



还原蓝 4 高效降解菌的分离鉴定及降解条件优化

邓田田, 李海红, 王洋涛

(西安工程大学环境与化学工程学院, 陕西西安 710048)

[摘要] 从印染废水活性污泥中筛分出一株还原蓝 4(VB4)染料降解菌株, 并对其降解条件进行优化。通过微观形态、生理生化及 16S rRNA 鉴定种属, 利用单因素实验初步确定了 VB4 降解的影响因子, 进一步应用 PB 实验、最陡爬坡实验、CCD 实验及响应面法对其降解条件进行了优化及预测。结果表明: 该菌株为 *Pseudomonas aeruginosa* 属细菌; 最佳降解条件: pH=7.35, 尿素质量浓度 0.95 g/L, 温度 35.37 °C, 该条件下 VB4 脱色率可达 97%, 与预测值 97.24% 相差 0.24%。建立的模型对处理 VB4 染料废水的预测效果较好, 也为后续印染废水的处理提供了理论基础。

[关键词] 印染废水; 还原蓝 4; 脱色菌; 响应面优化

[中图分类号] X703 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2021)10-0083-08

Isolation and identification of high-efficiency vat blue 4 dye-degrading strain and its degradation condition optimization

DENG Tiantian, LI Haihong, WANG Yangtao

(College of Environmental and Chemical Engineering, Xi'an Polytechnic University, Xi'an 710048, China)

Abstract: A strain of vat blue 4 (VB4) dye decolorization was isolated from the printing and dyeing activated sludge, and its degradation conditions for VB4 was optimized. Species were identified by microscopic morphology, physiological and biochemical properties and its 16S rRNA gene sequence analysis. Single-factor experiment was used to preliminarily determine the factors affecting VB4 degradation, and Plackett-Burman experiment, steepest ascent experiment, Central Composite Design experiment and response surface analysis were used to optimize and predict the degradation conditions. The results showed that the strain was identified as *Pseudomonas aeruginosa*, the optimal degradation conditions on VB4 were: pH 7.35, urea concentration 0.95 g/L, the temperature 35.37 °C, the degradation rate reached 97%, which was 0.24% difference from the predicted value of 97.24%. The established model predicted well for treatment of VB4 dye wastewater. All the results provided some information for the effective treatment of the printing and dyeing wastewater.

Key words: printing and dyeing wastewater; vat blue 4; decolorization bacteria; response surface analysis

印染工业是我国促进经济发展的传统产业支柱, 同时也是高排放、高污染的行业, 由此社会面临着加快经济发展与环境保护的巨大冲突。随着国家一系列污水排放政策的相继出台, 印染企业面临的治污压力也越来越大, 基于此, 研究印染废水的处理变得尤为重要。研究表明, 许多种类的染料都具有 3 致作用, “致毒、致癌、致突变”^[1]。若将处理不彻底的

印染废水排放到环境中, 不仅会降低水的透光性, 还会减少水体中溶解氧的含量, 干扰水中生物的生长^[2]。特别地, 对于各种合成染料, 其发色基团如偶氮基团、蒽醌基团等在水体中保留的时间较长, 不易被环境吸收降解。因此, 如何高效、彻底地降解合成染料成为一个亟待解决的问题。

蒽醌染料是一类含有蒽醌等环状结构的具有还

原性、疏水性的染料通称,颜色以蓝色、绿色、紫色等为主^[3-4]。由于该类染料具有色泽艳丽、固色率高、价格低廉等优势,已成为目前印染行业中的一类不可或缺或染料,使用量仅次于偶氮染料^[5]。其品种主要有还原蓝 4、酸性萘醌蓝、活性艳蓝 X-BR 等^[6-7]。萘醌染料大多数含有多环芳香族化合物,结构复杂且难降解,存在一定的潜在毒性^[8-9];其产生的废水有机成分含量高、可生化性差、色度高,是众人皆知的一类难处理有机废水^[10-12]。

近年来,有研究报道关于萘醌染料废水的处理方法,如 Fenton 氧化法、光催化氧化法等,但这些方法存在成本高、易产生二次污染的缺陷;而采用生物法处理萘醌染料废水具有效率高、环保且成本低的优点,已成为染料废水处理研究的热点^[13]。目前,已筛选到可高效降解萘醌染料的微生物包括藻类^[14]、真菌^[15]、放线菌和细菌^[16],通过这些微生物的吸附、降解等过程可高效去除印染废水中的染料^[17]。还原蓝 4(VB4)广泛用于印染行业,由于其利用率低,处理不彻底,导致大量进入到环境水体中。但由于 VB4 具有结构复杂、毒性大、不易被生物降解等特点,到目前为止几乎没有关于其生物降解的相关报道。为实现印染废水的有效处理,有必要研究筛选可高效降解 VB4 的菌株。为此,本研究利用印染废水生物氧化池的活性污泥,通过富集培养、分离纯化得到了一株高效降解 VB4 染料的菌株,并用响应面优化法确定了最佳降解条件。

1 材料与方法

1.1 染料

实验所用染料为还原蓝 4(VB4),购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司(TCI Shanghai)。本实验所用模拟废水由还原蓝 4 配制而成。

1.2 培养基

无机盐培养基^[18]: KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, CaCl_2 0.02 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, 微量盐溶液 2.0 mL/L。用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节初始 pH 为 7.0。121 °C 高压灭菌 20 min,备用。

微量盐溶液: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.0 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.8 mg/L, H_3BO_3 4.0 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 28.0 mg/L, MoO_3 4.0 mg/L。0.24 μm 滤膜

过滤,备用。用于培养菌株时,按需加入 VB4 染料及其他底物。

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,氯化钠 10 g/L。121 °C 灭菌 20 min,用于菌株的活化与培养。

LB 固体培养基:在液体 LB 培养基中需加入 1.5% 琼脂粉。

BM 培养基: KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, CaCl_2 0.02 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, 尿素 1.0 g/L, 微量盐溶液 2.0 mL/L。用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节初始 pH 为 7.0。121 °C 高压灭菌 20 min,备用。

1.3 主要仪器设备

ZQZY-C 恒温培养摇床,上海知楚仪器有限公司;生化培养箱,上海恒科技有限公司;FE-20 酸度计,瑞士梅特勒-托利多公司;FD-IC-50 冷冻干燥仪,北京博医康实验仪器有限公司;mini-15K 高速离心机,杭州奥盛仪器有限公司;SW-CJ-1G 单人超净工作台,苏州净化设备有限公司;UV-3100 紫外分光光度计,MAPADA 公司;HIRAYAMA 高压灭菌锅,德国默克公司。

1.4 菌株的富集、筛选与纯化

1.4.1 VB4 高效降解菌的富集与筛选

将 5 mL 破碎泥水混合物即菌悬液(样品前处理所得)接入含有 20 mg/L VB4 的 BM 培养基中,置于 35 °C、200 r/min 的摇床中培养。1 周后吸取 5 mL 培养液到新鲜的含有 40 mg/L VB4 的 BM 培养液中,富集驯化,直到培养液中 VB4 质量浓度达到 100 mg/L。保存混合菌液,观察菌群结构变化。

1.4.2 VB4 高效降解菌的纯化

用超纯水稀释菌悬液(混合菌液),然后吸取 50 μL 的稀释菌悬液涂纯平板,于 30 °C 恒温培养,直到明显能观察到单克隆。挑取不同形态的单克隆到液体 LB 中扩大培养后,在 1 000 r/min 下离心 5 min 收集菌体,然后采用 BM 培养液洗 3 遍,转接入含有 VB4 的 BM 培养液中验证脱色率。高效降解菌保存于 30% 的甘油中。菌体量利用细胞干重衡量。

1.5 菌株鉴定

采用电镜进行菌株形态观察,具体的生理生化鉴定方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[19]。使用

16S rRNA 技术对其进行种属鉴定。

1.6 单因素实验优化菌株降解条件

采用单因素实验探索不同因素对 VB4 高效降解菌降解 VB4 的影响,影响因素包括温度、初始接种量(OD₆₀₀)、培养基初始 pH 以及葡萄糖、尿素、微量盐、VB4 初始浓度。所有样品均置于恒温摇床中培养 24 h,然后于 8 000 r/min 下离心 5 min,用紫外分光光度计在 615 nm 处测定上清液的吸光度,计算脱色率。收集离心后菌体,冷冻干燥至恒重,称量菌体干重,用以衡量菌体量。每组实验平行进行 3 次。

1.7 响应面法优化 VB4 高效降解菌株降解 VB4 的条件

1.7.1 Plackett-Burman 实验

单因素实验不能确定影响因子的主次^[20],采用 Plackett-Burman 实验(PB 实验)筛选出对目标值影响最大的关键因素^[21]。分别选取高、中、低 3 个水平,具体各个因子的水平设置如表 1 所示。利用 Design-Export 8.0.0 软件进行数据分析,以 VB4 脱色率为响应值,每组实验做 3 个平行。

表 1 Plackett-Burman 实验设计

Table 1 The Plackett-Burman design

因素水平	A 温度/℃	B 初始接种量 (OD ₆₀₀)	C pH	D 葡萄糖/ (g·L ⁻¹)	E 尿素/ (g·L ⁻¹)	F 染料/ (mg·L ⁻¹)	G 微量盐 溶液 (mL·L ⁻¹)
高水平	40	0.08	8	1.5	1.5	80	4
低水平	30	0.04	6	0.5	0.5	20	2
中心	35	0.06	7	1	1	50	3

1.7.2 最陡爬坡实验

响应面拟合方程只有在接近最佳值区域才能较好地模拟真实情况,故用最陡爬坡法快速逼近最大 VB4 脱色率区域^[22-23]。根据 PB 实验得出的一次拟合方程进行设计^[24],在拟合方程中,各因子的系数决定爬坡方向,系数大小及主要因素效应值确定变化步长^[25-26]。

1.7.3 CCD 实验

利用响应面法中 CCD 实验对 VB4 的脱色条件进一步优化。采用 CCD 实验设计 3 因素 3 水平的响应面分析实验,研究主要因子对 VB4 脱色率的影响。实验因素水平及编码如表 2 所示。为验证优化响应面模型的准确性,根据得到的最佳条件设计实验进行验证。每组实验做 3 个平行。

表 2 CCD 实验因素水平及编码

Table 2 Independent variables levels used for CCD matrix

自变量	水平				
	最低	低	中心	高	最高
分辨率	-1.68	-1	0	1	1.68
A-温度/℃	26.6	30	35	40	43.4
C-pH	5.32	6	7	8	8.68
E-尿素/(g·L ⁻¹)	0.4	0.6	0.9	1.2	1.4

2 结果与讨论

2.1 脱色菌株的筛选与鉴定

通过对印染活性污泥中的微生物进行染料脱色筛选,分离到 1 株能以 VB4 染料为唯一碳源的脱色菌株,命名为 WYT。菌株 WYT 在 LB 平板上的单克隆菌落呈圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,容易挑起[见图 1(a)]。革兰氏染色实验得该菌株呈革兰氏阴性,菌体大小为(0.5~1.0) μm×(1.0~3.0) μm,单个菌体呈短杆状,无芽孢[见图 1(b)]。

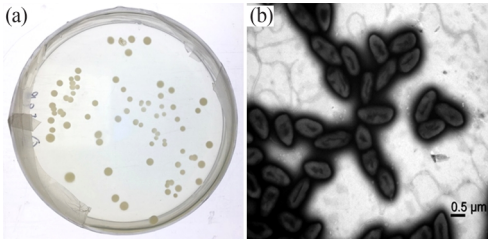


图 1 菌株 WYT 的单克隆平板照片(a)和菌株 WYT 的负染电镜图(b)

Fig. 1 Monoclonal photograph of WYT(a) and negative staining electro microscopy of WYT(b)

将菌株 WYT 的测序结果在 Genbank 数据库(登录号:MW019607)中与已有核酸序列进行相似性比对,结果显示,菌 WYT 与 *Pseudomonas aeruginosa* S25 具有很高的同源性(99%)。结合 WYT 的形态和生理生化特征,鉴定其种属为 *Pseudomonas aeruginosa*。系统发育树如图 2 所示。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 培养温度对脱色效果的影响

温度是微生物重要的生存因子。不同温度条件下,菌株 WYT 的生长和降解情况如图 3 所示。培养基初始 pH 为 7,初始接种量为 0.02,VB4 初始质量浓度为 50 mg/L。

由图 3 可知,菌株 WYT 生长和降解 VB4 的适宜温度范围为 30~37 ℃,在 35 ℃时,菌株生长量和脱色率达到最大,即 35 ℃初步确定为最适温度。当

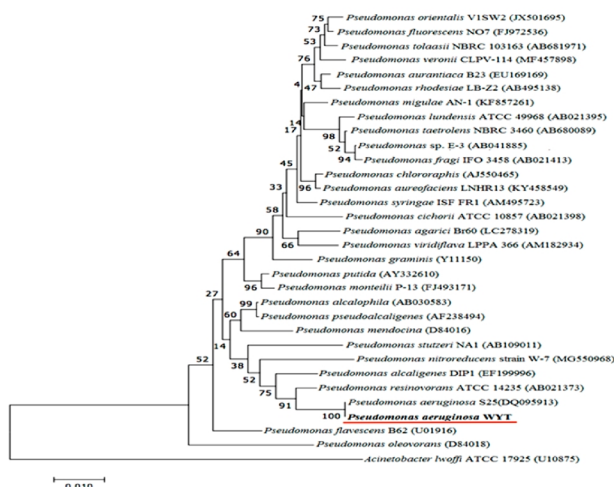
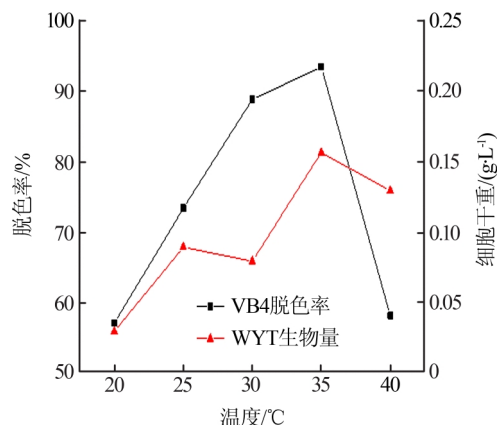
图2 *Pseudomonas aeruginosa* WYT 的系统发育树Fig. 2 The unrooted tree of *Pseudomonas aeruginosa* WYT

图3 培养温度对 VB4 降解的影响

Fig. 3 Effect of different temperatures on VB4 degradation

温度 $>35^{\circ}\text{C}$ 时,脱色率与菌体量急剧下降,可能是温度过高抑制了细菌的生长和酶活性,从而使脱色率下降^[27]。

2.2.2 初始接种量对脱色效果的影响

初始接种量对脱色效果的影响如图4所示。培养基初始 pH 为 7,培养温度为 30°C ,VB4 初始质量浓度为 50 mg/L 。

由图4可以看出,随着初始接种量的增加,VB4 脱色率先升高后趋于稳定。当初始接种量为 0.02 时,脱色率最低,仅为 62.18%。初始接种量太小,无法抵御染料的毒性,导致生物量很小,从而使脱色率较低。当初始接种量 >0.06 时,VB4 脱色率的增加不明显。菌株 WYT 的最适接种量为 0.06。实验结果表明,初始生物量对 VB4 的降解影响很小,这有利于

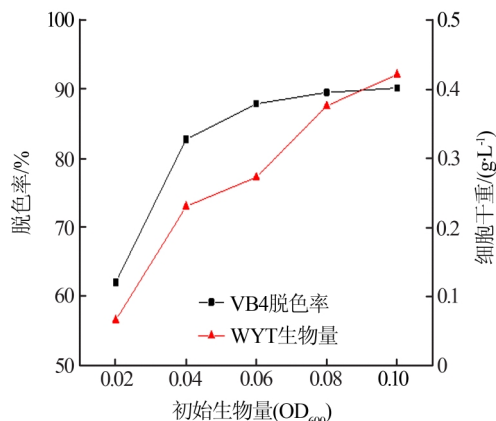


图4 初始接种量对 VB4 降解的影响

Fig. 4 Effect of initial biomass on VB4 degradation

该菌株在实际印染废水处理中的应用。

2.2.3 培养基初始 pH 对脱色效果的影响

培养基初始 pH 对脱色效果的影响如图5所示。培养温度为 30°C ,初始接种量为 0.02,VB4 初始质量浓度为 50 mg/L 。

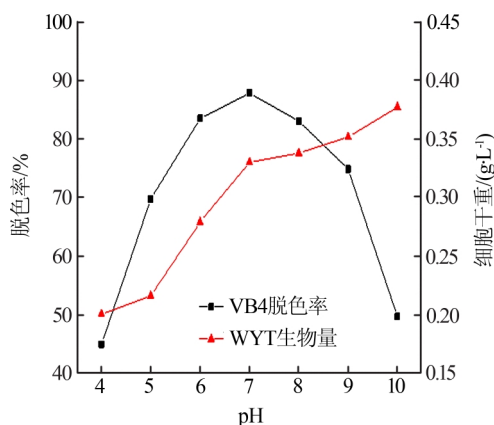


图5 初始 pH 对 VB4降解的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on VB4 degradation

由图5可知,当 pH=7 时,VB4 脱色率最高,达到 90.07%,表明最适宜菌株 WYT 降解 VB4 的 pH 是 7,该结果与文献[28]中 *Pseudomonas* sp. WJ 菌株最佳降解的 pH 一致。随着 pH 的进一步增大,脱色率下降,而生物量上升,可能是由于在碱性条件下培养基灭菌产生沉淀,后续实验中菌体吸附在沉淀物表面,造成较大的测量误差。

2.2.4 葡萄糖浓度与尿素浓度对脱色效果的影响

葡萄糖浓度与尿素浓度对脱色效果的影响如图6所示。培养温度为 30°C ,初始接种量为 0.02,培养基初始 pH 为 7,VB4 初始质量浓度为 50 mg/L 。

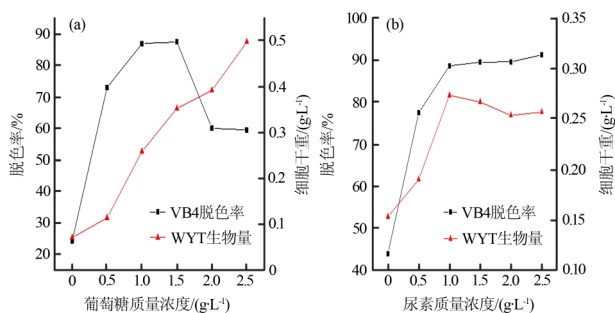


图6 葡萄糖浓度(a)与尿素浓度(b)对VB4降解的影响

Fig. 6 Effect of glucose concentration (a) and urea concentration (b) on VB4 degradation

由图6(a)可知,当葡萄糖质量浓度为1.0~1.5 g/L时,VB4脱色率超过87%,而当葡萄糖质量浓度为0~0.5 g/L和2.0~2.5 g/L时,VB4脱色率均小于80%,说明较低或较高的葡萄糖浓度都不利于菌株对VB4的降解。葡萄糖作为外加碳源,浓度较低时,不足以维持微生物的生长繁殖,导致脱色率较低;而浓度较高时,可能是由于碳代谢抑制了微生物活性,进而阻碍了三羧酸(TCA)循环^[29]。选取最佳葡萄糖质量浓度为1.0 g/L。由图6(b)可知,当尿素质量浓度为1.0 g/L时,脱色率几乎达到最大,即其为最佳的尿素质量浓度。

2.2.5 不同投加量微量盐溶液对脱色效果的影响

不同投加量的微量盐溶液对脱色效果的影响如图7所示。培养温度为30℃,培养基初始pH为7,初始接种量为0.02,VB4初始质量浓度为50 mg/L。

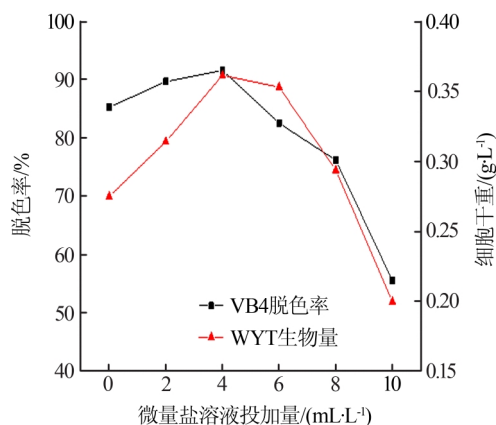


图7 不同投加量微量盐溶液对VB4降解的影响

Fig. 7 Effect of trace salt solution of different concentration on VB4 degradation

由图7可知,随着溶液中微量盐浓度的增加,VB4脱色率和生物量均先升高后降低。当添加4

mL/L的微量盐溶液时,VB4脱色率和生物量最高;继续增大微量盐溶液的投加量,VB4脱色率和生物量明显下降,这一现象与Linna DU等报道的DY1菌株降解特性一致^[30]。实验结果表明,添加适量的微量盐溶液可能会促进WYT产生降解酶。

2.2.6 不同VB4初始浓度对脱色效果的影响

不同VB4初始浓度对脱色效果的影响如图8所示。培养温度为30℃,培养基初始pH为7,初始接种量为0.02。

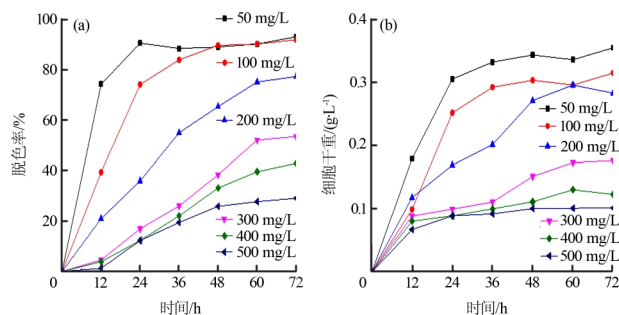


图8 不同VB4初始浓度对VB4降解的影响

Fig. 8 Effect of different VB4 concentration on VB4 degradation

由图8可知,当VB4初始质量浓度分别为50、100、200、300、400、500 mg/L时,培养72 h后的VB4脱色率分别为93.1%、91.9%、77.3%、53.5%、42.9%和29.1%,菌株的生长也受到了相应的影响,表明高浓度VB4会抑制WYT的生长及其对VB4的降解^[31]。当VB4初始质量浓度分别50 mg/L和100 mg/L时,脱色率相近,但细胞干重不同。这可能是因为一方面不同浓度的染料对细菌的生长会产生不同影响,脱色可能是细菌本身的脱色,也可能是细菌的分泌物或发酵产物对染料的脱色,虽然最终脱色率相近,但是高染料浓度下的细菌死亡率也高;另一方面细胞干重的测量可能存在误差,导致2种浓度下的细胞干重不同。

2.3 响应面优化VB4降解条件

2.3.1 Plackett-Burman 实验

为筛选出影响VB4降解的主要因子,选取温度、初始接种量、初始pH以及葡萄糖、尿素、微量盐、染料初始浓度设计了2水平的PB实验,结果如表3所示。

实验结果表明,该菌株对VB4的脱色率分布在35.75%~90.41%范围内,说明筛选的因子对脱色率有非常显著的影响。运用Design-Export 8.0.0软件

表 3 Plackett-Burman 实验设计及结果

Table 3 Plackett-Burman design for factors optimization and measured response

实验 序号	温度/ ℃	初始 接种量 (OD ₆₀₀)	pH	葡萄糖/ (g·L ⁻¹)	尿素/ (g·L ⁻¹)	染料/ (mg·L ⁻¹)	微量盐 溶液/ (mL·L ⁻¹)	脱色 率/%
1	40	0.08	6	1.5	1.5	20	2	53.43
2	40	0.08	8	1.5	0.5	80	2	81.88
3	40	0.04	8	0.5	1.5	80	4	44.38
4	40	0.04	8	0.5	1.5	20	2	68.49
5	30	0.04	8	1.5	0.5	80	2	80.62
6	30	0.08	8	0.5	0.5	20	4	90.41
7	40	0.04	6	1.5	0.5	20	4	56.16
8	30	0.04	6	0.5	0.5	20	2	54.79
9	30	0.08	8	1.5	1.5	20	4	68.75
10	40	0.08	6	0.5	0.5	80	4	40.88
11	30	0.08	6	0.5	1.5	80	2	35.75
12	30	0.04	8	1.5	1.5	80	4	38.88

进行回归分析,结果如表 4 所示。

表 4 方差回归模型分析

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for the regression model						
项目	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	影响排名
温度	1	404.43	404.43	9.67	0.036*	3
初始接种量	1	64.23	64.23	1.54	0.283	6
pH	1	1 993.03	1 993.03	47.66	0.002 **	1
葡萄糖	1	168.89	168.89	4.04	0.115	4
尿素	1	753.24	753.24	18.01	0.013*	2
染料	1	105.07	105.07	2.51	0.188	5
微量盐	1	48.00	48.00	1.15	0.344	7
回归统计	7	3 536.90	3 536.90			
误差	4	167.26	41.82			
总计	11	3 704.16				
R ² =0.955						

注:*,显著($P<0.05$);**,较显著($P<0.01$)。

经过数据分析得到一次回归模型如下:

$$\text{VB4 脱色率}(\%)=59.53-5.81A+2.31B+12.89C+3.75D-7.92E-2.96F-2.00G$$

从表 4 可知,模型的 R^2 值为 0.955,说明模型的拟合度较好;pH、尿素浓度以及温度对 VB4 脱色率存在显著影响,其中 pH 的影响最显著,其次是尿素,再次为温度;其他 4 个因素 P 值均大于 0.05,对 VB4 脱色率没有明显影响。由此得出,初始 pH、温度和尿素浓度为影响 VB4 脱色率的关键因素。

2.3.2 最陡爬坡实验

基于 PB 实验的结果,设计 3 个因素温度、pH 和尿素的步长和方向。最陡爬坡实验结果如表 5 所示。

由表 5 可知,pH 对 VB4 脱色率有显著正效应,而温度与尿素浓度对其有显著负效应^[32],且第 4 组的脱色率最高,为 96.37%,故以此为中心进行 CCD

表 5 最陡爬坡实验设计及结果分析

Table 5 The design and results of steepest ascent experiment

实验 序号	温度/ ℃	初始接 种量 (OD ₆₀₀)	pH	葡萄糖/ (g·L ⁻¹)	尿素/ (g·L ⁻¹)	染料/ (mg·L ⁻¹)	微量盐 溶液/ (mL·L ⁻¹)	脱色 率/%
1	45		4		1.8			21.37
2	40		5		1.5			40.35
3	35	0.06	6	1.0	1.2	50	2	70.28
4	30		7		0.9			96.37
5	25		8		0.6			94.66
6	20		9		0.3			90.24

优化。

2.3.3 CCD 实验设计及结果

根据 PB 实验及爬坡实验的结果,确定 CCD 实验的因素和水平,并利用 Design-Export 8.0.0 设计 CCD 实验。CCD 实验设计与结果如表 6 所示。

表 6 CCD 实验设计及结果

Table 6 Operational variables for CCD matrix and responses

序号	变量			脱色率/%	
	温度/℃	pH	尿素/(g·L ⁻¹)	测定值	预测值
1	35	7	1.4	69.04	64.25
2	30	8	0.6	55.67	52.30
3	35	7	0.9	99.67	97.24
4	30	6	0.6	24.00	20.96
5	40	8	1.2	50.26	46.21
6	35	7	0.9	93.04	97.24
7	43	7	0.9	33.35	33.13
8	35	7	0.9	97.93	97.24
9	35	7	0.9	98.04	97.24
10	40	8	0.6	67.51	67.44
11	30	6	1.2	61.33	60.40
12	35	5.32	0.9	19.78	22.49
13	40	6	1.2	24.84	27.22
14	40	6	0.6	15.09	10.30
15	35	7	0.9	99.34	97.24
16	27	7	0.9	46.66	45.22
17	35	8.68	0.9	71.76	69.87
18	35	7	0.4	37.63	43.86
19	35	7	0.9	95.69	97.24
20	30	8	1.2	55.87	59.66

基于 CCD 实验结果,得到如下数学回归模型:

$$Y=97.24-4.51A+14.10C+6.07E+6.45AC-5.63AE-8.02CE-20.03A^2-18.09C^2-15.30E^2$$

方差分析结果如表 7 所示。

方差分析结果表明, C 、 A^2 、 C^2 和 E^2 4 个因素是影响 WYT 降解 VB4 的最决定性变量($P<0.000\ 1$),其余因素则非常显著($P<0.01$)。模型失拟项的 P 值为 0.057 5,说明该模型对响应值的拟合效果较好;相关系数 $R^2=0.989\ 1$,说明方程的拟合度很好,可以用该方程进行实验结果预测^[33]。

表 7 响应面模型的方差分析

Table 7 ANOVA for response surface quadratic model					
误差	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A-温度	277.47	1	277.47	15.49	0.002 8**
C-pH	2 713.46	1	2 713.46	151.53	<0.000 1***
E-尿素浓度	502.44	1	502.44	28.06	0.000 3**
AC	333.21	1	333.21	18.61	0.001 5**
AE	253.46	1	253.46	14.15	0.003 7**
CE	514.08	1	514.08	28.71	0.000 3***
A ²	5 761.66	1	5 761.66	321.74	<0.000 1***
C ²	4 703.24	1	4 703.24	262.64	<0.000 1***
E ²	3 364.57	1	3 364.57	187.88	<0.000 1***
残差	179.08	10	17.91		
失拟项	147.61	5	29.52	4.69	0.057 5 不显著
纯误差	31.46	5	6.29		
所有项	16 374.38	19			

注:*,显著($P<0.05$);**,较显著($P<0.01$);***,极显著($P<0.000 1$);
 $R^2=0.989 1$;Adj $R^2=0.979 2$;预测 $R^2=0.927 5$ 。

2.3.4 主效应因子间的交互作用

主效应因子间的交互作用如图 9 所示。

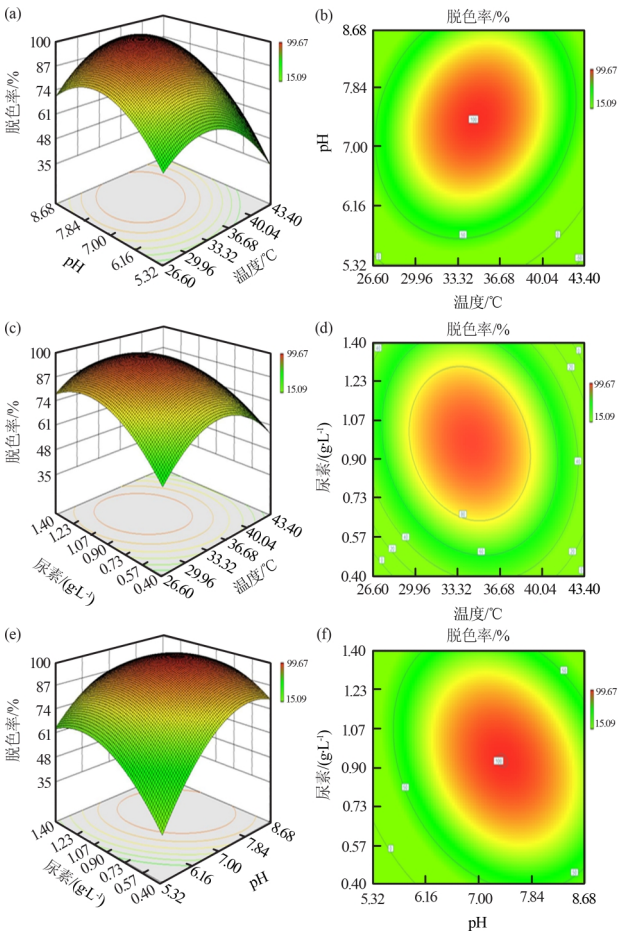


图 9 影响 VB4 脱色的响应面及等值线图

Fig. 9 Response surface and contour plot of the VB4 degradation rate

由图 9(a)可知,温度与培养基初始 pH 的交互作用显著。VB4 脱色率随着温度和 pH 的增加先迅速上升,然后迅速下降,在温度为 35 ℃,pH 为 7.0 时,脱色率最高。图 9(c)与图 9(d)展示了温度与尿素浓度对脱色率的影响,可明显看到最优条件包含在测试的范围内。图 9(e)中的 2 个轴相对陡峭,说明培养基初始 pH 和尿素浓度的相互作用对 VB4 脱色有显著影响。

CCD 实验结果表明,温度、初始 pH 及尿素浓度之间的交互作用均显著。利用模型得出 VB4 脱色率的最大预测值为 97.24%,最佳的脱色条件:温度 35.37 ℃,pH 7.35,尿素质量浓度 0.95 g/L。

2.3.5 模型验证

为了验证模型的准确性和有效性,按照优化后的 VB4 脱色条件进行 3 组平行实验,24 h 后测定脱色率。结果表明,与初始条件相比,脱色率从 85%提高到 97%。由模型预测的脱色率为 97.24%,非常接近实际值,说明模型能够比较准确地预测各因素对 VB4 脱色率的影响。

3 结论

(1)本研究从印染活性污泥中筛选分离到 1 株能降解 VB4 染料的脱色菌株,经过菌落形态观察、生理生化鉴定以及 16S rRNA 测序分析,初步鉴定为假单胞菌属,暂命名为 WYT。

(2)通过单因素实验得到菌株 WYT 降解 VB4 的最佳条件:培养温度 35.0 ℃,初始接种量 0.06,pH 7.0,葡萄糖 1.0 g/L,尿素 1.0 g/L,VB4 初始质量浓度 50 mg/L,微量盐溶液投加量 2 mL/L。

(3)采用 Plackett-Burman 实验设计筛选出影响 WYT 菌株降解 VB4 的主要因素为温度、尿素浓度和初始 pH,其中初始 pH 为影响最大的因素。应用响应面实验确定了 WYT 菌株降解 VB4 的最佳条件:温度 35.37 ℃,尿素质量浓度 0.95 g/L,pH 7.35,在此条件下 VB4 脱色率可达 97.0%。

参考文献

[1] RU Jiang,FU Yongqian,ZHU Huayue,et al. Removal of methyl orange from aqueous solutions by magnetic maghemite/chitosan nanocomposite films: Adsorption kinetics and equilibrium[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2012, 125(S2): E540-E549.

[2] YAN Han,LI Haijiang,YANG Hu,et al. Removal of various cationic dyes from aqueous solutions using a kind of fully biodegradable ma-

- gnetic composite microsphere [J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 223:402-411.
- [3] 邹新振, 李美真. 活性蓝 FNR 降解脱色菌的培养及其脱色性能的研究[J]. 染料与染色, 2012, 49(1):56-58.
- [4] BINUPRIYA A R, SATHISHKUMAR M, KU C S, et al. Sequestration of Reactive Blue 4 by free and immobilized *Bacillus subtilis* cells and its extracellular polysaccharides [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 76(1):179-185.
- [5] PANDEY A, SINGH P, IYENGAR L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2007, 59(2):73-84.
- [6] 陈瑶, 梁红昌, 吴晓玉. 微生物对蒽醌类染料废水脱色的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008(18):7896-7899.
- [7] 王静, 陆万祥. 蒽醌染料废水处理技术综述[J]. 河南科技, 2017(9):130-131.
- [8] 刘露, 张汪群. 蒽醌类染料废水处理技术研究进展[J]. 四川化工, 2019, 22(2):16-19.
- [9] PARMAR N D, SHUKIA S R. Biodegradation of anthraquinone based dye using an isolated strain *Staphylococcus hominis subsp. hominis* DSM 20328 [J]. Environmental Progress & Sustainable Energy, 2018, 37(1):203-214.
- [10] 王魁, 马俊, 柴春玲. 蒽醌类染料废水处理研究进展[J]. 印染, 2018, 44(4):48-53.
- [11] OLAGANATHAN R, PATTERSON J. Decolorization of anthraquinone Vat Blue 4 by the free cells of an autochthonous bacterium, *Bacillus subtilis* [J]. Water Science and Technology, 2009, 60(12):3225-3232.
- [12] BISSCHOPS I A E, SPANJERS H. Literature review on textile wastewater characterisation [J]. Environmental Technology, 2003, 24(11):1399-1411.
- [13] AHMAD A, MOHD-SETAPAR S H, CHUONG C S, et al. Recent advances in new generation dye removal technologies; Novel search for approaches to reprocess wastewater [J]. RSC Advances, 2015, 5:30801-30818.
- [14] HANIFZADEH M, SARRAFZADEH M H, NABATI Z, et al. Technical, economic and energy assessment of an alternative strategy for mass production of biomass and lipid from microalgae [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, 6(1):866-873.
- [15] NARAIAN R, KUMARI S, GAUTAM R L. Biodecolorization of brilliant green carpet industry dye using three distinct *Pleurotus* spp. [J]. Environmental Sustainability, 2018, 1:141-148.
- [16] CHAUDHARI A U, PAUL D, DHOTRE D, et al. Effective biotransformation and detoxification of anthraquinone dye reactive blue 4 by using aerobic bacterial granules [J]. Water Research, 2017, 122:603-613.
- [17] POPLI S, PATEL U D. Destruction of azo dyes by anaerobic-aerobic sequential biological treatment; A review [J]. International Journal of Environmental Science & Technology, 2015, 12(1):405-420.
- [18] 周璇, 张丹, 冯刚, 等. 一株活性黑染料脱色菌株的分离及其特性研究[J]. 黄冈师范学院学报, 2013, 33(6):42-45.
- [19] 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.
- [20] POLYMENAKOU P N, STEPHANOU E G. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas* [J]. Biodegradation, 2005, 16(5):403-413.
- [21] ZHOU Jiangya, YU Xiaojuan, DING Cong, et al. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology [J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(1):22-30.
- [22] PAN C M, FAN Y T, XING Y, et al. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fnp2 [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8):3146-3154.
- [23] 张晓萍, 杨静, 勇强, 等. 响应面优化法在纤维素酶合成培养基设计上的应用[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(3):29-34.
- [24] NELSON P R. Design and analysis of experiments, 3rd Ed [J]. Journal of Quality Technology, 1991, 23(4):375.
- [25] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3):91-94.
- [26] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006(1):38-41.
- [27] 周玉史, 陈东之, 金小君, 等. 食油假单胞菌 DT4 菌株对四氢呋喃(THF)的降解特性[J]. 环境科学, 2011, 32(1):266-271.
- [28] 於建明, 刘舰, 蔡文吉, 等. 一株苯乙烯高效降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2014, 34(6):1564-1571.
- [29] SADYKOV M R, THOMAS V C, MARSHALL D D, et al. Inactivation of the Pta-AckA pathway causes cell death in *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(13):3035-3044.
- [30] DU Linna, WANG Sheng, LI Gang, et al. Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition; Characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity [J]. Ecotoxicology, 2011, 20(2):438-446.
- [31] CHEN K C, WU J Y, LIOU D J, et al. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 101(1):57-68.
- [32] 葛启隆, 岳秀萍, 王国英. 一株苯酚降解菌的分离鉴定及响应面法优化其固定化[J]. 中国环境科学, 2014, 34(2):518-525.
- [33] 贺强礼, 刘文斌, 杨海君, 等. 1 株对叔丁基邻苯二酚降解菌的筛选鉴定及响应面法优化其降解[J]. 环境科学, 2015, 36(7):2695-2706.
- 【作者简介】 邓田田(1996—), 硕士研究生。电话:17868811952, E-mail:2391446711@qq.com。通讯作者:李海红, E-mail:1624116019@qq.com。
- 【收稿日期】 2021-07-16(修改稿)