

高效聚磷鞘氨醇杆菌 XF-5 的分离与鉴定

李海峰^{1*}, 李志建², 屈建航¹

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001)

摘要: 采用寡营养与长时间培养方法, 从活性污泥与土壤样品中分离筛选到 7 株高效聚磷菌。以菌株的除磷率为考察指标, 确定其中的 XF-5 为高效聚磷菌株。对其培养条件进行优化, 并进行了生理生化特性的检测与系统发育分析。16S rRNA 基因序列的分析结果显示, XF-5 与鞘氨醇杆菌属的菌种同源性达 99%, 结合生长特点与生理生化特性, 初步确定该菌株为鞘氨醇杆菌 (*Novosphingobium* sp.)。当合成废水中总磷质量浓度为 10.0 mg/L 时, 将菌株 XF-5 在 28 ℃、pH 值为 6.5 的条件下培养 24 h, 除磷率可达 80% 以上。该菌株在污水除磷与水体富营养化的防治方面, 有潜在的应用前景。

关键词: 鞘氨醇杆菌; 聚磷菌; 鉴定

中图分类号: Q93-331 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)09-0068-05

Isolation and Identification of A High-efficient Phosphate Accumulating *Novosphingobium* sp. Strain XF-5

LI Hai-feng^{1*}, LI Zhi-jian², QU Jian-hang¹

(1. College of Bioengineering of Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Food Science and Technology of Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: A oligotrophic medium culture conditions was adopted to isolate and screen high phosphate accumulating bacteria from activated sludge and soil samples. After testing the phosphate accumulating rates, the strain XF-5 was chosen as a high efficient strain. In this study, physiological and biochemical characteristics and phylogenetic analysis were conducted for identification of the high efficient phosphorus removal strain. 16S rRNA gene sequence analysis showed that XF-5 and other species of the genus *Novosphingobium* had a homology of 99%. Combined with the growth and physiological and biochemical characteristics, XF-5 was finally identified as a member of *Novosphingobium* sp. When cultured in synthetic wastewater with total phosphorus concentration of 10 mg/L at 28 ℃, pH value of 6.5 for 24 h, the phosphorus accumulation rate of the strain XF-5 could reach more than 80%. So the strain could be used to remove phosphorus of sewage and then used to control eutrophication.

Key words: *Novosphingobium* sp.; phosphorus accumulating organisms; identification

水体富营养化已成为世界性的环境污染问题, 目前受污染的水体范围达到 30%~40%^[1]。就我国而言, 80% 以上的湖泊都已处于富营养化状态^[2]。水体富营养化的发生, 不仅会严重破坏生态平衡, 导致环境污染, 还会造成巨大的经济损失, 严重影响周

边居民的生产与生活。

研究表明, 对水体中磷的去除是防治富营养化的关键步骤^[3]。相较于除磷效率较低的物理吸附法与成本高且易产生二次污染的化学沉淀法, 生物除磷法的除磷效率更高, 更利于环境保护。而生物除

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000065); 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011B180012); 河南工业大学高层次人才科研基金项目(2011BS042, 2010BS058)

作者简介: 李海峰(1984-), 女, 河北涿鹿人, 讲师, 博士, 主要从事微生物与磷循环研究。E-mail: dragonfly1225@126.com

磷法主要是依靠聚磷菌(phosphorus accumulating organisms, PAOs)对水体中的磷进行“超量吸收”来实现的。

目前发现的聚磷菌菌体多为球形或杆状,可吸收远超过自身生长所需的磷量,菌体磷含量可达细胞干质量的10%以上^[4]。现已报道的聚磷菌包括不动杆菌(*Acinetobacter*)^[5]、气单胞菌(*Aeromonas* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[6]、莫拉氏菌(*Moraxella* sp.)、分支杆菌(*Mycobacterium* sp.)、贝日阿托菌(*Beggiatoa* sp.)、克雷伯氏杆菌(*Klebsiella* sp.)、聚磷小月菌(*Microthrix phosphovorus*)和产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)等。另外,随着分子生物学的发展,人们还发现了活性污泥中许多仍未获得纯培养的聚磷菌类群,*Candidatus Accumilibacter*就是其中得到认可的一个优势种群^[7]。笔者从活性污泥与土壤样品中共分离得到7株具有聚磷潜力的细菌,其中菌株XF-5的聚磷能力最强。在此基础上,对XF-5的生长条件与生理生化特性进行了鉴定,并对16S rRNA基因同源性进行了分析,从而确定了该菌株的系统发育地位。

1 材料和方法

1.1 样品来源

活性污泥样品采自郑州市五龙口污水处理厂,土壤样品来源于河南工业大学校园,样品采集后立即置于无菌自封袋中,送至实验室进行分离与培养。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基 YG培养基:葡萄糖1.0 g,酵母浸膏1.0 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.3 g, KH_2PO_4 0.25 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, ddH₂O 1 000 mL,琼脂18.0 g, pH值6.5^[8]。

1.2.2 定性筛选培养基 (1)标注MOPS培养基(10×)^[9]: Mops 8.370 g, tricine 0.717 g,定容到44 mL,以10 mol/L的KOH调pH值至7.4, 0.01 mol/L的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mL,按顺序加入以下溶液: NH_4Cl (1.9 mol/L) 5 mL, K_2SO_4 (0.276 mol/L) 1 mL, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.02 mol/L) 0.025 mL, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2.5 mol/L) 0.21 mL, $NaCl$ (5 mol/L) 10 mL,微量元素^[10]混合液0.02 mL,葡萄糖0.1 g, X-Pi (5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐) 5 mg,微量硫氨酸,定容到100 mL。(2)限磷培养基^[5]:取10×MOPS培养基50 mL,置于500 mL三角瓶中,加入 KH_2PO_4 0.008 7 g。(3)过磷培养基^[5]:取10×MOPS培养基50 mL,置于500 mL三角瓶中,加入 KH_2PO_4 0.173 g。(4)微量元素混合液^[10]: EDTA 50.0 g, $FeSO_4 \cdot$

$7H_2O$ 5.0 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.6 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5.0 g, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 1.1 g, H_3BO_3 50.0 mg, KI 10.0 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 50.0 mg,加ddH₂O至1 000 mL, pH值7.0。

1.2.3 定量筛选培养基 人工合成废水^[11]: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.08 g, 乙酸钠0.5 g, 牛肉膏0.22 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 g, ddH₂O 1 000 mL,用1.0 mol/L的NaOH调节pH值至6.5,根据不同试验需求加入不同量的 KH_2PO_4 ,调节磷的初始浓度。

1.3 聚磷菌的分离与筛选

1.3.1 聚磷菌的分离与纯化 将活性污泥样品与土壤样品梯度稀释,涂布于寡营养的YG培养基平板上,于28℃下恒温培养箱中倒置培养。培养7 d后,挑取单菌落划线纯化。

1.3.2 聚磷菌株的定性筛选 将分离纯化好的菌种活化,分别点接到限磷和过磷2种MOPS培养基上,28℃培养1~5 d,2种平板上菌落均变为蓝色的菌株即为初筛得到的聚磷菌^[8]。

1.3.3 高效聚磷菌的定量筛选 将初筛到的聚磷菌接种于100 mL初始总磷质量浓度分别为1.0 mg/L、5.0 mg/L和10.0 mg/L的人工合成废水中,28℃、150 r/min振荡培养24 h(每个质量浓度设3个重复);吸取菌悬液,8 000 r/min,离心8 min,取上清,采用钼酸铵分光光度法^[12]测定总磷含量;以未接菌的人工合成废水的总磷浓度作为初始对照,并计算菌株的除磷率。

除磷率=(初始总磷-上清液总磷)/初始总磷×100%。

1.4 高效菌株的生长周期与除磷的关系

将高效菌株接入YG液体培养基中,28℃、150 r/min培养24 h,取培养液2 mL,8 000 r/min离心8 min,收集菌体。无菌ddH₂O洗涤离心后将菌体接入100 mL初始磷质量浓度为10 mg/L的合成废水中,28℃、150 r/min培养,定期取样10 mL,其中3 mL用于测定培养液在600 nm波长下的吸光度。其余7 mL离心,测定上清的总磷含量,考察XF-5的生长周期与除磷的关系。

1.5 高效菌株XF-5的鉴定

1.5.1 生理生化特性分析 对于高效聚磷菌株的形态观察与生理生化特性分析,除特别说明外均参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]的方法进行。

1.5.2 16S rRNA基因的PCR扩增与同源性分析 细菌基因组总DNA制备采用水煮法:用无菌牙签挑取少量单菌落菌体重悬于20 μL无菌ddH₂O

中,沸水浴中煮 10 min,立即置于冰上 5 min,之后于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 5 min。之后置于冰上,取上清液 1.5 μ L 作为 DNA 模板。阴性对照以 1.5 μ L 无菌 ddH₂O 为模板,同样条件进行扩增。PCR 扩增采用的上游引物为 P0(*E. coli* 27-46): 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物为 P6(*E. coli* 1 476-1 495): 5'-CTACGGCTAC-CTTGTTACGA-3'。

16S rRNA 基因的 PCR 扩增程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s,58 ℃ 复性 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增结束后,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。送由上海生工生物工程技术服务有限公司测序,之后将所得测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对,建立系统发育树进行分析。

1.6 菌株的生长条件测定

1.6.1 pH 值对菌株 XF-5 生长的影响 以 2%(菌悬液 OD₆₀₀ = 0.2)的接种量将高效聚磷菌接入 YG 液体培养基中,分别设 pH 值为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,28 ℃ 下 150 r/min 培养 48 h,测定不同 pH 值下菌悬液的 OD₆₀₀ 值,考察不同 pH 值对菌株 XF-5 生长的影响。

1.6.2 温度对菌株 XF-5 生长的影响 将高效聚磷菌按 2%(菌悬液 OD₆₀₀ = 0.2)的接种量接种于 YG 液体培养基中,分别于 4、10、20、28、37、45 ℃ 条件下,150 r/min 振荡培养 48 h,检测菌悬液 OD₆₀₀ 值。

1.6.3 NaCl 含量对菌株 XF-5 生长的影响 将高效聚磷菌按 2%(菌悬液 OD₆₀₀ = 0.2)接种量分别接入 NaCl 含量为 0、0.1%(W/V,下同)、0.3%、0.5%、1.0%、3.0%、5.0% 和 8.0% 的 YG 液体培养基中,28 ℃ 下 150 r/min 振荡培养 48 h,测菌悬液的 OD₆₀₀,考察菌株在不同 NaCl 含量条件下的生长情况。

2 结果与分析

2.1 聚磷菌的分离和筛选

将从活性污泥与土壤样品中分离纯化好的菌株接到限磷与过磷 MOPS 培养基上进行初筛,菌落均变蓝的有 7 株。将初筛得到的菌株分别接入初始磷质量浓度为 1.0 mg/L、5.0 mg/L 与 10 mg/L 的合成废水中,通过对除磷的检测,确定菌株 XF-5 的聚磷能力最强,除磷率分别为 99.4%、92.3% 和 84.1%。

2.2 菌株 XF-5 生长周期与除磷速率的关系

由图 1 可知,在菌株生长的延滞期(4 h 之内),

菌株的除磷速率较慢,而处于对数生长前期(9 h)时,除磷速率明显加快,至对数生长末期(16 h),除磷率达到最大。之后,在衰亡期(36 h),溶液中的磷含量(TP)又有所升高,可能与菌体的裂解与释放有关。所以,应用聚磷菌进行污水除磷时,对时间的把握是非常关键的。

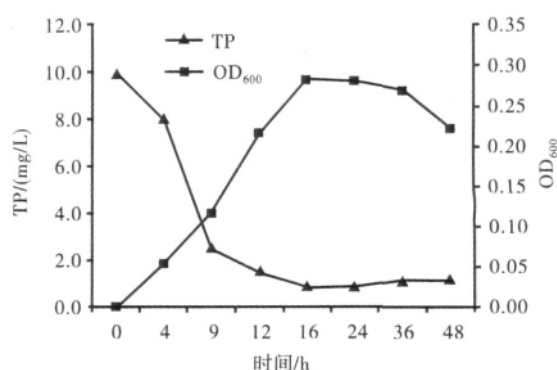


图 1 菌株 XF-5 的生长周期与除磷速率的关系

2.3 高效聚磷菌株的鉴定

菌株 XF-5 在 YG 培养基上生长 48 h 后,菌落呈圆形、表面较湿润、凸起、边缘整齐、不透明、淡黄色,菌体呈短杆状。

生理生化特性为:不运动,不产吲哚,革兰氏染色阴性,甲基红试验、脲酶、精氨酸双水解酶、色氨酸脱氨酶、苯丙氨酸脱羧酶、反硝化、柠檬酸盐与丙二酸盐利用、明胶液化试验均呈阴性,不能水解卵磷脂、淀粉、七叶灵与酪蛋白;产硫化氢,碱性磷酸酯酶阳性,葡萄糖发酵阳性,土温-80 水解阳性,可还原硝酸盐。

16S rRNA 基因 PCR 扩增的片段长度为 1 349 bp,在 GenBank 数据库的 BLAST 比对结果显示,菌株 XF-5 与 *Novosphingobium aromaticivorans* (CP 000248) 的同源性达 99%。下载鞘氨醇杆菌属菌种的 16S rRNA 基因序列,采用 Clustal W 软件进行聚类分析,并利用 MEGA3.1 软件构建 Neighbor-Joining 系统发育进化树(图 2)。由图 2 可知,菌株 XF-5 与菌株 *Novosphingobium aromaticivorans* (CP 000248) 聚到了一个分支,亲缘关系最近。结合菌株的菌体及菌落形态、生理生化特性与 16S rRNA 基因序列的比对结果,确定菌株 XF-5 为鞘氨醇杆菌。

鞘氨醇杆菌属是在 2001 年由 Takeuchi 等^[14]确立的,之前与 *Sphingobium* 和 *Sphingopyxis* 都被归为了鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)^[15]。鞘氨醇杆菌属的细菌来源很广泛,目前已从土壤、玫瑰的根际与沉积物等环境中分离得到该属的菌种^[14,16],但还未见到关于该属的细菌可以除磷的报道。

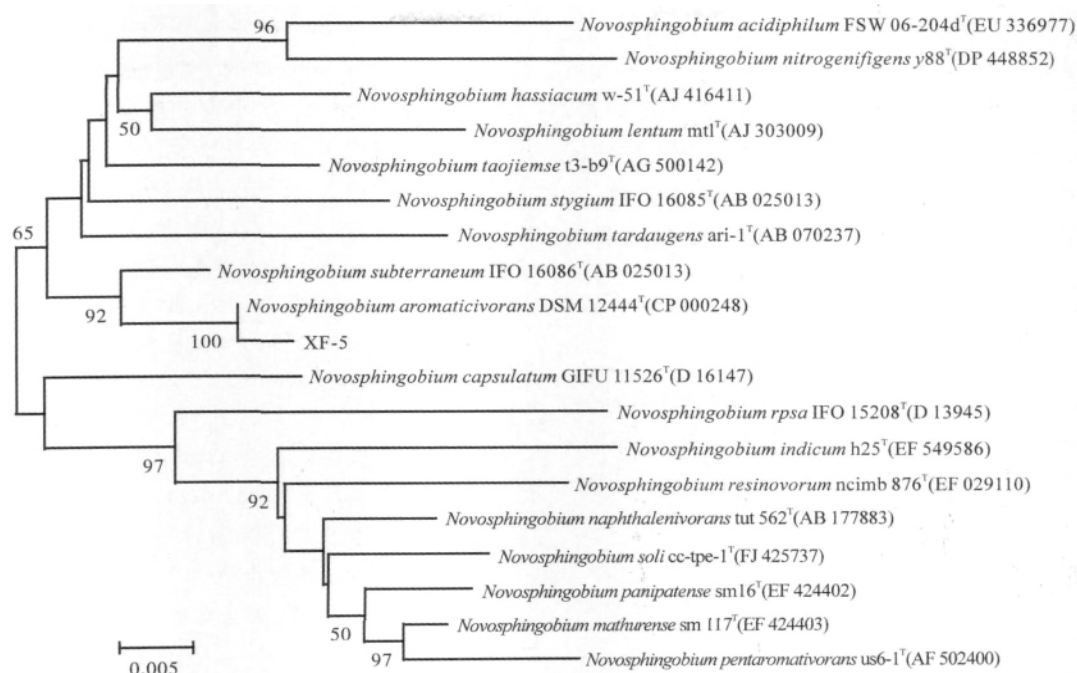


图 2 基于鞘氨醇杆菌属内 16S rRNA 基因序列同源性构建的系统发育树

2.4 菌株 XF-5 的生长条件

2.4.1 温度对菌株生长的影响 由图 3 可知,菌株 XF-5 在 4℃ 条件下几乎不能生长。基本生长温度为 10~37℃,最适生长温度为 28~37℃,20℃ 以下生长较为缓慢,37℃ 以上基本不能生长。

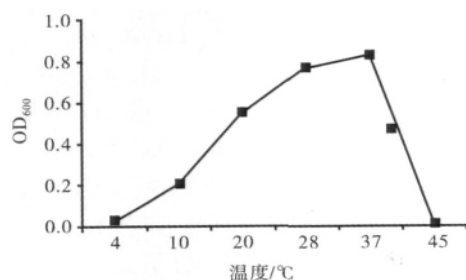


图 3 温度对菌株 XF-5 生长的影响

2.4.2 pH 值对菌株生长的影响 由图 4 可知,菌株 XF-5 的生长 pH 值为 5~9,可以适应的酸碱范围较大,最适 pH 值为 6.0~6.5,在碱性环境中可以生长,但明显受到抑制。XF-5 对 pH 值 ≤ 7 的偏酸性环境适应能力较好。

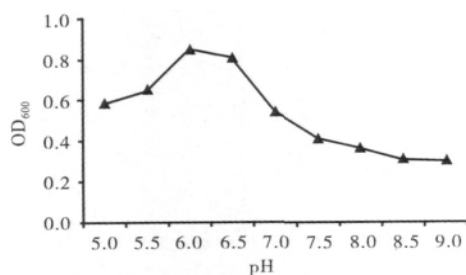


图 4 pH 值对菌株 XF-5 生长的影响

2.4.3 NaCl 含量对菌株生长的影响 由图 5 可知,在 NaCl 含量为 1% 以下时菌株 XF-5 生长良好。在 0~0.5% 的范围内差异不大。NaCl 含量大于 3% 后基本不能生长,适于在低盐环境下生长。

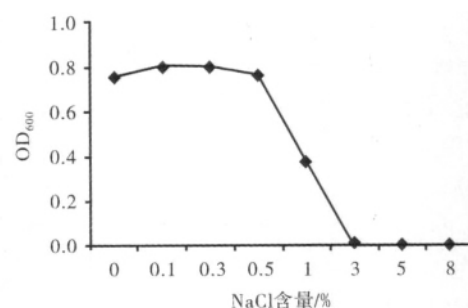


图 5 NaCl 含量对菌株 XF-5 生长的影响

据报道,鞘氨醇杆菌属的细菌大多具有降解芳香族化合物的能力^[16],关于不同影响因素对菌株 XF-5 除磷能力的影响,以及对于芳香族化合物降解等特性的研究还在进一步考察。

3 结论与讨论

通过从活性污泥与土壤样品中分离并筛选聚磷菌,获得高效菌株 XF-5,结合形态观察、生理生化鉴定与 16S rRNA 基因序列分析的结果,确定该菌株属鞘氨醇杆菌。在 1.0 mg/L、5 mg/L 与 10 mg/L 的合成废水中,菌株 XF-5 的除磷能力均最强,除磷率分别达 99.4%、92.3% 和 84.1%,属于高效菌株。菌株在对数生长末期的除磷率可达最大。高效菌株

XF-5 可在 10~37 °C, pH 值 5~9, NaCl 含量 1% 以下的条件下生长, 最适生长温度为 28~37 °C, pH 值为 6.0~6.5, NaCl 含量 ≤ 0.1%。本研究分离、筛选并系统鉴定了一株除磷效率较高的鞘氨醇杆菌, 确定了其生长条件、生长周期与除磷的关系, 丰富了当前的聚磷菌资源, 亦利于对污水生物除磷的深入研究。

参考文献:

- [1] Gao J Q, Xiong Z T, Zhang J D, *et al.* Phosphorus removal from water of eutrophic lake donghu by five submerged macrophytes[J]. *Desalination*, 2009, 242: 193-204.
- [2] Le C, Zha Y, Li Y, *et al.* Eutrophication of lake waters in China: Cost, causes, and control[J]. *Environ Manage*, 2010, 45: 662-668.
- [3] Schindler D W, Hecky R E, Findlay D L, *et al.* Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 11254-11258.
- [4] 王琳, 李季, 康文利, 等. 污水生物除磷研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2006, 28(5): 348-351.
- [5] 吴云. 高效聚磷菌筛选、鉴定及菌株 Y11 的基因组文库构建[D]. 北京: 中国农业大学, 2008.
- [6] Bao L L, Li D, Li X K, *et al.* Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system[J]. *Environ Sci*, 2007, 19: 391-395.
- [7] Peterson S B, Madejska F W J, McMahon K D, *et al.* Environmental distribution and population biology of *Candidatus Accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal[J]. *Environ Microbiol*, 2008, 10: 2692-2703.
- [8] Morohoshi T, Yamashita T, Kato J, *et al.* A method for screening polyphosphate accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater[J]. *Biosci Bioeng*, 2003, 95: 637-640.
- [9] Neidhardt F C, Bloch P L, Smith D F. Culture medium for enterobacteria[J]. *J Bacteriol*, 1974, 119: 736-747.
- [10] Merzouki M, Delgenes J P, Bernet N, *et al.* Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors[J]. *Current Microbiol*, 1999, 38: 9-17.
- [11] 汤桂兰, 花日茂. 聚磷菌的诱变选育及其生长特性[J]. *生物技术*, 2006, 16(2): 34-37.
- [12] 国家环保总局. 水和废水监测法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [13] 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.
- [14] Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 1405-1417.
- [15] Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, *et al.* Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*[J]. *Microbiol Immunol*, 1990, 34: 99-119.
- [16] Liu Z P, Wang B J, Liu Y H, *et al.* *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 1229-1232.