

自然土壤中苯酚降解菌的分离和系统发育分析

王云端^{1,2}, 董小军², 王茜², 洪青^{1,2*}, 蒋新¹, 李顺鹏²

(1. 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; 2. 南京农业大学生命科学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:采用富集培养的方法, 从未受苯酚污染的自然土壤中分离得到 5 株能以苯酚为唯一碳源生长的细菌. 根据生理生化特性和系统发育分析对它们进行了初步鉴定, 菌株 PHD-2 为 *Ralstonia* sp., 菌株 PHD-4 为 *Acinetobacter* sp., 菌株 PHD-5 为 *Microbacterium* sp., 菌株 PHD-1 和 PHD-3 均为 *Pseudomonas* sp., 16S rRNA 基因序列的同源性比较和系统发育分析表明自然土壤中的苯酚降解菌具有丰富的多样性.

关键词:自然土壤; 苯酚降解菌; 系统发育分析

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)03-0623-04

Isolation of Phenol-Degrading Bacteria from Natural Soil and Their Phylogenetic Analysis

WANG Yun-duan^{1,2}, DONG Xiao-Jun², WANG Xi², HONG Qing^{1,2}, JIANG Xin¹, LI Shun-peng²

(1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Five bacterial strains capable of utilizing phenol as sole carbon source for growth were isolated from non-contaminated natural soil sample after enrichment in the presence of phenol. They were preliminarily identified according to their phylogenetic analysis and physiological and biochemical characteristics. Strain PHD-2, PHD-4 and PHD-5 belonged to the genera of *Ralstonia*, *Acinetobacter* and *Microbacterium* respectively; strain PHD-1 and PHD-3 were from the genus of *Pseudomonas*. Homology comparing of their 16S rRNA gene sequences and phylogenetic analysis displayed the high biodiversity of phenol-degrading microorganisms in the natural soil.

Key words: natural soil; phenol-degrading microorganisms; phylogenetic analysis

苯酚是染料、农药、医药等行业的重要生产原料和中间体, 是工业废水中的常见污染物之一. 由于它具有较强的生物毒性, 许多国家已将其列入重点污染物名单之中^[1], 并且采取各种措施来消除环境中的苯酚污染. 在这些措施中, 生物修复是一种低成本的环境友好型污染消除方式, 它的关键是获得具有苯酚降解功能的微生物^[2]. 目前国内外已经分离到许多能够降解苯酚的细菌^[3~14], 它们都是从受苯酚污染的环境中采集原位样品, 经过富集培养后分离获得. 这种方法虽然容易获得苯酚降解菌, 但是由于这些环境已经受到苯酚的污染, 环境中的生物多样性和基因多样性已经发生了选择性改变, 并不能反映自然环境中苯酚降解菌的生物多样性. 本研究首次从非污染的自然土壤中分离苯酚降解微生物, 以探索自然土壤中苯酚降解菌的多样性, 以期消除苯酚污染提供菌株资源.

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00. 苯酚无机盐培养基(PMM, g/L): NH₃NO₃ 1.00, KH₂PO₄ 1.50, K₂HPO₄ 0.50, NaCl 0.50, MgSO₄·7H₂O 0.10, pH 7.0~7.2, 苯酚作为碳源, 浓度根据需要添加, 固体培养基加 2.0% 的琼脂.

1.2 细菌的富集和分离

从南京农业大学校园内采集未受苯酚污染的土样, 称取 5.00 g 加到含有 100 mg/L 苯酚的 PMM 培养基中, 并加入 5 粒玻璃珠, 于 30℃, 180 r/min 摇床培养, 每隔 7 d 按 1% 接种量转移至新鲜的 PMM 培养基中, 并逐步提高培养基中的苯酚浓度至 300 mg/L, 最后取培养液进行系列稀释后涂布于苯酚浓度为 300 mg/L 的 PMM 固体培养基平板上, 30℃ 培养 3 d 后挑

收稿日期: 2006-04-29; 修订日期: 2006-06-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400013, 40471073); 江苏省科技厅项目(BG2005322); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放基金项目(055112); 南京农业大学 SRT 项目(0506A10)

作者简介: 王云端(1986~), 女, 主要研究方向为环境微生物学.

* 通讯联系人, E-mail: hongqing@njau.edu.cn

取形态上有差异的单菌落,测定其苯酚降解特性.

1.3 细菌生物量和苯酚浓度的测定

取5 mL培养液于12 000 r/min离心 10 min 后,上清液用于苯酚浓度的测定,方法采用 2-氨基安替比林法^[15].沉淀以等量蒸馏水悬浮后测定 D_{600nm} ,以所测数值表示菌体生长量.

1.4 菌株的鉴定

菌株的生理生化特性鉴定参照文献[16]进行,菌株 16S rRNA 基因的克隆及序列测定参照文献[17]:用 SDS-蛋白酶裂解细胞,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀细胞碎片,再用异丙醇沉淀得菌株的基因组 DNA.以基因组 DNA 作为模板,进行菌株的 16S rRNA 基因扩增;正向引物 5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3',反向引物 5'-TACGGCTACCTTG TTACGACTT-3';50 μ L 体系为:模板 2 μ L, dNTP (25 mmol/L) 4 μ L,引物(1 mmol/L)各 2 μ L, 10 $\times$ Taq 缓冲液 5 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 3.0 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L) 0.6 μ L,超纯水 31.4 μ L. PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min,52 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 3 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.琼脂糖胶电泳检测扩增产物的大小(1.5 kbp 左右)后,将其 TA 克隆后进行测序(由 BIOAISA 公司完成).

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离及生理生化特性

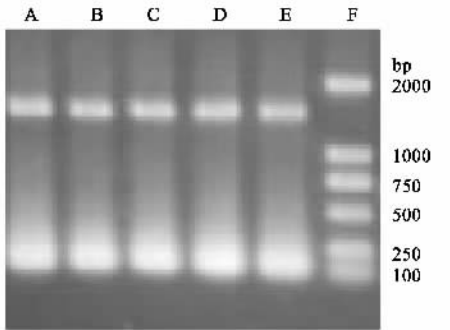
通过富集培养与分离,在 PMM 平板上纯化后得到 5 株细菌,对它们进行了常规的生理生化性鉴定,结果见表 1. 除 PHD-5 为革蓝氏阳性菌外,其余均为革蓝氏阴性菌.PHD-1 和 PHD-3 的常规生理生化特性相同,可能来自相近的生理类群,而其余几株菌的生理生化特性有些差异,可能来自不同的生理群.这还需要通过分子鉴定来进一步研究它们发育地位的差异.

表 1 5 株菌常规生理生化特性

试验项目	PHD-1	PHD-2	PHD-3	PHD-4	PHD-5
革兰氏染色	-	-	-	-	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	+	-
硝酸盐利用	+	+	+	-	+
VP 试验	-	+	-	-	-
MR 试验	-	-	-	-	-
明胶液化	-	-	-	-	+
接触酶	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	-	+
葡萄糖发酵	+	+	+	+	+

2.2 菌株 16S rRNA 基因的克隆和系统发育分析

分别以各菌株的基因组 DNA 为模板,利用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kbp 的产物(图 1).测序后在 GenBank 上登录,序列号分别为:PHD-1(DQ227339), PHD-2(DQ227340), PHD-3(DQ227341), PHD-4(DQ227342), PHD-5(DQ227343), 将这些序列与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行在线 Blast 分析后(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),选取相似性大于 97% 的序列用 ClustalX 1.8.3 软件进行聚类分析后,利用 MEGA 3.0 软件以 NJ 方式生成系统发育进化树(距离计算采用 Kimura 2 模式).从图 2 中可以看出,PHD-1 和 PHD-3 的发育地位相近,都来自假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),而 PHD-2、PHD-4 和 PHD-5 的发育地位相距较远,它们分别来自罗尔斯通菌属(*Ralstonia* sp.),不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)和微杆菌属(*Microbacterium* sp.).



A: 菌株 PHD-1; B: 菌株 PHD-2; C: 菌株 PHD-3; D: 菌株 PHD-4; E: 菌株 PHD-5; F: DL2000 marker

图 1 菌株 16S rRNA 基因的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis map of 16S rRNA gene of phenol-degrading strains

2.3 5 株菌 16S rRNA 基因序列同源性矩阵

利用 Bioedit5.0 软件分析降解菌 16S rRNA 基因序列得出它们的相似性矩阵,从表 2 中可以看出,菌株之间的序列同源性范围为 74.7% ~ 99.5%,其中 PHD-1 和 PHD-3 的序列相似性大于 97%,它们与 PHD-2、PHD-4 和 PHD-5 之间的序列相似性均小于 97%,而且 PHD-2、PHD-4 和 PHD-5 之间的序列相似性也均小于 97%,据此可推测 PHD-1 和 PHD-3 来自于相同的属,而 PHD-2、PHD-4 和 PHD-5 分别来自不同的属.这也显示了本研究自然土壤中苯酚降解菌的多样性.

2.4 菌株对苯酚的降解

分别挑取 LB 平板上活化的单菌落接种到 LB 液体培养基中,于 30 $^{\circ}$ C, 180 r/min 摇床振荡培养至

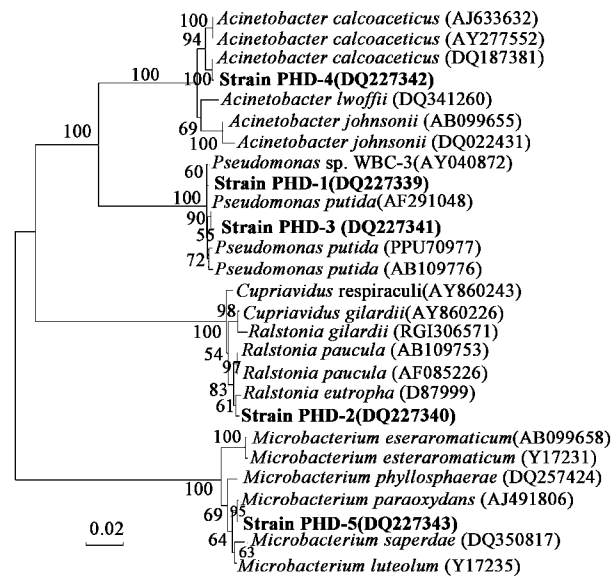


图 2 基于 16S rRNA 基因序列同源性的苯酚降解菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of phenol-degrading strains based on the 16S rRNA gene homology

表 2 降解菌 16S rRNA 基因序列相似性矩阵

Table 2 Similarity matrix of 16S rRNA gene

菌株	PHD-1	PHD-2	PHD-3	PHD-4	PHD-5
PHD-1	100	82.3	99.5	88.4	76.2
PHD-2		100	82.0	81.6	74.7
PHD-3			100	88.3	76.0
PHD-4				100	75.7
PHD-5					100

$D_{600nm} \approx 2.00$ 作为种子液. 将菌液通过离心洗涤后用等体积的无菌水悬浮, 按 1% 的接种量接种到苯酚浓度为 300 mg/L 的 PMM 液体培养基中, 定时取样测定苯酚的含量和菌株的生长量. 由图 3 可见, 虽然每株菌都能以苯酚为唯一碳源生长, 但是它们的延滞期和苯酚降解特性有一定的区别. PHD-4 的延滞期为最短, 只有 12 h, 到第 36 h 能完全降解培养基里的苯酚, 最大生物量 D_{600nm} 为 0.373. PHD-5 的延滞期 36 h, 是 5 株菌中最长的, 但是到第 60 h 也能完全降解培养基里的苯酚, 最大生物量 D_{600nm} 为 0.317. 虽然 PHD-1 和 PHD-3 都属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 但是它们的降解特性有明显区别, 延滞期分别为 15 h 和 24 h, 从开始降解到完全降解 300 mg/L 苯酚所用的时间差异也很大, 分别为 21 h 和 36 h. 不过最大生长量 D_{600nm} 类似, 分别为 0.245 和 0.223. PHD-2 的延滞期为 15 h, 到 54 h 能完全降解培养基里的苯酚, 最大生物量 D_{600nm} 为 0.375.

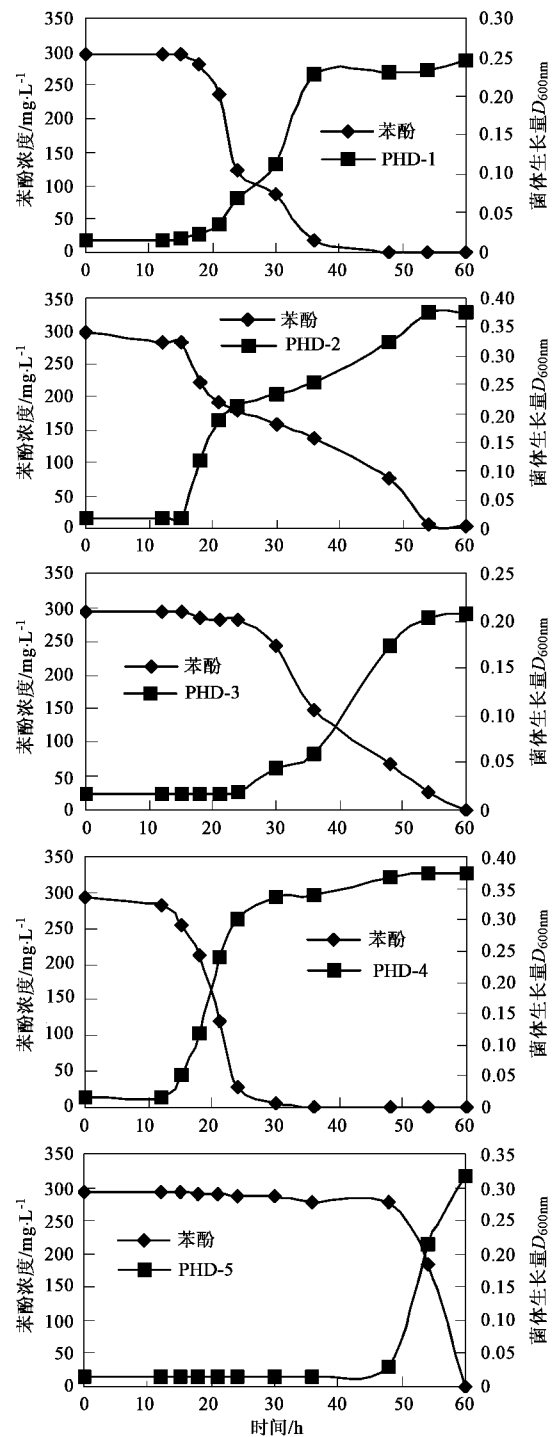


图 3 菌株的生长和苯酚降解之间的关系

Fig.3 Relation between the growth of strains and phenol-degrading

3 结论

- (1) 从未受苯酚污染的自然土壤中分离到 5 株能以苯酚为唯一碳源生长的细菌, 它们的常规生理生化特性和对苯酚的降解特性有一定的差异.
- (2) 5 株菌 16S rRNA 基因序列的同源性比较和系统发育分析表明自然土壤中的苯酚降解菌具有丰

富的多样性. PHD-1 和 PHD-3 的发育地位相近, 都来自假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 而 PHD-2、PHD-4 和 PHD-5 的发育地位相距较远, 它们分别来自罗尔斯通菌属 (*Ralstonia* sp.), 不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 和微杆菌属 (*Microbacterium* sp.).

参考文献:

[1] 朱利中, 徐霞, 胡松, 等. 西湖底泥对水中苯胺、苯酚的吸附性能及机理[J]. 环境科学, 2000, **21**(2): 28 ~ 31.

[2] Chapalmandugu S, Chaudhury G R. Microbial and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates[J]. Crit. Rev. Biotech., 1992, **12**(5 ~ 6): 357 ~ 389.

[3] 高振贤, 马宏, 贾振华, 等. *Ralstonia metallidurans* CH34 苯酚降解特性的研究[J]. 微生物学通报, 2005, **32**(1): 44 ~ 47.

[4] 向述荣, 陈秀蓉, 王亚馥, 等. 苯酚降解菌 phen8 的分离筛选及其 16S rDNA 序列分析[J]. 微生物学杂志, 2002, **22**(6): 19 ~ 21.

[5] 潘利华, 姜绍通, 刘鹏达, 等. 苯酚降解菌的筛选及其降解特性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, **30**(5): 78 ~ 81.

[6] 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株 (*Rhodococcus* sp. strain PNAN5) 的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. 环境科学学报, 2004, **24**(3): 482 ~ 486.

[7] 陈明, 张维, 徐玉泉, 等. 醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 对苯酚的降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2001, **21**(3): 226 ~ 229.

[8] Wang S J, Loh K C. Biotransformation kinetics of *Pseudomonas putida* for cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence

of sodium glutamate[J]. Biodegradation, 2000, **12**: 189 ~ 199.

[9] Thomas S, Sarfaraz S, Mishra L C, *et al.* Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, **18**: 57 ~ 63.

[10] Usama B, Desouky A E H, Hassan M, *et al.* Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinetobacter* [J]. Biotechnology Letters, 2002, **24**: 1295 ~ 1297.

[11] Wael S S, Mohamed K, Mohamed A S, *et al.* Isolation and characterization of phenol catabolizing bacteria from a coking plant [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2003, **67**(9): 2026 ~ 2029.

[12] Chen W M, Chang J S, Wu C H, *et al.* Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis* [J]. Research in Microbiology, 2004, **155**: 672 ~ 680.

[13] Arutchelvan V, Kanakasabai V, Elangovan R, *et al.* Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, **B129**: 216 ~ 222.

[14] Hun B S, Kim K H, Cheng R Y, *et al.* Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low oxygen conditions [J]. Current Microbiology, 2003, **47**: 462 ~ 466.

[15] Folsom B R, Chapman P J, Pritchard P H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: Kinetics and interactions between substrates [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56**(5): 1279 ~ 1285.

[16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 370 ~ 410.

[17] 奥斯特伯, 布伦特, 金斯顿, 等著, 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 39 ~ 40.