

高效降解甲醛菌株的分离鉴定及其特性

谢文娟^{1,2} 王洁^{1*} 孙珮石¹ 邹平¹

(1. 云南大学 环境与湖泊研究院 云南 昆明 650091)

(2. 云南大学 生命科学学院 云南 昆明 650091)

摘要: 首先对新分离的、能高效降解甲醛的两菌株 A1 和 A2 在形态学特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析等方面进行了系统研究; 随后通过测定在液体培养过程中甲醛浓度的变化, 确定新分离菌株 A1、A2 降解溶液中甲醛的性能; 最后利用菌株 A1、A2 分别进行生物填料塔的挂膜实验, 确定其对甲醛气体的净化性能。结果表明: 菌株 A1 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*), 菌株 A2 为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*); 当甲醛初始浓度 < 1 200 mg/L 时, 菌株 A1、A2 都能完全降解溶液中的甲醛, 当甲醛浓度增高至 1 600 mg/L 时, 菌株 A1 在 48 h 后的甲醛降解率为 50%, 菌株 A2 在 104 h 后的甲醛降解率为 74.3%; 菌株 A1、A2 对甲醛气体的净化效率均能达到 99% 以上, 菌株 A1 的甲醛生化去除量能达到 26.4 mg/(L·h), 菌株 A2 的甲醛生化去除量可达 20.6 mg/(L·h)。

关键词: 甲醛, 假单胞菌属, 鞘氨醇单胞菌属, 净化性能

Isolation and identification of bacterial strains efficient degrading formaldehyde and their degrading characteristics

XIE Wen-Juan^{1,2} WANG Jie^{1*} SUN Pei-Shi¹ ZOU Ping¹

(1. Academy of Environment & Lake, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. School of Life Science, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: In this paper, two newly isolated bacterial strain A1 and strain A2, which were capable of degrading formaldehyde in high efficiency, were identified based on the results of standard morphological identification, physiological and biochemical characters, 16S rDNA sequence analysis. Their capability of degrading formaldehyde was investigated by determination of the formaldehyde concentration change in culture. The biological packed tower hung membrane experiment was carried to determine the purification performance of the two bacterial to formaldehyde gas. The results showed that: these two bacterial strain A1 and strain A2 were identified as *Pseudomonas* and *Sphingomonas*, respectively; when formaldehyde initial concentration was below 1 200 mg/L, it could be degraded by bacteria strain A1 and strain A2 completely; when original formaldehyde concentration was up to 1 600 mg/L, 50% of formaldehyde was consumed by strain A1 after 48 h, 74.3% of formaldehyde was consumed by

strain A2 after 104 h; the removal efficiency of these two bacteria could be over 99%, the formaldehyde removal biochemical can amount to 26.4 mg/(L·h) of strain A1 and 20.6 mg/(L·h) of strain A2.

Keywords: Formaldehyde, *Pseudomonas*, *Spingomonas*, Purification performance

甲醛属剧毒化学物质, 已经被世界卫生组织确定为致畸型和致癌物质。甲醛的毒性主要表现在对人的皮肤及其他裸露组织和呼吸器官有强烈的刺激反应, 能引起许多症状, 对人体的危害极大。各种人造板材中由于使用了脲醛树脂粘合剂, 因而含有大量的甲醛。化妆品、防腐剂、纸张、印刷油墨、纺织纤维、清洁剂、杀虫剂、消毒剂等多种轻工产品也含有甲醛^[1-3]。因此对甲醛污染物进行防治对人类健康意义重大。

据报道从自然界中分离得到的甲醛降解菌大部分为细菌和少部分的真菌。目前, 甲醛降解细菌的种类大致有恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、扭脱甲基杆菌、假产碱假单胞菌株、鞣丸酮假单胞菌、甲基营养菌等, 它们能以甲醛为唯一的碳源和能源进行生长, 而且有些细菌对甲醛的降解能力非常强^[4-11]。也有报道称在添加甲醇的条件下硝化细菌和反硝化细菌也能降解甲醛^[12]。黄赛花等^[13]和 Yurimoto H 等^[14]分离出能够降解甲醛的真菌, 甲醛耐受真菌能在高浓度甲醛下生长, 并将甲醛浓度降到很低或趋于零。目前所报道的菌株都只是测定其对甲醛废水的降解能力, 而针对高浓度的工业甲醛废气的研究还不多见。本文在进行甲醛降解菌对甲醛废水研究的同时还就其对甲醛废气的净化效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 培养基组成

细菌完全培养基: 葡萄糖 0.5%, 牛肉膏 0.3%, 蛋白胨 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%, 琼脂 2%。

营养培养基(g/L): 酵母提取物 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.1, K_2HPO_4 4.2。

基本无机培养基(g/L): $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, $CaCl_2$ 0.1, NaCl 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, K_2HPO_4 4.2, $FeCl_3$ 0.02。

1.2 菌种的富集培养、分离纯化与鉴定

取自于污水处理厂的活性污泥经过长时间通有

甲醛废气的生物填料塔的驯化而分离获得菌株。取表面长满微生物的陶粒, 加入 100 mL 无菌水, 制成菌悬液。移取菌悬液以 10% 的高浓度接种量接种于细菌完全培养基, 于 30 °C、150 r/min 的摇床上振荡, 培养 24 h 后, 用倍比稀释法将富集培养后菌液稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍, 涂布于甲醛浓度为 370 mg/L 的营养培养基平板上, 30 °C 倒置培养, 直到长出肉眼可见的菌落。选出长势良好、形态不同的菌落, 进行划线分离, 直至得到纯的单菌落。

观察菌落的形态特征, 并对菌株进行生理生化特性分析。

1.3 16S rDNA 序列的 PCR 扩增和测序

基因组 DNA 的提取采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克, Bioteke Corporation)。

16S rDNA 序列的扩增采用正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 和反向引物 1492R: 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应程序如下: 94 °C 4 min; 94 °C 50 s, 52 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 反应的产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

16S rDNA 序列的 PCR 扩增和测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。将 16S rDNA 的碱基序列在 NCBI 数据库上进行 BLAST 比对, 选出数据库中具有代表性的几株细菌的 16S rDNA 全序列, 利用软件 MEGA 4.0 构建系统发育树, 进行系统发育分析。

1.4 生长性能的测定

将菌体(接种量为 1%)接种在甲醛浓度为 370 mg/L 的无机培养液中, 在 28 °C±2 °C、转速为 150 r/min 的摇床中培养, 以未接种菌体的培养液为参比, 在设计时间间隔下取样, 于 600 nm 波长处测光密度 OD 值, 作 OD-t 曲线, 用培养液的 OD 值间接表示细菌数量。

1.5 降解溶液中甲醛性能的测试

将菌体(接种量为 1%)分别投加至甲醛底物浓度

分别为 400、800、1 200 和 1 600 mg/L 的基本无机盐培养基中, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、转速为 150 r/min 的摇床中培养, 在设计的时间间隔内取样, 通过测定培养基前、后的甲醛浓度变化考察菌株降解溶液中甲醛的性能。甲醛的浓度用乙酰丙酮分光光度法测定^[15]。

1.6 净化甲醛废气性能的测试

将菌体(接种量为 1%)投加至甲醛浓度为 370 mg/L 的基本无机盐培养基中, 在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、转速为 150 r/min 的摇床中培养, 然后在生物填料塔中进行挂膜。实验采用的生物膜填料塔直径为 4.5 cm, 在填料塔中装有直径约为 1 cm 的陶粒, 填料层高度为 50 cm。实验采用气液逆流操作, 即菌悬液由高位槽进入塔顶然后向下喷淋, 菌悬液在填料层中自由向下流动, 最后从塔底排出进入循环水槽, 再由水泵打回到高位槽。甲醛气体发生装置采用动态法, 即由一小气泵向 37%–42% 的纯甲醛溶液瓶中吹入少量空气, 鼓出的甲醛气体进入主气道, 并与空气混合均匀, 之后混合气体由塔底进入生物膜填料塔, 在上升的过程中甲醛气体与润湿的生物膜接触而被净化, 净化后的气体从塔顶排出。

实验在常温常压下进行, 甲醛入口气体浓度范围为 $100\text{--}500\text{ mg/m}^3$, 气体流量为 100 L/h, 循环液体喷淋量约为 1 L/h, 液体的 pH 在 6–8 之间。每隔 2 d 换 1 L 新鲜的无机盐培养液。15 d 后, 生物填料塔内布满了长势良好的菌体。通过测定塔内菌体对甲醛废气的净化效率和生化去除量来考察菌株净化甲醛废气的性能。甲醛废气的浓度用乙酰丙酮分光光度法测定^[16]。

2 结果与讨论

2.1 降解甲醛菌株的鉴定

2.1.1 菌株的形态及生理生化特性: 经过反复富集培养和纯化后, 得到 2 株均能高效降解甲醛的细菌菌株, 编号为 A1 和 A2。菌株 A1 于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 菌落呈圆形, 边缘规则, 表面光滑湿润, 透明, 有黏性, 有光泽, 凸起, 呈乳白色; 革兰染色阴性, 无芽孢, 菌体呈短杆状。菌株 A2 菌落呈圆

形, 无芽孢, 杆状, 不运动, 呈黄色, 革兰氏阴性。通过扫描电镜观察菌株 A1 和 A2 都呈短杆状(图 1、图 2)。对细菌的多项生理生化指标进行测定, 其结果如表 1 所示。

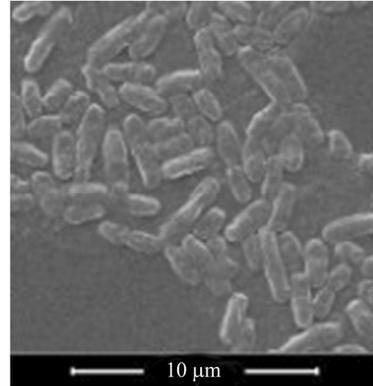


图 1 菌株 A1 的扫描电镜照片

Fig. 1 Photo of transmission electron microscope of strain A1

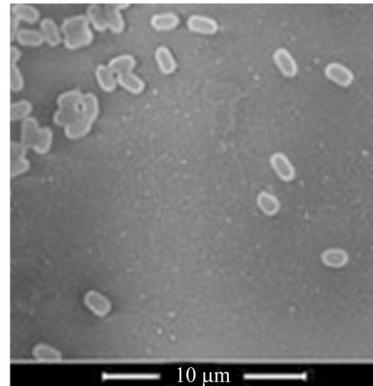


图 2 菌株 A2 的扫描电镜照片

Fig. 2 Photo of transmission electron microscope of strain A2

表 1 细菌的生理生化实验结果
Table 1 The result of bacterium physiological biochemistry experimental

测定项目 Tested items	菌株 A1 Strain A1	菌株 A2 Strain A2
Methyl red test	–	–
Voges-Proskauer test	+	–
Indole test	–	–
Gelatin liquefaction test	–	–
Starch hydrolysis	–	–
Catalase test	+	+
Hydrogen sulfide test	–	–
Glucose fermentation	+	+

2.1.2 16S rDNA 序列分析: 将所测的菌株 A 和菌株 E 的 16S rDNA 序列。通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 选出数据库中具有代表性的几株细菌 16S rDNA 全序列, 利用软件 MEGA 4.0 构建系统发育树如图 3 和图 4 所示。

结果表明: 菌株 A1 与 *Pseudomonas putida* (EU443615.1) 聚在进化树的同一个分支上, 其同源性为 99% (图 3); 菌株 A2 与 *Sphingomonas* sp. (DQ010645.1) 菌株聚在一个分支上, 且在 NCBI 数据库中相似性可达到 66% (图 4)。结合细菌形态和

生理生化特性研究结果, 从生物膜中分离出来的 2 株细菌分别属于: 假单胞菌属(*Pseudomonas*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)。

在降解甲醛的微生物中, 假单胞菌是一类具有突出作用的细菌。据国内外文献报道, 恶臭假单胞菌除引起动植物尸体的腐败分解外, 某些菌株尚可用于甲苯、甲基对硫磷、吗啡生物碱等有机物的生物转化或生物降解。而它在净化甲醛的过程中, 可以以甲醛为唯一的碳源进行生长^[4]。

鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)在地球上分布极

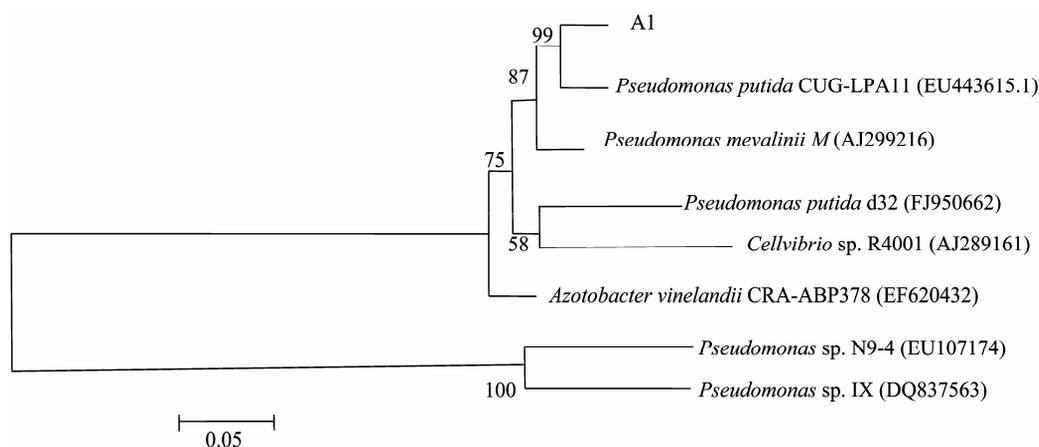


图 3 菌株 A1 的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequences of strain A1

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.05 represent sequence divergence.

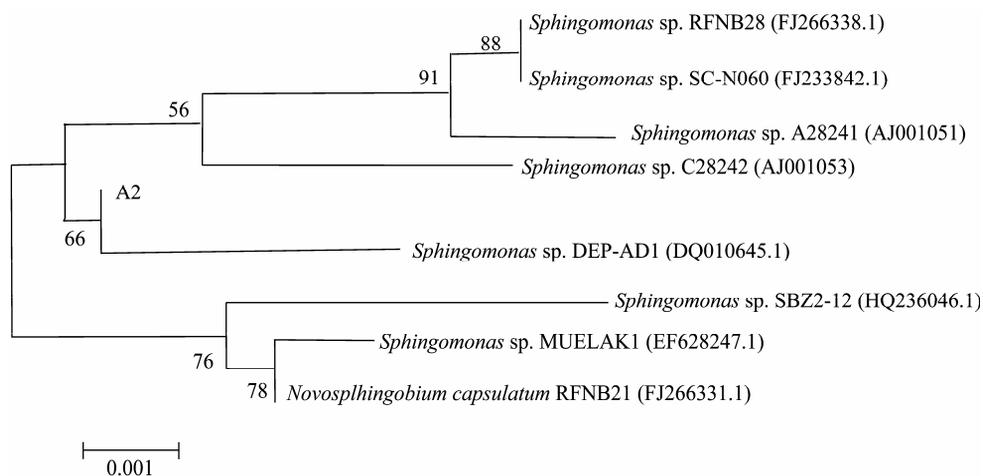


图 4 菌株 A2 的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequences of strain A2

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar: 0.001 represent sequence divergence.

其广泛,在各种水体、土壤、大气以及极端环境中都有其存在的踪影。它们具有耐受极端贫营养条件、利用各种简单分子、降解复杂有机物的能力,某些种属还能产生有价值的生物高分子(如 β 胡萝卜素、结冷胶);它们又是一类致病菌,能引起植物根部或动物伤口的感染。该属在水体中分布广泛,并且大多数都与有毒化合物的降解有关^[17]。

2.2 降解甲醛菌株的生长性能

实验所测得的菌株的生长曲线见图 5。从图 5 可知,菌株 A1 在接种的 2 h 内,OD 值变化较小,但在 2 h 后,OD 值呈指数上升,进入对数生长期,直到 10 h 后,OD 值的上升速度减缓,开始进入稳定期。菌株 A2 在接种的 8 h 间,OD 值呈上升较小,但在 8 h 后,OD 值呈上升加快,40 h 后 OD 值趋于不变,开始进入稳定期。

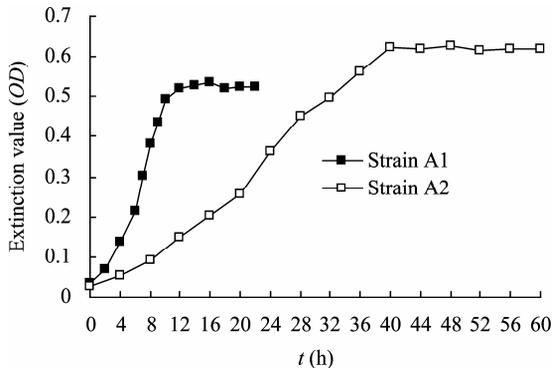


图 5 菌株 A1 和菌株 A2 的生长曲线
Fig. 5 Growth curve of strain A1 and strain A2

2.3 菌株 A1、A2 对甲醛的降解性能研究

考察了底物初始浓度的改变对菌株降解甲醛能力的影响。菌株降解甲醛的条件为 150 r/min、30 °C,实验结果的模拟曲线如图 6 和图 7 所示。

由图 6 和图 7 可知,当甲醛初始浓度 <1 200 mg/L 时,菌株 A 和菌株 E 都能够完全降解溶液里的甲醛。当甲醛浓度增高至 1 600 mg/L 时,菌株 A1 与菌株 A2 对甲醛的降解能力发生变化,48 h 后菌株 A1 对甲醛的降解能力减弱至无,此时对甲醛的降解率达到 50%,这是因为底物浓度过高会对微生物产生毒害作用,同时抑制菌株正常的新陈代谢,

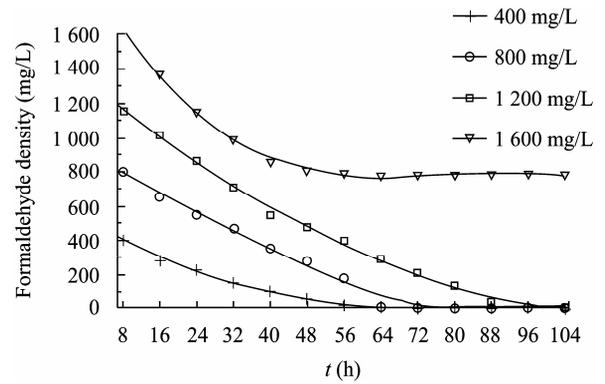


图 6 菌株 A1 在不同初始甲醛浓度下净化甲醛的能力
Fig. 6 The ability of purification formaldehyde of strain A1 in different initial formaldehyde concentration

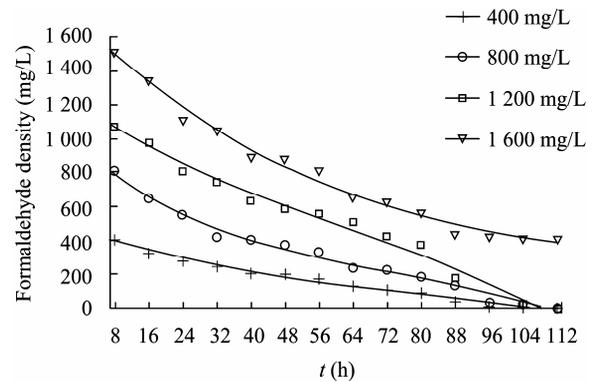


图 7 菌株 A2 在不同初始甲醛浓度下净化甲醛的能力
Fig. 7 The ability of purification formaldehyde of strain A2 in different initial formaldehyde concentration

进而影响其对底物的降解能力;菌株 A2 则不受限制,对甲醛持续降解,在 104 h 时对甲醛的降解率达到 74.3%,说明菌株 A2 对高浓度甲醛的耐受性比菌株 A1 的高。

2.4 菌株 A1、A2 对甲醛废气净化性能的研究

通过对菌株 A1、A2 进行生物填料塔的挂膜实验,当甲醛气体流量为 0.1 m³/h、甲醛入口气体浓度控制在 100–500 mg/m³ 的实验范围内,考察 2 株菌对甲醛废气的净化性能。结果表明,在生物膜填料塔挂膜完成后,生物填料塔内的菌株 A1、A2 对甲醛的净化效率均能稳定在 99% 以上,因此本实验重点考察 2 株菌净化甲醛废气的生化去除量。其结果如图 8 所示。

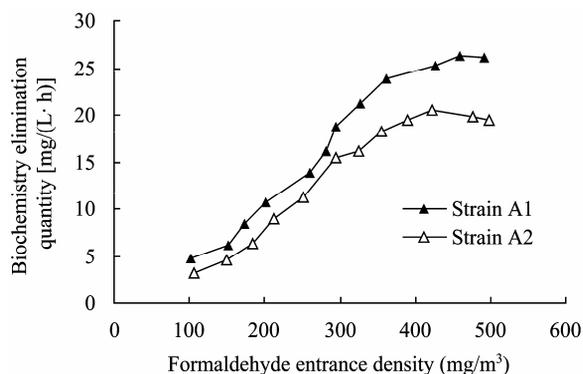


图 8 甲醛入口气体浓度的改变对生化去除量的影响

Fig. 8 Effect of the gas concentration on the biological elimination

从图 8 可以看出, 随着甲醛入口气体浓度增加, 两株菌对甲醛的生化去除量均有先呈直线增加, 再缓慢上升达到最大值后有下降的趋势。菌株 A1 在甲醛入口气体浓度为 458 mg/m^3 时, 甲醛生化去除量达到最大值, 其生化去除量为 $26.4 \text{ mg/(L}\cdot\text{h)}$; 菌株 A2 在甲醛入口气体浓度为 422 mg/m^3 时, 甲醛生化去除量达到最大值, 其生化去除量为 $20.6 \text{ mg/(L}\cdot\text{h)}$ 。

3 结论

(1) 对分离的菌株进行了形态学、生理生化以及分子生物学的分析, 初步鉴定菌株 A1、A2 分别属于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)。

(2) 当甲醛初始浓度 $< 1 \text{ 200 mg/L}$ 时, 菌株 A1 和菌株 A2 都能够完全降解溶液中的甲醛。当甲醛浓度增高至 1 600 mg/L 时, 菌株 A1 在 48 h 后的甲醛降解率为 50%, 菌株 A2 在 104 h 时甲醛降解率为 74.3%。

(3) 生物填料塔内的菌株 A1、A2 对甲醛的净化效率均能达到 99% 以上; 当气体流量为 100 L/h 、培养液的流量为 1 L/h 、甲醛进口气体浓度在 $100\text{--}500 \text{ mg/m}^3$ 的条件下, 菌株 A1 的生化去除量最大值为 $26.4 \text{ mg/(L}\cdot\text{h)}$, 菌株 A2 的甲醛生化去除量最大值为 $20.6 \text{ mg/(L}\cdot\text{h)}$ 。

参考文献

[1] 李晶平, 鲁统布, 陆慧玲. 甲醛毒性及其常用检测方法[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学、医学版, 2006, 26(1): 34-38.

- [2] 梁建聪, 郭云霞, 容学军. 甲醛污染来源及防治措施[J]. 广西轻工业, 2009, 25(3): 100-101.
- [3] 牛凤兰, 宋德锋, 陈林, 等. 环境中甲醛污染来源及检测方法新进展[J]. 上海预防医学, 2009, 21(9): 453-455.
- [4] Mirdamadi S, Rajabi A, Khalilzadeh P, et al. Isolation of bacteria able to metabolize high concentrations of formaldehyde[J]. Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6/7): 1299-1301.
- [5] Azachi M, Henis Y, Oren A, et al. Transformation of formaldehyde by a *Halomonas* sp.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(6): 548-553.
- [6] Doronina NV, Ezhov VA, Trotsenko YA. Aerobic biodegradation of formaldehyde, methanol and methylamine by immobilized *Methylobacterium extorquens* cells[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 1997, 33(2): 138-141.
- [7] Qu MB, Bhattacharya SK. Toxicity and biodegradation of formaldehyde in anaerobic methanogenic culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 55(5): 727-736.
- [8] Mitsui R, Omori M, Kitazawa H, et al. Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, *Methylobacterium* sp. MF1: Enzymatic analysis related to C_1 metabolism[J]. J Biosci Bioeng, 2005, 99(1): 18-22.
- [9] Adroer N, Casas C, de Mas C, et al. Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 33(2): 217-220.
- [10] 徐云, 金晶, 郑重, 等. 高活性高耐受甲醛降解菌株的分离鉴定及降解条件研究[J]. 环境科学, 2010, 31(10): 2481-2486.
- [11] 吕阳, 刘京, 吕炳南, 等. 生物滴滤塔处理甲醛和三苯混合气体的实验研究[J]. 天津大学学报, 2007, 40(10): 1215-1219.
- [12] Eiroa M, Kennes C, Veiga MC. Formaldehyde biodegradation and its inhibitory effect on nitrification[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2004, 79(5): 499-504.
- [13] 黄赛花, 陈能场, 胡文锋, 等. 一株甲醛降解真菌 *Aspergillus* spp.H4 的分离鉴定[J]. 生态环境, 2007, 16(4): 1175-1179.
- [14] Yurimoto H, Kato N, Sakai Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism[J]. Chem Rec, 2005, 5(6): 367-375.
- [15] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版增补版. 北京: 中国环境科学出版社, 2003.
- [16] 国家环境保护总局. 空气和废气监测分析方法[M]. 第四版增补版. 北京: 中国环境科学出版社, 2003.
- [17] 胡杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431-437.