

青岛农业大学

毕业论文(设计)

题目: 节杆菌 PMP 降解二甲基吡啶的研究

姓名: 吴一昊

学院: 生命科学学院

专业: 生物技术(食用菌)

班级: 2016 级 01 班

学号: 20165186

指导教师: 于浩

2020 年 6 月 1 日

青岛农业大学 毕业论文（设计）诚信声明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年 月 日

目 录

摘要	I
Abstract	II
引言	1
1 实验材料与试验方法	2
1.1.实验材料	2
1.1.1 实验用菌株	2
1.1.2 主要试验仪器	2
1.1.3 化学试剂	2
1.1.4 实验所用器具	3
1.1.5 所用培养基	3
1.2 试验方法	3
1.2.1 菌株获取保藏与品种鉴定	3
1.2.2 温度、PH 对菌株生长研究	4
1.2.3 底物浓度对菌株生长研究	5
1.2.4 固定底物量菌株的生长和降解研究	5
1.2.5 多种底物降解的休止细胞反应	5
2 实验结果	6
2.1 二甲基吡啶菌株测序鉴定	6
2.2.二甲基吡啶在各温度条件下的生长状况分析	7
2.3 二甲基吡啶在各 pH 条件下的生长状况分析	8
2.4 二甲基吡啶菌株在不同底物浓度条件下的生长状况分析	9
2.5 固定底物量菌株的生长和降解生长状况分析	10
2.6 休止细胞反应对各种底物降解分析	11
3.讨论	18
参考文献	19
致谢	20

节杆菌 PMP 降解二甲基吡啶的研究

生物技术专业（食用菌） 吴一昊

指导老师 于浩

摘要：分离到一株能以二甲基吡啶为唯一碳氮源生长的菌株，通过 16SrRNA 鉴定该菌株为节杆菌，将该菌株命名为 PMP。通过控制变量的方法进行试验验证此菌株的生长条件，通过改变变量 pH、温度、底物浓度、等方面研究此菌株的最适生长条件，最终得到菌株生长最适温度在 25°C-37°C 之间，最适 pH 为 7-8 之间，最适浓度为 25 mg / L-200 mg / L 之间，并且对用休止细胞方法对菌株的降解能力方面进行试验研究，得到此菌株只能够降解二甲基吡啶，对其他所验证的几种底物不进行降解。

关键词：节杆菌；二甲基吡啶；降解；休止细胞反应

Degradation of 2-methylpyridine by *Arthrobacter* sp. PMP

Student majoring in Biotechnology (edible fungi) Yihao Wu

Tutor Yu Hao

Abstract: A strain which can use 2-methylpyridine as the sole carbon and nitrogen source was isolated. The strain was identified as *Arthrobacter* based on 16SrRNA and named as PMP. The growth conditions of the strain were tested. The optimal growth conditions of the strain were studied under different pH, temperature, and substrate concentration conditions. the optimal growth temperature of strain PMP was 25 °C - 37 °C, the optimal pH was 7-8, the optimal concentration was 25 mg / L-200 mg / L, and the degradation ability of the strain by cell suspension method was improved. The results showed that the strain could only degrade 2-methylpyridine, but not other substrates.

Key words: *Arthrobacter*; 2-methylpyridine; degradation; resting cell reaction;

引言

二甲基吡啶是一种液体药品、无色、无味有很强烈刺激性气味的油性液体，也是一种化学中间品，在各个领域上都能见到其身影，例如做燃料，合成药品，做树脂等，也可以制取化肥增效剂、除草剂、牲畜驱虫剂、橡胶促进剂、染料中间体等^[1]。

二甲基吡啶和吡啶性质有一些相似性，都能够跟有机酸和无机酸一样生成盐，能够和无机盐类、卤代烷等形成变成化合物，二甲基吡啶的化学性质稳定，不能够发生聚合反应，用于制取 2-乙炔基吡啶、氮肥增效剂、长效磺胺、抗矽肺病药、牲畜驱虫药、家禽用药、有机磷解毒剂、局部麻醉药、泻药、胶片感光剂的添加物、染料中间体和橡胶促进剂等。除用作溶剂外，也用作医药、染料、农药、合成树脂和化肥增效剂的原料。用于制取染料、树脂、农药、兽药、橡胶促进剂、胶片感光剂添加物等。在医药上用于制备思卡尼、扑尔敏、解磷定、乙酰半胱氨酸等药物。用于药品、染料、橡胶等化学品的合成，也用作溶剂、实验试剂。检定钴、氰酸盐和铁^[2]。

2,3- 二甲基吡啶是重要的医药中间体,主要用于合成兰索拉唑和雷贝拉唑等用于治疗消化性溃疡的药物。我国是奥美拉唑、兰索拉唑和埃索美拉唑原料药的消费大国，但合成拉唑类原料药的医药中间体——烷基吡啶 国内产量少，主要依赖进口，使得医药产品价格居高不下，制约了我国新型医药的开发与创新^{[3][4]}。

二甲基吡啶在未来的领域中应用会越来越多，对二甲基吡啶的需求量约会越来越大，当制造量越来越大时，所面临的问题就会越来越多，因此对二甲基吡啶的研究也越来越重要，认识到二甲基吡啶的一些性质以及对以后二甲基吡啶的讲解进行研究，对二甲基吡啶以后所可能发生的问题具有很好的预防作用。

本实验所用菌株是从污染土壤中经过多次筛菌所得，是一种将二甲基吡啶当做唯一营养物质的细菌，经过提基因当做模板进行 16SrDNA 扩增，并将扩增所得序列进行鉴定，还通过控制唯一变量的方法，对该菌株的最适 pH、温度、底物生长浓度、底物降解进行试验，再加休止细胞反应研究其最适生长条件以及对底物的降解速率。

1 实验材料与试验方法

1.1.实验材料

1.1.1 实验用菌株

实验所用的菌株为筛菌所得到的菌株，是一种能够在二甲基吡啶为底物时生长的一种菌株，筛菌^[5]所得新菌株通过平板分区划线，挑取单菌落培养获得能够在二甲基吡啶中生长的纯菌株。

1.1.2 主要试验仪器

表 1.1.1 实验仪器

仪器名称	型号	厂家
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
全自动高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司
电子天平	AR1140	Ohaus Corp.pine Brook,NJ,USA
电热恒温培养箱	DRD-9082	上海森信实验仪器有限公司
磁力加热搅拌器	79-1 型	常州国华电器有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
Eppendorf biophotometer	Plus	常州诺基设备有限公司
离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
紫外可见分光光度计	G6860A	上海精科有限公司
双层全温培养床	QYC2112	上海福玛实验设备有限公司

1.1.3 化学试剂

表 1.1.2 试验试剂

二甲基吡啶 (2MP)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
三甲基吡啶 (3MP)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
四甲基吡啶 (4MP)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
吡啶	上海麦克林生化科技有限公司
2-羧基吡啶 (2PD)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
3-羧基吡啶 (3PD)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
4-羧基吡啶 (4PD)	生工生物工程股份有限公司
2-吡啶羧酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
烟酸	国药集团化学试剂有限公司
异烟酸	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
磷酸氢二钾 (K ₂ HPO ₄)	莱阳市康德化工有限公司
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	天津市鼎鑫化工有限公司
LB 肉汤培养基(LB Broth)	青岛高科园博生物科技技术有限公司

硫酸钠(Na_2SO_4)	天津市巴斯夫化工有限公司
七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	天津市巴斯夫化工有限公司

1.1.4 实验所用器具

三角瓶、移液枪、枪盒、枪头、培养皿、玻璃棒、比色皿、1.5 ml 离心管、50 ml 离心管、烧杯、量筒、注射器、滤头

1.1.5 所用培养基

LB 培养基配制：量取 25gLB 粉装入量筒并定容至一升，分装到 20 瓶 250 mL 三角瓶，每瓶装 50 mL，用封口膜和牛皮纸封装，最后放入灭菌锅 121 °C 灭菌。

LB 固体培养基配制：量取 25 g LB 粉装入量筒并定容至一升，分装到 10 瓶 250 mL 三角瓶中，每瓶装 100 mL，并且在每瓶中加入 2 g 琼脂粉，最后放入 121°C 灭菌锅中灭菌 20 min。

MSM 培养基配制：一 LMSM 培养基配制： $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 12.6 g, KH_2PO_4 3.4 g, Na_2SO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 微量金属盐溶液 1 mL, 调 PH 为 7.0, 分装到 20 个 250 mL 三角瓶中，121°C 灭菌。其中金属离子母液（2000 倍）1L 中含有：0.05 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.008g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.04g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g ZnSO_4 , 0.1g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.038g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 0.0124 g H_3BO_3 。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株获取保藏与品种鉴定

通过污染土壤初次筛菌得到能够在二甲基吡啶中生长的菌液，拿之前配好的 MSM 培养基，在其中加入 50 μL 二甲基吡啶和 1L 初次筛选所得的菌液，放入摇床培养一到两天，重复此步骤直至得到能够稳定生长且能够降解二甲基吡啶的菌液。

超净工作台进行灭菌，将所需灭过菌平板和枪头、移液枪和上面试验所得菌液、新的灭过菌 MSM 培养基放入超净工作台内，开紫外灯灭菌十五分钟，点酒精灯并在酒精灯倒平板，等平板冷却后用接种环沾取菌液划线，封好封口膜放入 30°C 培养箱中培养等待菌株生长。等菌株生长好放入超净工作台灭菌，将酒精灯点燃并烧镊子，将烧完的镊子倒放在离心管架上冷却，等镊子冷却完毕后夹取黄枪头挑取单菌落与 MSM 培养基中，

用紫外灯灭过菌的注射器抽取二甲基吡啶,给注射器带上滤头将吸取的二甲基吡啶注入 1.5 mL 离心管中,用移液枪吸取 50 μ L 二甲基吡啶打入挑取单菌的 MSM 培养基中,放入 30°C摇床中培养即为所需菌株。每一次接种完毕后都要取一瓶新的灭过菌 MSM 培养基进行无菌接种,以保证菌种的活性。

菌株保藏^[6]:将获得的纯菌株菌液放入超净工作台内,并把所需工具和四瓶 MSM 培养基放入超净工作台内,灭菌 15 分钟,灭菌完毕后每瓶 MSM 培养基接种 1L 菌液和 50 μ L 的滤头过滤的二甲基吡啶,密封完毕后放入 30°C摇窗内培养一至两天。将养好的四瓶菌液分装到四根 50 mL 的离心管内,配平后放入离心机内离心,离心条件 8000r/5min,离心完毕后将上清倒入三角瓶内备用,用移液枪吸取 600 μ L 上清去悬浮离心管内菌体,悬浮完毕后注射到 1.5 mL 离心管内,在离心管内加入 300 μ L 甘油放入 -80°C冰箱内密封保存。

菌种鉴定:以纯化培养获得的菌株作为模板构建 15 μ L 的 16srRNA 扩增体系,使用 27F 和 1492R 作为引物,,15 μ L 的体系构建:7.5 μ L 的 2 \times Taq Max,0.6 μ L 的 27F,0.6 μ L 的 1492R,7 μ L 的超纯水。将构建完成的体系进行扩增,扩增完毕后送到测序公司进行测序,将得到的序列与数据库比较确定菌株的种类^[7]。

1.2.2 温度、PH 对菌株生长研究

温度对菌株生长研究:在 20 点进行接种,使用 16 瓶灭过菌的 MSM 培养基,每四瓶为一组分四组,并在每组的瓶上分别标记 25°C、30°C、37°C、42°C、每瓶中加入 50 μ L 的二甲基吡啶以及 1 L 的菌液,将每组的瓶放入所对应温度的摇床内,摇床的转速为 120r/min,分别在第二天的 8 点、11 点、14 点、17 点、20 点取样,取样每次取 1 L 的菌液到 1.5 mL 离心管中,每次取完样后都要在 600nm 吸光值处测量 OD 值。

pH 对菌株生长研究:首先调配缓冲液,缓冲液 A:1L 中加入 18.3 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、1 g Na_2SO_4 ,缓冲液 B:1L 中加入 10.9 g KH_2PO_4 、1 g Na_2SO_4 ,其次调配 pH 为 5、6、7、8、9、10 的六种培养基,每种培养基配三瓶。调制 pH 为 5 的培养基:加入 150 mL 的缓冲液 B 配制,如果 PH 有偏差用 HCl 调 pH,调制 pH 为 6 的培养基。加入 11.45 mL 的缓冲液 A、131.55 mL 的缓冲液 B,如果 pH 有偏差用缓冲液 A、B 调 pH,调制 pH 为 7 的培养基:加入 91.5 mL 缓冲液 A、58.5 mL 缓冲液 B,如果 pH 有偏差用缓冲液 A、B 调 pH,调制 pH 为 8 的培养基:加入 124 ml 缓冲液 A、8 mL 缓冲液 B,如果 pH 有偏差用缓冲液 A、B 调 pH,调制 pH 为 9 的培养基:加入 150 mL 的缓冲液 A,如果 pH 有偏差用 NaOH 调 pH,调制 pH 为 10 的培养基:加入 150 mL 的缓冲液 A,如果 pH

有偏差用 NaOH 调 pH。每种 pH 总量为 150 mL，将 150 mL 液体分装到三瓶三角瓶中，所有种类 pH 总共有 18 瓶。20 点进行接种，每瓶内接种 1000 mL 菌液和 50 μ L 二甲基吡啶，密封放入 30 $^{\circ}$ C 摇床内，摇床的转速为 120r/min，分别在第二天的 8 点、11 点、14 点、17 点、20 点取样，取样每次取 1000 mL 的菌液到 1.5 mL 离心管中，每次取完后都要在 600nm 吸光值处测量 OD 值。

1.2.3 底物浓度对菌株生长研究

取 15 瓶灭过菌的 MSM 培养基，在 20 点接种，每瓶接种 1 L 菌液，每三瓶为一组分为五组，在每组的瓶上分别写上 12.5、25、50、100、200，用移液枪在每瓶培养基内注射相应含量的二甲基吡啶，密封放入 30 $^{\circ}$ C 摇床内，摇床的转速为 120r/min，分别在第二天的 8 点、11 点、14 点、17 点、20 点取样，取样每次取 1000 mL 的菌液到 1.5 ml 离心管中，每次取完后都要在 600nm 吸光值处测量 OD 值。

1.2.4 固定底物量菌株的生长和降解研究

取 10 瓶灭过菌的 MSM 培养基，20 点接种，每五瓶为一组，一组内分别有一瓶为空白，其中四瓶接种 1 L 菌液和 50 μ L 二甲基吡啶，一瓶只接 50 μ L 的二甲基吡啶；另一组内四瓶接 1 L 菌液和 100 μ L 二甲基吡啶，一瓶只接 100 μ L 的二甲基吡啶，密封放入 30 $^{\circ}$ C 摇床内，摇床的转速为 120r/min，分别在第二天的 8 点、11 点、14 点、17 点、20 点取样，取样每次取 1000 ml 的菌液到 1.5 mL 离心管中，取两组，一组在每次取样完毕后都要在 600nm 吸光值处测量 OD 值，另一组每次取完后放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱内冷冻保存，等所有时间样品取完后解冻，在 280nm 吸光值处测量，如果数值太大进行稀释测量，保证数值 2 以内。

1.2.5 多种底物降解的休止细胞反应

配 5 瓶 200 mL 的 MSM 培养基，密封在 115 $^{\circ}$ C 进行灭菌，灭菌完毕后在超净工作台上进行接种，每瓶接种 2000 ml 菌液和 200 μ L 的二甲基吡啶，接种的二甲基吡啶为滤头滤过的，密封放到 30 $^{\circ}$ C 摇床内，摇床的转速为 120r/min，期间在无菌条件下用移液枪吸取 1 L 菌液，在 600nm 处测量 OD 值，当 OD 值在 1.2 左右时停止培养，将培养完成后的 5 瓶菌进行离心，离心条件为 8000r/5min，离心完成后去除上清，用超纯水对沉

淀进行悬浮，悬浮完成后再次进行离心，离心条件依旧为 8000r/5min，离心完成后重新用超纯水洗涤，方法与上一次相同，将所得沉淀用移液枪悬浮，悬浮完后倒入量筒内定容至 50 mL 备用,此时的细胞即为休止细胞^[8]。

找 14 瓶 150 mL 的小三角瓶冲洗干净，其中 10 个小三角瓶加入 10 mL 超纯水，其余 4 个小三角瓶加入 15 mL 超纯水作对照，10 瓶加入 10 mL 超纯水的小三角瓶内分别加入 15mg (15 μ L) 的药品并在瓶上做好相应标记，药品种类为：

吡啉、三甲基吡啉、四甲基吡啉、二羟基吡啉、三羟基吡啉、四羟基吡啉、异烟酸、烟酸、二吡啉羧酸、二甲基吡啉，用玻璃棒搅拌，待样品溶解完全后每瓶内加入 5 mL 悬浮后的菌液密封。四瓶加入 15 mL 超纯水的小三角瓶内分别加入 15 μ L 的吡啉、二甲基吡啉、三甲基吡啉、四甲基吡啉密封，在瓶上做好相应标记。

对 14 瓶培养基进行取样，每瓶取 1 L 与 1.5 mL 离心管中离心，离心完成后吸出上清与新的 1.5 mL 离心管中，做好标记放在-20 $^{\circ}$ C冰箱内冷冻保存，取完样品后的 14 瓶培养基放入 30 $^{\circ}$ C摇窗内，摇床的转速为 120r/min，分别于 3h、6h、21h 取样，每次取完样后都要放到-20 $^{\circ}$ C冰箱内冷冻保存，带所有样品取完后解冻扫全波长，扫全波长的条件为 400nm 处开始 200nm 处结束，吸光值的峰值设定为 3，用超纯水做空白对照，每次测量时要将溶液在比色皿中震荡混匀后再放入紫外分光光度计扫。

对于所进行的温度、pH、底物浓度、底物降解、休止细胞反应都要绘制生长曲线，并且对生长曲线^{[9][10]}的特性进行分析。

2 实验结果

2.1 二甲基吡啉菌株测序鉴定

以纯化培养获得的菌株作为模板构建 15 μ L 的 16SrRNA 扩增体系进行 PCR 扩增，将扩增完全后的基因片段序列送往上海生工生物工程有限公司进行测序，测序的结果如下所示：

M_16S-27F_TSS20191128-0532-3659_H04

GCGGGGGTCTTACCTGCAGTCGAACGATGATCCGGTGCTTGCGCCGGGGATT
AGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGC
CTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCATGGTGGGGGGTGA
AAGCTTTTTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAAT

GGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTG
TAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCCCTCTTTGGGGGTGACGGTACTTGCAGAA
GAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCTGCTGTGA
AAGACCGGGGCTCAACTCCGGTTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGT
AGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAAC
ACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCAT
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACT
AGGTGTGGGGGACATTCCACGTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
TTGACATGGACCGGAAAGACCTGGAAACAGGTGCCCGCTT

基因片段序列与 NCBI 的 Nr 数据库进行 Blastn 比较得到此菌种属于节杆菌属，所以将此菌株叫做节杆菌 PMP。

2.2.二甲基吡啶在各温度条件下的生长状况分析

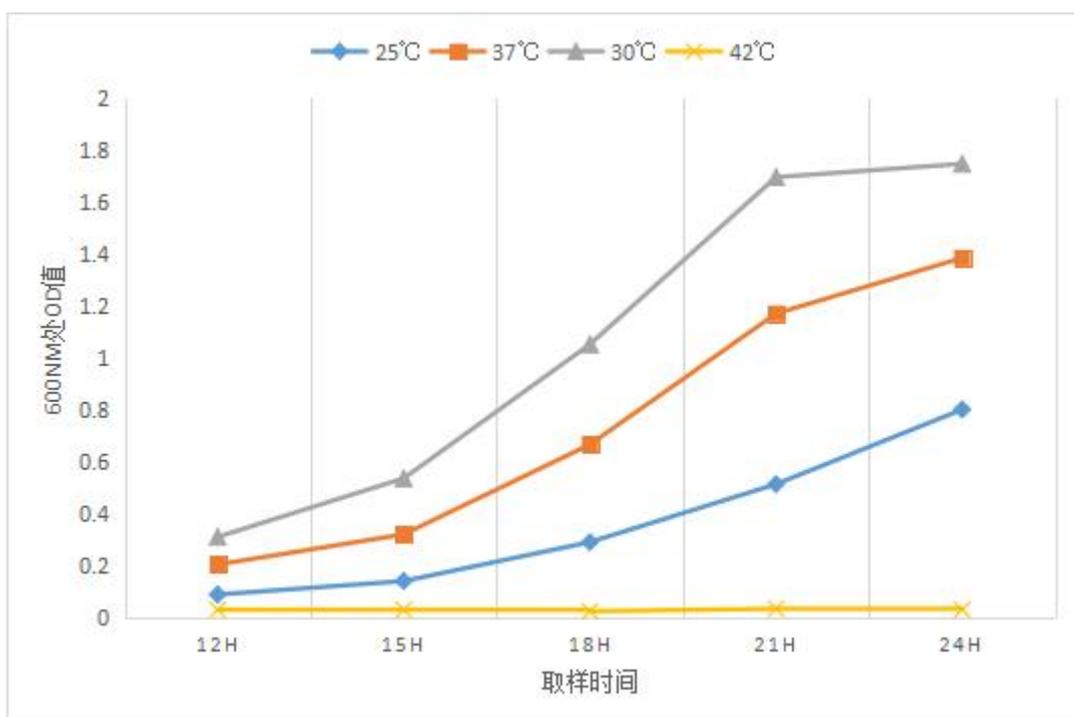


图 1、菌株在不同温度下 OD 生长值

由图 1 可以看出当温度不同时菌体的生长速度明显不同，说明温度对于菌体生长有非常大的影响。菌株在 42°C 时已经超出温度承受范围停止生长，在 25°C 时生长就受到抑制，生长速度慢，但是当菌体基数变大时生长速度渐渐变快，温度在 30°C 和 37°C 时生长速度快。由于本次所做试验条件有限，只在 25°C-42°C 范围之间取了四个时间点，在这个范围内 42°C 已经超过菌株忍受极限，而 25°C 时菌体还能够继续生长，从上面可以看出此菌株属于适应低温的一种菌株，不耐高温。

由图 1 可以看出当取样时间在 15h 到 21h 时菌体生长速度最为迅猛，12h 到 15h 点时由于菌体数目基数小，因此菌体生长速度慢，当时间超过 21h 时底物基本消耗完，由于缺少菌体生长所需营养物质，所以当时间超过 21h 时生长速度开始降低并且进入稳定期。当时间足够长时 25°C 的菌体也能够进入稳定期，但是所需时间比较长。

由上面试验可以总结出菌体适宜温度生长范围在 25°C-37°C 之间，最佳生长温度在 30°C 左右，因此在进行后续试验时所用摇床温度为 30°C。

2.3 二甲基吡啶在各 pH 条件下的生长状况分析

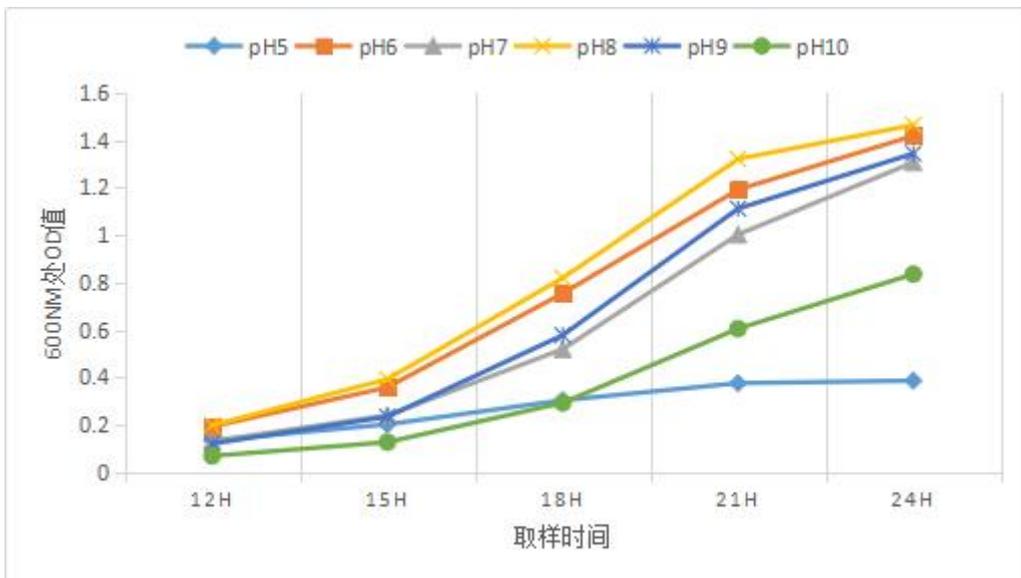


图 2、菌株在不同 pH 下 OD 值

由图 2 可以看出在 pH 不同时菌株生长速度明显不同，说明 pH 对于菌株生长具有非常大的影响，当 pH 为 8 时菌株生长速度最快，当 pH 为 5 和 pH 为 10 时对菌株的抑制较大，菌株生长速度最慢，本次实验所用菌株对于 pH 的适应范围比较广，在 5-10 的 pH 内都能够生长。

由图 2 可以看出取样时间为 15h 到 21h 时菌株生长速度最快,取样时间在 12h 到 15h 时,由于菌体基数小,因此菌株生长缓慢,取样时间在 21h 到 24h 时,菌体生长也缓慢,由于底物基本被消耗完,所以菌株生长缓慢并且进入稳定期,当时间足够长时,pH 为 5 和 pH 为 10 时菌株也能够持续生长且进入一个稳定期,菌株适宜 pH 生长范围为 6-9,最佳生长 pH 为 8 左右,因此在进行后续试验时所用培养基 pH 为 8。

2.4 二甲基吡啶菌株在不同底物浓度条件下的生长状况分析

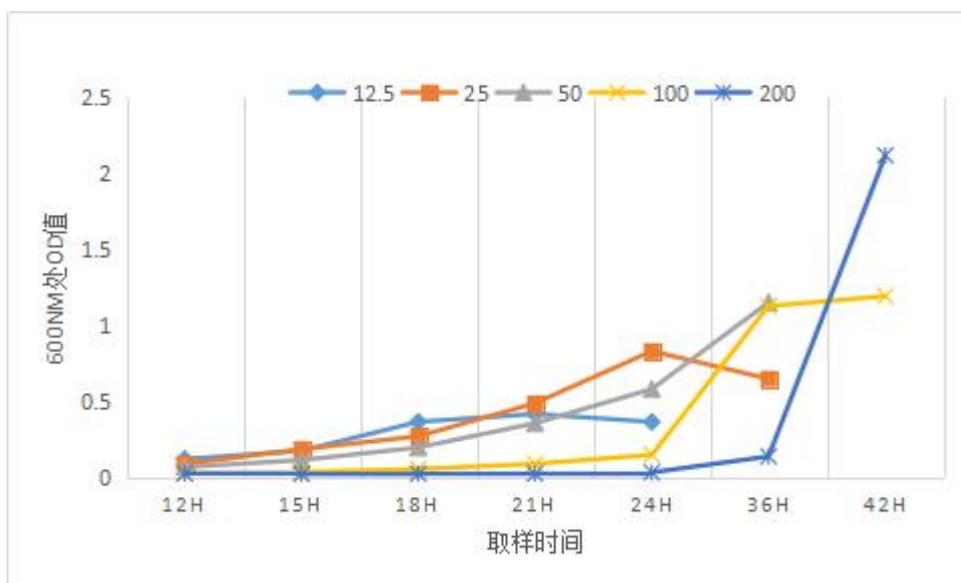


图 3、菌株在不同底物浓度条件下的生长状况分析

由图 3 可以看出在底物浓度不同时菌株的生长状况明显不同,因此底物浓度对于菌株的生长也有很大的影响,当底物浓度为 12.5ml/L 和 25m/L、50ml/L 时对菌株的抑制效果小或者没有,菌株的生长速度最快,在所有浓度相比较之下 100ml/L、200ml/L 都对菌株具有明显的抑制效果,菌株的生长速度慢。

在八点到二十点时间段内由图三可以看出 200ml/L 浓度的底物对菌株有很强烈的抑制效果,菌株基本不生长,在 12h 到 18h 时间段内除去 200ml/L 底物浓度的菌株不生长,其他底物浓度时菌株都能够生长,其中 12.5ml/L 底物浓度的菌株生长速度最快并进入稳定期,但是当时间超过 18h 时 12.5ml/L 底物浓度的菌株将底物消耗完,菌株没有底物作为能源物质,菌体数量开始减少进入衰退期。取样时间为 18h 到 24h 时,200ml/L 底物浓度的菌株由于底物浓度还很高,对菌株依旧有很大的抑制效果,因此此浓度下的菌株依旧不生长,12.5ml/L 底物浓度的菌株由于底物耗尽进入衰退期,25m/L、50ml/L、100ml/L 底物浓度的菌株在此时间段内都能够生长,25ml/L 底物浓度的菌株生长速度最

快并进入稳定期，但是当时间超过 24h 时底物被消耗完，菌体数量开始减少进入衰退期。取样时间在 24h 以后时 25ml/L 底物浓度的菌株的由于底物耗尽进入衰退期，50ml/L、100ml/L、200ml/L 底物浓度的菌株都开始进行生长。

由于后续试验接种所培养时间都在 24h 左右，只有 50ml/L 底物浓度的菌株能够正好处于稳定期，12.5ml/L 底物浓度的菌株在 6h 进入衰退期，25ml/L 底物浓度的菌株在 12h 进入衰退期，100ml/L、200ml/L 底物浓度的菌株在 24h 后才进入生长阶段，因此后续试验用底物浓度为 50ml/L 进行接种。

2.5 固定底物量菌株的生长和降解生长状况分析

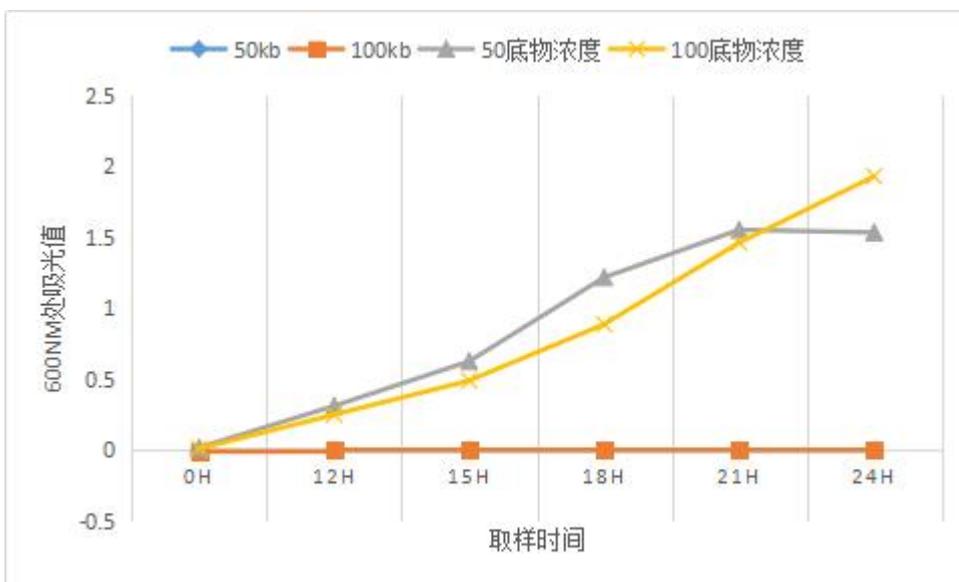


图 4、菌株在两种底物浓度下的生长状况分析

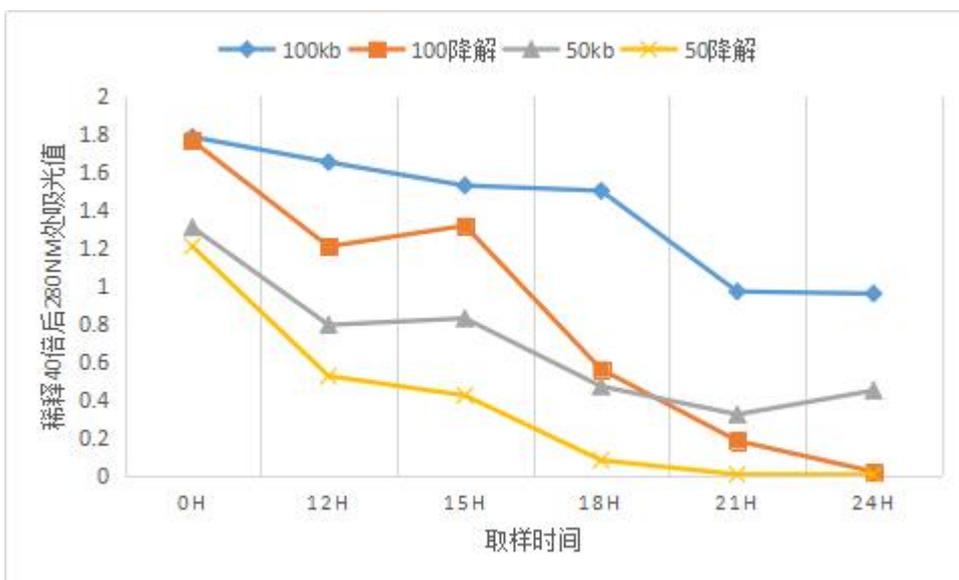


图 5、菌株在两种底物浓度下底物降解图

由图 4 可以看出 50ml/L 底物浓度的空白对照和 100ml/L 底物浓度的空白对照在所有时间段都没有菌体生长，因此这两个空白对照都没有染菌可以作为空白对照正常使用。加菌液的 50ml/L、100ml/L 底物浓度的菌株都能够正常生长，和之前所做事底物浓度的试验生长状况形同，因此试验没有出错，可以正常检测底物降解的测量。

由图 5 可以看出 50ml/L、100ml/L 的空白对照组底物都有所下降，是因为底物二甲基吡啶具有挥发性，下降的那一部分为挥发的，还有一部分实验仪器操作等误差造成。

由图 5 可以看出接入菌体的 50ml/L 和 100ml/L 底物浓度的菌株都能够将底物完全降解，并且 50ml/L 底物浓度的菌株在 21h 就已经完全降解，总共所用时间为 21h，100ml/L 底物浓度的菌株在 20 点时完全降解，总共所用时间为 24h。

2.6 休止细胞反应对各种底物降解分析

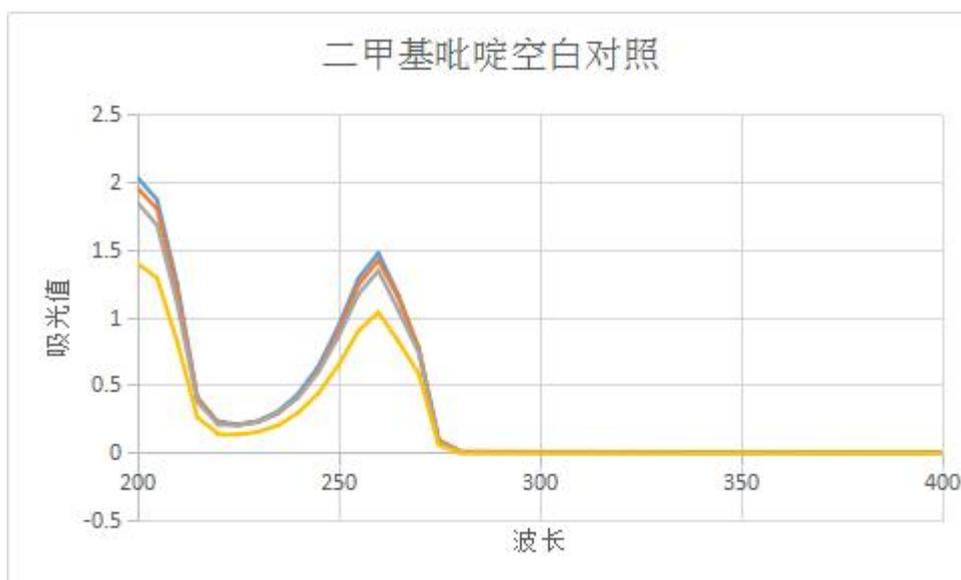


图 6、加入二甲基吡啶未加菌体的全波长扫描图

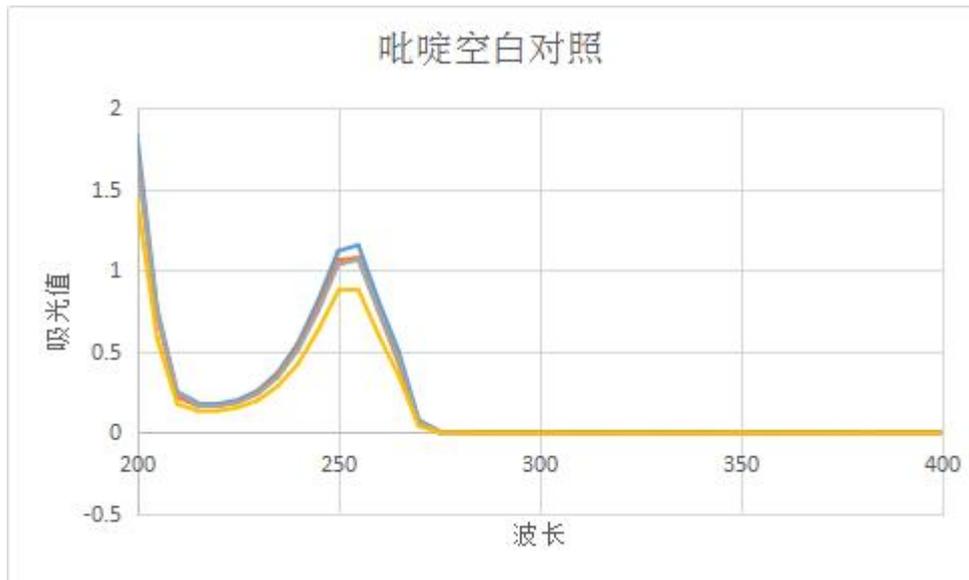


图 7、加入吡啶未加菌体的全波长扫描图

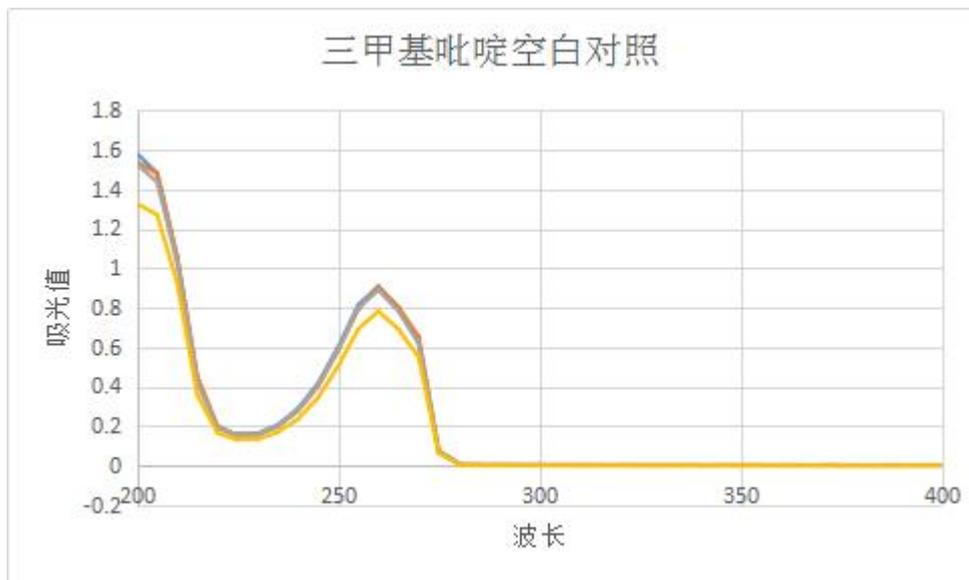


图 8、加入三甲基吡啶未加菌体的全波长扫描图

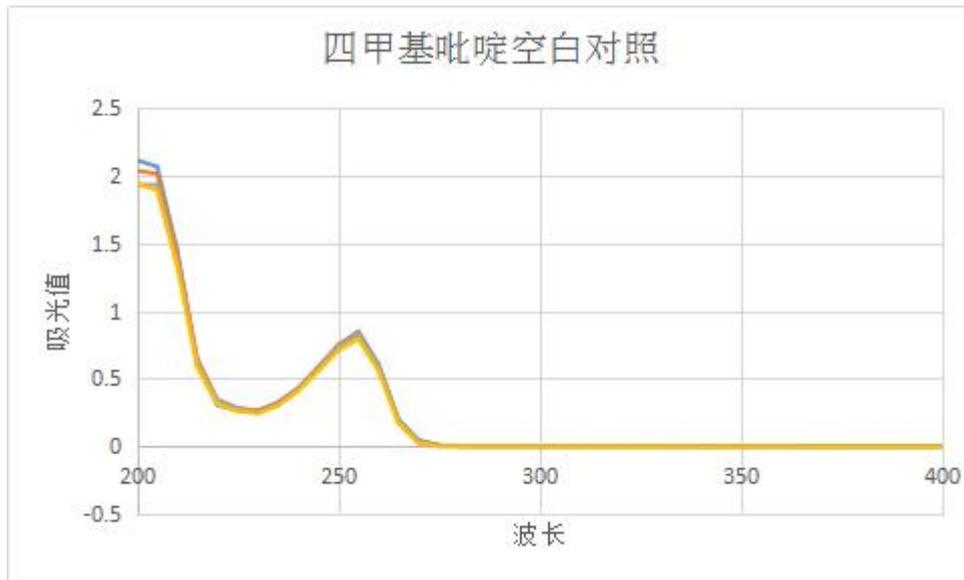


图 9、加入四甲基吡啶未加菌体的全波长扫描图

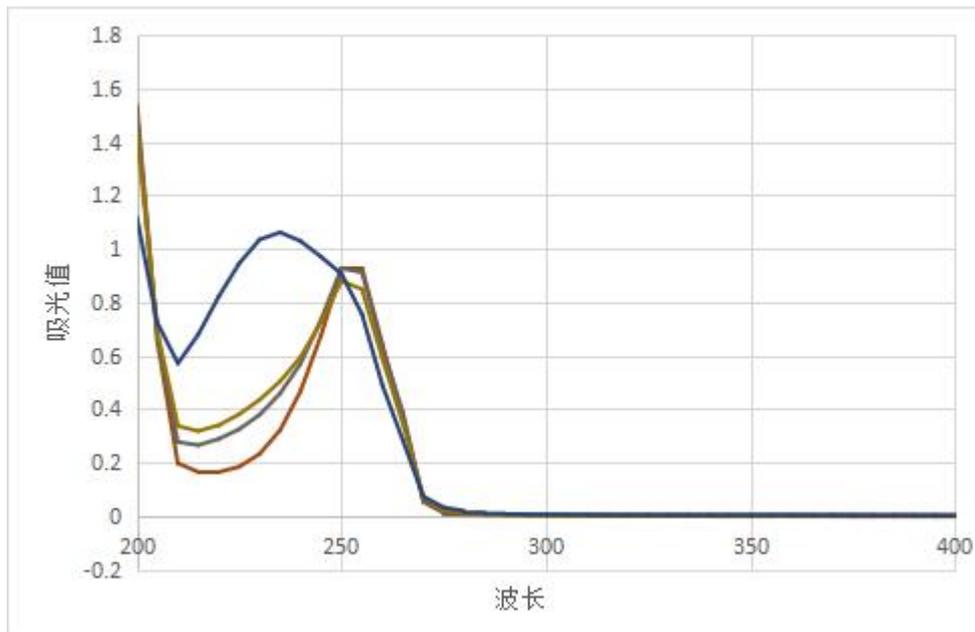


图 10、加入吡啶和菌体的全波长扫描图

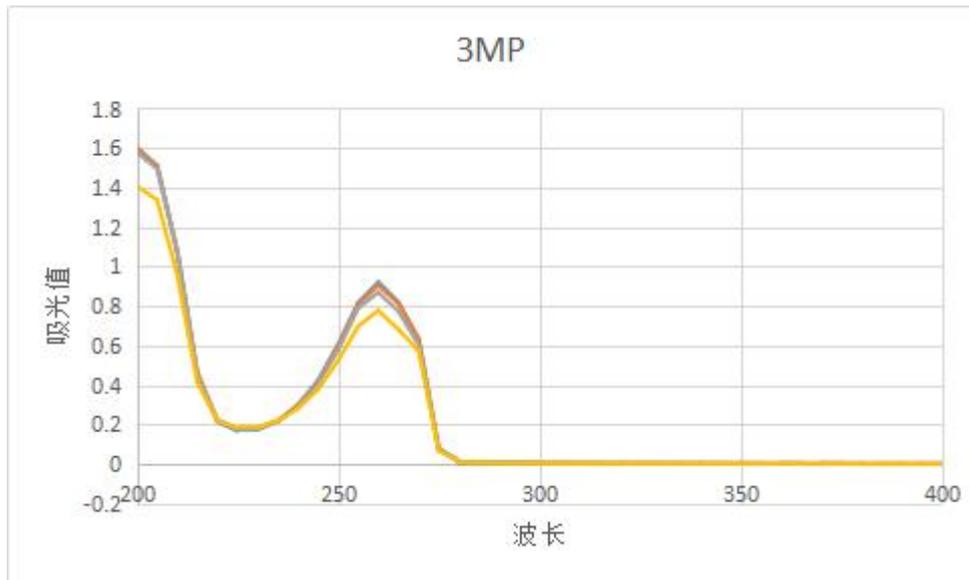


图 11、加入三甲基吡啶和菌体的全波长扫描图

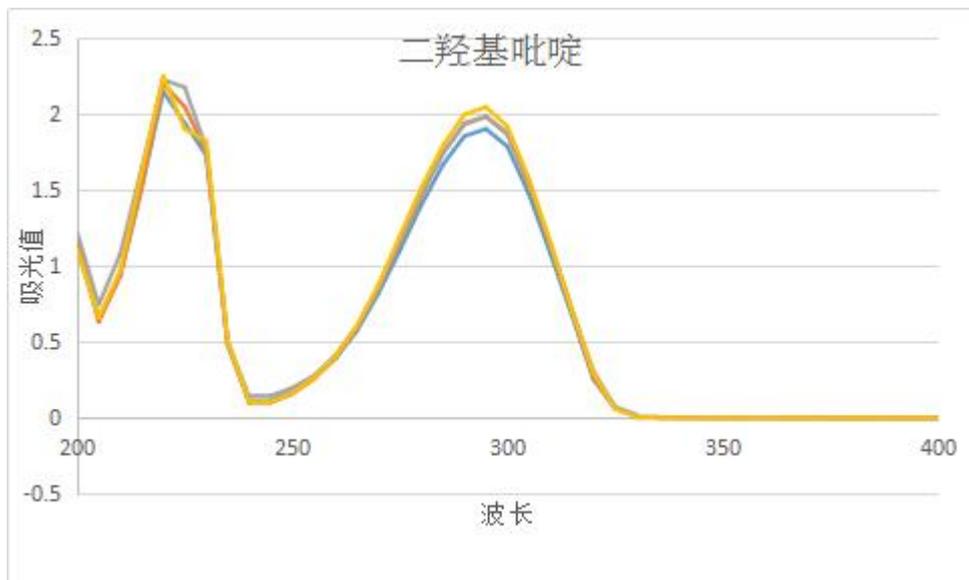


图 12、加入二羟基吡啶和菌体的全波长扫描图

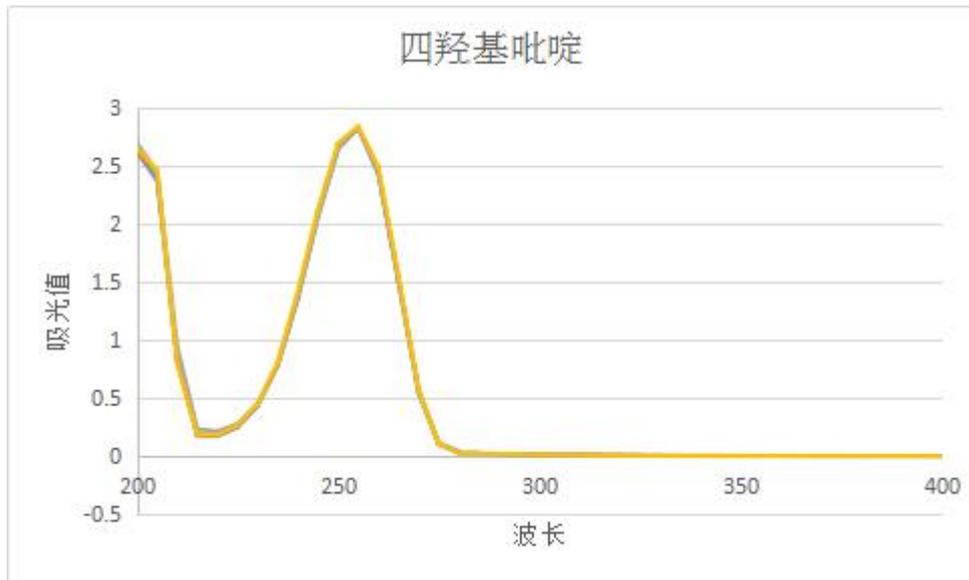


图 13、加入四羟基吡啶和菌体的全波长扫描图

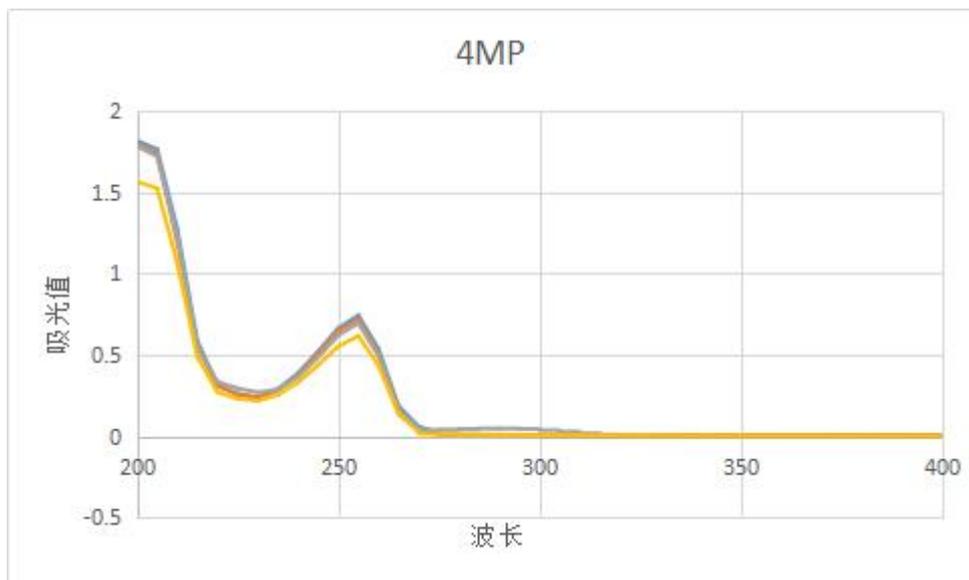


图 14、加入四甲基吡啶和菌体的全波长扫描图

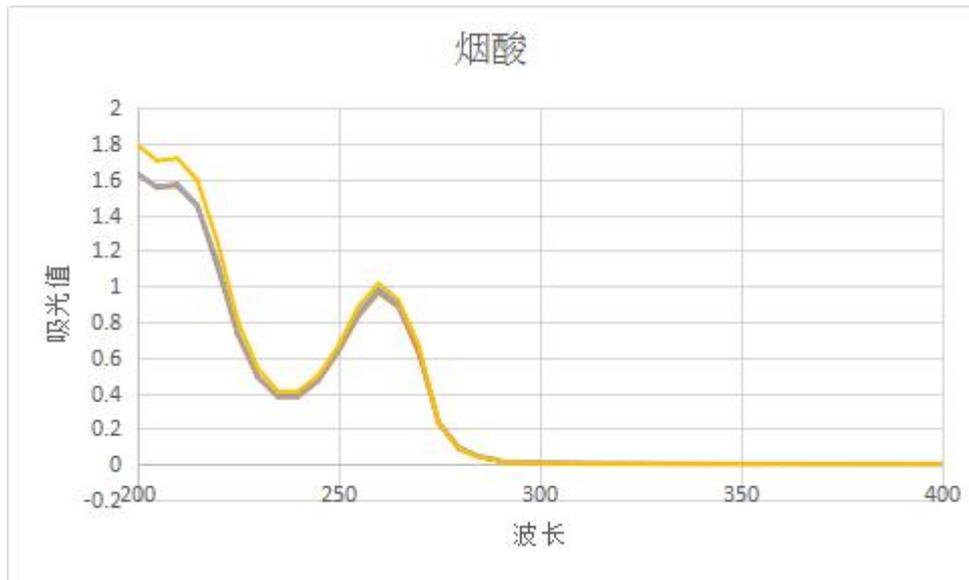


图 15、加入烟酸和菌体的全波长扫描图

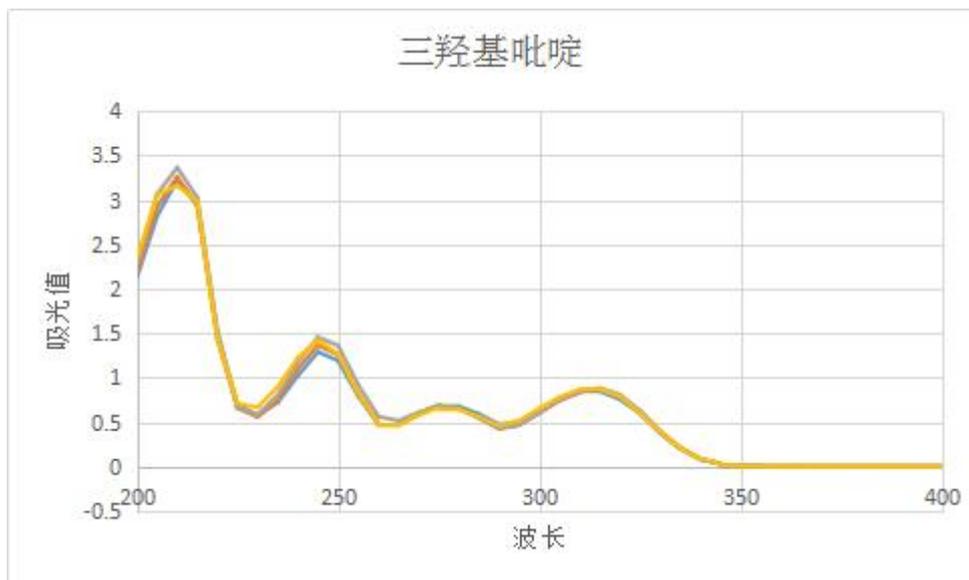


图 16、加入三羟基吡啶和菌体的全波长扫描图

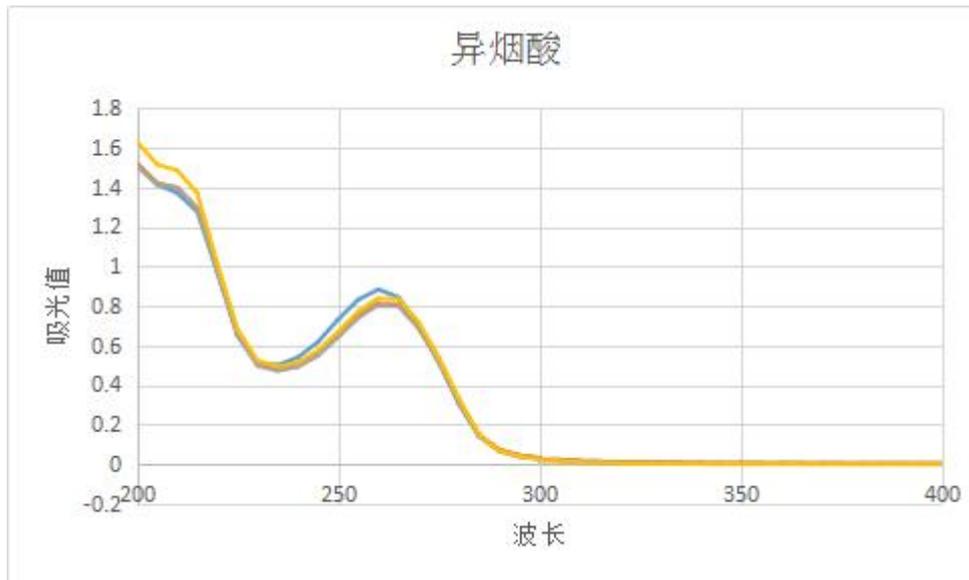


图 17、加入异烟酸和菌体的全波长扫描图

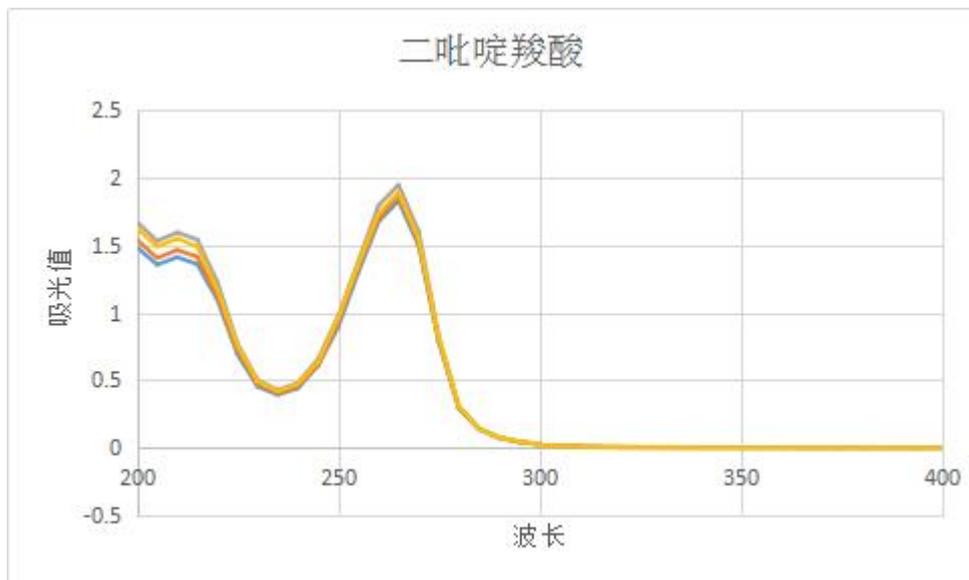


图 18、加入二吡啶羧酸和菌体的全波长扫描图

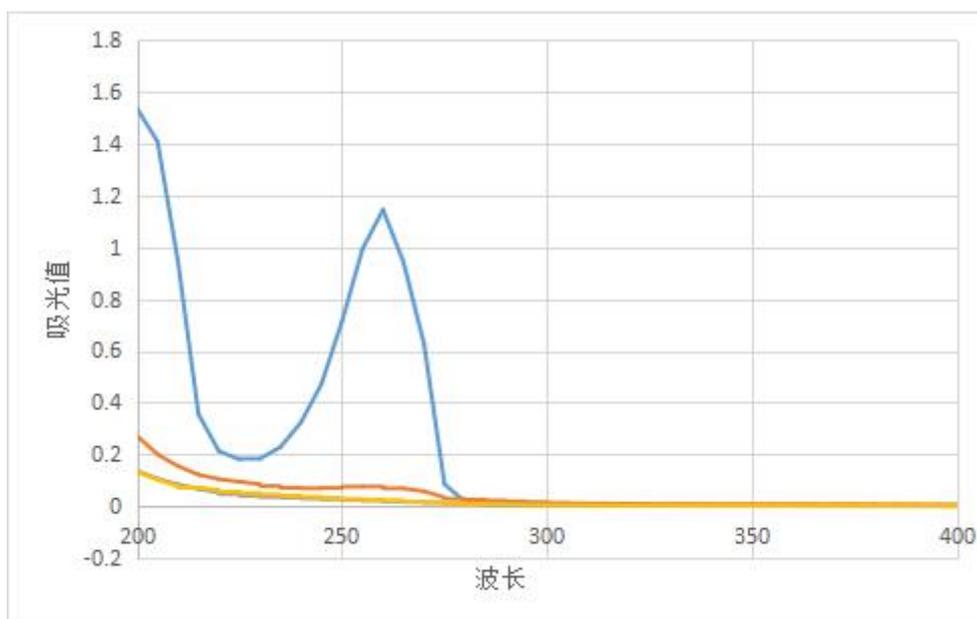


图 19、加入二甲基吡啶和菌体的全波长扫描图

从图 19 中可以看出二甲基吡啶在 3h 就已经基本被降解完全，因此可以说明此菌株为降解二甲基吡啶的菌株没有被污染。

从图 6、7、8、9 可以看出四种底物都有所降低，是因为四种液体底物都具有挥发性，减少的那一部分为挥发掉的，由于 6h 取得样品和 21h 取得样品相差的时间最长，所以挥发的最多。

从图 10 到图 18 综合来看，加入固体底物的吸光值基本没有变，所以本次实验所用菌株不降解二羟基吡啶、三羟基吡啶、四羟基吡啶、异烟酸、烟酸、二吡啶羧酸。加入液体底物的吸光值都有一定的下降，从空白对照可以看出下降的哪一部分是由于挥发性所导致，因此本实验所用菌株不降解吡啶、三吡啶甲基、四吡啶甲基。

3. 讨论

通过休止细胞反应可以看出节杆菌 PMP 是一种能以二甲基吡啶为唯一能源物质的菌株，通过底物降解试验可以看出此菌株能够有效降解二甲基吡啶。节杆菌 PMP 菌株在 25°C-37°C 内都能生长，其中最适生长温度为 30°C。节杆菌 PMP 菌株在 12.5ml/L-200ml/L 底物浓度的环境中都能够生长，其中最适底物生长浓度为 50ml/L。节杆菌 PMP 对 pH 的适应范围非常广，在 5-10 的范围内都能够生长，其中最适 pH 为 8。

参考文献

- [1]黄齐华,张财华,张令伟,吴超.2,3-二甲基吡啶的精馏研究[J].安徽化工,2019,45(05):64-65.
- [2]I. Cibulka,J.-C. Fontaine,K. Sosnkowska-Kehiaian,H. V. Kehiaian. Volumetric Properties of the Mixture Hexane C₆H₁₄ + C₇H₉N 2,6-Dimethylpyridine (VMSD1211, LB3885_V)[M].Springer Berlin Heidelberg:2012-06-15.
- [3]陈华平,周林军,王佳,耿宇.2,3-二甲基吡啶合成研究[J].安徽化工,2019,45(05):70-71+74.
- [4]吴恢庆. 2, 3-二甲基吡啶的催化合成研究[D].浙江大学,2005.
- [5]熊阅斌.土壤中镉耐受菌的筛选及其生长[J].贵州农业科学,2013,41(11):113-115.
- [6]郭玲玲.微生物菌种保藏方法及关键技术[J].微生物学杂志,2019,39(03):105-108.
- [7]朱诗应,戚中田.16S rDNA 扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用[J].微生物与感染,2013,8(02):104-109.
- [8]王玉萍,谭训刚,陈师勇,王勇,王静,李翔太.肉碱脱水酶突变株的获得及其休止细胞反应条件的优化[J].生物技术通讯,2000(04):261-263.
- [9]Richard J. L. Paulton Ph.D.. The bacterial growth curve. 2010, 25(2):92-94.
- [10]Visith Chavasit, Juntima Photi, Sasiumphai Purttiponthanee, et al. Chapter 11 - Use of Bacterial Growth Curve for Assessing Risk of Microbiological Pathogens in Food Products. 2018

致谢

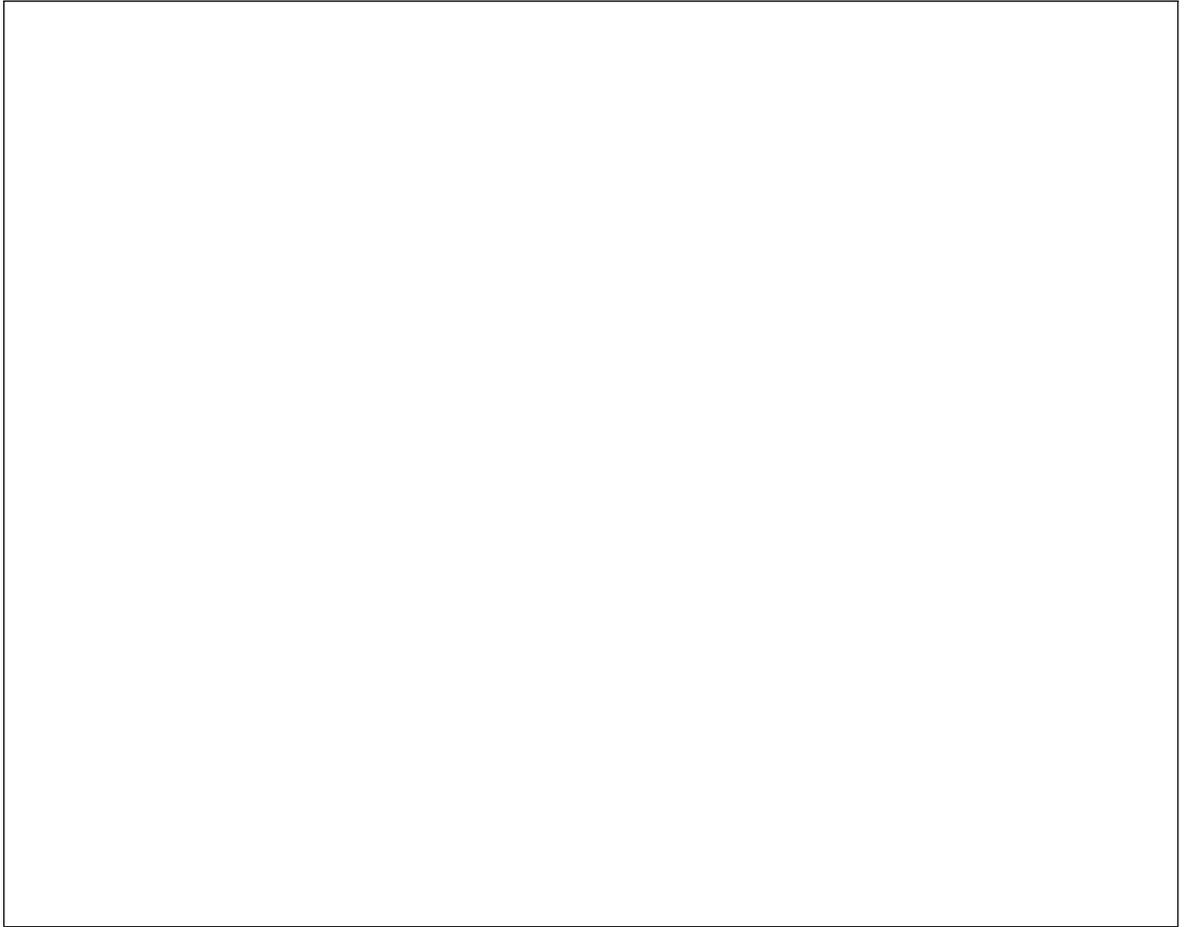
毕业设计能够成功做完，首先感谢的就是于浩老师，如果没有于浩老师的帮助这次试验肯定是做不成功的，由于我的做实验底子弱，对实验操作的技巧有很多的不足，每一次问于浩老师问题，于浩老师总能及其耐心的和我说实验该怎么做，以及做实验需要注意的事项等。在这次毕业设计中我学到了很多的东西，实验的操作技巧，最重要的是锻炼了耐性，认识到实验不是一蹴而就的，实验是一点一点做出来的，非常感谢于浩老师在我毕业设计中所给予的帮助。

实验室的师兄师姐赵书雪、孙倩姝、王菲、高洁、吉建成他们也给予了我很多帮助，在做实验的过程中遇到不会的问题去问师兄师姐，他们总会在第一时间就帮我想问题的解决办法，非常感谢师兄师姐在我毕业设计给予的帮助。这次试验也非常感谢学校，如果没有学校所给予的做实验场地和实验仪器，这次实验也不能成功。

青岛农业大学

毕业论文(设计)任务书

学生姓名	吴一昊	学号	20165186
专业年级及班级	生技(食用菌)1601	指导教师及职称	于浩(副教授)
毕业论文(设计)题目	节杆菌 PMP 降解二甲基吡定的研究		
选题来源	<input type="checkbox"/> 结合科研课题 课题名称: _____ <input checked="" type="checkbox"/> 生产实际或社会实际 <input type="checkbox"/> 其他		
选题性质	<input checked="" type="checkbox"/> 基础研究 <input type="checkbox"/> 应用研究 <input type="checkbox"/> 其他		
<p>主要内容和要求</p> <p>分离到一株能以二甲基吡啶为唯一碳氮源生长的菌株，通过 16SrRNA 鉴定该菌株为节杆菌，将该菌株命名为 PMP。通过控制变量的方法进行试验验证此菌株的生长条件，通过改变变量 pH、温度、底物浓度、等方面研究此菌株的最适生长条件，最终得到菌株生长最适温度在 25°C-37°C 之间，最适 pH 为 7-8 之间，最适浓度为 1mg/mL-2mg/mL 之间，并且对用休止细胞方法对菌株的降解能力方面进行试验研究，得到此菌株只能够降解二甲基吡啶，对其他所验证的几种底物不进行降解。</p>			



主要中文参考资料与外文资料

- [1]黄齐华,张财华,张令伟,吴超.2,3-二甲基吡啶的精馏研究[J].安徽化工,2019,45(05):64-65.
- [2]I. Cibulka,J.-C. Fontaine,K. Sosnkowska-Kehiaian,H. V. Kehiaian. Volumetric Properties of the Mixture Hexane C₆H₁₄ + C₇H₉N 2,6-Dimethylpyridine (VMSD1211, LB3885_V)[M].Springer Berlin Heidelberg:2012-06-15.
- [3]陈华平,周林军,王佳,耿宇.2,3-二甲基吡啶合成研究[J].安徽化工,2019,45(05):70-71+74.
- [4]吴恢庆. 2, 3-二甲基吡啶的催化合成研究[D].浙江大学,2005.
- [5]熊阅斌.土壤中镉耐受菌的筛选及其生长[J].贵州农业科学,2013,41(11):113-115.
- [6]郭玲玲.微生物菌种保藏方法及关键技术[J].微生物学杂志,2019,39(03):105-108.
- [7]朱诗应,戚中田.16S rDNA 扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用[J].微生物与感染,2013,8(02):104-109.
- [8]王玉萍,谭训刚,陈师勇,王勇,王静,李翔太.肉碱脱水酶突变株的获得及其休止细胞反应条件的优化[J].生物技术通讯,2000(04):261-263.
- [9]Richard J. L. Paulton Ph.D.. The bacterial growth curve. 2010, 25(2):92-94.
- [10]Visith Chavasit, Juntima Photi, Sasiumphai Purttiponthanee, et al. Chapter 11 - Use of Bacterial Growth Curve for Assessing Risk of Microbiological Pathogens in Food Products. 2018,

要求完成日期: 2020 年 6 月 1 日 指导教师签名: _____

接受任务日期: 2020 年 3 月 11 日 学生本人签名: _____

青岛农业大学

毕业论文(设计)开题报告

学生姓名	吴一昊	学 号	20165186
专业年级及班级	生技(食用菌)1601	指导教师及职称	于浩(副教授)
毕业论文(设计)题目	节杆菌 PMP 降解二甲基吡定的研究		
<p>文献综述</p> <p>选题研究意义：二甲基吡啶是一种液体药品、无色、无味有很强烈刺激性气味的油性液体，也是一种化学中间体，在各个领域上都能见到其身影，例如做燃料，合成药品，做树脂等，也可以制取化肥增效剂、除草剂、牲畜驱虫剂、橡胶促进剂、染料中间体等。二甲基吡啶和吡啶性质有一些相似性，都能够跟有机酸和无机酸一样生成盐，能够和无机盐类、卤代烷等形成变成化合物，二甲基吡啶的化学性质稳定，不能够发生聚合反应，用于制取 2-乙烯基吡啶、氮肥增效剂、长效磺胺、抗矽肺病药、牲畜驱虫药、家禽用药、有机磷解毒剂、局部麻醉药、泻药、胶片感光剂的添加物、染料中间体和橡胶促进剂等。除用作溶剂外，也用作医药、染料、农药、合成树脂和化肥增效剂的原料。用于制取染料、树脂、农药、兽药、橡胶促进剂、胶片感光剂添加物等。在医药上用于制备思卡尼、扑尔敏、解磷定、乙酰半胱氨酸等药物。用于药品、染料、橡胶等化学品的合成，也用作溶剂、实验试剂。检定钴、氰酸盐和铁。</p> <p>国内外研究现状：2,3-二甲基吡啶是重要的医药中间体,主要用于合成兰索拉唑和雷贝拉唑等用于治疗消化性溃疡的药物。我国是奥美拉唑、兰索拉唑和埃索美拉唑原料药的消费大国，但合成拉唑类原料药的医药中间体——烷基吡啶 国内产量少，主要依赖进口，使得医药产品价格居高不下，制约了我国新型医药的开发与创新[3][4]。二甲基吡啶在未来的领域中应用会越来越多，对二甲基吡啶的需求量约会越来越大，当制造量越来越大时，所面临的问题就会越来越多，因此对二甲基吡啶的研究也越来越重要，认识到二甲基吡啶的一些性质以及对以后二甲基吡啶的讲解进行研究，对二甲基吡啶以后所可能发生的问题具有很好的预防作用。</p> <p>主要参考文献：</p> <p>[1]黄齐华,张财华,张令伟,吴超.2,3-二甲基吡啶的精馏研究[J].安徽化工,2019,45(05):64-65.</p>			

- [2]I. Cibulka,J.-C. Fontaine,K. Sosnkowska-Kehiaian,H. V. Kehiaian. Volumetric Properties of the Mixture Hexane C₆H₁₄ + C₇H₉N 2,6-Dimethylpyridine (VMSD1211, LB3885_V)[M].Springer Berlin Heidelberg:2012-06-15.
- [3]陈华平,周林军,王佳,耿宇.2,3-二甲基吡啶合成研究[J].安徽化工,2019,45(05):70-71+74.
- [4]吴恢庆. 2, 3-二甲基吡啶的催化合成研究[D].浙江大学,2005.
- [5]熊阅斌.土壤中镉耐受菌的筛选及其生长[J].贵州农业科学,2013,41(11):113-115.
- [6]郭玲玲.微生物菌种保藏方法及关键技术[J].微生物学杂志,2019,39(03):105-108.
- [7]朱诗应,戚中田.16S rDNA 扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用[J].微生物与感染,2013,8(02):104-109.
- [8]王玉萍,谭训刚,陈师勇,王勇,王静,李翔太.肉碱脱水酶突变株的获得及其休止细胞反应条件的优化[J].生物技术通讯,2000(04):261-263.
- [9]Richard J. L. Paulton Ph.D.. The bacterial growth curve. 2010, 25(2):92-94.
- [10]Visith Chavasit, Juntima Photi, Sasiumphai Purttiponthanee, et al. Chapter 11 - Use of Bacterial Growth Curve for Assessing Risk of Microbiological Pathogens in Food Products. 2018,

研究方案

分离到一株能以二甲基吡啶为唯一碳氮源生长的菌株，通过 16SrRNA 鉴定该菌株为节杆菌，将该菌株命名为 PMP。通过控制变量的方法进行试验验证此菌株的生长条件，通过改变变量 pH、温度、底物浓度、等方面研究此菌株的最适生长条件，最终得到菌株生长最适温度在 25°C-37°C 之间，最适 pH 为 7-8 之间，最适浓度为 1mg/mL-2mg/mL 之间，并且对用休止细胞方法对菌株的降解能力方面进行试验研究，得到此菌株只能够降解二甲基吡啶，对其他所验证的几种底物不进行降解。

实验方法：

菌株获取、温度、PH 对菌株生长研究、底物浓度对菌株生长研究、固定底物量菌株的生长和降解研究、多种底物降解的休止细胞反应实验。

青岛农业大学

毕业论文(设计) 成绩评定表

学生姓名	吴一昊	学 号	20165186
专业年级及班级	生技(食用菌)1601	指导教师及职称	于浩副教授
毕业论文(设计)题目	节杆菌 PMP 降解二甲基吡啶的研究		
<p>毕业论文(设计)摘要:</p> <p>分离到一株能以二甲基吡啶为唯一碳氮源生长的菌株,通过 16SrRNA 鉴定该菌株为节杆菌,将该菌株命名为 PMP。通过控制变量的方法进行试验验证此菌株的生长条件,通过改变变量 pH、温度、底物浓度、等方面研究此菌株的最适生长条件,最终得到菌株生长最适温度在 25°C-37°C 之间,最适 pH 为 7-8 之间,最适浓度为 1mg/mL-2mg/mL 之间,并且对用休止细胞方法对菌株的降解能力方面进行试验研究,得到此菌株只能够降解二甲基吡啶,对其他所验证的几种底物不进行降解。</p> <p>关键词: 节杆菌 ; 二甲基吡啶 ; 降解 ; 休止细胞反应 ;</p>			
成 绩	指导教师成绩 ()	答辩成绩 ()	总评分 ()

签字	指导教师:	答辩小组成员:	计分人:
----	-------	---------	------

注：指导教师成绩：答辩成绩=2：8