

类球红细菌降解敌敌畏特性初步研究

赵凯^{1,3} 于影¹ 王栋² 张洪勋¹ 白志辉^{1*}

(1. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2. 北京中科嘉华高科技发展有限公司, 北京 100078; 3. 北京科技大学, 北京 100083)

摘要 类球红细菌具有广泛的代谢方式, 它能够发酵生产 5-氨基乙酰丙酸、辅酶 Q₁₀、类胡萝卜素、氢气等, 已经成为一种非常有工业化开发潜力的微生物。本文报道了一株从土壤中筛选的类球红细菌, 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 0645, 研究了它高效降解敌敌畏的新功能, 显示出其在无公害农产品生产中的应用潜力。

引言

类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 属于细菌域中紫色细菌群的 α 亚群, 具有广泛的代谢方式, 可以在多种生长条件下生长。如它具有广泛的能量代谢机制, 包括: 光合作用、无机营养、好氧和厌氧呼吸等。它还可以固定氮分子, 合成重要生物活性物质四吡咯 (tetrapyrroles)、叶绿素 (chlorophylls)、血红素 (heme)、维生素 B₁₂ 等^[1]。

大量研究文献表明, 类球红细菌已经成为一种非常有工业化开发潜力的微生物。比如, 已有多篇文章报道了利用类球红细菌发酵生产 5-氨基乙酰丙酸 (ALA)^[11, 111]; ALA 可促进植物叶绿素合成, 增强植物抗逆性, 促进植物生长^[14]。用类球红细菌来生产辅酶 Q₁₀ 的文献也很多^[6, 11]; 辅酶 Q₁₀ 是人体内具有重要作用的辅酶之一, 又称泛醌, 它在体内呼吸链中质子移位及电子传递中起重要作用, 是细胞呼吸和细胞代谢的激活剂, 也是重要的抗氧化剂和非特异性免疫增强剂, 已经广泛应用于临床药物、保健品和化妆品^[14, 6]。还有文献报道了类球红细菌发酵生产类胡萝卜素^[7]、氢气^[8, 9]等。我们也发现了类球红细菌促进植物生长的取得了长足进展^[1]。

敌敌畏 (Dichlorvos, DDVP), 化学名称为 2,2-二氯乙烯基二甲基磷酸酯, 是一种有机磷农药, 在农业生产与害虫防治中应用广泛, 但其残毒容易造成环境与食品污染, 因此, 世界各国都对其农产品制定了相应的残留标准, 如: 中国国家标准中对水果、蔬菜中敌敌畏残留的限量为 ≤ 0.2 mg/kg, 欧盟对茶叶中敌敌畏残留的限量为 ≤ 0.02 mg/kg。对于消除敌敌畏农药残留造成的污染, 微生物降解是一种安全、有效的方法^[10]。目前, 已有微生物降解敌敌畏的相关研究论文发表^[11, 12], 但还未见有关类球红细菌降解敌敌畏的研究论文。

我们从土壤中分离到一株类球红细菌, 保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号: CGMCC No. 0645, 本文报道了它的培养条件, 及其对敌敌畏农药的高效降解作用, 显示了它在无公害农产品生产中的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 类球红细菌及其培养基

实验采用类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 0645 菌株, 保存在 LB 固体培养基斜面上, 保藏于 4℃ 冰箱, 半年转接一次。

液体培养基配方 (g/L): 蛋白胨 5, 酵母膏 5, 氯化钠 5, 调 pH 至 6.8。

1.2 类球红细菌的培养和计数

将斜面保存的菌种接种到盛有 100 mL 液体培养基的三角瓶中, 共 3 瓶, 置于光照培养箱中, 于 32℃

特性^[6]。鉴于类球红细菌的巨大应用潜力, 美国休斯顿得克萨斯大学健康科学中心微生物学和分子遗传学系的研究人员已经开展了类球红细菌基因组计划研究, 测序工作已经于 2005 年完成, 功能基因研究也

* 通讯作者, E-mail: zhbai@rcees.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30600082) 资助

下, 150 r/min 摇床振荡培养 24 h, 得到液体种子。按照 5% 的接种量将摇瓶活化的液体种子接种到盛有 4 L 液体培养基的发酵罐中, 发酵液初始 pH 6.7, 通气量 5 L/min, 温度 32℃, 培养 26 小时。采用平板菌落计数法计算培养液中的活菌数 (CFU)。用 pH 计测定发酵液 pH。

1.3 类球红细菌原位 PCR 直接扩增 16S rDNA

使用细菌 16S rDNA 通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, M = C 或 A) 和 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT, Y = C 或 T), 挑取少量类球红细菌菌体作为 DNA 模板, PCR 扩增其 16S rDNA。PCR 反应条件为: 先 95℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后在 72℃ 下延伸 10 min。PCR 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 类球红细菌 16S rDNA 序列分析

将类球红细菌 16S rDNA 的 PCR 产物送交上海生工生物工程技术有限公司测序。将所得序列录入 NCBI 网站的 Blast 程序, 与 GenBank 数据库中已有得序列进行比对。

1.5 类球红细菌在水溶液中降解敌敌畏农药

分别将类球红细菌培养液用无菌水稀释 10 倍、30 倍、50 倍和 100 倍, 取 50 mL 稀释液于 150 mL 三角瓶中, 以高温灭菌的 10 倍稀释的培养液为对照, 分别加入 80% 的敌敌畏乳油, 使敌敌畏的含量为 100 mg/L。在 30℃ 摇床 150 r/min 振荡, 在不同时间取样, 分析敌敌畏的残留量。

1.6 类球红细菌降解白菜叶面上残留的敌敌畏农药

在大田中包心前的大白菜上用 80% 敌敌畏乳油的 1000 倍稀释液均匀喷雾处理, 每 30 棵分成一组, 共 4 组, 2 小时后, 分别喷洒 1.5%、3% 和 5% 类球红细菌培养液, 以喷洒自来水为对照。分别在 24 小时和 48 小时采集白菜叶片, 测定敌敌畏残留量。

1.7 农药残留分析

残留量测定按照国家标准方法 GB/T 5009.20.2003 “食品中有机磷农药残留量的测定”, 进行; 敌敌畏标准品由北京伟业科创科技有限公司提供, 浓度为 100 mg/L。

2 结果和讨论

2.1 类球红细菌生长特性

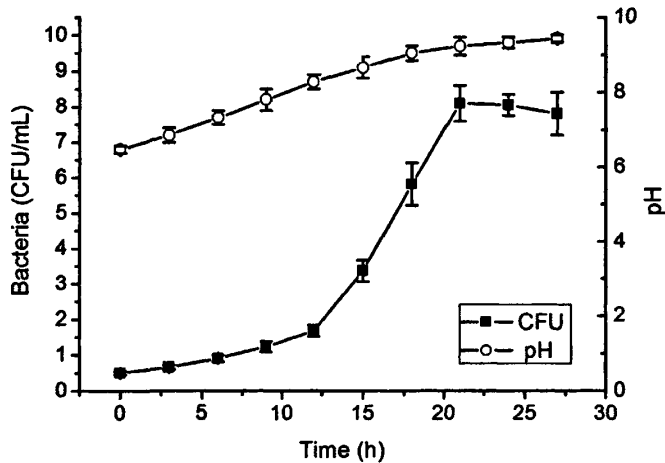


图 1 类球红细菌生长曲线

在发酵罐中, 用液体培养基培养类球红细菌的生长曲线见图 1。结果表明, 在 32℃, 液体培养基中, 培养 21 h 活菌数达到最大浓度 8.1×10^9 CFU/mL, 培养 24 h 后, 活菌数开始降低。而培养基 pH 随培养时间的延长逐渐升高, 从开始 6.8 到 27 小时可达 9.9。可见类球红细菌可以在很宽泛的 pH 条件下生长, 但当 pH 达到 9.5 以上, 活菌数增加缓慢, 甚至降低。因此, 培养过程中控制培养基 pH 可能会进一步增加活菌数浓度。

2.2 类球红细菌 16S rDNA 序列分析

类球红细菌 0645 菌株的 16S rDNA 序列递已交到 GenBank 数据库, 登录号: EU263643。与 GenBank 数据库中已有得序列进行比对, 相似性最高的是 *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17025 菌株, 序列相似性达到 99%。

2.3 类球红细菌在水溶液中降解敌敌畏特性

分别将类球红细菌培养液用无菌水稀释 100 倍(8×10^7 CFU/mL)、50 倍(1.6×10^8 CFU/mL)、30 倍(2.6×10^8 CFU/mL) 和 10 倍 (8×10^8 CFU/mL), 取 50 mL 稀释液于 150 mL 三角瓶中, 以高温灭菌的 10 倍稀释的培养液为对照, 分别加入 80% 的敌敌畏乳油, 使敌敌畏的含量为 100 mg/L。在 30℃ 摇床 150 r/min 振荡, 在不同时间取样, 分析敌敌畏的残留量, 结果见表 1。结果表明类球红细菌 0645 菌株对敌敌畏有高效降解作用。

表 1: 不同浓度类球红细菌水溶液降解敌敌畏特性

类球红细菌浓度 (CFU/mL)	溶液中敌敌畏残留浓度 (mg/L)		
	12 h 培养	24 h 培养	72 h 培养
高压灭菌菌液	96	91	—
0.8×10^8	—	—	0.11
1.6×10^8	—	0.03	—
2.6×10^8	—	0.02	—
8×10^8	0.01	—	—

2.4 类球红细菌降解白菜叶面上残留敌敌畏的特性

为了验证类球红细菌在实际应用中的是否还能发挥高效降解敌敌畏的作用, 我们在白菜上均匀喷洒敌敌畏后, 再喷洒不同浓度的菌液, 不同时间采样测定敌敌畏残留量 (表 2)。

结果表明, 类球红细菌在白菜上也有显著的降解敌敌畏能力, 所测使用浓度的类球红细菌喷洒到白菜叶片上 24 h 后, 敌敌畏残留量都不超国家标准 (0.1 mg/kg), 但是只有最高使用浓度 4×10^8 CFU/mL 类球红细菌处理的白菜能超欧洲标准 (0.02 mg/kg)。24 h 后, 各处理敌敌畏残留都在国家标准内了, 但不用菌处理的白菜还不能达到欧洲标准所控制的残留量。

表 2: 不同浓度类球红细菌降解白菜上的敌敌畏残留特性

类球红细菌浓度 (CFU/mL)	喷菌后不同时间敌敌畏残留量 (mg/kg)		
	0 h	24 h 培养	48 h 培养
0	3.63 ± 0.29	0.27 ± 0.03	0.049 ± 0.06
1.3×10^8	—	0.051 ± 0.05	0.019 ± 0.03
2.6×10^8	—	0.021 ± 0.01	0.011 ± 0.02
4×10^8	—	0.015 ± 0.02	0.011 ± 0.02

3 结论

类球红细菌 0645 能够高效降解水溶液中和白菜叶面上的敌敌畏农药残留, 而且以前的研究表明它还有促进植物生长的作用, 显示出它在无公害农产品生产中的应用潜力。至于该菌株能否降解其他种类的农药, 是否在其他植物叶面也有很好的降解敌敌畏的作用, 及其降解敌敌畏的机理等还有待进一步研究。

类球形红细菌降解敌敌畏特性初步研究

作者: 赵凯, 于影, 王栋, 张洪勋, 白志辉

作者单位: 赵凯(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085 北京科技大学, 北京 100083), 于影, 张洪勋, 白志辉(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085), 王栋(北京中科嘉华高新技术发展有限公司, 北京 100078)

本文读者也读过(10条)

1. 倪锦俊. 徐圣君. 王斌科. 闫海. 白志辉 利用绿色木霉处理甘薯淀粉废水初探[会议论文]-2009
2. 王晓辉. 白志辉. 罗湘南. 孙裕生 低价硫化物微生物电极的研究[会议论文]-1999
3. 李祖明. 荆梦. 谷立坤. 白志辉 碱性果胶酶对油菜叶际微生物群落结构的影响[会议论文]-2009
4. 王玉芬. 张肇铭. 胡筱敏. 杨官娥. 郭凌. WANG Yu-fen. ZHANG Zhao-ming. HU Xiao-min. YANG Guan-e. GUO Ling 氯苯对球形红细菌的毒性效应研究[期刊论文]-安全与环境学报2007, 7(1)
5. 谷立坤. 李文颖. 庄国强. 张洪勋. 白志辉 玉米叶际微生物群落结构多样性初步研究[会议论文]-2009
6. 赵志瑞. 安晓宇. 韩庆莉. 金德才. 侯彦林. 白志辉 水稻种植对黑土微生物群落结构的影响[会议论文]-2010
7. 白志辉. 齐鸿雁. 张洪勋 利用剩余活性污泥生产木霉生防剂初步研究[会议论文]-2006
8. 康铸慧. 王磊. 周琪 不产氧光合细菌Rhodobacter Sphaeroides产氢影响因子的实验研究[会议论文]-2005
9. 王玉芬. 张肇铭. 胡筱敏. 白红娟. 杨官娥. WANG Yu-fen. ZHANG Zhao-ming. HU Xiao-min. BAI Hong-juan. YANG Guan-e 光合细菌球形红细菌厌氧降解氯代苯[期刊论文]-中国环境科学2007, 27(1)
10. 朱春节. 谢秀祯. 王小明. 黄循吟. 覃绪林. Zhu Chunjie. Xie Xiuzhen. Wang Xiaoming. Huang Xunyin. Qin Xulin 利用制胶废水生产5-氨基乙酰丙酸的发酵条件研究[期刊论文]-海南师范大学学报(自然科学版)2008, 21(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Conference_7245499.aspx