

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(3):313–319; 4 March 2011
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株高效降解芘的细菌分离、鉴定及其降解效果

许丽,高振,罗霖,程言君,金京华*

(轻工业环境保护研究所,北京 100089)

摘要:【目的】获得高效降解高分子量多环芳烃的细菌,并研究其对多环芳烃的降解能力。【方法】利用富集培养和芘升华平板方法,从焦化厂污染土壤中分离多环芳烃降解细菌,对分离菌株通过形态特征、16S rRNA 基因和 *gyrb* 基因序列相似性分析进行鉴定,并研究该菌对高分子量多环芳烃(HMW-PAHs)的降解效果。【结果】筛选到一株能以芘、苯并蒽、屈、苯并芘、茚并芘、苯并花、荧蒽为碳源和能源生长并降解这些底物的菌株 HBS1,该菌株的 16S rRNA 基因和 *gyrb* 基因序列与 *Gordonia amicalis* 的相应基因的相似性最高(>99%),因此初步鉴定菌株 HBS1 属于戈登氏菌属(*Gordonia* sp.)。菌株 HBS1 在 17 d 内对 50 mg/L 的芘的降解率为 97%。初步研究发现该菌株中含有的双加氧酶大亚基保守区氨基酸序列与已报道的分支杆菌的 *nidA3* 基因保守区氨基酸序列相似性为 93.8%。【结论】筛选获得 1 株高效降解芘的菌株,通过降解实验确定了其降解性能,经鉴定为戈登氏菌属,是一株十分具有研究开发潜力的 HMW-PAHs 降解菌株。

关键词: 高分子量多环芳烃,微生物降解,戈登氏菌,降解效果

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0313-07

多环芳烃是一类含有 2 个以上苯环的致癌、致畸、致突变的有毒污染物。高分子量多环芳烃(HMW-PAHs)由 4 个以上的苯环组成,由于他们具有稳定的结构,难挥发,通常很难被微生物降解利用。然而,自然环境的不断驯化仍然使一些微生物具备降解 HMW-PAHs 的能力。1975 年, Barnsley 报道一株可以共代谢降解荧蒽和苯并芘的假单胞菌^[1]。随后,1980s 的 3 篇报道开启了 HMW-PAHs 研究的里程碑^[2–4]。自此之后,对 HMW-PAHs 研究报道不断增多,但是能同时降解多种 HMW-PAHs 的微生物并不多见,如已报道的有放线菌中的分支杆菌^[5–8]和红球菌^[9],革兰氏阴性的假单胞菌^[10]。在现代工业生产中,石油加工厂和焦化厂造成的大范围污染,是土壤中高浓度多环芳烃的主要来源,同时

在这些污染土壤中也蕴藏着丰富的降解微生物,这些是对污染土壤进行生物修复的宝贵资源,并有一些新的 HMW-PAHs 降解菌被分离出来^[11]。

细菌降解 PAHs 的起始双加氧酶是多环芳烃代谢途径的关键酶,他们是由多个亚基组成的多聚体蛋白质:包括一个还原酶亚基,铁氧化还原蛋白亚基,一个铁硫蛋白 α 大亚基,一个铁硫蛋白 β 小亚基。在目前的研究中,铁硫蛋白 α 大亚基和 β 小亚基是研究的最多也最详细的^[12–14]。Aurélien Cébron 对已报道的 α 大亚基基因序列进行了系统发育分析,将其分成两大类,分别来源于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。并且,在对两类基因序列进行比对分析后,根据各自的保守区域设计了 2 对不同的简并引物,命名为 GP 和 GN,并成功地从环境样品中克

基金项目:北京市科学技术研究院创新工程项目(IE012009610019-1)

* 通信作者。Tel: +86-10-68410478; Fax: +86-10-68456027; E-mail: jin.jinghua@gmail.com

作者简介:许丽(1982–),女,黑龙江人,硕士,助理研究员。E-mail: xulinico@yahoo.cn

收稿日期: 2010-10-08; **修回日期:** 2010-12-21

隆到双加氧酶大亚基的部分序列^[15]。

本研究从长期污染的焦化厂土壤中分离到一株高分子量多环芳烃的降解菌,并对其进行了分子生物学鉴定和分类,研究了该菌降解 HMW-PAHs 的底物范围,重点探讨了对芘的降解效果,以及检测了该菌中的降解基因,为将该菌应用于污染土壤的生物修复提供了基础理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集和主要试剂:土壤样品取自有 50 年历史的焦化厂,样品保存在 -20°C 备用。多环芳烃标准品由 Sigma 生产,购自百灵威公司,均为分析纯($\geq 99.5\%$)。其他化学试剂均为国产分析纯,分子生物学试剂购自天根生化公司。

1.1.2 培养基:LB 培养基:酵母膏 10 g;蛋白胨 5 g;氯化钠 10 g; H_2O 1000 mL。MS 无机盐培养基: MgSO_4 0.2 g; KH_2PO_4 1 g; NH_4NO_3 1 g; CaCl_2 0.02 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 微量; H_2O 1000 mL。

1.2 土壤理化性质及污染物检测

土壤的理化性质委托北京市科学技术研究院理化测试中心进行测定,各种多环芳烃含量采用 GC-MS(ThermoFisher ITQ-1100)测定,具体测定条件如下:色谱柱:DB-5ms 30 mB-5ms mm-5ms μm ;载气:高纯 He(99.9999%) 1.0 mL/min;进样口温度: 300°C ,不分流进样;色谱升温程序: $60^{\circ}\text{C} \rightarrow 25^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 250^{\circ}\text{C}$ (1 min) $\rightarrow 5^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 280^{\circ}\text{C}$ (4 min) $\rightarrow 5^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 290^{\circ}\text{C}$ (5 min);传输线温度: 280°C ;离子源温度: 250°C ;电子激发能量:70 eV;扫描模式:选择离子扫描 SIM。

1.3 降解菌的筛选

称取 10 g 污染土壤,加入 90 mL 无菌液体 MS 培养基中, 30°C ,150 r/min 培养 7 d,将 1 mL 菌悬液用无菌水进行梯度稀释后涂布在 MS 无机盐平板上,然后用平板升华法在培养基表面覆盖一层芘。具体方法:涂布有菌液的平板倒扣在底部含有固体芘的 500 mL 烧杯上,用封口膜将接口处封闭,整体放在沙浴中加热,保持沙浴温度在 120°C 。在平板上方放置冰块使加热升华后的芘遇冷凝结在培养基表面。将制备好的平板在 30°C 培养至有降解圈出现,挑起有降解圈的菌落用 LB 平板进行纯化。将得到的单菌落重新接种于芘升华的平板上, 30°C 恒

温培养,每日观察,根据降解圈的大小初步确定其降解能力。

1.4 菌株 16S rRNA 基因和 *gyrb* 基因序列分析

将纯化后的单菌落在 50 mL LB 培养基中培养 3 d 后,离心收集菌体,采用 CTAB/NaCl 的方法提取细菌基因组 DNA。采用已报道的 16S rRNA 基因通用引物^[16](5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3', 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')和 *gyrb* 基因引物^[17](5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGGNGGNAARTTYGA-3', 5'-AGC AGGCTACGGATGTGCCAGCCRTCACRTGCKTCNGTCAT-3')扩增该菌的 16S rRNA 基因和 *gyrb* 基因。PCR 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s,25 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经试剂盒回收纯化后连接 pEASY-T3 载体,转化大肠杆菌 DH10B,挑选阳性克隆提取质粒,测序,测序结果通过 NCBI 的 BLAST 比对。

1.5 降解特性研究

1.5.1 芘降解率:挑取单菌落 30°C 、150 r/min 培养至菌体的 OD_{600} 为 0.1 后转接入含有芘的 MS 培养基中(芘的初始浓度为 50 mg/L),相同条件下避光培养 17 d,不接种的培养基作为空白对照。每两天取样,采用 GC-MS 测定培养基中残留的芘含量,采用平板菌落计数法测定培养基中细菌菌落总数,所有试验重复 3 次。

1.5.2 底物特异性:取对数期的培养物 500 μL 接种于含有单一 HMW-PAHs 的 MS 液体培养基中, 30°C 、150 r/min,避光培养 30 d,测定 HBS1 对各种 PAHs 的降解率,并采用比浊法测定微生物的生长。含有的 HMW-PAHs 包括荧蒽、屈、苯并芘、苯并蒽、苯并花、茚并芘,终浓度为 50 mg/L,所有试验重复 3 次。

1.6 PAHs 双加氧酶基因检测

采用已经报道的草兰氏阳性菌 PAHs 起始双加氧酶大亚基保守区基因序列两端的简并引物 GP^[15](5'-CGGCGCCGACAAATTYGTNGG-3', 5'-GGGGAA CACGGTGCCRTGDAT RAA-3'),以基因组 DNA 为模板,PCR 扩增菌株 HBS1 基因组中编码双加氧酶大亚基保守区的部分基因序列。PCR 程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s,循环 25 次; 72°C 10 min。PCR 产物大小约在 200-300 bp 之间,经试剂盒回收纯化后连接 pEASY-T3 载体,转化大

肠杆菌 DH10B,挑选阳性克隆提取质粒,测序,测序结果通过 NCBI 的 BLAST 比对分析。

2 结果

2.1 供试土壤的基本理化性质为

pH 7.8,总有机碳 2.408%,总氮 0.17%,总磷 0.09%。共检测出 14 种多环芳烃,分别是:萘、蒽、芘、菲、蒽、芘、苯并蒽、屈、苯并蒽、苯并芘、茚并芘、苯并芘,总量达 1951.233 mg/kg。其中菲的含量最高 522.361 mg/kg,其次是蒽和芘,含量分别为 341.056 mg/kg,200.772 mg/kg,其余几种 HMW-PAHs 的含量均在 40 mg/kg 以上。

2.2 降解菌的分离

通过富集培养和平板升华的方法筛选到一株菌落表面颜色为橙红色,可以利用芘作为唯一碳源和

能源生长的菌株 HBS1。该菌株在芘升华平板上 30℃ 培养一周可以形成清晰的降解圈,经显微镜镜检为革兰氏阳性棒杆菌。

2.3 16S rRNA 和 gyrB 基因分析

PCR 扩增菌株 HBS1 的 16S rRNA 基因,对得到长约 1.5 kb 的 PCR 扩增产物进行亚克隆后测序,序列通过 NCBI 的 BLAST 程序比对。结果表明,该菌株与戈登氏菌属的 *Gordonia amicalis* LH3 (EF424581.1),*Gordonia* sp. SP72-3 (AY887068.1) 和 *G. rubripertincta* DSM 43248 (AY995557.1) 16S rRNA 基因相似性均为 99%。可以确定该菌属于戈登氏菌属,系统发育分析如图 1 所示。

放线菌 *Gordonia* 菌属的 16S rRNA 基因保守性极高,较难利用此基因序列进行菌种间的区分。*gyrB* 基因的变异程度无论是在菌属、菌种甚至各分

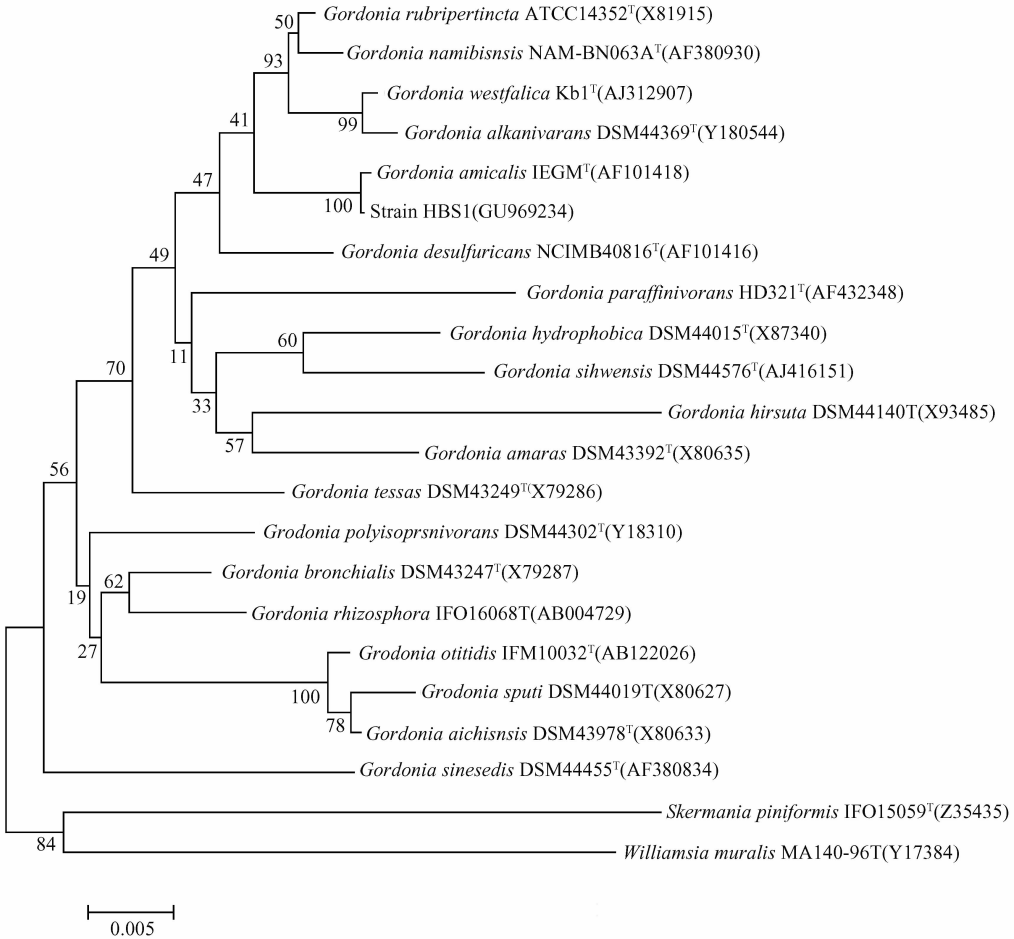


图 1 基于菌株 HBS1 和参比菌株的 16S rRNA 基因同源性的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence similarity of strain HBS1 and the reference strains. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar,0.5% sequence divergence.

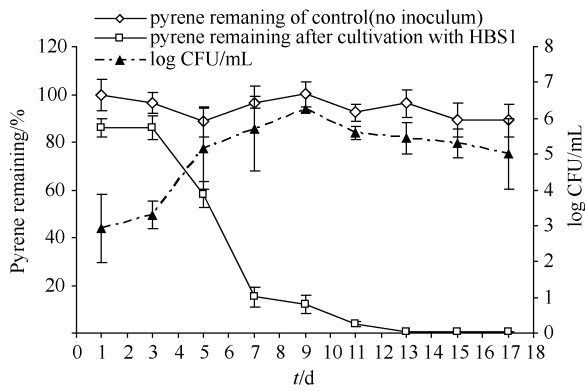


图3 *Gordonia* sp. HBS1 培养液中芘的含量随时间变化

Fig. 3 Time course of pyrene degradations by *Gordonia* sp. HBS1.

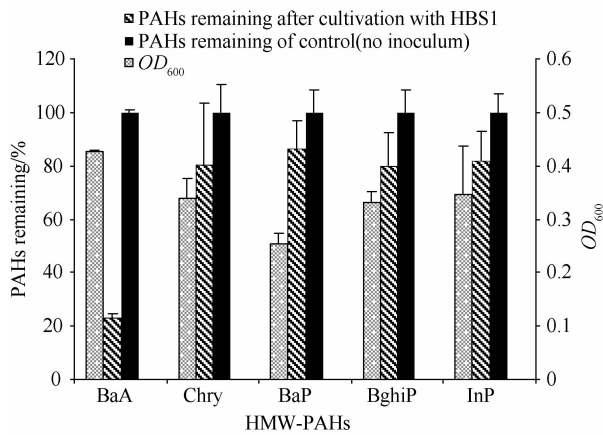


图4 *Gordonia* sp. HBS1 培养 30 d 后对 HMW-PAHs 的降解情况

Fig. 4 HMW-PAHs degradation by *Gordonia* sp. HBS1 after 30 days incubation.

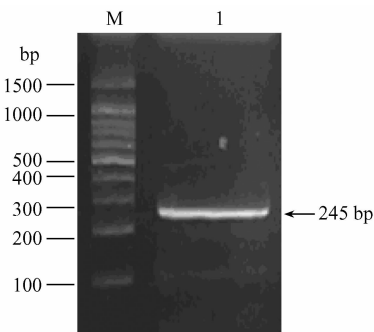


图5 PAHs 双加氧酶大亚基基因片段 PCR 扩增 (PAH-RHD α)

Fig. 5 Results of PCR with primers GP of (PAH-RHD α) genes. Lane M, DNA marker; Lane 1, fragment of the dioxygenase gene from *Gordonia* sp. HBS1.

因的部分氨基酸序列同源性最高为 93.8%。而与 *Rhodococcus opacus* B4 (YP_002777149.1) 萘双加氧酶大亚基和 *Gordonia* sp. CC-NAPH129-6 (ACV96-857.1) 的假定的萘双加氧酶大亚基同源性仅为 46%。

3 讨论

经过对焦化厂土壤中多环芳烃含量的检测,证明了土壤受到严重的高浓度的多环芳烃的污染(参考荷兰和加拿大多环芳烃浓度标准)。本研究从高浓度 PAHs 污染的土壤中分离到一株 HWM-PAHs 降解菌 HBS1,初步鉴定属于放线菌戈登氏菌属。该菌株能够利用多种 HWM-PAHs 作为唯一碳源和能源生长并降解这些底物。迄今为止,报道最多的降解多环芳烃的放线菌主要是分支杆菌和红球菌,而戈登氏菌属的菌株降解 PAHs 的特性和降解基因方面的报道很少。1994 年, M. Kastner 通过富集培养的方法得到的 *Gordonia* sp. BP9, 它可以利用蒽、芘作为唯一碳源生长,并证明它与分支杆菌、红球菌组成了污染土壤中主要的 PAHs 降解菌群^[18], 但该研究并未对其降解能力进行细致的描述。2007 年,刘磊等从石油污染的土壤中分离到 1 株降解石油烃类污染物的 *Gordonia* sp. He4, 该菌株能够以正十六烷、苯、萘、蒽、菲和芘作为唯一碳源生长^[19]。2009 年,杨秀虹等从污染土壤中分离出可以降解菲的 *Gordonia* sp., 该菌在 10 d 内对初始浓度为 50 mg/L 菲的去除率为 32.6%^[20]。本文也以菲作为唯一碳源进行了降解试验,发现初始浓度 50 mg/L 菲在 7 d 后的残留量几乎为零。并且,我们主要针对 HWM-PAHs 进行研究,分离的 *Gordonia* sp. HBS1 不但可以利用蒽和芘作为唯一碳源生长,而且还可以利用五环的苯并芘,六环的苯并花和茚并芘作为唯一碳源生长。HBS1 对四环的芘、苯并蒽等都表现出良好的降解能力,经过 17 d 的培养后对初始浓度 50 mg/L 芘的去除率为 97%。这些结果说明菌株 HBS1 可望应用于 HWM-PAHs 污染严重的土壤生物修复。通过对其降解多环芳烃的起始双加氧酶大亚基编码基因的检测分析发现,该菌中的双加氧酶大亚基基因的保守区域氨基酸序列与已报道的分支杆菌的双加氧酶大亚基基因保守区氨基酸序列相似性最高为 93.8%,预示菌株 HBS1 在降解多环芳烃过程中与这些菌株具有类似的起始反应

步骤,但该酶的基因序列以及该酶的催化反应特性与作用底物等还有待进一步研究,将通过双加氧酶大亚基基因 *nidA3* 全序列的克隆与分析并另作报道。

参考文献

- [1] Barnsley EA. The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene. *Canadian Journal of Microbiology*, 1975,21(7):1004-1008.
- [2] Heitkamp MA, Cerniglia CE. Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Bacterium Isolated from Sediment below an Oil Field. *Applied Environmental Microbiology*, 1988,54(6):1612-1614.
- [3] Mahaffey WR, Gibson DT, Cerniglia CE. Bacterial oxidation of chemical carcinogens; formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Applied Environmental Microbiology*, 1988,54(6):2415-2423.
- [4] Mueller JG, Chapman PJ, Pritchard PH. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Applied Environmental Microbiology*, 1989,55(12):3085-3090.
- [5] Boldrin B, Tiehm A, Fritzsche C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp.. *Applied Environmental Microbiology*, 1993,59(6):1927-1930.
- [6] Kelley I, Cerniglia CE. Degradation of a mixture of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. *Soil and Sediment Contamination*, 1995,4(1):77-91.
- [7] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, Xue W, Warshawsky D. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied Environmental Microbiology*, 1996,62(1):13-19.
- [8] Vila J, López Z, Sabaté J, Minguillón C, Solanas AM, Grifoll M. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two-and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, 2001,67(12):5497-5505.
- [9] Walter U, Beyer M, Klein J, Rehm HJ. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Environmental Microbiology*, 1991,57(5):671-676.
- [10] Caldini G, Cenci G, Manenti R, Morozzi G. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilise chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, 1995,61(1-2):225-229.
- [11] Klankeo P, Nopcharoenkul W, Pinyakong O. Two novel pyrene-degrading *Diaphorobacter* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp. isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009,108(6):488-495.
- [12] Khan AA, Wang RF, Cao WW, Doerge DR, Wennerstrom D, Cerniglia CE. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied Environmental Microbiology*, 2001,67(8):3577-3585.
- [13] Kim SJ, Kweon O, Freeman JP, Jones RC, Adjei MD, Jhoo JW, Edmondson RD, Cerniglia CE. Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low-and high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Environmental Microbiology*, 2006,72(2):1045-1054.
- [14] Zhou HW, Guo CL, Wong YS, Tam NF. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2006,262(2):148-157.
- [15] Cébron A, Norini MP, Beguiristain T, Leyval C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2008,73:148-159.
- [16] Gauthier E, Déziel E, Villemur R, Juteau P, Lépine F, Beaudet R. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *Journal of Applied Microbiology*, 2003,94(2):301-311.
- [17] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied Environmental Microbiology*, 1995,61(3):1104-1109.
- [18] Kästner M, Jammali MB, Mahro B. Enumeration and

characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41 (2) :267-273.

[19] 刘磊,李习武,刘双江,刘志培. 降解多环芳烃的菌株 *Gordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在非污染土壤修复

过程中的动态变化. 环境科学 (*Chinese Journal of Environmental Science*), 2007, 28(3) :617-622.

[20] 杨秀虹,汤婉环,李适宇,洪娟. 污染土壤中非降解菌的分离鉴定及其降解能力. 环境科学研究 (*Research of Environmental Sciences*), 2009, 22(6) :675-681.

Isolation and identification of a pyrene-degrading bacterial strain from contaminated soil

Li Xu, Zhen Gao, Mu Luo, Yanjun Cheng, Jinghua Jin*

Environmental Protection Research Institute of Light Industry, Beijing 100089, China

Abstract: [**Objective**] The aim of this study was to isolate high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons (HMW-PAHs) degrading bacterial strains, and to study their degradation potential. [**Methods**] We used sublimation method to enrich and isolate the degrading bacteria from coking plant samples. Morphological properties, the sequence homology of 16S rRNA and *gyrb* genes were used to identify the isolated strains. GC-MS was used to analyze the degradation potential against some HMW-PAHs. [**Results**] An HMW-PAHs degrading bacterium, HBS1, was obtained. HBS1 could use several HMW-PAHs such as pyrene, benzoanthracene, benzopyrene, chrysene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, benzo[g,h,i]perylene and fluoranthene as sole carbon source for growth. HBS1 was identified as *Gordonia* sp., based on the high sequence similarities (more than 99%) of both 16S rRNA gene and *gyrb* gene to those of *Gordonia amicalis*. When the initial concentration of pyrene was 50 mg/L, HBS1 could consume 97% of the pyrene in 17 days. One fragment of the dioxygenase gene was obtained by PCR with size about 300 bp, which was closest to the counterpart from *Mycobacterium* sp. with 93.8% similarity. [**Conclusion**] We isolated a strain HBS1 from seriously PAHs-polluted soils and identified as a *Gordonia* sp.. The isolate had the degradation potential of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons.

Keywords: high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, Microbial degradation, *Gordonia* sp., degrading efficiency

(本文责编:张晓丽)