

聚氨酯泡沫固定化产碱杆菌细胞生物转化氰化物

刘幽燕¹, 李青云¹, 覃益民¹, 韦炳努¹, 何勇强², 童张法¹

(1. 广西大学化学化工学院化学工程系, 南宁 530004; 2. 广西大学微生物及植物遗传工程教育部重点实验室, 南宁 530004)

摘要: 利用 1 株产碱杆菌 DN25 作为降氰菌株, 以聚氨酯泡沫为载体进行固定化, 研究其转化特性。结果表明, 采用吸附生长法能有效实现菌株 DN25 的固定, 固定细胞量可达到每 g 泡沫载体生物量干重 0.35g, 固定化细胞的最适转化温度和 pH 为 35℃ 8.0。对于低浓度氰化物, 固定化细胞和游离细胞的转化速率相当; 对于高浓度氰化物, 固定化细胞具有明显优势, 不仅可耐受更高浓度的氰化物转化, 其转化速率也高于游离细胞, 最大转化速率为 507mg/(L·h), 是游离细胞的 2.8 倍。通过初步的摇瓶模拟序批式反应, 固定化细胞活性可保持 20d。

关键词: 聚氨酯泡沫; 固定化细胞; 氰化物; 生物转化

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)03-0586-04

Degradation of Cyanide by an *Alcaligenes* sp. Strain Immobilized on Polyurethane Foam

LIU You-yan¹, LI Qing-yun¹, QIN Yi-min¹, WEI Bing-nu¹, HE Yong-qiang², TONG Zhang-fa¹

(1. Department of Chemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. The Key Laboratory of Microbial and Plant Genetic Engineering of Ministry of Education, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: An *Alcaligenes* sp. DN25 strain was immobilized on polyurethane foam and cyanide biotransformation characteristics of immobilized cells were investigated. Immobilization could be realized through the growth of the cell on the polyurethane foam and cell load of 0.35g was obtained. The immobilized cell exhibited the best degradation behavior at pH 8.0 and 35℃. For the low concentration cyanide, the degradation rate was the same no matter which the immobilized cell and the free cell were used, while the immobilized cell was proved to be of a more rapid degradation rate for the high concentration cyanide. The highest cyanide degradation rate for the immobilized cell could reach 507mg/(L·h), which was 2.8 times as that of the free cell. Through the preliminary sequencing batch reactor, the immobilized cell could maintain active after 20 days.

Key words: polyurethane foam; immobilized cell; cyanide; biotransformation

固定化细胞技术由于可维持较大密度的细胞量, 保持高效菌活, 具有较强的耐有毒物质冲击的能力, 在废水处理中应用广泛, 尤其对于有毒及难转化物质的生物强化处理有着巨大的潜力^[1]。成本低、稳定性好、传质性能优越的载体是固定化细胞技术的关键之一, 将直接影响固定化技术的工业化应用。聚氨酯泡沫孔隙多, 表面积大, 吸附能力强, 在环保和催化领域中的应用正受到广泛关注^[2, 3], 目前美国环保局(USEPA)将其列为废水生物处理的一项新兴材料, 然而国内在这方面的应用鲜见报道。

氰化物是一种剧毒物质, 被列入环境优先控制污染物名单^[4]。它以无机氰或金属络合物形式存在, 在黄金提炼、冶金、化肥、橡胶、纤维、染料等工业中有大量含氰废水排放。传统的活性污泥法处理时易引起污泥中毒, 寻找高效菌株进行生物强化处理被认为是可行之路, 因而对其净化研究一直受到关注^[5, 6]。本实验室从污染土壤中筛选出 1 株产碱杆

菌(*Alcaligenes* sp.) DN25, 它具有良好的降解无机氰特性^[7]。本文在此基础上以廉价的聚氨酯泡沫为载体进行固定化研究, 发现固定化提高了细胞的转化性能, 具有一定的工业化应用前景。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基组成

转化菌 DN25 为产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.), 由本研究室从受污染土壤中筛选获得^[7]。

培养基组成: (NH₄)₂SO₄: 2.0g, NaCl: 0.5g, K₂HPO₄: 2.0g, 蛋白胨: 5.0g, 葡萄糖: 10.0g, 酵母

收稿日期: 2005-03-12; 修订日期: 2005-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(39860038); 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室开放课题; 广西自然科学基金资助项目(桂科青 0447003)

作者简介: 刘幽燕(1971~), 女, 博士, 副教授, 主要从事固定化生物技术、生物处理废水和生物反应器等方面的研究, E-mail: liuyouyngx@163.com

膏: 5.0g, 用蒸馏水定容至 1.0L, pH8.0.

1.2 细胞培养

培养在 250mL 摇瓶中进行, 将菌株接种于 20mL 培养基中, 摇床培养(30℃、120r/min) 48h, 离心得湿菌体, 待用.

1.3 细胞固定化方法

固定化前对载体进行预处理: 将泡沫切成约 5mm 的立方块, 过 16 目筛去除碎屑, 用蒸馏水清洗数次, 烘干. 本文根据文献报道^[8, 9]采用 2 种方式进行吸附法固定化. ①将培养得到的湿菌体重新悬浮于 20mL 磷酸缓冲液(pH8.0)中, 加入预处理过的聚氨酯泡沫 0.05g, 在常温下轻微震荡 12h 后取出. 用磷酸缓冲液清洗固定化载体 2~3 次, 得到固定化细胞 1 份, 待用. ②在 250mL 三角瓶中先后装入 20mL, pH8.0 的培养基和预处理过的聚氨酯泡沫 0.05g, 灭菌接种后放入恒温摇床培养箱内进行培养(30℃, 120r/min), 48h 后取出. 将固定化载体与发酵液过滤分离, 用磷酸缓冲液清洗固定化载体 2~3 次, 得到固定化细胞 1 份, 待用.

1.4 菌株对氰化物转化能力的测定

游离细胞的转化实验如下: 在完成细胞培养后, 取 5mL 菌悬液置于 250mL 三角瓶, 加入 15mL pH8.0 的磷酸缓冲溶液和 KCN, 使 CN^- 浓度为 50 mg/L, 于 30℃、120r/min 条件下转化 1h 后测定残余氰含量.

固定化细胞降氰实验条件如下: 在 250mL 三角瓶中加入 20mL 磷酸缓冲液(pH8.0)和 KCN, 使得 CN^- 浓度为 50mg/L, 然后加入制备好的一份固定化细胞, 于 30℃转化 1h 后测定残余 CN^- 含量. 同时做对照实验.

转化能力用转化速率表示, 即为每 h 转化的 CN^- 浓度. 在考察温度、pH 等因素影响时, 保持其它条件不变.

1.5 分析方法

氰化物的测定采用异烟酸-吡啶啉酮比色法^[10]; 细胞量的测定采用干重法, 即将已知重量的固定化载体和吸附在其上的细胞 80℃烘干至恒重, 减去载体重量, 即为细胞干重.

2 结果与讨论

2.1 固定化操作方式

采用 2 种操作方式制备吸附固定化细胞. 制备固定化细胞可以先进行细胞培养, 离心获得的湿菌体再与载体混合进行吸附固定^[8]; 也可在细胞培养

过程中同时加入载体, 让菌体附着在载体上生长^[9]. Manohar 等人^[7]采用吸附固定法实现了 *Pseudomonas* sp. 在聚氨酯泡沫上的固定化, 但是对于本文所用产碱杆菌 DN25, 采用此方法, 每 g 泡沫的固定化细胞生物量仅达到 0.012g 干细胞, 无法完成氰转化; 而采用菌体附着在载体上生长的固定化方法, 同样重量的载体上细胞量可达到 0.35g. 由此可知, 应根据菌种和载体的特性、来源不同选择合适的固定化方法. 菌体增殖培养与固定化同时进行, 有利于产碱杆菌 DN25 在载体上的吸附, 因此在以下实验中均采用此种方法制备固定化细胞.

2.2 载体用量对细胞固定化的影响

一般来说, 载体用量加大, 可增强细胞的附着生长. 文献报道^[8]中聚氨酯载体用量为 2.5mg/mL. 本实验进一步加大载体用量, 20mL 的培养基中分别加入 0.05g、0.08g 和 0.10g (相当于 2.5、4.0、5.0mg/mL) 的聚氨酯泡沫, 测定所得到固定化细胞的吸附生物量. 从表 1 可看出, 泡沫用量过多反而生物吸附量明显下降, 当泡沫用量从 2.5mg/mL 增加到 5mg/mL, 固定生物量下降 90%. 在实验中发现此时过多的载体塞满整个培养体系, 反而不利于细胞在载体上均匀吸附. 因此本文选择泡沫用量为 2.5mg/mL.

表 1 聚氨酯泡沫用量对细胞固定化的影响

Table 1 Effect of amount of polyurethane foam on immobilized cell

载体用量/mg·mL ⁻¹	固定生物量(细胞干重/泡沫)
2.5	0.35
4.0	0.13
5.0	0.030

2.3 固定化细胞的降氰特性

2.3.1 温度的影响

细胞经固定化后, 最适温度可能随之变化. 图 1 为温度对游离细胞和固定化细胞转化氰的影响. 如图 1 所示, 游离细胞的最适温度为 30℃, 固定化后最适温度提高, 在 35℃下细胞转化速率最大; 另一方面适用温度范围增加, 固定化细胞 30℃的转化速率比最高转化速率减少 10%, 而游离细胞 35℃的转化速率仅为最高速率的 65%. 由此可见, 固定化细胞比游离细胞对温度变化的适应性更好.

通过空白实验发现温度过高易引起氰的挥发, 造成大气污染, 因此在下面的实验中仍然采用 30℃作为转化温度, 此时固定化细胞的转化速率仍然可达到最适温度(35℃)时的 90%.

2.3.2 pH 的影响

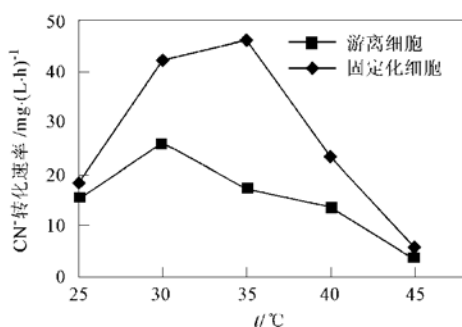


图1 温度对细胞转化氰速率的影响

Fig. 1 Effect of temperature on biotransformation rate by free and immobilized cell

不同的 pH 值对氰的处理速率有很大影响, 由于氰在酸性条件下易挥发, 因此必须在碱性条件下进行转化反应. 图 2 比较了游离细胞和固定化细胞在 pH 7~12 之间的转化速率. 无论游离细胞还是固定化细胞, 均在 pH 8.0 时具有最佳转化速率; 随着 pH 值的增大, 细胞转化活性明显下降.

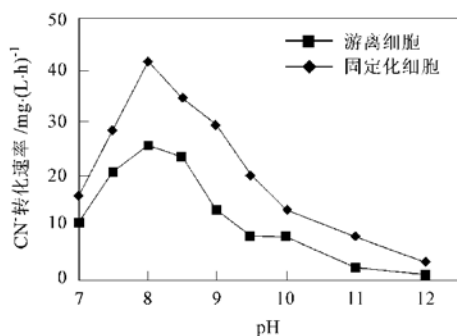


图2 pH值对细胞转化氰速率的影响

Fig. 2 Effect of pH on biotransformation rate by free cell and immobilized cell

2.3.3 细胞对不同浓度氰化物的转化

将固定化细胞和游离细胞在 30 °C 和 pH 8.0 条件下用于转化不同浓度的氰化物, 测定 1h 内的转化速率, 结果见图 3 和图 4. 可以看到, 产碱杆菌 DN25 对于高浓度氰化物有着良好的转化性能, 并且随着氰浓度的增加, 细胞的转化速率有所增加, 达到一定浓度后, 转化速率又会下降. 与游离细胞相比, 固定化细胞在转化高浓度的氰化物方面更有优势: 当氰浓度为 700mg/L 时游离细胞的氰转化速率达到最大值, 固定化细胞的最大转化速率则发生在氰浓度为 1 200mg/L 的时候.

比较固定化细胞与游离细胞的转化速率, 发现在转化 5mg/L、10mg/L 等低浓度氰化物时, 2 种细

胞的转化速率基本相同; 当氰浓度增加到 50mg/L 时, 固定化细胞的转化速率开始较游离细胞稍快, 当氰浓度进一步增加到 800mg/L 时, 固定化细胞的氰转化速率约为游离细胞的 2 倍. 而且固定化细胞的最大转化速率可达到 507mg/(L·h), 为游离细胞的 2.8 倍. Kyungsu^[11] 等人用聚氨酯泡沫固定化细胞转化 PCB 的研究也有相同结果报道. 本文认为机理可能与生物活性炭相类似. 因为聚氨酯泡沫为多孔隙物质, 对小分子物质具有一定的吸附能力, 固定化细胞催化的转化过程中载体物理吸附和生物降解协同作用, 从而加快转化速率. 在初步实验中已证明载体可吸附部分氰, 同时固定化细胞最终可将吸附的氰完全转化. 值得指出的是本文比较固定化细胞和游离细胞的转化特性是在保持两者生物量相同的前提下进行实验, 由此可排除固定化细胞氰转化速率提高是由于固定化提高细胞量^[12] 的原因.

由此可见, 利用聚氨酯泡沫为载体制备的固定化细胞转化性能明显优于游离细胞, 不仅可转化更高浓度的氰化物, 转化速率也加快.

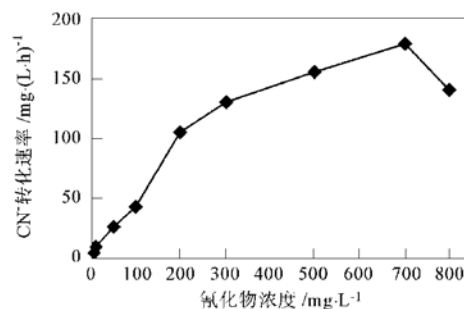


图3 游离细胞对不同浓度氰化物的转化速率

Fig. 3 Biotransformation rate for cyanide of different concentration by free cell

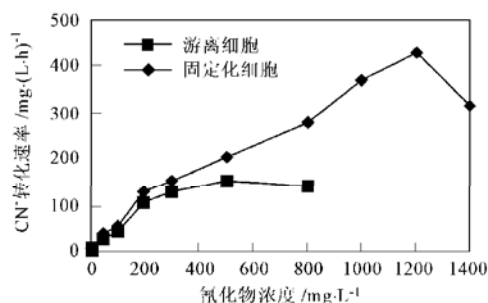


图4 固定化细胞和游离细胞对不同浓度氰化物的转化速率的比较

Fig. 4 Comparison of biotransformation rate for cyanide of different concentration by free and immobilized cell

2.4 细胞转化氰化物的进程曲线

图 5 所示为 30 ℃和 pH8.0 条件下游离细胞和固定化细胞转化 50mg/L 和 100mg/L 的氰化物的进程曲线. 无论游离细胞还是固定化细胞, 在转化初始阶段, 氰浓度呈指数型曲线下降, 此时转化速率较快; 在转化后期, 曲线趋于平缓. 固定化细胞的转化速率及转化效果皆优于游离细胞: 对于 50mg/L 的氰化物, 游离细胞转化 2.5h 后残余氰浓度为 6.3mg/L, 而采用固定化细胞, 残余氰浓度为 0.33mg/L; 对于 100mg/L 的氰化物, 固定化细胞 5h 的转化率可达到 99%, 游离细胞仅为 90%.

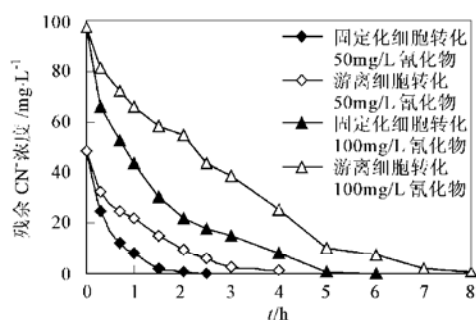


图 5 细胞转化氰化物的进程曲线

Fig. 5 Time course of cyanide biotransformation by the cell

2.5 序批式生物反应器转化氰化物的初步实验

以摇瓶反应模拟序批式反应器的运行, 每个周期为 24h, 以 50mg/L 的氰化物为底物, 重复 20 批. 图 6 显示该体系具有稳定的去除效率, 20d 后细胞转化率仍可达到 93%. 测定不同运行时期的固定化细胞量, 发现细胞量基本保持不变. 这说明聚氨酯泡沫具有一定的机械强度和较强的菌种保持能力, 使得整个处理系统有望实现长期稳定运行, 具备一定的应用前景.

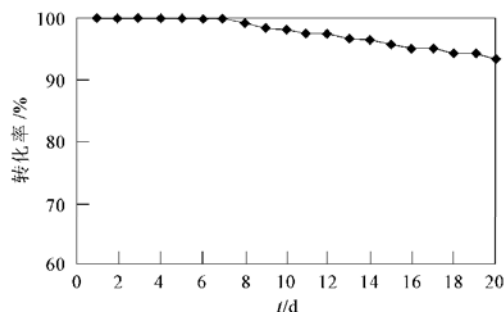


图 6 序批式反应器中氰转化实验

Fig. 6 Cyanide biotransformation in a sequencing batch reactor biofilm reactor

3 结论

(1) 以聚氨酯泡沫为载体, 通过吸附生长, 实现

了产碱杆菌 DN25 的固定化, 每 g 泡沫的固定化生物量达到 0.35g, 能满足氰转化要求. 与游离细胞相比, 固定化细胞最适转化温度由 30 ℃提高至 35 ℃, 同时温度适应范围增宽; 最适 pH 保持在 8.0.

(2) 对于低浓度氰化物, 游离细胞和固定化细胞的氰转化速率相同. 值得注意的是固定化细胞在转化高浓度的氰化物方面更有优势, 最大转化速率可达到 507mg/(L·h), 为游离细胞的 2.8 倍. 聚氨酯泡沫对氰分子的吸附是固定化细胞转化速率提高的原因之一.

(3) 所测定的氰转化进程曲线进一步表明固定化细胞进行氰转化, 可以提高转化效率, 缩短转化时间. 在初步的模拟序批式生物反应器中固定化细胞使用 20d 后仍保持一定的稳定性. 因此采用聚氨酯泡沫固定化产碱杆菌 DN25, 具有一定的应用潜力.

参考文献:

- [1] 张永明, 张悦, 施汉昌, 等. 固定化梭形气芽孢杆菌在降解废水时微观形态的观察和比较[J]. 环境科学, 2003, 24(3): 70~73.
- [2] Branyik T, Kuncovag G, Paca J. The use of silica gel prepared by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 54(2): 168~172.
- [3] Ory I, Romero L E. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti* [J]. Proc. Biochem., 2004, 39(5): 547~555.
- [4] 中国环境优先监测研究课题组编, 环境优先污染物[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 13.
- [5] Kao C M, Liu J K, Lou H R, et al. Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca* [J]. Chemosphere, 2002, 50(8): 1055~1061.
- [6] White D M, Pilon T A, Woolard C. Biological treatment of cyanide containing wastewater [J]. Wat. Res., 2000, 34(7): 2105~2109.
- [7] 刘幽燕, 何玉财, 李青云, 等. 一株降氰细菌的筛选及其转化特性初步研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 25~28.
- [8] Manohar S, Kim C K. Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, 55(3): 311~316.
- [9] O'reilly K T, Crawford R L. Degradation of pentachlorophenol by polyurethane immobilized *flavobacterium* cells [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55(9): 2113~2118.
- [10] 水质监测分析方法标准实务手册(一) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 300~307.
- [11] Kyungsu N, Yongwoon L, Wanjin L, et al. Characterization of PCB-Degrading bacteria immobilized in polyurethane foam [J]. J. Biosci. Bioeng., 2000, 90(4): 368~373.
- [12] Sub Y J, Park J M, Yang J W. Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite [J]. Enzyme. Microb. Technol., 1994, 16(6): 529~533.