

一株土壤中苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性研究

崔树军¹, 金维平¹, 张建云¹, 陈红歌², 张庆甫¹

(1. 河南工程学院 资源与环境工程系, 河南 郑州 451191; 2. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 采用富集培养的方法, 从焦化废水污染的土壤中分离得到 1 株能够高效降解苯酚的菌株, 命名为 HNGCXY.1。该菌株可以在以苯酚为唯一碳源和能源的无机培养基上生长, 能够耐受最高浓度为 1 000 mg/L 的苯酚。对该菌株的降解性能研究表明: 该菌株具有较强的苯酚降解能力, 在温度为 28~32℃, pH 值为 6.5~7.5, 摇床振荡速度大于 160 r/min, 苯酚浓度为 600 mg/L 的条件下, 单位时间内对苯酚的降解能力最强。根据其生理生化特性和 16S rDNA 序列同源性分析结果, 将其初步鉴定为产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。

关键词: 苯酚降解菌; 产碱杆菌; 分离鉴定; 16S rDNA

中图分类号: X53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)04-0069-04

Studies on Isolation and Degradation Characteristics of A Phenol Degrading Bacteria

CUI Shu-jun¹, JIN Wei-ping¹, ZHANG Jian-yun¹, CHEN Hong-ge², ZHANG Qing-fu¹

(1. College of Resource and Environment Science, Henan Institute of Engineering, Zhengzhou 451191, China;

2. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A strain (HNGCXY.1) isolated from the phenol-contaminated soil of a coking plant was able to grow on phenol as sole carbon and energy sources. The highest endurance capability of this strain for phenol was 1000 mg/L. The factors affecting phenol degrading were investigated. It showed better phenol degrading rate at pH 6.5—7.5, 28—32℃, rotation speed bigger than 160 r/min, the concentration of 600mg/L phenol as the substrate. It was identified as *Alcaligenes* sp., based on the 16s rDNA sequences, biochemical and physiological characteristics.

Key words: Phenol degrading bacteria; *Alcaligenes* sp.; Isolation and identification; 16S rDNA

苯酚是焦化、造纸、石油、塑料、纺织、制药等工业废水中的主要污染物, 也是生物降解多种人工合成化合物如杀虫剂时产生的一种中间代谢物^[1,2]。苯酚本身是有毒的有机化合物, 具有使蛋白质变性的特性, 对水生生物、植物和细菌生长有很大毒性, 并且会使饮用水和食品工艺用水散发刺激性气味^[3,4], 大量酚类物质及其衍生物在土壤和水体中的排放和积累导致了生态环境的日趋恶化^[5]。我国污水综合排放标准(GB8978—1996)规定的挥发酚的

一级标准、二级标准和三级标准分别为 0.5 mg/L、0.5 mg/L、2.0 mg/L^[6]。利用微生物处理是降低苯酚污染的一条重要途径。近年来, 国内外在苯酚生物降解方面进行了广泛的研究, 已经分离鉴定到许多能够降解苯酚的细菌、真菌^[7]等。这些苯酚降解菌多数是从受苯酚污染的环 境中原位采集样品, 经过富集培养后分离获得的^[8]。

高效降解苯酚的微生物在治理含酚工业废水中具有较大应用潜力。为此, 从自然环境中分离出一株

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 河南工程学院青年基金项目(Y2007031)

作者简介: 崔树军(1964-), 男, 山东淄博人, 副教授, 主要从事环境生态学研究。

新的高效苯酚降解菌, 并研究了其降解苯酚的环境条件和生长特征, 旨在为进一步利用该菌处理苯酚污染水体提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 菌源土样采集

2007 年 5 月采集河南平顶山焦化厂排污口附近土壤, 所取土壤封装于无菌取样袋中, 带回实验室 4℃冰箱保存, 2d 内进行富集培养。

1.2 培养基

富集与驯化培养基: 在无机盐溶液中添加不同浓度的苯酚 (50~1 000mg/L) 配制而成。各种无机盐的含量为 (g/L): KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, MgSO_4 0.2, CaCl_2 0.1, NaCl 0.2, KNO_3 1.0。

分离及保存培养基: 含 500mg/L 苯酚的牛肉膏蛋白胨固体培养基 (1%蛋白胨, 0.5% 牛肉膏, 1% NaCl , 1.6% 琼脂)。

1.3 苯酚降解菌的驯化、筛选与分离^[8]

取 10g 菌源土壤加入到苯酚浓度为 50mg/L 的 100mL 富集培养基中, 28℃摇床 200r/min 富集培养 2 周, 以 10%接种量再添加到新的驯化培养基中 (逐渐提高苯酚的浓度), 重复 3 次。2 个月采用稀释涂布的方法在分离培养基平板上分离筛选能以苯酚为惟一碳源和能源的降解苯酚的菌株。

1.4 苯酚含量的测定

采用 4-氨基安替吡啉直接分光光度法^[9]测定苯酚含量。

1.5 苯酚降解菌降解性能的测定

主要考察 pH 值、温度、转速、苯酚初始浓度及外加氮源对苯酚降解菌降解性能的影响。基本试验条件为: 取苯酚浓度为 500mg/L 的无机盐培养液 50mL 于 250mL 三角瓶中, 按 10%的接种量接入 OD_{600} 值为 0.5 的种子液。以蒸馏水为空白参比, 用稀 HCl 或 NaOH 调节培养液初始 pH 值。一定时间后测定培养液中苯酚浓度, 每一条件 3 个重复, 计算其平均苯酚降解率。

1.6 菌株生理生化鉴定和抗生素耐受性试验

将选育得到的菌株根据文献^[10]的方法进行革兰氏染色鉴定、鞭毛染色、氧化酶、接触酶、V-P 试验、吲哚、过氧化氢酶、硝酸盐还原试验。同时检验其对氨苄青霉素、四环素、链霉素、卡那霉素的耐抗性。

1.7 菌株的鉴定

用试剂盒 (天根生化科技公司) 提取细菌 DNA, 以细菌通用引物 F27 (*Escherichia coli* position 8-

27) 和 R1492 (*Escherichia coli* position 1510-1492), 扩增该苯酚降解菌株的 16S rDNA, 扩增片段长度为 1.5kb。PCR 反应体系体积为 50μL, 包括 2.5U *Taq* DNA 聚合酶 (Takara 生物技术公司)、5μL PCR 反应缓冲液、2.5mmol/L 的 dNTPs 2μL、10pmol/L 的引物各 2μL, 1μL DNA 样品。PCR 反应条件为: 94℃预变性 4min; 94℃变性 1min, 55℃退火 1min, 72℃延伸 2min, 30 个循环; 最后 72℃总延伸 10min。PCR 产物经检测后送交上海生工生物工程技术有限公司测序。测序后将序列提交到 NCBI 进行 BLAST, 进行序列同源性分析。

2 结果

2.1 苯酚降解菌的分离与鉴定

从苯酚污染土壤中分离到 1 株高效苯酚降解菌, 将其命名为 HNGCXY.1。它能在以苯酚为惟一碳源的无机盐培养基中生长, 革兰氏染色阴性, 6 根周生鞭毛, 氧化酶、接触酶阳性、不产生吲哚, 分别在 50μg/mL 氨苄青霉素、四环素、链霉素、卡那霉素的 LB 培养基上检验其耐抗性, 28℃培养 24h 未发现生长菌落, 48h 发现氨苄青霉素、链霉素的培养基上有菌落生长。

将 HNGCXY.1 菌株 16S rDNA 测序结果提交到 NCBI 上进行 BLAST, 其核苷酸的序列同源性分析结果表明: 该菌株的 16S rDNA 序列与多数产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. 的序列同源性均在 90%以上, 与粪产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis* strain N8 的同源性达到 99%以上。结合生理生化特性, 初步鉴定该降解苯酚的菌株属于产碱杆菌属。将其最相近的 14 个 16S rDNA 序列构建进化树, 如图 1。

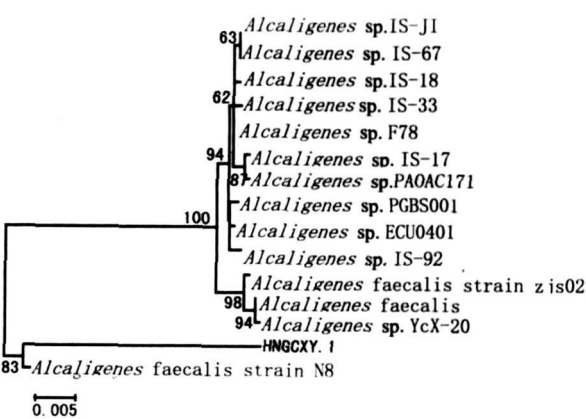


图 1 基于 16S rDNA 序列同源性构建的菌株 HNGCXY.1 和相关细菌的系统进化树

2.2 苯酚降解菌生长条件与降解特性

2.2.1 苯酚浓度对菌体生长和降解能力的影响

将 HNGCXY.1 接种于发酵培养基中, 培养基中苯酚浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 g/L, 在 28℃、200 r/min 的条件下摇瓶振荡培养 24 h 后, 测定培养基中苯酚剩余量, 计算苯酚降解率, 如图 2 所示。从图 2 可知: 随着苯酚浓度增加, 苯酚降解率逐步降低, 但苯酚降解总量却是先增加后降低, 在苯酚浓度为 0.6 g/L 时, 单位时间内可以获得最大苯酚降解量。以上结果表明, HNGCXY.1 生长和降解苯酚的最适苯酚浓度为 0.6 g/L, 苯酚浓度大于 0.6 g/L 时, 单位时间内 HNGCXY.1 菌株对苯酚的降解能力和降解率均下降。

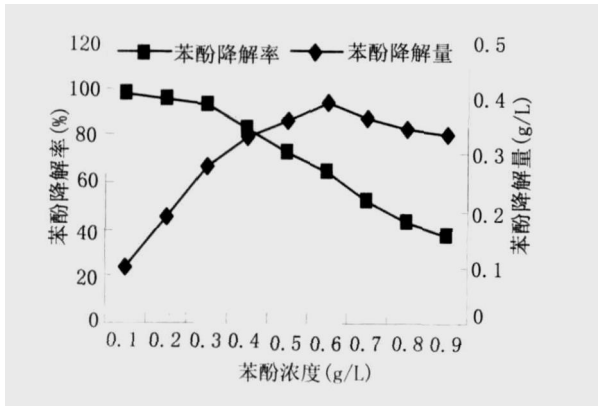


图 2 苯酚浓度对 HNGCXY.1 降解苯酚能力的影响

2.2.2 pH 值对菌体生长和降解能力的影响

将 HNGCXY.1 接种于无机盐培养基中, 培养基中苯酚浓度 0.5 g/L, pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5, 在 30℃、200 r/min 的条件下摇瓶振荡培养 24 h 后, 测定摇瓶中苯酚剩余量, 并计算苯酚降解率, 如图 3 所示。从图 3 可以看出, pH 值在 6.5~7.5, HNGCXY.1 菌株对苯酚的降解能力最强; pH 值在 5.5~7.0 时, 随着 pH 值增高, 苯酚降解能力增强, pH 值在 7.5~8.0 时, 随着 pH 值增高, 苯酚降解能力减弱。以上结果表明, HNGCXY.1 降解苯酚的最适 pH 值为 6.5~7.5。

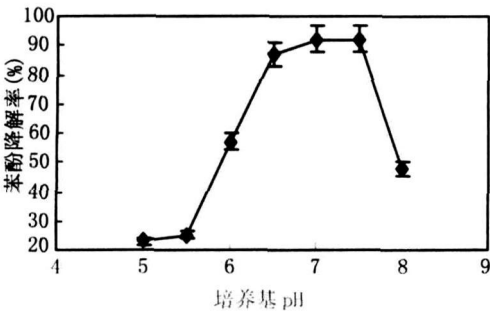


图 3 pH 值对 HNGCXY.1 降解苯酚能力的影响

2.2.3 温度对菌体生长和降解能力的影响

将 HNGCXY.1 接种于牛肉膏蛋白胨培养基中, 分别在 20℃、24℃、28℃、32℃、36℃、40℃和 200 r/min 的条件下摇瓶振荡培养 24 h 后, 测定摇瓶中苯酚剩余量, 并计算苯酚降解率, 如图 4 所示。从图 4 可以看出, 培养温度在 20~28℃, 随着温度的升高, 菌株对苯酚的降解率也逐渐增大; 28~32℃时, 苯酚降解率最大; 培养温度超过 32℃时, 苯酚降解率呈快速下降趋势。以上结果表明, HNGCXY.1 降解苯酚的最适温度为 28~32℃。

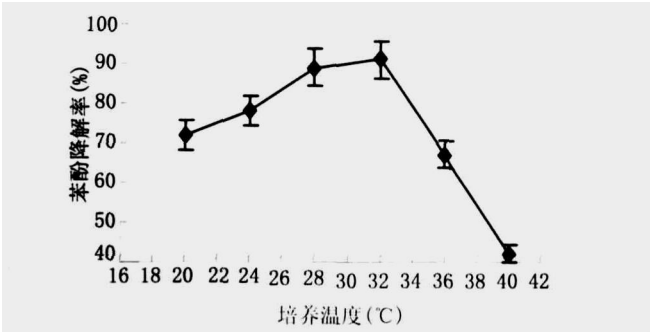


图 4 培养温度对 HNGCXY.1 降解苯酚能力的影响

2.2.4 氮源对菌体生长和降解能力的影响

将 HNGCXY.1 接种于去氮无机盐培养基中, 分别添加 1% 硫酸铵、尿素、硝酸钾、蛋白胨、酵母粉、牛肉膏, 28℃、200 r/min 的条件下摇瓶振荡培养 24 h 后, 测定摇瓶中苯酚剩余量, 并计算苯酚降解率, 如图 5 所示。从图 5 可以看出, 以蛋白胨、酵母粉、牛肉膏为氮源时, 苯酚降解率明显大于以硫酸铵、尿素、硝酸钾为氮源的降解率。

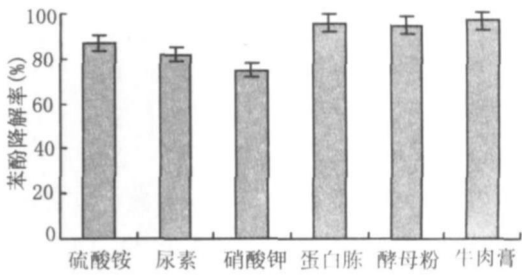


图 5 氮源对 HNGCXY.1 降解苯酚能力的影响

2.2.5 摇床转速对菌体生长和降解能力的影响

将 HNGCXY.1 接种于以硫酸铵为氮源的无机盐培养基中, 分别设置转速 120、140、160、180、200、220、240、260 r/min, 28℃振荡培养 24 h 后, 测定摇瓶中苯酚剩余量, 并计算苯酚降解率, 如图 6 所示。随着摇床转速增加, 苯酚降解率逐渐上升; 在 120~160 r/min 时, 随着转速加大, 苯酚降解率增加较快; 在 160~260 r/min 时苯酚降解率上升缓慢。

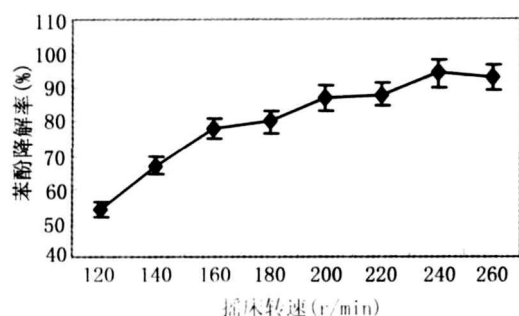


图 6 摇床转速对苯酚降解能力的影响

3 结论

1) 采用富集培养的方法, 从受苯酚污染的土壤中分离得到 1 株能以苯酚为惟一碳源和能源生长的细菌。

2) 16S rDNA 基因序列同源性和系统发育分析结果表明, 该菌为产碱杆菌属 *Alcaligenes* sp.。

3) 降解性能研究结果表明: 该菌株具有较强的苯酚降解能力, 且在温度为 28 ~ 32 °C, pH 值 6.5 ~ 7.5, 摇床振荡速度大于 160 r/min, 苯酚浓度为 600 mg/L 时, 单位时间内对苯酚降解能力最强。在以有机氮为氮源的条件下, 该菌株对苯酚的降解能力较以无机氮为氮源的条件下好。

4 讨论

国内已有多种微生物被报道具有降解苯酚的能力, 如不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)^[11]、假丝酵母菌属 (*Candida* sp.)^[12]、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)^[13] 和红球菌 (*Rhodococcus* sp.)^[14] 等。本试验通过富集培养的方法从焦化厂排污口的土壤中分离到一株高效的苯酚降解菌, 16S rRNA 基因序列测定分析表明, 该菌为产碱杆菌属 *Alcaligenes* sp., 该菌株的获得进一步充实了可降解苯酚的微生物的资源库。降解特性研究结果表明, 该菌株能够降解较高浓度的苯酚, 而且对 pH 及温度的适应范围较广, 具有实际应用处理废水的潜力。

参考文献:

[1] Ramos A F, Gómez M A, Hontoria E, *et al.* Biological ni-

trogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 142(2): 175-183.

[2] Gholamreza Moussavi, Maryam Mahmoudi, Behnam Barikbin. Biological removal of phenol from strong wastewaters using a novel MSBR[J]. *Water Research*, 2008, 41(2): 4657-4671.

[3] Sunil S Adav, Ming-Yuan Chen, Durr-Jong Lee *et al.* Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granule[J]. *Chemosphere*, 2007, 42(8): 1566-1572.

[4] Muhammad, Afzal Samina Iqbal, Sakandar Rauf, *et al.* Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 149(1): 60-66.

[5] Leonard D Youssef B, Destruhaut C, *et al.* Phenol degradation by *Ralstonia eutropha*: Colorimetric determination of 2-hydroxy muconate semialdehyde accumulation to control feed strategy in fed-batch fermentations[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 19(65): 407-415.

[6] 梁树才, 杨宝玉, 刘海舟, 等. 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*, 2007, 30(3): 27-31.

[7] Kobayashi F. Degradation of phenol in seawater using a novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kuroda*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 59(3): 252-254.

[8] Yoshifumi Shinoda, Yasuyoshi Sakai, Makiko U, *et al.* Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol[phenol][J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(4): 1286-1291.

[9] 国家环保局《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.

[10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[11] 徐玉泉, 张维, 陈明, 等. 一株苯酚降解菌的分离和鉴定[J]. *环境科学学报*, 2000, 20(4): 450-455.

[12] 龚斌, 刘津, 赵斌. 一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(12): 2008-2012.

[13] 沈锡辉, 刘志培, 刘双江, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNA5 菌株 (*Rhodococcus* sp. strain PNA5) 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.