

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(10):1117-1124; 4 October 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>

## 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

张玉秀<sup>1</sup>, 蒙小俊<sup>1</sup>, 柴团耀<sup>2</sup>

<sup>1</sup>中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083

<sup>2</sup>中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

**摘要:**【目的】酚类物质的去除是焦化废水处理的关键问题, 目的是从焦化废水中分离高效的苯酚降解细菌。【方法】以苯酚为唯一碳源筛选纯化降解苯酚细菌, 菌株鉴定采用菌落形态和 16S rRNA 序列分析方法, 并研究其苯酚降解特性和在焦化废水中的除酚作用。【结果】菌落形态和 16S rRNA 序列比对分析表明分离的 P1 菌株为红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 细菌; 其耐酚浓度高达 1400 mg/L, 苯酚降解的最适条件为 32℃ - 42℃、pH 7.0 和 0 - 4% 盐; 苯酚降解动力学曲线符合 Haldane 动力学模型,  $q_{max} = 0.517/h$ ,  $K_s = 77.487 \text{ mg/L}$ ,  $K_i = 709.965 \text{ mg/L}$ ; 不同重金属对红球菌 P1 菌株的苯酚降解抑制作用不同,  $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和低浓度的  $Pb^{2+}$  对菌株降酚没有影响,  $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$  均抑制菌株对酚的降解; 红球菌 P1 菌株 2 d 内可完全降解 1/3 焦化原水中的 279.9 mg/L 酚类物质。【结论】P1 菌株是 1 株高效的苯酚降解菌, 具有生物处理焦化废水酚类物质的潜力。

**关键词:**红球菌 (*Rhodococcus* sp.), 苯酚, 生物降解, 重金属, 焦化废水

**中图分类号:**X172      **文献标识码:**A      **文章编号:**0001-6209 (2013)10-1117-08

炼焦、合成氨、造纸、木材防腐和化工行业是含酚废水的主要来源, 其中炼焦产生的废水是一种典型的高浓度难降解有毒工业有机废水。焦化废水主要含有酚类、苯系物、喹啉、吡啶和胺类等难降解有机物以及氨、硫化物、氰化物和多种重金属 (Cd、Pb、Zn 和 Mn) 离子等无机物, 其中亲水性的苯胺、苯酚和喹啉以及疏水性的甲基取代酚类物质分别占溶解性有机物 (DOC) 的 44% 和 32%, 而胺类和含氮杂环化合物以及吡啶及其衍生物含量低于 24%<sup>[1-2]</sup>, 对环境危害的主要组分是挥发酚和氨氮。酚类属于难

降解物, 具有高毒性和致癌作用, 含酚焦化废水的排放或回用, 不但对土壤和水体生态环境造成严重的污染, 而且严重危害人类的健康。所以, 酚类物质的去除对于焦化废水的循环利用、清洁生产 and 降低环境污染具有重要意义。

含酚废水处理技术包括蒸馏、液液萃取、吸附、渗透蒸发、高级氧化和生物处理等, 生物活性污泥法是焦化废水处理最经济、有效和易操作的处理方法。然而, 由于有毒难降解有机物浓度高, 抑制微生物的生长, 现有的处理工艺并不能完全矿化其中的酚类

**基金项目:**国家“863 计划”(2009AA06Z320, 2006AA10Z407); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2010YH05); 中国矿业大学(北京)教学建设项目 (t120301)

**作者简介:**张玉秀(1962-), 女, 博士, 研究方向为环境生物学。Tel: +86-10-62331792; E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn

**收稿日期:**2012-11-01; **修回日期:**2013-03-12

物质,致使出水中的 COD 超过排放标准<sup>[3]</sup>,即使达标排放的出水对环境仍然存在累计的污染效应,因此分离鉴定高效持久的苯酚降解菌株是焦化废水酚类物质去除的关键。

多种苯酚降解菌株已在皮革废水、石油污染土壤和河流底泥中分离鉴定,如在皮革废水中分离的红球菌(*Rhodococcus* sp.)<sup>[4]</sup>和在石油化工废水分离的芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)<sup>[5]</sup>,在石油污染土壤分离的弗氏柠檬酸细菌(*Citrobacter freundii*)和奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)<sup>[6]</sup>及酵母菌(*Trichosporon montevidense*)<sup>[7]</sup>,在河流底泥分离的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)等<sup>[8]</sup>。近年来,焦化废水酚类降解菌的筛选鉴定受到广泛关注,如洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*) PW3 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) AT2 能在1000 mg/L苯酚中生长<sup>[9]</sup>,鞣丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosterone*) D2 菌株在48 h内可完全降解1000 mg/L苯酚<sup>[10]</sup>,*Gulosibacter* sp. YZ4 能在10℃ - 42℃和pH 5 - 11 条件下降解1000 mg/L苯酚<sup>[11]</sup>,而间甲酚和喹啉可抑制宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*) JH6 的苯酚降解速率<sup>[12]</sup>,表明苯酚降解菌是生物法处理焦化废水的优质种质资源。焦化废水活性污泥中的苯酚降解菌具有生物多样性<sup>[13]</sup>,尽管在焦化废水分离出一些苯酚降解菌,但用于强化焦化废水生物处理的菌株未见报道<sup>[14]</sup>,而在其他废水或土壤中分离的苯酚降解菌不一定适用于焦化废水处理,所以,迫切需要分离鉴定能在焦化废水中生长的苯酚降解菌,为强化生物除酚技术和生物反应器的设计提供基础。本研究主要报道红球菌 P1 菌株的苯酚降解特性、降解动力学及对焦化废水酚类物质的降解潜力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:**苯酚(北京笃信精细制剂厂);磷酸二氢钾、硝酸铵、氢氧化钠(北京化工厂);硫酸镁(北京精求化工有限责任公司);硫酸亚铁、氯化钙(北京益利精细化学品有限公司);硫酸锰(北京世纪红星化工有限责任公司);其他药品购于国药集团化学试剂有限公司;气浴摇床(太仓市实验设备厂);台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机

仪器有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(杭州科博仪器有限公司);7200 型分光光度计(南京联创分析仪器有限公司);紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);PCR system 9700(Gene Amp);PB-10 型精密 pH 计(Sartorius);环境扫描电子显微镜(FEI 公司)。

**1.1.2 培养基:**(1)牛肉膏蛋白胨培养基;(2)无机盐培养基(g/L): $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0 g、 $\text{MgSO}_4$  0.2 g、 $\text{CaCl}_2$  0.2 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01 g, pH7.0 - 7.2, 121℃ 高压灭菌20 min,苯酚浓度根据需要量配制。

### 1.2 苯酚降解菌株的筛选、驯化与鉴定

取5 mL某焦化厂二次沉淀池的焦化废水,接种于100 mL牛肉膏蛋白胨培养基中,37℃、180 r/min 震荡培养至浑浊后,按照5%的接种量转接到400 mg/L苯酚的无机盐培养基中富集。培养液浑浊后逐级提高苯酚浓度,直到菌株在苯酚浓度为1400 mg/L的培养基中不能变浑浊时,将苯酚浓度为1000 mg/L的细菌培养液涂布在1000 mg/L苯酚的无机盐固体平板上,30℃恒温培养48 h后,待培养基长出菌落后,挑取单菌落划线分离培养多次后获单菌株。

用扫描电子显微镜观察细胞形态特征,菌株鉴定采用形态观察和16S rRNA 序列 PCR 分析方法。16S rRNA 扩增的引物为 F-primer F27: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3; R-primer R1492: 5'-GGCTACCTT GTTACGACTT-3'。扩增产物由北京华大基因公司测序,利用 BLAST 程序与 NCBI 中的已知序列进行序列比对分析。驯化的菌株用于后续的实验研究。

### 1.3 菌株生长曲线的测定

将驯化的菌株活化10 - 16 h至对数生长期, $OD_{600}$ 为1.0 - 1.5 时离心分离菌体,用等体积的无机盐洗涤两次,重新悬浮于无机盐培养基( $OD_{600}$  1.0)中,以5% (V/V)的接种量接种于600 mg/L苯酚的无机盐培养基中,37℃、180 r/min 振荡培养,4 h 取样1次,测定菌株生物量( $OD_{600}$ )和培养基 pH,试验重复3次,结果取其平均值。

### 1.4 环境条件对菌株苯酚降解效率的影响

活化的菌体悬浮于无机盐培养基( $OD_{600}$  1.0)中,以5%的接种量接种于初始浓度为600 mg/L苯酚的无机盐培养基中,在不同的温度(23、28、32、37、

42 和 47℃)、pH(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0) 或 NaCl 浓度(0、1、2、4、6 和 8% (W/V)) 等条件下 180 r/min 振荡培养, 同时, 以相同条件下未加菌的 600 mg/L 苯酚培养基为对照。除温度实验外, pH 和盐浓度实验均在 37℃ 下进行。24 h 取样测定  $OD_{600}$  和残留的苯酚浓度, 苯酚浓度测定采用 4-氨基安替比林法<sup>[15]</sup>。

### 1.5 不同初始酚浓度对菌株苯酚降解效率的影响

将对数生长期的菌株重新悬于无机盐培养基 ( $OD_{600}$  为 1.0) 中, 以 5% 的接种量分别接种于含不同苯酚浓度(50、70、180、280、380、480、580、650、800、900 或 1160 mg/L) 的无机盐培养基中, 37℃、180 r/min 条件下振荡培养, 定时取样, 测定  $OD_{600}$ 、苯酚浓度和培养基 pH。

苯酚降解动力学: 在苯酚的生物降解过程中, 苯酚既是反应的基质, 同时也是抑制剂。对于底物又是抑制剂的生物反应过程, 通常采用 Haldane 方程来模拟底物降解动力学过程, Haldane 方程:

$$q = \frac{q_{max}}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}}$$

( $q$ : 苯酚比降解速率, /h;  $S$ : 为酚浓, mg/L;  $q_{max}$ : 最大比降解速率, /h;  $K_s$ : 饱和常数, mg/L;  $K_i$ : 抑制常数, mg/L)

根据不同初始浓度苯酚降解过程计算苯酚浓度与降解速率的关系作图, 通过 Matlab 软件按照 Haldane 方程对实验数值进行非线性最小二乘曲线拟合。

### 1.6 不同重金属离子对菌株苯酚降解效率的影响

分别将 50  $\mu$ mol/L 和 200  $\mu$ mol/L 不同重金属盐离子 ( $Cu^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Zn^{2+}$ ) 添加到苯酚浓度为 600 mg/L 的液体无机盐培养基中, 并以未添加重金属离子的 600 mg/L 苯酚浓度为对照, 将活化的菌株以 5% 接种量接种于不同浓度重金属培养基中, 180 r/min、37℃ 振荡培养 24 h, 取样测定苯酚浓度。

### 1.7 菌株降解焦化原水酚类物质

焦化废水浅褐色, 有刺激性气味, pH 9.38 - 9.50, 酚类化合物含量约为 830.72 - 834.22 mg/L, 有少量悬浮杂质。将经真空过滤去除固体物质后的焦化原水用灭菌蒸馏水稀释, 分别配制成含有 1/3、1/2、2/3 和 1 的不同浓度(体积比)的焦化废水, pH

调至 7.0 左右, 并分别以未接种菌株的不同浓度焦化废水为对照, 按照 5% 的接种量接种, 180 r/min、37℃ 下振荡培养, 定时取样, 测定酚浓度。

## 1.8 数据分析

试验结果采用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 耐苯酚细菌的筛选与鉴定

焦化废水样品经富集和分离筛选, 获得 1 株能在含有 1400 mg/L 苯酚无机盐培养基中生长的细菌菌株, 命名为 P1。菌落形态(图 1-A)呈圆形、边缘整齐、菌落略隆起、表面光滑、质地湿润, 电镜扫描(图 1-B)结果表明 P1 为杆状菌。利用细菌 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到长度约为 1443 bp 的扩增产物, BLAST 比对分析显示 P1 的 16S rRNA 序列 (accession number JN984129) 与 NCBI 数据库中注册的红球菌属菌 *Rhodococcus* sp. 的同源性高达 99%, 表明 P1 菌株为一种红球菌属细菌。

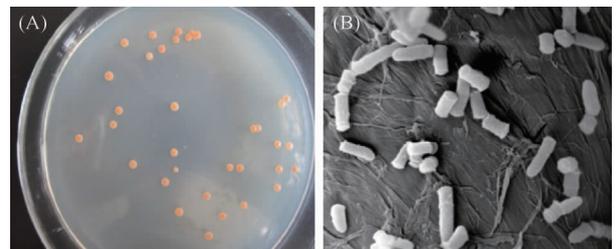


图 1. P1 菌株菌落形态 (A) 与菌体细胞电镜扫描图 (B, 10000  $\times$ )

Figure 1. The colony morphology (A) and scanning electron microscope (B, 10000  $\times$ ) of P1 strain.

### 2.2 红球菌 P1 菌株生长曲线

将对数生长期的菌株接种于以 600 mg/L 苯酚为唯一碳源和能源的液体无机盐培养基中, 37℃、180 r/min 下振荡培养。生物量  $OD_{600}$  测定结果(图 2)表明, P1 菌株的生长延滞期为 4 h; 4 h 后  $OD_{600}$  急剧上升, 迅速进入对数生长期; 16 h 达到稳定期,  $OD_{600}$  达最大值 1.04; 24 h 后生物量逐渐下降。培养基 pH 测定结果表明(图 2): 在对数生长期培养基 pH 随着 P1 菌株的生长迅速下降, pH 由 6.6 下降到 5.4 左右; 进入稳定期后 pH 又随生物量的下降逐渐

升高。在好氧菌中,苯酚羟化酶能将苯酚转化为邻苯二酚中间产物,而邻苯二酚 2, 3-双加氧酶或 1, 2-双加氧酶可将其开环裂解形成相应的有机酸,如丙酮酸、琥珀酸和乙酸等,然后进入为三羧酸(TCA)循环,最终转化为  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  [16]。在对数生长期 P1 菌株的生物量与 pH 变化趋势相反,表明 P1 菌株在利用苯酚的过程中酸性中间产物累积增加,导致培养基 pH 降低;在稳定期后培养基 pH 逐渐回升,这可能是由于有机酸被 P1 菌株生长代谢所利用,导致其含量降低所致。

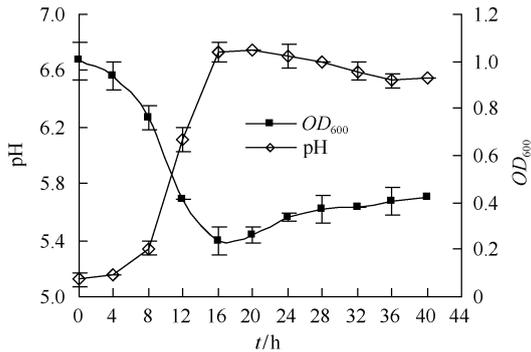


图 2. P1 菌株的生长曲线和培养基 pH

Figure 2. Growth curves of strain P1 and pH in the medium.

### 2.3 环境条件对红球菌 P1 菌株苯酚降解效率的影响

pH 是影响生化反应的重要因素。将活化 P1 菌株接种于 pH5 - 10 的无机盐培养基中,苯酚初始浓度为 600 mg/L, 37℃、180 r/min 振荡培养 24 h。

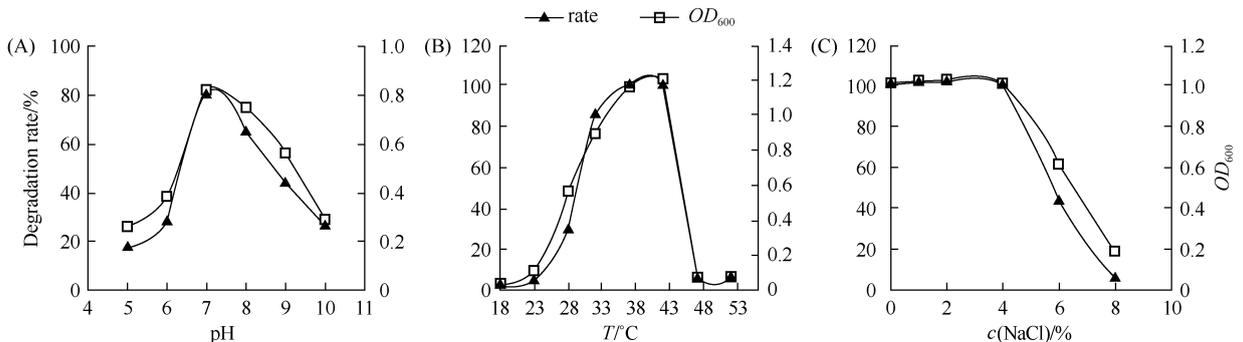


图 3. pH (A)、温度 (B) 和盐浓度 (C) 对 P1 菌株降酚效率的影响

Figure 3. Effects of pH (A), temperature (B) and NaCl (C) on phenol degradation by strain P1.

### 2.4 不同初始酚浓度对红球菌 P1 菌株苯酚降解效率的影响

为了研究不同初始苯酚浓度对 P1 菌株生长和苯酚降解效率的影响,设置 50 - 1160 mg/L 苯酚初始浓度梯度,  $\text{OD}_{600}$  和苯酚浓度 (图 4-A) 分析表明: P1

$\text{OD}_{600}$  和苯酚浓度测定结果表明 (图 3-A) P1 菌株在 pH 为 7.0 时,  $\text{OD}_{600}$  最大, 苯酚降解率最高; pH < 6 或 pH > 9 时,  $\text{OD}_{600}$  下降, 苯酚降解率随之下降, 表明苯酚降解率与菌株的生物量成正相关, pH 7 - 8 是苯酚降解的最佳条件。pH 太高或太低可引起微生物苯酚降解酶活性降低, 从而抑制其苯酚降解能力。焦化原水的 pH 约 9 - 11, 经混凝处理除去一些有机物和吹脱部分氨氮后 pH 值有所降低, P1 菌株在中性偏碱的环境中生长最佳, 适用于焦化废水生化处理工艺。

温度是影响生化反应的又一重要因素。图 3-B 表明在 32℃ - 42℃ 时,  $\text{OD}_{600}$  值最大, 苯酚降解率相应较高; 而 < 32℃ 或 > 42℃ 时,  $\text{OD}_{600}$  值和苯酚降解率均降低。推测较低或较高温度可降低苯酚代谢酶活性, 引起苯酚降解能力下降。焦化废水经除油预处理进入厌氧处理的水温约 40℃, 而 P1 菌株在该温度范围生长最好, 是强化焦化废水生物降解的菌种资源。

焦化废水是含盐 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Cl}^-$  等) 的工业废水 [1], 影响细菌的生长。将 P1 菌株接种于含 0 - 8% NaCl 的无机盐培养基中, 图 3-C 结果表明 P1 菌株在 0 - 4% 盐浓度时能在 24 h 内几乎完全降解 600 mg/L 苯酚; 在 4% - 6% 盐时  $\text{OD}_{600}$  值迅速降低, 苯酚降解率随之降低; 在 8% 盐浓度时菌株几乎不能生长, 苯酚也不能被代谢利用。表明 P1 菌株的耐盐能力强, 可用于高含盐量的含酚废水的处理。

菌株的生长在 50 - 150 mg/L 苯酚浓度梯度中几乎没有延滞期, 8 h 生长达到最大值, 且苯酚在 8 h 内完全降解 (图 4-A 中未显示)。随着苯酚浓度 275 - 1162 mg/L 的提高, P1 菌株生长的延滞期从 4 h 增加到 8 h, 在 12 - 24 h 达到最大生物量, 然后进

入稳定期;苯酚浓度在细菌生长的延滞期基本不变,在对数期迅速下降,当细菌生长进入稳定期时,除 1162 mg/L 苯酚初始浓度外,低于 907 mg/L 苯酚浓度均被完全降解,表明苯酚的降解主要发生在细菌的对数生长期,同时,低浓度苯酚可以促进 P1 菌株的生长和苯酚的降解,而高浓度的苯酚则抑制其生长和苯酚降解能力。培养基 pH (图 4-B) 分析表明培养基初始 pH 为 6.5 左右,在细菌生长的对数期

其 pH 随着苯酚浓度的降低而降低;苯酚的初始浓度越高,pH 下降幅度越大,表明苯酚浓度越高,累积产生的酸性物质越多,pH 下降越大;在细菌生长进入稳定期后,培养基 pH 缓慢上升,表明苯酚降解过程中产生的酸性中间产物可能进入 TCA 循环,逐渐被细菌分解利用,累积的酸性产物浓度降低,所以 pH 出现回升现象。

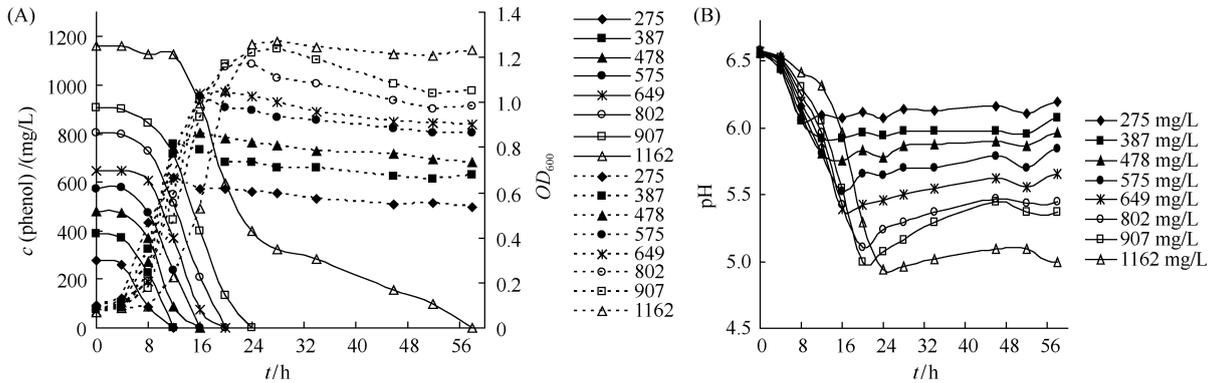


图 4. 不同初始苯酚浓度对 P1 菌株苯酚降解、细菌生长 (A) 和培养基 pH (B) 的影响

Figure 4. Biodegradation of phenol and growth of strain P1 (A) as well as pH in medium (B) with different phenol concentrations.

苯酚既是酶促反应的基质,同时也是抑制剂。对于底物是抑制剂的生物反应过程,通常采用 Haldane 方程来模拟底物降解动力学过程。根据不同初始苯酚浓度  $s$  与降解速率的关系作图,通过 Matlab 软件按照 Haldane 方程对实验数值进行非线性最小二乘曲线拟合,可得苯酚降解的动力学参数:  $q_{\max} = 0.516/\text{h}$ ,  $K_s = 77.487 \text{ mg/L}$ ,  $K_i = 709.965 \text{ mg/L}$  (相关系数  $R^2$  为 0.963),理论值和实验值的对比见图 5。通过对方程求导,可得出菌株  $q_{\max}$  对应的苯酚浓度  $S = 234.548 \text{ mg/L}$ ,该浓度为 P1 菌株苯酚降解的最适初始浓度。当苯酚浓度在 50 - 234.548 mg/L 时,由于缺乏碳源和能源,细胞生长可能受底物的限制作用,苯酚降解率随着苯酚浓度的提高而提高;当苯酚浓度大于 234.548 mg/L 时,苯酚降解速率随着苯酚浓度的增加呈下降趋势,即出现底物抑制作用。高浓度苯酚对菌株生长和降解的抑制作用也同样在细菌 *Gulosibacter* sp. YZ4<sup>[11]</sup> 和 *Pseudomonas putida* LY1<sup>[8]</sup> 及真菌 *Paecilomyces variotii* JH6<sup>[12]</sup> 中被报道。这可能是由于高浓度的底物抑制菌株的同化作用,从而降低了细胞的生长速率和苯酚降解速率。

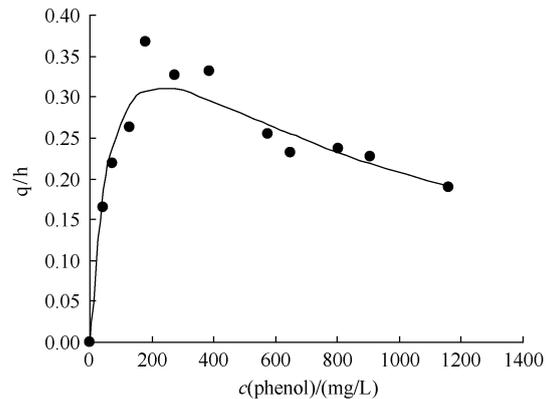


图 5. 实验和预测的 P1 菌株在苯酚中的生长动力学曲线

Figure 5. Experimental and predicted specific growth kinetics of strain P1 on phenol.

## 2.5 重金属离子对红球菌 P1 菌株苯酚降解效率的影响

P1 菌株接种于 600 mg/L 苯酚的无机盐培养基中,分别添加 50  $\mu\text{mol/L}$  或 200  $\mu\text{mol/L}$  不同浓度的 6 种重金属离子  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$ ,振荡培养 24 h。苯酚降解率结果表明 (图 6),与对照相比较,P1 菌株分别在 50  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Pb}^{2+}$ 、

200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Zn}^{2+}$  或 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Mn}^{2+}$  存在时能完全降解 600 mg/L 苯酚, 而 50  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  均显著抑制其降解能力, 表明 P1 菌株耐重金属  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$ 。

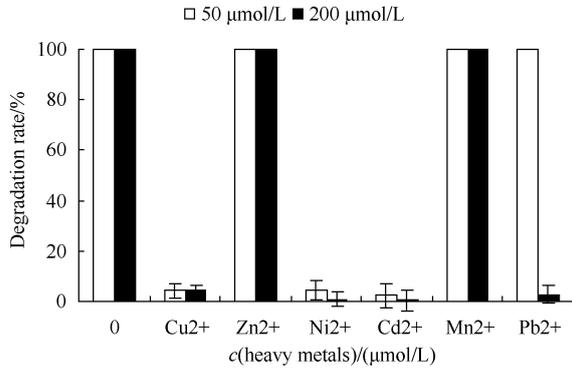


图 6. 不同重金属离子对 P1 菌株苯酚降解的影响

Figure 6. The effect of various heavy metal ions on phenol degradation using strain P1.

## 2.6 红球菌 P1 菌株对焦化原水酚类物质的降解

P1 菌株可在无机盐中降解苯酚, 不能说明其具有降解焦化原水酚类物质的能力。焦化原水中含有 830.72 – 834.22 mg/L 的酚类化合物, 将驯化的 P1 菌株接种于用灭菌水稀释的不同体积浓度的焦化原水中, 酚类降解结果表明 (图 7), P1 菌株可生化降解 1/3 – 1/2 焦化原水中的酚类物质, 而不能降解 2/3 – 1 的焦化废水中的酚类物质。其中 1/3 的焦化废水中的酚类物质 (279.9 mg/L) 可以在 2 d 内完全降解, 1/2 的焦化废水中的酚类物质 (412.3 mg/L) 可以在 4 d 内完全降解, 与单一底物苯酚降解相比, 去除焦化废水酚类物质的时间被延

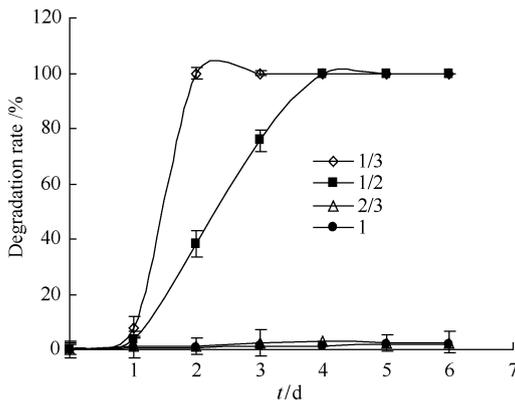


图 7. P1 菌株对焦化废水中不同浓度酚类物质的降解

Figure 7. Phenol degradation of coking wastewater with different concentrations by strain P1.

迟, 降酚效率远低于无机盐培养基。这与 Zhu 等报道的假单胞菌 PCT01 和 PTS02 在焦化废水中苯酚降解的实验结果一致<sup>[14]</sup>, 推测焦化废水中存在的其他难降解有机物 (如吡啶、喹啉和苯胺等) 的毒害作用可能抑制了细菌的生长和酚类物质的降解, 或是其富氧缺磷 (营养不平衡) 导致细菌营养缺乏, 致使酚类物质不能完全矿化和去除率降低。

## 3 讨论

焦化废水是含芳香族、杂环及多环化合物的典型含酚废水, 与化学和物理法相比, 生物处理法具有经济、安全、高效等显著优点, 使微生物技术处理焦化废水成为污染治理的研究热点。红球菌是介于分枝杆菌和诺卡氏菌之间的一类微生物, 能产表面活性剂<sup>[17]</sup>、生物絮凝生物脱硫、生物除  $\text{Mn}^{2+}$ 、破乳及降解多种芳香烃污染物<sup>[18-19]</sup>, 是一类能降解多种难降解有机物的多功能菌株。本课题组从焦化废水活性污泥中分离的红球菌 P1 在 20 h 内可完全降解 600 – 800 mg/L 苯酚, 24 h 内可完全降解 907 mg/L 苯酚, 58 h 可完全降解 1162 mg/L 苯酚 (图 4)。Gulosibacter sp. 完全降解 800 mg/L 苯酚需要 28 h, 但 76 h 内可完全降解 2000 mg/L 苯酚<sup>[11]</sup>; 假单胞菌 PCT01/PTS02 不能在 899 – 920 mg/L 苯酚中生长<sup>[14]</sup>, 而洋葱伯克霍尔德菌 PW3 和铜绿假单胞菌 AT2 在 1000 mg/L 苯酚延滞期达 5 d 以上<sup>[9]</sup>。虽然 P1 菌株对高浓度苯酚的降解能力不及 Gulosibacter sp. YZ4, 但其在苯酚浓度低于 900 mg/L 时的降解能力高于 Gulosibacter sp.; 另外, P1 菌株的苯酚降解能力远高于洋葱伯克霍尔德菌 PW3 和铜绿假单胞菌 AT2, 说明 P1 菌株是 1 株高效苯酚降解菌。苯酚降解菌 Gulosibacter sp. YZ4 的降酚动力学常数为:  $K_s = 70.87$  mg/L、 $K_i = 418.2$  mg/L<sup>[11]</sup>, Paecilomyces variotii JH6 的降酚动力学常数:  $K_s = 130.35$  mg/L、 $K_i = 200$  mg/L<sup>[12]</sup>。P1 菌株的苯酚降解动力学过程符合 Haldane 抑制模型, 其  $K_s = 77.487$  mg/L 与 Gulosibacter sp. YZ4 的  $K_s$  (70.87 mg/L)<sup>[11]</sup> 相当, 而低于 Paecilomyces variotii JH6 的  $K_s$  (130.35 mg/L)<sup>[12]</sup>, 表明苯酚降解的抑制作用出现在较高的苯酚浓度范围。此外, 假单胞菌 PCT01 和 PTS02 可以分别在 1 d 和 2 d 内降解初始浓度为 154 – 240 mg/L 苯酚的焦化废水, 且苯酚降解速率与

接种量相关<sup>[14]</sup>;红球菌 P1 菌株在2 d内能完全降解含有初始浓度为279.86 mg/L苯酚的焦化废水,其降解能力与假单胞菌 PCT01 和 PTS02 相当;同时,P1 菌株具有耐盐和多种重金属的能力,表明从焦化废水中分离的 P1 菌株具有强化生物处理焦化废水酚类物质的潜力。

## 参考文献

[1] Ren Y, Wei C, Wu C, Li B. Environmental and biological characteristics of cokingwastewater. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(7):1094-1100. (in Chinese)

任源, 韦朝海, 吴超飞, 李国保. 焦化废水水质组成及其环境学与生物学特性分析. *环境科学学报*, 2007, 27(7):1094-1100.

[2] Zhang W, Wei C, Yan B, Ren M, Peng P. Composition characterization of dissolved organic matters in coking wastewater. *Environmental Chemistry*, 2012, 31(5):702-707. (in Chinese)

张万辉, 韦朝海, 晏波, 任曼, 彭平安. 焦化废水中溶解性有机物组分的特征分析. *环境化学*, 2012, 31(5):702-707.

[3] Wu Z, Zhu L. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from coking wastewater by simultaneously synthesized organobentonite in a one-step process. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(2):248-253.

[4] Paisio CE, Talano MA, González PS, Busto VD, Talou JR, Agostini E. Isolation and characterization of a *Rhodococcus* strain with phenol-degrading ability and its potential use for tannery effluent biotreatment. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2012, 19(8):3430-3439.

[5] Banerjee A, Ghoshal AK. Phenol degradation by *Bacillus cereus*; pathway and kinetic modeling. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14):5501-5507.

[6] Mohite BV, Pawar SP, Morankar A. Isolation, selection and biodegradation profile of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 2011, 87(2):143-146.

[7] Liu H, Yu QJ, Wang GY, Cong Y. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1. *Process Biochemistry*, 2011, 46:1678-1681.

[8] Li Y, Li J, Wang C, Wang P. Growth kinetics and

phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17):6740-6744.

[9] El-Sayed WS, Ibrahim MK, Abu-Shady M, El-Beih F, Ohmura N, Saiki H, Ando A. Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2003, 67(9):2026-2029.

[10] Chen C, Li W, Wu J, Li J. Screening and characterization of phenol degrading bacteria for the coking wastewater treatment. *Environmental Science*, 2012, 33(5):1652-1656. (in Chinese)

陈春, 李文英, 吴静文, 李静. 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):1652-1656.

[11] Zhai Z, Wang H, Yan S, Yao J. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel bacterium: *Gulosibacter* sp. YZ4. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2012, 87(1):105-111.

[12] Wang L, Li Y, Yu P, Xie Z, Luo Y, Lin Y. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183(3):366-369.

[13] Mao Y, Zhang X, Xia X, Zhong H, Zhao L. Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thaueria* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(9):927-934.

[14] Zhu X, Tian J, Chen L. Phenol degradation by isolated bacterial strains: kinetics study and application in coking wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2012, 87(1):123-129.

[15] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 第三版. 北京:中国环境科学出版社, 1989:407.

[16] Arail H, Ohishi T, Chang MY, Kudo T. Arrangement and regulation of the genes for meta-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology*, 2000, 146(7):1707-1715.

[17] Margesin R, Labbe D, Schinner F, Greer CW, Whyte LG. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied Environment Microbiology*, 2003, 69:3085-3092.

[18] Toda H, Itono N. Isolation and characterization of styrene metabolism genes from styrene-assimilating soil bacteria *Rhodococcus* sp. ST-5 and ST-10. *Journal of Bioscience*

and *Bioengineering*, 2012, 113(1):12-19.

presence of chromium (VI) or phenol. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 191:62-68.

[19] Sun JQ, Xu L, Tang YQ, Hen FM, Liu WQ, Wu XL.

Degradation of pyridine by one *Rhodococcus* strain in the

# Characterization of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain P1 from coking wastewater

Yuxiu Zhang<sup>1\*</sup>, Xiaojun Meng<sup>1</sup>, Tuanyao Chai<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining & Technology, Beijing 100083, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, College of Life Science, Beijing 100049, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The removal of phenolic compounds was a key problem for coking wastewater treatment. This study focused on the isolation and characterization of an efficient phenol-degrading bacterial strain from coking wastewater.

[ **Methods** ] Phenol-degrading bacterium was screened by using phenol as the sole carbon source, strain was identified according to the morphological properties and 16S rRNA sequence analysis, the phenol-degrading characteristics and the potential for removal of phenol in the coking wastewater were evaluated. [ **Results** ] Strain P1 was identified as the genus *Rhodococcus* sp. with morphological properties and 16S rRNA gene sequence. This strain could survive at the presence of phenol with concentration up to 1400 mg/L. The optimal conditions for biodegradation of 600 mg/L phenol in mineral medium were at 32 – 42°C, pH 7.0 and 0 – 4% NaCl. The phenol-degrading efficiency by P1 strain was different in response to various heavy metal ions, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and low concentration of Pb<sup>2+</sup> had no effect on the phenol degradation. However, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> seriously inhibited phenol degradation by strain P1. The 279.9 mg/L phenols from 1/3 coking wastewater were completely degraded after incubation for 2 days. [ **Conclusion** ] Strain P1 is an efficient phenol-degrading bacterium and has the potential for removing phenolic compounds in coking wastewater.

[ **Results** ] Strain P1 was identified as the genus *Rhodococcus* sp. with morphological properties and 16S rRNA gene sequence. This strain could survive at the presence of phenol with concentration up to 1400 mg/L. The optimal conditions for biodegradation of 600 mg/L phenol in mineral medium were at 32 – 42°C, pH 7.0 and 0 – 4% NaCl. The phenol-degrading efficiency by P1 strain was different in response to various heavy metal ions, Ni<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and low concentration of Pb<sup>2+</sup> had no effect on the phenol degradation. However, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> seriously inhibited phenol degradation by strain P1. The 279.9 mg/L phenols from 1/3 coking wastewater were completely degraded after incubation for 2 days. [ **Conclusion** ] Strain P1 is an efficient phenol-degrading bacterium and has the potential for removing phenolic compounds in coking wastewater.

**Keywords:** *Rhodococcus* sp., phenol, biodegradation, heavy metal, coking wastewater

(本文责编:王晋芳)