

研究报告

一株高效丙烯腈降解细菌 *Rhodococcus rhodochrous* BX2 的丙烯腈降解条件优化

王淑婷 文璐铭 安雪姣 刘婉君 杜小鹏 李春艳*

(东北农业大学资源与环境学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】以丙烯腈为目标污染物,利用实验室已筛选获得的一株高效腈降解菌 *Rhodococcus rhodochrous* BX2, 研究其对丙烯腈的降解特性, 优化降解条件以提高菌株对丙烯腈的降解能力。【方法】通过单因素试验和响应面分析相结合的方法优化 *Rhodococcus rhodochrous* BX2 对丙烯腈的降解条件。考察外加碳、氮源对 BX2 的生长及丙烯腈降解的影响, 并确定其在丙烯腈合成废水中对丙烯腈的处理效果。【结果】菌株 BX2 优化后的最佳降解条件为: 底物浓度 403.51 mg/L、pH 7.44、温度 34.46 °C, 在此条件下丙烯腈的降解率为 95.1%。外加碳源为葡萄糖, 或外加氮源为氯化铵对菌株生长及丙烯腈降解有明显的促进作用。菌株 *Rhodococcus rhodochrous* BX2 能够高效降解合成废水中的丙烯腈, 在 30 h 时其丙烯腈降解率可达 89.4%。【结论】降解条件优化以及外源物质的添加强化了菌株对丙烯腈合成废水的处理效果, 为生物法处理丙烯腈废水新方法的开发提供技术支持。

关键词: 丙烯腈, *Rhodococcus rhodochrous* BX2, 响应面分析法, 降解条件

Optimization of acrylonitrile biodegradation by acrylonitrile-degrading bacterium *Rhodococcus rhodochrous* BX2

WANG Shu-Ting WEN Lu-Ming AN Xue-Jiao LIU Wan-Jun

DU Xiao-Peng LI Chun-Yan*

(College of Resource and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] To improve acrylonitrile biodegradation efficiency, we studied acrylonitrile degradation characteristics of a nitrile-degrading bacterium *Rhodococcus rhodochrous* BX2 isolated by our laboratory. [Methods] Single factor test and response surface methodology were used to optimize the biodegradation conditions. At the same time, the effects of various additional carbon and nitrogen resources on cell growth and acrylonitrile degradation were studied, as well as cell growth and degradation rate of strain BX2 in acrylonitrile synthetic wastewater. [Results] The maximum biodegradation rate (95.1%) was obtained under optimal degradation conditions (substrate

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41271504)

*Corresponding author: Tel: 86-451-55190034; E-mail: chunyanli@neau.edu.cn

Received: February 02, 2016; Accepted: March 25, 2016; Published online (www.cnki.net): May 12, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41271504)

*通讯作者: Tel: 86-451-55190034; E-mail: chunyanli@neau.edu.cn

收稿日期: 2016-02-02; 接受日期: 2016-03-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-12

concentration 403.51 mg/L, pH 7.44, temperature 34.46 °C). The cell growth and degradation effectiveness can be obviously improved by addition of carbon sources (glucose) or nitrogen source (ammonium chloride). The degradation rate of acrylonitrile in acrylonitrile synthetic wastewater reached 89.4% after 30 h. **[Conclusion]** The acrylonitrile biodegradation efficiency of *Rhodococcus rhodochrous* BX2 in acrylonitrile synthetic wastewater was enhanced by optimizing biodegradation conditions and the addition of exogenous substance. This work provides technical support for the development and application of new techniques in biological treatment of acrylonitrile wastewater.

Keywords: Acrylonitrile, *Rhodococcus rhodochrous* BX2, Response surface methodology, Degradation conditions

丙烯腈(又称氰基乙烯)是一种有机氰化物,主要用于生产腈纶、ABS 塑料、丁腈橡胶、丙烯酰胺、合成纤维等化工原料,是腈纶废水的主要成分之一^[1-2]。近年来,随着丙烯腈的产量及用量的逐年增加,含有丙烯腈废水的排放量也呈增长趋势^[3]。丙烯腈废水流入自然水体环境中,会给动植物的生存、人类生活以及生态环境造成严重威胁。其高毒性、致癌性和致突变等特性,会造成水生动植物死亡,破坏生态环境^[4]。长期接触会引发一些人类疾病,丙烯腈可在人体体内释放 CN⁻,从而对呼吸酶产生抑制作用,因此能够导致呼吸中枢被麻醉。人若在含有 1.6×10^4 μg/L 丙烯腈的环境中吸入丙烯腈则会引发恶心、呕吐、头痛和抽搐等病症,短期内还可能引发人体死亡。丙烯腈已被列入我国 58 种优先控制和美国 EPA 114 种优先控制污染物名单之中^[5]。

目前,关于丙烯腈废水的治理方法主要包括化学法、物化法、生物法等^[2]。其中化学法和物化法在实施过程中存在许多问题,如操作复杂、成本高、处理效果差和易造成二次污染等弊端,而生物法以其反应条件温和、运行费用低、外排水质好、时间短、见效快、无二次污染等优点而被广泛接受^[6]。近年来已筛选到多种可降解丙烯腈的细菌,包括紫红红球菌 PA-34 (*Rhodococcus rhodochrous* PA-34)^[7]、根瘤菌属 F28 (*Mesorhizobium* sp. F28)^[8]、节杆菌 ZJUTB06-99 (*Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99)^[9]、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[10]等。然而,已筛选出的丙烯腈降解菌株在短时间内对于丙烯腈

的降解效果并不理想,如在林春绵等的研究中,筛选出一株丙烯腈降解菌株,经鉴定为节杆菌属 ZJUTB06-99 (*Arthrobacter* sp. YH-5)^[11],当培养液中丙烯腈浓度为 341.4 mg/L 时,培养 120 h 后,其丙烯腈降解率为 73.12%;Nawaz 等从工业废水中分离筛选出一株丙烯腈降解菌株肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[10],其在 72 h 内可降解 326 mg/L 的丙烯腈。因此,获得具有高效丙烯腈降解能力的菌株,研究其降解特性对提高丙烯腈废水处理效率具有重要意义。本实验室筛选并保藏了一株乙腈高效降解菌 *Rhodococcus rhodochrous* BX2,通过降解率测定、降解产物分析及相应酶活测定对其乙腈降解特性及降解途径进行了研究,经后续实验发现其对丙烯腈也具有较强的降解能力,但有关丙烯腈降解特性还有待进一步探讨。

本研究通过单因素试验和响应面分析法优化了菌株 *Rhodococcus rhodochrous* BX2 对丙烯腈的降解条件,同时考察了多种外加碳、氮源对丙烯腈降解的影响,并在丙烯腈合成废水中研究菌株 BX2 对丙烯腈的降解效果,以期将其用于丙烯腈废水的实际生物处理。

1 材料与方法

1.1 菌株

紫红红球菌 BX2 (*Rhodococcus rhodochrous* BX2) 分离自江苏激素研究所污水处理池污泥,由本实验室保存。

1.2 培养基

无机盐基础培养基(g/L)^[12]: KH₂PO₄ 1.7,

Na_2HPO_4 9.8, MgSO_4 0.1, MgO 0.010 75, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 9, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 44, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.000 25, H_3BO_3 0.000 06, pH 7.2, 考察菌株丙烯腈降解能力时, 以丙烯腈为唯一碳源。

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0。

丙烯腈合成废水(g/L): 葡萄糖 0.3, NH_4Cl 0.040 1, KH_2PO_4 0.009 2, CaCl_2 0.010 7, MgSO_4 0.008, FeSO_4 0.000 11, 溶于自来水, 加丙烯腈 400 mg/L。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液制备: 在无菌操作条件下, 取斜面保藏的 *Rhodococcus rhodochrous* BX2 菌种挑取一环接种到 LB 培养基中, 置于 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养; 取 10 mL 对数生长期菌液 6 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 用 0.2 mol/L 磷酸缓冲液洗涤菌体, 共洗涤 3 次, 收集菌体; 然后用磷酸缓冲液调节菌体浓度, 在 600 nm 波长下用紫外可见分光光度计测定其吸光值, 使 OD_{600} 在 2.0±0.1 的范围。

1.3.2 菌株 BX2 降解条件的优化: 单因素实验 (1) 培养时间对菌株生长及丙烯腈降解率影响: 分别以 6、12、18、24、30、36、42、48 h 作为培养时间实验组。将菌株以 1.5% (体积比) 接种量接种于 100 mL 含丙烯腈添加浓度为 400 mg/L 的无机盐培养液中, 温度为 35 °C, pH 7.5, 180 r/min 恒温振荡培养后, 测定菌株生长量 OD_{600} 及丙烯腈降解率。

(2) 底物浓度对菌株生长及丙烯腈降解率影响: 分别以 200、400、600、800、1 000、1 200 mg/L 作为丙烯腈浓度实验组, 将菌株以 1.5% (体积比) 接种量接种于 100 mL 含上述丙烯腈浓度的无机盐培养液中, 温度为 35 °C, pH 7.5, 180 r/min 恒温振荡培养 42 h 后, 测定菌株生长量 OD_{600} 及丙烯腈降解率。

(3) pH 值对菌株生长及丙烯腈降解率影响: 分

别以 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 作为 pH 实验组, 将菌株以 1.5% (体积比) 接种量接种于 100 mL 含丙烯腈添加浓度为 400 mg/L 的无机盐培养液中, 35 °C、180 r/min 恒温振荡培养 42 h 后, 测定菌株生长量 OD_{600} 及丙烯腈降解率。

(4) 接种量对菌株生长及丙烯腈降解率影响: 分别以 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% (体积比) 作为菌体接种量实验组, 将菌株以上述接种量接种于 100 mL 含丙烯腈添加浓度为 400 mg/L 的无机盐培养液中, 温度为 35 °C, pH 7.5, 180 r/min 恒温摇床振荡培养 42 h 后, 测定菌株生长量 OD_{600} 及丙烯腈降解率。

(5) 温度对菌株生长及丙烯腈降解率影响: 分别以 20、25、30、35、40 °C 作为温度实验组, 将菌株以 1.5% (体积比) 接种量接种于 100 mL 含丙烯腈添加浓度为 400 mg/L 的无机盐培养液中, 以 pH 7.5, 180 r/min, 按照上述温度振荡培养 42 h 后, 测定菌株生长量 OD_{600} 及丙烯腈降解率。以上每个处理设 3 个平行重复, 不加菌悬液组作为对照, 按照 1.3.5 的气相色谱检测条件测定各处理中丙烯腈的含量以计算丙烯腈降解率。

响应面分析实验: 在单因素试验的基础上, 选取对丙烯腈降解率影响较大的因素, 利用 RSM 中的 Box-Behnken design (BBD) 模型进行丙烯腈降解条件优化的响应面设计, 试验设计中自变量分别为底物浓度(X_1)、温度(X_2)、pH (X_3), 响应值为丙烯腈降解率, 利用 BBD 模型设计三因素三水平的响应面试验^[13-14]。每个变量按-1、0、+1 水平进行编码, 试验设计因素及水平见表 1。用于本试验设计的二次方程式如下:

$$Y = A + \sum_{j=1}^k A_j X_j + \sum_{j=1}^k A_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum_{i=1}^k A_{ij} X_i X_j$$

式中: A : 常数; A_j : 单因素线性系数; A_{jj} : 单因素平方系数; A_{ij} : 两交互因素的平方系数; k : 单因素的数量; Y : 响应值。

表 1 菌株 BX2 的响应面试验因子及水平列表
Table 1 Factors and levels of response surface experiments of strain BX2

因素编码值 Factors	因素名称 Name	低水平 Low (-1)	中水平 Middle (0)	高水平 High (1)
X_1	Substrate concentration (mg/L)	200	400	600
X_2	Temperature (°C)	30	35	40
X_3	pH	7.0	7.5	8.0

模型验证试验：为检验 RSM 模型的可靠性，根据模型得出的最佳降解条件进行试验的验证。以 1.5% (体积比) 的接种量将菌株 BX2 接种到以丙烯腈为唯一碳氮源的无机盐培养基中，按优化获得的丙烯腈降解条件进行培养，测定丙烯腈降解率，进行 3 次重复试验，同时设不加菌液组作对照。

1.3.3 外源营养物质对菌株 BX2 生长及降解丙烯腈的影响：外加碳源包括果糖、半乳糖、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、乙酸钠、柠檬酸钠、乳酸钠、丙三醇；外加氮源包括乙酰胺、酵母膏、氯化铵、蛋白胨、磷酸氢二胺、硝酸钠，加入比例均为 1%，将以上各物质分别加入 100 mL 含丙烯腈的无机盐培养液中，同时设置两个对照组，分别为接种降解菌但未添加碳、氮源的丙烯腈无机盐培养液组和未接种降解菌的丙烯腈无机盐培养液组。将菌株以 1.5% (体积比) 接种量接种于 100 mL 含丙烯腈添加浓度为 403.51 mg/L 的无机盐培养液中，温度为 34.5 °C，pH 7.44，180 r/min 恒温摇床振荡培养 30 h 后，测定菌株生长量及溶液中丙烯腈残留量，计算降解率，每个处理设 3 个平行重复。添加外源物质组与未添加组进行降解率比较后判断各外源物质对丙烯腈降解的影响。

1.3.4 菌株 BX2 在丙烯腈合成废水中丙烯腈降解能力检测：以 1.5% 接种量将最佳条件培养的 BX2 菌悬液接种于含丙烯腈的合成废水中，于 35 °C、180 r/min 恒温摇床振荡培养，每 6 h 取样测定丙烯腈合成废水中丙烯腈残留量，并计算降解率，每次试验设置 3 个重复，不加菌悬液组作为对照。

1.3.5 丙烯腈降解率测定：气相色谱检测法测定丙

烯腈浓度，具体分析条件如下：GC-14C 型气相色谱仪；检测器：FID；温度条件：进样口温度为 150 °C，柱温为 80 °C，FID 温度 180 °C；载气：氮气、空气、氢气的分压均为 50 kPa；载气流速：30 mL/min；柱流量：4.46 mL/min；总流量：96.7 mL/min；线速度：74.3 cm/s；吹扫流量：3.0 mL/min；平衡时间：1 min；采样速度：80 ms；进样方式：分流；分流比：20:1；进样量：1 μL。

丙烯腈浓度标准曲线的绘制：配制丙烯腈浓度为 50、150、250、350、450、550、650、750 mg/L 的标准系列，采用外标法^[15]，根据气相色谱仪测得的峰面积，绘制峰面积与浓度相对应的标准曲线。菌株 *Rhodococcus rhodochrous* BX2 的丙烯腈降解率按照以下公式进行计算^[16]：

$$X = (A - B) / A \times 100\%$$

式中， X 为丙烯腈的生物降解率； A 为未接种对照组中丙烯腈的浓度 (mg/L)； B 为接菌培养液中丙烯腈的浓度 (mg/L)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

图 1 显示的是不同因素对菌株 BX2 的生长及丙烯腈降解能力的影响。如图 1A 所示，初始底物浓度不同对 BX2 生长和丙烯腈降解有较大的影响。降解菌 BX2 在丙烯腈浓度 200–1 200 mg/L 范围时均可以生长；丙烯腈浓度为 200 mg/L 时，菌株 BX2 的生长量达到 0.687，降解率达到 85.6%；丙烯腈浓度为 400 mg/L 时，菌株 BX2 的生长量达到 0.983，降解率达到 91.1%；菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率随着浓度的继续增加而逐渐下降，出现此种现象的原因可能是丙烯腈在低浓度时可作为碳源、

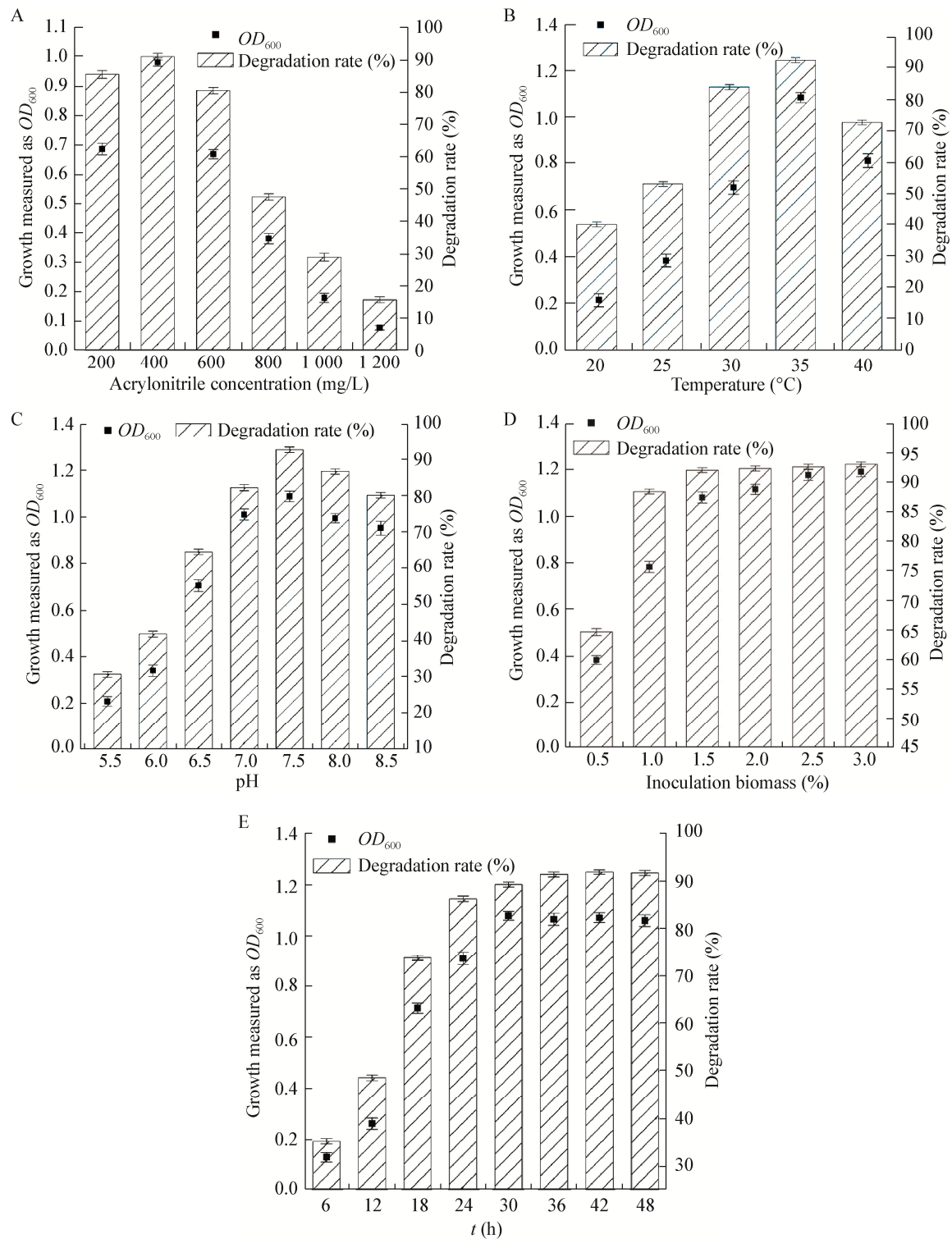


图 1 不同因素对菌株 BX2 生长和丙烯腈降解的影响

Figure 1 The effect of different factors on the growth and acrylonitrile degradation rate of strain BX2

注: A: 底物浓度; B: 温度; C: pH; D: 接种量; E: 培养时间.

Note: A: Substrate concentration; B: Temperature; C: pH; D: Inoculation biomass; E: Time.

氮源, 利于细胞生长, 但在高浓度时则成为抑制因素, 致使部分细胞死亡。根据实验结果确定试验中底物浓度为 400 mg/L。由图 1B 可知, 温度范围在 20–35 °C 时, 菌株 BX2 生长较好。35 °C 时, 菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率达到最高。低于此温度时, 菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率随着培养温度的上升不断增加; 高于 35 °C 后, 随着温度的继续升高, 菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率呈下降趋势, 由此说明 35 °C 是菌株 BX2 生长和丙烯腈降解最适温度。由图 1C 可知, 菌株 BX2 的生长和对丙烯腈降解受培养液 pH 影响较大。pH 为 5.5–6.0 时, 菌株 BX2 的生长和降解均处于较低水平, 说明该降解菌不利于在酸性条件下生长; 当 pH 为 7.5 时, 生长量达到最大值, 降解率达到 92.8%。此后菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率均随着 pH 继续增大而逐渐降低。以上结果说明菌株 BX2 生长及丙烯腈降解的最适 pH 为 7.5。由图 1D 可知, 当接种量在 0.5%–1.5% 范围内时, 菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率呈上升趋势;

当接种量超过 1.5% 时, 菌体 BX2 的生长量继续增加, 但丙烯腈降解率的上升幅度较小, 考虑到实际应用时的经济成本, 选取 1.5% 为最适接种量。

由图 1E 可知, 随培养时间的延长, 菌株 BX2 的生长量和丙烯腈降解率逐渐升高; 培养至 42 h 时菌体生长量达到 1.071, 丙烯腈降解率为 91.9%; 此后随着培养时间的延长, 菌体生长量和丙烯腈降解率变化不大。以上结果说明 42 h 是菌株 BX2 生长和丙烯腈降解的最佳培养时间。

2.2 响应面优化结果

菌株 BX2 的响应面试验设计方案及结果如表 2 所示, 经 Box-Behnken 模型设计后共进行 17 组试验, 其中有 5 组重复试验用以估计误差。丙烯腈降解条件的响应面试验设计方案及结果如表 2、3 所示。利用响应面分析方法对丙烯腈降解条件进行优化, 获得底物浓度(X_1)、温度(X_2)、pH(X_3)之间的二次多项式回归方程为:

$$Y=96.38+1.91 X_1-1.60 X_2-1.26 X_3-1.95 X_1 X_2-1.03 X_1 X_3-0.85 X_2 X_3-5.93 X_1^2-3.55 X_2^2-4.78 X_3^2。$$

表 2 响应面试验设计与结果
Table 2 Experimental design and results of RSM

序号 No.	因素 Factors			降解率 Degradation rate (%)
	X_1	X_2	X_3	
1	0	0	0	93.3
2	-1	0	-1	82.7
3	1	0	1	82.6
4	1	0	-1	88.3
5	-1	1	0	83.7
6	0	0	0	93.1
7	0	0	0	93.2
8	1	1	0	83.5
9	0	0	0	93.5
10	-1	-1	0	82.5
11	0	1	1	81.5
12	1	-1	0	90.4
13	0	-1	1	87.7
14	0	1	-1	85.8
15	-1	0	1	80.7
16	0	0	0	92.9
17	0	-1	-1	87.4

表 3 为利用 Design-Expert 8.0 软件得出的响应面分析试验回归分析结果。表中偏差平方和代表的是样本值与平均值之间的偏离量；均方差在数值上等于偏差平方和与自由度之间的比值，它可表示样本值与平均值之间的偏离程度大小； F 值是一个服从 F 分布的统计量， F 值大则说明模型显著； P 值代表的是显著性概率，当 $P<0.05$ 时，表示该变量对丙烯腈的降解具有显著影响，当 $P>0.05$ 时，表示该变量对丙烯腈的降解无显著影响，当 $P<0.01$ 时，表示该变量对丙烯腈的降解产生极显著的影响^[17-18]。

由表 3 可知，模型的相关系数 $R^2=0.996\ 1$ ，校正后的决定系数 $R^2_{Adj}=0.991\ 1$ ，说明丙烯腈的降解试验值与预测值之间具有良好拟合度且表明方程模型有很高的可信度，能够对丙烯腈的降解试验进行合理预测；根据方差分析显著性检验可判断该模型为显著型，即 $P<0.000\ 1$ ，且失拟值(Lack of fit)呈现不显著，失拟 P 值为 $0.354\ 9$ ；由表 3 可知，在响应面分析试验中独立变量底物浓度、温度、pH 均对丙烯腈降解率具有极显著影响，其中底物浓度、温度、pH 的 P 值依次为 $<0.000\ 1$ 、 $0.000\ 6$ 和

$0.002\ 2$ 且均 <0.01 ，在 3 个独立变量中底物浓度的 P 值最小，说明底物浓度对丙烯腈的降解影响最大，由此可得出各独立变量对丙烯腈降解的影响作用依次为：底物浓度>温度>pH；在交互作用中底物浓度与温度交互组合、底物浓度与 pH 交互组合、温度与 pH 交互组合的 P 值依次为 $0.000\ 6$ 、 $0.017\ 2$ 、 $0.042\ 0$ ，说明上述各交互组合对丙烯腈的降解均产生显著影响；其中底物浓度与温度交互组合的 $P<0.01$ ，说明此交互组合对丙烯腈的降解产生极显著影响，底物浓度与 pH 交互组合、温度与 pH 交互组合的 P 值均小于 0.05 ，说明这些交互组合对丙烯腈的降解产生显著影响。

采用 Design Expert 8.0 软件绘制 3D 曲面图以便进一步研究各因素间的交互作用^[19-20]，从而更直观地反映各因素对丙烯腈降解的影响。各交互因素的 3D 曲面图如图 2 所示。各影响因素的交互作用可以从 3D 曲面图的坡度变化得到反映。3D 曲面图坡度若呈现相对平缓则表明此交互作用对丙烯腈降解率的影响不敏感；反之，3D 曲面图坡度越陡峭则表明此交互作用对丙烯腈降解率的影响敏感。

表 3 响应面分析试验回归分析结果

Table 3 Results of the regression analysis of RSA of strain BX2

项目 Items	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方差 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
Model	571.12	9	63.46	199.60	<0.000 1	Significant
X_1	28.88	1	28.88	90.84	<0.000 1	
X_2	10.81	1	10.81	34.01	0.000 6	
X_3	7.03	1	7.03	22.12	0.002 2	
X_1X_2	11.22	1	11.22	35.30	0.000 6	
X_1X_3	3.06	1	3.06	9.63	0.017 2	
X_2X_3	1.96	1	1.96	6.16	0.042 0	
X_1^2	282.08	1	282.08	887.25	<0.000 1	
X_2^2	103.59	1	103.59	325.81	<0.000 1	
X_3^2	74.63	1	74.63	234.73	<0.000 1	
残差 Residual	2.23	7	0.32			
失拟 Lack of fit	1.16	3	0.39	1.45	0.354 9	Not significant
纯误差 Pure error	1.07					
总和 Cor total	573.34	4	0.27			
决定系数 R^2	0.996 1	16				
校正系数 R^2_{Adj}	0.991 1					

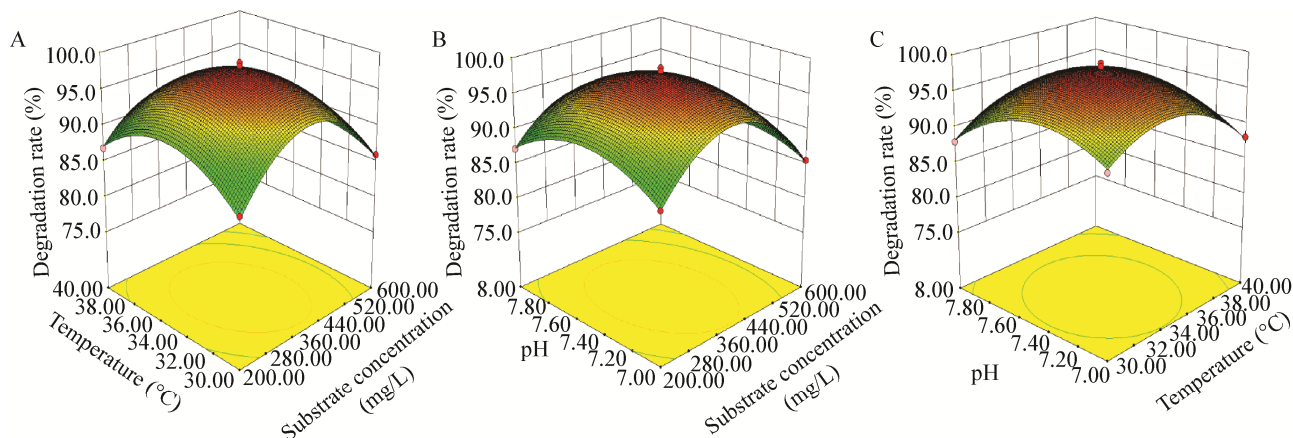


图2 不同因素对菌株 BX2 降解率产生交互影响的响应曲面图

Figure 2 Response surface plot of the mutual effect on acrylonitrile degradation rate of strain BX2

注：A：底物浓度与温度；B：底物浓度与 pH；C：温度与 pH。

Note: A: Substrate concentration and temperature; B: Substrate concentration and pH; C: Temperature and pH.

图 2A 是底物浓度(X_1)与温度(X_2)交互组合对丙烯腈降解的交互作用图。固定底物浓度，丙烯腈的降解率随着温度的增加呈现先增加后减少的趋势，在 34–36 °C 温度范围内时，丙烯腈的降解率达到较大值。固定温度，丙烯腈的降解率随着底物浓度的增加也呈现先增加后减少的趋势，在底物浓度为 360–440 mg/L 范围内时，丙烯腈的降解率达到较大值。由此可以判断丙烯腈的较高降解率在底物浓度 360–440 mg/L 和温度 34–36 °C 范围内获得。图 2B 是底物浓度(X_1)与 pH (X_3)交互组合对丙烯腈降解的交互作用图。固定底物浓度，丙烯腈的降解率随着 pH 的增加呈现先增加后减少的趋势，在 pH 7.4–7.6 范围内时，丙烯腈的降解率达到较大值。固定 pH，丙烯腈的降解率随着底物浓度的增加同样呈现先增加后减少的趋势，在底物浓度为 360–440 mg/L 范围内时，丙烯腈的降解率达到较大值。由此可以判断丙烯腈的较高降解率在底物浓度 360–440 mg/L 和 pH 7.4–7.6 范围内获得。图 2C 为温度(X_2)与 pH (X_3)交互组合对丙烯腈降解的交互作用图。固定温度，丙烯腈的降解率随着 pH 的增加呈现先增加后减少的趋势，在 pH 7.4–7.6 范围内时，丙烯腈的降解率达到较大值。固定 pH，丙烯腈的降解率随着温度的增加也呈现

先增加后减少的趋势，在温度 34–36 °C 范围内时，丙烯腈的降解率达到较大值。由此可以判断丙烯腈的较高降解率在温度 34–36 °C 和 pH 7.4–7.6 范围内获得。

利用响应面分析方法优化后所得丙烯腈降解的最优试验条件分别为：底物浓度 403.51 mg/L、pH 7.44、温度 34.46 °C，丙烯腈的最高降解率为 95.8%。

2.3 最佳条件验证结果

为检验响应面模型的可靠性，按照模型得出的最佳降解条件(底物浓度 403.51 mg/L、pH 7.44、温度为 34.46 °C)进行 3 次平行实验，所得丙烯腈降解率为 95.100%±0.052%，实测值与预测值(95.8%)相近，表明利用 RSM 模型对试验结果可以进行较好的预测。

2.4 外加碳、氮源对菌株 BX2 降解丙烯腈的影响

2.4.1 外加碳源对菌株 BX2 生长及丙烯腈降解的影响：培养 42 h 时取样测定 BX2 生长及对丙烯腈的降解。如图 3 所示，乳酸钠和丙三醇抑制 BX2 生长和丙烯腈的降解，丙烯腈降解率比对照降低 22.3%和 25.9%；乙酸钠、蔗糖对菌体生长无影响，但抑制菌体对丙烯腈降解，其中乙酸钠的抑制作用更明显，丙烯腈降解率比对照降低约 20.7%；果糖、

半乳糖、麦芽糖在整个培养过程中对 BX2 生长及降解无明显影响; 柠檬酸钠、葡萄糖在整个培养过程中均促进了 BX2 的生长及丙烯腈的降解, 其中葡萄糖对菌体生长及降解的促进作用比较明显, 生长量和降解率比对照分别提高了 55.9% 和 2.2%。

2.4.2 外加氮源对菌株 BX2 生长及丙烯腈降解的影响: 图 4 显示不同氮源对 BX2 生长及降解丙烯腈的影响, 培养 42 h 时取样测定 BX2 生长及对丙烯腈的降解率。如图 4 所示, 磷酸氢二铵、硝酸钠会抑制 BX2 生长和丙烯腈降解, 其中磷酸氢二铵抑制丙烯腈生长及降解更加明显, 丙烯腈降解率比对照降低 36.5%; 乙酰胺、酵母膏、氯化铵和蛋白胨均不同程度促进 BX2 生长和丙烯腈降解, 其中氯化铵促进菌株 BX2 生长及丙烯腈降解最为明显, 生长量和降解率可分别达到 1.587 和 98.9%。

2.5 *R. rhodochrous* BX2 对丙烯腈合成废水中丙烯腈的降解作用

在响应面优化实验获得的最佳降解条件下培养的 BX2 菌悬液以 1.5% 的接种量接种于丙烯腈合成废水中, 于 35 °C、180 r/min 恒温摇床振荡培养检测其对丙烯腈降解率, 由图 5 可知, 随着培养时

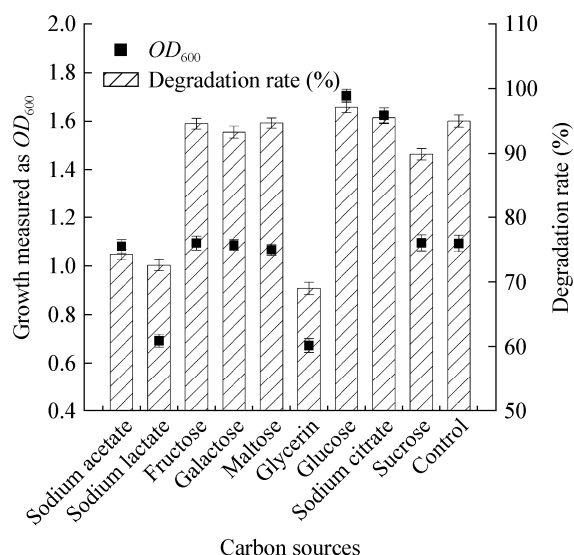


图 3 不同外加碳源对菌株 BX2 生长和丙烯腈降解的影响

Figure 3 The effect of additional carbon source on the growth and acrylonitrile degradation rate of strain BX2

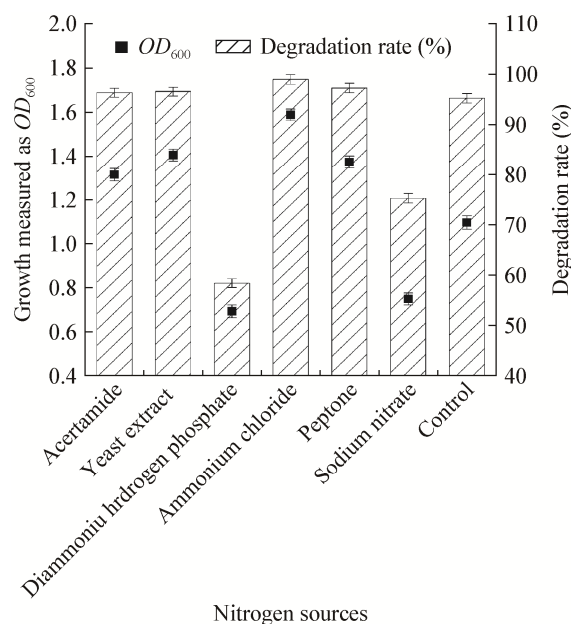


图 4 不同外加氮源对菌株 BX2 生长和丙烯腈降解的影响
Figure 4 The effect of additional nitrogen resource on the growth and acrylonitrile degradation rate of strain BX2

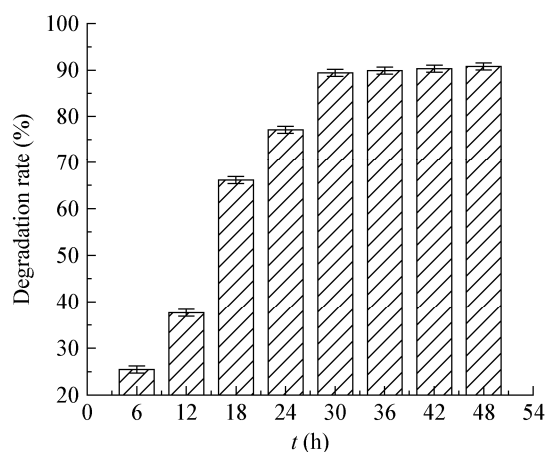


图 5 菌株 BX2 在合成废水中的丙烯腈降解效果
Figure 5 The acrylonitrile degradation efficiency of strain BX2 in acrylonitrile synthetic waste water

间的延长, 菌株的丙烯腈降解率逐渐升高, 说明菌株可以很快适应丙烯腈合成废水的环境, 并且能够降解其中的丙烯腈。当培养到 30 h 时, 菌株的丙烯腈降解率趋于平稳, 可达到 89.4%, 表明菌株在丙烯腈合成废水中能够降解大部分的丙烯腈。

3 讨论

腈类化合物是现代工业生产中常用的原料或

中间物质,可广泛应用于有机溶剂、塑料、橡胶以及医药行业。然而,腈类化合物又是一种在环境中残留时间较长、具有较大潜伏性危害的有机氰化物,在其大量生产和持续应用的过程中所产生的含腈废水未经处理或处理不彻底排放已导致环境的污染^[21]。利用微生物法处理实际丙烯腈废水仍存在丙烯腈降解不彻底、速度慢等问题^[8,10]。通过获得耐高浓度丙烯腈的高效降解菌株,并优化降解条件以提高菌株降解效率是丙烯腈工业废水处理中的重点。目前在生物学研究中常用的降解条件优化方法主要有正交试验法和响应曲面法。正交试验法是线性模型,只能对孤立的试验点进行分析,数据分析相对较少,不能很好地体现出各因素对响应值的显著性影响程度,因此有一定的局限性^[22]。响应面分析法利用回归分析方法进行函数估算,然后用一次或二次多项式模型将回归因素与试验结果进行拟合,对影响响应值的因子水平及其交互作用进行优化与评价,是一种更为有效合理的试验设计方法^[23]。本研究在单因素试验的基础上,选取对菌株 BX2 丙烯腈降解率影响较大的 3 种因素(底物浓度、温度、pH),采用响应面分析法对菌株丙烯腈的降解条件进行了优化,得出各独立变量对丙烯腈降解的影响作用依次为:底物浓度>温度>pH,优化结果为:底物浓度为 403.51 mg/L、pH 为 7.44、温度为 34.46 °C。在此条件下,30 h 内对浓度为 403.51 mg/L 的丙烯腈降解率为 95.1%,比优化前提高 1.9%。

在实际腈纶废水处理中,其复杂的成分通常会影响微生物对有害难降解污染物的去除效率^[24],而外加碳、氮源在一定程度上也会影响微生物降解有机物的能力^[25]。因此,研究外源物质存在下有毒有害污染物的生物降解行为,对提高废水治理效果具有促进作用。如果某一物质的存在对目标物质的降解有抑制作用,则有必要优化工艺使这两种物质不同时存在于污水处理系统中。如果某一物质的存在对目标物降解有促进作用,而这种物质又是微生物易于利用的碳/氮源或能源,则可

以考虑向废水中补充这种物质,或通过不同类型废水的综合治理引入这种物质,以提高目标物的可生物降解性。本研究考察了多种碳、氮源对菌株 BX2 生长及丙烯腈降解效果的影响,其中碳源以葡萄糖对菌株生长及丙烯腈降解的促进作用最明显,生长量和降解率可分别达到 1.705 和 97.2%;氮源以氯化铵对菌株生长及丙烯腈降解的促进作用最明显,生长量和降解率可分别达到 1.587 和 98.9%。说明这些物质作为第二碳/氮源存在,有可能对 BX2 降解丙烯腈产生了共代谢作用。共代谢是微生物利用有机物的一种特殊方式,在污染物降解领域较常见,通过共代谢作用,可以提高微生物对于较难利用物质的降解能力^[26-30]。

为了实际应用,本研究考察了菌株在丙烯腈合成废水中对丙烯腈的降解情况。研究发现,菌株 BX2 能够高效降解合成废水中的丙烯腈,在 30 h 时,其丙烯腈降解率可达 89.4%。在本实验室的前期研究工作中,对菌株 BX2 的乙腈降解情况及降解过程中的代谢产物进行了研究,发现其可高效降解乙腈,中间代谢产物存在时间短且降解完全。后续研究还将进一步考察菌株 BX2 降解丙烯腈的代谢产物及降解途径,并将高效腈降解菌 *R. rhodochrous* BX2 与生物膜形成菌复配联合作用,投加到移动床生物膜反应器(Moving bed biofilm reactor, MBBR)中,强化丙烯腈废水处理的研究,为生物法处理丙烯腈废水新方法的开发提供技术支持。

参 考 文 献

- [1] Qian BZ, Zhu JF. Domestic and international market analysis of acrylonitrile production[J]. Jiangsu Chemical Industry, 2007, 35(1): 56-59 (in Chinese)
钱伯章, 朱建芳. 丙烯腈生产的国内外市场分析[J]. 江苏化工, 2007, 35(1): 56-59
- [2] Ni M. Progress on treatment technologies for wastewater from acrylonitrile production[J]. Technology of Water Treatment, 2010, 36(6): 1-4 (in Chinese)
倪明. 丙烯腈生产废水处理技术研究进展[J]. 水处理技术, 2010, 36(6): 1-4
- [3] Liang C. Production status and development trends of acrylonitrile[J]. Techno-Economics in Petrochemicals, 2002, 18(2): 33-37 (in Chinese)
梁诚. 国内外丙烯腈生产现状与发展趋势[J]. 石油化工技术

- 经济, 2002, 18(2): 33-37
- [4] Zhang T, Jin HJ. Phytotoxicity evaluation of four pollutants by Lemna minor test[J]. China Environmental Sciences, 1995, 15(4): 266-271 (in Chinese)
张彤, 金洪钧. 用浮萍试验检测 4 种污染物的植物毒性[J]. 中国环境科学, 1995, 15(4): 266-271
- [5] Léonard A, Gerber GB, Stecca C, et al. Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of acrylonitrile[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 1999, 436(3): 263-283
- [6] Santoshkumar M, Veeranagouda Y, Lee K, et al. Utilization of aliphatic nitrile by *Paracoccus* sp. SKG isolated from chemical waste samples[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(1): 153-159
- [7] Raj J, Prasad S, Sharma NN, et al. Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using polyacrylamide entrapped cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34[J]. Folia Microbiologica, 2010, 55(5): 442-446
- [8] Feng YS, Chen PC, Wen FS, et al. Nitrile hydratase from *Mesorhizobium* sp. F28 and its potential for nitrile biotransformation[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(12): 1391-1397
- [9] Shen M, Zheng YG, Shen YC. Isolation and characterization of a novel *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99, capable of converting acrylonitrile to acrylic acid[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(7): 781-785
- [10] Nawaz MS, Franklin W, Campbell WL, et al. Metabolism of acrylonitrile by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Archives of Microbiology, 1991, 156(3): 231-238
- [11] Lin CM, Yang H, Wei M, et al. Screening of an acrylonitrile degradation strain and its application[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2015, 43(5): 527-531 (in Chinese)
林春绵, 杨浩, 魏敏, 等. 丙烯腈降解菌的筛选及应用研究[J]. 浙江工业大学学报, 2015, 43(5): 527-531
- [12] Fang SM, An XJ, Liu HY, et al. Enzymatic degradation of aliphatic nitriles by *Rhodococcus rhodochrous* BX2, a versatile nitrile-degrading bacterium[J]. Bioresource Technology, 2015, 185: 28-34
- [13] Bo RN, Ma X, Feng YB, et al. Optimization on conditions of *Lycium barbarum* polysaccharides liposome by RSM and its effects on the peritoneal macrophages function[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117: 215-222
- [14] Fan GJ, Han YB, Gu ZX, et al. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(1): 155-160
- [15] Sun J, Xiong MH, Cheng XS, et al. Characteristics and pathway of acetonitrile degradation by *Rhodococcus* sp. BX2[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32(5): 1041-1048 (in Chinese)
孙晶, 熊明华, 成小松, 等. *Rhodococcus* sp. BX2 菌对乙腈的降解特性及降解途径研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(5): 1041-1048
- [16] Chu JY, Nguyen TT, King KD. Group additivity parameters for the estimation of thermochemical properties of gaseous and liquid nitriles[J]. The Journal of Physical Chemistry, 1982, 86(4): 443-447
- [17] Nigam VK, Khandelwal AK, Gothwal RK, et al. Nitrilase-catalysed conversion of acrylonitrile by free and immobilized cells of *Streptomyces* sp.[J]. Journal of Bioscience, 2009, 34(1): 21-26
- [18] Song JL, Gu JG, Zhai Y, et al. Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1[J]. Bioresource Technology, 2013, 140: 243-248
- [19] Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, et al. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4597-4602
- [20] Yang JF. Experimental study on the production of cellulase by mixed culture[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2011 (in Chinese)
杨君芳. 液态混菌发酵产纤维素酶的实验研究[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2011
- [21] Li GB. Experimental study on treatment of wastewater from acrylonitrile production by A/O² process[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Engineering University, 2012 (in Chinese)
李广彬. A/O² 工艺处理丙烯腈生产废水的实验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学硕士学位论文, 2012
- [22] Zeng MG, Li Y. Comparative study on orthogonal design and response surface optimization used for extraction of gualou guizhi jieying granules[J]. Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 24(3): 32-37 (in Chinese)
曾茂贵, 李颖. 正交设计与响应面优化法对瓜蒌桂枝解痉颗粒提取工艺的比较[J]. 福建中医药大学学报, 2014, 24(3): 32-37
- [23] Suhaila YN, Ramanan RN, Rosfarizan M, et al. Optimization of parameters for improvement of phenol degradation by *Rhodococcus* UKMP-5M using response surface methodology[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(2): 513-521
- [24] Wang YE, Bai QX, Sun LT, et al. Treatment characteristics and research progress of acrylic fiber wastewater[J]. China Water & Wastewater, 2012, 28(6): 24-28 (in Chinese)
王亚娥, 白巧霞, 孙莉婷, 等. 腈纶生产废水的处理特点及研究进展[J]. 中国给水排水, 2012, 28(6): 24-28
- [25] Liu ZQ, Li Y, Ping LF, et al. Isolation and identification of a novel *Rhodococcus* sp. ML-0004 producing epoxide hydrolase and optimization of enzyme production[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 889-894
- [26] Qi Y, Zhao L, Hu B, et al. Biodegradation of chlorobenzoate at different temperatures and cometabolic degradation by *Rhodococcus* sp.[J]. Journal of Tianjin University, 2006, 39(12): 1428-1433 (in Chinese)
齐云, 赵林, 胡滨, 等. 不同温度下红球菌降解氯代苯甲酸及共代谢作用[J]. 天津大学学报, 2006, 39(12): 1428-1433
- [27] Luo W, Zhao YH, Ding HT, et al. Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 158(1): 208-214
- [28] Benner J, De Smet D, Ho A, et al. Exploring methane-oxidizing communities for the co-metabolic degradation of organic micropollutants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(8): 3609-3618
- [29] Wang SZ, Yang Q, Bai ZY, et al. Acclimation of aerobic-activated sludge degrading benzene derivatives and co-metabolic degradation activities of trichloroethylene by benzene derivative-grown aerobic sludge[J]. Environmental Technology, 2015, 36(1): 115-123
- [30] Netzer R, Peters-Wendisch P, Eggeling L, et al. Cometabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7148-7155