

菲降解菌的分离鉴定及其降解性研究

杨金水¹, 许良华², 余跃惠³, 李兴利², 张忠智^{1,2}

(1. 中国农业大学 生物学院, 北京 100094; 2. 中国石油大学 化工学院, 北京 102249; 3. 长江大学 化学与工程学院, 湖北 荆州 434023)

摘要: 采用微生物富集培养分离法对南洋油田不同油样中的菲降解菌进行了分离鉴定。分离得到 2 株以菲作为唯一碳源和能源的细菌菌株 S17 和 S28, 经革兰氏染色及显微镜形态观察, 发现两者都是具有极生单鞭毛的革兰氏阴性、无芽孢杆菌。根据生理生化特性分析, 以及 16S rDNA 序列同源性分析, 两者属于假单胞菌属的不同种。菌株 S17 与食树脂假单胞菌 (*Pseudomonas resinovorans*) 序列同源性为 97%; 菌株 S28 则为高温假单胞菌 (*Pseudomonas thermaerum*), 其序列同源性达到 100%。在以菲为唯一底物的条件下, 菌株 S28 的生长速度是 S17 的 2 倍多, 第 4 天即达到最大生长量, 但是对于菲的降解而言, 两者都在第 10 天达到最大, 降解率分别为 88.86% 和 82.02%, 但是二者在起始的两天内对菲的降解效率最高, 分别达到 70.21% 和 72.74%, 因此可用于菲污染的快速治理领域。

关键词: 菲; 生物降解; 16S rDNA; 同源性分析

中图分类号: X523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)12-0024-04

石油是由碳氢化合物, 不定量的氧、硫, 微量的氮、金属离子和其他元素组成的复杂混合物, 由于石油工业的发展, 每年有大量的石油及其附属产品泄漏到自然环境中, 危害人们的健康^[1,2]。菲属于三环的多环芳烃, 在煤焦油污染的地点和污染的水环境中具有很高的浓度^[3,4], 由于菲及其代谢物的毒性、致癌性和致突变性相对较低, 此外菲也是最简单的含有与其反应性和致癌性相关的区域—— β 域和 κ 域的芳烃^[5,6], 因此在许多环境领域被作为模式底物, 有助于人们理解自然界中其他多环芳烃的降解途径及机理问题。利用微生物进行降解具有操作简便, 投资少, 不会形成二次污染而具有广阔的前景^[7,8]。

作者从南洋油田的不同油样中富集, 分离到 2 株可以菲为唯一碳源的降解菌, 对其降解特性及系统发育进行了初步的探讨, 为菲等多环芳烃的生物修复提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品

分离样品采自南洋油田的原油样、油水混合样、注水样以及油沙混合样。

1.2 培养基

无机盐培养基: K_2HPO_4 1 g, NaH_2PO_4 1 g,

$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $FeSO_4$ 0.05 g, $MnSO_4$ 0.02 g, 水 1 000 mL, pH 7.2, 121℃ 灭菌 30 min。

斜面保存培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.3 菌种分离

无机盐培养基中加 20 g/L 油样, 37℃ 摇床培养 7 d, 取富集液按体积分数 5% 的接种量接种到相同新鲜培养基, 相同条件下培养 7 d。菲溶于氯仿后抽滤灭菌, 加入到预先灭菌的无机盐培养基中, 将上述经两次富集后的富集液加入到含菲 1 g/L 的无机盐培养基中, 37℃ 摇床培养 7 d 后, 转接到另一含菲的新鲜无机盐培养基中, 经 3 次转接后, 取 0.1 mL 培养液涂布在含菲的固体无机盐平板上培养, 待菌落长出后, 用 2,3-二羟基联苯乙醚溶液 (1 g/L) 喷雾^[9,10], 选择变色的菌落并将其转接到斜面培养基上。

1.4 菌株的鉴定

根据细菌分类手册的标准^[11], 对分离到的菌株进行了初步的形态观察和生理生化试验, 菌体形态采

收稿日期: 2005-11-10; 修回日期: 2006-03-10

作者简介: 杨金水 (1975), 男, 陕西眉县人, 副教授, 博士, 从事环境微生物学研究, 电话: 010-62733464, E-mail: yangjsh1999@126.com

用日立 600 透射电镜进行观察,初步鉴定到属。

1.5 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定

正向引物: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTT AGA ACG AAC GCT-3'

反向引物: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC G-3'

PCR 反应体系为 50 μ L, PCR 的反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 总共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 维持。得到的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带回收后进行序列测定。

1.6 序列数据处理和系统发育树的构建

对测序得到的核苷酸序列, 通过 NCBI 的 Blast 软件和 DNAMAN 软件与目前报道的 16S rDNA 序列进行比较, 构建系统发育树。

1.7 菲降解率和降解产物的分析

以三氯甲烷萃取后, 采用美国惠普 1100 高效液相色谱仪测定降解率^[12]。流动相为甲醇: 水(体积比为 75: 25), 流速 1.0 mL/min, 菲的测定波长为 250.10 nm, 保留时间为 6.26 min。

1.8 菌株的生长

分别接种菌株 S17 和 S28 菌株于含菲 1 g/L 的无机盐培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养, 每隔两天取样测底物浓度的变化, 同时采用光密度法测定菌体浓度。

2 结果

2.1 菌株的鉴定结果

透射电镜的结果显示, 菌株 S17 菌株为短杆状, 两端稍尖, S28 也为短杆状, 但两端钝圆, 具有极生单鞭毛, 细胞大小分别为(1.3~1.6) μ m \times (0.5~0.7) μ m 和(1.2~1.5) μ m \times (0.6~0.7) μ m。且菌株 S17 的细胞壁较 S28 更为致密, 表面显示的更为凸凹不平(图 1)。

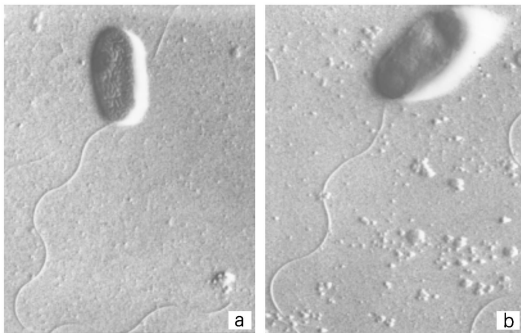


图 1 菌株 S17 和 S28 的透射电镜图

Fig. 1 Transmission electron microscopy figures of strains S17 and S28

a. 菌株 S17($\times 15\ 000$); b. 菌株 S28($\times 17\ 000$)
a. strain S17, magnified 15 thousand times; b. strain S28, magnified 17 thousand times

结合细菌形态观察结果, 进一步测定了菌株 S17 和 S28 的氧化酶活性、接触酶活性、葡萄糖发酵等生理生化反应特性, 发现两者除了对硝酸盐还原的结果不同之外, 其余性质基本一致, 根据常用细菌鉴定方法, 初步确定两者均为假单胞菌属(*Pseudomonas*), 结果如表 1 所示。

表 1 分离菌株的初步鉴定

Tab 1 The identification of the strains

特征	S17	S28
个体形态	短杆状	短杆状
革兰氏染色	-	-
芽孢有无	-	-
非水溶性色素	-	-
运动性	+	+
鞭毛着生位置	极生单鞭毛	极生单鞭毛
氧化酶	+	弱
接触酶	+	+
运动性	+	+
葡萄糖发酵	-	-
乙醇氧化	+	+
乙酸氧化	+	+
硝酸盐还原	+	-
pH 4.5 生长	-	-

注: + 阳性; - 阴性

2.2 序列的数据处理和系统发育树的构建

一般情况下, 16S rDNA 的同源性小于 98%, 可以认为同属不同种, 而同源性小于 93%~95%, 则可以认为属于不同属^[8,13], 分别对菌株 S17 和 S28 提取 DNA, 然后进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 电泳检测后进行序列测定, 其大小分别为 1 368 bp 和 1 396 bp。通过序列比对发现, 菌株 S17 与 *Pseudomonas resinovorans* 的同源性为 97%, 与 *Pseudomonas thermotolerans* 的同源性为 95%, 因此初步推测菌株 S17 与 *P. resinovorans* 及 *P. thermotolerans* 同属不同种, 尚需进一步确证。从系统发育树上也可以看出, 菌株 S17 与其他成员的进化距离较远; 菌株 S28 与 *P. thermaerum* 的同源性为 100%, 与 *P. aeruginosa* 的同源性为 99%, 因此初步推测 S28 为 *P. thermaerum* 的一个新菌株, 尚需进行分子杂交确证。采用 DNAMAN 软件构建系统发育树, 结果如图 2 所示, 由图中结果可以看出, 菌株 S17 和 S28 分别属于假单胞菌的不同种, 其同源性仅仅只有 31%, 亲缘关系较远。

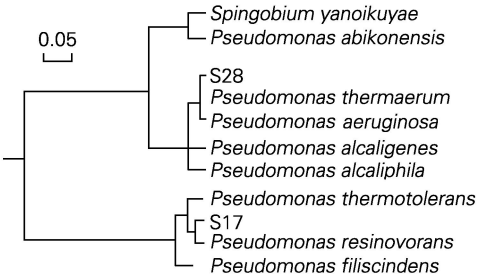


图2 菌株 S17 与 S28 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of strains S17 and S28 based on 16S rDNA sequences

2.3 不同培养时期菲的降解与细菌的生长量

在含菲 1 g/L 的液体无机盐培养基中, 菌株 S17

和 S28 的生长情况及菲的降解情况如图 3 所示。由图中可以看出, 随着菌体浓度的增加, 代谢底物菲的量明显减少, 在培养的前 2 d 菲的下降最快, 降解率分别达到 72. 74% 和 70. 21%。对菌株 S17 而言, 菌体的生长有 2 次高峰期, 与此相对应, 菲的利用率也达到最大, 菲的利用率最大可达到 82. 02%, 然后, 随着菌体的快速衰亡, 菲的降解率未出现明显变化。对菌株 S28 而言, 到达生长稳定期后, 菲的降解率变化缓慢, 第 10 天时, 降解率最大, 达到 88. 86%, 随后由于菌体的死亡, 降解率基本不再变化。据报道, 细菌对菲的降解主要通过两条途径, 一条是邻苯二甲酸途径, 另一条为水杨酸途径^[14], 最终的代谢底物为 CO₂ 和水。关于菌株 S17 和 S28 对菲的降解底物的研究进一步研究中。

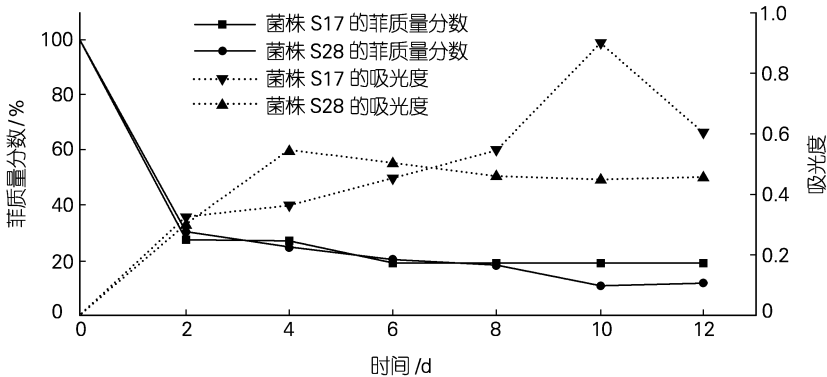


图3 菌株 S17 和 S28 在菲中的生长曲线及菲的降解率

Fig. 3 The curves of strains S17 and S28 growth and phenanthrene degradation

3 结论

(1) 分离筛选到 2 株能以菲为唯一碳源的菌株 S17 和 S28, 经过形态观察和生理生化反应及 16S rDNA 序列比对, 其中 S17 与 *P. resinovorans* 的同源性为 97%, 菌株 S28 与 *P. thermaerum* 的同源性为 100%。

(2) 菌株 S28 对菲的降解能力要优于菌株 S17, 第 10 天时菲的降解率达到 88. 86%, 但是二者在起始的 2 d 内对菲的降解效率最高, 分别达到 70. 21% 和 72. 74%, 因此可用于菲污染的快速治理领域。

致谢: 感谢北京大学环境工程系的孙卫玲老师和郝鹏鹏博士在高效液相色谱方面给予的指导和帮助。

参考文献:

[1] Nadim F, Hoag G E, Liu S L, *et al.* Detection and remediation of soil and aquifer systems contamination with petroleum products: an overview[J]. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 2000, 26: 169-178.

[2] Watanabe K, Kodama Y, Sytsubo K. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 66: 4 803-4 809.

[3] Chang B V, Shiung L C, Yuan S Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil [J]. **Chemosphere**, 2002, 48: 717-724.

[4] Laor Y, Strom P F, Farmer W J. Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral associated humic acid [J]. **Wat Res**, 1999, 33(7): 1 719-1 729.

- [5] Cerniglia C E. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons[A]. Atalas R M. Petroleum Microbiology[C]. New York: Macmillan, 1984. 99-128.
- [6] Laor Y, Strom P F, Farmer W J. Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral associated humic acid [J]. *Wat Res*, 1999, **33** (7): 1719-1729.
- [7] 丁克强, 骆永明. 多环芳烃污染土壤的生物修复[J]. 土壤, 2001, **33**(4): 169-178.
- [8] 夏颖, 闵航, 周德平, 等. 两株菲降解菌株的特性及其系统发育分析[J]. 中国环境科学, 2003, **23**(2): 162-166.
- [9] Furukawa K M. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas paucimobilis* [J]. *J Bacteriol*, 1986, **166**: 392-398.
- [10] 张小凡, 小柳津广志. 多环芳烃化合物菲降解菌的分离鉴定及分解特性研究[J]. 上海环境科学, 2003, **22** (8): 544-586.
- [11] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 1-50.
- [12] 龙涛, 刘翔, 杨建刚, 等. 非离子型表面活性剂吐温80增溶条件下菲的生物降解[J]. 环境污染治理技术与设备, 2003, **4**(5): 1-4.
- [13] 王振雄, 徐毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究[J]. 微生物学报, 2000, **40**(2): 115-120.
- [14] Iwabuchi T, Harayama S. Biochemical and genetic characterization of trans-2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. KP7 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**: 6488-6494.

Isolation, identification and characteristics of phenanthrene degrading bacteria

YANG Jir shui¹, XU Liang-hua², SHE Yue-hui³, LI Xing-li², ZHANG Zhong-zhi^{1,2}

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Chemistry & Chemical Engineering, Beijing University of Petroleum, Beijing 102249, China; 3. College of Chemistry & Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434023, China)

Received: Nov. , 10, 2005

Key words: Phenanthrene; biodegradation; 16S rDNA; homology assay

Abstract: Two bacterial strains, S17 and S28, were isolated and identified using inorganic salt medium from different oil samples of Nanyang oil field, which could be able to use phenanthrene as sole carbon and energy sources. They were G strains with only one flagellum on one side of the cell and without spore detected using microscope and staining. The strains were identified as *Pseudomonas* species on the basis of biochemical tests and 16S rDNA sequences assay. The homology was 97% between the strain S17 and *P. resinovorans*, and the strain S28 was *P. thermaerum*. The growth speed of S28 was twice as large as that of S17 and reached maximum concentration within 4 days in the inorganic salt medium with phenanthrene as sole carbon source. The maximum degradation rates of phenanthrene of S17 and S28 were 88.86% and 82.02% respectively within 10 days.

(本文编辑: 张培新)