

一株甲胺磷高效降解菌——巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的分离及其分子鉴定*

刘文海¹ 邓先余^{1,2} 向言词¹ 邱山红³

(1. 湖南科技大学生命科学学院 湘潭 411201; 2. 湖南湘潭县赛克生态农业有限公司 湘潭 411200;
3. 湖南怀化市第三中学 怀化 418000)

提要 湘潭南天化工厂的甲胺磷废水未经处理直接排放,对湘江及下游的湖泊造成了一定的污染,利用解磷微生物去除江河湖泊中的甲胺磷污染是一条有效的途径。本文作者从被该厂甲胺磷废水污染的湖泊中分离细菌样品,以甲胺磷为唯一碳源和能源,经过定向筛选,得到一株可高效降解甲胺磷的菌株 HN001。气相色谱测定结果表明,此菌株对甲胺磷的降解率在 48h 和 96h 分别为 49.24% 和 98.20%。对其进行了常规生理生化测试,结果表明,该菌株与巨大芽孢杆菌的表型特征非常相似。为了进一步确定 HN001 的分类学地位,测定了其 16S rRNA 基因序列,分析了相关细菌相应序列的同源性,构建了分子系统发生树,结果表明菌株 HN001 与巨大芽孢杆菌的亲缘关系最近。综合上述结果,菌株 HN001 可鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

关键词 甲胺磷, 巨大芽孢杆菌, 降解, 生理生化测试, 16S rRNA 基因
中图分类号 X172

甲胺磷(methamidophos, MAP), 化学名称为 O, S 二甲基胺基硫代磷酸酯, 属剧毒杀虫剂, 对多种害虫有触杀、胃毒和一定的熏蒸作用, 并有一定的内吸传导作用, 残效期长。由于具有以上特点, 甲胺磷一直是我国用量最大的农药品种之一, 每年都在万吨以上(范永仙等, 2002)。甲胺磷除了对害虫有毒杀作用外, 对人、畜和禽类也有高毒性, 我国近 20 年来发生的农药中毒事故大多数集中于高毒有机磷农药, 尤其是甲胺磷(大鼠口服致死剂量为 29.9mg/kg)(肖华胜等, 1995)。甲胺磷被广泛使用的同时也带来了很大的污染问题。在蔬菜、粮食等农产品中, 甲胺磷农药超标是最常见的问题, 每年我国的农副产品因其残留量超标而出口受阻, 造成了巨大的经济损失, 也严重影响了我国的外贸信誉。现在甲胺磷已成为优先监测的十大农药品种之一(芮玉奎等, 2005)。另外, 甲胺磷为间歇式生产产品, 收率为 50% 左右, 大量原料、副

产品进入废水中, 与其它废水相比, 甲胺磷废水具有污染物含量高、毒性强、盐含量高、水质波动大等特点(高明华等, 1999), 给此类废水的治理带来了困难。目前由于缺乏完善的处理技术, 致使大量的甲胺磷废水未得到有效治理就被直接排放, 对下游的江河湖泊及周边环境造成了严重的污染。

广泛分布于土壤、水体、大气及农产品中的甲胺磷残留, 难以利用大规模的工程措施消除污染, 在自然界主要依靠微生物缓慢地进行降解, 但自然环境复杂多变, 影响着微生物的降解效率。因而, 人工筛选或驯化高耐受性的微生物, 再将其释放至自然界, 有助于提高甲胺磷降解的速率。不少学者已对甲胺磷的生物降解进行了较多的研究(李淑彬等, 1999; 钞亚鹏等, 2000; 刘斌斌等, 2001; Molla *et al.*, 1984; Elliot *et al.*, 1987; Kucey, 1987)。但这些工作多集中在解磷效能和生理生化特征上, 缺乏 16S rRNA 基因序列等

* 国家“863”计划资助项目, 2005AA219040 号; 湖南科技大学博士基金资助项目, E50437 号。刘文海, 实验师, E-mail: liuwenhai335@126.com

通讯作者: 邓先余, 博士, 副教授, E-mail: dengxy1008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-11-30, 收修改稿日期: 2008-02-21

分子生物学特征分析。作者从严重污染湘江的湘潭南天化工厂的甲胺磷生产车间排污渠污染的一湖泊中分离筛选得到了一株能高效降解甲胺磷的菌株,进行了对甲胺磷、pH 值和温度等因子的耐受性实验,同时对其生理生化特征和分子生物学特征进行分析,鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 培养基

1.1.1 甲胺磷选择培养基 NaNO_3 2g, KCl 0.15g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, CaCl_2 0.04g, 水 1000ml, 调 pH 为 7.0, 121 °C 下灭菌 20min。加入甲胺磷适量。

1.1.2 甲胺磷固体选择培养基 NaNO_3 2g, KCl 0.15g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, CaCl_2 0.04g, 琼脂 20g, 水 1000ml, 调 pH 为 7.0, 121 °C 下灭菌 20min。加入甲胺磷适量。

1.2 试剂

50%甲胺磷乳剂, 购于湘潭南天化工厂; *Taq* DNA 聚合酶, dNTPs, 购自 Takara 公司; DNA 胶回收试剂盒由湖南科技大学肖璐博士惠赠。

1.3 样品的采集

土样和水样取自湘潭南天化工厂甲胺磷生产车间的排污渠污染的一小型湖泊的沼泽地带。

1.4 菌株的分离与定向筛选

取土样 2.0g 放入装有 100ml 富集培养基的 250 ml 三角瓶中, 其中甲胺磷浓度为 500 mg/L, 置于 30 °C、180 r/min 摇床培养, 以后每周移种 1 次, 取 200 μl 接入 5 ml 新鲜培养液中, 并逐渐提高甲胺磷浓度, 至培养液中的甲胺磷浓度达到 1000 mg/L。以后用基础培养基, 每隔 1 周移种 1 次, 甲胺磷浓度仍是 1000mg/L。如此驯化培养 4 周以上, 最后用平板划线, 在普通培养基上对长出的菌落进行纯种分离, 得到纯菌种, 并转入普通培养基斜面上。

1.5 菌株对甲胺磷降解率的测定

参照张德咏等(2005)的方法, 略作修改。以目标农药甲胺磷作为唯一的碳源和能源, 配制含有目标农药的 1000 mg/L 培养液, 接种菌液 1 ml 于 125 ml 的培养液中, 置于 30 °C、180 r/min 摇床培养, 同时设有不接种菌的空白对照和只接种菌而不加农药的对照, 以消除水解和光解等因素引起目标农药减少的影响, 在与前述条件相同的培养条件下, 分别于培养后 48 h 和 96 h, 取样用 GC9800 型气相色谱仪(由浙

江大学智能信息工程研究所生产)测定细菌对目标农药的降解率。

气相色谱测定条件为

(1) 进样口: 分流/不分流进样口温度 200 °C; 不分流。(2) 柱温采用程序升温: 在 120 °C 时停留 2min, 然后每 10min 升高 10 °C, 直到 200 °C, 并保持 30min。(3) 检测器: 氢火焰检测器(FID), 200 °C。(4) 载气: 氮气, 线速度 20ml/min; 空气, 线速度 260ml/min; 氢气, 线速度 20ml/min。

1.6 耐受性测定

1.6.1 菌株对甲胺磷的耐受性测定 将分离得到的纯菌接种到甲胺磷浓度为 1000mg/L 的液体培养基中, 置 30 °C、180r/min 摇床培养, 以后每周移种 1 次, 取 200 μl 接入 5ml 新鲜培养液中, 每次将培养基的甲胺磷浓度提高 3 倍, 同时取 100 μl 在相同甲胺磷浓度的平板上涂布, 重复 3 次, 培养 5—7 天, 记录甲胺磷浓度及菌落生长存活情况并保种, 直至平板上无菌落长出。每次实验设置 3 个重复。

1.6.2 对温度的耐受性测定 将菌株接种于甲胺磷固体培养基上, 于 4、10、15、20、25、30、37、40、42、45 °C 不同温度梯度下培养, 观察一周, 与未接种的空白培养基对比, 记录生长情况。每次实验设置 3 个重复。

1.6.3 对 pH 值的耐受性测定 将菌株分别接种于 pH 1.0—14 的甲胺磷固体培养基中, 30 °C 培养, 观察一周, 与未接种的对照平板对比, 记录其生长的 pH 范围。每次实验设置 3 个重复。

1.7 生化特征测试

参照《伯杰鉴定细菌学手册》(第 9 版)(Holt *et al.*, 1994)和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)等相关文献, 按常规方法鉴定菌株的生理生化特性和糖醇发酵特性, 以标准菌株为对照进行系统鉴定。

1.8 16S rRNA 基因序列测定和分析

1.8.1 PCR 模板 DNA 的制备 将细菌接种在平板上, 30 °C 培养过夜。取单一菌落悬浮于 50 μl 无菌蒸馏水中, 于 100 °C 水浴加热 5min, 2000r/min 离心 2min, 取上清作为 PCR 模板 DNA。

1.8.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序 扩增 16S rRNA 基因的正向引物为 F: 5'-AGAGTTTGA TC(C/A)TGGCTCAG-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 8—27 个碱基位置), 反向引物为 R: 5'-TACGG (C/T)TACCTTGTTACGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492—1510 个碱基位置)。50 μl PCR

反应体系内含: 3.0 μl 10 \times buffer [100mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 500mmol/L KCl, MgCl₂ 15mmol/L, 1% Triton-X100], 引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 各 250 $\mu\text{mol/L}$, Taq DNA 聚合酶 2 U, 模板 DNA 约 50ng。反应在热循环仪上进行, 循环参数为: 94 5min; 94 60s, 55 45s, 72 90s, 循环 35 次; 72 延伸 10min。反应完毕分别取 6 μl 进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下分析结果。PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统(成都元太公司生产)纯化后, 直接交由上海生物工程技术公司进行序列测定。

1.8.3 序列分析及数据处理 利用 BLAST 在线同源性查询软件查询所测菌株 HN001 的 16S rRNA 基因序列的属性, 将其与从 Genbank 数据库中获得的芽孢杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列, 采用 Clustal W1.8 软件进行多序列匹配排列(Multiple Alignments), 用系统发生推断软件包 MEGA 3.1 进行系统发育分析。在 Kimura-2-parameter 模型的基础上, 用 Neighbor-joining 法构建分子系统树, 自举分析(Bootstrap)1000 次重复检测分子系统树的置信度, 缺失和不确定的位点在计算中被省略。

1.8.4 核酸序列登录号(Accession number) 用于构建分子系统树的其它相关菌株的数据与登录号见文中(图 2)。

2 结果

2.1 菌株的分离结果

经分离和定向筛选获得 1 株生长良好的菌株, 菌株号为 HN001。于甲胺磷固体培养基上培养, 菌落为淡黄色, 边缘整齐, 表面光滑, 凸状隆起。菌体呈杆状, 大小为(1.0—1.2) μm \times (1.2—3.0) μm , 革兰氏和芽孢染色均为阳性, 芽孢为椭圆形, 孢囊不膨大。

2.2 降解率测定

气相色谱测定结果表明, 菌株 HN001 经 30、180r/min 摇床培养后 48h 和 96h 后, 对甲胺磷的平均降解效率分别达到 49.24%和 98.20%。

2.3 耐受性测定

对甲胺磷的耐受性测定 经过 2 个多月的连续摇床及平板涂布培养, 发现菌株 HN001 在甲胺磷浓度为 15000mg/L 的平板上有 5—10 个菌落生长, 而在甲胺磷浓度为 45000mg/L 的平板上未有菌落长出, 因此可以大致判断菌株 HN001 对甲胺磷最大耐受浓度为 15000—45000mg/L 之间。

对温度的耐受性测定 菌株 HN001 在 20—

37 范围生长旺盛, 在 10 以下和 42 以上不生长(但移至 10—37 的环境中又能生长)。

对 pH 的耐受性测定 菌株 HN001 在 pH 3.0—14.0 范围内均能生长, 在低于 pH 2.0 下不生长(但移至 pH 3.0—14.0 范围的培养基上又能重新生长), 而在 pH 值中性时或弱碱性时生长较旺盛。

2.4 生化特征测试

常规生化测试表明, 菌株 HN001 的卵黄反应、吲哚试验及 V-P 测定均为阴性, 接触酶阳性, 从葡萄糖和甘露醇产酸, 利用柠檬酸盐, 淀粉和酪蛋白水解, 在 7.5% NaCl 生长。根据这些特征, 初步判断该菌为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

2.5 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增与测序结果

为了进一步确定菌株 HN001 的分类学位置, 测定了其 16S rRNA 基因序列。包括引物结合区, 所获得的 16S rRNA 基因序列长度为 1515bp。图 1 列出了 HN001 的 16S rRNA 基因序列。

将 HN001 的 16S rRNA 基因在 NCBI 中进行同源性检索, 发现 HN001 与芽孢杆菌属的 16S rRNA 序列自然聚类。在最相近的 100 个序列中, 芽孢杆菌占 90%, HN001 与它们的同源性为 96%—99.5%; 10% 的菌株为假芽孢杆菌(*Paenibacillus*), HN001 与它们的同源性为 90%—95%。从 100 个序列中选取 29 个菌株的 16S rRNA 基因序列, 并选取相近属的多粘假芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* (AM062684)作外群进行分子系统发育分析, 结果如图 2 所示。HN001 与巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* (DQ462195)聚成一分支, 二者遗传距离为 0.001, 序列相似性达 99.5%, 表明 HN001 与巨大芽孢杆菌的亲缘关系最近。

3 讨论

近年来, 随着工农业的发展以及环保措施的相对滞后, 我国的水污染情况日益严重, 大面积的绿藻、蓝藻在太湖、滇池等湖泊时有暴发, 水质严重恶化的事件频频发生, 引起人们的广泛关注。有机磷在湖泊中的富集是引起上述藻类暴发的主要原因之一(黄清辉等, 2003)。有机磷化工厂生产的甲胺磷、敌敌畏、乐果等农药的滥用和废水的任意排放是造成江河湖泊富磷化的重要原因之一。如何治理甲胺磷等有机磷农药污染是一个严峻的课题。许多研究表明, 利用解磷微生物来治理甲胺磷污染是一条有效的途径(范永仙等, 2002)。

已有研究表明, 分解甲胺磷的微生物主要有细

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGAT
 TTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG
 ACTGGGATAAAGCTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATTG
 AAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
 CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTA
 ACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCT
 GATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAG
 AAAAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTANAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC
 GGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
 GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA
 ACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACAT
 CCTCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA
 GCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
 ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGAC
 CGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG
 AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
 CCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGC
 CTAAGGTGTTCCAGAAATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTA

图 1 HN001 菌株的 16S rDNA 序列

Fig.1 The sequence of 16S rDNA of strain HN001

菌、放线菌、酵母、霉菌等, 尤以细菌为多(范永仙等, 2002)。目前, 已报道的可降解甲胺磷细菌主要有芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)等(范永仙等, 2002)。

本文中从湘潭南天化工厂的甲胺磷废水和污泥中分离细菌样品, 以甲胺磷为唯一碳源和能源, 经过定向筛选得到 1 株可高效降解甲胺磷的菌株 HN001。常规生理生化测试结果表明, 该菌株革兰氏和芽孢染色均为阳性, 芽孢为椭圆形; 卵黄反应、吲哚试验及 V-P 测定均为阴性, 接触酶阳性, 从葡萄糖和甘露醇产酸, 利用柠檬酸盐, 淀粉和酪蛋白水解, 在 7.5% NaCl 生长, 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的表型特征非常相似。从 16S rRNA 基因序列相似性和系统发育树上, 菌株 HN001 与巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* 聚成一支, 具有最高(99.5%)的序列相似性, 表明 HN001 与巨大芽孢杆菌的亲缘关系最近。

综上所述, 从形态、生理生化、系统发育学、16S rRNA 基因序列同源性等方面分析, 菌株 HN001 可鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

巨大芽孢杆菌多分布在土壤中, 是自然界中降解磷的主要菌种之一, 有关此菌对有机磷降解作用的研究开展得较少。最早的报道为前苏联科学家孟基娜于 1935 年从土壤中分离一种解磷巨大芽孢杆菌(*B. megaterium* var. *phosphaticum*)能分解核酸和卵磷脂, 并于 1947 年大量生产使用, 接种于土壤中能提高土壤有效磷含量(王光华等, 2003)。我国对解磷菌的研究始于 1950 年, 前东北农业科学研究所从东北黑土和灰化土中分离出能分解有机磷的巨大芽孢杆菌(王光华等, 2003), 但这些研究大都停留在肥效试验上, 基础性研究并不多。近年来, 国内少数学者相继报道了一些可降解卵磷脂等有机磷的巨大芽孢杆菌(郑传进等, 2002; 朱长俊等, 2005), 但多集中在解磷效能上, 缺乏细致的生理生化鉴定和 16S rRNA 基因等分

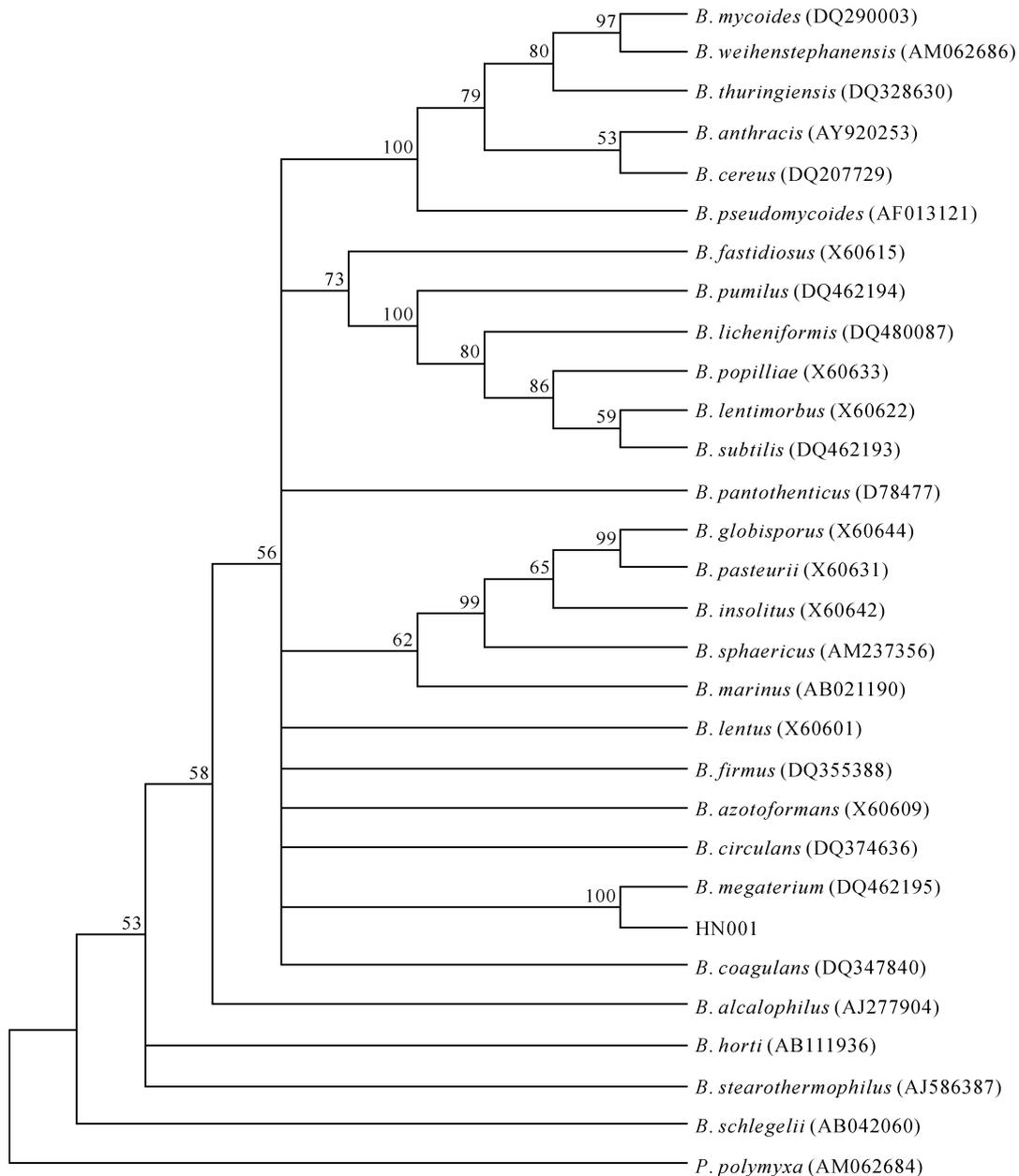


图2 16S rRNA 基因序列分析聚类结果

Fig.2 The molecular phylogenetic tree of strain HN001 based on 16S rDNA sequences

注: 分支上的数字为 1000 次重复抽样检测的 bootstrap 值, 括号内字母及数字为序列在 GenBank 中的登录号,

P. polymyxa = *Paenibacillus polymyxa*

子生物学特征分析。本文在国内首次报道了从甲胺磷废水和污泥中分离出高效降解甲胺磷的 *Bacillus megaterium*, 并辅以 16S rRNA 基因序列分析之佐证。

经测定, 发现菌株 HN001 对甲胺磷的降解率在 48h 和 96h 分别为 49.24% 和 98.20%, 远高于张德咏等 (2005) 报道的光合细菌 HP-1 对甲胺磷的降解能力 (后者在同等培养条件下培养 7 天时对甲胺磷的降解率为 49.60%)。另外, 经 2 个多月的定向诱导, 菌株

HN001 对甲胺磷最大耐受浓度为 15000—45000mg/L, 也高于张德咏等 (2005) 报道的菌株 HP-1 对甲胺磷的耐受能力 (后者对甲胺磷最大耐受浓度为 8000—10000mg/L), 更远远高于农业生产所使用的甲胺磷浓度剂量。菌株 HN001 对 pH 值和温度的适应范围也很广, 虽然不能在强酸 (pH < 2.0)、低温 (10) 和高温 (42) 条件下生长, 但可以借大量产生芽孢度过恶劣环境。因此菌株 HN001 具有很好的应用前景, 有

望被改良构建成甲胺磷高效降解工程菌株。

致谢 湖南科技大学化学化工学院邓谦教授、蔡铁军副教授提供气相色谱仪, 硕士生李辛玉和本科生丁兰帮助进行气相色谱分析, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王光华, 赵 英, 周德瑞等, 2003. 解磷菌的研究现状与展望. 生态环境, 12(1): 96—101
- 东秀珠, 蔡妙英编著, 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 62—65
- 朱长俊, 潘彦平, 2005. 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)解磷机理的研究(1)——解磷能力与磷素影响. 嘉兴学院学报, 17(3): 60—62
- 刘斌斌, 赵永芳, 钞亚鹏等, 2001. 鲁氏酵母菌 WY-3 降解甲胺磷的性能. 环境科学, 22(4): 37—41
- 芮玉奎, 黄昆仑, 郭 晶等, 2005. 一种快速检测甲胺磷的方法. 安全与环境学报, 5(2): 40—42
- 李淑彬, 钟英长, 1999. 固定化假单胞菌降解甲胺磷的研究. 应用与环境生物学报, 5(4): 422—426
- 肖华胜, 王银善, 1995. 假单胞菌 WS-5 的分离及降解甲胺磷某些性质的研究. 中国环境科学, 15(6): 464—469
- 张德咏, 谭新球, 罗香文等, 2005. 一株能降解有机磷农药甲胺磷的光合细菌 HP-1 的分离及生物学特性的研究. 生命科学研究, 9(3): 247—253
- 范永仙, 陈小龙, 姜晓平等, 2002. 甲胺磷农药的生物降解研究进展. 微生物学杂志, 22(3): 45—50
- 郑传进, 黄 林, 龚 明, 2002. 巨大芽孢杆菌解磷能力的研究. 江西农业大学学报(自然科学版), 24(2): 190—192
- 钞亚鹏, 赵永芳, 刘斌斌等, 2000. 甲基营养菌 WB-1 甲胺磷降解酶的产生、部分纯化及性质. 微生物学报, 40(5): 523—527
- 高明华, 梁载琪, 周湘梅, 1999. 甲胺磷生产废水处理试验研究. 化工环保, 19(2): 69—74
- 黄清辉, 王东红, 王春霞等, 2003. 沉积物中磷形态与湖泊富营养化的关系. 中国环境科学, 23(6): 583—586
- Elliot J M, Mathre D E, Sand D C, 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. Appl Environ Microbiol, 53: 2793—2799
- Holt J G, Krieg N G, Sneath P H A *et al*, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition. Baltimore: Williams and Wilkins, 786—788
- Kucey R M N, 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaii* strain and with Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungi. Appl Environ Micro, 53(12): 2699—2703
- Molla M A Z, Chowdhury A A, 1984. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. Plant and Soil, 78: 393—399

BACILLUS MEGATERIUM, AN EFFICIENT BIODEGRADER TO METHAMIDOPHOS: ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION

LIU Wen-Hai¹, DENG Xian-Yu^{1,2}, XIANG Yan-Ci¹, QIU Shan-Hong³

(1. School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, 411201; 2. Cycle Eco-Agriculture Company Ltd., Xiangtan County, Xiangtan, 411200; 3. No.3 Middle School of Huaihua City, Huaihua, 418000)

Abstract A bacteria strain HN001 showing efficient biodegrading ability to methamidophos was isolated and purified from methamidophos-polluted sludge from a local chemical factory discharge in Hunan Province. The methamidophos-degrading rate of this strain determined in gas-chromatography reached 49.24% and 98.20% in 48h and 96h, respectively. The strain is very similar to *Bacillus megaterium* in most of the phenotypes in traditional physiological and biochemical aspects, as well as in molecular phylogenetic dendrogram built from 1515bp 16S rRNA gene sequence with which those of related strains were compared. Therefore, strain HN001 was identified as *B. megaterium*.

Key words Methamidophos, *Bacillus megaterium*, Degradation, Physiological and biochemical tests, 16S rRNA gene