



韩晓云,郑桂华,郑宝江,等. *Pseudomonas* sp. H8 的分离和鉴定及其产絮凝剂成分分析[J]. 黑龙江农业科学, 2019(9):115-120.

Pseudomonas sp. H8 的分离和鉴定及其产絮凝剂成分分析

韩晓云^{1,2}, 郑桂华^{1,2}, 郑宝江³, 王运来^{1,2}, 刘 杨^{1,2}, 康传红^{1,2}, 李秀凉^{1,2}, 孙庆申^{1,2}

(1. 黑龙江大学 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150500; 2. 黑龙江大学 生命科学学院/黑龙江省普通高等学校微生物重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080; 3. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为挖掘产生物絮凝剂的菌株,利用生物絮凝剂对污水、淤泥进行环保处理。本研究经过菌种分离纯化和对高岭土悬浊液沉降效果分析,从低温污水处理生物膜中获得1株高效絮凝菌,命名为H8,该菌株在4℃条件下生长良好,其LB发酵液对高岭土的絮凝效率达到85.79%,针对H8菌株的一系列菌种鉴定,包括菌落形态、菌体形态、生理生化试验、Biolog菌种鉴定系统分析和细菌16S rDNA序列分析比对,与菌种*Pseudomonas mandelii*亲缘关系最近,确定H8菌株为假单胞菌属。采用乙醇沉淀法对H8菌株发酵液中的絮凝剂进行提取,再经过Sevage法除去絮凝剂中蛋白质,获得絮凝剂产率0.807 g·L⁻¹,与发酵液相比其絮凝率也提高到98%以上,定性定量分析结果确定H8絮凝剂的化学成分主要为多糖,占51%,还含有2.64%蛋白质、1.3%葡萄糖醛酸和少量氨基糖。

关键词:低温絮凝菌筛选;菌种鉴定;H8絮凝剂;成分分析

生物絮凝剂一般来自微生物胞外分泌物,它的优势体现在生物来源,具有绿色、易降解、无二次污染特点^[1]。目前已经广为使用的利用活性污泥中的微生物处理生活污水,就是微生物代替化学物质用于环境处理的成功范例,在活性污泥中存在着生物絮凝菌,它们利用自身分泌的胞外物质结合污水中的悬浮颗粒,形成大的絮凝团,加速污泥沉降,同其他细菌、真菌和原生动物一起,去除污水中的有机物,降低污水的COD和BOD指标以达到出水标准^[2]。生物絮凝剂的提取过程一般包括对产絮菌进行筛选、分离培养、絮凝成分分离纯化等环节,成本较高,使生物絮凝剂的得规模化应用受到限制^[3]。针对上述问题,国内外有研究者尝试采用有机废弃物来代替培养基中的碳源和氮源,例如:污泥残渣、酒精废液等来扩培产絮菌^[4-7],也有人尝试将复合生物絮凝剂应用于低温低浊水中金属离子的处理^[8-10]。但是已经报道的

生物絮凝剂大多来自中温菌,对于低温絮凝菌株的研究比较少,而北方冬季气温低,利用现有的中温絮凝菌在北方进行污水处理效率会大大降低,这是北方污水处理厂普遍难以破解的问题。虽然在工程实践上尝试采用降低污泥负荷、增加污水停留时间、加热保温或升温等方式来提高处理效果,但这也大大增加了污水处理成本。

为了提高低温污水的处理效果,本研究前期在低温微生物分离和固定化研究基础上,构建了一个单体体积112.75 L,日进水量0.5 t的低温反应器,连续运转1年时间证明其对低温污水处理效果显著提高。在研究低温反应器中微生物群落生态过程中发现菌胶团结构,电镜照片可以清晰看到包裹着胞外聚合物的细菌^[11]。本文主要针对这些低温生物絮凝细菌,进行分离筛选、鉴定并对其产生生物絮凝剂化学成分进行分析,意义在于从低温出发,挖掘微生物资源并为其在环境治理方面应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

活性污泥:采样自低温生物反应器填料池;低温生物膜:采样自低温生物反应器污泥回流装置;低温生物反应器运行在哈尔滨工业大学环境工程

收稿日期:2019-04-17

基金项目:黑龙江省教育厅面上项目(12521410)。

第一作者简介:韩晓云(1970-),女,博士,副教授,从事环境微生物、食品和药物物质功能的挖掘及开发研究。E-mail: hanxiaoyun70@126.com。

通讯作者:孙庆申(1977-),男,博士,教授,从事食品和药物物质功能的挖掘及开发研究。E-mail: sunqingshen@hlju.edu.cn。

学院实验室。

供试仪器主要有紫外分光仪(普析通用仪器有限公司)、超净台(苏州净化设备有限公司)、恒温培养箱(上海南荣实验设备有限公司)、灭菌锅(日本三洋)、电子天平(METTLER)、磁力搅拌器(其林贝尔仪器制造有限公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、PCR仪(德国 Eppendorf 公司)、BIOLOG 微生物自动鉴定系统(美国 Biolog 公司)、凝胶成像系统(美国 ULTRA-LUM)。

1.2 方法

1.2.1 絮凝细菌的分离和筛选 用离心管称取活性污泥或生物膜各 1 g,漩涡振荡 10 min,然后用灭菌蒸馏水进行梯度稀释,取稀释倍数为 4、5、6 的样品涂布于 LB 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和葡萄糖培养基,分别在 4 和 30 ℃ 的培养至长出菌落,挑取单菌落,平板划线分离纯化菌株。纯化后菌株采用试管斜面保存、编号。

挑取上面纯化后菌株接种于筛选培养基(葡萄糖 2%, K_2HPO_4 0.5%, KH_2PO_4 0.2%,NaCl 0.01%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.02%,尿素 0.05%,酵母膏 0.05%, $MgSO_4$ 0.02%)中,4 ℃ 培养 72 h,取发酵液进行絮凝效率检测。检测方法为:取 2 mL 发酵液,加入 50 mL 含有高岭土 0.4%、 $CaCl_2$ 0.04%的水悬浊液,磁力搅拌器上以 $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 1 min,再以 $60\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 3 min,静置 5 min 后于液面下 2 cm 处取样,在分光光度仪上检测其吸光度 $A_{550\text{nm}}$ 值,另取一份不加发酵液的高岭土悬浊液作为空白,测得吸光度 $B_{550\text{nm}}$ 值,根据测得数据计算各菌株絮凝率。公式如下:

$$\text{絮凝率}(\%) = (A - B) / A \times 100。$$

1.2.2 絮凝细菌的菌种鉴定 菌种鉴定采用形态学、生理生化实验和细菌 16S rDNA 序列分析 3 种方法。革兰氏染色、菌落形态、菌体形态、和生理生化实验方法均参照《微生物实验手册》^[11]。Biolog 细菌鉴定方法根据仪器操作手册,将菌株 H8 制成适当浓度菌悬液,接种于 96 孔细菌培养板,培养 4~24 h,置于分光光度计中检测,计算机自动分析菌种指纹图谱并给出鉴定结果。

透射电镜(TEM)观察:将 H8 菌落滴到水中制成菌液,静置至细菌单细胞扩散,取铜网吸附细菌细胞后用醋酸铀染色 3 min,取下铜网晾干后

在 TEM 上观察并拍照。

16S rDNA 序列分析:细菌基因组 DNA 提取使用天根生物公司的 DNA 提取试剂盒,PCR 扩增引物如下:8F 5'-AG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3';1512R 5'-A CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3'。反应体系(20 μL)为:1 \times Buffer,dNTP 0.25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$,引物 0.02 pmol,DNA 模板约 1 nmol,*Taq* 酶 0.1 μL 。上述翻译体系首先在 94 ℃ 反应 5 min;再进行 35 个循环:94 ℃,30 s;55 ℃,45 s;和 72 ℃,90 s;最后 72 ℃,10 min 后于 4 ℃ 保存。PCR 扩增结果用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,16S rDNA 片段采用凝胶回收试剂盒(购自大连宝生物有限公司)回收后送到上海生工生物公司进行 DNA 序列分析。

系统发育树的构建:将测定的 16S rDNA 序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已知的 16S rDNA 序列进行同源性比较,绘制系统发育树。

1.2.3 菌株 H8 产絮凝剂的成分分析 利用乙醇沉淀法从絮凝细菌发酵液中提取生物絮凝剂,絮凝剂粗制品采用 Seavage 法去除蛋白质,获得 H8 絮凝剂,对絮凝剂进行化学成分定性检测包括: α 氨基酸(水合茚三酮法)、芳香族氨基酸(黄蛋白反应)、总糖(Molish 反应)分析、还原糖(蒽酮反应)、酮糖(Seliwanoff 反应)。定量分析方法中糖含量采用苯酚-硫酸法、蛋白质含量采用考马斯亮蓝法、氨基糖含量采用对二甲氨基苯甲醛显色法、葡萄糖醛酸含量采用硫酸咔唑法测定。

1.2.4 数据分析 试验数据采用 Origin 8.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 絮凝细菌分离筛选及纯化结果

本试验选择 4 ℃ 对低温菌进行分离培养,同时以 30 ℃ 培养作为对照,30 ℃ 培养条件下平板菌落的数量和种类明显占优势。从表 1 可以看出,活性污泥和生物膜中都含有一定数量可以在低温下生长的细菌,根据 3 种培养基中菌落形态的差别进行低温菌株纯化及保存,低温生物反应器中共分离到 64 株低温细菌,其中 29 株来自活性污泥,35 株来自生物膜。进一步的絮凝菌筛选试验结果证明低温反应器活性污泥中大约 79% 的低温菌具有絮凝活性。生物膜中的低温菌是被

固定在特定载体上,所以对菌株的絮凝性要求不高,但是在初筛实验中发现 13 株低温菌具有絮凝活性,占分离菌株的 37%。絮凝性复筛主要考察菌株絮凝稳定性和絮凝效率,选取絮凝率超过 50%的菌株,最后获得活性污泥中 5 株絮凝细菌

(表 2),和生物膜中 5 株絮凝细菌,它们的命名和絮凝效率见表 2,其中 H8、DG2 和 DN1 三株菌絮凝效果最好,均超过 80%。H8 菌株在低温下生长较快,絮凝率达到 83.79%(表 2),絮凝照片(图 1)肉眼可见的絮凝沉降呈胶团絮状。

表 1 4℃条件下活性污泥与生物膜中菌的分离结果

Table 1 The isolation results of bacteria from the activated sludge and biofilm at 4 ℃				
培养基种类 Type of medium	活性污泥 Activated sludge		生物膜 Biofilm	
	菌落数量	产絮菌初筛	菌落数量	产絮菌初筛
	Number	Preliminary screening of	Number	Preliminary screening of
	of colony	Flocculant-producing Bacteria	of colony	Flocculant-producing Bacteria
LB	17	15	10	5
葡萄糖	7	4	8	2
牛肉膏蛋白胨	5	4	17	6
总计	29	23	35	13

表 2 4℃下活性污泥和生物膜中产絮凝菌复筛结果

Table 2 The rescreening result of flocculants-producing bacteria in activated sludge and biofilm at 4℃												
项目 Items	活性污泥 Activated sludge						生物膜 Biofilm					
	空白	DL10	DG2	DG7	DN1	DN4	空白	H8	H13	外 9	D3	D5
OD ₅₅₀	0.332	0.081	0.042	0.088	0.062	0.059	0.487	0.079	0.105	0.179	0.212	0.239
絮凝率	-	75.60	87.35	73.49	81.33	82.23	-	83.79	78.44	63.24	56.47	50.92
Flocculation rate/%												

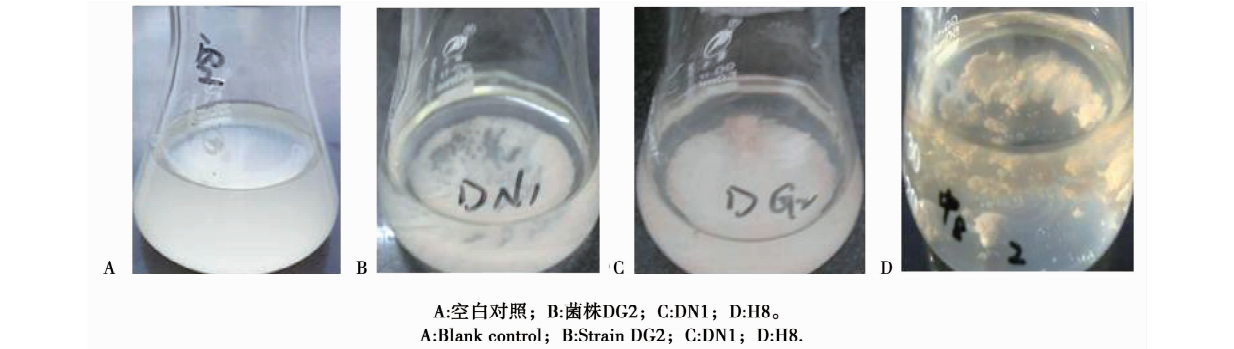


图 1 产絮凝菌絮凝效果

Fig.1 The flocculating performance of flocculant producing bacteria

2.2 低温絮凝菌 H8 的菌种鉴定结果

菌株 H8 的菌落呈圆形,有凸起,边缘光滑整齐,乳黄色,不透明,大小约 3.5 mm×3.5 mm。革兰氏染色阳性,菌体椭圆形,大小(0.10±0.02) μm×(0.06±0.005) μm,无鞭毛、纤毛(图 2)。生理生化试验结果证明菌株 H8 可以水解淀粉、明胶,不能水解酪蛋白、纤维素,可发酵乳糖产酸,不产生尿素酶,接触酶试验阴性,氧化

酶试验阳性,可还原硝酸盐,硫化氢试验阴性,IMVIC 试验中只有柠檬酸盐试验为阳性。

Biolog 细菌鉴定系统鉴定 H8 菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas*),它可以利用的碳源包括:L-阿拉伯糖、乙酸、柠檬酸、D,L-乳酸、D-半乳糖、葡萄糖酸、顺式乌头酸、琥珀酸、L-天门冬氨酸、丙酸、L-鸟氨酸、L-丙氨酰甘氨酸、α-D-葡萄糖、羟基L-脯氨酸、β-羟丁酸、L-脯氨酸、溴代丁二酸、γ-

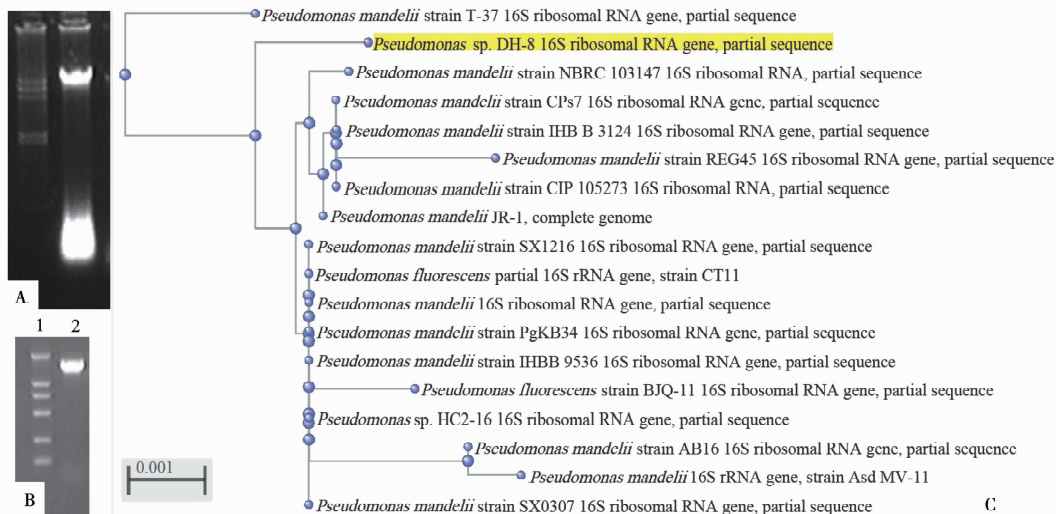


图 2 菌株 H8 电镜照片

Fig. 2 TEM image of strain H8

氨基丁酸、L-天门冬酰胺、L-丝氨酸、L-谷氨酸、D-甘露糖。

进一步通过 PCR 扩增菌株 H8 的 16S rDNA,其片段大小约 1 500 bp(如图 3A,图 3B),测序结果共获得 1 442 个核苷酸序列,采用 GenBank 系统 BLAST 软件将序列与 GenBank 已知序列进行同源性比对,与一株假单胞菌(*Pseudomonas mandelii*)一致性达到 99%。将菌株 H8 的 16SrDNA 序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已发表的 16SrDNA 序列进行同源性比较,用文献报道的方法^[12]选取同源性在 95%以上的细菌构建系统发育树(图 3C)。由系统发育树可知 H8 菌株与已报道的假单胞菌亲缘关系最近。



A: 1泳道为15 000 marker, 2泳道为DNA的琼脂糖电泳条带; B: 1泳道为2 000 marker, 2泳道为PCR产物电泳条带。

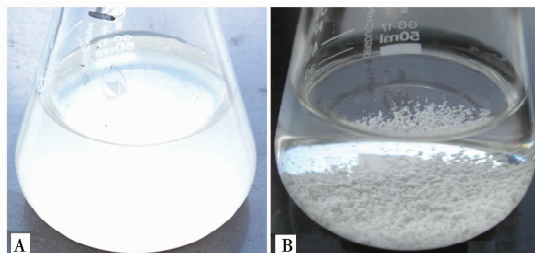
A: 1 lane is 15 000 marker, 2 lane is agarose electrophoretic band of DNA; Fig. B: 1 lane is 2 000 marker and 2 lane is PCR product electrophoretic band.

图 3 H8 基因组 DNA 的琼脂糖电泳(A),16S rDNA 的 PCR 扩增结果(B)以及系统发育树(C)

Fig. 3 Genome DNA isolated from the strain H8 (A),PCR product of 16S rDNA amplified (B) and the strain H8 phylogenetic tree (C)

2.3 菌株 H8 产絮凝剂的化学成分鉴定结果

由图 4 可知,取发酵液用无水乙醇沉淀,获得絮凝剂粗制品为 $2.33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,由于采用乙醇沉淀会将发酵液中蛋白质也提取出来,所以采用 Sevage 法对絮凝剂进行脱蛋白后产量为 $0.807 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,投加量为 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,絮凝率达到 98%,与发酵液絮凝效果比较,絮凝颗粒更加均匀致密。絮凝剂化学组成分析结果见表 3,说明其中含有 α -氨基酸、芳香族氨基酸和己糖。进一步对絮凝剂主要成分进行定量分析,确定其中多糖含量为 51%,



A:对照; B: H8絮凝剂。

A: Control; B: H8-derived flocculants.

图 4 H8 絮凝剂的絮凝效果

Fig. 4 The flocculating results of strain H8-derived flocculants

蛋白质 2.64%，还有少量氨基糖 0.38%和葡萄糖醛酸 1.3%。

微生物絮凝剂的主要成分为多糖，但也有报道发现以蛋白质成分为主的生物絮凝剂，同时研究者也在其中发现少量脂类物质、纤维素、甚至 DNA 成分。本研究发现，H8 菌株所产的絮凝剂以多糖为主。

表 3 絮凝剂的定性分析结果

Table 3 Qualification analysis result of flocculants

方法	检测成分	定性结果
Methods	Testing components	The qualitative results
水合茛三酮反应	α-氨基酸	+
蛋白黄反应	芳香族氨基酸	+
莫氏反应	多糖	+
蒽酮反应	己糖	+
Seliwanoff 反应	酮糖	-
Benedict 反应	还原糖	-

3 结论

本试验从低温活性污泥和生物膜中共分离到 75 株细菌，其中中温菌有 46 株，29 株在低温下生长的细菌。对分离到的细菌进行产絮能力的初筛和复筛试验，共得到 4 株絮凝颗粒大，絮凝效果好的高效低温产絮菌株，其中 DG2 和 DN1 来自活性污泥，絮凝率分别达到 87.35%和 81.33%，H8 和 H13 来自生物膜，絮凝率分别达到为 83.79%和 78.44%。经多次重复试验证明 H8 的絮凝性最好，且在低温下絮凝效果稳定，该菌为乳黄色圆形细菌，表面光滑湿润且有凸起，不透明的革兰氏阳性菌。将形态学观察和生理生化、Biolog 细菌鉴定系统和 16SrDNA 序列分析鉴定结合，查阅《伯杰氏细菌鉴定手册》，都确定此菌为假单胞菌。初步提取 H8 发酵液中絮凝剂表明其絮凝效率高达 98%，絮凝速度快且絮凝颗粒均匀。对絮凝剂主要成分进行定量分析，确定此絮凝剂主要

含有糖和蛋白质，其中糖占总物质的 51%，蛋白质占 2.64%，另外还含有氨基糖 0.38%，葡萄糖醛酸 1.3%。

参考文献：

[1] 张一卉,朱迟,梁慧芳,等. 微生物絮凝剂概况及发展前景[J]. 生命科学研究,2005(S1):39-42.

[2] Yang P,Li D,Zhang W, et al. Flocculation-dewatering behavior of waste activated sludge particles under chemical conditioning with inorganic polymer flocculant: Effects of typical sludge properties [J]. Chemosphere, 2019, 218: 930-940.

[3] 李梦茜,莫松柏,钱荣坤. 微生物絮凝剂应用于污水处理的研究进展[J]. 大众科技,2019,21(4):30-32.

[4] 李春玲,金若菲,周集体,等. 利用污泥残渣制备生物絮凝剂及其絮凝机理的探讨[J]. 环境科学与技术,2012,35(1): 38-41,94.

[5] 任敦建,宋汕柯,李红阳,等. 利用木薯淀粉酒精废水培养复合型生物絮凝产生菌条件优化及其应用研究[J]. 广东农业科学,2013,40(10):97-100.

[6] 易小畅,蒋智,陆兵,等. 糖蜜酒精废液培养微生物絮凝剂产生菌的研究[J]. 酿酒科技,2014(1):85-88.

[7] Merkel T, Blattler O, Konigsson S. Flocculant screening method at lab scale for application in disc stack centrifuges with Hermetic Design[J]. Chemical Engineering & Technology,2018,41(12):2312-2322.

[8] 刘泽群. 低温复合产絮菌去除铁离子的试验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2010.

[9] Shi C,Sun W,Sun Y, et al. Synthesis, characterization, and sludge dewaterability evaluation of the chitosan-based flocculant CCPAD[J]. Polymers (Basel), 2019, 11(1): E95. DOI:10.3390/polym11010095.

[10] Wang Z,Huang W,Yang G,et al. Preparation of cellulose-base amphoteric flocculant and its application in the treatment of wastewater[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 215:179-188.

[11] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社,2007.

[12] Yoon J H,Cho Y G,Kang S S, et al. Rhodococcus koreensis sp. nov., a 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2000,50:1193-201.

Isolation and Identification of *Pseudomonas* sp. H8 with Flocculant-producing Capacity and Analysis of the Flocculant Components

HAN Xiao-yun^{1,2}, ZHENG Gui-hua^{1,2}, ZHENG Bao-jiang³, WANG Yun-lai^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, KANG Chuan-hong^{1,2}, LI Xiu-liang^{1,2}, SUN Qing-shen^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin 150500, China; 2. Key Laboratory of Microbiology in Universities of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 3. School of Life Sciences, Northeast Forestry University Harbin 150040, China)

Abstract: The use of bioflocculants for the treatment of sewage and sludge has such advantages as environmentally friendly and no secondary pollution. Therefore, the exploitation of flocculants-producing strains, especially those that produce flocculants at low temperature, has important significance theoretically and application prospects. In this study, the strain named H8 with efficient flocculation activities was isolated and purified from the low-temperature sewage treatment biofilm, the flocculation effect towards kaolin suspension was also evaluated. The strain grew well at 4 °C, and its LB fermentation broth showed 85.79% flocculation efficiency towards kaolin. The H8 strain was characterized with colony and cell morphology, physiological and biochemical tests, Biolog strain identification system analysis and bacterial 16S rDNA sequence analysis, which showed close relation to *Pseudomonas mandelii* and identified as *Pseudomonas*. The flocculants in the H8 strain-derived fermentation broth was extracted by ethanol precipitation with flocculants yield of 0.807 g·L⁻¹ after the protein removal by sewage method. The flocculation rate was also increased to 98%. Qualitative and quantitative analysis confirmed that the chemical constituents of H8 flocculants were mainly composed of polysaccharides which accounted for 51% (w/w), protein (2.64%, w/w), glucuronic acid (1.3%, w/w) and a small amount of amino sugar.

Keywords: low temperature flocculants-producing bacteria screening; strain identification; strain H8-derived flocculants; component analysis

(上接第 114 页)

Hepatoprotective Activity of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Polysaccharides on Carbon Tetrachloride-induced Acute Liver Injury of Mice

WANG Chun-hua, ZHANG Yun-long

(School of Life Science and Technology, Mudajiang Normal University, Mudanjiang 157000, China)

Abstract: In order to promote the further processing and drug utilization of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, mice were randomly divided into six groups: normal control group, acute liver injury model group (0.1% (V/V) CCl₄, 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹, low, medium and high-dose PAPS groups (100, 200 and 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and bifendate group (150 mg·kg⁻¹·d⁻¹). After administration for 7 continuous days, the histopathological characteristics of liver were observed, and liver function and liver antioxidant index were detected, the results showed that compared with acute liver injury model group, PAPS significantly decreased the levels of ALT, AST and ALP, restrain SOD activity, and enhanced MAD content. Conclusion: PAPS have effects of hepatoprotective on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice.

Keywords: *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* polysaccharides; liver injury; mice; hepatoprotective