二甲戊乐灵降解细菌的分离及降解特性

朱鲁生[1], 林爱军[1,2], 王军[1], 程翠花[3]
(1. 山东农业大学资源与环境学院, 山东泰安 271018; 2. 中国科学院生态环境研究中心土壤环境研究室, 北京 100085; 3. 山东华阳集团环保科, 山东宁阳 271400)

摘要: 分离鉴定了二甲戊乐灵降解细菌, 并研究了培养条件对二甲戊乐灵降解和细菌生长的影响. 结果表明, 所分离的 29 株细菌中有 3 株在 3d 内对 100 $mg \cdot L^{-1}$ 二甲戊乐灵的降解率在 80 %以上, 选择 HB-1、WB-1 2 株细菌进一步研究, 此 2 株细菌经鉴定分别属于假单胞菌(*Pseudomonas*)和玫瑰色微球菌(*Mirococcus luteus*). 结果表明 2 株细菌在中性培养液中外加碳源浓度为 0.2 %、二甲戊乐灵浓度不大于 100 $mg \cdot L^{-1}$、30 ~ 40 ℃培养的条件下, 细菌生长量和二甲戊乐灵的降解率都达到最大.

关键词: 二甲戊乐灵; 细菌; 降解; 生长量
中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0145-05

Isolation and Degrading Characters of Pendimethalin Degrading Bacteria

ZHU Lu-sheng[1], LIN Ai-jun[1,2], WANG Jun[1], CHENG Cui-hua[3]
(1. College of Environment and Resources, Shandong Agricultural University, Shandong Taian 271018, China; 2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. Shandong Huayang Group, Shandong Ningyang 271400, China)

Abstract: Microbial degradation of pendimethalin and the effects of culture conditions in vitro are studied. Twenty-nine strains are isolated by enrichment from soil and sludge. 3 strains can degrade more than 80 % of pendimethalin of 100 $mg \cdot L^{-1}$ in 3 days in culture fluid. 2 bacteria are considered as efficiently degrading strains identified as *Pseudomonas*, *Mirococcus luteus*. The efficiency of degradation is affected by culture conditions such as pH, temperature and the concentration of sucrose and pendimethanlin. The optimal conditions are proposed.

Key words: pendimethalin; bacteria; degradation; bacterial growth

近年来, 我国农药生产量和使用量居世界第二位, 仅次于美国[1]. 在生产中使用的农药有 70 %左右直接进入生态环境, 成为我国进入环境中数量最多、影响范围最广的有毒环境污染物质, 给人民生命健康带来严重威胁. 农药在环境中的降解, 主要是在微生物的作用下进行的生物降解, 降解速率受到农药性质、环境条件和施药方式等因素的影响[2]. 影响农药生物降解的因素很多, 如土壤环境条件、气候条件、土壤微生物活性等, 其中土壤环境条件又包括土壤温度、湿度、pH 值、有机质含量等.

二甲戊乐灵是二硝基苯胺类选择性芽前除草剂, 属低毒高活性除草剂[3~4], 抑制分生组织细胞分裂, 不影响种子的萌发, 其选择性为生理和位差选择, 在国内外应用很广, 适用于多种大田作物和蔬菜防治多种杂草. 二甲戊乐灵还是一种低毒植物生长调节剂, 主要用于抑制烟草腋芽的生长. 二甲戊乐灵在环境中的降解主要是生物降解和光降解, 国内外已经有人做了一些二甲戊乐灵微生物降解方面的工作[5], 主要集中在土壤中二甲戊乐灵的降解和纯培养条件下一些真菌对二甲戊乐灵的降解[6~10]. 本文分离了 2 株可降解二甲戊乐灵的细菌, 并研究了培养条件对细菌生长和降解的影响.

1 材料和方法

1.1 仪器设备

GC-14C 型气相色谱仪带电子捕获检测器和 N2000 色谱工作站, 净化工作台, 恒温振荡培养箱, 生化恒温养箱, 高压灭菌锅, 电子天平及实验室常用玻璃仪器等.

1.2 药品和试剂

二甲戊乐灵标准品(纯度 ≥97.0 %), 以石油醚或丙酮配成一定浓度的溶液备用; 33 %施田补乳油(瑞士氰胺公司)用无菌水适当稀释, 按需加入培养液; 无水 Na_2SO_4 为分析纯, 130 ℃烘 5h 后使用; 石油醚为分析纯, 经全玻璃装置重蒸后使用.

1.3 菌株分离与鉴定

收稿日期: 2004-03-10; 修订日期: 2004-06-22
基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(03BS123); 山东农业大学博士后科研基金(22023)资助.
作者简介: 朱鲁生(1963~), 男, 博士, 教授, 主要研究环境污染的生态毒理与生物修复, Email: lushzhu@sdau.edu.cn

基础培养基按照参考文献[11~12]配制,配方为: NH_4NO_3 1.0g, $MgSO_4$ 0.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 1.5g, NaCl 0.5g,酵母膏 0.05g,蔗糖按需加入,pH 7.2~7.3,121 ℃灭菌 30 min.灭菌后根据需要加入二甲戊乐灵的丙酮溶液,并加热使丙酮挥发,或加入施田补乳油的无菌水稀释液.采用 2 种培养液富集二甲戊乐灵降解细菌,不含外加碳源(蔗糖)的培养液(A)和含有少量外加碳源(蔗糖)的培养液(B),培养液中其它组分相同.

采集的土壤和污泥以 5%的量接种到含二甲戊乐灵 100 mg·L^{-1}的 2 种培养液中,33 ℃振荡培养 1 周,取适量富集液接种于同样培养液中培养,同时将二甲戊乐灵浓度提高到 200 mg·L^{-1},如此转接并不断提高二甲戊乐灵的浓度,直到二甲戊乐灵的浓度提高到 5 000 mg·L^{-1}.取最后富集液采用混合平板法进行分离,挑取单菌落转接到二甲戊乐灵为碳源的选择性培养平板和含蔗糖的平板并纯化,连续转接且不断提高二甲戊乐灵的浓度最终达到 5000 mg·kg^{-1},选取生长好的菌株分别编号保存.

细菌的鉴定按参考文献[13~16]进行.

1.4 微生物降解试验

细菌预培养于无药平板,用无菌生理盐水配成一定浓度的菌悬液,待用.根据实验需要配制一定蔗糖浓度的培养液,并根据实验需要加入二甲戊乐灵,分装到试管,接种上述细菌溶液,另设置不接菌处理,同时置恒温振荡培养箱一定温度下 150r/min 培养.培养结束后,一部分试管测定 650nm 下的 OD 值,细菌的生长量.

1.5 二甲戊乐灵的测定

培养结束后测定二甲戊乐灵的试管加入重蒸石油醚 5.0mL,于旋涡混合器振荡提取 2 次,每次 2.0min,静置分层后,吸取一定体积石油醚于 25mL 的容量瓶,定容后气相色谱测定.

色谱条件:色谱柱:内径 0.3 cm×180cm 玻璃色谱柱;固定相:3%OV-17/Gas Chrom sorb W AW DMCS 80~100 目;操作温度:进样口 270 ℃;柱室 255 ℃;检测器 290 ℃;气体流量:N_2 为 110kPa,ECD 上尾吹为 20kPa.

1.0、10.0、100.0mg·L^{-1} 3 个浓度重复 6 次的标准添加回收率及变异系数分别为 99.88%±0.55%,98.70%±0.41%、98.13%±0.42%.

2 结果与讨论

2.1 高效降解菌株的筛选

取最后富集液采用混合平板法分离,挑取生长快的单菌落接种于平板纯化并编号保存.以不含外加碳源(蔗糖)的富集液(A)获得 17 株细菌,测定 3d 内对 100 mg·L^{-1}二甲戊乐灵的降解能力如表 1 所示.含有少量外加碳源的富集液(B)分离后获得 12 株细菌,测定 3d 内对 100 mg·L^{-1}二甲戊乐灵的降解能力如表 2 所示.

表 1 富集液(A)分离细菌 3d 内对 100 mg·L^{-1}二甲戊乐灵的降解率

Table 1 Biodegradation rate of pendimethalin by bacterial strains isolated from enrichment culture A in three days

菌株	降解率/%	菌株	降解率/%
B-101	15.84	HB-3	16.28
B-102	13.46	HB-4	59.85
B-103	6.43	HB-6	49.47
B-104	7.66	HB-9	36.85
B-105	10.03	HB-10	81.82
B-106	12.52	HB-11	40.69
B-107	6.48	HB-12	60.94
HB-1	88.09	WB-1	87.78
HB-2	73.09		

从表 1 中可以看出,虽然各菌株均可利用二甲戊乐灵为碳源,并可耐受 5000 mg·L^{-1}的二甲戊乐灵,但并不都具有高的降解率.在此 17 株细菌中有 5 株细菌在 3d 内的降解率在 60%以上,其中 HB-1、WB-1 和 HB-10 3 株细菌在 80%以上.从表 2 中可以看出,虽然各菌株含有少量外加碳源和 5 000 mg·kg^{-1}二甲戊乐灵的平板上均可正常生长,但各菌株对二甲戊乐灵的降解能力都很低,没有二甲戊乐灵的高效降解菌.根据各菌株的降解能力确定 HB-1 和 WB-1 为进一步研究的菌种.

表 2 富集液(B)分离细菌 3d 内对 100 mg·L^{-1}二甲戊乐灵的降解率

Table 2 Biodegradation rate of pendimethalin by bacterial strains isolated from enrichment culture B in three days

菌株	降解率/%	菌株	降解率/%
B-201	0.0	B-207	0.0
B-202	0.0	B-208	1.01
B-203	0.0	B-209	0.02
B-204	0.0	B-210	0.61
B-205	0.0	B-211	2.46
B-206	0.0	B-212	2.35

2.2 菌株鉴定

菌株 HB-1 菌落大,边缘不规则,表面低凸面,乳白色,半透明,有光泽,菌体为杆状,不形成芽孢,革兰氏染色为阴性. WB-1 菌落小,圆形边缘整齐,表面高凸面,红色,不透明,无光泽,菌体呈球状,革兰氏染色为阳性.各项生理生化指标如表 3 所示.

根据表 3 中的生理生化反应特性以及菌落形态

和菌体形状,初步鉴定 HB-1 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),WB-1 属于玫瑰色微球菌(*Mirococcus luteus*).

表 3　细菌的生理、生化特性[1)]

Table 3　The physiological and biochemical characters of isolates

反应类型 Reaction types	菌株 Strains	
	HB-1	WB-1
蔗糖发酵试验	-	⊕
麦芽糖发酵试验	-	-
D-葡萄糖发酵试验	+	+
乳糖发酵试验	-	-
D-甘露醇发酵试验	+	-
D-木糖发酵试验	+	⊕
L-阿拉伯糖发酵试验	+	-
脲酶产生试验	±	未做
甲基红(M.R.)试验	-	-
乙酰甲基甲醇(V.P.)试验	-	-
过氧化氢酶试验	-	-
柠檬酸盐利用试验	-	-
石蕊牛乳试验	产碱	产酸不产碱
淀粉水解试验	-	-
明胶液化试验	-	-
酪素水解实验	-	-
硫化氢产生试验	-	-
吲哚产生试验	-	-
硝酸盐还原试验	+	+
革兰氏染色	- 杆状	+ 球状

1)"+"表示反应呈阳性,"-"表示反应呈阴性

2.3　细菌生长和对二甲戊乐灵的降解

(1)细菌生长曲线　2 株细菌在不含及含二甲戊乐灵 100 mg·L^{-1} 培养液中的生长曲线分别见图 1 及图 2 所示.从图 1 中可以看出,在不含二甲戊乐灵的培养液中细菌生长迅速,在 18h 菌体数目达到最大,HB-1、WB-1 2 株细菌 OD_{650} 的值分别达到 1.414、1.251,以后趋于平缓.从图 2 中可以看出,在含二甲戊乐灵 100 mg·L^{-1} 的培养基中开始细菌生长较慢,有一个适应期,然后迅速生长,在 18h 生长量达到最大,但少于不含二甲戊乐灵培养液,随后菌量逐渐减少.由此表明,虽然二甲戊乐灵可以作为碳源被细

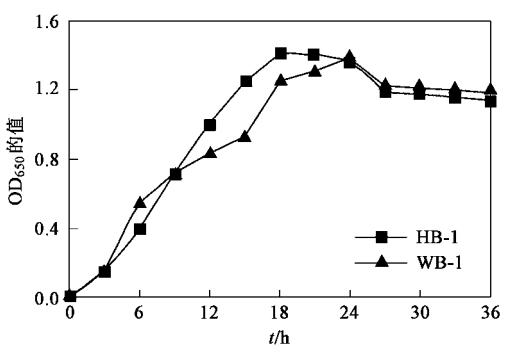

图 1　无药培养基上细菌生长曲线

Fig.1　Growth curves of bacteria in culture medium

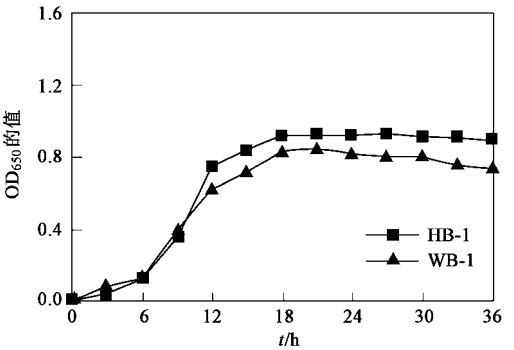

图 2　含药培养基上细菌生长曲线

Fig.2　Growth curves of bacteria in culture medium containing

菌所利用,但对细菌的生长有一定的抑制作用.

(2)二甲戊乐灵降解曲线　含有 0.2%蔗糖的培养基加入 120 mg·L^{-1} 二甲戊乐灵后接种 2 株细菌进行培养,并测定不同培养时间二甲戊乐灵的浓度,其随时间变化如图 3 所示.从图 3 中可以看出,未接菌处理和接菌处理中二甲戊乐灵浓度都减小,但接菌处理培养液中二甲戊乐灵的浓度减少速度远远大于未接菌处理,表明细菌对二甲戊乐灵有降解作用.在 24h 前,细菌保持比较高的降解能力,但在 24h 后其浓度变化趋于平稳,分析其原因,在接种初期,菌体能吸附大量农药,使农药浓度下降,在对数生长期由于微生物数量多而且活性高,降解速度大,对数生长期后微生物种群老化,数量增加变慢,降解速率下降.

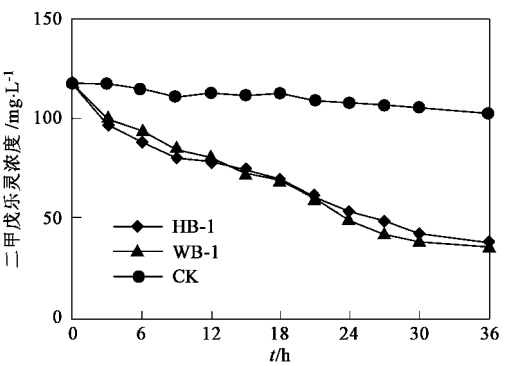

图 3　二甲戊乐灵的浓度随时间变化曲线

Fig.3　The concentration of curves of pendimethalin in culture medium at deferent time

2.4　外加碳源浓度对细菌生长及降解率的影响

含不同蔗糖浓度的培养液中添加 100 mg·L^{-1} 二甲戊乐灵接种后培养 24h,测定细菌的生长和二甲戊乐灵的降解,如图 4 所示.

虽然随外加碳源浓度的提高,微生物生长繁殖加快,细菌生长量增大,但从图 4 中可以看出,二甲戊乐灵的降解率却都是先增加,后降低.在没有外加

碳源的条件下,菌体数量少,对二甲戊乐灵的降解率很低,随外加碳源浓度的提高,可利用碳源浓度增加,细菌生长繁殖加快,二甲戊乐灵的降解率增加,在 0.2 %时达到最大,HB-1 和 WB-1 分别是 53.2 %、65.67 %,但外加碳源浓度再增加时,二甲戊乐灵降解率反而开始降低.由此可见,在可利用碳源浓度低的情况下,加入一定的生长基质并不抑制,而且常常加速农药的生物降解[17~19].没有外加碳源时缺乏易于利用的碳源,细菌的生长受到抑制[20],降解率低;加入少量外加碳源后促进细菌的增长,产生降解酶的数量多[21],降解率增加;若外加碳源浓度过高,虽然细菌的生长量增加,但菌株优先利用易于利用的蔗糖,减少了对二甲戊乐灵的利用.总之,微生物降解农药,需要合适的外加碳源浓度,过低则抑制了微生物正常的生长代谢,过高则降低了对农药的利用或抑制了降解酶的产生,只有适量添加外加碳源,才能既保证细胞的正常生理功能,又满足降解酶产生的要求.

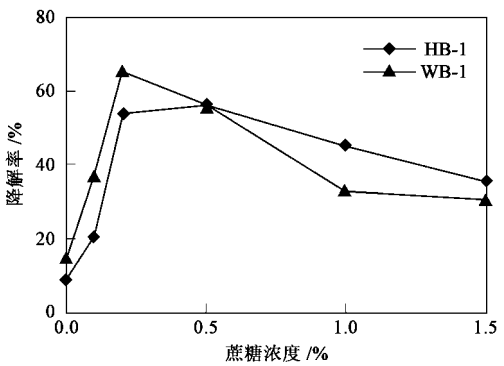

图 4 蔗糖浓度对二甲戊乐灵降解率的影响

Fig.4 Effects of concentration of sucrose on biodegradation of pendimethalin

2.5 初始 pH 值对细菌生长及降解率的影响

含有 0.2 %蔗糖的培养基加入 100 mg·L^{-1}二甲戊乐灵后测定初始 pH 值对二甲戊乐灵降解率影响如图 5 所示.研究中发现,在 pH5 ~ 9 的范围内,细菌生长随培养液 pH 值升高先增加,在 pH8 的条件下生长量最大,然后随培养液 pH 值升高先生长量减少.但两菌株所受到的影响程度也不相同,菌株 WB-1 的生长量受培养液 pH 值影响小,菌株 HB-1 受的影响大.从图 5 可以看出,二甲戊乐灵的降解率随 pH 值的增加而加大,在 pH 值为 7 时达到最大,而后随 pH 值的增加降解率减小.各菌株在 pH6 ~ 8 的条件下均可以保持较高的降解率.在 pH 值为 9 时,WB-1 的降解能力受抑制程度大,其降解率仅为 10.18 %.

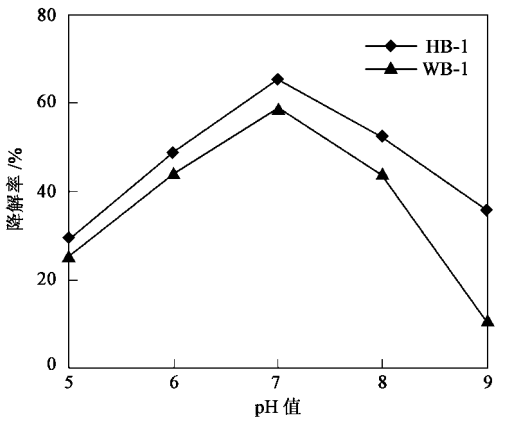

图 5 pH 值对二甲戊乐灵降解率的影响

Fig.5 Effects of pH value on pendimethalin biodegradation rate

2.6 二甲戊乐灵浓度对细菌生长及底物降解率的影响

在 0.2 %蔗糖的培养基中加入不同浓度的二甲戊乐灵浓度后测定细菌的生长量和底物的降解.二甲戊乐灵对细菌的生长有抑制作用,随着其浓度增加,细菌的生长量逐渐下降.二甲戊乐灵浓度对底物降解率的影响如图 6 所示.

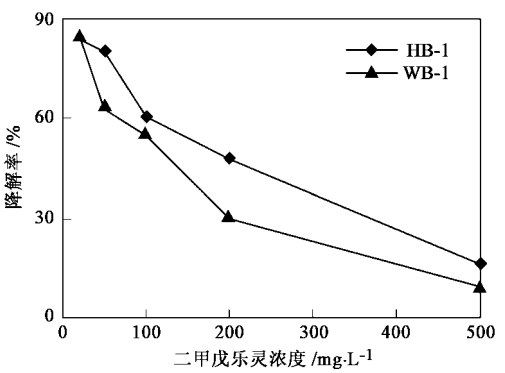

图 6 不同二甲戊乐灵浓度下细菌的降解率

Fig.6 Effects of pendimethalin concentration on pendimethalin biodegradation rate

从图 6 中可看出,随培养液中农药浓度升高,二甲戊乐灵的降解率降低;但如果计算二甲戊乐灵的绝对去除量可以发现,随培养液中农药浓度的升高,二甲戊乐灵的绝对去除量先增加后减少.这是因为,二甲戊乐灵作为一种复杂的化学物质,一方面可以诱导降解酶活性的提高,一方面也抑制细菌的生长和生理活动.在低浓度的条件下,随二甲戊乐灵浓度的提高,细菌降解酶活性增加的程度大于生理活动受抑制的程度,所以农药的绝对去除量增加,但是由于浓度提高的程度大于去除量增加的程度,所以降解率下降.当二甲戊乐灵的浓度大于 200 mg·L^{-1}时,二

甲戊乐灵对细菌生理活动的抑制程度大于降解酶活性提高的程度,绝对去除量减少,降解率下降.由此可见,微生物降解农药的过程中对于一定量的菌体来讲存在一个合适的降解浓度,在此浓度下,农药的降解率和绝对去除量都比较高,微生物降解农药的能力得到充分的发挥.在实际利用微生物治理农药时,要充分考虑农药浓度与微生物数量的关系,既要得到高的降解率,又要有大的绝对去除量[22].

2.7　培养温度对细菌生长及降解率的影响

培养温度是影响微生物生长和降解农药的一个重要环境因素,在含有 0.2%蔗糖的培养基加入 100 mg·L^{-1}二甲戊乐灵后测定了不同培养温度下 3 株细菌的生长和二甲戊乐灵的降解率.测定结果表明,在不同的培养温度下,细菌的生长量随温度的升高增大,然后随温度升高细菌生长减少.培养温度对二甲戊乐灵降解的影响如图 7 所示.从图 7 中可以看出,培养温度对细菌降解二甲戊乐灵的影响和对生长的影响是相同的,也是随温度升高降解率先增加,在 30 ℃达到最大,HB-1 和 WB-1 的降解率分别是 62.98%、58.98%,然后降解率下降.

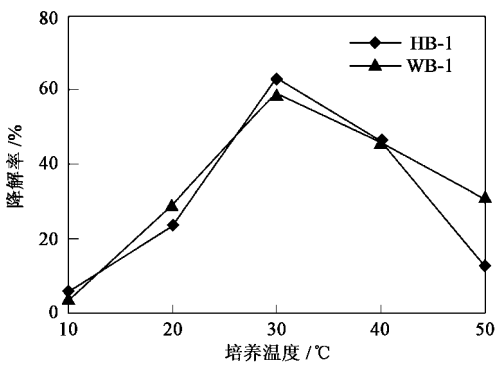

图 7　培养温度对降解率的影响

Fig.7　Biodegradation rate of pendimethalin at different temperature

3　结论

(1)本研究通过富集培养的方法分离得到 29 株细菌,其中 HB-1、WB-1 细菌对二甲戊乐灵的降解能力较强.

(2)2 株细菌在中性培养液中外加碳源浓度为 0.2%、二甲戊乐灵浓度不大于 200 mg·L^{-1}、30 ℃培养的条件下,生长量和对二甲戊乐灵的降解率都达到最大.

参考文献:

[1] 华晓梅,单正军.我国农药生产、使用状况及环境影响因子分析[J].安徽化工,1999,**6**:6~10.

[2] 蔡道基.农药环境毒理学研究[M].北京:中国环境科学出版社,1999.3~18.

[3] 王险峰.进口农药应用手册[M].北京:农业出版社,2000.421~429.

[4] 张付斗,郭怡卿,许胡兰,等.施田补防除旱育秧苗床杂草应用技术研究[J].农药,1999,**38**(6):13~15.

[5] Prakash N B, Suseeladevi L, Siddaramappa R. Effect of organic amendments onpersistence of butachlor and pendimethalin in soil [J]. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 2000, **13**(3): 575~580.

[6] Barriuso E, Houot S, Serra Wittling C. Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides [J]. Pesticide Science, 1997, **49**(1): 65~75.

[7] Carol R, Lemmon, Harry M, Pylypiw Jr. Degradation of diazinon, chlorpyrifos, isofenphos, and pendmethalin in grass and compost [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1992, **48**(3): 409~415.

[8] John Gasper, John R Street, Kentharrison S. Pendimethalin efficacy and dissipation in turfgrass as influenced by rainfall incorporation [J]. Weed Science, 1994, **42**(4): 586~592.

[9] Leoc S, Patrick J Shea, Robert N, *et al*. Efficacy and dissipation of dithiopyr and pendimethalin in perennial ryegrass (Lolium perenne) turf [J]. Weed Science, 1995, **43**(1): 140~148.

[10] Michael R B, Terry L L. Effects of soil water content on pendimethalin dissipation [J]. Journal of Environmental Quality. 1983, **12**(4): 504~508.

[11] 杜秉海.微生物学实验[M].北京:北京农业大学出版社,1994.31~35.

[12] 钱存柔,黄仪秀,林稚兰,等.微生物学实验教程[M].北京大学出版社,1999.101,205~224.

[13] 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.

[14] 中科院微生物所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法[M].北京:科学出版社,1978.

[15] (澳)V B D,斯克尔曼.蔡妙英,凌代文,战立克等译.细菌属的鉴定指导[M].北京:科学出版社,1978.

[16] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergeys manual of determinative bacteriology (8th edition)[M]. USA: The Williams & Wilkins Company. 1986.

[17] Behki R M, Khan S U. Degradation of atrazine by Pseudomonas: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1986, **34**: 746~749.

[18] Giardina M C, Giardi G F. 4-Amino-2-chloro-1,3,5-triazine: a new metabolite of ariazine by a siol bacterium[J]. Agricultural & Biological Chemistry, 1980, **44**(9): 2061~2066.

[19] Istvan N, F C K G. A single cytochrome system is involved in degradation of the herdicides EPTC (S-Ethyl Dipropylthiocarbamate) and atrazine by rhodococcus sp. strain Nl86/21 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**: 1959~2056.

[20] Struthers J K, Jayachandran K, Moorman T B. Biodegradation of atrazine by Agrobacterium radiobacter J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(9): 3368~3375.

[21] 王永杰,李顺鹏,沈标,等.有机磷农药广谱活性降解菌的分离及其生理特性研究[J].南京农业大学学报,1999,**22**(2):42~45.

[22] 周军英,林玉锁,徐亦刚,等.巨大芽孢杆菌 LY-4 对土壤中杀虫单农药的降解[J].中国环境科学,2000,**20**(6):511~514.