

1 株高效油脂降解菌的筛选鉴定及其特性研究

康燕莉, 孟宪刚*, 李纲, 李玉梅 (兰州交通大学化学与生物工程学院, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的]从自然环境中筛选鉴定高效降解油脂菌, 并对其特性进行研究。[方法]从一学校食堂下水道口土壤中筛选分离得到1株高效降解油脂的菌株, 经16SrDNA同源性序列分析鉴定, 并对其降解条件进行研究, [结果]试验鉴定出该筛选菌株为地衣芽孢杆菌, 以大豆油作为碳源, 温度为35℃, 最初pH为8, 摇床速率为150 r/min, 培养48 h后对油脂的降解率87.4%。[结论]筛选得到的菌株用于含油废水的生物处理。

关键词 筛选; 鉴定; 地衣芽孢杆菌; 降解率

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-04077-03

Screening and Identification on Oil-Degradation Bacteria and Study of Characteristics

KANG Yan-li et al (School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] To screen and identify high-effective oil-degradation bacteria from nature environment, and study on its characteristics. [Method] One bacterial strain with high-oil degradation ability was screened from a school restaurant sewer soil. It was identified by 16SrDNA sequence homology analysis, and its degradation conditions were studied. [Result] The strain was identified as *Bacillus licheniformis*, with soybean oil as carbon source, temperature 35℃, initial pH 8, agitation 150 r/min, the degradation on bean oil reached 87.4% after culturing 48 h. [Conclusion] The screened bacteria are proper for biological treatment of oily wastewater.

Key words Screening; Identification; *Bacillus licheniformis*; Degradation rate

餐饮废水是指餐饮业、食堂和食品加工业等产生的残渣和废料的总称, 主要成分为有机物, 具有营养成分高、含水量高、油脂和盐分含量高、易腐发酵发臭等特点。随着人民生活水平的提高以及餐饮业的增多, 排放在水体中的油脂含量日益增高。对于这类废水的处理, 人们采用了不同方法, 如物理法有沉淀、隔油等, 化学法有絮凝、吸附、电解等, 这些方法一般投资大、流程复杂且化学方法会产生二次污染。相比之下, 微生物能利用油脂作为生长碳源和能源, 使之水解成甘油和脂肪酸, 最终降解为水和CO₂等代谢产物。近些年发展起来的生物法具有成本低、投资省、无二次污染的优点, 已成为国内外处理油脂废水研究的热点^[1]。因此, 从自然环境中寻找高效降解油脂菌, 用于含油废水的处理, 具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品。样品采自兰州交通大学化学与生物工程学院食堂下水道口周围土壤。

1.1.2 培养基。富集培养基: NaCl 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 牛肉膏 5.0 g/L, 食用油 4 ml, pH 7.2~7.4, 121℃灭菌 20 min。分离培养基: 蛋白胨 5.0 g/L, 牛肉膏 5.0 g/L, 无水葡萄糖 3.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, 琼脂 20.0 g/L, pH 自然, 121℃灭菌 20 min。复筛培养基: (NH₄)₂SO₄ 5.0 g/L, Na₂HPO₄ 2.0 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, NaCl 2.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, 食用油 20.0 g/L, pH 自然, 121℃灭菌 20 min。脂肪酶验证培养基: 酵母膏 5.0 g/L, 蛋白胨 10.0 g/L, 无水葡萄糖 20.0 g/L, Tween-80 8.0 g/L, CaCl₂ 0.3 g/L, 琼脂 15~20 g/L, pH 自然,

121℃灭菌 20 min^[2]。LB培养基: 胰化蛋白胨 10.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, 琼脂 15.0~20.0 g/L, pH 7.0, 121℃灭菌 20 min。油脂培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 牛肉膏 5.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, 食用油 10.0 g/L, 琼脂 20.0 g/L, 1.6% 中性红水溶液 1 ml, pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选与纯化。

1.2.1.1 样品处理。将采集的样品充分混合, 取土样 5 g, 加入装有 45 ml 无菌水和无菌玻璃珠的 150 ml 三角瓶内, 充分振荡 10 min, 打碎菌胶团, 释放游离菌。

1.2.1.2 驯化培养。取处理后的样品上清液 10 ml 加入 150 ml 富集培养基中, 置于 30℃, 150 r/min 的恒温摇床上进行振荡培养。以后每天观察, 如果发现油脂降解得好, 就补加少量食用油。每 5 d 为一个周期, 一个周期后转接 5 ml 悬浊液至 150 ml 新的富集培养基中, 以促进油脂分解菌的生长。此驯化过程持续 6 个周期, 最后一个周期的驯化液用于菌种的分离筛选。

1.2.1.3 产脂肪酶能力验证。将驯化的菌液取 1 ml, 加入 9 ml 无菌水, 制成起始菌液, 再对它进行适当稀释, 取 1 ml 稀释后的菌液涂布在脂肪酶验证培养基平板上, 30℃培养 24~48 h, 观察菌落的生长以及透明溶脂圈的大小情况。稀释菌液: 按 10⁻¹, 10⁻², ……10⁻⁹ 进行。

1.2.1.4 平板分离。选取脂肪酶验证培养基平板上菌落的生长良好并且透明溶脂圈大的菌落, 接种到分离培养基上, 30℃培养 24~48 h。

1.2.1.5 菌种的纯化。选取生长良好的菌落接种到 LB 培养基上, 多次划线分离直至得到纯菌种, 纯化后的菌株斜面保存至 4℃冰箱中备用。

1.2.2 油脂降解菌菌株的筛选。将上述步骤筛选出的菌株分别接种到油脂琼脂培养基平板, 37℃恒温培养箱中培养 24 h, 筛选出油脂降解菌, 即只利用油脂作为碳源和能源生长

基金项目 兰州市创新团队计划(201003); 甘肃省基本科研业务项目(620031); 兰州市城关区科技创新项目(201201)。

作者简介 康燕莉(1986-), 女, 甘肃定西人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学, E-mail: yanlikangkang@163.com。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事工业微生物研究, E-mail: mengxg@mail.lzjtu.cn。

收稿日期 2013-03-15

的菌株。

1.2.3 形态特征的观察和生理生化反应。在普通琼脂平板上观察筛选出的油脂降解菌的菌落形态,进行革兰染色并进行参照《常见细菌系统鉴定手册》^[3],对筛选得到的菌株进行葡萄糖氧化发酵试验、甲基红(M.R)试验、淀粉水解、明胶液化、吡啶试验、苯丙氨酸脱氢等生理生化试验。

1.2.4 菌株 16SrDNA 测定。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取菌株基因组 DNA,根据 16S DNA 设计通用引物并 PCR 扩增 16S DNA 片断。设计引物正向引物为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAGAACGAACGCT-3',反向引物为:5'-TACGGCTACCTGT-TACGACTCACCCC-3',PCR 扩增体系为:10 × buffer (Mg²⁺) 6 μl;Tag 酶 3 μl;dNTP 2 μl;正反向引物各 3 μl;模板 DNA 5 μl;ddH₂O 28 μl,总共 50 μl 体系。PCR 程序为:95 °C 预变性 10 min,循环体系为:94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,共 30 个循环,最后于 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 的凝胶电泳测序验证后用于测序。

1.2.5 油脂含量的测定。紫外分光光度法^[4]。

1.2.5.1 大豆油标准曲线绘制。精确称取 10.0 g 大豆油,溶于 100 ml 容量瓶中,用石油醚定容至标线,制备成含 0.1 g/ml 食用油的的标准溶液。向 9 个 25 ml 的容量瓶中,分别加入 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0 ml 的食用油标准溶液,用石油醚定容至标线,配制成浓度分别为 0、0.004、0.008、0.012、0.016、0.020、0.024、0.032 和 0.040 g/ml 石油醚的大豆油溶液在 225 nm 波长下,以石油醚作为参比,分别测量上述系列浓度的大豆油溶液的吸光值。根据得到的数据绘制出大豆油标准溶液的标准曲线。经回归得到下列计算式: $y = 1.2116x + 0.0144$ ($R^2 = 0.9918$),其中 y 为吸光度, x 为油脂浓度, R^2 相关系数。标准曲线见图 1。将待测样品用石油醚萃取后在 230 nm 波长处测量其吸光度,然后计算出油脂浓度。

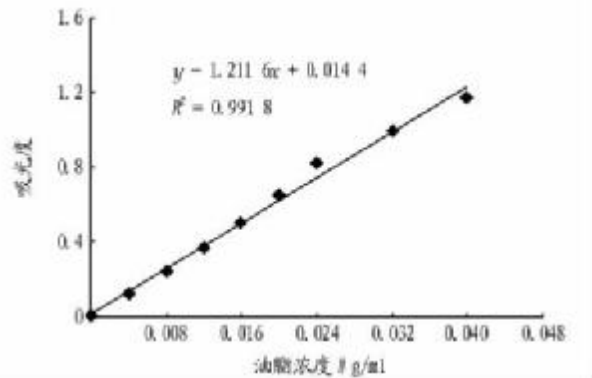


图1 大豆油标准曲线

1.2.5.2 菌株油脂降解率的测定。纯化后的菌种处理一定时间后,其降解率的计算是通过石油醚萃取培养液中剩余的油脂,测得其吸光值,根据油脂浓度与吸光值的关系计算而得剩余油脂的浓度,然后与初始油脂浓度相比,从而计算出油脂降解率,计算公式为:

$$\text{油脂降解率} = \frac{\text{初始油脂浓度} - \text{降解后的油脂浓度}}{\text{初始油脂浓度}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选 从学校食堂周围土壤中筛选了对油脂有降解作用的菌株,根据脂肪酶验证培养基上溶脂圈的大小初筛得到了 9 菌株,再经过中性红培养基的筛选,得到一株菌的红色最为明显,编号为 C3。

2.2 形态特征的观察 在 LB 平板上编号 C3 的菌株菌落呈灰白色,表面粗糙,中间低陷有褶皱,显微镜观察菌体呈杆状。

2.3 菌株生理生化特征 C3 菌株的生理生化特征具体见表 1。

表1 菌株 C3 生理生化特征

检测项目	结果	检测项目	结果
淀粉水解	+	葡萄糖	产酸不产气
明胶液化	+	乳糖	-
油脂水解	+	柠檬酸盐	-
吡啶试验	-	苯丙氨酸脱氢酶	-
甲基红	-		

注: + 为阳性; - 为阴性。

2.4 菌株的鉴定 序列 PCR 电泳显示,在 1.5 bp 附近有 PCR 扩增产物(图 1),测序后 BLAST 比对显示 C3 与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)同源性最高。

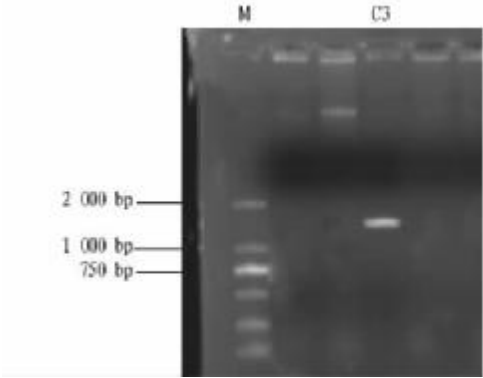


图1 16S rDNA PCR 扩增结果

2.5 温度对油脂降解率的影响 从图 2 可以看出,C3 对温度的适应范围较广泛,在 25 ~ 35 °C 时,降解率可达 43.6% ~ 73.4%。在 35 °C 时达到最大值;之后随着温度的升高,导致菌株的生长繁殖速度减慢,产生酶的量也相应地减少,因此降解率会逐渐下降。

2.5 初始 pH 对降解率的影响 初始 pH 还可影响菌体对基质的利用速度和细胞的结构状态,以至影响菌体的生长速度和微生物细胞的代谢途径。从图 3 可以看出,菌株 C3 对 pH 适应性较广,pH 在 8 时降解率达到最大值,该菌株生长环境为碱性,随后降解率随初始 pH 增大逐渐下降。

2.6 溶解氧对降解率的影响 摇床转速不仅对充氧过程有影响,同时影响培养基中基质的混合,随摇床速率的提高,供氧和混合过程都得到提高,有利于油脂的降解。从图 4 可以

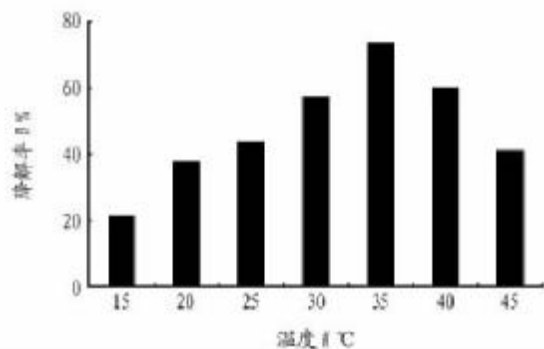


图2 温度对降解率的影响

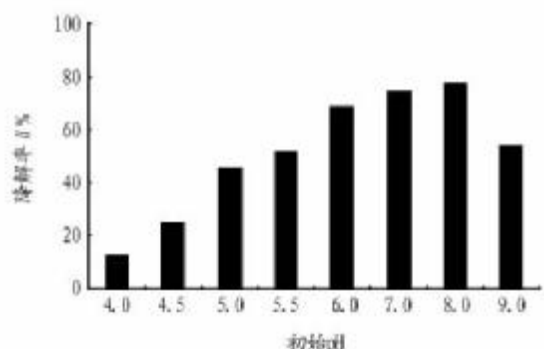


图3 初始 pH 对降解率的影响

看出,随着摇床速率的提高,降解率也相应地增大,在 150 r/min 时降解率达到最大,随着摇床速率的增加,受菌体自身生长和代谢的影响,导致降解率下降。

3 讨论

该试验从学校食堂下水道口土壤中,经筛选分离获得 1 株降解油脂的菌株,经鉴定为地衣芽孢杆菌,当初始 pH 为 8,

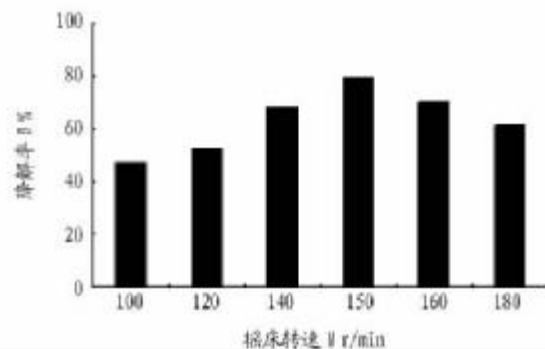


图4 溶解氧对降解率的影响

温度为 35 °C,摇床速率为 150 r/min,培养 48 h 后,降解率可达 87.4%。说明该菌株油脂有较强的降解能力,而且该菌株对温度和 pH 适应范围广泛。芽孢杆菌属因其可产生芽孢,具有对环境的耐受性好、抗逆性强、无致病性等优点,逐步成为治理环境污染的首选菌种^[5]。该研究筛选的油脂降解菌是从自然环境中获取,通过实验室的培养、筛选和驯化得到的,今后对于该菌的研究可集中在对其进行遗传改造,探讨不同油脂降解菌间的相互作用等方面,提高油脂降解率,以期应用于油脂废水的生物处理。

参考文献

- [1] 陈熹兮,杨虹,李道棠,等. Isolation and characterization of microorganisms for degradation of minimal oils and fats at low temperatures[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2003, 8(2): 123-127.
- [2] 张树政. 酶制剂工业(下)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [3] 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.
- [4] 沈叔平, 汪小梅. 废水中动植物油脂的紫外分光光度测定法[J]. 中国环境监测, 1994, 10(3): 4-7.
- [5] 刘婕, 杨博. 一株高效油脂降解菌的分离鉴定及其性能研究[J]. 中国油脂, 2010(35): 41-44.

(上接第 4076 页)

潮解 3 个方面共同作用。因此, GAB 模型可用来描述薄片在高温湿度环境中的平衡含水率且具有较好的拟合效果。

3 结论

研究得出,相对湿度和温度对薄片平衡含水率均有一定的影响,且相对湿度比温度对平衡含水率有更大的影响。GAB 模型能对薄片的平衡含水率进行较好地预测($R^2 > 0.95$)。

参考文献

- [1] 许日鹏, 苏文强, 段继生. 烟草薄片的应用[J]. 上海造纸, 2008(6): 46-49.
- [2] AIT MOHAMED, KOUHILA M, JAMALI A, et al. Moisture sorption isotherms and heat of sorption of bitter orange leaves (Citrus aurantium) [J]. Journal of Food Engineering, 2005, 67: 491-498.
- [3] JAMALI A, KOUHILA M, MOHAMED L A, et al. Moisture adsorption-desorption isotherms of Citrus reticulata leaves at three temperatures [J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77: 71-78.
- [4] LAHSASNI S, KOUHILA M, MAHROUZ M, et al. Moisture adsorption-desorption isotherms of prickly pear cladode (Opuntia ficus indica) at different temperatures [J]. Energy Conversion and Management, 2003, 44: 923-936.

- [5] GHODAKE H M, GOSWAMI T K, CHAKRAVERTY A. Moisture sorption isotherms, heat of sorption and vaporization of withered leaves, black and green tea [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78: 827-835.
- [6] BASUNIA M A, ABE T. Adsorption isotherms of barley at low and high temperatures [J]. Journal of Food Engineering, 2005, 66: 129-136.
- [7] MCEWEN P E, SIMMONDS W H C, WARD G T. The Drying of wheat grain Part III: Interpretation in terms of its biological structure [J]. Chemical Engineering Research and Design, 1954, 32: 115-120.
- [8] 国家烟草质量监督检验中心. YC/T31-1996, 烟草及烟草制品 试样的制备和水分测定 烘箱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [9] KUROIWA T, NAKANISHI Y. Measurement of migration rate of water in cured tobacco material [J]. Food Science and Technology Research, 2003, 3: 245-249.
- [10] 胡有持, 徐亮, 张威, 等. 云南烤烟的吸湿特性研究[J]. 烟草科技, 2000(9): 8-12.
- [11] 中国烟草总公司郑州烟草研究院. 烟草热湿处理特性在线分析装置: 中国, 200510107366. X[P]. 2006-06-28.
- [12] BASUNIA M A, ABE T. Thin-layer re-wetting of rough rice at low and high temperatures [J]. Journal of Stored Products Research, 2005, 41: 163-173.
- [13] ASABE D245.6, Moisture relationships of plant-based agricultural products [S]. 2007.
- [14] 郑松锦. 烟叶在高温湿度环境中的热质传递过程研究[D]. 郑州: 郑州烟草研究院, 2009.