

不同培养条件对阴沟肠杆菌乐果降解效能的影响

官雪芳^{1,2}, 马丽娜¹, 林 斌², 林抗美¹, 刘 波¹

(1. 福建省农业科学院生物资源研究所, 福建 福州 350003;
2. 福建省农业科学院农业工程技术研究所, 福建 福州 350003)

摘 要: 从福建省福农生化有限公司排污口的土壤中筛选到 1 株对乐果有较好降解效果的菌株阴沟肠杆菌, 为了使该菌能更好的应用于乐果残留污染的治理, 采用正交试验法 $L_{16} (4^4 \times 2^3)$ 研究各培养条件对该菌降解乐果的降解效能的影响, 结果表明, 该菌降解乐果的最佳发酵条件组合为: 碳源为蔗糖、离子为 $\text{CuCl}_2 (10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ 、乐果浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、培养时间 36 h、培养温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、pH 值 8、氮源 (酵母 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 降解率达到 58.90%; 运用 DPS 数据处理系统分析各类因子对菌降解乐果的影响, 得出离子对其影响最为显著, pH 值、培养温度、乐果浓度、培养时间等也依次对菌降解乐果有较大的影响。

关键词: 阴沟肠杆菌; 乐果; 降解; 优化; 正交试验

中图分类号: X 172 文献标识码: A

Effect of culture conditions on *Enterobacter cloacae* in degrading dimethoate

GUAN Xuefang^{1,2}, MA Lina¹, LIN Bin², LIN Kangmei¹, LIU Bo¹

(1. Agricultural Bioresources Research Institute Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Institute of Agricultural Engineering Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: By using selective cultural media, *Enterobacter cloacae* was isolated from the soil around a pesticide factory. For evaluating factors affecting *E. cloacae*'s potential in degrading residual dimethoate, a $L_{16} (4^4 \times 2^3)$ orthogonal test was used for the design of the experiment. The results showed that sucrose as the conformable carbon source, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dimethoate, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, initial pH 8.0, $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract as the conformable nitrogen source, and 36 h cultivation to yield a degrading rate of 58.90%. Statistical analysis by using DPS Data Processing System revealed that the ion exerted the most significant impact on the degradation rate, followed by pH, culture time, dimethoate concentration, temperature and carbon source in that order.

Key words: *Enterobacter cloacae*, dimethoate, degradation, optimize orthogonal experiments

有机磷农药一直是我国用量最大的农药种类, 每年都在 10 万 t 以上, 这类农药施用于农田后, 只有大约 1% 作用于靶标生物, 其余的或残留于土壤, 或通过径流进入水域, 影响土壤和水体中的生物, 残留于土壤、水源、大气以及农作物中, 对人类及其环境产生深远的影响^[1-4]。微生物是环境中有机磷农药降解的重要方式, 农药微生物降解在农药废水处理 and 土壤生物修复等领域具有广阔的开发应用前景, 因此筛选新菌株、提高已有菌株的降解性能、研究农药的微生物降解机制等一直是近几年来国内外研究的热点^[5-8]。目前国内外已经在提高

已有菌降解性能方面做了不少的研究^[9-11], 其中包括环境因子对农药降解效能的影响研究等。谭芙蓉等筛选到 1 株对甲胺磷有降解效果的铜绿假单胞菌, 并研究了底物浓度、接种量、营养源及金属离子对菌降解甲胺磷的影响, 发现以上因素均不同程度影响着菌对甲胺磷的降解作用^[12]; 许育新等用 GC-MS 研究了红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯的最适条件, 发现温度、pH 及碳源等因素也不同程度的影响着其降解效果^[13]; 另外也有其他环境影响因子如含水量、溶解氧、盐度、有机质、黏度及气候条件等影响微生物对农药的降解作用的报道^[14]。

收稿日期: 2009- 02- 12 初稿; 2009- 04- 10 修改稿
作者简介: 官雪芳 (1979-), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事环境微生物方面的研究(E mail: guan- 619@ 163. com)
通讯作者: 刘波 (1957-), 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物生物技术和农业生物药物研究(E mail: fzliubo@ 163. com)
基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 2008ZX07425- 002; 福建省科技厅项目 (编号: 2005Y008)

但在关于各类因素对影响微生物降解农药的效能分析等方面的研究目前未见报道。

本研究筛选到的 1 株对乐果有较高降解效能的阴沟肠杆菌,经研究发现该菌具有生长速度快,生存适应能力强等优点^[15]。由于环境因子对农药微生物修复的影响巨大,有些因子的影响有时甚至决定了农药微生物修复的成功与否^[16],因此运用正交试验法对碳源、离子、乐果浓度、培养时间、培养温度、pH 值、氮源 7 因素在影响阴沟肠杆菌降解乐果的情况方面做比较分析,目的在于分析比较各类因素对菌降解乐果的影响情况,筛选出阴沟肠杆菌降解乐果的最佳发酵条件组合,从而将该菌更好地应用于土壤、水体的乐果残留治理,同时也为其他微生物降解农药的降解效能的因素研究提供理论参考。

1 材料与 方法

1.1 试剂与药品

菌种:阴沟肠杆菌;药品:40% 乐果乳油(湖南海利常德农药化工有限公司)、乐果标样(Sigma Aldrich 公司)、丙酮(分析纯)、二氯甲烷、乙腈(色谱纯)、CdCl₂、ZnCl₂、CuCl₂、FeCl₂、氯化钠、盐酸、氢氧化钠(优级纯)、果糖、蔗糖、葡萄糖、淀粉、酵母、蛋白胨等;葡萄糖蛋白胨水培养基:蛋白胨 6.5 g、葡萄糖 6.5 g、K₂HPO₄ 2 g、水 1 000 mL、pH 7.0 (固体培养基加琼脂 20 g)。

1.2 仪器设备

Agilent 1100 H PLC 仪(带 VWD 检测器及色

谱工作站)、色谱柱: Hypersi LODS C₁₈ 反相柱(4.0 mm×250 mm, 填料孔径 5 μm)、真空抽滤器(2XZ-0.5 型选片真空泵,浙江黄岩真空泵厂);UV-2550 紫外分光光度计、摇床、恒温箱、pH 计、水浴锅等。

1.3 阴沟肠杆菌的培养

取一环阴沟肠杆菌接种于 100 mL 体葡萄糖蛋白胨水培养基中,于 32 ℃、60 r·min⁻¹ 条件下摇床培养 24 h,作为接种液备用。

1.4 乐果的浓度和峰面积关系的标准曲线的制作

将乐果标样用乙腈稀释成 15 mg·L⁻¹、20 mg·L⁻¹、40 mg·L⁻¹、60 mg·L⁻¹、80 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹,再将各标样用液相色谱仪测定,液相色谱操作条件^[17]为流动相:V(乙腈:水=30:70),流速:1 mL·min⁻¹,波长:210 nm,出峰时间:7.59 min。每次进样 10 μL,每处理重复 3 次,得到对应乐果浓度的峰面积,再以峰面积为横坐标,乐果浓度为纵坐标,绘制标准曲线图(图 1),得标准曲线方程。

1.5 不同培养条件对阴沟肠杆菌乐果降解效能的影响

1.5.1 试验设计 参照文献[18]的方法,选用 L₁₆(4⁴×2³) 正交表,对 7 因子进行试验,其中因子碳源、离子、乐果浓度及培养时间设置 4 个水平,培养温度、pH 值、氮源等因子设置 2 个水平,具体见表 1。

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and design of orthogonal experiment

因子	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4
碳源(g·L ⁻¹)	果糖(3)	蔗糖(3)	葡萄糖(3)	淀粉(3)
离子(mmol·L ⁻¹)	CuCl ₂ (10)	FeCl ₂ (10)	CdCl ₂ (2)	ZnCl ₂ (2)
乐果浓度(mg·L ⁻¹)	50	100	200	500
培养时间(h)	12	24	36	48
培养温度(℃)	35	30		
pH 值	7	8		
氮源(g·L ⁻¹)	酵母(3)	蛋白胨(3)		

1.5.2 试验方法 参照文献[19–20]采用 L₁₆(4⁴×2³) 正交因素水平表(表 3)中的要求配制各处理发酵液,每处理 30 mL 发酵液,高压灭菌,在各处理中加入活化好的菌液各 50 μL,以未加菌的相应培养基为对照,每处理 2 次重复。放置于不同温度的摇床中培养,并在相应的培养时间内取

样,此即为待测样品。吸取样品 4 mL,用真空抽滤器抽滤,回收滤液,在滤液中加入氯化钠至饱和,再加 12 mL 的二氯甲烷充分混匀,用分液漏斗萃取分离,取二氯甲烷部分,剩余的残液再用 8 mL 二氯甲烷二次提取,将两次所得二氯甲烷提取液用冷风吹干,再用乙腈定容至 4 mL,进行液相色谱

分析 (具体操作见 1. 4), 最后将测得的峰面积带入乐果的浓度和峰面积关系的标准曲线方程中, 求出相应的浓度。

1. 6 结果统计

农药降解率 (%) = (对照样品残留量 - 处理样品残留量) × 100 / 对照样品残留量; 用 DPS 数据处理系统对试验结果进行分析^[21]。

2 结果与分析

2. 1 乐果的浓度和峰面积关系的标准曲线图

从图 1 可以看出, 乐果在 15. 0~ 100. 0 mg·L⁻¹ 的范围内, 其浓度和峰面积呈现良好的线性关系, 其标准曲线方程为 $y = 0. 0723x + 0. 2227$, $R^2 = 0. 9992$ 。

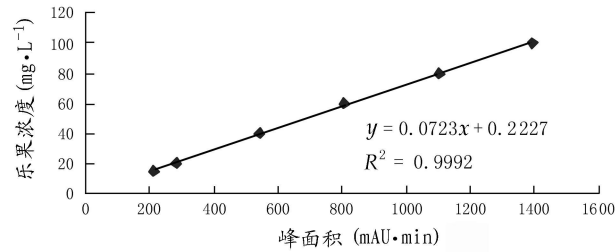


图 1 乐果浓度和峰面积关系标准曲线
Fig 1 Standard curve for relation between dimethoate concentration and peak area

2. 2 不同培养条件对阴沟肠杆菌乐果降解效能的影响

表 2 为 16 个处理的降解效果, 可以看出, 不同处理的降解率有很大的差别, 最高的降解率为处理 5, 即碳源为蔗糖、离子为 CuCl₂ (10 mmol · L⁻¹)、乐果浓度为 100 mg · L⁻¹、培养时间 36 h、培养温度 30 ℃、pH 值 8、氮源为酵母 3 g · L⁻¹, 降解率达到 58. 90%, 而降解率最低的为处理 6, 其中处理 3、4、6、7、8、10、11、12、14 的降解率不到 4%, 可认为无降解作用。以上结果说明培养条件因素等对菌降解乐果的影响作用很大, 适合的条件可以促进菌对乐果的降解, 反之将可能阻碍甚至阻止菌对乐果的降解作用。分析各因素碳源、离子、乐果浓度、培养时间、培养温度、pH 值、氮源调整后的极差值 R' 分别为 7. 40、30. 56、19. 99、18. 69、25. 51、26. 23、0. 52。极差描述的是个体值间的差异变异范围, 极差越大, 表明样本变异范围越大, 反之亦然^[22]。运用这一原理分析各因素对菌降解乐果的效能差异, 可知极差值最大的离子对菌降解乐果的影响作用最大, 其余依次为 pH 值、培养温度、乐果浓度、培养时间, 影响作用最小的是碳源、氮源, 这和方差分析的结果是一致的。

表 2 L ₁₆ (4 ⁴ × 2 ³) 培养条件对阴沟肠杆菌乐果降解效能的影响								
Table 2 Effect of culture conditions on dimethoate degradation by <i>E. cloacae</i>								
处理号	因素水平							
	碳源	离子	乐果浓度	培养时间	培养温度	pH 值	氮源	降解率 (%)
1	1	1	1	1	1	1	1	38. 70
2	1	2	2	2	1	2	2	17. 23
3	1	3	3	3	2	1	2	2. 92
4	1	4	4	4	2	2	1	3. 89
5	2	1	2	3	2	2	1	58. 90
6	2	2	1	4	2	1	2	0
7	2	3	4	1	1	2	2	1. 10
8	2	4	3	2	1	1	1	0. 29
9	3	1	3	4	1	2	2	49. 47
10	3	2	4	3	1	1	1	1. 31
11	3	3	1	2	2	2	1	3. 00
12	3	4	2	1	2	1	2	2. 27
13	4	1	4	2	2	1	2	9. 76
14	4	2	3	1	2	2	1	2. 46
15	4	3	2	4	1	1	1	26. 52
16	4	4	1	3	1	2	2	50. 23

处理号	因素水平							降解率 (%)
	碳源	离子	乐果浓度	培养时间	培养温度	pH 值	氮源	
K ₁	62 73	156 84	91. 92	44 53	184 84	81 77	135. 07	
K ₂	60 30	21. 01	104 92	30 28	83 21	186 28	132. 98	
K ₃	56 06	33 53	55. 14	113 36				
K ₄	88 96	56 67	16. 07	79 88				
R	8 23	33 96	22. 21	20 77	12 70	13 06	0 26	
R'	7. 40	30 56	19. 99	18 69	25 51	26 23	0 52	

注: K₁、K₂、K₃、K₄ 分别为各因素的水平数的观察值的总和, R 和 R' 分别为极差值和调整后的极差值。

2 3 方差分析

用 DPS 数据处理系统统计分析各因素对阴沟肠杆菌降解乐果的显著水平 (表 3), 结果表明, 碳源的 *P* 值为 0. 0515, 大于 0. 0500, 所以碳源对菌降解乐果没有显著性影响, 而离子、乐果浓度、培养时间、培养温度、pH 值的 *P* 值依次为 0. 0124、0. 0192、0. 0205、0. 0130、0. 0127, 其 *P* 值均在 0. 0100~ 0. 0500 之间, 说明这些因素对菌降解乐果有显著的影响。

表 3 不同培养条件对阴沟肠杆菌乐果降解效能影响的显著性分析

Table 3 Variance analysis of degrading rates affected by culture conditions						
变异来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>	
碳源	166 3454	3	55 4480	203 6880	0. 0514	
离子	2853 1540	3	951 0510	3493 6470	0. 0124	
乐果浓度	1198 5400	3	399 5130	1467 5960	0. 0191	
培养时间	1042 1010	3	347 3670	1276 0390	0. 0205	
培养温度	645 5792	1	645 5790	2371 5080	0. 0130	
pH 值	682 5809	1	682 5910	2507 4320	0. 0127	
氮源	0 2722	1	0 2722			
误差	0 2722	1	0 2722			
总和	6588 5730	16				

3 讨 论

关于微生物对农药降解的影响因素的研究, 目前还主要集中在单个因素的研究上^[12- 14], 而对乐果的降解研究方面, 也主要涉及到乐果降解酶产生菌的筛选及产酶条件优化的研究^[23]和个别单一因素如温度、乐果浓度等对乐果的降解率的影响研究^[24]。本试验于采用 L₁₆ (4⁴ × 2³) 正交法研究了碳源、离子、培养时间、温度、pH 值、乐果浓度、氮源等 7 因素对阴沟肠杆菌降解乐果的影响,

并采用 DPS 数理系统对各因素进行了分析, 表明各因素对菌降解乐果效能的影响也存在差异等的特点, 并最终筛选出了阴沟肠杆菌降解乐果的各类因子最佳发酵条件组合。

从结果中可知, 在最佳发酵条件组合下阴沟肠杆菌对乐果的降解率可达到 58. 90%, 这与已报道的降解菌对乐果的降解率相比有了较大的提高^[24- 25]。研究还发现离子对阴沟肠杆菌降解乐果的影响最为显著, 这可能是离子会与阴沟肠杆菌分泌的降解酶作用的结果, 适量的 Cu²⁺ 很有可能与降解酶结合从而促进其降解效能, 相反, 有些离子则可能因会与其他因素结合, 从而阻止了降解酶的降解作用, 如处理 6 对菌已经没有降解作用等, 但具体原因还有待进一步研究。其次 pH 值对菌降解影响也较培养温度等另 5 种因素明显, 这一研究也进一步用理论数据证实了郑永良等提到的土壤 pH 值降解影响相对较大的结论^[14]。另外, 培养温度、乐果浓度、培养时间、碳源等对菌降解乐果也有较大的影响。通过对以上结果的分析, 可知将菌应用到田间时, 了解待处理环境中的因素条件尤为重要, 特别是被处理环境中离子种类、浓度和 pH 值的状况, 不适合的环境如当土壤过酸时, 很可能使菌失去降解功能。因此在田间使用技术研究中, 要结合以上结果将阴沟肠杆菌的降解条件调整到最佳的状态, 以利于提高菌的降解功效。另外本研究结果也可以为其他微生物降解有机磷的降解效能研究提供理论参考依据, 进一步促进农药残留治理的深入研究发展。

参考文献:

[1] 梁伊丽, 曾富华, 卢向阳. 有机磷农药的微生物降解研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2004 (6): 51- 55.
[2] 明惠青, 李莉. 有机磷农药微生物降解的研究进展 [J]. 江苏环境科技, 2006, 19 (1): 123- 126.
[3] 李松桢, 李日强. 有机磷农药生物降解的研究进展 [J]. 科技情报开发与经济, 2008, 18 (2): 123- 124.

[4] ROUSSEAU X S, SOULAS G, HARTMANN A. Plasmid localisation of atrazine degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains [J]. FEMS Microbio1 Eco1, 2002, 41 (1): 69– 75.

[5] MALLICK K, BHARATI K, BANERJI A, et al. Bacteria degradation of chlorpyifos in pure culture and insoi [J]. Bull Environ Contain Toxicol, 1999, 62: 48– 54.

[6] NICHOL T D. Rhizosphere microbial populatious in contaminated soils [J]. Water, Air and Soil Pollution, 1997, 95 (1– 4): 165.

[7] 汪小勇, 张兰, 姜文. 被农药污染的土壤植物修复研究进展 [J]. 中国农学通报, 2005, 21 (7): 382– 384.

[8] 沈齐英, 刘欢, 张英俊. 有机磷农药乐果降解菌的分离 [J]. 农药, 2004, 3 (12): 552– 554.

[9] 颜世雷, 陶玉贵, 潘军. 氧化乐果降解菌的分离与初步鉴定 [J]. 中国土壤与肥料, 2007 (6): 78– 80.

[10] 王圣惠, 闫艳春, 徐刚明. 一株有机磷农药降解菌的分离、鉴定及降解酶基因的克隆 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26 (增刊): 84– 88.

[11] 石成春, 刘用凯. 环境微生物降解有机磷农药研究进展 [J]. 上海环境科学, 2003, 22 (23): 863– 867.

[12] 谭芙蓉, 李佳楠, 杨志荣. 甲胺磷降解菌的生长特性及其降解活性的研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2001, 38 (5): 728– 731.

[13] 许育新, 李晓慧, 张明星, 等. 红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯的特性及途径 [J]. 中国环境科学, 2005, 25 (4): 399– 402.

[14] 郑永良, 陈舒丽, 刘德立. 土壤中降解农药微生物的类别及降解特性 [J]. 黄冈师范学院学报, 2005, 25 (3): 34– 39.

[15] 林抗美, 官雪芳, 马丽娜. 有机磷农药降解菌——阴沟肠杆菌的生物学特性 [J]. 中国农学通报, 2008, 24 (9): 382– 386.

[16] 尤民生, 刘新. 农药污染的生物降解与生物修复 [J]. 生态学杂志, 2004, 23 (1): 73– 77.

[17] 严衍禄. 现代仪器分析 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2002, 2: 182– 185.

[18] 马育华. 田间试验和统计方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1978: 182– 191.

[19] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000.

[20] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.

[21] 林文浩. 概率论与数理统计 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2002: 298– 324.

[22] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统– 试验设计、统计分析及模型优化 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.

[23] 刘芳, 钟英长. 乐果降解酶产生菌的筛选及酶条件的优化 [J]. 农业环境保护, 2000, 19 (6): 336– 338.

[24] 王永杰, 李顺鹏, 沈标. 有机磷农药乐果降解菌的分离及其活性研究 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24 (2): 71– 74.

[25] 林淦, 姚威. 阴沟肠杆菌 W-1 粗酶液对氯氟氰菊酯的降解效果及其作用机理 [J]. 江苏农业科学, 2006 (3): 191– 192.

(责任编辑: 林海清)