

文章编号: 1000-5013(2008)01-0038-04

一株苯胺蓝降解菌的分离鉴定及其降解特性

吴 楚, 王 慧, 郑天凌

(厦门大学生命科学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 从河水中驯化、筛选、分离得到一株对染料苯胺蓝有降解能力的菌株 WZR-B, 该菌能以苯胺蓝为唯一碳源、能源生长. 通过对菌株 WZR-B 的形态特征、生理生化, 以及 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*). 研究苯胺蓝的质量浓度、pH 值和温度等因素对该菌株生长, 以及对降解苯胺蓝的影响. 结果表明, 菌株生长和脱色的最适 pH 值为 6.5, 最适合温度为 30 ℃, 苯胺蓝的最适脱色质量浓度为 200 mg · L⁻¹. 此外, 总有机碳(TOC)残留量测定结果表明, 该菌株对苯胺蓝的脱色率可达 83%, TOC 去除率为 80% 以上, 不仅能对苯胺蓝脱色, 而且还能进行矿化降解.

关键词: 苯胺蓝; 生物降解; 脱色; 假单胞菌

中图分类号: X 172; Q 939.11+2; X 791.031

文献标识码: A

印染和染料工业是现代工业中对环境污染比较严重的行业, 在生产和使用过程中大约有 10% ~ 20% 的染料会直接随废水进入环境中^[1]. 目前, 常用的染料废水处理方法有物化方法和生物方法^[2]. 其中, 生物法在处理染料废水中有明显的优势, 已受到越来越多的关注. 特别是微生物的脱色能力, 在近 10 年来得到比较广泛的研究. 利用微生物进行染料脱色和降解, 被认为是经济有效地去除这些污染物的方法^[3-4]. 染料品种繁多、结构差异大, 其生物降解性能有很大的差别, 结构的细微差别如空间结构、电子分布与电子云密度, 都会明显影响染料的可生物降解性. 在染料家族中, 三苯甲烷染料是仅次于偶氮染料的一个大类, 其化学结构特点使它们难以被微生物降解^[1,5]. 尽管近年来, 国内外关于染料脱色菌的研究很多^[7-9], 但对三苯甲烷染料, 特别是复杂三苯甲烷染料脱色降解菌的研究却很少. 苯胺蓝是三苯甲烷染料类的高分子量染料, 在自然条件下极难分解, 国内外迄今未见有利用细菌降解的报道. 本实验选用苯胺蓝作为研究对象, 从河水中驯化、筛选得到一株能以苯胺蓝作为唯一碳源、能源的假单胞菌, 并进行相关性的特性研究.

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基 (1) LB 培养基(g · L⁻¹): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH = 7.2. (2) 基础培养基(MS, g · L⁻¹): Na₂HPO₄ · 12H₂O 5.37, KH₂PO₄ 1.02, NH₄Cl 0.22, MgSO₄ 0.005, CaCl₂ 0.002, 微量元素 1.0 mL, 加入相应质量浓度的苯胺蓝, pH = 7.0. 其中, 微量元素(g · L⁻¹): FeSO₄ · 7H₂O 1.0, MnSO₄ · H₂O 1.0, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.25, H₃BO₃ 0.1, CuCl₂ · 2H₂O 0.25, ZnCl₂ 0.25, NH₄VO₃ 0.1, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.25, NiSO₄ · 6H₂O 0.1. 固体培养基中加入琼脂粉 15 g · L⁻¹. (3) 富集培养基. 基础培养基中加 0.2~0.5 g · L⁻¹ 酵母粉.

1.1.2 试剂和仪器 (1) 试剂. 苯胺蓝(C₃₂H₂₅N₃O₉S₃Na₂, 分子量为 737.72). 试验中所用化学试剂

收稿日期: 2007-12-14

作者简介: 吴 楚(1974-), 男, 讲师; 通讯作者: 郑天凌(1955-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事环境微生物的研究. E-mail: microzh@xmu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目(D0610021); 福建省重大专项前期研究项目(2005YZ1023); 厦门市科技计划项目(3502Z20073009)

均为分析纯。Taq 酶及生化试剂购自辽宁大连宝生物公司或北京鼎国生物技术有限公司。(2) 仪器。SHIMADZU UV-2401 PC 紫外分光光度计(日本),Eppendorf 冷冻离心机(德国),Apollo 9000 型总有机碳测定仪(美国),Biometra PCR 仪(德国),GelDoc-It UVP 凝胶成像系统(美国)。

1.2 菌株的分离和纯化

苯胺蓝降解菌的分离源为浙江温州地区的河水,经 10 多轮的驯化、筛选、分离,并经平板划线纯化,得到一株以苯胺蓝为唯一碳源的菌株,命名为 WZR-B。该菌可在 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苯胺蓝基础培养基中,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $150\sim 200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下传代培养。

1.3 16Sr DNA 序列分析方法

采用菌落聚合酶链式反应(PCR)扩增 16Sr DNA。用于 16Sr DNA PCR 反应的引物为一对通用引物。正向引物 BSF8/20: $5'\text{-AGAGT TTGAT CCTGG CTCA G-3'}$; 反向引物 BSR1541/20: $5'\text{-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'}$ 。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。50 μL 的 PCR 反应体系包括: 5 μL 的 $10\times$ PCR 缓冲液, 4 μL $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 , 2 μL $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTP, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物 BSF8/20 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物 BSR1541/20 各 1 μL , 1 μL 模板 DNA, 5 μL $5.0\times 10^5\text{ u}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Taq 酶, 35.5 μL 重蒸水。PCR 程序有如下 5 个步骤。(1) $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min。(2) $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min; $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 min。(3) 步骤(2)循环 29 次。(4) $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min。(5) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置。琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物的测序由上海博亚生物技术有限公司完成,得到的菌株 WZR-B 的 16Sr DNA 序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析。

1.4 生理鉴定方法

菌株 WZR-B 的生理鉴定是通过 Biolog 微生物自动鉴定仪完成的。在 Biolog 96 孔平板上,除对照孔不含碳源外,每孔都含有四唑紫缓冲营养培养基和不同碳源。被鉴定的细菌细胞悬浮于微孔中,培养 4, 24 h 后,分别用 Biolog 细菌自动鉴定仪分析它们对各种碳源的利用情况,检测供试菌株的代谢指数。

1.5 菌株的生长和脱色能力的测定方法

菌株 WZR-B 在 0.1% 苯胺蓝的富集培养基中培养 3 d,将培养液离心后倾去上清液,再用基础培养基洗涤 2 次。以 0.1% 的接种量将菌株 WZR-B 接入含苯胺蓝的基础培养基中,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床中培养。每 24 h 取 4 mL 上述液体培养基,于 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,在 585 nm 处(苯胺蓝的可见光最大吸收峰)测定上清液吸光值,测定试验前后吸光度值(D),计算脱色率(φ)。收集上述离心后的菌体,洗涤 2 次后,用 4 mL 基础培养基制成细胞悬液,测定吸光度以反映细菌生长情况。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态

该菌株呈革兰氏染色阴性,细胞形状为直杆状,边缘整齐光滑,在含苯胺蓝的基础培养基上可产生透明圈。

2.2 16Sr DNA 序列的相似性

PCR 扩增结果显示,菌株 WZR-B 的 16Sr DNA 的 PCR 产物约为 1 500 bp(碱基对)左右,符合预期产物长度。测序结果输入 GenBank 以 Blast 进行序列同源性比较表明,菌株 WZR-B 的 16Sr DNA 序列与 *Pseudomonas aeruginosa* 的 16Sr DNA 序列相似性高达 99%。

2.3 生化鉴定

将菌株 WZR-B 细胞悬浮液接种到 Biolog 板微孔中,培养 4, 24 h 后,测定降解菌株代谢指数。经 Biolog 细菌鉴定系统分析菌株 WZR-B 的代谢指数与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的相似性为 99%。结合上述的形态、生理鉴定、Biolog 测试结果与 16Sr DNA 序列分析结果,将 WZR-B 菌株初步鉴定为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

2.4 对菌株生长和脱色能力

菌株 WZR-B 在 0.1% 苯胺蓝的富集培养基中生长较好,3 d 就可达到对数期。按菌株 0.1% 的接种量接入到苯胺蓝质量浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础培养基中,培养 10 d,每 24 h 测定染料脱色率(φ)和细

菌浊度(D), 结果如图 1 所示. 从图 1 可以看出, 脱色率和菌体生长曲线的趋势相似. 接种了菌液的培养液为蓝色, 随着培养时间的延长, 蓝色变浅. 离心后菌体颜色为白色或灰白色, 而不是蓝色. 这说明菌株 WZR-B 的脱色机制并不是靠吸附染料脱色, 而是通过降解苯胺蓝脱色. 菌体在指数期时, 脱色速率明显加快; 进入稳定期 (144 h), 菌株对染料的脱色效果最好, 脱色率达 83% .

2.5 菌株生长和脱色的条件

2.5.1 pH 值 在 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胺蓝基础培养基中培养 7 d 后, 测定不同 pH 值的染料脱色率和细菌浊度, 如图 2 所示. 从图 2 可知, 当 pH 值为 6.5, 7.0 时, 细菌生长良好, 当 pH 值为 6.0, 7.5 时, 菌株生长缓慢, 而当 pH 值为 7.5, 8.0 时, 菌株生长很差. 因此, pH 值为 6.5 是菌株生长的最适 pH 值.

2.5.2 温度 在 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胺蓝的培养基, pH 值为 6.5 的条件下, 于不同温度进行培养, 7 d 后测定染料脱色率和细菌浊度, 结果如图 3 所示. 从图 3 中

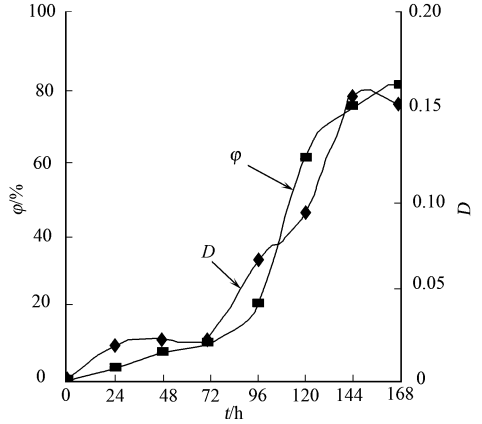


图 1 降解菌的生长与苯胺蓝脱色曲线

Fig.1 Growth curves of the isolate with aniline blue as sole carbon source and its decolorization curve

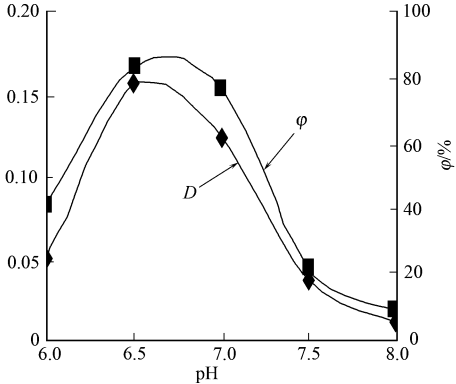


图 2 pH 值对菌体生长和脱色的影响

Fig.2 The effects of pH value on the growth of the isolate and on its degradation

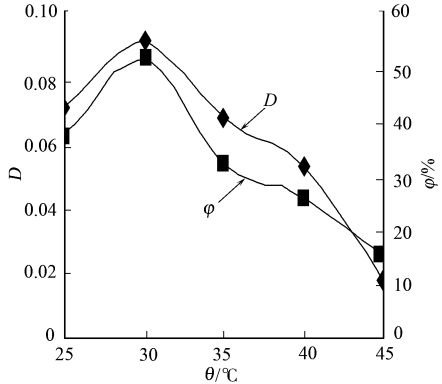


图 3 温度对菌体生长和脱色的影响

Fig.3 The effects of temperature on the growth of the isolate and on its degradation

可以看出, 菌株的生长和苯胺蓝的脱色受温度变化影响显著, 在 30 ℃左右达到最高生长水平和最高的苯胺蓝脱色率.

2.5.3 苯胺蓝质量浓度 将菌株 WZR-B 接种入 pH 值为 6.5, 苯胺蓝质量浓度为 $50\sim 250\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液中进行培养, 7 d 后测定培养物的细菌浊度, 结果如图 4 所示. 从图 4 中可以看出, 随着苯胺蓝质量浓度的增加, 培养液细菌浊度有增加的趋势. 当苯胺蓝质量浓度大于 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细菌浊度开始下降. 因此, $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为菌株 WZR-B 的最适脱色浓度, 在该浓度下培养菌株的浊度最大, 苯胺蓝脱色也完全. 这表明高浓度的苯胺蓝对菌株有毒性, 会抑制菌株 WZR-B 的生长并影响它对染料的脱色能力.

2.6 菌株降解苯胺蓝

将降解菌株接种在苯胺蓝质量浓度为 $200\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 6.5, 7.0 的基础培养基中, 于 30 ℃,

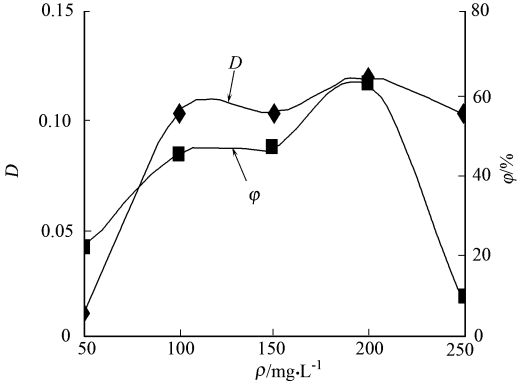


图 4 苯胺蓝质量浓度对菌体生长和脱色的影响

Fig.4 The effects of aniline blue mass concentration on the growth of the isolate and on its degradation

$180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下培养 7 d. 采用 TOC 测定仪测定总有机碳残留浓度. 结果表明, 总有机碳残留浓度与苯胺蓝脱色率相符, 说明该菌株不仅能对苯胺蓝脱色而且还能进行矿化降解.

3 结束语

本实验分离得到了一株苯胺蓝高效降解菌 WZR-B, 7 d 内降解率可达 80% 以上, 经 16Sr DNA 及 Biolog 分析鉴定为 *Pseudomonas aeruginosa*. 实验对各种影响该菌株生长与染料降解的因素进行了研究. 该菌株能以苯胺蓝为唯一碳源和能源生长, 这为进一步研究这类高分子量三苯甲烷染料的降解机理提供了良好的研究材料.

参考文献:

- [1] AZMI W, SANI R K, BANERJEE U C. Biodegradation of triphenylmethane dyes[J]. Enzyme Microb Technol, 1998, 22(2): 185-191.
- [2] PEARCE C I, LLOYD B J R, GUTHRIE J T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: A review[J]. Dyes and Pigments, 2003, 58: 179-196.
- [3] 安虎仁, 钱 易, 顾夏声. 染料在好氧条件下的生物降解性能[J]. 环境科学, 1994, 15(6): 16-19.
- [4] 宋文华, 颜 慧, 胡国臣, 等. 脱色酶和优势菌混合固定化降解染料的研究[J]. 城市环境与城市生态, 1999, 12(2): 5-7.
- [5] BANAT I M, NIGAM P, SINGH D, et al Microbial decolorization of textile dye-containing effluents: A review[J]. Bioresource Technology, 1996, 58: 217-227.
- [6] 成 文, 曾宝强. 孔雀绿染料的微生物脱色研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(4): 370-373.
- [7] 文湘华, 徐文东, 付莉燕. 活性翠兰 KN-G 脱色细菌的选育与研究[J]. 北京建筑工程学报, 2002, 18(3): 1-7.
- [8] 文湘华, 徐问东, 付梨燕. 偶氮染料派拉丁蓝 RRN 脱色细菌的选育和研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(S1): 127-132.
- [9] HE Fang, HU Wen-rong, LI Yue-zhong. Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS[J]. Water Research, 2004, 38: 3596-3604.

Isolation and Characterization of Aniline Blue-Degrading Bacteria

WU Chu, WANG Hui, ZHENG Tian-ling

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A strain WZR-B was domesticated, screened and isolated from a contaminative river, which can utilize aniline blue as the sole carbon and energy source for growth. It was preliminarily identified as *Pseudomonas aeruginosa* based on morphological, physiological and biochemical features and 16Sr DNA sequence. The effects of dye mass concentration, pH value and temperature on the growth of this strain and its degradation ability was studied. The results suggested that the optimum mass concentration for aniline blue decolorization was $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the optimum pH and temperature for decolorization were 6.5 and 30°C , respectively. Residual total organic carbon (TOC) analysis suggested that the TOC removal rate was greater than 80% and the aniline blue decolorization rate reached 83%, the strain can not only decolor aniline blue but also mineralized it.

Keywords: aniline blue; biodegradation; decolorization; *Pseudomonas aeruginosa*

(责任编辑: 黄仲一)