

一株高效脱酚菌麦芽糖假丝酵母 10-4 的研究

杨彦希 尹 萍 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从炼油厂严重污染的污水和土壤中分离筛选到 12 株假丝酵母及丝孢酵母, 能以苯酚为唯一碳源生长, 28-40h 内降解苯酚可达 1200mg/L 以上。其中 10-4 号菌株降解苯酚浓度最高可达 1700mg/L。在含 500mg/L 苯酚及 20mg/L CN^- (50mg/L KCN) 的培养液中, 降解苯酚的同时能降解 13.7mg/L 的 CN^- 。鉴定为麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*)。其生长的最适 pH 范围为 6-9, 降解苯酚的最适 pH 范围为 4-9, 生长的最适温度为 25-32℃, 降解苯酚的最适温度为 28-37℃。生长与降解苯酚均需通气条件。加入氮源能促进生长和苯酚降解。

关键词 生物降解, 苯酚, 氰化物, 麦芽糖假丝酵母

酵母菌降解苯酚的研究, 国内外多集中于皮状丝孢酵母 (*Trichosporon Cusancun*) 和热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*), 其降解苯酚的浓度一般在 1000 mg/L 左右^[1-4]。某些含酚废水常有氰化物同时存在, 在生化处理中氰对酵母生长有极强的抑制作用, 酚、氰相互干扰一直是处理此类废水的难题, 因此分离筛选能同时降解苯酚和氰化物的微生物是解决这一矛盾的关键, 但迄今未见报道。我们从炼油厂受石油及其组份污染的土壤及污水中分离筛选到一株降解苯酚浓度可达 1700 mg/L, 并能降解氰化物的高效菌株, 研究了其降解苯酚与生长的适宜条件, 并进行了菌种鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品来源

从五个炼油厂采样 12 份。

1.2 菌种培养

培养基组成 (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, KH_2PO_4 1, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 酵母膏 0.5, 苯酚浓度按试验需要添加。pH 5.5-6, 30℃振荡培养 28-40h (生理实验中按实验要求改变相应的培养基成份及培养条件)。分离采用普通麦芽汁固体培养基 (含苯酚 800mg/L)。

1.3 分析方法

菌体生长: 采用 Folin 酚法^[5]测定培养后增加的菌体蛋白质量 (mg/L)。

苯酚测定: 采用 4-氨基安替比林比色法^[6]。

氰 (CN^-) 测定: 采用硝酸银容量法^[7]。

1.4 菌种鉴定

按 N. J. W. Kreger-Van Rij 的方法进行^[8]。

2 结果与讨论

2.1 降解苯酚酵母菌的分离筛选

样品经用含 500、800mg/L 苯酚的培养基两次富集后, 分离获得 165 株酵母, 用含 1000、1200mg/L 苯酚的培养基反复筛选, 获得 12 株酵母能在 28-40h 内去除苯酚 1200 mg/L, 再用 1500mg/L 苯酚驯化筛选, 获得 6 株能降解苯酚 1500mg/L (表 1)。

从 6 株降解 1500mg/L 苯酚的酵母中选择菌株 10-4, 进一步测定了其降解苯酚的最高浓度, 从表 2 看出该菌降解苯酚最高浓度可达 1700mg/L, 耐受浓度可达 1800mg/L。当苯酚浓度达 2000mg/L 时, 则菌不能生长, 苯酚降解很低。

国家自然科学基金资助项目

1994-06-04 收稿

表 1 12 株酵母菌降解苯酚的能力

菌号	起始苯酚浓度 1260mg/L			起始苯酚浓度 1560mg/L		
	培养后 浓度 (mg/L)	去除浓度 (mg/L)	去除率 (%)	培养后 浓度 (mg/L)	去除浓度 (mg/L)	去除率 (%)
3-8	8	1252	99.36	1020	540	34.61
8-3	12	1248	99.05	1240	320	20.52
10-3	0	1260	100	640	920	58.97
10-4	0	1260	100	0	1560	100
10-6	10	1250	99.20	20	1540	98.70
11-3	16	1244	98.73	1510	50	3.20
11-6	8	1252	99.36	1530	30	1.90
12-3	8	1252	99.36	50	1510	96.79
12-4	4	1256	99.6	46	1514	97.05
12-5	6	1254	99.52	560	1000	64.10
12-6	8	1252	99.36	46	1514	97.05
12-9	4	1256	99.6	46	1514	97.05

表 2 酵母菌 10-4 降解苯酚的浓度

苯酚起 始浓度 (mg/L)	菌体蛋白 质增加量 (mg/L)	培养后苯 酚浓度 (mg/L)	降解苯 酚浓度 (mg/L)	去除率 (%)
1000	568	0	1000	100.00
1200	636	11	1189	99.08
1400	485	2.5	1397.5	99.78
1600	458	40	1560	97.59
1800	398	95	1705	94.72
2000	-5	1624	376	18.80

2.2 10-4 菌株分解氰化物的能力及 CN⁻ 对其生长和降解苯酚的影响

表 3 10-4 菌降解 CN⁻ 的能力及 CN⁻ 对该菌生长及降解苯酚的影响

处 理	菌体蛋白 质增长量 (mg/L)	苯 酚 降 解					CN ⁻ 降解 (40h)		
		24h			40h		剩余浓度 (mg/L)	降解浓度 (mg/L)	去除率 (%)
		剩余浓度 (mg/L)	降解浓度 (mg/L)	去除率 (%)	剩余浓度 (mg/L)	去除率 (%)			
苯酚对照		500			500				
苯酚+ CN ⁻ 0mg/L	242.5	0	500	100.00	0	100.0	—	—	—
苯酚+ CN ⁻ 4mg/L	159.5	0	500	100.00	0	100.0	0	4	100.0
苯酚+ CN ⁻ 8mg/L	109.5	119.5	380.5	76.10	0	100.0	0	8	100.0
苯酚+ CN ⁻ 12mg/L	103.5	191.0	309	61.80	0	100.0	0	12	100.0
苯酚+ CN ⁻ 16mg/L	97.5	205.0	295	59.00	0	100.0	3.2	12.8	80.0
苯酚+ CN ⁻ 20mg/L	91.5	238.0	261.5	52.30	0	100.0	6.3	13.7	68.5

各组处理苯酚均为 500mg/L

在含 500mg/L 苯酚的培养基中分别加入不同浓度的氰化钾,使 CN⁻ 浓度为 0、4、8、12、16 和 20mg/L。培养 24h 测菌体蛋白质增长量和苯酚浓度,40h 再测苯酚浓度和 CN⁻ 浓度。

表 3 结果表明,随着培养基中 CN⁻ 浓度增加,菌体蛋白质增加量下降,24h 内苯酚降解浓度下降,可见 CN⁻ 对该菌生长和苯酚降解有一定的抑制作用,但 CN⁻ 达 20mg/L (50 mg/L KCN),菌体蛋白质量仍增加 91.5mg/L,培养至 40h,500 mg/L 苯酚均全部降解。据报道丝孢酵母在含 500 mg/L 苯酚的培养基中加入 5mg/L CN⁻ 即不能生长^[6],热带假丝酵母耐 7.5 mg/L 的 CN⁻,筛选的 10-4 菌耐 CN⁻ 可达 20 mg/L,可见有一定的抗氰能力。测定 CN⁻ 的结果表明,该菌对培养液中 4、8、12mg/L 的 CN⁻ 能全部降解,对 16 及 20mg/L 的 CN⁻ 也能分别去除 12.8 和 13.7 mg/L,表明其能同时降解苯酚和氰化物。

2.3 菌种鉴定

对 12 株酵母按属的特征鉴定,其中 8 株为假丝酵母属 (*Candida*),4 株为丝孢酵母属 (*Trichosporon*)。按 N. J. W, Kreger-Van Rij 所编“酵母分类研究”^[7] 进行鉴定,10-4 菌属于麦芽糖假丝酵母 (*C. maltosa*)。

2.4 10-4 菌生长与降解苯酚的适宜条件

2.4.1 pH: 试验结果表明, 该菌对 pH 的适应性较强, 在 pH 4—9 范围内生长良好, 对 1200 mg/L 苯酚的去除率均在 98—100%。生长的最适 pH 范围在 6—9。pH 3 或 10 则生长与降解苯酚均明显受到抑制。

2.4.2 温度: 采用 TN-F3 型温度梯度培养箱进行试验, 结果表明该菌生长的最适温度为 25—32℃之间, 而降解苯酚的最适温度为 28—37℃, 在此温度范围内 1200mg/L 苯酚的去除率都在 98—100%之间。41℃时菌仍有生长, 苯酚去除率仍达 65%。但低于 10℃或高于 50℃时, 则完全受到抑制。

2.4.3 通气条件: 采用摇床振荡、静止及厌氧三种条件培养, 结果表明厌氧及静止条件下缺氧或供氧不足, 该菌不能生长或生长极差, 1250 mg/L 苯酚的去除率仅达 8—9%, 摇床振荡培养采用 250ml 三角瓶, 装液量分别为 50、100、150、200 四种, 其菌体蛋白质增长量均达 500 mg/L 以上, 1250mg/L 苯酚均全部去除, 说明该菌降解苯酚系氧化代谢。

2.5 氮源对 10-4 菌生长及降解苯酚的影响

选择几种有机及无机氮源比较, 浓度为 0.2%。

表 4 氮源对 10-4 菌生长及降解苯酚的影响

氮源 (0.2%)	菌体蛋白 质增长量 (mg/L)	培养后苯 酚浓度 (mg/L)	降解浓度 (mg/L)	去除率 (%)
对照	—	1280	0	0
不加氮源对照	215	400	880	68.75
NH ₄ Cl	490	25	1255	98.29
(NH ₄) ₂ SO ₄	506.5	30	1250	97.95
NH ₄ NO ₃	467.8	35	1245	97.61
尿素	421.5	72	1208	95.10
蛋白胨	729	10	1270	99.31
酵母膏	819.5	0	1280	100

表 5 结果表明, 蛋白胨和酵母膏为氮源时, 菌生长较快, 苯酚去除率略高, 三种无机氮源差异不大, 不加氮源则生长和苯酚降解均受抑制。

2.6 碳水化合物对 10-4 菌的影响

该菌降解苯酚系利用其为碳源生长, 在处理含酚废水时不必添加碳源, 但在需要大量生物量如接种挂膜时, 添加某些碳水化合物如葡萄糖, 或废水中含有易被微生物利用的碳水化合物时, 无疑能促进菌体生长, 但碳水化合物对该菌降解苯酚是否有影响尚需明确, 因此进行了在含苯酚 1200 mg/L 的培养基中加入不同浓度 (0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5%) 葡萄糖的试验, 培养 28 小时测定, 结果表明, 随着葡萄糖浓度增加, 菌体蛋白质增加量相应上升, 葡萄糖浓度在 0.05% 范围内, 该菌对 1200mg/L 苯酚均全部去除。但葡萄糖浓度超过 0.05% 时, 则随葡萄糖浓度增高, 而苯酚去除率下降, 表现出一定程度的抑制作用。为了探明抑制作用的原因, 进一步进行了在含苯酚的培养基中加入 0.2% 的葡萄糖与不加作对比试验, 定时取样测定其菌体蛋白质质量与苯酚降解能力。结果见图 1。

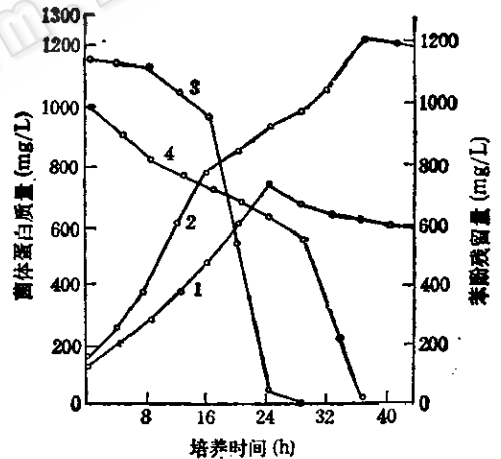


图 1 葡萄糖对 10-4 菌生长与降解苯酚的影响
1. 不加葡萄糖的菌体蛋白质质量 2. 加入葡萄糖的菌体蛋白质质量 3. 不加葡萄糖的苯酚降解 4. 加入葡萄糖的苯酚降解

从图 1 看出, 在不加葡萄糖的培养液中 24 h 菌体生长量达最高, 菌体蛋白质由 150mg/L 增至 722mg/L, 提高 572mg/L, 苯酚也在 8—24h 内迅速降解, 28h 降解完。在加入 0.2% 葡萄糖的培养液中, 菌体生长量 36h 达最高, 菌体蛋白质由 170 mg/L 增至 1220 mg/L, 提高

1050mg/L, 可见加入葡萄糖能促进生长。但由于该菌优先利用葡萄糖生长, 因此在 28h 之前苯酚降解较慢, 表现出抑制现象, 葡萄糖大量消耗后, 28h 至 36h, 苯酚迅速降解完。因此加入葡萄糖超过一定量时, 则使该菌降解苯酚的时间延长。

综合以上试验结果, 麦芽糖假丝酵母 10-4 可降解高浓度苯酚, 降解苯酚的同时还能降解氰。能同时降解酚、氰的该种酵母菌尚未见报道。且该菌对 pH 的适应性广, 可利用苯酚作为碳源生长, 因此可以利用该菌处理含酚和一定浓度氰化物的废水。但需添加氮源和通气条件, 如废水中含有其他易被该菌利用的碳源时, 能促进菌体生长, 但可能延长降解苯酚的时间。

致谢 在苯酚分析方法上得到本所李文忠同志的协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Halina Y Neujahr, Janos M Varga. *European J Biochemistry*, 1970, 13(1):37—44.
- [2] Andras Gasl, Halina Y Neujahr. *J Bacteriology*, 1979, 137(1): 13—21.
- [3] Makoto Shoda, Shigezo Udaka. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 39(6):1129—1130.
- [4] 陈健斌, 韩树琴, 黄武华, 等. *环境科学学报*, 1981, 1(4): 331—335.
- [5] Oliver H Lowry, Nira J Rosebrough, A Lewis Farr, *et al.* *J Biology Chemistry*, 1951, 193(1): 265—276.
- [6] 北京市环境保护研究所. *水质物理化学分析基本知识*. 北京: 中国建筑工业出版社, 1974, 220—223.
- [7] 中国医学科学院卫生研究所. *水质分析法*. 北京: 人民卫生出版社, 1974, 178—180.
- [8] J P van der Walt, Yarrow D. *Methods for Isolation, Maintenance, Classification and Identification of Yeasts*. in Kreger-van Rij N J W, ed. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984, 45—108, 585—734.

STUDY ON ONE STRAIN OF HIGH EFFECTIVE DEGRADING PHENOL MICROBE *CANDIDA MALTOSA*

Yang Yanxi Yin Ping Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Twelve strains of yeast belonging to *Candida* and *Trichosporon* have been isolated from sewage and soil, which polluted by oil and its constituents from oil refinery. These yeasts can use phenol as sole carbon source for growth and degrade phenol more than 1200 mg/L in 28—40 hours. Among them strain 10—4 is the most effective one. It is able to degrade 1700 mg/L of phenol. Moreover it can degrade not only total phenol but also 13.7 mg/L of CN^- in medium containing 500 mg/L of phenol and 20 mg/L of CN^- . It has been identified as *Candida maltosa*. The optimum range of pH is 6—9 for growth and 4—9 for degrading phenol. The optimum temperature is 25—32°C for growth and 28—37°C for degrading phenol. Aerobic condition is necessary for it to grow and degrade phenol. Adding nitrogen source can promote its growth and degradation.

Key words Biodegradation, Phenol, *Candida maltosa*, cyanide