

# Separation and Identification of a Sort of Water Purification Bacteria and Analysis of Its Physiological Characteristics

Liu Cao, Zhe Zhao, Bin Zhao, Junkun Huang, Shuqian Yang, Shixiang Li

School of Resources and Materials, Northeastern University of Qinhuangdao, Qinhuangdao Hebei  
Email: 429753292@qq.com

Received: Jan. 31<sup>st</sup>, 2019; accepted: Feb. 18<sup>th</sup>, 2019; published: Feb. 25<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

A microorganism capable of removing ammonia nitrogen from water was isolated from the soil. After the analysis of bacterial colony characteristics and microscopic staining experiments, the bacterial colony was round, milky white, and the cells were short and straight rod-shaped, strictly aerobic, which was gram-negative bacterium. Through the analysis of the results of five physiological and biochemical experiments, including enzyme exposure test, V-P test and urea decomposition test, the bacteria were preliminarily identified as pseudomonas by comparing the manual of Berger.

## Keywords

Isolation, Ammonia Nitrogen, Physiological and Biochemical Experiment, Water Purification

# 一种水体净化细菌的分离鉴定及生理特性分析

曹 鏊, 赵 喆, 赵 斌, 黄俊坤, 杨书乾, 李诗香

东北大学秦皇岛分校, 资源与材料学院, 河北 秦皇岛  
Email: 429753292@qq.com

收稿日期: 2019年1月31日; 录用日期: 2019年2月18日; 发布日期: 2019年2月25日

## 摘 要

从土壤中分离出一株能够去除水中氨氮的微生物, 经过细菌菌落特征分析, 显微镜染色实验, 菌落呈圆形, 乳白色, 细胞呈短直杆状, 严格好氧, 为革兰氏阴性菌。通过接触酶实验、V-P实验、尿素分解等

五项生理生化实验结果分析, 对比伯杰氏手册, 初步鉴定该细菌属假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

## 关键词

分离, 氨氮, 生理生化实验, 水体净化

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

随着国民生活质量的不断提高, 生活污水和工业废水的排放量与日俱增, 大量未经处理的污水直接排放, 造成了严重的水质恶化, 我国主要水系的水体都遭到不同程度的破坏[1][2]; 高浓度、难降解的有机废水成为了我国污水处理的主要难题。

微生物应用于水体净化首先源于美国学者 Parker 提出的“Probiotics”一词, 通过向水体中定向投放微生物控制水体净化过程, 逐渐发展出活性污泥法和生物膜法等微生物处理工艺; 而我国于 20 世纪 80 年代开始研究微生物对水体净化的作用, 目前水体净化细菌主要有硝化(反硝化)细菌、光合细菌、芽孢杆菌等三类; 微生物脱氮、聚磷过程同步化进行已经成为国内外对于污水处理中优先解决的热点问题[3]。

近年来兴起的固定化微生物技术为有机废水的处理开拓了新的领域, 应用微生物的生理代谢构建高效生化反应器, 人为增强水体自净能力, 符合环境保护要求, 是污水处理的必然发展趋势, 同时该技术还具有安全性高、成本低、可持续性强的优点[4]。

本实验于秦皇岛市海港区汤河沿岸表层土壤中分离出来的微生物就是一种优良的水体净化细菌, 具有降解有机物、反硝化脱氮、聚磷等特性, 可广泛应用在有机废水处理、特种废水处理等领域[5]。

## 2. 实验仪器及药品

### 2.1. 实验仪器

- 1) 手提式压力蒸汽灭菌锅: DSX-280B, 上海申安医疗器械厂;
- 2) 生物显微镜: CX23LED RFSIC, 奥林巴斯(中国)有限公司;
- 3) 生化培养箱: HPS-400, 哈尔滨东联电子技术开发有限公司。

### 2.2. 实验药品

1) 分离培养基: 蛋白胨 1% (生物试剂, 北京奥博星生物技术有限责任公司), 牛肉膏 0.3% (生化试剂, 天津市凯通化学试剂有限公司), NaCl 0.5% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司) 0.5%, 琼脂粉(生化试剂, 天津市凯通化学试剂有限公司) 1.5%。

2) 革兰氏染色: 结晶紫染色液(CM1001, 北京路桥技术有限公司), 革兰氏碘液(CM1001, 北京路桥技术有限公司), 95%乙醇(CM1001, 北京路桥技术有限公司), 沙皇复染液(CM1001, 北京路桥技术有限公司)。

3) 淀粉培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, 琼脂 1.5%, 可溶性淀粉 0.2% (分析纯, 天津市北方天医化学试剂厂), 碘液 3%。

4) 甲基红培养基: 蛋白胨 1%, 葡萄糖 0.5%,  $K_2HPO_4$  0.5% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 甲基红试剂(分析纯)。

5) V-P 培养基: 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.5%, NaCl 0.5%, 40%氢氧化钾溶液(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 5%  $\alpha$ -萘酚酒精溶液(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司)。

6) 尿素培养基:  $KH_2PO_4$  0.14% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司),  $NaH_2PO_4$  0.21% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 葡萄糖 1%, 尿素 0.1% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 琼脂 1.5%。

7) 硫化氢培养基: 蛋白胨 10%, 胱氨酸 0.01% (生化试剂, 天津市凯通化学试剂有限公司), 硫酸钠 0.01% (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 醋酸铅试纸(分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司)。

### 3. 实验步骤

#### 3.1. 细菌的分离培养

从秦皇岛市海港区小汤河沿岸土壤表层处取得样品, 通过样品风干、磨碎、过筛、混合后制成不同浓度梯度菌悬液, 将菌悬液涂布到培养基中进行培养, 多次划线分离得到纯菌落[6] [7]。

采用连续培养的方法进行培养, 将培养基 pH 值调至 7.0~7.5 之间, 放入高压蒸汽灭菌锅灭菌 0.15 MP 灭菌 15 min, 在无菌试验台进行接种, 接种完成后放入恒温培养箱, 控制培养温度 25℃~30℃, pH 值 7.0~7.5 之间, 培养 24 h [8]。

#### 3.2. 革兰氏染色

- 1) 固定: 利用接种环将细菌接种在滴有无菌水的载玻片上, 通过火焰 3~4 次使其固定;
- 2) 初染: 滴加结晶紫液覆盖涂面, 染色 1 min 后用缓慢水流冲洗, 利用吸水纸吸去水分;
- 3) 媒染: 滴加碘液覆盖涂面, 染色 1 min 后进行水洗并吸去水分;
- 4) 脱色: 滴加 95%的酒精溶液三滴, 并轻轻摇动进行脱色, 脱色 20 s 后进行水洗并吸去水分;
- 5) 复染: 滴加番红染液覆盖涂面, 染色 2 min 后进行水洗并吸去水分;
- 6) 镜检: 对染色后的载玻片进行显微镜观察。

#### 3.3. 生理生化实验

##### 3.3.1. 淀粉水解实验

将分离出的细菌接种到淀粉培养基上, 调节 pH 值为 7.2, 控制恒温培养箱温度 37℃培养 36 h, 培养完成后滴加少量碘液至培养基中。

##### 3.3.2. 甲基红试验

将分离出的细菌接种到甲基红液体培养基中, 调节 pH 值为 7.0~7.2, 控制恒温培养箱温度 37℃培养 24 h, 沿管壁加入 3~4 滴甲基红试剂。

##### 3.3.3. V-P 实验

将分离出的细菌接种到 V-P 培养基中, 控制恒温培养箱温度 37℃培养 24 h, 依次加入 40%氢氧化钾水溶液 0.2 ml、5%  $\alpha$ -萘酚酒精溶液 0.2 ml, 摇匀后置入培养箱中 37℃恒温培养 4 h。

##### 3.3.4. 尿素分解实验

将分离出的细菌接种到尿素培养基中, 控制恒温培养箱温度 37℃培养 72 h, 每 24 h 观察一次微生物生长情况。

### 3.3.5. 硫化氢鉴定实验

将分离出的细菌接种到硫化氢鉴定培养基中, 控制恒温培养箱温度 30℃ 培养 24 h, 用无菌水润湿的醋酸铅试纸放在培养基中。

## 4. 实验结果与分析

菌悬液经稀释涂布平板后分离出 12 种菌落, 通过平板划线获得目标菌落, 菌落呈圆形, 颜色为乳白色, 不透明, 正反面颜色一致, 湿润, 较为粘稠, 与培养基结合松散, 易被挑取, 有臭味[9]。该细菌在显微镜下呈直或弯曲杆状, 革兰氏阴性菌(-)溶解氧耐受程度强, 革兰氏染色红色, 接触酶阳性, 耐酸程度差, 温度超过 40℃ 不能生长[10] (表 1)。

**Table 1.** Physiological and biochemical experiment results

**表 1.** 生理生化实验结果

生理生化实验	淀粉水解实验	甲基红试验	V-P 实验	尿素分解实验	硫化氢鉴定实验
实验结果	菌落周围未出现无色透明圈, 淀粉水解实验结果为阴性(-)。	溶液显黄色, 甲基红实验结果阴性(-)。	培养基未发生变化, V-P 实验结果为阴性(-)。	培养基中未产生菌落, 尿素水解实验结果为阴性(-)。	醋酸铅试纸未变黑, 硫化氢鉴定实验结果为阴性(-)。

## 5. 结论

本实验通过对土壤中微生物进行采集、分离、纯化得到一种杆状细菌, 经过对该细菌的生物学性质及生理特性分析, 根据伯杰氏手册 - 常见细菌鉴定手册对该细菌进行鉴定, 可确定该细菌属假单胞菌属下 29 种之一, 具有分解有机物, 降解有毒有害物质的特性, 是一种优良的水体净化细菌; 可广泛应用于固定化微生物技术, 搭载载体进行有机废水的处理。

## 参考文献

- [1] 黄雪娇, 杨冲, 倪九派, 李振轮. 1 株高效去除氨氮的红假单胞菌的分离鉴定及特性[A]. 环境科学, 0250-3301(2016) 06-2276-08.
- [2] 吴星, 王红英, 钱斯日古楞, 刘丹. 淡水净化水体细菌的筛选和应用[A]. 大连理工大学学报, 1674-1404(2015) 06-0404-04.
- [3] 慕庆峰, 文波龙, 贝丽霞, 王智慧, 杨丽娟. 一株反硝化聚磷菌的脱氮、除磷能力及其固定化净化水体的研究[J]. 湿地科学, 2013, 11(2): 227-232.
- [4] 宋漫利, 李成, 刘春敬, 梁致齐, 李容臻, 谢建治. 1 株好氧反硝化菌的筛选鉴定及固定化研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(13): 271-275.
- [5] 吕鹏羿, 罗金学, 韩振飞, 黄占斌. 生物膜法强化净化氨氮污染水体及其微生物群落解析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2015-2066.
- [6] 张艳萍, 令利军, 赵瑛, 厚毅清, 马海霞. 土壤中细菌 HC5 的分离鉴定及抑菌活性测定[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(6): 527-532.
- [7] 汪晶, 柯凤乔. 一株降解雌二醇的恶臭假单胞菌的分离鉴定及降解活性[J]. 环境化学, 2015, 34(4): 814-816.
- [8] 赖宏刚, 蒋云升, 张元嵩, 曹宏, 肖欢. 真空包装冷鲜鸡中腐败菌微生物的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 198-201.
- [9] 韩金鑫. 恶臭假单胞菌的采集及菌种鉴定分析[A]. 山东化工, 1008-021X(2018)15-0202-02.
- [10] 杨田, 随树珍, 刘逸寒, 黎明. 大麻纤维微生物脱胶菌株的筛选、鉴定及其应用[A]. 天津大学科学学报, 1672-6510(2017) 04-0024-06.

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5485，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[aep@hanspub.org](mailto:aep@hanspub.org)