

高效氯嘧磺隆降解菌株培养条件的优化

燕红, 魏彦阳, 何立, 刘长睿, 李雅杰

(哈尔滨理工大学 化学与环境工程学院, 黑龙江省高校绿色化工技术重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以筛选出的3株高效氯嘧磺隆降解细菌(A2、A5和A6)为实验对象,研究碳源、氮源、pH、温度及氯嘧磺隆初始浓度对菌株生长的影响,确定其最适培养条件。A2、A5和A6生长的最适碳源为乳糖,氮源为蛋白胨。A2生长最适乳糖浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,最适蛋白胨浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,适宜pH值范围5.4~7.0,最适pH值6.0,生长的适宜温度范围25~36℃,最适温度28℃;A5和A6生长最适乳糖浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,最适蛋白胨浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,适宜pH值范围5.4~8.0,最适pH值5.4,生长的适宜温度范围25~36℃,最适温度28℃。3株菌于最佳培养条件下,培养60 h,其最大菌密度(OD_{600})可分别达到1.802、1.804和1.887,分别是野生菌株的15.5、8.4和42.9倍。

关键词:氯嘧磺隆;氯嘧磺隆降解菌;培养条件;优化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)05-0804-04

Optimization on Cultivation Conditions of High Effective Chlorimuron-Ethyl Degrading Strains

YAN Hong, WEI Yan-yang, HE Li, LIU Chang-rui, LI Ya-jie

(College of Chemical and Environmental Engineering, Harbin University of Science and Technology, Key Laboratory of Green Chemical Technology of College of Heilongjiang Province, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: The high effective Chlorimuron-ethyl degrading strains (A2, A5 and A6), which used in this study, were isolated and selected in early experiments. The effects of carbon sources, nitrogen source, pH, temperature, and chlorimuron-ethyl concentration on the growth were explored in this experiment. The results showed that the best carbon source and nitrogen source were lactose and peptone, respectively, for these three strains. As for A2, optimal concentration of lactose and peptone was $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Suitable pH range of growth for A2 was 5.4-7.0, whereas the optimal pH was 6.0. Suitable temperature range of growth was 25-36℃, whereas the optimum temperature was 28℃. The suitable concentration of lactose and peptone for A5 and A6 were $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Appropriate pH range was 5.4-8.0, and the optimal pH was 5.4. Suitable temperature range of growth for A5 and A6 was 25-36℃, and the optimum temperature was 28℃. The biggest bacterium density (OD_{600}) of the three strains (A2, A5, and A6) could reach to 1.802, 1.804 and 1.887, respectively, which were 15.5, 8.4 and 42.9 times higher than wild strains, under the optimum culture condition for 60 h.

Key words: Chlorimuron-ethyl; Chlorimuron-ethyl degrading strain; Cultivation conditions; Optimization

氯嘧磺隆(chlorimuron-ethyl)是美国杜邦公司开发的磺酰脲类除草剂,由于其杀草谱广、可混性强、选择性好、活性高、价格低,被广泛应用于大豆田除草。但由于其不易挥发,不易光解,残留期较长,其土壤残留易对后茬敏感作物造成严重药害,导致作物减产或绝产,甚至形成“癌症田”^[1]。如何清除土壤中长残留的除草剂,解决其残留药害和减少环境污染是很多学者关注的课题^[2]。微生物法处理除草剂土壤残留条件温和、去除率高且无二次污染。目前,利用微生物降解长残留除草剂,进行生物修复已成为清除土壤中长残留除草剂的热点^[3-4]。因此,分离筛选能够高效降解氯嘧磺隆的微生物菌株,优化培养条件,并研究其对氯嘧磺隆的降解特性,可为实际生产上利用该菌株进行生物修复清除土壤中长残留的氯嘧磺隆除草剂提供理

论依据。本文以前期分离筛选获得的高效氯嘧磺隆降解细菌菌株A2、A5和A6为研究对象,优化了这3株高效降解菌的培养条件,研究了氯嘧磺隆初始浓度对高效降解菌生长发育的影响及菌株在最优培养条件下的生长曲线。旨在为开发生物治理氯嘧磺隆残留微生物菌剂,解决大豆田残留药害,减少环境污染提供生物学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 经前期分离筛选获得的高效氯嘧磺隆降解细菌菌株A2、A5和A6。混土经生物测定,3株降解菌对氯嘧磺隆降解率分别高达99.58%、97.29%和97.81%。

收稿日期:2012-06-08

基金项目:哈尔滨理工大学2011年校级开放实验项目资助。

第一作者简介:燕红(1976-),女,教授,博士,主要从事环境污染物的生物治理方面的研究。E-mail:yanhong204821@yahoo.com.cn。

1.1.2 器材 电子分析天平、酸度计、T6 紫外-可见分光光度计、恒温培养箱、恒温振荡摇床、立式高压蒸汽灭菌器、超净工作台等。

1.1.3 培养基 斜面培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L。

摇瓶发酵培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 L。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 首先将 A2、A5、A6 分别接种在牛肉膏-蛋白胨斜面培养基上活化^[5],置 28℃ 恒温培养箱培养 48 h。然后分别从斜面上挑两环到装有 50 mL 牛肉膏-蛋白胨液体培养基的 250 mL 三角瓶中,置 28℃ 摇床 120 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h,备用。

1.2.2 培养条件优化 采用单因素试验^[6]研究不同碳源及碳源浓度、氮源及氮源浓度、培养液初始 pH 值、温度、氯噻磺隆初始浓度等对高效氯噻磺隆降解菌株生长的影响,确定其最适培养条件。按 2% 接种量将发酵液分别接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中。置 120 r·min⁻¹ 的摇床振荡培养 48 h,在 600 nm 处测定培养基的 OD 值,每种测量因素设 3 组平行试验,同时以未接种的培养基作空白对照。

碳源的选择及最适碳源浓度的确定:分别用 20 g·L⁻¹ 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉代替牛肉膏-蛋白胨培养基中的牛肉膏,其余条件不变,选择适宜的碳源。根据以上试验的结果,选择乳糖作为 3 株细菌的最适碳源,乳糖浓度分别为 5、10、15、20、25 g·L⁻¹,其它条件不变,确定最适乳糖浓度。

氮源的选择及最适氮源浓度的确定:用 20 g·L⁻¹ 的硫酸铵、硝酸铵、尿素、硝酸钾、硝酸钠代替牛肉膏-蛋白胨培养基中的蛋白胨,其余条件不变,选择适宜的氮源。根据以上试验的结果,选择蛋白胨作为 3 株细菌的最适氮源,蛋白胨浓度分别为 5、10、15、20、25 g·L⁻¹,其它条件不变,确定最适蛋白胨浓度。

培养液初始 pH 值的选择:调节培养基初始 pH

值分别为 4.4、4.8、5.4、6、7、8、9,其它条件不变,确定最适初始 pH 值。

温度的选择:将培养基分别置于 21℃、25℃、28℃、30℃、36℃ 的摇床振荡培养,其它条件不变,确定最适生长温度。

1.2.3 氯噻磺隆初始浓度对菌株生长的影响 在培养基中加入氯噻磺隆,使其浓度分别为 0.07、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0 g·L⁻¹,确定氯噻磺隆初始浓度对菌株生长的影响。

1.2.4 菌株生长曲线的测定 根据 A2、A5 和 A6 的最适培养条件试验结果,将 3 株菌分别接到装有 50 mL 最适培养基的 250 mL 三角瓶中,其它条件不变,置 28℃ 摇床 120 r·min⁻¹ 振荡培养 60 h,每隔 2 h 取菌液,在 600 nm 处测定菌液的 OD 值。以培养时间为横坐标,OD 值为纵坐标作图,即为 A2、A5 和 A6 的生长曲线^[7]。

2 结果与讨论

2.1 碳源对菌株生长的影响

由表 1 可知,不同碳源对 A2、A5 和 A6 的生长具有一定影响。3 株菌均以乳糖作为碳源时生长最好,在葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉碳源中生长次之,在牛肉膏中生长不好。由表 2 可知,A2 最适乳糖浓度为 20 g·L⁻¹,OD₆₀₀ 为 1.832,其余浓度条件下生长不好;乳糖浓度范围为 15 ~ 25 g·L⁻¹ 时,A5 和 A6 生物量变化不大,最适乳糖浓度均为 15 g·L⁻¹,OD₆₀₀ 分别为 1.367 和 1.047。

2.2 氮源对菌株生长的影响

由表 3 可知,A2、A5 和 A6 均以蛋白胨为氮源生长最好,在硫酸铵、硝酸铵、尿素、硝酸钾、硝酸钠等氮源中生长不好。由表 4 可知,蛋白胨浓度在 5 ~ 10 g·L⁻¹ 时,3 株菌的生物量随蛋白胨浓度的增加而增加,在蛋白胨浓度为 10 g·L⁻¹ 时,生物量最大,OD₆₀₀ 分别为 2.123、2.276 和 2.205,蛋白胨浓度在 15 ~ 25 g·L⁻¹ 时,生物量随蛋白胨浓度的增加而下降。所以 A2、A5 和 A6 生长的最适蛋白胨浓度为 10 g·L⁻¹。

表 1 碳源对菌株生长的影响
Table 1 Effect of carbon source on strain growth (OD₆₀₀)

菌株 Strains	碳源 Carbon sources					
	牛肉膏	葡萄糖	蔗糖	乳糖	麦芽糖	可溶性淀粉
	Beef extract	Dextrose	Sucrose	Lactose	Maltose	Soluble starch
A2	0.116	1.134	1.038	1.822	0.993	1.074
A5	0.261	1.647	1.174	1.664	1.493	0.998
A6	0.044	1.624	1.545	1.773	1.365	1.002

表 2 乳糖浓度对菌株生长的影响
Table 2 Effect of lactose concentration on strain growth (OD₆₀₀)

菌株 Strains	乳糖浓度 Lactose concentration/g·L ⁻¹				
	5	10	15	20	25
A2	0.085	0.088	0.144	1.832	0.188
A5	0.778	0.832	1.367	1.286	1.261
A6	0.769	0.777	1.047	0.910	0.801

表 3 氮源对菌株生长的影响
Table 3 Effect of nitrogen source on strain growth (OD₆₀₀)

菌株 Strains	氮源 Nitrogen sources					
	蛋白胨 Peptone	硫酸铵 Ammonium sulfate	硝酸铵 Ammonium nitrate	尿素 Urea	硝酸钾 Potassium nitrate	硝酸钠 Sodium nitrate
A2	1.853	0.094	0.102	0.184	0.113	0.106
A5	1.962	0.092	0.109	0.128	0.073	0.082
A6	1.950	0.126	0.131	0.186	0.117	0.114

表 4 蛋白胨浓度对菌株生长的影响
Table 4 Effect of peptone concentration on strain growth (OD₆₀₀)

菌株 Strains	蛋白胨浓度 Peptone concentration/g·L ⁻¹				
	5	10	15	20	25
A2	1.436	2.123	2.078	1.904	1.817
A5	1.843	2.276	2.095	2.058	2.030
A6	1.151	2.205	2.053	2.032	1.959

2.3 pH 值对菌株生长的影响
由表 5 可知,pH 值范围为 5.4~7.0 时,A2 生物量最大,最适生长 pH 值为 6.0,OD₆₀₀ 为 2.039;
A5 和 A6 在 pH 值范围为 5.4~8.0 时,生物量最大,最适生长 pH 值均为 5.4,OD₆₀₀ 分别为 1.941 和 1.832。

表 5 pH 值对菌株生长的影响
Table 5 Effect of pH on strain growth (OD₆₀₀)

菌株 Strains	pH						
	4.4	4.8	5.4	6.0	7.0	8.0	9.0
A2	0.843	1.253	1.772	2.039	1.705	1.689	1.300
A5	0.159	0.282	1.941	1.748	1.742	1.727	1.671
A6	0.152	0.235	1.832	1.785	1.680	1.642	1.604

2.4 温度对菌株生长的影响
由表 6 可知,温度范围从 25~36℃,对 3 株菌生长的影响并不十分显著,A2、A5 和 A6 生长的最
适温度均为 28℃,OD₆₀₀ 分别为 1.993、1.904 和 1.817。

表 6 温度对菌株生长的影响
Table 6 Effect of temperature on strain growth (OD₆₀₀)

菌株 Strains	温度 Temperature/℃				
	21	25	28	31	36
A2	1.328	1.883	1.993	1.917	1.880
A5	1.382	1.711	1.904	1.811	1.749
A6	1.070	1.622	1.817	1.812	1.729

2.5 氯噻磺隆初始浓度对菌株生长的影响
由表 7 可知,氯噻磺隆浓度范围在 0.07~0.5 g·L⁻¹时,对 A2、A5 和 A6 生长抑制作用并不十分显
著,当氯噻磺隆浓度从 0.7 增加至 1 g·L⁻¹时,A2、A5 和 A6 的生物量明显下降。由此可知氯噻磺隆作为降解菌株酶促反应底物浓度不高于 0.5 g·L⁻¹

时,菌株生长及对其去除能力比较强;当其浓度大于 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对菌株生长产生抑制作用。

表 7 氯嘧磺隆初始浓度对菌株生长的影响

Table 7 Effect of chlorimuron-ethyl initial concentration on the strain growth							(OD ₆₀₀)
菌株	氯嘧磺隆初始浓度 Chlorimuron-ethyl initial concentration/g·L ⁻¹						
Strains	0.07	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9	1.0
A2	1.907	1.808	1.802	1.757	1.714	1.580	1.542
A5	1.982	1.875	1.835	1.807	1.787	1.721	1.681
A6	1.942	1.888	1.812	1.761	1.711	1.679	1.666

2.6 菌株生长曲线的测定

如图 1 所示,在培养 12 h 之前,3 株菌株生长均很缓慢,处于适应期,之后进入对数生长期,此期间细菌代谢旺盛,同化作用大于异化作用,细胞分裂速度快。A2 菌 24 h 后进入稳定期,细菌数量增加速度减慢,36 h 细菌数量达到最高值,然后进入衰亡期。A5 菌在 26 h 进入稳定期,菌体数量基本不变,52 h 后进入衰亡期。A6 菌 22 h 后进入稳定期,56 h 后进入衰亡期。

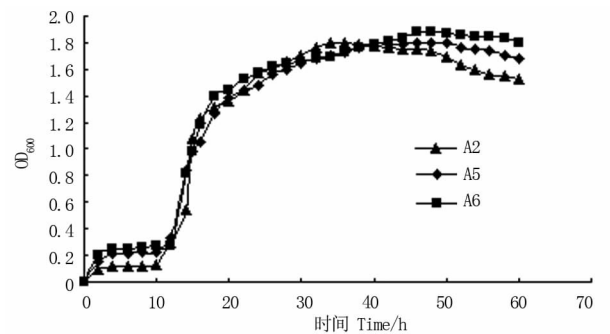


图 1 最适培养条件下菌株生长曲线
Fig.1 The curves of growth of bacterias at optimal condition

3 结 论

乳糖和蛋白胨是这 3 株高效氯嘧磺隆降解菌株生长适宜的碳源和氮源,A2 最适乳糖浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,而 A5 和 A6 最适乳糖浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;最佳蛋白胨浓度均为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;A2 最佳培养 pH 值为 6.0,A5 和 A6 最佳培养 pH 值为 5.4;3 株菌的适宜培养温度均为 28°C 。

通过优化菌株培养条件,菌密度大幅提高,A2、A5 和 A6 最大菌密度(OD₆₀₀)可分别达到 1.802、1.804 和 1.887,最大菌密度分别为野生菌株的 15.5、8.4 和 42.9 倍。优化培养条件后,进一步缩

短了菌株培养时间,提高了研究效率。

参考文献

[1] 马艳军,程苗,乔琦,等. 氯嘧磺隆对大豆根圈土壤 3 种酶活性的影响[J]. 现代农业科学,2009,16(4):1-3. (Ma Y J, Cheng Z, Qiao Q, et al. Effect of chlorimuron-ethyl on three soil enzyme activity in soybean rhizosphere[J]. Modern Agricultural Science, 2009,16(4):1-3,20.)

[2] 陶波,何钟佩. 作保灵(TNA)对大豆保护效应及机制的研究[J]. 大豆科学,2000,19(2):189-192. (Tao B, He Z P. Protective action and mechanism of TNA on soybean[J]. Soybean Science, 2000,19(2):189-192.)

[3] 李丽,谢明,周淑云,等. 氯嘧磺隆高效降解细菌的分离与筛选[J]. 中国生物防治学报,2009,25(1):70-73. (Li L, Xie M, Zhou S Y, et al. Isolation and screening of chlorimuron-ethyl degrading bacteria from soil[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2009,25(1):70-73.)

[4] 朱连丹. 土壤残留氯嘧磺隆降解菌的筛选[D]. 长春:吉林农业大学,2009:11. (Zhu L D. Screening of chlorimuron-ethyl degrading fungi in soil[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2009:11.)

[5] 张希国,张伟,李德斌. 氯嘧磺隆降解菌培养条件的优化[J]. 林业科技情报,2011,43(2):10-12. (Zhang X G, Zhang W, Li D B. Optimization of cultivation conditions of chlorimuron-ethyl degrading bacteria[J]. Forestry Science and Technology Information, 2011,43(2):10-12.)

[6] 欧红香,闫永胜,毛艳丽,等. 1 株高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养条件优化[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):15139-15140,15168. (Ou H X, Yan Y S, Mao Y L, et al. Screening of an efficient producing bacterium of microbial flocculant and optimization on its culture condition[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009,37(31):15139-15140,15168.)

[7] 滕春红. 氯嘧磺隆对土壤微生态的影响及其高效降解真菌的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2006:35. (Teng C H. Effects of chlorimuron-ethyl on the soil microecosystem and research of chlorimuron-ethyl degrading fungi[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2006:35.)