

易馨,杨开智,童晋,等. 响应面法对光合细菌还原亚砷酸盐条件的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):217-220.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.060

响应面法对光合细菌还原亚砷酸盐条件的优化

易馨,杨开智,童晋,李明学,谢鸿观
(成都理工大学材料与化学化工学院,四川成都 610059)

摘要:以实验室前期获得的 1 株对亚砷酸盐有还原能力的光合细菌——沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)为研究对象,采用响应面法对其还原亚砷酸盐的条件进行优化。在单因素试验基础上,以砷的还原率为响应值,采用 Box-Behnken(BB)设计,利用 Design-Expert 软件对响应值进行 4 因素 3 水平下的多元二次回归拟合分析,确定最佳还原条件为:菌种接种量 8% (体积分数,下同),初始砷浓度 63 mg/L,初始 pH 值 6.2,接种后培养 9 d,则亚砷酸盐的还原率可达 99.76%。反应过程中还原条件的优化,对后期利用微生物治理环境的砷污染具有参考价值。

关键词:光合细菌;亚砷酸盐;最佳还原条件;响应面法;砷污染治理

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0217-04

砷(Te)是一种非金属稀散元素,于 1782 年在金矿中发现^[1]。砷及其化合物广泛应用于冶金、化工、电子、医药等行业,被誉为“现代工业、国防与尖端技术的维生素”“当代高技术新材料的支撑材料”^[2]。随着砷的广泛应用,对环境造成的污染也日益增加。

砷的化合物在很低的浓度水平都具有毒性,其中以亚砷酸盐(TeO_3^{2-})的毒性最强,是污染环境的主要物质之一。亚砷酸盐具有很好的水溶性且易于进入生物体内,其毒性远比单质砷的毒性强,主要是其具有氧化性^[3],而单质砷不溶于水,常被认为无生物利用性。将污染物中易溶有毒的亚砷酸盐还原成砷单质,从而可以达到去除这种元素的目的。微生物的这种作用在环境砷污染的治理方面具有应用前景。

响应面分析法(response surface analysis methodology, RSM)是目前广泛应用的一种综合试验设计和数学建模的优化方法,通过多元二次回归方程拟合多因子与响应值间的关系进行模型预测,并可得到最佳优化条件^[4]。成都理工大学测试楼微生物实验室前期获得 1 株对亚砷酸盐有还原能力的光合细菌——沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*),本研究对其还原亚砷酸盐的影响条件进行系统研究,用响应面法分析确定了最佳还原条件,对后期利用微生物治理环境中的砷污染问题具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验菌种为实验室前期储藏的 1 株对亚砷酸盐有还原能力的沼泽红假单胞菌。

收稿日期:2016-01-22

基金项目:四川省成都市科技局科技惠民技术研发项目(编号:2014-HM01-00331-SF);四川砷铋产业技术研究院平台项目(编号:2015510010000322)。

作者简介:易馨(1990—),女,硕士研究生,主要从事含砷废液的生物处理研究。E-mail:461505315@qq.com。

通信作者:谢鸿观,博士,副教授,主要从事资源环境微生物的应用研究。E-mail:xiehongguan08@cdut.cn。

1.2 供试培养基

培养基采用 RCVBN 液体培养基,其配方如下:DL-苹果酸 4.00 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00 g, KH_2PO_4 1.36 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.24 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mg, EDTA 20 mg, 维生素 B₁ 1 mg, 烟酸 1 mg, 生物素 15 μg, 微量元素 1 mL, 双蒸水 1 L。微量元素包括 H_3BO_3 2.8 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 240 μg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 40 μg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 750 μg, 双蒸水 1 L。

1.3 试验方法

1.3.1 单因素试验优化亚砷酸盐还原条件

1.3.1.1 菌种接种量的考察 将初始砷浓度为 60 mg/L 的 100 mL 液体培养基用氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.0, 分别按体积分数为 1%、3%、5%、7%、9%、11% 的接种量将在 30 ℃ 下培养了 5 d 的沼泽红假单胞菌接种至培养基中, 置于 30 ℃ 光照培养箱中。

1.3.1.2 初始砷浓度的考察 将接种了 5% 沼泽红假单胞菌的液体培养液置于 30 ℃ 光照培养箱中, 培养 5 d 后将不同浓度的亚砷酸钠溶液加入培养基中, 使其初始砷浓度分别为 20、40、60、80、100、120、140 mg/L, 初始 pH 值均为 7.0。

1.3.1.3 初始 pH 值的考察 将初始砷浓度为 60 mg/L 的 100 mL 液体培养基用氢氧化钠溶液调 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 并将在 30 ℃ 培养了 5 d 的沼泽红假单胞菌按 5% 接入培养基中混合, 置于 30 ℃ 光照培养箱中。

以上几组培养基均培养 8 d 后, 用灭菌的针筒分别抽取上述菌液 10 mL 于洁净离心管中, 置于高速离心机中离心分离(5 000 r/min, $t = 10$ min), 取上清液用一次性的 0.22 μm 滤膜过滤, 并测定滤液中剩余砷的浓度。

1.3.1.4 接种后培养时间的考察 将初始砷浓度为 60 mg/L 的 500 mL 液体培养基用氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.0, 并将在 30 ℃ 培养了 5 d 的沼泽红假单胞菌菌株按 5% 接入培养基中混合, 置于 30 ℃ 光照培养箱中。培养至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 d 时, 分别用灭菌的针筒分别抽取菌液 10 mL 于洁净离心管中, 置于高速离心机中高速离心分离

(5 000 r/min, $t = 10$ min), 取上清液用一次性的 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 并测定滤液中剩余碲的浓度。

1.3.2 响应面法优化试验设计 对沼泽红假单胞菌的接种量、初始碲浓度、初始 pH 值及接种后培养时间(分别记为 A、B、C、D), 每个因素取 3 个水平; 以 Te^{4+} 的还原率作为响应值, 记为 R , 进行 Box - Behnken (BB) 试验设计, 建立数学模型, 通过 Design Expert 软件对试验数据进行回归分析, 预测最优还原条件, 并按照预测最优还原条件重复试验, 与模型的预测值进行比较, 验证其有效性。

1.3.3 碲还原率的测定 采用氢化物 - 原子荧光仪 (HG - AFS) 测定培养液中 Te^{4+} 的浓度^[5]。

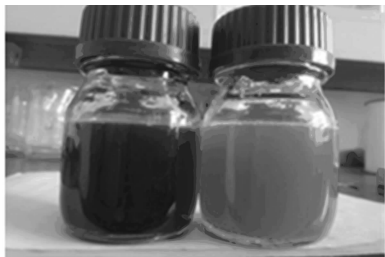
碲还原率 = $(A - B) / A \times 100\%$ 。

式中: A 为初始碲浓度, mg/L ; B 为还原后培养基中 Te^{4+} 浓度, mg/L 。

2 结果与分析

2.1 细菌还原亚碲酸盐现象

沼泽红假单胞菌在未添加亚碲酸钠的液体培养基中培养 8 d, 结果如图 1 (右) 所示, 培养液由无色逐渐变成红色, 这是细菌正常培养的颜色。而沼泽红假单胞菌在含亚碲酸钠的液体培养基中培养 8 d, 结果见图 1 (左), 培养液颜色逐渐变为黑色, 这是由于沼泽红假单胞菌将 Na_2TeO_3 还原成黑色单质碲的缘故。



左侧为含亚碲酸钠的液体培养基, 在该培养基中培养沼泽红假单胞菌 8 d, 培养液颜色变黑; 右侧为未添加亚碲酸钠的液体培养基, 在该培养基中培养沼泽红假单胞菌 8 d, 培养液颜色变红

图1 细菌还原亚碲酸盐的液体培养特征

2.2 菌种接种量对亚碲酸盐还原率的影响

在不同的菌种接种量条件下, 沼泽红假单胞菌对亚碲酸盐的还原率存在明显的差异, 结果如图 2 所示。随着菌种接种量的增加, 沼泽红假单胞菌对碲的还原率明显提高; 当接种量达到 5% 时, 还原率达到一个高值, 为 90.24%; 随后再增加菌种接种量, 碲的还原率变化不大, 由此推测, 当菌种接种量低于 5% 时, 菌株在培养基中的生长速度相对缓慢, 严重影响了碲的还原率, 当菌种接种量 $\geq 5\%$ 时, 对亚碲酸盐还原效果更好。

2.3 初始碲浓度对亚碲酸盐还原率的影响

沼泽红假单胞菌在不同的初始碲浓度条件下培养, 对碲的还原率如图 3 所示。随着初始碲浓度的增大, 对碲的还原率呈现上升一下降的趋势。碲的还原效果在亚碲酸钠添加量低于 $60\ \text{mg/L}$ 时, 碲还原率呈缓慢上升趋势, 达到最大值 (90.98%), 说明菌株可忍受一定浓度的亚碲酸盐, 而未受到 TeO_3^{2-} 的抑制且菌株活性良好。当初始碲浓度超过 $60\ \text{mg/L}$

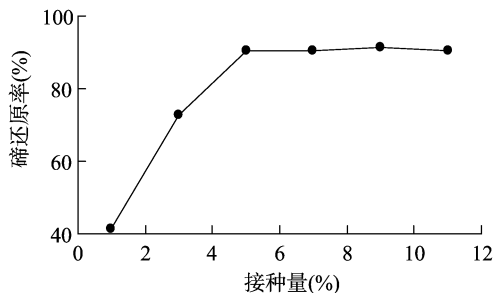


图2 菌种接种量对还原率的影响

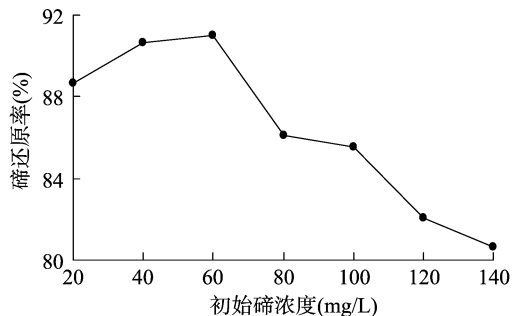


图3 初始碲浓度对还原率的影响

时, 随着碲浓度的升高, 其较高的毒性抑制了菌的活性, 碲还原率逐渐降低。

2.4 pH 值对亚碲酸盐还原率的影响

在不同的 pH 值条件下, 菌株还原碲的效果如图 4 所示。当 pH 值为 $6.5 \sim 7.5$ 时, 碲还原效果较好, 还原率为 $90.09\% \sim 91.13\%$, 因此试验中采用的沼泽红假单胞菌适宜的生长代谢 pH 值范围为 $6.5 \sim 7.5$ ^[6]。当 pH 值 < 6 或 pH 值 > 8 时, 碲还原率相对较低。可见, 过高或过低的 pH 值环境会直接影响菌的酶活性, 抑制其生长和代谢能力, 不利于菌株对亚碲酸钠的还原。

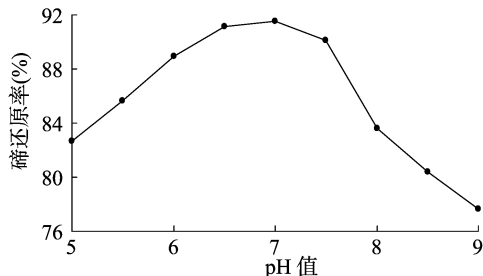


图4 pH 值对还原率的影响

2.5 接种后培养时间对亚碲酸盐还原率的影响

沼泽红假单胞菌接种后随着培养时间的变化, 碲的还原率也存在明显的变化, 结果如图 5 所示。接种培养的前 7 d, 随着菌的生长, 培养液中的 TeO_3^{2-} 浓度降低, 碲还原率迅速增长。在培养后 8 d, 对亚碲酸盐的还原率达到一个高值, 为 89.09% ; 随后, 随着时间的推移, 碲还原率达到稳定期。这一趋势与细菌在亚碲酸盐的胁迫下菌体的生长曲线相符合, 说明沼泽红假单胞菌还原亚碲酸盐可能依赖菌体生物量的生长。

2.6 Box - Behnken 中心组合设计试验与响应面优化还原条件

2.6.1 模型的建立及显著性检验 将菌种接种量、初始碲浓

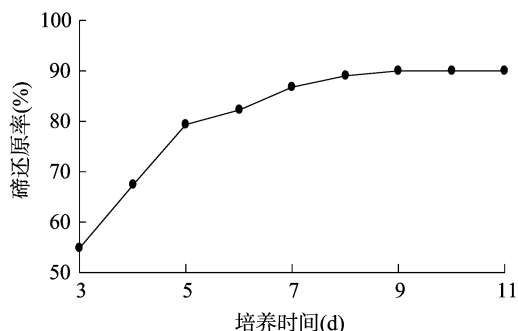


图5 接种后培养时间对还原率的影响

度、初始 pH 值及接种后培养时间分别记为 A、B、C、D, 各因素水平的取值见表 1, 以 Te^{4+} 的还原率作为响应值, 记为 R ; 试验方案及结果见表 2。

表 1 沼泽红假单胞菌还原亚碲酸钠工艺条件的优化设计

水平	A: 接种量 (%)	B: 初始碲浓度 (mg/L)	C: pH 值	D: 培养时间 (d)
-1	4	40	6	7
0	6	60	7	8
1	8	80	8	9

表 2 沼泽红假单胞菌还原亚碲酸钠工艺条件的优化结果

试验编号	A	B	C	D	$R(\%)$
1	0	0	-1	1	94.34
2	0	1	1	0	54.96
3	-1	0	0	-1	79.16
4	1	0	0	1	98.87
5	0	0	0	0	87.12
6	-1	-1	0	0	84.43
7	0	-1	0	1	88.09
8	-1	0	0	1	88.65
9	1	0	-1	0	92.36
10	0	1	-1	0	75.85
11	0	-1	1	0	57.39
12	-1	0	1	0	60.98
13	0	1	0	1	86.44
14	0	1	0	-1	70.56
15	1	0	1	0	59.78
16	0	-1	-1	0	81.66
17	0	0	0	0	87.88
18	0	0	0	0	83.76
19	0	0	1	1	61.06
20	1	-1	0	0	85.05
21	0	-1	0	-1	77.05
22	0	0	-1	-1	68.98
23	1	0	0	-1	82.32
24	-1	1	0	0	70.44
25	-1	0	-1	0	74.07
26	0	0	0	0	87.87
27	0	0	0	0	85.45
28	0	0	1	1	60.09
29	1	1	0	0	85.56

利用 Design Expert 软件对表 2 中的响应值进行二元回归拟合分析, 确定如下回归方程预测模型 $R = 86.42 + 3.85A - 2.49B - 11.08C + 6.45D + 3.62AB - 4.87AC + 1.76AD + 0.85BC + 1.21BD - 6.58CD + 0.41A^2 - 5.11B^2 - 14.61C^2 - 0.35D^2$ 。对模型进行回归分析得到的结果见表 3。

表 3 沼泽红假单胞菌还原亚碲酸盐工艺条件

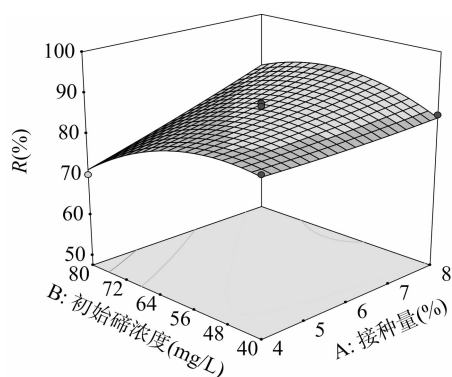
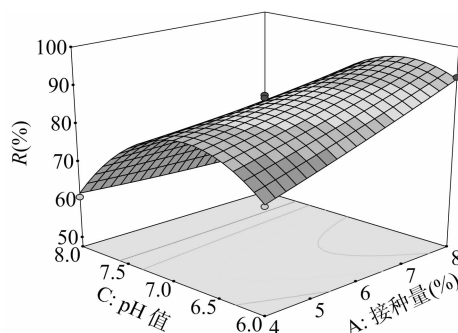
响应面试验结果方差分析

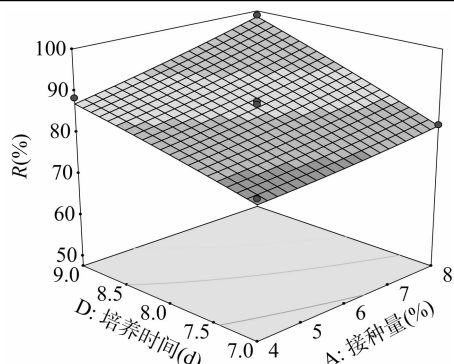
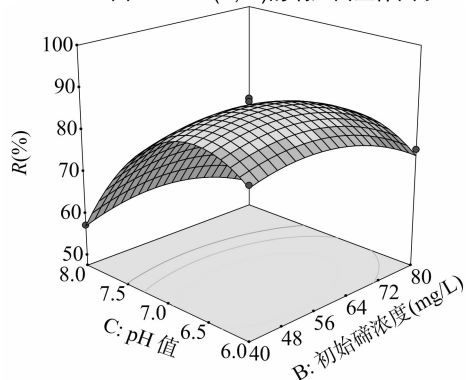
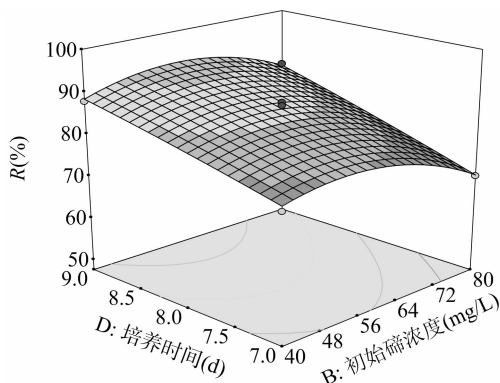
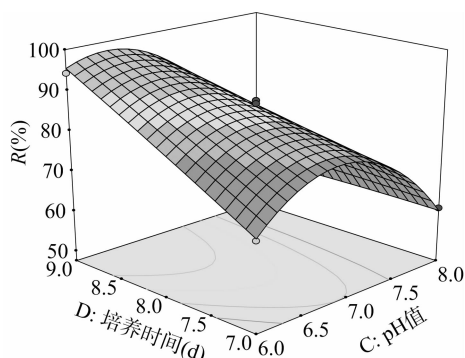
变异来源	df	均方	F 值	P 值
模型	14	293.74	142.35 **	<0.000 1
A	1	177.95	86.23 **	<0.000 1
B	1	74.30	36.01 **	<0.000 1
C	1	1474.08	714.36 **	<0.000 1
D	1	498.59	241.62 **	<0.000 1
AB	1	52.56	25.47 **	0.000 2
AC	1	94.97	46.02 **	<0.000 1
AD	1	12.46	6.04	0.027 6
BC	1	2.86	1.38	0.259 0
BD	1	5.86	2.84	0.114 2
CD	1	173.32	83.99 **	<0.000 1
A^2	1	1.10	0.53	0.477 6
B^2	1	169.52	82.15 **	<0.000 1
C^2	1	1384.02	670.71 **	<0.000 1
D^2	1	0.78	0.38	0.549 5
残差	14	2.06		
失拟值	10	1.61	0.51	0.825 1
误差	4	3.19		

注: **、* 分别表示差异极显著 ($P < 0.01$)、显著 ($P < 0.05$)。

由表 3 可知, 模型的 $P < 0.000 1$, 说明回归模型极显著, 失拟 $P = 0.825 1 > 0.05$, 说明模型失拟不显著, 确定系数 $R^2 = 0.9930$, 说明回归模型拟合度很好, 回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的关系, 可以用此模型来确定沼泽红假单胞菌还原亚碲酸盐的最佳条件。回归方程系数的显著性分析结果表明, 此次在各因素取值范围内, 对响应值影响的大小是 $C > D > A > B$ 。

2.6.2 亚碲酸盐还原条件的响应面分析 通过以上二次多项回归方程所作的响应面值见图 6 至图 11。

图6 $R = f(A, B)$ 的响应面立体图示图7 $R = f(A, C)$ 的响应面立体图示

图8 $R=f(A,D)$ 的响应面立体图示图9 $R=f(B,C)$ 的响应面立体图示图10 $R=f(B,D)$ 的响应面立体图示图11 $R=f(C,D)$ 的响应面立体图示

2.6.3 最佳还原条件的预测与检验 根据所建立的数学模型进行参数的最优化分析,得出沼泽红假单胞菌还原亚碲酸盐的条件为:菌接种量 8%,初始碲浓度 63.29 mg/L,初始 pH 值 6.23,接种后培养 9 d,在此条件下,亚碲酸盐的还原率在理论上可达 107.38%。考虑到实际可操作性,将还原条件

修正为:菌接种量 8%,初始碲浓度 63 mg/L,初始 pH 值 6.2,接种培养 9 d。为验证试验结果的可靠性,在最优的还原条件下进行试验,6 组平行试验的平均值为 99.76%,试验结果与模型复合良好。因此,采用响应面分析法优化得到的沼泽红假单胞菌还原亚碲酸盐的条件参数准确可靠,具有利用价值。

3 结论与讨论

利用微生物将溶解性强的亚碲酸盐还原成溶解性差、无毒的碲单质的报道有很多^[7-10],如 Lloyd 等利用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 对亚碲酸盐还原,发现碲单质积累在靠近细胞膜位置^[7];Klonowska 等发现,希瓦氏菌 (*Shewanella oneidensis*) 能够在厌氧条件下还原亚碲酸盐^[9]。目前,对细菌还原亚碲酸盐影响条件的系统研究还较少。通过单因素试验和中心组合设计试验,采用响应面分析方法优化光合细菌还原亚碲酸盐影响条件,得到优化还原条件为:菌接种量 8%,初始碲浓度 63 mg/L,初始 pH 值 6.2,接种后培养 9 d,在此条件下,亚碲酸盐的还原率可达 99.76%。在此试验范围内建立起的二次线性回归模型准确有效,对试验拟合较好。说明本研究对后期利用微生物治理环境中的碲污染问题具有重要意义。

参考文献:

- [1] Fan Y Q, Yang Y X, Xiao Y P, et al. Recovery of tellurium from high tellurium-bearing materials by alkaline pressure leaching process: thermodynamic evaluation and experimental study [J]. Hydrometallurgy, 2013, 139: 95-99.
- [2] 方锦, 王少龙, 付世继. 从碲渣中回收碲的工艺研究[J]. 材料研究与应用, 2009, 3(3): 204-206.
- [3] Kim D H, Kanaly R A, Hur H G. Biological accumulation of tellurium nanorod structures via reduction of tellurite by *Shewanella oneidensis* MR-1 [J]. Bioresource Technology, 2012, 125: 127-131.
- [4] 梁红昌, 张庆华, 吴瑜瑜, 等. 响应面法优化曲霉 Asaw117 脱色培养基的研究[J]. 环境工程, 2009(1): 218-221.
- [5] 郭小伟, 郭旭明. 从碱性溶液中发生氢化物的原子荧光/原子吸收光谱法测定 Te^{4+} 及 Te^{6+} [J]. 光谱学与光谱分析, 1996, 16(3): 88-92.
- [6] 陈燕红, 杨紫红, 喻国辉, 等. 光照、氧气、pH 和盐度对沼泽红假单胞菌 2-8 菌株生长和亚硝酸盐消除的影响[J]. 南方水产, 2010, 6(4): 1-5.
- [7] Lloyd-Jones G, Osborn A, Ritchie D, et al. Accumulation and intracellular fate of tellurite in tellurite-resistant *Escherichia coli*: a model for the mechanism of resistance [J]. FEMS Microbiology Letters, 1994, 118(1/2): 113-119.
- [8] Diaz-Vasquez W A, Abarca-Lagunas M J, Arenas F A, et al. Tellurite reduction by *Escherichia coli* NDH-II dehydrogenase results in superoxide production in membranes of toxicant-exposed cells [J]. BioMetals, 2014, 27(2): 237-246.
- [9] Klonowska A, Heulin T, Vermeglio A. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5607-5609.
- [10] Wang X J L G, Zhou J T E A. Quinone-mediated reduction of selenite and tellurite by *Escherichia coli* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3268-3271.