

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A62D 3/00

C02F 3/34 C12S 13/00

B09C 1/10

/(C12S13/00,

C12R1 : 77)(C12S13/00,

C12R1 : 80)(C12S13/00,

C12R1 : 88)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97197143.9

[43] 授权公告日 2003 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1106870C

[22] 申请日 1997.6.12 [21] 申请号 97197143.9

[30] 优先权

[32] 1996. 6. 14 [33] GB [31] 9612442.5

[86] 国际申请 PCT/GB97/01585 1997.6.12

[87] 国际公布 WO97/47363 英 1997.12.18

[85] 进入国家阶段日期 1999.2.9

[71] 专利权人 BG 公开有限公司

地址 英国伯克郡

[72] 发明人 C·J·诺尔斯 V·泰特

M·巴克利

[56] 参考文献

EP0234760A2 1987.09.02 C12N9/88

审查员 张京德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称 金属氰化物的生物降解

[57] 摘要

一种金属氰化物或两种或两种以上金属氰化物的混合物的生物降解方法,包括使生物在含有一种或多种所述氰化物的培养基中生长,所述培养基的 pH 是 6 或更低。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

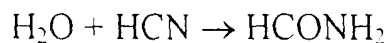
1. 一种生物降解氰化铁络合物的方法，其包括使选自腐皮镰孢(IMI 369371)、*Trichoderma polysporum*(IMI 369372)、尖镰孢(IMI 370462)、*Scytalidium thermophilum*(IMI 370463)和米舒青霉(IMI 360461)的真菌在含有所述氰化物络合物的培养基中生长，所述培养基的 pH 值是 7.5 或更低。
2. 权利要求 1 的方法，其中两种或两种以上的氰化铁络合物被生物降解。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中培养基的 pH 值是 6 或更低。
4. 权利要求 3 的方法，其中 pH 值在 3 到 6 之间。
5. 上述权利要求中任一权项的方法，其中氰化铁络合物包括普鲁士蓝。

金属氰化物的生物降解

5 本发明涉及金属氰化物或两种或两种以上金属氰化物的混合物，尤其是氰化铁或者是氰化铁的混合物的生物降解。

从十九世纪到二十世纪六十年代中期，煤的兼气气体发酵产生甲烷气体在欧洲的大部分、英国和美国是通常的做法。这个方法已废而不用，遗留下大约 5,000 个以前的受兼气气体发酵副产物污染的煤气厂及随后的净化。这些污染物通常包括如含硫和氰化物的化合物的无机物、金属、挥发性芳族化合物、酚醛塑料和聚芳族烃(PAH)。使气体通过含有氧化铁的氧化物净化器去除氰化氢和硫化氢，导致产生废氰化物，它包含多达 45,000 mg/Kg 的氰化物。大多数氰化物与例如普鲁士蓝($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)的化合物形式的铁络合，产生废氰化物其特征性的蓝色。普鲁士蓝的溶解性强烈依赖于 pH 值。尽管氰化物在低 pH 下高度稳定和不溶性的(典型煤气厂土壤)，但是由于沥滤和流失，高于 pH 4 时地下水中的氰化铁浓度超过荷兰最大耐受水平 200 $\mu\text{g/L}$ (相当于 $1.28 \times 10^{-6} \text{ mM}$)(Meeussen 等, 1992)。基于此考虑，Meeussen 等(1992)决定应该在氰化铁浓度降到可耐受水平之前除去所有的普鲁士蓝。有毒化合物经受完全矿化的生物过程，比用去除这些有毒化合物的化学过程经常是更便宜且被认为更具环保意识。因此分离一种能够降解氰化铁化合物(包括普鲁士蓝)的生物是人们高度想望的。

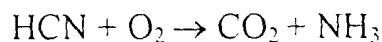
25 菌柄菌 *Stemphylium loti* 是生氰植物牛角花的病原真菌，已经表明所述真菌诱导氰(cyan)。



Fry 和 Millar (1972)也表明该酶的最适 pH 活性范围为 7.0-9.0。

已经从包括镰孢 Fusarium Laterium (Cluness 等, 1993)和高粱胶尾孢(Goleocerospora sorghi) (Wang 和 Van Etten, 1992)的许多其它真菌纯化了氰化物水合酶。

5 细菌荧光假单孢菌(Pseudomonas Fluorescens) NCIMB 11764 首先由 Harris 和 Knowles (1983a)分离, 该细菌在补料分批中的中性条件下, 在限氮条件下利用 KCN, 这种情况下的关键酶是把氰化物转化为氨的氰化物加氧酶(Harris 和 Knowles 19836), 氨随后应用于工业过程。



10

Kunz 等(1992)后来指出, 氰化物水合酶也存在于一种种名待定的假单孢菌中, 尽管它的活性被限制在 20-25mM 氰化物的高浓度。

许多细菌包括荧光假单孢菌(Pseudomonas Fluorescens) NCIMB 11764 (Rollinson 等, 1987)、恶臭假单孢菌(Pseudomonas putida) BCN3
15 (Silva-Avalos 等 199x)和少动假单孢菌 (Pseudomonas paucimobilis) mudlock ATCC 39204 (参见 Mudder 和 Whitelock 的美国专利 4,461,834 号), 在中性 pH 值限氮分批或连续培养中, 有能力利用例如氰化镍 $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$ 形式的中等强度金属络合氰化物。再次观察到氰化物加氧酶活性。

20 尽管已经表明有包括 $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ 和 $\text{Cu}(\text{CN})_4^{2-}$ 的许多金属氰化物在中性 pH (pH 7 左右)被细菌生物降解, 但是没有分离到有能力在氰化铁上生长的微生物的预培养物或微生物的混合培养物。也没有文献表明生物在 pH 7 的 pH 下, 能降解金属氰化物。同样, 尽管显示了许多真菌通过用氰化物水合酶解毒, 耐受 HCN 形式的氰化物, 但是从没有显示
25 真菌在 pH7 或其它条件下在任何金属氰化物的络合物上生长。

根据本发明的一个方面, 提供了生物降解金属氰化物或两种或两种以上金属氰化物的混合物的方法, 该方法包括促使生物在含有所述一种或多种氰化物的培养基中生长, 所述培养基的 pH 值是 6 或更低。

所述生物最好是真菌。

按照本发明的另一个方面，提供了生物降解金属氰化物或两种或两种以上金属氰化物的混合物的方法，该方法促使真菌在含有一种或多种所述氰化物的培养基上生长，所述培养基的 pH 值是 7.5 或更低。

5 按照本发明的再一方面，提供了生物降解一种氰化铁或两种或两种以上氰化铁的混合物的方法，该方法包括促使真菌在含所述氰化物或氰化物混合物的培养基上生长。

所述培养基的 pH 最好低于 7.5，且适宜于为 3-6。

按照本发明的又一方面，所述真菌是腐皮镰孢(*Fusarium solarii*)
10 (IMI 369371)。

按照本发明的再一方面，所述真菌是 *Tricoderma Polysporum* (IMI 369372)。

按照本发明的一个不同方面，所述真菌是尖镰孢(*Fusar oxysporum*)
(IMI 370462)。

15 按照本发明的另一不同方面，所述真菌是米舒青霉(*Penicillin miczynski*) (IMI 360461)。

参考以下详细叙述本发明的实施方案：

用取自废弃煤气厂的土壤产生混合培养物，包括能在金属氰化物的络合物上生长的真菌，所述络合物包括氰化镍($\text{Ni}(\text{CH}_3)_4^{2+}$)、铁氰化
20 钾($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)、亚铁氰化钾($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)和普鲁士蓝($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)，在酸条件下(大约 pH4)加入这些物质作为唯一氮源时，在 pH4 (50mM 琥珀酸盐/10mM NaOH)建立富集。

由黑色真菌生物质的形成，生长是可见的。培养基不加氮源时就不存在生长。用两种方法监测氰化铁络合物的去除。首先，就氰化铁
25 来说，当真菌生长时，培养基的蓝色(由于普鲁士蓝的形成)消退，直到培养基变成无色。而没有接种的对照培养基仍保持蓝色。其次，通过培养基中金属氰化物的浓度，即在酸化并蒸馏培养基以释放出氰化物，然后用 NaOH 捕获并通过 dionex 后，根据游离氰化物的浓度进行

测定。就氰化铁来说, 含有所述真菌的培养基去除了 95%以上的氰化物, 而在对照培养基中仍保留 90%以上的最初氰化物浓度。

已经鉴定优势真菌种是一种种名待定的镰孢。其它的真菌种 *Tricoderma* sp 也已经与种名待定的镰孢和种名待定的青霉一起得到了鉴定。

用由 0.2M 琥珀酸缓冲液 25ml、1M NaOH 1ml、微量元素 0.1ml、1ml $\text{MgSO}_4/\text{CaCl}_2$ 、0.25mM $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ 、葡萄糖 10mM、M9 磷酸缓冲液(不加 NH_4Cl) 1ml 组成的 pH4 培养基建立富集。在 250ml 摇瓶中在培养基中加蒸馏水到 100ml。

将来自废氧化物堆或所述位点边缘受污染土壤的物质(1g)加到培养基中, 于 25 °C 暗处摇瓶(通气)。这些富集样本在六周前取自废弃的煤气厂且在 4 °C 保存。

10 天后停止摇瓶, 把 5ml 培养基转移到 100ml pH4 的新鲜培养基中, 所述培养基也包含 0.25mM $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ 作为唯一氮源。七天后重复这个过程, 但是这一次也接种不含氮源的培养基。

在含有真菌接种物的摇瓶中或最初含有污染土壤的富集摇瓶中, 真菌的生长变成明显的黑色团。只含废氧化物的富集摇瓶, 微生物的生长是不明显的。没有添加氮的摇瓶生长不可见。

再于不含氮源或是 0.5mM $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ 作为唯一氮源的培养基中, 进行两次连续的继代培养。再次只有以 $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ 作为氮源的生长是可见的。以 0.5mM $\text{Cu}(\text{CN})_4^{2-}$ 或氨作为氮源也观察到了生长; 然而以氨为氮源, 尽管真菌生长可见, 但是培养基变得浑浊, 使人想到也发生了细菌的生长。

在富集过程后, 加入 0.5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 或 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 作为唯一氮源配制培养基, 当其中一种盐加入到培养基时, 它完全溶解, 释放出 K^+ 和相应的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{+}$ 或 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 离子。 $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 离子由于很稳定, 不发生解离, 然而加入含有单体铁的微量元素时, $\text{Fe}(\text{CN})_6$ 离子立即与微量铁反应, 生成沉淀普鲁士蓝($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)(H. Meeussen, 个人通

讯), 加 $K_4Fe(CN)_6$ 的培养基开始颜色是蓝色的, 而加 $K_3Fe(CN)_6$ 的培养基是绿色的; 这种不同可能是由于不同量的钾与普鲁士蓝共同沉淀造成的, 然而过一段时间且暴露于光下, 当 $Fe(CN)_6$ 离子开始分解放出少量 CN^- 和单体铁时, 随着普鲁士蓝进一步形成, 两种培养基都变成亮蓝色(H. Meeussen, 个人通讯)。然后单体铁立即与剩余的 $Fe(CN)_6$ 反应, 形成普鲁士蓝。如果加入到培养基的微量元素不含铁, 这后一种反应也发生。

在沉淀的普鲁士蓝中, 部分铁以 Fe^{2+} 出现, 而部分是以 Fe^{3+} 出现。为了形成普鲁士蓝, 培养基必须含有 Fe^{2+} 和 $Fe(CN)_6^{3-}$ 或者 Fe^{2+} 和 $Fe(CN)_6^{4-}$, 两种组合都产生相似的普鲁士蓝沉淀, 如果两种形式都是氧化型($Fe^{3+} + Fe(CN)_6^{3-}$)或者都是还原型($Fe^{2+} + Fe(CN)_6^{4-}$), 将不倾向于形成普鲁士蓝, 然而氧化型是高度氧化性的, 将与有机物反应, 例如, 与微生物 pH4 生长培养基中存在的琥珀酸缓冲液反应, 形成沉淀普鲁士蓝必需的还原型。另外, 还原型组合也非常活泼, 与空气反应, 部分氧化, 再形成沉淀普鲁士蓝。

所述真菌(5%接种物)加入氰化铁培养基(添加 $K_4Fe(CN)_6$ 或 $K_3Fe(CN)_6$)中大约 20 天后, 可见生长成黑色团, 培养基变成无色。

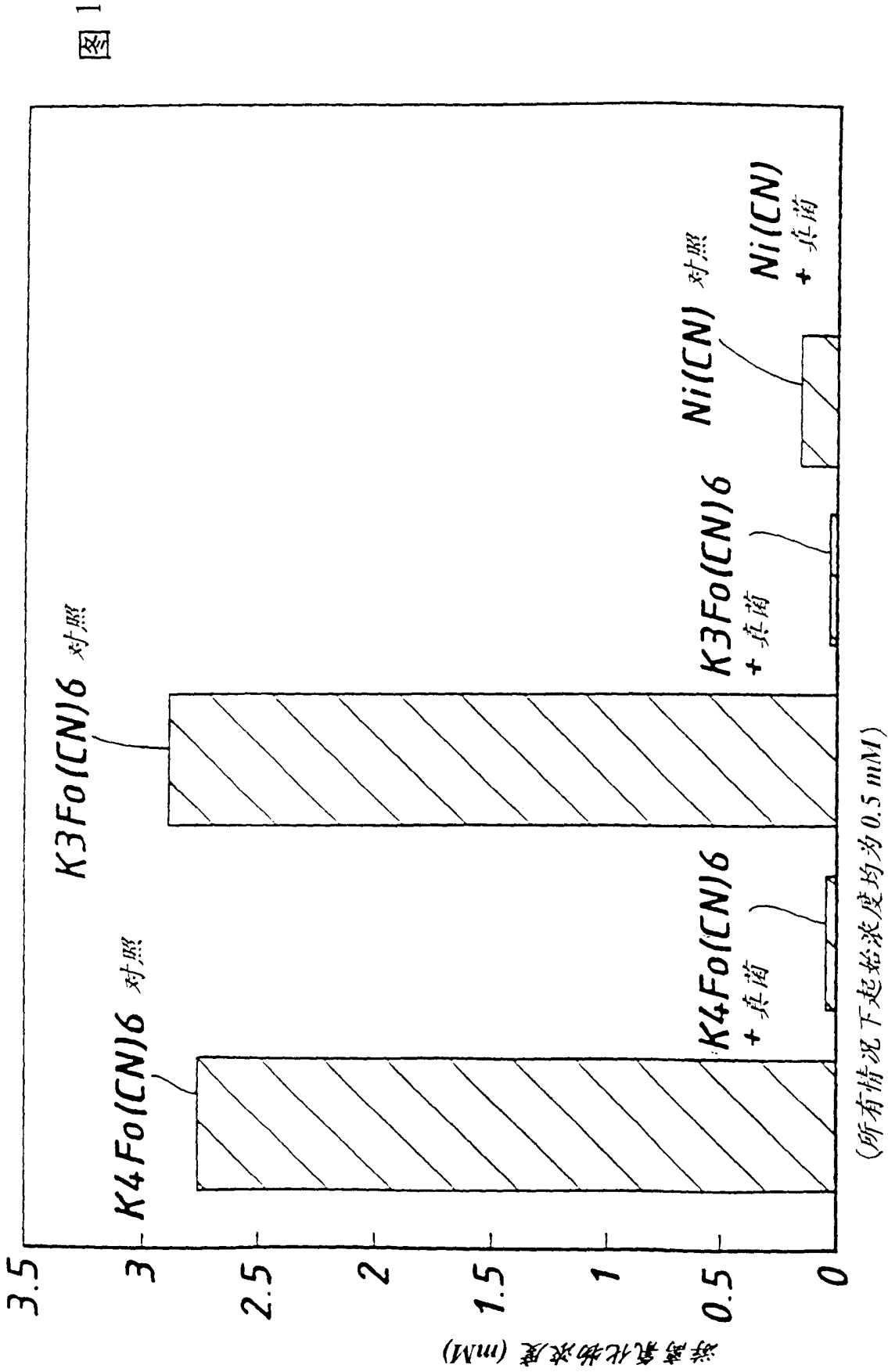
用含 $K_4Fe(CN)_6$ 、 $K_3Fe(CN)_6$ (如上所述, 两种都反应生成普鲁士蓝)、 $Ni(CN)_4^{2-}$ 或不含氮源的摇瓶进行对照实验。每种情况都从含相应氮源的培养基中取真菌以 5% 的接种量接种培养基; 无氮源对照从先前 $Ni(CN)_4^{2-}$ 生长培养基取菌接种。也设立不接种的对照摇瓶。摇瓶置于暗处的振荡培养箱于 25 °C 通气培养, 然而可以定期取出在亮光下观察。

在摇瓶含有氮源的所有情况下均可见生长。无氮源的对照不见生长。在含有氰化铁(产生普鲁士蓝)和真菌的摇瓶中, 培养基(大约 pH4)大约 20 天后变成无色, 然而没有接种的摇瓶, 培养基仍保持亮蓝色。当允许于亮光下静置时, 在 $K_4Fe(CN)_6$ 和 $K_3Fe(CN)_6$ 的对照摇瓶中, 也可见普鲁士蓝的蓝色沉淀。

5 也通过培养基的酸化和蒸馏从络合物中释放出氰化物来测定接种摇瓶中氰化物的消失。在 NaOH 中捕获游离氰化物, 用 Dionex 系统进行分析。在氰化铁情况下, 含有真菌的培养基中有 95% 以上氰化物被降解, 而在对照(不接种)培养基中, 90% 以上的原始氰化物浓度保持不变。对于 $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$, 尽管没有从接种摇瓶回收氰化物, 但是从对照摇瓶回收很少量的氰化物是由于这种络合物在 pH4 不稳定。图 1 图示这种分析。

26 天后, 对接种培养基和对照摇瓶的 pH 值也进行测定。在存在生长的所有情况下, pH 值都增加(参见图 2)。

直方图显示于pH4 真菌生长26 天后游离氰化物的浓度



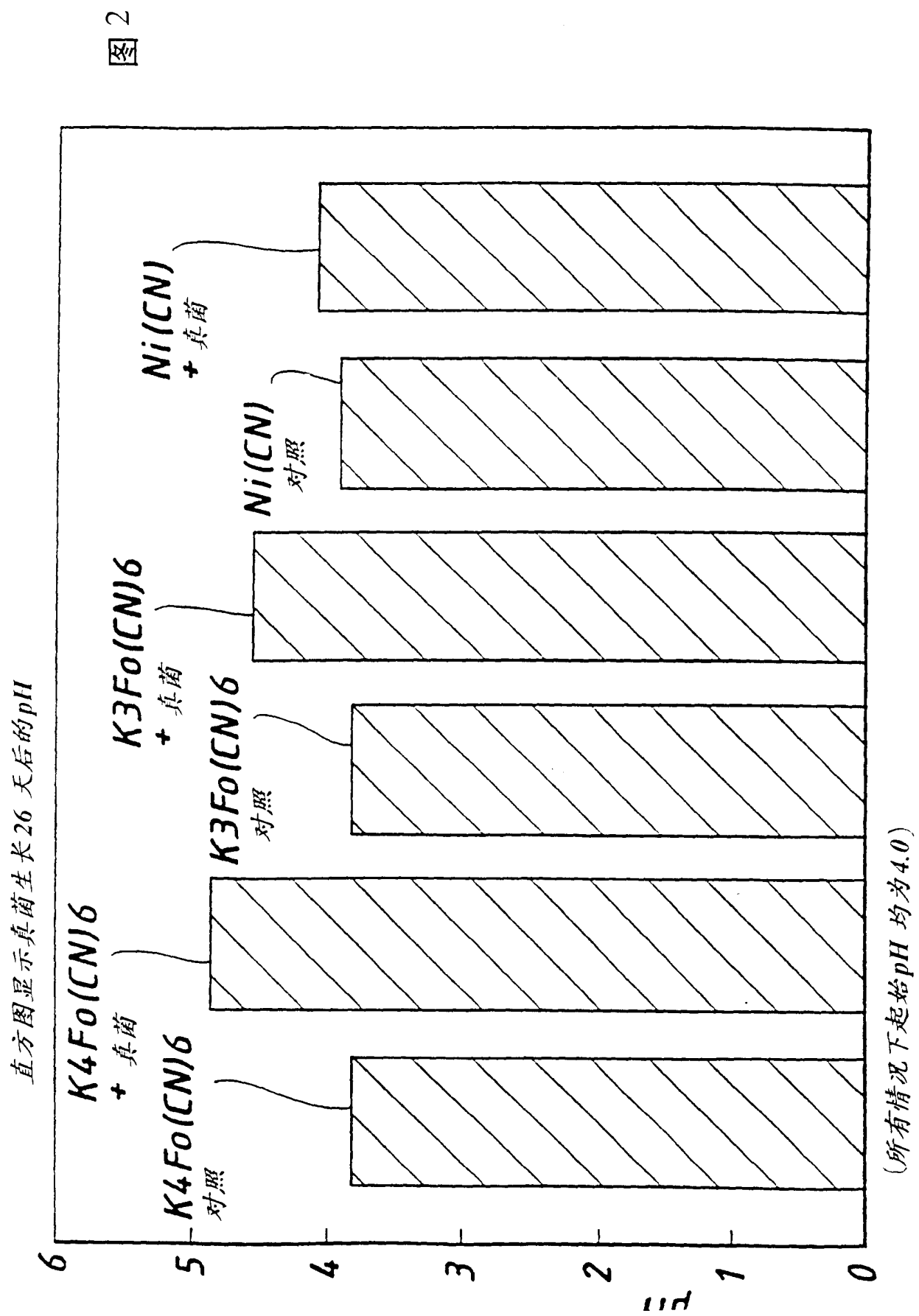


图 2