

# 一株[卅屈]高效降解菌的分离鉴定及其降解特性

唐玉斌\* 孙常宇 陈芳艳 郁 昉

(江苏科技大学 生物与环境工程学院 江苏 镇江 212018)

**摘 要:** 以多环芳烃[卅屈] (Chrysene)为选择培养基的碳源,从焦化污泥中筛选出一株[卅屈]的高效降解菌 SQ-1, SQ-1 可在以[卅屈]为唯一碳源的无机盐培养基中生长,经过电镜形态学观察、生理生化和 16S rDNA 序列分析,并基于 16S rDNA 序列结果,构建了该菌株的系统发育树。最终确定菌株 SQ-1 为木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)。又考察了[卅屈]的初始浓度、接种量、pH 值对 SQ-1 菌株降解[卅屈]效果的影响,确定了最佳降解条件。结果表明,该菌对水中[卅屈]具有良好的降解特性,在[卅屈]浓度为 40 mg/L、接种量 10% (V/V)、pH 7.0~7.5、温度 30°C 条件下,接种 5 d 后对[卅屈]的降解效率达到 80%以上。

**关键词:** [卅屈]降解菌, 16S rDNA, 系统发育分析, 降解特性

## Isolation and Identification of a Chrysene-degrading Strain and Its Degradation Characteristics

TANG Yu-Bin\* SUN Chang-Yu CHEN Fang-Yan YU Fang

(School of Biotechnology and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

**Abstract:** A predominant chrysene-degrading strain was isolated and screened from biological sludge sampled from a coking plant, which can use chrysene as sole carbon source for growth in the selective culture medium. The phylogenetic tree of the strain was produced on the basis of morphology observation by SEM, experimental results of physiology and biochemistry and analysis of 16S rDNA sequence. The strain was identified as *Achromobacter xylosoxidans*. The effect of initial concentration of chrysene solution, inoculating dose and pH on degradation efficiencies was investigated. The results indicate that the degrading characteristics of the strain is fine. The optimal degrading conditions are: initial concentration of chrysene solution 40 mg/L, inoculating dose (V/V) 10%, pH 7.0~7.5, respectively. Under the optimal conditions, the degrading efficiency can reach more than 80% after 5 days at 30°C.

**Keywords:** Chrysene-degrading strain, 16S rDNA, Phylogenetic analysis, Biodegradation characteristics

多环芳烃(PAHs)是一类难降解有毒有机物,在环境中分布十分广泛<sup>[1]</sup>。该类物质是一种“前致癌物”,在代谢过程中易被活化为“终致癌物”,具有潜

在的“三致性”<sup>[2]</sup>。随着PAHs分子量的增加,其水溶性急剧减小,且更难被微生物降解,故高分子量的PAHs在环境中停留时间更长,危害更大。据报道,

大量微生物能够降解低分子量的PAHs, 如已发现的能够降解萘和菲的微生物有气单胞菌属、产碱杆菌属、不动杆菌属、芽胞杆菌属、黄杆菌属、莫拉氏菌属、分枝杆菌属和假单胞菌属等<sup>[3]</sup>, 也有关于白腐担子菌可降解蒽<sup>[4]</sup>、尖镰孢菌和茄镰孢菌可降解蒽和菲<sup>[5,6]</sup>的报道。而关于高分子量PAHs(四环及以上)降解菌的报道则相对较少<sup>[7]</sup>, S Krivobok等人<sup>[8]</sup>报道了分枝杆菌能够以芘为唯一碳源生长, 国内学者盛下放等人<sup>[9]</sup>筛选出可降解苯并[a]芘的氮单胞菌属, 陈晓鹏等<sup>[10]</sup>也筛选出能以芘为唯一碳源生长的假单胞菌混合菌群, H M Zhang等<sup>[3]</sup>从多环芳烃污染土壤中筛选出既可降解蒽、菲等低分子量PAHs, 又可降解高分子量PAHs 芘和[+屈]的副球菌属。[+屈](Chrysene, 1,2-苯并菲, 以下简称Ch)是一种具有弱致癌性的高分子量多环芳烃, 其降解菌的筛选鉴定在国内尚未见报道, 分离筛选Ch的高效降解菌, 对于防治高分子量多环芳烃的污染、保护人类健康具有重要意义。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

菌种取自镇江焦化厂生化处理装置的污泥。选择性液体培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.3 g,  $\text{CaCl}_2$  0.02 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 mg,  $\text{H}_2\text{O}$  1 L。pH 调节到 7。

选择性固体培养基: 基本成分同选择性液体培养基, 加入 2%琼脂。

丰富培养基:  $\text{NaCl}$  5 g, 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, 蒸馏水 1 L。

磷酸缓冲溶液: 取 0.1 mol/L的 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 溶液 615 mL与 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液 385 mL, 即得 0.1 mol/L、pH 7 的磷酸缓冲溶液 1 L<sup>[11]</sup>。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种的筛选与分离: 将采集来的活性污泥样品加入一定量的蒸馏水空曝 24 h, 取 10 mL 上清液转接至无菌 100 mL 新鲜选择性液体培养基中。选择性培养基中加入浓度为 1 g/L 的 Ch 的丙酮溶液 4 mL, 待丙酮挥发完全(摇床振荡 24 h)后使用。在振荡速率 110 r/min、恒温 30°C 的水浴摇床中驯化培养 5 d。5 d 后取 10 mL 培养液移接至新鲜选择性液体培养

基中。如此反复 7 个周期后, 倒平板反复进行划线分离。重复 5 个周期后分离纯化出单一菌株。

1.2.2 水中 Ch 的测定: 以环己烷作为萃取剂对水中 Ch 进行萃取。采用日本岛津公司气相色谱仪(GC-14C)对水中 Ch 进行定量测定(FID 检测器)。色谱条件: 毛细管色谱柱(SE-54), 长度 30 m, 内径 0.33 mm。柱温 260°C, 进样口 280°C, 检测器 300°C。

1.2.3 Ch 降解菌的生长曲线和降解曲线测定: 间隔一段时间取培养液, 采用 721 可见分光光度计在 600 nm 波长下测定吸光度, 绘制吸光度与时间关系曲线即得生长曲线。

在 250 mL 容量瓶中加入固定浓度的无机盐培养基和一定量的 Ch 的丙酮溶液, 在相同条件下培养, 间隔一定时间, 测定培养液中剩余的 Ch 浓度, 绘制剩余 Ch 浓度与时间关系曲线, 即得降解曲线。

1.2.4 菌种的鉴定: 从形态学、生理生化和微生物分子生物学 3 个方面对该菌进行鉴定。利用扫描电子显微镜观察菌体的形态及大小。菌种鉴定采用 16S rDNA 基因序列分析, 对该菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增的引物采用 8f: 5'-AGAGTTTGATCM TGGC-3'和 1542r: 5'-AAAGGAGGTGATCCA-3'。PCR 反应条件为: 95°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min<sup>[12]</sup>。得到的 PCR 扩增产物经过纯化后用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。测序委托南京大学完成。将测序结果在 NCBI 上与已知 16S rDNA 序列进行同源性比较, 在 16S rDNA 序列分析的基础上, 采用 MEGA 程序构建系统发育树。为了对菌株的种属进行准确的鉴定, 进一步分析该菌种的生理生化特性, 通过以上手段对菌种鉴定到种。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种鉴定

经过筛选分离, 得到一株能以 Ch 为唯一碳源生长的细菌, 命名为 SQ-1。生理生化检测表明, 该菌革兰氏染色反应呈阴性, 乳糖、葡萄糖发酵产酸、苯丙氨酸脱羧试验、硝酸盐还原和过氧化氢酶试验呈阳性; 吲哚试验、硫化氢试验、柠檬酸盐试验、MR 和 V.P. 试验以及尿素酶试验呈阴性。在扫描电子显微镜下, 菌体呈短杆状, 无芽孢, 大小:  $0.85 \mu\text{m} \times (1.0 \sim 4.0) \mu\text{m}$ , 菌体常以一定角度成对或成串排列

(图 1)。在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上,菌落小,圆形,边缘整齐,直径约 1 mm;菌落呈淡红色,正反面均匀一致;表面湿润光滑,凸起;质地均匀,有光泽,无水溶性色素(图 2)。

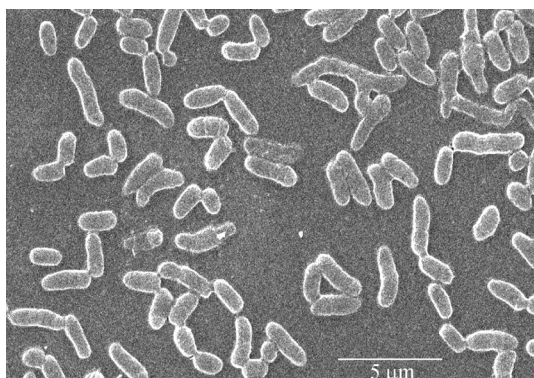


图 1 扫描电子显微镜下菌株 SQ-1 的形态  
Fig. 1 The morphous of strain SQ-1 obtained by SEM

对菌株SQ-1 的 16S rDNA进行PCR扩增,经过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测获得约 1.5 kb大小的产物。扩增产物回收后测序,得到 16S rDNA的序列为 1448 bp。将获得的菌株SQ-1 的 16S rDNA序列在 NCBI上用Blast进行核苷酸同源性比较, SQ-1 菌株与木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)的同源性为 99%。将最相似的序列下载后,以 *Achromobacter ruhlandii*和*Achromobacter piechaudii*两菌株为外群并用MEGA软件和MP法<sup>[13]</sup>构建SQ-1 菌株的系统发育树(图 3)。从发育树可见, SQ-1 菌株与木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)位于同一个分支上。

结合 SQ-1 菌的培养特征、细胞形态和生理生化



图 2 菌株 SQ-1 的菌落特征  
Fig. 2 The colony characteristic of strain SQ-1

实验结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>和相关文献[15–17],最终可确定SQ-1 菌株为木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)。

## 2.2 Ch 降解菌的生长曲线及降解曲线

将经过纯化的菌株SQ-1 制备成菌悬液(微生物浓度为  $10^7$  个/mL)接种到选择性液体培养基后,选择性液体培养基由无色透明逐渐变为浑浊后又逐渐变成乳白色,说明培养基中有大量的微生物生长。图 4 是菌株SQ-1 的生长曲线和降解曲线。由图 4 可知, SQ-1 菌在培养基体系中具有较长的适应期,经 60 h,降解菌进入对数生长期,同时在这一时期Ch 浓度也大幅下降, 100 h后微生物的增量趋于缓慢,此时培养体系中 80%以上的Ch已经被微生物降解,这一降解率明显高于B Marius等人<sup>[18]</sup>报道的白腐真菌对Ch的降解效率(小于 30%)。

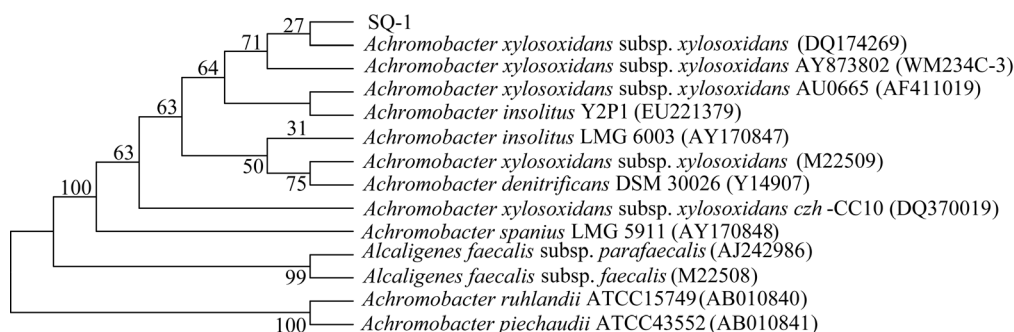


图 3 SQ-1 菌株系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of strain SQ-1

注:分支点的数字为聚类置信度(%);括号中的序号为 GenBank 数据库中的登录号。

Note: The data at branchpoint in Fig. 3 are cluster analysis confidence(%). The serial numbers in bracket are accession number in GenBank database.

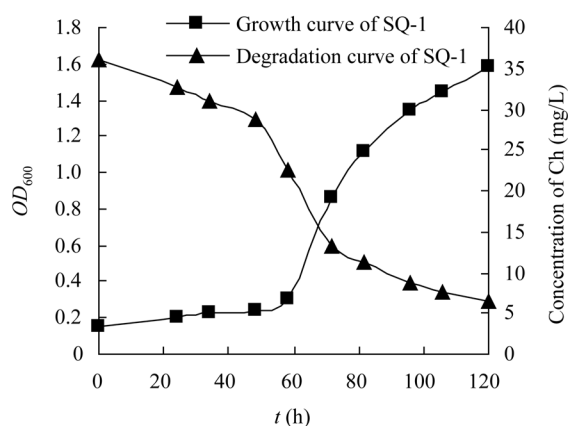


图4 菌株 SQ-1 的生长曲线和降解曲线

Fig. 4 Growth curve and characteristics of Ch degradation by strain SQ-1

### 2.3 Ch 初始浓度对降解效率的影响

Ch 的初始浓度对降解效率的影响十分明显, 见图 5。当 Ch 浓度大于 50 mg/L 时, 随着 Ch 初始浓度的增加, 去除率明显下降。当 Ch 浓度升至 130 mg/L 时, 去除率仅有 10% 左右, 说明高浓度的 Ch 对菌株 SQ-1 具有较强的抑制作用。从图 5 还可看出, 当 Ch 浓度在 10 mg/L~40 mg/L 范围时, 去除率变化不大, 均在 75% 以上, 说明菌株 SQ-1 比较适合在这一浓度范围内生长。

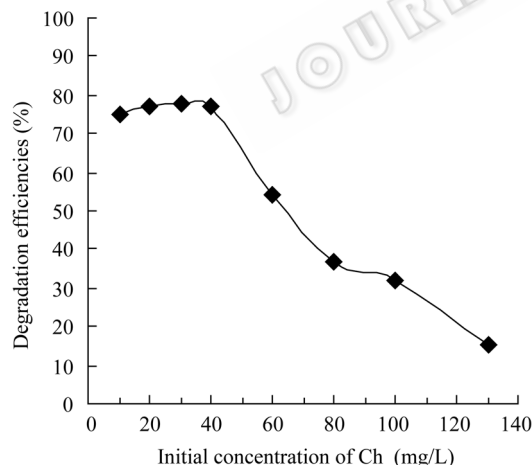


图5 Ch 初始浓度对降解效率的影响

Fig. 5 Effect of initial concentration of Ch solutions on degradation efficiencies

### 2.4 投菌量对 Ch 降解效率的影响

投菌量对 Ch 降解效率的影响见图 6。从图 6 可见, 投菌量增大, 去除率随之提高, 当投菌量达到 16%(V/V) 时, 去除率可达 87.8%, 继续增加投菌量,

去除率则有所下降, 说明过多的投菌量可导致细菌之间发生竞争性抑制作用, 这与有关研究结果相一致<sup>[5]</sup>。由于在投菌量为 10% 时, Ch 的 5 d 去除率仍可达 78.68%, 为避免投菌量过多造成浪费, 也为了充分发挥微生物的繁殖潜力, 故本研究在下述实验中, 投菌量均取 10%(V/V)。

### 2.5 pH 对 Ch 降解效率的影响

在 Ch 溶液初始浓度为 40 mg/L、接种量为 10%(V/V)、温度为 30°C 条件下, pH 对 Ch 降解效率的影响(接种 5 d)见图 7。从图 7 可见, 当 pH 在 7.0~8.0 之间时, 菌株 SQ-1 对 Ch 的降解效率可高达 70% 以上。而 pH 在 4.0~6.0 的酸性条件和 pH 在 9.0~10.0 的碱性条件下, SQ-1 对 Ch 的降解效率均明显下降, 并且酸性或者碱性越强降解效率越低, 可见, 酸性和碱性条件均不利于菌株 SQ-1 对 Ch 的降解。说明中性和弱碱性的 pH 条件是该菌的最适生长条件(如 pH 在 7.0~7.5 范围)。

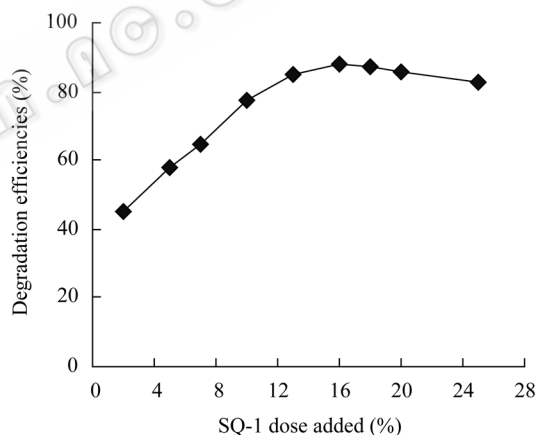


图6 投菌量对 Ch 的降解效率的影响

Fig. 6 Effect of SQ-1 dosage on degradation efficiencies

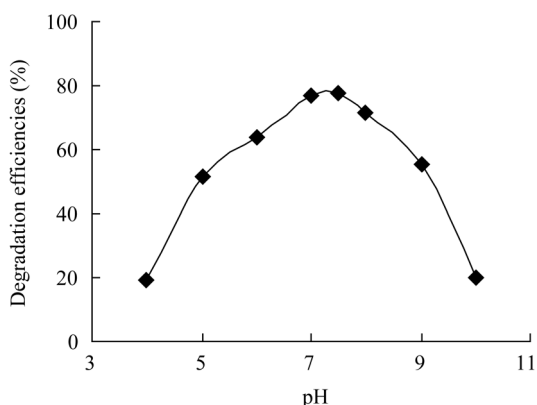


图7 pH 对 Ch 降解效率的影响

Fig. 7 Effect of pH on degradation efficiencies

### 3 结论

1) 从焦化污泥中分离纯化一株菌株 SQ-1 能以 Ch 为唯一碳源和能源生长, 通过对培养特征和细胞形态进行观察, 根据染色反应和生理生化结果以及对 16S rDNA 基因序列进行 Blast 分析, 又通过 MEGA 程序构建系统发育树, 最终确定 SQ-1 为木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)。

2) SQ-1 菌株对多环芳烃 Ch 具有良好的降解特性, 该菌在 Ch 浓度为 40 mg/L, 接种量 10%(V/V)、pH 7.0~7.5、温度 30°C 条件下, 接种 5 d 后对 Ch 的降解效率可达 80%以上。

### 参 考 文 献

- [1] 陈春云, 岳珂, 陈振明, 等. 微生物降解多环芳烃的研究进展. 微生物学杂志, 2007, 27(6): 100-103.
- [2] 安社娟, 陈家堃, 陈学敏. 多环芳烃致癌的分子毒理学研究进展. 国外医学: 卫生学分册, 2005, 32(1): 10-13.
- [3] HM Zhang, A Kallimanis, AI Koukkou, et al. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(1): 124-131.
- [4] C Novotny, K Svobodova, P Erbanova, et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36(10): 1545-1551.
- [5] 唐玉斌, 毛莉, 吕锡武, 等. 一株蒽降解菌的分离鉴定及其降解特性研究. 环境科学与技术, 2007, 30(9): 11-13.
- [6] 陈芳艳, 唐玉斌, 毛莉, 等. 一株茄镰孢菌对菲的降解特性研究. 江苏科技大学学报(自然科学版), 2008, 22(3): 72-76.
- [7] YC Wu, YM Luo, DX Zou, et al. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. *Biodegradation*, 2008, 19(2): 247-257.
- [8] S Krivobok, S Kuony, C Meyer, et al. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol*, 2003, 185(13): 3828-3841.
- [9] 盛下放, 何琳燕, 胡凌飞. 苯并[a]芘降解菌的分离筛选及其降解条件的研究. 环境科学学报, 2005, 25(6): 791-795.
- [10] 陈晓鹏, 易筱筠, 陶雪琴, 等. 石油污染土壤中芘高效降解菌群的筛选及降解特性研究. 环境工程学报, 2008, 2(3): 413-417.
- [11] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2001, pp.84-109.
- [12] CH Liu, X Chen, TT Liu, et al. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(2): 459-466.
- [13] 常青, 周开亚. 分子进化研究中系统发生树的重建. 生物多样性, 1999, 6(1): 55-62.
- [14] 布坎南 RE, 吉布斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984, p.359, 360, 382.
- [15] 李慧, 陈冠熊, 张颖, 等. 高效石油烃降解菌的分离鉴定及降解特性. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(10): 1664-1669.
- [16] 李杰, 张启英, 陈梅, 等. 三株木糖氧化无色杆菌的培养和鉴定. 淮南医药, 1997, 15(3): 20.
- [17] 武凤霞, 范丙全, 刘建玲. 木糖氧化无色杆菌反硝化亚种细菌的分离鉴定及其菲降解特性研究. 植物营养与肥科学报, 2007, 13(4): 725-729.
- [18] B Marius, E Dana, T Jan, et al. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere*, 2008, 73(9): 1518-1523.

### 栏目介绍

### 生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度, 深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果, 交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室, 以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。