

研究报告

稻田除草剂二氯喹啉酸降解菌 15[#]的分离、鉴定及降解特性

黄思琦 屠王满措 潘九月 李洪艳 马晨怡 陈铭学 林晓燕*

农业农村部稻米及制品质量监督检验测试中心 中国水稻研究所 浙江 杭州 310006

摘要:【背景】二氯喹啉酸(Quinclorac, QNC)是一种高选择性、激素类、低毒性除草剂,主要用于防治稻田稗草,持效期长,易于在土壤中积累而影响后茬作物的生长发育,而且环境中残留的 QNC 可对动物生长发育产生不良影响,并影响微生物的群落结构和丰度。【目的】从稻田土壤中分离筛选出一株可降解除草剂 QNC 的菌株,鉴定并明确其降解特性。【方法】通过形态学、生理生化试验、磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)微生物鉴定、16S rRNA 基因测序及分析鉴定菌株。通过单因素实验探究菌株的降解特性。【结果】筛选得到一株编号为 15[#]的 QNC 降解菌,被鉴定为无色杆菌属菌株(*Achromobacter* sp.)。降解特性研究结果表明,菌株 15[#]的最佳培养条件为: 30 °C、pH 为 6.0、初始 QNC 浓度为 100 mg/L、接种量为 7%、添加质量分数为 0.1%的酵母浸粉、氮源为蛋白胨,在此条件下培养 21 d 后 QNC 的降解率可达 43.0%。【结论】筛选到降解 QNC 新菌株并为该菌株的进一步研究提供理论基础。

关键词: 二氯喹啉酸, 无色杆菌 15[#], 分离鉴定, 降解特性Isolation, identification and degradation characteristics of paddy field herbicide quinclorac degrading bacteria 15[#]

HUANG Siqi TUWANG Mancuo PAN Jiuyue LI Hongyan MA Chenyi

CHEN Mingxue LIN Xiaoyan*

Rice Quality Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, China Rice Research Institute, Hangzhou, Zhejiang 310006, China

Abstract: [Background] Quinclorac (QNC) is a highly selective, hormonal, and low-toxic herbicide. It is mainly used to control barnyard grass in rice fields with a long duration. And the growth and development of subsequent crops are easily affected by QNC accumulated in the soil. In addition, the growth and development of animals will be affected by the residual QNC in the environment, as well as the community structure and the abundance of microorganisms also will be affect. [Objective] To isolate and screen a strain of degrading the herbicide QNC from the paddy soil, and determine its

Foundation items: The Construction of Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-01-47); Collaborative Innovation Task of the Science and Technology Innovation Project of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-XTX2019024); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (CPSIBRF-CNRI-202127)

*Corresponding author: E-mail: fzhlyx@163.com

Received: 01-02-2021; Accepted: 11-03-2021; Published online: 03-06-2021

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项基金(CARS-01-47); 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务(CAAS-XTX2019024); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CPSIBRF-CNRI-202127)

*通信作者: E-mail: fzhlyx@163.com

收稿日期: 2021-02-01; 接受日期: 2021-03-11; 网络首发日期: 2021-06-03

degradation-characteristics. **[Methods]** The strain was identified by morphological, physiological and biochemical tests, phospholipid fatty acid (PLFA) microbial identification, 16S rRNA gene sequence. The degradation characteristics of strains with single factor analysis was carried out. **[Results]** The QNC-degradation strain numbered 15[#] was screened and identified as *Achromobacter* sp. The results of the research on the degradation characteristics show that the optimum conditions for strain 15[#] were 30 °C, pH 6.0, initial QNC concentration 100 mg/L, inoculation amount 7%, and added mass fraction 0.1% of yeast extract powder and nitrogen source are peptone. Under the conditions, the degradation rate of QNC could reach 43.0% after cultured 21 d. **[Conclusion]** A new strain was screened for microbial degradation of QNC and provided a theoretical basis for further research on this strain.

Keywords: quinclorac, *Achromobacter* 15[#], isolation and identification, degradation characteristics

二氯喹啉酸(Quinclorac, QNC)是一种高选择性、激素类、低毒性除草剂,主要用于水稻秧田、直播田和移栽田杀除稗草^[1]。因其具有良好的除草效果、施用适期宽、施用剂量小、持效期长等优点,并且可以与五氟磺草胺、氯氟吡啶酯、节嗜磺隆等多种除草剂混用扩大杀草谱,所以在世界各水稻种植区被广泛使用。然而,因为QNC持效期长,易于在土壤中积累而影响后茬作物的生长发育^[2-3]。QNC残留会对多种蔬菜产生药害,施用QNC后至少2年不能种植辣椒、茄子、番茄、芹菜、胡萝卜和甜菜等作物^[4-6]。在我国湖南、江西和广东等地区多采用烟-稻轮作的耕种模式,当水稻季喷施QNC超过推荐施药剂量的25%时即可危害后茬作物,增加烟叶的畸形率,降低烟叶产量^[7-10];而且环境中残留的QNC可对动物生长发育产生不良影响、导致变态发育或生殖异常,进一步影响自然界生物的多样性和丰度^[11]。随着QNC在水稻生产中的大规模应用,其对动植物产生的危害也越来越引起人们的重视,因此有必要找到一种实用、高效的方法来降解QNC残留,解决二氯喹啉酸残留造成的环境污染问题。

微生物由于具有代谢途径多样、作用底物广、副产物少等特点,在农药的降解上具有广阔的应用前景。目前研究人员从不同环境中分离获得了一些可降解QNC的细菌。Lang等通过循环流化床富集培养筛选出链霉菌属(*Streptomyces* sp.)细菌AH-B,其主要降解产物为3-氯-7-甲氧基-8-喹啉羧酸、3-氯-7-甲基-8-喹啉羧酸、3-氯-7-氧乙基-8-喹

啉-羧酸和3,7-二氯-6-甲基-8-喹啉羧酸^[12]。产碱菌属(*Alcaligenes* sp.)细菌J3通过烟草盆栽实验证明该菌株对药害烟草有显著的修复作用^[13]。泛菌属(*Pantoea* sp.)细菌QC06的生物修复实验结果表明其对烟草药害的修复效果明显,对降解烟田中QNC残留有一定实际应用^[14]。Li等研究发现分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)细菌F4的降解产物为3-氯-7-羟基喹林-8-羧酸或7-氯-3-羟基喹林-8-羧酸,而且降解产物对烟草无植物毒性^[15]。徐淑霞等研究发现博德特氏菌属(*Bordetella* sp.)细菌HN36不仅可降解QNC,而且对喹啉、邻苯二甲酸、苯酚和邻苯二酚也有降解作用^[16]。周挺等研究发现分枝嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia* sp.) J03对QNC在无机盐培养基中的降解效率在21 d后为33.5%,而且可有效缓解QNC对烟株生长的危害^[17]。节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)细菌MC-10 7 d可降解污染土壤中的QNC残留^[18]。李子木等研究发现洋葱伯克氏菌属细菌WZ1的主要降解产物为3,7-二氯喹啉和2-氯-1,4-苯二甲酸^[19]。

目前尚未有无色杆菌降解QNC的报道。无色杆菌在自然环境中普遍存在,通常出现在水和土壤中^[20],对维护生态环境有很高的应用价值。然而目前还未有关于无色杆菌降解QNC的报道,为填补无色杆菌降解QNC研究的空白,本研究通过实验探究无色杆菌降解QNC的降解效果、降解特性,以期为无色杆菌降解稻田土壤环境中的QNC提供基础信息,并为该菌株的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

二氯喹啉酸标准品(纯度 98%), 上海源叶生物公司; 50%二氯喹啉酸可湿性粉剂(50% Quinclorac WP), 江苏快达农化股份有限公司; 生理生化试剂盒, 青岛海博生物有限公司; BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, ABI 公司; 稻田土壤来自中国水稻研究所试验田, 水稻(*Oryza sativa* L.)品种为中国水稻研究所自种品种中浙优 1 号。

LB 液体培养基: 氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, pH 7.0, 超纯水定容到 1 000 mL。

LB 固体培养基: 氯化钠 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g, 琼脂 20 g, pH 7.0, 超纯水定容到 1 000 mL。

大豆酪蛋白琼脂(Tryptose Soya Agar, TSA)培养基: 大豆粉木瓜蛋白酶消化物 5 g, 氯化钠 5 g, 酪蛋白胰酶消化物 15 g, 琼脂 18 g, 超纯水定容到 1 000 mL。

无机盐液体培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, FeCl_3 0.05 g, KH_2PO_4 1.0 g, Na_2HPO_4 1.0 g, CaCl_2 0.02 g, NH_4NO_3 1.0 g, 超纯水定容到 1 000 mL。

气相色谱仪, Agilent 公司; 三重四极杆质谱仪, Thermo Fisher 公司; T3 色谱柱, Waters 公司; 紫外分光光度计, 岛津公司; 精密 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; 生化培养箱, 上海博讯实业有限公司;

1.2 QNC 降解菌株的筛选

取 5 g 稻田土壤样品加入到 100 mL 无机盐液体培养基中, 每个培养基中添加终浓度为 100 mg/L 的 QNC 10 mg。在 30 °C、180 r/min 孵育 7 d 后, 取 5 mL 培养液转接于 QNC 浓度为 200 mg/L 的无机盐培养基内, 持续培养 7 d 后, 继续转接直至无机盐培养基中的 QNC 浓度达到 500 mg/L。然后将菌液进行 10 倍比梯度稀释, 并接种在 LB 固体培养基上, 30 °C 培养 48 h 后挑取单菌落在新的 LB 固体培养基上划线培养, 直到获得单菌落。挑取不

同形态的单菌落, 分别接入 QNC 浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基中培养 21 d, 使用 QuEChERS-液相色谱-串联质谱法检测无机盐培养基中的 QNC 浓度^[21], 验证不同菌株对 QNC 的降解效果, 选出降解 QNC 的优势菌株。

1.3 QNC 降解菌株的鉴定

1.3.1 菌株 15[#]的形态观察和生理生化鉴定

将菌株 15[#]接种于 LB 固体培养基上, 于 30 °C 培养 48 h, 观察菌落形态特征, 并在扫描电镜下观察菌株形态。

生理生化鉴定采用生理生化试剂盒, 根据试验结果参照《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)^[22]进行鉴定。

1.3.2 菌株 15[#]的磷脂脂肪酸(Phospholipid Fatty Acid, PLFA)鉴定

于 TSA 培养基上以四区划线法 30 °C 培养菌种 48 h, 取 40 mg 第 3 区菌落, 置于 8 mL 螺口玻璃管中, 加入 1 mL 甲醇碱溶液, 沸水浴 5 min, 取出振荡 5–10 s, 继续沸水浴 25 min; 待样品管冷却后加入 2 mL 甲基化试剂, 盖严振荡, 随后水浴 10 min, 温度保持在 80±1 °C, 冷水浴冷却(此步骤需严格控制温度和时间, 以免羧基酸和环式脂肪酸受到破坏), 在冷却的样品管中加入 1.25 mL 萃取溶剂, 快速振荡 10 min, 弃去下层水相; 在剩余有机相中加入 3 mL 稀碱液及几滴饱和氯化钠溶液至无泡沫, 快速振荡 5 min, 取 2/3 上层有机相置气相色谱样品瓶中备用。

使用气相色谱仪检测菌株的脂肪酸组成, 气相色谱条件: 色谱柱 60.0 m×0.25 mm×0.25 μm; 载气 N_2 , 载气流量 0.35 mL/min; 载气 H_2 , 载气流量 0.35 mL/min; 载气空气, 载气流量 0.42 mL/min; 炉温 170 °C, 进样口温度 250 °C, 检测器温度 300 °C。

菌种鉴定采用 Sherlock 脂肪酸微生物鉴定系统(6.10), 该系统能够对菌株 15[#]的脂肪酸图谱进行分析, 通过与标准数据库 TSBA6 比对后进行菌株鉴定。

1.3.3 菌株 15[#]的 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树构建

将菌株 15[#]接种于 LB 液体培养基 30 °C、180 r/min 培养 12 h 后, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 15[#]的基因组 DNA, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取效率。PCR 扩增引物为细菌通用引物对^[16] (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACCTTGTTACGAC TT-3')。PCR 反应体系(20 μ L): DNA 1 μ L, BigDye 8 μ L, 正、反向引物(3.2 μ mol/L)各 0.5 μ L, 灭菌去离子水 10 μ L。PCR 反应条件: 96 °C 1 min; 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min, 25 个循环; 4 °C 保存。PCR 产物由上海尚亚生物科技有限公司进行测序。测序结果上传至 NCBI 数据库, 在 GenBank 中通过 BLAST 进行同源性比对。运用 MEGA 7.0 软件进行系统发育分析, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4 菌株 15[#]降解 QNC 的特性研究

1.4.1 降解菌菌悬液的制备

将菌株 15[#]接种到 100 mL LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 48 h, 8 000 r/min 离心 5 min 后去上清, 沉淀用灭菌生理盐水溶液洗涤 2 次, 再用无机盐液体培养基重悬沉淀使其 OD_{600} 为 1.0, 备用。

1.4.2 初始 pH 对 QNC 降解效率的影响

配制 QNC 浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基, 调节培养基 pH 为 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0, 103.4 kPa 灭菌 25 min (下同), 接种量为 5%, 30 °C、180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度, 并按照以下公式计算降解率: $QNC \text{ 降解率}(\%) = (1 - \text{实验测定值} / \text{对照测定值}) \times 100$ 。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

1.4.3 初始 QNC 浓度对二氯喹啉酸降解效率的影响

配制 QNC 浓度为 20、50、100、200、500 mg/L 的无机盐液体培养基, 调节 pH 为 6.0, 灭菌, 接

种量为 5%, 30 °C、180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度并计算降解率。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

1.4.4 接种量对 QNC 降解效率的影响

配制 QNC 浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基, 调节 pH 为 6.0, 灭菌后分别接种 1%、2%、5%、7%和 10%的菌悬液, 30 °C、180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度并计算降解率。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

1.4.5 酵母浸粉含量对 QNC 降解效率的影响

配制 QNC 浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基, 调节 pH 为 6.0, 分别添加质量分数为 0、0.1%、0.5%、1%和 2%的酵母浸粉, 灭菌后接入 7%的菌悬液, 30 °C、180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度并计算降解率。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

1.4.6 氮源对 QNC 降解效率的影响

配制 QNC 浓度为 100 mg/L 和氮源分别为尿素、蛋白胨、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4NO_3 和 NH_4Cl 的无机盐液体培养基, 调节 pH 为 6.0, 灭菌后接入 7%的菌悬液, 30 °C、180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度并计算降解率。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

1.4.7 温度对 QNC 降解效率的影响

配制 QNC 浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基, 调节 pH 为 6.0, 无机盐培养基的氮源为蛋白胨, 添加 0.1%的酵母浸粉, 灭菌后接入 7%的菌悬液, 设定培养温度分别为 20、25、30、35、40 °C, 180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度并计算降解率。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

1.4.8 最适培养条件下的降解情况

配制 QNC 浓度为 100 mg/L 的无机盐液体培养基, 调节 pH 为 6.0, 灭菌。无机盐培养基的氮源为蛋白胨, 添加 0.1%的酵母浸粉, 接入 7%的菌悬液, 40 °C、180 r/min 培养。分别在接种后的 3、7、12、15、18 和 21 d 取样测定 QNC 的浓度并计算降解率。每个处理设置 3 个平行, 同时设不接菌的处理作为对照。

2 结果与分析

2.1 QNC 降解菌株 15[#]的鉴定

2.1.1 菌株 15[#]的形态特征和生理生化特性

通过分离筛选得到一株能有效降解 QNC 的菌株 15[#], 其菌落特征及菌体特征如图 1 所示, 菌落呈圆形, 轻微隆起, 乳白色, 湿润, 半透明, 边缘整齐, 光滑。菌体杆状, 无芽孢, 革兰氏染色阴性。其生理生化特性如表 1 所示。

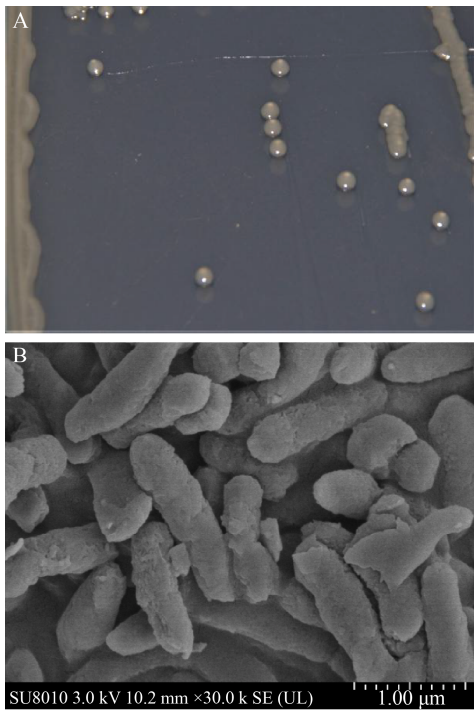


图 1 菌株 15[#]的菌落及菌体
Figure 1 The colony and bacteria of strain 15[#]
注: A: LB 平板上菌落形态; B: 扫描电镜下菌体形态
Note: A: Colony morphology on LB plate; B: Bacteria morphology under Scanning Electron Microscope

表 1 菌株 15[#]的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain 15[#]

指标 Items	结果 Results
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	—
精氨酸 Arginine	+
赖氨酸 Lysine	+
鸟氨酸 Ornithine	+
柠檬酸 Citric acid	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	+
脲酶 Urease	+
乳糖 Lactose	—
吲哚 Indole	—
V. P. test	—
明胶 Gelatin	—
葡萄糖 Glucose	—
甘露醇 Mannitol	—
肌醇 Inositol	—
山梨醇 Sorbitol	—
鼠李糖 L-rhamnose	—
蔗糖 Sucrose	—
蜜二糖 Melibiose	—
苦杏仁苷 Amygdalin	—
阿拉伯糖 Arabinose	—
氧化酶 Oxidase	+
D-核糖 D-ribose	—
棉子糖 Raffinose	—
接触酶 Catalase teste	+

注: +: 阳性; —: 阴性
Note: +: Positive; —: Negative

2.1.2 菌株 15[#]的 PLFA 鉴定结果

采用 Sherlock 微生物鉴定系统对菌株 15[#]进行鉴定, 当相似度(SI)>0.500 则结果可信, 结果显示菌株 15[#]与木糖氧化无色杆菌的相似度(SI)为 0.740, 匹配性很高, 结果可信。菌株 15[#]磷脂脂肪酸组成如图 2 所示。菌株 15[#]鉴定结果为无色杆菌属。

2.1.3 菌株 15[#]的 16S rRNA 基因系统发育分析

将菌株 15[#]的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 进行 BLAST 核苷酸序列比对, 并构建系统发育树。图 3 为菌株 15[#]的 16S rRNA 基因系统发育树。从图 3 中可以看出, 菌株 15[#]和多数无色杆

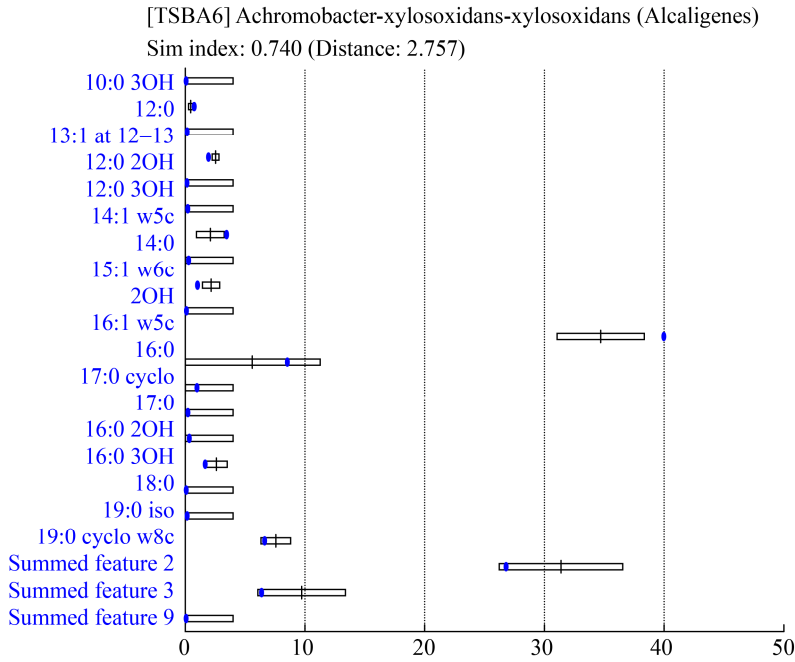


图 2 菌株 15[#]的磷脂脂肪酸组成
Figure 2 Phospholipid fatty acid composition of strain 15[#]

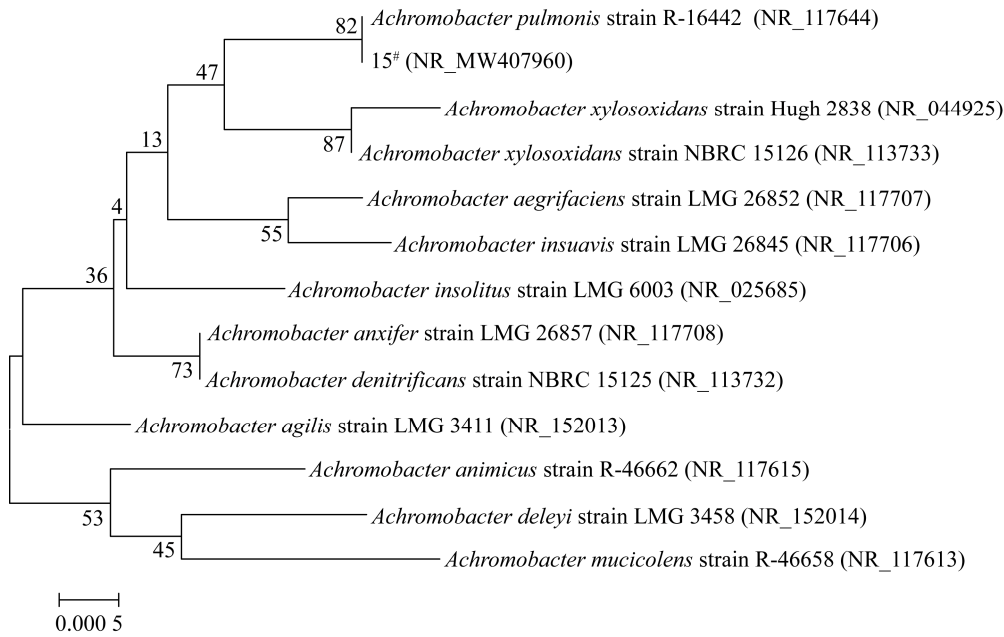


图 3 菌株 15[#]基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树
Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain 15[#]

注：括号中序号为菌株登录号；分支点上的数字为 Bootstrap 支持率；标尺刻度=0.000 5：序列差异的分支长度
Note: Numbers in parentheses: The sequence accession number; Numbers in each branch points: the percentages supported by bootstrap; Bar=0.000 5: nucleotide divergence

菌的变异性差异很小, 菌株 15[#] (GenBank 登录号 NR_MW407960) 和肺部无色杆菌 R-16442 (GenBank 登录号 NR_117644) 在 16S rRNA 基因系统发育树上聚类于同一个分支, 相似性为 99.93%。因此, 菌株 15[#] 被鉴定为无色杆菌属 (*Achromobacter* sp.)。

2.2 菌株 15[#] 降解 QNC 的降解特性

2.2.1 初始 pH 对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响

从图 4 可知, 菌株 15[#] 在碱性较强 (pH 10.0) 的环境中降解效果较差, 随着碱性减弱, 降解效果逐渐增强; 当培养液的 pH 值为 6.0 时, 菌株 15[#] 处于弱酸性环境中降解效果最佳, 降解率为 27.5%, 随后降解效果又随酸性增强而减弱。

2.2.2 初始 QNC 浓度对 QNC 降解效率的影响

菌株 15[#] 在 QNC 初始浓度为 20、50、100、200、500 mg/L 的无机盐液体培养基中的降解效果如图 5 所示。当 QNC 的浓度为 20 mg/L 时降解效果较弱, 随着浓度的增加, 菌株 15[#] 的降解能力增强; 当初始 QNC 浓度为 100 mg/L 时菌株 15[#] 降解效果最佳, 降解率为 27.2%; 当 QNC 浓度过大, 即 200–500 mg/L 时, 菌株 15[#] 对 QNC 的降解效果降低。

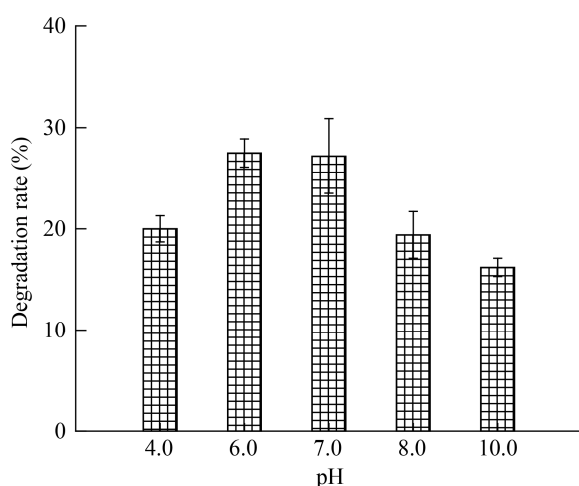


图 4 pH 值对 QNC 降解效率的影响

Figure 4 Effect of initial pH on QNC-degradation by strain 15[#]

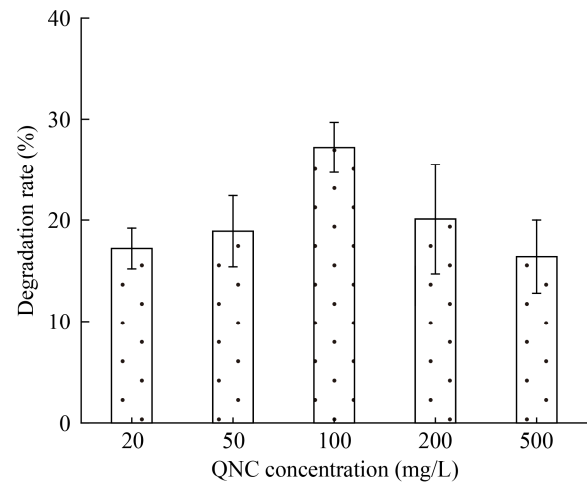


图 5 QNC 初始浓度对 QNC 降解效率的影响

Figure 5 Effect of initial concentration of QNC on QNC-degradation by strain 15[#]

2.2.3 接种量对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响

在相同培养条件下, 不同接菌量对 QNC 降解效率的影响如图 6 所示。在 21 d 的降解过程中, 当接种量在 1%–7% 时菌株 15[#] 的降解率呈现上升趋势, 当接种量为 7% 时菌株 15[#] 的降解效果最好, 可持续稳定地降解 QNC, 培养 21 d 后降解率可达 28.4%; 当接种量超过 7% 时降解效果减弱。

2.2.4 酵母膏含量对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响

酵母膏添加量对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响如图 7

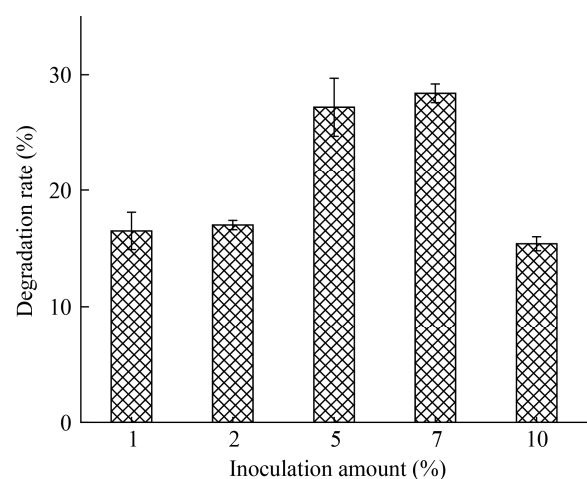


图 6 接种量对 QNC 降解效率的影响

Figure 6 Effect of inoculum on the QNC-degradation effect by strain 15[#]

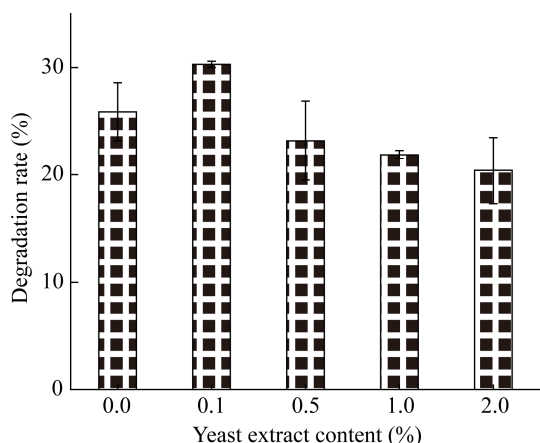


图7 酵母膏含量对 QNC 降解效率的影响

Figure 7 Effect of yeast extract content on the QNC-degradation effect by strain 15[#]

所示。少量酵母膏添加到无机盐培养基可以促进菌株的生长, 进而提高菌株对 QNC 的降解效率。当在无机盐培养基添加 0.1% 的酵母膏时, 菌株 15[#] 对 QNC 的降解效果最好, 降解率为 30.3%。不添加酵母膏和酵母膏添加量较多时, 菌株 15[#] 对 QNC 的降解效果均没有添加 0.1% 的酵母膏效果好, 酵母膏添加量为 2% 时培养 21 d 的降解效果最差。酵母膏^[23] 能作为氮源和碳源的补充剂, 当酵母膏含量较少时降解菌的碳源仍为 QNC, 但是酵母膏添加过多会使菌株 15[#] 降解底物发生改变而导致降解率下降。

2.2.5 不同氮源对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响

不同氮源对 QNC 降解效率的影响见图 8。由图 8 可知, 不同氮源对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响不同。其中, 以蛋白胨为氮源时, 菌株 15[#] 降解 QNC 的效果最好, 降解率为 32.8%。不同氮源对菌株 15[#] 降解 QNC 的促进作用顺序为: 蛋白胨 > NH₄NO₃ > NH₄Cl > 尿素 > (NH₄)₂SO₄。

2.2.6 不同温度对菌株 15[#] 降解 QNC 的影响

初始 pH 值为 6.0、初始 QNC 浓度为 100 mg/L、接种量为 7%、酵母浸粉含量为 0.1%、氮源为蛋白胨时, 在不同温度下, 菌株 15[#] 降解 QNC 的情况如图 9 所示。由图 9 可知, 随着培养温度的升高, 菌株 15[#] 降解 QNC 的降解能力逐渐增强; 当培养

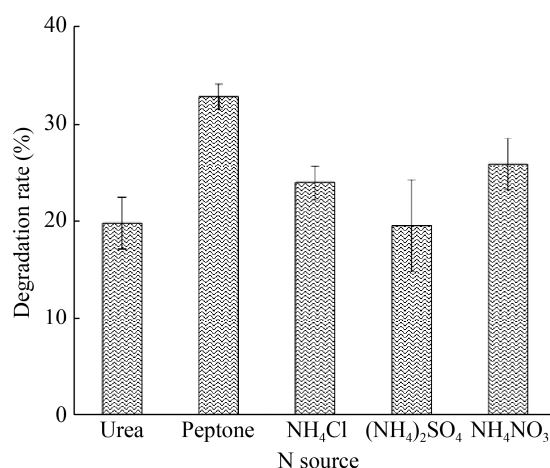


图8 外源氮对 QNC 降解效率的影响

Figure 8 Effect of external nitrogen source on QNC-degradation by strain 15[#]

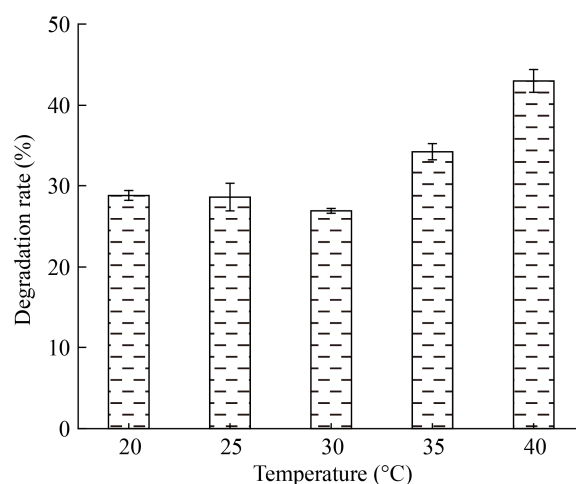


图9 温度对 QNC 降解效率的影响

Figure 9 Effect of temperature on QNC-degradation by strain 15[#]

温度达到 40 °C 时降解效果最佳, 降解率为 43.0%。

2.2.7 最适培养条件下的降解情况

在最适培养条件下, 初始 pH 值为 6.0、初始 QNC 浓度为 100 mg/L、接种量为 7%、酵母浸粉含量为 0.1%、氮源为蛋白胨时, 培养温度为 40 °C 培养 21 d 的菌株 15[#] 降解 QNC 的情况和生长曲线如图 10 所示。经过 21 d 培养的菌株 15[#] 可降解 43.0% 的 QNC, 菌株 15[#] 在培养 3 d 后进入对数生长期, 12 d 后进入稳定期, 18 d 后进入衰退期。

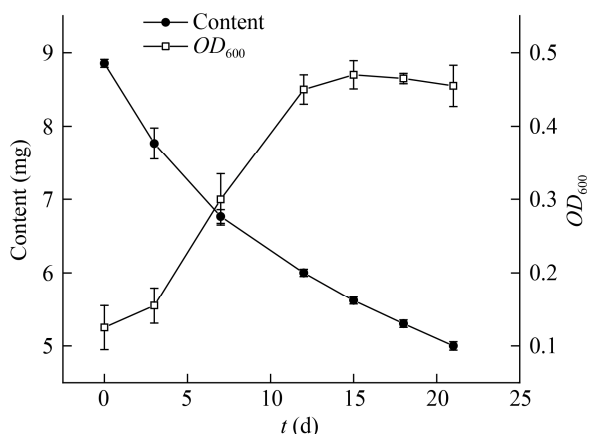


图 10 最适条件下菌株 15[#]降解 QNC 的情况和生长曲线
Figure 10 The effect of on the optimal conditions the degradation of QNC by strain 15[#] and growth curve

3 讨论

QNC 易在土壤中积累, 残留期长, 容易对多种作物产生药害, 在自然条件下只能通过光降解和微生物降解。在现有的大多数研究中筛选的 QNC 降解菌都被应用于修复药害烟草, 对稻田土壤 QNC 残留污染的修复并未见较多报道。本研究旨在筛选出适应稻田环境的 QNC 降解菌, 期望其在 QNC 残留污染稻田中得到广泛应用。本研究筛选获得的无色杆菌(*Achromobacter* sp.)为革兰氏阴性菌, 属好氧自养型杆菌, 在系统分类学上属于细菌界变形菌门 β-变形菌纲伯克氏菌目产碱菌科无色杆菌属, 广泛分布在自然环境中。无色杆菌是生防菌的一种, 已有研究发现无色杆菌可以降解 5-氯-2-吡啶甲酸^[20]、磺胺甲恶唑^[24]、邻苯二甲酸二正丁酯^[25]、多环芳烃^[26]等化学物质, 以及 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 2-甲基-4-氯苯丙酸(MCPA)^[27]等农药, 并且可以进行有氧脱硝和除磷^[28], 对重金属铬^[29]和砷化物^[30]也有一定降解作用, 具有良好的生物研究前景。

本研究表明菌株 15[#]能以 QNC 为唯一碳源生长代谢, 在无机盐培养基中培养 21 d 可降解 43.0% 的 QNC。通过单因素试验优化菌株 15[#]降解条件, 在 40 °C、pH 值为 6.0、初始 QNC 浓度为 100 mg/L、

接种量为 7%、添加质量分数为 0.1% 的酵母浸粉、氮源为蛋白胨培养条件下, 菌株 15[#]的降解效果最佳。降解菌的降解效果与多种因素有关, 包括温度、pH 值、初始底物质量浓度、接种菌量以及营养物质和菌株自身降解能力等。温度是影响微生物生长与存活的重要物理因素。温度主要通过影响微生物生长繁殖代谢进而影响微生物降解 QNC 的速度。已报道的 QNC 降解菌的最适温度在 25–35 °C 之间^[12-19,31]。根据《临川微生物手册》^[32]记录, 无色杆菌能在 42 °C 生长, 本研究得到的最适温度在无色杆菌的生长范围内。菌株 15[#]在 30–40 °C 之间的环境下, 降解率为 26.9%–43.0%, 由此可知该菌株能够适应水稻种植生长期间的温度。QNC 化学结构中含有易水解的羧基, pH 值为 4.35, 呈弱酸性^[33], 在碱性条件下易解离, 酸性条件可抑制 QNC 的解离。然而水稻适宜生长的 pH 值为 6.0–7.0, 所以 QNC 不易在稻田土壤中自然解离。本研究筛选出的菌株在 pH 值为 6.0–7.0 的条件下, 降解效果明显好于其他条件, 十分适应在自然环境下降解稻田中的 QNC。接种量同样对菌株的降解能力产生影响。接种量通过影响微生物初始生长能力, 进而影响菌株的生长繁殖。接种量过低会导致细菌培养出现更长的延迟期, 而后随着接种量的增加菌株的降解率呈现上升趋势, 当接种量为 7% 时菌株 15[#]的降解效果最好, 可持续稳定地降解 QNC; 当接种量超过 7% 时, 降解率呈下降趋势, 原因可能是菌体间的竞争抑制导致营养物质不足, 影响 QNC 降解率。

营养物质的种类以及含量都对微生物的降解能力有所影响。QNC 作为菌株的碳源, 浓度对菌株 15[#]降解效果有很大的影响。在二氯喹啉酸浓度为 20–100 mg/L 的范围内, 降解率随 QNC 浓度的增加而增加; 但当浓度过高时, QNC 降解率会处于较低水平, 原因可能是高浓度的 QNC 产生生理毒性从而抑制菌株的繁殖代谢。吕镇梅^[34]研究表明, 当 QNC 浓度超过一定限度会对微生物造成氧

化性胁迫。目前报道的最小初始 QNC 质量浓度为 5 mg/L, 嗜麦芽寡养单胞菌 J03 培养 21 d 对 QNC 的降解率为 33.5%^[17]。最大的初始 QNC 质量浓度为 1 000 mg/L 时, 洋葱伯克氏菌 WZ1^[33] 培养 5 d 可降解 90% 的 QNC。本研究前期实验已得知, 按照推荐剂量(有效成分: 375 g/hm²)施用 QNC, 土壤中的 QNC 浓度为 15.0 mg/kg。最佳 QNC 浓度过低或极高的降解菌并不适用于常见 QNC 污染农田。然而菌株 15[#] 的最优 QNC 浓度与 QNC 污染严重的稻田土壤中 QNC 浓度更为接近, 适用重度污染稻田。通过优化氮源的种类可以有效提高菌株 15[#] 的降解效率, 本研究发现不同氮源对菌株 15[#] 降解 QNC 的促进作用顺序为: 蛋白胨>NH₄NO₃>NH₄Cl>尿素>(NH₄)₂SO₄, 在其他条件相同的环境下氮源为蛋白胨时菌株降解率可提升 6.9%–13.3%。酵母膏富含蛋白质、氨基酸类、肽类、核苷酸、B 族维生素和微量元素, 不仅能作为氮源和碳源的补充剂, 同时也含有利于微生物生长的维生素和微量营养元素, 适量添加酵母膏可促进微生物生长繁殖进而提高降解效率。

目前国内学者筛选出的数株 QNC 降解菌如菌株 QC06^[14]、菌株 HN36^[16]、菌株 JO3^[17] 等主要应用于降解污染烟田的 QNC 残留, 从而使药害烤烟得到修复, 但有关适用于治理 QNC 污染稻田菌株的研究很少。本试验通过对菌株 15[#] 降解特性的研究发现, 菌株 15[#] 可适应稻田环境。然而农田生态系统具有多样性、复杂性和不稳定性, 因此, 深入研究菌株 15[#] 降解 QNC 机制及田间修复评价等问题将是我们下一步研究的重点内容, 可为进一步实际应用效果提供理论基础, 本实验室将进一步探究菌株 15[#] 的实际应用效果和降解机制。

4 结论

本研究采用驯化分离筛选的方法从稻田土壤中筛选出一株可以有效降解 QNC 的菌株, 编号为 15[#]。菌株 15[#] 经过形态学观察、生理生化试验, 磷脂脂肪酸鉴定以及 16S rRNA 基因相似性比对分

析, 鉴定为无色杆菌(*Achromobacter* sp.), 并对菌株 15[#] 的降解特性进行了探究, 结果表明, 该菌株在温度为 40 °C、pH 6.0、QNC 浓度为 100 mg/L、接种量为 7%、酵母浸粉添加量为 0.1%、氮源为蛋白胨时降解能力最强, 培养 21 d 对 QNC 的降解可达 43.0%。微生物治理农药残留污染农田是一项复杂的工程, 本研究可为微生物治理 QNC 污染提供新的菌株, 并为该菌株的下一步研究提供理论基础, 对修复 QNC 污染稻田土壤研究具有一定意义。

REFERENCES

- [1] Norsworthy JK, Bangarwa SK, Scott RC, Still J, Griffith GM. Use of propanil and quinclorac tank mixtures for broadleaf weed control on rice (*Oryza sativa*) levees[J]. Crop Protection, 2010, 29(3): 255-259
- [2] Resgalla C, Noldin JA, Tamanaha MS, Deschamps FC, Eberhardt DS, Rörig LR. Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil[J]. Ecotoxicology, 2007, 16(8): 565-571
- [3] Grossmann K, Kwiatkowski J. The mechanism of quinclorac selectivity in grasses[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2000, 66(2): 83-91
- [4] Chen GQ, Tian XS, Feng L. Early diagnosis and prediction of crop injury caused by residual quinclorac: urgent research agendas in Southern China[J]. Weed Science, 2014, 32(1): 96-100 (in Chinese)
陈国奇, 田兴山, 冯莉. 南方二氯喹啉酸残留药害早期诊断和预警亟待研究[J]. 杂草科学, 2014, 32(1): 96-100
- [5] Li RH, Chu SH. Studies on the safety of quinclorac for succeeding crops of paddy rice[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2013, 52(23): 5749-5752 (in Chinese)
李儒海, 褚世海. 二氯喹啉酸对水稻后茬作物的安全性研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(23): 5749-5752
- [6] Moyer JR, Esau R, Boswall AL. Effects of quinclorac on following rotational crops[J]. Weed Technology, 1999, 13(3): 548-553
- [7] Koo SJ, Neal JC, DiTomaso JM. Mechanism of action and selectivity of quinclorac in grass roots[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1997, 57(1): 44-53
- [8] Li JX, Han JF, Liu HS, Xu SX, Zuo T, Yuan SH. Effects of quinclorac on the germination of seed and primary seedling growth of flue-cured tobacco[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010(02): 37-39, 48 (in Chinese)
李晶新, 韩锦峰, 刘华山, 徐淑霞, 左涛, 袁士豪. 二氯喹啉酸对烤烟种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 河南农业科学, 2010(2): 37-39, 48
- [9] Wang J, Chen ZP, Wan SQ, Deng JC. Study on degradation

- dynamic of quinclorac in water and inhibiting activity to tobacco[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2007(2): 59-61 (in Chinese)
- 王静, 陈泽鹏, 万树青, 邓建朝. 二氯喹啉酸在烟草水培液中的消解动态及对烟苗生长的影响[J]. 广东农业科学, 2007(2): 59-61
- [10] Zuo T, Liu HS, Han JF, Xu SX, Wang XJ, Yuan SH, Pu WX, Wang YF, Yi JH. Effects of degradation bacteria on reactive oxygen species and protective enzymes of tobacco leaves under quinclorac stress[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010(12): 36-39 (in Chinese)
- 左涛, 刘华山, 韩锦峰, 徐淑霞, 王晓军, 袁仕豪, 蒲文宣, 汪耀富, 易建华. 二氯喹啉酸胁迫下降解菌对烤烟叶片中活性氧及保护酶的影响[J]. 河南农业科学, 2010(12): 36-39
- [11] Song WC, Yu PZ. Advances of research on eco-toxicology of quinclorac[J]. Pesticide Science and Administration, 2006(9): 13-17 (in Chinese)
- 宋稳成, 余苹中. 二氯喹啉酸的生态毒理学研究进展[J]. 农药科学与管理, 2006(9): 13-17
- [12] Lang Z, Qi D, Dong JJ, Ren LW, Zhu QF, Huang WW, Liu YM, Lu DN. Isolation and characterization of a quinclorac-degrading Actinobacteria *Streptomyces* sp. strain AH-B and its implication on microecology in contaminated soil[J]. Chemosphere, 2018, 199: 210-217
- [13] Dong JY, Luo K, Bai LY, Zhou XM, Zeng AP, Fan J. Isolation, identification and characterization of an *Alcaligenes* strain capable of degrading quinclorac[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2013, 15(3): 316-322 (in Chinese)
- 董俊宇, 罗坤, 柏连阳, 周小毛, 曾爱平, 范俊. 二氯喹啉酸降解菌的分离鉴定及降解特性分析[J]. 农药学报, 2013, 15(3): 316-322
- [14] Fan J, Bo LY, Liu MJ, Zhou XM, Ren ZH, Dong JY, Sun LF, Liu EM. Isolation, identification and degradation characteristics of quinclorac-degrading strain QC06[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(3): 431-436 (in Chinese)
- 范俊, 柏连阳, 刘敏捷, 周小毛, 任佐华, 董俊宇, 孙良菲, 刘二明. 1 株二氯喹啉酸降解菌 QC06 的筛选鉴定及其降解特性[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(3): 431-436
- [15] Li YY, Chen W, Wang YS, Luo K, Li Y, Bai LY, Luo F. Identifying and sequencing a *Mycobacterium* sp. strain F4 as a potential bioremediation agent for quinclorac[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185721
- [16] Xu SX, Zhou J, Huang N, Liu HS, Feng HB, Han JF, Wu K. On the way of isolating, identifying and characterization of quinclorac-degrading bacterium HN36[J]. Journal of Safety and Environment, 2012, 12(2): 45-49 (in Chinese)
- 徐淑霞, 周杰, 黄宁, 刘华山, 冯航标, 韩锦峰, 吴坤. 二氯喹啉酸降解菌 HN36 的分离、鉴定及降解特性研究[J]. 安全与环境学报, 2012, 12(2): 45-49
- [17] Zhou T, Guo XQ, Tian PY, Chen FP, Gu G. Repair effect of *Stenotrophomonas maltophilia* J03 on quinclorac-injured flue-cured tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(5): 86-91 (in Chinese)
- 周挺, 郭学清, 田佩玉, 陈凤平, 顾钢. 嗜麦芽寡养单胞菌 J03 对烤烟二氯喹啉酸药害的修复作用[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(5): 86-91
- [18] Zhang S, Huang GL, Xu JL, Li B, Li HG, Chen DX. Screening, identification and characterization of a quinclorac-degrading *Arthrobacter* sp. MC-10[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(1): 80-88 (in Chinese)
- 张顺, 黄国联, 许家来, 李斌, 李宏光, 陈德鑫. 二氯喹啉酸降解菌 MC-10 的筛选、鉴定及其降解特性[J]. 微生物学报, 2015, 55(1): 80-88
- [19] Li ZM. Studies on stress response and biodegradation of *Burkholderia capeciae* WZ1 upon quinclorac[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2008 (in Chinese)
- 李子木. 洋葱伯克氏菌 WZ1 对二氯喹啉酸胁迫的应激反应及其降解机制研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2008
- [20] Wu ZG, Wang F, Ning LQ, Stedtfeld RD, Yang ZZ, Cao JG, Sheng HJ, Jiang X. Biodegradation of 5-chloro-2-picolinic acid by novel identified co-metabolizing degrader *Achromobacter* sp. fl[J]. Biodegradation, 2017, 28(2/3): 139-144
- [21] Huang SQ, Guo ZL, Mou RX, Ma YN, Lin XY, Ni YX. Determination of quinclorac residue in paddy water, soil and rice plants in a simulated paddy environment based on QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(5): 831-836 (in Chinese)
- 黄思琦, 郭珍玲, 牟仁祥, 马有宁, 林晓燕, 倪妍霞. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定模拟稻田环境中水、土壤和水稻植株中二氯喹啉酸残留[J]. 农药学报, 2020, 22(5): 831-836
- [22] Balows A. Bergey's manual of determinative bacteriology. eighth edition[J]. American Journal of Public Health, 1975, 65(3): 315
- [23] Wang XR, Tian SY, Li SC, Lai SX, Chen GH, Qiu JW, Chen DX. Study on the utilization of some kinds of nutrients by *Xenorhabdus luminescens* in the medium[J]. Journal of Zhangkai Aguotechaical College, 1998, 11(4): 1-4 (in Chinese)
- 王晓容, 田世尧, 李素春, 赖仕霞, 陈根洪, 丘俊威, 陈冬晓. 无色杆菌(*Xenorhabdus luminescens*)对培养液中几种营养成分利用的研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1998, 11(4): 1-4

- [24] Liang DH, Hu YY. Simultaneous sulfamethoxazole biodegradation and nitrogen conversion by *Achromobacter* sp. JL9 using with different carbon and nitrogen sources[J]. Bioresource Technology, 2019, 293: 122061
- [25] Jin DC, Kong X, Li YJ, Bai ZH, Zhuang GQ, Zhuang XL, Deng Y. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Achromobacter* sp. isolated from rural domestic wastewater[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12(10): 13510-13522
- [26] Hou N, Zhang NN, Jia TT, Sun Y, Dai YF, Wang QQ, Li DP, Luo ZK, Li CY. Biodegradation of phenanthrene by biodemulsifier-producing strain *Achromobacter* sp. LH-1 and the study on its metabolisms and fermentation kinetics[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 163: 205-214
- [27] Xia ZY, Zhang L, Zhao Y, Yan X, Li SP, Gu T, Jiang JD. Biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by a new isolated strain of *Achromobacter* sp. LZ35[J]. Current Microbiology, 2017, 74(2): 193-202
- [28] Liu SF, Chen Q, Ma T, Wang M, Ni JR. Genomic insights into metabolic potentials of two simultaneous aerobic denitrification and phosphorus removal bacteria, *Achromobacter* sp. GAD3 and *Agrobacterium* sp. LAD9[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2018, 94(4): fty020
- [29] Liang DH, Hu YY. Application of a heavy metal-resistant *Achromobacter* sp. for the simultaneous immobilization of cadmium and degradation of sulfamethoxazole from wastewater[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 402: 124032
- [30] Mohapatra B, Satyanarayana T, Sar P. Molecular and eco-physiological characterization of arsenic (As)-transforming *Achromobacter* sp. KAs 3-5^T from As-contaminated groundwater of West Bengal, India[J]. Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2018, 53(10): 915-924
- [31] Yu C. Screening of quinclorac degrading bacteria and its remediation effect on rape seedlings[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese)
俞程. 二氯喹啉酸降解菌的筛选及其对油菜苗期的修复效应[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [32] Murray PR. Manual of Clinical Microbiology[M]. Beijing: Science Press, 2005. (in Chinese)
P.R.默里. 临床微生物学手册[M]. 北京: 科学出版社, 2005
- [33] Sterling TM. Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells[J]. Weed Science, 1994, 42(2): 263-276
- [34] Lu ZM. Influences of herbicide quinclorac on microecosystem in flooded paddy soils and characterization of quinclorac-degrading bacteria[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2004 (in Chinese)
吕镇梅. 除草剂二氯喹啉酸对水稻田土壤微生态的影响及其降解特性研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2004