

一个可降解直链烷基苯磺酸盐的新种*

柯 娜¹ 肖昌松^{1**} 应启锋² 纪树兰²

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(² 北京工业大学环境与能源工程学院 北京 100022)

摘 要 本文鉴定了一株可完全降解直链烷基苯磺酸盐(Linear Alkylbenzene Sulphonate, 简称 LAS) 的菌株 GZ6。革兰氏染色阴性, 细胞为杆状或短杆状, 大小为 $0.5\mu\text{m} \sim 0.8\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$, 其生长 pH 范围为 pH6.0 ~ 10.0, 最适生长 pH 为 7.0, 生长温度范围为 $4^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$, 最适生长温度为 30°C 。生化特征测定除过氧化氢酶、尿酶、精氨酸脱羧酶反应为阳性, 其它均为阴性。可利用 Chloridazon、安替比林(antipyrin)以及 LAS 等为碳源。不能利用大多数糖醇。醌组分以泛醌 Q-10 为主。菌体脂肪酸主要为 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ 及 $\text{C}_{16:1}$ 。DNA 中 G + C mol% 含量为 70.10。16S rRNA 序列分析表明菌株 GZ6 与其亲缘关系最近的菌株 *Phenylobacterium immobile* DSM1986^T 序列相似值为 97.49%, DNA-DNA 杂交率为 40%。菌株 GZ6 具极生鞭毛, 可运动, 两者在细胞形态有很大差异。故将菌株 GZ6 定为苯基杆菌属的新种可动苯基杆菌(*Phenylobacterium mobile*) GZ6。

关键词: 苯基杆菌属, 可动苯基杆菌, 16S rDNA

中图分类号: Q 939.11 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)01-0001-06

直链烷基苯磺酸钠(Linear Alkylbenzenesulfonate, LAS)是目前世界上使用量最大的一种阴离子表面活性剂, 广泛应用于合成洗涤剂、肥皂及化妆品, 以及各种工业用途的乳化剂、分散剂、润滑剂以及防腐剂等。由于 LAS 带来日益严重的生态问题, LAS 的生物降解引起了国内外科学家的广泛重视, 在其降解机理、特性及降解菌株的分离筛选上做了一些研究。对 LAS 单独降解率达 90% 以上的菌株, 目前报道的有蓝色色杆菌(*Chromobacterium lividum*) ATCC 12473、脱氢黄杆菌(*Flovobacterium dehydrofenans*) ATCC 13930、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris* E) 假单胞菌属 MICRO-C、楔形弧菌(*Vibrio cuneatus*) ATCC 6972、黄单胞菌属的 90-4^[1, 2]。本文通过形态学、生理生化特征、化学分类、分子分类相结合的多项分类方法, 鉴定了一株从洗衣粉厂水样中分离出可高效消除 LAS 的菌株 GZ6^[3]。菌株 GZ6 在 24 h 内可将浓度为 400 mg/L 的 LAS 降解 98.7%, 最高 LAS 负荷量为 700 mg/L, 是目前报道的 LAS 负荷量最高的菌株。多项分类研究结果表明菌株 GZ6 是不同于已报道的 LAS 降解菌株的新的细菌。本文介绍了菌株 GZ6 的生物学特征和分类鉴定结果。

* 北京市自然科学基金资助项目(8992004)

** 通讯作者

作者简介 柯 娜(1976-)女, 民族汉, 湖北武汉人, 中国科学院微生物研究所 99 级硕士, 主要从事环境微生物学的研究。E-mail: kena-ke@hotmail.com

收稿日期: 2002-04-16, 修回日期: 2002-07-08

1 材料和方法

1.1 菌株

模式菌株 *Phenylbacterium immobile* DSM1986^T 购自德国菌保中心。大肠杆菌 K12 (AS1.365) 从中国科学院微生物研究所获得。菌株 GZ6 分离于广州洗衣粉厂污水处理站进水沟渠。

1.2 培养基和试剂

分离降解 LAS 细菌富集培养基 :MgSO₄·7H₂O 0.14 g ,FeSO₄·7H₂O 0.0005 g ,K₂HPO₄ 0.33 g ,KCl 0.06 g 酵母膏 1.2 g ,LAS 0.05 g pH 7.0 ,用蒸馏水定容至 1 L ,100 kPa 压力下灭菌 30min。

PCR 产物纯化采用北京赛百盛公司的 PCR 产物纯化试剂盒 ,其它化学试剂均为国产分析纯。

1.3 形态观察和生理生化实验

将菌株接种于富集培养基中 ,30℃ 培养 24 ~ 48 h 后 ,用光学显微镜与电子显微镜结合观察细胞形态、鞭毛并测量细胞大小 ,革兰氏染色。接种富集培养基平板上 ,30℃ 培养 2 d ,观察菌落颜色及形态。

生化特征测定按文献 [4] 进行。碳源利用实验采用美国 Biologo 公司的 MicrostationTM 微孔板鉴定系统的 GN Microplate 进行 ,使用 Biologo Micro Station system 3.50 软件分析。

1.4 靛的提取和测定

采用 Collins 等^[5]方法 ,离心收集 10 g 菌体 ,冷冻干燥 ,氯仿:甲醇 (2:1) 抽提 ,以苯为展层剂 ,在 GF252 硅胶板上进行薄层层析分离 ,在 252 nm 的紫外灯下观察层析板 ,取绿色带溶于氯仿中 ,过滤 ,浓缩。用 HEWLETT PACKARD 1050 高压液相色谱 (HPLC) 分析泛靛组成。采用反向 HPLC C₁₈ 硅胶柱 ODS 球形吸着剂 5 μm 250 mm × 4.6 mm ,流动相为乙腈:异丙醇 (1:1.25) 流速 1 mL/min ,40℃ 270 nm 紫外检测。

1.5 菌体脂肪酸成分分析

全细胞脂肪酸的提取参照 Osterhout^[6]方法进行。采用美国 MIDI 公司 Sherolock 全自动细菌鉴定系统^[7]分析成分。

1.6 DNA 的 G + C mol% 含量测定和 DNA-DNA 同源性实验

DNA 提取参照 Marmur^[8]的方法。采用熔点法 (T_m 值法) 测定 G + C mol%^[9] ,对照菌株为 *E. coli* AS1.365。DNA-DNA 同源性实验 ,采用液相复性速率杂交法^[10]。

1.7 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和序列测定

采用细菌的 16S rRNA 基因扩增的通用引物 :正向引物 27F :5'-GAGAGTTTGATCCT-GGCTCAG-3' 和反向引物 1541R :5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。两者分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 7 ~ 27 个碱基和第 1525 ~ 1542 碱基。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min ,94℃ 变性 1min ,54℃ 退火 1 min ,72℃ 延伸 3 min ,经 30 个循环后 72℃ 延伸 5min。PCR 产物纯化 ,ABI Prism 377 DNA 自动测序仪测序。

1.8 以 16S rDNA 为基础的系统发育分析^[11,12]

将菌株 GZ6 的 16S rDNA 的序列与从 GenBank/EMBL/DBI 等数据库中的 16S rDNA 序

列,采用 ClustalW version 1.8 进行多序列匹配排列。通过 Treecon for Windows v.1.1.2 程序中 Neighbor-Joining 方法,采用 Kimura 双参数计算模型构建系统发育树。

2 结果

2.1 形态和培养特征

菌株 GZ6 为革兰氏阴性的杆状或短杆状细胞,大小为 $0.5\mu\text{m} \sim 0.8\mu\text{m} \times 1.0\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$,以极生鞭毛运动(图 1、2)。在 LAS 富集固体培养基中培养 48 h,菌落呈圆形,低凸起,边缘整齐,表面光滑,有光泽,浅黄色,不透明。

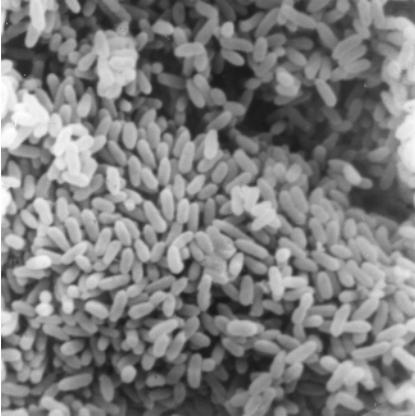


图 1 菌株 GZ6 的扫描电镜照片 ($\times 8\ 000$)

Fig.1 Scanning electron micrograph of strain GZ6



图 2 菌株 GZ6 极生鞭毛的透射电镜照片 ($\times 80\ 000$)

Fig.2 Transmission electron micrograph of strain

GZ6's polar flagellum

2.2 生理生化特征

菌株 GZ6 严格好氧生长,呼吸代谢。其生长 pH 范围为 pH6.0 ~ 10.0,最适生长 pH 为 7.0,生长温度范围为 $4^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$,最适生长温度为 30°C 。最适生长的 NaCl 浓度为 1% ~ 2%,NaCl 浓度大于 8% 时,生长被抑制。酵母粉对菌株 GZ6 的生长有明显的刺激作用。

除过氧化氢酶、尿酶、精氨酸脱羧酶、硝酸盐还原反应为阳性外,其它反应均为阴性:氧化酶,甲基红为阴性,不产生吲哚、硫化氢;不能降解明胶、纤维素、七叶苷、淀粉及酪蛋白。菌株 GZ6 不能利用大多数常见碳源,但在 Chloridazon、安替比林以及 LAS 等为碳源的培养基中生长良好。

菌株 GZ6 DNA 的 G + C mol% 的含量为 70.1%,细胞醌组分主要为泛醌 Q-10,脂肪酸主要为 $\text{C}_{18:1}$ 、 $\text{C}_{16:0}$ 及 $\text{C}_{16:1}$,含量分别为 68.12%、15.04% 和 7.05%。

菌株 GZ6 与苯基杆菌属模式菌株 *Phenylobacterium immobile* DSM1985^T 的鉴别特征见表 1。

2.3 以 16S rDNA 序列同源性为基础的系统发育学分析

取与菌株 GZ6 16S rDNA 序列(GenBank 注册号为 AY035307)相似值大于 95% 的 21 个种的 16S rDNA 序列做系统发育树图。从图 3 可以看出,所选菌株在系统发育树中基本分为 *Caulobacter*、*Phenylobacterium* 和 *Brevundimonas* 3 个分支。菌株 GZ6 与 *Phenylobacterium*

表 1 菌株 GZ6 与苯基杆菌属模式菌株 *Phenylobacterium immobile* DSM1985^T 的特征对照表Table 1 Distinguishing features of GZ6 and *Phenylobacterium immobile* DSM1985^T

Characteristic	GZ6	<i>Phenylobacterium immobile</i> DSM1985 ^T [13]
Gram stain	-	-
Size/ μm	0.5 ~ 0.8 × 1.0 ~ 2.0	0.7 ~ 1.0 × 1.0 ~ 2.0
Flagellum	1 polar flagellum	0
Optimum temperature/ $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	28 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$
Optimum pH	7.0	6.8 ~ 7.0
Optimum NaCl concentration	1% ~ 2%	0.25%
Restrained NaCl concentration	> 8%	> 0.5%
Oxidase	-	Week +
Urease	+	-
Nitrate reduction	+	-
Production of :		
Indole	-	-
H ₂ S	-	Week -
DNA G + C mol%	70.1	65.5

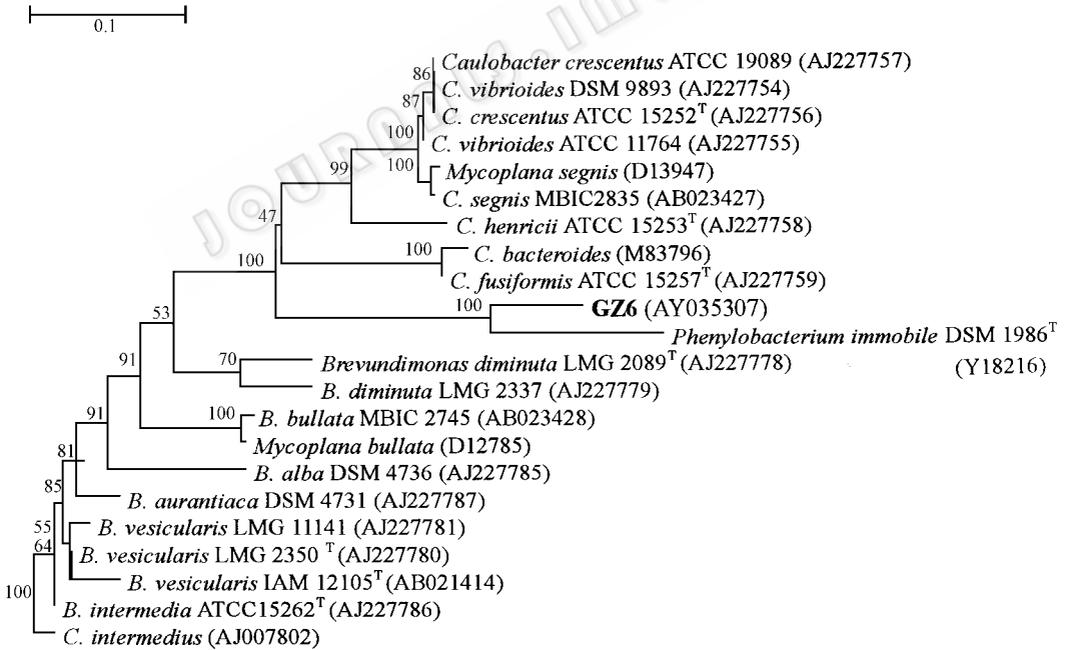


图 3 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 GZ6 与相关种属的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing relationships between strain GZ6 and other bacteria

Type strains used for this analysis are with 16S rDNA accession numbers in parentheses.

The scale bar indicates the 0.1 evolutionary distance unit. Bootstrap values, expressed as percentages of 100 replications, are given at branch points.

immobile DSM1986^T关系最密切,两者的 16S rRNA 相似性为 97.49%。很明显,依据此结果菌株 GZ6 可归于苯基杆菌属。

2.4 DNA-DNA 杂交

菌株 GZ6 与模式菌株 *Phenylobacterium immobile* DSM1986^T 进行 DNA-DNA 杂交实验,根据复性速率计算得出杂交率为 40%。依据国际分类委员会的建议,DNA 相关性 70% 为定种的界限。菌株 GZ6 与苯基杆菌的模式菌株的相关性低于 70%,应该可作为该属的一个独立的种。

3 讨论

苯基杆菌属是 Franz lingens 等人在 1985 年建立的,属于 Proteobacteria; alpha subdivision; *Caulobacter* group^[4]。该属目前仅有一个种 *Phenylobacteriu immobile* DSM1986^T。其特征为营养谱单一,不能利用大多数糖、醇,可降解 Chloridazon 等农药中的有效成分。菌株 GZ6 在生理生化特征、碳源利用以及化学分类特征与苯基杆菌属的模式种 *Phenylobacteriu immobile* 相同,如:不能利用大多数常见糖、醇,可利用 Chloridazon、安替比林、苯丙氨酸以及直链烷基苯磺酸钠为碳源;大多数生理生化反应为阴性,醌的主要组成为泛醌-10;脂肪酸的主要组分为 Sum7, C_{16:0} 及 Sum4;DNA G + C% 相差不到 5%。故两者可归为同一个属。

依据实验结果,菌株 GZ6 在细胞形态、生长特征及系统发育学特征上与模式种 *Phenylobacteriu immobile* 又有很大差异。*Phenylobacterium immobile* 以无鞭毛,非运动性为该模式种的特征。而菌株 GZ6 具有极生单鞭毛,可运动。从形态学特征可将菌株 GZ6 与 *Phenylobacteriu immobile* 区分开来。在生长特征方面,*P. immobile* 为渗透压敏感性,当 NaCl 浓度大于 5% 时,生长就被抑制,而菌株 GZ6 在 NaCl 浓度为 1% ~ 2% 时,最适生长;NaCl 浓度大于 8% 时,生长才被抑制。从系统发育树图分析,菌株 GZ6 16S rDNA 序列与 *Phenylobacterium* 属的代表菌株 *Phenylobacterium immobile* 关系最近,但两者的进化距离仍较大,为 0.26。菌株 GZ6 与 *Phenylobacterium immobile* 为苯基杆菌属两个相距较远的种。DNA-DNA 杂交结果也表明,二者的 DNA 同源性仅为 40%。故把菌株 GZ6 定为 *Phenylobacterium* 属中一个独立的新种,即可动苯基杆菌(*Phenylobacterium mobile* sp. nov.)

新种苯基可动杆菌(*Phenylobacterium mobile* sp. nov.)的特征如下:革兰氏阴性,细胞为杆状或短杆状,大小为 0.5 ~ 0.8 μm × 1.0 ~ 2. μm,运动,极生鞭毛。菌落圆形,直径 1 mm ~ 2 mm,微凸,边缘整齐,表面光滑,浅黄色,不透明。其生长 pH 范围为 pH6.0 ~ 10.0,最适生长 pH 为 7.0,生长温度为 4℃ ~ 40℃,最适生长温度为 30℃。最适生长的 NaCl 浓度为 1% ~ 2%,可耐受 8% 的 NaCl。好氧菌、过氧化氢酶、尿酶、精氨酸脱羧酶及硝酸盐还原反应为阳性,氧化酶、甲基红为阴性。不产生吲哚、硫化氢。不能降解明胶、纤维素、七叶苷、淀粉及酪蛋白。不能利用大多数常见糖醇。可以奎尼酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、羟基脯氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、肉碱、咪唑丙烯酸、苯基乙胺、腐胺及 2-氨基乙醇为唯一生长碳源,但不能以阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、岩藻糖、半乳糖、龙胆二糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蜜二糖、阿洛酮糖、蜜三糖、鼠李糖、蔗糖、海藻糖、松二糖、木糖、核糖醇、阿拉伯糖醇、赤藓醇、肌醇、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、乙酸、蚁酸、

羟基苯基乙酸、衣康酸、丙二酸、丁二酸、甘氨酸、 γ -氨基丁酸、次黄嘌呤核苷、尿(嘧啶核)苷、胸腺嘧啶脱氧核苷、2,3-丁二醇、丙三醇、D,L- α -甘油磷酸及葡萄糖-1-磷酸葡萄糖-6-磷酸。可以 Chloridazon、安替比林、L-苯丙氨酸以及直链烷基苯磺酸钠等异型生物质为碳源。对阿齐霉素、多粘菌素、氯霉素、强力霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、诺氟沙星、利福平、链霉素、磺胺甲基异恶唑及四环霉素敏感。有邻苯二酚-1,2-双加氧酶酶活。主要醌组分为泛醌 Q-10。主要菌体脂肪酸为 $C_{18:1}$ 、 $C_{16:0}$ 及 $C_{16:1}$ 。DNA 中 G + Cmol% 含量为 70.10。模式菌株为菌株 GZ6。

参 考 文 献

- [1] 刘秀荣,吕晓猛,纪树兰. 微生物降解直链十二烷基苯磺酸钠的研究. 北京工业大学学报, 1995, 21(4):103~108.
- [2] 张蔚文,张灼. 降解直链烷基苯磺酸钠(LAS)菌株的筛选及其降解质粒的研究. 环境科学与技术, 1991, 3(2):6.
- [3] 应启锋,肖昌松,纪树兰. 直链烷基苯磺酸钠(LAS)降解菌的筛选及其降解特性的初步研究. 微生物学通报, 2002, 29(1):1~5.
- [4] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001.
- [5] Collins, M D, Analysis of isoprenoid quinines. In: Gottschalk G. ed. Methods in microbiology, Vol 18, London: Academic Press, 1995:329~366.
- [6] Osterhout, G J, Shull, V H, Dick J D. Identification of clinical isolates of Gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *J Clin Microbiol*, 1991, 29:1882~1830.
- [7] Sassar, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids MIDI technical note 101. Newark, DE. MIDI Company of USA, 1990.
- [8] Marmur J. A Procedure for the Isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol*, 1961, 3:208~218.
- [9] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等. 放线菌研究及应用. 北京:科学出版社, 1990.186.
- [10] De Ley, Cattoit J A, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem*. 1970, 12:133~142.
- [11] Altschul B, Stephen F, Thomas L M, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25:3389~3402.
- [12] Van de Peer, Y, De Wachter R. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci*, 1994, 10:569~570.
- [13] Lingens F, Blecher R, Blecher H, et al. *Phenylobacterium immobile* gen. Nov., sp. Nov., a gram-negative bacterium that degrades the herbicide chloridazon. *Int J Syst Bacteriol*, 1985, 35(1):26~39.

A New Species of the Genus *Phenylobacterium* for the Degradation of LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate)*

Ke Na¹ Xiao Changsong^{1**} Ying Qifeng² Ji Shulan²

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² College of Environment and Energy Engineering, Beijing Polytechnic University, Beijing 100022, China)

Abstract: A strain GZ6 that can biodegrade LAS (Linear Alkylbenzene Sulphonate) is identified. It is aerobic gram-negative rod or short-rod (0.5 to 0.8 by 1.0 to 2.0 μm). It is mobile with a single

polar flagellum. Optimum growth occurred at 30°C and pH7.0. It is catalase positive, urease positive, and arginine decarboxylase positive. All the other physiological and biochemical tests performed were negative. It utilizes the xenobiotic compounds chloridazon, antipyrin and LAS as sole carbon sources. Most sugars, alcohols, and carboxylic acids are not utilized. It has Q-10 as the major quinone. The main cell fatty acids are Sum7, C_{16:0} and Sum4. The DNA G + C mol% content is 70.10. A phylogenetic tree was constructed on the basis of 16S rDNA sequences. It showed that the previously known member of the genus *Phenylobacterium*, *Phenylobacterium mobile* DSM1986^T, is the nearest neighbor to strain GZ6. The level of binary sequence similarity between them is 97.49%. And the DNA-DNA relatedness is 40%. These genetic analysis and their morphological difference show that they are different species of *Phenylobacterium*. A new species, *Phenylobacterium mobile* sp. nov., has been proposed.

Key words: *Phenylobacterium*, *Phenylobacterium mobile*, 16S rDNA

* Project supported by the Natural Science Foundation of Beijing (8992004)

** Author for correspondence

《微生物学报》第八届编辑委员会名单(任期 2002—2006 年) (排名不分先后)

主 编:

李季伦 院 士 中国农业大学生物学院

副主编:

谭华荣 研究员 中国科学院微生物研究所 陆德如 研究员 第二军医大学遗传研究所

王敖全 研究员 中国科学院微生物研究所 曲音波 教 授 山东大学生命科学学院

徐建国 研究员 中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所

编 委:

范云六 院 士 中国农业科学院生物技术所

翟中和 院 士 北京大学生命科学学院

黄 力 研究员 中国科学院微生物研究所

陆承平 教 授 南京农业大学动物医学院

郑天凌 教 授 厦门大学生命科学学院

陈永青 教 授 复旦大学生命科学学院

胡福泉 教 授 第三军医大学微生物教研室

杨苏声 教 授 中国农业大学生物学院

邵一鸣 研究员 卫生部爱滋病预防中心

闵 航 教 授 浙江大学生命科学学院

东秀珠 研究员 中国科学院微生物研究所

盛 军 研究员 长春生物制品研究所

田 波 院 士 中国科学院微生物研究所

钱世钧 研究员 中国科学院微生物研究所

唐 宏 研究员 中国科学院微生物研究所

蔡永峰 高 工 天津市工业微生物研究所

郭 俊 研究员 广东省微生物研究所

朱宝泉 研究员 上海医药工业研究院

诸葛健 教 授 江南大学生物工程学院

程 池 高 工 中国食品发酵工业研究所

谢 红 研究员 山西省生物研究所

胡远扬 教 授 武汉大学生命科学学院

王 平 教 授 华中农业大学生命科技学院