

低温苯胺降解菌的筛选及其特性

张兰英, 仲建强, 刘 娜, 高 松, 刘 鹏

(吉林大学环境与资源学院, 吉林 长春 130026)

摘要 通过驯化培养, 从含苯胺的管道污泥中分离出 1 株高效苯胺降解菌 7[#], 在苯胺质量浓度低于 5 500 mg/L 的普通培养基中均可生长。7[#] 菌株降解苯胺的最适温度为 30℃, 经低温驯化后, 10℃ 和 30℃ 时对苯胺的降解率接近, 最适 pH = 7.0, 当苯胺质量浓度在 400 mg/L 以下时, 对该菌不表现出明显抑制作用。在苯胺质量浓度 200 mg/L 的无机盐溶液中, 10℃ 下培养 60 h 可使苯胺降解率达 89.14%, 降解符合二级动力学模型。经鉴定, 该菌株为假单胞菌属。

关键词 苯胺; 生物降解; 菌种筛选; 废水处理

中图分类号 X703 **文献标识码** A **文章编号** 1004-693X(2008)01-0052-03

Screening and characteristics of low temperature aniline-degrading strain

ZHANG Lan-ying, ZHONG Jian-qiang, LIU Na, GAO Song, LIU Peng

(Institute of Environment and Resources, Jilin University, Changchun 130026, China)

Abstract Through domestication and culture, a bacterial strain 7[#], which was able to grow on common substrate with aniline below 5 500 mg/L, was isolated from the sludge in conduits. The optimum temperature and pH for its growth and aniline degradation were 30℃ and 7.0 respectively, but after low temperature domestication, the degradation rate at 10℃ was close to that at 30℃. The restraint contribution was not be obvious under the concentration of aniline below 400 mg/L. At 10℃, the aniline-degradation rate reached 89.14% when the culture time was 60 hours in solutions with aniline of 200 mg/L and the degradation accorded with the second-order kinetics. Strain 7[#] was identified as *Pseudomonas*.

Key words aniline; biodegradation; screening of strains; wastewater disposal

在地下环境中, 硝基苯及其他物质很有可能被转化为苯胺, 导致苯胺含量不断增加。苯胺属芳香族化合物, 难降解, 能经皮肤、呼吸道和消化道吸收, 长期与苯胺接触可引起肝癌或皮肤癌, 还可导致人体急性中毒, 产生头疼、眩晕、记忆力下降、呼吸不畅甚至窒息死亡等症状, 严重污染环境和危害人体健康^[1-3]。

国内对苯胺的微生物处理多在常温下进行^[4-5]。东北地区气温较低, 限制了常温苯胺降解菌的应用。笔者从某管道污泥中分离出 13 株以苯胺为碳源、氮源和能源的菌株, 经复筛获得 1 株高效降解苯胺的 7[#] 菌株, 并对该菌株进行低温驯化, 对降解苯胺的最适条件进行了研究。

1 实验部分

1.1 材料

a. 菌种来源为管道污泥。

b. 培养基。①富集培养基: 蛋白胨 10 g, 葡萄糖 1 g, NaCl 为 1 g, KH₂PO₄ 为 1 g, 苯胺按需加入, 蒸馏水为 1 000 mL, pH = 7.0 ~ 7.2; ②基础培养基: NaCl 为 1 g, K₂HPO₄ 为 1 g, KH₂PO₄ 为 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 为 0.5 g, 蒸馏水为 1 000 mL, pH = 7.0 ~ 7.2 (在进行模拟地下水去除苯胺化合物的试验时, 用东北某地下水代替蒸馏水配置上述基础培养基); ③牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 为 5 g, 蒸馏水为

1 000 mL ,pH = 7.2。

1.2 方法与实验

a. 菌种的诱变与驯化。在 250 mL 的三角瓶中 , 加入富集培养基 45 mL(苯胺质量浓度 200 mg/L) , 再加入污泥 5 g , 置于 30℃ 下 , 120 r/min 摇床培养 , 7 d 为 1 个驯化周期 , 每个周期结束后以 10% 的接种量接入新鲜的富集培养基中 , 同时苯胺质量浓度由 10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 逐渐递增至 500 mg/L , 在此期间每隔 1 d 将驯化菌液置于一定剂量的紫外光线下诱变若干时间。为保证菌体良好生长 , 在驯化过程中每天定时检测驯化液的 pH 值变化情况 , 及时将 pH 值调至 7.0 ~ 7.2 之间。待富集培养液中的苯胺质量浓度达到 500 mg/L 且驯化 7 d 后 , 用苯胺质量浓度 50 mg/L 的基础培养基代替富集培养基 , 培养 14 d 后 , 将富集培养液适当稀释 , 将稀释液用涂布法在以苯胺为唯一碳源和氮源的基础培养基(苯胺质量浓度 200 mg/L) 上 28℃ 培养 , 挑取单菌落 , 反复划线纯化 , 将所得菌株接种于苯胺质量浓度 500 mg/L 的牛肉膏蛋白胨斜面上 4℃ 冰箱保存^[6]。

b. 菌种的低温驯化。在苯胺质量浓度 200 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养液中投加筛选出的 7# 菌株 , 在转速 120 r/min、10℃ 下避光培养驯化 , 当苯胺质量浓度低于 50 mg/L 时 , 追加投入苯胺 , 反复驯化直至驯化成功。

c. 苯胺降解能力的测定。定时测定细菌生长过程中苯胺的残存量 , 以苯胺降解率来表示菌株对苯胺的降解能力。测定时以不接菌对照瓶加入无菌水作为苯胺浓度的平衡条件 , 以对照瓶摇床培养后的苯胺浓度作为试验培养前的苯胺标准浓度。

d. 生长曲线的测定。参考《工业微生物实验技术手册》^[7]。

2 结果与讨论

2.1 细菌的分离筛选及鉴定

经富集、驯化、筛选和纯化 , 共得到以苯胺为唯一碳源、氮源和能源的细菌 17 株 , 对这些菌株进行复筛 , 得到 7# 菌株对苯胺有较好的降解能力。该菌株在牛肉膏培养基上长出菌落 , 颜色为乳白色 , 菌落为圆形 , 边缘整齐 , 低凸 , 腊状 , 有光泽 , 直径 0.5 ~ 2 mm , 在显微镜下呈杆状 (如图 1) 。革兰氏阴性 , 非发酵属。此菌为无鞭毛、无荚膜、无芽孢并具有多形性的菌 , 单个存在或成对排列 , 有时形成短链。

根据 7# 菌株在牛肉膏蛋白胨平板上的菌落形态、个体形态、染色反应和生理生化反应 , 用 Biolog 细菌鉴定仪鉴定 , 7# 菌株的代谢指数与标准菌株铁角蕨假单胞菌 (*Pseudomonas asplenii*) 的 SIM 值为

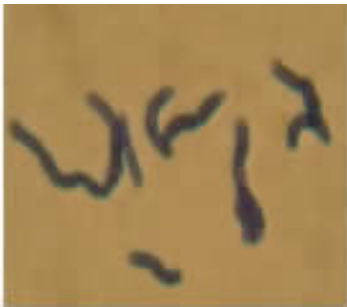


图 1 7# 菌株的形态

0.205 , DIST 值为 2.1。

2.2 7# 菌株对不同苯胺浓度的忍耐力考察

吸取含菌 60 万个/mL 细胞悬浮液 0.1 mL , 分别加入到苯胺质量浓度 100 , 200 , 300 , 400 , 500 , 1 000 , 2 000 , 3 000 , 5 000 , 5 500 , 6 000 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养基中 , 制成平板 , 28℃ 培养 48 h , 通过菌落生长考察其忍耐力^[8] , 结果见表 1。从表 1 可以看出 , 该菌株对苯胺的忍耐力为 5 500 mg/L , 在 6 000 mg/L 的牛肉膏蛋白胨平板上无菌落长出。

表 1 7# 菌株在不同浓度苯胺培养基中的生长情况

苯胺质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	长出菌 落数/个	苯胺质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	长出菌 落数/个
100	1 520	2 000	64
200	1 340	3 000	31
300	780	5 000	15
400	640	5 500	3
500	269	6 000	0
1 000	148		

2.3 温度对 7# 菌株降解苯胺的影响

在不同温度 (10℃ , 20℃ , 25℃ , 30℃ , 35℃) 下摇床培养 48 h , 基础培养基苯胺质量浓度为 200 mg/L , pH = 7.0 , 培养 48 h 后取样测定苯胺降解率如图 2 所示。结果表明 , 7# 菌株降解苯胺的最佳温度为 30℃。

对 7# 菌进行低温驯化 , 然后用上述方法进行不同温度对苯胺降解效果影响实验。结果 (图 3) 表明 , 该菌在驯化后 , 在 10℃ 左右其降解能力接近于室温条件下的降解效果 , 该菌可作为地下水中苯胺的降解菌种。

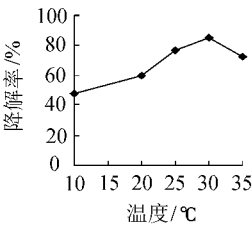


图 2 温度对 7# 菌株降解苯胺的影响

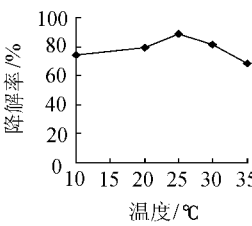


图 3 驯化后温度对 7# 菌株降解苯胺的影响

2.4 pH 值对 7# 菌株降解苯胺的影响

在不同 pH 值下苯胺质量浓度 200 mg/L 的基础

培养基中,10℃摇床培养 48 h,测定苯胺的降解率,结果表明:7# 菌株降解苯胺的最佳 pH=7.0(图 4)。

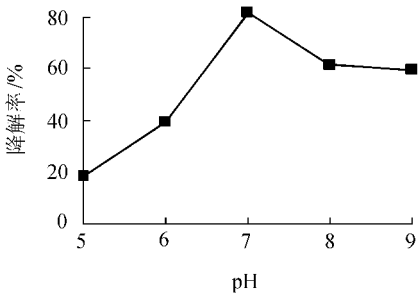


图 4 pH 值对 7# 菌株降解苯胺的影响

2.5 7# 菌株在不同生长期对降解苯胺的影响

在苯胺质量浓度 200 mg/L 的无机盐溶液中,按 10% 接种量接入活化后的苯胺菌悬液(含菌量 10⁹ 个/mL),10℃避光培养,摇床转速为 150 r/min,定时取样测苯胺降解率及生物量,其中苯胺用 HPLC 测试,生物量用紫外分光光度计测定菌液的 OD 值,λ = 420 nm。结果如图 5 所示。

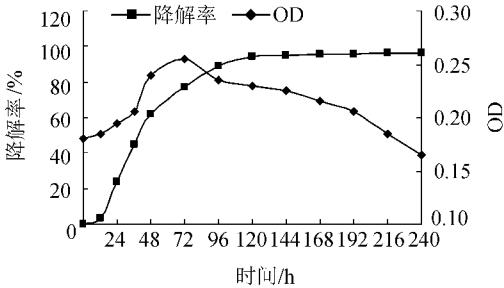


图 5 7# 菌株生长-降解曲线

由图 5 可知,苯胺菌在开始的 48 h 内生长缓慢,处于适应期阶段,对苯胺的降解非常缓慢,仅为 37.33%。在 48 h 后进入指数生长期,对苯胺的降解率也大幅度增加,84 h 达到了 94.56%。84 h 后苯胺菌进入静止期和衰亡期,对苯胺的降解率虽有增加,但是一直在 98% 左右。在菌生长过程中,对苯胺的降解符合二级动力学降解模型,拟合系数 R² = 0.9535,如图 6 所示。因此,应该利用处于指数生长期的苯胺菌对苯胺进行降解。

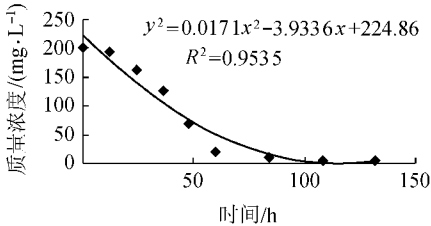


图 6 苯胺降解动力学曲线

2.6 重金属离子对 7# 菌株降解苯胺的影响

在苯胺质量浓度 200 mg/L 的基础培养基中,添加各种重金属离子,接入 7# 菌株,在 10℃、pH = 7.0

的条件下,摇床培养 48 h,测定对苯胺的降解率(2 组数据,取平均值),如表 2 所示。结果表明:所试浓度的重金属离子对 7# 菌株的降解均具有抑制作用,其中以 Hg²⁺ 和 Ag⁺ 最为明显。

表 2 重金属离子对 7# 菌株降解苯胺的影响

重金属离子	浓度/ (mmol·L ⁻¹)	降解 率/%	重金属离子	浓度/ (mmol·L ⁻¹)	降解 率/%
HgSO ₄	0.010	0	NiSO ₄	1	13.5
Ag ₂ SO ₄	0.025	0	MnCl ₂	1	43.6
CuSO ₄	1.000	17.5	对照	0	96.1

2.7 7# 菌株对取代类苯胺化合物的降解

为了检验 7# 菌株是否能利用取代类苯胺化合物,分别以各种取代类苯胺化合物(N 甲苯胺,N,N 二甲苯胺,对氨基苯甲酸)代替苯胺配制基础培养基并制成平板接种 7#,30℃培养 24 h,观察该菌是否能生长^[9-10]。结果表明:7# 菌株除了可以利用苯胺为碳源、氮源和能源生长外,还可以利用其他取代类苯胺化合物作为碳源、氮源。

2.8 7# 菌株对模拟地下水中苯胺的去除

用取自吉林市某厂地下水代替蒸馏水制备基础培养基,pH 值调到 7.0,高压灭菌,加入过滤除菌后的苯胺(质量浓度 200 mg/L)作为唯一碳源氮源,接入 7# 菌株,10℃摇床培养,每隔 24 h 测定苯胺的降解率^[11],结果见图 7。可以看出,7# 菌株在模拟水中对苯胺仍保持较高的降解率,但用地下水制备的培养基对 7# 菌株的降解有一定的抑制作用,且 24 h 内苯胺的降解率很低,这可能是吉林市双苯厂地下水有机成分复杂而延长了菌株的适应期。由以上试验可以看出,7# 菌株对苯胺既有很强的抗性,又有较高的降解能力,是处理地下水苯胺的理想菌株。

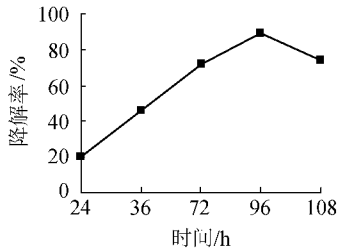


图 7 7# 菌株在模拟废水中的降解

3 结 论

综上所述,在低温条件下,7# 菌株可以有效降解高浓度苯胺,当 pH 值为 7.0 左右,对质量浓度 200 mg/L 的苯胺废水可高效降解,3 d 降解率就达到了 90% 以上,对质量浓度 200 mg/L 以上的苯胺也有明显降解作用。这说明可以利用 7# 菌株在低温下对高浓度的苯胺废水通过生化方法进行处理,为以后东北地区低温处理苯胺提供依据。(下转第 58 页)

低。因此在反应过程中,需要曝入氧或其他的电子捕获剂来捕获光生电子,提高光催化活性。而 NiO 是 p-型半导体,由于表面吸附氧的存在,相当于增加了受主杂质,可接受满带中被紫外光照射而激发的电子,使满带中的空穴增加。随着满带中被激发的电子增多,氧以负离子态吸附可以一直进行^[9],减少了电子与空穴的复合几率,减少了对曝氧的依赖性。因此在未曝氧或其他电子捕获剂存在的条件下,NiO 对染料 KN-R 溶液的光催化活性优于 p-25 TiO₂。

2.6 催化剂的重复利用

表 2 是 100mg 样品 A 在紫外灯照射下,降解染料 B-RN 溶液 2h,抽滤,干燥后,经 3 次循环使用的脱色率变化情况。由表 2 可知,新制备的催化剂活性较高,第 1 次回收后的催化剂的活性有一定的降低,催化剂部分失活的原因可能是由于反应中的有机物吸附在催化剂的表面上,导致催化剂活性中心减少。另外经过第 1 次使用,以后几次的使用中催化剂的性能相差不大,说明新制催化剂表面的一些活性位在光反应中被钝化后,催化剂的活性变得比较稳定。3 次循环使用后,其脱色率仍可保持在 80% 以上,故该催化剂可多次循环利用。

表 2 NiO 重复利用的降解效果

使用次数	脱色率/%	使用次数	脱色率/%
1	100.0	3	84.1
2	87.2	4	81.6

3 结 论

通过对 NiO 催化剂的用量、光照和烧结温度等因素的分析,得出 NiO 在紫外光照射下,最佳用量为 100 mg,热处理温度在 350℃ 时催化活性最佳。在未曝入

O₂ 的条件下,对蒽醌染料 KN-R 和 B-RN 的模拟废水有着极高的催化活性,优越于 p-25 TiO₂ 光催化剂,并且该催化剂可多次循环利用。

参考文献：

[1] GRACA M B S ,MARIA C F ,PESSOA DE AMORIM M T. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation[J]. Bioresource Technology 2001 ,79(2) :171-177.

[2] ADESINA A A. Industrial exploitation of photocatalysis : progress ,perspectives and prospects[J]. Catalysis Surveys from Asia 2004 ,8(4) 265-273.

[3] KIDA K ,HIROTA K ,TAJIMA K ,et al. Photocatalytic printing of nanostructures on TiO₂ using diblock copolymer[J]. Chem Mater 2006 ,18(6) :1386-1389.

[4] NOSAKA Y ,NATSUI H ,SASAGAWA M ,et al. Electron spin resonance studies on the oxidation mechanism of sterically hindered cyclic amines in TiO₂ photocatalytic system[J]. J Phys Chem B 2006 ,110(26) :12993-12999.

[5] TANG C ,CHEN V. The photocatalytic degradation of reactive black 5 using TiO₂/UV in an annular photoreactor[J]. Water Research 2004 ,38 :2775-2781.

[6] 王潮霞. 蒽醌染料光褪色机理及其影响因素分析[J]. 上海染料 2001 ,29(3) 26-29.

[7] CAO Yong-song , CHEN Jiu-xin , HUANG Lu , et al. Photocatalytic degradation of chlorfenapyr in aqueous suspension of TiO₂[J]. Journal of Molecular Catalysis A Chemical ,2005 , 233(1-2) 61-66.

[8] 张金龙,陈锋,何斌. 光催化[M]. 上海 :华东理工大学出版社 2004 :14-18.

[9] 王桂茹. 催化剂与催化作用[M]. 大连 :大连理工大学出版社 2003 :120-127.

(收稿日期 2006-11-02 编辑 :傅伟群)

(上接第 54 页)

参考文献：

[1] 王中麟,宣志刚,黄京生. 利用专利微生物治理硝基苯和苯胺混合废水[J]. 东北林业大学学报, 2006 ,34(4) : 97-99.

[2] 曾国驱,任随周,曹渭,等. 兼性厌氧苯胺降解菌的分离鉴定及其特性[J]. 环境科学, 2006 ,27(8) :1618-1622.

[3] 周霞, 庄先强, 佟树敏, 等. 苯胺降解菌的特性研究及分子生物学基础[J]. 南开大学学报 :自然科学版, 2004 ,37(2) 24-28.

[4] 顾加兵,雷俐玲. H. S. B. 微生物生化法处理苯胺污水[J]. 工业用水与废水, 2000 ,31(5) 20-22.

[5] ZHANG Jin-ping ,KAN Zhen-rong ,LI Yan-qin ,et al. Screening of dye-decolorization and aromatic amine-biodegrading bacterium and studying of dye biodegradation [J].

Biotechnology 2006 ,116(11) 68-70.

[6] 韦朝海,任源,吴超飞. Ocgribacterum anthropi 对苯胺的降解特性[J]. 环境科学, 1998(5) 22-24.

[7] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京 :中国轻工业出版社, 1996 :224-225.

[8] 刘志培,杨惠芳,周培瑾. 苯胺降解菌的分离和特性研究[J]. 环境科学学报, 1999 ,19(2) :174-179.

[9] ZEYER J ,WASSERFALLEN A ,TIMM K N. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through ortho-cleavage pathway[J]. Appl Environ Microbial ,1985 ,50 :447-453.

[10] LYONS C D ,KAIZ S ,BARTHA R. Mechanism and pathways of aniline elimination from aquatic environments[J]. Appl Environ Microbial ,1984 ,48 :491-496.

[11] 毕洪凯,黄媛,武波. 高效苯胺降解细菌 GXA7 的筛选鉴定与特性研究[J]. 广西大学学报 :自然科学版, 2003 ,28(4) 309-313. (收稿日期 2006-10-28 编辑 :傅伟群)