

研究报告

直链烷基苯磺酸钠 (LAS) 降解菌的筛选及其降解特性的初步研究*

应启锋¹ 肖昌松² 纪树兰¹(北京工业大学环境与能源工程学院 北京 100022)¹(中国科学院微生物研究所 北京 100080)²

摘要: 从洗衣粉生产废水中分离到一株高效降解 LAS (Linear Sodium Alkylbenzenesulfonate) 菌 GZ6, 经初步鉴定其为杰氏棒杆菌 (*Corynebacterium jeikeium* GZ6)。该菌株最高可以降解 700mg/L 左右的 LAS, 降解 LAS 的最适 pH 值和温度分别为 7.0 和 30℃, 最适 LAS 浓度为 400 mg/L, 所需时间为 24h, 降解率可达 98.7%。实验还表明一些重金属离子如 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 等对该菌株降解 LAS 有不同程度的抑制作用。

关键词: 杰氏棒杆菌, 直链烷基苯磺酸钠, 生物降解

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0001-05

STUDIES OF SCREENING MICROORGANISMS DEGRADING LINEAR SODIUM ALKYL BENZENESULFONATE (LAS) AND ITS DEGRADING CHARACTERISTICS

YING Qi-Feng¹ XIAO Chang-Song² JI Shu-Lan¹(College of Environment and Energy Engineering, Beijing Polytechnic University, Beijing 100022)¹(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)²

Abstract: A bacterium which can effectively degrade LAS (Linear Sodium Alkylbenzenesulfonate) was isolated from washing powder manufacturing effluent and was preliminarily identified as *Corynebacterium jeikeium* GZ6. The bacterium can degrade LAS up to till 700 mg/L, and the optimum pH, temperature and concentration of LAS are 7.0, 30℃ and 400 mg/L, respectively. The biodegradation rate can reach 98.7% after 24 hours' cultivation in the suitable conditions. Experiments also showed that some heavy metal ions such as Hg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} can differently inhibit the degradation of LAS.

Key words: *Corynebacterium jeikeium*, LAS, Biodegradation

直链烷基苯磺酸钠 (Linear Sodium Alkylbenzenesulfonate, 简称 LAS) 作为一种阴离子表面活性剂, 具有良好的去污、乳化、渗透等能力, 因而在国民经济的各个部门得到广泛应用, 其产量约占洗涤剂世界总用量的 40% 左右^[1]。但 LAS 本身有一定毒性^[2], 所以不仅生产 LAS 的废水而且在使用过程中产生的含 LAS 的废水均对环境造成了严重污染。

处理 LAS 废水的方法很多^[3], 其中通过生物降解而消除环境中的 LAS 是行之有效

* 北京市自然科学基金资助项目 (No. 8992004)

收稿日期: 2001-01-04, 修回日期: 2001-03-20

的重要途径^[2,4], 很多学者在这方面进行了广泛的研究^[5~7]。本文报道一株能高效降解 LAS 的细菌及其降解 LAS 的特性。

1 材料与方法

1.1 样品来源

取广州浪奇洗衣粉厂污水处理站进水沟渠中污水作为实验的原始菌液。

1.2 培养基配方^[8]

1.2.1 富集培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005g, K_2HPO_4 0.33g, KCl 0.06g, 酵母膏 1.2g, LAS 0.05g, pH 7.0, 用蒸馏水定容至 1L。

1.2.2 筛选培养基: 以 3g NH_4Cl 代替酵母膏, LAS 为 0.025g, 其余同富集培养基。

1.2.3 发酵培养基: LAS 为 0.15g, 其余同富集培养基。

1.3 菌种的富集与分离纯化

采集的样品接种于富集培养基中, 30℃、200r/min 摇瓶振荡培养 5d, 然后在固体培养基上稀释倒平板, 挑取单菌落, 反复划线纯化后接种于斜面上。

1.4 菌体生长量的测定

以波长为 460nm 处的 OD 值表示。

1.5 LAS 浓度的测定

采用电位滴定法^[9]对 LAS 浓度进行测定。

1.6 菌株鉴定

将筛选出的具有降解 LAS 能力的菌株经过纯化为单一菌株后进行革兰氏染色, 然后接种在 Biolog (GP) 试验板上培养 24h, 再通过美国 Biolog Microstation Identification System 自动化鉴定系统对本实验菌株与标准菌株进行对比确定分类地位 (相似系数 SIM 大于 0.50 则分类地位可最后确立)。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

通过对菌种的富集培养与划线分离、纯化, 共得到 6 株菌, 再用筛选培养基 (以 LAS 为唯一碳源) 对这些菌进行筛选, 得到 1 株降解 LAS 能力比较高的菌株 GZ6, 其对 LAS 的降解率可达 95% (24h)。

菌株 GZ6 在固体培养基上菌落为乳白色, 圆形, 边缘整齐, 透明有光泽, 革兰氏染色阳性, 在显微镜下呈短杆状, 经美国 Biolog Microstation Identification System 自动化鉴定系统鉴定其与杰氏棒杆菌 (*Corynebacterium jeikeium*) 相似系数 (SIM) 达到 0.807, 因此被初步鉴定为杰氏棒杆菌 (*Corynebacterium jeikeium* GZ6)。

2.2 菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的最佳条件

2.2.1 温度的影响: 将菌株 GZ6 在不同温度下 (10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃) 接种于发酵培养基中摇瓶振荡培养 24h。从图 1 可知, 在 25℃ ~ 35℃ 之间, 菌株 GZ6 生长和降解 LAS 比较稳定, 其中尤以 30℃ 时最佳, 菌体 OD_{460} 可达 0.228, LAS 降解率为 97.2%。在 25℃ 以下和在 35℃ 以上时, 菌体生长缓慢, LAS 降解率下降很快。

2.2.2 pH 的影响: 将菌株 GZ6 接种于不同的 pH (3、4、5、6、7、8、9、10、11、12) 的发酵培养基中, 在 30℃ 条件下摇瓶振荡培养 24h。图 2 的结果表明, 菌株 GZ6 的生长

和 LAS 降解率在 pH6.0 ~ 10.0 之间比较稳定, 其中在 pH7.0 时效果最佳, 菌体生长 OD_{460} 为 0.241, 对 LAS 的降解率可达 97.5%。此结果说明, 菌株 GZ6 是一株中性菌, 但其在偏碱性环境中也能较好生长和利用 LAS。

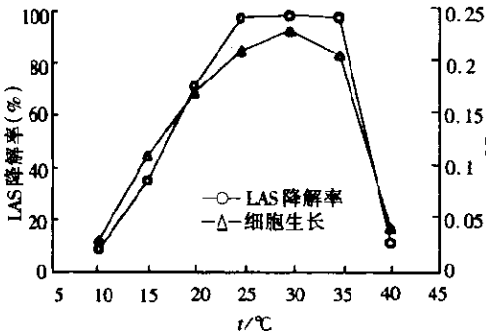


图 1 温度对菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的影响

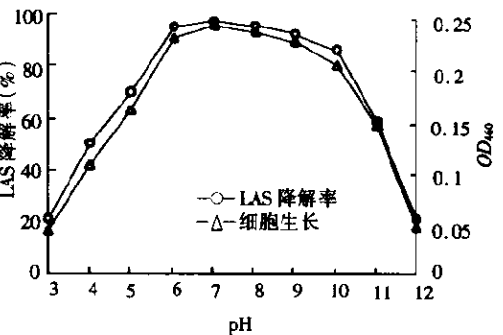


图 2 pH 对菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的影响

2.2.3 通气量的影响: 一般来说, 通气量是好氧微生物生长的重要影响条件。首先采用 250mL 摇瓶并改变其中装液量 (50mL、100mL、150mL、200mL), 摇床转速为 200r/min, 按相同比例接种量将菌株 GZ6 接种于发酵培养基中振荡培养 24h; 另外改变摇床转速 (50 r/min、100 r/min、150 r/min、200 r/min、250 r/min、300r/min), 固定装液量为 50mL, 按相同比例接种量将菌株 GZ6 接种于发酵培养基中摇瓶振荡培养 24h。图 3 的结果表明, 菌株 GZ6 的生长量和对 LAS 的降解率均随着摇瓶中装液量的增加即通气体积的减少而递减, 所以在装液量为 50mL 时效果最好, 菌体生长 OD_{460} 和对 LAS 的降解率分别为 0.242 和 97.6%; 由图 4 可见, 随着摇床转速的加快菌株 GZ6 的生长和降解 LAS 的状况明显增强, 并在 300r/min 时达到最佳, OD_{460} 和对 LAS 的降解率分别为 0.248 和 98.1%。从总体上看, 通气量对菌株 GZ6 的生长及其降解 LAS 的效果具有一定的影响, 因此在实际实施过程中考虑和设计好最佳装液量和转速是具有实际意义的。

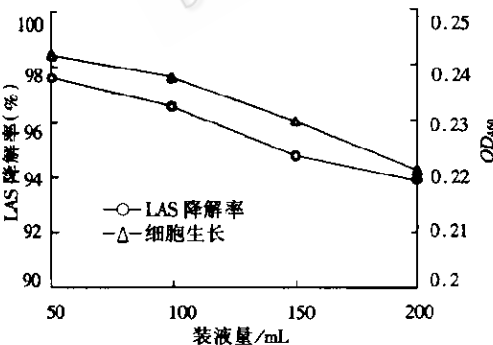


图 3 装液量对菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的影响

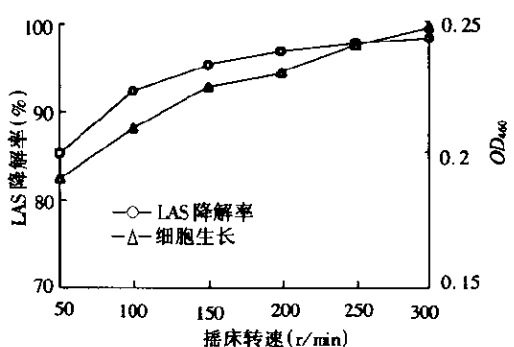


图 4 转速对菌株 GZ6 生长降解 LAS 的影响

2.2.4 LAS 浓度对菌株 GZ6 降解 LAS 的影响: 将菌株 GZ6 按相同接种量接种于不同 LAS 浓度的发酵培养基中, 30℃摇瓶振荡培养 24h, 定时测定菌体的生长和对 LAS 的降解情况。图 5 的结果表明, 当 LAS 浓度低于 400 mg/L 时, 菌株 GZ6 基本能实现对 LAS 的完全降解, 同时它的生长随 LAS 浓度的提高而明显递增, 在 400 mg/L 时达到最大 OD_{460} 为 0.335; 而当 LAS 浓度高于 400 mg/L 时, 菌株 GZ6 细胞由于受到较强 LAS 毒性的影

响, 菌株的生长和对 LAS 的降解均呈下降趋势, 到 750 mg/L 时基本不能生长, LAS 降解率也趋于零。此结果说明菌株 GZ6 生长细胞最高可降解 LAS 可达 700 mg/L 左右。

2.2.5 菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的关系: 选取最佳培养条件对菌株 GZ6 进行摇瓶振荡培养, 定时取样测定菌体的生长量和对 LAS 的降解率。从图 6 可知, 菌株 GZ6 细胞的生长和对 LAS 的降解是同步的。在培养的最初 6h 内, 菌体生长和对 LAS 的降解非常缓慢, 此后细胞开始进入对数生长期, 对 LAS 的降解速率大大提高, 到 24h 时达到菌体的最大生长和对 LAS 的最高降解率。进一步培养, 则由于 LAS 与其它一些营养成分的缺失以及代谢废物的增多, 菌体生长进入衰退期, OD_{460} 值开始下降。

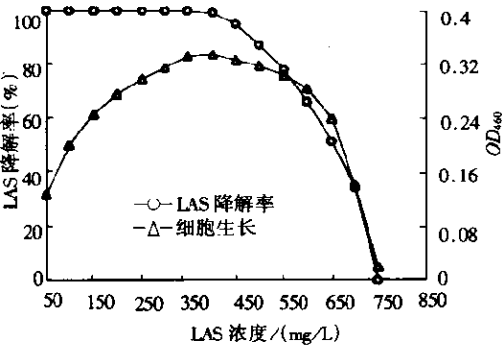


图 5 LAS 浓度对菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的影响

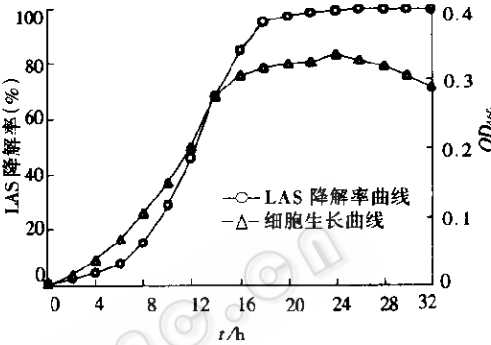


图 6 菌株 GZ6 生长曲线与 LAS 降解曲线

2.3 一些金属离子对菌株 GZ6 降解 LAS 的影响

在工业废水以及生活污水中, 可能含有一些金属离子, 它们可为微生物提供各种重要元素, 同时也存在一些重金属离子, 它们则会对微生物的生长和降解能力产生较大的影响。表 1 所示为在发酵培养基添加各种金属离子后与未添加时的对比降解情况。结果表明, Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Na^{+} 、 Mn^{2+} 离子对菌株 GZ6 的生长和降解 LAS 的活性影响不大, 而重金属离子 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对菌株 GZ6 的生长和降解 LAS 均有抑制作用, 其中以 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 最为显著。

表 1 金属离子对菌株 GZ6 生长和降解 LAS 的影响

| 化合物 | 浓度 (mg/L) | OD_{460} | LAS 降解率 (%) |
|----------------|-----------|------------|-------------|
| 对照 | | 0.235 | 100 |
| NaCl | 20 | 0.230 | 97.1 |
| $CaCl_2$ | 20 | 0.225 | 96.3 |
| $MnCl_2$ | 20 | 0.218 | 92.4 |
| $FeCl_3$ | 20 | 0.207 | 89.1 |
| $Al_2(SO_4)_3$ | 20 | 0.185 | 70.3 |
| $CoCl_2$ | 0.1 | 0.083 | 25.5 |
| $HgCl_2$ | 0.1 | 0 | 0 |
| $CuSO_4$ | 0.1 | 0.091 | 36.7 |
| $ZnSO_4$ | 0.1 | 0.112 | 38.1 |
| $Cd(NO_3)_2$ | 0.1 | 0.04 | 13.4 |

2.4 添加其它碳源或氮源对菌株 GZ6 的影响

在发酵培养基中分别添加 200 mg/L 的各种碳源和氮源, 30℃ 摇瓶振荡培养 24h, 测定菌的生长和对 LAS 的降解情况。表 2 结果表明, 其它碳源或有机氮源对菌体生长均有一定程度的促进作用, 但它们都不能提高对 LAS 的降解效果, 甚至在添加其它碳源后菌株 GZ6 对 LAS 的降解效果反而有较大的降低, 这说明 LAS 并非能被菌株 GZ6 优先利用的碳源, 在有其它易被利用

的碳源存在时, LAS 的降解会受到影响; 另外, 各种无机氮源对菌体的生长和降解 LAS 的促进作用均不如所试有机氮源。

目前, 有关优势微生物降解 LAS 的研究已有报道。国外 Christian Gloxhuber 等人^[10]

报道的粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 以及粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 和 J. A. Bird 等人^[7]报道的一株弧菌 (*Vibrio* sp.) 均可降解 LAS; 国内张蔚文等人^[6]报道的邻单胞菌 (*Plesiomonas* sp.) 与黄单胞菌 (*Xanthomonas* sp.) 以及刘秀荣等人^[5]报道的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 与产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) 也可对 LAS 进行降解; 不过他们所报道的 LAS 降解菌的 LAS 允许浓度均在 50 mg/L 以内, 远不如本文所报道的

杰氏棒杆菌 GZ6 的最佳降解 LAS 浓度 400mg/L 以及最高 LAS 负荷量 700mg/L 的水平, 而且该菌对于各种环境条件包括温度、酸碱度、通气量以及金属离子的适应性较强, 是一株良好的 LAS 降解菌, 可望在 LAS 废水处理中具有较好的应用前景。

表 2 其它碳源或氮源对菌株 GZ6
生长和降解 LAS 的影响

| 化合物 | OD ₆₆₀ | LAS 降解率 (%) |
|---|-------------------|-------------|
| 对照 | 0.242 | 100 |
| 葡萄糖 | 0.314 | 51.4 |
| 蔗糖 | 0.301 | 62.3 |
| 麦芽糖 | 0.295 | 61.7 |
| 乳糖 | 0.287 | 60.4 |
| 淀粉 | 0.276 | 70.5 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.153 | 55.4 |
| NH ₄ NO ₃ | 0.188 | 69.7 |
| NH ₄ Cl | 0.176 | 72.8 |
| 蛋白胨 | 0.335 | 83.4 |
| 牛肉膏 | 0.318 | 85.8 |

参 考 文 献

- [1] 郑富源编译. 合成洗涤剂生产技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1996, 15.
- [2] 范凤申, 张忠祥, 孙孝然. 环境科学, 1988, 9 (6): 2~8.
- [3] 析梦兰. 中国环境科学, 1994, 14 (4): 296~301.
- [4] Swisher R. D. Surfactant Biodegradation. New York: M. Dekker Inc., 1970, 2.
- [5] 刘秀荣, 吕晓猛, 纪树兰, 等. 北京工业大学报, 1995, 21 (4): 103~108.
- [6] 张蔚文, 张 灼. 环境科学与技术, 1991, 3: 2~6.
- [7] J. A. Bird and R. B. Cain. Metabolism of Linear Alkylbenzenesulphonates by a *Vibrio* sp., *Biochemical Journal*, 1972, 127: 46p.
- [8] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭编. 环境工程微生物检验手册, 北京: 中国环境科学出版社, 1990, 363.
- [9] 中华人民共和国国标, 水质阴离子洗涤剂的测定, 电位滴定法, 1994.
- [10] Christian Gloxhuber and Klaus Knstler. Anionic Surfactants: biochemistry, toxicology, dermatology. New York: M. Dekker Inc., 1992, 283~327.