

申志慧,王 亚,李昊聪,等. 1 株氟环唑降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):273-278.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.049

1 株氟环唑降解菌的分离鉴定及降解特性

申志慧^{1,2}, 王 亚², 李昊聪², 卯新蕊², 冯发运², 任立云¹, 余向阳²

(1. 广西大学农学院,广西南宁 530004; 2. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/省部共建国家重点实验室培育基地-江苏省食品质量安全重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:从废弃农药厂周边土壤中分离筛选得到 1 株以氟环唑为唯一碳源的降解菌,命名为 F1。经过对菌落菌体的形态观察、16S rRNA 序列相似性及系统发育分析,初步鉴定其为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) 菌株,其亲缘关系与昆明假单胞菌(*Pseudomonas kunmingensis*) 最近。进一步优化 F1 降解氟环唑的条件,结果表明,氟环唑初始浓度为 20 mg/L、温度为 30 ℃、pH 值为 7.0 时,菌株降解氟环唑的效果最佳。在最佳条件下,接入菌悬液使无机盐液体培养基在 600 nm 处的吸光度($D_{600\text{ nm}}$) 为 0.1,培养 4 d 后,菌株达到生长高峰,培养 6 d 时氟环唑降解率达 90.4%。研究还发现,增加接菌量能明显提高 F1 对氟环唑的降解效率。

关键词:农药;氟环唑;假单胞菌属;生物修复;影响因子;降解特性

中图分类号: X592;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0273-05

氟环唑(epoxiconazole)是一类新型三唑类含氟杀菌剂,具有内吸和残留活性,可以通过抑制麦角甾醇的形成,阻碍病菌的细胞壁形成^[1],通常用于防治谷物条锈病等多种病害^[2]。由于具有良好的内吸性和杀菌活性,氟环唑在杀菌剂市场中所占的份额日渐增大^[2-4],其残留危害也日渐受到关注。Taxvig 等发现,高剂量氟环唑对妊娠期和哺乳期的大鼠有生殖毒性,而低剂量的氟环唑可导致大鼠子代体质量增加,另外可通过参与扰乱类固醇激素合成的关键酶对大鼠的胎儿分化及内分泌产生影响^[5]。Hester 等研究发现,氟环唑能够引起肝细胞肿大,肝癌细胞增殖,且可对谷胱甘肽 S-转移酶、细胞色素 P450 和氧化应激的基因转录等造成影响^[6]。在农业生产中,氟环唑等被大量运用于作物病害防治,它在土壤、水体等环境中的滞留期及非生物降解半衰期较长,给农业生态环境及农产品质量带来安全隐患^[7-8]。

近年来,有研究表明,利用微生物降解有机污染物,进行环境修复是一种安全有效、易于操作、低成本且无二次污染的生物修复技术^[9-10]。国内外

关于三唑类杀菌剂的降解研究主要集中于戊唑醇^[11-15]、丙环唑^[15-17]、烯唑醇^[18]、三唑醇^[19]、苯醚甲环唑^[20-21]等上。微生物降解农药的机制包括酶促反应和非酶促反应,微生物对三唑类农药的降解大多通过酶促反应,包括氧化、羟基化、脱卤及还原等反应过程^[22]。此外,温度、湿度、pH 值、含氧量等环境因素可能会影响微生物对三唑类农药的降解效率。目前,有关微生物降解三唑类杀菌剂的研究较多,且以往研究筛选到的菌株对几种三唑类杀菌剂均有较好的降解效果^[11-21]。然而,作为 1 种新型三唑类杀菌剂,国内外还未发现氟环唑相关降解菌的筛选及其降解特性研究。

本研究筛选到 1 株对氟环唑有良好降解效果的假单胞菌,初步分析其对氟环唑的降解特性及影响因素,以期为三唑类农药污染土壤的生物修复提供借鉴和材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样本来源 土样采自江苏省苏科农化有限责任公司厂区。

1.1.2 主要试剂 95% 氟环唑原药,江苏辉丰生物农业股份有限公司;98.5% 氟环唑标准品,德国 Dr. Ehrensterfer 公司;色谱纯乙腈,德国 Darmstadt 公司;其他试剂除特别说明外均为分析纯。

1.1.3 培养基 无机盐液体培养基:0.4 g

收稿日期:2019-10-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31772197)。

作者简介:申志慧(1991-),女,河南安阳人,硕士研究生,主要从事微生物降解农药研究。E-mail:1097130928@qq.com。

通信作者:余向阳,博士,研究员,主要从事农产品质量安全研究。

E-mail:yuxy@jaas.ac.cn。

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g K_2HPO_4 , 0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.08 g CaSO_4 , 去离子水定容至 1 000 mL, pH 值为 7.0 ± 0.2 。LB 液体培养基:牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 去离子水定容至 1 000 mL。LB 固体培养基分别在上述液体培养基中加琼脂 15 g/L, pH 值为 7.0。以上培养基均在温度为 121 °C 条件下, 灭菌 20 min 后, 备用。

1.1.4 仪器设备 WH-3 微型旋涡混合仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司; A-1506 型紫外可见分光光度计, 上海奥析科学仪器有限公司; SW-CJ-1D 净化工作台, 苏州净化设备有限公司; ZQZY-70BF 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; Five go 便携式 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Agilent LC/MS-1260/6410 液相色谱质谱联用仪, 美国安捷伦科技有限公司。

1.2 氟环唑降解菌的筛选和纯化

初筛: 取 5 g 土壤, 置于 LB 液体培养基中富集培养 24 h 后, 依次转移至含氟环唑 50、100、200 mg/L 的无机盐液体培养基中, 在 30 °C、200 r/min 下培养 5 d。利用平板划线法在 LB 固体培养基上分离纯化菌株, 获得纯化菌株 8 株, 分别编号为 F1 ~ F8。将菌株 F1 ~ F8 接种于 LB 液体培养基中进行富集培养, 并将富集的纯菌种保存在 30% 的甘油中, 于 -60 °C 冰箱中保存待用。

复筛: 将初筛得到的 F1 ~ F8 单菌落分别接种于以氟环唑为唯一碳源的无机盐液体培养基中, 在 30 °C、200 r/min 下振荡培养, 以不接菌的处理组为对照, 每个处理重复 3 次。培养 6 d 后取样测定氟环唑含量并计算降解率。选择降解效能高且生长速度快的细菌为目标菌株, 进一步研究其降解特性。

1.3 菌株鉴定

细菌 16S rRNA 的测序与系统发育树的构建基本步骤如下: 提取细菌 DNA 基因组 → 16S rRNA PCR 扩增 → PCR 产物琼脂糖凝胶电泳及纯化回收 → TA 克隆 → 验证(阳性) → 测序 → NCBI 比对同源性。16S rRNA 扩增引物为通用引物, 正向引物为 27F(5' - TTGATCMTGGCTCAG - 3'), 反向引物为 1492R(5' - GGTACCTTGTACGACTT - 3'); TA 克隆后测序的正向引物为 M13F(5' - CGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGA - 3'), 反向引物为 M13R(5' - AGCG GATAACAATTTACACAGGA - 3')。测序方式为双向测序, 由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。将测序结果在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

中与具有相似性的细菌 16S rRNA 序列进行比对, 选择同源性最高($\geq 97\%$)的序列, 利用 ClustalX 进行多重序列比对后, 用 MEGA 6.0 软件进行遗传距离计算, 邻接法(NJ 法)构建细菌的系统进化树。

1.4 生长曲线测定

将菌种接种于 100 mL LB 液体培养基中, 在 30 °C、200 r/min 下振荡培养, 每隔 2 h 测定 1 次培养基在 600 nm 处的吸光度($D_{600\text{nm}}$), 连续测定 24 h, 绘制菌株生长曲线。取处于稳定生长期的液体菌种进行氟环唑降解试验。

1.5 菌株对氟环唑的降解特性

1.5.1 菌悬液制备 将“1.4”节中所得到的菌种接种于 LB 液体培养基中, 放置在 30 °C、200 r/min 培养箱中避光培养 14 h。取 20 mL 富集菌液于 4 °C、5 000 r/min 下离心 5 min, 弃去上清液, 用 10 mL 无菌水清洗浓缩菌体, 重复 3 次, 用 5 mL 无菌水稀释后配制成菌悬液母液。

1.5.2 菌株对氟环唑的降解特性及其生长规律 将“1.5.1”节中的菌悬液母液接种到 50 mL 无机盐液体培养基中, 调整 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.1, 添加氟环唑至其质量浓度为 20 mg/L, 测定初始 $D_{600\text{nm}}$ 和氟环唑含量。以不接菌(加入与接菌液等体积的无菌水)的培养基作为对照, 每处理重复 3 次。于 30 °C、200 r/min 摇床中避光培养, 每天定时取样测定 $D_{600\text{nm}}$ 及氟环唑残留量。

1.5.3 温度和初始 pH 值对菌株降解效率的影响

用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸调节无机盐液体培养基的 pH 值分别为 5、6、7、8、9[培养基中 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲液浓度为 5 mmol/L]。灭菌后, 将“1.5.1”节中的菌悬液母液接种到 50 mL 无机盐液体培养基中, 调整 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.1, 添加氟环唑使其质量浓度为 20 mg/L, 分别置于 25、30、35 °C 的摇床(转速为 200 r/min)中避光培养 6 d 后取样测定培养液中氟环唑的残留量。每个处理 3 次重复。

1.5.4 接菌量对菌株降解效率的影响 将“1.5.1”节中的菌悬液母液接种到 50 mL 灭菌的无机盐液体培养基(pH 值为 7.0)中, 调整 $D_{600\text{nm}}$ 分别为 0.05、0.10、0.20、0.50, 添加氟环唑至其质量浓度为 20 mg/L, 于 30 °C、200 r/min 下避光培养, 分别于 0、2、4、6 d 取样测定培养液中氟环唑残留量。每个处理重复 3 次。

1.5.5 氟环唑质量浓度对菌株降解效率的影响 将“1.5.1”节中的菌悬液母液接种到 50 mL 无机盐

液体培养基中,调整 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.1,添加氟环唑至其初始质量浓度分别为 5、10、20、50 mg/L,培养、取样及测定方法同“1.5.4”节。每个处理重复 3 次。

1.6 氟环唑提取及分析方法

1.6.1 提取及净化 采用 Quechers 法^[23]提取氟环唑:取 2 mL 样品溶于 10 mL 乙腈中,添加 1 g NaCl 涡旋振荡 1 min 后,在 5 000 r/min 下离心 5 min,吸取上清液 0.5 mL 置于 10 mL 离心管中,加 3.5 mL 乙腈涡旋振荡 1 min,最后加入 0.05 g *N*-丙基乙二胺和 0.100 g 无水硫酸镁进行净化,过 0.22 μm 有机系滤膜,待测。

1.6.2 仪器检测条件 液相色谱条件:色谱柱为 ZORBAX SB-C18(3.5 μm,2.1×150 mm);流动相比例设置为 9:1,其中 A 相为 100% 色谱乙腈,B 相为 0.1% 甲酸;等梯度洗脱;流速为 0.4 mL/min;进样体积为 5 μL;柱温为室温。

质谱条件:多反应监测扫描模式;电喷雾正离子源;离子化电压为 4 000 V;雾化温度为 350 ℃;喷雾气压为 25 Psi。具体质谱监测参数见表 1。

表 1 氟环唑质谱检测参数

保留时间 (min)	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞电压 (V)	驻留时间 (ms)
1.209	330	141.0	110	10	200
	330	121.1	110	15	

在上述条件下,氟环唑的添加回收率为 91.6%~96.5%。

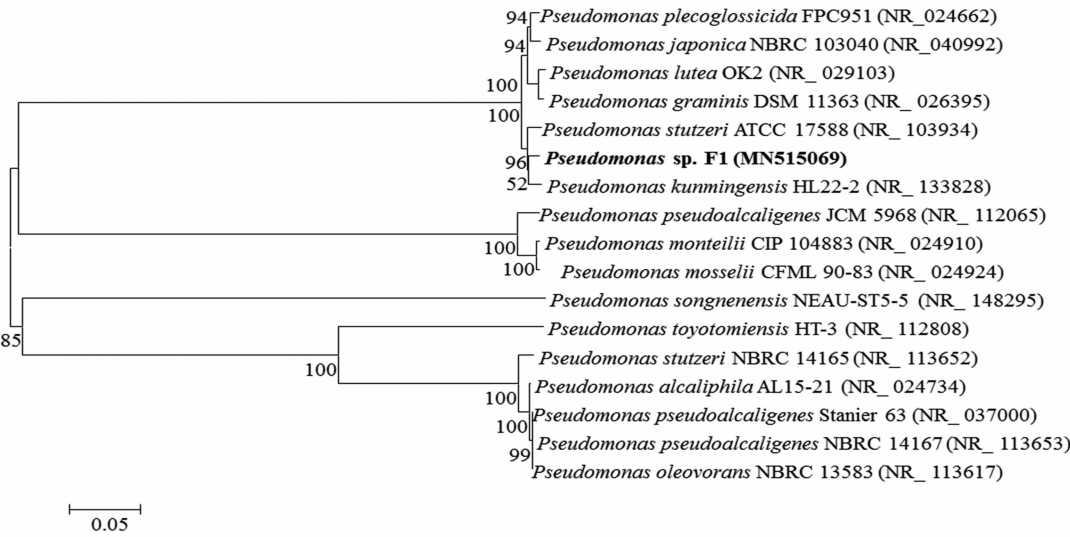
2 结果与分析

2.1 氟环唑降解菌的分离筛选

经过富集培养、梯度驯化、分离纯化等过程,得到 8 株可在含氟环唑的无机盐液体培养基中生长并可耐受 200 mg/L 氟环唑的菌株,通过初步降解试验发现,其中 1 株菌株能够以氟环唑为唯一碳源快速生长,且对氟环唑有较好的降解效果,将其命名为 F1。在 LB 固体培养基上,菌落呈白色突起、圆形、边缘整齐、质地光滑、黏稠。

2.2 菌种鉴定

菌株 F1 的 DNA 通过 PCR 扩增得到约 1.4 kb 的 16S rRNA 基因片段,对该基因片段进行测序,并将测序结果在 NCBI 上进行 Blast 同源性比对,结果表明,该菌株与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)相似度达 99%,将该菌株的 16S rRNA 序列提交至 GenBank,获得的登录号为 MN515069。使用 MEGA6.0 软件构建系统发育树,结果(图 1)发现,该菌株与昆明假单胞菌 *Pseudomonas kunmingensis* HL22-2 同源性最高。



进化枝的分枝部分的数字是 Bootstrap 概率值(1 000 次重复计算分配到该位置的百分比)。比例尺代表 16S rRNA 序列的每 100 个核苷酸发生 5 个核苷酸替代事件

图1 F1 与已知假单胞菌的系统发育树

2.3 降解菌的生长曲线

从图 2 可以看出,F1 菌株接入 LB 液体培养基培养 4 h 后进入对数生长期,10 h 后生长速度减缓,

到 14 h 时达到生长高峰。F1 菌株处于稳定生长期的时间为培养后 14~18 h。取处于稳定生长期的细菌制备成菌悬液母液,进行下一步氟环唑降解试验。

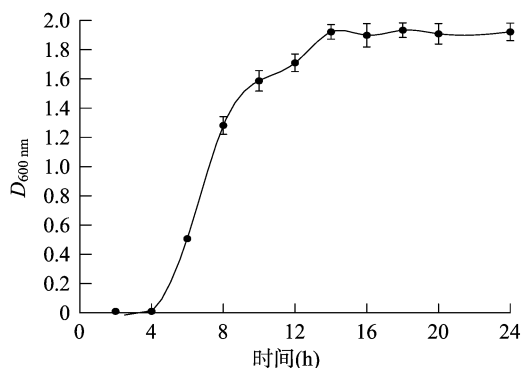


图2 菌株 F1 生长曲线

2.4 菌株 F1 对氟环唑的降解特性及其生长规律

从图 3 可以看出,在以 20 mg/L 氟环唑为单一碳源的无机盐液体培养基中,菌株 F1 的生长繁殖均以氟环唑为唯一碳源和能源,菌株在培养 0~4 d 内逐步生长繁殖,同时氟环唑被快速代谢;在培养 4 d 后因氟环唑含量降低,菌株生长进入衰退期(数量减少),氟环唑降解速率降低。在培养 4 d 时菌株 F1 数量达到最大值,其对氟环唑的降解率达 75.3%;至培养 6 d 时,氟环唑的残留量为 1.92 mg/L,降解率达到 90.4%,而在未接菌的处理中,氟环唑的自降解率仅为 12.8%,表明接菌处理组培养基中氟环唑浓度的下降主要是由于菌株 F1 的作用。

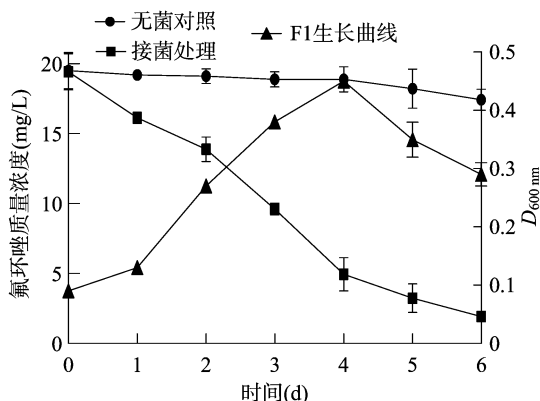


图3 菌株 F1 的生长曲线及氟环唑降解曲线

2.5 菌株 F1 对氟环唑降解条件的优化

2.5.1 温度和初始 pH 值对菌株 F1 降解氟环唑的影响

从图 4 可以看出,在 pH 值为 6.0~8.0 范围内,菌株 F1 对氟环唑的降解效率较高,最适初始 pH 值为 7.0, pH 值过高或者过低均会影响菌株的生长及对氟环唑的降解率。在相同 pH 值、不同温度(25~35℃)条件下,菌株 F1 在 25℃ 下生长较慢,对氟环唑的降解能力也最小;在 30℃ 下菌株 F1 对氟环唑降解效率最高,培养 6 d 后氟环唑降解率达 90.1%。

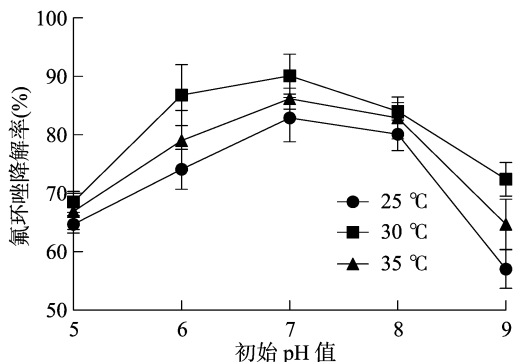


图4 不同温度和初始 pH 值条件下菌株 F1 对氟环唑的降解率

2.5.2 接菌量对菌株 F1 降解氟环唑的影响

从图 5 可以看出,在底物氟环唑浓度均是 20 mg/L 的无机盐液体培养基中,随着初始接菌量的逐渐增加,菌株 F1 对氟环唑的降解效率明显提高。接菌量(即无机盐培养基的 $D_{600\text{ nm}}$)在 0.05~0.50 范围内时,培养 6 d 后菌株 F1 对氟环唑的降解率为 22.0%~92.1%;其中当接菌量为 0.05 时,菌株 F1 的适应期延长,氟环唑降解缓慢;当接菌量分别为 0.10、0.20 时,菌株 F1 在培养 4 d 内快速降解氟环唑,随后降解速率变缓;而当接菌量为 0.50 时,菌株 F1 在培养 2 d 内快速降解氟环唑,之后降解速率变慢。

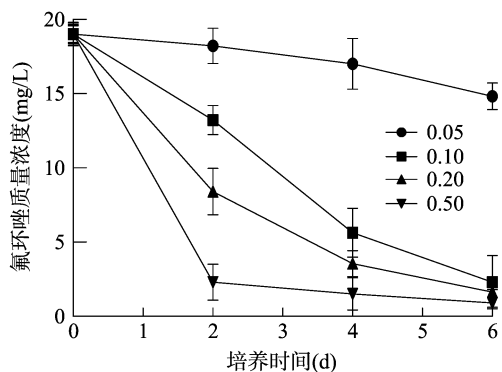


图5 不同接菌量下菌株 F1 降解氟环唑的动态曲线

2.5.3 氟环唑底物浓度对菌株 F1 降解氟环唑的影响

从图 6 可以看出,在菌株 F1 接菌量为 0.10、底物氟环唑的质量浓度为 5~50 mg/L 时,培养 6 d 后,随着初始氟环唑浓度的增加,降解率呈现先增加后降低的趋势。当底物浓度为 50 mg/L 时,推测由于底物浓度较大,菌株 F1 适应时期较长,导致培养 6 d 后氟环唑的降解率仅为 38%;当底物浓度低于或等于 20 mg/L 时,菌株 F1 快速降解氟环唑,培养 6 d 后降解率均高于 80%,表明该菌株对浓度低于或等于 20 mg/L 的氟环唑有较高的降解效果。

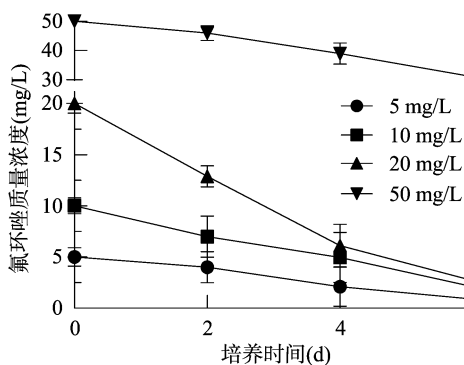


图6 不同氟环唑质量浓度下菌株 F1 降解氟环唑的动态曲线

3 结论与讨论

本研究在农药厂区污染土壤中采样,经过以氟环唑为唯一碳源的梯度驯化、分离纯化等步骤,得到 1 株对氟环唑降解性能较好的菌株 F1。经过 16S rRNA 同源性比较分析,初步鉴定该菌株属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),其亲缘关系与昆明假单胞菌 *Pseudomonas kunmingensis* 最为接近。目前已报道的三唑类(戊唑醇^[13]、丙环唑^[17]、多效唑^[24])农药降解菌大多属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。假单胞菌属细菌是从污染物中分离出的常见菌株,且大部分种属对人类危害较小,有望应用于三唑类农药污染环境的微生物修复。

本研究表明,菌株 F1 降解氟环唑的最佳环境条件是 pH 值为 6.0~8.0,温度为 30℃。细菌都具有一定的最适 pH 值和温度生长范围,其中温度通过控制微生物的酶促反应速率来影响降解菌的生长,进而影响降解菌对农药的降解速率^[22]。当氟环唑初始浓度为 20 mg/L,接菌量($D_{600\text{ nm}}$)为 0.1, pH 值为 7.0,温度为 30℃时,培养 6 d 后,氟环唑降解率达 90.4%。除以上影响因素外,能源物质的添加也可能影响微生物对农药的降解效率。Sarkar 等研究表明,葡萄糖作为碳源物质或硝态氮作为氮源物质的加入均能促进微生物对土壤中三唑类杀菌剂的降解作用^[17]。在氟环唑的降解过程中是否具有类似的规律,需要进一步研究。

菌株 F1 是 1 株降解氟环唑功效良好的降解菌,对主要影响因素适应性良好,但还需进一步研究该菌株介导的氟环唑代谢途径及降解氟环唑过程中起关键作用的酶或控制基因等。另外,该菌株对其他三唑类农药的降解效果如何还需要进一步研究。目前,国内外对氟环唑的生物降解研究尚无报道,本研究为三唑类农药氟环唑的生物降解提供了微

生物资源。该降解菌在已被氟环唑污染的化工废水及农田环境的生物修复中可能具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] 闫立单,顾松山,余强. 氟环唑的合成新工艺[J]. 中国农药, 2012(12):14-16.
- [2] 王新茹,赵建昌,白伟,等. 几种三唑类杀菌剂对小麦条锈病的防治效果[J]. 麦类作物学报,2008,28(4):705-708.
- [3] 邱勇波,张晓蕾. 杀菌剂氟环唑的合成新方法[J]. 化学试剂, 2017,39(2):218-220.
- [4] 刘丽秀,张鲁新,张亚敏. 氟环唑的合成工艺研究进展[J]. 山东化工,2009,38(4):28-30,41.
- [5] Taxvig C, Hass U, Axelstad M, et al. Endocrine-disrupting activities *in vivo* of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole [J]. Toxicological Sciences, 2007, 100(2):464-473.
- [6] Hester S, Moore T, Padgett W T, et al. The hepatocarcinogenic conazoles: cyproconazole, epoxiconazole, and propiconazole induce a common set of toxicological and transcriptional responses [J]. Toxicological Sciences, 2012, 127(1):54-65.
- [7] 吴文铸,郭敏,孔德洋,等. 3 种三唑类杀菌剂的环境降解特性[J]. 生态与农村环境学报,2016,32(5):837-841.
- [8] 顾晨凯,陈茜茜,陈猛,等. 自然条件下水中三环唑、氟环唑和苯醚甲环唑的非生物降解及其影响因素[J]. 环境化学,2014,33(1):30-36.
- [9] Singh D K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments [J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(1):35-40.
- [10] 滕应,骆永明,李振高. 污染土壤的微生物修复原理与技术进展[J]. 土壤,2007,39(4):497-502.
- [11] 吴红萍,万红艳,王锐萍. 戊唑醇农药降解菌的筛选及其降解效能初探[J]. 农药,2013,52(2):102-104.
- [12] 侯晓娟,赵巍巍,杨茜,等. 戊唑醇降解菌 B1 的培养基优化[J]. 吉林农业大学学报,2019,41(1):23-28.
- [13] Obanda D N, Shupe T F. Biotransformation of tebuconazole by microorganisms: evidence of a common mechanism [J]. Wood and Fiber Science, 2009, 41(2):157-167.
- [14] Sehnm N T, Souza-Cruz P, Peralba M D, et al. Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils [J]. Journal of Environmental Science and Health (Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes), 2010, 45(1):67-72.
- [15] Woo C, Daniels B, Stirling R, et al. Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by *Basidiomycetes*: a wood-based bioassay [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(5):403-408.
- [16] 李体文,魏朝俊,贾临芳,等. 丙环唑降解菌筛选的初步研究 [C]//农业环境与生态安全——第五届全国农业环境科学学术研讨会论文集,2013.
- [17] Sarkar S, Seenivasan S, Premkumar R. Biodegradation of propiconazole by *Pseudomonas putida* isolated from tea rhizosphere [J]. Plant Soil and Environment, 2009, 55(5):196-201.

张秀霞,王冬梅,李军涛,等. 1 株热带海洋光合细菌的筛选、鉴定及水质净化能力[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):278-281.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.050

1 株热带海洋光合细菌的筛选、鉴定及水质净化能力

张秀霞^{1,2}, 王冬梅¹, 李军涛¹, 胡永华¹, 郑佩华¹, 鲁耀鹏¹, 洗健安¹

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省海洋生物资源功能性成分研究与利用重点实验室, 海南海口 571101;

2. 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300392)

摘要:从西沙群岛永兴岛滩涂底泥中,通过富集分离纯化得到 1 株光合细菌(编号 YX-1),对菌株进行形态观察和生理生化特性分析,经 16S rDNA 鉴定为红假单胞菌。将该菌株接种到模拟富营养化养殖污水中,结果显示该菌株具有较强的 COD、氨氮和亚硝酸盐去除能力,优于阳性对照菌株,可开发应用于海南水产养殖污水的净化处理。

关键词:光合细菌;分离;养殖污水;净化

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)04-0278-04

光合细菌(photosynthetic bacteria, PSB)是一类具有光合色素、能在无氧条件下进行光合磷酸化的微生物,分布广泛,遍及江河、沼泽、湖泊、海洋、池塘及活性污泥和土壤中^[1],易培养,生长速度快,繁殖力和生命力强,与自然界的 C、N、S 化学循环有重要关系,在自然界自我净化过程中担负着重要角色,在污水净化、水产养殖、保健品研发、产氢、农业等多方面得到广泛应用^[2-3]。PSB 最初被应用于处理有机污水,后来逐渐引入应用到水产养殖当中。PSB 在水产养殖上的研究和应用主要集中在调控、改善和稳定养殖水体的水质^[4],防治疾病的发生及利用 PSB 作为生物饵料和营养性添加剂^[5-6]。

本研究从西沙群岛永兴岛滩涂底泥中富集并分离筛选出 1 株光合细菌菌株,对其形态学和生理

生化特性进行了分析,并对其在模拟的富营养化对虾养殖污水中的净化效果进行了研究,为其进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 试验使用饲料为本实验室自制对虾饲料,阳性对照菌为市售光合细菌产品。

1.1.2 试验试剂 PCR 扩增试剂购自 TaKaRa 公司,其他试剂购自广州化学试剂厂。

1.1.3 培养基配方

1.1.3.1 富集培养基 NaCl 2.00 g、MgSO₄·7H₂O 0.20 g、NH₄Cl 1.00 g、NaHCO₃ 2.00 g、KH₂PO₄ 1.75 g、CH₃COONa 3.00 g、酵母膏 1.00 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0^[7]。

1.1.3.2 分离培养基 培养基成分见表 1,按上储备液 A、B、D、E 配制好后用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.0,置于高压蒸汽灭菌锅中 121 ℃,灭菌 20 min,若配固体培养基则再添加 2% 琼脂粉,储备液 C、F 使用时在无菌超净工作台中用 0.22 μm

收稿日期:2018-12-05

基金项目:农业农村部财政专项(编号:NFXZ2018);天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金(编号:TJAE201808)。

作者简介:张秀霞(1982—),女,广东梅州人,硕士,工程师,主要从事水产健康养殖研究。E-mail:107265834@qq.com。

通信作者:洗健安,博士,副研究员,主要从事水产养殖生态及毒理学、水产动物营养与饲料学研究。E-mail:xian-ja@163.com。

[18]张凤霞,李学德,花日茂,等. 烯唑醇降解菌的分离筛选及降解特性研究[J]. 激光生物学报,2009,18(5):591-595,603.

[19]鹿文红. 三唑醇降解菌的筛选与降解特性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.

[20]蔡慧敏,曹之富,赵建庄,等. 苯醚甲环唑降解菌 BMJHZ-01 的分离鉴定及降解影响因素[J]. 农药学报,2015,17(5):590-595.

[21]郑金伟,何健,王哲,等. 苯醚甲环唑降解菌 B2 的分离、鉴定及其降解特性[J]. 中国环境科学,2009,29(1):42-46.

[22]田春燕,徐军,董丰收,等. 微生物降解三唑类杀菌剂研究进

展[J]. 农药学报,2016,18(2):141-150.

[23]Annastasiades M, Lehotay S J, Štajnbaher D, et al. Easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce[J]. Journal of AOAC International, 2003,86(2):412-413.

[24]Chen J, Xu L, Giesy J P, et al. Biodegradation of paclobutrazol by a microbial consortium isolated from industrially contaminated sediment[J]. Toxicological and Environmental Chemistry, 2010,92(8):1487-1494.