

杀灭菊酯降解菌菌株的分离鉴定和降解纯化酶的特性研究

阎 华, 于 博*

(湖北文理学院食品科学技术学院, 湖北 襄阳 441053)

摘 要:从湖北省襄阳市南漳王冠茶园表层土分离得到降解杀灭菊酯农药的菌株TK-2。菌株TK-2革兰氏染色为阴性, 镜检为长棒状, 生理生化特征和16S rDNA序列特征符合铜绿假单胞菌典型特征, 综合鉴定其为铜绿假单胞菌。TK-2在添加杀灭菊酯的无机盐培养基培养72 h后, 获得最高产量的杀灭菊酯降解酶, 酶活力为10.8 U/mL。TK-2杀灭菊酯降解酶经过DEAE-52和CM-52纯化后, 纯化倍数达到3.4倍, 酶活力回收率达到56.2%, 凝胶电泳后分析得到酶的分子量为83.6 kDa。TK-2杀灭菊酯降解纯化酶酶促反应的最适温度是35℃, 25~45℃稳定性良好; 酶促反应的最适pH值是8.0, pH 7.0~9.0稳定性良好, 对底物反应的米氏常数 K_m 是0.738 mmol/L, 最大反应速率 V_{max} 是1.123 mmol/(L·min)。

关键词:铜绿假单胞菌; 杀灭菊酯; 纯化酶; 降解特性

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)04-0056-06

Isolation and Identification of Fenvalerate Degrading Bacteria and Characteristics of Purified Degrading Enzymes

YAN Hua, YU Bo*

(College of Food Science and Technology, Hubei University of Arts and Sciences, Xiangyang 441053, China)

Abstract: Strain TK-2 was isolated from the topsoil of Nanzhang Wangguan Tea Garden in Xiangyang City, Hubei Province. The strain TK-2 was Gram-negative and long rod-shaped by microscopic examination. Its physiological and biochemical characteristics, as well as the 16S rDNA sequence characteristics, corresponded to the typical features of *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* TK-2 was cultured in inorganic salt medium supplemented with fenvalerate for 72 h. The highest yield of fenvalerate degrading enzyme was obtained, with an enzyme activity of 10.8 U/mL. After being purified by DEAE-52 and CM-52, the fenvalerate degrading enzyme of *P. aeruginosa* TK-2 reached 3.4 times, and the recovery rate of enzyme activity reached 56.2%. The molecular weight of the enzyme was 83.6 kDa after gel electrophoresis. The optimum temperature for degradation and purification of fenvalerate by *P. aeruginosa* TK-2 was 35℃, exhibiting good stability within the range of 25~45℃. The optimal pH value for the enzymatic reaction was 8.0, with good stability in the pH range of 7.0~9.0. The Michaelis constant (K_m) for the substrate reaction was 0.738 mmol/L, and the maximum reaction rate V_{max} was 1.123 mmol/(L·min).

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; Fenvalerate; Purified enzyme; Degradation characteristics

杀灭菊酯又称为氰戊菊酯, 该农药作用对象为鳞翅目、直翅目、半翅目和双翅目昆虫等。适用作物有棉花、大麦、小麦、茶叶等^[1]。杀灭菊酯容易通过食物链产生富集作用, 会危害到人体健

康。目前杀灭菊酯农药在茶园土壤中残留造成的环境污染和茶叶污染直接产生危害。生物修复是有效清除残留农药的方法, 秦坤等研究了氯氰菊酯降解真菌的作用特点^[2]。陈少华等研究了溴氰菊酯降解细菌的作用特点^[3]。分离筛选农药降解菌及其降解酶可以清除农药。农药降解菌生长速度快使得农药降解效率高。农药降解菌富集作用使农药降解安全无毒。农药降解酶通常比农药降解菌更适应于宽广的温度和pH值。由农药降解菌发酵制备产生的农药降解粗酶含有杂蛋白及其他小分子物质。将有活力的农药降解酶从粗酶中

收稿日期: 2020-10-15

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201616); 湖北文理学院食品新型工业化学科群建设项目(XKQ08321)

作者简介: 阎 华(1978-), 男, 副教授, 硕士, 主要从事生物科学相关研究工作。

通讯作者: 于 博, 男, 博士, 副教授, E-mail: 13530823443@139.com

富集纯化并研究其生理生化特征,有助于酶的综合利用。本研究在分离筛选杀灭菊酯降解菌TK-2以后,鉴定其为铜绿假单胞菌。采用DEAE-52阴离子交换层析柱和CM-52阳离子交换层析柱对铜绿假单胞菌TK-2中杀灭菊酯降解酶富集纯化。使用SDS-PAGE不连续凝胶电泳确定该酶蛋白的分子量和评价阴阳离子交换层析柱的纯化效果,并分析铜绿假单胞菌TK-2中杀灭菊酯降解酶的酶促反应最适温度、最适pH值及反应动力学等特性。

1 材料和方法

1.1 试验培养基和试剂

富集培养基:牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, H₂O 1 000 mL, pH 7.2, 121 °C高压灭菌 30 min;无机盐培养基:(NH₄)₂SO₄ 2.0 g, MgSO₄ 0.2 g, CaCl₂ 0.01 g, FeSO₄ 0.001 g, Na₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, pH 7.2, 121 °C高压灭菌 30 min^[4]。SDS、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、溴酚蓝、甘氨酸、考马斯亮蓝G-250、三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、琼脂糖,其他生化试剂购自深圳华因康科技有限公司;标准蛋白Marker,购自大连宝生物工程有限公司。10%杀灭菊酯乳油,购自河南科隆化工有限公司;杀灭菊酯标样,购自深圳市和本高科技有限公司。

1.2 试验仪器和设备

UV-2100型紫外-可见分光光度计,购自日本岛津公司;TV-100型振荡型恒温水浴锅,购自上海康利公司;FH-3型恒温振荡器,购自江苏苏阳公司;HT-75型中空纤维超滤膜管,购自广州太乐公司;BD-230型蛋白电泳仪、电泳槽,购自厦门高科公司;HP-6890型气相色谱仪,购自美国惠普公司;PCR扩增仪,购自爱普公司。

1.3 菌株的筛选和鉴定

将湖北省襄阳市南漳王冠茶园表层土精确称重 5 g 置于 250 mL 锥形瓶中,加入已添加 50 mg/L 杀灭菊酯的 100 mL 无机盐培养基,将锥形瓶放入恒温摇床中,设定 30 °C, 150 r/min, 左右振荡培养 7 d。7 d 后转接上述 5 mL 培养液第二次添加 100 mg/L 杀灭菊酯的无机盐培养基,设定 30 °C, 150 r/min, 左右振荡培养 7 d。如此重复接种 5 次,以 50 mg/L 的浓度梯度来强化菌株活力。然后将菌悬液制备成 10⁻⁵ 稀释液划线涂布于固体富集培养基, 30 °C 温度下培养 48 h。根据细菌生长形态和特征挑选单菌落。最后将分离筛选的菌株涂布于固体富集

培养基斜面, 4 °C 保存。杀灭菊酯降解菌株的形态、生理生化特征分析技术参照《常见细菌系统鉴定手册》操作^[5]。杀灭菊酯降解菌株 16S rDNA 通用引物为 FT1(5'-ACAGTTTGATTATGGCTCTC-3') 和 RK2(5'-GCGTTACCTTGTGTCGACGA-3'), 扩增菌株的 16S rDNA 片段^[6]。PCR 扩增的产物分离纯化使用 DNA 胶回收试剂盒进行收集, 产物送至深圳华大基因股份有限公司测序以鉴定菌株。

1.4 铜绿假单胞菌 TK-2 杀灭菊酯降解粗酶液制备和可溶性蛋白含量测定

铜绿假单胞菌 TK-2 杀灭菊酯降解粗酶液的制备方法参照文献[7]操作。粗酶液蛋白含量的测定参考福林酚法文献[8]操作。

1.5 杀灭菊酯浓度测定和降解菌酶活力测定

杀灭菊酯浓度测定参考气相色谱法文献[9]操作。降解菌酶活力测定参考文献[10]操作。降解菌酶活力单位(U)定义为每分钟降解 1 mg 杀灭菊酯所需的酶量。

1.6 铜绿假单胞菌 TK-2 菌株生长和降解菌酶活力的关系

在添加 50 mg/L 杀灭菊酯作为唯一碳、氮源的液体无机盐培养基上对铜绿假单胞菌 TK-2 进行培养, 培养条件为 30 °C、pH 7.0、120 r/min, 左右振荡培养 120 h, 每隔 12 h 取出铜绿假单胞菌 TK-2 菌液 1 mL, 测定 OD₆₀₀, 从而确定铜绿假单胞菌 TK-2 的生长速度, 同时采用 1.5 的方法测定培养基中的杀灭菊酯浓度, 从而计算出降解菌酶活力大小。

1.7 铜绿假单胞菌 TK-2 杀灭菊酯降解酶的富集纯化

1.7.1 DEAE-52 阴离子交换柱层析

使用 0.005 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液对 DEAE-52 进行柱平衡 24 h。DEAE-52 柱平衡后, 加样 1.4 制备得到的铜绿假单胞菌 TK-2 粗酶液, 采用 0.005 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液洗脱 4 h, 使用 0.1~0.5 mol/L 不同 NaCl 浓度梯度洗脱各 1 h。洗脱过程采用自动收集器进行汇集。采用 1.5 的方法测定出汇集峰的酶活力, 将有活力的酶蛋白进行合并, 透析袋和聚乙二醇-20000 浓缩后的酶液低温保存。

1.7.2 CM-52 阳离子交换柱层析

使用 0.005 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液对 CM-52 柱进行柱平衡 24 h。CM-52 柱平衡后, 加样 1.7.1 浓缩过的铜绿假单胞菌 TK-2 酶液, 采用 0.005 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液洗脱 4 h, 而后使用 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的 NaCl 溶液洗

脱各 1 h。采用 1.5 的方法测定汇集峰的酶活力,将有活力的酶蛋白进行合并,透析袋和聚乙二醇-20000 浓缩后的酶液低温保存。

1.8 铜绿假单胞菌 TK-2 降解酶蛋白纯度和分子量的分析

铜绿假单胞菌 TK-2 降解酶蛋白的纯度和分子量的分析参照文献[11]操作,采用 SDS-PAGE 不连续凝胶电泳进行分析。电泳完成后以标准蛋白条带为基准,推测出杀灭菊酯降解酶蛋白分子量。

1.9 铜绿假单胞菌 TK-2 降解纯化酶特性分析

1.9.1 酶促反应最适温度和温度稳定性

经过纯化的铜绿假单胞菌 TK-2 降解酶用磷酸缓冲液配制成 0.01 mg/mL, pH 值为 8.0。分别在恒温水浴锅中 15~60 ℃ 保持 60 min。最后按照 1.5 的方法测定铜绿假单胞菌 TK-2 纯化酶活力,酶活力最高值为 100%,酶活力最高值的温度即为最适温度。相对酶活力在 65% 以上温度即为铜绿假单胞菌 TK-2 纯化酶温度稳定性范围。

1.9.2 酶促反应最适 pH 值和 pH 值稳定性

经过纯化的铜绿假单胞菌 TK-2 降解酶用磷酸缓冲液配制成 0.01 mg/mL, 温度为 35 ℃。然后用 0.1 mol/L HCl 或 0.1 mol/L NaOH 分别调节 pH 值为 5.0~10.0 保持 60 min。最后按照 1.5 的方法测定铜绿假单胞菌 TK-2 纯化酶活力,酶活力最高值为 100%,相对酶活力最高 pH 值即为最适 pH 值。相对酶活力在 70% 以上的 pH 值即为 pH 值稳定性范围。

1.9.3 酶促反应动力学测定

将杀灭菊酯农药分别配制成浓度为 0.5~5.0 mmol/L 的溶液,在 35 ℃、pH 值 8.0 条件下,按照 1.5 的方法测定铜绿假单胞菌 TK-2 降解纯化酶活力,采用单位时间内的底物减少量来计算反应速率 V。然后采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算铜绿假单胞菌 TK-2 降解纯化酶对底物杀灭菊酯

的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 。Lineweaver-Burk 方程如下^[8]:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} \times [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

2 结果与分析

2.1 杀灭菊酯降解菌菌落形态

使用平板划线培养方法从湖北省襄阳市南漳王冠茶园土壤中分离得到降解杀灭菊酯的菌株 TK-2,培养后菌落呈圆形,边缘较为光滑湿润,中央稍微隆起,半透明,灰绿色,具体见图 1A。革兰氏染色后 PA-5 为革兰氏阴性细菌,显微镜观察为红色,长棒状杆菌,长度约 2.0 μm,宽度约 0.6 μm,细胞分散可以运动,具体见图 1B。

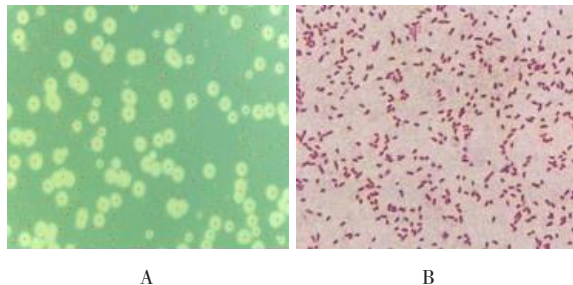


图 1 湖北省襄阳市南漳王冠茶园土壤中分离得到的菌株 TK-2 菌落形态(A)和菌株特征(B)

2.2 杀灭菊酯降解菌 TK-2 生理生化特性和 16S rDNA 鉴定序列分析

杀灭菊酯降解菌 TK-2 生理生化特性见表 1。使用细菌的 16S rDNA 通用引物 FT1 和 RK1 进行扩增,PCR 后获得 1 015bp 的 16S rDNA 序列。与其他细菌序列进行 BLAST 比对,结果显示该菌株的 16S rDNA 序列与铜绿假单胞菌 FL37624.5 菌株同源性达 99.1%。综合分析杀灭菊酯降解菌 TK-2 的生理生化特性和 16S rDNA 序列,杀灭菊酯降解菌 TK-2 鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

表 1 杀灭菊酯降解菌 TK-2 的生理生化特性

生理生化反应	生理生化特性	生理生化反应	生理生化特性
伯胶糖	+	单奶糖	+
甘露糖	+	葡萄糖	+
乙酸	-	D-葡糖酸	+
L-鼠李糖	-	木糖醇	-
麦芽糖	-	葡聚糖	-
棉籽糖	-	蔗糖	-
N-乙酰-BD-氨基葡萄糖苷	+	尿素	-
PNP-BD-糖苷	-	甘氨酸	-
Beta-葡二糖	-	L-谷氨酸	+

续表 1

生理生化反应	生理生化特性	生理生化反应	生理生化特性
半乳糖苷	-	L-脯氨酸	+
山梨醇	-	赖氨酸-丙氨酸	+
L-阿拉伯糖	-	枸橼酸	+
麦芽酮糖	-	Alpha-酮戊二酸	+
甘氨酸-脯氨酸	-	L-脯氨酸	+
L-色氨酸	-	蜜二糖	-
氧化酶	+	香豆酸	+

2.3 铜绿假单胞菌 TK-2 菌株生长和降解菌酶活力的关系

从图 2 可以发现,降解菌酶活力大小和铜绿假单胞菌 TK-2 生长速度基本一致,72 h 降解菌酶活力达到 10.8 U/mL。所以培养铜绿假单胞菌 TK-2 制备杀灭菊酯降解酶的时间以 72 h 最适宜。

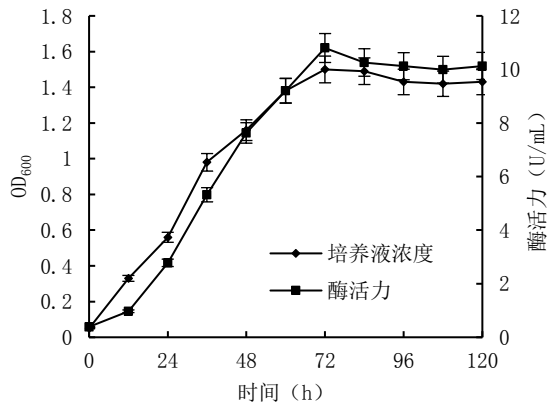


图2 铜绿假单胞菌 TK-2 生长和降解菌酶活力的关系

2.4 铜绿假单胞菌 TK-2 杀灭菊酯降解酶的纯化

2.4.1 DEAE-52 阴离子交换柱层析

DEAE-52 纤维素柱加样粗酶液 20.0 mL,采用磷酸缓冲液和 NaCl 梯度浓度洗脱,对杀灭菊酯有降解活力的酶蛋白出现在 30~40 馏分管(见图 3)。DEAE-52 柱层析后,对杀灭菊酯有降解活力的酶

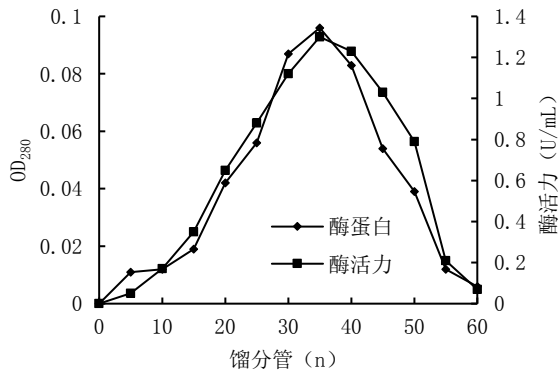


图3 杀灭菊酯降解酶的 DEAE-52 阴离子交换柱层析

蛋白得到部分纯化,汇集 30~40 管酶蛋白,采用透析袋和聚乙二醇-20000 进行浓缩,去除盐分和水,浓缩后得到酶液体积为 6.2 mL。

2.4.2 CM-52 阳离子交换柱层析

CM-52 纤维素柱加样 2.4.1 浓缩后的酶液 6.2 mL,采用磷酸缓冲液和 NaCl 梯度浓度洗脱,对杀灭菊酯有降解活力的酶蛋白出现在 25~45 馏分管(见图 4)。汇集 25~45 管酶蛋白,采用透析袋和聚乙二醇-20000 进行浓缩,去除盐分和水,浓缩后得到酶液体积为 2.6 mL。

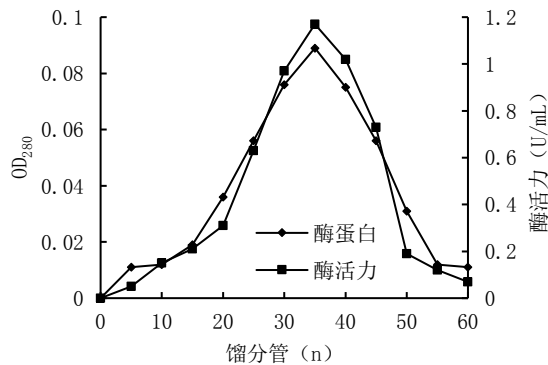


图4 杀灭菊酯降解酶的 CM-52 阳离子交换柱层析

2.4.3 杀灭菊酯降解酶纯化结果分析

从表 2 中可以看出,最初铜绿假单胞菌 TK-2 降解菌破碎获得粗酶液体积为 20.0 mL。DEAE-52 阴离子交换柱层析后酶液体积为 6.2 mL。CM-52 阳离子交换柱层析后酶液体积为 2.6 mL。证实 DEAE-52 和 CM-52 纤维素柱层析对杀灭菊酯降解酶蛋白具有纯化作用。最初的酶总蛋白为 13.8 mg,DEAE-52 阴离子交换柱层析后酶总蛋白为 4.3 mg,CM-52 阳离子交换柱层析后酶总蛋白为 2.3 mg,酶蛋白得到纯化。最初的酶总活力为 231.5 U/mL,DEAE-52 阴离子交换柱层析后酶总活力为 149.8 U/mL,CM-52 阳离子交换柱层析后酶总活力为 130.2 U/mL。酶的比活力会逐渐升高,最初酶的比活力为 16.8 U/mg,DEAE-52 阴

表2 铜绿假单胞菌TK-2杀灭菊酯降解酶的纯化结果

杀灭菊酯降解酶	总体积(mL)	总蛋白(mg)	总酶活力(U)	比活力(U/mg)	纯化倍数	回收率(%)
粗酶	20.0	13.8	231.5	16.8	1.0	100.0
DEAE-52酶	6.2	4.3	149.8	34.8	2.1	64.7
CM-52酶	2.6	2.3	130.2	56.6	3.4	56.2

离子交换柱层析后酶的比活力上升为34.8 U/mg, CM-52 阳离子交换柱层析后酶的比活力上升为56.6 U/mg。综合上述结果,杀灭菊酯降解酶的纯化倍数为3.4,回收率为56.2%,酶总活力的回收率整体较高^[5]。

2.5 杀灭菊酯降解纯化酶的电泳分析

由图5可知,电泳后杀灭菊酯降解纯化酶的条带较为清晰,条带直径较粗。杀灭菊酯降解酶较为均一,蛋白含量较高。铜绿假单胞菌TK-2中杀灭菊酯降解纯化酶的分子量约为83.6 KDa。

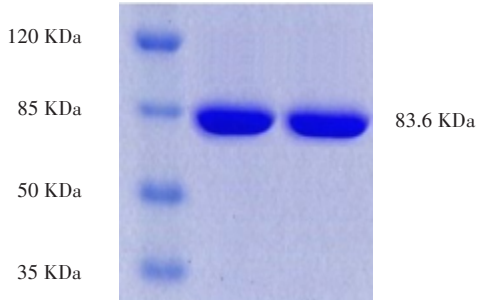


图5 铜绿假单胞菌TK-2中杀灭菊酯降解纯化酶的SDS-PAGE不连续凝胶电泳

2.6 杀灭菊酯降解纯化酶的特性分析

2.6.1 酶促反应最适温度和温度稳定性

本试验将不同温度处理降解纯化酶对杀灭菊酯降解酶活力进行测定,结果见图6。酶促反应最适温度为35℃,25~40℃酶活力稳定性良好,相对酶活力较高,可以达到65%以上。酶促反应温度从35℃升高到60℃,酶活力出现下降。60℃时对酶活力不足20%。综合分析得到铜绿假单胞

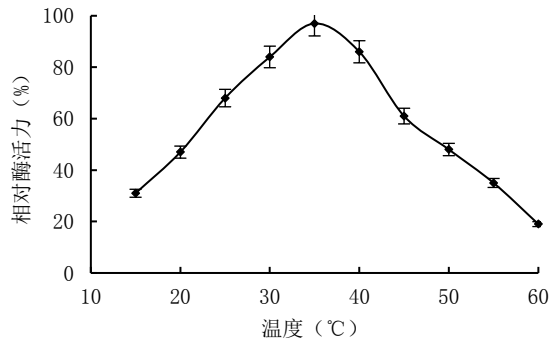


图6 不同温度对杀灭菊酯降解纯化酶活力的影响

菌TK-2中杀灭菊酯降解纯化酶的最适温度为35℃,25~40℃范围内酶活力稳定性良好。

2.6.2 酶促反应最适pH值和pH值稳定性

本试验以不同pH值处理降解纯化酶对杀灭菊酯降解酶活力进行测定,结果见图7。酶促反应最适pH值为8.0,pH 7.0~9.0酶活力稳定性良好,相对酶活力可以达到70%以上。当pH值低于8.0时,酶活力随着pH值下降而降低,pH 5.0时相对酶活力不足25%。当pH值高于8.0时,酶活力随pH值上升而降低,pH 10.0时相对酶活力不足30%。综合分析铜绿假单胞菌TK-2中杀灭菊酯降解纯化酶的最适pH值为8.0,pH 7.0~9.0酶活力稳定性良好。

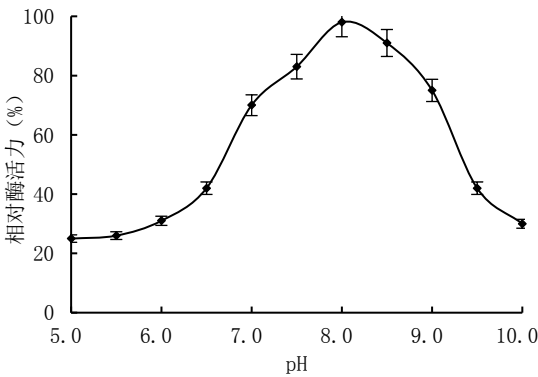


图7 不同pH值对杀灭菊酯降解纯化酶活力的影响

2.6.3 酶促反应动力学

本试验采用酶促反应初速度倒数1/v和底物浓度倒数1/[S]进行作图,使用线性回归方程计算反应动力学相关参数,结果见图8。铜绿假单胞菌TK-2降解纯化酶对底物杀灭菊酯的降解过程符合米氏常数方程特征。米氏常数方程线性标准曲线R²为0.991,表明该线性标准曲线拟合性良好。使用线性回归方程计算后获得K_m为0.738 mmol/L,V_{max}为1.123 mmol/(L·min)。

3 讨论

杀灭菊酯农药适用于茶叶病虫害防治^[12],使用浓度的不断增加会引起农药残留。微生物降解是农药残留污染环境修复的重要发展方向。筛选和鉴定农药残留降解微生物是杀灭菊酯农药残留

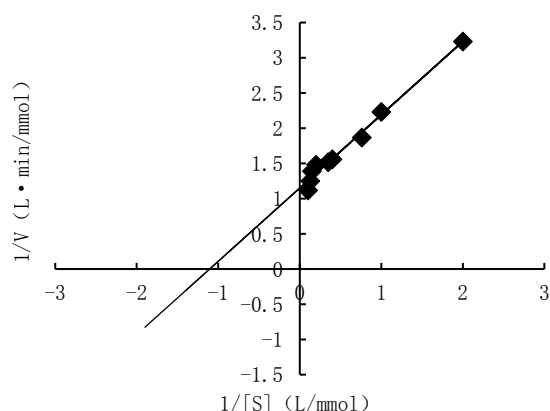


图8 铜绿假单胞菌TK-2降解纯化酶对底物杀灭菊酯的Lineweaver-Burk曲线

生物修复的核心^[13]。平板划线培养、生理生化特性鉴定和分子生物学技术鉴定技术一直应用于降解微生物的分离筛选和鉴定,具有良好的应用价值,应用相关技术分离得到 *Lysinibacillus sphaericus* FLQ-11-1, *Arthrobacter* sp. CN2^[6-7]。本研究从湖北省襄阳市南漳王冠茶园表层土通过多次驯化、富集,分离获得降解杀灭菊酯农药的铜绿假单胞菌菌株TK-2。筛选的降解杀灭菊酯铜绿假单胞菌TK-2是首次发现,因其高效的特点具备进一步开发的潜力。

农药降解酶也可以清除农药,具有良好的应用价值。使用阴阳离子吸附、凝胶层析技术提纯了新型拟除虫菊酯水解酶,并分析该酶清除农药的最适温度和pH值^[11];使用阴阳离子吸附技术提纯拟除虫菊酯水解性羧酸酯酶,并分析该酶清除农药的离子浓度影响^[4];使用阴阳离子吸附技术提纯热稳定性拟除虫菊酯水解酶,并分析该酶清除农药的矿化机理^[9]。本研究的铜绿假单胞菌TK-2生长与杀灭菊酯降解基本一致,显示出良好的同步关系。培养时间72 h获得最高产量的杀灭菊酯降解酶10.8 U/mL。铜绿假单胞菌TK-2降解酶使用DEAE-52和CM-52纯化后,纯化倍数较高,酶活力回收率较好。酶促反应最适温度为35℃,最适pH值为8.0,在温度25~45℃和pH 7.0~9.0,杀灭菊酯降解酶具有优良的温度稳定性和pH值稳定性。降解纯化酶对底物杀灭菊酯反应速度较快,属于正向反应。

铜绿假单胞菌TK-2来源于茶园表层土,农药降解菌生长速度快,应用田间具有良好的适应性,适合于不同作物的土质环境,可以单独作为良好的农药降解剂。铜绿假单胞菌TK-2也可以产生较丰富的杀灭菊酯降解酶,对该农药降解酶

进行了纯化,目标是为了优化降解效果和分析降解特性,去除杂蛋白及其他小分子物质,提高农药降解效能。以期为开发杀灭菊酯农药残留环境污染生物处理技术提供参考。

4 结 论

湖北省襄阳市南漳王冠茶园表层土分离得到降解杀灭菊酯农药的菌株TK-2。菌株TK-2革兰氏染色为阴性,镜检为长棒状,生理生化特征和16S rDNA序列特征符合铜绿假单胞菌典型特征,综合鉴定其为铜绿假单胞菌。

铜绿假单胞菌TK-2以杀灭菊酯作为唯一碳、氮源,培养时间72 h获得最高产量的杀灭菊酯降解酶,该酶活力可以达到10.8 U/mL。TK-2降解酶使用DEAE-52和CM-52纯化后,纯化倍数可以达到3.4倍,酶活力回收率可以达到56.2%。TK-2的降解纯化酶使用SDS-PAGE不连续凝胶电泳进行分析后分子量为83.6 kDa。

铜绿假单胞菌TK-2降解纯化酶酶促反应最适温度为35℃,最适pH值为8.0,在温度25~45℃和pH 7.0~9.0,杀灭菊酯降解酶具有优良的温度稳定性和pH值稳定性。降解纯化酶对底物杀灭菊酯 K_m 为0.738 mmol/L, V_{max} 为1.123 mmol/(L·min)。

参考文献:

- [1] 董照锋,张小平. 5种杀虫剂对茶棍蓟马、茶黄蓟马田间防效[J]. 东北农业科学, 2018, 43(5): 38-40.
- [2] 秦 坤,朱鲁生,王金花. 氯氰菊酯降解真菌的筛选及其降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2010, 4(4): 950-954.
- [3] 陈少华,罗建军,肖 盈,等. 一株拟除虫菊酯农药降解菌的分离鉴定及其降解特性与途径[J]. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1616-1625.
- [4] Guo P, Wang B Z, Hang B J, et al. Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(4): 1107-1112.
- [5] Zhai Y, Li K, Song J L. Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 16(1): 221-222.
- [6] Hu G P, Zhao Y, Song F Q, et al. Isolation, identification and cyfluthrin-degrading potential of a novel *Lysinibacillus sphaericus* strain, FLQ-11-1[J]. Research in Microbiology, 2014, 165(2): 110-118.
- [7] Wang J H, Ren L, Jia Y, et al. Degradation characteristics and metabolic pathway of 4-nitrophenol by a halotolerant bacterium *Arthrobacter* sp. CN2[J]. Toxicological and Environmental Chemistry, 2016, 98(5): 226-240.

(下转第94页)

品质,适于应用在生产中,亦可以根据相关目标需求自行调节所需硒的喷施浓度以达到最优经济效益。

参考文献:

- [1] 陈玉波,张学明,姚环宇,等. 8个草莓品种在日光温室立体栽培的引种表现[J]. 东北农业科学, 2016, 41(6): 97-99.
- [2] 许真. 硒对草莓营养物质含量的影响[J]. 农家参谋, 2018(24): 86-87.
- [3] 石春兰,叶舜,朱立辉,等. 施硒对火龙果果实品质及总硒含量的影响[J]. 江西农业, 2019(22): 36-37.
- [4] 李磊,尹显慧,龙友华,等. 叶面喷施硒对辣椒果实品质及微量元素的影响[J]. 北方园艺, 2019(16): 1-6.
- [5] 王世明. 叶面喷硒可提高甜樱桃果实品质并降低部分重金属的含量[J]. 中国果业信息, 2019, 36(7): 54.
- [6] 薛竞一,王瑞雪,魏蓉,等. 叶面喷施亚硒酸钠对葡萄果实品质及叶片衰老的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2018(6): 161-165.
- [7] 耿艳秋,李大勇,吴莹,等. 低温胁迫对玉米萌发出苗期生理生化指标的影响[J]. 东北农业科学, 2016, 41(6): 11-15.
- [8] 于玲,董丽丽. 三种方法测定不同产区酸枣仁中Vc含量的研究[J]. 甘肃科学学报, 2015, 27(5): 66-69.
- [9] 黄艳,文露,庞亚卓,等. 喷施钙肥对‘夏黑’葡萄果实糖酸积累的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2020(2): 166-172.
- [10] 朱新鹏,金玉洁,邵晓园,等. 4种市售黑蒜主要成分分析和pH对抗氧化活性的影响[J]. 东北农业科学, 2018, 43(2): 44-48.
- [11] 杨艳,祁平,吴永妮,等. 黑木耳花青素提取工艺的优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(9):

70-75.

- [12] 徐锴,赵德英,袁继存,等. 叶面喷施硒肥对梨果实性状的影响[J]. 北方园艺, 2019(22): 35-40.
- [13] 仰路希,谢永东,贺忠群. 施硒对人参莱生长及生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2019, 39(9): 1636-1641.
- [14] 闫帅,李晓光,徐锴,等. 硒叶面肥对‘南果梨’幼树叶片光合、叶绿素荧光参数及组织结构的影响[J]. 中国果树, 2018(4): 23-26, 30.
- [15] 韩丹,熊双莲,许自成,等. 硒对烤烟生长、化学指标及矿质营养元素含量的影响[J]. 核农学报, 2017, 31(10): 2072-2079.
- [16] 马倩. 南丰蜜橘在成熟过程中营养及功能性成分的变化规律研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2019.
- [17] 陈建伟. 叶面喷施沼液和硒肥对苹果果实及蔗糖酶活性的调控效应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [18] 郭坤元,何银生,林先明,等. 亚硒酸盐对葛根幼苗形态及生理指标的影响[J]. 中药材, 2020, 43(3): 532-535.
- [19] 谭景莹. 发现参与蛋白质生物合成的第21种氨基酸[J]. 生理科学进展, 1988(4): 309.
- [20] 袁丽君,袁林喜,尹雪斌,等. 硒的生理功能、摄入现状与对策研究进展[J]. 生物技术进展, 2016, 6(6): 396-405.
- [21] 肖真真,李启明,焦自高,等. 叶面喷施外源硒营养液对甜瓜产量和品质的影响[J]. 蔬菜, 2019(9): 23-27.
- [22] 田明. 硒处理对西兰花中硫代葡萄糖苷合成及代谢影响的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [23] 孙媛媛,悦晓孟,贾礼,等. 亚硒酸钠促进大豆芽苗菜下胚轴花青苷合成的机制[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(2): 267-273.
- [24] 刘艳芳. 富硒萝卜苗发芽过程中营养组分的动态变化[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2019, 36(3): 21-24.

(责任编辑:王昱)

(上接第61页)

- [8] Fan X J, Liu X L, Huang R, et al. Identification and characterization of a novel thermostable pyrethroid-hydrolyzing enzyme isolated through metagenomic approach[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 5(1): 11-33.
- [9] 许超,曲勤凤,顾文佳,等. 新型可降解高效氯氰菊酯微生物菌株的筛选、鉴定及条件优化[J]. 东北农业科学, 2016, 41(2): 70-73.
- [10] Yang Z, Fu X. Monitoring of total type II pyrethroid pesticides in citrus oils and water by converting to a common product 3-phenoxybenzoic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(3): 50-65.

- [11] Balasubramanian V, Lakshminarayanan A K, Varahamoorthy R, et al. Application of response surface methodology to prediction of dilution in plasma transferred arc hardfacing of stainless steel on carbon steel[J]. Journal of Iron and Steel Research, International, 2009, 16(1): 44-53.
- [12] 董照锋. 不同药剂混合处理对茶树主要病虫害的防治效果研究[J]. 东北农业科学, 2020, 45(2): 36-40.
- [13] Cycon M, Wojcik M, Piotrowska-Seget Z. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia sp.* and *Pseudomonas sp.* and their use in bioremediation of contaminated soil[J]. Chemosphere, 2009, 76(6): 494-501.

(责任编辑:王昱)