

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/385 (2006.01)



## [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510093673.7

[45] 授权公告日 2007年7月25日

[11] 授权公告号 CN 1328371C

[22] 申请日 2005.9.1

[21] 申请号 200510093673.7

[73] 专利权人 北京未名凯拓农业生物技术有限公司

地址 100093 北京市海淀区上地西路39号北大生物城凯拓公司

[72] 发明人 王军 李毅 乔琳 沙圣德 夏勉

[56] 参考文献

US5658793A 1997.8.19

US5240851A 1993.8.31

CN1112356A 1995.11.22

CN1626459A 2005.6.15

Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonasaeruginosa* strain mineralizing selected isomers inabranched - chain dodecylbenzenesulfonate mixture. Soberon. Chavez. G, et al, World. J. Microbiol. Biotechnol. , Vol. 12 No. 4 1996

分离产生金属内酰胺酶的铜绿假单胞菌沈定霞等, 中华医院感染学杂志, 第14卷第1期 2004

审查员 魏聪

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称

一株铜绿假单胞菌及其培养方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一株铜绿假单胞菌及其培养方法与应用。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 的发酵培养方法, 是将铜绿假单胞菌菌株(*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 接种到其专用液体培养基中, 在30-35℃下通气培养; 所述专用液体培养基的配方为: 每1000mL水中含: 酵母浸粉12-18g, 胰蛋白胍8-12g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2-1.8g,  $\text{NaCN}$  320-480mg, pH值为7.0-7.8。本发明的铜绿假单胞菌菌株(*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 可用于含苯、甲苯、苯酚、吡啶、氰化物等有机污染物的废水的生物治理, 并借此开发出相应的环保生物制剂, 具有较高的研究、应用及市场价值。

1、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445。

2、一种培养铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 的方法，是将铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 接种到其专用液体培养基中，在 30-35℃ 下通气培养；所述专用液体培养基的配方为：每 1000mL 水中含：酵母浸粉 12-18g，胰蛋白胨 8-12g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2-1.8g，NaCN 320-480mg，pH 值为 7.0-7.8。

3、根据权利要求 2 所述的培养方法，其特征在于：所述专用液体培养基的配方为：每 1000mL 水中含酵母浸粉 15g，胰蛋白胨 10g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g，NaCN 400mg，pH 值为 7.6。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的培养方法，其特征在于：所述接种比例为 5-10%；培养温度为 35℃；培养过程的溶解氧为 3-5mg/L，培养时间为 40-45 小时。

5、权利要求 1 所述的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 在治理环境污染中的应用。

6、权利要求 1 所述的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 在降解氰化物中的应用。

7、权利要求 1 所述的铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 在制备生物制剂中的应用。

## 一株铜绿假单胞菌及其培养方法与应用

### 技术领域

本发明涉及一株铜绿假单胞菌及其培养方法与应用。

### 背景技术

受启于地球“自净”过程的生物治理具有成本低、二次污染轻、环境相容性好等优势，生物治理技术现已成为污染治理技术中的首选方案之一，如现已产生良好效果的可用于污水/废水处理的活性污泥法、氧化沟法等。决定生化处理工艺成功、有效、适用的因素，除了工艺条件和操作管理外，用于污染物降解、转化等过程的功能微生物群体的作用也是十分重要的。因此，对特种微生物的分离、筛选，功能基因的分离、提取，以及借此构建各种环境工程菌已成为环境科学、生命科学中的研究热点。

应运而生的生物强化技术（Bioaugmentation，简称 BA 技术）、基因强化技术（Gene-Enhanced-Technology，简称 GET 技术）是向污染体系中投加人工培育的功能菌株/菌群，导入功能基因，以增强体系中目标底物的降解、转化。美国、日本、英国等一些国外的科研机构，现已成功开发出商品化的环境生物制剂，其中著名的有日本的 EM 制剂，美国的 AM 制剂。

我国的污染情况与其它国家明显不同，现有的商品化生物制剂对“三废”难以起到有效的治理效果，严重的污染情况亟待解决，基于这样的客观需要，我们从一些被有毒/有害物质长期浸染的环境中采集、分离、筛选可用于降解特定污染物的功能微生物。

### 发明内容

本发明的第一个目的是提供一株可用于环境治理的铜绿假单胞菌及其培养方法。

本发明所提供的用于环境治理的铜绿假单胞菌菌株（*Pseudomonas aeruginosa*）W7-1，已于 2005 年 08 月 25 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 1445。

铜绿假单胞菌菌株（*Pseudomonas aeruginosa*）W7-1 CGMCC No. 1445 属革兰氏阴性杆菌，严格好氧，有鞭毛，运动性极强；有较强的絮凝性，絮凝率大于 80%；在 LB 固体培养基中生长的该菌可产生可溶性蓝绿色或茶色色素，该菌在 LB 液体培养基中生长、繁殖速度较快，生长曲线如图 1 所示，代时 30-40min，进入对数期的时间为 8-12 小时，平衡期细胞浓度可达  $10^9$ - $10^{10}$  个细胞/L。

本发明的第二个目的是提供一种铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 的大规模发酵培养方法。

本发明所提供的铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 的大规模发酵培养方法,是将铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 接种到其专用液体培养基中,在 30-35℃ 下通气培养;所述专用液体培养基的配方为:每 1000mL 水中含:酵母浸粉 12-18g,胰蛋白胨 8-12g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2-1.8g, NaCN 320-480mg, pH 值为 7.0-7.8。

在上述培养方法中,接种比例为 5-10%,优选为 7%;培养液中的溶解氧含量为 3-5mg/L;培养 40-45 小时即可停止发酵,收集菌体。培养温度优选为 35℃。

优选的专用液体培养基的配方为:每 1000mL 水中含酵母浸粉 15g,胰蛋白胨 10g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5g, NaCN 400mg, pH 值为 7.6 (固体培养基再添加 15g 琼脂)。

实验证明,本发明提供的铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445,可以有效地降解或利用苯、甲苯、苯酚、吡啶、氰化物等有机污染物,对初始浓度为 1000mg/L 的 NaCN 降解率可达 90% 以上 (72 小时内);并具有广谱的抗生素抗性较高的重金属耐受性,对抗生素氯霉素、壮观霉素、卡那霉素、四环素、潮霉素等的抗性均可达到 100mg/L,对重金属盐  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  的耐受浓度可达到 20mg/L;该菌的胞内酶对氰化物具有较高的降解能力;此外,该菌的培养方法简单,生长、繁殖速度快,具有扩大化生产的可行性。

基于上述特点,本发明的铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 可用于含苯、甲苯、苯酚、吡啶、氰化物等有机污染物的污染源的生物治理,并借此开发出相应的环保生物制剂,具有较高的研究、应用及市场价值。

### 附图说明

图 1 为铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 在 LB 液体培养基中的生长曲线。

图 2 为铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 对 NaCN 的降解曲线图。

### 具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法,所有培养基中的溶剂均为水。

BS 无机盐溶液组分:每 1000mL 水中含:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.0g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0g, NaCl 0.25g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.045g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.01g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.002g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.003g,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.003g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002g, pH 7.5 (固体培养基添加 15g 琼脂)。

实施例 1、铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 的分离、筛选、纯化

在选择压力 NaCN 200mg/L 下,也就是以无机氰化物为唯一碳源与氮源,从长期驯养的活性污泥中,经过富集、分离、筛选、纯化等步骤得到铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W<sub>7-1</sub>,该菌株已于 2005 年 08 月 25 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No.1445。

具体过程:将采集样品接种到含液体富集培养基(在 BS 无机盐溶液中添加 NaCN 200mg/L 作为唯一碳源与氮源)的摇瓶中,35℃,120rpm 下振荡培养一周。将富集液涂布到固体 BS 选择培养基上,35℃,恒温培养,直至长出明显可见的菌落。挑取单菌落,移接到液体 BS 选择培养基中,35℃,120rpm 下振荡培养,直至细胞浓度达到  $10^7$ - $10^8$  cells/mL。再次固体平板涂布,检测纯度,直至获得以无机氰化物为唯一碳源与氮源生长的纯种菌株。

实施例 2、铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 培养条件的优化

一、铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 培养基组分的优化

### 1、碳源的优化

考察了铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 对葡萄糖,甘油,蔗糖,麦芽糖,酵母浸膏等几种碳源的利用情况,具体方法为:采取单因素实验,固定氮源成分胰蛋白胨 2.5g/L 与无机盐组分,改变碳源成分为葡萄糖,甘油,蔗糖,麦芽糖,酵母浸膏(含量均为 5g/L),接种铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445,35℃,150rpm,培养 48h,测定  $\text{OD}_{600}$ ,确定细胞生长情况,试验结果显示,酵母浸膏为适宜的碳源。

### 2、氮源的优化

考察了铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 对胰蛋白胨,蛋白胨,牛肉膏,尿素,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  几种氮源的利用情况,具体方法为:采取单因素实验,固定碳源成分酵母浸膏(5g/L)与无机盐组分,改变氮源成分为胰蛋白胨,蛋白胨,牛肉膏,尿素,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (含量均为 2.5g/L),接种铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445,35℃,150rpm,培养 48h,测定  $\text{OD}_{600}$ ,确定细胞生长情况,试验结果显示,适宜的氮源为胰蛋白胨。

### 3、发酵培养基组分的正交试验

通过正交试验确定铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 发酵培养基各组分的最佳添加量, 被考察的因子与水平数如下:

酵母浸粉 (g/L): 0, 5, 10, 15;

胰蛋白胨 (g/L): 0, 2.5, 5, 10;

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L): 0, 0.5, 1.0, 1.5;

NaCN (mg/L): 0, 400, 800, 1200。

正交试验结果数据与分析如表 1 所示:

表 1 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 发酵培养基优化正交试验结果

所在列	A	B	C	D	E	
因素	酵母浸粉	胰蛋白胨	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	NaCN	空白	实验结果
1	1	1	1	1	1	-0.005
2	1	2	2	2	2	0.03
3	1	3	3	3	3	0.002
4	1	4	4	4	4	0
5	2	1	2	3	4	0
6	2	2	1	4	3	0.017
7	2	3	4	1	2	0.183
8	2	4	3	2	1	0.18
9	3	1	3	4	2	-0.035
10	3	2	4	3	1	-0.005
11	3	3	1	2	4	0.167
12	3	4	2	1	3	0.138
13	4	1	4	2	3	0.165
14	4	2	3	1	4	0.135
15	4	3	2	4	1	-0.006
16	4	4	1	3	2	0.155
均值 1	0.007	0.031	0.084	0.113	0.041	
均值 2	0.095	0.044	0.041	0.136	0.083	
均值 3	0.066	0.086	0.071	0.038	0.081	
均值 4	0.112	0.118	0.086	-0.006	0.076	
极差	0.105	0.087	0.045	0.142	0.042	

经分析得出的最佳组合为: A4B4C4D2, 各组分的方差分析结果如表 2 所示:

表 2 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 发酵培养基各组分的方差分

析结果

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
酵母浸粉	0.026	3	5.200	9.280	
胰蛋白胨	0.019	3	3.800	9.280	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.005	3	1.000	9.280	
NaCN	0.052	3	10.400	9.280	*
误差	0.01	3			

通过方差分析可知，四个因素的显著性顺序为：D>A>B>C。根据上述正交试验的数据与分析结果，确定铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 优选的发酵培养基配方为：酵母浸粉 15g/L，胰蛋白胨 10g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g/L，NaCN 400mg/L。试验结果还表明，在被考察的因子中，NaCN 对菌株生长的影响最显著。

## 二、其它培养条件的优化

### 1、最适装样量的确定

在上述优化的培养基中，采取不同的装样量：30mL/300mL，50mL/300mL，100mL/300mL，150mL/300mL，温度 35℃，转速 150rpm，振荡培养 52 小时后，测定 OD<sub>600</sub>，试验结果表明，铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 摇瓶培养的适宜装样量为 30mL/300mL。

### 2、生长 pH 值的优化

采用上述优化的培养基，固定其他培养条件如温度 35℃，转速 150rpm，改变起始 pH 值条件 7.0，7.2，7.4，7.6，振荡培养 52 小时后，测定 OD<sub>600</sub>，试验结果表明，铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 最适生长 pH 值为 7.6。

### 3、培养温度的优化

采用上述优化的培养基，改变培养温度 28℃，33℃，35℃，37℃，40℃，转速 150rpm，培养 52 小时后，测定 OD<sub>600</sub>，试验结果表明，铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 适宜的生长温度为 30-35℃。

### 4、最适转速的优化

采用上述优化的培养基与其他适宜条件，如培养温度 35℃，pH 值为 7.6，改变转

速条件 120rpm, 150rpm, 180rpm, 200rpm, 培养 52 小时后, 测定  $OD_{600}$ , 试验结果表明, 铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 摇瓶培养的适宜转速为 150rpm。

实施例 3、铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 的发酵培养

将经过平板活化的铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 菌种接种到 500mL 三角瓶中 (含 100mL 培养液: 酵母浸粉 15, 胰蛋白胨 10,  $KH_2PO_4$  1.5 ( $g L^{-1}$ ), NaCN 400mg/L, pH 值为 7.6), 在 35°C、150rpm 下预培养 32-37h 后, 以 5% 接种比例接种到 10L 种子罐中, 35°C、200rpm 培养 40h 后, 以 7% 的接种量接种到 120L 发酵罐 (BioFlo 5000, New Brunswick Scientific Co. Inc) 中 (含有 80L 培养液) 35°C、200rpm 进行扩大培养。在不同培养阶段取样镜检、测定  $OD_{600}$ , 观测该菌的生长动态。在 120L 发酵罐中铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 采用上述最佳培养条件, 得到活菌浓度数大于  $7.8 \times 10^{10} CFU mL^{-1}$  的菌悬液, 具有扩大化生产的可行性。

实施例 4、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对有毒、有害污染物的降解或利用情况

考察了铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对苯、甲苯、苯酚、吡啶、氰化物、喹啉的降解或利用情况。具体实验过程如下: 采用 BS 无机盐琼脂固体培养基, 以上述待试底物作为唯一的碳源或氮源, 添加的浓度分别为苯 5g/L, 甲苯 2g/L, 苯酚 50mg/L, 吡啶 1g/L, NaCN 200mg/L 和喹啉 0.5 g/L, 在 35°C 下培养, 结果显示, 在以上底物条件下, 铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 均生长良好, 表明其可以有效降解或利用苯、甲苯、苯酚、吡啶、氰化物、喹啉, 因此对有机污染物具有较好的降解功能。

实施例 5、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对抗生素、重金属的抗性

一、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对抗生素的抗性

检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对羧苄霉素、卡那霉素、壮观霉素、氯霉素、潮霉素、四环素、头孢霉素的抗性, 方法为将该菌分别接种于含上述不同浓度抗生素的 LB 固体培养基中, 实验结果显示铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对上述抗生素的耐受浓度均可达到 100mg/L, 具有较高的抗生素抗性。



## 二、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对重金属的抗性

以 Pb 为例，检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对重金属的抗性，方法为将该菌接种于含不同浓度  $Pb(NO_3)_2$  的 LB 固体培养基中，在 35℃ 下培养，结果铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对上述  $Pb(NO_3)_2$  的耐受浓度可达到 20mg/L，具有较高的重金属抗性。

## 实施例 6、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对氰化物的生物降解能力

### 一、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对氰化物的微生物降解能力

以 NaCN 为例，检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对氰化物的微生物降解能力，具体方法为：将该菌接种于含 400mg/L NaCN 的 BS 无机盐液体培养基中，在 35℃ 下培养，每隔 12h 测定发酵液 580nm 的 OD 值和氰化物的含量，对 NaCN 的降解曲线如图 2 所示（空白：未进行接种），结果表明，经过 72 小时，铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对 NaCN 的去除率达到 90% 以上，因此对氰化物具有较高的降解能力。

### 二、检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对氰化物的酶促降解能力

以 NaCN 为例，检测铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 的胞内、胞外酶对氰化物的降解能力，首先按下述步骤进行粗酶的提取：

- 1) 将细菌培养至对数生长期后，8000rpm 离心 20min，收集上清和菌体；
- 2) 用 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液洗涤沉淀，再 8000rpm 离心 20min，保留两次离心得到的上清液作为胞外酶提取物；
- 3) 用步骤 2) 所用的缓冲液重新悬浮沉淀，并冻融；
- 4) 超声波破碎细胞 (300W，作用 10min)；
- 5) 8000rpm 离心 20min，保留上清，再用步骤 2) 所用的缓冲液洗涤，再 8000rpm 离心 20min，保留上清，将保留的两次上清液作为胞内酶提取物。

然后，按下述步骤和反应体系进行铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 的胞内、胞外酶酶的活性测定：

- 1) 向 100mL 锥形瓶内加入 5mL 的 0.1ml/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)，1mL 的 10ug/mL NaCN，4mL 粗酶制品，空白对照：以水代替粗酶；
- 2) 将锥形瓶置于水浴摇床内，每隔 15 分钟，分两次测定反应体系中的氰化物含

量。

结果显示，铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No.1445 的胞内酶粗提物对氰化物的降解速率可达 0.6g/L/h，表明该菌的胞内酶对氰化物均具有较高的降解活力。

实施例 7、基因水平上研究铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对氰化物的降解特性

提取铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 的质粒 DNA，采用电穿孔法，将提取的质粒转化大肠杆菌 XL0LR，将转化子接种于含 400mg/L NaCN 的 BS 无机盐液体培养基中，使其以 NaCN 作为唯一碳源和氮源生长，在 35℃ 下培养，结果转化子可正常生长，从而从基因水平上证明铜绿假单胞菌菌株 (*Pseudomonas aeruginosa*) W7-1 CGMCC No. 1445 对氰化物具有降解能力。

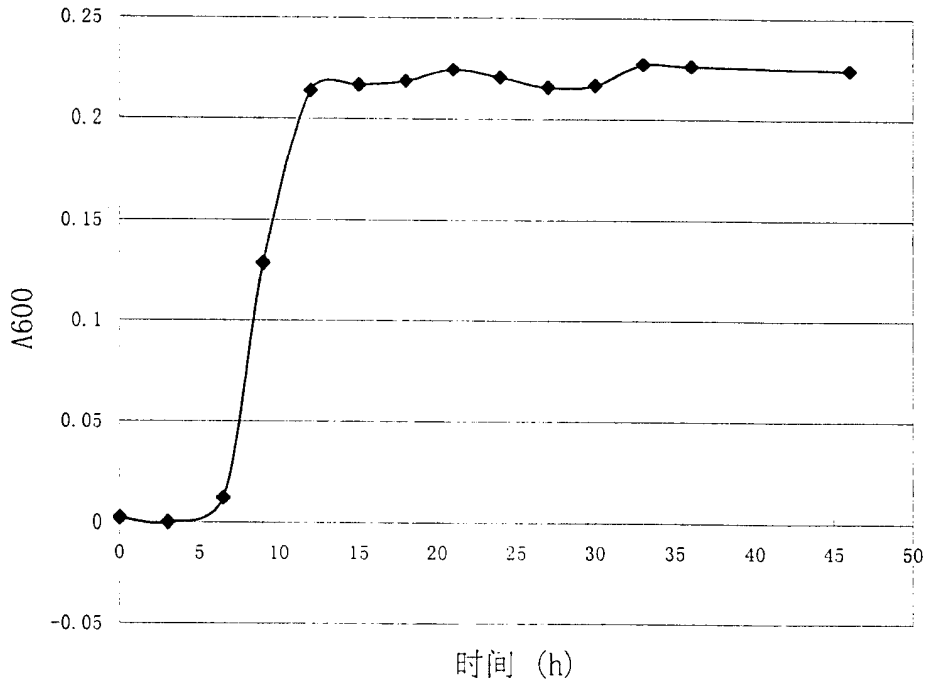


图 1

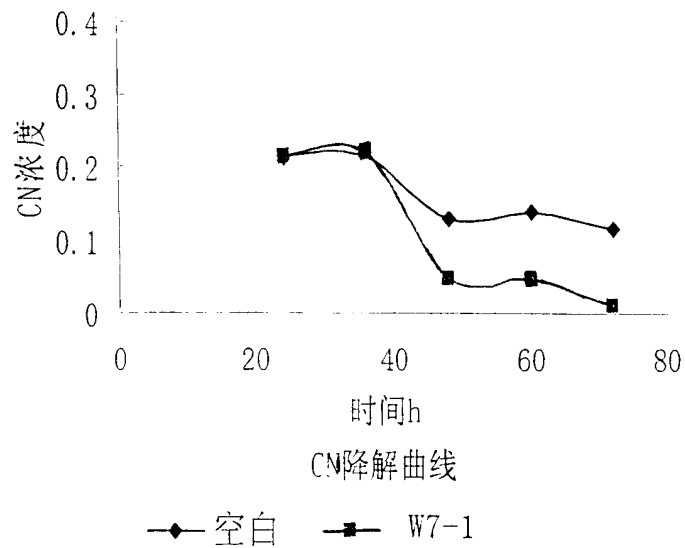


图 2