

高效苯酚降解菌 PDB1 的筛选及降解特性研究

王图锦 潘 瑾 刘雪莲

(重庆交通大学河海学院,重庆 400074)

摘 要 从一个焦化厂受污染土壤中分离获得一株具有高效降解苯酚能力的不动杆菌属细菌 PDB1,以苯酚为唯一碳源和能源对该菌株降解特性进行研究。结果表明:在初始苯酚浓度低于 1 200 mg/L 时,该菌株能够在 60 h 内完全降解苯酚;在更高苯酚浓度下,高浓度苯酚对菌株生长造成明显抑制,菌株降解能力出现显著下降。对该菌株苯酚降解动力学过程进行模拟,苯酚降解符合基质抑制型的 Haldane 模型;当初始苯酚浓度低于 144.56 mg/L 时,苯酚比降解速率随苯酚浓度增大而增大;在苯酚浓度为 144.56 mg/L 时,得到最大比降解速率,苯酚浓度高于 144.56 mg/L 时,苯酚比降解速率逐渐下降。该菌株降解苯酚最适温度为 25~40 ℃,pH 为 7.0~8.0,菌株具有良好的高盐分耐受性,能够耐受 5% NaCl 浓度并取得良好降解效果。

关键词 苯酚 生物降解 降解动力学 抑制

中图法分类号 X172; **文献标志码** B

苯酚及其衍生物大量存在于印染、石化、炼焦、制药等工业废水中。酚类污染物具有难生物降解性、高毒性、具有致癌作用等特征,进入环境中对动植物及人类健康造成极大威胁^[1,2],因此美国国家环境保护总署将其列入优先控制污染物,在我国也被列入具有致癌性单环芳烃,是优先监测的持久性有机污染物。因此去除废水中酚类化合物具有重要意义。目前国内外处理含酚工业废水常用的方法有物理法(例如萃取法、盐析法、膜技术、吸附法)、化学法(例如光催化氧化、电化学氧化、Fenton 试剂)和生物法^[3]。生物法是利用微生物对酚类物质的降解作用而达到去除目的,由于生物降解法具有经济高效、无二次污染等特点而被广泛使用^[4]。性能优良的降酚菌株是生物法的关键,苯酚能够被众多微生物有效降解,目前已知具有苯酚降解能力的菌种有假丝酵母、假单胞菌、苍白杆菌等^[5-7]。由于菌株易变异特性,通常由于菌种的退化而导致含酚废水处理能力的下降,因此筛选具有优良性状、性能稳定的菌种,扩大菌种资源库具有重要的实际应用价值。

本研究从一个焦化厂厂区受污染土壤中分离得到一株对苯酚具有优良降解效果的菌株,笔者对该菌株降酚能力,以及影响因素进行分析,以期能够为含酚废水的处理提供优良菌株,为菌株的工程应用打下基础。

1 实验材料与方法

1.1 培养基配制

无机盐培养基(以苯酚为唯一碳源)^[8]:
KH₂PO₄ 0.5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L, NH₄NO₃ 1.0 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, NaCl 0.2 g/L, MnSO₄·H₂O 0.01 g/L, H₂O 1 000 mL,根据需要添加苯酚。

1.2 菌种筛选

以某焦化厂受污染土壤作为富集材料,取 1 g 土壤加入装有 100 mL 培养基的锥形瓶中,苯酚初始浓度为 400 mg/L,锥形瓶置于恒温振荡器,于 30 ℃、150 r/min 条件下培养约 7 d,培养液变浑浊后,将培养液转接于苯酚浓度为 800 mg/L 的培养基中进一步驯化,以此方法使用苯酚浓度为 1 000 mg/L, 1 200 mg/L 的培养基进行梯度驯化。富集液采用平板涂布的方式涂布于苯酚浓度为 1 000 mg/L 的固体培养基。30 ℃ 恒温培养,待长出菌落后,挑取单菌落划线分离获得纯菌株。

1.3 菌种鉴定——16SrDNA 序列测定

PCR 模板的制备:使用无菌牙签挑取少许纯菌落,加入 30 μL 无菌水中搅拌混匀,98 ℃ 高温下加热 5 min,裂解液转移至 1.5 mL 离心管中,10 000 r/min 条件下离心 5 min,取上清液备用。

使用细菌 16S rDNA 通用引物^[9]进行 PCR 扩

2016 年 7 月 29 日收到

重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2014jcyjA20011)资助
第一作者简介:王图锦(1981—),汉族,讲师。研究方向:环境微生物。E-mail:wangtujian@163.com。

引用格式:王图锦,潘 瑾,刘雪莲. 高效苯酚降解菌 PDB1 的筛选及降解特性研究[J]. 科学技术与工程,2017,17(2): 301—304

Wang Tujin, Pan Jin, Liu Xuelian. Breeding of phenol-degradation bacteria and study on phenol biodegradation by the strain PDB1[J]. Science Technology and Engineering, 2017, 17(2): 301—304

增。PCR 正向引物 8F: AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG, 反向引物 1495R: CTACGGCTACCTTGT-TACGA。25 μL 的反应体系: 10 $\times$ buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL , 10 mmol/L dNTP 0.5 μL , 10 pmol/L 引物各 1 μL , 简易 DNA 模板 2 μL , 2.5 U TaqDNA 聚合酶。PCR 温度条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min; 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 结束反应。上海生工生物工程有限公司完成 DNA 测序。16S rDNA 序列提交至 GenBank 数据库进行比对分析。

1.4 PDB1 菌株降酚影响因素分析

PDB1 接种液制备: 将斜面保存的菌种接种至无机盐培养基中(苯酚浓度为 500 mg/L), 培养至对数生长期, 菌液于 3 000 r/min 条件下离心 10 min, 菌泥经去离子水洗涤后用不含苯酚的无机盐培养基调配(OD_{600} 为 1)。

1.4.1 苯酚初始浓度影响实验

以 10% 的接种量接种菌液至苯酚初始浓度为 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L, 1 000 mg/L, 1 200 mg/L, 1 400 mg/L 的培养液中, 在恒温振荡器中以 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 条件下培养, 每隔 3 h 测量溶液中苯酚浓度, 连续培养 60 h, 观察不同苯酚初始浓度对苯酚降解率的影响。

苯酚降解动力学分析: 由于苯酚既是微生物生长的底物又是抑制剂, 使用 Haldane 方程模拟底物降解动力学过程^[10], 方程式为:

$$v_{\text{phenol}} = \frac{v_{\text{max, phenol}} C_{\text{phenol}}}{K_s + C_{\text{phenol}} + C_{\text{phenol}}^2 / K_{\text{SI}}}$$

(v_{phenol} : 苯酚比降解速率, h^{-1} , C_{phenol} : 苯酚浓度, mg/L; $v_{\text{max, phenol}}$: 苯酚最大比降解速率, h^{-1} , K_s : 半饱和常数, mg/L; K_{SI} : 抑制常数, mg/L), 对不同苯酚初始浓度及其对应的比降解速率作关系图, 采用 Matlab 软件按照 Haldane 方程进行非线性最小二乘曲线拟合。

1.4.2 温度影响实验

以 10% 的接种量接种菌液至 100 mL 无机盐培养液中, 苯酚初始浓度为 600 mg/L, 培养温度设置为 15 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 30 $^{\circ}\text{C}$, 35 $^{\circ}\text{C}$, 40 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$, 于 150 r/min 条件下培养 48 h 后取样测试残余苯酚浓度及菌液 OD_{600} 。

1.4.3 pH 影响实验

以 10% 的接种量接种菌液至 100 mL 无机盐培养液中, 苯酚初始浓度为 600 mg/L, 调节培养液 pH 为 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 于 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 条件下培养 48 h 后取样测试残余苯酚浓度及菌液 OD_{600} 。

1.4.4 盐浓度影响实验

以 10% 的接种量接种菌液至 100 mL 无机盐培养液中, 苯酚初始浓度为 600 mg/L, 调节 NaCl 浓度为 0, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 于 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 条件下培养 48 h 后取样测试残余苯酚浓度及菌液 OD_{600} 。

1.5 苯酚浓度测试方法

采用 4-氨基安替比林法测定苯酚浓度^[11]。

2 实验结果与讨论

2.1 菌株的分离

通过富集驯化, 及分离纯化获得一株对苯酚具有良好降解效果的细菌 PDB1。测定 16S rDNA 核酸序列, 并将序列在 GenBank 数据库中作比对分析, 结果表明此序列与不动杆菌细菌相似度达到 98%, 根据同源性分析结果该菌株鉴定为不动杆菌属细菌。

2.2 苯酚初始浓度对降解率的影响

不同苯酚初始浓度下苯酚随时间降解效果如图 1 所示。苯酚初始浓度为 100 mg/L 时, 在 18 h 内苯酚被完全降解, 随着苯酚初始浓度的增高, 完全降解所需的时间逐渐延长, 当苯酚浓度达到 1 400 mg/L, 苯酚 60 h 内不能被完全降解, 最终降解率为 34.14%。由此可见, 在较高苯酚浓度下菌株的生长受到严重抑制, 使得苯酚难以被降解。

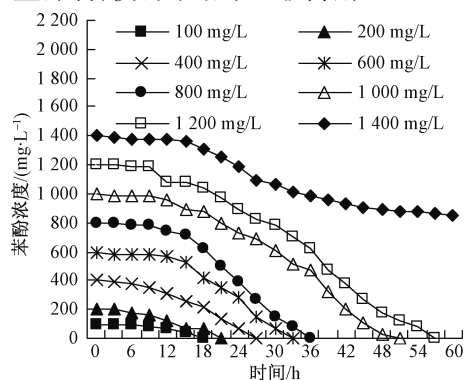


图 1 不同苯酚初始浓度的培养基中 PDB1 对苯酚降解特征
Fig. 1 Biodegradation of phenol by PDB1 in medium containing different initial phenol concentration

苯酚降解动力学曲线如图 2 所示。按照 Haldane 方程拟合可得 $v_{\text{phenol}} = 0.278 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 99.51 \text{ mg/L}$, $K_{\text{SI}} = 210 \text{ mg/L}$ 。从图 2 可看出该模型拟合较好, 相关系数 R^2 为 0.989。对原方程求导可知最大比降解速率所对应的苯酚浓度为 144.56 mg/L。

苯酚初始浓度小于 144.56 mg/L 时, 菌株 PDB1 对苯酚的比降解速率随苯酚初始浓度的升高而增大, 当苯酚浓度大于 144.56 mg/L 时, 比降解速率随

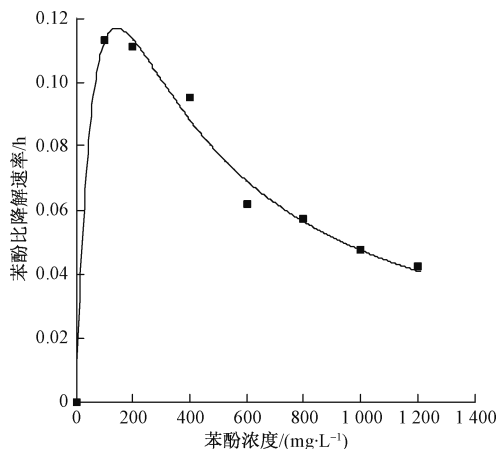


图2 PDB1 苯酚降解动力学

Fig. 2 Phenol degradation kinetics of PDB1

苯酚初始浓度的增加呈下降趋势,底物产生抑制作用。

2.3 温度对菌株 PDB1 降解苯酚的影响

温度是微生物生理代谢活动的重要影响因素之一,微生物对环境温度通常具有一定适应范围。从图3可以看出,菌株 PDB1 在温度范围为 25 ~ 40 °C,能够较好的利用苯酚生长,在 48 h 内 OD_{600} 增长迅速,同时苯酚达到完全降解,当温度低于 25 °C 或高于 40 °C 时,菌株代谢活动减慢,苯酚降解率显著下降。

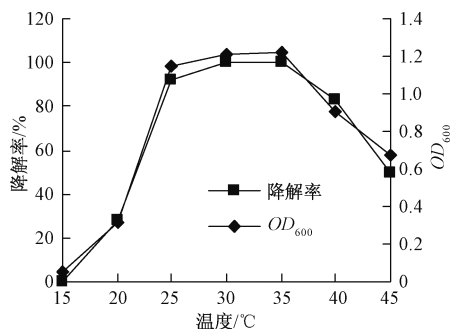


图3 温度对苯酚降解及 PDB1 生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature on phenol degradation and growth of PDB1

2.4 pH 对菌株 PDB1 降解苯酚的影响

pH 是影响微生物生长的另一重要因素。由图4可以看出,pH 在 7~8 之间时菌株生长快速,苯酚得到快速降解。当 pH 小于 7 或 pH 大于 8 时,苯酚降解率和 OD_{600} 都呈现显著下降,可见菌株最佳降解 pH 为 7~8 之间。

2.5 NaCl 浓度对菌株 PDB1 降解苯酚的影响

通常在高含酚废水中盐浓度也较高,过高的盐浓度对微生物的生长构成抑制作用,不利于苯酚的生物降解^[12]。菌株对 NaCl 的耐受能力如图5所示。从图5可看出,在 NaCl 浓度在 0~5% 之间,48

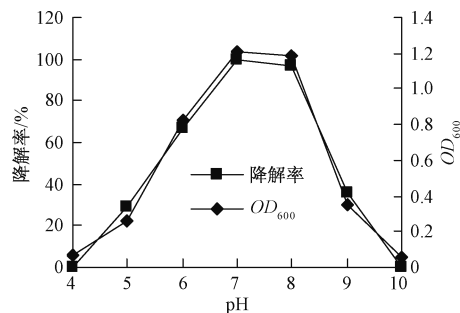


图4 pH 对苯酚降解及 PDB1 生长的影响

Fig. 4 Effect of pH on phenol degradation and growth of PDB1

h 内 600 mg/L 的苯酚可被完全降解,当 NaCl 浓度超过 5% 时,苯酚降解效果受到显著影响,48 h 内降解率下降明显,菌株的生长也受到极大抑制。可见,菌株对盐浓度具有很好的耐受性,能够耐受最高 5% 的 NaCl 浓度。

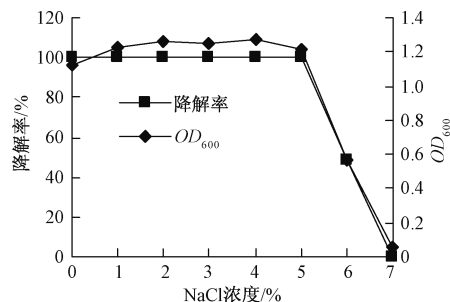


图5 NaCl 浓度对苯酚降解及 PDB1 生长的影响

Fig. 5 Effect of NaCl concentration on phenol degradation and growth of PDB1

3 结论

(1)通过富集驯化、平板分离获得对苯酚具有良好降解效果的菌株 PDB1,经 16S rDNA 序列分析,该菌株属于不动杆菌属细菌。

(2)当初始苯酚浓度低于 1 200 mg/L 时苯酚在 60 h 内可被完全降解,所需的时间随着初始苯酚浓度的升高而延长,当苯酚浓度达到 1 400 mg/L,高浓度苯酚对菌株的生长造成抑制,苯酚不能被完全降解。苯酚最大比降解速率所对应的苯酚浓度为 144.56 mg/L。

(3) PDB1 降解苯酚最适温度范围为 25~40 °C 之间,最适 pH 在 7~8 之间,菌株能耐受最高 5% NaCl 浓度并取得良好苯酚降解效果。

参考文献

- 何熙璞,刘鸿杰,陈加辉,等. 高效苯酚降解复合菌群的构建及其降解性能. 高等化学工程学报, 2014; 28(2): 298—304

- He Xipu, Liu Hongjie, Chen Jiahui, *et al.* Construction and characterization of a high-efficient phenol degradation bacterial consortium. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2014; 28(2): 298—304
- 2 Banerjee A, Ghoshal A K. Phenol degradation performance by isolated bacillus cereus immobilized in alginate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011; 65: 1052—1060
- 3 葛启隆, 岳秀萍, 王国英, 等. 好氧反硝化苯酚降解菌的分离鉴定及动力学. *环境工程学报*, 2014; 8(6): 2605—2610
Ge Qilong, Yue Xiuping, Wang Guoying, *et al.* Isolation and identification of aerobic denitrifying phenol-degrading strain and its kinetic. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014; 8(6): 2605—2610
- 4 魏 伟, 隋 玉, 都兴川, 等. 从土壤中分离选育高效降酚菌. *沈阳建筑大学学报(自然科学版)*, 2014; 30(3): 547—552
Wei Wei, Sui Yu, Du Xingchuan, *et al.* The research on isolating high-efficiency phenol degrading strains from soil. *Journal of Shenyang Jianzhu University (Natural Science)*, 2014; 30(3): 547—552
- 5 Shourian M, Noghabi K A, Zahiri H S, *et al.* Efficient phenol degradation by a newly characterized pseudomonas sp. SA01 isolated from pharmaceutical wastewater. *Desalination*, 2009; 246 (1-3): 577—594
- 6 陈晓华, 魏 刚, 刘思远, 等. 高效降酚菌株 *Ochrobactrum* sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究. *环境科学*, 2012; 33(11): 3956—3961
Chen Xiaohua, Wei Gang, Liu Siyuan, *et al.* Growth kinetics and phenol degradation of highly efficient phenol-degrading *ochrobactrum* sp. CH10. *Environmental Science*, 2012; 33(11): 3956—3961
- 7 沈锡辉, 刘志陪, 王保军, 等. 苯酚降解红球菌 PNAN5 菌株的分离鉴定, 降解特性及开环加氧酶性质研究. *环境科学学报*, 2004; 24(3): 482—486
Shen Xihui, Liu Zhipai, Wang Baojun, *et al.* Isolation, identification of phenol-degrading rhodococcus sp. strain PNAN5 and characterization of its ring-cleavage dioxygenases. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004; 24(3): 482—486
- 8 陈 春, 李文英, 吴静文, 等. 焦化废水中苯酚降解菌筛选及其降解性能. *环境科学*, 2012; 33(5): 1643—1656
Chen Chun, Li Wenying, Wu Jingwen, *et al.* Screening and characterization of phenol degrading bacteria for the coking wastewater treatment. *Environmental Science*, 2012; 33(5): 1643—1656
- 9 Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol*, 1995; 59:143—169
- 10 张玉秀, 蒙小俊, 柴团耀. 苯酚降解菌红球菌 (*Rhodococcus* sp.) P1 的鉴定及其在焦化废水中的应用. *微生物学报*, 2013; 53(10): 1117—1124
Zhang Yuxiu, Meng Xiaojun, Chai Tuanyao. Characterization of phenol-degrading rhodococcus sp. strain P1 from coking wastewater. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013; 53(10): 1117—1124
- 11 国家环境保护局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1997: 408—410
Editorial Board of National Environmental Protection Bureau. Detection and analysis methods of water and wastewater. Beijing: China Environmental Science Press, 1997: 408—410
- 12 Jiang Y, Yang K, Wang H Y, *et al.* Characteristics of phenol degradation in saline conditions of a halophilic strain JS3 isolated from industrial activated sludge. *Marine Pollution Bulletin*, 2015; 99: 230—234

Breeding of Phenol-degradation Bacteria and Study on Phenol Biodegradation by the Strain PDB1

WANG Tu-jin, PAN Jin, LIU Xue-lian

(School of River and Ocean Engineering, Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, P. R. China)

[**Abstract**] A bacterial strain which could degrade phenol with high efficiency was isolated from the polluted soils in a coke plant. The strain was named PDB1 and was identified as the genus *Acinetobacter* sp with 16S rRNA gene sequence. Biodegradation was investigated in details with phenol as the sole carbon and energy source. The results indicated that PDB1 could utilize phenol as a sole source of carbon and could degrade less than 1 200 mg/L phenol completely in 60 h, but higher phenol concentrations had an inhibitory effect. The process of phenol degradation was investigated using Haldane kinetic model. Phenol degradation kinetic studies indicated that the degradation followed Haldane's model. The optimal concentration of initial phenol was 144.56 mg/L. The rate of phenol degradation increased with increasing initial phenol concentrations up to 144.56 mg/L. Further increase in initial phenol concentrations caused decrease in the rate of phenol degradation because of substrate inhibition. The optimal conditions for biodegradation of phenol were at 25 ~ 40 °C, pH 7.0 ~ 8.0 and 0 ~ 5% NaCl.

[**Key words**] phenol biodegradation degradation kinetics inhibition