

苯胺降解菌的分离及降解特性研究

张世敏, 赵迪, 徐淑霞*, 刘翠翠, 吴坤

(河南农业大学生命科学学院, 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南郑州 450002)

摘要 [目的] 筛选高效苯胺降解菌并研究其降解特性。[方法] 通过驯化富集培养, 从河南某化工厂活性污泥中分离出 1 株以苯胺为唯一碳、氮源的高效苯胺降解菌 DA-K, 并对该菌株进行了生理生化鉴定和生物学降解特性研究。[结果] DA-K 菌株呈革兰氏阴性, 细胞为杆状, 菌落颜色呈灰白色, 初步确定为不动细菌属。通过测定, DA-K 菌株生长的最适 pH 为 6.0, 最适温度为 30 ℃, 可在苯胺质量浓度为 2 500 mg/L 的无机盐培养基上生长良好。DA-K 菌株在苯胺浓度为 1 000 mg/L, pH 6.0, 30 ℃, 180 r/min 的条件下振荡培养 96 h, 苯胺降解率接近 80%。[结论] DA-K 菌株苯胺降解效率较高, 具有实际处理苯胺废水的能力, 为构建基因工程菌奠定了基础。

关键词 苯胺; 降解菌; 分离筛选; 降解特性

中图分类号 S 182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-03630-02

Study on Isolation and Degradation Characteristics of an Aniline-degrading Strain

ZHANG Shi-min et al (College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract [Objective] The research aimed to screen out an efficient aniline-degrading strain and study its degradation characteristics. [Method] By domesticated enrichment culture, an efficient aniline-degrading strain named as DA-K was isolated from activated sludge sample collected from a chemical plant in Henan. DA-K could use aniline as sole carbon and nitrogen sources. The strain was conducted physiological and biochemical experiments, and its biological degradation characteristics were studied. [Result] DA-K strain was G⁻ and rod-shaped, and its colony color was offwhite. It was initially determined as *Acinetobacter* sp. By measuring, the optimum growth temperature and pH for DA-K were respectively 30 ℃ and 6.0. DA-K strain could grow well in the medium within 2 500 mg/L of aniline. After shaking for 96 h under the conditions of pH 6.0, 30 ℃, 180 r/min and 1 000 mg/L of aniline, degradation rate of the aniline by DA-K could reach nearly 80%. [Conclusion] DA-K strain had higher aniline degradation efficiency and actual treatment capability of the aniline wastewater, which laid foundation for establishing gene engineering strain.

Key words Aniline; Degrading bacteria; Isolation and screening; Degradation characteristics

苯胺是重要的化工原料, 主要用于医药和橡胶硫化促进剂, 也是制造树脂和涂料的原料^[1]。苯胺毒性较高, 同时被证实具有致癌性, 是一种对人类构成严重危害的物质。随着工业的发展, 越来越多的苯胺进入到环境中, 造成严重的环境污染, 破坏生态平衡, 危害人类身体健康, 已被 EPA 列为优先控制的 129 种污染物之一^[2], 因此如何降解环境中苯胺已引起人们的极大关注^[3]。利用微生物降解苯胺具有成本低、无二次污染等优点, 因此越来越受到人们的重视^[4]。近年来, 国内外对苯胺降解的研究日益增多, 国内多集中在苯胺高效降解菌的筛选和特性研究方面^[5]。笔者从化工厂活性污泥中筛选得到 1 株能以苯胺为唯一碳、氮源的细菌, 并对其生物学特性和降解特性进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 样品来源 样品取自化工厂苯胺污水处理池中。

1.2 培养基和试剂 富集培养基(w/v): 葡萄糖 0.1%, 蛋白胨 0.05%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 初始加入苯胺浓度为 200 mg/L, 之后慢慢加大浓度, pH 7.0。降解与筛选培养基(w/v): NaH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, pH 6.5~7.0, 固体培养基加 2.0% 的琼脂, 碳、氮源

为苯胺。活化培养基(w/v): 胰蛋白胨 5%, 酵母提取物 2.5%, NaCl 5%, pH 7.0。以上培养基均在 121 ℃ 灭菌 30 min, 所用试剂均为分析纯。

1.3 菌株的驯化和筛选 采用好氧周期振荡法来进行菌种的富集和分离。取样品 1 ml 加入到 100 ml 的富集培养基中, 在 35 ℃、180 r/min 的摇床上培养, 每 5 d 为 1 个周期, 共培养 12 个周期。初始加入苯胺浓度为 500 mg/L, 第 1 个周期过后测定苯胺浓度, 确定降解后逐步加大至 1 000 mg/L。之后在无菌条件下将最后一轮驯化的培养液 0.1 ml 涂布于苯胺浓度为 400 mg/L 的固体筛选培养基上, 37 ℃ 恒温培养 72 h。挑取长势较好的一些单菌落在 LB 培养基上划线分离, 得到优势菌株。

1.4 菌株鉴定 对分离出的菌株按文献[6]鉴定到属。

1.5 分析方法 苯胺浓度的测定(萘乙二胺偶氮光度法测定): 测定之前先绘制标准曲线, 之后利用紫外可见分光光度计在波长 545 nm 下测定样品的 OD₅₄₅ 值, 计算样品中的苯胺含量, 从而计算出苯胺的降解率^[7]。测定前先将样品 12 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中苯胺的含量, 每处理设 3 次重复。细胞浓度: 比浊法, 600 nm 下测定培养液的菌体 OD₆₀₀ 值。

1.6 生长特性与降解特性研究 环境条件直接影响菌体的生长代谢, 其中温度、pH 及苯胺含量为直接的影响因素, 在不同生长条件下的菌体生长量进行测定, 可确定菌体的最适生长条件。在最适的生长条件下, 菌体的生长代谢越旺盛, 降解苯胺的活性则越大。优化降解菌的生长条件, 在最

基金项目 国家转基因专项(2008ZX2008005-001); 河南省重大公益项目(091100910500)。

作者简介 张世敏(1970-), 男, 河南济源人, 副教授, 博士, 从事环境微生物研究。* 通讯作者, 副教授, 在读博士, 从事环境微生物研究, E-mail: xushuxia97@163.com。

收稿日期 2013-03-06

适生长条件下对其降解率进行测定^[8]。

1.6.1 最适温度的测定。按 5% 的接种量接种于 100 ml 苯胺浓度 1 000 mg/L 的无机盐培养基中,分别在 20、25、30、35、40 ℃,180 r/min 下振荡培养 24 h,测定 OD_{600} 值。

1.6.2 最适 pH 的测定。按 5% 的接种量接种于 100 ml 苯胺浓度 1 000 mg/L 的无机盐培养基中,分别在 pH 为 4、5、6、7、8、9、10,30 ℃,180 r/min 下振荡培养 24 h,测定 OD_{600} 值。

1.6.3 苯胺最适浓度。按 5% 的接种量接种于 100 ml 无机盐培养基中,苯胺起始浓度分别为 100、500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000 mg/L,30 ℃,180 r/min 下振荡培养 24 h,测定 OD_{600} 值。

1.6.4 菌株降解活性。接菌株于无机盐培养基中振荡培养 12 h 制备成菌悬液,按 5% 接种量接入含有苯胺的无机盐培养液中,在不同条件下进行降解试验。

2 结果与分析

2.1 筛选结果 经过多次分离纯化,得到 1 株能以苯胺为唯一碳、氮源的细菌菌株,命名为 DA-K。该菌在 LB 固体培养基上生长 3 d 后,菌落呈规则的椭圆形,表面凸起,边缘平滑,直径 2 mm 左右,灰白色,有粘性;电镜下观察菌体为短杆状,大小 0.5~0.8 μm × 1~2 μm ,多聚在一起,无芽孢,无鞭毛,革兰氏染色阴性。

2.2 菌种的生物学特性 对 DA-K 号菌株进行生理生化试验,结果见表 1。结合菌落及电镜下形态,可初步鉴定该菌为不动细菌属(*Acinetobacter* sp.)。

表 1 DA-K 菌株的生理生化鉴定

项目	结果	项目	结果
油脂水解试验	阴性(-)	尿素酶试验	阳性(+)
淀粉水解试验	阳性(+)	甲基红试验	阴性(-)
柠檬酸盐试验	阳性(+)	V.P 试验	阴性(-)
吲哚试验	阳性(+)	糖发酵试验	阳性(+)
过氧化氢酶试验	阳性(+)	硫化氢试验	阳性(+)

2.3 环境条件对细胞生长的影响

2.3.1 温度对菌体生长的影响。如图 1 所示,温度为 30 ℃ 时,细菌的细胞生长量最大,高于或者低于这个温度,菌体生长都会受到不利影响,确定 30 ℃ 为该菌生长的最适温度。

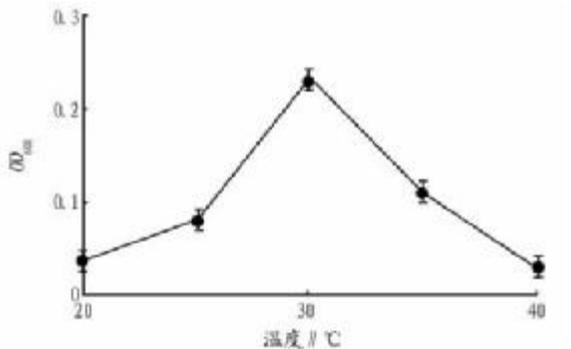


图 1 温度对菌体生长的影响

2.3.2 pH 对菌体生长的影响。如图 2 所示,pH 为 6.0 时,细菌的细胞生长量最大,偏低或偏高的 pH 都会对菌体生长

产生不利影响。

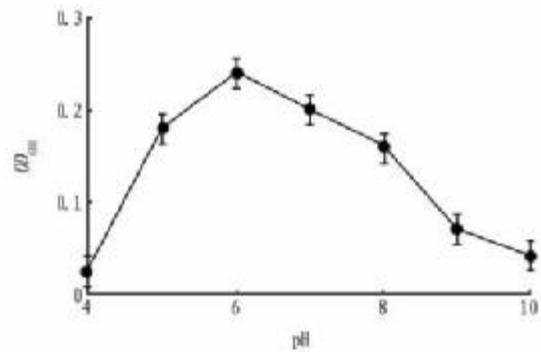


图 2 pH 对菌体生长的影响

2.3.3 菌株耐受苯胺能力和降解苯胺的合适起始浓度。分别接 5 ml 菌悬液于不同苯胺浓度的 100 ml 无机盐培养液,在温度 30 ℃,pH 6.0,180 r/min 下振荡培养 24 h,测定细菌的浓度。如图 3 所示,菌体生长适宜范围为 500~2 500 mg/L,脱离这个范围,菌体生长受到限制。

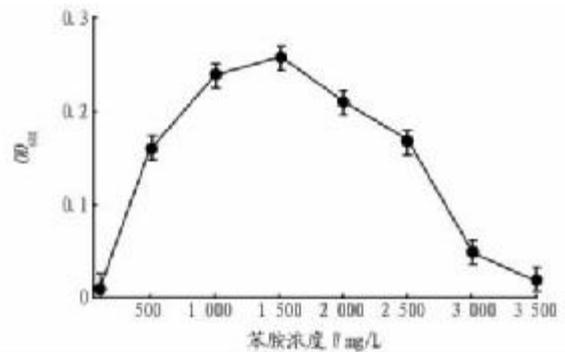


图 3 苯胺浓度对菌体生长的影响

2.3.4 降解效率的测定。在浓度 1 000 mg/L 以苯胺为唯一碳、氮源的 100 ml 无机盐培养液中接入 5 ml 菌悬液,在温度 30 ℃ 条件下振荡培养,测量培养液中的苯胺剩余量。如图 4 所示,当培养时间达到 96 h 时,苯胺的降解率达 79.1%。

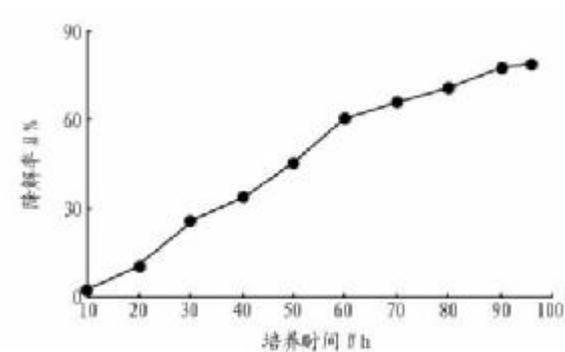


图 4 苯胺降解曲线

3 结论与讨论

该试验从河南某化工厂活性污泥中分离到 1 株以苯胺为唯一碳、氮源的降解菌 DA-K,该菌在苯胺浓度范围为 500~2 500 mg/L 的无机盐培养基中生长良好。DA-K 在苯胺浓度为 1 000 mg/L,pH 为 6.0,温度 30 ℃,180 r/min 条件下振荡培养 96 h,接近 80% 的苯胺被降解。可见,DA-K 菌株苯胺降

(下转第 3715 页)

在充分利用降水的条件下,仍然需要一定的灌溉用水才能发挥功效,而关中泾惠渠、宝鸡峡、洛惠渠、交口、羊毛湾、桃曲坡、冯家山、石头河、石堡川等 12 个大型灌区^[25]以及 9 个中型灌区和 89 个中小型灌区为保水剂推广创造了条件。保水剂在关中灌区所涉及的铜川、宝鸡、咸阳、渭南、西安和杨凌等地应用成效显著,不仅增强了土壤保水持肥改土的能力,还增加了作物的产量,为农民创造了较好的经济收益,得到了灌区农民的认可,将会在关中灌区节水农业的发展中更大范围、更加规范地推广应用。

3 结语

保水剂作为一种农业科技产品,在关中农业生产中应用后,通过发挥其促进壤土保水持肥改土的作用,能够推动关中灌区粮食作物和经济作物的增产增收,特别是对玉米、小麦和果树等作物的增产增收效果显著,在关中灌区农业生产中推广保水剂的应用,能够保障关中地区的粮食生产安全,提高关中灌区灌溉水利用系数,达到节水增效的目的。

参考文献

- [1] 李倩倩,陈印军. 关中地区耕地压力指数分析及预测[J]. 中国农学通报,2011,27(29):229-234.
- [2] 李晶,任志远,周自翔. 区域粮食安全分析预测——以陕西省关中地区为例[J]. 资源科学,2005,27(4):89-94.
- [3] 杜太生,康绍忠,魏华. 保水剂在节水农业中的应用研究现状与展望[J]. 农业现代化研究,2000,21(5):317-320.
- [4] 黄占斌,辛小桂,宁荣昌,等. 保水剂在农业生产中的应用与发展趋势[J]. 干旱地区农业研究,2003,21(3):11-14.
- [5] 张育林,王益权,胡海燕,等. 陕西关中地区农田土壤物理状态初探[J]. 干旱地区农业研究,2011,29(1):75-79.
- [6] JANARDAN S, SINGH J. Effect of stockosorb polymers and potassium levels on potato and onion[J]. J Potassium Res, 1998,4(1):78-82.

(上接第 3631 页)

解效率较高,具有实际处理苯胺废水的能力,为构建基因工程菌奠定了基础。

参考文献

- [1] RUSS R, RAU J, STOLZ A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4):1429-1434.
- [2] STOLZ A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56:69-80.
- [3] RAU J, STOLZ A. Oxygen - nsensitive Nitroreductases NfsA and NfsB of Escherichia coli function under anaerobic conditions as lawsonone - dependent azo reductases [J]. Appl Environ Crbiol, 2003, 69(6):3448-3455.
- [4] 依滋麦罗夫. 环境中常见污染物(第三辑)[M]. 北京:中国环境科学出版社,1989.

- [7] 李晶晶,白岗栓. 保水剂在水土保持中的应用及研究进展[J]. 中国水土保持科学,2012,10(1):114-120.
- [8] 李云开,杨培岭,刘洪禄. 保水剂农业应用及其效应研究进展[J]. 农业工程学报,2002(2):182-187.
- [9] 张富仓,康绍忠. BP 保水剂及其对土壤与作物的效应[J]. 农业工程学报,1999,15(2):74-78.
- [10] 汪志农. 灌溉排水工程学[M]. 北京:中国农业出版社,2009.
- [11] 张富仓,李继成,雷艳,等. 保水剂对土壤保水持肥特性的影响研究[J]. 应用基础与工程科学学报,2010,18(1):120-128.
- [12] 李继成,张富仓,孙亚联,等. 施肥条件下保水剂对土壤蒸发和土壤团聚性状的影响[J]. 水土保持通报,2008,28(2):48-53.
- [13] 李继成. 保水剂土壤肥料的相互作用机制及作物效应研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [14] 李常亮,张富仓. 保水剂与氮肥混施对土壤持水特性的影响[J]. 干旱地区农业研究,2010,28(2):172-176.
- [15] 李常亮. 保水剂保水持肥特征及作物效应研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010.
- [16] 杜太生. 保水剂在节水灌溉中的应用及其对作物生长和水分利用的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2001.
- [17] 黄占斌,张国桢,李秧秧,等. 保水剂特性测定及其在农业中的应用[J]. 农业工程学报,2002,18(1):22-26.
- [18] 黄占斌,朱书全,张铃春,等. 保水剂在农业改土节水中的效应研究[J]. 水土保持研究,2004,11(3):57-60.
- [19] 黄占斌,俞满源,方锋. 保水剂与水分控制对辣椒生长及水分利用效率的影响研究[J]. 中国生态农业学报,2004,12(2):73-76.
- [20] 员学峰,汪有科,吴普特,等. PAM 对土壤物理性状影响的试验研究及机理分析[J]. 水土保持学报,2005,19(2):37-40.
- [21] 张国桢,黄占斌,方锋. 保水剂对土壤和猕猴桃产量的影响[J]. 干旱地区农业研究,2003,21(3):26-29.
- [22] 员学峰,吴普特,冯浩. 聚丙烯酰胺(PAM)的改土及增产效应[J]. 水土保持学报,2002,9(2):55-58.
- [23] 丁瑞霞. “科翰 98”保水剂对冬小麦栽培生理特性及其产量特性的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [24] 庄文化,吴普特,冯浩,等. 土壤中施用聚丙烯酸钠对冬小麦生长及产量影响[J]. 农业工程学报,2008,24(5):37-41.
- [25] 王密侠,汪志农,尚虎君,等. 关中九大灌区农业水价与农户承载力调查研究[J]. 灌溉排水学报,2005,24(3):1-4.

- [5] KIBRET M, SOMITSEH W, ROBRAK H. Characterization of a enol degrading mixed population by enzyme assay[J]. Water Res, 2000, 34(4):1127-1134.

- [6] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [7] 马溪平,魏娜,徐成斌,等. 微生物降解高盐苯胺废水的研究进展[J]. 环境保护科学,2012,38(1):10-12,18.
- [8] 李岩,李社增,鹿秀云. 苯胺高效降解菌的筛选及其生物学特性研究[J]. 农业环境科学学报,2007,26(5):1738-1743.

- [9] LIN X, HOU Z A, ZHAO S F, et al. Isolation of Carbendazim-degrading Bacterium XJ-D and Analysis on Its Characteristics[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(2):412-416, 448.

- [10] 彭亚军,程小梅,王俊华,等. 丁草胺降解菌 P10 的分离鉴定及其对植株修复效果的研究[J]. 湖南农业科学,2012(7):85-87.