2 ,6-二叔丁基酚降解菌的降解特性研究

方振炜[1] ,徐德强[2*] ,张亚雷[1] ,肖义平[2] ,赵建夫[1]

(1 . 同济大学污染控制和资源化研究国家重点实验室 ,上海 200092 , E-mail :fangzhw @eyou .com ; 2 . 复旦大学生命科学学院 ,上海 200433)

摘要 :从腈纶废水处理构筑物的生物膜中分离 、筛选得到 1 株能降解 2 ,6-二叔丁基酚的菌株 ,经驯化 ,其对 2 ,6-二叔丁基酚的降解率提高了 26 % ,具有了较高降解能力 .经形态和生理生化鉴定 ,该菌株属于产碱菌属(*Alcaligenes* sp .) .通过摇瓶试验考察了生长条件对菌株的生长和底物降解的影响 ,得出该菌株的最适生长条件为温度 37 ℃ ,初始 pH 为 7.0 ,接种量为 0.1 % .在该条件下 ,对初始底物浓度为 100 mg/ L 的降解过程进行了考察 ,结果表明其 11 d 的降解率达 62.4 % ,而且降解过程符合 Eckenfelder 动力学模型 ,半衰期为 9.38 d .还对不同初始底物浓度对菌株降解性能的影响进行了研究 ,结果表明最佳初始底物浓度为 200 mg/ L ,当小于该值时 ,初始底物浓度的增加促进该菌株的生长和底物的降解 ,而当大于这个值时 ,则起抑制作用 .

关键词 :2 ,6-二叔丁基酚 ;生物降解 ;产碱菌

中图分类号 : X172 文献标识码 : A 文章编号 :0250-3301(2004)03-0098-04

The Degradation Characteristics of Degrading Bacterium of 2 , 6-Di-tert-butylphenol

FANG Zhen-wei[1] , XU De-qiang[2*] , ZHANG Ya-lei[1] , XIAO Yi-ping[2] , ZHAO Jian-fu[1]

(1 . State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse , Tongji University , Shanghai 200092 , China E-mail : fangzhw @eyou .com ; 2 . School of Life Science , Fudan University , Shanghai 200433 , China)

Abstract : A degrading bacterial strain F-3-4 for 2 , 6-Di-tert-butylphenol (2 , 6-DTBP) was isolated from biofilm in acrylic fiber wastewater treatment structures . By acclimation , its capacity for degradation of 2 ,6-DTBP was enhanced by 26 % . It was identified as *Alcaligenes* sp . according to morphological , physiological and biochemical characters . By tests in shaking flasks , the effects of the conditions of growth was studied , and it was determined that the optimum conditions of growth for the strain was 37 ℃ , pH 7.0 and inoculum amount 0.1 % . Under these conditions , the kinetics of degradation for 2 ,6-DTBP of initial concentration 100 mg/ L was studied , and the result indicated that the removal rate of 2 ,6-DTBP within 11 days was 62.4 % , and the degradation process followed Eckenfelder kinetics . The half life of 2 ,6-DTBP was 9.38 days . The effect of initial concentration on degradation ability of the strain also was investigated . The results showed that the optimum initial concentration was 200 mg/ L . When the initial concentrations were below it , the growth of strain and removal of 2 ,6-DTBP increased with the increase of initial concentration , while when above the value , they were inhibited .

Key words : 2 ,6-Di-tert-butylphenol ; biodegradation ; *Alcaligenes* sp . strain F-3-4

酚类物质被广泛地用在钢铁 、制药 、石化和农药等行业 ,是这些行业废水中的主要有毒有害成分之一 .含酚废水通常污染水源 ,毒死鱼虾 ,危害农作物 ,并严重威胁人类的健康 .国内外许多学者对这类物质的生物降解进行了研究[1~6] ,但其中对 2 ,6-二叔丁基酚的生物降解研究还鲜有报道 .2 ,6-二叔丁基酚在制药 、化纤和橡胶行业上广泛地被作为中间媒介 ,用在制备抗氧化剂 、抗紫外剂上 ,是这些行业排放的污染物之一 .该物质对水体中的鱼类 、藻类和微生物有很大的毒害作用[7] ,而且难生物降解[8] .本研究针对上海某石化腈纶厂的废水 ,从该厂的废水处理构筑物生物膜中经分离 、筛选和驯化获得一株高效 2 ,6-二叔丁基酚降解菌 ,并对其降解性能进行了研究 ,为进一步开展此类废水的工业化处理提供良好的微生物菌源 .

1 材料和方法

1.1 供试底物

2 ,6-二叔丁基酚(分析纯 ,北京助剂研究所) .

1.2 培养基

肉汤培养基成分见文献[9] .

Bushnell-Hass(B .H .) 基础培养基成分如下[10] : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.2g ; KH_2PO_4 ,1g ; $(NH_4)_2SO_4$,1g ; $CaCl_2$,0.02g ; K_2HPO_4 ,1g ; $FeCl_3$,2 滴浓缩液 ;蒸馏

收稿日期 :2003-08-28 ;修订日期 :2003-12-04
基金项目 :国家自然科学基金资助项目(50008011)
作者简介 :方振炜(1980 ~) ,男 ,硕士研究生 ,主要研究方向为水污染控制技术 .
* 通讯联系人

水 1 L.

1.3　微生物来源

采自上海某石化腈纶厂废水处理站的塔式生物滤池和沉淀池水,经分离和筛选得到 1 株能降解 2,6-二叔丁基酚的 F-3-4 菌株.

1.4　菌悬液的制备

将 37 ℃下生长 24h 的斜面菌种接种到装有 30 mL 肉汤培养基的 250 mL 三角烧瓶中,在 37 ℃、250 r/ min 的恒温摇床中培养 24h,然后将种子液离心、洗涤,最后配成一定浓度的菌悬液.

1.5　菌株驯化

将 3 mL 浓度为 3 %[以单位体积的细胞湿重(*W*/ *V*) 表示]的 F-3-4 菌悬液接种到含 2,6-二叔丁基酚 500 mg/ L 的 B.H.基础培养基中,于 37 ℃下在转速为 250 r/ min 的恒温摇床中培养 4d,此时培养液明显浑浊.然后取上述驯化液 3 mL 加入到含 2,6-二叔丁基酚 500 mg/ L 的新鲜 B.H.基础培养基中继续驯化,重复多次.最后取上述驯化液进行试验.

1.6　样品预处理和分析

在各摇瓶(包括空白对照样瓶) 中加入 10 mL 正己烷,并将该混合液振荡 2 min 后迅速倒入离心管中,在 4 ℃、10 000 r/ min 条件下离心 8 min,抽取上清液作适当的稀释,最后在 276nm 处用 UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司) 测定 2,6-二叔丁基酚的浓度.培养液的光密度在 640nm 处采用 SP-1105 型可见分光光度进行分析.

1.7　菌株鉴定

主要参考文献[11 ~16],对驯化后的 2,6-二叔丁基酚降解菌进行鉴定.

2　结果与讨论

2.1　菌株驯化对 2,6-二叔丁基酚降解的影响

分别将未经驯化、2 次驯化和多次驯化的菌种制备成菌悬液,接种到含 2,6-二叔丁基酚 100 mg/ L 的 B.H.基础培养基中进行培养,定时取样,测定 2,6-二叔丁基酚的含量变化.结果(图 1) 表明,通过驯化,F-3-4 菌株对底物的降解能力有了一定的提高.在初始浓度为 100 mg/ L 时,经 11 d 培养,其降解率比未驯化的提高了 26 %,而且起始反应速率也得到了提高.

2.2　生长条件对菌株生长和 2,6-二叔丁基酚降解的影响

在装有 30 mL B.H.基础培养基的 250 mL 三角烧瓶中加入 2,6-二叔丁基酚作为唯一碳源,并使其浓度达 100 mg/ L.分别对温度(25、30、37、40、45 ℃) 初始 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 和接种量(0.01、0.05、0.1、0.15、0.20 %) 进行单因素条件试验.测定培养 11 d 时培养液的光密度和 2,6-二叔丁基酚浓度.各条件对菌株 F-3-4 降解 2,6-二叔丁基酚的影响如图 2 ~ 4 所示.

图 2 表明,温度对菌株 F-3-4 生长的影响很显

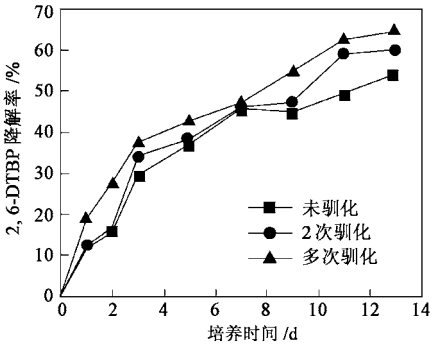

图 1　驯化对 2,6-二叔丁基酚降解的影响

Fig.1　2,6-DTBP degradation of acclimated strain F-3-4

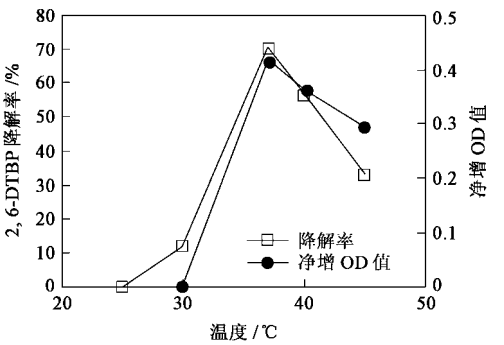

图 2　温度对菌株生长和 2,6-二叔丁基酚降解的影响

Fig.2　Effects of temperature on strain growth and 2,6-DTBP degradation

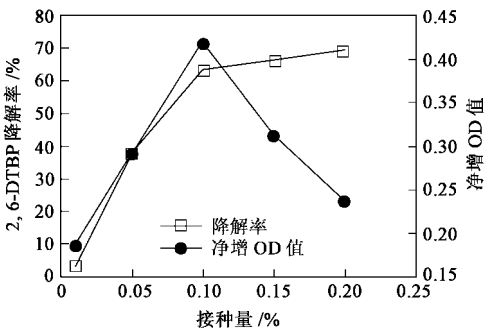

图 3　接种量对菌株生长和 2,6-二叔丁基酚降解的影响

Fig.3　Effects of amount size on strain growth and 2,6-DTBP degradation

著.在温度小于 30 ℃时,菌株的生长基本停止,而 2,6-二叔丁基酚降解率也很小,温度在 30 ℃和 37 ℃

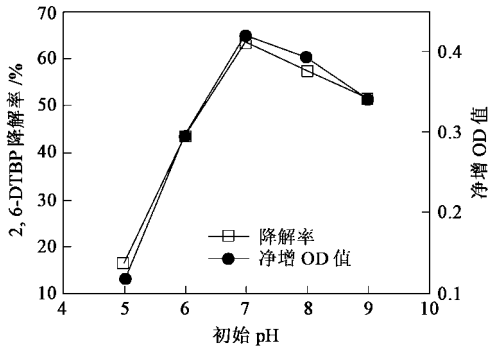

图 4 初始 pH 对菌株生长和 2 ,6-二叔丁基酚降解的影响

Fig .4 Effects of initial pH on strain growth and 2 ,6-DTBP degradation

之间时,菌株的生长和 2 ,6-二叔丁基酚降解率随温度的升高而同步上升,在温度大于 37 ℃,它们则随温度的升高而同步下降.图 3 表明,当接种量小于 0.1 %时,菌株 F-3-4 的生长量(以净增 OD 值表示)和 2 ,6-二叔丁基酚的降解率随接种量的增加而梯度上升,当大于 0.1 %时,菌株生长量反而随接种量的增加而降低,2 ,6-二叔丁基酚的降解率的上升则明显趋缓.图 4 表明,酸性环境相比碱性环境,对菌株的生长和 2 ,6-二叔丁基酚的降解有更明显的抑制作用;该菌株适合在中性或偏碱的环境中生存.

以底物去除率高、菌体生长量大以及经济可行性为原则,根据以上试验结果确定菌株 F-3-4 降解 2 ,6-二叔丁基酚的最适条件为:温度 37 ℃,初始 pH 为 7.0 ,接种量为 0.1 %.

2.3 最适生长条件下的2 ,6-二叔丁基酚降解

在最适生长条件下,以 2 ,6-二叔丁基酚为唯一碳源,进行 F-3-4 菌株降解 2 ,6-二叔丁基酚的摇瓶试验研究.接种的摇瓶和不接种的空白对照瓶均以磨口玻璃塞密闭并在瓶口缠 Parafilm 密封,置于恒温摇床中培养.按一定时间间隔取样,分析摇瓶中的底物浓度变化.当底物浓度为 100 mg/ L 时,F-3-4 菌株对底物的降解情况如图 5 .结果表明,F-3-4 菌株对 2 ,6-二叔丁基酚有较好的降解能力.在上述的培养条件下,培养 11 d 时,底物的降解率达 62.4 %.

在实验中建立 Monod 模型,根据实际条件推导,发现该模型实际上符合 Eckenfelder 模式,由数据处理可得动力学方程 $\ln S = -0.0739t + 4.4677$, R^2 为 0.9596 ,半衰期 $t_{1/2}$ 为 9.38d .由图 5 可以看出,所得的动力学方程能较好地描述试验中的反应趋势.

2.4 初始底物浓度对菌株降解性能的影响

初始底物浓度分别为 41 、72 、106 、153 、200 、404 、595 和 1007 mg/ L 时,在最适条件下通过摇瓶试验考察初始底物浓度的影响.培养 11 d 取样分析.

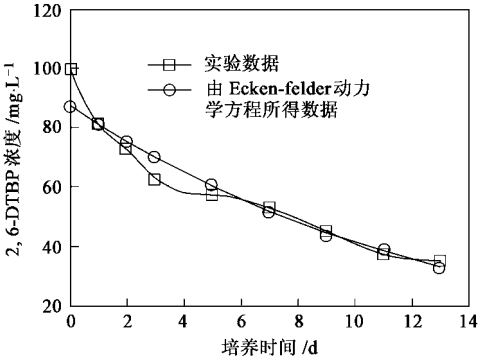

图 5 最佳生长条件下的 2 ,6-二叔丁基酚降解

Fig .5 2 ,6-DTBP Degradation by F-3-4 in the optimum growth conditions

图 6 表明,在底物 2 ,6-二叔丁基酚浓度小于 200 mg/ L 时,菌株的生长和底物的降解量都随初始底物浓度的增大而增加;在 200 mg/ L 和 1000 mg/ L 之间时,菌株的生长和底物的降解量随底物浓度的增加出现了停滞现象.这说明,在低浓度范围内,底物浓度的增加对菌株的生长和底物的降解有促进作用,而高浓度则带来了毒害作用,产生了一定的抑制.Patrick 在研究 2 ,6-二氯酚的生物降解时,对这种高浓度现象的解释是:由于反应体系的能量有限,高浓度底物的存在分散了能量的分布[3].基于这样

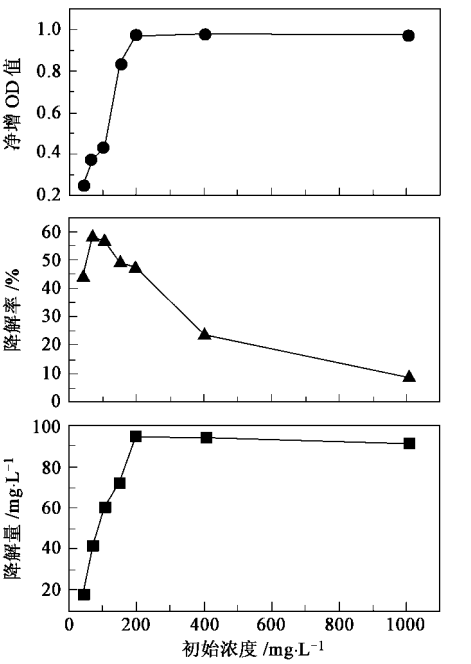

图 6 初始底物浓度对菌株降解性能的影响

Fig .6 The effect of initial concentrations of 2 ,6-DTBP on the degradation ability of strain F-3-4

的原因,引发底物降解反应所需的能量难以达到活化能,从而使底物的降解受到了抑制.另外,在这个高浓度段,F-3-4 菌株对底物的降解能力仅是略微下降,说明该菌株对 2,6-二叔丁基酚有很强的耐毒性,适应范围广.浓度为 200 mg/L 时,F-3-4 菌株的生长量最大,净增 OD 值达 0.974,2,6-二叔丁基酚的降解量达 94.3 mg/L,降解率达 47.8 %.

2.5　2,6-二叔丁基酚降解菌株的鉴定

根据文献[11~16],对2,6-二叔丁基酚降解菌 F-3-4 菌株进行了形态学和生理生化特征研究(表 1).

上述结果表明:F-3-4 菌株符合产碱菌属(*Alcaligenes*)的特征[11~13],故确认 F-3-4 菌株属于产碱菌属(*Alcaligenes* sp.).

表 1　2,6-二叔丁基酚降解菌的形态学和生理生化特征

Table.1　The morphological, physiological and biochemical characters of the bacterium for degrading 2,6-Di-tert-butylphenol

菌落特征	菌体特征	生理生化特征	
		阳性	阴性
圆形,Φ0.5~1.0 mm,麦杆黄,不透明,表面光滑,湿润,低凸起,边缘裂叶状,有水果香味.	杆-短杆或近球,单个存在,大小为(0.5~0.6)×(0.6~2.0) μm,有 1~5 根周生鞭毛.	需氧性(好氧) 过氧化氢酶 氧化酶 氧化型代谢(产碱) 从亚硝酸盐产气 利用酰胺类和有机盐产碱: 　乙酰胺 　天门冬酰胺 　醋酸钠 　柠檬酸三钠 　丙酸钠 利用为唯一碳源和能源: 　赖氨酸(弱) 　丙氨酸 　柠檬酸 　反丁烯二酸 　苹果酸 适宜生长温度(20~37 ℃)	革兰氏染色 $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ 从硝酸盐产氮气 利用为唯一碳源和能源: 　葡萄糖 　D-果糖 　D-甘露糖 　D-木糖 　D-丝氨酸 　苯丙氨酸 利用碳水化合物产酸: 　葡萄糖 　D-果糖 　D-甘露醇 　D-木糖 　七叶灵水解 纤维素水解 明胶水解 吲哚产生 氧化乙醇为乙酸 生长需要 NaCl

3　结论

(1)由试验得出 F-3-4 菌株的最适生长条件:温度 37 ℃,初始 pH 为 7.0,接种量为 1.0 %.

(2)在最适生长条件下,2,6-二叔丁基酚的初始浓度为 100 mg/L 时,菌株对底物的降解率达 62.4 %,底物降解过程符合 Eckenfelder 动力学模型,半衰期为 9.38 d.

(3)最佳初始底物降解浓度为 200 mg/L.当低于该浓度时,初始底物浓度的增加促进 F-3-4 菌株的生长和底物的降解;而高于这浓度时,则起抑制作用.

(4)经鉴定,F-3-4 菌株为产碱菌(*Alcaligenes* sp.).

参考文献:

[1] Menke B, Rehm H-J. Degradation of mixtures of monochlorophenols and phenol as substrates for free and immobilized cells of *Acaligenes* sp. A7-2 [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992, **37**: 655.

[2] Huban C M, Plownman R D. Bioaugmentation: Put microbes to work [J]. Chemical Engineering, 1997, **104**(3): 74~84.

[3] Patrick S, Stucki G, Stettler R, *et al*. Aerobic mineralization of 2,6-Dichlorophenol by *Ralstonia* sp. strain RKI [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, **64**: 2566~2571.

[4] Tirrola M A, Männistö M K, Puhakka J A, *et al*. Isolation and Characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1, a Dominant Polychlorophenol-Degrading Strain in a Groundwater Bioremediation System [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, **68**: 173~180.

[5] 任源,慎义勇,韦朝海. 驯化筛选微生物对油制气废水的降解特性[J]. 环境科学,2002,**23**(5):76~79.

[6] 陈明,张维,徐玉泉,等. 醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 对苯酚的降解特性研究[J]. 中国环境科学,2001,**21**(3):226~229.

[7] U.S. Environmental Protection Agency. G034. 2,6-Di-tert-butylphenol test results [128-39-2].

[8] 张亚雷. 难降解有机废水(腈纶废水)处理工艺及其污染物生物降解性能研究[D]. 上海:同济大学,1999. 77~79.

[9] 周群英,高廷耀编著. 环境工程微生物学(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,2000. 330.

[10] Bushnell L D, Hass H F. The utilization of certain hydrocarbons by microoganisms [J]. Journal of Bacteriology, 1941, **41**(5): 653~673.

[11] Krieg N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume 1) [M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. 361~373.

[12] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al*. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.) [M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1994, **75**: 131.

[13] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001. 180~181,353~388.

[14] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著. 一般细菌常用鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1978. 64~65.

[15] Oberhofer T R, Rowen J W. Acetamide agar for differentiation of nonfermentative Bacteria [J]. Appl. Microbiol., 1974, **28**(4): 720~721.

[16] Oberhofer T R, Rowen J W, Cunningham G F. Characterization and Identification of Gram-negative, nonfermentative Bacteria [J]. J. Clin. Microbiol., 1977, **5**(2): 208~220.