

低温条件下苯酚降解菌的分离鉴定及降解特性

马溪平¹, 艾娇¹, 徐成斌¹, 于宁², 惠秀娟¹, 付宝荣¹

1. 辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁省环境监测中心站, 辽宁 沈阳 110031

摘要: 在15℃低温的条件下, 从本溪钢铁集团公司焦化厂曝气池活性污泥中分离、筛选得到1株高效苯酚降解菌, 即Bb-2, 它对起始质量浓度为400 mg·L⁻¹的苯酚降解率为74.8%。经形态观察和生理生化实验, 初步鉴定为假单胞菌属。该菌株能在4~40℃的温度条件下生长繁殖, 因此为耐冷菌。当醋酸钠和葡萄糖作为第二碳源存在时, 促进了低温下Bb-2对苯酚的生物降解。采用反应动力学方程拟合其降解过程, 初始苯酚质量浓度较低时, 遵循Monod方程; 初始质量浓度较高时, 其降解过程以基质抑制型的Haldane方程为主。

关键词: 苯酚; 低温; 降解特性

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2009) 02-0418-04

苯酚是一种重要的有机化工原料, 具有很强的毒性和腐蚀性, 是石油化工、造纸、炼焦和纺织等工业废水中的主要污染物之一, 许多国家已经将其列为重点控制的污染物, 在我国, 含酚废水在水污染控制中也被列为重点解决的有害废水之一^[1-5]。

目前, 在处理含酚废水的众多方法中, 经济高效且无二次污染的生物法越来越受到国内外的广泛重视, 利用纯菌种和混合菌种对含酚废水进行生物降解的工程技术也一直在深入的研究中^[6-9]。但是, 目前的大部分研究都是以常温条件为背景值, 然而我国北方寒冷地区, 特别是冬季, 生化池水温低于15℃, 这就对微生物的代谢产生了极大威胁。因此, 在筛选出低温条件下的高效苯酚降解菌对于处理含酚废水具有更加重大的现实意义。

本研究从本溪钢铁集团公司焦化厂的活性污泥中, 经驯化、分离、筛选得到1株低温(15℃)苯酚降解细菌, 并对其进行了初步鉴定, 为后续高效工程菌的构建及工程应用研究提供了理论支持和前提条件。

建立动力学模型对表征菌株的苯酚的降解能力, 对于理论研究和实际应用都有重要的指导意义。对单底物低质量浓度生物降解, 一般采用Monod方程描述底物的比降解速率, 而对于高质量浓度底物的降解, 则多采用Haldane方程来描述, 该方程能够较好的表征出底物对细胞生长的抑制情况^[10-11]。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

取自本溪钢铁集团公司焦化厂曝气池活性污

泥, 对此污泥进行长达30 d的低温驯化, 最终分离筛选出1株低温(15℃)苯酚降解菌。

1.2 培养基

保存培养基: 牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、琼脂 15~20 g、NaCl 5.0 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

富集培养基: 牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

驯化培养基: KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、NH₄Cl 1.0 g、NaCl 0.2 g、MnSO₄ 0.05 g、FeSO₄ 0.05 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4, (苯酚要按需加入)。

1.3 分析项目

(1) 苯酚浓度的测定。

采用高效液相色谱法^[12]。色谱柱: ODS C₁₈烷基键合色谱柱(柱内径4.6 mm, 柱长250 mm); 流动相: 甲醇/水 = 50/50; 检测波长: UV-270 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL。

(2) 菌体质量浓度的测定。

采用光电比浊法和干重法分别测定菌体质量浓度。其中比浊法用紫外分光光度计测定培养基在波长为600 nm处光的透光率(OD₆₀₀), 透光率值越高说明培养基中的菌体质量浓度越高。

(3) 菌株的鉴定。

形态观察: 观察菌落特征, 用显微镜观察菌体形态。

生理生化鉴定: 按照生理生化实验和细菌鉴定手册进行^[13-14]。

2 结果与讨论

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20042040); 辽宁省科技攻关项目(2005229003); 辽宁省科技厅项目(20060117-232); 辽宁省环境保护开放实验室与辽宁大学污染控制与环境修复重点实验室联合基金资助; 2008年辽宁省教育厅科学研究一般项目资助

作者简介: 马溪平(1957年生), 女, 教授, 硕士, 长期从事污染控制微生物学研究。E-mail: maxiping@163.com

收稿日期: 2009-01-14

2.1 菌株的分离与鉴定

经过分离纯化，在 15 ℃ 的条件下，共得到 18 株耐酚菌。经进一步筛选，以苯酚作为唯一碳源，通过降解实验，最终确定了 1 株在低温条件下对苯酚仍具有较高降解性能的菌株，即 Bb-2，它对起始质量浓度为 400 mg·L⁻¹ 的苯酚降解率为 74.8%。经形态观察和生理生化实验，初步鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。菌落呈黄色，微凸，边缘光滑，革兰氏染色阴性。

2.2 菌株温度适应性的测定

冷适应微生物 (*cold-adapted microorganism*) 可分为两类：一类是在 0 ℃ 可以生长繁殖，最适温度不超过 15 ℃，最高温度不超过 20 ℃ 的微生物，称之为嗜冷菌 (*psychrophiles*)；另一类是能在低温条件下生长，在 0~5 ℃ 可生长繁殖，最高温度可达 20 ℃ 以上的微生物，称之为耐冷菌 (*psychrotrophs*)^[15]。耐冷菌比嗜冷菌更能忍受温度波动，它的温度适宜范围也比较宽。因此，强化污泥中耐冷菌的数量是提高冬季低温污水处理效率的根本途径。本实验通过观察不同培养温度下菌株在固体培养基中的生长情况 (以 48 h 出现可见菌落为准)，来考察菌株对温度的适应性，具体结果如表 1 所示。

由表 1 可知，在 48 h 内，菌株 Bb-2 能在 4 ℃ 的低温条件下生长繁殖，最高温度可达 40 ℃，因此该菌株为耐冷菌。另外，从酚质量浓度角度来看，不同的酚质量浓度对菌株的温度适应性范围影响不大，这说明菌株具有较大的实际应用价值。

表 1 不同酚浓度对菌株生长温度范围的影响
Table 1 Influence of different phenol concentration on growing temperature range

菌株	酚的质量浓度/(mg·L ⁻¹)					
	0	50	100	200	300	400
Bb-2	4~40 ℃	6~40 ℃	6~40 ℃	6~38 ℃	6~35 ℃	8~35 ℃

2.3 pH 值对菌株降解率和菌体生长的影响

将处于对数生长期菌株 Bb-2 按 10% (体积分数) 的接种量接到苯酚质量浓度为 400 mg·L⁻¹，pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0 的培养基中，在 150 r·min⁻¹，15 ℃ 条件下振荡培养，菌株的生长情况和苯酚的降解率如图 1 所示。

由图 1 可知：菌株 Bb-2 对 pH 值的适应性较强，当 pH 在 6~8 变化时，菌株能保持较高生物量和降解率，其降解率均在 50% 以上。另外，从图中的变化趋势可以看出，碱性环境与酸性环境相比，对菌株 Bb-2 的生长情况和降解率影响较小。

2.4 接种量对菌株降解率的影响

分别以 4%，6%，8%，10%，12%，14% (体

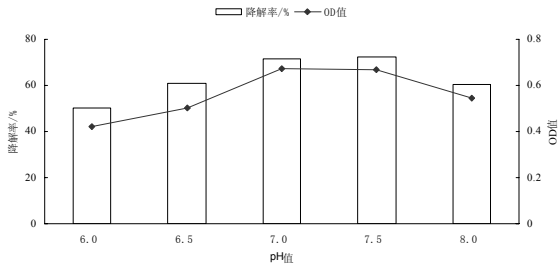


图 1 pH 值对 Bb-2 的降解率和菌体生长的影响
Fig. 1 Influence of pH on biodegradation rate and growing ability of Bb-2

积分数) 的接种量将处于对数生长期的菌株接种至 pH=7.2，苯酚质量浓度为 400 mg·L⁻¹ 的培养液中，在 150 r·min⁻¹，15 ℃ 条件下振荡培养，苯酚的降解情况如图 2 所示。

由图 2 可知：苯酚降解率随着接种量的增大而升高。但接种量在 8%~14% 之间时，接种量的增大对降解率的影响不大。因此从成本的角度综合考虑，取 8% 为最佳。

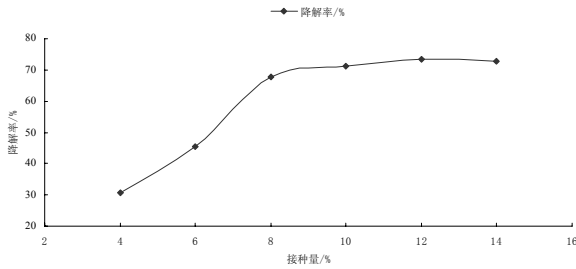


图 2 接种量对 Bb-2 降解率的影响
Fig. 2 Influence of inoculation quantity on biodegradation rate of Bb-2

2.5 外加第二碳源对菌株降解率的影响

分别以等量的葡萄糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖和醋酸钠作为外加第二碳源，来考察它们的加入对苯酚降解率的影响，结果如图 3 所示。

由图 3 可知：当在培养基中加入外加碳源后，菌株的 OD 值均有所增加，苯酚的降解率也存在着相应的提高。加入醋酸钠、葡萄糖两种外加碳源作为第二碳源时，苯酚降解率由 72.5% 提高到 90% 以上。说明醋酸钠和葡萄糖作为第二碳源存在时，对菌株

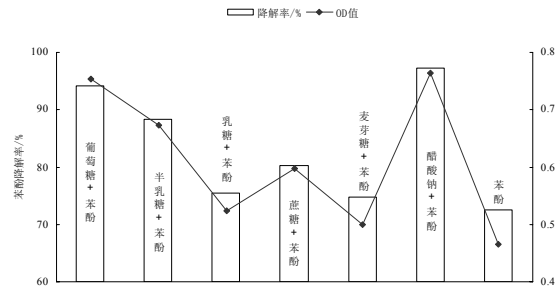


图 3 外加碳源对 Bb-2 的生长和苯酚降解率的影响
Fig. 3 Influence of carbon sources on biodegradation rate and growing ability of Bb-2

的苯酚降解过程起到了共代谢的作用,其中醋酸钠的共代谢效果稍好于葡萄糖,但是由于醋酸钠的市场价格要比葡萄糖贵。所以出于成本的考虑,可以添加葡萄糖作为低温下菌株对苯酚降解的共代谢基质。

2.6 菌株对苯酚的降解动力学^[16-23]

由上述实验可知,在菌株降解苯酚的反应体系中,其动力学行为表现为2个方面:(1)细菌的生长;(2)基质的消耗。因此,我们应用 Lawrence—McCarty生物处理数学模式中的Monod方程和Haldane方程来描述菌株降解苯酚的动力学行为。

Monod方程适用于第一基质不进行自我抑制的情况,即低浓度降解苯酚的动力学。方程表示为:

$$v = \frac{v_m S}{K_s + S}$$

式中: v 为有机底物的比降解速度; v_m 为有机底物的最大比降解速度; S 为有机底物浓度; K_s 为饱和常数。

通过非线性最小二乘法对 v - S 数据按照Monod方程拟合(见图4),可得到动力学参数分别为 $v_m=0.60$, $K_s=47.89$,因此菌株降解低浓度苯酚的动力学方程为:

$$v = \frac{0.60s}{47.89 + s}$$

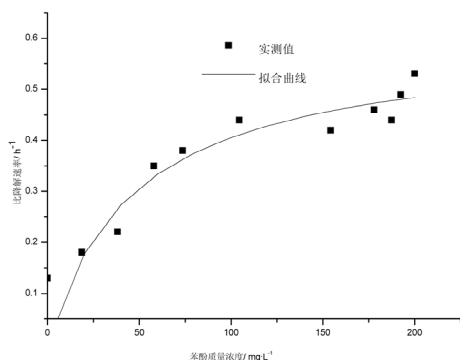


图4 低浓度下菌株降解苯酚动力学

Fig. 4 Kinetics of phenol biodegradation

当苯酚质量浓度过高时,有机物对菌体出现了毒物抑制作用,用Haldane方程来描述高质量浓度苯酚降解动力学,方程式为:

$$v = \frac{v_m}{1 + K_s / S + S / K_i}$$

式中, K_i 为抑制系数。

同样以 v - S 作图得到图5,从图5可以看出,在 S 较低时,菌株对苯酚的去除速率随着 S 的升高而增加, S 增加到一定程度后苯酚的比降解速率开始下降,曲线符合抑制动力学模型。

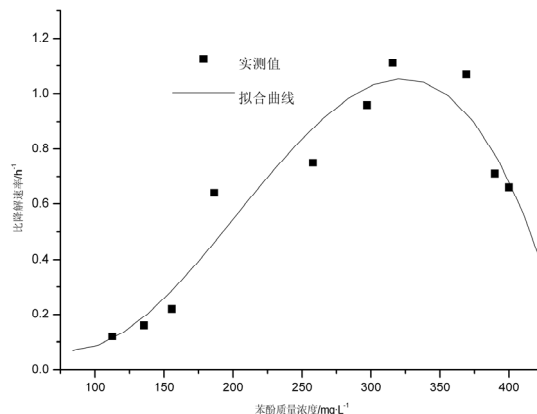


图5 高浓度下菌株降解苯酚动力学

Fig. 5 Kinetics of phenol biodegradation

通过非线性最小二乘法对 v - S 数据按照Haldane方程拟合,可得到动力学参数分别为 $v_m=1.32$, $K_s=113.72$, $K_i=427.6$;因此菌株降解高浓度苯酚的动力学方程为:

$$v = \frac{1.32}{1 + 113.72 / S + S / 427.6}$$

3 结论

(1) 本试验从本溪钢铁集团公司焦化厂的活性污泥中分离得到一株能够在低温条件下(15℃)利用苯酚作为唯一碳源生长的细菌Bb-2,初步鉴定为假单胞菌属。当初始质量浓度为400 mg·L⁻¹的苯酚作为唯一碳源,在15℃,150 r·min⁻¹条件下,经过24 h培养,菌株Bb-2的降解率为74.8%。

(2) 经菌株Bb-2温度适应性范围研究表明:菌株Bb-2能在4~40℃的温度条件下生长繁殖,因此该菌株为耐冷菌。另外,不同的酚质量浓度对菌株的温度适应性范围影响不大。菌株Bb-2对pH值的适应性较强,当pH在6~8变化时,对苯酚的降解率均在50%以上,其最佳接种量为8%(体积分数)。当醋酸钠和葡萄糖作为第二碳源存在时,对菌株Bb-2的苯酚降解过程起到了共代谢的作用。

(3) 低质量浓度时,低温下苯酚对菌体没有出现抑制作用,符合Monod方程模型,经拟合得到动力学参数分别为 $v_m=0.60$, $K_s=47.89$;高质量浓度时,低温下苯酚对菌体出现明显的抑制作用,符合Haldane方程,经拟合得到动力学参数分别为 $v_m=1.32$, $K_s=113.72$, $K_i=427.6$ 。

参考文献:

- [1] 金相灿. 有机化合物污染化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1990: 79-80.
JIN Xiangcan. Organic Pollution Chemical[M]. Beijing: Qinghua University Press, 1990: 79-80.
- [2] 杨素亮. 一株高效苯酚降解菌的分离鉴定及动力学研究[J]. 化学工业与工程, 2006, 23(4): 287-290.

- YANG Suliang. Isolation and identification of a phenol-degrading yeast with high activity and its kinetic study[J]. Chemical Industry and Engineering, 2006, 23(4): 287-290.
- [3] 肖利萍, 李喜林, 于洋, 等. 一株苯酚高效降解菌的生长条件[J]. 城市环境与城市生态, 2007, 20(1): 38-40.
- XIAO Liping, LI Xilin, YU Yang, et al. Growth conditions of dominant degrading phenolic bacteria[J]. Urban Environment and Urban Ecology, 2007, 20(1): 38-40.
- [4] 孔繁翔, 尹大强, 严国安. 环境生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 113-115.
- KONG Fanxiang, YIN Daqiang, YAN Guoan. Environmental Biology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 113-115.
- [5] 许庆清, 周作明. 微生物降解苯酚废水的特性研究[J]. 环境科学与管理, 2006, 31(4): 136-138.
- XU Qingqing, ZHOU Zuoming. Study on the properties of microbial degradation of phenol[J]. Environmental Science and Management, 2006, 31(4): 136-138.
- [6] PRIETO M B, HIDALGO A. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 853-859.
- [7] HANNAFORD A M, KUEK C. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 22: 121-126.
- [8] ABD-EL-HALEEM D, MOAWAD H, ZAKI E A, et al. Molecular characterization of phenol-degrading bacteria isolated from different Egyptian ecosystems[J]. Microbial Ecology, 2002, 43: 217-224.
- [9] GARCIA A, BRENES M, MARTINEZ F, et al. High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001, 78: 625-629.
- [10] LIU Yu, LIN Y M. A thermodynamic interpretation of the monod equation[J]. Current Microbiology, 2003, 46: 233-234.
- [11] LIU Yu. Overview of some theoretical approaches for derivation of the Monod equation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 73: 1241-1250.
- [12] 《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997: 631-633.
- 《Water and wastewater monitoring and analysis methods》Editorial Board. Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1997: 631-633.
- [13] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 44-45.
- SHEN Ping, FAN Xiurong, LI Guangwu. Microbiology Experiment [M]. 3th ed. Beijing: Higher Education Press, 1999: 44-45.
- [14] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 77-79.
- DONG Xiuzhu. Identification of a Bacterium Commonly Found in the Manual System[M]. Beijing: Science Press, 2001: 77-79.
- [15] WHYTE L G, GREER C W, INNIS W E. Assessment of the Biodegradation Potential of Psychrotrophic Microorganisms[J]. Can J Microbiol, 1996, 42(1): 99-106.
- [16] 韩瑜, 马放, 山丹, 等. 耐低温菌JH-9降解苯胺的动力学研究[J]. 环境科学研究, 2007, 20(5): 119-123.
- HAN Yu, MA Fang, SHAN Dan, et al. Study on kinetics of aniline biodegradation by low temperature - resistance strain JH-9[J]. Research of Environmental Science, 2007, 20(5): 119-123.
- [17] 覃晶晶, 江小林. 污水处 Monod 方程的简化及其线性化方程[J]. 市政技术, 2006, 24(2): 75-80.
- QIN Jingjing, JIANG Xiaolin. Application of simplified and linearized monod equation for sewage treatment[J]. Municipal Engineering Technology, 2006, 24(2): 75-80.
- [18] MENG X Z, ZHAO Q L, CHEN L S. Global qualitative analysis of new Monod type chemostat model with delayed growth response and pulsed input in polluted environment[J]. Appl Math Mech-Engl Ed, 2008, 29(1): 75-87.
- [19] SUN S L, CHEN L S. Dynamic behaviors of Monod type chemostat model with impulsive perturbation on the nutrient concentration[J]. Journal of Mathematical Chemistry, 2006, 42(4): 837-847.
- [20] 贾士儒. 生物反应工程原理[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2003: 49-52.
- JIA Shiru. Bioreactor Engineering Principles[M]. 2th ed. Beijing: Science Press, 2003: 49-52.
- [21] ZHANG L L, ZHU R Y, CHEN J M. Biodegradation of methyl tert-butyl ether as a sole carbon source by aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2008, 31: 527-534.
- [22] GENG A L, WEISOH A E, LIM C J. Isolation and characterization of a phenol-degrading bacterium from an industrial activated sludge[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71: 728-735.
- [23] TOMEI M C, ANNESINI M C. Biodegradation of phenolic mixtures in a sequencing batch reactor a kinetic study[J]. Biodegradation of Phenolic Mixtures, 2008, 15(3): 188-195.

Isolation and characterization of a phenol degrading Bacterium under low temperature

Ma Xiping¹, Ai Jiao¹, Xu Chengbin¹, Yu Ning², Fu Baorong¹, Hui Xiujuan¹

1. School of the Environment Liaoning University, Shenyang 110036, China;

2. Liaoning Provincial Environmental Monitoring Center Station, Shenyang 110031, China

Abstract: A bacterium was isolated and screened from the active mud of a ventilated pool in the Coking Plant of Benxi Iron and Steel Group, under low temperature of 15 °C. When the initial concentration of phenol is 400 mg/L, the degradation rate can achieve 74.8%. Bb-2 is identified to be *Pseudomonas*, according to morphological characteristics observation and physiological-biochemical experiment. It is *psychrotrophs* due to growing and breeding under temperature of 4 ~ 40 °C. The addition of glucose and sodium acetate as a secondary carbon source resulted in acceleration of the phenol degradation rate of Bb-2 with low temperature. Reaction dynamic equations were adopted to fit the degradation process, with low organic compound concentration, which was in accordance with Monod equation; with high phenol mass concentration, which was in accordance with Haldane equation.

Key words: phenol; low-temperature; degrading characteristics