

嗜硫小红卵菌对常用除草剂“草克星”的解毒作用

肖容楚 / 湖南省长沙市雅礼中学 谢雨晨 / 湖南省长沙市长郡中学 唐丁柯 / 湖南省长沙市南雅中学
指导教师 马学品 王立峰 彭世文

◎ 研究的动机

吡嘧磺隆是农药“草克星”的化学名称。查询资料后我们发现,吡嘧磺隆是人工合成的化合物,在自然环境中较难分解,对多种敏感作物产生毒害作用。用什么方法能够解决吡嘧磺隆的毒害问题呢?我们想到微生物是自然界中生长、进化速度最快的类群,在吡嘧磺隆高浓度环境下(如农药厂排污口处),是否会有个别微生物进化出解毒能力呢?如果能够筛选到这种解毒微生物,将会对解决吡嘧磺隆的残留药害有极大帮助,但这是否有实际可操作性呢?

◎ 研究方法与过程

☛ 耐吡嘧磺隆胁迫微生物富集培养

采用富集培养法配制富集培养基,采用摇瓶富集培养:取 10.0 g 采集的土样,加入 50 mL 富集培养液中,培养液吡嘧磺隆初始浓度设定为 50 mg/L,置于 28℃、180 r/min 恒温摇床上培养 7 天之后,以 2% 的接种量接入新鲜培养液中,每隔 1 周转接 1 次,并以 10 mg/L 为梯度逐渐提高吡嘧磺隆浓度至 100 mg/L,连续培养 6 轮,空白对照组同样连续培养 6 轮。

☛ 吡嘧磺隆解毒微生物检验

本实验参照钟亚兰等运用高效液相色谱表征高聚物的方法(钟亚兰等,2010)对吡嘧磺隆的量的变化进行测定,检验耐高浓度吡嘧磺隆胁迫微生物中可对其产生解毒微的生物是否存在。在富

集培养最后一次转接前及经历 7 天培养后,各取培养物 1.5 mL,用高速离心机以 12 000 r/min 离心 5 min,上清液经 0.22 μm 水相滤膜过滤,取滤液检测。

最后以吡嘧磺隆的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘出标准曲线,求出峰面积和浓度的相关方程。

☛ 解毒菌的分离与纯化

参照已有方法,采用 10 倍稀释法将富集液稀释,再用平板倾注法分离单菌,分别得到 10^{-8} ~ 10^{-1} 浓度的富集液;对每一梯度浓度稀释液各取 100 μL 加入到 2 个灭菌的培养皿中,其中一个培养皿倒入 0.5 cm 厚的牛肉膏蛋白胨培养基,另一培养皿倒入 0.5 cm 厚的 PSA 培养基,在超净台的台面上水平混匀稀释液和培养基,冷却凝固后,置于 28℃ 恒温培养箱中倒置培养,牛肉膏蛋白胨平板培养 3 天观察菌落,PSA 平板培养 5 天观察菌落。将单菌落挑出,在相应平板上用四线法划线纯化菌株。

☛ 单菌解毒实验

在吡嘧磺隆浓度 50 mg/L 的富集培养基中,分别接种纯化后的菌落,28℃、180 r/min 恒温摇床培养 7 天,同时以不接菌的培养基为空白对照;分别取培养前及培养 7 天的培养物 1.5 mL,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.22 μm 的水相滤膜,取滤液检测。

☛ 吡嘧磺隆解毒菌的鉴定

Yc-5 菌株的形态观察: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。菌体的其他形态特征、培养特性及生理生化实验参照文献相应进行。

Yc-5 菌株的 rDNA-ITS 分子鉴定:首先进行 DNA 扩增,将扩增的产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收,回收纯化后的产物送华大基因公司测序。将测得的 ITS 序列在 GenBank 中利用 BLAST 进行比对,选取一些与该序列最相似的其他菌株的序列,然后用软件 MEGA 4.0 进行序列分析,再构建系统发育树,查看 Yc-5 与其他菌株亲缘关系的大小。

☛ 解毒菌解毒特性及实际应用研究

采用比浊法反映菌株生长并动态跟踪检测吡嘧磺隆浓度变化,绘制解毒菌生长解毒曲线。

若想要 Yc-5 解毒菌最大程度地发挥其吡嘧磺隆解毒能力,就要使其处于较优的解毒条件下,为此我们又对 Yc-5 解毒吡嘧磺隆的最佳条件进行了初步探索,还用油菜苗和饲养中的小虾做了解毒菌实际应用实验。

◎ 结果与讨论

☛ 耐吡嘧磺隆胁迫微生物富集培养

我们在湖南海特农药厂吡嘧磺隆生产车间采集了几袋污泥作为后续富集培养的样品来源(图 1)。富集培养后,与未转接移种的空白对照组相比较,污泥实验组培养瓶中培养液明显浑浊致密,同时瓶体有少量细胞沉积(图 1 左)。



图1 富集转接后的培养基（左为富集实验组，右为未转接的空白对照）



图2 分离纯化后的菌落

这表明富集培养液中有大量微生物在生长、繁殖。

吡啶磺隆解毒微生物检验

农药等有机物的浓度变化可通过色谱或质谱技术测定、显现。我们运用高效液相色谱测定吡啶磺隆的量的变化，进一步证实富集培养基中是否存在能够分解吡啶磺隆的微生物。结果表明不接菌的空白对照组浓度几乎未发生任何变化，而接种并经7天富集培养后的实验组，吡啶磺隆浓度均显著下降。结果证实富集培养基中存在可解毒吡啶磺隆的微生物群落。

解毒菌的分离与纯化

虽然富集培养瓶中证实有吡啶磺隆解毒微生物的存在，但其中的微生物菌落混杂、成分不明，究竟是哪一种或哪几种微生物起到主要的解毒作用必须加以明确。参照已有方法，采用10倍稀释法将富集液稀释，再用平板倾注法分离单菌。本项目最终将其归类为7种不同的菌，并分别命名为Yc-1、Yc-2、Yc-3、Yc-4、Yc-5、Yc-6、Yc-7（图2）。通过初步形态观察，其中1株为真菌（Yc-3），其他6株均为细菌。

单菌解毒实验

为了进一步确定分离纯化得到的不同菌落中，究竟是哪一种或几种微生物对吡啶磺隆有分解解毒作用，我们设置了单菌解毒实验进行验证。结果显示，不接菌的空白对照组浓度几乎未发生任何变化，在分离纯化得到的菌株中有1株菌Yc-5具高效解毒效果，7天培养

后对吡啶磺隆的解毒率达51.6%。

吡啶磺隆解毒菌的鉴定

再次查阅文献后，我们决定从菌株形态及分子遗传两方面对解毒菌Yc-5进行鉴定。结果表明，该解毒菌与*Rhodovulum sulfidophilum* strain sy59亲缘关系最为接近。综合形态学鉴定和分子鉴定，Yc-5属于嗜硫小红卵菌（*Rhodovulum sulfidophilum*）。

解毒菌实际应用初探

为证实解毒菌Yc-5在实际生产中的利用价值，我们初步探索了解毒菌对遭受吡啶磺隆药害的油菜幼苗的生长恢复效应，及降低幼虾受毒害致死的缓解作用。

油菜苗生长恢复实验：与栽培无菌土中喷洒了含Yc-5菌株菌液的处理组对比，对照组中的油菜幼苗生长发育迟缓、植株低矮，茎秆纤细、易折断，叶片较小、疏松稀落，花蕾数量少且成功开花率较低；而由Yc-5菌株菌液进行解毒作用的处理组油菜幼苗生长状态显著改善，植株高大直挺，花叶较为茂盛。

幼虾生长饲养实验：全程观察幼虾整体生长状态，与空白对照组相比，添加了Yc-5菌株菌液的处理组中幼虾较为活跃、游动频繁，说明该菌株对水体中吡啶磺隆也具有良好的解毒作用。

结论与展望

本项目从现实生活中的实际问题出发，采用富集培养方法，从长期经受吡啶磺隆污染的污泥中分离筛选得

到了1株吡啶磺隆解毒菌Yc-5；该菌株可通过共代谢高效解毒吡啶磺隆；通过形态特征及ITS序列分析将其鉴定为嗜硫小红卵菌（*Rhodovulum sulfidophilum*）；采用室内培养方法，研究了Yc-5对吡啶磺隆的解毒特性，菌株生长2~5天为吡啶磺隆解毒高峰阶段；均匀实验结果表明，在基础培养液中，在接种量为6%、温度为31℃、吡啶磺隆浓度为50mg/L条件下，可获得最优解毒效果，培养7天解毒率达84.7%。油菜苗生长恢复实验和幼虾生长对比实验表明解毒菌Yc-5具有较高的实际应用价值，该菌为吡啶磺隆等类似有机物污染的高效治理提供了有效的解决途径。

该项目获得第29届全国青少年科技创新大赛创新成果竞赛项目中学组环境科学一等奖。

专家评语

该项目针对南方地区使用大量的除草剂“草克星”引发的可能环境问题，从有效降解草克星、降低其毒害作用等入手，开展了具有降解作用微生物的筛选鉴定。项目整体设计科学，具有创新性，研究结果整体性强并获得了有效数据。■