

袁巧云,孙悦,张迹.多菌灵降解菌株 djl-10 的分离及降解特性[J].江苏农业科学,2019,47(23):284-288.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.23.068

多菌灵降解菌株 djl-10 的分离及降解特性

袁巧云,孙悦,张迹

(淮阴师范学院生命科学学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室,江苏淮安 223300)

摘要:从多菌灵生产废水处理系统中,通过富集和选择性培养,分离得到 1 株能高效降解多菌灵的细菌,并将其命名为 djl-10。根据菌株的菌落形态,生理生化特性及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析等,初步将菌株鉴定为分枝杆菌属。该菌株能利用多菌灵作为唯一碳源、氮源进行生长并基本彻底矿化多菌灵。2-氨基苯并咪唑和 2-羟基苯并咪唑为菌株降解多菌灵的中间代谢产物。菌株能够在较宽温度和 pH 值范围内有效降解多菌灵,其降解多菌灵的最适温度和 pH 值分别为 37 ℃、7.0。装液量试验结果表明,菌株 djl-10 对多菌灵的降解明显依赖氧气。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 等离子能够明显促进菌株 djl-10 对多菌灵的降解。此外,本研究克隆和表达菌株 djl-10 的多菌灵水解酶基因 *mhe*。酶促反应结果表明,纯化的重组酶 Mhe 对多菌灵具有明显的催化活性。

关键词:分枝杆菌;多菌灵;生物降解;废水处理系统

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)23-0284-05

多菌灵是一种广谱、内吸性杀菌剂,广泛应用于防控各种农作物的真菌病害^[1]。许多苯并咪唑类和托布津类杀菌剂均可在作物体内转化为多菌灵而起作用^[2]。多菌灵同时还是一种持久性环境污染物,其半衰期在表层土壤中约为 3~15 周^[3-4]。值得注意的是多菌灵在土壤和水体中长期残留会进一步污染食品,危害人们身体健康^[5-6]。研究表明,多菌灵对动物的肝脏和内分泌系统有害,是一种“三致”物质,即使在较低浓度下也会对生物体造成伤害^[7-8]。我国每年多菌灵的生产量已超过 10 000 t^[9]。经生产和使用途径多菌灵进入环境中,并在土壤、河流中残留,对各种生物的生长繁殖以及人们的食品安全和身体健康造成潜在的危害。目前,已经报道多种多菌灵降解菌株^[7-12]。本研究分离得到 1 株能高效降解多菌灵的分枝杆菌菌株,并对其降解特性进行初步研

究,以期进一步丰富高效多菌灵降解菌株的资源库。

1 材料与方法

1.1 化学试剂与培养基

多菌灵(纯度>98.0%),由江苏新沂农药厂赠送;用于高效液相色谱分析的色谱纯甲醇,购自江苏汉邦科技股份有限公司。其他化学试剂均为普通国产分析纯试剂。

基础盐(MSM)培养基配方:1.0 g/L NaCl,1.0 g/L NH_4NO_3 ,1.5 g/L K_2HPO_4 ,0.5 g/L KH_2PO_4 ,0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,1 000 mL 去离子水;富集分离培养基:在基础盐培养基中添加 0.01% 的多菌灵原药作为唯一碳氮源;LB 培养基配方:10.0 g/L 胰蛋白胨,5.0 g/L 酵母粉,5.0 g/L NaCl,1 000 mL 去离子水。

1.2 菌株的富集与分离

取多菌灵生产废水处理系统中的 5 mL 活性污泥加入到 100 mL 富集培养基中,在 30 ℃,180 r/min 条件下振荡培养。每隔 4 d 取 5 mL 富集培养物接种至 100 mL 新鲜富集培养基中。经连续 3 代富集后,取富集液梯度稀释涂布到含过饱和多菌灵的基础盐琼脂平板上,30 ℃培养 3 d。周围有透明圈的菌落即为疑似多菌灵降解菌,将这些菌株用固体 LB 培养

收稿日期:2018-09-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300099)。

作者简介:袁巧云(1981—),女,江苏盐城人,硕士,主要从事微生物学研究。E-mail:qiaoyunyuan@163.com。

通信作者:张迹,博士,讲师,主要从事环境微生物学研究。E-mail:zhangjihnu@163.com。

80 cm 地温曲线与 160 cm 地温曲线相交,80 cm 地温开始高于 160 cm 地温时,0~80 cm 土体的总体地温环境在 3 ℃以上,紫花苜蓿整体根系的生理活动已经全面激活,此时可作为紫花苜蓿返青即将进入普遍期的气象预测时间节点。当 160 cm 地温与 320 cm 地温的差值为 0,即 160 cm 地温曲线与 320 cm 地温曲线相交,并开始高于 320 cm 地温时,0~320 cm 土体的地温环境进入到植物生长季正常态,由下而上逐次升高,总体地温环境在 6 ℃以上,此时可作为紫花苜蓿返青即将结束进入旺盛分枝期的气象预测时间节点。基于降温对紫花苜蓿返青的冷害与冻害的灾害性影响,在对达拉特旗紫花苜蓿返青期的气象服务中,适时关注天气变化,对日平均

地表温度 0 ℃或以下,或者降温幅度超过 10 ℃以上的降温过程,及时进行紫花苜蓿冻害预警,提醒紫花苜蓿种植大户及时采取田间防御措施。

参考文献:

- [1] 杨泽龙,苗百岭,郑晓艳.内蒙古达拉特旗黄河灌区春季返盐气象条件分析[J].中国农学通报,2019,35(6):70-76.
- [2] 宁夏畜牧兽医学会草原研究会.宁夏草地资源与牧草种植[M].银川:宁夏人民出版社,1989.
- [3] 马强,王丽学,王文杰,等.紫花苜蓿和羊草栽培草地返青规律[J].天津农业科学,2016,22(5):67-70.

基平板划线分离,纯化后进一步验证其多菌灵降解能力。

1.3 菌株鉴定

采用高盐法提取菌株基因组 DNA 作为模板,以细菌 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增菌株 16S rDNA 序列。PCR 扩增产物 TA 克隆后,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞,挑选阳性转化子送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序序列提交到 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 上进行在线分析,利用 Blast 软件在 GenBank 中与其他菌株 16S rDNA 序列进行同源性比对。采用软件 Mega 6.0,通过邻结法构建系统进化树。菌株 djl-10 16S rDNA 序列的 GenBank 登录号为 KX509812。

1.4 多菌灵降解及检测

1.4.1 菌悬液制备 接种菌株 djl-10 至液体 LB 培养基中,在 30 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下振荡培养 3 d,离心收集菌体,用 MSM 培养基洗涤并重悬菌体至 $D_{600\text{nm}} \approx 1.0$ 。

1.4.2 降解体系构建 以 1% 的接种量,接种菌悬液至 MSM 液体培养基中,并添加终浓度为 100 mg/L 的多菌灵作为唯一碳源和能源。当以多菌灵为唯一氮源时,向降解体系中添加 100 mg/L 葡萄糖。所有处理均设置 3 次重复,在 30 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下振荡培养,按特定时间间隔取样待测。

1.4.3 样品处理 向待测样品中加入等体积二氯甲烷,剧烈振荡 2 min,静置分层后吸出水相,有机相在通风橱中充分挥发后加甲醇重新溶解定容,用 0.22 μm 一次性有机相过滤器过滤后进行高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, 简称 HPLC) 分析。

1.4.4 样品检测 样品中多菌灵残留浓度采用 HPLC 法检测,色谱条件为 Agilent 1260 高效液相色谱仪, Kromasil 100-5 C₁₈ 反向柱 (4.6 mm \times 25.0 cm),流动相为甲醇与 0.02 mol/L 醋酸铵体积比为 65 : 35,流速为 1 mL/min,检测波长为 286 nm,室温检测。

1.5 环境条件对菌株降解多菌灵的影响

1.5.1 温度的影响 将降解体系分别置于 20、25、30、37、40、45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养 24 h,取样测定不同温度下菌株 djl-10 对多菌灵的降解率。

1.5.2 初始 pH 值的影响 根据“1.5.1 节”中试验选择温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。分别用盐酸溶液和氢氧化钠溶液将 MSM 培养基的初始 pH 值调为 5、6、7、8、9 后构建“1.4.2 节”中的降解体系。在 37 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下振荡培养 24 h,取样测定不同 pH 值条件下菌株 djl-10 对多菌灵的降解率。

1.5.3 装液量的影响 在 100 mL 三角瓶中构建降解体系,并设置 10、20、30、40、50 mL 等 5 个装液量处理组。在 37 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下振荡培养 24 h,取样测定不同装液量条件下菌株 djl-10 对多菌灵的降解率。

1.5.4 不同金属离子的影响 分别向多菌灵降解体系中添加 MgCl₂、CuSO₄、CaCl₂、MnSO₄、ZnSO₄、FeCl₃、CoCl₂ 等溶液,设置 0.1、1.0、10.0 mmol/L 等 3 个处理浓度。在 37 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下振荡培养 24 h,取样测定不同金属离子处理条件下菌株 djl-10 对多菌灵的降解率。以不加金属离子的多菌灵降解体系为对照。

1.6 多菌灵水解酶基因 mhe 的克隆与表达

1.6.1 mhe 基因的 PCR 扩增与序列分析 参考文献[8]设

计合成多菌灵水解酶基因的 PCR 引物 MheI-F 和 MheI-R。以菌株基因组 DNA 为模板,PCR 扩增菌株 mhe 基因片段。PCR 产物 TA 克隆后,挑选阳性转化子送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序序列提交 GenBank 进行 Blast 同源性比对分析。

1.6.2 重组表达载体构建 通过引物设计,在 mhe 基因片段 PCR 产物的上下游分别引入限制性酶切位点 Nde I 和 Xho I,并通过载体构建的方式将 mhe 基因片段连接到表达载体 pET29a 的相应位点上,构建成重组表达载体 pET29a-mhe,随后转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株。

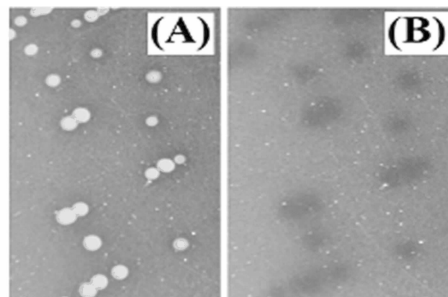
1.6.3 蛋白 Mhe 诱导表达及纯化 在含 50 mg/L 卡那抗生素的 LB 液体培养基中,将重组表达菌株于 37 $^{\circ}\text{C}$,200 r/min 条件下振荡培养至菌体浓度达到 $D_{600\text{nm}} \approx 0.5$ 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, 简称 IPTG),在 18 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 条件下振荡培养 24 h,以诱导蛋白 Mhe 表达。采用 Ni 柱亲和层析策略,参照产品说明步骤纯化目标蛋白 Mhe。纯化的目标蛋白透析脱盐后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

1.6.4 Mhe 酶活力检测 构建酶促反应体系:500 μL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 8.0),25 μL Mhe 酶液,5 μL 多菌灵母液(终浓度为 10 mg/L),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴。平行操作 15 个反应体系,分为 5 组,每组 3 次重复,分别在 0、2、4、6、8 h 取样,加入等体积的二氯甲烷终止酶促反应并萃取体系中残留的多菌灵,用 HPLC 检测分析各组样品中多菌灵的残留浓度。

2 结果与分析

2.1 多菌灵降解菌株的富集与分离

从处理多菌灵生产废水的活性污泥中分离得到 1 株高效多菌灵降解菌株,命名为 djl-10。菌株革兰氏染色为阳性,在 LB 固体平板上经 30 $^{\circ}\text{C}$,2~3 d 培养后形成黄色菌落。菌株能在以过饱和多菌灵为唯一碳氮源的浑浊基础盐琼脂平板上生长,并在菌落周围和下方形成清晰的透明水解圈(图 1)。



A—菌株 djl-10 在含过饱和多菌灵的 MSM 琼脂平板上生长,并在菌落周围和下方形成透明水解圈;
B—洗掉平板上的菌落,使透明水解圈更清晰

图1 多菌灵过饱和浑浊平板水解圈形成试验

2.2 菌株 djl-10 的鉴定

菌株 djl-10 的 16S rDNA 序列同源性比对分析显示其与分枝杆菌属 (Mycobacterium sp.) 菌株有较高的同源性,达 99%。分枝杆菌属与诺卡氏菌属、红球菌属等在亲缘关系上相近,同时为考察菌株 djl-10 与其他已报道的多菌灵降解菌

株之间的进化关系,从 GenBank 中调取它们的 16S rDNA 序列进行聚类分析,构建系统发育树。结果表明,其与

Mycobacterium sp. 亲缘关系最近(图2)。据此,将菌株 djl-10 初步鉴定为分枝杆菌属菌株。

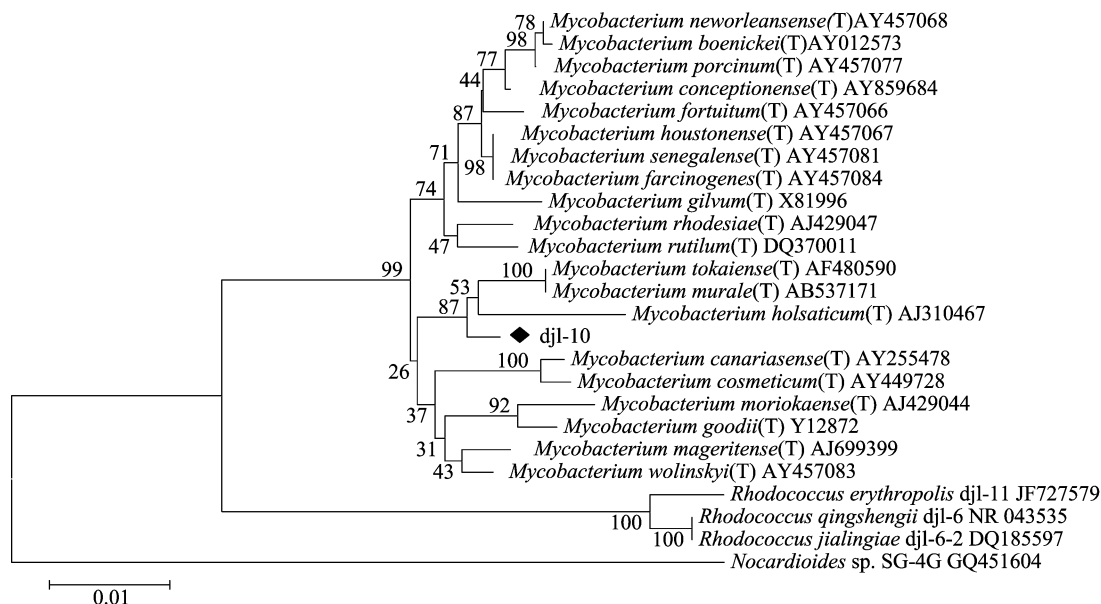
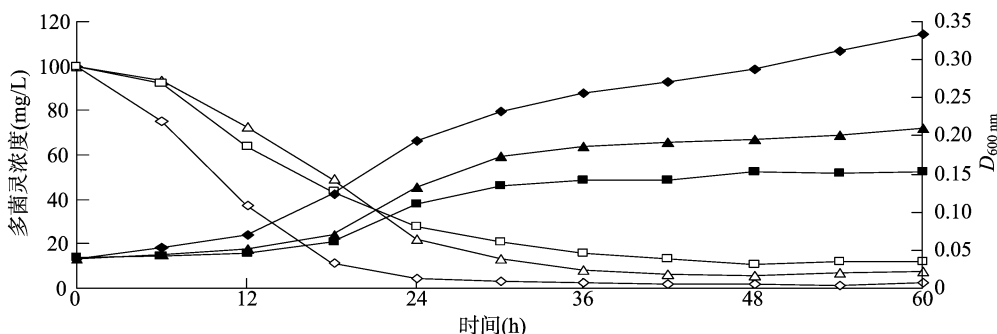


图2 菌株 djl-10 的系统发育树

2.3 菌株对多菌灵的降解及代谢产物鉴定

菌株 djl-10 对多菌灵的降解及生长情况如图3所示,菌株能够以多菌灵为唯一碳氮源生长,并降解多菌灵。当以多菌灵为唯一氮源时菌株的生长和降解均相对较好,菌株能在24 h 内将 100 mg/L 的多菌灵几乎彻底降解。而以多菌灵为

唯一碳源或唯一碳氮源时,菌株需要近 36 h 才能将多菌灵基本彻底降解。以多菌灵为唯一氮源时,体系中添加了葡萄糖,能够促进菌体的快速增加和对多菌灵的降解。因此,葡萄糖的存在应是以多菌灵为唯一氮源时菌株生长和降解更快的原因。



“△”表示以多菌灵为唯一碳源时的降解情况;“◇”表示以多菌灵为唯一氮源时的降解情况;“□”表示以多菌灵为唯一碳氮源时的降解情况;“▲”表示以多菌灵为唯一碳源时的菌株生长情况;“◆”表示以多菌灵为唯一氮源时的菌株生长情况;“■”表示以多菌灵为唯一碳氮源时的菌株生长情况

图3 以多菌灵为唯一碳源、氮源、碳氮源时菌株的生长及降解情况

根据文献[7-8]报道,2-氨基苯并咪唑(2-AB)和2-羟基苯并咪唑(2-HB)是多种微生物菌株降解多菌灵的中间代谢产物。在菌株 djl-10 降解多菌的过程中,通过 HPLC 分析也检测到了2个中间代谢产物。由图4可知,这2个代谢产物分别与2-AB、2-HB 标准品有相同的保留时间,基于此并结合文献报道,将这2个代谢产物初步鉴定为2-AB 和2-HB,这也说明菌株 djl-10 降解多菌灵的代谢途径与文献[7-8]报道的多菌灵降解菌株基本相同。

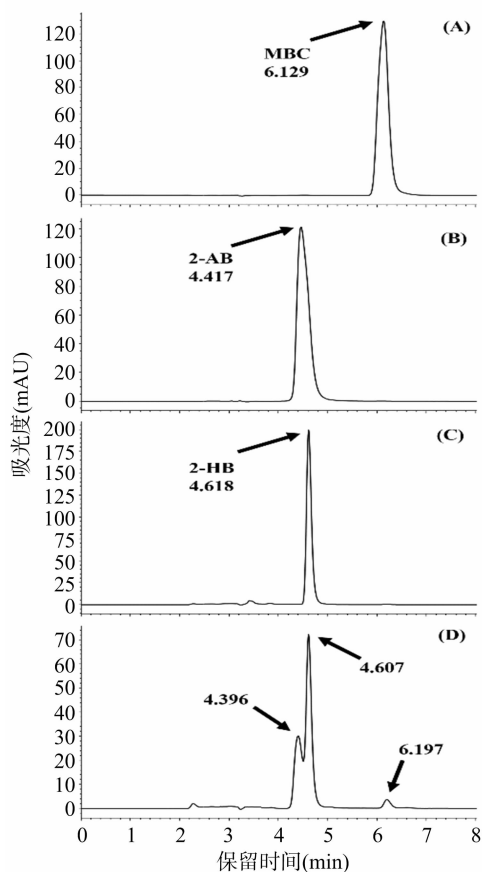
2.4 环境条件对菌株 djl-10 降解多菌灵的影响

2.4.1 温度和初始 pH 值对降解率的影响 由图5可知,在温度低于 37 ℃时,多菌灵降解率随着温度升高而升高,但当温度高于 37 ℃时,降解率随着温度升高略有下降。因此,菌

株 djl-10 降解多菌灵的最适温度为 37 ℃。由图6可知,菌株 djl-10 降解多菌灵的最适 pH 值为 7.0,培养基初始 pH 值偏酸和偏碱均会抑制多菌灵的降解。

2.4.2 装液量对降解率的影响 由图7可知,在 100 mL 三角瓶中装液量为 10、20 mL 时多菌灵的降解率明显高于装液量为 30、40、50 mL 时,且随着装液量的增加,降解率逐渐下降,表明菌株 djl-10 降解多菌灵对氧气有明显的需求。

2.4.3 金属离子对降解率的影响 由图8可知, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 能够明显促进菌株 djl-10 对多菌灵的降解; Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 在试验浓度为 0.1、1.0 mmol/L 时对降解有明显促进作用,但浓度为 10.0 mmol/L 时对降解作用强烈抑制; Cu^{2+} 对降解有明显的抑制作用;值得注意的是, Fe^{3+} 在低浓度



A ~ C 分别表示多菌灵(MBC)、2-AB 和 2-HB 的标准品; D 表示菌株 djl-10 降解多菌灵中间代谢产物
图4 菌株 djl-10 降解多菌灵代谢产物 HPLC 检测图谱

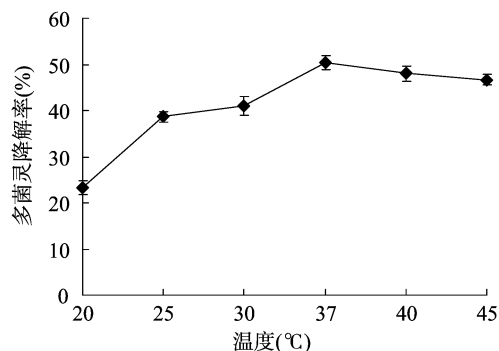


图5 温度对菌株 djl-10 降解多菌灵的影响

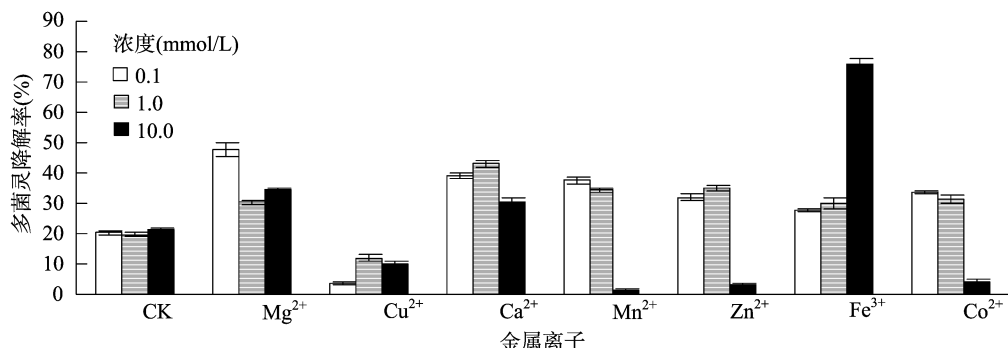


图8 金属离子对菌株 djl-10 降解多菌灵的影响

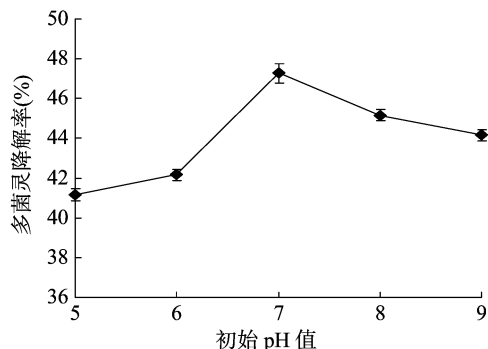


图6 初始 pH 值对菌株 djl-10 降解多菌灵的影响

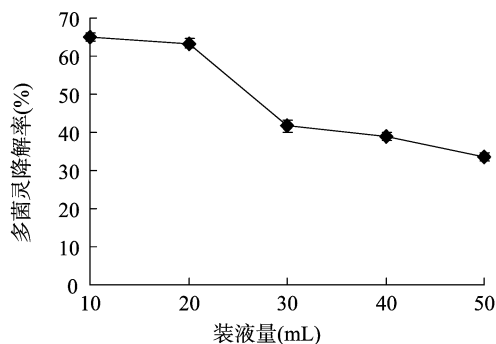


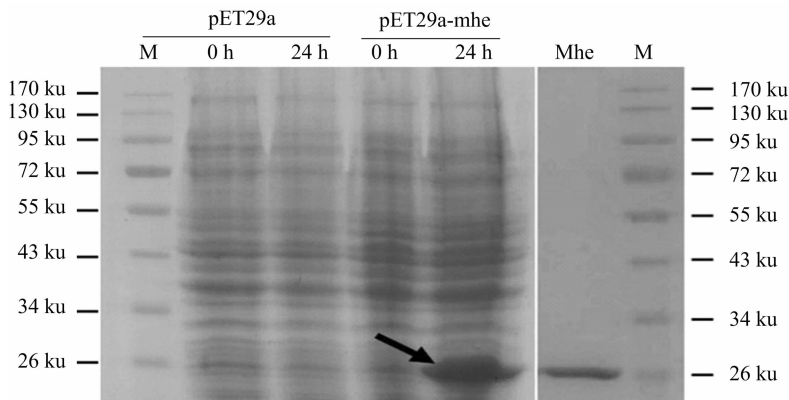
图7 装液量对菌株 djl-10 降解多菌灵的影响

(0.1、1.0 mmol/L) 时对菌株降解多菌灵的影响不大,但在试验浓度为 10.0 mmol/L 时对多菌灵的降解有强烈的促进作用。

2.5 菌株多菌灵水解酶 *mhe* 基因的克隆和表达

从菌株 djl-10 的基因组 DNA 中,PCR 扩增得到 1 个特异条带,测序分析表明其为长度为 729 bp,起始密码子为 ATG 终止密码子为 TGA,编码 242 个氨基酸残基的开放式阅读框 (ORF)。序列同源性比对分析表明其与已报道的菌株 *R. erythropolis* djl-11^[13] 和 *Nocardioide* sp. SG-4G^[8] 中的多菌灵水解酶基因 *mhe/mheI* 的序列相似性分别达到 100%、99%。据此,推测该 ORF 就是菌株 djl-10 中负责编码多菌灵水解酶 Mhe 的基因。

利用大肠杆菌表达系统表达并纯化菌株 djl-10 的多菌灵水解酶 Mhe,SDS-PAGE 分析结果 (图 9) 显示,纯化的 Mhe 为单一条带,分子量约为 26 ku,与基于氨基酸序列推测的理论值 (26251.93u) 相符。酶促反应试验显示纯化的



M—蛋白marker; pET29a—空表达载体阴性对照; pET29a-mhe—Mhe IPTG 诱导表达 0 h 和 24 h; Mhe: 纯化的重组 Mhe

图9 Mhe诱导表达及纯化的 SDS-PAGE 分析图谱

Mhe 对多菌灵具有催化活性,如图 10 所示,在 Mhe 的催化下,反应体系中多菌灵的残留浓度随时间推移逐步降低。这进一步说明该 ORF 是菌株 djl-10 中负责编码多菌灵水解酶基因的 *mhe* 基因。

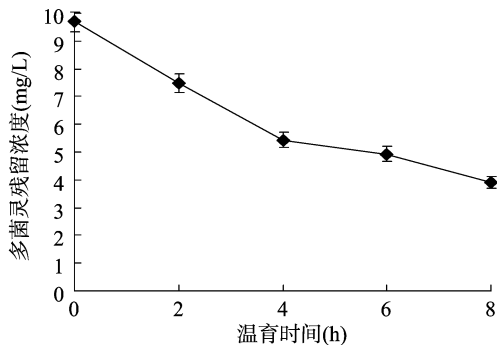


图10 重组酶 Mhe 催化多菌灵水解进程

3 结论

从多菌灵废水处理系统活性污泥中分离得到 1 株高效多菌灵降解菌株 djl-10,初步鉴定为分枝杆菌属菌株。该菌株能以多菌灵为唯一碳源、氮源和唯一碳氮源生长并基本彻底降解多菌灵。进一步丰富了多菌灵降解菌株的资源库。

菌株 djl-10 降解多菌灵的最适温度和初始 pH 值分别为 37 ℃、7.0。装液量试验结果表明,菌株降解多菌灵时须要好氧环境。 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 等多种金属离子对菌株降解多菌灵有明显促进作用; Cu^{2+} 对降解有明显的抑制作用;高浓度 (10.0 mmol/L) 的 Fe^{3+} 对降解有强烈的促进作用。

2-AB 和 2-HB 是菌株 djl-10 降解多菌灵的中间代谢产物。菌株中负责催化多菌灵降解的第一步反应的编码基因是多菌灵水解酯酶基因 *mhe*,该基因表达的产物对多菌灵有明显的催化活性。

参考文献:

- [1] Chen Y, Zhou M G. Characterization of *Fusarium graminearum* isolates resistant to both carbendazim and a new fungicide JS399-19 [J]. *Phytopathology*, 2009, 99(4): 441-446.
- [2] Mazellier P, Leroy E, de Laat J, et al. Degradation of carbendazim by

UV/ H_2O_2 investigated by kinetic modelling [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2003, 1(1): 68-72.

- [3] European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim [J]. *EFSA Journal*, 2010, 8(5): 1598.
- [4] Jones S E, Williams D J, Holliman P J, et al. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME) - an instrument for testing potentially harmful substances; fate of the model chemical carbendazim [J]. *Ecotoxicology*, 2004, 13(1/2): 29-42.
- [5] Arora S, Mukherjee I, Trivedi T P. determination of pesticide residue in soil, water and grain from IPM and non-IPM field trials of rice [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 81(4): 373-376.
- [6] Holmes M, Kennedy M C, Riccio R, et al. Assessing the risk to U. K. children from carbendazim residues in apple products [J]. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2008, 14(2): 86-93.
- [7] Wang Z C, Wang Y Y, Gong F F, et al. Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 [J]. *Chemosphere*, 2010, 81(5): 639-644.
- [8] Pandey G, Dorrian S J, Russell R J, et al. Cloning and biochemical characterization of a novel carbendazim (methyl-1-H-benzimidazol-2-ylcarbamate)-hydrolyzing esterase from the newly isolated *Nocardioide* sp. strain SG-4G and its potential for use in enzymatic bioremediation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(9): 2940-2945.
- [9] 李杰, 王亦然, 年浩瀚, 等. 一株新的多菌灵降解菌的筛选、鉴定及其降解特性 [J]. *淮北师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 38(3): 37-42.
- [10] 许敬亮, 王志春, 王堃, 等. 多菌灵降解菌株 djl-6-2 的分离、鉴定及降解特性 [J]. *中国环境科学*, 2006, 26(3): 307-310.
- [11] 田连生, 陈菲. 多菌灵降解菌 T8-2 的分离及其降解条件研究 [J]. *江苏农业科学*, 2008, 36(6): 271-274.
- [12] 张虹, 阳辉, 代金霞. 多菌灵降解细菌降解能力的影响因素 [J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(11): 374-376.
- [13] Zhang X J, Huang Y J, Harvey P R, et al. Isolation and characterization of carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): 1520-1538.