

一株耐盐苯酚降解菌的分离、鉴定及特性研究

曲媛媛*, 周豪, 王平, 汲广欣, 周集体

(大连理工大学 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要:从污水处理厂活性污泥中筛选到一株高效的耐盐苯酚降解菌,经形态观察及 26S rRNA 序列分析鉴定为假丝酵母菌 *Candida sp.*,命名为 W3. 该菌株可以在 1%~10% NaCl 环境中生长,并可以利用苯酚为唯一碳源和能源. 苯酚降解的最优条件为 pH=7.0, 温度 30 ℃, NaCl 质量分数 5%. 在 NaCl 质量分数为 5%、苯酚浓度为 1 500 mg/L 时, 12 d 苯酚的降解率可达到 99.8%. 菌株可以在高盐条件下降解苯胺、水杨酸等多种芳香化合物,且对混酚具有一定的降解能力. 对菌株的耐盐机理进行了初步研究,发现细胞内四氢嘧啶和甜菜碱的含量随着盐浓度的增大而增加,表明 W3 在高盐条件下以四氢嘧啶和甜菜碱作为主要的渗透调节物质.

关键词:苯酚;耐盐酵母菌;四氢嘧啶;甜菜碱

中图分类号:X172 **文献标志码:**A

0 引言

苯酚及其衍生物对人和动植物的毒性很强,已被列入环境优先控制污染物名单. 含酚废水主要来源于造纸、炼油、合成纤维、合成橡胶、农药等行业,是工业排放废水中主要的污染物. 在含酚废水的治理中,利用微生物处理苯酚是一种既经济又无二次污染的方法^[1,2]. 近年来,从被酚类物质污染的环境中已经分离得到多种降酚微生物菌株,如假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)、醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、真养产碱菌(*Alcaligenes eutrophus*)、藻类(*alga*, *Ochromonas danica*)等^[3~5]. 最常见的酚降解菌是假单胞菌和不动杆菌. 但是我国工业特别是化工行业所排放的含酚废水中常常含有很高浓度的盐分^[6]. 这种含高盐、难降解有机污染物工业含酚废水的生物处理是一项非常迫切的任务.

本文考虑到工业含酚废水既含苯酚又含高盐的实际情况,采用苯酚作为唯一碳源并加入一定浓度的 NaCl 作为双重选择压力,通过逐步提高苯酚浓度的驯化方法从污泥样品中筛选出一株能够

在高盐条件下利用苯酚作为唯一碳源和能源的菌株 W3,对其进行形态观察及 26S rRNA 序列分析,考察菌株 W3 在高盐条件下的生长降解特性及混酚降解能力,并对其耐盐机理进行初步探索.

1 材料与方法

1.1 培养基

实验采用无机盐培养基,组成包括 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, Na_2HPO_4 1.3 g/L, 苯酚 0.1 g/L, NaCl 50 g/L. pH 7.0 左右.

1.2 菌株的分离

采用逐渐提高苯酚浓度的驯化方法,将污泥样品按 10% 的接种量接种于含有 100 mg/L 苯酚、5% NaCl 的无机盐培养基中, 30 ℃ 摇床 150 r/min, 培养 3 d 后,以 10% 接种量转至苯酚浓度为 300 mg/L、含盐 5% 的无机盐培养基中,继续培养. 按此方式连续循环 3 次,直到苯酚浓度达到 1 000 mg/L, 然后进行平板涂布,将培养皿放于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 72 h,挑取单菌落,转接入液体无机盐培养基中,反复涂布.

1.3 菌株的鉴定及系统进化分析

1.3.1 菌株的形态 采用扫描电镜观察菌株 W3 的形态,放大倍数为 2 000 倍.

1.3.2 26S rRNA 基因扩增、序列测定及同源性比较 采用通用引物 P1 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')、P2 (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') 对酵母细胞基因组进行 PCR 扩增.反应总体积为 20 μL ,其中 ddH₂O 13.1 μL ,25 nmol/L Mg²⁺ 4 μL ,10 mmol/L 引物 NS1 和 NS8 各 0.8 μL ,Taq 酶 1 U,10 mmol/L dNTP 0.5 μL ,模板 DNA 1 μL (约 200 ng).PCR 扩增过程为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2.5 min,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 结束.取 PCR 产物 1 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后紫外检测.用琼脂糖凝胶纯化试剂盒(大连宝生物公司)切胶回收 PCR 产物进行测序分析.26S rDNA 的测序工作由大连宝生物公司完成.菌株 W3 的 26S rRNA 序列测序结果登录 GenBank,并用 BLAST 与 GenBank 中的 26S rRNA 序列进行同源性比较.将得到的相似菌株的 26S rDNA,利用 ClustalX1.8 软件构建系统发育树.

1.4 环境条件对 W3 生长及苯酚降解的影响

采用紫外分光光度法测量生长量和苯酚的含量.间隔一定时间取 2 mL 培养液,于 660 nm 处测量生长量,随后 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液在 269 nm 处测苯酚的残留浓度.

(1)温度实验:在苯酚初始浓度为 100 mg/L,NaCl 质量分数为 5%,pH 7.0 的无机盐培养基中接种 W3,温度分别设定为 10、15、20、25、30、35、40、45、50 $^{\circ}\text{C}$.24 h 振荡培养后取样测定生物量和苯酚的残留浓度.

(2)pH 实验:设定 pH 分别为 5、6、7、8、9、10、11,24 h 振荡培养后取样测定生物量和苯酚的残留浓度,其他条件同温度实验.

(3)盐度实验:苯酚初始浓度为 200 mg/L,NaCl 质量分数分别为 1%、5%、10%,每隔 12 h 取样测定生物量和苯酚的残留浓度,其他条件同温度实验.

(4)底物浓度实验:苯酚浓度分别为 100、500、1 000、1 500 mg/L,每隔 12 h 取样测定生物

量和苯酚的残留浓度,其他条件同温度实验.

1.5 底物广谱性实验

取 50 mL 锥形瓶,每个锥形瓶中加入 25 mL 无机盐培养基,以不同的芳香化合物作为唯一碳源和能源进行培养,48 h 后观察 W3 的生长情况.

1.6 W3 对混合酚降解能力考察

选择几种典型的酚类化合物与苯酚组成混合体系,保证各体系中两种酚的浓度均为 100 mg/L,30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床培养 72 h 后利用高效液相色谱考察 W3 对混合酚的降解率.液相色谱条件:色谱柱采用 Shimpeck VP-ODS(2.0 mm $\times$ 15 cm),流动相 V(甲醇):V(水)=60:40,流速 1.0 mL/min,检测波长 254 nm,进样量 10 μL .

1.7 耐盐机理初步研究

1.7.1 相容性溶质的提取 选择苯酚浓度为 100 mg/L 的基础培养液,调节 NaCl 质量分数为 1%、5%、7%、10%,选取了较为典型的 3 种相容性溶质:四氢嘧啶、甜菜碱、谷氨酸,利用改进的 Bligh-Dyer 法进行提取.在不同盐度培养基中培养 W3 至 OD₆₆₀ 约为 0.5,离心收集菌体,用 400 μL 抽提液(V(甲醇):V(氯仿):V(水)=10:5:4)溶解菌体,猛烈振荡 30 min 进行抽提.再加入等体积(约 130 μL)氯仿和水,继续振荡 10 min.离心(12 000 r/min,20 min)分层收集水相、干燥.如测定四氢嘧啶则干粉用 500 μL 80% 乙腈溶解,如测定谷氨酸和甜菜碱则干粉用 500 μL 水溶解.

1.7.2 相容性溶质含量的测定 四氢嘧啶含量的测定采用液相色谱法^[7];甜菜碱含量的测定采用碘结晶沉淀法^[8];谷氨酸含量的测定采用茚三酮比色法^[9].

2 结果与讨论

2.1 W3 的分离与鉴定

经过多次传代驯化、反复平板涂布,分离纯化得到一株能够以苯酚为唯一碳源生长的耐盐菌株,命名为 W3.菌株 W3 在固体培养基上菌落表面光滑、湿润、黏稠,易挑起,菌落质地均匀,正反面和边缘、中央部位的颜色均一,菌落呈白色,图 1 是该菌株的电镜照片.

以菌株 W3 的总 DNA 为模板,利用真菌 26S rRNA D1/D2 区域通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经酶切测序,测得序列全长为 632 bp,

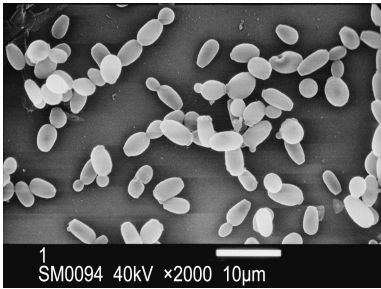


图 1 菌株 W3 的电镜照片

Fig. 1 Microscopical photograph of strain W3

菌株 W3 的 26S rRNA 序列测序结果登录 GenBank,并用 BLAST 与 GenBank 中 26S rRNA 序列进行同源性比较,发现菌株 W3 与 *Candida tropicalis* 的 26S rRNA 序列同源性达到 100%. 利用ClustalX1.8软件构建系统发育树,

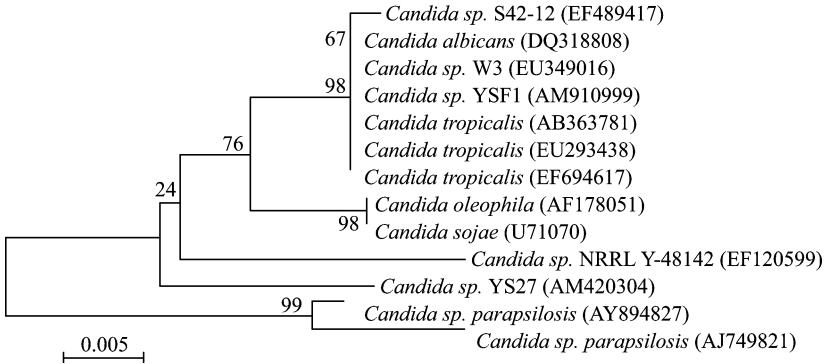


图 2 W3 菌株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain W3

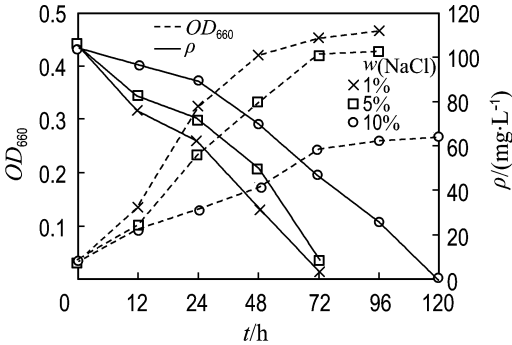


图 3 不同盐度下 W3 的生长降解曲线

Fig. 3 Effect of salt concentration on W3 biomass and phenol degradation

上述研究结果表明,W3 生长和降解的最优条件均为 $\text{pH}=7.0, 30\text{ }^{\circ}\text{C}$,生长量随盐度的增加而降低,而在 5%盐度以下,盐度对苯酚的降解速率基本没有影响,考虑到实际的工业含酚废水通

W3 在系统中的位置如图 2 所示.

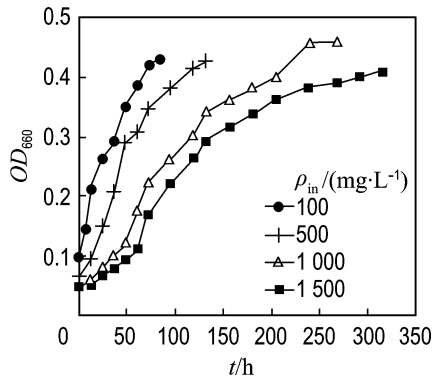
2.2 W3 生长及苯酚降解特性研究

2.2.1 环境条件对菌体生长及苯酚降解能力的影响 W3 菌株在 $\text{pH } 5.0\sim 11.0$ 内都能保持正常的生长和降解活性, $\text{pH } 7.0\sim 9.0$ 时对苯酚的降解率均可达到 80%以上. pH 为 7.0 时对苯酚的降解效果最好. W3 菌株生长及降解苯酚温度的适宜范围为 $10\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时同时达到生长量和降解率的最大值.

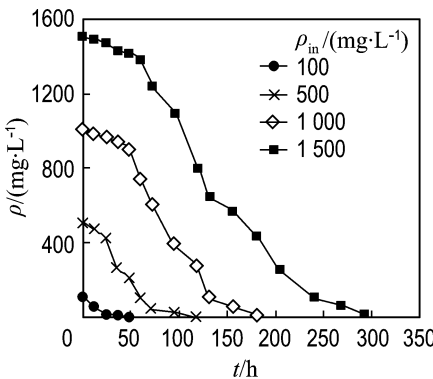
W3 菌株在 1%~10%NaCl 环境下都能进行生长和降解苯酚. 盐度在 5%以下时,72 h 即可完全降解 200 mg/L 苯酚(见图 3). 当盐度达 10%时, W3 的生长量和对苯酚的降解率随着盐浓度的增加而降低,200 mg/L 苯酚完全降解需要 120 h.

常具有一定的盐度,不大于 5%盐度的含酚废水均适于使用 W3 处理.

2.2.2 不同底物浓度对菌体生长和苯酚降解能力的影响 研究表明,菌株的生长速率随加入苯酚浓度 ρ_{in} 升高而下降,苯酚浓度越高,延滞期越长,降解时间也越长(见图 4). 苯酚浓度小于 1 500 mg/L 时,菌株能够完全降解苯酚. 苯酚浓度为 1 500 mg/L 时,288 h 苯酚的降解率可达到 99.8%. 但苯酚浓度达到 2 000 mg/L 时菌株无法生长(数据未显示). 这说明高浓度的苯酚对菌株的生长有一定抑制作用. 苯酚对细胞具有毒性,其毒性随浓度的增大而增加,由实验结果可看出,菌株可耐受浓度高达 1 500 mg/L,且能够维持较高的降解率. 但是当苯酚浓度继续增加时,菌株的生长受到严重的抑制,进而影响到对苯酚的降解.



(a) 对菌株 W3 生长的影响



(b) 对苯酚降解的影响

图 4 苯酚浓度对菌株 W3 生长及苯酚降解的影响

Fig. 4 Effect of phenol concentration on W3 growth and phenol degradation

2.3 底物广谱性

由表 1 可看出菌株 W3 能够利用苯胺、氨基酚、甲基酚、对苯二酚等多种芳香化合物作为碳源和能源进行生长,而硝基苯、邻二硝基苯、对氯苯胺等物质不能被利用.这可能是因为硝基和卤原

表 1 菌株 W3 对不同芳香族化合物的利用情况

Tab. 1 The utilization of different aromatic compounds by strain W3

名称	可降解性	名称	可降解性
苯甲酸	+	2-硝基苯甲酸	—
水杨酸	+	对苯二酚	++
苯胺	++	2,4-二氯苯酚	—
硝基苯	—	邻硝基酚	—
邻二硝基苯	—	邻甲基酚	++
对硝基苯胺	—	对甲基酚	+
二苯胺	+	邻氨基酚	++
邻氯苯胺	—	间氨基酚	++
对氯苯胺	—	对氨基酚	+

注:++ 易利用, + 可利用, — 不利用

子的存在会降低苯环的电子云密度,较难进行亲电反应,不易被氧化,从而影响生物降解性^[10].

2.4 菌株 W3 对混合酚的降解

实验选择了几种典型的芳香化合物与苯酚组成混合酚体系,考察菌株 W3 对混合酚的降解能力.从图 5 可以看出,苯酚作为唯一碳源时,48 h 可降解 90% 以上的苯酚.苯酚-对甲基酚、苯酚-对苯二酚体系的总酚降解率也达 50% 以上,而苯酚-间氨基酚体系的降解率约为 40%.这可能是因为其他酚类化合物比苯酚毒性更强,影响菌株的生长;或者是底物之间相互作用抑制了对另一种底物的降解.混合酚的降解属于共代谢过程,受试混合酚体系中其他酚类化合物的毒性比苯酚更强,更难降解,因此,当不同的酚类物质与苯酚同时存在时,苯酚的降解率下降.不同的混合酚体系中苯酚的降解率下降的程度不同,这可能与另一种酚类物质的毒性大小有关,尽管混合酚体系的苯酚降解率有所下降,但是实验结果表明 W3 仍具有用于实际含酚废水(通常含多种酚类物质)处理的潜力.

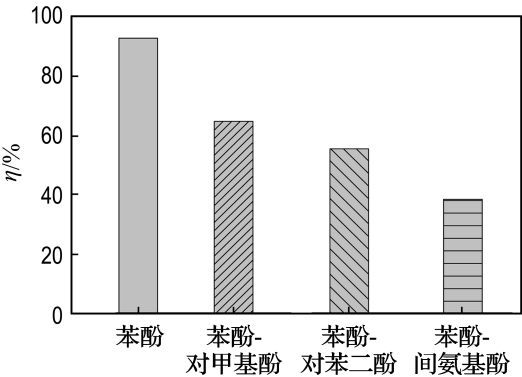


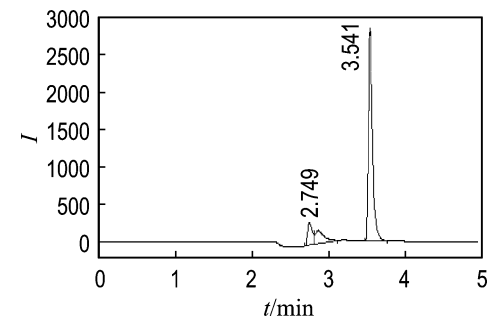
图 5 菌株 W3 对不同混合酚的降解能力

Fig. 5 Degradation of phenol and substituted phenol by strain W3

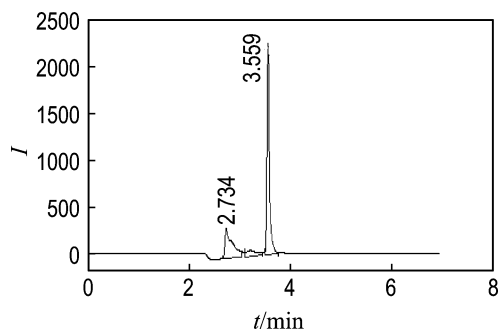
2.5 菌株 W3 耐盐机理初步探讨

在高盐环境下,一些耐盐菌株会在细胞内积累一些相容性物质来抵御外界高盐环境造成的负面影响^[11].相容性物质主要包括糖类、氨基酸类、甜菜碱和四氢嘧啶,W3 在 1% 的盐度下生长速度最快,但能耐受至少 10% 的盐度,说明该菌株属于耐盐菌.根据国外文献报道,耐盐机理主要是菌株在细胞内积累相容性溶质,如海藻糖、甜菜碱、四氢嘧啶等小分子来进行渗透调节,其中以四氢

嘧啶为主。因此,利用高效液相色谱检测 10% 盐度下 W3 细胞提取物的四氢嘧啶含量(见图 6),结果表明,W3 细胞提取物有一个和四氢嘧啶标样峰形特征和出峰时间均一致的吸收峰,说明 W3 细胞内含有高浓度的四氢嘧啶。



(a) 四氢嘧啶标样



(b) W3 细胞提取物

图 6 四氢嘧啶标样和 W3 细胞提取物的 HPLC 谱图

Fig. 6 HPLC spectra of ectoine and W3 cell extraction

其次,本文考察了不同盐度下 W3 细胞内相容性物质积累情况。由图 7 可知,各种相容性溶质的含量 q 均随盐度升高而增加,这是菌体为了适应外界高渗透压而实行的渗透保护功能。在 1% NaCl 条件下,细胞内积累的相容性物质以四氢嘧啶和谷氨酸为主,但含量较低仅为 0.01 mmol/g。随着盐度的增加,细胞内四氢嘧啶和甜菜碱的含量增长速度较快,当盐度达 10% 时,细胞内四氢嘧啶含量为 0.27 mmol/g,甜菜碱为 0.16 mmol/g,而谷氨酸仅为 0.06 mmol/g。由此可见,四氢嘧啶和甜菜碱的积累是 W3 抵抗高盐环境的重要机制。这两类物质作为高盐条件下常见的相容性溶质在许多文献中均有报道^[12,13]。甜菜碱类中的甘氨酸甜菜碱转运基因 BetM、四氢嘧啶合成基因 EctABC 都已被成功克隆,限于时间和仪器条件,

本文作者对耐盐机理的分子水平研究还在进行中,下一步工作的目标是获取编码合成相应相容性溶质的基因和对应的酶,从分子水平阐明相容性溶质的合成途径。

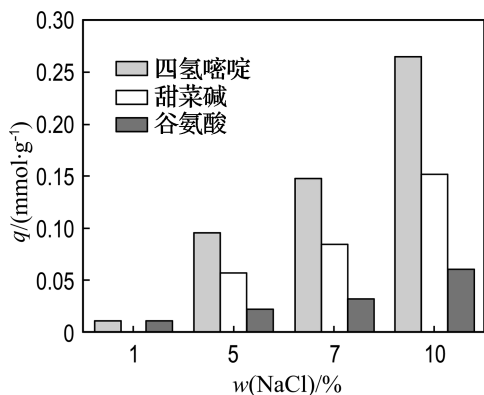


图 7 不同盐度对 W3 细胞内相容性溶质积累的影响

Fig. 7 Effects of salinity on the accumulation of compatible solutes in W3 cells

3 结 论

(1)从污水处理厂活性污泥中筛选出一株能以苯酚为唯一碳源和能源进行生长的菌株,鉴定为假丝酵母菌 *Candida sp.* W3。

(2)菌株 W3 能够在 1%~10% 的盐度下生长并降解苯酚,在 NaCl 质量分数为 5%、苯酚浓度为 1 500 mg/L 时,288 h 苯酚的降解率可达到 99.8%。

(3)菌株 W3 可利用多种芳香类化合物,并对苯酚-对甲酚、苯酚-对苯二酚、苯酚-间氨基酚组成的混合酚体系具有一定的降解能力。

(4)菌株 W3 在高盐环境下以四氢嘧啶和甜菜碱作为主要的渗透调节物质。

参考文献:

- [1] 王 韬,李鑫钢,杜启云. 含酚废水治理技术研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27(2):231-234
- [2] 吕荣湖,付 强. 高浓度酚降解菌的选育及其降酚性能[J]. 环境科学, 2005, 26(5):147-151
- [3] MUHAMMAD A, SAMINA L, SAKANDAR R, et al. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei* [J].

- Journal of Hazardous Materials**, 2007, **149**(1):60-66
- [4] LEE Seung-goo, HONG Seung-pyo, SUNG Moon-hee. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1996, **19**(5):374-377
- [5] 陈 明, 张 维. 醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 对苯酚降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2001, **21**(3):226-229
- [6] KATAYAMA-HIRAYAMA K, TOBITA S, HIRAYAMA K. Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis* [J]. **Water Science and Technology**, 1994, **30**(9):59-66
- [7] KUHLMANN A U, ERHARD B. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus spp.* [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, **68**(2):772-783
- [8] GRIEVE C M, GRATTAN S R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds [J]. **Plant and Soil**, 1983, **70**(2):303-307
- [9] 王 昂, 王丽丽, 仪 红, 等. 茚三酮比色法测定谷氨酸含量的研究[J]. 中国调味品, 2005, **8**:50-52
- [10] 王菊思, 赵丽辉, 匡 欣, 等. 某些芳香化合物生物降解性研究[J]. 环境科学学报, 1995, **15**(4):407-414
- [11] 张 薇, 胡跃高, 张力群, 等. 中度嗜盐菌 DTY1 的鉴定及其耐盐机制的初步分析[J]. 微生物学报, 2006, **46**(6):956-960
- [12] 赵百锁, 杨礼富, 王 磊, 等. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2007, **47**(5):937-941
- [13] VERMEULEN V, KUNTE H J. *Marinococcus halophilus* DSM 20408^T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM [J]. **Extremophiles**, 2004, **8**(3):175-184

Isolation, identification and characteristics of a salt-tolerant strain for phenol degradation

QU Yuan-yuan*, ZHOU Hao, WANG Ping, JI Guang-xin, ZHOU Ji-ti

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: A salt-tolerant phenol degrading yeast strain W3 was isolated from the sludge of a sewage plant. It was identified as *Candida sp.* by morphological and 26S rRNA sequence analysis. The strain was capable of growing in the medium with 1%-10% NaCl and utilizing phenol as sole carbon source and energy. It is found that the optimal conditions for growth and degradation are pH 7.0, temperature 30 °C, 5% NaCl. Under 5% NaCl, 1 500 mg/L of phenol is degraded by W3 within 12 days and the degrading rate is 99.8%. The strain can also degrade various aromatic compounds, such as aniline, salicylic acid, and phenolic mixtures under high salt conditions. The salt-tolerant mechanism of W3 shows that the level of ectoine and betaine inside of cells increases with increasing salinity, which indicates that W3 can use ectoine and betaine as the osmoprotectant in hypersaline environment.

Key words: phenol; salt-tolerant yeast; ectoine; betaine