

# 啤酒厂废水处理活性污泥中一株细菌的分离与鉴定

阎春兰, 李娜, 敖偲成, 高斯, 张芸梦

(中南民族大学 生命科学学院, 武汉 430074)

**摘要** 从某啤酒厂废水的活性污泥中分离纯化了一株微生物菌株 Z-1, 分析了该菌株的 16S rDNA 基因序列及形态特征, 测定了该菌株的生长曲线、对抗生素的耐药性及该菌株的曝气池污水氮、磷含量。结果表明: 该微生物为芽孢杆菌属细菌 (*Bacillus*), 生长较快, 对抗生素的耐药性弱, 对废水中 N、P 去除较多, 为筛选活性污泥法处理啤酒废水的高效菌株奠定基础。

**关键词** 啤酒厂废水; 活性污泥; 16S rDNA; 生长曲线; 耐药性

中图分类号 TQ920; R282.71 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)01-0021-03

## Isolation and Identification of A Microorganism from the Active Sludge in Brewery Wastewater

Yan Chunlan, Li Na, Ao Sicheng, Gao Si, Zhang Yunmeng

(College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** A strain Z-1 was isolated and purified from the active sludge in brewery wastewater. 16S rDNA gene sequence and the morphological characteristics of Z-1 were analyzed. The growth curve, antibiotic resistance, N and P content in the aeration tank sewage from the strain were also examined. The results showed that this strain belong to *Bacillus*. It grew fast and was weakly resistant to antibiotic, with efficient removal of N and P in wastewater. The results may provide the basis for subsequent selection of highly efficient microorganism to treat brewery wastewater with activated sludge process.

**Keywords** brewery wastewater; active sludge; 16S rDNA; growth curve; antibiotic resistance

啤酒的糖化、发酵和灌装等工艺流程中会产生大量废水, 其中糖化和发酵工艺流程的废水属于高浓度废水, 化学需氧量高, 约占总废水量的 30%; 而灌装工艺流程废水属于低浓度废水<sup>[1]</sup>。啤酒废水中糖类、醇类等有机物含量较高, 虽然无毒但易腐败, 直接排放会导致水体中溶解氧的大量消耗, 进而恶化环境。目前我国处理啤酒废水多采用好氧生物法, 常用的有活性污泥法、生物膜法、新型深井曝气法和膜生物处理法等<sup>[2]</sup>。

本文以湖北省某雪花啤酒厂废水处理的曝气池中的活性污泥为研究材料, 分离与纯化了一株好氧性微生物, 利用 16S rDNA 对该微生物进行物种鉴定, 测定了该微生物的生长曲线, 各种抗生素的耐药

性, 以及曝气池污水中的氮、磷含量, 为筛选活性污泥法处理啤酒废水的高效菌株奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

实验废水来自于湖北省某雪花啤酒厂中废水处理的活性污泥曝气池。培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基 (牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 水 1000 mL, pH 7.4 ~ 7.6); 16S rDNA 基因的克隆按照标准方法进行, 其中 pMD18-T 载体、Taq 聚合酶购自 Takara 公司, T4 DNA 连接酶购自 MBI 生物公司; 北京三博远志公司完成 16S rDNA 的基因测序。PCR 仪(T-personal 48, Biometra 公司)。

收稿日期 2015-12-13

作者简介 阎春兰(1977-), 女, 副教授, 研究方向: 微生物分子遗传学与生理学, E-mail: yanchunlan@mail.scuec.edu.cn

基金项目 中央高校基本科研业务费专项(CZY13011), 中南民族大学学生科研基金项目(YCX15026)

## 1.2 微生物的分离与鉴定

采用稀释涂布平板法分离啤酒废水中的微生物,对单菌落利用平板划线进行纯化.提取纯化菌体的基因组 DNA,PCR 扩增 16S rDNA 序列,引物和 PCR 程序见文献 [3].电泳回收 PCR 产物,与 T 载体连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,获得的阳性转化子测序,测得该菌株的 16S rDNA 序列.调取 GenBank 数据库中代表性菌株的 16S rDNA 序列,利用 Blast 软件与该菌株的 16S rDNA 序列进行比较分析,构建系统进化树.采用 Mega 2.0 程序对系统进化树进行分析.

## 1.3 细菌的生长特性

取培养至对数生长期的菌液 1.5 mL 接种到 30 mL 牛肉膏蛋白胨培养液中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养,分别在 0,4,8,12,16,20,24,36 h 取样,测定 OD<sub>600</sub> 值,并根据 OD<sub>600</sub> 值来绘制生长曲线.

## 1.4 细菌抗生素耐药性特征

采用卡那霉素(Km)、氨苄青霉素(Ap)、壮观霉素(Sp)、链霉素(St)、四环素(Tc)、氯霉素(Cm)、庆大霉素(Gm)等共 7 种常用的抗生素测定细菌耐药性.将不同浓度的抗生素加入到牛肉膏蛋白胨培养基中,制成不同的抗生素平板;将待测菌株接种到抗生素平板,37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后检查菌株的生长情况.

## 1.5 废水中的氮、磷含量的测定

废水中氮含量和磷含量的测定,采用国家环保局标准方法进行测定<sup>[4]</sup>.

# 2 结果及分析

## 2.1 菌株形态特征与鉴定

经分离纯化后得到一个纯培养菌株,命名为 Z-1.在平板上菌落圆形,边缘整齐,微隆起;镜检结果为两端钝圆的短杆菌,革兰氏阴性.同源性比较 16S rDNA 序列,发现 Z-1 菌株与 *Bacillus* 属的多株细菌均具有 99% 以上的序列相似性.

## 2.2 系统发育分析

构建了菌株 Z-1 的系统发育树,如图 1 所示.从图 1 中可见,从 GenBank 中搜索得到的与 Z-1 同源性在 99% 以上的 15 个菌株中,Z-1 与多种 *Bacillus* 属的微生物亲缘关系很近.根据 Z-1 菌株的形态、革兰氏染色结果和 16S rDNA 序列的分析结果,可将 Z-1 菌株归属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),按照 Bergey 分类系统,Z-1 菌株在系统发育上的地位为:细菌界 Bacteria、厚壁菌门 Firmicutes、芽孢杆菌纲 Bacilli、芽孢杆菌目 Bacillales、芽孢杆菌科 Bacillaceae、芽孢杆

## 菌属 *Bacillus*.

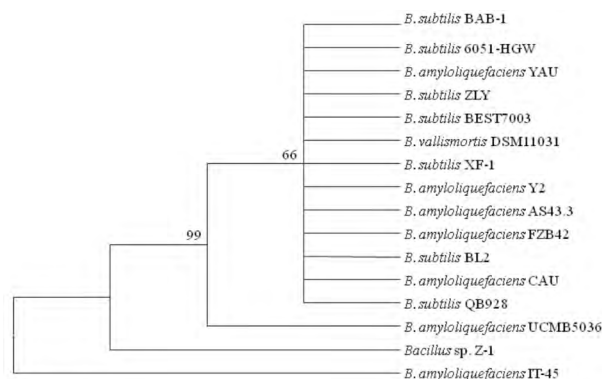


图 1 菌株 Z-1 的 16S rDNA 序列的系统进化分析

Fig. 1 The phylogenetic analysis of the strain Z-1 based on 16S rDNA sequence

## 2.3 Z-1 菌株的生长特性

菌株 Z-1 生长曲线的测定结果如图 2 所示.由图 2 中可见,菌株在 4~16 h 之间生长迅速,约 20 h 进入平台期,之后细胞数量不变,维持在平台期.

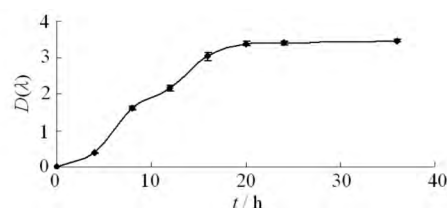


图 2 菌株 Z-1 的生长特性

Fig. 2 The growth characteristics of strain Z-1

## 2.4 菌株 Z-1 的抗药性测定结果

菌株 Z-1 对多种抗生素的抗药性结果如表 1 所示.由表 1 可见: Km20、Ap20、Gm5、Tc2 和 St50 均对菌株 Z-1 有很好的抑制作用.即终浓度为 20  $\mu$ g/mL Km、20  $\mu$ g/mL Ap、5  $\mu$ g/mL Gm、2  $\mu$ g/mL Tc 和 50  $\mu$ g/mL St 均能抑制该菌株的生长.而 10  $\mu$ g/mL Sp 也能部分抑制 Z-1 的生长,其他如 2  $\mu$ g/mL Cm 无抑制作用.

表 1 菌株 Z-1 的抗生素抗性

Tab. 1 The antibiotic resistance of strain Z-1

抗生素	菌株生长情况
Ap20	-
Km20	-
Sp10	+
Tc2	-
Gm5	-
Cm2	+++
St50	-

注: - 代表菌种不能生长, + 代表菌种可以生长

## 2.5 曝气池中氮、磷含量的测定

鉴于 Z-1 菌株较快的生长,对多种抗生素不耐受,测定该菌株的曝气池污水氮、磷含量,以检测该

菌株对氮磷的去除效果,结果如表 2 所示.啤酒厂废水属于中浓度有机废水,总氮含量在 30 ~ 70 mg/L,总磷含量在 6 ~ 20 mg/L<sup>[5]</sup>.

由表 2 可见,经前期的厌氧处理、好氧性活性污泥处理之后,废水中的总氮(TN)、总磷(TP)含量下降很多,但仍属于富营养化水体.

表 2 啤酒厂曝气池中氮、磷的含量

Tab. 2 Content of nitrogen and phosphorus content of brewery wastewater

氮磷含量	测量值 $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
SRP	4.88 ± 0.19
TDP	5.16 ± 0.20
TP	5.30 ± 0.38
DN	35.94 ± 3.36
TN	35.99 ± 2.88

注:SRP 为可溶性磷(不经消解测得);TDP 为可溶性磷;TP 为总磷;TDN 为可溶性总氮;TN 为总氮

### 3 讨论

活性污泥法是目前处理好氧生物处理工业废水的常用方法,微生物是活性污泥的主要组成部分,包括细菌、真菌、原生动物、后生动物等多种微生物群体,其中细菌在活性污泥组成和净化功能中起中心作用<sup>[6]</sup>.污水中有机物的性质决定细菌的种属优势,如含蛋白质的污水有利于产碱杆菌属和芽孢杆菌属细菌的生长,而糖类污水或烃类污水中则以假单胞菌属细菌为主.

研究发现不同种类的芽孢杆菌属细菌在各类污水处理中起重要作用.枯草芽孢杆菌对电镀废水中镉的吸附达 93% 以上<sup>[7]</sup>、对含铜废水的去除率为 16.27%<sup>[8]</sup>;可用于处理造纸黑液,使其色度和 COD 下降<sup>[9]</sup>等;枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌对于水产养殖废水中硝态氮的去除率分别为 99.28% 和 99.51%<sup>[10]</sup>;利用其产生的  $\gamma$ -聚谷氨酸絮凝剂来处理含铬废水,在最佳工艺条件下对铬的去除率可达 55%<sup>[11]</sup>等;最近又从制革废水中分离得到一株对多种重金属均有较高耐受的芽孢杆菌属细菌<sup>[12]</sup>.芽孢杆菌属细菌也可以和其他微生物一起来处理各类废水,如与盐单胞菌一起处理造纸废水;蜡状芽孢杆菌和膜璞毕赤酵母可一起循环利用制酒废水作为替代培养基产生复合型微生物絮凝剂,达到以废治废的目的<sup>[13]</sup>.

本文从某啤酒厂废水处理的活性污泥中分离得

到一株细菌 Z-1.根据 Z-1 菌株的形态特征和 rDNA 序列结果可将该菌株归属于芽孢杆菌属(*Bacillus*).该菌株生长较快,对抗生素的耐药性弱,多种抗生素均能抑制其生长,对环境友好,即使释放到环境也不会对环境产生威胁;对废水中 N、P 去除较多,但处理后废水中 N、P 含量偏高,可为该菌株在净化啤酒厂废水中的应用奠定理论基础.

### 参 考 文 献

- [1] 梁多,彭超英.啤酒工业废水治理及清洁生产实例[J].酿酒,2004,31(3):84-86.
- [2] 贾艳萍,马皎,贾心情.啤酒废水处理技术研究进展[J].中国酿造,2013,32(8):5-9.
- [3] 阎春兰,代金刚,王恒涛,等.土壤中一株产黑色素微生物的分离与鉴定[J].中南民族大学学报(自然科学版)2014,33(3):44-46.
- [4] 国家环境保护局.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:中国环境科学出版社,2002.
- [5] 石明岩.啤酒废水处理技术的革新与实践[J].工业水处理,2003,23(1):16-19.
- [6] 陈燕飞.微生物在好氧活性污泥法处理水污染中的作用[J].科技情报开发与经济,2007,17(7):182-183.
- [7] 代淑娟,王玉娟,魏德洲,等.枯草芽孢杆菌对电镀废水中镉的吸附[J].有色金属,2010,62(3):156-159.
- [8] 李青彬,褚松茂,徐伏,等.芽孢杆菌生物吸附处理含铜废水研究[J].环境科学与技术,2007,30(5):89-91.
- [9] 汪春蕾,赵敏,杨洪亿,等.一株产漆酶细菌的分离、鉴定及对造纸黑液处理的初步研究[J].北京林业大学学报,2011,33(3):81-85.
- [10] 孟睿,何连生,席北斗,等.芽孢杆菌与硝化细菌净化水产养殖废水的试验研究[J].环境科学与技术,2009,32(11):28-31.
- [11] 万俊杰,邓毛程.枯草芽孢杆菌产  $\gamma$ -聚谷氨酸絮凝剂条件及含铬废水处理研究[J].环境保护科学,2010,36(3):35-37.
- [12] Abbas S, Ahmed I, Kudo T, et al. A heavy metal tolerant novel bacterium, *Bacillus malikii* sp. nov., isolated from tannery effluent wastewater[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2015, 108(6): 1319-1330.
- [13] 张帆,蒋文举,王向东,等.混合菌利用制酒废水产生的微生物絮凝剂的成分及理化特性研究[J].环境污染与防治,2013,35(1):50-53,59.