

溴氨酸降解菌株的分离和特性*

李莹¹ 蔡宝立^{2**} 庄源益¹ 丁春丽¹ 杨湘龙³

(南开大学环境科学与工程学院 天津 300071)¹ (南开大学生命科学学院 天津 300071)²

(天津医科大学医学检验学系 天津 300020)³

摘要: 从化工厂污泥中分离到 4 个对蒽醌染料中间体溴氨酸有显著降解和脱色作用的菌株。经鉴定, 4 株菌均为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。脱色效果最好的 N1 菌株能以溴氨酸为唯一碳源生长, 其脱色效果受温度和 pH 影响较大, 最佳生长条件是 30℃, pH7.2。

关键词: 假单胞菌属, 溴氨酸, 生物降解

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0005-04

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BROMAMINE ACID-DEGRADING STRAINS

LI Ying¹ CAI Bao-Li^{2**} ZHUANG Yuan-Yi¹ DING Chun-Li¹ YANG Xiang-Long³

(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071)¹

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)²

(Department of Laboratory Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300020)³

Abstract: Four strains, capable of degrading and decolorizing bromamine acid, an intermediate of anthraquinone dye, were isolated from sludge of chemical plant. The four strains were identified as *Pseudomonas* spp. Experimental results show that strain N1 was able to grow on bromamine acid as sole carbon source. Decolorizing bromamine acid of the strain N1 was considerably affected by temperature and pH. The optimum growth conditions for the strain are 30℃, pH7.2.

Key words: *Pseudomonas* sp., Bromamine acid, Biodegradation

蒽醌染料的产量仅次于偶氮染料, 其结构稳定, 在环境中滞留期较长^[1]。蒽醌染料及其中间体(如溴氨酸、单或二氨基蒽醌、单或二氯蒽醌、含磺酸基蒽醌等)的生产废水的显著特点是废水成分复杂, 既含有产品, 也含有中间体及副产品, 废水 COD_{cr} 值高, 其次是废水色度高, 有的还含有大量盐类, 绝大部分难被生物降解。有的毒性较大加上高盐份使一般微生物难以存活。用于这类废水处理的新技术基础研究应加紧进行, 以便开发新工艺。其中, 生物降解处理是一种急待开发的新技术, 因而筛选高效广谱的染料脱色及降解菌株具有重要的理论和实用价值^[2-4]。

溴氨酸(学名为 1-氨基-4-溴蒽醌-2-磺酸, 简称 ABA)是蒽醌染料中间体中的一种, 其分子结构中含氨基、磺酸基和溴原子, 而且具有应用范围广、水溶性强、结构稳定、难被普通微生物降解等特点, 所以其生物降解研究受到广泛重视^[5-8]。作者通过富集培养和梯度驯化的方法从化工厂的污泥中分离到对溴氨酸有明显脱色作用的特效菌, 并初步探讨了这些菌株对溴氨酸脱色的生理生化特性。

* 高等学校博士学科点专项基金资助课题 (No. 2000005519)

** 联系人

收稿日期: 2001-12-30, 修回日期: 2002-03-15

1 材料与方法

1.1 试剂

溴氨酸由东港工贸集团提供, 其它化学试剂均为市售分析纯。

1.2 培养基

修改的高氏一号培养基 (记为 G)^[7]: KNO_3 1g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, NaCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, 溴氨酸 30 ~ 120mg, 去离子水 1,000 mL, pH 7.5。

无机盐培养基 (记为 N)^[9]: KH_2PO_4 0.9g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4g, 微量元素 1mL^[9], 溴氨酸 30 ~ 120mg, 去离子水 1,000 mL, pH 7.2。在 pH 实验中, 调节两种磷酸盐的比例, 但总摩尔数与标准培养基相同, 从而得到 pH 值不同的 N 培养基。

1.3 菌株筛选

将所采集的污染土壤制成悬浊液加入到所配的两培养基中, 溴氨酸起始浓度为 $30\mu\text{g/mL}$, 30°C , 120r/min 振荡培养。当培养液脱色后 (大约 2 ~ 3d), 按 2% 接种量接种到新的培养基中进行浓度梯度驯化培养。溴氨酸浓度分别为 $30\mu\text{g/mL}$, $60\mu\text{g/mL}$, $120\mu\text{g/mL}$ 。将转接 3 次的培养液 (G 和 N) 分别用无菌水稀释, 涂 G 或 N 培养基平板, 30°C 培养 3d。长出的单菌落再划线纯化 1 次。

1.4 菌种鉴定

见参考文献 [10]。

1.5 培养基中溴氨酸浓度的测定

取不同时间的培养物, 12,000 r/min 离心 10min, 上清液在 485nm 波长处测定吸光度 (A), 其值反映溴氨酸浓度^[7]。

1.6 菌株生长曲线及降解曲线的测定

在菌株的最佳脱色条件下, 按 2% 接种量接种后摇床培养。取不同时间培养物测其清液的 485nm 吸光度, 同时以离心后的清液作参比, 于 OD_{600} 条件下测培养物的浊度, 以表示细菌的生长。以培养时间为横坐标, 培养液的浊度 (OD_{600}) 和溴氨酸吸光度 (OD_{485}) 为纵坐标作图, 便得到生长和降解曲线。

2 结果与讨论

2.1 溴氨酸脱色菌株的分离

经过富集筛选, 共分离出溴氨酸脱色菌 4 株, 其中用 G 培养基分离 2 株 (记为 G1, G2), 用 N 培养基分离 2 株 (记为 N1, N2)。这 4 个菌株在含溴氨酸的 G 和 N 培养基中培养 24h 后, 培养液由溴氨酸的鲜红色变成无色或淡黄色。因为培养基中只含有氮源, 说明降解菌株能以溴氨酸为唯一碳源生长。在培养基中加入额外碳源 (淀粉) 时, 溴氨酸脱色效果没有以溴氨酸为唯一碳源时的效果好。推测其原因, 可能是脱色菌先取淀粉为营养物, 对溴氨酸消耗较少, 因此造成溴氨酸脱色效果不佳。另经观察发现, N 培养基中溴氨酸脱色效果要优于 G 培养基, 其中 N1 菌株的脱色效果最好, 故以下的条件实验中选用 N 培养基和 N1 菌株。

2.2 菌株鉴定

对 N1、N2、G1 和 G2 菌株做了形态、生理和生化鉴定实验，结果见表 1。根据表 1 中 4 个菌株的形态及生理生化特征，可确定 N1、N2、G1 和 G2 菌株均属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

2.3 温度对溴氨酸脱色的影响

在不同温度条件下培养 N1 菌株，培养物的吸光度 (485nm) 随时间的变化见图 1。由图 1 可知，在 25℃ 和 30℃ 温度条件下，溴氨

表 1 菌株鉴定结果

菌株	N1	N2	G1	G2
革兰氏染色	—	—	—	—
细胞形状	中杆	中杆	中短杆	短球杆
鞭毛	极生	周生	极生	极生
类脂粒	+	+++	+	++
芽孢	无	无	无	无
氧化酶	+++	++	+++	+
过氧化物酶	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	++	+
葡萄糖氧化 (产酸)	+	++	+	++
葡萄糖氧化 (产气)	—	—	—	—
葡萄糖发酵 (产酸)	—	—	—	—
葡萄糖发酵 (产气)	—	—	—	—

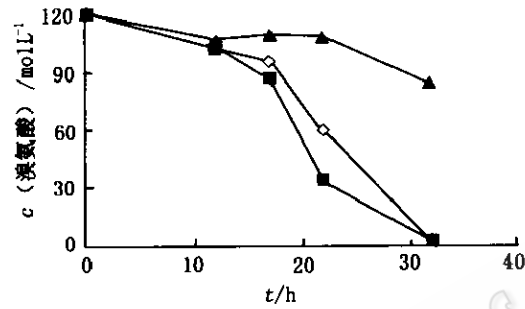


图 1 不同温度下溴氨酸浓度随时间变化
—◇— 25℃, —■— 30℃, —▲— 37℃

酸的脱色情况大致相同，30℃ 条件下略快。37℃ 下培养细菌的生长受到抑制，对溴氨酸的降解作用极弱。

2.4 pH 对溴氨酸脱色的影响

在不同 pH 值条件下培养 N1 菌株，培养物的吸光度 (485nm) 随时间的变化见表 2。由表 2 可知，在偏酸性条件下 (pH6.0)，溴氨酸需要较长时间才能完全脱色。当酸性较强 (pH4.8) 时，培养物吸光度略微下降后就保持不变了，说明酸性环境非常不利于脱色菌的生长，溴氨酸基本上不能脱色。中性及偏碱性 (pH7.2~8.6) 环境中，溴氨酸脱色效果都较好。

表 2 不同 pH 下溴氨酸吸光度 OD_{485} 随时间变化

pH	t (h)					
	0	12	17	21	25	34
4.8	1.94	1.94	1.84	1.80	1.86	1.81
6.0	1.82	1.83	1.84	1.66	1.80	1.65
6.6	1.90	1.83	1.58	1.16	0.356	0.03
7.2	1.89	1.83	1.49	1.07	0.046	0.03
7.6	1.75	1.78	1.44	0.71	0.102	0.072
8.0	1.93	1.74	1.42	0.70	0.06	0.04
8.6	1.87	1.79	1.48	0.92	0.048	0.036

2.5 溴氨酸浓度对降解速率的影响

在不同溴氨酸浓度培养基中培养 N1 菌株，溴氨酸残留量 (%) 随时间变化见图 2。

由图 2 可知，12h 内各浓度的溴氨酸降解速率均较慢，12h 后降解速率均有大幅度上升。随着溴氨

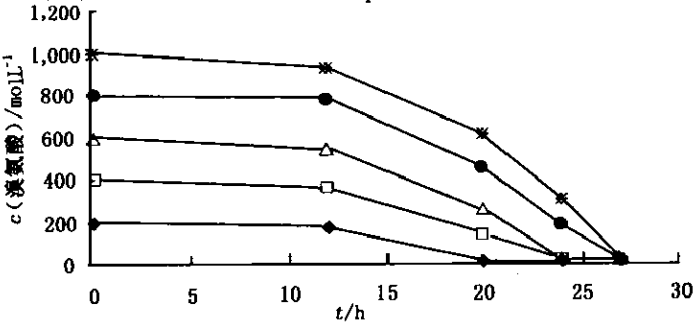


图 2 溴氨酸浓度对降解速率的影响

—◆— 200mg/L, —□— 400mg/L,
—△— 600mg/L, —●— 800mg/L, —*— 1,000 mg/L

酸浓度的增加,其脱色速度略微变慢,但均能在30h内完全脱色。30h各组的溴氨酸残留量非常接近,均在2%左右。

2.6 N1菌株生长曲线和溴氨酸降解曲线的测定

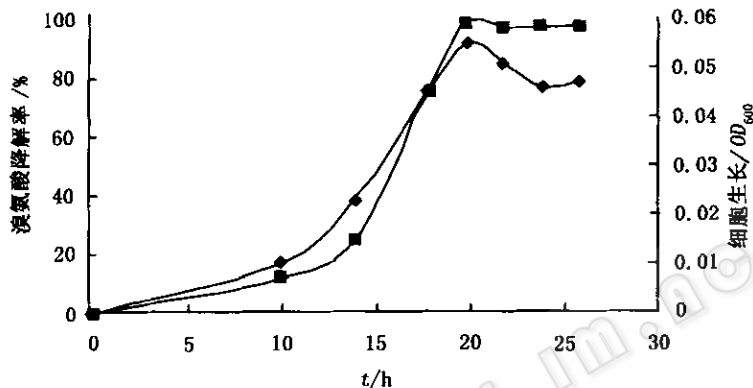


图3 N1菌株的生长和溴氨酸降解曲线

■ 溴氨酸降解率, ◆ 细胞浓度

在30℃, pH7.2条件下摇床培养N1菌株,溴氨酸降解率(%)及菌体细胞浊度(600nm)随时间变化如图3。

从图3可见,以溴氨酸为唯一碳源情况下,菌体的生长量很少,其OD₆₀₀最大值仅为0.055。当溴氨酸浓度为120μg/mL时,12h内的菌体生长曲线和溴

氨酸降解曲线相对平缓,14~20h期间菌体生长达到对数期,OD₆₀₀值急剧增加,溴氨酸的含量迅速下降。20h培养物的菌体浊度达到最大值,同时溴氨酸含量达到最小值,降解率为98%以上。菌体的生长和溴氨酸的降解过程是同步进行的。

参考文献

- [1] Cripps C, Bumpus J A, Aust S D. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 1114 ~ 1118.
- [2] Itoh K, Yatome C, Ogawa T. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1993, 50: 522 ~ 527.
- [3] Young L, Yu J. Water Research, 1997, 31 (5): 1187 ~ 1193.
- [4] 化学工业部染料工业科技情报中心站编. 化学工业手册. 北京: 化学工业出版社, 1985.
- [5] 辛宝平, 庄源益, 胡国臣, 等. 城市环境与城市生态, 1999, 12 (5): 1 ~ 3.
- [6] 金若非, 王 竞, 张劲松, 等. 环境科学研究, 1999, 12 (6): 32 ~ 35.
- [7] 辛宝平, 庄源益, 邹其猛, 等. 中国环境科学, 2000, 20 (4): 332 ~ 336.
- [8] 庄源益, 辛宝平, 宋文华, 等. 城市环境与城市生态, 2001, 14 (2): 1 ~ 3.
- [9] 蔡宝立, 王淑芳, 黄金勇, 等. 环境化学, 1998, 17 (2): 434 ~ 438.
- [10] Holt J G, Krieg N G, Sneath P H A. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Ed), Willims & Wilkings, Baltimore, 1994.