

文章编号 :1003-8701(2013)06-0055-03

异噁草酮高效降解菌 W2 摇瓶发酵条件的研究

张金花¹, 韩润亭¹, 马超², 胡超², 刘亚光^{2*}

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所 / 东北作物有害生物综合治理重点实验室, 吉林 公主岭 136100 ;
2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 :本文对异噁草酮的降解菌 W2 菌珠的发酵条件进行研究。通过单因素筛选实验确定降解菌 W2 的摇瓶发酵条件为初始 pH 值 8、摇床转速 180 r/min、摇瓶装液量 25 mL/250 mL、培养温度 25℃, 接种量 10%。

关键词 :异噁草酮 ;降解菌 W2 ;发酵条件

中图分类号 :S482.4

文献标识码 :A

Studies on Fermentation Conditions of the Clomazone Degrading Bacteria W2

ZHANG Jin-hua¹, HAN Run-ting¹, MA Chao², HU Chao², LIU Ya-guang^{2*}

(1. *Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences / Key Lab of Integrated Controlling of Harmful Organisms of Crops in Northeast China, MOA, Gongzhuling 136100;*
2. *College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract: The fermentation conditions of Clomazone degrading bacteria W2 were studied. Determined by single factor screening experiment, W2 shaking flask fermentation conditions was that: initial pH 8, table speed 180 r/min, shaking bottled liquid volume of 25ml/250 ml, culture temperature 25 °C, 10% inoculation amount.

Keywords: Clomazone; W2 degradation bacteria; Fermentation conditions

异噁草酮是美国 FMC 公司于 20 世纪 80 年代中期开发的高效除草剂, 防除一年生禾本科杂草和阔叶杂草, 属于低毒除草剂, 多作为芽前选择性除草剂, 也可用做萌后除莠剂^[1]。其最先用于防除大豆田杂草, 由于其具有高效的除草活性和用量少等突出特点被广泛应用于多种作物田^[2-3]。异噁草酮在土壤中的生物活性可持续 6 个月以上, 施用当年的秋天或次年春天都不宜种植小麦、大麦、燕麦、谷子和苜蓿等作物, 施用后的次年春季, 可

以种植水稻、玉米、棉花、花生和向日葵等作物^[4-5], 其长残留性一直是限制其应用的唯一障碍。目前通过土壤富集的方法在长期施用过异噁草酮的土壤中成功分离出能够高效降解异噁草酮的降解菌 W2 为短杆菌属(*Brevibacterium. sp.*), 木糖氧化亚种, 并对其降解特性、对土壤的修复能力等方面进行了研究^[6]。本文对降解菌 W2 的摇瓶发酵条件进行了研究, 为降解菌扩大生产提供理论依据, 从而延长此农药的使用寿命。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

W2 为短杆菌属(*Brevibacterium. sp.*), 木糖氧化亚种, 东北农大农学院农药室保存。

1.1.2 培 养 基

种子培养基 :牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5

收稿日期 :2013-05-14

基金项目 :吉林省农科院植物保护研究所青年科研基金项目 (zbs2010-06); 黑龙江省高校重点实验室开放基金项目 (GXSO8-3); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (11521017)

作者简介 :张金花 (1978-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水稻病害及农药微生物降解的研究。

通讯作者 :刘亚光, 女, 博士, 教授, E-mail: liuyaguang@sina.com

g 蒸馏水 1 000 mL ,pH 7.0。

最优发酵培养基：葡萄糖 1.5% , 酵母粉 0.25% , 淀粉 0.8% , 豆粕 1% , $\text{FeSO}_4 \cdot 0.01\%$, $\text{MnCl}_2 \cdot 0.01\%$, $\text{CaCl}_2 \cdot 0.1\%$ 。

1.2 方法

1.2.1 降解菌 W2 发酵条件的优化

分别选取不同的接种量 (1% , 3% , 5% , 10% , 15% , 20%) ;不同的温度 (25℃ , 30℃ , 35℃ , 37℃) ;不同的装液量 25 mL , 50 mL , 75 mL , 100 mL ;不同的初始 pH (用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将发酵培养基分别调至 5 , 5.5 , 6.0 , 6.5 , 7.0 , 7.5 和 8.0) ;不同的摇床转数 (90 r/min , 120 r/min , 150 r/min , 180 r/min , 210 r/min) , 在 30℃ , 120 r/min 的摇床中恒温培养 , 培养时间以最佳种龄为准 , 以未接种的发酵培养基作对照 , 在 650 nm 下比色测定 , 考察不同发酵条件对降解菌生长量的影响。

1.2.2 降解菌生长量的测定方法

本试验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。

1.2.3 发酵后活菌量的测定方法

以细菌数衡量各因素对降解菌株发酵的影响 , 利用稀释平板法测发酵液中有效活菌数。

1.2.4 酸度的测定

采用 S-3 型酸度计 , 每次使用前用 pH6.8 标准缓冲液校正。

2 结果与分析

2.1 发酵条件的优化

2.1.1 种龄对降解菌生长量的影响

从图 1 中可以得出当种龄在 32 h 前随着种龄的增长降解菌生长量不断增加 , 当种龄超过 32 h 时菌体生长量又开始下降 , 此时的菌体生长量达到最大值 1.19 , 且种龄为 32 h 时的菌体生长量与其他种龄的菌体生长量间差异显著。因此确定 W2 菌最佳种龄为 32 h。

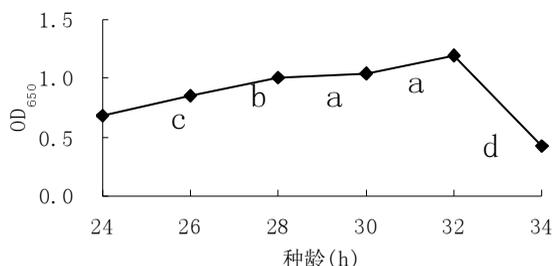


图 1 种龄对降解菌生长量的影响

2.1.2 接种量对降解菌生长量的影响

降解菌 W2 在接种量为 10% , 15% , 20% 处理间无显著差异 , 但在接种量为 10% 时菌体生长量 OD_{650} 达到最大值 1.02。因此 , 可确定最佳接种量为 10%。

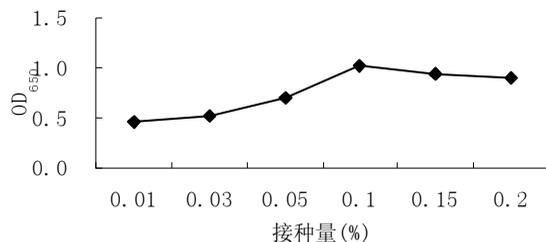


图 2 接种量对降解菌生长量的影响

2.1.3 培养温度对降解菌生长量的影响

图 3 表明降解菌 W2 的生长量随着温度的升高菌体生长量逐渐下降 , 可见高温下不适合 W2 菌株的生长 , 方差分析结果表明 , 培养温度为 25℃ 处理与其他处理有明显差异 , 此时降解菌 W2 的生长量 OD_{650} 达到最大值 0.869 , 以此确定降解菌 W2 最佳培养温度为 25℃。

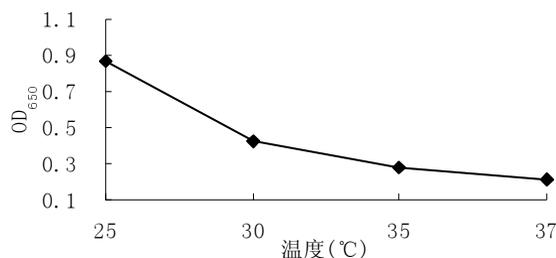


图 3 培养温度对降解菌生长量的影响

2.1.4 摇瓶装液量对降解菌生长量的影响

从图 4 可以看出 , 随着摇瓶装液量增加 , 菌体生长量逐渐降低 , 在摇瓶装液量为 25 mL 时菌体生长量最大。说明菌体的生长对溶氧有一定的要求 , 过大不利于菌体生长。结合方差分析结果表明 , 摇瓶装液量为 25 mL 处理与其他处理间差异显著。

2.1.5 培养基的初始 pH 值对降解菌生长量的影响

从图 5 可以看出 , 初始 pH 值为 8 时 , 发酵终点时菌体生长量明显高于其他水平。经方差分析可知初始 pH 值为 8 时与其他处理相比差异显著 , 可见降解菌 W2 适宜在偏碱性培养基中生长 , 适宜在碱性较强的培养基中生长 , 初始 pH 值为 8.0 时降解菌 W2 的生长量 OD_{650} 达到最大值为 0.605 , 在本试验中没有对 W2 菌的 pH 值增设高于 8.0 的浓度 , 分析上述试验结果 W2 菌在高于 8.0 的培养基中可能生长更好 , 本次试验只能确定降解菌 W2 发酵培养基的初始 pH 值为 8.0。

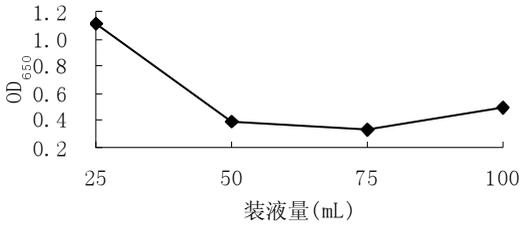


图 4 摇瓶装液量对降解菌生长量的影响

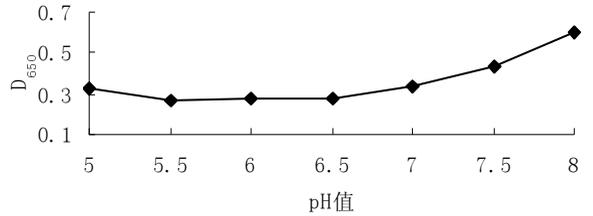


图 5 培养基的初始 pH 值对降解菌生长量的影响

2.1.6 摇床转数对降解菌生长量的影响

图 6 中可以看出,降解菌 W2 生长量随着摇床转速的增加先升高后降低,在转速为 180 r/min 时菌体生长量达到最大值,方差分析得知转速为 180 r/min 处理与其他处理间菌体生长量有显著差异,摇床转速为 180 r/min 时降解菌 W2 的生长量 OD₆₅₀ 达到最大为 0.753,所以选择 180 r/min 为降解菌 W2 摇瓶发酵的摇床转速。

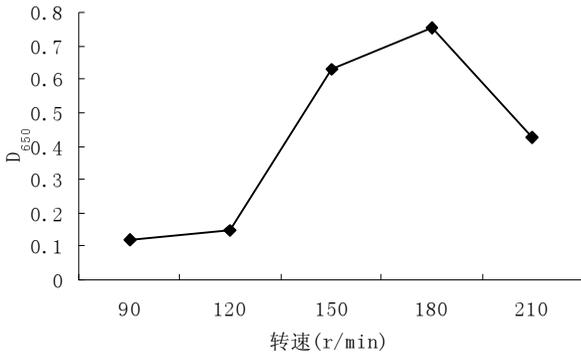


图 6 不同摇床转数对降解菌生长量的影响

2.1.7 发酵过程代谢曲线

从图 7 W2 菌代谢曲线中可以看出,将种子液转入发酵培养基后能很快就进入对数生长期。0~32 h 为对数生长阶段,在此阶段 pH 值先是迅速下降,从初始的 7.303 下降到 5.79 左右,此后 pH 值逐渐上升,说明菌体在此阶段快速生长产生酸性代谢物,而培养基的调节作用使其稳定到一定范围。

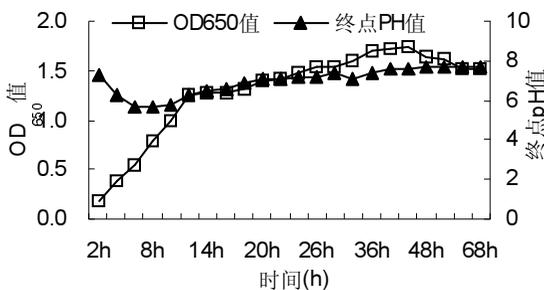


图 7 降解菌代谢曲线

32~48 h 为稳定生长期,菌体生长量没有明显变化,OD₆₅₀ 值均达到了 1.5 以上,并且在 48 h 时菌体生长量 OD₆₅₀ 达到了最大值为 1.634,而后有所下降,可能因为菌体数量已达到最大值而生长受到抑制所致,而此时发酵液 pH 值开始逐渐升高。56~68 h 为菌体自溶期,自溶开始,生物量有所减少,pH 值逐渐升高。综上所述,判断发酵终点为 48 h,终点 pH 值为 7.65。

2.2 最优条件下发酵液中菌体的活菌数

经优化后的发酵液中菌株的有效活菌数均大幅度增加,其中 W2 菌株的最优发酵培养的活菌数高达 9.3×10^{11} cfu/mL。

表 1 发酵液中菌体的活菌数与种子液中活菌数

菌株	种子液中活菌数 (cfu/mL)	发酵液中活菌数 (cfu/mL)	发酵终点 pH
W2	2.65×10^{10}	9.3×10^{11}	7.65

3 结 论

通过试验降解菌 W2 的摇瓶发酵条件为种龄 32 h、初始 pH 值 8、摇床转速 180 r/min、摇瓶装液量 25 mL/250 mL、培养温度 25℃,接种量 10%。

参考文献:

- [1] Macleod, I, L. The use of clomazone as a postemergence herbicide in poppies (*Papaver somniferum*), Weeds, 1997(61): 1457.
- [2] Renner, Karen A. Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) control in sugarbeet (*Beta vulgaris*)[J]. Weed Technol, 1991, 5(1): 97-102.
- [3] Semidey, Nelson. Clomazone and oxyfluorfen for weed control in transplanted cabbage (*Brassica oleracea* L.) [J]. Agric. Univ. P. R., 1997, 81(3-4): 203-210.
- [4] 秦宜哲,刘清瑞. 化学除草技术问答[M]. 郑州:河南科学技术出版社, 1995: 18-19.
- [5] 张金艳,曲虹云. 抑制光合作用除草剂的生物测定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2000, 12(3): 19-25.
- [6] 刘亚光,闫春秀,赵滨. 降解除草剂异噁草酮细菌的分离、鉴定及生长特性[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(3): 328-332.