

黑龙江省北部地区土著咪唑乙烟酸 降解细菌的分离与鉴定

张 武

(黑龙江省农业科学院 黑河分院,黑龙江 黑河 164300)

摘要:从长期施用咪唑乙烟酸的土壤中筛选获得了3株对咪唑乙烟酸具有较好降解能力的细菌(降解率均在75%以上)。通过形态特征、生理生化鉴定。结果表明:J₁为微球菌属(*Micrococcus* sp.),J₂、J₃为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

关键词:咪唑乙烟酸;降解菌;微球菌属;芽孢杆菌属

中图分类号:S482.4

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)04-0065-03

咪唑乙烟酸,通用名咪草烟,商品名称普施特,属咪唑啉酮类除草剂。保守估计,黑龙江省咪唑乙烟酸(5%水剂)单剂年销量约3 500 t,使用面积为 $1.33 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ hm²[1-2]。黑龙江省北部地区由于其气候的特殊性,大豆一直以来是该地区的主要作物,但是由于咪唑乙烟酸的残效期长,已成为目前困扰黑龙江省北部地区大豆倒茬,产业结构调整的主要阻碍因素之一。

有研究表明,咪唑乙烟酸不易降解、挥发和光解,其半衰期长,残留量大。咪唑乙烟酸在土壤中主要通过微生物降解而消失,因此,利用咪唑乙烟酸降解菌快速降解和转化土壤中的咪唑乙烟酸已成为国内外研究热点[3]。由于细菌的特殊性,其进入环境中受到诸多环境因素制约,严重影响其在土壤的定殖,这也是造成降解菌迟迟不能应用于生产实践的主要因素。土壤中土著菌具有良好的本地适应性,所以对受咪唑乙烟酸污染的本地土壤进行筛选,就可以筛选出具有较高降解率的土著降解菌。该研究从长期施用咪唑乙烟酸的黑龙江省北部地区的土壤中筛选出适应性好且具有较好降解性的土著菌,并进行简单的鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试土壤 采自黑龙江省逊克县、孙吴

县、黑河市及黑龙江省农业科学院黑河分院长期施用咪唑乙烟酸的土壤。

1.1.2 供试培养基 牛肉膏液体培养基:牛肉膏5 g, NaCl 5 g, 蛋白胨 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.2(固体培养基加入15%~20%琼脂)。无机盐培养基:K₂HPO₄ 1.60 g, KH₂PO₄ 0.4 g, MgSO₄ 0.06 g, NH₄Cl 1.0 g, NaCl 0.50 g, Fe₂(SO₄)₃ 0.03 g, CuSO₄ 0.05 g, ZnSO₄ 0.05 g, CaCl₂ 0.01 g, 蒸馏水 1 L(固体培养基加入15%~20%琼脂)。

1.2 方 法

1.2.1 降解咪唑乙烟酸细菌的分离与纯化 参考瓶培养富集技术,取经充分混合的土样5 g,在无菌条件下置于牛肉膏液体培养基(含有100 mg·L⁻¹咪唑乙烟酸),于空气浴摇床中培养(30℃,150 r·min⁻¹),每隔7 d,按5%转移量至新的牛肉膏液体培养基中培养,共富集5次;然后转入无机盐培养基中,并逐步提高咪唑乙烟酸,培养条件与富集过程相同,但每转接一次增加咪唑乙烟酸含量100 mg·mL⁻¹,直至培养液浓度达到1 000 mg·mL⁻¹。在牛肉膏蛋白胨固体培养基进行划线分离,挑取形态、颜色不同的菌株进行纯化。

1.2.2 咪唑乙烟酸残留的测定 标准曲线的测定包括残留和降解率的测定。该试验采用水培玉米根长法进行咪唑乙烟酸的残留测定。选取玉米种子边三2号,在25℃黑暗条件下浸种24 h,催芽20 h,选取胚根长1~5 mm长势均匀一致的玉米种子,播于含有除草剂0、1、5、10、25、50、100、

收稿日期:2009-12-24

基金项目:黑龙江省农业科学院青年基金项目

作者简介:张武(1983-),男,黑龙江省大兴安岭市人,学士,研究实习员,从事植物保护研究工作。E-mail:guoguo_zw@163.com。

500、800、1 000 mg · mL⁻¹的纸质基质上,设 3 次重复,保持培养液浓度不变,在 25±1℃ 黑暗条件下培养 5 d 后,测量玉米根长,算出各处理的抑制率。用 Excel 建立咪唑乙烟酸浓度与根长抑制率的标准曲线,求出线性回归方程 $y=ax+b$,以此计算咪唑乙烟酸的含量。

采用水培法进行降解率的测定,向预先配置好有咪唑乙烟酸的培养基中添加 OD600 值为 2.0 的菌悬液,接种于含有 500 mg · L⁻¹咪唑乙烟酸的无机盐培养基中,接种量为培养液的 0.5%,同时设置空白对照。于空气浴摇床中培养(30℃, 150 r · min⁻¹),分别在培养的第 7、15、30、45、60、90 d,进行水培。将各处理置于 25℃ 恒温培养箱中培养,分别在培养的第 5 天,测量其根长抑制率。求出各处理咪唑乙烟酸的降解率和半衰期。

1.2.3 降解菌的鉴定 首先对菌株在牛肉膏固体培养基上的形态、革兰氏染色、荚膜染色、芽孢染色等通过镜检进行观察和描述。然后通过甲基红、乙酰甲基醇、淀粉水解、明胶液化、柠檬酸利用、荧光色素等对降解菌生理生化特性进行鉴定,

表 1 处理后培养液咪唑乙烟酸的降解率

处理时间/d	J ₁		J ₂		J ₃	
	检出量	降解率	检出量	降解率	检出量	降解率
	/mg · L ⁻¹	/%	/mg · L ⁻¹	/%	/mg · L ⁻¹	/%
7	434.76	13.05	410.57	17.89	422.49	15.50
15	390.88	21.82	343.51	31.30	363.81	27.24
30	383.86	23.23	319.01	36.20	337.71	32.46
45	312.02	37.06	223.98	55.20	258.72	48.26
60	204.17	5.32	123.52	75.30	151.05	69.79
90	108.88	78.22	62.14	87.57	85.30	82.94

2.3 咪唑乙烟酸降解菌的鉴定

2.3.1 降解菌的形态与菌落特征 将所筛选出的 3 株菌株接种到培养皿中,30℃ 培养 24 h 后观察细菌菌落形状、大小、运动性和菌落特征(见表 2)。

表 2 降解菌形态特征

项目	菌株		
	J ₁	J ₂	J ₃
形状	球状	杆状	杆状
长/μm	1.78~2.44	2.23~3.15	2.18~3.08
宽/μm	0.64~0.73	0.75~1.23	1.23~1.35
运动性	运动	运动	运动
菌落特征	表面光滑、边缘光滑、隆起生长、透明、在培养基上呈黄色	表面褶皱、边缘褶皱、不隆起、不透明、在培养基上呈白色	表面光滑、边缘光滑、隆起生长、半透明、在培养基上呈乳白色

2.3.2 降解菌生理生化特征 按照生理生化鉴定方法进行鉴别,包括革兰氏染色、芽孢染色、需

鉴定至属。

2 结果与分析

2.1 降解咪唑乙烟酸的细菌富集与分离

依照富集培养条件富集 35 d,转入无机培养基中培养 70 d 进行筛选。将培养好的培养液按逐级稀释法,取 10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释培养液进行涂布分离,30℃ 培养 48 h。待出现单个菌落后,按菌落的颜色、形状、透明度、边缘及粘度不同进行划线分离纯化。共分离 6 株菌株,其中 3 株菌株可以在含药培养基中大量生长且经冷冻保存可以保证较高活性,所以将这 3 株菌株标记为 J₁~J₃。

2.2 降解菌降解效果的测定

从表 1 可以看出,编号为 J₁、J₂、J₃ 的细菌均对咪唑乙烟酸具有较高的降解率,随着时间的延长,降解率也逐渐提高,3 株在 90 d 的时候降解率分别为 78.22%、87.57%、82.94%;降解半衰期 T_{1/2} 分别为 55.04、40.50、45.93 d。其降解率都在 75% 以上,有一定的应用价值,所以选择这 3 株菌进行下一步鉴定。

氧化性测定、接触酶试验、淀粉水解试验、甲基红试验(MR)、乙酰甲基醇试验(V-P)、明胶液化试验、柠檬酸利用试验等试验(见表 3)。

表 3 降解菌部分生理生化特性

试 验	菌株		
	J ₁	J ₂	J ₃
革兰氏染色	+	+	—
芽孢染色	无	有	有
需氧性	+	+	±
接触酶	—	+	+
淀粉水解	+	—	—
甲基红(MR)	+	+	—
乙酰甲基醇试验(V-P)	—	—	—
明胶液化试验	—	+	+
柠檬酸盐利用	+	+	+
荧光色素	—	—	—

注:“+”表示生化反应(或革兰氏染色)为阳性;“—”表示生化反应(或革兰氏染色)为阴性。

根据降解细菌培养的形态特征及生理生化特

征的测定,参考伯杰氏细菌鉴定手册第八版^[4],初步鉴定这 3 株降解菌结果为:J₁ 菌为微球菌属 (*Micrococcus* sp.), J₂、J₃ 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

3 结论与讨论

通过瓶富集高压选择的方法,从长期施用咪唑乙烟酸的土壤中分离得到 3 株,对咪唑乙烟酸具有较好降解率的降解菌,通过微生物形态学及生理、生化鉴定,初步鉴定为 J₁ 为微球菌属 (*Micrococcus* sp.), J₂、J₃ 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

目前,关于芽孢杆菌属细菌降解农药等难降解有机物的报道较多,如张志光等分离得到 5 株对甲胺磷和甲基对硫磷 2 种有机磷农药具有降解作用的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.),张建等分离得到 1 株对拟除虫菊酯类农药功夫菊酯具有降解作用的芽孢杆菌^[5-6]。但有关芽孢杆菌属降解咪唑乙烟酸的报道较少,如郑玉莲等首次分离得到一株芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌 zx7 对咪唑乙烟酸具有较好的降解能力^[2]。

国内关于微球菌属(*Micrococcus* sp.)的研究报道主要集中在土壤和水源的修复,如潘利华等从某印染厂的排污管道中分离得到 1 株高效能降解苯酚的微球菌属的细菌,温洪宇等从被石油污

染的土壤中分离得到一株能降解萘的微球菌属的细菌^[7-8]。

该研究结果说明了土壤中存在可加速降解咪唑乙烟酸的细菌,但试验是在理想环境下进行的,因此,关于咪唑乙烟酸在田间加速咪唑乙烟酸降解及降解动力学问题,仍需要进行更进一步的研究。

参考文献:

[1] Wepplo P J, Shaner D L. Imidazolinone Herbicides[M]. Princeton: Academic Press,1997:75-29.

[2] 郑玉莲,许景钢,李淑芹,等. 普施特优势降解细菌的筛选与鉴定[J]. 东北农业大学学报,2009,40(6):40-44.

[3] 苏少泉. 长残留除草剂对后茬作物安全性问题[J]. 农药, 1998,37(12):4-7.

[4] Buchanan R E,Gibbons E N. 伯杰氏鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所,译. 北京: 科学出版社,1984: 660-728.

[5] 张广志,杨合同,李纪顺,等. 多功能芽孢杆菌的分离、筛选及活性测定[J]. 江苏农业科学,2009(1): 298-300.

[6] 张建,张振华,黄星,等. 功夫菊酯降解菌 GF-1 的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 土壤,2009,41(3):454-458.

[7] 潘利华,姜绍通,刘鹏达,等. 苯酚降解菌的筛选及其降解特性的初步研究[J]. 微生物学通报,2003,30(5):78-80.

[8] 温洪宇,廖银章,李旭东,等. 菌株 N-1 对萘的降解特性研究[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(1):96-98.

Isolation and Identification on Degradation Bacteria of the Aboriginal Imazethapyr in the Northern Region of Heilongjiang Province

ZHANG Wu

(Heihe Branch of Heilongjiang Academy Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 164300)

Abstract: Three strains were separated from soil, which contained the herbicide imazethapyr and were long polluted by the pesticide (the degradation rates were all above 75%). From the analyses of their morphological, physiological and biochemical characteristics, the initial identification was as follow: J₁ was *Micrococcus* sp., J₂ and J₃ were *Bacillus* sp. .

Key words: imazethapyr; degradation bacteria; *Micrococcus* sp. ; *Bacillus* sp.