

一株甲醛降解菌的筛选及降解特性的研究

孔芳^{1*} 郭凤献¹ 吴木章¹ 杨超英¹ 王幼平²

(1. 安徽工程大学 生物与化学工程学院 安徽 芜湖 241000)

(2. 扬州大学 生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

摘要:【目的】以甲醛为唯一碳源与能源,以期从印染厂采集的活性污泥中筛选出快速降解甲醛的菌株。【方法】采用传统微生物纯培养方法和形态学特征、生理生化试验,结合 16S rRNA 基因序列分析以及甲醛关键脱氢酶(FDH)对筛选的菌株 W1 进行系统研究,并利用正交设计法研究不同因素处理对菌株 W1 降解甲醛特性的影响。【结果】分类结果显示鉴定菌株 W1 属于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),通过单因素试验和正交试验考察培养条件对菌株降解甲醛的影响,得出菌株 W1 降解甲醛的最适条件为:甲醛浓度为 500 mg/L,温度 30 °C, pH 6.0,摇床转速为 200 r/min,接种量为 3%。【结论】在最适条件下菌株 W1 具有较强的降解甲醛能力,在 24 h 其甲醛降解率达 98%。

关键词: 甲醛降解, 菌种鉴定, 降解特性, 正交试验

Isolation and identification of bacterium strain efficient degrading formaldehyde and its degraing characteristics

KONG Fang^{1*} GUO Feng-Xian¹ WU Mu-Zhang¹ YANG Chao-Ying¹ WANG You-Ping²

(1. Academy of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

(2. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this project was to isolate a newly formaldehyde-degrading bacterium from soil of dyeing and printing plant activated sludges. [Methods] Strain was isolated by pure culture method and classified based on standard morphological identification, physiological and biochemical tests, 16S rRNA gene sequence analysis and formaldehyde dehydrogenase genes amplification. And the orthogonal design was used to study the capability of degradation characteristics of strains W1. [Results] The strain was identified as *Pseudomonas putida*. The optimum conditions of formaldehyde degradation were as follows: concentration of formaldehyde 500 mg/L, incubation temperature of 30 °C, pH 6.0, rotating rate of 200 r/min, bottled fluid volume of 3%. [Conclusion] The results showed that under optimum conditions, strain W1 had strong formaldehyde degradation capability in this study. The removal efficiency of formaldehyde can be as high as 98% in 24 h.

基金项目: 2012 年国家大学生创新创业训练计划项目(No. 201210363090); 中国博士后科学基金项目(No. 2013M-541735)

*通讯作者: Tel: 86-553-2871034; 信箱: kongf2003@126.com

收稿日期: 2013-08-07; 接受日期: 2013-10-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

Keywords: Formaldehyde degradation, Identification, Characteristics of degradation, Othogonal test

甲醛是一种无色、有强烈刺激性气味的有机污染物,其主要污染源来自有机合成、塑料、涂料、装潢材料及油漆等行业排放的废气、废水等,由于甲醛易发生加聚、氧化还原反应的特性,同时又具有高度的水溶性和生物大分子的高度反应特性,因此甲醛在接触部位较易被吸收进入人体,可再经呼吸道吸收后引起生物细胞核基因突变、损害 DNA、抑制 DNA 损伤修复;与氨基结合,改变蛋白质的内部结构;扰乱细胞的正常代谢;引起染色体异常等;高浓度甲醛则对神经系统、免疫系统、肝脏等都有毒害^[1-3]。国际癌症研究机构(IARC)已将甲醛上升为第 I 类致癌物质,因此对甲醛污染物进行防治工作对人类健康意义重大。

含甲醛的废水来源较广,由于甲醛在环境中颇为稳定,很难降解。在常温下水中甲醛浓度为 5 mg/L 时,5 d 内可稳定不降解;甲醛浓度为 <20 mg/L 时,可由驯化的微生物消耗降解;高于 100 mg/L 时,甲醛降解菌活性仅为原活性的 10%;而甲醛含量超过 200 mg/L 时,生物降解过程几乎全部中止,此时甲醛降解微生物的活性几乎完全被抑制^[3]。目前去除甲醛污染的方法有活性炭吸附、纳米光催化、臭氧负离子、植物分解、等离子技术等,但这些方法存在药剂消耗量大、费用高、不能将甲醛有效去除等缺点。而生物法降解甲醛具有效果好、成本低、无二次污染等优点^[4-6],因此筛选分离具有较强降解甲醛污染物的微生物已成为近年来国内外研究热点,目前大部分甲醛降解菌的筛选分离多为细菌与少部分真菌,降解效果总体来说是从低浓度到高浓度筛选趋势^[7-8]。Mirdamadi 等^[9]筛选的扭脱甲基杆菌和假产碱假单胞菌,它们能以甲醛为唯一碳源和能源进行生长,并能高效降解甲醛 1 850 mg/L,其中假产碱假单胞菌 OSS 菌株在 24 h 内可完全降解 3 700 mg/L 的甲醛,培养 72 h 可 70%降解浓度为 5 920 mg/L 的甲醛。Zagornaya 等^[10]在活性淤泥作基质的实验中,好氧菌在氧气充足条件下可完全降解甲醛 2 300 mg/L

与苯酚 2 400 mg/L。Tetsuya Kondo 等^[11]从土壤中筛选到一株甲醛降解真菌,该真菌能生长在最高甲醛浓度 4 500 g/L 中并把甲醛完全消耗掉。黄赛花等^[12]筛选获得了一株甲醛降解真菌黄曲霉,此真菌可忍耐高浓度甲醛,并可在 144 h 内将高浓度 1 241 mg/L 甲醛降解至 4 mg/L。

本实验目的是从印染厂采集的长期由甲醛废水浸泡的活性污泥作为优良菌种来源,经过筛选分离出一株能够以甲醛为唯一碳源与能源的优良菌种,并对其降解甲醛的生长条件与特性进行了初步研究,旨在为深入研究含甲醛降解的生物处理工业化应用提供有力的基础资料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从安徽芜湖中天印染厂采集活性污泥(长期被印染废水浸泡)作为菌种筛选样品。

1.2 药品与试剂

牛肉膏、蛋白胨、甲醛溶液质量分数为 37%、NaCl、MgSO₄、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、CaCl₂·2H₂O、(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄ 和 K₂HPO₄ 等系上海国药集团化学试剂有限公司提供,均为分析纯。

1.3 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,NaCl 10,蒸馏水 1 L,调 pH 至 7.0,1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

基本无机盐培养基^[13](g/L):(NH₄)₂SO₄ 1.00, K₂HPO₄ 2.16, MgSO₄ 0.10, KH₂PO₄ 0.85, MnSO₄·H₂O 0.05, CaCl₂·H₂O 0.03, FeSO₄·7H₂O 0.01,加蒸馏水定容至 1 L,调 pH 至 7.0, 0.68×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

培养条件:以下实验如无特殊情况,均在 30 °C 恒温培养箱振荡培养,摇床转速 150 r/min,培养 24 h。

1.4 实验方法

1.4.1 甲醛降解菌的筛选分离:富集培养:收集长

期浸泡印染废水的活性污泥各 5 g 加入 100 mL LB 培养基的锥形瓶中搅拌静置,取 2 mL 上清液加入到 100 mL 基本无机盐培养基,以浓度 50 mg/L 甲醛为唯一碳源,置于 150 r/min 摇床上 30 °C 振荡培养。3 d 转接一次菌液,每次按 2% (质量体积比)接种量转接到新鲜无机盐培养基中振荡培养,如此重复 10 次,同时将甲醛浓度从 50 mg/L 增加到 100 mg/L。

菌株分离:利用倍比稀释法将稀释液 0.1 mL 涂布于甲醛(50 mg/L)为唯一碳源的无机盐培养基固体培养基上,在 30 °C 培养箱中培养 2 d。将长出的单菌落编号并多次划线纯化,直至得到纯的单菌落,以确保菌株的纯度和甲醛降解的稳定性。

1.4.2 降解溶液中甲醛性能的测试:参照国标 GB/T13197-1991 的乙酰丙酮分光光度法测定,取适量待测样品加入 25 mL 具塞刻度试管,加 ddH₂O 稀释至刻度线,加入 2.5 mL 乙酰丙酮溶液,颠倒数次混匀,60 °C 水浴 15 min,室温冷却 1 h,测波长 414 nm 处的吸光度。根据测量降解前后甲醛 OD 值,考察菌株降解溶液中甲醛的性能,以水为对照。

$$\text{降解率}(\%)=(1-OD_1/OD_0)\times 100$$

式中:OD₀与 OD₁分别为降解前后的 OD 值。

1.4.3 菌株 W1 生长曲线的绘制与降解甲醛的测定:将菌株 W1 按 2%接种量(质量体积比)接种在甲醛浓度为 100 mg/L 的 LB 培养液中,30 °C 条件下,转速 150 r/min 摇床上振荡培养,以 LB 培养液为空白对照,每 2 h 在灭菌的超净台迅速移取 1 mL 于灭菌的离心管中,迅速将三角瓶重新放回摇床,取 1 mL 菌液于 460 nm 波长处测光密度 OD 值,作出 OD-t 曲线,同步取样测定培养液在 460 nm 处的甲

醛含量。

1.4.4 菌株的鉴定:利用扫描电镜观察细菌形态,使用革兰氏染色法将细菌染色并在显微镜下观察菌体颜色。菌株基因组 DNA 参照细菌基因组 DNA 提取方法。16S rRNA 基因序列扩增采用通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增(27F:5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3'; 1492R:5'-GGYTACCTGT TACGACTT-3')。PCR 反应条件如下:94 °C 5 min; 94 °C 30 s,54 °C 45 s,72 °C 1 min,共 33 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳(120 V,45 min)后,在凝胶成像系统中观察成像。16S rRNA 基因序列的测定提交上海生物工程技术有限公司完成。

根据 NCBI 中公布的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)基因序列,设计了甲醛脱氢酶(FDH)基因特异性引物。fdh-F:5'-CCATATGCTGG CAATCGTGGAGGT-3'; fdh-R:5'-CTACTCGAG CGCCGCACCCCACATCTTGTGCG-3'。由上海生物工程技术有限公司合成。

1.4.5 影响菌株 W1 降解甲醛的因素及正交优化:在选择性无机盐培养基中接入菌株 W1 菌悬液作为甲醛降解菌,分别选取不同甲醛浓度,培养 24 h 后测定甲醛降解率。在选择最佳甲醛浓度基础上,再考察初始 pH、接种量与摇床转速等因素对甲醛降解性能的影响。培养条件均在测定某一环境因素时,其他因素保持不变。

在单因素试验结果基础上,本试验选用 L₉(3⁴)正交设计表在 3 个水平上对甲醛浓度、pH 值、菌种接种量、摇床转速 4 个因素进行分析,以甲醛降解率为测定指标,考察多因素的综合影响。其因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 L₉(3⁴)正交设计试验的因素水平表
Table 1 L₉(3⁴) orthogonal design for the factors and levels in W1 strain

| 水平 Levels | A 甲醛浓度 Formaldehyde concentration (mg/L) | B pH 值 pH value | C 接种量 Inoculum dose (%) | D 摇床转速 Rotating rate (r/min) |
|--------------|---|--------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 1 | 450 | 6.0 | 2.5% | 100 |
| 2 | 500 | 7.0 | 3% | 150 |
| 3 | 550 | 8.0 | 4% | 200 |

2 结果与分析

2.1 甲醛降解菌筛选分离与鉴定

2.1.1 菌株 W1 的形态鉴定：经过反复富集与以无机盐培养基添加甲醛为唯一碳源纯化培养，从印染厂废水处理的活性污泥中筛选一株甲醛降解菌，命名为 W1。菌株 W1 于 30 °C 条件下培养 24 h，菌落呈圆球形，边缘规则，表面光滑湿润，有黏性，有凸起，呈乳白色；细菌革兰氏染色显示，该菌株为革兰氏阴性菌，不产芽孢。通过扫描电镜观察菌株 W1 呈短杆状(图 1A、B、C)，对菌株 W1 的多项生理生化指标进行测定，结果如表 2 所示。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》与《常见细菌系统鉴定手册》等^[14]，可初步鉴定菌株 W1 为假单胞菌^[15]。

2.1.2 菌株 W1 的 16S rRNA 基因序列分析：提取菌株 W1 的总 DNA 作模板，利用 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增，结果显示扩增产物大小约 1.5 kb 左右，将产物提交上海生工生物工程技术服务有限公司克隆测序(序列未列出)，将序列与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中报道的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对分析，与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)相似度达到 99%，序列长度为 1 438 bp (Accession No. GQ502786)。

2.1.3 甲醛脱氢酶(Formaldehyde dehydrogenase)

基因的扩增：根据 NCBI 报道的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的甲醛脱氢酶基因序列设计了一对特异性引物(fdh-F, fdh-R)，以菌株 W1 的总基因组 DNA 为模板，以期扩增获得甲醛降解途径中的关键酶基因。对照 Marker 结果表明在 65 °C 扩增片段主带约在 1 300 bp 处条带最亮(图 2)，后续实验可进行该基因的相关克隆工作，如 Ito 等从恶臭假单胞菌中克隆了甲醛脱氢酶(FDH)基因，并成功转化到大肠杆菌中进行高效表达^[16]。

2.1.4 菌株 W1 生长曲线和甲醛降解率曲线：从图 3 可以看出，菌株 W1 的甲醛降解曲线与生长曲线基本吻合，在菌液加入培养基 10 h 前期，由于菌株在新环境下生长处于延滞期，菌体生长缓慢，因此对甲醛降解也稍缓慢；随后进入对数生长期(10–40 h)，培养液 OD 值由 0.105 上升至 0.680，而甲醛降解率从 21%上升到 92%，说明菌株 W1 对培养基环境适应后迅速生长的同时对甲醛的降解量也随之升高；40 h 后 OD 值上升速度减缓直至趋于不变，开始进入稳定期，因此甲醛降解率基本保持不变；稳定期后由于细胞繁殖越来越慢，菌体自溶，死亡数增多，50 h 后细胞进入衰亡期，甲醛降解率开始趋于下降，56 h 后下降至 60%。由此可以确定菌株 W1 处于对数生长期所需培养时间 12–40 h 范围。

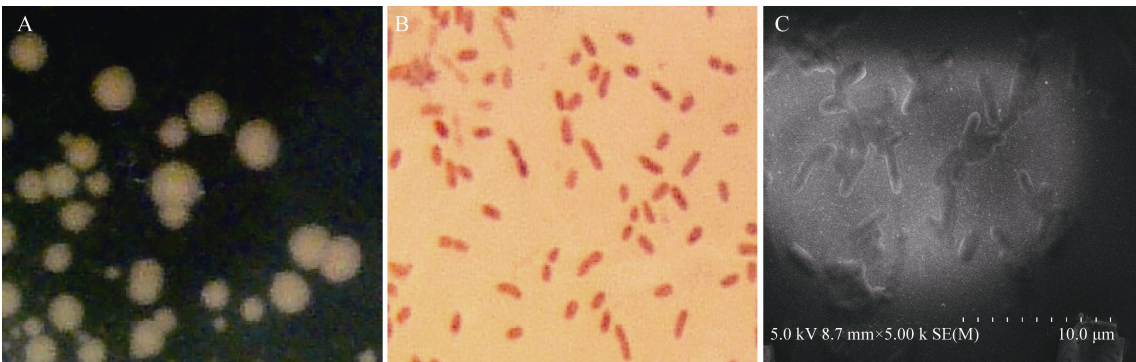


图 1 分离株 W1 的菌落及在显微镜下观察的菌体形态

Figure 1 Colonial morphology and micrographs of W1 observed under the optical microscope

注：A：菌落；B：革兰氏染色(100×)；C：扫描电镜图像(5 kV，8.7 mm×5.00 k)。

Note: A: Colonial morphology; B: Gram staining (Negative, 100×); C: Micrograph by SEM (5 kV，8.7 mm×5.00 k)。

| 表 2 菌株 W1 生理生化实验结果 Table 2 The result of bacterium physiological biochemistry experiment of strain W1 | |
|---|--------------------|
| 测定项目 Tested items | 菌株 W1 Strain W1 |
| Methyl red test | — |
| Indole test | — |
| Voges-Proskauer test | — |
| Glucose fermentation | + |
| Sucrose fermentation | + |
| Lactose fermentation | — |
| Hydrogen sulfide test | + |
| Gelatin liquefaction test | — |
| Starch hydrolysis | — |

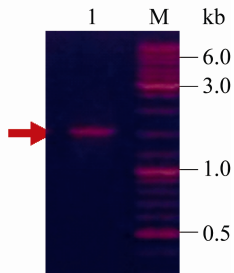


图 2 菌株扩增甲醛脱氢酶基因的电泳图谱
Figure 2 PCR of formaldehyde dehydrogenase gene
sequence from W1
Note: 1: Strain W1; M: 6 kb DNA ladder.

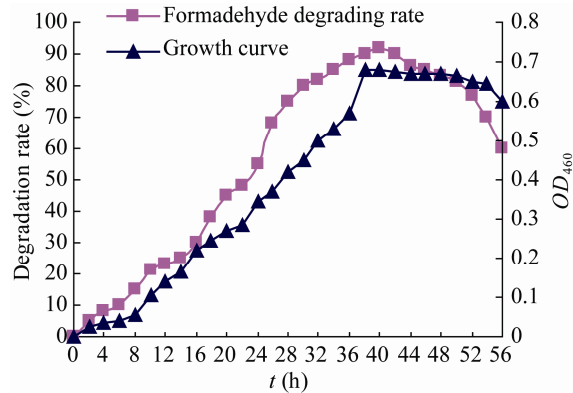


图 3 菌株 W1 的生长曲线与甲醛降解率曲线图
Figure 3 Curve of the growth of strain W1 and
formaldehyde degradation efficiency

2.2 降解条件的优化

2.2.1 甲醛浓度对菌株 W1 降解甲醛效果的影响：
在含甲醛浓度分别为 350、400、450、500、550、
600、650、700、750 和 800 mg/L 的无机盐选择培
养基中 ,分别加入菌株 W1 菌悬液 ,振荡培养 24 h ,
测定甲醛降解率 ,结果如图 4 所示。

由图 4 可知 ,甲醛浓度为 500 mg/L 时 ,菌株
W1 甲醛降解率最大 ,达 98.21% ,表明在一定范围
内甲醛降解率随甲醛浓度的增加而上升 ;甲醛浓度
为 500–600 mg/L 时 ,甲醛降解率趋于平稳 ;随着
甲醛浓度的继续增加 ,降解率呈不断下降趋势 ,当
甲醛浓度达到 800 mg/L 时降解率降至 4.09%。实
验表明甲醛浓度增加可在一定浓度范围促进菌株
W1 对甲醛的降解 ,超过此浓度临界值后 ,降解甲
醛趋势处平稳状态 ,随后大幅度下降。究其原因可
能是在以甲醛为唯一碳源和能源的培养基中 ,随着
甲醛浓度的增加 ,细菌大量繁殖 ,促使降解率不断
提高 ;但当甲醛浓度持续增加时 ,高浓度的甲醛可
能影响了菌株的细胞渗透压 ,阻隔菌体与 O₂ 接触 ,
导致菌体生长受到抑制 ,甲醛降解率趋于平稳 ;当
甲醛浓度达 800 mg/L 时 ,可能导致菌体大量死亡 ,
从而使降解率骤然下降。

2.2.2 pH 对菌株 W1 降解效果的影响：环境 pH
值对微生物的生命活动影响较大 ,主要是引起膜电
荷变化 ,从而影响微生物对营养物质的吸收 ,影响
酶的活性 ,最终改变生长环境中营养物质的可给性
以及有害物质的毒性。

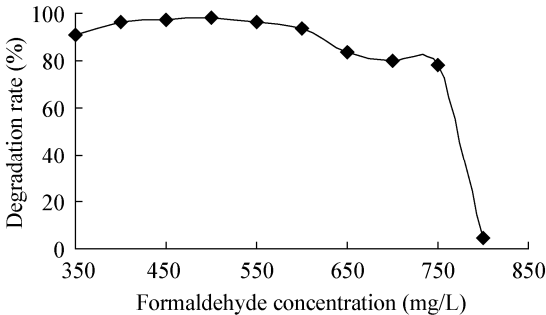


图 4 甲醛浓度对菌株 W1 降解效果的影响
Figure 4 Effect of formaldehyde concentration on
degradation of strain W1

在甲醛浓度为 500 mg/L 时的无机盐培养基中,分别调节初始 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0,加入菌株 W1 菌悬液,振荡培养 24 h,测定甲醛降解率。

由图 5 可知,菌株 W1 在 pH 为 3.0 时,降解率为 93.7%,pH 为 6.0 时,降解率升至 97.0%;pH 为 7.0 时,降解率最高可达 98.2%;pH 值升至 10.0 时,降解率也能达到 95.2%,表明当 pH 值低于或者高于 7.0 时,甲醛也都能维持较高降解率,较适合的 pH 范围为 6.0–8.0,最适合 pH 为 7.0。一般的甲醛废水 pH 均在 6.0–8.0 范围内,因此该菌株对于处理后续实验中的甲醛废水时不必调节其 pH 值。

2.2.3 接种量对菌株 W1 降解效果的影响: 将甲醛浓度为 500 mg/L 的无机盐培养基 pH 调至 7.0,分别接种 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、4.0%和 5.0%的菌悬液,振荡培养 24 h,测量甲醛降解率。

由图 6 可知,接种量对菌株 W1 的降解率有直接影响,当接种量为 0.1%时,降解率仅为 53.8%,随接种量的增加降解率也不断增加,当接种量为 2.5%时降解率达最高值 98.4%,随着接种量的增加,降解率不增加反而下降。实验表明前期降解率较低的原因可能是接种量较少生物量低,从而导致降解率不高,当接种量超过某一浓度后降解率会不断下降,究其原因在于接种量过大,摇瓶 O_2 有限,阻碍了菌体的快速繁殖,从而使降解率不断下降。

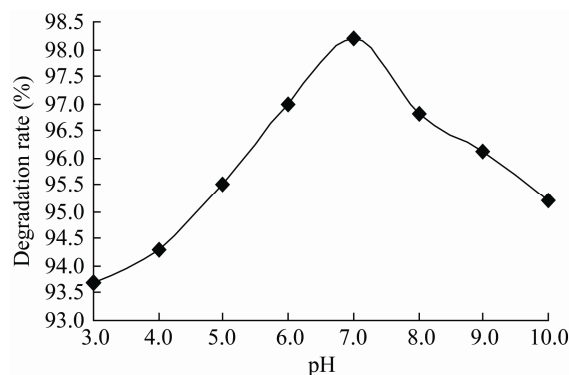


图 5 pH 对菌株 W1 降解率的影响

Figure 5 Effect of pH on degradation of strain W1

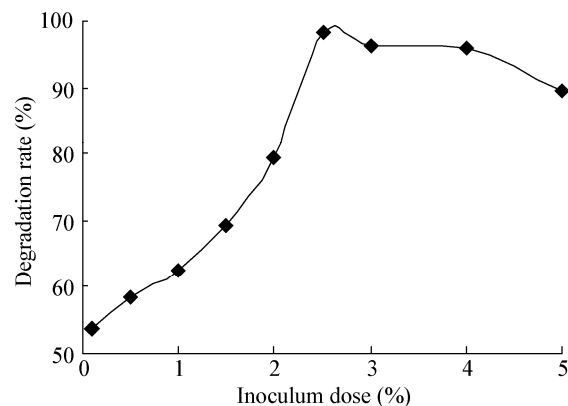


图 6 接种量对菌株 W1 降解率的影响

Figure 6 Effect of inoculating amount on degradation of strain W1

2.2.4 摇床转速对菌株 W1 降解效果的影响: 在上述最佳甲醛浓度 500 mg/L、pH 7.0、接种量 2.5% 条件下的无机盐培养基中,加入制备好菌株 W1 菌悬液,分别调节水浴摇床转速为 50、100、150、200 和 250 r/min,30 °C 振荡培养 24 h,测定甲醛降解率。

由图 7 可看出,不同摇床转速会使培养基中的溶解 O_2 含量发生相应变化,产生不同质传效率。从图 7 可知,摇床的转速对甲醛降解率影响较大,在转速为 200 r/min 时降解率达最高值 98.6%;当摇床转速低于 200 r/min 时,甲醛降解率随摇床转速的增加不断升高,原因是在微生物的生长中溶氧作为生物降解中优先利用的电子受体,发挥着重要生理作用,并且一定浓度含量的溶氧有利于菌体自身生长繁殖,从而使甲醛降解速率加快;当溶氧水平超过一定临界浓度后,这时即使供氧量继续增加,即摇床转速为 250 r/min,这时甲醛降解率不升反降,原因可能是由于过高的氧分压反而会对菌体本身产生毒害作用^[5,17]。

2.2.5 正交实验结果及方差分析: 根据以上单因素试验的结果设计了 $L_9(3^4)$ 的正交试验,考察各因素对菌株 W1 甲醛降解率的影响,得出的 4 因素 3 水平的正交试验测定结果见表 3,方差分析结果见表 4。

由表 3 正交试验极差 R 值可以看出,4 种因素对菌株 W1 甲醛降解率的影响主次因素顺序依次为: $B>C>A>D$, 即 pH 值>接种量>甲醛浓度>摇床转速,同时比较同一因素在不同水平下所对应甲醛降解率的大小,从而得知本试验的最佳水平组合为 $A_2B_1C_2D_3$, 即这 4 种因素中甲醛浓度 500 mg/L, pH 值 6.0, 接种量 3%, 摇床转速 200 r/min, 甲醛降解率达到 98%。

根据表 4 中 4 因素对菌株 W1 甲醛降解率的影响进行了方差分析,4 个因素的 F 值由大到小依次为 pH 值、接种量、甲醛浓度、摇床转速,说明 pH 对菌株降解甲醛的影响力最大,其次是接种量,影

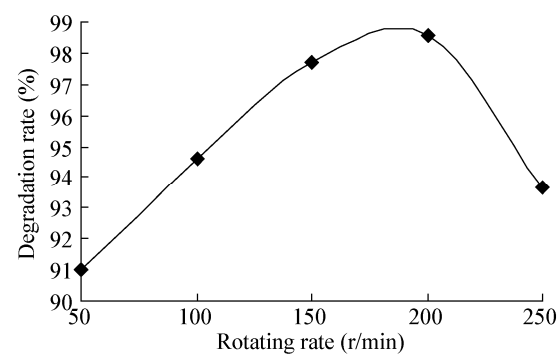


图 7 摇床培养箱转速对降解率的影响
Figure 7 Effect of incubator rotating rate on degradation of strain W1

| 表 3 $L_9(3^4)$ 甲醛降解菌 W1 的正交试验结果与分析 | | | | | |
|--|--|------------|----------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Table 3 $L_9(3^4)$ orthogonal test results of formaldehyde degrading rate on W1 strain | | | | | |
| 序号 No. | A 甲醛浓度 Formaldehyde concentration (mg/L) | B pH pH | C 接种量 Inoculum dose (%) | D 摇床转速 Rotating rate (r/min) | 降解率 Degradation rate (%) |
| 1 | 1(450) | 1(6.0) | 1(2.5%) | 1(100) | 96.8 |
| 2 | 1 | 2(7.0) | 2(3.0%) | 2(150) | 95.7 |
| 3 | 1 | 3(8.0) | 3(4.0%) | 3(200) | 94.4 |
| 4 | 2(500) | 1 | 2 | 3 | 98.0 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 96.0 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 93.7 |
| 7 | 3(550) | 1 | 3 | 2 | 97.3 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 94.7 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 94.5 |
| K_{1j} | 286.9 | 292.1 | 285.2 | 287.1 | |
| K_{2j} | 287.7 | 286.4 | 288.2 | 286.7 | |
| K_{3j} | 286.5 | 282.6 | 287.7 | 287.3 | |
| R | 0.40 | 3.17 | 1.00 | 0.20 | |
| 优水平 Optimum level | A_2 | B_1 | C_2 | D_3 | |

| 表 4 正交试验方差分析 | | | | | |
|---|-----------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| Table 4 Variance analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal test | | | | | |
| 方差来源 Source of variation | 平方和 Sum of squares | 自由度 Degree of freedom | 均方 Mean squares | F 值 Value of F | $F(a)$ |
| A | 0.253 | 2 | 0.1265 | 0.058 | |
| B | 15.250 | 2 | 7.625 | 3.529* | $F_{(0.05)}=3.110$ |
| C | 1.730 | 2 | 0.865 | 0.399 | $F_{(0.01)}=4.460$ |
| D | 0.067 | 2 | 0.0335 | 0.014 | |
| 总和 Total | 17.3 | 8 | 2.1625 | | |

注：*：在 0.05 水平下有显著差异。
Note: *: There were significant differences at 0.05 level.

响最小的是摇床转速, 4 个因素中 pH 的影响达到 95% 的显著水平。

3 结论

目前甲醛仍然是被最广泛应用的工业原料, 随之带来的甲醛污染也会不断增加, 所以筛选具有良好降解性能的细菌, 对处理甲醛的环境污染具有广泛的应用前景。甲醛降解的生物代谢途径主要有同化作用与异化作用两种途径。前者主要包括丝氨酸途径和 RuMP 途径, 而后者又称甲醛氧化途径, 是通过甲醛脱氢酶将甲醛转化为甲酸, 随后又生成 CO_2 和 H_2O , 此途径中的关键酶即为甲醛脱氢酶^[18]。本试验筛选出的菌株 W1, 以其基因组为模板, 可特异扩增出甲醛异化作用的关键酶——甲醛脱氢酶 (FDH) 基因, 其结果与已报道的恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 具有较高相似性, 可利用甲醛脱氢酶基因进行克隆, 实现目的蛋白的高效表达。

迄今国内外报道的甲醛降解菌的甲醛最高浓度为 $7\,500\text{ mg/L}$ ^[19], 其他筛选的甲醛降解菌均存在甲醛耐受浓度和降解活性都还不够高、降解速度慢等缺点, 影响其实际应用。如 Sawada 等^[20]筛选的甲醛降解真菌可在 8 h 内完全降解 350 mg/L 的甲醛, 每克干菌丝可降解 14.3 mg/h 甲醛, 而 Mirdamadi 等筛选的菌株 OSS 对于含 $5\,920\text{ mg/L}$ 浓度的甲醛废水, 72 h 内的去除率为 70%, 无法完全降解甲醛^[9]。因此, 筛选出能快速降解高浓度甲醛的降解菌是进行强化应急处理的关键。本实验从印染厂甲醛浸泡的活性污泥中筛选到一株新发现的甲醛降解菌 W1, 通过单因素试验和正交试验考察 24 h 内培养条件对菌株 W1 降解甲醛能力的影响, 该菌株降解甲醛的最适条件为: 甲醛浓度为 500 mg/L , 温度 $30\text{ }^\circ\text{C}$, pH 6.0, 摇床转速为 200 r/min , 接种量为 3%, 24 h 时甲醛降解率达到 98%, 对甲醛具有较强的应急降解能力, 这对快速降解甲醛提供了很好的微生物样本, 但该菌株在降解甲醛浓度方面与甲醛高效降解菌还存在一定的差距, 今后的工作可放在通过复合诱变等手段在耐受甲醛浓度与降解活性方面显著提高, 以期得到更高的甲醛降解能力菌株, 为工业应用生产提供良好菌种。

参考文献

- [1] 李晶平, 鲁统布, 陆慧玲. 甲醛毒性及其常用检测方法[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版, 2006, 26(1): 34-38.
- [2] 梁建聪, 郭云霞, 容学军. 甲醛污染来源及防治措施[J]. 广西轻工业, 2009, 25(3): 100-101.
- [3] 牛凤兰, 宋德锋, 陈林, 等. 环境中甲醛污染来源及检测方法新进展[J]. 上海预防医学, 2009, 21(9): 453-455.
- [4] 王文超, 周仕学, 姜瑶瑶, 等. 室内甲醛污染治理技术的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(9): 106-108.
- [5] 徐仲均, 程足芬, 林爱军, 等. 活性污泥对甲醛废水的净化性能[J]. 环境工程学报, 2008, 2(9): 1173-1176.
- [6] Eiroa M, Kennes C, Veiga MC. Simultaneous nitrification and formaldehyde biodegradation in an activated sludge unit[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(17): 1914-1918.
- [7] 谢文娟, 王洁, 孙佩石, 等. 高效降解甲醛菌株的分离鉴定及其特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(11): 1626-1631.
- [8] 徐云, 金晶, 郑重, 等. 高活性高耐受甲醛降解菌株的分离鉴定及降解条件研究[J]. 环境科学, 2010, 31(10): 2481-2486.
- [9] Mirdamadi S, Rajabi A, Khalilzadeh P, et al. Isolation of bacteria able to metabolize high concentrations of formaldehyde[J]. Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6/7): 1299-1301.
- [10] Zagornaya PB, Denis AD, Gvozdyak PI, et al. Microbiological purification of above resin waste-waters[J]. Biotekhnologiya, 1990, 2: 51-53.
- [11] Tetsuya K, Yutaka M, Naohiro H, et al. Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 214(1): 137-142.
- [12] 黄赛花, 陈能场, 胡文锋, 等. 一株甲醛降解真菌 *Aspergillus* spp. H4 的分离鉴定[J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1175-1179.
- [13] 李章良, 林小园, 陈勇, 等. 甲醛降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(11): 2547-2551.
- [14] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 274-280.
- [15] Adroer N, Casas C, de Mas C, et al. Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1990, 33(2): 217-220.
- [16] Ito K, Takahashi M, Yoshimoto T, et al. Cloning and high-level expression of the glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(9): 2483-2491.
- [17] 强婧, 尹华, 彭辉, 等. 蕈降解菌烟曲霉 A10 的分离及降解性能研究[J]. 环境科学, 2009, 30(5): 1298-1305.
- [18] Anthony C. The bacterial oxidation of methane and methanol[J]. Advances in Microbial Physiology, 1996, 27: 113-210.
- [19] Azahi M, Henis Y, Oren A, et al. Transformation of formaldehyde by a *Halomonas* sp.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995(41): 548-553.
- [20] Sawada A, Ikada R, Tamiya E, et al. A novel formaldehyde-degrading fungus, *Trichoderma virens*: Isolation and some properties[J]. IEICE Transactions on Electronics, 2006, E89-C(12): 1786-1791.