

# 一株联苯降解菌的特性及鉴定\*

孙 艳 钱世钧\*\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要:** 从华北油田污染土壤中筛选出一株能够以联苯为唯一碳源和能源生长的菌株。该菌生长的最适联苯浓度为 0.2% ~ 0.4%, 在联苯浓度为 0.1% 的培养基中培养 36 h 后降解率达 99.8%。该菌还可以降解苯甲酸钠、邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚和多氯联苯 Aroclor1221、Aroclor1242 等芳香族化合物。通过 16S rDNA 基因序列分析鉴定该菌为嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinovorans*)。

**关键词:** 联苯, 嗜吡啉红球菌, 生物降解

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0252-2654 (2004) 06-0023-04

## Characterization and Identification of a Biphenyl Degrading Strain\*

SUN Yan QIAN Shi-Jun\*\*

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract:** R04, a Gram-positive bacterium, which can use biphenyl as the sole carbon source, was isolated from soil contaminated with oil in northern China. The bacterium has high biphenyl degradation efficiency and also can degrade polychlorinated biphenyl congeners, Aroclor1221 and Aroclor 1242. The bacterium was identified as *Rhodococcus pyridinovorans* by the method of 16S rDNA gene sequencing (accession No. AY072745).

**Key words:** Biphenyl, *Rhodococcus pyridinovorans*, Biodegradation

联苯是煤焦油、原油和天然气的天然组分, 它是许多工业和民用化学材料的原料。联苯通过原油、煤炭和石油的燃烧以及民用和工业加热系统的废气排放进入环境<sup>[1]</sup>。联苯的卤代衍生物尤其是多氯联苯作为工业原料和除草剂的主要组分在世界范围内广泛生产, 大量的氯代联苯在应用早期就泄漏到环境中, 造成环境的长期污染。联苯是可疑致突变剂, 而多氯联苯是确定的致癌剂、致畸剂和致突变剂<sup>[2]</sup>。

联苯及其衍生物的生物降解研究始于 70 年代。早期研究的联苯降解菌株主要是革兰氏阴性菌, 如 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Comamonas* 和 *Burkholderia*<sup>[3]</sup>, 只有很少的革兰氏阳性菌被报道。1998 年 Wagner-Dobler 等将不同土壤和淤泥的全部微生物群在联苯中培养, 试图发现新的微生物类型。6 个月, 最普遍存在的菌是革兰氏阳性菌红球菌属<sup>[4]</sup>。目前, 已有的红球菌属联苯降解菌主要有 *Rhodococcus globulus* P6<sup>[5]</sup>, *Rhodococcus erythropolis* TA421<sup>[6]</sup>, *Rhodococcus* sp. strain RHA1<sup>[7]</sup> 和 *Rhodococcus* sp. M5<sup>[8]</sup>。

本文筛选到一株高效降解联苯及其衍生物的细菌, 经鉴定为嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinovorans*); 并对其降解联苯及其它芳香族化合物的性能进行了研究。

\* 国家“863”计划资助项目 (No. 2002AA601170)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA601170)

\*\* 联系人 Tel: 86-10-62651598, E-mail: qiansj@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2003-12-29, 修回日期: 2004-02-06

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源:** 中国科学院微生物研究所刘志培先生采自华北油田的土样, 经石油富集培养得到。

**1.1.2 基础盐培养基 (g/L):**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.93 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.87 g,  $\text{MgSO}_4$  0.3 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g,  $\text{NaCl}$  2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g, 微量盐溶液 2 mL。固体培养基中加入 1.6 g 琼脂。微量盐溶液 (mg/L):  $\text{MoO}_3$  4 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  28 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2 mg,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4 mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  4 mg。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌种筛选:** 0.01 g 联苯溶于 200  $\mu\text{L}$  丙酮, 用涂棒涂在基础盐固体培养基表面, 将经石油富集培养的菌液稀释后涂布上述固体培养基上, 30℃ 培养一周后, 有少量菌落形成。挑取一些单菌落在上述固体培养基上划线, 培养 3 d 后将长起来的单菌落分别接种于含联苯 0.05% 的基础盐液体培养基中, 30℃ 200 r/min 培养 3~6 d, 在培养过程中, 观察到培养基颜色变黄, 过一段时间后黄色消失, 并且悬浮的联苯颗粒最终消失。选择变黄最快的菌液在固体培养基上划线分离 3 次。得到一株以联苯为唯一碳源和能源的菌。

**1.2.2 培养液中联苯浓度的测定:** 培养液中加入等体积乙酸乙酯萃取, 将有机相浓缩后用分光光度计测定  $OD_{280}$ , 根据标准曲线计算出联苯含量。标准曲线按如下作出:

0.5 mg/mL 联苯/乙酸乙酯母液, 稀释 10 倍、6.7 倍、5 倍、4 倍后得到浓度分别为 0.05、0.075、0.10、0.125 mg/mL, 分别测定  $OD_{280}$ , 作出标准曲线。

**1.2.3 底物范围试验:** 以 2 mmol/L 和 5 mmol/L 的苯甲酸钠、萘、苯胺、邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚、丁香醛; 0.3 mg/L 和 0.6 mg/L 的多氯联苯 Aroclor1221、Aroclor1242 和 Aroclor1254 替代联苯作为唯一碳源和能源, 接菌后 30℃ 200 r/min 培养 7 d, 测定菌液光密度。

**1.2.4 菌种鉴定:** 用 16S rDNA 序列分析方法进行初步鉴定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种分离

从华北油田土壤样品中分离到一株可以在以联苯为唯一碳源和能源的选择固体平板上良好生长并且最终使联苯晶体消失的细菌, 经过划线纯化后得到单菌落。接种到以联苯为唯一碳源和能源的液体培养基中, 在培养 24 h 左右菌液变黄, 再继续培养, 黄色在几小时之内消失, 并且悬浮联苯也逐渐消失。

该菌种被命名为 R04, 菌体呈浅粉色, 在培养的不同时间具有明显的球、杆变化的现象, 革兰氏染色为阳性。

### 2.2 菌种 R04 对联苯的降解

将 R04 接种到联苯含量为 0.1% 的基础盐培养基中, 30℃ 振荡培养, 每隔 12 h 测定的生物量和降解率结果如图 1。从图中可以看出降解率和生物量的曲线是非常相似的。但菌体生长处于延迟期时, 降解速率较慢; 进入对数期, 降解速率增加; 进入稳定期

(36 h) 生物量最大, 联苯基本降解完, 降解率达 99.8%。说明 R04 具有很好的联苯降解能力。

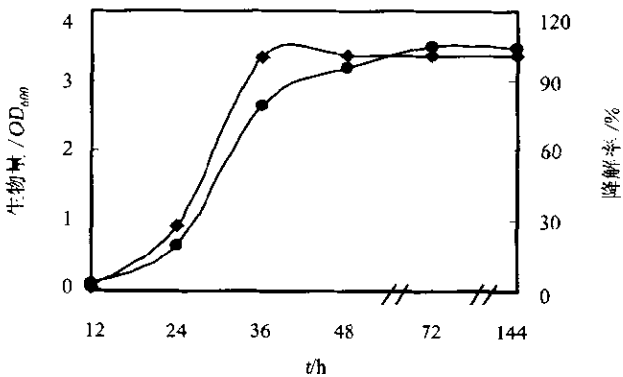


图 1 生物量和降解率的时间曲线

2.3 菌种 R04 在不同联苯浓度培养基中的生长情况

50 mL 液体培养基加入浓度分别为 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.5% 的联苯, 30℃ 200 r/min 培养 5 d, 用脱脂棉过滤菌液后测定 OD<sub>600</sub>。图 2 是 R04 在不同联苯浓度培养基中的生长情况。从图中可以看出, R04 的最适联苯生长浓度为 0.3%, 在联苯浓度高达 1.5% 的培养基中也可以生长。说明该菌对联苯有很强的耐受能力。

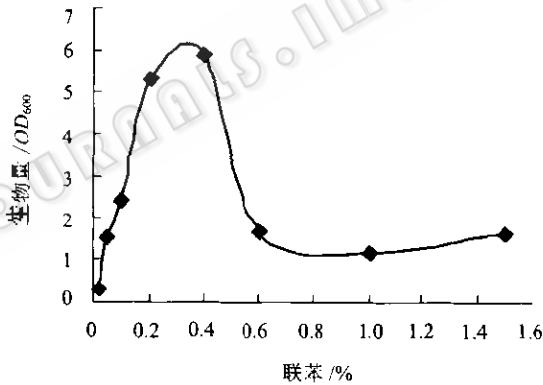


图 2 菌种 R04 在不同联苯浓度培养基中的生情况

2.4 菌种 R04 以不同芳香族化合物为唯一碳源和能源的生长情况

R04 在不同底物中培养后测定生长情况的结果如表 1 和表 2。该菌除了能在联苯培养基中生长外还可以在苯甲酸钠、邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚和多氯联苯 Aroclor1221、Aroclor1242 中生长。说明该菌有广泛的底物适应性。

表 1 R04 在联苯类似物中的生长情况

底物 (mmol/L)	生物量 (OD <sub>600</sub> )		
	0	2	5
对照**	0.188	-	-
联苯*	-	0.775	1.461
苯甲酸	-	0.752	1.122

续表 1

萘*	-	0.113	0.112
苯胺	-	0.123	0.146
邻苯二酚	-	0.471	1.004
间苯二酚	-	0.573	1.302
对苯二酚	-	0.847	1.364
丁香醛*	-	0.141	0.224

表 2 R04 在联苯衍生物中的生长情况\*

底物 (mg/L)	生物量 ( $OD_{600}$ )		
	0	0.3	0.6
对照**	0.188		
Aroclor1221	-	0.519	0.572
Aroclor1242	-	0.326	0.324
Aroclor1254	-	0.149	0.157

\* 联苯、萘、丁香醛为固体颗粒悬浮在培养基中，测定吸光度时用脱脂棉过滤后测定；其余用菌液直接测定，\*\* 对照，在不加任何底物的基础盐培养基中培养

2.5 菌种鉴定

将菌种 R04 转接到牛肉汁液体培养基培养 12 h 后收集菌体，提取总 DNA。以此为模板，利用细菌 16S rDNA 的通用引物进行 PCR 扩增，得到长度约为 1.5 kb 的片段，将其连接于 pUCm-T 载体，转化到受体菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中，测序，得到该菌 16S rDNA 的基因序列 593bp，GenBank 登录号为 AY072745，2002。与已收录的嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinovorans*，登录号 AF173005，2001) 有 100% 的同源性，因此该菌鉴定为红球菌属的 *Rhodococcus pyridinovorans*。

本研究首次发现嗜吡啉红球菌能够降解联苯、多氯联苯及其它芳香族化合物。该菌不仅具有广泛的底物范围而且对于联苯有较高的降解效率，它对 0.1% 的联苯 36 h 的降解率可达 99.8%；并且可以在联苯浓度高达 1.5% 的培养基中能够正常生长，这是以往没有报道的。该菌的发现为革蓝氏阳性菌降解联苯及多氯联苯提供了一个新的材料。

致谢 中国科学院微生物研究刘志培博士为本研究提供筛选土样，微生物资源研究中心东秀珠研究员在菌种鉴定中给予热情指导，蹇文英同学在操作上给予大力帮助，特此致谢。

参考文献

[1] Moody J D, Doerge D R, Freeman J P, *et al.* Applied Microbiol Biotechnol, 2002, **58**: 364 ~ 369.  
[2] Ambrose A M, Booth A N, DeEds F, *et al.* Food Res, 1960, **25**: 328 ~ 336.  
[3] Abramowicz D A. Crit Rev Biotechnol, 1990, **10**: 241 ~ 251.  
[4] Wagner D I, Bennisar A, Vancanneyt M, *et al.* Applied and Enviromental Microbiology, 1998, **64** (8): 3014 ~ 3022.  
[5] Asturias J A, Timmis K N. Journal of Bacteriology, 1993, **175** (15): 4631 ~ 4641.  
[6] Chung S Y, Maeda M, Song E, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 1994, **58**: 2111 ~ 2113.  
[7] Masui E, Yamada A, Healy J M, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61** (6): 2079 ~ 2085.  
[8] Pelouquin L, Greer C W. Gene, 1993, **125**: 35 ~ 40.