

王浩东, 张嘉宇, 钱灿灿, 等. 敌草隆降解菌 SL-6 的筛选鉴定及降解条件优化 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 94-101.
WANG Haodong, ZHANG Jiayu, QIAN Cancan, et al. Screening and identification of diuron-degrading strain SL-6 and optimization of degradation conditions[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(1): 94-101.

敌草隆降解菌 SL-6 的筛选鉴定及降解条件优化

王浩东, 张嘉宇, 钱灿灿, 魏姿涵, 吴彩兰, 杨德松

(石河子大学 农学院/新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用重点实验室, 新疆 石河子 832000)

摘要:【目的】明确筛选分离得到的敌草隆降解菌株 SL-6 生物学分类地位, 并优化其降解条件, 为降解敌草隆提供新的途径。【方法】采用富集培养法从棉田中分离敌草隆降解菌 SL-6, 并通过 16S rDNA 及 *nrdA* 基因序列分析结合形态学、生理生化特征对其进行鉴定; 运用 HPLC 法检测 SL-6 菌株对敌草隆的降解效果, 研究该菌株在不同敌草隆初始质量浓度、接菌量、蔗糖含量、pH 及温度条件下的降解能力并优化降解条件。【结果】从棉田土壤中分离得到 7 株菌株, 其中, 无色杆菌属 *Achromobacter* 菌株 SL-6、SL-7 和 SL-9 对敌草隆的降解效果好且消解动态符合消解动力学方程; 木糖氧化无色杆菌 *A. xylosoxidans* SL-6 降解效果最佳, 第 15 天的降解率为 94.6%。在敌草隆初始质量浓度为 200 mg/L、接菌量为 15%(ϕ)、不外加碳源、pH 为 8.0 以及温度为 30 ℃ 时, 处理 5 d 后降解率达 93.1%。【结论】SL-6 菌株能够高效降解敌草隆, 可作为新的菌株资源, 为进一步研究微生物降解敌草隆奠定基础。

关键词: 敌草隆; 生物降解; 生物修复; 木糖氧化无色杆菌; 培养条件
中图分类号: X592;X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)01-0094-08

Screening and identification of diuron-degrading strain SL-6 and optimization of degradation conditions

WANG Haodong, ZHANG Jiayu, QIAN Cancan, WEI Zihan, WU Cailan, YANG Desong
(College of Agriculture, Shihezi University / Key Laboratory for Oasis Agricultural
Pest Management and Plant Resource Utilization, Shihezi 832000, China)

Abstract: 【Objective】This study was aimed to clarify the biological classification of the diuron-degrading strain SL-6 obtained by screening and isolation, and optimize its degradation conditions for providing a new way to degrade diuron. 【Method】Diuron-degrading strain SL-6 was isolated in the soil of cotton field by enrichment culture, and identified by 16S rDNA and *nrdA* gene sequence analysis combined with morphological, physiological and biochemical characteristics. HPLC method was used to detect the degradation effect of SL-6 strain on diuron, and the degradation abilities of the strain under different initial concentrations of diuron, inoculation amount, sucrose content, pH and temperature conditions were studied and the degradation conditions were optimized. 【Result】Seven strains were isolated from soil of cotton field. Among them, *Achromobacter* strains SL-6, SL-7 and SL-9 had good degradation effects on diuron and the degradation kinetics conformed to the degradation kinetics equation. Among the three strains, *A. xylosoxidans* SL-6 had the best degradation effect, with the degradation rate of 94.6% on the 15th day. When the initial concentration of diuron

was 200 mg/L, inoculation amount was 15% (ϕ), carbon source was not added, pH was 8.0 and temperature was 30 °C, the degradation rate reached 93.1% after five days. 【Conclusion】 Strain SL-6 can efficiently degrade diuron, and can be used as a new strain resource. This study provide a basis for further research on microbial degradation of diuron.

Key words: Diuron; Biodegradation; Bioremediation; *Achromobacter xylosoxidans*; Cultural condition

敌草隆 (Diuron), 化学名称为 3-(3,4-二氯苯基)-1,1-二甲基脲, 是一种低毒、高效的取代脲类除草剂, 广泛应用于棉花、甘蔗^[1]、葡萄^[2]等作物的苗前除草。该药还在新疆作为棉花脱叶剂 (复配制剂噻苯·敌草隆) 广泛应用于棉田机械化作业中^[3]。然而, 敌草隆对哺乳动物和鸟类有轻微毒性, 对水生无脊椎动物中等毒性, 在土壤和地下水中具有持久性^[4]。在施药后 70 d, 径流水和土壤中仍可以检测到低浓度的敌草隆^[5]。因此, 研究敌草隆的降解对农业可持续发展具有重要意义。

随着社会发展, 农药对环境的影响受到人们日益关注, Khongthong 等^[6]在微米反应器中通过电化学高级氧化工艺降解敌草隆, 降解率约为 90%; Vanraes 等^[7]优化了介质阻挡放电 (Dielectric barrier discharge, DBD) 等离子体反应器与活性炭纺织材料吸附相结合的装置, 可以最大限度地减少敌草隆在水中的氧化副产物的生成。在农业可持续发展进程中, 微生物降解农药作为一种生态友好型技术具有很好的应用前景^[8], 生物修复环境中残留的敌草隆是目前最佳途径之一。据报道, 目前分离得到的降解敌草隆的菌株主要为白腐真菌 (*Phanerochaete chrysosporium*^[9]、*Ganoderma lucidum*^[10]、*Trametes versicolor*^[11])、费氏埃希菌 *Escherichia fergusonii*^[12] 及嗜根寡养单胞菌 *Stenotrophomonas rhizophila*^[13]。本文从长期施用敌草隆的棉田土壤中筛选分离出降解效果好的敌草隆降解菌株, 并进行形态学观察、生理生化及分子生物学鉴定, 探索菌株的降解特性及优化降解条件, 提高菌株降解效率, 以期为该菌剂的制备提供理论基础, 对敌草隆污染土壤修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 仪器 超净工作台; 高速冷冻离心机; 生化培养箱; 高压灭菌锅; PCR 仪; 紫外分光光度计; 高效液相色谱仪 (Waters e2695 Separations Module); 旋转蒸发仪; 恒温水浴锅; 摇床; 超纯水器; 精确电子分析天平; 烘箱; 震荡仪。

1.1.2 土壤采集及制备 2018 年 9 月在新疆生产建设兵团第八师 147 团和 149 团采集连续施用敌草隆药剂 10 年以上的棉田, 取土深度 10~20 cm, 各采集 1 kg。将采集的土样去除大粒石块并过 2 mm 筛, 风干后贴标存于密封袋, 置于 4 °C 冰箱保存。

1.1.3 药剂及培养基 药剂: 敌草隆原药、敌草隆标准品 (质量分数 98.8%) 购于 Dr.Ehrenstorfer 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; 甲醇 (分析纯)、二氯甲烷 (分析纯) 购于天津市富余精细化工有限公司; 无水硫酸钠 (分析纯) 购于天津市盛奥化学试剂有限公司。

液体培养基: 无机盐培养基 (MgSO₄·7H₂O 0.2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2), 牛肉膏蛋白胨培养基 (牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2), 富集培养基 (在无机盐培养基中添加所需含量的敌草隆), LB 培养基 (胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 000 mL); 固体培养基均在以上液体培养基中加入 18 g/L 琼脂粉末, 高氏一号培养基 (可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g)。

1.2 试验方法

1.2.1 敌草隆降解菌株的筛选 在含 100 mg/L 敌草隆的 90 mL 富集培养液中加入 10 g 供试土样, 在 30 °C、180 r/min 下培养 7 d 后, 取体积分数为 10% 的混合液体, 接种到含 500 mg/L 敌草隆的富集培养液中继续培养 7 d 后, 再按照 10%(ϕ) 的接菌量将上述富集培养液接种到含 1 000 mg/L 敌草隆的富集培养液中, 如此持续不断转接至 1 500、1 800、2 000 mg/L 时, 进行平板涂布, 观察菌落形成情况 (2 000 mg/L 时未形成菌落)。

随机从 1 800 mg/L 富集培养液的平板中挑取 36 组形态不同且清晰的菌落通过划线处理的方法接种于含 100 mg/L 敌草隆的牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 于 30 °C 恒温培养箱培养。待平板长出单个菌落, 直至培养基中敌草隆质量浓度为 2 000 mg/L (进行压力筛选), 取 7 株生长良好的菌株编号并放入 4 °C 的冰箱内进行保存。

从以上 7 株菌落中挑取单菌落接入 LB 液体培养基中, 30 ℃、180 r/min 下制成菌液。在含 100 mg/L 敌草隆的无机盐降解培养基中加入 10% 体积的菌液, 置于摇床上, 分别摇培 3、6、9、12、15 d 后, HPLC 法检测降解液中敌草隆的含量, 计算降解率(重复 3 次, 设置无菌对照)。

1.2.2 敌草隆的 HPLC 检测 取降解液 2 mL 于管内, 12 000 r/min 离心处理 8 min, 取上层液体 1 mL 与二氯甲烷 4 mL, 充分震荡后分层, 取下层有机相至无水硫酸钠柱中, 将过柱后的液体移至圆底烧瓶, 减压浓缩至接近干燥, 加入甲醇定容至 2 mL, 再通过有机相微孔过滤器过滤后装入样瓶, 待液相色谱检测。

色谱条件: 色谱柱 5.0 μm×4.6 mm×250 mm、流动相 *V*(甲醇):*V*(水)=60:40、流速 1.0 mL/min、柱温 35 ℃、测定波长 254 nm、进样量 20 μL。

1.2.3 敌草隆降解菌株的鉴定 将降解率最高的菌株接种至 LB 平板上, 30 ℃ 条件下培养, 进行形态观察、生理生化试验(生理生化鉴定参照 BIOLOG GEN III、API 20 E、API 20 NE 等说明书, 其中 BIOLOG GEN III 鉴定板用于革兰阴性和阳性好氧菌的鉴定, API 20E 是肠杆菌科和其他 G-杆菌的标准鉴定系统, API 20NE 是鉴定不属肠杆菌科、革兰阴性非苛养杆菌的标准鉴定系统)。

选择新鲜菌体作为 PCR 扩增模板进行分子鉴定, 采用细菌 16S rRNA 序列通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492-R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增菌株目标片段。PCR 反应体系(100 μL): 正、反向引物(10 μmol/L)各 2 μL; *Taq*(5 U/μL)0.8 μL; 10×PCR Buffer (Mg²⁺Plus)10 μL; dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)8 μL; 模板 DNA 2.5 ng; ddH₂O 补足到 100 μL。PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 1 min, 57 ℃ 1 min, 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。

使用引物 *nrdA*-F (5'-ACTGATTCCCGA CCTGTTC-3') 和 *nrdA*-R(5'-TTCGATTTGAC GTACAAGTTCTGG-3') 扩增菌株目标片段。*nrdA* PCR 反应体系(100 μL): 正、反向引物(50 μmol/L)各 2 μL; *Taq*(2.5 U/μL)0.8 μL; 10×PCR Buffer (Mg²⁺Plus)10 μL; dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)8 μL; 模板 DNA 10 ng; ddH₂O 补足到 100 μL。*nrdA* PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 45 s, 52 ℃ 45 s, 72 ℃ 60 s, 33 个循环; 72 ℃ 10 min。

产物进行测序后, 将结果在 GenBank 数据库中通过 BLAST 进行比对, 采用临位连接法构建系统

进化树。

1.2.4 不同培养条件对菌株降解率的影响 探索降解菌在不同敌草隆初始质量浓度、接菌量、蔗糖含量、pH、温度及最优条件下对敌草隆的降解效果, 评估降解能力, 其中敌草隆初始质量浓度为 25、50、100、200 和 500 mg/L; 接菌量为 1%、3%、5%、10% 和 15%(φ); 蔗糖质量分数为 0.0%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0%; pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0; 温度为 20、25、30、35 和 40 ℃。

1.3 数据统计与分析

试验结果均采用 SPSS 22.0 与 Excel 统计软件进行数据方差分析, 运用 Duncan's 法进行各处理间的多重比较分析, 本试验所显示的结果均为 3 次重复测定的平均值。

2 结果与分析

2.1 HPLC 检测敌草隆的标准曲线

用敌草隆标准品分别配置 20、50、100、200、500、1 000 mg/L 的敌草隆样品, 进行 HPLC 检测, 以峰面积为纵坐标, 添加水平为横坐标绘制标准曲线, 并进行线性回归分析, 获得的标准曲线为: $y = 4.13 \times 10^{-4}x + 1.81 \times 10^5 (R^2 = 0.99)$ (图 1), 相对保留时间为 5.658 min(图 2)。

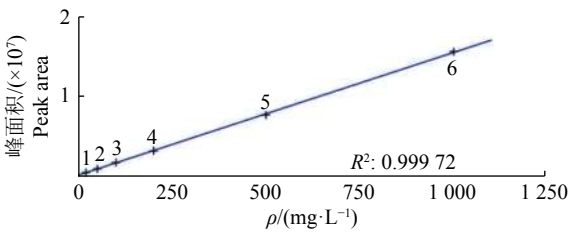


图 1 敌草隆的标准曲线图

Fig. 1 The standard curve of diuron

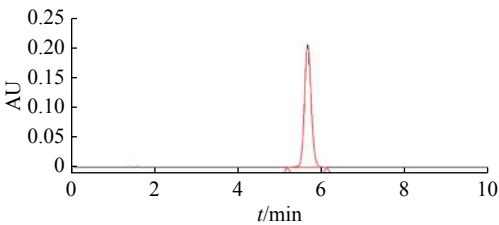


图 2 敌草隆的标样色谱图

Fig. 2 The standard HPLC-UV chromatogram of diuron

2.2 HPLC 检测方法的准确性和精密度

敌草隆在空白培养基中的添加质量浓度分别为 25、50、100 mg/L, 进行 HPLC 检测, 每个质量浓度重复 5 次, 计算回收率和相对标准偏差(RSD)。测定的样品中敌草隆的回收率为 94.72%~96.99%, RSD 为 1.29%~1.86%(表 1), 符合对敌草隆的残留检测要求, 可用于培养基中敌草隆残留检测。

表 1 敌草隆在培养基中的回收率

Table 1 The recovery rate of diuron in medium

$\rho_{\text{添加}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/% Recovery rate						相对标准偏差/%
	1	2	3	4	5	平均 Average	Relative standard deviation (RSD)
Added concentration							
25	92.82	96.37	91.23	98.58	94.62	94.72	1.29
50	96.92	90.78	100.02	91.69	92.29	94.34	1.77
100	91.47	102.76	98.22	95.18	97.32	96.99	1.86

2.3 敌草隆降解菌的降解速率测定

经平板初筛, 逐步提高培养基中敌草隆的含量进行压力筛选, 筛选出 7 株菌株并对其命名为 SL-6、SL-7、SL-8、SL-9、SL-10、SL-11 和 SL-12, 涂板保存。初筛获得的 7 株菌株, 在含 100 mg/L 敌草隆、接菌量 10%(φ) 的培养基中, 30℃、180 r/min 的条件下进行培养。

菌株 SL-6、7、9 对敌草隆的降解效果明显高于其余 4 株。且在第 15 天, 降解率均高达 90% 以上(图 3), 因此选取该 3 株菌株开展后续试验。

在敌草隆质量浓度为 100 mg/L 的培养基中, 以 10% 的接菌量(φ) 分别接种初筛获得 3 个菌株后, 敌草隆的消解动态符合消解动力学方程。如表 2 所示, 菌株 SL-6、7、9 对培养基中的敌草隆消解方

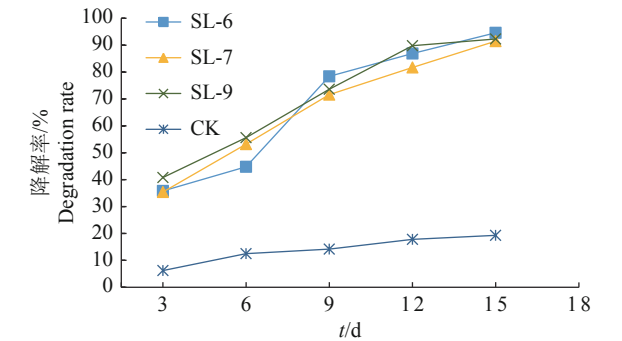


图 3 初筛菌株对敌草隆的降解率

Fig. 3 Degradation rate of diuron by preliminary screening strains

程分别为 $\rho_t = 74.482e^{-0.213t}$ 、 $\rho_t = 59.264e^{-0.166t}$ 、 $\rho_t = 58.165e^{-0.182t}$, 其中 ρ_t 为 t 时刻敌草隆的质量浓度; 半衰期分别为 3.2、4.2、3.8 d。

表 2 敌草隆的消解动力学方程和相关参数

Table 2 Digestion kinetic equation and related parameters of diuron

菌株	消解方程	速率常数	决定系数	$t_{\text{半衰}}/\text{d}$
Strain	Degradation equation	Rate constant (K)	Coefficient of determination (R^2)	Half-life
SL-6	$\rho_t = 74.482e^{-0.213t}$	0.213	0.9636	3.2
SL-7	$\rho_t = 59.264e^{-0.166t}$	0.166	0.9782	4.2
SL-9	$\rho_t = 58.165e^{-0.182t}$	0.182	0.9691	3.8

2.4 降解菌株的鉴定

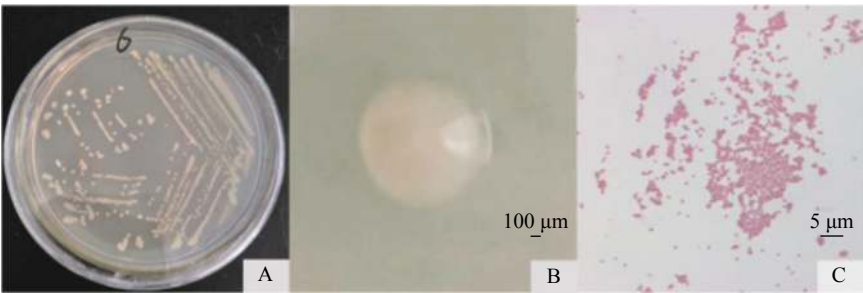
分别提取 3 株敌草隆降解菌株的 DNA, 并将其作为模板, 利用 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, 分别得到 1 500 bp 左右的片段, 将 PCR 产物进行回收连接转化, 然后进行测序。将菌株 SL-6、7、9 的 16S rDNA 基因序列在 GeneBank 中进行 BLAST 比对, 结果发现, 菌株 SL-6、7、9 与变形菌门 Proteobacteria 的 *Achromobacter xylosoxidans* 菌株的 16S rDNA 序列相似度均高达 99.94% 以上, 由此首先确定菌株 SL-6、7、9 均为无色杆菌属 *Achromobacter*, 因此选取该 3 株菌种降解率最高 (94.6%) 的 SL-6 进行后续试验及进一步鉴定, 并将菌株 SL-6 鉴定至种。

2.5 菌株 SL-6 的鉴定

2.5.1 菌株 SL-6 形态学鉴定 菌株 SL-6 的 LB 培养基菌落形态为白色, 其单菌落形态呈白色且表面

隆起, 外表光滑湿润, 边缘光滑平整不透明, 有黏性; 菌株 SL-6 的革兰氏染色呈阴性(图 4)。

2.5.2 菌株 SL-6 的生理生化特征 菌株 SL-6 细胞形态呈杆状; 经 BIOLOG GEN III 鉴定反应呈阳性的包括氧化酶、接触酶、对羟基苯乙酸、糊精、丙酮酸甲酯、柠檬酸、1% 乳酸钠、林可霉素、茶啉酸、夫西地酸、十四烷硫酸钠、亚碲酸钾、葡萄糖醛酰胺、丙酸、乙酸、糖质酸、醋竹桃霉素、万古霉素、氨曲南、利福霉素、二甲胺四环素、四唑紫、四唑蓝、丁酸钠、 α -D-葡萄糖、D-果糖、L-丙氨酸、L-乳酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、 α -酮戊二酸、D-苹果酸、L-鼠李糖、L-焦谷氨酸、L-苹果酸、L-丝氨酸、D-半乳糖醛酸、 γ -氨基丁酸、 α -羟丁酸、D-葡萄糖酸、 β -羟基-D、L-丁酸、D-葡萄糖醛酸、 α -丁酮酸、D-果糖-6-磷酸, 反应呈弱阳性的包括溴代丁二酸、盐酸胍、氯化



A:SL-6 LB 培养基菌落形态;B:SL-6 LB 培养基单菌落形态;C:SL-6 革兰氏染色图
A: SL-6 colony morphology on LB medium; B: SL-6 single colony morphology on LB medium; C: SL-6 gram staining

图 4 菌株 SL-6 的常规形态学特征

Fig. 4 Conventional morphological characteristics of strain SL-6

锂、黏酸、甲酸、溴酸钠、*D*-岩藻糖、*L*-组氨酸、*D*-天冬氨酸, 反应呈阴性的包括明胶、龙胆二糖、蔗糖、松二糖、水苏糖、肌苷、果胶、吐温-40、肌醇、甘油、乙酰乙酸、奎宁酸、*D*-甘露糖、甘氨酸-*L*-脯氨酸、*D*-麦芽糖、*D*-乳酸甲酯、*D*-海藻糖、*D*-半乳糖、*L*-精氨酸、*D*-纤维二糖、3-甲基-*D*-葡萄糖、*L*-岩藻糖、*D*-丝氨酸、*D*-棉子糖、*D*-山梨醇、 α -*D*-乳糖、*D*-甘露醇、*D*-蜜二糖、*D*-阿糖醇、*L*-半乳糖酸内酯、*D*-水杨苷、*N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺、*N*-乙酰- β -*D*-甘露糖胺、*N*-乙酰-*D*-半乳糖胺、*N*-乙酰神经氨酸; API 20E 鉴定反应呈阳性的包括精氨酸双水解酶、柠檬酸、丙酮酸盐, 反应呈阴性的包括赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、硫代硫酸钠、脲酶、色氨酸

脱氨酶、色氨酸、明胶; API 20NE 鉴定反应呈阳性的包括硝酸钾, 反应呈阴性的包括色氨酸、葡萄糖、精氨酸、脲素、七叶灵、明胶、 β -半乳糖苷酶。以上生化特征所包含的资料库无法将其鉴定至种, 故后续通过 16S rDNA 与 *nrdA* 基因序列进行分析鉴定。
2.5.3 菌株 SL-6 与相关菌种的 16S rDNA 序列系统发育进化树 采用邻位连接法显示菌株 SL-6 与相关菌种的 16S rDNA 系统发育树, 进行 1000 次的相似度重复计算, 菌株 SL-6 与木糖氧化无色杆菌 *A. xylosoxidans* 的相似性最高, 为 100%。(图 5)。
2.5.4 菌株 SL-6 与相关菌种的 *nrdA* 基因序列系统发育进化树 采用邻位连接法显示菌株 SL-6 与相关菌种的 *nrdA* 基因序列系统发育树, 进行 1000

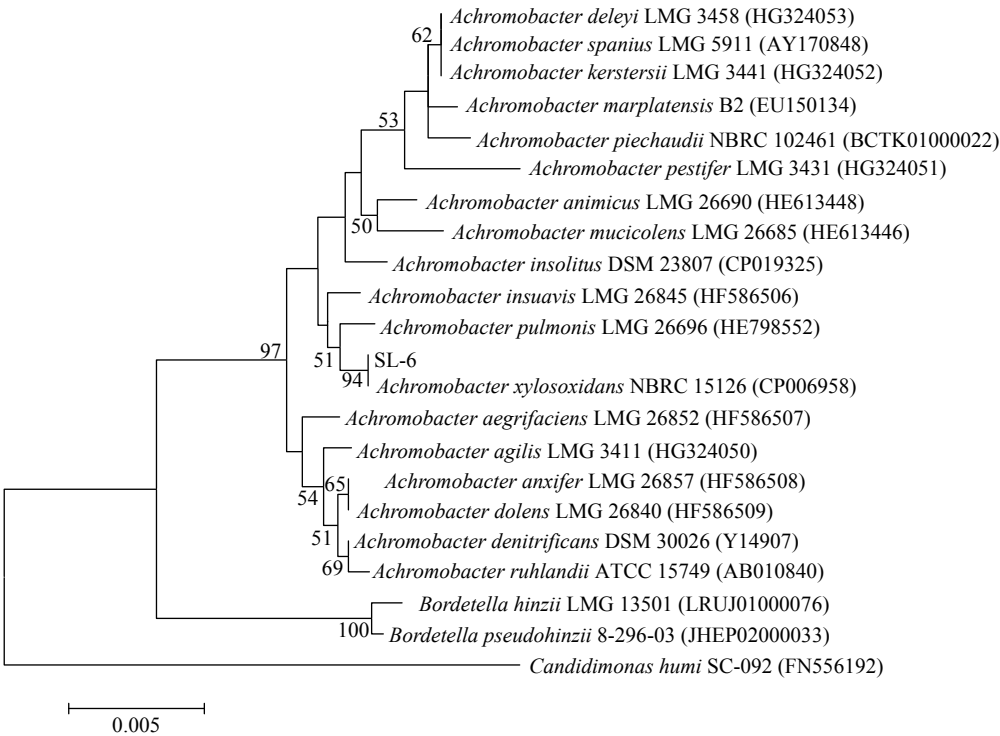


图 5 基于 16S rDNA 序列的菌株 SL-6 与相关菌种的系统发育进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain SL-6 and related strain species based on 16S rDNA sequence

次的相似度重复计算, 图中发育树节点只显示 Bootstrap 值大于 50% 数值。菌株 SL-6 与木糖氧化

无色杆菌 *A. xylosoxidans* 的 *nrdA* 基因序列相似性高达 99.996%(图 6)。

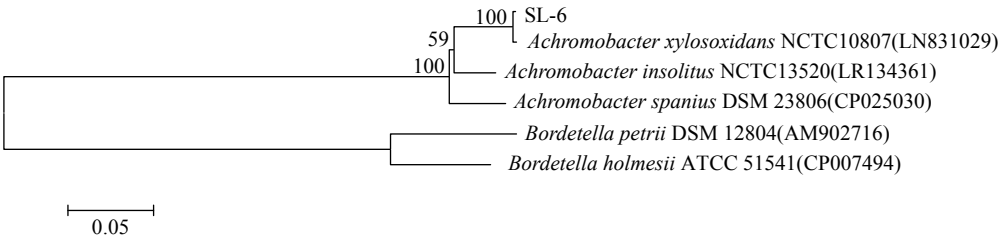


图 6 基于 *nrdA* 基因序列的菌株 SL-6 与相关菌种的系统发育进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strain SL-6 and related strain species based on *nrdA* gene sequence

2.6 SL-6 菌株不同培养条件对敌草隆降解率的影响

2.6.1 敌草隆质量浓度对敌草隆降解率的影响
降解率随着敌草隆初始质量浓度的增加呈逐渐增加后减少的趋势(图 7A)。当培养液中敌草隆质量浓度为 200 mg/L 时, 降解效果最佳, 第 3 天的降解率高达 82.2%; 当质量浓度为 25 mg/L 时, 第 3 天的降解率为 39.4%, 仅为 200 mg/L 质量浓度的 47.9%。

2.6.2 菌株不同接菌量对敌草隆降解率的影响
随着接菌量增大, 敌草隆的降解率也随之增高, 当接菌量 (φ) 为 15% 时, 降解率为 63.5%, 但接菌量在 5%~15% 之间, 降解率的提高并不显著(图 7B)。

2.6.3 外加碳源含量对敌草隆降解率的影响
向培养液中分别加入质量分数为 0.5%、1.0%、1.5%、

2.0% 的蔗糖作为外加碳源(图 7C), 3 d 后敌草隆的降解率并未有较大变化。与不添加碳源相比, 添加 0.5%~2.0% 的蔗糖碳源, 降解率在 40.6%~53.2% 之间, 均低于不添加碳源的 57.4% 降解率。

2.6.4 培养液 pH 对敌草隆降解率的影响
分析培养液 pH 对菌株 SL-6 降解率影响, 结果表明, pH 8 时降解率最高, 为 59.6%(图 7D)。

2.6.5 培养温度对敌草隆降解率的影响
分析不同培养温度对菌株 SL-6 降解率的影响, 结果表明, 20~40 ℃ 时的降解率呈现逐渐升高后降低的趋势, 温度为 30℃ 时, 降解效果最佳, 第 3 天的降解率高达 57.2%; 当温度为 20 ℃ 时, 第 3 天的降解率为 18.2%, 仅为 30℃ 的 31.8%(图 7E)。

2.6.6 最优培养条件下菌株降解率
最优敌草隆

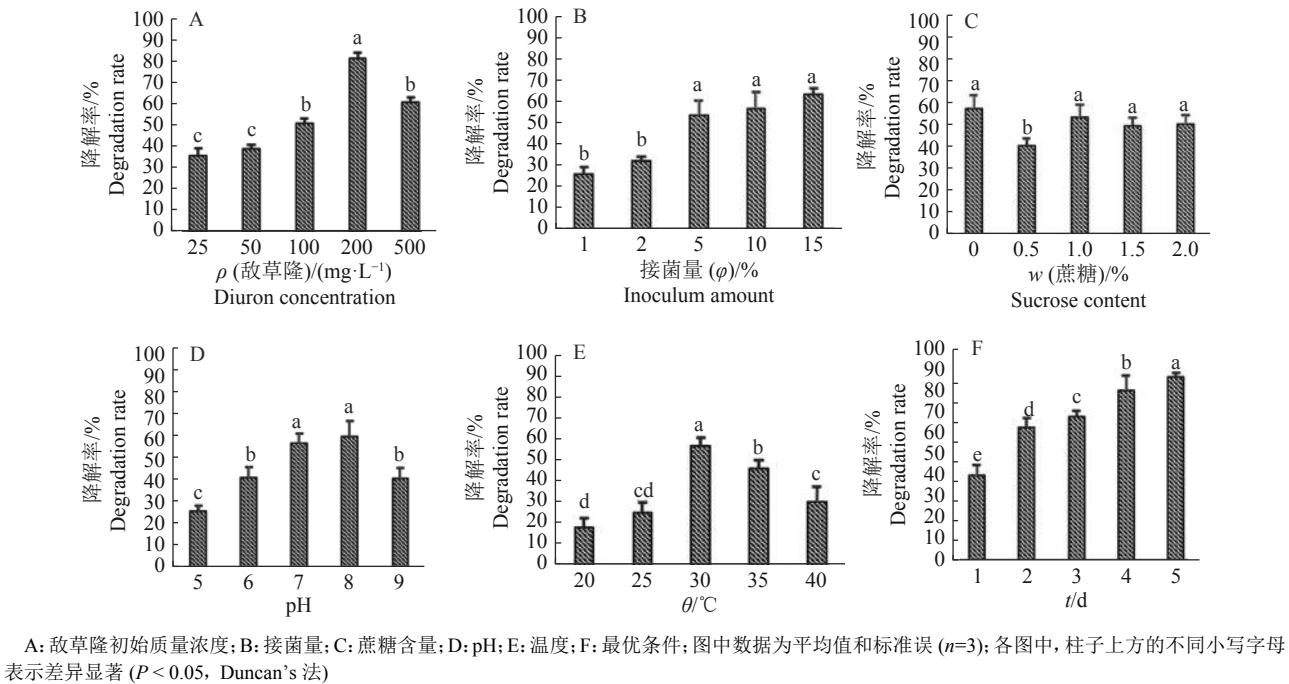


图 7 不同培养条件对菌株 SL-6 降解敌草隆的影响

Fig. 7 Effect of various cultural conditions on diuron degradation by strain SL-6

初始质量浓度为 200 mg/L、接菌量为 15%(φ)、pH 为 8、培养温度为 30℃, 该条件下, 分别于 1、2、3、4、5 d 后, 运用液相色谱法检测培养液中敌草隆的剩余浓度, 并计算降解率。菌株 SL-6 在最优培养条件下, 随着时间的增加, 敌草隆的降解率亦随之增高, 第 5 天的降解率为 93.1%; 第 1 天的降解率为 43.1%, 仅为第 5 天的 46.3%(图 7F)。

3 讨论与结论

在连续施用敌草隆 10 年以上的棉田中分离得到降解菌, 通过形态学观察、生理生化测试、16S rDNA 及 *nrdA* 基因序列相似性分析, 鉴定菌株 SL-6 为木糖氧化无色杆菌 *A. xylosoxidans*。本研究表明: 菌株 SL-6 在敌草隆初始质量浓度为 200 mg/L 时, 降解率为 82.2%; 接菌量为 15%(φ) 时, 降解率为 63.5%; pH 为 8 时, 降解率为 59.6%; 温度为 30℃ 时, 降解率为 57.2%; 与不添加蔗糖相比, 添加蔗糖后降解率均低于 57.4%。于上述最优培养条件下, 在第 5 天, 菌株 SL-6 对 200 mg/L 的敌草隆降解率达 93.1%。

本研究分离得到 1 株高效降解敌草隆的菌株, 为木糖氧化无色杆菌, 是一种毒力较弱的革兰阴性杆菌。该菌能够引起轻微的菌血症、心包炎、导管相关的血流感染、肺炎等^[14], 相较而言, 该菌株治理环境污染时表现出极大潜力, 在合理规范的操作下, 引起人体不适微乎其微, 有研究表明, 该菌株可通过碳酸盐矿化作用固定土壤中的复合重金属 (Cu、Pb、Cd)^[15] 以及固结土壤中的有效态 Cd, 从而减少水稻对 Cd 的吸收^[16]。

国内外已有可降解敌草隆的部分真菌和细菌, 以及对降解条件进行优化的报道。孙纪全等^[17] 报道了 1 株细菌菌株 Y57, 鉴定为鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas* sp., 该菌株在敌草隆初始质量浓度为 20 mg/L, 30℃ 及 5%(φ) 接菌量时, 其降解率达到 80% 以上, 与该研究相比, 本研究所得降解条件中敌草隆初始质量浓度更高, 接菌量更大, 培养温度相同, 但降解率相对较高。封国君等^[18] 报道了 1 株真菌菌株 D12, 鉴定为镰刀菌属 *Fusarium*, 该菌株在敌草隆初始质量浓度为 50 mg/L, 35℃ 及 pH 6.0 时, 经过 7 d 培养, 降解率为 57.42%, 半衰期为 7.30 d, 与该研究相比, 本研究所得降解条件为碱性环境, 培养温度更低, 敌草隆初始质量浓度更高, 同时降解率相对更高。杨孟然^[19] 报道了敌草隆降解菌株 D47(*Arthrobacter globiformis*), 处理 4 d 后该菌株对 0.5~20.0 mg/L 的敌草隆降解率均为 100.0%, 与

该研究相比, 本研究所得降解条件中敌草隆初始质量浓度更高, 但处理时间与降解率相对较低。以上学者报道的降解菌株在降解过程中敌草隆初始质量浓度较低, 而本研究中菌株 SL-6 可在敌草隆初始质量浓度较高的环境中对其进行降解, 无需外加碳源, 适于敌草隆残留极端的环境条件, 同时菌株 SL-6 降解敌草隆的最适温度在 30℃, 该温度下无需供给额外能量, 此外, 菌株 SL-6 只有一定的耐弱碱性, 而新疆棉田土壤呈一定的弱碱性, 为该菌株的生产应用提供条件。菌株 SL-6 的降解能力与 pH 及温度等因素密切相关, 还发现在接菌量较低的情况下, 其对敌草隆的降解能力大大减弱。经过系列分析推测, 该菌株降解敌草隆时, 产生的酶的活性不是特别高, 后期应进一步优化。

迄今为止, 对于敌草隆降解菌的研究大部分集中于降解特性, 关于降解机制的相关研究较少。敌草隆的主要代谢产物为 3,4-二氯苯胺 (DCA)、3-(3,4-二氯苯基) 脲 (DCPU)、3-(3,4-二氯苯基)-1-甲基脲 (DCPMU)^[20]。变色栓菌^[21] *Trametes versicolor* 培养 7 d 后, 除降解敌草隆 (降解率为 83%) 外, 主要代谢产物 DCA(降解率为 100%) 迅速降解, 在降解过程中, 根据鉴定的转化产物, 3-(3,4-二氯苯基)-1-羟甲基-1-甲基脲 (DCPHMU) 代谢为 N'端去烷基化合物 DCPMU 和 DCPU, DCPHMU 的发现揭示了羟基化对 N'端去甲基化的相关作用, 有助于更好地研究敌草隆降解机制的反应机理。

参考文献:

[1] 罗志明, 尹炯, 李俊, 等. 3 种农药对蔗田杂草香附子的防除效果及其安全性评价[J]. *农学学报*, 2020, 10(11): 7-10.

[2] JACOBSON A R, DOUSSET S, GUICHARD N, et al. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 138(2): 250-259.

[3] 周先林, 覃琴, 王龙, 等. 脱叶催熟剂在新疆棉花生产中的应用现状[J]. *中国植保导刊*, 2020, 40(2): 26-32.

[4] GIACOMAZZI S, COCHET N. Environmental impact of diuron transformation: A review[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(11): 1021-1032.

[5] DORES E F, SPADOTTO C A, WEBER O L, et al. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2009, 197: 175-183.

[6] KHONGTHON W, JOVANOVIĆ G, YOKOCHI A, et al. Degradation of diuron via an electrochemical advanced oxidation process in a microscale-based reactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 292:

298-307.

[7] VANRAES P, WARDENIER N, SURMONT P, et al. Removal of alachlor, diuron and isoproturon in water in a falling film dielectric barrier discharge (DBD) reactor combined with adsorption on activated carbon textile: Reaction mechanisms and oxidation by-products[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 354: 180-190.

[8] VERMA J P, JAISWAL D K, SAGAR R. Pesticide relevance and their microbial degradation: A-state-of-art[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2014, 13(4): 429-466.

[9] COELHO-MOREIRA J D S, BRACHT A, SOUZA A C, et al. Degradation of Diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: Role of ligninolytic enzymes and cytochrome P450[J]. *BioMed Research International*, 2013(1): 251354.

[10] COELHO-MOREIRA J D S, BRUGNARI T, SÁ-NAKANISHI A B, et al. Evaluation of diuron tolerance and biotransformation by the white-rot fungus *Ganoderma lucidum*[J]. *Fungal Biology*, 2018, 122(6): 471-478.

[11] MORI T, SUDO S, KAWAGISHI H, et al. Biodegradation of diuron in artificially contaminated water and seawater by wood colonized with the white-rot fungus *Trametes versicolor*[J]. *Journal of Wood Science*, 2018, 64(5): 690-696.

[12] MORETTO J, FURLAN J, FERNANDES A, et al. Alternative biodegradation pathway of the herbicide diuron[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019(143): 104716.

[13] SILAMBARASAN S, LOGESWARI P, RUIZ A, et al. Influence of plant beneficial *Stenotrophomonas rhizophila* strain CASB₃ on the degradation of diuron-contaminated saline soil and improvement of *Lactuca sativa* growth[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(28): 35195-35207.

[14] 王伟宝, 王建芳, 谢飞, 等. 张家口地区木糖氧化无色杆菌耐药性的相关基因分析[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(30): 5984-5987.

[15] 周野, 王一莹, 李哲, 等. 氧化木糖无色杆菌 (*Achromobacter xylosoxidans*) LAX2 对 Cu、Pb 和 Cd 复合污染土壤的生物矿化修复研究[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(11): 4497-4504.

[16] 李哲, 吴迪, 张秀芳, 等. 一株氧化木糖无色杆菌对 Cd 的固定作用[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(9): 91-98.

[17] 孙纪全, 黄星, 何健, 等. 异丙隆降解菌 Y57 的分离鉴定及其降解特性[J]. *中国环境科学*, 2006, 26(3): 315-319.

[18] 封国君, 王彦辉, 唐文伟, 等. 敌草隆内生降解真菌筛选[J]. *农药学报*, 2017, 56(5): 339-343.

[19] 杨孟然. 以蚕沙为载体的敌草隆降解菌制剂研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.

[20] MOHAMMED A M, HUOVINEN M, VÄHÄKANGAS K H. Toxicity of diuron metabolites in human cells[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020, 78: 103409.

[21] HU K, TORÁN J, LÓPEZ-GARCÍA E, et al. Fungal bioremediation of diuron-contaminated waters: Evaluation of its degradation and the effect of amendable factors on its removal in a trickle-bed reactor under non-sterile conditions[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 743: 140628.

【责任编辑 庄 延】