

## 咪唑乙烟酸降解菌 Z 发酵培养基的优化

马 超,胡 超,刘亚光

(东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**采用摇瓶培养法对咪唑乙烟酸降解菌株 Z 的发酵培养基配方进行了研究;并通过单因子试验确定咪唑乙烟酸降解菌株 Z 的碳源、氮源及无机盐,同时应用正交试验设计对发酵培养基组分进行优化。结果表明:优化后确定的发酵培养基的配方为:麦麸皮 1.5%,米糠 2%,豆粕 1.5%,酵母粉 1.5%,NaCl 0.8%, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01%, $\text{MnCl}_2$  0.03%。该研究结果为大规模发酵生产奠定了基础。

**关键词:**咪唑乙烟酸;降解菌;发酵培养基;优化

中图分类号:Q815

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)01-0084-04

## Optimization of Imazethapyr Degradation Bacteria Z Fermentation Medi

MA Chao, HU Chao, LIU Ya-guang

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** The paper studied on the fermentation medium of imazethapyr degradation bacteria Z by shake-flask experiment. The carbon sources, nitrogen sources and inorganic salt of imazethapyr degradation bacteria Z were determined by single ingredient experiment. The factors of fermentation medium were optimized by orthogonal design. The optimal fermentation medium was composed of wheat bran 1.5%, rice bran 2%, soybean meal 1.5%, yeast 1.5%, NaCl 0.8%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01%,  $\text{MnCl}_2$  0.03%, and the optimized results is suitable for large scale fermentation production.

**Key words:** Imazethapyr; Degrading microorganisms; Fermentation medium; Optimization

咪唑乙烟酸(Imazethapyr),是美国氰胺公司于20世纪80年代初研制的咪唑啉酮类性除草剂,主要用于大豆田苗前防除一年生禾本科杂草和阔叶杂草,具有杀草谱广、选择性强、活性高等优点<sup>[1-2]</sup>。其作用方式是抑制乙酰乳酸合成酶(ALS),破坏蛋白质合成,使杂草生长受抑制而死亡。而豆科植物吸收咪唑乙烟酸后,在体内很快被分解,因此是大豆田优良的除草剂<sup>[3-4]</sup>。目前中国主要在东北地区单季大豆田中使用,其中黑龙江省使用量最大,近几年使用量在4 000 t左右<sup>[5-6]</sup>。但咪唑乙烟酸持效期长,残留在土壤中的低量咪唑乙烟酸易对水稻、马铃薯、甜菜等敏感后茬作物产生药害<sup>[7]</sup>,有研究表明,并且土壤表土层以下的咪唑乙烟酸不水解、不挥发,主要通过微生物降解而消失<sup>[8-9]</sup>。目前国内外少见有关降解咪唑乙烟酸微生物筛选及生物降解的研究报道。

针对咪唑乙烟酸长残留问题,采用富集分离的

方法,已经在受咪唑乙烟酸污染的土壤中筛选出一株高效降解咪唑乙烟酸的微生物菌株 Z,并对其降解特性等方面进行了研究<sup>[10]</sup>。现采用摇瓶发酵的方法对降解菌 Z 的发酵培养基进行优化研究,以明确其最优发酵培养基配比,充分发挥菌种的生长潜力,提高降解菌产率,降低发酵成本。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

1.1.1 供试菌种 咪唑乙烟酸降解菌 Z,酸单胞杆菌属(*Acidomonas*),由东北农业大学农学院农药与杂草教研室提供。

1.1.2 供试培养基 斜面培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,pH7.0。种子培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH7.0。初始发酵培养基:葡萄糖 10 g,酵母粉 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,

收稿日期:2009-09-15

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C2007-20);大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目(SB08B03)。

第一作者简介:马超(1985-),男,硕士,研究方向为土壤农药生物修复。E-mail:76251817@163.com。

通讯作者:刘亚光,博士,副教授。E-mail:Liuyaguang@sina.com。

pH7.0。

## 1.2 试验方法

1.2.1 种子液培养方法 从保存菌株的斜面培养基上挑取降解菌株 Z 接种于装有 200 mL 种子培养基的 1 L 三角瓶中,在 30℃,120 r·min<sup>-1</sup> 的摇床中恒温振荡培养 28 h。

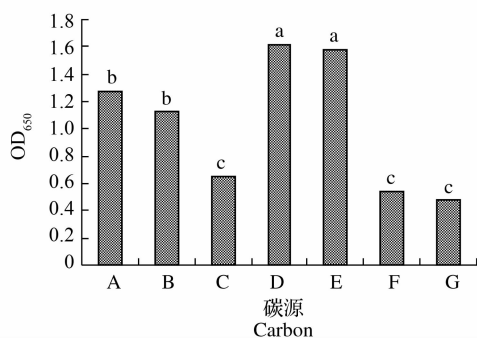
1.2.2 摇瓶发酵培养条件 发酵试验的装瓶量为 250 mL 三角瓶中装入 50 mL 发酵培养基,以 5 % 的接种量接入种子液,在 30℃,120 r·min<sup>-1</sup> 的摇床中恒温振荡培养 30 h。

1.2.3 降解菌生长量的测定方法 以未接种的发酵培养基作对照,采用紫外分光光度计在 650 nm 下比色测定降解菌数量的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同碳源对降解菌生长量的影响

选取葡萄糖(A)、淀粉(B)、玉米面(C)、麦麸皮(D)、米糠(E)、玉米秸秆(F)和大麦粉(G)分别替换初始发酵培养基中的碳源,添加浓度不变,培养基中其它组分不变,按上述摇瓶发酵条件培养,测定降解菌的生长量,比较各种碳源对降解菌生长量的影响,结果见图 1。



小写字母表示 0.05 显著水平。下同。

Different lowercase letters represent significant at 0.05 probability level. The same as below.

图 1 不同碳源对降解菌生长量的影响

Fig. 1 Influence of different carbon sources on the biomass of degrading bacteria

由图 1 可知,菌株 Z 在麦麸和米糠为碳源的培养基中生长量最大,与其它 5 种碳源的生长量相比达到显著差异,其次是葡萄糖、淀粉,而在以玉米面、玉米秸秆和大麦粉为碳源的培养基中 Z 菌的生长量较小。表明降解菌对葡萄糖等的利用能力不高,并且推测菌株水解淀粉能力不强,大量多糖无法被菌体利用从而影响菌体的生长。麦麸和米糠由于价

格低廉并且适于大规模生产,因此选择麦麸和米糠作为发酵培养基的碳源。

### 2.2 不同氮源对降解菌生长量的影响

选取黄豆粉(A)、豆粕(B)、酵母粉(C)、蛋白胨(D)、尿素(E)、NaNO<sub>3</sub>(F)、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(G)和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(H),分别替换初始发酵培养基中的氮源,添加浓度不变,培养基中其它组分不变,对降解菌进行摇瓶发酵培养,测定降解菌的生长量,比较各种氮源对降解菌生长量的影响,结果见图 2。

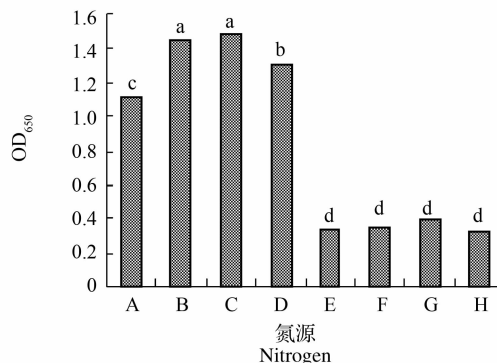


图 2 不同氮源对降解菌生长量的影响

Fig. 2 Influence of different nitrogen sources on the biomass of degrading bacteria

由图 2 可以看出,菌株 Z 在酵母浸粉和豆粕为氮源的培养基中生长量最大,与其它 6 种氮源的生长量相比达显著差异,其次是豆粉,蛋白胨。而在以尿素、NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>和(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>为唯一氮源的培养基到发酵终点时菌体生长量非常小,因此对于该菌株发酵来说,有机氮源远远优于无机氮源。酵母粉和豆粕是工业上常用的氮源,因此选择酵母粉和豆粕配合加入作为发酵培养基的氮源。

### 2.3 不同无机盐对降解菌生长量的影响

选取 ZnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>和 CoCl<sub>2</sub>等无机盐,并设置不同的浓度,分别替换初始发酵培养基中的无机盐,对降解菌进行摇瓶发酵培养,比较不同质量分数的无机盐对降解菌生长的影响,结果见表 1。

从表 1 可以看出,所选 8 种无机盐中,CaCl<sub>2</sub>、FeSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>和 CoCl<sub>2</sub>均抑制降解菌的生长,并且抑制作用随添加质量分数的增加而增强。这些无机盐可能使菌体产生抑制生长物质或因为培养基中的碳氮源中含有大量微量元素无需另外添加。NaCl 随着添加浓度的增加对菌体生长促进作用增强;MnCl<sub>2</sub>和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>在低浓度时促进降解菌 Z 的生长,但在高浓度时却有不同程度的抑制作用。

在所选浓度中,NaCl、MnCl<sub>2</sub>和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>添加质量分 最大。  
数分别为 0.8%、0.02% 和 0.02% 时,菌体生长量

表 1 不同无机盐对降解菌生长量的影响

Table 1 Influence of different inorganic salt on the biomass of degrading bacteria

质量分数 Quality fraction/%	OD <sub>650</sub>							
	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	FeSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	MnCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>
0	1.029 c	1.029 a	1.029 b	1.029 a	1.029 a	1.029 a	1.029 b	1.029 a
0.001					0.994 a	0.895 ab		
0.01					0.826 b	0.841 b	1.302 b	0.576 b
0.02			1.527 a	0.883 b			1.894 a	0.470 b
0.05			0.977 b	0.673 c				
0.07					0.596 c	0.664 c		
0.10	1.209 c	0.787 b	0.922 b	0.377 d			0.477 c	0.280 c
0.40	1.602 b	0.647 c						
0.80	1.852 a	0.270 d						

小写字母表示 0.05 显著水平。

Lowercase letters represent significant at 0.05 probability level.

2.4 正交试验

在发酵培养基单因子试验的基础上,综合考虑各因素对发酵的影响,选取较合适的碳源、氮源和无机盐进行正交试验优化,采用 7 因素 3 水平正交试验设计进一步优化培养基组成,运用 DPS 软件进行统计处理分析,确定最佳培养基组合。正交试验的因素及水平见表 2,正交试验结果见表 3。

通过均值比较可以看出发酵培养基的最优组合为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>F<sub>1</sub>G<sub>3</sub>,即麦麸皮 1.5%,米糠 2%,豆粕 1.5%,酵母粉 1.5%,NaCl 0.8%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01%,MnCl<sub>2</sub> 0.03%。分析极差值的大小得出影

响降解菌生长的因素依次为:豆粕>MnCl<sub>2</sub>>米糠>酵母粉>麦麸>NaCl>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。

表 2 发酵培养基优化的正交试验因素和水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal test for fermentation medium optimization

水平 Level	质量分数 Quality fraction/%						
	麦麸皮 Wheat bran	米糠 Rice bran	豆粕 Soybean meal	酵母粉 Yeast	NaCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MnCl <sub>2</sub>
1	1.5	1.5	1	0.5	0.6	0.01	0.01
2	2.0	2.0	1.5	1.0	0.8	0.02	0.02
3	2.5	2.5	2.0	1.5	1.0	0.03	0.03

表 3 正交试验结果分析

Table 3 Analysis the rsulsts of orthogonal design

试验号 Test number	因素 Factors							OD <sub>650</sub>
	麦麸皮 Wheat bran	米糠 Rice bran	豆粕 Soybean meal	酵母粉 Yeast	NaCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MnCl <sub>2</sub>	
1	1	1	1	1	1	1	1	0.698
2	1	2	2	2	2	2	2	0.820
3	1	3	3	3	3	3	3	0.922
4	2	1	1	2	2	3	3	0.671
5	2	2	2	3	3	1	1	0.832
6	2	3	3	1	1	2	2	0.727
7	3	1	2	1	3	2	3	0.809
8	3	2	3	2	1	3	1	0.781
9	3	3	1	3	2	1	2	0.774
10	1	1	3	3	2	2	1	0.835
11	1	2	1	1	3	3	2	0.751

续表 3

试验号 Test number	因素 Factors							OD <sub>650</sub>
	麦麸皮 Wheat bran	米糠 Rice bran	豆粕 Soybean meal	酵母粉 Yeast	NaCl	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MnCl <sub>2</sub>	
12	1	3	2	2	1	1	3	0.844
13	2	1	2	3	1	3	2	0.810
14	2	2	3	1	2	1	3	0.980
15	2	3	1	2	3	2	1	0.756
16	3	1	3	2	3	1	2	0.634
17	3	2	1	3	1	2	3	0.731
18	3	3	2	1	2	3	1	0.764
k1	0.812	0.743	0.730	0.788	0.765	0.794	0.778	
k2	0.796	0.816	0.813	0.751	0.807	0.780	0.753	
k3	0.749	0.798	0.812	0.817	0.784	0.783	0.826	
R	0.063	0.073	0.083	0.066	0.042	0.014	0.074	

3 结论与讨论

发酵培养基的组成应做到适当丰富和完备,满足菌体迅速生长需要,营养过多或过少都不利于菌体的生长,营养不足会导致菌体提前进入衰亡期,产量减少;营养过多会导致菌代谢途径发生一定的改变,造成底物抑制,不仅生物量减少,同时造成产量减少,对产物的合成有明显的抑制作用。

该试验首先对生产上常使用的碳源、氮源和无机盐进行单因素筛选,从中得出较适合菌体生长的碳源、氮源及无机盐,然后运用正交试验对初筛出的几种因素进行优化。最后确定了咪唑乙烟酸降解菌 Z 的发酵培养基最优组合:麦麸皮 1.5%,米糠 2%,豆粕 1.5%,酵母粉 1.5%,NaCl 0.8%,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01%,MnCl<sub>2</sub> 0.03%。影响菌体生长的因素为豆粕 > MnCl<sub>2</sub> > 米糠 > 酵母粉 > 麦麸 > NaCl > KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>。

参考文献

[1] 王险峰,关成宏,辛明远. 我国长残效除草剂使用概况、问题及对策[J]. 农药,2003,42(11):5-10. (Wang X F, Guan C H, Xin M Y. Long residual herbicides in China- current status, problems and solutions[J]. Pesticides,2003,42(11):5-10. )

[2] 刘延,刘波,王险峰. 中国化学除草问题与对策[J]. 农药,2005,44(7):289-293. (Liu Y, Liu B, Wang X F. Problems and solutions for chemical weed control in china[J]. Pesticides,2005,44(7):289-293. )

[3] 吴春先,吕潇,慕卫,等. 环境条件和微生物对灭线磷降解的影响[J]. 农药学报,2002,4(1):45-51. (Wu C X, Lü X, Mu

W, et al. Effect of environmental conditions and microbes on degradation of ethoprophos in soil[J]. Chinese Journal of Pesticide Science,2002,4(1):45-51. )

[4] 王永杰,李顺鹏,严淑玲. 活性微生物与农药的降解[J]. 中国沼气,1999,17(4):10-13. (Wang Y J, Li S P, Yan S L. The active microbes and the degradation of pesticides[J]. China Biogas, 1999,17(4):10-13. )

[5] Weqiang Zhang, Steven D, Linscombe. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clear field rice to red rice[J]. Euphytica,2006,152:75-86.

[6] 杨小红,李俊,葛诚. 微生物降解农药的研究新进展[J]. 微生物学通报,2003,30(6):93-96. (Yang X H, Li J, Ge C. Novel advances on pesticides degradation by microorganisms[J]. Microbiology,2003,30(6):93-96. )

[7] 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. (Su S Q. The influence on the subsequent crops of long residue herbicides[J]. Pesticides,1998,37(12):4-7. )

[8] 苏少泉. 除草剂在土壤中的降解与使用[J]. 现代农药,2004,3(1):5-8. (Su S Q. Herbicide degradation in soil and application [J]. Modern Agrochemicals,2004,3(1):5-8. )

[9] 王学东,欧晓明,王慧利. 除草剂咪唑乙烟酸高效降解菌的筛选及其降解性能的研究[J]. 农业环境科学学报,2003,22(1):102-105. (Wang X D, Ou X M, Wang H L. Optimized cultivation of highly-ef ficient degradation bacterial strains and their degradation ability towards imazapyr[J]. Journal of Agro- environmental Science,2003,22(1):102-105. )

[10] 刘亚光,马超,庞福德. 降解除草剂咪唑乙烟酸细菌的分离鉴定及生长特性[J]. 东北农业大学学报,2009,40(2):7-12. (Liu Y G, Ma C, Pang F D. Separation identification and growth characters of herbicide imazethapyr degrading- bacteria[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2009,40(2):7-12. )