

一株多环芳烃芘降解菌的鉴定及其降解特性研究

卢仕严¹, 曹永军¹, 招嘉佩¹, 何红¹, 孙省利²

(1. 广东海洋大学 农学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学 海洋资源与环境监测中心, 广东 湛江 524088)

摘要: 从红树植物红海榄叶片中分离一株对芘具有较好降解作用的海洋细菌, 命名为 B11, 并对其菌体特征、生长条件及降解效能等进行了系统研究。结果发现该菌株为革兰氏阴性菌, 结合其生理生化特征和 16S rDNA 序列比对, 表明此菌株属于交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)。菌株在芘的起始浓度为 100 mg/L, pH 为中性或偏碱性条件下, 盐度 35 时对芘的降解作用最强。外加碳源对 B11 对芘的降解效果都具有一定的抑制作用, 其中水杨酸的抑制作用更为显著。综合菌株 B11 的生长特性和降解效能, 初步认为 B11 菌株较适合用于降解多环芳烃芘, 可用于红树植物多环芳烃生态污染的原位修复。

关键词: 多环芳烃; 海洋细菌; 芘; 生物降解

中图分类号: X53; X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)08-0021-05
doi: 10.11759/hyxx20130702001

多环芳香烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一大类广泛存在于环境中的有机污染物, 也是最早被发现和研究的化学致癌物^[1]。随着苯环的增加, 多环芳烃的水溶性越来越差, 其脂溶性则越来越强, 而致癌性也随之增强^[2]。芘(Pyrene)是具有四个苯环的稠环芳烃, 常被作为监测 PAHs 污染的指示物和生物降解的模型分子^[3-5], 其代谢物醌(Quinone)比芘毒性更大, 具有致突变性^[6]。

微生物降解 PAHs 技术因其环保廉价的特点成为自然环境中 PAHs 污染介质修复的重要途径之一^[7-9]。海洋环境中数量庞大, 种类繁多的微生物在物质循环、能量流动、生态平衡及环境净化等方面担当着重要的角色^[10]。因此, 从海洋环境中筛选高效的降解菌是 PAHs 污染微生物修复研究的重要内容。红树植物是生长在热带、亚热带海岸潮间带的一种海陆两栖的特殊植物群落。近年来已从红树植物中分离出了许多特殊功能菌株, 其中包括对各类污染物有较强降解能力的微生物^[11], 其中关于红树内生细菌用于 PAHs 降解的研究还鲜有报道。本研究针对红树植物红海榄(*Rhizophora stylosa*)叶片中分离得到的一株对芘具有较强降解能力的内生细菌 B11, 根据菌落形态与生理生化性能及分子生物学手段对其进行鉴定, 并研究了环境条件对其降解芘的影响, 以期高效 PAHs 微生物降解技术的开发利用提供基础依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株来源

由湛江市特呈岛东区红树林保护区植物红海榄(*Rhizophora stylosa*)叶片中分离得到。

1.1.2 主要试剂和培养基

芘购于 SUPELCO 公司, 含量 >99%。

芘-丙酮母溶液: 取 10 mg 芘用 1 mL 丙酮里充分溶解, 制成质量浓度为 10 mg/mL 的芘-丙酮溶液。

海水 NA: 过滤陈海水 1000 mL、牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、琼脂 20g。

无机盐培养基 (MMC): NaCl₂ 24.477 g、MgCl₂·6H₂O 4.981 g、Na₂SO₄ 3.917 g、CaCl₂·H₂O 1.1020 g、KCl 0.6640 g、NaHCO₃ 0.1920 g、H₂BO₃ 0.0260 g、蒸馏水 1000 mL。

人工海水 MMC: MgSO₄·7H₂O 0.12 g、CaCl₂ 0.02 g、KH₂PO₄ 1.0 g、K₂HPO₄ 1.0 g、NH₄NO₃ 1.0 g、FeCl₃ 0.05 g、MMC 1000 mL、pH 7.0(固体培养基加 20 g 琼脂)。

收稿日期: 2013-07-28; 修回日期: 2013-10-11

基金项目: 广东省海洋渔业科技推广专项(A200899J01); 海洋公益性行业科研专项(200905005-05)

作者简介: 卢仕严(1964-), 男, 汉族, 广西容县人, 教授, 主要从事海洋环境污染监测研究, E-mail: lushuyan@126.com; 何红, 通信作者, 教授, E-mail: hehong893@126.com

1.2 研究方法

1.2.1 菌种鉴定

菌种的鉴定采用常规鉴定(形态观察和生理生化指标测定)和分子生物学鉴定相结合的方法实施。

1.2.1.1 菌株形态学观察与生理生化测定

参照东秀珠的《常见细菌鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[12-13]。将纯化的菌株接种于海水 NA 培养基上,在 28℃下,培养 48h,期间观察其生长情况以及菌落特征。采用革兰氏染色法确定其革兰氏属性。测定的主要生理生化指标有:乙酰甲基醇(V.P.)反应、甲基红(M.R.)反应、七叶灵水解、淀粉水解、产氨、吲哚、苯丙氨酸脱氢酶、硝酸盐还原、亚硝酸还原、葡萄糖发酵、丙二酸利用、柠檬酸利用、碳源利用、氮源利用、氧化酶、接触酶、反硝化、硫化氢等。

1.2.1.2 16S rRNA 的 PCR 扩增、序列测定和系统发育树的构建

细菌 B11 的 DNA 提取、纯化和检测方法参见《精编分子生物学实验指南》^[14]。用于 16S rRNA 全长的 PCR 扩增的引物为: 799f(5'-AACAGGATTAGATAC CCTG-3')和下游引物 1492r(5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3')。扩增体系(50μL)为: 模板 DNA 2.5μL, 10 × PCR Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L)4μL, 引物 799f/1492r (10 pmol/L) 3.5 μL, *rTaq* 酶(5 U/μL) 0.25 μL, ddH₂O 37.75 μL。PCR 反应条件为: 94℃预变性 4 min; (94℃、30 s, 55℃、30 s, 72℃、1 min) 循环 30 次; 72℃延伸 7 min; 反应结束后在 10℃保温。PCR 产物由广州英俊生物技术有限公司进行测序。将测得菌株 B11 的 16S rRNA 序列与 Genbank 数据库已报道的序列进行同源性比较,选取同源性较高的相关菌株序列,利用 Clustalx1.83 进行分析,通过 MEGA 4.0 软件分析生成系统发育树^[15]。

1.2.2 不同芘初始浓度下菌株 B11 对芘的降解

人工海水 MMC 中加入一定量的芘-丙酮溶液,调节芘质量浓度分别为 50、100 和 150 mg/L。150 mL 的三角瓶中装 20 mL 培养液,接种 1 mL 已备好的菌液(菌悬液浓度为 10⁹CFU/mL),30℃下振荡(180 r/min)培养 15 d。实验设不接菌对照,每个处理设 3 个重复。

1.2.3 不同 pH 下菌株 B11 对芘的降解

用缓冲体系调节芘质量浓度为 100 mg/L 的人工海水 MMC 的 pH 分别为 5、6、7、8 和 9。接菌与培养过程同 1.2.2。

1.2.4 不同盐浓度下菌株 B11 对芘的降解

芘浓度为 100 mg/L 的人工海水 MMC 中,加入

一定量的 NaCl,分别配制成盐度为 25、30、35、40 和 45 的液体培养基。接菌与培养过程同 1.2.2。

1.2.5 不同外加碳源下菌株 B11 对芘的降解

芘质量浓度为 100 mg/L 的人工海水 MMC 中,加入一定量的葡萄糖或水杨酸,分别配制成外加碳源质量浓度为 0、50、100 和 200 mg/L 的液体培养基,接菌与培养过程同 1.2.2。

1.3 芘降解率测定

1.3.1 培养基中芘的提取

培养液用环己烷在 125 mL 梨形分液漏斗中反复萃取 3 次,合并有机相,经无水 Na₂SO₄脱水后定容。

1.3.2 芘降解率的测定

参照杨金水等^[16]的方法用气相色谱-质谱联用仪(安捷伦 GC/MS 7890A, 美国)对有机相中的芘含量进行测定。色谱条件: 进样口无分流模式,进样口温度 290℃; 色谱柱型号为 HP-5 弹性石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 柱流量 1.5 mL/min; 炉温 80℃保持 1 min,以 15℃/min 升至 255℃保持 1 min,再以 1℃/min 升至 265℃保持 1 min,最后以 2.5℃/min 升至 295℃保持 2 min; 氢火焰离子化检测器(FID)300℃。

芘降解率=(芘初始质量浓度-芘剩余质量浓度)/芘初始质量浓度×100%

1.4 数据处理

实验所得数据在 Microsoft office Excel 2003 中进行处理,用 SPSS 13.0 one-wayANOVA 进行显著性分析,显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌株的生理生化特征

菌株 B11 在人工海水 MMC 平板上,菌落为圆形,白色,菌落颜色较深,边缘光滑透明,黏稠状。菌体呈单细胞短杆状,革兰氏染色阴性,菌体单个或双聚。其生理生化性能测定结果见表 1。依据《伯杰氏细菌手册》,菌株 B11 鉴定为交替单胞菌属(*Aalteromonas* sp.)。

2.1.2 16S rRNA 序列分析

对细菌 B11 的 16S rRNA 进行 PCR 扩增,经过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测获得大小约 700 bp 的产物,扩增产物回收后测序,得到 16S rRNA 的序列为 668bp(图 1)。将测序结果提交到 GenBank,获得登录号为 JN108007。用 Blast 软件和 GenBank 中已登录

表 1 菌株 B11 的生理生化特征

Tab. 1 Characteristics of physiology and biochemistry of strain B11

生化反应	特性	生化反应	特性	碳源	特性	氮源	特性
V-P 反应	-	亚硝酸还原	+	山梨糖	-	果糖	-
M-R 反应	-	葡萄糖发酵	-	D-木糖	+	甘油	+
七叶灵水解	+	丙二酸利用	-	肌酸	-	硫酸铵	+
淀粉水解	-	柠檬酸利用	-	乳糖	-	磷酸氢二氨	-
产氨	-	氧化酶	+	甘露醇	-	尿素	-
吲哚试验	-	接触酶	-	肌醇	-	硝酸铵	+
苯丙氨酸脱氢酶	-	反硝化	-	阿拉伯糖	+	硝酸钾	+
硝酸盐还原	+	硫化氢	-	麦芽糖	-		

注：“+”表示阳性(可生长、利用或反应);“-”表示阴性(不可生长、利用或无反应)



图 1 菌株 16S rRNA 的 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rRNA PCR products of strains

M 为标记; 1 为 B11
M. markers; 1. B11.

的核苷酸序列进行同源性比较, 发现菌株 B11 与交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)的多个菌株基因序列同源性达到了 98%以上。其中, 与同样为有机物降解菌的海洋细菌 H91(登录号: FJ903194)的同源性达到 99%, 与具有防污活性的海洋细菌 C73(登录号: FJ040190.1)的同源性达为 98%。从序列系统发育树(图 2)可见, 菌株 B11 与交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)的菌株能聚成一簇。综合生理生化指标及 16S

rRNA 测序结果分析, 可初步将菌株 B11 归于交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)。

2.2 芘初始浓度对菌株 B11 降解芘的影响

培养液中芘的初始质量浓度分别为 25、50、100、150 和 200 mg/L 时, 菌株 B11 对芘都有较好的降解效果, 降解率分别为 48.84%、54.26%、65.26%、60.32%和 55.13%, 其中以初始质量浓度为 100 mg/L 时, 降解效果最好(图 3)。

2.3 pH 对菌株 B11 降解芘的影响

pH 是影响微生物生长的关键因素, 在极端 pH 下, 微生物生长变慢, 活性降低。优选出最佳的 pH, 为微生物提供良好的生存环境, 对微生物有效降解 PAHs 至关重要。由图 4 可以看出, 在不同 pH 条件下, 菌株 B11 对芘的降解率差异较大。在 pH 为 7.0 时, 降解率最高(64.60 %); 酸性条件下, 降解率较低(pH 5.0 和 pH 6.0 时分别为 18.45 %和 21.08 %); 碱性条件下, 降解率相对较高(pH 8.0 和 pH 9.0 时分别为 45.85 %和 44.56 %)。

2.4 盐度对菌株 B11 降解芘的影响

盐度对 B11 菌株降解芘的影响如图 5 所示。在

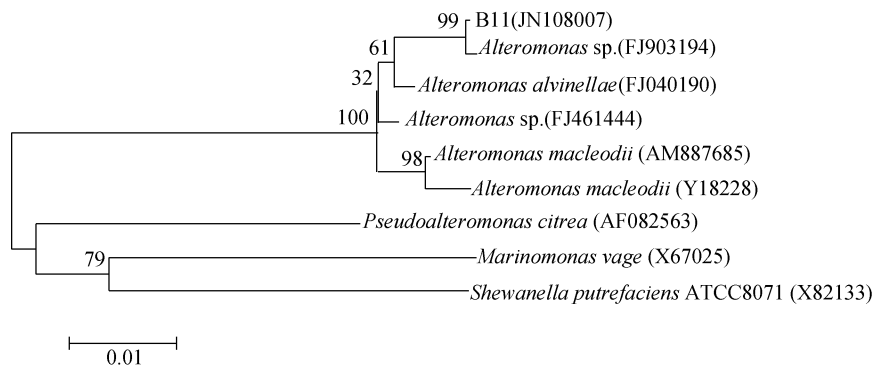


图 2 菌株 B11 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain B11

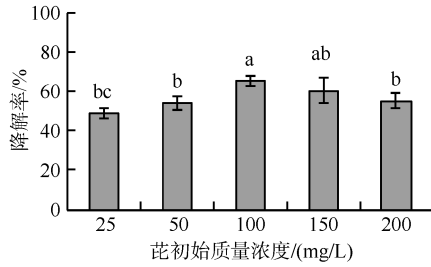


图3 芘初始质量浓度对菌株 B11 降解芘的影响

Fig.3 Effect of initial pyrene concentrations on the degradation of pyrene by B11

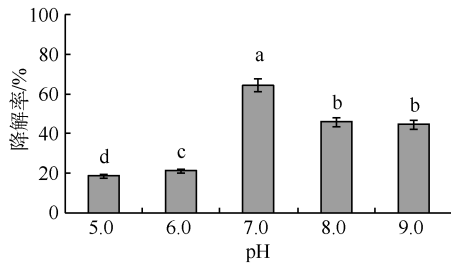


图4 培养液 pH 对菌株 B11 降解芘的影响

Fig.4 Effect of pH on the degradation of pyrene by B11

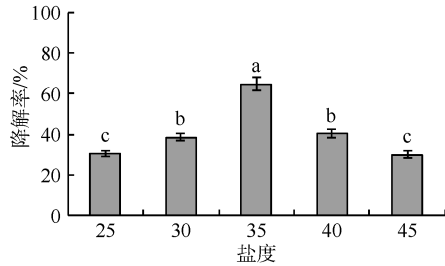


图5 培养液盐度对菌株 B11 降解芘的影响

Fig.5 Effect of salinity on the degradation of pyrene by B11

25~45 的盐度时, 菌株 B11 对芘均有一定的降解作用, 在 35(标准海水盐度)盐度时, 菌株对芘的降解效果最好, 达到 64.79%, 其他盐度条件下均不同程度抑制了菌株对芘的降解能力。

2.5 外加碳源对菌株 B11 降解芘的影响

如图 6 所示, 在试验所设定的浓度范围内, 添加

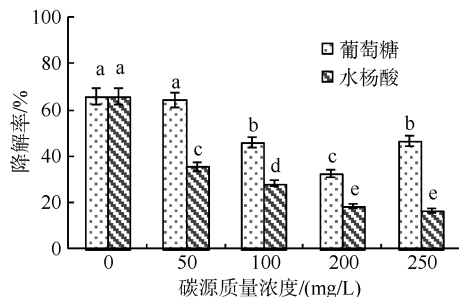


图6 外加碳源对菌株 B11 降解芘的影响

Fig.6 Effect of exotic carbon source on the degradation of pyrene by B11

葡萄糖和水杨酸作为外加碳源都会不同程度抑制菌株 B11 对芘的降解能力。外加葡萄糖在 200 mg/L 时, 菌株 B11 对芘的降解率最低(32.46%), 随着外加葡萄糖质量浓度的增加(250 mg/L), 菌株 B11 对芘的降解率又有所提高(46.58%)。水杨酸作为外加碳源, 质量浓度越高, 菌株 B11 对芘的降解率越低。

3 结论

经形态观察和 16S rDNA 鉴定, PAHs 降解菌 B11 属交替单胞菌属(*Alteromonas* sp.)。芘作为培养液中的唯一碳源, 在初始浓度为 100 mg/L 时, 菌株 B11 对芘的降解效果最好。初始浓度过低时, 可能因碳源不足而生长缓慢, 减少了对芘的降解; 而高浓度的芘因为对菌株产生毒性, 抑制了菌体的生长, 也导致降解率逐渐下降。

菌株 B11 在中性或偏碱性条件下相比酸性条件下对芘的降解作用更好, 这与细菌一般在中性或偏碱性条件下生长较好, 代谢旺盛, 而在酸性条件下生长明显受到抑制相符。

35(标准海水盐度)盐度时, 菌株对芘的降解效果最好。过高或过低盐度条件下, 菌株可能因处于不利的渗透压下, 生长受到抑制, 最终影响到对芘的降解效果; 而 35 左右的盐度正是菌株在自然海水环境的盐度条件, 因此菌株处于适宜的生长状态, 从而对芘具有较好的降解作用。

外加碳源都会不同程度抑制菌株 B11 对芘的降解能力。相比较而言, 葡萄糖对 B11 降解芘的抑制作用较小。这一结果可能是由于葡萄糖在一定浓度范围内可能通过促进菌体的生长与繁殖, 对芘的降解具有促进作用, 与有些报道中认为微生物对 3 环以上的 PAHs 类的降解多以共代谢的方式进行的的结果相符^[15]。随着外加葡萄糖浓度的增高, 菌株 B11 对芘的降解率下降, 外加葡萄糖在 200 mg/L 时, 菌株 B11 对芘的降解率最低(32.46%), 但随着外加葡萄糖浓度的增加(250 mg/L), 菌株 B11 对芘的降解率又有所提高(46.58%)。这可能是因为随着葡萄糖浓度的增加, 促进了菌株 B11 的生长与繁殖, 虽然单位菌体的降解能力有所下降, 但是总的降解率反而有所增加。水杨酸作为外加碳源, 一方面由于分子结构相似, 无法避免竞争性抑制作用, 另一方面本身对降解菌可能具有一定的毒性, 因而其对芘的共代谢促进作用不明显^[17-18]。另外, 水杨酸还可能会显著影响培养基的 pH, 不利于降解菌的生长。

红树本身生态系统较为脆弱, 海洋污染在很大程

度上影响了红树植物的生长及生态系统的稳定。本研究筛选的菌株 B11 来源于红树植物, 对 pH 的耐受范围都较广, 有一定的耐盐性, 较适合用于降解多环芳烃的近海潮间带红树生长地带的原位修复。

参考文献:

- [1] Wilson S C, Jones K. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review[J]. *Environmental Pollution*, 1993, 81: 229-249.
- [2] 刘世荣. 微生物在多环芳烃降解应用中的机理及其研究趋势[J]. *现代商贸工业*, 2008, 8: 379-380.
- [3] 高彦征, 朱利中, 胡辰剑, 等. Tween80 对植物吸收菲和芘的影响[J]. *环境科学学报*, 2004, 24: 714-718.
- [4] Yuan S Y, Wei S H, Chang B V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture [J]. *Chemosphere*, 2000, 41(9): 1463-1468.
- [5] 王蕾, 聂麦茜, 王志盈, 等. 多环芳烃降解菌的筛选及其对芘的降解研究[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(1): 43-47.
- [6] Ravelet C, Krivobok S, Sage L, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi[J]. *Chemosphere*, 2000, 40: 557-563.
- [7] Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon: A review[J]. *Biodegradation*, 1992, 3: 351-368.
- [8] Harayama S. Polyeyelic aromatic hydrocarbon bioremediation design[J]. *Curren Opinion in Biotechnology*, 1997, 8: 268-273.
- [9] 宋玉芳, 宋雪英, 张薇, 等. 污染土壤生物修复中存在问题的探讨[J]. *环境科学*, 2004, 25(2): 129-133.
- [10] 李先国, 张庆红, 刘思敏, 等. 多环芳烃的海洋环境行为及其代谢产物的研究进展[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(3): 467-475.
- [11] 龙寒, 向伟, 庄铁, 等. 红树林区微生物资源[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(6): 696-702.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Buchana R E, Gibbons N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(第 8 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [14] 奥斯伯, 金斯顿, 塞德曼, 等. 精编分子生物学实验指南(第 4 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [15] 杜彦玲, 台培东, 施秋峰, 等. 多环芳烃降解菌 X20 的鉴定及降解特性[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(6): 1208-1212.
- [16] 杨金水, 许良华, 余跃惠, 等. 菲降解菌的分离鉴定及其降解性研究[J]. *海洋科学*, 2007, 31(12): 24-27..
- [17] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 芘在土壤中的共代谢研究[J]. *应用生态学报* 2001, 12(3): 447-450.
- [18] Tongpim S, Pickard M A. Co-metabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene trans-9, 10-dihydrodiol by mycobacterium strain S1 growing on anthracene in the presence of Phenanthrene[J]. *Can J Microbiol*, 1999, 45(5): 369-376.

Isolation and characterization of a pyrene-degrading marine bacterium from mangrove (*Rhizophora stylosa*)

LU Shi-yan¹, CAO Yong-jun¹, ZHAO Jia-pei¹, HE Hong¹, SUN Sheng-li²

(1. College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Analytical and Testing Centre of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Received: Jul., 28, 2013

Key words: poly-aromatic hydrocarbons (PAHs); marine bacterium; pyrene; microbial degradation

Abstract: A predominant indigenous bacterium utilizing pyrene as a sole carbon and energy source was isolated from mangrove (*Rhizophora stylosa*) in Zhanjiang, China. The morphology, physiological and biochemical characteristics, capacity of degradation were studied. The results showed that the strain was Gram-negative bacteria. Based on its characteristics mentioned above as well as the 16 S rDNA sequence analysis, the bacterium was identified as *Alteromonas* sp., and named B11. The best pyrene degradation condition of B11 was that the initial concentration of pyrene was 100 mg/L, pH was 7 or a little alkalinity and salinity was almost 35. Extra carbon source especially salicylic acid reduced degradation rate of pyrene by B11 strain. The results showed that strain B11 was suitable to degrade Pyrene and indigenous rehabilitation in mangrove polluted zone.

(本文编辑: 梁德海)