

硝磺草酮降解菌的分离鉴定及其降解特性

韩海涛 刘 婕 高云飞 张建英 钟国华

华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642

摘要 采用富集培养法,从活性污泥中分离到硝磺草酮降解菌 HZ-2 菌株,通过形态、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,初步鉴定其为短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*。在通气、pH 7.0、温度 30 ℃、1%接种量、转速 180 r/min、50 mL LB 培养基条件下共培养 5 d,该菌株对 200 mg/L 硝磺草酮的降解率达到 100%。试验结果表明,分离到的硝磺草酮降解菌 HZ-2 菌株能高度耐受并快速降解硝磺草酮。

关键词 硝磺草酮;生物降解;短小芽孢杆菌;HZ-2 菌株

中图分类号 S 482.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0062-05

硝磺草酮(mesotrione)是三酮类苗前和苗后广谱选择性除草剂,能抑制羟基苯基丙酮酸酯双氧化酶(HPPD),有效防治多种旱地作物的主要阔叶杂草和禾本科杂草^[1]。近年来,硝磺草酮使用量和施用频率不断加大,已导致过量积累,对生态环境有严重影响^[2-3]。因此,研究高效降解硝磺草酮残留对保障农产品安全和保护环境具有重要意义。

生物降解是清除农业环境中农药残留的有效途径之一,具有高效、安全、无再次污染等优点^[4]。目前,国外已有分离获得可用于降解硝磺草酮微生物的报道^[2,5-6],但国内尚无相关报道。为了筛选适合我国农田环境的硝磺草酮降解菌,笔者从活性污泥中进行了系统分离与筛选,鉴定了 1 株可高效降解硝磺草酮的菌株 HZ-2,并测定了其对于硝磺草酮的降解能力,旨在为研究与开发硝磺草酮生物降解制剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 培养基

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,氯化钠 10 g/L;固体培养基为液体培养基中添加 15 g/L 琼脂。

1.2 仪器与试剂

主要仪器:UV mini240 紫外分光光度计(SHIMADZU,日本)、BX51 荧光显微镜(OLYMPUS,日本)、SHZ-82A 气浴恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司)、TDL-5000B 低温冷冻多管离心机(上海安亭科学仪器厂)、PCR 扩增仪(TaKaRa,日本)、LABORTA-4001 旋转蒸发仪(Heidolph,德国)、HP 1100 高效液相色谱仪(Agilent,美国)等。

主要试剂:98%硝磺草酮原药,由广东省佛山市盈辉作物科学有限公司提供;色谱纯乙腈和甲醇购自瑞典 Oceanpak 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 降解菌的分离与筛选

供试样品采自广东省惠州市第七污水处理厂厌氧污泥池的活性污泥。将 50 mL 的 LB 培养基装到 250 mL 三角瓶中灭菌,冷却后在无菌条件下加入硝磺草酮样品母液(乙腈为溶剂)和适量吐温 80,使硝磺草酮最终质量浓度为 100 mg/L。同时加入活性污泥样 5 g,于 30 ℃、180 r/min 摇床培养 7 d 后,按 10% 的接种量转接到第二批 250 mg/L 硝磺草酮的 LB 培养基中,相同条件培养 7 d 后,再按 10% 的接种量转接到 500 mg/L 硝磺草酮的 LB 培养基中,继续培养 7 d。此时取 0.2 mL 的 LB 培养基发醇液均匀涂抹到 LB 固体平板中反复进行划线分离,直至得到单菌落,并将单菌落接种到试管斜面培养基上,于 4 ℃ 冰箱内保存待测^[7]。

1.4 菌种鉴定

形态学鉴定主要通过观察 LB 平板上菌株的菌落形态,并将培养至对数生长期的菌株进行革兰氏

收稿日期:2012-09-15

基金项目:国家自然科学基金项目(30871660)

韩海涛,硕士研究生,研究方向:农药残留与环境保护。E-mail: haitaohan@live.com

通讯作者:钟国华,博士,教授,研究方向:天然源农药、昆虫生理和农药毒理。E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn

染色,在显微镜下观察、鉴定菌株形态特征^[8]。在此基础上进行 16S rDNA 序列分析鉴定,以提取的细菌总 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物(正向引物:5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3';反向引物:5'-AAGGAGGTGATGCAGCCGCA-3')进行扩增^[9]。PCR 反应体系(50 μL):DNA 模板 10~100 ng, *Taq* 酶(2.5 U/μL) 0.6 μL, 10×PCR Buffer(带 Mg²⁺) 5 μL, dNTPs(2.5 μmol/L) 1 μL, 引物(10 μmol/L) 各 1 μL, 加双蒸水至 50 μL。反应条件:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94 ℃ 1 min,退火 56 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 1 min,35 个循环;延伸 72 ℃ 7 min。反应完成后,经 1% 琼脂糖电泳,检测扩增片段的大小和特异性。PCR 扩增产物纯化后,委托美吉基因技术有限公司测序。将菌株 HZ-2 测得的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中利用 Blast 进行比对分析。

1.5 菌株 HZ-2 对硝磺草酮降解作用测定

1)HPLC 检测标准曲线。准确称取 98% 硝磺草酮原药 1.020 4 g 于 100 mL 容量瓶中,乙腈(色谱纯)定容,得 10 000 mg/L 标准品工作母液。按照梯度稀释法,分别配制 400、200、100、50、25、10、5 mg/L 溶液,通过 HPLC 法测定各质量浓度溶液对应的峰面积,以硝磺草酮质量浓度为 x ,峰面积为 y ,制作标准曲线方程: $y=ax+b$ 。

2)HPLC 检测条件。培养基中硝磺草酮的提取和检测参照文献[10]并略有改进:HP-1100 型高效液相色谱工作站(Agilent,美国),色谱柱为 C₁₈ 反相柱(Kromasil C-18 4.6 mm×150 mm, 5 μm, 100 Å),流动相为甲醇:0.05%磷酸水溶液=55:45(体积比),流速 1.0 mL/min,柱温(30±1)℃,检测波长 268 nm,进样量 10 μL。

3)添加回收率的测定。取灭菌新鲜 LB 液体培养基 50 mL,添加硝磺草酮母液,使其最终质量浓度分别为 10、25、50 mg/L 并设 3 个重复。各瓶加入二氯甲烷 30 mL 后超声 20 min,将混合液移入 250 mL 分液漏斗;另用 30 mL 二氯甲烷分 2 次刷洗三角瓶内壁,将混合液一并移入分液漏斗,摇匀,剧烈振荡 3~5 min,静置,分层,弃去上层溶液;下层二氯甲烷层过滤后装入有 20 g 无水硫酸钠的小漏斗至 250 mL 圆底烧瓶中,重复萃取 3 次,滤液并入烧瓶中,45 ℃ 恒温浓缩至近干,用乙腈分 3 次洗涤圆底烧瓶并定容至 10 mL 刻度试管中,最后取 2 mL 经 0.45 μm 微孔有机滤膜过滤器过滤,滤液收集于

进样瓶中待测。采用 HPLC 法检测硝磺草酮的残留量^[11]。

4)菌株生长曲线的测定。挑取单菌落于 50 mL 液体 LB 培养基中,30 ℃、180 r/min 振荡培养,通过连续测定液体培养基中细菌的 $D_{600\text{ nm}}$ 值,确定菌株生长状况,制作生长曲线。

5)菌株降解率的计算。在无菌条件下按体积分数 1% 的接种量接种到装有 50 mL 灭菌 LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,并添加硝磺草酮样品母液,使其最终质量浓度为 100 mg/L,于 30 ℃、180 r/min 气浴恒温振荡器中培养 1~7 d,以不接菌并添加等量乙腈的无菌 LB 培养液作为对照。所得菌悬液于 4 800 r/min 离心 10 min,弃去菌体,上清液中硝磺草酮的残留量采用 HPLC 法检测^[11],由下式计算降解率: $\rho=(1-A_1/A_0)\times 100\%$,式中 A_0 和 A_1 分别为降解菌株处理前、后硝磺草酮残留量(mg/L)。

2 结果与分析

2.1 菌株 HZ-2 的分离与鉴定

经分离、纯化和筛选,得到对硝磺草酮保持较高且较稳定降解率的菌株 HZ-2(图 1)。结果表明在通气、LB 培养基 pH 7.0、温度 30 ℃、1% 接种量、摇速 180 r/min 条件下培养 5 d,菌株 HZ-2 对 200 mg/L 硝磺草酮的降解率达到 100%。

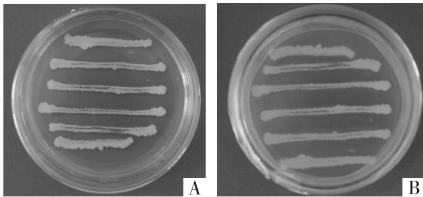
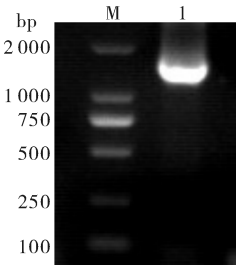


图 1 菌株 HZ-2 的正面菌落形态(A)和反面菌落形态(B)
Fig.1 The colony morphology of strain HZ-2 in the front (A) and opposite (B) surface



M:DL 2000 Marker; 1. 菌株 HZ-2 的 16S rDNA 16S rDNA of strain HZ-2.

图 2 菌株 HZ-2 的 16S rDNA 扩增产物
Fig.2 16S rDNA of strain HZ-2

以菌株 HZ-2 的基因组 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度为 1 483 bp 的扩增产物(图 2),测序结果在 NCBI 上进行比对,比对结果显示菌株 HZ-2 与芽孢杆菌属亲缘关系最近,16S rDNA 同源性达 99%。菌株 HZ-2 的 16S rDNA 序列:

GCAATGCGGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGG
ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAA
CTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTGAACCGCATGGTTCAAGGATGA
AAGACGGTTTCGGCTGTCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAAGTCTTGACCTTGACGGTAC
CTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGAACTTGAGTGCAGA
AGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT
AGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAC
AACCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCT
TAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTGCTACA
ATGGACAGAAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCT
TCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACC
ACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGA
AGGTGGGGCAGATGATTGGGGAAGTCTAGCAAGGTGCCCGGAGG

菌株 HZ-2 的菌落为不透明圆形菌落,边缘整齐;培养 24 h 之后进行革兰氏染色,镜检结果为阳性杆菌,产芽孢;生理生化特性见表 1。

表 1 菌株 HZ-2 的生理生化特性¹⁾

Table1 Physiological and biochemical characteristics of strain HZ-2

项目 Item	结果 Result
细胞直径>1.0 μm Cell diameter>1.0 μm	—
芽孢圆形 Circular pore	—
厌氧生长 Anaerobic grow	—
接触酶 Contact enzyme	+
V-P 测定 V-P test	+
D-葡萄糖 D-glucose	+
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	—
产酸 Acid production;L-阿拉伯糖 L-arabinose	+
产酸 Acid production;木糖 D-xylose	+
产酸 Acid production;甘露醇 D-mannitol	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	—
生长 pH 6.8 营养肉汤 Growth pH 6.8 nutrient broth	+
生长 pH 5.7 营养肉汤 Growth pH 5.7 nutrient broth	+
生长 NaCl:2% Growth NaCl:2%	+
生长 NaCl:10% Growth NaCl:10%	+
生长温度 30 ℃ Growth temperature 30 ℃	+
生长温度 40 ℃ Growth temperature 40 ℃	+

1)“+”表示阳性反应,“—”表示阴性反应。
“+” indicates positive reaction, “—” negative reaction.

根据菌落形态、培养特征和生理生化特性,并结合 16S rRNA 序列测定和比对结果,初步鉴定菌株 HZ-2 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),暂定名 *Bacillus pumilus* HZ-2。

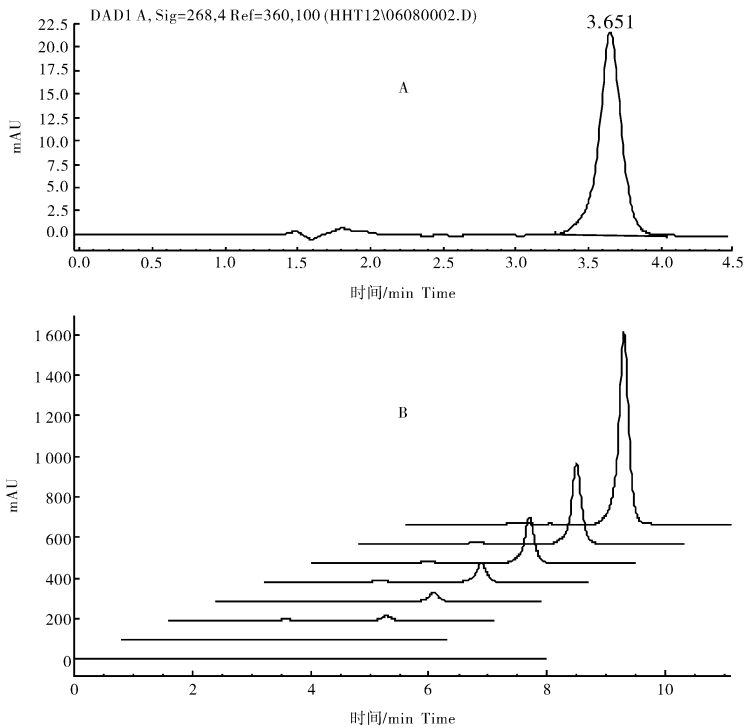
2.2 硝磺草酮的 HPLC 测定

对硝磺草酮标样进行 HPLC 检测,硝磺草酮保留时间为 3.5 min,结果显示峰形尖锐、对称、稳定(图 3),回归方程 $y=26.51x+22.14$,相关性系数为 0.998 6,相关性显著。测得各浓度下的平均添加回收率为 86%~92%(表 2),符合农药残留 70%~110%的要求,变异系数均小于 5%,表明试验所采用的硝磺草酮残留提取和分析方法稳定可靠。

表 2 LB 液体培养基中硝磺草酮的添加回收率

Table 2 Fortified recovery of mesotrione from LB

质量浓度/(mg/L) Concentration	回收率/% Recovery rate	变异系数/% Variable coefficient
10	87.38±2.72	3.12
25	92.80±2.98	3.21
50	86.19±0.69	0.81



A. 硝磺草酮 10 mg/L 标样; B. 硝磺草酮标样 5、10、25、50、100、200、400 mg/L。A. Chromatogram of 10 mg/L mesotrione standard sample; B. Chromatogram of 5,10,25,50,100,200,400 mg/L mesotrione standard samples.

图 3 硝磺草酮标样液相色谱图

Fig.3 Chromatogram of mesotrione standard samples

2.3 菌株 HZ-2 的生长曲线

连续测量液体培养基中菌株 HZ-2 的 $D_{600\text{ nm}}$ 值,在供试培养条件下该菌可较快生长,2~12 h 可快速生长繁殖,24 h 后达到稳定期后菌株生长量不再增长且趋于平稳(图 4)。

浓度提高至 400 mg/L 时,菌株 HZ-2 仍能在此环境下良好生长,且其对硝磺草酮的降解率仍达 98.28%,说明菌株 HZ-2 对硝磺草酮有较强的耐受能力和降解能力。

3 讨 论

硝磺草酮作为一种新型的玉米田除草剂,具有作用速度快、杀草谱广且对玉米安全等特点^[11]。然而,硝磺草酮在土壤中具有较强的淋溶性,半衰期较长(在土壤溶液中的光解半衰期 84 d,土壤中光解半衰期 15~21 d),其对地下水的污染风险较大^[1,12]。同时,在使用中发现,不论苗前土壤处理或苗后茎叶喷雾均存在着土壤残留伤害后茬敏感作物问题。2008 年在黑龙江省齐齐哈尔及内蒙古扎兰屯地区曾有玉米后茬作物大豆、向日葵、西葫芦因硝磺草酮残留导致受害的报道^[1]。微生物降解可有效解决农药残留对环境的污染问题。目前,国外已报道的硝磺草酮降解菌有 *Bacillus* sp. 3B6 菌株^[5] 和 *Arthrobacter* sp. 菌株等^[2,6],而国内尚无硝磺草酮微生物降解的相关报道,笔者筛选的 *B. pumilus* HZ-2 菌株可丰富降解菌资源库。

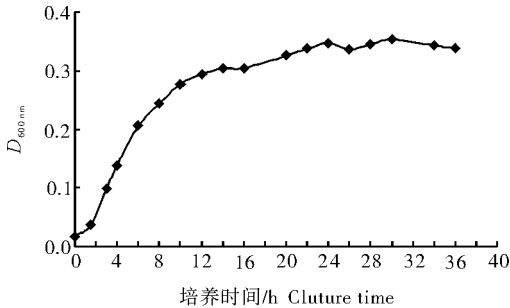


图 4 HZ-2 菌株的生长动态

Fig.4 Growth dynamic of strain HZ-2

2.4 菌株 HZ-2 对硝磺草酮降解效能的测定

菌株 HZ-2 在 1~7 d 对 200 mg/L 硝磺草酮降解率测定结果表明,1 d 后降解率已经达 90.66%,随着时间的延长,硝磺草酮很快被降解,2 d 后降解率为 97.42%,3 d 后降解率达到 99.24%,4 d 后降解率为 99.33%,5 d 后完全降解。当硝磺草酮初始

农药残留降解微生物的获得途径有很多,如定向培育、诱变育种及工程菌的构建等。从受农药污染严重的污泥和贫营养环境中筛选分离具有优良降解性状的菌种是目前最常用的方法。笔者筛选的 *B. pumilus* sp. HZ-2 菌株,在通气、LB 培养基 50 mL、pH 7.0、温度 30 ℃、1% 接种量、摇速 180 r/min 条件下培养 5 d,可完全降解 200 mg/L 硝磺草酮。同时,在 1~7 d 的检测中,该菌株对硝磺草酮的降解动态与其生长动态基本保持一致,2 d 后菌株生长量与降解率均可达到较高水平,且当硝磺草酮质量浓度提高至 400 mg/L 时,仍保持 98% 的降解率,说明菌株 HZ-2 能快速、高效降解硝磺草酮,具有潜在的实际应用价值。

目前,有关硝磺草酮降解菌的研究报道主要集中在降解菌的分离筛选和特性研究等方面。已有的研究表明,硝磺草酮部分降解产物毒性超过其自身毒性^[3]。另外,对降解菌 HZ-2 的研究是在实验室液体纯培养条件下进行,而田间应用会受到诸多因素的影响与制约,因此,今后还需对生物降解途径、降解机制以及降解菌制剂等方面进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 苏少泉. 硝磺草酮的开发、选择性及生物学特性[J]. 农药研究与应用, 2009,13(5): 1-6.

[2] BATISSON I, CROUZET O, BESSE-HOGGAN P, et al. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp.

from soil [J]. Environmental Pollution, 2009,157:1195-1201.

[3] BONNET J L, BONNEMOY F, DUSSER M, et al. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008,55:576-583.

[4] GIACOMAZZI S, COCHET N. Environmental impact of diuron transformation: a review [J]. Chemosphere, 2004, 56: 1021-1032.

[5] DURAND S, BERTRAND L, MARTIN A, et al. Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a *Bacillus* strain [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20: 2603-2613.

[6] PILEGGI M, PILEGGI S A V, OLCANHESKI L R. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil [J]. Chemosphere, 2012,86:1127-1132.

[7] 黄文文, 刘晶晶, 叶美玲, 等. 甲氰菊酯降解菌 ZH-3 的分离鉴定及降解特性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(10):103-109,114.

[8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001:242-266.

[9] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991,173(2):697-703.

[10] 王小丽, 陈铁春, 李友顺, 等. 硝磺草酮原药高效液相色谱分析方法研究[J]. 农药科学与管理, 2009,30(6):44-46.

[11] 范友虎. 莠去津和硝磺草酮在环境中的迁移行为与光催化降解研究[D]. 天津: 天津大学图书馆, 2008.

[12] 孔德洋, 石利利, 单正军, 等. 除草剂甲基磺草酮在土壤中的吸附及淋溶特性[J]. 中国环境科学, 2008,28(8):753-757.

Isolation, identification and characterization of
a mesotrione-degrading bacterial strain

HAN Hai-tao LIU Jie GAO Yun-fei ZHANG Jian-ying ZHONG Guo-hua
Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China

Abstract A bacterial strain HZ-2 was newly isolated by enrichment culture from the activated sludge in a sewage treatment plant. Based on the morphology, the physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence analysis, the strain HZ-2 was identified as *Bacillus pumilus* HZ-2. The strain HZ-2 could not only completely degrade mesotrione 200 mg/L in 5 d, under the conditions of 1% inoculum, 30 ℃, pH 7.0 and 180 r/min, but also could tolerate and efficiently degrade mesotrione of high concentrations up to 400 mg/L. All these results indicate the strain HZ-2 is deserved to be further developed as a candidate mesotrione-degrading microbe.

Key words mesotrione; biodegradation; *Bacillus pumilus*; strain HZ-2