

苯酚高效降解菌的筛选和降解特性研究

李江* 白涛 饶军 宋钞穷

(东华理工大学生物系 江西 抚州 344000)

摘要 :从东华理工学院北区原化学系排污口土壤中筛选到一株高效的苯酚降解细菌 PS1。该菌为球菌,革兰氏染色阴性,能以苯酚为唯一碳源和能源生长。经 16S rRNA 基因部分序列分析 PS1 为 *Raoultella* 属菌株(*Raoultella* sp. strain PS1),其最高苯酚耐受和降解浓度在 3500mg/L 以上,当苯酚浓度为 500mg/L 和 1000mg/L 时,22h 和 32h 可完全降解,在 1500mg/L~3000mg/L 时,32h~50h 可完全降解,2500mg/L 时降解速率最快,达 78.1mg/h。通过正交试验得出该菌最适生长条件为 25℃、pH6.5、葡萄糖 500mg/L,最佳苯酚降解条件为 20℃、pH7.0、葡萄糖 500mg/L。

关键词 苯酚 苯酚降解菌 筛选 16S rRNA 基因 *Raoultella* sp.

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0492-04

Isolation and Degrading Characteristics of a Phenol-degrading Bacterial Strain with High Efficiency

LI Jiang* BAI Tao RAO Jun SONG Chao-Qiong

(Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou Jiangxi 344000)

Abstract :A high efficiency phenol-degrading bacterial strain PS1 was isolated from the drainage ditch of chemical laboratory of East China Institute of Technology. PS1 is a coccus, Gram negative and can live on phenol as its sole carbon and energy source. PS1 is identified as a strain of *Raoultella* sp. by 16S rRNA gene sequence analysis, which can degrade and tolerate more than 3500mg/L phenol. When phenol concentration is 500mg/L and 1000mg/L, PS1 can completely degrade it in 22 h and 32h, respectively. And while it is between 1500mg/L~3000mg/L, all phenol can be degraded by PS1 in 32h~50h. When phenol concentration is 2500mg/L, the phenol-degrading rate is the biggest and can reach to 78.1mg/h. The optimum growth and phenol-degrading conditions were obtained by orthogonal experiment, which are 25℃, pH6.5, glucose concentration 500mg/L and 20℃, pH7.0, glucose concentration 500mg/L, respectively.

Key words Phenol, Phenol-degrading bacteria, 16S rRNA gene, *Raoultella* sp.

随着石油化工、塑料、合成纤维和焦化等工业的迅速发展,各种含酚废水也相应增多,是目前水体的主要污染源之一。

废水中含酚量在 5mg/L~500mg/L 时,适于生物法处理,多采用好氧、厌氧-好氧、活性污泥和生物膜等方法处理^[1,4],所用微生物主要有细菌、真菌和藻类等。与物理、化学方法相比,生物法具有经济、高效的优点,更重要的是可以实现无害化处理,且处理量大、无二次污染,因此应用最广,是我国含酚废水无害化处理的主要方法。在目前筛选到的降解苯酚的微生物中,大多数种类苯酚耐受浓度在 1500mg/L 左右^[3],降解浓度在 500mg/L~1000mg/L 左右^[3,7],最高可达 1700mg/L^[8],但许多污染源含酚

浓度较高,用这些微生物处理时必须稀释,在当今水资源缺乏的条件下,是不现实的,为此有必要筛选耐受力强、降解苯酚浓度更高的微生物,才能真正实现利用微生物处理含酚废水的目的。

从长期受苯酚污染的土壤中筛选到一株高效苯酚降解菌,对其进行了分子鉴定,并对其生物学特性及苯酚降解特性进行了研究,为深入开发该菌用于污水处理打下了良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

土样取自于东华理工大学北区原化学系排污口。

* 通讯作者 Tel: 0794-8684563, E-mail: li6600@163.com

收稿日期:2006-08-15, 修回日期:2006-12-04

北京鼎国生物技术有限公司 DNA 回收试剂盒。

富集培养基:牛肉膏 5g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,苯酚 0.5g,定容至 1L,pH 自然。

选择培养基 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35g, CaCl_2 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, NaH_2PO_4 0.5g,定容至 1L,pH 自然。苯酚视情况添加。固体培养基在此基础上加 2% 的琼脂。

1.2 方法

1.2.1 苯酚浓度的测定方法:苯酚浓度测定采用 4-氨基安替比林直接光度法^[2]。

1.2.2 细菌生长量:以 600nm 波长处测得的 OD 值表示。

1.2.3 菌种的富集、分离、纯化和复筛:取 10g 土壤,加 100mL 无菌水搅拌均匀,制成菌悬液,静置片刻,取 1mL 菌悬液接于富集培养基中,30℃、150r/min 培养 48h。取富集培养的菌悬液 1mL 进行梯度稀释,分别取 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 稀释度的菌液 0.1mL 涂布接种于苯酚浓度为 500mg/L 的选择培养基固体平板上,30℃ 培养 48h,选取菌落大者进行纯化,获得纯种。

用选择培养基分别添加 500mg/L 和 2000mg/L 苯酚,制成梯度平板;取上述所得纯种制作 10^{-3} 稀释液,取 0.1mL 进行涂布接种,30℃ 培养 48h,挑取高浓度苯酚区域单菌落作为试验菌株。

1.2.4 菌株的鉴定:采用文献 [5][6] 方法进行形态和分子鉴定。

1.2.5 生长特性正交试验:选取温度、pH、葡萄糖浓度、接种量和装液量等 5 个因素,分别取 4 个水平(表 1)选用 $L_{16}(4^5)$ 正交表设计正交试验。

表 1 正交试验因素及水平

水平	温度 (℃)	pH	葡萄糖 (mg/L)	装液量 (mL)	接种量 (%)
1	20	6.5	0	30	0.5
2	25	7.0	500	40	1.0
3	30	7.5	1000	50	1.5
4	35	8.0	1500	60	2.0

试验用培养基为选择培养基,苯酚含量为 1000mg/L,按照相应的条件培养 14h 时测定 OD_{600} 和苯酚浓度。

1.2.6 苯酚降解试验:分别配制苯酚浓度为 500mg/L、1000mg/L、1500mg/L、2000mg/L、2500mg/L、

3000mg/L、3500mg/L 和 4000mg/L 的选择培养基,在正交试验确定的最佳降解条件下培养,每隔 12h 补加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g^[3],定时取样测定苯酚浓度,重复 2 次。

2 结果与讨论

2.1 富集、分离、纯化和复筛

富集培养后经 3 次分离和纯化获得一个菌株,对其进行苯酚梯度选择,结果如图 1,选取高苯酚浓度端菌落(箭头所指处)作为实验菌种,代号为 PS1。

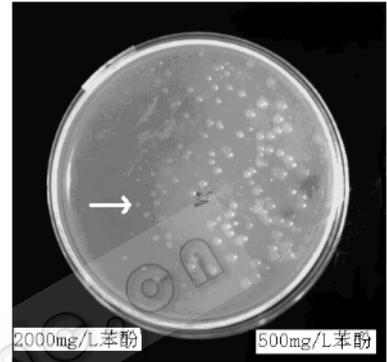


图 1 梯度平板培养 48h 结果

2.2 PS1 菌株鉴定

PS1 菌落为乳白色,圆形,较大,周边圆滑,不透明。显微镜观察为球菌,革兰氏染色阴性。通过 PCR 反应扩增其 16S rRNA 基因,产物送上海生物技术服务有限公司测序,所得 16S rRNA 基因部分序列见表 2,用 BLAST 软件比对分析与 *Raoultella rnithinolytica* 同源性达 99%,因此确定 PS1 为 *Raoultella* 属的一个菌株(*Raoultella* sp. strain PS1)。

2.3 PS1 生长特性正交试验结果

由正交试验结果(表 3、表 4)可见,影响 PS1 菌株生长的因素主次顺序为:葡萄糖浓度,温度,接种量,pH,装液量。影响 PS1 菌株降解苯酚的因素主次顺序为:葡萄糖浓度,装液量,pH,温度,接种量。

结果最佳生长条件为 25℃、pH6.5、葡萄糖 500mg/L、装液量 30mL、接种量 0.5%,最佳苯酚降解条件为 20℃、pH7.0、葡萄糖 500mg/L、装液量 40mL、接种量 1.0%。

2.4 PS1 菌株苯酚降解试验结果

由图 2 可以看出,在苯酚浓度为 2500mg/L 时降解速率最大,达 78.1mg/h,其次是苯酚浓度为 3000mg/L 时,降解速率为 60mg/h;苯酚浓度为 500mg/L 时完全降解苯酚耗时最短,但降解速率却

表2 PS1菌株的16S rRNA基因部分序列

```

GCTGGCTCGGCCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACG
GGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGTGGGGACCTTCGGCCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA
GGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACGTG
AGACACGTCCAGACTCCACGCGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACAGCAGGAGGAAGGCGTTAAGGTAA
TAACCTTAGCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGTAAAGCGCACGACGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAA
ATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGA
CTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGAT
GTCGACTTGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCG

```

表3 正交试验结果

处理号	温度(℃)	pH	葡萄糖(mg/L)	装液量(mL)	接种量(%)	OD值	降解率(%)
1	20	6.5	0	30	0.5	0.018	0.1
2	20	7.0	500	40	1.0	0.105	61.7
3	20	7.5	1000	50	1.5	0.104	30.3
4	20	8.0	1500	60	2.0	0.113	33.7
5	25	6.5	500	50	2.0	0.285	34.5
6	25	7.0	0	60	1.5	0.009	30.3
7	25	7.5	1500	30	1.0	0.263	27.7
8	25	8.0	1000	40	0.5	0.310	32.1
9	30	6.5	1000	60	1.0	0.236	20.6
10	30	7.0	1500	50	0.5	0.226	17.9
11	30	7.5	0	40	2.0	0.050	24.9
12	30	8.0	500	30	1.5	0.269	19.1
13	35	6.5	1500	40	1.5	0.276	28.3
14	35	7.0	1000	30	2.0	0.216	24.6
15	35	7.5	500	60	0.5	0.319	33.4
16	35	8.0	0	50	1.0	0.006	15.7
K1OD 0.0850	0.2038	0.0208	0.1915	0.2183			
K2OD 0.2168	0.1390	0.2445	0.1853	0.1525			
K3OD 0.1953	0.1840	0.2165	0.1553	0.1645			
K4OD 0.2043	0.1745	0.2195	0.1693	0.1660			
ROD	0.1318	0.0648	0.2238	0.0363	0.0658		
K1JJ	31.4500	20.8800	17.7500	17.88	20.8800		
K2JJ	31.1500	33.6300	37.1800	36.75	31.4300		
K3JJ	20.6300	29.0800	26.9000	24.6	27.0000		
K4JJ	25.5000	25.1500	26.9000	29.5	29.4300		
RJJ	10.8300	12.7500	19.4300	18.88	10.5500		

注:KOD,KJJ分别为同一因素OD值和降解率平均值;ROD,RJJ分别为同一因素OD值和降解率最大与最小值的差。

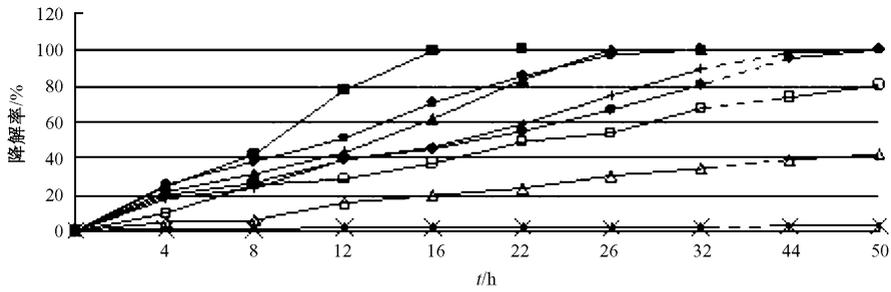


图2 不同苯酚浓度 PS1 菌株的降解情况

●—500mg/L ▲—1000mg/L +—1500mg/L □—2000mg/L ■—2500mg/L ◆—3000mg/L △—3500mg/L ×—4000mg/L

最低为 22.7mg/h;苯酚浓度为 1000mg/L、1500mg/L、2000mg/L 时降解速率居中,分别为 31.3mg/h、30mg/h 和 32mg/h;在苯酚浓度为 3500mg/L 时,仍有降解能力,50h 降解率达 40%,降解速率为 28mg/h;当苯酚浓度为 500mg/L 和 1000mg/L 时,22h 和 32h 可完全降解,在 1500mg/L ~ 3000mg/L 时,32h ~ 50h 可完全降解。结果说明苯酚浓度在 2500mg/L ~ 3000mg/L 之间时降解效率最高,当苯酚浓度达 4000mg/L 时还有一定的耐受力,且有微弱的降解,由此可见 PS1 是一株高耐受力、高降解速率的苯酚降解菌。

表4 方差计算结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
温度	0.0444	3	0.0148	13.8846	0.0290
pH	0.0088	3	0.0029	2.7541	0.2137
葡萄糖浓度	0.1293	3	0.0431	40.4044	0.0063
装液量*	0.0032	3	0.0011		
接种量	0.0103	3	0.0034	3.2094	0.1819
误差	0.0032	3	0.0011		
总和	0.1960				

注:* 该因素对实验影响极不显著,计算方差时候不参与计算

3 小结

分离到的 PS1 菌株经鉴定属于 *Raoultella* 属,而该属微生物在国内外苯酚降解研究中未见报道,其最适生长条件为 25℃、pH6.5、葡萄糖 500mg/L,最佳苯酚降解条件为 20℃、pH7.0、葡萄糖 500mg/L。苯

酚浓度为 2500mg/L 时,达最高降解速率 78.1mg/h,最高苯酚耐受和降解浓度在 3500mg/L 以上,比目前报道的多数苯酚降解菌降解和耐受苯酚浓度更高。由此可见,*Raoultella* sp. strain PS1 是一株适应力较强的高效苯酚降解菌,非常适合于处理酚浓度较高的废水。

以上研究为该菌用于高浓度含酚废水的生物处理打下了基础,但要应用于实际废水处理中还需作进一步研究(1)对其降解苯酚的动力学进行研究,寻找合适的动力学模型,并确定各种动力学参数;(2)研究污水中各种有毒物质对其生长及苯酚降解效果的影响(3)克隆苯酚降解基因,为进一步构建基因工程菌株打下基础。

参考文献

- [1] 张铭,魏炜,高玉华. 环境保护科学,1999,25(2):6~7.
- [2] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第四版),北京:中国环境科学出版社,2002,pp.294~295.
- [3] 潘利华,姜绍通,刘鹏达,等. 微生物学通报,2003,30(5):78~81.
- [4] Harold Wright, James A Nicell. Bioresource Technology, 1999, 70:69~79.
- [5] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验指导,北京:高等教育出版社,1999,pp.26~49.
- [6] F. 奥斯伯等著,颜子颖,王海林译. 精编分子生物学实验指南,北京:科学出版社,2001,pp.29~71.
- [7] 余水静,李杰庆,宋秋华,等. 生物技术,2005,15(3):62~64.
- [8] 吕荣湖,付强. 环境科学,2005,26(5):147~151.