

香精香料废水降解微生物的筛选及鉴定*

王亮¹, 蔡家利¹, 段云霞², 吕晶华²

(1. 重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400050; 2. 天津市环境保护科学研究院 分子生物学实验室, 天津 300191)

摘要: 山东省某家香精香料厂废水中主要有机污染物是芳香族化合物, 以叔丁基苯酚最难降解。为了筛选香精香料废水降解微生物, 实验采集上述香精香料厂好氧曝气池的活性污泥为样本, 以叔丁基苯酚为唯一碳源, 进行筛选并分离出一株能降解废水的微生物。对该微生物的形态、生理生化特征进行鉴定, 并对它的 16S rDNA 基因序列进行分析比对。结果表明, 该菌株属于类球红细菌属(*Rhodobacter sp.*) 适应偏盐性和适当芳香有机物的废水环境中生长并能有力地降解废水中的叔丁基苯酚。研究认为该菌株在有关废水处理方面的贡献难以估量。

关键词: 香精香料; 16S rDNA; 生物降解; 筛选; 类球红细菌属

中图分类号: X703.1 X815

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2012)01-0091-04

随着中国社会生活水平的提高, 香精香料被大量用在食品、化妆品以及除味剂中, 使人们得到嗅觉的享受。它们在人们的生活中越来越密不可分, 因而有关制造厂商也越来越多, 同时也造成了生产污水排放和治理的问题^[1-6]。

香精香料的废水主要由重金属离子和有机大分子污染物构成, 其中以有机物污染最为严重。这些有机物具有毒性大、浓度高、种类多、分子结构复杂多样等特点, 治理难度非常高^[7]。然而, 在含有上述有机物的废水中仍然生存着微生物, 它们必定存在着自身适应这种环境的生理生化和形态学特征^[8]。由于这些微生物能以废水中有机物为原料合成自身营养所需, 因此从中筛选出的微生物, 应具有降低废水中有机物的作用^[9]。

近年来, 由于分子生物学技术的不断发展, 人们利用微生物解决污染问题的意识日益增强^[10]。微生物降解有害物质不仅具有经济效益、环境效益, 同时还可为以后解决类似的环境污染问题提供参考和借鉴^[11-14]。为此, 本研究以香精香料生产厂区的废水为样品, 采用生物学方法从中分离筛选微生物, 并对它们进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 样品来源

研究用活性污泥于 2010 年 7 月份取自山东省某香精香料厂好氧曝气池中。

1.2 培养基

B. H. 基础培养基成分为 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.02 g, KH_2PO_4 1 g, K_2HPO_4 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $FeCl_3$ 1 mg。LB 培养基成分为: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, $NaCl$ 10 g, 琼脂粉 1.5% ~ 2.0%。

按以上配方称取培养基中成分配制两种培养基, 均分别用蒸馏水溶解定容到 1 L, 并调 pH 值至 7.0 ~ 7.2, 分装到锥形瓶中, 进行灭菌。其中 LB 固体培养基在灭菌之前加入 1.5% ~ 2.0% 琼脂即可。B. H. 培养基可能会出现沉淀, 可以用灭菌后的蔡氏滤器过滤后再用。

1.3 筛菌

取好氧曝气池污泥接种在 B. H. 培养基中, 里面加有唯一碳源叔丁基苯酚, 含量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 于 37 °C、200 转摇床培养过夜, 反复驯化 3 次以上, 即为活性污泥样品。

将上述活性污泥样品 20 mL 于灭菌的锥形瓶中, 加入玻璃珠后剧烈振摇均匀。取 0.3 mL 样本于 4 mL 离心管中, 再加入 2.7 mL 的灭菌蒸馏水, 将该溶液稀释 10 倍, 然后继续稀释, 依次得到稀释度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 的溶液, 将当中稀释度为 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的溶液涂布在 LB 平板上, 于 37 °C 下倒置恒温培养过夜。

在以上几个稀释度的平板中挑取各自菌落形态不同的菌株进行划线培养, 在 37 °C 下倒置恒温培养过夜。反复多次划线培养, 以确保能挑起单菌落为止。

* 收稿日期 2011-04-08 修回日期 2011-09-04 网络出版时间 2012-01-15 18:09:00

资助项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(No. 2008ZX07314-001)

作者简介: 王亮, 男, 硕士研究生, 研究方向为疫苗与诊断技术, 通讯作者: 蔡家利, E-mail: cjl@cqut.edu.cn

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120115.1809.201201.92_017.html

1.4 菌株生态学与生理生化特征

依据文献[15-16]对筛选出的菌株进行形态和生理生化特征鉴定。

1.4.1 革兰氏染色法 首先在超净工作台内挑取单菌落到加有少量生理盐水的载玻片上,自然风干;再滴加少量结晶紫染料初染1 min之后用流水冲洗;然后加入少量碘液放置1 min之后用流水冲洗;再加少量95%乙醇,脱色30 s之后用流水冲洗;最后加入番红复染1 min,用清水冲洗后,镜检。

1.4.2 接触酶实验 将接种培养24 h的斜面菌种以接种环取一小环涂抹于已滴有3% H₂O₂的玻片上,如有气泡产生,则为阳性,反之为阴性。

1.4.3 碳源和氮源利用实验 从平板中挑取单菌落进行液体培养18~24 h,以菌悬液接种连续3代移种于灭了菌的碳源利用培养液,浑浊为阳性,反之为阴性;将培养18~24 h的菌液接种到氮源利用培养液中,适温培养3~7 d,与空白试管对比,较浑浊为阳性,反之为阴性。

1.4.4 耐盐性实验 将幼龄菌株接种在2%、5%、7%和10%的不同浓度NaCl的LB培养基中,适温培养3~7 d,与未接种的试管对比,自测生长情况。

1.5 菌株分子生物学鉴定

1.5.1 菌株总DNA提取 从超低温冰箱中取出保存的上述甘油菌液,先划线培养出单菌落,然后挑取单菌落进行摇瓶培养37℃过夜。以5 000 r·min⁻¹离心3 min,收集菌沉淀,准备提取总DNA。应用淤泥基因组DNA快速提取试剂盒(离心柱型,购于北京百泰克生物技术有限公司)并按照该试剂盒介绍的操作步骤提取菌液总DNA。

1.5.2 对提取的DNA序列PCR扩增 通过primer premier 5.0软件设计16S rDNA上、下游引物,其中上游引物为5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3';下游引物为5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3';对菌液总DNA序列进行PCR扩增。PCR反应体系为:10×LA Taq buffer 0.5 μL, dNTP 4 μL,模板DNA 0.5 μL,上游引物1 μL,下游引物1 μL, ddH₂O 38 μL, LA Taq 0.5 μL,共50 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,退火55℃,45 s,72℃延伸90 s,共25个循环,之后72℃,10 min,4℃保存。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.3 对PCR产物测序 将PCR产物送往基因公司测序,并在Genbank数据库里进行比对,找出被筛菌株属等。

2 结果

2.1 菌株形态学鉴定

经鉴定该菌为革兰氏阴性菌,细胞卵圆形或杆状,单个或短链状排列。菌落呈橘红色或橘黄色,表面湿润,不透明。细胞表面产生粘液或生有荚膜。经芽孢染色证明此菌株不产芽孢,接触酶实验呈阳性结果。

2.2 菌株生理生化鉴定

对该菌株进一步进行生理生化鉴定,根据文献[15]所述该菌株跟类球红细菌属*Rhodobacter sp.*特点相似。在碳源利用率试验中,不加碳源的不生长,加葡萄糖为唯一碳源比用乙酸钠为唯一碳源的生长状态要好。在氮源利用率实验上,空白不生长,加NH₄H₂PO₄比加KNO₃生长的状态差。在耐盐性试验中,该菌株对NaCl的耐受性浓度依次为:7% < 5% < 2% < 空白,在10%的NaCl浓度下该菌不生长(表1)。

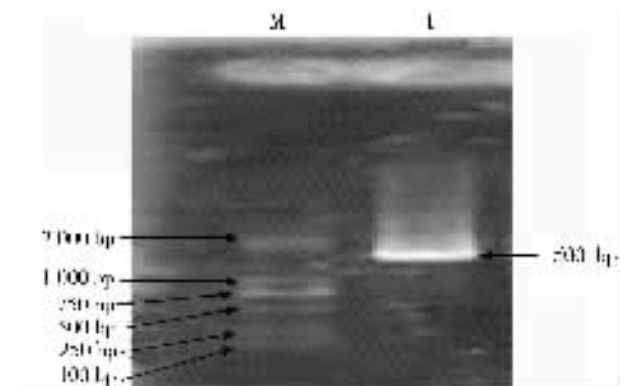
表1 能量利用实验结果和耐盐性实验

实验项目	空白	菌株反应
碳源利用实验	葡萄糖	+++
	乙酸钠	++
	空白	-
氮源利用实验	NH ₄ H ₂ PO ₄	++
	KNO ₃	+++
耐盐性实验	空白	++++
	2% NaCl	+++
	5% NaCl	++
	7% NaCl	+
	10% NaCl	-

注:“+”表示阳性反应,“+”越多说明反应越强,“-”表示阴性结果。

2.3 16S rDNA的基因序列分析

以菌株总DNA为模板,利用设计的上、下游引物进行16S rDNA扩增,电泳结果证实约在1 500 bp处有清晰可见明亮的单条带(图1)。

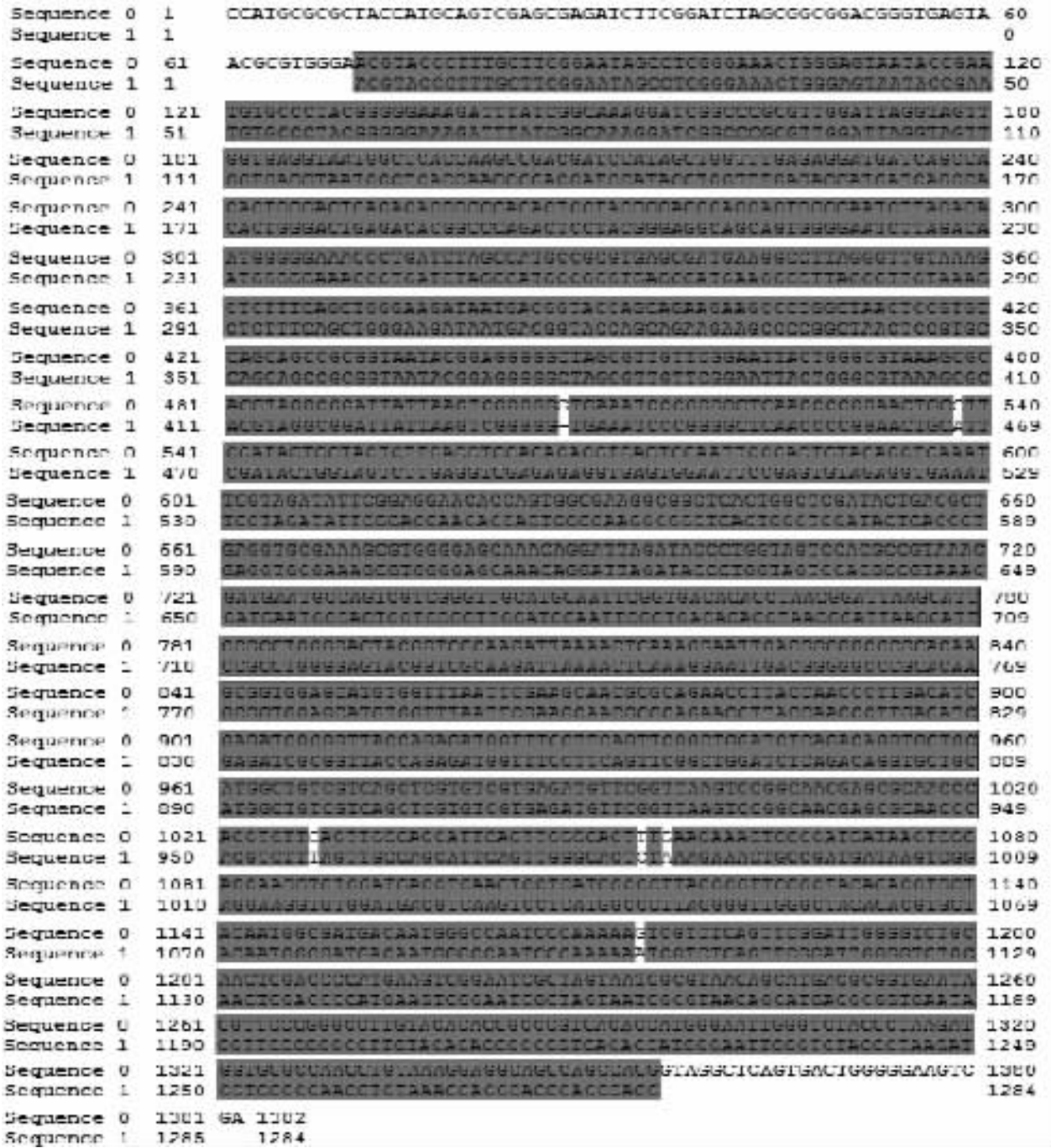


注:M为DNA marker;1为PCR扩增产物

图1 16S rDNA序列PCR扩增产物电泳图

登录 Genbank 数据库(www. ncbi. nlm. nih. gov/ genbank/) 经比对 , 分离出的野生菌株与 *Rhodobacter aestuarii* partial 16S rRNA gene strain MS22 标准株

(Genbank 注册序列号为 GI :300393879) 有 98% 的同源性 , 略有个别碱基突变 , 但在功能上没有发生改变 (图 2) 。



注 Sequence 0 为本研究 16S rDNA PCR 扩增产物的测序结果 Sequence 1 为 *Rhodobacter aestuarii* partial 16S rRNA gene strain MS22 标准株 GenBank 序列 , 灰色部分为两序列相同部分。

图 2 16S rDNA PCR 产物的测序结果 GenBank 比对图

3 小结

本研究从好氧曝气池中对污泥进行驯化 , 采用只加叔丁基苯酚作为唯一碳源的 B. H. 培养基 , 使

能利用此有机物的细菌富集 , 分离出可降解叔丁基苯酚的细菌 , 然后对该菌株的形态学、生理生化鉴定和 16S rDNA 基因序列的分析 , 最后测序得知该菌株为类球红细菌属 *Rhodobacter sp.* 。 可以相信 , 该菌株

在有关废水处理方面的贡献难以估量。

参考文献：

- [1] 唐兵,唐晓峰,彭珍荣.嗜冷菌研究进展[J].微生物学杂志 2002 22(1) 51-53.
- [2] 马放,杨基先,金文标,等.环境生物制剂的开发与应用[M].北京:化学工业出版社 2004 :194-195.
- [3] 伍晓林,石梅.以烃为碳源的微生物驱油微观机理探索研究[J].大庆石油地质与开发 2003 22(4) 56-57.
- [4] 陈燕,李寅,堵国成,等.石油污染水体的生物修复[J].水处理技术 2001 29(5) 250.
- [5] Atlas R M. Bioremediation of petroleum pollutants[J]. International Biodeterioration & Biodegradation ,1995 35 (1 / 2/3) 317-327.
- [6] Morgan P ,Watkinson R J. Assessment of the potential for in situ biotreatment of hydrocarbon-contaminated soils[J]. Water Science and Technology ,1990 22(6) 63-68.
- [7] Greenwood P F ,Wibrow S ,George S J. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure[J]. Organic Geochemistry 2009 40(3) : 293-300.

- [8] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M]. 3 版.北京:高等教育出版社,1999.
- [9] 俞统馨.环境工程微生物检验手册[M].北京:中国环境科学出版社,1990 :144.
- [10] 北京市环境保护科学研究所.水污染防治手册[M].上海:上海科学技术出版社,1989.
- [11] 中国微生物菌种保藏管理委员会.中国菌种目录[M].北京:轻工业出版社,1983 :1.
- [12] 傅占江,刘宝文,江源,等.16S rRNA 基因测序技术在临床细菌学鉴定中的应用[J].中国医学检验杂志,2002 3(4) 223-226.
- [13] 都立辉,刘芳.16S rRNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用[J].乳业科学与技术 2006 5 207-209.
- [14] 马雅琳,沈宁一,舒余德.生物降解技术研究现状及发展趋势[J].湖南有色金属 2000 16(2) 34-36.
- [15] 布坎南 R E ,吉本斯 N E.伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版.中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.北京:科学出版社,1984.
- [16] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社 2001.

Screening and Identification of Microorganisms for Degrading Essence and Spice

WANG Liang¹, CAI Jia-li¹, DUAN Yun-xia², LV Jing-hua²

(1. School of Pharmacy & Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050 ;

2. Molecular Biology Laboratory, Tianjin Academy of Environmental Sciences, Tianjin 300191, China)

Abstract : It is aromatic compound which is mainly organic pollution that essence and spice industry wastewater in Shan dong , para-tertiary butyl phenol is very difficult degradation. In order to screen biodegradation microbiology in essence and spice industry wastewater , a strain it existing in para-tertiary butyl phenol was isolated from activated flavors and fragrances industry wastewater with mixed organic compounds as sample. According to thxonomic outline of the prokaryotes Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology* (the 8th version) and *the Routine Germ Authenticates a Manual* (Edited by Dong Xiu-zhu , et al.) that it was identified according to morphological , physiological and biochemical and the 16S rDNA gene sequence was blasted from www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. As a result , it was bacterial of *Rhodobacter sp.* . It was adapted to plant wastewater of slanting salt and phenol. It was able to biodegradation para-tertiary butyl phenol in the wastewater. In this study , this discovers laying foundation is going to contribute the microorganism of solving the waste water share.

Key words : essence and spice ; 16S rDNA ; biodegradation ; screening ; *Rhodobacter sp.*

(责任编辑 方 兴)