



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.201908105

中图分类号 X172

文献标识码 A

谢晓航, 叶萌, 潘宏, 等. 嗜联苯红球菌 B403 对酚类污染物的降解特性及动力学分析[J]. 环境工程学报, 2020, 14(4): 1103-1112.

XIE Xiaohang, YE Meng, PAN Hong, et al. Degradation characteristics and kinetic analysis of phenolic pollutants by *Rhodococcus biphenylivorans* B403[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(4): 1103-1112.

嗜联苯红球菌 B403 对酚类污染物的降解特性及动力学分析

谢晓航^{1,2}, 叶萌^{1,2}, 潘宏^{1,2}, 许宋思恒¹, 杨慧¹, 柯榆杰¹, 宋慧婷^{1,2,*}

1. 湖北大学资源环境学院, 区域开发与环境响应湖北省重点实验室, 武汉 430062

2. 湖北大学生命科学学院, 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 武汉 430062

第一作者: 谢晓航(1994—), 男, 硕士研究生。研究方向: 环境微生物工程。E-mail: 474672223@qq.com

*通信作者: 宋慧婷(1975—), 女, 博士, 教授。研究方向: 水污染控制与生态修复技术。E-mail: htsong@hubu.edu.cn

摘要 为提高降酚菌株的降酚能力, 实验测定了嗜联苯红球菌 B403 对 6 种酚的最小抑菌浓度, 考察了该菌在不同碳源条件下的生长与降酚特性及其关联, 进而研究其降解动力学规律。结果表明, 菌株 B403 对苯酚、间甲酚、邻苯二酚、对硝基苯酚、2,4-二氯苯酚和 2,4,6-三氯苯酚的最小抑菌浓度分别为 1 190、630、700、140、70、48 mg·L⁻¹, 菌株 B403 对苯酚、间甲酚、邻苯二酚表现出较强的耐受性。分别以这 3 种酚为唯一碳源, 该菌株能有效降解苯酚和间甲酚, 无机盐培养基中处理 30 h 后, 苯酚、间甲酚、邻苯二酚的降解率分别为 97.85%、100%、56.54%; 当有其他有机碳源存在时, 菌株 B403 的生物量大幅度提高, 3 种酚的降解效率也显著提高, 处理 15 h 后 LB-无机盐混合培养基中苯酚、间甲酚、邻苯二酚的降解率分别为 98.92%、99.93%、94.35%。菌株 B403 的降酚动力学过程符合 Haldane 模型, 菌株 B403 降解苯酚的动力学参数为 $q_m=0.503 \text{ h}^{-1}$, $K_s=270.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_i=69 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 降解间甲酚时, $q_m=0.672 \text{ h}^{-1}$, $K_s=171.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_i=23.74 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 降解邻苯二酚时, $q_m=1.749 \text{ h}^{-1}$, $K_s=541.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_i=42.61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据动力学方程, 推论降解苯酚、间甲酚、邻苯二酚的最佳浓度分别为 136.4、87.4、116.1 mg·L⁻¹。综合上述结果, 其他有机碳源的存在可以显著提高该菌株降酚能力和降解效率, 在工业含酚废水治理及有机质丰富的酚类污染土壤修复领域具有一定的应用潜力。

关键词 生物降解; 酚类污染物; 嗜联苯红球菌; 最小抑菌浓度; 降解动力学

酚类污染物是工业废水中常见的一类污染物, 在石油精炼、塑料制造、树脂生产、农药生产、钢铁制造以及油漆生产等工业生产过程都有酚类污染物的产生^[1]。酚类污染物的种类很多, 其中以苯酚、甲酚、氯酚的污染最为突出^[2]。由于苯酚及其衍生物有毒且难以降解, 在水环境中分布广泛, 已对生态环境造成损害, 同时也严重威胁着人类的生存和发展, 中国将苯酚、间甲酚、2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚、五氯苯酚和对硝基苯酚列入环境优先处理的污染物“黑名单”^[3]。因此, 高效治理含酚废水的研究十分重要。

含酚废水的处理方法有很多, 主要分为物理法、化学法和生物法。其中生物法因其成本低、

收稿日期: 2019-08-19; 录用日期: 2019-11-01

基金项目: 湖北省科技厅技术创新重大专项(2018ABA096); 武汉市科技计划(2019020701011496); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810512040, 201910512029)

二次污染小等优点而被广泛应用^[4]。生物法处理含酚废水的关键在于降酚菌株的筛选^[5]。据报道,国内外学者已从环境中成功分离、筛选出了一些降酚菌株。EREQAT等^[6]从橄榄油废物中分离出1株苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),在96 h内对700 mg·L⁻¹苯酚的最大去除率可达到88.6%;JIANG等^[7]从工业废水处理系统中分离出1株德巴利氏酵母(*Debaryomyces*),在32 h内可完全降解500 mg·L⁻¹苯酚;贾子龙^[8]从焦化废水中分离出1株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),可在78 h内完全降解360 mg·L⁻¹间甲酚;黄强等^[9]筛选得到1株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),其降解50 mg·L⁻¹对硝基苯酚需要8 h;于彩虹等^[10]从首钢焦化废水处理系统中分离出蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),其完全降解400 mg·L⁻¹和800 mg·L⁻¹苯酚所需要的时间分别为24 h和72 h。这些菌株均能以单一酚为唯一碳源进行生长,但在有其他有机碳源存在时酚类物质降解的研究较少。酚类污染物种类繁多,寻求对酚类污染物具有降解广谱性,能够降解不同酚类物质的菌株对含酚废水的生物处理具有重要意义。同时,为了更好地研究降酚菌对酚类污染物的降解机理,降解动力学的研究是必不可少的^[11]。微生物降解动力学有助于微生物处理的设计、运行合理化与科学化,克服长期以来微生物处理的设计和运行多为根据经验数据来进行的局限,为酚类污染物的生物处理提供理论依据^[12]。

本研究报道了1株能以多种酚类污染物作为唯一碳源生长的红球菌对酚类污染物的耐受性,并针对其在耐受性强的3种酚中的生长情况结合降解特性进行了分析,发现该菌株在其他有机碳源存在时表现出更高的酚降解效率,这一特性更利于在酚类污染物土壤、水体治理中的实际应用。为阐明该菌株对苯酚、间甲酚、邻苯二酚3种酚类污染物的最适降解环境,根据菌株对3种酚的最小抑菌浓度,选择合适的浓度梯度建立动力学模型,为酚类污染物的治理提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 实验原料

实验用菌株为嗜联苯红球菌(*Rhodococcus biphenylivorans*),命名为B403,由湖北大学省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室筛选,其保藏编号为CCTCC NO: M 2019087。

实验过程中所使用的培养基有3种类型:LB培养基、无机盐培养基、LB-无机盐混合培养基。LB培养基:胰蛋白胨10 g·L⁻¹、酵母提取物5 g·L⁻¹、NaCl 10 g·L⁻¹。无机盐培养基:NaCl 0.2 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 0.5 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 0.5 g·L⁻¹、NH₄NO₃ 1 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.2 g·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 微量。LB-无机盐混合培养基:胰蛋白胨5 g·L⁻¹、酵母提取物2.5 g·L⁻¹、NaCl 5.1 g·L⁻¹、KH₂PO₄ 0.25 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 0.25 g·L⁻¹、NH₄NO₃ 0.5 g·L⁻¹、MgSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 微量。

以上培养基调节pH至6.5~7.0,121 ℃蒸汽灭菌后30 min备用,每组设置3个平行,酚类污染物配成5 g·L⁻¹母液,过滤除菌后,按需加入培养基中。

1.2 实验方法

分别配制苯酚、间甲酚、对硝基苯酚、2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚和邻苯二酚母液,设置苯酚浓度为100~200 mg·L⁻¹、间甲酚浓度为600~700 mg·L⁻¹、邻苯二酚浓度为600~700 mg·L⁻¹、对硝基苯酚浓度为100~200 mg·L⁻¹、2,4-二氯苯酚浓度为0~100 mg·L⁻¹、2,4,6-三氯苯酚浓度为0~80 mg·L⁻¹。测定2,4,6-三氯苯酚时,每支试管浓度相差8 mg·L⁻¹,测定其他酚类时,每支试管浓度相差10 mg·L⁻¹。按0.6%的接种量接入菌株B403菌悬液,于28 ℃、200 r·min⁻¹恒温摇床中培养24 h,肉眼观察,试管中溶液保持澄清时的最低浓度为最小抑菌浓度(MIC),通过最小抑菌浓度表征菌株对这6种酚的耐受性。

用LB液体培养基活化菌株B403单菌落,48 h后分别接种菌液至LB培养基、无机盐培养基、LB-无机盐混合培养基中培养,控制接种后培养基中初始OD₆₀₀=0.1。在3种培养基中加入同一种

酚，每个处理设置3个重复，于28℃、200 r·min⁻¹恒温摇床中培养51 h，每3 h取样1次，测定细菌生长量。同时取样1 mL培养液至EP管中，在12 000 r·min⁻¹离心5 min后取上清液，用双蒸水稀释50倍，经0.22 μm的有机相微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定酚含量。苯酚、间甲酚、邻苯二酚初始浓度均设置为500 mg·L⁻¹。

1.3 分析方法

细菌生长量的测定：用空白培养基做参比，在波长600 nm下测定菌液的光吸收值，记作OD₆₀₀，反映液体培养基中该菌株的生长状况。

苯酚含量的测定：采用高效液相色谱法^[13]，XDB-C18(5 μm, 4.5 mm×150 mm)色谱柱，体积分数为50%的甲醇溶液为流动相，流速0.5 mL·min⁻¹，柱温25℃，进样量10.00 μL，苯酚、间甲酚、邻苯二酚检测波长分别为270、272、270 nm。苯酚去除率按式(1)计算。

$$\eta = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中： η 为苯酚去除率； C_0 为初始苯酚浓度，mg·L⁻¹； C 为反应后苯酚浓度，mg·L⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 菌株B403对不同酚类污染物的耐受性

菌株B403在苯酚、间甲酚、邻苯二酚、对硝基酚、2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚中的生长情况如表1所示。根据实验结果，菌株B403在实验浓度范围内的6种酚中均能生长，但对酚的耐受能力存在差异。菌株B403对苯酚的耐受能力最强，最小抑菌浓度为1 190 mg·L⁻¹；其次是间甲酚和邻苯二酚，最小抑菌浓度分别为630 mg·L⁻¹和700 mg·L⁻¹。该菌对硝基苯酚、2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚的最小抑菌浓度分别为140、70、48 mg·L⁻¹，说明这3种酚对菌株B403的生长抑制较为强烈，可能与这3种酚中含有的硝基和卤原子取代基有关^[14]。在耐受性实验基础上，选取耐受能力较强的苯酚、间甲酚和邻苯二酚考察菌株在不同碳源条件下的生长和降酚特性。

表1 菌株B403在不同浓度酚类物质中的生长情况
Table 1 Growth of strain B403 in different concentrations of phenolic substances

苯酚/(mg·L ⁻¹)	间甲酚/(mg·L ⁻¹)	邻苯二酚/(mg·L ⁻¹)	对硝基苯酚/(mg·L ⁻¹)	2,4-二氯苯酚/(mg·L ⁻¹)	2,4,6-三氯苯酚/(mg·L ⁻¹)
1 100+++	600+++	600+++	100+++	0+++	0+++
1 110+++	610++	610+++	110+++	10+++	8+++
1 120+++	620+	620+++	120++	20+++	16+++
1 130+++	630*	630+++	130+	30+++	24++
1 140+++	640-	640++	140*	40+++	32+
1 150++	650-	650++	150-	50++	40+
1 160+	660-	660++	160-	60+	48*
1 170+	670-	670++	170-	70*	56-
1 180+	680-	680+	180-	80-	64-
1 190*	690-	690+	190-	90-	72-
1 200-	700-	700*	200-	100-	80-

注：“+++”表示细菌生长量多；“++”表示细菌生长量较多；“+”表示细菌生长量较少；“-”表示不能生长；*表示最小抑菌浓度。

2.2 不同碳源条件下菌株B403在酚类污染物中的生长和降解情况

在分析菌株B403在苯酚中的生长情况和降解效率时，以500 mg·L⁻¹苯酚为底物，初始接种OD₆₀₀

一致,测定菌株 B403 生长量和苯酚含量。菌株 B403 在苯酚-无机盐培养基、苯酚-LB 培养基及苯酚-LB-无机盐混合培养基中的生长曲线和对苯酚的降解曲线如图 1 和图 2 所示。3 种培养基中菌株 B403 表现出不同的生长特性,在苯酚-LB 培养基中,菌株 B403 的生长状况最佳,在 51 h 内,OD₆₀₀ 最大可增加至 10.85。在苯酚-LB-无机盐混合培养基生长状况次之,51 h 内,OD₆₀₀ 最高值为 6.65。而在苯酚-无机盐培养基中,菌株 B403 的生长状况最差,在 51 h 内,OD₆₀₀ 最大值仅为 0.97。这说明该菌能够以苯酚为唯一碳源生长,且在有其他有机碳源存在的情况下能快速提高菌株的生物量。苯酚-LB 培养基和苯酚-LB-无机盐混合培养基的菌株在前 15 h 内生长情况基本一致。18 h 后,菌株 B403 在苯酚-LB 培养基和苯酚-LB-无机盐混合培养基中的生长明显加快,相比在无机盐培养基中差异更为明显。这说明在生长前期,苯酚对菌株 B403 生长有一定的抑制作用,这种抑制作用在苯酚作为单一碳源时更为显著。在含有其他有机碳源的情况下,18 h 之后,苯酚对菌株的生长抑制减弱,菌株快速进入对数期,而苯酚为唯一碳源条件下,苯酚对菌株的生长抑制并没有随着时间的增加而减弱。

菌株 B403 在不同培养基中酚降解效率存在明显差异,15 h 时,苯酚-LB-无机盐混合培养基中菌株 B403 对苯酚的降解率最高,达到了 98.92%,在苯酚-LB 培养基中的苯酚降解率为 85.87%。处理 18 h 后,2 种培养基中的苯酚被完全降解,而苯酚-无机盐培养基中的菌株酚降解效率仅为 62.27%,处理 30 h 能达到 97.85%,菌株 B403 在苯酚-无机盐培养基中的降解效率最低与其低生物量密切相关^[15]。添加有机碳源不仅能够增强该菌株对酚的耐受性,而且提高了生物酚降解效率^[16-17]。在实验过程中发现,在苯酚降解过程中会产生邻苯二酚和顺,顺-黏糠酸等中间产物,但这些中间产物量非常小,与已报道的结果^[18-19]一致。低浓度邻苯二酚和顺,顺-黏糠酸等中间产物对菌株生物生长抑制较弱,因此,推测在菌株 B403 生物降解苯酚的过程中主要抑制物为苯酚。18 h 后,在苯酚-LB 培养基和苯酚-LB-无机盐混合培养基中的苯酚完全被降解,此时菌株 B403 利用其他有机碳源继续生长,生长速率大幅度提升。菌株 B403 在苯酚-LB-无机盐混合培养基的降解效率高于在苯酚-LB 培养基中的降解效率,这说明在含有较高生物量的情况下,添加少量的无机盐离子对该菌株降解苯酚有促进作用。

关于苯酚的微生物降解已经有了大量的研究,陈晓华等^[20]筛选了 1 株苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.),在 30 °C、初始 pH=7.0、接种量为 5%、初始苯酚浓度为 400 mg·L⁻¹ 的条件下,完全降解苯酚需要 24 h;沈娥等^[21]分离了 1 株红球菌 W2,在 30 °C、pH=7.0、50 g·L⁻¹NaCl 条件下,其降解 500 mg·L⁻¹

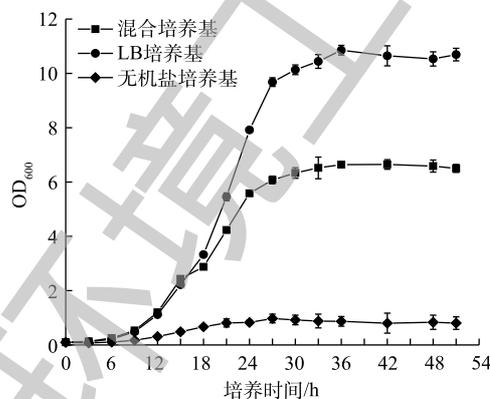


图 1 菌株 B403 以苯酚为底物时在 3 种培养基中的生长情况

Fig. 1 Growth of strain B403 in three mediums with phenol as substrate

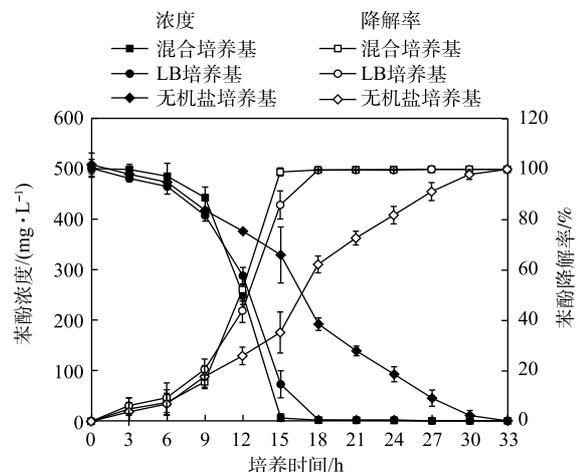


图 2 菌株 B403 在 3 种培养基中对苯酚的降解特性

Fig. 2 Phenol degradation characteristics by strain B403 in three media

苯酚需要 78 h; 高振贤等^[22]发现 *Ralstonia metallidurans* CH34 菌株降解 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯酚需要 48 h。菌株 B403 在苯酚为唯一碳源的情况下, 其降解苯酚能力明显高于以上文献报道中的菌株。在此基础上, 添加常规碳源可大幅提高该菌株的苯酚降解能力, 含酚工业废水以及土壤中往往含有丰富的常规碳源, 这一特性更利于菌株 B403 在环境领域实际应用。

在分析菌株 B403 在间甲酚中的生长情况和降解效率时, 以 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间甲酚为底物, 其他条件同上, 绘制生长曲线和降解曲线, 如图 3 和图 4 所示。结果表明, 在间甲酚-LB 培养基中, 在 51 h 内, OD_{600} 最大增加到 8.58, 菌株 B403 的生长状况最佳。在间甲酚-LB-无机盐混合培养基中, 生长状况次之, 51 h 内, 最高增长到 5.23。而在间甲酚-无机盐培养基中, 菌株 B403 的生长状况最差, 在 51 h 内, OD_{600} 最大仅增长到 0.44。这说明该菌不仅能以苯酚为唯一碳源生长, 而且在间甲酚为唯一碳源时也能生长。当间甲酚为唯一碳源时, 间甲酚及其代谢中间产物对菌株生长均有持续抑制作用, 因而菌株生物量较低, 而在有其他有机碳源存在时, 18 h 后间甲酚及其代谢中间产物对菌株的生长抑制作用减弱, 导致菌株生物量大幅度提高。彭丽花等^[23]发现, *Citrobacter farmeri* sp. 在间甲酚完全降解的反应液中, 中间产物所带来的 TOC 占总 TOC 的 25% 左右, 间甲酚中间产物的进一步转化反应可能受到某种条件的制约。菌株 B403 在含苯酚的 3 种培养基中的生物量高于含同浓度间甲酚的 3 种培养基中的生物量可能与此相关。

菌株 B403 在不同培养基中对间甲酚的降解效率存在明显差异。在 12 h 时, 间甲酚-LB-无机盐混合培养基中菌株 B403 对间甲酚的降解率达到 67.49%, 15 h 间甲酚被完全降解; 间甲酚-LB 培养基中在 12 h 时对间甲酚降解率为 48.17%, 15 h 达到 99.93%, 18 h 间甲酚被完全降解; 而在 18 h 时, 甲酚-无机盐培养基中的菌株对间甲酚的降解率仅为 66.34%, 30 h 后, 间甲酚被完全降解。间甲酚-LB 培养基和间甲酚-LB-无机盐混合培养基中的间甲酚完全降解后, 菌株 B403 可以利用其他有机碳源继续生长, 生长速率大幅度提升。菌株 B403 在间甲酚-LB-无机盐混合培养基的降解效率高于在间甲酚-LB 培养基中的降解效率, 说明在含有较高生物量的情况下, 添加适量无机盐离子对该菌降解间甲酚有一定的促进作用。菌株 B403 在间甲酚-LB 培养基和间甲酚-LB-无机盐混合培养基中的高生物量和比生长速率大幅度地提升了其对间甲酚的降解效率。葛启隆^[24]发现 1 株短芽孢杆菌 (*Brevibacillus borstelensis*), 在添加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 琥珀酸后, 降解 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间甲酚所需时间缩短了 20 h, 这与上述文献结果相符。

白静^[25]得到 1 株降酚菌 *Alcaligenes faecalis* sp., 其对间甲酚最大降解能力为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,

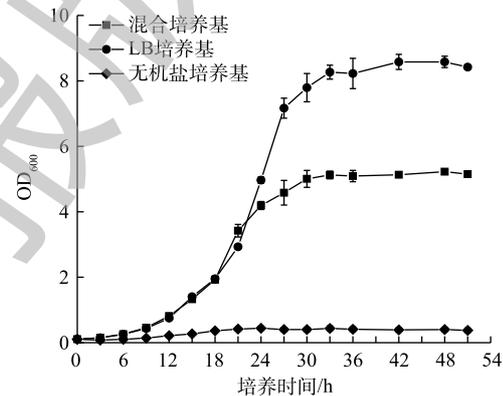


图 3 菌株 B403 以间甲酚为底物时在 3 种培养基中的生长情况

Fig. 3 Growth of strain B403 in three media with m-cresol as substrate

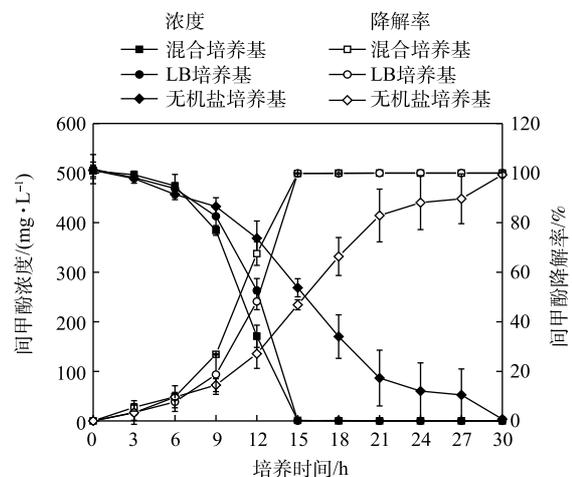


图 4 B403 在 3 种培养基中对间甲酚的降解特性

Fig. 4 M-cresol degradation characteristics by strain B403 in three media

需要 118 h 才能降解完全。WANG 等^[26]利用 *Paecilomyces variotii* JH6 降解 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间甲酚, 在 65 h 时, 间甲酚去除率达到 96.4%。通过实验对比发现, 菌株 B403 具有更高的间甲酚降解能力。

在分析菌株 B403 在邻苯二酚中的生长情况和降解效率时, 以 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二酚为底物, 其生长和降解特性如图 5 和图 6 所示。与苯酚、间甲酚结果类似, 在邻苯二酚-LB 培养基中, 菌株 B403 的生长状况最佳, 在 51 h 内, OD_{600} 最大值为 13.09; 其次是邻苯二酚-LB-无机盐混合培养基, 在 51 h 内, OD_{600} 最高增长为 8.68; 而在邻苯二酚-无机盐培养基中, 菌株 B403 的生长状况最差, 在 51 h 内, OD_{600} 最大仅增长到 0.36。这说明菌株能够以邻苯二酚为唯一碳源进行代谢生长, 并且有外加碳源存在时, 对菌株生物量有大幅提高。邻苯二酚-LB 培养基和邻苯二酚-LB-无机盐混合培养基的菌株在前 6 h 内生长速率基本一致。9 h 后, 生长速率均有了明显提升, 这说明其他有机碳源能够减弱邻苯二酚对菌株的生长抑制, 菌株进入对数生长期, 与苯酚和间甲酚生长情况相比, 菌株进入对数期时间更短, 且在 18 h 后菌株进入衰亡期, 这说明邻苯二酚对菌株具有持续的生长抑制。

菌株 B403 在不同培养基中对邻苯二酚的降解效率也存在明显差异。邻苯二酚-LB 培养基中菌株完全降解邻苯二酚仅需 15 h, 邻苯二酚-LB-无机盐混合培养基中 18 h 后完全降解, 此时邻苯二酚-无机盐培养基中菌株对邻苯二酚的降解率仅为 46.27%。该菌株在无机盐培养基中对邻苯二酚的降解效率最差, 在 51 h 时, 仍然没有完全降解, 降解率为 64.16%。邻苯二酚是苯酚降解的中间产物^[27], 邻苯二酚既可以促进微生物生长, 同时也可能具有生物毒害作用抑制微生物生长^[28]。邓维琴等^[29]确定了 1 株鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp. SC-1), 其能在 48 h 降解 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 邻苯二酚。程珂珂等^[30]发现了 1 株邻苯二酚降解菌, 当邻苯二酚浓度超过 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌株生长会受到明显抑制, 邻苯二酚降解率仅能达到 45%。当无机盐培养基中含有高浓度邻苯二酚时, 菌株 B403 生长受到了明显抑制, 菌株快速进入衰亡期, 邻苯二酚无法完全降解, 说明高浓度邻苯二酚对菌株有较强抑制作用。在邻苯二酚-LB 培养基和邻苯二酚-LB-无机盐混合培养基中, 菌株 B403 能够正常生长, 邻苯二酚降解效率也有所提高, 表明其他有机碳源的存在可以缓解邻苯二酚对菌株 B403 的抑制作用。与苯酚、间甲酚底物情况不同, 菌株 B403 在 LB 培养基中对邻苯二酚的降解效率最佳, 这说明无机盐离子的存在对菌株降解邻苯二酚没有促进作用。

实验结果表明, 菌株 B403 的降解底物具有广谱性, 在好氧条件下不仅能够将苯酚作为碳源进行生长和降解苯酚, 还能在一定浓度范围内降解间甲酚和邻苯二酚。菌株 B403 的生

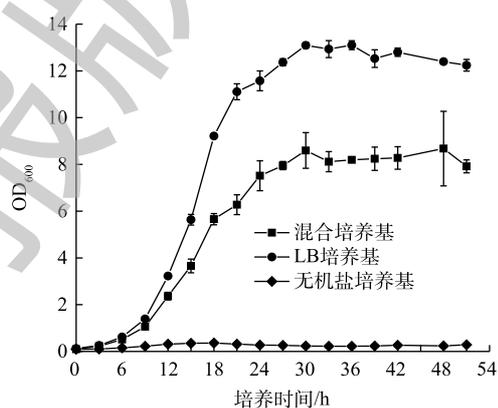


图 5 菌株 B403 以邻苯二酚为底物时在 3 种培养基中的生长情况

Fig. 5 Growth of strain B403 in three media with catechol as substrate

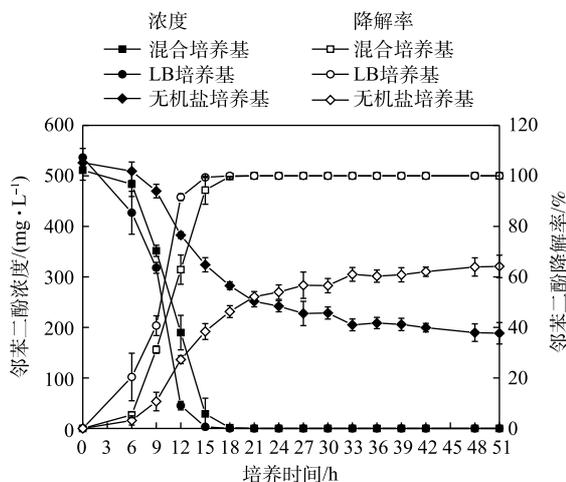


图 6 菌株 B403 在 3 种培养基中对邻苯二酚的降解特性

Fig. 6 Catechol degradation characteristics of strain B403 in three media

长与苯酚降解同步进行，分别以 3 种酚为唯一碳源时，苯酚和间甲酚对菌株 B403 生长抑制程度相近，邻苯二酚对菌株生长抑制作用更强。在有其他有机碳源存在时，3 种酚对菌株的生长抑制均有缓解，菌株生物量大幅增长，极大地促进了菌株对 3 种酚的降解。此外，无机盐离子对苯酚和间甲酚的降解也有一定促进作用，而对邻苯二酚的降解没有起到促进作用。

2.3 菌株 B403 降解酚类污染物的动力学

国内外已有一系列酚类降解动力学模型^[31]，对于酚类底物既是反应基质又是抑制剂的生物降解过程，通常采用 Haldane 方程来模拟底物降解动力学过程^[32]。分别以 500 mg·L⁻¹ 苯酚、邻苯二酚、间甲酚作为底物，降解速率最高的培养基为实验用培养基，苯酚和间甲酚采用 LB-无机盐混合培养基，邻苯二酚采用 LB 培养基，进行降解动力学实验。根据最小抑菌浓度设置浓度梯度，投加菌株 B403 后，在不同降解时间下测定培养液中 3 种酚的浓度，对实验数据进行拟合并求出 Haldane 方程参数。Haldane 方程如式 (2) 所示。

$$q = q_m S_0 / [K_s + S_0 + (S_0^2 / K_i)] \quad (2)$$

式中： q 为比底物利用速率，h⁻¹； q_m 为最大比底物利用速率，h⁻¹； S_0 为初始底物浓度，mg·L⁻¹； K_s 为底物亲和常数，mg·L⁻¹； K_i 为底物抑制常数，mg·L⁻¹。

将实验结果在 matlab 7.0 中进行非线性回归分析，得到所有分离物的动力学参数 q_m 、 K_s 、 K_i ，如表 2 所示。可以看出，苯酚、间甲酚、邻苯二酚的降解动力学均符合 Haldane 方程，拟合情况良好。图 7 为菌株 B403 降解 3 种酚的降解曲线。图 7(a) 为苯酚降解曲线，完全降解 200、400、600、800、1 000、1 200 mg·L⁻¹ 苯酚所需时间分别为 12、15、18、24、30、45 h；图 7(b) 为间甲酚降解曲线，完全降解 100、200、300、400、500、600 mg·L⁻¹ 间甲酚所需时间分别为 9、9、12、15、18、21 h；图 7(c) 为邻苯二酚降解曲线，完全降解 100、200、300、400、500、600 mg·L⁻¹ 邻苯二酚所需时间分别为 9、12、12、15、18、21 h。根据 3 种酚的降解曲线可知，菌株 B403 降解酚类污染物的滞后期随着浓度的升高明显延长，不同初始浓度具有相同降解率可能与取样时间间隔有关。

表 2 由 Haldane 模型得到的菌株 B403 降解苯酚、间甲酚、邻苯二酚的动力学参数

Table 2 Degradation kinetic parameters of phenol, m-cresol and catechol by strain B403 obtained from Haldane model

酚类污染物	q_m/h^{-1}	$K_s/(mg \cdot L^{-1})$	$K_i/(mg \cdot L^{-1})$	误差平方和	R^2
苯酚	0.503	270.9	69	0.039	0.97
间甲酚	0.672	171.9	23.74	0.024	0.998
邻苯二酚	1.749	541.9	42.61	0.051	0.954

图 8 为菌株 B403 对 3 种酚的降解速率曲线和拟合降解曲线。当苯酚、间甲酚、邻苯二酚浓度分别超过 136.4、87.4、116.1 mg·L⁻¹ 时，菌株 B403 对 3 种酚的比降解速率随着浓度的升高而降低，

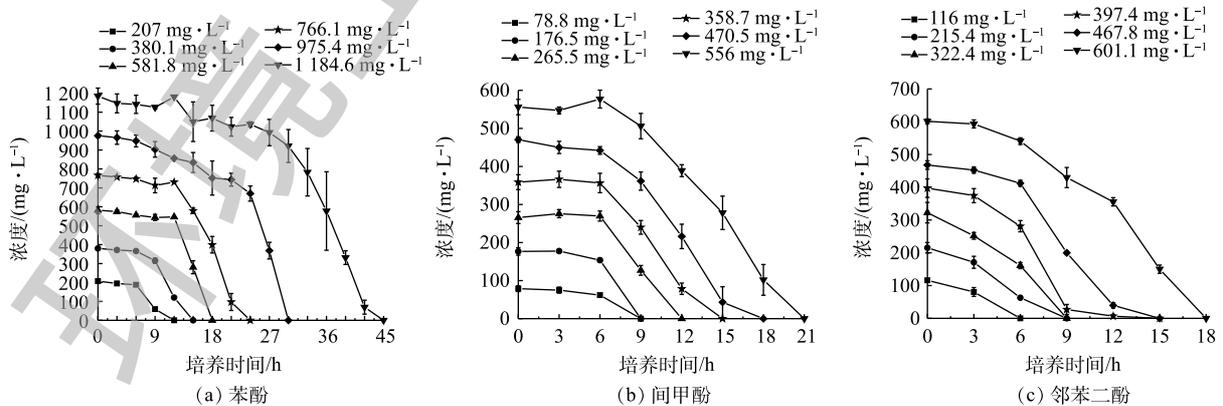


图 7 菌株 B403 对不同浓度的苯酚、间甲酚、邻苯二酚的降解曲线

Fig. 7 Degradation curves of phenol, m-cresol and catechol with different concentrations by strain B403

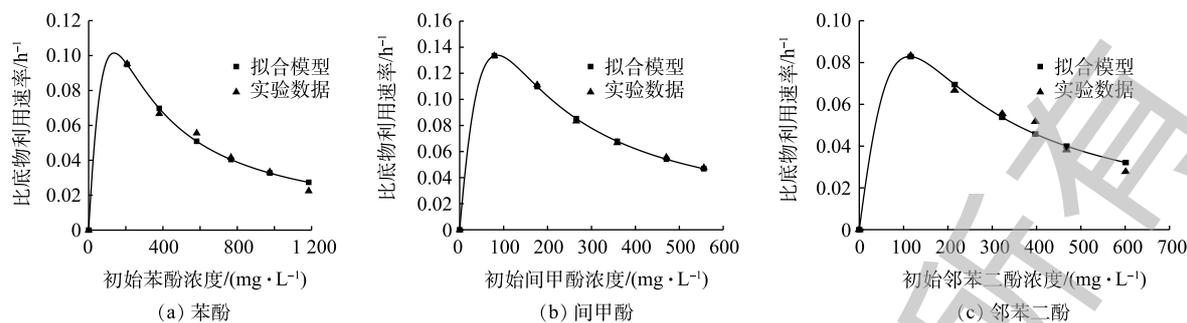


图8 菌株 B403 对苯酚、间甲酚、邻苯二酚的动力学拟合曲线

Fig. 8 Kinetic fit curve of phenol, m-cresol and catechol degradation by strain B403

呈现底物抑制作用,即认为 136.4、87.4、116.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别为降解苯酚、间甲酚、邻苯二酚的最佳浓度。在降解动力学方程中,若底物抑制常数(K_i)越大,说明菌株对底物的抑制越不敏感,底物亲和常数(K_s)越大,说明菌株对底物生物降解的潜能越大,最大比底物利用速率(q_m)越大,则表明底物越容易被降解,误差平方和越接近 0, R^2 越接近 1,这说明模型拟合得越好。菌株 B403 对苯酚的 K_i 最大,为 69 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,这说明实验的 3 种酚中菌株 B403 对苯酚的抑制最不敏感,与实验中菌株对苯酚具有最高的最小抑菌浓度的实验结果一致。菌株 B403 对邻苯二酚的 K_s 和 q_m 最大,邻苯二酚作为苯酚的代谢产物,在有其他有机碳源存在时,邻苯二酚更容易被菌株利用,菌株对邻苯二酚的生物降解潜能最大。由误差平方和和 R^2 可知,使用 Haldane 模型拟合苯酚、邻苯二酚、间甲酚的降解动力学过程时,间甲酚的拟合效果最佳。

张玉秀等^[33]从焦化废水中分离出 1 株苯酚降解菌红球菌(*Rhodococcus* sp.),并用 Haldane 方程对其降解苯酚的实验数值进行拟合,得到降解苯酚的最佳浓度为 234.548 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_s=77.487 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。贾子龙^[8]从处理模拟焦化废水系统里分离得到 1 株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),用 Haldane 方程对其降解间甲酚进行拟合,得到降解间甲酚的最佳浓度为 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_s=9.85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。目前关于菌株降解邻苯二酚的降解动力学研究较少,相比于其他研究,菌株 B403 降解苯酚的最佳浓度较低, K_s 高于大部分已报道的菌株,这说明菌株 B403 对多种酚类污染物生物降解的潜能较大。

3 结论

1) 菌株 B403 对苯酚、间甲酚、邻苯二酚、对硝基苯酚、2,4-二氯苯酚和 2,4,6-三氯苯酚的最小抑菌浓度分别为 1 190、630、700、140、70、48 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 菌株 B403 对苯酚、间甲酚、邻苯二酚有较强的耐受性。

2) 菌株 B403 在含有 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一酚(苯酚、间甲酚、邻苯二酚)的 LB 培养基和 LB-无机盐混合培养基中与在含有 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一酚(苯酚、间甲酚、邻苯二酚)的无机盐培养基中与相比,生物量和降酚能力大幅提高,其他有机碳源的存在,更有利于菌株 B403 生长,提高降酚能力,具有广阔的应用前景。

3) 菌株 B403 在含常规碳源条件下降解苯酚、间甲酚、邻苯二酚均符合 Haldane 模型。降解苯酚、间甲酚、邻苯二酚的最佳浓度分别为 136.4、87.4、116.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌株 B403 对 3 种酚的生物降解潜能较大。

参考文献

- [1] 裴芳,罗泽娇,彭进进,等.某炼油厂退役场地土壤与浅层地下水酚类污染特征研究[J].环境科学,2012,33(12):4251-4255.
- [2] 张帆,刘媛,贺盛福,等.处理含酚废水的研究进展[J].现代化工,2015,35(1):67-72.

- [3] 贺强礼, 关向杰, 黄水娥, 等. 典型酚类废水的微生物处理研究现状及其进展[J]. 环境工程, 2014, 32(3): 6-9.
- [4] 赵娜娜, 许继飞, 宋晓雪, 等. 嗜盐高效降酚菌株 *Halomonas* sp. H17 的筛选及降解苯酚特性[J]. 环境科学学报, 2019, 39(2): 318-324.
- [5] 丁丽. 煤气废水优势降酚菌筛选及降酚效果研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [6] EREQAT S I, ABDELKADER A A, NASEREDDIN A F, et al. Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2017, 53(1): 1-7.
- [7] JIANG Y, SHANG Y, YANG K, et al. Phenol degradation by halophilic fungal isolate JS4 and evaluation of its tolerance of heavy metals[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(4): 1883-1890.
- [8] 贾子龙. 假单胞菌降解间甲酚和好氧反硝化特性[D]. 太原: 太原理工大学, 2015.
- [9] 黄强, 张明强. 固定化铜绿假单胞菌生物降解对硝基苯酚[J]. 环境工程技术学报, 2012, 2(3): 247-252.
- [10] 于彩虹, 陈飞, 胡琳娜, 等. 一株苯酚降解菌的筛选及降解动力学特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(3): 1215-1220.
- [11] HASAN S A, JABEEN S. Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(1): 45-53.
- [12] 辛蕴甜. 石油降解菌的降解性能、固定化及降解动力学研究[D]. 上海: 东华大学, 2013.
- [13] 阮国洪. 水中苯酚、苯二酚和苯三酚的高效液相色谱分析方法的研究[J]. 环境与健康杂志, 2002, 19(1): 64-65.
- [14] PETROUTSOS D, KATAPODIS P, SAMIOTAKI M, et al. Detoxification of 2, 4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*[J]. Phytochemistry, 2008, 69(3): 707-714.
- [15] 胡婷, 谷洁, 甄丽莎, 等. 石油污染土壤中苯酚降解菌 ad049 的鉴定及降解特性[J]. 生态学报, 2014, 34(5): 1140-1148.
- [16] POLYMENAKOU P N, STEPHANOU E G. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*[J]. Biodegradation, 2005, 16(5): 403-413.
- [17] 张海涛, 刘文斌, 杨海君, 等. 一株耐盐高效苯酚降解菌的筛选、鉴定、响应面法优化与降酚动力学研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(9): 3200-3207.
- [18] GU Q, WU Q, ZHANG J, et al. *Acinetobacter* sp. DW-1 immobilized on polyhedron hollow polypropylene balls and analysis of transcriptome and proteome of the bacterium during phenol biodegradation process[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4863.
- [19] ALVA V A, PEYTON B M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(19): 4397-4402.
- [20] 陈晓华, 魏刚, 刘思远, 等. 高效降酚菌株 *Ochrobactrum* sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究[J]. 环境科学, 2012, 33(11): 3956-3961.
- [21] 沈娥, 王平, 周豪, 等. 一株耐盐苯酚降解菌的分离、鉴定及耐盐机制研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(2): 377-382.
- [22] 高振贤, 马宏, 贾振华, 等. *Ralstonia metallidurans* CH34 苯酚降解特性的研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 44-47.
- [23] 彭雨花, 任源, 邓留杰, 等. 间甲酚降解菌 *Citrobacter farmeri* 的降解特性及代谢途径解析[J]. 环境化学, 2009, 28(1): 44-48.
- [24] 葛启隆. 波茨坦短芽孢杆菌异养硝化性能与关键酶活性研究[J]. 太原学院学报(自然科学版), 2017, 35(2): 31-35.
- [25] 白静. 粪产碱杆菌降解苯酚、间甲酚的特性及其动力学研究[D]. 天津: 天津大学, 2006.
- [26] WANG L M, LI Y, YU P, et al. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 183(1/2/3): 366-371.
- [27] BASAK B, BHUNIA B, DUTTA S, et al. Kinetics of phenol biodegradation at high concentration by a metabolically versatile isolated yeast *Candida tropicalis* PHB5[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2014, 21(2): 1444-1454.
- [28] 张云波, 吴伟林, 薛蓉蓉, 等. 一株石油烃降解菌的筛选、鉴定及对石油烃模式物的降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(8): 1887-1892.
- [29] 邓维琴, 刘书亮, 姚开, 等. 3-苯氧基苯甲酸降解菌 *Sphingomonas* sp. SC-1 降解苯酚环境条件及其降解中间产物的研究[J].

微生物学通报, 2015, 42(3): 497-503.

[30] 程珂珂, 刘雯, 卫亚红, 等. 邻苯二酚降解菌筛选及其降解特性[J]. 中国农学通报, 2014, 30(26): 165-169.

[31] 颜立敏, 杨春艳, 除炎华, 等. 菌株M降解硝基苯的特性及动力学研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 277-281.

[32] HO K L, LIN B, CHEN Y Y, et al. Biodegradation of phenol using *Corynebacterium* sp. DJ1 aerobic granules[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(21): 5051-5055.

[33] 张玉秀, 蒙小俊, 柴团耀. 苯酚降解菌红球菌(*Rhodococcus* sp.)P1的鉴定及其在焦化废水中的应用[J]. 微生物学报, 2013, 53(10): 1117-1124.

(本文编辑: 曲娜, 郑晓梅, 张利田)

Degradation characteristics and kinetic analysis of phenolic pollutants by *Rhodococcus biphenylivorans* B403

XIE Xiaohang^{1,2}, YE Meng^{1,2}, PAN Hong^{1,2}, XU Songsiheng¹, YANG Hui¹, KE Yujie¹, SONG Huiting^{1,2,*}

1. Hubei Province Key Laboratory of Regional Development and Environment Response, School of Resources and Environment, Hubei University, Wuhan 430062, China

2. State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

*Corresponding author, E-mail: htsong@hubu.edu.cn

Abstract The removal of phenolic pollutants is a key issue in the treatment of industrial wastewater, therefore, characterizing strains with degradation ability of phenolic pollutants is of great significance. In this study, the minimum inhibitory concentrations of *Rhodococcus biphenylivorans* B403 against six phenolic pollutants of phenol, such as m-cresol, catechol, p-nitrophenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol, were determined. The results showed that the minimum inhibitory concentrations of strain B403 on phenol, m-cresol, catechol, p-nitrophenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol were 1 190, 630, 700, 140, 70, 48 mg·L⁻¹, respectively. And strain B403 had stronger tolerability on phenol, m-cresol and catechol than others. Subsequently, the growth and degradation properties of *Rhodococcus biphenylivorans* B403 for these three pollutants under different carbon sources were investigated. The strain B403 could effectively degrade phenol and m-cresol when a phenolic compound was used as the sole carbon source. After 30 h treatment in inorganic salt medium, the degradation rates of phenol, m-cresol and catechol were 97.85%, 100%, 56.54%, respectively. At the presence of other organic carbon sources, the biomass of strain B403 greatly increased, and the degradation efficiency of the three types of phenolic pollutants was significantly improved. After 15 h treatment in the mixed medium of LB-inorganic salt, the degradation rates of phenol, m-cresol and catechol were 98.92%, 99.93%, 94.35%, respectively. To further characterize the properties of strain B403, the Haldane model was used to fit the phenol degradation kinetics under optimal degradation conditions. For phenol degradation by strain B403 at different concentrations, the q_m , K_s and K_i were 0.503 h⁻¹, 270.9 mg·L⁻¹ and 69 mg·L⁻¹, respectively. As to m-cresol and catechol degradation, the q_m , K_s , K_i were 0.672 h⁻¹ and 1.749 h⁻¹, 171.9 mg·L⁻¹ and 541.9 mg·L⁻¹, 23.74 mg·L⁻¹ and 42.61 mg·L⁻¹, respectively. Based on the kinetic equations, the optimum concentrations for phenol, m-cresol and catechol degradation by strain B403 were 136.4, 87.4, 116.1 mg·L⁻¹, respectively. This study indicated that B403 presented stronger degradation ability against phenolic contaminants at the presence of other organic carbon sources, and strain B403 possesses certain application potential in the field of organic wastewater treatment with phenolic pollutants and organic phenol-contaminated soil remediation.

Keywords biodegradation; phenolic pollutants; *Rhodococcus biphenylivorans*; minimum inhibitory concentration; degradation kinetics