

一株多菌灵降解细菌的分离、鉴定及系统发育分析

张桂山¹ 贾小明^{1*} 马晓航¹ 周宏斌^{1,2} 程天凡¹

(¹ 浙江大学生命科学院 杭州 310029)

(² 广州出入境检验检疫局 广州 510623)

摘 要 从被多菌灵污染的湖南红壤土中分离到一株能以多菌灵为唯一碳源和能源生长的菌株 1-1, 该菌在含酵母膏多菌灵(500mg/L)的无机盐培养基中与无酵母膏的多菌灵(500mg/L)无机盐培养基中 24d 对多菌灵的降解率分别为 95.56% 和 19.16%。根据表型特征、G+C 含量及 16S rDNA 序列分析将菌株 1-1 鉴定为 β -Proteobacteria 中的 *Ralstonia* sp.(罗尔斯通氏菌)。

关键词 多菌灵, 生物降解, 16S rDNA, 罗尔斯通氏菌, 系统发育

中图分类号 Q939 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)04-0417-05

多菌灵(Carbendazim)是一种广谱、高效内吸性苯并咪唑类杀真菌农药, 国内外广泛应用于谷类、蔬菜、果树等植物的病害防治中。多菌灵化学性质稳定, 在环境中降解半衰期较长^[1], 能持久地残留在使用部位, 易致累积效应, 其在水果、植物、土壤中的残留可通过食物链影响人们健康。据研究多菌灵还有引起肝病^[2], 导致染色体畸变的作用^[3,4], 因而其在环境中的降解代谢也受到普遍关注。Fleeker^[5]等曾研究过多菌灵的光化学降解, 而多菌灵在环境中主要是通过生物降解^[6]。因此, 分离筛选能高效降解多菌灵的微生物是人们进行多菌灵环境污染治理、土壤生物修复的一种有效途径。但到目前为止, 有关多菌灵降解细菌的报道尚不多见^[7,8]。本文报道从多菌灵污染的湖南红壤土中分离到的一株多菌灵降解细菌 1-1 的分离、鉴定以及在系统发育中的地位, 以为多菌灵污染的生物修复和治理提供一些基础理论资料。

1 材料和方法

1.1 多菌灵降解细菌的富集、分离和纯化

在 75mL 不同浓度梯度的多菌灵富集培养液中分别加入 7.5g 土样, 30℃、200r/min 摇床培养 3d 后, 吸取 1mL 转接至相同浓度的多菌灵富集培养液中, 连续富集、转接 5 次后, 用接种环蘸取少许富集培养液, 在相同浓度的多菌灵分离纯化培养基平板上划线分离, 28~30℃ 培养, 待平板上出现单菌落后, 挑

取单菌落转接至多菌灵分离纯化斜面培养基上, 连续转接、传代 5 次, 仍能在多菌灵培养基上生长的菌种选用。

土样: 为多菌灵污染的湖南祁阳红壤土。多菌灵: 为江苏盐城利民化工厂产品, 纯度为 94.6%。**富集培养基**: NaCl 1.0g, K₂HPO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 1.0g, CaCO₃ 1.0g, 多菌灵(多菌灵先用少量稀盐酸溶解设 5 个浓度梯度, 分别为 200mg/L、400mg/L、500mg/L、600mg/L、800mg/L), 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。**分离纯化培养基**: NaCl 1.0g, K₂HPO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 1.0g, (NH₄)₂SO₄ 2.0g, CaCO₃ 1.0g, 多菌灵(5 个浓度梯度同富集培养基), 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

1.2 降解菌多菌灵降解能力测定

在 5 个含酵母膏和 5 个无酵母膏的多菌灵降解性试验培养基中以 2% 的接种量接入菌株 1-1, 同时做 5 个不接种(无菌水代替)对照。置于 30℃, 200r/min 摇床培养, 每隔 3d 测定各培养液中的多菌灵残留量。

多菌灵降解性试验培养基: NaCl 1.0g, K₂HPO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 1.0g, (NH₄)₂SO₄ 2.0g, CaCO₃ 1.0g, 酵母膏 0.15g, 多菌灵 500mg, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0。

1.3 多菌灵含量的测定

薄层紫外扫描法^[9]: 采用高效薄层层析硅胶板

基金项目 国家科技部社会公益研究专项资金项目(177-2-2)

* 通讯作者。Tel: 86-571-86971962; E-mail: jiaxiaoming@21cn.com

作者简介 张桂山(1976-)男, 安徽省寿县人, 硕士研究生。主要从事应用微生物学研究。E-mail: zhangguishan2003@yahoo.com.cn

收稿日期 2003-12-09, 修回日期 2004-04-12

GF254(青岛海洋化工厂产品,10cm×20cm)。取15mL多菌灵降解液到50mL锥形瓶中,加20mL二氧六环,在水浴上加热5min后加1mL乙酸,将此溶液冷却至室温,用G4砂芯漏斗过滤到50mL容量瓶中,用15mL二氧六环冲洗锥形瓶和玻璃砂芯漏斗,洗脱液放入容量瓶中,然后用二氧六环定容。每个样品取过滤液10μL在GF254薄层板上均匀点样,点样线距薄板底边3cm。在苯:丙酮:乙酸(70:30:5,V/V)液中展层,展开后取出待溶液完全挥发干。用岛津CS930双波长薄层扫描仪在260nm波长处扫描。并以同样步骤做多菌灵回收率试验和含量的标准曲线。检测限为3.5mg/L。回收率为94.56%。

1.4 分离菌株 1-1 的鉴定

分离菌株 1-1 的鉴定参照文献 [10] 进行。生理生化测定采用微量生理生化测定管(杭州天和微生物试剂厂产品),每管穿刺接种,每一测试指标重复3管,于30℃培养,定期观察结果。(G+C)mol%用带有加热装置的岛津UV-2550型紫外分光光度计测定热变性温度法(T_m)。

1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

取培养在LB培养基上24h的供试菌体少量,加入装有200μL无菌重蒸H₂O的Eppendorf管中,旋涡混匀后,沸水浴3min,12000r/min离心5min,上清液作为模板DNA直接用于PCR扩增。

用于16S rDNA的PCR反应的引物为一对通用引物^[11](由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。正向引物BSF8/20:5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3'(Escherichia coli对应位置为8~27);反向引物BSR1541/20:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'(E. coli对应位置为1541~1522)。

PCR反应体系(50μL)为:10×PCR缓冲液(含Mg²⁺)5μL,dNTP(5mmol/L)1μL,引物BSF8/20和引物BSR1541/20各1μL,模板DNA1.5μL,Taq酶2.5U,重蒸水40μL,石蜡油30μL。PCR程序为:94℃5min,94℃1min,50℃1min,72℃1min,循环29次;72℃10min。PCR产物的纯化和测序由上海博亚生物技术有限责任公司完成。

1.6 系统发育分析

将所得1420bp序列(GenBank登录号:AY571787)与GenBank中核酸数据进行BLAST分析,利用ClustalX 1.8.1^[12]进行比对,通过MEGA 2.1^[13]软件选用Kimura 2-parameter距离模型^[14]进行UPGMA分析生成系统发育树,发育树用Bootstrap法(1000次重复)检验。

2 结果和讨论

2.1 降解菌的分离和筛选

在多菌灵浓度为200mg/L、400mg/L、500mg/L的分离纯化培养基上均有菌落长出,且菌落形态非常相似。各菌落纯培养物经个体形态、革兰氏染色、鞭毛电镜等观察初步确定为同一种菌,取在多菌灵浓度为500mg/L的培养基上生长、编号为1-1的菌株作进一步鉴定和多菌灵降解性研究。

2.2 菌株 1-1 多菌灵的降解率

菌株 1-1 降解多菌灵的试验结果(图1)表明在有酵母膏的多菌灵培养基中培养24d后,多菌灵浓度从原来的500mg/L降至20.2mg/L,降解率达到95.96%,平均降解速率有19.99mg/(L·d)。而不加酵母膏的无机盐培养基中,24d后多菌灵浓度从原来的500mg/L降至404.2mg/L,降解率为19.16%,平均降解速率为3.99mg/(L·d)。这表明含有酵母膏促进了多菌灵的降解,这也与本试验观察到加入酵母膏能明显增进供试菌的生长现象相符。

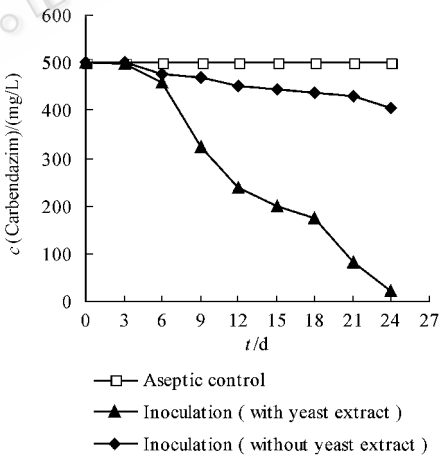


图1 菌株 1-1 对多菌灵的降解曲线
Fig.1 The degradation curves of carbendazim by strain 1-1 within 24d

Holtman等^[7]曾报道分离到6株革兰氏阳性的多菌灵降解细菌,经鉴定均为Rhodococcus erythropolis(红城红球菌)。其中有5株菌15d后能降解完无机盐培养液中16mg/L的多菌灵,平均降解速率为1.07mg/(L·d)。本研究分离到的菌株1-1的降解能力优于该菌。

2.3 菌株 1-1 的表型特征

菌株 1-1 为杆状,0.5μm~0.6μm×0.6μm~2.7μm,革兰氏染色阴性,无芽孢,能运动,周生鞭毛(图2)。在多菌灵为唯一碳源的分离纯化培养基上3~5d可形成1.1mm菌落,菌落为圆形,表面凸起、

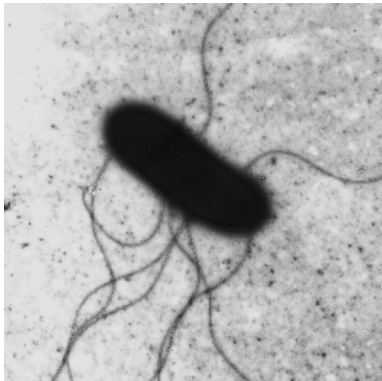


图 2 菌株 1-1 的负染电镜照片(12000 ×)

Fig. 2 Electron micrograph of negative-stained 1-1 cell with flagella
(12000 ×)

表 1 菌株 1-1 与 4 个罗尔斯通氏菌株的表型特征比较

Table 1 Phenotypic features of 4 *Ralstonia* strains and strain 1-1

	<i>R. pickettii</i> EY 3254 ^T	<i>R. solanacearum</i> EY 2181 ^T	<i>R. eutropha</i> EY 3798 ^T	<i>R. campinensis</i> WS2 ^T	Strain 1-1
Gram-negative rod-shaped	+	+	+	+	+
Motility	+	—	+	+	+
Flagellation	Polar mono	None	Peri	ND	Peri
Growth at 37℃	+	—	+	+	+
41℃	+	—	+	+	+
Growth : NaCl 0%	+	+	+	ND	+
NaCl 3%	—	—	+	ND	+
NaCl 5%	—	—	—	ND	—
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Urease	+	+	—	+	+
Arginine dihydrolase	—	—	+	—	+
Lysine decarboxylase	—	—	—	ND	+
Ornithine decarboxylase	—	—	—	ND	+
Alkaline (Acid) phosphatase	ND	ND	ND	+	+
NO ₃ to NO ₂	+	+	+	+	+
Denitrification	+	—	—	—	—
Fermentation of glucose	—	—	—	—	—
Indole	ND	ND	ND	—	—
Utilization : Galactose	+	—	—	ND	—
Citrate	—	+	+	—	—
D- & L-Arabinose	—	—	—	—	—
D-gluconate , L-malate	ND	ND	ND	+	+
Lactose	+	—	+	ND	—
Maltose	+	+	—	—	—
Mannose	+	+	—	—	—
Mannitol	—	—	—	—	—
Melezitose , Raffinose	—	—	—	ND	—
D-Ribose	+	—	+	ND	+
D-glucose	+	—	+	—	—
Mol% G + C of DNA	64	66.6	66.5	66.6 ~ 66.8	64.9

+ : Positive ; — : Negative ; ND : No datum ; *R.* : *Ralstonia* .

2.4 菌株 1-1 的系统发育分析

图 3 是根据菌株 1-1 的 16S rDNA 序列与相关属种 16S rDNA 序列构建的系统发育树。图中可见菌株 1-1 位于 *Ralstonia* 分支上 ,经同源性比较发现菌株 1-1 与罗尔斯通氏菌属模式种 *R. pickettii* 的 16S

光滑 ,透明 ,边缘整齐。培养基中加入酵母膏能促进其生长 ,在 LB 培养基上 1 ~ 2d 形成菌落 ,但菌落颜色不同于多菌灵培养基上的颜色 ,为乳白色 ,不透明 ,表面光滑。

分离菌株 1-1 氧化酶、过氧化氢酶、精氨酸双水解酶、赖(鸟)氨酸脱羧酶、酸(碱)性磷酸酶均为阳性 ,能利用苹果酸盐、葡糖酸盐、核糖 ,不发酵葡萄糖、甘露醇、乳糖。菌株 1-1 的(G + C)为 64.9mol%。菌株 1-1 同 *Ralstonia* (罗尔斯通氏菌) 4 个菌种^[15 , 16]的表型特征比较见表 1。

rDNA 序列相似性为 97% ,与 *R. campinensis* 同源性最高 ,达 99% 结合表型特征、G + C mol% 含量 ,可确定菌株 1-1 应归属于 Proteobacteria (变形菌门) β-Proteobac(β-变形菌纲)中的 *Ralstonia* sp.(罗尔斯通氏菌属)。

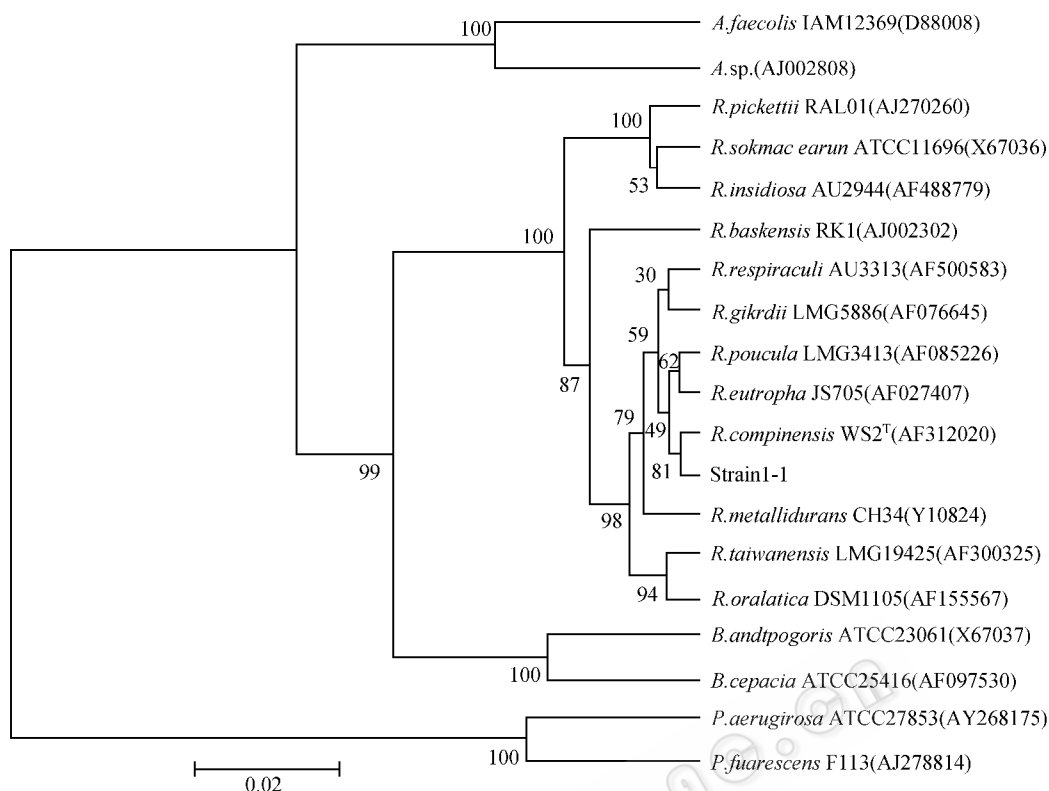


图3 基于多菌灵降解菌株 1-1 和亲缘关系相近的多菌灵降解菌株的 16S rDNA 序列的无根系统发育树

Fig.3 UPGMA phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain 1-1 and relating carbendazim-degrading species

Bootstrap values obtained with 1000 repetitions are indicated as percentages at all branches. GenBank accession numbers are in brackets. Abbreviation: A. *Alcaligenes*; B. *Burkholderia*; P. *Pseudomonas*; R. *Ralstonia*.

罗尔斯通氏菌属是 1995 年由 Yabuuchi 等建立的一个新属^[15],在 Bergey's 系统细菌学手册第一版中无该菌属。该属现已合格发表了 13 个种^[17],其中包括了能降解苯环化合物的菌株 *R. eutropha* JS705^[18](降解氯苯)和 *R. basilensis* RK1^[19](降解 2,6-二氯苯酚)。本文报道的分离菌株 1-1 是一株具有降解多菌灵性能的 *Ralstonia* sp.。

目前已报道的苯并咪唑类农药降解细菌仅见 *Pseudomonas* spp.^[8]和 *R. erythropolis*^[7]。*Pseudomonas* spp.与本文报道的菌株 1-1 同属于 Proteobacteria,但前者归属于 γ -Proteobacteria,后者归属于 β -Proteobacteria。而 *R. erythropolis* 则为高 G + C 的革兰氏阳性菌,分类学上属于 Actinobacteria(放线杆菌纲) Actinomycetales(放线菌目) Nocardiaceae(诺卡氏菌科) *Rhodococcus*(红球菌属),与菌株 1-1 的亲缘关系较远。

3 结论

分离菌株 1-1 能在多菌灵为唯一碳源和能源的培养基上生长,培养基中加入酵母膏可明显促进菌株 1-1 对多菌灵的降解,且其降解多菌灵的性能优

于已报道的 *Rhodococcus* spp.。

根据表型特征鉴定及系统发育分析,将菌株 1-1 归属为 β -Proteobacteria 中的 *Ralstonia* sp.,但该菌株目前尚不能定种,还需与模式种进行 DNA 杂交,根据同源性作进一步分析。本研究为多菌灵的生物降解提供了新的微生物资源。

致谢 农业部天津环科所曹仁林研究员提供了多菌灵标样。

参 考 文 献

- [1] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm>.
- [2] 潘尚任,邵鹤生,景锡南,等.多菌灵在大鼠体内转运过程的研究.核技术,1989,12:376-380.
- [3] Sarrif A M, Arce G T, Krahn D F, et al. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the *Salmonella*/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities. *Mutat Res*, 1994, 321:43-56.
- [4] Nakai M, Hess R A, Moore B J, et al. Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat. *J Androl*, 1992, 13:507-518.
- [5] Fleeker J R, Lacy H M. Photolysis of methyl-2-benzimidazole-carbamate. *J Agric Food Chem*, 1977, 25:51-55.

- [6] Yarden O , Salomon R , Katan J , *et al.* Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. *Can J Microbiol* , 1990 , **36** : 15 – 23 .
- [7] Holtman M A , Kobayashi D Y . Identification of *Rhodococcus erythropolis* isolates capable of degrading the fungicide carbendazim. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1997 , **47** : 578 – 582 .
- [8] Fuchs A , de Vries F W . Bacterial breakdown of benomyl. I. Pure cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* , 1978 , **44** : 283 – 292 .
- [9] 中国农业科学院植物保护研究所 , 等编著 . 农药分析 . 第八版 . 北京 : 化学工业出版社 , 1988 .
- [10] 东秀珠 , 蔡妙英 . 常见细菌系统鉴定手册 . 北京 : 科学出版社 , 2001 .
- [11] Devereux R , Willis S G . Amplification of ribosomal RNA sequences. In : Akkermans A D L , *et al.* ed. *Molecular Microbial Ecology Manual*. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers , 1995 , 3. 3.1 – 3.3.11 .
- [12] Thompson J D , Gibson T J , Plewniak F , *et al.* The ClustalX windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* , **24** : 4876 – 4882 .
- [13] <http://www.megasoftware.net/> .
- [14] Kimura M . A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* , 1980 , **16** : 111 – 120 .
- [15] Yabuuchi E , Kosako Y , Yano I , *et al.* Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. : proposal of *Ralstonia Pickettii* (Ralston , Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov. *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. . *Microbiol Immunol* , 1995 , **39** : 897 – 904 .
- [16] Goris J , de Vos P , Coenye T , *et al.* Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov. , *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basileensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2001 , **51** : 1773 – 1782 .
- [17] Euzéby J P . List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. (<http://www.bacterio.cict.fr/>) .
- [18] Van der Meer J R , Werlen C , Nishino S F , *et al.* Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** : 4185 – 4193 .
- [19] Steinle P , Stucki P , Stettler R , *et al.* Aerobic mineralization of 2 , 6-dichlorophenol by *Ralstonia* sp. strain RK1. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** : 2566 – 2571 .

Isolation , Identification and Phylogenetic Analysis of Carbendazim-degrading Bacterium Strain

ZHANG Gui-Shan¹ JIA Xiao-Ming^{1*} MA Xiao-Hang¹ ZHOU Hong-Bin^{1,2} CHENG Tian-Fan¹

(¹ College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

(² Guangzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Guangzhou 510623 , China)

Abstract : A bacterial strain 1-1 capable of utilizing carbendazim as the sole carbon and energy sources was isolated from carbendazim-contaminated Hunan red soil. The degradation rates of carbendazim by strain 1-1 were 19.16% and 95.56% in the carbendazim (500mg/L)-mineral medium and in the carbendazim (500mg/L)-mineral medium supplemented with yeast extract (150mg/L) within 24d , respectively. Strain 1-1 was identified as β -proteobacteria ; *Ralstonia* sp. based on the results of phenotypic features , G + C mol% and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences .

Key words : Carbendazim , Biodegradation , 16S rDNA , *Ralstonia* sp. , Phylogenetic analysis