

# 一株吡啶磺隆降解菌 S<sub>8-1</sub> 的分离鉴定及生物学特性

尹乐斌<sup>1</sup> 张德咏<sup>2</sup> 张松柏<sup>1,2</sup> 何明远<sup>2</sup> 刘绍文<sup>2</sup> 罗香文<sup>2</sup> 刘勇<sup>1,2\*</sup>

(1. 中南大学隆平分院 湖南 长沙 410125)  
(2. 湖南省植物保护研究所 湖南 长沙 410125)

**摘要:** 以多年连续施用吡啶磺隆除草剂的水稻试验田泥土为材料, 采用富集培养、平板反复划线分离方法, 分离到一株能以吡啶磺隆为唯一碳源和能源生长的光合细菌(Photosynthetic Bacterium, 简称 PSB), 命名为 S<sub>8-1</sub>。通过菌落形态特征观察、菌体形态学观察、活细胞吸收光谱特征、培养特性、生理生化特性及 16S rRNA 同源性序列分析(GenBank 登录号: GQ180069)等试验, 初步鉴定该菌为红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas* sp.)。利用高效液相色谱(HPLC)测定了菌株 S<sub>8-1</sub> 的降解性能, 得出该菌降解吡啶磺隆的最佳条件为: pH 值为 7.0-7.5, 温度为 30°C-35°C; 在 30°C 与 pH 7.0 的光合细菌培养基中培养 7 d, 对 100 mg/L 的吡啶磺隆降解率为 52.07%; 并且该菌对浓度高达 800 mg/L 的吡啶磺隆仍保持降解活性, 外加发酵提取物能够明显提高菌体的生长及其降解效率, 显示了该菌在高浓度农药废水处理及土壤农药残留生物修复方面潜在的开发价值。

**关键词:** 吡啶磺隆, 富集培养, 光合细菌, 红假单胞菌属

## Isolation, Identification and Biological Characteristics of a Pyrazosulfuron-ethyl Degrading Bacterium Strain S<sub>8-1</sub>

YIN Le-Bin<sup>1</sup> ZHANG De-Yong<sup>2</sup> ZHANG Song-Bai<sup>1,2</sup> HE Ming-Yuan<sup>2</sup>  
LIU Shao-Wen<sup>2</sup> LUO Xiang-Wen<sup>2</sup> LIU Yong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Longping, Graduate School of Central South University, Changsha, Hunan 410125, China)  
(2. Hunan Plant Protection Institute, Changsha, Hunan 410125, China)

**Abstract:** A strain of photosynthetic bacterium capable of degrading the herbicide pyrazosulfuron-ethyl, designated as S<sub>8-1</sub>, was isolated and purified from the rice experimental field soil samples which have been successively used pyrazosulfuron-ethyl for many years by continuous enrichment culture techniques. The isolate exhibited substantial growth in mineral salt medium amended with pyrazosulfuron-ethyl as a sole source of carbon and energy. Based on the colony and cell morphological observation, absorption spectra of living cells, cultural and biochemical characteristics, and the sequence analysis of the partial 16S rRNA gene, the isolate S<sub>8-1</sub> had been preliminary identified as *Rhodospseudomonas* sp.. High performance liquid chromatography (HPLC) data analysis revealed the optimum degradation conditions of strain S<sub>8-1</sub> were: pH value at 7.0-7.5 and temperature at 30°C-35°C, respectively. At the con-

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02401); 国家“十一五”科技支撑计划项目(No. 2006BAD17B08); 中南大学研究生学位论文创新基金(No. 2960-71131100065); 湖南省农村科技计划重点项目(No. 2008NK2009)

\* 通讯作者: Tel: 86-731-84691176; ✉: haoasliu@163.com

收稿日期: 2010-04-14; 接受日期: 2010-07-07

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

centration of 100 mg/L, 52.07% of pyrazosulfuron-ethyl was degraded in 7 days at pH 7.0, 30°C and 7500 lx of light illumination intensity. The strain S<sub>8-1</sub> still maintained degradation activity at the concentration of pyrazosulfuron-ethyl up to 800 mg/L, additional yeast extract can significantly increase the growth speed and degradation rate. The result indicated that strain S<sub>8-1</sub> has potential value for biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl plant waste water or contaminated soils and waters.

**Keywords:** Pyrazosulfuron-ethyl, Enrichment culture technique, Photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas* sp.

磺酰脲类除草剂是目前世界上最大的一类除草剂,其除草机理为抑制乙酰乳酸合成酶(ALS),阻碍细胞分裂而达到杀草目的<sup>[1]</sup>。随着该类除草剂使用量及范围的加大,其在作物中的残留以及对人类健康和环境造成的毒害也越来越为人们所关注<sup>[2]</sup>。吡嘧磺隆(Pyrazosulfuron-ethyl)属磺酰脲类高活性内吸选择性除草剂,药剂主要通过植物的根系被吸收并在植物体内迅速进行传导,用于防治水稻田一年生和多年生阔叶杂草和莎草科杂草,以提高作物产量。近年来随着吡嘧磺隆在水稻直播田的广泛应用,药害问题也在不断发生,不同品种水稻的耐药性有差异,早稻品种对其安全性好,晚稻品种(粳、糯稻)对其相对敏感<sup>[3]</sup>。因此,研究解决吡嘧磺隆残留毒害问题对扩大该药剂在稻田生产中的应用,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。

研究表明,微生物降解是除草剂从土壤中消失的重要因素,目前分离得到能够降解磺酰脲类的微生物主要有浅灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*)<sup>[4-6]</sup>、青霉菌属(*Penicillium* sp.)<sup>[4,7]</sup>、放线菌属(*Actinomycetes*)<sup>[8]</sup>、黄单胞菌属(*Xanthomonas* sp.)<sup>[9]</sup>、鞣丸酮丛毛假单胞菌(*Comamonas* sp.)<sup>[10]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)<sup>[11-14]</sup>等。然而,关于光合细菌降解吡嘧磺隆还未见报道,笔者从多年施用吡嘧磺隆的水稻直播试验田分离筛选出能够降解吡嘧磺隆的光合细菌,并对吡嘧磺隆的降解特性进行了初步研究,不仅丰富了微生物降解菌资源,还可为生产上利用该菌株对吡嘧磺隆除草剂污染土壤的原位生物修复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 土壤样品及供试农药:** 采自长期施用吡嘧磺隆除草剂的湖南省植物保护研究所水稻直播试验田

的土壤样品。100 mg/L 吡嘧磺隆标样储备液(农业部环境保护科研监测所研制,天津市)。97%吡嘧磺隆原药(江苏常隆化工有限公司)。吡嘧磺隆残留检测由湖南省植物保护研究所农药残留检测室完成检测。

**1.1.2 供试培养基:** PSB 液体富集培养基的配制具体参照文献[15]的方法; PSB 分离纯化培养基为在RCVBN培养基<sup>[16]</sup>中分别加入1.3%和1.8%的琼脂;唯一碳氮源培养基为MSM培养基。生理生化试验所用培养基配方参照文献[17-18]。除特别说明外,所有的培养基pH值为7.0左右,1 × 10<sup>5</sup> Pa灭菌30 min。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 菌株 S<sub>8-1</sub> 的富集、驯化培养:** 取适量的土壤样品置于120 mL的PSB液体富集培养基的培养瓶中,加入吡嘧磺隆使其终浓度为100 mg/L,在温度为30°C、光照强度为7500 lx的智能人工气候箱中富集培养1-2周,光照培养期间每天手动摇匀3-5次,可以观察到光合细菌在瓶壁上聚集,培养基也变成红棕色。然后取2 mL培养液转接至新鲜的富集培养基中,加入吡嘧磺隆使其终浓度为200 mg/L,同等条件下培养至培养液变棕红。依照前面的方法连续富集、驯化培养10代,吡嘧磺隆的浓度也渐渐提高到1000 mg/L。

**1.2.2 菌株 S<sub>8-1</sub> 分离及纯化:** 参照孙军德等<sup>[19]</sup>的方法并稍加改进,利用双层平板夹心法对富集、驯化的菌体培养液进行分离纯化。在直径为9.5 cm的培养皿中加入含200 mg/L吡嘧磺隆的1.3% PSB分离培养基,待其凝固后富集菌液用接种环划线,待水汽稍干后再加入含同样浓度农药的1.8% PSB分离培养基,用封口膜封好培养皿,置于上述同等条件的光照培养箱中培养1周左右,用灭菌的牙签挑取双层平板夹心层的单菌落于PSB液体培养基中光照扩大培养,用同样的方法反复分离纯化3-5次,直

至获得纯培养物并保存,单菌落培养物编号为 S<sub>8-1</sub>。

**1.2.3 菌株 S<sub>8-1</sub>的鉴定:** (1) 传统的细菌菌落形态、菌体形态及生理生化鉴定:以双层平板夹心层上生长的菌落形态描述菌落颜色、大小和形状。菌体形态用光学显微镜(BX51, OLYPUS)与电子显微镜(JEXL-230, 日本电子公司)观察相结合。革兰氏染色方法参照文献[20]。菌体的其它形态特征、培养特性及生理生化试验参照文献[17-18,21]选择相应试验,并结合《伯杰氏细菌鉴定手册》(第8版)<sup>[22]</sup>进行菌种鉴定。(2) 菌株 S<sub>8-1</sub>活细胞吸收光谱的测定:取2 mL培养6 d的菌液纯培养物在8000 r/min离心10 min收集菌体沉淀,用灭菌的生理盐水洗涤菌体沉淀3次,沉淀最后悬浮于60%的蔗糖溶液至原体积,以60%的蔗糖溶液做参比,用北京普析 Tu-901型双光束紫外可见分光光度计检测菌体的活细胞吸收光谱,扫描波长范围为300 nm-900 nm。(3) 菌株 S<sub>8-1</sub>的16S rRNA序列测定:菌体基因组DNA的提取采用上海生工生物工程技术有限公司的UNIQ-10柱式基因组DNA抽提试剂盒,具体方法参照说明书。以所提取的细菌总DNA为模板,在Eppendorf公司 Mastercycler gradient PCR仪上进行16S rRNA序列扩增,所用引物为原核生物16S rRNA通用引物(8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')<sup>[23]</sup>,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系(50 μL): 10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 5 μL, dNTPs (各2.5 mmol/L) 4 μL, 8F/1492R引物各1 μL, Taq酶(5 U/μL) 0.25 μL, ddH<sub>2</sub>O 37.75 μL, 模板DNA 1 μL。PCR反应程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 34个循环; 72°C 10 min。用BioDev Gel Extraction System B试剂盒进行胶回收,回收纯化后的产物送上海生工生物工程技术有限公司完成测序。(4) 菌株 S<sub>8-1</sub> 16S rRNA序列同源性比对及系统发育树构建:将获得的16S rRNA序列的测序结果在NCBI中进行BLAST同源性比对检索,选出序列相似性大于96%的部分登录号,应用MEGA 4.0软件构建系统发育树。

**1.2.4 菌株 S<sub>8-1</sub>的最适生长条件研究:**不同培养条件对菌株 S<sub>8-1</sub>生长的影响,主要的影响因素包括不同的温度、pH值、光照强度及吡啶磺隆浓度。

**1.2.5 菌株 S<sub>8-1</sub>的降解能力检测:**(1) 样品的前处理:样品的前处理参照文献[24-26],并稍加改进。

将菌液充分摇匀,取1 mL菌液,用流动相定容到10 mL,超声波萃取处理20 min,通过C<sub>18</sub>柱固相萃取柱净化后,以3种不同比例的丙酮和正己烷混合剂分3步洗脱,氮气吹干,5 mL乙腈溶解,过0.22 μm有机滤膜,供HPLC测定。(2) 高效液相色谱条件:流动相(经过优化后的配比):乙腈/水(用磷酸调节pH值3.0) = 70 : 30 (V/V); 流速:1 mL/min; 柱温:30°C; 进样量:10 μL; 检测波长为241 nm。(3) 菌株 S<sub>8-1</sub>对吡啶磺隆降解率的测定:吡啶磺隆降解率的计算公式为:吡啶磺隆降解率(%) = (CK-CS)/CK × 100%。其中CS降解菌处理后的吡啶磺隆浓度(mg/L); CK为空白培养基中吡啶磺隆浓度(mg/L)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的鉴定

**2.1.1 菌落形态及生理生化特征:**经过反复富集培养和双层平板夹心法纯化分离,分离获得形态不同的纯化菌株15株。利用吡啶磺隆除草剂作为唯一碳源进行加压选择,选择单菌落直径大即繁殖速度快、抗性较好的1个菌株作为目标菌株命名为S<sub>8-1</sub>。S<sub>8-1</sub>在PSB双层平板(含100 mg/L吡啶磺隆)培养基上,30°C、7500 lx光照厌氧培养,7 d后形成红色的圆形铁饼状和点状菌落,菌落湿润且正反面颜色一致,边缘整齐光滑且颜色较中间稍浅,有光泽,中间稍稍隆起(图1),菌落直径0.54 mm-3.40 mm。光学显微镜下观察,革兰氏阴性,单细胞呈小球形或卵状,有时细胞呈珠状串联,能在厌氧或好氧条件下生长。该菌超薄切片电镜观察表明:菌体切片形态多变,以短杆形为主。以二分分裂繁殖,极生鞭毛(图2),菌体大小(0.7-1.2) μm × (0.8-2.5) μm(图3),光合内膜结构为片层状,位于质膜之下并与质膜平行(图4)。菌株的生理生化特征见表1。

**2.1.2 菌株 S<sub>8-1</sub>的培养特征:**富集培养时,培养液呈深褐色,培养瓶壁上有深红色的菌体附着物。纯化后菌株在光照厌氧或黑暗好氧及微好氧条件下均能够生长,光照厌氧液体培养液开始变浑浊,随后培养液为淡红黄色,对数生长期之后培养液变为鲜红色或深棕红色,培养时间过长,培养瓶底部可见菌体聚集成絮状沉淀。若培养的温度或光照强度过高,菌体过度代谢而死亡,培养液变黑发臭。

表 1 菌株 S<sub>8-1</sub> 的生理生化特性  
Table 1 Biological and physiological characteristics of strain S<sub>8-1</sub>

Characteristics	Results	Characteristics	Results	Characteristics	Results
Gram stain	-	3% NaCl	-	Aerobic dark growth	+
Motility	+	M. R reaction	-	Succinate utilization	+
Hydrogen sulfide	+	Citrate utilization	+	Mannitol utilization	+
V-P reaction	-	Acid from carbohydrates	-	Glycerol utilization	+
Gelatin liquefaction	+	Indole production	-	Pyruvate utilization	+
Catalase	+	Urease	-	Benzoate utilization	-
Oxidase	+	Pigment production	+	Ammonia utilization	+
Strach hydrolysis	+	Nitrate reduction	+	Glucose utilization	+

Note: +: Positive; -: Negative.

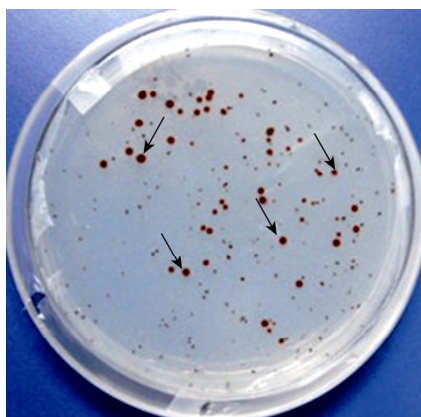


图 1 S<sub>8-1</sub> 在双层琼脂上的菌落形态(培养 7 d)  
Fig. 1 The single colony morphology of S<sub>8-1</sub> in double-agar plate (Cultured for 7 d)

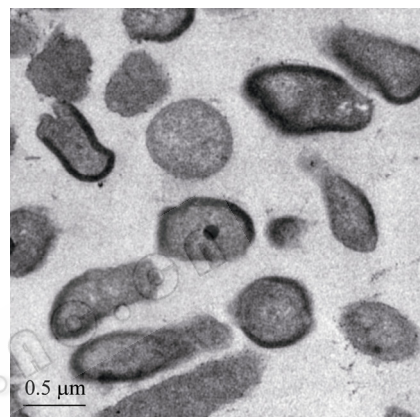


图 3 S<sub>8-1</sub> 示细胞切面形态电镜照片(× 40000)  
Fig. 3 Cell Section morphology of S<sub>8-1</sub> by EM (× 40000)

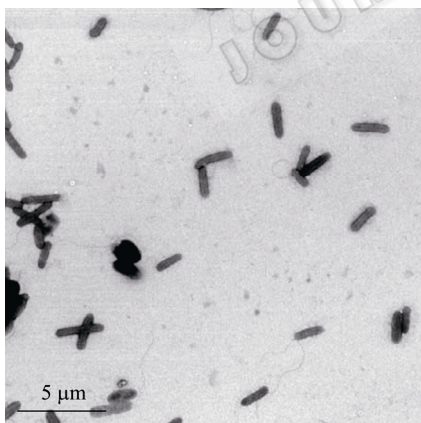


图 2 S<sub>8-1</sub> 极生鞭毛电镜照片(× 6000)  
Fig. 2 Scanner electron photograph of polar flagellum of S<sub>8-1</sub> (× 6000)

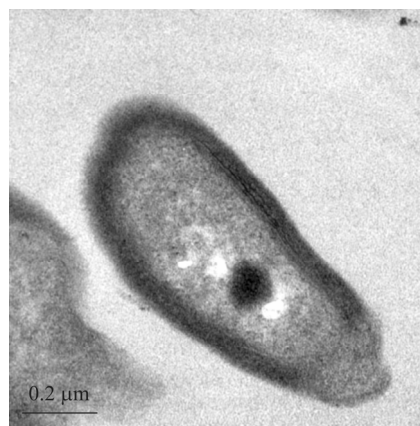


图 4 S<sub>8-1</sub> 电镜照片, 示光合内膜系统(× 120000)  
Fig. 4 Internal photosynthetic membranes of strain S<sub>8-1</sub> by EM (× 120000)

**2.1.3 菌株 S<sub>8-1</sub> 活细胞光谱扫描:** 菌株 S<sub>8-1</sub> 的活细胞经过紫外分光光度计连续扫描, 其色素吸收峰如图 5 所示, 在波长 379 nm、592 nm、805 nm 及 862 nm 处均出现最大吸收峰, 表明菌株 S<sub>8-1</sub> 含有红螺菌目叶绿素 a 的吸收峰; 在波长 460 nm、492 nm

和 528 nm 则出现 3 个特征吸收峰, 表明有正常红螺菌黄质系的类胡萝卜素存在, 这与《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)<sup>[22]</sup> 所描述的相吻合。由此可见: 菌株 S<sub>8-1</sub> 活细胞含有光合作用所必需的细菌叶绿素 a 及类胡萝卜素。

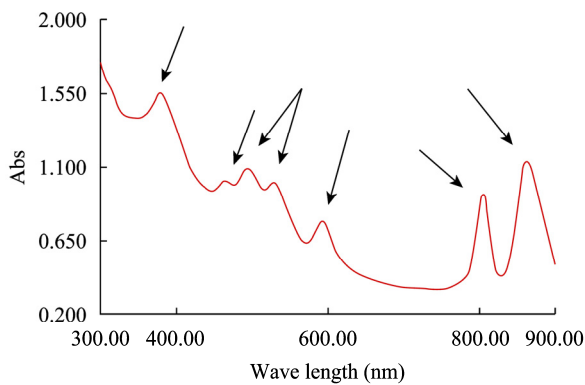


图5 菌株  $S_{8-1}$  活细胞吸收光谱

Fig. 5 The absorption spectra of living cells of strain  $S_{8-1}$

#### 2.1.4 16S rRNA 序列同源性及其系统发育树分析:

测得的 16S rRNA 序列长度为 1424 bp, 其在 GenBank 中的登录号为: GQ180069. BLAST 比对结果与登录号为 GU247218 的 *Rhodopseudomonas* sp. enrichment culture clone CS4 16S rRNA 序列相似性水平达 97%, 从中选取 20 株与  $S_{8-1}$  16S rRNA 序列相似度高的菌株进行系统发育分析(图 6)。综合菌体的形态学、生理生化及培养特性、活细胞吸收光谱及 16S rRNA 序列同源性分析结果, 结合《常见细菌鉴定手册》<sup>[21]</sup>和《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)<sup>[22]</sup>中对光合细菌各种属的检索步骤及特征描

述, 可初步确定分离的菌株  $S_{8-1}$  为红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas* sp.)。

**2.1.5 菌株  $S_{8-1}$  的最适生长条件:** 从图7可以看出,  $S_{8-1}$  在 30°C 生长良好, 温度过高或过低都不利于它的生长; 35°C 时,  $S_{8-1}$  初期生长速度快但是很快进入死亡阶段, 并产生沉淀; 如果温度过高, 菌体代谢过度旺盛或死亡, 培养基变黑发臭。  $S_{8-1}$  在较广的 pH 值范围内都能生长, 其最适宜的 pH 为 7.0, pH 过低或过高生长都受到抑制(图8)。从图9可以看出, 在一定的时间条件下, 随着光照强度的增加,  $S_{8-1}$  的数量不断增加, 在 20% 光照强度(大约为 680 lx)时, 光合细菌的生长量最低, 直到 80% 光照强度(大约为 7500 lx)时,  $S_{8-1}$  的生长趋于平稳, 说明光照强度对  $S_{8-1}$  的生长有促进作用, 这与李朝霞<sup>[27]</sup>等的研究一致; 但从节约能源的角度考虑, 实际应用中只能适当的提高光照强度, 尽量达到最佳光照条件。  $S_{8-1}$  在含低浓度的吡啶磺隆中的生长明显快于高浓度条件下(图10)。另外, 在培养的过程中适当增加搅拌对  $S_{8-1}$  的生长有促进作用, 可能是在搅拌的条件下细胞在培养液中的分布更加均匀而促进了细胞的代谢。

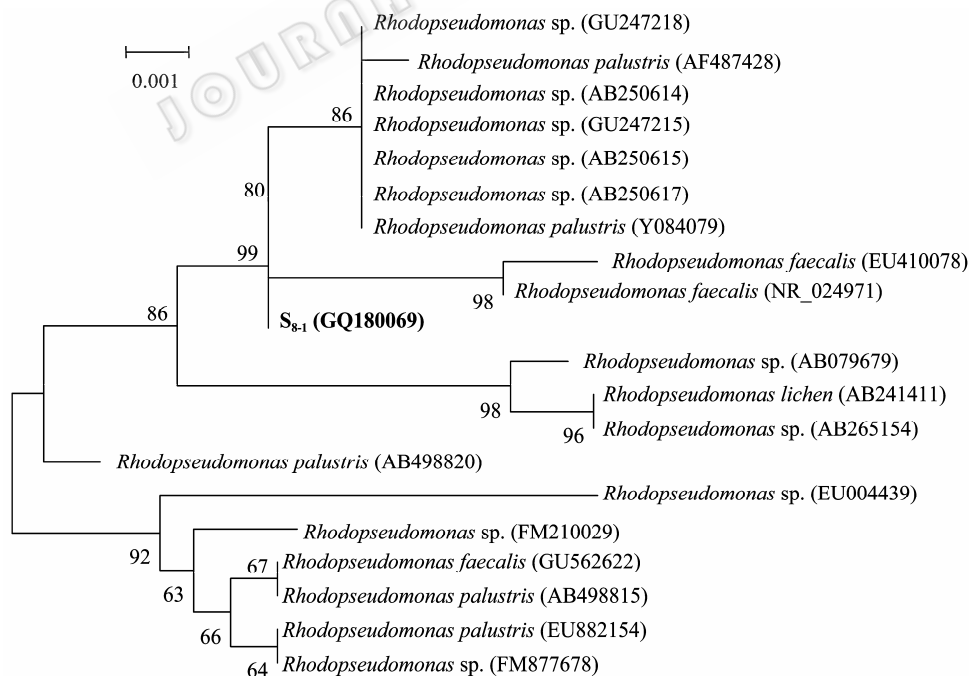
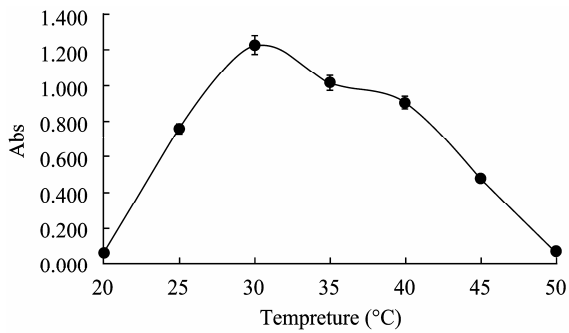
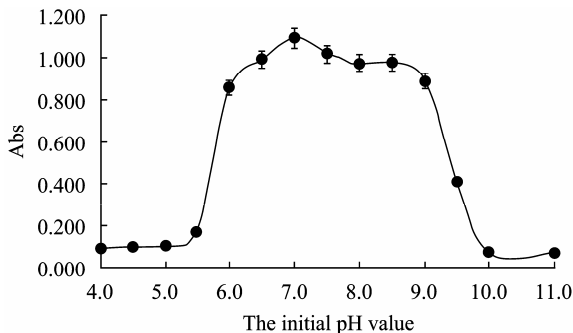
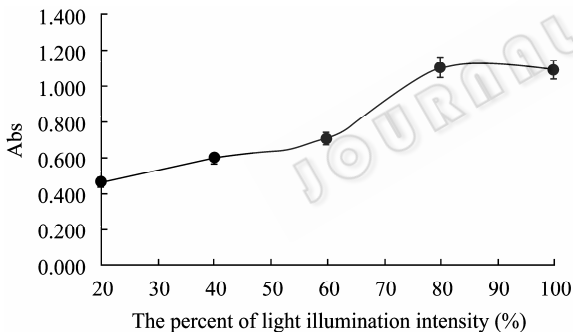
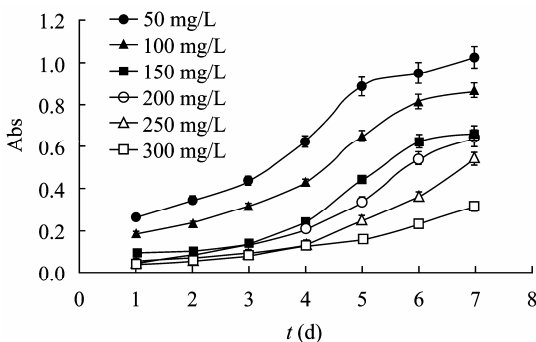


图6 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株  $S_{8-1}$  和相关菌株的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain  $S_{8-1}$  and related species constructed with Neighbour-joining method

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 replicates. The GenBank accession number is showed in parentheses. Bar: 0.001 substitutions per nucleotide.

图7 温度对菌株 S<sub>8-1</sub> 生长的影响Fig. 7 The effect of initial temperature on the growth of strain S<sub>8-1</sub>图8 pH 对菌株 S<sub>8-1</sub> 生长的影响Fig. 8 The effect of initial pH value on the growth of strain S<sub>8-1</sub>图9 光照强度对菌株 S<sub>8-1</sub> 生长的影响Fig. 9 The effect of different light illumination intensity on the growth of strain S<sub>8-1</sub>图10 农药浓度对菌株 S<sub>8-1</sub> 生长的影响Fig. 10 The effect of initial pyrazosulfuron-ethyl concentration on the growth of strain S<sub>8-1</sub>

## 2.2 吡嘧磺隆残留检测

**2.2.1 最佳检测波长的确立:** 磺酰脲类除草剂的母体化合物大多在 200 nm–260 nm 波长范围内有较强的吸收峰, 采用紫外可见分光光度计测定了吡嘧磺隆水溶液的紫外吸收光谱(图 11)。从图 10 中可以看出吡嘧磺隆在 240 nm 左右有最大吸收峰, 结合其它文献资料<sup>[14,28]</sup>, 因此确定吡嘧磺隆的 HPLC 最佳检测波长为 241 nm。

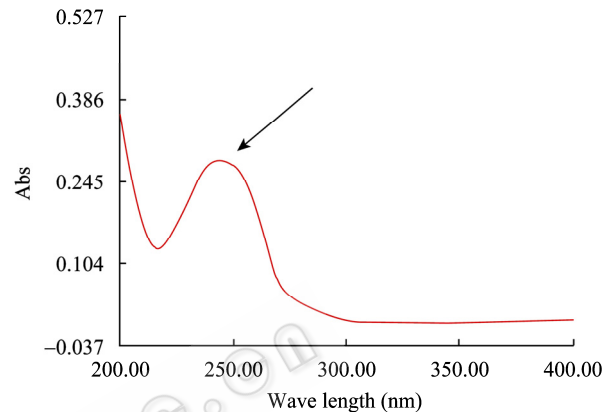


图11 吡嘧磺隆水溶液的紫外光谱吸收

Fig. 11 UV-absorption spectra of pyrazosulfuron-ethyl

**2.2.2 流动相的选择:** 由于磺酰脲类除草剂为弱酸性, 采用常规的甲醇-水、乙腈-水流动相体系, 会出现色谱拖尾、峰形不对称现象, 应通过选择合适的调节剂将流动相的 pH 值调至弱酸性, 以抑制待测组分的解离, 增加其在固定相中的保留, 同时达到改善色谱峰形的作用。本实验中流动相的选择和优化, 不仅考虑吡嘧磺隆组分的分离, 而且还考虑了其于干扰物质的分离。本实验考察了不同配比的乙腈/水(85%磷酸调节 pH 值)的流动相体系, 当磷酸水溶液的 pH 值从 3.0 调至 2.5 时, 对色谱峰形与保留值变化不大, 考虑到较低 pH 值对柱寿命以及样品的稳定性都可能产生负面影响, 最终选择磷酸水溶液的 pH 值为 3.0。结果发现: 采用乙腈/水(85%磷酸调节 pH 值 3.0) = 70/30 (V/V) 的流动相体系基线稳定, 色谱峰尖锐, 峰形对称, 分离效果较好, 检测结果令人满意。

**2.2.3 吡嘧磺隆降解率的测定:** 样品经乙腈提取、凝胶渗透色谱净化、C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化后, 采用高效液相色谱分离, 可变波长紫外(VWD)检测器检测, 外标法定量。上机前用 0.45 μm 有机相滤膜过滤。待仪器基线稳定后, 于 Agilent 1200 Series 高效液相

色谱仪进行测定,保留时间大约为 4.5 min。在 30°C 与 pH 7.0 的光合细菌培养基中培养 7 d, 100 mg/L 的吡嘧磺隆降解率为 52.07%, 结果见图 12。

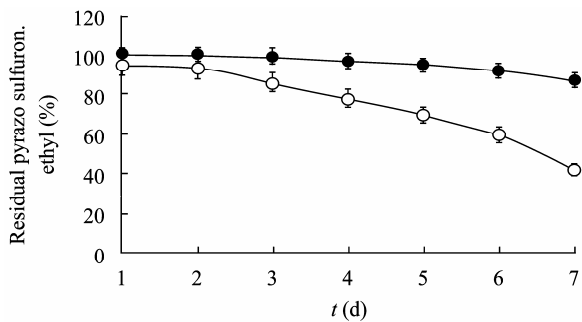


图 12 吡嘧磺隆在 S<sub>8-1</sub> 培养基中连续 7 d 的残留

Fig. 12 Pyrazosulfuron-ethyl degradation by strain S<sub>8-1</sub>

注: ●-●: 对照; ○-○: 试验样品; 1、2、3、4、5、6、7 d 后的吡嘧磺隆残留浓度的百分数。

Note: ●-●: Control; ○-○: Tests. Pyrazosulfuron-ethyl residual concentrations were displayed in percentage for days 1,2,3,4,5,6 and 7, respectively. Errorss bars represent SD.

### 3 讨论

生物修复是一种行之有效的清除环境污染物的生物技术,其目标是采用各种可行的方法来加速和强化微生物对有机污染物的降解能力。在众多治理农药残留的方法中,微生物降解符合国家节能减排的要求,因此,利用微生物降解水体及土壤中的农药残留方法更可行,更具有实际意义。目前,农药降解菌的获得主要有两条途径:其一是从长期受污染的环境中分离、筛选<sup>[14,29-31]</sup>;其二是通过富集培养获得<sup>[24,32-34]</sup>。前者因所得到的微生物种类多,致使目标菌筛选的工作量大。

由于磺酰脲类除草剂的挥发性低和热不稳定性,一般不适于气相色谱分析。液相色谱法是磺酰脲类除草剂残留分析最常用的分析方法<sup>[2,35-36]</sup>,但是由于该类除草剂的残留相对较低,因此样品的提取技术成为分析过程的关键。光合细菌是一类能利用光能并具有复杂代谢功能的微生物,它可以降解大分子有机物,并具有固氮、脱氮、硝化、反硝化、硫化物氧化等多种功能,它能够在多个生态系统中生活并表现出很强的环境适应能力,这与光合细菌多元化代谢能力是分不开的,不同生态环境中的光合细菌对营养物质的利用能力有很大差异。本试验通过富集培养、平板反复划线的分离方法得到了一株吡嘧磺隆降解菌命名为 S<sub>8-1</sub>,经过菌体形态及生

理生化和 16S rRNA 序列等初步分析将其鉴定为 *Rhodospseudomonas* sp., 并对 S<sub>8-1</sub> 最适生长条件进行了研究,为以后的大规模发酵生产提供了理论数据。该菌在 30°C、pH 7.0 的光合细菌培养基中培养 7 d, 对 100 mg/L 的吡嘧磺隆降解率为 52.07%, 农药浓度在低于 600 mg/L 时对菌体生长的影响较小,而浓度达到 800 mg/L 时菌体生长的延滞期明显延长,说明菌株 S<sub>8-1</sub> 的生长和对吡嘧磺隆降解受其浓度的影响很大。这只是室内模拟的实验结果,其在田间土壤条件下对吡嘧磺隆的降解效果、关于除草剂在微生物作用下的代谢途径及其产物和有关降解酶的研究,尤其是降解酶基因的研究和降解酶基因的克隆和高效工程菌的构建等有待进一步的探索。

### 参考文献

- [1] 范志金, 刘丰茂, 钱传范. 磺酰脲除草剂的现状和发展趋势分析. 农药, 1999, 38(5): 6-9.
- [2] 祁彦, 李淑娟, 占春瑞, 等. 高效液相色谱-质谱法测定大豆中磺酰脲类除草剂多残留量的研究. 分析化学, 2004, 32(11): 1436-1440.
- [3] 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. 杂草科学, 2006(4): 38-39.
- [4] Joshi MM, Brown HM, Romesser JA. Degradation of chlorsulfuron by soil microorganisms. *Weed Science*, 1985(33): 888-893.
- [5] Kulowski K, Zirbes EL, Thede BM, et al. Microbial transformations of prosulfuron. *Journal of Agricultural and Food*, 1997, 45(4): 1479-1485.
- [6] Dietrich RF, Reiser RW, Stieglitz B. Identification of microbial and rat metabolites of triflurosulfuron methyl, a new sugar beet herbicide. *Journal of Agricultural and Food*, 1995, 43(2): 531-536.
- [7] 沈东升, 方程冉, 周旭辉. 土壤中降解甲磺隆除草剂的微生物的分离与筛选. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2002, 20(3): 186-189.
- [8] Brown HM, Joshi MM, Van AT, et al. Degradation of thifensulfuron methyl in soil: role of microbial carboxyesterase activity. *Journal of Agricultural and Food*, 1997, 45(3): 955-961.
- [9] 邵劲松, 沈标, 洪青, 等. 一株氯磺隆降解菌的分离鉴定及其特性研究. 土壤学报, 2003, 40(6): 952-956.
- [10] 丁伟, 杨薇, 白赫, 等. 长残留除草剂氯嘧磺隆降解菌的筛选、鉴定和降解特性. 作物杂志, 2007(4): 88-91.
- [11] Zanardini E, Arnoldi A, Boschin G, et al. Degradation pathways of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by a

- Pseudomonad fluorescens* strain. *Annals of Microbiology*, 2002, **52**(1): 25-37.
- [12] 杨亚君, 刘顺, 武丽芬, 等. 可降解水体中烟嘧磺隆微生物的分离与筛选. *农药学学报*, 2007, **9**(3): 275-279.
- [13] 王哲, 孙纪全, 马吉平, 等. 氯嘧磺隆降解菌株 LW-3 的分离及生物学特性研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(12): 1899-1904.
- [14] Xu J, Li XS, Xu YJ, *et al.* Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils. *Chemosphere*, 2009, **74**(5): 682-687.
- [15] 周洪波, 刘飞飞, 邱冠周. 一株光合细菌的分离鉴定及污水处理能力研究. *生态环境*, 2006, **15**(5): 901-904.
- [16] Weaver PF, Wall JD, Gest H. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Archives of Microbiology*, 1975, **105**(1): 207-216.
- [17] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995: 394-436.
- [18] Goldman E, Green LH. Practical handbook of microbiology (second edition). United States of America: CRC Press, 2008: 67-80.
- [19] 孙军德, 赵春燕, 李炳学, 等. 光合细菌双层平板计数方法的研究. *沈阳农业大学学报*, 2001, **32**(2): 110-112.
- [20] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999: 28-31.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英, 等编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353-399.
- [22] 布坎南 RE, 吉本斯 NE, 等编著. 中国科学院微生物所编译. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [23] Valle A, Boschin G, Negri M, *et al.* The microbial degradation of azimsulfuron and its effect on the soil bacterial community. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, **101**(2): 443-452.
- [24] 张松柏, 张德咏, 罗香文, 等. 一株降解吡啶磺隆光合细菌的分离鉴定及其降解特性. *生态环境*, 2008, **17**(5): 1774-1777.
- [25] 俞幼芬, 高巍, 耿宁, 等. 液相色谱法同时测定 13 种磺酰脲类除草剂. *农药*, 2009, **48**(11): 811-813.
- [26] 葛宝坤, 赵孔祥, 王云凤, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定粮谷中多种磺酰脲除草剂残留量. *食品研究与开发*, 2009, **30**(6): 127-129.
- [27] 李朝霞, 丁成. 富营养化水体中光合细菌的分离、鉴定与生长条件的研究. *四川师范大学学报: 自然科学版*, 2007, **30**(6): 794-798.
- [28] 金雁, 姜莉, 赵颖, 等. 高效液相色谱法同时测定蔬菜中多种磺酰脲类除草剂的残留量. *分析测试*, 2008, **14**(4): 61-63, 67.
- [29] Ma JP, Wang Z, Lu P, *et al.* Biodegradation of the sulfon-ylurea herbicide chlorimuron-ethyl by strain *Pseudomonas* sp. LW3. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, **296**(2): 203-209.
- [30] Gu LF, Jiang JD, Li XH, *et al.* Biodegradation of ethametsulfuron-methyl by *Pseudomonas* sp. SW4 isolated from contaminated soil. *Current Microbiology*, 2007, **55**(5): 420-426.
- [31] Zhang XL, Zhang HW, Li X, *et al.* Isolation and characterization of *Sporobolomyces* sp. LF1 capable of degrading chlorimuron-ethyl. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2009, **21**(9): 1253-1260.
- [32] Musarrat J, Bano N, Rao RAK. Isolation and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-catabolizing bacteria and their biodegradation efficiency in soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, **16**(5): 495-497.
- [33] He YH, Shen DS, Fang CR, *et al.* Rapid biodegradation of metsulfuron-methyl by a soil fungus in pure cultures and soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, **22**(10): 1095-1104.
- [34] Zhu YW, Zhao YH, Lin XY, *et al.* Isolation, characterization and phylogenetic analysis of an aerobic bacterium capable of degrading bensulfuronmethyl. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005(21): 1195-1200.
- [35] Polati S, Bottaro M, Frascarolo P, *et al.* HPLC-UV and HPLC-MS<sup>n</sup> multiresidue determination of amidosulfuron, azimsulfuron, nicosulfuron, rimsulfuron, thifensulfuron methyl, tribenuronmethyl and azoxystrobin in surface waters. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **579**(2): 146-151.
- [36] 隋凯, 李军, 卫峰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时检测大米中 12 种磺酰脲类除草剂的残留. *色谱*, 2006, **24**(2): 152-156.