

# *Ralstonia metallidurans* CH34 苯酚降解特性的研究

高振贤 马 宏 贾振华 李承光 宋水山\*

(河北省科学院生物研究所 石家庄 050051)

**摘要:** *Ralstonia metallidurans* CH34 是从一家锌工厂的沉积物中分离筛选到的一株细菌。对其降解苯酚的特性进行了研究。结果表明 *R. metallidurans* CH34 具有很高的降解苯酚的能力, 其降解苯酚的速率常数为 0.33, 降解苯酚的最适条件为 pH7.0, 温度 30℃, 装液量 20% (v/v)。在高浓度重金属存在的条件下, *R. metallidurans* CH34 仍保持较高的苯酚降解活力。柠檬酸钠、琥珀酸则能促进其对苯酚的降解。

**关键词:** *Ralstonia metallidurans* CH34, 苯酚, 生物降解, 重金属

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0044-04

## Study on Phenol Degradation in *Ralstonia metallidurans* CH34

GAO Zhen-Xian MA Hong JIA Zhen-Hua LI Cheng-Guang SONG Shui-Shan\*

(Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, 050051)

**Abstract:** *Ralstonia metallidurans* CH34 was isolated from the deposit of a zinc factory. The degradation of phenol by *R. metallidurans* CH34 was investigated. The results showed that *R. metallidurans* CH34 possesses high ability to degrade phenol with the biodegradation rate constant of 0.33. The optimal pH, temperature and volume of medium for phenol degradation are pH 7.0, 30℃, and 20% (v/v), respectively. In addition, this strain retains its ability to degrade phenol in the presence of high concentration of heavy metal ion. The sodium citrate, sodium succinate can enhance the degradation of phenol.

**Key words:** *Ralstonia metallidurans* CH34, Phenol, Biodegradation, Heavy metal

苯酚是焦化厂及炼油厂污水的主要有机污染物。利用微生物降解苯酚是一种经济高效且不会产生二次污染的方法<sup>[1]</sup>。含酚工业废水中往往含有高浓度的重金属离子, 而高浓度重金属离子的存在会抑制微生物对苯酚的生物降解。因此, 获得耐或抗重金属的苯酚降解菌在含酚工业废水的生物处理中将具有重大的潜力。

*Ralstonia metallidurans* CH34 是从一家锌工厂的沉积物中分离筛选到的一株细菌, 具有抗镉、钴、镍、锌、汞等重金属的特性<sup>[2]</sup>。国外学者对其抗重金属的代谢途径和分子机制进行了大量的研究, 但尚未见关于其降解有机污染物的报道。在研究酯酶的过程中, 我们从 *R. metallidurans* CH34 中克隆到一酯酶基因 *estA* (基因登录号: AJ251831)<sup>[3]</sup>。经序列同源性比较发现, *R. metallidurans* CH34 的酯酶基因 *estA* 与细菌中参与芳香化合物代谢中间位裂解途径的水解酶有很高的同源性<sup>[4]</sup>, 说明其可能具有降解芳香化合物的代谢途径。利用生物信息学方法分析 *R. metallidurans* CH34 的全基因组序列发现, 其基因组确实存在与其它几种苯酚降解菌具有高度同源性的降解苯酚基因的操纵子<sup>[5]</sup>。为了探索 *R. metallidurans* CH34 在生物治理含酚工业废水和重金属

\* 联系人 Tel: 0311-3014618, E-mail: shuishans@hotmail.com

收稿日期: 2004-03-15, 修回日期: 2004-06-10

双重污染中的应用潜力, 本研究对其降解苯酚的能力和特性进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌种

*Ralstonia metallidurans* CH34, 德国 Münster 大学 Alexander Steinbüchel 教授提供, 由本实验室保存。

### 1.2 培养基

LB 培养基: 胰蛋白胨 5 g, 酵母膏 10 g, NaCl 10 g, 定容至 1 L。

M9 培养基:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g, NaCl 0.5 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g, 酵母膏 0.2 g,  $\text{MgSO}_4$  0.24 g,  $\text{CaCl}_2$  0.011 g, 定容至 1 L。

### 1.3 生物降解实验

取菌株一环于 20 mL LB 液体培养基中, 振荡培养 24 h, 离心分离菌体, 用 pH7.0 的 M9 培养基洗涤两次, 溶于 3~4 mL 的 M9 培养基中, 制成悬浮液。以 10% 的接种量将菌悬液接种于含 3 mmol/L 苯酚的 20 mL M9 培养基中, 30℃ 振荡培养 32 h。

### 1.4 菌体生长的测定

以 600 nm 处光吸收值代表菌体的生长状况。

### 1.5 苯酚含量的测定

采用改进的 4-氨基安替比啉法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 苯酚降解的最适条件

**2.1.1 pH 对菌体生长和降解苯酚的影响:** 培养基 pH 值分别为 5、6、7、8、9, 苯酚浓度为 3 mmol/L, 摇床培养 32 h 后, 测菌株生长量及苯酚降解率 (图 1)。由图 1 可知, pH 为 7 时, 菌体生长最好, 且苯酚的降解率达到 100%; 当 pH 为 5~8 之间时, pH 对菌种的生长影响较小, 苯酚也基本全部降解, 说明该菌株有较广的适应范围。

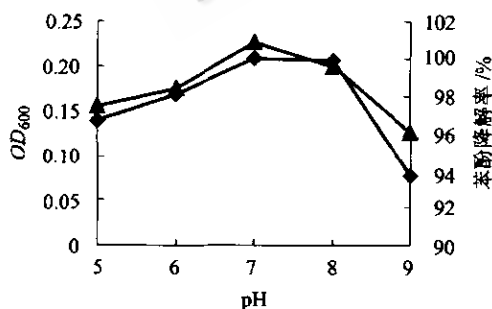


图 1 pH 值对菌种生长量和苯酚降解的影响

▲-OD<sub>600</sub>, ◆-苯酚降解率

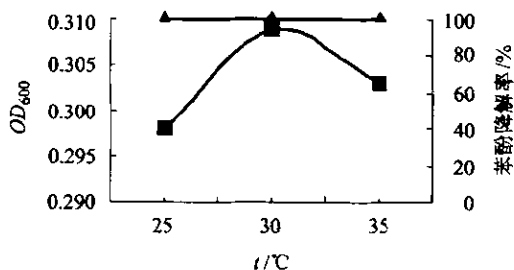


图 2 温度对菌种生长量和对苯酚降解的影响

▲-OD<sub>600</sub>, ◆-苯酚降解率

**2.1.2 温度对菌种生长和降解苯酚的影响:** 由于 *R. metallidurans* CH34 的最适生长温度为 30℃, 所以选取 25、30、35 3 个温度测定该菌种对苯酚的最佳降解温度。通过实验可知, 在苯酚的起始浓度为 3 mmol/L, 温度在 25℃~35℃ 之间, 经 32 h 培养后苯酚均已全部降解, 说明测试温度对苯酚的降解影响不大; 而 30℃ 时菌种生长量最大, 则

表明苯酚在此温度下降解速率较快,即为最适降解温度(图2)。

**2.1.3 装液量对苯酚降解的影响:**在 100 mL 的三角瓶中,分别加入 10、20、30、40、50、60 mL 的培养基,苯酚的起始浓度为 3 mmol/L,摇床培养,测定装液量对苯酚降解的影响。结果如图 3,培养基的量为 20 mL 时,苯酚降解最快。

**2.1.4 重金属对苯酚降解的影响:***R. metallidurans* CH34 具有抗重金属的特性。为测试环境中重金属的存在对其降解苯酚能力的影响,根据 *R. metallidurans* CH34 的抗性水平我们在培养基中分别加入 2 mmol/L 的氯化汞、氯化镍、氯化钴、氯化锌,进行摇床培养 32 h 后,测得苯酚残留量,计算苯酚降解率。结果表明,即使在 2 mmol/L 的氯化钴和氯化锌存在下,该菌种对苯酚的降解率仍能保持 50% 以上(图 4),氯化汞完全抑制菌种对苯酚的降解,其余的对苯酚的降解均有影响。

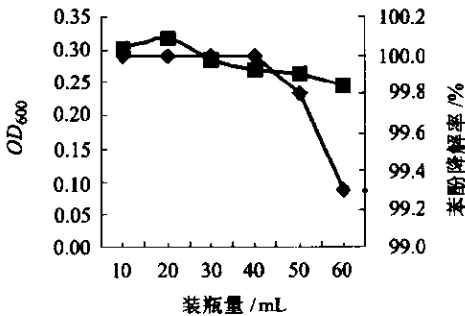


图3 装液量对菌种生长和苯酚降解的影响  
—□— OD<sub>600</sub>, —◆— 苯酚降解率

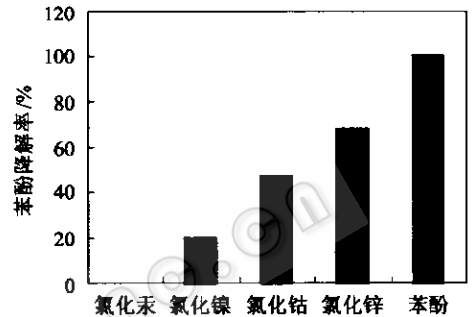


图4 重金属对苯酚降解的影响

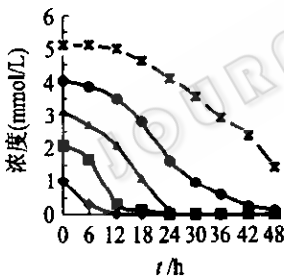


图5 菌种对不同初始浓度苯酚的降解  
—◆— 1, —■— 2, —▲— 3, —●— 4, —×— 5

## 2.2 苯酚降解动力学特性

**2.2.1 不同浓度苯酚降解动力学特性:**为了解 *R. metallidurans* CH34 降解苯酚的动力学性质,试验在一定的菌种量条件下,考察菌株对初始浓度为 1、2、3、4、5 mmol/L 的苯酚降解率,结果如图 5 (图例 1~5 分别表示对应的 5 个初始浓度)。初始浓度为 1、2 mmol/L 时,苯酚完全降解仅用 12 h; 3 mmol/L 时,需 24 h; 48 h 后,4 mmol/L 的苯酚几乎全部被降解,要完全降解 5 mmol/L 的苯

酚,还需一定时间。说明苯酚初始浓度越大,菌种生长周期越长,苯酚完全降解所需时间越长。

**2.2.2 苯酚降解速率常数:**假设菌株对苯酚的降解遵循 Monod 方程,即:  $\ln c = -kt + A$  ( $k$  系表征苯酚降解速率的动力学常数)。据图 5 可得表 1 的动力学方程。由表 1 可知,菌株对苯酚的降解符合一级动力学特征。在一定范围内随着苯酚初始浓度的增加,  $K$  值变大; 初始浓度大于 3 mmol/L 后,  $K$  值开始减小。说明高浓度的苯酚将抑制菌体的生长和对苯酚的降解, 3 mmol/L 是苯酚降解的最适初始浓度。

表 1 苯酚降解动力学方程

单位 c: mmol /L

苯酚初始浓度 (c)	1	2	3	4	5
动力学方程	$\ln c = -0.1917t + 0.0198$	$\ln c = -0.2257t + 1.9075$	$\ln c = -0.3342t + 6.0753$	$\ln c = -0.0952t + 2.7739$	$\ln c = -0.0193t + 1.8595$
半寿期 $t_{1/2}$ (h)	3.72	8.45	16.96	21.86	48.87
r	0.9941	0.9978	0.9943	0.9962	0.9930

2.3 其它碳源对苯酚降解的影响

实验表明 *R. metallidurans* CH34 可以利用琥珀酸和柠檬酸钠为唯一碳源，为探索添加琥珀酸和柠檬酸钠对菌种降解苯酚能力的影响，分别将苯酚与琥珀酸、苯酚与柠檬酸钠以相同浓度 4.5 mmol/L 加入培养基，只加苯酚为对照。测得菌种生长曲线及对应的苯酚残留浓度曲线图 6。从总体上看，加入琥珀酸和柠檬酸钠后，菌种生长量明显增加，对应的苯酚降解的也较快，可能是琥珀酸和柠檬酸钠促进了菌种的生长，加大了培养基中酶的含量，从而促进了苯酚的降解。而前 12 个小时，加入琥珀酸的，菌种生长较快，苯酚降解也较快，说明在这一时期菌种同时利用两种碳源；之后，菌种生长缓慢，而苯酚降解基本没影响，可能是苯酚影响了菌种对琥珀酸的利用。加入柠檬酸钠的却与之相反，前 12 h，菌种生长缓慢，苯酚降解量较少，但高于对照，可能苯酚抑制了菌种对柠檬酸钠的利用；之后菌种生长迅速，苯酚降解快，可能是苯酚与柠檬酸钠达到了一种平衡，从而促进了反应。

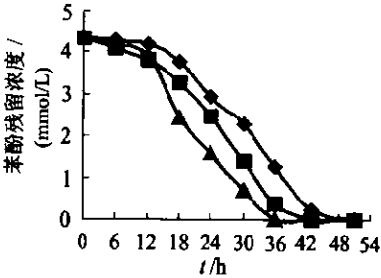


图 6 琥珀酸和柠檬酸钠作为共碳源对苯酚降解的影响  
—○— 苯酚, —■— 琥珀酸 + 苯酚, —▲— 柠檬酸钠 + 苯酚

3 结论

- (1) *R. metallidurans* CH34 可以利用苯酚作为唯一碳源。30℃, pH7.0, 装液量 20% (v/v) 是其降解苯酚的最适条件。
- (2) 通过实验, 从事实上进一步证明 *R. metallidurans* CH34 具有降解苯酚及抗重金属的双重功效。由于重金属与污染物的共存抑制了污染物降解菌的降解能力, 因此, 在重金属污染的极端环境中, 只具有降解有机污染物单一能力的细菌将难以发挥其降解效能<sup>[7]</sup>。所以, *R. metallidurans* CH34 在治理含酚废水方面将有很大的应用价值。*R. metallidurans* CH34 降解苯酚的最适条件已测定, 有利于今后处理含酚污水的实际应用。而菌种对重金属的抗性, 仍需进一步诱导, 以期达到更好的效果。

参考文献

[1]徐玉泉, 张 维, 陈 明, 等. 高技术通讯. 2000, 10 (3): 12~14.  
[2]Diels L, Sadouk A, Margeay M. Toxicol Environ Chem, 1989, 23: 78~89.  
[3]Song S, Hein S, Steinbuechel A. Biotechnol Lett, 22: 443~449.  
[4]宋水山, Alexander. 微生物学报, 2001, 41 (4): 402~407.  
[5]宋水山, 段非凡, 贾振华, 等. 河北省科学院学报, 2003, 20 (4): 245~251.  
[6]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. 北京: 中国环境科学出版社, 1997. 408~410.  
[7]丁克强, 骆永明. 土壤, 2001, 4: 179~184