DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2012.05.001

文章编号:1003-8701(2012)05-0045-03

氯嘧磺隆高效降解菌 2N3 的生长特性研究

张文花[1],王国林[2]

(1. 吉林农业大学资源与环境学院,长春 130118;2. 63850 部队后勤处)

摘 要:本文对氯嘧磺隆高效降解菌 2N3 的生长特性进行了研究。结果表明:供试碳氮源中,葡萄糖为碳源时,5× 10^{-3} g/L 氯嘧磺隆 96 h 时降解完全;蛋白胨为氮源时,氯嘧磺隆 96h 时的降解率仅为 5%,因此葡萄糖为最优碳源;同时在 2N3 最优生长环境正交试验中,当葡萄糖添加浓度 5%,接菌量 1%,氯化钠 0.2%,通气量 100 mL 条件下,培养 18 h 时 2N3 生长量最大。

关键词:2N3;生长特性;正交设计

中图分类号:S154.3 文献标识码:A

Studies on Growth Characteristics of Highly Efficient Degrading Strain 2N3 of Chlorimuron-Ethyl

ZHANG Wen-hua[1], WANG Guo-lin[2]

(1. *College of Resource and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun* 130118;
2. *Logistics Department of* 63850 Army, China)

Abstract: Growth characteristics of the Klebsiellasp. 2N3 strain in chlorimuron-ethyl were examined in the paper. The results showed that when glucose was carbon source, 5 × 10^{-3} g/L chlorimuron-ethyl was degraded completely after 96 hours, while only 5% of chlorimuron-ethyl was degraded when peptone was the nitrogen source. So glucose was the best carbon source. Optimal environment for the growth orthogonal test of 2N3 showed that concentration of glucose was 5%, the inoculate of 2N3 1%, sodium chloride 0.2%, optimal ventilation 100 mL, after inoculating 18 h, OD_{600} was up to 0.8 and growth of 2N3 was the most.

Keywords: 2N3; Growth characteristics; Orthogonal design

氯嘧磺隆(Chlorimuron-ethyl),最早是由美国杜邦公司研制开发的磺酰脲类除草剂[1]。主要用于大豆田防除多种杂草[2]。但由于氯嘧磺隆在土壤中残留时间长,对后茬敏感作物如油菜、甜菜、向日葵以及多种蔬菜等毒害严重,严重影响大豆的轮作换茬,同时对农田环境也造成了污染[3-5]。因此,研究解决氯嘧磺隆残留毒害问题对扩大氯嘧磺隆在大豆田中的应用,减少对后茬作物及环境造成的污染具有重要的理论和实践意义[6]。本文主要是对已筛选的氯嘧磺隆高效降解菌 2N3 进行生长优化,旨在为其生产中大面积推广运用奠定基础。

收稿日期:2012-05-10

作者简介:张文花(1984-),女,硕士研究生,从事环境微生物研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种:2N3(克雷伯氏菌属,*Klebsiellas.sp*)本实验室提供。

试剂:氯嘧磺隆(Chlorimuron-ethyl)原药(97.5%)由沈阳化工研究院提供,甲醇(色谱纯),其它化学试剂均为分析纯。

主要仪器:Agilent1100 型液相色谱仪(美国安捷伦公司),TU-1900 紫外可见分光光度计。

富集培养基(g/L):酵母浸粉 5 g、胰蛋白胨 5 g、NaCl 10 g、蒸馏水 1 L,pH=7。

无机盐液体培养基(g/L):K_2HPO_4 0.5 g、KH_2PO_4 0.5 g、NaCl 0.2 g、$MgSO_4$ 0.2 g、蒸馏水 1 L,碳氮源按

中国知网 https://www.cnki.net

需加入。

备用碳氮源：蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、苯甲酸钠、碳酸钠、硝酸铵、乙酸、蛋白胨。

固体培养基：富集培养中添加琼脂粉 15～20 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 氯嘧磺隆测定：参见文献[5]。

样品处理：取无机盐液体培养基 5 mL，4 000 r/min 高速离心 20 min，取上清液过微孔滤膜(0.45μm 纤维膜)，吸取滤液 1 mL，稀释后过 0.22 μm 纤维膜后待用。

1.2.2 2N3 最优碳氮源筛选

转接 2N3 与富集培养基，30℃、150 r/min 的条件下培养 20 h 至对数期，取适量离心，生理盐水冲洗、过滤备用。逐次取 0.5 g 菌体分别加入含量 5 g/L 蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、苯甲酸钠、碳酸钠、硝酸铵、乙酸，蛋白胨为碳、氮源，氯嘧磺隆添加浓度 5×10^{-3} g/L 的无机盐液体培养基，分别在 0 h、24 h、48 h、96 h 等处取样检测 2N3 OD_{600} 及氯嘧磺隆残留量。

1.2.3 2N3 最佳生长条件正交设计

以葡萄糖、菌体接入量、通气量、氯化钠为考察因素，建立 4 因素 3 水平正交试验模型(表 1)。转接 2N3 与富集培养基，30℃，150 r/min 的条件下培养 20 h 至对数期，取适量离心，生理盐水冲洗、过滤备用。取适量加入正交设计的 9 个处理中，隔 18 h 检测 2N3 OD_{600}。

表 1 各因素水平列表

水平	因素			
	葡萄糖(g/L)	氯化钠(g/L)	接菌量(g/L)	通气量(mL)
1	3	0.1	0.5	50
2	4	0.2	1	100
3	5	0.4	1.5	200

2 结果与讨论

2.1 2N3 在不同碳氮源下生长情况

碳氮源的筛选实验结果见图 1。2N3 在接种 24～72 h 时，葡萄糖为碳源的无机盐培养基中 2N3 处于适应期；蛋白胨与蔗糖所在的培养基中，2N3 进入对数生长期，但蔗糖中 2N3 长势不佳，表明蛋白胨有助于 2N3 适应氯嘧磺隆存在的环境生长；96 h 时，葡萄糖为碳源的培养基中 2N3 进入对数生长期，24 h 后 OD_{600} 可达到蛋白胨培养基中的最大 OD_{600}；麦芽糖也可以被 2N3 利用，但生长周期较长且长势不好，因此，供试碳氮源中，葡萄糖、蛋白胨较适宜 2N3 生长。

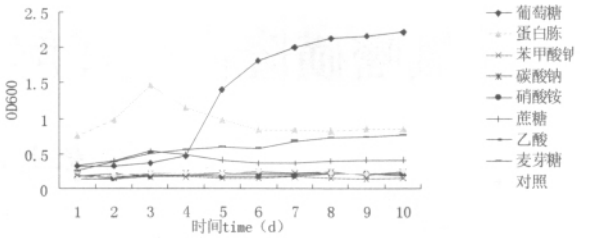

图 1 2N3 在不同碳氮源下生长情况

2.2 2N3 在葡萄糖、蛋白胨培养基中的生长及对氯嘧磺隆的降解

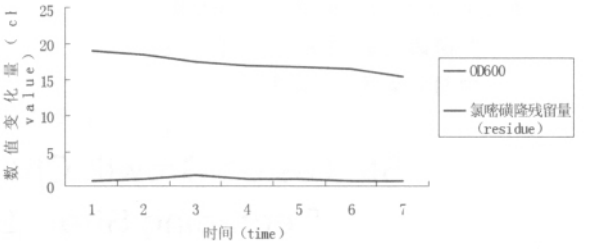

图 2 2N3 在蛋白胨培养基中生长及氯嘧磺隆降解示意图

注：氯嘧磺隆残留量数值为缩小 100 倍后所得数值

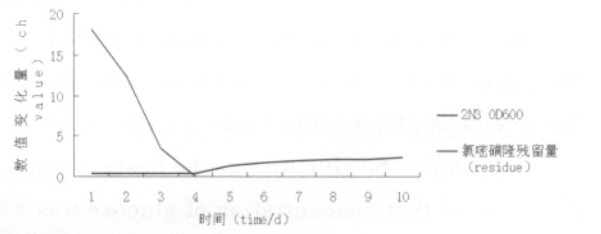

图 3 2N3 在葡萄糖培养基中生长及氯嘧磺隆降解示意图

2N3 在葡萄糖、蛋白胨培养基中对氯嘧磺隆的降解实验结果见图 2、图 3。由图 2 得知，在添加蛋白胨的培养基中，2N3 经历了完整的生长周期，但对氯嘧磺隆的降解效果不明显，仅为对照的 5%；图 3 中，伴随 2N3 生长，氯嘧磺隆残留量逐渐减小，在接入菌体 96 h 后氯嘧磺隆降解完全，此时 2N3 进入对数生长期，因此，葡萄糖的存在加速了氯嘧磺隆的降解，是较优良的碳源。

2.3 正交设计

2N3 最优生长正交设计实验结果见表 2。试验结果表明：在葡萄糖添加浓度 5%、接菌量 1%、氯化钠 0.2%、通气量 100 mL 条件下 2N3 生长最好，18 h OD_{600} 可达 0.8。上述 4 因素对 2N3 生长影响因素大小为：菌体接入量 > 氯化钠浓度 > 通气量 > 葡萄糖百分含量。

中国知网 https://www.cnki.net

表 2　2N3 最优生长环境正交设计

试验序号	葡萄糖(%)	菌体接入量(%)	氯化钠(%)	通气量(mL)	实验结果(平均)OD_{600}
1	1	1	1	1	0.4
2	1	2	2	2	0.6
3	1	3	3	3	0.5
4	1	4	4	4	0.5
5	2	1	2	3	0.3
6	2	2	1	4	0.6
7	2	3	4	1	0.5
8	2	4	3	2	0.2
9	3	1	3	4	0.8
K1	0.5	0.467	0.4	0.5	
K2	0.467	0.367	0.633	0.567	
K3	0.5	0.633	0.433	0.4	
R	0.033	0.266	0.233	0.167	

3　小结与讨论

供试碳氮源中，葡萄糖是促进氯嘧磺隆降解的最优能源，葡萄糖为碳源时，氯嘧磺隆 96 h 时降解完全。2N3 最优生长环境正交试验表明：葡萄糖添加浓度 5%、接菌量 1%、氯化钠 0.2%、通气量 100 mL 条件下 2N3 生长最优，18 h OD_{600} 可达 0.8。在上述条件下，能确保短期内得到 2N3 菌体，为 2N3 工业化生产奠定基础。

参考文献：

[1] 关　靓，赵　敏．氯嘧磺隆高效降解菌的分离、鉴定及其降解特性[J]．东北林业大学学报，2009，6(37)：6-8．

[2] Strek H J．Fate of chlorsulfuron in the environment[J]．Pestic Sci，1998，53：52-70．

[3] 滕春红，陶　波，赵世君．高效降解真菌对大豆田除草剂氯嘧磺隆的降解特性研究[J]．大豆科学，2006，25(1)：58-61．

[4] 王　哲，孙纪全，马吉平，等．氯嘧磺隆降解菌菌株 LW-3 的分离及生物学特性研究 [J]．微生物学学报，2008，35(12)：1899-1904．

[5] 汪佳秀，张祥辉，穆文辉．降解菌 2N3 对被氯嘧磺隆污染土壤的生物修复[J]．农药学学报，2010，12(1)：49-53．

[6] 尤民生，刘　新．农药污染的生物降解与生物修复[J]．生态学杂志，2004，23(1)：73-77．

(上接第 24 页)效果明显高于 JD 改良剂。

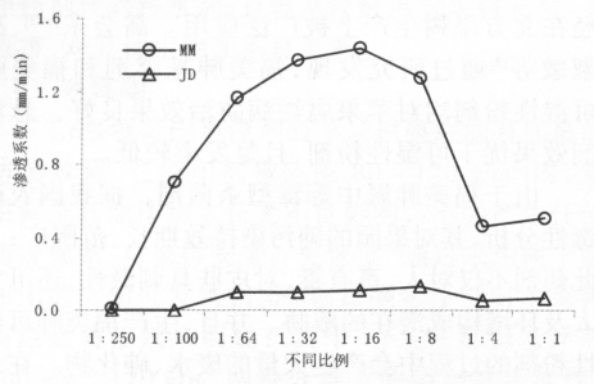

图 3　不同改良剂对表层土渗透系数的影响

3　结论

(1)在不同土层中，MM 改良剂对土壤渗透速度作用大小为：表层＞中层＞下层；JD 改良剂对土壤渗透速度作用大小为：下层＞中层＞表层。

(2)在相同土层中，MM 改良剂的效果明显高于 JD 改良剂。

参考文献：

[1] 王遵亲．中国盐渍土[M]．北京：科学出版社，1993：1-6．

[2] 赵世龙，田奉俊，朴　燕，等．抗病、高产、抗倒水稻新品种通 98-56 选育报告[J]．吉林农业科学，2005，30(1)：32-33．

[3] 俞仁培．碱土的形成与防止 [M]．北京：科学出版社，1982：4-19．

[4] 李　彬，王志春，梁正伟，等．吉林省大安市苏打碱土碱化参数之间的关系[J]．土壤通报，2007，38(3)：443-446．

[5] 李　彬，王志春，马红媛，等．吉林省盐碱地资源与可持续利用对策[J]．吉林农业科学，2005，30(5)：46-50．

中国知网　https://www.cnki.net