

氯嘧磺隆降解菌株 LW-3 的分离及生物学特性研究

王 哲 孙纪全 马吉平 黄 星 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要: 从长期受氯嘧磺隆污染的土壤中分离到一株氯嘧磺隆高效降解菌株, 命名为 LW-3, 菌株 LW-3 可以氯嘧磺隆为唯一氮源生长, 接种量为 2% 时, 50 mg/L 氯嘧磺隆经过 7 d, 降解率达 70%~80%。生理生化实验和 16S rDNA 序列同源性分析, 将菌株 LW-3 归属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.); 菌株的适宜降解条件为: 温度 30°C~35°C, pH 6.5~7.2, pH 对菌株 LW-3 降解氯嘧磺隆有明显地影响。

关键词: 氯嘧磺隆, 微生物降解, 假单胞菌属, 生物学特性

Isolation of Strain LW-3 Capable of Degrading Chlorimuron-ethyl and Its Biological Characteristics

WANG Zhe SUN Ji-Quan MA Ji-Ping HUANG Xing LI Shun-Peng*

(College of Life Sciences, Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: A bacterium (designated as LW-3), capable of degrading Chlorimuron-ethyl, was isolated from the long-term contaminated soil by Chlorimuron-ethyl. Based on physiological and biochemical analyses and sequences comparison of 16S rDNA, strain LW-3 was identified as *Pseudomonas* sp. LW-3 could use Chlorimuron-ethyl as sole nitrogen source for growth. The optimum pH and temperature for degradation of Chlorimuron-ethyl were pH 6.5~7.2 and 30°C~35°C, at same temperature the pH change to the Chlorimuron-ethyl degrading influence is large. When the pH and temperature were pH 6.5 and 32°C, 50 mg/L Chlorimuron-ethyl could be degraded to 70%~80% level within 7 days.

Keywords: Chlorimuron-ethyl, Micro-biodegradation, *Pseudomonas* sp., Biological characteristics

氯嘧磺隆(Chlorimuron-ethyl)是由美国杜邦公司于 20 世纪 80 年代研制的一种磺酰脲类除草剂, 商品名称为氯嘧磺隆。氯嘧磺隆的作用靶标为乙酰乳酸合酶(ALS)^[1], 因其对大豆高度安全, 杀草谱广, 尤其是对大豆田恶性杂草如苣荬菜、刺菜等防效显著, 氯嘧磺隆及其复配制剂用量很大^[1]。由于氯嘧磺

隆的残留期较长, 导致氯嘧磺隆残留对农田环境的污染, 对后茬作物如油菜、甜菜、玉米、向日葵以及多种蔬菜产生药害, 影响到了大豆的轮作换茬^[2]。因此, 研究解决氯嘧磺隆残留毒害问题对扩大氯嘧磺隆在大豆田生产中的应用, 减少对后茬作物及环境造成的污染具有重要的理论和实践意义。Strek

基金项目: 农业微生物学菌种资源标准化整理、整合及其共享试点(No. 2005DKA2120-2); 国家 863 项目(No. 2006AA102402); 国家支撑计划(No. 2006BAD17D04); 江苏省社会发展项目(No. BS2007056)

* 通讯作者: Tel/Fax: 025-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

收稿日期: 2008-05-02; 接受日期: 2008-07-14

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

等^[2]曾报道, 磺酰脲类除草剂在土壤中的降解主要为非酶促的生物降解, 光化学分解及水解作用则很少。然而, 目前关于氯嘧磺隆生物降解的研究则报道较少。笔者在实验过程中分离了一株能够高效降解氯嘧磺隆的细菌, 研究该菌对氯嘧磺隆的降解特性和菌株的生长特性, 以期为研究该菌株的代谢途径及在氯嘧磺隆污染土壤的原位生物修复中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 取样、试剂及培养基

土壤样品取自江苏金坛长期受氯嘧磺隆污染的农田土壤, 取地表及以下 10 cm 的土层土。

基础盐培养基(g/L): NaCl 0.5, NH_4NO_3 1.0, K_2HPO_4 1.5, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, pH 7.0~7.5, 用于菌株的分离富集。

唯一氮源培养基: 基础盐培养基添加葡萄糖 1.00 g/L, 氯嘧磺隆 50 mg/L; 唯一碳源培养基: 基础盐培养基添加氯嘧磺隆 50 mg/L; 降解培养基: 唯一氮源培养基 pH 调至 6.5。以上三种培养基用于菌株降解氯嘧磺隆的研究。

1/10 LB 培养基(g/L): 酵母粉 0.5, 蛋白胨 1.00, NaCl 1.00, 用于菌株的分离培养。

氯嘧磺隆原药(98.6%)由江苏农药研究所馈赠, pMD-T vector 购自 TaKaRa 公司, 所用甲醇为色谱醇, 购自 Sigma 公司, 其余试剂均为分析纯。

1.2 菌株富集分离

在 100 mL 基础盐培养基中加入 3 g 土样, 添加氯嘧磺隆至终浓度 50 mg/L, 于 30°C、160 r/min 摇床培养 7 d 后, 吸取 5 mL 转接至含有相同除草剂浓度的基础盐培养基中, 连续转接 3 次。经测定有降解效果后, 在 500 mg/L 的氯嘧磺隆 1/10 LB 培养基平板上划线, 放于 30°C 培养箱中培养, 待平板上出现单菌落后, 挑取单菌落转接至含 100 mg/L 氯嘧磺隆的基础盐培养基中, 验证单菌对氯嘧磺隆的降解效果。

1.3 生理生化鉴定

方法参见文献[4]。

1.4 菌体总 DNA 的提取、16S rDNA 序列 PCR 扩增及 TA 克隆

菌体 LW-3 总 DNA 提取方法和 16S rDNA 引物设计参见文献[3]: 5'端引物 5'-AGAGTTTGATCCT

GGCTCAG-3'(E. coli bases 8 to 27), 3'端引物 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'(E. coli bases 1507 to 1492)。扩增反应体系如下: 10×Taq 聚合酶反应缓冲液 5.0 μL , dNTPs(20 mmol/L) 5.0 μL , 引物(25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) 各 2.0 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 6.0 μL , 菌体DNA(约 50 ng/ μL) 1.0 μL , Taq DNA聚合酶(5 U/ μL) 0.3 μL , 加 H_2O 至 50 μL 。反应条件: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。所扩增产物的 16S rDNA产物经回收纯化后酶连到pMD18-T载体上, 具体方法参见pMD18-T vector使用说明书, DNA的转化过程参见文献[4]。所获克隆经验证转入目的片段后, 委托Invitrogen公司测序。

1.5 系统发育树的构建

将测序结果用Blast软件与 16S rDNA序列进行同源性比较^[4]。从GenBank中调取亲缘关系近的菌株的 16S rDNA 序列用于系统发育学分析, 16S rDNA全序列用MEGA version 2 软件包排序, 用MEGA version 2 软件包中的Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, 用Neighbor-Joining 法构建系统发生树, 1000 次随机抽样, 计算自引导值(Bootstrap)以评估系统发生树的置信度。

1.6 氯嘧磺隆定量分析

取 1 mL 待测样品, 加入 4 mL 二氯甲烷, 剧烈振荡 1 min; 室温下静置 10 min, 使水相与有机相分层, 去除上层水相, 有机相过无水硫酸钠柱, 收集流出的二氯甲烷, 10000 r/min 离心 10 min, 用滤膜(孔径 0.22 μm)过滤, 将其分装于 1.5 mL 离心管, 室温下将二氯甲烷挥发至干, 将提取物溶于 1 mL 甲醇, 样品放-20°C 保存待用。测定用液相色谱仪型号为 Waters 600, 检测器为紫外检测器。液相色谱条件参考文献[5,9]并做适当修改: 流动相为甲醇: 水: 冰乙酸(70:30:0.1, V/V/V), Zorbax C-18 ODS Spherex 反相柱(5 μm , 4.6×250 mm i.d., Agilent, USA), 柱温为室温, 紫外检测器, 测定波长 235 nm, 进样量 20 μL , 流速为 1 mL/min。外标法按峰面积定量。

2 结果

2.1 降解菌株的分离与鉴定

从长期受氯嘧磺隆污染的农田土中筛选到一株氯嘧磺隆降解细菌, 命名为 LW-3。在添加 500 mg/L 氯嘧磺隆的 1/10 LB 固体培养基上可形成较为明显的透明圈。在 1/10 LB 固体培养基平板上菌落乳白

色、圆形、不透明、边缘略有突起、表面隆起、湿润光滑。菌体呈杆状,一端双生鞭毛(电镜照片见图1),革兰氏染色阴性,甲基红和V-P反应阴性,接触酶阳性,氧化酶阴性,能利用硝酸盐,明胶和淀粉水解、利用柠檬酸盐以及吲哚产生阴性,蔗糖发酵不产气,没有颜色变化。对氨苄青霉素、氯霉素、四环素、头孢他啶、复合磺胺及低浓度的卡那霉素有抗性。

将菌株 LW-3 的 16S rDNA 序列(LW-3 在 GenBank 的登录号为 EU257208)与 GenBank 中的已有序列进行比对,发现菌株 LW-3 与菌株 *Pseudomonas veronii*(AF064460)同源性最高,达 99.8%。基于 LW-3 菌株 16S rDNA 序列构建的系统发育树见图2。菌株 LW-3 位于 *Pseudomonas* sp. 分支上,与假单胞菌属细菌的 *Pseudomonas veronii* 相似性在 99%

以上,结合生理生化试验及菌体和菌落形态学上的对比将 LW-3 归属于假单胞菌属。

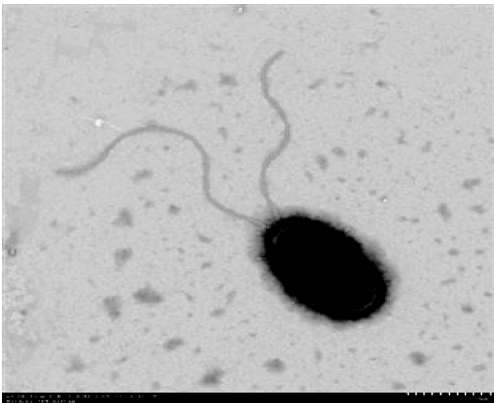


图1 菌株 LW-3 的电镜照片(10000×)
Fig. 1 Micrograph of LW-3 under transmission electron microscope

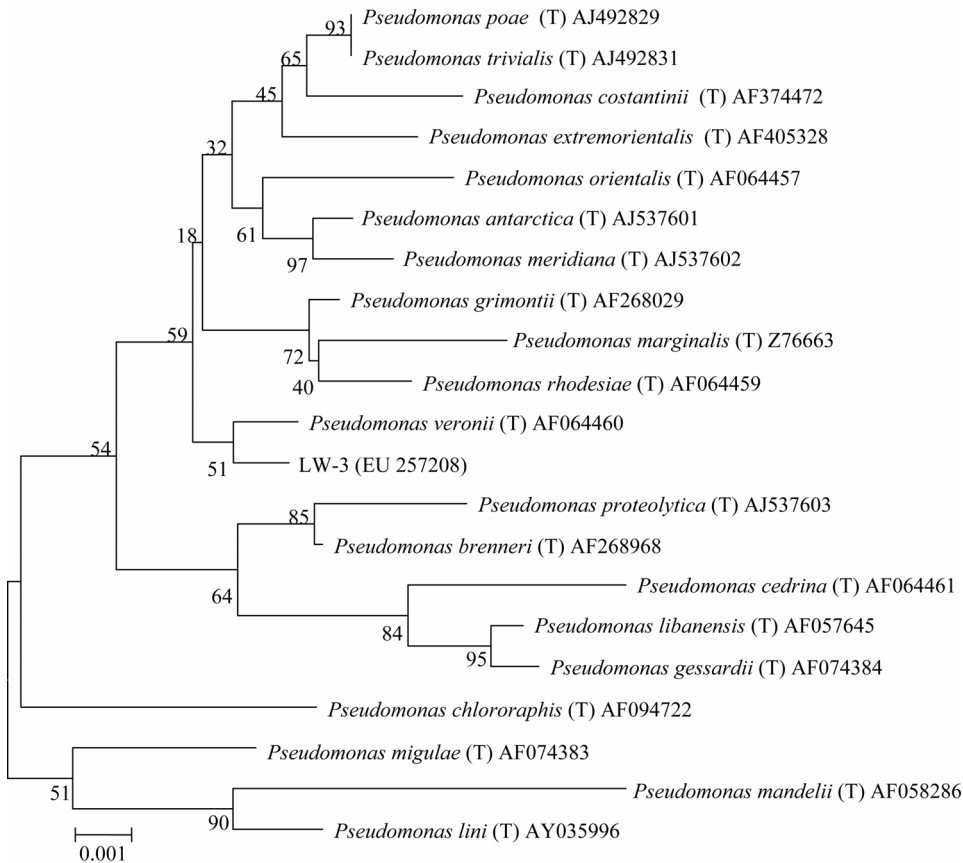


图2 菌株 LW-3 的系统发育树
Fig. 2 The phylogenetic tree of strain LW-3

2.2 LW-3 生长影响因素
2.2.1 NaCl 浓度对 LW-3 生长的影响: 在 1/10 LB 培养基的基础上添加氯化钠使培养基中的氯化钠浓

度分别为 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%和 4.0%。按 2%的接种量接入菌悬液,将接种后的锥形瓶放入,30℃、160 r/min 摇床振荡培养 32 h 后,测定

600 nm 处吸光值, 结果如图 3 所示, NaCl 浓度低于 1% 时, 菌株的生长并未受到氯化钠浓度的影响, 浓度超过 1.0% 时, 菌株的生长受到抑制, 培养基中菌体的浓度随着氯化钠浓度的升高而降低, 说明菌株 LW-3 对较高浓度的氯化钠敏感。

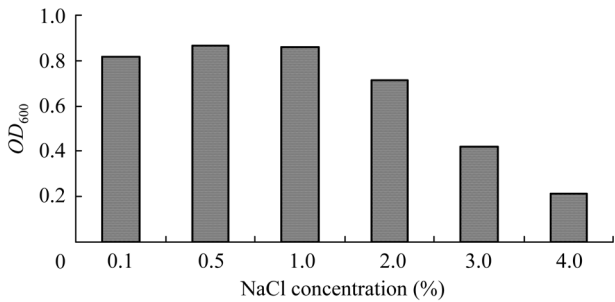


图 3 NaCl 浓度对菌株生长的影响
Fig. 3 Effect of NaCl concentration on the growth of strain LW-3 in 1/10 LB media

2.2.2 LW-3 在基础盐培养基和 LB/10 培养基中生长曲线: 添加浓度为 1% 葡萄糖的 200 mL 基础盐培养基, 按 1% 的接种量接入 LW-3 菌悬液后, 将锥形瓶放入 30℃、160 r/min 摇床振荡培养, 设 5 个重复。每 2 h 取样测定 1 次, 从瓶中取出 3 mL 菌液, 测定 600 nm 处的吸光值; 在 1/10 LB 培养基中生长曲线的测定方法操作同基础盐培养基中生长曲线的测定。实验测定结果如图 4 所示, 菌株 LW-3 在基础盐培养基中生长速率略快于在 LB/10 的生长, 在 16 h 进入对数生长期, 28 h 后, LW-3 在两种培养基中的生长均已进入稳定生长期了。但从最大生长量来说, LW-3 在 LB/10 中要远远大于基础盐培养基。分析原因是与可利用生长底物的总量差异有关。

2.2.3 LW-3 最适生长温度: (分成 3 部分) 以 1/10 LB 培养基作为测试培养基。测定菌株的适宜生长温度,

取 250 mL 三角瓶, 装液量为 100 mL, 接种后分别在 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃ 下 160 r/min 振荡培养, 每个温度设 3 个重复, 48 h 后, 测定菌悬液在 600 nm 处的吸光值。实验结果如表 1 所示, 菌株的适宜生长条件为 30℃, 当温度过高或过低时, 都会对生长产生不良影响。

2.2.4 菌株的最适生长 pH: 采用 250 mL 的三角瓶, 装液量为 100 mL, 分别调节其培养基的 pH 值为 5.0、6.0、6.8、7.5、8.0、9.0 和 10.0, 设 3 个重复, 30℃、160 r/min 摇床振荡培养 48 h, 测定 600 nm 处的吸光值。如表 1 所示菌株对酸碱的耐受能力较强, 在中等强度的酸碱环境环境下都能够生长, 但在强酸碱环境环境下生长受到抑制, 适宜生长 pH 值为 7~8。

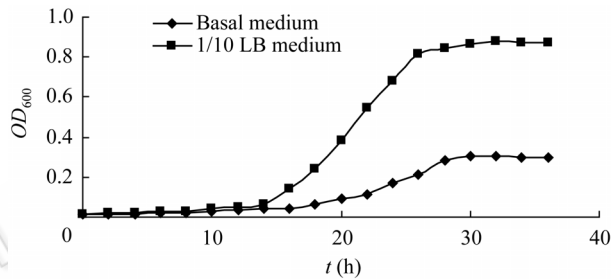


图 4 LW-3 在基础盐培养基和 1/10 LB 培养基中的生长曲线
Fig. 4 The growth curve of LW-3 in basal medium and 1/10 LB medium

2.2.5 通气状况对 LW-3 生长的影响: 测定通气量对其影响时, 在 250 mL 的三角瓶中分别装液 50 mL、100 mL、150 mL、200 mL 1/10 LB 培养基, 每样设 3 个重复, 30℃、160 r/min 振荡培养, 48 h 后测定 600 nm 处的吸光值。试验表明菌株应为好氧菌,

表 1 温度、通气量和 pH 对 LW-3 生长的影响 Table 1 The influence on growth of LW-3 by temperature, ventilation and pH					
温度(℃) Temperature	OD ₆₀₀	装液量(mL) Contain	OD ₆₀₀	pH	OD ₆₀₀
10	0.1423	50	0.6862	5.0	0.4762
15	0.2162	100	0.5742	6.0	0.5543
20	0.3841	150	0.4451	6.8	0.7081
25	0.4562	200	0.3624	7.5	0.8324
30	0.8164			8.0	0.7321
35	0.6931			9.0	0.6145
40	0.5724			10.0	0.4013

在通气良好的情况下, 单位时间的生长量可以达到一个较高的水平。

2.3 LW-3 对氯嘧磺隆的降解

在基础盐培养基、唯一氮源培养基和唯一碳源培养基中分别添加氯嘧磺隆至终浓度 50 mg/L, 按 2%(V/V, 下同)的接种量接入 LW-3 的 LB 菌悬液, 设接种灭活的 LW-3 为对照, 将三角瓶放于 30°C、160 r/min 摇床培养, 每 24 h 取样测定样品中氯嘧磺隆的浓度, 实验结果如图 5。菌株在不同培养基中降解氯嘧磺隆的曲线显示, 氯嘧磺隆为唯一氮源时的降解效果最好, 8 d 时降解率能达到 72.2%。LW-3 能够以氯嘧磺隆为唯一碳源生长, 8 d 降解率达到 50%。再以氯嘧磺隆为唯一碳氮源时, 菌株虽有降解效果, 但速率大为降低。分析原因可能是菌株 LW-3 对氯嘧磺隆的降解需要一定的启动能源(碳源), 以使降解环境中的菌体活性和数量达到一定的水平, 同时对氮元素的分解利用提供支持。

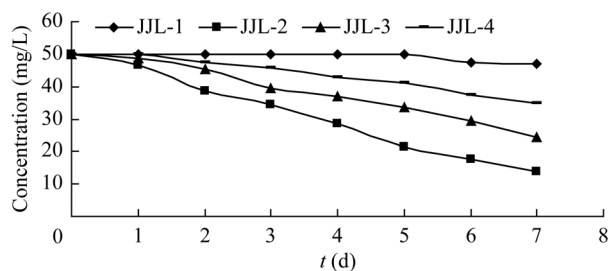


图 5 LW-3 对氯嘧磺隆的降解

Fig. 5 Biodegradation of Chlorimuron-ethyl by LW-3

注: JIL-1: 加灭活菌对照; JIL-2: 唯一氮源; JIL-3: 唯一碳、氮源; JIL-4: 唯一碳源

Note: JIL-1: Control (Killed LW-3); JIL-2: Sole nitrogen source; JIL-3: Sole carbon and nitrogen source; JIL-4: Sole carbon source

2.4 pH 对 LW-3 降解氯嘧磺隆的影响

在降解培养基中添加氯嘧磺隆至终浓度 50 mg/L, 用 NaOH 或盐酸调节初始 pH 分别至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0, 按 2%的接种量接入 LW-3 菌悬液, 设接种灭活的 LW-3 为对照, 培养 7 d ($OD_{600}=0.30$)后取样测定氯嘧磺隆浓度, 实验结果见图 6。pH 对菌株降解氯嘧磺隆的影响实验表明, 菌株在在弱酸性条件或弱碱性条件下降解效果较好, pH 6.5 时的降解效率最高, 达到 80%左右。

2.5 温度对 LW-3 降解氯嘧磺隆的影响

在降解培养基添加 50 mg/L 的氯嘧磺隆, 按 2%接种量接入 LW-3 菌液, 设接种灭活的 LW-3 为对照, 分别在 25°C、28°C、30°C、32°C、35°C、37°C 和

40°C 培养 7 d ($OD_{600}=0.30$)后取样测定氯嘧磺隆含量。实验结果(见图 7)显示温度对 LW-3 降解氯嘧磺隆影响较大, 菌株在 30°C~35°C 的范围内降解率较好。当温度高于或低于此区间时, 菌株的降解速率都会降低。

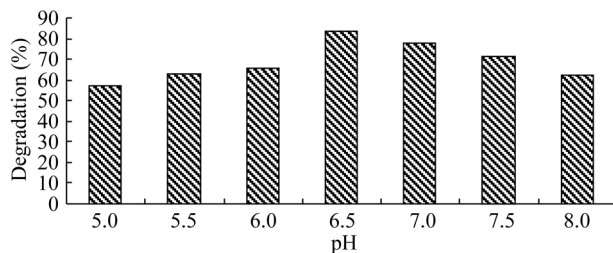


图 6 初始 pH 值对 LW-3 降解氯嘧磺隆的影响

Fig. 6 Effect of media initial pH on the degradation of Chlorimuron-ethyl by strain LW-3

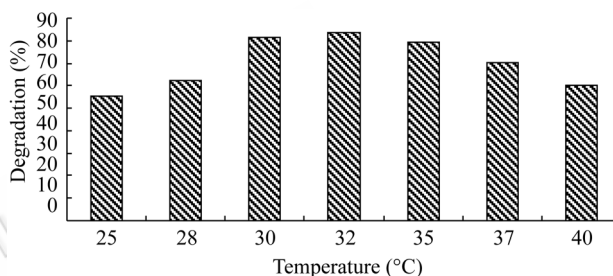


图 7 温度对 LW-3 降解氯嘧磺隆的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the biodegradation of Chlorimuron-ethyl

2.6 农药浓度对 LW-3 降解氯嘧磺隆的影响

在基础盐培养基中添加氯嘧磺隆使其浓度分别为 50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、500 mg/L 和 600 mg/L, pH 值为 6.5, 以 2%的接种量接入 LW-3 菌液, 设接种灭活的 LW-3 为对照, 培养 7 d ($OD_{600}=0.30$)后取样测定氯嘧磺隆含量, 实验结果见图 8。氯嘧磺隆浓度低于对 500 mg/L 时, 氯嘧

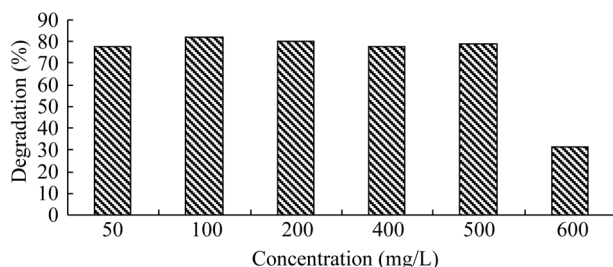


图 8 农药浓度对 LW-3 降解氯嘧磺隆的影响

Fig. 8 Effect of pesticides concentration on the biodegradation of Chlorimuron-ethyl

磺隆初始浓度对菌株 LW-3 降解的速率和最终的降解率没有明显地影响, 当浓度达到高于 600 mg/L 时, 菌株对氯嘧磺隆降解率显著降低。分析原因是由于氯嘧磺隆达到一定浓度后会强烈抑制菌体的生长或是对底物的代谢。

3 讨论

氯嘧磺隆是黑龙江省大豆产区应用面积较大的除草剂品种之一, 因其价格低, 对大豆高度安全, 杀草谱广, 尤其是对黑龙江省的苣荬菜、刺菜等恶性杂草效果好而被广泛使用。但是其缺点是在自然环境中的半衰期较长, 对后茬敏感作物造成的药害严重。目前国外报道的对降解氯嘧磺隆有降解作用的微生物主要有曲霉菌属、芽孢杆菌属、念珠菌属、链霉菌属、假单孢菌属、诺卡氏菌属、根霉菌属等, 其中以假单孢菌属降解效率最好。

本研究分离筛选的假单孢菌属 LW-3 菌株能够高效的降解氯嘧磺隆, 通过唯一碳源培养基、唯一氮源培养基及唯一碳、氮源培养基利用试验, 初步推断该菌株对于该农药的降解途径应主要集中在氮元素的分解利用, 即脲桥的断裂及针对吡啶环结构的降解, 其具体代谢产物及过程有待进一步研究。通过降解特性的研究, 经过 7 d, 该菌株在 32°C、pH 6.5 时对 50 mg/L 浓度的氯嘧磺隆的降解率可达 80% 左右。农药浓度在低于 500 mg/L 时对降解率影响较小, 而在达到 600 mg/L 时, 降解率出现显著降低。对比分析生物学特性研究中的生长因素对菌株生长的影响, 可以发现菌株的适宜生长条件和适宜降解条件基本一致, 说明菌株对氯嘧磺隆的降解受环境因素的影响较大, 但这只能代表室内模拟的结果。

其在田间土壤条件下对氯嘧磺隆的降解效果及影响因素还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 苏少泉. 长残留除草剂队后茬作物安全性问题. 农药, 1998, 37(12): 4-7.
- [2] Streck HJ. Fate of Chlorsulfuron in the environment. *Pestic Sci*, 1998, 53: 52-70.
- [3] William D, Hiorns, Barbara A Methe. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Appl Envir Microbiol*, 1997, 63: 2957-2960.
- [4] 姜红霞, 王圣惠, 薛庆节, 等. 甲基对硫磷降解菌 *Alealigenes*. sp. YeX-20 的分离鉴定及降解性能研究. 农业环境科学学报, 2005, 24(5): 962-965.
- [5] 沙家骏, 张敏恒, 姜君雅主编. 国外新农药品种手册. 北京: 化学工业出版社, 1995, pp.471-472.
- [6] 欧晓明, 步海燕. 磺酰尿类除草剂水化学降解机理研究进展. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1607-1614.
- [7] Brown HM, Cotterman JC. Recent advances in sulfonylurea herbicides. *Chem Plant Prot*, 1994, 10: 47-81.
- [8] Sabadie J. Degradation of bensulfuron-methyl on various minerals and humic acids. *Weed Res*, 1997, 37: 411-418.
- [9] Zanardini E. Degradation pathways of Chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Annals of Microbiology*, 2002, 52: 25-37.
- [10] 廖显威, 邓嘉莉, 李来才, 等. 单嘧磺隆除草剂水解机理的理论研究. 化学学报, 2006, 64(9): 868-872.
- [11] Reiser RW, Barefoot AC, Dietrich RF, et al. Application of microcolumn liquid chromatography-continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry in environmental studies of sulfonylurea herbicides. *J Chromatogr*, 1991, 30: 1-8.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 $S E$ 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。