

一株高分子量多环芳烃降解菌的筛选、 鉴定及降解特性研究

毛 健^{1,2,3} 骆永明^{1,2,3*} 滕 应^{1,2} 李振高^{1,2} 吴宇澄^{1,2}

- (1. 中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室 南京 210008)
(2. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所) 南京 210008)
(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要: 采用富集培养方法从多环芳烃污染土壤中筛选分离得到 1 株能以苯并[a]芘(B[a]P)为唯一碳源和能源生长的菌株。形态特征观察和 16S rDNA 序列分析结果表明, 该菌株为副球菌属(*Paracoccus* sp.), 编号为 HPD-2。HPD-2 在 3.0 mg/L 的 B[a]P 液体培养基中生长较慢, 培养 5 d 后 B[a]P 的降解率为 89.7%。同时, 该菌株对四环的芘和荧蒹也具有较好的降解能力, 培养 7 d 后芘和荧蒹的降解率分别达到 47.2%和 84.5%。可见, 该菌株对高分子量 PAHs 具有很好的降解潜力。
关键词: 多环芳烃, 高分子量, 苯并[a]芘, 芘, 荧蒹, 生物降解

Isolation and Characterization of a High-molecular-weight (HMW) PAHs Degrading Bacterial Strain

MAO Jian^{1,2,3} LUO Yong-Ming^{1,2,3*} TENG Ying^{1,2} LI Zhen-Gao^{1,2} WU Yu-Cheng^{1,2}

- (1. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy Sciences, Nanjing 210008)
(2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008)
(3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: A bacterial strain, which utilized Benzo[a]pyrene (B[a]P) as the sole carbon and energy source for growth, was isolated from soil heavily contaminated by PAHs. This strain was identified as *Paracoccus* sp. by its morphology and 16S rDNA sequence, and designated HPD-2. After incubated in MS medium containing B[a]P of 3.0 mg/L for 5 days, 89.7% of B[a]P was degraded by HPD-2. When this strain was grown in pyrene and fluoranthene of 50 mg/L for 7 days, 47.2% and 84.5% of which was degraded respectively. Thus, this study provides evidence for the potential application of HPD-2 for improving HMW- PAHs biodegradation.

Keywords: PAHs, High-molecular-weight, Benzo[a]pyrene, Pyrene, Fluoranthene, Biodegradation

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(No. 2002CB410809); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. kzcx2-yw-404); 国家自然科学基金重点项目(No. 40432005)资助

* 通讯作者: ✉ ymluo@issas.ac.cn

收稿日期: 2007-11-20; 接受日期: 2008-01-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是环境中普遍存在的一类有机污染物, 由于其在环境中的半衰期较长和致癌、致畸、致突变的性质而受到人们的重视^[1]。美国环保局在 20 世纪 80 年代初把 16 种未带分支的 PAHs 确定为环境中的优先污染物, 我国也将其列入环境污染的黑名单中^[2]。苯并[a]芘 (Benzo[a]pyrene, B[a]P) 是由 5 个苯环组成的一种多环芳烃化合物, 致癌性极强, 是国内外环境监测的重要指标之一。芘 (Pyrene, PYR) 和荧蒽 (Fluoranthene, FA) 都是四环的多环芳烃化合物, 也具有一定的致癌作用。三环以上的 PAHs 都属于高分子量 PAHs。通常认为, PAHs 的环数越高, 越难被微生物降解利用^[3]。

近年来, 国内外对高分子量 PAHs 的微生物降解研究表明, 能够同时降解多种高分子量 PAHs (如四环和五环) 的微生物资源还很少^[1,4]。事实上, 环境中 PAHs 通常以多种组分同时存在, 呈现其复合污染现象。因此, 筛选能够同时降解多种高分子量 PAHs 的微生物, 具有重要的现实意义。

本文拟通过富集培养, 从长江三角洲地区某多环芳烃长期污染土壤中筛选高分子量 PAHs 的高效降解菌, 分析其降解特性, 为多环芳烃类污染物的微生物修复提供资源保障和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤: 采自长江三角洲某地多环芳烃重度污染土壤。其基本理化性质为: pH 6.4, 有机质 19.2 g/kg, 碱解氮 1.0 g/kg, 全磷 0.5 g/kg, 有效钾 14.2 g/kg, 阳离子交换量 21.5 cmol/kg。16 种 EPA 定为优先污染物的 PAHs 的总量达 10.3 mg/kg。新鲜土壤样品过 2 mm 筛, 于暗处 4℃ 保存, 以供筛选多环芳烃降解微生物用。

1.1.2 多环芳烃: B[a]P、PYR 和 FA 都购自 Sigma 公司(美国), 均为分析纯。

1.1.3 培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基; 无机盐培养基(MS): 每升蒸馏水含 K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 5.5 g, Na₂SO₄ 2.0 g, KCl 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 微量金属盐溶液 1.0 mL^[3], pH 7.0; 含 PAHs 的无机盐培养基: 以 DMF 配制 1000 mg/L 的不同 PAHs (B[a]P, PYR, FA) 溶液, 按适当的浓度加入灭菌的无机盐培

养基。

1.2 PAHs 降解菌的分离与纯化

称取 10 g 新鲜土壤, 加入装有 100 mL 无机盐液体培养基(B[a]P 浓度为 5.0 mg/L)的三角瓶中, 28℃ 下 200 r/min 振荡培养 1 周。按 10% 接种量转接到新鲜的 B[a]P 无机盐培养基中, 继续培养 1 周, 反复 5 次。最后吸取 0.1 mL 培养液稀释不同梯度涂布于牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 挑取单菌落, 将平板划线纯化后的单菌落再接种到 B[a]P 无机盐液体培养基中, 选取生长速度最快的菌株作为研究菌株。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态观察及鉴定: 将已充分活化的菌株接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 28℃ 培养 24 h, 革兰氏染色后在光学显微镜下观察细胞形态、菌体大小。将活化菌种在牛肉膏蛋白胨平皿上划线接种, 28℃ 培养箱中倒置培养 2 d, 观察菌落形态, 并测量菌落大小。细菌样品经处理后用日立 H-7650 透射电子显微镜(TEM)观察菌体结构。

1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列分析和系统发育树的构建: 利用 Biospin 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(杭州博日科技有限公司)提取细菌 DNA。用于 16S rDNA PCR 反应的引物为一对通用引物。正向引物为 BSF8/20: 5'-AGAGTGTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物为 BSR1541/20: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 29 次; 72℃ 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物的测序由上海博亚生物技术有限公司完成。降解菌 16S rDNA 序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析。然后利用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树, 采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析。

1.4 菌株对苯并[a]芘的降解特性

1.4.1 菌悬液的制备: 在无菌条件下将菌株接种于 5.0 mg/L B[a]P 无机盐液体培养基中, 28℃ 下 200 r/min 振荡培养 1 周, 离心收集菌体, 并用磷酸盐缓冲液反复洗涤 3 次, 再用磷酸盐缓冲液将菌悬液调至所需浓度备用。

1.4.2 菌株对苯并[a]芘的降解: 将 10% 的菌悬液加入 50 mL 液体培养基中, 以加灭活菌悬液的处理作

为对照, 加入 B[a]P, 使 B[a]P 的最终浓度约为 3.0 mg/L, 每个处理设 3 个重复。28^oC 200 r/min 避光振荡培养 5 d, 在不同时段(0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h)取样, 4^oC 冷冻保存。测定溶液中 B[a]P 的浓度和 OD_{600} 的变化。

1.4.3 菌株对芘和荧蒹的降解: 在 50 mL 液体培养基中加入 10% 的菌悬液, 以加灭活菌悬液的处理作为对照, PYR 和 FA 的最终浓度为 50.0 mg/L, 每个处理设 3 个重复。28^oC 200 r/min 避光振荡培养 7 d 后取样, 测定溶液中 PYR 和 FA 的浓度。

1.5 溶液中多环芳烃的提取与分析

将三角瓶中的菌液全部倒入分液漏斗, 加入 50 mL 乙酸乙酯提取 3 次, 合并提取液后用无水 Na_2SO_4 去除水分。在水温为 36^oC 的旋转蒸发器中旋转浓缩至干。加 2.0 mL 乙腈溶解, 用高效液相色谱 (HPLC) 测定。液相色谱为日本岛津 Class-vp 高效液相色谱分析系统, 配荧光检测器 RF-10AXL, 柱温箱 OTO-10ASVP, 二元梯度泵 LC-10AT, 色谱分离柱为美国 Varian 公司的 ChromSpher 5 PAH。流动相为乙腈/水 (60:40, V/V), FA、PYR 和 B[a]P 的保留时间分别为 32.5 min、35.1 min 和 56.5 min^[5]。

2 结果与讨论

2.1 多环芳烃降解菌株的形态特征与 16S rDNA 序列分析

该菌株在平板上生长 48 h 后呈乳白色凸起菌落, 菌落直径约为 1 mm~4 mm, 表面光滑, 边缘完整(如图 1)。经染色镜检, 该菌为革兰氏阴性, 球状, 菌体直径为 0.6 μ m~1.0 μ m(如图 2)。

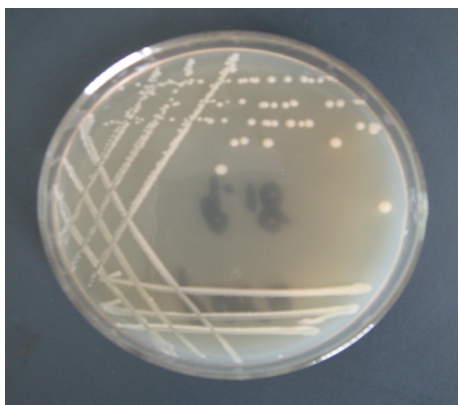


图 1 菌株 HPD-2 在固体培养基上菌落形态

Fig. 1 The colony of HPD-2 strain

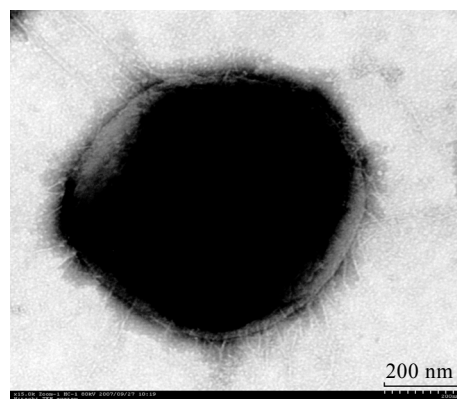


图 2 菌株 HPD-2 单菌株在透射电镜(15000 倍)下的形态
Fig. 2 The cellular morphology of HPD-2 strain under transmission electron microscope

PCR 扩增结果显示 16S rDNA PCR 产物约 1.5 kb 左右。16S rDNA 序列同源性比对表明, 该菌株 16S rDNA 序列与 *Paracoccus* sp. 细菌的 16S rDNA 序列相似性高达 100%。结合上述的形态鉴定与 16S rDNA 分析结果将此菌株鉴定为副球菌属, 其编号为 HPD-2。

2.2 HPD-2 在苯并[a]芘培养基上的生长曲线

HPD-2 在含有 B[a]P 的无机盐液体培养基中的生长曲线见图 3。该菌株从接种到第 6 h 生长缓慢, 处于延滞期; 从 6 h 到 12 h, 菌株开始加速生长, 细胞数目开始有所增加; 从 24 h 到 48 h, 细胞数目急剧增加, OD_{600} 值从 0.1 快速增加到 0.4, 处于指数生长期; 第 48 h 到 96 h, OD_{600} 值变化不大, 细胞处于稳定期; 到 120 h, 细胞数目有所减少, 进入衰亡期。从图中还可看出, 与正常条件相比, HPD-2 在含 B[a]P 培养液中的生长显得比较缓慢。这可能是由

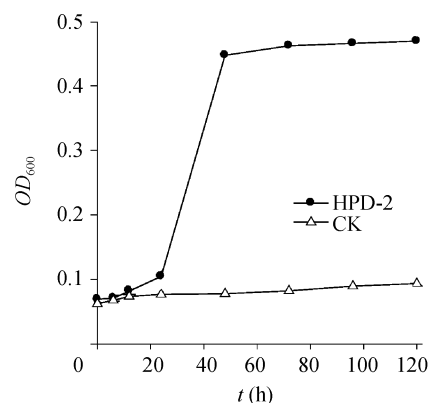


图 3 菌株 HPD-2 在 B[a]P 培养液中的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of HPD-2 strain in B[a]P-containing medium

于无机盐培养基中是以 B[a]P 作为唯一碳源, 而 B[a]P 本身的毒性也可能对菌株的生长产生抑制作用。

2.3 HPD-2 对苯并[a]芘、芘和荧蒹的降解特性

无机盐液体培养基中 B[a]P 的浓度随时间的变化情况如图 4 所示。由图可知, B[a]P 的浓度从培养初期即开始下降, 第 24 h 至 48 h 降低得最快, 48 h 后下降的速度减缓, 与该菌的生长曲线呈现一定的对应关系。与培养初期相比, 第 120 h 时加 HPD-2 的处理中 B[a]P 的降解率达 89.7%。在加灭活菌悬液处理(对照)中, B[a]P 的浓度也有所降低, 可能是由于非生物因素造成。

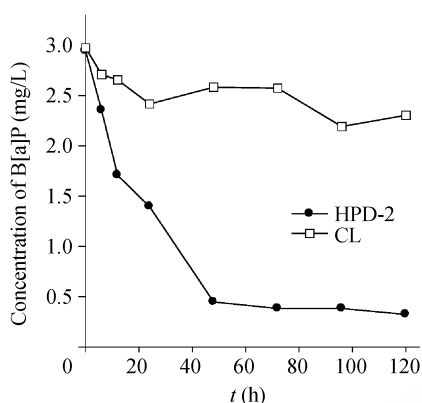


图 4 菌株 HPD-2 培养液中 B[a]P 浓度随时间的变化
Fig. 4 The changes of B[a]P concentration in the medium

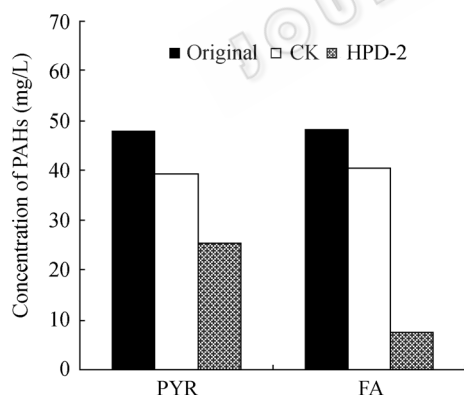


图 5 培养 7 d 后菌株 HPD-2 对 PYR 和 FA 的降解情况
Fig. 5 Degradation of PYR and FA by HPD-2 strain after incubation

图 5 所示的是 HPD-2 培养 7 d 后对 PYR 和 FA 的降解情况。从图中可以看出, PYR 和 FA 的浓度均明显低于对照, 而且 FA 比 PYR 降低得更多。表明该菌对 PYR 和 FA 都有一定的降解能力, 且对 FA 的降解能力更强, 它们降解率分别为 47.2% 和 84.5%。虽然有

研究者认为在一种底物诱导下生长的细胞, 对其它底物的降解能力可能会受到抑制^[4], 但是本研究中利用 B[a]P 生长的 HPD-2 仍然对 PYR 和 FA 表现出了较好的降解能力。

2.4 讨论

微生物一般通过两种方式降解 PAHs: 以 PAHs 作为唯一的碳源和能源形式的降解和共代谢(或共氧化)形式的降解。以前的研究通常认为, 微生物可以直接降解萘、菲等小分子 PAHs, 而 B[a]P 等高分子量 PAHs 的生物降解一般均以共代谢方式进行^[2]。然而, 随着研究的深入, 国内外已经发现了一些能够以高分子量 PAHs 作为唯一碳源和能源的微生物。一些筛选出的高效降解菌对 PAHs 具有广谱降解能力, 如糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)能共代谢萘、芘、芴和苯并[a]芘^[6]。一种分枝杆菌菌株 PYR-1 能同时降解菲、萘、荧蒹、芘和苯并芘组成的混合物, 在有适当碳源存在下, 接种 6 d 后, PAHs 总量降解率超过 74%, 其中菲降解最明显^[7]。近几年, 我国科研工作者在分离筛选 PAHs 高效降解菌方面也取得了诸多成就^[8]。

目前有关副球菌属对 PAHs 的降解研究较少, 主要针对四环以下的 PAHs, 如有学者发现了一株副球菌具有氧化萘的能力^[9], Zhang 等报道了一株可以降解萘、菲、芴、荧蒹、屈、芘等一系列 PAHs 的副球菌属细菌^[10]。然而, 至今还未发现能够同时降解 B[a]P、芘和荧蒹的副球菌的报道。HPD-2 菌株不但能降解四环 PAHs(芘和荧蒹), 而且同时也能够降解五环 PAHs(B[a]P)。这有利于四环和五环 PAHs 污染土壤的生物修复, 为研发高分子量 PAHs 复合污染土壤的生物修复技术提供宝贵的微生物资源。本研究所用的副球菌 HPD-2 虽然在 3.0 mg/L 的 B[a]P 液体培养基中生长比较缓慢, 但是培养 5 d 后能够降解 89.7% 的 B[a]P。同时, 该菌株对四环 PAHs 也具有较好的降解能力, 培养 7 d 后对芘和荧蒹的降解率分别达到 47.2% 和 84.5%。由此可见, HPD-2 对高分子量 PAHs 具有很好的降解潜力。该菌株降解高环 PAHs 的途径正在进一步研究中。

参 考 文 献

- [1] Luan TG, Yu KS, Zhong Y, *et al.* Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons

(PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere*, 2006, **65**(11): 2289–2296.

[2] 邢维芹, 骆永明, 李立平. 影响土壤中 PAHs 降解的环境因素及促进降解的措施. *土壤通报*, 2007, **38**(1): 173–178.

[3] 李 莹, 蔡宝立, 庄源益, 等. 溴氨酸降解菌株的分离和特性. *微生物学通报*, 2003, **30**(1): 5–8.

[4] Venkata SM, Takeru O, Robert AK, *et al.* Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 2006, **5**: 347–374.

[5] 钱 薇, 倪进治, 骆永明, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定土壤中的多环芳烃. *色谱*, 2007, **25**(2): 221–225.

[6] 房 妮, 俱国鹏. 多环芳烃污染土壤的微生物修复研究进展. *安徽农业科学*, 2006, **34**(7): 1425–1426.

[7] Kelley I, Cerniglia CE. Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. *J Soil Contamination*, 1995, **4**(1): 77–91.





[8] 刘 磊, 李习武, 刘双江, 等. 降解多环芳烃的菌株 *Gordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在非污染土壤修复过程中的动态变化. *环境科学*, 2007, **28**(3): 617–622.

[9] Ensley BD, Laborde AL. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. *J Bacteriol*, 1982, **149**(3): 948–954.

[10] Zhang HM, Kallimanis A, Koukoku AI, *et al.* Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(1): 124–131.

编辑部公告

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动！

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 全年定价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。 汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401 收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: hanl@im.ac.cn 请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量