# 丙酯草醚降解菌 CY 的分离、鉴定及其降解特性*

蔡志强[1,2**] 杨百科[1] 赵希岳[1] 陈巧丽[1] 王利群[1] 黄 磊[1] 叶庆富[2]

(1. 常州大学微生物与生物工程实验室, 常州, 213164;
2. 浙江大学, 原子核农业科学研究所, 农业部核农学重点开放实验室, 杭州, 310029)

**摘 要** 采用富集培养的方法,从施用过丙酯草醚除草剂的油菜田中分离筛选出 5 株以丙酯草醚(ZJ0273)为唯一生长碳源和能源的菌株,选其中降解率高的菌株 CY 进行研究. 根据其生理生化和 16S rRNA 基因序列相似性分析,鉴定其为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.). 根据对 CY 的初步研究和简单优化,菌株 CY 在 30 d 内对 50 mg·L$^{-1}$ ZJ0273 的降解率达到 55.1%,该菌株降解 ZJ0273 的最适初始 pH 值为 8.0,最适温度为 35 ℃. 菌株 CY 对 ZJ0273 的降解效果与初始接种量在一定范围内呈正相关,当初始浓度 > 400 mg·L$^{-1}$时,ZJ0273 降解率偏低.

**关键词** 丙酯草醚, 芽孢杆菌属, 16S rRNA, 生物降解, 降解特性.

丙酯草醚(ZJ0273),化学名称 4-(2-(4,6-二甲氧基-2-嘧啶氧基)苄胺基)苯甲酸正丙酯,是我国研发的具有自主知识产权的农药新品种,属于嘧啶水杨酸类除草剂,该除草剂已获得多项国内外发明专利[1-2],其作用机理是乙酸乳酸合成酶(acetolactate synthase)抑制剂[3-5],属缓效性除草剂,主要用于防除油菜阔叶杂草和禾本科杂草,具有较好的应用前景[6-8]. 主要复配品种有 10% 丙酯草醚乳油(EC,商品名:油力)和 10% 丙酯草醚悬浮剂(SC,油力 2 号).

关于 ZJ0273 在环境中的归宿也日益引起人们的重视,ZJ0273 易与土壤形成结合残留,在微生物的作用下,在土壤中矿化为 $CO_2$. ZJ0273 在不同土壤中的半衰期也不一样,这与土壤理化性质和当地环境有直接关系[9-10]. 王伟等[11]研究发现 ZJ0273 在土壤中的迁移和淋溶较慢,属不易移动农药. 余志扬等[12]研究表明 ZJ0273 进入土壤后容易被土壤吸附,不易再发生解吸. Han 等[13]研究表明 ZJ0273 在土壤中可通过生理与化学作用或者生物化学过程分解,施用过 ZJ0273 的田地不易续种大米等作物. 随着 ZJ0273 浓度的提高,影响油菜的生长及产量[14]. 目前,农药的不合理使用给生态环境和人类健康造成很大的危害,利用微生物对农药的生物降解是最理想的途径,且不会产生二次污染,人们已从自然界中分离出许多降解农药的微生物,主要包括细菌、真菌、放线菌和藻类等[15-17].

本论文从土壤中分离筛选出一株具有降解 ZJ0273 的菌株 CY,对其降解特性作了初步研究,结果可为 ZJ0273 残留环境的生物修复提供理论依据和菌株资源.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试土壤取自江苏省常州市某地长期使用丙酯草醚的油菜田(表层 5—15 cm),4 ℃保存至实验所用. 原药丙酯草醚由中国科学院上海有机化学研究所提供,化学纯度为 98.6%.

基础培养基(MM,g·L$^{-1}$):$K_2HPO_4$ 5.17,$KH_2PO_4$ 1.70,$(NH_4)_2SO_4$ 2.63,盐溶液 10 mL,pH 7.0—7.2(固体 MM 需加 15—20 g 的琼脂). ZJ0273 在 MM 灭菌后,冷却至 50 ℃左右加入.

盐溶液(g·L$^{-1}$):$MgSO_4$ 19.5,$MnSO_4$ 5,$FeSO_4$ 5,$CaCl_2$ 0.3.

2010 年 10 月 15 日收稿.

* 国家自然科学基金(面上项目 10775118,重点项目 20632070);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX3-SYW-203-03);农业部公益性行业科研专项(200803034);常州市科技基金项目(20092008)资助.

* * 通讯联系人, Tel: 0519-86330256; E-mail: zhqcai@cczu.edu.cn

LB 培养基($g\cdot L^{-1}$):蛋白胨 10,酵母膏 5,NaCl 5,pH 7.0—7.2(固体 LB 需加 15—20 g 的琼脂).

丙酯草醚原药浓度 20000 $mg\cdot L^{-1}$. 本实验所用药品为分析纯试剂.

1.2 菌株的分离和筛选

取土样 5 g 加入到含 ZJ0273(200 $mg\cdot L^{-1}$)的 100 mL MM 中,于 30 ℃,130 $r\cdot min^{-1}$摇床中富集培养,每隔 6 d 取培养液接种到相同的富集培养基中,转接量为 10%($V/V$),连续转接 6 次,然后取 100 μL 富集培养液梯度稀释,取合适的浓度涂布于含 ZJ0273(200 $mg\cdot L^{-1}$)的 MM 平板中,30 ℃培养 6 d. 挑取具有不同形态特征的单菌落接种于 MM 平板(同上),连续划线纯化培养 10 次,得到 5 株纯化菌株;然后把纯化菌株接种于 LB 培养基增殖培养 15 h($OD_{600}$ = 1.900),取菌液 2 mL 离心,菌体加入到 20 mL 含 ZJ0273(200 $mg\cdot L^{-1}$) MM 中,于 30 ℃,130 $r\cdot min^{-1}$的摇床中振荡培养 15 d,萃取并 HPLC 测定其降解效果,选取降解效果高的菌株 CY 进行研究.

1.3 菌株 CY 的鉴定

菌株形态及生理生化特性分析参照文献[18]进行. 菌株 16S rDNA 基因的扩增及序列测定委托宝生物工程(大连)有限公司完成. 实验方法如下:(1)变性:菌体置于 50 μL Lysis Buffer 中变性,反应条件:80 ℃,15 min,然后离心取上清液作为模板. (2)50 μL PCR 反应体系:上述变性反应液 1 μL,PCR Premix 为 25 μL,Forward primer ($2\times10^{-8}$ $mol\cdot\mu L^{-1}$)为 0.5 μL,Reverse primer2 ($2\times10^{-8}$ $mol\cdot\mu L^{-1}$)为 0.5 μL,16S-free $H_2O$ 为 23 μL. (3)PCR 扩增条件:94 ℃,5 min;94 ℃,1 min;55 ℃,1 min;72 ℃,1.5 min;循环 30 次,72 ℃延伸 5 min.

1.4 菌株的培养与菌悬液的配制

从冰箱中取出保存的菌株接种于 100 mL LB 液体培养基,置于 30 ℃,130 $r\cdot min^{-1}$的摇床中振荡培养 15 h,再按 3% 接种量重新接种至 100 mL 新鲜无菌 LB,培养 15—18 h,($OD_{600}$ = 1.900). 取适量上述菌液,离心(4000 $r\cdot min^{-1}$,10 min)并用无菌生理盐水洗涤菌体,离心去上清液后的菌体作为需添加的菌株.

1.5 残余 ZJ0273 的提取和测定

ZJ0273 的提取:将摇床中三角瓶中的培养液(20 mL)转入 100 mL 分液漏斗中,分别添加二氯甲烷 60 mL(体积比为 1:3)萃取两次,摇荡 2 min,静置分层出有机相后,收集和合并二氯甲烷相于圆底烧瓶中,置旋转蒸发仪中蒸发至干(水浴温度约为 50 ℃),准确移取无水甲醇 20 mL 溶解,高效液相色谱测定.

ZJ0273 含量的测定:采用 HPLC 法,以外标法定量. HPLC 测定色谱的条件:色谱柱:Arcus EP-C18,4.6 mm × 150 mm,5 μm;柱温:室温;检测器:UV(Waters 248);流动相($V:V$) = 甲醇(色谱级):水(双蒸水) = (90:10,$V:V$);检测波长:254 nm;流速:0.8 $mL\cdot min^{-1}$;进样量:20 μL.

$$X(\%) = C_K / C_{CK} \times 100\%$$

式中,$X$: 残留率,$C_{CK}$:空白对照样品残留浓度($mg\cdot L^{-1}$),$C_K$:处理样品残留浓度($mg\cdot L^{-1}$).

1.6 ZJ0273 回收率的测定

为了评估 ZJ0273 在 MM 中的回收率,移取适量 20000 $mg\cdot L^{-1}$的 ZJ0273 原药溶液添加至 MM 中,得到一系列含不同浓度(50 $mg\cdot L^{-1}$、100 $mg\cdot L^{-1}$、200 $mg\cdot L^{-1}$、400 $mg\cdot L^{-1}$)ZJ0273 的 MM,按照 1.5 中提取方法,萃取 ZJ0273(3 个重复),HPLC 测定 ZJ0273 在 MM 中的回收率.

## 2 结果与讨论

2.1 ZJ0273 降解菌的筛选分离与生理生化特性

在含 ZJ0273 的 MM 平板上,挑取 5 株不同形态特征的菌株,做降解预试验,测定培养 15 d 后菌株对 ZJ0273 的降解率(表 1),选取降解率高的菌株 CY 作为实验菌株,对其生理生化特性和降解特性进行初步研究.

**表 1**　5 株菌株对 ZJ0273 的初步降解率及其形态特征

**Table 1**　The morphology and initial degradation rate of ZJ0273 by five strains

| | BQ80 | PT12 | W13 | W73 | CY |
|---|---|---|---|---|---|
| 降解率/% | 7.08 | 11.95 | 14.16 | 15.93 | 24.11 |
| 镜检 | 球形 | 杆状 | 杆状 | 球形 | 短棒状 |

菌株 CY(图 1):细胞呈短棒状((2—4 μm) ×(1—1.3 μm)),革兰氏染色阳性,产芽孢,端生鞭毛,氧化酶、过氧化氢酶呈阳性,硝酸盐还原、吲哚反应呈阴性,V. P. 和 M. R. 试验阴性,液化明胶,水解淀粉,产 $H_2S$,葡萄糖发酵产酸、氧化不产酸不产气.

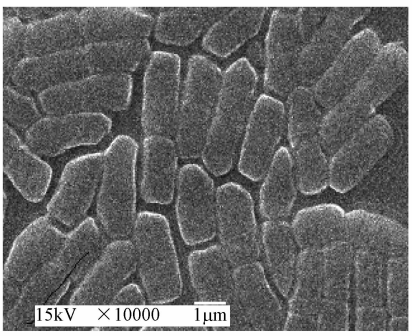


**图 1**　CY 的电镜照片( ×10000)

**Fig. 1**　Electron microscopic photo of strain CY( ×10000)

2.2　降解菌株 CY 的进化分析

以菌株 CY 总 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1427 bp 的扩增产物,根据宝生物工程(大连)生物有限公司的测序结果,测序后在 GenBank 登录,利用 BLAST 软件分析,和 Clustalx1.81 进行对比,与其它菌株的 16S rRNA 基因的同源性进行比较表明,菌株 CY 与 *B. flexus*(登录号:FJ861081.1)等的同源性在 99% 以上. 结合生理生化特性将 CY 鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),应用MEGA4.1 软件采用邻接法构建系统发育树(图 2),用 Bootstrap 进化分析(重复 1000 次).

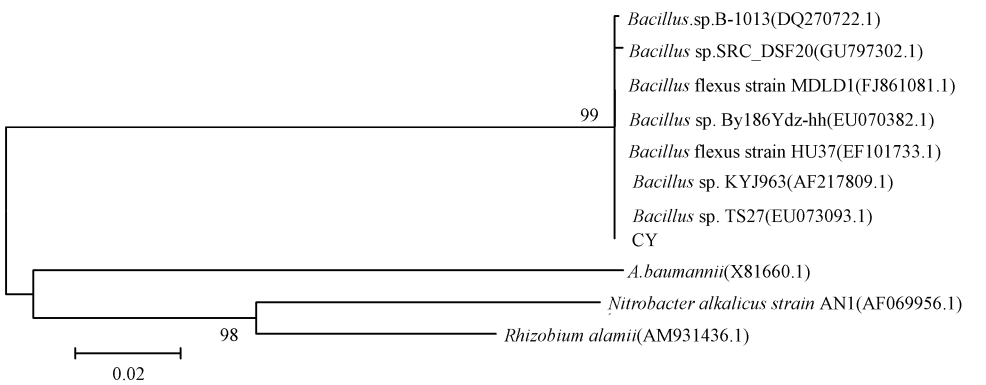


**图 2**　菌株 CY 的系统发育树

**Fig. 2**　Phylogenetic tree of strain CY

2.3　ZJ0273 回收率分析

ZJ0273 在 MM 中的回收率及变异系数如表 2 所示,其回收率均在 92.1%—100.3% 之间,变异系数在 0.3%—6.7% 之间.

2.4　培养基初始 pH 对菌株 CY 降解 ZJ0273 的影响

在 ZJ0273 浓度为 200 $mg \cdot L^{-1}$,初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 MM(20 mL)中,将接种

量为10%的菌液($OD_{600}$=1.900)离心.离心后菌体接入到上述MM中,置于30 ℃,130 r·min$^{-1}$摇床中培养30 d,每隔5 d取出样品(同时重复2个),测定ZJ0273的残留量,如图3所示,在MM中,当pH值为8.0时,CY对ZJ0273降解效果最好,pH值为6—7时,降解效果较好,当pH≤5或pH≥9时,菌株CY对ZJ0273的降解力明显降低.

**表2** ZJ0273的回收率

**Table 2** The recovery of ZJ0273 in culture medium

| 添加浓度/(mg·L$^{-1}$) | 回收率/% | | | 平均值/% | 变异系数(CV)/% |
|---|---|---|---|---|---|
| | Ⅰ | Ⅱ | Ⅲ | | |
| 50 | 90.7 | 103.5 | 95.0 | 96.4 | 6.7 |
| 100 | 105.5 | 98.5 | 94.2 | 99.4 | 0.3 |
| 200 | 105.0 | 98.6 | 97.3 | 100.3 | 4.1 |
| 400 | 96.5 | 85.8 | 94.1 | 92.1 | 6.1 |

2.5 温度对菌株CY降解ZJ0273的影响

在ZJ0273浓度为200 mg·L$^{-1}$的MM(20 mL)中,将接种量为10%的菌液($OD_{600}$=1.900)离心,离心后的菌体接入到上述MM中,分别置于20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、130 r·min$^{-1}$的摇床中培养30 d,每隔5 d取出样品(同上),测定ZJ0273的残留量.结果如图4所示,菌株降解适宜温度为25 ℃—35 ℃,当温度在35 ℃时,其降解效果最好,降解率达到53.4%;当温度≤20 ℃和温度≥40 ℃时,菌株对ZJ0273降解效果较差,原因可能是CY在此温度区间降解酶受到抑制而失活.

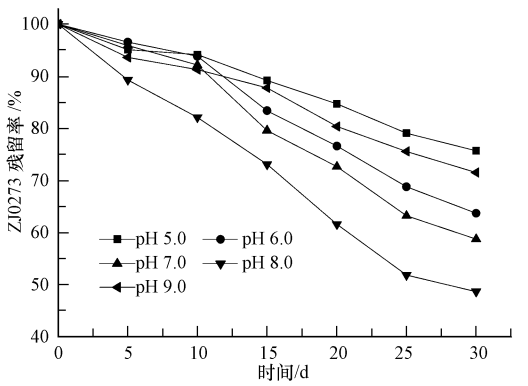


**图3** 培养基初始pH值对CY降解ZJ0273的影响

**Fig. 3** Effect of initial pH of culture medium on ZJ0273 degradation by strain CY

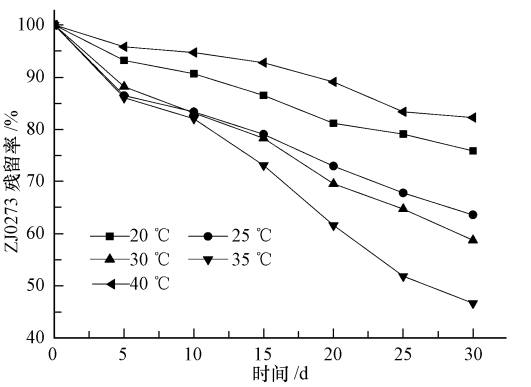


**图4** 温度对菌株CY降解ZJ0273的影响

**Fig. 4** Effect of temperature on ZJ0273 degradation by strain CY

2.6 接种量对菌株CY降解ZJ0273的影响

在ZJ0273浓度为200 mg·L$^{-1}$的基础培养基中,分别以3%、7%、10%、15%、20%的接种量处理,置于35 ℃,130 r·min$^{-1}$的摇床中培养30 d,测定ZJ0273的残留量.由图5可知,接种量为3%—10%时,ZJ0273的降解率随着接种量的增加而增大;当接种量≥10%时,ZJ0273的降解率逐渐趋于稳定.

2.7 农药起始浓度对菌株CY降解ZJ0273的影响

将接种量为10%的菌液($OD_{600}$=1.900)离心,离心后的菌体接入到含不同浓度(50 mg·L$^{-1}$、200 mg·L$^{-1}$,400 mg·L$^{-1}$)ZJ0273的MM(20 mL)中,置于35 ℃,130 r·min$^{-1}$的摇床中振荡培养30 d,同时做空白对照(50 mg·L$^{-1}$),每隔5 d取出样品(同上),测定ZJ0273的残留量,结果如图6所示,随着浓度的升高,CY对ZJ0273的降解能力逐渐降低.当浓度50 mg·L$^{-1}$和200 mg·L$^{-1}$,降解率分别达到55.1%和53.4%;当浓度≥400 mg·L$^{-1}$时,菌株CY对ZJ0273的降解受到抑制.

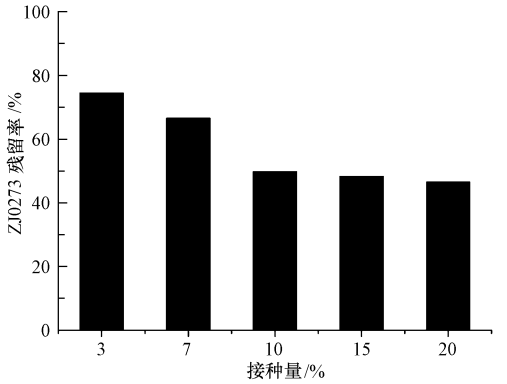


**图 5**　接种量对菌株 CY 降解 ZJ0273 的影响

**Fig. 5**　Effect of inoculating rate on ZJ0273 degradation by strain CY

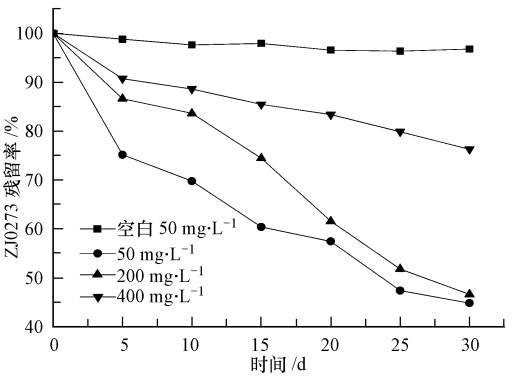


**图 6**　ZJ0273 起始浓度对 CY 降解 ZJ0273 的影响

**Fig. 6**　Effect of initial ZJ0273 concentration on ZJ0273 degradation by strain CY

## 3　结论

(1) 从油菜田土壤中分离出 5 株以 ZJ0273 为唯一碳源和能源生长的菌株,筛选出一株降解率高的菌株,命名为 CY,经形态观察、生理生化特征及 16S rRNA 序列鉴定出其属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.).

(2) 根据初步研究,CY 降解 ZJ0273 的最适 pH 值为 8.0,最适温度 35 ℃,降解效果与初始接种量在一定范围呈正相关; 随着 ZJ0273 浓度的升高,CY 对 ZJ0273 的降解能力逐渐降低;最佳条件下,30 d 内菌株 CY 对 ZJ0273 的降解率为 55.1%.

### 参　考　文　献

[1] 吕龙,陈杰,吴军,等. 2-嘧啶氧基-N-芳基苄胺衍生物、制备方法及应用[P]. WO 02/34724 A1, 2002

[2] Lu L, Chen J, Wu J, et al. New 2-pyrimidinyloxy-n-aryl-benzylamine derivatives, their processes and uses[P]. EP1327629, 2007

[3] 陈杰,袁军,刘继东,等. 新型除草剂丙酯草醚的作用机理[J]. 植物保护学报,2005,32(1):48-52

[4] Zhao dandan, Liu yong li, Lan dawei, et al. Effects of novel herbicide ZJ0273 on acetolactate synthase activity in oilseed rape and circkweed[J]. Journal of Zhejiang University(Agric. &Life Sci),2009,35(6):633-638

[5] Zhang F, Jin Z L, Naeem M S, et al. Spatial and temporal changes in acetolactate synthase activity as affected by new herbicide ZJ0273 in rapeseed, barley and water chickweed[J]. Pesticide Biochemistry and physiology,2009,95(6):63-71

[6] 陈仕高,谢雪梅,蒲正国,等. 10% 丙酯草醚 EC 防除油菜杂草效果及药害分析[J]. 农药,2007,46(3):199-201

[7] 唐庆红,陈杰,沈国辉,等. 油菜田新型除草剂丙酯草醚的应用技术[J]. 植物保护学报,2006,33(3):328-332

[8] 付群梅,董德臻,吕龙,等. 丙酯草醚在土壤中的残留及结后茬作物的安全性[J]. 农药,2009,1(1):50-52

[9] Wang Haiyan, Ye Qinfu, Yue Ling, et al. Kinetics of extractable residue, bound residue and mineralization of a novel herbicide, ZJ0273, in aerobic soils[J]. Chemosphere, 2009,76(8):1036-1040

[10] Wang Haiyan, Yu Zhiyuan, Yue Ling, et al. Transformation of $^{14}$C-pyrimidynyloxybenzoic herbicide ZJ0273 in aerobic soils[J]. Science of the Total Environment, 2010,408(10):2239-2244

[11] 王伟,岳玲,丁炜,等. [A 环-U-$^{14}$C]丙酯草醚在土壤中的迁移和淋溶[J]. 核农学报,2007,21(3):283-286

[12] 余志扬,岳玲,汪海燕,等. [A 环-U-$^{14}$C]丙酯草醚在土壤中的吸附与解吸特性研究[J]. 核农学报,2008,22(3):324-328

[13] Han Ailiang, Yue Ling, Li Zheng, et al. Plant availability and phytotoxicity of soil bound residues of herbicide ZJ0273, a novel acetolactate synthase potential inhibitor[J]. Chemosphere, 2009,77(7):955-961

[14] Jin Z L, Zhang F, Ahmed Z I, et al. Differential morphological and physiological responses of two oilseed *Brassica* species to a new herbicide ZJ0273 used in rapeseed fields[J]. Pesticide Biochemistry and Physiolog,2010,98(1):1-8

[15] 曾斌,宁大亮,王慧. 白腐真菌降解五氯酚的初步研究[J]. 环境化学,2008,27(2):181-185

[16] 尤民生,刘新. 农药污染的生物降解与生物修复[J]. 生态学杂志,2004,23(1):73-77

[17] 彭丽花,任源,邓留杰,等.间甲酚降解菌 *Citrobacter farmeri* 的降解特性及代谢途径解析[J].环境化学,2009,28(1):44-48
[18] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:353-398

# ISOLATION, IDENTIFICATION AND DEGRADATION CHARACTERISTICS OF A HERBICIDE ZJ0273-DEGRADING STRAIN CY

*CAI Zhiqiang*[1,2] *YANG Baike*[1] *ZHAO Xiyue*[1] *CHEN Qiaoli*[1] *WANG liqun*[1]
*HUANG Lei*[1] *YE Qingfu*[2]

(1. Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Changzhou University, Changzhou, 213164, China;
2. Institute of Nuclear Agricultural Science/ Key Lab. of Nuclear-Agricultural Science, Ministry of Agriculture, Zhejiang Uviversity, Hangzhou, 310029, China)

## ABSTRACT

Propyl (4-(2-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yloxy)benzylamino)benzoate(ZJ0273) is a new herbicide used in the rapeseed fields. Five strains which utilize ZJ0273 as sole carbon and energy source were isolated from ZJ0273-used soil in oilseed fields by selective enrichment culture, and a CY strain most capable of degrading ZJ0273 was selected. Based on its physiological and biochemical characteristics and phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences, the strain was identified as *Bacillus* sp.. When the initial concentration of ZJ0273 was 50 $mg \cdot L^{-1}$ in the basic medium, the degradation rate of ZJ0273 within 30 days was 55.1% by strain CY. The optimal intial pH of culture medium and temperature were 8.0 and 35 ℃ respectively. The degradation rate of ZJ0273 by strain CY showed a positive correlation with inoculating rate within a certain range, and the degradation rate was lower when initial concentration of ZJ0273 was more than 400 $mg \cdot L^{-1}$.

**Keywords**: ZJ0273, *Bacillus* sp., 16S rRNA, biodegradation, degradation characteristics.