

# 固定化 *Ralstonia metallidurans* CH34 降解苯酚的研究\*

吴志国<sup>1</sup> 王艳敏<sup>1</sup> 邢志华<sup>2</sup> 武晓炜<sup>2</sup> 宋水山<sup>3\*\*</sup>

(河北工业大学化工学院生物工程系 天津 300130)<sup>1</sup>

(华北制药华胜有限公司 石家庄 052160)<sup>2</sup> (河北省生物研究所环境工程室 石家庄 050051)<sup>3</sup>

**摘要:** 将既能耐抗重金属又能降解苯酚的细菌 *Ralstonia metallidurans* CH34 固定化以提高其降酚效率。首先通过正交实验, 得到了固定化该菌种的最优制备条件, 然后对固定化细胞的降酚效果进行了研究。结果表明, 固定化 *R. metallidurans* CH34 的降酚效果明显优于游离细胞; 抗重金属毒性方面也有较大提高; 在加入额外碳源(甲苯, 柠檬酸)情况下, 固定化 *R. metallidurans* CH34 进行苯酚降解时所受影响明显要小于游离态菌。

**关键词:** 抗重金属, 固定化, 正交实验, 额外碳源

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0031-06

## Study on Degrading Phenol by Immobilized *Ralstonia metallidurans* CH34 \*

WU Zhi-Guo<sup>1</sup> WANG Yan-Min<sup>1</sup> XING Zhi-Hua<sup>2</sup> WU Xiao-Wei<sup>2</sup> SONG Shui-Shan<sup>3\*\*</sup>

(Department of Biotechnology Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130)<sup>1</sup>

(North China Pharmaceutical Huasheng Co., Ltd., Shijiazhuang 052160)<sup>2</sup>

(Laboratory of Environmental Engineering, Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050051)<sup>3</sup>

**Abstract:** The subject of this study is to improve the ability of *Ralstonia metallidurans* CH34, a phenol-degrading strain with anti-heavy metal feature by immobilization. The optimal conditions for immobilizing bacterial cells were obtained with cross act experiment. The phenol-degrading efficiency of immobilized *Ralstonia metallidurans* CH34 was investigated. Results show that phenol-degrading efficiency of immobilized cells is obviously superior to that of the free cells; The ability of its resistance to heavy metal have been greatly improved; When additional carbon sources were added in the simulated waste water, the immobilized *R. metallidurans* CH34 were affected less than the free cells.

**Key words:** Anti-heavy metal, Immobilized cells, Cross act, Additional carbon sources

含酚废水是当前工业生产中主要也是较严重的污染源之一。因此, 国内外关于含酚废水处理的研究很多, 其中用生物降解的方法是比较可行且很有前途的方法。但目前许多工业废水含重金属盐, 其对苯酚降解菌的生长有很强的抑制作用, 从而大大限制了生物降解法在各种含酚废水中的应用。*Ralstonia metallidurans* CH34 是一株能耐抗重金属的菌株, 本室在对其进行研究时发现, 其基因组序列存在与其它降酚菌中有关降解基因高度同源的基因簇<sup>[1]</sup>。后经实验证明其能在苯酚为唯一碳源的环境中生长, 表明 *R. metallidurans* CH34 可作为满足耐重金属且降酚条件的候选菌株。

本文旨在将该菌进行固定化, 通过正交化的方法得到固定化细胞最优制备条件, 并对固定化细胞的降酚性能进行了测试与研究, 从而为该菌种的进一步应用提供实验基础与理论依据。

\* 作者还有: 高振贤<sup>3</sup> 马宏<sup>3</sup> 赵国忠<sup>2</sup>

\*\* 通讯作者 Tel: 0311-3014618, E-mail: shuishans@hotmail.com

收稿日期: 2004-09-17, 修回日期: 2004-11-04

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种: *Ralstonia metallidurans* CH34 由德国明斯特大学 Alexander Steinbüchel 教授提供, 由本室保存。

1.1.2 主要试剂: 苯酚、4-氨基安替比啉、铁氰化钾溶液 (质量分数为 8%) 均为 AR, 氯化钙、海藻酸钠、柠檬酸、甲苯、氯化汞、氯化钴、氯化镍均为 CP。

1.1.3 培养基: 废水样采用 M9 无机培养基添加苯酚模拟。M9 无机培养基:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g,  $\text{NaCl}$  0.5g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.492g,  $\text{CaCl}_2$  0.0111g, 苯酚 300mg, 定容 1L (以下实验若不另提则同此浓度)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 检测方法: 苯酚含量的测定采用改进的 4-氨基安替比啉比色法<sup>[2]</sup>。

1.2.2 固定化细胞的制备: 以海藻酸钠为载体, 采用包埋法制备固定化细胞。具体操作是: 将离心 (5,000r/min 离心 15min) 得到的若干湿菌体加入 M9 培养基制成菌悬液 (0.3g/10mL), 再将一定量菌液加入到溶解好的海藻酸钠溶液中, 充分搅拌制成均匀菌悬液后, 滴入成型剂氯化钙溶液中, 经搅拌、钙化, 静置 18h<sup>[3]</sup>后, 形成直径均匀的固定化细胞珠体, 用无菌水洗涤后即可使用。

1.2.3 培养方法: 将已固定好的细胞加到装有 20mL 模拟废水的 100mL 三角瓶中, 在 30℃ 下, 250r/min 的摇床上恒温培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度和 pH 值对固定化细胞珠体的影响

实验中发现将固定化后的海藻酸钠小球放入游离态菌的最适培养基中, 较短时间内, 小球发生解离。为探明原因, 我们改变培养基中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度及 pH 值, 研究其对固定化小球强度及完好性的影响, 结果列于表 1。

分析其中原因: 成型剂  $\text{CaCl}_2$  溶液中 pH 值为 6 左右,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度也相对较高, 所以当在这种条件下小球自然完好。从单一因素考虑, 可能是因为在酸性条件下海藻酸钠钙化率提高, 趋于钙化完全, 从而提高了珠体的凝胶强度; 而当液体中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较高时, 会抑制固定化小球表面的海藻酸钙的溶解, 保持完整的外壳, 从而使小球保持基本完整。

因为在后续的 4-氨基安替比啉比色法检测苯酚含量时, 要用到磷酸盐缓冲液, 当试样中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较高时会产生磷酸钙沉淀, 使检测产生误差。所以最终选择将 M9 培养基的 pH 值调到 6 左右并加少量  $\text{Ca}^{2+}$  加强小球机械强度。

### 2.2 固定化细胞降酚的最优制备条件

在制备固定化细胞过程中, 有诸多因素如包埋微生物菌体量、成型剂氯化钙浓度、载体海藻酸钠浓度和钙化时间等影响固定化细胞的降解效果。为了考察诸因素间的相互影响及各因素不同水平对固定化细胞苯酚降解的影响, 我们利用文献 [4] 中的  $L_9(3^4)$  正交表 (为了作方差分析方便), 以液体培养基中的苯酚残存量为指标进行正交实验。将影响因素中的钙化时间固定为 18h 左右, 其它因素按表 2 安排实验水平。

表 1  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和 pH 值对固定化细胞珠体的影响

$\text{Ca}^{2+}$	pH	
	$\leq 6$	7 ~ 11
$\leq 0.001 \text{ mol/L}$	+	-
$\geq 0.01 \text{ mol/L}$	++	+

注: + 小球基本完好, ++ 小球完好, - 小球破碎、自溶

表 2 正交实验因素水平表

水平	因素		
	A	B	C
1	2%	3%	1: 25
2	3%	4%	2: 25
3	4%	5%	4: 25

注: A  $\text{CaCl}_2$ , B 海藻酸钠浓度, C 包埋比 (菌液体积/海藻酸钠体积)

按照表 2 中不同的因素与水平下的相应数据, 制得了 9 组固定化细胞, 分别加到 20mL 模拟含酚废水中, 经过 4h 后测定残余苯酚浓度, 得到表 3 的实验数据分析表。

表 3 正交实验表

方案	因素			i	
	A	B	C		
1	1	1	1	104.462	
2	1	2	2	87.477	
3	1	3	3	30.598	
4	2	1	2	45.213	
5	2	2	3	136.456	
6	2	3	1	111.966	
7	3	1	3	209.529	
8	3	2	1	155.020	
9	3	3	2	169.635	
$k_{1j}$	253.768	390.434	402.679	441.783	
$k_{2j}$	324.866	410.184	333.556	440.203	
$k_{3j}$	565.415	343.430	407.814	262.06	
$K_{1j}$	74.047	119.866	123.816	136.851	$Y_1$ : 残余苯酚 浓度 (mg/L)
$K_{2j}$	97.747	126.186	100.907	136.456	
$K_{3j}$	177.930	104.067	125.396	76.812	
$R_j$	88.267	6.504	8.874	44.423	
最优水平	$A_1$		$B_2$	$C_3$	
最优方案		$A_1 B_2 C_3$			

结果表明: (1) 所制得的固定化细胞 4h 后各方案的苯酚降解程度有很大差异, 降解率最高的可达 90% 左右。(2) 根据正交实验数据的统计分析, 我们选出了制备固定化细胞的最优操作条件组合, 为  $A_1 B_2 C_3$ , 这一组合不在实验的 9 组数据中, 因此将这一组合与 9 组实验中降解最高者 (即  $A_1 B_3 C_3$ ) 再进行实验比较, 得表 4 数据。

表 4 包埋条件的二次确定

状态		t (h)					
		0	2	4	6	8	
游离态		303.654	300.377	256.928	162.525	0	
固定态	$A_1 B_2 C_3$	1 次	307.559	197.679	81.947	0	0
		2 次	299.998	157.390	0	0	0
	$A_1 B_3 C_3$	1 次	305.325	196.889	80.763	0	0
		2 次	301.695	126.581	0	0	0

注: 表中为苯酚残余浓度 mg/L

降解实验中两种包埋方式在最初的苯酚降解中，降解效率几乎是一样的，而在随后的降解中 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub> 包埋方式显示出了优势，从而确定了制备固定化细胞的最优操作条件为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>，即：湿菌体量 4.8g/L（湿菌体质量/海藻酸钠体积），氯化钙质量浓度为 2%，海藻酸钠质量浓度 5%。

### 2.3 固定化小球的连续运行实验

用选定的模拟废水对选定的固定化小球进行连续化培养，测试其使用寿命。当不更换培养基连续在摇床上培养一个月左右仍能保持良好，小球基本上无膨胀变形，仍有一定弹性。当一天换一次培养基时，经过 20d 左右小球有一定的膨胀，小球颜色逐渐由白色变为半透明浅黄色，估计是小球表面的海藻酸钙壳在慢慢失去；每天更换培养基，到 30d 左右时，固定化小球体积有了较大的膨胀，并开始有个别的破裂现象。因此，在实际应用中要使小球能保持完好更长时间，应向培养基中再多加一些 Ca<sup>2+</sup>。

第二种情况在 30d 的连续运行过程中模拟废水中苯酚的降解时间由最初的 6h 左右，在经历大约 3 个更换培养基的周期后降解时间稳定在 2~3h 左右。

### 2.4 固定化细胞降解苯酚的动力学初步分析

由图 1 的 9 种方案苯酚降解曲线可明显看出它们的一个共同点：在前 2h 苯酚显著

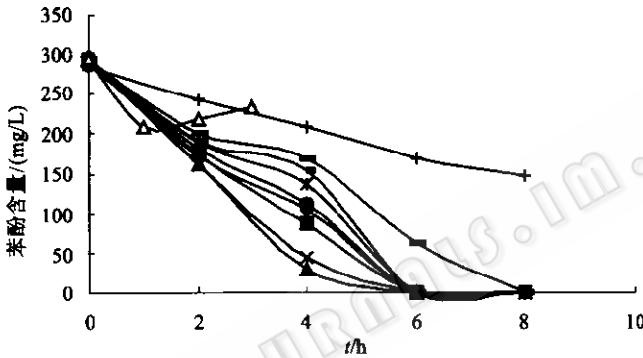


图 1 正交实验降解动力学曲线

- 方案 1, —■— 方案 2, —▲— 方案 3, —×— 方案 4
- \*— 方案 5, —●— 方案 6, —+— 方案 7, —○— 方案 8
- 方案 9, —△— 方案 3 空白

减少，尔后苯酚降解速率相对趋缓，接着苯酚降解速率又增大。与 3 号方案的空白载体（无菌）作对比推测原因，可能是因为降解过程之初固定化载体对苯酚的吸附作用占据了主导地位，在载体的吸附与菌体的降解共同作用下导致了初始苯酚的迅速减少，当吸附达到平衡时苯酚减少速率趋缓，随着固定化载体中菌体生长，苯酚消耗的速率再次加大。

Monod 方程是描述化合物

作为唯一碳源的动力学方程，在有机物浓度 C 很低时，微生物的量基本不变，通常就用简单的一级动力学方程表示： $d\ln C/dt = -k^{[5]}$ 。分别将九组方案的数据拟合，得到苯酚的降解动力学方程，如表 5 所示。

动力学方程中的降解速率常数能够反映出苯酚降解的快慢，当其绝对值较大时表示降解较快。由表 5 可以看出方案 3 的 |k| 值最大，这与之前所选出的最佳方案一致。

表 5 正交实验动力学

方案	动力学方程 R <sup>2</sup>	
1	$\ln C = -0.2611t + 5.6853$	0.9993
2	$\ln C = -0.3014t + 5.7053$	0.9935
3	$\ln C = -0.5644t + 5.8547$	0.9318
4	$\ln C = -0.4688t + 5.7996$	0.9581

续表 5

5	$\ln C = -0.1872t + 5.6499$	0.9953
6	$\ln C = -0.2360t + 5.6665$	0.9997
7	$\ln C = -0.0851t + 5.6622$	0.9968
8	$\ln C = -0.1621t + 5.6519$	0.9565
9	$\ln C = -0.1369t + 5.6468$	0.955

### 2.5 固定化与游离态细胞降酚效果的比较

当苯酚浓度分别为 300mg/L 和 500mg/L, 比较固定化前后差异, 得如图 2 所示。游离态的 *R. metallidurans* CH34 在对苯酚降解时都有一段或长或短的延滞期, 而固定化后的菌则不存在这种情况, 这表明固定化细胞的降酚能力较游离细胞有较大提高, 显示出固定化细胞降酚的优势。

当把模拟废水中的苯酚浓度提高到 1,000mg/L 左右, 固定化后的 *R. metallidurans* CH34 在 60h 内能将苯酚基本降解, 而游离态 *R. metallidurans* CH34 在这一浓度则几乎不能降酚。

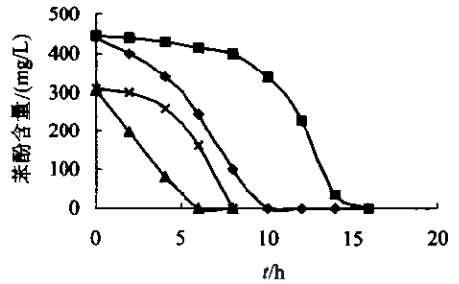


图 2 固定化与游离态菌降酚对比  
 ◆ 500mg/L 固定, ■ 500mg/L 固定,  
 ▲ 500mg/L 固定, × 300mg/L 固定

### 2.6 固定化后抗重金属性能的改善

按照选定方案对 *R. metallidurans* CH34 固定化, 将其与游离态下的菌在同样的重金属环境下作对比试验,  $Hg^{2+}$ ,  $10\mu mol/L$ ;  $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ ,  $2mmol/L$ <sup>[6]</sup>。实验结果: 游离态菌在重金属下降解苯酚速度远远低于固定化后的菌。游离态菌在  $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  下分别需 32h、48h 内能降酚基本完全, 在  $Hg^{2+}$  中 80h 仍保持延滞状态; 而固定化后在  $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  下只需 11h、13h 内即可降酚基本完全, 在  $Hg^{2+}$  中 31h 内就能降酚基本完全。结果充分说明固定化可以使 *R. metallidurans* CH34 在重金属环境下相对于游离态更快地降酚。

### 2.7 固定化 *R. metallidurans* CH34 降酚中加入额外碳源的影响

*R. metallidurans* CH34 在游离状态下降酚若加入额外碳源会对该菌的生长及降酚产生较大影响如图 3 所示, 而向固定化后的 *R. metallidurans* CH34 中添加相同的额外碳源时, 则得到了如图 4 结果。

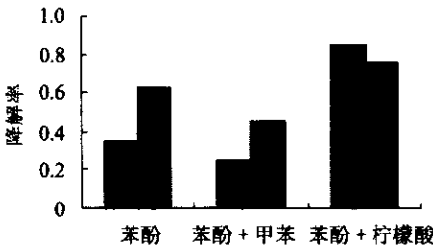


图 3 加额外碳源对游离菌的影响  
 □ 菌体 OD<sub>600</sub>, ■ 5h 苯酚降解率

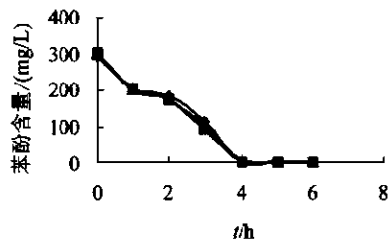


图 4 加额外碳源对固定化菌的影响  
 ◆ 苯酚, ■ 苯酚 + 甲苯, ▲ 苯酚 + 柠檬酸

图4中3条降解曲线几乎重合,说明对于固定化后的 *R. metallidurans* CH34 加入额外碳源并不会对其降酚起到象游离态 *R. metallidurans* CH34 的那种影响,固定化后的降酚抗干扰能力有了较大提高。

### 3 结论

(1) 通过以残酚量为指标的正交化实验确定了 *R. metallidurans* CH34 最优固定化方案,并由动力学角度得到了证实,最佳包埋条件:湿菌体量 4.8g/L;氯化钙质量浓度 2%;海藻酸钠质量浓度 5%。同时还分析确定了固定化小球保持完好的较优环境条件。

(2) *R. metallidurans* CH34 固定化后,分别在降酚速度、降酚能力、抗重金属毒性、抗其它碳源的干扰等方面较游离态都有较大提高。

### 参考文献

- [1] 宋水山,段普凡,贾振华,等. 河北省科学院学报, 2003, 20 (4): 245~251, 262.
- [2] 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: 中国环境出版社, 1997. 408~410.
- [3] 蒋宇红,黄霞,俞毓馨. 环境科学, 1993, 14 (2): 11~14.
- [4] 孙荣恒. 数理统计. 重庆: 重庆大学出版社, 1995. 214~239.
- [5] 钱奕忠,张鹏,谭天伟. 过程工程学报, 2001, 1 (4): 439~441.
- [6] Diels L, Sadouk A, Margeay M. A Genetic Approach Toxicol Environ Chem, 1989, 23: 78~89.