

浓香型白酒糟醅中农药降解菌的筛选及多样性分析

Selection and diversity of pesticide-degrading bacteria isolated from
Zaopei of Luzhou-flavor Liquor

冯瑞章^{1,2} 周万海² 游玲^{1,2} 魏琴^{1,2} 舒媛¹

FENG Rui-zhang^{1,2} ZHOU Wan-hai² YOU Ling^{1,2} WEI Qing^{1,2} SHU Yuan¹

(1. 宜宾学院生命科学与食品工程学院, 四川 宜宾 644000; 2. 固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644000)

(1. College of Life Science and Food Engineering, Yibin University, Yibin, Sichuan 644000, China;

2. Solid-State Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin, Sichuan 644000, China)

摘要:通过富集培养和平板初筛,从浓香型白酒糟醅中分离筛选可降解农药的微生物菌株,并进行 16S rRNA 基因序列系统发育分析。结果显示:52 株分离菌株中,可降解丙环唑、莠去津和 2,4D 丁酯的菌株分别为 25,10,17 株,其中 51 株菌分属于 *Bacillus*、*Lysinibacillus*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Brevibacillus* 和 *Stenotrophomonas* 6 个属的 22 个模式菌株,1 株菌与 *B.thuringiensis* 的序列相似度为 97.3%,可能是该菌株的变种;*Bacillus* 是可以降解 3 种农药的共有属和优势属(37 株,占总菌数的 71.2%),*Stenotrophomonas* 和 *Brevibacillus* 分别为降解莠去津和 2,4D 丁酯的特有属。

关键词:白酒糟醅;农药降解菌;筛选;多样性

Abstract: The pesticide-degrading bacteria was isolated and selected from Zaopei of Luzhou-flavor Liquor by the enrichment culture and plate separation technology, then the phylogenetic analysis of these strains were carried out by 16S rRNA gene sequence. The results showed that 52 strains were isolated from Zaopei of Luzhou-flavor Liquor, and 25 strains had degradative capability for Propiconazol, and 10, 17 had degradative capability for, Atrazine, 2, 4-D butyl ester respectively. 51 strains belonged to 22 species of 6 genera (*Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brevibacillus*, *Stenotrophomonas*), and 1 isolate was presumed to be variety of *Bacillus thuringiensis* (with 97.3% sequence similarity). *Bacillus* was the shared and dominant genus for, degradation three kinds of pesticides (Propiconazol, Atrazine, 2, 4-D butyl ester) with 37 strains (accounting for 71.2% of 52 strains). *Stenotrophomonas* and *Brevi-*

bacillus was the specific genera for Atrazine and 2, 4-D butyl ester degradation respectively.

Keywords: Zaopei of Luzhou-flavor Liquor; pesticide-degrading bacteria; selection; diversity

农药残留是农药吸附、降解、迁移等多种因素综合作用的结果,其中降解是制约残留量的关键因子^[1]。为了降低农药对食品和环境的影响,科学家们早就开始了农药降解行为的研究,张宁^[2]2006 年报道臭氧可降解蔬菜中多种农药的残留。研究^[3]表明,因微生物对农药的降解具有反应条件温和、反应速度快和反应专一性强等特点,对环境中的农药降解起着关键作用。近年来,研究人员^[4]已从自然界的土壤或污水中筛选出包括细菌、真菌、放线菌、藻类等可降解各类农药的菌群;亦有研究^[5]表明,农产品的发酵可有效降低或消除农药残留,表现出潜在降解农药的作用。以固态发酵为典型特征的浓香型白酒,其酿造过程中复杂的微生物群落对产品的质量和酒体风格有至关重要的作用,目前关于浓香型白酒微生物的研究主要涉及微生物群落组成及变化、功能微生物在提高产量方面的应用,但对于农药降解微生物的研究未见报到。

本研究拟选用小麦、玉米、高粱等浓香型白酒生产原料种植中广泛使用的莠去津、丙环唑和 2,4D 丁酯农药,通过糟醅喷药、诱发降解菌、采集糟醅进行农药降解菌的分离和筛选,并对其发育多样性和农药降解能力进行研究,旨在为中国白酒生产过程的安全监控和风险预测提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 糟醅和药剂

糟醅:采自宜宾规模以上浓香型白酒生产企业;

莠去津(99%)、丙环唑(98%)、2,4D 丁酯(95%):国药集团化学试剂有限公司。

基金项目:四川省教育厅项目(编号:13ZA0201);发酵资源与应用四川省高校重点实验室项目(编号:2010KFZ004, 2011KFJ003)

作者简介:冯瑞章,女,宜宾学院副教授,博士。

通信作者:周万海(1979—),男,宜宾学院副教授,博士。

E-mail:wanhaizhou@126.com。

收稿日期:2016—12—22

1.1.2 培养基

基础培养基: K₂ HPO₄ 2.4 g/L, KH₂ PO₄ 1.2 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂ O 0.2 g/L, CaCl₂ · 2H₂ O 0.025 g/L, Fe₂(SO₄)₃ 0.008 g/L,蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0~7.2;

富集培养基:基础培养基中添加一定浓度的农药;

纯化培养基:蛋白胨 5 g/L,胰蛋白胨 5 g/L,酵母膏 5 g/L,葡萄糖 10 g/L, MgSO₄ · 7H₂ O 0.03 g/L, CaCl₂ · 2H₂ O 0.003 g/L;蒸馏水 1 000 mL,pH 值 7.0~7.2。

1.2 试验方法

1.2.1 富集培养 将 50 mL 富集培养基装入 250 mL 的三角瓶中,灭菌后加入丙环唑原药,使丙环唑含量为 100 mg/L,加入糟醅样品 10 g 摇床培养 7 d(30 ℃,160 r/min),按体积比 1:10 的接种量转接到含丙环唑浓度为 200 mg/L 的富集培养基,相同条件培养 7 d。连续转接 5 次,直至培养基中莠去津浓度为 500 mg/L。相同的方法富集培养莠去津和 2,4D 丁酯降解菌株。

1.2.2 菌种分离纯化 取富集培养 5 次后的菌悬液 0.2 mL,稀释至 10⁻⁵,10⁻⁶,10⁻⁷,涂布于含有 100 mg/L 丙环唑的基础培养基平板上,28 ℃培养 3~4 d。根据形态、色泽、大小特点挑取单个菌落接种至纯化培养基上 28 ℃培养 24 h,再将菌落划线培养,至单菌落生成。同法分离纯化莠去津和 2,4D 丁酯菌株,不同农药菌株分别编号。

1.2.3 农药降解菌的筛选 将纯化、编号后的菌株接种于含有 100 mg/L 丙环唑的固体基础培养基上,28 ℃培养 2~3 d,转代培养于丙环唑含量为 200 mg/L 的培养基,继续转代 3 次,培养基中丙环唑浓度增至 500 mg/L 时还能生长良好的菌株,即为具有丙环唑降解潜能的菌株。同法筛选具有莠去津和 2,4D 丁酯降解潜能的菌株。

1.2.4 DNA 提取与 PCR 扩增 参照文献[6]的方法提取各菌株的总 DNA、扩增 16S rRNA 基因片段。引物 27f:5-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3 和 1541r:5-AAGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3。扩增产物由上海生物工程技术服务有限公司(Sangon)纯化测序(长度 700~900 bp),所有序列在 GenBank 注册。

1.2.5 系统发育分析 所得序列用 EzTaxon Server 2.0^[7] 在线进行相似性分析。用 ClustalX 程序按照最大同源性的原则进行比对,采用 Kimura-2^[8] 计算序列相似值,并用 BioEdit 5.0.9 进行检验;Mega 4.0 软件进行系统进化树的构建、编辑与保存。

2 结果分析

2.1 农药降解菌的分离筛选

通过富集驯化,在 3 种含有供试农药的基础培养基上,共分离纯化得到 132 株细菌的纯培养物,其中可利用丙环唑、莠去津、2,4D 丁酯的菌株分别为 37,53,43 株(表 1)。将上述菌株转代培养于农药浓度逐渐增加的固体平板培养基上,当莠去津、丙环唑和 2,4D 丁酯的浓度达到 500 mg/L 时,长势良好的菌株共 52 株,其中,在丙环唑培养基上 25 株、

表 1 糟醅中农药降解菌的分离和筛选

Table 1 Isolation and selection of pesticides-degrading bacteria from Zaopei

农药	分离菌落数/株	筛选菌落数/株	比例/%
丙环唑	37	25	67.6
莠去津	53	10	18.9
2,4D 丁酯	43	17	39.5
合计	133	52	39.1

在莠去津培养基上有 10 株、2,4D 丁酯培养基上 17 株,分别占初分离菌株数的 18.9%,67.6%,39.5%。

2.2 系统发育分析

由图 1 可知,52 株供试细菌中,1 株菌(菌株代号:XQB-33)的对应序列与 *Bacillus thuringiensis* 的相似性为 97.3%,根据微生物 16S rRNA 基因序列时相似度大于 98%可认定为同一个种,相似度大于 97%可认定为同一个属的理论^[9-10],可认定该菌株为 *B.thuringiensis* 菌株的变种或与其亲缘关系较近的其它种。除 XQB-33 菌株外,其余 51 株菌与 6 个属的 22 个种的模式菌株对应序列相似度大于 98%,其中 37 株菌属于 *Bacillus*,占总供试菌株总数的 71.2%,7 株属于 *Lysinibacillus*,3 株属于 *Acinetobacter*,2 株属于 *Pseudomonas*,2 株分别属于 *Stenotrophomonas* 和 *Brevibacillus*。以上结果表明浓香型白酒糟醅中可降解农药的微生物菌株表现一定的系统发育多样性,其中 *Bacillus* 是降解农药的主要和优势微生物。

2.3 降解不同农药菌株的种属分布

分析降解不同农药菌株的种属分布特征(表 2)发现,能够降解丙环唑的 25 株细菌中,有 22 株分属于 *Bacillus* 的 10 个种,其中与模式种 *Bacillus anthracis* ATCC 14578(T)的序列相似度大于 98%的有 12 株,与 *B.oceanisediminis* H2(T) 的序列相似度大于 98%的有 2 株,与其它 8 个种相似度大于 98%的菌株各有 1 株;剩余 2 株与 *Lysinibacillus macroides* LMG 18474(T)属于同一微生物种群,1 株与 *Pseudomonas azotoformans* IAM1603(T)的相似度大于 98%。

能够降解莠去津的 10 菌株中,5 株属于 *Bacillus* 的 3 个模式菌株,其中与 *B.anthraxis* ATCC 14578(T)序列相似度大于 98%有 3 株,1 株与 *B. mycoides* ATCC 6462(T) 序列相似度大于 98%,1 株与 *B.thuringiensis* ATCC 10792(T)的序列相似度为 97.3%,可能是该模式种的一个变种或与其亲缘性很近的其它种;3 株与 *Acinetobacter* 属的 2 个模式种的同源性大于 98%,另外 2 株分别与 *Pseudomonas* 和 *Stenotrophomonas* 属的菌株同源性大于 98%。

17 株可降解 2,4D 丁酯的菌株中 11 株与 *Bacillus* 的 6 个模式菌株同源性超过 98%,占到降解该农药总菌株数的 64.7%,4 株与 *Lysinibacillus macroides* LMG 18474(T)为同一菌株,另外 2 株分别与 *Acinetobacter nosocomialis* LMG 10619(T)和 *Brevibacillus parabrevis* IFO 12334(T)为同一菌株。

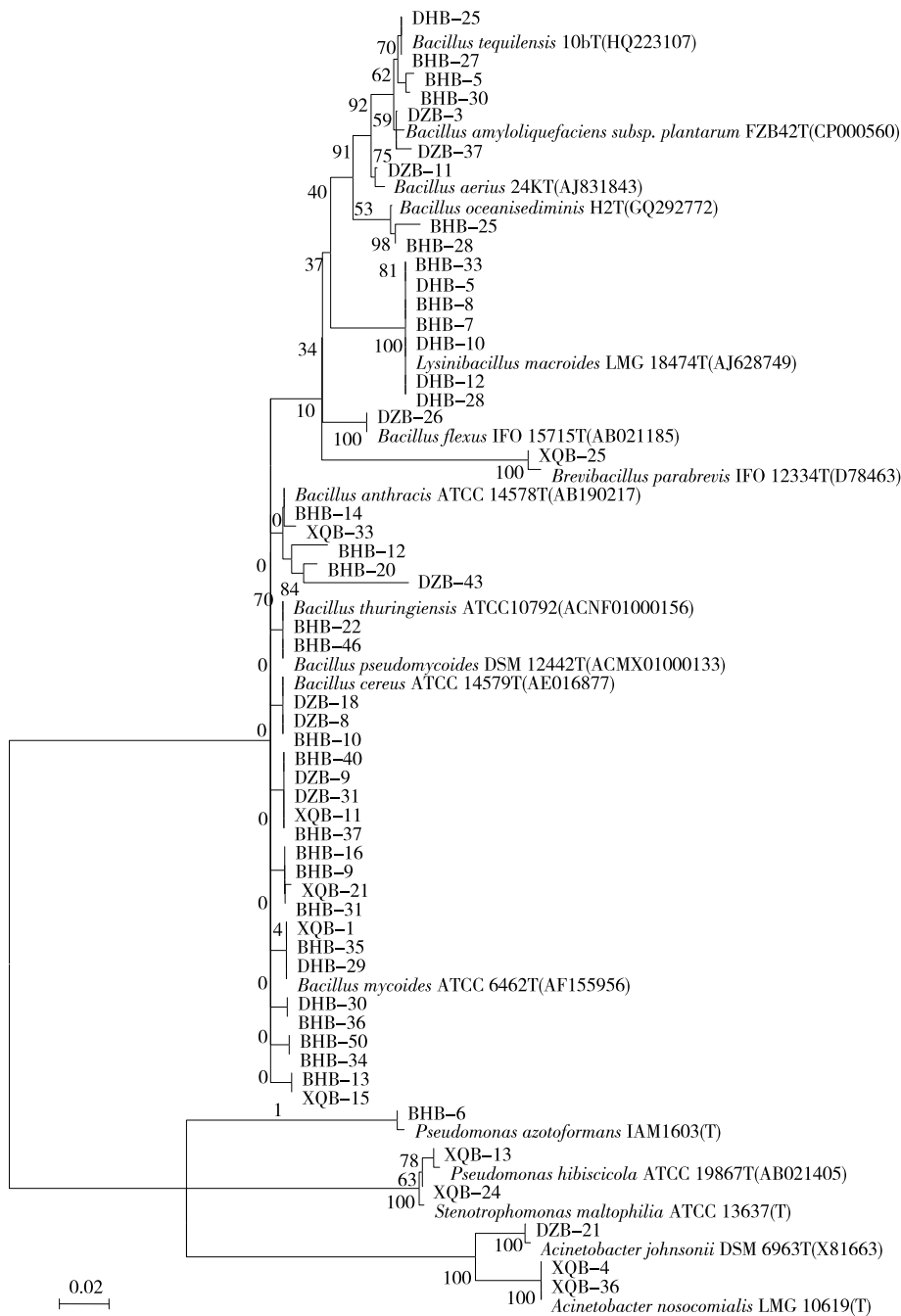


图 1 52 株农药降解菌与相关典型菌株构建的基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树
Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationships between the 52 isolates and reference strains

以上结果表明,在宜宾白酒糟醅中,能够降解丙环唑的细菌有 *Bacillus*、*Lysinibacillus* 和 *Pseudomonas* 3 个属,能够降解莠去津的细菌有 *Bacillus*、*Acinetobacter*、*Pseudomonas* 和 *Stenotrophomonas* 4 个属,可以降解 2,4D 丁酯的菌株有 *Bacillus*、*Lysinibacillus*、*Acinetobacter* 和 *Brevibacillus* 4 个属,其中 *Bacillus* 是可以降解 3 种农药的共有属,也是降解各种农药的优势属,*Stenotrophomonas* 和 *Brevibacillus* 分别为降解莠去津和 2,4D 丁酯的特有属。

3 结论

微生物降解农药具有投入低、无毒、无残留、无二次污染

的优势,治理效果也相对明显,是目前公认的低成本且环境友好型去除污染物的方法^[11]。目前已经分离得到一批能降解或转化某种农药的细菌、真菌、放线菌等微生物,其中细菌因生化上的多种适应能力及易诱发突变菌株而占主要地位^[12]。本试验通过富集培养,从宜宾浓香型白酒糟醅中分离筛选得到 52 株可降解农药的微生物菌株,系统发育分析发现,51 株供试菌株与 6 个属 22 个种的模式菌株对应序列相似度大于 98%,1 株菌与 *Bacillus thuringiensis* 的相似性为 97.3%。*Bacillus* 是可以降解丙环唑、莠去津和 2,4D 丁酯农药的共有属和优势属,*Stenotrophomonas* 和 *Brevibacillus*

表 2 降解不同农药的细菌种属分布[†]

Table 2 Bacteria distribution for degrading different pesticides

属名	模式种	降解丙环 唑菌株	降解莠去 津菌株	降解 2,4D 丁酯菌株	总计
<i>Bacillus</i>	<i>B.pseudomycoides</i> DSM12442(T)	1	—	—	1
	<i>B.anthraxis</i> ATCC 14578(T)	12	3	3	18
	<i>B.thuringiensis</i> ATCC 10792(T)	1	1	1	3
	<i>B.oceanisediminis</i> H2(T)	2	—	—	2
	<i>B.tequilensis</i> 10b(T)	1	—	—	1
	<i>B.amyloliquefaciens</i> subsp.	1	—	—	1
	<i>B.macroides</i> LMG 18474(T)	1	—	—	1
	<i>B.pseudomycoides</i> DSM 12442(T)	1	—	—	1
	<i>B.cereus</i> ATCC 14579(T)	1	—	3	4
	<i>B.tequilensis</i> 10b(T)	1	—	—	1
	<i>B.aerius</i> 24K(T)	—	—	1	1
	<i>B.tequilensis</i> 10b(T)	—	—	1	1
	<i>B.flexus</i> IFO 15715(T)	—	—	1	1
	<i>B.amyloliquefaciens</i> subsp FZB42(T)	—	—	2	2
	<i>B.mycoides</i> ATCC 6462(T)	—	1	—	1
<i>Lysinibacillus</i>	<i>L.macroides</i> LMG 18474(T)	2	—	4	6
<i>Pseudomonas</i>	<i>P.azotoformans</i> IAM1603(T)	1	—	—	1
	<i>P.hibiscicola</i> ATCC 19867(T)	—	1	—	1
Acinetobacter	<i>A.nosocomialis</i> LMG 10619(T)	—	2	—	2
	<i>A.johnsonii</i> DSM 6963(T)	—	1	1	2
<i>Brevibacillus</i>	<i>B.parabrevis</i> IFO 12334(T)	—	—	1	1
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S.maltophilia</i> ATCC 13637(T)	—	1	—	1
总计		25	10	17	52

† “—”代表没有菌株分配。

分别为降解莠去津和 2,4D 丁酯的特有属,优势种属及特有种微生物的开发利用为中国白酒安全生产提供资源,也为后续继续研究农药降解菌及其酶活性的作用机制、有效应用现代生物技术改造或构建新的菌种提供资源。

参考文献

[1] LOZOWICKA B, KACZYNSKI P, PARITOVA A E, et al. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 64: 238-248.

[2] 张宁. 臭氧降解蔬菜中农药残留机理与效果研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 57-60.

[3] 郑永良, 刘德立, 高强, 等. 甲胺磷农药降解菌 HS-A32 的分离鉴定及降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 399-403.

[4] 虞云龙, 樊德方, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略[J]. 环境科学进展, 1996, 4(3): 28-36.

[5] ZHOU Xin-wei, Zhao Xin-huai. Susceptibility of nine organo-phosphorus pesticides in skimmed milk towards the inoculmed lactic acid bacteria and yogurt starters [J]. Journal of the Science

of Food and Agriculture, 2015, 92(230): 260-266.

[6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[J]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-358.

[7] CHUN J, LEE J H, JUNG Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 2 259-2 261.

[8] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16: 111-120.

[9] DEVEREUX R, HE S H, DOYLE C L, et al. Diversity and origin of Desulfovibrio species; phylogenetic definition of a family [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(7): 3 609-3 619.

[10] STACKEBRANDT E, EBERS J. Taxonomic paramenters revisited: tarnished gold standard [J]. Microbiology Today, 2006, 33(4): 152-155.

[11] 王连祥, 闰繁, 袁方曜, 等. 不同微生物菌剂降解土残农药的研究[J]. 山东农业科学, 2010(4): 75-78.

[12] 卢桂宁, 陶雪琴, 党志. 农药降解菌及其基因工程研究进展[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2005, 24(3): 258-262.