

# 一株降解芘的苍白杆菌的分离、鉴定及性能表征

谢文娟<sup>1</sup> 林爱军<sup>1\*</sup> 杨晓进<sup>1</sup> 王凤花<sup>2</sup> SHIM Hojae<sup>3</sup>

(1.北京化工大学 化学工程学院,北京 100029; 2.中国科学院生态环境研究中心 中澳联合土壤环境研究室,北京 100085;  
3.澳门大学 科技学院,澳门)

**摘要:**采用富集培养的方法从北京焦化厂多环芳烃(PAHs)污染土壤中筛选到一株高效降解芘的微生物,命名为PW,分子生物学等手段鉴定此菌株属于苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.)。经一次性大剂量方法对此菌株进行驯化后,考察了摇瓶条件下环境因素对此菌株降解芘效率的影响。结果表明,驯化培养使得菌株5 d内对0.5 mmol/L芘的降解率由62.3%提高到92.7%。此外,该菌株的环境耐受性好,在环境温度为20~40℃下该菌株对芘均具有一定的降解能力,30℃培养时降解效果最好;在pH为5~10的培养基中,PW对芘的降解率均在45%以上;当盐度小于3%时,此菌株对芘降解率在60%以上;同时菌株PW还可耐受一定浓度的重金属。

**关键词:**多环芳烃;降解菌分离;鉴定

**中图分类号:**X172

## 引言

多环芳烃(PAHs)是一类具有“三致”效应的有机污染物,近年来已经成为引起较多关注的污染物之一<sup>[1]</sup>。生物修复是一种治理环境PAHs污染的有效手段<sup>[2]</sup>,其中微生物修复由于具有见效快,成本低,无二次污染等优点,已成为国内外学者研究的重点<sup>[3]</sup>。而利用微生物修复多环芳烃污染的关键因素之一是获得高效降解微生物<sup>[4-5]</sup>。虽然国内外已报道的很多微生物都可降解芘,但是盲目引进微生物治理当地的环境污染还有很多难以克服的问题,例如生物的适应性以及生物入侵的风险等。

北京市由于企业搬迁等原因遗留下大量PAHs污染土壤,为了治理这些污染土壤,有必要以当地微生物类群为研究对象寻找可以有效降解PAHs的微生物。本研究从北京市当地的污染土壤中,利用分离筛选的方法,以高环PAHs的代表物芘为研究对象,得到一株环境耐受性强,降解效率高的菌株,以期在北京有机污染土壤的场地修复提供高效降解菌株和理论依据。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 化学试剂

芘(pyrene, 纯度>99%)购自Alfa Aesar公司,溶于丙酮制成储备液;正己烷和丙酮为色谱纯;其他剂均为分析纯。

#### 1.1.2 主要培养基

无机盐液体培养基(MSM): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 1 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2。LB培养基:胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 5 g, 蒸馏水 1000 mL。牛肉膏蛋白胨培养基(固体培养基):牛肉膏 1.5 g, 蛋白胨 2.5 g, 琼脂 2.5 g, 蒸馏水 500 mL。富集培养基:灭菌后的MSM,加入一定量芘的丙酮溶液振荡过夜使丙酮挥发。培养基均在121℃, 20 min 灭菌后使用。

### 1.2 细菌的筛选

采集北京焦化厂内受PAHs的污染土壤,称取5 g置于250 mL三角瓶中,加入100 mL无机盐培养基,在摇床中30℃、150 r/min 恒温水浴培养5 d。培养结束后,取10 mL的菌液移至100 mL新的富集培养基中继续培养,以相同的接种量多次转接并逐步提高芘的浓度直至5 mmol/L,取富集菌液在牛肉膏蛋白胨培养基上反复平板划线得到单菌落,挑取单菌落接种至含有芘的MSM中继续培养,得到一株

收稿日期:2010-12-07

基金项目:国家自然科学基金项目(40901149);中央高校科研业务费项目(ZZ01005/ZD0904)

第一作者:女,1985年生,硕士生

\* 通讯联系人

E-mail: ajlin@126.com

PAHs 降解高效降解菌。5 d 后转接至牛肉膏固体培养基斜面,4 ℃ 保存待用。

### 1.3 菌株的鉴定

细菌分离后,观察该菌在牛肉膏蛋白胨培养基平板上的单菌落形态,并利用分子生物学的手段对菌株进行鉴定,通过提取菌株 DNA,然后对 16S rDNA 进行 PCR 扩增。将菌株进行平板划线并在 30 ℃ 下恒温培养 24 h,得到菌株的单菌落,然后挑取单菌落接种于 LB 液体培养基振荡培养 12 h 后,提取菌体 DNA。PCR 引物采用 16S rDNA 的通用引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 和 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')。反应体系共 50 μL (37.75 μL ddH<sub>2</sub>O, 5.0 μL buffer, 4 μL dNTP, 1.0 μL 16S 正向引物, 1.0 μL 16S 反向引物, 0.25 μL Taq DNA 聚合酶, 1.0 μL DNA 溶液)。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 4 min, 63 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 次循环, 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。产物由上海生工生物工程技术有限公司测序,测序结果在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行比对。

### 1.4 菌株的驯化

在含有 22.5 mL 的 MSM 中加入芘的丙酮溶液至芘的终浓度为 0.5 mmol/L,振荡过夜至丙酮挥发,接入 2.5 mL 菌悬液后在 30 ℃、150 r/min 的条件下培养,并以不接菌液的含相同量芘的 25 mL MSM 为对照组。定时取样,分对照组和样品组,各 3 次重复,完成对菌株降解曲线的测定。同时,在相同条件下对菌株进行培养,于培养第 5 天时转接至新鲜的培养基中,多次重复这一过程,对微生物进行驯化培养,驯化结束后重复对菌株降解曲线的测定。

### 1.5 菌株对芘的降解效果试验

在三角瓶中加入 22.5 mL 无机盐培养基,于 121 ℃ 下灭菌 20 min,冷却后加入芘的丙酮溶液使三角瓶中芘的浓度达到 0.5 mmol/L,然后振荡至丙酮挥发,接入 2.5 mL 菌悬液,在特定条件下振荡培养 4 d,测定芘的降解效果。该部分研究中的对照处理均为相同培养条件下的不接菌处理,每个处理均重复 3 次。

### 1.6 芘的提取及浓度测定

培养结束后将三角瓶中培养液用正己烷等体积振荡萃取 3 次,合并萃取液后用无水硫酸钠脱水,定容至 25 mL,使用 Agilent 6820C 气相色谱仪 (FID, HP-5 毛细管柱和 HP 气相色谱化学工作站) 测定芘浓度。分析条件为:进样口温度为 300 ℃,检测器温

度为 300 ℃,柱温采用程序升温,起始温度为 50 ℃,以 25 ℃/min 的速度升到 250 ℃ 后保持 10 min;载气采用氮气,进样量为 1 μL,不分流进样。研究中采用外标法定量,芘标准曲线在 0.005 ~ 0.5 mmol/L 区间呈线性 ( $R^2 = 0.9993$ )。

芘的降解率  $D$  按式(1)计算

$$D = (c_{ck} - c_f) / c_{ck} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中  $c_{ck}$ ,  $c_f$  分别为对照处理中和接菌处理中芘的浓度, mmol/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株筛选及其鉴定

富集分离之后得到一株能以芘为唯一碳源生长的菌株,命名为 PW。菌株 PW 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上 30 ℃ 培养 24 h 后可见清晰的单菌落,菌落呈圆型,表面光滑,为乳白色。通过 PCR 扩增获得 16S rDNA 序列,在 NCBI 网站用 BLAST 程序对得到的扩增产物序列与已登录的菌株序列进行同源性比较。菌株 PW 的系统发育树见图 1,由图 1 可以看出 PW 与多株苍白杆菌同源性均在 99% 以上,依据此结果可判断,菌株 PW 归属苍白杆菌属 (*Ochrobactrum* sp.)。本研究从北京的 PAHs 污染土壤中筛选得到的苍白杆菌,与国内其他一些科学家的研究结果相似<sup>[6-7]</sup>。

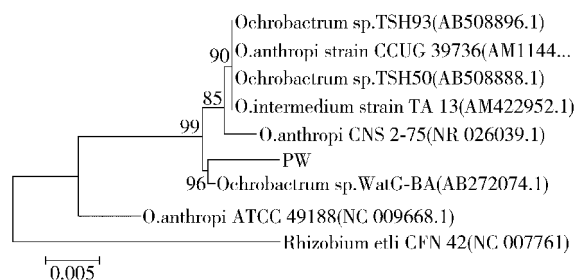


图 1 菌株 PW 的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of strain PW

研究表明微生物难以利用高环 PAHs 主要由于 PAHs 的环数越高,其疏水性越强,越不易溶于水,因此也越难以被微生物所利用<sup>[8]</sup>。本研究得到的菌株 PW 在对高环 PAHs 芘的降解中可能是产生了生物表面活性剂使得芘的辛醇-水分配系数降低,在水中的溶解度增加,并且使得芘更容易通过细胞膜进入微生物体内,然后进一步被分解代谢。另一个原因可能是菌株 PW 含有双加氧酶基因,可产生大量的双加氧酶,将四环的芘不断氧化开环从而获得生长所需的碳源和能源。

## 2.2 菌株 PW 对芘的降解

分离获得 PW 之后,对其进行了驯化培养,实验结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,经过驯化菌株 PW 对芘的降解有了显著提高,在芘的初始浓度为 0.5 mmol/L 时,5 d 内对芘的降解率可由驯化前的 62.3% 提高到驯化后的 92.7%。

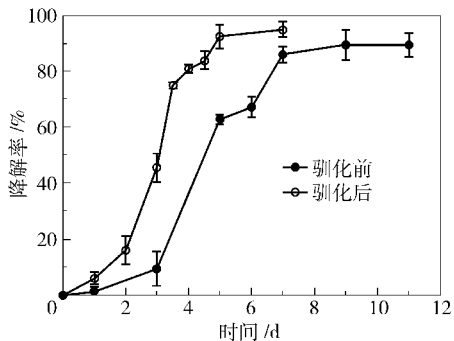


图 2 驯化前后菌株 PW 对芘的降解

Fig. 2 Pyrene degradation before and after domestication

一般而言,普通土壤中很少含有可降解 PAHs 的微生物,即使在污染土壤中多数微生物只对 PAHs 具有较好的耐性,并不具有高的降解能力,而一般的土著 PAHs 降解菌生长较为缓慢与土壤中微生物群落的其它微生物相比并不占有优势,因此为了得到能高效降解 PAHs 的菌株或者菌群,需要进行富集培养,在富集培养中通过逐步提高污染物浓度从而提高了环境压力,因而使得具有降解特性的菌株或者菌群比例增加。为了能进一步提高富集分离的菌株在纯培养条件下对 PAHs 的降解,在本研究中又采用一次大剂量 PAHs 处理对其进行驯化,这一方法主要是有利于提高菌株对毒性底物的适应性,以提高菌株在纯培养条件下对污染物的耐受性,从而提高菌株的生长和降解能力。在本研究中,驯化后的菌株 PW 对芘的降解效果得到了明显的提高,这与他人的一些研究结果<sup>[9]</sup>相类似,这可能是由于微生物在高浓度毒性底物培养基中生长时,环境条件逐渐促使菌株的某一休眠基因由于长时间的代谢活动刺激而恢复活性,从而产生更多的降解酶,提高了降解效果<sup>[10]</sup>。

## 2.3 环境因素对菌株降解芘的影响

### 2.3.1 温度

不同培养温度对 PW 降解芘的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出,在 30 ~ 35 °C 时菌株的降解能力最强。本研究中菌株在 25 ~ 40 °C 下对芘的降解效果都较好,但是在 30 °C 下培养时降解效果最佳,

可能是由于本菌株富集筛选过程中的温度是 30 °C,因而在该温度下微生物细胞内酶的活性最高,对污染物的降解能力最强。

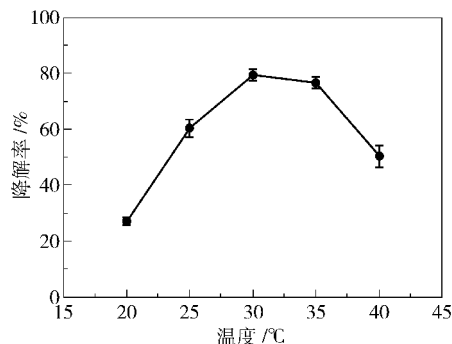


图 3 温度对 PW 降解芘的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the extent of pyrene degradation

### 2.3.2 pH

pH 在 5 ~ 10 的范围内对菌株降解芘的影响如图 4 所示,由图 4 可以看出菌株在 pH 5 ~ 10 的范围内均可降解芘,但菌株在酸性至中性条件下均对芘有较高的降解效果,并且分别在 pH 为 5、6、7 时处理,菌株对于芘的降解并没有明显差异,但是在碱性条件下,随着碱性增大降解率迅速降低。菌株对酸碱耐受能力强,在环境中有广泛的适应性,在 pH 为 5 ~ 10 的范围均可有效的降解芘,而且在酸性条件下的培养最有利于芘的降解,这和他人的一些研究结果相似<sup>[11]</sup>,因此本研究筛选到的该菌可以用于酸性土壤中 PAHs 的污染修复。

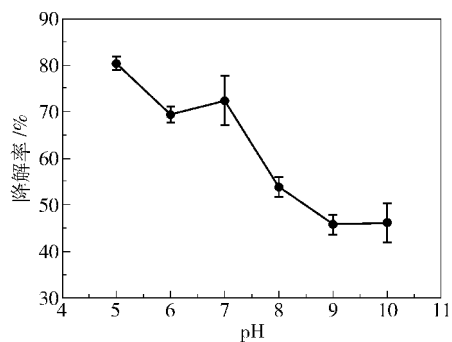


图 4 pH 对 PW 降解芘的影响

Fig. 4 Effect of pH on the extent of pyrene degradation

pH 影响微生物降解有机污染物的原因,可能在于培养基 pH 能引起细胞膜电荷的变化,进而影响酶的活性。已有研究表明在细菌降解芘的过程中,主要发挥作用的开环酶类是双加氧酶,双加氧酶在开环过程中需要消耗大量的 NADH 或 NADPH,也

就是需要大量的  $H^+$ 。本研究中发现酸性条件下, PW 对芘的降解效果较好, 可能是环境供给了微生物足够的  $H^+$  用于代谢芘。

### 2.3.3 盐度

环境中盐度 (NaCl 的质量分数) 对微生物降解芘的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出在盐度 0 ~ 2% 之间对微生物的降解活性没有显著影响, 当盐度高于 2% 时, 随着盐度的升高, 降解活性迅速下降。

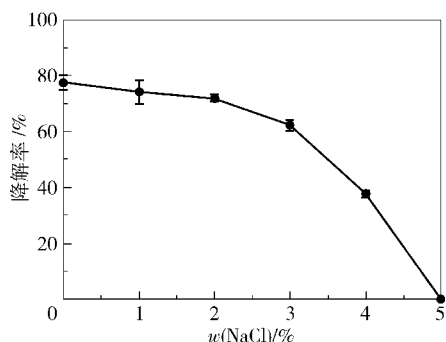


图 5 盐度对 PW 降解芘的影响

Fig. 5 Effect of saline solution on the extent of pyrene degradation

### 2.3.4 重金属

在含有重金属的培养基中芘的降解效果如表 1 所示。由表 1 可知, 菌株对于不同金属离子耐受性不同, 在  $Cd^{2+}$  浓度为 0.32 mmol/L 的浓度时仍可以降解芘, 而在  $Cr^{6+}$  浓度为 0.17 mmol/L 时则不能生长。  $Cu^{2+}$  是杀菌剂有效成分, 本文主要考察了菌株对于  $Cu^{2+}$  的耐受性, 结果表明, PW 在  $Cu^{2+}$  浓度为 0.03 mmol/L 时对芘的降解仅有 9.7%。

表 1 重金属对 PW 降解芘的影响

Table 1 Effect of heavy metal ions on the extent of pyrene degradation

| 金属离子      | 浓度/mm $\cdot$ L $^{-1}$ | 降解率/%          |
|-----------|-------------------------|----------------|
| $Cd^{2+}$ | 0.03                    | 49.6 $\pm$ 2.1 |
|           | 0.16                    | 30.5 $\pm$ 1.4 |
|           | 0.32                    | 7.4 $\pm$ 4.3  |
| $Cr^{6+}$ | 0.03                    | 54.3 $\pm$ 1.7 |
|           | 0.17                    | —              |
|           | 0.34                    | —              |
| $Cu^{2+}$ | 0.03                    | 9.7 $\pm$ 6.4  |
|           | 0.06                    | —              |
|           | 0.31                    | —              |

## 3 结论

(1) 分离得到一株芘的降解菌, 经过驯化后能

快速有效的降解芘。在初始浓度为 0.5 mmol/L 芘浓度下, 第 5 天的降解率由驯化前的 62.3% 提高到了驯化后的 92.7%, 微生物经过培养后可大大提高其降解能力。

(2) PW 的最适生长温度为 30 ~ 35  $^{\circ}C$ , 在 pH 5 ~ 7 范围内生长对芘的降解最大, PW 适宜在酸性条件下对芘进行降解, 并且菌株对盐和重金属有较高的耐受性。

## 参考文献:

- [1] Deepthike H U, Tecon R, van Kooten G, et al. Unlike PAHs from Exxon Valdez crude oil PAHs from Gulf Alaska coals are not readily bioavailable[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43: 5864-5870.
- [2] Lafortune I, Juteau P, Déziel E, et al. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem[J]. Microbial Ecology, 2009, 57: 455-486.
- [3] Chauhan A, Fazlurrahman, Oakeshott J G, et al. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation[J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48: 95-113.
- [4] Das K, Mukherjee A K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 1339-1345.
- [5] Hilyard E J, Jones-Meehan J M, Spargo B J, et al. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 74(4): 1176-1182.
- [6] Luo Y R, Tian Y, Huang X, et al. Analysis of community structure of a microbial consortium capable of degrading benzo(a) pyrene by DGGE[J]. Marine Pollution Bulletin, 2009, 58: 1159-1163.
- [7] Wu Y R, He T T, Zhong M Q, et al. Isolation of marine benzo[a] pyrene-degrading *Ochrobium* sp. BAP5 and proteins characterization[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21: 1446-1451.
- [8] Bordoloi N K, Konwar B K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 170: 95-505.
- [9] 王新, 李培军, 巩宗强, 等. 多环芳烃高效降解菌的筛选[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 92-

96.  
Wang X, Li P J, Gong Z Q, et al. Screening of immobilized microorganism strains capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26 (suppl): 92–96 (in Chinese)
- [10] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- Zhou Q Y, Gao T Y. *Microbiology for environmental engineering* [M]. 2nd Ed. Beijing: Higher Education Press, 2000. (in Chinese)
- [11] Uyttenbroek M, Vermeir S, Wattiau P, et al. Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3159–3164.

## Isolation, identification and characteristics of pyrene degrading bacteria *Ochrobactrum* sp.

XIE WenJuan<sup>1</sup> LIN AiJun<sup>1</sup> YANG XiaoJin<sup>1</sup> WANG FengHua<sup>2</sup> SHIM Hojae<sup>3</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Department of Soil Environmental Sciences, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Beijing 100085;

3. Faculty of Science and Technology, University of Macao, Macao, China)

**Abstract:** A pyrene-degrading bacterium strain named PW was isolated from the soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Beijing Coking Plant using an enrichment culture. It was identified according to its morphology and molecular biology analysis. This bacterium belongs to the strain *Ochrobactrum* sp. This strain was domesticated for a period of time by a large dose method, and then shake flask experiments were used to study the influence of environmental conditions on the degradation extent of pyrene. The results showed that after domestication the degradation extent increased from 62.3% to 92.7% on the 5th day. The bacterium strain PW could degrade pyrene at temperatures ranging from 20 to 40 °C, and the degradation extent at 30 °C was the highest. The degradation extents were above 45% in cultural mediums at a wide range of pH from 5 to 10. The results also indicated that the pyrene degradation could be affected by salt concentration and the degradation effects were better when the mass fraction of NaCl in the culture medium was less than 3%. Further study showed that the strain PW could be resistant to high concentrations of some heavy metal ions.

**Key words:** PAHs; isolation of pyrene degrading strain; identification