

# 氟磺胺草醚降解菌 BX3 的分离、鉴定与降解特性研究

张清明

(青岛农业大学 化学与药学院 山东 青岛 266109)

**摘要:** 为了减轻氟磺胺草醚对土壤的污染问题,利用富集培养技术从山东某农药厂活性污泥中筛选到 1 株具有高效降解氟磺胺草醚能力的细菌,命名为 BX3。通过菌落形态、生理生化特征和 16S rDNA 基因序列分析,初步鉴定菌株 BX3 为微嗜酸寡氧单胞菌。同时对菌株 BX3 的生长特性及降解特性进行了初步研究。结果表明,该菌株降解氟磺胺草醚的最适条件为:氟磺胺草醚质量浓度为 100 mg/L,培养温度为 30 ℃,pH 值 6~7。在最适条件下,菌株 BX3 具有较强的降解氟磺胺草醚的能力,培养 5 d 后对氟磺胺草醚的降解率达到 80% 以上。可为氟磺胺草醚污染土壤的生物修复提供适宜的菌种资源。

**关键词:** 氟磺胺草醚;降解菌;微嗜酸寡氧单胞菌;降解特性

中图分类号: X506; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0199-05

## Isolation, Identification and Degradation Characteristics of Fomesafen Degradation Bacterium BX3

ZHANG Qing-ming

(College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** In order to decrease the amount of fomesafen in soil, a high efficiency degradation strain BX3 was screened from the activated sludges by enrichment culture. The strain was preliminary identified as *Stenotrophomonas acidaminiphila* according to its colony morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence analysis. Meanwhile, the growth characteristics and degradation characteristics of strain BX3 were preliminary studied. The optimum conditions of fomesafen degradation were as follows: concentration of fomesafen culture solution of 100 mg/L, incubation temperature of 30 ℃ and pH value of 6-7. The result shows that strain BX3 had strong fomesafen degradation capacity under the optimum conditions. The removal efficiency of fomesafen could reach more than 80% after incubation of 5 days. The strain BX3 was a suitable candidate in bioremediation of fomesafen-contaminated soil.

**Key words:** Fomesafen; Degradation strain; *Stenotrophomonas acidaminiphila*; Degrading characteristics

氟磺胺草醚(Fomesafen),又名虎威,是由英国捷利康公司开发成功的二苯醚类除草剂,1988 年首次在我国取得制剂登记,由于其高效、低毒、选择性好而被广泛应用于大豆、花生等油料作物田阔叶杂草的防治,且近年来随着我国种植结构的调整和除草剂工业的发展,氟磺胺草醚的登记次数和田间使用量呈现出逐渐增多的趋势<sup>[1-2]</sup>。然而,氟磺胺草醚在土壤中残效期比较长,若使用不当容易对后茬作物如玉米、高粱等造成不同程度的危害<sup>[3-4]</sup>。因此,研究如何降低氟磺胺草醚在土壤中的残留量,减

少其对后茬作物及环境造成的污染具有重要的理论和实践意义。

研究表明,微生物降解是降低氟磺胺草醚在土壤中残留量的主要途径,因此,氟磺胺草醚降解菌的筛选与土壤修复成为近几年我国学者研究的热点内容之一。目前,我国已有氟磺胺草醚降解细菌如芽孢杆菌(*Lysinibacillus* sp.) ZB-1<sup>[5]</sup>、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) F-12<sup>[6]</sup>、门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina* sp.) FB8<sup>[7]</sup>以及氟磺胺草醚降解真菌如黑曲霉属(*Aspergillus Niger*) S7<sup>[8]</sup>和菌黄曲霉

收稿日期: 2013-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(41101488)

作者简介: 张清明(1978-),男,山东博兴人,讲师,博士,主要从事农药环境毒理与生物修复研究。

(*Aspergillus flavus*) TZ1985<sup>[9]</sup> 等微生物被分离鉴定出来,这些微生物资源的发掘对氟磺胺草醚污染土壤的修复有着非常重要的意义。

本研究通过富集培养,从生产氟磺胺草醚农药厂的活性污泥中分离出一株高效降解菌株,并对其进行了鉴定,找出了该菌株的最佳生长条件,旨在为解决氟磺胺草醚在土壤中的残留药害问题,丰富降解氟磺胺草醚的微生物资源,为该除草剂的生物修复研究工作提供更多的有效途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

污泥样品采集于山东某农药厂;氟磺胺草醚原药(含量 95.7% 京博农化控股有限公司);氟磺胺草醚标准品(含量 98.2% 德国 Dr Ehrenstorfer 公司)。

无机盐培养液(g/L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{NaCl}$  0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.2 微量元素溶液 2 mL pH 值 7.0 充分混合搅拌均匀。

LB 培养液(g/L): 酵母粉 10, 蛋白胨 5,  $\text{NaCl}$  10 pH 值 7.0 充分混合搅拌均匀。

固体培养基: 液体培养基中加 1.5% 琼脂。

各类培养基使用前均用高压蒸汽灭菌(115 °C, 30 min),在灭菌后无机盐培养基冷却至 50 ~ 60 °C 时加入一定浓度的氟磺胺草醚即可得到以氟磺胺草醚为唯一碳源的无机盐培养基。

### 1.2 氟磺胺草醚降解菌的筛选

取 5 mL 活性污泥样品置于 250 mL 锥形瓶中,加入含 50 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐培养基中,置于 30 °C, 160 r/min 的培养箱中黑暗培养 7 d,取 10 mL 富集培养液转移到新鲜的含 100 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐培养基中,继续振荡培养,以后每隔 7 d 转接一次,同时提高氟磺胺草醚含量,每次提高 100 mg/L,直至氟磺胺草醚浓度为 500 mg/L,取富集培养液稀释涂布于添加相应氟磺胺草醚浓度的无机盐平板上,置于恒温培养箱(30 °C)中培养,待平板上长出菌落后,挑取生长较好的菌株进行反复纯化,直至菌落单一。将纯化后各菌落的菌悬液分别接种于含 100 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐液体培养基中,置于 30 °C, 160 r/min 的培养箱中黑暗培养,每 24 h 取样一次,利用高效液相色谱法(HPLC)检测培养液中氟磺胺草醚残留量,同时测定培养液的  $\text{OD}_{600}$  值,绘制菌株的氟磺胺草醚降解和生长曲线。

### 1.3 氟磺胺草醚的测定

氟磺胺草醚的测定参照战徊旭<sup>[9]</sup>建立的方法,并略做修改:取 5 mL 培养液,置于具塞试管中,用

0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 3.0 左右,然后用 2 × 5 mL 二氯甲烷萃取,二氯甲烷层经无水硫酸钠脱水,在旋转蒸发器上浓缩至近干,用色谱甲醇定容至 2 mL,摇匀,过 0.22 μm 有机滤膜待测。检测条件:仪器:Agilent 1100,色谱柱: Eclipse XDB-C18(250 mm × 4.6 mm 5 μm),柱温: 25 °C,流动相: 甲醇/水(80/20, V/V, 冰醋酸调 pH 值 3),流速: 0.8 mL/min,检测波长: 290 nm,进样量: 20 μL。利用外标法计算样品中氟磺胺草醚残留量,根据公式求出其降解率:

氟磺胺草醚降解率 =  $[1 - (\text{处理实测残留量} / \text{对照实测残留量})] \times 100\%$

### 1.4 菌种的鉴定

菌株形态及生理生化特征鉴定参照东秀珠<sup>[10]</sup>的《常见细菌系统鉴定手册》进行。

菌株的分子鉴定:采用 OMEGA 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,以细菌 16S rDNA 通用引物<sup>[11]</sup> 27F(5'-AGAGTTTGATCATGG CTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGA CTT-3') 对 DNA 模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系(25 μL)为: PCR Master Mix 12 μL、引物各 1 μL、模板 DNA 1 μL、 $\text{ddH}_2\text{O}$  10 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,纯化后的 PCR 产物送上海生工生物工程公司直接测序。测序结果与 NCBI 数据库 GenBank 中的核酸序列进行同源性比对分析,利用 MAGE 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法进行系统发育树的构建,1 000 次随机抽样,计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发育树的置信度,以确定菌株的种属关系。

### 1.5 降解菌的生长特性研究

通过测定不同浓度的碳源(氟磺胺草醚)、不同温度和不同 pH 对降解菌的生长和降解能力的影响,以确定降解菌的最适生长条件。具体步骤如下:降解菌在 LB 液体培养基中培养至平台期后,离心,将菌体制成  $\text{OD}_{600}$  为 1.0 的菌悬液,以 2% 的比例分别接入到含 50, 100, 200, 400, 800 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐培养液中,30 °C, 160 r/min 黑暗培养 5 d,取样测定其吸光度值( $\text{OD}_{600}$ )和降解能力,确定菌株最适生长的农药浓度;选取不同温度(20, 25, 28, 30, 35, 40 °C)以及不同初始 pH 值(5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)置于 30 °C, 160 r/min 分别黑暗培养 5 d,取样测定温度和初始 pH 值对降解菌的生长以及对最适浓度农药降解能力的影响;以上各试验每个处理均设置 3 个重复,另设不接菌处理为对照;所有数据均

采用 SigmaPlot 12.0 进行统计分析和制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 氟磺胺草醚高效降解细菌的筛选

通过富集培养驯化后,从形态差别上筛选出 4 株菌株,编号分别为 BX1、BX2、BX3 和 BX4,将各菌株在含 100 mg/L 的氟磺胺草醚液体无机盐培养基中培养 5 d,经测定,结果表明 4 株菌株均对氟磺胺草醚有一定的降解能力,其中以菌株 BX3 降解能力最高,培养 5 d 后降解率可达 84.7%,因此,选择 BX3 作为研究的目标菌株。菌株 BX3 的降解曲线和生长曲线如图 1 所示。从生长曲线可以看出,降解菌 BX3 在 0~48 h 处于生长恢复延迟期,从 48 h 开始生长加快,进入对数生长期,从 60 h 开始,进入生长稳定期,培养 96 h 后,菌株 BX3 逐渐开始衰亡;从氟磺胺草醚降解曲线可以看出,培养 60 h 后,降解加速,直到培养 96 h 后降解率可达到 83.9%,可见菌株 BX3 降解氟磺胺草醚的最佳时间段位于培养后 60~96 h,96 h 之后降解率变化较小;此时大部分氟磺胺草醚已被降解,不能给菌株生长提供足够的碳源和能源,以致部分菌体大量死亡,菌体生物量下降。

### 2.2 降解细菌 BX3 的鉴定

形态及生理生化特征: BX3 菌落在 LB 培养基上呈圆形,紧贴在培养基上,边缘光滑,中央凸起,菌体颜色呈淡黄色,不透明,菌体呈杆状。生理生化特

征显示 BX3 好氧,耐盐性差,革兰氏染色、淀粉水解试验、吲哚试验、甲基红试验、乙酰甲基甲醇(V-P)试验均为阴性。接触酶反应为阳性,能还原硝酸盐、液化明胶,可利用葡萄糖、蔗糖及甘露醇等碳源。

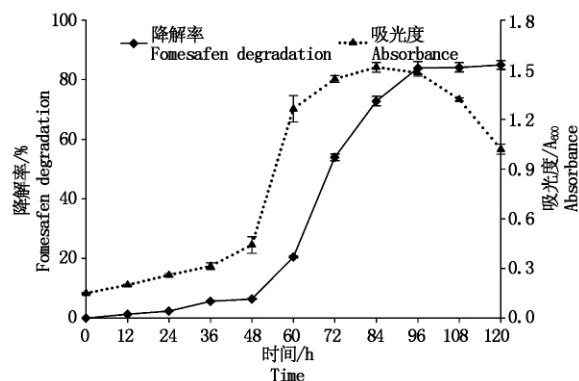
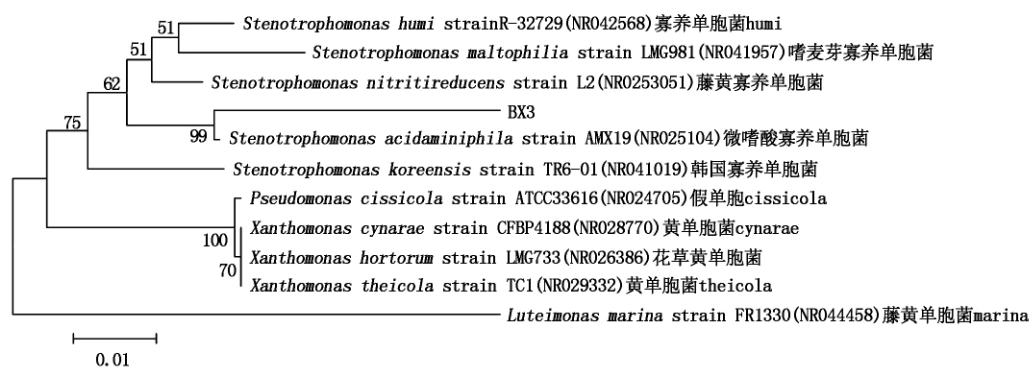


图1 菌株 BX3 的生长与氟磺胺草醚的降解曲线

Fig.1 Curves of strain BX3 growth and fomesafen degradation

16S rDNA 序列分析: BX3 测序结果表明,扩增得到的 16S rDNA 长度为 1 451 bp,将菌株 BX3 测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行 BLAST 比对分析并应用 MEGA 5.05 软件做系统发育树如图 2 所示,结果显示, BX3 与微嗜酸寡氧单胞菌 (*Stenotrophomonas acidaminiphila*) 聚在一个分支,同源性达到 99%。通常来讲,如果 2 个菌株的 16S rDNA 同源性大于 95%,则可将其归为同一属<sup>[12]</sup>。因此,本研究基于菌株 BX3 的形态、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析,将 BX3 鉴定为微嗜酸寡氧单胞菌。



分支上的数字表示聚类置信度(%) ; 括号中数值为菌株的 GenBank 登录号。

The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap; Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

图2 基于菌株 BX3 16S rDNA 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of strain BX3 base on 16S rDNA

### 2.3 氟磺胺草醚初始质量浓度对菌株 BX3 生长和降解能力的影响

不同质量浓度的氟磺胺草醚对菌株生长和降解能力的影响如图 3 所示。从图 3 可以看出,不同氟磺胺草醚质量浓度下,降解菌生长量不同。氟磺胺草醚质量浓度为 100 mg/L 条件下,菌株的生长量较

大,在氟磺胺草醚质量浓度达到 800 mg/L 时,菌株生长量最小,这可能是由于氟磺胺草醚质量浓度过大时会对菌株产生轻微毒性从而抑制其生长造成的;同时从图 3 可以看出,菌株的生长量及其对氟磺胺草醚的降解能力是相对应的,培养 5 d 后,菌株 BX3 对 100 mg/L 的氟磺胺草醚去除率可达到 80%

以上,因此,选择 100 mg/L 作为降解菌的最适农药质量浓度。

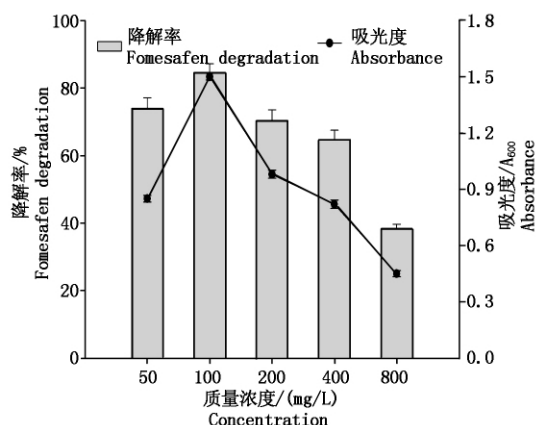


图3 不同质量浓度的氟磺胺草醚对菌株 BX3 生长和降解能力的影响

Fig.3 Effects of different fomesafen concentration on strain BX3 growth and fomesafen degradation

## 2.4 温度对菌株 BX3 的生长及降解能力的影响

培养温度对降解菌的生长和降解能力也有一定的影响,从图4可以看出,菌株 BX3 在 25~40℃ 的环境下均可以存活,并对氟磺胺草醚有一定的降解能力,但温度偏高和偏低时均不利于菌株的生长。当培养温度在 28~35℃ 时,菌株均可以较好地生长并对 100 mg/L 氟磺胺草醚的降解率达到 80% 左右。菌株在培养温度为 30℃ 时,生长量达到峰值,同时对氟磺胺草醚的降解效果也最好,因此,可以推断菌株 BX3 的最适生长温度为 30℃。这和菌株的生长特性有关,温度过高或过低时均会影响菌株的正常生长从而影响其对目标农药的降解能力。

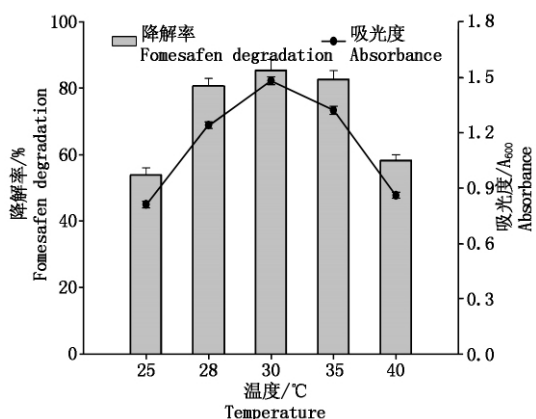


图4 温度对菌株 BX3 的生长及降解能力的影响  
Fig.4 Effects of different temperature on strain BX3 growth and fomesafen degradation

## 2.5 pH 值对菌株 BX3 的生长及降解能力的影响

培养溶液初始 pH 值对菌株 BX3 的生长和降解能力的影响如图5所示。在 pH 值为 6 和 7 的条件下菌株生长速度较快,对氟磺胺草醚的降解能力也最强,降解率在 80% 以上。菌株在弱碱性的条件下

也可以生长,但在 pH 值为 9 的偏碱性条件下,不利于其生长,对氟磺胺草醚的降解率也最低,这说明菌株 BX3 不适合在偏碱性条件下生长。本试验表明,菌株 BX3 在 pH 值为 6~7 的微酸环境下生长最好,对氟磺胺草醚的降解能力也最强,这可能与菌株 BX3 为微嗜酸寡氧单胞菌的生长特性有关。

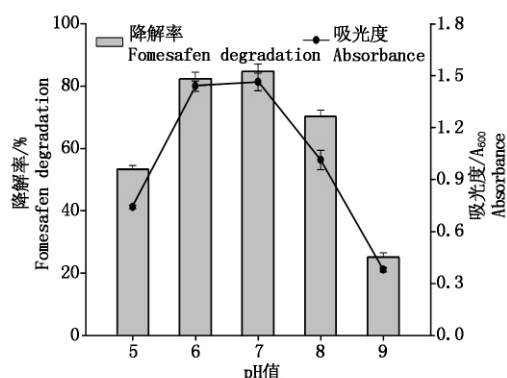


图5 初始 pH 值对菌株 BX3 的生长及降解能力的影响

Fig.5 Effects of primary pH on strain BX3 growth and fomesafen degradation

## 3 讨论

氟磺胺草醚作为二苯醚类除草剂的主打品种,如今已经越来越多地在大豆、花生等作物田中用于恶性杂草的防治。然而,随着利用率和使用量的增加,其对环境的影响也引起了一定的关注,研究表明,土壤中残留质量浓度在 100 μg/kg 以上时,会引起蚯蚓体内抗氧化酶活性的提高,对土壤中生物可能存在一定的风险性<sup>[13]</sup>。有关氟磺胺草醚污染土壤的生物修复研究报道也越来越多,其中研究较为深入的有南京农业大学梁波等<sup>[5]</sup>从农田土壤中分离出一株高效降解细菌 ZB-1,该菌株在 7 d 内对 50 mg/L 氟磺胺草醚的降解率可以达到 81.32%,其生长的适宜温度范围为 20~30℃,最适 pH 值为 7.0,对 10~200 mg/L 氟磺胺草醚都有良好的降解能力,同时还对菌株 BZ-1 对氟磺胺草醚的降解途径做了研究;黑龙江大学杨峰山等<sup>[7]</sup>从氟磺胺草醚污染土壤中分离出一株高效降解菌株 FB8,该菌株在 96 h 内对 500 mg/L 氟磺胺草醚的降解率高达 86.75%,其最适生长温度为 35~37℃,pH 值为 6.0~8.0,初始农药质量浓度为 500 mg/L,同时该菌株处理土壤 30 d 可以显著恢复敏感作物玉米和高粱的各项生物量指标,对氟磺胺草醚质量浓度为 5 mg/kg 的土壤修复效果明显。

本试验所筛选出的菌株 BX3 经鉴定为微嗜酸寡氧单胞菌。寡养单胞菌属是环境中一类常见的菌属,也是环境中典型污染物的降解菌属之一,有研究

表明,该属细菌具有降解莠<sup>[14]</sup>、苯噻草胺<sup>[15]</sup>、噻吩磺隆<sup>[16]</sup>、DDT<sup>[17]</sup>等污染物的能力,但作为氟磺胺草醚降解菌尚未见报道。本研究证实了该属细菌具有降解氟磺胺草醚的能力,且所筛选出的菌株 BX3 在温度为 28~35℃、pH 值为 6~8、氟磺胺草醚质量浓度为 50~400 mg/L 的条件下均可以良好地生长,这说明菌株 BX3 的生长条件比较宽泛,环境适应性较强。本研究丰富了氟磺胺草醚污染土壤生物修复的微生物资源,同时也证实了寡养单胞菌属可以利用氟磺胺草醚,为氟磺胺草醚在环境中消减提供了新的依据。

#### 4 结论

从山东某农药厂活性污泥中分离筛选得到 1 株氟磺胺草醚的高效降解菌株,结合形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析,鉴定该菌株为微嗜酸寡养单胞菌。

菌株 BX3 的最适生长条件为: 氟磺胺草醚初始质量浓度 100 mg/kg、温度 30℃、pH 值 7。在该培养条件下,培养 5 d 后,氟磺胺草醚降解率可达 84.7%。

#### 参考文献:

- [1] 过成吉. 氟磺胺草醚除草剂产品登记今年升高[J]. 农药市场信息, 2006(6): 23.
- [2] 刘刚. 氟磺胺草醚原药最新登记情况[J]. 农药市场信息, 2010(4): 27.
- [3] 卢向阳,徐筠. 氟磺胺草醚对作物的药害及解决措施[J]. 农药, 2006, 45(5): 350-352.
- [4] 刘友香,王险峰. 氟磺胺草醚药害原因分析与处理[J]. 现代化农业, 2010(12): 8-9.
- [5] Liang B, Lu P, Li H H *et al.* Biodegradation of fomesafen by strain *Lysinibacillus* sp. ZB-1 isolated from soil [J]. Chemosphere, 2009(77): 1614-1619.
- [6] 吴秋彩,刘艳,王晓萍. 氟磺胺草醚降解菌 F-12 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(12): 216-222.
- [7] 杨峰山,刘亮,刘春光,等. 除草剂氟磺胺草醚降解菌 FB8 的分离鉴定与土壤修复[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1232-1239.
- [8] 李阳,孙庆元,宗娟,等. 一株降解氟磺胺草醚的黑曲霉菌特性[J]. 农药, 2009, 48(12): 878-882.
- [9] 战徊旭,任洪雷,蒋凌雪,等. 氟磺胺草醚降解菌的分离鉴定及生长特性研究[J]. 作物杂志, 2011, 2: 40-44.
- [10] 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.
- [11] Frank J A, Reich C I, Sharma S *et al.* Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2461-2470.
- [12] Wang S N, Liu Z, Xu P. Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. Strain S33 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(3): 838-847.
- [13] Zhang Q M, Zhu L S, Wang J *et al.* Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20: 201-208.
- [14] 唐玉斌,王晓朝,陈芳艳,等. 莠降解优势菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2010, 30(8): 1086-1090.
- [15] 叶央芳,杜宇峰. 三株寡养单胞菌对苯噻草胺的降解及系统发育分析[J]. 江苏环境科技, 2005, 18(4): 4-6.
- [16] 黄星,何健,潘继杰,等. 噻吩磺隆降解菌 FLX 的分离鉴定及降解特性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(2): 214-218.
- [17] 李红权,李红梅,蒋继志,等. 一株 DDT 降解菌的筛选、鉴定及降解特性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 696-699.