

# 一株绿磺隆降解菌的分离鉴定及其特性研究\*

邵劲松 沈 标 洪 青 李顺鹏†

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

**摘 要** 从长期施用绿磺隆的土壤中采取土样, 经驯化富集后筛选到一株能高效降解绿磺隆的细菌 IHL-1 菌株, 经初步鉴定为黄单胞菌 (*Xanthomonas* sp)。在此基础上, 研究了该菌株对绿磺隆的降解特性。结果表明: 在绿磺隆浓度为  $20 \text{ mg L}^{-1}$  的无机盐培养基中,  $30^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r min}^{-1}$  振荡 40 h, 其对绿磺隆的降解率达 62%。在所试的金属离子中,  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^+$  抑制其生长,  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等对其生长没有影响。

**关键词** 黄单胞菌, 绿磺隆, 生物降解

中图分类号 S154.39

农药的使用已成为现代农业增产的重要措施之一, 但农药特别是除草剂的大量持续投入, 对土壤环境形成污染, 严重时不但影响土壤肥力和降低农产品品质<sup>[1]</sup>, 而且会造成地下水甚至饮用水的污染, 直接危害人类健康, 农药对土壤的污染日益引起学术界和公众的关注<sup>[2]</sup>。绿磺隆是 20 世纪 80 年代由美国杜邦公司开发的磺酰脲类除草剂, 广泛应用于麦田, 用量为有效成分  $7.5\sim 15 \text{ g hm}^{-2}$ <sup>[3]</sup>。由于绿磺隆的生物活性极高, 分解缓慢(在土壤中的半衰期为 4~6 周), 即使很低的残留量都可能对下茬作物(例如甜菜、油菜、玉米、高粱、大豆及水稻等)产生伤害或抑制生长, 因此如何消除绿磺隆的残留毒性一直为人们所重视<sup>[4]</sup>。生物修复技术能有效消除农药残留, 具有时间短、不产生二次污染等优点, 是近年来兴起的研究热点之一<sup>[5]</sup>。目前, 国内外学者围绕绿磺隆降解行为展开的工作主要集中在水解和光解方面<sup>[6]</sup>, 有关微生物降解的报道很少<sup>[7]</sup>。本实验室从土壤中分离到一株降解绿磺隆效率较高的菌株, 并对其降解特性进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与培养基

绿磺隆原药购自江苏省激素研究所(纯度为 95%); 绿磺隆标准品购自上海迪马公司(进口, 纯度为 98%)。培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基、细菌鉴定培养基<sup>[8]</sup>和无机盐培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{CaCl}_2$  0.1 g,  $\text{NaCl}$  0.2 g, 葡萄糖 5 g, 加 1 000 ml 蒸馏水, pH 自然。向无机盐培养基中加入不同体积绿磺隆母液( $1\ 000 \text{ mg L}^{-1}$ )制成各种浓度绿磺隆培养基。

### 1.2 绿磺隆降解菌株的分离方法

取 1 g 土样加入盛有 50 ml 无机盐培养基的三角瓶中, 在摇床上培养 2 d, 转接至含绿磺隆浓度更高的培养基中, 直至转接至含绿磺隆  $20 \text{ mg L}^{-1}$  的培养基中培养 2 d 后, 在含同样成分的琼脂平板上接入 0.1 ml 培养液, 涂布后于  $30^\circ\text{C}$  细菌培养箱中培养 2 d, 挑出单菌落划线分离 3~4 次进行纯化, 纯化后接斜面保存供作实验菌株用。

### 1.3 分析测定方法

菌株生长量的测定: 以未接种的培养基作空白对照, 用 722 型分光光度计在 540 nm 波长下测定菌悬液的 OD 值。绿磺隆浓度的测定<sup>[9]</sup>: 采用高效液相色谱仪(Waters 600), 使用可变波长紫外检测器, 分离柱为 20 cm 长内填有  $\text{C}_{18}$  的反相柱。流动相为甲醇/水(80/20, v/v), 流量为  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$ , 可变波长紫

\* 国家 863 计划项目(2001AA214121)、农业部财政部跨越计划项目(M200011)资助

† 通讯作者

收稿日期: 2002-06-24; 收到修改稿日期: 2003-03-24

外检测器的工作波长为 225 nm, 进样量为 20  $\mu$ l, 采用外标法按峰面积定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离及鉴定

经过对土壤中微生物的分离、纯化, 得到绿磺隆降解菌株 LHL-1, 其经 2 d 培养呈淡黄色, 外型光滑, 不透明。在细菌培养基上 30 $^{\circ}$ C 培养 72 h 菌落的直径为 4 mm。在含绿磺隆的无机盐培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 72 h 菌落直径为 1 mm 左右, 透明。能利用不同的糖和有机酸盐作为惟一碳源, 菌落有粘性, 石蕊牛奶不产酸, 不利用纤维素, 能够利用乳酸钙。菌体照片见图 1。对其进行了几项主要的生化特征指标测定, 结果见表 1, 初步鉴定 LHL-1 归于黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。

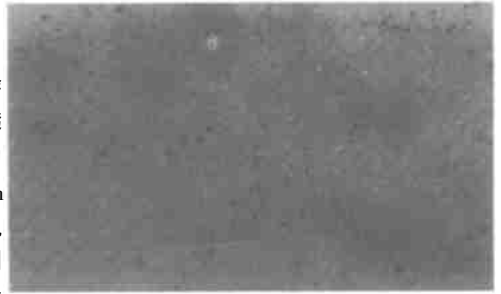


图 1 LHL-1 的菌体形态( $\times 1000$ )

Fig. 1 Morphology of LHL-1 strain

表 1 LHL-1 菌株的鉴定结果

Table 1 Identification of LHL-1 strain

菌体形态	革兰氏染色	氧化酶试验	接触酶试验	硝酸盐还原	葡萄糖发酵
Shape	Gram dye	Oxidase test	Catalase test	Nitrate reduction	D-glucose fermentation
杆状	阴性	阴性	阳性	阴性	产少量酸

### 2.2 绿磺隆起始浓度与 LHL-1 菌生长的关系

250 ml 三角瓶中装入 50 ml 无机盐培养基, 加入不同体积的绿磺隆溶液, 使绿磺隆的浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30、35  $\text{mg L}^{-1}$ , 按 10% 接种量(体积比,  $\text{OD}_{540}$  为 2.2, 下同) 分别接入经预培养的 LHL-1 菌体, 于 30 $^{\circ}$ C 摇床上培养 40 h 后(150  $\text{r min}^{-1}$ ), 在 540 nm 处测定溶液的 OD 值, 其结果见图 2。试验结果表明, 在绿磺隆浓度为 5~20  $\text{mg L}^{-1}$  的范围内, LHL-1 菌株的生长量随底物浓度增大而增加。当底物浓度大于 20  $\text{mg L}^{-1}$  时, LHL-1 菌株的生长速度减慢, 甚至停止生长。降解绿磺隆的起始浓度为 20  $\text{mg L}^{-1}$  时, 细菌的生长量最大, 说明在该浓度范围内菌体能够正常生长。

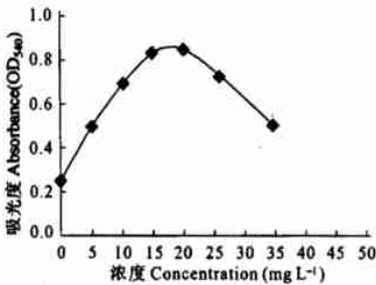


图 2 绿磺隆浓度对 LHL-1 菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of concentration of Chlorosulfuron on growth of

LHL-1 strain

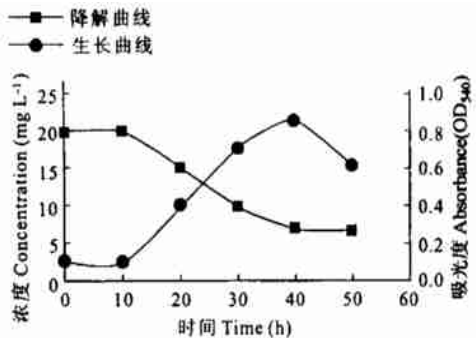


图 3 LHL-1 菌株生长及其对绿磺隆的降解曲线

Fig. 3 The time-curves of Chlorosulfuron degradation and

growth of LHL-1 strain

### 2.3 绿磺隆的降解速度与 LHL-1 菌生长速度的关系

在 200 ml 绿磺隆培养基中, 接入 10% 的新鲜菌液, 于 30 $^{\circ}$ C 摇床培养(150  $\text{r min}^{-1}$ ), 每隔一定时间测

定绿磺隆的含量及菌体生长量,结果见图3。从图中可以看出,菌体生长处于延迟期时,绿磺隆的降解速度较慢,进入对数期时,降解速度增加,而到稳定期和衰亡期时,降解速度又趋于缓慢。菌体生长曲线与绿磺隆降解曲线相吻合。由此可知,处于对数生长的细菌体内降解绿磺隆的酶或酶系,其活性最高,菌体培养至40 h左右,降解率可达62%。

### 2.4 绿磺隆降解的影响因素

**2.4.1 温度** 250 ml三角瓶中装入50 ml无机盐培养基,加入绿磺隆使其浓度为 $20 \text{ mg L}^{-1}$ ,按10%接种量(体积比)接入LHL-1菌体,分别在25、30、37、40℃进行摇床培养,转速为 $150 \text{ r min}^{-1}$ ,每隔一定时间测定绿磺隆的含量,结果见图4。

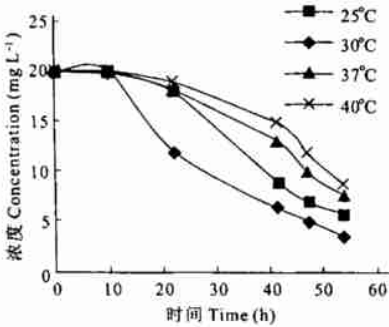


图4 温度对LHL-1菌株降解绿磺隆的影响

Fig. 4 Effect of temperature on Chlorsulfuron degradation by LHL-1

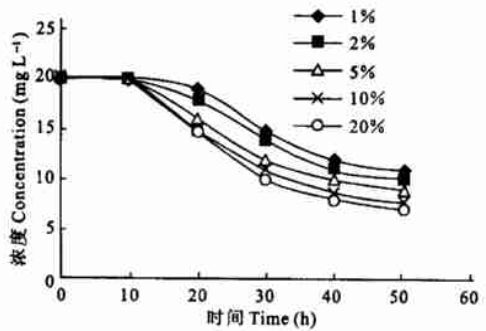


图5 接种量对LHL-1菌株降解绿磺隆的影响

Fig. 5 Effect of quantity of inoculum on Chlorsulfuron degradation by LHL-1

从图中可以看出,在菌体生长处于延迟期时(0~10 h),不同温度下的降解率都很低;当菌体生长进入对数生长期时(10~40 h),降解率明显升高,30℃时LHL-1菌株降解绿磺隆的速度最快,25℃时次之,降解速度较慢的是37℃和40℃,两者降解曲线较为接近。LHL-1菌株降解绿磺隆的最适温度为30℃。

**2.4.2 细菌接种量** 在温度为30℃,pH值为6,转速为 $150 \text{ r min}^{-1}$ 时,分别按1%、2%、5%、10%、20%的接种量接入250 ml摇瓶进行培养,每隔一定时间测定绿磺隆的含量,结果见图5。试验表明,接种量对绿磺隆降解速度有一定影响,当接种量在1%~10%时,绿磺隆的降解速率随接种量的增加而加快;但当接种量从10%增加到20%时,绿磺隆的降解速度无明显增加。由此可知,LHL-1菌株的最适接种量为10%。

**2.4.3 pH值** 在其它条件不变时,分别调节培养基的pH值为5、6、7、8、9、10、11,在菌体生长40 h左右采样,测定绿磺隆的降解率,同时测定不同pH值条件下菌株在细菌培养基中的生长情况,结果见图6。

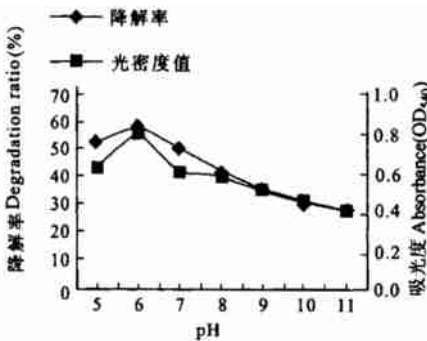


图6 初始pH值对LHL-1菌株降解绿磺隆的影响

Fig. 6 Effect of initial pH on Chlorsulfuron biodegradation by LHL-1

结果表明,在pH值为5~6范围内,绿磺隆的降解效率最高,可达60%。在pH值大于7时,随着pH值升高,其降解效率逐渐下降,从50%左右下降到30%左右。这可能是由两方面的原因造成的。一个原因是绿磺隆的pKa为3.6,为弱酸性化合物,当 $\text{pH} \approx \text{pKa}$ 时,绿磺隆以中性分子存在,当介质呈弱酸性时( $\text{pH} < 6$ ),以中性分子和离子形式共同存在,当 $\text{pH} > 6$ 时,主要以离子形式存在。中性分子对水解的敏感程度比离子高250~1000倍<sup>[10]</sup>。酸性条件下有利于其水解。另一个原因可能是pH值为6时,LHL-1菌株生长最旺,生物量最大,酶活性较高,因此其降解效率也高。

**2.4.4 通气量** 在250 ml 三角瓶中分别装入 30、50、70、100、150、180 ml 绿磺隆液体培养基, 另一瓶装量为 50 ml, 静置培养。按 10% 接种量接种, 30℃、150 r min<sup>-1</sup> 振荡培养 40 h, 结果见表 2。

表 2 通气量对 LHL-1 菌株降解绿磺隆的影响

Table 2 Effect of aeration on Chlorsulfuron degradation by LHL-1

培养基装量 The volume of media(ml)	绿磺隆降解率 Degrading ratio (%)	培养基装量 The volume of media(ml)	绿磺隆降解率 Degrading ratio (%)
30	54.7	150	47.3
50	62.2	180	32.6
70	53.1	50 <sup>1)</sup>	37.4
100	52.4		

#### 1) 静置

从表 2 中可以看出, LHL-1 菌株降解绿磺隆的过程是好氧过程, 静置培养时的降解率远低于振荡培养时的降解率。因此, LHL-1 菌株的培养需要有较好的通气条件, 培养基以装至容器体积的 1/5 为宜, 且应振荡培养(或不断搅拌)。

**2.4.5 金属离子对 LHL-1 降解绿磺隆的影响** 配制 1 mol L<sup>-1</sup> 的各种金属离子溶液, 取 1 ml 分别加入 50 ml 绿磺隆液体培养基中, 使金属离子的终浓度达 0.02 mol L<sup>-1</sup>, 按 10% 接种量接种, 其它条件同上, 振荡培养 40 h, 测定绿磺隆的含量及菌体生长情况, 结果见表 3。

表 3 金属离子对 LHL-1 菌株降解绿磺隆的影响

Table 3 Effect of metal ions on Chlorsulfuron degradation by LHL-1

金属离子 Metal ions	绿磺隆的降解率 Degrading ratio of Chlorsulfuron (%)	生长情况 <sup>2)</sup> Growth	金属离子 Metal ions	绿磺隆的降解率 Degrading ratio of Chlorsulfuron (%)	生长情况 <sup>2)</sup> Growth
Ba <sup>2+</sup>	55.6	++++	Cd <sup>2+</sup>	33.7	++
Zn <sup>2+</sup>	49.5	+++	Al <sup>3+</sup>	52.4	+++
Cr <sup>3+</sup>	35.6	++	Pb <sup>2+</sup>	21.5	+
Cu <sup>2+</sup>	47.2	+++	Ag <sup>+</sup>	29.8	+
Co <sup>2+</sup>	32.8	++	对照 <sup>1)</sup>	61.8	++++

1) 对照: 未添加其它金属离子; 2) + 号愈多表示生长情况愈好

从表中可以看出, LHL-1 能耐受多种金属离子, Ba<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup> 等对其生长不造成影响, Co<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup> 对其稍有影响, 而 Pb<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup> 则抑制其生长。

### 3 讨论

生物修复是利用微生物催化降解污染物, 从而消除环境污染的一种新的生物治理技术。直接向遭受污染的土壤接种外源的污染物降解菌, 能加速污染物的降解, 快速消除土壤污染, 国内外已有应用成功的报道。筛选出绿磺隆高效降解菌株, 运用生物修复技术来消除农药污染, 恢复生态环境, 是本研究的主要目的之一。本实验只在实验室条件下初步研究了 LHL-1 降解绿磺隆的一些基本特性, 关于其降解绿磺隆的代谢途径和分子生物学特性, 以及在土壤中的生态学行为、田间试验、安全性评估等, 将有待进一步研究。

### 4 结论

1. 从土壤中分离出一株绿磺隆降解菌株 LHL-1, 经初步鉴定属于黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。
2. LHL-1 菌株生长的最适温度为 30℃, 最适 pH 为 6, 适宜接种量为 10%, 降解绿磺隆适宜的起始浓度为 20 mg L<sup>-1</sup>, 30℃、40 h 培养, 降解率达 62%。
3. LHL-1 菌株能耐多种金属离子, Ba<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup> 等对其生长无影响, Co<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup> 对其稍有影响, 而 Pb<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup> 则抑制其生长。

## 参考文献

1. Walker S R, Cotterill E G, Welch S J. Absorption and degradation of chlorsulfuron metsulfuron-methyl in soils from different depths. *Weed Res.*, 1989, 29: 281~ 285
2. Shea P J. Chlorsulfuron dissociation and absorption selected adsorbents and soils. *Weed Science*, 1986, 34: 476~ 478
3. 蔡立, 蒋梅茵. 绿磺隆在土壤中的残留与危害. *农村生态环境*, 1995, 11(2): 39~ 42
4. Anderson R L, Larsen P L, Sydne L K, *et al.* Environment effects on metsulfuron and chlorsulfuron bioactivity in soil. *J. Environ. Qual.*, 1985, 14: 517~ 521
5. Chino H T, suji, Isikawa Y. Study on bioremediation of oil contaminated soil. Part 3. Properties of bioremediated soil and applicability for greenery in Kuwait. *Obayashigumi Gijustu Kenkyushoho.*, 1998, 57: 111~ 114
6. Walker A, Brown P A. Measurement and prediction of Chlorsulfuron persistence in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxic.*, 1983, 30: 365~ 372
7. Smith A E. Persistence of herbicides chlorsulfuron and metsulfuron-methyl in prairie soils. *Bull. Environ. Contam. Toxic.*, 1986, 37: 698~ 704
8. 布坎南 R E, 吉本斯 N F. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984
9. 秦曙, 乔雄梧, 朱九生等. 土壤中残留苯磺隆的高效液相色谱分析. *环境化学*, 1997, 16(2): 119~ 121
10. Fredrickson D R, Shea P J. Effect of soil pH on degradation, movement and plant uptake of chlorsulfuron. *Weed Science*, 1986, 34: 328~ 332

## ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERS OF A CHLORSULFURON-DEGRADING STRAIN

Shao Jin-song Shen Biao Hong Qing Li Shun-peng

(College of Life Science, Nanjing Agric. Univ., Key Lab of Microbiological Engineering Agricultural  
Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

### Summary

Chlorsulfuron is a kind of herbicide that is used all over the world for the control of broad-leaved weeds in the field of cereal crops. Increasing attention is being paid all over the world for its persistency and high toxicity. Bioremediation is an effective and economic method to treat the environment that has been polluted by hazardous organic compounds. So researchers paid much attention in this area; most of this research has been focused on the isolating and characterizing bacteria with abilities to degrade particular pollutants or transformation of metals. At the same time people have begun to explore genetic manipulation of genes encoding degradability of specific chemicals and applied genetic engineered microorganisms in the waste treatment of cleaning up. Environmental biotechnology has become an indispensable component of our current society dealing with pollution reduction and cleaning up the contaminated sites. A strain of Chlorsulfuron degrading bacteria was isolated from soil samples collected from field with frequent application of herbicide. The strain was designated LHE-1 and preliminary identified as *Xanthomonas* sp. About 62% of Chlorsulfuron was degraded when the strain was cultured in a mineral salt medium containing 20 mg L<sup>-1</sup> Chlorsulfuron under the condition of 30 °C, 150 r min<sup>-1</sup>, 40 h. Among the tested metal ions, Pb<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup> inhibited its growth, while Ba<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and other metal ions have no effect on its growth.

**Key words** *Xanthomonas*, Chlorsulfuron, Biodegradation