

孙 勇,曹小迎,蒋继宏,等. 华北大黑鳃金龟幼虫肠道菌的分离及对农药的降解[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):151-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.043

华北大黑鳃金龟幼虫肠道菌的分离及对农药的降解

孙 勇¹, 曹小迎¹, 蒋继宏¹, 张先道²

(1. 江苏师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室, 徐州 221116; 2. 江苏师范大学生命科学院, 徐州 221116)

摘要:采用4种培养基对金龟幼虫肠道内微生物进行分离培养,并通过16S rRNA测序进行初步鉴定,将分离获得的菌株接种于含辛硫磷和毒死蜱的基础盐培养基上,初步测定对肠道内微生物降解农药的能力。结果表明,选用的4种培养基中,淀粉-酪素培养基获得的微生物数量最多,羧甲基纤维素钠培养基次之,甘油天门冬氨酸培养基最差。对13株有代表性的菌株进行测序分析,初步鉴定这些微生物分属9个属,在分离筛选的菌株中随机挑选供试的28株菌株中,在以毒死蜱(浓度100 mg/L)为唯一碳源的基础盐培养基中,能形成菌落的菌株为8株,在以辛硫磷为唯一碳源的基础盐培养基中,能形成菌落的菌株为19株,表明肠道中有一些微生物对农药有降解作用,其中对辛硫磷降解作用优于毒死蜱,说明在防治华北大黑鳃金龟时,毒死蜱防治效果可能优于辛硫磷。

关键词:华北大黑鳃金龟; 肠道微生物; 分离; 农药降解

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0151-03

我国农药使用技术水平和农药的利用率都比较低,而更多的农药在施用后则进入了土壤、水体和空气中,对非靶标生物和各个生态因子产生了严重影响,最终导致了农产品品质低劣和农药残留超标^[1-2]。长期大量使用农药使害虫产生一定的抗药性,因此要想杀死害虫就得加大药量,害虫的抗药性不断增强,农药使用量不断加大,就会形成恶性循环,环境污染问题日益严重,国家环保局也发布:农药残留污染已被列为环境污染重点治理的工程之一,因此解决农药污染问题势在必行。生活在这些农药环境中的微生物,为了自身生存,与这些污染源一直在进行着斗争,随着时间的推移,它们之间形成了一种协同进化关系,这些微生物具备了降解和利用这些污染源的机制。农药生物修复是利用特定的生物吸收、转化、清除或降解农业生态环境中农药污染,实现农业生态环境净化、生态功能恢复的生物措施。而且已有大量研究表明细菌、真菌、放线菌、藻类等微生物对农药有很好的降解作用^[3-10],它们大多数来自土壤微生物类群。华北大黑鳃金龟为鞘翅目鳃

金龟科昆虫,分布在我国东北、华北、西北等地区,主要危害杨、柳、榆、桑、核桃、苹果、刺槐、栎等林木叶片,幼虫危害阔、针叶树根部及幼苗;幼虫栖息在土壤中,取食萌发的种子,造成缺苗断垄;将根茎、根系咬断,使植株枯死,且伤口易被病菌侵入,引起其他病害发生。华北大黑鳃金龟幼虫生活在土壤中,且长期接触化学农药(辛硫磷和毒死蜱是常见的用来杀灭大黑鳃金龟的化学农药),肠道内可能含有一些能降解农药的微生物,因此我们分离了华北大黑鳃金龟幼虫肠道中微生物,采用16S rRNA序列分析进行了初步鉴定,并就农药降解能力进行了初步筛选。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

华北大黑金龟鳃幼虫:取冬眠期幼虫。

1.2 培养基

TNYE培养基:酵母膏0.25 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 琼脂15.0 g, pH值为7.2, NaCl 10%, 水1 L, pH值7.2。

淀粉-酪素培养基:葡萄糖5 g, 可溶性淀粉5 g, 蛋白胨2 g, 酵母膏1 g, CaCO₃ 2 g, 琼脂15 g, pH值7.2, NaCl 10%, 水1 L, pH值7.2。

甘油天门冬氨酸培养基:甘油10 g, L-天冬氨酸1 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.1 g, 琼脂15 g, pH值7.2, NaCl 10%, 水

收稿日期:2015-03-26

基金项目:江苏师范大学省药用植物生物技术实验室开放课题(编号:KLBMP1305)。

作者简介:孙 勇(1977—),男,江西高安人,硕士,讲师,从事应用微生物学研究。E-mail:sunyong23@jsnu.edu.cn。

通信作者:蒋继宏,教授。Tel:(0516)83403515; E-mail:jhjiang@jsnu.edu.cn。

[8]刘立新. 科学施肥新思维与实践[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008.

[9]孔垂华. 21世纪植物化学生态学前沿领域[J]. 应用生态学报, 2002,13(3):349-353.

[10]景伟文, 逢晓南, 陈燕勤, 等. 棉叶中棉酚的快速提取与测定方法研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012,24(4):498-502.

[11]王省芬, 马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法[J]. 棉花学报, 2002,14(4):231-233.

[12]Bolek Y, Bell A A, El Z M. Reaction of cotton cultivars and an F₂

population to stem inoculation with isolates *Verticillium dahliae*[J]. J Phytopathology, 2005,15(3):269-273.

[13]彭 珊, 吕学莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究[J]. 棉花学报, 2008,20(3):174-178.

[14]马 平, Huang H C, 李社增, 等. 一种新的棉花黄萎病快速接种技术及其在病原菌致病力和寄主抗病性鉴定上的应用[J]. 植物病理学报, 2004,34(6):536-541.

[15]吕金殿, 甘 莉, 阎飞龙. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J]. 植物病理学报, 1991,21(2):129-133.

1 L, pH 值 7.2。

羧甲基纤维素钠培养基:羧甲基纤维素钠 20.0 g,磷酸氢二钠 2.5 g,磷酸二氢钾 1.5 g,蛋白胨 2.5 g,酵母膏 0.5 g,琼脂 15.0 g,水 1 L, pH 值 7.2。

ISP2 培养基:酵母提取物 4 g,麦芽提取物 10 g,葡萄糖 4 g,水 1 L,琼脂 15 g, pH 值 7.2。

LB 培养基:胰化蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g, NaCl 10 g,琼脂 15 g, pH 值 7.0。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g, 20 g 琼脂, 1 L 水。

基础盐培养基:

NaCl 1.00 g, NH_4NO_3 1.00 g, K_2HPO_4 1.50 g, KH_2PO_4 0.50 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10 g, 水 1 L, pH 值 7.0。

1.3 金龟幼虫肠道微生物的分离

清洗 5 支试管,每支试管注入 10 mL 蒸馏水,加上试管塞,用高温灭菌锅 121 °C 灭菌 20 min,取出后使其冷却至室温,并标上编号为 1、2、3、4、5。打开无菌操作台进行紫外灭菌。选取冬眠的金龟幼虫放入 75% 的乙醇中浸泡 2 min,在无菌操作台上取出虫体放在培养皿中无菌解剖。取少量肠道里白色物质,放入标号为 1 的试管,然后盖上试管塞摇晃使微生物分布均匀,取出后在无菌操作台上进行梯度稀释。从稀释 10^3 倍和 10^4 倍的菌液中取 50 μL ,分别滴入供分离用的培养基中(分离培养基:TYNE 培养基,淀粉-酪素培养基,甘油天门冬氨酸培养基,羧甲基纤维素钠培养基),涂布均匀,把培养皿倒置放入恒温保温箱内 30 °C 培养 8 d。观察菌落生长情况,统计菌落数,并挑取部分菌株转接于试管中保存。

1.4 部分分离菌株的初步鉴定

通过测定 16S rRNA 基因序列进行初步鉴定,分离菌株总 DNA 的提取参照文献[11]的方法进行,PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 通用引物(27F:5' - CAGAGTTTGATCTCTGGCT - 3'; 1492R:5' - AGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3')。PCR 反应条件为:94 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 共

35 个循环,72 °C 10 min。PCR 产物用经 EB 染色的 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测后测序。依照测序结果,从 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 数据库中调出相似性较高相关菌株的 16S rRNA 基因序列,进行序列比对分析。

1.5 降解辛硫磷和毒死蜱菌株的筛选

配制含辛硫磷和毒死蜱有效成分 100 mg/L 基础盐培养基,将分离获得的菌株接种于培养基上,置于 28 °C 恒温培养箱中培养,生长状况良好(能形成菌落)的即定为可降解菌。

2 结果与分析

2.1 各培养基菌株分离情况

由表 1 可知,选用的 4 种培养基培养微生物,淀粉-酪素培养基获得的微生物数量最多,0.5 g 湿样/mL 在稀释 10^3 倍下平板菌落数 162 个,稀释 10^4 倍下获得菌落数 36 个,羧甲基纤维素钠培养基次之,甘油天门冬氨酸培养基最差,在稀释 10^3 倍下平板菌落数为 30 个。

表 1 各供试培养基中微生物生长数量

稀释倍数	TYNE 培养基生长数量(个)	淀粉-酪素培养基生长数量(个)	甘油天门冬氨酸培养基生长数量(个)	羧甲基纤维素钠培养基生长数量(个)
10^3	56	162	30	106
10^4	9	36	2	16

2.2 分离获得的菌株种类情况

从各种培养基中共挑取菌株 65 株,细菌保存于含 LB 培养基斜面试管中,放线菌保存于含 ISP₂ 培养基斜面试管中,从 65 株菌株挑取了 13 株有代表性的菌株进行测序分析,由比对结果(表 2)可知,幼虫肠道微生物至少包括原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、冢村氏菌属(*Tsukamurella*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、詹森菌属(*Janthinobacterium*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、链霉菌属(*Streptomyces*)等 9 个属。

表 2 13 株菌株比对结果

菌株号	比对菌株名	匹配度(%)	相似度(%)	比对菌株 GenBank 登录号
CH17	<i>Promicromonospora sukumoe</i>	100	100	KF040984.1
CH22	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	100	99	KC581673.1
CH36	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	99	KF732977.1
CH50	<i>Promicromonospora sukumoe</i>	100	99	KF040984.1
CHa	<i>Tsukamurella spumae</i>	100	99	KF410367.1
CHe	<i>Promicromonospora pachnodae</i>	100	99	A J629070.1
CHj	<i>Promicromonospora endophytica</i>	100	99	AB923928.1
CHl	<i>Agromyces humatus</i>	99	97	KC493987.1
CHd	<i>Streptomyces thioluteus</i>	100	98	NR_041203.1
CH6	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	100	99	JN627190.1
CH47	<i>Saccharopolyspora gloriosae</i>	100	99	JX007965.1
CHi	<i>Saccharopolyspora tripterygii</i>	100	99	FJ214364.1
CH26	<i>Janthinobacterium lividum</i>	100	97	KF150395.1

2.3 肠道微生物对 2 种农药的降解情况

挑选部分获得的菌株,进行降解毒死蜱和辛硫磷的试验,结果见表 3。

供试的 28 株菌株中,在以毒死蜱(浓度 100 mg/L)为唯

一碳源的基础盐培养基中,能形成菌落的菌株为 8 株,占供试菌株 28%,在以辛硫磷为唯一碳源的基础盐培养基中,能形成菌落的菌株为 19 株,占供试菌株 67.8%,对毒死蜱和辛硫磷都能降解的有 CH1、CH19、CH32、CH33、CH44、CH47(*Sac-*

表3 不同菌株对2种农药的降解情形

菌株	毒死蜱	辛硫磷
CHa	-	-
CHb	-	+
CHd	-	+
CHe	-	-
CHf	-	-
CHc	-	-
CHl	-	-
CH1	+	+
CH2	-	-
CH12	-	-
CH17	-	+
CH03	-	+
CH19	+	+
CH26	-	-
CH27	-	+
CH32	+	+
CH33	+	+
CH34	-	+
CH36	-	+
CH37	-	+
CH44	+	+
CH45	-	+
CH47	+	+
CH50	+	+
CH51	-	+
CH52	-	+
CH101	+	+
CH102	-	-

注：“-”表示不能形成菌落，“+”表示能形成菌落，对农药能利用(降解)。

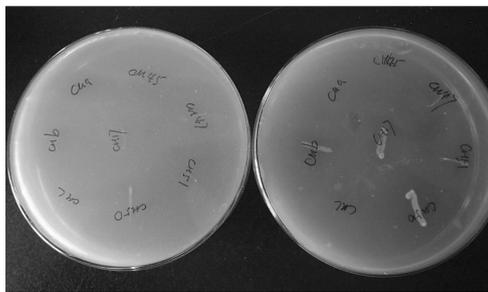


图1 分离菌株在含毒死蜱和辛硫磷的基础盐培养基上的生长情况

charopolyspora gloriosae)、CH50 (*Promicromonospora sukumoe*)、CH101,共8株菌;能降解毒死蜱都能降解辛硫磷。

3 讨论

华北大黑鳃金龟幼虫肠道微生物的分离试验选用的4种培养基中,淀粉-酪素培养基分离效果最好,甘油天门冬氨酸培养基分离效果最差。因此,在做肠道微生物分离试验时建议使用淀粉-酪素培养基。

通过研究表明,一些肠道微生物对农药有降解作用,本试验中,华北大黑鳃金龟幼虫肠道微生物对辛硫磷降解作用优于毒死蜱,说明在防治华北大黑鳃金龟时,毒死蜱防治效果可能优于辛硫磷,肠道微生物的降解作用可能是昆虫产生抗药性的原因之一。在农药降解上,微生物菌剂的使用也可能导致害虫获得有分解农药的菌株,为防止用量上的恶性循环,建议使用具有降解农药菌株的代谢产物进行农药降解,而不应直接使用微生物菌体。

参考文献:

- [1]杨新玲. 2011年我国农药产量情况[J]. 农药学学报,2012(1):50.
- [2]王永杰,李顺鹏,沈标. 有机磷农药乐果降解菌的分离及其活性研究[J]. 南京农业大学学报,2001,24(2):71-74.
- [3]张韩杰,闫艳春. 农药残留及微生物在农药降解中的应用与展望[J]. 湖北植保,2004(1):31-35.
- [4]虞云龙,樊德方,陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略[J]. 环境科学进展,1996(3):28-36.
- [5]崔中利,李顺鹏. 化学农药的微生物降解及其机制[J]. 江苏环境科技,1998(3):1-5.
- [6]仪美芹,王开运,姜兴印,等. 微生物降解农药的研究进展[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2002,33(4):519-524.
- [7]魏敏,李玉江. 微生物降解土壤残留农药的研究进展[J]. 山东化工,2007,36(3):15-18.
- [8]程国锋,李顺鹏,沈标,等. 微生物降解蔬菜残留农药研究[J]. 应用与环境生物学报,1998(1):82-85.
- [9]Spychala J,Datta N S,Takabayashi K,et al. Cloning of human adenosine kinase cDNA: Sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases[C]//Proc. Natl. 93. Sci. USA,1996:1232-1237.
- [10]Müller C W,Schlauderer G J,Reinstein J,et al. Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding[J]. Structure,1996,4(2):147-156.
- [11]姜淑梅,张龙,戴世鲲,等. 一种简单、有效的适于PCR操作的放线菌DNA提取方法[J]. 生物技术,2007,17(1):39-41.