

# 嗜水气单胞菌 RB5-M1 的分离鉴定及脱色条件研究

于文娟 谢学辉\* 洪武林 范凤霞 柳建设\*

(东华大学 环境科学与工程学院 上海 201620)

**摘要:** 【目的】筛选具有高效脱色活性黑 5 能力的菌株。【方法】利用梯度浓度驯化法, 从上海松江污水处理厂的活性污泥中分离获得了一株具有良好脱色能力的细菌 RB5-M1。

【结果】经形态学观察、生理生化特性鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析, 发现该菌株与嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的同源性达到 99.86%。【结论】菌株 RB5-M1 在 35 °C、pH 8.0 的条件下, 厌氧条件培养(氮气 85%、二氧化碳 6%) 24 h, 测定的平均脱色率可达 94.1%, 最高脱色率为 99.8%。

**关键词:** 生物脱色, 活性黑 5, 嗜水气单胞菌, 分离, 鉴定, 16S rRNA

## Isolation, identification and biological decoloring conditions of *Aeromonas hydrophila* strain RB5-M1

YU Wen-Juan XIE Xue-Hui\* HONG Wu-Lin FAN Feng-Xia LIU Jian-She\*

(College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

**Abstract:** [Objective] The purpose was to develop some bacterial strains that could decolorize reactive black 5 effectively. [Methods] We isolated a bacterial strain which has strong decolorization ability, by the method of domestication with gradient concentrations, from activated sludge of Songjiang sewage treatment plant in Shanghai. [Results] According to its morphological, physiological characteristics and the analysis of 16S rRNA gene analyses for strain identification, >99.86 % of gene sequences in isolated strain RB5-M1 were similar to *Aeromonas hydrophila* compared to available gene sequences in the NCBI BLAST gene bank. [Conclusion] When the strain was cultivated in anaerobic cultural incubator (nitrogen 85%,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 50374075, 41073060); 上海市重点学科建设项目(No. B604)

\*通讯作者: 谢学辉: Tel: 86-21-67792535; 信箱: xiexuehui@dhu.edu.cn

柳建设: Tel: 86-21-67792973; 信箱: liujianshe@dhu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-14; 接受日期: 2011-12-12

carbon dioxide 6%), 35 °C, pH 8.0; it showed a decolorization rate performance of 94.1% for average value, 99.8% for maximum value.

**Keywords:** Biological decoloring, Reactive Black 5, *Aeromonas hydrophila*, Isolation, Identification, 16S rRNA

随着染料工业、印染工业的发展,大量的染料排放到环境中,目前全球每年以废物形式释放到环境中的染料达到 60 000 t<sup>[1]</sup>,导致环境和生态恶化,严重威胁人类和其他生态圈的平衡发展,受染料污染的河流严重影响了其景观美感和河流内生物种群的平衡,排放废水的色度较深,影响河流的入射光线,从而影响水生动植物的生长,严重破坏水体自净能力。因而染料废水的色度治理成为其排放达标控制的重要指标之一<sup>[2]</sup>。常规物理化学方法对于污染物质的降解反应通常是单一的、可预测的,然而微生物对污染物的降解途径通常是复合的、复杂的反应过程。且生物方法处理染料废水因其成本低廉而应用广泛。筛选对染料具有高效脱色、降解、吸附能力的菌株,是生物法处理染料废水的一个重要的研究内容<sup>[3]</sup>。

高效脱色微生物的获得及其脱色性能研究是微生物治理染料废水领域的重要工作。国内外研究人员发现某些微生物如细菌<sup>[4]</sup>、真菌<sup>[5]</sup>等对染料有较强的脱色能力,脱色率一般随着初始染料

浓度的增加而改变。其中研究最多细菌有芽孢杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、枯草芽孢杆菌、成团肠球菌、球形红细菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌,真菌中报道最多是白腐菌中的黄孢原毛平革菌(*Phanerochaeta chrysosporium*)<sup>[6]</sup>。细菌因其培养条件简单,繁殖容易,在工业微生物领域应用广泛<sup>[7]</sup>。

本文利用梯度浓度驯化法,从松江污水处理厂的活性污泥中分离出了一株对活性黑 5 有脱色作用的菌株 RB5-M1,通过形态学观察、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析对其进行了鉴定,并初步探讨了菌株 RB5-M1 的最佳脱色温度、pH、培养方式等条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 染料:** 活性黑 5, Dystar 公司生产。双偶氮类染料,分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>19</sub>S<sub>6</sub>, 分子量为 991.82, 特征波长 λ<sub>max</sub>=598 nm, 分子结构式如图 1 所示。

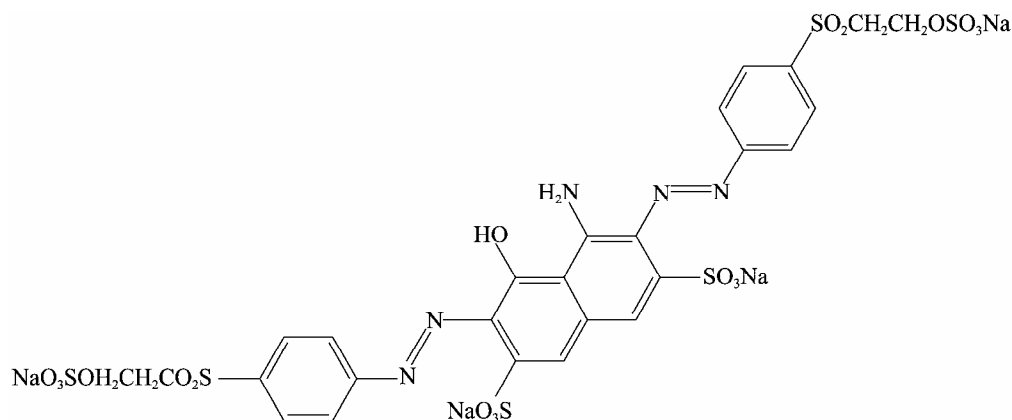


图 1 活性黑 5 (RB5)的分子结构式

Fig. 1 Chemical structure of reactive black 5 (RB5)

**1.1.2 培养基:** 驯化培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 染料 0.05–0.20; 富集培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5; 染料培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 染料 0.05。配制好的驯化培养基和染料培养基颜色均为深黑色液体, 富集培养基为浅黄色透明液体。液体培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 下灭菌 20 min 后冷却备用。各种固体培养基均为在原液体培养基的基础上添加 20 g/L 琼脂, 形成带有相应颜色的固体平板。

**1.1.3 仪器厂家:** Eppendorf 高速离心机, Eppendorf 艾本德中国有限公司; 恒温鼓风干燥箱, 上海显示有限公司; Thermo CO<sub>2</sub> 厌氧培养箱, 上海旦鼎国际贸易有限公司; HITACHI U-2910 型紫外可见分光光度计, 天美(中国)科学仪器有限公司; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计, 上海盛磁仪器有限公司; OLYMPUS CX31 双目微生物学显微镜, 北京中显恒仪仪器表有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 脱色菌株的分离筛选:** 从松江污水厂取新鲜的活性污泥用无菌玻璃珠打散制成污泥悬液, 取 10 mL 加入到含 90 mL 富集培养基的 250 mL 锥形瓶中, 35 °C 下恒温培养 12 h。在显微镜下观察培养液中微生物生长状况, 以未加菌液的富集培养基为空白, 用分光光度法测定培养液的  $OD_{600}$  值。当视野范围内微生物活动频繁,  $OD_{600}$  在 1.0 左右时, 可对其用驯化培养基在厌氧培养箱(氮气 85%、二氧化碳 6%)内进行梯度浓度的驯化培养, 温度为 35 °C, pH 8.0。直到培养液颜色明显由深黑色变浅黄色(与不加染料的富集培养基颜色基本一致), 则驯化培养结束。取 10 mL 的驯化液加入到含 90 mL 富集培养基的 250 mL 锥形瓶中, 35 °C 恒温培养 24 h, 然后取该菌液梯度稀释后涂布到固体的染料培养基上, 35 °C 恒温培养, 直到长出单菌落。重复此步骤直到染料培养基固体平板上长出周围有明显脱色圈的单菌落, 将此单菌落挑出在液体富集培养基中培养 24 h,

测定其脱色率, 若脱色率大于 10%, 则认定该菌株有脱色能力。脱色率的测定按照下文 1.3 中所述步骤进行。

**1.2.2 形态及生理生化特征:** 将处于稳定期的菌液制片, 在光学显微镜下观察, 并做革兰氏染色。对固体平板上菌落进行形态观察。菌株的生理和生化特征实验测定方法及初步的鉴定见《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[8]</sup> 及《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition)》<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 16S rRNA 基因测序:** 菌体在液体培养基培养至对数期, 取 1 mL 菌液使用上海生工公司基因组抽提试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取 DNA<sup>[10]</sup>。用细菌通用引物对(正向引物 27F 5'-AGAGTTYGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'<sup>[11]</sup>)扩增菌株 16S rRNA 基因。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, 所用程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 扩增产物的纯化和测序由上海生工生物技术有限公司完成, 测序结果用 BLAST 软件于 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 用 ClustalX 软件进行系统发育树分析。

**1.2.4 脱色率的测定:** 将菌株 RB5-M1 在染料培养基中培养, 设定不同温度、pH、培养方式, 隔一定时间从培养液中取出 10 mL 样液, 经 10 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液, 以未加菌液的染料培养基为空白, 测量上清液在染料最大吸收波长处的吸光度值, 即  $OD_{598}$ , 并根据下式计算染料脱色率, 以此来表示菌体的脱色能力。

$$\text{脱色率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%.$$

$A_1$ : 脱色后样品在 598 nm 的  $OD$  值;  $A_0$ : 脱色前样品在 598 nm 的  $OD$  值。

**1.2.5 培养方式对脱色的影响:** 取 10 mL 菌液加入 90 mL 的染料培养基中, 温度为 35 °C, pH 8.0。选择静置培养、摇床培养、厌氧培养 3 种方式初步测定其最佳培养方式。其中, 静置培养条件为

温度 35 ℃, pH 8.0, 恒温培养箱中静置培养; 摇床培养条件为温度 35 ℃、pH 8.0、转速 150 r/min、摇床中振荡培养; 厌氧培养条件为温度 35 ℃、pH 8.0、厌氧培养箱(氮气 80%, 二氧化碳 6%)中厌氧培养。

2 结果与讨论

2.1 脱色菌株的筛选分离及鉴定

2.1.1 脱色菌株的筛选分离: 经筛选分离得到 6 株对活性染料具有脱色作用的菌株, 结果见表 1, 选取脱色性能最好的 RB5-M1 菌株作为后期进行脱色条件研究的菌株。菌株 RB5-M1 在多次重复试验中测得的平均脱色率为 94.1%, 最高脱色率为 99.8%。

表 1 不同菌株的脱色率		
Table 1 Decolorization rate of different strains		
编号 No.	命名 Name	平均脱色率 Decolorization rate on average (%)
1	RB5-M1	94.1
2	RB5-M2	87.4
3	RB5-M3	72.5
4	RB5-M4	69.3
5	RB5-M5	83.4
6	RB5-M6	62.0

2.1.2 细菌形态学观察与生理生化试验: 菌株 RB5-M1 为革兰氏阴性菌, 扫描电子显微镜显示, 该菌为短杆状, 如图 2 所示。在固体培养基上, 35 ℃ 经 24–48 h 培养形成直径为 3 mm–4 mm 大小的菌落, 如图 3 所示。菌株 RB5-M1 的菌落特征为不透明、黄色、扁平、表面光滑蜡状、边缘锯齿状、较粘稠、易挑起。菌株 RB5-M1 主要生化特性为兼性厌氧, 氧化酶和过氧化氢酶试验为阳性, 根据其生理生化试验指标(表 2)初步鉴定其为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

2.1.3 16S rRNA 基因序列分析: 测序获得菌株 RB5-M1 的 16S rRNA 基因序列(1 442 bp),

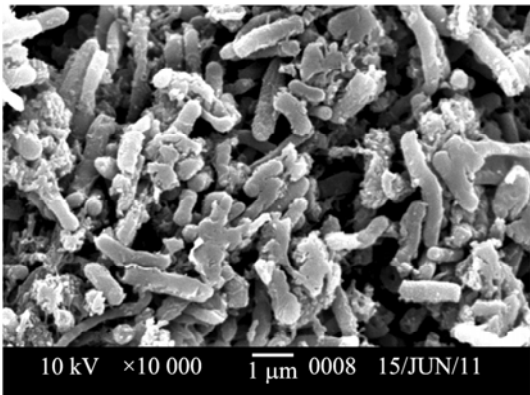


图 2 菌株 RB5-M1 的扫描电镜照片  
Fig. 2 SEM image of strain RB5-M1

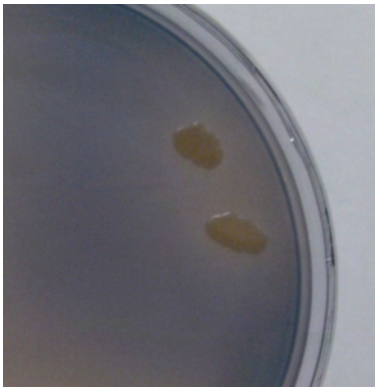


图 3 菌株 RB5-M1 菌落照片  
Fig. 3 Colony image of strain RB5-M1

GenBank 序列登录号为 JN019024。16S rRNA 基因序列与 GenBank 中已有的嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* strain 菌株相似性为 99.86% 以上。菌株 RB5-M1 的 16S rRNA 基因序列的系统发育树见图 3。

结合菌株 RB5-M1 的主要形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分析结果, 鉴定该菌株为嗜水气单胞菌, 命名为 *Aeromonas hydrophila* strain RB5-M1。

2.2 培养条件对菌株 RB5-M1 脱色的影响

2.2.1 脱色菌 RB5-M1 的生长曲线和脱色曲线: 取 10 mL 菌液加入 90 mL 的富集培养基中, 温度为 35 ℃、pH 8.0、厌氧条件(氮气 85%、二氧化碳

表 2 菌株 RB5-M1 的生理生化特征  
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain RB5-M1

测试项目 Items	试验结果 Results
革兰氏染色试验 Gram stain test	—
过氧化氢酶试验 Catalase test	+
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	—
尿素酶试验 Urease test	+
葡萄糖发酵实验 Glucose fermentation test	+
V.P 试验 VP test	—
硫化氢-靛基质-动力琼脂试验 SIM test	+
精氨酸双水解酶肉汤 Arginine dihydrolase test	+
精氨酸双水解酶对照 Arginine dihydrolase controlled test	+
胆汁七叶苷 Bile esculin agar test	+
氧化酶试验 Oxidase test	+
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	+
需氧性测试 Aerobic test	兼性厌氧

注: +:阳性; -:阴性。  
Note: +: Positivity; -: Negativity.

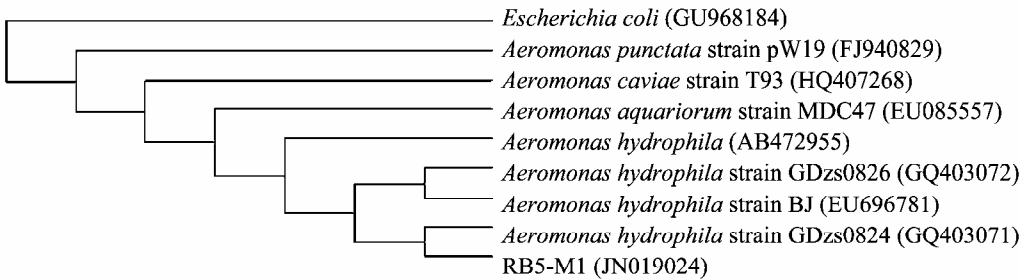


图 4 RB5-M1 菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenic tree derived from 16S rRNA gene sequence of RB5-M1 strain

注: 括号内数字为菌株的 GenBank 登录号。  
Note: The number in the bracket denotes the GenBank accession number.

6%)培养。取不同时间的菌液,以未加菌液的富集培养基为空白,测量其在 600 nm 下的吸光度值,即  $OD_{600}$ 。根据不同时间  $OD_{600}$  的变化绘制生长曲线,如图 5 所示。

取 10 mL 菌液加入 90 mL 的染料培养基中,温度为 35 °C、pH 8.0、厌氧条件(氮气 85%、二氧化碳 6%)培养。取不同时间的菌液,以未加菌

液的染料培养基为空白,离心后取上清液测量其在 598 nm 下的吸光度值,即  $OD_{598}$ 。根据不同时间  $OD_{598}$  的变化绘制生长曲线,如图 6 所示。可以看出,培养时间达到 24 h 时,菌株 RB5-M1 已达到对数期的顶峰,此时的脱色率为 94.1%。可见菌株 RB5-M1 易生长,脱色快,在实际废水处理中,能够快速解决色度问题。

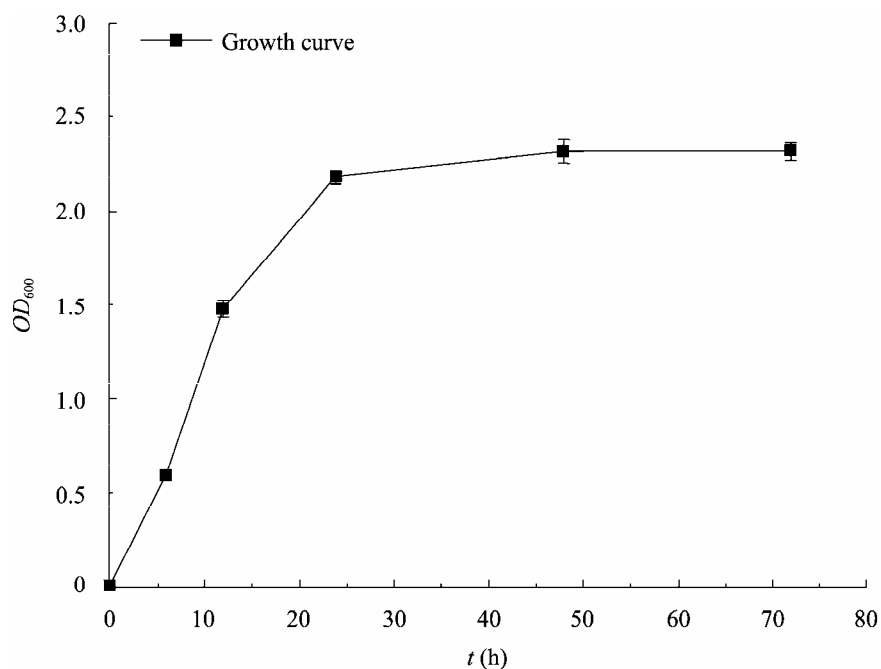


图 5 菌株 RB5-M1 生长曲线  
Fig. 5 Growth curve of strain RB5-M1

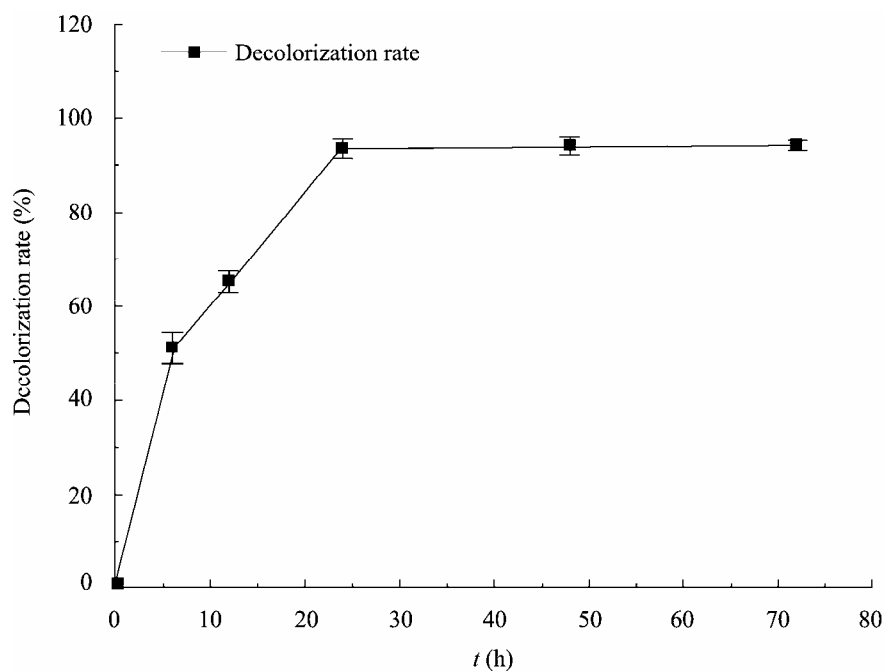


图 6 菌株 RB5-M1 脱色曲线  
Fig. 6 Decolorization curve of strain RB5-M1

**2.2.2 脱色最适温度的确定:** 在不同温度下, 脱色率随时间的变化如图 7 所示, 当温度低于 40 °C 时, 脱色率明显较高, 其中温度为 35 °C 时脱色率最高, 24 h 测定脱色率达到 94.1%; 而温度为 40 °C 时, 脱色率最低, 48 h 测定脱色率为 30.7%。因此菌株脱色的最适温度为 35 °C。

**2.2.3 脱色最适 pH 的确定:** 在不同温度下, 脱色率随 pH 的变化如图 8 所示, 在相同温度下, pH 5.0–9.0 时脱色率均较高, pH 4.0 或 pH 10.0 时, 24 h 测定的脱色率分别为 4.7% 和 5.6%。该菌株脱色性能最佳的 pH 为 8.0, 当 pH 8.0、温度为 35 °C 时, 24 h 测定的脱色率为 94.1%。培养 72 h 后, 测定培养基最终 pH, 如表 3 所示, 初始 pH 为 4.0–10.0, 最终 pH 为 5.0–8.5。由此可见, 菌体可调节环境酸碱度, pH 9.0 和 pH 10.0 的染料培养基在脱色前后 pH 变化较明显, 因此利用该菌株处理碱性染料废水时, 不仅可去除色度, 可能还可适当降低废水的碱性。

**2.2.4 氮气和二氧化碳对脱色的影响:** 不同的

N<sub>2</sub> 与 CO<sub>2</sub> 的比例对菌株 RB5-M1 脱色的影响如图 9 所示, 当 N<sub>2</sub> 与 CO<sub>2</sub> 的比例为 5.0: 85.0 时, 培养 24h 后测得菌液脱色率最高为 83%。当 N<sub>2</sub> 与 CO<sub>2</sub> 的比例为 6.0: 85.0 时, 培养 24h 后测得菌液脱色率最高为 94.1%。当二氧化碳气体占比>6.0% 时, 对于细菌脱色有明显的抑制作用。

根据 Rau J 等<sup>[12]</sup>的研究, 二氧化碳含量升高, 环境中氧气含量降低, 会导致氧化还原电势降低。当氧化还原电势低于-320 mV, 菌体细胞首选 NAD(P)H 作为电子受体, 这时脱色率会显著上升。但过高的二氧化碳含量可能会导致细菌生长微环境的 pH 降低, 而根据前文对最佳 pH 的试

表 3 菌株 RB5-M1 培养前后 pH 变化							
Table 3 pH changes after decolorization							
样品编号 No.	1	2	3	4	5	6	7
初始 pH Initial pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
脱色后 pH pH after decol- orization	5.0	5.7	6.1	6.3	6.8	7.5	8.5

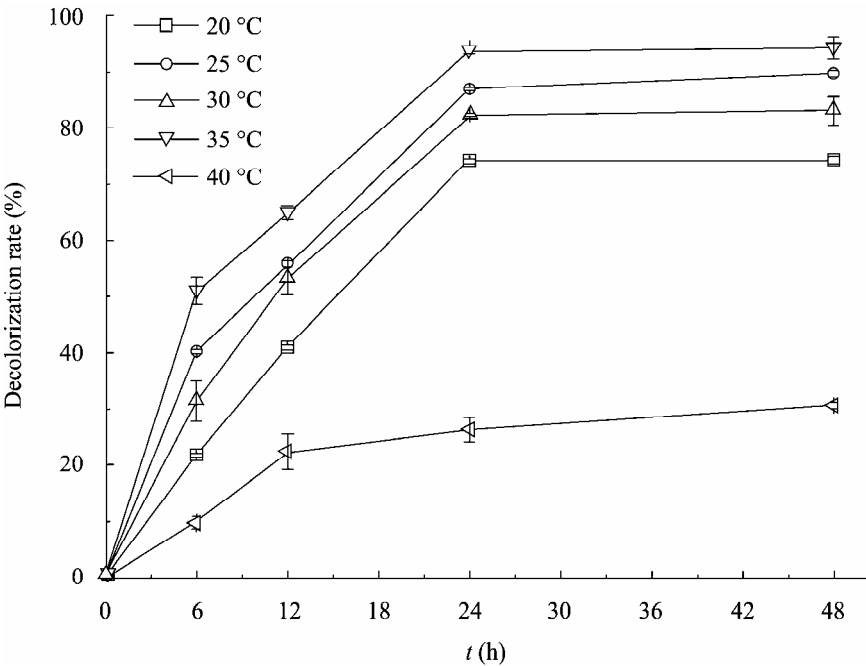


图 7 温度对脱色率的影响  
Fig. 7 Effect of temperature on decolorization rate

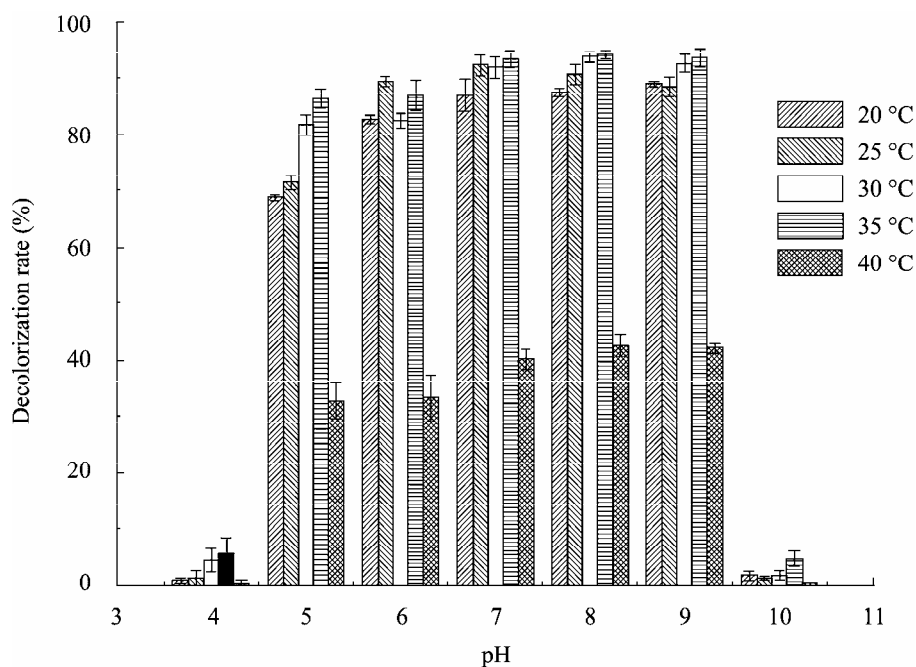


图 8 pH 对脱色率的影响  
Fig. 8 Effect of pH on decolorization rate

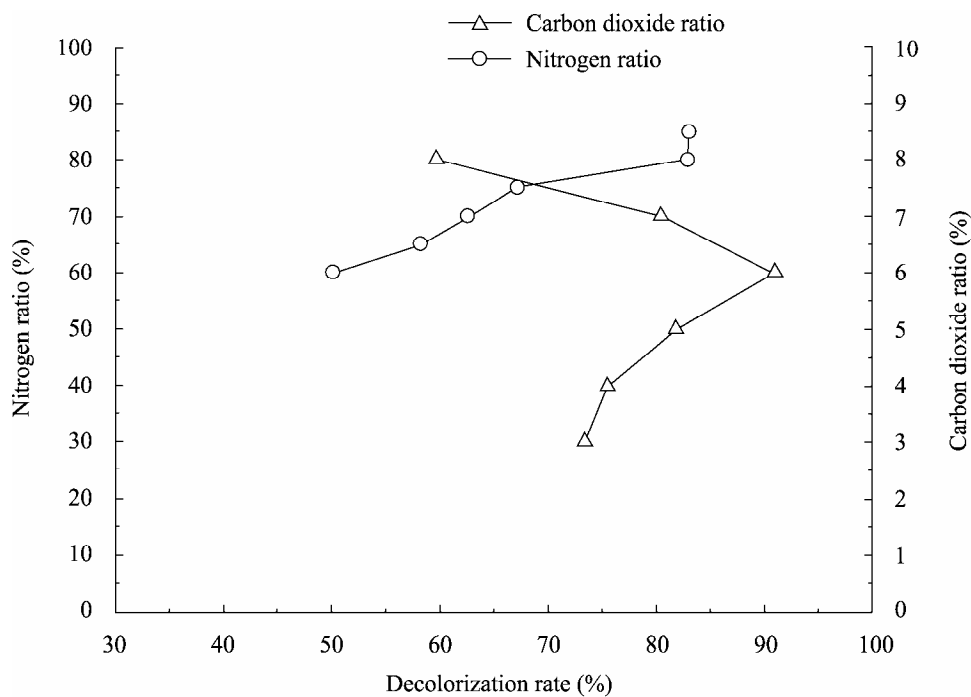


图 9 气体占比对脱色率的影响  
Fig. 9 Effect of gas ratio on decolorization rate



验研究可知,脱色率在碱性环境( $\text{pH}>7.0$ )下要高于酸性环境( $\text{pH}<7.0$ ),因此在本试验的培养条件下,二氧化碳含量高于 6%时,不利于菌株 RB5-M1 的脱色。

**2.2.5 培养方式对脱色的影响:**从图 10 可见,在培养初期 0–24 h 内,厌氧培养的脱色速率上升最

快,静置培养的脱色速率次之,摇床培养的脱色速率最慢;进入培养中后期 24–72 h,厌氧培养方式脱色率增加速率减缓,而静置培养方式的脱色率明显增加,72 h 后静置培养与厌氧培养的脱色效率几乎持平,约为 90%,摇床培养的脱色率仅为 25%。

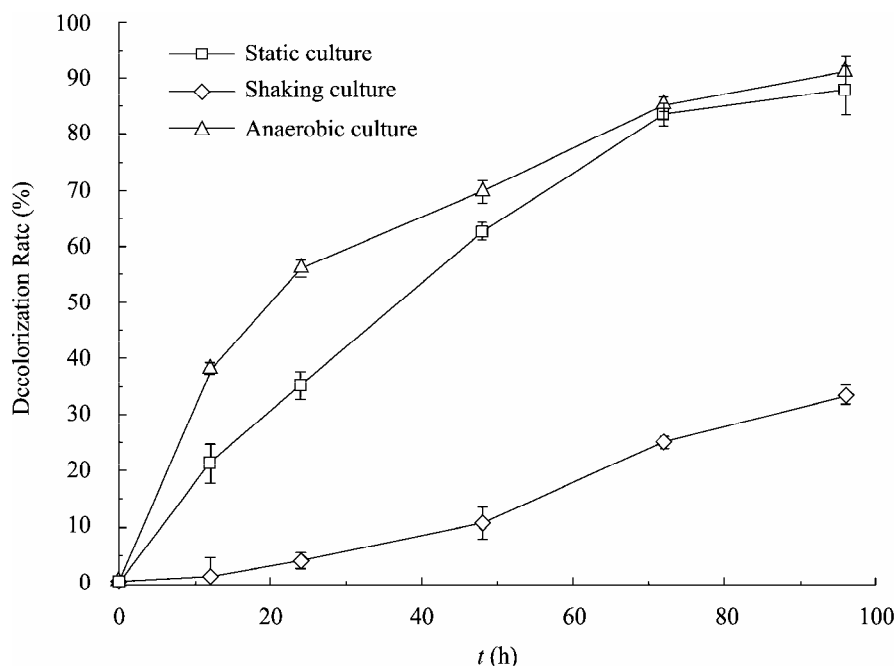


图 10 培养方式对脱色率的影响

Fig. 10 Effect of cultivation mode on decolorization rate

### 3 结论

(1) 从活性污泥中筛选分离得到了一株具有良好脱色能力的菌株 RB5-M1。经鉴定菌株 RB5-M1 为嗜水气单胞菌,命名为 *Aeromonas hydrophila* strain RB5-M1。

(2) 菌株 RB5-M1 脱色最适温度为 35 °C, 最佳 pH 为 8.0, 24 h 最高脱色率为 99.8%。

(3) 不同培养方式对菌株 RB5-M1 的脱色率有显著影响。根据我们的实验结果设想,若设计适当的反应器,采用静置培养方式来对染料废水进行脱色处理,相比于厌氧或好氧条件可在达到

预期效果的同时大大节约成本。

### 参考文献

- [1] 李家珍. 染料染色工业废水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994: 138–142.
- [2] 魏剑斌, 付永胜, 朱杰, 等. 印染废水生物脱色研究现状及展望[J]. 污染防治技术, 2003, 16(4): 87–91.
- [3] 程云, 周启星, 马奇英, 等. 染料废水处理技术的研究与进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2003, 4(6): 56–60.
- [4] Wu J, Li LG, Du HW, et al. Biodegradation of leuco

- derivatives of triphenylmethane dyes by *Sphingomonas* sp. CM9[J]. Biodegradation, 2011, 22(5): 897-904.
- [5] Zhuo R, Ma L, Fan FF, et al. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 192(2): 855-873.
- [6] Enayatizamir N, Tabandeh F, Rodríguez-Couto S, et al. Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye Reactive Black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10359-10362.
- [7] Chen BY, Wang MY, Lu WB, et al. Use of active consortia of constructed ternary bacterial cultures via mixture design for azo-dye decolorization enhancement[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 145(3): 404-409.
- [8] 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: 107.
- [9] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd ed. USA: Department of Microbiology and Molecular Genetics Michigan State University East Lansing, 2004: 112.
- [10] 钱林, 郑巧利, 付瑾, 等. 一株高效纤维素降解菌株的分离鉴定及其酶学性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 524-528.
- [11] Liu JS, Xie XH, Xiao SM, et al. Isolation of *Leptospirillum ferriphilum* by single-layered solid medium[J]. Journal of Central South University of Technology, 2007, 14(4): 467-473.
- [12] Rau J, Knackmuss HJ, Stolz A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria[J]. Environmental Science and Technology, 2002, 36(7): 1497-1504.

## 栏目介绍

### 教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2-5 张, 文字 1 000 字以内。
- 2、展示单位将获赠当期刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘 (1974-2006) 一张。
- 3、参展单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站免费发布一年, 或将单位网址与我刊友情链接。
- 4、参展单位应保证宣传材料真实客观, 来稿请加盖公章, 文责自负。
- 5、本栏目将适当收取版面制作费。
- 6、本栏目联系方式:

电话: 010-64806142

E-mail: gg@im.ac.cn

联系人: 王闵