

降解硫氰酸和丙烯腈的一种新型混合细菌培养物

杨惠芳 谢树华 鲜海军 贾省芬 张鸿翼

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从腈纶废水生物粘膜中选育到能降解硫氰酸钠、丙烯腈、异丙醇和丙酮的新型混合细菌培养物 SAT 13, 其降解硫氰酸钠和丙烯腈的能力分别为 1800 mg/l 和 120 mg/l。该培养物由自养菌和异养菌组成, 包括排硫杆菌 (*Thiobacillus thioparus*)、中间硫杆菌 (*Thiobacillus intermedius*)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.)、节杆菌 *Arthrobacter* sp. 和固氮菌 (*Azotobacter* sp.)。这些细菌是净化腈纶废水中污染物的主要微生物, 其中降解硫氰酸钠的主要细菌为排硫杆菌、中间硫杆菌和假单胞杆菌。降解丙烯腈的主要细菌是中间硫杆菌和节细菌。固氮菌对这两种污染物无降解作用。

关键词 硫氰酸钠; 丙烯腈; 混合细菌培养物

关于硫氰酸盐的生物氧化作用已有一些研究, 以往的报道^[1-4]表明, 好氧自养菌中的排硫杆菌或称氧化硫氰酸盐硫杆菌是氧化硫氰酸盐的重要菌群。它们可以从处理高浓度 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和硫氰酸盐废水中, 以及含酚的焦化废水的活性污泥中分离得到。还有人从焦化废水中分离到一些降解氰酸盐的异养细菌^[5-7], 这些细菌可利用硫氰酸盐作为氮源和硫源。

某些生产腈纶的排出水中含有硫氰酸钠和丙烯腈等污染化合物, 由于腈的毒性使硫氰酸钠的生物降解较为困难。虽然 Buczowska^[8] 曾报道过同化硫氰酸盐和腈类化合物的混合细菌, 但对其中的细菌种类未作鉴定。本文报道从生物粘膜中选育到一种既能降解硫氰酸钠, 又能降解丙烯腈等污染物的混合细菌培养物 SAT 13, 鉴定了其中的主要细菌种类, 并对它们的生理功能作了描述。

材料与 方法

(一) 菌种的选育和分离

采集腈纶排出水污染的污泥和生物粘膜样

品 6 个, 分别取样品 2g 接入内盛 50ml 基础培养液的 250 ml 三角瓶中, 28℃ 振荡富集培养 3 至 4 次, 在成份相同的琼脂平板上获得微小菌落, 挑取菌落于装有 10ml 试管中振荡培养, 获得降解 NaSCN 良好的混合细菌培养物 SAT 13, 该混合细菌培养物中的细菌种类, 分别在下列选择培养液中分离, 获得不同种的细菌。

(二) 培养基成份

1. 基础合成培养基成份为 (g/l): KH_2PO_4 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaSCN 0.15, 丙烯腈 0.15, 微量元素* 1ml, pH 7.0~7.2。

根据试验需要变动基础培养液, 有不加硫氰酸钠加丙烯腈者; 或补加 0.2g/l 葡萄糖作为碳源; 或只加 NaSCN 不加任何有机物者。

2. 排硫杆菌培养基成份为 (g/L): Na_2HPO_4 1.2, KH_2PO_4 1.8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, FeCl_3 0.02, NaSCN 1, 微量元素 1ml, pH 7.0~7.2。

3. 肉汁蛋白胨培养基成份为 (g/l): 蛋白胨 10, NaCl 5, 牛肉汁 1000ml, pH 7.0~7.2。

4. 固氮菌培养基成份为 (g/l): 甘露醇 10, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NaCl 0.2, CaCO_3 1, 琼脂 15, pH 7.0~7.2。

本文于 1982 年 12 月 15 日收到。

*微量元素成份 (mg/l): $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 500, CoCl_2 50, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5.1, ZnCl_2 100。

(三) 废水水质

试验采用腈纶废水一级生物滤塔处理出水, 水中含 NaSCN 100~200 mg/l, 丙烯腈 10 mg/l, 异丙醇 50 mg/l, 丙酮 50 mg/l, COD 450 mg/l, BOD₅ 170 mg/l, pH 7.0。

(四) 分析方法

丙烯腈、异丙醇、丙酮用 100 型气相色谱仪测定。硫氰酸钠用硝酸铁显色测定。细菌生长量用 721 型分光光度计波长 460 nm 比浊测定。用凯瓦定氮法测定含氮量, 蒽酮法测定糖的含量。

试验结果

(一) 混合细菌培养物 SAT 13 降解硫氰酸钠、丙烯腈、异丙醇和丙酮的能力。

用基础合成培养基选育出来的混合细菌培养物 SAT 13, 在含硫氰酸钠和丙烯腈的培养基中生长良好而稳定。测定该菌生长过程中两种污染物的降解能力, 从图 1 的结果可见, 当菌处于对数生长期时, 丙烯腈含量随之下降, 培养 15 小时 120 mg/l 丙烯腈已降解完毕, 此时硫氰酸钠消耗甚微, 当菌处于生长平衡期时, 硫氰酸钠降解速度加快, 直至 70 小时 160 mg/l 硫氰酸钠全部去除, 由此表明该混合细菌培养物具有降解硫氰酸钠和丙烯腈的能力。而且丙烯腈的降解速度比硫氰酸钠快。

为了解混合菌培养物 SAT 13 能否用于工业废水处理的实践, 直接取废水进行培养, 测定培养过程中各种污染物含量的变化, 图 2 的结果表明, 废水中硫氰酸钠和丙烯腈的降解规律与图 1 相似。但异丙醇和丙酮的降解存在交替的关系, 随着细菌的生长异丙醇迅速下降, 而在此过程中丙酮含量确有明显的提高, 这一现象可能是由于异丙醇氧化过程中形成丙酮, 只有当异丙醇消耗完以后, 丙酮又继续被生物氧

化。由此表明培养物 SAT 13 不仅能去除腈纶废水中的硫氰酸钠, 还能去除丙烯腈、异丙醇和丙酮等有机污染物。

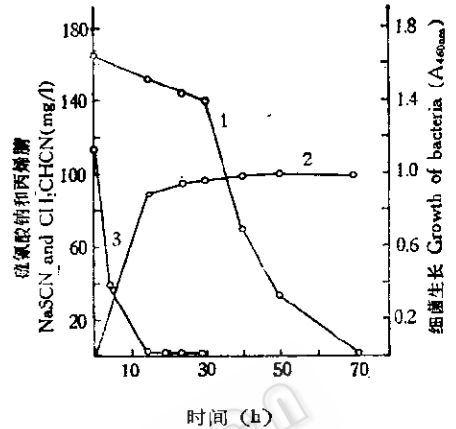


图 1 混合细菌培养物 SAT 13 在合成培养基中的生长及其降解 NaSCN 和丙烯腈的能力
Fig. 1 Degradation of sodium thiocyanate and acrylonitrile and growth of mixed bacterial culture SAT 13 in synthetic medium
1. NaSCN 2. 细菌生长 Growth of bacteria
3. CH_2CHCN

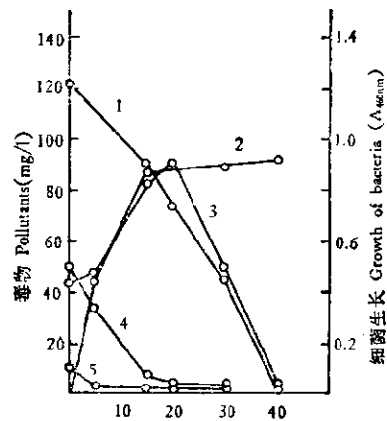


图 2 混合细菌培养物 SAT 13 在废水中的生长及其降解污染物的能力
Fig. 2 Degradation of pollutants and growth of mixed bacterial culture SAT 13 in wastewater
1. NaSCN 2. 细菌生长 Growth of bacteria
3. CH_3COCH_3 4. $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$
5. CH_2CHCN

表 1 污染物对混合细菌培养物 SAT 13 降解硫氰酸钠的影响*

Table 1 Effect of pollutants on degradation of sodium thiocyanate by mixed bacterial culture SAT 13.

污染物名称 Pollutants	污染物加量 Added pollutants (mg/L)	NaSCN 降解量 Degraded NaSCN (mg/ml)	NaSCN 去除率 Removal percentage of NaSCN (%)
硫氰酸钠 NaSCN	800	800	100
	1200	1200	100
	1800	1800	100
	2000	1640	82
异丙醇 (CH ₃) ₂ CHOH	130	200	100
	5000	200	100
	10000	200	100
丙酮 CH ₃ COCH ₃	200	200	100
	300	200	100
	500	200	100
	700	200	100
	1400	38	19
丙烯腈 CH ₂ CHCN	200	200	100
	400	82	41
	600	42	21
	800	14	7
	1000	8	4

* 在异丙醇、丙酮和丙烯腈中加入硫氰酸钠的初始浓度为 200 mg/l。

(二) 污染物对混合细菌培养物 SAT 13 降解硫氰酸钠的影响

排出水中由于工艺过程的变化, 各种污染物的浓度会有改变。由此我们研究了废水中主要污染物的含量对培养物降解硫氰酸钠的影响。试验在含有硫氰酸钠的基础培养基中进行。表 1 的结果可见, 该培养物降解硫氰酸钠的能力较强, 当其浓度从 200 mg/l 提高至 1800 mg/l, 48 小时内能全部去除, 而不断提高浓度至 2000 mg/l 时硫氰酸钠的降解受到抑制。除此之外异丙醇和丙酮的浓度对硫氰酸钠降解的影响不大, 异丙醇由 130 mg/l 至 10000 mg/l, 丙酮在 700 mg/l 以上均不影响硫氰酸钠的降解。然而, 丙烯腈对硫氰酸钠的降解有一定的影响, 当丙烯腈浓度在 200 mg/l 时, 48 小时内 200 mg/l 硫氰酸钠可全部去除,

而当其浓度提高到 400 mg/l, 硫氰酸钠的去除率却下降到 41%, 继续提高至 1000 mg/l 硫氰酸钠的降解几乎全部被抑制。由此可见, 如果应用该细菌培养物净化废水中的硫氰酸盐必须注意其中丙烯腈的浓度, 在此丙烯腈以 200 mg/l 为宜, 否则会影响处理效果。

(三) 混合细菌培养物 SAT 13 中的主要细菌种类及其降解污染物的作用

为确定培养物 SAT 13 中的细菌种类, 用方法中所述的各种培养基分离、纯化获得五种生理功能不同的细菌, 按伯杰氏细菌学鉴定手册^[9]定名为: 排硫杆菌 (*Thiobacillus thio-parus*)、中间硫杆菌 (*Thiobacillus intermedius*)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.)、节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 和固氮菌 (*Azotobacter* sp.)。它们的主要特性

表 2 混合细菌培养物 SAT 13 中的细菌种类及其主要特征*
Table 2 The kinds of bacteria in mixed bacterial culture SAT 13 and their major characteristics

试验项目 Tests	排硫杆菌 <i>T. thioparus</i>	中间硫杆菌 <i>T. intermedius</i>	假单胞杆菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	节丝菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	固氮菌 <i>Azotobacter</i> sp.
革兰氏染色 Gramstain	-	-	-	+	-
细胞形状 Shape of cell	短杆状 short rods	短杆状 Short rods	杆状 rods	短杆到球状 short rods globule	杆状 rods
细胞大小 ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$) size of cell	0.5×1—2	0.5×1.0	0.5—1×1.5—4	0.4—0.5×0.5—0.8	1—2×3—6
鞭毛及运动 Motile and flagellum	单极毛运动 motile with polar flagellum	不运动 non-motile	单极毛运动 motile with polar flagellum	不运动 non-motile	不运动 non-motile
肉汁蛋白胨 Broth peptone	-	+	++	++	-
CH ₂ CHCN 0.012%	-	+	-	+	-
CH ₂ CHCN 0.012% +NaSCN 0.015%	-	+	-	+	-
Glucose 0.5% +NaSCN 0.015%	-	++	++	+	±
NaSCN 0.1%	+	+	/	/	/
Na ₂ S ₂ O ₃ 10%	+	+	-	-	-
KCN 75ppm	/	+	+	+	-
固氮培养基琼脂 Nitrogen-fixing medium agar	/	-	++	-	++

* - 不生长 no growth ± 微弱生长 meagre growth
+ 生长 growth ++ 旺盛生长 good growth

列于表 2。

排硫杆菌 (*Thiobacillus thioparus*): 革兰氏阴性菌, 短杆状, 单极鞭毛运动。不能在肉汁蛋白胨和葡萄糖培养基中生长, 也不能以丙酮、异丙醇或酚作为碳源的培养基上生长, 在含有硫代硫酸钠的肉汁中均不生长, 只能在含有硫代硫酸钠 (1%) 或硫氰酸钠 (0.1%) 以及其他还原性硫化物 (Na₂S, S⁰ 等) 的无机合成培养液中良好生长, 在硫代硫酸钠培养液中 pH 可从 7.0 降到 4.5, 在此琼脂平板上菌落细小, 直径为

1—2 mm, 由于形成元素硫, 菌落呈浅黄色, 是严格好氧自养菌。

中间硫杆菌 (*Thiobacillus intermedius*): 从前述硫氰酸钠和丙烯腈的基础培养基琼脂平板上分离得到, 菌落细小老化后有硫粒附着。革兰氏阴性短杆菌, 无鞭毛不运动, 能在肉汁蛋白胨琼脂或酵母膏琼脂平板上生长, 在葡萄糖、谷氨酸钠中生长旺盛, 能在硫代硫酸钠的无机合成培养基上生长, 亦能在含硫代硫酸盐和其他有机物 (如: 葡萄糖, 牛肉汁、酵母膏等) 同时存在

时生长,因此该菌属兼性自养菌。

假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.): 革兰氏阴性菌,细胞杆状,极毛运动,严格好氧不发酵,能在以葡萄糖作为碳源,硫氰酸钠作为氮源的培养基中生长,并能在以甘露醇为碳源的无氮培养基上良好生长,该菌能固定大气氮。

节杆菌 (*Arthrobacter* sp.): 生长过程中细胞形态有显著变化,4 小时呈球形短杆状,10 小时细胞膨大,18 小时后为类球状。革兰氏阴性,无鞭毛不运动,在硫氰酸钠加丙烯腈的培养液中生长旺盛。

固氮菌 (*Azotobacter* sp.): 革兰氏阴性菌,细胞短杆状,有荚膜。具有固定大气氮的能力,在以甘露醇为碳源的无氮培养基上旺盛生长,并能在葡萄糖加有硫氰酸钠的培养基上微弱生长,而不能在含丙烯腈的硫氰酸钠的基础培养基中生长。定量测定该菌在无氮的葡萄糖培养基上固定氮的能力,试验表明该菌消耗 1g 糖可固定 10 mg 左右的大气氮。由此确定该菌为固氮菌。

从以上结果得知上述五株细菌的生理特征各有差异,在含硫氰酸钠的培养基中生长情况亦有不同。为了阐明五株菌降解硫氰酸钠和丙烯腈的作用,分别在基础合成和排硫杆菌培养基上试验。从图 3 的结果明显地观察到,严格自养菌细菌排硫杆菌降解硫氰酸钠浓度最高,其次是兼性自养细菌中间硫杆菌和假单胞杆菌,假单胞杆菌是异养性的,只有在培养基中加入葡萄糖为碳源时才有降解硫氰酸钠的能力。混合菌培养物 SAT 13 中能降解丙烯腈的细菌是节杆菌和中间硫杆菌,如图 4 所示,节杆菌降解丙烯腈的能力比中间硫杆菌高。中间硫杆菌具有降解硫氰酸钠和丙烯腈两种功能是该菌的新的特征,值得注意。固氮菌在净化这类废水中的作用还不明

确,推测该菌在固定大气氮的同时,有净化一般容易生化降解的有机化合物,因此认为,这些细菌是净化腈化腈纶废水的主要微生物。

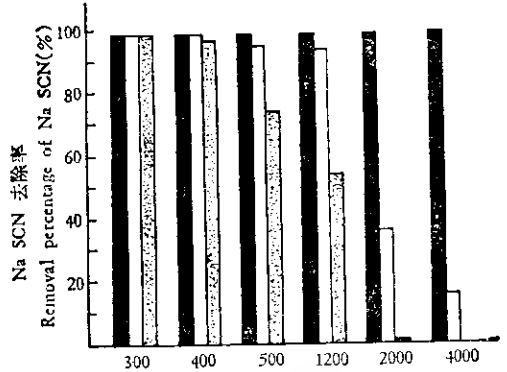


图 3 排硫杆菌、中间硫杆菌和假单胞杆菌降解 NaSCN 的能力

Fig. 3 Degradation of sodium thiocyanate by *T. thioparus* *T. intermedius* and *Pseudomonas*

■ *T. thioparus* □ *T. intermedius*
▨ *Pseudomonas*

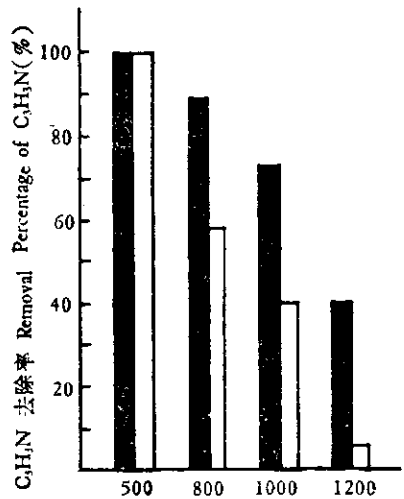


图 4 节杆菌和中间硫杆菌降解丙烯腈的能力

Fig. 4 Degradation of acrylonitrile by *Arthrobacter* and *T. intermedius*

■ *Arthrobacter* sp. □ *T. intermedius*

讨 论

由于工业废水是含有多种复杂化合物

的污染水体,依据水质的变化,净化各类废水必有其不同的微生物群体。因此,选育混合细菌处理某些工业废水既符合实践的需要,又是一个研究方向。我们选育的混合细菌培养物 SAT 13,就是自养细菌和异养细菌的混合菌群,这些细菌构成了一个自然的小生态系统,各种细菌各自执行它们应尽的生理功能,成为净化腈纶废水的微生物基础,我们成功地应用该菌在浸没式滤池上接种挂膜处理腈纶废水,效果良好^[10]。试验表明,混合细菌培养物 SAT 13 中的严格自养的排硫杆菌和兼性自养的中间硫杆菌对硫氰酸钠有极大的降解能力,是净化废水中硫氰酸钠的重要菌群,其次是假单胞杆菌、特别应该注意的是中间硫杆菌在净化硫氰酸钠的同时还有净化丙烯腈的作用,这一生理功能是前人未有报道过的。显然,异养细菌包括固氮菌是净化废水中其它有机污染物的微生物菌群。

至于它们之间的生态关系尚须进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Happold, F. C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **10**: 261—266, 1954.
- [2] Youatt, J. B.: *J. Gen. Microbiol.*, **11**: 139—149, 1954.
- [3] Happold, F. C. et al.: *Nature*, **182**: 266—267, 1958.
- [4] Katayama, Y. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **24** (7): 804—810, 1978.
- [5] Пумилина, Н. Т.: *Микробиология*, **30** (2): 294—297, 1961
- [6] Stafford, D. A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **55**: 285—289, 1969.
- [7] Betts, P. M. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **25** (11): 1277—1282, 1979.
- [8] Buczowska, Z. et al.: *Bull. Inst. Mar. Med. Gdansk.*, **19**: 201—210, 1968.
- [9] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth edition, 1974.
- [10] 杨惠芳等: *环境科学学报*, **2**(2): 162—169, 1982.

A NEW KIND OF MIXED BACTERIAL CULTURE DEGRADING SODIUM THIOCYANATE AND ACRYLONITRILE

Yang Huifang Xie Shuhua Xian Haijiun Jia Sungfen Zhang Hongyi

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

A new kind of mixed bacterial culture SAT13, capable of degrading sodium thiocyanate, acrylonitrile, isopropyl alcohol and acetone, has been screened from biological slime polluted by polyacrylonitrile wastewater. The mixed culture possesses the abilities to degradate about 1800 mg/l sodium thiocyanate and 120 mg/l acrylonitrile. It consists of both autotrophic and heterotrophic bacteria, such as *Thiobacillus thioeparus*, *Thiobacillus intermedius*, *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Azoto-*

bacter sp.. They are the main microorganisms for polyacrylonitrile wastewater purification, but *T. thioeparus*, *T. intermedius* and *Pseudomonas* sp. are the major microorganisms for sodium thiocyanate degradation, and *T. intermedius* and *Arthrobacter* sp. for degrading acrylonitrile. *Azotobacter* sp. has no ability to attack both pollutants.

Key words

Sodium thiocyanate; Acrylonitrile; Mixed bacterial culture