

一株嗜热菌的分离鉴定及其苯酚降解特性

唐 贇^{1,2} 刘沐之¹ 梁凤来¹ 冯 露¹ 刘如林^{1*}

(南开大学生命科学学院 天津 300072)¹ (西华师范大学生命科学学院 南充 637002)²

摘要: 从油田地层水中分离到一株嗜热并高效降解苯酚的BF80菌株, 其最适生长和降解苯酚的温度为60℃~65℃。利用API 50 CHB/E系统和16S rDNA序列分析对菌株BF80进行了分类鉴定, 该菌株的形态和生理生化特性与*Geobacillus thermoglucosidasius*基本相同, 其16S rDNA序列与*Geobacillus thermoglucosidasius* BGSC W95A1 (= ATCC 43742)的相似性为99.22%。在接种量为1%的条件下, 该菌在20 h内能完全降解3 mmol/L的苯酚; 在pH值5.5~9.0范围内能保持对苯酚良好的降解能力, 并在12 mmol/L苯酚的无机盐培养基中也能生长和降解苯酚, 表明该菌能耐受高浓度苯酚并可用于高温含酚废水的生物处理。

关键词: *Geobacillus thermoglucosidasius*, 嗜热菌, 苯酚, 生物降解

中图分类号: Q 93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0039-06

Identification and Characterization of a Novel Thermophilic *Geobacillus* Degrading Phenol

TANG Yun^{1,2} LIU Mu-Zhi¹ LIANG Feng-Lai¹ FENG Lu¹ LIU Ru-Lin^{1*}

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)¹

(College of Biological Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002)²

Abstract: A thermophilic strain BF80 isolated from formation water of oil field has strong ability of phenol degradation. The optimal temperature for its growth and phenol degradation is 60 °C ~ 65 °C. API 50 CHB/E system and the analysis of 16S rDNA sequence were used to identify strain BF80. The morphological and physiological characterization of BF80 is almost the same as *Geobacillus thermoglucosidasius*. The 16S rDNA of BF80 shares 99.22% sequence similarity with the typical strain *Geobacillus thermoglucosidasius* BGSC W95A1 (= ATCC 43742). Under the conditions of incubation amount of 1%, it can degrade 3mmol/L phenol entirely within 20 hours, and it can also grow and degrade phenol at the concentration of 12mmol/L phenol. The degradation ability can maintain at the range from pH5.5 to 9.0. The results showed that it can endure high concentration of phenol and can be used for treatment of the phenol contained high temperature waste water.

Key words: *Geobacillus thermoglucosidasius*, Thermophiles, Phenol, Biodegradation

苯酚是炼焦、炼油、石油化工、塑料、造纸、纺织等工业废水中的主要有机污染物。治理含酚工业废水的方法有微生物降解、萃取、活性炭吸附和化学氧化法等, 其中利用微生物降解苯酚是一种经济有效且不产生二次污染的方法。国内外学者对利用常温微生物处理废水中的酚及其衍生物进行了较多的研究, 所用微生物包括 *Candida tropicalis*, *Landida maltose*, *Pseudomonas* sp. 4003, *Acinetobacter* sp. 3008 等^[1], 而对高温酚降解菌的报道较少。因此, 分离获得高温苯酚降解菌在含酚工业废水的生物处理中将具有很好的发展前景^[2]。

* 通讯作者 Tel: 86-022-23505967, E-mail: meor@nankai.edu.cn

收稿日期: 2005-12-15, 修回日期: 2006-03-01

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

菌株 BF80, 由南开大学石油微生物研究室从大港油田地层水分离并保存。

1.2 培养基

无机盐培养基^[2]: NH_4Cl 1.0 g, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.06 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.23 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.092 g, KCl 0.4 g, 10 mL 微量元素溶液, 苯酚按实验需要量添加, 定溶至 1 L, pH 7.0 ~ 7.2。

微量元素溶液参见文献 [3]。

1.3 菌株的形态和生理生化鉴定

参照文献 [4] 对菌株 BF80 进行了多种生理生化特性研究。在 60℃ 条件下, 用 API 50 CHB/E 试剂盒 (BioMérieux, Marcy-l'étoile, France) 按产品说明书对 BF80 利用不同碳源进行了产酸实验。

1.4 菌株 BF80 的 16S rDNA 分析

细菌总 DNA 的提取见文献 [5]。利用 PCR 技术, 从 BF80 菌总 DNA 中扩增其 16S rDNA 片段。PCR 反应体系 (50 μL): 无菌去离子水 40.5 μL, 10 × Buffer (含 MgCl_2) 5.0 μL, 10 mmol/L dNTPs 1.0 μL, 10 μmol/L 引物 1 (27 F: 5'-GAGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 1.0 μL, 引物 2 (1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 1.0 μL, Taq plus 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL。反应为 30 个循环: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环后于 72℃ 继续延伸 5 min, 4℃ 保温 2 h。PCR 反应产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色后, 用紫外分析仪检测。用上海生工的 UNIQ-100 DNA 胶纯化试剂盒回收琼脂糖凝胶上的 PCR 产物, 用 Promega pGEM-TEasy 载体试剂盒进行连接 (操作方法按试剂盒说明), 转化 *E. coli* DH5α 的感受态细胞, 然后在含氨苄青霉素 Amp/ IPTG/ Xgal 的平板上筛选白斑^[6], 经碱裂解法提取质粒^[6], 并 *EcoRI* 酶切, 其产物进行电泳检测。16S rDNA 的测序由天津生物芯片有限责任公司完成。用 BLAST 软件, 将测定得到的 16S rDNA 全序列递交于 GenBank, 并与 GenBank/EMBL/DBJ 中的已知序列进行同源性分析。将同源性最高的 11 个全序列 16S rDNA 用 Clustal W 1.82 比对, 然后将此生成的文件输入到 MEGA3.0 采用邻接法生成系统发育树^[7]。

1.5 生物降解实验

取 BF80 菌苔一环于 20 mL LB 液体培养基中, 振荡培养 24 h, 离心分离菌体, 用生理盐水洗涤两次, 悬于 10 mL 的生理盐水中。以 1% 的接种量将菌悬液接种于不同浓度苯酚的无机盐培养基中, 同时以不接菌做对照, 60℃, 180 r/min 培养一定时间后测定残余苯酚量, 并计算降解率。

1.6 菌体生长的测定

培养后的菌液经洗菌并加入等体积的无菌水后, 于 600 nm 测定菌液 OD 值, 或直接进行稀释涂 LB 平板。

1.7 苯酚含量的测定

采用 4-氨基安替吡啉法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌株的培养特征: BF80 是从大港油田的地层水中分离获得, 在 LB 培养基上培养 24 h 后的菌落直径 1 mm ~ 2.5 mm, 乳白色, 菌落圆形, 稍隆起, 外形光滑, 湿润, 不透明; 在显微镜下观察, 细胞长杆状, 大小为 $0.3\mu\text{m} \sim 0.5\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m} \sim 3.0\mu\text{m}$ 。革兰氏阳性, 周生鞭毛, 能运动, 芽孢端生, 圆形或椭圆形膨大。BF80 细胞接触酶阳性, 能水解明胶、淀粉和酪蛋白; 能还原硝酸盐和亚硝酸盐; 不能利用柠檬酸盐; 高于 3% 的 NaCl 其生长受到抑制; 最适生长温度为 $60^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$, 低于 42°C 和高于 75°C 时其生长也受到抑制。

用 API 50 CHB/E 不同碳源试验条 (BioMérieux), 接种 BF80 在 60°C 培养 6 ~ 24 h, 结果发现 BF80 与报道的 *Geobacillus thermoglucosidarius* 具有相同或近似的形态和生理生化特征^[9,10], 但 BF80 发酵鼠李糖产酸微弱。而 BF80 与 *G. caldxylosilyticus*、*G. stearothermophilus*、*G. thermodenitrificans* 及 *G. thermophilus* 的生理生化特性差异较大 (表 1), 因此, 可初步确定 BF80 属于 *Geobacillus thermoglucosidarius*。

表 1 菌株 BF80 与相近嗜热菌的表型特征比较

表型特征	BF80	1	2	3	4	5
细胞形状	长杆状	长杆状	长杆状	长杆状	长杆状	单个球形或成簇
芽孢	+	+	+	+	+	-
运动	+	-	+	+	ND	ND
接触酶	+	+	+	V	+	+
生长: 3% NaCl	-	-	-	V	+	ND
5% NaCl	-	-	-	V	-	-
柠檬酸盐	-	W	-	-	-	-
形成叫噪	-	-	-	ND	-	-
尿酶	ND	-	+	-	-	+
硝酸盐还原	+	+	+	V	+	+
利用亚硝酸盐产气	-	+	-	-	+	-
水解: 淀粉	+	+	+	+	W	-
酪蛋白	+	+	+	V	W	-
明胶	+	-	+	+	-	-
产酸: 甘油	-	+	-	ND	+	+
葡萄糖	+	+	+	ND	+	+
半乳糖	-	+	-	-	+	-
甘露糖	+	+	+	ND	+	+
海藻糖	+	+	+	ND	+	+
鼠李糖	W	+	+	-	-	+
果糖	+	+	+	ND	+	+
蔗糖	+	+	+	ND	+	+
麦芽糖	+	+	+	ND	+	+
乳糖	-	+	-	-	+	-
木糖	+	+	+	-	+	-
阿拉伯糖	-	+	-	-	-	+
山梨醇	-	+	-	ND	-	-

1 *G. caldxylosilyticus*, 2 *G. thermoglucosidarius*, 3 *G. stearothermophilus*, 4 *G. thermodenitrificans*, 5 *G. thermophilus*, + 阳性, - 阴性, W 反应微弱, ND 未测定, V 可变

2.1.2 菌株的16S rDNA分析:通过对BF80的16S rDNA在GenBank/EMBL/DDBJ中进行序列比对分析,发现与*G. thermoglucosidasius* BGSC W95A1 (= ATCC 43742)的相似性最高,达到99.22%,与*Bacillus* sp. BGSC W9A6的相似性为98.64%;而与*G. caldxylosilyticus* BGSC W9A36、*G. toebii* BGSC 99A1、*Geobacillus* sp. BGSC 20A1的相似性为98.1%~98.3%,与*G. stearothermophilus* BGSC 9A5的相似性仅有97.61%。结合其形态和生理生化特征,BF80应属于*Geobacillus thermoglucosidasius*,但其生理生化特性又有较小的差异,有可能是一新的亚种,系统发育树如图1。

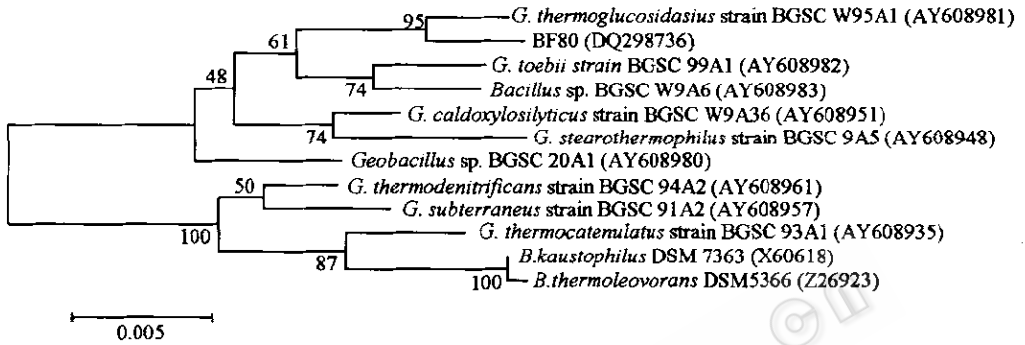


图1 基于16S rDNA序列的系统发育树

2.2 菌株生长和降解苯酚的适宜条件

2.2.1 温度:将BF80接种于50 mL无机盐培养基中(接种量1%,苯酚3 mmol/L),在不同温度下,180 r/min振荡培养30 h(表2)。结果表明,在50℃~70℃之间,BF80菌株生长和降解苯酚能力较强,苯酚降解率在97.80%以上,其中在60℃时,菌液OD₆₀₀值最高可达0.364,苯酚降解率达99.32%。在45℃以下和70℃以上时菌体生长缓慢,苯酚降解率明显较低。

表2 温度对BF80的生长和苯酚降解的影响

培养条件	温度(℃)						
	45	50	55	60	65	70	75
生长(OD ₆₀₀)	0.011	0.253	0.317	0.364	0.362	0.325	0.178
苯酚降解率(%)	2.44	51.43	78.85	99.32	99.53	80.17	41.33

2.2.2 pH:将BF80菌株接种于不同pH值的50 mL无机盐培养基中(接种量1%,苯酚3mmol/L),60℃,180 r/min振荡培养30 h(表3)。结果发现,BF80菌株的生长和苯酚降解率在pH 5.5~9.0之间较为稳定,其中在pH7.0时效果最佳,菌体生长OD₆₀₀值为0.358,苯酚降解率达99.24%。

表3 pH对BF80的生长和苯酚降解的影响

培养条件	pH值										
	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
生长(OD ₆₀₀)	0.032	0.191	0.278	0.349	0.352	0.358	0.354	0.336	0.331	0.281	0.026
苯酚降解率(%)	3.11	42.17	80.33	97.49	98.47	99.24	99.01	98.92	96.15	82.19	2.95

2.2.3 充氧量:充氧量是好氧微生物生长的重要影响条件。首先采用250 mL摇瓶,在接种量1%,60℃条件下,改变装液量,固定摇床转速为180 r/min;另外,改变摇床转速,固定装液量为50 mL,振荡培养30 h(表4)。结果表明,菌株BF80的生长量

和对苯酚的降解率均随着装液量的增加即通气量的减少而递减,装液量为 30 mL 时效果最好,苯酚降解率达 99.65%,此时菌体生长 OD_{600} 值达 0.360。同时,当装液量不变时,随着摇床转速的加快,菌株 BF80 生长和对苯酚的降解率呈递增趋势,当转速为 250 r/min 时, OD_{600} 值和苯酚降解率分别为 0.357 和 99.72%。由此可见,溶氧量对 BF80 菌株生长和苯酚降解具有显著的影响,考虑摇瓶的利用率及动力消耗,选定装液量为 50 mL,摇床转速为 180 r/min。

表 4 充氧量对 BF80 的生长和苯酚降解的影响

培养条件	装液量 (mL)				摇床转速 (r/min)			
	30	50	80	100	150	180	250	300
生长 (OD_{600})	0.360	0.301	0.274	0.242	0.251	0.327	0.357	0.319
苯酚降解率 (%)	99.65	85.36	80.21	66.61	81.34	98.15	99.72	100

2.3 BF80 对不同浓度苯酚的降解能力

BF80 能在一定苯酚浓度条件下以苯酚为唯一碳源的无机盐培养基生长,将 BF80 按 1% 接种量接种于 50 mL 不同苯酚含量的无机盐培养基,以不接菌为对照,60℃,180 r/min 振荡培养,隔一定时间取样测定菌体的生长和苯酚降解情况。图 2 的结果表明,在含有 3 mmol/L 苯酚的无机盐培养基中,BF80 的生长延滞期为 8 h,而在 6 mmol/L 的苯酚浓度下,菌的生长延滞期为 50 h,说明苯酚浓度越高,BF80 的延滞期愈长。从图 2 中的生长曲线进一步可看出,苯酚浓度愈高,菌体的生长量愈大,在 3 mmol/L 的苯酚浓度下,菌生长的最大 OD_{600} 值为 0.364,而在 6 mmol/L 的苯酚浓度下,菌体生长的最大 OD_{600} 值为 0.693,表明苯酚可作为该菌的唯一碳源供生长所需。在 BF80 生长延滞期,苯酚浓度变化很小,而当菌体生长进入对数生长期后,苯酚浓度下降很快,表明苯酚的降解主要发生在对数生长期,并在 20h 内被完全降解。进一步的研究还发现,BF80 也能在 12 mmol/L 的苯酚浓度下生长并降解苯酚,但不能在 15 mmol/L 的苯酚浓度下生长,表明对苯酚的耐受能力较强,可用于高温含酚废水的处理。

2.4 少量营养物质对 BF80 菌株降解苯酚的影响

活化的 BF80 菌株分别接种于含 0.1% 蛋白胨、0.1% 酵母粉、0.1% 葡萄糖的 50 mL 无机盐培养基(苯酚浓度为 3 mmol/L)中,60℃,180 r/min 振荡培养,隔一定时间取样测定菌体生长量和苯酚残留浓度。图 3 的结果表明,在含 3 mmol/L 苯酚的无机盐培养基中加入 0.1% 的蛋白胨、0.1% 酵母粉、0.1% 葡

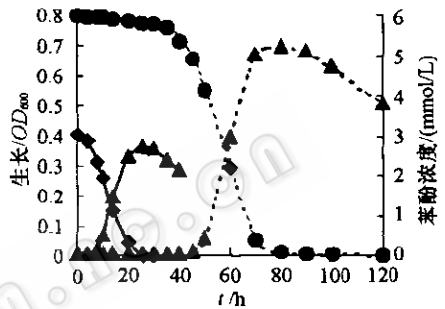


图 2 菌株 BF80 生长和苯酚降解曲线(无机盐培养基)
 —▲— 3 mol/L 生长, —▲— 6 mol/L 生长,
 —◆— 3 mol/L 降解, —◆— 6 mol/L 降解

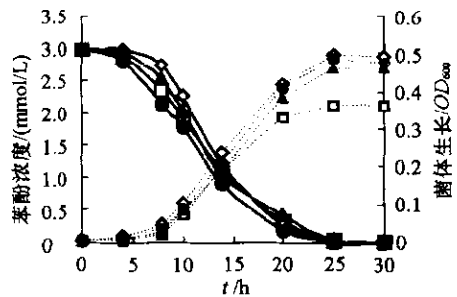


图 3 其它营养物质对 BF80 降解苯酚的影响
 —□— 降解对照, —○— 加蛋白胨降解, —●— 加酵母粉降解,
 —▲— 加葡萄糖降解, —□— 生长对照, —◇— 加蛋白胨生长,
 —●— 加酵母粉生长, —▲— 加葡萄糖生长

萄糖后,菌体的生长量增加,但苯酚降解速率与菌体的生长量并不存在相对应的关系。当加入0.1%的酵母粉后,苯酚的降解速率最快,由于酵母粉中含有丰富的生长刺激因子,有利于对苯酚的降解,因此添加少量的酵母粉是必需的。而在含0.1%蛋白胨或葡萄糖的无机盐培养基中,苯酚降解迟于无少量碳水化合物存在时的降解,但在对数生长后期对苯酚的降解反而又加快,这是细胞总生长量增加的结果。

3 结论

从油田地层水分离获得的嗜热菌BF80在无机盐培养基中,能以苯酚为唯一碳源良好生长,经API系统和16S rDNA分析,该菌归属*Geobacillus thermoglucosidasius*;BF80的最适生长和苯酚降解温度为60℃~65℃,并在较广的pH值范围(pH 5.5~9.5)内保持较好的苯酚降解能力;对苯酚的降解作用主要发生在该菌的对数生长期,在接种量为1%时,20 h内可完全降解3 mmol/L苯酚,并能耐受高达12 mmol/L的苯酚浓度;添加一定量的蛋白胨或葡萄糖(0.1%)抑制了BF80在对数生长的中前期对苯酚的降解速率,在中后期又加快;而添加0.1%酵母粉能提高对苯酚的降解速率,可见,添加少量的生长因子可促进菌体的生长,并提高整个培养体系的苯酚降解能力。该菌可用于高温含酚废水的生物处理,具有较高的研究和应用价值。

参 考 文 献

- [1] 陈明,张维,徐玉泉,等. 中国环境科学, 2001, 21(3): 226~229.
- [2] Mutzel A, Reinscheid U M, Antranikian G, et al. Appl Microbiol Biotechnol., 1996, 46(5~6): 593~596.
- [3] Balch W E, Fox G, Margrum L J, et al. Microbiol Rev, 1979, 43(2): 260~296.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] Bastin D A, Reeves P R. Gene, 1995, 164(1): 17~23.
- [6] 萨姆布鲁克 J(美). 金冬雁译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1992.
- [7] Kumar S, Tamura K, Nei M. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150~163.
- [8] 水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1997. 408~410.
- [9] Fortina M G, Mora D, Schumann P, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(6): 2063~2071.
- [10] Nazina T N, Sokolova D S, Grigoryan A A, et al. Syst Appl Microbiol, 2005, 28(1): 43~53.