



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202107070

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

张牧原, 彭自然, 刘可玉, 等. 高浓度苯酚降解产电菌 ZY07 的筛选及其降解产电特性[J]. 环境工程学报, 2021, 15(10): 3324-3333.

ZHANG Muyuan, PENG Ziran, LIU Keyu, et al. Screening of high-concentration phenol-degrading electrogenic strain ZY07 and its biodegradation and electricity-generating characteristics[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(10): 3324-3333.

## 高浓度苯酚降解产电菌 ZY07 的筛选及其降解产电特性

张牧原<sup>1</sup>, 彭自然<sup>1,✉</sup>, 刘可玉<sup>2</sup>, 何文辉<sup>1</sup>

1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

第一作者: 张牧原(1997—), 男, 硕士研究生。研究方向: 微生物燃料电池。E-mail: 18451112437@163.com

✉通信作者: 彭自然(1978—), 男, 硕士, 讲师。研究方向: 生态修复。E-mail: zrpeng@shou.edu.cn

**摘要** 从以苯酚为燃料且运行至稳定的微生物燃料电池阳极碳毡上筛选驯化获得一株能够降解高浓度苯酚的产电菌株 ZY07, 经 18S rRNA 序列分析, 鉴定该菌为热带假丝酵母菌 (*Candida tropicalis*)。初步探究了菌株 ZY07 的生物学特性和产电特性。结果表明, 经驯化后, 菌株 ZY07 的耐酚质量浓度可达到 2 000 mg·L<sup>-1</sup>, 48 h 基本能完全降解 1 700 mg·L<sup>-1</sup> 的苯酚; 菌株 ZY07 的最适生长及降解条件为: 接菌量为 8%、pH 为 8、温度为 35 ℃。循环伏安分析结果表明, 菌株 ZY07 具有良好的电化活性, 以 ZY07 构建的 MFC 最大输出电压为 0.72V, 最大功率密度达 48.02 mW·m<sup>-2</sup>; 阳极碳毡扫描电镜显示, 产电菌 ZY07 附着在碳毡表面形成生物膜。综合循环伏安和扫描电镜分析结果可推测, 菌株 ZY07 是通过生物膜与电极表面直接接触的方式传递电子。

**关键词** 苯酚降解; 产电微生物; 微生物燃料电池; 真菌

苯酚是众多化工反应的中间体, 是分布最广的酚类挥发性有机物之一, 因其具有长效性、生物累积性和强致癌性, 被列入优先控制污染物<sup>[1-2]</sup>。利用微生物降解苯酚二次污染小<sup>[3]</sup>, 已逐渐成为处理含酚废水的主要方法。目前已发现多种苯酚降解菌, 如假单胞菌 (*Pseudomonas adaceae*)<sup>[4-5]</sup>、芽孢杆菌 (*Bacillus*)<sup>[6-7]</sup>、不动杆菌 (*Acinetobacter*)<sup>[8-9]</sup>、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)<sup>[10]</sup>、酵母菌 (*Yeast*)<sup>[11-12]</sup>、红球菌 (*Rhodococcus*)<sup>[13-14]</sup>, 然而这些降解菌大部分仅适于低浓度含酚废水降解, 高浓度下因微生物生长受抑制导致降解能力下降。近年来也有高浓度苯酚降解菌的研究报道。周江亚等<sup>[15]</sup>筛选出假丝酵母菌, 以 1.5×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 接菌量降解 1.03 g·L<sup>-1</sup> 苯酚, 48 h 降解率达 99.1%; 丁杰等<sup>[16]</sup>筛选出假丝酵母菌, 以 1%(体积比)接菌量, 30 h 可完全降解 1 500 mg·L<sup>-1</sup> 苯酚; 魏炜等<sup>[17]</sup>筛选出酵母菌, 以 6%(体积比)接菌量降解 1 500 mg·L<sup>-1</sup> 苯酚, 24 h 降解率达 86.44%。

微生物燃料电池 (microbial fuel cell, MFC) 利用附着在阳极表面的产电菌氧化分解有机物产生电子, 在降解污染物同时还达到产电效果<sup>[18-19]</sup>。陈柳柳等<sup>[20]</sup>以葡萄糖和苯酚为双底物构建 MFC, 当

收稿日期: 2021-07-13; 录用日期: 2021-09-06

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项 (2017zx07205-003-R07)

苯酚贡献 COD 为  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 苯酚降解率为 99.9%, 库仑效率为 7.2%。汪家权等<sup>[21]</sup>以 MFC 降解  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚,  $35\text{ }^\circ\text{C}$  下降解率达 88%, 输出电压 280 mV, 功率密度达  $30 \text{ mW}\cdot\text{m}^{-2}$ 。产电微生物作为 MFC 核心也受到广泛关注, 已报道的产电菌多达数十种, 其中研究较多的有希瓦氏菌 (*Shewanella*)<sup>[22-24]</sup>, 假单胞菌 (*Pseudomonas adaceae*)<sup>[25]</sup> 等, 但有关真菌的报道较少。殷赞等<sup>[26]</sup>在 2010 年首次发现酒精酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 可用于 MFC 产电, 2015 年 LEE 等<sup>[27]</sup>发现假丝酵母菌 (*Candida*) 接种 MFC 可产生 200~250 mV 的电压。产电微生物消耗分解有机碳源是 MFC 运行的基础<sup>[19]</sup>, 以苯酚为唯一碳源筛选具有高效降解性的产电菌株将为苯酚废水处理与能源节约提供新思路。

本研究以上海海滨污水处理厂进样区污泥为底物构建 MFC, 从阳极生物膜上分离驯化一株可降解高浓度苯酚的产电菌 ZY07, 经鉴定后分析其生长特性及最适降解条件, 并对其产电性做初步探讨, 以期为 MFC 处理高浓度苯酚废水提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基及缓冲液

液体富集培养基:  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  牛肉膏、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蛋白胨、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚、 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸铁, 调节 pH 为 7.2。筛选驯化苯酚培养基:  $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ 、 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ 、 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、苯酚(按实验所需加入), 调节 pH 为 7.2。分离纯化固体苯酚培养基为液体培养基中加入  $18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂粉。阳极缓冲液:  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚、 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、 $0.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl。阴极缓冲液:  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  铁氰化钾、 $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、 $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl、 $1.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 。

### 1.2 产电微生物的富集

采用双室微生物燃料电池, 阳极室接种污泥样品并加入  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚, 阴极室加入阴极缓冲液, 待电池电压稳定时取出阳极室碳毡, 用接种环刮取生物膜, 重悬于无菌水。以 4% 接种量接种于液体富集培养基,  $30\text{ }^\circ\text{C}$  下培养 24 h 后稀释涂布于固体培养基,  $30\text{ }^\circ\text{C}$  下培养 48 h, 挑选形态和颜色差异明显的单菌落分别接种至富集培养基, 培养 3~5 代得到若干纯菌株。

### 1.3 苯酚降解菌的驯化与筛选

将初步筛选后的纯菌株接种至富集培养基, 培养至对数生长期取适量菌液离心, 收集菌体重悬于生理盐水, 接种于  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚培养基,  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下培养 24 h, 取 0.1 mL 菌液涂布于固体苯酚培养基培养 24 h 后观察固体平板, 若有菌落生成, 则以  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度梯度逐步提高培养基苯酚浓度继续驯化, 若无菌落生成, 则结束该菌株培养。经驯化筛选得优势纯菌株 ZY07。

### 1.4 菌株的鉴定

菌液经稀释后涂布于固体苯酚培养基,  $30\text{ }^\circ\text{C}$  下培养 48 h 观察其菌落特征。采用扫描电镜观察其单一菌体表面形态。采用上游引物 ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG 和下游引物 ITS4: TCCTCCGCTTATIGATATGC 进行 PCR 扩增, 由上海生工生物工程股份有限公司进行 18S rRNA 测序, 测序结果提交至 Gen bank 中进行同源性序列比对, 利用 Mega 软件构建系统发育树。

### 1.5 菌株降解苯酚特性

1) 菌株生长曲线和苯酚降解曲线。取 3%(所占苯酚培养基体积比, 1% 接菌量对应菌落总数为  $3\times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 干菌量为  $56.43 \text{ mg}$ ) 对数生长期菌液以  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  速率离心, 所得菌体重悬于生理盐水并接种于  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚培养基,  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下培养 24 h, 间隔 2 h 取样。

2) 最适苯酚降解条件及 COD 去除比较。取对数生长期菌液接种于苯酚培养基,  $160 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下培养进行单因素实验, 初始苯酚质量浓度为 100、300、500、800、1100、1400、1700、2000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;

pH为3、4、5、6、7、8、9、10、11；温度为20、25、30、35、37、40℃；接菌量为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%。另以500 mg·L<sup>-1</sup>苯酚作为研究对象，30℃、160 r·min<sup>-1</sup>下培养24 h，6 h间隔取样，比较苯酚降解率和COD去除率。以上实验均在摇瓶中进行，设置3组平行和3个无菌对照。

### 1.6 菌株产电特性

1) 菌株循环伏安分析。将菌株与碳毡在富集培养基中培养，用电化学工作站定期进行循环伏安扫描，通过氧化还原峰表征电化学活性。以负载对数生长期菌株的碳毡为工作电极，铂电极为对电极，Ag/AgCl电极为参比电极，扫描速率为100 mV·s<sup>-1</sup>，扫描电压为-0.8~0.8 V。

2) MFC的菌株接种与运行。双室微生物燃料电池反应器阴阳极室均为100 mL，电极材料为碳毡。将菌液与阳极缓冲液按一定比例混合加入阳极室，阴极室加入阴极缓冲液，30℃下运行记录MFC电压变化。调节外接电阻阻值测量对应的输出电压，绘制极化曲线和功率密度曲线。

3) 阳极碳毡扫描电镜。将稳定运行的MFC阳极碳毡取出，用叔丁醇和戊二醛法制备扫描电镜样品<sup>[28]</sup>，用扫描电子显微镜在5.00 kV的加速电压下进行表面形态观察。

### 1.7 分析测定方法

1) 采用紫外分光光度法在600 nm波长处测定菌液吸光度(OD<sub>600</sub>)表示菌体生物量；用4-氨基安替比林直接分光光度法测定苯酚质量浓度<sup>[29]</sup>；取4 mL菌液离心后弃掉上清液，加入4 mL无酚水超声萃取10 min，离心取上清液测定吸附苯酚质量浓度<sup>[30]</sup>。苯酚表观去除率、吸附率、被氧化损失率和降解率根据式(1)~式(4)计算。

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

$$\alpha = \frac{C_a \times \frac{V_m}{V_n}}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$\beta = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$\delta = \eta - \alpha - \beta \quad (4)$$

式中： $\eta$ 为表观去除率； $C_0$ 为初始苯酚质量浓度，mg·L<sup>-1</sup>； $C$ 为反应后表观苯酚质量浓度，mg·L<sup>-1</sup>； $\alpha$ 为吸附率； $C_a$ 为菌体萃取液中苯酚质量浓度，mg·L<sup>-1</sup>； $V_m$ 、 $V_n$ 分别为萃取剂、取样体积，mL； $\beta$ 为被氧化损失率； $C_t$ 为氧化后苯酚质量浓度，mg·L<sup>-1</sup>； $\delta$ 为微生物降解率。

2) MFC输出电压用数据采集器采集，电阻箱调节阻值。电流密度和功率密度根据式(5)和式(6)计算。

$$I = \frac{U}{RA} \quad (5)$$

$$P = \frac{U^2}{RA} \quad (6)$$

式中： $I$ 为电流密度，A·m<sup>-2</sup>； $P$ 为功率密度，mW·m<sup>-2</sup>； $U$ 为测量电压，V； $R$ 为外接电阻阻值， $\Omega$ ； $A$ 为电极面积，m<sup>2</sup>。

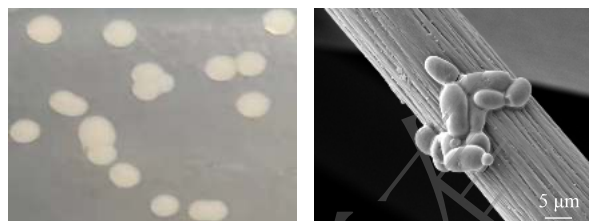
## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离鉴定

筛选所得菌株ZY07的菌落形态如图1(a)所示。可见，菌落呈卵圆或椭圆状，边缘整齐，不透明乳白色。由扫描电镜图1(b)可见，菌体呈不透明椭圆状，颜色较为均一，且菌体之间相互黏

接，可明显看到液泡存在。

对菌株 ZY07 的 18S rRNA 片段进行 PCR 扩增，测序后将序列提交至 Gen bank，序列号为 (MZ373278)。序列进行同源性比对，选取模式菌株序列构建系统发育树如图 2 所示，可见，菌株 ZY07 与热带假丝酵母菌 (*Candida tropicalis*) 汇聚于同一分支中，且序列同源性高达 100%。因此，菌株 ZY07 属于假丝酵母菌属 (*Candida*) 的热带假丝酵母菌 (*Candida tropicalis*)。



(a) ZY07菌落形态 (b) ZY07扫描电镜图

图 1 菌株 ZY07 的菌落形态及扫描电镜图

Fig. 1 Colcolony morphology and SEM image of strain ZY07

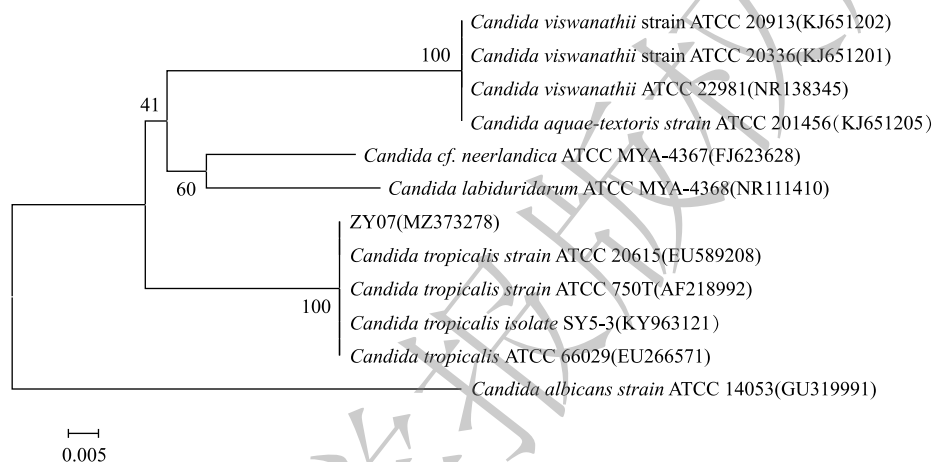


图 2 菌株 ZY07 基于 18S rRNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 18S rRNA sequence of the strain ZY07

## 2.2 生物学特性

1) 生长曲线和苯酚降解曲线。菌株 ZY07 的生长曲线和苯酚降解曲线如图 3 所示。对数生长期是研究菌株生物学特性的最佳时期。可见，ZY07 约 12 h 结束对数生长期，期间内生长迅速且 12 h 后仍保持良好的生物量。当 ZY07 处于对数生长期时苯酚质量浓度迅速降低，仅 12 h 降解率达 95.5%，说明菌株 ZY07 具备降解高浓度苯酚的潜力。

2) 初始浓度的影响。不同初始浓度下苯酚降解菌 ZY07 生物量变化如图 4 所示。在 0~12 h，不

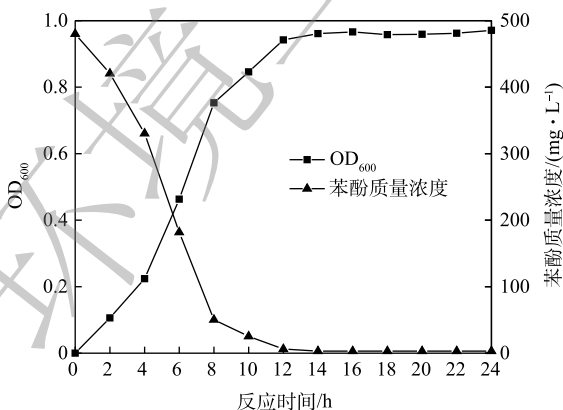


图 3 菌株 ZY07 生长曲线和苯酚降解曲线的关系

Fig. 3 Relationship between strain ZY07 growth curve and phenol degradation curve

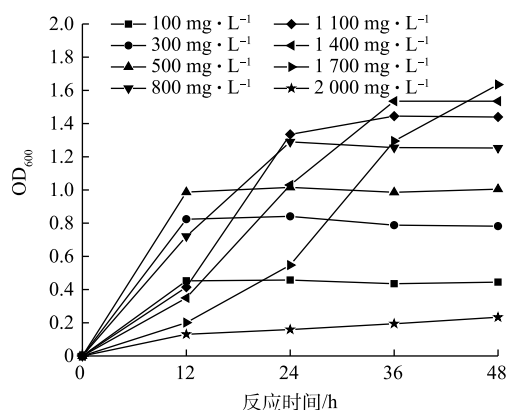


图 4 初始苯酚浓度对菌株 ZY07 生长的影响

Fig. 4 Influence of the initial phenol concentration on the growth of strain ZY07



同浓度苯酚对菌株产生显著影响。作为唯一碳源，苯酚质量浓度为  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时对微生物生长起促进作用，生物量随苯酚浓度增加而增加，此时 ZY07 可以充分利用低浓度苯酚碳源获取营养<sup>[31]</sup>。但苯酚质量浓度低至  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，因无法满足微生物需求导致生物量增长较小<sup>[32]</sup>。当苯酚质量浓度为  $800\sim 2\,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，ZY07 生长受到抑制， $2\,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时生长最缓，仅增长 13%。苯酚质量浓度越高，毒害作用越强，微生物生长代谢越缓慢<sup>[33]</sup>。值得注意的是，ZY07 并未因为苯酚浓度升高而停止生长，只是延长了缓慢生长期，当苯酚质量浓度为  $800\sim 1\,700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，生长曲线大致呈 S 形，即使在  $1\,700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，ZY07 也可在 24~36 h 内达到对数生长期。

初始浓度对苯酚降解的影响如图 5 所示。可见， $100$ 、 $300$  和  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚在 12 h 降解趋于完全， $800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚降解率约为 50%，而  $1\,100$ 、 $1\,400$  和  $1\,700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苯酚降解率仅 20% 左右。对比图 4 和图 5， $100\sim 1\,700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时 ZY07 的生长和降解曲线变化呈一致趋势，降解率快速上升阶段与对数生长期相对应，且 ZY07 生长至稳定期时苯酚也达到最大程度降解。以上结果均说明，ZY07 具有良好的耐酚性和降解高浓度苯酚特性。

3) pH 的影响。酸碱环境变化可影响微生物新陈代谢和生长状况<sup>[34]</sup>。如图 6 所示，随着 pH 的升高，ZY07 生物量及苯酚降解率均呈现先上升后下降的趋势。pH 的变化可影响微生物胞外酶活性，进而影响微生物生长及其对污染物的降解<sup>[35-36]</sup>。中性环境下 ZY07 的生物量和苯酚降解率显著提升，当 pH 为 8 时，培养 9 h 后 ZY07 生物量达到最高，苯酚降解率达 69.1%。随着 pH 的进一步增大，ZY07 生物量和苯酚降解率显著降低。当 pH 为 11 时，苯酚降解率仅 6.8%。此外，还发现反应后菌液最终 pH 均有所降低，这是由于微生物降解苯酚过程中生成如羟基黏酸、酮基己二酸、酮基戊酸等有机酸的中间产物<sup>[37]</sup>。

4) 温度的影响。温度是影响微生物酶学性质的重要因素。由图 7 可见，不同温度下 ZY07 生物量与苯酚降解率的变化趋势较为一致；培养 9 h 后， $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 ZY07 的生物量和降解率均达到最大，苯酚降解率 86.9%。 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下 ZY07 生长最为缓慢，降解率仅 11%，温度过低时微

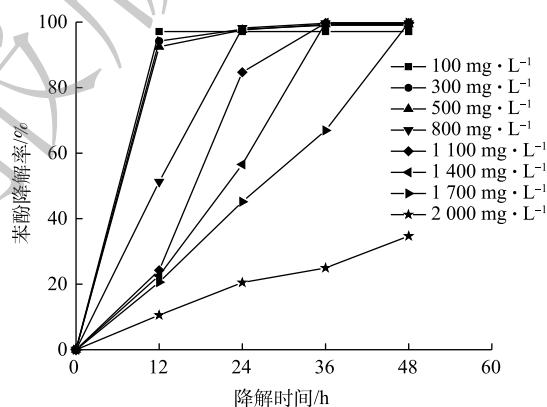


图 5 初始苯酚浓度对苯酚降解的影响

Fig. 5 Influence of the initial phenol concentration on phenol degradation

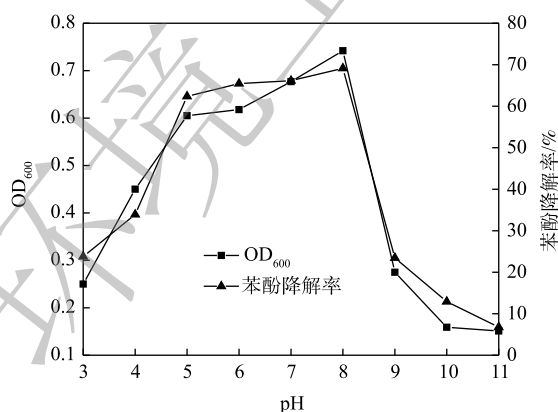


图 6 pH 对菌株 ZY07 生长及苯酚降解的影响

Fig. 6 Influence of pH on the growth of strain and phenol degradation

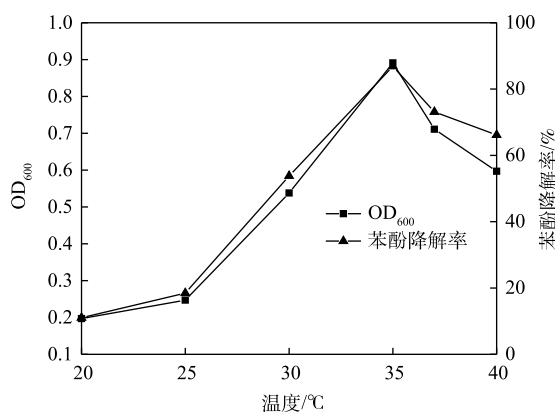


图 7 温度对菌株 ZY07 生长及苯酚降解的影响

Fig. 7 Influence of temperature on the growth of strain ZY07 and phenol degradation

生物产酶活性受到抑制<sup>[38]</sup>。随着温度的提高，ZY07 生物量和苯酚降解率不断上升。但当温度大于 35 ℃ 时，生物量和降解率均明显降低，这是因为高温影响微生物酶活和酶促反应，从而影响有机物代谢<sup>[39]</sup>。

5) 接菌量的影响。不同接菌量对 ZY07 的影响如图 8 所示。可见，生物量和降解率整体变化均呈上升趋势。当接菌量为 2%~8% 时，ZY07 生物量持续增长，且以 8% 接菌量培养 9 h 后，苯酚降解率可达 99.3%，故 8% 为 ZY07 降解苯酚的最适接菌量。接菌量继续增大时生物量和降解率略微降低，这可能是由于：当碳源量一定时，微生物之间竞争作用使其生长受到抑制<sup>[37]</sup>。

6) 苯酚降解率和 COD 去除率对比结果如图 9 所示。可见，COD 去除率小于苯酚降解率。培养 12 h 后，苯酚几乎降解完全，COD 去除率仅为 74.5%；继续培养至 24 h，苯酚降解率变化不大，COD 去除率仍不断上升，这说明苯酚降解完全时 COD 仍未完全去除。在降解过程中，有机酸等中间产物的存在使得 COD 去除率低于苯酚降解率<sup>[37]</sup>。

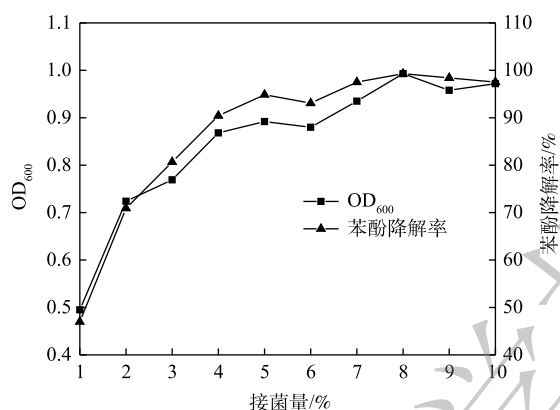


图 8 接菌量对菌株 ZY07 生长及苯酚降解的影响

Fig. 8 Influence of inoculation amount on the growth of strain ZY07 and phenol degradation

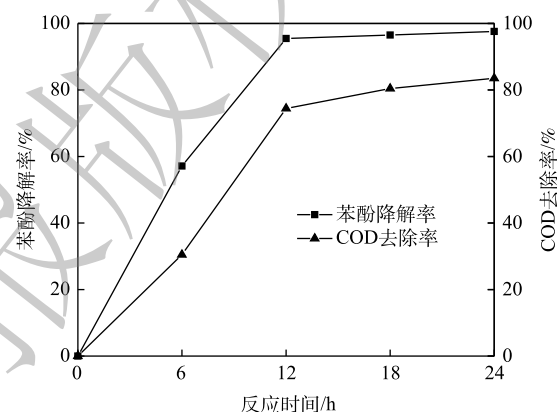


图 9 苯酚降解率与 COD 去除率对比

Fig. 9 Comparison of phenol degradation rate and COD removal rate

### 2.3 产电特性

1) 循环伏安分析。ZY07 的电化学活性可通过循环伏安分析表征，图 10 为不同生长时期 ZY07 的循环伏安曲线。可见，CV 曲线氧化峰为 0.15~0.25 V，还原峰为 -0.4~-0.6 V。峰值随培养时间的增加而增加，氧化还原活性不断增强。有研究表明，假丝酵母菌通过好氧呼吸代谢降解苯酚<sup>[40]</sup>，并通过生物膜与材料接触直接传递电子<sup>[41]</sup>，随着时间的增加，生物膜逐渐发育成熟，电子转移效率随之提高。

2) MFC 产电分析。以 1 000 mg·L<sup>-1</sup> 苯酚为唯一碳源接种 ZY07 构建 MFC，其产电状况如图 11 所示。可见，阳极缓冲液加入后电压快速上升，随着苯酚不断消耗，电压缓慢下降。周期结束更换阳极缓冲液后，峰值电压较前一周期均有所增加，运行至第 4 周期时最大可产生 0.72 V 开路电压。在 MFC 稳定输出阶段绘制极化曲线和功率密度曲线，如图 12 所示，当外接电阻为 500 Ω 时，功率密度最大达到 48.02 mW·m<sup>-2</sup>。姜允斌等<sup>[42]</sup>筛选出土壤产电菌

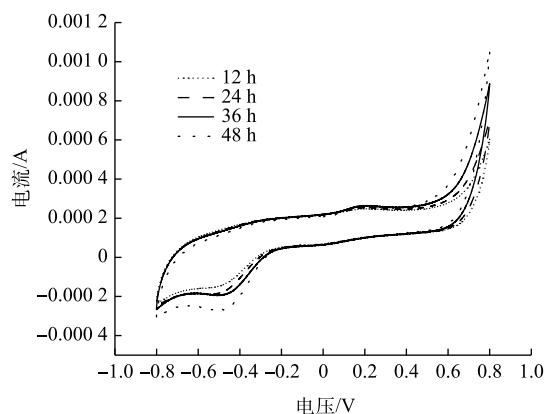


图 10 菌株 ZY07 不同生长时期的循环伏安曲线

Fig. 10 Cyclic Voltammogram during different growth periods of strain ZY07

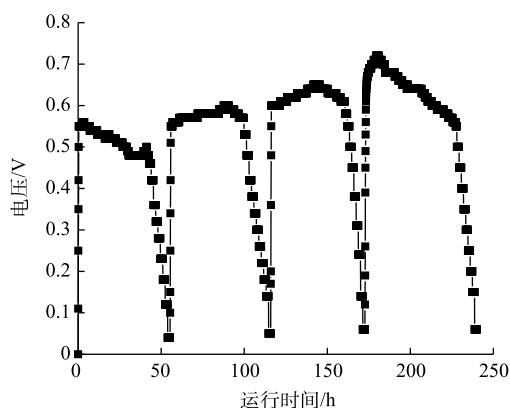


图 11 菌株 ZY07 构建 MFC 的输出电压

Fig. 11 Output voltage of MFC built by strain ZY07

最大输出功率为  $44.42 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ ，并认为 MFC 产电能力的关键在于阳极电子传递方式，纳米导线传递能使产电菌在阳极表面形成多层生物膜，产电性能较优。此外，电极材料、面积及装置构造等因素也会影响产电能力。MFC 系统阳极苯酚降解结果如图 13 所示。可见，产电同时苯酚不断消耗， $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  苯酚在 MFC 运行 36 h 后几乎降解完全。以上结果均说明，以苯酚为碳源接种 ZY07 的 MFC 具有良好的降酚和产电特性。

3) 阳极碳毡扫描电镜分析。生物膜的形成分为黏附、起始、成熟、分散 4 个阶段。对不同运行阶段 ZY07 所构建 MFC 的阳极碳毡进行生物膜扫描电镜观察，结果如图 14 所示。由图 14(a) 可以看出，碳毡内部呈长条状相互交错，该结构有利于微生物在其表面负载形成生物膜。如图 14(b) 所示，6 h 后在碳毡表面仅观察到少量零散无规则菌体，此时生物膜处于黏附阶段，菌体呈个体分布，在黏附过程中，生物膜极容易受到破坏而回到游离状态<sup>[43]</sup>。如图 14(c) 所示，24 h 后单个菌体开始相互连接形成微菌落，菌丝不断增殖，入侵材料表面并逐渐成为生物膜的基底层。碳毡表面出现菌体掉落的痕迹，进一步说明菌丝的黏性与入侵性提升了生物膜的抗压性<sup>[44]</sup>。如图 14(d) 所示，在生物膜发育至 72 h 时，碳毡表面出现类似连接体的基质，这是假丝酵母菌产生的胞外基质包裹覆盖菌体，菌落相互融合形成成熟的生物膜<sup>[45]</sup>。

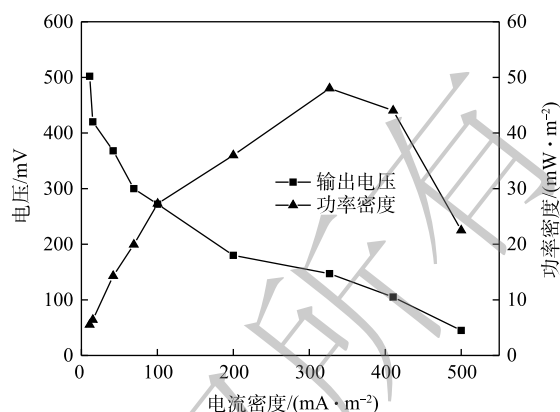


图 12 菌株 ZY07 构建 MFC 的极化曲线和功率密度曲线

Fig. 12 Polarization curve and power density curve of MFC built by strain ZY07

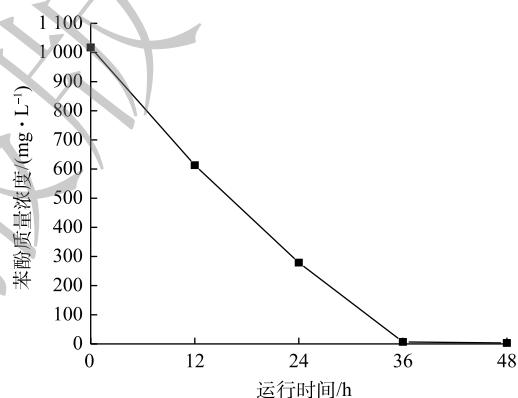


图 13 菌株 ZY07 构建 MFC 的苯酚降解曲线

Fig. 13 Phenolic degradation curve of MFC built by strain ZY07

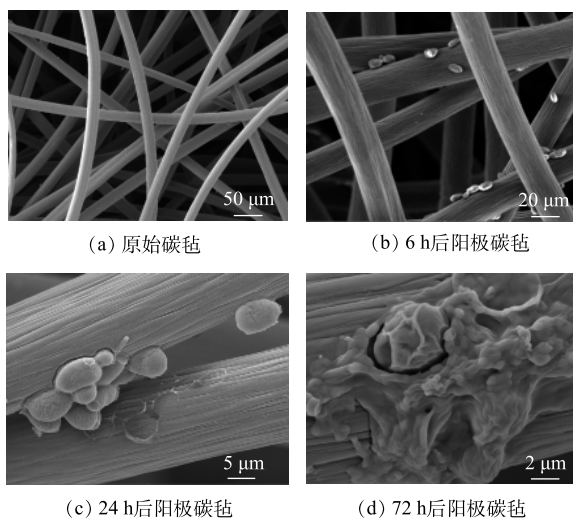


图 14 不同运行阶段 MFC 阳极生物膜扫描电镜图

Fig. 14 SEM images of MFC anode biofilm at different operation stages

通过阳极生物膜扫描电镜分析可初步推断 ZY07 电子传递机制。产电微生物电子转移机制主要有直接电子转移和间接电子转移 2 种, 其中直接电子转移又可以分为生物膜接触传递如希瓦氏菌 (*Shewanella*)<sup>[46]</sup> 和纳米导线接触传递如地杆菌 (*Geobacteraceae*)<sup>[47]</sup>, 而铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 则是典型的借助自身产生绿脓素作为电子介体进行的间接电子传递<sup>[48]</sup>。有研究<sup>[41, 49]</sup>表明, 假丝酵母菌可通过生物膜直接接触的方式转移电子, ZY07 在碳毡表面形成成熟的生物膜, 属于生物膜接触式直接电子传递, 但其具体的电子转移方式还有待进一步探究。

### 3 结论

1) 筛选出一株可降解高浓度苯酚的产电菌 ZY07, 经 18S rRNA 鉴定为假丝酵母菌属的热带假丝酵母菌。

2) ZY07 在 12 h 内达到对数生长期, 温度为 35 °C、接种量为 8%、pH 为 8 是 ZY07 生长及降解苯酚的最适条件, 48 h 基本能完全降解 1 700 mg·L<sup>-1</sup> 的苯酚, ZY07 对浓度高达 2 000 mg·L<sup>-1</sup> 的苯酚具有耐受性。

3) ZY07 所构建 MFC 可产生最大输出电压 0.72 V, 最大功率密度 48.02 mW·m<sup>-2</sup>。据循环伏安曲线和扫描电镜结果推测, ZY07 的电子传递机制为生物膜接触式直接传递。

### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 苏琼, 江子骏. 高效苯酚降解菌的筛选及其降解特性分析[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(6): 567-571.
- [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] MOHANTY SS J H. Biodegradation of phenol by free and immobilized cells of a novel *Pseudomonas* sp. NBM11[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2017, 34(1): 75-84.
- [5] 曹宏明, 龚斌, 朱丽娟, 等. 红树林根际土壤中耐高盐苯酚降解菌的分离鉴定[J]. *应用海洋学报*, 2021, 40(2): 179-188.
- [6] 王丽丽, 国巍, 付春娜, 等. 可降解苯酚的产电芽孢杆菌WL027的分离筛选及其产电机制初探[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2016, 42(6): 654-664.
- [7] KE Q, ZHANG Y, WU X, et al. Sustainable biodegradation of phenol by immobilized *Bacillus* sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 222: 185-189.
- [8] 贺强礼, 刘文斌, 杨海君, 等. 一株苯酚降解菌的筛选鉴定及响应面法优化其降解[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(1): 112-123.
- [9] VAN DEXTER S, BOOPATHY R. Biodegradation of phenol by *Acinetobacter tandonii* isolated from the gut of the termite[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(33SI): 34067-34072.
- [10] 母显杰, 丁舒心, 许继飞, 等. 耐盐苯酚降解菌 *Staphylococcus* sp. 的分离及降解特性[J]. *环境化学*, 2020, 39(7): 1985-1995.
- [11] PATEL A, SARTAJ K, ARORA N, et al. Biodegradation of phenol via meta cleavage pathway triggers de novo TAG biosynthesis pathway in oleaginous yeast[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 340: 47-56.
- [12] GOMES E SILVA N C, DE MACEDON A C, TELES PINHEIRO A D, et al. Phenol biodegradation by *Candida tropicalis* ATCC 750 immobilized on cashew apple bagasse[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2019, 7: 1030763.
- [13] 魏霞, 周俊利, 谢柳, 等. 苯酚降解菌CM-HZX1菌株的分离、鉴定及降解性能研究[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(9): 3193-3199.
- [14] ZHAO T, GAO Y, YU T, et al. Biodegradation of phenol by a highly tolerant strain *Rhodococcus ruber* C1: Biochemical characterization and comparative genome analysis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111709.
- [15] 周江亚, 李娟, 于晓娟, 等. 高浓度苯酚降解菌 *Candida tropicalis* Z-04 的鉴定及其对苯酚降解条件的优化[J]. *环境污染与防治*, 2011, 33(2): 12-17.
- [16] 丁杰, 郝艳, 孟繁华, 等. 假丝酵母菌对高浓度苯酚的降解效果及 SDS 对其生长影响[J]. *环境监测管理与技术*, 2018, 30(1): 65-67.
- [17] 魏炜, 李萌, 董家利, 等. 降酚酵母菌驯化筛选及其降酚性能[J]. *沈阳建筑大学学报(自然科学版)*, 2013, 29(6): 1122-1127.
- [18] 李蕾, 王辉, 朱丹丹, 等. 传质对土壤微生物燃料电池的产电性能及阿特拉津降解的影响[J]. *东南大学学报(自然科学版)*, 2018, 48(3): 455-462.
- [19] WANG J, LIU X. Treatment of the real boiler cleaning wastewater in an anaerobic fluidized bed microbial fuel cell: Organic matter degradation, bioelectrochemistry, and kinetics[J]. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2019, 97(12): 2994-3001.
- [20] 陈柳柳, 徐源, 杨倩, 等. 微生物燃料电池对苯酚的降解及其产电性能



- [J]. 化工环保, 2015, 35(1): 1-5.
- [21] 汪家权, 夏雪兰, 丁巍巍. 微生物燃料电池处理苯酚废水运行条件研究[J]. 环境科学学报, 2010, 30(4): 735-741.
- [22] 黄亦馨, 李晓, 赵津莹, 等. 一株耐盐产电菌 *Shewanella algae* E-1 的分离及其产电特性分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 351-361.
- [23] 王再明, 王健鑫, 苑文凤, 等. 兼性厌氧海洋细菌 *Shewanella* sp. N3B\_R 的分离鉴定及产电性能分析研究[J]. 海洋与湖沼, 2021, 52(1): 175-185.
- [24] 张宗斌, 岳正波, 吴景行, 等. 1株海洋产电菌 *Shewanella* XMS-1 的特性分析[J]. 环境工程, 2021, 39(1): 33-39.
- [25] JAYAPRIYA J, RAMAMURTHY V. Use of non-native phenazines to improve the performance of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2474 catalysed fuel cells[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124: 23-28.
- [26] 殷赟, 刘宜胜, 王一非, 等. 直接微生物燃料电池酒精酵母产电及驯化[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 412-414.
- [27] LEE Y, KIM T G, CHO K. Isolation and characterization of a novel electricity-producing yeast, *Candida* sp. IR11[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 192: 556-563.
- [28] 谢风莲, 汤建安, 胡汉华. 单用叔丁醇和戊二醛的扫描电镜样品制备技术探讨[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(12): 1735.
- [29] FAYIDH M A, KALLARY S, BABU P A S, et al. A rapid and miniaturized method for the selection of microbial phenol degraders using colourimetric microtitration[J]. *Current Microbiology*, 2015, 70(6): 898-906.
- [30] 薛潮, 唐锦平, 曹若愚, 等. 邻苯二甲酸二乙酯的微生物降解与吸附性能研究[J]. 环境污染与防治, 2019, 41(5): 526-530.
- [31] 姜立春, 阮期平, 袁利娟, 等. 高效降酚菌株 JY03 的筛选及其降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(8): 1912-1916.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 璇绍雷, 孙宝盛, 赵双红, 等. pH 对间歇进水序批式生物反应(SBR)工艺活性污泥沉降性能和微生物结构的影响[J]. 环境化学, 2016, 35(3): 508-515.
- [35] PIMDA W, BUNNAG S. Biodegradation of waste motor oil by *Nostoc hatei* strain TISTR 8405 in water containing heavy metals and nutrients as co-contaminants[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2015, 28: 117-123.
- [36] VALENZUELA J F, PINUER L, CANCINO A G, et al. Effect of pH and dilution rate on specific production rate of extra cellular metabolites by *Lactobacillus salivarius* UCO-979C in continuous culture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(15): 6417-6429.
- [37] 张安龙, 王晔, 王雪青, 等. 一株高效苯酚降解真菌的分离鉴定及其菌剂的制备[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 1450-1461.
- [38] 王少峰, 石先阳. 酸性条件下苯酚降解菌的降解特性及动力学分析[J]. 生物学杂志, 2013, 30(3): 24-28.
- [39] 刘国生, 郝晓洁, 段佩玲, 等. 苯酚降解菌 UW7 的鉴定及对苯酚的降解作用[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(1): 118-120.
- [40] 梁树才, 杨宝玉, 刘海舟, 等. 热带假丝酵母 8953 菌株对苯酚的降解特性研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(3): 27-28.
- [41] PRASAD D, ARUN S, MURUGESAN M, et al. Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(11): 2604-2610.
- [42] 姜允斌, 邓欢, 黄新琦, 等. 一株土壤产电菌 *Clostridium sporogenes* 的分离及其产电性能[J]. 微生物学报, 2016, 56(5): 846-855.
- [43] 华可心, 于淑颖, 徐英春. 白念珠菌生物被膜的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2021, 16(1): 56-59.
- [44] KATHERINE L, JIGAR V D, JONATHAN S F, et al. Microscopy of fungal biofilms[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 100-107.
- [45] GULATI M, NOBILE C J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms[J]. *Microbes and Infection*, 2016, 18(5): 310-321.
- [46] DI M, LEI C, FENG Z, et al. Enhancing extracellular electron transfer of *shewanella oneidensis* MR-1 through coupling improved flavin synthesis and metal-reducing conduit for pollutant degradation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(9): 5082-5089.
- [47] 刘远峰, 张秀玲, 张其春, 等. 微生物燃料电池中阳极产电菌的研究进展[J]. 精细化工, 2020, 37(9): 1729-1737.
- [48] 乔亚娟. 基于粉末微电极的铜绿假单胞菌阳极界面自介导电子传递机理研究[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [49] HUBENOVA Y, MITOV M. Mitochondrial origin of extracellular transferred electrons in yeast-based biofuel cells[J]. *Bioelectrochemistry*, 2015, 106: 232-239.

(责任编辑: 曲娜)

## Screening of high-concentration phenol-degrading electrogenic strain ZY07 and its biodegradation and electricity-generating characteristics

ZHANG Muyuan<sup>1</sup>, PENG Ziran<sup>1,\*</sup>, LIU Keyu<sup>2</sup>, HE Wenhui<sup>1</sup>

1. School of Marine Ecology and the Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. School of Food, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

\*Corresponding author, E-mail: zrpeng@shou.edu.cn

**Abstract** An electrogenic strain ZY07 capable of degradation high concentration phenol was screened from the anodic carbon felt in a stable running microbial fuel cells with phenol as fuel and domesticated, 18S rRNA analysis showed that the bacteria was the *Candida tropicalis*. The biological characteristics and electrical production properties of the strain ZY07 were preliminarily investigated. The results showed that the phenol resistant concentration of strain ZY07 could reach 2 000 mg·L<sup>-1</sup>, and this strain could almost completely degrade 1 700 mg·L<sup>-1</sup> in 48 h after domestication; The best growth and phenol-degrading conditions of strain ZY07 were following: the receiving volume of 8% , initial pH 8 and 35 °C; cyclic voltammogram analysis showed that strain ZY07 had a good electrochemical activity, the maximum voltage output of MFC built by ZY07 was 0.72V, and the maximum power density could reach 48.02 mW·m<sup>-2</sup>; the scanning electric microscope of anode carbon felt showed that ZY07 attached to the carbon felt surface to form biofilms; based on the cyclic voltammogram and SEM results, it is speculated that the strain ZY07 transmits the electrons through the direct contact between the biofilm and the electrode surface.

**Keywords** phenol degradation; current-producing microbe; microbial fuel cell; fungi