

曲霉 M-2 降解有机磷农药(甲胺磷)的研究

李淑彬 周仁超

(湘潭师范学院 湘潭 411201)

刘玉焕 刘 芳 钟英长

(中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要 分离了一株能降解甲胺磷的曲霉 M-2。M-2 能以甲胺磷为唯一碳源、氮源及磷源生长。在 0.2% 甲胺磷无机盐发酵液中,培养 5d 后,降解率达 81.5%。添加少量有机氮能促进 M-2 对甲胺磷的利用。

关键词 甲胺磷,降解,曲霉

分类号 Q93-3 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-27-30

THE STUDIES ON METHAMIDOPHOS-DEGRADING ASPERGILLUS M-2

Li Shubing, Zhou Renchao

(Xiangtan Teachers college, Xiangtan 411201)

Liu Yuhuan, Liu Fang, Zhong Yingchang

(Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract A strain of methamidophos-degrading *Aspergillus* M-2 was isolated. M-2 can use methamidophos as sole carbon source, Nitroge source, and Phosphate source. It can grew in 0.5% methamidophos solution. M-2 can degrade 81.5% methamidophos in methamidophos-inorgan salt medium at 28℃ (200r/min).

Key words Methamidophos, *Aspergillus*, Degrade

大量研究已经证实在土壤和环境中的有机磷农药降解中微生物起着重要的作用^[1]。科学工作者已分离出了一大批能降解或转化有机磷农药的微生物类群,并对它们进行了初步的研究^[2]。但到目前为止,所分离的能降解有机磷农药的微生物绝大多数为细菌,真菌对有机磷农药的降解研究却很少。1992 年 Zboninskn 等^[3]首次报道分离出一种 *Penicillium citrinum* 能以有机磷化合物作为唯一碳源进行生长,但未作进一步的研究。我们从被甲胺磷农药长期污染的土壤中分离了一株曲霉 M-2,能以甲胺磷为唯一碳源、氮源及磷源进行生长,并对其进

行了初步的研究,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:由本实验室从土壤中分离。

主要培养基: (1) 甲胺磷—无机盐发酵液: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01g KCl 0.5g FeSO_4 0.01g $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g 蒸馏水 1000mL pH6.8 分装后,高压 121℃ 灭菌 20min,待冷却加入适量经提纯的甲胺磷。(2) 选择培

培养基:在(1)中加入2%水洗琼脂。

1.2 实验方法

1.2.1 甲胺磷的纯化:市售甲胺磷按文献[4]纯化。

1.2.2 磷的测定:总磷及有机磷的测定参阅文献[5],无机磷测定采用钼锑抗法[5]。

1.2.3 菌量的测定:取一定体积的培养液离心收集菌体,洗涤2次,110℃烘2h至恒重称干重。

1.2.4 菌种的鉴定:参阅文献[6]。

1.2.5 甲胺磷降解率的测定:培养液于4500r/min离心30min后,取1mL上清液于50mL刻度比色管中,加入过硫酸钾121℃消化30min,测定其总磷量。分别测定培养前后总磷量及无机磷量,以下公式计算甲胺磷降解率。

$$\text{降解率} = \frac{\text{进水有机磷含量} - \text{出水有机磷含量}}{\text{进水有机磷含量}} \times 100\%$$

* 有机磷(mg/L) = 总磷 - 无机磷

1.2.6 菌种的分离:收集某农药厂甲胺磷生产车间及包装车间附近土壤8份,长期被甲胺磷污染的稻田土壤12份,磨碎混匀,称取0.5g制成菌悬液,无菌稀释至 10^{-5} ,取 10^{-5} 稀释液0.5mL接种于甲胺磷—无机盐选择平板上,25℃培养,待长出单个霉菌菌落后,挑取单菌落连续纯化3次,纯化过程中不断提高平板上甲胺磷初始浓度。取在甲胺磷—无机盐选择培养基上生长较好的菌落,在查氏培养基上预培养3d,培养液于4500r/min离心10min,取0.1g湿菌体接入100mL(500mL三角瓶装)甲胺磷—无机盐发酵液中,28℃,200r/min恒温振荡培养5d后,测定其甲胺磷降解率。以甲胺磷降解率最高者作为试验菌株。

2 实验结果

在选择平板上共筛得11株霉菌。其中M-2菌株在甲胺磷浓度为0.2%的选择平板上48h菌落直径达8mm。复筛发现M-2菌株培养5d后,其甲胺磷降解率达81.5%。M-2菌菌落疏松、絮状、圆形、不蔓延,产生大量黄色孢子。在选择平板上,M-2菌菌丝稀疏,仅产生少量孢

子,颜色较浅。镜检发现,M-2菌为有隔菌丝,分生孢子梗直立,顶端膨大成球形,其上产生成串的分生孢子。根据以上特征,M-2菌初步鉴定为曲霉(*Aspergillus spp.*)。

2.1 甲胺磷初始浓度对M-2菌生长及降解甲胺磷的影响

500mL三角瓶装入100mL无机盐发酵液,加入不同量的甲胺磷,使初始甲胺磷浓度分别为0.05%,0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%,1%,分别接种经过预培养的M-2湿菌体0.1g,28℃,200r/min振荡培养,在培养时间为0d、1d、2d、3d、4d、5d、6d分别取样,测定其甲胺磷降解率及菌体干重。结果如图1和图2。

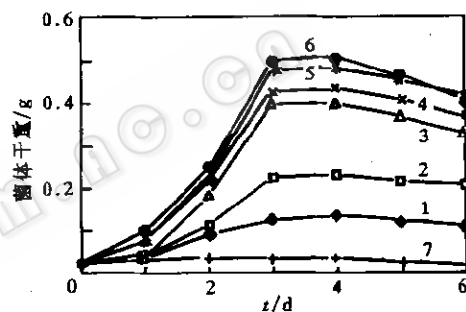


图1 初始甲胺磷浓度对M-2菌生长的影响

1.甲胺磷为0.05%, 2.甲胺磷为0.1%, 3.甲胺磷为0.2%,
4.甲胺磷为0.3%, 5.甲胺磷为0.4%, 6.甲胺磷为0.5%,
7.甲胺磷为1%

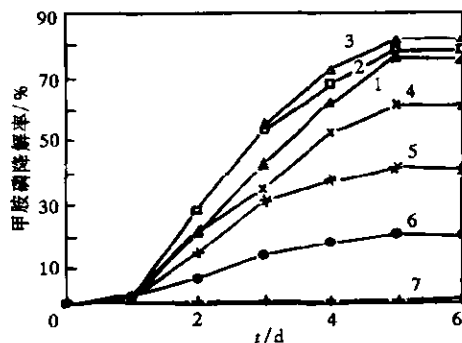


图2 甲胺磷浓度对M-2菌降解甲胺磷的影响

1.甲胺磷为0.05%, 2.甲胺磷为0.1%, 3.甲胺磷为0.2%,
4.甲胺磷为0.3%, 5.甲胺磷为0.4%, 6.甲胺磷为0.5%,
7.甲胺磷为1%

图1结果表明,在起始甲胺磷浓度为0.05%

表1 添加碳源及氮源对M-2菌降解甲胺磷的影响

添加物	1%葡萄糖	1%蔗糖	1%淀粉	1%甘油	1%甲醇	0.1%牛肉膏
降解率(%)	52.4	53.2	48.3	62.6	61.4	86.2
菌体干重(g)	1.154	1.136	1.112	1.139	0.756	0.782

添加物	1%纤维素	0.1%NaNO ₃	0.1%(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1%蛋白胨	对照*
降解率(%)	72.1	80.4	80.8	85.3	81.5
菌体干重(g)	0.321	0.382	0.372	0.543	0.375

*对照为除甲胺磷外未添加其它碳源及氮源

表2 添加磷源对M-2菌生长及降解甲胺磷的影响

添加磷源	0.01%KH ₂ PO ₄	0.025%KH ₂ PO ₄	0.05%KH ₂ PO ₄	0.1%KH ₂ PO ₄	对照*
甲胺磷降解率(%)	52.3	46.5	41.2	32.3	81.5
菌体干重(g)	0.395	0.398	0.397	0.399	0.394

*对照为未添加其它磷源

~0.5% 范围内, 菌体生长量随底物浓度而增大。在培养 3d 后, 菌体生长量达最大, 继续培养, 一部分菌体开始死亡和溶解, M-2 不能在 1% 的甲胺磷溶液中生长。

图 2 结果表明, 在初始甲胺磷浓度为 0.05%~0.2% 范围内, 甲胺磷降解率随甲胺磷浓度增大而增大, 在初始甲胺磷浓度为 0.2% 时, M-2 菌培养 5d, 其甲胺磷降解率达 81.5%。其一部分甲胺磷用于菌体生长; 另外, 镜检发现, 菌丝体能吸附无机磷, M-2 菌产生的甲胺磷降解酶把甲胺磷降解为无机磷后, 有一部分被菌丝体所吸附, 使培养液中甲胺磷及总磷含量减少。

2.2 添加碳源及氮源对 M-2 菌降解甲胺磷的影响

在 500mL 三角瓶中装入 100mL 甲胺磷—无机盐发酵液(其初始甲胺磷浓度为 0.2%), 添加 1% 的各种碳源, 及 0.1% 的各种氮源, 接入 0.1g 经预培养的 M-2 湿菌体, 28℃, 200r/min 振荡培养 5d, 取样测定其菌体干重和甲胺磷降解率, 得结果如表 1。

表 1 结果表明, 在所试验碳源中, 添加 1% 的葡萄糖、蔗糖、淀粉、甘油、甲醇能促进 M-2 菌的生长, 但对甲胺磷的利用率显著下降, 可能是由于 M-2 菌优先利用已有碳源。但 M-2 菌不能利用纤维素。添加 0.1%NaNO₃、(NH₄)₂SO₄ 对 M-2 菌无明显影响, 但增加少量有机氮则能

提高其降解率。

2.3 添加磷源对 M-2 菌生长及降解甲胺磷的影响

在甲胺磷—无机盐发酵液中添加 0.01%、0.025%、0.05%、0.1% 的 KH₂PO₄, 试验其磷源对 M-2 菌生长及降解甲胺磷的影响, 结果表明, 添加磷源物质对 M-2 菌生长无明显影响, 但是添加磷源能降低其甲胺磷的降解率, 其原因可能是磷抑制了 M-2 菌甲胺磷降解酶的产生, 且抑制过程随添加磷浓度而增大。其结果见表 2。

2.4 通气量对 M-2 菌降解甲胺磷的影响

在 500mL 三角瓶中分别装入 50mL, 100mL, 200mL, 300mL 甲胺磷—无机盐发酵液(另一瓶装入 100mL 发酵液后静置培养), 初始甲胺磷浓度为 0.2%, 28℃, 200rpm/min, 培养 5d, 测定其甲胺磷降解率及菌体干重, 得结果如下表 3。

表3 通气量对M-2菌降解甲胺磷的影响

培养基装置	50mL	100mL	200mL	300mL	100mL (静置)
甲胺磷降解率 (%)	83.2	81.5	63.6	41.3	45.3
菌体干重 (g)	0.478	0.432	0.312	0.224	0.254

在通气不足的情况下, M-2 菌生长较差, 故对甲胺磷的利用率较差。

3 小结

M-2 菌能以甲胺磷作为唯一的碳源、氮源及磷源进行生长,能耐受高达 0.5% 的甲胺磷。此菌在处理高浓度甲胺磷废水中能起重要作用。可节约稀释用水降低成本。M-2 菌降解甲胺磷可能是通过矿化作用,因在培养上清液中能测出一定数量的无机磷存在。作者还发现 M-2 菌菌丝球表面能吸附大量的无机磷颗粒,因此 M-2 菌不仅可用于降解有机磷,而且能除去矿化作用后生成的无机磷,避免水质富营养化。

参 考 文 献

- [1] 山本出,深见顺一.农药的代谢降解与毒理,北京:化学工业出版社,1991,152~210.
- [2] 虞云龙.环境科学进展,1996,4(3):28~35.
- [3] Zboinska E. Letters in Applied Microbiology, 1992, 15:269~272.
- [4] 周运才.农药,1983,6:34.
- [5] 国家环保局水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法,北京:中国环境科学出版社,1989,250~280.
- [6] 中国科学院微生物研究所常见与常用真菌编写组.常见与常用真菌,北京:科学出版社,1973.