

# 乙酰甲胺磷高效降解菌的筛选与鉴定

龙家茹 (井冈山大学医学院, 江西吉安 343009)

**摘要** [目的]为获得高效降解乙酰甲胺磷的微生物菌株。[方法]从常年生产有机磷农药企业排污口附近土壤取样,采用逐渐加量的驯化方式,分离筛选出菌株 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>,将菌株接种在乙酰甲胺磷选择性培养基中,观察菌株的生长情况和个体形态。[结果]菌株 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 可降解乙酰甲胺磷。菌株 L<sub>1</sub> 降解乙酰甲胺磷的降解率可达 73%,菌株 L<sub>2</sub> 的降解率为 61%。显微镜下观察菌株 L<sub>1</sub> 形成的幼龄菌落较大,菌体由分支的菌丝组成,菌丝的横隔膜上有小孔,具有足细胞存在;菌株 L<sub>2</sub> 形成的菌落很小,圆形,隆起状,黄色,被革兰氏染色成紫色,为革兰氏阳性菌,细胞呈微球状。[结论]菌株 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 可降解乙酰甲胺磷,降解率分别为 73%、61%。经培养特征和生理特征鉴定,L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 分别属于曲霉属和微球菌属。

**关键词** 乙酰甲胺磷;降解;菌株

**中图分类号** S835 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)35-11504-02

## Screening and Identification of Highly Efficient Acephate Degrading Bacteria

LONG Jia-ru (College of Medicine, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009)

**Abstract** [Objective] The aim of the research was to obtain the microbial strains with high efficiency of degrading acephate. [Method] Samples were collected from the soil near the sewage discharge outlet of the enterprises that produced organophosphorus pesticide for many years. By the domestication mode of gradual addition, L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> strains were isolated and screened out. And the strains were inoculated into the selective medium of acephate to observe the growth conditions and the individual form of the strains. [Result] L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> strains could degrade acephate. The degradation rate of L<sub>1</sub> strain to acephate reached 73% and that of L<sub>2</sub> strain was 61%. Microscope observation showed that L<sub>1</sub> strain formed bigger young bacterial colonies, the bacteria consisted of the branches of mycelium and there was a small hole on the diaphragm of mycelium, where some podocytes existed. While L<sub>2</sub> strain formed very small young bacterial colonies with round knob shape. It was changed from yellow to purple after Gram dyeing. It was gram-positive bacteria and the cells presented the micro-spherical. [Conclusion] L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> strains could degrade the acephate and their degradation rates were 73% and 61% resp. Through identification on the cultural characteristics and the physiological characteristics, L<sub>1</sub> strain and L<sub>2</sub> strain belonged to *Aspergillus* and *Micrococcus* resp.

**Key words** Acephate; Degradation; Strain

乙酰甲胺磷是一种高效、持效期长、内吸性强的广谱性有机磷杀虫剂。目前,随着农业经济的发展,我国禁止大规模使用甲胺磷而使用乙酰甲胺磷替代,乙酰甲胺磷等农药消耗量呈现逐年增加的趋势。但乙酰甲胺磷只有不到 0.1% 的量到达靶生物,高达 99.9% 的农药则散布到环境中,对微生物、植物及生态环境产生潜在危害<sup>[1]</sup>。对于土壤污染处理而言,传统物理及化学修复技术的最大弊端是污染物去除不彻底,导致二次污染的发生,从而带来一定程度的环境健康风险<sup>[2-3]</sup>。而生物修复技术主要是利用有机体,尤其是微生物的降解作用将污染物分解并最终去除,具有快速、安全、费用低廉的优点。因此,笔者以常年受有机磷污染的土壤为对象来筛选乙酰甲胺磷高效降解菌,旨在为农业生产中降解乙酰甲胺磷类农药提供参考。

## 1 材料与方 法

**1.1 土壤的取样及原料** 土样取自长期受有机磷农药污染的农药厂排污口附近土壤。采用 5 点梅花形采样法采样 500 g 左右,将土样粉碎混匀后按圆锥四分法进行分样,得适量土样。乙酰甲胺磷及其他试剂均为市售。

**1.2 供试培养基** 基础培养液:KNO<sub>3</sub> 1.0 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,KCl 0.5 g,CaCl<sub>2</sub> 0.02 g,蒸馏水 1 000 ml,121 °C 灭菌 20 min;乙酰甲胺磷选择培养液:KNO<sub>3</sub> 1.0 g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,KCl 0.5 g,CaCl<sub>2</sub> 0.02 g,乙酰甲胺磷 1 ml,蒸馏水 1 000 ml,121 °C 下灭菌 20 min。

**1.3 菌种的分离与筛选** 称取 2 g 土样,加入装有 100 ml 无菌水的 250 ml 锥形瓶中,加入几颗玻璃珠,置于 200 r/min

摇床中 25 min,制备土壤悬浮液;取 10 ml 用无菌水稀释的土壤悬浮液加入到 100 ml 乙酰甲胺磷选择性培养液中(含 100 μl 乙酰甲胺磷),置于 30 °C,200 r/min 摇床,逐步提高乙酰甲胺磷的浓度,每次接种体积分数 10% 的菌液,直到乙酰甲胺磷浓度为 3 500 mg/L 为止,以后用乙酰甲胺磷选择培养基每隔 1 周移种 1 次,乙酰甲胺磷浓度仍为 3 500 mg/L,最后用平板涂布分离纯化,接种保存。

**1.4 菌种的鉴定** 将筛选出的菌株在乙酰甲胺磷选择性培养基上培养,观察菌落特征,根据显微镜观察到的菌丝、产孢器官、孢子大小等特征,参考《真菌鉴定手册》<sup>[4]</sup>,对筛选出的乙酰甲胺磷降解菌进行鉴定。

**1.5 乙酰甲胺磷降解率的测定** 将筛选出的高效菌株接种在乙酰甲胺磷选择性培养液中培养,30 °C 温度下摇床培养(200 r/min)。120 h 后离心获得菌体,将菌体用 20 倍体积蒸馏水洗涤 2 次,然后将菌体制成一定浓度的溶液,一份作对照,另一份配制一定乙酰甲胺磷浓度溶液处理 2 h 后测定 OD<sub>700</sub>,求有机磷转化无机磷的降解率。

## 2 结果与分析

**2.1 乙酰甲胺磷降解菌的筛选** 据试验方法开展乙酰甲胺磷降解菌的筛选,结果表明,可降解乙酰甲胺磷的菌株有 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 2 株。其生长形态见图 1。

**2.2 乙酰甲胺磷降解菌的初步鉴定** 将菌株 L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub> 分别接种在乙酰甲胺磷选择性培养基中,30 °C 条件下培养 3~5 d,观察菌株的生长情况和个体形态。结果表明,菌株 L<sub>1</sub> 形成的幼龄菌落较大,近圆形,出现辐射纹,丝绒状,菌丝白色,随着菌落的老化,近圆心部出现黄色。镜检菌体,发现 L<sub>1</sub> 菌体由分支的菌丝组成,许多菌丝相互交织,菌丝中间有横隔膜;菌丝呈分支成串的多细胞,每个细胞内含有一个或多个

**作者简介** 龙家茹(1956-),女,江西永新人,实验师,从事医学生物技术研究。

**收稿日期** 2007-09-16

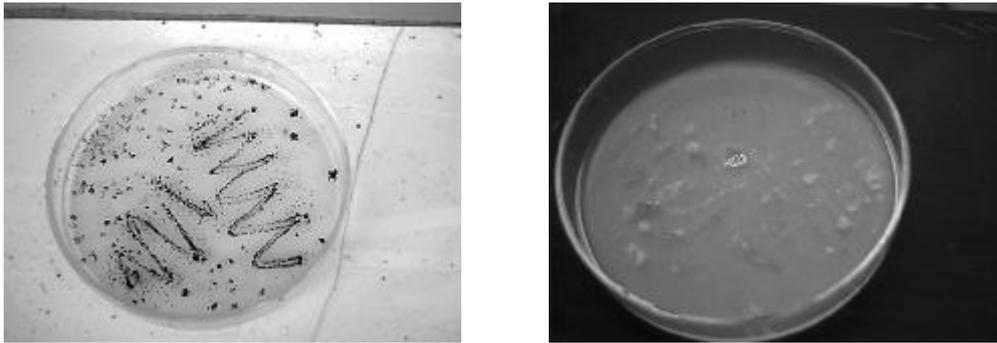


图 1 菌株 L<sub>1</sub> (左)、L<sub>2</sub> (右) 的培养形态

细胞核;菌丝的横隔膜上有小孔,具有足细胞,由足细胞生出直立的分生孢子梗(无隔膜),顶部膨大形成球形的顶囊,在顶囊的表面以放射状生出一层或两层小梗(初生小梗和次生小梗),小梗的顶端着生成串的分生孢子。根据菌株的培养特征及个体形态,菌株 L<sub>1</sub> 初步鉴定为曲霉属(*Aspergillus*)。菌株 L<sub>2</sub> 形成的菌落很小,圆形,隆起状,边缘整齐,表面光滑,闪光,质地粘,黄色,不透明。对 L<sub>2</sub> 进行革兰氏染色观察,发现 L<sub>2</sub> 菌体被染成紫色,为革兰氏阳性菌,细胞呈微球状,经初步鉴定为微球菌属(*Micrococcus*)。

**2.3 两菌株降解能力的比较** 测定了两菌株的降解能力,结果表明,菌株 L<sub>1</sub> 降解乙酰甲胺磷可达 73%,菌株 L<sub>2</sub> 降解率为 61%。

### 3 讨论

利用微生物来降解污染物的本质是由其分泌的酶所完成。利用传统微生物技术筛选出的微生物菌株为后续细胞中酶的提纯及固定化等研究奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 龚平,孙铁衍,李培军.农药对于土壤微生物的生态效应[J].应用生态学报,1996(7):127-132.
- [2] MOHAMED T A, SAAD M M I, MABROUK S S. Residues of some chlorinated hydrocarb pesticide in rain water, soil and ground water, and their influence on some soil microorganisms [J]. Environ Intern, 1998, 24(5/6):665-670.
- [3] TU C M. Influence of ten herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1993, 51(1):30-39.
- [4] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.

(上接第 11471 页)

表 2

南京主城区六朝时期皇家园林现状

园林名称	现状
吴苑城华林园	西起中科院南京分院西侧,东至公教一村东侧,北界“台城”,南迄北京东路以南。现为北京东路干休所、南京人才大厦、和平新村西边大部分及中科院南京土壤研究所部分地区
西苑	太初宫西门外。现为南京大学南园(包括宿舍和食堂的大部分地区)
乐游苑(南朝)	包括和平新村,土壤研究所,九华山公园和南京军区大院,小营军区大院的一部分。由和平新村东边小部分,土壤研究所、九华山公园和南京军区大院、小营军区大院的一部分所占
上林苑	今玄武湖北岸,占地包括现在的北山公园、东井亭、黑墨营、樱驼村、红山森林动物园等地方
南苑	今城西南凤台山瓦官寺东北,秦淮河南岸的林陵县建兴里
芳林苑(南朝)	今武定门至通济门一带,近青溪中桥。现状主要为东城水岸小区、东水关遗址公园、清雅苑小区、武定门公园、白鹭新村、南京市水利局仓库、南京市水利建筑工程总公司、南京三鸽橡胶厂等单位占领,和白鹭洲公园紧邻,处于秦淮河边上。
芳山苑	今江宁区芳山脚下,现为田园和农居用地
娄湖苑	城东南娄湖之滨(雨花门内老虎头一带,临近秦淮河)“老虎”系“娄湖”讹音
玄圃	台城北,今西家大塘、天山路、十三中学至高云岭一带。现状为西家大塘、十三中学所占,加上天山路至高云岭一带部分地区
东田小苑	中山西南山麓至今半山园海军指挥学院一带。海军指挥学院、后宰门清溪路小区、清溪花园、维景国际大酒店、前湖靠近明城墙附近地区
博望苑	后宰门、军区干休所一带,半山园之南,东临前湖,旁为沈约住宅旧址,现有半山花园小区,前半山园小区
芳乐苑	宫城阅武堂前(台城之内),现状为台城公园,九华山公园,绿树覆盖
青林苑	今太平门外白马村现在为白马石刻公园,白马山庄(居住小区),白马紫金阁大酒店等所占领,南倚富贵山,西临玄武湖
建兴苑	秦淮河南岸的林陵县建兴里(今集庆路一带)
白水苑	玄武湖东南临近太平门一带。现为佳源公寓,太平花园小区,鱼翅皇酒店,金御花园一带,西与九华山公园、台城公园相邻

阶段,在进行保护建设的过程中,须根据不同的情况采取不同的保护方式,不但要保护好这些历史园林,更重要的是保护园林周围的自然山水形制,使得自然园林赖以存在的自然地理格局完整性得以保持。南京城北的玄武湖周围、钟山以南一带,包括现在的前湖、琵琶湖,城西的石头城、清凉山,以及沿内秦淮河、清溪,城南的雨花台,西南的凤凰台一带,是历代园林建设的主要地点,这些园林顺应自然山水,有系列连续的山脉以及依山而建的明城墙,山水交界汇聚,在规划建设过程中应该加以研究保护,维护山、水、城、园的整体性。

### 3 结论

南京“钟山龙蟠,石城虎踞,负山带江,九曲清溪”的形胜,不但成为建都立业的理想之地,同时也成为发展山水园林的基础。六朝时期,在钟山之麓、后湖(玄武湖)之滨、秦淮

两岸、清溪沿线等建设了许多著名名园芳圃,其自然山水园林开创了我国园林发展的新局面,融山水、自然式的布置手法为现代园林发展的新模式。历史园林是南京城市建设的文化遗产,是南京历史文化名城建设的一个重要方面,其空间布局展现了深厚的文化底蕴。系统地保护好历史园林,创造出既有古典园林的诗情画意,又有强烈的现代生活气息的园林空间是南京现代风景园林发展建设的要旨。

### 参考文献

- [1] 周维权.中国古典园林史[M].2版.北京:清华大学出版社,1999:119.
- [2] 蒋赞初.南京史话[M].南京:南京出版社,1995
- [3] 卢海鸣.六朝都城[M].南京:南京出版社,2002.
- [4] 姚亦锋.南京城市地理变迁及现代景观[M].南京:南京大学出版社,2006.
- [5] 朱偁.金陵古迹图考[M].上海:中华书局,1936.