

4株苯磺隆降解菌的分离鉴定及其生长特性

田爽, 田方方, 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:从长期受农药苯磺隆污染的土壤中通过采用富集培养分离技术得到4株以苯磺隆为唯一碳源生长的细菌,分别将其命名为B1、B2、B3和B4。通过观察这4种菌株的形态学特征,研究其生理生化特性以及分析其16S rDNA序列,初步鉴定菌株B1为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),B2为戴尔福特菌(*Delftia* sp.),B3为微杆菌(*Microbacterium* sp.),B4为产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。并通过研究温度、初始pH值、接种量、苯磺隆初始浓度、培养基体积、氮源、碳源、 Mg^{2+} 浓度等因素对4种菌株生长情况的影响,确定了菌株的最佳生长条件。结果显示,B1菌株的最适温度为35℃,其他3株菌株均为30℃。菌株B3最适pH为8.0,其余3株菌株均为pH 7.0。B1和B3菌株最适接种量为15%,B2和B4最适接种量为10%。菌株B3最适苯磺隆初始浓度为100 mg·L⁻¹,其余菌株最适苯磺隆初始浓度均为200 mg·L⁻¹。4株菌株最适培养基体积均为75 mL,最适氮源均为硝酸铵,最适碳源均为葡萄糖。B2菌株最适 Mg^{2+} 浓度为100 mg·L⁻¹,其余3株菌株均为200 mg·L⁻¹。B1和B4菌株最适NaCl浓度为20 g·L⁻¹,B2菌株NaCl浓度为5~30 g·L⁻¹,B3菌株最适NaCl浓度为50 g·L⁻¹。该结果为利用微生物对农药苯磺隆污染的土壤进行原位生物修复提供理论依据。

关键词:苯磺隆;降解菌;分离鉴定;生长特性

中图分类号:X172

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2014)05-0437-09

doi: 10.13254/j.jare.2014.0153

Isolation, Identification and Growth Characteristics of Four Tribenuron-methyl Degrading Bacteria

TIAN Shuang, TIAN Fang-fang, WANG Xiao-ping*

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

Abstract: Four bacteria named B1, B2, B3 and B4 which were able to degrade tribenuron-methyl, were isolated from the soil of long term applied with tribenuron-methyl by enrichment culture. Based on physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the strain B1 was identified preliminarily as *Pseudomonas aeruginosa*, the strain B2 was identified preliminarily as *Delftia* sp., the strain B3 was identified preliminarily as *Microbacterium* sp., and the strain B4 was identified preliminarily as *Alcaligenes* sp.. The effect of temperature, initial pH, inoculation amount, initial concentration of tribenuron-methyl, medium volume, nitrogen source, carbon source and Mg^{2+} concentration on growth efficiencies was studied. The results showed that B1 optimal temperature was 35 °C, the rest were 30 °C. B3 optimal initial pH was 8.0, the others were 7.0. B1 and B3 optimal inoculation amount were 15%, B2 and B4 optimal inoculation amount were 10%. B3 optimal initial concentration of tribenuron-methyl was 100 mg·L⁻¹, the other three were 200 mg·L⁻¹. The four bacteria optimal medium volume all were 75 mL, optimal nitrogen source were ammonium nitrate and optimal carbon source were glucose. B2 optimal Mg^{2+} concentration was 100 mg·L⁻¹, the others were 200 mg·L⁻¹. B1 and B4 optimal sodium chloride concentration were 20 g·L⁻¹ while B2 could grow well from 5 g·L⁻¹ to 30 g·L⁻¹, B3 optimal sodium chloride concentration was 50 g·L⁻¹. The results provide theoretical basis for using bacteria in situ bioremediation of soil pollution of tribenuron-methyl.

Keywords: tribenuron-methyl; degrading bacteria; isolation and identification; growth characteristics

苯磺隆(Tribenuron-methyl),又名麦乐乐、苯黄隆、巨星(杜邦)、亿力、阔叶净、麦磺隆等,是20世纪80年代由美国杜邦公司开发的一种内吸传导型磺酰

脲类麦田除草剂^[1-4],主要用于防除各种一年生阔叶杂草,对播娘蒿、荠菜、碎米荠、麦家公、藜、反枝苋等效果较好,对地肤、繁缕、蓼、猪殃殃等也有一定的防除效果,对田蓟、卷茎蓼、田旋花、泽漆等效果不显著,对野燕麦、看麦娘、雀麦、节节麦等禾本科杂草没有效果^[5-6]。苯磺隆在我国长江、黄河和淮河流域有着广泛的使用范围。苯磺隆的大量使用,给土壤、水体、生物及大气等诸多环境因子造成大量污染,影响农业生产

收稿日期:2014-06-06

基金项目:黑龙江省教育厅科技项目“抗除草剂微生物的分离与鉴定”(12541253)

作者简介:田爽(1989—),女,硕士研究生,主要研究方向为分子遗传学。E-mail: tianshuang0801@163.com

*通信作者:王晓萍 E-mail: dr_wxp@sina.com

和生态平衡^[7-9]。因此,解决苯磺隆的残留问题对改善除草剂对作物的药害,修复受除草剂污染的土地有重要的理论意义和实际价值。

在生态系统中,作为分解者的微生物,代谢类型多样,适应环境的能力极强,能利用各种人工合成的农药作为碳、氮源生长,并将其完全降解成无机物。微生物降解技术安全、快速、费用低廉,大量研究已经证明微生物对农药的降解是一种行之有效的修复方法,对农业生产及环境保护具有极其重要的现实和理论意义。

目前,国内外关于苯磺隆的研究主要集中在田间药效、残留分析方法研究及其对植物生理特性的影响等方面^[7,9-18]。对能够降解苯磺隆的菌种的分离、鉴定和生长特性的研究目前还很少^[19-21]。Zhang^[20]筛选出一株能够降解苯磺隆的降解菌,经其初步鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),可以在 5 d 内降解 200 mg·L⁻¹ 的苯磺隆,降解效率达到 80%。王惟帅等^[21]筛选出一株能够降解苯磺隆的降解菌,并对其生长特性进行研究。就所查资料,尚未发现国外在苯磺隆降解菌方面的研究报道。

本研究以山东地区长期施用苯磺隆除草剂的麦田土壤为试验材料,分离筛选出对苯磺隆有降解活性的菌株,并通过形态学特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析进行分类鉴定,并研究了降解菌的生长特性,以期对苯磺隆微生物降解的深入研究和苯磺隆降解菌的产业化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试土壤

山东省菏泽单县长年(至少 4 年)施用苯磺隆的农田土壤,取土表及以下 5~15 cm 的耕层土壤,过 40 目筛备用。

1.1.2 培养基

无机盐培养基(MSM, g·L⁻¹): 2.0 (NH₄)₂SO₄, 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.5 NaH₂PO₄, 0.1 CaCl₂, 0.5 K₂HPO₄, pH 7.0。LB 培养基(g·L⁻¹): 10.0 蛋白胨, 5.0 酵母粉, 5.0 NaCl, pH 7.0~7.2。

1.1.3 农药

10%可湿性粉剂(安徽金泰农药化工有限公司)。

1.1.4 主要试剂

胶回收试剂盒(博大泰克公司)、卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)、链霉素(Str)、四环素(Tet)、红霉

素(Ery)、庆大霉素(Gen)和氯霉素(Dhl)。

1.1.5 主要仪器

pH 计(Beckman, 美国)、紫外分光光度计(U2008, 日本)、低温冷冻离心机(Beckman Allegra 21R, 美国)、PCR 扩增仪(PTC-100, MJResearch, 美国)。

1.2 苯磺隆降解菌株的富集与分离纯化

取 10 g 备用土壤放入装有 100 mL 无菌生理盐水的 250 mL 三角瓶中,加入适量的玻璃珠,摇床振荡约 1 min,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⁻¹ 苯磺隆的 100 mL 无机盐培养基中,置于 30 ℃、150 r·min⁻¹ 的恒温摇床中振荡培养 7 d。每周移种 1 次,以接种量 10%接入到新鲜的无机盐培养基溶液中,苯磺隆浓度以 100 mg·L⁻¹ 的梯度递增,至培养基中苯磺隆浓度达到 500 mg·L⁻¹。将最终所得的降解菌溶液用无菌水稀释成 10 倍,取 0.1 mL 涂布到牛肉膏蛋白胨培养基上,置于 35 ℃培养箱中培养 2 d,待生长茂盛后挑取单菌落,在培养基上反复多次划线分离、纯化。经初筛、复筛和纯化后,将分离的降解菌接种于 LB 斜面培养基上,编号,置于 4 ℃条件下冷藏保存备用。

1.3 苯磺隆降解菌的鉴定

1.3.1 降解菌的形态观察及生理生化鉴定

用平板涂布法将富集和纯化后的苯磺隆降解菌接种,在恒温培养箱中 30 ℃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[22]。

1.3.2 降解菌的分子鉴定

采用 CTAB 法提取降解菌总 DNA, 16S rDNA 引物设计参见文献[23]。F8/20: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; F1541/20: 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'。

扩增反应体系为: 10×Buffer(Mg²⁺) 5 μL, dNTPs (2 mmol·L⁻¹) 3 μL, 引物 (20 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, 菌体 DNA(约 50 mg·L⁻¹) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.5 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 30 个循环, 72 ℃ 10 min。扩增产物在 4 ℃中保存。

将 PCR 扩增产物送于上海生工公司进行测序,将测序结果进入 GenBank 数据库进行相似性分析。并与 GenBank 中的相近序列在 Clustal W 程序包中进行多重序列匹配排列分析,最后形成一个多重序列匹配排列阵,用 MEGA 4.0 程序包中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,计算模型为 Kimura2-parameter, 计算次数为 1 000 次。

1.4 菌株降解苯磺隆的生长因素研究

将菌株接种在 50 mL LB 液体培养基(pH 7.0)中,之后在温度为 30 ℃,转速为 150 r·min⁻¹ 的恒温摇床中振荡培养 18~24 h(OD₆₀₀=0.30),再按 5%(V/V)的量接种于无机盐培养基中,初始 pH 为 7.0,初始苯磺隆浓度为 50 mg·L⁻¹,温度为 30 ℃,150 r·min⁻¹ 恒温摇床振荡培养,分别进行以下几组处理测定生长量的变化,每种因素设 3 个重复试验,同时设接种灭活的菌株为对照组,24 h 后取样测定菌株生长量变化。

设温度分别为 20、25、30、35、40、45 ℃;用 NaOH 或 HCl 调节初始 pH 值分别至 4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0;设接种量分别为 5%、10%、15%、20%、25%;设苯磺隆初始浓度分别为 10、50、100、200、300、400、500、600 mg·L⁻¹;设培养基体积分别为 25、50、75、100、150、200 mL;设氮源分别为 NH₄NO₃、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、NaNO₃;设碳源分别为葡萄糖、蔗糖和乳糖;设 Mg²⁺浓度分别为 100、200、300、400、500 mg·L⁻¹;设 NaCl 浓度分别为 5、10、20、30、50、100、150、200 g·L⁻¹;设抗生素分别为卡那霉素、四环素、庆大霉素、链霉素、氯霉素、氨苄青霉素、红霉素。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的分离和生理生化鉴定

从长期受农药苯磺隆污染的土壤中通过采用富集培养分离技术得到 4 株能够降解农药苯磺隆的细菌,分别将其命名为 B1、B2、B3 和 B4。其形态学鉴定结果和生理生化实验结果见表 1 和表 2。

表 1 四株菌的形态学鉴定结果

Table 1 Results of morphological identification of four strains

菌落特征	B1	B2	B3	B4
菌落形态	圆形	圆形	圆形	圆形
表面结构	微凸	凸起	凸起	凸起
表面光滑程度	不光滑	光滑	光滑	不光滑
颜色	黄绿色	略乳黄	白色	黄色
透明度	半透明	略透明	不透明	不透明
边缘结构	波浪状	整齐	整齐	整齐
粘滞性	不易挑	易挑起	易挑起	易挑起
菌体形态	杆状	杆状	杆状	杆状
革兰氏染色	+	-	+	-
芽孢	+	-	-	+
荚膜	-	-	-	+
鞭毛	+	+	-	+
运动性	+	+	-	+

表 2 四株菌生理生化实验结果

Table 2 Results of physiological and biochemical experiments of four strains

生理生化实验	B1	B2	B3	B4
荧光色素试验	+	+	-	+
脓青素的产生试验	-	+	-	-
丙二酸利用试验	+	-	-	+
柠檬酸盐作用试验	+	+	-	+
耐盐性和需盐性试验	2%	+	+	+
	5%	+	+	+
	7%	+	+	+
	10%	+	+	-
氧化酶试验	+	+	+	+
接触酶试验	+	+	+	+
甲基红(M.R)试验	+	-	-	-
V.P 试验	+	-	-	-
淀粉水解试验	-	-	-	-
纤维素分解试验	-	-	-	-
3- 酮基乳糖测定试验	-	-	-	-
硝酸盐还原试验	+	+	+	+
亚硝酸还原试验	+	-	-	+
反硝化试验	-	+	-	+
产氨试验	-	+	-	-
吡啶试验	+	-	+	-
苯丙氨酸脱氨酶试验	-	-	-	-
明胶液化试验	+	+	-	-
硫化氢试验	+	+	-	+
乙醇氧化试验	+	-	-	-
脲酶试验	+	-	+	-
葡萄糖氧化发酵试验	氧化	发酵	发酵	-

注:“+”表示结果阳性;“-”表示结果阴性。

2.2 降解菌株系统发育树的构建

分别以 B1、B2、B3 和 B4 的基因组 DNA 为模板,以细菌 16S rDNA 为通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物。将其与 GenBank 上的其他序列用 Blast 软件进行同源性分析比对,结果表明菌株 B1 与 *Pseudomonas aeruginosa* NO5 的 16S rDNA 序列的同源性高达 100%,B2 与多株戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)细菌的 16S rDNA 序列同源性达 99%,B3 与多株微杆菌属(*Microbacterium* sp.)细菌的 16S rDNA 序列同源性达 99%,B4 与 *Alcaligenes* sp. MHS013 的 16S rDNA 序列同源性高达 100%。将所得序列应用 MEGA 4.0 软件采用近邻法构建系统发育树,如图 1~图 4 所示。再结合形态学特征分析和生理生化反应特性的结果,分别将这 4 株菌株初步鉴定为铜绿假单胞

菌(*P.aeruginosa*)、戴尔福特菌(*Delftia* sp.)、微杆菌(*Microbacterium* sp.)、产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。

2.3 菌株降解苯磺隆的生长因素研究

2.3.1 温度对菌株生长情况的影响

结果如图 5 所示,降解菌株 B1 在 35 ℃时生长情况最好,OD₆₀₀ 值明显高于其他几个设定温度,达到 0.640,其后随温度增加而迅速降低。降解菌株 B2、B3 和 B4 在 20~40 ℃的范围内均可生长;在 20~30 ℃时,降解菌株 B2、B3 和 B4 的生长量 OD₆₀₀ 值随温度升高而增加;30 ℃时 OD₆₀₀ 达到最大,分别达到 0.638、0.699 和 0.668,其后 OD₆₀₀ 值随温度升高而降低。4 株降解菌均不能在较高温度下生长,它们最适的生长温度范围在 25~35 ℃之间,其中降解菌株 B2、B3 和 B4 生长的最适温度为 30 ℃,菌株 B1 则为 35 ℃。

2.3.2 初始 pH 值对菌株生长情况的影响

结果如图 6 所示,pH 7.0 时,降解菌株 B1、B2 和 B4 生长情况最好;当 pH 小于 7.0 或大于 7.0 时,降解菌株生长量即 OD₆₀₀ 的值均下降。相比较来说在 B1、B2 和 B4 三株降解菌中,降解菌株 B1 具有良好的 pH 值适应性,可在较广泛的 pH 值范围内生活。降解菌株 B3 在 pH 8.0 时生长最好,菌体生长量即 OD₆₀₀ 达到 0.743,当 pH 小于 8.0 或大于 8.0 时,菌体生长量均下降。

2.3.3 接种量对菌株生长情况的影响

结果如图 7 所示,在一定范围内,提高接种量可以加快生长速率,缩短延滞期。在营养充足的条件下,降解菌株 B1 和 B3 接种量在 15%(V/V)时,细菌生长活力明显增强。在 5%~15% 范围内,接种量越大降解

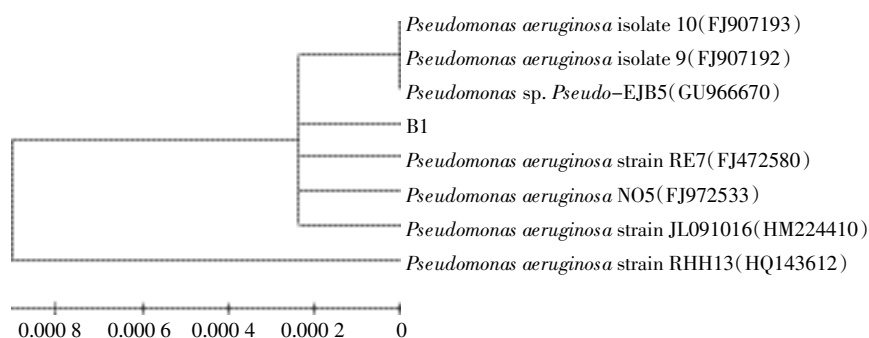


图 1 B1 的系统发育树

Figure 1 Pictures of phylogenetic tree of strain B1

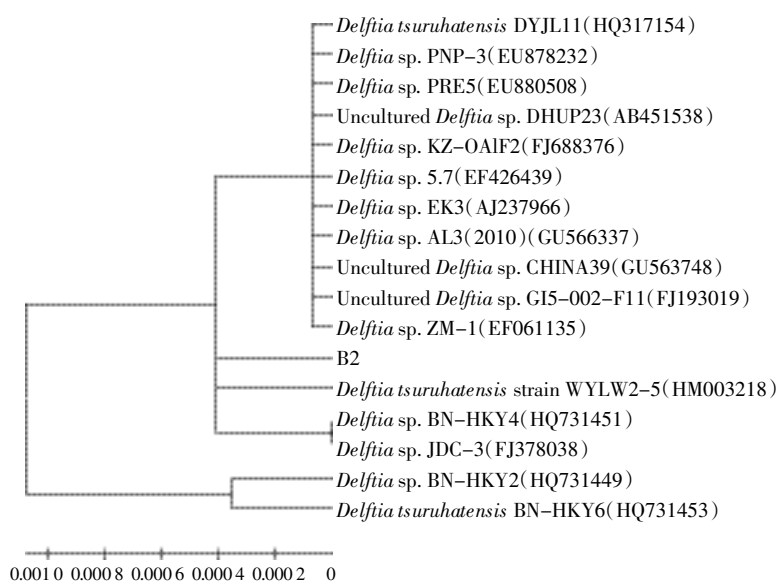


图 2 B2 的系统发育树

Figure 2 Pictures of phylogenetic tree of strain B2

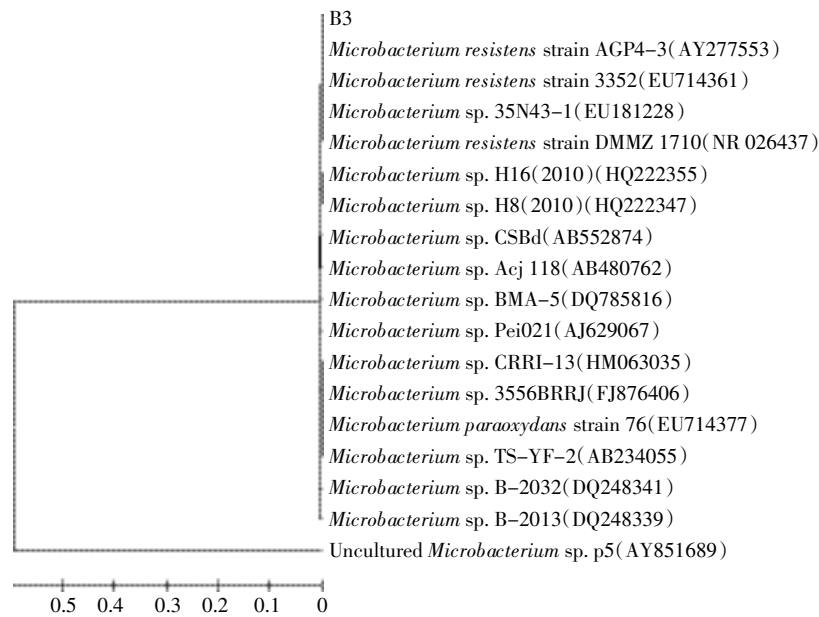


图 3 B3 的系统发育树
Figure 3 Pictures of phylogenetic tree of strain B3

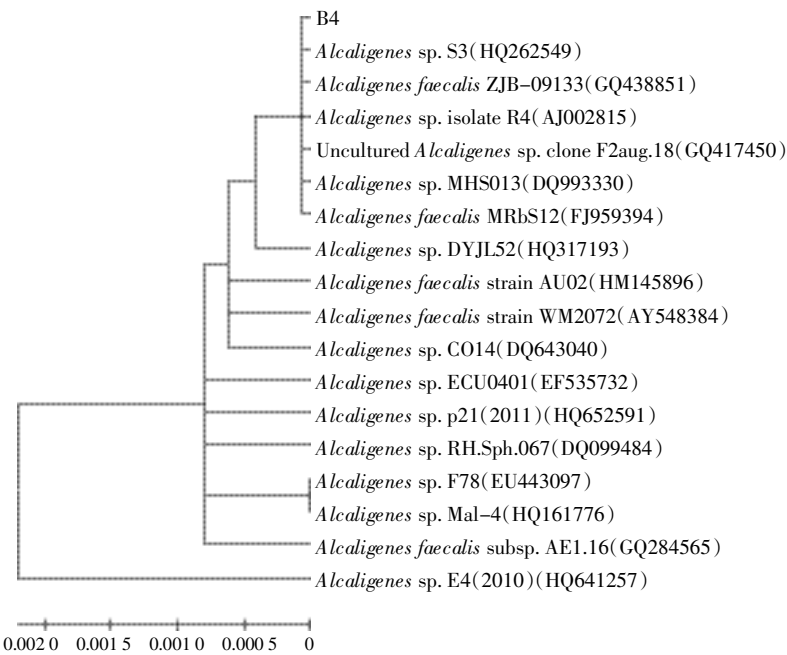


图 4 B4 的系统发育树
Figure 4 Pictures of phylogenetic tree of strain B4

菌株 B1 和 B3 的生长量越大,成正相关。菌株 B2 和 B4 在接种量为 10%时,OD₆₀₀ 值均达到最大。

2.3.4 苯磺隆初始浓度对菌株生长情况的影响

结果如图 8 所示,降解菌株 B1、B2 和 B4 在苯磺隆浓度 10~200 mg·L⁻¹ 的范围内,OD₆₀₀ 值随浓度增加而增大;在 200 mg·L⁻¹ 时降解菌株 B1、B2 和 B4 的生

长最佳,OD₆₀₀ 值达到 0.780、0.761 和 0.708;当苯磺隆浓度大于 200 mg·L⁻¹ 时,OD₆₀₀ 值随浓度增加反而减小。菌株 B3 在 10~100 mg·L⁻¹ 之间随浓度增加而升高;在 100 mg·L⁻¹ 苯磺隆条件下生长情况最好,OD₆₀₀ 值达到最大 0.758;其后随着苯磺隆浓度的增加 OD₆₀₀ 值降低。4 株降解菌均对 600 mg·L⁻¹ 浓度的苯磺隆不

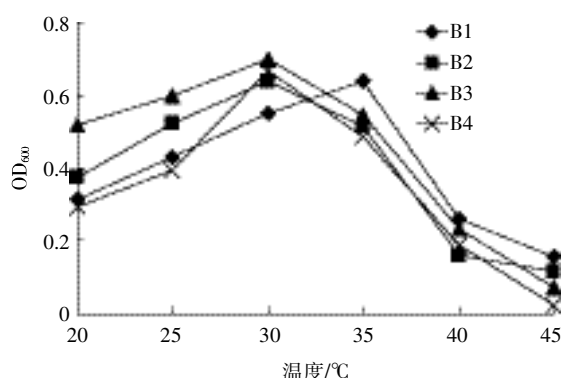


图 5 温度对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响

Figure 5 Effects of different temperature on growth of strain B1, B2, B3 and B4

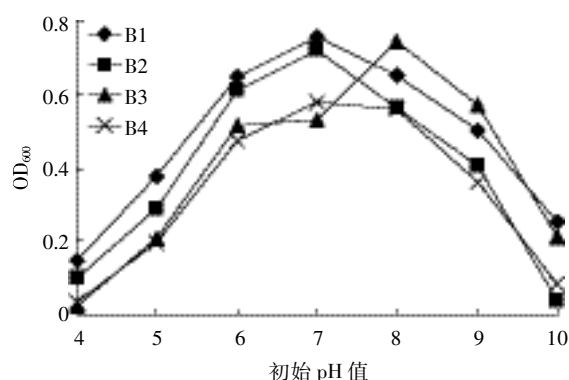


图 6 初始 pH 值对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响

Figure 6 Effects of different initial pH on growth of strain B1, B2, B3 and B4

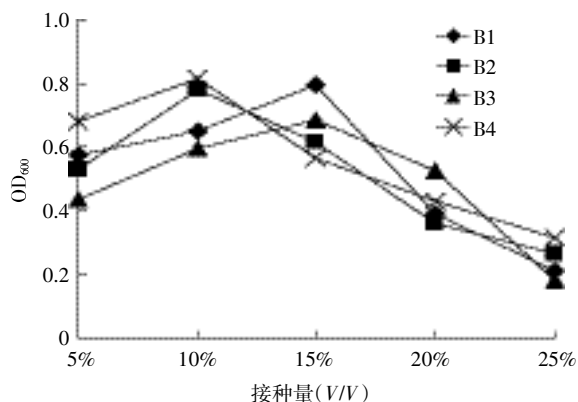


图 7 接种量对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响

Figure 7 Effect of inoculum concentration on growth of strain B1, B2, B3 and B4

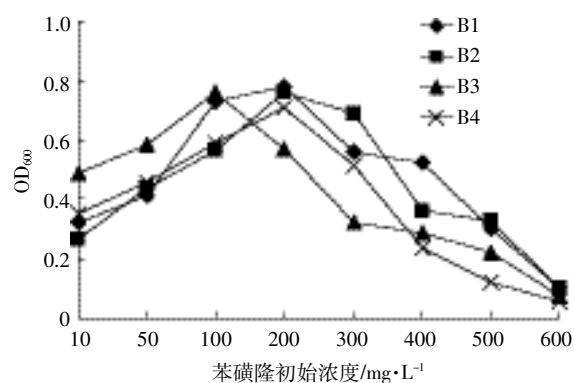


图 8 苯磺隆初始浓度对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响

Figure 8 Effects of initial tribenuron-methyl concentration on growth of strain B1, B2, B3 and B4

耐受。

2.3.5 培养基体积对菌株生长情况的影响

结果如图 9 所示,在 250 mL 的三角锥瓶中装入 25~150 mL 的无机盐液体培养后,4 株菌均可以正常生长;在 25~75 mL 范围内降解菌株生长呈上升趋势,并且 4 株降解菌在装液量为 75 mL(3/10 体积)时生长最好,降解菌株 B1、B2、B3 和 B4 的 OD₆₀₀ 值分别达到 0.739、0.774、0.831 和 0.709;当装液体积大于 75 mL 时,随着培养液体积的增大 OD₆₀₀ 值降低。这可能是由于装液量达到一定之后,装液量的继续增加会使培养液中的溶解氧含量降低,降解菌株生长所需氧气供应不充分,菌体需氧量不充足,从而造成生长缓慢。

2.3.6 不同氮源对菌株生长情况的影响

结果如图 10 所示,降解菌株 B1、B2、B3 和 B4 在以 100 mg·L⁻¹ 的 NaNO₃、NH₄NO₃、NH₄Cl 和 (NH₄)₂SO₄ 为唯一氮源的培养基中均可以生长,菌株的生长情况

因氮源不同而不同。从图 10 中可以明显看出,以相同浓度硝酸铵为唯一氮源时,4 株降解菌的生长情况均处于最好状态,降解菌株的 OD₆₀₀ 值明显比用其他几种氮源培养该降解菌株时的 OD₆₀₀ 值高。

2.3.7 不同碳源对菌株生长情况的影响

结果如图 11 所示,在含有 50 mg·L⁻¹ 苯磺隆的无机盐液体培养基中,另加入 100 mg·L⁻¹ 葡萄糖、蔗糖与乳糖的外加碳源,结果证明外加碳源均能对 4 株降解菌株的生长起促进作用。3 种外加碳源相比较来说,葡萄糖对 4 株降解菌的生长促进情况最好,OD₆₀₀ 值分别为 0.850、0.739、0.911 和 0.817。在供试的 3 种碳源中,4 株降解菌均对葡萄糖的利用效果最好。

2.3.8 Mg²⁺浓度对菌株生长情况的影响

结果如图 12 所示,在一定范围内的 Mg²⁺浓度对降解菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长均有一定的促进作用,菌体生长量随 Mg²⁺的浓度变化而变化。降解菌株

B1、B3 和 B4 在 Mg^{2+} 浓度为 $50\sim 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内,生长量随 Mg^{2+} 浓度增加而增多,在 Mg^{2+} 浓度达到 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,降解菌 B1、B3 和 B4 的 OD_{600} 值达到最大值;当 Mg^{2+} 浓度继续增加时降解菌株 B1、B3 和 B4 的生长量呈下降趋势。降解菌株 B2 在 Mg^{2+} 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下,菌体生长情况最好。此后,菌体的生长量随着 Mg^{2+} 浓度的升高而降低。由此可见, Mg^{2+} 浓度在一定范围内的确对苯磺隆降解菌株的生长起到了促进作用,但当浓度超过一定范围之后反而会减少菌体的生长量。

2.3.9 NaCl 浓度对菌株生长情况的影响

结果如图 13 所示,外加 NaCl 对降解菌株 B1、B2、B3 和 B4 菌体生长有一定程度的影响。随着 NaCl 浓度的增加,降解菌 B1 和 B4 最适盐度出现在 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,降解菌株 B1 和 B4 的生长量达到最大值,分别为 0.653 和 0.720,其后随着 NaCl 浓度的升高生长量逐渐减少;降解菌 B2 在 $5\sim 30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内生长量均保

持较高水平且变化不大,在 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后生长量逐渐减少;降解菌 B3 在 $5\sim 50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, OD_{600} 值随浓度升高而变大, $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 B3 菌株的最适盐浓度。当 NaCl 浓度达到 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时降解菌株 B1、B2、B3 和 B4 几乎失活。

2.3.10 抗生素对菌株生长情况的影响

结果如表 3 所示,B1、B2 和 B4 这 3 株降解菌在氨苄青霉素的平板培养基中都可以正常生长,且长势较好;只有降解菌株 B3 不产生抗性。在卡那霉素培养基中,B1 降解菌不能生长,其他 3 株降解菌株均能正常生长。在四环素培养基上,降解菌株 B2 不产生抗性,但抑菌圈很小。在庆大霉素培养集中,只有降解菌株 B3 不产生抗性,其他 3 株降解菌均能正常生长。在链霉素培养基中,4 株降解菌均能正常生长。在氯霉素培养基中,只有 B1 不产生抗性,其余 3 株降解菌均能够正常生长。在红霉素培养基中,B3 菌不能生长,其余 3 株降解菌正常生长。整体看来各降解菌

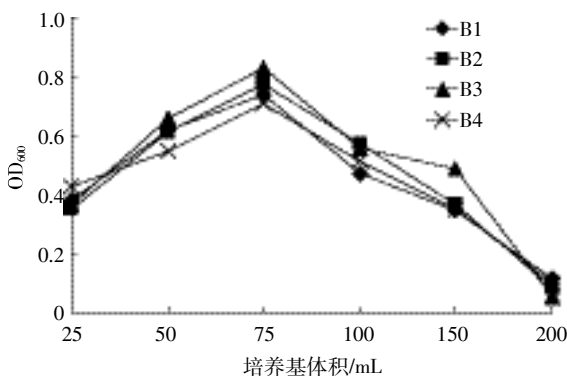


图 9 培养基体积对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响
Figure 9 Effects of medium volume on growth of strain B1, B2, B3 and B4

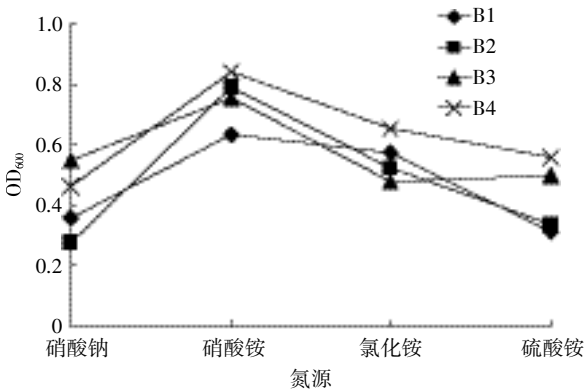


图 10 不同氮源对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响
Figure 10 Effects of different nitrogen sources on growth of strain B1, B2, B3 and B4

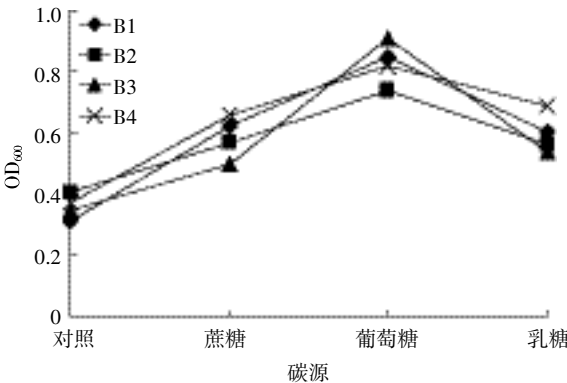


图 11 不同碳源对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响
Figure 11 Effects of different carbon sources on growth of strain B1, B2, B3 and B4

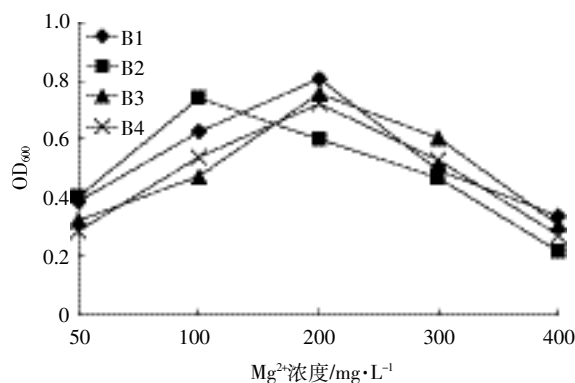


图 12 Mg^{2+} 浓度对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长情况的影响
Figure 12 Effects of Mg^{2+} concentration on growth of strain B1, B2, B3 and B4

表 3 抗生素抗性实验结果

Table 3 Results of antibiotics resistance experiment

菌株	氨苄青霉素 (50 mg·L ⁻¹)	卡那霉素 (30 mg·L ⁻¹)	四环素 (20 mg·L ⁻¹)	庆大霉素 (10 mg·L ⁻¹)	链霉素 (30 mg·L ⁻¹)	氯霉素 (20 mg·L ⁻¹)	红霉素 (20 mg·L ⁻¹)
B1	+	-	+	+	+	-	+
B2	+	+	-	+	+	+	+
B3	-	+	+	-	+	+	-
B4	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示抗性；“-”表示敏感。

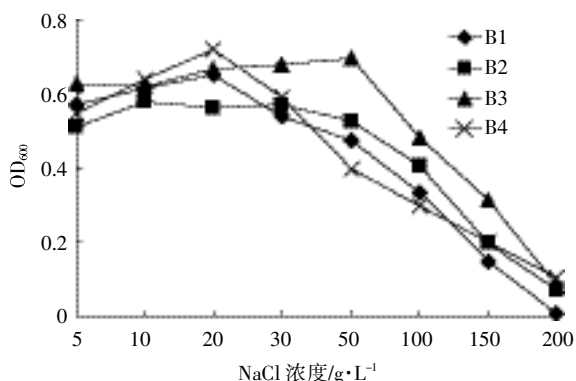


图 13 不同 NaCl 浓度对菌株 B1、B2、B3 和 B4 生长的影响

Figure 13 Effects of different NaCl concentration on growth of strain B1, B2, B3 and B4

株均有较好的抗生素抗性,这可能有利于日后的基因工程实验操作。

3 讨论

目前,除草剂污染是影响我国范围最大的有机污染之一,严重影响土壤的可持续利用和人类的健康生活。在除草剂市场上,苯磺隆、绿麦隆和氯磺隆这 3 种农药占据了大部分市场。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重要内容之一,是土壤污染治理研究领域的热点。

本文从长期受苯磺隆污染的土壤中分离出 4 株能够降解苯磺隆的菌株,分别对这 4 株菌株进行了形态、生理生化特性研究和 16S rDNA 分析,将 B1 鉴定为铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*),B2 为戴尔福特菌(*Delftia* sp.),B3 为微杆菌(*Microbacterium* sp.),B4 为产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。对于能够降解苯磺隆的铜绿假单胞菌属、戴尔福特菌属、微杆菌属、产碱杆菌属降解菌的报道尚属于首次,这对扩大苯磺隆降解菌资源库和开展农田修复实验具有一定的意义。王惟帅等^[21]虽筛选出一株能够降解苯磺隆的降解菌,但并未对其进行形态、生理生化特性研究和 16S rDNA 分析。

Zhang^[20]筛选出一株能够降解苯磺隆的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),但并未对该菌株的最适生长条件进行研究。本文还通过研究温度、pH 值、接种量、农药浓度、培养基体积、碳源、氮源等不同影响因子对菌株生长状况的影响来确定菌株的最适生长条件。

由于苯磺隆为一种新型的磺酰脲类除草剂,相关研究资料还不是很多,而且麦田生态系统具有一定的复杂性、多样性及不稳定性,加上课题研究时间有限,使目前研究还存在有很多不足和遗憾之处。传统的菌株培养及筛选方法并不能得到全部的降解目标污染物的微生物,本实验所筛选出的苯磺隆降解菌,是在特定培养条件下的结果,未必是实际土壤环境中的优势菌株。今后可以在菌株培养和筛选、降解酶的鉴定以及降解基因的定位等方面作进一步研究和探讨,以便更深入地了解苯磺隆污染下土壤微生物的生态效应及其毒性机理,全面揭示并调控微生物降解目标污染物的机制,为开发除草剂污染土壤的生物修复技术提供依据。

4 结论

(1)从长期施用苯磺隆的土壤中分离出 4 株降解菌 B1、B2、B3 和 B4,根据菌株的形态和生理生化特性及 16S rDNA 分析,初步鉴定分别为铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、戴尔福特菌(*Delftia* sp.)、微杆菌(*Microbacterium* sp.)、产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。

(2)四株降解菌的最佳生长条件为 30~35 ℃,pH 7.0~8.0,接种量 10%~15%(V/V),苯磺隆浓度为 100~200 mg·L⁻¹,培养基体积为 75 mL,氮源为硝酸铵,碳源为葡萄糖,Mg²⁺浓度 100~200 mg·L⁻¹,NaCl 浓度为 20~50 g·L⁻¹。在实验的抗生素中,4 株降解菌均有抗性。

参考文献:

- [1] 吴志凤. 麦田除草剂苯磺隆应用研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(14): 4246, 4280.

- WU Zhi-feng. Catcher application of herbicide tribenuron[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(14): 4246, 4280. (in Chinese)
- [2] 李会芹, 李鹏, 刘凤英. 除草剂苯磺隆的研制[J]. 精细与专用化学品, 2007, 15(13): 23-24.
- LI Hui-qin, LI Peng, LIU Feng-ying. Study on the herbicide tribenuron-methyl[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2007, 15(13): 23-24. (in Chinese)
- [3] 王天赋, 柳梅. 苯磺隆的高效液相色谱分析[J]. 农化新世纪, 2005(5): 32.
- WANG Tian-fu, LIU Mei. Tribenuron HPLC analysis[J]. *Agrochemical New Century*, 2005(5): 32. (in Chinese)
- [4] 唐韵. 除草剂的结构类型与靶标类型[J]. 农药市场信息, 2005(17): 16.
- TANG Yun. Herbicides structure type and target type[J]. *Pesticide Market News*, 2005(17): 16. (in Chinese)
- [5] 袁卉馥, 牛瑞明. 75%苯磺隆 WG 在莠麦田间除草效果[J]. 农药, 2009, 48(3): 218-220.
- YUAN Hui-fu, NIU Rui-ming. Experiment of tribenuron-methyl 75% WG for controlling weeds in the naked oats field[J]. *Agrochemicals*, 2009, 48(3): 218-220. (in Chinese)
- [6] 张敏恒. 磺酰脲类除草剂的发展现状、市场与未来趋势[J]. 农药, 2010, 49(4): 235-240.
- ZHANG Min-heng. The development situation, market and trend of sulfonylurea herbicides[J]. *Agrochemicals*, 2010, 49(4): 235-240. (in Chinese)
- [7] Blair A M, Martin T D. A review of the activity, fate and mode of action of sulfonylurea herbicides[J]. *Pestic Science*, 1988, 22: 195-219.
- [8] 张蓉, 岳永德, 花日茂, 等. 磺酰脲类除草剂在环境中的转归和影响[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(6): 1007-1009.
- ZHANG Rong, YUE Yong-de, HUA Ri-mao, et al. The outcome and impact of sulfonylurea herbicides in environment[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2003, 31(6): 1007-1009. (in Chinese)
- [9] Bhattacharjee A K, Dmujia P. Light-induced transformation of tribenuron-methyl on glass soil and plant surface[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2002, 37(2): 131.
- [10] 郎印海, 蒋新, 赵其国, 等. 磺酰脲除草剂在土壤中的环境行为研究进展[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1187-1190.
- LANG Yin-hai, JIANG Xin, ZHAO Qi-guo, et al. Advances in researches of environmental behavior of sulfonylurea herbicides in soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(9): 1187-1190. (in Chinese)
- [11] Susanne K, Husein A A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36: 1625-1635.
- [12] 江改青. 小麦和土壤中苯磺隆与氯氟吡氧乙酸残留分析方法及降解动态研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009: 4-5, 7-8.
- JIANG Gai-qing. Studies on analytical methods and dynamics of tribenuron-methyl and fluroxypyr residues in wheat and soil[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2009: 4-5, 7-8. (in Chinese)
- [13] 杜慧玲, 吴济南, 王丽玲, 等. 苯磺隆对土壤酶活性的影响[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 585-588.
- DU Hui-ling, WU Ji-nan, WANG Li-ling, et al. Effect of tribenuron-methyl application on activity of soil enzyme[J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2010, 24(3): 585-588. (in Chinese)
- [14] Andersen S M, Hertz P B, Holst T, et al. Mineralisation studies of ^{14}C -labelled metsulfuron-methyl, tribenuronmethyl, chlorsulfuron and thifensulfuron one Danish soil and groundwater sediment profile[J]. *Chemosphere*, 2001, 45: 775-782.
- [15] 杨春璐, 孙铁珩, 和文祥. 农药对土壤脲酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2006, 17(7): 1354-1356.
- YANG Chun-lu, SUN Tie-heng, HE Wen-xiang. Effects of pesticides on soil urease activity[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(7): 1354-1356. (in Chinese)
- [16] 仇宏伟, 胡继业, 周革菲. 磺酰脲类除草剂在土壤及植物中行为综述[J]. 莱阳农学院学报, 2000, 17(2): 132-138.
- QIU Hong-wei, HU Ji-ye, ZHOU Ge-fei. Sulfonylurea herbicides in soil and plant behavior review[J]. *Journal of Laiyang Agricultural College*, 2000, 17(2): 132-138. (in Chinese)
- [17] 白翎, 王玫, 宫静宏. 毛细管气相色谱法测定农产品中氟草烟残留量[J]. 色谱, 2003, 21(3): 288-290.
- BAI Ling, WANG Mei, GONG Jing-hong. Determination of fluroxypyr residue in farm produce by capillary gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2003, 21(3): 288-290. (in Chinese)
- [18] Muhamad H B, Ai T Y, Sahid I B. Determination of the herbicide fluroxypyr in oil matrices[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2008, 43(2): 134-140.
- [19] Wang Nan-Xi, Tang Qiang, Wang Ya-Nan, et al. Biodegradation of tribenuron methyl that is mediated by microbial acidohydrolysis at cell-soil interface[J]. *Chemosphere*, 2012, 86: 1098-1105.
- [20] Zhang Jun-Jie. Co-metabolic degradation of tribenuron methyl, a sulfonylurea herbicide, by *Pseudomonas* sp. Strain NyZ42[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2013, 76: 36-40.
- [21] 王惟帅, 吴济南, 张天宝, 等. 苯磺隆降解菌生长条件研究[J]. 山西农业科学, 2012, 40(8): 862-865.
- WANG Wei-shuai, WU Ji-nan, ZHANG Tian-bao, et al. Study on growth conditions of tribenuron-methyl degradation strain[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2012, 40(8): 862-865. (in Chinese)
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-410.
- DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Systematic identification book of commonly clinical pathogenic bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410. (in Chinese)
- [23] William D, Hiorns, Barbara A Methe. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences[J]. *Applied Environment Microbiology*, 1997, 63: 2957-2960.