

降解辛硫磷农药菌株的筛选

刘海潮 李淑高

(山西农业大学, 太谷县)

摘要 从农药厂附近的土壤中,分离得到两株降解辛硫磷有机农药能力较强的菌株,编号为 1631、2021。经鉴定均属于 PREVOT 系统中的不动芽孢杆菌属 (*Bacteridium*)。在辛硫磷含量为 50ppm 的模拟废水中,1631 号菌株把辛硫磷降解为无机磷的转化率为 33.7%,而 2021 号菌株为 36.6%。两个菌株在培养特性、形态特征及生理生化特性方面均是相似的。

关键词 降解;辛硫磷;加富培养基;富集培养;不动芽孢杆菌属 (*Bacteridium*); 有机磷

农药生产过程中排放的大量污水和使用过程中留下的残渣。通过各种渠道进入水体、土壤和空气中,直接间接地污染了环境,对人类产生了危害。辛硫磷又名倍腈松、肟硫磷 ($C_{12}H_{15}O_3N_2PS$) 是一种有机磷农药。目前对农药生产中的污水和残渣的处理方法很多。但使用优势菌种和固定化细胞等方法还未见报道。本文首先对优势菌种进行了筛选,筛选结果报道如下。

材料和方法

(一) 土样的采集

土样采自山西省永济县农药厂辛硫磷车间

的排水沟及污水处理场的进水口等处,共采 6 个土样,按常规配成 10% 的土壤悬液。

(二) 培养基

1. 牛肉膏蛋白胨培养基 (g): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂 20, 蒸馏水 1000ml, pH 7.0—7.2。

2. 缺磷液体培养基 (g): 硫酸铵 0.5, 硫酸镁 0.3, 氯化钾 0.3, 氯化钠 0.3, 葡萄糖 10, 硫酸锰 0.02, 硫酸亚铁 0.02, 蒸馏水 1000ml, pH 7.0—7.2。

3. 缺碳液体培养基 (g): 硝酸铵 3, 磷酸二氢钾 0.5, 硫酸镁 1, 硫酸亚铁 0.1, 氯化钠 2, 蒸馏水 1000ml, pH 7.0—7.2。

4. 加富培养基 (g): 硫酸铵 0.5, 硫酸镁 0.3, 碳酸钙 5, 氯化钾 0.3, 氯化钠 0.3, 葡萄糖 10, 硫酸锰 0.02, 硫酸亚铁 0.02, 辛硫磷 20ml, 蒸馏水 1000ml, pH 7.0—7.2。

(三) 分离方法

1. 富集培养: 将液体加富培养基 50ml 装于三角瓶中, 灭菌, 待温度降至室温, 加辛硫磷乳剂(辛硫磷含量 50%) 和 10% 的土壤悬液各 1ml。28℃, 振荡培养 2 天。同法转接 2 次, 每次接种量均为 2ml。

2. 分离培养: 将富集培养的菌液稀释, 涂于牛肉膏蛋白胨培养基上培养, 挑取单菌落接种于斜面, 再将斜面菌种转接在平板上划线分离。反复多次至获得纯菌株为止。

(四) 筛选方法

1. 初筛: 将纯化菌株接种于细菌培养基上, 28℃ 培养 2 天, 选择生长快, 菌苔丰厚、菌落清晰的菌株为初筛菌株。

2. 复筛: 将初筛菌株接种在含辛硫磷的缺磷液体培养基中, 28℃ 振荡培养 7 天。用磷钼兰比色法^[1] 测定培养液中无机磷含量, 选出转化能力强的菌株。

结果与讨论

(一) 菌株的筛选

从 20 个纯菌株中, 初筛出 9 个生长旺盛, 菌苔丰厚, 菌落清晰的菌株, 其中以 1052、1711、1631、1511 和 2021 菌株的生长最好, (表

表 1 9 株菌的生长量 (比浊法测)

菌号	1052	1711	1631	1511	2021	1432	1621	1831	3021
光密度 (A)	0.970	0.930	0.880	0.880	0.825	0.769	0.610	0.530	0.430

表 2 9 株菌培养液中的无机磷含量

菌种	光密度	无机磷	菌种	光密度	无机磷
1052	0.025	2.0	1432	0.020	1.6
1711	0.007	0.6	1621	0.025	2.0
1631	0.036	2.9	1831	0.010	0.8
1511	0.010	0.8	3021	0.005	0.4
2021	0.045	3.6	对照	0	0

1)。此 9 个菌株经复筛, 其中 1631 和 2021 两菌株降解辛硫磷的能力最强(表 2)。

(二) 两个菌株的形态特征和培养特性

1631 菌为 G⁺ 杆状, 两端钝圆, 大小为 0.55 × 0.96 μm, 芽孢位于菌体中部不使菌体变形, 无鞭毛, 不运动, 无荚膜。在营养琼脂培养基上菌落乳白色, 丰厚, 边缘不整齐, 光滑, 不产生色素, 不透明。培养前期湿润, 后期产生皱褶。在液体培养基中有菌膜出现, 无沉淀, 半固体穿刺培养, 不扩散(图 1)。

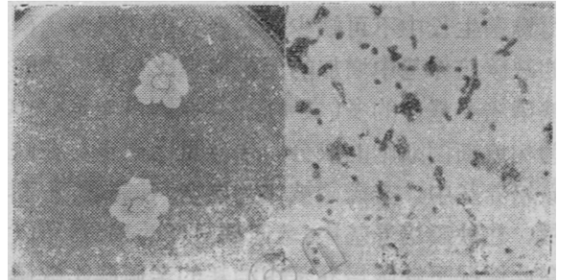


图 1 1631 菌株的菌落与菌体

2021 菌株的形态和培养特性与 1631 菌株基本相似, 不同的是菌体呈链杆状, 两端平截, 大小为 0.50 × 1.17 μm。在营养琼脂培养基上菌落白色, 培养 3 天后有水溶性淡黄色素产生(图 2)。在液体培养基中产生菌膜并有沉淀。根据上述特征, 1631 和 2021 菌株在 PRÉVOT 分类系统中属于不动芽孢杆菌属 (*Bacteridium*)^[2]

(三) 两个菌株的生理特性

1631 和 2021 菌株生长的较适宜温度为 28—37℃, 1631 菌最适 pH 7.4, 2021 菌 pH 为 7.2。但在 pH 5—10.5 范围内两菌均可生长(表 3)。两菌均属好气性细菌。两株菌是否以辛硫磷中的磷和碳作为磷源和碳源? 经试验表明,

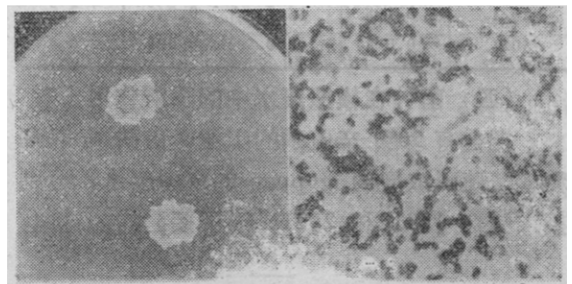


图 2 2021 菌株的菌落与菌体

表3 两株菌在不同温度和不同 pH 的生长情况

菌种	温度 (°C)						pH							
	4	5	28	37	44	65	4.0	6.0	7.0	7.2	7.4	7.6	8	10.5
1631	-	-	++++	+++	++	+	-	+	++	+++	++++	+++	+	+
2021	-	+	++++	+++	++	+	-	+	++	++++	+++	++	++	+

在缺碳培养基中,不加辛硫磷时,未见菌的生长,含磷量也未增加;加入辛硫磷后便有明显的变化。在缺磷培养基中,未加辛硫磷,菌液微有变化,菌可以生长,但缓慢;加入辛硫磷后,也有明显变化。由此可见,辛硫磷中的磷和碳是两株菌生长中不可缺少的营养。但在含辛硫磷的缺碳培养基中增加的无机磷量比含辛硫磷的缺磷培养基中的多(表4)。其原因可能是:作为构成细菌细胞的成分,需碳量比磷多。在缺碳培养基中,辛硫磷被作为碳源与能源来利用,在缺磷培养基中,辛硫磷只作为磷源,所以在此情况下缺碳培养基中消耗的辛硫磷比缺磷培养基要多,因此释放的无机磷也多。由此看来,当环境中能源物质含量较低时,可促进微生物对辛硫磷的降解。实际应用中应控制碳源物质在较低水平上,以充分发挥微生物的降解作用^[3]。由表4还可看出,菌株1631和2021的降解作用均较强。

表4 9株菌在含辛硫磷的两种培养基中的降解作用

菌种	缺碳培养基		缺磷培养基	
	光密度	无机磷	光密度	无机磷
1052	0.056	4.5	0.025	2.0
1432	0.112	8.5	0.015	1.2
1511	0.096	8.0	0.010	0.8
1621	0.128	9.5	0.006	0.5
1631	0.160	11.5	0.036	2.9
1711	0.112	8.5	0.007	0.6
1831	0.128	9.5	0.010	0.8
2021	0.168	13.5	0.045	3.6
3021	0.096	8.0	0.005	0.4

(四) 菌种在模拟废水中的降解作用

把含有50%辛硫磷的工业辛硫磷乳剂稀释成辛硫磷浓度为50ppm的模拟废水,分别接入菌株1631和2021,以不接菌的为对照,

28°C,恒温培养一周,测其增加的无机磷量和转化率(表5)。

表5 模拟废水的降解试验

菌种	光密度值	无机磷	转化率(%)
1631	0.038	0.035	33.7
2021	0.045	0.038	36.6

由表5可以看出,在模拟废水中,两个菌株降解辛硫磷农药的转化率分别是33.7%和36.6%。选用50ppm的稀释液作为模拟废水,是因为工厂排出的废水中辛硫磷的含量一般在50ppm左右。但从农药厂排出的废水成分非常复杂,这些成分对菌种可能有抑制作用,也可能有刺激作用,究竟会产生什么影响,还待进一步研究。

结 论

1. 从农药厂附近土壤中筛选出的两个菌株是好气性、中温型的细菌,在PRÉVOT系统中属于不动芽孢杆菌属(*Bacteridium*)。

2. 辛硫磷农药可以作为菌株的碳源,也可以作为磷源利用,作为碳源(能源)降解作用比作为磷源大。

3. 所选的两个菌株降解辛硫磷的能力均较强。在辛硫磷浓度为50ppm的模拟废水中菌株1631的转化率为33.7%,菌株2021的为36.6%。

参 考 文 献

- [1] 南京农学院主编: 土壤化学分析, 农业出版社, 66-71, 1980。
- [2] 冈查洛夫, N. (法)(徐浩译): 异养细菌鉴定的检索与方法, 科学出版社, 57, 1973。
- [3] 陈华癸、樊庆笙: 微生物学, 农业出版社, 229-232, 1979。