

文章编号: 1000-5862(2012)01-0035-05

# 丙烯酰胺降解菌的筛选及优势菌株降解条件优化

李俊叶, 王筱兰\*, 邹峥嵘

(江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022)

**摘要:** 通过富集培养和选择培养分离, 从江西昌九农科化工有限公司厌氧池废水中筛选分离到能够降解丙烯酰胺单体的菌株, 对菌株的培养基配方及降解工艺条件进行优化. 测定菌株对丙烯酰胺的降解性能, 得到一株降解效果较好的菌株 AM-4, 通过生理生化特性初步鉴定其属于葡萄球菌属.

**关键词:** 丙烯酰胺; 降解; 菌株; 筛选; 鉴定

**中图分类号:** Q 936

**文献标志码:** A

## 0 引言

丙烯酰胺(Acrylamide, 简称 AM)是一种无气味的白色晶体, 在工业上主要用于合成聚丙烯酰胺(PAM). PAM由于具有特殊的物理化学性质, 因而广泛应用于石油开采、污水处理、造纸、矿产、医药、农业、纺织等行业, 享有“百业助剂”之称. 丙烯酰胺能对周围神经系统和中枢神经系统产生毒性, 因此, 常人每天允许接触的最大量不超过  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[1]</sup>. 现代化工、医药等行业废水中常含有丙烯酰胺, 对环境造成污染, 直接危害人类健康. 利用微生物处理废水中的污染物是目前最常用的废水处理方法, 也是比较重要和有发展前途的一种处理方法<sup>[2]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 分离菌种的样品采集

样品采自江西省昌九农科化工有限公司厌氧池活性污泥.

### 1.2 培养基

1.2.1 富集培养基 采用最基础的细菌培养基——牛肉膏蛋白胨液体培养基.

1.2.2 选择培养基 配方如下:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.00 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.50 g,  $\text{NaCl}$  0.30 g,  $\text{CaCl}_2$  0.10 g,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g, 丙烯酰胺 0.50 g, 水 1 000 mL, pH 值为 7.0. 选择性固体培养基: 向上述培养基中加入 15~20 g 琼脂粉,

制成平板. (注: 丙烯酰胺过滤除菌, 该培养基以丙烯酰胺作为菌种生长的唯一碳源和氮源.)

### 1.3 微生物菌种的筛选<sup>[3]</sup>

水样接入富集培养基, 30 °C 摇床培养 2 d, 将富集培养基中的培养液 1 mL 接入 30 mL 选择性液体培养基中, 30 °C 100 r/min 摇床培养 3 d, 取培养液进行梯度稀释后平板划线培养, 根据菌落形态挑选出现频率较高的菌株 AM-3、AM-4、AM-5.

### 1.4 微生物菌种的分离、纯化<sup>[4]</sup>

将菌株 AM-3、AM-4、AM-5 在选择性液体培养基中培养, 分别取培养液进行梯度稀释, 制成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$  9 个梯度, 每个梯度取 0.1 mL 涂布在 3 个重复的选择性固体培养基平板上, 于 30 °C 培养 3 d, 分离、纯化出 AM-3、AM-4、AM-5 的单菌落, 转至斜面试管上编号保存.

### 1.5 菌株降解丙烯酰胺的测定方法<sup>[5]</sup>

为了确定丙烯酰胺的吸收波长, 配制了不同浓度丙烯酰胺溶液, 在 UNICO UV-2100 紫外分光光度计上进行扫描, 确定丙烯酰胺的吸收波长为 260 nm. 以下实验中均采用 260 nm 的波长.

### 1.6 菌株生理生化性质测定

鉴定主要包括革兰氏染色法、芽孢染色法、荚膜染色、接触酶试验、甲基红试验、V-P 实验、明胶液化、葡萄糖氧化发酵实验. 具体操作方法参考《简明第八版伯杰细菌鉴定手册》<sup>[6]</sup>及《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup>.

收稿日期: 2011-05-28

基金项目: 江西省科技支撑计划(2009JX00564)资助项目.

作者简介: 王筱兰(1965-), 女, 江西景德镇人, 教授, 博士, 主要从事微生物工程方面的研究.

### 1.7 菌株培养基及生长条件优化

丙烯酸胺是具有生长毒性的物质,因此,需向菌株培养液中添加营养物质达到促进微生物生长的要求,从而降解丙烯酸胺.通过实验确定了菌株培养液外加碳源、氮源、磷源的物质及其最佳浓度,并且优化了菌株在纯培养条件下降解丙烯酸胺的最佳生长条件<sup>[8-9]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种分离及生理生化性质鉴定

在以丙烯酸胺作为唯一碳源及氮源的选择性培养基上,分离得到3株出现频率较高的菌株,菌株编号分别为 AM-3、AM-4、AM-5,形态及生理生化性质见表 1.

表 1 菌落的形态及生理生化特征

实验项目	AM-3	AM-4	AM-5
颜色	淡黄色	乳黄色	淡黄色
透明度	否	否	半透明
大小	小	大	小
表面形态及湿润度	光滑、干燥	光滑、湿润	光滑、湿润
边缘形态	不规则	规则	规则
形状	杆状	球状	球状
革兰氏染色	阳性	阳性	阳性
芽孢染色	阴性	阴性	阴性
荚膜染色	阴性	阴性	阴性
接触酶试验	阳性	阳性	阳性
甲基红试验	阴性	阴性	阴性
V-P 试验	阴性	阴性	阴性
明胶液化实验	阴性	阳性	阳性
葡萄糖发酵试验	产酸产气	产酸不产气	产酸不产气

### 2.2 各菌株单独及组合接种降解丙烯酸胺效果

在丙烯酸胺浓度为 500 mg/L 的 50 mL 选择培养基中,接种量按 2%,将 3 株菌培养液按等量接种原则进行组合培养,单株菌接种量为 1.000 mL,2 株菌混合培养,各单株菌接种量为 0.500 mL,3 株菌混合培养各单株菌接种量为 0.333 mL,确定单株菌株以及菌株组合对丙烯酸胺的降解效果.

通过实验可知,菌株组合后的降解效果没有叠加,反而降解效果最差,可能是由于3株菌之间存在拮抗作用或者培养液营养成分不足,3株菌之间存在营养资源竞争,不能满足菌株最佳生长条件而使得降解效率差.由图 1 可以得出以下结论:菌株 AM-5 可能与 AM-3、AM-4 2 株菌之间存在拮抗作用.在含有 AM-5 菌株的组合培养中,丙烯酸胺的降解效

果都低于单株菌的丙烯酸胺降解效果;菌株 AM-3 与菌株 AM-4 组合后的丙烯酸胺降解效果与菌株 AM-4 单株菌的降解效果大致相等,2 菌株组合后降解率达到 72.5%,AM-4 降解效率为 72.0%;单株菌 AM-5 的降解效率为 60.0%.考虑到菌株间因营养竞争而影响丙烯酸胺降解效率,本实验采用单株菌进行优化测试,选取降解效率较高的 AM-4 进一步测定降解性能.

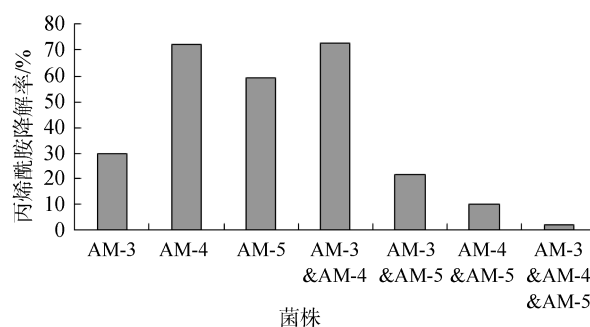


图 1 单株菌株及菌株组合培养对丙烯酸胺的降解率

### 2.3 AM-4 菌株降解丙烯酸胺的培养基条件优化

2.3.1 碳源 本实验研究选用葡萄糖、蔗糖、液体石蜡作为碳源.所选碳源以 0.2 g/L 的量分别加入选择性液体培养基中. AM-4 菌株在 30 ℃、100 r/min 摇床上培养,测定丙烯酸胺的降解率.

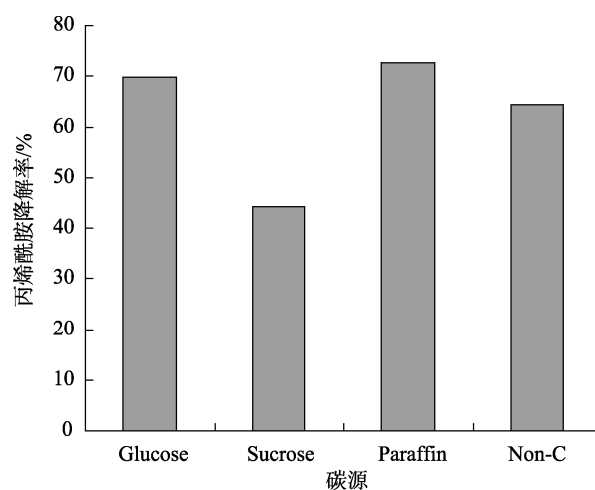


图 2 不同的碳源对丙烯酸胺降解率的影响

通过分析实验结果的数据可知,加入石蜡的一组丙烯酸胺降解效果最好,加葡萄糖的一组丙烯酸胺降解效果较加入石蜡一组的效果略差.加入蔗糖和不加碳源的 2 组,丙烯酸胺的降解效果相对较低,原因可能是葡萄糖是比较容易利用的碳源,菌株优先利用葡萄糖从而降低了对丙烯酸胺的降解.本实

验研究的最终目的是将筛选菌株应用于工业污水处理, 所以选用石蜡作为外加碳源。

以石蜡为碳源, 进一步研究丙烯酰胺降解菌株在不同的石蜡浓度条件下对丙烯酰胺的降解效果。

由图 3 可以看出, 当液体石蜡浓度为 0.4 g/L 时, 丙烯酰胺的降解率最高, 原因可能是低碳源时菌株营养不好, 生长受到抑制; 若液体石蜡浓度过高, 菌株以石蜡作为碳源, 从而对丙烯酰胺的利用率降低。

**2.3.2 氮源** 本研究选用  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、蛋白胨进行实验, 所选氮源以 0.2 g/L 的用量分别加入选择性液体培养基中, 30 °C、100 r/min 摇床培养, 测定丙烯酰胺的降解率。

由图 4 知, 加入蛋白胨后, 丙烯酰胺的降解率比没加氮源的降解率还要低, 加入其他 4 种氮源后降解

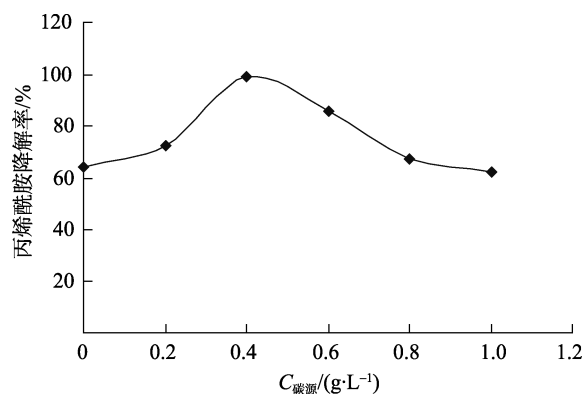


图 3 碳源浓度对丙烯酰胺降解率的影响

率都比不加氮源的降解效率高。其中以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为外加氮源的降解效果最好。所以本实验把  $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为氮源。

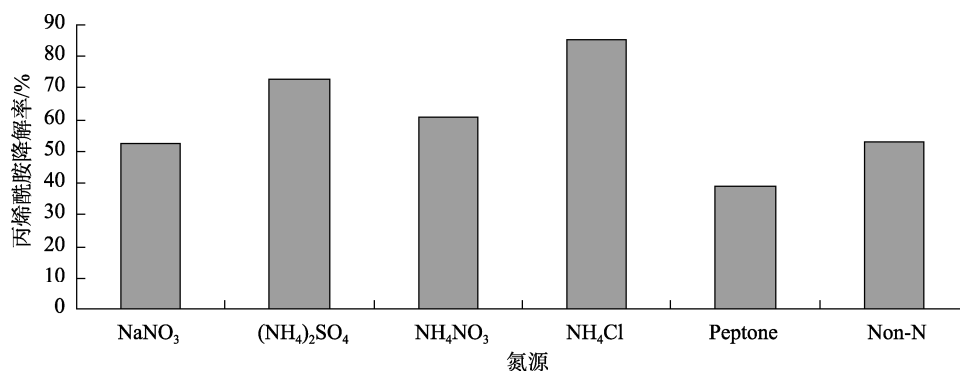


图 4 不同的氮源对丙烯酰胺降解率的影响

以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源, 进一步研究了丙烯酰胺降解菌株在不同浓度  $\text{NH}_4\text{Cl}$  条件下对丙烯酰胺的降解情况。

如图 5 所示, 在  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为 0.2~0.4 g/L 时, 丙烯酰胺降解率都比较高, 所以该实验在确定选择附加氮源  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的浓度时, 考虑了碳源、磷源的影响, 最佳氮源浓度在磷源选择优化过程中确定。

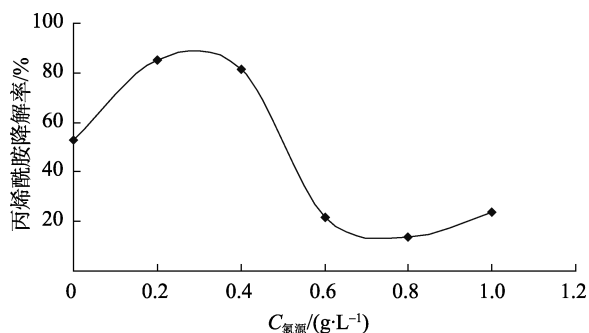


图 5 不同氮源浓度对丙烯酰胺降解率的影响

**2.3.3 磷源** 确定了最佳碳源、氮源后, 进一步研究了菌株对磷源的利用。本实验研究选用了  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  及  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  缓冲体系作为磷源, 并且以不加磷源的培养基作对照实验。所选用磷源都以 0.5 g/L 的用量分别加入选择性液体培养基中, 30 °C、100 r/min 摇床培养, 测定降解率见图 6 与图 7。

当外加氮源  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为 0.2 g/L 时, 各种磷源对丙烯酰胺的降解率如图 6 所示。

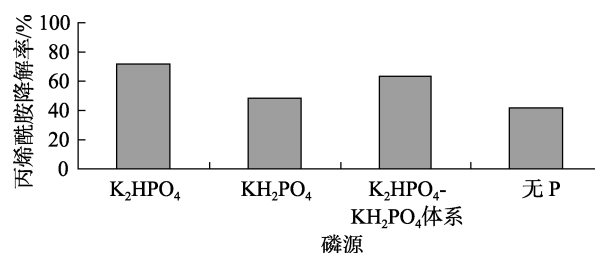


图 6  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为 0.2 g/L 时不同磷源对丙烯酰胺降解率的影响

当外加氮源  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为  $0.4 \text{ g/L}$  时, 各种磷源对丙烯酰胺的降解率如图 7 所示。

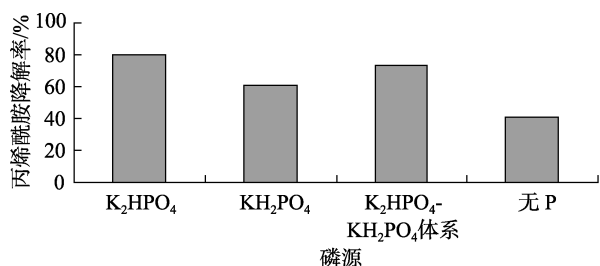


图 7  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为  $0.4 \text{ g/L}$  时不同磷源对丙烯酰胺降解率的影响

由图 6 与图 7 可以看出, 不添加磷源时, 丙烯酰胺的降解率较加入磷源的 3 组低。因为细菌在丙烯酰胺的降解过程中需要消耗大量的 ATP 以及相关的活性酶, 所以需要有充足的磷源补充这些消耗。实验研究表明, 以  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  为磷源, 当外加氮源  $\text{NH}_4\text{Cl}$  浓度为  $0.4 \text{ g/L}$  时丙烯酰胺降解率最高, 达到  $80.3\%$ 。故本实验选用  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  为磷源。

确定  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  为磷源, 进一步研究了  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的浓度对菌株降解丙烯酰胺的影响(见图 8)。通过对实验数据的分析可知, 当  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  浓度为  $0.5 \text{ g/L}$  时丙烯酰胺降解率趋于稳定, 所以确定  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  浓度为  $0.5 \text{ g/L}$ 。

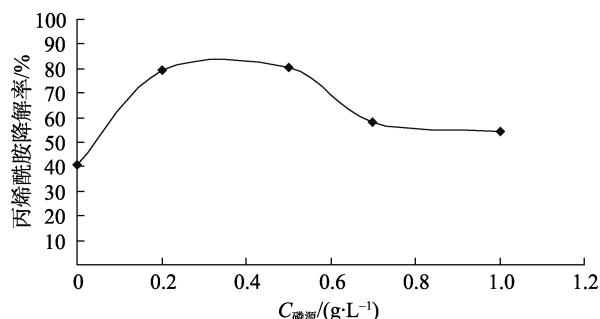


图 8 不同磷源浓度对丙烯酰胺降解率的影响

## 2.4 AM-4 菌株生长条件优化

2.4.1 培养时间对丙烯酰胺降解率的影响 测定了 AM-4 在最佳碳源、氮源、磷源及浓度优化后的选择性培养基生长过程中随时间变化对 AM 降解率的变化。通过对实验数据分析可知, 丙烯酰胺降解率在  $10\sim 30 \text{ h}$  内呈上升趋势, 之后趋于稳定(见图 9), 所以本实验确定  $24 \text{ h}$  为丙烯酰胺降解的最佳时间。

2.4.2 接种量对丙烯酰胺降解率的影响 将 AM-4 菌株分别按不同的体积分数接种到选择性液体培养基。在已确定的优化后的条件下培养  $24 \text{ h}$  后测定丙烯酰胺的降解率。实验结果见图 10。

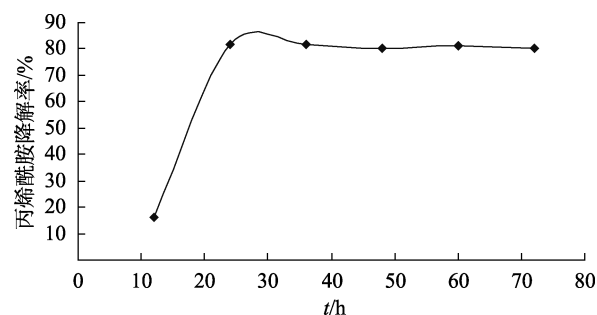


图 9 丙烯酰胺降解率随时间的变化曲线

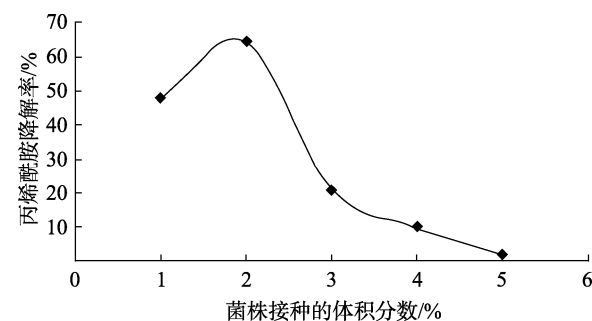


图 10 菌株接种量对丙烯酰胺降解率的影响

由图 10 可知, 当接种量的体积分数大于  $2\%$  时丙烯酰胺降解率开始下降。这是因为大量接种会使微生物对营养物质的需求增加, 从而使每个微生物能利用的营养物质减少, 限制了其生长, 影响了丙烯酰胺的降解率。

2.4.3 菌株培养温度对丙烯酰胺降解率的影响 实验测定了不同培养温度下 AM-4 菌株对丙烯酰胺的降解效果(见图 11)。通过测定丙烯酰胺的降解率, 最终确定菌株对丙烯酰胺溶液降解程度较高的温度范围是  $30\sim 35^\circ\text{C}$ 。

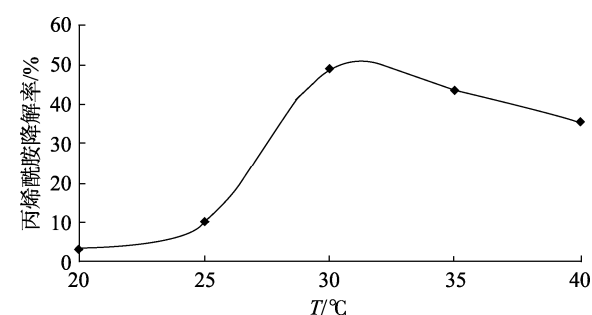


图 11 不同培养温度下菌株对丙烯酰胺降解率的影响

2.4.4 初始 pH 值对丙烯酰胺降解率的影响 分别配制丙烯酰胺浓度  $500 \text{ mg/L}$  初始 pH 值为  $5.0\sim 9.0$  的培养基, 通过实验确定 AM-4 菌株在不同初始 pH 值条件下对丙烯酰胺的降解情况(见图 12)。实验结果表

明, 不同的初始 pH 值菌株对丙烯酰胺的降解率也不同, 在初始 pH 值为 7.0~7.5 时, 丙烯酰胺的降解率最高, 这与 M. Y. Shukor 等<sup>[9]</sup>的研究报道结果一致. 过高或过低的 pH 值都不利于丙烯酰胺的降解.

2.4.5 溶解氧对丙烯酰胺降解率的影响 在实验室摇瓶试验中, 测定和控制溶液含氧量都比较困难, 一般情况下, 都是通过改变摇床的转速来调节液体培养基的溶解氧, 而通过提高转速来达到提高液体培养基中溶解氧的量是一种常用方法, 不同转速对菌株的生长以及丙烯酰胺降解率的影响结果见图 13.

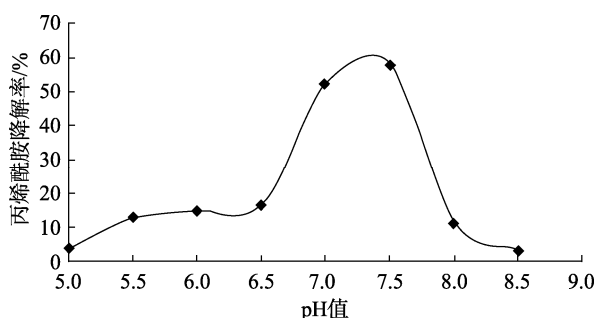


图 12 不同 pH 值对丙烯酰胺降解率的影响

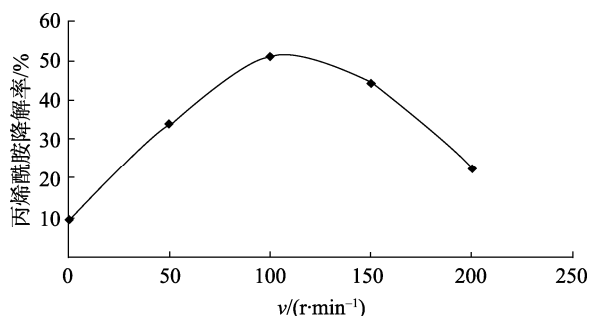


图 13 不同的摇床转速对丙烯酰胺降解率的影响

从图 13 可以看出, 该菌株是兼性好氧菌, 随着供氧量的增加, 生物量也迅速增加, 但到一定程度菌株生长又会受到抑制, 生物量下降, 丙烯酰胺降解率也下降. 当摇床转速为 100 r/min 时, AM-4 菌株降解丙烯酰胺的效率最高, 达到 50%; 当摇床转速大于 200 r/min 时, 丙烯酰胺降解率迅速下降, 可能是因为摇床转速快加大了溶氧量, 使得菌株的内源呼吸速率增快, 使菌株迅速到达衰亡期<sup>[10-11]</sup>.

### 3 结论

(1) 通过实验研究, 筛选得到了 3 株丙烯酰胺降

解菌株, 分别命名为 AM-3、AM-4、AM-5. 生理生化性质鉴定, AM-3 属于棒杆菌属, AM-4 属于葡萄球菌属, AM-5 属于微球菌属.

(2) 通过对 3 株菌株分别培养及菌株组合培养后得到: AM-4 菌株对丙烯酰胺的降解效果最好, 在丙烯酰胺浓度为 500 mg/L 的溶液中其降解率最高可达到 72%.

(3) 通过对 AM-4 菌株降解丙烯酰胺的生长条件的优化实验表明, 确定浓度为 0.4 g/L 时液体石蜡为外加碳源, 浓度为 0.5 g/L 的  $K_2HPO_4$  为磷源,  $NH_4Cl$  为氮源. 最佳降解时间为 24 h, 接种量为 2%, 温度为 30~35 °C, 初始 pH 值为 7.0~7.5, 摇床转速为 100 r/min.

### 4 参考文献

- [1] 张学佳, 纪巍, 王宝辉, 等. 丙烯酰胺生态毒理行为研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2008(3): 217-223.
- [2] 孔繁翔. 环境生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [3] 李志茹, 武艷文. 丙烯酰胺降解微生物的研究: 降解菌的分离、筛选 [J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(2): 40-42.
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [5] 刘铭, 高毅, 曹竹安. 紫外光谱法实时测定脲水合酶的催化动力学 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26 (12): 2284-2288.
- [6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 包木太, 骆克峻, 耿雪丽, 等. 聚丙烯酰胺降解菌的筛选及降解性能评价 [J]. 西安石油大学学报, 2008, 23(2): 71-74.
- [9] Shukor M Y, Gusmanizar N, Ramli J, et al. Isolation and characterization of an acrylamide-degrading Antarctic bacterium [J]. Journal of Environmental Biology, 2009, 30(1): 107-112.
- [10] Rishi Shanker, Cherla Ramakrishna, Prahlad K Seth. Microbial degradation of acrylamide monomer [J]. Arch Microbiol, 1990(154): 192-198.
- [11] Wang Chunchin, Lee Chimei. Isolation of the acrylamide denitrifying bacteria from a wastewater treatment system manufactured with polyacrylonitrile fiber [J]. Curr Microbiol, 2007(55): 339-343.

## The Screening and Advantage of Degradation Process Optimization of Acrylamide Degradation Bacterium

LI Jun-ye, WANG Xiao-lan\*, ZOU Zheng-rong

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

**Abstract:** Through the enrichment training and selection cultivation separation, from the anaerobic pond wastewater of Jiangxi Chang Nine Agricultural Chemical Co. LTD, the bacteria which can degrade the acrylamide monomer was obtained, then the culture medium and growth conditions was optimized. Measure the degradation performance of strains, AM-4 which has better degradation performance was got, physiological and biochemical characteristics identified belong to *staph*.

**Key words:** acrylamide; degrade; strains; screen; identification

(责任编辑: 刘显亮)

---

(上接第 24 页)

## The Optimization of Polyacrylamide Inverse Emulsion Polymerization by Response Surface Methodology

WANG Xue-fang<sup>1,2</sup>, LIU Jian-ping<sup>2\*</sup>, YANG Xiao-min<sup>2</sup>

(1. Department of Engineering Technology, Gongqing College of Nanchang University, Jiujiang Jiangxi 332020, China;

2. Department of Chemistry, East China Jiaotong University, Nanchang Jiangxi 330013, China)

**Abstract:** In order to optimize the polyacrylamide polymerization technology, the effect of monomer mass fraction, initiator mass fraction and reaction temperature on polymerization process was discussed by response surface methodology using quadratic regression orthogonally rotational combination test design. And then the prediction model was evaluated by DPS data processing software. The results indicated that monomer mass fraction of 0.4%, initiator mass fraction of 0.2%, reaction temperature of 41.6°C were found optimum, the polymer's intrinsic viscosity predicted of 14.00 dL·g<sup>-1</sup>, in good agreement with the experimental value of intrinsic viscosity 12.25 dL·g<sup>-1</sup>. Therefore, the model of the polyacrylamide polymerization technology optimized by response surface methodology is very reliable.

**Key words:** polyacrylamide; inverse emulsion polymerization; response surface methodology; intrinsic viscosity

(责任编辑: 刘显亮)