

呋喃丹降解菌的分离与特性研究

李玉梅^{1,2}, 王根林³, 于洪久², 汤 晖⁴, 陶 波¹, 马凤鸣¹

(¹东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150010; ²黑龙江省农业科学院农村能源研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; ³黑龙江省农业科学院土肥所, 黑龙江 哈尔滨 150086; ⁴河北大学生命科技学院, 河北 保定 071002)

摘 要:采用富集驯化培养方法,从长期施用呋喃丹的大豆田土壤中分离到1株可高效降解呋喃丹的菌株。生物降解表明,5 d内该菌株生物降解农药率达到94.7%;降解后期培养液采用气质联用分析方法未能检测到原药呋喃丹,检测到有新的化合物生成,而对照培养液中未发现有该类化合物的生成。同时无机盐培养液后期有红色现象生成,可能与呋喃酚开环有关;无细胞提取液加入农药重新培养表明,菌株可通过分泌胞外诱导酶在周质空间内降解农药;经16S rDNA鉴定,初步认为该菌株属于沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)。

关键词:呋喃丹;生物降解;沙雷氏菌属

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0281-04

Separating and Characteristics of a Strain Capable of Degrading Carbofuran

LI Yu-mei^{1,2}, WANG Gen-lin², YU Hong-jiu², TANG Hui³, TAO Bo¹, MA Feng-ming¹

(¹Agricultural College of North-East Agricultural University, Harbin 150010, Heilongjiang; ²Country Resource Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; ³Soil Fertilizer Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; ⁴College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China)

Abstract: One strain that is capable of degrading carbofuran was isolated from the carbofuran acclimated soybean soil by domestication and enrichment. Biodegrading test showed the degraded ration reached 94.7% in five days. By GC-MS analyzing, carbofuran was degraded into carbophenyl mostly, and in inorganic medium, red compound of carol was showed after a given periods, which may be related with the opening loop of carbophenyl. In no cell extracting solution with pesticide, carbofuran was also degraded into carbophenyl, which showed the strain could degrade pesticide by inducing enzyme out of the cell. The strain is a *Serratia* sp. by 16S rDNA identification.

Key words: Carbofuran; Biodegradation; *Serratia* sp.

呋喃丹(Carbofuran)属于氨基甲酸的芳香酯类化合物,是国内农药中使用量最大、毒性最高的农药之一。作为胃毒和触杀型杀虫剂的代表,能够有效防治大豆、玉米等作物的主要害虫及土壤中的大部分害虫。但此类农药在土壤中残留时间较长,具有较高的生物学毒性,对整个生态系统具有很强的短期副作用以及长期的滞留毒害作用。生物降解是消除环境中呋喃丹污染重要方式之一^[1-2]。通过对可降解氨基甲酸酯类农药的分离与特性研究,不仅对该类农药的降解机制研究具有重要意义,而且能够为受农药污染土壤的生物修复提供良好的材料^[3]。沙雷氏菌属具有解磷、降解生物柴油等多种生物学功能,但国内外对于沙雷氏菌属的研究多集中于医

学上的研究,并且多见于粘质沙雷氏菌属的报导,对其降解农药方面的研究少有报道^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤 采自黑龙江省农科院多年施用呋喃丹的大豆田土壤(黑土),土壤基础肥力为:全氮0.16%,全磷0.52%,碱解氮247.4 mg·kg⁻¹,速效磷86.3 mg·kg⁻¹,速效钾217.6 mg·kg⁻¹,有机质含量3.96%,pH值6.51。

2.1.2 培养基 LB培养基:牛肉膏5 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、蒸馏水1 000 mL、pH值7.0左右。

改良无机盐培养基:蔗糖0.5 g、Na₂HPO₄1.0 g、

收稿日期:2008-11-11

基金项目:黑龙江省农科院青年基金资助项目(20060402)。

作者简介:李玉梅(1971-),女,副研究员,博士研究生,主要从事土壤微生物、肥料等方面的研究。

KCl 0.5 g、MgSO₄ 0.02 g、FeSO₄ 微量、蒸馏水 1000 mL、pH 值 7.0 左右。

1.2 方法

1.2.1 菌株筛选与分离 取长期施用呋喃丹的土壤 40 g,按 1:2 比例,加入含有呋喃丹浓度为 100 mg·L⁻¹的富集培养基中,30℃ 180 r·min⁻¹恒温培养 7 d。吸取上述富集培养液 10 mL,加入呋喃丹浓度为 200 mg·L⁻¹的富集培养基中,30℃ 180 r·min⁻¹恒温培养 7 d。依此方法,直至培养液中呋喃丹浓度达到 500 mg·L⁻¹时,进行菌株平板分离。

1.2.2 呋喃丹的测定方法 光度法定量测定呋喃丹含量^[5]。根据呋喃丹在 pH>12 时,发生水解生成酚类物质,用 4-氨基安替比林萃取光度法测定其含量。

气谱质谱联用法定性检测呋喃丹降解产物^[3]。GC/MS 条件色谱柱:HP-5-30 m×0.25 m×0.25 m;进样口温度 250℃;起始温度 100℃,保留 3 min;升温速率 10℃·min⁻¹;终止温度 300℃,保留 5 min。MS 传输线温 300℃。电离电压 70eV。载气 He,流速 1 mL·min⁻¹柱头压 100 kPa。

1.2.3 菌株降解条件优选 采用正交试验确定菌株最佳降解条件,因素水平见表 1。

表 1 菌株降解条件优选

Fig.1 The condition optimizing on degrading pesticide by strains

水平 Level	A 温度 Temperature/℃	B 接种量 Inoculation quantity/%	C 转速 Rotation /r·min ⁻¹	D pH
1	1(25)	1(3)	120	5.5
2	2(30)	2(5)	180	6.5
3	3(35)	3(10)	200	7.0

1.2.4 菌株利用农药生长能力 250 mL 三角瓶中加入改良的无机盐培养基 100 mL,呋喃丹浓度为 20 mg·L⁻¹。按照 5% 接种量接入相应体积的菌液,30℃ 180 r·min⁻¹振荡培养,定期吸取培养液于 600nm 下测定菌液吸光度,并比色测定呋喃丹含量以反应菌株利用农药进行生长的能力。

1.2.5 不同浓度底物下菌株降解农药效果 250 mL 三角瓶中加入改良的无机盐培养基 50 mL,呋喃丹浓度分别为 0、10、20、30、40、50 mg·L⁻¹。按照 5% 接种量接入相应体积的菌液,30℃ 180 r·min⁻¹振荡培养,每隔一段时间吸取培养液比色测定呋喃丹含量,确定菌株在不同浓度农药下降解呋喃丹的效果。

1.2.6 菌株 DNA 提取及 16S rDNA 扩增 按照文

献方法进行基因提取^[6],回收克隆的 DNA 片段以质粒形式送交上海生物工程公司测序。

1.2.7 菌株呋喃丹降解酶的定位 吸取一定体积 LB 培养液中培养 24 h 的菌液,10 000 r·min⁻¹离心 10 min,上清液在无菌操作室内过细菌滤器即为无细胞提取液。250 mL 三角瓶中按照 20 mg·L⁻¹的浓度加入呋喃丹,30℃ 180 r·min⁻¹培养 7 d,质谱法检测降解产物。

2 结果与分析

2.1 呋喃丹降解菌株的分离

通过富集驯化培养,从土壤中分离到 4 株可降解呋喃丹的菌株,其中 1 株降解能力最强,命名为 FN-3。16S rDNA 序列同源比对表明菌株 FN-3 与 *Serratia* sp. SSU1 同源性为 99%,初步判定该菌株为沙雷氏菌属。

2.2 菌株 FN-3 降解条件优选

以培养温度、pH 值、摇床转速、接种量为主要因素,设计四因素三水平正交试验。在所选的因素范围内,温度对 FN-3 生长影响最大,其次为 pH 值和接种量,摇床转速影响最小。确定最佳组合为:温度 30℃,pH 值 6.5~7.0,180 r·min⁻¹,5% 接种量,120 h 内对呋喃丹的降解率可达到 95% 左右。

2.3 菌株 FN-3 利用农药能力

由图 1 可见,该菌株具有较强的利用呋喃丹的能力,随着生长的开始,呋喃丹开始被降解,120 h 降解率达 94.7%。

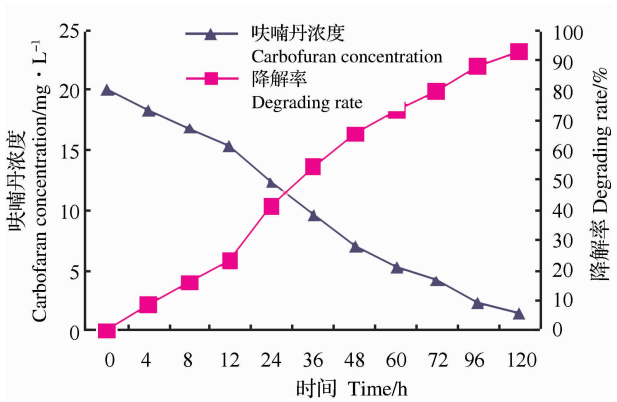


图 1 菌株 FN-3 利用农药生长能力

Fig.1 The ability of utilizing pesticide for strain FN-3

2.4 不同浓度农药下菌株 FN-3 降解效果

根据呋喃丹浓度标准曲线($y = 0.0092x + 0.0025, R^2 = 0.9965$),可知呋喃丹浓度与吸光度之间有很好的线性相关。由图 2 可见不同浓度农药下

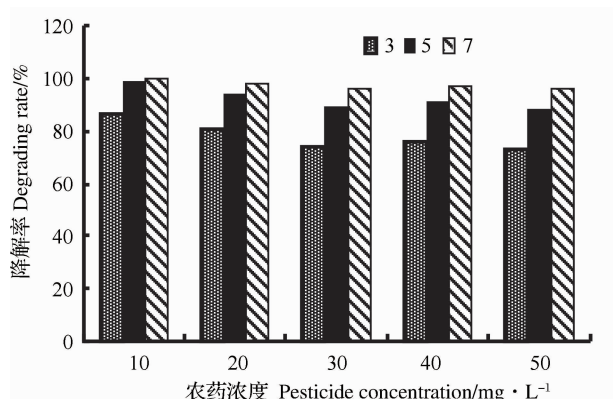


图2 不同浓度农药下菌株 FN-3 降解效果

Fig. 2 The effects of bio-degrading under different contents of pesticide for strain FN-3

菌株 FN-3 降解农药效果趋势相似,但随农药浓度增加,降解率最初值表现为延后,可能与高浓度农药对菌株生长前期生长有一定的抑制作用有关。

2.5 呋喃丹降解产物分析

呋喃丹属于氨基甲酸酯类化合物,降解途径首先为氨基甲酸酯键的断裂,生成呋喃酚。在改良的无机盐培养基中加入一定浓度呋喃丹并接入该菌株进行培养,一定时间后取培养液进行气质联用分析。由图 3A 可见,10.30 min 出现呋喃酚保留峰值,呋喃丹保留峰值应在 10.50 min 出现,在相应的时间点,呋喃丹峰值很小,说明其已基本被降解。进一步的质谱分析(图 3B),培养液中出现了分子量为 205、220 的化合物,而对照培养液中未检测到二化合物的存在,有学者推测其为 2,4-二叔丁基苯酚及它的氧化产物 2,4-二叔丁基苯醌。也有试验认为呋喃酚下一步降解途径为呋喃环的开环,生成红色的藏香酮^[7]。在试验中无机盐培养液在降解后期颜色由无色变为红色,培养液为清香味,也进一步说明有新的物质生成。

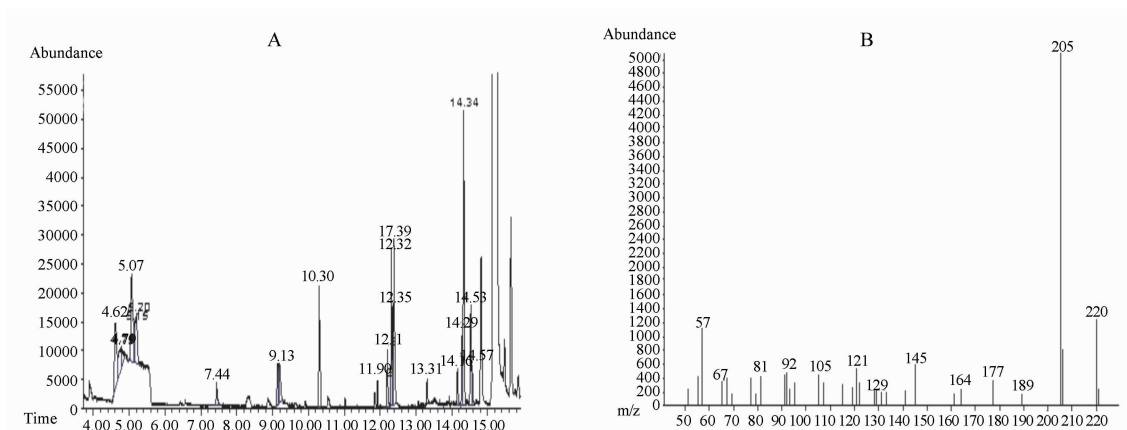


图3 呋喃丹降解产物气质质谱分析图

Fig. 3 GC/MS spectra analysis of carbofuran production

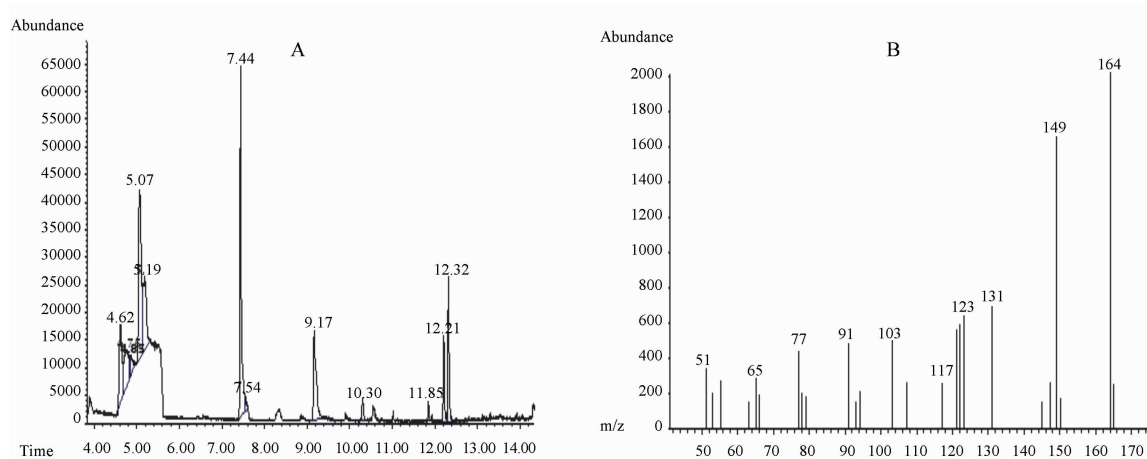


图4 无细胞提取液降解产物气质质谱分析图

Fig. 4 GC/MS spectra analysis of no cell-extraction degradation

2.6 菌株降解途径的分析

生物降解呋喃丹的途径分为胞内降解和胞外降解两种。由图 4- A、B 可见,将一定浓度的呋喃丹加入离心后的菌液上清部分重新培养,在 10. 30 min 左右出现呋喃酚的保留峰,而 10. 50 min 左右呋喃丹保留峰值很小,说明菌株 FN- 3 可过分泌胞外酶来降解农药。又经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胞外酶(图 5),A 为对照(未加入呋喃丹),B 为加入呋喃丹后的胞外酶提取,进一步证实该菌株对呋喃丹的降解是通过分泌胞外酶来进行的。

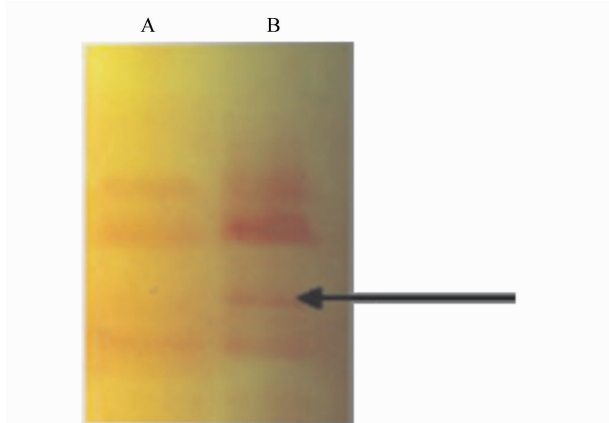


图 5 无细胞提取液 SDS- PAGE 分析

Fig. 5 Analysis of no cell- extraction SDS- PAGE

3 讨论

目前,我国已开始大范围内污染源调查工作,其中剧毒农药的使用作为普查之重。黑龙江省作为全国重要的商品粮生产基地,也是农药使用量较大的省份之一。因此,有效消除污染源,解决农药残留问题是当今农业生产中迫切需要解决的问题。关于呋喃丹生物降解菌的研究,多见于假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、无色杆菌属、球菌属等种属的报导^[8],而有关沙雷氏菌属可降解呋喃丹的研究目前还少有报导^[9]。研究筛选到一株可降解呋喃丹的沙雷氏菌株,并可通过分泌胞外酶降解农药,对今后农药生物降解酶制剂的研究提供新的方法和思路。

4 结论

通过对大豆田杀虫剂呋喃丹降解菌的筛选与分离,获得一株高效农药降解菌。经 16SrDNA 鉴定,该菌株属于沙雷氏菌属。光度法和质谱分析表明,降解后期培养液中未能检测到呋喃丹的存在,同时有新的物质生成。无细胞提取液重新加入农药培养及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳证明该菌株可通过分泌胞外酶降解农药。

参考文献

- [1] Chapalmandugu S, Chaudhury G R. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 1992, 12: 357-389.
- [2] Bachman J, Patterson H H. Photodecomposition of the carbamate pesticide carbofuran: Kinetics and the influence of dissolved organic matter [J]. Environmental Science and Technology, 1999, 33: 874-881.
- [3] Snooze H, Kemps L R, Mazola E P, et al. Isolation and identification of a new conjugated carbofuran metabolite in carrots: angelic acid ester of 3- hydroxycarbofuran [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1981, 29(6): 1125-1129.
- [4] Sherman M, Ross E. Acute and subchronic toxicity to Japanese quail of the carbamate insecticides, carbofuran and SD 8530 [J]. Poultry Science, 1969, 48(6): 2013-2020.
- [5] 稽正平, 汪士新, 陆自强, 等. 光度法快速测定土壤中呋喃丹 [J]. 理化检验化学分册, 2005, 41(4): 279-280. (Ji Z P, Wang S X, Lu Z Q, et al. Using photometry to detect Carbofuran in the soil [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2005, 14(4): 279-280.)
- [6] 沈德新, 封志纯, 杜江. 细菌 DNA 提取方法比较 [J]. 中原医刊, 2006, 31(10): 20-22. (Shen D X, Feng Z C, Du J. Comparison on extracting bacterium DNA [J]. Central Plain Medicine Journal, 2006, 31(10): 20-22.)
- [7] 卢培标, 戴维列. 呋喃丹及其主要水解、代谢产物的检验 [J]. 分析测试学报, 1998, 17(5): 81-83. (Lu P B, Dai W L. The testing on the production of carbofuran hydrolysate and metabolism [J]. Journal of Instrumental Analysis, 1998, 17(5): 81-83.)
- [8] Feng X, Ou L T, Ogram A. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(4): 1332-1337.
- [9] 木村贞夫. 沙雷氏菌属 [M]. 日本医学介绍, 1984, 5(12): 15. (Kimura S. Serratia [M]. Production of Japanese Medicine, 1984, 5(12): 15.)