

锐劲特降解菌株 R-2 的分离、鉴定 及降解特性

宋瑶 李荣 王融 张曼曼 杨洪杏 李顺鹏 蒋建东*

(南京农业大学 生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 从长期受锐劲特污染的农药厂活性污泥中分离到一株锐劲特降解菌株 R-2, 根据其生理生化特征和 16S rRNA 基因序列同源性分析, 将该菌株鉴定为 *Paracoccus* sp.。菌株 R-2 能以锐劲特为唯一碳源生长, 在含有 50 mg/L 的锐劲特的基础盐培养基中, 3 d 的降解率达到 85%。菌株 R-2 降解锐劲特的最适温度为 30 °C, 最适 pH 值为 6.0–7.0, 其降解锐劲特的效率与锐劲特初始浓度呈负相关。添加 0.1 mmol/L 的 Zn^{2+} 或 Fe^{3+} 能够显著促进菌株对锐劲特的降解。灭菌与非灭菌土壤降解试验表明, 菌株 R-2 均可以在 10 d 内降解 63.4%–71.2% 的 100 $\mu\text{g/g}$ 的锐劲特。

关键词: 锐劲特, 微生物降解, *Paracoccus* sp. R-2, 分离鉴定

Isolation and characterization of a fipronil-degrading strain R-2 and its degrading characteristics

SONG Yao LI Rong WANG Rong ZHANG Man-Man YANG Hong-Xing
LI Shun-Peng JIANG Jian-Dong*

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: A bacterial strain R-2, capable of degrading fipronil, was isolated from a long-term fipronil-polluted activated sludge in a fipronil manufacture factory. Strain R-2 was preliminarily identified as *Paracoccus* sp. based on its physiological and biochemical properties, as well as the 16S rRNA gene sequence analysis. Strain R-2 could utilize fipronil as the sole carbon source for growth, and degrade 85% of 50 mg/L fipronil within 3 d in mineral salts medium. The optimal pH value and temperature for fipronil degradation by strain R-2 were 6.0–7.0 and 30 °C, respectively. The degrading rate showed a negative correlation with the initial concentration of fipronil. The addition of 0.1 mmol/L Zn^{2+} or Fe^{3+} to the culture medium could significantly increase the degradation of fipronil. In both sterile and

non-sterile soils, strain could remove 63.4%–71.2% of 100 µg/g fipronil within 10 d.

Keywords: Fipronil, Biodegradation, *Paracoccus* sp. R-2, Identification and characterization

化学农药在防治农林病虫害过程中发挥着非常重要的作用,然而,不恰当的农药使用也会对人类健康和生态环境造成严重危害^[1-3]。锐劲特,又名氟虫腈(Fipronil),是一种苯基吡唑类杀虫剂。锐劲特杀虫谱广,以胃毒作用为主,兼有触杀和一定的内吸作用,其杀虫机制在于阻碍昆虫 γ -氨基丁酸控制的氯化物代谢。因此,锐劲特对蚜虫、叶蝉、飞虱、鳞翅目幼虫、蝇类和鞘翅目等主要害虫具有很高的杀虫活性^[4]。

据中国农药毒性分级标准,锐劲特属中等毒性杀虫剂。锐劲特对甲壳类水生生物和蜜蜂有高风险^[5-6],在水和土壤中降解缓慢。我国农业部、工业和信息化部 and 环境保护部于 2009 年 2 月 25 日联合发布公告,自 2009 年 10 月 1 日起,在我国境内停止销售和使用含氟虫腈成分的农药制剂。锐劲特可通过光化学反应、物理作用等被自然降解,但在土壤中主要是依赖生物因素分解,其中微生物是分解的主要因素之一^[7-10]。因此,分离筛选高效的锐劲特降解菌株,深入研究其降解特性,最终应用于田间原位生物修复,具有重要的理论意义和应用价值。然而,目前国际上还没有关于锐劲特降解菌株分离及其降解特性研究的报道。

本研究将筛选降解锐劲特的微生物菌株,研究其生物学特性和降解特性,以期对锐劲特污染环境的生物修复提供理论指导和菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 供试样品

菌株分离样品取自江苏某农药厂生化池活性污泥;降解试验土壤取自南京农业大学校园黄棕壤,土壤 pH 值为 6.97,含有机质 17.34 g/kg,含氮 1.01 g/kg,土壤经过风干过筛($\Phi=2$ mm),备用。

1.2 培养基、供试农药及主要试剂

1.2.1 培养基:基础盐培养基(MM, g/L): NaCl 1.00, NH_4NO_3 1.00, K_2HPO_4 1.50, KH_2PO_4 0.50, MgSO_4 0.20, pH 自然;富集培养基:在基础盐培养基中加

入锐劲特浓度至 50 mg/L; LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, NaCl 10.00, 蛋白胨 10.00, 固体培养基加入 2%的琼脂粉。培养基经 1×10^5 Pa、30 min 湿热灭菌。**1.2.2 供试农药及试剂:**锐劲特原药($\geq 97\%$),由江苏省农药研究所馈赠。二氯甲烷(分析纯)、无水硫酸钠、甲醇(色谱纯)购自 Sigma 公司。

1.3 菌株的富集、筛选及纯化

在 50 mL 富集培养基中加入 2 g 长期受锐劲特污染的活性污泥,于 30 °C、160 r/min 摇床振荡培养 7 d 后,吸取 5 mL 转接到新鲜的富集培养基中,连续富集,转接 5 次。富集培养液经测定有降解效果后,在含 50 mg/L 锐劲特的 MM 培养基固体平板上梯度稀释涂布,于 30 °C 培养箱培养,待平板上出现单菌落后,挑取单菌落分别转接至含 50 mg/L 锐劲特的 MM 培养基中,验证菌株对锐劲特的降解效果。

1.4 菌株的生理生化鉴定

生理生化鉴定方法参见文献[11]。

1.5 菌株的 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增

提取菌株 R-2 基因组 DNA 作为模板^[12],进行 16S rRNA 基因扩增。一对引物分别为正向引物 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'^[13],反向引物 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。扩增反应体系如下: $10 \times \text{Taq}$ 聚合酶反应缓冲液 5 µL, dNTPs (20 mmol/L) 4 µL, 引物(25 µmol/L)各 2 µL, Mg^{2+} (25 mmol/L) 4 µL, 菌体 DNA (约 50 ng/µL) 1 µL, Taq DNA 聚合酶(5 U/µL) 0.5 µL, 加 ddH₂O 至 50 µL。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 20 min; 10 °C 5 min。

1.6 系统发育树的构建

采用 PCR 回收试剂盒回收 16S rRNA 的基因片段,琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小, T/A 克隆后进行测序,测序由上海英骏生物技术有限公司完成。测序结果在 GenBank 核酸数据库中进行 BLAST 比对,利用 ClustalX 1.8.1 进行分析,通过 NJplot 软件分析生成系统发育树。

1.7 锐劲特的提取

1.7.1 溶液中锐劲特的提取: 在待测溶液中加入 20 mL 二氯甲烷, 剧烈振荡 5 min, 室温下静置 10 min, 使水相与有机相分层, 用移液管吸取下层的二氯甲烷 5 mL, 过无水 Na_2SO_4 柱, 除去有机相中少量的水分, 用旋转蒸发器蒸发干, 色谱纯甲醇溶解, 用孔径 0.45 μm 的有机相针头过滤器过滤后留待液相检测。

1.7.2 土壤中锐劲特的提取: 取土样 10 g 加入 250 mL 三角瓶中, 加入 20 mL 丙酮和正己烷^[14](1:1, V/V), 置 30 °C 摇床 200 r/min 振荡 1 h, 静置过夜, 抽滤, 滤渣用 20 mL 丙酮洗 3 次, 合并滤液, 经无水 Na_2SO_4 脱水后, 用旋转蒸发器蒸发干, 色谱纯甲醇溶解, 用孔径 0.45 μm 的有机相针头过滤器过滤后留待液相检测。

锐劲特含量的测定采用 HPLC 法, 采用高效液相色谱仪(Waters 600), 使用可变波长紫外检测器, 分离柱为 20 cm 长、内填有 C18 的反相柱。流动相为甲醇, 流量为 1 mL/min, 可变波长紫外检测器的工作波长为 215 nm, 进样量为 1 μL , 按峰面积定量。

1.8 降解特性研究

1.8.1 菌株 R-2 对锐劲特降解曲线的绘制: 在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 含有 50 mg/L 锐劲特的 MM 液体培养基, 并按 5% (体积比) 的接种量接入菌株 R-2, 置于 30 °C、160 r/min 摇床振荡培养。以 1 d 为间隔取样测定菌株 R-2 对锐劲特的降解能力, 绘制降解曲线。

1.8.2 不同环境条件对菌株 R-2 降解锐劲特的影响: 在 LB 液体培养基中接种菌株 R-2, 培养至对数期(OD_{600} 约为 1.0), 离心收集菌体, 用新鲜的 MM 培养液洗涤 2 次后重悬, 作为降解试验的接种菌液。除非特别说明, 降解试验中锐劲特浓度为 50 mg/L, 接种量为 5%, 培养温度为 30 °C, 160 r/min 摇床振荡培养, 定时取样, HPLC 检测, 每次试验重复 3 次。研究温度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响, 温度分别设置为 10 °C、20 °C、30 °C、37 °C、45 °C; 研究培养基初始 pH 值对菌株 R-2 降解锐劲特的影响, 初

始 pH 值分别设置为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0; 研究锐劲特起始浓度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响, 将初始锐劲特浓度分别设置为 25、50、100、200、400、800 mg/L; 研究金属离子对菌株 R-2 降解锐劲特的影响, 以氯化物的形式分别添加 0.1 mmol/L 的下列金属离子: Ni^{2+} (NiCl_2)、 Co^{2+} (CoCl_2)、 Hg^{2+} (HgCl_2)、 Zn^{2+} (ZnCl_2)、 Mg^{2+} (MgCl_2)、 Fe^{3+} (FeCl_3)。

1.8.3 土壤中锐劲特的降解: 称取 200 g 干土, 锐劲特初始浓度为 100 $\mu\text{g/g}$, 试验土壤采用灭菌土壤与非灭菌土壤两组, 每组分别设对照和处理组, 处理组为添加锐劲特和锐劲特降解菌株 R-2 (10^7 CFU/mL), 对照组只添加锐劲特, 用去离子水调节各组土壤的含水量至 40%, 放置于 30 °C 培养箱中保温保湿培养, 定期取样(10 g), 3 次重复, 土壤中的锐劲特提取后用 HPLC 检测。

2 结果与讨论

2.1 降解菌株的分离与鉴定

经过分离纯化, 获得了一株能以锐劲特为唯一碳源生长的细菌(菌株 R-2), 该菌株为革兰氏阴性, 在 LB 固体平板上 30 °C 培养 24 h 的菌落呈乳白色、圆形、不透明、边缘整齐、表面隆起、湿润光滑(图 1), 菌体形态为球状、无鞭毛(图 2)。菌株 R-2 的 V. P. 试验、淀粉水解、明胶水解和苯丙氨酸脱氨酶试验均呈阴性; 硝酸盐还原、吲哚试验、柠檬酸利用试验均呈阳性。菌株 R-2 对 100 mg/L 的链霉素具有抗性, 而对卡那霉素、四环素、壮观霉素和氯霉素敏感。菌株 R-2 在 LB 培养基中生长的最适温度为 30 °C, 最适 pH 值为 7.0。

2.2 菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

以菌株 R-2 的总 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物, 测序后在 GenBank 上登录(序列号为 EU725799)。16S rRNA 序列同源性分析结果显示菌株 R-2 与 *Paracoccus aminovorans* 同源性最高, 为 99% (图 3)。结合生理生化特征和系统发育分析, 将菌株 R-2 鉴定为 *Paracoccus* sp.。

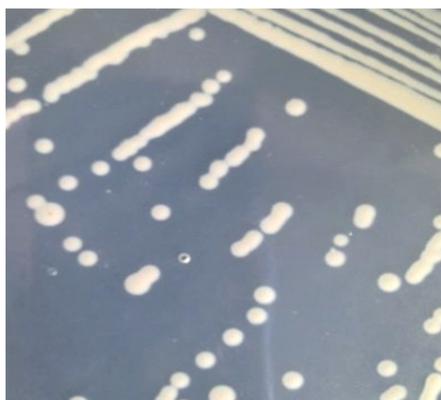


图1 菌株 R-2 在 LB 平板上的菌落形态
Fig. 1 The colony of strain R-2 on LB plate

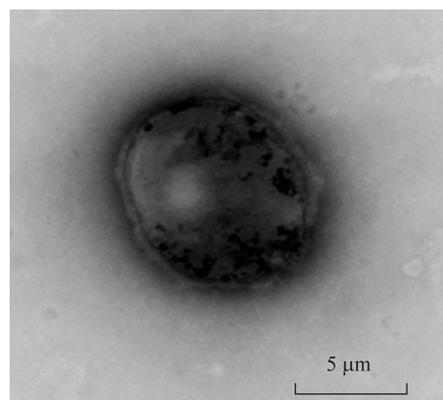


图2 菌株 R-2 的电镜照片
Fig. 2 The electronic photograph of strain R-2

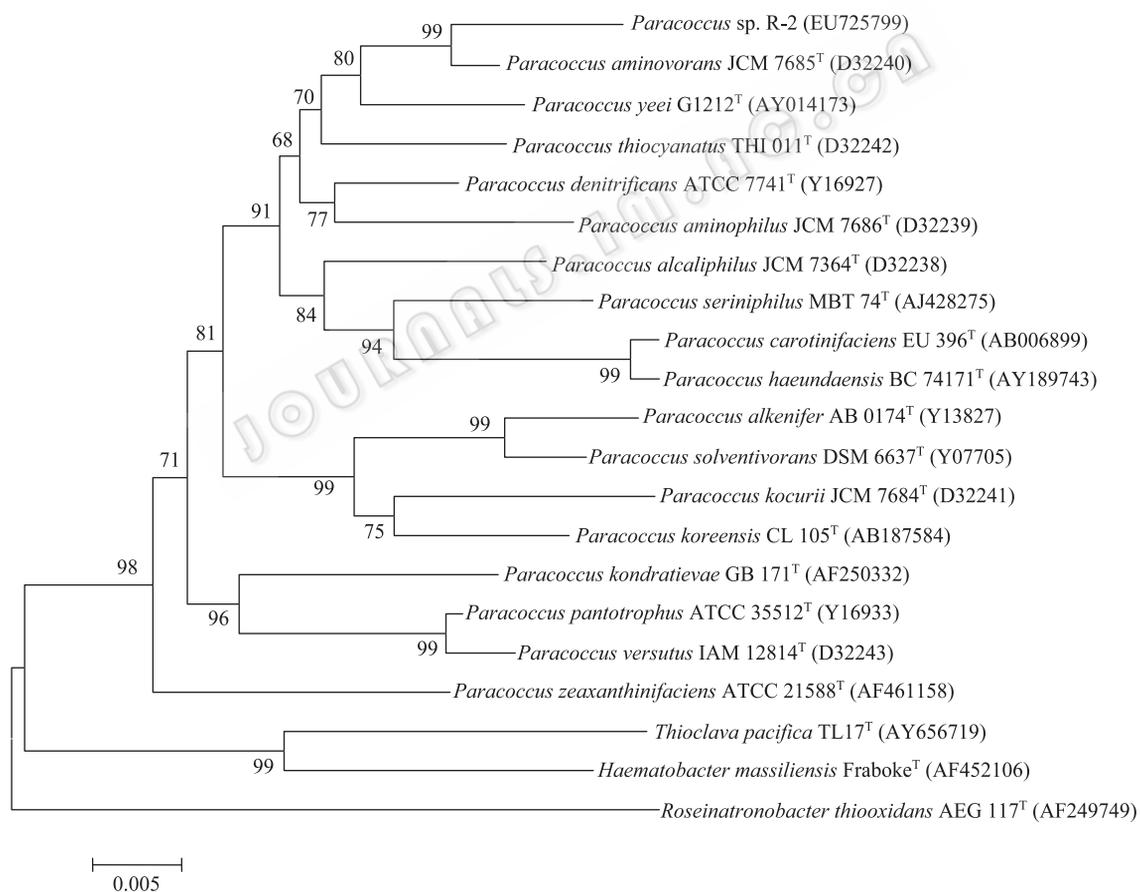


图3 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 R-2 的系统发育树
Fig. 3 The phylogenetic tree of strain R-2 based on the sequences of 16S rRNA gene

2.3 菌株 R-2 对锐劲特的降解

2.3.1 菌株 R-2 以锐劲特为唯一碳源的降解: 在以锐劲特为唯一碳源的 MM 培养基中, 菌株 R-2 的生物量随着时间的延长而逐渐增加, 与此同时, 锐劲特的含量逐渐下降(图 4)。该实验表明菌株 R-2 能够以锐劲特为唯一碳源进行生长, 在 3 d 时 85%左右的锐劲特被降解。

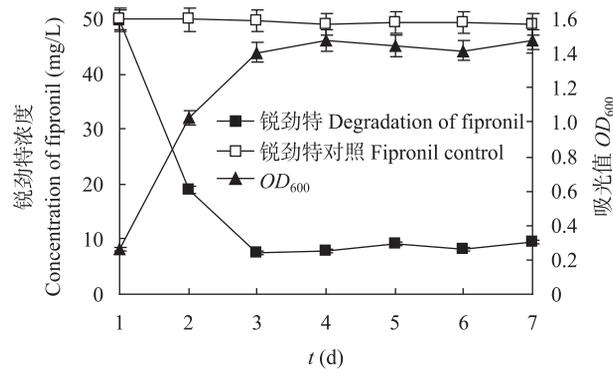


图 4 菌株 R-2 利用锐劲特为唯一碳源的降解曲线
Fig. 4 Biodegradation of fipronil versus R-2 cell growth in mineral salts medium supplemented with 50 mg/L fipronil

2.3.2 温度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响: 从图 5 可以看出, 温度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响较大, 在 30 °C 时降解效果最好, 而温度过低和过高对降解均有一定的抑制作用, 这可能与菌株 R-2 的生长情况以及菌体中降解锐劲特的降解酶的最适温度有关。

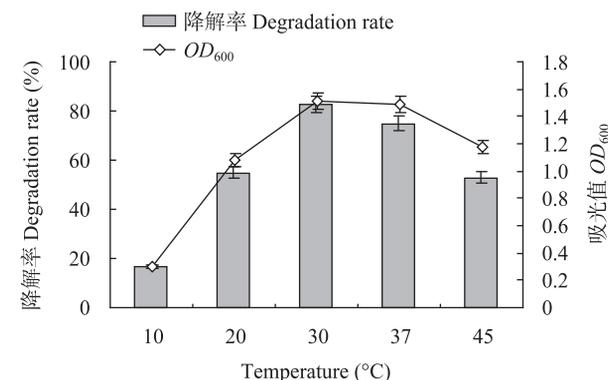


图 5 温度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响
Fig. 5 Effect of temperature on the fipronil degradation by strain R-2

2.3.3 培养基初始 pH 值对菌株 R-2 降解锐劲特的影响: 从图 6 可知, 培养基初始 pH 值对菌株 R-2 降解锐劲特的影响显著, 菌株在弱酸性或者中性条件下降解效果较好, 当初始 pH 值为 6.0–7.0 时, 菌株 R-2 对锐劲特的降解率最高。当 pH 值低于 5.0 或者高于 7.0 时, 菌株 R-2 对锐劲特的降解能力降低。由此可以看出菌株 R-2 较适用于中性或弱酸性污染环境的修复。

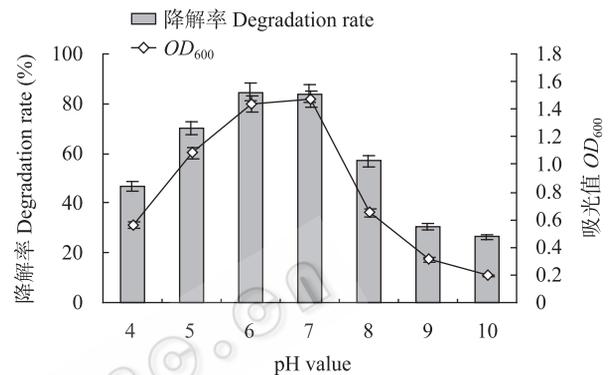


图 6 初始 pH 对菌株 R-2 降解锐劲特的影响
Fig. 6 Effect of initial pH value on the fipronil degradation by strain R-2

2.3.4 锐劲特初始浓度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响: 由图 7 可知, 当锐劲特初始浓度为 25 mg/L 或者 50 mg/L 时, 菌株 R-2 对锐劲特的降解效果最好。当锐劲特的浓度达到或超过 100 mg/L 时, 降解率显著下降, 菌株 R-2 几乎不能降解浓度超过 400 mg/L 的锐劲特, 这可能是由于过高的锐劲特浓度或中间代谢产物的积累对 R-2 菌株产生毒害作用所致。

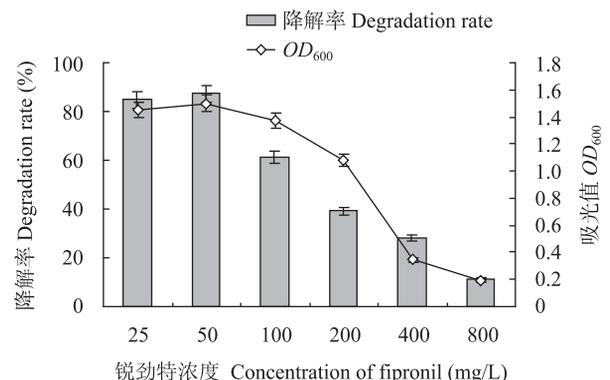


图 7 锐劲特初始浓度对菌株 R-2 降解锐劲特的影响
Fig. 7 Effect of fipronil initial concentration on the degradation by strain R-2

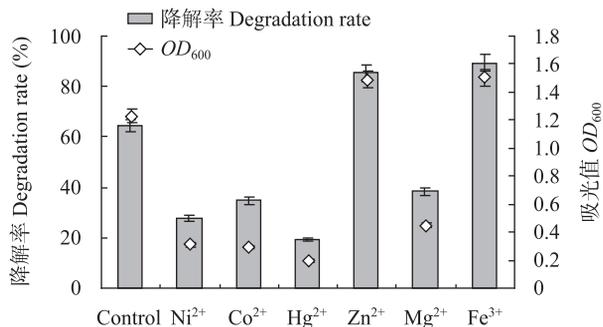


图8 金属离子对菌株 R-2 降解锐劲特的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on the degradation of fipronil by strain R-2

2.3.5 金属离子对菌株 R-2 降解锐劲特的影响: 由图 8 可知, 在 MM 培养基中加入 0.1 mmol/L Zn²⁺ 或 Fe³⁺ 对菌株 R-2 降解锐劲特有一定的促进作用。而 Ni²⁺、Co²⁺、Hg²⁺、Mg²⁺ 则对降解有显著的抑制作用, 可能原因是这几种金属离子抑制了菌株 R-2 对锐劲特降解酶的活性。

2.3.6 菌株 R-2 对土壤中锐劲特的降解: 菌株 R-2 对不同土壤处理组(灭菌和未灭菌)中锐劲特的降解效果如图 9 所示。10 d 后灭菌对照土壤中只有 2.3% 的锐劲特被降解, 这可能是由于锐劲特的水解或吸附作用等引起的。在接种菌株 R-2 的灭菌土壤中, 63.4% 的锐劲特被降解。在未灭菌的对照土壤中, 7.2% 的锐劲特被降解, 高于经过灭菌处理的土壤, 说明在自然土壤中存在的一定量的土著微生物对锐劲特有降解作用。接种降解菌株的未灭菌土壤中有 71.2% 的锐劲特被降解。接种菌株 R-2 的土壤中的锐劲特的降解率明显要高于未接种对照组, 说明菌株 R-2 在土壤中可以发挥降解作用, 具有一定的修复土壤中锐劲特污染的潜力。

3 结论

(1) 从江苏某农药厂活性污泥中分离得到一株锐劲特降解菌株 R-2, 根据表型特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析, 将其鉴定为副球菌属 (*Paracoccus* sp.)。

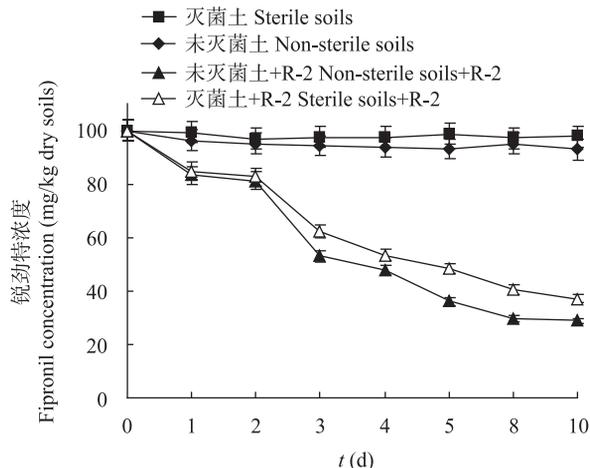


图9 菌株 R-2 对土壤中锐劲特的降解

Fig. 9 Degradation of fipronil by strain R-2 in sterile and non-sterile soils

(2) 菌株 R-2 降解锐劲特的最适温度为 30 °C、最适 pH 值为 6.0–7.0。菌株 R-2 对较低浓度的锐劲特有很好的降解效果, 过高的起始浓度抑制菌株 R-2 对锐劲特的降解; 添加 0.1 mmol/L 的金属离子 Zn²⁺ (ZnCl₂) 或 Fe³⁺ (FeCl₃) 对降解有促进作用。土壤试验表明, 菌株 R-2 可以在 10 d 内降解 63.4%–71.2% 的 100 μg/g 的锐劲特。

参考文献

- [1] 王赛妮, 李蕴成. 我国农药使用现状、影响及对策[J]. 现代预防医学, 2007, 34(20): 3853–3854.
- [2] 国家环境保护总局. 我国农药污染现状、存在问题及建议[J]. 环境保护, 2001(6): 23–24.
- [3] Ngabe B, Bidleman TF. DDT concentrations in soils of Brazzaville, Congo[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 76(4): 697–704.
- [4] Zhu GN, Wu HM, Guo JF, et al. Microbial degradation of fipronil in clay loam soil[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2004, 153(1/4): 35–44.
- [5] 李海燕, 刘世丽, 王勇, 等. 农药锐劲特对养蜂业和生态的影响及其应对措施[J]. 安徽农业科学, 2007(36): 11873–11874.
- [6] Zhang CZ, Zhang XM, Tian ZH, et al. Degradation of chlorpyrifos and fipronil in rice from farm to fork and risk assessment[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(5): 754–763.

- [7] 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展[J]. 土壤, 2004, 36(6): 577-583.
- [8] Li XQ, Bao C, Yang DB, et al. Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010, 29(1): 127-132
- [9] 蒋建东, 张瑞福, 何健, 等. 细菌对环境污染物的趋化性及其在生物修复中的作用[J]. 生态学报, 2005, 25(7): 1764-1771.
- [10] 崔新仪, 储晓刚, 王大宁. 氟虫腈及其代谢物的研究进展[J]. 农药, 2008, 47(2): 87-89.
- [11] 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: 349-398.
- [12] Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(1): 55-59.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995: 29-58.
- [14] Ghani A, Wardle DA. Fate of ^{14}C from glucose and the herbicide metsulfuron-methyl in a plant-soil microcosm system[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001(33): 71-76.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2012 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817;

国外发行代号: BM413