

低温污水中耐冷微生物的筛选及多样性分析

顾美英 谢玉清 唐琦勇 张志东 房世杰 包慧芳 茆军*

(新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 采用 4 种分离培养基对新疆乌鲁木齐市污水处理厂低温污水中的耐冷微生物进行分离筛选, 共获得各种耐冷微生物 154 株, 其中丝状真菌 12 株, 酵母 46 株, 放线菌 6 株, 细菌 90 株。并对部分菌株的耐受性和产酶特性进行了研究, 获得了耐 4%NaCl 的菌株 44 株, 耐 0.2%苯酚的 16 株, 耐 0.5% SDS 的 33 株, 具有淀粉酶活性的菌株 40 株, 蛋白酶活性的 30 株, 脂酶活性的 27 株。对其中 60 株细菌进行 16S rRNA 基因测序, 序列比对分析表明, 其分属 13 个属, 其中菌株 39 与不动杆菌属中的标准菌株 *Acinetobacter lwoffii* (DSM2403) 同源性最近, 为 96.6%, 极有可能为新种。证明低温污水中存在着丰富的耐冷微生物及种属多样性, 且具有较好的耐受性及产酶特性, 预示着低温污水可能是重要潜在的微生物资源库。

关键词: 低温污水, 耐冷微生物, 多样性

Diversity of Psychrotrophs from Low-temperature Sewage

GU Mei-Ying XIE Yu-Qing TANG Qi-Yong ZHANG Zhi-Dong FANG Shi-Jie
BAO Hui-Fang MAO Jun*

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: Psychrotrophs were isolated by using four media from low-temperature sewage of sewage treatment plant in Urumqi, Xinjiang. Totally, 154 strains were obtained including 12 filamentous fungi, 46 yeasts, 6 actinomycetes and 90 bacteria. The results of tolerance tests of the isolates to salt, phenol and SDS, and enzyme producing characters of amylase, proteinase and esterase were shown. Then 60 bacterial strains were chosen for 16S rRNA gene sequencing and analysis. The blasting results showed that the strains were assigned to 13 recognized genera, and the Strain 39 exhibited 96.6% similarity to *Acinetobacter lwoffii*(DSM2403), indicating that it might be a novel species. These results suggested that there were a lot of psychrotrophs and rich bacterial diversity in low-temperature sewage. In addition, which maybe an important and potential library of microbial resources.

Keywords: Low-temperature sewage, Psychrotrophs, Diversity

生活污水因水质较稳定, 污染成分主要是各种无机盐类和可溶性的有机物质, 更适宜各种微生物的繁殖。因此, 生活污水更多的使用生物法处理, 最

为常用的为活性污泥法^[1]。我国北方冬季气候寒冷漫长, 在低温环境条件下中温菌所分泌的酶对底物分子的亲和力降低, 酶的催化能力下降, 生理代谢

基金项目: 新疆高技术项目(No. 200815117)

* 通讯作者: ✉ xjmaojun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-02-20; 接受日期: 2009-05-22

活性也随之降低,势必导致活性污泥沉降性能、降解作用和吸附能力变差等现象^[2]。在环境污染状况日益加剧且国家排放标准日益严格的情况下,如何在低温条件下有效提高污水处理效果备受关注。目前,我国寒冷地区一般采用延长污水停留时间、增加污泥回流量、对构筑物采取保温或升温等措施来保证冬季污水处理出水达标,这无疑会增加运行周期和运行费用^[3]。

耐冷微生物较常温菌和嗜冷菌因更能忍受温度波动,它的温度适宜范围也比较宽^[4],更适用于低温污水处理^[5-7]。而低温微生物在低温条件下具有较高降解盐类、有机物、表面活性剂、酚等污染物的特性,在污水处理和保持生态平衡中起着很重要的作用^[8-10]。因此,筛选获得具有重要低温生物活性的低温微生物是提高寒冷地区低温生活污水处理效果、降低运行周期和节约运行费用的根本途径和有效措施。

乌鲁木齐地处北方寒冷地区,气温变化较大,最低月平均气温为 -16.9°C ,极端最低温为 -41.5°C 。年均温度为 6.9°C ,冬季漫长而寒冷,气温最冷达 $-20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$,低温时间一般从12月到3月末。城市污水的水温受气温的影响,冬季平均水温为 $9^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$,这就给城市污水处理带来较大的影响和困难^[11],因此分离和筛选在低温条件下有较高活性的耐冷菌株并研究其生物特性,这在处理低温生活污水中具有较高的应用价值。

本研究以新疆乌鲁木齐市低温生活污水为研究对象,对其中耐冷微生物进行了分离、鉴定,并对其微生物生物特性及多样性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 样品

污水样品分别采自乌鲁木齐市某污水处理厂污水处理的不同区域,并放置在 4°C 冰箱中保存。

1.2 培养基

污水琼脂培养基:琼脂 15 g,污水 1 L, pH 自然。

污水完全培养基:蛋白胨 10 g,酵母膏 3 g,葡萄糖 1 g, K_2HPO_4 3 g,琼脂 15 g,污水 1 L, pH 7.0 左右。

污水高氏培养基:可溶性淀粉 20 g, NaCl 0.5 g, MgSO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, KNO_3 1 g, Fe_2SO_4 10 mg,琼脂 15 g,污水 1 L, pH 7.2 左右。

污水 PDA 培养基:土豆 300 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,污水 1 L, pH 自然。

基础培养基:葡萄糖 1 g,酵母膏 1 g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 3 g,琼脂 15 g, H_2O 1 L, pH 7.0 左右。

1.3 菌种分离

样品经适当稀释涂布在分离培养基平板上,在 10°C 的培养箱中培养 1 d~7 d,根据菌落大小、形态、颜色进行初步筛选分离并纯化。

1.4 菌种生长温度范围和最适生长温度

将各菌种接入 5 mL 完全液体培养基中, 10°C 、180 r/min 培养 24 h 后,再分别取 0.1 mL 的菌悬液接种至 5 mL 新鲜的完全液体培养基中,在不同的温度梯度下(4°C 、 10°C 、 15°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C)振荡培养,1 d~2 d 后在 600 nm 处测定其吸光值,以确定筛选菌种生长的温度范围和最适生长温度。

1.5 菌种耐受性及产酶特性研究

将筛选所得到的菌株点植在分别加有 NaCl (4%)、苯酚(0.2%)、SDS(0.5%)、可溶性淀粉(1%)、酪素(1%)、吐温 80(1%)的基础培养基平板上,于各菌株最适生长温度下培养 1 d~7 d,观察菌株生长及产酶情况,以获得耐盐、耐酚、耐表面活性剂性能及产淀粉酶、蛋白酶、脂酶的特性。

1.6 总 DNA 的小量提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

采用上海华舜生物工程有限公司的细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,并加以改良。首先刮取平板培养的菌体两环,用 pH 7.8 的 TE 洗涤 2 次,离心后收集菌体,两倍于说明书中的溶菌酶加入量,彻底振荡悬浮, 37°C 温育过夜,以达到完全裂解放线菌细胞壁。随后参照试剂盒说明进行操作,取 1 μL DNA 溶液作为模板。

16S rRNA 的 PCR 扩增,扩增引物为通用引物(正向引物 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCA G-3',反向引物 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTTA CGA-3'), 95°C 5 min; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经切胶纯化(上海华舜生物技术公司胶回收试剂盒) 100 μL 无菌去离子水洗脱, -20°C 保存备用。

1.7 系统发育树的构建及分析

将实验菌株所得的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 Blast 比较,确定

与实验菌株亲缘关系最近的种属。并从数据库获得相关种属的 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA version 3.0^[12] 软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行聚类分析和系统进化树构建。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

从 12 份水样中筛选出在 10°C 生长较好的菌株 154 株, 其中丝状真菌 12 株, 酵母 46 株, 放线菌 6 株, 细菌 90 株。其中对细菌的大小、形状、革兰氏染色、产芽孢特性等进行了研究, 发现杆菌 70 株, 球菌 17 株; 革兰氏阴性菌 20 株, 革兰氏阳性菌 20 株。

2.2 菌株生长温度范围和最适生长温度的确定

对筛选出的 90 株细菌进行生长温度范围的测定, 结果表明 80% 的菌株在 4°C~35°C 均能生长, 属耐冷微生物。研究发现, 筛选的低温微生物最适生长温度大部分在 15°C~20°C 左右, 共计 65 株, 占有 90 株测试菌的 72%。

2.3 耐冷微生物耐受性及产酶特性

通过对菌体形态、菌落形态以及低温下长势的比较, 共选择了 87 株细菌进行了耐受性及产酶特性研究, 结果如表 1。经实验研究发现, 所有测试菌株都能在 1% NaCl 下生长, 其中能在 4% NaCl 以上生长的共有 44 株, 占有所有测试的 87 株中的 51%。能在 0.2% 苯酚下生长的有 16 株, 占 18%, 能在 0.5% SDS 下生长的菌株有 33 株, 占总数的 38%。

在 15°C 以下低温培养条件下具有淀粉酶活性的菌株有 40 株, 蛋白酶活性的有 30 株, 脂酶活性的有 27 株。同时具有 2 种酶活性的菌株有 30 株, 具有 3 种酶活性的菌株有 5 株。其中菌株 67 具有两种酶活性, 且同时具有耐盐、耐酚、耐表面活性剂的特性, 具有良好的应用前景。

2.4 16S rRNA 基因序列分析

通过测序获得 16S rRNA 基因全序列, 与 GenBank 中序列比对并进行系统发育树分析得知, 所得到的 60 株细菌分离株分布于 13 个属: 假单胞菌 (*Pseudomonas*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、隐

表 1 低温污水中部分耐冷微生物产酶及耐受性特征
Table 1 Characteristics of partial psychrotrophs from low temperature sewage

菌株 Strain	生长温度范围 Temperature rang of growth (°C)	最适生长温度 Optimum growth temperature (°C)	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	脂酶 Lipase	4% NaCl	0.2% 苯酚 0.2% phenol	0.5% SDS
1	4~35	15°C (0.6)	+	-	+	-	-	-
2	4~35	20°C (0.7)	+	+	-	+	+	-
6	4~35	20°C (0.7)	-	+	-	-	+	-
8	4~35	15°C (0.5)	+	-	+	-	+	-
9	4~35	20°C (0.6)	-	+	+	-	-	-
10	4~35	15°C (0.7)	-	+	-	+	-	+
11	4~35	20°C (0.8)	-	+	-	+	+	-
8	4~35	20°C (0.7)	+	-	-	+	+	+
9	4~35	20°C (0.7)	-	-	+	-	+	-
22	4~35	15°C (0.4)	-	+	+	+	+	-
25	4~35	20°C (0.6)	-	-	+	+	-	-
29	4~35	15°C (0.7)	-	+	+	-	+	+
30	4~35	20°C (0.7)	+	-	-	-	-	-
35	4~35	15°C (0.5)	-	-	+	+	-	+
36	4~35	15°C (0.5)	+	+	+	+	-	+
59	4~35	20°C (0.7)	+	-	-	+	-	-
67	4~30	10°C (0.3)	+	-	+	+	+	+
79	4~35	20°C (0.7)	-	-	-	+	-	-
83	4~35	20°C (0.7)	+	+	-	+	-	+

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

杆菌属(*Empedobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、环丝菌属(*Brochothrix*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、香味菌属(*Myroides*)、明串球菌属(*Trichococcus*)、*Anthinobacterium*、*Rheinheimera*; 其中,假单胞菌最多,共计21株,涉及8个种,占有测序菌株的35%以上。表2为全部测序菌株比对统计。

表2 根据16S rRNA基因序列比对的细菌分离株的鉴定
Table 2 Identification of the bacteria isolates based on sequences of the 16S rRNA gene

Identification (nearest genus)	Similarity (%)	No. of isolates
<i>Pseudomona</i>	97~100	21
<i>Acinetobacter</i>	96~100	8
<i>Flavobacterium</i>	97~99	5
<i>Arthrobacter</i>	98	5
<i>Empedobacter</i>	97~99	4
<i>Enterobacter</i>	96~100	3
<i>Brochothrix</i>	97~100	3
<i>Exiguobacterium</i>	98~99	3
<i>Shewanella</i>	97~99	3
<i>Myroides</i>	98	2
<i>Trichococcus</i>	98%	1
<i>Anthinobacterium</i>	97	1
<i>Rheinheimera</i>	98	1

其中筛选出的菌株39,与不动杆菌属种间进化的已知标准菌株 *Acinetobacter lwoffii* (DSM2403)最高同源性为96.6%,极可能为新种,菌株的NJ进化树见图1。

3 结论

利用4种筛选培养基,对乌鲁木齐市污水处理厂低温水样中的耐冷微生物进行了筛选,共获得各种菌株154株,其中丝状真菌12株,酵母46株,放线菌6株,细菌90株。并对部分菌株进行了耐受性及产酶情况的研究,发现绝大部分菌株最适生长温度为15°C~20°C左右,51%的菌株耐受4% NaCl,18%的菌株耐受0.2%苯酚,38%菌株耐受0.5% SDS。并且大部分具有分泌低温酶的能力。

通过形态及生理特性,选择了60株细菌进行了16S rRNA测序,通过比对发现60株细菌分离株分布于13个属,其中假单胞菌分布最多,共计21株,占有测序菌株的35%以上。菌株39极可能为新种。

本研究发现,低温污水中存在着丰富的耐冷微生物及种属多样性,且具有较好的耐受性及产酶特性,预示着低温污水可能是重要的潜在微生物资源库。同时,研究获得的部分具有各种酶活和耐受性的菌株,为低温污水的处理以及人工投放污泥奠定了坚实的应用基础。

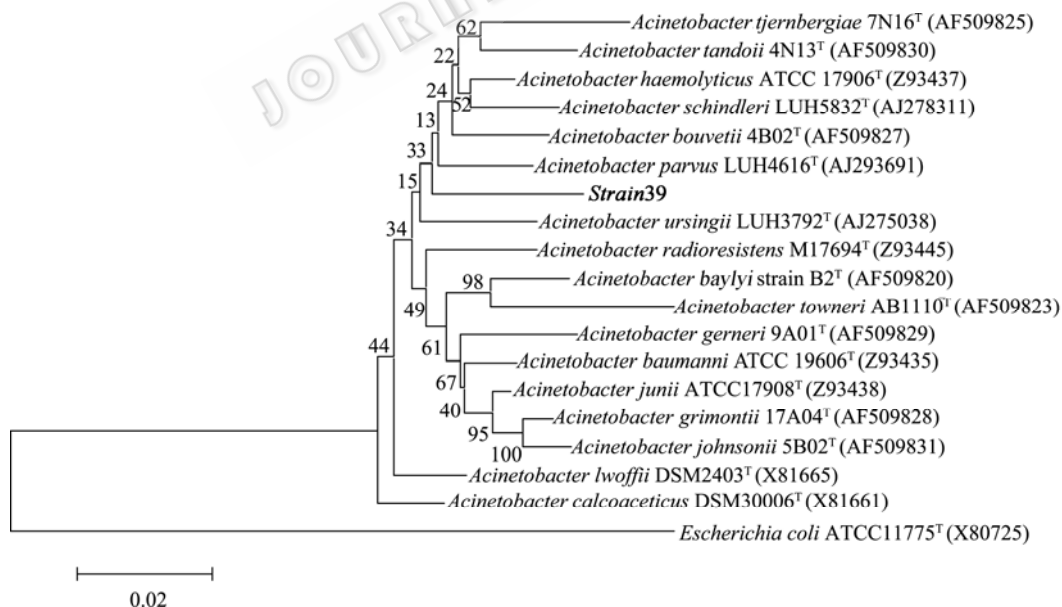


图1 依据16S rRNA序列构建的不动杆菌属实验菌株及相关种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences showing the positions of strain 39

Note: Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). The sequence of *Escherichia coli* ATCC11775^T (X80725) was used as outgroup nodes. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position.

参 考 文 献

- [1] 王凯军, 贾立敏. 城市污水生物处理新技术开发与应用. 北京: 化学工业出版社, 2000, pp.1-10.
- [2] 李亚选, 张晓玲, 姜安玺, 等. 低温菌去除污染物的研究现状. 广州环境科学, 2006, 21(2): 14-18.
- [3] 李亚选, 负英伟, 焦瑞虎, 等. 低温耐冷菌在寒冷地区生活污水处理中的应用. 应用科技, 2007, 34(4): 63-66.
- [4] 辛明秀, 马延和. 嗜冷菌和耐冷菌. 微生物学通报, 1999, 26(2): 155, 109.
- [5] 姜安玺, 孟雪征, 曹相生, 等. 耐冷菌的分离及在低温污水处理中的应用研究. 哈尔滨大学学报, 2002, 34(4): 563-565.
- [6] 马文成, 韩洪军. 混合耐冷菌群的优化筛选及应用研究. 环境工程学报, 2008, 2(7): 891-895.
- [7] 贲岳, 陈忠林, 徐贞贞, 等. 低温生活污水处理系统中耐冷菌的筛选及动力学研究. 环境科学, 2008, 29(11): 3189-3193.
- [8] Rosa Margesin, Pierre-Alain Fonteyne, Bernhard Redl. Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by rhodococcus SPP and basidiomycetous yeasts. *Res Microbiol*, 2005, 156(1): 68-75.
- [9] R Margesin, F Schinner. Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate at low temperatures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998, 41(2): 139-143.
- [10] R Magresin, F Schinner. Low-temperature bioremediation of a wastewater contaminated with anionic surfactants and fuel oil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(4): 482-486.
- [11] 穆瑞林. 城市污水低温生化处理技术研究. 中国给水排水, 1985, 3: 8-13.
- [12] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.

2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫, 病毒及药物学会 (SNIP) 年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009 国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5月 29-31日	400	北京	www.fungalinfection.cn /isham2009 何苗苗 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8月 17-19日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8月 20-25日	600	上海	白林泉 021-62932418

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>