

# 阿维菌素降解菌株AW70的分离鉴定及降解特性研究<sup>①</sup>

李荣<sup>1</sup>, 管晓进<sup>1</sup>, 陈荣宗<sup>2</sup>, 朱彬<sup>3</sup>, Shinawar Waseem Ali<sup>1</sup>, 李顺鹏<sup>1</sup>, 蒋建东<sup>1\*</sup>

(1 南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095;

2 江西柳浪农业应用科技有限公司, 江西抚州 344500; 3 泰州出入境检验检疫局, 江苏泰州 225300)

**摘要:** 从长期受阿维菌素农药污染的土壤中分离到一株能高效降解阿维菌素的菌株 AW70。结合生理生化实验和 16S rDNA 序列同源性分析, 将该菌株鉴定为伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia* sp.), Gen Bank 登录号为 EU295449。菌株 AW70 能利用阿维菌素为唯一 C 源生长, 在温度 25℃~42℃ 和 pH 6.5~8.5 范围时降解能力较好, 其最适降解温度为 30℃, 最适初始 pH 值为 7。48 h 对 50 mg/kg 阿维菌素的降解率大于 85%。南丰蜜桔上农药降解试验结果表明, 喷施菌株 AW70 菌剂的蜜桔中未检测到阿维菌素的残留, 表明该菌株具有良好的应用前景。

**关键词:** 阿维菌素; 鉴定; 生物降解; AW70

**中图分类号:** X13112

农药在农业生产过程中对防治病虫害、提高农作物产量必不可少, 然而, 农药在广泛使用的同时也给环境造成了严重的污染, 使得农业产量和环境质量之间的矛盾日益突出<sup>[1]</sup>。阿维菌素 (Avermectins 简称 AVM) 是从阿维链霉菌的发酵产物中分离出的一种新型、高效、低残留生物农药<sup>[1-2]</sup>, 已在很多国家登记使用<sup>[3-4]</sup>, 是目前中国应用最广泛的理想抗寄生虫药, 广泛适用于蔬菜、果树、棉花和花卉等作物, 阿维菌素的产量和用量近年来增长迅速。

模拟农药飘移和流失来评价阿维菌素对土壤环境的作用证实其半衰期为 20~47 天, 而灭菌土壤中不会发生阿维菌素的代谢。对阿维菌素与土壤结合能力的研究表明, 阿维菌素与土壤颗粒紧密结合, 使之成为环境中的不流动农药, 在土壤中易形成结合态残留<sup>[9-10]</sup>。阿维菌素的长期大量使用带来了环境污染及农产品中农药残留等问题, 研究阿维菌素的微生物降解对于保护环境及保障农产品安全具有重要意义。

目前国外有关阿维菌素的研究主要集中在其光解动态<sup>[1, 4-5]</sup>以及不同环境 (土壤、水体、蔬菜、水果、动物体等) 中阿维菌素残留的检测技术<sup>[6-8]</sup>等方面, 有关阿维菌素微生物降解动态与机理方面的研究报道较少, 我国也只有张卫等人<sup>[10-13]</sup>在这一方面做过一定研究, 但是有关阿维菌素降解菌株在农产品中农药污染消除中的应用研究还未见报道。本实验分离到一株能高效降解阿维菌素的菌株 AW70, 对其生理生化特性、

分类学地位以及降解特性进行了研究, 并将该菌株成功应用于南丰蜜桔中阿维菌素农药污染的修复。

## 1 材料与方法

### 1.1 取样、试剂及培养基

降解菌株分离: 土壤样品取自江苏南通长期受阿维菌素农药污染土壤。阿维菌素 (纯度 98%) 由苏科农化农药厂赠送, 其余试剂均为分析纯。

基础盐培养基 (g/L): NaCl 1.00, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.50, MgSO<sub>4</sub> 0.20, pH 7.0~7.5; 富集培养基为基础盐培养基中添加阿维菌素浓度至 100 mg/L。LB 培养基 (g/L): 酵母膏 5.00, NaCl 10.00, 蛋白胨 10.00; 固体培养基上加入 20 g/L 的琼脂粉。1/10 LB 培养基 (g/L): 酵母膏 0.50, NaCl 0.50, 蛋白胨 1.00; 固体培养基上加入 20 g/L 的琼脂粉。

### 1.2 菌株筛选

在 50 ml 富集培养基中加入 1 g 土样, 于 30℃ 摇床 (160 r/min) 培养 5 天后, 吸取 5 ml 转接至相同浓度的富集培养基中, 连续富集, 转接 3 次。富集培养液经测定有降解效果后, 在含 100 mg/L 阿维菌素的 1/10 LB 培养基固体平板上梯度稀释涂布, 30℃ 培养, 待平板上出现单菌落后, 挑取单菌落分别转接至含阿维菌素 (100 mg/L) 的液体基础盐培养基中, 验证单菌对阿维菌素的降解效果。

### 1.3 生理生化鉴定

① 基金项目: 国家星火计划项目 (2007EA730041)、农业部生态专项 (农财发[2005]52 号) 和科技部平台建设项目 (2005DKA21201-2) 资助。

\* 通讯作者 (jiang\_jjd@njau.edu.cn)

作者简介: 李荣 (1982-), 男, 江苏海安人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学方面研究。E-mail: njlirong@yahoo.com.cn

生理生化鉴定方法参见文献[14]。

#### 1.4 分子生物学操作

菌体染色体总 DNA 提取、纯化、回收、酶连、转化方法参见文献[17], pMD-T vector 购自 TaKaRa 公司, 序列测定由上海英俊公司进行。

#### 1.5 16S rDNA 序列的 PCR 扩增

16S rDNA 序列的 PCR 扩增引物设计为: 5' 端引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* bases 8 to 27<sup>[16]</sup>), 3' 端引物 5'-TACCTTGTTAC-GACTT-3' (*Escherichia coli* bases 1507 to 1492)。扩增反应体系如下: 10×Taq 聚合酶反应缓冲液 5 μl, dNTP (20 mmol/L) 4 μl, 引物 (25 pmol/μl) 各 2 μl, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 4 μl, 菌体 DNA (约 50 ng/μl) 1 μl, Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.5 μl, 加 H<sub>2</sub>O 至 50 μl。反应条件: 95℃ 变性 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 20 min, 10℃ 5 min。

#### 1.6 系统发育树的建立

将扩增的 1.5 kb 左右的 AW70 菌株的 16S rDNA 序列送上海英俊公司测序, 获得序列后在 GenBank 核酸数据库中进行 BLAST 比对, 利用 ClustalX1.8.1 进行分析, 通过 NJplot 软件分析生成系统聚类树。

#### 1.7 阿维菌素含量分析

**1.7.1 溶液中阿维菌素的紫外扫描定性分析法** 在待测溶液中加入 20 ml 二氯甲烷, 剧烈振荡 5 min, 室温下静置 10 min, 使水相与有机相分层, 用移液管吸取下层的二氯甲烷 5 ml, 过无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 柱, 除去有机相中少量的水分。收集剩余二氯甲烷在紫外-可见分光光度计 (岛津 UV-2401PCP/450) 上波长 200 ~ 350 nm 范围内进行扫描。

**1.7.2 高效液相色谱定量测定法** 溶液、土壤、南丰蜜桔阿维菌素的提取和净化参考文献[15]。HPLC 法测定: 采用高效液相色谱仪 (Waters600), 使用可变波长紫外检测器, 分离柱为 20 cm 长内填有 C18 的反相柱。流动相为甲醇/水 (70:30, v/v), 流量为 1 ml/min, 可变波长紫外检测器的工作波长为 235 nm, 进样量为 20 μl, 按峰面积定量。

#### 1.8 土壤中阿维菌素残留降解试验

称取 10 mg 阿维菌素农药, 溶于 100 ml 的丙酮中, 将农药分别拌入 400 g 的灭菌和未灭菌的过筛风干菜园土中, 使其浓度为 50 mg/kg。将处理好的土样置于花盆中, 喷施水使其含水量达到饱和含水量的 40%, 放置 36 h 待用, 准备一定量的 AW70 菌液, 离心后等体积无菌水清洗悬浮。共设灭菌土添加菌液 (mcl),

灭菌土不加菌液 (mck), 不灭菌土添加菌液 (bmcl), 不灭菌土不加菌液 (bmck) 4 个处理。所加菌液为先前制备的无菌水清洗悬浮的菌液, 添加约 7.4×10<sup>6</sup> CFU/g (以干土计) 的降解菌株, 对照中添相同体积的无菌水, 分别于 1、2、3、4、5、6、7 天后取土样检测农药浓度。

#### 1.9 南丰蜜桔中阿维菌素残留降解试验

试验于 2007 年 3 月 1 日到 11 月 7 日在江西省南丰县市山镇密桔园进行。试验区总面积 2000 m<sup>2</sup>, 处理和对照各重复 3 次, 每个重复小区面积约为 333 m<sup>2</sup>。阿维菌素施药剂量均为当地农户正常使用剂量, 为河北保定农药厂生产的 20g/L 阿维菌素乳油稀释 2000 倍喷施, 分别喷施 3 次。处理小区在第 2 次和第 3 次喷药后 3 天分别喷施菌剂 AW70, 菌剂由南京农业大学微生物中试工厂生产, 菌数 1.1×10<sup>10</sup> CFU/ml, 菌剂稀释 100 倍喷施, 每亩用量为 5 L。最后 1 次施菌剂后第 7 天分别在对照和处理小区用五点取样法采蜜桔鲜样 500 g 检测阿维菌素含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 降解菌株的分离与鉴定

从富集液中筛选到一株能降解阿维菌素的细菌, 命名为 AW70。该菌株革兰氏染色为阴性, 杆状。在 LB 培养基上培养 24 h 后可以形成直径为 1 mm 菌落, 菌落圆形、微黄色、表面光滑、有光泽、边缘整齐、不透明, 甲基红和 VP 反应为阴性, 接触酶测定阳性, 氧化酶测定阴性, 吡啶试验为阴性。

扩增获得 AW70 菌株的 1.5 kb 16S rDNA 序列, 测序后在 GenBank 核酸数据库中进行 BLAST 比对, 利用 Clustal X1.8.1 进行分析后通过 NJplot 软件分析生成系统发育树 (图 1)。菌株 AW70 位于 *Burkholderia* sp. 分支上, 与伯克霍尔德氏菌属细菌的 *Burkholderia vietnamiensis* 相似性为 99.4%, 最终结合生理生化试验将 AW70 鉴定为伯克霍尔德氏菌属。

### 2.2 AW70 对阿维菌素的降解

#### 2.2.1 初始 pH 值对 AW70 降解阿维菌素的影响

在基础盐培养基中添加 50 mg/L 的阿维菌素, 分别调节初始 pH 值至 4、5、6、7、8、9、10, 10g/L 接种量接入 AW70 菌液, 设接种灭菌的 AW70 为对照, 培养 48 h 后取样测定阿维菌素的浓度。从图 2 可知, 阿维菌素的降解在 pH 6 ~ 9 之间最好, 降解率都达到 50% 以上, 其降解的最适 pH 值为 7。菌株对 pH 值耐受范围比较广, 尤其对碱性污染环境的微生物修复具有一定的潜力。

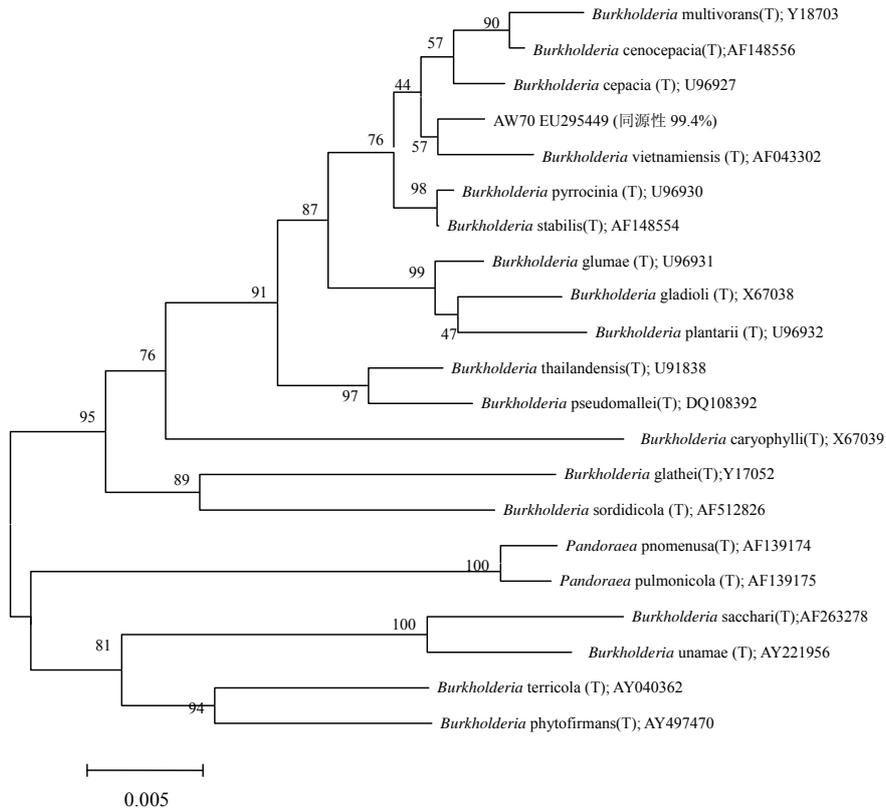


图 1 菌株 AW70 的系统发育树

Fig.1 The phylogenetic tree of strain AW70

2.2.2 初始农药浓度对 AW70 降解阿维菌素的影响  
 在基础盐培养基中添加阿维菌素使其浓度分别至 10、30、50、100、150 和 200 mg/L，初始 pH 值为 7.0，10 g/L 接种量接入 AW70 菌液，设接种灭菌的 AW70 为对照，培养 48 h 后取样测定阿维菌素的含量。从图 3 中可以看出农药浓度对 AW70 降解阿维菌素的影响

较大，>150 mg/L 的浓度开始抑制菌株的降解效率，推测可能产生了高浓度中间代谢产物，抑制了菌株的降解。在农药浓度低于 100 mg/L 时，降解率都>70%，低浓度对菌株的降解效率没有影响，表明该菌株能够在低浓度下很好地降解阿维菌素，适宜于环境中的低浓度阿维菌素残留的修复。

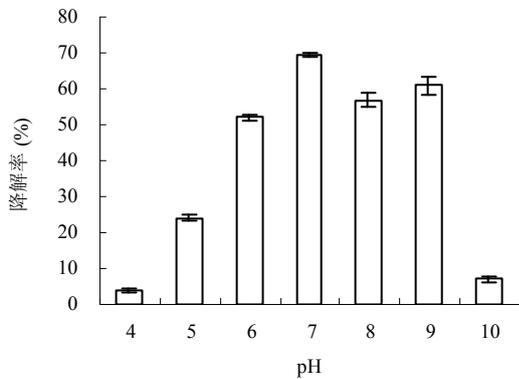


图 2 pH 值对 AW70 降解阿维菌素的影响  
 Fig.2 Effect of pH value on the degradation of avermectins by AW70

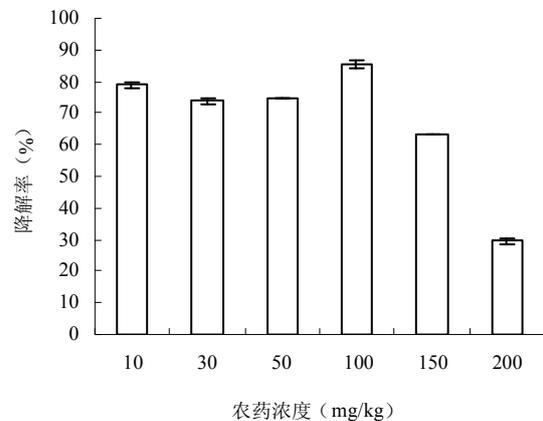


图 3 农药浓度对 AW70 降解阿维菌素的影响  
 Fig.3 Effect of pesticide concentration on the degradation of avermectins by AW70

**2.2.3 添加外源营养物质对 AW70 降解阿维菌素的影响** 在含有 50 mg/L 阿维菌素的基础盐培养基中分别添加 10g/L 的葡萄糖、蛋白胨和酵母膏, pH 值为 7.0, 10g/L 接种量接入 AW70 菌液, 设接种灭菌的 AW70 为对照, 培养 48 h 后取样测定阿维菌素的含量。从图 4 中可以看出, 外源营养物质的添加对阿维菌素的降解没有影响, 说明菌株可以在不依赖外源 C 源的情况下很好地降解农药。

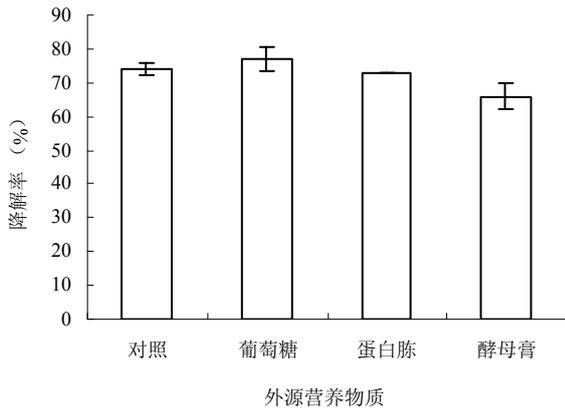


图 4 外加 C 源对 AW70 降解阿维菌素的影响  
Fig.4 Effect of carbon source on the degradation of avermectins by AW70

**2.2.4 温度对 AW70 降解阿维菌素的影响** 在基础盐培养基中添加 50 mg/L 阿维菌素, 初始 pH 值为 7.0, 10 g/L 接种量接入 AW70 菌液, 设接种灭活的 AW70 为对照, 分别在 20°C、25°C、30°C、37°C、42°C、50°C 培养 48 h 后取样测定阿维菌素。从图 5 可看出温度对 AW70 降解阿维菌素影响较大, 在 30°C~37°C 的范围内降解率较好, 能达到 80% 以上, 而低温与高温对降解都有一定影响。

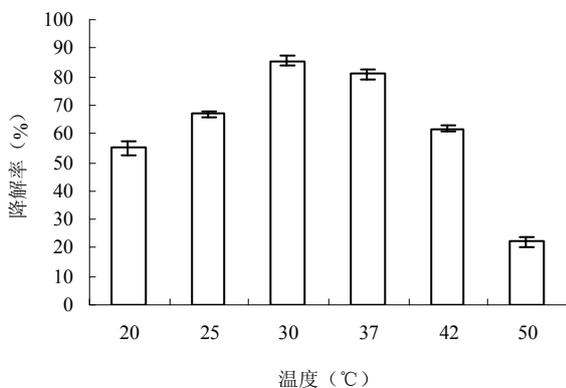


图 5 温度对 AW70 降解阿维菌素的影响  
Fig.5 Effect of temperature on the degradation of avermectins by AW70

**2.2.5 AW70 降解土壤中的阿维菌素** 从图 6 中可以看出, 对照在土著微生物以及光化学等的作用下, 农药浓度有一定程度的降低, 但降低得较慢, 7 天后土壤中仍然残留一定量的农药。接种降解菌株后农药浓度快速下降, 表明接种的降解菌株能够加快农药的降解。灭菌土壤中的降解效果低于未灭菌土壤, 说明土著微生物和接种的 AW70 菌株之间存在一定的协同作用, 从图中可以看出, 菌株在田间土壤修复应用中有着很好的应用前景。

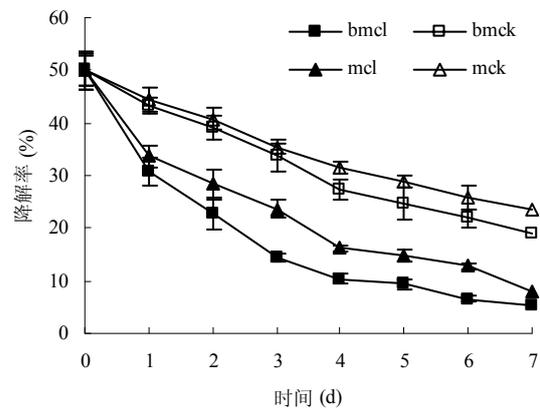


图 6 灭菌和未灭菌土壤中 AW70 对阿维菌素的降解  
Fig.6 Biodegradation of Avermectins added to sterilized soil and non-sterilized soil by AW70.

### 2.3 AW70 在南丰蜜桔阿维菌素残留上的降解应用

按上述试验设计进行操作和取样测定, 喷施降解菌剂的处理中未检测到残留阿维菌素, 未喷施降解菌剂的对照中阿维菌素的残留为 0.247 mg/kg, 菌剂可以加速阿维菌素的降解。

## 3 结论

(1) 从长期受阿维菌素农药污染的土壤中分离到一株能降解阿维菌素的细菌 AW70, 鉴定为伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia* sp.)。该菌株 AW70 在 2 天内将 50 mg/kg 阿维菌素高效降解, 其降解率 >85%。

(2) 菌株 AW70 对阿维菌素降解最适 pH 值为 7, 最适初始农药浓度为 100 mg/L, 添加外源营养物质对菌株的降解性能没有显著影响。该菌株 AW70 能加快阿维菌素农药在南丰蜜桔中的降解, 具有良好的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Joan AL, Richard AD. Avermectins, a novel class of compounds: Implications for use in arthropod pest control. *Annual Review Entomology*, 1991, 36: 91-117
- [2] Fisher MH. Ivermectin and Avermectins Chemistry. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1989: 1-23
- [3] Miller TW. Avermectins: A new family of potent anthelmintic agents, producing organism and fermentation, antimicrob. *Agents Chemother*, 1979, 15: 368
- [4] Crouch LS. Photodegradation of Avermectins B1a thin films on glass. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39(7): 1310-1319
- [5] Demchak RJ. Photostability of Abamectin microspheres. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45(1): 260-262
- [6] Hernando MD, Suarez-Barcena JM, Bueno MJM, Garcia-Reyes JF, Fernandez-Alba AR. Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectins residues in food. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1155: 62-73
- [7] Diserens H, Henzelin M. Determination of abamectin residues in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999, 833: 13-18
- [8] 郑忱. Abamectin 研究的最新进展. *农药译丛*, 1991, 13(3): 19-63
- [9] 范晓光. 植保中使用齐墩螨素的环境影响. *农药译丛*, 1995, 17(6): 43-48
- [10] 张卫, 虞云龙, 吴加伦, 李少南, 樊德方. 阿维菌素在土壤中的降解和高效降解菌的筛选. *土壤学报*, 2004, 41(4): 590-596
- [11] 张卫, 林匡飞, 蔡兰坤, 李少南, 吴加伦, 樊德方. 阿维菌素的微生物降解及其机理研究. *生态环境*, 2007, 16(2): 421-424
- [12] 张卫, 虞云龙, 吴加伦, 李少南, 樊德方. 阿维菌素高效降解菌的筛选及其降解特性. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2004, 22(2): 157-161
- [13] 张卫, 虞云龙, 谭成侠, 李少南, 吴加伦, 樊德方. 阿维菌素水解动力学研究. *农业环境科学学报*, 2004, 23(1): 174-176
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- [15] 张怡, 张宗山, 王芳, 张蓉. 阿维菌素在枸杞果实中的残留动态. *农药*, 2007, 46(1): 46-48
- [16] William DH, Barbara AM. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 2957-2960
- [17] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 2版. 北京: 科学出版社, 1995

## Isolation and Identification of an Avermectins Degrading Strain AW70 and Its Degrading Characteristics

LI Rong<sup>1</sup>, GUAN Xiao-jin<sup>1</sup>, CHEN Rong-zong<sup>2</sup>, ZHU Bin<sup>3</sup>, SHINAWAR Waseem-ali<sup>1</sup>, LI Shun-peng<sup>1</sup>, JIANG Jian-dong<sup>1</sup>

(1 College of Life Sciences, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Jiangxi Liulang Agriculture Technology Co. Ltd., Nanfeng, Jiangxi 344500, China; 3 Taizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

**Abstract:** A bacterium (AW70) capable of degrading avermectins was successfully isolated from the long-term avermectins polluted soil. This strain was identified as *Burkholderia* sp. based on the physiological & biochemical characteristics and homology analysis of its 16S rDNA sequence. AW70 could use avermectins as the sole-carbon source for growth and it could maintain the good degrading ability at the temperature of 25 °C ~ 42 °C and initial pH value of 6.5 ~ 8.5. The most adaptable initial pH value and temperature for the degradation of avermectins were 7.0 and 37 °C under which more than 85% of the pesticide could be degraded within 48 h. In the bioremediation of avermectins contamination on oranges in Nanfeng, Jiangxi province, AW70 could degrade 0.247 mg/kg avermectins to non-detectable level, indicating that the strain has a great potential application.

**Key words:** Avermectins, Biodegradation, Identification, AW70