

丁草胺高效真菌的分离及性能研究

李 川, 古国榜, 柳 松

(华南理工大学应用化学系, 广东 广州 510640)

摘 要: 采用现场采样、室内培养富集测出等方法, 对能高效降解丁草胺的真菌进行了分离鉴定, 并研究了其降解性能。结果表明, 从经常使用丁草胺的稻田土壤中分离出的茄类镰刀菌(*F. sp. solani*), 该菌能以丁草胺为惟一碳源生长, 在马丁氏液体培养基中, 于培养 15~60 h 期间, 生长速度最快。在丁草胺基础无机盐培养液中, 在接种量为 5×10^5 孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 温度为 35 °C, pH 值为 6.0, 丁草胺浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养时间为 35 h 的最佳条件下, 降解率高于 97.4%。该菌对生物治理丁草胺水环境污染显示出重要的潜在应用价值。

关键词: 茄类镰刀菌; 分离; 降解; 丁草胺

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1672-2043(2004)03-0611-04

Isolation and Its Degradability of High Efficiency Butachlor Fungi

LI Chuan, GU Guo-bang, LIU Song

(Department of Applied Chemistry, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Water and soil are seriously polluted due to much production and improper application of butachlor that is an effective herbicide. Most butachlor in water and soil was degraded by microbe, but the efficiency of degradation by bacteria was not high enough to cope with the pollution. By enrichment shaking culture, *F. sp. Solani* capable of degrading butachlor was isolated from rice soil in which butachlor was often applied, and purified by successive streak transfer on agar-plant medium. The growth characteristics and the kinetics of butachlor biodegradation were studied by shaking flask test. Factors concerning degradation efficiency involved inoculation, temperature, pH, butachlor concentration, and culturing time. After bio-treatment and centrifugation, butachlor residue in solution was extracted by refined petroleum ether. The organic phase was filtered through a column filled with dry sodium sulfate. Concentration of butachlor in solution was determined by chromatography. *F. sp. Solani* could grow on medium with sole carbon of butachlor, but grew fastest in liquid Martin medium containing butachlor during culturing 15~60 h. The degradation rate increased with the increase of inoculation no more than 5×10^5 spores $\cdot \text{mL}^{-1}$, decreased obviously when temperature was lower than 30 °C or higher than 37 °C due to the decrease of enzyme activity resulted from the deterioration of protein at higher or lower temperature and was more than 90% when temperature was 30 °C ~ 37 °C. Partially acidic environment was favorable to the microbe. The degradation percentage was more than 87.4% when pH was 5.0~7.5 and decreased fast when environment became basic, which indicated the wide pH adaptability of the microbe. The suitable butachlor concentration was 25~100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. During the culturing conditions, the microbe completed spore germination and cell growth in 15 h, and degraded butachlor fast from 16 h to 35 h. on MM medium with butachlor. The degradation percentage was more than 97.4% in the optimum culture condition with inoculation 5×10^5 spores $\cdot \text{mL}^{-1}$, 35 °C, pH 6.0, butachlor concentration $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and culturing 35 h. The microbe degraded butachlor effectively in MM medium, which suggested that it might have greatly potential value to bio-treatment of the water polluted by butachlor.

Keywords: *F. sp. Solani*; isolation; degradation; butachlor

丁草胺是一种高效内吸传导型酰胺类芽前除草剂, 杀草活性高, 选择性强, 在我国广为生产和应用, 也对环境造成了很大的影响。一方面, 这类除草剂的生产废水或残液直接排放, 对生态环境构成明显的危害^[1]; 另一方面, 农田中残留的丁草胺随水纵向渗透

和横向流失, 造成地下水及江河污染; 再者, 丁草胺对藻类、光合细菌、固氮细菌等许多微生物的生长有抑制作用, 从而破坏了土壤及水体微生态平衡^[2,3]。

丁草胺常温下挥发性小, 抗光解性能好^[4], 其在水体和土壤中的消解主要是被微生物降解^[5,6]。吴新杰^[7]等分离出能降解水体中丁草胺的细菌, 但其降解效率还不高。考虑到真菌酶系全, 对生物降解各种污染物具有巨大潜能, 且其较易适应不利环境, 生物降

收稿日期: 2003-08-18

作者简介: 李 川(1970—), 男, 湖北省监利县人, 博士研究生, 从事环境生物与高级氧化技术研究。E-mail: chuan248@163.com

解能力较稳定等优势^[8], 本研究从经常使用丁草胺的稻田土壤中分离并鉴定了一株对丁草胺有高效降解能力的真菌——茄类镰刀菌 (*F. sp. solani*), 为丁草胺等酰胺类除草剂及含氮农药的环境寻求新的污染生物治理方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样

分别采集已连续使用丁草胺 3 年以上的中稻和晚稻田土壤, 按 5 点取样, 采集表层土 ($\delta < 4$ cm), 置于已灭菌的广口塑料瓶中备用。共得 4 份土样。

1.1.2 试剂

丁草胺原药 (95%), 广州农药厂; 丁草胺准确含量为 99.1% 的标准品 (沈阳化工研究院)。

1.1.3 培养基

(1) 丁草胺基础无机盐培养液^[9]: 将基础无机盐 (MM) 溶液进行高压蒸汽灭菌后, 按试验要求加入不同浓度的丁草胺作为惟一碳源。

(2) 丁草胺马丁氏液体培养基^[10]: KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0。灭菌后, 加入一定量的丁草胺。

(3) 丁草胺马丁氏固体培养基^[10]: 在 1 000 mL 马丁氏液体培养基中加入琼脂 20 g, 1% 的孟加拉红水溶液 3.3 mL 及一定量的丁草胺。临用时以无菌操作在每 100 mL 的培养基中加入 1% 的链霉素 0.3 mL, 使其终浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 然后分别制成平板培养和斜面培养基备用。

1.2 试验方法

1.2.1 降解菌的筛选、分离与鉴定

(1) 降解菌的富集: 参考瓶培养法富集技术^[11], 在 4 个 250 mL 的三角瓶中分别加入 50 mL 丁草胺基础无机盐培养液 (含丁草胺 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 加入 10 g 土样, 置于 35°C 恒温摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养, 以后每周添加 5 mL 的新鲜培养液, 每次增加丁草胺的浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 富集培养时间约 2 个月, 至培养液中的丁草胺浓度达 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

(2) 降解菌的分离纯化: 用平板划线法在丁草胺马丁氏固体培养基上对经过富集培养后的菌液进行纯化培养。取优势菌落, 在同样的培养基上进一步纯化数次。

(3) 高效降解菌的筛选与保藏: 将纯化的菌珠接种于斜面培养基上培养后, 加入无菌水制成菌悬液,

接种 0.1 mL 菌悬液于 $10 \text{ mL} \cdot 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丁草胺基础无机盐培养液中, 35°C 恒温摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 35 h, 提取丁草胺并进行分析, 由此挑选出对丁草胺降解率最大的菌珠接种于斜面培养基上, 35°C 恒温培养 12 h, 置于 4°C 冰箱保藏, 作为后续研究的高效降解菌种。

(4) 菌种的鉴定: 由中科院广东省微生物研究所代鉴。

1.2.2 降解菌的生长曲线测定

向保藏的斜面菌种中加入适量的无菌水, 制成菌悬液, 取 2 mL 该菌悬液加入装有 100 mL 丁草胺马丁氏液体培养基的三角瓶中, 35°C 恒温摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养, 每隔 6 h 拿出 1 瓶, 将菌体从培养液中取出, 放在烘箱中, 60°C 烘干至恒重并称量。

1.2.3 降解菌对丁草胺的降解性能测定

(1) 菌悬液的制备: 将保藏的斜面菌种放在 35°C 恒温箱中培养活化 24 h, 然后在菌珠斜面上加入无菌水至斜面顶, 用接种环刮下菌苔, 接种于含有 25 mL 马丁氏液体培养基^[10]的 100 mL 三角瓶中, 35°C 恒温摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 20 h 后, 培养液经 $4\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃去清液, 菌体用 pH 7.0, $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 磷酸盐缓冲液 10 mL 分 10 次洗涤, 并用该缓冲液稀释, 使其浓度为 5×10^7 孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(2) 反应液的配制: 将菌悬液和丁草胺基础无机盐培养液^[9]以一定比例在烧杯中混合均匀, 使混合液达到试验所需要的丁草胺浓度和菌体浓度, 然后用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 和的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 到一定值, 即得反应液。

(3) 影响丁草胺降解率的因素: 每 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 反应液作为处理样, 35°C 恒温摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养, 间隔取样, 测定残余丁草胺的浓度, 求出降解率。在接种量、温度、pH 值、丁草胺浓度、时间等因素中, 分别考察某个因素的不同水平对丁草胺降解的影响。试验均重复 3 次。

1.3 分析测试

(1) 样品处理: 将已降解的反应液离心 ($4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min) 并真空过滤, 取 10 mL 上层液, 移入 125 mL 分液漏斗中, 加入少许无水硫酸钠, 用 $3 \times 30 \text{ mL}$ 重蒸石油醚振荡萃取 3 次, 有机相经无水硫酸钠柱过滤, 再用重蒸石油醚定容 25 mL, 摇匀待测。

用同样的方法从含 5, 50, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁草胺的反应液中提取丁草胺时, 回收率分别为 (89.1 ±

2.01)%, (98.5 ± 2.83)%, (95.4 ± 3.14)%。

(2) 仪器及操作条件: 美国 PE 公司 Autosystem GC9000 气相色谱仪, 带氢火焰离子化检测器 (FPD); 美国 HP3395 积分仪, 纸速 3mm · min⁻¹; 2 000 × 3.0 mm 不锈钢色谱柱, 内装填 3% OV-225 固定液, 涂于 Chromsorb W AW DMCS (80 ~ 100 目) 担体上, 柱子经 265 °C 老化 24 h 以上; 气体流速分别为载气 (高纯 N₂) 30, 氢气 (H₂) 45, 空气 450 mL · min⁻¹; 温度控制为气化室 250 °C, 色谱柱 200 °C, 检测器 250 °C; 进样量 1 μL。

在此分析条件下, 丁草胺的保留时间为 2.8 min, 检测器对丁草胺的响应呈线性关系。该方法的准确度、精确度和灵敏度均能满足丁草胺残留分析的基本要求^[12]。

(3) 结果计算: 根据样品峰面积、标样峰面积及取液抽取所用重蒸石油醚的体积、进样量, 计算出培养液中丁草胺的含量。计算公式:

$$X = A_x / A_0 \times a \times V_0 / V_x$$

式中: A_x 为待测样峰面积; V_x 为未知样进样量; a 为标准样浓度; A_0 为标准样峰面积; V_0 为标准样进样量。

2 结果与讨论

2.1 降解菌的筛选及鉴定结果

筛选富集培养后, 发现只有接种土样 2 的三角瓶中的培养液出现浑浊。在相同条件下, 测定 4 瓶培养液中的丁草胺含量, 发现 2 号三角瓶中的丁草胺的含量最少。将接种土样 2 的浑浊培养液划线培养, 分离出 1 株优势菌。根据菌体形态、培养特性和生理生化反应特性与镰刀菌属 (*Fusarium*) 的描述基本相符, 进一步鉴定, 这株真菌为茄类镰刀菌 (*F. sp. solani*)。用这株真菌进行丁草胺降解试验, 结果, 降解率达 97.39%, 可以选取该菌作为后续的高效降解菌种。

2.2 茄类镰刀菌的生长曲线

茄类镰刀菌的生长曲线见图 1。由图 1 可知, 在丁草胺马丁氏液体培养基上, 茄类镰刀菌的迟缓期为 10 ~ 15 h, 指数期约为 15 ~ 60 h, 此期该菌生长速度最快, 稳定期为 60 ~ 80 h, 此期菌体量可达最高。以下试验均取 20 h 作为接种材料。

2.3 影响茄类镰刀菌降解丁草胺的因素

2.3.1 接种量

丁草胺浓度为 50 mg · L⁻¹, 当反应液中的接种量分别为 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 mL 菌悬液时, 调节

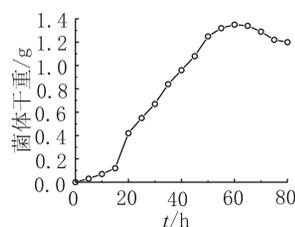


图 1 茄类镰刀菌的生长曲线

Figure 1 Growth curve of *F. sp. Solani*

pH6.0, 35 °C 恒温摇床 (180 r · min⁻¹) 培养 35 h 后, 丁草胺降解率分别为 64.75%, 90.03%, 97.42%, 98.87%, 99.01%, 说明降解率随接种量增大而升高, 见图 2。但当接种量达到一定程度 (0.5 mL 菌悬液, 折合成菌体孢子浓度 5 × 10⁵ 孢子 · mL⁻¹) 时, 则对丁草胺降解率的影响不明显。

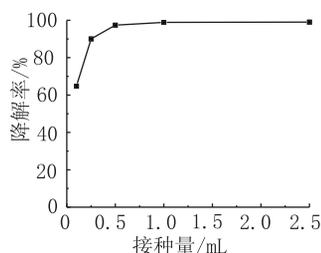


图 2 不同接种量时丁草胺的降解

Figure 2 Degradation of butachlor under different *F. sp. Solani* biomasses

2.3.2 温度

当丁草胺浓度为 50 mg · L⁻¹, 菌悬液接种量为 0.5 mL, pH = 6.0 时。分别在 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 43 °C 和 45 °C 摇床培养 35 h, 测定菌株对丁草胺的降解率, 见图 3。由图 3 可以看出, 该菌对丁草胺的最佳降解温度为 35 °C, 在 30 °C ~ 37 °C 范围内, 温度升高对丁草胺降解率的影响不大, 均在 90% 以上。温度低于 30 °C 或高于 37 °C, 丁草胺降解率显著下降, 这是因为温度太低或太高, 蛋白质变性导致代谢酶活性降低。

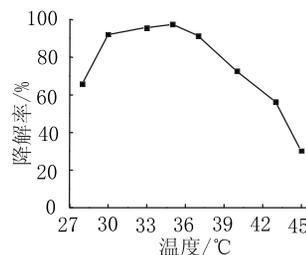


图 3 不同温度时丁草胺的降解

Figure 3 Degradation of butachlor under different temperatures

2.3.3 pH 值

当丁草胺浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 菌悬液的接种量为 0.5 mL 时, 分别在 $\text{pH} = 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0$ 时, 35°C 摇床培养 35 h 后, 测定丁草胺降解率, 结果见图 4。由图 4 可知, 茄类镰刀菌倾向于偏酸环境, 当环境呈碱性时, 则降解率急剧下降。在 $\text{pH} 6.0$ 时, 其降解率最高; 在 pH 为 $5.0 \sim 7.5$ 范围内, 其降解率也可达 87.4% 以上, 表明茄类镰刀菌对 pH 具有较广的适应范围。

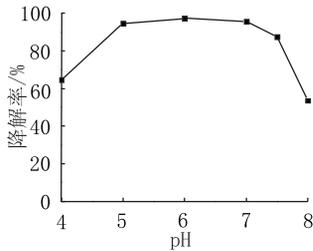


图 4 不同 pH 值时丁草胺的降解

Figure 4 Degradation of butachlor under different pH values

2.3.4 丁草胺的浓度

在反应液中, 接种量为 0.5 mL 菌悬液, $\text{pH} = 6.0$, 35°C 恒温摇床 ($180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养的试验条件下, 丁草胺的浓度分别为 $25, 50, 100, 150$ 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 茄类镰刀菌对丁草胺的降解率分别为 $95.8\%, 97.4\%, 90.67\%, 63.25\%$ 和 45.32% , 表明该菌对丁草胺有较宽的降解范围, 最适浓度在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 见图 5。

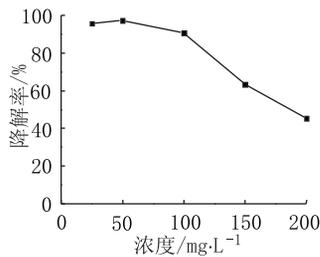


图 5 不同浓度时丁草胺的降解

Figure 5 Degradation of butachlor under different concentrations

2.3.5 培养时间

降解率与培养时间的关系见图 6。由图 6 可知, 菌体培养 15 h 之前降解率较低, 仅为 23.30% , 在此期间, 菌体主要完成孢子萌发及菌体增长过程; 16 h 以后才进入快速降解时期, 降解率明显增高, 到了 35 h 时, 降解率已达 97.4% 。

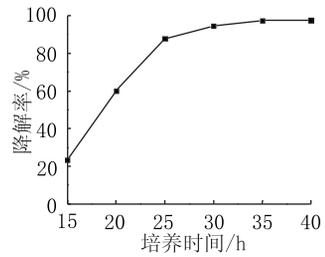


图 6 不同培养时间下丁草胺的降解

Figure 6 Degradation of butachlor under different incubation time

(F. sp. solani), 进一步说明了丁草胺在土壤中被微生物的可降解性。该菌能以丁草胺为唯一碳源生长, 在马丁氏液体培养基中, 于培养 $15 \sim 60 \text{ h}$ 期间生长速度最快。

(2) 在丁草胺基础无机盐培养液中, 该菌株降解丁草胺的最佳培养条件是: 接种量为 5×10^5 孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 温度为 35°C , pH 值为 6.0 , 丁草胺浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 适宜的培养时间 35 h 左右, 在此条件下降解率高于 97.4% 。

(3) 该菌对基础无机盐溶液中的丁草胺具有强烈的降解能力, 大大高于已报道的细菌^[7]。这是因为真菌酶系完全, 适应能力强、活性高。因此, 对生物治理丁草胺水环境污染显示出重要的潜在应用价值, 而其在土壤中对丁草胺的降解特性仍需进行试验探讨。

参考文献:

- [1] 华小梅, 单正军. 我国农药的生产、使用状况及其污染环境因子分析[J]. 环境科学进展, 1996, 4(2): 33 - 45.
- [2] Lee K M. Effects of butachlor on the growth of purplenor sulfur bacteria [J]. *Misaengmul Hakhoechi*, 1991, 29(2): 130 - 135.
- [3] Zager M Y. Effects of benthocarb and butachlor on growth and nitrogen fixation by cyanobacteria[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1990, 45 (2): 232 - 234.
- [4] 花日茂, 李湘琼, 李学德, 等. 丁草胺在不同类型水中的光化学降解[J]. 应用生态学报, 1999, 10(1): 57 - 59.
- [5] Beetman G B, Deming D M. Dissipation of acetanilide herbicides from soils[J]. *Agronomy Journal*, 1974, 66(2): 308 - 311.
- [6] Moon, Young Hee. Effects of heavy metals on the degradation of fenitrothion, IBP (Iprobenfos) and butachlor in flooded soils[J]. *Han Guk Nonghwa Hakhoeshi*, 1990, 33(2): 138 - 142.
- [7] 吴新杰, 岳永德, 花日茂, 等. 丁草胺高效降解细菌的分离[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(6): 593 - 596.
- [8] 金志刚, 张 彤, 朱怀兰. 污染物生物降解[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1997. 28 - 30.
- [9] 徐文东, 文湘华, 付莉燕. 偶氮染料派拉丁蓝 RRN 脱色细菌的选育与研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(增刊): 127 - 132.
- [10] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 6, 56 - 57.
- [11] [日]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.
- [12] 樊德方. 农药残留分析与检测[M]. 上海: 科学技术出版社, 1982, (第一版). 117 - 121.

3 结论

(1) 通过富集培养, 从施用丁草胺的稻田土壤中获得了高效降解丁草胺的真菌, 经鉴定为茄类镰刀菌