

蜡状芽孢杆菌 HY-1 的生长及对毒死蜱的酶促降解特性

段海明 王开运* 朱玉坤

(山东农业大学植物保护学院 山东 泰安 271018)

摘要: 为明确毒死蜱降解菌——蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* HY-1 的生长和粗酶液对毒死蜱的降解特性, 采用种子液中定量添加毒死蜱和测定粗酶比活力的方法, 研究含毒死蜱的种子液培养基中菌株的生长规律和环境因素对粗酶液降解毒死蜱的影响。结果表明: 含毒死蜱的培养液和空白对照相比, 菌株生长的适应期延长, 对数期、稳定期顺序后延。随着培养液中菌体数量的增长, 培养液的 pH 也随之升高。粗酶液中可溶性蛋白的含量为 2.21 g/L, 测得粗提酶中其米氏常数 K_m 为 1.235 6 mmol/L, 最大降解速率 V_{max} 为 0.022 6 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。酶促反应时间为 1 h 时, 粗酶液对 50 mg/L 毒死蜱的降解率最高可达 74%, 粗酶液加入体积为 1 mL 时的比活力最高。在 20 °C–44 °C 温度范围内, 粗酶液能保持较好的降解活性, 最适温度为 28 °C; 在 pH 5.0–9.0 之间, 粗酶比活力都能达最高比活力的 66% 以上, 最适 pH 为 6.0。进一步研究发现, 该粗提酶具有较好的热稳定性和 pH 稳定性, 在温度 -20 °C–40 °C、pH 4.0–8.0 的条件下, 暴露 1 h 仍能保持较高的比活力。该粗酶液在 10–70 g/L 的 NaCl 浓度下保持 1 h, 仍能高效降解毒死蜱, 其耐盐性与目前国内外已报道的毒死蜱降解粗提酶相比是最高的, 其开发应用价值大。

关键词: 毒死蜱, 蜡状芽孢杆菌, 生长规律, 酶促降解, K_m 值

The growth pattern of the *Bacillus cereus* HY-1 and the enzymatic degradation characteristics of insecticide chlorpyrifos

DUAN Hai-Ming WANG Kai-Yun* ZHU Yu-Kun

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: The growth pattern of the bacteria and degradation characteristics of the crude enzyme extracted from an isolated strain *Bacillus cereus* HY-1 were approached in the paper. The results showed that the adaptation period of the bacteria was prolonged by addition of chlorpyrifos and the logarithmic

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA10Z404)

* 通讯作者: Tel: 86-538-8242345; E: kywang@sdau.edu.cn

收稿日期: 2010-09-25; 接受日期: 2010-12-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

phase and stationary phase were also extended against the control. Moreover, the pH of the culture medium increased with the growth of the strain. The results also indicated that the soluble protein of the crude enzyme was determined with Albumin (bovine serum) as standard protein and the soluble protein content of the crude enzyme was 2.21 g/L. The K_m value and the maximal enzymatic degradation rate for chlorpyrifos were 1.235 6 mmol/L and 0.022 6 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$, respectively. The appropriate incubation time for the enzymatic degradation was 1 h. The highest specific activity of the crude enzyme was gained when the adding volume of the crude enzyme was 1 mL. The crude enzyme activity had optimal temperature of 28 °C for the enzymatic degradation of chlorpyrifos, which was still over 78% of the maximal activity within temperature ranged from 20 °C to 44 °C. The crude enzyme showed comparatively greatest enzymatic activity at pH 6, high activity pH ranged from 5 to 9. Furthermore, additional experimental evidence revealed that the crude enzyme had some extent stability for temperature and pH. The crude enzyme also degraded chlorpyrifos efficiently while it was dealt with sodium chloride from 10 g/L to 70 g/L for 1 h.

Keywords: Chlorpyrifos, *Bacillus cereus*, Growth pattern, Enzymatic degradation, K_m

农药不仅是有毒化学品,也是环境释放率较大、影响面广的物质。我国是世界农药生产大国,品种繁多、使用量大,它在对作物进行保护的同时也进入环境,现已成为农业污染中最为重要的污染源之一^[1]。毒死蜱(Chlorpyrifos)又名乐斯本,化学名称 O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯,是一种高效、广谱、中等毒性的有机磷杀虫、杀螨剂,具有良好的触杀、胃毒和熏蒸作用,广泛用于粮棉、果树和蔬菜等作物防治多种害虫和害螨,也可用于防治家畜体外的寄生虫^[2]。由于我国将其列为替代五种高毒有机磷农药的主要品种之一,高效价廉,使用方便,现已发展成为大吨位骨干品种。因此,在农药生产和施用过程中,其在环境中的残留也势必会逐渐增多,其对环境造成的污染不容忽视^[3-4]。

利用微生物或其酶制剂来消除毒死蜱污染的生物修复技术有着物理、化学方法无可比拟的优越性^[5]。利用生化法处理毒死蜱生产企业排放的废水也同样成为人们积极探索的途径,因废水中含较高的盐分,传统的处理方法通常为稀释后再生物降解、反渗透和离子交换等方法,但使用这些方法的成本都较高,而且占用大量空间。因此,开发出耐盐性高的降解菌株具有重要的实践意义^[6]。目前国内外已分离出多株能够降解毒死蜱的菌株^[3,7-9],且已在降解菌的降解特性和降解途径方面进行了大量研究,但是对于耐盐性毒死蜱降解菌株却鲜有报道。

由于降解菌剂的利用需要较为严格的营养条件,环境条件不适宜微生物的生长则失去利用价值。降解酶往往比产生这类酶的微生物更能忍受异常的环境条件,且降解效果远胜于微生物菌体本身^[1,10]。因此,降解酶对目标污染物降解特性的研究就显得尤为重要,而且鲜见有关毒死蜱耐盐性降解酶的报道。关于降解酶的降解性能与环境因素的关系是降解酶(或其酶制剂)实际应用的重要依据。因此,本实验对前期筛选到的一株耐盐性毒死蜱降解菌株——蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* HY-1 进行了降解粗酶的提取,开展了环境因素对粗酶液降解毒死蜱影响的研究,以期为该降解粗酶的实际应用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌种: 以本实验室分离纯化得到的一株蜡状芽孢杆菌 HY-1 为研究对象,在 GenBank 的登录号为 EU915687。

1.1.2 供试药品: 毒死蜱(95.9%原药): 山东华阳科技股份有限公司提供; 石油醚: 分析纯, 天津凯通化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基: 普通培养基(g/L): 牛肉浸膏 3.0, 胰蛋白胨 5.0, 酵母膏 1.0, 氯化钠 5.0, pH 7.0, 可加入 1.5%的琼脂条制成固体培养基用于菌株的平板培养。种子液培养基(g/L): 胰蛋白胨 5.0, 酵母膏 5.0,

KH₂PO₄ 1.0, pH 7.0。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 6.0, 胰蛋白胨 2.2, K₂HPO₄ 2.0, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.1, NaCl 0.1, 微量元素溶液 2 mL, pH 7.0。微量元素溶液(g/L): EDTA 2.5, FeSO₄·7H₂O 1.0, ZnSO₄·7H₂O 5.0, MnSO₄·H₂O 1.0, CuSO₄·5H₂O 0.4, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.2, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25。

1.2 菌株 HY-1 的培养

无菌条件下将菌株 HY-1 接种到普通培养基平板上, 在 33 °C 下培养 72 h。取 2 接菌环于 100 mL 种子液培养基中, 33 °C、170 r/min 培养 16 h, 将培养好的菌体利用低温冷冻离心机在 15 °C、8 000 r/min 条件下离心 5 min, 收集菌体, 用 pH 6.8 的 0.04 mol/L 磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄)洗涤 3 次, 然后用灭菌的蒸馏水重悬菌体, 调整菌悬液 OD₆₀₀=2.0, 按 1% (V/V)的接菌量转接到 100 mL 发酵培养基中, 33 °C、170 r/min 培养 18 h。

1.3 粗酶液的提取

将培养好的菌体利用低温冷冻离心机 15 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 将菌体用 pH 6.8 的 0.04 mol/L 磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄)洗涤 3 次, 再以 8 000 r/min 的速度离心 10 min, 将菌体(比例为 2 g 湿菌体加入到 10 mL 磷酸盐缓冲液中)悬浮于一定量的上述磷酸盐缓冲液中, 置于冰水浴中用超声波细胞破碎仪处理 10 min, 功率为 280 W, 频率为破碎 5 s、间隔 5 s, 然后以 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 除去细胞碎片得降解酶粗酶液。

1.4 测定方法

菌量的测定: 采用紫外-可见分光光度计(UV-2201, 日本岛津)于 600 nm 固定波长下测定光密度值。

蛋白质含量测定: 粗酶液中总蛋白含量按 Bradford 法^[11]进行测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白, 在 595 nm 下进行比色测定。

毒死蜱残留量测定: 在处理结束后, 反应液用等体积的石油醚提取 2 次, 合并 2 次提取液后检测。利用毒死蜱在 λ=290 nm^[9]左右处有紫外特征吸收峰的特性, 进一步通过紫外分光光度计扫描确定在 λ=292 nm 处测定样品的 OD₂₉₂, 根据标准曲线计算

样品中毒死蜱的含量, 从而计算出毒死蜱的去除量。粗酶比活力的计算公式为:

$$X = \frac{a}{b \cdot c} \quad (1)$$

式中, X: 粗酶的比活力[μmol/(mg·min)]; a: 毒死蜱的去除量(μmol); b: 粗酶液中总蛋白的质量(mg); c: 反应时间(min)。

1.5 研究方法

1.5.1 菌株在不同毒死蜱浓度下的生长规律和 pH 变化趋势: 无菌条件下取 2 接菌环于普通培养基平板上培养 72 h 的菌体接种到 100 mL 种子液培养基中, 33 °C、170 r/min 摇培 60 h, 其间每隔 10 h 用 pH 计测定培养液的 pH 值, 同时取 5 mL 菌液以 15 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 然后用 pH 6.8 的 0.04 mol/L 磷酸盐缓冲液(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄)洗涤菌体 3 次, 再用 5 mL 该缓冲液重悬菌体, 测定菌体的生长量(OD₆₀₀)。同样的方法在种子液培养基中加入适量的毒死蜱, 使最终药剂浓度分别为 50 mg/L 和 100 mg/L, 分别得出菌体的生长抑制曲线和培养液 pH 值变化趋势。

1.5.2 粗酶比活力测定方法: 取 3 mL 含 50 mg/L 毒死蜱的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液, 在 28 °C 水浴中预热 10 min, 之后加入预热的粗酶液 1.0 mL 反应 1 h, 用 0.5 mL 1.0 mol/L 的 HCl 溶液终止反应, 每个处理重复 3 次, 以不加粗酶液作为对照。计算粗酶比活力, 以最大比活力为 100%, 推算出其它同类条件下的相对粗酶比活力。

1.5.3 毒死蜱降解动力学常数测定: 取 3 mL 含已知浓度(分别为 20、40、50、60、80、100 和 150 mg/L)毒死蜱 0.04 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 为 6.8, 在 28 °C 水浴中预热 10 min, 加入预热的粗酶液 1 mL 反应 1 h, 用 0.5 mL 1.0 mol/L 的 HCl 溶液终止反应。以不加粗酶液作为对照。运用 Lineweaver-Burk^[12]作图法求得粗酶对毒死蜱的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max}。

1.5.4 不同体积粗酶液对粗酶比活力的影响: 采用 1.3 方法从菌体中提取粗酶, 设置不同体积的粗酶液分别为 0.5、0.7、1.0、1.5 和 2.0 mL, 分别加入到 3 mL 含 50 mg/L 毒死蜱的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-

NaH₂PO₄缓冲液中(pH 6.8)反应 1 h, 每个处理重复 3 次, 同时设不加粗酶液为对照。计算粗酶比活力, 以最大比活力为 100%, 推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.5.5 不同温育时间对粗酶比活力的影响: 取 3 mL 含 50 mg/L 毒死蜱的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(pH 6.8)于 28 °C 水浴中预热 10 min, 加入预热的粗酶液 1.0 mL, 设置不同的温育时间, 分别为 20、40、60、80、100 和 120 min, 同时设不加粗酶液作为对照。计算粗酶比活力, 以最大比活力为 100%推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.5.6 温度对粗酶比活力的影响: 取 3 mL 含 50 mg/L 毒死蜱的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(pH 6.8), 分别于 20 °C、28 °C、36 °C、44 °C 和 52 °C 的水浴中预热 10 min, 然后加入 1.0 mL 粗酶液反应 1 h, 同时设不加粗酶液作为对照。计算粗酶比活力, 以最大比活力为 100%推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.5.7 pH 对粗酶比活力的影响: 配置磷酸盐缓冲液的 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9 和 10。取 3 mL 含 50 mg/L 毒死蜱的不同 pH 值的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液于试管中, 置于 28 °C 水浴中预热 10 min, 加入 1.0 mL 粗酶液反应 1 h, 同时设不加粗酶液作为对照。计算粗酶比活力, 以最大比活力为 100%推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.5.8 粗酶的热稳定性: 将提取出来的粗酶液分为 6 份, 在 pH 6.8 的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液中, 分别于-20 °C、4 °C、28 °C、40 °C、50 °C 和 60 °C 下保温 1 h, 测定剩余粗酶比活力, 以最适条件下的比活力为 100%推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.5.9 粗酶的 pH 稳定性: 将培养好的菌悬液等分为 4 份, 离心收集菌体。根据 5.0 mL 缓冲液中加入 1 g 湿菌体的比例, 将菌体分别悬浮在 pH 为 4、6、8 和 10 的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液中, 超声波破碎后得到的粗酶液在冰水浴中放置 1 h 后, 测定剩余粗酶比活力。以最适条件下的比活力为 100%, 推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.5.10 粗酶对高盐的耐受度: 将培养好的菌悬液

等分为 4 份, 离心收集菌体。根据 5.0 mL 缓冲液中加入 1 g 湿菌体的比例, 将菌体分别悬浮在 NaCl 浓度为 10、30、50 和 70 g/L 的 0.04 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液中(pH 6.8), 超声波破碎后得到的粗酶液在冰水浴中放置 1 h 后测定剩余粗酶比活力。以最适条件下的比活力为 100%推算出其它条件下的相对粗酶比活力。

1.6 数据分析与方法

数据采用 SPSS13.0 软件进行 ANOVA 方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 HY-1 在不同毒死蜱浓度下的生长规律和培养液的 pH 变化趋势

从图 1 可见, 当接菌培养 10 h 时, 培养液中不含毒死蜱的菌株生长较为迅速, 在 30 h 时菌量达到最大, 接着菌株生长进入稳定期。当毒死蜱浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L 时, 菌株的生长规律是相似的, 在 10 h 时, 菌株的生长量较小, 从 10 h 到 20 h, 菌量增长较快, 菌量分别在 40 h 和 50 h 时达到最大。表明毒死蜱对 HY-1 初期的生长有抑制作用, 但是

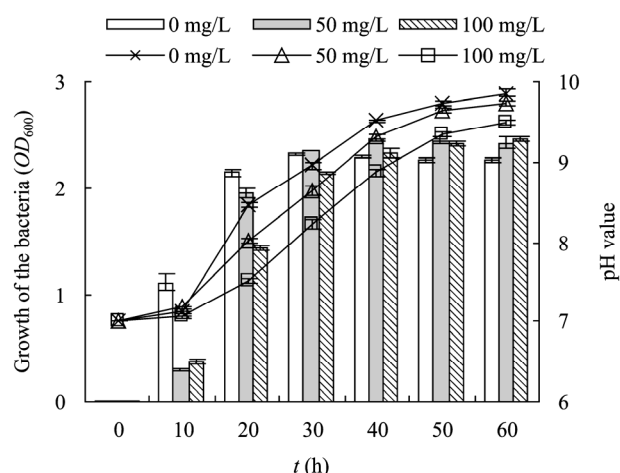


图 1 菌株在不同毒死蜱浓度下的生长规律和培养液 pH 变化趋势

Fig. 1 The growth kinetics of the bacteria and pH trend of the culture medium

注: 柱状图: 菌株的生长规律; 折线图: 培养液 pH 变化趋势。

Note: The column and the curve represent the growth kinetics of the bacteria and the pH trend of the culture medium, respectively.

菌株生长达到最高峰的菌量大致相同。与空白对照相比,菌株在含毒死蜱的培养液中生长的适应期延长,对数期、稳定期顺序后延。由图 1 还可以看出,在 20 h 时不含毒死蜱培养液的 pH 从 7.0 增至 8.45,在 60 h 达到 9.86。这表明, pH 随着菌体数量的增加而上升。当含毒死蜱的浓度为 50 mg/L 和 100 mg/L 时, pH 的变化趋势和空白对照相似,分别在 50 h 和 60 h 时达到和空白对照相同的水平。

2.2 粗酶液中可溶性蛋白含量和粗酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 测定

以测得的反应速率倒数 $1/V$ 对毒死蜱浓度的倒数 $1/[S]$ 作 Lineweaver-Burk 图(图 2),其纵轴截距为 $1/V_{max}$,横轴截距为 $-1/K_m$,斜率为 K_m/V_{max} ,求得粗酶对毒死蜱降解的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。由图 2 可得出直线公式为 $y=24.711x+0.2$ 。令 $y=0$,得出 $K_m=1.2356$ mmol/L;令 $x=0$,求得 $V_{max}=50.00$ nmol/min。以牛血清白蛋白为标准蛋白制作标准曲线,在波长 595 nm 下比色测定,测得粗酶液中可溶性蛋白含量为 2.21 g/L。因此,粗酶对毒死蜱的最大降解速率为 $0.0226 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。

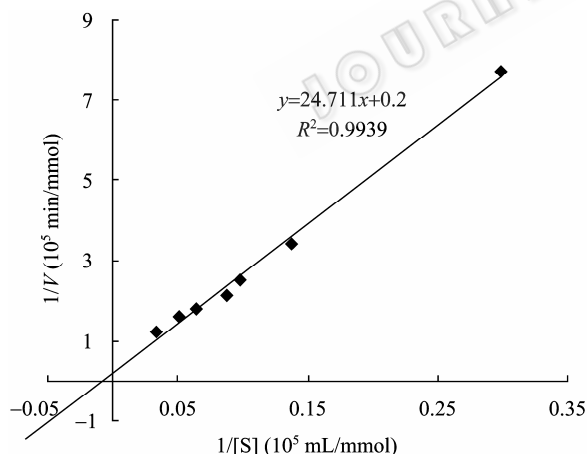


图 2 粗酶的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 2 Lineweaver-Burk plots of the crude enzyme

2.3 不同体积粗酶液对粗酶比活力的影响

由图 3 可见,当温育时间为 1 h,粗酶液体积从 0.5 mL 增至 0.7 mL 时,粗酶比活力由最大比活力的 59% 上升到 96%。当体积为 1 mL 时,粗酶比活力达

到最大($P<0.05$)。随着加酶液体积的进一步加大,粗酶的比活力迅速降低。当体积为 2 mL 时粗酶比活力下降到最大比活力的 66%。因此,为提高降解酶利用效率,对于初始浓度为 50 mg/L 的毒死蜱确定粗酶液体积为 1 mL。

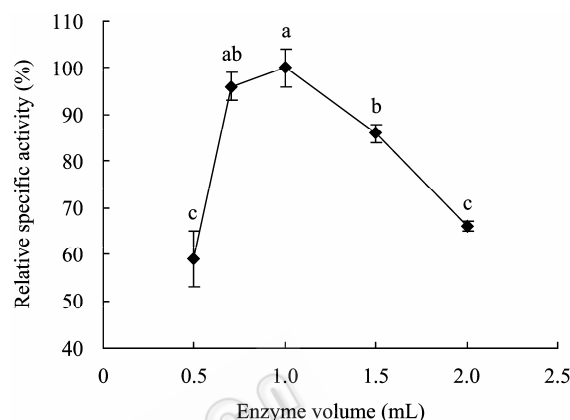


图 3 不同体积粗酶液对粗酶比活力的影响

Fig. 3 Effect of different volume of crude enzyme on the specific activity

注:数据之间的显著性差异用 Duncan 检验;同一折线图(柱状图)上标的字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$),字母相同表示处理间差异不显著($P>0.05$)。下同。

Note: Data in the graph were tested by Duncan's test. Data that in the graph followed by the same letters was not significantly different at 0.05 level. The same as below.

2.4 不同温育时间对粗酶比活力的影响

由图 4 可见,当粗酶液加入量为 1 mL,温育时间为 20 min 时,粗酶比活力较高,随着温育时间的增长,粗酶的比活力先下降后上升,当温育时间达到 60 min 时,粗酶的比活力达到最大。从图 4 还可以看出,粗酶比活力在温育时间为 20 min 和 60 min 时相差不大($P>0.05$)。但是在 20 min 时对毒死蜱的降解率较低为 24%,而温育时间为 60 min 时降解率可达 74%。因此,当毒死蜱浓度为 50 mg/L 时,确定粗酶液降解毒死蜱的温育时间为 60 min。

2.5 不同温度对粗酶比活力的影响

由图 5 可见,温度在 28 °C 时,粗酶对 50 mg/L 毒死蜱的降解活性最高。在 20 °C–44 °C 范围内均能保持较好的降解活性,其粗酶比活力保持在最高比活力的 78% 以上,显示了该酶对温度较好的适应

性。温度过高或偏低都会抑制粗酶对毒死蜱的降解, 尤其是高温对粗酶比活力的影响较大, 当温度为 52 °C 时, 粗酶比活力仅能达到最高比活力的 37%。

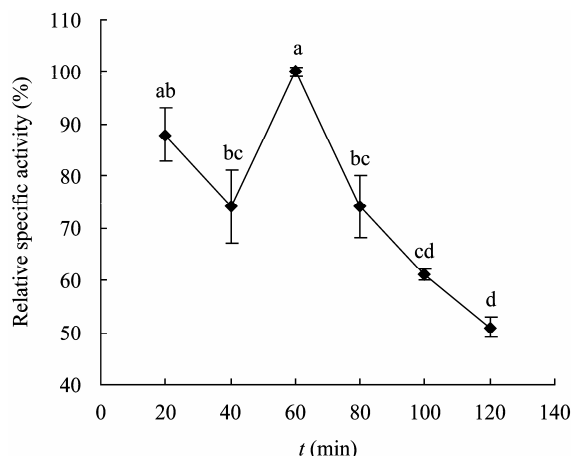


图 4 不同温育时间对粗酶比活力的影响

Fig. 4 Effect of different incubation time on the specific activity

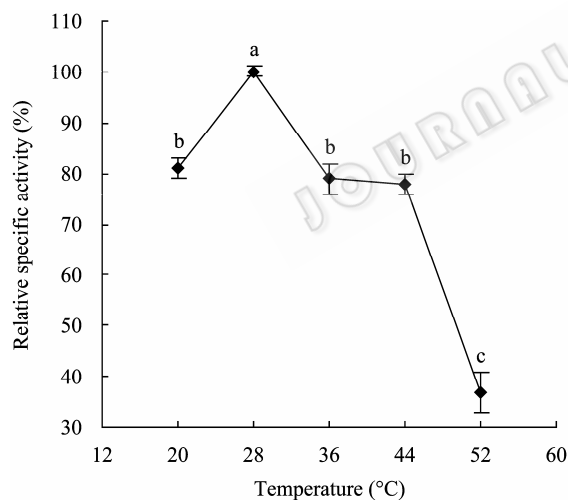


图 5 不同温度对粗酶比活力的影响

Fig. 5 Effect of different temperature on the specific activity

2.6 不同 pH 对粗酶比活力的影响

由图 6 可知, pH 值对粗酶的活性有较大影响。粗酶降解毒死蜱的最适 pH 值为 6, 在 pH 5.0–9.0 之间粗酶比活力都能保持在最高比活力的 66% 以上, 说明粗酶液能够适应较宽泛的 pH 值。

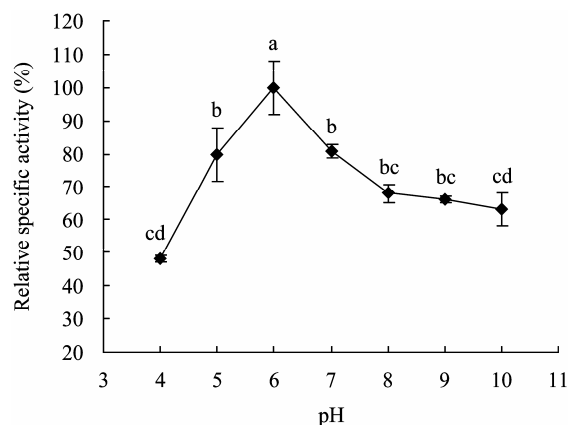


图 6 不同 pH 对粗酶比活力的影响

Fig. 6 Effect of different pH value on the specific activity

2.7 粗酶对温度的耐受性

由图 7 可见, 粗酶在 -20 °C 和 4 °C 时保存最为稳定, 处理 1 h 后粗酶比活力仍能达最高比活力的 98% 左右。粗酶比活力随着温度的升高而降低, 当温度为 28 °C 时, 粗酶比活力下降到最高比活力的 70% 左右, 在 60 °C 保存 1 h 粗酶比活力仅能维持最高比活力的 20% 左右。可见温度对粗酶活性的影响较大, 较高的温度可使降解酶变性失活。

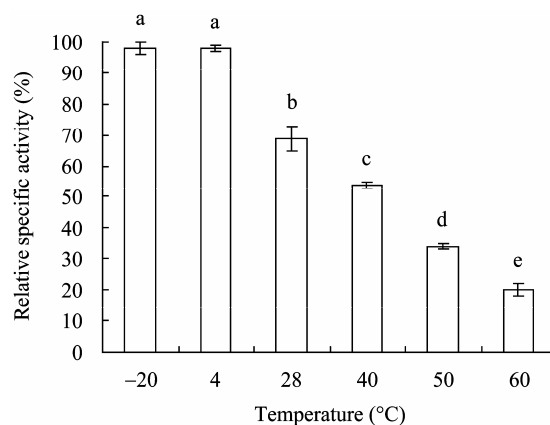


图 7 粗酶对温度的耐受性

Fig. 7 The tolerance of the crude enzyme to different temperature

2.8 粗酶的 pH 稳定性

由图 8 可见, 当 pH 为 6.0 时, 粗酶的剩余酶比活力最高, 处理 1 h 还能达最高比活力的 87%。在 pH 为 4.0 的环境中保存 1 h 后, 粗酶比活力损失 34%, 而在 pH 为 10.0 的环境中保存 1 h 后, 粗酶比

活力损失达 74%, 可见粗酶液对碱性环境的耐受力较低 ($P<0.05$), 略偏酸性的环境对粗酶比活力的影响相对较小。

2.9 粗酶对高盐的耐受度

由图 9 可见, 当氯化钠浓度为 10 g/L 时, 粗酶处理 1 h 能维持最高比活力的 92% ($P<0.05$), 当氯化钠浓度为 30 g/L 和 50 g/L 时, 粗酶比活力下降到最高比活力的 73% 和 63%。当氯化钠浓度增加到 70 g/L 时, 粗酶比活力为最高比活力的 48% ($P<0.05$), 仍有较高的毒死蜱降解活性。这说明该降解酶具有较高的耐盐性。

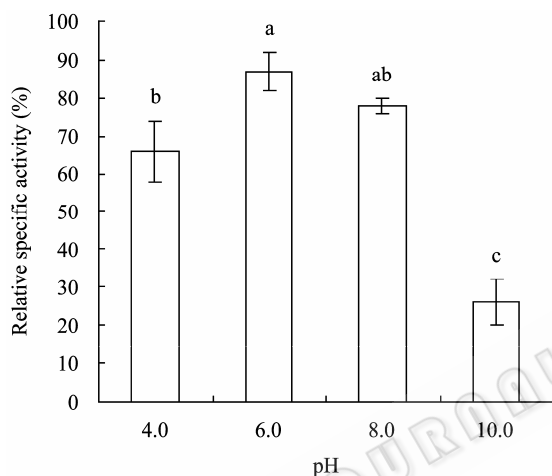


图 8 粗酶对 pH 的耐受性

Fig. 8 The tolerance of the crude enzyme to different pH

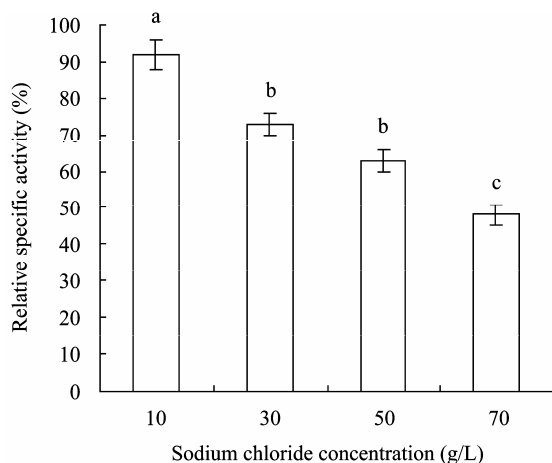


图 9 氯化钠浓度对粗酶比活力的影响

Fig. 9 Effect of the sodium chloride concentration on the specific activity

3 讨论

当微生物接触新的环境后会有一段适应新环境的时间, 这段时间的长短与菌株对环境条件的适应性有关, 若新环境与原来的生长环境差别较大, 适应期会较长, 反之, 则适应期很短甚至没有。然而, 在适应期内, 降解菌体内发生着许多有益于生物降解的变化, 如降解基因的表达或变异和降解酶的诱导等, 这些变化决定着菌株对污染物降解能力的大小。Spain JC 和 Nishino SF 等^[13-14]报道, 微生物生长适应期的长短和目标污染物的化学结构和浓度、菌株驯化周期的长短、接种量的大小等有关。任源等^[15]报道在苯胺初始浓度相同的条件下, 菌株的适应期随着驯化周期的增加而缩短, 而在相同的驯化周期内, 苯胺初始浓度低的适应期则相对较短。Singh BK 和庄铁诚等^[16-17]也曾报道随着污染物浓度的升高, 菌株生长的适应期明显延长。为了缩短菌株的适应期, 提高生物降解效率, 多位学者进行了有益的探索。Ka JO 等^[18]报道, 通过构建混合菌可以大大缩短除草剂 2,4-D 生物降解菌的适应期; Stanlake GJ 等^[19]报道, 通过提高菌株生长环境的 pH 值, 可以缩短五氯酚降解过程中菌株生长的适应期。至于如何缩短蜡状芽孢杆菌 HY-1 降解毒死蜱的适应期, 还需要进一步的研究。

降解菌(或其酶制剂)在农药污染领域的脱毒和工业废水的处理方面发挥着越来越重要的作用。酶促生物降解是一种潜在的快速净化环境中农药残留的方法。但有机磷水解酶(OPH)对毒死蜱的水解作用要比对其它有机磷农药弱的多。Cho CM 等^[20]报道通过改良有机磷水解酶(对氧磷为其最适底物)可以较快速的降解毒死蜱。通常酶反应速率非常快, 但是本文报道的降解粗酶的反应时间要 1 h 才能达到较好的降解效果, 也进一步印证了毒死蜱难被生物降解的特性。该毒死蜱降解酶是否也属于已报道的有机磷水解酶(OPH)还需要进一步验证。微生物(或其酶制剂)在生物修复方面的成功与否是由多种因素决定的, 如菌株竞争力的强弱、污染物生物利用度的大小以及所处环境的温度、湿度和 pH 值等。

目前国内外已有关于毒死蜱降解酶与环境因素关系的相关报道, Xu GM 等^[3]报道从副球菌 *Paracoccus* sp. TRP 中提取的粗酶液在温度为 35 °C、pH 为 8.0 时对毒死蜱的降解率最高; 谢慧等^[21]从真菌镰孢霉属 WZ-I 中提取的胞内粗酶液降解毒死蜱的最适温度为 40 °C, 最适 pH 为 6.8。本研究从蜡状芽孢杆菌 HY-1 中提取的粗酶和环境因素的关系和上述研究较为接近, 只是在最适温度和 pH 方面有差异。这可能与菌株的差异以及酶促反应体系不同有关。但是迄今为止尚未见毒死蜱降解粗酶耐盐性的相关报道, 而在农药污染地区的微生物修复过程中, 尤其是在农药企业废水的生化处理过程中, 降解酶(或其固定化酶)的耐盐性是非常重要的^[22]。一般毒死蜱生产废水的含盐量就达到 8.7%左右^[4], 再加上国内大多数农药企业的废水需要混合处理, 含盐量还会升高。蜡状芽孢杆菌 HY-1 所产降解粗酶在 10–70 g/L NaCl 浓度下, 处理 1 h 仍能高效降解毒死蜱, 属于耐盐性较强的毒死蜱降解酶。因此, 本文的研究结果对蜡状芽孢杆菌(或其降解酶)用于高盐环境毒死蜱污染的治理具有重要意义。

4 结论

(1) 在添加毒死蜱的种子液培养基中, 蜡状芽孢杆菌生长的适应期延长, 对数期、稳定期顺序后延。随着培养液中菌体数量的增长, 培养液的 pH 也随之增大。

(2) 当粗酶液温育时间为 1 h 时, 其对 50 mg/L 毒死蜱的降解率最高可达 74%, 且粗酶液加入体积为 1 mL 时粗酶的比活力最高。以牛血清白蛋白为标准蛋白测得粗酶液中可溶性蛋白的含量为 2.21 g/L。该粗提酶的米氏常数 K_m 为 1.235 6 mmol/L, 最大降解速率 V_{max} 为 0.022 6 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ 。

(3) 该粗酶在 20 °C–44 °C、pH 5.0–9.0 时都能保持较好的降解活性, 其中最适温度为 28 °C, 最适 pH 为 6.0, 该粗酶还具有较好的热稳定性和较宽泛的 pH 适应性。该粗酶在 10–70 g/L NaCl 浓度下处理 1 h 仍能高效降解毒死蜱。该降解粗酶与国内外已报道的毒死蜱降解粗酶相比, 其耐盐性是最高的,

故进一步开发应用价值较大。

参考文献

- [1] 朱福兴, 王沫, 李建洪, 等. 降解农药的微生物[J]. 微生物学通报, 2004, 31(5): 120–123.
- [2] Cáceres T, He WX, Naidu R, et al. Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: the influence of microbial degradation in natural water[J]. Water Research, 2007, 41(19): 4497–4503.
- [3] Xu GM, Zheng W, Li YY, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(1): 51–56.
- [4] 李培国, 姜莉英. 毒死蜱废水处理技术研究[J]. 浙江化工, 2004, 35(10): 25–26.
- [5] 华小梅, 江希流. 高效微生物在农药废水治理中的应用[J]. 污染防治技术, 1999, 12(3): 149–151.
- [6] Peyton BM, Wilson T, Yonge DR. Kinetics of phenol biodegradation in high salt solutions[J]. Water Research, 2002, 36(19): 4811–4820.
- [7] Yang C, Liu N, Guo XM, et al. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 265(1): 118–125.
- [8] Yu YL, Fang H, Wang X, et al. Characterization of a fungal strain capable of degrading chlorpyrifos and its use in detoxification of the insecticide on vegetables[J]. Biodegradation, 2006, 17(5): 487–494.
- [9] 钱博, 朱鲁生, 谢慧, 等. 毒死蜱降解细菌 XZ-3 的分离及降解特性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(12): 2827–2832.
- [10] 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.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [12] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 356–363.
- [13] Spain JC, Van Veld PA. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45(2): 428–435.
- [14] Nishino SF, Spain JC. Cell density-dependent adaptation of

- Pseudomonas putida* to biodegradation of p-Nitrophenol[J]. Environmental Science & Technology, 1993, 27(3): 489-494.
- [15] 任源, 吴超飞, 韦朝海. 苯胺分解菌的驯化筛选研究[J]. 环境科学研究, 1998, 11(4): 3-5.
- [16] Singh BK, Walker A, Wright DJ. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(9): 2682-2693.
- [17] 庄铁诚, 张瑜斌, 林鹏. 红树林土壤微生物对甲胺磷的降解[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(3): 276-280.
- [18] Ka JO, Holben WE, Tiedje JM. Analysis of competition in soil among 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(4): 1121-1128.
- [19] Stanlake GJ, Finn RK. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 44(6): 1421-1427.
- [20] Cho CM, Mulchandani A, Chen W. Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4681-4685.
- [21] 谢慧, 朱鲁生, 王军, 等. 真菌 WZ-I 对有机磷杀虫剂毒死蜱的酶促降解[J]. 环境科学, 2005, 26(6): 164-168.
- [22] Woolard CR, Irvine RL. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor[J]. Water Research, 1995, 29(4): 1159-1168.

征订启事

2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemsctm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwzzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月 刊	300	www.linyekexue.net	linyix@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季 刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月 刊	480	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月 刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月 刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月 刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net