There was no significant difference in the degradation rate when the concentration of chlorpyrifos ranged from 50 mg·L⁻¹ to 200 mg·L⁻¹ by HY-1 and HY-4, HY-2 had significant difference with HY-1 and HY-4 at the 0.05 level. The degradation efficiency of 100 mg·L⁻¹ triazophos by three strains was weak, HY-2 reached the highest and was only 20.7%. The degradation rates by the other two strains were lower and had no significant difference at the 0.05 level. The results reflected the diversity of the degradation characteristics of organophosphorus pesticides by different *Bacillus cereus* strains.

Key words: *Bacillus cereus*; organophosphorus pesticide; enrichment culturing; biodegradation

2013年《中国农业科学》中、英文版征订启事

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学; 耕作栽培·生理生化·农业信息技术; 植物保护; 土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境; 园艺; 贮藏·保鲜·加工; 畜牧·资源昆虫; 兽医; 农业经济与管理等栏目。读者对象是国内外农业科研院所(所)、农业大专院校的科研、教学及管理人员。

《中国农业科学》中文版为半月刊, 影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。为北京大学图书馆1992—2011年连续6次遴选的核心期刊, 位居《中文核心期刊要目总览》“农业综合类核心期刊表”的首位。1999年起连续10年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 1999年获“首届国家期刊奖”, 2003、2005年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”; 2002—2011年先后9次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号; 2009年获中国期刊协会/中国出版科学研究所“新中国60年有影响力的期刊”称号; 2010年荣获“第二届中国出版政府奖期刊提名奖”。

《中国农业科学》中文版大16开, 每月1、16日出版, 国内外公开发行。每期224页, 定价49.50元, 全年定价1188.00元。国内统一刊号: CN11-1328/S; 国际标准刊号: ISSN 0578-1752。邮发代号: 2-138; 国外代号: BM43。

《中国农业科学》英文版(*Agricultural Sciences in China*), 2002年创刊, 月刊, 2012年更名为《农业科学学报》(*Journal of Integrative Agriculture*, JIA)。2006年1月起与国际著名出版集团Elsevier合作, 全文数据在ScienceDirect平台面向世界发行。2009年被SCI收录, 2012年JCR影响因子为0.449。

JIA大16开, 每月20日出版, 国内外公开发行。每期160页, 国内订价80.00元, 全年960.00元。国内统一刊号: CN 10-1039/S; 国际标准刊号: ISSN 2095-3119。邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

《中国农业科学》中、英文版均可通过全国各地邮局订阅, 也可向编辑部直接订购。

邮编: 100081; 地址: 北京 中关村南大街12号《中国农业科学》编辑部

电话: 010-82109808, 82106280, 82106281, 82106282; 传真: 010-82106247

网址: www.ChinaAgriSci.com; E-mail: zgnykx@mail.caas.net.cn

联系人: 林鉴非