

低温菌株的筛选及酚降解能力的研究

孙晓东 李建宏 潘欣 浩云涛

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

[摘要] 为了寻找在低温条件下降解含酚污水的微生物,利用低温条件(6°C)从自然界筛选出 2 株在低温条件下有较强的生长率及代谢活性的菌株,经 $300\mu\text{g/mL}$ 酚的诱导,分别培养于不同酚浓度及不同温度条件下,经过诱导的菌株耐酚和降解酚的能力有了显著的提高.菌株 XD-1 的酚最大致死浓度由原来 $300\mu\text{g/mL}$ 提高到 $1200\mu\text{g/mL}$,菌 XX-2 由 $300\mu\text{g/mL}$ 提高到 $1000\mu\text{g/mL}$. 6°C 下 $600\mu\text{g/mL}$ 酚浓度的降解时间由原来的 7d 缩至 4d.经生理生化反应鉴定, XD-1 为 *Pseudomas stutzeri* sp; XX-2 为 *Acinetobacter group NO-1* sp,且其对苯酚的降解主要发生在生长对数期.此菌株的研究可望在低温条件下对水体中酚污染的去除起到重要的作用.

[关键词] 低温 酚 耐冷微生物 酚降解

[中图分类号] Q939.9;X172 [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0083-04

酚是环境中比较常见的有机污染物.对于酚类化合物引起水污染的治理,一般可分为化学试剂和生物处理法两大类.化学试剂处理,如离子交换、化学氧化、溶剂萃取、活性炭吸附等方法由于存在一些缺陷,如成本高、操作复杂、容易造成二次污染等,因此目前实践中采用生物法处理含酚废水已成为一种趋势.研究表明,微生物能通过诱导形成诱导酶用来分解环境中的有机物,以适应新的环境条件.微生物对外来化合物的降解或转化所具有的巨大潜力,引起了国内外的广泛兴趣.

在正常温度条件下的污水处理,如利用微生物去除废水中的 N、P 等,已做了大量的研究工作^[1-3],但在自然界中,气温是在相当大的范围内变动的,以江苏省为例,全年气温有大约有 3 个月的时间在 10°C 以下,而在这样的温度条件下大部分微生物的生长代谢处于抑制状态,其在污水处理中的作用也受到很大的限制.虽然有关低温微生物的研究,近年来也有了巨大的进展^[4],但将二者结合起来,在低温条件下研究微生物在污水处理中的应用尚未见报道.

本文从自然界中分离、筛选到 2 株细菌,并对其进行了初步鉴定.研究了其在低温(6°C)下的生长规律,以及该菌株在低温下对不同浓度酚的耐受及分解利用情况,旨在进一步探讨低温状态下微生物在自然环境和污水处理系统中对酚类等有机物的降解途径.

1 材料及方法

1.1 菌样采集

菌样采自南京某冷藏厂冷冻车间角落处和冻鱼内脏中.

1.2 培养基

驯化培养基为含 $300\mu\text{g/mL}$ 酚浓度的 LB 固体培养基(10g 蛋白胨,3g 牛肉膏,5g 氯化钠,

收稿日期 2000-12-22

基金项目 江苏省教育委员会自然科学基金(98KJD180002)

作者简介 孙晓东,1975—,南京师范大学生命科学学院硕士研究生,从事微生物学的学习与研究.

万方数据

17 g 琼脂 ,加蒸馏水至 1 000 mL ,pH7.2).

1.3 实验微生物的筛选、分离

利用 LB 培养基做成 3 000 μg/mL 酚浓度梯度平板并进行划线分离 ,在 6℃ 条件下进行培养 ,挑取生长速度最快及抗酚能力最强的 2 株菌 ,临时编号为 XD-1 ;XX-2.

1.4 纯种的培养条件

利用加 600 μg/mL 浓度苯酚的 LB 培养基在 6℃ 条件下进行培养.

1.5 实验方法

将菌株培养在 6℃ 下不同酚浓度的培养基中 ,分别测定其生长状况及酚降解能力的变化.

1.6 测定方法

生长曲线的测定 :以 560 nm 处光吸收值代表菌株的生长状况.

酚浓度的测定 :4-氨基安替比林显色法^[5].

1.7 酚降解能力的测定

酚降解能力 $P = \Delta W / A * T$. 其中 , ΔW 表示经降解后浓度的变化 , A 表示光吸收值 , T 表示所需的时间.

1.8 生理生化鉴定

将 2 菌株分别接种到不同的碳源上观察其分解利用能力^[2].

2 结果

2.1 低温苯酚降解菌株的生理生化特性鉴定

XD-1 :从 4℃ 到 43℃ 都可生长 ,菌落无色 ,细胞单个 ,直的或弯曲杆菌 ,革兰氏阴性 ,氧化酶阳性 ,触酶阳性 ,能利用但不发酵葡萄糖 ,严格好氧 ,有微弱动力 ,不产生硫化氢 ,能利用木糖、麦芽糖 ,还原硝酸盐 ,赖氨酸阴性 ,七叶苷阴性 ,不利用蔗糖、甘露醇、乙酰胺及赖氨酸 ,根据以上 XD-1 的“ 代谢指数 ”,经 Bergey's 细菌鉴定系统分析 ,XD-1 应归属于斯氏假单胞菌 (*Pseudomas stutzeri* sp.).

XX-2 :菌落无色 ,革兰氏阴性球杆菌(革兰氏染色时需 20 ~ 30 min 脱色),在显微镜下该菌往往成对存在 ,氧化酶阴性 ,触酶阳性 ,不利用也不发酵葡萄糖 ,严格好氧 ,无动力 ,硝酸盐还原酶阴性 ,不利用蔗糖、淀粉、甘露醇、木糖及麦芽糖 ,根据以上 XX-2 的“ 代谢指数 ”,经 Bergey's 细菌鉴定系统分析 ,XX-2 应归属于不动杆菌非发酵菌群 I (*Acinetobacter* group NO- I sp.).

2.2 菌株生长情况的测定

经测定 ,不同酚浓度对 2 菌株的正常生长 (以 48 h 出现可见菌落为准)温度范围的影响很小 ,这对该菌株在实际应用中的久效性具有重大价值.

挑取 LB 固体培养基上的新活化的菌株分别接种到 50 mL 的液体 LB 培

养基中 ,6℃、200 r/min 摇床培养至对数期(OD 值约为 0.5 ~ 0.8),分别取 1 mL 接种于 200 mL 含 0 μg/mL、200 μg/mL、400 μg/mL、600 μg/mL 酚浓度的 LB 液体培养基中 ,6℃、200 r/min 连续摇床培养 ,每隔 16 h 取出 5 mL 培养液测定 OD₄₉₀ 值.结果表明 ,0 μg/mL 时菌株的延滞期大约为 16 h ,200 μg/mL 时菌株的延滞期大约为 32 h ,400 μg/mL 时菌株的延滞期大约为 48 h ,600 μg/mL

表 1 不同酚浓度对实验菌株生长温度范围的影响

菌株	酚 的 浓 度			
	0 μg/mL	200 μg/mL	400 μg/mL	600 μg/mL
XD-1	4 ~ 45℃	4 ~ 45℃	6 ~ 42℃	6 ~ 42℃
XX-2	4 ~ 45℃	6 ~ 42℃	6 ~ 40℃	6 ~ 40℃

时菌株的延滞期大约为 54 h(如图 1、2),由此看出,随着酚浓度的增大,二菌株延滞期时间也随之延长.同时从图中还可看出,其最大生长量也随着酚浓度的升高而增加.0 $\mu\text{g/mL}$ 时菌生长最大 OD 值约为 1.0,200 $\mu\text{g/mL}$ 时菌生长最大 OD 值约为 1.4,400 $\mu\text{g/mL}$ 时菌生长最大 OD 值约为 1.5,600 $\mu\text{g/mL}$ 时菌生长最大 OD 值约为 1.6.由此可以推断,菌株可以利用苯酚作为碳源,供自己生长所需.

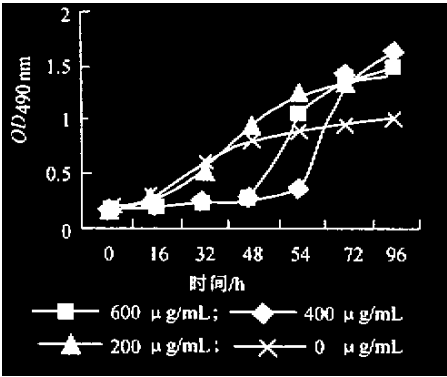


图 1 6°C不同酚浓度 XD-1 菌株生长曲线

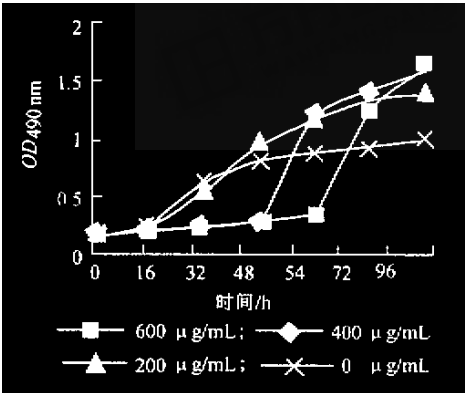


图 2 6°C不同酚浓度 XX-2 菌株生长曲线

2.3 温度与降酚能力的关系

将温度从 6°C 逐渐升高,则菌株的生长速度及抗酚能力均有相应的改变.将 2 菌株分别在 37°C、25°C 和 6°C,酚浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下进行培养,图 3、图 4 表明了菌株在酚浓度为 600 $\mu\text{g/mL}$ 时在不同温度下生长情况的对比情况.以生长速度代表菌株的生长状况指标,生长速度 $V = A/T$.其中 A 为 490 nm 光吸收值, T 表示达到最大生长量所需的时间,计算得出菌株在 37°C 时生长状况最好,这表明所分离的菌株并不是嗜冷菌(psychrophile),而是耐冷菌(psychrotrophs).同时根据公式 $P = \Delta W/A * T$ 计算的酚降解能力表明 25°C 时菌株具有最大的酚降解能力.因此菌株取得最佳生长状况的条件并不意味着其具有最大的酚降解能力.

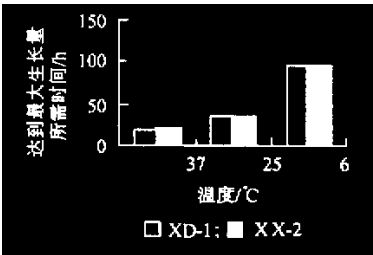


图 3 达到最大生长量时间与温度关系

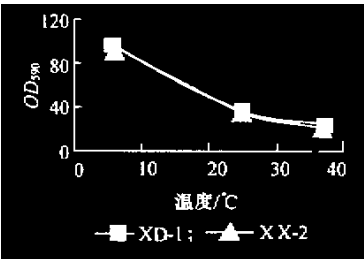


图 4 温度与最大生长量关系

2.4 菌株降解酚能力的测定

经测定,在实验温度(6°C、25°C、37°C)及酚浓度(200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、600 $\mu\text{g/mL}$)下,2 菌株在其生长的延滞期内,酚浓度下降的速度都很慢,而一旦达到生长对数期,酚浓度下降速度明显提高(见图 5),并且能在 24 h 内将酚完全降解,最后基本检测不到酚含量.这说明,酚的降解主要是在菌的生长对数期.

3 讨论

由以上对两株菌的研究分析表明,所选菌种具有良好的抗酚及降解酚的能力,尤其是在特殊条件下(低温 6℃)在污水处理中将具有重大潜力.此菌株还具有较强的分解淀粉、脂肪、蛋白质及多种酚类衍生物如间苯二酚、邻二氯酚等的能力(数据未列出),因此,预计其将在污水处理中发挥重大作用.

微生物降解有机污染物的基因通常与的质粒有关^[6],目前,已发现了许多与芳香化合物降解菌相关的降解性质粒.因此,我们可沿用同样的方法在 XD-1 和 XX-2 中寻找编码降解这些有机物的基因,然后通过基因工程技术构建新的、高效的遗传工程菌.这样有望大大节省成本,提高效率,在处理含酚类等有机物的污水中,使其发挥更大的作用.

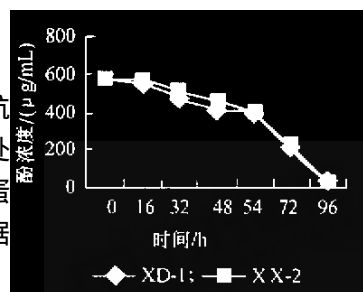


图 5 6℃时菌株酚降解能力

[参考文献]

- [1] 陈勇生,庄源益,戴树桂.氯代芳香化合物的微生物降解研究[J].环境科学进展,1997,5(2):17—26.
- [2] 牛世全,胡正嘉.高效解酚细菌的筛选[J].环境科学与技术,1991,2:44—47.
- [3] 徐玉泉,张维,陈明,等.一株苯酚降解菌的分离和鉴定[J].环境科学学报,2000,20(4):450—455.
- [4] 周宇光,崔存起,李钟庆.嗜冷微生物和耐冷微生物的研究[J].生物技术,1989,2:79—82.
- [5] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:轻工业出版社,1989,375.
- [6] Young-Gyun Cho. Simultaneous degradation of P-nitrophenol and phenol by a newly isolated Nocardioideis sp. [J]. Gen. Appl. Microbiol, 1998 (44) 303—309.

Isolation of Low Temperature Bacteria and Researching of Phenol Biodegradation

Sun Xiaodong, Li Jianhong, Pan Xin, Hao Yuntao

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC)

Abstract Based from the view of treating with polluted water including phenol by microbiology under low temperature, this article explains under the low temperature of 6 degree centigrade how to screen two strains of bacteria with relatively powerful growth rate and metabolism vitality. Then, induced by 300 μg/mL phenol, separately nurtured under the conditions of different phenol concentrations and temperatures, the anti-phenol and phenol degrading ability of the induced bacteria improve remarkably. The maximum fatal phenol concentration of the XD-1 and XX-2 bacteria increases separately from 300 μg/mL to 1200 μg/mL and 300 μg/mL to 1000 μg/mL. Under 6 degree centigrade, the degrading time for 600 μg/mL phenol concentration decreases from 7 days to 4 days. By physical and biochemistry identification, XD-1 belongs to *Pseudomas stuzeri* sp. XX-2 belongs to *Acinetobacter* group NO- I sp. And we hope that our researching on these bacteria will play an important protective role to the environment under low temperatures.

Key words low temperature, phenol, psychrotrophs, phenol biodegradation

[责任编辑 孙德泉]