

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2015.0813

魏霞,周俊利,谢柳,等.2016.苯酚降解菌 CM-HZX1 菌株的分离、鉴定及降解性能研究[J].环境科学学报,36(9):3193-3199

Wei X, Zhou J L, Xie L, et al. 2016. Isolation, identification and characterization of phenol-degrading strain CM-HZX1 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 36(9):3193-3199

苯酚降解菌 CM-HZX1 菌株的分离、鉴定及降解性能研究

魏霞¹,周俊利²,谢柳¹,赵鸭美¹,杨岳平^{1,3,*}

1. 湖州环境科技创新中心,湖州 313028

2. 湖州至美生物科技有限公司,湖州 313000

3. 浙江大学环境工程研究所,杭州 310058

收稿日期:2015-10-19

修回日期:2015-12-23

录用日期:2015-12-25

摘要:从污水处理厂的活性污泥中分离出一株以苯酚为唯一碳源生长的高效降解苯酚菌 CM-HZX1.通过形态特征、生理生化及 16S rDNA 基因序列分析,初步鉴定菌株属于红球菌(*Rhodococcus* sp.),16S rDNA 在 GeneBank 的登录号为 KM014567.实验结果表明,菌株 CM-HZX1 培养及降解苯酚的最适条件为 pH=7.0,温度 30 ℃,转速为 150 r·min⁻¹.该菌株能耐受 4% 的盐度,适应性强.0.5 g·L⁻¹ 苯酚在 24 h 时的降解率可达 93.6%,1.5 g·L⁻¹ 苯酚在 48 h 时的降解率在 90% 以上.研究表明,该菌株在处理工业含酚废水方面具有广阔的应用前景.

关键词:苯酚;红球菌;16S rDNA;生物降解

文章编号:0253-2468(2016)09-3193-07

中图分类号:X703

文献标识码:A

Isolation, identification and characterization of phenol-degrading strain CM-HZX1

WEI Xia¹, ZHOU Junli², XIE Liu¹, ZHAO Yamei¹, YANG Yueping^{1,3,*}

1. Huzhou Environmental Science and Technology Innovation Center, Huzhou 313028

2. Huzhou Chimey Biological Technology Co. Ltd., Huzhou 313000

3. Institute of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058

Received 19 October 2015;

received in revised form 23 December 2015;

accepted 25 December 2015

Abstract: A strain CM-HZX1 which can use phenol as the sole carbon source, was isolated from activated sludge of the sewage treatment plant. The strain CM-HZX1, was tentatively identified as *Rhodococcus* sp. based on morphological and physiological-biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, with the accession number of KM014567 deposited in Genbank. The results indicate that the optimal conditions for the growth of strain CM-HZX1 and its degradation of phenol are pH 7, 30 ℃, 150 r·min⁻¹ of shaking. It shows strong adaptability in 4% NaCl aqueous solution. Its phenol degradation removal efficiency was up to 93.6% with in 24 hours with an initial phenol concentration of 0.5 g·L⁻¹, and was up to 90% with in 48 hours under initial phenol concentration of 1.5 g·L⁻¹. The strain would have a good application potential for the treatment of phenol-containing industrial wastewater.

Keywords: phenol; *Rhodococcus* sp.; 16S rDNA; biodegradation

1 引言(Introduction)

含酚废水主要来源于炼油、焦化、煤气和以苯酚或酚醛为原料的化工、造纸、冶炼、纺织印染等行业的生产过程中.此类废水来源广、水量大、组分复杂、毒性大,是我国水污染控制中列为重点解决的有毒有害废水之一(聂玉冰,2011).在水体中,5

mg·L⁻¹ 以上的苯酚即可对鱼类的生存构成威胁 (Chung *et al.*, 2003).苯酚被美国环保署列入优先控制污染物和 65 种有毒污染物名单,也是我国优先控制污染物之一(金相灿等,1990).我国污水综合排放标准 (GB8978-1996) 规定,挥发酚的一级标准、二级标准和三级标准分别为 0.5、0.5、2.0 mg·L⁻¹.

随着我国工业化程度的提高,各种含酚废水也

基金项目:湖州科技计划项目(No.2013KC01)

Supported by the Science and Technology Research Program of Huzhou City(No.2013KC01)

作者简介:魏霞(1986—),女,E-mail:wx9559900@163.com; * 通讯作者(责任作者),E-mail: yangyp@chimeyep.com

Biography: WEI Xia(1986—), female, E-mail: wx9559900@163.com; * Corresponding author, E-mail: yangyp@chimeyep.com

相应增多,随之而来的酚类污染已经威胁着人类和动物,因此,必须寻找有效的方法治理含酚废水(李焱等,2008; Jeong *et al.*, 2003).国内外关于含酚废水处理的研究很多,其中,物理、化学法具有操作简单、见效快的特点,但也存在能耗大、成本高且容易引起二次污染等不足;而生物强化法则利用微生物的新陈代谢作用将废水中的酚类物质代谢成二氧化碳、氨、二氧化硫等稳定的小分子,利用微生物体内的酶来分解酚以合成自身的有机质,使污水得到净化.这种方法不仅危害少,而且成本低廉,因此,在苯酚污染的治理中起到了越来越重要的作用(Chung *et al.*, 2003).但目前生物处理技术只限于处理低浓度的含酚废水,而高浓度含酚废水具有污染物浓度高、可生化性差等特点,制约了这一技术在实际中的应用.

近年来,许多学者从酚类污染严重的环境中分离到许多降解苯酚的微生物菌种,主要包括 *Pseudomonas* sp. (宋璟等, 2010)、*Bacillus* sp. (张楠等, 2010)、*Candida tropicalis* (周倩倩等, 2011)、*Brucella* sp. (周集体等, 2010)、*Bacillus cereus* (温洪宇等, 2009; 姜立春等, 2011)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes* sp.) (Baek *et al.*, 2001; Essam *et al.*, 2010)、微球菌属 (*Micrococcus* sp.) (凌琪等, 2007)、红球菌 (*Rhodococcus* sp.) (沈锡辉等, 2004)、不动杆菌 (*Acinetobacter*) (Liu *et al.*, 2009)、醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.)、根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) (Wei *et al.*, 2008)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*) 等. 这些菌

种都能以苯酚为单一碳源进行生长,但由于不同的微生物菌种和不同的实验条件导致生物降解能力差异较大. Lee 等 (2001) 曾筛选到一株降解苯酚的酵母菌 (*Yarrowia Lipolytica* Y103), 可以降解 $47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚; 高振贤等 (2005) 研究发现, *R. MetaLlidurans* CH34 菌株降解 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $378 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的苯酚需要 48 h; 热带假丝酵母 8953 菌株在 48 h 内可完全降解约 $14.88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚 (梁树才等, 2007); *Neis-seria Gonorrhoea* BF-1 菌株能在 24 h 内降解 99.60% 的 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚 (刘亮等, 2010). 总之, 虽然目前报道的去除苯酚的微生物种类较多, 但这些菌株还存在耐酚浓度较低, 降解酚需时较长, 菌体生长及降解酚适应条件窄等不足, 因此, 有必要进一步开展苯酚降解微生物资源的发掘工作.

基于此, 本研究从湖州污水处理厂的活性污泥中分离筛选到一株高效苯酚降解菌, 结合形态学观察、生理生化实验和分子鉴定等方法确定其种属信息, 鉴定为 (*Rhodococcus* sp.) CM-HZX1; 同时, 研究 pH、温度、转速、苯酚含量及盐度等对菌株 CM-HZX1 降解苯酚的影响, 以为含酚废水的处理提供一定的理论技术支持.

2 材料与方法 (Material and methods)

2.1 菌株来源与试验仪器

本实验分离得到的菌株 CM-HZX1 来自湖州污水处理厂的活性污泥中. 实验仪器相关信息见表 1.

表 1 实验仪器

Table 1 Experimental apparatus

仪器名称	型号	厂家
分析天平	BSA124S	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司
紫外可见分光光度计	UV-2102C	尤尼克(上海)仪器有限公司
电热恒温水浴锅	DK-S26	上海精宏实验设备有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-50A	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
超低温保存箱	DW-86L386	青岛海尔特种电器有限公司
台式离心机	TGL-16C	上海安亭科学仪器厂
离心机	3K15	德国
恒温摇瓶柜	HZ-2010KA	太仓市科教器材厂
酸度计	FE20K	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
琼脂糖水平电泳仪	DYCP-31CN	北京市六一仪器厂
双稳定时电泳仪电源	DYY-6C	北京市六一仪器厂
全自动凝胶成像分析仪	JS-6800	上海培清科技有限公司

2.3 培养基

2.3.1 LB 培养基 胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母粉 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 以无酚蒸馏水配制, 调节 pH 值为 7.0, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温蒸汽灭菌 20 min. LB 琼脂平板培养基中需加入 $10 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂.

2.3.2 无机盐培养基 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO_4 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 无酚水定容, 调节 pH 为 7.0~7.2, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温蒸汽灭菌 20 min. 平板培养基中需加入 $10 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂.

2.3.3 苯酚无机盐培养基 一定量的苯酚加入上述无机盐培养基中, pH 调节至 7.0~7.2, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温蒸汽灭菌 20 min. 平板培养基中需加入 $10 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂.

2.4 实验指标

细菌生长量的测定: 以 600 nm 处的光吸收值 (OD 值) 代表该菌体的生长状况. 苯酚值的测定: 根据《水和废水监测分析方法 (第四版)》的 4-氨基安替比林直接光度法测定挥发酚 (以苯酚计). 苯酚降解率: $\eta = (1 - C_t / C_0) \times 100\%$, 其中, η 为苯酚降解率, C_t 为反应后的苯酚浓度, C_0 为初始的苯酚浓度.

2.5 方法

2.5.1 分离与筛选 取适量从湖州污水处理厂取回的活性污泥样品 (约 5 g) 加到苯酚浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LB 培养基中, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上振荡培养; 待溶液由澄清变浑浊后, 取上清液 10 mL 转接到苯酚浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LB 培养基中, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床上振荡培养; 如此转接直至苯酚浓度提高至 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 然后取 10 mL 菌液到 100 mL 苯酚浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐培养基中, 待培养液由澄清变浑浊后, 收集保存.

取上述驯化培养的菌液 1 mL , 配制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度的稀释液, 然后取 $100 \sim 200 \text{ } \mu\text{L}$ 稀释液平板涂布在苯酚无机盐固体培养基平板上, 每个稀释度做 3 个重复, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温黑暗培养 1 周, 观察平板上菌落的生长情况. 挑选其中清晰可见的单菌落多次分离纯化, 得到 4 株纯菌株.

挑取 4 株单菌接种至 50 mL 一定浓度苯酚的无机盐培养基中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床富集培养 7~10 d, 检测培养基中苯酚的含量, 从而判断菌株降解苯酚的能力, 筛选出一株以苯酚为唯一碳源生长且具有高效降解能力的菌株, 命名为 CM-HZX1.

2.5.2 菌株的鉴定 形态学观察: 主要针对菌落形态, 包括菌株长在平板上的形态、光泽、大小等; 细胞形态观察主要是对菌株进行电镜扫描. 生理生化特征实验: 按照北京陆桥公司购入的试剂盒进行实验.

分子鉴定: 包括 16S rDNA 基因序列分析及系统发育树构建, 用英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成的酶提取 CM-HZX1 菌株的 DNA, 扩增该菌株的 16S rDNA, 将获得的 PCR 产物纯化后委托上海立菲生物技术有限公司测序. 引物为 27F: 5' to 3': -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-, 1492R: 5' to 3': -GGY TAC CTT GTT ACG ACT T- (英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成). 测序结果提交 NCBI GenBank (National Center of Biotechnology Information), 用 BLAST 进行相似性检索和同源性比较. 利用 MEGA5.0 软件对这些细菌构建系统发育树, 并进行同源性分析.

2.5.3 苯酚降解菌生长曲线的研究 在 500 mL 锥形瓶中配制 300 mL 约 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚培养基, 转接量约为 15%, 离心取菌泥加至苯酚培养基, pH = 7.0, 温度设定为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速设定为 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 隔一定时间段取样检测挥发酚值, 以不加菌株的培养基作为对照. 以时间为横坐标, 苯酚降解率为纵坐标, 绘制图形.

2.5.4 苯酚降解菌最适条件的研究 初始 pH 对降解苯酚的影响: 在 500 mL 锥形瓶中配制 300 mL 约 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚培养基, 转接量约为 15%, 离心取菌泥加至苯酚培养基, pH 控制为 3、4、5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、10、11, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下, 隔一定时间段取样检测挥发酚值, 以不加菌株的培养基作为对照. 以时间为横坐标, 苯酚降解率为纵坐标, 绘制图形.

菌株最适生长温度测定: 实验设计同 pH 影响实验, 初始 pH 控制在 7.0, 温度依次设定为 20、25、30、35、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

转速对降解苯酚的影响: 实验设计同 pH 影响实验, 初始 pH 控制在 7.0, 温度设定为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速依次设定为 100、150、200、 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.

初始浓度对降解苯酚的影响: 实验设计同 pH 影响实验, 初始 pH 控制在 7.0, 温度设定为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速设定为 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 初始苯酚溶液浓度依次设定为 10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、 $3000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.5.5 降解菌耐盐性研究 实验设计同 2.5.4 节中的 pH 影响实验,初始 pH 控制在 7.0,温度设定为 30 °C,转速设定为 150 r·min⁻¹,利用 NaCl 调节盐度,NaCl 质量分数依次设定为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、5.0%、6.0%。

3 结果与分析(Results and analysis)

3.1 菌株鉴定

3.1.1 形态学观察、生理生化特性 CM-HZX1 在 LB 培养基上培养 1 d 后,菌落形态呈现圆形、湿润、橘红色、不透明、易于挑起、边缘整齐,直径为 0.8~1.12 mm,革兰氏染色反应呈阳性.由扫描电镜照片可知(图 1),菌体呈球状,无鞭毛,不产生芽孢.菌株

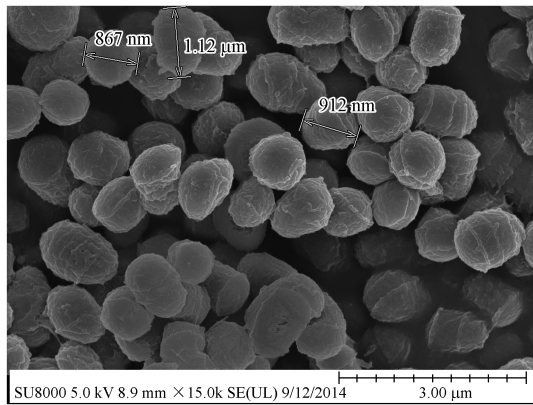


图 1 菌株 CM-HZX1 的扫描电镜图片

Fig.1 Scanning electron micrograph of strain CM-HZX1

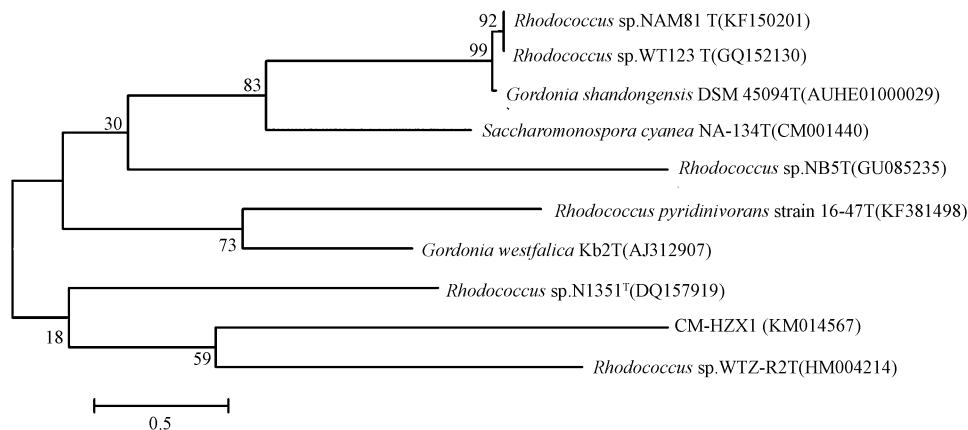


图 2 基于 16S rDNA 序列建立的 CM-HZX1 菌株和相关菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the partial 16S rDNA sequence of CM-HZX1 and the related strains

3.2 苯酚降解菌生长的曲线

微生物的生长曲线测定为菌株的培养及生长特性研究提供了参考.苯酚降解菌生长曲线的实验结果见图 3,结果表明,随着时间的延长,CM-HZX1 对于苯酚的降解率也逐步增高,54 h 的降解率达到

CM-HZX1 的部分生理生化特征研究结果显示:接触酶、硫化氢试验、硝酸盐还原、尿素酶呈阳性,葡萄糖发酵、吡啶、V.P、甲基红、明胶、甘油产酸、山梨醇、甘露醇、柠檬酸、水杨素、七叶苷、苯丙氨酸实验结果为阴性.该菌株的生理生化特性同《伯杰氏系统细菌学手册》中 *Rhodococcus* sp.的结果一致.

3.1.2 CM-HZX1 菌株的分子生物学鉴定 用英潍捷基(上海)贸易有限公司合成的酶提取 CM-HZX1 菌株的 DNA,扩增该菌株的 16S rDNA,将获得的 PCR 产物纯化后委托上海立菲生物技术有限公司测序.获得长度为 1381 bp 的 16S rDNA 片段,在 GenBank 中的注册登记号为 KM014567.通过 Blast 比对发现,CM-HZX1 菌株与已报道红球菌种属 (*Rhodococcus* sp.) 一些细菌的 16S rDNA 序列相似性达 96%~99%.用 MEGA5.0 软件对这些细菌构建了系统发育树,并进行同源性分析.

如图 2 所示,CM-HZX1 菌株与红球菌 (*Rhodococcus* sp.) 的遗传距离最近,结合菌株的形态学特征,可初步确定 CM-HZX1 菌株为红球菌 (*Rhodococcus* sp.),命名为红球菌 (*Rhodococcus* sp.) CM-HZX1,并将该菌株送至位于武汉大学的中国典型培养物保藏中心(简称 CCTCC)进行保藏,保藏编号为 CCTCC NO:M 2014329,保藏日期为 2014 年 7 月 9 日.

92.5%.在 6~12 h 有一个延缓的增长期,而在这个时间段,该菌的生长曲线也处于延迟期;在 24~54 h 苯酚的降解率开始稳定增长,在 12~24 h 之间,该菌正处于对数生长期,此时的降解率增长至 93.6%,说明 CM-HZX1 在这段时间内的降解效率最高.当

CM-HZX1 进入衰退期时,由于培养基中活菌数量减少,降解率虽然在增长,但增长幅度减小。

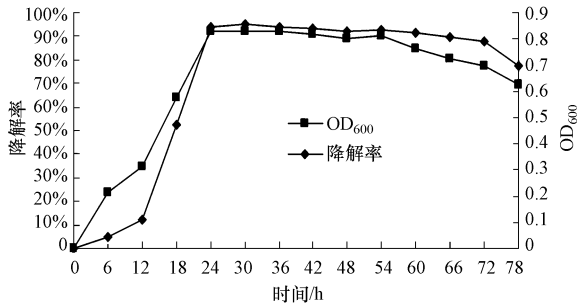


图3 CM-HZX1 生长曲线和苯酚降解曲线的关系

Fig.3 Relations curve describing the growth of CM-HZX1 and phenol-degradation

3.3 苯酚降解最适条件

3.3.1 初始 pH 对苯酚降解的影响 pH 值在含酚废水的处理上是一个很关键的因素,因为它会直接影响到废水的物质组成及微生物的活力.本实验通过改变初始培养基中 pH 值,考察初始 pH 对 CM-HZX1 菌株降解苯酚的影响,结果见图 4.从图 4 可以看出,该菌在初始 pH 为 4.0 以下的苯酚培养基中几乎没有降解能力,当 pH 由 4.0 增加至 5.0 时对苯酚的降解率有所增加;pH 再增至 6.0 时,对苯酚的降解率迅速增大至 82.6%;当 pH 升高至 7.0 时,苯酚降解率仍然增加,降解率为 93.6%,再增大 pH 对苯酚的去除没有显著影响;当 pH 增加至 10.0 时,苯酚的降解率显著下降至 32.5%.由此可知,苯酚微生物降解菌 CM-HZX1 在 pH 值为 6.0~9.0 时对苯酚的降解率达到 80% 以上,说明该苯酚降解菌在弱酸性至弱碱性范围内对苯酚有较好的降解效果,该微生物耐受环境范围广,初始 pH 在 7.0 时,苯酚降解率最高为 93.6%。

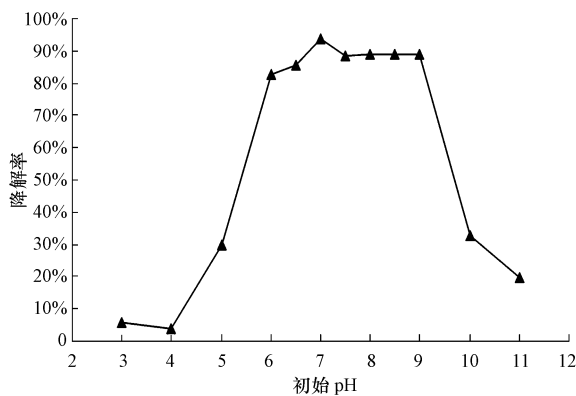


图4 初始 pH 对苯酚降解的影响

Fig.4 Influence of pH on phenol degradation

3.3.2 温度对苯酚降解的影响 温度是影响微生物活力的重要因素之一,本实验通过改变培养温度,考察温度对 CM-HZX1 菌株降解苯酚能力的影响,结果见图 5.可以看出,CM-HZX1 菌株在温度为 30~35 °C 时对苯酚的降解率均超过 90%;培养温度为 40 °C 时,苯酚降解率急剧下降,这可能是高温抑制了细胞的生长,从而导致降解率下降。

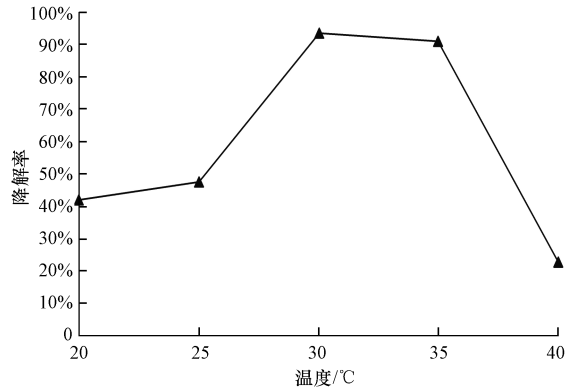


图5 温度对苯酚降解的影响

Fig.5 Temperature effect on phenol degradation

3.3.3 转速对苯酚降解的影响 随着摇床转速的提高,供氧量逐渐增加,本文通过设定不同摇床转速,得到溶解氧作用于微生物对苯酚降解率的影响,结果见图 6.可以看出,随着转速的增大,苯酚降解率也在变大,在 150 r·min⁻¹ 时降解率为 93.6%;随后转速增大,降解率趋于平稳。

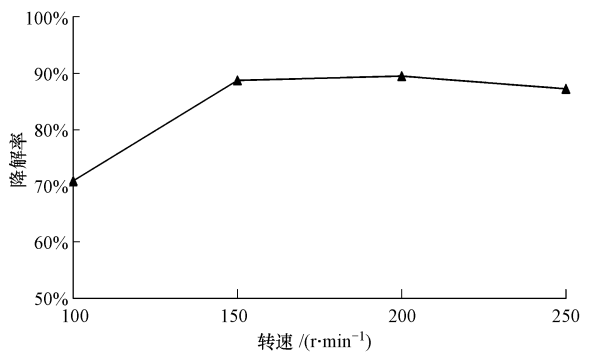


图6 转速对苯酚降解的影响

Fig.6 Influence of rotating speed on phenol degradation

3.3.4 初始苯酚浓度对苯酚降解的影响 图 7 结果表明,在 24 h 时,苯酚初始浓度为 10~500 mg·L⁻¹ 时,降解率在 80% 以上;初始浓度为 500~1000 mg·L⁻¹ 时,降解率在 70% 左右;初始浓度为 500 mg·L⁻¹ 时,降解率最高为 93.6%.说明在这个浓度下菌株能够更好地将苯酚降解转化为自己能利用的营养物质.在 48 h 时,苯酚初始浓度在低于

1500 mg·L⁻¹时,降解率都在 90% 以上,高于 1500 mg·L⁻¹时降解率很低,可能是高浓度苯酚对细胞有一定的毒害作用从而抑制其生长,影响降解效果.苯酚的消耗并不是完全用来生成新的细胞,而是被用来克服强烈的底物抑制作用.另外,细胞各种代谢产物的积累也影响了细胞生物量的增加 (Monteiro *et al.*, 2000).苯酚浓度越高,底物抑制作用越强,相对的细胞得率就越小,同时也导致细胞生长的延滞期越长 (Hao *et al.*, 2002).

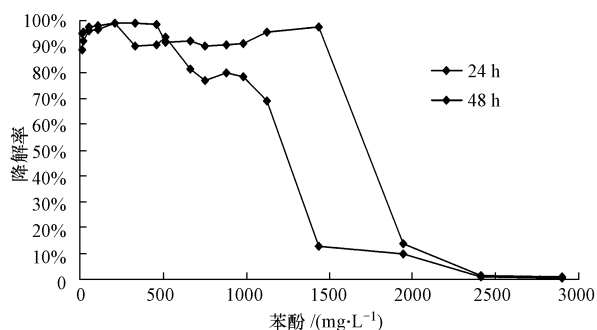


图 7 初始苯酚浓度对苯酚降解的影响

Fig.7 Influence of initial phenol concentration on phenol degradation

近年来,人们在苯酚降解研究中分离出大量的苯酚降解菌.例如,唐赟等(2006)分离出的嗜热菌 BF80 降解 6 mmol·L⁻¹(约为 564 mg·L⁻¹)的苯酚需要 120 h;刘广金等(2007)分离出的一株假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*)降解 500 mg·L⁻¹的苯酚需要 60 h;钱奕忠等(2001)发现的一株假单胞菌,在 pH = 6.79、温度为 30~37 °C 之间时,降解 472 mg·L⁻¹的苯酚需要 78 h;章杰等(2006)分离出的苯酚降解菌 JF-2 降解 600 mg·L⁻¹的苯酚需要 13 d; Lee 等(1996)分离出的醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 降解苯酚的最佳质量浓度为 300 mg·L⁻¹.本研究分离出的菌株 CM-HZX1 降解苯酚的能力明显高于上述诸多已分离出的苯酚降解菌株.

3.4 苯酚降解菌耐盐的研究

工业废水水质复杂,特别是石化废水中含盐量较高,微生物难以发挥活性甚至于死亡.因此,需要考察盐度对苯酚降解菌的影响.从图 8 可以看出,苯酚降解菌 CM-HZX1 在 NaCl 质量分数为 0.5%~4.0%时,苯酚降解率都在 85% 以上,随着盐度的增大,苯酚降解率下降,说明 CM-HZX1 属于中度耐盐菌.

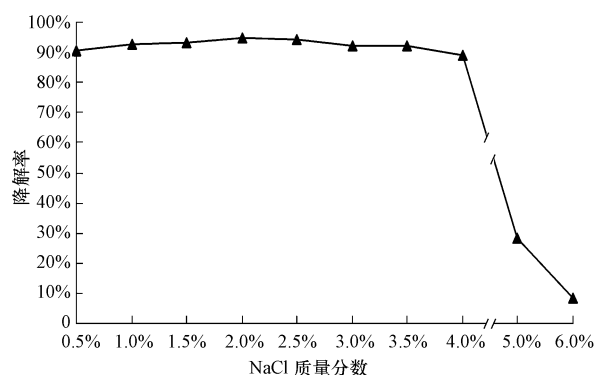


图 8 盐浓度对降解苯酚的影响

Fig.8 Influence of NaCl concentration on phenol degradation

4 结论 (Conclusions)

1) 从活性污泥中分离到一株能以苯酚为唯一碳源生长的菌株 CM-HZX1,初步鉴定该菌株属于红球菌 (*Rhodococcus sp.*).

2) 通过对菌株在不同 pH、温度、转速及不同苯酚浓度下的降解率大小比较,初步认为该菌株能适应较广泛的环境条件,降解最适条件为 pH = 7.0、温度 30 °C、转速 150 r·min⁻¹,能耐受 4% 盐度的废水环境.

3) 在最适条件下,对 0.5 g·L⁻¹的苯酚在 24 h 时降解率可达 93.6%,对 1.5 g·L⁻¹的苯酚在 48 h 时降解率在 90% 以上,降解效果远高于已报道的大部分苯酚降解菌株,可将其运用于工业含酚废水的生物处理,具有广阔的应用前景.

参考文献 (References):

- Baek S H, Yin C R, Lee S T. 2001. Aerobic nitrate respiration by a newly isolated phenol-degrading bacterium, *Alcaligenes* strain P5 [J]. *Biotechnology Letters*, 23:627-630
- Chung T P, Tseng H Y, Juang R S, *et al.* 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems [J]. *Process Biochemistry*, 38 (10): 1497-1507
- Essam T, Aminb M A, Tayeb O E. 2010. Kinetics and metabolic versatility of highly tolerant phenol degrading *Alcaligenes* strain TW1 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 73:783-788
- 高振贤, 马宏, 贾振华. 2005. *Ralstonia metallidurans* CH34 苯酚降解特性的研究 [J]. *微生物学通报*, 32(1): 44-47
- Hao O J, Kim M H, Seagren E A, *et al.* 2002. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species [J]. *Chemosphere*, 46(6): 797-807
- Jeong J J, Kim J H, Kim C K, *et al.* 2003. 3- and 4-alkyl phenol degradation pathway in *Pseudomonas sp.* Strain KL28 genetic organization of the

- lap gene cluster and substrate specificities of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase[J]. *Microbiology*, 149(11):3265-3277
- 姜立春,阮期平,袁利娟,等.2011.高效降酚菌株 JY03 的筛选及其降解特性研究[J]. *环境工程学报*, 5(8):1912-1916
- 金相灿,程振华,徐南妮,等.1990.有机化合物污染化学 有毒有机物污染化学[M].北京:清华大学出版社
- Lee J S, Kang E J, Kim M O, et al. 2001. Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol [J]. *Microbiol Biotechnol*, 11(1):112-117
- Lee S G, Hung S P. 1996. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by z-thermostable β -tryrosion[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 19:374-377
- 梁树才,杨宝玉,刘海舟,等.2007.热带假丝酵母 8953 菌株对苯酚的降解特性研究[J]. *环境科学与技术*, 30(3):27-29
- 李焱,陈羽,齐秀兰,等.2008.高效苯酚降解菌细胞固定化方法与条件的研究[J]. *微生物学杂志*, 28(5):61-64
- 凌琪,汤利华,陶勇,等.2007.苯酚降解细菌的分离与选育研究[J]. *中国给水排水*, 23(11):78-82
- 刘广金,张袖丽.2007.苯酚高效降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. *现代农业科技*, (11):202-203
- 刘亮,唐赞,杨峰晓,等.2010.一株苯酚降解菌 BF-1 的鉴定及降解特性测定[J]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 31(3):239-243
- Liu Y J, Zhang A N, Wang X C. 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacte* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03 [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 44:187-192
- Monteiroú A M, G, Boaventura R A R, Rodirgues A. 2000. E Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor [J]. *Biochem Eng J*, 6(1):45-49
- 聂玉冰.2011.高效苯酚降解菌剂复配及其对含酚废水处理系统的强化[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学
- 钱奕忠,张鹏,谭天伟.2001.假单胞菌降解含苯酚废水[J]. *实验过程工程学报*, 1(4):439-441
- Wei G H, Yu J F, Zhu Y H, et al. 2008. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 151:111-117
- 沈锡辉,刘志培,王保军,等.2004.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*, 24(3):482-486
- 宋璟,王慧捷,赵玮,等.2010.苯酚降解菌 SZH3 的分离及降解特性的初步研究[J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 39(3):315-320
- 唐赞,刘沐之,梁凤来,等.2006.一株嗜热菌的分离鉴定及其苯酚降解特性[J]. *微生物学通报*, 33(5):39-44
- 温洪宇.2009.苯酚降解嗜盐菌的筛选及分子生物学鉴定[D].中国矿业大学
- 章杰,何泽超,梁川.2006.一株降解苯酚微生物的研究[J]. *四川环境*, 25(1):8-10
- 张楠,陈波水,杨致邦,等.2010.苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性[J]. *后勤工程学院学报*, 26(1):22-26
- 周集体,关晓燕,曲媛媛,等.2010.苯酚降解菌株 GXY-1 分离鉴定、降解及其粗酶特性研究[J]. *大连理工大学学报*, 50(3):340-345
- 周倩倩,丁丛,王志平,等.2011.苯酚降解菌的筛选及其降解特性初探[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 27(4):544-549