

## 低温高效苯酚降解菌的分离与降解特性

李凤敏<sup>1</sup> 王继华<sup>1\*</sup> 崔迪<sup>2</sup> 马放<sup>2</sup> 刘翔<sup>3</sup> 李春艳<sup>1</sup> 广慧<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150025)

(2. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

(3. 清华大学环境科学与工程系 北京 100084)

**摘要:** 从哈尔滨太平污水厂活性污泥中筛选到 7 株高效苯酚降解菌, 可利用苯酚作为唯一碳源和能源。通过对这 7 株菌在不同温度、pH 值、以及不同苯酚浓度下生长和苯酚降解情况的考察, 确定了这 7 株菌的最适生长温度为 10°C, 最适 pH 值为 7.5, 最大可降解苯酚浓度为 3000 mg/L。通过对这 7 株苯酚降解菌降解性能的研究表明: 其具有较强的苯酚降解能力, 在 10°C、pH 值为 7.5、装液量为 50 mL、接种量 15%、摇床振荡速度 160 r/min 的条件下, 反应 48 h 后可使 500 mg/L 的苯酚降解率达 90%以上。葡萄糖对菌体的生长及苯酚降解能力均有一定的影响, 当葡萄糖浓度是 500 mg/L 时, 该菌对苯酚的降解率仍在 80%以上。该研究对处理含有其它碳源的含酚废水具有一定的意义。通过 DGGE 图谱条带的分析表明, 其亮度可以说明这些菌在各个系统中均表现为优势菌, 且在污水环境中表现出较强的活性, 其优势地位能够稳定地存在。其中 2、4、24、28 条带丰富, 表现出它们在污水环境系统中的多样性。

**关键词:** 低温, 高效, 苯酚降解菌, 降解特性, DGGE

## Efficient Low-temperature Separation of Phenol-degrading Bacteria and Degradation Characteristics

LI Feng-Min<sup>1</sup> WANG Ji-Hua<sup>1\*</sup> CUI Di<sup>2</sup> MA-Fang<sup>2</sup> LIU Xiang<sup>3</sup>  
LI Chun-Yan<sup>1</sup> GUANG Hui<sup>1</sup>

(1. Life Science and Technology College, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

(2. Harbin Institute of Technology Urban Water Resources and State Key Laboratory of Water Environment, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

(3. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Screening seven strains of efficient phenol degradation bacterium in activated sludge from Harbin Taiping sewage treatment plant. These strains can use phenol as the only available carbon sources and energy. Based on inspects the growth and degradation of phenol in different temperature, pH value, and different phenol concentration. We can determine that the optimal temperature of seven bacterias is 10°C, the optimal pH value is 7.5, the lagest concentration of degradation of phenol is 3000 mg/L. From the study of

基金项目: 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(No. 1154G31); 博士后研究人员落户黑龙江科研启动金资助项目(2009); 哈尔滨市科技局优秀学科带头人项目(No. 2007IFXX5030); 国家自然科学基金项目(No. 50778052)

\* 通讯作者: Tel: 86-451-88060576; ✉: wangjihua333@hotmail.com

收稿日期: 2009-11-16; 接受日期: 2010-02-09

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

degradation performance by these seven bacteriums shows that it has strong ability of phenol degradation. In the condition of 10°C, pH 7.5, fluid for 50 mL, vaccination is 15%, vibration velocity wave 160 r/min, degradation rate of 500 mg/L phenol can reach more than 90% after 48 h in the training. Glucose to the growth of bacteria and phenol degradation ability all have certain effects, when glucose concentration is 500 mg/L, the degradation rate of phenol is still more than 80%. The study on treatment contain other carbon sources of hydroxyl benzene wastewater has certain significance. Through the analysis DGGE strip map shows that the brightness can explain these bacteria are advantage bacterium in each system, and strong activity in sewage, its dominant position can be exist steadily. Rich strips are 2, 4, 24, 28, and it is showing its diversity in sewage system.

**Keywords:** Low temperature, Efficient, Phenol degradation bacterium, Degradation characteristics, DGGE

苯酚也叫石炭酸, 是最简单的酚, 外观为白色或无色结晶, 有特殊气味和一定的腐蚀性, 显酸性<sup>[1]</sup>。在空气中易变成粉红色, 密度 1.0719 g/cm<sup>3</sup>, 熔点 42°C–43°C, 沸点 182°C, 在室温下微溶于水、乙醚、氯仿、甘油和二硫化碳, 几乎不溶于石油醚<sup>[2]</sup>。

苯酚是石油化工、造纸、炼焦、塑料和纺织等工业废水中的主要污染物, 即使在低浓度下对人体及微生物也有毒害作用。如果不加处理, 会对人类健康和农作物的生长造成不良影响, 中国等许多国家已将其列入重点污染物的名单之中<sup>[3]</sup>。它可通过皮肤、粘膜的接触、吸入和经口服而侵入人体内部。它与细胞原浆中蛋白质接触时可发生化学反应, 形成不溶性蛋白质, 而使细胞失去活力。浓酚液能使蛋白质凝固, 稀酚液仅使其变性。而且酚还能继续向深部渗透, 引起深部组织损伤、坏死, 直至全身中毒<sup>[4]</sup>。

水体遭受含酚废水污染后, 将产生许多严重的恶果。由于废水的耗氧量高, 水体氧的平衡将受到严重破坏。当水中含酚 0.002–0.015 mg/L 时, 加氯消毒会产生毒性更大的氯酚恶臭, 影响饮用水源<sup>[5]</sup>。酚类排入水体后严重影响水质及水产品质量。除了工业废水外, 粪便和含氮有机物在分解过程中也产生少量酚类化合物, 所以城市中排出的大量粪便污水也是水体中酚污染物的重要来源。

目前已经获得的降酚菌包括根瘤菌 (*Rhizobia*)<sup>[6]</sup>、藻类 (*Alga Ochromonas danica*)<sup>[7]</sup>、酵母菌 (*Yeast Trichosporon cutaneum*)<sup>[8]</sup>、醋酸钙不动杆菌 (*A. calcoaceticus*)<sup>[9]</sup>、假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*)<sup>[10]</sup>、真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*)<sup>[11]</sup> 等苯酚降解菌。

含酚废水的任意排放导致了水资源的恶化, 严重影响了人民群众的身心健康, 并且已成为城市可

持续发展的很重要的制约因素。因而必须采取有效措施处理含酚废水, 改善水资源环境。目前虽然对含酚废水的生物处理已有较多研究, 但对高浓度含酚废水的处理效果还不够理想。在对高浓度含酚废水进行生物处理时, 必须在进水前通过稀释将苯酚浓度降低, 有的稀释倍数可达几十倍, 使处理费用大幅度增加。如果能够提高微生物对酚的耐受程度, 减少稀释倍数, 对显著降低高浓度含酚废水的处理成本具有重要意义。

利用菌的优良性状, 以极高极快的效率降解苯酚、净化废水、保护环境, 对可持续发展有着极其深远的意义; 在实验中可以把研究过程中的一些思想、方法和经验用于其他相关实验中, 节约研究成本, 提高研究效率; 对苯酚的研究会带动其他有毒害物质的快速研究, 从而引起公众对环境的重视; 由于东北地区特有的寒冷气候, 对苯酚降解菌的研究将对未来大面积的低温微生物的研究提供扎实的理论基础。

## 1 实验材料

### 1.1 样品来源

哈尔滨太平污水厂。

### 1.2 培养基

(1) 富集培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, H<sub>2</sub>O 1000 mL, pH 7.0, 培养基在 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后备用。

(2) 驯化培养基<sup>[2]</sup>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g, 微量元素液 1 mL, H<sub>2</sub>O 1000 mL, pH 7.5, 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。待冷却后加入经过滤除菌的不同浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/L) 的苯酚溶液。当进行细菌的分离和纯化时, 加入 8.0 mL 苯酚溶液和 20 g

琼脂,制成固体培养基。

(3) 筛选培养基: 同驯化培养基。

(4) 微量元素液:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.15 g,  $\text{ZnSO}_4$  0.14 g,  $\text{CoCl}_2$  0.2 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 mL。

(5) 斜面培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g,  $\text{NaCl}$  5 g, 琼脂 15–20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2–7.5。  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。待冷却后加入经过滤除菌的不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 g/L)的苯酚溶液 8.0 mL, 将培养基分装, 每管约 10 mL, 制成斜面, 晾干备用。

(6) 细菌生理生化实验培养基配方参见文献[12]。

## 2 实验方法

### 2.1 低温高效苯酚降解菌的富集与驯化

菌种的富集和驯化采用一次性加入大剂量化合物的方法<sup>[13]</sup>。将菌种在无菌条件下接种到 50 mL 细菌富集培养基中, 在 10°C、160 r/min 摇床振荡培养 48 h 后, 取振荡后的培养液 3 mL, 分别接种于苯酚含量为 500 mg/L 和 1000 mg/L 的 50 mL 细菌驯化液体培养基中; 在 10°C、160 r/min 的摇床上继续振荡培养 48 h。共驯化 5 个周期。同时苯酚浓度由 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 逐渐递增至 3.0 g/L。

### 2.2 低温高效苯酚降解菌的分离筛选及鉴定

**2.2.1 分离和纯化:** 细菌的分离采用 10 倍稀释法<sup>[14]</sup>并在无菌操作条件下进行, 倒置于 10°C 的恒温箱中培养 48 h, 以得到单一的菌落。根据平板分离得到的菌落, 采用平板划线法, 挑取单菌落进行细菌的分离, 反复纯化 3 次后, 将培养的纯种菌种接种到斜面培养基上再进行培养, 待菌苔长出后, 放入 4°C 冰箱中, 低温保存备用。

**2.2.2 菌种初筛:** 将得到的菌体通过肉汤培养基扩大培养后, 分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭

过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基, 将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液, 以 10% (V/V) 的接种量接种到 500 mg/L 苯酚的无机盐培养液中, 在 10°C、160 r/min 的摇床中培养, 隔一定时间取样, 通过测得溶液中苯酚剩余浓度的变化以考察菌体对苯酚的降解利用状况。

**2.2.3 菌种复筛:** 初筛得到的菌体进行纯菌平板培养菌落及菌体形态特征考察, 再次经过肉汤培养基进行扩大培养后, 对其进行苯酚降解能力(条件同菌种初筛时苯酚降解性能实验)的测定, 对菌种特性进行综合评价后确定实验所需的高效菌种。

**2.2.4 菌种鉴定:** (1) 高效苯酚降解菌个体形态观察: 挑取少量菌苔划线于营养琼脂斜面, 10°C 恒温培养 48 h 后, 观察菌体个体形态。(2) 细菌的简单染色实验和革兰氏染色实验见文献[12]。(3) 16S rRNA 序列测定, 采用 16S rRNA 基因的通用引物 R518、F338(含 GC 夹)扩增菌株基因组 DNA, 取 3  $\mu\text{L}$  产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 2.3 苯酚标准曲线的制定

采用 4-氨基安替比林法对苯酚浓度进行测定<sup>[15]</sup>。

### 2.4 高效菌降解苯酚能力的测定

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。在不同初始质量浓度的苯酚无机盐溶液中加入一定量的菌液(10%, V/V)、pH 7.0、10°C、160 r/min 摇床振荡培养, 每隔一段时间测培养基残余的苯酚浓度, 经计算得出苯酚降解率, 公式如下:

$$\text{降解率}(\%) = \frac{\text{空白样苯酚残余浓度} - \text{微生物作用后苯酚残余浓度}}{\text{空白样苯酚残余浓度}} \times 100\%$$

## 3 主要环境因子对高效菌生长及降解苯酚能力的影响

### 3.1 pH 的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清

液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。以 15% (V/V) 的接菌量接到 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 苯酚浓度为 0.5 g/L 的培养基中, 于

160 r/min、10°C 恒温摇床振荡培养, 48 h 后测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

### 3.2 温度的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。以 15% (V/V) 的接菌量接到 pH 7.5、苯酚浓度为 0.5 g/L 的培养基中, 分别在 4°C、6°C、8°C、10°C、15°C 恒温摇床振荡培养, 摇床转速 160 r/min, 48 h 后取样测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

### 3.3 溶解氧的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。以 15% (V/V) 的接菌量接到 pH 7.5、苯酚浓度为 0.5 g/L 的培养基中, 培养基体积分别为 50、100、150、250 mL 三角瓶中, 于 160 r/min、10°C 恒温摇床振荡培养, 48 h 后测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

### 3.4 苯酚初始浓度的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。以 15% (V/V) 的接菌量接到 pH 7.5、苯酚初始浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 的培养基中, 于 160 r/min、10°C 恒温摇床振荡培养, 48 h 后测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

## 4 培养基主要成分对高效菌生长及降解苯酚的影响

### 4.1 外加碳源的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清

液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。以 15% (V/V) 的接菌量接到 pH 7.5、苯酚浓度为 0.5 g/L 的培养基中, 分别加入葡萄糖、乳糖、蔗糖、果糖、乙酸钠, 浓度分别为 1.00、0.92、0.92、1.00 和 2.27 g/L, 于 160 r/min、10°C 恒温摇床振荡培养, 并做空白对照实验, 48 h 后测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

### 4.2 外加氮源的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。以 15% (V/V) 的接菌量接到 pH 7.5、苯酚浓度为 0.5 g/L 的培养基中, 分别加入  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaNO}_3$ , 浓度均为 0.1 g/L, 于 160 r/min、10°C 恒温摇床振荡培养, 并做空白对照实验, 48 h 后测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

### 4.3 微量元素离子的影响

将用营养肉汤扩大培养的待测菌体分装到离心管中, 在 8000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基。将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液。同时设置加微量元素和不加微量元素的对照组, 再以 10% (V/V) 的接菌量接到苯酚浓度为 0.5 g/L、pH 7.5 的无机盐培养基中, 于 160 r/min、10°C 恒温摇床下振荡培养, 48 h 后测培养基的吸光度及残余的苯酚浓度。

### 4.4 不同底物的利用

用接种环将营养琼脂固体培养基培养 48 h 的苯酚降解菌分别接种到苯胺、o-甲苯胺、对氨基苯、苯酚、安息香酸、水杨酸、萘、m-甲苯胺、p-甲苯胺、氯苯胺及氨基酸制成的平板上, 培养 4-7 d, 观察该菌是否能生长。

## 5 基因组 DNA 的提取

采用 CTAB-NaCl 法, 具体步骤参见文献[16]。

### 5.1 DNA 粗提液的纯化和测定

使用紫外分光光度仪对提取的 DNA 粗提液样品进行测定( $OD_{260}/OD_{280}$ ), 计算所得样品 DNA 产量和纯度。采用上海华舜 DNA 柱式胶回收试剂盒纯化 DNA 提取液, 将纯化后的基因组 DNA 作为 PCR 的模板。

### 5.2 细菌 16S rDNA 扩增体系的优化<sup>[17]</sup>

以大多数细菌和古细菌的 16S rDNA 的 V3 区通用引物扩增。引物序列如下:

上游引物 F338(含 GC 夹): 5'-CGCCCGCCGC GCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGC CTACGGGAGGCAGCAG-3';

下游引物 R518: 5'-ACCGCGGCTGCTGG-3'。

PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 10  $\times$  Ex *Taq* ( $Mg^{2+}$ )缓冲液, 2.5  $\mu$ L; 4  $\times$  dNTPs (2.5 mmol/L), 2  $\mu$ L; 上游引物 F338, 1  $\mu$ L; 下游引物 R518, 1  $\mu$ L; cDNA 第 1 链(稀释 10 倍), 1  $\mu$ L; Ex *Taq* polymerase(5 U/ $\mu$ L), 0.2  $\mu$ L; 加灭菌 ddH<sub>2</sub>O 到 25  $\mu$ L。

PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s; 45°C–58°C 30 s; 72°C 40 s, 30 个循环; 72°C 10 min。

在进行 DGGE 之前, 确认 PCR 产物是否正确扩增。PCR 反应的产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。电泳缓冲液用 1  $\times$  TAE, 电泳约 15–20 min。

### 5.3 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测

将 PCR 产物进行 DGGE 的指纹图谱分析, 并通

过对比分析样品电泳条带的数目和亮度, 来评估微生物的多样性和种群相对数量。

## 6 结果与讨论

### 6.1 菌种的筛选

**6.1.1 菌株的初筛:** 从污水厂活性污泥中初步筛选出 28 株苯酚降解能力比较强的菌, 分别标记为 1–28 号, 其降解苯酚的浓度为 0.5 g/L。

**6.1.2 菌株的复筛:** 在初筛的 28 株菌中进一步筛选出降解能力强的菌株, 共筛选出 7 株降解能力强的菌株分别为 2、4、14、17、20、24、28, 其降解苯酚的浓度为 1 g/L。

### 6.2 菌种的形态学鉴定结果(表 1)

细菌菌株 Bacteriums	革兰氏 Gram	荚膜 Capsult	鞭毛 Flagellum	运动性 Mobility
2#	杆 +	-	+	+
4#	双杆 +	-	+	-
14#	球 -	-	+	+
17#	双球 +	-	+	-
20#	杆 -	+	-	+
24#	杆 -	-	+	+
28#	双球 +	-	+	+

注: +: 表示结果阳性; -: 表示结果阴性。

Note: +: Means the result is positive; -: Means the result is negative.

### 6.3 糖发酵结果(表 2)

细菌菌株 Bacteriums	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	乳糖 Lactose	半乳糖 Galactose	麦芽糖 Maltose	果糖 Fructose	木糖 Xylose	山梨糖 Sorbose	肌醇 Inositol	甘露醇 Mannite
2#	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
4#	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14#	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
17#	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
20#	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
24#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28#	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

注: +: 表示产酸; -: 表示不产酸。

Note: +: It can product acid; -: It cannot product acid.

## 6.4 7 菌株其他生理生化实验的结果(表 3)

细菌菌株 Bacteriums	吲哚试验 Indole test	产氨试验 Ammoni- agene test	油脂水解 Fat hy- drolyzing	苯丙脱氨 Phenylalanine ammonia	淀粉水解 Starch hydrolysis	尿素降解 Hydrolysis of urea	硝酸还原 Nitrate reductase	石蕊牛奶 litmus milk	甲基红 Methyl red	伏普试验 V. P test	纤维素 Cellulose
2#	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
4#	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
14#	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
17#	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
20#	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
24#	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
28#	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

注: +: 表示水解; -: 不水解。

Note: +: It can hydrolysis; -: It cannot hydrolysis.

## 6.5 苯酚标准曲线的制定(图 1)

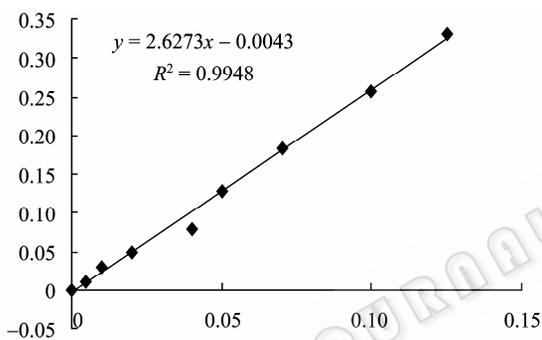


图 1 苯酚标准曲线

Fig. 1 Phenol standard curve

## 6.6 苯酚降解率的计算

根据苯酚标准曲线图可以计算得到 7 菌株在不同苯酚初始浓度的培养液中培养 48 h 后的降解率, 由图 2 中可以看出, 这 7 菌株对苯酚都有一定的适应性, 且降解率都在 80% 以上, 甚至达到 100%。

## 6.7 主要环境因子对高效菌生长及降解苯酚的影响

**6.7.1 pH 值的影响:** 不同 pH 值对菌株生长及降解苯酚结果见图 2 和图 3。可以看出, 当 pH 为 7.0 时, 菌株对苯酚的降解效果最好, 此时苯酚降解率都在 90% 以上; 当 pH 小于 7.0 或大于 7.0 时, 吸光度及苯酚降解率都有所下降; pH 为 5.5 时, 苯酚降解效果和菌株的生长效果均达到最差; 整个过程中菌株的生长趋势和苯酚降解的趋势一致。

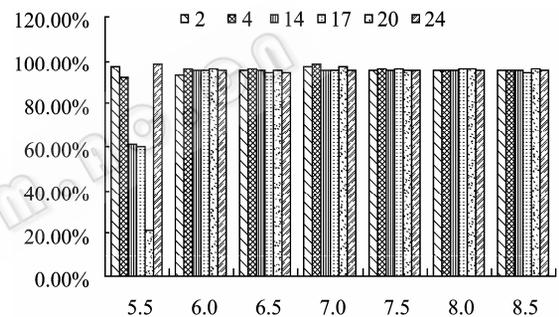


图 2 pH 值对菌株降解性能的影响

Fig. 2 Effects of pH value on phenol degrading by bacteria

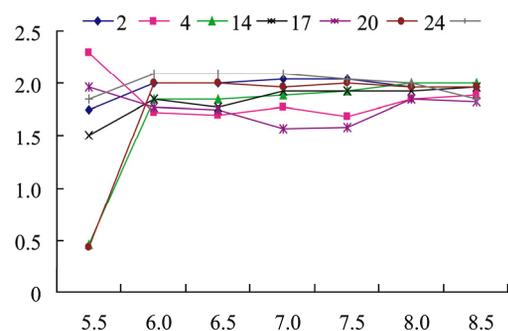


图 3 pH 值对菌株生长性能的影响

Fig. 3 Effects of pH value on bacteria growing

**6.7.2 温度的影响:** 不同温度下, 培养 2 d 后菌株在 10°C 对苯酚的降解效果都达到了 90% 以上, 说明菌株的最适生长温度为中温 10°C, 但低温条件下仍可以生长, 属于耐冷菌。

**6.7.3 溶解氧的影响:** 在实验中可用振荡器(摇床)

充氧, 振荡速率越大, 溶解氧浓度越大; 装样量越少, 溶解氧浓度越大。

**6.7.4 苯酚初始浓度的影响:** 富集扩大培养的待测菌体在培养了 48 h 后其生长量、吸光度及残余的苯酚浓度结果如图 4 和图 5。

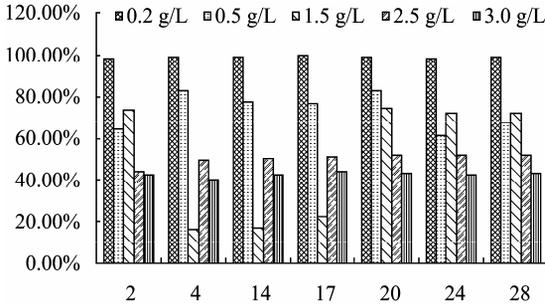


图 4 苯酚初始浓度对菌株降解性能的影响  
Fig. 4 The initial concentration of phenol bacteria degradability

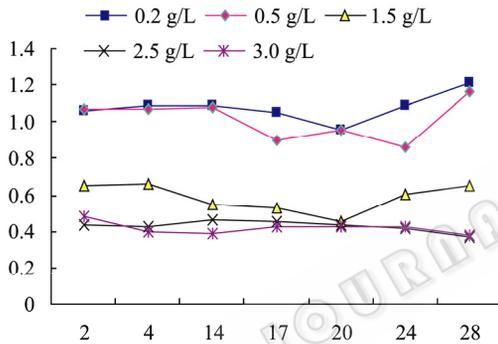


图 5 苯酚初始浓度对菌株生长性能的影响  
Fig. 5 The initial concentration of effects on phenol effects on bacteria growing

**6.8 培养基主要成分对高效菌生长及降解苯酚的影响**

**6.8.1 加入不同碳源的影响:** 菌株对不同碳源的利用结果见图 6 和图 7。可以看出, 菌株在有葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、乙酸钠存在时正常生长并对苯酚进行降解。

**6.8.2 加入不同氮源的影响:** 菌株对不同氮源的利用结果见图 8 和图 9。可以看出, 菌株能在含有 NH<sub>4</sub>Cl、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub> 的溶液中正常生长并对苯酚进行降解, 且降解率都在 60% 以上。

**6.8.3 微量元素离子的影响:** 微量元素对菌株生长及降解苯酚的实验结果见图 10 和图 11。可以看出, 不加微量元素的对照实验中苯酚的最大降解率为

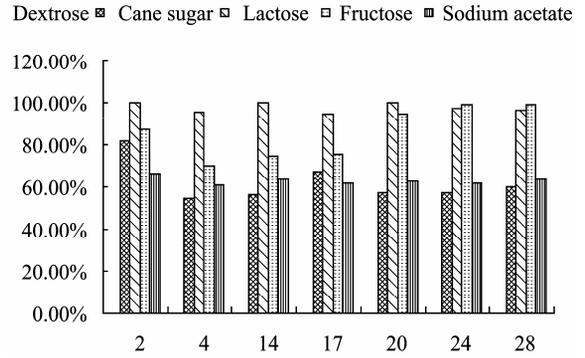


图 6 不同碳源对菌株降解性能的影响  
Fig. 6 Different carbon sources on bacteria effect on phenol degraded

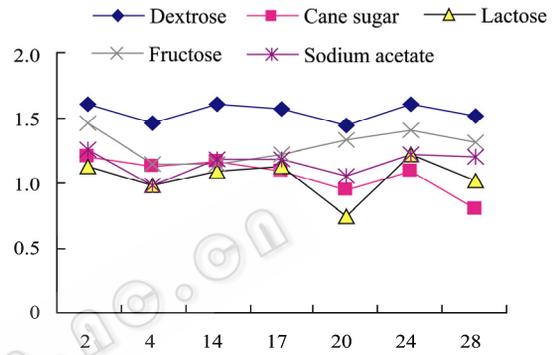


图 7 不同碳源对菌株生长性能的影响  
Fig. 7 Different carbon sources effect on bacteria growing

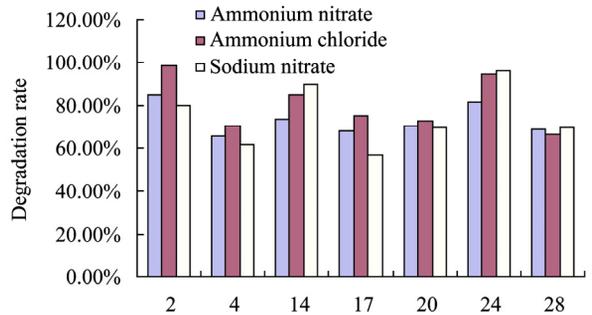


图 8 不同碳源对菌株降解性能的影响  
Fig. 8 Different carbon sources effect on bacteria phenol degraded

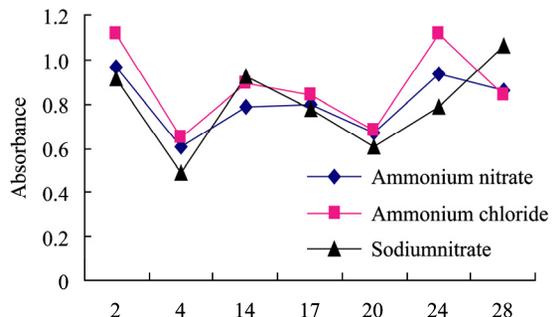


图 9 不同碳源对菌株生长性能的影响  
Fig. 9 Different carbon sources effect on bacteria growing

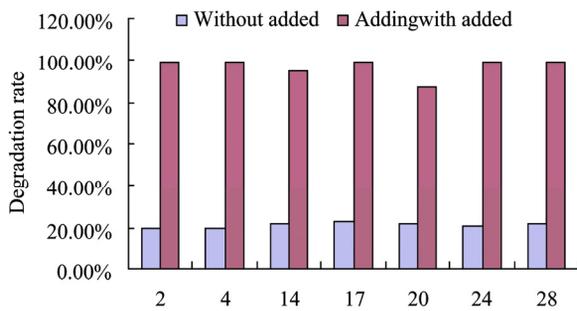


图 10 微量元素对菌株降解性能的影响

Fig. 10 The impact of trace elements on on the degradation rate of strain

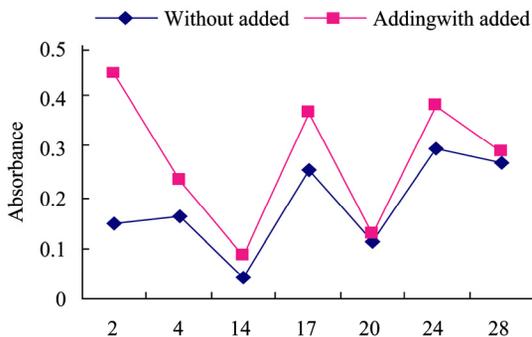


图 11 微量元素对菌株生长量的影响

Fig. 11 The impact of trace elements the growth increment of strain

33.83%, 吸光度为 0.385; 而加入微量元素后对菌株的生长和苯酚的降解率都有一定的促进作用, 苯酚降解率均达到 90%, 吸光度为 0.444。实验进一步说明无机离子对菌株降解苯酚和自身的生长繁殖都有一定的影响。无机离子的加入使得菌株对苯酚的降解和其生长量都有所提高。

#### 6.8.4 7 株菌对不同底物的利用情况(表 4)

#### 6.9 基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增

对 7 株菌进行了基因组 DNA 的提取, 并进行了 PCR 扩增, 采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其扩增

效果。如图 12 和图 13 所示, 各样品均已扩增出产物, 且亮度和纯度都比较好, 未出现特异性扩增。扩增片段在 DL2000 250 bp 条带下方, 通过与边上的 DL2000 对比, 可知其片段大小约为 200 bp。符合引物扩增片段大小, 且阴性对照未有产物出现, 说明 PCR 扩增效果良好。所得的 PCR 产物可以满足 DGGE 分析的需要。

#### 6.10 PCR 反应产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)检测

DGGE 指纹图谱上的每一条带可能代表了一个可操作分类单位(OTU), 条带的数量和亮度可相应地反映出环境样品中微生物物种的数量以及该群落中的优势菌群, 并且可同时检测多个复杂样品。条带越丰富, 说明群落多样性越大; 条带信号越强, 表示该 OTU 的数量越多, 即相应的细菌数量越多, 因此可以根据指纹信息得出微生物多样性的信息。如图 14 所示, 通过条带的亮度可以说明这些菌在各个系统中均表现为优势菌。可见, 该类群菌在污水环境中表现出较强的活性, 其优势地位能够稳定地存在。其中 2、4、24、28 条带丰富, 表现出了它们在污水的环境系统中的多样性。

## 7 结论分析

(1) 筛选出 7 株降解能力强的菌株分别为 2、4、14、17、20、24、28, 这 7 株菌对苯酚都有一定的适应性, 且降解率都在 80% 以上, 甚至达到 100%。其 0.5 g/L 和 1.0 g/L 浓度的苯酚降解率达到 90% 以上, 最大苯酚降解浓度达到 3.0 g/L。

(2) 葡萄糖能作为低温下生物降解苯酚的共代谢基质, 且硫酸铵对低温条件下苯酚的微生物降解具有促进作用, 可以考虑在菌群驯化和低温苯酚类

表 4 7 株菌对不同底物的利用情况

Table 4 Utilization of different substrates by seven strains of bacteria

细菌菌株 Bacteriums	苯酚 Phenol	苯胺 Aniline	对氯苯酚 4-Chlorophenol solution	苯甲酸 Phenylformic acid	水杨酸 Salicylic acid	二甲苯 Dimethyl- benzene	氨基酸 Amino acid	$\alpha$ -萘酚 $\alpha$ -Naphthol	对苯二酚 p-Dihydro- xybenzene	邻苯二酚 o-Dihydro- xybenzene
2#	++	+	+	++	+	++	++	+	-	+
4#	++	+	-	++	+	++	++	-	-	+
14#	++	+	-	+	+	++	++	-	-	+
17#	++	+	-	+	+	+	++	+	-	+
20#	++	+	-	++	+	++	++	-	-	++
24#	++	+	-	++	+	++	++	-	-	+
28#	++	+	-	++	+	++	++	-	-	+

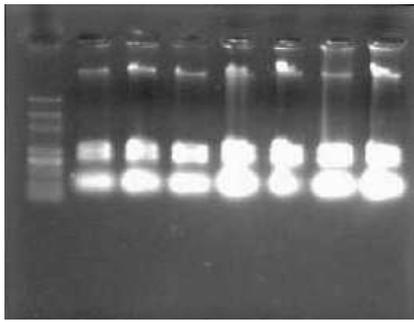


图 12 基因组 DNA 的提取电泳  
Fig. 12 Extraction of genomic DNA gel electrophoresis

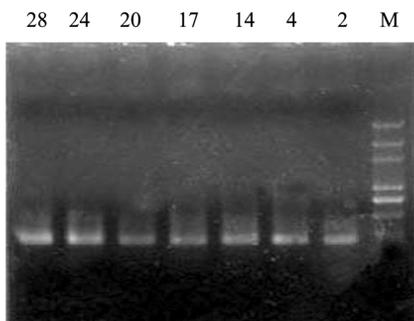


图 13 PCR 产物电泳检测结果  
Fig. 13 Results of PCR product electrophoresis test

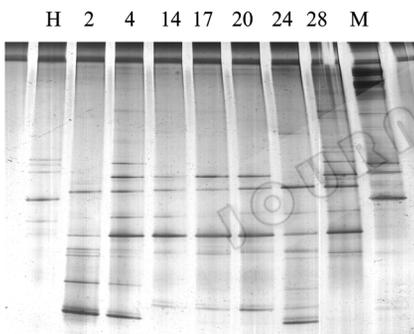


图 14 7 株菌的 DGGE 检测图谱  
Fig. 14 Patterns of 7 strains of bacteria DGGE detection

废水生物处理系统中适量补充葡萄糖和硫酸铵等营养物质。

(3) 通过对这 7 株菌在不同温度、pH 值、以及不同苯酚浓度下的生长和苯酚降解情况的考察, 确定了这 7 株菌的最适生长温度为 10°C, 最适 pH 值为 7.5, 最大可降解苯酚浓度为 3.0 g/L。

(4) 通过条带的亮度可以说明这些菌在各个系统中均表现为优势菌。可见, 该类菌群在污水环境中表现出较强的活性, 其优势地位能够稳定地存在。其中 2、4、24、28 条带丰富, 表现出它们在污水环境系统中的多样性。

## 参 考 文 献

- [1] 金相灿, 程振华, 徐南妮, 等. 有机化合物污染化学. 北京: 清华大学出版社, 1999: 250-265.
- [2] 黄蓓佳, 张兰英, 王少平. 低温条件下 1, 2, 4-三氯苯降解菌的筛选及降解特性. 环境科学研究, 2008, 21(5): 19-22.
- [3] 钱易, 汤鸿霄, 文湘华. 水体颗粒物和难降解有机物的特性与控制技术原理(下卷). 北京: 中国环境科学出版社, 2000: 55-65.
- [4] 张自洁. 排水工程(下册). 北京: 中国建筑工业出版社, 1996: 115-128.
- [5] 张芳西, 金承基. 含酚废水的处理与利用. 北京: 化学工业出版社, 1983: 48-55.
- [6] 简放棱, 黄凯那. 合成酚醛树脂废水前处理初探. 仲凯农业技术学院学报, 2000, 13(1): 40-44.
- [7] Rodriguez I, Liompart MP, Cela R. Solidphase extraction of phenols. *Journal of Chromatography A*, 2000, 885(1/2): 291-304.
- [8] Andrzej W, Trochimczuk, Michael Streat. Highly polar polymeric sorbents characterization and sorptive properties towards phenol and its derivatives. *Reactive and Functional Polymers*, 2001, 46(3): 259-271.
- [9] Gibson DT. Microbial degradation of aromatic compounds. *Science*. 1968(161): 1093-1097.
- [10] Fewson CA. The identity of the gramnegative bacterium NCIB8250. *J Gen Microbiol*, 1967(48): 107-110.
- [11] Juni E. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu Rev Microbiol*, 1978(32): 349-371.
- [12] 马放, 任南琪, 杨基先. 污染控制微生物学实验. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002: 67-82.
- [13] 任源, 吴超飞, 韦朝海. 苯胺分离菌的驯化筛选研究环境科学研究. 1998, 4(11): 4-26.
- [14] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社. 第 3 版. 2001: 24-159.
- [15] 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.
- [16] FM 奥斯伯, RE 金斯顿, JG 赛德曼, 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, 1998: 39-43.
- [17] 李建婷, 纪树兰, 刘志培, 等. 16S rDNA 克隆文库方法分析好氧颗粒污泥细菌组. 环境科学研究, 2009: 22(17): 1218-1223.