

# 处理柠檬酸发酵废水的高活性光合细菌 P<sub>4</sub> 菌株的分离鉴定\*

杨大庆 陈萍 俞吉安 林志新 霍玉兰

(上海交通大学生物技术研究所,上海)

**摘要** 光合细菌 P<sub>4</sub> 菌株从柠檬酸发酵废水流经的污泥中分离得到。经鉴定 P<sub>4</sub> 菌株为红假单胞菌属 (*Rhodospseudomonas*), 浑球红假单胞菌 (*R. sphaeroides*)。P<sub>4</sub> 菌株以乙酸钠为碳源生长良好, 50 小时进入稳定期 (菌液 OD<sub>660nm</sub> = 1.8—2.0)。将经过可溶化的柠檬酸发酵废水用 P<sub>4</sub> 菌株的乙酸钠培养基进行处理, 作用 72 小时后废水 COD 的去除率达 85.5%。

**关键词** 菌种鉴定; 浑球红假单胞菌; 柠檬酸发酵废水

光合细菌是水生的革兰氏阴性细菌, 能够利用光能通过不放氧的光合作用而生长繁殖。光合细菌菌体含有大量的蛋白质和丰富的维生素、类胡萝卜素等物质, 对禽畜、水生生物的生长有促进作用<sup>[1]</sup>。光合细菌还具有净化高浓度有机废水的能力<sup>[2]</sup>, 由于利用光合细菌处理废水具有操作简单、投资省、占地少、菌体污泥可回收利用等显著特点<sup>[3]</sup>, 目前这方面的研究已受到国内外科学家的广泛重视。

要成功地利用光合细菌处理有机废水, 首先必须获得高活性的降解菌株。我们从柠檬酸发酵废水流经的污泥中分离到一株对高浓度柠檬酸废水具有很高降解能力的菌株, 对该菌株的鉴定结果如下。

## 材料与方法

### (一) 菌种来源

光合细菌 P<sub>4</sub> 菌株从南通发酵厂柠檬酸发酵废水流经沟渠的污泥中采样分离得到。

### (二) 培养基及培养条件

1. P<sub>4</sub> 菌株的分离鉴定: 分离菌种采用标准

RCVB<sup>[4]</sup> 或 YP<sup>[5]</sup> 培养基。液体培养时, 将菌株从斜面接入螺口液体管, 28℃、3000lx 光照厌氧培养 48 小时 (OD<sub>660nm</sub> = 1.8—2.0)。平皿光照培养时, 采用真空干燥器, 抽真空后充氮气以保证厌氧环境。避光好氧培养时, 置于 28℃ 恒温箱培养 72 小时。

2. 菌种的扩大培养: 采用乙酸钠培养基<sup>[3]</sup>, 将菌种从液体管接入 1000ml 三角瓶中, 接种量 5%, 于磁力搅拌器上搅拌, 30℃、3000lx 光照微好氧培养。

3. P<sub>4</sub> 菌株对废水的处理试验: 先取 1000ml 柠檬酸发酵废水于 2 升玻璃容器中, 调 pH 至 7.2, 加入 10ml 可溶化异养菌液通气培养 24 小时。

取上述经过可溶化处理的废水 1000ml 与 500ml P<sub>4</sub> 菌株的培养液混合, 置于 2L 不锈钢罐

本论文承蒙中科院上海生物工程基地孙玉昆研究员指导测定 G+C 克分子百分比; 占中科院上海植物生理研究所郭一松同志协助进行电镜观察, 特此表示致谢。

\* 本论文工作属国家“七五”攻关课题“采用光合细菌处理食品加工废水生产单细胞蛋白的技术研究”的一部分。

中,微量曝气,溶解氧控制在 0.5ppm 左右,每隔一段时间取样测定挥发酸和 COD。

### (三) 形态观察、碳源利用及生理特性的测定<sup>[6-8]</sup>

#### (四) DNA 的提取

主要按 Marmur 氏法<sup>[9]</sup>。

#### (五) 分析方法

1. 光密度测定: 用 721 分光光度计在 660 nm 波长下进行。

2. 挥发酸测定: 样品经适当预处理, 用水蒸汽蒸馏法蒸出挥发酸, 用标准碱滴定后进行计算。

3. COD 测定: 采用重铬酸钾法, 用 HH-1 型化学耗氧仪测定。

## 结果与讨论

### (一) *P.* 菌株的分离鉴定

1. *P.* 菌株的分离: 污泥样品采用 RCVB 液体培养基光照厌氧培养 4—6 天后, 培养基呈棕红色, 经过多次连续转接培养, 使紫色非硫光合细菌占优势。按 Van Niel 的振荡培养法, 用半固体琼脂培养基将菌液在一系列无菌试管中逐级稀释, 待琼脂冷凝后覆盖无菌液体石蜡, 光照培养。将试管中长出的单个棕红色菌落先在液体培养基中培养, 然后在 RCVB 固体培养基上反复划线分离, 光照厌氧培养, 挑取单个典型菌落, 经镜检为纯培养物。

2. 形态特征及培养特征: *P.* 在 YP 培养基中呈球形, 直径为  $1.0\mu\text{m}$ ; 在 RCVB 培养基中呈卵圆形, 菌体大小为  $0.8-0.9 \times 1.7-1.8\mu\text{m}$ , 菌体有单根极生鞭毛(图 1), 菌体为单个排列, 分裂方式为二分分裂(图 2)。

光照好氧培养时, 在 RCVB 平板上菌落呈红色, 有圆形突起, 面积较大, 光滑、湿润。避光好氧培养情况下, 菌落中央呈浅红色, 四周为乳白色。

3. 生理特征: *P.* 菌为革兰氏阴性, 接触酶阳性, 淀粉水解阳性,  $\text{H}_2\text{S}$  生成, 吡啶生成, 明胶液化及硝酸盐还原都为阴性。

4. 碳源利用: 碳源利用试验在光合细菌分

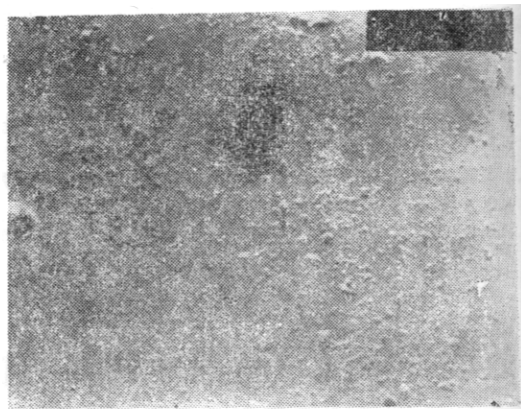


图 1 *P.* 菌株在 RCVB 培养基中的菌体和鞭毛形态( $\times 14000$ )

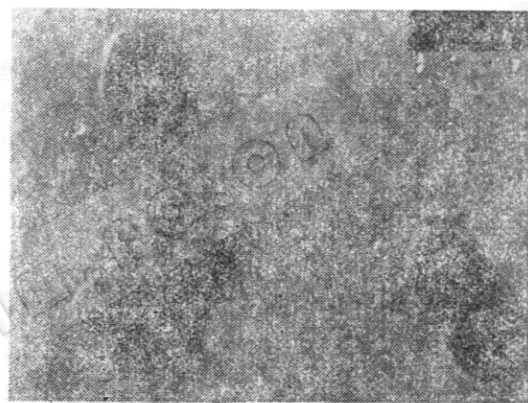


图 2 *P.* 菌株在 RCVB 培养基中的增殖方式( $\times 14000$ )图 1、2 皆采用日本产 JEL-100 CX2 型透射电子显微镜拍摄

类上是很有用的鉴别特征。用省去苹果酸的 RCVB 培养基作基础培养基, 分别添加各种碳源, 浓度为 0.3% (除丙酸钠为 0.05% 外), 在不同碳源平板上点涂菌液, 于  $28^\circ\text{C}$  下培养观察结果。从表 1 可知, *P.* 能很好地利用甘油、甘露醇、葡萄糖和乙酸钠, 也能利用乙醇、果糖和酒石酸钠, 但不利用丙酸钠, 这一点与浑球红假单胞菌相一致<sup>[6,7]</sup>。

5. DNA 中的 G+C 克分子%的测定: 按文献[10]的方法, 将抽提出的 DNA 充分水解, 以盐酸-异丙醇为展开剂, 用纸层析法分开 G, C, A, T 四种碱基, 洗脱后用紫外分光光度计分别测定消光值, 再推算出各种碱基含量, 得到 G+C 克分子%为 68.74, 此结果与文献[6,7]中浑球红假单胞菌的数值(浮力密度法测定)相

符。

根据上述实验结果,说明  $P_4$  菌株属红假单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*), 为浑球红假单胞菌 (*R. sphaeroides*)。

(二)  $P_4$  菌株对柠檬酸发酵废水的处理

利用光合细菌处理高浓度有机废水, 首先由异养微生物通过可溶化过程把高分子碳水化合物分解成短链脂肪酸等低分子物质, 光合细

菌再利用这些小分子物质,使污水 COD 值迅速下降<sup>[2]</sup>。

碳源利用试验表明  $P_4$  菌株可利用小分子乙酸钠。采用乙酸钠培养基培养  $P_4$  菌株,从菌的生长曲线(图 3)可见,延迟期较短,对数期 OD 值增长很快,约 50 小时进入稳定期,OD 值达到 1.8—2.0。在培养液 OD 值上升的同时,挥发酸含量也相应降低,表明采用低分子脂肪酸作为碳源,能很好地满足  $P_4$  菌株的生长需要。

取可溶化 24 小时的柠檬酸发酵废水,用  $P_4$  菌株的乙酸钠培养液进行处理,结果如表 2 所示:处理 36 和 72 小时  $P_4$  培养液对废水 COD 的去除率分别高达 67% 及 85.3%。废水经处理后,其挥发酸含量也大幅度下降。

表 1  $P_4$  菌株对碳源的利用情况

碳源	菌株	
	$P_4$	<i>R. sphaeroides</i> <sup>[2]</sup>
苹果酸	+++	+
硫代硫酸钠	-	-
正壬酸	-	±
乙醇	+	+
果糖	+	+
戊酸	-	±
乙酸钠	++	+
丙酸钠	-	±
酒石酸钠	+	+
谷氨酸	+++	0
柠檬酸	+	+
葡萄糖	++	+
甘露醇	++	+
甘油	++	+

表 2  $P_4$  菌株的乙酸钠培养液对高浓度柠檬酸发酵废水的处理结果

处理时间 (h)	VA(ppm)	COD(ppm)	COD 去除率 (%)
起始	8760	31050	
36	3627	10246	67
72	1568	4564	85.3

注: 以上结果为三次实验的平均值  
COD: 化学耗氧量; VA: 挥发酸含量

参 考 文 献

注: “+”生长一般, “++”生长较好, “+++”生长最好, “-”不生长, “±”某些菌生长, “0”未试验。

图 3 以乙酸钠为碳源时  $P_4$  菌株的生长曲线

OD: 光密度值; VA: 挥发酸含量

1. 获野珍吉: 发酵と工业, 36(10): 836—841, 1978。
2. 小林正泰: 发酵と工业, 36(9): 753—766, 1978。
3. Shen Jianwei et al.: *Water Treatment*, 4(2): 187—198, 1989。
4. Weaver PF et al.: *Arch. Microbiol.*, 105: 207—216, 1975。
5. 吴永强等: 微生物学通报, 11(1): 17—20, 1984。
6. Buchanan RE et al: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md., 24—64, 1974。
7. Roderick R and R William Sitron: “*The Photosynthetic Bacteria*”. Plenum Press, New York, pp. 30, 1978。
8. 中国科学院微生物研究所细菌分类组编: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 北京, 1978。
9. Marmur J and P Dortsy: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962。
10. P. 康德拉, W. 阿塔尔著, 李中德译: 分子生物学方法, 第 102—106 页, 科学出版社, 北京, 1979。