

# 氯苯降解菌的筛选鉴定及降解特性研究

杨洪江\* 卢彦珍

(工业微生物教育部重点实验室 天津科技大学 天津 300457)

**摘要:** 本文采集化工厂排污口的污泥样品, 在含有氯苯为唯一碳源的基本培养基中, 先后分离筛选出 7 株能够降解氯苯的微生物菌株。通过对分离菌株的 16S rRNA 基因序列进行分析, 发现其中 5 株细菌分别属于放线菌目的考克氏菌属(KD139)、红球菌属(KD140 和 KD142)和节杆菌属(KD230 和 KD232), 1 株细菌属于杆菌目的芽胞杆菌属(KD178), 另外 1 株细菌属于黄色单胞菌目的寡食单胞菌属(KD237); 同时我们构建了系统进化树, 确定分离菌株的相对进化地位。本文还利用气相色谱方法, 对分离菌株降解氯苯的能力进行了初步分析, 其中寡食单胞菌 KD237 降解氯苯能力最高, 24 h 内氯苯分解率达 60.78%。

**关键词:** 氯苯, 生物降解, 16S rRNA 基因

## Isolation and Characterization of Chlorobenzene Degrading Bacteria

YANG Hong-Jiang\* LU Yan-Zhen

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** In this study, we isolated and characterized chlorobenzene degrading bacteria from the effluent and sludge samples of one chemical plant. Minimal medium supplemented with chlorobenzene as sole carbon source was used during the enrichment and domestication process. Seven major bacterial isolates were obtained and purified. Their 16S rRNA genes were amplified by PCR for sequencing and their identities were determined with homology comparisons. Five of the seven isolates belong to *Actinomycetales* including *Kocuria* KD139, *Rhodococcus* KD140, *Rhodococcus* KD142, *Arthrobacter* KD230, and *Arthrobacter* KD232; one is classified as *Bacillus* d KD178; and another one as *Stenotrophomonas* KD237. The phylogenetic tree was also constructed based on the analysis of 16S rRNA gene sequences. Chlorobenzene concentrations were quantified with gas chromatography to investigate the bio-degradation rates of the isolated strains. *Stenotrophomonas* KD237 degraded 60.78% chlorobenzene in the minimal medium within 24 h.

**Keywords:** Chlorobenzene, Bio-degradation, 16S rRNA gene

氯苯是重要的化工原料, 广泛应用于有机化工、塑料、染料、香料、医药和农药等行业, 同时

氯苯具有较强的毒性, 在环境中能够长期滞留, 对环境造成了严重的危害, 被美国环保局(EPA)列入

优先控制污染物名单<sup>[1]</sup>。为了修复氯苯对环境造成的破坏,国内外学者从不同环境中分离了多种能够降解氯苯的微生物,以期采用生物方法修复被氯苯污染的自然环境<sup>[2,3]</sup>。

本文收集某化工厂排污口的污泥样品,在基本培养基中加入氯苯为唯一碳源,采用富集驯化的方法,分离筛选能够降解氯苯的微生物,通过测定和分析其 16S rRNA 基因序列,对分离的微生物菌株进行了鉴定,并采用气相色谱手段,对分离菌株降解氯苯的速率进行了初步定量分析。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料和培养基

污泥样品采自天津化工厂排污口的污泥,在富集驯化过程中作为种泥加入到基本培养基中。

Min A 基本培养基配方组成为:  $K_2HPO_4$  10.5 g/L,  $KH_2PO_4$  4.5 g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  1 g/L, Sodium Citrate  $2H_2O$  5 g/L, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.0。在液体培养基中,加入 20 g/L 的琼脂粉,配制相应固体培养基。

LB 培养基:蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.2~7.4。在液体培养基中,加入 20 g/L 的琼脂粉,配制相应固体培养基。

### 1.2 降解氯苯微生物的富集驯化

称取 5.0 g 泥样,接种于 100 mL Min A 基本培养基中,加入氯苯作为碳源,氯苯浓度为 50 mg/L。在 26°C 下,150 r/min 振荡培养 1 周,取培养物按 10% 的接种量,重新转接到含有氯苯的新鲜基本培养基中,同样条件继续培养一周,反复 5 次。富集驯化结束后,取 0.1 mL 培养液稀释成不同浓度,涂布于 LB 培养基平板上,挑取单菌落,在含有 50 mg/L 氯苯的 MinA 基本培养基固体平板上划线,26°C 下培养,挑选生长较快、形态不同的菌落继续研究。

### 1.3 分离菌株的分子鉴定

按照以前描述的方法,提取细菌基因组 DNA<sup>[4,5]</sup>,作为扩增 16S rRNA 基因的 DNA 模板。PCR 产物经过纯化后,进行 DNA 序列测定。本文采用 Hendrickson 设计的引物<sup>[6]</sup>,对 16S rRNA 的基因片段进行扩增,引物序列如下:

517F: 5'-GCCAGCAGCCGCCCTA-3'

1406R: 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'

将所得的 DNA 序列递交于 GenBank,同时利用 Ribosomal Database Project II 软件 Classifier,对分离的菌株进行分类<sup>[7]</sup>;通过 Blast 检索,在 GenBank 中的已知序列中进行同源性分析,确定与分离菌株同源程度最高的序列;用 MEGA 4.0 软件,构建系统发育树,分析各分离菌株的进化地位<sup>[8]</sup>。

### 1.4 分离菌株降解氯苯能力的定量分析

将待测菌株首先接种在 LB 液体培养基中,26°C 培养 20 h 后离心去上清,菌体用不含氯苯的 MinA 基本培养基悬浮,离心取上清,重复洗涤 3 次,菌体重新悬于含有 50 mg/L 氯苯的 MinA 基本培养基中,菌体浓度调整为  $10^8$ ,26°C 振荡培养 24 h,离心后取上清液,上清液用石油醚萃取,用气相色谱检测上清液中氯苯的含量。采用 SP-200 气相色谱仪(GC)及火焰离子化检测器(FID),检测条件为:分离柱为 SE-30 色谱柱,尺寸为 30 m×0.25 mm,柱温为 100°C;载气采用高纯氮气;检测器温度为 200°C。按照方玲等的计算方法<sup>[9]</sup>,计算不同菌株的氯苯降解率,公式如下:

$$\text{降解率}\% = \frac{\text{对照样品残留量} - \text{处理样品残留量}}{\text{对照样品残留量}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选及表面菌落特征形态结构观察

按照实验材料和方法中所述,在含有氯苯的 MinA 基本培养基中,对污泥样品进行富集驯化培养,先后分离到多株微生物。通过划线分离纯化,根据菌落的形态和大小的不同,选定了 7 株分离菌株作为继续研究的对象(如表 1 所示),分别命名为 KD139、KD140、KD142、KD178、KD230、KD232 和 KD237。

### 2.2 分离菌株 16S rRNA 基因片段的扩增和序列分析

提取分离菌株的基因组 DNA,采用细菌通用引物 517F 和 1406R,体外扩增 16S rRNA 基因片段。扩增产物纯化后,取部分样品进行琼脂糖电泳,结果如图 1 所示,扩增的基因片段长度约为 900 bp。

以 517F 为引物,对纯化的 PCR 产物进行序列测定,每个序列上传至 GenBank 并获得了相应的序列号。在 GenBank 中,利用 Blast 工具查找最相似的序列,结果如表 2 所示,有 5 株分离菌株分别与放线

表 1 分离菌株的菌落形态特征							
Table 1 The colony morphology of the isolated strains							
菌株 Strains	大小(直径/mm) Diameters/mm	形状 Shape	表面 Surface	边缘 Edge	隆起程度 Height	透明程度 Transparence	颜色 Color
KD139	1	圆形	光滑	平整	突起平滑	不透明	橙红
KD140	1	圆形	光滑	平整	突起平滑	不透明	亮橙红
KD142	1	圆形	湿润	平整	突起	不透明	亮粉
KD178	10	圆形	干燥	不平整	平坦无突起	半透明	乳白
KD230	2	圆形	光滑	平整	突起平滑	半透明	浅米黄
KD232	2	圆形	光滑	平整	突起平滑	不透明	米黄
KD237	1	圆形	光滑	平整	突起	不透明	浅橙黄

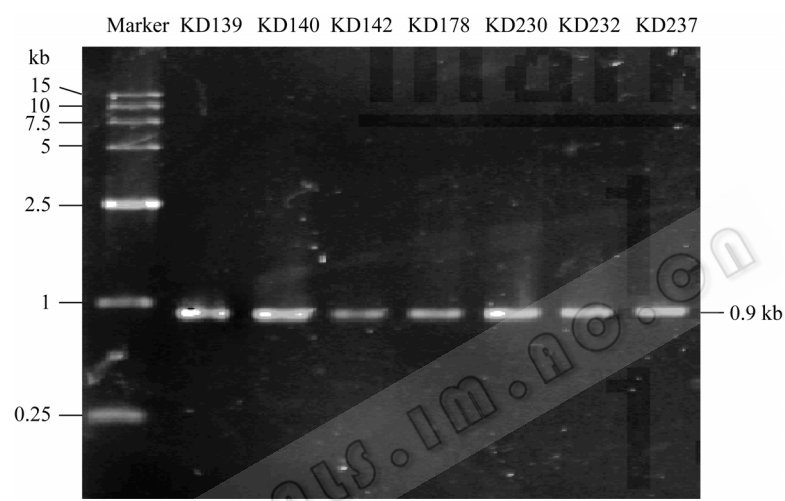


图 1 PCR 方法扩增分离菌株的 16S rRNA 基因片段

Fig. 1 Amplification of 16S rRNA genes of the isolated strains

表 2 GenBank 中与分离菌株 16S rRNA 基因最相似的序列				
Table 2 Blast searches of the most similar sequences in GenBank to the 16S rRNA gene sequences of the isolated strains				
菌株 Strains	序列长短 Length in bp	GenBank 序列号 Accession No.	同源最高的种属(序列号) Most similar strains (accession No.)	相似性(%) Similarity (%)
KD139	744	FJ227136	<i>Kocuria</i> sp. G1DM-50(DQ416792.1)	99
KD140	775	FJ227137	<i>Rhodococcus</i> sp. L4(2008)(EU552925.1)	99
KD142	843	FJ227138	<i>Rhodococcus</i> sp. WC3(EU309676.1)	99
KD178	706	FJ227139	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone woFOC_R5(EF600603.1)	100
KD230	773	FJ227140	<i>Arthrobacter protophormiae</i> strain 98-0077(EU086815.1)	99
			Uncultured bacterium clone CE2_e12_2(EU468032.1)	99
KD232	761	FJ227141	<i>Arthrobacter protophormiae</i> strain 98-0077(EU086815.1)	100
			<i>Arthrobacter</i> sp. MC8M6(AJ893515.1)	100
KD237	696	FJ227142	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain B2A(EU360468.1)	99

菌目中考克氏菌属(KD139)、红球菌属(KD140、KD142)和节杆菌属(KD230、KD232)的不同细菌同源程度最高, KD178 与不可被培养杆菌的相关序列同源性达到 100%, 而 KD237 与寡食单胞菌属的

B2A 菌同源程度最高。

2.3 分离菌株的鉴定

为了进一步对分离菌株进行分类, 我们利用 16S rRNA 专业网站 Ribosomal Database Project

提供的工具 Classifier, 对分离菌株的核酸序列进行分析, 对分离菌株进行菌种鉴定。分类结果如表 3 所示, 与 Blast 查找结果相似, 有 5 株分离菌株分别属于放线菌目的 3 个不同属, KD237 确定为寡食单胞菌属, KD178 与前面查找结果略有差别, 确定为杆菌目的芽胞杆菌 d 属。

2.4 系统发育树的构建

运用 MEGA4.0 软件, 构建分离菌株的系统发

育树, 选择枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* strain SC2-2-1)和大肠杆菌(*Escherichia coli* 53638)作为参考菌株, 同时在 GenBank 中, 选择 1~2 株与分离菌株 16S rRNA 基因序列具有最高相似性的菌株(见表 2), 构建系统发育树如图 2 所示。

2.5 分离菌株氯苯降解能力的初步分析

按照实验材料与方法中所述, 利用气相色谱法定量测定培养基中氯苯的含量, 测量结果分别与

表 3 菌种鉴定结果					
Table 3 Classification results of the isolated strains					
菌株 Strains	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
KD139	放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria	放线菌目 Actinomycetales	微球菌科 Micrococcaceae	考克氏菌属 <i>Kocuria</i>
KD140	放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria	放线菌目 Actinomycetales	诺卡氏菌科 Nocardiaceae	红球菌属 <i>Rhodococcus</i>
KD142	放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria	放线菌目 Actinomycetales	诺卡氏菌科 Nocardiaceae	红球菌属 <i>Rhodococcus</i>
KD178	硬壁菌门 Firmicutes	杆菌纲 "Bacilli"	杆菌目 Bacillales	芽胞杆菌科 Bacillaceae	芽胞杆菌 d 属 <i>Bacillus d</i>
KD230	放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria	放线菌目 Actinomycetales	微球菌科 Micrococcaceae	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>
KD232	放线菌门 Actinobacteria	放线菌纲 Actinobacteria	放线菌目 Actinomycetales	微球菌科 Micrococcaceae	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>
KD237	变形菌门 Proteobacteria	-变形菌纲 Gammaproteobacteria	黄色单胞菌目 Xanthomonadales	黄色单胞菌科 Xanthomonadaceae	寡食单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>

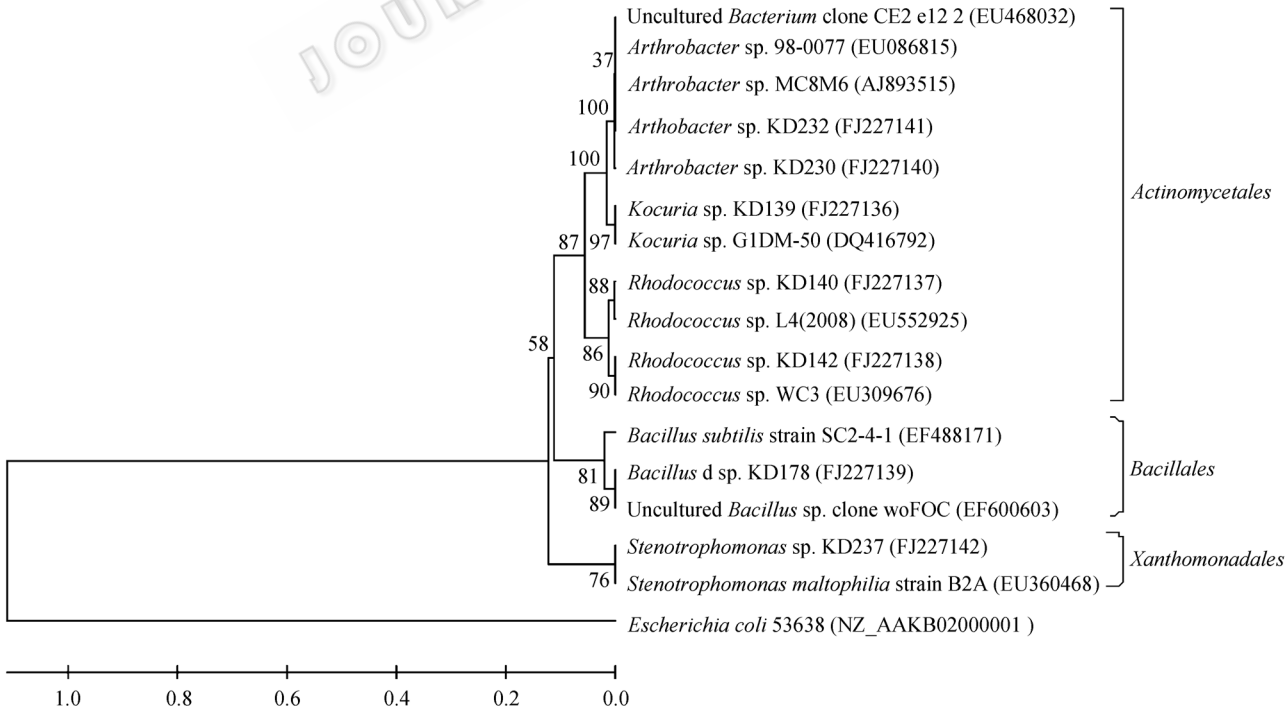


图 2 氯苯降解菌系统发育树的构建

Fig. 2 Phylogenetic tree of the chlorobenzene degrading strains and related strains based on of 16S rRNA gene sequences

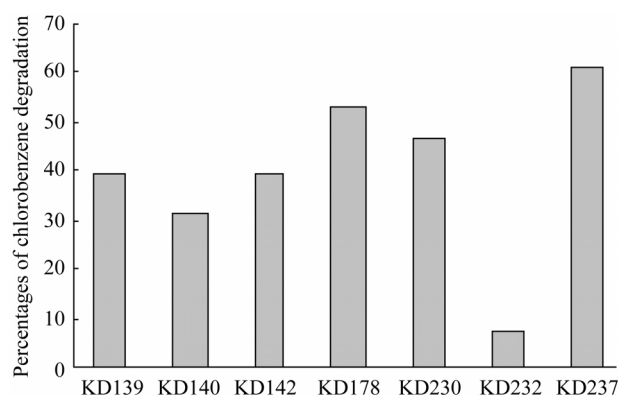


图3 气相色谱方法分析分离菌株降解氯苯的能力

Fig. 3 Analysis of chlorobenzene degradation abilities of the isolated strains with GC method

空白对照比较, 得到不同菌株的氯苯降解率, 实验结果如图3所示。分离菌株降解氯苯的能力差别比较明显, 菌株KD232利用氯苯的能力最低, 只有7.84%的氯苯被降解; 菌株KD237氯苯降解率最高, 达到60.78%。

### 3 讨论

氯苯降解分为有氧降解和无氧降解两种途径。研究显示, 氯苯很难通过无氧途径进行分解, 我国学者1997年分离到1株厌氧降解氯苯的微生物, 该菌属于气单胞菌属(*Aeromonas*), 在3周内的氯苯降解率为33%<sup>[10]</sup>, 国外学者也有类似的发现, 但是报道很少<sup>[11,12]</sup>。有氧途径是微生物降解氯苯的主要方式, 近年来先后从不同环境中筛选了多株能够分解氯苯的微生物, 包括链球菌属(*Streptococcus*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)和寡食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)等<sup>[2,3,13-18]</sup>。

本文通过富集驯化的方法, 从化工厂排污口的污泥分离筛选到7株能够降解氯苯的微生物, 分别为*Kocuria* sp. KD139、*Rhodococcus* sp. KD140、*Rhodococcus* sp. KD142、*Bacillus* d sp. KD178、*Arthrobacter* sp. KD230、*Arthrobacter* sp. KD232和*Stenotrophomonas* sp. KD237。其中KD139和KD140同属于红球菌属, 另外2株细菌KD230和KD232同属于节杆菌属。为了研究这些菌株是否属于同一属内的不同种类(species), 我们分别将这些菌株16S rRNA基因序列进行了比对, 发现KD139和KD140

菌株的16S rRNA基因序列有97%相同, 而KD230和KD232菌株的16S rRNA基因序列有99%相同。16S rRNA基因序列相同程度决定细菌是否为不同种类即species, 一般认为16S rRNA基因序列相同程度少于97%的细菌, 可以认为是不同种类<sup>[19]</sup>, 最近也有研究认为相同程度在99%以下, 就可能为不同的种类<sup>[20,21]</sup>。究竟KD139和KD140、KD230和KD232是否是同一属内的不同种类, 还需要进一步实验进行确认。

### 参考文献

- [1] USEPA. Ambient water quality criteria for chlorinated benzenes. EPA 440-/5-80/028. Department of Commerce National Technical Information Service VA 22151, 1980.
- [2] 王玉芬, 张肇铭, 胡筱敏, 等. 微生物法去除水中氯苯类化合物的研究进展. 微生物学通报, 2008, 35(6): 949-954.
- [3] Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation*, 2008, 19(4): 463-480.
- [4] 李长林, 吴建波, 杨殿林, 等. 转基因棉花根际土壤DNA的提取方法研究. 微生物学通报, 2007, 34(5): 943-945.
- [5] 黄进勇, 岳彩鹏, 周伟. 麦田土壤细菌群落16S rDNA V3片段PCR产物的DGGE分析. 河南农业大学学报, 2007, 41(4): 396-400.
- [6] Hendrickson ER, Payne JA, Young RM, et al. Molecular analysis of dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(2): 485-495.
- [7] Wang QG, Garrity M, Tiedje JM, et al. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [9] 方玲. 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果. 应用生态学报, 2000, 11(2): 249-252.
- [10] 罗新如, 沈标, 李顺鹏. 一氯苯的微生物厌气降解及其降解性质粒的研究. 南京农业大学学报, 1997, 20(2): 63-66.
- [11] Kaschl A, Vogt C, Uhlig S, et al. Isotopic fractionation

- indicates anaerobic monochlorobenzene biodegradation. *Environ Toxicol Chem*, 2005, **24**: 1315–1324.
- [12] Kastner M, Fischer A, Nijenhuis L, *et al.* Assessment of microbial in situ activity in contaminated aquifers. *Eng Life Sci*, 2006, **6**: 234–251.
- [13] 王永强, 毕贵芹, 张洪林. 氯苯降解菌的筛选及其降解特性的研究. 工业用水与废水, 2003, **34**(6): 35–36.
- [14] Sander P, Wittich RM, Fortnagel P, *et al.* Degradation of 1,2,4-trichlorobenzene and 1,2,4,5- tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 1430–1440.
- [15] Haigler BE, Pettigrew CA, Spain JC. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain-JS150. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**: 2237–2244.
- [16] Reh fuss M, Urban J. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov. a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Syst Appl Microbiol*, 2005, **28**: 695–701.
- [17] Vogt C, Alfreider A, Lorbeer H, *et al.* Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide. *J Contam Hydrol*, 2004, **68**: 121–141.
- [18] 张 晶, 王战勇, 苏婷婷. 氯苯降解菌的筛选及降解条件. 辽宁石油化工大学学报, 2005, **25**(1): 36–39.
- [19] Stackebrandt E, Goebel BM. A place for DNA–DNA re-association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**: 846–849.
- [20] Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006, **361**: 1929–1940.
- [21] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 2006 (Nov.), 152–155.

2009 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	致病菌微进化论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	1 月	80	北京	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
2	第十五届国际神经免疫, 病毒及药物学会 (SNIP) 年会	中国微生物学会病毒学专业委员会	4 月	待定	湖北武汉	www.whcdc.org
3	2009 国际医学真菌大会北京卫星会	中国微生物学会真菌学专业委员会	5 月 29-31 日	400	北京	www.fungalinfection.cn/is ham2009 何苗苗 010-65041809
4	第十二届全国微生物学教学科研研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7 月	100	湖北武汉	孙明 027-87283455
5	食品微生物监测技术与实验室质量管理	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8 月	100	山东青岛	杨瑞馥 yangrf@nic.bmi.ac.cn
6	第八届全国病毒学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	8 月 17-19 日	150	北京	王健伟 bdhy2009@163.com
7	全国第六届感染与免疫和生物制品学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	8 月	100	吉林延吉	孟繁平
8	第三届病毒学国际学术会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	9 月	200	湖北武汉	刘芳 027-68754592
9	第十五届国际放线菌生物学大会	中国微生物学会	8 月 20-25 日	600	上海	白林泉 021-62932418

(下转 p.615)