应用生态学报 2006年11月 第17卷 第11期
CHINESE JOURNAL OF APPLIED ECOLOGY, Nov. 2006, 17(11): 2117 ~ 2120

一株菲降解细菌的分离鉴定及其特性*

祝儒刚[1] 钟 鸣[1**] 周启星[2] 刘海宁[1] 李玉双[1]
([1] 沈阳农业大学辽宁省农业生物技术重点实验室, 沈阳 110161; [2] 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016)

【摘要】 通过选择性富集培养,从沈抚灌区石油污染土壤中分离到1株菲降解细菌.试验证明该菌株能以菲为唯一碳源和能源生长.经形态学、生理生化鉴定和16S rRNA基因序列比对分析,确定该菌株属于不动杆菌属,命名为 *Acinetobacter* sp. L2. 系统发育进化分析发现,L2菌株与 *Acinetobacter* sp. DG880[AY258108]亲源关系最近.L2菌株培养7 d后对菲的降解率达96.3%.邻苯二酚2,3-双加氧酶活力测定表明,L2菌株可能含有菲降解基因.

关键词 菲 16SrRNA Acinetobacter 生物降解 邻苯二酚2,3-双加氧酶
文章编号 1001-9332(2006)11-2117-04 **中图分类号** X172 **文献标识码** A

Isolation and identification of a phenanthrene-degrading bacterial strain. ZHU Rugang[1], ZHONG Ming[1], ZHOU Qixing[2], LIU Haining[1], LI Yushuang[1] ([1]*Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang* 110161, *China*; [2]*Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang* 110016, *China*). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2006, **17**(11): 2117 ~ 2120.

Through selective enriched culture, a phenanthrene-degrading bacterial strain was isolated from the oil-contaminated soil in Shenfu irrigation area of Shenyang, Northeast China. The morphological and physiological-biochemical identification, 16S rDNA sequence analysis, and phylogenetic study showed that this strain was belonged to genus Acinetobacter and named as *Acinetobacter* sp. L2, and closest to *Acinetobacter* sp. DG880[AY258108]. It could use phenanthrene as the sole carbon source. After 7 days culture, the degradation rate of phenanthrene was 96.3%. According to the activity of catechol 2,3-dioxygenase, the strain probably had phenanthrene-degrading genes.

Key words Phenanthrene, 16SrRNA, Acinetobacter, Biodegradation, Catechol, 2,3-dioxygenase.

1 引 言

多环芳烃(PAHs)是一类重要的环境污染物,具有极强的致癌毒性,已被美国等国家列为优先污染物,治理与监测此类化合物对保证人类健康和环境清洁具有重要意义[25].近年来,随着我国国民经济和社会的发展,尤其是石油、橡胶和化工等工业的迅速发展,多环芳烃(PAHs)等有机污染日趋严重.土壤和沉积物中PAHs污染来源日益广泛,包括油类来源(如石化产品、橡胶、塑料、润滑油、防锈油等),以及高温燃烧来源和大气颗粒物的干湿沉降输入等.目前,PAHs污染土壤的修复技术主要有化学淋洗、物化分离和生物吸收及降解四类.由于生物修复技术具有操作简单、技术可靠、费用低廉等诸多优势,成为当前的研究热点.大多数种属的微生物对石油中烷烃、苯、甲苯等组分具有较强的分解能力,但对高脂溶性、难挥发、具致畸、致癌及致突变作用的PAHs的降解情况则不甚理想[3,11,21].菲由3个苯环连接而成,它不仅在污染环境中的含量高,对人的呼吸道和皮肤有毒害作用,而且有着与致癌多环芳烃类似的区域结,有一个"湾"区和一个"K"区,这两个结构与多环芳烃的致癌性关系密切[16].因其独特的化学结构,菲成为PAHs研究中的模式化合物.本研究从石油污染区域筛选能以菲为唯一碳源生长的降解细菌,并进行菲降解能力测定和菌种鉴定.

2 材料与方法

2.1 菲降解菌的分离

采集沈抚灌区石油污染土壤,在30 ℃好氧条件下,利用以菲为唯一碳源的MS液体培养基(每升液体培养基中含有 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g, KH_2PO_4 0.4 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.02 g, NH_4NO_3 1 g, Na_2HPO_4 0.6 g)进行菲降解细菌的驯化富集培养.采用平板划线法[14]分离获得长势较好的纯菌株.

2.2 生长曲线测定

用浊度法测定L2菌株的生长曲线[15].将L2菌株接种

* 国家"863"计划项目(2004AA649060)和中国科学院陆地生态过程重点实验室开放课题资助项目.
** 通讯联系人. E-mail: zhming@syau.edu.cn
2005-11-03收稿, 2006-08-24接受.

于液体LB（胰蛋白胨1%，NaCl 1%，酵母提取物0.5%）培养基，每隔2 h分别取接菌和不接菌培养基测定其OD_{600}值，做L2菌株生长曲线.

2.3 菲降解能力测定

2.3.1 菌悬液的制备 在无菌条件下，将L2菌株接种于LB液体培养基中，28 ℃下150 r·min^{-1}振荡培养48 h，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.

2.3.2 降解实验 在事先准备好的MS液体培养基中加入菲，使质量浓度达到100 mg·L^{-1}，调好pH值后分装入小三角瓶，每瓶7 ml，121 ℃下灭菌30 min. 反应时，对照组不接菌；样品组加入配制好的菌悬液后混匀，使细胞密度为1×10^8个·ml^{-1}，于28 ℃温度下150 r·min^{-1}振荡培养[28].

培养过程中每天取样1次，分对照组和样品组，3次重复，分别用环已烷振荡萃取3次，萃取液经定容后进行高效液相色谱（LC-1100型安捷伦液相色谱仪）分析. 分析流动相为78%色谱纯甲醇水溶液，流速为1.0 ml·min^{-1}，分离柱为C18反相色谱柱，柱温25 ℃，进样量5.0 μl，检测波长254 nm[14].

2.4 菌种鉴定

2.4.1 染色、形态观察及鉴定 将已充分活化的L2菌株接种到LB液体培养基中，28 ℃培养18 h. 进行革兰氏染色[15]后在光学显微镜下观察细胞形态、菌体大小. 将活化菌种在LB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. 芽孢染色采用孔雀绿法[15]，根据《常见细菌系统鉴定手册》进行鉴定[1].

2.4.2 16S rDNA序列分析法鉴定 以CTAB/NaCl法提取细菌总DNA[7]. 16S rRNA片段扩增及测序为：以细菌总DNA为模板，扩增引物为16S rRNA的通用引物P_1：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′和P_2：5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3′. 反应体系25 μl，含有1×buffer，200 μmol·L^{-1} dNTP混合物，1.5 mmol·L^{-1}的$MgCl_2$，0.6 μmol·L^{-1}引物，25 ng模板DNA，1.5 U Taq酶. 扩增条件：95 ℃预变性5 min，94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，29个循环，最后于72 ℃保存10 min. 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测，并用宝生物工程（大连）公司的DNA凝胶回收试剂盒，回收目的条带. 测序由宝生物（大连）技术有限公司完成.

2.4.3 系统发育分析 将测序结果用BLAST软件与GenBank中16S rRNA基因序列进行同源性比较. 由GenBank中得到相关菌株的序列，与本工作所测得序列一起输入ClustalX1.8程序进行DNA同源序列排列，经核查后，序列输入Phylip 3.6软件包，以简约法构建进化树并进行系统发育分析[5,6].

2.5 邻苯二酚2,3双加氧酶活力的测定

2.5.1 粗酶液的制备 将L2菌种接入以菲为唯一碳源的MS培养基中，于28 ℃振荡培养14 h后离心，收集菌体，用磷酸缓冲液重悬后冰浴中超声破碎，12 000 r·min^{-1}、4 ℃冷冻离心30 min，取上清液（粗酶液）.

2.5.2 酶活力测定 采用分光光度法，测定体系总体积3 ml. 分别向玻璃比色杯中加入2.4 ml缓冲液，0.4 ml的20 μmol·L^{-1}的邻苯二酚溶液，以及0.2 ml的粗酶液. 混匀后，37 ℃水浴反应，记录反应初始时375 nm处的吸光值，反应30 min后，测定反应液在该波长的光吸收增加值. 酶活力单位（U）定义为：在标准测定条件下，每分钟内OD值变化0.001为1个酶活力单位（U）.

3 结果与分析

3.1 菲降解细菌分离、生长曲线及菲降解能力测定

以菲为唯一碳源定向富集，逐级驯化，共筛选到10株优势生长菌，其中L2菌株生长迅速、外形较大，选做供试菌株. 从L2菌株生长曲线可以看出（图1），L2菌株在培养8 h开始进入对数生长期，菌数成几何级数增长，至18 h进入生长平衡期. 接种后的第1天L2菌株对菲的降解较慢（图2），第2~4天降解速度增加较快，略有波动，以后降解速度逐渐趋于缓慢，到第7天L2菌株对菲的降解率达到96.3%.

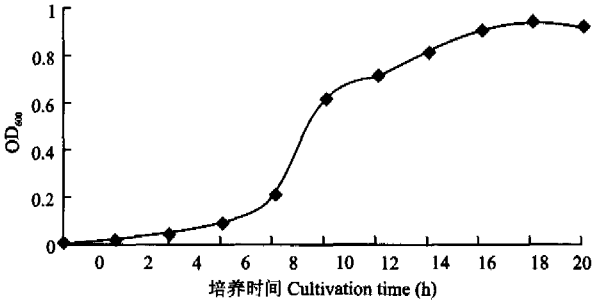

图1 菲降解菌L2的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of phenanthrene-degrading strain L2.

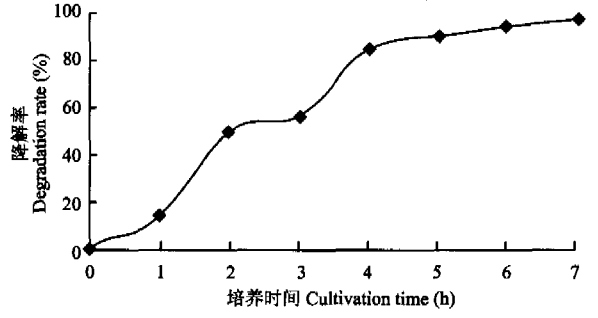

图2 L2菌株对菲的降解率变化

Fig. 2 Changes in degrading rate of phenanthrene by strain L2.

3.2 菌株鉴定结果

3.2.1 染色、形态学及理化性质 L2菌株在以菲为唯一碳源的固体培养基上生长，呈圆形乳黄色菌落，较光滑，边缘有锯齿（图3）. 显微镜下观察为杆状，静止期呈球形，较大，不运动，无芽孢，好氧，不嗜盐，最适温度25~37 ℃. G^-，无荧光色素，接触酶阳性，

丙氨酸脱氢酶阳性,能够利用葡萄糖产酸,色氨酸脱氢酶阴性,尿酶阴性,M. R 阴性,能够液化明胶,不能水解淀粉,不能分解纤维素,不能还原硝酸盐,不产 H_2S.

图 3　L2 菌株单菌落形态
Fig. 3 Shape of individual bacterial colony of strain L2.

3.2.2 分离菌株 16SrRNA 基因的 PCR 扩增和序列分析　PCR 扩增和测序结果表明,以 L2 菌株总 DNA 为模板,用 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增,得到 1 条约 1.5 kb 的片段(图 4). 扩增片段经回收、测序明确其大小为 1 480 bp.

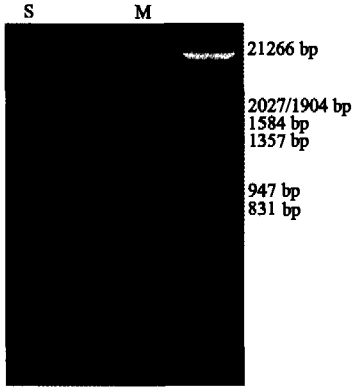

图 4　16S rDNA PCR 扩增结果
Fig. 4 Result of 16S rDNA PCR amplification.
M:DNA 标准分子量 Marker DNA standard molecular marker (*Lamda* DNA/*Hind*Ⅲ + *Eco*R Ⅰ);S:样品 Sample.

将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的序列进行比较发现,L2 菌株 16S rRNA 序列与不动杆菌属的 *Acinetobacter* sp. ANT9054[AY167273]、*A. lwoffii*[AY176770]、*A. lwoffii*[X81665]、*A.* sp. DG880[AY258108]、*A. lwoffii* A382[AF188302]、*A.* sp. ATCC 9957[Z93442]及 *A. lwoffii* ATCC 17925[Z93441]的 16S rRNA 序列相似性都高达 99%,与 *A.* sp. An9[AJ551148]、*A.* sp. HJ2(AY237406)、*A. lwoffii* IE(AY277551)、*A.* sp. Wuba16[AF336348]、*A.* sp. Wuba25[AF336350]及 *A.* sp. LUH4547[AJ301674]的 16S rRNA 序列相似性为 98%[22].

基于 16S rRNA 序列的 L2 菌株与不动杆菌各种菌株之间的系统发育树可知(图 5),L2 菌株与 *Acinetobacter* sp. DG880[AY258108]具有较高的同源性,遗传距离也较近[2,10,17,18].

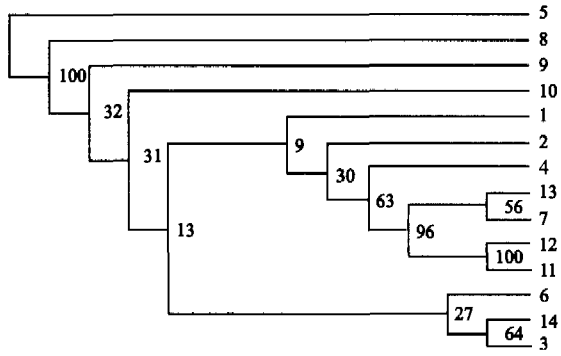

图 5　基于 16S rDNA 序列的 L2 菌株与不动杆菌菌株系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of strain L2 and strains of Acinetobacter based on 16S rDNA sequence.
1)*A. lwoffii* A382[AF188302]; 2)*A.* sp. HJ2(AY237406); 3)*A.* sp. DG880[AY258108]; 4)*A. lwoffii*[X81665]; 5)*A. lwoffii*[AY176770]; 6)*A.* sp. ANT9054[AY167273]; 7)*A.* sp. An9[AJ551148]; 8)*A.* sp. ATCC 9957[Z93442]; 9)*A. lwoffii* ATCC 17925[Z93441]; 10)*A. lwoffii* IE(AY277551); 11)*A.* sp. Wuba16[AF336348]; 12)*A.* sp. Wuba25[AF336350]; 13)*A.* sp. LUH4547[AJ301674]); 14)*A.* sp. L2.

3.3　邻苯二酚 2,3 双加氧酶活力

将 L2 菌株接种到 pH 7.2 的不加菲的及菲浓度分别为 50、100、150 mg · L^{-1} 的培养基中,14 h 后测定酶活力(表 1),菲含量不同的培养基中收集菌体测得的酶活力均高于对照组,且在 0 ~ 150 mg · L^{-1} 范围内,菲浓度与酶活力之间存在剂量-效应关系,菲浓度越高酶活力越大.

表 1　不同菲浓度下邻苯二酚 2,3-双加氧酶活力
Table 1 Activity of catechol 2,3-dioxygenase under different phenanthrene concentrations

	浓度 Concentration(mg · L^{-1})			
	CK	50	100	150
酶活性 Enzyme activity(U)	0.7 ±0.02d	2.2 ±0.15c	5.8 ±0.10b	6.4 ±0.20a

不同字母表示 0.05 水平上差异显著 Values followed by different letters in the same row meant significant difference at 0.05 level.

4　讨　论

许多种 PAHs 降解菌已经从石油污染土壤中得到分离,例如假单胞菌 FAP10[23]、黄杆菌 FCN1 和 FCN2[26]、鞘氨醇单胞菌[12]、动胶杆菌[20]、黄孢原毛平革菌[4]和曲霉菌[8]等. 本研究分离得到的 L2 菌株能在以菲为唯一碳源的培养基上生长且生长迅速,具有较高的菲降解能力.

邻苯二酚 2,3-双加氧酶是催化芳香族化合物开环裂解的关键酶,能催化邻苯二酚的间位代谢途

径,生成2-羟基粘康酸半醛(2-HMS)[27]. 已有多种产邻苯二酚2,3-双加氧酶的细菌被报道,如红球菌[19]、伯克霍尔德氏菌[24]、假单胞菌[13]等. 本研究发现L2菌株具有邻苯二酚2,3-双加氧酶活力,与已经报道的细菌相比略偏低. 降解PAHs的基因大多以操纵子的形式存在于降解细菌的质粒上,共同作用完成对某一PAHs的降解[9]. L2菌株含有能降解邻苯二酚的酶基因,故可能含有降解菲的一系列基因,这有待于进一步深入研究.

参考文献

1 Buchanan BE, Bergey NE. 1994. Manual of Common Determinative Bacteriology. 9th Ed. London: Williams & Wilkins Company. 597 ~635

2 Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, *et al*. 2003. Seven novel species of Acinetobacter isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**: 953 ~963

3 Cerniglia CE. 1992. Biodegratation of polycyclic aromatic hydrocarbon: A review. *Biodegratation*, **3**: 351 ~368

4 Chen J-H (陈建海), Li H-R (李慧蓉). 2000. Biodegradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Jiangsu Inst Petrochem Technol* (江苏石油化工学院学报), **9**(3): 177 ~180 (in Chinese)

5 Chen S-Y (陈双雅), Dong X-Z (东秀珠). 2004. Characterization of a new *Clostridium* species and its hydrogen production. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **44**(4): 411 ~417 (in Chinese)

6 Chen W-X (陈文新). 1998. Bacterial phylogeny. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **38**(3): 24 (in Chinese)

7 Chen X-Z (陈秀珠), Hu H-J (胡海菁), Jia S-F (贾士芳), *et al*. 2000. Construction of genomic library from *L. lactis* A12 and isolation entire nisin biosynthesis gene cluster. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **40**(5): 465 ~469 (in Chinese)

8 Clemente AR, Durrant LR. 2004. Biodegradation of PAHs in soil by two deuteromycete fungi. *Soil Sediment Contam*, **13**(2): 162 ~163

9 Cui Y-X (崔玉霞), Jin H-J (金洪钧). 2001. Advance in molecular genetics for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with microorganism. *Tech Equip Environ Pollut Control* (环境污染治理技术与设备), **2**(6): 16 ~23 (in Chinese)

10 Freiberg C, Fellay R, Bairoch A, *et al*. 2003. Molecular basis of symbiosis between rhizobium and legumes. *Nature*, **378**: 394 ~401

11 Harayama S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr Opin Biotechnol*, **8**: 268 ~273

12 Hynes RK, Farrell RE, Germida JJ. 2004. Plant-Assisted degradation of phenanthrene as assessed by solid-phase microextraction (SPME). *Int J Phytoremed*, **6**(3):253 ~268

13 Kukor JK, Olsen RH. 1996. Catechol 2,3-Dioxygenases functional in oxygen-limited (Hypoxic) environments. *Appl Environ Microbiol*, **9**(5): 1728 ~1740

14 Lei P (雷 萍), Nie M-Q (聂麦茜), Wen X-M (温晓玫), *et al*. 2004. Study to degradation characters of preponderant flavobacterials strains in a mixture of anthracene, phenanthrene and pyrene. *J Xi'an Jiaotong Univ* (西安交通大学学报), **38**(6): 657 ~660 (in Chinese)

15 Li Q-Z (李庆忠), Zhang Z-Z (张忠智), Wang H-J (王洪君). 2002. Screening identification and characteristic of a strain of facultative anaerobe metabolizing diosel. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **29**(3): 28 ~33 (in Chinese)

16 Ma Y-F (马迎飞), Liu X-L (刘训理), Shao Z-Z (邵宗泽). 2005. Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and analysis of their degrading-enzyme gene. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), **11**(2): 218 ~221 (in Chinese)

17 Pang Z-T (庞在堂), Yang H-W (杨怀文), Yang X-F (杨秀芬), *et al*. 2004. Identification of a strain *Xenorhabdas* sp. with high antibiotic and insecticidal activity. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **44**(2): 131 ~136 (in Chinese)

18 Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: Expression in Escherichia coli. *J Bacteriol*, **182**(8): 2134 ~2141

19 Shen X-H (沈锡辉), Liu Z-P (刘志培), Wang B-J (王保军), *et al*. 2005. Isolation, identification of phend-degrading *Rhodococcus* sp. strain PNAN5 and characterization of its ring-cleavage dioxygenases. *Acta Sci Circum* (环境科学学报), **24**(3): 482 ~486 (in Chinese)

20 Wang X (王 新), Li P-J (李培军). 2000. Study on *Zoogloca* sp. immobrillzation and its degradation of phenanthrene and pyrene contamination soil. *China Environ Sci* (中国环境科学), **20**(6): 515 ~518 (in Chinese)

21 Wilcke W. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in soil—A review. *J Plant Nutr Soil Sci*, **163**(7): 229 ~248

22 Xia Y (夏 颖), Min H (闵 航). 2003. Identification, cloning and sequencing of GST gene of bacterium degrading poly-aromatic hydrocarbons. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), **43**(6): 691 ~697 (in Chinese)

23 Xu H (徐 虹), Zhang J (章 军), Shao Z-Z (邵宗泽). 2004. Isolation and identification of PAH-degradating strains and their degradation capability. *Mar Environ Sci* (海洋环境科学), **23**(3): 61 ~64 (in Chinese)

24 Xue Y (薛 勇), Zhang C-K (张长铠), Liu T (刘 涛). 2003. Study on the catechol 2,3-dioxygenase production by *Burkhderia cepacia*. *Life Sci Res* (生命科学研究), **7**(2): 156 ~161 (in Chinese)

25 Yang F-Z (杨发忠), Yan Y (颜 阳), Zhang Z-Z (张泽志). 2005. Research advance of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Yunnan Chem Technol* (云南化工), **32**(2): 44 ~48 (in Chinese)

26 Zhang J (张 杰), Liu Y-S (刘永生), Feng J-X (冯家勋), *et al*. 2003. Isolation and identification of PAHs-degrading strain ZL5 and its degradative plasmid. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), **9**(4): 433 ~435 (in Chinese)

27 Zhang J (张 杰), Liu Y-S (刘永生), Zhang Z-Z (张忠泽), *et al*. 2003. Cloning, location and overexpression of catechol 2,3-dioxygenase gene. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), **9**(5): 542 ~545 (in Chinese)

28 Zhu R-G (祝儒刚), Li Y-S (李玉双), Zhong M (钟 鸣), *et al*. 2006. Degradation rate of phenanthrene-degrading strain L2 and its cultural condition. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), **34**(3): 407 ~408 (in Chinese)

作者简介 祝儒刚,男,1980年生,硕士. 主要从事污染土壤的生物修复研究, 发表文章2篇. E-mail: zrg_luck@163.com

责任编辑 肖 红