

一株苯酚降解菌的鉴定及其降解特性

李慧娟 赵从 王力* 曹智琨 邵先祥

(山东科技大学 化学与环境工程学院 山东 青岛 266519)

摘要: 【目的】鉴定从某化工厂附近土样中分离到的一株耐高浓度苯酚的菌株 T10, 通过优化菌株的培养条件提高菌株对苯酚的降解率。【方法】根据菌株的形态、生理生化鉴定及 16S rDNA 测序分析确定其种属, 以液体摇瓶培养菌株 T10 对苯酚的降解率为指标, 对菌株的生长条件进行优化。【结果】菌株 T10 属恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。添加葡萄糖、蛋白胨能有效缩短 T10 菌的生长周期, 并使苯酚的降解率提高 1.7 倍。在菌体初始接种浓度为 10%、温度为 30 °C、转速为 180 r/min 条件下, 对初始苯酚浓度、pH 和装液量的响应面优化结果如下: 初始苯酚浓度 3 000 mg/L、pH 7.5 和装液量 80 mL/250 mL, 苯酚去除率最高可达到 87.56%。【结论】T10 菌能够耐受较高浓度的含酚废水, 并且对苯酚有较强的降解能力, 为下一步利用生物法处理含酚废水提供科学依据。

关键词: 恶臭假单胞菌, 苯酚, 降解特性, 响应面分析法

Identification of degradative bacterium of phenol and its degradation characterization

LI Hui-Juan ZHAO Cong WANG Li* CAO Zhi-Kun SHAO Xian-Xiang

(College of Chemical and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266519, China)

Abstract: [Objective] A phenol-degradative strain named T10 which was isolated from the soil sample of a chemical plant was identified, and increased degradative rate of phenol by op-

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(No. J11LC08)

*通讯作者: Tel: 86-532-86057103; 信箱: Wanglisdust@126.com

收稿日期: 2012-01-08; 接受日期: 2012-05-15

timizing the growth conditions. **[Methods]** The strain was identified by morphological observation, physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis. The phenol-degradative capacity of strain T10 was analyzed when they were cultured in a series of liquid media containing different pH, initial phenol concentration and liquid volume. **[Results]** The strain T10 belongs to *Pseudomonas putida*. Glucose and peptone can reduce growth period of strain T10, and the degradation rate of phenol was improved 1.7 times. Under the condition of inoculating concentration 10%, 30 °C and 180 r/min, the phenol removal rate of strain T10 could reach 87.56% when initial phenol concentration, pH and liquid volume were 3 000 mg/L, 7.5, 80 mL/250 mL, respectively. **[Conclusion]** The experimental data show that strain T10 can tolerate wastewater containing higher concentration phenol, and has stronger degradation ability on phenol. These results would provide reliable basis for further treatment of wastewater containing phenol by the means of biological method.

Keywords: *Pseudomonas putida*, Phenol, Degradating characterization, Response surface methodology

苯酚属于高毒类物质, 对生物体危害很大, 可经过呼吸道、皮肤粘膜和消化道吸收进入人体内。苯酚对人体组织具有腐蚀作用, 如接触眼睛, 能引起严重角膜灼伤, 甚至失明^[1]。当水中苯酚浓度持续为 0.1 mg/L 时, 鱼肉会有苯酚的特殊臭味; 而当水中苯酚浓度达到 5–25 mg/L 时, 鱼类就会中毒死亡^[2]。苯酚及其衍生物主要来源于炼油、焦化、造纸、塑料、纺织、染料、树脂以及制药等行业的工业废水中, 有些废水中苯酚的排放浓度高达 3 000–4 000 mg/L^[3–4], 特别是在橄榄油厂废水中, 苯酚浓度高达 10 000 mg/L^[5]。工业含酚废水的大量排放给环境带来了严重的污染, 不仅有害于人类健康及生物的生长繁殖, 还影响经济的可持续性发展。美国环境保护局 (Environmental protection agency, EPA) 规定废水中的苯酚含量低于 0.1 mg/L^[6]。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 和 2.0 mg/L。

目前处理含酚废水的方法主要有溶剂萃取法、活性炭吸附法、化学氧化法、电化学氧化法和生物

降解法等^[7], 其中生物降解法是一种经济有效、环境友好的处理方法, 具有良好的发展前景。最常见的苯酚降解菌是假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 等^[2–3,8–11], 但是它们对苯酚的最大降解浓度一般在 2 000 mg/L 左右。

本实验从某化工厂的土样和水样中共分离得到 9 株能够降解苯酚的菌株, 其中编号为 T10 的菌株能耐受苯酚浓度高达 3 500 mg/L, 通过 16S rDNA 序列、形态、生理生化等方面对该菌进行了初步鉴定, 并对该菌降解苯酚的特性进行了系统研究, 为利用该菌处理含酚废水提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 培养基

(1) 2216 培养基: 酵母抽提物 0.1%, 蛋白胨 0.5%; 固体培养基附加 2.0% 琼脂。

(2) MSM 培养基 (g/L): NH_4NO_3 1.00, NaCl 0.20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, K_2SO_4 0.20, K_2HPO_4 0.50, KH_2PO_4 0.50, FeCl_2 0.01, 用 10% NaOH 调 pH 为 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选: 从某化工厂采集的水样 1 mL

和土样 1 g 分别接入以 500 mg/L 苯酚为唯一碳源的 20 mL MSM 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 5 d; 取 1 mL 培养液再转接入 20 mL 上述培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 5 d; 如此操作 3 次后, 将培养液稀释适当浓度在 2216 固体培养基上划线培养, 取单菌落在逐渐提高苯酚浓度的 MSM 培养基中进行耐受性实验, 对苯酚耐受性程度最高的菌株进行后续实验。

1.2.2 菌株鉴定: (1) 形态鉴定: 在 2216 固体培养基中划线培养 T10 菌, 取单菌落接种在 5 mL 2216 液体培养基中, 30 °C 培养 24 h, 取菌液用 1% 磷钨酸染色, 在透射电镜(型号 JEM-100CXII)下观察菌体的显微结构, 并照相。

(2) 分子鉴定: 用细菌 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)提取细菌基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, 27F 和 1492R 为 16S rDNA 引物^[12]进行 PCR。PCR 产物电泳后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒(TIANGEN)回收大约 1.5 kb 的目的条带, 连接到 pMD-18T 载体(上海生工), 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 将阳性重组子送上海博亚生物有限公司测序。将测定得到的 16S rDNA 序列通过 BLAST 软件与 GenBank 中相关序列进行比对, 并利用 MEGA 4.0 软件进行聚类分析构建进化树^[13]。

(3) 部分生理生化指标鉴定^[14]: 将 2216 固体平板上的单菌落分别在淀粉酶、酯酶、蛋白酶(酪蛋白、明胶和脱脂牛奶)和 DNA 酶固体培养基上划线, 30 °C 培养 2–3 d, 鉴定其相应酶的活性。分别取 100 μ L 菌液加入 5 mL 硝酸盐、亚硝酸盐液体培养基及脲酶鉴定培养基中, 鉴定其硝酸盐、亚硝酸盐还原性及脲酶活性。将 3% 的过氧化氢溶液滴至载玻片上, 加上菌苔观察其触酶活性。

1.2.3 T10 菌苯酚降解特性的研究: T10 菌接种在 2216 液体培养基中培养 12 h (30 °C、180 r/min), 以 10% 的接种量接种于 MSM 培养基中, 按设定

的初始苯酚浓度、pH (用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调节)和装液量振荡培养; 将菌分别接种在添加 0.1% 外加碳源(葡萄糖、蔗糖、乙酸钠)和 0.1% 外加氮源(蛋白胨)的 MSM 培养基中振荡培养。采用 4-氨基安替比林法^[15]测定发酵液中苯酚浓度, 根据苯酚标准曲线计算苯酚去除率。

1.2.4 响应面法优化 T10 菌降解苯酚的条件: 以初始苯酚浓度、pH 和装液量作为响应面优化的因素, 以苯酚的去除率为响应值(Y)进行中心组合设计, 并采用 Design Expert 软件进行试验设计、数据回归分析以及建立多项式模型方程, 确定各因素的最优水平。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态、生理生化和分子鉴定结果

T10 菌落颜色为黄色, 不透明, 呈圆形, 直径 1.0 mm–2.0 mm, 边缘整齐, 菌落略隆起, 表面光滑有光泽, 质地湿润, 如图 1A 所示。在透射电镜中的显微结构为长椭圆形, 无鞭毛, 长约 1 μ m 左右, 宽约 700 nm 左右, 如图 1B 所示。

T10 菌的生理生化鉴定结果显示该菌的脲酶、硝酸盐和亚硝酸盐还原能力为阳性, 淀粉酶、酯酶、蛋白酶、DNA 酶和触酶等均为阴性。将所测定的 T10 菌株 16S rDNA 序列结果(图 2)经 NCBI 网站上的 BLAST 数据库比对, 结果表明与该序列一致性大于 97% 的序列全部来自于恶臭假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。通过 MEGA 4.0 软件进行聚类分析所构建的系统发育树见图 2, 在

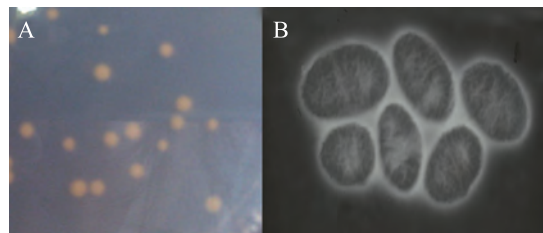


图 1 T10 菌菌落图(A)及透射电镜图(B) (19 000 \times)
Fig. 1 Colony (A) and transmission electron micrograph (B) of strain T10 (19 000 \times)

AATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGATTCCAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
GAGCGGATGAAAGGAGCTTGCTCCTGGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAG
GAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG
GGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACATG
CATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
TCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAA
TGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACCTT
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAAC
GAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCAGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGCTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGCGCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAA
CCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTGCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCTTGTACACACCGCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATT
CATGACTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAATCGTGCACCTGCAGGCAGCAA

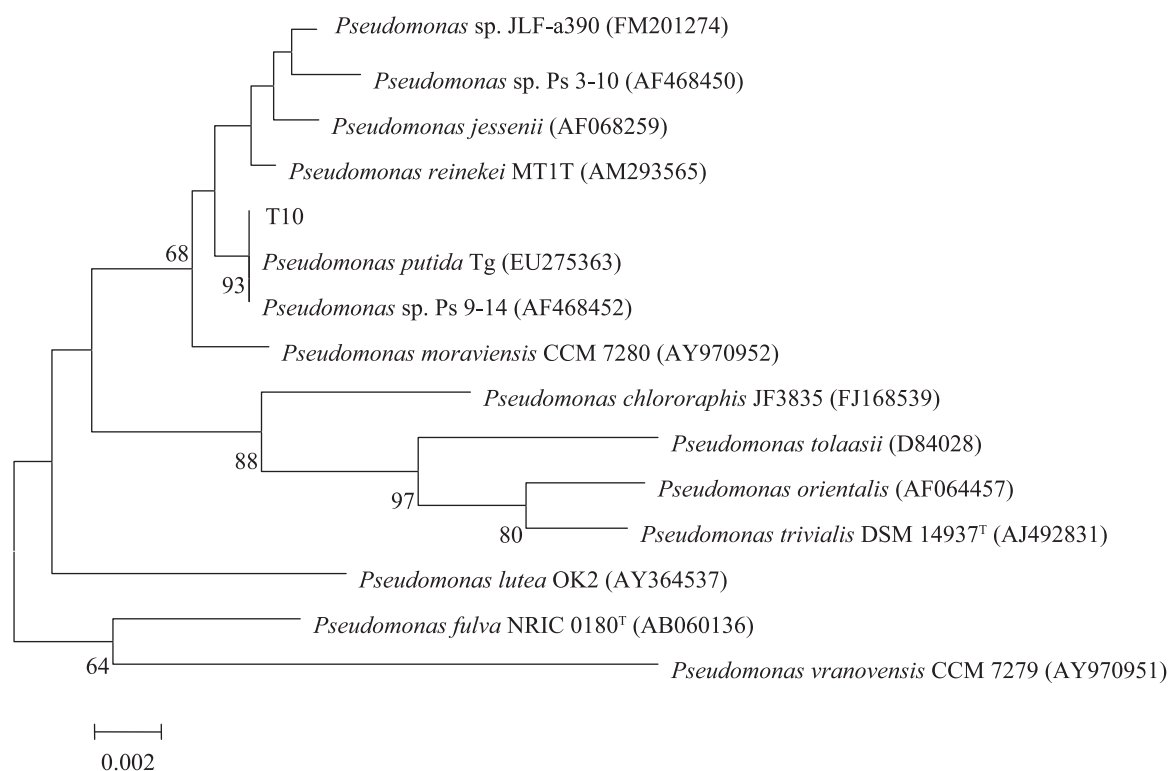


图2 T10菌株的16S rDNA序列结果和系统发育树

Fig. 2 The sequence and construction of the phylogenetic tree by 16S rDNA of strain T10

Note: Bootstrap percentages (from 1 000 replicates) are indicated at nodes. Bar, 0.002 substitutions per nucleotide position.

15种菌株中, T10与*P. putida* Tg菌株同源性高达99%以上, 因此, T10菌属恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* T10)。

2.2 T10菌苯酚降解特性的研究

2.2.1 初始苯酚浓度对T10菌降解苯酚的影响:

苯酚作为一种有毒有机物, 其浓度的高低不仅影

响微生物的生长, 也影响微生物对苯酚的降解性能。T10菌按10%接种量接种于初始苯酚含量分别为1 500、2 250、3 000、3 750和4 500 mg/L的MSM培养基(pH 7.0)中, 30℃、180 r/min条件下恒温振荡培养, 分别在培养48 h和96 h后取样测苯酚浓度。结果如图3所示, 培养48 h时, T10

菌对苯酚已有初步降解,并且在不同的苯酚浓度下表现出明显差异;培养 96 h 后,苯酚浓度在 1 500–3 000 mg/L 范围内,菌株降解苯酚能力较好,其苯酚去除率均高于 85%,在苯酚浓度高达 3 000 mg/L 时,去除率仍为 85.16%;但初始苯酚浓度 $\geq 3\ 750$ mg/L 时,菌株的苯酚降解能力大幅度降低,去除率不足 30%,菌体的生长也受到明显抑制。在较低的苯酚浓度范围内,菌株能够利用苯酚作为唯一的碳源和能源而降解苯酚;高浓度苯酚具有强烈的毒性,对微生物的毒害作用大,抑制菌体的生长,导致苯酚的降解能力下降以致丧失^[9,16]。在后续实验中,初始苯酚浓度定为 3 000 mg/L。

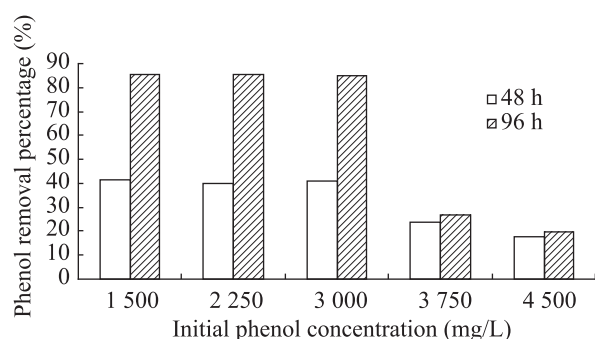


图 3 初始苯酚浓度对 T10 菌降解苯酚的影响

Fig. 3 Influence of initial phenol concentration on phenol degradation of strain T10

2.2.2 装液量对 T10 菌降解苯酚的影响: 苯环类污染物可以经过微生物的有氧呼吸和发酵途径而被降解,微生物通过有氧呼吸途径可把它们完全矿化成 CO_2 、 H_2O 和 NH_3 ^[17]。实验中采用静置培养和摇瓶培养来初步判定 T10 菌株对氧需求情况,结果表明摇床培养的生物量比静置培养的生物量增加 20%,苯酚去除率提高了 23% (数据未示),初步推断 T10 菌为好氧菌,通过有氧呼吸途径降解苯酚。溶解氧通过影响好氧微生物的生长而影响微生物对苯酚的降解效率。本实验通过摇瓶的不同装液量反映溶解氧对菌体降解苯酚性

能的影响。将 T10 菌按 10%接种量接种于不同装液量(30、50、80、100 和 120 mL/250 mL)的 MSM 培养基(初始苯酚浓度为 3 000 mg/L, pH 7.0)中, 30 °C、180 r/min 条件下恒温振荡培养 48 h, 取样测苯酚浓度。结果见图 4: 装液量为 30–80 mL 范围时,苯酚去除率均在 44%,且差距不超过 5%;而装液量大于 80 mL 时,溶液中溶解氧含量明显不足,菌体生长较差,苯酚去除率不足 30%。考虑到实际情况下,一次性处理量大,工作效率高,故选择 80 mL 的装液量。

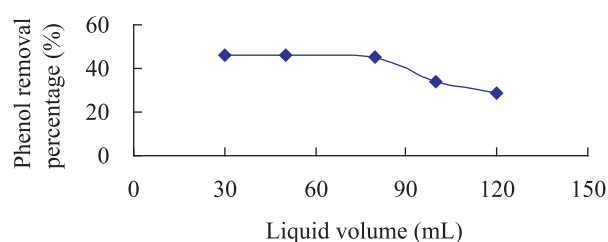


图 4 装液量对 T10 菌降解苯酚的影响

Fig. 4 Influence of liquid volume on phenol degradation of strain T10

2.2.3 初始 pH 对 T10 菌降解苯酚的影响: 培养基的 pH 不仅影响菌体的生长,也影响酶的活性^[3]。将 T10 菌按 10%接种量接种于不同 pH (6.0、7.0、7.5、8.0 和 8.5)的初始苯酚浓度为 3 000 mg/L MSM 培养基中, 30 °C、180 r/min 条件下恒温振荡培养 48 h, 取样测苯酚浓度,结果见图 5, 图中表明,菌株在 pH 7.0–8.0 之间降解苯酚的效率较高,48 h 时去除率达到 30%以上, pH 7.5 时苯酚的去除率为 39.03%;在 $\text{pH} \leq 6.0$ 和 $\text{pH} \geq 8.5$ 时,苯酚去除率均低于 20%。在较酸或较碱的环境下,菌体的苯酚降解能力受到抑制, pH 可能通过影响苯酚的离子化程度和苯酚降解过程中相关酶的生物活性,使得以苯酚作为唯一碳源和能源的微生物对苯酚的利用能力下降,不利于微生物的生长,进而抑制微生物降解苯酚的效率^[3,16,18]。本实验中的 T10 菌株降解苯酚的最适初始 pH 为 7.5。

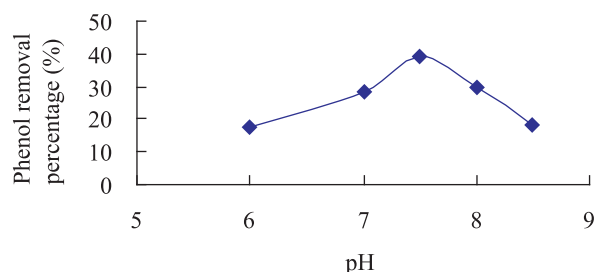


图5 pH对T10菌降解苯酚的影响

Fig. 5 Influence of pH on phenol degradation of strain T10

2.2.4 外加碳源和氮源对 T10 菌降解苯酚的影响: 研究发现降解有毒有机物的微生物所遭受的高浓度底物抑制可通过固定化菌体或添加传统碳源以提高微生物对底物的耐受性^[19]。本实验在初始苯酚浓度为 3 000 mg/L MSM (pH 7.5)培养基中, 分别添加 0.1%外加碳源(葡萄糖, 蔗糖和乙酸钠)和 0.1%外加氮源(蛋白胨), 30 °C、180 r/min 条件下恒温振荡培养 48 h, 取样测苯酚浓度。结果见图 6, 经过 48 h 的培养后, MSM 培养基中分别添加蛋白胨和葡萄糖的菌体生长较好, OD_{600} 值分别达到 1.4 和 0.6, 这说明通过添加少量蛋白胨和葡萄糖能够在较短时间内提高生物量。由图 7 可以看出, 在添加蛋白胨和葡萄糖的情况下, T10 菌降解苯酚的效率均有所提高, 苯酚的去除率均在 80%以上, 比同等时间内不外加碳源和氮源时 T10 菌降解苯酚效率(46.5%)提高了 1.7 倍; 在不同碳源中, 葡萄糖对 T10 菌降解苯酚有明显的促进作用, 培养 48 h 后对苯酚的降解率达到 81%。添加低浓度葡萄糖一方面能够促进菌株合成与苯酚降解有关的酶; 另一方面葡萄糖与苯酚之间存在反竞争性抑制作用, 从而减弱了高浓度苯酚对菌株生长的抑制作用^[7,18,20]。通过对培养液 COD 的测定(图 8), 发现葡萄糖在菌体生长过程中 COD 的贡献率接近 70%, 显著高于其他碳源和氮源, 表明外加低浓度葡萄糖通过促进菌体的生长, 提高了菌体对苯酚的利用, 推测

葡萄糖是以共代谢形式参与菌体对苯酚的降解, 这与 Lob 等的研究结果一致^[19], 为以后缩短菌种的培养时间, 提高菌株降解苯酚的效率提供了理论依据。

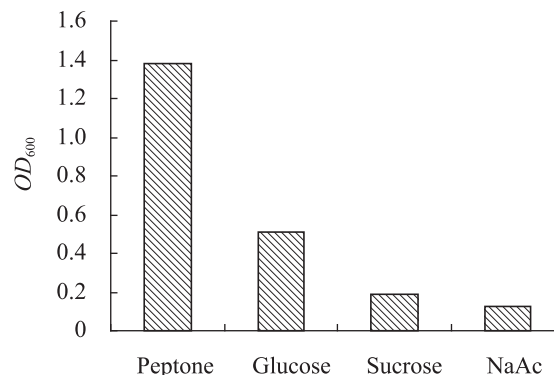


图6 外加碳源和氮源对T10菌生长的影响

Fig. 6 Effect of additional carbon and nitrogen source on the growth of strain T10

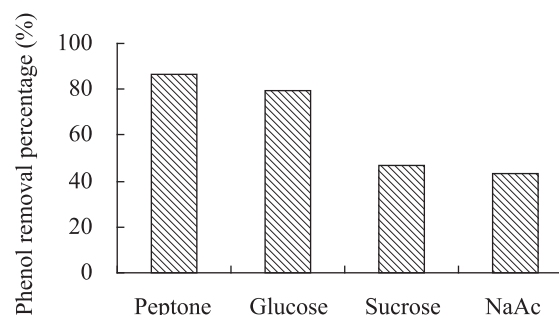


图7 外加碳源和氮源对T10菌降解苯酚的影响

Fig. 7 Effect of additional carbon and nitrogen source on degradation capacity of strain T10

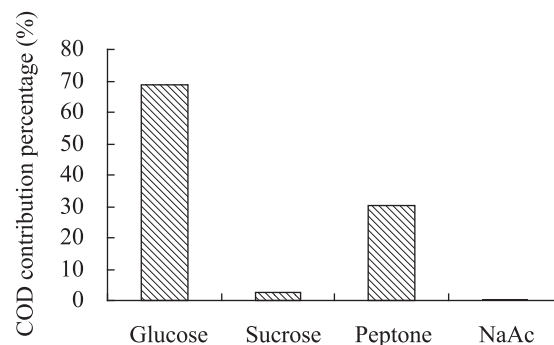


图8 外加碳源和氮源在T10菌降解苯酚过程的COD变化

Fig. 8 Effect of additional carbon and nitrogen source on COD for degradation capacity of strain T10

2.2.5 响应面法优化 T10 菌降解苯酚的最适条件: 根据响应面分析试验软件 Design expert 设计了 3 因素 5 水平(表 1)共 20 个实验点进行响应面分析, 实验安排及实验结果(菌体培养 96 h 取样

测定)、回归模型方差分析见表 2 和表 3。20 个实验点分为两类: 一类是析因点, 共 14 个; 一类是零点为区域的中心点。零点重复 6 次, 用于估计试验的误差^[20]。

表 1 实验参数和水平					
Table 1 Experimental parameters and levels					
因素 Factors	水平 Level				
	-1.68	-1	0	1	1.68
A: pH	6.66	7.00	7.50	8.00	8.34
B: 装液量 Liquid volume (mL)	63.18	70.00	80.00	90.00	96.82
C: 初始苯酚浓度 Initial phenol concentration (mg/L)	1 738.66	2 250.00	3 000.00	3 750.00	4 261.34

表 2 实验设计表及结果				
Table 2 Experimental design and results				
Run	Factor A pH	Factor B 装液量	Factor C 初始苯酚浓度	Experimental value 苯酚去除率
		Liquid volume (mL)	Initial phenol concentration (mg/L)	Phenol removal rate (%)
1	7.00	70.00	2 250.00	70.90
2	7.00	90.00	3 750.00	64.63
3	7.50	80.00	4 261.34	72.82
4	7.00	70.00	3 750.00	68.15
5	7.50	80.00	3 000.00	87.48
6	7.00	90.00	2 250.00	64.46
7	7.50	80.00	3 000.00	87.40
8	7.50	80.00	3 000.00	87.30
9	7.50	63.18	3 000.00	69.92
10	8.00	70.00	3 750.00	59.16
11	7.50	96.82	3 000.00	66.76
12	7.50	80.00	1 738.66	69.33
13	6.66	80.00	3 000.00	65.62
14	8.34	80.00	3 000.00	65.54
15	8.00	90.00	3 750.00	61.83
16	8.00	70.00	2 250.00	67.97
17	7.50	80.00	3 000.00	87.56
18	8.00	90.00	2 250.00	70.08
19	7.50	80.00	3 000.00	87.50
20	7.50	80.00	3 000.00	87.30

表 3 回归模型方差分析表
Table 3 Regression model anova table

变异来源 Source	平方和 Sum of Squares	df	均方和 Mean Square	F 检验 F value	Prob>F
Model	1 890.44	9	210.05	41.37	< 0.000 1
A: pH	6.24	1	6.24	1.23	0.293 2
B: 装液量 Liquid volume (mL)	8.06	1	8.06	1.59	0.236 0
C: 初始苯酚浓度 Initial phenol concentration (mg/L)	13.89	1	13.89	2.73	0.129 1
AB	27.16	1	27.16	5.35	0.043 2
AC	26.21	1	26.21	5.17	0.046 4
BC	1.51	1	1.51	0.30	0.596 9
A ²	920.49	1	920.49	182.08	< 0.000 1
B ²	709.44	1	709.44	140.41	< 0.000 1
C ²	527.37	1	527.37	104.44	< 0.000 1
残差 Residual	50.77	10	5.08		
失拟项 Lack of fit	50.71	5	10.14	863.40	< 0.000 1
纯误差 Pure error	0.059	5	0.012		
相关系数 R-squared	0.973 8				
校正决定系数 Adj R-squared	0.950 3				
变异系数 C.V. (%)	3.08				

表 3 结果表明所选模型的不同处理间差异极显著($P<0.000\ 1$), 说明用回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其应变量与全体自变量之间的线性关系显著, 即该试验方法可靠。pH(A)、装液量(B)、初始苯酚浓度(C)的二次项的差异极显著($P<0.000\ 1$); pH(A)、装液量(B)、初始苯酚浓度(C)、pH 与装液量(AB)和 pH 与初始苯酚浓度(AC)的 P 值小于 0.05 呈显著; 装液量与初始苯酚浓度(BC)的 P 值大于 0.05 呈不显著。这说明 pH、装液量和初始苯酚浓度与苯酚的去除率存在显著的相关性, 其中 pH 和初始苯酚浓度对 T10 菌的苯酚去除率影响最为显著。

失拟项 $863.40>0.05$, 差异不显著, 说明方程对实验拟合情况好, 实验误差小; 变异系数值为 3.08, 说明了实验可靠; 模型的校正决定系数 $R^2_{\text{adj}}=0.9503$, 说明该模型能解释 97.38% 的响应值的变化。

分析后得出的二项式方程为:

$$Y= 87.46-0.68A-0.77B-1.01C+1.84AB-1.81AC+0.44BC-7.99A^2-7.02B^2-6.05C^2$$

($R^2=0.973\ 8, P<0.1$)

根据上述回归方程及回归模型方差分析表绘出双因子效应分析图。如图 9-11 分析图所示, 两因素之间的影响基本呈抛物线型关系, 且均有一个极大值点, 变化趋势都是先增大后减小。等高

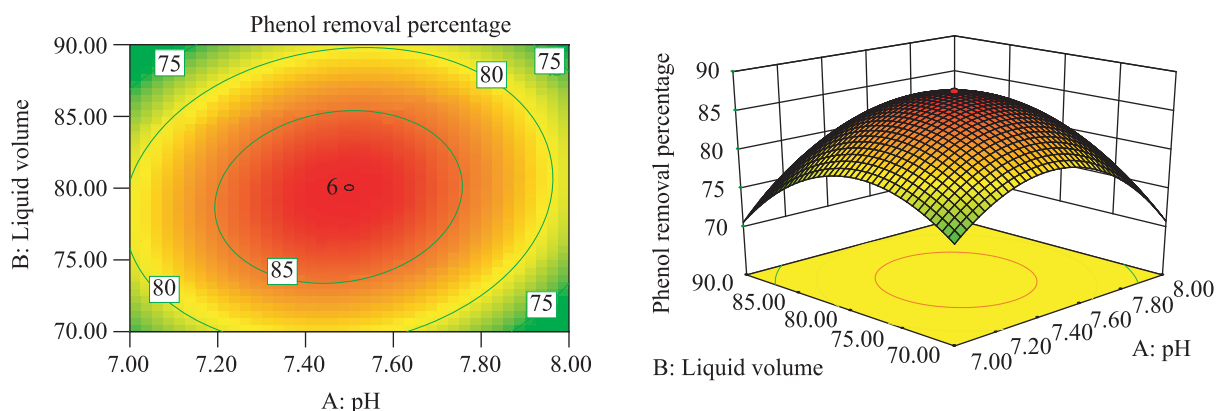


图 9 pH 与装液量对 T10 菌降解苯酚的等高线和响应面

Fig. 9 The contours and response surface of pH and liquid volume effect on phenol degradative capacity of strain T10

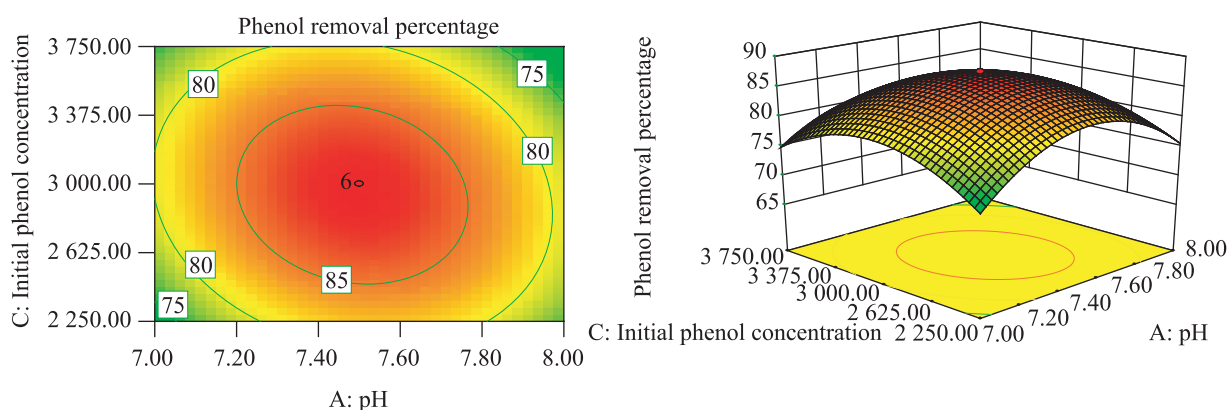


图 10 pH 与初始苯酚浓度对 T10 菌降解苯酚的等高线和响应面

Fig. 10 The contours and response surface of pH and initial phenol concentration effect on phenol degradative capacity of strain T10

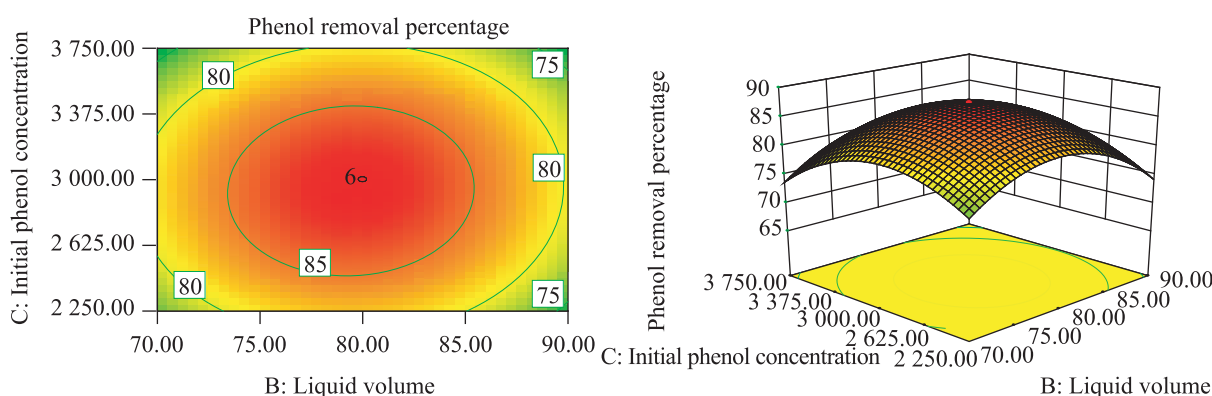


图 11 初始苯酚浓度与装液量对 T10 菌降解苯酚的等高线和响应面

Fig. 11 The contours and response surface of initial phenol concentration and liquid volume effect on phenol degradative capacity of strain T10

线呈圆形说明两因素交互作用不显著, 呈椭圆或者马鞍形则表明作用显著, 图 9、10 和 11 呈椭圆形, 反应的结果均与回归模型方差分析表(表 3)一致。由此回归模型的二项式方程求一阶偏导得出, 实验的最优培养条件为: 初始苯酚浓度 2 941.04 mg/L, pH 7.48, 装液量 79.37 mL/250 mL, 此时苯酚的降解率预测能够达到 88.34%, 实际值(87.56%, 见表 2)与预测值非常接近。

3 结论

T10 菌株经初步鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* T10), 能在以苯酚为唯一碳源和能源的 MSM 培养基中进行生长繁殖, 其耐受苯酚的浓度高达 3 500 mg/L, 高于已报道的苯酚降解菌株^[2-3,8-9,20], 这为工业处理高浓度含酚废水奠定了基础。不足之处在于该菌株降解苯酚需时较长, 96 h 内降解苯酚的效率不足 90%, 但在培养基中添加较低浓度的葡萄糖后, 发现葡萄糖不仅能够有效缩短 T10 菌的生长周期, 而且可能通过共代谢途径^[19]提高 T10 菌株降解苯酚的能力。通过比较菌株在静置和摇床培养条件下的生长及降解苯酚情况, 发现 T10 菌降解苯酚为有氧呼吸过程。在研究 pH、装液量及初始苯酚浓度对 T10 菌降解苯酚效率的单因素基础上, 通过 3 因素 5 水平响应面法优化 T10 菌降解苯酚效率, 实验结果与回归模型方差分析表明: pH 和初始苯酚浓度对菌株降解苯酚影响显著, T10 菌在初始苯酚浓度 3 000 mg/L、pH 7.5 和装液量 80 mL/250 mL 条件下, 苯酚的降解率可达到 87.56%。

因该菌株能够耐受较高浓度的苯酚, 在治理含酚废水方面具有很好的应用价值, 其在实际含酚废水中降解动力学和如何缩短降解周期等方面有待深入探讨, 为进一步处理不同来源的苯酚

废水及生物法降解高浓度苯酚奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 孔志明. 环境生物毒理学[M]. 第4版. 南京: 南京大学出版社, 2008.
- [2] Hannaford AM, Kuek C. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, 22(2): 121-126.
- [3] Hsieh FM, Huang Ch, Lin TF, et al. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(1): 83-92.
- [4] Godjevargova T, Ivanova D, Alexieva Z, et al. Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste waters by free and immobilized *Trichosporon cutaneum* R57[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(6): 915-920.
- [5] Borja R, Martin A, Maestro R, et al. Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors[J]. Process Biochemistry, 1992, 27(4): 231-237.
- [6] Mukherjee S, Kumar S, Misra AK, et al. Removal of phenols from water environment by activated carbon, bagasse ash and wood charcoal[J]. Chemical Engineering Journal, 2007, 129(1/3): 133-142.
- [7] Wang LM, Li Y, Yu P, et al. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 183(1/3): 366-371.
- [8] Juang RSh, Tsai ShY. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 31(2): 133-140.
- [9] Li Y, Li J, Wang Ch, et al. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(17): 6740-6744.
- [10] 任河山, 王颖, 赵化冰, 等. 酚降解菌株的分离、

- 鉴定和在含酚废水生物处理中的应用[J]. 环境科学, 2008, 29(2): 482-487.
- [11] 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.
- [12] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]// Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. Chichester: Wiley, 1991.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] 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.
- [16] 周倩倩, 丁丛, 王志平, 等. 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, 2011, 27(4): 544-560.
- [17] 池振明. 现代微生物生态学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2010.
- [18] 姜立春, 阮期平, 袁利娟, 等. 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, 2011, 5(8): 1912-1916.
- [19] Lob KC, Tar CPP. Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 64(6): 756-763.
- [20] Annadurai G, Ling LY, Lee JF. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 151(1): 171-178.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2012年每册定价58元, 全年696元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413