

文章编号:1673-1689(2005)04-0100-04

聚乙烯醇降解酶产生菌的筛选及生物多样性初探

宋朝霞, 张颖, 钱鼎, 李寅, 陈坚*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 根据聚乙烯醇与碘的作用机理确定了聚乙烯醇降解酶产生菌的筛选原理, 并在此基础上对从无锡、上海和贵阳等地采集的样品进行分离, 得到 53 株能够产生 PVA 降解酶的菌株. 通过菌落形态及一系列生理生化实验对这些菌株进行了初步鉴定, 同时利用生物多样性指数法对 PVA 降解酶产生菌的物种丰富度进行了分析. 结果初步说明了 PVA 降解酶产生菌在自然界的分布具有普遍性.

关键词: 聚乙烯醇; 生物降解; 微生物多样性; 生物多样性指数

中图分类号: Q 93

文献标识码: A

Study on Diversity of Poly(vinyl alcohol)- Degrading Enzyme Producing Microorganism

SONG Zhao-xia, ZHANG Ying, QIAN Ding, LI Yin, CHEN Jian*

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Based on the mechanism of PVA reacted with I_2 , the screening principles of PVA-degrading enzyme producing microorganisms were determined. Based on these principles, 53 microbes were screened from samples collected at Wuxi, Shanghai and Guiyang. The cellular morphology, physiological and biochemical characteristics of these microbes were identified, respectively. In addition, the biological diversity index was used to analyze the species richness. The results indicated that, the PVA-degrading enzyme producing organisms are extensively and universally distributed in nature.

Key words: PVA; biodegradation; microbial diversity; biological diversity index

聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, 简称 PVA)是一种人工合成的水溶性高分子聚合物, 具有良好的粘附性、浆膜强韧性和耐磨性, 是纺织工业中棉织物的理想上浆剂. 但是料浆中 PVA 的过量使用, 会导致棉纺企业排放的退浆废水中含有大量的 PVA. 由于 PVA 的可生化性较差, 这些废水难以用常规方法进行处理. 如果能够在退浆过程中使用 PVA 降

解酶, 可显著提高对 PVA 退浆废水的处理效率.

筛选能够产生 PVA 降解酶的微生物是实现 PVA 生物降解的前提. 与能够降解其它脂肪族高聚物的微生物相比, 能够产生 PVA 降解酶的微生物在种类和分布上要少得多. 迄今为止, PVA 降解酶产生菌种类主要集中于革兰氏阴性的假单胞菌属, 并且其中大部分细菌呈共生关系^[1~5]. 作者所

收稿日期: 2004-09-20; 修回日期: 2004-11-02.

基金项目: 国家(863)计划项目(2003AA322050)资助课题.

作者简介: 宋朝霞(1979—), 女, 山东威海人, 环境工程专业硕士研究生. * 通讯作者

在研究室从无锡、上海和贵阳等多个地点收集污水、土壤、活性污泥,对不同采样点的样品进行筛选、分离,旨在筛选出能够产生 PVA 降解酶的菌株,同时在筛菌过程中对 PVA 降解酶产生菌的生物多样性进行了初步研究。

1 材料与方方法

1.1 试剂

PVA1799(聚合度 1 700,醇解度 99.0%),购于四川维尼纶厂;其他试验药品均为分析纯。

1.2 分离培养基

参照文献[2]配制。

1.3 方法

1.3.1 样品采集 分别从无锡太平洋纺织厂、德发印染厂、上海金山石化股份有限公司和贵州水晶化工集团等地收集污水、土壤、活性污泥样品。

1.3.2 PVA 降解酶产生菌的筛选原理及步骤

PVA 是直链高分子聚合物,在水溶液中其分子中 C—C 骨架既伸开又不完全舒展,形成疏松的螺旋状。KI 分子在水中电离成 K^+ 和 I^- ,而 I_2 分子与 I^- 相遇时立即生成 I_3^- ,因此在 I_2 -KI 水溶液中, I_2 分子基本上是以 I_3^- 形式存在。当将 I_2 -KI 水溶液与 PVA 水溶液混合时, I_3^- 能够迅速进入 PVA 分子的螺旋状结构域内,发生颜色反应,形成有色络合物^[6],见图 1。

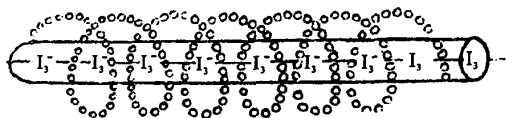


图1 PVA 与 I_2 -KI 水溶液形成的络合物结构

Fig.1 Structure of the complex formed by PVA and I_2 -KI in solution

PVA 与 I_2 -KI 水溶液形成的有色络合物与 PVA 的浓度、醇解度及碘和硼酸的添加浓度等很多因素有关。PVA 完全醇解时与 I_2 -KI 反应生成蓝色络合物,醇解度低于 90% 时,它与 I_2 -KI 生成的络合物是紫红色的。在含有少量或微量的 PVA 溶液中,反应体系中必须加入硼酸才能显色,硼酸的加入可以使 PVA 分子链进一步聚合有利于其与 I_2 -KI 之间形成有色络合物。有研究显示^[1~5],将能够产生 PVA 降解酶的微生物接种在以 PVA 为碳源的平板上培养时,微生物产生的 PVA 降解酶可通过扩散、渗透等途径专一地与菌落周围的 PVA 作用,将其由大分子物质降解为小分子物质,进而转化为羧酸类物质。将硼酸、 I_2 -KI 溶液喷洒在 PVA 平板上,

待其与培养基中的 PVA 充分反应后,平板呈现蓝绿色,而在生长产生 PVA 降解酶的菌落周围则呈现无色透明圈,酶活高则透明圈大。根据这一原理,配制 PVA 平板^[2],将所取的水样作 10 倍系列稀释,土壤样品和活性污泥则取 1 g,置于 9 mL 蒸馏水中制成悬液后也按上述方法稀释,然后分别取不同稀释度的样液各 0.2 mL 涂布于固体分离培养基上,于 30 ℃ 培养 1~2 d,选出长出单菌落的固体培养基平板,将固体分离培养基上的菌落移走后,喷洒适量硼酸、 I_2 -KI 溶液于培养基上,暗处反应 10 min,将能够产生透明圈的单菌落转至新鲜固体培养基上,进一步分离纯化,直到成为纯菌株。筛选流程见图 2。

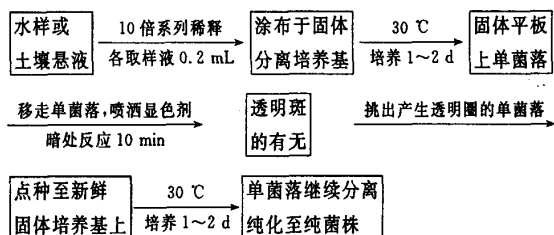


图2 PVA 降解酶产生菌的筛选流程

Fig.2 Process of screening PVA-degrading enzyme producing microbes

1.3.3 菌株鉴定 得到纯化后的菌株 53 株,其中包括 48 株细菌、4 株放线菌和 1 株霉菌,对这 53 株菌进行菌落形态观察及一系列生理生化试验。

1.3.4 生物多样性指数分析 对于物种丰富度,作者采用 Shannon-Wiener 的多样性指数模式进行分析,其公式为:

$$H' = - \sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N} \right) \log_2 \left(\frac{N_i}{N} \right)$$

式中: H' 为生物多样性指数, N 为样品中各种生物的总个体数, S 为样品中生物种类数, N_i 为样品中某种生物的个体数。

2 结果与讨论

2.1 细菌的初步鉴定

对纯化的细菌进行菌落形态观察及一系列生理生化试验。根据实验结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和《一般细菌常用鉴定方法》,将筛选出来的细菌鉴定,结果见表 1。

由表 1 可以看出,筛选出的 48 株细菌分属于 17 个属,假单胞菌属在数目上占有优势,这与已报道的 PVA 降解酶产生菌的结果一致。另外,除细菌外,作者还从无锡太平洋纺织厂采集的样品中分离

出一株霉菌,从上海金山石化股份有限公司和贵州 水晶化工集团采集的样品中各分离出两株放线菌.

表 1 细菌细胞形态及生理生化实验鉴定结果

Tab.1 Appraisal results of bacteria by cell morphology, physiology and biochemistry

菌株	革兰氏染色	淀粉水解	氧化酶试验	V-P测定	硫化氢的生成	吡啶试验	过氧化氢酶试验	明胶液化试验	酪素水解试验	甲基红实验	好氧性	细胞形态特征	鉴定结果
W1-1	G ⁻	+	-	+	-	-	+	+	-碱	-	好氧	直杆状	假单胞菌属
W1-2	G ⁻	-	(+)	+	-	-	+	+	-碱	+	好氧	杆状	动胶菌属
W2-1	G ⁻	-	+	+	-	+	+	+	+碱	-	兼厌	直杆状	邻单胞菌属
W2-2	G ⁻	+	+	+	+	-	+	+	-碱	-	好氧	直杆状	假单胞菌属
W2-3	G ⁻	-	-	+	-	-	-	-	-酸	-	好氧	直杆状	假单胞菌属
W3-1	G ⁻	+	-	-	-	+	+	-	-碱	+	兼厌	直杆状	埃希氏菌属
W3-2	G ⁻	+	+	-	-	+	+	+	+碱	+	兼厌	短杆状	气单胞菌属
W3-3	G ⁺	-	-	+	-	(-)	+	+	-酸	-	好氧	球形,对生	微球菌属
W3-4	G ⁻	-	+	-	-	(-)	+	-	-不变	+	好氧	杆状	动胶菌属
W3-5	G ⁻	+	-	+	-	+	+	+	+碱	+	好氧	直杆状	假单胞菌属
W4-1	G ⁻	+	+	-	+-	-	+	+	+碱	-	好氧	杆状	产碱杆菌属
W4-2	G ⁺	-	-	-	-	(-)	+	+	+酸	+-	兼厌	有芽孢	芽孢杆菌属
W5-1	G ⁺	+	+	+	+-	(-)	+	+	+碱	+	兼厌	有芽孢	芽孢杆菌属
W5-2	G ⁻	+	+	+	+-	+	-	+	+碱	+	好氧	直杆状	假单胞菌属
W5-3	G ⁻	+	+	+	+-	+	-	+	+碱	+	好氧	直杆状	假单胞菌属
S1-1	G ⁻	+	-	+	+	-	+	-	-酸	+-	兼厌	有芽孢	芽孢杆菌属
S1-2	G ⁻	+	-	+	-	-	+	-	-酸	+	好氧	直杆状	假单胞菌属
S1-3	G ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-碱	-	好氧	直杆状	假单胞菌属
S2-1	G ⁻	+	+	+	-	-	-	+-	+碱	-	好氧	直杆状	假单胞菌属
S2-2	G ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+碱	+	好氧	细杆状	气单胞菌属
S2-3	G ⁻	-	-	+-	-	-	-	-	-酸	-	好氧	直杆状	假单胞菌属
S3-1	G ⁻	-	+	+	-	-	+	+	-碱	-	好氧	粗短杆菌	莫拉氏菌属
S3-2	G ⁻	+	-	+	-	-	+	+	+酸	-	兼厌	菌落黄色	黄杆菌属
S3-3	G ⁻	+	-	-	-	-	+	+	+碱	-	好氧	杆状稍弯	紫色杆菌属
S3-4	G ⁻	-	-	-	-	-	+	-	-碱	-	兼厌	直杆状	欧文氏菌属
S3-5	G ⁻	-	+	+	-	-	+	+	+碱	+-	兼厌	菌落粉红	黄杆菌属
S3-6	G ⁻	+	+	+	-	-	+	+	-酸	-	兼厌	菌落稍黄	黄杆菌属
S3-7	G ⁺	-	+	+	-	-	-	-	+酸	-	兼厌	有芽孢	芽孢杆菌属
G1-1	G ⁺	-	-	-	-	-	+	+	-酸	-	好氧	球形,对生	微球菌属
G1-2	G ⁺	-	-	+-	-	-	+	+	+碱	+-	好氧	形态变化	节杆菌属
G1-3	G ⁺	-	+	-	-	-	+	+	+酸	-	兼厌	有芽孢	芽孢杆菌属
G2-1	G ⁻	+	+	+	-	-	+	-	-碱	-	好氧	杆状	动胶菌属
G2-2	G ⁻	-	+	-	-	-	-	+	+碱	-	好氧	球杆状	产碱杆菌属
G2-3	G ⁺	-	-	-	-	-	+	+	-碱	+	厌氧	杆状	沙门氏菌属
G2-4	G ⁺	-	-	+	-	-	+	+	+碱	+	厌氧	卵圆形	微杆菌属
G2-5	G ⁻	+	+	+	-	-	+	+	+不变	-	兼厌	直杆状	气单胞菌属
G2-6	G ⁻	+	-	-	-	+	+	-	+碱	+	厌氧	直杆状	埃希氏菌属
G2-7	G ⁻	-	+	+	+	-	-	+	+酸	+	好氧	直杆状	假单胞菌属
G3-1	G ⁻	+	-	+	+	+	(+)	+	+碱	+	好氧	直杆状	假单胞菌属
G3-2	G ⁻	+	-	+	+	(-)	(+)	+	+不变	+	兼厌	细杆状	气单胞菌属
G3-3	G ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-酸	+-	兼厌	菌落粉红	黄杆菌属
G4-1	G ⁻	+	+-	-	-	-	+	-	-碱	-	好氧	杆状	产碱杆菌属
G4-2	G ⁻	+	+	-	+-	(-)	+	+	+碱	-	好氧	杆状	产碱杆菌属
W2-4	G ⁺	+	(+)	+	+	+	+	+	+碱	+	兼厌	短杆状	短杆菌属
W1-3	G ⁻	+	+	-	+	+	+	+	+碱	+	兼厌	直杆状	气单胞菌属
W4-3	G ⁻	-	-	-	-	-	+	-	-碱	-	好氧	粗短杆状	不动杆菌属
W4-4	G ⁻	-	-	(+)	+	(+)	+	+	-碱	-	好氧	粗短杆状	假单胞菌属
W4-5	G ⁻	-	-	+	+	(+)	+	+	-碱	-	好氧	粗短杆状	假单胞菌属

注:+-表示现象不是很明显.

2.2 不同采样地点的 PVA 降解酶产生菌的分布特征

作者采用 Shannon-Wiener 的多样性指数模式对不同采样地点产 PVA 降解酶的微生物的物种丰富度进行分析,结果见表 2.

表 2 不同采样地点的生物多样性指数
Tab.2 Biodiversity index of different places

采样地点	多样性指数 H'
无锡太平洋纺织厂	2.777 4
德发印染厂	1.75
上海金山石化股份有限公司	2.789 9
贵州水晶化工集团	3.454 8

Shannon-Wiener 生物多样性指数一般在 1.5~3.5 之间,很少超过 4.5^[7]. 由表 2 的结果看,不

同采样地点的多样性指数可以初步说明 PVA 降解酶产生菌在种类上是多样的,它们的生活环境是比较广泛的.

3 结 语

通过在不同地点采样、筛选和分离,得到 53 株能够产生 PVA 降解酶的菌株,并对它们进行了初步鉴定. 从鉴定结果看,在筛选出的细菌菌株中,假单胞菌属在数目上占优势,但同时也有其它属能够产生 PVA 降解酶的细菌存在. 并且除细菌外,放线菌和霉菌也能够产生 PVA 降解酶. 另外从生物多样性指数分析结果看,不同采样地点的多样性指数可以初步说明 PVA 降解酶产生菌在自然界的分布具有普遍性.

参考文献:

[1] Lee J A, Kim M N. Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)-degrading strains and their degradation activity[J]. **Polymer Degradation and Stability**, 2003, 81: 303—308.

[2] Hashimoto S, Fujita M. Isolation of a *Bacterium* requiring three amino acids for polyvinyl alcohol degradation[J]. **J Ferment Technol**, 1985, 63(5): 471—474.

[3] Sakazawa C, Shimao M, Taniguchi Y, *et al.* Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed culture[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1981, 41: 261—267.

[4] 王银善, 庞学军, 方慈祺, 等. 共生细菌 SB1 降解聚乙烯醇的研究——1. 共生细菌 SB1 的分离及某些性质[J]. **环境科学学报**, 1991, 11(2): 236—241.

[5] Kim B C, Sohn C K, Lim S K, *et al.* Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp. SA3 and its symbiote[J]. **Journ Indust Microbiol Biotech**, 2003, 30: 70—74.

[6] 谷冈明彦. 聚乙烯醇与碘的反应[J]. **维纶通讯**, 1997, 17(3): 44—49.

[7] Magurran A E. *Ecological Diversity and its Measurement*[M]. New Jersey: Princeton University Press, 1988.

(责任编辑:李春丽)