

一株丁草胺降解菌的分离鉴定及其降解特性的研究

李艳春¹ 熊明华¹ 肖晶¹ 李春艳^{1,2*}

(1. 东北农业大学资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

(2. 东北林业大学博士后流动站 黑龙江省农业科学院博士后工作站 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 利用富集培养技术从长期施用丁草胺的稻田土壤中分离得到能够降解丁草胺的细菌1株, 标记为 LYC-1。经形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析, 将该菌株鉴定为不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.), 菌株 LYC-1 的最适生长温度为 30°C, 最适 pH 值为 7.5。当接种量为 5%时, 该菌株在含 100 mg/L 的丁草胺无机盐基础培养液中培养 7 d 后, 可使丁草胺降解达 80%以上。

关键词: 丁草胺, 不动杆菌属, 生物降解, 分离鉴定, 降解特性

Isolation and Characteristics of a Butachlor Degradation Bacterium

LI Yan-Chun¹ XIONG Ming-Hua¹ XIAO Jing¹ LI Chun-Yan^{1,2*}

(1. College of Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(2. Post-doctoral station of Northeast Forestry University, Post-doctoral workstation of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: One Butachlor-degrading bacterium named LYC-1 was isolated from a soil sample by enrichment culture. Combining morphologic characteristics and physiobiochemical characteristics with 16S rRNA sequence analysis, strain LYC-1 was identified as *Acinetobacter* sp.. The optimal temperature and pH value for growth of strain LYC-1 was 30°C and pH 7.5, respectively. The strain could degrade butachlor more than 80% when it was cultured in 100 mg/L butachlor medium for 7 days.

Keywords: Butachlor, *Acinetobacter* sp., Biodegrading, Isolation and identification, Degrading characteristics

丁草胺(Butachlor)是一种高效内吸传导型苯乙酰胺类除草剂, 主要用于防除水稻田稗草和旱田中的禾本科杂草, 由于其具有用量少、杀草活性高, 选择性强等特性, 丁草胺及其复配制剂每年大量生产, 已逐步成为我国用量最大的三种除草剂之一^[1]。随

着丁草胺除草剂的施用, 不可避免的在农田生态系统中残留, 对环境造成污染。一方面, 丁草胺随水纵、横向淋溶与扩散, 特别是随排灌水和降水流失, 会造成地下水及江河污染; 另一方面, 丁草胺对藻类、光合细菌、固氮细菌等许多微生物的生长有抑

制作用, 从而破坏了土壤微生态平衡^[2,3]。目前减轻甚至解除丁草胺在土壤中污染的途径主要靠光解和微生物降解。与光解相比, 微生物代谢在除草剂降解中具有针对性强、周期短、见效快的优势, 因此筛选出丁草胺的高效降解菌株, 对于丁草胺污染土壤的生物修复具有重要的意义。目前已有许多关于丁草胺光解效应的研究报道^[4,5], 然而国内外有关丁草胺生物降解的报道相对较少。本研究从长期施用丁草胺的稻田土壤中, 分离筛选出 1 株能以丁草胺为唯一碳源或氮源生长的不动杆菌属细菌, 并对其生长和降解特性进行了初步研究。该菌株的获得丰富了丁草胺降解菌株的多样性, 并为丁草胺污染土壤的生物修复提供了菌株资源。

1 材料与方法

1.1 供试原药与培养基

丁草胺原药(93%): 由山东绿邦化工有限公司提供。

无机盐基础培养液: K_2HPO_4 0.1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g, $CaSO_4$ 0.04 g, 加重蒸馏水至 1 L, pH 调至 7.0。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 琼脂 20.0 g, NaCl 5.0 g, 加重蒸馏水至 1 L, pH 调至 7.0~7.2。

LB 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, NaCl 10.0 g, 加重蒸馏水至 1 L, pH 调至 7.0。

1.2 降解菌的富集与分离筛选

取已连续施用丁草胺 3 年以上的稻田土 10 g, 加入到 100 mL LB 培养基中, 30°C、150 r/min 培养 24 h, 取上述培养液 5 mL 加入到 50 mL 丁草胺浓度为 100 mg/L 的无机盐基础培养液中, 于 30°C、150 r/min 恒温摇床振荡培养, 然后每隔 1 周以 10% 的接种量接入新鲜的丁草胺无机盐培养液中, 并逐渐提高丁草胺浓度, 至培养液中丁草胺浓度达到 800 mg/L, 如此驯化约 2 个月。于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上划线分离, 挑取生长较好的菌落, 进一步分离纯化 3~4 次, 得到纯化降解菌株。将纯化好的降解菌株回接于丁草胺无机盐基础培养液中, 验证其是否对丁草胺有降解能力, 若出现混浊, 则将其分离, 接种于牛肉膏蛋白胨琼脂斜面培养基上, 培养 24 h 后, 置于 4°C 冰箱保存备用。

1.3 降解菌株的鉴定

1.3.1 降解菌的形态观察及生理生化鉴定: 将降解

菌采用平板涂布法接种, 30°C 恒温培养 24 h 后观察菌落形态, 用光学显微镜和电子显微镜观察菌体形态, 参照《常见细菌系统鉴定手册》对其进行生理生化鉴定^[6]。

1.3.2 降解菌株 16S rRNA 序列测定: 提取细菌总 DNA^[7]。采用细菌的 16S rRNA 通用引物^[8], 上游引物: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物: 5'-GGTTACCTTCTTACGACTT-3', 引物由大连宝生物有限公司合成。以提取的总 DNA 为模板, 对该菌株的 16S rRNA 进行 PCR 扩增。反应体系为: dNTPs 4 μ L (2.5 mmol/L), 10 \times buffer 5 μ L, 上游引物及下游引物各 2 μ L (50 μ mol/L), ExTaq 酶 0.5 μ L, 模板 DNA 5 μ L, 加去离子水至 50 μ L。反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 50 s, 48°C 50 s, 72°C 2.5 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外光下观察, 然后将纯化后的 PCR 扩增产物送上海生工公司测序。测序结果用 Blast 软件与 GenBank 中的相关属种的 16S rRNA 序列进行比对, 采用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树, 用 DNA-man 软件进行同源性分析。

1.4 降解菌株对丁草胺的降解性能测定

1.4.1 气相色谱检测条件: GC-14C 型气相色谱仪, FID 检测器; 色谱柱: 内涂 14% OV-1701 大口径毛细管柱(30 m \times 0.53 mm i.d.); 温度条件: 进样口 250°C, 柱温 225°C, 检测器 250°C; 气体流量: 氮气 100 kpa, 氢气 50 kpa, 空气 50 kpa, 尾吹 100 kpa; 不分流进样, 保留时间为 3.7 min。进样量 1 μ L。

1.4.2 丁草胺的提取: 将三角瓶中待测的丁草胺基础培养液倒入 250 mL 分液漏斗中, 三角瓶用重蒸馏水 2 \times 10 mL 洗涤 2 次, 洗涤液一并移入分液漏斗中。加入少许无水硫酸钠, 用重蒸石油醚 10 mL、5 mL、5 mL 振荡萃取 3 次, 石油醚层经无水硫酸钠柱过滤, 合并有机相, 于 40°C 旋转蒸发浓缩至近干, 待冷却至室温, 加丙酮定容至 5 mL, 摇匀待测。

1.4.3 不同环境因素对降解菌生长和降解的影响: 分别以接种量为 2%、5%、6%、8%、10% 作为菌悬液添加量实验组; 分别以 20°C、25°C、28°C、30°C、33°C、35°C、37°C、41°C 作为最佳温度实验组; 分别以 pH 为 6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 作为最佳 pH 实验组。以上各实验组丁草胺无机盐基础培养液均为 50 mL, 丁草胺浓度均为 100 mg/L, 菌悬液 OD_{600} 均调至 1.0, 培养条件均为 30°C、150 r/min 恒温摇床振荡培养, 在培养第 7 天测定 OD_{600} 值和丁草胺残留量。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的鉴定

经过多次分离和纯化,得到一株以丁草胺为唯一碳源或氮源生长的菌株,标记为 LYC-1。透射电镜照片如图 1 所示。降解菌株 LYC-1 的形态特征和生理生化指标分别见表 1 和表 2。

2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

降解菌株 LYC-1 的序列已在 GenBank 中注册,登录号: EU998912。将其与数据库中同源性较高的 11 个模式株进行比较,构建系统发育树。发育树中菌株 LYC-1(GenBank 登录号为 EU998912)的 16S rRNA 序列与 *Acinetobacter* 属的 4 个种即 *Acinetobacter* sp. HX-2006 (GenBank 登录号为 DQ979375)、*Acinetobacter calcoaceticus* (GenBank 登录号为 AJ888983)、*Acinetobacter* sp. 283 (GenBank 登录号为 EF672507)、*Acinetobacter baumannii* strain Ab8 (GenBank 登录号为 AY847284)在同一个分支上。其

表 1 降解菌株 LYC-1 的形态特征
Table 1 Morphology Characteristic of the strain of LYC-1

| 菌落形态 (Colony morphology) | | 菌体形态 (Strain morphology) | |
|-----------------------------|------|-----------------------------|---|
| 形状 Shape | 圆形 | 形状 Shape | 杆状 |
| 颜色 Colour | 乳白色 | 大小 Size | (0.9~1.6) $\mu\text{m} \times$ (1.5~2.5) μm |
| 透明度 Diaphaneity | 不透明 | 革兰氏染色 Gram staining | - |
| 表面状况 Surface condition | 光滑湿润 | 芽孢 Spore | - |
| 边缘 Edge | 整齐 | 纤毛 Pilus | 周生 |
| 隆起度 Oncoides | 略有隆起 | 荚膜 Capsule | - |

表 2 降解菌株 LYC-1 的生理生化特征结果
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain of LYC-1

| 生理生化特征 Physiological characteristics | 结果 Results |
|--|------------|
| 葡萄糖产酸 Acid from glucose test | - |
| 果糖产酸 Acid from fructose test | + |
| 麦芽糖产酸 Acid from maltose test | - |
| 乳糖产酸 Acid from lactose test | - |
| 蔗糖产酸 Acid from sucrose test | - |
| 乙酰甲基甲醇试验 Voges-Proskauer test | - |
| 葡萄糖氧化(产酸) Acid from glucose oxidation | - |
| 葡萄糖氧化(产气) Gas from glucose oxidation | - |
| 葡萄糖发酵(产酸) Acid from glucose fermentation | + |
| 葡萄糖发酵(产气) Gas from glucose fermentation | - |
| 吲哚试验 Indole test | + |
| 硫化氢产生试验 H ₂ S production test | - |
| 脲酶试验 Urea ferment test | + |
| 明胶液化试验 Gelatin liquefaction test | - |
| 氧化酶试验 Oxidase test | - |
| 精氨酸双水解酶的测定 Arginine di-hydrolase test | - |
| 过氧化氢酶试验 Catalase test | + |
| 硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test | + |
| 生长温度测定试验 Low growth temperature (4°C) | + |
| 生长温度测定试验 High growth temperature (41°C) | + |
| 丙二酸盐利用试验 Malonate utilization test | + |
| 柠檬酸盐利用试验 Citrate utilization test | + |

注:“+”: 阳性反应;“-”: 阴性反应。

Note: “+”: Positive; “-”: Negative.

中与 *Acinetobacter baumannii* strain Ab8 (GenBank 登录号为 AY847284)序列相似性最大,为 98.27%,其次是 *Acinetobacter* sp. HX-2006 (GenBank 登录号为 DQ979375),相似性达 95.27%。从图 2 可以看出,菌株 LYC-1 与 *Acinetobacter* 属的模式株 *Acinetobacter calcoaceticus* 能聚为一簇。

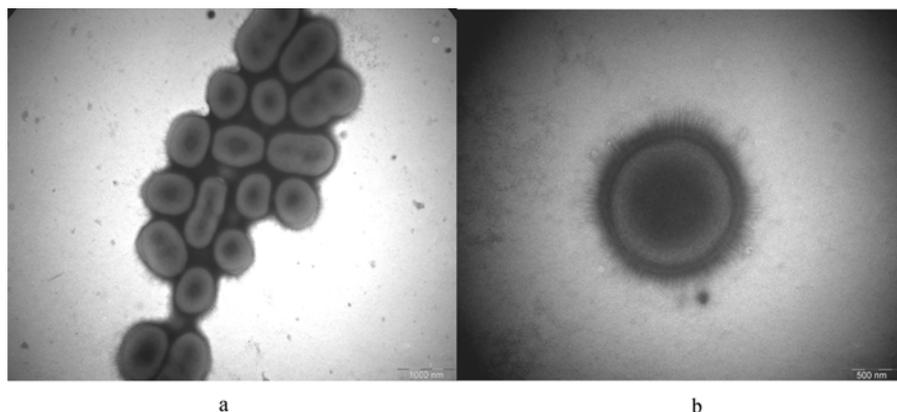


图 1 菌株 LYC-1 培养初期(a \times 25000)和生长稳定期(b \times 60000)的透射电镜照片

Fig. 1 The photo of LYC-1 at initial phase (a \times 25000) and stationary phase (b \times 60000) by electron microscope

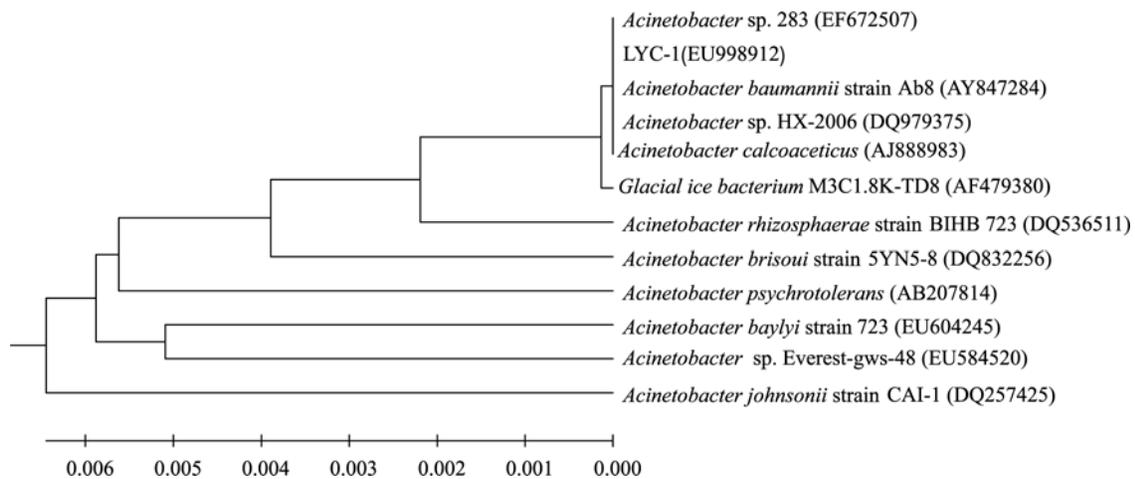


图2 降解菌株 LYC-1 的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of the strain of LYC-1

注: 括号内为序列登录号, 0.001 表示 1000 个碱基中 1 个发生变异。

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses, 0.001 means one changed per 1000 bases.

2.3 不同环境因素对降解菌株 LYC-1 生长和降解的影响

由图 3 可知, 当接种量在 2%~5% 时, 菌株 LYC-1 的生长量和降解率都呈上升趋势, 接种量为 5% 时, 生长量和降解率达到最大值, 降解率为 80.04%。而后随着接种量的增加, 生长量和降解率均开始下降, 因此以 5% 作为最佳接种量。由图 4 可知, 在温度为 25°C~33°C 范围内, 菌株 LYC-1 均能较好地生长, 并且菌株 LYC-1 对丁草胺的有较好的降解能力。其中降解菌在 30°C 时, 菌株 LYC-1 的生长量达到最高, 丁草胺的降解率也最高, 为 80.34%, 由此确定 30°C 为降解菌 LYC-1 的最佳生长温度。由图 5 可知, 菌株 LYC-1 在初始 pH 值 6.0~8.0 范围内, 能良好生长并且具有较高的降解能力。当 pH 值为 7.5 时, 生长量最大, 降解率也达到最大值, 为 84.56%。说明降解菌株 LYC-1 在偏碱性条件下具有较好的生长和降解能力。

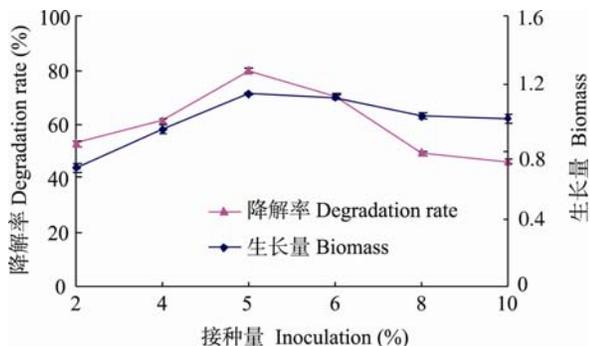


图3 接种量对菌株 LYC-1 生长和降解的影响
Fig. 3 Effect of different inoculation biomass on the growth and the degradation rate of the strain LYC-1

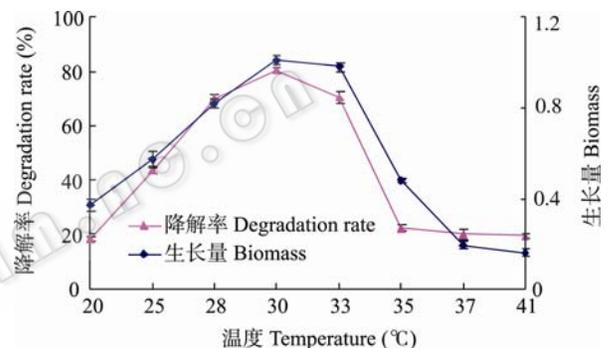


图4 温度对菌株 LYC-1 生长和降解的影响
Fig. 4 Effect of different temperature on the growth and the degradation rate of the strain LYC-1

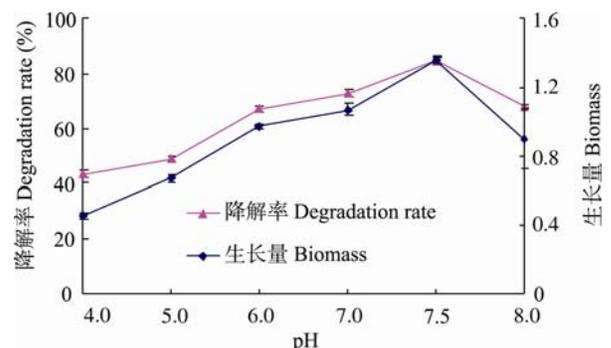


图5 pH 值对菌株 LYC-1 生长和降解的影响
Fig. 5 Effect of different pH on the growth and the degradation rate of the strain LYC-1

3 讨论

丁草胺因其具有杀草活性高, 选择性强, 对水稻安全等优点而被广为生产和应用, 目前已成为中国和世界水稻田首选的除草剂与杀稗剂之一。随着

丁草胺的大量使用,其在农田生态系统中的残留不断增加,因此对土壤及水体造成了一定污染。目前国外报道的对丁草胺有降解作用的微生物主要有毛霉属、链霉属、青霉属、曲霉属、毛壳菌属、镰孢霉属等^[9]。国内关于丁草胺降解菌的报道相对较少,主要有节杆菌属^[10]、镰刀菌属^[11]。不动杆菌属作为土壤中常见微生物,其对农药的降解研究国内已有报道^[12,13],而有关不动杆菌属细菌对酰胺类农药丁草胺降解作用的报道本文尚属首次。

在富集驯化过程中,菌株 LYC-1 能在丁草胺最终浓度达到 800 mg/L 的无机盐基础培养液中良好生长,说明菌株 LYC-1 能够耐受高浓度的丁草胺。另外,细菌分类学家认为当某 2 个细菌的 16S rRNA 的相似性大于 95% 时,可将其归为同一属^[14]。因此,根据相似性比较,再结合菌株形态学特征和生理生化指标可将 LYC-1 鉴定为不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。该菌株在生长过程中具有明显的球杆变化,培养初期为杆状(见图 1a),随着时间的增加,逐渐变短,到了生长稳定期时呈球状(见图 1b)。通常情况下,微生物降解农药的能力与接种量、环境 pH、温度等均有一定的关系,在自然环境中的降解能力还会受到其他微生物的影响,因此本研究主要针对接种量、温度、pH 三个因素对菌株 LYC-1 的降解性能进行研究,结果表明,接种量 5%,培养温度 30°C, pH 7.5, 为菌株 LYC-1 的最佳生长条件,而且菌株 LYC-1 在温度为 25°C~33°C, pH 为 6.0~8.0 的范围内也能良好生长,并且降解率较高,最高可达 84.56%。说明菌株 LYC-1 的生长与降解对温度和 pH 的要求范围较宽,更适合田间复杂多变的自然环境。

降解菌株 LYC-1 在实验室条件下对丁草胺有较高的降解能力,然而,该菌株是否能够在土壤中的丁草胺则需将其回接至污染土壤,借助气相色谱法分析丁草胺浓度和残留产物以准确判定菌株的实际修复能力。另外,本研究还将进一步探索该菌株的发酵条件及进行发酵培养基的优化,以获得高活性的细菌发酵液,为在自然环境下提高其与土著微生物的竞争性提供保证,同时还将考察多种降解菌混合复配的降解效果,为丁草胺污染土壤的生物修复提供有力依据。

4 结论

1) 从长年施用丁草胺的稻田土壤中分离得到

一株能以丁草胺为唯一碳源或氮源生长的细菌,根据菌株的形态和生理生化特征及 16S rRNA 分析,将其鉴定为不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。

2) 降解菌株 LYC-1 的最佳生长和降解条件为:培养温度 30°C, pH 7.5, 接种量 5%。

3) 降解菌株 LYC-1 在含 100 mg/L 的丁草胺无机盐基础培养液中培养 7 d 后,降解率达 80% 以上。

参 考 文 献

- [1] 胡笑彤. 我国农药工业的现状与发展方向. 农药, 1998, 37(6): 7-10.
- [2] Zager MY. Effects of benthocarb and butachlor on growth and nitrogen fixation by cyanobacteria. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1990, 45(2): 232-234.
- [3] Lee KM. Effects of butachlor on the growth of purple non sulfur bacteria. *Misaengmul Hakhoechi*, 1991, 29(2): 130-135.
- [4] Zheng H, Ye C. Photodegradation of acetochlor and butachlor in waters containing humic acid and inorganic ion. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2001, 67: 601-608.
- [5] Lin YJ, Lin C, Yeh KJ, et al. Photodegradation of the herbicides butachlor and ronstar using natural sunlight and diethylamine. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000, 64: 780-785.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 267-273.
- [7] Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 55-59.
- [8] Karen MK, Sherry LH, Douglas CN. Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents possess vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 7487-7496.
- [9] 田 芹, 周志强, 江树人, 等. 丁草胺在环境中降解行为的研究进展. 农药, 2004, 43(5): 205-208.
- [10] 吴新杰, 岳永德, 花日茂, 等. 丁草胺高效降解菌的分离. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 293-296.
- [11] 李 川, 古国榜, 柳 松. 丁草胺高效真菌的分离及性能研究. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 611-614.
- [12] 郑永良, 高 强, 王 玮, 等. 甲胺磷农药降解菌 HS-A32 的分离鉴定及降解特性. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 399-403.
- [13] 王永杰, 李顺鹏, 沈 标. 有机磷农药乐果降解菌的分离及其活性研究. 南京农业大学学报, 2001, 24(2): 71-74.
- [14] 杨苏声. 细菌分类学. 北京: 中国农业出版社, 1997, 1-7.