

研究报告

一组高效喹啉降解复合菌群的构建及其降解特性

李宁健, 江玉玲, 安雪姣, 汪流伟, 李泽霖, 张庆华*

江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

李宁健, 江玉玲, 安雪姣, 汪流伟, 李泽霖, 张庆华. 一组高效喹啉降解复合菌群的构建及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2305-2319.

LI Ningjian, JIANG Yuling, AN Xuejiao, WANG Liuwei, LI Zelin, ZHANG Qinghua. Screening and biodegradation characteristics of an efficient quinoline-degrading microbial consortium[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2305-2319.

摘要: 【背景】喹啉是一种典型的含氮杂环污染物, 广泛存在于焦化废水, 具有致畸、致癌、致突变作用, 易通过水体污染环境。微生物技术因其绿色高效的特点, 被认为是喹啉废水污染最有前景的修复手段之一。【目的】筛选得到一组高效喹啉降解复合菌群, 实现含喹啉废水的高效工业化处理。【方法】使用逐级递增驯化法从焦化废水厂污泥中筛选出一组高效喹啉降解复合菌群, 结合形态学观察并通过酶活测定、底物广谱性研究, 完成对该复合菌群的初探。然后将该复合菌群的培养 pH、温度、转速、装液量、接菌量、不同浓度外加碳氮源进行单因素优化, 结合优化结果以喹啉降解率为目标进行响应面优化, 并通过降解动力学研究喹啉对复合菌群降解行为的影响。【结果】分离出可 30 h 降解 1 500 mg/L 喹啉的高效复合菌群, 可以降解多种含氮杂环化合物; 响应面优化结果表明, 当 pH、温度、转速分别为 6.8、30 °C、200 r/min 时, 降解率最高达 66%; 降解动力学分析发现, 当喹啉浓度为 1 154 mg/L 时, 比降解率最大高达 60.0 mg/(L·h)。【结论】该复合菌群具有高效喹啉降解能力和底物降解广谱性, 为微生物高效处理含喹啉废水的工业化处理提供了良好基础。

关键词: 喹啉; 复合菌群; 降解特性; 响应面优化; 降解动力学

资助项目: 江西省自然科学基金重点项目(20212ACB205003); 江西省高层次高技能领军人才项目; 江西省杰出青年人才资助计划(20171BCB23044); 国家大学生创新创业训练项目(S202210410034)

This work was supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20212ACB205003), the High-level and High-skilled Leading Talents Training Project of Jiangxi Province, the Outstanding Youth Talent Funding Program of Jiangxi Province (20171BCB23044), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for National College Students (S202210410034).

*Corresponding author. E-mail: zqh_net@163.com

Received: 2022-09-10; Accepted: 2022-10-31; Published online: 2022-11-30

Screening and biodegradation characteristics of an efficient quinoline-degrading microbial consortium

LI Ningjian, JIANG Yuling, AN Xuejiao, WANG Liuwei, LI Zelin, ZHANG Qinghua*

School of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

Abstract: [Background] Quinoline, a typical nitrogen-containing heterocyclic pollutant in coking wastewater, is teratogenic, carcinogenic, and mutagenic, posing a threat to the environment. Microbial technology is environmentally friendly and efficient in the treatment of water polluted by quinoline. [Objective] To screen an efficient quinoline-degrading microbial consortium for the industrial treatment of quinoline-containing wastewater. [Methods] An efficient consortium was screened from the sludge of a coking wastewater plant by incremental stepwise domestication. The morphology was observed and the enzyme activity and substrate spectrum were tested. Then, the pH, temperature, rotational speed, loading volume, inoculum volume, and concentration of added carbon and nitrogen sources for the culture of the microbial consortium were optimized by single factor test. [Results] A consortium which can degrade 1 500 mg/L quinoline in 30 h was isolated. It can degrade a variety of nitrogen-containing heterocyclic compounds. The results of response surface methodology showed that the highest degradation rate of 66% was achieved at pH, temperature, and rotational speed of 6.8, 30 °C, and 200 r/min, respectively. The degradation kinetic analysis revealed that the maximum specific degradation rate of 60.0 mg/(L·h) was achieved when the quinoline concentration was 1 154 mg/L. [Conclusion] The microbial consortium has a high quinolone-degrading capacity and a broad spectrum of substrates. The findings lay a basis for the industrial treatment of quinoline-containing wastewater by microorganisms.

Keywords: quinoline; microbial consortium; degradation characteristics; response surface optimization; degradation kinetics

含氮杂环化合物是工业废水中常见的环境污染物质^[1], 喹啉及其衍生物是典型的多环芳烃含氮杂环化合物, 常出现在印染与制药废水、焦化废水和钢铁废水中, 在焦化废水中占比高达 13.47%^[2-3], 该水质成分复杂、化学需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 高, 是一种典型较难处理的工业有机废水。喹啉具有“三致”毒性, 因溶解度高易随污水进入土壤和地下水^[4-5]; 喹啉在常温下可随水蒸气挥发, 人体致死量 (LD_{50}) 为 460 mg/kg, 属于中等毒性物质; 喹啉受热分解可放出有毒的氧化氮烟气并通过食物

链在生物体内富集和积累, 对动植物、人体健康及生态环境产生潜在的巨大危害^[6-7]。高效处理含喹啉废水已成为当前亟待解决的难题之一。

目前针对喹啉废水的污染治理迫在眉睫, 通常含喹啉废水的处理方式主要有物理吸附法、化学法和生物法等^[8-10]。其中, 物化处理法虽然有一定的效果, 但普遍存在实施成本高、需投入大量试剂、需进行二次处理等弊端, 限制了其大规模的开发使用^[11-12]。相较而言, 生物法投入少、效率高、无二次污染, 被认为是喹啉废水污染最有前景的修复手段之一^[13-14]。

目前关于喹啉降解菌的筛选研究已较为丰富, 如 *Alcaligenes* sp. WUST-qu^[15]、*Bacillus* sp.^[16]、*Aeromonas* sp. A-L2^[17], 但大多为单菌且最高降解浓度只达 700 mg/L。含喹啉废水成分复杂多变, 严重限制单菌在生产实践中的应用^[18]。由于喹啉可生化性低, 许多微生物具有的酶系统都不能有效识别喹啉, 同时喹啉还对微生物具有较大毒性, 对含喹啉废水的高效生物处置造成了较大的障碍。细菌共培养技术(复合菌群)处理含喹啉废水能有效结合多种代谢途径, 避免单菌处理过程中遇到的底物抑制、产物抑制及效率低下等问题, 展现出了极大的应用潜力^[19]。

本研究通过对焦化废水处理厂的活性污泥进行逐级驯化, 以期筛选构建得到一组高效的喹啉降解复合菌群, 结合形态学观察、酶活变化、底物广谱性研究完成对复合菌群的初探, 通过降解特性研究及响应面分析, 探索其最佳代谢条件, 以期为复合菌群高效降解含喹啉废水工业化应用提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

样品采自江西省丰城新高焦化有限公司二沉池进水口的底层污泥, 在 4 °C 冰箱中保存。

1.1.2 培 养 基

富集培养基^[16](g/L): 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 酵母粉 5.0, pH 7.0。

筛选无机盐培养基^[15](g/L): (NH₄)₂SO₄ 1.0, KH₂PO₄ 1.0, Na₂HPO₄ 1.0, MgSO₄ 0.5, CaCO₃ 0.5。

生物降解无氮无机盐培养基(g/L): KH₂PO₄ 1.0, Na₂HPO₄ 1.0, MgSO₄ 0.5, CaCO₃ 0.5。

固体培养基(g/L): KH₂PO₄ 1.0, Na₂HPO₄ 1.0, MgSO₄ 0.5, CaCO₃ 0.5, 琼脂 20.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

喹啉, 上海麦克林生化科技有限公司; 二氯甲烷, 西陇科学股份有限公司; ABTS 试剂盒, 上海纪宁生物科研有限公司; 氨基磺酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。洁净工作台, 苏州泰安空气技术有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; 离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 喹啉降解菌群的富集、驯化及构建

取 1 g 污泥样品加入 99 mL 富集培养基中 30 °C、200 r/min 培养 7 d, 混匀。按 10% (体积分数)加入 90 mL 无机盐培养基中, 添加喹啉至浓度为 100 mg/L, 30 °C、200 r/min 培养, 每隔 8 h 取样。当喹啉完全降解后, 按 10% (体积分数)继续加入 90 mL 无机盐培养基中, 并逐级提高无机盐培养基中喹啉浓度, 直至降解液不再变色、喹啉不再降解。将复合菌群接种至含 1 500 mg/L 喹啉的无氮无机盐培养基, 在 30 °C、200 r/min、pH 7.0 的条件下培养, 进行后续实验。

1.3 复合菌群的形态学观察

将复合菌群在含 1 500 mg/L 喹啉的无氮无机盐培养基和固体培养基培养, 观察复合菌群生长状况。通过革兰氏染色观察菌体组成; 通过扫描电镜观察复合菌群整体形貌特征。

1.4 生理指标及代谢物的测定

通过液相色谱-质谱联用技术检测降解液中的中间代谢物质, 并测定不同时间点次级代谢物浓度变化。漆酶酶活采用 ABTS-分光光度法进行测定^[20]; 脱氢酶酶活采用分光光度测定^[21]; 反硝化酶酶活采用硝态氮剩余法进行测定^[21]; 氨氮采用纳氏比色法测定^[15]; 硝氮采用氨基磺酸比色法测定^[22]。

1.5 底物广谱性研究

根据喹啉含氮杂环结构选取环境污染中常

见的一元环化合物(苯酚、吡啶、咪唑、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、邻苯二酚)、二元化合物(萘、异喹啉、2-羟基喹啉、吲哚、双酚 A)和三元环化合物(呋唑)为降解底物。配制 100 mg/L 不同底物的无氮无机盐培养基,按 10% (体积分数)接种复合菌群,每隔 5 h 测定底物残留浓度,根据实际降解情况,按 100 mg/L 逐级增加浓度,检测复合菌群对不同底物的最优降解效果。

将复合菌群按 10% (体积分数)接种在蒸氨废水中,测定其中污染物含量变化及 COD 的降解情况,以此测试复合菌群对其中混合污染物的最佳联合降解效果。

苯酚通过 4-氨基安替比林法测定^[15];吡啶、萘、吲哚采用分光光度法测定^[12];咪唑、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、邻苯二酚、异喹啉、2-羟基喹啉、双酚 A 采用气相色谱测定^[15];呋唑使用液相色谱法测定^[21];COD 采用快速消解法测定^[22]。

1.6 复合菌群降解条件优化

1.6.1 环境因素对喹啉降解的影响

通过单因素轮换法依次改变温度(20、25、30、35、40 °C)、pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)、转速(100、150、200、250、300 r/min)、装液量(20%、30%、40%、50%、60%) (体积分数)、接菌量(5%、10%、15%、20%、25%) (体积分数)将菌悬液接种于含 1 500 mg/L 喹啉的灭菌无氮无机盐培养基中振荡培养,设置 3 个平行重复,考察喹啉降解性能和生物量变化。

1.6.2 外加碳氮源对喹啉降解的影响

确定最佳培养环境,将菌悬液接种于含 1 500 mg/L 喹啉的灭菌无氮无机盐培养基中,通过单因素轮换法,外加不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L)的葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、淀粉及不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L)的氯化铵、过硫酸铵、硫氰酸铵、蛋白胨、尿素,在最佳环境条件下振荡培养,设置

3 个平行重复,考察外加不同浓度碳氮源对喹啉降解性能和生物量变化影响。

1.7 Box-Behnken design 响应面分析

参考单因素试验与 Plackett-Burman 试验结果,选择 3 个影响显著的因素:温度、pH、转速,以喹啉降解率为响应值,利用 Design Expert 10 软件设计三因素三水平进行响应面优化试验。试验因素水平设计见表 1。

1.8 喹啉降解动力学研究

最佳培养条件下,每隔 4 h 测定复合菌群降解不同时间的喹啉浓度。利用 Origin 2021 对降解时间及喹啉残留浓度进行拟合,得到不同浓度时复合菌群降解喹啉动力学方程;计算不同喹啉浓度时复合菌群的比降解率,利用 Origin 2021 对喹啉初始浓度及比降解率进行拟合,得到复合菌群降解动力学曲线。

2 结果与分析

2.1 复合菌群的驯化及构建

通过逐级递增法驯化,得到一组高效喹啉降解复合菌群,该复合菌群可在 30 h 降解 1 500 mg/L 喹啉,如图 1A 所示,其降解效果远超现在国内外喹啉降解最高水平 700 mg/L (48 h)^[15],具有较强的生物降解潜力。

该复合菌群液体培养基中会形成粉状、絮状小团,菌体分散在发酵液中(图 1B),少量时呈白棕色,大量时呈棕黄色。该复合菌群在固

表 1 响应面因素水平设计表

Table 1 Box-Behnken experiment design factors and levels

Level	A: pH	B: Temperature (°C)	C: Rotation speed (r/min)
-1	5	20	100
0	7	30	200
-1	9	40	300

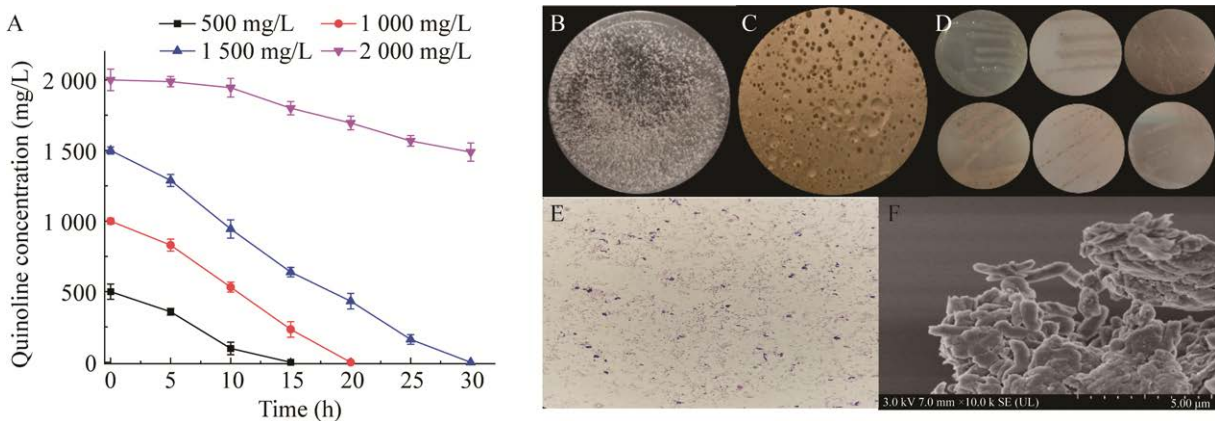


图1 复合菌群表型特征 A: 复合菌群降解喹啉效果. B: 液体培养时复合菌群形态. C: 固体培养时复合菌群形态. D: 单菌划线. E: 革兰氏染色. F: 扫描电镜图片

Figure 1 The characteristics of microbial consortium. A: The effect of quinoline degradation. B: Microbial consortium under liquid cultures. C: Microbial consortium under solid cultures. D: Streaking inoculation. E: Gram stain result. F: Scanning electron microscope of microbial consortium.

体培养基进行涂布培养, 菌体周围培养基逐渐由透明变为淡粉色, 然后转变为红褐色; 固体培养基表面菌体大多透明、凸起、湿润、周围不规则, 直径 1–2 mm; 部分菌生长在固体培养基的内部, 直径 1 mm 左右, 呈白色或黑色点状, 可能是由于其中存在部分兼性厌氧菌(图 1C)。通过分离该复合菌群得到几株不同的菌株, 分别呈透明、褐色、白色等, 可以降解喹啉生成绿色或粉色代谢物(图 1D)。革兰氏染色发现该复合菌群由大量革兰氏阴性菌及少量革兰氏阳性菌组成(图 1E)。通过扫描电镜观察发现该菌群由杆状、球状等多种形状不同且大小不一的菌株组成, 相互紧密地附着在一起, 部分菌体的表面呈现绒毛状(图 1F)。

2.2 复合菌群降解喹啉过程中生理指标的变化

通过液相色谱-质谱联用发现喹啉代谢中间产物 2-羟基喹啉, 其在喹啉代谢过程中的浓度变化如图 2A 所示。2-羟基喹啉浓度随喹啉代谢呈现先增加后减少的趋势, 推测 2-羟基喹啉

是喹啉代谢的初级代谢物, 这与易红磊的推测^[15]一致。在此过程中硝氮、氨氮浓度不同程度地上升, 可能是 2-羟基喹啉进一步解环, 氮原子与氢、氧结合形成了次级产物。复合菌群生物量在喹啉完全降解后仍缓慢上升, 这可能是由于复合菌群进一步降解 2-羟基喹啉及其代谢物为微生物生长供能。

漆酶、脱氢酶和反硝化酶是含氮杂环化合物生物降解中常见的 3 种酶, 通过测定脱氢酶酶活可以观测到复合菌群处理喹啉的能力, 具体酶活变化如图 2B 所示。漆酶通过羟自由基-单电子氧化过程完成污染物的降解^[23], 漆酶在喹啉降解初期酶活逐渐增加, 中期达到最大, 到降解后期逐渐减少, 这可能是漆酶参与喹啉的一级代谢, 与 2-羟基喹啉的形成或代谢有关, 因此随喹啉与 2-羟基喹啉被完全代谢, 其活性降低; 脱氢酶主要参与污染物降解过程中的递氢作用, 同时也表征了微生物活性, 脱氢酶酶活随时间推移逐渐增加, 并在喹啉和 2-羟基喹啉完全降解后仍继续增加, 这可能是由于脱氢

酶参与 2-羟基喹啉及其他次级代谢产物的脱氢作用, 随其他次级代谢物浓度增加脱氢酶活性仍缓慢增加; 反硝化酶参与部分微生物降解喹啉的过程, 主要与其中硝氮代谢有关, 该过程中反硝化酶活性较低, 在喹啉完全代谢后活性增加明显, 可能是由于降解初期系统内发生硝化反应, 氨氮转化为硝氮, 降解后期反硝化酶活性增加, 硝氮减少。通过测定喹啉代谢过程中氨氮和硝氮浓度变化, 发现在此过程中氨氮

和硝氮浓度缓慢上升, 氨氮在喹啉完全降解后继续增加, 但硝氮却开始缓慢减少, 可能是硝氮经反硝化酶转化成亚硝氮(图 2), 这与侯思宇^[21]的研究相符。

2.3 喹啉高效降解复合菌群的底物广谱性

工业废水中往往存在多种污染物, 底物广谱性较大的菌更具应用价值。该复合菌群对几种常见废水污染物的降解能力如图 3A 所示。除喹啉外, 该复合菌群对咪唑、吲哚、异喹啉、

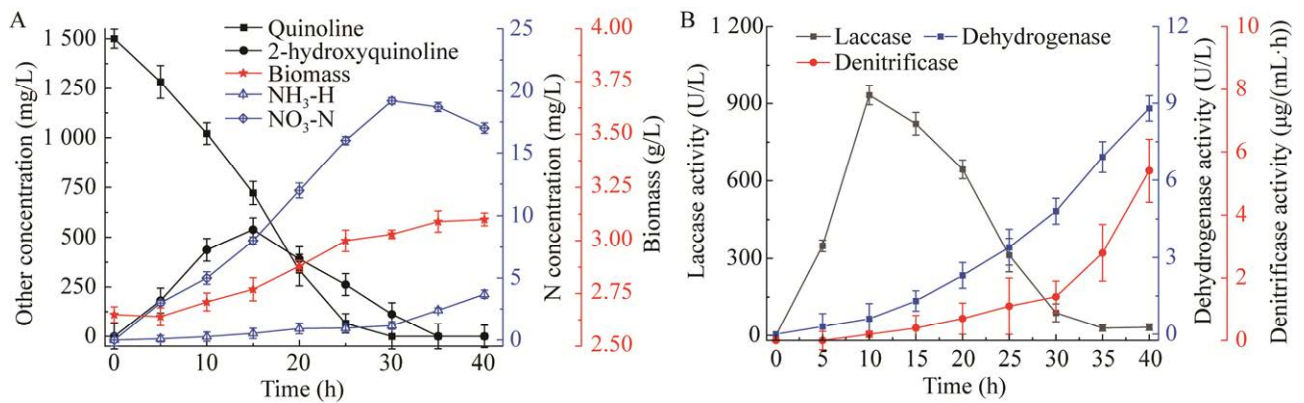


图 2 喹啉降解过程中的物质变化 A: 代谢物及生物量. B: 酶活

Figure 2 Changes in substances during quinoline degradation. A: Metabolites and biomass. B: Enzyme activity.

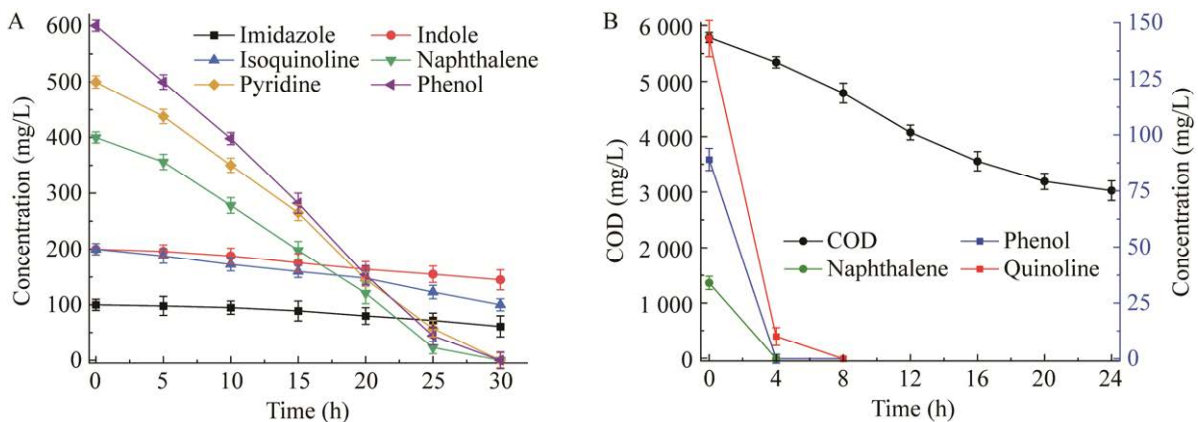


图 3 复合菌群底物广谱性 A: 不同化合物(咪唑、吲哚、异喹啉、萘、吡啶、苯酚). B: 蒸氨废水

Figure 3 The substrates broad spectrum for the microbial consortium. A: Different compounds (imidazole, indole, isoquinoline, naphthalene, pyridine, phenol). B: Ammonia evaporation effluent.

萘、苯酚的降解率可达 14%、25%、46.7%、95%、81.4%、91.6%，并且对多种杂环化合物都具有降解能力(表 2)。这可能是由于复合菌群参与喹啉代谢的酶可以降解其他杂环化合物，显示出良好的底物广谱性。

蒸氨废水成分复杂、COD 含量较高，对微生物具有一定抑制作用。使用该复合菌群降解江西省丰城新高焦化有限公司蒸氨废水，发现该复合菌群可以降解废水中的苯酚、喹啉、萘等物质，并且 COD 从 5 897 mg/L 降解到 2 944 mg/L，降解率达 47% (图 3B)，说明该复合菌群对复杂污染物废水也具有一定降解能力，在焦化废水等工业废水的处理上具有很好的应用前景。

2.4 不同因素对复合菌群降解喹啉性能的影响

2.4.1 培养条件对复合菌群降解喹啉性能的影响

不同温度对复合菌群的生长及喹啉降解影响如图 4A 所示。过高或过低的温度会抑制酶

活，影响微生物的生长代谢。当温度在 20–30 °C 时，喹啉降解率随温度升高而增强，生物量增长率增加；当温度在 30–40 °C 时，喹啉降解率随温度上升而下降，生物量增长率减少；当温度为 30 °C 时，降解率最大达 90%，生物量增长率为 11%。结果表明，复合菌群最佳培养温度为 30 °C。

不同 pH 对复合菌群的生长及喹啉降解影响如图 4B 所示。pH 会影响微生物酶活、细胞膜通透性及有机物离子化程度，进一步影响菌体代谢及生长。当 pH 值为 5.0–7.0 时，喹啉降解率及生物量增长率随 pH 值升高而增强；当 pH 值为 7.0–9.0 时，喹啉降解效率和生物量增长率随温度上升而下降；当 pH 7.0 时，喹啉降解率最高达 89%，生物量增长率最高达 11.6%。另外，观察到复合菌群在 pH 6.0 时的降解率高于 pH 8.0 时的降解率，pH 6.0 和 pH 7.0 的生物量增长率几乎相等，说明该复合菌群可能对中性偏酸的环境具有良好的耐受能力。

表 2 喹啉降解复合菌群的底物广谱性

Table 2 Substrate broad spectrum of quinoline-degrading microbial consortium

Compound type	Name	Concentration (mg/L)	Utilization	Degradation period (h)
Monocyclic compounds	Phenol	600	+++	25
	Pyridine	500	++	30
	Imidazole	100	+	48
	o-cresol	50	+	30
	m-cresol	–	–	–
	p-cresol	200	+	36
	Catechol	100	+	30
Bicyclic compounds	Quinoline	1 500	++++	30
	Naphthalene	400	++	42
	Isoquinoline	200	+	36
	2-hydroxyquinoline	500	+++	12
	Indole	200	+	48
	Bisphenol A	–	–	–
Tricyclic compounds	Carbazole	–	–	–

+: The degree of degradability; -: Non-degradability.

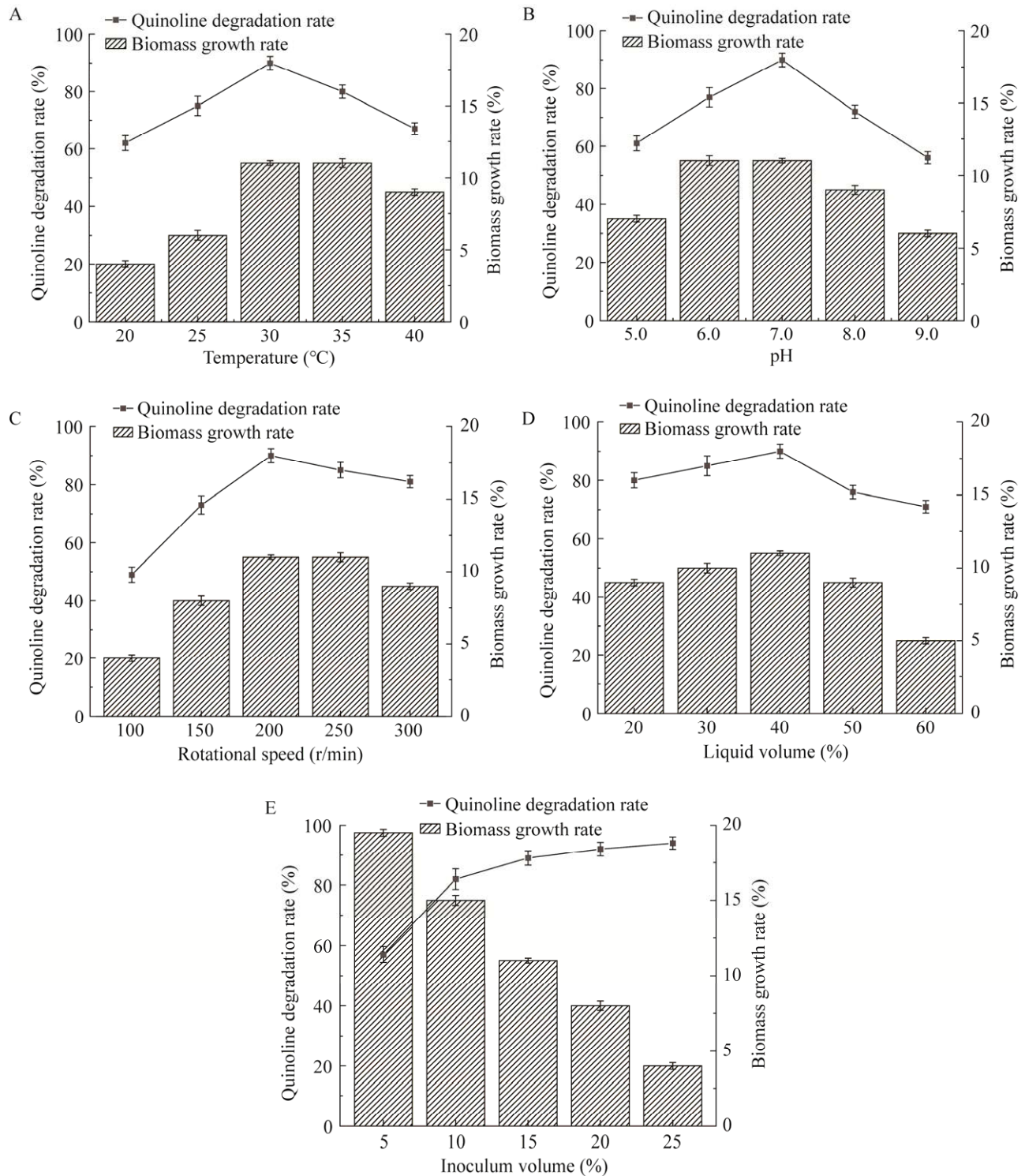


图4 不同培养条件对喹啉降解和复合菌群生长的影响 A: 温度. B: pH. C: 转速. D: 装液量. E: 接菌量
Figure 4 Effect of different conditions on the degradation of quinoline and the growth of the microbial consortium. A: Temperature. B: pH. C: Rotational speed. D: Liquid volume. E: Inoculum size.

不同转速对复合菌群的生长及喹啉降解影响如图 4C 所示。转速影响培养液中氧气浓度, 进而影响好氧微生物的生长代谢。当转速为 100–200 r/min 时, 喹啉降解率随转速升高明显增强, 生物量增长率增加; 当转速为 200–300 r/min 时, 喹啉降解率随转速上升而缓慢下降, 生物量增长率减少; 当转速为 200 r/min 时, 喹啉降解率最高达 88%, 当转速为 200 r/min 和 250 r/min 时, 生物量增长率最大达 11.3%。这可能是由于该复合菌群存在大量好氧菌和少量兼性厌氧菌, 过高或过低的氧浓度都不适合其生长代谢。

不同装液量对复合菌群的生长及喹啉降解影响如图 4D 所示。减少装液量可有效增加培养液中溶氧量, 促进好氧微生物利用培养基。当装液量在 20%–40% 时, 喹啉降解率随装液量升高而增强, 生物量增长率增加; 当装液量在 40%–60% 时, 喹啉降解率随温度上升而下降, 生物量增长率明显减少; 装液量在 40% 时降解效率最佳, 喹啉降解率最高达 90%, 生物量增长率最大达 11%。该变化与转速对复合菌群降解喹啉性能的影响结果一致。

不同接菌量对复合菌群的生长及喹啉降解影响如图 4E 所示。接菌量少时, 高底物浓度会使菌体生长受抑制; 接菌量过大时, 菌体代谢耗氧过快, 菌体衰退代谢减弱。当接菌量在 5%–25% 时, 喹啉降解率随接菌量升高而增强, 接菌量为 10% 时, 降解率达 83%, 比 5% 接菌量 58% 的降解率高 25%, 接菌量大于 10% 后降解率的增长不明显; 在接菌量为 5%–25% 时, 生物量增长率明显逐步减少, 由最初 19% 一直降低到 3.5%。这可能是由于随培养基中菌体增加, 复合菌群代谢暂时加快, 但整体空间减少, 不利于菌体生长。总体而言, 其最佳接菌量为 10%。

2.4.2 外加碳源对复合菌群降解喹啉性能的影响

不同浓度的不同外加碳源对复合菌群的生

长及喹啉降解影响如图 5 所示。随外加碳源浓度增加, 喹啉降解率不同程度下降, 与此同时, 复合菌群生物量增长率呈现先增后减的趋势。可能是外加碳源存在的情况下, 复合菌群优先利用外加碳源, 减弱了复合菌群适应喹啉的能力, 使得喹啉降解速率减缓; 碳源浓度过高时, 生物量增加, 氧气不足, 进一步导致菌体生长滞后。比较发现, 外加碳源对复合菌群降解喹啉的影响大小为葡萄糖>乳糖>果糖>淀粉>蔗糖, 可能是由于复合菌群对碳源的利用有选择性; 外加 1.0 g/L 葡萄糖和 1.0 g/L 乳糖时, 菌体增长量最明显, 达 16% 和 15%, 高于对照组 11%–12%。考虑菌体生长、喹啉代谢及经济因素, 确定该复合菌群最佳外加碳源及对应浓度为 1.0 g/L 的葡萄糖。

2.4.3 外加氮源对复合菌群降解喹啉性能的影响

不同浓度的不同外加氮源对复合菌群的生长及喹啉降解影响如图 6 所示。随外加氮源浓度增加, 喹啉代谢和复合菌群生物量增长率都呈先增后减的趋势, 但总体而言变化不明显。可能是喹啉上的 N 不易分解, 外加氮源存在的情况下提供了额外的氮源, 可以促进菌体代谢和生长, 同一时间生物量增长明显, 当喹啉代谢完, 整体生物量并不会增加; 过高浓度氮源或不适宜的氮源存在情况下, 喹啉代谢积累过多的 N^{3-} , 可能会抑制菌体代谢和利用喹啉。比较发现, 外加氮源在适宜浓度对复合菌群的促进效果为 NH_4Cl >尿素> $(NH_4)_2S_2O_8$ > NH_4SCN >蛋白胨, 添加 0.5 g/L NH_4Cl 时喹啉降解率最高达 89%; 其中 1 g/L NH_4Cl 和 1 g/L 尿素明显促进菌体生长, 生物量增长率分别达到 6.8% 和 6.0%。考虑菌体生长、喹啉代谢及经济因素, 确定该复合菌群最佳外加氮源及对应浓度为 0.5 g/L NH_4Cl 。

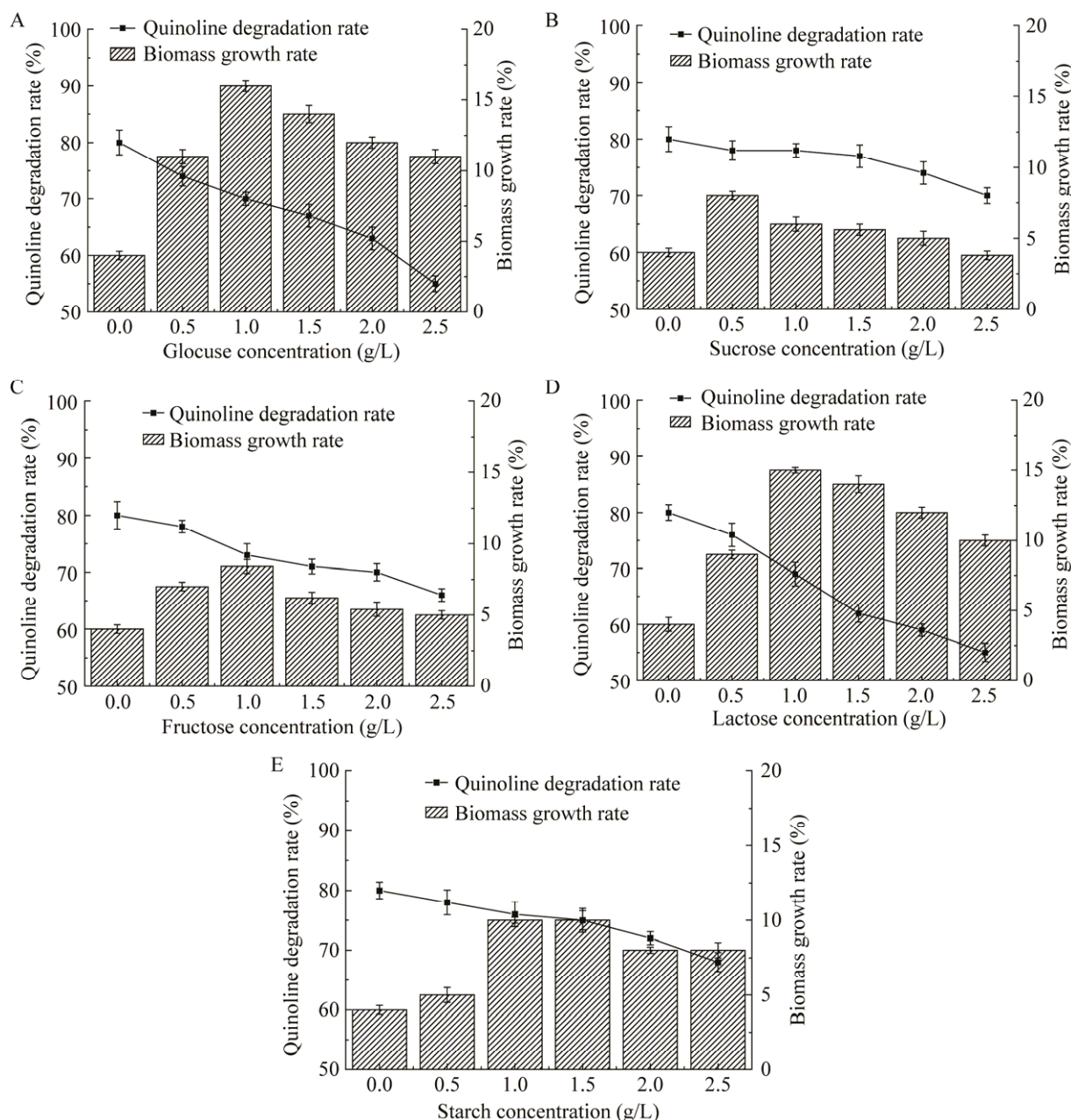


图5 外加碳源对喹啉降解菌群生长代谢的影响 A: 葡萄糖. B: 蔗糖. C: 果糖. D: 乳糖. E: 淀粉

Figure 5 Effect of external carbon sources on the growth and metabolism of quinoline-degrading microbial consortium. A: Glucose. B: Sucrose. C: Fructose. D: Lactose. E: Starch.

2.5 Box-Behnken design 响应面分析

以 pH (A)、温度(B)、转速(C)为自变量, 以喹啉降解率为响应值, 利用 Design-Expert 10 进行拟合, 回归方程模型: $R_1 = 66 - 1.87A + 0.63B + 0.75C + 0.25A \times B + 0.5A \times C - 1.5B \times C - 15.13A^2 - 17.63B^2 -$

$16.36C^2$, pH、温度、转速对应的 F 值为 1.57、0.17、0.25, 该拟合的模型达到极显著水平 ($P < 0.001$), 表明 pH、温度、转速都极大地影响了复合菌群降解喹啉的效果, 并且影响效果为 温度 > 转速 > pH。

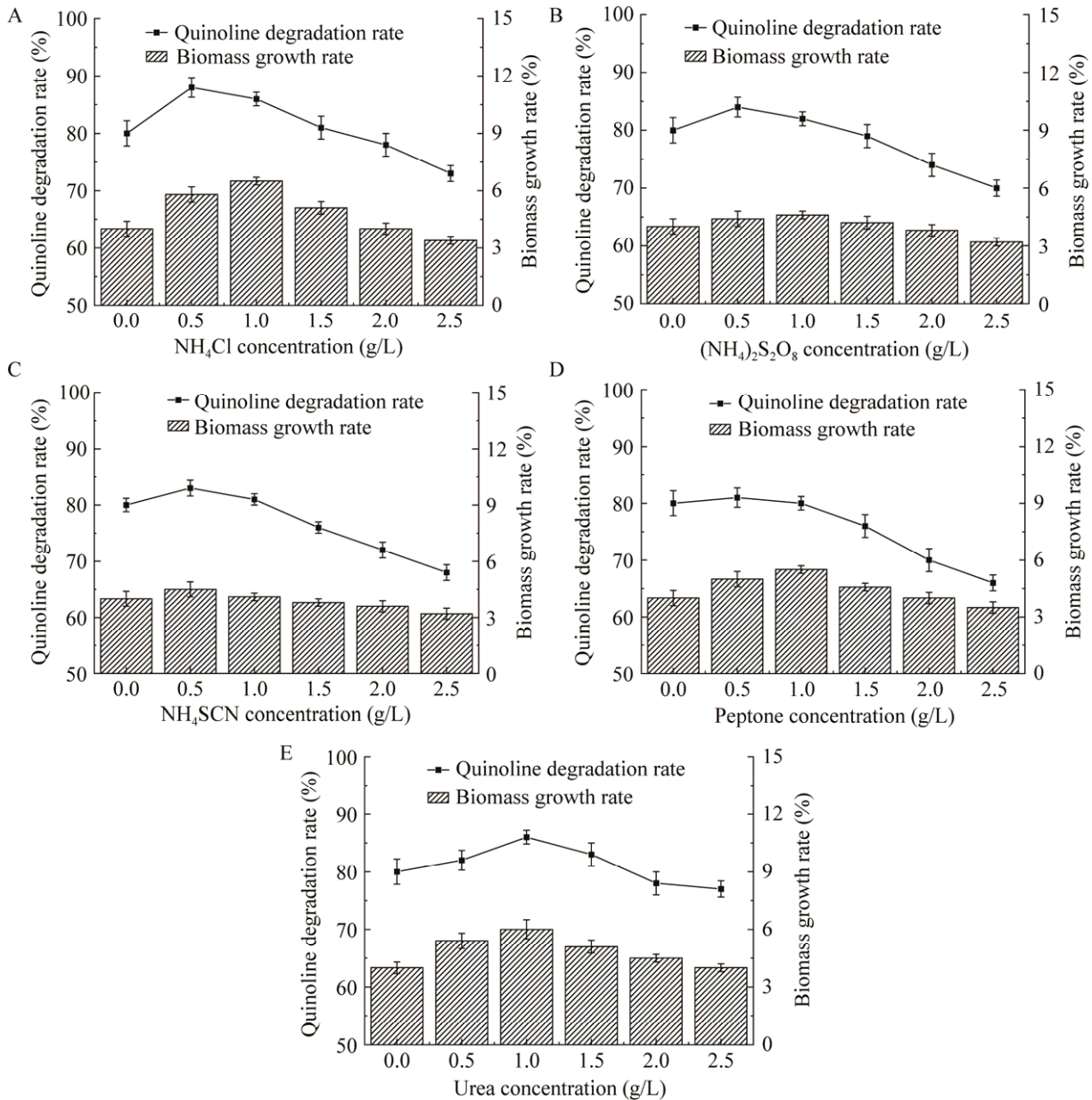


图 6 外加氮源对喹啉降解菌群生长代谢的影响 A: 氯化铵. B: 过硫酸铵. C: 硫氰酸铵. D: 蛋白胨. E: 尿素

Figure 6 Effect of external nitrogen sources on the growth and metabolism of quinoline-degrading microbial consortium. A: NH_4Cl . B: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. C: NH_4SCN . D: Peptone. E: Urea.

对该三因素进行响应面优化, 如图 7 所示。图 7A–7C 分别反映了 pH 和温度、pH 和转速、温度和转速对复合菌群降解喹啉的影响, 该响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 说明 pH

和温度、pH 和转速、温度和转速分别对复合菌群降解喹啉有显著影响。通过响应面法优化得到最佳培养条件为 pH 6.8、温度 30 °C、转速 200 r/min; 预测最佳条件下 20 h 喹啉降解

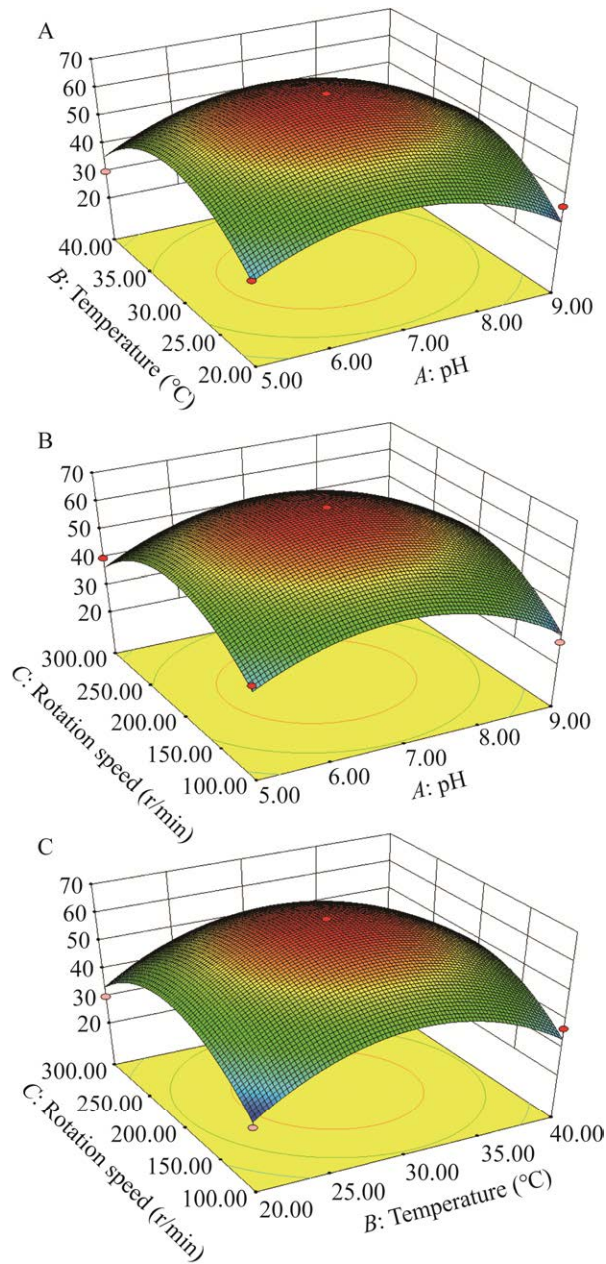


图 7 喹啉降解率响应面分析

Figure 7 Response surface diagram of quinoline degradation rate.

率达到 66%，与实际实验结果相符，说明此模型可靠合理。

2.6 喹啉高效降解复合菌群的降解动力学

对复合菌群降解不同浓度喹啉进行了拟合(图 8A)，发现其基本符合零级反应，由每条曲

线拟合的动力学方程如表 3 所示。有研究表明，细菌降解喹啉的过程主要在胞内进行，主要依赖于细胞膜的传质作用^[15]，符合零级动力学方程，这与本研究结果相符。

对喹啉浓度及比降解率用 Haldane 模型对降解动力学进行拟合，拟合曲线如图 8B 所示。当喹啉浓度 < 1 154 mg/L 时，喹啉比降解率随喹啉浓度升高而增加，可能是复合菌群受底物抑制不明显，底物增加有助于复合菌群的生长代谢；在喹啉浓度为 1 154 mg/L 时比降解率最大，

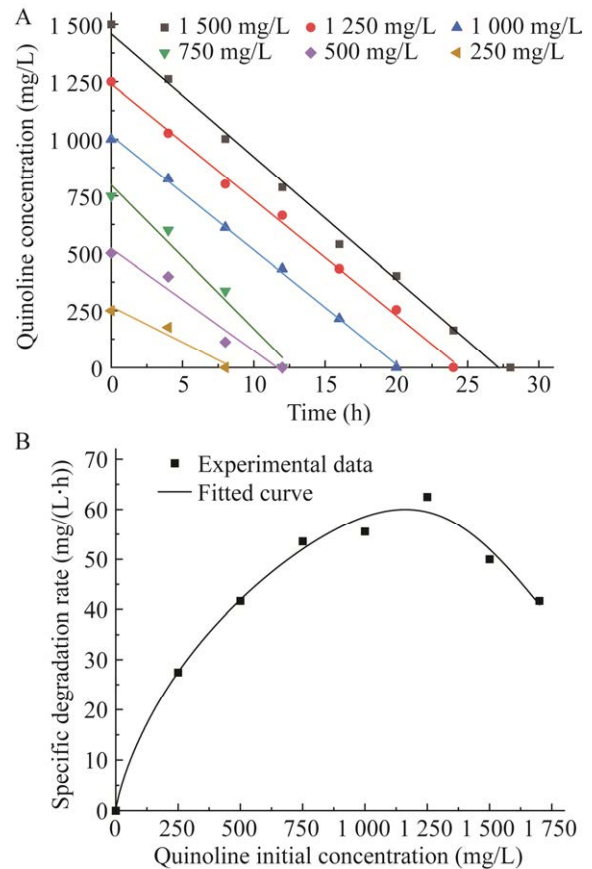


图 8 复合菌群降解特性 A: 降解动力学. B: 复合菌群在不同初始浓度喹啉的比降解率

Figure 8 Degradation characteristics of microbial consortium. A: Degradation kinetics. B: Specific degradation rates of the microbial consortium at different initial concentration of quinolone.

表3 复合菌群降解喹啉动力学方程
Table 3 Kinetic equations for quinoline degradation by microbial consortium

Initial quinoline concentration (mg/L)	Kinetic equations	Degradation rate constants K_0 (mg/(L·h))	R^2
250	$C=-29.033t+256.4$	27.45	0.983 0
500	$C=-41.667t+505.0$	41.67	0.998 0
750	$C=-51.080t+769.6$	50.00	0.994 0
1 000	$C=-53.470t+1 030.4$	55.56	0.987 0
1 250	$C=-49.627t+1 240.5$	62.50	0.999 0
1 500	$C=-53.687t+1 458.7$	50.00	0.995 2

达到 60.00 mg/(L·h); 当浓度>1 154 mg/L 时比降解率急剧下降, 这可能是由于高浓度喹啉对复合菌群产生了抑制。

3 讨论与结论

喹啉是工业废水中主要的污染物, 环境微生物在污染物去除中起到重要作用, 但难以在实际工业废水中进行大规模应用并达到良好的效果。本研究从活性污泥中驯化得到一组可 30 h 降解 1 500 mg/L 喹啉的高效喹啉降解复合菌群。目前喹啉降解微生物最高降解浓度为 700 mg/L^[15], 喹啉生物降解研究主要集中在单菌对单一化合物的降解, 只有少数研究描述了喹啉类化合物的微生物共代谢^[24], 对于复合菌群处理喹啉及杂环化合物的研究少之又少。细菌共培养(即复合菌群)技术处理含喹啉废水能避免单菌在喹啉降解过程中遇到的底物抑制、产物抑制及效率低下等问题, 并有机结合了多种代谢途径, 降低了单菌降解喹啉产生的有害产物对整个降解系统的负面影响, 简化了工艺流程、可节省设备与运行费用, 展现出了极大的应用潜力。相较而言, 本研究中复合菌群展现出良好的降解优势, 为高效菌剂的开发提供了资源。

本研究发现该复合菌群可以降解多种污染

物如苯酚、吡啶、咪唑、吡啶等其他废水中常见有机物, 展现出良好的底物广谱性, 为含喹啉工业废水工业化应用提供了基础。由于实际含喹啉废水体系成分复杂多变, 不利于微生物生长代谢。复合菌群可借助多种微生物协同作用, 在降解喹啉过程中必定存在与单菌不同的代谢降解机制和更加广泛的降解途径, 从而实现喹啉及其他污染物的高效降解。与其他喹啉降解菌相比, 该复合菌群在较宽泛的温度(20–40 °C)、pH(5.0–9.0)、溶氧(转速 100–300 r/min、装液量 20%–60%)条件下都具有较为良好的喹啉代谢能力; 当温度为 30 °C、pH 7.0、转速 200 r/min、装液量 40%时, 该复合菌群对喹啉具有最大代谢能力。在实际工厂废水处理过程中, 往往伴随着温度高、pH 不稳定等情况, 废水的环境直接影响菌株代谢能力。该复合菌群环境适应范围广, 有利于实际工业化应用。

本研究发现外加 1.0 g/L 葡萄糖时生物量增长率最高; 外加 0.5 g/L NH₄Cl 促进喹啉降解最为明显; 外加碳源会促进复合菌群生长并抑制喹啉代谢, 外加氮源短期内会促进其生长代谢, 但总体而言菌量不变。工业废水自身含有外加氮源, 前期可以促进复合菌群利用氮离子代谢喹啉。随着喹啉及其他污染物的代谢, 水体中总氮、NH₃-N、NO₃-N 含量进一步提升, 难以达到规定排放标准。已知实践中多采用硝化-反硝化作用的生物脱氮法对废水进行处理, 本研究中复合菌群具有反硝化能力, 可节省废水好氧处理中的能量消耗、缓解生物脱氮的压力。Liu 等^[25]报道了喹啉反硝化过程中微生物群落的演替, 发现主要功能菌为 *Thauera* 和 *Azoarcus*, 通过对它们进行研究, 发现大多可以进行反硝化, 但只有部分菌株可以在好氧条件下降解喹啉, 且无以喹啉为唯一碳源的细菌, 反硝化过程复杂, 对喹啉等污染物的代谢有重要作用。本研

究中复合菌群可在好氧条件下降解喹啉,且具有反硝化能力,具有研究意义。

本研究结合响应面分析,发现环境因素对复合菌群的影响效果为温度>转速>pH,确定了该复合菌群最佳培养条件为pH 6.8、温度 30 °C、转速 200 r/min,复合菌群 20 h 对 1 500 mg/L 喹啉降解率最高达 66%,30 h 内可实现喹啉完全降解;通过分析其降解动力学,发现其符合零级动力学,在喹啉浓度为 1 154 mg/L 时具有最大比降解率。对复合菌群最佳培养条件及最佳降解底物浓度进行优化,有利于进一步认识该复合菌群,实现该复合菌群的最大化利用,为工业化提供理论基础。

此外,本研究只对喹啉高效降解复合菌群进行了初步探索,关于复合菌群的群落结构演替、代谢机理、解毒作用及调控方式并未深入研究;通过解析该复合菌群的分子作用机制,可以为利用基因工程技术构建具有抗生素抗性的安全高效喹啉降解工程菌提供理论基础;另外,可以利用固定化技术、生物膜技术提高复合菌群对喹啉的降解效果,制备高效菌剂实现该复合菌群的工业化应用。

REFERENCES

- [1] HUANG Y, HOU X, LIU ST, NI JR. Correspondence analysis of bio-refractory compounds degradation and microbiological community distribution in anaerobic filter for coking wastewater treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 304: 864-872.
- [2] ZHU H, HAN YX, MA WC, HAN HJ, MA WW. Removal of selected nitrogenous heterocyclic compounds in biologically pretreated coal gasification wastewater (BPCGW) using the catalytic ozonation process combined with the two-stage membrane bioreactor (MBR)[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 786-793.
- [3] ZHANG ZC, YUE XP, DUAN YQ, RAO Z. A study on the mechanism of oxidized quinoline removal from acid solutions based on persulfate-iron systems[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(21): 12504-12510.
- [4] ROVIRA J. Human health risks due to exposure to inorganic and organic chemicals from textiles: a review[J]. *Environmental Research*, 2019, 168: 62-69.
- [5] GARCÍA E, COA JC, OTERO E, CARDA M, VÉLEZ ID, ROBLEDO SM, CARDONA WI. Synthesis and antiprotozoal activity of furanchalcone-quinoline, furanchalcone-chromone and furanchalcone-imidazole hybrids[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2018, 27(2): 497-511.
- [6] YU ML, WANG JJ, TANG L, FENG CY, LIU HY, ZHANG H, PENG B, CHEN ZM, XIE QQ. Intimate coupling of photocatalysis and biodegradation for wastewater treatment: mechanisms, recent advances and environmental applications[J]. *Water Research*, 2020, 175: 115673.
- [7] ZHAO Q, LIU Y. State of the art of biological processes for coal gasification wastewater treatment[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(5): 1064-1072.
- [8] de OLIVEIRA FERREIRA ME, VAZ BG, BORBA CE, ALONSO CG, OSTROSKI IC. Modified activated carbon as a promising adsorbent for quinoline removal[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2019, 277: 208-216.
- [9] BOONNORAT J, TECHKARNJANARUK S, HONDA R, GHIMIRE A, ANGTHONG S, ROJVIROON T, PHANWILAI S. Enhanced micropollutant biodegradation and assessment of nitrous oxide concentration reduction in wastewater treated by acclimatized sludge bioaugmentation[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 637/638: 771-779.
- [10] ZHANG YT, WANG YK, LU QY, ZHANG CY, YAN N, ZHANG YM, RITTMANN BE. The role of ultrasound-treated sludge for accelerating quinoline mono-oxygenation[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 233: 561-566.
- [11] WANG ZC, XIAN WX, MA YS, XU T, JIANG R, ZHU H, MAO XH. Catalytic ozonation with disilicate-modified nZVI for quinoline removal in aqueous solution: efficiency and heterogeneous reaction mechanism[J]. *Separation and Purification Technology*, 2022, 281: 119961.
- [12] XUE LL, LIU JX, LI MD, TAN L, JI XY, SHI SN, JIANG B. Enhanced treatment of coking wastewater containing phenol, pyridine, and quinoline by integration of an E-Fenton process into biological treatment[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(10): 9765-9775.

- [13] RAIMONDO EE, SAEZ JM, APARICIO JD, FUENTES MS, BENIMELI CS. Coupling of bioaugmentation and biostimulation to improve lindane removal from different soil types[J]. *Chemosphere*, 2020, 238: 124512.
- [14] CHEN J, WANG XS, HUANG Y, LV SS, CAO XH, YUN J, CAO DP. Adsorption removal of pollutant dyes in wastewater by nitrogen-doped porous carbons derived from natural leaves[J]. *Engineered Science*, 2019, 5: 30-38.
- [15] 易红磊. 喹啉高效降解菌株 *Alcaligenes* sp. WUST-qu 的筛选及表征[D]. 武汉: 武汉科技大学硕士学位论文, 2019.
- YI HL. Isolation and characterization of a novel high effectively quinoline degrading bacterial strain *Alcaligenes* sp. WUST-qu[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [16] TUO BH, YAN JB, FAN BA, YANG ZH, LIU JZ. Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 55-60.
- [17] GAO M, LIU YJ, LIU Z, LI HT, ZHANG AN. Dynamic characteristics of AHLs-secreting strain *Aeromonas* sp. A-L2 and its bioaugmentation during quinoline biodegradation[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 1060-1073.
- [18] LI Y, ZHANG Q, LI M, SANG WJ, WANG Y, WU LF, YANG YQ. Bioaugmentation of sequencing batch reactor for aniline treatment during start-up period: investigation of microbial community structure of activated sludge[J]. *Chemosphere*, 2020, 243: 125426.
- [19] ZHANG K, LUO HB, ZHU ZY, CHEN W, CHEN J, MO Y. Performance and microbial community structure of bioaugmentation in a sequencing batch reactor treating bis (2-ethylhexyl) phthalate wastewater at low temperature[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2018, 144(9): 4018085.
- [20] 龚志敏, 王佳豪, 刘鹏, 高士祥. 在不同土壤体系下漆酶催化降解对乙酰氨基酚的差异研究[J]. *环境化学*, 2022, 41(7): 2256-2263.
- GONG ZM, WANG JH, LIU P, GAO SX. Effects of laccase degradation on acetaminophen in different soil systems[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(7): 2256-2263 (in Chinese).
- [21] 侯思宇. 喹啉降解菌的筛选及活化条件对喹啉降解速率的影响[D]. 西安: 西安建筑科技大学硕士学位论文, 2017.
- HOU SY. Screening of a highly efficient quinoline degrading strain and the effects of domesticated conditions on the rate of quinoline degradation[D]. Xi'an: Master's Thesis of Xi'an University of Architecture and Technology, 2017 (in Chinese).
- [22] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- State Environmental Protection Administration. Analytical Methods for Water and Wastewater Testing[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese).
- [23] IYER PV. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(10): 1019-1032.
- [24] 赵乾程, 苏凯文, 邱子梁, 王庆宇, 于彩虹. 苯酚和喹啉降解菌 *Alcaligenes faecalis* 的降解特性及固定化应用[J]. *矿业科学学报*, 2022, 7(2): 247-256.
- ZHAO QC, SU KW, QIU ZL, WANG QY, YU CH. Biodegradation characteristics of phenol and quinoline by *Alcaligenes faecalis* and its immobilization application[J]. *Journal of Mining Science and Technology*, 2022, 7(2): 247-256 (in Chinese).
- [25] LIU BB, ZHANG F, FENG XX, LIU YD, YAN X, ZHANG XJ, WANG LH, ZHAO LP. *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 55(2): 274-286.