

葡萄糖与二价锰离子对磺胺-5-甲氧基嘧啶钠生物降解影响

郭夏丽¹, 张凡英¹, 陈红坤², 罗亚婷¹

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001; 2. 濮阳市南乐县环保局, 河南 濮阳 457400)

摘 要: 通过分批试验研究了葡萄糖与二价锰离子在黄孢原毛平革菌降解磺胺-5-甲氧基嘧啶钠(SMD-Na)中的作用. 结果表明: 未添加葡萄糖时, SMD-Na 的去除率和生物量极低, 当葡萄糖质量浓度在 3~10 g/L 时, 两者随之增加, 同时, SMD-Na 的去除率与锰过氧化物酶活(MnP)和木质素过氧化物酶活(LiP)变化具有正相关性. 当二价锰离子初始浓度为 0.01~0.1 mmol/L 时, SMD-Na 的去除率和 MnP 酶活随着锰离子浓度增加而增大, 锰离子浓度对 LiP 酶活没有显著影响.

关键词: 黄孢原毛平革菌; 磺胺-5-甲氧基嘧啶钠; 生物降解; 锰过氧化物酶; 木质素过氧化物酶

中图分类号: X703.1 **文献标志码:** A doi:10.13705/j.issn.1671-6833.2016.04.021

0 引言

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)能产生木素过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(Mn-dependent peroxidase, MnP)^[1]. Kirk 等^[2]发现限氮条件有利于 LiP 和 MnP 的产生. LiP 和 MnP 催化反应是高度非特异性和无立体选择性的, 所以黄孢原毛平革菌能有效降解多种难降解有机污染物, 如多氯联苯、多环芳烃等^[3].

由于废水中磺胺类药物很难有效去除, 探索其有效去除方法显得尤为重要. 目前黄孢原毛平革菌降解磺胺类药物的相关研究报道较少^[4-5], 本研究选择磺胺-5-甲氧基嘧啶钠(SMD-Na)作为目标物, 通过摇瓶试验探究添加不同浓度的葡萄糖和不同浓度的锰离子对 SMD-Na 生物降解的影响, 为磺胺类药物的生物降解技术的建立提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 试剂和菌种

SMD-Na(99%)购自 Sigma 有限公司, 色谱甲醇(99.9%)购自天津四友有限公司, 双蒸水由实验室蒸馏获得, 其它化学试剂为分析纯.

菌体来自实验室 4℃保存的黄孢原毛平革菌

种土豆琼脂斜面. 基本培养基^[6]: 酒石酸铵 0.2 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.75 g, CaCl₂ 0.1 g, 维生素 B₁ 2 mg, 微量元素溶液 20 mL, 吐温 801 g, 蒸馏水 1 L, 20 mmol/L 酒石酸缓冲液调 pH 为 5.0. 微量元素溶液组成: MgSO₄ 3 g, MnSO₄ 0.5 g, NaCl 1.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, CoCl₂ 0.1 g, Zn-SO₄·7H₂O 0.1 g, CuSO₄ 0.1 g, AlK(SO₄)₂·12H₂O 10 mg, H₃BO₃ 10 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 10 mg, 蒸馏水 1 L.

1.2 实验设计

1.2.1 葡萄糖质量浓度对 SMD-Na 生物降解的影响

在 250 mL 的锥形瓶里装入 50 mL 含 10 mg/L SMD-Na 的基本培养基, 其中葡萄糖的浓度分别为 0、3、5、10 g/L, 121℃灭菌 30 min, 然后接种 4% 孢子悬液(1×10⁵ 孢子/mL), 于 30℃摇床里培养 10 d, 转速是 150 r/min.

每个处理 3 个重复, 每天测定培养基中 SMD-Na 的残余浓度、LiP 酶活、MnP 酶活、葡萄糖的剩余量、生物量等.

1.2.2 二价锰离子浓度对 SMD-Na 降解的影响

在 250 mL 的锥形瓶里装入 50 mL 含 10 mg/L 的 SMD-Na、不含锰离子的基本培养基, 其中葡萄糖质量浓度为 10 g/L. 锰离子以 MnSO₄ 形式添加, 浓度分别为 0、0.01、0.1 和 5 mmol/L. 然后每

收稿日期:2016-04-25; 修订日期:2016-06-18

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2015ZX07204-002)

作者简介: 郭夏丽(1966—), 女, 河南新乡人, 郑州大学副教授, 博士, 主要从事环境生物技术与固废资源化等研究, E-mail: guoxl@zzu.edu.cn.

瓶接入 1.2.1 中同样的孢子悬液,放入 30 ℃ 的摇床中培养 10 d,转速是 150 r/min. 每天测定 SMD-Na 的残余浓度、LiP 酶活、MnP 酶活.

1.3 方法

1.3.1 SMD-Na 的测定

培养基中的 SMD-Na 使用高效液相色谱分析,紫外检测器检测. 色谱柱: Agilent 5 TC-C18 250 mm × 4.6 mm;流动相采用甲醇溶液(甲醇和二次水的体积比为 30:70),用 1% 的乙酸调节 pH 为 3.4 ± 0.1;流速为 1.0 mL/min;进样量 20 μL;柱温 30 ℃;测定波长为 278 nm^[7]. 利用标准曲线法对 SMD-Na 进行分析测定.

1.3.2 酶的测定

粗酶液提取:培养液过滤后取滤液在转速 12 000 r/min 下离心 20 min,取上清液即为粗酶液,在 4 ℃ 冰柜中保存备用.

LiP^[6]:反应混合物(4 mL)含 2 mmol/L 藜芦醇、0.4 mmol/L 过氧化氢和 50 mmol/L 酒石酸-酒石酸钠缓冲溶液(pH 2.5)以及 1 mL 粗酶液,在恒温水浴锅中维持 30 ℃ 条件下反应,用紫外分光光度计检测 310 nm 处 2 min 内吸光度值的变化. 定义每分钟氧化 1 μmol 藜芦醇成藜芦醛所需的酶量为 1 个酶活力单位.

MnP^[8]:反应混合物(4 mL)含 0.1 mmol/L 硫酸锰、0.1 mmol/L 过氧化氢和 100 mmol/L 酒石酸-酒石酸钠缓冲溶液(pH 5.0)以及 1 mL 粗酶液,在恒温水浴锅中维持 30 ℃ 条件下反应,用紫外分光光度计检测 238 nm 处 10 s 内吸光度值的变化. 定义每分钟氧化 1 μmol Mn²⁺ 为 Mn³⁺ 所需的酶量为 1 个酶活力单位.

1.3.3 其它测定

菌体生物量:干重法测定^[9];还原糖:3,5-二硝基水杨酸法测定^[10].

2 结果和讨论

2.1 不同葡萄糖质量浓度对 SMD-Na 生物降解的影响

在限氮条件下研究不同质量浓度的葡萄糖对 SMD-Na 生物降解的影响,结果如图 1 所示. 在葡萄糖存在下,SMD-Na 的浓度随着时间的延长不断减小,而未添加葡萄糖的对照中 SMD-Na 浓度下降幅度极小,说明黄孢原毛平革菌在葡萄糖存在下可以降解 SMD-Na. 随着葡萄糖初始质量浓度的增大,第 10 d SMD-Na 的剩余浓度分别为 7.21、5.00 和 2.55 mg/L,说明在一定范围内葡萄

糖质量浓度的增加促进了 SMD-Na 的生物降解.

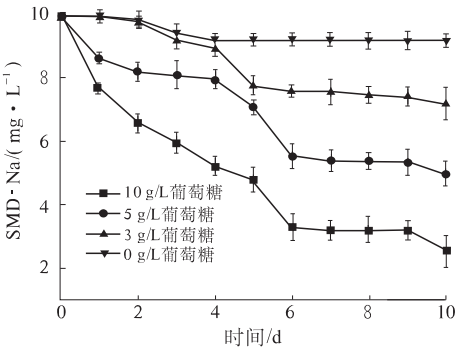


图 1 不同质量浓度葡萄糖对 SMD-Na 降解的影响
Fig.1 Effects of different glucose concentrations on degradation of SMD-Na

图 2 为各物质随时间的变化曲线,从图 2(c) 和图 2(d) 中可以看出,随着培养时间的延长,不同水平的葡萄糖质量浓度在不断下降,黄孢原毛平革菌的生物量在逐渐增加,表明黄孢原毛平革菌以葡萄糖为碳源和能源进行生长. 随着葡萄糖质量浓度的增加,黄孢原毛平革菌生长速率逐渐增加,在第 6 d,各生物量均达到最大,随之生长进入稳定期. 未添加葡萄糖的对照中磺胺-5-甲氧基嘧啶钠的去除率很低,并且黄孢原毛平革菌生物量增加幅度很小,表明黄孢原毛平革菌难以利用磺胺-5-甲氧基嘧啶钠为唯一碳源和能源进行生长代谢. 而当生长基质葡萄糖存在时,黄孢原毛平革菌以共代谢的方式降解了 SMD-Na.

微生物体内某些关键酶是共代谢过程发生的关键因素^[11]. 从图 2(a) 中可以看出,在不同葡萄糖质量浓度下,MnP 活性变化规律大致相同,即第 4 d 酶活开始出现,之后增大,于第 6 d 达到最大值,随后开始下降;同样条件下,LiP 活性于培养的第 1 d 便出现,然后保持稳定,第 6 d 后开始缓慢减小(图 2(b)). 随着葡萄糖质量浓度的加大,两种酶活均有增加,SMD-Na 降解率也随之增加,表明两种过氧化物酶均参与了 SMD-Na 的共代谢. 在未加葡萄糖的对照中,两种酶活均未检出,表明菌体生长是该酶系合成的前提条件. 当葡萄糖质量浓度为 10 g/L 时,MnP 在培养的前 3 d 内未检出,而 LiP 活性又很低,但 SMD-Na 去除率在前 3 d 内较高,推测其它酶有可能参与了 SMD-Na 的降解,在前期,本研究通过添加 P450 酶抑制剂 1-氨基苯并三唑证明在黄孢原毛平革菌降解 SMD-Na 中,P450 酶也参与其中(数据未显示). 由此,葡萄糖在菌株对 SMD-Na 降解过程中起到了共代谢的作用.

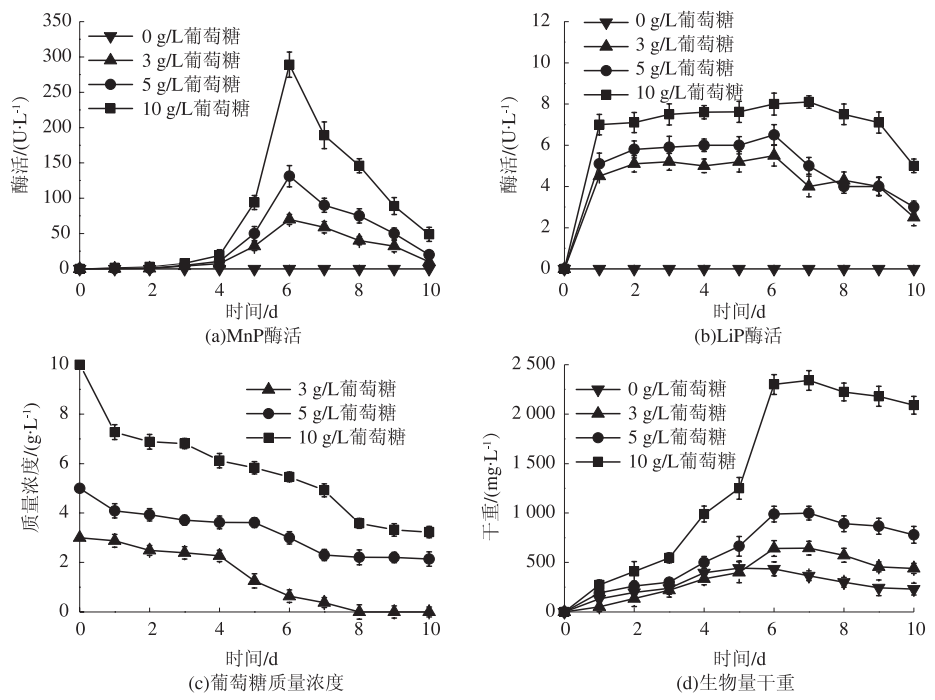


图2 MnP 酶活、LiP 酶活、葡萄糖剩余浓度及生物量干重随时间的变化曲线
Fig.2 Dynamic curves of the activity of MnP, LiP, residual glucose and dry biomass

2.2 不同浓度锰离子对 SMD-Na 生物降解的影响

图 3 为不同浓度锰离子对 SMD-Na 降解的影响,从图 3 中可以看出,当锰离子浓度由 0.01 mmol/L 增加至 0.1 mmol/L 时,SMD-Na 的降解率由 74.5% 增加至 92%. 当锰离子浓度大于 0.1 mmol/L 时,SMD-Na 的降解率变为 58%,对照组中 SMD-Na 的降解率最小. 结果表明,一定量的二价锰离子可以促进 SMD-Na 的生物降解,而较高浓度的锰离子会对微生物产生一定的毒害作用从而抑制 SMD-Na 的生物降解.

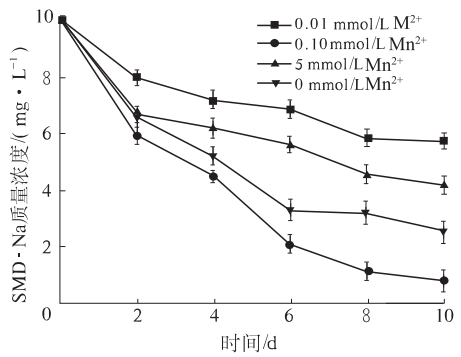


图3 不同浓度锰离子对 SMD-Na 降解的影响
Fig.3 Effects of different Mn(II) concentrations on degradation of SMD-Na

MnP 可以氧化 Mn²⁺ 为 Mn³⁺,氧化木质素及/或异质^[12]. 本研究中在不含 Mn²⁺ 的对照中,未检测出 MnP,在 0.01 ~0.1 mmol/L 浓度范围内,

MnP 酶活随着 Mn²⁺ 浓度增加而增加,当锰离子浓度继续增加时,MnP 酶活却下降,锰离子对 MnP 和 LiP 酶活的影响如图 4 所示. 从图 4(b)中可以看出,不同锰离子浓度对 LiP 酶活没有显著影响. 依据 LiP 酶活的大小以及不同 Mn²⁺ 浓度下 LiP 酶活与 SMD-Na 降解率变化趋势的对应性,推测 LiP 在 SMD-Na 降解中作用较小.

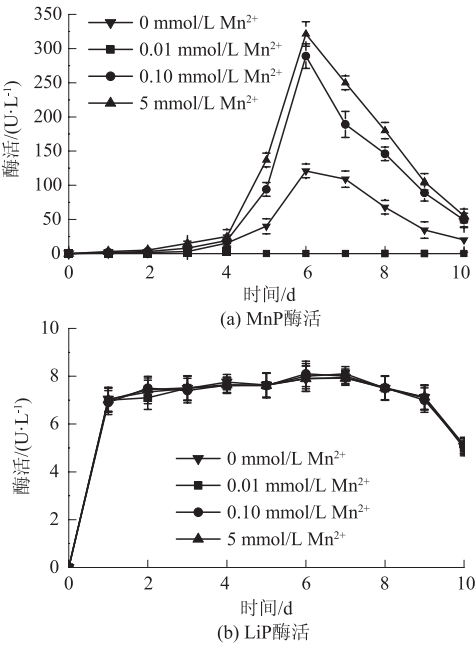


图4 锰离子对 MnP 和 LiP 酶活的影响
Fig.4 Effect of Mn(II) on the activity of MnP and LiP

3 结论

(1)葡萄糖质量浓度的增加提高了 SMD-Na 的生物降解率. MnP 和 LiP 均参与了 SMD-Na 的降解转化,其中 MnP 酶作用大于 LiP 酶.

(2) Mn^{2+} 是 MnP 催化活性所必须的,0.1 mmol/L 的 Mn^{2+} 有助于增加 MnP 酶活,从而提高 SMD-Na 降解率. 另外,不同浓度 Mn^{2+} 对 LiP 没有显著影响.

参考文献:

- [1] ZHAO M H, ZHANG C S, ZENG G M, et al. Growth, metabolism of *phanerochaete chrysosporium* and route of lignin degradation in response to cadmium stress in solid-state fermentation [J]. Chemosphere, 2015, 138: 560–567.
- [2] KIRK T K, CROAN S, MING T. Production of multiple ligninases by *phanerochaete chrysosporium* and use of a mutant strain [J]. Enzyme microbial technology, 1986, 8(1): 27–32.
- [3] WU F, OZAKI H, TERASHIMA Y, et al. Activities of ligninolytic enzymes of the white rot fungus, *phanerochaete chrysosporium* and its recalcitrant substance degradability [J]. Water science and technology, 2015, 34(7/8): 69–78.
- [4] CARACCILO A B, TOPP E, GRENNI P. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2014, 106: 25–36.
- [5] GUO X L, ZHU Z W, LI H L. Biodegradation of sulfamethoxazole by *phanerochaete chrysosporium* [J]. Journal of molecular liquids, 2014, 198(1): 169–172.
- [6] KIRK T K, MING T, KERSTEN P J, et al. Lignin peroxidase from fungi: *phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods in enzymology, 1990, 188: 159–171.
- [7] LI T, SHI Z G, ZHENG M M, et al. Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking [J]. Journal of chromatography A, 2008, 1205(1/2): 163–170.
- [8] PASZCZYNSKI A, CRAWFORD L R, HUYNH V B. Manganese peroxidase of *phanerochaete chrysosporium*: purification [J]. Methods in enzymology, 1988, 161(1): 264–270.
- [9] 李翠珍,文湘华. 白腐真菌 F2 的生长及产木质素降解酶特性的研究 [J]. 环境科学学报, 2005, 25(2): 226–231.
- [10] ADNEY B, BAKER J. Measurement of cellulase activities [R]. U.S.: [s. n.], 1996.
- [11] 徐冰洁. 不同碳源条件下功能菌共代谢降解典型 PPCPs 的效能与机理 [D]. 东华大学环境科学与工程学院, 2014.
- [12] 胡明,卢雪梅,高培基. 锰过氧化物酶的结构与功能 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(3): 30–34.

Effects of Glucose and Mn(II) on Biodegradation of Sulfametoxydiazine Sodium

GUO Xiali¹, ZHANG Fanying¹, CHEN Hongkun², LUO Yating¹

(1. School of Chemical Engineering and Energy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Nanle County Environmental Protection Bureau, Puyang 457400, China)

Abstract: The effects of various concentrations of glucose and Mn(II) on degradation of sulfametoxydiazine sodium (SMD-Na) by *Phanerochaete chrysosporium* were investigated through batch experiments. The results showed that the degradation efficiency of SMD-Na and the fungal biomass were very low without glucose and increased with the rise glucose concentration from 3 g/L to 10 g/L. At the same time, the SMD-Na biodegradation had the positive relevance of manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP). The removal efficiency of SMD-Na and MnP activity increased with the rise Mn(II) concentration from 0.01 mmol/L to 0.1 mmol/L. However, the Mn(II) concentration had no significant effect on LiP.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*; SMD-Na biodegradation; Mn-dependent peroxidase; lignin peroxidase