

# 一株耐盐苯酚降解酵母菌的分离 及降解特性研究\*

顾立锋 何 健 张瑞福 李顺鹏<sup>†</sup>

(南京农业大学农业部环境微生物重点开放实验室, 南京 210095)

**摘 要** 从化工厂污泥中分离到一株酵母菌, 初步鉴定为德氏酵母属(*Debaryomyces* sp.), 命名为 Gb。该菌株可以在 0~20%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  环境中生长, 并能以苯酚为唯一碳源和能源。其苯酚降解最适浓度为  $1\ 000\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ , 最适  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  浓度为 5%, 最适 pH 和温度分别为 5.5 和  $30\ ^\circ\text{C}$ , 在 250 ml 三角瓶中最适装液量为 100 ml。当  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  盐浓度为 5%、苯酚浓度为  $1\ 000\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$  时, 最适条件下培养 3 天即能降解 95% 的苯酚。本文还对其耐盐机理进行了初步研究, 发现细胞内海藻糖含量随外界盐浓度增加而增加, 表明 *Debaryomyces* sp. 在高盐条件下能以海藻糖作为渗透调节物质。

**关键词** 耐盐; 苯酚降解; 酵母菌

中图分类号 X172 文献标识码 A

苯酚是化工行业生产的基本原料之一, 是工业上常见的污染物, 另外酚渗透性很强, 常造成地下水大面积污染。我国污水综合排放标准(GB8978-1996)规定的挥发酚的一级标准、二级标准和三级标准分别为  $0.5$ 、 $0.5$ 、 $2.0\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ 。近年来, 对于含酚废水的生物降解研究很多, 分离到多种降解苯酚的微生物菌株。Bastos 等<sup>[1]</sup>在亚马逊河流域的土壤中分离到一株假丝酵母(*Candida tropicalis*), 可降解  $1\ 504\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$  的苯酚。Semple 等<sup>[2]</sup>分离到一株酵母(*Ochromonas danica*)可降解  $574\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$  的苯酚。周治等<sup>[3]</sup>筛选到一株酵母(*Pityrosporum* sp.), 可降解  $1\ 000\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$  的苯酚。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( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  含量可达 5%~30%)<sup>[4]</sup>。这种含高盐、难降解有机污染物工业废水(如苯酚废水)的大量排放已经给环境造成了巨大的压力, 含酚废水的生物处理是一项非常迫切的任务。

本文考虑了工业含酚废水既含苯酚又含高盐的实际情况, 研究采用以苯酚为唯一碳源并加入盐分作为双重选择压力, 通过对活性污泥的驯化、富集, 分离到了一株耐高盐浓度的降解苯酚的酵母菌, 并对其降解特性进行了研究, 另对其耐盐机理进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 培养基<sup>[5]</sup>** (1) 基础盐培养基(Minimal medium, MM):  $\text{KH}_2\text{PO}_4\ 2.0\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\ 0.1\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\ 1.0\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2\ 0.1\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ , 用 HCl 调节 pH 至 5.5, 苯酚浓度和盐浓度按具体要求添加。(2) 完全培养基(Complete medium, CM): 蛋白胨  $3.5\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ , 酵母膏  $3.0\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ , 葡萄糖  $10\ \text{g}\ \text{L}^{-1}$ , 用 HCl 调节 pH 至 5.5。

**1.1.2 供试污泥** 江苏泰兴化工厂排污口污泥。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 苯酚的测定** 取 5 ml 培养液,  $3\ 000\ \text{r}\ \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液测苯酚的残留浓度。苯酚的定量测定用紫外分光光度法测定<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 菌株的鉴定** 对菌株进行形态及生理生化实验, 参照文献<sup>[7]</sup>鉴定到属。

**1.2.3 苯酚降解条件的研究** 对培养时间、苯酚初始浓度、接种量、pH 温度、装液量等参数进行单因子试验, 确定菌株降解苯酚及生长的最适条件。

(1) 接种量试验: 在苯酚初始浓度为  $1\ 000\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  浓度为 5% 的基础培养液中接种 Gb, 接种量分别设定为 1、3、5、7、9 Unit ( $\text{OD}_{600}$  为 0.6 时的菌悬液 1 ml

\* 高校博士点专项资助基金(2000030711)、江苏省环境保护厅资助项目(苏环科 2000(21)号)

† 通讯作者: E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介: 顾立锋(1979~), 江苏宜兴人, 在读博士研究生, 主要从事环境微生物学的研究

收稿日期: 2003-10-08; 收到修改稿日期: 2004-02-24

定为 1 个 Unit), 30℃, 150 r min<sup>-1</sup> 振荡培养, 于 12 h、48 h、72 h 取样测定剩余苯酚浓度和 OD<sub>600</sub> 值。

(2) 培养时间试验: 在完全培养基和基础盐培养基中分别接入 5 Unit 的 Gb, 每隔 2 h 取样, 其他测定条件同接种量试验。

(3) 盐浓度试验: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度分别为 0、5%、10%、20%, 72 h 振荡培养后取样, 测定 OD<sub>600</sub> 和苯酚降解率, 其他条件同接种量试验。

(4) 苯酚初始浓度试验: 苯酚初始浓度分别为 500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、3 500 mg L<sup>-1</sup>, 72 h 振荡培养后取样, 其他条件同接种量试验。

(5) pH 试验: pH 分别设定为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 72 h 振荡培养后取样, 其他条件同接种量试验。

(6) 温度试验: 温度分别设定为 25、30、35、40℃, 72 h 振荡培养后取样, 其他条件同接种量试验。

(7) 装液量试验: 250ml 三角瓶装液量分别为 50、80、100、120、150 ml, 72 h 振荡培养后取样, 测定剩余苯酚浓度, 其他条件同接种量试验。

**1.2.4 耐盐机理的初步研究** 选择苯酚浓度为 1 000 mg L<sup>-1</sup> 的基础培养液, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 0、5%、10%、20%, 30℃, 150 r min<sup>-1</sup> 振荡培养 12 h、36 h、48 h、72 h, 取样测定 Gb 生长量、苯酚降解率及细胞内的海藻糖含量。胞内海藻糖的提取与测定参照文献 [8]。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选及鉴定

**2.1.1 菌株分离** 将污泥按 1:10 接入基础盐培养基, 逐步增高苯酚和 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度, 进行微生物的富集与驯化, 定期镜检观察微生物生长情况, 并测定苯酚降解率。最终在含 5% 的 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 1 000 mg L<sup>-1</sup> 苯酚的基础固体培养基中, 进行划线分离纯化, 得到目的菌株, 命名为 Gb。

**2.1.2 菌株鉴定** 将实验菌在完全培养基上培养, 于不同阶段用水浸片观察其个体形态。Gb 无性生殖为多边芽殖, 细胞卵形或球形, 偶尔形成假菌丝(图 1)。有性生殖为异型交配, 每个子囊有 1~2 个孢子, 中间有一小球状物质, 孢子球状或拟球状, 稍有瘤状突起。在液体培养基中培养 20d 后会形成沉淀。能发酵 D-葡萄糖、蔗糖和麦芽糖, 不能利用乳糖和硝酸盐。初步鉴定为德氏酵母属(*Debaryomyces* sp.)。

### 2.2 环境条件对 Gb 生长及苯酚降解的影响

**2.2.1 接种量** 苯酚降解率随着接种量的增加

而提高, 并且接种量对苯酚降解率的影响在不同时段是不同的(图 2)。在生长延滞期, 底物充足, 细胞基本不增殖, 反应器中的细胞数量接近于接种量, 所以苯酚降解率与接种量大致成正比例关系; 在对数生长期, 反应器中的细胞数量与接种量成指数关系, 因而此时接种量对苯酚降解率影响也最大。在末期, 不同接种量的反应器中的细胞数量趋于相同, 此时接种量对苯酚降解率影响较小。

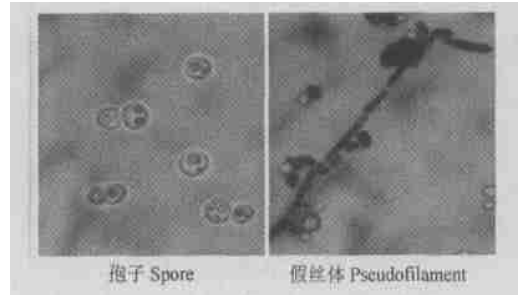


图 1 Gb 的显微照片(×1 000)

Fig. 1 Microscopical photograph of strain Gb(×1 000)

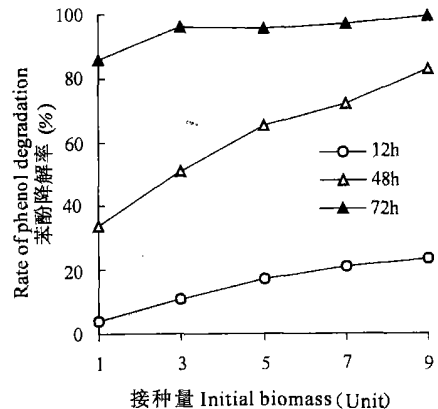


图 2 接种量对苯酚降解率的影响

Fig. 2 Effect of biomass on phenol degradation

**2.2.2 培养时间** 结果如图 3 所示, 在 CM 中, Gb 的延滞期为 8 h 左右, 22 h 后进入生长平稳期。在含 1 000 mg L<sup>-1</sup> 苯酚的 MM 中, Gb 的生长延滞期要比在完全培养液中长 16~18 h。到 48 h 苯酚降解率已达到 80%。从图 3 中可知在 MM 中, 苯酚的降解和菌体的生长是同步的, 菌株 Gb 是以苯酚为唯一碳源生长。

**2.2.3 盐浓度** 在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 5% 时, Gb 生长最好, 对苯酚的降解率最高, 达到 95% (图 4)。随后, Gb 的生长量和对苯酚的降解率随着盐浓度的提高而降低, 在 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 20% 时, Gb 对苯酚的降解率为 14.7%, 表明 Gb 对盐浓度冲击具有一定的耐受性。

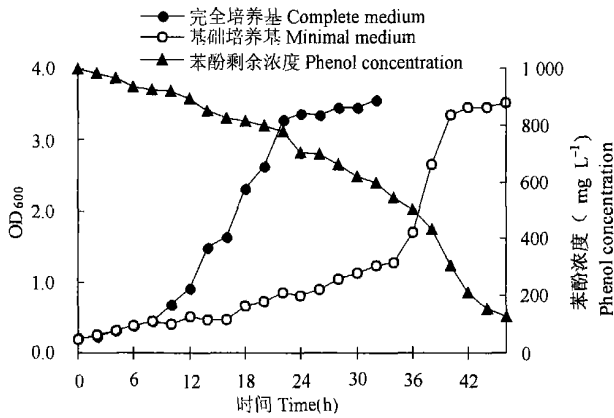


图3 培养时间对 Gb 生长及苯酚降解的影响

Fig. 3 Effect of duration on the growth and phenol degradation curve of Gb

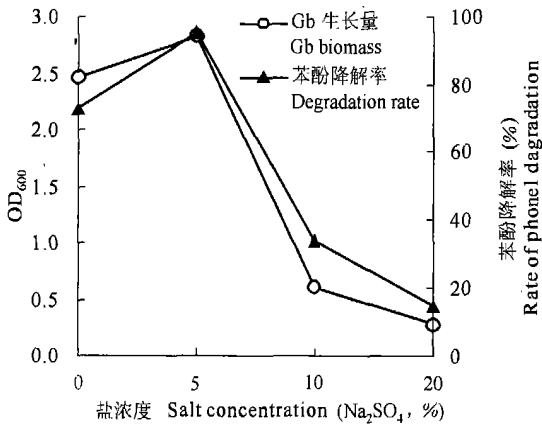


图4 盐浓度对 Gb 生长及苯酚降解的影响

Fig. 4 Effect of salt concentration on Gb biomass and phenol degradation

**2.2.4 苯酚初始浓度** 结果(图5)显示在苯酚浓度提高到  $1\ 500\ \text{mg L}^{-1}$  时降解率达到最高值,即 96%。当苯酚浓度继续提高时,开始对 Gb 产生抑制作用,降解率下降。将苯酚的浓度提高到  $2\ 000\ \text{mg L}^{-1}$  时降解率下降了近 90%,当苯酚浓度达到  $3\ 000\ \text{mg L}^{-1}$  时, Gb 生长被苯酚完全抑制。因此,选择能耐受较高苯酚浓度的微生物不仅可以提高反应器效率,而且对冲击负荷的抵抗力也会提高。

**2.2.5 pH** pH 试验表明, Gb 在 pH 5.5 时,生长量和苯酚降解率均达到最大,降解率可达到 95% (图6)。在 pH 5~ 6.5 范围内其苯酚降解率均大于 70%,说明 Gb 对 pH 有一定的适应能力,以弱酸性或微酸性条件为好,而苯酚废水大都呈酸性,这对含酚废水的处理非常有利。

**2.2.6 温度** 在温度低于  $30\ ^\circ\text{C}$  时,温度愈高,苯酚降解率愈高;当温度高于  $30\ ^\circ\text{C}$  后,降解率反而下降

(图7)。Gb 在  $20\ ^\circ\text{C}\sim 40\ ^\circ\text{C}$  范围内都有较高的降解率,以  $30\ ^\circ\text{C}$  生长最好,苯酚降解率最高,达到 94.6%。确定 Gb 降解苯酚及生长最适温度为  $30\ ^\circ\text{C}$ 。

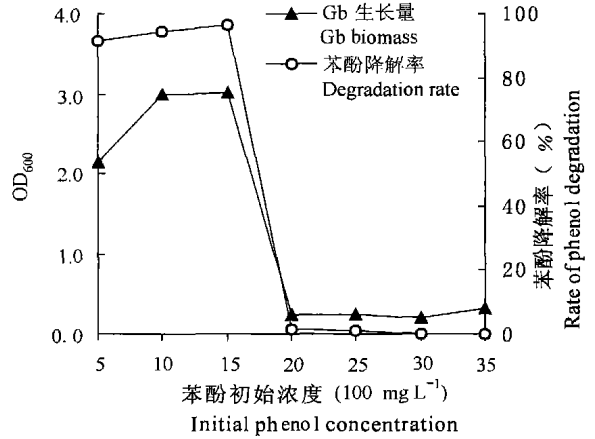


图5 苯酚初浓度对 Gb 生长及苯酚降解的影响

Fig. 5 Effect of initial phenol concentration on Gb growth and phenol degradation

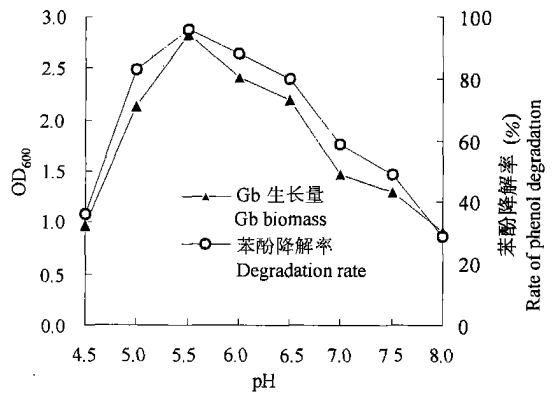


图6 pH 对 Gb 生长及苯酚降解的影响

Fig. 6 Effect of pH on Gb growth and phenol degradation

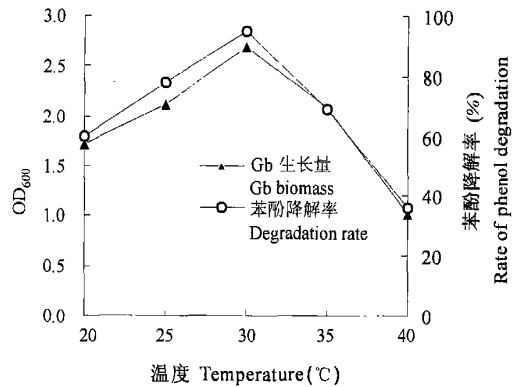


图7 温度对 Gb 生长和苯酚降解的影响

Fig. 7 Effect of temperature on Gb growth and phenol degradation

2.2.7 装液量 从图8可以看出装液量越大, 则苯酚降解率越小。说明 Gb 对苯酚的降解过程是好氧过程, 在苯酚充足的情况下, 氧气的供应速度成为反应的限制因素。当氧气的供应足够甚至超过微生物的需求后, 反应速率的增加就渐趋平缓, 此时氧气就不再是微生物新陈代谢速率的限制因素。综合生长与降解两个因素, 确定 250ml 的三角瓶适宜装液量为 100ml。

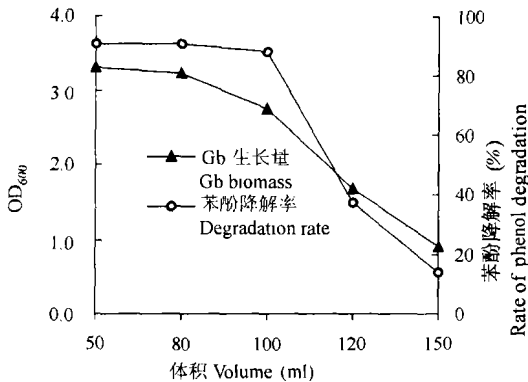


图8 装液量对 Gb 生长及苯酚降解的影响

Fig. 8 Effect of aeration on Gb growth and phenol degradation

### 2.3 耐盐机理初步研究

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 盐浓度对 Gb 胞内海藻糖的积累影响很大 (表1)。随着盐浓度的递增, Gb 胞内海藻糖的积累量增加。在研究中我们发现, 在同一盐浓度处理下, 胞内海藻糖的积累量随着细胞的生长而下降, 最后维持在某一较低浓度范围。可能是 Gb 酵母菌处于高盐环境时, 首先表达足够的海藻糖, 以抵御不良环境, 等细胞适应这种高盐环境后则适量表达海藻糖, 使胞内海藻糖的含量维持在某一适当的水平。

表1 盐浓度对胞内海藻糖积累的影响

Table 1 Effects of salt concentration on fucose content

盐浓度 Salt concentration Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	胞内海藻糖浓度 Fucose concentration in cell (mg L <sup>-1</sup> )			
	12 h	36 h	48 h	72 h
0	5.11	6.33	5.66	4.39
5	39.96	21.08	14.29	18.67
10	61.70	27.56	22.35	21.91
20	71.41	30.68	20.21	22.30

## 3 结论与讨论

1) 从活性污泥中分离到一株耐高盐苯酚降解

酵母菌, 初步鉴定为德氏酵母属 (*Debaryomyces* sp.)。该酵母菌可以在最高 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 20% 的苯酚废水中生长, 其最适苯酚降解浓度为 1 000 mg L<sup>-1</sup>, 最适 pH 是 5.5, 温度为 30℃, 250 ml 三角瓶中最适装液量 100 ml。在含 5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1 000 mg L<sup>-1</sup> 苯酚的基础盐培养液中, 最适条件下培养 72h 能降解 95% 的苯酚。

2) 海藻糖具有渗透调节和抗逆保护的作用。报道发现细胞在高盐环境中胞内有海藻糖的积累, 并且海藻糖的含量与细胞对外界不利环境的耐受性有密切关系<sup>[9,10]</sup>。Newman<sup>[11]</sup> 和 Crowe 等<sup>[12]</sup> 分别报道了海藻糖在保护胞内可溶性酶和细胞膜稳定性方面的功能。酵母菌 Gb 细胞内海藻糖的积累量随着盐浓度的提高而提高。当 Gb 接触高盐环境时, 初期细胞内海藻糖含量较高, 随着适应时间而逐步降低, 最后适应高盐环境后, 胞内海藻糖含量会稳定在某一适当的水平。初步认为海藻糖是酵母菌 Gb 的一种渗透调节物质, 至于海藻糖在酵母菌 Gb 中的详细作用过程值得进一步的探索。

### 参考文献

- [1] Bastos A E, Moon D H, Rossi A, et al. Salt tolerant phenol degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. Arch. Microbiol., 2000, 174(5): 346- 352
- [2] Semple K T, Cain R B. Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62(4): 1 265- 1 273
- [3] 周治, 杨柳燕. 高效降解苯酚的酵母菌筛选及其降解特性研究. 南京大学学报, 2001, 37(6): 724- 729. Zhou Z, Yang L Y. Screening of phenol degrading yeast and its characteristics (In Chinese). Journal of Nanjing University, 2001, 37(6): 724- 729
- [4] 刘相伟. 工业含酚废水处理技术的现状和进展. 工业水处理, 1998, 18(2): 4- 6. Liu X W. Current situations and developments of industrial phenolic water treatment techniques (In Chinese). Industrial Water Treatment, 1998, 18(2): 4- 6
- [5] 方心芳著. 应用微生物学实验法. 北京: 中国轻工业出版社, 1993. 11- 12. Fang X F. ed. Experimentation of Applied Microbiology (In Chinese). Beijing: Chinese Light Industries Press, 1993. 11- 12
- [6] 樊彩梅, 郝晓刚, 孙彦平. 苯酚降解中间产物对比色法测量苯酚浓度的影响. 太原理工大学学报, 1999, 30(2): 162- 164. Fan C M, Hao X G, Shun Y P. The effect of intermediates on the analysis of the phenol concentration using colorimetry (In Chinese). Journal of Taiyuan University of Technology, 1999, 30(2): 162- 164
- [7] 巴尼特 J A, 佩恩 R W 著. 胡瑞卿译. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991. 6. Barnit J A, Pien R W. eds. Hu R Q. trans. Handbook of Property and Identification of

- Yeast (In Chinese). Qingdao: Ocean University Publisher of Qingdao, 1991.6
- [ 8 ] 刘传斌, 李宁, 白凤武等. 酵母胞内海藻糖微波破碎细胞提取与传统提取比较. 大连理工大学学报, 2001, 41(2): 169~172. Liu C B, Li N, Bai F W, *et al.* Comparison of trehalose extraction from yeast after microwave cell disruption and traditional method (In Chinese). Journal of Dalian University of Technology, 2001, 41(2): 169~172
- [ 9 ] Zimmernann F K, Entian K D. eds. Yeast Sugar Metabolism. Lancaster, Pennsylvania, USA: Technomic Publishing Co. Inc., 1997. 285~303
- [10] 张岩, 梁萌, 刘德华. 克鲁氏假丝酵母在高渗环境中海藻糖和胞内甘油积累的研究. 生物工程学报, 2001, 17(3): 332~335. Zhang Y, Liang M, Liu D H. The metabolism of trehalose and intracellular glycerol in *Candida krusei* responding to osmosis (In Chinese). Chinese Journal of Biotechnology, 2001, 17(3): 332~335
- [11] Newman Y M, Ring S G, Colaco C. The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1993, 11: 263~294
- [12] Crowe J H, Whittam M A, Chapman D, *et al.* Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. Biochem. Biophys. Acta, 1984, 769(1): 151~159

## ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF A SALT-TOLERANT PHENOL DEGRADING YEAST STRAIN

Gu Lifeng He Jian Zhang Ruifu Li Shunpeng<sup>†</sup>

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** A yeast strain Gb identified as *Debaryomyces* sp. was isolated from sludge of a chemical plant by acclimatization. This strain was capable of growing in media with 20% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and utilizing phenol as sole carbon and energy sources. Effects of environmental factors on growth of this strain and degradation of phenol were tested. It was found that the optimal condition for growth and phenol degradation of this strain was phenol 1 000 mg L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%, pH 5.5 and temperature 30 °C. The optimal volume is 100 ml in a 250 ml conic flask. This strain can degrade 95% phenol in 3 days when Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was 5% and phenol was 1 000 mg L<sup>-1</sup>. The osmoregulation mechanism of this strain was studied. It was found that the intracellular level of trehalose increased with the increase of salinity, indicating that *Debaryomyces* sp. can use trehalose as osmoprotectant in hypersaline environment. The physiological characteristics of the strain were also studied, yielding some basic parameters useful for biodegrading of high salt concentration phenol wastewater.

**Key words** Salt-tolerant; Phenol degradation; Yeast; *Debaryomyces* sp.