

1 株吡嘧磺隆降解菌 DF12 的筛选和鉴定及降解特性

陈颖曦, 柏连阳, 曾爱平, 周小毛, 宋杰辉, 王彦辉, 刘二明*

(湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 从湖南瑞泽农药厂污水池中筛选到 1 株吡嘧磺隆降解菌 DF12, 经形态学、生理生化及 16S rDNA 鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 该菌在 100 mL 三角瓶中摇瓶体积 70 mL、接种量 2.0 % ($OD_{600}=0.80$)、pH 7.0 条件下对吡嘧磺隆降解率可达 74.78 %。

关 键 词: 吡嘧磺隆; 假单胞菌属; 降解特性

中图分类号: Q939.11⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)03-0287-04

Isolation, identification and characterization of a Pyrazosulfuronethyl-degrading strain DF12

CHEN Ying-xi, BO Lian-yang, ZENG Ai-ping, ZHOU Xiao-mao, SONG Jie-hui, WANG Yan-hui, LIU Er-ming*

(College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A Pyrazosulfuronethyl-degrading strain DF12 was isolated from sewage reservoir of the herbicides factory in Hunan, which belonged to *Pseudomonas putida* based on physiological and biochemical properties and 16S rDNA analysis. When strain DF12 grown in LB medium was adjusted to an OD_{600} of 0.80 and inoculated in an inoculum size of 2.0% in 70 mL culture containing Pyrazosulfuronethyl in a 100 mL flask with shaking under pH of 7.0, it could degrade 74.78 % of Pyrazosulfuron-ethyl.

Key words: Pyrazosulfuronethyl; *Pseudomonas* sp; degradating characters

吡嘧磺隆作为高效、低毒的磺酰脲类选择性内吸传导型除草剂,对一年生和多年生阔叶杂草和莎草科杂草有很好的防除效果。该药剂在水稻 1~3 叶期施用,若使用不当,易造成作物药害。钟决龙等^[1]指出,水稻直播田播后 4~5 d 施用 10%吡嘧磺隆可湿性粉剂,用量超过 300 g/hm²时,3 d 后稻株会出现生长停滞、黄化、白根少等药害症状。方圆^[2]报道,油菜对吡嘧磺隆敏感,油菜田误施吡嘧磺隆会出现无法挽回的药害,只能毁耕改种其他作物。

尹乐斌等^[3]从水稻土壤中分离得到 1 株能以吡嘧磺隆为唯一碳源和能源的光合细菌,该细菌被鉴定为红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas* sp.)菌株,在

光合细菌培养基中,30 ℃、pH 7.0 培养 7 d 后,对 100 mg/L 的吡嘧磺隆降解率达 52.07%; Xu Jun 等^[4]分离出 3 株能高效降解吡嘧磺隆的菌株,其中 D61 和 D66 系假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.), D713 属芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.), D61 和 D66 在 150 r/min、28 ℃的条件下,摇瓶培养 12 d 后能将初始质量浓度为 90 mg/L 的吡嘧磺隆全部降解, D731 在同样条件下能降解超过 85.9%的吡嘧磺隆。

笔者从取自湖南湘阴瑞泽农药厂污水池的污泥中分离得到 1 株能高效降解吡嘧磺隆的降解菌,对其进行了形态学、生理生化和 16S rDNA 鉴定,绘制了该菌的生长曲线和吡嘧磺隆降解曲线,研究

收稿日期: 2012-01-09

基金项目: 国家烟草专卖局项目(SR0558); 湖南省研究生创新基金项目(CX2011B288)

作者简介: 陈颖曦(1985—),男,湖南株洲人,硕士研究生,主要从事降解菌研究,chenchen_200801@126.com; *通信作者, emliu08@126.com

摇瓶体积、接种量和 pH 对该菌降解吡啶磺隆的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

采集湖南瑞泽农药厂污水池污泥,用自封袋保存于 4℃ 冰箱中备用。96%吡啶磺隆原药系常州达瑞化工产品。培养基为基础盐培养基^[5]和牛肉膏蛋白胨培养基^[6]。

1.2 方法

1.2.1 降解菌的富集与分离

取 3 g 污泥接种于灭菌的基础盐培养基中,培养基中加入用乙腈配制的吡啶磺隆母液,使吡啶磺隆初始质量浓度为 30 mg/L。置 28℃、180 r/min 培养 7 d,以 2%接种量转接至同样的新鲜培养基,使吡啶磺隆质量浓度为 40 mg/L,再转接 5 次,且每次提高培养基中的吡啶磺隆质量浓度,直至吡啶磺隆质量浓度为 100 mg/L,并设 100 mg/L 的不接菌对照,培养当天和第 7 天分别取 1.5 mL 培养物,12 000 r/min 离心 5 min,上清液用高效液相色谱仪检测吡啶磺隆的质量浓度,判断有无降解效果(色谱条件:波长为 241 nm,流动相为甲醇-乙酸(0.1%)=75%:25%,色谱柱为 C₁₈(4.6 mm×150 mm),流速为 0.8 mL/min,柱温为 35℃)。再用牛肉膏蛋白胨平板分离单菌落并纯化,复筛验证单菌降解效果。

1.2.2 降解菌形态、生理生化及 16S rDNA 鉴定

1) 降解菌形态观察和生理生化指标测定。降解菌形态观察包括在牛肉膏蛋白胨培养基上生长菌落形态、菌体扫描电镜观察、革兰氏染色。生理生化指标按《常见细菌系统鉴定手册》^[7]测定氧化酶、V.P、M.R 等生理生化指标。

2) 降解菌 16S rDNA 鉴定。将 LB 液体培养基增菌所得菌液在 1.5 mL 小管中以 12 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,按照文献[8]的方法提取总 DNA,按照 Claudia Moreno^[9]的引物序列交上海生物工程有限公司合成(27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3', 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'),以提取

的总 DNA 为模板进行 PCR 反应,25 μL 反应体系:DNA 模板 1 μL,上游引物及下游引物各 1 μL (100 μmol/L),MasterMix(TIANGEN)10 μL,ddH₂O 12 μL。反应程序:95℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 1 min;52℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 3 min;循环 35 次,72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,把电泳条带清晰、单一且无杂带的 PCR 产物送华大基因公司测序、拼接,目的序列在线 BLAST 比对,并选择与降解菌同属的菌株、已报道的吡啶磺隆降解菌菌株及跟降解菌不同属的 1 株菌,用 mega 4.0 构建系统发育树。

1.2.3 降解菌菌体数量与降解吡啶磺隆的关系

为了摸索 DF12 生长繁殖与吡啶磺隆降解之间的动态规律,对菌体的生长量和吡啶磺隆浓度进行实时监测。LB 液体培养基 28℃ 过夜增菌,在 600 nm 下测定 OD 为 0.917,离心收集菌体,接种至吡啶磺隆为 20 mg/L 的基础盐培养液中,设不接菌对照,在 28℃ 下 180 r/min 摇瓶,分别于第 1~9 天每天取样 4 mL,测 OD₆₀₀ 值。另分别取样 1.5 mL,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液经过滤膜过滤后,用高效液相色谱检测滤液中吡啶磺隆含量,用 Excel 绘制降解菌的生长曲线和对吡啶磺隆的降解曲线。

1.2.4 影响降解菌降解吡啶磺隆的因素

1) 培养基体积。在 100 mL 三角瓶中,分别装入 50、60、70、80、90、100 mL 基础盐培养基,接种菌量 0.1%(OD₆₀₀=0.800),初始 pH 7.0,在摇床中培养。各处理于接种当天和第 7 天取样,高效液相色谱检测吡啶磺隆含量,计算降解率。

2) 接种量。将降解菌菌液稀释至 OD₆₀₀=0.800,分别设 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 共 6 个接种量,均采用最佳摇瓶体积,于接种当天和第 7 天取样,高效液相色谱检测吡啶磺隆含量,计算降解率。

3) pH 值。在最佳摇瓶体积和最佳接种量下,设 pH5、6、7、8、9、10 等 6 个处理,于接种当天和第 7 天取样,高效液相色谱检测吡啶磺隆含量,计算降解率。

2 结果与分析

2.1 降解菌对吡啉磺隆的降解效果

从土壤中共分离得到 39 株细菌, 其中 6 株细菌对吡啉磺隆有降解效果, 单菌降解效果最好的是 DF12 菌株(图 1), 该菌株对吡啉磺隆降解率达 71.1%。

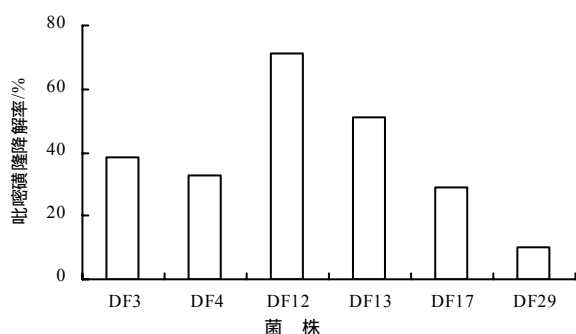


图 1 降解菌对吡啉磺隆的降解效果

Fig.1 The effect of degradation on pyrazosulfuronethyl with single strain

2.2 DF12 菌株的形态、生理生化及分子鉴定

2.2.1 形态与生理生化特性

DF12 在牛肉膏蛋白胨培养基上菌落为乳白色; 在牛肉膏蛋白胨平板上培养 7 d 后, 菌落周围呈深棕色; 细菌杆状(图 2), 革兰氏阴性, 18 个生理生

化鉴定指标与文献[7]中假单胞菌属一致。



图 2 DF12 在扫描电镜下的形态(×200 000)

Fig.2 The morphology of DF12 under SEM(×200 000)

2.2.2 DF12 菌株的 16S rDNA 鉴定

DF12 扩增 PCR 产物 16S rDNA 经测序结果拼接后, 在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 结果表明, DF12 与 *Pseudomonas* sp. CA15 (HM047297.1) 的相似度达 100%。选取假单胞菌属的代表性菌株 9 株和 Xu Jun^[4] 所筛选的 2 个菌株及 *Bacillus subtilis* (HQ021418) 等对照菌株相应种构建系统发育树(图 3)。综合形态、生理生化和分子鉴定的结果, 认定 DF12 为假单胞菌属(*Pseudomonas*) 中的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

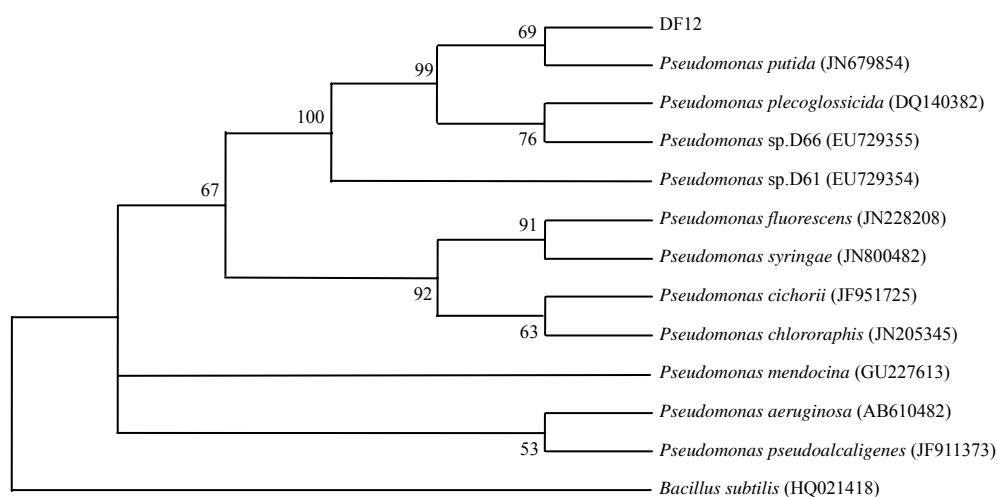


图 3 DF12 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of DF12

2.3 DF12 的菌体数量对吡啉磺隆降解的影响

用 Excel 制作峰面积(吡啉磺隆相对含量, y)和 OD 值(菌体浓度, x)作线性回归分析, 它们的关系

如回归方程: $y = -4.0 \times 10^{-5}x + 1.4$, $R^2 = 0.6898$ 。由方程可知, 吡啉磺隆相对含量和菌体对应的 OD 值呈负相关。菌体生长至第 6 天, 数量迅速增多, 6 d

后,菌体数量的增幅变小;而吡嘧磺隆相对含量至第 5 天逐渐减少,第 5~6 天,吡嘧磺隆相对含量迅速下降,至第 6 天后,降解呈小幅度减少。

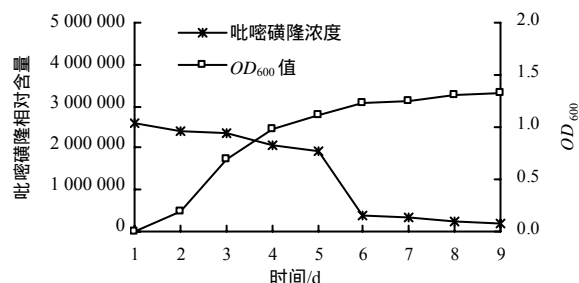


图 4 DF12 的生长曲线和吡嘧磺隆降解曲线

Fig.4 DF12 growth curve and Pyrazosulfuronethyl degradation curve

2.4 培养基体积对吡嘧磺隆降解率的影响

在 100 mL 的三角瓶中,当培养基体积小于 70 mL 时,对吡嘧磺隆的降解率随体积的增大逐步提高;当培养基体积为 70 mL 时,对吡嘧磺隆的降解率最高,达 40.65%;培养基体积大于 70 mL 时,对吡嘧磺隆的降解率又逐步下降,这是因为培养基占据三角瓶绝大部分空间,液面跟空气接触面积小,影响了空气中氧气的进入和溶解,从而影响菌体的降解酶活性,降低了降解效率。

2.5 接种量对吡嘧磺隆降解率的影响

培养基体积为 70 mL 时,随着接种量的增加,降解率逐渐升高,在接种量为 2.0% 时降解率最高,达到 74.40%,其后降解率不再增加。

2.6 pH 对吡嘧磺隆降解率的影响

培养基 pH 对吡嘧磺隆降解率的影响较大,当

pH 为 7.0 时降解率最高,达到 74.78%,pH 高于或低于 7.0,对吡嘧磺隆的降解率都会明显下降。

参考文献:

- [1] 钟决龙,南天竹.吡嘧磺隆在水稻直播田产生药害的原因及对策[J].杂草科学,2006(4):38-39.
- [2] 方圆.油菜田误用吡嘧磺隆没法救[N].江苏农业科技报,2007-01-06(007).
- [3] 尹乐斌,张德咏,张松柏,等.一株吡嘧磺隆降解菌 S8-1 的分离鉴定及生物学特性[J].微生物学通报,2010,37(10):1432-1439.
- [4] Xu Jun, Li Xue-sheng, Xu Yan-jun, et al. Biodegradation of Pyrazosulfuronethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils[J]. Chemosphere, 2009, 74: 682-687.
- [5] Chang Y J, Stephen J R, Richter A P, et al. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: Effect of profiling method[J]. Microbiol Methods, 2000, 40(1): 19-31.
- [6] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2004.
- [7] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[K].北京:科学出版社,2001.
- [8] 沈德新,封志纯,杜江.细菌 DNA 提取方法比较[J].中原医刊,2004,31(10):20-22.
- [9] Moreno Claudia, Romero Jaime, Espejo Romilio T. Polymorphism in repeated genes 16S rRNA is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. Microbiology, 2002, 148: 1233-1239.

责任编辑: 罗慧敏