

一株甲胺磷高效降解菌——巴氏葡萄球菌 (*Staphylococcus pasteurii*) 的筛选及其分子鉴定*

邓先余^{1,2} 高 健¹ 谭树华¹ 向言词¹

(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)

提要 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 HN003, 气相色谱测定其对甲胺磷的平均降解效率在 24h、48h 和 72h 分别达到 45.8%、88.5% 和 100%。对其进行常规生理生化测试, 结果表明, 菌株 HN003 革兰氏染色为阳性, 在 10—42 ℃、pH 3.0—pH 14.0 范围内均能生长, 并与巴氏葡萄球菌的表型特征非常相似。为了进一步确定 HN003 的分类学地位, 测定了其 16S rRNA 基因序列(1541bp), 分析了相关细菌相应序列的同源性, 构建了分子系统发育树, 结果表明, 菌株 HN003 与巴氏葡萄球菌的亲缘关系最近。综合上述结果, 菌株 HN003 可鉴定为巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)。

关键词 甲胺磷, 巴氏葡萄球菌, 降解, 生理生化测试, 16S rRNA 基因

中图分类号 X172

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、洞庭湖等湖泊时有暴发, 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污染及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)。

自 20 世纪 50 年代以来, 中外不少学者已对甲胺磷的微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微生物(主要是细菌和真菌)的解磷效能和生理生化特征上, 缺乏 16S rRNA 或 18S rRNA 基因等分子生物学特征分析。作者在湘江湘潭段进行有机磷污染调研时, 发现湘潭南天化工厂的甲胺磷生产车间废水未

经处理, 直接排放而严重污染湘江。从该车间排污渠污染的一小型湖泊的沼泽地带土壤和水样中分离筛选得到了一株能高效降解甲胺磷的菌株 HN003, 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, 鉴定为巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*), 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 NaNO₃ 2g, KCl 0.15g, MgSO₄·7H₂O 0.02g, CaCl₂ 0.04g, 水 1000ml, 调 pH 为 7.0, 121 ℃ 下灭菌 20min。加入甲胺磷适量。

1.1.2 甲胺磷固体选择培养基 NaNO₃ 2g, KCl 0.15g, MgSO₄·7H₂O 0.02g, CaCl₂ 0.04g, 琼脂 20g, 水 1000ml, 调 pH 为 7.0, 121 ℃ 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*

* 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。邓先余, 博士, 副教授, E-mail: dengxy1008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-17, 收修改稿日期: 2008-07-22

DNA 聚合酶, dNTPs, 购自 Takara 公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程技术公司。

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

取土样和水样混合物 2.0g 放入装有 100ml 富集培养基的 250ml 三角瓶中, 其中甲胺磷浓度为 500 mg/L, 置于 30 °C、180r/min 摇床培养, 以后每周移种 1 次, 取 200 μ l 接入 5ml 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 1000mg/L 培养液, 接种菌液 1ml 于 125ml 的培养液中, 置于 30 °C、180r/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 48h 和 96h, 取样用 GC9800 型气相色谱仪(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 (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 将分离得到的纯菌种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 μ l 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 μ l 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 μ l 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'-TACG G(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3' (对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 1492—1510 个碱基位置)。50 μ l PCR 反应体系内含: 3.0 μ l 10 \times buffer [100mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 500mmol/L KCl, MgCl₂ 15mmol/L, 1% Triton-X100], 引物各 0.5 μ mol/L, dNTPs 各 250 μ 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 °C 5min; 94 °C 60s, 55 °C 45s, 72 °C 90s, 循环 35 次; 72 °C 延伸 10min。反应完毕分别取 6 μ l 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 HN003 的 16S rRNA 序列的属性, 将其与从 GenBank 数据库中获得葡萄球菌属细菌的 16S rRNA, 采用 Clustal W1.8 软件进行多序列匹配排列(Multiple Alignments), 用系统发育推断软件包 MEGA4.1 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。本文所测的序列在 GenBank 的序列登录号为 EU256493。

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 HN003。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。菌体呈球状, 直径约为 0.5—1.5 μm , 革兰氏阳性, 无芽孢。

2.2 降解率测定

气相色谱测定结果表明, 菌株 HN003 经 30 , 180r/min 摇床培养后 24h、48h 和 72h 后, 对甲胺磷的平均降解效率分别达到 45.8%、88.5%和 100%。

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 HN003 在甲胺磷浓度为 40000mg/L 的平板上经 48h 培养后有 7—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 HN003 对甲胺磷最大耐受浓度为 40000—45000mg/L 之间。

对温度的耐受性测定 菌株 HN003 在 10—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 值的耐受性测定 菌株 HN003 在 pH 3.0

—pH 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—pH 14.0 范围的培养基上又能重新生长), 而在 pH 值中性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 HN003 为革兰氏阳性, 不运动, 无芽孢。兼性厌氧。产类胡萝卜素, 因此菌落不透明, 为淡黄色。氧化酶阴性。不还原硝酸盐。V.P 测定为阳性; 接触酶阳性, 利用麦芽糖、蔗糖、半乳糖和甘露醇产酸, 木糖、木糖醇和阿拉伯糖不产酸。对葡糖苷酶和葡糖苷酸酶敏感, 在 10% NaCl 生长旺盛。根据这些特征, 初步判断该菌为巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)。

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 HN003 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 1541bp。图 1 列出了 HN003 的 16S rRNA 基因序列。

将 HN003 的 16S rRNA 基因在 NCBI 中进行同源性检索, 发现 HN003 与葡萄球菌属细菌的 16S rRNA 序列自然聚类。在最相近的 100 个序列中, 葡萄球菌属细菌占 100%, HN003 与它们的同源性为 95.3%—99.8%; 从 100 个序列中选取 10 个已经鉴定到种的菌株的 16S rRNA 基因序列进行分子系统发育分析, 结果如图 2 所示: HN003 与巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*) (EF127830)聚成一分支, 二者遗传距离小于 0.001, 序列相似性达 99.8%, 表明 HN003 与巴氏葡萄球菌的亲缘关系最近, 并且自举分析的置信度百分比值达到 97, 表明结果非常可靠。

```

tgatcctggctcaggatgaacgctggcggcgtgcctaatacctgcaagtcgagcgaacagataaggagcttgcctttgacgttagcggcggacgggtgagtaaac
gtggataacctacataaactgggataactcgggaaaccggagctaataccgataanattgaaccgatggttcaatagtgaaggcggnttfgctgacttat
agatggatccgcgccnattagctagttgtaaggtaacggcttaccaggcaacgatncgtgaccgactgagagggtgatcgccacactggaactgagacacgg
gtccagactcctacgggagcagcagtagggaattctccgcaatggcgaaagcctgacggagcaaacgccgtaactacgtgccagcagccgggtaatacgtagtgcaa
ttatnagggaagaacaatgtgtaagtaactgtgcaactcttgacggtacgtgatcagaaagccacggcctaactacgtgccagcagccgggtaatacgtagtgcaa
gcgttatccggaattattggcgtaaaagcgcgctagcgggttttaagtctgatgtgaaagccacggctcaaccgtggagggtcattggaaactgaaaacttgagt
gcagaagaggaaagtgaattccatgtgtagcgggtgaaatgcgcanagatggaggaaacaccagtgccgaangcgaacttctggtctgtaaccgacgtgatgtgc
gaaagcgtgggatcaaacaggattagataccctggtagtcacgcgtaaacgatgagtgtaagtgttaggggttccgcccttagtctgcagctaacgcattaa
gcactcccgctgggagtagcaccgcaaggtgaaactcaaaaggaattgacggggacccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaac
cttaccaaatcttgacatccttagaccgctcagagatagagcttcccctcggggacaaagtgacaggtggtgcatggtgtcgtcagctcgtctcgtgatgtggg
ftaagtcccgaacgagcgaaccccttaagcttagttgcatcattaaagttggcactctaagttgactcgggtgacaaaccggaggaggtggggatgacgtcaaat
catcatgcccttatgatttgggtacacacgtgctacaatggacaatacaaaagggcagctaaaccgcgaggtcaagcaaatcccaataaagttgtctcagttcggattgt
agtctgaactcgaactacatgaagctggaatcgtagtaacgtatagatcagcatgctacgggtgaaatcgttccgggtctgtacacaccgccgtcacaccagagagt
ttgtaaccccgaagcgggtggagtaaccatttatggagctagccgtcgaaggtggacaatgattgggtgaagtcgtaacaaggtagccgtatcggaaaggtcgg
ctggatacctcctt

```

图 1 HN003 菌株的 16S rDNA 序列

Fig.1 The sequence of 16S rDNA of strain HN003

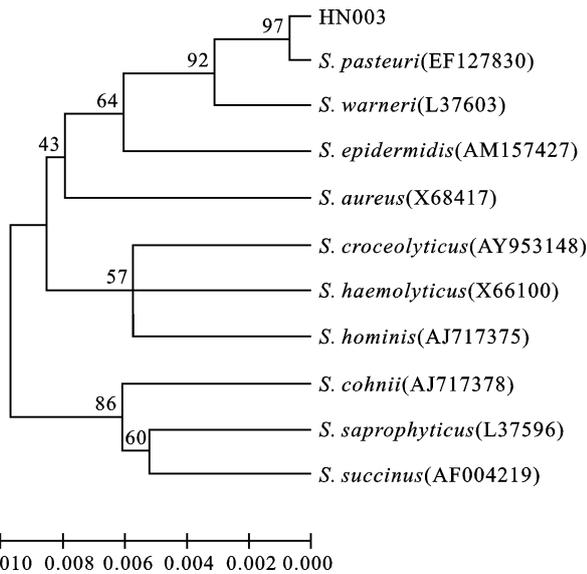


图2 菌株 HN003 的 16S rRNA 基因序列分析聚类结果
Fig.2 The molecular phylogenetic tree of strain HN003 based on 16S rDNA sequences

注: 分支上数字为 1000 次重复抽样检测的 bootstrap 百分比值, 括号内字母及数字为序列在 GenBank 中的登录号

3 讨论

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, 甲胺磷曾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, 致使一些化工厂生产的大量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。

广泛分布于江河湖泊和农田的土壤、水体及农产

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。

已有研究表明, 分解甲胺磷的微生物主要有细菌、放线菌(傅以钢等, 2008)、酵母(刘斌斌等, 2001)、霉菌等(刘玉焕等, 1999), 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*)(刘文海等, 2009)、假单胞菌(*Pseudomonas*)(肖华胜等, 1995; 李淑彬等, 1999)、气单胞菌属(*Aeromonas*)(周岳溪等, 1992)、黄杆菌(*Flavobacterium*)(华小梅等, 1997)等。

本文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 HN003。常规生理生化测试结果表明, 菌株 HN003 为革兰氏阳性, 不运动, 无芽孢。兼性厌氧。产类胡萝卜素, 因此菌落不透明, 为淡黄色。氧化酶阴性。不还原硝酸盐。V.P 测定为阳性; 接触酶阳性, 利用麦芽糖、蔗糖、半乳糖和甘露醇产酸, 木糖、木糖醇和阿拉伯糖不产酸。对葡糖苷酶和葡糖苷酸酶敏感, 在 10% NaCl 生长旺盛, 与巴氏葡萄球菌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看, 菌株 HN003 与巴氏葡萄球菌聚成一支, 具有最高(99.8%)的序列相似性, 表明 HN003 与巴氏葡萄球菌的亲缘关系最近。综上所述, 从形态、生理生化、16S rRNA 基因序列同源性、系统发育学等方面分析, 菌株 HN003 可鉴定为巴氏葡萄球菌。

巴氏葡萄球菌是葡萄球菌属(*Staphylococcus*)细菌, 最初由法国巴斯德研究所 Chesneau 等人于 1993 年从人类、动物及食品样本中分离鉴定并命名(Chesneau *et al.*, 1993)。Chesneau 等(1993)经 S1 核酸酶酶切 DNA 的实验结果证实此菌与 27 株葡萄球菌属已知细菌的同源性达 87%—98%, 其中与沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)的亲缘关系最近, 本文采用 16S rRNA 基因序列分析同源性的结果证实了上述报道。有关此菌的研究开展很少, 已有的一些报道主要集中在该菌对食品的污染及食品中此菌的检测(Vandenesch *et al.*, 1995; Blaiotta *et al.*, 2003; Kalliopi *et al.*, 2005)。近年来, 也有此菌污染血液制品(Savini *et al.*, 2008)、感染人类、哺乳类和鱼类并致病及对部分抗生素产生抗体(Savini *et al.*, 2009)等方面的零星

报道。据笔者所知, 国内外还未有关于此菌降解甲胺磷及其它物质的报道。本文在国内外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巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*), 并辅以 16S rRNA 基因序列分析之佐证。

经测定, 发现巴氏葡萄球菌 HN003 对甲胺磷的平均降解率在 24h、48h 和 72h 后, 分别达到 45.8%、88.5% 和 100%。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 HN003 对甲胺磷最大耐受浓度为 40000—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 HN003 对 pH 值和温度的适应范围也很广, 虽然在强酸(pH<2.0)、低温(10℃)和高温(42℃)条件下不能生长, 但移至正常环境下可以重新生长。因此巴氏葡萄球菌 HN003 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

- 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
- 华小梅, 江希流, 金 怡, 1997. 用高效菌种处理甲胺磷农药废水. 化工环保, 17(2): 67—70
- 刘文海, 邓先余, 向言词等, 2009. 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. 海洋与湖沼, 40(3): 170—175
- 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
- 刘玉焕, 钟英长, 1999. 甲胺磷降解真菌的研究. 中国环境科学, 19(2): 172—175
- 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
- 周岳溪, 钱 毅, 顾夏声等, 1992. 废水生物除磷机理的研究——循序间歇式生物脱氮除磷处理系统中微生物的组成. 环境科学, 13(4): 2—5
- 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
- 傅以钢, 戴 睿, 夏四清等, 2008. 平行 AO/AN 除磷工艺中放线菌群结构及分类. 环境科学学报, 28(5): 879—884
- Blaiotta G, Pennacchia C, Ercolini D *et al*, 2003. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S—23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian. Syst Appl Microbiol, 26(3): 423—433
- Chesneau O, Morvan A, 1993. *Staphylococcus pasteurii* sp. nov., isolated from human, animal, and food specimens. Int J Syst Bacter, 43(2): 237—244
- 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
- Kalliopi R, Lucilla I, 2005. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh Sausages. Inter J Food Microbiol, 97(3): 277—284
- 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
- Savini V, Catavittello C, Pompetti F *et al*, 2008. Contamination of a donated platelet unit by *Staphylococcus pasteurii*. J Infect, 57(6): 494—496
- Savini V, Catavittello C, Bianco A *et al*, 2009. Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 4(2): 123—129
- Vandenesch F, Perrier-Gros-Claude J D, Bes M *et al*, 1995. *Staphylococcus pasteurii*-specific oligonucleotide probes derived from a random amplified DNA fragment. FEMS Microbiol Lett, 132(1—2): 147—152

***STAPHYLOCOCCUS PASTEURI*, AN EFFICIENT BIODEGRADER TO METHAMIDOPHOS: ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION**

DENG Xian-Yu^{1,2}, GAO Jian¹, TAN Shu-Hua¹, XIANG Yan-Ci¹

(1. School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, 411201;

2. Cycle Eco-Agriculture Company Ltd., Xiangtan County, Xiangtan, 411200)

Abstract Using methamidophos as the sole carbon and energy source, a bacteria strain HN003 was isolated and purified from methamidophos-polluted sludge from a local chemical factory discharge in Xiangtan, Hunan Province. The strain showed an efficient biodegrading ability to methamidophos. The methamidophos-degrading rate of this strain reached 45.8%, 88.5%, and 100% in 24 h, 48h, and 72h, respectively, determined in gas-chromatography. Results of traditional physiological and biochemical tests show that the strain is Gram-positive, and can grow in 10—42 °C, and pH 3.0—14.0. The strain is very similar to *Staphylococcus pasteuri* in most of the phenotypes in traditional physiological and biochemical aspects, as well as in molecular phylogenetic dendrogram built from 1541bp 16S rRNA gene sequence with which they are compared. Therefore, strain HN003 was identified as *S. pasteuri*.

Key words Methamidophos, *Staphylococcus pasteuri*, Degradation, Physiological and biochemical tests, 16S rRNA gene