

一株菲降解细菌的分离及其特性

仇磊,袁红莉*

(中国农业大学生物学院 农业部农业微生物资源及其应用重点实验室, 北京 100094)

摘要:利用平板熏蒸和双氧加合酶活性测定的方法,从大庆油田水体中筛选出 1 株对菲具有降解活性的细菌,Phx1. 在 LB 培养基中,能将浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菲在 24h 内完全降解. 与无机盐培养基相比, LB 和牛肉膏蛋白胨培养基能促进此菌对菲的降解,尤其能促进对中间产物的进一步转化. 经质粒消除证明,Phx1 具有 2 个质粒,且较大的 1 个对菲的降解是必须的. 通过对其形态、生理生化特性、16S rDNA 序列分析,鉴定 Phx1 为土壤杆菌属细菌,其 16S rDNA 序列与 *Agrobacterium tumefaciens* UP-3、*Agrobacterium alberti magni* 的相似性最高,分别达到 97.8% 和 96.6%,但对向日葵的致瘤实验为阴性.

关键词:菲;多环芳烃;生物降解;双氧加合酶

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2005)01-0159-05

Screening for Phenanthrene Degrading Bacteria and Its Characteristics

ZHANG Lei, YUAN Hong-li*

(Key laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: One bacterial strain, designated as Phx1, was isolated from Daqing oil-field with the method of sublimator-plate and determination of dioxygenase activity. Phx1 can degrade phenanthrene ($100\mu\text{g}/\text{mL}$, in LB media) completely in 24 h. Compared to MSM, LB and broth media can accelerate the phenanthrene degradation, promote the degradation of intermediates especially. With the method of plasmid elimination, it was proved that the genes encoding for degradation of phenanthrene locate on the larger one of the two plasmids. According to morphological and physio-biochemical characteristics, Phx1 was identified as *Agrobacterium* sp. and was probably a new species of the genus *Agrobacterium* due to its 16S rDNA sequence which has the similarities of 97.8% and 96.6% to *Agrobacterium tumefaciens* UP-3 and *Agrobacterium alberti magni* respectively.

Key words: phenanthrene; PAHs; biodegradation; dioxygenase

多环芳烃(PAHs)普遍存在于环境中,并在环境中呈不断累积的趋势,其化合物多属强致癌物,因此其生物降解受到广泛关注. 目前主要集中在降解基因^[1,2]和降解途径^[3,4]等研究方面. PAHs 污染多是由石油工业引起,尤其是近些年石油泄漏事件频发,使其生物修复显得尤为重要. 本实验通过对采自大庆油田的油井及受石油污染的水样进行富集培养,分离获得了一株可以菲做唯一碳源的高效降解细菌 Phx1,并对其降解菲的特性及其系统发育进行了初步研究,从而为治理 PAHs 污染奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的样品均采自大庆油田,分别在油井及受石油污染的水体等 4 个不同的地点采样.

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(NR), LB 培养基. 无机盐培养基(MS)采用袁红莉等^[5]所报道,但略有改动:
 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaNO_3 0.5 g, CaCl_2 0.01 g, FeSO_4 痕量, 0.02% 酵母粉, pH 7.2 ~ 7.4, 蒸馏水 1 000 mL.

其中以 MS+1% 稠油做为富集培养基,以 NR、MS、LB 为降解培养基,以 NR 做为菌种斜面保存培养基.

1.3 PAHs 高效降解细菌的富集分离

在无机盐培养基中加入 1% 的原油样品,在摇床中 120 r/min, 37℃ 培养, 7d 后,取 1 mL 富集培养物,接种于相同的新鲜的培养基,相同条件下培养 7d,最后将适当培养物稀释,涂平板. 本实验采用平板升华法^[6]进行选择分离. 具体步骤如下:将稀释到 10^{-4} 和 10^{-5} 的样品涂布到无机盐固体培养基,然后再把接种后的平板倒扣底部平铺有固体菲的 500 mL 的烧杯上,并用封口膜将接口处封闭,整体

收稿日期:2004-04-07;修订日期:2004-08-12

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999045709)

作者简介:仇磊(1978~),男,汉族,博士,研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人

放到沙浴中加热,并在平板上方放上冰,使菲升华后遇平板冷却而附着其上,大约 5 min 后取下平板,置入 37 °C 温箱培养 3 d,挑取能产生透明圈的单菌落纯化。

1.4 分离菌株双氧加合酶活性的鉴定^[7]

将 10 mg 吡啶溶于 1 mL 75 % 的酒精中,然后把此溶液加入到液体 LB 培养基中,使其终浓度为 0.2 %,接种,120 r/min 37 °C 培养 3 d,观察现象。

1.5 菲降解效率的测定

菲首先溶于甲醇,配成 25 mg/mL 的浓缩液,然后加入装有 25 mL 的不同培养基(NR、MS、LB)的 150 mL 三角瓶中,使其终浓度达到 100 µg/mL。接种(以含有菲而不接种的 MS 培养基为对照),120 r/min 37 °C 培养 9 d。在培养过程中定时取样,加入等体积的甲醇,然后摇床振荡 10 min(充分溶解菲),离心、取上清液用 Waters 液相色谱测定,柱子为 Supelcosil LC₁₈-DB,流动相为水-乙醇(体积比 1:4),流速:0.8 mL/min,进样量为 20 µL,检测器为紫外,波长 254 nm^[8]。

1.6 菌体蛋白含量测定

以接种后的无菲 MS 培养基为对照,采用 Barnsley(1983)^[9]的方法处理样品,用考马斯亮蓝染色法^[10],以 BSA 为标准测定不同时间的菌体蛋白含量。

1.7 分离菌株的鉴定

(1) 菌株的形态、生理生化特性鉴定。依照文献^[11]对分离的菌株进行了多种生理生化特性实验。

(2) 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增、测序。本实验采用的正向引物为 BSF8/20:5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'; 反向引物 BSRI541/20:5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3'; PCR 的反应条件 95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,此步骤共进行 30 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min^[12]。产物进行电泳检测,纯化测序工作由上海生工技术有限公司完成。

(3) 16S rDNA 序列数据处理和系统发育树构建。将 16S rDNA 的测序结果输入 GenBank 中进行序列比对,将结果中同源性最高的 19 个全序列 16S rDNA 输入到 clustalx1.8 中以输出比对格式的文件,后将此生成的文件输入到 Phylip 3.6a3 软件包和 Treeview 1.6.6 中,采用邻接法生成系统发育树。

1.8 降解基因的定位

(1) 胶内裂解法^[13,14]进行大质粒快速检测。细菌在 LB 培养基中培养过夜,取 200 µL 培养液离心

收集菌体,用 Tris-蔗糖洗一次,然后再收集菌体,加入 70 µL 裂解液后轻轻吹打,冰浴保持,在 0.7 % 的琼脂糖凝胶上样各 20 µL,先以 15 V 电泳 20 ~ 30 min,待菌体在胶孔内全部裂解,再加大电压至 50 ~ 70 V,电泳 8 ~ 12 h。

(2) SDS 法进行质粒消除^[15]。在装有 5 mL 的试管中分别加入 10 % 的 SDS,使其终浓度为 0.02 %、0.04 % 等,至 0.10 %,37 °C 培养 24 h,取菌体能生长的 SDS 浓度最大的试管,将其进行梯度稀释,接种平板,最后利用平板升华法来观察是否能产生透明圈的现象,不产生透明圈的可能为质粒消除的突变株。

2 结果与分析

2.1 Phx1 的分离

经过 2 次富集、驯化,最后在附着菲的培养基上培养,由于可以降解菲的细菌能形成明显的透明圈,因此透明圈的大小及形成速度可表明菌株对菲降解能力。最后经过比较确定了一株具有高降解活性的细菌 Phx1,可在 36 h 内产生透明圈。如图 1。



图 1 Phx1 在菲培养基上形成的透明圈

Fig.1 Clearing zones around colonies of Phx1 on the LB plate with phenanthrene

2.2 双氧加合酶活性的鉴定

双氧加合酶几乎出现在所有能够降解多环芳烃的细菌中^[7,16,17],该酶是催化多环芳烃开环的关键酶。此酶能把吡啶转化为羟基吡啶,而此物质在空气中氧化,最终形成蓝靛,使培养基变成蓝色。这种转化过程已经成为双氧加合酶活性鉴定的重要特征反应^[7]。本实验将 Phx1 与多株能产生透明圈的细菌一起进行双氧加合酶活性的鉴定,发现这些菌株或多或少都能使含有吡啶的培养基变成蓝色,但是 Phx1 使 LB 培养基变蓝的速率最快(大约 48 h),而 Phx1 的透明圈的直径恰恰在这些菌株中是最大的,生长速率也是最快的,这说明 Phx1 降解菲的能力

最强.

2.3 Phx1 对菲降解的效率

利用 HPLC 对菲的降解效率进行定量分析,结果表明 Phx1 在 NR、LB、MS 3 种培养基中降解效果差别不明显,均表现出较高的菲降解能力,在 24h 内将 100μg/ mL 的菲几乎降解殆尽,与以往报道^[3,17,18]相比,此菌降解菲的能力明显要强.进一步研究 Phx1 在 3 种培养基中 24h 内对菲的降解情况.由图 2 可以看出 3 种培养基中均是前 6h 菲的变化较小,而在 8h~22h 之间菲的量迅速减少,但是 MS M 中仍有少量菲残余.此外由图 3 也可以看出,Phx1 在 MS M 中的生长情况(蛋白含量)与 NR、LB 相比也存在着明显差异.这说明 NR 和 LB 培养基对菌体的生长以及菲的降解是有益的.

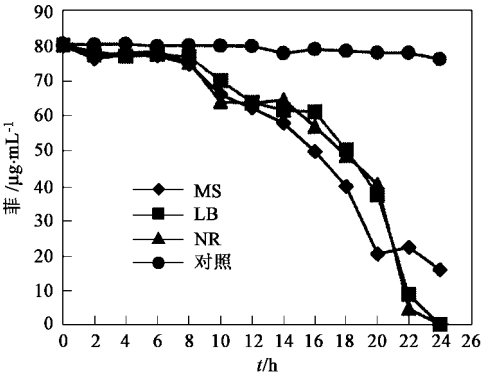


图 2 24h 内不同培养基对菲降解效率的影响

Fig.2 Effect of different media on the efficiency of phenanthrene-degrading by Phx1 in 24h

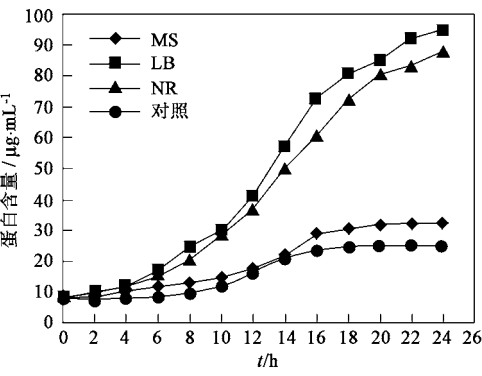
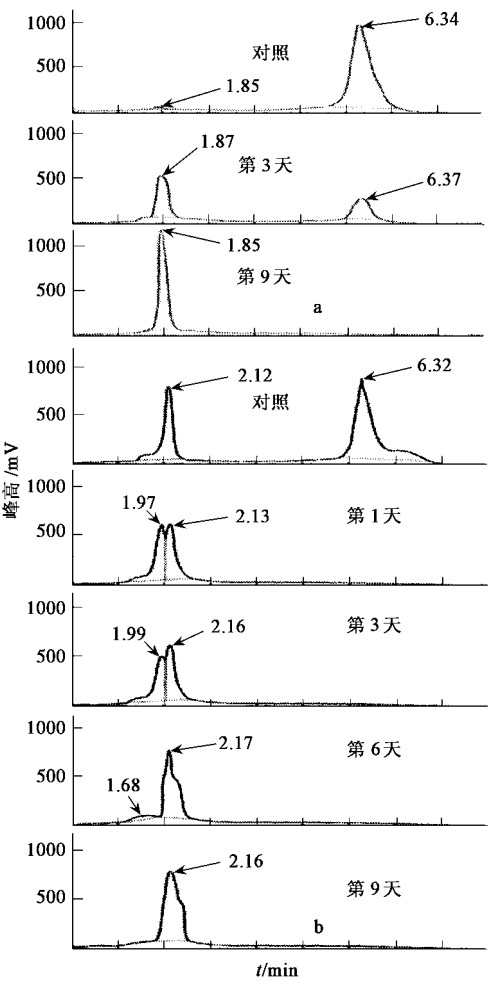


图 3 24h 内不同培养基对菌体生长的影响

Fig.3 Effect of different media on Phx1 growth in 24h

通过 HPLC 检测发现,虽然 Phx1 在 MS 培养基中对菲的降解效率与在 NR、LB 中相比差别不大,但是中间产物积累的量明显要多.菲在 MS 中的降解情况如图 4(a),图中结果表明在对照中保留时

间 t 为 6.34 的峰为菲在未降解前的峰谱,在 $t = 1.85$ 的位置的小峰,可能是菲中含有微量的菲的衍生物,经 3d 和 9d 降解后,样品中菲含量逐渐减少,而与此同时 $t = 1.87$ 处的峰值与菲的含量形成了一种此消彼长的关系,由此可以推断 $t = 1.87$ 处的峰为菲在降解过程中所积累的中间产物.菲在 NR 培养基中降解过程中间产物的积累情况,如图 4(b),从图中可以看出,对照中在 $t = 2.12$ 时出现了较高的峰,这可能是 NR 培养基中含有在波长为 254nm 下有特征吸收峰的物质.经 1d 降解,在 $t = 1.97$ 出现了一个峰,很可能就是降解过程中产生的中间产物,但这个峰随着时间的推移逐渐的减少,到第 9 天基本上已经消失了,这说明 NR 培养基对中间产物的转化与 MS 相比有促进作用.而且可以看到菲在 NR 中的降解速率较之在 MS 中要高.



时间/ min

a: MS 培养基 b: NR 培养基

图 4 菲在培养基中降解产物的 HPLC 谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of phenanthrene-degrading behavior by Phx1 in different media

菲在 LB 中的降解效率及其产物积累的情况与在 NR 中相似.说明有机营养物能加速 Phx1 对菲的降解.

2.4 Phx1 的鉴定

2.4.1 Phx1 菌落形态及生理生化特性

Phx1 菌落形态边缘规整,直径约为 1 ~ 3 mm 左右,幼龄菌落成乳白色,表面光滑.该菌体的形态为短杆状,大小为(0.36 ~ 0.54) μm × (1.33 ~ 3.57) μm,革兰氏染色阴性,能运动,类脂颗粒染色、葡萄糖氧化、糖醇发酵、硝酸盐还原、接触酶、氧化酶、明胶液化均为阳性,葡萄糖发酵、3-酮基乳糖反应、2% NaCl 抗性为阴性,石蕊牛奶为胨化,能在 37℃ 下生长.

2.4.2 16S rDNA 序列测序结果分析

将 Phx1 的 16srDNA 测序结果输入 VECTOR NTI 8.0 中,并与 NCBI 相连以 BLAST 软件进行序列同源性比较,发现与 *Agrobacterium tumefaciens* UP-3 和 *A. alberti magni* 的相似性最高分别达到 97.8 %和 96.6 %,结合其生理生化特性可以确定该菌为土壤杆菌属,系统发育地位如图 5.

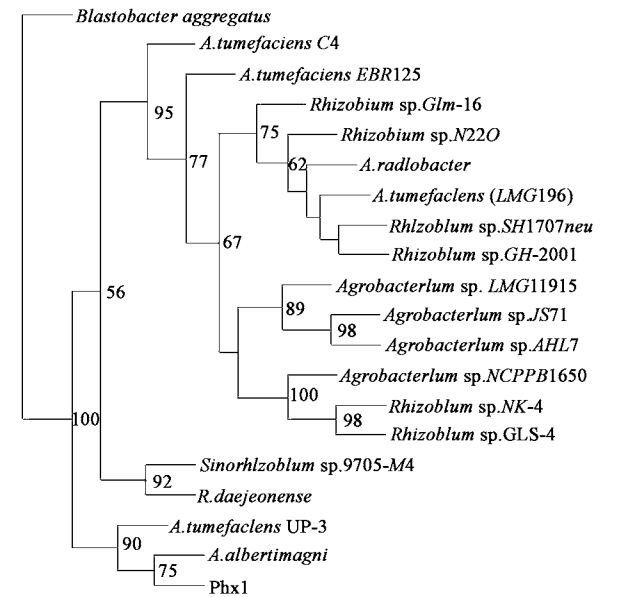


图 5 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of Phx1 and the sequences of relating species
结点处数字为 bootstrap 值

Phx1 的生理生化特性均与土壤杆菌属相符,而 3-酮基乳糖反应为阴性(根癌土壤杆菌特征反应,反应为阳性),同时还做了以根癌土壤杆菌做为对照的

Phx1 诱导向日葵致癌实验,发现 Phx1 不能使向日葵致癌,这初步证明 Phx1 与 *Agrobacterium tumefaciens* 不是一个种,因此 Phx1 可能是土壤杆菌中的新种,有待进一步研究.

2.5 降解基因的定位

一般自然界中编码细菌降解复杂有机物的功能基因大多分布在质粒上.对菌体进行质粒检测,结果发现其有两个较大的质粒.对经质粒消除的 Phx1 突变株(图 6 中泳道 1、2、3),能降解菲的 Phx1 (图 6,泳道 5、6)及一株在转接过程中分出的不能在含菲的培养基上形成透明圈的自然突变株(图 6,泳道 4),进行电泳检测并比较质粒条带,可以初步确定菲的降解基因位于这个大质粒上.

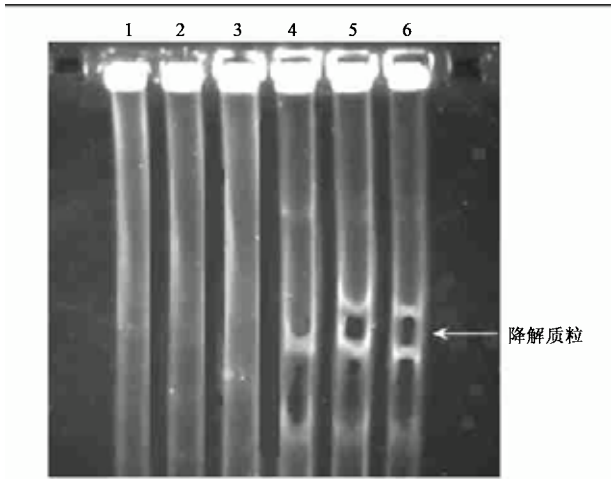


图 6 对 Phx1 几种不同处理后的质粒电泳图谱

Fig. 6 Electrophoresis of Phx1's plasmid by different curing

质粒检测采用胶内裂解的最大优点在于细胞破壁之后的破膜过程是在凝胶中完成的,这样就避免了大质粒受到机械剪切力的破坏,从而能较真实的反映质粒图谱的情况.

3 小结

本实验分离得到的一株具有高效降解活性的菌株 Phx1,经初步鉴定为土壤杆菌,而且很可能是一个新种.该菌体具有很强的双氧加合酶活性.与 MS 相比, LB 和 NR 培养基能促进其对菲的降解,并且明显加速中间产物的进一步转化.

经过质粒消除实验证明该降解基因分布在较大的质粒上.

参考文献:

[1] Mary J Simon, Timothy D Osslund. Sequences of genes encod-

ing naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4[J]. Gene, 1993, **127**:31 ~ 37 .

[2] Yen K M, Gunsalus I C. Plasmid gene organization naphthalene/salicylate oxidation[J]. Pros. Natl. Acad. Sci. US, 1982, **79**:874 ~ 878 .

[3] Guerin W F, Jones G E. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**: 929 ~ 936 .

[4] Samanta S K, Chakraborti A K, Jain R K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **53**: 98 ~ 107 .

[5] 袁红莉, 杨金水, 王占生, 李宝珍, 仇磊, 林壬子. 降解石油微生物菌种的筛选及降解特性[J]. 中国环境科学, 2003, **23** (2):157 ~ 161 .

[6] Jeremy F Alley, Lewis R Brown. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, **66**(1): 439 ~ 442 .

[7] Ensley B D, Ratzkin B J, Osslund T D, Simon M J, Wackett L P, Gibson D T. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo [J]. Science, 1983, **222**: 167 ~ 169 .

[8] 付晓泰, 王振平, 毕丽飞. 用高效液相色谱法预测两油层合采过程中单层的产量分数[J]. 色谱, 2000, **18**(4): 318 ~ 321 .

[9] Barnsley E A. Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate[J]. J Bacteriol, 1983, **154**: 113 ~ 117 .

[10] F. 奥斯伯, R. 布伦特, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 332 ~ 333 .

[11] 东秀珠, 蔡少英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 353 ~ 387 .

[12] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences. Molecular microbial ecology manual[M]. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995 .

[13] Echhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria[J]. Plasmid, 1978, **1**: 584 ~ 588 .

[14] Hynes M F, McGregor N F. Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*[J]. Mol. Microbiol., 1999, **4**: 567 ~ 574 .

[15] Lou Kai, Ban Rui, Zhao Xue-ming. Curing of the *Bacillus subtilis* plasmid using sodium dodecyl sulfate[J]. Transactions of Tianjin University, 2002, **8**(3): 149 ~ 152 .

[16] Kiyohara H, Nagao K, Yano K. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1982, **43**:458 ~ 461 .

[17] Keuth S, Rehm H J. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, **34**:804 ~ 808 .

[18] Weir S C, Dupuis S P, Providenti M A, Lee H, Trevors J T. Nutrient-enhanced survival of phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UGI 4Lr cells in creosote-contaminated soil slurries [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, **43**: 946 ~ 951 .