

一株降氰细菌的筛选及其转化特性初步研究*

刘幽燕^{1**} 何玉财¹ 李青云¹ 韩文亮¹ 童张法¹ 何勇强²

(广西大学化学化工学院 南宁 530004)¹

(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)²

摘要: 从污染土壤中分离一株高效降氰菌株 DN25, 经表型分析和 16S rDNA 分析, 初步判断为产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.)。该菌株耐氰能力强, 能在氰浓度达 1,000 mg/L 的环境中生长。其生长和转化的最佳温度和 pH 分别为 30℃ 和 8.0, 10 h 对氰浓度为 500 mg/L 的溶液转化率可达到 99%。同时菌株也可有效转化亚铁氰化钾, 对于氰浓度相当于 500 mg/L 的亚铁氰化钾液, 12 h 的转化率可达到 96%。

关键词: 氰化物, 生物转化, 筛选, 转化特性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0025-04

Studies on the Screening of a Cyanide-Degradation Strain and Its Cyanide-Transformation Characteristics *

LIU You-Yan** HE Yu-Cai LI Qing-Yun HAN Wen-Liang
TONG Zhang-Fa HE Yong-Qiang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004)¹

(The Key Laboratory of Microbial and Plant Genetic Engineering of Ministry of Education, Guangxi University, Nanning 530004)²

Abstract: A bacterial strain DN25, effective on cyanide-degradation, was isolated from contaminated soil and identified as *Alcaligenes* sp. on the basis of phenotype analysis and 16S rDNA sequence analysis. It showed great tolerance to the cyanide, which can grow in the medium containing 500mg CN⁻/L. The suitable condition for the cell growth and biotransformation was pH8.0 and 30°C and the transformation rate for 500mg CN⁻/L could achieve 99% in 10 h. It has also been found that the screened strain had the ability of K₄Fe (CN)₆ transformation with 96% of transformation rate at 12 h for the concentration of 500 mg CN⁻/L.

Key words: Cyanide, Biodegradation, Screen, Characteristics.

利用生物技术进行有毒废物的治理因其成本较低、安全有效正受到广泛重视, 其中获得高性能菌株是技术关键之一^[1]。氰化物是一种剧毒物质, 可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, 据报道 1992 年全球共有 9.5×10^6 吨 HCN 排放。近年来国内外都开展了转化含氰化合物的微生物的选育工作和特性研究^[2,3], 以寻找具有高效转化能力、可适应各种工业废水环境、有效净化各种氰污染形式的菌株, 从而实现含氰废水的生物强化处理。本文报道了一株从被污染土壤中筛选到的细菌, 其对氰浓度高达 500 mg/L 的溶液 10 h

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39860038)

广西科学基金资助项目 (No. 桂科青 0447003)

** 通讯作者 Tel: 0771-3233583, Email: liuyouyangx@hotmail.com, Fax: 0771-3233718

收稿日期: 2004-06-10, 修回日期: 2004-09-02

的转化率可达到 99% 以上, 并对无机氰和金属络合物均能有效转化。

1 材料与方 法

1.1 采样样品和实验材料

不同的来源土壤样品 20 份, 其余药品为分析纯。

筛选培养基: 琼脂 20 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g, NaCl 0.1 g, K_2HPO_4 0.4 g, 葡萄糖 0.04 g, 定容至 1 L, 然后加入 KCN, 使氰浓度达到 10 mg/L。

增殖培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 2 g, 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, 酵母膏 5 g, pH 8.0, 定容至 1 L。

1.2 菌种分离和鉴定

选用筛选培养基, 取土样悬液均匀涂于平板, 按照常规平板稀释分离法分离纯化, 并转入斜面保存。

观察菌株的形态特征, 然后采用 16S rDNA 序列分析法^[4]进行菌种鉴定。16S rDNA 序列的测定由上海生物工程公司完成, 将测定的序列用 BLASTN 与 GenBank 中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较。

1.3 菌株培养方法和降氰能力的测定

除特殊说明外, 一般培养在 250 mL 摇瓶中进行, 将菌株接种于 20 mL 增殖培养基中, 摇床培养 (30℃、120 r/min) 36 h, 离心得湿菌体, 洗涤数次。

将培养所得到的菌体分散于 20 mL、pH 8 的磷酸缓冲溶液中, 加入 KCN, 使氰浓度为 50 mg/L, 在 30℃、120 r/min 下进行振荡一定时间后测定氰含量。同时做不接菌株的对照实验。

1.4 分析方法

氰浓度的测定采用异烟酸-吡唑啉酮分光光度法^[5], 菌体密度测定采用浊度法, 波长为 638 nm。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

氰化物对细胞有较人毒害作用, 因此菌株筛选是通过在比较贫乏的营养基中加入一定量的氰为限制性底物进行富集。采取土样时多选择受到氰化物污染地及废水流经地域。实验证明, 这些地方存在着许多能转化氰的微生物。在所采 20 份土样中几乎都存在能转化氰化物的菌株, 而且所分离出的 49 株菌中, 60% (即 29 株) 为活性菌。但是大部分菌株的转化能力不大, 其中菌株 DN25 转化氰能力最高。其在固体培养基上菌落为白色、圆形、边缘整齐、有光泽, 革兰氏染色阴性; 在显微镜下呈圆形, 表面光滑。同时在采用 16S rDNA 序列分析法进行同源性比较中发现, DN25 的 16S rDNA 与在 GenBank 上登记的产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.) 的同源性达到 99% 以上。因此本文初步断定 DN25 为产碱杆菌 (*Alcaligenes* sp.)。

2.2 氰离子对细胞生长的影响

为考察氰离子对 DN25 生长的影响, 在增殖培养基中加入不同浓度的 KCN, 测定 48 h 的菌体浓度。从图 1 中可看出, 氰浓度在 400 mg/L 以内, 所得到的生物量基本保持不变, 随着氰浓度的增加, 菌体生长受到抑制, 氰浓度达到 1 g/L 时生物量只有对照

组的40%。进一步测定DN25在含1g CN⁻/L的培养基中的生长曲线(图2),发现菌体生长的迟滞期延长,对数生长期的比生长速率下降。氰对菌体的生长影响与文献报道^[6]相似,但是DN25耐氰能力更强,文献所报道菌株在含50mg CN⁻/L的培养基中的生长已受到明显抑制。

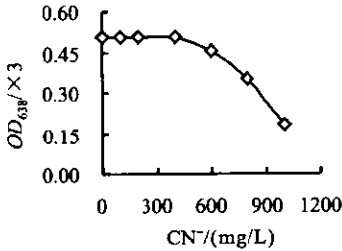


图1 氰浓度对菌体生长的影响

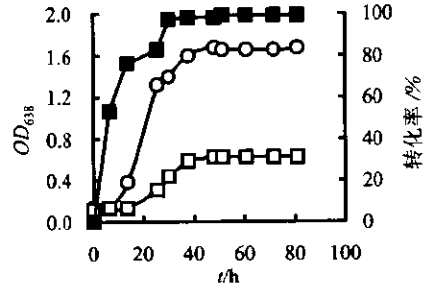


图2 细菌DN25的生长曲线

□—1g CN⁻/L, ○—无CN⁻, ■—转化率

此外,发现即使将此菌株置于含1g CN⁻/L的培养基中,虽然氰的存在会抑制菌体生长,但是转化仍然可以进行,结果见图2。从图中可以看出,在生长的起始阶段,虽然细胞生长较为缓慢,但是转化速率很高,当指数生长期结束时,培养基中的氰转化率已经达到98%。类似现象在文献[7]中也有报道。

2.3 菌株的生长与转化特性的研究

在以下实验中,菌体的培养是在无氰培养基中进行,以菌体48h培养的OD_{638nm}来反映各种因素对菌体生长的影响;在考察菌体的氰转化特性时,则以最佳培养条件下所得到的静息细胞为催化剂:

2.3.1 温度的影响:图3反映了温度对菌体生长和氰化物转化的影响。在20℃~40℃之间对菌株DN25进行培养,所得到的菌浓随着温度的升高而增加,其中40℃时达到最大,但是温度升高至50℃,菌株生长速率明显减慢,此时菌浓仅达到40℃下的20%。另一方面,菌株对氰的转化在30℃时最高,达到99.3%,不过该菌体细胞在20℃~40℃都有良好的转化特性,转化率都在90%以上。这对于实际应用来说是有利的,可适应实际工业废水水质温度的波动。同时通过对照试验,发现温度超过30℃,氰的自然挥发加剧。因此本文中选取30℃作为培养和氰转化条件。

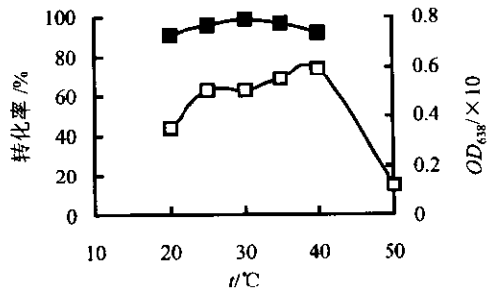


图3 温度对菌体生长和氰转化的影响

■—转化率, □—菌体浓度

工业废水水质温度的波动。同时通过对照试验,发现温度超过30℃,氰的自然挥发加剧。因此本文中选取30℃作为培养和氰转化条件。

2.3.2 pH的影响:由于在酸性条件下,氰以HCN状态存在,极易挥发,含氰废水必须在碱性条件下进行;同时在实验中观察到酸性条件下菌株的生长水平很低,因此菌株培养和氰转化都是在中、碱性条件下进行。图4结果显示在pH7~9之间菌株生长情况良好,随着pH升高,菌株生长减慢,pH12时细胞增殖很慢。选取相同pH下培养的菌株测定其在不同pH缓冲液中的转化能力的实验中,pH8~9.5下转化率均可达到95%以上,虽然pH增加,转化率稍微下降,但pH12时菌株的转化率仍高达90%。可

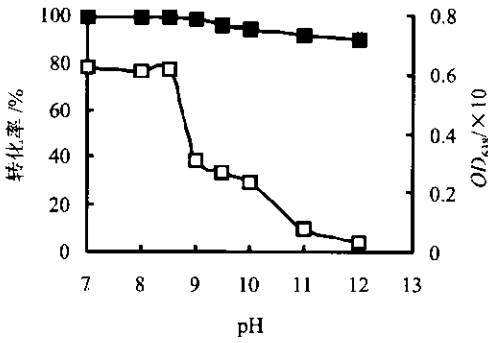


图4 pH对菌体生长的影响
 ■ 转化率, □ 菌体浓度

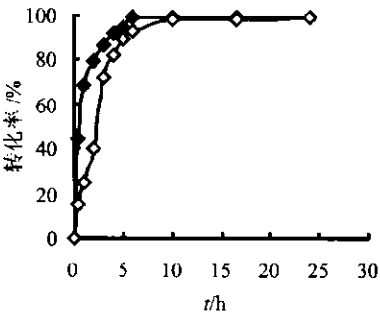


图5 氰转化进程曲线

● 50 mg CN⁻/L, ○ 500 mg CN⁻/L

见 pH 主要是影响细胞的产量, 合适的 pH 可以得到更高的细胞密度, 而对于细胞中所含酶催化的转化过程影响稍小。因此选择 pH8.0 作为最佳 pH。此外通过不接菌株的对照实验, 认为在本文的转化条件下氰转化主要是通过生物转化完成。

2.4 转化进程曲线

目前文献对氰的转化研究多局限于 100 mg/L 以内的含氰废水, 并且需转化 48 h 以上才能获得满意的转化率^[8,9]。本文分别测定菌株 DN25 对不同氰浓度的转化进程曲线。图 5 的实验结果表明, 筛选到的菌株 DN25 可转化较高浓度的氰化物, 同时转化速度也很快。菌株对 50 mg/L 氰的去除率 6 h 内可以达到 99%, 当氰浓度为 500 mg/L 时反应 10 h 后氰的转化率为 99%。在实验中进一步提高氰浓度至 1 g/L, 发现氰的转化速率仍然很高, 24 h 时为 97%。由此可见, 该菌株具有很好的耐氰特性和氰转化能力。

2.5 菌株对金属氰化物的转化

氰污染还有很大一部分是以络合物形式存在。为此, 本文进行了菌株对金属氰化物的转化研究。经过培养得到细胞后, 加入亚铁氰化钾溶液, 使氰根浓度达到 500 mg/L。实验结果表明菌株对于亚铁氰化钾同样具有较强的转化能力, 氰浓度为 500 mg/L 时, 6 h 的转化率可达到 90.7%, 12 h 后残余 4% 氰未转化。

以上的研究结果表明本研究从氰污染土壤中所分离出的一株产碱杆菌 DN25, 具有良好的氰耐受能力和降解能力, 而且其对无机氰和氰络合物均能转化, 因此在生物处理高浓度、成分复杂的含氰废水中有一定的应用价值。

参考文献

[1] 郑金来, 李君文, 晁福寰. 微生物学通报, 2001, 5: 85~88.
 [2] Kwon H K, Woo S H, Park J M. FEMS Microbiol Lett, 2002, 214: 211~216.
 [3] Dubey S K, HoLmes D S. World J Microbiol Biotechnol, 1995, 11: 257~265.
 [4] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, et al. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (2): 795~799.
 [5] 国家环保局. 环境监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1983. 96~98.
 [6] Suh Y J, Park J M, Yang J W. Enzyme Microb Technol, 1994, 16: 529~533.
 [7] Dumerstre A, Chone T, Portal J M, et al. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 2729~2734.
 [8] 李日强, 王翠红, 辛晓芸, 等. 重庆环境科学, 2002, 24 (3): 2~3.
 [9] Kao C M, Liu J K, Lou H R, et al. Chemosphere, 2003, 50: 1055~1061.