

• 研究论文 •

可降解水体中烟嘧磺隆微生物的分离与筛选

杨亚君¹, 刘 顺¹, 武丽芬², 庞民好¹, 陶 哺¹, 张金林^{* 1}

(1. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省农药检定所, 石家庄 050031)

摘 要: 为了筛选出可降解烟嘧磺隆的微生物, 利用富集培养技术从水样中分离得到了 5 株能以烟嘧磺隆为唯一氮源、碳源和能源的微生物, 分别编号为 YF1、YB1、YB2、YB3 和 YB4。其中 YF1 为真菌, 其余均为细菌。将所得菌株定量接种于含不同浓度烟嘧磺隆的培养基中, 于 30℃、150 r/min 摇床上振荡培养 5 d 后, 利用 HPLC 检测烟嘧磺隆含量, 计算降解率。结果发现: 这些菌株对低浓度烟嘧磺隆的降解率显著高于对高浓度烟嘧磺隆的降解率, 当培养基中烟嘧磺隆的含量为 2 mg/kg 时, YF1 对该药剂的降解率最高, 为 80.31%, 其次是 YB1 和 YB2, 降解率分别为 78.18% 和 73.72%, 而 YB3 和 YB4 对药剂的降解率只有 36.82% 和 25.75%。对 3 株降解率较高的菌株进行了初步鉴定, 发现 YF1 为黑曲霉 *Aspergillus niger*, YB1 和 YB2 均为芽孢杆菌 *Bacillus* sp。

关键词: 烟嘧磺隆; 微生物降解; 富集培养

中图分类号: O 657.72 X 592

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007) 03-0275-05

Isolation and Screening of Microorganisms Capable of Degrading Nicosulfuron in Water

YANG Ya-jun¹, LU Shun¹, WU Li-fen², PANG Min-hao¹,
TAO Bu¹, ZHANG Jin-lin^{* 1}

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China;

2. Hebei Institute for the Control of Agrochemicals, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract In order to obtain the microorganisms degrading nicosulfuron, five strains of microorganisms numbered as YB1, YB2, YB3, YB4 (bacteria), and YF1 (fungi) were isolated by enrichment culture with nicosulfuron as the only source of carbon, nitrogen and energy. All of the microorganisms were cultured in culture medium containing different concentrations of nicosulfuron, then put it in swing bed at 30℃ and shook at 150 r/min for 5 days, detected the concentration of nicosulfuron by HPLC and calculated the degradation efficiency. It was shown that the degradation rates of the five strains of microorganisms were higher in low concentration than in high concentration of nicosulfuron, with YF1 having the highest degradation rate of 80.31%, secondly, YB1 and YB2 having the degradation rate of 78.18% and 73.72%, respectively, however YB3 and YB4 having lower degradation rate of 36.82% and 25.75%, respectively. It was also discovered that YF1 was *Aspergillus niger*, YB1 and YB2 were *Bacillus* sp. by primary identification.

Key words nicosulfuron; microbial degradation; enrichment culturing

收稿日期: 2007-04-10 修回日期: 2007-07-08

作者简介: 杨亚君 (1980-), 女, 河北晋州市人, 硕士研究生; * 通讯作者 (Author for correspondence): 张金林 (1968-), 男, 河北香河县人, 博士, 教授, 主要从事农药学的教学和科研工作。联系电话: 0312-7528173; E-mail: zhangjinlin@hebau.edu.cn

基金项目: 河北省自然科学基金 (C2007000464); 河北农业大学博士基金项目。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

烟嘧磺隆是一种超高效、广谱的玉米田苗后磺酰脲类除草剂,对于玉米田中的一年生禾本科杂草、部分阔叶杂草及部分莎草科杂草具有较好的防治效果^[1,2],由于其用量低、效果好、对玉米安全,在我国已得到广泛的推广和使用^[3]。目前国内许多农药企业已开始生产该除草剂。烟嘧磺隆在土壤中的移动性较强,易造成对地下水的污染^[4],特别是在该除草剂生产企业排出的工业废水中,烟嘧磺隆的含量较高,为此,对水体中烟嘧磺隆降解作用的研究具有一定的现实意义。

已有的研究表明,微生物降解是解决磺酰脲类除草剂在环境中残留问题的主要途径之一^[5]。Kubwsk i等^[6]报道,降解磺酰脲类除草剂的微生物包括浅灰链霉菌 *Streptomyces griseus*、真菌黑曲霉 *Aspergillus niger* 和青霉 *Penicillium* sp 等。Josh i等从土壤中分离得到的黑曲霉和青霉能催化绿磺隆中磺酰脲桥的水解,产生相应的磺酰脲和杂环^[5]。沈东升等^[7]以甲磺隆为唯一碳源,从经甲磺隆驯化的潮土中分离得到了细菌、真菌和放线菌共 30 多种具有降解活性的菌株。汪海珍等也利用青霉菌很好地修复了被甲磺隆污染过的土壤^[8]。然而目前尚未检索到有关微生物对水体中烟嘧磺隆降解作用的研究报道。作者通过生物富集培养的方法从农药厂排去的污水中分离得到 5 株可降解烟嘧磺隆的微生物,通过对其降解率进行测定,筛选出 3 株高效降解菌株并进行了菌株的初步鉴定。其目的是分离筛选高效降解烟嘧磺隆的微生物,为被烟嘧磺隆污染的水体的生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

水样为采自烟嘧磺隆农药生产厂的污水处理池。药剂为 94.87% 烟嘧磺隆 (nicosulfuron) 原药 (山东京博农化有限公司)。

1.2 供试培养基

富集培养基:其组成为蛋白胨 10 g、氯化钠 1 g、磷酸二氢钾 1 g、葡萄糖 1.0 g 和 1 000 mL 蒸馏水, pH 值为 7.0。

基础培养基:其组成为磷酸二氢钾 0.5 g、磷酸氢二钾 0.5 g、氯化钠 0.5 g、硫酸镁 0.5 g 和蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0。

PDA 培养基:其组成为马铃薯 200 g、葡萄糖

20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.3 可降解烟嘧磺隆微生物菌株的筛选

1.3.1 水样中微生物的驯化处理与富集培养

向供试水样中添加烟嘧磺隆,使其含量为 500 mg/kg,将其置于 30℃、150 r/min 条件下驯化培养 14 d,取 5 mL 经驯化的水样加入到 50 g 含 200 mg/kg 烟嘧磺隆的富集培养基中,于 30℃、150 r/min 下振荡培养 7 d,然后取 5 mL 培养液,转移到 50 g 含 200 mg/kg 烟嘧磺隆的富集培养基中振荡培养,如此重复,共计 5 次。

1.3.2 菌株的筛选与鉴定 将经驯化后的含有水样微生物的培养基均匀涂布到含有 400 mg/kg 烟嘧磺隆的 PDA 平板上,于 30℃ 下培养 48~96 h 后,挑取能产生透明圈的单菌落继续在 PDA 平板上纯化培养并保存菌种。所得分离物若是真菌,则根据其菌丝特征、孢子大小等特征进行菌种的初步鉴定^[9];若是细菌则根据其菌落的形态、颜色、革兰氏染色和一些生理、生化特性进行菌种的初步鉴定^[10]。

1.4 微生物对烟嘧磺隆的降解作用

1.4.1 高效液相色谱检测条件 Agilent 1200LC 高效液相色谱仪。色谱柱 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈, 柱长 125 mm × 4.0 mm, 内径 5 μm; 柱温 30℃; 检测波长 240 nm; 流动相为乙腈-水-冰乙酸 = 30:70:0.05 (体积比); 流量 1.0 mL/min; 进样量 2 μL。

1.4.2 标准曲线的制作 准确称取 0.1336 g 烟嘧磺隆原药,先用甲醇溶解并稀释成 1 000 mg/kg 母液,备用。再用甲醇稀释成 400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.5625 mg/kg 系列浓度的测定液,按 1.4.1 节条件进行色谱分析,以峰面积为纵坐标,以样品浓度为横坐标绘制烟嘧磺隆的标准曲线。

1.4.3 烟嘧磺隆在基础培养基中的添加回收率测定 在盛有 50 g 基础培养基的三角瓶中分别添加烟嘧磺隆,使其含量分别为 0.2、2 和 200 mg/kg,于 30℃、150 r/min 的摇床上振荡 2 h,用等体积的二氯甲烷萃取 3 次,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,于 40℃ 下旋转蒸发浓缩至 2 mL,氮吹仪吹干,甲醇定量至 5 g,每处理重复 3 次,按 1.4.1 节方法测定烟嘧磺隆的含量,计算添加回收率和变异系数。

1.4.4 微生物对烟嘧磺隆降解率的测定 将分离纯化的各菌株分别接种于 PDA 平板上,在 30℃

下培养 3 d 后,用无菌水制备成菌悬液,将菌悬液在 4 000 r/min 下离心 5 min,沉淀物用无菌水洗涤后再次离心,用无菌水稀释沉淀物,制备成含菌量为 2.35×10^7 cfu/mL 的细菌菌悬液或真菌孢子悬浮液。取其 1 mL 接种于 50 g 基础培养基中,在其中添加烟嘧磺隆,使其在培养基中的浓度分别为

$$\text{烟嘧磺隆降解率}(\%) = \frac{\text{对照组含量} - \text{处理组含量}}{\text{对照组含量}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 可降解烟嘧磺隆菌株的筛选与纯化

供试水样中的微生物经高浓度的烟嘧磺隆驯化处理和富集培养后,接种于含烟嘧磺隆 400 mg/L 的 PDA 平板上培养 48 h 部分微生物因分解了烟嘧磺隆而在菌落的周围产生了透明圈(见图 1),将可产生透明圈的微生物纯化后并保存菌种,菌株分别编号为 YB1、YB2、YB3、YF1、YB4。其中对烟嘧磺隆降解率较高的 3 个菌株进行菌种鉴定,结果发现,YB1、YB2 均为杆状细菌,均能产生

芽孢(见图 2),以培养基中加入烟嘧磺隆但不接种菌体的为对照。每处理重复 3 次。将各处理置于 30℃、150 r/min 摇床上振荡培养 5 d 后,按 1.4 节的条件测定各处理中的烟嘧磺隆含量,按下列公式计算各菌株对烟嘧磺隆的降解率。

芽孢(见图 2),其中 YB1 为褐色、扁平状不规则菌落,YB2 为凸起有褶皱的淡黄色菌落,两株细菌的生理和生化特征见表 1。参照伯杰细菌鉴定手册(第八版)^[10],初步鉴定 YB1 和 YB2 均属于芽孢杆菌 *Bacillus* sp。经培养发现,YF1 为真菌,在 PDA 平板上培养 48 h 后菌落为淡黄色(见图 1),培养 60 h 时菌丝上产生顶囊球形分生孢子梗,小梗顶端产生瓶状产孢细胞,产生直径为 0.3~1 mm 的黑色椭圆形分生孢子,初步鉴定为黑曲霉 *Aspergillus niger*(见图 2)。

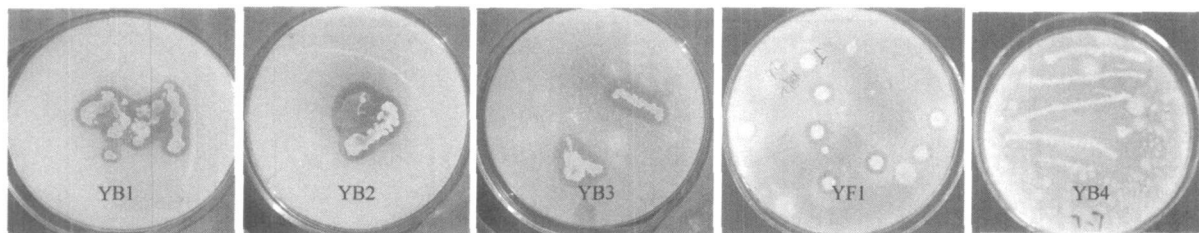


图 1 不同菌株在含烟嘧磺隆平板上产生水解圈的结果

Fig 1 Different nicosulfuron degrading microorganisms formed the degradation ring of nicosulfuron on agar plates

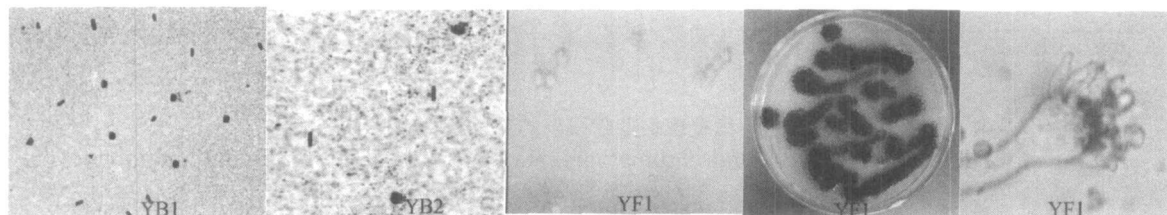


图 2 降解菌株的菌落、菌丝及孢子形态特征

Fig 2 Morphology characters of colony, microscopy and spores of microorganisms

2.2 供试微生物对烟嘧磺隆的降解率

2.2.1 烟嘧磺隆标准曲线 结果见图 3。标准曲线的线性回归方程为 $Y = 3.4648x - 4.0895$, 相关系数 r 为 0.9998, 可见,用供试条件对烟嘧磺隆进行定量分析其方法是可行的。

2.2.2 烟嘧磺隆在培养基中的添加回收率 结果表明,供试条件可以较好地将对烟嘧磺隆与其他

杂质分离,烟嘧磺隆的保留时间为 5.3 min(图 4),3 个不同添加浓度的平均回收率均在 90% 以上,变异系数均小于 8% (见表 2)。可见,用二氯甲烷萃取可以较好地将基础培养基中的烟嘧磺隆提取出来。

2.2.3 烟嘧磺隆的降解率 结果(表 3)表明,供试菌株对低浓度烟嘧磺隆的降解率显著高于对高

浓度烟嘧磺隆的降解率。其中,培养基中烟嘧磺隆的浓度为 2 mg/kg 时,真菌 YF1 对药剂的降解率最高,为 80.31%,其次是细菌 YB1 和 YB2 分别为 78.18% 和 73.72%,而 YB3 和 YB4 对药剂的降解率均较低;当烟嘧磺隆浓度为 10 mg/kg 时,各菌株的降解率都有所下降;而当烟嘧磺隆浓度为 200 mg/kg 时,降解率最低。

表 1 烟嘧磺隆降解菌株的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristic of strains capable of degrading nicosulfuron		
菌株 Strains	YB1	YB2
革兰氏染色反应 Gram reaction	+	+
细胞形状 Cellular shape	杆状 rod	杆状 rod
运动性 Move or not	运动 move	运动 move
接触酶反应 Catalase	+	+
M. R 试验 M. R test	-	-
V. P 试验 V. P test	+	+
葡萄糖氧化发酵	+	+
Fermentation of glucose		
水解淀粉 Hydrolyzing starch	+	+
柠檬酸生长试验 Citrate utilization	+	+

注:“+”阳性反应;“-”阴性反应。Note “+” positive “-” negative

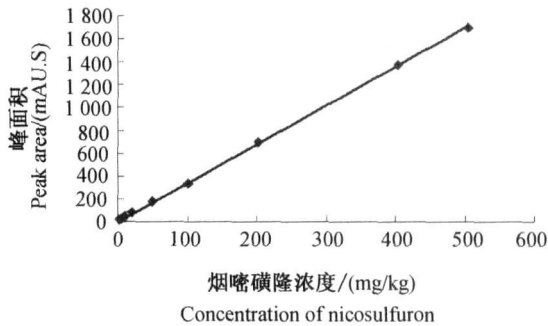


图 3 烟嘧磺隆标准曲线线性关系图

Fig 3 Calibration curves of nicosulfuron

表 2 烟嘧磺隆在培养基中的添加回收率及其变异系数
Table 2 Recovery and variation coefficients of nicosulfuron fortified in culture medium

添加浓度 Fortified concentration /(mg/kg)	平均回收率* Average recovery (X ±S) * (%)	变异系数 C. V. (%)
0.2	96.32 ± 2.6	3.2
2.0	98.58 ± 6.7	7.6
200	94.02 ± 2.8	3.3

* 回收率为 3 次重复的平均值; S 为标准差。

* All the recoveries are averages of three replications. S means the standard deviation.

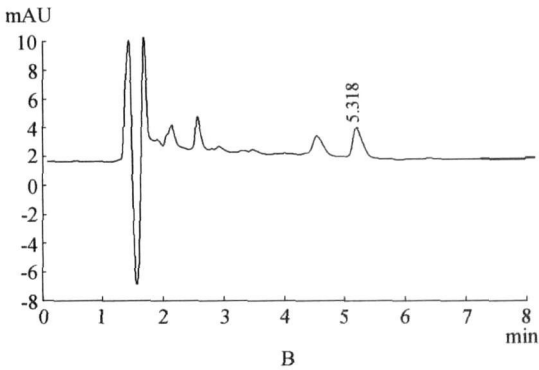
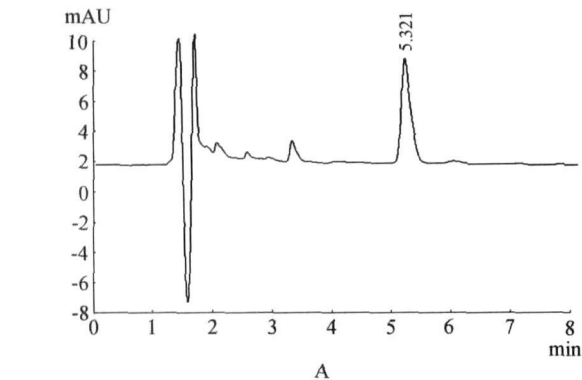


图 4 不同处理的烟嘧磺隆的高效液相色谱图

Fig 4 High performance liquid chromatograms of nicosulfuron at different conditions

A: 对照; B: 接种 YB1 菌株

A: CK; B: Inoculated the strain of YB1

表 3 降解菌株对培养基中不同浓度烟嘧磺隆的降解率 (%)

Table 3 Degradation rates of nicosulfuron at different concentration by microorganisms (%)					
烟嘧磺隆浓度 Concentration of nicosulfuron /(mg/kg)	YF1	YB1	YB2	YB3	YB4
2	80.31*** a	78.18*** a	73.72*** a	36.82** a	25.75* a
10	62.12*** b	70.42*** b	37.39*** b	30.50** b	19.86 b
200	51.50*** c	22.84** c	12.63* c	10.22* c	9.23* c

注:表中同列中不同字母表示 P = 0.05 水平差异显著;表中同行中不同星号表示 P = 0.05 水平差异显著。
Note: The different letters in the same column indicate statistically significant difference at P = 0.05. The different stars in the same row indicate statistically significant difference at P = 0.05.

3 讨论

生物修复是一种行之有效的清除环境中有机污染物的生物技术,其目标是采用各种可行的方法来加速和强化微生物对有机污染物的降解能力。利用微生物来降解水体及土壤中的长残效除草剂,方法更可行,更具有实际意义,而且已有成功的实例^[8,11,12]。目前,农药降解菌的获得主要有两条途径:其一是从长期受污染的环境中分离、筛选;其二是通过富集培养获得^[13~16]。前者因所得到的微生物种类很多,致使目标菌筛选的工作量很大。本研究从长期受烟嘧磺隆污染的水体中采样,将水样中的微生物在以烟嘧磺隆为唯一氮源、碳源和能源的培养基中进行驯化,经过5代驯化处理后,使能够以烟嘧磺隆作为营养物的微生物成为优势种群。通过分离发现,在PDA平板上经驯化后的水样中微生物种类远远少于所采集的水样。在富集培养的基础上,将待分离物接种于含烟嘧磺隆的不透明白色PDA平板上,经培养后发现,部分微生物菌落周围产生了透明圈,这是由于微生物分解了培养基中的烟嘧磺隆所致。利用这套方法可以快速筛选出对烟嘧磺隆降解能力较强的菌株,而且目标针对性强,工作量相对较小。

综合评价各菌株降解烟嘧磺隆的情况,发现分离出的细菌的降解能力低于真菌,其原因还有待于进一步研究。本试验筛选出了降解能力较强的菌株,并且从菌丝特征、孢子大小、菌落形态、颜色、革兰氏染色及生理生化特征等方面对菌株进行了初步鉴定。由于缺乏基因水平的数据作支持,因此还有待结合16S rDNA序列分析法作进一步菌种鉴定。关于菌株的最适降解条件以及降解机理也还需进一步研究。

参考文献:

- [1] MORTON C A, HARVEY R G, KELLS J J et al Effect of DIF-V 9360 and Terbufos on Field Corn and Sweet corn (Zea mays) under Three Environmental Conditions [J]. Weed Technol, 1991, 5(1): 130-136.
- [2] YANG Pei-su(杨培苏), JIANG Shu-ren(江树人), ZHAO Hong-bo(赵洪波). 烟嘧磺隆在玉米和土壤中的残留分析和消解动态研究[J]. Pesticides(农药), 1998, 37(1): 31-33
- [3] SU Shao-quan(苏少泉). 烟嘧磺隆在我国开发[J].

Pesticides(农药), 2003, 42(7): 5-8.

- [4] ZHANG W ei(张伟), WANG Jin-jun(王进军), ZHANG Zhong-ming(张忠明), et al 烟嘧磺隆在土壤中的吸附及与土壤性质的相关性研究[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2006, 8(3): 265-271
- [5] DSHIM M, BROWN H M, ROMESSER J A. Degradation of Chlorsulfuron by Soil Microorganism [J]. Weed Science, 1985, 33: 888-893.
- [6] KULOWSKI K, ZRBES E L, THEDE B M, et al Microbial Transformations of Prosulfuron [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1479-1485.
- [7] SHEN Dong-sheng(沈东升), FANG Cheng-ran(方程冉), ZHOU Xu-hui(周旭辉). 土壤中降解甲磺隆除草剂的微生物的分离与筛选[J]. J Shanghai Jiao tong Univ (Agric Sci) (上海交通大学学报·农业科学版, 2002, 20(3): 86-189
- [8] WANG Hai-zhen(汪海珍), XU Jian-min(徐健民), XIE Zheng-miao(谢正苗). 甲磺隆污染土壤生物修复的初步探索[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2003, 5(4): 53-58
- [9] WEI Jing-chao(魏景超). Manual of Determinative Fungi(真菌鉴定手册) [M]. Shanghai(上海): Shanghai Science & Technology Press(上海科技出版社), 1979.
- [10] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(伯杰细菌鉴定手册) [M]. Group of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology of Microbiological Institute of Chinese Academy of Science(中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组), 译. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1984
- [11] ZHANG Hong-jun(张宏军), CUI Hai-lan(崔海兰), ZHOU Zhi-qiang(周志强). 莠去津微生物降解的研究进展[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2002, 4(4): 10-16.
- [12] YAN Chun-xin(闫春秀), ZHAO Chang-shan(赵长山), LIU Ya-guang(刘亚光). 微生物降解长残效除草剂的研究进展[J]. J Northeast Agric Univ(东北农业大学学报), 2005, 36(5): 650-654.
- [13] YIM ei-qin(仪美芹), WANG Kai-yun(王开运), JIANG Xing-yin(姜兴印), et al 降解甲基对硫磷真菌的分离及降解特性[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2000, 2(4): 40-43.
- [14] WU Hui-ming(吴慧明), ZHANG Jing(张晶), ZHU Guo-nian(朱国念). 新型杀螨剂 F1050优势降解菌(芽孢杆菌)的筛选及其鉴定[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2004, 6(2): 43-47
- [15] LIU Zhi(刘智), LI Shun-peng(李顺鹏). 甲基对硫磷降解菌 DLL-1的诱变育种[J]. Acta Pedologica Sinica(土壤学报), 2003, 40(2): 293-300
- [16] MANDELBAUM, WACKETT R T, WACKETT L P. Isolation and Characterization of a Pseudomonas sp. That Mineralizes the S-Triazine Herbicide Atrazine [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1451-1457

(Ed. JIN SH)