

^{31}P NMR 与 HPLC 联用筛选高效有机磷降解细菌*

路 杨¹ 倪 锋¹ 许鹏翔¹ 王建峰¹ 胡利明¹ 赵玉芬^{1, 2}

(1 厦门大学化学系, 化学生物学福建省重点实验室, 厦门, 361005;

2 清华大学化学系, 生命有机磷化学与化学生物学教育部重点实验室, 北京, 100084)

摘 要 从有机磷农药污染地区分离到 14 株具有高效甲胺磷降解活力的细菌, 并用 HPLC 对其降解效率进行分析, 发现一周内降解率最高达 74%。采用 ^{31}P NMR 对其降解产物进行了同步监测, 发现其降解产物不同, 其中有三株可以把甲胺磷代谢成磷酸。这三株降解细菌可以从环境中有效的清除有机磷的污染。

关键词 甲胺磷, 降解, HPLC, ^{31}P NMR.

甲胺磷(methamidophos, MAP) 化学名称为 O,S-二甲基硫赶磷酰胺。是一种高效广谱的杀虫剂, 其在水体、土壤中的累积对生态环境和人类健康造成很大的威胁。从污染环境中筛选高效实用的降解菌株, 在解除甲胺磷污染的同时, 清除水环境中的有机磷, 防止水体的富营养化^[1, 2]。

本文采用 ^{31}P NMR 与 HPLC 联用技术, 从有机磷农药污染环境中筛选出高效的降解菌, 同时对不同菌株的降解产物进行监测。

1 实验部分

1.1 菌株的采集

菌株采集于福建省三明市沙溪污染河段及农药厂: (1) 三化总口污泥, (2) 渣厂 NaCl 堆积池污泥, (3) 生化池一级及二级池混合污水, (4) 黄磷口污水, (5) 生化池污泥, (6) 渣厂渗滤液。

基础培养基: NaCl 0.2g, KCl 0.2g, 无水 MgSO_4 0.2g, NH_4NO_3 1.0g, 纯净水 1000ml **富集培养基:** 在 1000ml 基础培养基中, 加入酵母膏 5g, NaCl 5g, 胰化蛋白胨 10g, LB 固体培养基。

1.2 菌株的分离

取土样 5g, 水样 10ml, 分别接种到 80ml 甲胺磷浓度为 $100\text{mg} \cdot \Gamma^{-1}$ 的基础培养基 (pH7.0) 中, 置于 $120\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中培养 (35°C)。一周后, 取 10ml 接入 90ml 甲胺磷浓度为 $200\text{mg} \cdot \Gamma^{-1}$ 的基础培养基中。以后每一周移种一次, 依次在 $400, 800\text{mg} \cdot \Gamma^{-1}$ 的浓度下再培养一周。在含有 $800\text{mg} \cdot \Gamma^{-1}$ 甲胺磷的 LB 固体培养基上涂布菌液, 35°C 温箱中培养一夜, 再划线培养, 直至挑出单菌落^[3, 4]。

1.3 甲胺磷降解率的检测

将单菌落接种入装有 5ml 富集培养基 (pH7.0, 甲胺磷含量为 $500\text{mg} \cdot \Gamma^{-1}$) 的螺口试管, 置于 $120\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中培养一夜 (35°C)。每株按照 10% 的接种量, 接入甲胺磷含量为 $2000\text{mg} \cdot \Gamma^{-1}$ 的基础培养基中, 置于 35°C , $120\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中培养。每 3—4d 取 1ml 菌液, 离心 ($12 \times 1000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10min。取上清液分别用于 HPLC Varian Prostar 210 高效液相色谱仪及 ^{31}P NMR Varian UNITY+ 500 核磁共振仪检测。HPLC 条件:^[5] C_{18} 色谱柱 ($150 \times 4.6\text{mm}$); 流动相为 20% 甲醇-80% 水; 流速 $0.8\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测范围 210nm—300nm, 检测波长为 215nm。根据以下公式计算甲胺磷的降解率。

$$\text{降解率} = \frac{S_0 - S_n}{S_0} \times \frac{C_n - C_0}{C_0} \times 100\%$$

式中, S_0 : 降解菌培养液中甲胺磷的起始浓度, S_n : 降解菌培养液培养 n 天时甲胺磷的浓度, C_n : 培养 n 天时对照组甲胺磷的浓度, C_0 : 对照组甲胺磷的起始浓度。

2004 年 3 月 4 日收稿。

* 福建省重大科技项目——福建沙溪微生物资源在环境保护和药物开发中的利用(2000h011)。

2 结果与讨论

2.1 甲胺磷降解率的测定

根据菌落外观以及采样地点的不同共挑取 14 株菌落. 其中 1 号采样点 4 株, 2 号 1 株, 3 号、4 号和 5 号采样点各 3 株, 6 号采样点盐度极高没有发现菌落. 测定 14 株细菌在 2 周内对于甲胺磷的降解速率. 试验结果表明, 这 14 株甲胺磷降解细菌对于甲胺磷的降解效能都比较高, 在培养 4, 7, 11, 14 d 后, 对甲胺磷的平均降解率分别为 42.7%, 67.6%, 81.1% 和 85.9% (表 1).

由表 1 可见, 在生化池一级及二级池混合污水(3 号)中分离出的菌株 C3b-H 的降解率最高, 一周的降解率为 74%, 两周后达到约 90%. 可见较高的农药压力, 驯化出了更高效的农药降解菌株.

表 1 14 株细菌对甲胺磷的降解

Table 1 degradation rate of 14 stains in 14 days

菌株	0d		4d		7d		11d		14d	
	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	降解率 (%)	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	降解率 (%)	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	降解率 (%)	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	降解率 (%)	
CON	499.5	517.7		527.7		559.0		569.8		
C1'	443.4	283	38.4	157.8	66.3	85.4	82.8	63.0	87.5	
C1''	465.2	291.2	39.6	165.9	66.2	101.5	80.5	78.1	85.3	
C1⊙	497.8	277.8	46.1	156.4	70.2	103.2	81.5	88.1	84.5	
C1-B	505.5	303.3	42.1	186.3	65.1	123.1	78.2	85.7	85.1	
C2	497.8	287	44.4	176.8	66.4	111.9	79.9	99	82.6	
C3	506.0	304.6	39.8	189.1	64.6	98.3	82.6	72.8	87.4	
C3b-H	480.1	261.1	47.5	131.9	74.0	74.9	86.0	56.8	89.6	
C3b-B	480.1	291	41.5	165.9	67.2	126.5	76.4	72.8	86.7	
C4	461.4	304.6	36.2	164.6	66.2	118.5	77.0	95.5	81.8	
C4'	503.2	287.5	55.1	179.5	66.2	100.4	82.1	78.3	86.4	
C4''	481.4	307.4	38.5	163.2	67.9	101.2	81.2	74.8	86.4	
C5	492.3	280	45.1	164.6	71.8	98.5	82.1	72.4	87.1	
C5''	480.1	289.7	41.8	165.9	67.2	91.0	83.1	67.9	87.6	
C5⊙	496.4	300	41.7	171.4	67.3	103.2	81.4	89.4	84.2	
平均值	485.1	290.1	42.7	167.1	67.6	102.7	81.1	78.1	85.9	

2.2 磷谱结果分析

对样品进行同步磷谱分析, 随着甲胺磷峰面积的减弱, 甲胺磷在 42.6 ppm 处的峰也逐渐减弱, 并向高场漂移, 在约 24ppm, 10ppm 和 1ppm 处出现新的峰. 不同菌株降解甲胺磷后产物磷谱峰不完全相同, 根据其产物的不同 14 株菌株可分为 3 种类型(A, B, C). 降解两周后的核磁结果见图 1.

在降解率相似的情况下, 属于 A 组的菌株把甲胺磷的 P-N, P-O 和 P-S 键都打断了, 使之完全降解为磷酸根, 而 B 组降解菌虽然可以打断所有被降解甲胺磷分子的 P-O 和 P-S 键, 但是还有部分分子的 P-N 键尚未打断, C 组降解菌则只能打断所有被降解甲胺磷分子的 P-O 键, 大量分子的 P-S 键, P-N 键尚未被打断. 由于含有 P-S, P-N 键的化合物一般毒性较强, 因此, 在降解效能相差不大的情况下, A 组菌株的应用价值显然大于 B, C 两组^[1,7,8].

具体产物如图 1 所示. 这一结果同时证明所用细菌对甲胺磷浓度降低所起的作用不是简单的表面吸附作用, 而是不同程度地打断甲胺磷的 P-N, P-O 和 P-S 键, 对其进行降解.

3 小结

在本实验中, 从长期受到甲胺磷污染的地区筛选出了 14 株具有甲胺磷耐受能力的细菌, 通过 HPLC 检测, 发现其对甲胺磷都具有较高的降解能力, 并且通过磷谱的同步检测发现, 这 14 株降解

细菌虽然降解能力差别不大,但是在相同时间内对甲胺磷分子的降解产物存在着区别,其中A组菌株在降解过程中可以打断全部所降解甲胺磷分子的P—N, P—O和P—S键,将其降解为无毒的磷酸根形式。在实际应用中,这类菌株的应用价值显然大于B组和C组的菌株。这一结果同时证明所用细菌对甲胺磷浓度降低所起的作用不是简单的表面吸附作用。

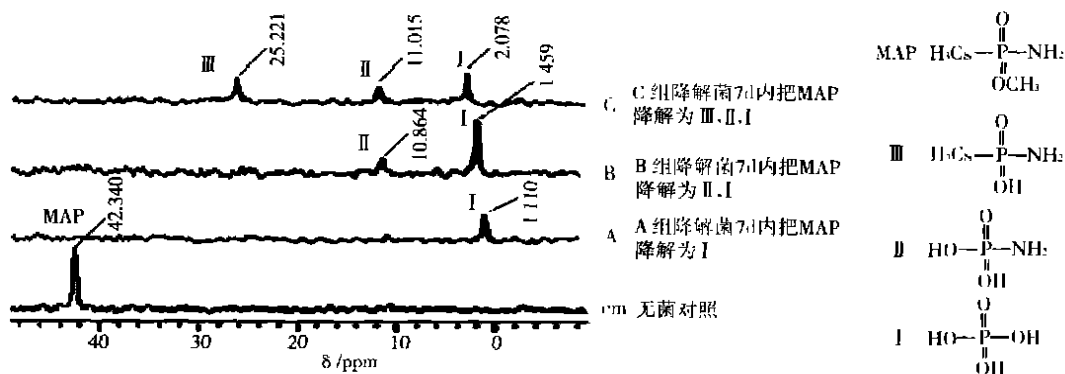


图1 甲胺磷经过三组细菌降解两周后的磷谱结果

Fig 1 ^{31}P NMR traced the MAP degraded results after 2 weeks degraded by 3 groups bacteria

参考文献

- [1] 范永仙, 陈小龙, 姜晓平等, 甲胺磷农药的生物降解研究进展, 微生物学杂志, 2002, 22(3): 45—50
- [2] 陈茹玉, 刘纶祖, 有机磷农药化学. 上海: 上海科学技术出版社, 1995, 117—120
- [3] Schie P M, Young L Y, Isolation Characterization of Phenol-Degrading Denitrifying Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 2432—2438
- [4] 张兰英, 林学钰, 李慧芳等, 地下水中阿特拉津降解菌种的筛选及其降解实验, 环境化学, 2002, 21(5): 490—493
- [5] Henry K R, 张卓勇, 赵进英等, 环境水中甲基对硫磷、对硫磷和辛硫磷农药残留的 SPE-HPLC 分析, 分析测试学报, 2002, (5): 50—53
- [6] 刘新, 尤民生, 廖金英等, 甲胺磷降解细菌的分离以及降解活力的测定, 武夷科学, 2001, 17: 1001—1026
- [7] David G Gorenstein, Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications, Orlando, Fla.: Academic Press, 1984
- [8] 江藤守总, 有机磷农药的有机化学与生物化学. 北京: 化学工业出版社, 1981, 56—58

^{31}P NMR AND HPLC TO SCREEN AND TRACE THE DEGRADATION OF METHAMIDOPHOS (MAP) BY BACTERIA

LU Yang¹ NI Feng¹ XU Peng-xiang¹ WANG Jian-feng¹ HU Li-ming¹ ZHAO Yu-fen^{1,2}

(1 Department of Chemistry and The Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, 361005; 2 The Key Laboratory for Bioorganic Phosphorus Chemistry, Ministry of Education, Department of Chemistry School of Life Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing, 100084)

ABSTRACT

HPLC is the fastest and most accurate technique in the analysis of organic phosphorus pesticides (OPPs) at present. HPLC showed that there were 14 strains bacteria able to degrade the methamidophos (MAP) and the highest degradation rate was 90% after 14 days. The results tracked by ^{31}P NMR showed that there were 3 strains able to degrade MAP into phosphoric acid through breaking all of the P—N, P—O and P—S bonds in 14 days. Accordingly, these strains can be utilized to remove OPPs pollutions.

Keywords: methamidophos, degradation, HPLC, ^{31}P NMR.