

乙草胺降解菌的筛选及其生长特性

胡海燕¹, 沙立娜², 王盼², 冯伟³, 李兆君^{1*}

(1. 农业部植物营养与肥料重点实验室, 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; 2. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000; 3. 河北省农林科学院农业资源环境研究所, 河北石家庄 050051)

摘要: 以黑龙江大豆田长期施用乙草胺的土壤为基质, 经过富集、驯化, 分离到细菌 13 株; 同时, 通过平板初筛实验从实验室保藏的 160 株细菌中筛选到能以乙草胺为唯一碳源的降解菌 15 株。通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定 28 株菌对乙草胺的降解能力, 共筛选到 16 株对乙草胺有降解效果的菌株, 7 d 对 50 mg/L 乙草胺降解率为 1.11% ~ 58.62%, 其中菌株 L201-4 和 DD20-4 的降解率分别达到 58.62% 和 48.07%。进一步研究了这 2 株菌在不同乙草胺浓度、培养温度、初始 pH 值及外加碳源量情况下的生长特性。研究结果可为乙草胺污染土壤的生物修复提供菌种资源和科学依据。

关键词: 乙草胺; 降解菌; 生物降解; 筛选

中图分类号: X172 文献标识码: A

Acetochlor Degrading Bacteria and Growth Characters

HU Hai-yan¹, SHA Li-na², WANG Pan², FENG Wei³, LI Zhao-jun^{1*}

(1. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Plant Nutrition and Fertilizer, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Hebei Baoding 071000, China; 3. Institute of Agro-resource and Environment, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Hebei Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: In this paper, 13 strains of bacteria were obtained from soybean field soil for long-term acetochlor in Heilongjiang by enrichment, domestication. 15 strains of degrading bacteria with acetochlor as sole carbon source were obtained from 160 bacteria in laboratory. Then, 28 acetochlor degrading bacterial strains were screened by high performance liquid chromatography. In pure culture, 58.62% and 48.07% of the 50 mg/L acetochlor was decomposed after 7 days incubation by L201-4 and DD20-4. Growth characters of the two bacteria in different concentrations of acetochlor, different culture temperature, different initial pH and different amount of carbon were further studied. The results would provide strain resources and scientific basis for bioremediation of acetochlor contaminated soil.

Key words: Acetochlor; Degrading bacteria; Biodegradation; Screening

乙草胺 (acetochlor) 化学名称 2-乙基-6-甲基-N-乙氧基甲基- α -氯代乙酰苯胺, 是内吸性酰胺类除草剂, 能够抑制杂草蛋白质合成, 主要用于防除大豆、花生、玉米、棉花等作物芽前一年生禾本科杂草和部分阔叶杂草^[1-2]。作为一种旱田除草剂, 乙草胺是我国使用最多的三种除草剂之一, 尤其在东北地区广为使用^[3-4]。农药的广泛使用在给人类带来增产增收效益的同时也给环境造成了严重的污染, 尤其

是除草剂的残留期一般较长, 不仅引起土壤和水体污染, 使得农药施用和环境质量之间的矛盾日益突出^[5-8], 同时也对后茬敏感作物产生药害, 影响农业种植业结构调整和换茬轮作, 因此, 除草剂的残留对生态环境及人类健康的危害, 成为当前亟待解决的问题。

除草剂的降解主要包括水溶性光解、化学水解和微生物降解 3 种途径, 其中以微生物修复理论为基础的农药残留降解技术是解决残留药害的一条有效途径。研究表明, 无论用高压、环氧乙烷、还是 γ -射线消毒土壤, 其结果为除草剂在未灭菌土壤中降解速度比灭菌土壤中迅速, 且在未灭菌土壤中降解产物更为复杂^[9], 由此可见, 微生物降解是除草剂从土壤中消除的关键途径。作为农田农药残留的

收稿日期: 2014-11-18

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2013-4); 国家自然科学基金项目 (41401578)

作者简介: 胡海燕 (1976-), 女, 河北张家口人, 博士, 助理研究员, 主要从事微生物资源与利用的研究工作, E-mail: huhaiyan02@caas.cn, * 为通讯作者; 李兆君 (1974-), 男, 山西大同人, 博士, 研究员, 主要从事农业环境生态方面的研究。

表 1 乙草胺降解菌富集用土壤样品

Table 1 Soil samples for acetochlor degrading bacteria enrichment

序号 Serial number	样品编号 Sample number	采样地点 Sample site	乙草胺残留量(mg/kg) Residual amount of acetochlor
1	DD12	黑龙江绥化幸福乡	29.49
2	DD13	黑龙江伊春翠峦	975.72
3	DD15	黑龙江伊春翠峦	51.21
4	DD16	黑龙江伊春上甘岭	143.00
5	DD20	黑龙江牡丹江宁安亚布力	25.73

主要降解者 微生物因其具有针对性强、周期短、见效快等优势 逐渐成为农药污染土壤生物修复的热点。有针对性地筛选除草剂高效降解菌株,加速土壤残留除草剂的降解,减少农田除草剂残留药害是一项十分必要的工作。本研究针对我国东北地区大豆田乙草胺残留问题,以长期施用乙草胺的大豆田土壤为基质,通过富集、驯化,从土壤中分离和筛选高效降解菌,为消除农田乙草胺污染提供科学指导和有效的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品、试剂及主要仪器

用来筛选乙草胺降解菌的土壤样品共计 5 份,采自黑龙江绥化、伊春和牡丹江长期施用除草剂乙草胺的大豆田,各土壤样品中乙草胺残留检测结果见表 1。

乙草胺纯度 96.8%,购自 Fluka 公司。其它试剂分别购自北京化学试剂公司和 Sigma 公司。

主要仪器:可控温摇床、培养箱、高效液相色谱仪(Agilent1100)、超声波清洗器(KQ-50)。

1.2 培养基

富集培养基^[10~11]: K₂HPO₄ 7 g, KH₂PO₄ 2 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g, MnSO₄ 0.05 g, FeSO₄ 0.05 g, CaCl₂ 0.003 g, 乙草胺(按照试验设计) 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

无机盐基础培养基^[10~11]: NH₄Cl 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

LB 培养基: 酵母膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 10.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0。

1.3 乙草胺降解菌的富集、分离

在 100 mL 乙草胺浓度为 50 mg/L 的富集培养液中加入 10 g 土样, 30 °C、180 r/min 振荡培养 7 d, 吸取 10 mL 培养液转接至乙草胺浓度为 100 mg/L 富集培养液中, 继续培养 7 d, 依次连续富集培养 6 次, 乙草胺浓度依次为 50、100、200、400、600 和 800

mg/L。取乙草胺浓度 800 mg/L 的富集液, 进行系列稀释, 取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液 100 μl 涂布在 LB 培养基上, 30 °C 培养 24 ~ 48 h, 根据菌落外观特征, 挑出外观特征不同的菌落在 LB 平板上进行划线纯化 3 次, 得到纯化的菌株。

1.4 乙草胺降解菌的初筛

将实验室保藏的 160 株菌活化于 LB 培养基上, 待菌长好之后, 用接种环挑取一环菌于含 100 μl MSM 培养液的 EP 管中配成菌悬液, 用枪吸打均匀, 吸取 10 μl 于乙草胺浓度为 800 mg/L 的固体 MSM 培养基上, 每 3 d 观察菌落生长情况, 并做记录, 筛选能在乙草胺为唯一碳源的培养基上生长良好的菌株。

1.5 乙草胺降解率的测定

采用高效液相色谱法(HPLC)测定乙草胺降解率^[8]。检测系统: Agilent 1100 Series。色谱柱: C18 Diamasil™ 反相柱 250.0 mm × 4.6 mm, 粒径 5 μm。色谱条件: 流动相: 甲醇: 水 = 80: 20(v/v), 用水用冰醋酸调至 pH 3; 检测波长: 215 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 20 μl; 柱温: 30 °C。

1.5.1 乙草胺标准曲线制作 用甲醇将乙草胺标准品稀释成系列浓度 10、20、40、60、80、100 mg/L, 在液相色谱上, 测定不同浓度乙草胺标准品的峰面积, 3 次重复。以乙草胺的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制乙草胺标准曲线, 得到标准曲线: $y = 45.443x - 244.11$ ($R^2 = 0.9983$)。

1.5.2 乙草胺降解菌的降解效果测定 在 50 mL 含乙草胺 50 mg/L 的无机盐培养基中接入 OD₆₀₀ 1.0 的菌液 2.5 mL, 30 °C, 180 r/min 摇床培养 7 d, 测定乙草胺残留量。方法为: 取 3 mL 培养液至 50 mL 离心管中, 8000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 加入 3 mL 二氯甲烷, 剧烈振荡 5 min, 静置 10 min, 待水相和有机相分层, 加入少量无水硫酸钠对有机相进行脱水, 准确吸取 800 μl 有机相于 1.5 mL 的离心管中, 用氮吹仪吹干, 加入 400 μl 甲醇, 在超声波清洗器中超声 10 min, 用 0.22 μm 的有机相针刺式滤

表 2 降解菌对乙草胺降解能力测定

Table 2 Degradation capability of bacteria for acetochlor

序号 Serial number	菌株 strain	乙草胺降解率 (%) Degradation rate for acetochlor	序号 Serial number	菌株 strain	乙草胺降解率 (%) Degradation rate for acetochlor
1	L201-1	20.47	15	Z201-5	26.64
2	L201-3	9.36	16	DD12-1	17.40
3	L201-4	58.62	17	DD12-2	-
4	L201-5	29.82	18	DD13-1	-
5	D96-1	-	19	DD13-2	-
6	D96-2	34.15	20	DD15-1	-
7	D96-3	17.52	21	DD15-2	29.87
8	D161-2	-	22	DD15-3	33.38
9	D161-6	20.14	23	DD16-1	1.11
10	P199-2	-	24	DD16-2	22.26
11	D171-2	-	25	DD16-3	-
12	Y111-2	-	26	DD16-4	6.26
13	Y164-3	-	27	DD20-1	48.07
14	Z201-4	6.80	28	DD20-2	-

器过滤至高压液相色谱小瓶内,按照上述 HPLC 法测定乙草胺含量。降解菌对乙草胺的降解率: $X = (1 - A/B) \times 100\%$, 式中 X 为降解率(%) A 为接菌处理液中乙草胺浓度, B 为未接菌阴性对照处理液中乙草胺浓度。

1.6 降解菌生长特性的研究

通过在不同乙草胺初始浓度、不同温度、不同 pH 及不同外加碳源量的条件下,对 2 株乙草胺高效降解菌进行生长量的研究,以确定乙草胺降解菌的最适生长条件。以波长为 600 nm 处的菌液 OD 值表示菌体生长量。

2 结果与分析

2.1 乙草胺降解菌的分离、筛选及降解能力测定

通过富集培养使土壤中的细菌得到了复壮和数量的增多,并用乙草胺进行逐级驯化,经过 42 d 的富集培养,从 5 个受乙草胺污染的土壤样品中共分离到菌株 13 株(如表 2 中序号 16~28)。通过对实验室保藏的 160 株菌的平板初筛实验,筛选到能在乙草胺含量为 800 mg/L 的固体 MSM 培养基上生长旺盛的菌株共 15 株(如表 2 中序号 1~15)。

采用高效液相色谱法对以上分离筛选到的 28 株菌分别进行乙草胺降解能力测定,结果见表 2。共筛选到对乙草胺具有降解能力的菌株 16 株,纯培养条件下,这些菌株能够将初始浓度 50 mg/L 的乙草胺在 7 d 内降解 1.11%~58.62%,其中降解率高于 30% 的菌株有 4 株,编号分别为 L201-4、D96-

2、DD15-3、DD20-1。其中菌株 L201-4 和 DD20-1 对乙草胺具有较好的降解效果,降解率分别为 58.62% 和 48.07%,显示了较好的应用前景。

2.2 降解菌生长特性的研究

2.2.1 乙草胺浓度对降解菌生长的影响 LB 培养液中,乙草胺浓度分别为 5、10、20、50、100 mg/L 时,接种降解菌 L201-4 和 DD20-1,30 °C,180 r/min 振荡培养 24 h 后测定各菌悬液的 OD₆₀₀ 值。由图可见,培养液中乙草胺浓度对 2 株菌的生长均有一定的影响。浓度在 5~20 mg/L 范围内,2 株菌的生长量均随着乙草胺浓度的增加而逐渐增加,当浓度超过 20 mg/L 时,2 株菌的生长量随着乙草胺浓度的增大而受到抑制,其 OD₆₀₀ 值逐渐减少。生长量最多的所在浓度可认定为是细菌生长的最适浓度,说明 2 株降解菌对乙草胺的生长适宜浓度均为 20 mg/L。

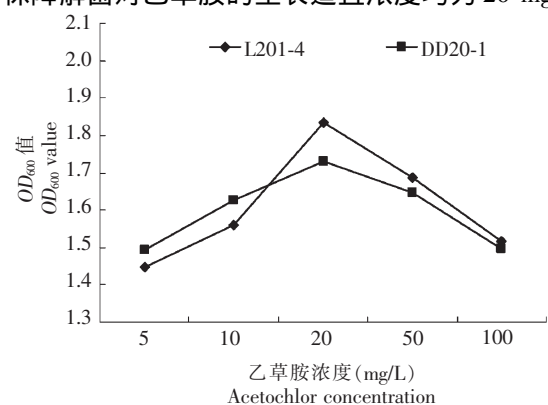


图 1 乙草胺浓度对降解菌生长的影响

fig. 1 Effect of acetochlor concentration on growth of degrading bacteria

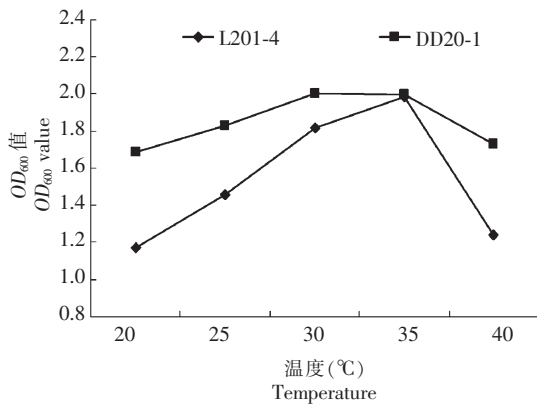


图2 温度对降解菌生长的影响

Fig. 2 Effect of temperature on growth of degrading bacteria

2.2.2 温度对降解菌生长的影响 将接种降解菌 L201-4 和 DD20-1 的 LB 培养液分别在培养温度为 20、25、30、35、40 °C 条件下, 180 r/min 振荡培养 24 h 后测定各菌悬液的 OD_{600} 值, 各菌株的生长情况见图 2。结果表明, 培养温度对 2 株降解菌的生长也有一定的影响。菌株 L201-4 在 15 ~ 35 °C 范围内, 随着温度的升高, 生长量也逐渐增高, 35 ~ 40 °C 范围内, 生长量迅速减少, 可见, 该菌株的最适生长温度为 35 °C。而菌株 DD20-1 在 30 ~ 35 °C 范围内 OD_{600} 值均保持较高水平, 说明这株菌对温度的适应范围较宽, 30 ~ 35 °C 为最适温度范围。

2.2.3 pH 值对降解菌生长的影响 将 LB 培养液的初始 pH 值分别调为 5、6、7、8、9, 接种降解菌 L201-4 和 DD20-1 后, 30 °C, 180 r/min 振荡培养 24 h 后测定各菌悬液的 OD_{600} 值。由图 3 可见 2 株菌的生长量 OD_{600} 值在 pH 5 ~ 7 范围内逐渐增加, 在 pH 7 ~ 9 范围内逐渐减少, 说明这 2 株降解菌的生长最适 pH 值均为 7。在试验设置的 pH 变化范围内, 菌株 DD20-1 在 pH 值大于 7 的环境中生长量比在 pH 值小于 7 的环境中生长量大, 说明该菌株适合中性偏碱的环境。

2.2.4 外加碳源量对降解菌生长的影响 葡萄糖

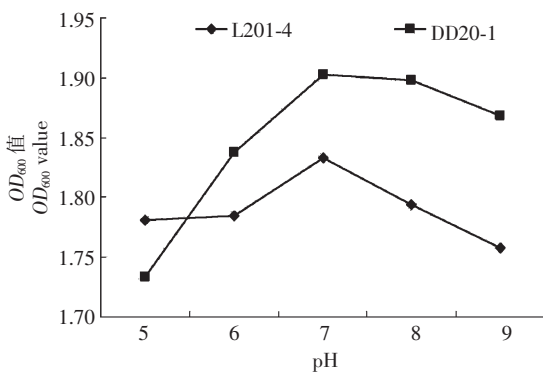


图3 pH 值对降解菌生长的影响

Fig. 3 Effect of culture medium pH on growth of degrading bacteria

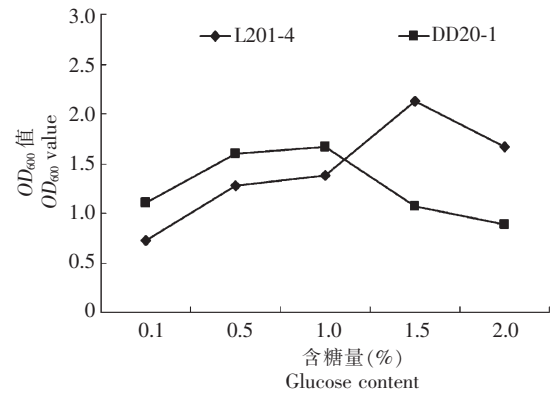


图4 葡萄糖对降解菌生长的影响

Fig. 4 Effect of glucose content on growth of degrading bacteria

添加量分别为 LB 培养液体积量的 0.1 %、0.5 %、1 %、1.5 % 和 2.0 % 条件下, 接种降解菌 L201-4 和 DD20-1, 30 °C, 180 r/min 振荡培养 24 h 后测定各菌株菌悬液的 OD_{600} 值。从图 4 可以看出, 加入葡萄糖后, 对 2 株菌的生长量影响较大, 当添加量较低时, 在 0.1 % ~ 1.0 % 范围内, 菌株 L201-4 的生长量较低, 而菌株 DD20-1 的生长量较高; 当添加量超过 1 % 时, 菌株 L201-4 的生长量迅速增加, 在 1.5 % 时生长量最大; 而菌株 DD20-1 的生长量迅速下降。可见, 菌株 L201-4 的生长最适葡萄糖添加量为 1.5 %, 而菌株 DD20-1 的生长最适葡萄糖添加量为 1 %。

3 结论与讨论

我国除草剂使用量约占所有农药使用量的 47 % 左右, 其中酰胺类除草剂的生产和使用量均排在几大除草剂品种前列, 而乙草胺是目前酰胺类除草剂中销量最大的一种^[12]。酰胺类除草剂在土壤中残留期较长, 对作物、土壤生物及土壤酶等均存在安全隐患。研究表明高浓度的乙草胺对农田中小型土壤动物群落组成、多样性及垂直分布均会产生显著的影响^[13]。通过室内模拟试验研究表明不同浓度乙草胺能显著抑制土壤脲酶活性, 脲酶 ED_{50} 为 13.12 ~ 75.76 mg/kg^[14]。

微生物作为土壤生态系统中数量最大、种类最多的物种, 对除草剂的降解起着举足轻重的作用。大量研究证实, 有很多土壤微生物对包括除草剂在内的多种农药有降解作用^[15~16]。微生物的降解作用可减少除草剂在土壤中的滞留时间, 对消除农药污染、环境压力起到了积极的作用。国内已有一些关于乙草胺降解菌的报道, 董滨^[17]等分离到粘着剑菌属 A-3 (*Ensifer adhaerens*), 对 10 mg/L 乙草胺的降解率为 33.6 %; 倪俊^[18]等分离到申氏杆菌 Y-4 (*Shinella* sp.), 对 50 mg/L 乙草胺的降解率为 83.3 %。

%。也有关于假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)和芽胞杆菌(*Bacillus* spp.)降解乙草胺的报道^[19-20],细菌是土壤中降解乙草胺的主要微生物种群^[21]。

利用富集、驯化、分离、筛选的方法,从长期施用乙草胺的土壤中分离到菌株 13 株,并从实验室保藏的 160 株菌中筛选到 15 株降解菌,通过乙草胺降解能力测定,筛选到对乙草胺有降解效果的降解菌 16 株,纯培养条件下 7 d 对初始浓度 50 mg/L 乙草胺的降解率为 1.11%~58.62%,其中降解率高于 30%的菌株有 4 株,编号分别为 L201-4、D96-2、DD15-3、DD20-1。菌株 L201-4 和 DD20-1 对乙草胺的降解率分别为 58.62%和 48.07%,显示了较好的应用前景。本试验结果为农业生产中解决乙草胺的残留药害问题提供了理论依据。

参考文献:

- [1]农业部农药检定所. 新编农药手册(续集) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2]朱九生, 乔雄梧, 王静, 等. 乙草胺在土壤环境中的降解及其影响因子的研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 1025-1029.
- [3]胡笑行. 我国农药工业的现状与发展方向[J]. 农药, 1998, 37(6): 7-10.
- [4]冯慧敏, 何红波, 武叶叶, 等. 黑土环境中乙草胺的微生物降解特性研究[J]. 土壤通报, 2008, 39(2): 379-383.
- [5]王丽红, 张林, 陈欢林. 三唑磷降解菌的筛选及其降解途径研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(5): 954-959.
- [6]李荣, 贾开志, 蒋建东, 等. 敌敌畏、敌百虫高效降解菌株 DDB-1 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 54-558.
- [7]Lee W J, Hoppin J A, Blair A, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the Agricultural Health Study [J]. J National Cancer Institute, 2004, 96(23): 1781-1789.
- [8]Poole C, Cullen M, Irons R, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the a cultural health study [J]. American J Epidemiology, 2005, 161(1): 101-102.
- [9]尹乐斌, 刘勇, 张德咏, 等. 磺酰脲类除草剂残留的微生物降解研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 594-600.
- [10]赵斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11]沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [12]李体文, 王慧敏, 魏朝俊, 等. 乙草胺农药厂周围土壤和农作物污染分布特征及风险评价[J]. 农药学学报, 2013, 15(6): 686-691.
- [13]翟清明, 林琳, 张雪萍, 等. 乙草胺对农田中小型土壤动物群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(4): 456-463.
- [14]张昀, 可欣, 张广才, 等. 乙草胺对土壤脲酶动力学特征的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2012, 18(4): 915-921.
- [15]张清明. 氟磺胺草醚降解菌 BX3 的分离、鉴定与降解特性研究[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 199-203.
- [16]荆新堂, 李勤凡, 张丽慧, 等. 咪喃丹降解菌 CF-44 的筛选及降解条件研究[J]. 华北农学报, 2011, 26(增刊): 229-232.
- [17]董滨, 王凤花, 林爱军, 等. 乙草胺降解菌 A-3 的筛选及其降解特性[J]. 环境科学, 2011, 32(2): 542-547.
- [18]倪俊, 沈维亮, 闫新, 等. 乙草胺降解菌 Y-4 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(5): 946-951.
- [19]Xu J, Qiu X H, Cao H, et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas oleovorans* degrading the chloroacetanilide herbicide acetochlor [J]. Biodegradation, 2006, 17(3): 219-225.
- [20]Wang Y S, Liu J C, Chen W C, et al. Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolated from tea garden soil [J]. Microb Ecol., 2008, 55(3): 435-43.
- [21]Xu J, Yang M, Dai J, et al. Degradation of acetochlor by four microbial communities [J]. Bioresour Technol, 2008, 99(16): 797-802.

(责任编辑 李洁)