

研究报告

乙醛降解菌 *Bacillus velezensis* LT-2 的发酵条件优化

姚璐晔¹, 闫如玉¹, 郑必艳¹, 杨铠忆¹, 国兆宇¹, 刘剑¹, 赵美琳¹, 吴凌天^{*1,2,3}

1 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏 常熟 215500

2 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816

3 苏州苏克生物科技有限公司, 江苏 张家港 215600

姚璐晔, 闫如玉, 郑必艳, 杨铠忆, 国兆宇, 刘剑, 赵美琳, 吴凌天. 乙醛降解菌 *Bacillus velezensis* LT-2 的发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3345-3356.

YAO Luye, YAN Ruyu, ZHENG Biyan, YANG Kaiyi, GUO Zhaoyu, LIU Jian, ZHAO Meilin, WU Lingtian. Optimization of fermentation conditions of an acetaldehyde-degrading bacterium *Bacillus velezensis* LT-2[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3345-3356.

摘要: 【背景】乙醛作为醛类污染物广泛存在于生产生活中, 相较于传统的物化方法, 生物降解具有诸多优势, 已成为研究热点。【目的】筛选获得降解乙醛的菌株并优化其发酵条件, 为微生物降解乙醛提供试验资源。【方法】经过富集培养和乙醛降解试验获得一株乙醛降解能力高的菌株; 通过单因子优化(碳源、氮源、金属离子、温度、转速、接种量和初始 pH)和多因子的交互试验(Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken design 试验)考察培养基组分和发酵条件对菌株降解乙醛的影响, 并考察菌株在最佳条件下的生长状态和乙醛降解能力。【结果】筛选获得一株具有乙醛降解能力的菌株 *Bacillus velezensis* LT-2, 该菌株降解乙醛的最佳培养条件为: 蔗糖 30 g/L, 营养肉汤 0.6 g/L, 氯化钾 0.12 mol/L, 温度 28 °C, 初始 pH 7.5, 接种量 6%, 摇床转速 200 r/min。在此条件下, *B. velezensis* LT-2 可在 1 g/L 乙醛的培养液中生长, 22 h 的降解率为 89.77%±2.33%, 是优化前降解率的 3.58 倍。【结论】试验菌株 *B. velezensis* LT-2 对乙醛具有良好的降解效率, 为乙醛工业废水的生物治理提供了较好的试验基础和应用依据。

关键词: 乙醛; 生物降解; 条件优化; 贝莱斯芽孢杆菌

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20201050); 姑苏创新创业领军人才计划(ZXL2022003); 苏州市科技支撑计划(SNG2021018, SNG2021013); 张家港市科技支撑计划(ZKCXY2143); 常熟市科技计划(CN202207, CS202109)

This work was supported by the Jiangsu Provincial Natural Science Foundation (BK20201050), the Project of Gusu Leading Talents of Innovation and Entrepreneurship Science and Technology (ZXL2022003), the Suzhou Science and Technology Development Project (SNG2021018, SNG2021013), the Zhangjiagang Science and Technology Development Project (ZKCXY2143), and the Changshu Science and Technology Project (CN202207, CS202109).

*Corresponding author. E-mail: wlt913@cslg.edu.cn

Received: 2022-10-10; Accepted: 2023-05-01; Published online: 2023-05-28

Optimization of fermentation conditions of an acetaldehyde-degrading bacterium *Bacillus velezensis* LT-2

YAO Luye¹, YAN Ruyu¹, ZHENG Biyan¹, YANG Kaiyi¹, GUO Zhaoyu¹, LIU Jian¹, ZHAO Meilin¹, WU Lingtian^{*1,2,3}

1 College of Biological and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, Jiangsu, China

2 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

3 Suzhou Suke Biotechnology Limited Company, Zhangjiagang 215600, Jiangsu, China

Abstract: [Background] As an aldehyde pollutant, acetaldehyde widely exists in production and life. Compared with physical and chemical methods, biodegradation with great advantages has become a research hotspot. [Objective] To provide experimental resources for the microbial degradation of acetaldehyde, we screened out an acetaldehyde-degrading strain and optimized the fermentation conditions for degrading acetaldehyde. [Methods] After enrichment culture and acetaldehyde-degrading experiment, a strain with high acetaldehyde-degrading ability was obtained. Single factor tests (carbon source, nitrogen source, metal ions, temperature, rotational speed, inoculation amount, and initial pH) and multi-factor interaction experiments (Plackett-Burman design, steepest ascent design, and Box-Behnken design) were carried out to study the effects of culture medium components and fermentation conditions on the degradation of acetaldehyde by the strain. The growth curve and acetaldehyde degradation curve of the strain were established. [Results] A strain LT-2 with high acetaldehyde-degrading ability was obtained and identified as *Bacillus velezensis* LT-2. The optimum parameters for degrading acetaldehyde by *B. velezensis* LT-2 were fermentation in the medium composed of 30 g/L sucrose, 0.6 g/L nutrient broth, and 0.12 mol/L potassium chloride at 28 °C, initial pH 7.5, inoculation size of 6%, and 200 r/min. Under the optimal conditions, *B. velezensis* LT-2 can grow in the medium with 1 g/L acetaldehyde and showed the 22 h acetaldehyde degradation rate of 89.77%±2.33%, which was 3.58 times of that before optimization. [Conclusion] *B. velezensis* LT-2 was effective in degrading acetaldehyde. This study provides experimental and practical references for the biological treatment of acetaldehyde-containing industrial wastewater.

Keywords: acetaldehyde; biological degradation; optimization of fermentation parameters; *Bacillus velezensis*

乙醛是一种具有生理毒性的化合物^[1], 能刺激人体皮肤、眼睛及呼吸道, 吸入乙醛能引起气喘、咳嗽、头痛等症状, 过量吸入会导致呼吸麻痹而导致死亡^[2]。乙醛作为工业产品广泛存在于生产生活中, 对乙醛污染的处理经常采用生化或物化的方法, 具体为光催化法或厌

氧法等, 而采用生物法降解乙醛具有廉价、设备要求低、操作简易、转化进程短、转化率高、无二次污染等^[3]显著优势, 已成为研究热点。目前, 乙醛生物降解的主要方式是微生物降解和乙醛脱氢酶降解, 其中酶降解法一般需要辅因子参与, 且还需酶的发酵与纯化步骤, 与微

生物降解相比成本较高。虽然微生物降解可以实现“边发酵边降解”,但目前文献主要报道的是通过霉菌及酵母等真核微生物降解乙醛^[4]。然而真核微生物生长周期较长,生长所需营养要求高^[5],不利于规模化低成本应用。此外,虽然有原核微生物降解乙醛的相关报道,但乙醛降解效果不佳^[3]。

本试验围绕实验室菌库中保藏的一株具有降解乙醛能力的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)展开。贝莱斯芽孢杆菌作为一种新型的生物防治芽孢杆菌,最早于2005年由Ruiz-García等分离于西班牙南部马拉加(Málaga)的维河(the Vélez river)含盐水样^[6]。近年来国内外对贝莱斯芽孢杆菌的研究越来越多,主要集中在生物防治^[7]、药物研发^[8]、食品发酵^[9]和工业酶制剂^[10-11]等领域,但尚无贝莱斯芽孢杆菌降解乙醛的报道。试验通过研究单因素(碳源、氮源、金属离子、温度、转速、接种量和初始pH)和多因素的交互作用,考察它们对试验菌株生长量及其乙醛降解能力的影响,从而确定试验菌株降解乙醛的最佳条件,为后续采用原核微生物降解乙醛提供试验资源。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

本次试验所用菌株均为课题组菌库中保藏的菌株。

1.1.2 主要试剂和仪器

蔗糖、酵母粉、NaNO₃、CaCl₂等分析纯试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司。超净工作台,苏州净化公司;高速冷冻离心机,江苏苏美达仪器设备有限公司;高压蒸汽灭菌锅,上海百仑生物科技有限公司;生化培养箱,南京保利华科学器材有限公司;全温摇床柜,南

京楚强医疗器械有限公司;pH计,电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;紫外可见分光光度计,岛津公司。

1.1.3 培养基

富集培养基(g/L):蔗糖 30.0,酵母粉 1.0, NaNO₃ 3.0, KH₂PO₄·3H₂O 1.5,乙醛 1.0, pH 7.5。生长培养基(g/L):蔗糖 30.0,酵母粉 2.0, NaNO₃ 3.0, KH₂PO₄·3H₂O 1.5, CaCl₂ 0.1, MgSO₄·7H₂O 0.3, MnSO₄·H₂O 0.002 5, 乙醛 1.0, pH 7.5。种子培养基:乙醛 0.5 g/L,其余成分按生长培养基添加。

1.2 乙醛降解菌的筛选

将实验室菌库保藏的多个菌株接入富集培养基(乙醛浓度 1.0 g/L),30 °C、200 r/min 振荡培养 36 h,初筛确定能降解乙醛的菌株,再将各菌株接入生长培养基中,30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h,检测乙醛降解率,选择降解率高的菌株为后续试验菌株。

1.3 方法

1.3.1 种子培养

从斜面刮取一环菌泥置于种子液体培养基中,在30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h。

1.3.2 生长培养

将种子液以 5% (体积分数)接种量接入生长培养基中,按照设计的单因素试验条件于 200 r/min 振荡培养 24 h,培养温度为 30 °C (除温度优化组)。

1.4 菌株 LT-2 降解乙醛的生长培养基优化

在生长培养基的基础上,在初始 pH 7.5、培养温度 30 °C、摇床转速 200 r/min 条件下,考察碳源(蔗糖、乳糖、葡萄糖、麦芽糖、阿拉伯糖和果糖)、蔗糖浓度(0–50 g/L)、有机氮源(酵母浸出粉、酵母浸膏、蛋白胨、胰蛋白胨、营养肉汤、花生饼粉、牛肉浸膏和黄豆饼粉)、营养肉汤(0.3–3.0 g/L)、无机氮源(氯化铵、硝酸

铵、硫酸铵、硝酸钠、亚硝酸钠、硝酸钙、磷酸氢二铵和磷酸二氢铵)、金属离子(硫酸锰、氯化镁、氯化锌、氯化铁、氯化钾、氯化钠和氯化钙,浓度为 0.1 mol/L)、氯化钾浓度(0–2.2 mol/L)对乙醛降解率的影响。

1.5 菌株 LT-2 降解乙醛的培养条件优化

在 1.4 的基础上,以乙醛降解率和菌体生长为检测指标,考察发酵温度(24、26、28、30、32 和 34 °C)、pH 值(3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5 和 10.5)、接种量(1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%和 8%)和摇床转速(120、160、180、200、220、240 和 260 r/min)对试验菌株的影响。

1.6 Box-Behnken design (BBD)试验

根据 PB 试验和最陡爬坡试验结果,采用 BBD 试验对乙醛降解能力影响最大的 3 个显著因素进行优化试验,进一步确定 *B. velezensis* LT-2 降解乙醛的最佳条件。

1.7 *Bacillus velezensis* LT-2 分批培养降解乙醛

将种子液按照 6%的接种量接种至装有最优培养基的 500 mL 锥形瓶进行发酵培养,

30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h,每 2 h 取样测定乙醛降解率和菌体生物量,绘制乙醛降解曲线和菌体生长曲线。

1.8 检测方法

1.8.1 乙醛含量测定

采用王振杰等^[12]的检测方法测定乙醛含量:发酵液 12 000 r/min 离心 5 min,取 100 μL 上清液与 100 μL 果糖混合后,加入 1 mL 间苯二酚,80 °C 水浴反应 10 min;然后置于冰水冷却后稀释 2 倍,测定 555 nm 处的吸光值。

1.8.2 菌体生物量的测定

菌体干重(dry cell weight, DCW)采用田静等^[13]报道的方法检测。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选结果

通过筛选获得菌株 LT-2 可耐受 1.0 g/L 的乙醛浓度,如图 1A 所示。显微镜下菌体为杆状,有芽孢,革兰氏染色呈阳性;菌落呈圆形中间隆起,表面湿润边缘圆滑,颜色为乳白色(图 1B)。通过菌落形态及菌号对比,该菌与本

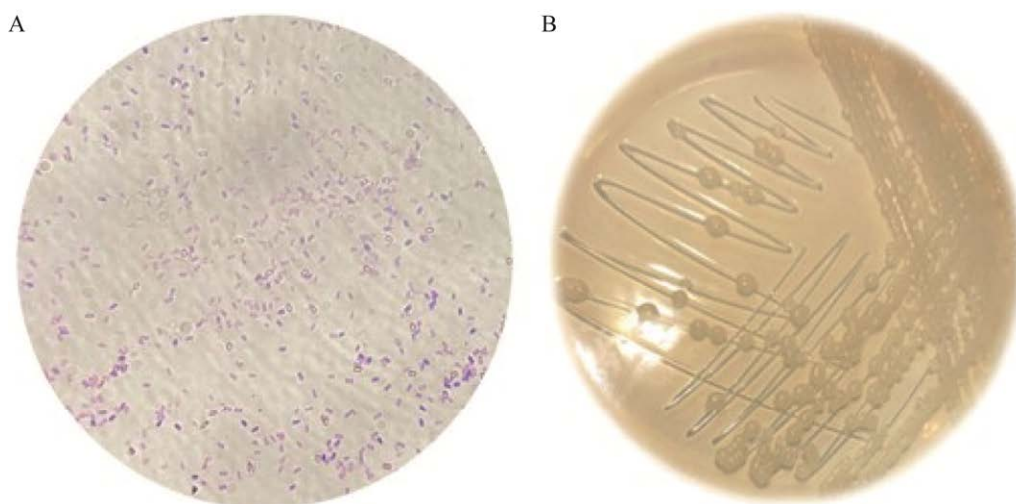


图 1 菌株 LT-2 的细胞显微镜检图(A)和菌落形态(B)

Figure 1 Photomicrograph (A) and colony morphology (B) of strain LT-2.

实验室前期王屈祎等^[14]报道的高产淀粉酶菌株 *B. velezensis* LT-2 (GenBank 登录号为 MN822654) 是同一株菌。菌株 LT-2 在 1.0 g/L 乙醛浓度的液体环境中培养 24 h 可降解 25.1% 乙醛, 且细胞干重达到 3.5 g/L。邵伟等^[15]报道 *Acetobacter pasteurianus* CCTCC AB96019 在 24 h 内可降解 0.35 g/L 的乙醛; 蔡志强等^[16]报道 *Halomonas axialensis* ACH-L-8 在 32 h 降解 85% 0.5 g/L 乙醛。野生型菌株 *B. velezensis* LT-2 在未优化的发酵条件下就能耐受 1.0 g/L 的乙醛, 且降解率为 25.1%, 降解速率为 0.03 g/(L·h), 因此, 优化该菌降解乙醛的发酵条件具有一定的研究价值。

2.2 发酵培养基优化结果

2.2.1 碳源对菌体量和乙醛降解的影响

由图 2A 可知, 麦芽糖作为碳源时, LT-2 菌体量较低, 其余碳源培养的生物量都相当 (5.00 g/L 左右), 当以蔗糖和葡萄糖为碳源时, 乙醛降解率远高于其他碳源, 考虑发酵成本, 选用蔗糖作为碳源进行后续研究。由图 2B 可知, LT-2 以乙醛为唯一碳源进行生长代谢, 生物量

较低为 (1.76±0.30) g/L, 乙醛降解率也比蔗糖存在下低; 随着蔗糖浓度的增加乙醛降解率显著提升; 当蔗糖为 30 g/L 时乙醛降解率达到最大 (27.80%±0.17%), 继续增加蔗糖浓度, 乙醛降解率反而下降。因此, 最佳蔗糖浓度为 30 g/L。

2.2.2 氮源对菌体量和乙醛降解的影响

由图 3A 可知, 酵母浸出粉、酵母浸膏、花生饼粉和黄豆饼粉能够促进试验菌株的生长, 但乙醛降解率并未随之增加。当以营养肉汤为氮源时, 生物量仅为 (5.64±0.17) g/L, 但乙醛降解率达到最大值 (33.70%±0.34%), 是初始降解率的 1.34 倍。由图 3B 可知, 随着营养肉汤浓度 [(0.3–1.2) g/L] 的升高, 菌体生物量和乙醛降解率都呈现相同的变化趋势, 当浓度为 0.60 g/L 时乙醛降解率最大, 因此选择 0.60 g/L 为最佳营养肉汤浓度。

2.2.3 金属离子对菌体量及乙醛降解的影响

如图 4A 所示, K^+ 和 Na^+ 可以提高试验菌株的乙醛降解率, 其中 K^+ 的促进作用较为显著, 为对照组的 1.38 倍, 这一现象与李晓敏^[9]的研究

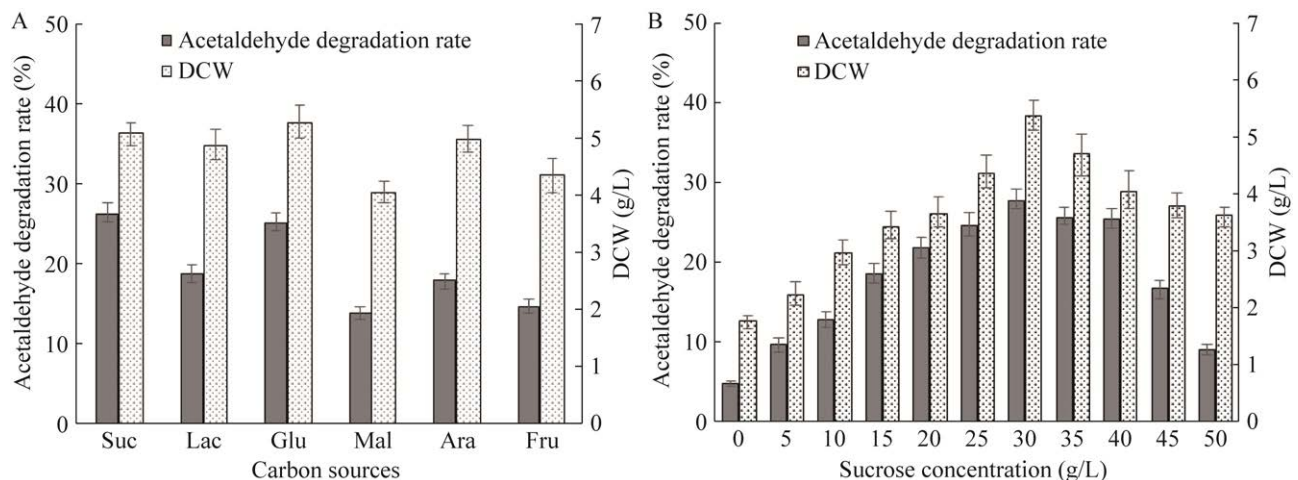


图 2 碳源种类(A)和蔗糖浓度(B)对菌体量及乙醛降解率的影响 Suc: 蔗糖; Lac: 乳糖; Glu: 葡萄糖; Mal: 麦芽糖; Ara: 阿拉伯糖; Fru: 果糖

Figure 2 Effects of carbon sources (A) and sucrose concentrations (B) on cell biomass and acetaldehyde degradation. Suc: Sucrose; Lac: Lactose; Glu: Glucose; Mal: Maltose; Ara: Arabinose; Fru: Fructose.

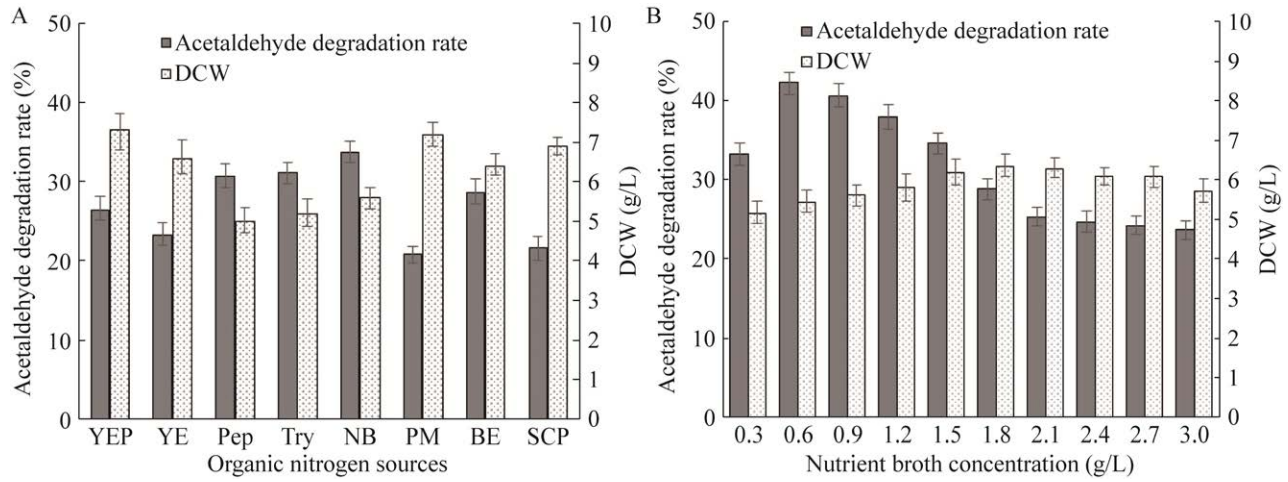


图 3 有机氮源种类(A)和营养肉汤浓度(B)对菌体量及乙醛降解率的影响 YEP: 酵母浸出粉; YE: 酵母浸膏; Pep: 蛋白胨; Try: 胰蛋白胨; NB: 营养肉汤; PM: 花生饼粉; BE: 牛肉浸膏; SCP: 黄豆饼粉

Figure 3 Effects of organic nitrogen sources (A) and nutrient broth concentrations (B) on cell biomass and acetaldehyde degradation. YEP: Yeast extract power; YE: Yeast extract; Pep: Peptone; Try: Tryptone; NB: Nutrient broth; PM: Peanut meal; BE: Beef extract; SCP: Soybean cake powder.

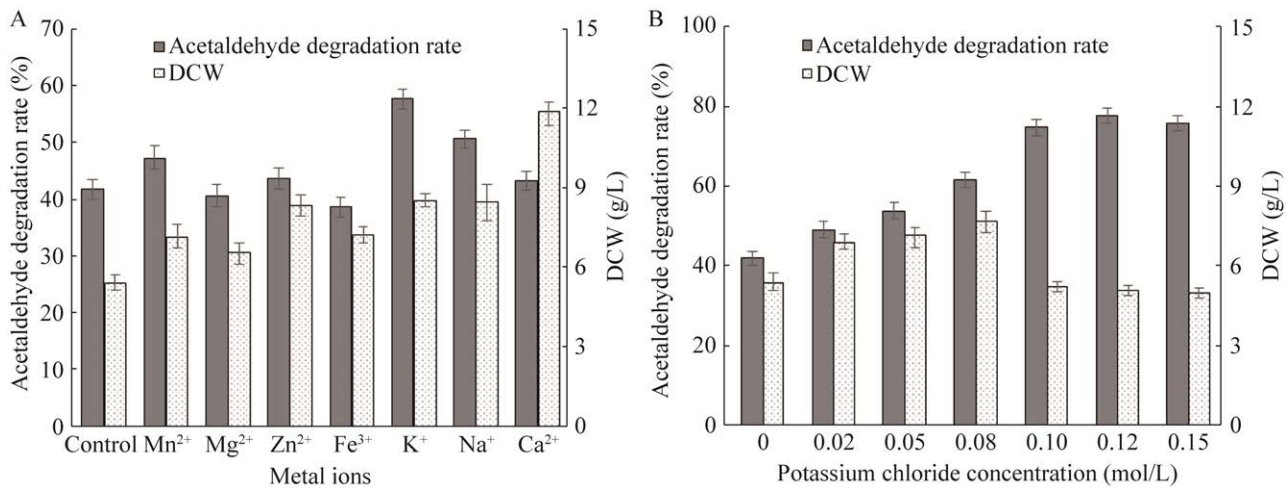


图 4 金属离子种类(A)和 K⁺浓度(B)对菌体量及乙醛降解率的影响

Figure 4 Effects of metal ions (A) and K⁺ concentrations (B) on cell biomass and acetaldehyde degradation.

一致,他在报道中指出菌体乙醛降解能力强即表明其胞内具有高活力的乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH),对 ALDH 酶活有促进作用的是 K⁺和 Na⁺,其中 0.10 mol/L KCl 能够提高

ALDH 活性至原有酶活性的 1.18 倍。随着 K⁺浓度的增加,乙醛降解率显著提高,当 KCl 浓度为 0.12 mol/L 时,菌体的乙醛降解率最高,为 77.60%±1.91% (图 4B)。

2.3 发酵条件优化

2.3.1 发酵温度对菌体量及乙醛降解的影响

如图 5A 所示, 当温度在 24–28 °C 时乙醛降解率随温度升高而增加, 这一趋势与菌体生物量一致; 当温度为 28 °C 时, 乙醛降解率达到最高, 为 $86.80\% \pm 2.24\%$; 温度升高, 菌体代谢旺盛, 使得降解能力也随之提高, 与已有的乙醛降解细菌报道^[17]一致。

2.3.2 摇床转速对菌体量及乙醛降解的影响

如图 5B 所示, 摇床转速在 120–200 r/min 时, 乙醛降解随着转速的提高而增加, 当转速

在 200 r/min 时, 乙醛降解率达到最高, 为 $83.70\% \pm 2.44\%$; 当转速继续提高, 乙醛降解率逐渐下降。

2.3.3 接种量对菌体量及乙醛降解的影响

如图 5C 所示, 试验菌株的乙醛降解能力随着接种量的增加呈现先增后降的趋势, 当接种量为 6% 时, 乙醛降解率达到最大, 为 $82.10\% \pm 2.43\%$, 因此, 选择 6% 为最佳接种量。

2.3.4 发酵液初始 pH 对菌体量及乙醛降解的影响

由图 5D 可知, pH 值升高可促进乙醛降解, 当 pH 值为 7.5 时乙醛降解率最高, 为

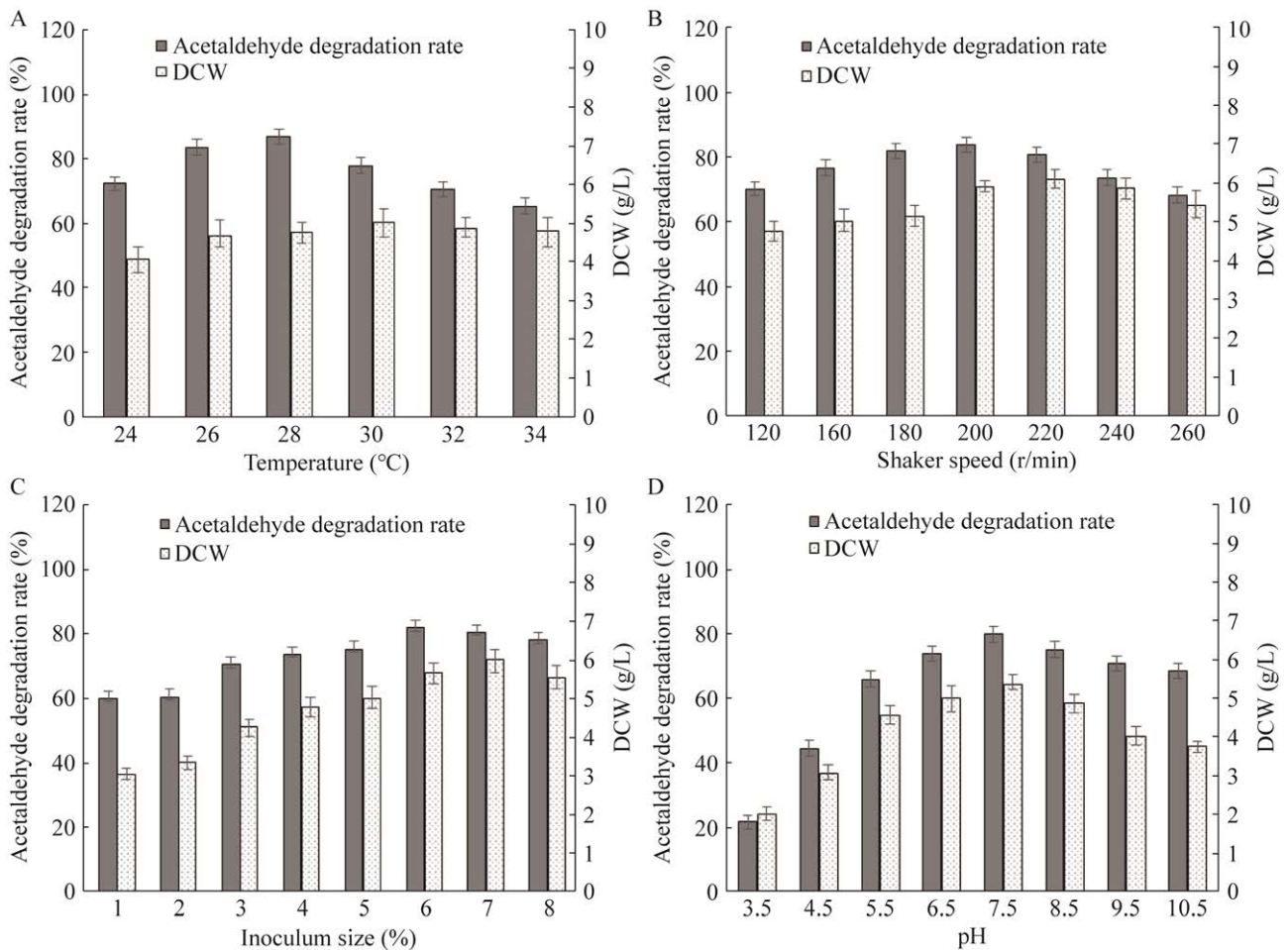


图 5 发酵条件对菌体量及乙醛降解率的影响 A: 发酵温度. B: 摇床转速. C: 接种量. D: 发酵液初始 pH

Figure 5 Effects of fermentation conditions on cell biomass and acetaldehyde degradation. A: Temperature. B: Shaker speed. C: Inoculum size. D: pH.

79.80%±2.34%；而在偏酸和偏碱条件下，菌株生长受到抑制，导致乙醛降解能力下降。

2.4 Box-Behnken design (BBD)试验结果

根据 PB 试验和最陡爬坡试验结果选出的 3 个影响显著因素，分别为 K^+ 、温度和接种量，为确定它们的交互作用，进行三因素三水平的响应面试验，试验设计与结果如表 1 所示。

由表 2 可知，模型($P<0.001$)极显著，失拟项($P=0.3684>0.05$)不显著， $R^2=0.9946$ ， R^2_{Adj} (0.9876)和 R^2_{Pre} (0.9758)的差值 <0.02 ，表明此模型预测结果与实际试验情况的拟合度较好，适用于试验菌株乙醛降解优化的预测分析。模型中 CF 、 C^2 和 D^2 ($P<0.001$)影响极显著；考虑

显著项，运用 design expert 10.04 进行二次线性回归拟合方程： $Y=24.56-0.83C+2.93D+0.015F+1.64CD+7.46CF+3.92DF-10.29C^2-5.81D^2-4.39F^2$ 。 K^+ 浓度、温度和接种量三者的交互作用对乙醛降解率的影响如图 6 所示。

2.5 乙醛降解最佳条件的确定与验证试验

使用 design expert 10.04 得到拟合方程，获得的极值点为 K^+ 浓度 0.12 mol/L、接种量 5.93%、温度 27.97 °C，此条件下模型预测最高乙醛降解率 90.01%。结合实际试验条件，选择 K^+ 浓度 0.12 mol/L、接种量 6%、温度为 28 °C进行验证试验，乙醛降解率为 88.98%±2.31%，是预测值的 98.89%，说明该拟合方程的可信度较高。

表 1 Box-Behnken design 试验设计及结果

Table 1 Design matrix and experimental results of Box-Behnken design

Assay	Factors			Degradation rate (%)	
	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>F</i>	Observed	Predicted
1	0.12 (0)	28.00 (0)	6.00 (0)	88.02±2.33	86.38
2	0.13 (1)	29.00 (1)	6.00 (0)	77.41±2.26	77.69
3	0.12 (0)	28.00 (0)	6.00 (0)	88.64±2.35	88.63
4	0.13 (1)	28.00 (0)	6.50 (1)	82.18±2.31	84.52
5	0.12 (0)	29.00 (1)	5.50 (-1)	78.36±2.28	78.68
6	0.12 (0)	28.00 (0)	6.00 (0)	89.46±2.34	88.51
7	0.11 (-1)	29.00 (1)	6.00 (0)	76.24±2.19	76.89
8	0.11 (-1)	28.00 (0)	6.50 (1)	68.48±2.16	69.04
9	0.13 (1)	27.00 (-1)	6.00 (0)	67.38±2.11	66.14
10	0.11 (-1)	27.00 (-1)	6.00 (0)	72.78±2.27	70.98
11	0.12 (0)	27.00 (-1)	5.50 (-1)	82.21±2.30	83.66
12	0.12 (0)	28.00 (0)	6.00 (0)	90.82±2.37	88.84
13	0.12 (0)	29.00 (1)	6.50 (1)	83.34±2.29	80.89
14	0.12 (0)	28.00 (0)	6.00 (0)	86.44±2.37	85.32
15	0.12 (0)	27.00 (-1)	6.50 (1)	72.52±2.26	72.02
16	0.11 (-1)	28.00 (0)	5.50 (-1)	82.48±2.28	84.01
17	0.13 (1)	28.00 (0)	5.50 (-1)	66.35±2.09	67.78

C、*D* 和 *F* 分别为变量 K^+ (mol/L)、温度(°C)和接种量(%)

C, *D* and *F* are K^+ (mol/L), temperature (°C) and inoculum (%), respectively.

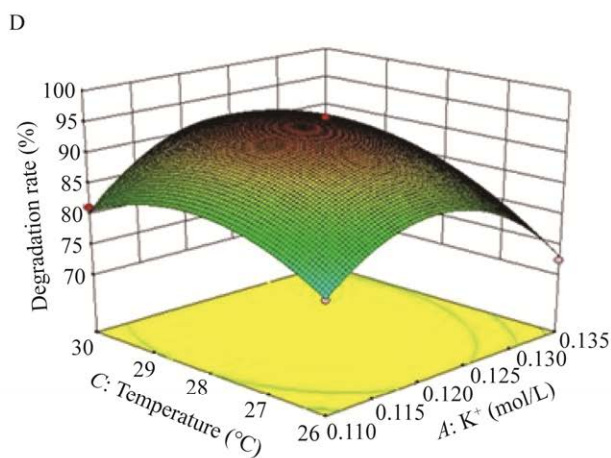
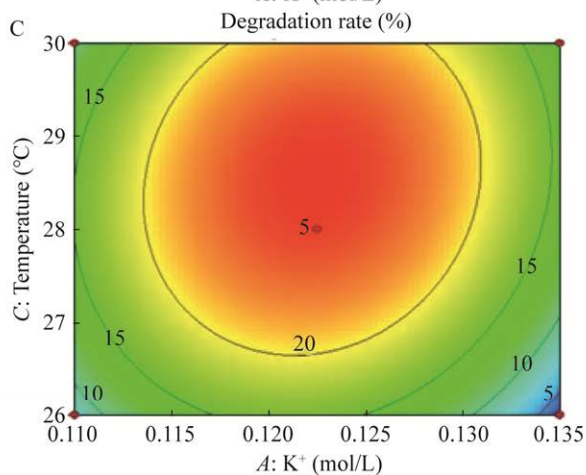
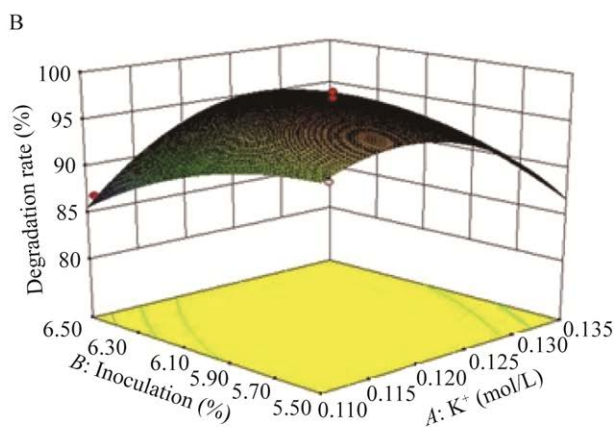
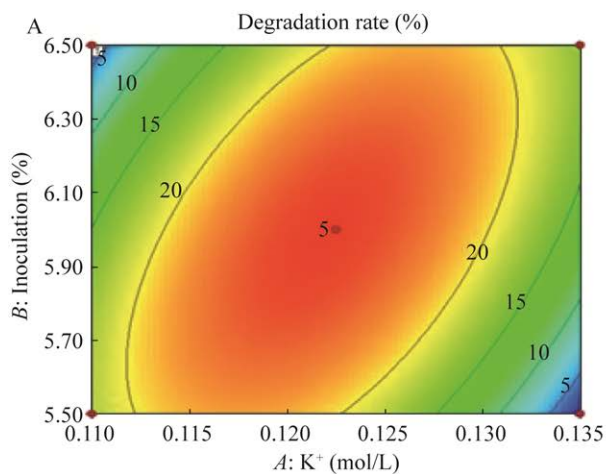
表 2 Box-Behnken design 试验回归方程和方差分析

Table 2 Experimental regression equations and analysis of variance of Box-Behnken design

Source	SS ^a	DF ^b	MS ^c	F-value	Probe>F
Model	999.36	9	111.04	35.81	<0.000 1 ^d
C-K ⁺	5.54	1	5.54	1.79	0.223 0
D-temperature	52.33	1	52.33	16.87	0.004 5 ^d
F-inoculation	1.04	1	1.04	0.33	0.581 2
CD	10.79	1	10.79	3.48	0.104 4
CF	222.46	1	222.46	71.73	<0.000 1 ^d
DF	53.80	1	53.80	17.35	0.004 2 ^d
C ²	398.56	1	398.56	128.52	<0.000 1 ^d
D ²	127.10	1	127.10	40.99	0.000 4 ^d
F ²	69.89	1	69.89	22.54	0.002 1 ^d
Residual	21.71	7	3.10		
Lack of fit	11.07	3	3.69	1.39	0.368 4
Pure error	10.64	4	2.66		
Cor total	1 021.07	16			

C、D 和 F 分别为变量 K⁺、温度和接种量. ^a: 平方和, ^b: 自由度, ^c: 均方差, ^d为极显著; R²=0.994 6, R²_{Adj}=0.987 6, R²_{Pre}=0.975 8

C, D and F are K⁺, temperature and inoculum, respectively. ^a: Sum of squares, ^b: Degrees of freedom, ^c: Squared difference, ^d: Highly significant; R²=0.994 6, R²_{Adj}=0.987 6, R²_{Pre}=0.975 8.



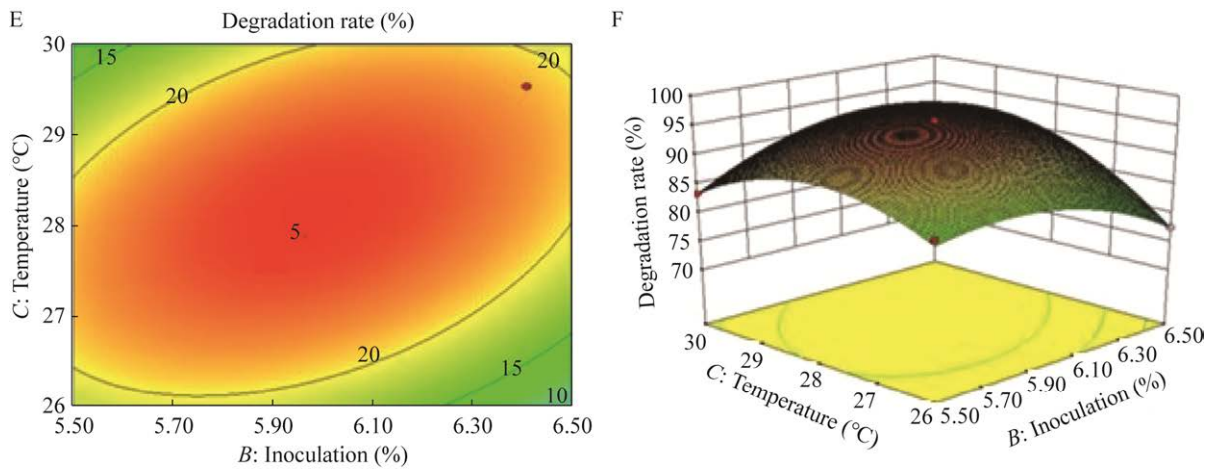


图 6 三因素交互作用对乙醛降解率的影响

Figure 6 The influence of the interaction of three factors on acetaldehyde degradation.

2.6 *Bacillus velezensis* LT-2 摇瓶培养降解乙醛

在最佳培养条件下, 将 *B. velezensis* LT-2 在 500 mL 摇瓶中培养降解乙醛。试验结果如图 7 所示: 菌体在培养 8 h 后开始降解乙醛, 此时生物量显著增加, 表明菌体的乙醛降解和生长代谢是同步; 至 22 h 时, 乙醛降解率达到最大值, 为 $89.77\% \pm 2.33\%$, 是优化前降解率的 3.58 倍, 对应的菌体量为 (6.17 ± 0.41) g/L。

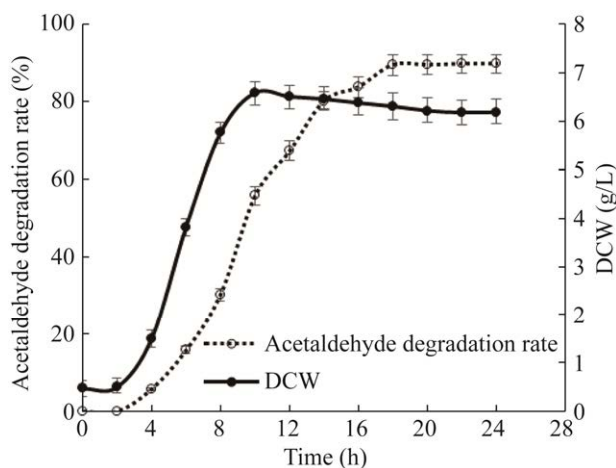


图 7 菌体生长与乙醛降解曲线

Figure 7 Cell growth and acetaldehyde degradation curve of strain *Bacillus velezensis* LT-2.

3 讨论与结论

本文筛选得到一株能够降解乙醛的细菌, 经形态学与菌号比对, 确定为贝莱斯芽孢杆菌, 目前关于该菌的研究主要集中在其对植物病原真菌及细菌的拮抗性能方面^[16], 关于乙醛降解的报道尚属空白。通过单因素试验、PB 试验、最陡爬坡试验和响应面试验获得菌株 LT-2 的最佳发酵培养基: 蔗糖 30 g/L, 营养肉汤 0.6 g/L, 氯化钾 0.12 mol/L, 温度 28 °C, 初始 pH 7.5, 接种量 6%, 摇床转速 200 r/min。在最佳发酵条件下, 菌株 LT-2 乙醛降解率达到 $89.77\% \pm 2.33\%$ (初始甲醛浓度 1.0 g/L), 是初始降解率的 3.58 倍。

现有报道表明, 具有乙醛降解能力的原核微生物主要有粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)^[12]、醋酸单胞菌(*Acetomonas* sp.)^[13]、巴氏醋杆菌(*Acetobacter pasteurianus*)^[15-16]、希瓦氏菌(*Shewanella mangrove*)^[18-19]、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)^[20]和盐单胞菌(*Halomonas axialensis*)^[21]等, 各菌株的乙醛降解能力如表 3 所示, 试验菌株 LT-2 能够降解初始浓度为 1 g/L 的乙醛溶液, 单位时间的降解率为 0.04 g/(L·h),

表 3 已有报道菌株的乙醛降解能力情况

Table 3 Acetaldehyde degrading ability of strains had been reported

Strains	Initial concentration of acetaldehyde (g/L)	Degradation time (h)	Degradation rate (%)	Degradation rate per unit time (g/(L·h))	References
<i>Enterococcus faecalis</i> TXZ-3	1.00	24	93.60	0.04	[12]
<i>Acetomonas</i> sp. A572	0.01	48	94.00	0.02×10 ⁻³	[13]
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1.40	96	98.00	0.01	[15]
<i>Acetobacter pasteurianus</i> A27	0.50	48	100.00	0.01	[16]
<i>Shewanella mangrove</i> sp. nov.	0.20×10 ⁻³	48	100.00	0.04×10 ⁻⁴	[18]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. NPYQ10A	0.50×10 ⁻³	24	100.00	0.02×10 ⁻³	[20]
<i>Halomonas axialensis</i> ACH-L-8	0.50	43	85.00	0.01	[21]
<i>B. velezensis</i> LT-2	1.00	22	89.77	0.04	This study

高于已有报道的菌株;其中粪肠球菌(*E. faecalis* TXZ-3)^[12]的降解能力与 LT-2 相近[初始浓度 1 g/L, 单位时间降解率为 0.04 g/(L·h)], 但由于该菌是从小鼠结肠中筛选获得, 其所需的环境温度为 35 °C, 且喜好厌氧环境, 这与工业废水处理环境(25 °C, 需氧)相差较大, 不适合处理工业废水。菌株 LT-2 的降解环境条件更接近于工业废水的情况, 这为后续利用该菌株进行废水处理奠定了试验基础。

REFERENCES

- [1] TIAN XM, SHEN ZQ, ZHOU YX, WANG KJ. Inhibition on biological acidification and microbial community by high-strength acetaldehyde[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2020, 143: 231-238.
- [2] WANG HY, WANG BD, LI JH, ZHU TL. Adsorption equilibrium and thermodynamics of acetaldehyde/acetone on activated carbon[J]. Separation and Purification Technology, 2019, 209: 535-541.
- [3] 商谢. 深海环境中乙醛降解菌及醛脱氢酶基因的多样性研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2014. SHANG XX. Diversity of acetaldehyde-degrading bacteria and ALDH in the deep-sea environment[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2014 (in Chinese).
- [4] OSBORNE JP, MIRA de ORDUÑA R, PILONE GJ, LIU SQ. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 191(1): 51-55.
- [5] EVANS WE, JOHNSON JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response[J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2001, 2: 9-39.
- [6] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195.
- [7] HASHEM A, TABASSUM B, ABD-ALLAHD EF. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(6): 1291-1297.
- [8] CHEN XH, SCHOLZ R, BORRIS M, JUNGE H, MÖGEL G, KUNZ S, BORRIS R. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1/2): 38-44.
- [9] 李晓敏. 大肠杆菌氧胁迫适应性的蛋白组学、O-抗原研究和嗜热菌 NG80-2 醛脱氢酶分子生物学研究[D]. 天津: 南开大学博士学位论文, 2010. Li XM. Proteomic and O-antigen analysis of *Escherichia coli* and functional genomic research in *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Nankai University, 2010 (in Chinese).
- [10] LU MY, GAO ZX, XING SQ, LONG J, LI CQ, HE LP, WANG X. Purification, characterization, and chemical modification of *Bacillus velezensis* SN-14 fibrinolytic enzyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 177: 601-609.

- [11] 陈龙, 吴兴利, 李立佳, 魏炳栋, 于维, 闫晓刚, 谷巍, 徐海燕, 刘臣, 刘洪亮, 张芳毓. 一株高产内切纤维素酶贝莱斯芽孢杆菌的产酶条件优化及酶学性质分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(5): 1353-1361.
CHEN L, WU XL, LI LJ, WEI BD, YU W, YAN XG, GU W, XU HY, LIU C, LIU HL, ZHANG FY. Optimization of enzyme production conditions and analysis of enzymatic properties of a high-yield endocellulolytic enzyme *Bacillus velezensis*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(5): 1353-1361 (in Chinese).
- [12] 王振杰, 杨鹏, 马桢朋, 张艺豪, 刘聚源, 田晓柱. 小鼠胃肠道中乙醛降解菌的分离·鉴定及乙醛降解特性的测定[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(31): 80-84.
WANG ZJ, YANG P, MA ZP, ZHANG YH, LIU JY, TIAN XZ. Isolation and identification of acetaldehyde-degrading bacteria from the gastrointestinal tract of mice and determination of their acetaldehyde degradation characteristics[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(31): 80-84 (in Chinese).
- [13] 田静, 李尔场. 乙醛降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(35): 11502-11503.
TIAN J, LI EY. Research on separation and identification of ethylal-degradation bacteria and its degradation characteristics[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(35): 11502-11503 (in Chinese).
- [14] 王屈祎, 钟倩, 闫如玉, 马醒佳, 王会, 刘思瑜, 吴凌天. 淀粉酶产生菌的筛选、鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 173-188.
WANG QY, ZHONG Q, YAN RY, MA XJ, WANG H, LIU SY, WU LT. Screening and identification of amylase-producing strain and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 173-188 (in Chinese).
- [15] 邵伟, 唐明, 熊泽, 乐超银. 醋酸菌对乙醛的降解及细菌纤维素合成作用的研究[J]. 中国酿造, 2004, 23(5): 13-14, 17.
SHAO W, TANG M, XIONG Z, LE CY. Study on *Acetobacter pasteurianus* in treating acetaldehyde wastewater and the fermentation condition of bacterial cellulose[J]. China Brewing, 2004, 23(5): 13-14, 17 (in Chinese).
- [16] 蔡志强, 赵希岳, 王利群, 朱孝霖, 李尔场, 张芸. 一株乙醛耐冷降解菌 A27 的分离鉴定和降解特性的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(28): 12078-12079.
CAI ZQ, ZHAO XY, WANG LQ, ZHU XL, LI EY, ZHANG Y. Research on the isolation, identification and polyester degradation of a bacterial strain A27 with cold-tolerance[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(28): 12078-12079 (in Chinese).
- [17] 高晓丹. 一株广谱抑病芽孢杆菌的筛选、鉴定及其抑菌机理的初探[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
GAO XD. Screening and identification of a broad-spectrum bacteriostatic *Bacillus* and preliminary study on its bacteriostatic mechanism[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [18] LIU Y, SHANG XX, YI ZW, GU L, ZENG RY. *Shewanella mangrovi* sp. nov., an acetaldehyde-degrading bacterium isolated from mangrove sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(Pt_8): 2630-2634.
- [19] LIU Y, SHANG XX, ZENG RY. Permanent draft genome of acetaldehyde degradation bacterium, *Shewanella* sp. YQH10[J]. Marine Genomics, 2015, 19: 9-11.
- [20] 何雄飞. 深海可利用难降解有机物菌种筛选及功能鉴定[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所硕士学位论文, 2014.
HE XF. Screening and functional identification of strains of biodegradable organic matter available in deep sea[D]. Xiamen: Master's Thesis of Third Institute of Oceanography (TIO) of the Ministry of Natural Resources, 2014 (in Chinese).
- [21] 叶军. 深海细菌 *Halomonas axialensis* ACH-L-8 的醛类降解功能分析及应用研究[D]. 厦门: 集美大学硕士学位论文, 2016.
YE J. Analysis and application of aldehyde degradation function of *Halomonas axialensis* ACH-L-8, a deep-sea bacterium[D]. Xiamen: Master's Thesis of Jimei University, 2016 (in Chinese).