

棒状杆菌属 22-1 菌株降解黑索金活力形成的研究

杨彦希 李文忠 尹 萍 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 从黑索金污染的土壤中分离的棒状杆菌属 22-1 菌株具有降解黑索金的能力,经黑索金适应的完整细胞比未经适应的细胞降解黑索金活力高 1.4 倍。其降解活力形成的最适 pH 和温度分别为 9 和 30℃。供氧不足时抑制其降解活力形成。测定的 10 种碳源中,柠檬酸钠、甘露醇、乳酸钠、蔗糖和葡萄糖能促进细胞量增长与降解活力形成;测定的 5 种氮源中,硝酸钾、脲和蛋白胨则对降解活力形成有明显抑制作用。12 种金属离子中, Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^+ 及硝基炸药 (TNT、DNT、三硝基酚)和硝基苯均明显抑制其降解黑索金活力形成。

关键词 黑索金;降解;棒状杆菌

环三次甲基三硝胺又名黑索金 (RDX) 是一种毒性较大的炸药,在其制造和装弹过程中排出大量废水污染环境,国外报道黑索金只能在厌氧条件下生物降解^[1,2]。前文报道首次分离到好氧降解黑索金的棒状杆菌属菌株 (*Corynebacterium* spp.)^[3] 并研究应用这些菌株生化处理含黑索金装弹废水及含黑索金——梯恩梯混合装弹废水,经小试、中试均取得良好效果^[4-6],出水的各项主要指标 (TNT、RDX、COD、BOD) 均达到国家排放标准。关于微生物好氧降解黑索金的机理国内外尚无资料。为了提高其处理废水的效果,探索应用固定化细胞处理此类废水的方法,本文报道棒状杆菌 22-1 号菌株完整细胞系统中降解黑索金活力形成的条件。

材料与方 法

1. 菌种: 研究采用的棒状杆菌属菌株 22-1 号系由长期受黑索金污染的土壤中分离获得^[3]。

2. 完整细胞培养: 种菌培养采用含 40mg/L 黑索金的普通牛肉汁斜面,30℃ 培养 40 小时。完整细胞培养采用合成培养基,成份如下: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, KH_2PO_4 0.03%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, 葡萄糖 0.2%, 酵母膏 0.01%, 黑索金 30mg/L, 于 500ml 三角瓶中加入 200ml 上述基本培养基,用新鲜种菌接种

后,于 30℃ 摇床振荡培养 16 小时。以上为基本培养条件,单项试验中的各项处理在该实验中说明。

3. 细胞量增长测定: 用 721 型分光光度计 460nm 波长测定浊度,细胞增长量以 mg/L 干重表示。

4. 完整细胞悬液制备: 培养好的菌液用冷冻离心机 (K70D)5000r/min(0℃) 离心 20 分钟收集细胞,用 1/15M (pH 6.8) 磷酸缓冲液洗涤后再离心,收集的完整细胞用相同缓冲液配成一定浓度的细胞悬液备用。

5. 完整细胞降解黑索金的活力测定: 250ml 三角瓶中,按反应液所需黑索金浓度 (30—40mg/L) 加入一定量的 60mg/L 黑索金溶液,加入 1/3M (pH 6.8) 磷酸缓冲液 5ml,加入定量细胞悬液,最后用蒸馏水稀释至 25ml,使反应液中细胞量为 6mg/ml,磷酸缓冲液浓度为 1/15M。30℃ 摇床反应 1—2 小时。取样测定黑索金的初浓度 S_0 (不加菌对照),及黑索金剩余浓度 S ,黑索金的测定方法按前文^[3]进行。

6. 完整细胞降解黑索金活力计算

$$(1) \text{黑索金去除百分率} \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100\%$$

(2) 降解 1 μg 黑索金/mg 细胞/小时定为

国家自然科学基金委员会资助项目

1 活力单位。

(3) 相对活力: 每次试验中以上述基本培养条件所得细胞的降解黑素金活力为 100, 计算不同处理的相对活力。

结果与讨论

(一) 菌体生长、降解黑素金活力形成与培养时间的关系

收集 4、8、12、16、20、24 小时的细胞, 分别测定细胞增长量与其降解黑素金的活力, 结果如图 1 所示。0—16 小时细胞生长迅速, 16 小时后略有生长, 培养 16—20 小时的细胞去除黑素金达 100%, 形成的降解黑素金活力最高; 培养 24 小时的细胞活力开始下降, 因此实验中均采用培养 16—20 小时的细胞。

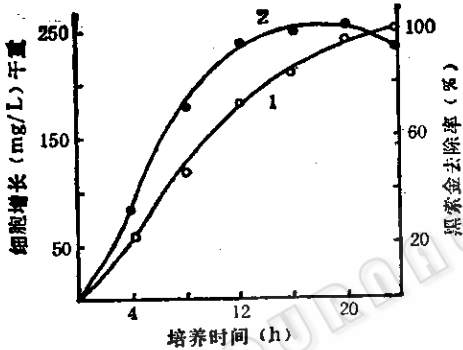


图 1 细胞生长、降解黑素金活力形成与培养时间的关系
1 细长增长 2 黑素金去除率

(二) 细胞经黑素金适应与降解黑素金活力形成的关系

在培养基中分别加入 0、20、30、40mg/L 不同浓度黑素金培养细胞, 测定其细胞增长量与降解黑素金活力, 结果表明加入黑素金对细胞增长量影响不明显, 依次为 118.5、117.5、126.5 和 132.5mg/L 干重, 但对细胞降解黑素金活力形成有明显促进作用, 且随加入适应培养的黑素金浓度增加而促进作用增强。如图 2 所示加入 0、20、30 和 40mg/L 黑素金适应培养后收集的细胞分别与 38.36mg/L 的黑素金在磷酸缓冲液中反应 1 小时后降解的黑素金依次为 14.93、27.89、31.74 和 36.07mg/L。最高

与最低之间相差 1.4 倍, 说明黑素金对细胞降解黑素金活力形成有一定促进作用。

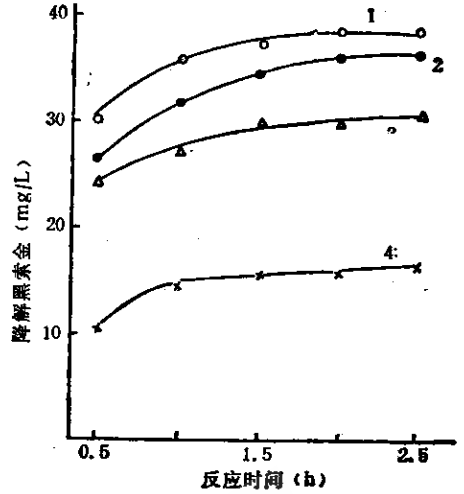


图 2 细胞经不同浓度黑素金适应培养与降解黑素金活力形成的关系

- 1 用 40 mg/L 黑素金适应培养的细胞
- 2 用 30 mg/L 黑素金适应培养的细胞
- 3 用 20 mg/L 黑素金适应培养的细胞
- 4 未经黑素金适应培养的细胞

(三) 22-1 号菌株降解黑素金活力形成的条件

1. pH 和温度: 将培养基分别调至 pH 4、5、6、7、8、9 和 10 培养细胞, 分别测定细胞增长量及降解黑素金活力。结果表明, 该菌在碱性条件下生长良好, 细胞增长量依次为 122、226、263、302、313、318 和 322.5mg/L。降解黑素金活力形成的最适 pH 为 8—9。酸性条件有明显抑制作用。细胞降解黑素金的相对活力依次为 22.86、49.13、76.76、100.00、114.85、125.32 和 110.06(%)。

将培养基接菌后于 15℃、20℃、30℃、40℃ 和 50℃ 静止培养 24 小时后, 收集细胞, 分别测定其细胞增长与降解黑素金活力。结果表明该菌生长与降解黑素金活力形成的最适温度均为 30℃。

2. 通气量对降解黑素金活力形成的影响: 采用静止培养和摇床培养, 摇床培养采用 500 ml 三角瓶中分别加入 150、200、250、300ml 培

培养基。静止培养为 200ml, 结果见表 1。

表 1 通气量对降解黑素金活力形成的影响

培养方式与装液量	细胞增长量 (mg/L)	相对活动 (%)
摇床培养 150ml	376	104.4
200ml	340	100.0
250ml	330	94.2
300ml	318	93.6
静止培养 200ml	27.5	36.6

由表 1 看出, 该菌在静止培养供氧不足的情况下, 细胞生长与降解黑素金活力形成均受到抑制。

3. 不同碳源对该菌降解黑素金活力形成的影响: 采用 10 种不同碳源按 0.2% 浓度分别加入 200ml 基本培养基中, 收集细胞测定其细胞增长量与降解黑素金活力。由表 2 看出细胞增长与降解黑素金活力形成需要碳源, 但不同碳源之间差异很大。10 种碳源中以甘露醇对细胞量增长最有利, 柠檬酸钠对促进降解黑素金活力形成效果最显著, 乳酸钠与蔗糖优于葡萄糖, 不加碳源及加入其他几种碳源细胞增长量与降解黑素金活力均很低。

表 2 不同碳源对降解黑素金活力形成的影响

碳源	细胞增长量 (mg/L)	活力单位*	相对活力 (%)
核糖	76	0.48	15.18
葡萄糖	119.5	3.16	100*
山梨糖	38	1.98	62.65
乳糖	37.5	0.26	8.22
麦芽糖	52	0.42	13.29
蔗糖	164.5	4.55	143.98
柠檬酸钠	199.5	5.99	189.55
乳酸钠	215.5	4.61	145.88
甘露醇	360	4.7	148.21
丙酮酸钠	49	0.64	20.25
黑素金(不加碳源)	27.5	0.71	22.46

* 以葡萄糖为碳源(即基本培养基)的细胞降解活力为 103%。

采用 0、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 不同浓度葡萄糖和蔗糖分别加入培养基中培养细胞, 测定其对细胞量增长与降解黑素金活力形成的影响。由图 3 看出在碳源浓度 0.2% 以

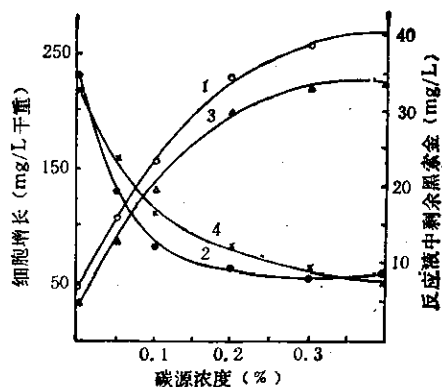


图 3 碳源浓度与降解黑素金活力形成的关系

- 1 表示蔗糖为碳源时细胞增长
- 2 表示蔗糖为碳源时反应液中黑素金剩余浓度
- 3 表示葡萄糖为碳源时细胞增长
- 4 表示葡萄糖为碳源时反应液中黑素金剩余浓度

内, 随碳源浓度增加细胞量明显增加, 反应液中黑素金浓度明显降低, 表明对细胞降解黑素金活力形成明显促进。当碳源浓度超过 0.2% 时, 两者均渐趋平稳状态。

4. 不同氮源对降解黑素金活力形成的影响: 在基本培养基中分别加入 300mg/L 的 KNO_3 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、脲、谷氨酸、蛋白胨等不同氮源及以黑素金为氮源作对照, 收集细胞后测定其对细胞量增长与降解黑素金活力形成的影响。结果表明, 加入谷氨酸与蛋白胨明显促进细胞量增长, 但加入任何一种氮源均程度不同地抑制细胞降解黑素金活力的形成, 尤以脲、蛋白胨、硝酸钾更为明显。

表 3 不同氮源对降解黑素金活力形成的影响

氮源	细胞量增长 (mg/L)	活力单位	相对活力 (%)
KNO_3	141	0.89	21.98
$(NH_4)_2SO_4$	185	3.9	96.29
脲	164	1.98	48.88
谷氨酸	405	3.6	88.89
蛋白胨	270	2.05	50.62
黑素金(不另加氮源)	154	4.05	100

采用抑制作用最强的 KNO_3 和脲分别按 0、50、100、150、200 和 300mg/L 加入基本培养基中培养细胞, 由图 4 看出, 两种氮源仅加入 50mg/L, 即明显抑制细胞降解黑素金活力的

形成。相对活力分别下降 30.15% (KNO₃) 和 28.61% (脲)。

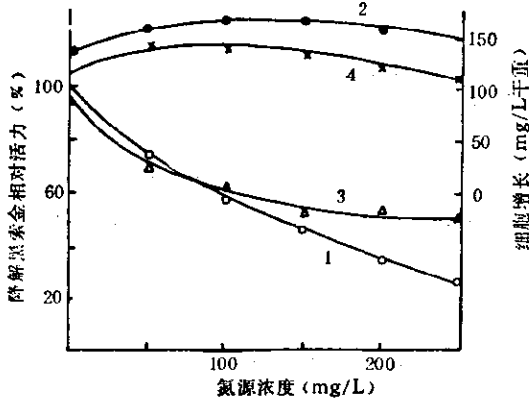


图4 不同氮源浓度与降解黑索金活力形成的关系

- 1 脲为氮源时,细胞降解黑索金的相对活力
- 2 脲为氮源时,细胞增长
- 3 KNO₃为氮源时,细胞降解黑索金相对活力
- 4 KNO₃为氮源时,细胞增长

5. 不同金属离子对降解黑索金活力形成的影响: 选择 Fe²⁺、Fe³⁺、Cr⁶⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Al³⁺、Hg²⁺、Ag⁺ 等 12 种不同的金属离子按 0.1mM 浓度加入基本培养基中, 收集细胞后测定其对降解黑索金

表4 不同金属离子对降解黑索金活力形成的影响

金属离子	细胞增长量 (mg/L)	活力单位	相对活力 (%)
对照	292.5	3.44	100
Fe ³⁺	309	3.65	106.1
Fe ²⁺	307.5	3.25	94.47
Mn ²⁺	339.5	3.5	101.74
Zn ²⁺	282.0	3.27	95.06
Ca ²⁺	297.0	3.28	95.35
Al ³⁺	322.5	3.23	93.89
Cr ⁶⁺	172.0	3.04	88.39
Ni ²⁺	168.0	1.68	48.84
Co ²⁺	99.0	1.01	29.36
Cu ²⁺	29.0	1.16	33.72
Hg ²⁺	9.0	0.37	10.75
Ag ⁺	-1.5	-	-

活力形成的影响, 从表 4 看出 Ni²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ag⁺、Hg²⁺ 有明显抑制作用, Cr⁶⁺ 有轻微抑制, 符合重金属离子抑制微生物生长和酶活力形成的一般规律。

6. 硝基炸药及硝基苯对降解黑索金活力形成的影响: 在实际装弹过程中, 黑索金常与其他硝基炸药如 TNT 混合使用, 排出的废水亦为混合废水, 因此选择几种硝基炸药及硝基苯类化合物按 0.25mM 浓度分别加入基本培养基中, 收集细胞并测定其对该菌降解黑索金活力形成的影响, 从表 5 看出各种硝基炸药及硝基苯均有抑制作用, 尤以 TNT 和 DNT 最严重。因此增加了利用该菌处理含黑索金和 TNT 混合废水的难度, 我们采用两步生化法处理, 先去除 TNT 后, 再降解黑索金, 在实际应用中取得成功。

表5 硝基炸药及硝基苯类物质对降解黑索金活力形成的影响

硝基化合物	细胞增长 (mg/L)	活力单位	相对活力 (%)
RDX	158	3.68	100
DNT	18	0.91	24.72
TNT	17	1.31	35.59
三硝基酚	69.5	2.42	65.76
对-二硝基苯	52.0	1.74	47.28
间-二硝基苯	71.0	2.12	57.61

以上研究结果可为培养该菌降解黑索金活力较高的细胞提供依据, 关于该菌降解黑索金酶的性质及提取尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Soli, G.: AD, 762751, 1973.
- [2] Mc Cormick, N. G. et al: Appl. Environ. Microbiology, 42: 817-823, 1981.
- [3] 杨彦希等: 微生物学报, 23(3): 251-256, 1983.
- [4] 杨彦希等: 微生物学通报, 12(1): 14-16, 1985.
- [5] 杨彦希等: 环境工程, 3: 8-11, 1985.
- [6] 杨彦希等: 微生物学报, 26(1): 53-59, 1986.