

PAHs 降解菌的分离、鉴定及降解能力测定

徐虹¹, 章军¹, 刘陈立¹, 邵宗泽²

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局 第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 以芴、菲、蒽、芘为碳源和能源筛选、分离 PAHs 降解菌。14 株能降解利用 PAHs 的菌株被分离。通过 HPLC 分析, 在含芴、菲、蒽、芘的混合培养基中 10 号菌的降解能力最强。研究它的降解性能和生长情况, 表明该菌在混合反应体系中培养 30 d 后对芴、菲、蒽、芘的降解率分别为 95.27%、90.46%、28% 和 80%; 在只含一种 PAH 的单反应体系中该菌对芴、菲、蒽的降解能力提高, 降解率分别可达 98.91%、94.32% 和 52.17%, 而对芘的降解能力则降低, 降解率仅为 62.47%。与混合 PAHs 培养体系相比, 在单一 PAH 培养体系中, 细菌的对数生长期缩短 1/3。经生理生化鉴定和 16S rDNA 序列对比分析, 确定 10 号菌株属于假单胞菌, 命名为 *Pseudomonas* sp. FAP10。

关键词: 生物降解; 多环芳烃; 假单胞菌

中图分类号: O625.15; X55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2004)03-0061-04

Isolation and identification of PAH degrading strains and their degradation capability

XU Hong¹, ZHANG Jun¹, LIU Chen-li¹, SHAO Zong-ze²

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. The Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: Fluorene, phenanthrene, anthracene and pyrene were used as carbon and energy source to isolate and screen PAHs-degrading strains. Fourteen strains capable of degrading PAHs were isolated from the petroleum in seawater contaminated. Analyses was done by HPLC, strain No. 10 showed the strongest degrading ability in the mixing system of fluorene, phenanthrene, anthracene and pyrene. Its degradation performance and growth curve were tested. The degradation rates of fluorene, phenanthrene, anthracene and pyrene were 95.27%, 90.46%, 28% and 80% respectively in the mixing system within 30d. Under the condition of single PAH existence, the degradation rates of fluorene, phenanthrene and anthracene by strain No. 10 increased to 98.91%, 94.32%, 52.17% respectively while the degradation rate of pyrene decreased to 62.47%. Compared to the mixing system, the logarithmic growth phase of strain No. 10 was shortened one third in single PAH system. Based on the results of physio-biochemical identification and phylogenetical analyses of 16S rDNA sequence, strain No. 10 was belonged to *Pseudomonas* sp., named as *Pseudomonas* sp. FAP10.

Key words: biodegradation; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); *Pseudomonas*

目前对于海洋油污染的清除方法主要有物理方法、化学方法和生物修复方法。其中生物修复法能利用生物有机体将污染物转化为稳定、无毒的终产物和微生物自身的生物量从根本上消除环境中的油污染, 具有成本低、投资少、效率高、原位降解及不易造成二次污染等优点而受到普遍重视^[1,2]。因此生物修复方法已经广泛应用于油污染的研究中。对于石油中烷烃、苯、甲苯等组分, 大多数种属的微生物都具较强的分解能力, 但对于高脂溶性、难挥发、具致畸、致癌及致突变作用的多环芳烃 (PAHs) 的降解情况则不甚理想, 为此, 许多研究者

也进行了大量研究, 取得了不少成果^[3~10]。本研究旨在从石油污染的海域初步筛选出对多种 PAHs 组分均具较强降解能力的海洋降解菌, 为将来研究 PAHs 生物降解的分子机制, 构建能降解 PAHs 的基因工程菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

MSM 培养基: NaCl 24g/L, NH₄NO₃ 1.0g/L, KCl 0.7g/L, KH₂PO₄ 2.0g/L, Na₂HPO₄ 3.0g/L, MgSO₄ · 7 H₂O 0.7g/L, CaCl₂ 0.02g/L, FeCl₃

收稿日期: 2003-10-17, 修改稿收到日期: 2003-12-01

基金项目: 国家海洋局第三海洋研究所海洋生物工程重点实验室开放基金 [A97304(021)]

作者简介: 徐虹 (1973-), 女, 湖南常德人, 在职博士, 主要从事基因工程与分子生物学研究。

0.05 g/L, 琼脂 15 g/L (固体培养基), pH 7.4。

LB 高盐培养基: NaCl 30g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, pH 7.4。

1.2 采样

水样来自厦门石油码头。

1.3 降解菌的分离与纯化

将采集的水样 1 mL 接种于 200 mL LB 高盐培养基中, 28 °C 摇床培养过夜后, 将所得菌液 1 mL 接种于 100 mL 含葱、菲、芴、芘各 50 mg/L 的 MSM 液体培养基中, 待培养基浑浊后, 再次转接于新鲜培养基中, 如此富集三次后, 将所得菌液在含 50 mg/L 葱、菲、芴、芘的 MSM 固体培养基平板上反复划线分离获得纯菌种。

1.4 PAHs 降解能力的测定

1.4.1 PAHs 的萃取

将所得纯菌种分别接种于含葱、菲、芴、芘各 100 mg/L 的 MSM 液体培养基中, 28 °C 摇培一定时间后, 加入 20 mL CH₂Cl₂ 超声萃取培养基中残留的 PAHs, 萃取液过无水 Na₂SO₄ 柱后, 用高纯 N₂ 吹至 0.5 mL 以下, 再用 CH₂Cl₂ 定容至 1 mL, 过滤后用于 HPLC 测定。萃取前在培养物中加入萘作为标记物以计算萃取过程中葱、菲、芴、芘的损失。以未接菌的含 100 mg/L 的葱、菲、芴、芘 MSM 液体培养基为对照。每次测定均设置 3 个平行样。

1.4.2 HPLC 测定

将过滤后的萃取液进行 HPLC 测定。测定用色谱柱为 Waters 公司的 Symmetry C18 柱 (3.9 × 150mm, 5 μm), 流动相为甲醇/水 (75/25), 流速为 1 mL/min, 使用 Waters 2487 双波长检测器, 波长为 254 nm, 进样体积 5 μL。

1.5 细菌的鉴定

1.5.1 生理生化鉴定

使用美国 BD 公司的 BBL Crystal™ 细菌自动鉴定系统鉴定。

1.5.2 细菌总 DNA 提取

用上海生工生物工程有限公司的基因组 DNA 抽提试剂盒提取。

1.5.3 16S rDNA 扩增与测序

以细菌总 DNA 为模板, 以 16S rDNA 的通用引物 P₁: 5' ³AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 P₂: 5' ³AAGGAGGTGATCCA GCCGCA-3' 进行扩增, 反应液为 50 μL, 含有 1 × PCR Buffer, 200 μmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.6 μmol/L 引物, 50 ng 模板 DNA, 2.5 U Taq 酶。扩增条件为 95 °C 预变性 5min, 94 °C 1

min, 50 °C 90 s, 72 °C 2 min, 35 个循环, 最后于 72 °C 保温 10 min。扩增产物连接在 T 载体上。测序由上海博亚生物技术有限公司完成, 将测序结果用 Blast 软件与 Genbank 中 16S rDNA 序列进行同源性比较。

2 结果与讨论

2.1 高效降解菌的筛选分离

通过富集培养和分离纯化得到 14 株能以葱、菲、芴、芘为碳源和能源进行生长的菌株。为了从中挑选出降解能力强、降解速度快的实用型菌株, 我们采用高效液相色谱法分别对这 14 株菌在培养 20 d 后的葱、菲、芴、芘的降解能力进行了测定。从测定结果可知 (表 1) 这 14 株菌对 Flu、Phe、An、

表 1 114 株菌的 PAHs 降解率

Tab1 PAHs - degradation rates (%) of fourteen bacteria

编号	降解率 / (%)			
	Flu	Phe	An	Pyr
对照	8.37	3.61	1.74	3.25
1	53.67	58.12	31.85	31.07
2	29.45	32.73	18.15	13.29
3	52.08	56.11	14.73	21.74
4	39.36	43.17	36.83	41.26
5	50.41	47.36	58.65	36.47
6	49.70	31.33	32.23	56.31
7	25.63	23.42	20.88	11.62
8	58.96	87.57	38.08	37.61
9	37.53	31.27	16.30	11.74
10	83.91	81.44	21.37	72.39
11	33.78	25.31	11.63	9.17
12	41.22	54.63	27.10	13.56
13	45.67	43.37	17.13	15.24
14	22.61	37.53	20.68	15.66

Pyr 的降解能力存在较大差别, 降解率变化幅度较大, 对 Flu 的降解率为 22.61% ~ 83.92%, 对 Phe 的降解率为 23.42% ~ 87.57%, 对 An 和 Pyr 的降解率则分别为 11.63% ~ 58.65% 和 9.17% ~ 72.39%; 其中 10 号菌株对 Flu 和 Pyr 的降解能力最强, 5 号菌株对 An 的降解能力最强, 8 号菌株对 Phe 的降解能力最强。虽然 10 号菌株对 Phe 和 An 的降解能力不及 8 号菌株和 5 号菌株的强, 但 10 号菌株生长速度快, 在无机盐培养基和 LB 高盐培养基中均生长良好, OD 值较高, 它对 4 种 PAHs 的综合降解能力强于其他菌, 尤其是对四环 PAHs 芘的降解能力在培养 20 d 后可达 72.39%。而 5 号菌株和 8 号菌株虽然分别对 An 和 Phe 的降解能力最强, 但它们对其他三种 PAHs 的降解能力均不如 10 号菌株, 且生长速度较慢, 因此 10 号菌株可能为 14 株菌中最具实用性的菌株, 选择其做进一步的研究。

2.2 降解能力的测定

我们将10号菌株接种于含Flu、Phe、An、Pyr这4种PAHs各100mg/L的MSM培养基中,28 200r/min振荡培养,从第2d开始测定菌体生长OD600和培养液中Flu、Phe、An、Pyr的残留量并计算降解率,以此衡量10号菌株在含混合PAHs的培养基质中对Flu、Phe、An、Pyr的降解能力和降解速度,每次测定均设置3个平行。以含这4种PAHs但未加菌液的MSM培养基为对照。测定结果表明菌体在培养5d后进入对数生长期,20d后进入生长稳定期,25d的细菌浓度达到最大值。在混合PAHs培养体系中,10号菌对Flu的降解速度最快,在培养5d后也就是菌体进入对数生长期时,Flu的降解也进入快速期,在14d后降解率达75.81%左右,而30d后降解率可达95.27%以上;其次为Phe和Pyr,它们分别在培养8d和10d后进入快速降解期,在培养17d后Phe的降解率达70%,30d后降解率达到90.46%,而Pyr则在21d后降解率达72.55%,30d后可达80%。但该菌对An的降解速度则较慢,降解能力较差,在培养20d后降解率仅为20.14%,30d后也才28%(图1)。对照中的4种PAHs在30d后的回收率均在90%以上。

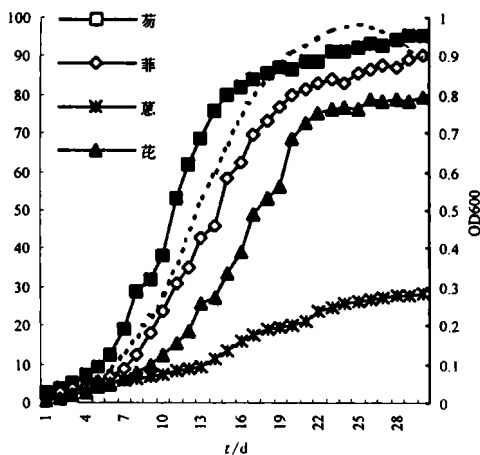


图1 在含芴、菲、蒽、芘的混合培养基中10号菌的生长和降解曲线

Fig. 1 Growth and degradation curves of strain No. 10 in the mixing system of fluorene, anthracene, phenanthrene and pyrene

从上述结果可知,在含4种PAHs的无机培养基中,除An外10号菌株对Flu、Phe、Pyr都具有较高的降解能力。为了研究10号菌株在只含一种PAH的单反应体系中,对Flu、Phe、An、Pyr的降解能力和降解效率,我们将它分别接种于只含单一PAHs(即只含100mg/L的Flu或Phe或An或Pyr)

的MSM培养基中,通过高效液相色谱测定其降解能力。结果表明10号菌株能以不同的PAHs作为唯一碳源和能源生长,在单反应体系中,它对Flu、Phe、An的降解能力均有提高,在培养30d后各自的降解率分别达到98.91%、94.32%和52.17%,尤其是对An的降解率,由混合培养基中的28%提高到单反应体系中的52.17%,几乎提高了一倍(图2a,b,c)。其原因可能是由于An在混合反应体系中存在竞争代谢或者是由于混合反应体系中某些中间产物对An的降解途径具有抑制作用而导致其降解利用受阻。但是在以芘为单一碳源和能源的反应体系中,菌株对Pyr的降解率则有所下降,在培养30d后的降解率由混合体系中的80%降为62.47%(图2d),且菌株在生长后期出现了明显的抑制作用。这可能是由于Pyr在混合体系中与Flu或Phe存在一定程度的共代谢,在单反应体系中因缺乏共代谢途径而导致降解率降低和某些中间有毒产物积累,使细菌生长抑制。另外,与混合PAHs培养体系相比,10号菌在单反应体系中的对数生长期时间缩短近1/3(图2a,b,c,d)。

2.3 菌株的鉴定

10号菌株在培养基上生长为乳黄色的圆形菌落,菌落边缘整齐,表面湿润光滑,显微镜下细胞形态为短杆状,革兰氏染色阴性,细胞色素氧化酶阳性,利用BBL Crystal™细菌鉴定系统对其生理生化进行鉴定,结果表明该菌属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

以10号菌的总DNA为模板,用细菌16S rDNA通用引物进行PCR扩增,得到一条1.3Kb大小的带(图3),将其插入到T载体后测序,结果表明该片段大小为1337bp,将测序结果(Genbank登录号为AY425758)用Blast软件与Genbank中的序列进行比较,发现该菌株与假单胞菌属的多个菌株序列相似性都达到95%以上。据此可确定10号菌在分子系统发育分类学上属于假单胞菌,这与细菌自动鉴定系统鉴定结果吻合。将该菌命名为*Pseudomonas* sp. FAP10。

3 结论

从厦门石油码头的海水中分离、筛选出的PAHs降解菌,经鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),命名为*Pseudomonas* sp. FAP10。*Pseudomonas* sp. FAP10具有较强的降解PAHs的能力,在含芴、菲、蒽、芘的混合PAHs培养体系中生长状况良好,

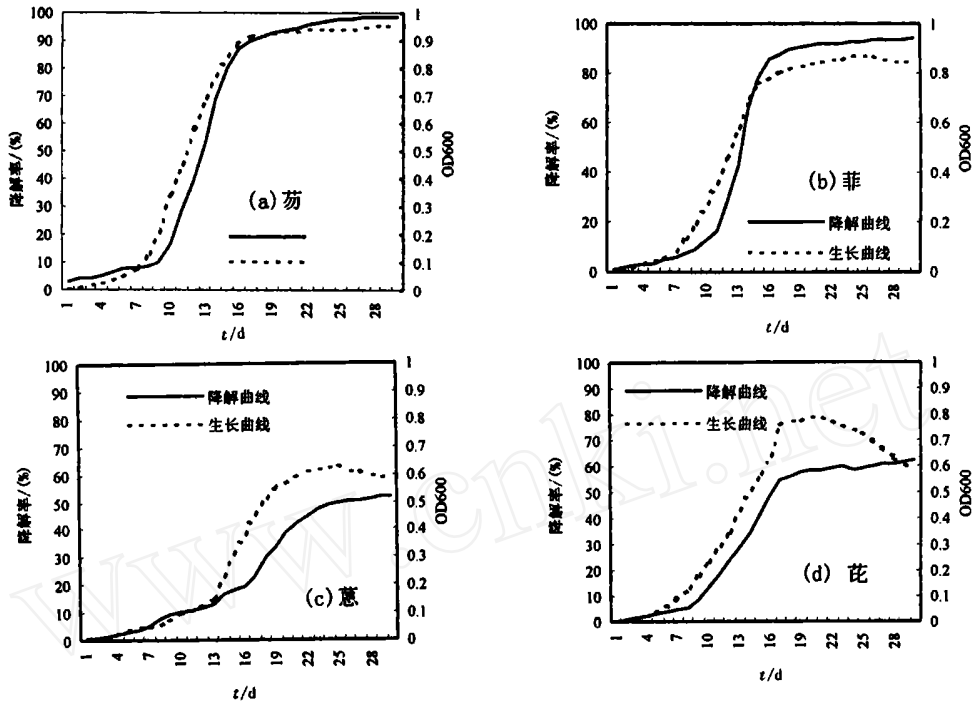


图 2 单反应体系中 10 号菌的生长和降解曲线

Fig. 2 Growth and degradation curves of strain No. 10 under the condition of single PAH existence



图 3 10 号菌 16s rDNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis analysis of 16S rDNA PCR product of strain No. 10

(1. Marker: DNA/ EcoRI+Hind 2. 16S rDNA 3. 无模板对照)

在培养 5 d 后即进入对数生长期, 20 d 后进入生长缓慢期, 25 d 后达到细菌最大培养浓度; 它对芴的降解效能最大, 降解速度最快, 其次为菲和芘, 而对蒽的降解能力最差。在只有一种 PAH 存在时, *Pseudomonas* sp FAP10 对芴、菲、蒽的降解能力有所提高, 尤其是对蒽的降解效能由混合培养的 28 % 提高到 52.17 %, 但在以芘为唯一碳源和能源时, 它对芘的降解利用率则明显下降。与混合 PAHs 培养体系相比, 在单一 PAH 培养体系中, *Pseudomonas* sp FAP10 的生长相对迟滞, 一般在 7 d 后才进入对数生长期, 17 d 后就达生长稳定期, 对数

生长期时间缩短了约 1/3。

参考文献:

[1] ALTAS R M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation [J]. Marine Pollution Bulletin, 1995, 31 (4-12) :178-182.

[2] HEDLUND B P, GEISELBRECHT A D, BAIR T J, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov. sp. nov [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (1) : 251-259.

[3] 周得平, 夏颖, 韩如, 等. 三株菲降解细菌的分离、鉴定及降解特性的研究 [J]. 环境科学学报, 2003, 23(1) :124-128.

[4] 聂麦茜, 张志杰, 王晓昌, 等. 两株假单胞菌对蒽菲芘的降解作用 [J]. 环境科学学报, 2002, 22(5) :630-633.

[5] 聂麦茜, 张志杰, 雷萍. 优势短杆菌对多环芳烃的降解性能 [J]. 环境科学, 2001, 22(6) :83-85.

[6] BALKWILL D L, DRAKE G R, REEVES R H, et al. Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticovorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranean* sp. nov. and *Sphingomonas stygia* sp. nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(1) :191-201.

[7] AITKEN M D, STRINGFELLOW W T, NAGEL R D et al. Characteristics of phenanthrene degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons [J] Can J Microbiol, 1998, 44:743-752.

[8] 雷萍, 聂麦茜, 张志杰. 一株多环芳烃降解菌在焦化废水处理中应用研究 [J]. 西安交通大学学报, 2001, 35(10) :1 055-1 058.

[9] 郭楚玲, 郑天凌, 洪华生. 多环芳烃的微生物降解与生物修复 [J]. 海洋环境科学, 2000, 19(3) :24-29.

[10] 郭楚玲, 哈里德, 郑天凌, 等. 海洋微生物对多环芳烃的降解 [J]. 台湾海峡, 2001, 20(1) :43-47.