文章编号:1673-1689(2005)03-0012-04

微生物处理甲苯废气的菌种选育

郭晓芬, 郑连英
(浙江大学 材料与化学工程学院,浙江 杭州 310027)

摘 要:从土壤中分离筛选出以甲苯为惟一碳源的 5 种细菌菌株,测定菌体浓度随时间变化曲线,以较优菌种 ZD5 作为出发菌株进行紫外诱变,获得优势诱变菌株 ZD5A. 初步鉴定菌株 ZD5A 为假单胞菌,命名为 *Pseudomonas sp.* ZD5A. 得出甲苯降解和菌体浓度变化有相关性,且这种较简便降解挥发性有机废气的菌种评选方法是可行的.

关键词:甲苯;菌种选育;相关性
中图分类号:TQ 920 **文献标识码**:A

Screening of Toluene Degrading Bacterial Strains

GUO Xiao-fen, ZHENG Lian-ying
(School of Materials Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Toluene has induced some diseases, screening of bacterial strains is necessary for toluene biodegradation. Five toluene biodegradation strains were isolated and screened from soil, and the time course of the bacteria growth were also determined. Strain ZD5A obtained by UV mutation of ZD5 showed the superiority. Through preliminary, identification, it was named as *Pseudomonas* sp. ZD5A. The results showed that toluene biodegradation was related with bacteria growth. Furthermore, this method is feasible.

Key words: toluene; screening of bacterial strains; relativity

甲苯是应用广泛的重要有机溶剂,有较强的挥发性和毒性,可通过对人体肝脏的损害,降低造血功能,引起障碍性贫血. 近年来,治理甲苯类有机废气已成为环保研究领域的热点. 生物法处理挥发性有机废气用的微生物大多是从污染严重的污泥中进一步驯化得到的菌群[1,2],处理效果不是很理想,而且菌群内微生物种类繁多、关系复杂,给研究带来很大困难. 采用人工选育具有较强降解作用的优势菌株[3],可缩短达到较高稳态的时间,具有实际意义. 同时,对降解甲苯这样的挥发性有机废气的菌株的评选存在一定的难度,液态中的甲苯含量测定方法较复杂[4],因此找出简单可行的评选方法非常重要.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 杭州焦化厂和上海卷烟厂长期受甲苯等有机挥发性气体污染的土样和污水样.

1.1.2 甲苯 杭州化学试剂有限公司提供.

1.1.3 诱变剂 物理诱变剂为紫外线,紫外灯功

收稿日期:2004-09-13; **修回日期**:2004-10-28.
基金项目:浙江省科技计划项目(011103115)资助课题.
作者简介:郭晓芬(1979-),女,湖北嘉鱼人,生物化工硕士研究生.

万方数据

率:15 W,波长:2 537 Å;化学诱变剂为 LiCl 晶体,分析纯.

1.1.4 培养基

1) 选择培养基(组分 g/L):甲苯 10.4,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.34,KH_2PO_4 1,NH_4Cl 2,$NaH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 1,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.012,$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003,$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001,琼脂 12.调节 pH 值至 7.0.

2) 富集培养基(组分 g/L):KH_2PO_4 1,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.34,蛋白胨 4,$(NH_4)_2SO_4$ 1,$NaH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 1,尿素 0.2,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.012,$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003,$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001,葡萄糖 12,琼脂 12.调节 pH 值至 7.0.

3) 斜面保藏培养基(组分 g/L):KH_2PO_4 1,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.34,蛋白胨 1,$NaH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 1,葡萄糖 6,$(NH_4)_2SO_4$ 1,琼脂 12.调节 pH 值至 7.0.

4) 无碳源液体培养基(组分 g/L):KH_2PO_4 1,$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.34,NH_4Cl 2,$NaH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 1,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.012,$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003,$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003,$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001.

1.2 实验方法

1.2.1 菌种的分离纯化　从 10 个样品中各取出 1 g 土样,制得稀释倍数分别为 10 倍、100 倍、1000 倍……的菌悬液.分别吸取 0.2 mL 各浓度的菌悬液均匀涂在富集培养基平板上,倒置于培养箱内,恒温 30 ℃培养 48 h.挑取长势良好的单菌落接种到选择培养基上培养.将能够在选择培养基上生长的菌落作平板划线培养,进行纯种分离,随后将纯种菌株(共 15 株)接入斜面保藏培养基试管中并置于冰箱冷冻保藏.

1.2.2 细菌计数　血球计数板显微镜直接计数法.

1.2.3 甲苯浓度的测定　采用 FULI9790 气相色谱仪检测,色谱分析条件:角鲨烷不锈钢填充柱 3 m×0.5 mm×3 μm;检测器:FID;检测器温度:130 ℃;进样口温度:120 ℃;柱温:100 ℃;进样量:1 mL.

1.2.4 菌种的诱变方法

1) 紫外诱变法:将出发菌株制成菌悬液,用显微镜直接计数法计数,调整细胞浓度为 10^8 个/mL.取直径 6 cm 无菌培养皿 5 套,分别加入上述调整好细胞浓度的菌悬液 3 mL,并放入一根无菌搅拌棒.将上述 5 套培养皿先后置于磁力搅拌器上,打开培养皿盖,在距离 30 cm、功率为 15 W 的紫外灯下分别搅拌照射 10,30,60,120,240 s.把经过照射的菌悬液在无菌水中稀释 10^{-1}～10^{-6} 倍,每个稀释度 3 套平板,每套平板加稀释液 0.1 mL,然后涂平板,用黑色纸包好,倒置于 30 ℃电热恒温培养箱中培养 2 d.以同样的操作,取未经紫外线处理的菌液稀释涂平板作为对照.选取活菌落数在 5～6 个左右的平板观察诱变效应.与对照平板相比较,选取菌落最大的菌株移接到试管斜面保藏培养基上培养[5].

2) LiCl 化学诱变法:将紫外诱变后得到的菌种制成菌液涂平板,在平板稍靠边的一个位点上放少许 LiCl 晶体,然后将平板倒置于 30 ℃恒温箱中培养 24 h.放 LiCl 晶体的周围出现抑菌圈.取紧靠抑菌圈外侧的少许菌苔到盛有 20 mL 富集液体培养基的三角烧瓶中震荡培养后涂布,涂布后的平板置 30 ℃恒温箱中培养 2 d.选取活菌落数在 5～6 个左右的平板观察诱变效应.选取菌落最大的菌株移接到试管斜面保藏培养基上培养,保藏待用[6].

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与分离

从选择培养基组成成分中可以看出,甲苯是惟一的碳源,所以能够在平板上生长的微生物就是要筛选的有降解甲苯能力的菌种.将能够在选择培养基上生长的菌落作平板划线培养,进行纯种分离,共分离出 15 个菌株.将分离筛选得到的 15 个菌株富集培养后再接种入选择基本培养基上,30 ℃恒温培养 3 d,挑选出菌落大、长势好的 5 种细菌菌株 ZD1、ZD2、ZD3、ZD4、ZD5 进行初筛和复筛.并对这 5 个菌株进行革兰氏染色、芽孢染色及镜检[7],结果表见 1.其中 2 株为芽孢杆菌,其它 3 株为革兰氏阴性杆菌和球菌.

用细胞计数法比较这 5 个菌株在甲苯环境中的生长情况,间接筛出对甲苯降解效果好的菌株.将这 5 个菌株(10^7 个/mL)以相同的初始浓度,在以甲苯为惟一碳源的培养基的摇瓶中,30 ℃恒温培养,测出菌体浓度随时间的变化曲线,结果见图 1.这几种菌株在同样的培养条件下菌体浓度随时间的变化趋势相同,大约 15 h 后都开始进入对数生长期.在稳定期时,菌种 ZD5 的菌体浓度高于其他菌株,即在含有甲苯的培养基中生长繁殖速度比其它细菌稍快,由于生长繁殖速度和甲苯降解能力有很大的相关性,所以,与其它菌株 ZD1、ZD2、ZD3、ZD4 相比,ZD5 对甲苯有较强的降解能力.

万方数据

表1 菌株特征概况

Tab. 1 The survey of bacteria characteristics

菌株编号	菌落特征	革兰氏染色	菌体形态	菌体大小/μm	芽孢染色	菌种来源
ZD1	黄色,不规则	+	杆状	1.2～2.5×0.7	+	A
ZD2	白色,粘稠	+	杆状	2.0～3.2×0.8	−	A
ZD3	白色,光滑,粘稠	−	杆状	1.7～3.5×0.8	+	B
ZD4	橘红色,光滑	−	杆状	0.5～0.9×0.2	−	A
ZD5	白色,光滑	−	杆状	1.5～3.0×0.3	−	A

菌种来源:A为焦化厂土样或污水样,B为卷烟厂污水样;+表示试验结果呈阳性,−表示试验结果呈阴性.

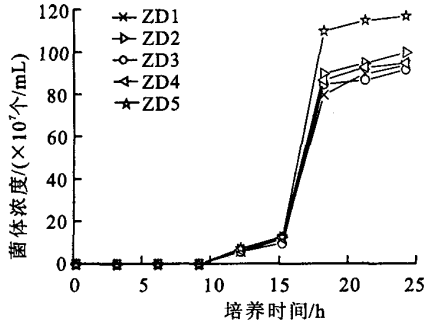

图1 菌体浓度随时间的变化曲线图

Fig. 1 The time course of the bacteria growth

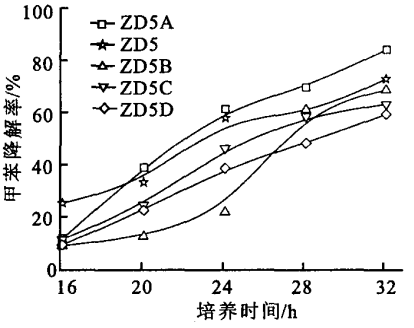

图2 不同培养时间下菌种对甲苯的降解率

Fig. 2 The toluene elimination efficiencies of five bacteria at different cultivation time

2.2 诱变菌株的筛选

菌种ZD5作为出发菌株,紫外诱变后得到菌落较大的4个菌落的菌株ZD5A、ZD5B、ZD5C、ZD5D,比较菌体浓度随时间变化和降解甲苯随时间变化情况.取6只250 mL锥形瓶,每瓶中加50 mL无碳源液体培养基,然后在空白对照瓶中加0.2 mL无菌水,其它5瓶中分别接入菌体浓度在同一数量级的5个不同菌株菌悬液0.2 mL,菌体浓度10^8个/mL.菌悬液浓度通过血球细胞计数板确定.接着往每瓶中加入0.1 mL甲苯,塞上橡皮塞.此橡皮塞中间插有直径为10 mm的玻璃管,以便取样.然后,在塞子与瓶口的外面用8层纱布包好,放入30 ℃、转速140 r/min的摇床中恒温培养.间隔一定时间,通过玻璃管取锥形瓶中液相上方的气体分析甲苯含量.这样,既保证好氧菌对氧气的利用,又抑制甲苯的过分挥发.以空白作对照,由此可计算菌株对甲苯的降解率,甲苯降解率对培养时间作图见图2.

$$甲苯降解率(\%)=\frac{(c_{空白}-c_{甲苯质量浓度})}{c_{空白}}\times 100\%$$

从表2和图2可以看出,随着培养时间的增加,各个菌株对甲苯的降解率总体上呈上升的趋势.菌株ZD5B在培养20 h后对甲苯的降解作用明显,而其它菌株16 h后就开始有明显的降解.相对于原始菌株ZD5,诱变菌株ZD5A从20 h后能看出它的优势,培养32 h降解率达到85.2%,远远大于其它的菌株,因此认为菌株ZD5A为较好的诱变菌株.为了验证甲苯降解与菌体浓度的相关性是否正确,在盛有以甲苯为惟一碳源的培养基的5只摇瓶中,考察这5个菌株在甲苯环境中的生长情况.将5个菌株以相同的初始浓度10^7个/mL,于30 ℃恒温培养,测菌体浓度随时间的变化曲线,见图3.

由图2和图3可见,甲苯降解和菌体浓度变化趋势具有一致性,随时间变化都呈上升趋势.而相对菌体浓度变化来说,甲苯降解率有些滞后.微生物处于对数生长期阶段,菌体适应了新环境,开始大量繁殖,所以大量消耗甲苯,从而引起甲苯降解率的增加,底物的减少影响菌体的生长,菌体浓度变化大的菌株相应甲苯降解效果好.

紫外诱变后将这4个菌株ZD5A、ZD5B、ZD5C、ZD5D进行LiCl化学诱变,但所得到菌株的长势均不如ZD5A,故确定长势最好的ZD5A即为最终的诱变突变菌

2.3 菌种ZD5A的初步鉴定结果

依据《常见细菌系统鉴定手册》中的实验方法结合镜检得到以下结论:菌株ZD5A呈白色,直状

万方数据

表 2　不同菌株降解甲苯对比

Tab. 2　The comparison of toluene degradation by different bacteria

培养时间/h	甲苯质量浓度 $c/(mg/m^3)$					
	空白	ZD5	ZD5A	ZD5B	ZD5C	ZD5D
16	3 316.84	2 441.19	2 888.97	2 985.16	2 902.24	2 971.89
20	3 053.49	2 003.09	1 829.04	2 638.22	2 268.74	2 329.81
24	2 889.52	1 187.59	1 089.35	2 224.93	1 522.78	1 739.49
28	2 273.04	909.22	666.00	861.48	920.58	1152.43
32	1 669.27	434.01	247.05	504.12	595.93	661.03

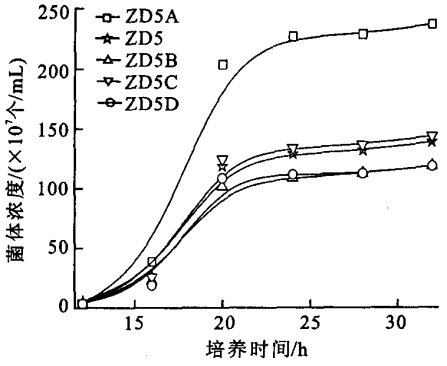

图 3　菌体浓度随时间的变化曲线图

Fig. 3　The time of course the bacteria

杆菌,(1.5～3.0)×0.3 μm. 没有菌柄,也没有鞘. 不产芽孢,革兰氏阴性,好氧,初步鉴定为假单孢菌,命名为 *Pseudomonas sp.* ZD5A.

3　结　论

1) 筛选、分离纯化了能够降解甲苯并以甲苯为惟一碳源的 15 种菌株,经初筛后得到了 5 种降解甲苯的菌株,对这 5 种细菌的形态特征进行了观察和鉴别,并测定了它们在摇瓶培养过程中的生长曲线. 通过对比,菌株 ZD5 有较强的降解甲苯能力.

2) 以筛选出的有降解甲苯能力的野生菌株 ZD5 作为诱变出发菌,以紫外光作物理诱变剂对其进行诱变,得到一株生长更快并有更高甲苯降解效率的诱变突变株 ZD5A. 培养 20 h 后能看出它降解甲苯的优势,培养 32 h 降解率达到 85.2%,远远大于其它的菌株,因此认为菌株 ZD5A 为较好的诱变菌株.

3) 菌种 ZD5A 被初步鉴定为假单孢菌,命名为 *Pseudomonas sp.* ZD5A.

4) 甲苯降解和菌体浓度变化趋势具有一致性,利用菌体浓度变化来筛选优势菌株是一种简单省时可行的评选方法.

参考文献:

[1] 刘强,马广大,贾立岩,等. 生物滴滤床净化二甲苯废气的性能研究[J]. 环境科学研究,2002,15(6):35－38.

[2] 王玉亭,林大泉. 利用微生物治理炼油厂废气中的硫化物恶臭污染[J]. 石油炼制与化工,1998,29(10):40－42.

[3] 陆军,王菊思,赵丽辉,等. 苯系化合物好氧降解菌的驯化和筛选[J]. 环境科学,1996,17(6):1－4.

[4] 张兰英,阿布巴卡尔·达布雷,林学钰,等. 模拟地下水环境微生物降解甲苯的研究[J]. 环境科学学报,2002,22(5):634－636.

[5] 裘娟萍,王家德,于建明,等. 二氯甲烷降解菌的紫外线诱变及降解工艺条件的研究[J]. 激光生物学报,2001,10(2):92－95.

[6] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京:科学出版社,1984.

[7] 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.

(责任编辑:李春丽)

万方数据