高浓度酚降解菌的选育及其降酚性能

吕荣湖 ,付强
(石油大学(北京) 化工学院环境研究中心 ,北京 102249)

摘要 :以苯酚为唯一碳源 ,对活性污泥进行筛选及驯化 ,得到能降解高酚浓度的优势降酚菌 .该混合菌在 15h 内将 1 700 mg/ L 浓度的酚完全降解 ,同时使 COD 降至 102. 9 mg/ L ,降解率达到 96. 9 % .经分离纯化 ,得到 4 种不同的单一菌株 ,并对各菌株的菌属进行了初步鉴定 .同时 ,还考察了初始酚浓度 、菌投加量 、温度 、pH 等因素对降酚菌降解 COD 和酚的影响 .混合菌的降酚效果要优于所分离出的 4 种单菌株 .

关键词 :酚 ; 降酚菌 ; 驯化
中图分类号 : X172 文献标识码 : A 文章编号 :0250-3301(2005) 05-0147-05

Culture and Biodegradation Performance for Phenol-Degrading Bacterium in High Phenol Concentration

LÜ Rong-hu , FU Qiang
(Research Center for Environmental Sciences , Department of Chemical Engineering , University of Petroleum , Beijing 102249 , China)

Abstract : The activated sludge was acclimated by the inorganic salt medium containing phenol as the sole carbon source . The phenol-degrading bacterium obtained now can degrade completely phenol at initial concentration of 1 700 mg/ L at 30 ℃ for 15h , and COD can be degraded by 96 . 9 % . Some factors effecting degradation of phenol and COD were studied , which include initial phenol concentration , quantity of bacterium , temperature and pH . Four strains of bacterium were isolated from the mixed phenol-degrading bacterium . It is shown that the degradation effect of mixed bacterium is superior to that of sole strain .

Key words : phenol ; phenol-degrading bacterium ; acclimate

含酚废水是一种污染范围广 、危害性大的工业废水 .这种废水不经过处理而任意排放 ,会对人类和生态环境带来严重影响[1] .普遍认为利用微生物处理工业含酚废水是一种有发展前途的方法 .但另一方面 ,酚及其衍生物能引起蛋白质变性 ,并破坏微生物质膜 .对于微生物来说 ,酚类化合物是一种有抑制性 、难降解的物质[2] .在实际生产中 ,废水中酚的浓度一般限制在 300 mg/ L .在对高浓度含酚废水进行生物处理时 ,就必须在进水前通过稀释将酚浓度降低[3] ,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 .

对降酚菌的选育研究已有大量的报道 .近年来 ,对降酚菌的研究已进入到分子生物学研究的层次[4~6] .但是 ,对直接用于高浓度含酚废水的高效降酚菌的研究报道很少 .文献[7]报道了可耐受 1 500 mg/ L酚浓度的降酚菌 ,96 h 的降酚率为 91 % ,并且 COD 降解率仅为不到 20 % .而文献[8]报道了通过紫外诱变得到的可耐受 1 500 mg/ L 酚浓度的降酚菌 ,9 h 的降酚率为 91 % ,没有报道相应的 COD 降解结果 .从文献看 ,目前对适宜高浓度含酚废水的高效降酚菌的研究结果尚不十分理想 .

本研究的目的是从自然界中筛选和驯化出可适用于高浓度含酚废水的高效降酚菌 ,同时具有高效的 COD 降解能力 .

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取活性污泥为降酚菌的驯化菌种 .该菌泥呈深褐色 .实验采用 2 种含酚培养基 :含酚液体培养基和含酚固体培养基 ,分别用作降酚菌的驯化 、培养和分离纯化 、保存 .

根据文献[9~14] ,配制的含酚无机液体培养基组成如下 :苯酚变量 ;$(NH_4)_2SO_4$ 1.5g/ L ; NaCl 1.0 g/ L ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8g/ L ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/ L ; 缓冲溶液 15 mL ;微量元素溶液 1 mL .缓冲溶液由 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 配制而成 .

含酚固体培养基组成[15] :牛肉膏 5.0g/ L ;蛋白胨 10.0g/ L ; NaCl 5.0g/ L ; 琼脂 15.0g/ L ; 苯酚

收稿日期 :2004-10-02 ;修订日期 :2004-12-17
基金项目 :国家科技攻关计划(2004BA610A10)
作者简介 :吕荣湖 ,男 ,副教授 ,主要从事石油与石油化工废水和废渣治理技术的研究 . E-mail :lurh@bjpeu.edu.cn

0.8g/ L.

1.2 实验方法

1.2.1 降酚菌的筛选及驯化

将 100 mL 含酚培养液倒入 250 mL 无菌锥形瓶中,再投加 1.00g 湿菌体,放在摇床中培养.培养条件:160r/ min、30 ℃.培养时间及周期均根据菌种的降酚效果做出调整.在每个培养周期,均采用 1.00g 湿菌体: 100 mL 含酚培养液对降酚菌进行培养驯化.若菌的降酚效果表现良好且稳定,则提高培养液中酚的浓度,对降酚菌做进一步的驯化.

1.2.2 降酚菌的降解性能评价方法

取 1.00g 湿菌体接种于一定酚浓度的液体培养基中培养 24h,再接种至同样酚浓度的新鲜液体培养基中培养 12h,离心得到处于稳定期的湿菌体.取该湿菌体 1.00g 与 100 mL 一定酚浓度的液体培养基混合,在摇床上反应,根据实验要求,定时移取反应液做降酚效果分析.

对取出的反应液进行低速离心(3 600r/ min、10 min)分离,保留湿菌体,上清液再用高速离心机离心(11 000r/ min、8 min)进一步去除悬浮菌,以测定最终的上清液样品中的剩余酚浓度和 COD 值,进行降解性能评价.酚浓度采用四氨基安替比林分光光度法[16]测定,若样品中酚浓度过高,则进行适当稀释.

1.2.3 降酚菌的分离、纯化

采用划线分离法.

1.2.4 菌株的生化反应及初步鉴定

本实验通过降酚菌株对生物大分子的分解利用(淀粉水解、油脂水解、明胶液化、石蕊牛乳实验)、对含碳化合物的分解利用(葡萄糖发酵、蔗糖发酵、甲基红 MR、乙酰甲基甲醇 VP、柠檬酸盐利用、过氧化氢酶实验)以及对含氮化合物的分解利用(吲哚、H_2S 产生、硝酸盐还原实验),根据微生物分类鉴定检索表的要求,结合降酚菌株的形态、结构等特征,对菌进行初步的分类鉴定[17].

2 结果与分析

2.1 降酚菌的驯化结果

对活性污泥先用初始酚浓度为 500 mg/ L 的液体培养基进行驯化,驯化时间根据菌降解情况进行调整.经过一段时间的驯化,逐渐提高液体培养基中的酚浓度.

随着驯化过程中初始酚浓度提高,降酚湿菌体的颜色由最初的深褐色变为橙黄色.这说明随着培养液中初始酚浓度提高,部分菌种由于酚的抑制作用,失去生物活性而遭到淘汰.同时降酚优势菌大量增殖,并在混合菌的数量中占有明显优势,使湿菌体的颜色发生了变化.降酚菌最终耐酚浓度达到 1 700 mg/ L.图 1 描述了菌在初始酚浓度为 1 700 mg/ L时不同驯化阶段的降酚率.

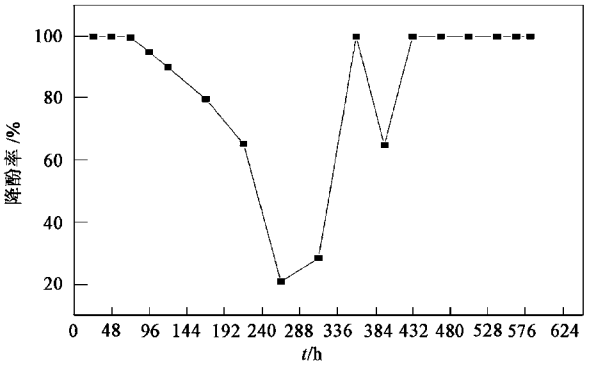


图 1 不同驯化阶段菌的降酚率

Fig.1 Phenol removal at different steps

该阶段的驯化累计时间达 582h.最初的驯化周期为 24h,降酚菌在该阶段的驯化周期内的降酚率有所下降.这表明降酚菌的生物活性受到了高浓度苯酚的严重抑制,部分菌种由于不能耐受高浓度酚而死亡.随后,驯化周期延长至 48h,降酚菌的降酚率仍呈下降趋势.在累计驯化时间 264h 时,降酚率达到最低点 20.9%.但随着培养驯化的不断进行,能够适应高浓度酚的降酚菌活性得到恢复.将驯化周期调整为 36h,降酚率的变化有所起伏.驯化累计时间为 540h,菌的降解效果基本达到稳定.最后将驯化周期调整为 18h,所驯化的降酚菌依然保持较好的降酚性能.

2.2 降酚菌的降解性能评价

菌在初始酚浓度为 1 700 mg/ L 条件下,降酚和 COD 的效果如图 2 所示.由图 2(a)可以看出,菌的降酚率与反应时间基本上呈线性关系,至 15h 时降酚率达到 100%.图 2(b)描述了菌在降酚过程中,反应液 COD 和 pH 的变化趋势.

配制的含酚培养液初始 pH 为 7.58.在酚的降解过程中,pH 值的变化范围在 6.0~8.0 之间.在反应的前阶段,反应液 pH 下降,甚至呈现弱酸性.说明菌降解酚的代谢中间产物为酸类物质[18].随着反应的进行,pH 值升高,代谢中间产物得到进一步的分解.当降酚菌表现出良好的降解效果时,pH 可以增大至 8.0.菌降酚的同时,反应液中 COD 也在不断下降.15h 时酚已被完全降解,COD 降至

102.9 mg/ L,降解率为 96.9 %.而 15h 以后,COD 随反应时间的变化不明显,说明溶液中已不存在降酚菌所需的营养物质,主要存在降解苯酚过程中所产生的代谢产物.

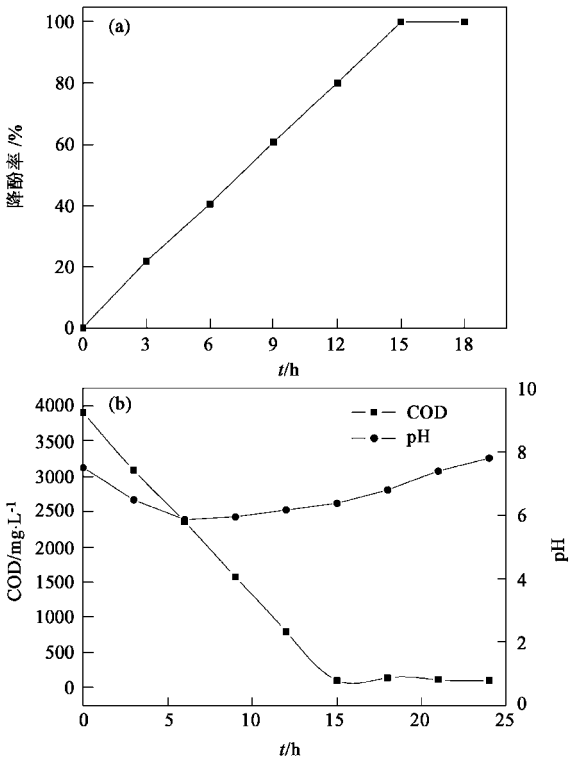


图 2　初始酚浓度 1 700 mg/ L 条件下菌对酚和 COD 的降解情况

Fig.2　Phenol(a) and COD(b) removal at 1 700 mg/ L initial concentration of phenol

2.3　降酚菌的分离纯化与鉴定

采用酚浓度约为 1 600 mg/ L 平板,对混合降酚菌进行划线分离.经 30 ℃培养 2d,分离出诸多单一菌落.根据菌落特征,初步选取 11 个单一菌株,对其进行革兰氏染色,在显微镜下对菌体形态进行观察,确定混合降酚菌是由 4 种不同的菌株组成(表 1).初步确定了这 4 种菌的菌属,分别为:D1 葡萄球菌属、D2 产碱杆菌属、D3 芽孢杆菌属和 D4 假单胞菌属.

2.4　各因素对混合菌降酚性能的影响

2.4.1　初始酚浓度对降酚性能的影响

分别选用不同初始酚浓度的液体培养基,考察菌降酚和 COD 的情况.实验结果如图 3 所示.降酚菌可以在 9、12、13、15h 分别将 1 000、1 200、1 500 和 1 700 mg/ L 4 种不同浓度的酚降解完全.与此相对应,在不同初始酚浓度下,降酚菌随时间降解 COD 曲线与降酚曲线趋势基本相同.在不同初始酚浓度的溶液中,降酚菌 15h 时 COD 的降解率可以达到 96 %以上.

表 1　单一降酚菌的生化反应

Table 1　Biochemical reaction of phenol-degrading bacteria

项目	D1	D2	D3	D4
革兰氏染色	G^-	G^-	G^+	G^-
淀粉水解	+	-	-	+ +
油脂水解	+	-	-	+
明胶液化	+	+	+	+ +
石蕊牛乳	产酸	产酸	产碱	产酸
葡萄糖发酵	+	-	+	-
蔗糖发酵	+	-	+	-
甲基红(MR)	-	-	-	-
VP	-	+	+	+
柠檬酸盐利用	- -	+ -	+ -	+ +
过氧化氢酶	+	+	+	+
吲哚	+	+	-	+
H_2S 产生	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	-	+ +	+ +

由图 3(c)可以看出,降酚菌随初始酚浓度的增大,降酚速率降低,说明酚浓度的提高增强了对菌的抑制作用,使其生物活性降低,从而降解性能减弱.

2.4.2　温度对菌降解性能的影响

初始酚浓度 1 700 mg/ L、pH 值为 7.5 的条件下,考察了温度对菌降解性能的影响.其实验结果如图 4 所示.

温度主要影响微生物体内酶的活性.只有在特定酶催化作用下,微生物才能完成生长过程所发生的化学反应[19].而每种酶有最适合的酶促反应温度,因此温度的变化影响酶促反应速率,最终影响细胞物质合成.从图 4 可以看出,在 30 ℃~ 40 ℃范围内,菌降酚效果良好,基本能够在 15h 时将溶液中的酚完全降解.这说明在该温度范围内,菌细胞内的酶促反应速率达到最大,降解酚的速率最快.在 20 ℃条件下,菌能够在 24h 时将酚完全降解,但相对酶的活性有所降低.在 50 ℃下,菌的降解性能表现最差,溶液中的酚几乎没有得到降解,这可能是由于在 50 ℃高温下酶发生变性,使菌丧失酶促反应而失去生物活性.菌降酚的最佳温度范围在 30 ℃~ 40 ℃之间.这与文献[20]报道的结果基本一致.

2.4.3　pH 对降解性能的影响

分别选用初始 pH 为 6.0、7.5 和 8.5 的培养液,考察了对菌降解性能的影响.反应条件为:1.00 g 湿菌体: 100 mL 含酚培养液,反应时间 24h、温度 30 ℃.其实验结果如图 5 所示.分别选用初始 pH 为 6.0、7.5 和 8.5 的培养液,由图 5 可以看出,pH 值在 6.0 ~ 8.5 范围内对菌的降解效果影响不大,所驯化的降酚菌在 pH 为 6.0 ~ 8.5 范围内,均可达到较

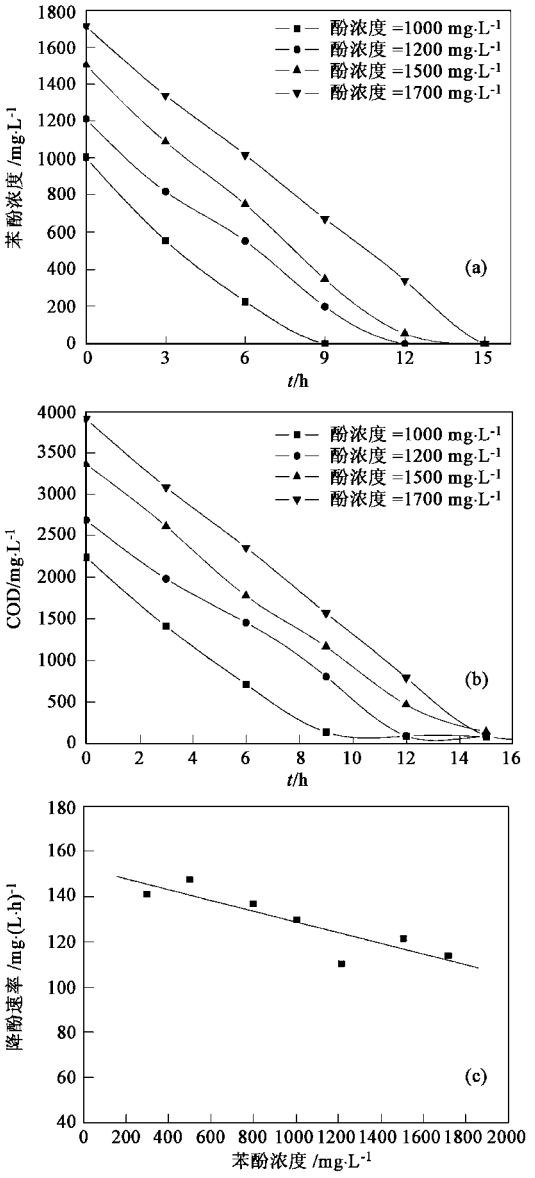


图 3 初始酚浓度对菌降酚速率的影响

Fig .3 Effect of initial phenol concentration on phenol(a) and COD(b) removal

好的降解效果.相比较而言,在 pH 为 8.5 的条件下,菌降解酚的效果最好.

2.4.4 菌投加量对降解酚性能的影响

取含酚 1 700 mg/ L 液体培养基各 100 mL,分别投加 1.00g、2.00g 和 4.00g 湿菌体,考察不同湿菌体投加量对降酚性能的影响.

实验所采用的湿菌体均由培养后的菌悬液经 3 600 r/ min、10 min 离心后得到.对菌悬液进行稀释、倾注分离,计算得到湿菌体密度为每 g 湿菌体 1.28×10^{14}个菌.从图 6 可以看出,不同投加量的菌均可以在 18h 内将液体培养基中的酚完全降解.但在降解过程中,降解速率有一定的差别.6h 到 15h 之间,1.00g 湿菌体降酚速率要高于另外 2 组.这可能由于在振荡曝气过程中,供氧量确定的条件下,降酚菌投加量的增大使单体耗氧量降低,从而影响了降酚菌的生物活性.

以上分析可知,在 100 mL 含酚 1 700 mg/ L 的液体培养基中,投加 1.00g 的降酚菌降酚效果较好.

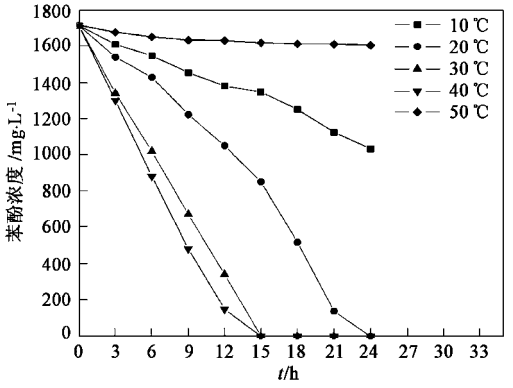


图 4 温度对菌降解性能的影响

Fig .4 Effect of temperature on phenol removal

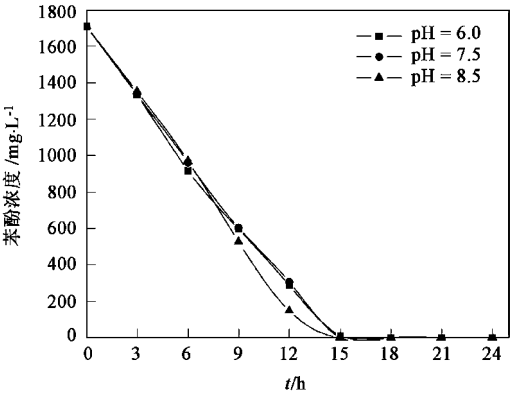


图 5 pH 值对菌降解性能的影响

Fig .5 Effect of pH on phenol removal

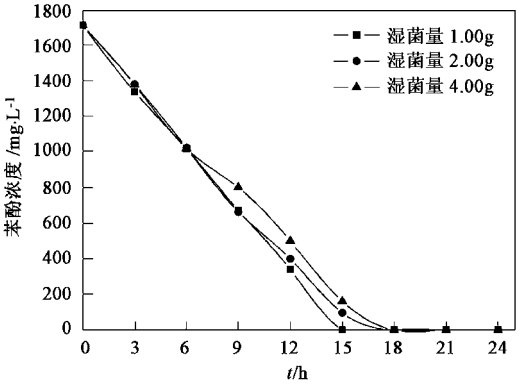


图 6 菌投加量对降解性能的影响

Fig .6 Effect of dose of bacterium on phenol removal

2.5　单菌株与混合菌的降酚性能比较

对所分离出的单一降酚菌株先在 1 700 mg/L 酚浓度进行驯化,然后在 4 种不同初始酚浓度 1 000、1 200、1 500、1 700 mg/L 下考察对比单一菌与混合菌的降解性能,反应时间 12h,结果如图 7 所示.

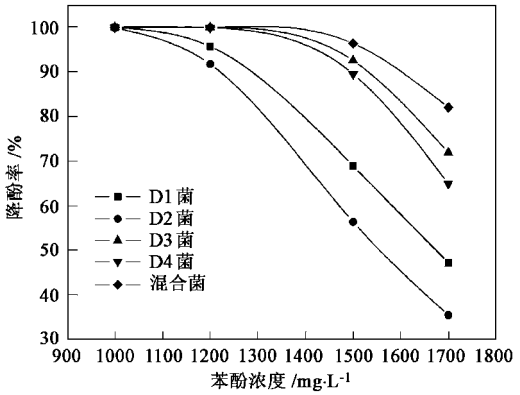


图 7　单一菌株和混合菌的降解性能比较

Fig.7　Comparison of sole strain and mixed bacterium on phenol removal

结果表明,混合菌降酚和降 COD 的效果均优于这 4 种单一菌株的降解效果.这与其它研究报道结果[21]相一致.对单一菌而言,D3 和 D4 菌株降解性能较好,D1 和 D2 菌株较差.

3　结论

(1) 对活性污泥进行筛选和驯化,得到降解酚和 COD 均表现良好效果的优势降酚菌.该混合菌能够在 15h 内将 1 700 mg/L 浓度的酚完全降解,同时使 COD 降至 102.9 mg/L,降解率达到 96.9 %.

(2) 降酚菌降酚条件为:菌投加比例为 1.00g 菌: 100 mL 含酚培养液、温度 30 ~ 40 ℃、pH6.5 ~ 8.5.

(3) 从混合降酚菌中分离出 4 种不同的菌株,分别为葡萄球菌属、产碱杆菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属.通过对混合菌和单菌株的降解性能的比较可知,混合菌的降解效果优于单一菌株.

参考文献:

[1] 张芳西,等. 含酚废水的处理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 1983.

[2] Dluhy M, *et al*. Phenol degradation by bacteria Part one: Isolation and characterization of bacterial strain[J]. Pol. J. Environ. Stud., 1996, **5**(2): 21 ~ 26.

[3] 杨柳燕,马文漪.三相流化床降解含酚废水的研究[J]. 环境科学, 1998, **19**(6): 63 ~ 65.

[4] 高平平,王健,席玉英,等. 代表活性污泥中苯酚降解菌群的 ERIC-PCR 产物片段的多态性[J]. 生态学报, 2003, **23**(6): 1095 ~ 1100.

[5] 向述荣,林敏. 苯酚的生物降解基因组成及其调控机制[J]. 微生物学杂志, 2001, **21**(3): 48 ~ 53.

[6] Irene T, Michalis A. Mass spectrometric mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil pseudomonad[J]. Biochemica. et Biophysica. Acta, 2004, 1700: 117 ~ 123.

[7] 杨建设,张冬梅,陈茂濠. 不同苯酚浓度下耐酚优势菌的活力比较[J]. 茂名学院学报, 2002, **12**(4): 13 ~ 17.

[8] 沈齐英,刘录,申林波. 紫外诱变选育高效降酚[J].微生物环境科学与技术,2004, **27**(1): 82 ~ 85.

[9] Bandhyopadlyay K, *et al*. Solid matrix characterization of immobilized *Pseudomonas putida* MTCC 1194 used for phenol degradation[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, **51**(6): 891 ~ 895.

[10] Wu K YA, Wisecarver K D. Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid [J]. Biotechnology and bioengineering, 1992, **39**: 447 ~ 449.

[11] Hannaford A M, *et al*. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*[J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1999, **22**(2): 121 ~ 126.

[12] Wang Si-Jing, *et al*. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation[J]. Enzyme and microbial Technology, 1999, **25**: 177 ~ 184.

[13] Branyik T, *et al*. The use of silica gel prepared by sol-gel method and polyurethane foam as microbial carriers in the continuous degradation of phenol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000; **54**: 168 ~ 172.

[14] Pessione E, *et al*. Acinetobacter radioresistens metabolizing aromatic compounds. Optimization of the operative conditions for phenol degradation[J]. Microbios., 1996, **88**: 213 ~ 221.

[15] 钱存柔,等. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001.

[16] 国家环保局编.水和废水检测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,1989. 408 ~ 410.

[17] R.E.布坎南, N.E.吉本斯, 等. 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1978.

[18] Van Schie, *et al*. Biodegradation of phenol: mechanisms and applications[J]. Biorem. J., 2000, **4**(1): 1 ~ 18.

[19] Kira A Onysko, *et al*. Effect of temperature on the inhibition kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5 [J]. Biotec. and Bioeng., 2000, **70**(3): 291 ~ 299.

[20] Park Geun-T, *et al*. Biodegradation of phenol by a trichloroethylene-co-metabolizing acterium[J]. J. Microbiol. Biotechnol., 1998, **8**(1): 61 ~ 66.

[21] Morson A, *et al*. Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptoeoccus elinovii* adsorbed on activated-carbon[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1987; **26**: 283 ~ 288.