

文章编号:1673-1689(2005)02-0034-04

原生质体融合技术选育高效菌株降解聚乙烯醇

廖劲松¹, 郭勇², 庄桂³

(1. 华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631; 2. 华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640; 3. 河南工业大学 生物工程系, 河南 郑州 450052)

摘要: 从自然界中分离聚乙烯醇(PVA)的降解细菌,经紫外线诱变,得到两株具有单重抗药性的突变菌株 S7(Str^s, Kan^r)和 K15(Str^r, Kan^s),两者对 PVA 的去除率分别达到 52%和 58%。将 S7 和 K15 作为亲本菌株进行原生质体融合,并对融合条件进行优化,融合子 F4 菌株对 PVA 去除率达到 79.9%,将其培养成活性污泥后,PVA 去除率可达 87%,是普通活性污泥的三四倍。

关键词: 原生质体融合;菌种选育;聚乙烯醇;降解

中图分类号:Q 933

文献标识码: A

The Breeding of High Efficient Strain with the Technique of Protoplast Fusion to Degrade Polyvinyl-Alcohol

LIAO Jin-song¹, GUO Yong², ZHUANG Gui³

(1. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Food and Biological Engineering College, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China; 3. Biological Engineering Department, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Bacteria with the ability to degrade Polyvinyl-Alcohol (PVA), were isolated from natural specimens. Two single resistant mutants, S7 (Str^s Kan^r) and K15 (Str^r Kan^s) were obtained by UV-irradiation. The S7 strain and the K15 strain could remove 52% and 58% of PVA, respectively. Then, using protoplast fusion technique with the two mutants as parent strains, the conditions of protoplast fusion were optimized. The fusion strain F4 could remove 79.9% PVA in specimen and the active sludge cultured with F4 could remove 87% PVA in specimen. The PVA removing ability was about 3~4 times of that with ordinary active sludge.

Key words: protoplast fusion; strain breeding; PVA; degradation

聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol,简称 PVA)是一种水溶性有机大分子化合物,是纺织工业用量较大的退浆液。PVA 是一种难以生物降解的物质,且分子的化学性质稳定,在印染工序中以退浆废水的形式排入江河,并在环境中积累,使被污染的水体表面泡沫增多,粘度加大^[1],影响好气微生物的活动,

对水体的性能及水体的复氧极为不利。许多行业还以 PVA 作为胶料、乳化剂、保护胶、增厚剂、稳定剂等。国内外从 20 世纪 70 年代开始对 PVA 废水的治理进行了研究,其处理方法分为物化法和生化法。物化法处理那些组分单一且 PVA 浓度很高的废水时才有价值。而在一般情况下,PVA 废水成分

收稿日期:2004-02-26; 修回日期:2004-03-09.

作者简介:廖劲松(1976-),男,福建泉州人,生物工程博士研究生。

万方数据

复杂,PVA 浓度较低,水量较大,从材料、设备和处理成本而言,都难以采用该项技术. 因此用生化方法处理较低浓度 PVA 废水的研究就成为热点.

废水中 PVA 形成的 BOD₅(生化需氧量)很低,含有大量 PVA 的印染废水中 BOD₅/ COD(化学需氧量)小于 30 %,可生化性差. 过去认为 PVA 不能被微生物降解. 但 1973 年 Suzuki 等人^[2]从土壤中分离到 1 株假单胞菌(*Pseudomonas boreopolis*),它能产生一种 PVA 降解酶,该酶可以氧化并切断 PVA 分子. 从以后大多数的研究结果看,PVA 生物降解是可行的,关键是筛选高效降解菌. 作者从废水中筛选分离得到高效处理菌株,然后将高效菌株进行原生质体融合,实现基因重组,融合子的性状能够通过互补而得到改善,使其对 PVA 废水的处理能力得到提高.

1 材料与方法

1.1 实验材料

废水样品,取自郑州市印染厂废水处理厂.

1.2 实验方法

1.2.1 PVA 降解高效原始菌株的分离 见文献[3,4].

1.2.2 原生质体融合选育 PVA 降解高效菌 详见文献[5].

- 1) 紫外线诱变:获得抗药性遗传标记.
- 2) 原生质体的制备与融合:生长曲线的测定→青霉素预处理→制备菌悬液→溶菌酶处理→原生质体平板计数→去溶菌酶→亲本原生质体混合→PEG 助融→钙离子处理→再生培养→双抗融合子的检出.

1.2.3 融合子再生的形态特征观察与 PVA 降解初步试验

- 1) 双抗融合子在再生平板检出时,32 ℃下恒温培养一周,每隔 6 h 观察一次.
- 2) 将单个融合菌株分别进行 PVA 降解试验,方法与原始菌株的相同.
- 3) 比较各种活性污泥降解印染废水的效果.

2 结果与讨论

2.1 从自然界中分离筛选 PVA 降解高效原始菌株 菌种分离得到 53 株纯化菌株,对它们进行印染废水处理特性的试验. 其中 3[#],7[#],15[#],22[#]菌株对总 COD_{Cr}(Cr 表示氧化剂为酸性条件下的重铬酸钾)和 PVA 均有较大的去除率,因此该 4 株细菌被选为出发菌株,结果见表 1.

表 1 高效原始菌的形态特征
Tab. 1 Morphological characters of the ordinary high efficient strains

项目	菌 株			
	3 [#]	7 [#]	15 [#]	22 [#]
细胞形状	短杆菌	长杆菌	球菌	球菌
细胞大小/ μm	d<2	0.5×4~8	d<1	d<1
排列状况	链状	链节状	簇状	簇状
革兰氏染色	阴性	阳性	阴性	阴性
芽孢	无	无	无	无
平板菌落	乳白色,卷发状,边缘隆起,齿状	乳白色,边缘平滑,齿状	乳白色,圆形,中间隆起,边缘齿状	乳白色,不规则状,扩展,边缘突起
半固体培养基	囊状	漏斗状	茈青状	茈青状
穿刺液体培养基	不明显	絮状	絮状且有浮膜	环状

2.2 原生质体融合选育 PVA 降解高效菌

2.2.1 紫外线诱变处理获得抗药性遗传标记 采用链霉素(streptomycins)和卡那霉素(kanamycins)两种药物进行抗药性标记. 将 3[#],7[#],15[#],22[#]菌株作为出发菌株,控制 80%~95%的致死率进行紫外诱变. 诱变处理后的菌悬液经活化培养以后,采用不同药物浓度和梯度培养皿的方法,分别进行初筛、复筛.

根据菌落生长速度和耐药性筛选,得到 7 个单重抗性菌落,为了防止出现回复突变或性状退化的现象,所有菌株都经过了 5 次以上的传代转接,其中抗药能力遗传稳定性较好的有 S-7,S-22,K-3,K-15 等 4 个菌株,见表 2.

表 2 突变菌株的抗药性测定
Tab. 2 Resistance determination of the mutants

菌株	药 物 质 量 浓 度/($\mu\text{g/mL}$)														无药 平板
	10		20		30		40		50		60		70		
	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	S	K	
S-3	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
S-7	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+
S-15	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+
S-22	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+
K-3	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	+
K-7	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+
K-15	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	+
K-22	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+

注:“S”表示含链霉素的培养基,“K”表示含卡那霉素的培养基;“+”表示生长,“-”表示不生长.

2.2.2 原生质体的制备及融合率的正交试验 采用溶菌酶酶解的去壁方法提取了原生质体,原生质体融合过程涉及到的因素比较多,每个因素对融合率的影响有所不同,将这些因素设计成正交试验,以融合率为惟一的指标,对试验结果进行分析和讨论^[6],正交试验设计见表 3.

表 3 正交试验设计

Tab. 3 Design of the orthogonal experiment

水平	因 素						
	A	B	C	D	E	F	G
1	20	2	0.005	4	200	1	1.5
2	30	4	0.010	6	0	3	0
3	40	6	0.015	8			
4	50	8	0.020	10			

注:A:PEG 的质量分数(‰);B:促融时间(min);C:Ca²⁺处理浓度(mol/L);D:pH 值;E:添加细胞壁引物量(μL);F:紫外线照射原生质体的时间(min),功率 15 W,距离 30 cm;G:添加聚乙烯吡咯烷酮的质量浓度(g/dL).

从表 4 正交试验结果可以看出,不同的实验条件所得到的融合率有很大的差别,其优化条件为 A₃B₂C₄D₃E₁F₁G₁.

表 4 正交试验结果

Tab. 4 Results of the orthogonal experiment

试验号	因 素							融合率
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	0.074×10 ⁻⁵
2	1	2	2	2	1	2	2	0.041×10 ⁻⁵
3	1	3	3	3	2	1	2	0
4	1	4	4	4	2	2	1	0.013×10 ⁻⁵
5	2	1	2	3	2	2	1	0.038×10 ⁻⁵
6	2	2	1	4	2	1	2	0.761×10 ⁻⁵
7	2	3	4	1	1	2	2	0
8	2	4	3	2	1	1	1	1.048×10 ⁻⁵
9	3	1	3	4	1	2	2	3.728×10 ⁻⁵
10	3	2	4	3	1	1	1	4.274×10 ⁻⁵
11	3	3	1	2	2	2	1	0.591×10 ⁻⁵
12	3	4	2	1	2	1	2	0.216×10 ⁻⁵
13	4	1	4	2	2	1	2	0
14	4	2	3	1	2	2	1	0.009×10 ⁻⁵
15	4	3	2	4	1	1	1	3.951×10 ⁻⁵
16	4	4	1	3	1	2	2	0.004×10 ⁻⁵

通过表 5 的正交试验极差分析,得到的优化条件为 A₃B₂C₃D₄E₁F₁G₁. 按照此优化条件进行验证实验,结果融合频率达到 4.603×10⁻⁵.

表 5 正交试验极差分析

Tab. 5 Extremum difference analysis of the orthogonal experiment

水平	融合率(×10 ⁻⁵)						
	A	B	C	D	E	F	G
1	0.128	3.840	1.432	0.299	13.120	10.320	9.998
2	1.847	5.085	4.246	1.681	1.628	4.424	4.752
3	8.809	4.542	4.785	4.316			
4	3.964	1.281	4.287	8.453			
R	8.681	3.804	3.355	8.154	11.490	5.896	5.246

通过表 6 的正交试验方差分析可以看到,在所有因素中,因素 E 是高度显著的,因素 A 和因素 D 的不同水平也对实验结果造成显著的影响,其他因素也有一定的影响,但相比之下对实验结果不具有决定性作用.各因素的重要性排序为:E>A>D>F>G>B>C.

表 6 正交试验方差分析

Tab. 6 Variance analysis of the orthogonal experiment

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	表值 F	显著性
A	10.591	3	3.503	6.0298		*
B	2.124	3	0.708	1.2188		
C	1.743	3	0.581	1	F _{0.95} (3,8)=4.07	
D	9.654	3	3.218	5.5388	F _{0.99} (3,8)=7.59	*
E	8.254	1	8.254	14.2065	F _{0.95} (1,8)=5.32	**
F	2.176	1	2.176	3.7746	F _{0.99} (1,8)=11.26	
G	1.721	1	1.721	2.9627		
误差	1.743	3	0.581			

注:*表示显著;**表示高度显著.

2.2.3 融合子降解印染废水 PVA 初步试验 经镜检观察,挑选菌落形态有较明显差别的 6 个融合子菌落,命名为 F-1,F-2,F-3,F-4,F-5,F-6. 经摇瓶实验,发现其降解性能均有不同的变异,见表 7. 选择其中效果最好的 F-4 融合子进行增殖并用于培植污泥.

把 F-4,S-7,K-15 培养成活性污泥,经驯化后和常规活性污泥进行比较.它们对常规聚乙烯醇废水(PVA 体积分数 500 mL/L,pH 7.5~8.32 ℃,140 r/min,24 h)的处理效果见表 8. 可以看到,以融合子 F-4 为优势菌株的活性污泥对 PVA 的降解率达到了 87%,因为试验条件全部一致,影响降解效果的因素只有细胞生理方面的特异性变化.这可能是由于融合以后,菌株中为 PVA 降解酶系编码的基因所在的质粒体系发生了变化,使菌株 PVA 降解性能得到互补.

表 7 融合子与亲本菌株的 PVA 降解性能
Tab. 7 Ability to degrade PVA of the fusant and parent mutants

菌 株	PVA 去除率/%	COD _{cr} 去除率/%	菌 株	PVA 去除率/%	COD _{cr} 去除率/%
K-15	100	100	F-3	94	105
S-7	91	93	F-4	136	104
F-1	89	80	F-5	104	78
F-2	86	110	F-6	82	96

表 8 不同活性污泥处理 PVA 废水的效果
Tab. 8 Comparison results of wastewater treatment using the different active sludge

活性污泥	优势降解菌株	PVA 去除率/%	COD _{cr} 去除率/%
1 [#]	常规	29	69
2 [#]	K-15	63	82
3 [#]	S-7	59	84
4 [#]	F-4	87	85
5 [#]	K-15 混合 S-7	68	86

3 结 论

从自然界中分离到 4 株 PVA 降解细菌,经紫外诱变后,得到两株具有链霉素和卡那霉素单重抗药性的突变株 (S-7 和 K-15), 其 PVA 去除率分别比原来提高了 0.47 倍和 0.27 倍. 将 S-7 和 K-15 作为亲本菌株,进行原生质体融合,在优化条件下,融合率达到 4.603×10^{-5} . 融合子 F-4 菌株的 PVA 降解能力超过亲本菌株,PVA 去除率达到 79.9%,是原始菌株的两倍;将 F-4 菌株培养成活性污泥后,PVA 去除率可达 87%,是普通活性污泥的 3~4 倍. 这充分说明原生质体融合技术在难降解有机工业废水的生物降解菌育种上是有应用前景的.

参考文献:

[1] 顾鼎言. 印染废水处理[M]. 北京:中国建筑工业出版社,1985.
[2] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, *et al.* Purification and properties of secondary alcohol oxidase from a strain of *Pseudomonas*[J]. *Agric Biol Chem*,1973,37(6):747—756.
[3] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997.5—7.
[4] 廖劲松. 原生质体融合选育高效菌株净化 PVA 工业废水的研究[D]. 郑州:郑州工程学院,2001.26—35.
[5] 宋大新. 微生物学实验技术教程[M]. 上海:复旦大学出版社,1992.30—39.
[6] 温天舜,周大强,刘一勋. 随机数据分析与处理——应用概率统计[M]. 开封:河南大学出版社,1993.5—18.
(责任编辑:李春丽)

(上接第 33 页)

参考文献:

[1] 张炳文,郝真红,杜红霞. 低温真空油炸技术综述[J]. 粮油食品科技,1997,(5):10—15.
[2] 沈泽洞,黄键豪. 鲢鱼低温真空油炸的研究[J]. 食品工业科技,2001,(22):26—29.
[3] 何健. 降低油炸食品含油率的研究[J]. 食品科技,2002,(6):20—22.
[4] 罗庆丰,夏德昭,刘勤生. 降低真空油炸果蔬脆片含油率的探讨[J]. 农机与食品机械,1998,(4):6—8.
[5] 张炳文,郝真红. 利用低温真空油炸技术研发酥脆枣产品[J]. 现代科技,2002,(10):12—14.
[6] 刘艳. 苹果脆片的研制和生产[J]. 食品工业科技,1998,(3):56—57.
[7] 许牡丹,杨芙莲. 真空油炸土豆片的主要工艺条件的研究[J]. 西北轻工业学院学报,1996,(1):93—98.
[8] 石小琼,邓金星,刘锦华,等. 芋芋真空油炸最佳工艺研究[J]. 中国粮油学报,2001,(16):54—59.
[9] 蔡亚东,赵成军. 哈密瓜脆片真空油炸工艺技术[J]. 食品工业科技,1998,(6):59—60.
[10] 王肇慈. 粮油食品品质分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
[11] Krokida M K, Oreopoulou V. Water loss and oil uptake as a function of frying time[J]. *Journal of Food Engineering*, 2000,(44):39—46.
[12] Gamble M H, Rice P. Effect of pre-fry drying of oil uptake and distribution in potato crisp manufacture[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1987,(22):535—548.
(责任编辑:杨 勇)