

兼性厌氧苯胺降解菌的分离鉴定及其特性

曾国驱¹, 任随周^{1,2}, 曹渭¹, 胡锦涛¹, 林璐菁¹, 孙国萍^{1*}

(1. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 从处理印染废水的厌氧折流板反应器 (ABR) 系统中分离、纯化并筛选出 1 株能以苯胺为唯一碳氮源进行代谢的兼性厌氧苯胺降解菌株 AN29。经过形态、生理生化特征试验和 16S rDNA 序列分析结果, 鉴定菌株 AN29 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 其特性为: 降解苯胺的最适温度为 37℃, 降解苯胺合适的起始 pH 值为 6.5~8.0, 可以利用苯胺的最高浓度为 4 000 mg/L, 合适起始浓度为 500~2 000 mg/L。

关键词: 苯胺; 兼性厌氧; 生物降解; 特性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)08-1618-05

Isolation and Characterization of a Facultative Anaerobic Aniline-Degrading Bacterium

ZENG Guo-qu¹, REN Su-zhou^{1,2}, CAO Wei¹, HU Jin-cai¹, LIN Lu-jing¹, SUN Guo-ping¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: An aniline-degrading bacterium (designated strain AN29) was isolated from dyeing wastewater process (anaerobic baffled reactor, ABR) with the capability of utilizing aniline as sole carbon source and nitrogen source. It was identified as *Pseudomonas* sp. based upon the phenotypic properties and a partial analysis of the 16S rDNA. The strain could degrade aniline under the aerobic and anaerobic conditions, the optimal initial pH 6.5~8.0, a temperature of 37℃, and initial aniline concentrations of 500~2 000 mg/L with maximum concentration of 4 000 mg/L respectively.

Key words: aniline; facultative anaerobic; biodegradation; characterization

苯胺被用以制造农药、染料、塑料、药品^[1,2], 除此之外还作为污染物释放到环境中且其进入途径日渐增多, 对环境造成严重的威胁, 引起多个国家的重视并列为优先控制物或危险物^[3,4]。生物降解被认为是水环境苯胺消除最有效的方法^[5], 近年来, 降解苯胺的微生物和以苯胺降解菌为核心的生物处理工艺 2 个方面的研究都取得了进展^[6], 其中苯胺降解菌的分离筛选、代谢途径及其降解基因的研究有不少的报道, 但以好氧菌的研究为主, 苯胺厌氧降解菌或苯胺兼性厌氧降解菌的研究甚少, 而且存在菌体生长缓慢和降解效果与好氧状态下相差甚远的问题^[6~15]。兼性厌氧苯胺降解菌适合应用于不同环境中, 有着苯胺好氧降解菌不可替代的优势, 因此筛选高效兼性厌氧苯胺降解菌是环境污染治理、土壤生物修复的关键之一。本研究从印染废水处理系统中分离出在兼性厌氧条件下有较高降解能力的苯胺降解菌 AN29, 并对其进行鉴定和特性研究, 以期构建降解基因工程菌和实际应用提供帮助。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

分离样品采自处理印染废水的厌氧折流板反应器 (ABR) 小试装置。

1.2 培养基

LB 培养基: 每 L 含酵母抽提物 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 10g, 调 pH 值至 7.0。

MMN 培养基组成按文献 [16] 略作修改 (mg/L): 含 Na₂HPO₄: 1 419.6, KH₂PO₄: 1 360.9, MgSO₄: 98.5, CaCl₂·2H₂O: 5.88, H₃BO₄: 1.16, FeSO₄·7H₂O: 2.78, ZnSO₄·7H₂O: 1.15, MnSO₄·H₂O: 1.69, CuSO₄·5H₂O: 0.38, CoCl₂·6H₂O: 0.24, EDTA: 3.2。

1.3 菌株的富集

取 1 mL 待分离样品置于预先灭菌的 250 mL 的锥形瓶中, 加入 100 mL 苯胺浓度为 250 mg/L 的无机盐培养基, 静置富集培养, 直到培养液由澄清变

收稿日期: 2005-09-09; 修订日期: 2005-11-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2003AA214040); 广东省自然科学基金研究团队项目 (2015017); 广东省科技攻关重大项目 (2004A30404002); 广东省自然科学基金项目 (032319); 广东省科技攻关项目 (2002C31605)

作者简介: 曾国驱 (1966~), 男, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为环境生物技术。

* 通讯联系人, E-mail: ebiotech@163.com

浑浊后转接,逐渐增加苯胺的浓度到 800 mg/L。

1.4 菌株的分离筛选

1.4.1 分离与纯化

将富集培养的菌液稀释成 $10^{-2} \sim 10^{-8}$, 分别接种于含 250 mg/L 苯胺的琼脂无机盐培养基中并倒平板, 密封后置 30 °C 下培养。4d 后从平板中挑取长势良好的单菌落, 作进一步的纯化。

1.4.2 菌株降解苯胺能力的试验

菌种的制备: 将分离纯化的菌株接入装有 100mL 培养液的 250 mL 摇瓶中, 置摇床在 30 °C、150r/m 的条件下培养, 到对数期收获。离心 (20 °C, 15 000 r/m, 5min), 洗涤菌体, 重复 3 次, 降解试验时用 MMN 培养基配成终浓度 D_{600nm} 值为 0.265 3。

分离菌株的苯胺降解: 将菌种接入苯胺含量为 200 mg/L 的 MMN 培养基中, 置 30 °C、150 r/m 的条件下培养 40h, 离心后测定上清剩余苯胺量, 计算去除率。

1.5 菌株的鉴定

分离的菌株进行形态观察和生理生化特性试验, 并参照文献[17, 18] 和 16S rDNA 序列分析进行鉴定。

1.5.1 菌株的菌落形态特征

菌落形态观察: 接种菌液在肉汤培养基平板上划线, 置 30 °C 下培养 24h 后观察菌落形态。

电镜扫描观察: 将菌液接种于肉汤培养基上, 置 30 °C 下培养至对数期时制样, 用电镜观察并拍照。

1.5.2 菌株的生理生化特性特征

分离菌株的生理生化特性试验按参考文献[18] 进行。

1.5.3 菌株的 16S rDNA 序列分析

菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列测定: 取对数生长期新鲜菌液, 离心收集菌体, 按文献[19] 的方法提取基因组 DNA。采用细菌 16S rDNA 通用引物 F27 和 R1522 进行 PCR 扩增菌株的 16S rDNA^[20], PCR 反应产物进行直接测序。

菌株的 16S rDNA 序列分析: 利用 BLAST 将所测得的序列与 GenBank/EMBL/DBJ 数据库中已登录的序列进行同源性比较, 采用 ClustalX 进行比对, 通过邻接 (Neighbour Joining) 法构建系统发育树 (PHYLP, Version 3.5)^[21]。

1.6 分离菌株的特性

1.6.1 环境因子对分离菌株的影响试验

根据环境因子的变化, 分别调节溶解氧、培养温度、初始 pH 值等条件, 试验菌株在苯胺含量约为

300 mg/L 的 MMN 培养基中, 培养 40h 后剩余苯胺量, 计算去除率。

1.6.2 菌株耐受苯胺能力和降解苯胺的合适起始浓度试验

分别配制含有 250 mg/L、500 mg/L、1 000 mg/L、2 000mg/L、3 000 mg/L、4 000mg/L 苯胺的 MMN 培养基, 接入菌株培养 3d, 测量 D_{600nm} 值。

1.7 检测方法

苯胺 pH 值采用标准方法测定^[22]。

2 结果与讨论

2.1 苯胺降解菌的分离筛选

经过富集、分离、纯化, 得到多株苯胺降解菌, 测定 40h 内对 200 mg/L 苯胺的降解率为 69.0% ~ 99.0%, 其中菌株 AN29 的降解能力最强, 故以下以该菌株为试验菌株。

2.2 菌株 AN29 的鉴定

2.2.1 形态特征

菌株 AN29 菌落形态为浅黄色, 圆形, 边缘整齐, 凸状隆起, 粘稠。细胞为革兰氏染色阴性, 呈杆菌, 大小为 (0.6~0.8) $\mu\text{m} \times$ (0.9~1.6) μm , 端生鞭毛 (如图 1 所示)。细胞无芽孢, 不积累 PHB。

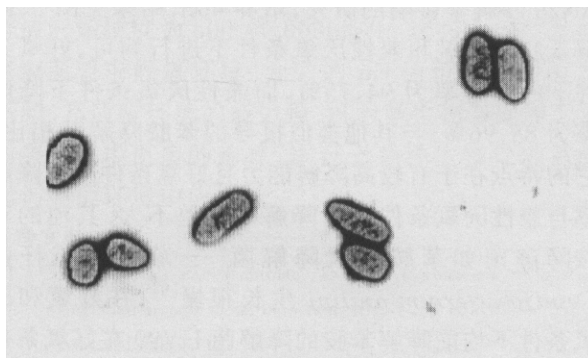


图 1 菌株 AN29 的电镜图 ($\times 6\,000$)

Fig. 1 Electron micrograph of strain AN29 ($\times 6\,000$)

2.2.2 生理生化特征

菌株 AN29 的主要生理生化特征为: 兼性厌氧生长, 接触酶、氧化酶、明胶液化均为阳性, 硝酸盐还原不产气, 不水解淀粉, 4 °C 不能生长, 41 °C 能生长, 能利用葡萄糖、果糖。

2.2.3 16S rDNA 序列分析

菌株 AN29 在 GenBank 中的序列登录号为 DQ104486, 利用 BLAST 将所测得的菌株 AN29 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库序列进行同源性比较, 结果显示, 菌株 AN29 与 *Pseudomonas alcaligenes* isolate M47、*Pseudomonas* sp. K50、*Pseudomonas*

resinovorans strain ATCC 14235^T、*Pseudomonas* sp. PAI-A最为匹配,相似性均为 99%.

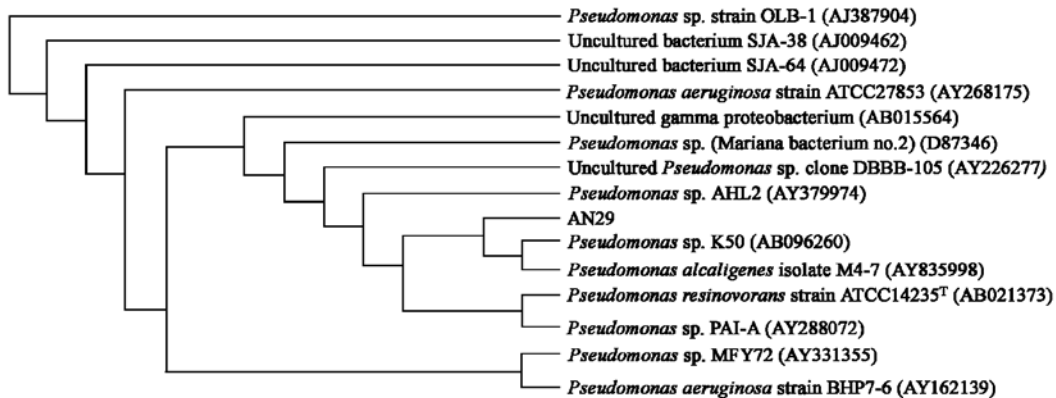


图 2 AN29 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of AN29 with its relating species

根据菌株 AN29 的形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果,初步鉴定该菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) 的细菌.

2.3 菌株 AN29 的特性

通过试验环境因子对降解苯胺的影响,研究苯胺降解菌株 AN29 的特性.

2.3.1 溶解氧对 AN29 菌株降解苯胺的影响

以好氧、兼性厌氧条件下进行溶解氧对菌株 AN29 降解率影响的研究,培养 40h,结果见图 3,降解苯胺在好氧和兼性厌氧条件下进行均可,好氧条件下的降解率为 94.75%,而兼性厌氧条件下降解率为 85.96%. 与其他类似报导的苯胺降解菌相比,它的特点在于有较高降解能力且好氧条件下的降解率与兼性厌氧条件下的降解率相差不大. 其他的苯胺降解菌如苯胺厌氧降解菌——苯胺脱硫杆菌 *Desulfobacterium anilini* 生长很慢^[9]; 在好氧和厌氧条件下均能降解苯胺的降解菌 HY99 在好氧条件下,30 h 内将 93 mg/L 苯胺降解到 0.93 mg/L 以下,但在厌氧的条件下将 93 mg/L 苯胺完全降解需要超过 7d 时间,远远比不上在好氧状态下的降解效果^[10]; 苯胺降解菌食酸丛毛单胞菌 AN3 振荡培养的降解率显著高于静置培养,同样培养 6h,振荡的降解率为 98.3%,而静置的只有 14.9%,需要保证良好的通气(曝气)条件,否则将严重影响处理效果^[11].

2.3.2 温度对 AN29 菌株降解苯胺的影响

在不同温度(20℃、25℃、30℃、37℃、42℃)下,以苯胺为唯一碳氮源 pH 值为 7.0 的培养基摇床培养 40h,取样测定培养液中剩余苯胺的量. 图 4 的结果表明菌株降解苯胺的最佳温度为 37℃,对苯胺的

降解率达到 98.85%,大于 30℃时的 73.95%、25℃时的 30.08%、20℃时的 15.58% 和 42℃时的 10.35%.

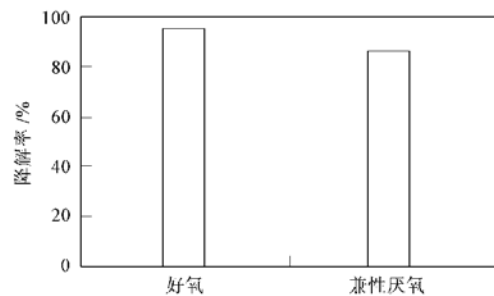


图 3 溶解氧对 AN29 降解苯胺的影响

Fig. 3 Effects of DO on aniline degradation by strain AN29

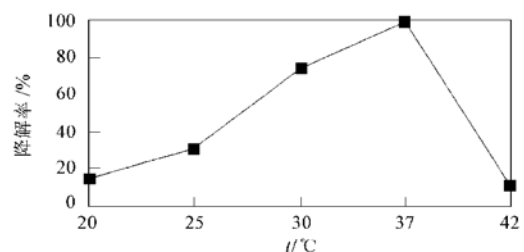


图 4 温度对 AN29 降解苯胺的影响

Fig. 4 Effects of temperature on aniline degradation by strain AN29

2.3.3 培养基初始 pH 值对 AN29 菌株降解苯胺的影响

将菌株接种于不同 pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)的 MMN 培养基中培养 40h. 初始 pH 值对降解率的影响如图 5 所示. 研究发现,菌株降解苯胺的合适 pH 值条件为 6.5~8.0,特别是菌株

AN29 降解苯胺的初始 pH 值适应范围较宽, pH 值在 6.5~ 8.0 条件下均可以保持较高的降解率, 在 pH 值为 9.0 时, 菌株 AN29 的降解能力受抑制程度大, 其降解率仅为 19.78%.

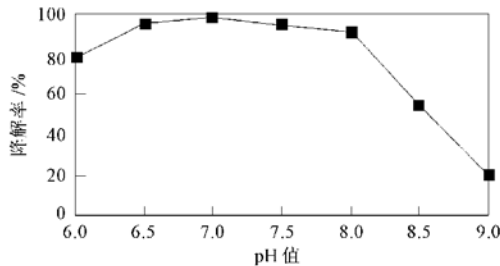


图 5 初始 pH 值对 AN29 降解苯胺的影响

Fig. 5 Effects of pH value on aniline degradation by strain AN29

2.3.4 AN29 菌株的苯胺耐受能力和合适的生长起始浓度

分别配制苯胺梯度浓度的 MMN 培养基, 接入菌液在兼性厌氧条件下培养 3d, 结果见表 1. 在 250~ 4 000mg/L 的苯胺浓度范围内, 菌株 AN29 均能生长, 在 500~ 2 000mg/L 时生长良好, 苯胺浓度再升高, 生长情况开始变差, 当苯胺浓度到 3 000mg/L 和 4 000 mg/L 时, 仅有少量菌体生长. 说明菌株 AN29 生长的可耐受浓度为 4 000 mg/L, 合适的起始浓度为 500~ 2 000mg/L.

表 1 AN29 的苯胺耐受能力

Table 1 Aniline-tolerant ability of strain AN29

苯胺浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$D_{600\text{nm}}$ ¹⁾
250	0.286 4
500	0.434 0
1 000	0.460 4
2 000	0.505 6
3 000	0.123 2
4 000	0.107 1

1) 已减去起始 $D_{600\text{nm}}$ 值

2.3.5 AN29 菌株在最佳条件下生长和降解苯胺的动力学曲线

AN29 菌株以 500 mg/L 苯胺为唯一碳、氮源, 在 150 r/min 37℃ 培养基初始 pH 值为 7.0 的条件下培养, 测定菌体的生长量和培养基中剩余苯胺量. 图 6 的结果表明 AN29 菌株细胞的生长与苯胺的降解同步进行, 菌株在 12~ 24h 时间段菌量得以迅速增长, 菌株对苯胺的降解率随之提高, 到 48h 后菌株接近达到最大的生长量, 降解率也达到 90.21%, 继续培养到 60h, 菌量增加不明显, 降解率

略增, 培养至 72h 达到最大的生长量, 苯胺降解率为 99.41%, 到 84h 部分细胞自溶, 菌量下降.

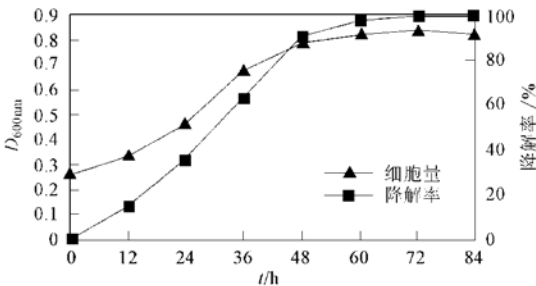


图 6 菌株 AN29 的生长和降解苯胺的动力学曲线

Fig. 6 Growth and degradation curve of strain AN29

3 结论

(1) 通过对分离纯化的苯胺降解菌进行筛选, 得到 1 株降解能力较强的兼性厌氧菌株 AN29, 从形态、生理生化特征和 16S rDNA 的分析, 初步鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 的细菌.

(2) 该菌株能以苯胺为唯一碳氮源进行代谢, 在好氧和兼性厌氧条件下均可降解苯胺, 好氧条件下的降解率略高于兼性厌氧条件下的降解率, 降解苯胺的最适温度为 37℃, 合适的 pH 值条件为 6.5~ 8.0, 可耐受浓度为 4 000mg/L 的苯胺, 降解苯胺的合适起始浓度为 500~ 2 000mg/L. 这和大多数苯胺降解菌要求好氧环境、合适的 pH 值范围较窄有所不同, 其适应环境的能力强, 可为微生物与处理工艺的搭建提供更多的选择, 适合于各种生物处理系统和污染的环境中应用.

参考文献:

[1] Kearney P C, Kaufman D D. Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action [M]. (2nd ed). New York: Marcel Dekker, 1975.

[2] Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants [A]. In: Leisinger T, Hutter R, Cook A M, et al (eds). Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds [M]. London: Academic Press, 1981. 371~ 385.

[3] Fed Regist. Priority Pollutant List (promulgated by the U. S. Environmental Protection Agency under authority of the Clean Water Act of 1977) [S].

[4] 76/464/EEC Directive. Council directive of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the community [S].

[5] Lyons C D, Katz S, Bartha R. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 48(3): 491~ 496.

[6] 曾国驱, 任随周, 许玫英, 等. 微生物降解苯胺的研究现状 [J]. 中国医学生物技术应用杂志, 2003, 4: 74~ 77.

- [7] Liu Z, Yang H, Huang Z, *et al.* Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **58**(5): 679~ 682.
- [8] Emtiazi G, Satarji M, Mazaherion F. The utilization of aniline, chlorinated aniline, and aniline blue as the only source of nitrogen by fungi in water[J]. Water Res., 2001, **35**(5): 1219 ~ 1224.
- [9] Schnell S, Schink B. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl CoA in *Desulfobacterium anilini*[J]. Arch. Microbiol., 1991, **155**(2): 183~ 190.
- [10] Kahng H Y, Kukor J J, Oh K H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, **190**(2): 215~ 221.
- [11] 刘志培, 杨惠芳, 周培瑾. 食酸丛毛单胞菌 AN3 菌株降解苯胺的研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, **5**(2): 185 ~ 189.
- [12] O' Neill F J, Bromley-Challenor K C A, Greenwood R J, *et al.* Bacterial growth on aniline: implications for the biotreatment of industrial wastewater[J]. Water Res., 2000, **34**(18): 4397~ 4409.
- [13] Boon N, Goris J, Vos P D, *et al.* Genetic Diversity among 3-Chloroaniline and Aniline-Degrading Strains of the Comamonadaceae[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, **67**(3): 1107~ 1115.
- [14] Liang Q, Takeo M, Chen M, *et al.* Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in *Delftia tsuruhatensis* AD9[J]. Microbiology, 2005, **151**(10): 3435~ 3446.
- [15] Murakami S, Hayashi T, Maeda T, *et al.* Cloning and functional analysis of aniline dioxygenase gene cluster, from Frateuria species ANA-18, that metabolizes aniline *via* an *ortho*-cleavage pathway of catechol[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2003, **67**(11): 2351~ 2358.
- [16] Boon N, Goris J, Vos P D, *et al.* Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteroni* Strain, I2gfp [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, **66**(7): 2906~ 2913.
- [17] R.E. 布坎南, N.E. 吉本, 等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 626~ 627.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [19] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**(2): 316~ 322.
- [20] Edwards U, Rogall T, Blocker H, *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Research, 1989, **17**(19): 7843~ 7853.
- [21] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c[M]. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.
- [22] 中国标准出版社第二编辑室. 中国环境保护标准汇编-水质分析方法[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001.