

# 一株利用苯胺的细菌的分离筛选

刘志培 杨彦希 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 从活性污泥中分离到一株能以苯胺为唯一氮源生长同时降解苯胺的细菌 C7, 经鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. C7)。该菌株最高可以降解 500mg/L 的苯胺, 所需时间为 9~12d, 降解苯胺的最适 pH 和温度分别为 8.0 和 30℃, 最适苯胺浓度为 400mg/L, 在此条件下苯胺的降解率可达 96.8%。试验结果表明, 重金属离子对 C7 菌株苯胺的降解都有不同程度的抑制作用, 以  $Hg^{2+}$ 、 $Ag^+$  和  $Co^{2+}$  最明显, 结果还表明硫酸铵对苯胺的降解也有抑制作用。

**关键词** 芽孢杆菌, 苯胺, 氮源

**分类号** X172

苯胺是农药、染料、塑料和医药工业的重要原料<sup>[1~2]</sup>, 在环境中由于硝基芳香化合物和苯胺类农药的微生物转化也可形成苯胺<sup>[3~4]</sup>。此外, 在印染废水的生物脱色处理中也有苯胺的形成<sup>[5]</sup>。苯胺严重污染环境和危害人体健康。生物降解是消除环境中苯胺的重要机制<sup>[6]</sup>。

已分离到一些能降解苯胺、氯代苯胺或甲基苯胺的细菌。Bachofer 等人<sup>[7]</sup>证明了在诺卡氏菌中苯胺通过加双氧酶反应形成邻苯二酚; 进而通过邻苯二酚-1, 2-加双氧酶<sup>[8~9]</sup>或邻苯二酚-2, 3-加双氧酶<sup>[10~11]</sup>的作用开环形成微生物可作为碳源、能源的化合物; 最近, 有人进行苯胺降解基因克隆<sup>[12]</sup>的研究。国内也已开展了苯胺降解微生物的分离筛选<sup>[13]</sup>方面的工作。本文报道一株能以苯胺为氮源同时降解苯胺的细菌, 研究了该菌株降解苯胺的生理生化特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 合成培养基(g/L)

葡萄糖 5.0,  $KH_2PO_4$  0.5,  $Na_2HPO_4$  0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3, 微量元素<sup>[14]</sup> 5ml, 苯胺 300mg, pH7.0。

### 1.2 样品

试验所用样品来自污水处理厂污泥。

### 1.3 样品的富集和菌种分离纯化

所采样品接种于上述培养基, 30℃ 摇床培养 7d, 重复 3 次, 然后在上述培养基平板上划线分离, 挑取单菌落, 接种于上述培养基斜面。

### 1.4 菌种鉴定

按文献 [15] 进行。

### 1.5 细菌生长的测定

以波长 460nm 处的浊度表示。

### 1.6 苯胺的测定

采用高压液相色谱法 (HPLC), C-18 反向柱, 测定波长为 230nm, 流动相为甲醇: 水 = 75:25, 流速为 1.5ml/min, 苯胺的停留时间约为 3.25min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 苯胺为氮源的细菌的分离和筛选

通过样品的富集培养和划线分离、纯化共得到 16 株能以苯胺为氮源的细菌, 这些菌株进一步复筛 (表 1) 得到 4 株以苯胺为氮源生长同时降解苯胺效果较好的菌株, 其中以菌株 C7 最好, 所以选 C7 菌株进行进一步试验。

### 2.2 菌株 C7 生长和降解苯胺的最佳条件

**2.2.1 温度的影响:** 在不同温度下 (10、15、20、25、30、35、40、45℃) 摇床培养 9d。结果表明, 菌

表1 细菌以苯胺为氮源的生长和对苯胺的降解<sup>1)</sup>

菌株	苯胺浓度 (mg/L) 起始/剩余	OD <sub>460</sub>	降解率 (%)
C4-3	427.5/213.8	0.255	50
C5-1	348.6/197.1	0.208	43.5
C5-2	321.1/191.9	0.180	40.2
C5-3(1)	308.3/12	1.28	96.1
C5-3(2)	331.3/221.2	0.179	33.2
C5-4	333.8/217.2	0.147	34.9
C5-5	373.4/219.5	0.196	41.2
C7	351.0/0	1.44	100
A1	329.7/321	0.072	2.6
A2	315.5/241.2	0.078	23.5
A3	329.0/93.6	1.1	71.5
A4	328.3/265.1	0.45	19.3
A5	323.8/264.1	0.59	18.4
A6	337.9/334.8	0.085	0.9
A7	389.0/9.9	0.79	97.5
A8	339.9/277.8	0.53	18.3
CK	323.1/320.7	0	0.7

1) 30℃摇床培养12d

株 C7 的生长和降解苯胺均以 30℃ 为最佳, 细菌的生长可达 OD<sub>460</sub> = 1.3, 对苯胺的降解率可达 96.2%。

2.2.2 pH 的影响: 接种不同 pH(5、6、7、8、9) 的培养基, 在 30℃ 条件下摇床培养 9d。结果表明, C7 菌株的细胞生长和对苯胺的降解均以 pH8.0 时为最好, 生长可达 OD<sub>460</sub> = 1.42, 对苯胺的降解率可达 96.5%。

2.2.3 C7 菌株生长细胞降解苯胺的动力学: 在 30℃ 摇床培养不同时间取样测定菌的生长和对

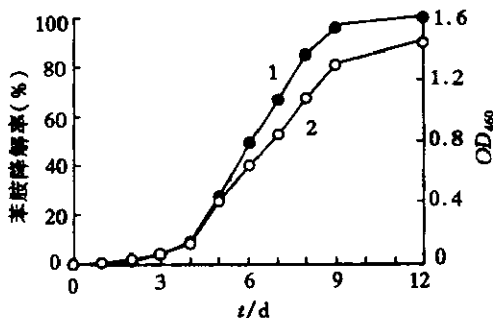


图1 菌株C7生长细胞降解苯胺的时间过程  
1 降解率, 2 细胞生长

苯胺的降解率。结果表明(图 1)C7 菌株细胞的生长和对苯胺的降解是同步的, 在摇床培养的最初几天(1~4d), 菌的生长和苯胺的降解非常缓慢, 此后菌的生长和对苯胺的降解速度迅速提高, 到 9d 时基本达到了最大的生长量和对苯胺的最高降解率; 到 12d 时达到了对所试浓度苯胺的完全降解, 进一步培养, 则培养液的浊度反而下降(数据未列出), 由于苯胺的完全消耗, C7 菌株因氮源的枯竭, 细胞自溶。

2.2.4 苯胺浓度对菌株 C7 生长细胞降解苯胺的影响: 将 C7 菌株接种含不同苯胺浓度的培养基, 在 30℃ 摇床培养 9d, 然后测定细菌的生长和对苯胺的降解情况。图 2 的结果表明, C7 菌株生长细胞在苯胺浓度低于 400mg / L 时, 基本能达到对苯胺的完全降解, 同时细胞的生长也随着苯胺浓度的提高而增加, 在 400mg / L 时达到最高, 为 OD<sub>460</sub> = 1.62; 而在苯胺浓度高于 400mg / L 时, 细胞的生长和对苯胺的降解率均呈下降的趋势, 到 600mg / L 时细胞基本不能生长, 对苯胺的降解率也非常低。此结果说明了 C7 菌株生长细胞对苯胺的降解的负荷量最高不能超过 600mg / L。

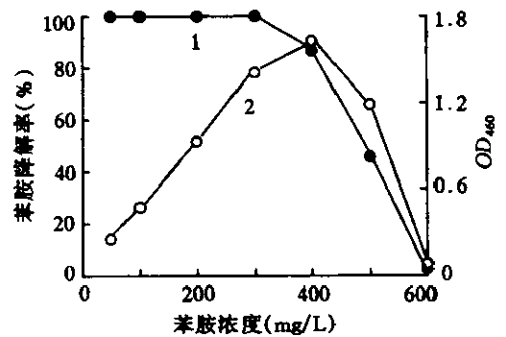


图2 苯胺浓度对苯胺降解的影响  
1. 降解率, 2. 细胞生长

### 2.3 重金属离子对 C7 菌株降解苯胺的影响

在化工废水和污染区域除了含有苯胺等有机污染物以外, 还含有各种重金属化合物的污染, 在利用生化方法处理含苯胺的化工废水或进行污染区域的生物修复时, 必须考虑各种重金属离子对微生物的生长和降解能力的影响, 在加有一定浓度的各种重金属离子的培养基中

表2 重金属离子对AN3菌株降解苯胺的影响<sup>1)</sup>

化合物	浓度 (mmol/L)	菌的生长 OD <sub>460</sub>	剩余苯胺 <sup>2)</sup> (mg/L)	降解活性 <sup>3)</sup>
对照	0	1.42	0	100
HgCl <sub>2</sub>	0.02	0	317.5	0
AgNO <sub>3</sub>	0.1	0	317.5	0
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.5	1.20	49.7	84.3
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.5	1.01	92.3	70.9
CoCl <sub>2</sub>	2.0	0.07	310.4	2.2
ZnSO <sub>4</sub>	1.0	1.10	82.5	74.0
NiSO <sub>4</sub>	2.0	1.10	79.3	75.0
MnCl <sub>2</sub>	1.0	1.10	78.7	75.2
CuSO <sub>4</sub>	2.0	1.15	63.4	80.0

1) pH7.0, 30℃ 摇床培养9d, 2) 苯胺起始浓度均为317.5mg/L, 3) 以对照为100, 其余与之相比较。

接种 C7 菌株, 30℃ 摇床培养 9d, 然后测定细胞的生长和对苯胺的降解情况。表 2 的结果表明, 重金属离子对 C7 菌株的细胞生长和苯胺的降解均有抑制作用, 其中以 Hg<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 最明显。

#### 2.4 添加含氮化合物对 C7 菌株的影响

在培养基中添加 100mg/L 的各种含氮化合物, 30℃ 摇床培养 9d, 然后测定菌的生长和对苯胺的降解情况。表 3 的结果表明, 添加含氮化合物对菌的生长均有明显的促进作用, 特别是以蛋白胨和牛肉膏的作用最为明显; 但是

表3 不同含氮化合物对C7菌株降解苯胺的影响<sup>1)</sup>

化合物	苯胺浓度 (mg/L)	OD <sub>460</sub>	降解率 (%)
	起始/剩余		
硫酸铵	359.2/234.5	1.82	35
硝酸铵	366.6/0.0	2.44	100
氯化铵	374.9/0.0	1.80	100
蛋白胨	375.4/0.0	4.32	100
酵母膏	377.9/0.0	1.65	100
牛肉膏	374.5/0.0	3.74	100

1) pH7.0, 30℃, 培养9d.

对苯胺的降解效率, 各种含氮化合物均没有明显的影响, 只有硫酸铵对 C7 菌株的苯胺降解有明显的抑制作用。

#### 2.5 C7 菌株的鉴定

根据 C7 菌株的菌落形态、细胞形态、染色反应、芽孢的形成与否以及生理生化特征, 该菌

株鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

芽孢杆菌 C7 (*Bacillus* sp. C7) 菌株, 可以苯胺为唯一氮源生长同时降解苯胺。该菌最高可降解 500mg/L 的苯胺, 降解苯胺的最适 pH 和温度分别为 8.0℃ 和 30℃, 重金属离子对 C7 菌株的生长和苯胺的降解均有抑制作用。此外, 除硫酸铵外, 其他含氮化合物对该菌株降解苯胺没有影响。该菌株能以苯胺为氮源, 说明它含有苯胺降解酶, 可脱除苯胺分子上的氨基形成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 作为细胞生长的氮源, 但该菌株不能以苯胺作碳源, 说明它缺乏苯胺脱氨基形成的中间产物的降解酶 (邻苯二酚-1, 2-加双氧酶或邻苯二酚-2, 3-加双氧酶), 不能使苯环开环裂解形成细胞可利用的化合物。周大石等人<sup>[12]</sup> 报道的菌株 AN12 可降解苯胺, 但不能以苯胺为氮源和碳源, 可能只是一种共代谢作用, 同时 AN12 菌株降解苯胺的浓度也只有 100mg/L。国外报道, 降解苯胺的微生物种类很多, 有许多菌株可以苯胺或甲基苯胺或氯代苯胺为氮源、碳源、能源, 有的菌株也只能以辅代谢的形式降解苯胺, 并不能彻底降解苯胺。

#### 参 考 文 献

- [1] Kearney P C, Kaufman D D. *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action*, 2nd ed, New York: Marcel Dekker, 1975.
- [2] Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants, In: T Leisinger, R Hutter, A M Cook and J Nuesch eds *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*, London: Academic Press, 1981, 371~385.
- [3] Hallas L E, Alexander M. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45:1234~1241.
- [4] McCormick N G, Feeherry F E, Levinson H S. *Appl Environ Microbiol*, 1976, 31:949~958.
- [5] 刘志培, 杨惠芳. *微生物学报*, 1989, 29(6): 418~426.
- [6] Lyons C D, Katz S, Bartha R. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48:491~496.
- [7] Bachofer R, Lingens F, Schater W. *FEBS Lett*, 1975, 50:288~290.
- [8] Loidl M, Hinteregger C, Ditzelmuller G *et al.* *Arch Microbiol*, 1990, 155:56~61.

(下转第 217 页)

(上接第 223 页)

- [9] Kaminski U, Janke D, Prauser H *et al.* *Z Allg Mikrobiol*, 1983, 23:235~246.
- [10] Konopka A, Knight D, Turco R F. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55:385~389.
- [11] Aoki K, Nakanishi Y, Murakami S *et al.* *Agric Biol Chem*, 1990, 54:205~206.
- [12] Meyers N L. *Current Microbiol*, 1992, 24(6):303~310.
- [13] 周大石, 王 莹, 高晓光. *环境科学研究*, 1996, 9(1): 25~28.
- [14] Konopka A. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 111:93~100.
- [15] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编写. *一般细菌常用鉴定方法*. 北京: 科学出版社, 1978.