

氯磺隆降解优势菌的筛选固定化及特性研究

李军红¹, 颜 慧², 宋文华³

(1. 深圳市环境科学研究所, 广东 深圳 518001; 2. 中国军事医学院, 北京 100580; 3. 天津理工学院, 天津 300003)

摘要:选择典型磺酰脲类化合物——氯磺隆作为作用对象,筛选出氯磺隆的降解优势菌系并考察了其降解能力。利用海藻酸钠包埋法将细胞固定化,考察了温度、pH 值和底物浓度等因素对游离和固定状态下优势菌系降解作用的影响。结果表明,固定化细胞对环境适应性强。

关键词:氯磺隆; 降解优势菌; 固定化细胞

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1672-2043(2004)05-985-04

Screening, Immobilization and Characters Studying on the Superior Microorganisms Strains for Degradation of Chlorsulfuron

LI Jun-hong¹, YAN Hui², SONG Wen-hua³

(1. Shenzhen Institute of Environmental Science, Shenzhen 518001, China; 2. Academy of Military Medical Science, Beijing 100580, China; 3. Tianjin Institute of Technology, Tianjin 300003, China)

Abstract: The environmental problem resulting from the residue of Chlorsulfuron – the first breed of Sulfonylurea herbicides has caught more attention now. By using Chlorsulfuron as the typical target and calculating the concentration of Chlorsulfuron using the root length of maize that grew in the Chlorsulfuron solution, the superior strains for degrading Chlorsulfuron were screened from sewage treatment plant sludge that had been domesticated under the pressure of Chlorsulfuron for thirty days, and their degradation characters were also studied. The temperature parameter had more impact on the degradation than the substrate concentration parameter had. The bacteria were immobilized using sodium alginate as embedding material. The degradation effect differences between the dissociated and immobilized bacteria were observed under different temperatures, pH and substrate concentrations. The results suggested that the superior strains had better degradation for Chlorsulfuron, immobilized cell had larger ranges in pH and temperature with quite fast degradation speed than the dissociated bacteria. The optimal temperature parameters for the dissociated and immobilized bacteria were both 35 °C, while the pH parameter was different, 7 and 6, respectively.

Keywords: Chlorsulfuron; superior strain; immobilized bacteria

氯磺隆(Chlorsulfuron),又名绿黄隆,是杜邦公司开发的第一个磺酰脲类除草剂品种,自从1980年底引进到国内后,在磺酰脲类除草剂中使用量最大。它适用于小麦、亚麻、大麦等作物的田间除草,能有效防除多种阔叶杂草和部分禾本科杂草,并且对麦类作物具有很高的选择性和安全性。而近些年的研究表明,在同类除草剂中,氯磺隆的残留期长达2~3 a,对于一些敏感作物,极微量的残留也会造成药害,如土壤中的残留量为0.1 μg·kg⁻¹时会对甜菜产生危害,残留量为1 μg·kg⁻¹会使大豆、水稻、高粱、油菜等作物

受损。氯磺隆残留所引起的环境问题已经引起了广泛的重视。

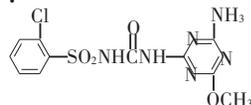
本文拟筛选出氯磺隆的降解优势菌,并对其基本生理和降解特性进行研究。在此基础上比较了固定化细胞和游离状态下菌种降解能力对环境的适应情况。

1 试验部分

1.1 试剂

氯磺隆,纯度95.4%,江苏常隆化工厂出品。

其结构式为:



收稿日期: 2004-02-10

作者简介: 李军红(1976—),女,工学硕士,目前从事环境工程方面的研究工作。E-mail: lijunhong@eyou.com

海藻酸钠, 化学纯。

其他化学试剂均为市售分析纯

1.2 菌种筛选及驯化方法

将取自污水处理厂的活性污泥置于烧杯中(总体积 1 000 mL), 搅拌 2 h 后排出 200 mL 混合液, 静置澄清, 吸出约 500 mL 上清液, 加入 500 mg 葡萄糖, 500 mg 蛋白胨, 25 mL $0.0667 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液, 1 mL 氯磺隆 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 之后用自来水将总体积补充至 1 000 mL, 继续搅拌, 至第 2 d 重复上述操作, 整个驯化时间为 30 d。

1.3 氯磺隆浓度测定方法

参照东北农业大学农药学教研室生测方法, 采用水培玉米主根长测定方法: 将浓度范围在 $0 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯磺隆溶液 20 mL 倒入底部已铺好 4 层纱布的培养皿中, 在培养皿中均匀放置大小相似、形状饱满的玉米种子, 然后于恒温培养箱中 $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 5 d, 测定玉米根长。然后将玉米根长数据带入氯磺隆标准曲线, 计算氯磺隆的浓度。

1.4 菌团降解能力的确定

反应体系总体积为 200 mL, 菌团以 $0.0667 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0 的磷酸缓冲液悬浮, 细胞浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (其中细胞重量以菌团湿重计, 下同), 加入氯磺隆贮备液至终浓度 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育并低速振荡, 每隔一定时间取样, 以生物测定法——玉米主根长法测定体系中氯磺隆的浓度。阳性对照为未经驯化的活性污泥菌团, 阴性对照添加物为灭菌土壤提取液, 其他组分相同。

取样时, 每次取样 1.5 mL, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 吸取上清液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 滤液为测试样品液, 样品液可立即测定或 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。由于玉米根对氯磺隆十分敏感, 样品在用于培养根时需要稀释至氯磺隆浓度约在 $0 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内。

1.5 固定化降解菌团的制备与降解能力的测定

将 2% 海藻酸钠与已知菌团浓度的驯化液以一定比例混合, 混合液匀速滴入静置的 5% CaCl_2 溶液中, 固化 1 h 后漏斗过滤, 收集小球, 以无菌水洗 2 次后保存在灭菌的袋中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 贮存备用。反应体系体积为 200 mL, 加入一定量固定化小球, 使包埋细胞量为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 其他测定条件同 1.4。

1.6 环境因素对游离态及固定化细胞降解作用的影响

1.6.1 温度对氯磺隆降解的影响

反应体系如 1.4。其中测试样 1 中添加一定量的

驯化液, 使菌团浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 测试样 2 中添加一定量固定化细胞, 使包埋细胞量为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个测试样作 2 个平行, 将反应液分别置于 $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下低速振荡, 每隔一定时间取样, 玉米根长法检测氯磺隆含量, 计算氯磺隆含量百分比。

1.6.2 pH 对氯磺隆降解的影响

如 1.6.1 所述方法配制反应液, 测试温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 体系 pH 值分别为 5、6、7、8, 其他测试条件同 1.6.1, 每隔一定时间取样检测氯磺隆残留量, 计算氯磺隆含量百分比。

1.6.3 底物浓度对氯磺隆降解的影响

反应体系如 1.4, 分别加入降解菌团及固定化菌, 菌团浓度均为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 测试温度为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 体系 pH 值为 7, 氯磺隆的初始浓度分别为 25、50、100、200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其他测试条件同 1.6.1, 每隔一定时间取样检测氯磺隆的残留量, 计算氯磺隆含量百分比。

2 结果与讨论

2.1 玉米根长抑制率与氯磺隆剂量关系的确定

玉米根的生长对环境中氯磺隆的浓度很敏感, 所以根据玉米种子的根长可以推算出环境中氯磺隆的浓度。测定种子根长, 求得每个浓度下玉米根的平均长度, 数据列于表 1。

表 1 玉米主根长与氯磺隆剂量的关系

Table 1 The relationship between the corn taproot length and the concentration of Chlorsulfuron

浓度(Y)/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	主根长(X)/cm	根长抑制率/%	$\ln X$
0	5.4	0	1.686 399
0.1	4.6	14.8	1.526 1
0.3	3.9	27.8	1.361
0.75	3.1	42.6	1.131 402
1.5	1.5	72.2	0.405 5
3	0.83	84.6	-0.186 3
5	0.2	96.3	-1.60 9

计算得到浓度 - 根长的关系式:

$$Y = 2.478 71 - 1.561 78 \ln X$$

相关系数 $r^2 = 0.9900$

由此可见, 在 $0 \sim 5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围, 氯磺隆浓度与玉米主根长之间有很好的剂量 - 反应关系, 可以用于环境中氯磺隆残留量的测定。

2.2 驯化菌团降解能力的测定

在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0 的条件下, 如 1.4 所述测试条件, 利用所驯化的菌团对氯磺隆进行了降解试验, 并进行对照, 结果如图 1 所示。

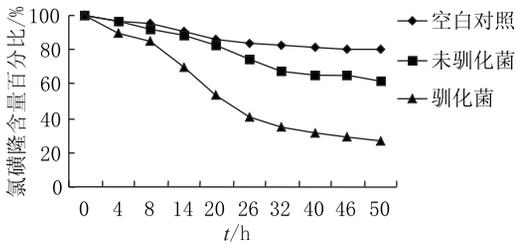


图 1 驯化菌团降解能力的测定

Figure 1 Measurements on degradation ability of domesticated strains

从图中数据可见,空白对照的氯磺隆在测试过程的初始阶段也有一定程度的消除,这主要是化学水解的作用,未驯化菌对氯磺隆的生物降解相当有限,经过驯化后的菌团具有良好的去除氯磺隆的能力,表明菌团对于氯磺隆的去除能力是诱导性的。

2.3 降解菌团的固定化

2% 海藻酸钠溶液与降解菌团以 15: 1 的配比混合后,制成小球,小球形状如图 2 所示。计算包埋细胞量为 $14.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 小球。

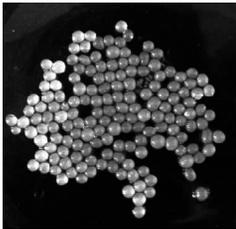


图 2 固定化小球外观图

Figure 2 Appearance of immobilized bacteria

2.4 环境因素对游离驯化菌及固定化细胞的影响

2.4.1 温度的影响

按 1.6.1 所述试验方法,改变反应体系温度,测定不同温度下游离驯化菌及固定化细胞对氯磺隆的去除情况,结果如图 3、图 4 所示。

结果表明,在进行测试的 $5^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 温度范围内,随着温度的升高,各测试样对氯磺隆的去除率均有不同程度的提高。而与游离细胞相比,固定化细胞受温度变化的影响较小,如游离细胞作用 50 h 后在 5

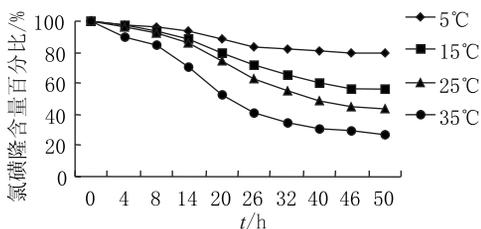


图 3 温度对游离驯化菌降解氯磺隆的影响

Figure 3 Influence of temperature on the Chlorsulfuron degrading effect of dissociated strains

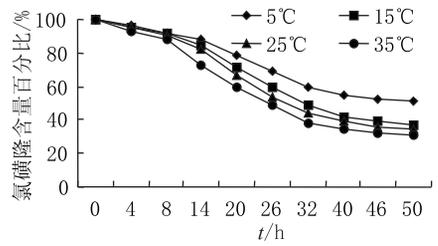


图 4 温度对固定化细胞降解氯磺隆的影响

Figure 4 Influence of temperature on the Chlorsulfuron degrading effect of immobilized bacteria

$^\circ\text{C}$ 下还残留 80%, 35°C 下仅残留 27%, 而固定化细胞的变化就小了许多,分别对应为 51% 和 31%, 表明细胞一经固定化后,对温度变化的耐受性增强。

2.4.2 pH 的影响

在 35°C 条件下,改变反应体系的 pH 值,测定不同反应体系对氯磺隆的降解情况,结果如图 5、图 6 所示。

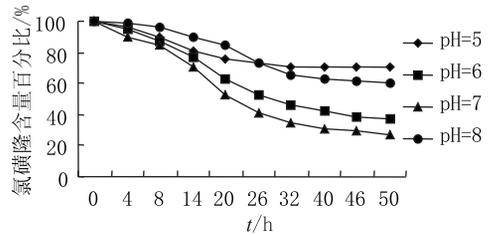


图 5 pH 对游离驯化菌降解氯磺隆的影响

Figure 5 Influence of pH on the Chlorsulfuron degrading effect of dissociated strains

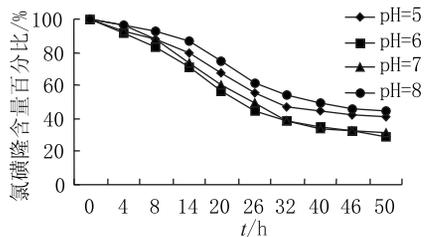


图 6 pH 对固定化细胞降解氯磺隆的影响

Figure 6 Influence of pH on the Chlorsulfuron degrading effect of immobilized bacteria

由图中数据可看出对于环境酸碱度的变化,固定化菌团表现出良好的稳定性,在反应 50 h 后其变化幅度仅为 15%, 而游离菌在四个梯度的 pH 下变化幅度为 43%。

2.4.3 底物浓度的影响

在 35°C , pH7 的条件下,改变反应体系中氯磺隆的含量,考察驯化菌团在游离和固定化两种存在形式下对不同浓度氯磺隆的降解情况,结果如图 7、图 8 所示。

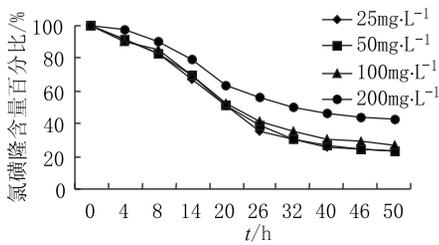


图7 底物浓度对游离驯化菌降解氯磺隆的影响

Figure 7 Influence of substrate concentrations on the Chlorsulfuron degrading effect of dissociated strains

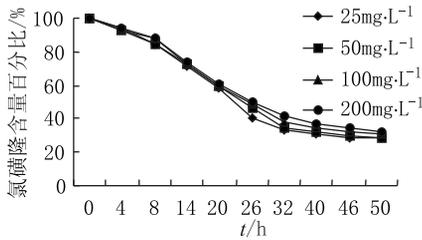


图8 底物浓度对固定化细胞降解氯磺隆的影响

Figure 8 Influence of substrate concentrations on the Chlorsulfuron degrading effect of immobilized strains

试验数据显示,氯磺隆初始浓度在 $25 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内,其高低对于菌株的降解速度的影响没有显著差异,但当其初始浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,游离菌对其降解效果要明显降低,这时,固定化菌团降解效果要优于游离菌团。

3 结论

(1) 对取自污水处理厂的活性污泥驯化 30 d 后,测定菌团对氯磺隆的去除能力,结果表明来自污水处理厂的活性污泥菌团,经一定时间驯化后,具有了较

高的降解氯磺隆的活性。

(2) 考察了温度、pH 值及底物浓度对驯化菌团去除氯磺隆的影响,结果表明温度变化对菌团的影响最大,底物浓度的变化几乎不对菌团有影响作用,驯化菌团最适的作用条件为: $35 \text{ }^\circ\text{C}$, pH7。

(3) 驯化菌团固定化后,对于温度及酸碱度变化的耐受性提高,其最适作用条件为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, pH6; 在 $5 \text{ }^\circ\text{C} \sim 35 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 pH 为 $5 \sim 8$ 时均有较高的降解率。

参考文献:

- [1] 魏东斌, 张爱茜. 磺酰脲类除草剂研究进展[J]. 环境科学进展, 1999, 7(5): 34 - 42.
- [2] Madan M Joshi, Hugh M Brown, and James A Romesser. Degradation of Chlorsulfuron by Soil Microorganisms[J]. *Weed Science*, 1985, 33: 888 - 893.
- [3] 周景恺, 苏少泉. 氯黄隆在土壤中降解的研究[J]. 农药译丛, 1997, 19: 381 - 386.
- [4] 陈祖义, 等. 氯黄隆在土壤中迁移特性[J]. 南京农业大学学报, 1994, 17(3): 121 - 127.
- [5] Allan Walker and Pauline A Brown. Measurement and Prediction of Chlorsulfuron Persistence in Soil, Environ[J]. *Contam Toxicol*, 1983, 30: 365 - 372.
- [6] Bickerstaff GF. Immobilization of enzymes and cells. Immobilization of enzymes and cells. Ed. by Gordon F Bickerstaff, Human Press. 1997.
- [7] Richins R D, Mulchandani A, Chen W. Expression, immobilization, and enzymatic characterization of cellulose - binding domain - organophosphorus hydrolase fusion enzymes[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 69(6): 591 - 596.
- [8] 蔡立. 土壤中氯黄隆残留量生物测定方法[J]. 农村生态环境(学报), 1995, 11(1): 22 - 25.
- [9] 姚东瑞, 宋晓玲, 等. 土壤中氯黄隆残留的生物测试现状与展望[J]. 杂草科学, 1995, 3: 2 - 6.