

苯胺黑药降解菌降解条件优化及降解酶特性的研究

宋卫锋, 武纯, 林丽婷, 倪俊, 汪卫 (广东工业大学环境科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要 从 SBR 反应器中分离出一株能高效降解苯胺黑药的菌株 AFF0039, 并且提取该菌株产生的苯胺黑药降解酶, 对降解酶的特性及 AFF0039 菌株降解苯胺黑药条件优化进行了研究。结果表明, 当降解酶为诱导酶, 温度在 25 ~ 40 °C 时, 降解酶的热稳定性高, 酶活保留率在 65% 以上; 当 pH 在 4.3 ~ 7 时, 降解酶的酸碱稳定性高, 酶活保留率在 85% 以上。正交试验优化结果表明, 菌株 AFF0039 降解苯胺黑药最佳条件为时间 30 h, 温度 35 °C, pH 6, 此时苯胺黑药降解率达到 98.61%; 同时, 菌株 AFF0039 产生降解酶的最佳条件为时间 12 h, 温度 40 °C, pH 5, 此时降解酶的活力达到最大值 49.01 μg/(h · ml)。

关键词 苯胺黑药; 降解酶; 特性

中图分类号 X703 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)35-13486-03

Optimization of Degradation Conditions for Degrading Bacteria of Dianilinodithiophosphoric Acid and Properties of Degrading Enzyme

SONG Wei-feng et al (School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract A strain named AFF0039 with high capacity of degrading dianilinodithiophosphoric acid was isolated from SBR system, and the degrading enzyme produced by the strain was extracted, properties of the enzyme and optimization of the degrading conditions were studied. The results show that the degrading enzyme is an induced enzyme with high thermal stability at 25 - 40 °C, enzyme activity retention rate above 65%; at pH4.3 - 7, the enzyme shows high stability, enzyme activity retention rate is above 85%. The results of orthogonal test show that the optimal conditions for AFF0039 degrading dianilinodithiophosphoric acid are 30 h, 35 °C, pH6, the degrading rate achieves 98.61%; the optimal conditions for AFF0039 producing degrading enzyme is 12 h, 40 °C, pH5, activity of the degrading enzyme achieves the maximum value 49.01 μg/(h · ml).

Key words Dianilinodithiophosphoric acid; Degrading enzyme; Characteristics

苯胺黑药(二苯胺基二硫代磷酸, 化学式为 $(C_6H_5NH_2)_2P(S)SH$) 由于文勇等^[1]在 1981 年研制成功, 是硫化矿有效捕收剂, 被广泛应用于浮选作业中。它捕收能力强, 选择性好, 但对 COD 贡献大, 不易降解, 是选矿废水中的难降解物质^[2-3]。现有的浮选废水处理方法是物理化学方法。通过适当的处理后回用于选矿作业, 但由于废水中残留的浮选药剂, 长时间回用会导致金属回收率的降低^[4-6]。

利用生物法对浮选废水进行处理, 可以比较彻底地去除浮选废水中的有机浮选药剂。姜彬慧等^[7]采用 MBR 技术对模拟丁基黄药废水进行处理, 最终 COD 去除率均大于 94%, 丁基黄药去除率也保持在 99.72% ~ 99.85% 之间。Malgorzata^[8]研究表明, 在浮选药剂的条件下, 氧化硫硫杆菌能有效降解浮选药剂。何绪文等^[9]发现, 采用 MBA 和 BAF 对选矿废水的某些浮选药剂产生的 COD 有明显的去除效果。采取生物法处理选矿废水主要依靠菌体的酶促反应, 而关于能降解浮选药剂的酶的研究还比较少。江玉姬等^[10-11]分别驯化筛选了能降解有机磷农药和百菌清的微生物, 并且研究了在降解过程中该微生物产生降解酶的特性。闫志英等^[12]优化了共生菌 B1 + B2 产生聚乙烯醇降解酶的条件。

笔者从处理浮选废水的 SBR 反应器中分离出一株苯胺黑药降解菌, 命名为 AFF0039。它能在好氧条件下以苯胺黑药为单一碳源进行代谢。经鉴定, AFF0039 为死亡谷枯草

芽孢杆菌^[13]。笔者主要以 AFF0039 及其降解酶为研究对象, 研究降解酶的特性, 同时优化 AFF0039 降解条件。

1 材料与方法

1.1 AFF0039 菌液的制备 无机盐培养基按文献^[13]配制; 以苯胺黑药为唯一碳源的培养基, 将无机盐培养基灭菌, 冷却后加入苯胺黑药, 苯胺黑药浓度为 300 mg/L。将实验室保存的菌种 AFF0039 接种于上述培养基中, 35 °C, 150 r/min 活化培养 48 h。按 10% (V/V) 接入苯胺黑药无机培养基中培养, 即 AFF0039 菌液。

1.2 粗酶液的制备 取 AFF0039 菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 将上清液经孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得胞外粗酶液。保持 4 °C, 离心后沉淀用磷酸缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 2 次, 加入 10 ml 缓冲液制成细胞悬液, 细胞悬液经超声波破碎 20 min (工作 5 s, 间歇 20 s), 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为胞内粗酶液^[14]。

1.3 酶活的测定 试管中加入 1 ml 粗酶液, 再加入 10 ml 已预热至 35 °C 的 0.1 mg/L 苯胺黑药溶液, 置于 35 °C 水浴, 准确计时 1 h, 取出, 沸水浴 10 min 中止反应, 测定反应前后苯胺黑药浓度^[15]。对照组将粗酶液置于沸水浴 10 min 灭活后, 重复上述试验。在上述培养条件下, 定义 1 ml 酶液 1 h 降解 1 μg 苯胺黑药为一个酶活单位 [μg/(h · ml)]。

1.4 降解酶的特性

1.4.1 降解酶的定位。 AFF0039 菌液培养 12 h 后, 采用渗透休克法^[16]分步提取胞外、细胞周质和胞内提取液中的降解酶, 并且测定酶活。

1.4.2 降解酶的诱导性。 将 AFF0039 菌液分别以 10% (V/V) 接种于 300 mg/L 葡萄糖溶液、淀粉溶液和苯胺黑药培

作者简介 宋卫锋(1972 -), 男, 河南郑县人, 副教授, 博士, 从事环境生物技术、矿上废水治理技术、清洁生产、环境影响评价研究。

收稿日期 2013-11-20

培养基中,培养至第4代,取第4代培养12、24 h的菌液提取粗酶液,并且测定酶活。

1.4.3 降解酶的稳定性。取粗酶液分别置于25、30、35、40、45℃水浴锅3 h,测定其残余酶活。以未处理前的酶活为100%计,计算其酶活保留率。取粗酶液用磷酸缓冲溶液稀释1倍,并调节pH至5、6、7、8、9,在4℃存放3 h,测其残余酶活,并且计算其酶活保留率。

1.5 正交试验设计 运用正交试验法,研究AFF0039菌的降解特性、最佳产酶条件。根据文献[17],确定该试验的影响因素为3个。3因素5水平可采用 $L_{25}(5^3)$ 正交表。选择对AFF0039生长影响较大的温度、pH和时间3个因素。AFF0039的降解条件的因素与水平见表1。

表1 AFF0039降解条件的正交因素和水平

| 编号 | A(温度)//℃ | B(pH) | C(时间)//h |
|----|----------|-------|----------|
| 1 | 25 | 5 | 6 |
| 2 | 30 | 6 | 12 |
| 3 | 35 | 7 | 18 |
| 4 | 40 | 8 | 24 |
| 5 | 45 | 9 | 30 |

2 结果与分析

2.1 降解酶的定位 研究表明,胞外、细胞周质和胞内提取液中降解酶的酶活分别为6.012、20.240 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{ml})$ 。AFF0039产生的苯胺黑药降解酶大部分分布于细胞内部,少部分在细胞外部,细胞周质提取液中不表现降解酶活性。这说明苯胺黑药主要是在细胞内部被降解,且降解酶由一种或几种酶组成,主要分布于细胞内,少量分布于细胞外,细胞周质中无降解酶的存在。由此可知,苯胺黑药作为唯一碳源,可能在未进入细胞之前被胞外的降解酶分解为较小的分子,再通过自由扩散或主动运输进入细胞内进行彻底氧化,从而为细胞提供生命代谢所需能量。

2.2 降解酶的诱导性 分别提取培养12、24 h的3种不同碳源培养基的粗酶液。研究表明,在3种碳源的培养基中,只有苯胺黑药培养基的粗酶液中有苯胺黑药降解酶存在,淀粉和葡萄糖培养基的粗酶液都不表现苯胺黑药降解酶的活性,由此可以断定苯胺黑药降解酶是一种诱导性酶,在无诱导条件下连续培养多代后降解酶逐渐减少,甚至消失。试验中,苯胺黑药作为唯一碳源,迫使AFF0039适应并产生相应的降解酶来满足自身生长的需求。

2.3 降解酶的稳定性 由图1可知,降解酶的酶活随温度的升高而不断降低,当存放温度在25~40℃时酶活保留率都在65%以上,但在45℃时酶活保留率只有34.7%。这说明AFF0039菌株产生的苯胺黑药降解酶在温度高于45℃时存在严重的失活现象;在25~35℃时,降解酶的酶活保留率达73%以上,降解酶在常温条件下稳定性好,可短时间存放。

由图2可知,在酸性和中性条件下降解酶的酶活保留率高于碱性条件,当 $4.3 \leq \text{pH} \leq 7.0$ 时,酶活保留率在87%以上,而随着pH的不断升高,酶活保留率不断下降,说明降解酶适宜存放在弱酸性、中性条件下,在碱性条件下易失活。

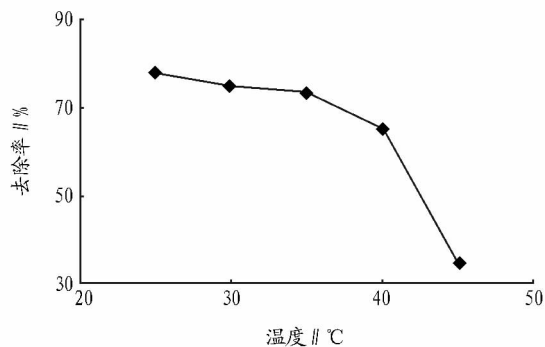


图1 降解酶的温度稳定性

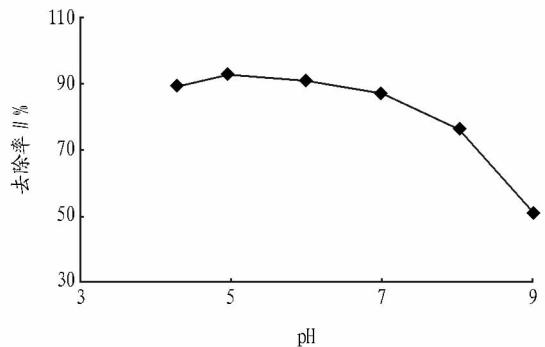


图2 降解酶的酸碱稳定性

表2 AFF0039菌的降解条件及产酶条件正交试验的极差分析

| 序号 | 试验因子 | | | 苯胺黑药 降解率/% | 酶活 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{ml})$ |
|----|-------|----|-------|---------------|--|
| | 温度//℃ | pH | 时间//h | | |
| 1 | 25 | 5 | 6 | 10.94 | 9.54 |
| 2 | 25 | 6 | 12 | 37.64 | 30.39 |
| 3 | 25 | 7 | 18 | 63.59 | 30.21 |
| 4 | 25 | 8 | 24 | 82.32 | 8.16 |
| 5 | 25 | 9 | 30 | 60.23 | 4.08 |
| 6 | 30 | 5 | 12 | 56.69 | 35.11 |
| 7 | 30 | 6 | 18 | 76.63 | 29.56 |
| 8 | 30 | 7 | 24 | 90.76 | 25.49 |
| 9 | 30 | 8 | 30 | 90.52 | 12.82 |
| 10 | 30 | 9 | 6 | 9.43 | 15.41 |
| 11 | 35 | 5 | 18 | 80.42 | 40.34 |
| 12 | 35 | 6 | 24 | 96.93 | 48.20 |
| 13 | 35 | 7 | 30 | 98.06 | 19.73 |
| 14 | 35 | 8 | 6 | 27.75 | 33.79 |
| 15 | 35 | 9 | 12 | 61.04 | 32.64 |
| 16 | 40 | 5 | 24 | 97.08 | 44.53 |
| 17 | 40 | 6 | 30 | 98.36 | 16.32 |
| 18 | 40 | 7 | 6 | 27.47 | 48.22 |
| 19 | 40 | 8 | 12 | 60.99 | 36.87 |
| 20 | 40 | 9 | 18 | 77.29 | 33.89 |
| 21 | 45 | 5 | 30 | 49.04 | 7.23 |
| 22 | 45 | 6 | 6 | 7.53 | 10.65 |
| 23 | 46 | 7 | 12 | 17.55 | 9.70 |
| 24 | 45 | 8 | 18 | 33.39 | 8.55 |
| 25 | 45 | 9 | 24 | 27.51 | 3.02 |

2.4 AFF0039菌降解条件优化及产酶最佳条件 按照正交试验设计,运用综合平衡法对试验结果进行极差分析(表2)。计算步骤为逐列计算各因素同一水平值和,记作 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 ;逐列计算各水平的平均数,记作 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 和 x_5 ;逐列计算各水平平均数的极差,记作 R 。

2.5 确定主次顺序和优化降解条件、产酶条件 由表2可知,对于试验指标苯胺黑药去除率,3个因素极差由大到小的顺序为 RC 、 RA 、 RB 。由此可知,各因素对苯胺黑药去除效果

影响由大到小的顺序为 C、A、B;根据各因素水平的 x_i 值,确定各因素的优化水平组合为 A3B2C5。对于试验指标酶活,3个因数的极差由大到小的顺序为 RA、RC、RB。由此可知,各因素对酶活的影响由大到小的顺序为 A、C、B;根据各因素水平的 x_i 值,确定各因素的优化水平组合为 A4B1C2。

2.6 最佳条件 研究表明,苯胺黑药降解菌 AFF0039 最佳降解条件组合为 A3B2C5,即时间为 30 h,温度为 35 °C,pH 为 6。在最优条件下,苯胺黑药的降解率达到 98.61%。降解菌 AFF0039 最佳产酶条件组合为 A4B1C2,即时间为 12 h,温度为 40 °C,pH 为 5。结果表明,在最优条件下降解酶的酶活达到最大,为 49.01 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{ml})$ 。降解酶的酶活直接影响某时刻苯胺黑药的降解速率,而苯胺黑药去除率是累积量,反映某时段的苯胺黑药的减少量。2个指标之间没有直接的数量关系。

3 结论

(1)AFF0039 产生的苯胺黑药降解酶为诱导酶,大部分分布于胞内,少部分在细胞外,细胞周质提取液不表现降解酶活性。

(2)当降解酶在 25 ~ 40 °C 时,酶活保留率都在 65% 以上。随着温度的升高,酶活保留率不断下降。在 pH 4.3 ~ 7.0 时,酶活保留率都在 85% 以上。当 pH > 7.0 时,随着 pH 的升高,酶活保留率不断下降。

(3)在优化降解条件后,苯胺黑药最高去除率可达到 98.61%,降解酶的活力达到最大值 49.01 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{ml})$ 。其中,时间对苯胺黑药去除率的影响最大,温度次之,pH 最小;温度对降解酶的产生影响最大,时间次之,pH 最小。

(上接第 13477 页)

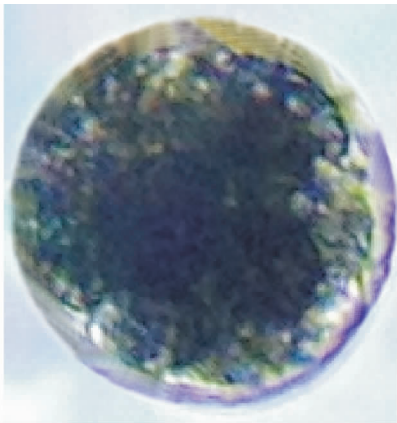


图3 饱食海洋尖尾藻(安鑫龙拍摄)

以增加细胞数目。海洋尖尾藻的有性繁殖方式是配子生殖-同配生殖-同宗同配生殖^[3]。所以,海洋尖尾藻多样性的繁殖方式有利于种群的繁衍发展,无论环境条件如何,均可以凭借其顽强的环境忍受能力生存,从而为广泛分布于潮池、沿海甚至外海奠定基础,使其作为模式海洋浮游生物成为可能。

参考文献

- [1] 于文勇,李友权,刘荣裳. 苯胺黑药合成与选矿工业实践[J]. 有色金属,1981(5):2-5.
- [2] 谢光炎,孙水裕,宁寻安,等. 选矿废水的回用处理研究与实践[J]. 环境污染治理技术与设备,2002,3(2):67-70.
- [3] 顾泽平,孙水裕,肖华花. Fenton 试剂处理选矿废水的实验研究[J]. 水资源,2006,7(4):82-84.
- [4] 孟玮. 电催化氧化处理黄药及黑药废水的研究[D]. 长沙:中南大学,2012.
- [5] 赵永红,姜科. Fenton 试剂去除选矿废水中黄药的试验研究[J]. 江西理工大学学报,2009,30(5):33-36.
- [6] YANG Y,LI Y,ZHANG Y M,et al. Applying hybrid coagulants and polyacrylamide floatations in the treatment of high-phosphorus hematite flotation wastewater (HHRW): Optimization through response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology,2010,76:72-78.
- [7] 姜彬慧,黄娅琼,王宇佳,等. 采用膜生物反应器处理丁基黄药废水[J]. 中南大学学报:自然科学版,2013,44(7):3072-3079.
- [8] PACHOLEWSKA M. The influence of flotation reagents on sulfur oxidizing bacterial acidithiobacillus thalassidans [J]. Physicochemical Problems of Mineral Processing,2008,42:37-46.
- [9] 何绪文,李静,张硕,等. 水解-好氧工艺降解选矿废水部分浮选药剂的研究[J]. 水处理技术,2012,38(S1):80-84.
- [10] 江玉姬. 有机磷农药降解菌的筛选及其降解酶特性[D]. 福州:福建农业大学,2006:53-56.
- [11] 李成龙. 细菌降解菌的筛选及降解酶特性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012:24-34.
- [12] 闫志英,李旭东,袁月祥,等. 共生菌 B1 + B2 聚乙烯醇降解酶活性优化研究[J]. 应用与环境生物学报,2007,13(4):556-560.
- [13] 宋卫锋,邓琪. 一株苯胺黑药降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 中国矿业大学学报,2012,41(6):1018-1023.
- [14] 岳贤田. 超声波辅助提取南瓜皮中果胶的研究[J]. 山西化工,2010,30(5):5-7.
- [15] 宋卫锋,严明,孙水裕. 浮选肺水肿苯胺黑药与外加基质的共代谢特性[J]. 中国有色金属学报,2012(7):2090-2096.
- [16] 夏东翔,曾仑,郑兆鑫,等. 邻苯二酚 2,3-双加氧酶在大肠杆菌的表达与定域[J]. 遗传学报,1992,19(2):177-185.
- [17] 李志西,杜双奎. 试验优化设计与统计分析[M]. 北京:科学出版社,2010:152-160.

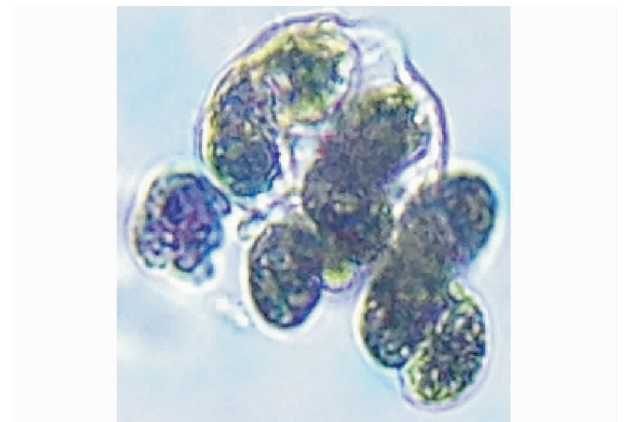


图4 饱食海洋尖尾藻破裂(安鑫龙拍摄)

参考文献

- [1] 安鑫龙,李雪梅,宫春光. 海洋尖尾藻的室内培养[J]. 安徽农业科学,2012,40(1):85-86.
- [2] 安鑫龙,李雪梅,么强. 河北省 1 个赤潮藻新记录种——海洋尖尾藻[J]. 安徽农业科学,2011,39(9):5078.
- [3] MONTAGNES D J S, LOWE C D, MARTIN L, et al. *Oxyrrhis marina* growth, sex and reproduction [J]. Journal of Plankton Research,2011,33(4):615-627.