

咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及其降解特性研究

丁伟^{1,2}, 白鹤³, 程茁³, 曲娟娟³, 徐伟钧^{2*}

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150001; 3. 东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 从生产咪唑乙烟酸化工厂排污口的污泥和长期施用咪唑乙烟酸的混合土壤中分离到 1 株能降解咪唑乙烟酸的细菌. 该菌株在 72 h 内对 500 mg/L 的咪唑乙烟酸降解率达到 90% 以上. pH 为 5 时, 500 mg/L 的咪唑乙烟酸 72 h 内可全部降解, 而 pH 8 和 pH 9 条件下, 72 h 咪唑乙烟酸的降解率仅为 50% 左右, 酸性条件比碱性条件更适合降解菌的生长. 25℃ 和 30℃ 条件下, 降解菌对咪唑乙烟酸的降解效率较高. 25℃, pH 5 是降解菌对咪唑乙烟酸降解的最佳条件. 从形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 序列分析鉴定该菌株属于产碱菌属.

关键词: 咪唑乙烟酸; 产碱菌属; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)05-1359-04

Isolation and Identification of Imazethapyr Degradable Bacteria and Its Degradation Characteristics

DING Wei^{1,2}, BAI He³, CHENG Zhuo³, QU Juan-juan³, XU Wei-jun²

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 3. College of Resource and Environmental Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: One strain of imazethapyr degradable bacteria was isolated from the mixture of imazethapyr production factory's sludge and the soil that was contaminated with imazethapyr for a long time. The strain could degrade imazethapyr more than 90% within 72 h when it grew in 500 mg/L imazethapyr condition. When pH was 5, the bacteria could degrade all the imazethapyr of 500 mg/L in 72 h, but when pH was 8 and 9, only 50% imazethapyr was degraded which showed acid condition was more compatible than that of alkalescency for this bacteria growing. The higher degradation ratio at 25℃ and 30℃ was observed and the optimum condition for the bacteria to degrade imazethapyr was pH = 5 and 25℃. Characterizing by physiological and biochemical properties as well as 16S rRNA sequence analysis, the strain is related and shared characteristics of the genus *Alcaligenes* sp..

Key words: imazethapyr; *Alcaligenes* sp.; biodegradation

咪唑乙烟酸是 20 世纪 80 年代美国氰胺公司开发的咪唑啉酮类除草剂优秀品种, 目前被广泛应用于大豆田化学除草. 由于咪唑乙烟酸在土壤中残留时间长且长期大量应用, 不仅造成对后茬敏感作物严重毒害, 导致大豆轮作困难^[1], 而且带来农田环境的严重污染. 为解决这一问题, 科研工作者在培育抗咪唑乙烟酸作物品种和作物安全剂研究方面做了大量工作^[1,2], 但均难以彻底解决咪唑乙烟酸对土壤环境的严重污染问题. 从土壤中富集和分离能够高效降解咪唑乙烟酸的微生物, 可为解决咪唑乙烟酸应用中的这一难点问题提供一条新途径. 目前已有许多关于利用生产杀虫剂化工厂废水池中的污泥分离可降解杀虫剂生物菌株的报道^[3~6], 然而国内外鲜见有关咪唑乙烟酸生物降解的相关报道. 本研究利用生产咪唑乙烟酸化工厂排污口的污泥和长期施用咪唑乙烟酸的大豆田土壤分离得到 1 株可利用咪唑乙烟酸为唯一碳源生长的产碱菌属 (*Alcaligenes*

sp.), 对该菌株的分类和降解特性进行分析, 以期为利用该菌株修复咪唑乙烟酸对土壤环境的污染提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试原药与培养基

96% 咪唑乙烟酸原药由浙江省乐津市农药厂提供.

基础盐培养基: $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 1.6 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.06 g; $CaCl_2$ 0.01 g; $ZnSO_4$ 0.05 mg; NH_4Cl 1.0 g; KH_2PO_4 0.4 g; $Fe_2(SO_4)_3$ 0.03 g; $CuSO_4$ 0.05 mg; HBO_3 0.03 mg; 蒸馏水 1 000 mL.

收稿日期: 2007-08-10; 修订日期: 2007-11-15

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (C2005-19); 黑龙江省博士后基金项目 (LBH-Z05222)

作者简介: 丁伟 (1968 ~), 男, 博士后, 副教授, 主要研究方向为农药与环境生态.

* 通讯联系人, E-mail: dingweing@yahoo.com.cn

LB 培养基:酵母膏 5 g;蛋白胨 10 g;NaCl 10 g;蒸馏水 1 000 mL.

1.2 咪唑乙烟酸降解细菌的分离方法

把生产咪唑乙烟酸化工厂排污口采集的污泥和长期施用咪唑乙烟酸的大豆田土壤 1:1 混合,取混合土样 1 g 加入到 100 mL LB 培养基中,30℃,170 r/min 培养 24 h,取上述培养液 10 mL 加入到 100 mL 含咪唑乙烟酸 100 mg/L 的基础盐培养基中 30℃,170 r/min 摇床培养 48 h 后,取培养液 10 mL 转接至 100 mL 含 200 mg/L 的咪唑乙烟酸基础盐培养基中 30℃,170 r/min 摇床培养 7 d.依此类推,连续富集、转接 5 次,基础盐培养基中咪唑乙烟酸的最终浓度为 500 mg/L,共计培养 30 d 左右.用接种环蘸取少许富集培养液,在含 500 mg/L 的咪唑乙烟酸为唯一碳源的培养基平板上划线,30℃培养,待平板上出现单菌落后挑取单菌落进一步纯化,将分离的 1 株降解菌于 LB 试管斜面培养基中 4℃保存.

1.3 环境条件对降解菌生长的影响

以 pH 7.0 无机盐培养基做为试验培养基,加入 500 mg/L 的咪唑乙烟酸,选取 20℃、25℃、30℃、35℃ 做为试验温度和设置 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,在其它因素不变的条件下定时取样测定咪唑乙烟酸残留率.以时间为横坐标,以咪唑乙烟酸残留率为纵坐标,从曲线变化和同一时间咪唑乙烟酸残留率高低判断培养环境条件的好坏.

1.4 降解菌的形态及生理生化鉴定

用电子显微镜观察降解菌的形态,参照文献[7]对其进行生理生化鉴定.

1.5 细菌总 DNA 的制备

用无机盐培养基加 1/10 的 LB 培养基,接种 1 环待测菌株,在标准条件下培养 24 h 后取 1 mL 离心,得到的菌体用 0.5 mol/L 的 NaCl 1 mL 洗 1 次,用 1.0 mg/mL 溶菌酶溶液 0.5 mL 悬浮菌体,室温作用 30 min 后加入 20 mg/L 蛋白酶 K 5 μ L 和 25 μ L 20% 的 Sarkosyl,室温作用 2 h,用 0.5 mL 体积比为 1:1 的酚-氯仿抽提蛋白,离心,取上层水相,再用 0.5 mL 酚-氯仿抽提 2 次,离心,取上层水相合并后加入 1:10 体积的乙酸钠和异丙醇,室温放置 10 min,离心,沉淀用 70% 乙醇洗 2 次,抽干得到 DNA 沉淀,加 100 μ L 的无菌双蒸水, -20℃ 保存.

1.6 16S rRNA 的 PCR 反应

根据 Genbank 注册的序列,利用 Oligo6 程序设计该片段 PCR 引物.上游引物 5'-AGA GTT TTG ATC CTG GCT-3',下游引物 5'-AAG GAG GTG ATC CAG

CCG CA-3',扩增片段长度约为 660 bp.反应条件为 95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 1 min,53℃ 1 min,72℃ 1.5 min 扩增 30 个循环,最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min.将得到的 PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳,观察结果,与 Marker DL2000 比较,以 PCR 产物中出现 662 bp 条带的样品为阳性.选取 2 个阳性克隆的菌种送到上海生工公司测序.测得序列与 Genbank 上已公布的基因序列进行比较,采用 MEGA3.0 软件进行系统发育树的构建.

1.7 降解菌对咪唑乙烟酸的降解

在 250 mL 的三角瓶中加入 99 mL 基础盐培养基,添加 1 mL 浓度为 50 mg/mL 的咪唑乙烟酸溶液,使咪唑乙烟酸终浓度为 500 mg/L,每 12 h 取样 1 次,在波长 600 nm 处进行比色,观察菌体生长情况.取培养液 10 mL,在 5 000 r/min 的离心机上离心 20 min,将上清液用二氯甲烷重复萃取,合并有机相.将提取液经无水硫酸钠干燥后,收集到圆底烧瓶中,在旋转蒸发仪上 35℃ 浓缩近干,常温下用 N_2 吹干,用色谱甲醇定容,待测.利用高效液相色谱法测定降解菌对咪唑乙烟酸的降解效率,采用 70% 甲醇做为流动相,流速为 1.0 mL/min,色谱柱为 4.6 mm $\times$ 250 mm 的 C_{18} 柱,柱温 28 ~ 30℃,检测波长 236 nm,保留时间 2.59 min,进样量为 100 μ L.

2 结果与分析

2.1 降解菌的分离和特性

通过富集培养,分离出 1 株可降解咪唑乙烟酸的细菌,命名为 BH-1.图 1 表明:温度 20 ~ 35℃ 条件下,降解菌均可利用咪唑乙烟酸做为碳源生长,但以 25℃ 和 30℃ 降解菌 BH-1 对咪唑乙烟酸的降解效率较高,其中降解菌在 25℃ 条件下,72 h 内可降解 95% 的咪唑乙烟酸,以此确定 25℃ 为 BH-1 的最佳降解温度.中性或酸性条件有利于咪唑乙烟酸降解,pH 为 5 时,72 h 内咪唑乙烟酸全部降解.随着 pH 升高,降解菌 BH-1 对咪唑乙烟酸降解能力降低,当 pH 为 8 和 9 时,BH-1 对咪唑乙烟酸的降解作用缓慢,72 h 内对咪唑乙烟酸的降解率仅为 50% 左右.由此确定 pH 中性或酸性条件有利于 BH-1 对咪唑乙烟酸的降解,最佳 pH 为 5(见图 2).

2.2 降解菌 BH-1 的分类鉴定

形态观察和革兰氏染色试验表明(表 1):菌株 BH-1 为革兰氏阴性菌.电镜扫描照片可观察到菌体球杆状,通常单个出现,不产芽孢,以 1 ~ 8 根周毛运动(图 3).LB 固体培养基 30℃ 培养 24 h,菌落光滑,

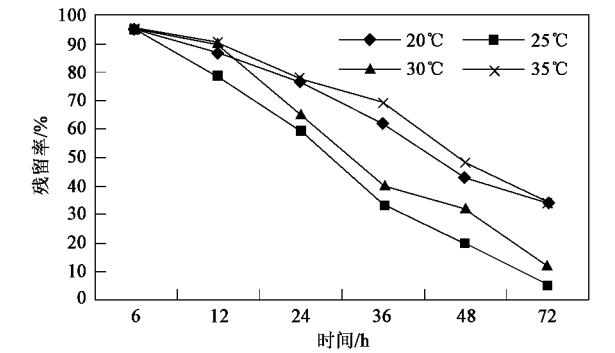


图 1 温度对 BH-1 降解咪唑乙烟酸的影响

Fig.1 Effect of temperature on imazethapyr degradation by BH-1

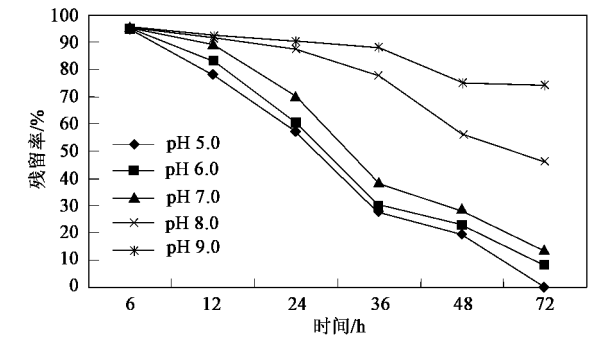


图 2 pH 对 BH-1 降解咪唑乙烟酸的影响

Fig.2 Effect of pH on imazethapyr degradation by BH-1

边缘整齐,且不产生色素.接触酶,氧化酶反应阳性,不产生吡啶.从 16S rRNA 扩增序列比对表明,它与 Genbank 中 5 个 *Alcaligenes* sp. 菌株的 16S rRNA 基因的同源性极高,千个核苷酸的替换率低于 0.005.并与其它几个 *Alcaligenes faecalis* 具有相似的系统发育关系,可以确定菌株 BH-1 属于 *Alcaligenes* 属.图 4 为降解菌 BH-1 和相关细菌的系统发育树.

表 1 降解菌 BH-1 的生理生化鉴定¹⁾

Table 1 Identification of BH-1 in Physiology and biochemistry	
项目	结果
革兰氏染色	-
鞭毛	周生
细胞形状	球杆状
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
水解明胶	-
H ₂ 无机化能营养	-

1) + :代表阳性, - :代表阴性

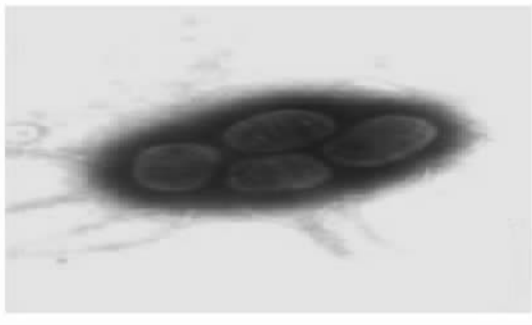


图 3 菌株 BH-1 的电镜照片(× 22 500)

Fig.3 EMS photo of strain BH-1(× 22 500)

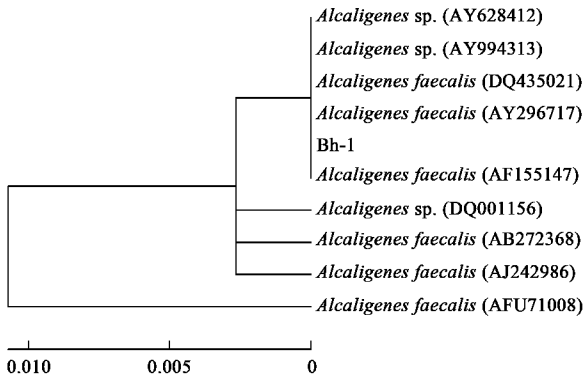


图 4 基于 16S rRNA 序列同源性的 BH-1 菌株和相关细菌的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic position of strain BH-1 and other related bacteria based on 16S rRNA sequences analysis

2.3 降解菌 BH-1 的生长和咪唑乙烟酸的降解

菌株 BH-1 在以 500 mg/L 咪唑乙烟酸为唯一碳源的无机盐培养基中生长良好(图 5).24 h 后,菌株 BH-1 进入快速生长期,无机盐培养基 D_{600} 值快速增大,72 h D_{600} 达到最大值.随着菌株 BH-1 的生长,咪唑乙烟酸的残留率降低,培养 48 h 后咪唑乙烟酸残留为 37%,72 h 菌株 BH-1 生长的无机盐培养基中

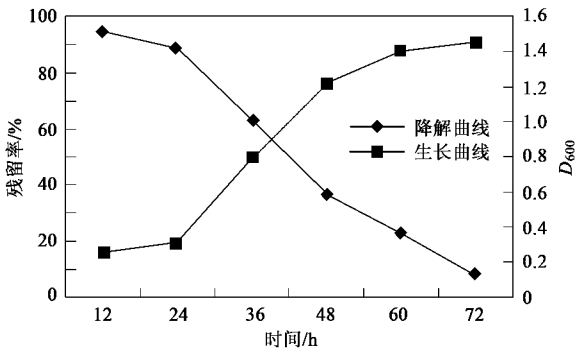


图 5 降解菌 BH-1 的生长曲线和咪唑乙烟酸的降解曲线

Fig.5 Growth curve of strain BH-1 and degradation curve of imazethapyr

咪唑乙烟酸的残留率仅为 8%。

3 讨论

到目前为止,人们已分离了许多可降解农药的微生物,这些微生物包括细菌、真菌、放线菌和藻类。其中,对细菌的研究最为深入,如假单孢属、芽孢杆菌属、黄杆菌属、产碱菌属对多种农药具有降解作用^[8]。此外,对农药具有降解作用的细菌还有棒状杆菌属、无色杆菌属、节细菌属、微球菌属等^[9]。关于咪唑乙烟酸的生物降解目前研究较少,Wang 等^[10]报道了从土壤中分离得到节细菌属,命名为 WWX-1。该菌在 50 μg/mL 和 200 μg/mL 咪唑乙烟酸浓度下,降解半衰期分别为 1.51 d 和 4.75 d。本试验分离得到的产碱菌属(*Alcaligenes* sp.)对咪唑乙烟酸具有高效降解特性是首次报道。

除草剂的微生物降解研究目前虽已得到了很大的发展,但应用微生物进行生物修复的实际应用往往受复杂的环境条件影响。如土壤 pH 及有机质含量对咪唑乙烟酸的残留影响较大,不同比例的腐殖酸均可以使咪唑乙烟酸的降解速度较纯水中加快^[11],因此利用降解菌在田间修复受咪唑乙烟酸污染的土壤则可以考虑向土壤中增加施用腐熟的有机质肥料,而关于有机质肥料与降解菌协同应用对咪唑乙烟酸残留的田间修复作用还有待进一步加以研究。pH 对咪唑乙烟酸残留影响方面,Bresnahan 等^[12]认为,尽管在不同 pH 的熟化土壤中咪唑乙烟酸保持相似的含量,但低 pH 条件下被土壤吸附的咪唑乙烟酸很快释放,而高 pH 条件下土壤吸附的咪唑乙烟酸难以快速解吸附,因而低 pH 土壤结合残留的咪唑乙烟酸常造成对敏感作物如甜菜的严重毒害。本试验分离得到的咪唑乙烟酸降解菌 BH-1 在酸性和中性条件下对咪唑乙烟酸的降解效率高于碱性条件,这与土壤酸性条件下咪唑乙烟酸释放较快,降解菌 BH-1 可利用的咪唑乙烟较多有关。

温度对咪唑乙烟酸的降解起到一定的作用,BH-1 对咪唑乙烟酸的最适降解温度为 25℃,此时降解菌 BH-1 对咪唑乙烟酸的降解效率最高,培养 72h 内,可使咪唑乙烟酸降解 90% 以上。在本试验 20℃ 和 35℃ 过低和过高温度的条件下,降解菌 BH-1 对咪唑乙烟酸的降解效率较低。田间条件下,尤其是黑龙江和内蒙古两省大量使用咪唑乙烟酸的地区温度较

低,适合降解菌生长的最适温度时间相对较短。因此,田间条件下降解菌 BH-1 对咪唑乙烟酸的降解规律及适应低温条件下快速生长的咪唑乙烟酸降解菌的驯化和分离还有待进一步深入研究。

4 结论

(1)从生产咪唑乙烟酸化工厂排污口的污泥混合长期施用咪唑乙烟酸的大豆田土壤中分离得到 1 株可利用咪唑乙烟酸为唯一碳源生长的细菌,根据其形态、生理生化特性及 16S rRNA 序列分析鉴定该菌株属于产碱菌属(*Alcaligenes* sp.)。

(2)降解菌在酸性和中性条件下对咪唑乙烟酸的降解效率较高,对咪唑乙烟酸降解的最佳条件为: pH = 5, 温度 25℃。

(3)降解菌能在含 500 mg/L 咪唑乙烟酸的基础盐液体培养基中降解咪唑乙烟酸,72 h 的降解率可达 90% 以上。

参考文献:

[1] 苏少泉. 抗咪唑啉酮类除草剂作物的发展与未来[J]. 现代农药, 2006, 5(1): 1-4.

[2] 叶非, 曲虹云. 安全剂 R-28725 保护玉米免受咪唑乙烟酸药害的机理研究[J]. 农药学报, 2002, 4(1): 18-22.

[3] 洪源范, 洪青, 武俊, 等. 甲氧菊酯降解菌 JQ14-5 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学, 2006, 27(10): 2100-2104.

[4] 贾开志, 李晓慧, 何键, 等. 久效磷降解菌的分离及其酶促降解特性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 908-912.

[5] 任华峰, 李淑芹, 刘双江, 等. 一株对氯苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学, 2005, 26(1): 154-158.

[6] 王圣惠, 闫艳春, 徐刚明, 等. 一株有机磷农药降解菌的分离、鉴定及降解酶基因的克隆[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 84-88.

[7] 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. 267-273.

[8] 李岩, 蒋继志, 马平, 等. 细菌降解农药研究新进展[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 33(增刊): 250-252.

[9] 虞云龙, 樊德方, 陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略[J]. 环境科学进展, 1996, 4(3): 28-36.

[10] Wang X, Liu X, Wang H, et al. Utilization and degradation of imazaquin by a naturally occurring isolate of *arthrobacter crystallopoietes*[J]. Chemosphere, 2007, 67(11): 2156-2162.

[11] Elazzouzi M, Mekkaoui M, Zaza S, et al. Abiotic degradation of imazethapyr in aqueous solution[J]. Environ Sci Health B, 2002, 37(5): 445-451.

[12] Bresnahan G A, Koskinen W C, Dexter A G, et al. Influence of soil pH-sorption interactions on imazethapyr carry-over[J]. Agric Food Chem, 2000, 48(5): 1929-1934.