

叶晓婉,张桂丽,戚贺飞,等. 明党参内生菌对苯磺隆的生物降解作用[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):287-292.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.054

# 明党参内生菌对苯磺隆的生物降解作用

叶晓婉,张桂丽,戚贺飞,李如凤,聂雅阁,李国阳,朱大恒

(郑州大学生命科学学院,河南郑州 450000)

**摘要:**寻找能够高效降解磺酰脲类除草剂苯磺隆的新型菌株,为生物降解苯磺隆提供微生物资源。对明党参内生菌进行分离、培养与纯化,从筛选得到的多株内生菌株出发,采用富集培养法筛选苯磺隆降解菌。采用紫外分光光度计法和高效液相色谱法测定苯磺隆的含量,计算苯磺隆的降解率。结果表明,从 29 株明党参内生细菌中筛选出 8 株能降解磺酰脲类除草剂苯磺隆的菌株,通过复筛得到高效降解苯磺隆菌株 PMG3,其降解率为 89.07%,并经鉴定为芽孢杆菌属。PMG3 比以往筛选出的苯磺隆降解菌降解效率都要高,为利用中草药内生菌对受农药苯磺隆污染的土壤进行原位修复提供理论依据和现实意义。

**关键词:**明党参;内生菌;苯磺隆;降解率;生物学鉴定

**中图分类号:** S182      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2020)09-0287-05

明党参(*Changium smyrnioides* Wolff)为我国特有的伞形科明党参属植物,别称山花、山萝卜、明参、明党<sup>[1]</sup>。明党参是草本植物,周围易杂草丛生,杂草与明党参植株竞争土壤中的营养成分,从而影响植株的生长发育,而磺酰脲类除草剂,如苯磺隆,能够有效去除其周围杂草,使明党参旺盛生长。

苯磺隆(tribenuron-methyl, TBM),别称麦乐乐、苯磺隆、巨星(杜邦)、亿力、阔叶净、麦磺隆等,是 20 世纪 80 年代由美国杜邦公司开发的一种内吸传导型磺酰脲类麦田除草剂<sup>[2-5]</sup>,主要用于防除各种一年生阔叶杂草。苯磺隆在我国长江、黄河和淮河流域有着广泛的使用范围。苯磺隆的大量使用,给土壤、水体、生物及大气等诸多环境因子造成大量污染,影响农业生产和生态平衡<sup>[6-8]</sup>。因此,解决苯磺隆的残留问题对改善除草剂对作物的药害,修复受除草剂污染的土地有重要的理论意义和实际价值。而在生态系统中,作为分解者的微生物,代谢类型多样,适应环境的能力极强,能利用各种人工合成的农药作为碳、氮源生长,并将其完全降解成无机物<sup>[9]</sup>。田爽等筛选出 4 株能以苯磺隆为唯一碳源生长的降解菌,并对其生理生化特性进行研

究<sup>[9]</sup>。Zhang 等筛选出一株苯磺隆降解菌,经初步鉴定为假单胞杆菌,根据所查资料,国外尚未见有关于降解苯磺隆菌株的研究报道<sup>[10]</sup>。本试验从明党参内生菌着手,进行一系列的研究,旨在从中筛选出能够高效降解苯磺隆的明党参内生菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 培养基 无机盐培养基(inorganic salt medium, IS):磷酸二氢钾(3.0 g/L)、七水硫酸镁(0.1 g/L)、硝酸铵(2.0 g/L)、磷酸氢二钾(1.5 g/L)、无水氯化钙(0.01 g/L)、乙二胺四乙酸二钠(0.01 g/L),pH 值 7.5±0.1,25℃。营养琼脂培养基(nutrient agar, NA):牛肉浸粉(3.0 g/L)、蛋白胨(10.0 g/L)、氯化钠(5.0 g/L)、琼脂粉(15.0 g/L),pH 值 7.3±0.1,25℃。

1.1.2 试验样品与试剂 试验样品明党参产自河南省郑州市某中草药试验田。试验试剂:苯磺隆(纯度 95%)由中国沈阳化工研究所提供;甲醇(色谱纯)由天津市科密欧化学试剂有限公司生产;乙腈(色谱纯)由天津市科密欧化学试剂有限公司生产。

1.1.3 试验仪器和设备 一次性无菌进样器(1 mL):江苏华达医疗器材有限公司生产;紫外可见分光光度计(UV2600):日本岛津仪器有限公司生产;高效液相色谱仪(Agilent 1200):安捷伦科技有限公司生产;台式高速冷冻离心机(Allegra 64R):美

收稿日期:2019-05-23

基金项目:河南省教育厅重点科研项目(编号:19A180031)。

作者简介:叶晓婉(1994—),女,河南郑州人,硕士研究生,主要从事微生物资源应用研究。E-mail:yexiaowan94@126.com。

通信作者:朱大恒,博士,教授,主要从事烟草生物工程和微生物资源开发与应用研究。E-mail:zhudaheng2000@aliyun.com。

国贝克曼库尔特有限公司生产。

## 1.2 试验方法

1.2.1 明党参内生菌的分离 取明党参的根、茎、叶等组织部位,将组织表面的泥土等杂质用自来水冲洗之后在干净的自来水中浸泡 1 h;然后移入无菌超净工作台,用无菌水再次冲洗 3 次之后用无菌滤纸吸干表面的水分。采用“75% 乙醇-2.5% 次氯酸钠-75% 乙醇”三步表面消毒法将各组织消毒,其中根组织用 75% 乙醇浸泡 3 min,2.5% 次氯酸钠浸泡 7 min,75% 乙醇浸泡 20 min;茎组织用 75% 乙醇浸泡 3 min,2.5% 次氯酸钠浸泡 5 min,75% 乙醇浸泡 18 min;叶组织用 75% 乙醇浸泡 2 min,2.5% 次氯酸钠浸泡 3 min,75% 乙醇浸泡 15 min。表面消毒过的明党参组织,分别用无菌水冲洗 6 次后用无菌滤纸吸干表面的水分。之后用灭菌的镊子、剪刀、无菌刀片将明党参的根与叶组织剪切成  $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$  的小块,茎组织剪成长度约为 0.5 cm 的组织。在 NA、PDA、高氏一号培养基的平板上,分别等距接种 4 个根、茎、叶组织块,每个处理重复 3 次。将平板依次放置到 37、28、30 °C 培养箱中,观察平板中组织边缘菌落生长状况。

对照组:采用组织印迹法,将以上经过消毒处理的根、茎、叶组织放入 NA、PDA、高氏一号培养基中,使灭菌材料表面与培养基接触 20 min 后移走明党参各组织块,并将培养基置于相同条件下培养相同时间,观察平板是否有肉眼可见的菌落长出。

1.2.2 明党参内生细菌的纯化与保藏 待平板中组织块边缘长出可以用肉眼观察到的菌落后,用接种环挑取少许边缘菌落接种到新的 NA 培养基中,37 °C 恒温箱中倒置培养,待菌落生长后重复此操作 6 次以上进行纯化,直到得到单一的纯菌落。定期观察,挑选优势单菌落划线纯化后甘油保藏备用。

1.2.3 苯磺隆降解菌的筛选 (1)初筛。将以上分离得到的明党参内生菌接种在 NA 培养基上进行活化,再转接到营养肉汤培养基中,37 °C、150 r/min 下培养 12 h。配制无机盐固体培养基,121 °C、0.1 MPa 下灭菌 15 min。在超净工作台中,向无机盐培养基中加入等量的浓度为 10% 的苯磺隆溶液,倒平板,冷却。分别取 1 mL 菌液接种于无机盐培养基,无菌环境下涂布,37 °C 恒温培养箱进行培养。将得到的菌株接入 NB 培养基,37 °C、150 r/min 振荡培养 1 d,向 100 mL 无机盐液体培养基中加入浓度为 10% 的苯磺隆溶液 1 mL,取 1 mL NB 培养基中

的菌液接种于无机盐液体培养基,37 °C、150 r/min 振荡培养,定时取样,于  $D_{600\text{ nm}}$  测定菌株的生长情况,重复多次。(2)复筛。配制 150 mL 的无机盐液体培养基,121 °C、0.1 MPa 下灭菌 15 min。在超净工作台中,向培养基加入苯磺隆标准品 0.45 g,摇匀混合。将初筛得到的菌液接种于此,37 °C、150 r/min 振荡培养,定时观察无机盐培养基的清晰程度,并定时取样,于  $D_{600\text{ nm}}$  测定菌株的生长情况,重复多次。

1.2.4 高效降解苯磺隆的明党参内生菌的生物学鉴定 (1)形态学鉴定。将经过复筛得到的明党参内生细菌菌株接种于 NA 平板上,37 °C 条件下培养 1 d,观察其菌落形态并记录;挑取菌落边缘少量菌体进行革兰氏染色,电子显微镜下镜检并拍照。(2)分子生物学鉴定。①高效降解苯磺隆的明党参内生菌的 16S rDNA 基因序列同源性分析:提取明党参内生细菌的基因组 DNA,然后进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行测序,并将测序结果进行 DNA 多序列比对,利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树,对菌株进行置信度分析。②高效降解苯磺隆的明党参内生菌的质谱分析:将内生细菌接种到 NA 平板上,37 °C 培养 12 h 后,按如下样品准备流程操作:在 1.5 mL 离心管中加入 300  $\mu\text{L}$  去离子水。挑取单菌落样本加入离心管中,充分振荡混匀。再加入 900  $\mu\text{L}$  无水乙醇,充分混匀。在室温 12 000 r/min 下离心 4 min,倒去上清,再次离心,除去上清,40 °C 恒温干燥沉淀 2 min。加入 10  $\mu\text{L}$  裂解液 1,振荡混匀;加入同体积的裂解液 2,充分混匀。在室温 12 000 r/min 下离心 4 min。吸取 1  $\mu\text{L}$  上清液,滴加到样品靶板上,另任意选一靶点滴加 1  $\mu\text{L}$  质谱仪校准品,并在室温下晾干。晾干后,取 1  $\mu\text{L}$  基质溶液覆盖在上述样品点上,并在室温下晾干。将样品靶板放入质谱仪进行测定。

1.2.5 苯磺隆降解率的测定 (1)紫外分光光度计法。配制 50 mL 的无机盐培养基,121 °C、0.1 MPa 下灭菌 15 min。向冷却后的每瓶培养基中加入 0.15 g 苯磺隆标准品,摇匀,取复筛得到的菌株菌液 0.5 mL 加入其中,每株菌重复 3 次,1 瓶培养基不加菌株菌液(空白对照),37 °C、150 r/min 振荡培养。配制不同浓度的苯磺隆标准品溶液,通过苯磺隆全波长扫描,检测分析出苯磺隆的最佳吸收波长为 245 nm。从每瓶培养液中取 5 mL 液体于离心管中,离心之后吸取上清液并加入 5 mL 二氯甲烷

进行萃取,分液,取有机相进行旋蒸,加入甲醇进行溶解,用 0.2  $\mu\text{m}$  的过滤膜过滤之后,在 245 nm 处测苯磺隆的吸光度。(2) 高效液相色谱法。将 0.3 g 苯磺隆标准品溶于 1 000 mL 的无菌水中,配制成浓度为 0.03% 的苯磺隆标准品溶液,充分溶解之后,取 5 mL 苯磺隆标准品溶液加入体积为 45 mL 的无机盐培养基中。吸取明党参内生菌降解苯磺隆的复筛菌液 0.5 mL,分别加入无机盐培养基中,每组重复 3 次,1 组不加菌液(对照)。37  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养,每隔 24 h,吸取 2 mL 苯磺隆降解液于试管中,再向其中加入 2 mL 的乙腈溶解降解液中的苯磺隆,用 0.22  $\mu\text{m}$  的有机过滤膜过滤,加入进样瓶中,制成待测的样品。

2 结果与分析

2.1 明党参内生菌的分离、筛选与纯化

将新鲜的明党参植株的根、茎、叶经“三步消毒法”消毒后分别放置到 NA、PDA、高氏一号平板中,在 37、28、30  $^{\circ}\text{C}$  培养一段时间得到明党参植株组织的内生菌。同时经对照组验证平板置于相同条件下培养相同时间,无菌落在对照组平板上生长,证明得到的菌落为明党参内生菌产生的。将明党参组织的内生菌经分离、纯化、对照组验证,根据平板中菌落初步特征(菌落大小、菌落颜色、菌落透明度、菌落边缘情况、是否凸起特征)初步分为 29 株。

2.2 降解苯磺隆的明党参内生菌的筛选结果

在含 10% 苯磺隆的固体无机盐培养基上接种的 29 株明党参内生细菌,在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内经过连续多天的培养,只有 8 株菌生长,分别为 NMY1、NMG9、NMJ10、PMG3、PMG4、NMG4、NMY4、NMG5。由表 1 可知,接种于含 10% 苯磺隆的固体无机盐培养基上的这 8 株菌数量大幅增加,长势良好,基本判断这 8 株菌能够以 10% 苯磺隆为唯一碳

源、氮源生存,由此推断这 8 株菌能够降解苯磺隆。用紫外分光光度计检测,对照组培养液在 245 nm 时吸光度平均值为 1.579,经过菌株 PMG3 降解后  $D_{245\text{ nm}}$  为 1.255,说明苯磺隆被降解了。将初筛选出的 8 株降解苯磺隆的明党参内生菌进行苯磺隆的富集驯化培养,筛选出 1 株能高效降解苯磺隆的菌株 PMG3。

表 1 菌株生长情况

菌株	$D_{600\text{ nm}}$ (NB)	$D_{600\text{ nm}}$ (IS)
NMY1	0.106	0.124
NMG9	0.043	0.073
NMJ10	0.279	0.276
PMG3	0.051	0.098
PMG4	0.037	0.046
NMG4	0.049	0.061
NMY4	0.057	0.056
NMG5	0.114	0.116

2.3 苯磺隆的降解率

在高效液相色谱仪 Agilent 1200 进行操作,色谱柱选用 Promesil  $\text{C}_{18}$  - BIO 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm,5 mm),对对照进行参数校正,流速确定为 0.8 mL/min,柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长为 245 nm,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,进样时间 15 min,流动相确定为水:乙腈为 30:70,苯磺隆对照峰与溶剂峰分开,苯磺隆的出峰时间在 3.1 min 左右,出峰完整且清晰可见,见图 1。随着苯磺隆浓度增加,其出峰时间会相对拖后。配制质量浓度不同的苯磺隆溶液,通过高效液相色谱分析的方法,以质量为横坐标,峰面积为纵坐标,作苯磺隆的标准曲线(图 2),得出苯磺隆的标准曲线方程为  $y = 4\,536.300x - 71.652$ ,  $r^2 = 0.999\,6$ ,用于估算苯磺隆的浓度。

试验测得菌株降解苯磺隆的样品的色谱峰的峰面积值,根据图 2 苯磺隆标准曲线,计算 10  $\mu\text{L}$  中

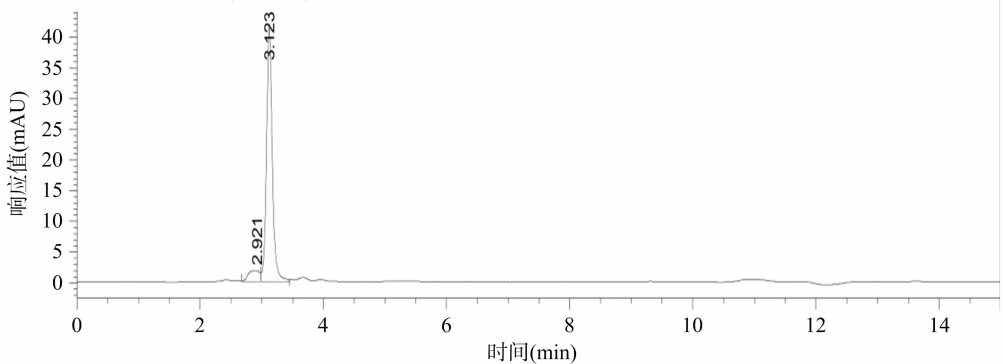


图1 苯磺隆色谱图

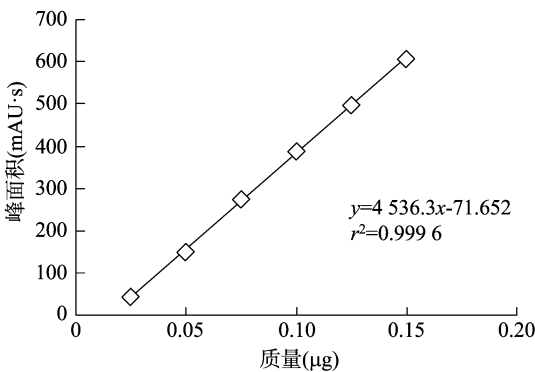


图2 苯磺隆的标准曲线

苯磺隆的含量,估算出菌株的降解率。对照组苯磺隆的质量浓度为 0.03 mg/mL,经过菌株降解之后,发现在第 1 天(24 h)时降解效率最高,在第 3 天(72 h)时降解率可以达到 89% 以上,其中菌株 PMG3 降解 3 d 后,苯磺隆的含量最高为 3.296 μg/mL,最低可达到 2.882 μg/mL,降解率达 89%(表 2)。通过初步试验筛选出菌株 PMG3 为高效降解苯磺隆的菌株,但后期的大量推广应用,还需进一步研究。

表 2 菌株 PMG3 对苯磺隆的降解率

样品	降解率(%)		
	24 h	48 h	72 h
样品 1	88.56	89.01	89.12
样品 2	88.65	88.79	89.13
样品 3	88.59	88.82	88.97
平均	88.60	88.87	89.07
总平均	89.07		

2.4 降解菌的生物学鉴定

2.4.1 降解菌的形态学鉴定 把明党参内生细菌菌株 PMG3 接种到 NA 平板上培养 24 h,其平板中菌落形态和显微镜镜检图见图 3。菌株 PMG3 在 NA 平板上生长时菌落为不规则圆,有凸起,呈现白色,菌落湿润,半透明,大小为 5~6 mm,在显微镜下

观察发现,PMG3 菌体为长杆状,芽孢柱状,两端钝圆,长度较长,革兰氏染色为紫色,为革兰氏阳性菌株。

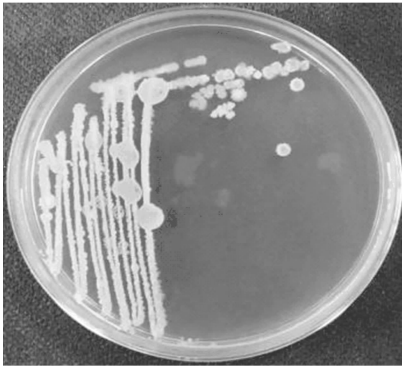


图3 PMG3在平板上的生长情况

2.4.2 降解菌的 16S rDNA 基因序列同源性分析 经过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、纯化回收 DNA 目的条带、PCR 引物测序,菌株 PMG3 的 16S rDNA 基因序列全长为 1 418 bp。选取与内生菌菌株同源性较高的 10 株菌株的 16S rDNA 基因序列构建系统发育进化树,结果见图 4。通过 BLAST 同源性比对,结果表明,菌株 PMG3 与 *Bacterium* wsb-1 和 *Bacillus tequilensis* stain Y11 进化距离较近;结合菌株形态特征、生化特性、微生物质谱鉴定结果和 16S rDNA 基因序列同源性分析,初步鉴定菌株 PMG3 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp. PMG3)。

2.4.3 降解菌的质谱分析 本试验所用的质谱仪基本原理是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术<sup>[11]</sup>,根据离子的质荷比与离子的飞行时间成正比,检测样品到达检测器的飞行时间即可检测离子,对样品进行分析,通过与数据库信息比对,筛选并确定相应图谱,进而得到鉴定结果,从而实现对不同细菌属、种的鉴定。菌株 PMG3 的质谱图谱如图 5 所示,菌株 PMG3 在 4 307.89 m/z 附近离子流强度最大,其峰高为 1 600,峰面积为 2 789 635,信

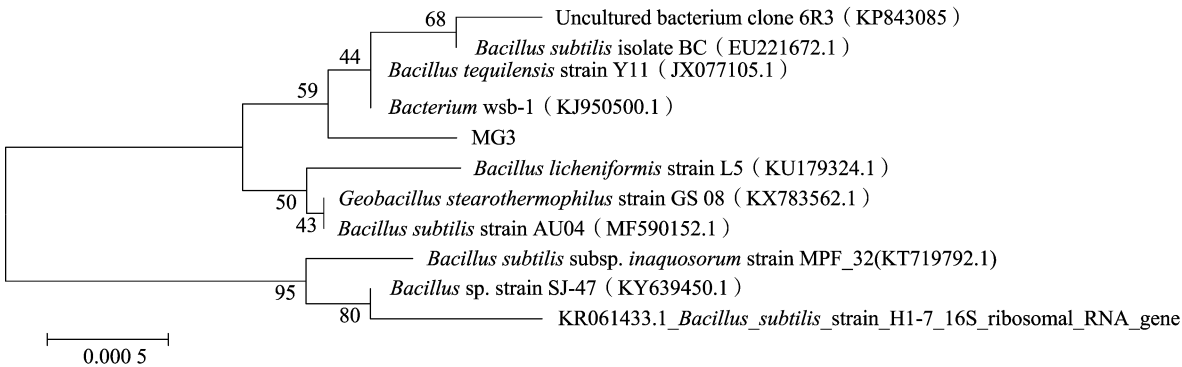
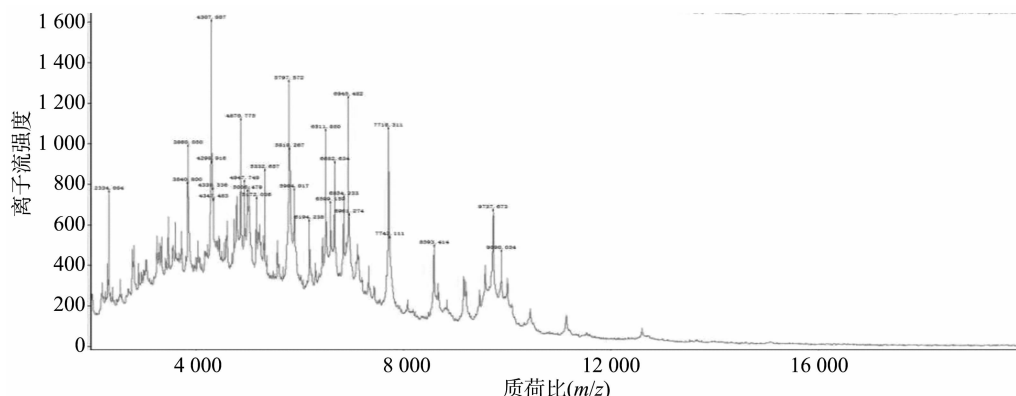


图4 菌株 PMG3 基于 16S Rdna 序列的系统进化树

噪比为 28,分辨率为 753。菌株 PMG3 经检索后与数据库中枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的匹配分

值为 9.115,菌株 PMG3 鉴定为芽孢杆菌属。



毛红云,孜比布拉·司马义,杨胜天,等. 农田土壤重金属的污染特征研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):292-297.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.055

# 农田土壤重金属的污染特征研究

毛红云,孜比布拉·司马义,杨胜天,田 甜,魏漪梦

(新疆大学资源与环境科学学院/新疆大学资源与环境科学学院智慧城市与环境建模普通高校重点实验室/

新疆大学绿洲生态教育部重点实验室,新疆乌鲁木齐 830046)

**摘要:**选取镉(Cd)、铬(Cr)、铅(Pb)、砷(As)、汞(Hg)5种重金属分析我国16个地区农田土壤重金属现状,以国家土壤背景值及GB 15618—2018《土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准(试行)》为参比,运用单因子污染指数和内梅罗污染指数作为农田土壤质量评价指标。结果表明:北方研究区5种重金属含量的变异系数从大到小依次为  $Hg > Cd > Pb > As > Cr$ ,其中Hg的变异系数最高;南方研究区5种重金属含量的变异系数从大到小依次为  $Cd > As > Pb > Hg > Cr$ ,其中Cd的变异系数最高。内梅罗指数法评价结果表明,研究区的土壤重金属污染由大到小依次为  $Cd > As > Cr > Hg > Pb$ ,且南方污染比北方严重。目前的重金属污染修复技术多是针对单一重金属或者少数几种一起修复,多种重金属联合修复技术需要进一步的研究。

**关键词:**农田土壤;重金属污染;修复技术

**中图分类号:**X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)09-0292-06

近年来,频发的农田土壤重金属污染事件,不仅影响农产品的质量,更损害民众身体健康,影响社会稳定<sup>[1]</sup>。作为人类生存的基础之一,土壤是组成生态环境的重要部分。人为和自然因素向环境中排放的重金属共同影响了土壤生态系统。有数据显示,我国受重金属污染的耕地面积占全国总耕地面积的  $1/6$ <sup>[2]</sup>。

工业活动中矿产资源开发、化学药品的研发及生产、金属冶炼与加工等过程中产生含重金属的“三废”以堆砌、沉降等形式进入土壤,造成土壤重金属污染,进而通过食物链威胁人体健康。“血铅事件”和“镉米风波”警示了全世界<sup>[3]</sup>,也为我国重金属污染防治敲响警钟,使食品安全和人体健康风险问题被人们广泛关注。减轻污染、降低危害和污染修复也成为生态环境界经久不衰的话题。《重金属污染综合防治“十二五”规划》将镉(Cd)、铬(Cr)、铅(Pb)、砷(As)、汞(Hg)等生物毒性强且污染严重的重金属元素列为第一类重点防控对象<sup>[4]</sup>。2013年全国两会提案聚焦农业,指出我国重金属污染耕地面积超过16%。“十三五”规划纲要将土壤

收稿日期:2019-05-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:U1603241)。

作者简介:毛红云(1993—),女,河南周口人,硕士研究生,主要从事土壤生态环境研究。E-mail:847770285@qq.com。

通信作者:孜比布拉·司马义,博士,教授,主要从事资源利用与城乡规划研究。E-mail:zibibulla3283@sina.cn。

Annual Review of Biochemistry,1978,47(1):533-606.

[15] Andersen S M, Hertz P B, Holst T, et al. Mineralisation studies of  $^{14}C$  - labelled metsulfuron - methyl, tribenuron - methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron - methyl in one Danish soil and groundwater sediment profile[J]. Chemosphere,2001,45(6/7):775-782.

[16] Klose S, Ajwa H A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives[J]. Soil Biology & Biochemistry,2004,36(10):1625-1635.

[17] Muhamad H B, Ai T Y, Sahid I B. Determination of the herbicide fluroxypyr in oil matrices[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B,2008,43(2):134-140.

[18] 白 翎,王 玫,宫静宏. 毛细管气相色谱法测定农产品中氟草

烟残留量[J]. 色谱,2003,21(3):288-290.

[19] 仇宏伟,胡继业,周革非. 磺酰脲类除草剂在土壤及植物中行为综述[J]. 莱阳农学院学报,2000,17(2):132-138.

[20] 杜慧玲,吴济南,王丽玲,等. 苯磺隆对土壤酶活性的影响[J]. 核农学报,2010,24(3):585-588.

[21] 江改青. 小麦和土壤中苯磺隆与氯氟吡氧乙酸残留分析方法及消解动态研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2009:7-8.

[22] 郎印海,蒋 新,赵其国,等. 磺酰脲除草剂在土壤中的环境行为研究进展[J]. 应用生态学报,2002,13(9):1187-1190.

[23] 杨春璐,孙铁珩,和文祥,等. 农药对土壤脲酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2006,17(7):1354-1356.

[24] 杜 迅,王亚南,何蔚荭,等. 麦田除草剂苯磺隆耐受菌株的筛选和初步鉴定[J]. 环境与健康杂志,2013,30(12):1103-1105.