

1 株二甲四氯降解菌的分离鉴定及其降解特性

江紫薇¹, 谭济才¹, 谭琳^{1*}, 曾维爱^{1,2}, 李宏光², 蒋瑒¹

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院,湖南 长沙 410128 ;2.湖南省烟草公司 郴州市公司,湖南 郴州 423000)

摘 要:采用富集培养法,从湖南省郴州烟区土壤中分离得到 1 株可降解二甲四氯的细菌 SE08,经过形态、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析,初步鉴定为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。SE08 对二甲四氯的降解特性研究表明,SE08 能有效降解质量浓度为 150~1 000 mg/L 的二甲四氯,在 30 ℃条件下,24 h 内对 500 mg/L 二甲四氯的降解率达到 45.21%。菌株 SE08 降解二甲四氯的最适 pH 值为 6.0,最适温度为 30 ℃。

关 键 词:二甲四氯;降解;肠杆菌属

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)06-0642-06

Isolation, identification and degradation characteristics of a MCPA-degrading bacterial strain

JIANG Zi-wei¹, TAN Ji-cai¹, TAN Lin^{1*}, ZENG Wei-ai^{1,2}, LI Hong-guang², JIANG Yang¹

(1.College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Chenzhou Tobacco Company of Hunan Province, Chenzhou 423000, China)

Abstract: A bacterial strain named SE08 capable of degrading 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid (MCPA) was newly isolated by enrichment culture from the tobacco field soil in Chenzhou district, Hunan province. Strain SE08 was temporarily identified as *Enterobacter* sp. based on morphological and physio-biochemical characteristics combined with 16S rDNA sequence analysis. Strain SE08 could effectively degrade MCPA in concentration range 150–1 000 mg/L. And 45.21% of MCPA (500 mg/L) could be degraded by strain SE08 in 24 h. The optimal pH value and temperature for MCPA degradation by SE08 was 6.0 and 30 ℃, respectively.

Key words: 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid; degradation; *Enterobacter* sp.

中国从 1956 年开始在稻田和烟田大规模使用苯氧羧酸类除草剂,其中二甲四氯因除草效果显著、价格低廉而被广泛应用^[1-2]。幼苗期禾本科植物对二甲四氯尤其敏感,二甲四氯对未出土杂草的防除效果并不明显,且气温低于 18 ℃时效果明显降低。二甲四氯是激素型内吸传导选择性苯氧羧酸类除草剂,易被植物的根和叶部吸收,对植物有强烈的生理活性,低浓度时促进生长,高浓度时抑制生长^[3-4]。除草剂的频繁使用已引起了严重的环境污染问题^[3,5],由于它在水中的溶解度高,一旦释放到环境中,很

容易进入水生系统,对水生生物的毒性不容忽视^[6-7]。二甲四氯在土壤表面容易转移且存在污染地下水的^[10]可能性;另一方面,自 20 世纪 70 年代初以来,随着除草剂的广泛使用,杂草对除草剂产生的耐药性、抗药性问题凸显^[11],自然界中也已产生越来越多不同类型的抗除草剂的物种^[12],因此,消除环境中除草剂的残留危害具有重要意义。近年来,随着人们对生物修复技术研究的深入,利用微生物来降解环境中残留的除草剂已成为当今的热点。国内外学者在除草剂的微生物降解方面做了大量研究,已

收稿日期: 2012-05-09

基金项目: 湖南省烟草公司项目(10-12Aa02); 上海烟草集团项目(SZBCW2011)

作者简介: 江紫薇(1987—),女,湖南常德人,硕士,主要从事植物保护研究,jiangziwei87@163.com; *通信作者, hqltanlin@163.com

分离得到2-甲-4-氯丙酸(MCPP)^[13]、2,4,5-三氯苯酸(2,4,5-T)^[14]、2,4-二氯苯氧丙酸(2,4-DP)^[15]、2-甲基-4-氯苯氧丁酸(MCPB)^[16]的高效降解菌。但有关二甲四氯微生物降解的报道很少。笔者对湖南郴州烟区土壤中耐高浓度二甲四氯的微生物进行富集培养,分离纯化后,获得1株能降解二甲四氯的菌株SE08,对菌株SE08的降解性能进行了测定,以期为开发降低二甲四氯残留的微生物处理技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

于2010年5—10月,自郴州烟田(长期施用二甲四氯)采集土样。采集表层土壤样品(0~20 cm)^[17],用塑料袋密封,置4℃冰箱冷藏。二甲四氯(MCPA)标准品购自美国Sigma-Aldrich公司。

主要仪器设备与试剂有:SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州智净净化设备有限公司);LEH-250F型智能生化培养箱(上海飞越实验仪器有限公司);HZQ-X100A型恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司);PHS-3E型数显酸度计(上海佑科仪器仪表有限公司);2-16K型SIGMA台式冷冻离心机(北京东迅天地医疗仪器有限公司)。

培养基:无机盐基础培养液,富集培养液为3 g/L葡萄糖、二甲四氯按需要量添加至无机盐基础培养液;NA液体培养基^[18]。

1.2 方法

1.2.1 二甲四氯高效降解菌的分离纯化

菌株的富集及纯化培养参照文献[19]的方法进行;二甲四氯高效降解菌的分离纯化参照文献[20]的方法进行。

1.2.2 降解菌对二甲四氯降解性能的测定

1) 二甲四氯标准曲线的建立。二甲四氯浓度的定量测定采用紫外分光光度法,配制质量浓度为10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 mg/L的二甲四氯标

准溶液,在特征吸收波长下测定吸光度值,以二甲四氯标准溶液质量浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

2) 二甲四氯降解率计算。将富集纯化所得优势降解菌株活化培养18 h后制成菌悬液,分别接种至100 mL无机盐基础培养液(二甲四氯含量为500 mg/L)中,每个菌种设4个重复,37℃、200 r/min培养,分别在摇床恒温培养前和72 h取样,6 000 r/min离心10 min,取上清液,稀释10倍,根据标准曲线的拟合方程计算培养基中二甲四氯浓度,通过降解率的比较,复筛出降解力较强的菌株^[21]。

1.2.3 降解菌的鉴定

1) 降解菌株的生理生化鉴定。取复筛后的降解菌种,参照文献[22]的方法进行。

2) 16S rDNA的PCR扩增及序列测定。CTAB法提取细菌的总DNA,设计引物16F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和16R(3'-GGTTACCTGTACGACTT-5')扩增16S rDNA片段,DNA序列由英茂盛业生物技术有限公司测定。

3) 系统发育树的构建。将获取的SE08菌株16S rDNA序列在GenBank中核酸数据库进行BLAST分析比对,选取相关序列,再利用DNAMAN进行多重序列比对,构建发育树。

1.2.4 菌种的降解特性的测定

1) 降解菌生长与降解二甲四氯的关系曲线测定。吸取经活化18 h的菌液($OD_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)2 mL,接入100 mL无机盐基础培养液(二甲四氯含量为500 mg/L),37℃、200 r/min振荡培养。分别于培养1.5、3、4、6、8、10、12、14、24、28、32、36、40、48 h后取出,测定菌株降解率,并绘制降解曲线和菌株生长曲线。

2) 不同浓度二甲四氯对降解率的影响的测定。吸取经活化18 h的菌液($OD_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)2 mL,接入100 mL无机盐基础培养液中,二甲四氯含量分别为150、250、500、750、1 000、2 000、3 000 mg/L,

37 ℃、200 r/min 振荡培养 24 h, 测定菌株降解率。

3) 不同温度对菌株生长的影响的测定。吸取经活化 18 h 的菌液($OD_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)2 mL, 接入 100 mL 无机盐基础培养液(二甲四氯含量为 500 mg/L)中, 分别在 20、25、30、35、40 和 45 ℃下, 200 r/min 振荡培养 24 h, 每个温度设 3 个重复, 测定菌株降解率。

4) 不同 pH 对菌株生长的影响的测定。吸取经活化 18 h 的菌液($OD_{600\text{ nm}} \approx 0.6$)2 mL, 接入 100 mL 无机盐基础培养液(二甲四氯含量为 500 mg/L)中, 分别调节 pH 为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0, 37 ℃、200 r/min 振荡培养 24 h, 每个 pH 设 3 个重复, 测定菌株降解率。

1.2.5 数据处理

采用 Microsoft Excel 2007 软件对数据进行处理和绘图, 采用 DPS7.5 统计分析软件对数据进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 二甲四氯标准曲线的制定

用紫外可见分光光度计扫描二甲四氯的特征吸收波长, 得出在 287 nm 波长下有最大光吸收值, 与李芳^[23]报道的大致相同。在特征吸收波长 287 nm 测定吸光度值, 以二甲四氯标准溶液为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得拟合方程为 $y=0.004x-0.001$ ($r=0.999\ 8$)。

2.2 二甲四氯降解菌的筛选

富集纯化后, 从供试土壤中分离得到 10 种菌株, 均能在低浓度二甲四氯的环境中生长, 将其编号为 SE01~SE10。其中编号为 SE01、SE03、SE06、SE08 的菌株能以 3 000 mg/L 二甲四氯为唯一碳源生长, 可作为有降解潜能的菌株进行复筛。

计算待测样品中二甲四氯的浓度(结果取平均值), 计算降解率, 通过降解率的对比复筛出有较强降解力的菌株。由表 1 可见, 初筛得到的 4 菌株均

有一定的降解能力, 其中 SE08 菌株的降解率最高, 达到 40.60%, 由此选取 SE08 菌株为高效降解菌进行研究。

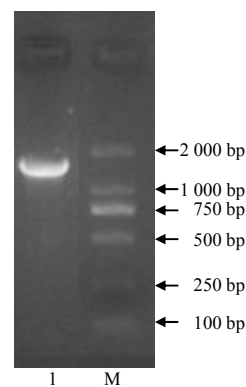
表 1 菌株的降解率

Table 1 Degrading rates for MCPA of the selected strains			
菌株编号	二甲四氯质量浓度/(mg·L ⁻¹)		降解率/%
	0 h	72 h	
SE01	506.821 5	317.044 6	37.40ABb
SE03	523.964 3	339.767 9	35.15Aa
SE06	509.142 9	322.937 5	36.57Aab
SE08	486.821 5	289.187 5	40.60Bc

2.3 降解菌株 SE08 的鉴定

经过分离纯化得到 1 株以二甲四氯为唯一碳源的降解菌 SE08, 该菌株为革兰氏阴性, 在 NA 固体培养基上 37 ℃培养 24 h, 形状椭圆, 边缘整齐, 表面光滑凸起, 菌落为奶白色, 体细胞呈短杆状, 长 2.0~2.5 μm, 宽 0.6~0.8 μm, 且随菌株生长变化, 无芽孢无荚膜。

利用 SE08 菌株 16S rDNA 特异引物进行 PCR 扩增, 得到的扩增产物(图 1)。DNA 测序后, 与 GenBank 细菌序列库中序列进行同源性比对, SE08 与肠杆菌属的多株细菌相似性较高, 与 *Enterobacter* sp. enrichment culture clone HSL90A 相似性系数达到 99%。根据 16S rDNA 序列, 再结合其生理生化特征, 将菌株 SE08 鉴定为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.), 图 2 为菌株 SE08 的系统发育树。



1 PCR 扩增产物; 2 DL2000 Marker。

图 1 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig.1 16S rDNA PCR amplification

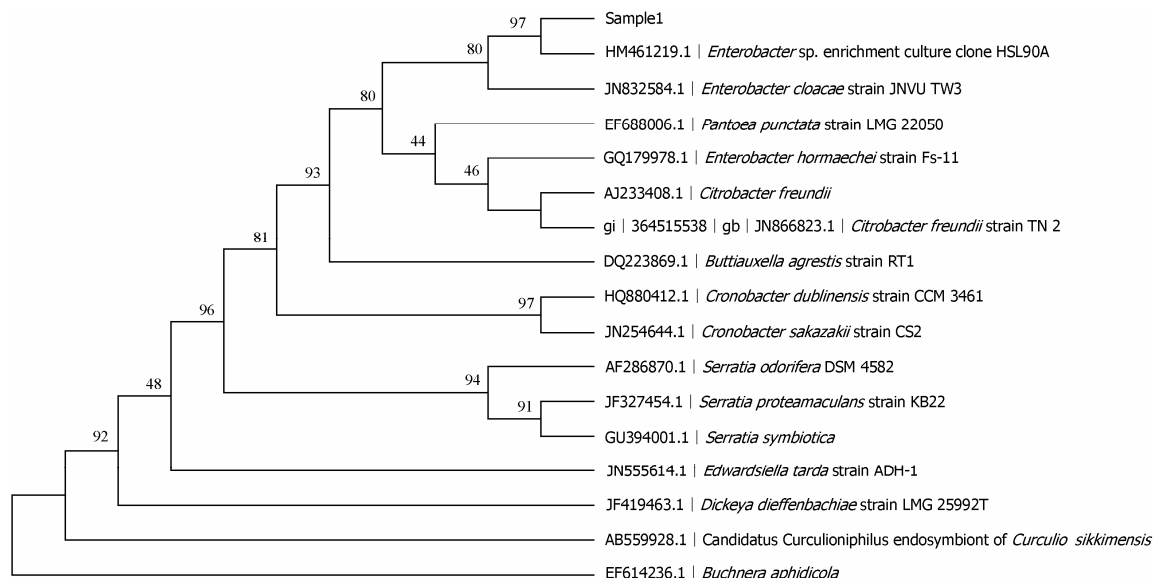


图2 菌株SE08基于16S rDNA序列同源性的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain SE08 and related species based on 16S rDNA sequences homology

2.4 菌株 SE08 的降解特性

2.4.1 降解菌生长与降解 MCPA 的关系曲线

如图 3 所示, 菌株 SE08 在以二甲四氯为唯一碳源生长时, 能较快进入对数生长期, 其中在 0 ~ 20 h 生长较快, 20 h 后 OD 值缓慢下降, 说明菌株生长受到抑制。而在 0 ~ 24 h, 二甲四氯的降解速率随底物浓度增大而加快, 培养 24 h 后二甲四氯的降解率为 40.83%, 24 h 后, 二甲四氯降解变化不大, 基本趋稳定, 这与菌液浓度不再增加有关。

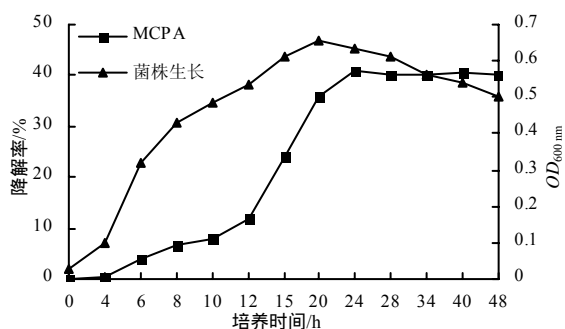


图3 降解菌 SE08 生长及对二甲四氯的降解率

Fig.3 Growth curve of strain SE08 growth and MCPA degradation

2.4.2 SE08 对不同初始质量浓度二甲四氯的降解

图 4 显示, 菌株 SE08 对不同初始质量浓度二甲四氯降解率各不相同, 最初, 降解率随培养液中二甲四氯质量浓度的升高而升高, 当二甲四氯质量

浓度为 500 mg/L 时, 降解率最高; 当二甲四氯质量浓度为 750 ~ 3 000 mg/L 时, 降解率明显降低, 二甲四氯质量浓度为 3 000 mg/L 时, 菌株几乎不再有降解作用。该菌株降解二甲四氯的较适质量浓度为 500 mg/L。

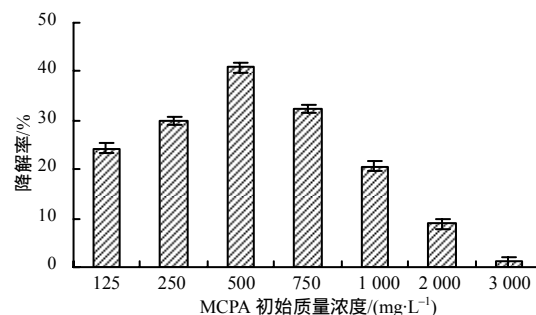


图4 二甲四氯不同初始质量浓度下菌株对二甲四氯的降解率

Fig.4 Degradation rate of MCPA under different initial concentrations

2.4.3 温度对菌株降解二甲四氯效率的影响

菌株 SE08 对二甲四氯的降解率随温度的升高而增大。到 30 °C 左右最大, 达到 45.21%。随后, 随温度升高, 降解率降低, 这是因为培养温度会影响细菌的生长, 温度过低, 细菌生长量小, 温度过高则抑制酶的活性, 所以二甲四氯的降解率都会变低。但从图 5 可看出, 在 35、40 °C 时也有近 40% 的降解率, 说明 SE08 对温度有较好的耐受性, 在田间应用有很强的适应性。

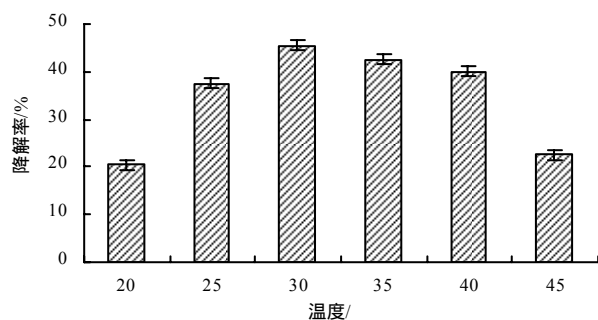


图5 不同温度下菌株对二甲四氯的降解率

Fig.5 Degradation rate of MCPA under different temperatures

2.4.4 pH 对菌株降解二甲四氯效率的影响

如图6所示,二甲四氯的降解率随pH值的增加而加大,在pH值为6的时候达到最大,尔后随pH值的增加降解率逐渐减小,可见在37℃、200 r/min 振荡培养下,pH6 是该菌降解二甲四氯的较适pH。二甲四氯的生物降解主要与细菌的生长量或产酶量有关,但是从降解率的大小来看,在pH 5~8 时,降解率均在35%以上,说明SE08对二甲四氯的降解受pH影响较小。

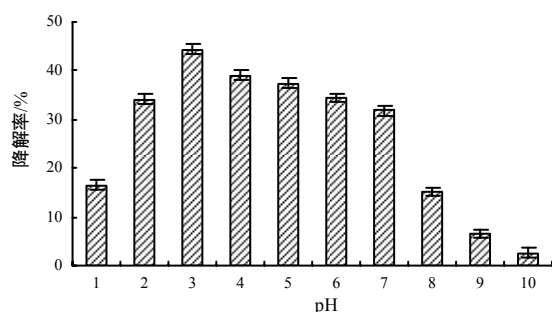


图6 不同pH值下菌株对二甲四氯的降解率

Fig.6 Degradation rate of MCPA at different pH media

3 讨论

从湖南郴州地区长期受到二甲四氯污染的烟田土壤中富集培养、筛选分离到1株革兰氏染色阴性的细菌SE08,根据表型特征、生理生化特性和16S rRNA 基因序列相似性分析,初步鉴定其为肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。 *Enterobacter* sp.能以二甲四氯为唯一碳源和能源生长,30℃条件下对500 mg/L 二甲四氯溶液的降解效率可达45.21%。 *Enterobacter* sp.生长和降解二甲四氯的较适pH值、温度分别为6.0和30℃。

肠杆菌多存在于人或动物的肠道,如赵悦等^[24]

在东亚飞蝗肠道内分离到肠杆菌。贾凌云^[25]以相似物为底物从变压器油污染点筛选获得了肠杆菌属(*Enterobacter* sp.),可降解多氯联苯(PCBs)。崔萍等^[26]利用稀释培养法从缫丝废水中分离到5株可降解家蚕蛹油的细菌,其中1株鉴定为肠杆菌。周莉^[27]从环境水体中筛选分离出肠杆菌,能降解氮源污染物。王卓娅等^[28]从长期汞污染地区分离得到1株肠杆菌用于降解氯化汞。吴辉等^[29]从酚废水中筛选得到苯酚降解菌肠杆菌属细菌,10 h内500 mg/L苯酚降解率达96.1%。郭明志^[30]从长期受铜污染的土壤中分离得到对重金属铜具有较强抗性的菌株肠杆菌,以用于修复土壤铜污染。

关于肠杆菌的降解作用报道较多,但未见研究报道肠杆菌属对苯氧羧酸类除草剂的降解作用,本试验筛选的SE08虽然对二甲四氯的降解率并不高,但是所用二甲四氯的质量浓度较高,证明SE08对高浓度二甲四氯有较好的耐受性,这对于在烟草生产中的降低高浓度除草剂药害和降低土壤毒性具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] 徐汉虹.植物化学保护学[M].北京:中国农业出版社,2007:8-10.
- [2] Shin H S. Determination of chlorine dioxide in water by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chromatogr A, 2006, 1123(1): 92-97.
- [3] 施海燕,吴慧明,程敬丽,等.2甲4氯人工抗原的合成与鉴定[J].农药学报,2004,6(2):20-24.
- [4] 韩熹莱.中国农业百科全书(农药卷)[M].北京:农业出版社,1993:145-146.
- [5] Hajšlová J, Rýparová L, Viden I, et al. A comparison of chromatographic methods for determination of striazines in milk[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 1990, 38: 105-114.
- [6] Wells M J, Yu L Z. Solid-phase extraction of acidic herbicides[J]. Chromatogr A, 2000, 885(1/2): 237-250.
- [7] Rayne S, Forest K, Friesen K J. Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives[J]. A review Environ Int, 2009(2): 425-437.
- [8] Keith L H. Environmental endocrine disruptors: A handbook of property data[K]. New York: Wiley, 1997:

- 261–270 .
- [9] Purcell V , Neaul J F , Malonga H , et al . Interactions of atrazine and 2 , 4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis and FTIR spectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta* , 2001 , 1548(1) : 129–138 .
- [10] Hiller E . Laboratory study of retention and release of weak acid herbicide MCPA by soils and sediments and leaching potential of MCPA[J] . *Plant Soil and Environment* , 2006(52) : 12 .
- [11] Tranel P J , Wright T R . Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides : What have we learned[J]. *Weed Science* , 2002 , 50(6) : 700–712 .
- [12] Hayes J D , Wolf C R . Molecular genetics of drug resistance[J] . *Biochem* , 1990 , 272(2) : 281–295 .
- [13] Mai P , Jacobsen O S , Aamand J . Mineralization and cometabolic degradation of phenoxyalkanoic acid herbicides by a pure bacterial culture isolated from an aquifer[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2004 , 6(3) : 486–490 .
- [14] Zharikova N V , Markushcheva T V , Galkin E G , et al . *Raoultella planticola* , a new strain degrading 2 , 4 , 5-trichlorophenoxyacetic acid[J] . *Applied Biochemistry and Microbiology* , 2006 , 42(3) : 258–262 .
- [15] Manfred H , Günther D , Michael L , et al . Isolation and characterization of a 2-(2 , 4-dichlorophenoxy) propionic acid-degrading soil bacterium[J] . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 1990 , 33(2) : 213–216 .
- [16] Smejkal C W , Seymour F A , Burton S K , et al . Characterisation of bacterial cultures enriched on the chlorophenoxyalkanoic acid herbicides 4-(2 , 4-dichlorophenoxy) butyric acid and 4-(4-chloro-2-methylphenoxy) butyric acid[J] . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 2003(9) : 561–567 .
- [17] 胡广军 , 梁成华 , 李培军 , 等 . 固定化微生物对多环芳烃污染土壤的降解[J] . *生态学杂志* , 2008 , 27(5) : 745–750 .
- [18] 诸葛健 , 李华钟 . 微生物学[M] . 北京 : 科学出版社 , 2003 : 26–31 .
- [19] 林秀 , 侯振安 , 赵思峰 , 等 . 一株多菌灵高效降解菌的分离鉴定及特性[J] . *生态学杂志* , 2011 , 30(7) : 1479–1483 .
- [20] 李丽 . 氯嘧磺隆高效降解菌的分离筛选及其生物学特性研究[D] . 北京 : 中国农业科学院 , 2008 .
- [21] 卫亚红 , 张晓燕 , 曲东 . 2,4-D 除草剂降解菌的分离及其生物学特性的研究[J] . *农业环境科学学报* , 2007 , 26(6) : 2183–2188 .
- [22] 东秀珠 , 蔡妙英 . 常见细菌系统鉴定手册[K] . 北京 : 科学出版社 , 1996 : 216 .
- [23] 李芳 , 王剑 , 文娜 . 土壤中二甲四氯钠的高效液相色谱分析[J] . *天津农业科学* , 2010 , 16(6) : 55–56 .
- [24] 赵悦 , 张泽华 , 王广君 . 东亚飞蝗肠道细菌鉴定及其对金龟子绿僵菌拮抗作用分析[J] . *植物保护* , 2008 , 12(22) : 69–73 .
- [25] 贾凌云 . 多氯联苯降解菌的筛选及其降解性能研究[D] . 大连 : 大连理工大学 , 2008 .
- [26] 崔萍 , 张楠 , 张莎莎 . 几株家蚕蛹油降解细菌的分离鉴定与降解能力测定[J] . *蚕业科学* , 2010(1) : 102–108 .
- [27] 周莉 . 用于污染河道修复的生物脱氮菌株的筛选及脱氮条件的研究[D] . 武汉 : 华中农业大学 , 2011 .
- [28] 王卓娅 , 李志红 , 李荷 . 抗汞菌株的筛选、鉴定及其特性研究[J] . *三峡大学学报* , 2008 , 30(5) : 72–77 .
- [29] 吴辉 , 郑师章 . 肠杆菌属一降酚菌株的降酚效果及其机理[J] . *复旦学报* , 2006 , 31(4) : 361–368 .
- [30] 郭志明 . 铜抗性菌株的分离鉴定及其强化植物修复铜污染土壤的研究[D] . 南京 : 南京农业大学 , 2009 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗 维