

文章编号:1006-9941(2022)10-1004-09

一株高效降解苯胺菌 Q6 的分离鉴定及其降解特性

胡锦涛,白红娟,宋雨,赵啟超

(中北大学环境与安全工程学院,山西太原 030051)

摘要: 火炸药在生产和加工中会产生苯胺废水,对环境造成较大的污染。为苯胺降解提供高效的菌种资源,从化工废水处理厂好氧曝气池活性污泥中分离出一株以苯胺为唯一碳源和能源生长的高效降解菌 Q6,通过形态观察、生理生化特征和 16S rDNA 基因序列系统发育分析,初步鉴定菌株属于食酸菌属(*Acidovorax sp.*)。研究了接种量、温度、pH 值、外加碳氮源对菌株 Q6 降解苯胺的影响,同时拟合了不同初始浓度苯胺的降解动力学过程和菌株 Q6 生长动力学过程。实验结果表明,在温度 23~37 °C 和 pH 5~8 的条件下,菌株 Q6 均能高效降解苯胺,且氯化铵可作为最优共代谢氮源促进菌株对苯胺的降解。最适条件 33 °C、pH 7 和接种量 10%,该菌株对不同初始浓度(200~3000 mg·L⁻¹)苯胺的降解率均可达 95.0% 以上,降解苯胺过程呈现一级和零级动力学关系。Q6 生长过程符合 Haldane 方程,其最大比生长速率 μ_{\max} 为 0.130 h⁻¹,半饱和常数 K_s 为 190 mg·L⁻¹,抑制常数 K_i 为 8497 mg·L⁻¹。研究表明,菌株 Q6 在处理含高浓度苯胺工业废水方面具有独特潜力。

关键词: 苯胺;食酸菌属(*Acidovorax sp.*);Q6;降解特性;降解动力学;生长动力学

中图分类号: TJ55; X172

文献标志码: A

DOI:10.11943/CJEM2022168

0 引言

苯胺(Aniline, C₆H₇N, 简称 AN)作为重要的化工原料广泛应用于各类火炸药合成,生产过程中往往会产生大量的苯胺废水^[1]。由于苯胺对人类和环境造成严重危害,已被我国和美国等国家列为优先控制污染物之一^[3-4]。因此,迫切需要开发一种合理、有效的方法从环境中消除苯胺。

苯胺废水的处理方法主要有物理法^[5]、化学法^[6-8]和生物法^[9-16],其中生物法是一种经济、有效和环保的技术。已有研究表明一些好氧菌如 *Acinetobacter calcoaceticus* JH9^[10], *Bacillus sp.* AN6-4^[17] 和 *Delftia sp.* ANP^[18],能够将苯胺先氧化成邻苯二酚,然后通过

邻位或间位开环机制代谢邻苯二酚,最终生成丙酮酸和乙醛,或中间代谢产物琥珀酸和乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环^[19]。近年来,已经分离到能降解苯胺的菌属 *Alcaligenes faecalis* LS1^[11]、*Candida tropicalis* AN1^[20]、*Dietzia natronolimnaea* JQ-AN^[21]、*Enterobacter ludwigii* KH-A5^[22],这些菌株通常能降解和耐受的苯胺浓度在 1000 mg·L⁻¹ 以下,48 h 内降解率为 40%~100%。然而,高浓度苯胺会对微生物产生严重的危害,如:渗透压平衡的破坏、抑制酶活性甚至细胞死亡^[15]。目前已有一些耐受高浓度苯胺降解菌的研究,例如, *Chryseobacterium sp.* AN4^[23] 可在苯胺初始浓度为 3000 mg·L⁻¹ 无机盐固体培养基上生长,在苯胺浓度为 1000 mg·L⁻¹ 时,需要 40 h 降解完全,苯胺浓度为 1750 mg·L⁻¹ 左右,降解效果不理想; *Delftia sp.* AN3^[24] 最高耐受苯胺浓度为 5000 mg·L⁻¹,苯胺浓度为 2000 mg·L⁻¹ 时,培养 3 d 才能完全降解,当浓度高于 3000 mg·L⁻¹ 时,苯胺不能被完全降解; *Ochrobactrum sp.* MC-01^[25] 能耐受 6500 mg·L⁻¹ 苯胺,对初始浓度为 200~1600 mg·L⁻¹ 的苯胺 48 h 降解率约为 75%。总之,虽然目前报道的降解苯胺的菌株种类较多,但这些菌株耐苯胺浓度低,或者虽然耐苯胺浓度高,但降解苯胺需时较长且降解率

收稿日期:2022-06-24;修回日期:2022-07-20

网络出版日期:2022-09-06

基金项目:山西省重点研发计划项目(201903D321083);中央引导地方科技发展资金项目(YDZX 20201400001443);山西省研究生教育创新项目(2022Y651)

作者简介:胡锦涛(1995-),女,硕士,主要从事环境微生物技术研究。e-mail:1162711379@qq.com

通信联系人:白红娟(1969-),女,博士,教授,主要从事环境微生物技术研究。e-mail:bhj44871@163.com

引用本文:胡锦涛,白红娟,宋雨,等.一株高效降解苯胺菌 Q6 的分离鉴定及其降解特性[J].含能材料,2022,30(10):1004-1012.

HU Jin-jun, BAI Hong-juan, SONG Yu, et al. Isolation and Identification of a Highly Efficient Strain of Aniline Degrading Bacterium Q6 and Degradation Characteristics[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao)*, 2022, 30(10):1004-1012.

较低,因此,有必要进一步开展苯胺降解微生物资源的发掘工作。

为了获得环境适应性好、耐受苯胺的高效降解菌,本研究从化工废水处理厂好氧曝气池活性污泥中分离出一株高效降解苯胺的菌株 Q6,对该菌株进行了初步鉴定和降解特性研究,以期为利用该菌株处理高浓度苯胺废水提供菌种资源和一定的理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂及设备

试剂:苯胺(C_6H_7N ,分析纯),无色油状液体,稍溶于水,易溶于乙醇、乙醚等有机溶剂,购自 Aladdin 公司;用于培养基制备的化学药品和试剂为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂开发中心。

仪器:HZ-9511KB 双层气浴恒温摇床;SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台;BXM-30R 型高压蒸汽灭菌锅;MGC-350HP-2 型智能人工气候箱;UV-2100 型紫外可见分光光度计;HC-3018 台式离心机;JY92-II 型超声波乳化机;EM-30PLUS 型扫描电子显微镜。

1.2 菌株来源及培养基

菌株来源:从太原清徐县某化工废水处理厂好氧曝气池活性污泥中驯化、富集所得,污泥呈褐色、松散。

无机盐培养基(筛选培养基): Na_2HPO_4 0.4 g, NaH_2PO_4 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, KCl 0.2 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, 按需添加苯胺,去离子水定容至 1000 mL, pH 7。

LB 培养基(富集培养基):酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 去离子水定容至 1000 mL, pH 7。

固体培养基:在上述培养基中加入 20 g 琼脂。

1.3 实验方法

1.3.1 降解苯胺菌株驯化分离及鉴定

将化工废水处理厂好氧曝气池活性污泥 10 g, 加入装有 90 mL 无菌水锥形瓶中,恒温摇床中震荡 24 h 制成样品液。取 10 mL 样品液转接于 200 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的无机盐培养基中,每 24 h 取样测苯胺残留量,至苯胺完全降解后,按照此方法依次转接于 500、800、1000 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的无机盐培养基中依次梯度驯化富集降解菌,取最终驯化的培养液稀释涂布到 LB 固体培养基平板上,30 $^{\circ}C$ 人工气候箱中培养。长出菌后选择不同形态的菌落平板划线分离纯化至长出单菌落,挑取纯化后的单菌落至 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的无机盐培养基中培养,24 h 取样测苯胺残留量,筛选出苯胺降解率

最大的菌株并命名为 Q6,用于随后的生物降解实验。

对菌株 Q6 的形态和生化特性进行了测定^[26],使用 16S rDNA 基因测序进行进一步鉴定^[26],Blast 方法将核苷酸序列提交到 GenBank 数据库进行比对和鉴定,使用 MEGA 7 通过邻接法生成最大似然系统发育树。

1.3.2 降解苯胺菌株菌悬液的制备

取斜面保存的菌株接种至含苯胺的富集培养基中 30 $^{\circ}C$ 培养至对数期,取样于离心机 5000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,弃去上清液,沉淀菌体用磷酸缓冲液清洗两次,无机盐培养基重悬制成菌悬液(生物量 $OD_{600nm}=1.0$)。

1.3.3 降解苯胺菌株生长及降解实验

在 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺无机盐培养基中,接种一定量的菌悬液使 $OD_{600nm}=0.2$,在温度 30 $^{\circ}C$ 、pH 7 的好氧条件下进行菌株 Q6 的生长及降解实验,每隔 4 h 取样测定生物量和苯胺残留量。

为了证明菌株 Q6 可以降解苯胺,设置 4 组不同的平行实验:(1)只含有 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的培养基;(2)含有 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的培养基和菌株 Q6;(3)含有 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的培养基和灭活的菌株 Q6;(4)含有 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺的蒸馏水和菌株 Q6。在温度 30 $^{\circ}C$ 、pH 7 的好氧条件下进行了苯胺降解试验,接种一定量菌悬液使 $OD_{600nm}=0.2$,每隔 4 h 取样测定苯胺残留量。

1.3.4 降解苯胺菌株影响因素实验

接种菌悬液至 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺无机盐培养基中进行单因素试验,在不同菌液接种量(5%、10%、15%、20%、25%)、pH 值(5、6、7、8、9)和温度(23、28、33、37、43 $^{\circ}C$)的条件下 150 $r \cdot min^{-1}$ 恒温摇床中培养,每隔 4 h 取等样测定生物量和苯胺残留量。确定其最适宜的苯胺降解条件。接种菌悬液至含 500 $mg \cdot L^{-1}$ 苯胺无机盐培养基中,另外添加 0.2% 碳源(乙酸钠、淀粉、葡萄糖、蔗糖)和氮源(硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、尿素)最适条件下 150 $r \cdot min^{-1}$ 恒温摇床中培养,12 h 取样测定生物量和苯胺残留量,以苯胺为唯一碳氮源的培养基为对照。

1.3.5 菌株 Q6 降解苯胺动力学及其生长动力学实验

(1) 菌株 Q6 降解苯胺动力学

在 pH 7、温度 33 $^{\circ}C$ 和接种量 10% 最适条件下,研究了不同初始苯胺浓度(200~4000 $mg \cdot L^{-1}$)对菌株 Q6 苯胺降解特性的影响。分别采用零级(式 1)和一级动力学(式 2)模型^[10]对不同初始浓度苯胺降解数据进行拟合,评估苯胺初始浓度对降解动力学的影响。

$$C_t = C_0 - kt \quad (1)$$

$$\ln C_t = \ln C_0 - kt \quad (2)$$

式中, t 是时间, h; k 是一阶常数, h^{-1} ; C_0 为苯胺初始浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C_t 为时间 t 时苯胺浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

(2) 菌株 Q6 生长动力学

选取菌株 Q6 对初始苯胺浓度 200~2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降解特性实验测得的生物量, 求出不同苯胺浓度所对应生长速率, 然后求出比生长速率, 最后采用 Haldane 底物抑制模型(式 3)^[27] 对菌株 Q6 在降解苯胺时的比生长速率进行拟合, 其方程如下:

$$\mu = \frac{C_{AN} \mu_{\max}}{\frac{C_{AN}^2}{K_i} + C_{AN} + K_s} \quad (3)$$

式中, μ 是比生长速率, h^{-1} ; μ_{\max} 为最大比生长速率, h^{-1} ; C_{AN} 为初始苯胺浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; K_s 为生长动力学的半饱和系数, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; K_i 为生长动力学的抑制系数, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4 分析方法

采用比浊法^[28]测定菌体生长量。不同时间间隔取样, 在 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 处依次测定菌体吸光值。

采用 N -(1-萘基)-乙二胺偶氮分光光度法^[29]测定苯胺的含量。配制苯胺标准溶液系列, 在 $\text{OD}_{545\text{nm}}$ 处依次测定吸光度。以苯胺浓度为横坐标, 以校正吸光度为纵坐标作图, 得到一条直线作为标准曲线, 通过与标准曲线的比较计算出具体数据。

采用扫描电镜法 (SEM) 对分离菌株 Q6 进行形态表征。

2 结果与讨论

2.1 降解苯胺菌株的分离筛选及鉴定

采用富集法, 从好氧曝气池的活性污泥中分离得到苯胺降解菌 Q6, 该菌株能以苯胺作为生长的唯一碳氮源, 根据形态学观察, 在含苯胺的 LB 固体培养基上, 菌落初期形态较小, 白色圆形中间凸起, 表面光滑, 四周平滑无隆起(图 1a); 当培养至 48 h, 菌落变大, 呈杏黄色圆形中间凸起, 表面光滑, 四周略微有隆起(图 1b); 当培养至 72 h 以后, 菌落呈暗褐色(图 1c); 可能是菌株 Q6 在苯胺降解过程中产生的有色代谢产物。菌株 Q6 为革兰氏阴性需氧杆状菌, 菌落长度为 1.5~1.8 μm , 宽度为 0.3~0.5 μm (图 1d)。生化试验表明该菌株 Q6 的菌膜形成、过氧化氢酶试验为阳性, V-P、甲基红、吡啶试验为阴性。此外, 使用同源搜索将菌株 Q6 序列与 NCBI 数据库中的序列进行比较, 通过 MEGA 软件构建系统发育树(图 2), 结果表明: 菌株 Q6 的

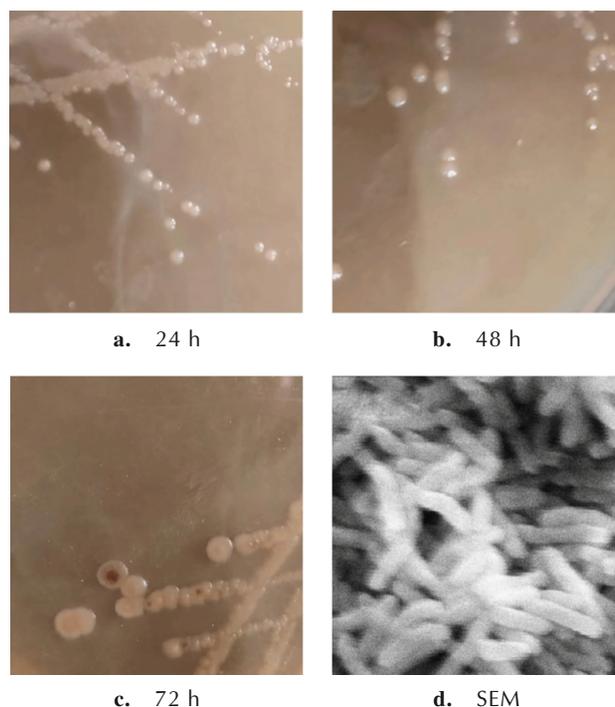


图 1 不同生长时刻的菌株 Q6 菌落形态及其电镜图

Fig. 1 Colony morphology and electron microscope structure of strain Q6 at different growth moments

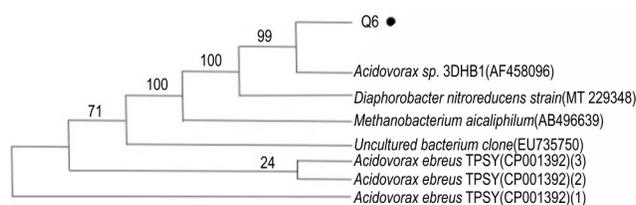


图 2 菌株 Q6 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain Q6

16S rRNA 序列与 *Acidovorax sp.* 3BHB1 的相似性为 99.93%, 并且该菌株与 *Acidovorax sp.* 3BHB1 聚于同一分支, 结合形态特征、生化试验和 16S rRNA 评估结果菌株 Q6 初步被鉴定属于食酸菌属 (*Acidovorax sp.*), 命名为食酸菌属 (*Acidovorax sp.*) Q6。

2.2 菌株 Q6 对苯胺降解及其生长

在无机盐培养基、含灭活菌株 Q6 无机盐培养基和含菌株 Q6 蒸馏水中, 苯胺的含量几乎没有较大变化(图 3)。表明苯胺的降解并不是由菌株吸附或挥发导致的, 其主要降解途径是生物降解。

在以苯胺 ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为唯一碳氮源的培养液中的苯胺降解过程和菌株 Q6 生长曲线如图 4。菌株在 0~4 h 生长缓慢, 而在此期间苯胺快速降解, 原因是在接种菌悬液之前, 菌株经过长期的驯化培养后提升了对苯胺毒性的耐受性, 菌株在生长适应期并非因苯胺

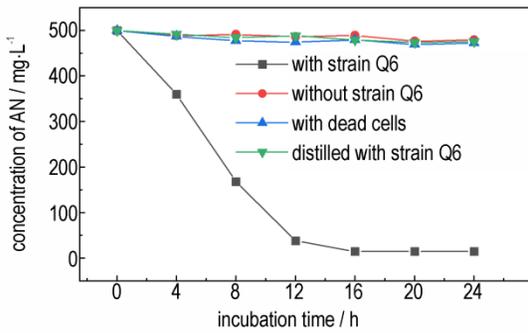


图3 不同体系对菌株 Q6 的降解

Fig.3 Degradation of strain Q6 in different systems

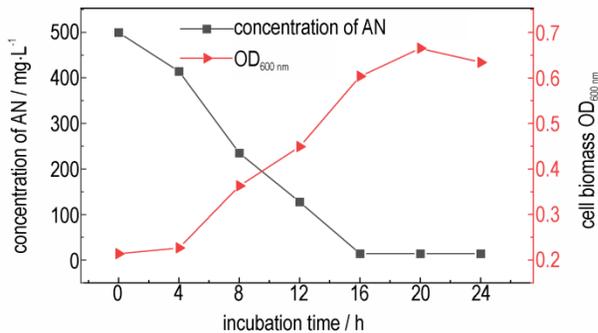


图4 苯胺降解过程和菌株生长曲线

Fig.4 Degradation process of Aniline and growth curve of strain

的快速降解而增长迅速,这是因为在苯胺降解初期,菌株进入新环境首先进行降解苯胺所需酶的形成,苯胺与酶结合后被分解利用使菌株进一步生长繁殖,经过短期的适应期后进入对数生长期^[30]。菌株在 4~20 h 生长迅速,在此期间苯胺快速降解,苯胺的降解率在 16 h 达 97.2%,苯胺完全降解后,OD 值继续增加到某一最大值后开始下降,说明菌株能够继续利用过程中的中间产物,使苯胺彻底降解^[31]。2 条曲线的变化趋势表明苯胺的降解和菌株 Q6 的生长相关。

2.3 影响因素结果分析

2.3.1 接种量对菌株 Q6 降解苯胺的影响

为了研究接种量对苯胺降解的影响,选用 5%~25% 的接种量进行苯胺测试,结果如图 5 所示,由图 5 可以看出,降解率随着接种量的增加而增加,与 *Ochrobactrum sp.* MC-01 对苯胺的生物降解实验^[23]和 *Alcaligenes faecalis* KDI 对苯酚和喹啉的降解实验^[32]结果类似。由此可见,接种量提升了菌株对污染物毒性的耐受性。培养相同的时间,高接种量的菌株指数期活菌数量相比低接种量高,加速了对底物的降解^[33]。由图 5 还可以看出,10%~25% 接种量 12 h 降解率为 74.4%~82.7%,12 h 后降解率无显著差异,因

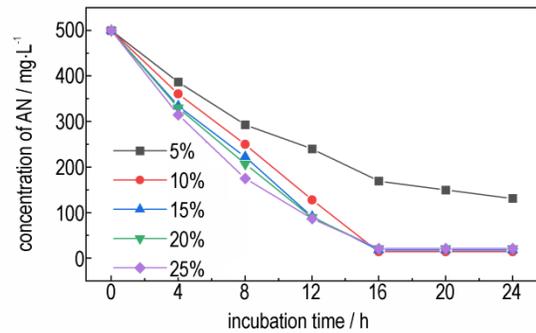


图5 接种量对苯胺降解的影响

Fig.5 Effect of inoculation amount on degradation of Aniline

此选取 10% 作为菌株 Q6 的接种量来降解苯胺。

2.3.2 pH 对菌株 Q6 降解苯胺的影响

pH 值对菌株 Q6 降解苯胺的影响如图 6。在 pH 5~8 的范围内,20 h 内苯胺的降解率均在 95.0% 以上,表明菌株 Q6 具有良好的 pH 耐受范围,并且可以很好的应对工业废水不同 pH 特性。在酸性和中性条件下菌株对苯胺的降解优于碱性,与 Peng H 等^[15]研究 pH 对菌株 *Delftia tsuruhatensis* AD4 降解苯胺的影响结果一致。pH 为 7 时,4,8 和 12 h 菌株 Q6 对苯胺的降解率分别为 27.9%,66.4% 和 92.4%,初始浓度 500 mg L⁻¹ 苯胺可以在 16 h 降解完全,因此菌株 Q6 降解苯胺最适 pH 为 7。当 pH 为 5 和 8 时,苯胺降解率略有下降,16 h 苯胺的降解率分别为 70.8%、87.9%。pH 为 9 时,16 h 苯胺的降解率仅为 21.5%。原因是高碱性条件下影响细胞膜所带电荷使酶的活性受到抑制,影响酶和污染物分子的结合,抑制了苯胺的降解效率^[34]。

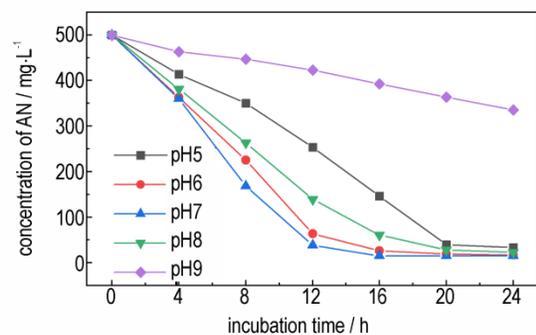


图6 pH 对苯胺降解的影响

Fig.6 Effect of pH on degradation of Aniline

2.3.3 温度对菌株 Q6 降解苯胺的影响

温度影响菌株的生长和代谢活性。*Acidovorax sp.* 与本研究中分离的菌株 Q6 具有约 99.93% 的序列相似性,是一种中温细菌,最适生长温度在 25~45 °C 之间^[32]。因此,选用 23,28,33,37 和 43 °C 温度梯度

研究温度对菌株 Q6 降解苯胺的影响, 结果如图 7 所示。从图 7 可以看出, 菌株 Q6 降解苯胺的合适温度为 23~37 °C, 此温度范围内苯胺在 24 h 降解率均高达 92.0% 以上, 表明菌株对普通环境温度有很强的适应性。温度为 33 °C 时, 4、8 和 12 h 苯胺的降解率分别为 27.9%、66.4% 和 92.4%, 初始浓度 500 mg·L⁻¹ 苯胺可以在 16 h 降解完全, 因此菌株 Q6 降解苯胺最适温度为 33 °C, 28 °C 和 37 °C 时, 16 h 内苯胺的降解率均可达到 95.0% 以上, 与 Chengbin X 等^[33]研究的 *Delftia sp.* XY16 菌降解苯胺的特性的结论相似。在 43 °C 时 8h 苯胺降解率仅为 11.4%, 之后没有发生显著变化, 主要原因是酶活性受到抑制影响苯胺降解速率^[35]。另一方面, 在高于最佳温度范围 (23~37 °C) 的温度下, 微生物生长速率的降低可能与细胞膜流动性和膜蛋白营养转运效率的降低有关^[36]。

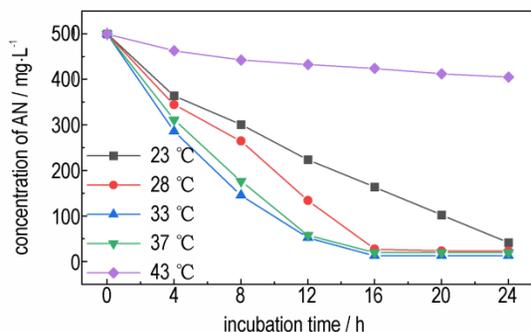


图 7 温度对苯胺降解的影响

Fig.7 Effect of temperature on degradation of Aniline

2.3.4 外加碳氮源对菌株 Q6 降解苯胺的影响

添加额外的碳氮源会促进或抑制有毒污染物的生物降解。如图 8 所示, 以苯胺为唯一碳氮源时的对照组中, 降解率为 76.2%, OD 值为 0.44。与对照相比, 额外添加碳源乙酸钠或蔗糖对苯胺降解有一定的促进作用, 降解率均提高了 5.0% 以上, 而添加淀粉和葡萄糖则表现出抑制作用, 葡萄糖抑制较为明显, 降解率降低了 16.6%, OD 值为 0.38。王薇等^[37]也曾报道葡萄糖对 *Rhodococcus sp.* AN5 降解苯胺过程有抑制作用, 可能是菌株生长优先利用葡萄糖作为碳源, 使苯胺降解率降低。然而值得注意的是, 苯胺降解率的降低不仅仅是由于菌株优先利用葡萄糖, 额外添加葡萄糖培养基的 OD 值低于对照组, 表明生长受到明显的整体抑制^[39]。在额外添加尿素作为第二氮源的试验中表现出显著的抑制作用, 降解率仅为 24.3%, 可能是尿素影响了酶活性, 改变了菌株代谢途径。而添加硫酸铵、氯化铵、硝酸铵后均促进了菌株对苯胺的降解, 氯

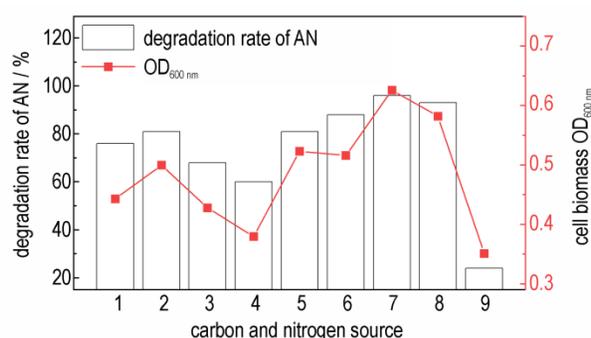


图 8 外加碳氮源对苯胺降解的影响

1—对照, 2—乙酸钠, 3—淀粉, 4—葡萄糖, 5—蔗糖, 6—硫酸铵, 7—氯化铵, 8—硝酸铵, 9—尿素

Fig.8 Effect of additional carbon and nitrogen source on degradation of Aniline

1—Contrast, 2—Sodium acetate, 3—Starch, 4—Glucose, 5—Sucrose, 6—Ammonium sulfat, 7—Ammonium chloride, 8—Ammonium nitrate, 9—Urea

化铵为最优氮源, 降解率较对照组提高了 20.8%, OD 值为 0.66, 其次是硝酸铵、硫酸铵, 降解率分别提高了 17.3% 和 12.5%。这说明, 菌株降解苯胺的过程受外加氮源的影响较外加碳源明显, 可以作为共代谢基质适量添加在苯胺废水处理系统中, 提高处理系统中苯胺的降解效率。

2.4 菌株 Q6 对苯胺的降解及动力学研究

2.4.1 菌株 Q6 对苯胺的降解及耐受性结果分析

菌株的生长情况受苯胺浓度的影响, 苯胺浓度越高其对生物的毒性越大。因此, 研究在不同初始苯胺浓度下菌株的生长及对苯胺的降解是评价降解能力的主要标准之一^[15]。菌株对不同初始浓度苯胺的降解如图 9。由图 9 可以看出, 菌株能够将初始浓度为 200, 500, 1000, 1500, 2000 mg·L⁻¹ 和 3000 mg·L⁻¹ 的苯胺分别在 8, 16, 20, 24, 36 h 和 80 h 降解 95.0% 以上, 并且随着浓度的升高, 适应期也相应延长。原因是极高浓度苯胺降解环境使部分菌株死亡, 导致活菌数量减少, 使适应期延长。在 4000 mg·L⁻¹ 苯胺浓度下, 菌株仍能存活并缓慢增殖且有微弱的降解能力, 说明菌株能耐受 4000 mg·L⁻¹ 苯胺。菌株 Q6 对苯胺的耐受浓度和降解效率均优于目前报道的大多数细菌^[20-22]。菌株 Q6 具有良好的抗苯胺能力, 极其适合处理高浓度苯胺废水。

2.4.2 菌株 Q6 对苯胺的降解动力学分析

对苯胺降解过程采用零级、一级反应动力学方程式进行拟合, 结果如表 1 所示, 苯胺初始浓度在 200~500 mg·L⁻¹ 之间时, 菌株降解苯胺的过程用一级反应动

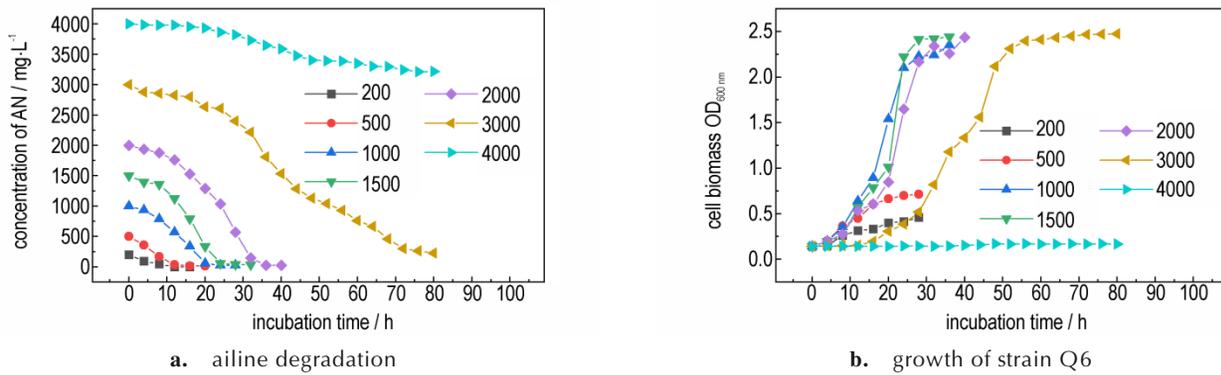


图9 不同初始浓度菌株 Q6 对苯胺的降解及生长

Fig.9 Degradation and growth of Aniline by strain Q6 at different initial concentrations

表1 菌株对不同苯胺初始浓度的降解动力学方程

Table 1 Degradation kinetics equations of strain to different initial concentration of Aniline

initial concentration of AN / mg·L ⁻¹	equation	degradation rate constant / mg·(L·h) ⁻¹	half life / h	R ²
200	ln c = -0.2066t + 5.2983	0.21	3.3	0.9799
500	ln c = -0.1419t + 6.2146	0.14	4.9	0.9383
1000	c = -38.97t + 1000	38.97	12.8	0.9473
1500	c = -49.92t + 1500	49.92	18.0	0.9224
2000	c = -43.42t + 2000	43.42	23.1	0.9110
3000	c = -35.51t + 3000	35.51	53.3	0.9530

力学描述,在 1000~3000 mg·L⁻¹之间时用零级反应动力学描述, R² 均达到 0.9 以上。这与 *Ochrobactrum anthropi* 菌^[39]对苯胺的降解过程相似,低浓度时比生长速率与基质浓度为一级反应特征,高浓度时表现为为零级反应特征。1000~1500 mg·L⁻¹时,降解速率逐步增大,1500 mg·L⁻¹时降解速率达到最大值 49.92 mg·(L·h)⁻¹,原因是充足的碳源以供菌株生长。随着初始浓度的升高,降解速率减小,是由于过高浓度的苯胺对菌株的生长有抑制和毒害作用,使降解速率减小。与之前研究报道相比,菌株 *Deftia sp.* AN3 可耐受 5000 mg·L⁻¹ 苯胺,降解速率为 29.76 mg·(L·h)⁻¹[40];菌株 *Klebsiella sp.* ZL-1 对苯胺的最大降解速率仅为 27.61 mg·(L·h)⁻¹[42];菌株 *Candida tropicalis* AN1 的最大降解速率也仅为 17.80 mg·(L·h)⁻¹[20];菌株 *Pseudomonas sp.* Z1 的最大降解速率为 41.40 mg·(L·h)⁻¹[9],这些菌株对苯胺的降解速率均低于菌株 Q6。因此,菌株 Q6 对苯胺有更高的生物降解能力。

2.4.3 菌株 Q6 降解苯胺的生长动力学分析

对其生长过程采用 Haldane 方程^[27]进行拟合(图 10),得到菌株 Q6 对苯胺的降解动力学方程为:

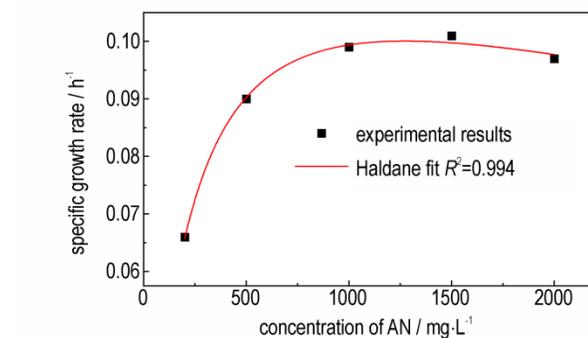


图10 菌株对不同苯胺初始浓度的比生长速率

Fig.10 Specific growth rates of strain to different initial concentrations of Aniline

$$\mu = \frac{0.130C_{AN}}{\frac{C_{AN}^2}{8497} + C_{AN} + 190}$$

动力学参数: $\mu_{max} = 0.130 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, K_i 为 $8497 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, R^2 为 0.994, 实验数据与模型拟合度良好。从图 10 可以看出,比生长速率随着初始苯胺浓度的增大呈先增加后减少的趋势,表明苯胺是一种抑制底物。降解苯胺最适浓度为 $1272 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 初始苯胺浓度低于 $1272 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 Q6 的比生长速率与初始苯胺浓度成正比关系,原因是缺乏充足的碳源以供

菌株生长,此时培养基中苯胺的浓度对菌株的生长起主要作用。初始苯胺浓度高于 $1272 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌株 Q6 的比生长速率与初始苯胺浓度成负相关,此时随着初始苯胺浓度的升高其对菌株抑制作用逐渐增强。

表 2 不同苯胺降解菌的生长动力学参数对比

Table 2 Comparison of growth kinetic parameters of different Aniline-degrading bacteria

bacterial species	fitting equation	$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	$K_s / \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_i / \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	R^2	reference
<i>Acidovorax sp.</i> Q6	Haldane	0.130	190	8497	0.994	In this study
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> JH9	Haldane	0.097	274	1005	0.938	[10]
<i>Bacillus firmus</i> BA01	Haldane	0.088	130	3500	-	[16]
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Monod	0.112	-	-	0.998	[39]
aerobic activated sludge granules	Haldane	-	441	1488	0.960	[42]

3 结论

(1)从化工废水厂的活性污泥中分离出一株耐高浓度苯胺降解菌 Q6,经鉴定为食酸菌属(*Acidovorax sp.*)。该菌株可以在苯胺为唯一碳氮源无机盐培养基中生长,能耐受高达 $4000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苯胺。

(2)菌株 Q6 降解苯胺具有较宽的环境适应范围和较高的苯胺降解率,最适条件下:接种量 10%、pH 7 和温度 $33 \text{ }^\circ\text{C}$,该菌株对不同初始浓度($200\sim 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)苯胺的降解率均可达 95.0% 以上,添加氯化铵作为额外氮源,降解率较对照组提高了 20.8%,可作为共代谢基质适量添加提高苯胺降解率。

(3)降解动力学分析表明,苯胺初始浓度在 $200\sim 500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间时,菌株 Q6 降解苯胺的过程呈现一级反应动力学反应,在 $1000\sim 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间时呈现零级动力学反应,其最大降解速率可达 $49.92 \text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$,高于目前报道的大多数苯胺降解菌。该菌株降解不同初始浓度苯胺生长动力学与 Haldance 模型拟合度良好,动力学参数: μ_{\max} 为 0.130 h^{-1} , K_s 为 $190 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, K_i 为 $8497 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, R^2 为 0.994,当浓度高于 $1272 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,生长速率开始下降,出现抑制模式。

参考文献:

- [1] 秦月娇,耿烁,焦纬洲,等.用超重力技术强化 $\text{O}_3/\text{Fe}(\text{II})$ 工艺深度氧化降解苯胺废水[J].含能材料,2018,26(5):448-454. QIN Yue-jiao, GENG Shuo, JIAO Wei-zhou, et al. Deep oxidation degradation of aniline wastewater by $\text{O}_3/\text{Fe}(\text{II})$ process enhanced using high-gravity technology[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials(Hanneng Cailiao)*, 2018, 26(5): 448-454.
- [2] MOHAMMED M, MEKALAL L P, CHINTAL Apati S, et al. New insights into aniline toxicity: Aniline exposure triggers en-
- velope stress and extracellular polymeric substance formation in *Rubrivivax benzoilyticus* JA2[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 385(C): 121571.
- [3] PENG Haojin, ZHANG Qian, TA Bin, et al. A metagenomic view of how different carbon sources enhance the aniline and simultaneous nitrogen removal capacities in the aniline degradation system [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 335: 125277.
- [4] 刘振海,马妍,黄占斌,等.基于硫酸根自由基高级氧化工艺降解水和土壤中苯胺的研究[C]//《环境工程》2019年全国学术年会论文集(下册),2019:61-67+75. LIU Zhen-hai, MA Yan, HUANG Zhan-bin, et al. Study on degradation of aniline in water and soil based on advanced oxidation process of sulfate radical [C]//Proceedings of 2019 national academic annual meeting of Environmental Engineering (Volume II), 2019: 61-67+75.
- [5] FAKHRI A. Adsorption characteristics of graphene oxide as a solid adsorbent for aniline removal from aqueous solutions: Kinetics, thermodynamics and mechanism studies[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2017, 21(S1): S52-S57.
- [6] QI Y, GUO C, XU X, et al. Co/Fe and Co/Al layered double oxides ozone catalyst for the deep degradation of aniline: Preparation, characterization and kinetic model[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 715(C): 136982.
- [7] ZHU X, HU W, FENG C, et al. Electrochemical oxidation of aniline using $\text{Ti}/\text{RuO}_2\text{-SnO}_2$ and $\text{Ti}/\text{RuO}_2\text{-IrO}_2$ as anode [J]. *Chemosphere*, 2021, 269: 128734.
- [8] DURAN A, MONTEAGUDO J M, SAN MARTIN I, et al. Photocatalytic degradation of aniline using an autonomous rotating drum reactor with both solar and UV-C artificial radiation [J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 210: 122-130.
- [9] 张浩,刘玉香,呼婷婷,等.一株苯胺降解菌的分离及其降解特性[J].环境工程学报,2015,9(12):6154-6160. ZHANG Hao, LIU Yu-xiang, HU Ting-ting, et al. The isolation and degradation characteristics of an aniline degrading bacteria[J]. *Environmental Engineering Journal*, 2015, 9(12): 6154-6160.
- [10] 韩瑜,马放,山丹,等.耐低温菌 JH-9 降解苯胺的动力学研究[J].环境科学研究,2007,20(5):119-123. HAN Yu, MA Fang, SHAN Dan, et al. Biodegradation of ani-

- line by bacteria JH-9[J]. *Research of Environmental Science*, 2007, 20(5): 119-123.
- [11] 王镔,蔡凯,邵汝英,等.苯胺高效降解菌的筛选及其代谢机制[J].*环境保护科学*, 2020, 46(4): 117-121.
WANG Bin, CAI Kai, SHAO Ru-ying, et al. Screening and co-metabolism mechanism of aniline-degrading bacteria with high efficiency[J]. *Environmental Protection Science*, 2020, 46(4): 117-121.
- [12] 赵芝清,王玉飞,杜祥君.不适宜生长条件对混菌降解苯胺的影响[J].*环境工程学报*, 2014, 8(4): 1681-1686.
ZHAO Zhi-qing, YANG Yu-fei, DU Xiang-jun. Effects of different growth conditions on the degradation of aniline[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(4): 1681-1686.
- [13] 盛多红,张素琴,刘海舟.一株高浓度苯胺降解菌的分离[J].*应用与环境生物学报*, 1999(S1): 18-20.
SHENG Duo-hong, ZHANG Su-qin, LIU Hai-zhou. Isolation of a high concentration aniline degrading bacterium[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 1999(S1): 18-20.
- [14] 马放,山丹,王晨,等.低温降解苯胺高效菌群的筛选及特性研究[J].*环境工程学报*, 2007(05): 7-10.
MA Fang, SHAN Dan, WANG Chen, et al. Screening and characterization of high efficiency bacteria for aniline degradation at low temperature[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2007(05): 7-10.
- [15] PENG H, ZHANG Q, LI M, et al. Identification and characterization of a highly efficient and resistant aniline-degrading strain AD4[J]. *Environmental Engineering Science*, 2021, 38(8): 742-751.
- [16] DINO A A, BRINDHA R, JAYAMUTHUNAGAI J, et al. Biodegradation of aniline from textile industry waste using salt tolerant *Bacillus firmus* BA01[J]. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 2019, 12(3): 360-366.
- [17] 谢青,董迎松,易薇,等.一株苯胺降解菌的分离及其苯胺降解特性的研究[J].*生物技术*, 2009, 19(1): 55-58.
XIE Qing, DONG Ying-song, YI Wei, et al. Isolation of an aniline degrading bacterium and Study on its aniline degradation characteristics[J]. *Biotechnology*, 2009, 19(1): 55-58.
- [18] 武洪杰,谭周亮,刘庆华,等.一株高浓度苯胺、苯酚降解菌的分离鉴定及降解特性[J].*应用与环境生物学报*, 2010, 16(2): 252-255.
WU Hong-jie, TAN Zhou-liang, LIU Qing-hua, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a high concentration aniline and phenol degrading bacterium[J]. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(2): 252-255.
- [19] 刘志培,杨惠芳,周培谨.微生物降解苯胺的特性及其降解代谢途径[J].*应用与环境生物学报*, 1999(S1): 5-9.
LIU Zhi-pei, YANG Hui-fang, ZHOU Pei-jin. Characteristics and metabolic pathway of aniline degradation by microorganisms[J]. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 1999(S1): 5-9.
- [20] WANG D, ZHENG G, WANG S, et al. Biodegradation of aniline by *Candida tropicalis* AN1 isolated from aerobic granular sludge[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(12): 2063-2068.
- [21] JIN Q, HU Z, JIN Z, et al. Biodegradation of aniline in an alkaline environment by a novel strain of the halophilic bacterium, *Dietzia natronolimnaea* JQ-AN[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 148-154.
- [22] KAFILZADEH F, KHEZHRI A. Biodegradation of aniline of aniline by *Enterobacter ludwigii* KHA 5 isolated from the soil around Shiraz refinery[J]. *Iran. Global NEST J*, 2016, 18(4): 697-707.
- [23] 张逸飞,顾挺,王国祥,等.一株苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性[J].*环境污染与防治*, 2008(02): 12-15+36.
ZHANG Yi-fei, GU Ting, WANG Guo-xiang, et al. Isolation and identification of an aniline degrading bacterium and its degradation characteristics[J]. *Environmental Pollution and Prevention*, 2008(02): 12-15+36.
- [24] LIU Z, YANG H, HUANG Z, et al. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(5): 679-682.
- [25] YANG L, YING C, FANG N, et al. Identification and characterization of a high efficiency aniline resistance and degrading bacterium MC-01[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 182(1): 41-54.
- [26] 张晴,白红娟,孙慧敏,等.一株非高效降解菌的分离鉴定及去除特性[J].*应用化工*, 2020, 49(7): 1720-1726.
ZHANG Qing, BAI Hong-juan, SUN Hui-min, et al. Isolation, identification and removal characteristics of a phenanthrene-degrading bacterium[J]. *Applied Chemical Industry*, 2020, 49(7): 1720-1726.
- [27] ZHU L, LV M, DAI X, et al. Reaction kinetics of the degradation of chloroanilines and aniline by aerobic granule[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 68: 215-220.
- [28] 全桂静,雷晓燕,李辉.微生物学实验指导[M].北京:化学工业出版社, 2010: 51-54.
QUAN Gui-lei, LEI Xiao-yan, LI Hui. Experimental guidance of Microbiology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 51-54.
- [29] 赵芝清,徐丽丽,裴建云,等.盐度对分光光度法测定水样中苯胺的影响[J].*工业水处理*, 2012, 32(12): 75-77.
ZHAO Zhi-qing, XU Li-li, PEI Jian-yun, et al. Effect of salinity on the determination of aniline in water samples by spectrophotometry[J]. *Industrial Water Treatment*, 2012, 32(12): 75-77.
- [30] 任源,韦朝海,肖美兰.苯胺废水的生物降解性能研究[J].*华南理工大学学报(自然科学版)*, 1999(07): 14-20.
REN Yuan, WEI Chao-hai, XIAO Mei-lan. Study on the biodegradability of aniline wastewater[J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 1999(07): 14-20.
- [31] 王亚娥,王萍,郑莹,等.1株具有铁氧化功能的苯胺降解菌的降解特性[J].*环境科学与技术*, 2019, 42(3): 140-145.
WANG Ya-e, WANG Ping, ZHENG Ying, et al. Degradation characteristics of an aniline degrading bacteria with iron oxidation function[J]. *Environmental Science and Technology*, 2019, 42(3): 140-145.
- [32] 李静,李文英.嗜碱降解菌筛选及其对焦化废水强化处理[J].*环境科学*, 2015, 36(4): 1385-1391.
LI Jing, LI Wen-ying. Screening of quinoline degrading bacteria and its enhanced treatment of coking wastewater[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(4): 1385-1391.

- [33] CHENGBIN X, JUN N, HAI Y, et al. Biodegradation of aniline by a newly isolated *Delftia* sp. XYJ6[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2009, 17(3): 500–505.
- [34] 赵乾程, 苏凯文, 邱子梁, 等. 苯酚和喹啉降解菌 *Alcaligenes faecalis* 的降解特性及固定化应用[J]. *矿业科学学报*, 2022, 7(2): 247–256.
- ZHAO Qian-cheng, SU Kai-wen, QIU Zi-liang, et al. Degradation characteristics and immobilized application of phenol and quinoline degrading bacterium *Alcaligenes faecalis* [J]. *Journal of Mining Science*, 2022, 7(2): 247–256.
- [35] WU K, SHI M, PAN X, et al. Decolourization and biodegradation of methylene blue dye by a ligninolytic enzyme-producing *Bacillus thuringiensis*: Degradation products and pathway [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022, 156: 109999.
- [36] FANG H, OBEROI A S, HE Z, et al. *Ciprofloxacin-degrading Paraclostridium* sp. isolated from sulfate-reducing bacteria-enriched sludge: Optimization and mechanism [J]. *Water Research*, 2021, 191: 116808.
- [37] 王薇, 张逸飞, 顾挺, 等. 苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2008(03): 964–969.
- WANG Wei, ZHANG Yi-fei, GU Ting, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of aniline degrading bacteria [J]. *Journal of Agricultural Environment Science*, 2008 (03): 964–969.
- [38] Cui D, Shen D, Wu C, et al. Biodegradation of aniline by a novel bacterial mixed culture AC [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 125: 86–96.
- [39] 韦朝海, 任源, 吴超飞, 等. 专性好氧菌降解苯胺废水的动力学研究[J]. *环境科学研究*, 1999(04): 18–21.
- WEI Chao-hai, REN Yuan, WU Chao-fei, et al. Kinetic study on aniline wastewater degradation by specific aerobic bacteria [J]. *Environmental Science Research*, 1999(04): 18–21.
- [40] LIU Z, YANG H, HUANG Z, et al. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58 (5) : 679–682.
- [41] MONFERRÁN M V, ECHENIQUE J R, WUNDERLIN D A. Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer [J]. *Chemosphere*, 2005, 61(1): 98–106.
- [42] ZHU L, LV M, DAI X, et al. Reaction kinetics of the degradation of chloroanilines and aniline by aerobic granule [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 68: 215–220.

Isolation and Identification of a Highly Efficient Strain of Aniline Degrading Bacterium Q6 and Degradation Characteristics

HU Jin-jun, BAI Hong-juan, SONG Yu, ZHAO Qi-chao

(School of Environment and Safety Engineering, Central North University, Taiyuan 030051, China)

Abstract: The production and processing of pyrotechnics produce aniline wastewater, which causes a great pollution to the environment. To provide an efficient strain resource for aniline degradation, a strain Q6 with aniline as the only carbon source and energy growth was isolated from the activated sludge in the aerobic aeration tank of the chemical wastewater treatment plant. Through morphological observation, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA gene sequence phylogeny analysis, the strain was identified as *Acidovorax* sp. The effects of inoculum amount, temperature, pH value and additional carbon and nitrogen sources on aniline degradation by strain Q6 were studied. Meanwhile, the degradation kinetics of aniline at different initial concentrations and the growth kinetics of strain Q6 were fitted. The results showed that under the conditions of temperature 23–37 °C and pH 5–8, strain Q6 could degrade aniline efficiently, and ammonium chloride was the best co-metabolizing nitrogen source to promote the degradation of aniline. The optimum conditions of 33 °C, pH 7 and inoculation amount of 10%, the degradation rate of aniline at different initial concentrations (200–3000 mg·L⁻¹) was above 95.0%, and the degradation process of aniline showed first-order and zero-order kinetics. The growth process of Q6 conformed to the Haldane equation with a maximum specific growth rate μ_{\max} of 0.130 h⁻¹, a half-satiation constant K_s of 190 mg·L⁻¹ and the inhibition constant K_i of 8497 mg·L⁻¹. The results show that strain Q6 has unique potential in the treating industrial wastewater containing high concentration of aniline.

Key words: aniline (AN); *Acidovorax* sp.; Q6; degradation characteristics; degradation kinetics; growth dynamics

CLC number: TJ55; X172

Document code: A

DOI: 10.11943/CJEM2022168

Grant support: Key R&D Program of Shanxi Province (No.201903D321083); Local Science and Technology Development Fund under the Guidance of the Central Government, (No.YDZX 20201400001443); Postgraduate Education Innovation Project of Shanxi Province (No.2022Y651)

(责编:姜梅)