

高效降解氯嘧磺隆菌株的分离筛选

燕红¹,代英杰²,赵冉¹

(1. 哈尔滨理工大学 化学与环境工程学院,黑龙江省高校绿色化工技术重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学 资源与环境学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以氯嘧磺隆为唯一碳源,从多年施用氯嘧磺隆的土壤中经富集和分离纯化获得了8株氯嘧磺隆降解菌。通过对其菌体和菌落形态的观察,确定其中有5株细菌,2株放线菌和1株真菌。采用玉米主根生长抑制率的生物测定法,对8株菌的氯嘧磺隆降解率进行测定,最终筛选出1株氯嘧磺隆高效降解放线菌B-4,其氯嘧磺隆降解率可达97.2%。

关键词:氯嘧磺隆;氯嘧磺隆降解菌;分离筛选

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)06-0972-04

Isolation and Screening of High Effective Chlorimuron-Ethyl Degrading Strain

YAN Hong¹, DAI Ying-jie², ZHAO Ran¹

(1. College of Chemical and Environmental Engineering, Harbin University of Science and Technology, Key Laboratory of Green Chemical Technology of College of Heilongjiang Province, Harbin 150040; 2. School of Resources Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: In this study, eight strains using chlorimuron-ethyl as the sole carbon source were isolated from soil that applied chlorimuron-ethyl for years. Through colony and thalli configuration observation, five strains of bacteria, two strains of actinomycetes and one strain of fungal were determined. By measuring chlorimuron-ethyl degradation efficiency using the bio-assay, one strain of actinomycetes B-4 with degradation efficiency of 97.2% was obtained.

Key words: Chlorimuron-ethyl; Chlorimuron-ethyl degrading strain; Isolation and screening

氯嘧磺隆(也称豆磺隆)是20世纪80年代初期美国杜邦公司开发的磺酰脲类除草剂,自90年代大面积使用以来,由于其杀草谱广、超高活性、高选择性、可混性强、价格低等特点,一直是大豆田化学除草剂的主要品种,但由于残留期长,其土壤残留不仅对后茬敏感作物造成严重药害,导致作物减产或绝产,而且还可能对土壤环境造成污染^[1-2]。如何清除土壤中长残留的除草剂,解决残留药害和减少环境污染是很多学者关注的课题^[1,3]。随着生物技术的迅猛发展,应用微生物进行生物修复已成为环境修复的一个重要内容。生物修复技术具有快速、安全、费用低廉的优点,因此被称为环境友好替代技术^[4-5]。当前,利用微生物降解长残留除草剂已成为清除土壤中长残留除草剂的热点,因此,该研究拟从长期施用氯嘧磺隆的土壤中分离筛选出高效降解氯嘧磺隆的菌株,为开发生物治理氯嘧磺隆残留微生物菌剂及进行生物修复奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土壤样品 黑龙江省伊春地区大豆田间多年施用氯嘧磺隆的土壤,经粉碎,过筛。

1.1.2 培养基 富集培养基:蛋白胨0.5 g,磷酸二氢钾0.1 g,硫酸镁0.05 g,蒸馏水100 mL。

牛肉膏蛋白胨培养基(用于细菌分离):牛肉膏0.3 g,蛋白胨0.5 g,氯化钠0.5 g,琼脂2 g,蒸馏水100 mL。

马丁氏培养基(用于真菌分离):蛋白胨0.5 g,葡萄糖1 g,磷酸二氢钾0.1 g,硫酸镁0.05 g,琼脂2 g,蒸馏水100 mL,加1%孟加拉红水溶液0.33 mL,临用时每100 mL培养基中加1%链霉素0.3 mL。

改良高氏一号培养基(用于放线菌分离):硝酸钾0.1 g,磷酸氢二钾0.05 g,硫酸镁0.05 g,氯化钠

收稿日期:2011-08-19

第一作者简介:燕红(1976-),女,副教授,博士,从事环境微生物与生物化学研究。E-mail:yanhong204821@yahoo.com.cn。

0.05 g, 硫酸亚铁 0.001 g, 可溶性淀粉 2 g, 琼脂 2 g, 蒸馏水 100 mL。

PDA 培养基: 马铃薯 20 g, 蔗糖 2 g, 琼脂 2 g, 水 100 mL。

1.1.3 试验器材 恒温培养箱、人工气候箱、超净工作台、高压蒸汽灭菌锅、电子分析天平、光学显微镜等。

1.2 试验方法

1.2.1 降解菌的富集 取田间多年施用氯嘧磺隆的土壤样品 10 g, 溶解于 90 mL 灭菌的生理盐水中, 制得土壤悬浊液^[6-7]。在 250 mL 三角瓶中, 加入 100 mL 富集培养基 (含氯嘧磺隆的浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 按 10% 的接种量接种土壤悬液, 于 28°C , $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床培养 5 d, 将培养液按 10% 接种量接种于氯嘧磺隆浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新鲜富集培养基中, 然后于 28°C , $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇瓶培养 5 d, 依次类推 10 次接种, 按氯嘧磺隆 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度梯度增长, 使最终富集培养液的氯嘧磺隆的浓度达到 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 得到富集降解菌株培养物种子。

1.2.2 降解菌的分离纯化 降解菌富集过程中, 每 2 次转接后, 将菌悬液进行逐级梯度稀释。取 0.15 ~ 0.2 mL 适当稀释梯度的样品溶液分别涂布于牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏培养基和改良高氏一号培养基平板。于 28°C 培养 2 d, 挑取单一菌落划线培养于分离平板, 并通过反复平板划线并结合菌落形态和显微镜观察菌体形态进行分离纯化, 直至获得纯菌株。然后将纯菌株分别接种于牛肉膏蛋白胨、PDA 和改良高氏一号斜面保存培养基中, 于 28°C 下恒温培养 2 d 后, 放入 4°C 冰箱保藏备用。

1.2.3 降解试验 分别用接菌环挑 1 环细菌、放线

菌和真菌的斜面培养物, 接入分别装有 50 mL 含 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯嘧磺隆的牛肉膏蛋白胨 (细菌)、改良高氏一号和 PDA 液体培养基的 250 mL 三角瓶中。于 28°C , $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床培养, 进行降解试验, 4 d 后取培养液适当稀释, 混土做生测, 由玉米主根长抑制率求出氯嘧磺隆残留量, 计算出氯嘧磺隆的降解率。氯嘧磺隆降解率 (%) = (初始氯嘧磺隆量 - 培养后氯嘧磺隆量) / 初始氯嘧磺隆量 $\times 100$

1.2.4 氯嘧磺隆含量的测定 采用玉米主根长抑制率法, 测定土壤中的氯嘧磺隆浓度^[8-11]。采集的土壤经自然风干, 去除杂质后待用。将玉米种子在 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ 温箱中浸种 24 h 后再催芽 20 h, 待玉米种子露白后, 选取芽长一致的种子备用。将一定量的氯嘧磺隆混入土样中, 配制成 0、0.5、1、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 9 个浓度的氯嘧磺隆药土, 将不同处理药土装入纸杯, 每纸杯播种 2 粒玉米种子, 每处理设 4 次重复。将纸杯放入 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱, 黑暗条件下培养, 第 3 天测玉米主根长, 建立氯嘧磺隆浓度与玉米主根生长抑制率之间的标准曲线。玉米主根生长抑制率的计算公式为: 玉米主根生长抑制率 (%) = (自然状态玉米主根长 - 玉米主根长) / 自然状态玉米主根长 $\times 100$

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离纯化

通过 10 次转接富集和 5 次分离, 根据菌落形态特征并结合显微镜菌体特征观察, 从土壤样品中共分离纯化出 8 株菌 (表 1), 其中 5 株细菌、2 株放线菌和 1 株真菌 (酵母菌)。按菌株种类分别接种于牛肉膏蛋白胨、PDA 和改良高氏一号试管斜面培养基上, 于 4°C 冰箱中保存备用。

表 1 从土样中分离纯化出的菌株

Table 1 Separated strains from soil samples

菌株编号 Strain numbers	菌类别 Strain classification	革兰氏反应 Gram staining	大小 Size	形状 Shape	排列 Arrangement	有无芽孢 With or without spore
A-1	细菌	+	短小	杆菌	单个	无
A-2-1	细菌	+	短小	杆菌	单个	无
A-3	细菌	-	较大	球菌	单个	无
B-2	细菌	+	较小	球菌	单个	无
C-1	细菌	+	较长	杆菌	单个	无
B-3	放线菌	-	-	-	-	-
B-4	放线菌	-	-	-	-	-
C-2	真菌 (酵母)	-	较大	腊肠	两个首尾相连	-

2.2 氯嘧磺隆高效降解菌株的筛选

2.2.1 生物测定氯嘧磺隆含量标准曲线的绘制

氯嘧磺隆对玉米主根生长具有抑制作用,因此可根据不同氯嘧磺隆浓度环境下生长的玉米的主根长度,建立起氯嘧磺隆浓度与玉米主根生长抑制率之间的标准曲线。

随着氯嘧磺隆浓度的增加,玉米主根长逐渐减小(表2)。以玉米主根生长抑制率为纵坐标,氯嘧磺隆浓度的对数 $\ln(C+1)$ 为横坐标,绘制标准曲线见图1。此标准曲线的线性关系式为: $y = 0.1679x + 0.0597$ 。它的线性相关系数 R^2 值为0.9916,说明此标准曲线的氯嘧磺隆浓度的对数 $\ln(C+1)$ 和玉米主根生长抑制率之间存在良好的线性关系,可以通过测定玉米生长于未知土壤样品中的主根长度,进而求得主根生长抑制率来计算土壤样品中氯嘧磺隆的浓度。

2.2.2 高效菌株的筛选

将分离纯化获得的8株菌分别接种于分别装50 mL含 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯嘧磺隆的牛肉膏蛋白胨、改良高氏一号和PDA液体培养基中,于 28°C , $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床培养,4 d后取培养液混土做生测,由玉米主根长抑制率求出氯嘧磺隆残留量,计算出氯嘧磺隆的降解率。从表3可知,8株菌中除A-2-1和A-3外,其它6株菌4 d内对 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯嘧磺隆的降解率均在60%以上。其中有4株菌的降解率达到了90%以上,它们分别是A-1、B-2、B-3和B-4,而放线菌B-4对氯嘧磺隆的降解率最高,达到了97.2%。该菌株于改良高氏一号

培养基上呈现白色的不规则形状,无光泽(图2),于 $100 \times$ 显微镜下菌丝呈交叉分布(图3)。

表2 生物测定中氯嘧磺隆含量与玉米主根生长抑制率

Table 2 Content of chlorimuron-ethyl and inhibiting ratio of maize radicle in bioassay

氯嘧磺隆浓度 Chlorimuron-ethyl concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	氯嘧磺隆浓度对数 logarithms of chlorimuron-ethyl concentration, $\ln(C+1)$	玉米主根长 Main root length/mm	玉米主根生长抑制率 Inhibiting ratio of maize radicle/%
0	0	60	0
0.5	0.4054	46	23.33
1	0.6931	40	33.33
5	1.7917	38	36.66
10	2.3978	33	45.00
20	3.0445	25	58.33
30	3.4339	22	63.33
40	3.7137	20	66.66
50	3.9318	16	73.33

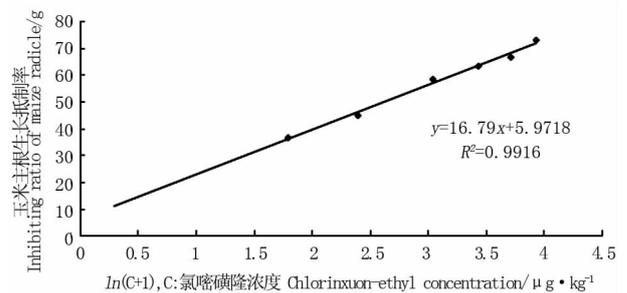


图1 生物测定中氯嘧磺隆含量标准曲线

Fig. 1 Dependence curve of chlorimuron-ethyl concentrations and inhibiting ratio of maize radicle in bioassay

表3 各菌株对氯嘧磺隆的降解率

Table 3 Degradation efficiency of chlorimuron-ethyl by strains

菌株编号 Strain numbers	未加入含氯嘧磺隆菌液的玉米主根长 Main root length without chlorimuron-ethyl/mm	加入含氯嘧磺隆菌液后的玉米主根长 Main root length after addition with chlorimuron-ethyl/mm	玉米主根生长抑制率 Inhibiting ratio of maize radical/%	氯嘧磺隆降解率 Degradation rate of chlorimuron-ethyl/%
A-1	60.00	44.25	26.25	91.9
A-2-1	60.00	31.00	48.33	49.2
A-3	60.00	31.00	48.33	49.2
B-2	60.00	43.50	27.50	90.8
B-3	60.00	44.25	26.25	91.9
B-4	60.00	49.00	18.33	97.2
C-1	60.00	35.75	40.42	71.9
C-2	60.00	33.50	44.17	62.6

3 结论

通过富集与分离纯化最终得到8株以氯嘧磺隆为唯一碳源的氯嘧磺隆降解菌,其中有5株细

菌,2株放线菌,1株真菌。对分离出的8株氯嘧磺隆降解菌进行筛选,最终筛选出一株氯嘧磺隆高效降解的放线菌B-4,其对氯嘧磺隆的降解率高达97.2%。

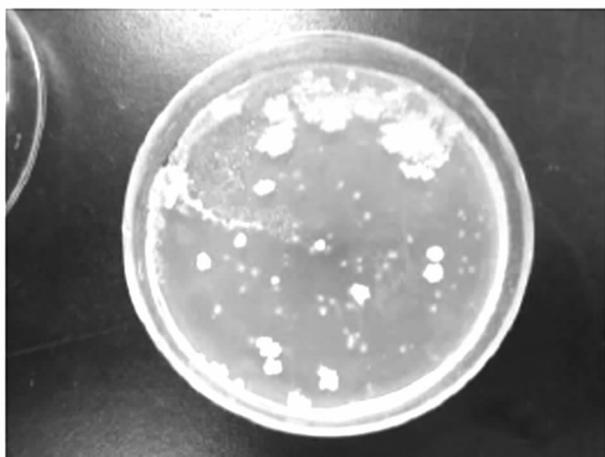


图 2 B-4 于改良高氏一号培养基的菌落

Fig. 2 Colony formed by B-4 on the improved Gause 1 plate



图 3 B-4 的菌丝体(100 ×)

Fig. 3 Mycelial morphology of B-4(100 ×)

参考文献

- [1] 陶波,何钟佩. 作保灵(TNA)对大豆保护效应及机制的研究[J]. 大豆科学,2000,19(2):189-192. (Tao B, He Z P. Protective action and mechanism of TNA on soybean[J]. Soybean Science,2000,19(2):189-192.)
- [2] Anderson R L, Barrett M R. Residual phytotoxicity of chlorsulfuron in two soils [J]. Journal of Environmental Quality, 1985, 14: 111-114.
- [3] Kotoula-Syka E, Hatzios K K. Interactions of tribenuron with four safeners and piperonyl butoxide on corn (*Zea mays*) [J]. Weed Science, 1996, 44: 215-218.
- [4] Brian J R, Fermor T R, Semple K T. Induction of PAH--catabolism in mushroom compost and its use in the Biodegradation of soil-associated phenanthrene [J]. Environmental Pollution, 2002, 118 (1): 65-73.
- [5] Haimi J. Decomposer animals and bioremediation of soils [J]. Environmental Pollution, 2000, 107(2): 233-238.
- [6] Venkaleswarlu K. Persistence and biodegradation of carbofuran in flooded soils [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, 25: 533-538.
- [7] 土壤微生物研究会. 土壤微生物实验法 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 267-293. (Soil microorganism research association. Experiment method of soil microorganism [M]. Beijing: Science Press, 1983: 267-293.)
- [8] 宋小玲, 马波, 皇甫超河, 等. 除草剂生物测定方法 [J]. 杂草科学, 2004(3): 3-8. (Song X L, Ma B, Huang-Pu C H, et al. Bioassay methods of herbicides [J]. Weed Science, 2004(3): 3-8.)
- [9] 陶波, 苏少泉. 广灭灵生测方法的研究 [J]. 农药科学与管理, 1995(3): 8-10. (Tao B, Su S Q. Study on bioassay methods of Clomazone [J]. Pesticide Science and Administration, 1995(3): 8-10.)
- [10] Streibig J C. Herbicide bioassay [J]. Weed Research, 1988, 28: 479-484.
- [11] 滕春红. 氯嘧磺隆对土壤微生态的影响及其高效降解真菌的研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006: 24-31. (Teng C H. Effects of chlorimuron-ethyl on the soil microecosystem and research of chlorimuron-ethyl degrading fungi [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006: 24-31.)