

任建军, 牛东泽, 汤 姚, 等. 特丁噻草隆降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 526-528.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.038

## 特丁噻草隆降解菌的分离鉴定及降解特性

任建军<sup>1</sup>, 牛东泽<sup>1</sup>, 汤 姚<sup>1</sup>, 张 晋<sup>2</sup>, 田英申<sup>3</sup>, 李春雨<sup>1</sup>

(1.常州大学城乡矿山研究院, 江苏 常州 213164; 2.河北慈心环保科技有限公司, 河北 廊坊 065600; 3.西安新天地草业有限公司, 陕西 西安 710699)

**关键词:** 特丁噻草隆; 降解菌; 生物降解

**中图分类号:** S482.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2020)02-0526-03

## Isolation, identification and degradation characteristics of tebuthiuron-degrading bacteria

REN Jian-jun<sup>1</sup>, NIU Dong-ze<sup>1</sup>, TANG Yao<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>2</sup>, TIAN Ying-shen<sup>3</sup>, LI Chun-yu<sup>1</sup>

(1. Institute of Urban and Rural Mines, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Hebei Cixin Environmental Technology Co., Ltd., Langfang 065600, China; 3. Xi'an Xintiandi Grass Industry Co., Ltd., Xi'an 710699, China)

**Key words:** tebuthiuron; degrading bacteria; biodegradation

随着现代农业的不断发展, 农药被广泛应用于病虫害的防治中, 这极大地提高了粮食产量。但是, 农药的频繁使用和超剂量施用会导致土壤中农药残留量超标, 特别是新型农药具有热稳定性强、不易光解等特点, 很难在自然条件下快速降解<sup>[1-2]</sup>。土壤中的农药残留不仅影响食品安全, 也给人畜的生活环境和健康带来了巨大威胁<sup>[3]</sup>。因此, 有效解决土壤中农药残留带来的污染问题已迫在眉睫。

目前, 常用的土壤农药残留修复技术包括物理修复技术、化学修复技术和生物修复技术。但是, 物理修复技术和化学修复技术主要用于修复工业污染农田的土壤<sup>[4]</sup>, 因其存在设备昂贵, 处理成本高, 可能产生二次污染等问题, 所以很少用于修复农药污染的农田土壤<sup>[5]</sup>。生物修复技术具有成本低, 无二次污染, 可以改善土壤结构等优点, 能够降解农药等大多数有机污染物, 可将污染物彻底分解为二氧化碳、水、

无机化合物等对环境和人畜无害的物质<sup>[6-7]</sup>。

特丁噻草隆是一种灭生性的杂环取代脲类除草剂<sup>[8]</sup>, 因其具有药效高、毒性小等特点而被用于控制多种农林作物的杂草, 并且因其在土壤和水体中的高溶解度、低生物降解性及潜在的可致癌性, 受到学者的广泛关注<sup>[9]</sup>。但是, 目前关于特丁噻草隆微生物降解的研究较少。因此, 本研究拟筛选特丁噻草隆的高效降解菌, 并研究其对特丁噻草隆的降解特性, 以为特丁噻草隆污染的修复提供方法和理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试仪器及试验材料

特丁噻草隆纯品及主要化学试剂(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司, 分子生物试剂购自宝生物工程(大连)有限公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自于南京奥青生物技术有限公司。土壤样品由河北慈心环保科技有限公司提供, 采集于长期施用特丁噻草隆的农田以及特丁噻草隆生产工厂排污口的污泥。试验主要器材包括: 恒温摇床、电泳仪、自动凝胶图像分析仪、恒温培养箱、高速离心机、高压灭菌锅、通风干燥箱、超纯水仪、紫外分光光度计、高效液相色谱仪、气相色谱-质谱联用仪。

基础盐培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g、 $\text{NaCl}$  1.0

收稿日期: 2019-09-15

基金项目: 新型生物饲料及肥料生产技术的开发和应用基金项目(2018K0947); 农林有机固废处理及土壤修复技术研究及示范基金项目(2018K0948)

作者简介: 任建军(1983-), 男, 山西朔州人, 博士, 研究员, 主要从事农业与环境微生物研究。(E-mail) rjj@cczu.edu.cn

通讯作者: 李春雨, (E-mail) chunyu.li@cczu.edu.cn

g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g、 $\text{MgCl}_2$  0.1 g、去离子水1 000 ml、pH 7.0,以特丁噻草隆为碳源,根据需要调整特丁噻草隆的浓度,基础盐固体培养基为基础盐培养基中再添加1.5%的琼脂。Luria-bertani (LB)培养基:酵母粉5.0 g、氯化钠10.0 g、胰蛋白胨10.0 g、去离子水1 000 ml, LB固体培养基为LB培养基中再添加1.5%的琼脂。

## 1.2 试验方法

1.2.1 富集与分离 取5 g特丁噻草隆污染土样,加入特丁噻草隆质量浓度为100 mg/L的基础盐培养基中,置于37℃、180 r/min条件下培养7 d,以3%的接种量将其接入相同的培养基中,传代3次。取1 ml富集培养物分别进行梯度( $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ )稀释,用移液枪吸取100  $\mu\text{l}$ ,分别涂布于特丁噻草隆质量浓度为100 mg/L的基础盐固体培养基上,置于37℃恒温培养箱中培养35 d,选择有透光圈的菌落在LB固体培养基上划线培养,挑取单菌落,通过培养得到纯化菌株。

1.2.2 菌株鉴定 通过16S rRNA基因序列鉴定纯化菌株的种属<sup>[10]</sup>。以降解菌的基因组DNA为模板,扩增16S rRNA基因,用16S通用引物,即27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'和1492R:5'-TACCTTGTACGACTT-3'。25.00  $\mu\text{l}$ 扩增体系为:10 $\times$  Buffer 2.50  $\mu\text{l}$ ,脱氧核糖核苷三磷酸(2.5 mmol/ $\mu\text{l}$ ) 2.00  $\mu\text{l}$ ,引物(25.0 mmol/ $\mu\text{l}$ )各0.75  $\mu\text{l}$ , $\text{MgCl}_2$ (25.0 mmol/ $\mu\text{l}$ ) 2.50  $\mu\text{l}$ ,模板DNA 0.25  $\mu\text{l}$ ,*Taq* DNA聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.20  $\mu\text{l}$ ,用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)补齐至25.00  $\mu\text{l}$ 。聚合酶链式反应(PCR)条件为:95℃预变性5 min;94℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸90 s,循环35次,72℃延伸10 min。PCR扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序,基因序列在NCBI上进行Blast比对分析,并与GenBank中其他菌株的16S rRNA基因序列进行同源性比较,利用Mega 6.0软件构建系统进化树。

1.2.3 特丁噻草隆质量浓度的测定 发酵样品过滤后,用高效液相色谱法(HPLC)进行检测<sup>[8]</sup>,条件为:C18(250.0 mm $\times$ 4.6 mm,长度 $\times$ 内径)不锈钢柱,流动相是甲醇+0.1%甲酸/超纯水(75/25,体积比),流速为1.0 ml/min,进样体积为10  $\mu\text{l}$ ,柱温为25℃,保留时间为5 min,检测波长为255 nm。根据标准曲线方程 $Y=0.9718x-2.7466$ ( $R^2=0.9987$ )计算特丁噻草隆的质量浓度。

1.2.4 降解菌生长状况和降解性能的测定 将筛选出的降解菌及其混合菌(等量混合)分别按0.5%接种于含400 mg/L特丁噻草隆的基础盐培养基中,置于37℃、180 r/min恒温摇床中培养7 d,测定特丁噻草隆的质量浓度和 $OD_{600}$ 的吸光值。

1.2.5 吐温-80对特丁噻草隆降解率的影响 将筛选出的降解菌及其混合菌分别按0.5%接种于含400 mg/L特丁噻草隆和0.5%吐温-80的基础盐培养基中,置于37℃、180 r/min恒温摇床中培养7 d,测定特丁噻草隆的质量浓度,并计算降

解率。

1.2.6 数据处理 利用DPS软件对数据进行统计分析,并用ANOVA方法进行多重比较,采用Duncan's方法检验差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 特丁噻草隆降解菌的筛选与鉴定

本试验从受污染的土样中筛选出15种菌株,对其进行富集驯化、分离纯化、初筛和复筛,最终选出了4株能在以特丁噻草隆作为唯一碳源的选择性培养基上生长的菌株,并将其分别命名为T2-1、T2-2、T2-3和T2-4。以菌株的总DNA为模板,扩增16S rRNA基因片段1.5 kb左右。将测序结果提交至NCBI在线Blast上,并用16S rRNA基因序列构建进化树,结果表明,T2-1为杀香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*),T2-2为台湾铜绿假单胞菌(*Cupriavidus taiwanensis*),T2-3为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),T2-4为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)。

### 2.2 降解菌的生长和降解性能

不同降解菌对特丁噻草隆降解性能的研究结果表明,降解菌T2-1、T2-2、T2-3、T2-4和混合菌对特丁噻草隆的降解量分别为11.39 mg/L、11.53 mg/L、10.95 mg/L、7.38 mg/L和15.27 mg/L,对应的降解率分别为0.0285、0.0288、0.0274、0.0185和0.0382。由此可知,混合菌的降解效果最好,在单菌降解中,T2-1和T2-2的降解效果较好。不同降解菌在降解培养基中的生长情况表明,降解菌T2-1、T2-2和T2-4的菌体生物量增长明显,而T2-3和混合菌的菌体生物量几乎没有变化。

### 2.3 吐温-80对降解菌降解特丁噻草隆效果的影响

结果表明,降解菌T2-1、T2-2、T2-3、T2-4和混合菌在添加0.5%吐温-80的基础盐培养基中,降解量分别为20.12 mg/L、27.37 mg/L、23.89 mg/L、23.20 mg/L和32.43 mg/L,对应的特丁噻草隆降解率分别为0.0503、0.0684、0.0597、0.0580和0.0811。由此可知,吐温-80能够明显提高降解菌对特丁噻草隆的降解率。

## 3 讨论

用于农药残留生物修复的微生物包括芽孢杆菌属、假单胞菌属、克雷伯氏菌属、黄单胞菌属等<sup>[10-11]</sup>。假单胞菌是重要的生物降解资源<sup>[11-13]</sup>。本研究筛选出4株降解菌,包括杀香鱼假单胞菌、台湾铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌和施氏假单胞菌,均可用于降解环境中的特丁噻草隆等有机污染物。除此以外,假单胞菌还可以用于生物防治,是具有潜力的生物防治菌种资源<sup>[9,14]</sup>。微生物降解农药等有机污染物的本质是一系列酶促反应,单一微生物往往不具备降解有机物所需要的全部酶,因此,多种微生物协同作用能够加快有机污染物的降解。有研究表明,红球菌属和假单胞菌属混合

培养可以明显提高氯氰菊酯的降解率<sup>[15-16]</sup>。本研究发现,杀香鱼假单胞菌、台湾铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌和施氏假单胞菌混合后对特丁噻草隆的降解率更高。表面活性剂充分保证了底物与微生物的接触,有利于微生物的降解作用<sup>[17]</sup>。本试验发现,吐温-80能提高假单胞菌对特丁噻草隆的降解率。

尽管本研究对分离菌株的降解率进行了研究,但特丁噻草隆的生物降解途径和代谢产物尚不明确。在今后的研究中,可以改进代谢产物的提取方法,优化检测系统,进一步探索其降解机理,同时优化降解条件,更好地促进其在特丁噻草隆污染修复中的应用。

### 参考文献:

- [1] 谷涛,李永丰,张迹,等.取代脲类除草剂的微生物降解[J].微生物学通报,2017,44(8):1967-1979.
- [2] QIAN Y, MATSUMOTO H, LIU X, et al. Dissipation, occurrence and risk assessment of a phenylurea herbicide tebuthiuron in sugarcane and aquatic ecosystems in South China[J]. Environmental Pollution, 2017, 227: 389-396.
- [3] DU TOIT J C O, SEKWADI K P. Tebuthiuron residues remain active in soil for at least eight years in a semi-arid grassland, South Africa[J]. African Journal of Range & Forage Science, 2012, 29(2): 85-90.
- [4] 周文常,阳海.特丁噻草隆光催化降解动力学研究[J].湖南工程学院学报(自然科学版),2017,27(1):60-64.
- [5] SUN J, PAN L, TSANG D C W, et al. Organic contamination and remediation in the agricultural soils of China: a critical review[J]. Science of the Total Environment, 2018, 615: 724-740.
- [6] DA ROCHA M S, ARNOLD L L, DODMANE P R, et al. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: *in vivo*, *in vitro* and molecular approaches[J]. Toxicology, 2013, 314(2/3): 238-246.
- [7] PASCAL-LORBER S, ALSAYEDA H, JOUANIN I, et al. Metabolic fate of [<sup>14</sup>C] diuron and [<sup>14</sup>C] linuron in wheat (*Triticum aestivum*) and radish (*Raphanus sativus*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(20): 10935-10944.
- [8] 支建梁,牟仁祥,陈铭学,等.柱后紫外光解荧光衍生液相色谱法测定蔬菜中残留的15种苯脲除草剂[J].色谱,2008,26(1):93-97.
- [9] GILLIOM R J, BARBASH J E, CRAWFORD C G, et al. Pesticides in the nation's streams and ground water, 1992-2001[M]. Reston: U.S. Geological Survey, 2006:135-137.
- [10] REN J J, SHI G L, WANG X Q, et al. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(12): 2343-2352.
- [11] HUSSAIN S, ARSHAD M, SPRINGAEL D, et al. Abiotic and biotic processes governing the fate of phenylurea herbicides in soils: a review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2015, 45(18): 1947-1998.
- [12] 祝腾辉,罗香文,李聪,等.啉菌酯降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J].南方农业学报,2019,50(6):1256-1262.
- [13] 张闻,郑立稳,王加宁,等.利用实时荧光定量PCR特异检测多环芳烃污染土壤中的外源降解菌[J].江苏农业科学,2018,46(11):15-18.
- [14] 任建军,师光禄,高美娟,等.植物病原真菌拮抗细菌的筛选鉴定及活性成分分析[J].东北林业大学学报,2014,42(3):126-132.
- [15] 许育新,孙记全,李晓慧,等.两株菌对氯氰菊酯及其降解产物3-PBA的协同代谢研究[J].微生物学报,2007,47(5):834-837.
- [16] LIM M W, VON LAU E, POH P E. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil-present works and future directions[J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 109(1): 14-45.
- [17] ELLIS B, HAROLD P, KRONBERG H. Bioremediation of a creosote contaminated site[J]. Environmental Technology, 1991, 12(5): 447-459.

(责任编辑:王妮)