

4 株苯系物降解菌菌株的筛选鉴定、降解特性 及其降解基因研究

王 琳 邵宗泽*

(国家海洋局第三海洋研究所 海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005)

摘 要 分别以苯、甲苯为碳源,从厦门污水处理厂活性污泥中富集筛选获得了 2 株苯降解菌 B1、B2 和 2 株甲苯降解菌 J2、J6。16S rRNA 基因鉴定结果表明 B1、J2 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), B2、J6 属于不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)。研究表明,这些菌在 pH7~10 的碱性范围内能很好生长。在以 0.1%(V/V)苯或甲苯为唯一碳源的无机盐培养基中, B1、B2 菌在 72 小时内对苯的降解率分别为 67.7%、94.2%, J2、J6 菌对甲苯的降解率分别为 92.4%、84.8%。简并 PCR 扩增、序列分析表明,这些菌含有相同的苯双加氧酶基因,表明苯降解基因在这些降解菌中可能存在水平转移。此外, J2、J6 两株菌还含有甲苯双加氧酶基因,而且 J2 能在甲苯浓度为 70%(V/V)的 LB 培养基中生长。这些降解菌在苯、甲苯污染的生物治理中有应用前景。

关键词: 苯系物, 生物降解, 有机溶剂耐受性, 双加氧酶基因

中图分类号: Q939 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)05-0753-05

苯系化合物是一类易挥发的单环芳香烃类化合物,包括苯、甲苯、乙苯、邻、间、对二甲苯等,已被许多国家列为优先控制污染物^[1]。已报道的苯系物降解菌主要有假单胞菌(*Pseudomonas*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、红球菌(*Rhodococcus*)、诺卡氏菌(*Nocardia*)、罗尔斯通氏菌(*Ralstonia*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)等^[2,3]。苯系物双加氧酶和单加氧酶是降解过程中的关键酶,双加氧酶是在苯环上直接加 2 个氧形成儿茶酚;单加氧酶则直接攻击苯环或者氧化侧链,进而形成儿茶酚,再经过儿茶酚双加氧酶作用使苯环裂解,进一步被降解后进入三羧酸循环^[4,5]。

此外,苯系物降解与有机溶剂耐受相关。自从日本 Inoue 和 Horikoshi 分离到一株能够耐受 50%(V/V)甲苯的假单胞菌^[6]以来,一些耐受高浓度有机溶剂的菌陆续被分离到,并展开了相关研究。降解菌耐受有机溶剂不仅对污染物的生物治理非常重要,且在溶剂-水两相生物转化中也有很大的潜力^[7]。在国内,苯系物生物降解研究目前主要集中在降解性能方面,如降解速率和底物浓度关系,生长的适宜 pH、温度等^[8,9]。其他方面报道较少。本研究从城市污水中富集得到了多种苯系物高效降解菌,并对其降解特性、基因类型进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 2003 年 10 月采自厦门前浦污水处理厂离心间活性污泥。

1.1.2 试剂: 苯,甲苯色谱标准,纯度大于 99.5%,购自中国上海试剂一厂。其它试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基 选择性无机盐培养基(MM): 每升含 NaCl 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.7g, NH₄Cl 1.0g, KCl 0.7g, KH₂PO₄ 2.0g, Na₂HPO₄ 3.0g, pH7.0, 高压灭菌后补加适量微量元素混合液。微量元素混合液每升含 CaCl₂ 0.02mg, FeCl₃·6H₂O 0.5mg, CuSO₄ 0.005mg, MnCl₂·4H₂O 0.005mg, ZnSO₄·7H₂O 0.1mg。以苯或甲苯作为唯一碳源,终浓度为 0.1%(V/V)。苯、甲苯及微量元素加入前经 0.22μm 孔径的滤膜过滤除菌。

1.2 降解菌的富集和筛选

苯系化合物降解菌的富集在含有 50mLMM 培养基的 250mL 三角瓶中进行,苯或甲苯含量为 0.1%(V/V)。用硅胶塞外加 3 层塑料薄膜密封瓶口,以防苯系化合物大量挥发。培养条件为 28℃, 200r/min。在培养过程中每 4~5d 从培养液中取出

基金项目: 中国大洋协会资助项目(DY105-04-02-06)

* 通讯作者。Tel: 86-592-2195321; Fax: 86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 王琳(1980-),女,山东人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。

收稿日期: 2006-04-05; 接受日期: 2006-06-07; 修回日期: 2006-06-17

0.5mL 转入 50mL 新鲜的同种培养基中。富集实验共转移了 6 次。之后,将最终的富集物梯度稀释,涂平板(LB, NaCl 1%) 28℃温箱培养 48h 后分离单菌。

1.3 降解菌生理特性的测定

MM 培养基中分别加入苯或甲苯 0.1%(V/V), 随机测定 2 株菌在不同温度(4℃、18℃、28℃、37℃),不同 pH(pH4、6、7、10)和不同盐度(0%、1%、2%、3%)条件下的生长情况,以确定降解菌的最适生长条件。

1.4 降解菌对苯系物有机溶剂的耐受能力测定

将活化的 4 株菌按 1%(V/V)接种量分别接入含不同浓度苯或甲苯有机溶剂的 50mL LB 液体培养基中,其中有机溶剂的浓度(V/V)分别为 1%、3%、5%、7%、10%、20%、30%、50%、70%,观察其生长情况。

1.5 菌株对苯系物的降解率测定

1.5.1 测定方法:采用好氧振荡试管培养法(试管口径小,以减少苯系物挥发),定时采样测定苯系物浓度,降解率=(苯系物减少量-苯系物挥发量)/(苯系物总量-苯系物挥发量)×100%,具体如下:在 18cm×180cm 的试管中,10mL MM 培养基经高压灭菌后,准确加入 10 μ L 过滤除菌的苯或甲苯,平行做两组。同时,将 4 株菌的活化菌种用无菌 MM 培养基洗涤两次,按 1%(V/V)接种量分别接入 MM 培养基中,以不接种的试管作为自然挥发的对照;用硅胶塞并覆以塑料薄膜封口,于 200r/min,28℃培养。在 0h 和 72h 分别测定苯或甲苯的浓度。取样时,每支试管分别取 2ml 液体于离心管中,13400r/min 离心 2min,上清液进行吹扫捕集-GC/MS 定量测定苯系物浓度。

1.5.2 分析方法:吹扫-捕集条件,室温吹扫 11min,压强 120kPa,解吸温度 180℃,时间 3min,富集柱烘烤温度 200℃,时间 10min,传输线温度 100℃。

GC/MS 条件,GCMS-QP2010(岛津公司),毛细管色谱柱 RTX-5MS,内径 0.25mm,膜厚 0.25 μ m,长

度 30m。高纯氦气为载气,柱温 50℃,以 30℃/min 升温至 138℃,保持 5min。进样口温度 180℃,分流比 10,柱流速 1.30mL/min,检测器温度 200℃。

1.5.3 苯、甲苯标准曲线绘制:用移液管准确吸取 100 μ L 苯于 100mL 容量瓶中用双蒸水稀释至刻度,配制成 876.5mg/L 的浓缩液(在溶解度范围之内),摇匀备用。将浓缩液分别以双蒸水稀释,配制系列苯标准溶液,分别为 10、50、100、300、500、700、876.5mg/L,摇匀备用。取系列标准溶液各 2mL 进行吹扫捕集-GCMS 定量测定,绘制标准曲线。甲苯的标准曲线绘制方法同苯。

1.6 16S rDNA 序列测定及系统进化树的构建

细菌总 DNA 的提取方法参考文献[10],16S rDNA PCR 扩增、克隆^[11],由上海生工完成测序。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析,取其中具有代表性的几株细菌的 16S rDNA 序列,利用 DNAMAN (version5.1)软件构建系统进化树。

1.7 双加氧酶基因的 PCR 克隆

参照已知的苯、甲苯双加氧酶的大亚基片段和甲苯单加氧酶基因保守片段,设计如下简并引物:苯双加氧酶基因引物(ben-F:5'-CATGGMAGTGGCTTCTA-3';ben-R:5'-ATCTCRACCCAGTTC-3'),甲苯双加氧酶基因引物(TOD-F:5'-ACCGATGARGAYCTGTACC3;TOD-R:5'-CTTCGGTCMAGTAGG-3'),甲苯单加氧酶基因引物(touA-F:5'-AAGACCTATCCSGARTACGT-3';touA-R:5'-GGCTGGATCWGRCCTGCSSGGAA-3')PCR 反应退火温度分别为 48℃、53℃、53℃,PCR 产物的克隆、测序同上。

2 结果

2.1 苯系物降解菌的分离与特性

经过液体富集、平板筛选,从苯、甲苯富集物中共获得了 19 株菌,经过单菌验证,显示有 4 株菌降解效果显著,其中 B1、B2 菌降解苯,J2、J6 菌降解甲苯。降解菌的形态特征如表 1。

表 1 苯系物降解菌的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of the isolates from benzene, toluene enrichments

Strains	Colony color	Transparent	Colony center raised	Colony surface	Edge character of colony	Colony morphology	Gram-staining
B1	orange	-	+	smooth moist	regular	circular	-
B2	golden	-	+	smooth moist	regular	circular	-
J2	yellow	-	+	smooth moist	regular	circular	-
J6	pale yellow	-	+	smooth moist	regular	circular	-

2.2 降解菌生长的最适条件

由于菌株能利用苯系物作碳源快速生长,该实验采用含苯或甲苯的 MM 培养基。图中结果为 2 次平行实验的平均值。

2.2.1 温度 随机选取 J6, B2 两菌在含 0.1% (V/V) 苯或甲苯的 MM 培养基中,分别在 4℃、18℃、28℃、37℃ 和 200r/min 培养,每隔 7~8h 测培养液的光密度值 OD_{600} 。结果如图 1 所示,两株菌在 18℃、28℃、37℃ 的 OD_{600} 值均较高,且相差不大,说明 2 株菌在 18℃~37℃ 的范围内生长较为适宜,这与它们的陆生环境相符。

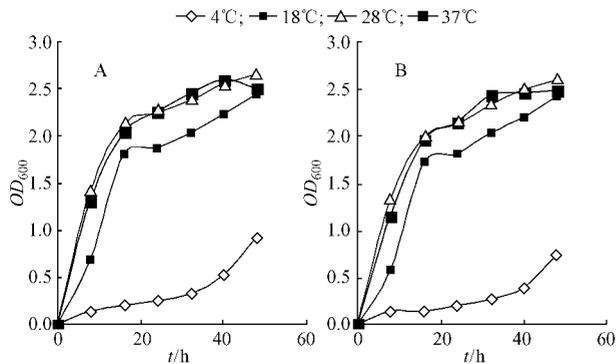


图 1 温度对菌株 B2 和 J6 生长的影响

Fig.1 The effect of temperature on growth of strains B2 and J6. A: Strain B2; B: Strain J6.

2.2.2 盐度 两株菌在 NaCl 浓度分别为为 0%、1%、2%、3% 的含苯或甲苯的 MM 培养液中培养, 28℃, 200r/min 培养,每隔 7~8h 测定生长培养液的光密度值 OD_{600} 。结果如图 2,这些苯系物降解菌在 0%、1%、2% 的盐度中的生长光密度值 OD_{600} 相差不大,且较高,而在 3% 盐度中生长的 OD_{600} 值略低。说明两株菌在 0%~2% 的盐度范围都能很好的生长。

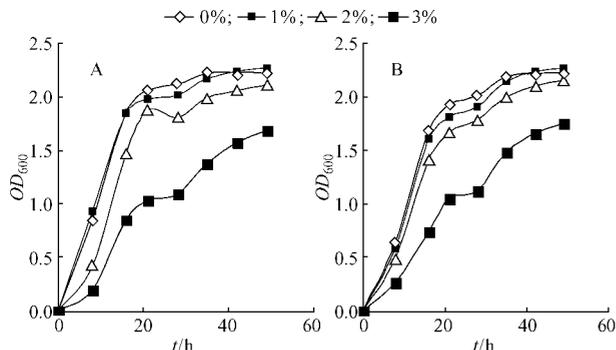


图 2 盐度对菌株 B2 和 J6 生长的影响

Fig.2 The effect of salinity in medium on growth of strains B2 and J6.

A: Strain B2; B: Strain J6.

2.2.3 pH 值 两株菌分别在 pH4、6、7、8、10 (pH10 时,溶液有少许沉淀,可通过酌量少加硫酸镁来减少沉淀)的含 0.1% (V/V) 苯或甲苯的 MM 培养基中培养,菌体的生长情况结果如图 3 所示。

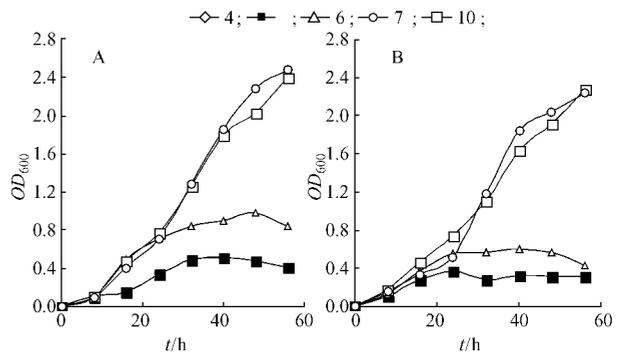


图 3 初始 pH 对菌株 B2 和 J6 生长的影响

Fig.3 The effect of initial pH in medium on growth of strains B2 and J6.

A: Strain B2; B: Strain J6.

结果表明, B2 和 J6 菌在 pH7~10 的环境条件下能够正常生长,生长 pH 范围较宽。在 pH7~10 范围内, B2 和 J6 菌生长最好。B2 菌和 J6 菌在 pH4 时仅有微弱生长。

2.3 降解菌耐受苯系物有机溶剂的能力测定

将 B1、B2、J2、J6 四株降解菌分别在含不同浓度苯或甲苯的 LB 培养基中培养 48h 后,观察其生长情况,结果如图 4。B1 和 B2 菌能分别在含苯 5% 和 10% (V/V) 的 LB 中生长, J6 和 J2 菌能分别在含甲苯 5% 和 70% (V/V) LB 中生长,表明 J2 菌至少能够耐受 70% (V/V) 甲苯,这为进一步研究降解菌的耐受机理提供了菌源。

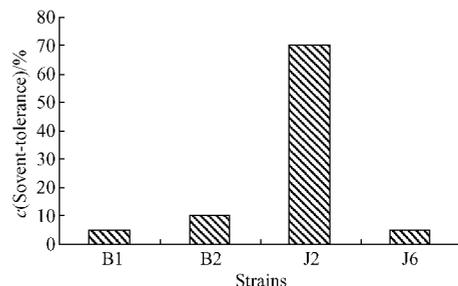


图 4 4 株菌对苯或甲苯耐受能力

Fig.4 The growth of four strains in LB with benzene or toluene.

2.4 菌株对苯系物的降解率的测定

分别在含苯、甲苯 0.1% (V/V) 的培养液中于 0h 和 72h 取样,经吹扫捕集-GCMS 分析测定苯、甲苯浓度。在 0h 时,苯和甲苯的浓度分别为 876.5mg/L 和 433.5mg/L (对照同)。培养 72h 后,对照管中苯和甲苯的残余浓度分别为 792.8mg/L、325.3mg/L; B1 和 B2 培养液中苯残余浓度分别为 256.1mg/L、46mg/L。

降解率达到 67.7%、94.2% ;J2 和 J6 培养液中甲苯残余浓度为 24.7mg/L 和 49.5mg/L ,降解率分别为 92.4% 和 84.8%。结果如图 5 ,表明它们都能高效的降解苯系物。

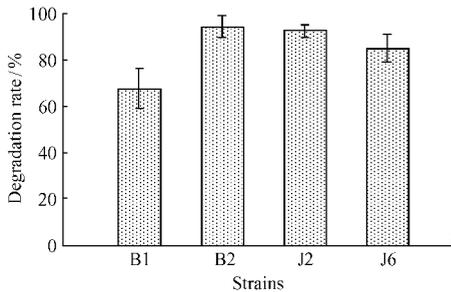


图 5 4 株菌对苯或甲苯的降解率

Fig.5 Benzene or toluene degradation rates of four bacterial strains.

2.5 16S rDNA 序列测定及菌株系统发育分析

J2、B1 和 J6、B2 菌的 16S rDNA 的部分序列长度分别为 1446bp、1555bp 和 1477bp、1456bp ;16S rDNA 的 GenBank 序列号分别为 DQ451101、DQ451093、DQ451095、DQ451094。J2 和 B1 菌同属于假单胞菌属 ,两者的同源性为 95.67%。Blast 分析结果显示 ,与 J2 同源性最高的是 *Pseudomonas putida* DQ060242 (99%) ,与 B1 同源性最高的是 *Pseudomonas aeruginosa* DQ115539(99%)。J6 和 B2 同属于不动杆菌属 ,两者之间的同源性为 99%。与 J6 菌同源性最高的是 *Acinetobacter baumannii* strain 25001CMCC(B) AY738400(99%) ,与 B2 菌同源性最高的是 *A. baumannii* strain 29108 AY738399(99%)。

2.6 双加氧酶基因的克隆及其相关分析

经简并 PCR 扩增 4 株菌均能得到苯双加氧酶目的片段 ,片段大小为 358bp。经序列分析 ,发现 4 株分离菌的苯双加氧酶片段序列完全相同 ,GenBank 序列号为 DQ451090 ,它们与 NCBI 上传的一组苯污染土壤中的菌同源性最高 ,达到 96% 以上。经验证 ,B1、B2 可降解苯 ,而 J2、J6 不能降解苯。此外 ,从 J2、J6 菌还获得了甲苯双加氧酶目的片段 (GenBank 序列号分别为 DQ451091、DQ451092) ,片段大小为 753bp ,其中 J2 菌与 1 株降解甲苯的恶臭假单胞菌^[12]的甲苯双加氧酶片段同源性最高 ,为 99%。而 J6 与 J2 甲苯双加氧酶片段却差别很大 ,同源性只有 86.5%。

3 讨论

在目前已报道的苯系物降解菌中 ,假单胞菌和不动杆菌是环境中 ,尤其是陆生环境中最重要的两

类降解细菌^[13,14]。本文从厦门前浦污水处理厂分离获得了 4 株苯系物降解菌 ,其中有 2 株苯降解菌 ,分别为鲍氏不动杆菌和铜绿假单胞菌 ,2 株甲苯降解菌 ,分别是鲍氏不动杆菌和恶臭假单胞菌。这些菌均能利用较高浓度的苯或甲苯作为唯一碳源和能源生长。席劲英等人筛选分离的 2 株高效降解甲苯的菌株在底物浓度 0 ~ 75mg/L 的范围内能较快地降解甲苯^[8] ;张小啸等人分离的苯降解菌在苯浓度 8.8 ~ 17.6mg/L 时 ,能较好地降解苯^[9]。而本研究降解菌在含苯和甲苯浓度分别为 876.5mg/L 和 433.5mg/L 培养基中能快速降解 ,72h 内降解率高达 67.7% ~ 92.4%。

有机溶剂一般在低浓度(小于 0.1% ,V/V)下即能杀死大多数微生物。近来发现某些假单胞菌对有机溶剂有耐受性 ,它们或通过改变(增加)细胞膜脂肪酸的不饱和度防止膜的损伤 ,或形成一个囊泡对有机溶剂进行胞内蓄积 ,或将其泵出胞外^[15]。本文中的 J2 菌能耐受至少 70%(V/V)的甲苯 ,是一株值得深入研究的菌株。

苯系物降解菌的降解途径有多种 ,单加氧酶和双加氧酶是细菌降解的关键酶^[13,16]。本文从获得的甲苯降解菌中均没有克隆到甲苯单加氧酶基因片段 ,说明它们不存在甲苯单加氧酶诱导的降解途径。从 2 株甲苯降解菌中均克隆到了甲苯双加氧酶的基因片段 ,然而它们的序列差别较大。从包括甲苯降解菌在内的降解菌中都克隆到了苯双加氧酶的基因片段 ,且序列完全相同。说明苯降解相关基因在不同菌株之间可能存在水平转移现象。

这些菌的特点之一是在碱性环境中降解苯系物 ,而一般降解 BTEX 的微生物的生长环境 pH 值多为中性^[8,9,17]。本文的降解菌的生长最适 pH 为 pH7 ~ 10 ,与嗜碱微生物相似。它们在碱性的污水治理中具有优势。

参 考 文 献

- [1] Xu Z, Mulchandani A, Chen W. Detection of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) using toluene dioxygenase-peroxidase coupling reactions. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**:1812 - 1815.
- [2] Stapleton RD, Bright NG, Sayler GC. Catabolic and Genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. *Microb Ecol*, 2000, **39**(3):211 - 221.
- [3] Kim D, Kim YS, Kim SK, et al. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7):3270-3278.

- [4] Burlage RS , Hooper SW , Saylor GS. The TOL (pWWO) catabolic plasmid. *Appl Environ Microbiol* , 1989 , **55** :1323 – 1328.
- [5] Kahng HY , Malinveni JC , Majko MM , et al. Genetic and functional analysis of the tbc operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** :4805 – 4816.
- [6] Inoue A , Horikoshi K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nat* , 1989 , **338** 264 – 266.
- [7] Holly CP , David CW. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J Bacteriol* , 1997 , **179** (13) :4219 – 4226.
- [8] 席劲英 胡宏营 朱洪博 , 等. 两株甲苯高效降解菌降解性能的比较. *中国环境科学* 2005 **25** :102 – 105.
- [9] 张小啸 王红旗 刘敬奇 , 等. 土壤微生物对苯的降解研究. *环境科学* 2005 **26** (6) :148 – 152.
- [10] Ausubel FM , Brent R , Kingston RE , et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998, 13 – 50.
- [11] 邵宗泽, 许 晔, 马迎飞, 等. 2 株海洋石油降解细菌的降解能力. *环境科学* 2005 , **26** (5) :133 – 137.
- [12] Mosqueda G , Ramos-Gonzalez MI , Ramos JL. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain and its role in solvent impermeabilization. *Gene* , 1999 , **232** 69 – 76.
- [13] Barbara H , Howard J , Jolana V. Alternative primer sets for PCR deletion of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Meth* , 2006 , **64** 250 – 265.
- [14] Greene EA , Kay JG , Jaber K , et al. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** (12) :5282 – 5289.
- [15] Ramos JL , Duque E , Gallegos MT , et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* , 2002 , **56** : 743 – 768.
- [16] Barbara H , Winnie D , Folkert F. PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites. *FEMS Microbiol Ecol* , 2006 , **55** 262 – 273.
- [17] Margesin R , Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2001 , **56** 650 – 663.

Isolation and characterization of 4 benzene/toluene-degrading bacterial strains and detection of related degradation genes

WANG Lin , SHAO Zong-ze *

(Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources , the Third Institute of Oceanography , State Oceanic Administration , Xiamen 361005 , China)

Abstract : Four bacteria with the ability of benzene or toluene degradation were isolated from the active sludge of a life sewage treatment farm , two of which degraded benzene , and named B1 and B2 ; and other two degraded toluene , and named J2 and J6 , respectively. Sequence analysis of 16S rDNA showed that strain B1 and J2 belonged to *Pseudomonas* , and B2 , J6 belonged to *Acinetobacter* . They all well adapted to the circumstances from 18°C to 37°C , 0% to 3% NaCl , and pH 7 ~ 10. The isolate J2 showed a high tolerance to organic solvent as it could grow well in the medium containing 70% (V/V) toluene , and degraded 92.4% of 0.1% (V/V) toluene within 72hrs in a medium with toluene as the sole carbon source ; while J6 presented 84.8% degradation under the same conditions to toluene. In the case of B1 and B2 , they degraded 67.7% and 94.2% of 0.1% (V/V) benzene within 72 hours , respectively. Moreover , all strains were detected harboring the same benzene dioxygenase gene. In addition , J2 and J6 also had toluene dioxygenase genes which share 86.5% homology from each other. These bacteria are of potential in bio-treatment of benzene and toluene pollutants.

Keywords : Benzene ; Toluene ; Biodegradation ; Solvent-tolerance ; Dioxygenase gene