

乐果降解酶产生菌的筛选及产酶条件的优化

刘芳, 钟英长

中山大学生命科学院, 广东广州 $B\tau\alpha\gamma\Delta B\rho$

摘要 H 采用室内培养实验方法, 从农药长期污染的土样中分离到一株铜绿假单胞菌 $o\ \phi\tau\sigma^9\ \rho^3\ 1\ 3\ 2\ \xi^7$ $\xi\sigma^6\ 9\ \upsilon\chi^2\ 3\ 7\ \xi\ \rho\ \phi - x\ s$ 该菌株可以利用乐果为唯一碳源和能源进行生长, 生长的最适 Φ 为 $\Delta\alpha\omega\sim\Delta\iota B s$ 最适温度为 $z\omega\sim z B\ C$ 。在组分为 $\omega\iota\epsilon\ %$ 蛋白胨 $s\omega\iota\epsilon B\ %$ 牛肉膏 $s\omega\iota\epsilon B\ %$ 乐果 $s\omega\iota B\ %$ $\partial\ \xi\ \Pi$ 的培养基中摇床 $\upsilon z B\ C\ s\ x\ B\omega^6\ \upsilon\ \chi^2\ \rho$ 培养 $y\ A\ \phi\ s$ 可产生最高的乐果降解酶活性, 达到约 $E^6\ \upsilon\ 1\ \partial$ 。

关键词 H 乐果; 降解酶; 假单胞菌

中图分类号 $H\ A E\ y\ \iota\ \epsilon\ z$ **文献标识码** $H E$ **文章编号** $H\ \tau\alpha\omega - \omega\gamma\ \Gamma\Delta\ \gamma\alpha\alpha\phi\ \rho\ \Gamma - \iota\ \epsilon\ z\ \Gamma - \iota\ \omega$

有机磷农药是我国目前农业生产上使用的主要农药品种, 近年来, 由于大规模施用化学农药所带来的环境问题日益明显^[1]。特别是在田间机械化施药时, 因器械清洗和剩余药液而产生大量低浓度的农药废水, 如不加处理则严重污染水体。但这些废水分散于各个农场, 处理困难。生物处理设备简单而去毒效果较为彻底, 很适用于农药废水的分散就地处理, 通过研究降解微生物菌株的筛选诱变及基因工程技术建立新菌株, 或者通过降解酶系统及固定化酶技术, 为处理农药废水提供更有效的手段^[2]。乐果属于二硫代磷酸酯, 是使用较多而较难降解的有机磷农药品种之一, 我们筛选了能产生乐果降解酶的菌株, 并对其产酶条件进行了研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 菌种的筛选

从广州农药厂附近受农药长期污染的土壤中采取土样, 加入乐果无机盐培养基中, 在 $z\omega\ C$ 摇床 $\upsilon x\ B\omega^6\ \upsilon\ 1\ \chi^2\ \rho$ 中培养 $\Delta\ \rho$, 再转入新鲜无机盐培养基中继续培养, 连续转接富集 A 次。将最后一次富集培养液取样进行梯度稀释, 涂布于乐果无机盐琼脂平板, 于恒温箱中培养, 待长出菌落后, 挑取单菌落连续划线纯化 z 次, 获得初筛菌株。将初筛菌株接种于含 $\omega\iota\epsilon\ %$ 乐果的发酵培养基中, 在 $z\tau\omega\ C$ 摇床 $\upsilon x\ B\omega^6\ \upsilon\ 1\ \chi^2\ \rho$ 培养 $y\ A\ \phi$, 取样测定各菌株的生长量和发酵液的酶活力, 以生长最好, 酶活力最高者为实验菌株。

1.2 主要培养基

(x) 乐果无机盐培养基 $H\ \Omega\ \Pi\ \tau\omega\iota B\ \upsilon\ \epsilon\ \upsilon\ s\ \phi\ A\ \tau\omega\iota B\ \upsilon\ \iota\ \epsilon\ \Pi\ \gamma\ \tau\omega\iota\ \upsilon\ \epsilon\ 2\ s\ \phi\ A\ \tau\omega\iota\ \epsilon\ \omega\ \upsilon\ \Phi\ \gamma\ \phi\ x\ \tau\alpha\alpha\ \upsilon\ 1\ \partial\ ,\ \Phi$

$\Delta\alpha\omega$, 灭菌后再添加 $\omega\iota\epsilon\ %$ 乐果作为唯一碳源, 如为固体平板则需加入 $y\ %$ 琼脂。(y) 牛肉膏蛋白胨培养基 H 蛋白胨 $x\ \omega\ \upsilon$ 、牛肉膏 $B\ \upsilon$ 、 $\partial\ \xi\ \Pi\ B\ \upsilon$ 、 $\Phi\ \gamma\ \phi\ x\ \tau\alpha\alpha\ \upsilon\ 1\ \partial\ ,\ \Phi\ \Delta\alpha\omega$ 。 $o\ z\ \rho$ 发酵产酶培养基 H 蛋白胨 $z\ \upsilon$ 、牛肉膏 $\omega\iota\epsilon B\ \upsilon$ 、 $\partial\ \xi\ \Pi\ B\ \upsilon$ 、 $\Phi\ \gamma\ \phi\ x\ \tau\alpha\alpha\ \upsilon\ 1\ \partial\ ,\ \Phi\ \Delta\alpha\omega$, 灭菌后再添加一定浓度的乐果作为产酶诱导物, 如为固体培养基则再添加 $y\ %$ 琼脂。 $o\ A\ \rho$ 鉴定培养基 H 参阅文献 $\iota\ \epsilon\ \kappa$ 配制。

1.3 菌体生长量的测定

将发酵液进行 $x : A$ 稀释后, 测定 $\Gamma\alpha\omega^2\ 1$ 处吸收值, 以 $E\ \Gamma\alpha\omega$ 表示。

1.4 磷的测定方法 参阅文献 $\iota\ \epsilon\ \kappa$ 测定。

$x\ \iota\ B$ 酶活力测定 将 $\omega\iota\epsilon B\ 1\ \partial$ 、 $B\omega\iota\ 1\ 3\ 0\ \upsilon\ \partial\ \alpha\ \phi\ \chi^4\ (\Phi\ E\ \iota\ \omega)$ 缓冲液, 其中含有 $\omega\iota\epsilon B\ %$ 乐果作为底物, 于 $\Gamma\omega\ C$ 预热 $x\ \omega\ 1\ \chi^2$, 然后加入酶液 $\omega\iota\epsilon\ 1\ \partial$, 迅速混匀, 精确反应 $x\ B\ 1\ \chi^2$, 以 $\omega\iota\epsilon\ 1\ \partial\ \omega\iota\epsilon\ 1\ 3\ 0\ \upsilon\ \partial\ \Phi\ \Pi$ 终止反应, 测定反应体系中产生的无机磷含量。以终止反应后加入酶液的试管为对照。酶活力单位的定义: 在上述反应条件下, 每催化反应生成 $x\ \mu\ \upsilon$ 无机磷所需酶量为 x 个活力单位。

2 实验结果

2.1 菌种的筛选结果

2.1.1 初筛结果

从土壤中分离筛选, 在选择平板上获得细菌 xz 株, 经摇瓶复筛, 获得细菌 Δ 株, 各菌株在摇瓶发酵时的生长量和产酶活力见表 x 。尽管其中 $xx\ \chi\ y\ \gamma\ y\ \gamma\ z$ 号菌株生长量也较高, 但检测其发酵上清酶活力并不高, 估计这几号菌株对乐果有一定的耐受力, 而 xz 、

O-z 号菌株的生长量较低，并且未能测出降解酶活力。最后，选取在含乐果的培养基上生长良好，并且具有最高酶活力的φ-x 菌株作为实验菌株。

表x 菌株的复筛结果

菌株编号	生长量 $\Sigma \Gamma \alpha \varphi$	酶活力 $\rho^{\circ} v^{\circ} \partial \rho$
xx	$wu \partial E$	$x u$
xy	$wu \partial \Gamma$	$wu Z$
xz	$wu \epsilon y A$	w
yy	$wu \partial A$	$wu B$
yz	$wu \alpha A$	$x u B$
φ-x	$wu \alpha x y$	$\Gamma u \Delta$
O-z	$wu \alpha \Gamma$	w

y u w u y 菌株的鉴定

(x) φ-x 菌株的培养特征 在牛肉膏蛋白胨培养基中，培养液浑浊，产生黄绿色的可溶性色素，不产生脓青素，不产生沉淀，无气泡产生。在乐果-无机盐培养基中，能以乐果为唯一碳源、氮源、磷源生长，但生长量明显降低。培养基中添加乐果后，会抑制菌种产生色素。

(y) φ-x 菌株的菌落特征 在营养琼脂平板上生长较快，培养xΓφ 菌落直径可达x~y^{1 1}，菌落边缘不规整，向外扩散，菌苔米白色。

(z) 镜检结果 革兰氏染色阴性短杆状细菌，两端钝圆， $wu B \sim wu E \times x u B \sim y u B \mu^1$ 。在缺氮培养基上的老培养物，经结晶紫染色后在菌体两端形成异染粒。

(A) φ-x 菌株的生理生化特征 见表y。

根据φ-x 菌株的以上特征，查阅《伯杰细菌鉴定手册》第八版，初步鉴定φ-x 菌株为铜绿假单胞菌($\phi^{\circ} \sigma^{\circ} \rho^{\circ} \text{ } 3 \text{ } 2 \text{ } \xi^{\circ} \text{ } \xi^{\circ} \sigma^{\circ} \text{ } \nu \chi^{\circ} \text{ } 3 \text{ } 7 \text{ } \xi^{\circ}$)。

y u y 产酶条件的优化

表y φ-x 菌株的生理生化特性

生理生化实验		碳源利用实验			
与氧的关系	严格	半乳糖	+	异戊醇	+
	好氧	蔗糖	+	正己醇	-
在Ar C生长	+	乳糖	-	乙二醇	-
	+	山梨醇	-	乙酸乙酯	+
荧光色素	+	甘露醇	+	丙酮	-
脓青素	-	麦芽糖	+	y-丁酮	-
接触酶	+	肌醇	-	乙醚	+
硝酸盐还原	-	棉子糖	-		
反硝化作用	+	赤藓糖醇	-		
淀粉水解	-	甲醇	-		
明胶液化	+	乙醇	+		
酪蛋白水解	+	异丙醇	-		
葡萄糖发酵	+	丁醇	+		
半乳糖发酵	+	正戊醇	+		
甘露醇发酵	+				

y u y u φ-x 菌株的产酶进程曲线

在发酵产酶培养基中，接种φ-x 菌株，在zB C摇床o x B w⁶ v¹ χ² p 培养，每隔一定时间取样测定上清的酶活力。结果表明，在发酵培养基中，最初Γφ 检测不到酶活，Zφ 后产酶逐渐上升，到第yAφ 达到最高峰，随后酶活开始下降。

y u y u y 初始¹ Φ 对菌种产酶的影响

在起始¹ Φ 值分别为B u w 到x x u w 间隔w u B¹ Φ 单位^p的发酵产酶培养基中接种φ-x 菌，在zB C摇床o x B w⁶ v¹ χ² p 培养yAφ，测定发酵上清的酶活力，结果如图x。起始¹ Φ 为Δ u w 时，菌株的酶产率最高，这与菌种的最适生长¹ Φ 是基本一致的。

图x 初始¹ Φ 对菌株生长量及产酶的影响

y u y u ε 培养温度对菌种产酶的影响

将菌种接种于发酵产酶培养基中，于y w C、y B C、z w C、z B C、A w C、A B C、B w C不同温度s 摇床o x B w⁶ v¹ χ² p 发酵yAφ，取样测定发酵液的酶活力，结果表明，培养温度为z B C时，上清具有最高的酶活力。当温度达到A B C时，菌体仍然有微弱的生长，但由于生长较弱，此时培养液中已测不出酶活力。

y u y u A 通气量对菌种产酶的影响

y B w¹ ∂ 三角瓶中分别装入y B¹ ∂、B w¹ ∂、Δ B¹ ∂、x w¹ ∂、x y B¹ ∂、x B w¹ ∂ 培养基，接种在z B C进行振荡o x B w⁶ v¹ χ² p 培养，yAφ 后取样测定发酵上清的酶活力。结果见图y。由于该菌的生长是个好氧过程，需要有较好的通气条件，通气不畅将抑制菌种的生长，进而抑制酶的产生。

图y 通气量对菌株生长及产酶的影响

y u y u B 乐果浓度对菌体生长及产酶的影响

以含有不同浓度的乐果的培养基接种菌株，在zBC摇床oXBv⁰v¹χ²p培养yAφ，取样检测发酵上清的酶活力及菌种生长量。结果表明o图zρ，该菌可以耐受较高浓度的乐果，但是乐果浓度越高，对菌种生长的抑制作用越明显，其产生的酶活也逐步降低。

图z 乐果浓度对φ-x菌株生长及产酶的影响
yuy^uΓ最佳发酵条件的选定

为了确定最佳发酵条件，进行了三因素三水平的正交实验^{OBΓκ}，实验条件和结果见表z、表A。

表z 正交实验的因素和水平

	蛋白胨ερ o %φ	牛肉膏Op o %φ	乐果Πρ o %φ
x	wuw	wuκB	wuκB
y	wuy	wiaw	wiaw
z	wuε	wiaB	wiyv

对正交实验的结果分析表明，蛋白胨作为菌种生长的主要营养物质，其浓度对菌体生长量和酶活力有显著影响。浓度越高，菌体生长量越高，同时产生的胞外酶活力也越高。乐果作为产酶的诱导物，较低浓度就能诱导该菌产生较高的酶活，浓度过高，将对菌种生长产生抑制作用，进而降低胞外酶活力。牛肉膏的浓度对生长量和酶活力均没有显著影响，估计这是因为该菌对生长因子的要求不高造成的。综合以上数据认为，采用ε_z、O_y、Π_x作为最佳发酵条件进行发酵实验能获得最高的酶产率^{OBΓκ}。

表A φ-x菌株正交实验结果

	ε	O	Π	酶活力φ ⁰ v ¹ ∂ρ
x	x	x	x	AuA
y	x	y	y	z uE
z	x	z	z	x uy
A	y	x	y	BiE
B	y	y	z	AiE
Γ	y	z	x	ΔiΓ
Δ	z	x	z	ΓuA
E	z	y	x	EiΔ
Z	z	z	y	Eiy
I	ZuA	xΓuA	ywuΔ	
II	xEiy	xΔuε	xΔuE	
III	yz uε	xΔuε	xy uA	
ρ	xz uZ	wuZ	Euε	

z 小结

本实验从农药长期污染的土壤中分离了能以乐果为唯一碳源和能源进行生长的假单胞菌，研究结果表明，该菌株生长较快，能适应较宽的Φ和温度生长范围，在较高的乐果浓度下也能生长，并在生长过程中能过量的吸收磷，同时产生较高的胞外降解酶活性，具有一定的实用化前景。

参考文献H

θxκ 程迪 u 有机磷农药废水生化治理现状及进展^{Uε} u 化工环保 s xZZy sxyv Ap H^uZ -yyΔu
 θyκ 郑重 u 农药的微生物降解^{Uε} u 环境科学 s xZZ s xw yρ HE -Δε u
 θzκ 卢振祖 u 细菌分类学 ε κ u 武汉 H 武汉大学出版社 s xZZε u
 θAε 国家环保局水和废水检测分析方法编委会 u 水和废水检测分析方法 θ ε κ u 北京: 中国环境科学出版社 s xZZε yρ EZ -yZΓ u
 θBε 正交试验法编写组 u 正交试验法 θ ε κ u 北京 I 国防工业出版社 s xZΔΓ u
 θΓε 张尤凯 u 农业生物应用统计方法 θ ε κ u 广州 I 广东高等教育出版社 s xZZε wΔv -xZvu

作者简介H

刘芳 xZAB -ρ, 女 xZZZ 年Δ月于中山大学获得硕士学位, 现在广西分析测试研究中心工作, 从事生化微生物方面的测试研究工作。

$$s\pi^0\sigma\sigma^2\chi^2v\ 3\tau\ \xi\ P\chi^1\sigma^8\varphi^3\xi^8\sigma - P\sigma v^6\xi\rho\chi^2v\ \Sigma_{2+3+1}\sigma\ \phi^{6+3}\rho^9\pi\chi^2v\ s^8\phi^5\xi\chi^2$$

$$\xi^2\rho\ X^7\ \phi^4\delta\chi^1\chi^1\xi^8\chi^3\ 3\tau\ 8\varphi\sigma\ \Sigma_{2+3+1}\sigma\ \phi^{6+3}\rho^9\pi^8\chi^3\ 2$$

$$\partial X\beta\ T\xi^2v\ s\ \eta\Phi\phi\vartheta\Gamma\ \zeta\chi^2v\ \pi\varphi\xi^2v$$

$$o\eta\varphi^3\sigma^2v\ \varphi\xi^2\ \beta^2\chi^0\sigma^6\tau\chi^3\ s\ \Upsilon^9\xi^2v\ \varphi^3\ s\ B\epsilon\omega\Delta B\ \Pi\varphi\xi^2\ \xi\ \rho$$

ε₀780ξπ₈ HE 78ξχ₂ 3τ ρχ₁σ⁸φ³ξ⁸σ -ρσv⁶ξρχ₂v φ⁷σ⁹ρ₃132ξ⁷ξσ⁹vχ₂3⁷ξ φ-x 1ξ⁷χ₃0ξ⁸σρ τ⁶3 1 78χ₇ξ¹40σ⁷308ξχ₂σρ τ⁶3 1 8φσ τχ₀ρ 790φσπ₈σρ 83 τ⁶σ⁵9σ²8 ξ¹40χ₂ξ⁸χ₂7 3τ 36vξ²34φ³74φ⁸697 χ₂7σ⁷πχ₀σ⁷ u αφσ 0ξπ₈σ⁰χ₀¹ 1 ξ⁷ξ⁰σ⁸ 83 97σ ρχ₁σ⁸φ³ξ⁸σ ξ⁷ 730σ πξ⁰32 ξ₂ρ σ²σ⁰v₃ 7396πσ⁷ u αφσ 348χ₁ξ⁰ 8σ¹4σ⁶ξ⁸96σ ξ₂ρ 4Φ 0ξ⁰9σ τ₃6 v₆318φ 3τ 8φσ 0ξπ₈σ⁰χ₀¹ 1 σ⁶σ zW-zBCs ξ₂ρ Δuε-ΔuBs 6σ⁷4σπ₈χ₀σ³ u δφσ₂ χ₁ξ⁷ π⁹0896σρ χ₂ξ 1σρχ₀¹ π₃28ξχ₂χ₂v wuε % 4σ4832σ s wuκB % 0σστ σ₂-86ξπ₈ s wuB % ρχ₁σ⁸φ³ξ⁸σ s wuB % ∂ξΠ ξ₂ρ χ₂π⁹0ξ⁸σρ ξ⁸ zBC 1χ₀φ 7φξ⁰χ₂v oXBv⁰v¹χ₂p τ₃6 yA φ⁹67 s χ₁ξ⁷ τ₃92ρ 8φξ⁸ 8φσ 0ξπ₈σ⁰χ₀¹ 1 ξ⁷ πξ⁴ξ⁰σ³ 3τ 483ρ⁹πχ₂v 8φσ 1ξ₂χ₁91 ρχ₁σ⁸φ³ξ⁸σ -ρσv⁶ξρχ₂v ξπ₈χ₀ξ₃ 1χ₀φ ξ⁰398 E 9v₁ ∂ u Ωσ₃136ρ⁷ Hρχ₁σ⁸φ³ξ⁸σ Θ ρσv⁶ξρχ₂v σ₂+3+1σ Θ φ⁷σ⁹ρ₃132ξ⁷ 74 u