

光合细菌与酵母跨界融合子降解 味精废水性能测定*

程树培 崔益斌 夏伏虎 邓良伟 葛 岚 王玉水

(南京大学环境科学与工程系, 南京 210093)

摘要 为了筛选出能综合双亲优势的杂种细胞, 为废水资源化生产 SCP 提供更为理想的菌株来源, 将原核球形红假单胞菌细胞(Nt^+Sm^+)与真核酿酒酵母细胞(Nt^+Sm^+)的原生质体融合, 构建成跨界杂种细胞(Nt^+Sm^+)。从中筛选出 F13, F15, F20 三株高絮凝性融合细胞, 在起始 BOD_5 浓度为 191—690 mg/L, pH 7.0, 30℃ 的味精废水中振荡反应 7—8 h, 测得融合细胞和双亲菌株降解利用有机污染物的系列反应动力学参数 μ_{max} , q_{max} , K_{sp} , K_{eq} , Y 和 K_d , 发现融合细胞降解废水的性能具有优势, 利于废水资源化处理。

关键词 球形红假单胞菌, 酿酒酵母, 原生质体融合, 味精废水, 动力学参数。

应用原生质体融合(protoplast fusion)技术, 在种间、属间和科间构建出新的菌株, 成为公认的一项快速组装新物种的基因工程技术^[1,2]。本课题在光合细菌球形红假单胞菌与沼泽红假单胞菌种间原生质体融合、酿酒酵母与热带假丝酵母属间原生质体融合的研究基础上^[3-5], 对球形红假单胞菌与酿酒酵母的原生质体进行融合, 构建出跨原核与真核两界细胞的能综合双亲优势^[6,7]的融合子杂种细胞, 为废水资源化生产 SCP 提供更为理想的菌株来源。

1 材料和方法

1.1 菌株

球形红假单胞菌 P9479 (Nt^+Sm^+) (*Rhodospseudomonas sphaeroides*), 原菌株由中国科学院上海植物生理研究所提供。本研究中以经 15 mmol/L 甲醛诱变后筛选的高絮凝菌株作为跨界融合的亲株之一^[12]。

酿酒酵母 Y9407 (Nt^+Sm^+) (*Saccharomyces cerevisiae*), 由广东省东莞糖厂提供, 筛选纯化后作为跨界融合另一亲株。

融合细胞 F13、F15、F20(Nt^+Sm^+), 由球形红假单胞菌 P9479 和酿酒酵母 Y9407 的原生质体融合构建而成^[9]。3 株融合细胞含有双亲的基

因组分, 有关分子遗传学和形态学研究另文报道。融合细胞经划线分离, 扩大培养复筛出高絮凝性的 F13、F15、F20 细胞用于动力学测定。

1.2 废水

味精废水采自江苏 YZ 味精厂。原废水 COD_{Cr} 88720 mg/L, BOD_5 57600 mg/L, TN 2680 mg/L, TP 241 mg/L, TSS 10793 mg/L。原废水经沉淀、去渣、稀释、调 pH 至 7.0, 灭菌之后用于研究。

1.3 实验方法

在 5 组各 200 ml, BOD_5 为 191—690 mg/L 的味精废水中, 接入待测的处于指数生长期的菌液 10 ml, 于 30℃, 120 r/min 振荡反应 8 h, 分别测定反应起始和终止时的生物量 X_0 、 X_{∞} (mg/L) 及废水 BOD_5 S_0 、 S_c (mg/L)。

COD_{Cr} 、 BOD_5 、TSS 及生物量测定参照美国 APHA 等《水和废水标准检验法》^[10]。TN、TP 测定参照钱君龙的过硫酸钾氧化法^[11]。

2 测定结果与分析

2.1 融合细胞和双亲菌株 μ_{max} 和 K_{sp} 参数计算

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1995-09-26

按照以下 Monod 变形方程(1), 进行直线回归, 计算出 $\mu_{\max}$ 和 $K_{s\mu}$.

$$1/\mu = K_{s\mu}/\mu_{\max} \times (1/S_0) + 1/\mu_{\max} \quad (1)$$

式中, μ : 菌体比增长率, 即单位生物量在单位时间内菌体细胞增长的速率, $\mu = (\ln X_n - \ln X_0)/\Delta t(h^{-1})$; $\mu_{\max}$: 菌体最大比增长率(h^{-1}); $K_{s\mu}$: 菌体比增长率达到 $\mu_{\max}$ 一半时反应液中基质的 BOD₅ 浓度(mg/L); S_0 : 反应液起始时 BOD₅ 浓度(mg/L).

方程(1)中以 $1/S_0$ 对 $1/\mu$ 作图为一 直线, 截距为 $1/\mu_{\max}$, 斜率为 $K_{s\mu}/\mu_{\max}$; 由此可算出 $\mu_{\max}$ 和 $K_{s\mu}$. 有关的计算结果见表 1.

从表 1 看出, P9479 菌体比增长率 $\mu_{\max}$ 数值最高, 为 $0.6636 h^{-1}$; $\mu_{\max}$ 值最低的是酿酒酵母 Y9407, 为 $0.4263 h^{-1}$; 3 株融合细胞的最大比增长率均介于双亲之间. $\mu_{\max}$ 数值高反映出菌体增殖速率具有优势; $K_{s\mu}$ 高反映出菌体适应味精废水增殖所需的有机物 BOD₅ 浓度高. 优势和劣势分别集中于 P9479 和 Y9479 双亲菌株. 而 3 株融合细胞的 $\mu_{\max}$ 和 $K_{s\mu}$ 数值水平均居双亲之间, 可以看出, 融合细胞在自身增殖方面兼具

双亲优势, 弥补了双亲各自的不足.

2.2 融合细胞和双亲菌株 $q_{\max}$ 和 K_{sq} 参数计算

按照以下 Monod 变形方程(2)进行回归, 计算出 $q_{\max}$ 和 K_{sq} [12].

$$1/q = K_{sq}/q_{\max} \times (1/S_e) + 1/q_{\max} \quad (2)$$

式中, q : 菌体对味精废水的比降解率, $q = \Delta S\mu/[(e^\mu - 1)X_0], h^{-1}$, $\Delta S = S_0 - S_e$; $q_{\max}$: 菌体对味精废水的最大比降解率(h^{-1}); K_{sq} : 达 $q_{\max}$ 一半时, 处理出水即反应终止时废水中 BOD₅ 的浓度(mg/L); S_e : 反应终止时废水 BOD₅ 浓度(mg/L). 方程(2)中以 $1/S_e$ 对应 $1/q$ 作图得到 1 条直线. $q_{\max}$ 和 K_{sq} 的计算同于 $\mu_{\max}$ 和 $K_{s\mu}$. 结果见表 2.

从表 2 的 $q_{\max}$ 和 K_{sq} 计算值看出, 3 株融合细胞的 $q_{\max}$ 均大于双亲菌株, 说明单位菌体细胞生物量在单位时间内去除废水中 BOD₅ 的速率高于双亲, 具有明显优势. 3 株融合细胞的 K_{sq} 介于双亲之间, 约为酿酒酵母的 2 倍, 近于球形红假单胞菌的 1/2, 表明 3 株融合细胞比降解率达 $q_{\max}$ 一半时所需污染物 BOD₅ 浓度介于双亲之间, 弥补了单一亲株酿酒酵母适应性不强的

表 1 融合细胞与双亲菌株细胞降解味精废水动力学参数 $\mu_{\max}$ 和 $K_{s\mu}$ 的测定结果¹⁾

菌株来源	融合细胞			双亲细胞	
菌株代号	F13	F15	F20	Y9407	P9479
回归方程 $1/\mu = K_{s\mu}/\mu_{\max} \times (1/S_0) + 1/\mu_{\max}$	$1/\mu = 0.719/S_0 + 2.1750$	$1/\mu = 0.6688/S_0 + 2.1164$	$1/\mu = 0.6712/S_0 + 1.7060$	$1/\mu = 0.5963/S_0 + 2.3458$	$1/\mu = 1.2265/S_0 + 1.5096$
$1/\mu$ 与 $1/S_0$ 相关性 $r_{(5),0.01} = 0.9343$	$r = 0.994$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9986$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9994$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9956$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.997$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著
$\mu_{\max}(h^{-1})$	0.4598	0.4725	0.5862	0.4263	0.6636
$K_{s\mu}(BOD_5, mg/L)$	331	316	393	254	814

1) μ 的单位为 h^{-1} ; $1/S_0$ 的单位为 $\times 10^{-3} L/mg$; F20 的反应时间为 7 h, 其余为 8 h

表 2 融合细胞与双亲菌株细胞降解味精废水动力学参数 $q_{\max}$ 和 K_{sq} 的测定结果¹⁾

菌株来源	融合细胞			双亲细胞	
菌株代号	F13	F15	F20	Y9407	P9479
回归方程 $1/q = K_{sq}/q_{\max} \times (1/S_e) + 1/q_{\max}$	$1/q = 0.1690(1/S_e) + 1.0858$	$1/q = 0.1965(1/S_e) + 1.3364$	$1/q = 0.1531(1/S_e) + 0.8676$	$1/q = 0.1181(1/S_e) + 1.7100$	$1/q = 0.4154(1/S_e) + 1.3433$
$1/q$ 与 $1/S_e$ 相关性 $r_{(5),0.01} = 0.9343$	$r = 0.9855$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9572$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9741$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9912$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著	$r = 0.9797$ $r > r_{(5),0.01}$ 正相关, 极显著
$q_{\max}(h^{-1})$	0.921	0.7483	1.1526	0.5848	0.7444
$K_{sq}(BOD_5, mg/L)$	156	147	176	69	309

1) q 的单位为 h^{-1} ; $1/S_e$ 的单位为 $\times 10^{-3} L/mg$; F20 的反应时间为 7 h, 其余为 8 h

弱点。3 株融合细胞的 $q_{\max}$ 高于双亲或接近于双亲中最高水平的现象, 表明融合细胞降解去除味精废水中有机污染物的性能优于双亲。

2.3 融合细胞和双亲菌株 Y 和 K_d 参数计算结果

菌体理论产率系数 Y 和代谢过程中细胞自身的衰减系数计算采用式(3)^[13]。

$$1/\theta_c = Yq - K_d$$

(3)

式中, θ_c : 细胞生物量在反应器内的停留时间(h); $1/\theta_c = \mu = (\ln X_n - \ln X_0)/\Delta t$; Y : 理论产率系数, 是细胞增长量和废水中 BOD_5 去除量的比值(%); K_d : 细胞自身代谢的衰减系数(h^{-1})。方程(3)中 $1/\theta_c = \mu$, μ 的数值可从表 1 中得出, q 数值从表 2 导出, 以 q 对应 $1/\theta_c$ 进行回归计算, 得到直线方程, 其斜率为 Y , 截距为 K_d , 结果见表 3。

表 3 融合细胞与双亲菌株细胞降解味精废水动力学参数 Y 和 K_d 的测定结果¹⁾

菌株来源 菌株代号	融合细胞			双亲细胞	
	F13	F15	F20	Y9407	P9479
回归方程	$1/\theta_c = 0.5612q$	$1/\theta_c = 0.6796q$	$1/\theta_c = 0.5618q$	$1/\theta_c = 0.6972q$	$1/\theta_c = 0.6768q$
$1/\theta_c = Yq - K_d$	-0.0005	-0.0034	-0.0368	-0.0112	-0.0002
q 与 $1/\theta_c$ 相关性	$r = 0.9997$	$r = 0.9999$	$r = 0.9800$	$r = 0.9927$	$r = 0.9999$
$r_{(5), 0.01} = 0.9343$	$r > r_{(5), 0.01}$	$r > r_{(5), 0.01}$	$r > r_{(5), 0.01}$	$r > r_{(5), 0.01}$	$r > r_{(5), 0.01}$
	正相关, 极显著	正相关, 极显著	正相关, 极显著	正相关, 极显著	正相关, 极显著
Y (%)	56.12	67.96	56.18	69.71	67.68
K_d (h^{-1})	0.0005	0.0034	0.0368	0.0112	0.0002

1) q 的单位为 h^{-1} ; θ_c 单位为 h; $1/\theta_c = \mu$

表 3 中 3 株融合细胞的理论产率系数 Y , 近于或低于双亲中较低水平的球形红假单胞菌 P9479, 表明融合细胞转化污染物 BOD_5 合成菌体生物量的理论效率不及酿酒酵母 Y9407, 而是近于或低于球形红假单胞菌。F13 和 F15 融合细胞自身代谢衰减系数 K_d 值介于双亲之间, F20 的 K_d 高于双亲, 融合细胞自身代谢的衰减功能可以超过双亲的最高水平或介于双亲之间。

3 结语

在 BOD_5 为 191—690 mg/L 的味精废水振荡反应中, 测得 F13, F15, F20 三株融合细胞的 $\mu_{\max}$ 和 $K_{s\mu}$ 均介于双亲之间, 说明其菌体增殖速率和适应性能同时受到了双亲特点的影响。

3 株融合细胞对味精废水中有机污染物的降解性能优于或接近于双亲中的最高水平的酿酒酵母 Y9407, 其理论产率系数 Y 不及双亲或接近于双亲中的最低水平的球形红假单胞菌 P9479。以振荡反应代替稳定发酵处理单级反应系统测定动力学参数, 降低了操作难度, 可以反映参数之间的定量关系。

融合细胞 F13, F15, F20 在降解味精废水 BOD_5 的速率上具有优势, 在适应废水能力方面受到了双亲特点的影响, 对净化去除废水中有机污染物具有潜力。

参 考 文 献

1 Siran A et al. . Appi. Environ. Microbiol. , 1990, **5**(8): 2404

2 Spencer J F T. Yeast Genetics: A Manual of Method, Germany, Spring-Verlag, Berlin Heidelberg. 1989: 64

3 程树培等. 南京大学学报, 1993, **29**(3): 407

4 程树培等. 环境污染与防治, 1993, **15**(5): 5

5 程树培等. 环境污染与防治, 1995, **17**(1): 9

6 陈世阳等. 海洋通报, 1991, **10**(1): 24

7 陈陶声. 工业微生物, 1986, **16**(2): 17

8 Battersby N S. Chemosphere, 1990, **21**(10—11): 1243

9 俞毓馨等. 环境工程微生物检验手册. 北京: 中国环境科学出版社. 1990: 100—119

10 美国 APAH 等编, 宋仁元等译. 水和废水标准检验法. 15 版, 北京: 中国建筑工业出版社, 1988: 84—85, 443—453

11 钱君龙. 环境科学, 1987, **8**(1): 81

12 秦麟源. 废水生物处理. 上海: 同济大学出版社. 1989: 50—71

13 程树培等. 南京大学学报, 1995, **31**(3): 415

Study on Electrokinetic Detection Characteristics of Inorganic Cationoid Coagulants in Water. Qu Jiuhui (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(3), 1996, pp. 1-4

A new essential factor of electrokinetic characters, streaming current (SC) was introduced into the study of coagulation processes, and the relative law and isoelectronic point between electrokinetic parameters and concentration or efficiency of inorganic cation coagulants were studied. Furtherly, in the paper the characteristics and functions to express coagulants affecting on colloid particles by SC have been investigated and an effective method was presented for studying on the relationship between the coagulation, detecting colloid potential in line and optimum dosage of coagulants.

Key words: ζ potential, streaming current, inorganic cationoid coagulants, electrokinetic detection characteristics.

Function Determination for Biodegradation of Monosodium Glutamate (MSG) Wastewater with Fusants between Photosynthetic Bacteria and Yeast. Cheng Shupeil et al. (Dept. of Environ. Sci. and Eng., Nanjing University, Nanjing 210093); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(3), 1996, pp. 5-7

The protoplasts of *Rhodospseudomonas sphaeroides* (eukaryote, Nt'Sm⁺) and *Saccharomyces cerevisiae* (prokaryote, Nt'Sm⁺) were induced with PEG (MW=6000) to fuse for the construction of the fusant cell (Nt'Sm⁺). The fusants F13, F15 and F20 screened from the fusion production with high flocculation were used to test the kinetics parameters for degradation of MSG wastewater in the shaking reaction for 7-8 h, while the initial BOD₅ concentration of the wastewater were from 191 to 690 mg/L. The values of maximum specific growth rate μ_{max} and its half velocity constant K_{sp} , the maximum specific degradation rate q_{max} and its half velocity constant K_{sq} , the true growth yield coefficient Y and the endogenous decay rate coefficient K_d were measured in the reaction. The results of this research suggest that the fusants F13, F15 and F20 have better ability for degra-

dation of the organic waste in MSG wastewater.
Key words: *Rh. sphaeroides*, *S. cerevisiae*, fusant, monosodium glutamate wastewater, biodegradation kinetic.

Study on Purification of Waste Gases Containing Toluene by Using a Biofilter. Huang Ruohua et al. (Dept. of Environ. and Chem. Eng., Kunming Univ. of Sci. and Tech., Kunming 650093); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(3), 1996, pp. 8-10

From this study, a fact can be affirmed that in China, it is feasible to purify the waste gas containing organic compounds in low concentration by using the biological trickling filter with biofilm packing-material, inoculated with a mixed culture from a biostation of treating wastewater in a coke-oven plant. The results of preliminary experiment showed that with the increasing of the concentration of toluene in influent gas and gas flow, and decreasing of the flow of circulating liquid simultaneously, the biochemical elimination of toluene in waste gas can be increased, which can reach 157.13 mg per hour per litre packing-material with biofilm in the tower. From the experimental results, it can be inferred that the process of purifying the waste gas containing toluene in low concentration by using the biofilter belongs to mass transfer. By contrast, a good suitability of the kinetic model established in this study for practical process is verified.

Key words: biofilter, toluene, waste gas, biological degradation, kinetics.

A Study on the Determination of Biodegradability of Polluted Organic Substances Using Production of Carbon Dioxide Test. Jiang Zhanpeng et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(3), 1996, pp. 11-14

In this paper, a rational PCD test for determining biodegradability of organic substance under aerobic conditions was established. The volume of bioreactor is 2 L, the concentration of organic substance is 100 mg/L (as DOC), the amount of the inoculum is 500 mg/L (as MLSS), the temperature is 25°C, the duration of test time is 14 days. Index of biodegradation (IB) was elaborated through analysis of biodegradability of