

氯嘧磺隆降解菌的分离鉴定及其降解特性

刘艳 范丽薇 王晓萍*

(哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要: 利用富集培养技术从长期施用氯嘧磺隆的土壤中分离得到 1 株能够降解氯嘧磺隆的细菌 L-7。通过生理生化特性和 16S rRNA 序列分析, 初步鉴定 L-7 为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)。并分析了氯嘧磺隆的初始浓度、接种量、温度和 pH 值对 L-7 菌株降解氯嘧磺隆效果的影响, 确定了最佳降解条件。结果表明, 该菌在氯嘧磺隆浓度为 100 mg/L、接种量为 5%、pH 4.0、温度 30°C 条件下, 接种 5 d 后对氯嘧磺隆的降解效率达到 80% 以上。

关键词: 氯嘧磺隆, 寡养单胞菌属, 降解特性

Isolation, Identification and Degradation Characteristics of Chlorimuron-ethyl Degradation Bacteria

LIU Yan FAN Li-Wei WANG Xiao-Ping*

(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

Abstract: L-7, a bacterium which was able to degrade chlorimuron-ethyl, was isolated from the soil of long term applied with chlorimuron-ethyl by enrichment culture. Base on physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis, the strain L-7 was identified preliminarily as *Stenotrophomonas* sp.. The effect of initial concentration of chlorimuron-ethyl, inoculation amount, temperature and pH on degradation efficiencies was studied. The optimal degrading conditions were: initial concentration of chlorimuron-ethyl 100 mg/L, inoculation amount of 5%, pH 4.0, respectively, under the optimal conditions, the degrading efficiency could reach more than 80% after 5 days at 30°C.

Keywords: Chlorimuron-ethyl, *Stenotrophomonas* sp., Degrading characteristics

氯嘧磺隆属于磺酰脲类除草剂, 是黑龙江省大豆产区应用面积较大的除草剂, 因其价格低, 对大豆高度安全, 杀草谱广, 尤其是杀苣荬菜、刺菜等恶性杂草效果好而被广泛使用^[1], 但由于其在土壤中残留时间长, 对后茬敏感作物如油菜、甜菜、向日葵、玉米等毒害严重, 影响大豆的轮作换茬, 同时污染农田环境^[2]。因此, 研究解决氯嘧磺隆残留毒害问题及对环境造成的污染具有重要理论和实践意义。

目前, 减轻甚至解除土壤中磺酰脲类除草剂污染的途径主要有化学水解和微生物降解两个途径, 其中微生物修复作用显著^[3]。因此筛选出氯嘧磺隆的高效降解菌株, 对于氯嘧磺隆污染土壤的生物修复具有重要的意义。当前, 对甲磺隆、绿磺隆、氟磺隆等磺酰脲类除草剂微生物降解的研究较多^[4-7], 而有关氯嘧磺隆的降解研究相对较少, 本研究从长期施用氯嘧磺隆的大豆田土壤中分离筛选出 1 株能够

* 通讯作者: Tel: 86-451-88060576; ✉ dr_wxp@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-01-18; 接受日期: 2010-06-01

降解氯嘧磺隆的菌株, 并对其进行了初步鉴定及降解特性的研究。以期氯嘧磺隆污染土壤的原位生物修复提供理论依据, 同时为构建高效降解氯嘧磺隆基因工程菌和降解菌酶制剂提供菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品: 取自黑龙江省五大连池市建设乡富民村常年施用氯嘧磺隆的大豆田土壤, 取土表及以下 5 cm–15 cm 的耕层土壤。

1.1.2 培养基: LB 培养基(g): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 蒸馏水定容至 1 L。

无机盐培养基(g): K_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 0.5, 葡萄糖 5, NaCl 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $CaCl_2$ 0.1, 蒸馏水定容至 1 L, 添加不同体积氯嘧磺隆母液(1000 mg/L)。

1.1.3 农药: 氯嘧磺隆标准品(纯度为 98%, 德国 Dr. Ehrenstorfer), 20%氯嘧磺隆可湿性粉剂(江苏漂化化学有限公司)。

1.2 氯嘧磺隆降解菌株富集与分离

取 10 g 土样放入装有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 加适量玻璃珠振荡约 30 s, 使样品与水充分混合, 将细胞分散, 形成均匀的菌悬液。以 10% 的接种量接到含 100 mg/L 氯嘧磺隆的无机盐培养基中, 置 30°C、150 r/min 的摇床振荡培养。以后每周移种一次, 以接种量 10% 接入新鲜的无机盐培养基中, 氯嘧磺隆浓度以 100 mg/L 的梯度递增, 至培养基中氯嘧磺隆浓度达到 500 mg/L。经初筛、复筛和纯化后, 将分离的 1 株降解菌接种于 LB 斜面上, 编号, 4°C 冰箱中保存。

1.3 降解菌的鉴定

1.3.1 降解菌的形态观察及生理生化鉴定: 降解菌采用平板涂布法接种, 30°C 培养 12–16 h 后用电子显微镜观察菌体形态。生理生化鉴定方法参见文献[8]。

1.3.2 降解菌分子鉴定: 降解菌总 DNA 的提取采用 CTAB 法及 16S rDNA 引物设计参见文献[9]: 5'端引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 3'端引物 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。

扩增反应体系为: 10 × Buffer (Mg^{2+}) 5 μL, dNTPs (2 mmol/L) 3 μL, 引物(20 μmol/L)各 1 μL, 菌体 DNA(约 50 mg/L) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶

(5 U/μL) 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 反应条件: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环; 72°C 10 min。

PCR 产物用博大泰克公司生产的胶回收试剂盒对目的片段进行回收, PCR 回收产物连至 pMD18-T Vector, 转化 *E. coil* JM109 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 验证插入片段后测序(由上海生工公司完成)。将所测序列进入 GenBank 数据库进行相似性分析。

1.4 降解菌对氯嘧磺隆的降解性能测定

1.4.1 氯嘧磺隆的提取: 将培养后的待测样品以 10000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, 将上清液转移至 250 mL 分液漏斗中, 分 3 次加入二氯甲烷 20、10、10 mL, 剧烈振荡 1 min, 室温下静置 10 min, 使水相与有机相分层, 有机相过无水硫酸钠柱后旋转蒸发至干后用甲醇定容至 10 mL, 摇匀待测。

1.4.2 液相色谱检测条件: 色谱柱为 C18 反相柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm i.d., Diamonsil, USA), 流动相为: 甲醇: 水: 冰乙酸(68: 32: 0.1, V/V/V), 柱温为室温, 检测波长为 240 nm, 进样量 20 μL, 流速为 1 mL/min。采用外标法测定样品中氯嘧磺隆的含量, 求出其降解率。

氯嘧磺隆降解率(%) = $[1 - (\text{实测残量} / \text{对照样实测残量})] \times 100\%$ 。方法参照文献[10–11]测得氯嘧磺隆的保留时间为 11.880 min。标准曲线为 $y = 60829.83x + 1234.58$, $r = 0.9999$ 。其中 x 为氯嘧磺隆浓度, y 为峰面积。

1.4.3 菌株降解氯嘧磺隆的影响因素研究: 将菌株在 LB 液体培养基中培养 18–24 h ($OD_{600} = 0.30$) 后, 按 5% 的量接种无机盐培养基中, 初始 pH 值为 7.0, 初始氯嘧磺隆浓度为 50 mg/L, 温度为 30°C, 150 r/min 恒温摇床振荡培养, 分别进行以下几组处理测定生长量和降解率的变化, 每种处理设 3 个平行试验, 同时设接种灭活的 L-7 为对照, 培养 7 d 后测定 OD_{600} 值和氯嘧磺隆的残留量。

(1) 每隔 24 h 取样测定菌株 L-7 生长量和降解率的变化。

(2) 将温度分别设置为 20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C 作为最佳温度试验组。

(3) 用 NaOH 或 HCl 调节初始 pH 值分别至 4、5、6、7、8、9 作为最佳 pH 试验组。

(4) 将接种量分别设置为 2%、5%、10%、15%、18%、20% 作为最佳接种量试验组。

(5) 将氯嘧磺隆浓度分别设置为 10、50、100、200、300、400 mg/L 作为最佳降解浓度试验组。

(6) 将菌株的培养时间、pH、接种量、温度、氯嘧磺隆浓度都设置为优化后的最佳条件,测定氯嘧磺隆的降解率。

2 结果

2.1 降解菌株的分离和生理生化鉴定

通过富集培养法,从长期施用氯嘧磺隆的土壤分离出 1 株能够降解氯嘧磺隆的菌株 L-7。菌落较小,白色,圆形,凸起,边缘整齐,表面光滑,不透明,易挑起。菌体呈杆状,极生鞭毛,无芽孢,无荚膜,大小为(0.7–1.0) μm \times (1.0–2.0) μm (电镜照片见图 1),革兰氏染色阴性,好氧,能运动,MR 和 V.P. 试验、氧化酶和接触酶试验、淀粉水解试验、吡啶试验、脲酶试验、柠檬酸盐试验、苯丙氨酸脱羧试验、硝酸盐还原试验呈阴性,明胶液化试验、硫化氢试验、产氨试验呈阳性。菌株 L-7 的抗药性检测结果表明,L-7 对卡那霉素(15 mg/L)敏感,而对氨苄青霉素(50 mg/L)、链霉素(30 mg/L)、四环素(12 mg/L)、氯霉素(20 mg/L)有抗性。

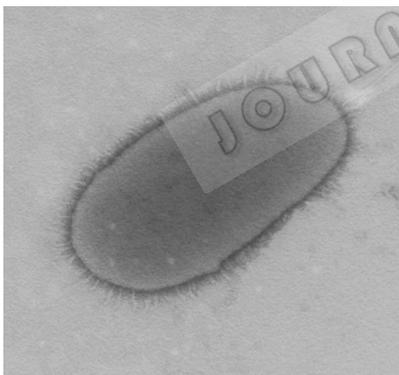


图 1 菌株 L-7 的电镜照片($\times 20000$)

Fig. 1 Micrograph of L-7 under transmission electron-microscope ($\times 20000$)

2.2 降解菌株 16S rRNA 的序列测序和比较

以 L-7 的基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物,测序后在 GenBank 上登录,序列号为 AB294555,将其与 GenBank 上的其他序列进行同源性比对,结果表明菌株 L-7 与 *Stenotrophomonas* sp. BBTR57 (DQ337605) 的相同性为 99%,与 *Stenotrophomonas* sp. 6C 4 (AY689049)、

Stenotrophomonas sp. OS17 (EF491967)、*Stenotrophomonas* sp. YRR09 (EU373437)、*Stenotrophomonas maltophilia* ZZ7 (DQ113454)、*Stenotrophomonas maltophilia* H2S8 (EU221397) 和 *Stenotrophomonas maltophilia* LMG11087 (X95924) 等的相同性为 98%,再结合生理生化特性结果,将 L-7 初步鉴定为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)。

2.3 降解影响因素的研究

2.3.1 培养时间对菌株 L-7 生长和降解的影响: 结果如图 2 所示,菌株 L-7 生长经过 1 d 的停滞期后进入对数生长期,3 d 后菌株 L-7 处于稳定生长期,由降解曲线可以看出,氯嘧磺隆的降解主要发生在对数生长期,主要是由于对数生长期菌株增殖能力强,对氮源和能源的需求量增大,氯嘧磺隆的降解迅速,氯嘧磺隆浓度下降快。此后,培养基的氮源和能源已相对较少,没有新的营养物质补充,同时菌株的代谢产物不断积累,菌体的生长受到抑制,菌体数量不再增加。因此,氯嘧磺隆降解缓慢。菌株 L-7 在 3 d 后可将 80% 以上的氯嘧磺隆进行降解。

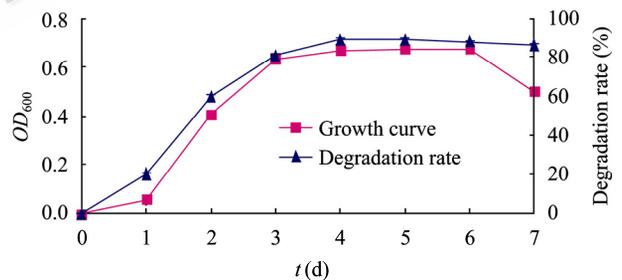


图 2 培养时间对菌株 L-7 生长和降解的影响

Fig. 2 Effect of incubating time on the growth and the degradation rate of the strain L-7

2.3.2 温度对菌株 L-7 生长和降解的影响: 结果如图 3 所示,菌株 L-7 在 25°C–40°C 范围内生长良好,在 25°C–35°C 范围内降解效果良好,在 30°C 时,菌体生长量达到最大,对氯嘧磺隆的降解也达到最大值为 86.53%,低于或高于该温度范围则降幅较大,分析原因可能是由于菌体产生的酶有最适温度,温度较低时,酶活性受到影响而降低,微生物生长缓慢,代谢活性差,导致氯嘧磺隆降解效果下降。高温时,菌体的酶促系统受到损伤影响其活力从而影响菌株对氯嘧磺隆的降解。因此,降解菌 L-7 的最佳生长和降解温度为 30°C。

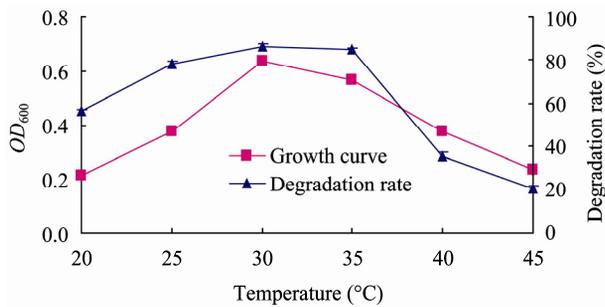


图3 温度对菌株 L-7 生长和降解的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the growth and the degradation rate of the strain L-7

2.3.3 pH 对菌株 L-7 生长和降解的影响: 每种微生物都有生长繁殖的适宜 pH 值, 当生存环境的 pH 值不适合时, 微生物生长代谢就会受到抑制。这是因为随着 pH 值的变化, 酶分子上的酸性及碱性氨基酸侧链基团处于不同的解离状态。具有催化活性的基团在总酶量中的比例不同使得酶分子催化能力也不一样^[12]。由图4可知, 菌株 L-7 在初始 pH 4~7 范围内具有良好的适应性, 降解率可达80%以上, 在 pH 4 的偏酸条件下菌体生长情况最佳, 对氯嘧磺隆的降解能力达到89.25%。

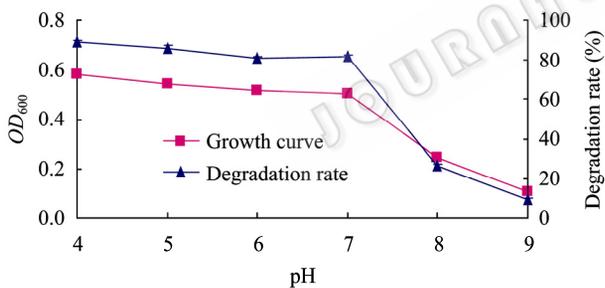


图4 pH 对菌株 L-7 生长和降解的影响

Fig. 4 Effect of pH on the growth and the degradation rate of the strain L-7

2.3.4 接种量对菌株 L-7 生长和降解的影响: 结果如图5所示, 当接种量在2%~5%时, 菌株 L-7 的生长量和降解率都呈上升趋势, 接种量为5%时, 生长量和降解率达到最大值, 降解率为89.12%。而后随着接种量的增加, 其降解率越来越低的主要原因可能是由于接种量过高时, 菌体密度大大增加, 不利于单个菌体的生长, 导致菌株之间发生竞争性抑制作用, 影响菌株对氯嘧磺隆的吸收降解。因此, 菌株 L-7 最适宜的接种量是5%。

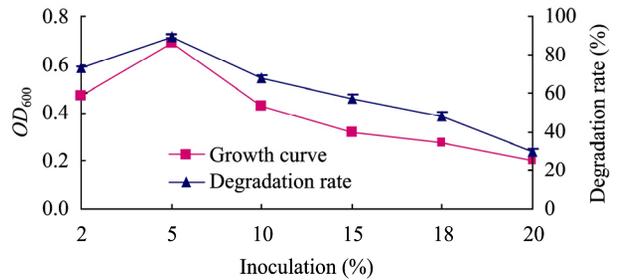


图5 接种量对菌株 L-7 生长和降解的影响

Fig. 5 Effect of inoculation on the growth and the degradation rate of the strain L-7

2.3.5 氯嘧磺隆浓度对菌株 L-7 生长和降解的影响: 结果如图6所示, 当氯嘧磺隆的浓度为100 mg/L时, 菌株 L-7 的降解率最高, 达到了88.72%。以后随着氯嘧磺隆浓度增加降解率逐渐下降, 400 mg/L时降解率仅为35.26%。分析原因可能是由于氯嘧磺隆水解的产物被菌株 L-7 吸收, 为其生长提供了良好的氮源, 因而随着氯嘧磺隆浓度的增加(10~100 mg/L), 菌株 L-7 大量生长繁殖, 促进了对氯嘧磺隆的生物降解。由图中可知, 80%以上的氯嘧磺隆被降解。因此, 氯嘧磺隆浓度低于100 mg/L时对降解率的影响较小。但当氯嘧磺隆浓度过大时, 对菌株 L-7 产生了毒性, 抑制了菌株的活性, 影响菌株生长从而使降解率下降。

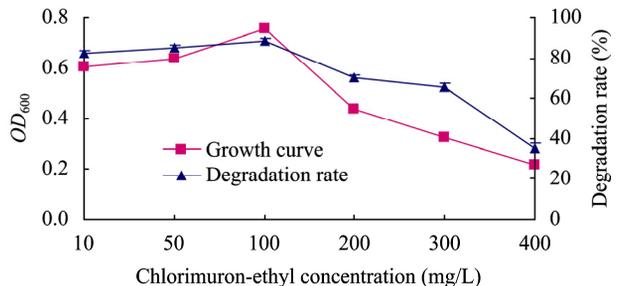


图6 氯嘧磺隆浓度对菌株 L-7 生长和降解的影响

Fig. 6 Effect of chlorimuron-ethyl concentration on the growth and the degradation rate of the strain L-7

2.3.6 最佳条件下的降解率: 前面试验得出的菌株 L-7 的最佳生长条件为培养时间5 d、温度30°C、pH 值为4、接种量5%、氯嘧磺隆浓度100 mg/L。在此条件下菌株降解率达到89.74%。

3 讨论

氯嘧磺隆因其价格低, 对大豆高度安全, 杀草谱广而被广泛使用, 随着氯嘧磺隆的大量使用, 其

在农田生态系统中的残留不断增加,因此对土壤及水体造成了一定污染。目前国外报道的对氯嘧磺隆有降解作用的微生物主要有曲霉菌属、根霉菌属、链霉菌属等^[1]。国内关于氯嘧磺隆降解菌的报道相对较少,主要有假单胞菌属^[1]、酿酒酵母^[13]。寡养单胞菌属对农药的降解研究国内已有报道^[14-15],而有关寡养单胞菌属对磺酰脲类农药氯嘧磺隆降解的报道本文尚属首次,为构建高效降解氯嘧磺隆基因工程菌和降解菌酶制剂提供菌种资源。

微生物在降解磺酰脲类除草剂中起着非常重要的作用,因此,凡是能够影响微生物活动的因素都将影响它对磺酰脲类除草剂的降解,主要的影响因子有 pH、微生物数量、温度、化合物结构同时还受到农药施用量、土壤类型、氧气供应等的影响^[3]。因此,本研究主要针对温度、接种量、pH、农药浓度 4 个影响因素对菌株 L-7 的降解性能进行研究。结果表明,菌株 L-7 的最佳接种量为 5%,当大于 5% 时,随着接种量的增加,其降解率越来越低。因此,在降解试验中要根据菌株的种类采用适宜的接种量,并非接种量越大降解效率越高。菌株 L-7 的最佳降解浓度为 100 mg/L,当农药浓度低于 100 mg/L 时对降解率的影响较小。菌株 L-7 在温度为 25°C-40°C, pH 4-7 范围内生长良好,并且降解效率较高,在 pH 4 的偏酸条件下菌体生长情况最佳,对氯嘧磺隆的降解最高可达 89.25%,说明菌株 L-7 的生长与降解对温度和 pH 的要求范围较广,具有较好的田间应用潜力。

菌株 L-7 在实验室条件下对氯嘧磺隆有较高的降解能力,其对田间氯嘧磺隆污染土壤的实际修复能力还需要做进一步的研究。此外,本课题还将进一步研究菌株 L-7 与另外 3 种氯嘧磺隆降解菌随机混合的降解效果。为氯嘧磺隆污染土壤的原位生物修复提供理论依据。

4 结论

(1) 从长期施用氯嘧磺隆的土壤中分离到 1 株降解菌 L-7,根据菌株的形态和生理生化特性及 16S rRNA 分析,初步鉴定为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)。

(2) 降解菌 L-7 的最佳生长和降解条件为培养基温度 30°C, pH 为 4, 接种量 5%。

(3) 降解菌 L-7 在含 100 mg/L 的氯嘧磺隆无机

盐培养液中培养 7 d 后,降解率达 80% 以上。

(4) 本研究首次发现寡养单胞菌属细菌降解氯嘧磺隆的特性,为利用寡养单胞菌属细菌降解氯嘧磺隆,进行生物修复奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 王哲,孙纪全,李顺鹏,等. 氯嘧磺隆降解菌株 LW-3 的分离及生物学特性研究. 微生物学通报, 2008, **35**(12): 1899-1904.
- [2] Streck HJ. Fate of chlorsulfuron in the environment. *Pestic Sci*, 1998(53): 52-70.
- [3] 刘祥英,柏连阳. 土壤微生物降解磺酰脲类除草剂的研究进展. 现代农药, 2006, **5**(1): 29-31.
- [4] Joshi MM, Brown HM, Romesser JA. Degradation of chlorsulfuron by soil microorganism. *Weed Science*, 1985(33): 888-893.
- [5] 黄星,何健,潘继杰,等. 甲磺隆降解菌 FLDA 的分离鉴定及其降解特性研究. 土壤学报, 2006, **43**(5): 821-826.
- [6] 邵劲松,沈标,洪青,等. 一株绿磺隆降解菌的分离鉴定及其降解特性研究. 土壤学报, 2003, **40**(6): 952-956.
- [7] Kulowskik, ZirbesEL, Thede BM, et al. Microbial transformations of prosulfuron. *Agric Food Chem*, 1997(45): 1479.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 北京科学出版社, 2001: 370-410.
- [9] William D Hiorns, Barbara A Methe. Bacterial diversity in Adiondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Envir Microbiol*, 1997(63): 2957-2960.
- [10] 丁海涛,李顺鹏,沈标,等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究. 土壤学报, 2003, **40**(1): 123-129.
- [11] 李丽,谢明,周淑云,等. 氯嘧磺隆高效降解菌的分离与筛选. 中国生物防治, 2009, **25**(1): 70-73.
- [12] 武金装,刘红玉,曾光明,等. 柴油降解菌的筛选及其降解特性研究. 农业环境科学学报, 2008, **27**(5): 1742-1746.
- [13] 滕春红,李晓薇,陶波. 氯嘧磺隆降解真菌的分离和鉴定. 东北农业大学学报, 2008, **39**(12): 19-22.
- [14] 李红权,李红梅,蒋继志,等. 一株 DDT 降解菌的筛选、鉴定及降解特性的初步研究. 微生物学通报, 2008, **35**(5): 696-699.
- [15] 许育新,冯昭中,陆鹏,等. 甲基对硫磷降解菌 PF32 的分离鉴定及其降解特性研究. 农药学报, 2009, **11**(3): 329-334.