

研究报告

## 一株高效苯酚降解真菌的分离鉴定及其菌剂的制备

张安龙<sup>1,3</sup> 王晔<sup>1</sup> 王雪青<sup>1,2\*</sup> 赵呈馨<sup>2</sup> 黄昱杰<sup>2</sup>

(1. 陕西科技大学环境科学与工程学院 陕西 西安 710021)

(2. 陕西科技大学轻工科学与工程学院 轻化工程国家级实验教学示范中心(陕西科技大学)  
陕西 西安 710021)

(3. 西安隆华环保技术有限公司 陕西 西安 710019)

**摘要:**【背景】含酚废水是普遍存在的有毒、难降解的有机污染物之一，生物法处理含酚废水因成本低、无二次污染而具有广阔的应用前景。可降解苯酚的微生物中，真菌比细菌对恶劣环境的适应性更好。针对液态菌液保存时间较短和运输困难的瓶颈，制备固体菌剂可以提高菌体存活率和储藏稳定性。【目的】筛选一株能够高效降解苯酚的真菌，优化其降酚性能并选择合适的载体制备菌剂。【方法】通过逐级驯化和纯化分离降酚菌，筛选得到降酚性能较强的真菌并通过 ITS rDNA 基因测序进行种属鉴定，通过参数优化进一步提高菌株降解苯酚的性能；以不同材料为载体制备菌剂，通过稀释平板计数法和苯酚降解实验探究菌剂在不同温度下的保存效果。【结果】分离筛选得到一株高效降解苯酚真菌 QWD1，通过鉴定证明其属于 *Magnusiomyces capitatus*，其最适降解条件： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  为氮源，接种量为 15%，pH 为 7.0，温度为 35 °C，氮源浓度为 14 mmol/L。在此条件下，28 d 内对 1 600 mg/L 苯酚去除率可以达到 97.15%；制备菌剂最适载体为谷糠，适宜保存温度为 4 °C，保存时间可达到 90 d 甚至更长，活菌数高达  $2.5 \times 10^8$  CFU/g 左右，降解苯酚效果良好。【结论】筛选得到了一株高效降解苯酚真菌，优化其降解性能并将其制备成菌剂，为处理含酚废水提供了新菌种和理论支持。

**关键词:** 降解苯酚，真菌，菌剂，载体

**Foundation items:** Major Science and Technology Special Program of Xianyang City (2016k01-15); Natural Science Basic Research Fund Youth Project of Shaanxi Province (2017JQ5057); Key Laboratory Project of Shaanxi Provincial Department of Education (17JK0098)

\*Corresponding author: E-mail: wangxueqing@sust.edu.cn

Received: September 29, 2017; Accepted: March 19, 2018; Published online (www.cnki.net): March 23, 2018

基金项目: 咸阳市重大科技专项计划(2016k01-15); 陕西省自然科学基金基础研究计划青年项目(2017JQ5057); 陕西省教育厅专项科研计划项目(17JK0098)

\*通信作者: E-mail: wangxueqing@sust.edu.cn

收稿日期: 2017-09-29; 接受日期: 2018-03-19; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-23

## Isolation and identification of a high-efficiency phenol-degrading fungi and the preparation of its microbial inoculum

ZHANG An-Long<sup>1,3</sup> WANG Ye<sup>1</sup> WANG Xue-Qing<sup>1,2\*</sup> ZHAO Cheng-Xin<sup>2</sup>  
HUANG Yu-Jie<sup>2</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an, Shaanxi 710021, China)

(2. College of Bioresources Chemical and Materials Engineering, National Demonstration Center for Experimental Light Chemistry Engineering Education (Shaanxi University of Science & Technology), Xi'an, Shaanxi 710021, China)

(3. Xi'an Longhua Environmental Protection Technology Co. Ltd., Xi'an, Shaanxi 710019, China)

**Abstract:** [Background] Phenolic wastewater is toxic, widespread and difficult to be decomposed. Biological treatment of phenolic wastewater has a broad application prospects due to its low cost and no secondary pollution. In the microorganisms that can degrade phenol, the fungi are more adaptable to the harsh environment than the bacteria. For the bottlenecks such as the short storage time of the fungal suspension and the difficulties for transport, preparation of microbial inoculum can improve cell viability and storage stability. [Objective] This paper tried to isolate an efficient phenol-degrading fungi, optimize the degradation performance and select the appropriate carrier for the preparation of its microbial inoculum. [Methods] Step-by-step domestication and purification was used to isolate the efficient phenol-degrading fungi. The species identification was carried out by ITS rDNA gene sequence analysis. The phenol degradation performance was further optimized by single factor experiments. Four different materials was used as carriers for the preparation of the microbial inoculum, then investigation of its preservation effect at different temperatures by dilution-plate method and phenol degradation were tested. [Results] An efficient phenol-degrading fungi named QWD1 was isolated and the identification proved it belonged to the *Magnusiomyces capitatus* genus. The optimal degradation conditions were as follows:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as nitrogen source, inoculum concentration 15%, pH 7.0, temperature 35 °C, nitrogen source concentration 14 mmol/L. Under this condition, the removal rate of phenol was up to 97.15% in 28 hours. The optimum carrier for the preparation of the fungi was cavings, the storage temperature was 4 °C and the storage time can reach 90 days or even longer. The number of viable fungi was about  $2.5 \times 10^8$  CFU/g, and the effect of phenol-degrading was good. [Conclusion] A high-efficiency phenol-degrading fungi was screened, for which the degradation performance was optimized, and it was prepared as the microbial inoculum, which provided new strain and theoretical support for the treatment of phenolic wastewater.

**Keywords:** Degradation of phenol, Fungi, Microbial inoculum, Carrier

苯酚广泛应用于石油炼制、石油化工、制药和树脂制造等行业,因此也是这些行业废水中的主要污染物<sup>[1]</sup>。苯酚被列入美国环境保护署(EPA)公布的水环境中129种优先控制污染物之一,具有长效性和生物积累性,即使在低浓度下也是有毒的,不仅会对水生生物造成很大伤害,而且会对人类造成几种全身性疾病<sup>[2]</sup>。如今,随着工业规模的扩大,含酚废水的排放量越来越大,在某些工业废水中苯酚浓度相当高,而且因其难降解特性极易在水和土

壤中积聚。因此,许多国家严格限定了苯酚及其衍生物在饮用水和环境中的允许浓度<sup>[3]</sup>。处理含酚废水的方法主要有物理法、化学法和生物法。物理方法主要有萃取法、吸附法等。其中吸附法是一种简单易行的废水处理方法,已成功地应用于废水处理中,但吸附剂普遍存在吸附量小、再生困难等弊病;萃取法是工业上常用的含酚废水处理方法,该法设备投资少、能耗低,但所采用的萃取剂多、价格昂贵且操作复杂,溶剂损失会给环境带来新的污染。

化学法主要包括化学氧化法、化学沉淀法和光催化法等。其中化学沉淀法工艺简单,应用范围广泛,但处理后废水中酚浓度仍较高;化学氧化法处理效率高,无二次污染,但是由于方法中使用的氧化剂资源少,价格昂贵且不能重复利用,使得降酚的成本很高<sup>[4-7]</sup>。

替代原始物理化学方法降解苯酚的生物处理法由于其成本低、环境安全性以及完全降解的可能性等特点而应用前景广阔。从被污染环境筛选出对酚类物质具有高降解能力的微生物,研究其降解特性后应用到含酚废水处理系统中,是处理含酚废水较为经济有效的途径之一。近年来,国内外在苯酚生物降解方面开展了广泛的研究,已分离和鉴定出多种具有苯酚降解能力的细菌,如醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)<sup>[8]</sup>、红球菌(*Rhodococcus* sp.)<sup>[9]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[10]</sup>、根瘤菌(*Rhizobia*)<sup>[11]</sup>等。但是这些菌株普遍都存在环境适应能力弱、对苯酚耐受浓度低、降解效率低等问题。因此,在利用微生物处理含酚废水的过程中,分离筛选出对苯酚耐受能力高且降解效率高的微生物仍是亟待解决的问题。而根据微生物对有机污染物和重金属的抗性特征,在大多数情况下,当环境大幅度变化时,真菌比细菌更难受到影响和限制<sup>[12]</sup>。在一些不适于细菌生长的极端情况下,有些真菌依然有较高的生物活性。例如,青霉菌 *Penicillium chrysogenum* 能在 5.8% 的盐度下以苯酚为唯一碳源和能源生长<sup>[13]</sup>; 真菌 *Mortierella sarnyensis* 在低温条件下可以成为降解高浓度苯酚和甲酚的生物膜反应器的主要微生物<sup>[14]</sup>。所以在很多情况下,真菌仍能成为降解有机污染物的主要菌群。因而,对真菌进行详细的研究十分必要。国内外已经报道了一些真菌降解废水中芳香族化合物的应用,如董婧等<sup>[15]</sup>从生物流化床中分离出一株具有苯酚降解能力的丝状真菌 PHE-1,但在苯酚浓度为 400 mg/L 时,苯酚对菌株生长表现出较明显的抑制作用。Jiang 等<sup>[3]</sup>从制药厂分离的嗜盐真菌 JS4 在

最佳条件下 32 h 可完全降解 500 mg/L 的苯酚。目前对苯酚降解真菌分离筛选的报道还不多,因此分离耐高浓度苯酚的高效降解真菌种群对含酚工业废水处理技术的开发具有重要意义。

微生物菌剂是利用吸附性能好的物质吸附菌体制成的活菌制剂,目前已经广泛应用到饲料添加、土壤改良和生物修复等领域。微生物对有毒化合物的降解性能受环境因素影响显著,相较于液态菌液,固体菌剂能有效提高有害有毒物质的处理效果,而且有利于菌体活性的保持、菌剂的保存和运输,适合在工程化应用中推广<sup>[16-17]</sup>。固定化细胞处理各类污水方面,中外学者已经进行了很多研究,固定化的方法具有耐受浓度高、降解速率高、处理能力强等特点。Santos 等<sup>[18]</sup>发现用海藻酸钠固定的丝状酵母降酚性能优于游离细胞,能够在 120 h 完全降解 30 mmol 的苯酚。然而固定化也存在方法复杂、菌体活性难以维持、成本较高等问题;同时,包埋固定化材料的传质阻力较大,对培养基中的营养物质和氧气向细胞内的传递以及胞内代谢废物向胞外的传递也会有不利影响。研究开发更为简单、经济且对菌株活性影响小的固定方法也是十分必要的。

本实验以造纸厂活性污泥为研究对象,通过实验室驯化苯酚降解菌并对其进行生物强化,筛选出对高浓度苯酚耐受性高且降解能效好的真菌菌种,通过过程参数控制进一步优化菌株对苯酚的降解效率,包括接种量、pH、温度、氮源种类和氮源浓度,以获得最好的苯酚去除效果。同时制备基于吸附法的固定化菌剂,在提高菌剂保存时间、保证菌株活性的基础上降低菌剂制备的成本。本研究以期将微生物强化菌剂应用于低成本高效处理含酚废水工业化处理提供一定的理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品来源

用于分离菌株的活性污泥取自陕西某造纸厂好氧池,污泥呈黑色、絮状。

## 1.2 培养基

(1) 富集培养液(g/L): 蛋白胨 3.00, 酵母粉 3.00,  $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15,  $\text{CaCl}_2$  0.10。

(2) 选择培养液<sup>[19]</sup>:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.396 g/L, 10% NaCl 10.0 mL, 营养液[次氨基三乙酸 10.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  29.5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.335 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.099 g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.009 3 g, 微量元素液 50.0 mL, 蒸馏水 950.0 mL] 20.0 mL/L, 灭菌后加入磷酸盐缓冲溶液( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  68.05 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  87.09 g, 蒸馏水 1 L) 20.0 mL/L, 维生素溶液(烟酸 0.1 mg/mL, 盐酸硫胺 0.05 mg/mL, 生物素 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 10.0 mL/L, 苯酚含量按需加入(详见 1.5 实验方法), 通过 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节 pH。

(3) 固体培养基: 在液体培养基中加入 2% 的琼脂粉, 经  $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 30 min 倒入直径为 9 cm 的无菌培养皿, 冷却后得到固体分离培养基平板。

## 1.3 主要试剂和仪器

苯酚、蛋白胨、酵母粉, 国药集团分析纯试剂; 4-氨基安替比林、铁氰化钾、氨水、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、NaCl、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ , 天津市大茂化学试剂厂分析纯试剂; 烟酸、盐酸硫胺、次氨基三乙酸、L-天冬氨酸, 天津市科密欧化学试剂有限公司分析纯试剂; 其他试剂均为分析纯试剂。

生物安全柜, 新加坡 ESCO 公司; 高速离心机, 长沙英泰仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 重庆雅玛拓科技有限公司; 双层恒温摇床, 江苏盛蓝仪器制造有限公司; 分析天平, 余姚市金诺天平仪器有限公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 磁力搅拌器, 艾卡仪器设备有限公司等。

## 1.4 分析方法

### 1.4.1 微生物生物量的测定

(1) 分光光度法: 用空白培养基作参比, 用紫外可见分光光度计在波长为 600 nm 下测定菌液的 OD 值, 记作  $OD_{600}$ 。此方法主要用于间接反映液体培养基中的微生物生长状况。

(2) 稀释平板计数法: 样品经分散和适当稀释后取一定量的稀释液涂布到平板上, 30 °C 培养至待平板上生长出肉眼可见的菌落, 统计菌落数。此方法主要用于测定菌剂的有效活菌数量。

### 1.4.2 苯酚浓度的测定

(1) 4-氨基安替比林分光光度法: 待测样品在 8 000 r/min 条件下离心 5 min 后取上清液采用分光光度法测定苯酚含量。

(2) 高效液相色谱法: 待测样品在 8 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后采用高效液相色谱仪测定苯酚的浓度。测定条件为: C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm)作为固定相, 40/30 (体积比)的甲醇、水系作为流动相; 紫外检测器检测波长为 270 nm; 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.4.3 苯酚降解率的测定

苯酚降解率=(反应前苯酚浓度-反应后苯酚浓度)/反应前苯酚浓度 $\times$ 100%。

### 1.4.4 分离株的分子生物学鉴定

分离株的分子生物学鉴定采用 ITS rDNA 测序分析, 用于 ITS rDNA 扩增的 PCR 反应引物为 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GG AAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')。PCR 反应体系 (50  $\mu\text{L}$ ): 模板 DNA (5 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Buffer 5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (2.5 mmol/L) 3.75  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 33  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。将 PCR 扩增产物交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将测序结果通过 BLAST 与 NCBI 数据库序列进行比对。

## 1.5 实验方法

### 1.5.1 好氧降酚菌的驯化

为了使好氧型苯酚降解菌成为活性污泥中的优势菌群, 利用苯酚为唯一碳源的选择培养基对其进行逐级驯化培养。取 10 g 活性污泥置于装有 100 mL

苯酚浓度为 200 mg/L 选择培养基的锥形瓶中,用棉花封口后,放入恒温摇床中 30 °C、200 r/min 振荡培养。当培养基中的苯酚完全降解时,取 20 mL 菌悬液接入含有 400 mg/L 苯酚的选择培养基中。以此逐级提高苯酚的浓度,最终得到可以降解 2 000 mg/L 苯酚的降酚菌菌群。

### 1.5.2 好氧降酚菌的分离筛选

将富集、驯化后的菌体培养液按  $10^{-1}$ – $10^{-10}$  梯度稀释,然后在固体分离培养基上进行涂布分离操作,涂布后的培养皿倒置于恒温培养箱中,30 °C 条件下进行好氧培养。随时观察,当平板上长出小型菌落,通过菌落形态观察和显微镜观察区别不同特征的单个菌落,挑取不同菌落分别进行平板划线分离多次,获得纯菌。选取不同纯菌株进行 1 200、1 400、1 600、1 800 mg/L 等浓度苯酚的降解实验,计算苯酚降解率。选择对苯酚耐受性高、降解率高的菌株作为后续研究对象并对其进行鉴定。

### 1.5.3 好氧降酚菌降解性能优化

将分离筛选得到的好氧降酚菌菌落接种到富集培养液中 30 °C、200 r/min 扩大培养,定时测定  $OD_{600}$ ,当其生长至对数期时,将菌液接种到含苯酚的选择培养液中进行苯酚降解实验。通过单因素实验考察不同氮源、不同氮源浓度、pH、温度和接种量等参数对菌株降解苯酚能力的影响,优化降酚菌的降解性能。

### 1.5.4 降酚菌剂的制备

分别选用蛭石、麦麸、硅藻土、谷糠 4 种材料作为载体,测定其吸水率以确定载体与菌剂的配合比。按合适的配合比称取一定量的载体材料,灭菌后在无菌条件下将 20 mL 培养至对数生长期的菌液加入载体材料中并混匀后装入无菌容器,放入 35 °C 恒温干燥箱低温烘干,保存备用。测定不同菌剂在不同保存温度(4、25 °C)和不同保存时间下的活菌数及对苯酚的降解效果,选择最佳的载体材料和最适保存温度。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离和纯化

按逐级驯化的方式不断提高苯酚在培养液中

的浓度,获得对苯酚降解性能好的优势菌群。观察到苯酚浓度为 2 200 mg/L 时培养液不能变浑浊,所以将苯酚浓度为 2 000 mg/L 的培养液在平板上进行涂布,待培养基上长出菌落后,挑取单菌落划线分离 3 次后获得 12 株纯菌。将筛选得到的菌株接种到含不同苯酚浓度的培养液中,在 pH 7.0、30 °C 的条件下测定苯酚降解率。选择一株对苯酚降解性能最好、耐受性最高的菌株作为研究对象,命名为 QWD1。如图 1 所示,此菌株在液体培养基中对苯酚的耐受可以达到 1 600 mg/L,而且在 48 h 内基本可将苯酚完全降解,苯酚浓度越低则完全降解所需时间也越短。

## 2.2 降酚菌株的鉴定

### 2.2.1 形态特征鉴定

如图 2 所示,菌株 QWD1 的菌落呈圆形,白色,不透明,无水溶性色素产生,表面粗糙,有放射状菌丝,与培养基连接紧密。其菌液呈白色,浑浊态。通过环境扫描电镜观察 QWD1 (图 3),菌株为丝状菌,菌丝直径约为 2  $\mu$ m–4  $\mu$ m。

### 2.2.2 分子生物学鉴定

对菌株 QWD1 进行基于 ITS rDNA 基因序列的分子生物学鉴定,将所得序列通过 NCBI 基因库中的序列进行同源性分析并通过软件 MEGA 6.0 使用邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树<sup>[20]</sup>,结果如图 4 所示,表明菌株 QWD1 属于

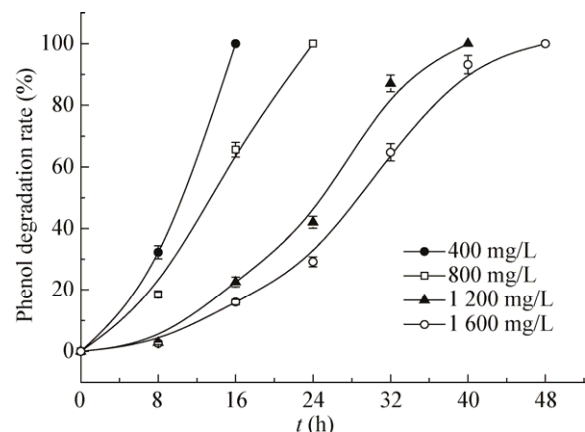


图 1 苯酚浓度对菌株 QWD1 降解能力的影响

Figure 1 Effect of phenol concentration on degradation ability of QWD1



图2 QWD1 菌落形态  
Figure 2 Colony morphology of QWD1

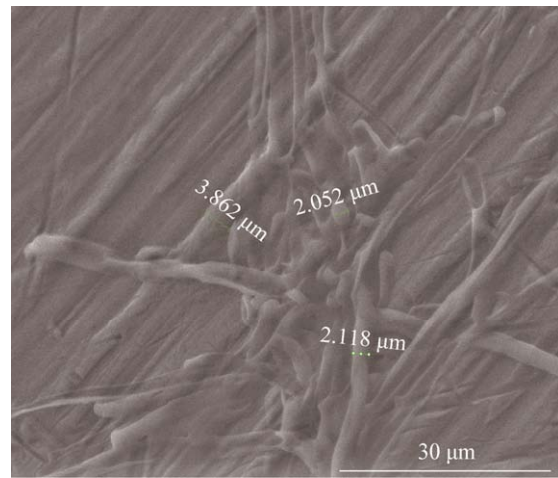


图3 QWD1 环境扫描电镜图  
Figure 3 Environmental scanning electron microscope photo of QWD1

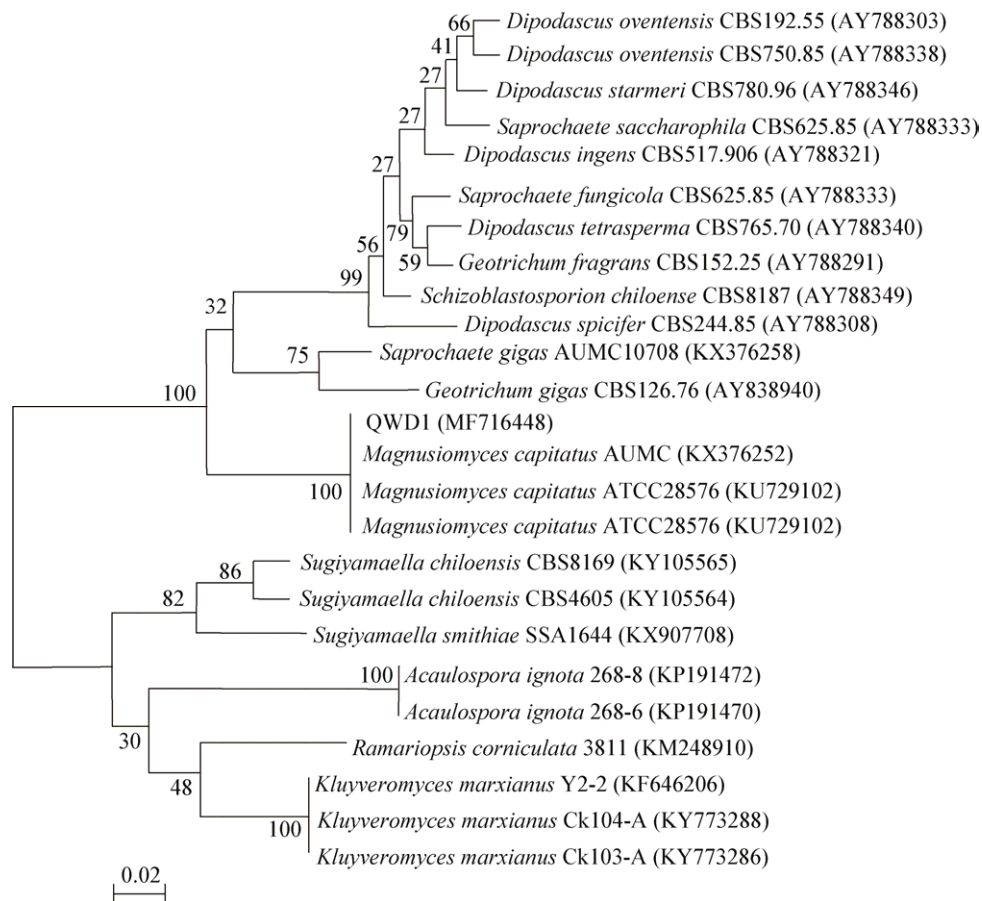


图4 菌株 QWD1 基于 ITS rDNA 基因序列的系统进化树  
Figure 4 The phylogenetic tree of QWD1 based on ITS rDNA gene sequence

注: 括号中的序号代表序列 GenBank 登录号, 分支处标注有自展值, 0.02 标尺代表序列间分歧度。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; The bootstrap values are shown at the node; Bar 0.02 represents sequence divergence.

*Magnusiomyces capitatus*, 而目前尚未有此种属菌株在含酚废水处理中应用的报道。同时, 将 QWD1 的 ITS rDNA 基因序列上传至 GenBank, 获得登录号为 MF716448。

### 2.3 QWD1 菌株的降酚性能优化

为了确定 QWD1 菌株对苯酚的最佳降解效果, 将其接种至含有 1 600 mg/L 苯酚的选择液体培养基中, 分别考察不同氮源、接种量、温度、pH、不同氮源浓度对菌株降解苯酚性能的影响, 以获取最佳降解条件参数。

#### 2.3.1 氮源

氮源是提供微生物生长繁殖所必需氮元素的营养源, 微生物吸收氮元素后用于构成蛋白质、核酸等细胞成分。本实验选择了 L-谷氨酸、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素、 $\text{KNO}_3$  作为研究对象, 在 pH 7.0、温度为 30 °C、接种量为 10% 的情况下, 分别添加 6 mmol/L 不同氮源进行苯酚降解实验以选择降解苯酚的最适氮源。结果如图 5 所示, 菌株 QWD1 对无机氮源的利用效果比有机氮源好, 其中氮源为  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  时苯酚降解效果最好, 32 h 的降解率可达到 78.3%。

#### 2.3.2 接种量

接种量直接影响苯酚的降解效果, 接种量过小时, 菌株生长停滞期延长; 接种量过大时, 一方面增加预配养成本, 另一方面微生物之间会竞争营养物质, 代谢产物也会增多, 从而影响苯酚降解效果。最适接种量的确定对今后的实际应用具有重要意义。

设置菌株 QWD1 接种量梯度为 5%、10%、15%、20%、25%, 在苯酚浓度 1 600 mg/L、pH 7.0、温度为 30 °C 的条件下培养, 每隔 4 h 测定苯酚浓度, 苯酚降解率变化如图 6 所示。可以看出, 当接种量过小时, 菌株降解苯酚的迟滞期显著延长, 对苯酚的最终去除效果也明显低于其他设置; 随着接种量的增加, 菌株降解苯酚的适应期越来越短, 苯酚去除率不断提高。接种量分别为 15%、20%、25% 时,

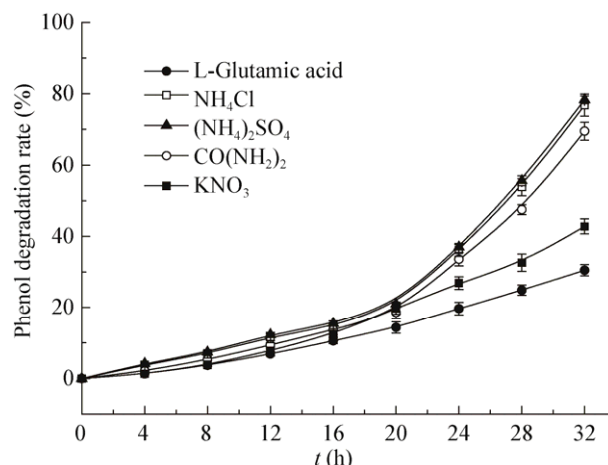


图 5 不同氮源下菌株 QWD1 的苯酚降解曲线图  
Figure 5 Degradation rate of phenol of strain QWD1 under different nitrogen sources

32 h 后培养液中的苯酚均基本降解完全, 说明适当提高接种量可以有效提高菌株对苯酚的降解效果, 但接种量过大对苯酚去除效果提高不明显, 而且会增加处理成本。经综合考虑, 选择 15% 为最佳接种量。

#### 2.3.3 温度

温度通过影响微生物酶活性和生长速率从而影响着降解苯酚的效果, 选择合适的培养温度有助于提高酶促反应, 加快微生物的细胞新陈代谢速率。

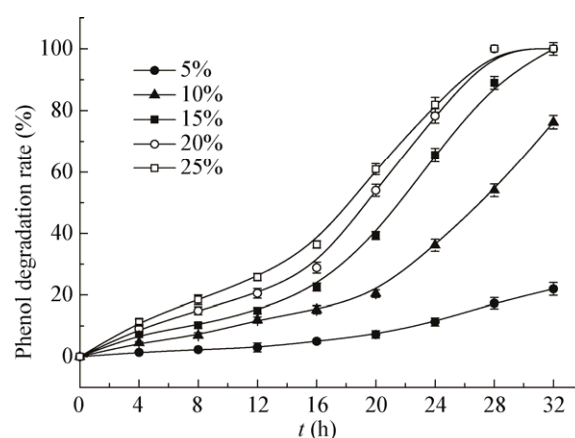


图 6 不同接种量时菌株 QWD1 的苯酚降解曲线图  
Figure 6 Degradation rate of phenol of strain QWD1 under different inoculation amount

设置温度梯度为 20、25、30、35、40 °C, 在 pH 7.0 条件下培养 28 h 时, 菌株 QWD1 苯酚降解率和微生物量如图 7 所示。可以看出, 菌株最佳生长和降解苯酚的温度为 35 °C, 28 h 时苯酚降解率可以达到 91.46%。温度过高时会使参与降解酚类的酶蛋白变性失活; 而温度过低时酶活性降低, 微生物生长代谢变慢, 表现为细菌数量增长缓慢和降酚能力变差。

### 2.3.4 pH

pH 对微生物的生命活动和代谢活力具有很重要的影响。pH 的改变不仅会影响微生物胞外水解酶的活性<sup>[21-22]</sup>, 增大有害物质对微生物的毒性, 还会引起细胞膜电荷的变化, 从而影响微生物对环境中营养物质的吸收以及对污染物的降解能力<sup>[23-24]</sup>。不同的微生物其适宜的 pH 环境也不同, 探究其 pH 适应范围和最佳 pH, 对通过调节酸碱性能来提高微生物的降解效果是非常必要的。

设置初始 pH 梯度分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0, 在菌株 QWD1 接种量为 15%、温度为 35 °C 条件下培养 28 h 时, 苯酚降解率和微生物量如图 8 所示。菌株 QWD1 能够生长的培养基 pH 范围为 4.0–10.0, 并且不同 pH 下微生物生长速率和苯酚降解率有明显区别, 其中 pH 在 6.0–8.0 时苯酚去除率和生物量相对较高, 该范围内 28 h 时苯酚

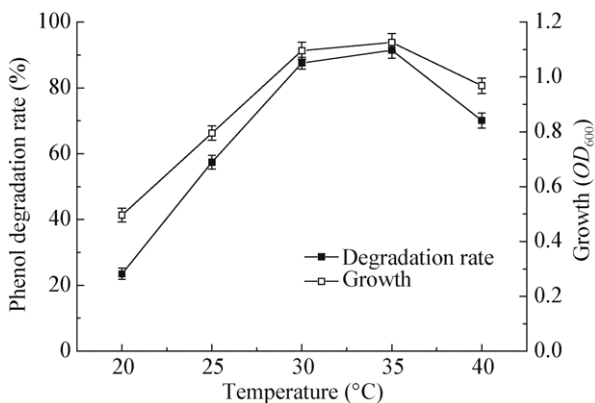


图 7 温度对菌株 QWD1 降解苯酚性能和生长的影响  
Figure 7 Effect of temperature on phenol degradation and growth of strain QWD1

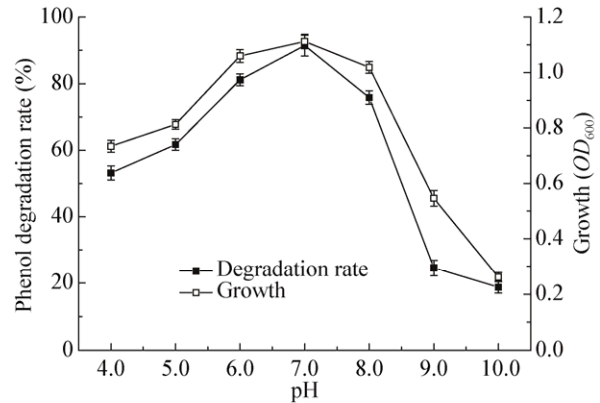


图 8 pH 对菌株 QWD1 苯酚降解性能和生长的影响  
Figure 8 Effect of pH on phenol degradation and growth of strain QWD1

去除率达到 70% 以上, 其最适 pH 为 7.0, 此条件下 28 h 时降解率可以达到 92% 左右。当 pH 为 3.0 和 11.0 时, 细菌量并无明显增长, 这与之前的研究结果一致, 即当 pH 与中性差异显著时, 大多数微生物的代谢过程被抑制<sup>[25-27]</sup>。此外, 通过测定反应后的培养液最终 pH, 发现 pH 都有所降低, 是因为苯酚降解过程中会生成一些有机酸的中间产物, 主要是己二酸、羟基粘酸、丙酮酸、琥珀酸等羧基酸, 这与苯酚降解的机理相符合<sup>[28]</sup>。

### 2.3.5 氮源浓度

氮源是影响微生物固碳效果的重要因素, 合适的氮源添加会提高微生物的固碳效率<sup>[29]</sup>。本研究设置氮源浓度梯度分别为 2、6、10、14、18 mmol/L, 在菌株 QWD1 接种量为 15%、温度为 35 °C、pH 为 7.0 的条件下培养 28 h 时, 苯酚降解率和微生物量如图 9 所示。可以看出氮源浓度对菌株生长和降酚能力的影响并不如温度和 pH 显著, 菌株在不同的氮源浓度下对苯酚的降解率均可以达到 90% 左右。其中当氮源浓度为 14 mmol/L 时, 菌株的生物量积累最大, 苯酚降解率也最高, 可以达到 97.15%。

综上所述, 相比于当前筛选出的一些菌株, 如 Jiang 等<sup>[3]</sup>从制药厂分离出的嗜盐真菌 JS4 降解 500 mg/L 的苯酚需要 32 h; 薛智权等<sup>[30]</sup>从污水处理厂曝气池中分离得到的热带假丝酵母 GY8 降解



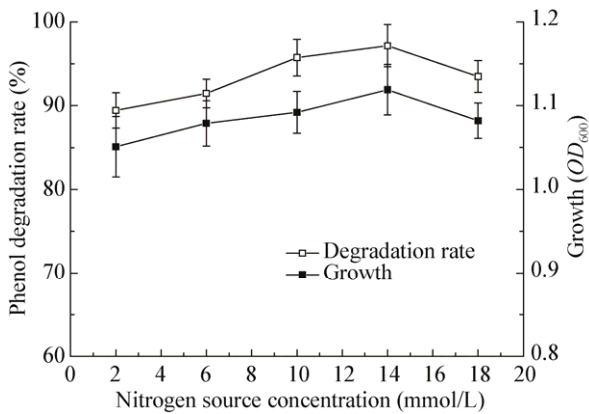


图9 氮源浓度对菌株 QWD1 苯酚降解性能和生长的影响  
Figure 9 Effect of nitrogen source concentration on phenol degradation and growth of strain QWD1

1.0 g/L 的苯酚需要 48 h。QWD1 显示出较高的苯酚耐受性和良好的苯酚降解效率, 28 h 对 1 600 mg/L 的苯酚降解率就可以达到 97.15%。

## 2.4 降酚菌剂的制备

目前对降酚菌剂制备的研究多采用包埋固定法, 如葛启隆等<sup>[31]</sup>以海藻酸钙为材料, 对降酚菌株进行包埋固定化; El-Naas 等<sup>[32]</sup>将恶臭假单胞菌固定在聚乙烯凝胶上。而对于利用载体直接吸附法的研究还较少, 包埋固定法操作复杂、成本高等问题也限制了其在实际应用中的推广。基于此, 本研究选择了原料丰富易得、操作简单的吸附法构建降酚菌剂, 对降酚菌剂载体吸附法的可行性和性能进行研究。

### 2.4.1 不同载体的吸水率

称取不同载体材料各 50 g 于烧杯中, 按梯度加入菌液并使菌液和载体充分混匀, 直到载体材料湿润、疏松且不结块、不粘壁时为止。实验得出蛭石、麦麸、硅藻土、谷糠 4 种载体的吸水率分别为 25%、45%、25%、40%。

### 2.4.2 不同保存温度下菌剂的活菌数

菌剂的保存稳定性直接影响其使用效果, 为评价不同载体制备菌剂的稳定性, 以不同载体制备的 4 种菌剂分别保存于 4 °C 和常温(25±5 °C)条件下, 在 2、10、20、35、60、90 d 时分别取 1 g 菌剂到

装有 100 mL 无菌水的锥形瓶中 200 r/min 振荡 2 h, 用稀释平板计数法测定载体活菌数, 设置 3 组平行实验并计算平均值。

结果如表 1 和表 2 所示, 可以看出, 采用不同载体材料制备的菌剂活化后微生物生长量差异很大。由于每种载体吸水率的差别, 所能定殖的菌量也有差别(0 d 时不同菌剂的活菌数通过测定接种到载体中的菌液的活菌数计算得到)。谷糠和麦麸由于其吸水性较强, 比表面积较大而更有利于菌株的吸附和固定, 因而初始有效活菌数多。同时, 在菌剂制备完成后常温烘干时间内, 由于麦麸和谷糠含有丰富的粗蛋白、粗脂肪、粗纤维等有机质和氮、磷、钾等元素, 可以供菌体利用维持生命活动并进

表 1 4 °C 保存条件下不同菌剂的有效活菌数

Table 1 The number of effective viable fungi of different microbial inoculum of storage in 4 °C ( $\times 10^5$  CFU/g)

载体材料 Carrier material	Time (d)						
	0	2	10	20	35	60	90
蛭石	36.5	12.2	14.2	13.6	11.8	12.1	11.2
Vermiculite							
麦麸	66.4	2 140	3 280	607	105	0.000 93	0
Wheat bran							
硅藻土	41.70	1.45	1.70	4.30	2.23	1.40	1.20
Kieselguhr							
谷糠	58.4	2 400	2 360	2 410	2 470	2 500	2 480
Cavings							

表 2 常温保存下不同菌剂的有效活菌数

Table 2 The number of effective viable fungi of different microbial inoculum of storage in normal temperature ( $\times 10^5$  CFU/g)

载体材料 Carrier material	Time (d)						
	0	2	10	20	35	60	90
蛭石	36.5	15.6	14.5	14.0	10.6	1.27	0.89
Vermiculite							
麦麸	66.4	2 720	2 310	0.000 8	0	0	0
Wheat bran							
硅藻土	41.70	5.30	5.07	3.60	3.03	2.67	1.61
Kieselguhr							
谷糠	58.4	3 140	3 200	2 780	890	625	420
Cavings							

行增殖, 出现了活菌数的一个明显增长。此外, 可以看出, 在不同的保存温度下, 载体中的活菌数随时间会发生一定的变化。以蛭石和硅藻土为载体的菌剂在不同温度下 90 d 的保存效果并没有明显变化, 90 d 时的有效活菌数分别为  $1.12 \times 10^6$  CFU/g 和  $1.2 \times 10^5$  CFU/g。以麦麸为载体的菌剂虽然在 10 d 时的活菌数最多, 达到  $2.3 \times 10^8$  CFU/g, 但随后快速下降, 4 °C 保存效果较常温保存效果稍好。通过测定发现以麦麸为载体的菌剂 pH 随着保存时间的延长不断增大, 超过菌体的耐受范围后引起了菌体的大量死亡, 推测是因为菌体利用麦麸含有的某些有机物代谢生长时会产生碱性物质而引起 pH 变化, 常温较低温新陈代谢更快, 因而 pH 变化更为明显。而以谷糠为载体的菌剂, 在 4 °C 保存时, 90 d 时的有效活菌数一直保持较高水平, 高达  $2.5 \times 10^8$  CFU/g 左右; 25 °C 保存时, 在 35 d 时的活菌数开始下降。测定发现以谷糠为载体的菌剂 pH 始终稳定在 6.0–7.0 左右, 适于作为长期保存的菌剂载体。综上所述, 利用谷糠作为载体制备的菌剂具有较好的储藏稳定性, 4 °C 保存效果优于常温保存, 菌剂可保存 90 d 甚至更长时间。

#### 2.4.3 不同保存温度下菌剂对苯酚的降解效果

有效活菌数并不能体现菌剂处理含酚废水的效果, 所以需要考察菌剂活性和降解苯酚性能随时间的变化。将保存于 4 °C 和常温(25±5 °C) 2 种温度条件下以不同载体制备的菌剂, 在 2、10、20、35、60、90 d 时分别取 0.1 g 菌剂加入到 50 mL 苯酚浓度为 500 mg/L 的模拟废水中, 测定 24 h 时的苯酚降解率, 以此表征菌剂中的菌株活性和降解苯酚的能力。结果如图 10 和图 11 所示, 可以看出, 2 种温度保存下的菌剂对苯酚的去除效果均有波动, 其中以麦麸为载体的菌剂分别在 35 d 和 10 d 前具有良好的降解苯酚效果, 24 h 内基本可以将苯酚降解完全; 但随保存时间的延长, 降解苯酚的效果快速下降。以蛭石和硅藻土为载体的菌剂在 2 种保存温度下 24 h 对苯酚的去除效果普遍不高。而以谷糠为

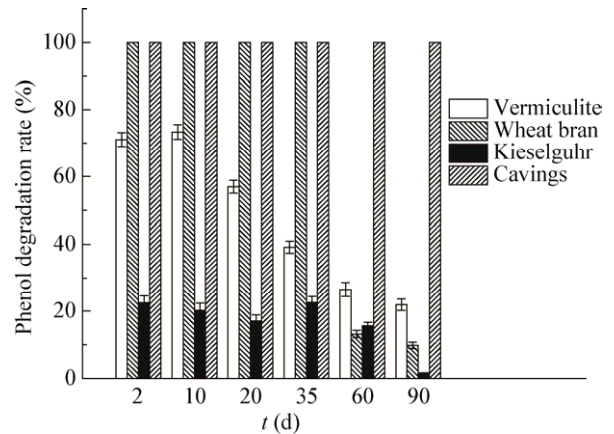


图 10 4 °C 保存下不同菌剂降解苯酚的效果  
Figure 10 The phenol-degrading rates of different microbial inoculum of storage in 4 °C

载体的菌剂, 无论是 4 °C 还是常温下, 保存 90 d 内 24 h 对苯酚的去除率均可以达到 100% 左右。综上所述, 以谷糠为载体的菌剂对苯酚的去除效果最好, 90 d 内 4 °C 和常温保存均对苯酚有较高的去除率, 这证明了合适的载体不仅会提供给微生物一定的碳源以满足它们的生命活动, 更能帮助微生物保持活性。如范伟平等<sup>[33]</sup>用稻草末固定白腐菌用于染料废水处理, 认为稻草末载体加入有利于提高白腐菌稳定性; 谢冬瑾<sup>[34]</sup>用木屑吸附固定白腐真菌对初始苯酚浓度为 282 mg/L 的模拟废水进行处理, 16 h 的苯酚去除率可以达到 100%。

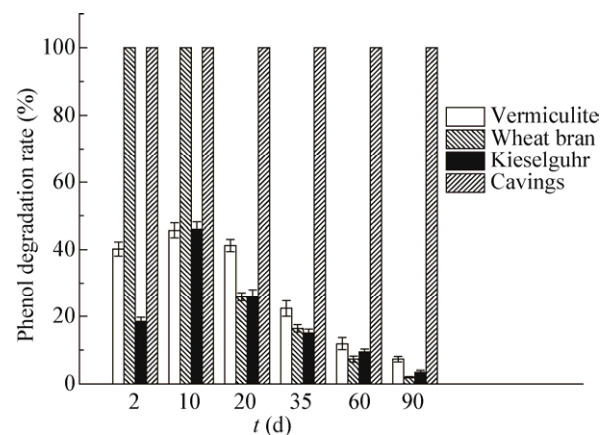


图 11 常温保存下不同菌剂降解苯酚的效果  
Figure 11 The phenol-degrading rates of different microbial inoculum of storage in normal temperature

### 3 讨论与结论

苯酚是许多工业废水中最常见的污染物之一,其环境暴露后的生态危害极大,基于微生物降解的含苯酚污水处理技术集反应条件温和、成本低和无二次污染等优点,极具开发潜力。目前,很多研究者通过不同方法从环境样品中分离获得了多种降解苯酚的细菌,并做了大量的研究工作,但对降解真菌的研究还较少。本研究从处理造纸厂废水活性污泥中分离筛选出的 *Magnusiomyces capitatus* 真菌 QWD1, 目前尚未有对其在含酚废水处理中应用的报道。对影响苯酚降解的实验因素进行优化后表明,相较于现在已分离出的一些降解菌株, QWD1 更能承受较高的有机负荷且降解效率高, 28 h 对 1 600 mg/L 苯酚的最大去除率达到 97.15%。

同时,本研究选择了原料丰富易得、操作简单的吸附法构建降解菌剂,并对菌剂性能进行优化。通过比较以蛭石、麦麸、硅藻土、谷糠为载体制备的菌剂在不同保存温度和保存时间的有效活菌数和苯酚降解效果,证明了有机载体由于其营养物质丰富更有利于菌株的保存,而且对微生物无毒害作用、传质性好,其中以谷糠为载体制备的菌剂在保存过程中 pH 稳定,单位有效活菌数高且投加后降解苯酚效果好,保存时间可达到 90 d 甚至更长。

综上所述,本研究分离得到一株高浓度苯酚耐受性和高降解效率的真菌菌株 QWD1,并制备了稳定性高、活性高、应用环境广泛的固定化降解菌剂,在含酚废水生物强化处理方面极具应用潜力。

### REFERENCES

- [1] Sivasubramanian S, Namasivayam SKR. Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2015, 3(1): 243-252
- [2] Huang DL, Wang C, Xu P, et al. A coupled photocatalytic-biological process for phenol degradation in the *Phanerochaete chrysosporium*-oxalate-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> system[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 97: 115-123
- [3] Jiang Y, Shang Y, Yang K, et al. Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(4): 1883-1890
- [4] Christoskova S, Stoyanova M. Degradation of phenolic waste waters over Ni-oxide[J]. *Water Research*, 2001, 35(8): 2073-2077
- [5] El-Naas MH, Al-Zuhair S, Alhaja MA. Removal of phenol from petroleum refinery wastewater through adsorption on date-pit activated carbon[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 162(3): 997-1005
- [6] Arena F, Italiano C, Ferrante GD, et al. A mechanistic assessment of the wet air oxidation activity of MnCeO<sub>x</sub> catalyst toward toxic and refractory organic pollutants[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2014, 144: 292-299
- [7] D'Abzac P, Bordas F, van Hullebusch E, et al. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 85(5): 1589-1599
- [8] Chen M, Zhang W, Xu YQ, et al. Study on characteristics of *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2 for phenol degradation[J]. *China Environmental Science*, 2001, 21(3): 226-229 (in Chinese)  
陈明, 张维, 徐玉泉, 等. 醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 对苯酚的降解特性研究[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(3): 226-229
- [9] Shen XH, Liu ZP, Wang BJ, et al. Isolation, identification of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain PNAN5 and characterization of its ring-cleavage dioxygenases[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(3): 482-486 (in Chinese)  
沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株(*Rhodococcus* sp. strain PNAN5)的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. *环境科学学报*, 2004, 24(3): 482-486
- [10] Dong XJ, Hong Q, He LJ, et al. Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(3): 257-262
- [11] Latha S, Mahadevan A. Role of rhizobia in the degradation of aromatic substances[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1997, 13(6): 601-607
- [12] Jiang Y, Yang K, Wang HY, et al. Characteristics of phenol degradation in saline conditions of a halophilic strain JS3 isolated from industrial activated sludge[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 99(1/2): 230-234
- [13] Leitão AL, Duarte MP, Oliveira JS. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 59(3): 220-225
- [14] Perron N, Welander U. Degradation of phenol and cresols at low temperatures using a suspended-carrier biofilm process[J]. *Chemosphere*, 2004, 55(1): 45-50
- [15] Dong J, Song YD, Zhou YX, et al. Community analysis, isolation and identification of phenol-degrading fungi in aerated biological fluidized tank[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(5): 997-1002 (in Chinese)  
董婧, 宋玉栋, 周岳溪, 等. 曝气生物流化床中苯酚降解真菌的种群结构及分离鉴定研究[J]. *环境工程学报*, 2011, 5(5): 997-1002

- [16] Zhu QQ, Gu ZQ, Guo T, et al. Development of fungi-bacteria consortia agent and its biodegradation of the mixed waste gas containing  $\alpha$ -pinene, butyl acetate and o-xylene[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(7): 2498-2505 (in Chinese)  
朱勤勤, 顾执奇, 郭涛, 等. “真菌-细菌”复合菌剂的构建及其降解阿尔法蒎烯, 乙酸丁酯和邻二甲苯混合废气的性能研究[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(7): 2498-2505
- [17] Chen JM, Zhu RY, Yang WB, et al. Treatment of a BTo-X-contaminated gas stream with a biotrickling filter inoculated with microbes bound to a wheat bran/red wood powder/diatomaceous earth carrier[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(21): 8067-8073
- [18] Santos VL, Heilbuth NM, Linardi VR. Degradation of phenol by *Trichosporon* sp. LE3 cells immobilized in alginate[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2001, 41(3/4): 171-178
- [19] Wang XQ, Yang HH, Zhang Y, et al. Remarkable enhancement on hydrogen production performance of *Rhodobacter sphaeroides* by disrupting *spbA* and *hupSL* genes[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, 39(27): 14633-14641
- [20] Li YL, Han GM, He SE, et al. A new strategy for construction of Phylogenetic tree based on DNA molecular mark data[J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2008(4): 168-170 (in Chinese)  
李亚玲, 韩国民, 何沙娥, 等. 基于 DNA 分子标记数据构建系统进化树的新策略[J]. *生物信息学*, 2008(4): 168-170
- [21] Zhu Z, Li T, Wang DS, et al. Effect of pH on surface properties and physical structure of activated sludge flocs[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(12): 1599-1604 (in Chinese)  
朱哲, 李涛, 王东升, 等. pH 对活性污泥表面特性和形态结构的影响[J]. *环境工程学报*, 2008, 2(12): 1599-1604
- [22] Qu SL, Sun BS, Zhao SH, et al. pH activated sludge sedimentation performance and the structure of the microbe of SBR technology[J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(3): 508-515 (in Chinese)  
璩绍雷, 孙宝盛, 赵双红, 等. pH 对间歇进水序批式生物反应(SBR)工艺活性污泥沉降性能和微生物结构的影响[J]. *环境化学*, 2016, 35(3): 508-515
- [23] Wei JH, Sun BS, Zhao SH, et al. Effect of pH on operational performance and microbial community structure of activated sludge of SBR[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(3): 1953-1958 (in Chinese)  
魏佳虹, 孙宝盛, 赵双红, 等. pH对SBR处理效果及活性污泥微生物群落结构的影响[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(3): 1953-1958
- [24] Zhou QQ. Isolation of phenol-degrading fungi and preliminary studies on its degrading characteristics[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiaotong University, 2011 (in Chinese)  
周倩倩. 颗粒污泥内苯酚降解真菌的筛选及其特性研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2011
- [25] Palanisamy N, Ramya J, Kumar S, et al. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil[J]. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 2014, 12(1): 142
- [26] Pimda W, Bunnag S. Biodegradation of waste motor oil by *Nostoc hatei* strain TISTR 8405 in water containing heavy metals and nutrients as co-contaminants[J]. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*, 2015, 28: 117-123
- [27] Valenzuela JF, Pinuer L, Cancino AG, et al. Effect of pH and dilution rate on specific production rate of extra cellular metabolites by *Lactobacillus salivarius* UCO\_979C in continuous culture[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(15): 6417-6429
- [28] Nakazawa T, Yokota T. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida(arvilla)* mt-2: demonstration of two benzoate pathways[J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 115(1): 262-267
- [29] Li J, Wu MM, Hu JJ, et al. Determination of optimal combining inorganic nitrogen on CO<sub>2</sub> fixation by a non-photosynthetic microbial community using orthogonal design[J]. *Industrial Microbiology*, 2012, 42(5): 14-18 (in Chinese)  
李军, 武满满, 胡佳俊, 等. 非光合固碳微生物菌群最佳组合氮源的正交实验分析[J]. *工业微生物*, 2012, 42(5): 14-18
- [30] Xue ZQ, Wang XY, Li H, et al. Study on isolation, identification and characteristic of phenol degradation fungus[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2016, 44(6): 801-804 (in Chinese)  
薛智权, 王向英, 李宏, 等. 高效降解真菌的分离、鉴定及特性研究[J]. *山西农业科学*, 2016, 44(6): 801-804
- [31] Ge QL, Yue XP, Wang GY. Isolation and identification of a phenol-degrading strain and optimization for its immobilization using response surface methodology[J]. *China Environmental Science*, 2014, 34(2): 518-525 (in Chinese)  
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
- [32] El-Naas MH, Al-Muhtaseb SA, Makhlof S. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(2/3): 720-725
- [33] Fan WP, Cao HJ, Zhang J, et al. Study on the treatment of dye wastewater by white-rot fungi immobilized on rice straw powder[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2002, 22(1): 7-11 (in Chinese)  
范伟平, 曹惠君, 张俊, 等. 稻草末固定白腐菌处理染料废水的研究[J]. *化工环保*, 2002, 22(1): 7-11
- [34] Xie DJ. Immobilization of white rot fungi and its application in wastewater treatment[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Science and Technology, 2008 (in Chinese)  
谢冬瑾. 白腐真菌的固定化及其在废水处理中的应用[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2008