

苯酚降解菌的筛选及其降解特性的初步研究

潘利华 姜绍通* 刘鹏达 李慧星

(合肥工业大学生物与食品工程学院 合肥 230009)

摘要: 从某印染厂下水道的污泥中分离到一株能高效降解苯酚的菌株 ph_{16} , 经初步鉴定为微球菌属 (*Micrococcus* sp.)。该菌株最高可耐受 1.5 g/L 左右的苯酚, 对苯酚降解最适条件为 pH 7.0, 温度 35℃, 苯酚浓度为 1.0 g/L, 时间为 36 h, 降解率可达 99.6%。试验还表明 Hg^{+} 、 Co^{2+} 、 Ag^{2+} 等重金属离子对该菌株降解苯酚能力有不同程度的抑制作用。并对其降解动力学作了初步探讨。

关键词: 苯酚, 生物降解, 微球菌属

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0078-04

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF A PHENOL-DEGRADING BACTERIUM

PAN Li-Hua JIANG Shao-Tong LIU Peng-Da LI Hui-Xing

(College of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

Abstract: A strain ph_{16} , that could effectively degrade phenol, was isolated from sewer sludge of printing and dyeing plant. The preliminary identification suggested that the strain belongs to *Micrococcus* sp. The strain could resist to phenol up to 1.5 g/L. The efficient biodegradation of phenol occurred when the strain was cultured in the medium (pH 7.0) containing 1.0 g/L phenol under 35℃, where the highest degradation rate reach 99.6% after 36 hours. This strain, when treated with some heavy metal ions such as Hg^{+} , Co^{2+} and Ag^{2+} , showed the significant inhibition of phenol degradation by 74.2% ~ 100%. The kinetics of phenol degradation during culture of the strain was also explored.

Key words: Phenol, Biodegradation, *Micrococcus* sp.

苯酚是重要的化工原料, 被广泛应用于酚醛树脂、杀虫剂、染料、农药和医药的生产中。但苯酚本身是有毒的有机化合物, 具有使蛋白质变性的作用, 对皮肤粘膜有腐蚀性; 此外, 它还可以作用于中枢神经而引起痉挛。美国环保局和我国相继把苯酚列入有毒污染物名单^[1]。

处理含酚废水的方法很多^[2], 其中生物降解法是一种经济有效且无二次污染的方法, 许多学者在这方面进行了大量研究^[3-5]。本试验从长期受苯酚污染的污泥中分离出一株能高效降解苯酚的细菌, 研究了其生长条件及降解特性, 为工业化生物处理含苯酚类污染物提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

取自某印染厂下水道的污泥为试验的原始菌液。

1.2 培养基

1.2.1 加富培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 苯酚 6 g, 定容至 1 L, pH 自

* 联系人 E-mail: jiangst@fm365.com

收稿日期: 2002-09-12, 修回日期: 2002-11-26

然,用于菌种的富集和保存。

1.2.2 选择培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g, KH_2PO_4 0.03g, 苯酚按试验需要量添加, 固体培养基加入2%的琼脂, 定容至1 L, pH自然。

1.2.3 发酵培养基: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03g, KH_2PO_4 0.03g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005g, $CaCl_2$ 0.005g, 尿素0.2g, 苯酚按试验需要量添加, 定容至1 L, pH7.0~7.2。

1.3 菌种的富集

吸取25 mL某印染厂下水道污泥, 加入含苯酚6.0 g/L的225 mL富集培养基中, 置37℃水浴摇床200 r/min振荡培养3 d。在无菌条件下分别用移液管吸取0.5 mL培养液, 注入5个平皿中, 再往平皿中分别倒入含苯酚1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/L的已冷却至55℃左右的固体选择培养基, 与菌液充分混匀, 置37℃培养2 d。从含苯酚最高浓度生有菌落的平皿上挑取单菌落转接至固体加富培养基中, 37℃恒温培养, 再经反复划线分离得到纯菌株。

1.4 菌种的驯化

富集后的纯菌株接入含苯酚1.0 g/L的发酵培养基中, 在250 mL锥形瓶中驯化培养, 温度37℃, 6~7 d为1个周期, 每周期第6d测苯酚含量, 若苯酚被降解则补充至原浓度, 否则再驯化直至降解完, 再添加苯酚, 进行下一驯化周期, 经5个周期后, 从中选出对苯酚降解力最强的菌株, 简称 ph_{16} 菌株, 将其接种于加富培养基斜面上, 培养后置4℃冰箱保存作为试验菌株。

1.5 菌株的鉴定

将筛选到的 ph_{16} 菌株根据文献[6, 7]鉴定至属。

1.6 分析方法

菌体生长: 以波长为460 nm处的OD值表示。

苯酚测定: 采用4-氨基安替比林法^[8]。

pH值: 采用pHREX-2型酸度计测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

样品经富集、初筛、复筛、驯化得 ph_{16} 纯菌株。 ph_{16} 菌株在加富培养基上培养2 d后的菌落直径1mm~2.5 mm, 乳白色, 菌落圆形, 隆起, 脐状, 外形光滑, 湿润, 不透明; 在显微镜下观察, 细胞球形, 直径0.5 μ m~1.5 μ m, 单个、成对及形成不规则团。不运动, 革兰氏阳性, 无鞭毛, 有荚膜, 无芽孢, 好氧, 氧化葡萄糖产酸。初步鉴定为微球菌属(*Micrococcus* sp.)。

2.2 菌株生长和降解苯酚的适宜条件

2.2.1 温度: 将 ph_{16} 菌株接种于发酵培养基中(接种量为 10^8 个cell/mL, 苯酚1.0 g/L, 下同), 在不同温度下摇瓶振荡培养36 h。结果表明, 在25℃~35℃之间, ph_{16} 菌株生长和降解苯酚能力较强, 苯酚降解率在95.0%以上, 其中35℃时, 菌体OD值为0.400, 苯酚降解率达98.8%。在25℃以下和35℃以上时菌体生长缓慢, 苯酚降解率下降很快。

2.2.2 pH: 试验结果表明, ph_{16} 菌株的生长和苯酚降解率在pH6.0~10.0之间比较稳

定, 其中在 pH7.0 时效果最佳, 菌体生长 OD 值为 0.486, 对苯酚降解率达 99.2%。

2.2.3 通气条件: 一般来说, 通气量是好氧微生物生长的重要影响条件。首先采用 500 mL 摇瓶, 改变其中装液量, 摇床转速为 200 r/min; 另外, 改变摇床转速, 固定装液量为 100 mL, 振荡培养 36 h。结果表明, 菌株 ph_{16} 的生长量和对苯酚的降解率均随着摇瓶中装液量的增加即通气体积的减少而递减, 装液量为 50 mL 时效果最好, 苯酚全部被降解, 此时菌体生长 OD 值为 0.498; 同时, 随着摇床转速的加快, 菌株 ph_{16} 生长和对苯酚的降解均增强, 300 r/min 时, OD 值和苯酚降解率分别为 0.496 和 100%。由此可见, 通气量对 ph_{16} 菌株生长和降解苯酚具有一定的影响, 考虑摇瓶的利用率及动力消耗, 选定装液量为 100 mL, 摇床转速为 250 r/min。

2.3 苯酚浓度对 ph_{16} 菌株降解苯酚的影响

于不同苯酚浓度的发酵培养基中接种 ph_{16} 菌株, 35℃ 摇瓶振荡培养 36 h 后, 取样测定菌体的生长和对苯酚的降解情况。结果表明, 当苯酚浓度低于 1.0 g/L 时, 该菌株基本能实现对苯酚的完全降解, 同时它的生长随苯酚浓度的提高而增强, 1.0 g/L 时达到最大 OD 值; 而当苯酚浓度高于 1.0 g/L 时, 菌株的生长和对苯酚的降解均呈下降趋势, 超过 1.5 g/L 时基本不能生长, 苯酚降解率也趋于零。这可能由于高浓度苯酚对细胞的毒害作用, 抑制了其生长和对苯酚的降解。因此, 当处理苯酚浓度较大的废水时, 应对其进行预处理或适当稀释以降低其浓度, 或者采取分批加入适当菌量的方法, 保证高浓度废水中苯酚能被完全降解。

2.4 一些重金属离子对 ph_{16} 菌株降解苯酚的影响

在化工废水和污染区除了含有苯酚等有机污染物外, 还含有各种重金属化合物的污染, 在利用生物降解法处理含苯酚的化工废水或进行污染区的生物修复时, 必需考虑各种重金属离子对微生物的生长和降解能力的影响。

在含 1.0 g/L 苯酚的发酵培养基中, 分别添加各种重金属离子, 接入 ph_{16} 菌株, 摇床振荡培养 36 h, 观察它们对菌体生长和降解能力的影响。表 1 的结果表明, Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对菌株的生长和降解苯酚的活性影响不大, 而所添加的其它重金属离子对菌株的生长和苯酚的降解均有不同程度的抑制作用, 其中以 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Co^{2+} 最为显著。

表 1 一些重金属离子对 ph_{16} 菌株的生长和降解苯酚的影响

化合物	对照	$CuSO_4$	$HgSO_4$	Ag_2SO_4	$ZnSO_4$	$Cd(NO_3)_2$	$Pb(NO_3)_2$	$MnCl_2$	$CoCl_2$
浓度/ $mmol \cdot L^{-1}$		1.0	0.01	0.025	0.1	0.25	0.25	0.5	1.0
OD 值	0.478	0.270	0.001	0.182	0.450	0.305	0.272	0.435	0.166
苯酚降解率/%	100	70.3	0.0	35.1	96.3	76.5	70.5	91.4	25.8

2.5 添加其它碳源或氮源对 ph_{16} 菌株降解苯酚的影响

在含苯酚 1.0 g/L 的发酵培养基中添加 0.2 g/L 的各种碳源或氮源化合物, 接入菌株, 培养 36 h, 测定菌株的生长和对苯酚的降解情况。表 2 的结果表明, 添加各种化合物后, 菌株 ph_{16} 均生长良好, 但对苯酚的降解率均下降, 这可能是在其它易被利用的碳源等存在时, 该菌株优先利用它们, 从而使苯酚降解受到影响。

表 2 添加其它碳源或氮源对 ph_{16} 菌株降解苯酚的影响

化合物	对照	葡萄糖	蔗糖	酵母膏	蛋白胨	淀粉	乳糖	硫酸铵	硝酸铵	氯化铵
OD 值	0.479	0.496	0.490	0.476	0.485	0.481	0.490	0.356	0.387	0.386
苯酚降解率/%	100	51.4	62.4	83.0	85.6	72.8	60.6	55.6	68.9	72.8

2.6 ph_{16} 菌株降解动力学的初步分析

图1显示了 ph_{16} 菌株在最佳培养条件下生长和对苯酚的降解情况。结果表明, 菌株 ph_{16} 细胞生长和对苯酚的降解是同步的。在培养的最初4 h内, 菌体生长和对苯酚的降解非常缓慢, 此后细胞开始进入指数生长期, 对苯酚的利用率大大提高, 到24 h达到菌体的最大生长, 对苯酚的降解趋于稳定。进一步培养, 由于环境中营养物质的不足, 菌体生长进入衰退期, OD值开始下降。图1亦表明, 培养液pH值随菌株的生长而稍有下降, 但指数期后pH又上升。这说明苯酚降解过程中产生有机酸, 与文献报道^[9]的苯酚降解机理相一致。

由上述讨论可知, 苯酚浓度较低时表现为无基质抑制过程, 而基质浓度较高时表现为基质抑制过程。因此很难用通用的模型来描述。Monod方程是描述单一基质限制生长的动力学方程^[10]。在有有机物浓度C很低时, 微生物的量基本不变, 通常用简单的一级动力学方程表示: $d\ln C/dt = -k$ 。

图2是初始浓度为600 mg/L的发酵培养液 $\ln C-t$ 图。由图2可知, 苯酚降解过程中, 由于菌株经过驯化, 几乎没有适应期, 前20 h苯酚降解相对缓和, 以后降解速度稍快, 为一级反应, 其动力学方程为 $-dC/dt = 6.99 - 0.15C$, $r = 0.2539$ 。

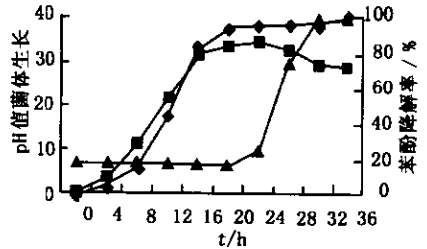


图1 菌株 ph_{16} 生长和苯酚降解曲线

■ OD值 × 100, ▲ pH, ◆ 苯酚降解率

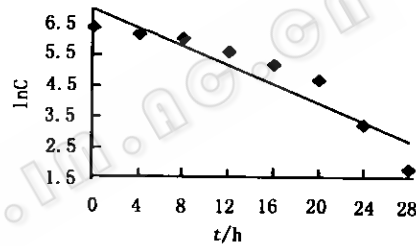


图2 苯酚的 $\ln C-t$ 曲线

3 小结

从某印染厂下水道的污泥中富集分离出一株能高效降解苯酚的菌株 ph_{16} , 经初步鉴定为微球菌属 (*Micrococcus* sp.)。

该菌株最高可耐受 1.5g/L 左右的苯酚, 降解苯酚最适条件为 pH7.0, 温度 35℃, 苯酚浓度 1.0 g/L, 时间 36 h, 通气有利于苯酚的降解, 降解率可达 99.6%。一些重金属离子如 Hg^+ 、 Co^{2+} 、 Ag^{2+} 等对其降解苯酚能力有不同程度的抑制作用。

低浓度苯酚培养液中, 该菌株细胞生长和苯酚的降解是同步的。苯酚降解过程中, 溶液 pH 值稍有上升, 表明代谢过程中有有机酸产生, 反应为一级反应。

参考文献

- [1] 金相灿. 有机化合物污染化学. 南京: 南京大学出版社, 1997. 116~117.
- [2] 佟丽萍, 唐霞, 朱宝花, 等. 工业水处理, 1998, 18(5): 36~37.
- [3] 沈标, 李顺鹏. 微生物学杂志, 1992, (2): 29~33.
- [4] 徐玉泉, 张维, 陈明, 等. 环境科学导报, 2000, 20(4): 450~455.
- [5] Yang R D, Humphrey A E. Biotechnol Bioeng, 1975, 17: 1211~1235.
- [6] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999. 272~281.
- [7] Buchanan R E, Gibbons E N, 伯杰氏鉴定手册(第八版). 中国科学院微生物研究所译. 北京: 科学出版社, 1984. 660~728.
- [8] 国家环保局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 294~295.
- [9] 王一惠, 向述荣, 张银宝, 等. 高技术通讯, 2001, (12): 98~101.
- [10] 王晓蓉. 环境化学. 南京: 南京大学出版社, 1997. 116~117.