

克百威降解菌 CYW-44 的分离及其酶促降解研究

李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 李社增, 马 平

(河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 河北 保定 071000)

摘 要: 为了有效治理克百威农药污染, 以克百威为唯一碳源, 利用富集培养的方法从农药厂活性污泥中分离到一株克百威降解菌 CYW-44, 经生理生化、16S rDNA 序列分析及 API 50CHB 鉴定试剂条分析, 将菌株鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。该菌在营养培养基中培养 5 d 时对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的克百威降解率为 97.72%, 6 d 能够完全降解克百威。通过液相色谱 (HPLC) 法检测, 发现在降解过程中, 克百威降解产物呋喃酚及其他代谢产物不产生累积; 研究证实该菌株能分泌胞外降解酶和胞内降解酶高效降解克百威, 对克百威的降解率分别达到 99.1% 和 82.63%; 通过 SDS-PAGE 验证了克百威对菌株降解酶活性的诱导作用。

关键词: 克百威; 呋喃酚; 降解; 降解酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1672-2043(2010)增刊-0196-05

Isolation of A Novel Carbofuran-degrading Bacterium and Its Enzymatic Degradation of Carbofuran

LI Bao-qing, LU Xiu-yun, GUO Qing-gang, LI She-zeng, MA Ping

(Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China)

Abstract: As a carbofuran-degrading bacterium, the strain CYW-44 was isolated from activated sludge samples of the agro-chemistry factory through the batch culture enrichment technique. It was selected due to its rapid growth on carbofuran medium. Based on morphological, physiological and biochemical tests, 16S rDNA analysis and API strip test, the strain was identified as *Bacillus subtilis*. Carbofuran of $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration was degraded by the bacterium up to 97.72% within five days, and no carbofuran was detected in the sixth day. HPLC analysis results demonstrated that there was no accumulation of carbofuran phenol and the other metabolic intermediate during the degradation of carbofuran. Preliminary mechanism of degradation was investigated. Both ectoenzyme and endoenzyme of strain CYW-44 played significant roles during carbofuran degradation. SDS-PAGE analysis showed that a new protein band was found when strain CYW-44 grew on the carbofuran medium. It indicated that degradation activities of some enzymes could be induced by carbofuran.

Keywords: carbofuran; carbofuran phenol; degradation; degrading-enzyme

克百威 (Carbofuran) 是一种常用的高效广谱氨基甲酸酯类杀虫剂和杀螨剂, 在农业防治的同时给环境带来了严重的污染。生物降解是治理克百威污染的

一种切实有效方法。20 世纪 80 年代以来, 国外对克百威的微生物降解做了大量研究工作, 已见诸报道的降解菌主要有 *Achromobacter* sp.^[1]、*Arthrobacter* sp.^[2]、*Pseudomonas* sp.^[3-4]、*Flavobacterium* sp.^[5]、*Sphingomonas* sp.^[6-9] 等, 并利用分子手段对降解菌进行了研究^[10-12]。20 世纪 90 年代后, 随着欧美国家对克百威的禁用, 这一方面的研究日趋减少。国内克百威的使用情况还相当复杂, 对其生物降解的研究还十分有限^[4,9]。

收稿日期: 2009-04-17

基金项目: 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心科研基金项目 (ZBL-07-01); 河北省农业环境保护监测站研究项目

作者简介: 李宝庆 (1983—), 硕士, 研究实习员, 主要从事土壤农药污染降解及土壤有益微生物的研究。E-mail: lbq831228@hotmail.com

通讯作者: 马 平 E-mail: pingma88@126.com

本研究通过富集培养的方法筛选到一株能够降解克百威及其中间产物呋喃酚的高效降解菌 *Bacillus subtilis*, 初步研究证明其降解途径不同于以往报道的克百威降解菌。在此基础上, 开展了其生长特性和降解性能等方面的研究, 为利用微生物修复克百威造成的环境污染提供理论依据和新的试验材料。

1 材料与方法

1.1 培养基

基础培养基配方: K_2HPO_4 7.5 g, KH_2PO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 15 mg, NaCl 0.5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。灭菌后的培养基中加入 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的克百威作唯一 C 源。固体培养基在上述液体培养基中加入 1.2% 的琼脂。

LB 培养基配方: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.2 降解菌株的分离筛选

取采自山东华阳农药厂的活性污泥 10 g 接种于 100 mL 基础培养基中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡培养 1 周, 以 1% 的接种量转接入克百威浓度为 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新鲜培养基中继续培养, 以后每周转接 1 次, 克百威浓度逐步提高, 将浓度保持在 $500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养驯化 2 周, 最后在固体基础培养基上稀释涂板, 挑取单菌落。

1.3 降解菌株的鉴定

1.3.1 形态观察

菌株形态特征及染色方案参照《常见细菌系统鉴定手册》进行。

1.3.2 API 试剂盒鉴定

API 试剂条法^[13]对菌株 CYW-44 进行鉴定: 菌体培养 24 h, 用灭菌棉签蘸取细菌, 将细菌按照说明书方法接种到 API 50 CHB/E 培养基中, 然后将混有菌体的 API 50 CHB/E 培养基加入到试剂条各孔内, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 静置培养 48 h, 观察试剂条各孔颜色的变化。根据其颜色变化所标注各反应阴性或阳性, 反应结果在 API 细菌鉴定软件中进行搜索。

1.3.3 16S rDNA 序列分析

采用碱裂法提取细菌染色体总 DNA, 以染色体总 DNA 为模板, PCR 扩增 16S rDNA, 通用引物^[14]为: 27F ($5' - \text{AGAGTTTGATCMTGGCTCAG}$) 和 1492R ($5' - \text{TACGGYTACCTGTTACGACTT}$)。扩增产物用 PCR 产物回收试剂盒 (TaKaRa) 回收纯化, 委托北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序, 利用 BLAST

方法将所得测序结果与 GenBank 中相关序列进行比对。

1.4 菌株降解性能及克百威降解产物分析

菌株在 LB 培养基中培养 12 h, 以 1% 的接种量接入含有克百威 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LB 中, 每隔 1 d 用紫外分光光度计在 600 nm 下测定菌株 OD 值, 采用 HPLC 法测定菌株对克百威的降解率。以 HPLC 中峰面积表示其降解产物的量, 分析克百威降解过程中降解产物的累积情况。色谱条件为: 色谱柱 HC-C18; 流动相体积比为甲醇/水 = 70/30; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$; 流速 $1\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 测定波长 280 nm; 柱温为室温。

1.5 降解酶的分析

1.5.1 降解酶定位

菌株在克百威浓度为 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LB 中培养 3 d, $5\text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 细菌过滤器过滤, 收集无菌体过滤液和菌体。菌体用 pH7.0 的磷酸缓冲液悬浮, 超声波破碎, $5\text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 收集细胞碎片和上清液, 将上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 细菌过滤器过滤, 获得胞内提取液, 比较无菌体过滤液、细胞碎片和胞内提取液对克百威的降解率。

1.5.2 降解酶的诱导性

将菌株分别在 LB 和含 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 克百威的 LB 中培养 6 d。取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液, $12\text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗净菌体, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品缓冲液, 沸水煮 5 min, $12\text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 取上清液作 SDS-PAGE 凝胶电泳, 检测不同培养基条件下菌体产生蛋白的差异。

2 结果与分析

2.1 降解菌的分离与鉴定

从山东华阳农药化工厂活性污泥中筛选到 200 株克百威降解菌, 通过进一步试验从中优选出一株高效降解菌 CYW-44, 该菌为革兰氏阳性菌, 细胞杆状, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 明胶水解阳性, 淀粉水解阳性。16S rDNA 产物经测序拼接后获得 1 464 bp 的序列 (GenBank 登录号: EU282823), 通过 BLAST 比对, 结果表明菌株 CYW-44 的 16S rDNA 序列与多株芽孢杆菌同源性均在 98% 以上。API 50 CHB 试剂条鉴定结果在分析软件中检索, 得到“好的鉴定结果”: 与枯草芽孢杆菌鉴定百分值为 91.5%, T 值为 0.53, 结合形态特征及 16S rDNA 序列, 初步确定菌株 CYW-44 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

2.2 降解菌 CYW-44 降解性能及降解产物分析

2.2.1 菌株 CYW-44 生长降解曲线测定

菌株在 LB 中培养 12 h 后,接种到克百威浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新鲜培养基中,测得其生长及降解趋势。结果表明,培养 3 d 时,菌株生长量达到最高值,并在随后几天内维持在此水平;克百威的降解率随时间延长逐渐增高,培养 5 d 降解率为 97.72%,培养第 6 d 已经完全降解克百威(图 1)。

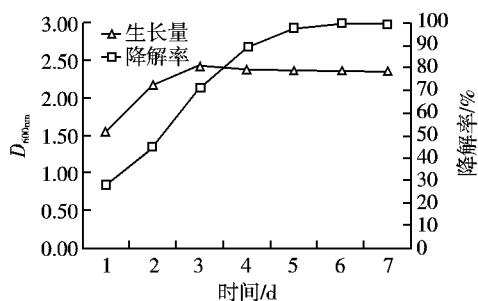
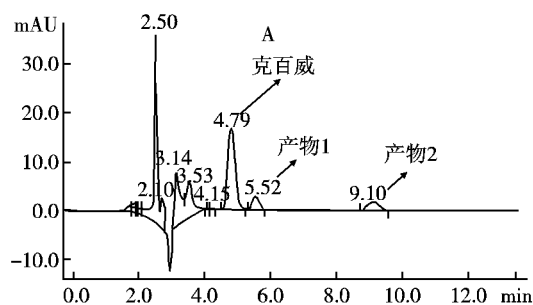


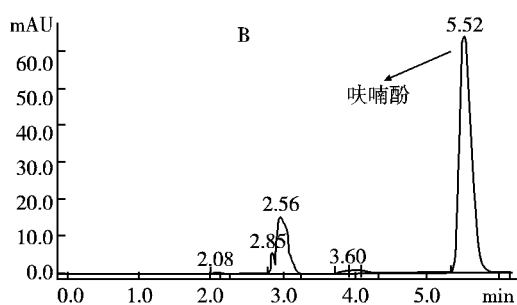
图 1 菌株 CYW-44 生长降解曲线

Figure 1 Growth curve and degradation of carbofuran by strain CYW-44



(A) 克百威及其降解产物的 HPLC

(A) HPLC chromatograms of carbofuran and its metabolite

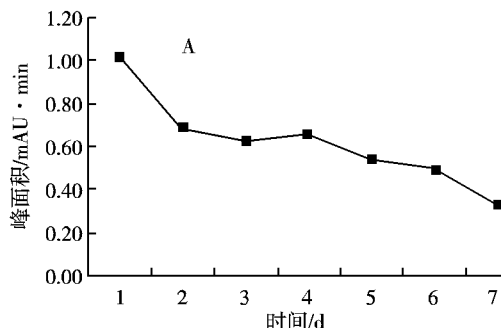


(B) 呋喃酚标准品的 HPLC

(B) HPLC chromatograms of carbofuran phenol

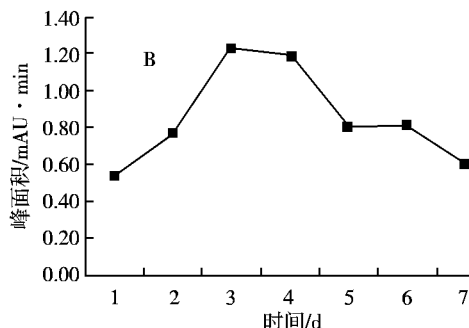
图 2 克百威降解产物 HPLC 分析

Figure 2 HPLC analysis of the culture extracts obtained from strain CYW-44 incubated with carbofuran



(A) 降解产物 1 的降解累积情况

(A) The accumulation of Product 1 in degradation of carbofuran



(B) 降解产物 2 的降解累积情况

(B) The accumulation of Product 2 in degradation of carbofuran

图 3 克百威降解产物含量变化

Figure 3 Variation of carbofuran metabolite content resulted by strain CYW-44

降解率的分析,发现胞内提取液对克百威的降解率为 82.63%,低于菌体对克百威的降解率,可能是由于超

2.2.2 克百威降解产物分析

克百威的保留时间为 4.79 min,经细菌降解后,在 5.52 min 和 9.10 min 处出现两个降解产物:产物 1 和产物 2。为了确定产物成分,用碱法^[5]处理克百威,克百威在碱性条件下分解为呋喃酚。HPLC 分析发现产物 1 与碱法处理克百威所得物质呋喃酚的保留时间一致,初步推测产物 1 为呋喃酚(图 2)。以峰面积表示其含量,检测克百威降解过程中呋喃酚的动态变化。结果表明,随着降解时间的延长,呋喃酚的含量也逐渐减少。该结果说明 CYW-44 在降解克百威的同时,降解产物呋喃酚也随之被降解,不形成次生毒性降解产物的累积。产物 2 的含量先增加,随后降低,分析可能是产物 1 呋喃酚的进一步降解产物,并且产物 2 也没有累积现象(图 3)。

2.3 降解酶的分析

2.3.1 降解酶的定位

通过对细菌培养过程中胞内外分泌物对克百威

声波处理破坏了胞内酶系统。破碎细胞不能降解克百威,即细胞质中不含降解酶。无菌体过滤液对克

百威的降解率达到 98.59%,说明在无菌体过滤液中含有降解酶。菌株 CYW-44 在降解克百威过程中使培养液的 pH 值升高,培养 3 d 时菌液 pH 值为 8.97。为了确定无菌体过滤液对克百威的降解不是因为培养液 pH 的变化,将上清液 pH 调到 7.0。通过检测,发现其对克百威的降解率亦达到 99.1% (表 1)。试验结果表明,菌株 CYW-44 对农药的降解是一个酶促降解的过程,通过降解酶的作用使克百威农药逐步降解,细菌在细胞内和细胞外均能分泌降解酶对克百威进行降解。

表 1 降解酶的分布检测

Table 1 Distribution of carbofuran-degrading enzyme in strain CYW-44

样品	降解率/%
无菌体过滤液 (pH8.97)	98.59
无菌体过滤液 (pH7.00)	99.1
破碎细胞	0
胞内提取液	82.63
对照	0.23

2.3.2 克百威对降解酶的诱导活性

通过 SDS-PAGE 法检测了菌株在两种培养基条件下产生的蛋白质情况,结果见图 4。在 LB 培养基中添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的克百威后,可诱导菌株蛋白产生一条新的条带,而菌株在 LB 中生长时没有检测到这条带,推测克百威诱导了这条蛋白条带的产生,并且该蛋白条带可能与降解酶有关系。

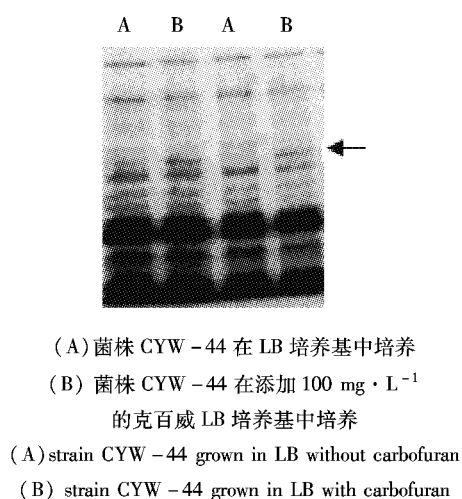


图 4 菌株 CYW-44 的 SDS-PAGE

Figure 4 Whole cell protein SDS-PAGE profiles of strain CYW-44

3 讨论

克百威降解产物之一为呋喃酚,其毒性比克百威大。一些研究的难题是微生物菌株只能将克百威降解为呋喃酚,而不能进一步对其进行降解^[15]。本研究也检测到了这种物质,但是随着降解时间的延长,呋喃酚也随之被降解,并不产生累积。呋喃酚的进一步降解产物也被逐渐降解,最终只检测到极其微量的各种降解产物。本试验中只是通过高效液相色谱的方法对克百威的降解产物进行了检测验证,但若确定其化学结构,还需要进行质谱分析。

微生物接触到农药后,农药能诱导微生物产生相关降解酶^[16],对农药进行降解,并利用农药作为碳源或氮源进行自身的菌体繁殖,同时达到降解农药的作用。本试验中菌株 CYW-44 在细胞内和细胞外均能产生降解酶对克百威进行降解,培养 3 d 时的胞外酶系已能完全降解 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的克百威,远高于单纯利用菌体对克百威的降解率。因此,利用生物方法来修复污染环境,高效的办法不是单纯利用菌体,而是在菌体发酵生产时适量加入相应农药以刺激其产生更多的降解酶,可通过固定化技术进一步处理细菌分泌的降解酶,对污染物进行高效降解。

此外,本研究还发现菌株 CYW-44 不仅能够有效降解克百威,而且对一些植物病原菌,如 *Rhizoctonia cerealis*、*Gibberella zeae*、*Fusarium oxysporum*、*Botrytis cinerea*、*Alternaria solani* 具有较好的抑菌效果。说明该菌是一株既可以降解克百威,又具生防潜力的多功能菌株。该菌株有望在农药污染修复和植物病害生防中得到广泛应用。

参考文献:

- [1] Tomasek PH, Karns JS. Cloning of a carbofuran hydrolase gene from *Achromobacter* strain WM11 and its expression in Gram-negative bacteria[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(7): 4038-4044.
- [2] Ramanand K, Sharmila M, Sethunathan N. Mineralization of carbofuran by a soil bacterium[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(8): 2129-2133.
- [3] Bano N, Musarrat J. Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 23(1): 13-17.
- [4] 刘宪华, 宋文华, 戴树桂. 呋喃丹降解菌 AEB13 的筛选及特性研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(11): 743-745.
Liu Xian-hua, Song Wen-hua, Dai Shu-gui. Study on screening and characteristics of superior strain AEB13 for degrading carbamate pesticides[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2003, 22(11): 743

- 745.
- [5] Head I M, Cain R B, Suett D L. Characterization of a carbofuran - degrading bacterium and investigation of the role of plasmid in catabolism of the insecticide carbofuran[J]. *Arch Microbiol*, 1992, 158: 302 - 308.
- [6] Feng X, Ou LT, Ogram A V. Plasmid mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (4): 1332 - 1337.
- [7] Ogram A V, Duan Y, Trabue S L, et al. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 32: 197 - 203.
- [8] IN SEON KIM, JI YOUNG RYU, HOR GIL HUR, et al. *Sphingomonas* sp. strain SB5 degrades carbofuran to a new metabolite by hydrolysis at the furanyl ring[J]. *Agric Food Chem*, 2004, 52(8): 2309 - 2314.
- [9] 武俊, 徐剑宏, 洪青, 等. 一株呋喃丹降解菌(CDS-1)的分离和性状研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(2): 338 - 342.
- Wu Jun, Xu Jian - hong, Hong Qing, et al. Isolation of a carbofuran degrading bacterium (CDS - 1) and its characterization [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(2): 338 - 342.
- [10] Desaint S, Arrault S, Siblot S, et al. Genetic transfer of the *med* gene in soil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95: 102 - 108.
- [11] Parekh N R, Hartmann Alain, Charnay M P, et al. Diversity of carbofuran - degrading soil bacteria and detection of plasmid - encoded sequences homologous to the *med* gene[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 17: 149 - 160.
- [12] Parekh N R, Hartmann A, Fournier J C. PCR detection of the *med* gene and evidence of sequence homology between the degradative genes and plasmids from diverse carbofuran - degrading bacteria[J]. *Soil Biol Biochem*, 1996, 28: 1797 - 1804.
- [13] Logan N A, Berkeley R C. Identification of *Bacillus* strains using the API system[J]. *J Gen Microbiol*, 1984, 130(7): 1871 - 1882.
- [14] Anderson C M, Haygood M G. α - Proteobacterial symbionts of marine bryozoans in the genus *Watersipora*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(1): 303 - 311.
- [15] Topp E, Hanson R S, Ringelberg, D B, et al. Isolation and characterization of an N - methylcarbamate insecticide - degrading methylotrophic bacterium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59 (10): 3339 - 3349.
- [16] Li Yang, Yu - hua Zhao, Bing - xin Zhang, et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6 - trichloro - 2 - pyridinol degrading bacterium[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 251: 67 - 73.