

丁二腈高效降解菌的筛选及其降解性

曹微寰¹,徐德强^{2*},张亚雷¹,欧阳丽¹,赵建夫¹(1. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室,上海 200092, E-mail: weihuan @sh163d.sta.net.cn; 2. 复旦大学生命科学学院,上海 200433)

摘要:以丁二腈为唯一碳源和氮源,从石化腈纶废水及其处理构筑物的生物膜中,分离、筛选出 2 株高效降解丁二腈的菌株:J-1-3 和 J-13-1. 经形态学观察和生理生化特征研究,两者均被鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.). 通过摇瓶试验得出 2 菌株的最适生长条件:温度为 30℃,摇床转速(间接反映通气量)为 250 r/min,接种量为 0.1%,初始 pH 为 6. 在最适生长条件下,分别对不同初始浓度丁二腈进行降解率试验. 结果表明,2 菌株对丁二腈的降解能力强,尤以 J-13-1 更为显著. 当丁二腈的初始浓度约为 6000 mg/L、8000 mg/L 和 10000 mg/L 时,J-13-1 菌株对丁二腈的降解率分别在 12.5h、14h 和 16h 时达到 100%.

关键词:丁二腈;降解菌;假单胞菌;菌株分离与筛选

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2003)02-05-0134

Screening of High Efficiency Succinonitrile Degrading Bacterium Strains and Their Degradability

Cao Weihuan¹, Xu Deqiang^{2*}, Zhang Yalei¹, Ouyang Li¹, Zhao Jianfu¹(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China E-mail: weihuan @sh163d.sta.net.cn; 2. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Succinonitrile used as a sole source of carbon and nitrogen, two bacterium strains, named as J-1-3 and J-13-1, which had high degrading capacity for succinonitrile were isolated and screened out from acrylic fiber wastewater and biofilm in its treatment structure. Through morphological and biochemical method, the two strains were primarily identified as *Pseudomonas* spp. By tests in shaking flasks, it was determined that the strains can be optimum growth at 30℃, with shaker rotary speed which indirectly reflected aeration capacity at 250r/min, inoculum amount of 0.1%, and initial pH6. On the optimum conditions for growth, the degradation experiments on different initial concentrations of succinonitrile were carried out. The results indicate that the two strains, especially J-13-1 had high degrading efficiency for succinonitrile. With the initial concentration of succinonitrile at ca. 6000, 8000 and 10000 mg/L, the degrading rates of succinonitrile by strain J-13-1 reached to 100% after 12.5h, 14h and 16h, respectively.

Key words: succinonitrile, degrading bacterium, *Pseudomonas* spp.; isolating and screening of strains

各种人工合成的脂肪腈化物,包括单腈、多腈和聚合腈,被广泛应用于溶剂、塑料和其他化工、化纤产品的生产中.腈类化合物具有强烈的生物毒性,但某些微生物经驯化可以分解这些物质.国内外对乙腈、丙烯腈等腈化物的微生物降解研究较多^[1~7],但对丁二腈却鲜有报道.

丁二腈是二步法腈纶废水中的主要污染物之一^[8].本课题针对上海某石化腈纶厂的生产废水,以丁二腈为目标污染物,分离、筛选高效降解菌,并对其降解性能进行了试验研究,为改善此类废水的实际处理效果提供微生物基础.

1 材料与方法

1.1 供试底物

丁二腈(纯度 > 98%, Lancaster Synthesis 产品).

1.2 培养基

肉汤培养基^[9].

Yamada 富集培养基^[11]:葡萄糖,0.5g;蛋白

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50008011)

作者简介:曹微寰(1970~),女,博士研究生,主要研究方向为水污染控制.

收稿日期:2002-06-09;修订日期:2002-09-13

* 通讯联系人

胨, 1 g; K_2HPO_4 , 0.1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g; 蒸馏水, 1 L. pH 7.0.

Yamada 基础培养基成分如下^[1]: K_2HPO_4 , 2 g; NaCl, 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; V_H , 2 μ g; 泛酸钙, 0.4 mg; 肌醇, 2 mg; 烟酸, 0.4 mg; $V_{B1} \cdot HCl$, 0.4 mg; $V_{B6} \cdot HCl$, 0.4 mg; 对氨基苯甲酸, 0.2 mg; V_{B2} , 0.2 mg; 叶酸, 0.01 mg; 蒸馏水, 1 L. pH 7.0. 以上培养基若为固体, 则加 1.6% 的琼脂粉.

B.B. 基础培养基(参照 Bushnell-Hass 培养基^[10]而除去氮源组分)成分如下: $MgSO_4$, 0.2 g; KH_2PO_4 , 1 g; $CaCl_2$, 0.02 g; K_2HPO_4 , 1 g; $FeCl_3$, 2 滴浓缩液; 蒸馏水, 1 L. 培养基的 pH 值分别调节如下: 在最适 pH 条件试验中分别是 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 在降解试验中为 6.0.

1.3 微生物来源

取自上海某石化总厂腈纶厂废水处理站的塔式生物滤池中的生物膜和沉淀池水.

1.4 丁二腈降解菌的富集和分离

将生物膜和沉淀池水样品分别接种到装有 30 mL Yamada 富集培养基的摇瓶中, 加入 0.5 g/L 的丁二腈, 于 30 $^{\circ}C$ 、220 r/min 的恒温摇床中振荡培养 3 d. 以此摇瓶中的培养菌液作为菌种, 在同样条件下进行二次转接培养, 得到丁二腈耐受菌.

将二次培养的菌液接种到含有 2 g/L 丁二腈的 30 mL Yamada 基础培养基摇瓶中, 在同样条件下培养. 然后对此培养菌液作适当稀释, 将不同浓度的稀释液分别涂布在含有丁二腈的 Yamada 基础培养基梯度平板上, 于 30 $^{\circ}C$ 培养 3 d. 继而对高浓度丁二腈区域长出的单菌落进行更高浓度丁二腈混血培养试验, 选择生长较好的菌株进一步在肉汤平板上划线纯化.

1.5 丁二腈高效降解菌的筛选

将纯化的菌株分别接种到装有 30 mL Yamada 基础培养基的 250 mL 摇瓶中, 以丁二腈为碳源和氮源, 在 30 $^{\circ}C$ 、220 r/min 的恒温摇床中进行振荡培养. 根据发酵液浑浊程度, 定性地初步筛选出生长良好的菌株.

以丁二腈作为碳源和氮源, 对初筛到的数

株降解菌同样进行通气培养, 并分析各菌株的生长量(通过分光光度计在波长 460 nm 处跟踪测定菌生长的光密度值)及其对丁二腈降解率(气相色谱分析摇瓶中丁二腈的浓度变化), 筛选出生长快、生长量大、对丁二腈降解率高的高活性菌株.

1.6 样品制备与分析

用针筒抽取发酵液, 通过微孔滤膜(ϕ 0.22 μ m)过滤, 并用去离子水对滤液作适当稀释, 以备分析.

采用 HP5890 气相色谱仪(GC-FID)分析样品. 运行条件如下: 柱温, 180 $^{\circ}C$ (2 min) $\rightarrow$ 230 $^{\circ}C$ (4 min), 升温速率 30 $^{\circ}C$ /min; 检测器温度, 250 $^{\circ}C$; 注射室温度, 250 $^{\circ}C$; 进样量, 2 μ L. 通过测定峰面积, 定量分析丁二腈的浓度.

1.7 丁二腈降解菌的鉴定

主要参考相关文献^[11~15], 对筛选到的丁二腈高效降解菌进行鉴定.

2 结果与讨论

2.1 丁二腈降解菌株的分离与筛选

经过分离纯化、初筛和复筛, 得到能利用丁二腈为唯一碳源和氮源, 并生长良好的 2 株高效降解菌株: J-1-3 和 J-13-1.

2.2 最适生长条件试验

在装有 30 mL B.B. 基础培养基的 250 mL 三角瓶中, 加入丁二腈作为唯一碳源和氮源, 将试验菌株的种子液经离心、洗涤而制备成一定浓度的菌悬液接入其中, 分别对温度(20、25、30、35、40 $^{\circ}C$)、摇床转速(130、160、190、220、250 r/min)、接种量[以单位体积的细胞湿重来表示(W/V)], 分别为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2% 和初始 pH 值(5、6、7、8、9)进行单因素条件试验. 测定不同条件下, 菌株 J-1-3 和 J-13-1 的生长量(在波长 460 nm 处的光密度值). 各条件对菌株生长的影响如图 1~图 5 所示.

由于丁二腈在降解过程中产生大量的氨, 致使试验体系的 pH 发生变化. 而实际处理中多采用连续运行, 废水 pH 值基本恒定. 因此在初始 pH 条件试验中, 发酵结束时刻的降解菌生长量并不能真正衡量 pH 的影响. 本研究中,

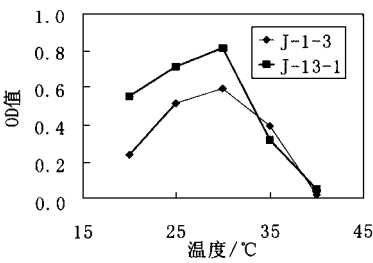


图 1 温度对生长的影响

Fig.1 The effect of temperature on growth

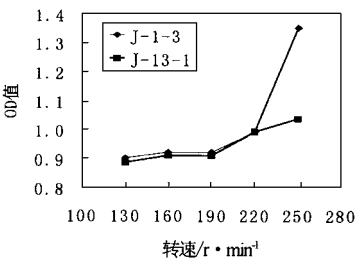


图 2 转速对生长的影响

Fig.2 The effect of shaker rotary speed on growth

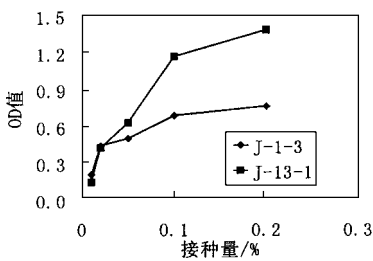


图 3 接种量对生长的影响

Fig.3 The effect of inoculum amount on growth

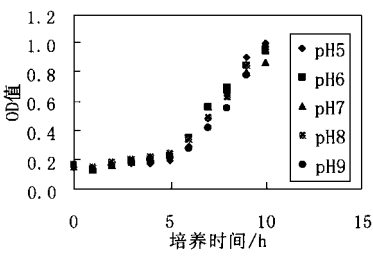


图 4 初始 pH 对 J-1-3 菌株生长的影响

Fig.4 The effect of initial pH on growth of strain J-1-3

而不同初始 pH 值对 J-1-3 菌株的影响并不显著.考虑到实际腈纶废水 pH 为 6,故以此作为 J-1-3 菌株的最适 pH.

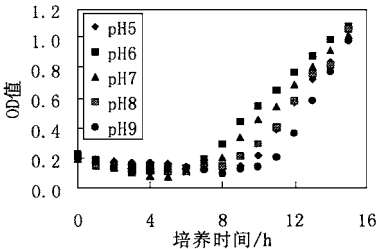


图 5 初始 pH 对 J-13-1 菌株生长的影响

Fig.5 The effect of initial pH on growth of strain J-13-1

根据以上试验结果,以降解菌的生长量最大,或者生长量较大但更经济可行的条件确定为最适生长条件(如表 1 所示).

表 1 丁二腈降解菌的最适生长条件

Table 1 The optimum conditions for growth of the succinonitrile degrading bacterium strains

菌株	温度/℃	转速/ $r \cdot min^{-1}$	接种量/%	pH 值
J-1-3	30	250	0.1	6.0
J-13-1	30	250	0.1	6.0

2.3 丁二腈降解试验

在装有 30 mL B.B.基础培养基 (pH=6) 的 250 mL 三角瓶中,以丁二腈为唯一碳源和氮源,按照最适生长条件,分别进行 J-1-3 和 J-13-1 菌株对不同初始浓度丁二腈的降解率试验.接种的摇瓶和未接种的空白对照瓶均置于恒温摇床内,按一定时间间隔取样,分析摇瓶中丁二腈的浓度变化.试验结果见图 6、图 7 和表 2.

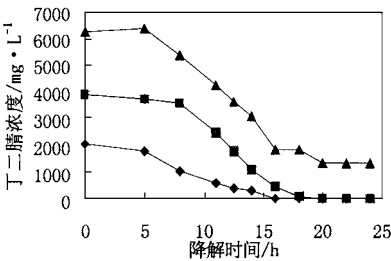


图 6 J-1-3 菌株对不同浓度丁二腈的降解

Fig.6 The degrading of succinonitrile with different concentrations by strain J-1-3

以延滞期后刚进入对数生长期阶段的降解菌逐时生长量为衡量依据.由图 4 和图 5 可知,在初始 pH 为 6 的条件下 J-13-1 菌株明显生长最好,

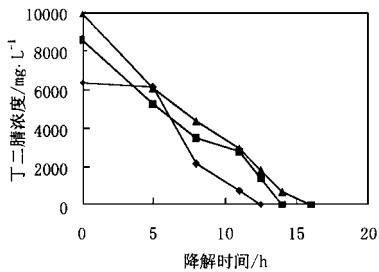


图 7 J-13-1 菌株对不同浓度丁二腈的降解

Fig.7 The degrading of succinonitrile with different concentrations by strain J-13-1

试验结果表明, J-1-3 和 J-13-1 菌株对丁二腈具有高效的降解能力,尤其以 J-13-1 菌株更为显著:

(1) 当丁二腈的初始浓度约为 2000 和 4000 mg/L 时, J-1-3 菌株分别在 16h 和 20h 对丁二腈的降解率达到 100%;当丁二腈的初始浓度约为 6000 mg/L 时, J-1-3 在 24h 对丁二腈的降解率为 78%.

(2) 当丁二腈的初始浓度约为 6000、8000 和 10000 mg/L 时, J-13-1 菌株分别在 12.5h、

14h 和 16h 时对丁二腈的降解率达到 100%.

表 2 丁二腈的平均降解速率

Table 2 The average degrading speed of succinonitrile		
菌株	丁二腈初始浓度/ mg·L ⁻¹	平均降解速率/ mg·(L·h) ⁻¹
J-1-3	2000	128
	4000	194
	6000	204
J-13-1	6000	507
	8000	612
	10000	623

由表 2 可知,在一定的丁二腈浓度范围内, J-1-3 和 J-13-1 菌株对丁二腈的平均降解速率很高,且随丁二腈初始浓度的提高而增大.

2.4 丁二腈高效降解菌株的鉴定

主要参考相关文献^[11~15],对筛选到的丁二腈高效降解菌株 J-1-3 和 J-13-1 进行了形态学和生理生化特征研究,结果见表 3.

经进一步查阅上述文献,确认 J-1-3 和 J-

表 3 丁二腈降解菌的形态学和生理生化特征

Table 3 The morphological and biochemical characters of the bacteria for degrading succinonitrile		
特征	J-1-3	J-13-1
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻
需氧性	好氧	好氧
过氧化氢酶	+	+
氧化酶	+	+
厌氧硝酸盐产气	-	-
需要有机生长因子	-	-
葡萄糖分解(O/F 培养基)	-	-
pH4.5 生长试验	不生长	不生长
菌落特征	圆形, $\phi 0.5 \sim 1.5$ mm,乳白色,半透明,表面光滑,湿润,有光泽,低凸起,边缘裂叶状.	近圆形, $\phi 0.5 \sim 2$ mm,淡蜜黄,表面光滑,湿润,扁平,中央稍凸起,边缘近裂叶状.
菌体形态	杆-短杆,有的稍弯曲,无芽孢, $(0.5 \sim 0.7) \times (1.0 \sim 2.0) \mu\text{m}$. 细胞内不积累 PHB,有极生鞭毛.	杆菌,有的稍弯曲,无芽孢, $[0.4 \sim 0.6 (-0.9)] \mu\text{m} \times (1.0 \sim 2.2) \mu\text{m}$. 细胞内不积累 PHB,有极生鞭毛.

13-1 菌株均为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) .

3 结 论

(1) 通过筛选,获得 2 株好氧条件下对丁二腈具有高效降解能力的菌株:J-1-3 和 J-13-1 . 经鉴定均为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) .

(2) 由试验得出 2 菌株的最适生长条件: 温度为 30 ℃,摇床转速为 250 r/ min,接种量为 0.1 % ,初始 pH 为 6 .

(3) 在最适生长条件下,2 菌株对丁二腈的降解能力强,尤以 J-13-1 更为显著.当丁二腈的初始浓度约为 6000、8000 和 10000 mg/ L 时,J-13-1 菌株对丁二腈的降解率分别在 12.5 h、14 h 和 16 h 时达到 100 % .

参考文献:

1 Yamada H, Asano Y, Hino T et al. Microbial utilization of acrylonitrile. J. Ferment. Technol., 1979, **57**(1):8 ~ 14 .
2 Yamada H, Asano Y, Tani Y et al. Microbial utilization of glutaronitrile. J. Ferment. Technol., 1980, **58**(6):495 ~ 500 .
3 Kuwahara M, Yanase H, Ishida Y et al. Metabolism of aliphatic nitriles in *Fusarium solani*. J. Ferment. Technol., 1980, **58**(6):573 ~ 577 .
4 Yanase H, Sakai T, Tonomura K. Microbial metabolism of nitriles in *Pseudomonas* spp. J. Ferment. Technol., 1985, **63**(2):193 ~ 198 .

5 杨惠芳,谢树华,鲜海军等.降解硫氰酸和丙烯腈的一种新型混合细菌培养物.微生物学报,1984, **24**(3):256 ~ 261 .
6 谢树华,杨惠芳.不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) 51-2 降解乙腈的研究.微生物学报,1990, **30**(6):471 ~ 474 .
7 李文忠,张鸿翼,杨惠芳.脂肪腈化物的微生物降解.应用与环境生物学报,1995, **1**(1):44 ~ 49 .
8 张亚雷.难降解有机废水(腈纶废水)处理工艺及其污染物生物降解性能研究[博士学位论文].上海:同济大学,1999.13 .
9 胡家骏,周群英编著.环境工程微生物学.北京:高等教育出版社,1988.226 .
10 Bushnell L D, Haas H F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. Journal of Bacteriology, 1941, **41**(5):653 ~ 673 .
11 张纪忠主编.微生物分类学.上海:复旦大学出版社,1990.21 ~ 23, 92, 99 .
12 卢振祖编著.细菌分类学.武汉:武汉大学出版社,1994.88 ~ 93, 340 ~ 358 .
13 Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology (volume 1). Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984.140 ~ 219 .
14 Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A et al. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.). Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1994.93 ~ 94, 151 ~ 168 .
15 东秀珠,蔡妙英等编著.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001.162 ~ 163 .