

doi : 10. 3969/j. issn. 1005 - 3026. 2016. 05. 021

一株高效絮凝剂产生菌的分离和鉴定

刘金亮,姜彬慧,赵鑫,胡筱敏

(东北大学 资源与土木工程学院,辽宁 沈阳 110819)

摘 要:应用多相分类手段对絮凝菌株 XHUA9 进行了分类研究,并对分离提纯的发酵产物进行紫外和红外分析.基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析表明,该菌和模式菌株 *Paenibacillus hunanensis* 的序列同源性为 96.7%,基因组 DNA-DNA 同源性杂交值为 51.6%.菌株的主要极性脂肪酸为双磷脂酰甘油、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇.菌株优势醌为 MK-7,主要优势脂肪酸为 anteiso-C_{15:0} 和 C_{16:0}.菌株 (G+C)摩尔分数为 51.9%.根据上述结果,菌株 XHUA9 鉴定为类芽孢杆菌属内的新种,命名为 *Paenibacillus shenyangensis* sp. nov..紫外扫描和红外检测等结果表明,菌株 XHUA9 所产絮凝剂的主要成分为多糖类物质.

关 键 词:絮凝剂;类芽孢杆菌;鉴定;16S rRNA;多相分类

中图分类号:X 172 文献标志码:A 文章编号:1005-3026(2016)05-0706-05

Isolation and Identification of an Efficient Bioflocculant-Producing Strain

LIU Jin-liang, JIANG Bin-hui, ZHAO Xin, HU Xiao-min

(School of Resources & Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, China. Corresponding author: HU Xiao-min, professor, E-mail: hxmin_jj@163.com)

Abstract: In order to ascertain taxonomic position of strain XHUA9, the polyphasic taxonomical identification was performed. The ferment products were separated and purified and then were analyzed by ultraviolet scanning spectrum (UV scanning spectrum) and infrared spectrum (IR spectrum). Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that the strain belonged to the genus *Paenibacillus*, sharing a most closely sequence similarity of 96.7% and DNA-DNA hybridization value of 51.6% with the type strain *Paenibacillus hunanensis*. The major polar lipids were diphosphatidylglycerol, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol. The predominant menaquinone is MK-7 and the major cellular fatty acids were anteiso-C_{15:0} and C_{16:0}. The genomic DNA G + C content was 51.9 mol%. Based on the results of the present study, it is concluded that strain XHUA9 represents a novel species of the genus *Paenibacillus*, for which the name *Paenibacillus shenyangensis* sp. nov. is proposed. The UV scanning and IR spectra data showed that bioflocculant produced by strain XHUA9 was mainly composed of polysaccharides.

Key words: flocculant; *Paenibacillus*; identification; 16S rRNA; polyphasic taxonomical

微生物絮凝剂(microbial flocculant, MBF)是具有絮凝活性的微生物代谢产物^[1]. 它们一般由多糖、蛋白质、糖蛋白、核酸等高分子物质构成^[2],分子量一般大于 1 × 10⁵ Da. 相对于无机絮凝剂和有机合成絮凝剂,微生物絮凝剂具有无毒、可生物降解及无二次污染等特点^[3],使其更适合作为应用在水处理和污水处理^[4-5]、食品和发酵产业的下游工序中^[6]. 研究发现能够产生絮凝剂的微生物种类繁多,包括细菌、放线菌、真菌、霉菌、酵母菌和某些藻类等. 这些微生物资源丰富,广泛分

布在土壤、沉积物、活性污泥及污水中。但存在生产成本较高、发酵工艺不成熟和絮凝效果不稳定等问题,限制了微生物絮凝剂的发展。因此,筛选高效稳定的絮凝剂产生菌,提高产品的稳定性是微生物絮凝剂的发展趋势之一。

类芽孢杆菌属最初是由 Ash 等基于 16S rRNA 基因序列将一些菌株从芽孢杆菌属中划分出来的^[7]。随后从土壤、植物的根和食物等不同的环境样品中分离出很多该属的菌株^[8]。由于该属的菌株具有固氮、降解纤维素和木聚糖、产生强抗菌化合物等功能^[9-11],类芽孢杆菌已成为近年来的研究热点。本研究从土壤中分离得到一株絮凝剂产生菌 XHUA9,对菌株形态、生理生化特征、细胞化学组分、(G + C) 摩尔分数、基因组 DNA - DNA 同源性、16S rRNA 基因序列等进行了研究。同时将菌株 XHUA9 的发酵产物进行分离提纯,并利用紫外和红外光谱检测其主要组成成分。

1 材料和方法

1.1 菌株分离方法及培养条件

XHUA9 筛选自一棵桃树下的土壤样本,用牛肉膏蛋白胨培养基,采用稀释法分离。保存于中国科学院微生物研究所菌种保藏中心(CGMCC NO. 2040)。实验中选择模式菌株 *Paenibacillus hunanensis* FeL05^T 作为对照菌。筛选培养基组成为:葡萄糖 1.0 g, KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 酵母膏 0.5 g, 脲 0.05 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.02 g, NaCl 0.01 g, 蒸馏水 100 mL, pH = 7.0。在三角瓶中装入 100 mL 培养基并灭菌,然后接入菌种,在 30 ℃ 和 150 r/min 的条件下培养 30 h,测定培养液絮凝率。

1.2 主要试剂及仪器

实验所用试剂均为分析纯。

主要仪器包括电子天平(FA1004,上海舜宇)、扫描电镜(SSX - 550,岛津)、冷冻离心机(5424R, eppendorf)、PCR 扩增仪(2720,美国 ABI)、紫外分光光度计(759,上海菁华)、红外光谱仪(Nicolet 380,美国)、恒温振荡器(TS - 100B,上海天呈)、高压灭菌锅(YXQ - LS - 50SII,上海博迅)、超净工作台(SW - CJ - 1FD,上海博迅)等。

1.3 絮凝率测定方法

在 100 mL 高岭土悬浮液(5 g/L)中加入

0.1 mL 菌株培养液,空白对照中不加培养液,静置 5 min 后测定上清液光密度 OD₅₅₀。絮凝率计算公式为

$$E = (OD_{550} - OD'_{550}) / OD_{550} \times 100\%$$

其中 OD₅₅₀ 为未加培养液前 550 nm 处光密度值; OD'_{550} 为加入培养液 5 min 后 550 nm 处光密度值。

1.4 发酵产物的分离鉴定

将培养液稀释 10 倍,高速离心去除菌体,然后用旋转蒸发器浓缩(50 ~ 60 ℃)至原体积,加入 2 倍体积的预冷乙醇,离心收集沉淀,再将沉淀溶于水,加 0.5 倍氯仿和正丁醇混合液去除游离蛋白,然后将上清液透析,并用乙醇沉淀,最后真空冷冻干燥得到絮凝剂精品。分别用紫外扫描、蛋白特征反应、Molish 和蒽酮呈色反应检测产物中是否含有蛋白质、核酸和糖类,并用红外光谱仪分析产物中的特征基团。

1.5 菌株形态及生理生化鉴定

光学显微镜下观察菌体形态,扫描电子显微镜下观察菌体表面结构和有无内生孢子;采用革兰氏染色;利用 API 50 CHB, API 20E (BioMerieux)试剂盒及 GP2 鉴定板(Biolog)(方法参照公司说明书)对菌株进行唯一碳源利用及酶学特性等生理生化指标鉴定。

1.6 菌株细胞化学组分分析

脂肪酸组分分析使用美国 MIDI 公司的 Sherlock 全自动细菌鉴定系统(Sherlock Version 6.0);极性脂肪酸通过二维薄层层析提取和分离,并喷洒检测试剂鉴定。细胞甲基萘醌采用 Collins 的方法分离提纯^[12],并用高效液相色谱分析法测定。

1.7 16S rRNA 基因序列分析

采用高效液相色谱法测定菌株(G + C)摩尔分数;采用微孔板杂交法测定菌株和模式菌株间基因组 DNA - DNA 同源性;16S rRNA 基因序列分析:扩增用上下游引物分别为 BSF 8/27 (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') 和 BSR 1525/1541 (5' - AAG GAG GTG ATC CAG CC - 3')。以菌株 XHUA9 的基因组为模板进行 PCR 扩增。反应程序为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 循环 35 次; 72 ℃ 30 min。用 TaKaRa 公司回收试剂盒回收 PCR 扩增产物,送生物公司测序。将测序得到的序列在 NCBI 的网站上进行比对,并用软件 MEGA 构建系统发育树^[13]。

2 结果与讨论

2.1 形态学特征

XHUA9 菌株为长杆状(见图 1a) (4.16 ~ 4.83) × 0.83 μm ,好氧 ,能形成芽孢 ,革兰氏染色阳性 .菌株 30 ℃ 下平板培养 ,其菌落呈圆形、表面光滑 ,较黏 ,凸起很高 ,为浅黄棕色并透明 (见图 1b) .

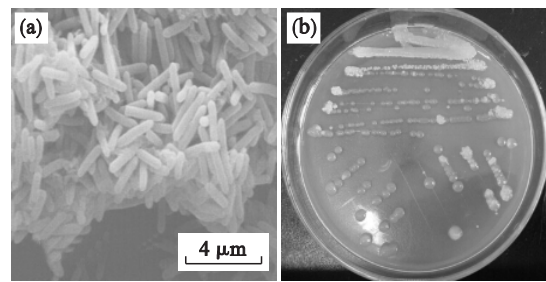


图 1 菌株 XHUA9 的细胞形态及菌落
Fig.1 Morphology and colony of the strain XHUA9
(a)—细胞形态 ;(b)—菌落 .

2.2 生理生化特征

菌株 XHUA9 和模式菌株 FeL05^T 生理生化实验结果见表 1 ,表中 YQ1 是课题组筛选的另一株类芽孢杆菌 .从表 1 可以看出 ,菌株 XHUA9 和 FeL05^T 主要生理生化指标较一致 ,个别指标上存在不同 .

2.3 菌株细胞化学组分

菌株 XHUA9 主要脂肪酸为 anteiso - C_{15:0} , C_{16:0} , iso - C_{15:0} , anteiso - C_{17:0} , iso - C_{16:0} 和 iso - C_{17:0} ;菌株 XHUA9 主要极性脂肪酸为双磷脂酰甘油(DPG)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰肌醇(PI) ,菌株 XHUA9 和 FeL05^T 的极性脂肪酸检测结果见图 2 ;菌株 XHUA9 和 FeL05^T 的甲基萘醌均为 MK - 7 .

不同微生物的脂肪酸在质量分数和组成上差异较大 ,它和微生物耐药性、遗传变异等关系密切^[14] .不同微生物具有不同种类的醌 ,它是微生物能量代谢过程中的电子传递体 .微生物醌主要有两种类型 :甲基萘醌(简称为 MK ,即 2 - 甲基 - 3 - 多异戊烯基 - 1 ,4 - 萘醌)和泛醌(简称为 Q ,即 2 ,3 - 二甲氧基 - 5 - 甲基 - 6 多异戊烯基 - 1 ,4 - 苯醌) .醌的异戊烯基侧链长度和氢的饱和度不同 ,可以为不同微生物属的分类提供依据 .革兰氏阳性细菌主要合成甲基萘醌 .经对比发现 ,菌株 XHUA9 和 FeL05^T 的主要脂肪酸相同 ,质量分数相差不大 ;主要极性脂肪酸存在差

异 ,菌株 XHUA9 和 FeL05^T 均含有双磷脂酰甘油(DPG)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰肌醇(PI) ,此外 ,FeL05^T 还含有氨基脂(AL)和磷脂(PL) ;菌株 XHUA9 和 FeL05^T 的甲基萘醌相同 .

表 1 XHUA9 的生理生化实验结果
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain XHUA9

实验项目	XHUA9	YQ1	FeL05 ^T
荚膜	+	+	+
革兰氏染色	+	+	+
氧化酶	-	-	-
伏 - 普	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
明胶水解	-	-	-
淀粉水解	+	+	+
生长温度 50 ℃	-	-	-
pH 5.6	+	+	+
DNA(G + C)摩尔分数/%	51.9	51.9	53.3
碳源利用			
L - 鼠李糖	w	w	-
D - 麦芽糖	+	+	+
D - 果糖 - 6 - 磷酸	w	w	+
蔗糖	+	+	+
葡糖醛酰胺	-	w	w
四唑蓝	-	-	-
乙酸	w	w	-
氨曲南	-	-	w
乙酰乙酸	-	w	w
D - 半乳糖醛酸	+	-	+
L - 苹果酸	-	-	w
L - 岩藻糖	-	-	-
D - 果糖	+	+	+
L - 乳酸	w	-	-
柠檬酸	-	-	-
D - 苹果酸	-	-	-
肌苷	+	+	+
D - 棉子糖	+	w	+
Tween 80	-	-	+
D - 葡萄糖醛酸	-	-	w
α - 酮戊二酸	-	-	-
丁酸钠	+	+	+
甲酸	-	-	w
四氮唑紫	w	w	-
奎宁酸	-	-	-
糊精	+	+	+
L - 丙氨酸	-	-	-
糊精糖	+	+	+
L - 谷氨酸	-	-	-
松二糖	+	+	+
L - 丝氨酸	-	-	-

注 :+ 为阳性或存在 ,w 为弱阳性 ;- 为阴性或缺失 .

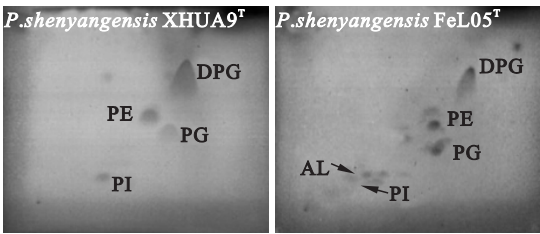


图2 菌株 XHUA9 和 FeL05^T 的极性脂肪酸检测结果
Fig. 2 Polar lipid profile of strain XHUA9 and FeL05^T

2.4 菌株 (G + C) 摩尔分数和 DNA 同源性分析
微生物 DNA 碱基组成具有种特异性, DNA 的 (G + C) 值在细胞中很稳定, 可以作为细菌鉴定重要遗传指标, 而且它不受菌龄及突变因素以外的其他因素影响. 菌株 XHUA9 的 (G + C) 摩尔分数为 51.9% .

许多资料表明, DNA - DNA 杂交最适合于微生物种一级水平的研究. DNA - DNA 杂交同源性在低于 20% 的菌株为不同属的关系, 同源性在 60% 以上者可视为同一个种, 而同源性在 20% ~

30% 之间的菌株应为属内关系紧密的种. 菌株 XHUA9 和模式菌株 FeL05^T 间基因组 DNA - DNA 同源性杂交值为 51.6% , 这个值在 30% ~ 60% 之间, 说明菌株 XHUA9 和 *Paenibacillus hunanensis* 是类芽孢杆菌属内亲缘关系较近的种.

2.5 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌通用引物对菌株 XHUA9 的 16S rRNA 基因序列进行测序, 得到目标序列长度为 1 426 kb. 其 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 KF834270. 用得到的序列在 GenBank 数据库中进行 Blastn 检索, 结果表明菌株 XHUA9 与 YQ1, *Paenibacillus hunanensis* FeL05^T 和 *Paenibacillus kribbensis* AM49^T 序列同源性分别达到 99% , 96.7% 和 94% . 采用软件 MEGA4.1 中 Neighbor - joining 法构建 16S rRNA 序列系统发育树, 结果发现菌株 XHUA9 和课题组筛选的另一菌株 YQ1 聚为一簇 (见图 3), 表明它们的亲缘关系最近.

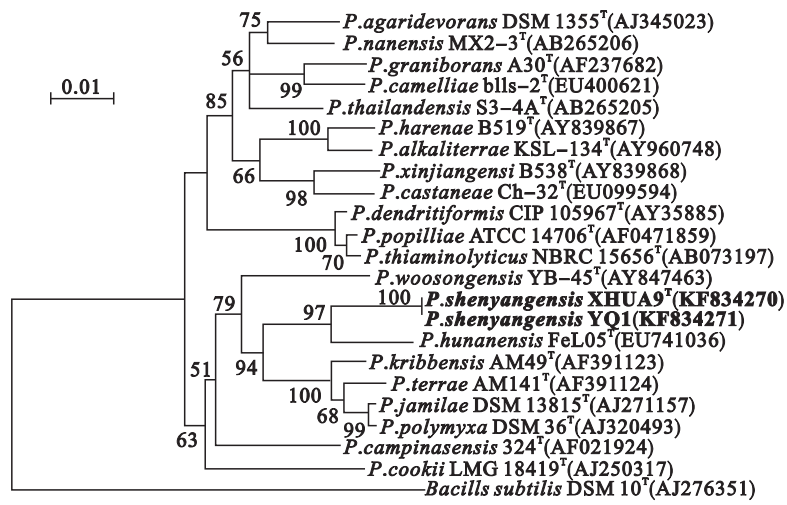


图3 菌株 XHUA9 的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain XHUA9

2.6 菌株发酵产物的絮凝活性及成分分析
经絮凝活性测定, 菌株 XHUA9 所产絮凝剂处理高岭土悬浮液, 絮凝率高达 97% , 用量少, 且不需添加 Ca^{2+} , Al^{3+} 等作为助凝剂. 用蒸馏水溶解絮凝剂提纯产物, 在 200 ~ 400 nm 波长下进行紫外扫描, 得到的扫描图中没有出现蛋白质和核酸的吸收峰, 说明提纯产物不含蛋白质和核酸. 双缩脲反应、茚三酮反应和蛋白黄色反应都无颜色变化, 进一步表明提纯产物中不含蛋白质. 在 Molish 反应中有紫环生成, 而蒽酮反应呈现蓝绿色, 说明产物中有糖的成分.

菌株 XHUA9 产生絮凝剂的红外光谱图具有

典型的多糖特征吸收峰 (见图 4). 特征吸收峰为 3 475.18, 2 924.49, 1 666.20, 1 622.94, 1 358.42, 1 004.12 cm^{-1} . 3 475.18 cm^{-1} 处宽吸收峰是糖分子内或糖分子间的氢键 O—H 伸缩振动的结果; 2 924.49 cm^{-1} 处小吸收峰为 C—H 不对称伸缩振动的结果, 此区域的吸收峰是糖类的特征; 1 666.20 cm^{-1} 处吸收峰是 C=O 键伸缩振动偏移的结果; 1 622.94 cm^{-1} 处吸收峰是 C=C 键伸缩振动的结果; 1 358.42 cm^{-1} 吸收峰是 C—H 的变角振动; 1 000 ~ 1 200 cm^{-1} 间吸收峰是 C—O 伸缩振动. 通过红外光谱分析, 得出菌株 XHUA9 所产絮凝剂的主要成分为多糖类物质.

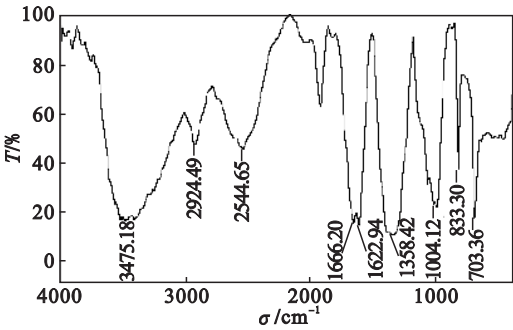


图 4 絮凝菌 XHUA9 产生絮凝剂的红外光谱图
Fig. 4 Infrared ray spectrum of bioflocculant produced by XHUA9

3 结 论

- 1) 根据形态学特征、生理生化特征、细胞化学组分、分子生物学等多相分类鉴定结果 ,菌株 XHUA9 被鉴定为类芽孢杆菌属内的新种.
- 2) 菌株 XHUA9 所产絮凝剂不需添加 Ca^{2+} , Al^{3+} 等作为助凝剂 ,且絮凝活性高、用量少 ,在微生物絮凝剂的开发和利用上具有一定的研究价值.
- 3) 紫外扫描、红外光谱、蛋白质和糖类的颜色反应等分析结果表明 ,菌株 XHUA9 所产絮凝剂的主要成分为多糖类物质.

参考文献 :

[1] 马放 ,段姝悦 ,孔祥震 ,等. 微生物絮凝剂的研究现状及其发展趋势[J]. 中国给水排水 ,2012 ,28(2) :14 - 17.
(Ma Fang ,Duan Shu-yue ,Kong Xiang-zhen ,et al. Present status and development trend of studies on microbial flocculants[J]. *China Water & Wastewater* ,2012 ,28(2) :14 - 17.)

[2] Sun J ,Zhang X H ,Miao X J ,et al. Preparation and characteristics of bioflocculants from excess biological sludge [J]. *Bioresource Technology* 2012 ,126 :362 - 366.

[3] Elkady M F ,Farag S ,Zaki S ,et al. *Bacillus mojavensis* strain 32A ,a bioflocculant-producing bacterium isolated from an Egyptian salt production pond[J]. *Bioresource Technology* , 2011 ,102(17) :8143 - 8151.

[4] Gong W X ,Wang S G ,Sun X F ,et al. Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology* ,2008 ,99 (11) :4668 - 4674.

[5] Yang G ,Wang N ,Zhang C. Flocculating properties of the novel bioflocculant poly(γ -glutamic acid) and its use in jean dyeing wastewater treatment [J]. *Advanced Materials Research* 2011 ,183 :125 - 129.

[6] Zhuang X L ,Wang Y P ,Li Q B ,et al. The production of bioflocculants by *Bacillus licheniformis* using molasses and its application in the sugarcane industry[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2012 ,17(5) :1041 - 1047.

[7] Ash C ,Priest F G ,Collins M D. *Paenibacillus* gen. nov. in validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IUSB ,list no. 51[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1994 ,44 :852 - 853.

[8] Berge O ,Guinebrethière M H ,Achouak W ,et al. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov. , isolated from plant roots ,soil and food[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002 , 52(2) :607 - 616.

[9] Jin H J ,Lyu J ,Chen S F. *Paenibacillus sophorae* sp. nov. ,a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sophora japonica*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2011 ,61(4) :767 - 771.

[10] Khianngam S ,Tanasupawat S ,Akaracharanya A ,et al. *Paenibacillus xylanisolvens* sp. nov. ,a xylan-degrading bacterium from soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2011 ,61(1) :160 - 164.

[11] Kim D S ,Bae C Y ,Jeon J J ,et al. *Paenibacillus elgii* sp. nov. ,with broad antimicrobial activity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004 , 54(6) :2031 - 2035.

[12] Collins M D. Isoprenoid quinone analysis in classification and identification [M]. London : Academic Press , 1985 : 267 - 287.

[13] Zhao X ,Xing D ,Zhang L ,et al. Characterization and over expression of a [FeFe]-hydrogenase gene of a novel hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense* [J]. *International Journal of Hydrogen Energy* ,2010 ,35 (18) :9598 - 9602.

[14] 王秋红 ,蓝江林 ,朱育菁 ,等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用[J]. 福建农业学报 ,2007 ,22 (2) :213 - 218.
(Wang Qiu-hong ,Lan Jiang-lin ,Zhu Yu-jing ,et al. Fingerprint analysis on methyl fatty acid and its applications in microbial study [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences* 2007 ,22(2) :213 - 218.)