

1株代尔夫特菌的分离鉴定及其对水稻 丁草胺药害的修复效果

程小梅^{1a}, 彭亚军^{1b}, 周小毛², 罗坤², 柏连阳^{1*}

(1.湖南省农业科学院 a.园艺研究所 ;b.植物保护研究所,湖南长沙 410125 ;2.湖南农业大学农药研究所,湖南长沙 410128)

摘要:通过富集培养技术,从农药厂排污口、废液池等长期受丁草胺污染的土壤中,分离到1株以丁草胺为唯一碳源生长的细菌C-5;经形态学观察、生理生化特征以及16S rDNA序列同源性分析,鉴定为代尔夫特菌属(*Delftia* sp.)。菌株C-5最适宜的生长条件为:pH7.0、温度30℃。在丁草胺初始质量浓度为20 mg/L、C-5接种量为5%($OD_{600}=1.34$)时,该菌株对丁草胺的降解率达76%以上。在实验室条件下,当丁草胺质量浓度为5 mg/L,C-5接菌量为10%时,出苗率达到87%,仅比空白低10%,比未加菌组高50%。株高比空白低44%,比未加菌高93%。综合分析出苗率和株高等指标,菌株C-5对丁草胺造成的水稻幼苗药害的总体修复效果大于50%。

关键词:代尔夫特菌属;丁草胺;生物修复

中图分类号:Q93-331;S154.3 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2014)01-0048-05

Isolation and identification of a *Delftia* sp. strain C-5 and its bioremediation effect on butachlor injured rice

CHENG Xiao-mei^{1a}, PENG Ya-jun^{1b}, ZHOU Xiao-mao², LUO Kun², BAI Lian-yang^{1*}

(1.a.Hunan Horticultural Institute; b.Hunan Plant Protection Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China; 2. Institute of Pesticide Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A bacterial strain capable of utilizing only butachlor as carbon source, named C-5, was isolated from butachlor-contaminated soil in sewage outfalls and waste reservoirs of several pesticide factories using enrichment culture technique. Strain C-5 was identified as *Delftia* sp. based on its morphological, physiological and biochemical characteristics and on 16S rDNA homologue sequence analysis. The optimal pH value and temperature for growth of strain C-5 were 7.0 and 30°C, respectively. When the initial mass concentration of butachlor was 20 mg/L and the inoculation rate of strain C-5 ($OD_{600\text{ nm}}=1.34$) was 5%, more than 76% of butachlor was degraded. When inoculation rate of strain C-5 was 10% and the seedlings were treated with butachlor in mass concentration of 5 mg/L, the emergence rate reached 87%, only 10% lower compared to the blank control, while 50% higher compared to the group without inoculation of strain C-5; the plant height was 44% lower than the blank control, but 93% higher than the group without inoculation of strain C-5 under laboratory conditions. Analyses of the emergence rate and the plant height of rice seedlings indicated that bioremediation effect of strain C-5 was over 50%.

Key words: *Delftia* sp.; butachlor; bioremediation

丁草胺(美国孟山都公司产品)选择性强、杀草活性高,近年来一直是中国水稻田使用面积广、施用量大的酰胺类除草剂^[1]。尽管丁草胺属于非长残效除草剂,但在土壤中的残留期有1个月以上,在植株、土壤以及水体中的大量沉积,使得丁草胺药害问题频频发生^[2]。解除丁草胺在土壤中的残留和污染研究成为热点^[3]。土壤中的除草剂残留主要通过物理、化学及生物学降解完成。生物修复是利用微生物的广泛代谢途径对污染物进行处理,微生物降解农药,既高效安全,又运行成本低,高效降解菌的筛选尤为关键^[4-5]。笔者通过富集培养技术,从农药厂排污口、废液池等长期受丁草胺污染的土壤中,分离得到1株以丁草胺为唯一碳源生长的细菌C-5,研究了其在不同条件下的生长和降解特性,及其对室内盆栽水稻药害的修复效果,以期为丁草胺药害的生物修复提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用江苏常隆化工有限公司农药厂长期排放丁草胺的排污口、废液池土壤作为富集培养的土壤来源。

无机盐培养基: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g; CaSO_4 , 0.08 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g; K_2HPO_4 , 0.2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g, 1 000 mL 去离子水, pH7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

LB 培养基: 牛肉膏 10 g, 蛋白胨 5 g, 氯化钠 10 g(固体培养基加琼脂 15 g), 1 000 mL 去离子水, pH7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 降解菌的筛选

取 5 g 土样, 加入含 50 mg/L 的丁草胺无机盐培养液中, 于 30 °C 恒温摇床黑暗振荡培养(150 r/min), 每隔 7 d 接种体积分数 5% 的菌液至同样的新鲜培养基中, 并且使丁草胺的质量浓度以 50 mg/L 的梯度递增, 至培养基中的丁草胺质量浓度达到 200 mg/L, 驯化约 2 个月。于 LB 培养基上划线分离, 挑取生长较好的菌落分离纯化 3 次, 得到单

一的菌株, 保存于 LB 固体斜面培养基上, 30 °C 培养过夜后放置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 降解菌的鉴定

1) 降解菌的形态和生理生化特性鉴定。根据《常见细菌系统鉴定手册》^[6]进行。

2) 降解菌的 16S rDNA 序列测定。提取细菌总 DNA^[7], 采用细菌的 16S rDNA 通用引物^[8], 引物 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 引物 R: 5'-GGTACCTTCT TACGACTT-3'。以提取的总 DNA 为模板, 对筛选菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10×EX-Taq Buffer 2.5 μL, dNTP mix(25 mmol/L) 2 μL, 16S rDNA 引物(10 mmol/L) 各 0.4 μL, EX-Taq 酶 0.2 μL, 基因组 DNA 模板 1 μL, 补水到总体积 25 μL。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 6 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 3 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物应用胶回收试剂盒纯化回收(GENERay), 回收片段连接到 pEASY T5, 热激 30 s 转化到 Top10 感受态细胞, 在含有 50 μg/mL 的 LB 固体培养基上 37 °C 过夜培养, 挑取阳性克隆斑于含有氨苄青霉素的液体 LB 培养基中培养 12 h, 应用 M13F/R 进行菌液 PCR 验证后测序, 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 分析同源性, 并采用 MEGA5.05 构建系统发育图谱。

1.2.3 降解菌的降解条件优化

1) 丁草胺的提取及色谱条件。将 20 mL 接种了菌体的无机盐培养基转入 125 mL 分液漏斗中, 分别用 20、20、10 mL 乙酸乙酯振荡提取 3 次, 有机相经无水硫酸钠(350 °C 烘干 4 h)过滤至浓缩瓶, 在旋转蒸发仪浓缩至近干, 冷却后加丙酮振荡淋洗定容至 10 mL, 摇匀待测。

丁草胺的气相色谱条件: 气相色谱仪为岛津 2010, 色谱柱为 RTX-5(30 m×0.25 mm×0.25 μm)^[9]。

2) 考查环境 pH 和接种量对菌株生长及对丁草胺降解效果的影响。分别以接种量 1%、5%、10%、15%、20% 作为菌悬液添加量; 分别以 pH5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 0.1 mol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液配制的无机盐培养基培养, 150 r/min 摇床 30 °C 培养 7 d, 测定细菌的 OD_{600} 值和对丁草胺的降解率^[10]。

1.2.4 降解菌修复丁草胺对水稻幼苗药害的盆栽试验

pH7.0 缓冲液配制的半固体无机盐培养基灭菌后,分别添加丁草胺至质量浓度为 5、10、20 mg/L,接种量 5%、10%($OD_{600}=1.34$),组合处理。菌液于室温下 12 000 r/min 离心 8 min,用无菌水洗脱菌体沉淀后加入培养基中。将培养基放置于培养箱中过夜后,将萌发一致的水稻种子移栽至盆中,每盆 10 粒,每个处理设 3 个生物学重复。于培养箱中 16 h 光照、8 h 黑暗、30 °C 培养,5 d 后观察记录出苗数、株高、根长、鲜重。

2 结果与分析

2.1 降解菌的筛选及鉴定结果

通过富集培养和对降解单菌株的分离和纯化,筛选出能以丁草胺为唯一碳源的单一菌株,将分离得到的单一菌株重新转接到含有丁草胺 20 mg/L 的无机盐培养基中,摇床培养验证其降解丁草胺的特性。通过测定各单一菌株的降解率,C-5 菌株的降解率最高。

C-5 菌株在 LB 平板上放置于培养箱 30 °C 培养 24 h 后,菌落乳白色,呈隆起、圆形、不透明状。菌体形态经扫描电镜(SEM)观察,大多以短链状存在,只有少数以单个存在,如图 1 所示。

C-5 菌株淀粉水解反应呈阴性、接触酶反应呈阳性、脲酶反应呈阳性、V-P 反应阳性、甲基红反

应阳性、氧化酶反应阳性、明胶液化反应阳性。

降解菌株 C-5 序列已在 GenBank 中注册,登录号为 KC702840。将 C-5 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的同源性较高的 4 个细菌模式株进行比较,菌株 C-5 的 16S rDNA 序列与代尔夫特菌属(*Delftia* sp.)的 4 个种都有较高的序列同源性 构建其系统发育树 如图 2。C-5 菌株的 16S rDNA 与 *Delftia tsuruhatensis* (GenBank 登录号为 GQ140326),*Delftia acidovorans* (GenBank 登录号为 GU459215),*Delftia lacustris*(GenBank 登录号为 JN644603)及 *Delftia* sp. (GenBank 登录号为 FJ688376)的相似性均为 99%,且与 *Delftia* sp.的几个种共同组成 1 个分支。

根据系统发育树的结果,结合生理生化特征,将 C-5 菌株鉴定为代尔夫特菌属(*Delftia* sp.)。

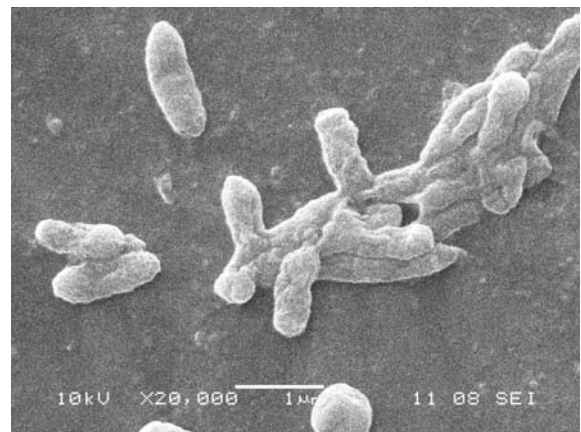


图 1 菌株 C-5 在扫描电镜下的菌体形态

Fig.1 Cell morphology of strain C-5 under scanning electron microscope

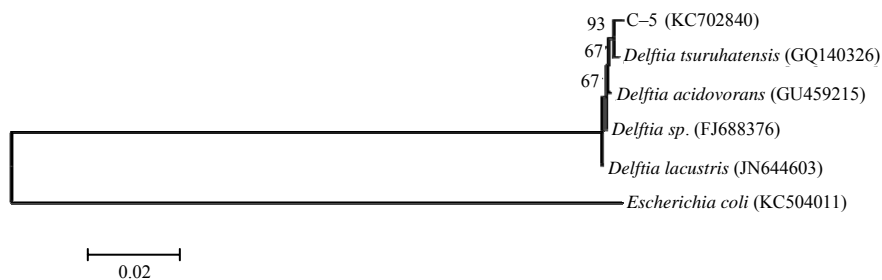


图 2 C-5 菌株的系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree for strain C-5

2.2 C-5 菌株的降解特性

2.2.1 pH 对 C-5 菌株生长和对丁草胺降解效果的影响

当 pH=7 时,C-5 菌株的生长状态最好,在

强酸或者强碱状态下都不利于细菌生长(图 3)。当 pH=7 时,C-5 菌株对丁草胺的降解率最高,偏酸或偏碱都影响细菌对丁草胺的降解能力。

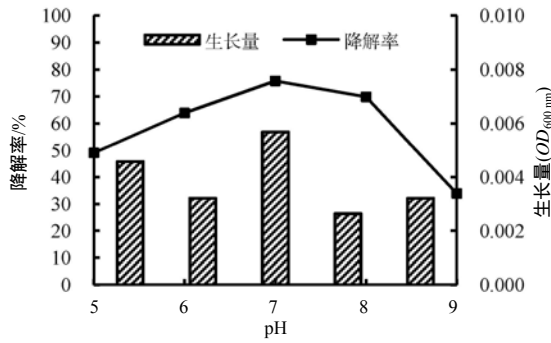


图 3 C-5 菌株在不同 pH 的生长量及对丁草胺的降解率

Fig.3 Influence of strain C-5 on growth and butachlor degradation under different pH

2.2.2 接菌量对 C-5 菌株生长和对丁草胺降解效果的影响

由图 4 可看出，随着接菌量的增加，细菌的生长量也随之增加。在接菌量为 5% 时，细菌对农药的降解率最高。随着接菌量的增大，降解率增幅不大，当接菌量达到 20% 时，降解率反而会下降，这可能是由于细菌量过大而产生了某些有害中间代谢产物，抑制了有效降解菌的生长的缘故。

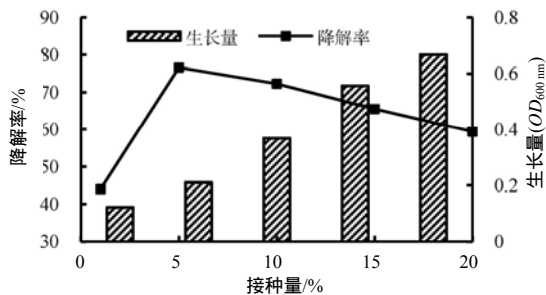


图 4 C-5 菌株在不同接种量的生长量及对丁草胺的降解率

Fig.4 Influence of strain C-5 on growth and butachlor degradation with different inoculation size

2.3 C-5 菌株在最佳培养条件下的生长量和对丁草胺的降解能力

由图 5 可知，C-5 菌株的生长量在第 7 天时达到最大值，其生长趋势趋于平缓，对丁草胺的降解在第 7 天也达到最大。说明随着 C-5 对培养基的适应和生长，对丁草胺的降解能力也愈来愈强，并同时第 7 天达到最大。在培养的第 1 天降解率虽然不高，但是丁草胺的浓度也下降了。同时该菌株生长比较快，在第 1 天就能生长良好，说明笔者对无机盐培养基的优化比较成功。

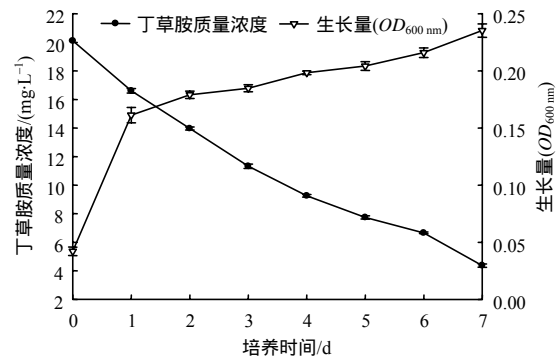


图 5 C-5 菌株的生长及其对丁草胺的降解效果

Fig.5 Growth curve of strain C-5 and degradation curve of butachlor with strain C-5

2.4 C-5 菌株对水稻丁草胺药害的修复效果

由表 1 可知，添加 C-5 菌株后对产生丁草胺药害水稻的出苗率、株高、根长、株鲜重均有比较明显的修复效果。在丁草胺质量浓度为 5 mg/L、接菌量为 10% (OD_{600nm}=1.34) 时，出苗率达到 87%，仅比空白低 10%，比未加菌组高 50%。株高比空白低 44%，比未加菌高 93%，对药害的修复效果最好。此外在丁草胺质量浓度 10、20 mg/L 下的修复效果虽然都不理想，但在 10% 接菌量下仍有一定的修复效果。

表 1 C-5 菌株不同接种量下的水稻药害植株性状

Table 1 Character of butachlor injured rice inoculated with different amount of strain C-5

丁草胺质量浓度/(mg·L ⁻¹)	接菌量/%	每盆出苗数/株	株高/cm	根长/cm	每 10 株鲜重/g
0	0	(9.67±0.57)Aa	(10.70±0.84)Aa	(5.97±0.29)Aa	(0.29±0.02)Aa
	5	(8.67±1.54)Aa	(5.32±0.44)Bb	(2.73±0.21)Bb	(0.14±0.01)Bb
5	10	(8.67±0.58)Aa	(5.97±0.31)Bb	(2.98±0.09)Bb	(0.17±0.01)Bb
	0	(3.67±0.58)Bb	(0.44±0.07)Cc	(1.19±0.04)Cc	(0.00±0.00)Cc
	5	(2.00±0.00)Cc	(0.97±0.18)Bb	(1.47±0.09)Bb	(0.05±0.01)Bb
10	10	(4.33±0.58)Bb	(1.51±0.33)Bb	(2.09±0.38)Bb	(0.06±0.01)Bb
	0	(0.67±0.58)Dd	(0.44±0.05)Bb	(1.17±0.12)Bb	(0.00±0.00)Cc
	5	(0.67±0.58)Cc	(1.08±0.18)Bb	(1.39±0.07)Bb	(0.02±0.01)Bb
20	10	(5.00±1.00)Bb	(1.28±0.15)Bb	(1.69±0.05)Bb	(0.03±0.01)Bb
	0	(0.67±1.15)Cc	(0.50±0.02)Bb	(1.07±0.05)Bb	(0.00±0.00)Cc

3 讨论

从长期受丁草胺污染的农药厂排污地筛选到的代尔夫特菌属的细菌 C-5, 对丁草胺具有较好的降解能力, 且能以丁草胺为唯一 C 源。通过富集驯化、生理生化特征和菌株形态相似性比较及 16S rDNA 序列同源性分析, 将菌株 C-5 鉴定为代尔夫特菌属 (*Delftia* sp.)。目前有学者在(2,4-D)^[13]、苯胺^[14]等中筛选出该菌属。国内外报道的对丁草胺其降解作用的微生物主要有钩杆菌属^[15]、不动杆菌属^[16]、施氏假单胞菌^[17]、副球菌属(*Paracoccus* sp.)^[18]、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[19]等, 本研究筛选出的代尔夫特菌属的细菌, 丰富了丁草胺降解菌株的多样性, 为受丁草胺污染的土壤的生物修复提供了菌株资源。

盆栽试验表明, 通过接种降解菌, 能明显减轻丁草胺对水稻植株的药害。在丁草胺质量浓度为 5 mg/L, 接菌量为 10% 的条件下, 对丁草胺的药害修复效果最好, 修复后出苗率达 87%, 总体修复效果达 50% 以上。在验证了室内盆栽药害修复效果后, 还将进一步探索该菌株的最适发酵条件, 配制高效发酵液投入大田, 在自然环境下验证药害修复效果。

参考文献:

- [1] Yu Y L, Chen Y X, Luo Y M, et al. Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(6): 771-774.
- [2] 程湘虹, 沈朵朵. 丁草胺引起药害的原因和对策[J]. *中国植保导刊*, 2005, 25(6): 40.
- [3] Zheng Jingwei, Li Rong, Zhu Jianchun. Degradation of the chloroacetamide herbicide butachlor by *Catellibacterium caeni* sp. nov DCA-1^T[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 73: 16-22.
- [4] 滕春红, 苏少泉. 除草剂在土壤中的微生物降解及污染土壤的生物修复[J]. *农药*, 2006, 45(8): 6-8.
- [5] 汪佳秀, 张祥辉, 穆文辉, 等. 降解菌 2N3 对被氯嘧磺隆污染土壤的生物修复[J]. *农药学学报*, 2010, 12(1): 49-53.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[K]. 北京:

科学出版社, 2001: 160-240.

- [7] Cheng H R, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28: 55-59.
- [8] Karen M K, Sherry L H, Douglas C N. Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents possess vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 7487-7496.
- [9] 楚小强, 庞国辉, 方华, 等. 丁草胺降解菌的分离鉴定及降解特性的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(1): 145-150.
- [10] Xu Jun, Qiu Xinghui, Dai Jiayin. Isolation and characterization of a *Pseudomonas oleovorans* degrading the chloroacetamide herbicide acetochlor[J]. *Biodegradation*, 2006, 17: 219-225.
- [11] 岳永德. 农药残留分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [12] González A J, Gallego A, Gemini V L. Degradation and detoxification of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) by an indigenous *Delftia* sp. strain in batch and continuous systems[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 66: 8-13.
- [13] Xiao Chengbin, Ning Jun, Yan Hai. Biodegradation of aniline by a newly isolated *Delftia* sp. XYJ6[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2009, 17(3): 500-505.
- [14] 李艳春, 熊明华, 肖晶, 等. 一株丁草胺降解菌的分离鉴定及其降解特性的研究[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(8): 1178-1182.
- [15] 李春艳, 李艳春, 成小松, 等. 一株丁草胺降解菌的分离鉴定及培养条件优化[J]. *环境科学学报*, 2010, 30(2): 347-353.
- [16] Zhang J, Zheng Jin-wei, Liang B. Biodegradation of chloroacetamide herbicides by *Paracoccus* sp. FLY-8 in Vitro[J]. *Agric Food Chem*, 2011, 59(9): 4614-4621.
- [17] Li Chao, Zhang Ji, Wu Zhi-Guo. Biodegradation of Buprofezin by *Rhodococcus* sp. strain YL-1 Isolated from rice field soil[J]. *Agric Food Chem*, 2012, 60: 2531-2537.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维