

文章编号: 1004-4353(2016)01-0019-04

腐霉利高效降解菌的筛选及其特性

金护定, 崔勇虎, 吴昊, 尹成日*

(延边大学长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要: 为了降解腐霉利,在长期受农药污染的蔬菜大棚土壤中,驯化分离出 13 种菌株,通过正交试验确定了混合菌群降解腐霉利的最优条件:腐霉利浓度为 300 mg/L,葡萄糖浓度为 200 mg/L,接种量为 15%。在分离出的 13 种菌株中,筛选出 1 种高效降解腐霉利的菌株 T32-1.通过高效液相(HPLC)对菌株 T32-1 和混合菌群对腐霉利的降解情况进行了分析,结果表明当腐霉利浓度为 300 mg/L 时,菌株 T32-1 和混合菌群对腐霉利的去除率分别为 77.2%和 90%。

关键词: 农药; 腐霉利; 生物降解; 微生物

中图分类号: Q93

文献标识码: A

Isolation and characterization of highly efficient procymidone-degrading bacterium

JIN Hudong, CUI Yonghu, WU Hao, YIN Chengri*

(*Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain and Functional Molecules*
(*Yanbian University*), Ministry of Education, Yanji 133002, China)

Abstract: In order to degrade procymidone, 13 species of strains were isolated from the soil in a vegetable greenhouse where was polluted by pesticide for a long time. Based on orthogonal test, the optimal condition of the degradation of procymidone was 300 mg/L of initial concentration of procymidone, 200 mg/L of glucose and 15% of inoculum. Among these strains, strain T32-1 shows efficient performance in the degradation of procymidone. The degradation of procymidone by mixed bacterial and strain T32-1 were analyzed by HPLC. The results indicated that strain T32-1 and mixed bacteria show 77.2% and 90% of high removal efficiency at 300 mg/L of initial concentration of procymidone.

Keywords: pesticides; procymidone; biodegradation; microorganisms

腐霉利又称杀霉利、二甲菌核利、速克灵等,属于杀菌剂,是一种常用农药^[1].腐霉利可以应用于果树、蔬菜、植物等的黑星病、腐病、真核病、灰霉病、大斑病的防治,并且对苯丙咪唑产生抗性的真菌也有效果^[2-3].研究表明,在温室中过多使用腐霉利,其毒性可在生菜等植物上蓄积,对人类健康存在潜在的影响,因此目前其已成为食品安全检测中的一个重要的目标物^[4].除此之外,腐霉利

还是一种抗雄激素,长期暴露于腐霉利环境中,能引发雄性鼠雄激素依赖组织发生组织学变化,包括纤维化、上皮增生和细胞浸润^[5].鉴于腐霉利对人类健康潜在的危害,腐霉利的降解显得十分重要.目前,腐霉利的研究主要集中在检测方法上^[6-10],而有关腐霉利的生物降解问题研究得很少^[11].本文以腐霉利为降解目标物,通过对长期受腐霉利污染的土壤微生物进行驯化培养,分离

得到 13 种菌株,并从中筛选出降解腐霉利的高效生物菌株,并对其生物降解效果进行了研究.

1 材料

1.1 土壤的采集

土壤样品采集于吉林省延吉市长期受农药污染的某蔬菜大棚.采集方法:将地表 5 cm 的表层拨开,取 5~20 cm 深的土壤,除去石块、植物根系等非土壤物质,过筛,置于冰箱(4 ℃)中保存备用.

1.2 试剂

试剂有腐霉利、乙腈、甲醇、CTAB、dNTP、去离子水、Taq 酶、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸、琼脂糖、氯仿、氯化钠、TE 缓冲液、溶菌酶、葡萄糖等,其中乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯.

1.3 仪器

BSC-1300 II A/B3 型生物净化工作台,上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产;HZQ-C 型空气浴振荡器,哈尔滨东联电子技术开发有限公司生产;LC-10A 型高效液相色谱仪,岛津公司生产;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂生产;SPX-250B-Z 型生化培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产;TC-512 型 PCR 仪,Technique 公司生产;BioSpectrum Imaging 型凝胶成像系统,UVP 公司生产.

1.4 培养基的制备

无机盐液体培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 0.014 g, KH_2PO_4 2.0 g, FeSO_4 0.13 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g, 稀释至 1 000 mL, pH 值为 7.0.

无机盐平板培养基:在上述无机盐液体培养基成分中加入 20 g 琼脂.

R2A 培养基:酸水解酪蛋白 0.5 g,胰蛋白胨 0.25 g,酵母浸粉 0.5 g,可溶性淀粉 0.5 g,无水 MgSO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.3 g,丙酮酸钠 0.3 g,葡萄糖 0.5 g,蛋白胨 0.25 g,琼脂 12.0 g,去离子水 1 000 mL, pH 值为 7.0.

NA 培养基:蛋白胨 10.0 g,氯化钠 15.0 g,牛肉粉 3.0 g,琼脂 15.0 g,去离子水 1 000 mL, pH 值为 7.0.

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,去离子水 1 000 mL, pH 值为 7.0.

LB 液体培养基:蛋白胨 10.0 g,酵母浸粉 5.0 g,氯化钠 10.0 g,去离子水 1 000 mL, pH 值为 7.0.

2 实验方法

2.1 菌种的驯化

取 1 g 受腐霉利污染的土壤样品,加入到以腐霉利(50 mg/L)为唯一碳源的无机盐培养基中,在 30 ℃、150 r/min 条件下摇床培养 7 d,每个样品作 3 个平行实验.取驯化后的菌液 10 mL 分别转入到含 100、150、200 mg/L 腐霉利的新鲜的无机盐液体培养基中继续驯化.取驯化后的混合菌群,加入到 100 mL 无机盐培养基中(腐霉利浓度为 200 mg/L),在 30 ℃、150 r/min 条件下振荡培养,每个样品做 3 个平行实验,以未加菌液的培养基为空白对照.为了优化混合菌群对腐霉利的生物降解条件,选取腐霉利初始浓度、接种量以及共基质(葡萄糖)等 3 种因素作为研究对象,建立了三因素三水平正交试验,每隔 3 d 测定腐霉利的浓度,其试验方案如表 1.

表 1 混合菌群对腐霉利的降解实验

水平	A 腐霉利初始 浓度/(mg/L)	B 葡萄糖浓度/ (mg/L)	C 接种量/ %
1	100	100	5
2	200	200	10
3	300	300	15

2.2 菌株的分离

利用平板十倍稀释法将驯化培养液稀释为 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 之间,取稀释液 200 μL ,用无菌三角棒均匀涂布在含 50 mg/L 腐霉利的培养基上,在 30 ℃条件下培养 1~7 d.在降解菌的筛选初期,根据菌落的大小、形态、颜色、表面结构等特征的不同,从培养后的平板上挑选出具有腐霉利耐受程度高、生长速度较快、菌落较大的菌株,通过连续划线法进行分离纯化,直到得到纯的菌株.最后筛选出耐受情况和生长情况良好,传代比较稳定,降解能力较高的菌株.

2.3 腐霉利的降解实验

将分离得出的菌株分别加入到含 300 mg/L 腐霉利的锥形瓶中,放置在恒温振荡器中,温度为 25 ℃.每隔 2 d 利用高效液相色谱仪测定腐霉利的浓度.色谱条件为:色谱柱采用 BDS HYPER-SIL C₁₈ (250 mm×4.6 mm),检测波长为 220 nm,流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 ℃,流动相为乙腈-水(60:40,体积比).在此条件下,腐霉利的保留时间约为 8.592 min(见图 1).

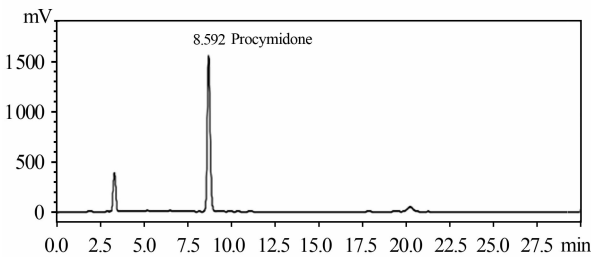


图 1 腐霉利的标准色谱图

2.4 菌株的形态学观察及基因序列的测定

在光学显微镜下观察高效菌株的大小及其形态.采用 CTAB 法^[12]提取高效菌株的总 DNA,使用 PCR 扩增 16S rDNA. PCR 反应体系(20 μL)为:缓冲液 2 μL, dNTP 2 μL, primer-27F 2 μL, primer-1492R 2 μL, DNA 2 μL, Taq 酶 0.4 μL, 去离子水 10 μL. PCR 扩增程序为:95 ℃预变性 3 min, 95 ℃变性 30 s, 56 ℃复性 30 s, 72 ℃延伸 90 s. 30 个循环,72 ℃延伸 7 min.

测定采用 PCR 纯化试剂盒(Silica Bend DNA Gel Extexaction Kit)纯化 PCR 产物,然后送上海英骏生物技术有限公司进行测序.

3 结果与分析

3.1 最优培养条件的确定

每个样品设置 3 个平行样,共 27 组试验,并设置空白对照,正交试验结果如表 2.当腐霉利浓度为 300 mg/L,葡萄糖浓度为 200 mg/L,接种量为 15%时降解效果最好.

3.2 优化前后混合菌群的降解性能比较

优化前后混合菌群对腐霉利的生物降解情况如图 2 和图 3 所示.可以看出,在优化条件下,混合菌群对腐霉利的降解速率明显加快,去除率也

明显提高,10 d 的去除率达到 90%.

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	空白	η
1	1	1	1	1	0.56
2	1	2	2	2	0.78
3	1	3	3	3	0.86
4	2	1	2	3	0.74
5	2	2	3	1	0.8
6	2	3	1	2	0.8
7	3	1	3	2	0.64
8	3	2	1	3	0.82
9	3	3	2	1	0.88
K_{j1}	1.94	2.18	2.24		
K_{j2}	2.4	2.4	2.22		
K_{j3}	2.54	2.3	2.42		
n	3	3	3		
$K_1=K_{j1}/n$	0.647	0.727	0.747		
$K_2=K_{j2}/n$	0.8	0.8	0.74		
$K_3=K_{j3}/n$	0.847	0.767	0.807		
极差 D	0.2	0.073	0.06		

注:其中 K_{ji} 及 D 分别表示 j 因素 i 水平总的试验结果及 j 因素对试验结果的影响.

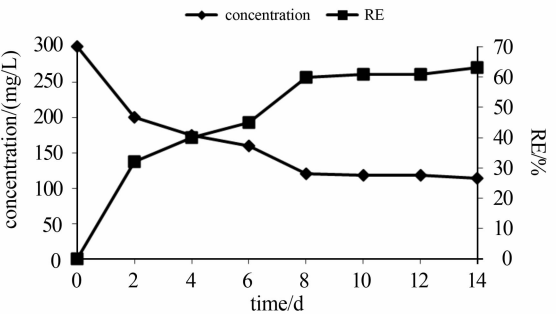


图 2 优化前混合菌群对腐霉利的生物降解

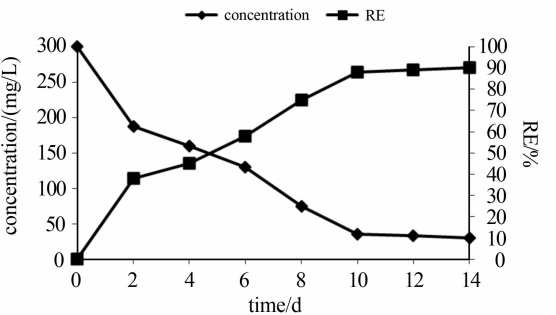


图 3 优化后混合菌群对腐霉利的生物降解

3.3 菌株 T32-1 对腐霉利的降解性能

从驯化的土壤中分离得到 13 种可降解腐霉利的菌株,其中筛选出一种腐霉利生物降解高效

菌株 T32-1. 利用菌株 T32-1 进行了腐霉利的降解实验,降解情况如图 4 所示. 当腐霉利的初始浓度为 300 mg/L 时,前 4 d 的降解效率相对缓慢,去除率只有 19%,但是从第 5 d 开始,降解速率大幅度增加,到第 14 d 时去除率达到 77.2%. 菌株 T32-1 对腐霉利的降解效果不如混合菌群,这可能是由于混合菌群中存在微生物物种间的协同作用,使得降解能力提高.

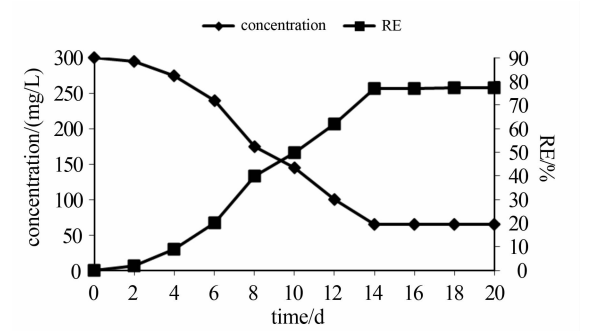
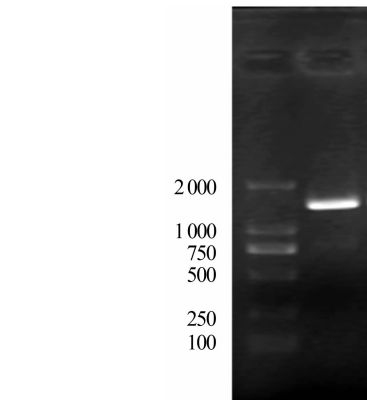


图 4 菌株 T32-1 对腐霉利的生物降解

3.4 菌株 T32-1 的形态学观察及其 DNA 测序鉴定
菌株 T32-1 在 R2A 培养基上呈淡粉色,菌体偏小,边缘整齐,表面光滑,半透明,微隆,有鞣质层,光学显微镜观察其菌体呈杆状. 经 PCR 后,菌株 T32-1 的 DNA 扩增结果如图 5 所示.

将测得的基因序列通过 Blast 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与 GenBank 中核酸数据库进行对比,相似的序列进行多重匹配排列分析(clustalx1.83)^[13]. 用 Mega 4.0^[14] 分析软件中的 Neighbor Joining 方法^[15] 构建系统发育树(图 6). 分析结果表明,菌株 T32-1 归属于 *Methylobacterium* sp..



DNA Marker(左), T32-1(右)

图 5 菌株 T32-1 的 16S rDNA 电泳图

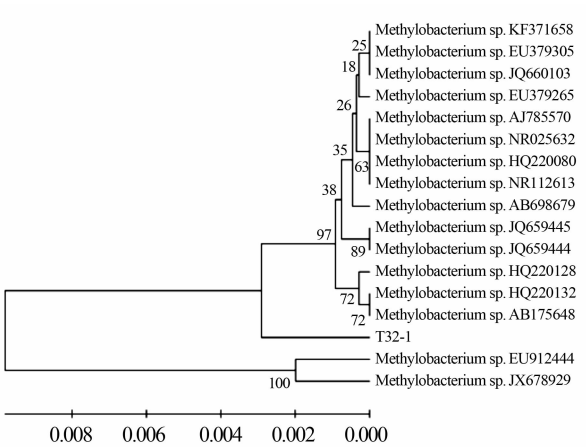


图 6 菌株 T32-1 的系统发育树

4 结论

在驯化的长期受农药污染的蔬菜大棚土壤中分离得到 13 种腐霉利生物降解菌株,经正交试验得出混合菌株对腐霉利的生物降解最佳条件:腐霉利浓度 300 mg/L,葡萄糖浓度 200 mg/L,接种量 15%. 经降解能力测定显示,混合菌群的降解能力高于菌株 T32-1,其中混合菌群的去除率可达到 90%,菌株 T32-1 的去除率可达到 77.2%. 通过形态学观察及 16S rDNA 测序并构建系统发育树表明,菌株 T32-1 归属于 *Methylobacterium* sp.. 混合菌群和菌株 T32-1 对腐霉利的降解机理还有待于进一步研究.

参考文献:

[1] 李娟,花日茂,艾琼. 腐霉利在水溶液中的光化学降解研究[J]. 安徽农业大学学报,2012,39(1):102-106.

[2] Sun H Y, Wang H C, Chen Y, et al. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to Carbendazim, Diethofencarb, Procymidone, and Pyrimethanil in China[J]. Plant Disease, 2010,94(5):551-556.

[3] 刘超,张悦丽,张博,等. 山东灰霉病菌对腐霉利的抗药性检测[J]. 农学学报,2014,4(12):30-32.

[4] Radice S, Marabini L, Gervasoni M, et al. Adaptation to oxidative stress: effect of vinclozolin and iprodione on the HepG2 cell line[J]. Toxicology, 1998,129(2/3):183-191.

[5] Hosokawa S, Murakami M, Ineyama M, et al. Effects of procymidone on reproductive organs and serum gonadotropins in male rats[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 1993,18(2):111-124.

的要求.运用本文方法,对采自敦化地区 3 个乡镇人参土壤样品中有机氯农药残留量进行了检测分析,结果显示土壤中 PCNB 的残留量超出了国家规定的最大残留限量,HCHs、DDTs 的残留量均达到了国家规定的最大残留限量,这些药物残留对人参质量的影响有待于进一步研究.本文方法具有成本低、分析简便、快速等优点,因此适合批量样品的检测分析.

参考文献:

[1] Jiang Yufeng, Wang Xuetong, Jia Ying, et al. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticides in agricultural soil of Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009,170:989-997.

[2] Tao S, Xu F L, Wang X J, et al. Organochlorine

pesticides in agricultural soil and vegetables from Tianjin, China[J]. Environmental Science & Technology, 2005,39:2494-2499.

[3] Patlak M. Estrogens may link pesticides, breast cancer[J]. Environmental Science & Technology, 1996,30(5):210A-211A.

[4] Zhang Lifei, Dong Liang, Shi Shuangxin, et al. Organochlorine pesticides contamination in surface soils from two pesticide factories in Southeast China [J]. Chemosphere, 2009,77:628-633.

[5] 杨国义,万开,张天彬,等. 广东省典型区域农业土壤中有有机氯农药含量及其分布特征[J]. 农业环境科学学报,2007,26(5):1619-1623.

[6] 吴志昇,谢光炎,杨国义,等. 广州市农业土壤中六六六(HCHs)和滴滴涕(DDTs)的残留特征[J]. 生态环境学报,2009,18(4):1256-1260.

[7] 赵晓松,李香丹,王玉军,等. 关于人参中有有机氯农药残留的分析[J]. 人参研究,1995(4):23-25.

(上接第 22 页)

[6] 长城,刘文丛,李伟,等. HPLC 和 GC 分析人参中腐霉利残留含量[J]. 人参研究,2011,23(4):16-19.

[7] 郑龙,周敏. 气相色谱-质谱联用法测定蔬菜中的腐霉利残留试验[J]. 广东农业科学,2009,3:155-156.

[8] Li Y, Kim M R, Lee K B, et al. Determination of procymidone residues in ginseng by GC-ECD and GC-MS equipped with a solvent-free solid injector [J]. Food Control, 2007,18(4):364-368.

[9] 李莉,赵晓松. 吉林省东部山区人参栽培基地土壤污染现状与评价[J]. 农业环境科学学报,2005,24(2):403-406.

[10] 任刚,廖卫波,胡志成,等. 人参提取物中腐霉利残留的 HPLC 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(23):107-110.

[11] 康燕玉. 微生物对腐霉利在土壤中降解的影响研究[J]. 现代农业科技,2012,22:209-210.

[12] 王凡,洪葵. CTAB 法提取野野村菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报,2010,37(8):1211-1215.

[13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Reseach, 1997,25(24):4876-4882.

[14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007,24(8):1596-1599.

[15] Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4):406-425.