3 株霉菌对甲醛转化能力的研究

黄赛花,陈能场*,毕鸿亮 (广东省生态环境与土壤研究所,广东 广州 510650)

摘要：利用含甲醛的选择性培养基分离并鉴定出 3 株甲醛转化霉菌 *Trichoderma viride* H1,*Penicillium javanicum* H2,*Aspergillus flavus* H4,均能生长在以甲醛为唯一碳源的培养基上,并探讨了其最适生长 pH 值,研究了 3 株霉菌的甲醛转化能力.结果表明,3 株霉菌的最适 pH 值分别为 4.5,5.0,5.5.30℃,160r/min 摇床培养 144h,H1、H2、H4 可将甲醛浓度由 1047,1059,1241mg/L 转化至 7.6,317,4.0mg/L,转化率分别为 99.3%,70.1%,99.7%.

关键词：甲醛转化；转化曲线；转化率；微生物；霉菌

中图分类号：X172,Q939.9 文献标识码：A 文章编号：1000-6923(2008)12-1111-05

Formaldehyde-degrading ability of three strains of fungus. HUANG Sai-hua, CHEN Neng-chang*, BI Hong-liang (Guangdong Institute of Eco-environmental and Soil Science, Guangzhou 510650, China). *China Environmental Science*, 2008,28(12)：1111~1115

Abstract：Three strains of formaldehyde-degrading fungus (H1, H2, H4) were isolated and identified as *Trichoderma viride*, *Penicillium javanicum* and *Aspergillus flavus* on selective media containing formaldehyde. All the isolated strains could grow on medium with formaldehyde as the sole carbon source. The optimal pH for their growth and their formaldehyde-degradation ability were investigated. The optimal pH were 4.5, 5.0, 5.5 for H1, H2, H4, respectively. Atter shaking culturing 144h, at30℃ formaldehyde degraded from 1047, 1059, 1241 mg/L to 7.6, 317, 4.0 mg/L by H1, H2, H4 with the degradation rate of 99.3%, 70.1%, 99.7%, respectively.

Key words：formaldehyde-degrading；degrading curves；degradation rate；microbe；fungus

甲醛作为粘合剂被广泛应用于胶合板等家装材料上[1-2],甲醛产生的环境污染对人体健康的危害主要表现为免疫功能异常、肝损伤、肺损伤及神经中枢系统受到影响,还能致胎儿畸形[3-5].国际癌症研究机构(IARC)已将甲醛上升为第 1 类致癌物质——对人致癌物质[6],因此对于甲醛污染的防治刻不容缓.目前国外关于甲醛微生物转化的研究较多,早期报道的多是低浓度转化菌[7-11].近年来高浓度甲醛转化菌也时有报道[12-13],然而甲醛转化霉菌方面的研究报道远远少于细菌、酵母菌等微生物.本研究对 3 株具有甲醛转化能力的霉菌的最适生长条件进行探讨,并考察了其对不同浓度甲醛的转化率.

1 材料与方法

1.1 培养基配制

基本培养基配方:葡萄糖 10g/L, $NaNO_3$ 2g/L, K_2HPO_4 1g/L, $MgSO_4·7H_2O$ 0.5g/L,KCl 0.5g/L, $FeSO_4·7H_2O$ 0.01g/L,酵母膏 0.1g/L,甲醛标准溶液 1100mg/L.pH 值 6.0[13].

1.2 分离与鉴定

淤泥样取自家具厂未处理出水口处,在超净工作台上,取 10g 淤泥样置于 90mL 无菌水中,振荡 15min,静置 20s,取 1mL 上清液接种于培养基里,160r/min,30℃的条件下摇床培养 5d,生长的霉菌经多次用 PDA 培养基平板划线,直至分离到单菌落为止.并观察其平板生长特征,镜检孢子形态特征,结合相关分子鉴定手段,作进一步的鉴定.

1.3 最佳生长 pH 值的测定

选取广口 150mL 三角瓶,配制 pH 值分别为 4.0,4.5,5.0,5.5,6.0 的液体基本培养基,瓶口用无

收稿日期：2008-04-30

基金项目：广东省科技攻关项目(2006A36703004)

* 责任作者, 研究员, ncchen@soil.gd.cn

菌封口培养膜封口(环凯公司生产的双层膜,上有直径 0.6cm 的圆孔 2 个,孔中间有直径 3cm、孔径<0.2μm 的无菌滤纸),培养一级种子[475nm 处吸光值(OD)H1 为 0.189,H2 为 0.168,H4 为 0.212].除空白外,分别接入一级种子 5mL,30 ℃,160r/min 摇床培养,在接种后的 0,24,48,72,96,120,144h 取样,每次取 2 瓶测量菌丝干重,OD 值采用 TU-1800 型紫外可见分光光度计测定,菌丝干重采用重量法测定[14].

1.4 甲醛转化效果

选取广口 150mL 三角瓶,配制基本培养基,甲醛浓度分别设置处理 1,约 1100mg/L;处理 2,约 1400mg/L;处理 3,约 2300mg/L;处理 4,约 2900mg/L.$C_{甲醛}$以实际测量值为准.pH 值分别选取 1.3 节中测得的最适 pH 值,瓶口用无菌封口培养膜封口,除空白外,每瓶接入一级种子 5mL,30℃, 160r/min 摇床培养.在接种后的 0,24,48,72,96,120,144h 取样,每次取 3 瓶,其中 1 瓶为空白, 7000r/min 离心 15min,过滤,滤液检测 $C_{甲醛}$,滤纸和霉菌一起转入已称至恒重的烧杯中测菌丝干重.$C_{甲醛}$的检测用 AHMT 分光光度法[15],结果以实际测量数据为准,菌丝干重采用重量法测量[14].

1.5 以甲醛为唯一碳源的试验

配制以甲醛为唯一碳源的培养基,其余培养基成分同基本培养基.选取广口 150mL 三角瓶,每株菌 2 个平行,其余操作同 1.4 节,测量甲醛浓度和菌丝干重.

1.6 甲醛脱氢酶的测定

取培养 7d 的菌液 25mL 于 4℃,7000r/min,离心 15min,去除上清液,并用 25mL 的 0.05mol/L,pH 值为 7.5 的磷酸钾缓冲溶液洗涤菌丝体 2 次,然后于 4℃,7000r/min,离心 15min,收集,以 1.5 倍菌体体积加入少量的缓冲液,置于冰浴中用超声波细胞粉碎机破碎细胞,再以 4℃,15000r/min,离心 30min,除去细胞碎片,得胞内酶粗提液.

在体积为 1.5mL 的石英玻璃比色皿中,加入以下溶液:去离子水 122μL,0.05mol/L, pH7.5 的磷酸钾缓冲液 815μL,5.7×10^{-3}mol/L β-NAD 205μL, 8.8mg/L 甲醛 41μL.混合均匀,37℃恒温,用紫外可见分光光度计在 340nm 处测定至稳定.加入胞内酶粗提液 50μL(空白 0μL).立即混匀并记录 OD_{340} 空白和样品的吸光值,测定 37℃反应 5min 的空白和样品的吸光值,计算ΔOD_{340}/min (与空白比较其最大的速率),酶结果用单位/mg 菌丝表示.

2 结果与讨论

2.1 分离鉴定结果

共分离到 3 株霉菌,编号为 H1、H2、H4.作者前期工作结果表明,H1 的 18S rDNA 序列与绿色木霉(*Trichoderma viride*)同源率达 99.6%,其培养特征及显微特征与绿色木霉(*Trichoderma viride*)最相似.H2 的 18S rDNA 序列与爪哇青霉(*Penicillium javanicum*)的有性世代爪哇正青霉(*Eupenicillium javanicum*)同源率达 99.4%,其培养特征及显微特征与爪哇青霉(*Penicillium javanicum*)最相似.H4 的 18S rDNA 序列与黄曲霉(*Aspergillus flavus*)同源率达 99.8%,其培养特征及显微特征与黄曲霉(*Aspergillus flavus*)最相似.

2.2 最佳生长 pH 值

霉菌 H1、H2、H4 在 5 种不同 pH 值培养基中培养 144h(图 1),菌丝干重最适 pH 值分别为 4.5,5.0,5.5.

2.3 甲醛转化特性

由图 2 可见,144h 空白甲醛挥发很少,计算甲醛转化率时挥发损失可以忽略不计.

霉菌 H1 接种后 144h(图 2A,图 3A),处理 1 的 $C_{甲醛}$从 1047mg/L 降至 7.6mg/L,转化率为 99.3%,处理 2 从 1365mg/L 降至 42mg/L,转化率为 96.9%,这两条转化曲线均是 96h 内,$C_{甲醛}$下降迅速,菌丝增长缓慢,96h 后,菌丝增长迅速,但 $C_{甲醛}$下降缓慢;处理 3 的 $C_{甲醛}$从 2333mg/L 降至 628mg/L,转化率为 73.1%,处理 4 从 2934mg/L 降至 949mg/L,转化率为 67.7%,处理 3 和处理 4 都是 48h 内,$C_{甲醛}$下降缓慢,处理 3 在 48h 后,处理 4 在 72h 后,$C_{甲醛}$下降迅速,菌丝干重一直增长缓慢.

霉菌 H2 接种后 144h(图 2B,图 3B)在 4 个不同浓度的处理中,转化率分别为 70.1%、53.4%、51.3%、28.2%, $C_{甲醛}$没有快速下降期,菌丝干重上升也很平缓.

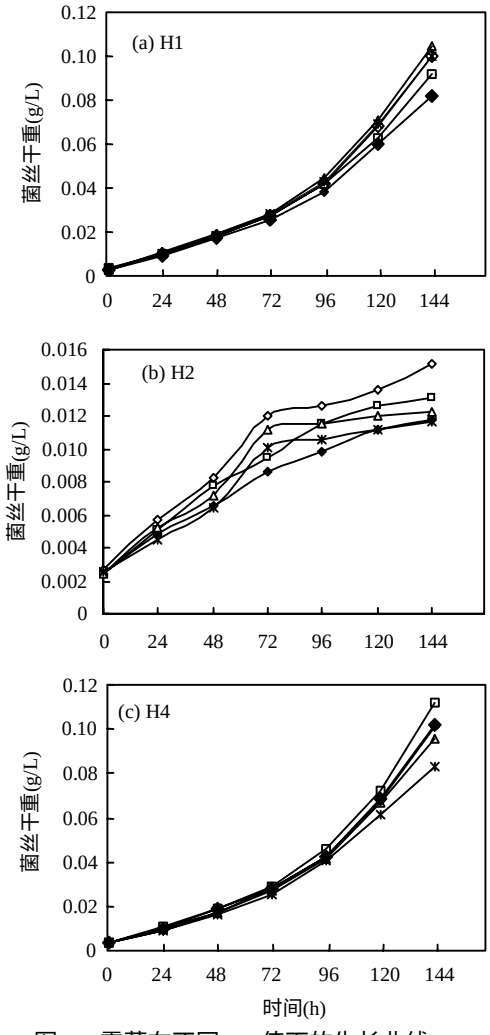
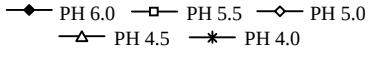


图 1　霉菌在不同 pH 值下的生长曲线

Fig.1　Growth diagram of different pH value



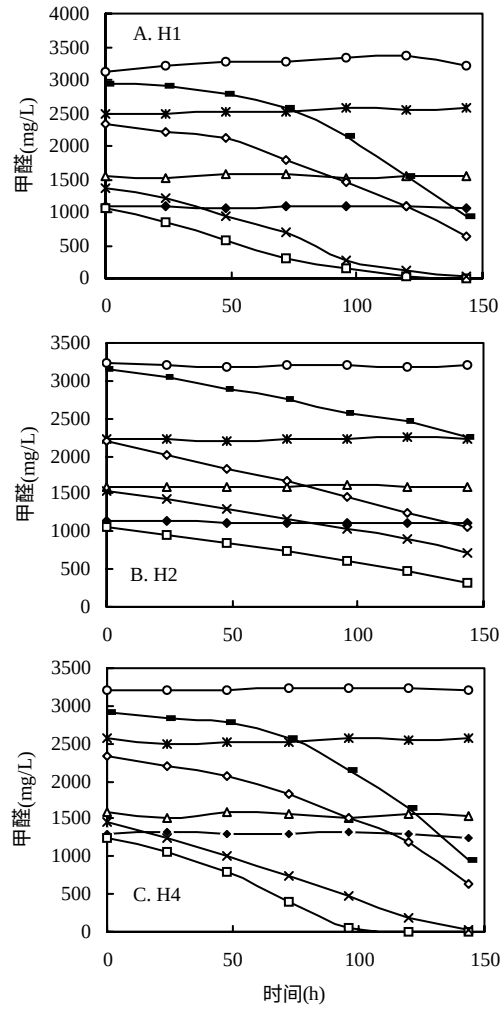
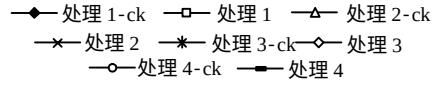


图 2　不同 $C_{甲醛}$的转化曲线

Fig.2　Degradation diagram of four concentration



霉菌 H4 接种后 144h(图 2C,图 3C),处理 1 的 $C_{甲醛}$从 1241mg/L 降至 4.0mg/L,转化率为 99.7%,处理 2 从 1465mg/L 降至 28mg/L,转化率为 98.1%,处理 1 和处理 2 分别在 96h、120h 内,$C_{甲醛}$下降迅速,菌丝增长缓慢,96h、120h 后菌丝干重增长迅速,但 $C_{甲醛}$下降缓慢;处理 3 的 $C_{甲醛}$从 2333mg/L 降至 628mg/L,转化率为 73.1%,处理 4 的 $C_{甲醛}$从 2922mg/L 降至 949mg/L,转化率为 67.7%,处理 3 和处理 4 都是 48h 内,$C_{甲醛}$下降缓慢,48h 后,$C_{甲醛}$下降迅速,菌丝干重增长一直缓慢.也就是说,菌丝干重的快速增长滞后于 $C_{甲醛}$的快速下降.

转化曲线的规律:H1、H4 的转化曲线总的规律是低浓度甲醛转化率高,高浓度甲醛转化率低;在高浓度甲醛处理中,甲醛的初始浓度接近霉菌的甲醛耐受极限,所以在培养前期影响了霉菌对甲醛的利用,抑制了霉菌的生长;在培养的 144h 内,高浓度甲醛转化速率是由慢到快,低浓度甲醛转化速率是由快到慢.H2 的甲醛转化曲线没有出现快速下降,菌丝干重曲线上升也很平缓.

转化曲线出现规律性的原因:霉菌 H1 和 H4 在处理 3、处理 4 中,有一个从缓慢下降转入到快速下降的值,暂且叫拐点,这个拐点 H1 是 1500mg/L

左右,H4 是 2800mg/L 左右.出现这个拐点的原因应该是前期高浓度的甲醛抑制了菌丝的繁殖,霉菌以甲醛和葡萄糖为碳源的同时,优先利用甲醛;当 H1, H4 的 $C_{甲醛}$分别从 1500,2800mg/L 降至约 50mg/L 时,霉菌以甲醛和葡萄糖同时为碳源,$C_{甲醛}$快速下降,菌丝干重也快速上升;当 $C_{甲醛}$降至 50mg/L 以下时,$C_{甲醛}$下降速度减缓,菌丝干重还在快速上升,可能是 $C_{甲醛}$已不能再抑制菌丝生长,霉菌优先利用葡萄糖为碳源.H2 的转化曲线快速下降期不明显,可能是碳源代谢变化规律不明显.

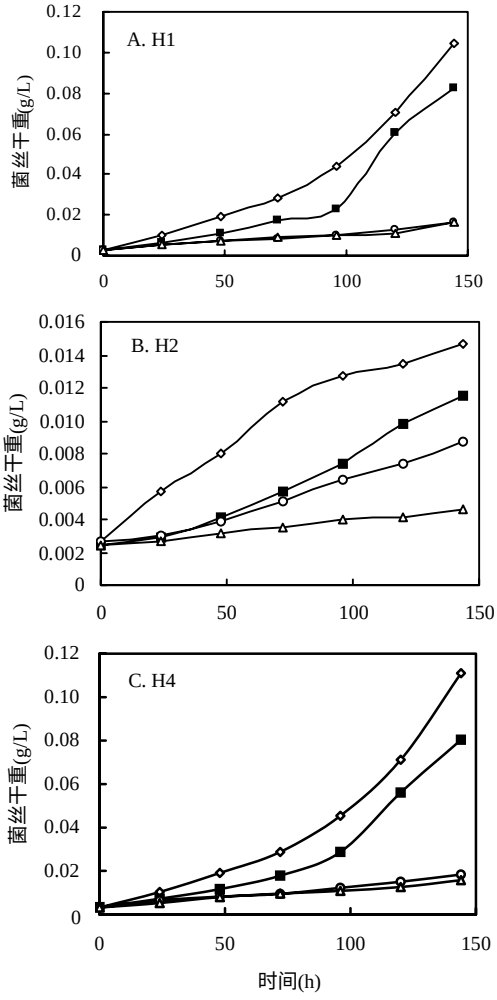


图 3 不同 $C_{甲醛}$下的生长曲线

Fig.3 Growth diagram of four formaldehyde concentration

2.4 以甲醛为唯一碳源的试验结果

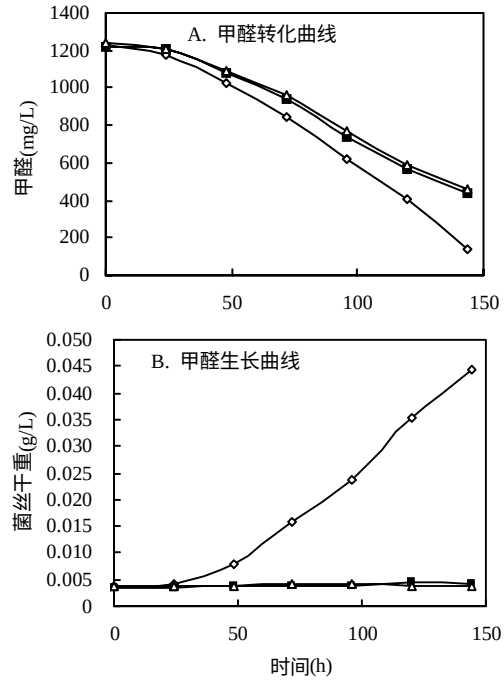


图 4 以甲醛为唯一碳源的甲醛转化和生长曲线

Fig.4 Growth degradation curve of the three fungus based on formaldehyde as their sole carbon source

在 144h 培养过程中(图 4),H1 的 $C_{甲醛}$从 1226mg/L 降至 142mg/L,转化率为 88.4%;H2 从 1214mg/L 降至 436mg/L,转化率为 64.1%;H4 从 1238mg/L 降至 458mg/L,转化率为 63.0%.其中 H1 菌丝干重从 0.0038 上升到 0.0443mg/L,没有测到菌丝干重快速增长的数据,但根据 2.3 中甲醛的转化数据可以看出,菌丝干重的快速增长滞后于甲醛浓度的快速下降,H2、H4 的菌丝干重增长几乎测不出,可能是受甲醛抑制的结果.

2.5 甲醛脱氢酶活性的测定

通过以甲醛为底物、β-NAD 为辅酶的甲醛脱氢酶实验,测得 3 株霉菌的甲醛脱氢酶活性分别是 H1 为 24.8 单位/mg 菌丝,H2 为 14.7 单位/mg 菌丝,H4 为 19.9 单位/mg 菌丝,表明这 3 株霉菌在甲醛转化过程中,甲醛脱氢酶进行了参与,其转化过程为:

$$甲醛+\beta\text{-NAD} \xrightarrow{甲醛脱氢酶} 甲酸盐+\beta\text{-NADH}$$

3　结语

3 株霉菌在振荡培养的 144h 内均能有效地转化甲醛,H1,H2,H4 可将 $C_{甲醛}$由 1047,1059,1241mg/L 转化到 7.6,317,4.0mg/L,转化率分别为 99.3%、70.1%、99.7%,甚至在 $C_{甲醛}$为 2934,3152,2922mg/L 时均能有效地转化甲醛,是较高浓度的甲醛转化菌.均能以甲醛为唯一碳源并转化甲醛,其中 H1 测到菌丝的生长.在 3 株霉菌中均测到甲醛脱氢酶的活性,具有进一步应用研究的价值.

参考文献：

[1] Zhang J, Smith K R. Emissions of carbonyl compounds from various cookstoves in China [J]. Emironmental Science and Technology, 1999, 33(14):2311-2320.

[2] Zhang J, He Q, Lioy P J. Characteristics of aldehydes: concentrations, sources, and exposures for indoor and outdoor residential microenvironments [J]. Emironmental Science and Technology, 1994,28:146-152.

[3] 孙晓航.室内空气污染对人体健康影响及防治对策 [J]. 黑龙江环境通报, 2005,29(3):74-75.

[4] 于立群,何凤生.甲醛的健康效应 [J]. 国外医学卫生学分册, 2004,31(2):81-87.

[5] Liteplo R G, Meek M E. Inhaled formaldehyde: exposure estimation, hazard characterization, and exposure-response analysis [J]. Tournal of Joxicology and Environmental Health Part B Critical Reviews, 2003,6: 85-114.

[6] IARC, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France [EB/OL]. http://www.iarc.fr/pageroot/PRELEASES/pr153a. html. 2004-06-15.

[7] Adroer N, Casas C, Demas C, et al. Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Psudomonas putida* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990,33(2):217-220.

[8] Azachi M, Henis Y, Oren A, et al. Transformation of formaldehyde by a *Halomonas* sp.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995,(41):548-553.

[9] Doronina N V, Ezhov V A, Trotsenko Y A. Aerobic biodegradation of formaldehyde, methanol and methylamine by immobilized *Methylobacterium* extorquens Cells [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 1997,33(2):162-165.

[10] Yamazaki T, Tsugawa W, Sode K. Biodegradation of formaldehyde by a formaldehyde-resistant bacterium isolated from seawater [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, 91-93:213-217.

[11] Mitsui R, Omori M, Kitazawa H, et al. Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, Methylobacterium sp. MF1: enzymatic analysis related to C1 metabolism [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005,99(1):18-22.

[12] Mirdamadil S, Rajabi A, Khalilzadeh P, et al. Isolation of bacteria able to metabolize high concentrations of formaldehyde [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(6/7):1299-1301.

[13] Tetsuya K, Yutaka M, Naohiro H, et al. Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002,214(1):137-142.

[14] 王允祥,陆兆新.翅鳞伞培养条件响应面法优化研究 [J]. 微生物学通报, 2004,31(6):42-47.

[15] 曲建翘,薛丰松,蒙　滨.室内空气质量检验方法指南 [M]. 北京:中国标准出版社, 2002:247-251.

[16] 黄赛花,陈能场,胡文锋,等.一株甲醛降解真菌 *Aspergillus* sp.H4 的分离鉴定 [J]. 生态环境, 2007,16(4):1175-1179.

作者简介：黄赛花(1977-),女,湖南衡东人,助理研究员,硕士,主要从事环境微生物的研究.发表论文 3 篇.

环保信息

《中国人类发展报告 2007/08》发布　建议加快建立惠及 13 亿人的基本公共服务体制　联合国开发计划署 11 月 16 日发布的《中国人类发展报告 2007/08》建议加快进行公共服务体制改革,加快建立惠及 13 亿人的基本公共服务体制,推进基本公共服务均等化,为每一个中国公民平等提供有保障的基本公共服务.

这一报告就加快实现基本公共服务均等化、给予农村人口和其他困难群体特别关注提出了 9 项有针对性的政策建议,其核心是怎样为 13 亿人口中的每一个人提供基本而有保障、符合最低统一标准和水平的公共服务.

摘自《中国环境报》

2008-11-18