

## 好氧氯苯降解菌的分离鉴定

李明堂<sup>1,2</sup>, 郝林琳<sup>3</sup>, 崔俊涛<sup>1</sup>, 曹国军<sup>1\*</sup>, 徐镜波<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 吉林农业大学资源与环境学院, 长春 130118)

(<sup>2</sup> 东北师范大学环境科学与工程系, 长春 130024)

(<sup>3</sup> 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062)

**摘要:**【目的】分离好氧氯苯降解菌,并通过研究降解特性为应用提供理论依据。【方法】利用富集培养技术分离菌株,通过形态、生理生化反应特征及 16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株,测定培养液中氯苯、其它氯苯类化合物和氯离子的浓度以及菌体细胞的密度和菌体细胞粗提液中邻苯二酚双加氧酶的活性,研究菌株的降解特性。【结果】16S rRNA 基因序列相似性比较表明,分离出的菌株与乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 的相似性高达 98.5%。以初始浓度为 50 mg/L 的氯苯为唯一碳源和能源时,120 h 内菌株对氯苯的降解率高达 98.2%,氯离子净释放量和氯苯降解量的摩尔比范围为 1:1.85-1:1.39,菌体细胞粗提液中邻苯二酚 1,2-双加氧酶的平均活性为 0.538 U/mg 蛋白质。加入葡萄糖后,菌体细胞数量和氯离子浓度明显增加,但单位细胞的氯苯降解能力明显下降。在二氯苯和三氯苯共存时,菌株对氯苯的降解能力受到明显的抑制作用,但对二氯苯有一定的降解作用,降解能力大小顺序为:1,3-二氯苯 > 1,2-二氯苯 > 1,4-二氯苯。【结论】分离出的好氧氯苯降解菌属于 *Acinetobacter* 属菌株,该菌株对氯苯和二氯苯均具有降解作用,可能通过邻位裂环途径降解氯苯,氯苯对菌株的降解能力和邻苯二酚 1,2-双加氧酶的活性具有明显的增强作用。

**关键词:** 不动杆菌; 系统进化分析; 氯苯; 邻苯二酚双加氧酶

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0586-07

氯苯是一种重要的有机溶剂和化工生产的中间体,是工业废水中的重要污染物,列于美国环保局 (EPA) 的水环境优先控制污染物名单之中<sup>[1]</sup>。由于使用广泛,生物降解性差,氯苯在多种环境介质中具有较高的检出率,对人体健康和生态系统安全构成了一定的威胁<sup>[2-4]</sup>。因此,国内外学者从不同角度研究了氯苯降解菌的筛选和降解特性,表明厌氧条件下微生物对氯苯的降解速度慢且容易形成致死产物,而好氧降解速度快且可实现氯苯的彻底降解,并释放出氯离子<sup>[5-7]</sup>。因此,挖掘可降解氯苯的微生物资源,研究其降解特性,对氯苯污染环境的治理具有重要的理论和现实意义<sup>[8]</sup>。本研究利用采集

的混合菌源,通过驯化和富集培养,分离好氧氯苯降解菌株;并利用 16S rRNA 基因序列进行了鉴定;研究了纯培养条件下该菌株对氯苯的一些降解特性。研究结果可为氯苯污染环境的生物修复和含氯苯化工废水的处理提供优势菌株,为实际应用提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器和试剂:** Agilent 6890N 气相色谱仪,配<sup>63</sup>Ni  $\mu$ -ECD,HP-5 弹性石英毛细管色谱柱(美国安捷伦公司);LRH -250A 生化培养箱(广东省医

基金项目:国家“973 项目”(2009CB426308);吉林省科技发展计划(20090413)

\* 通信作者。Tel: +86-431-84532955; E-mail: cgj72@126.com

作者简介:李明堂(1976-),男,山东威海人,副教授,主要从事环境污染生物修复研究。E-mail: limtdoc2008@163.com

收稿日期:2009-10-15;修回日期:2010-02-03

疗器械厂); BF-2000 型氮气吹干仪(上海勇规分析仪器有限公司); ZFA 型旋转蒸发器(上海玻璃仪器二厂); 754 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 奥利龙 868 型 ORION 868 型离子浓度计(美国), 电极采用 ORION CHN170 型氯离子复合电极。氯苯类化合物、正己烷、丙酮和无水硫酸钠均为分析纯试剂。氯苯首先以丙酮作为助溶剂, 配制质量浓度为 10 g/L 的标准储备液, 使用时在无菌条件下逐级稀释后再加入到培养基中, 曝气 10 min, 然后加入菌悬液, 摇匀, 培养实验开始时分析氯苯的初始浓度。

**1.1.2 培养基:**无机盐培养基和牛肉膏蛋白胨培养基的配制见参考文献[9]。

## 1.2 菌株的驯化富集和分离纯化

采集吉林石化公司污水处理厂好氧活性污泥、吉化公司污水处理厂排污口附近的表层底泥和江水, 混合后作为菌种来源。以氯苯为唯一碳源, 根据参考文献[9]的方法进行菌株的驯化和富集培养。将最后一轮的培养液逐级稀释, 取 0.2 mL 涂布于含 100 mg/L 氯苯的牛肉膏蛋白胨平板培养基上, 25℃ 下培养 24 h, 选择不同形态特征的菌落, 重新转接至含 50 mg/L 氯苯的无机盐培养基中培养, 验证单一菌株的降解能力。将降解能力强的菌株分离纯化后挑入斜面, 于 4℃ 冰箱中保存。驯化和富集培养过程中, 每次接种均做灭菌对照处理, 以保证结果的可靠性。

## 1.3 菌株鉴定

**1.3.1 16S rRNA 基因扩增和序列测定:**从平板中挑取一环菌体, 加入 100  $\mu$ L 无菌重蒸水中, 漩涡混匀后, 沸水浴 5 min, 13400  $\times$  g 离心 5 min, 上清液直接用于 PCR。细菌通用引物用于 16S rRNA PCR 的扩增。正向引物 Pf: 5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'; 反向引物 Pr: 5'-ACGGCTACCTTGTTA CGACT-3', 分别对应于大肠杆菌的 16S rRNA 基因的 8-27 和 1495-1514 碱基。PCR 反应采用 100  $\mu$ L 体系, 反应条件为: 95℃ 3 min; 95℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳电压为 5-8 V/cm, 时间 15 min。

用北京鼎国生物技术公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物, 经 DNA/RNA 定量仪定量后, 送至天根生物公司进行核苷酸序列测定, 将测定结果提交 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 获得登录号。

**1.3.2 序列同源性比较及系统发育分析:**将测得的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank, 利用 Blast 进行同源性序列比对, 选取同源性较高的序列用 DNAMEN 软件编辑成头尾一致并等长的序列后, 再选取属内同源性较高的细菌模式菌株的 16S rRNA 序列进行遗传距离计算, 用 ClustalW2.0 软件进行序列比对, 应用系统发育树分析软件 MEGA4.0 中 Neighbor-Joining 方法, 采用 Kimura 双参数计算模型构建系统树并计算序列相似性。另外, 已分离鉴定的氯苯类化合物的降解菌也包含在了系统发育树的构建中。

同时对分离纯化得到的菌株进行菌落特征和菌体形态结构的观察以及生理生化试验<sup>[10]</sup>。

## 1.4 菌悬液的制备

挑取一环菌株, 接种于含有 80 mg/L 氯苯的牛肉膏蛋白胨培养基中, 在 25℃ 和 160 r/min 条件下振荡避光培养 24 h 后, 于 13400  $\times$  g 下离心 5 min, 用无机盐培养基洗涤菌体, 再离心, 收集菌体。然后转入含 50 mg/L 氯苯的新鲜无机盐培养基中, 在 25℃ 和 160 r/min 条件下振荡避光培养, 菌体细胞的生长处于对数生长期时, 将培养液离心, 收集菌体。再利用无机盐培养基清洗, 离心, 然后取部分菌体再悬浮于少量无机盐培养基中作为菌悬液使用。制备完成的菌悬液的吸光度为 0.3 左右, 细胞数量大约为  $3.6 \times 10^{10}$  CFU/mL。

## 1.5 纯培养菌株的氯苯降解

**1.5.1 驯化对菌株降解能力的影响:**将分别由牛肉膏蛋白胨培养基和含 50 mg/L 氯苯的无机盐培养基中培养的菌体细胞制成的菌悬液加入到 pH 值为 7.2, 氯苯浓度为 50 mg/L 的无机盐培养基中进行培养。同时做灭菌的对照处理。

**1.5.2 菌株对氯苯的降解和菌体细胞生长:**将含 50 mg/L 氯苯的无机盐培养液中培养的菌体细胞制成的菌悬液加入到 pH 值为 7.2, 氯苯浓度为 50 mg/L 的 100 mL 无机盐培养基中培养。同时做加入 100 mg/L 葡萄糖的处理和灭菌对照处理。在规定的时间内采集样品, 测定氯苯的残留浓度、氯离子的浓度和培养液在 600 nm 处的吸光度。氯离子的净释放量 = 测定值 - 初始值。

**1.5.3 菌株对共存氯苯类化合物的降解:**将氯苯(CB)、1,3-二氯苯(1,3-DCB)、1,2-二氯苯(1,2-DCB)、1,4-二氯苯(1,4-DCB)、1,2,3-三氯苯(1,2,3-TCB)和 1,2,4-三氯苯(1,2,4-TCB)同时加入培养基中, 初始浓度分别为 10 mg/L, 在相同条件下进行

培养实验,测定各氯苯类化合物的浓度,计算降解率。

$$\text{降解率} = 1 - \frac{\text{培养液中的残留浓度}}{\text{初始浓度}} \times 100\%$$

### 1.6 粗提液的制备

将平板上的单个菌落挑至氯苯浓度为 50 mg/L 的 5 mL 无机盐培养基中,培养 3 d 后收集菌体细胞,加入到氯苯浓度为 50 mg/L 的 50 mL 无机盐培养基中继续培养,再收集菌体细胞,将其加入到 200 mL 无机盐培养基中培养 3 d,然后在 10000 × g 下离心,以 pH7.0 的 50 mmol/L 的磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次,然后重新悬浮于 1 mL 相同的缓冲液中制成细胞悬液,细胞悬液经过超声细胞破碎器破碎,再经 20000 × g 离心 30 min,取其上清液作为以氯苯为碳源和能源的菌体细胞的粗提液。将牛肉膏蛋白胨培养基培养的菌体细胞和无机盐培养基(无碳源)培养的菌体细胞按照上述相同的条件进行离心和细胞破碎,来制备各自条件下的粗提液。

### 1.7 分析和测定方法

**1.7.1 细菌生长的测定:**测定培养液在 600 nm 处的吸光度来表征菌体细胞的生长。

**1.7.2 氯苯和氯离子的测定:**氯苯用气相色谱法测定,氯离子用电极法测定,具体见参考文献[9]。

**1.7.3 邻苯二酚双加氧酶活性的测定:**邻苯二酚可在邻苯二酚 1,2-双加氧酶和邻苯二酚 2,3-双加氧酶的作用下催化开环,分别形成己二烯二酸和 2-羟基己二烯半醛酸,在 260 nm 和 375 nm 处分别有最大吸收峰,可利用紫外分光光度计分别测定这 2 个最大吸收峰处吸光度的增加量,来测得双加氧酶的酶比活。反应体系的总体积为 3.0 mL,其中包括 0.3 μmol 邻苯二酚,50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 1.0 mL,含有 0.3 - 0.9 mg 蛋白的粗提液。1 个单位的酶活力定义为在标准测定条件下(25℃)每 min 生成 1 mmol 的己二烯二酸或 2-羟基己二烯半醛酸所需的酶量<sup>[11,12]</sup>。酶的比活力(U/mg 蛋白质)计算公式:

$$\text{酶比活力} = \frac{(\Delta A_s - \Delta A_b) \times V \times 10^3}{\varepsilon \times \Delta T \times \text{mg}(\text{protein})}$$

$\Delta A_s$ :样品吸光度的变化值; $\Delta A_b$ :空白样吸光度的变化值; $V$ :反应体系的体积; $\varepsilon$ :摩尔吸光系数; $10^3$ :将  $\varepsilon$  的单位转换为  $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; $\Delta T$ :反应时间。

**1.7.4 蛋白质的测定:**采用 Bradford 比色法测定蛋白质含量<sup>[13]</sup>。

以上实验的结果表示为 3 次重复的平均值 ± 标

准差。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的筛选和鉴定

经过反复驯化和富集,将最后一次的培养液进行划线分离,筛选出了一株能以氯苯为唯一碳源和能源的菌株,编号为 CB001。

将菌株的 16S rRNA 测序结果(1240 bp)提交 GenBank(登录号 EU599570),利用 Blast 与已发表的 16S rRNA 基因序列进行同源性序列比对,发现菌株 CB001 的 16S rRNA 基因序列与乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)的同源性最高,达到 98.5%。因此,选取 20 株不动杆菌属的模式菌株和已分离的对氯苯类化合物具有降解能力的 7 株模式菌株的 16S rRNA 部分基因序列构建系统发育树(图 1)。由系统发育树可知,细菌 CB001 与已报道的不动杆菌属亲缘关系最近,与 BLAST 结果一致,与不动杆菌属内的其它模式菌株同源性为 97.83% - 95.11%,意味着菌株 CB001 在分类学地位上是归属于不动杆菌属。

菌株 CB001 在含有基质的牛肉膏蛋白胨琼脂平板上 25℃ 培养 48 h 后的菌落特征为:菌落呈圆形,表面光滑,颜色为淡黄色,边缘整齐,菌落透明。显微镜观察菌体短杆状,菌体大小为  $1.0 \times 1.8 \mu\text{m}$ 。革兰氏染色阴性,无芽孢。在无碳源的培养基中,菌落不生长。结合部分生化特性(表 1),菌株被鉴定为 *Acinetobacter* 属菌株。

表 1 菌株的形态和生理生化特性

Table 1 Morphological and biochemical character of the strain			
Item	Character	Item	Character
Colony	Light yellow, smooth	Hydrolysis of gelatin	-
Shape	Rod	Malonate	+
Size(μm)	1.0 × 1.8	D- malate	-
Gram staining	-	L-histidine	+
Transglutaminase	+	Histamine	-
Glucose	+	Ethanol	+
B-xylosidase	-	Oxidase	-
DL-lactate	+	Catalase	+
Glutarate	+	L-phenylalanine	+

### 2.2 驯化对菌株降解能力的影响

分别利用不同条件下驯化的菌体细胞制备的菌悬液进行氯苯的降解实验,结果显示(图 2),与含 50 mg/L 氯苯的无机盐培养基相比,牛肉膏蛋白胨培养基驯化的菌体细胞加入到降解体系后,菌株的适应期明显延长,对氯苯的降解能力明显减弱。这

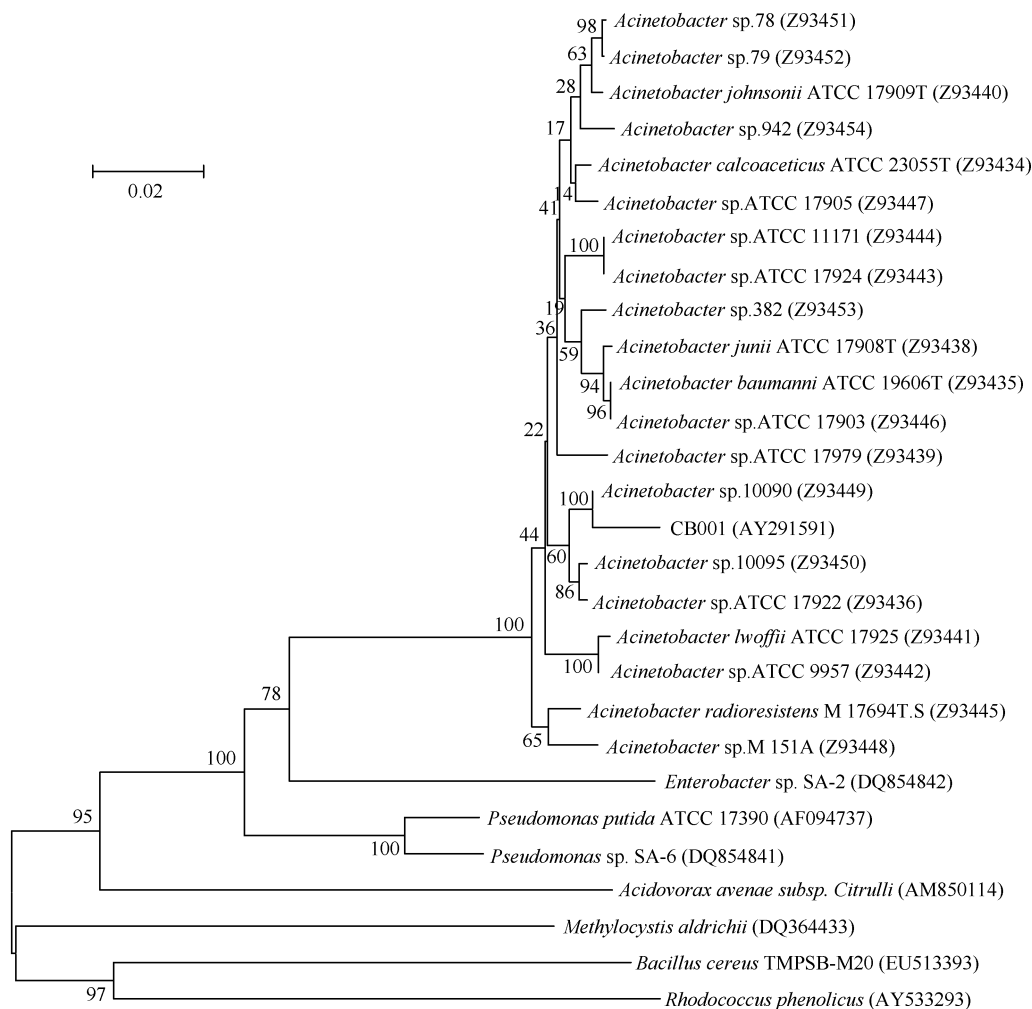


图 1 根据 16S rRNA 部分基因序列构建的菌株 CB001 与相关种属及已分离的氯苯类化合物降解菌的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic relationship between strain CB001 and other bacteria in the same genera and previously isolated bacteria degrading chlorobenzenes based on 16S rRNA sequence analysis. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The scale bar shows the number of substitutions per base.

表明,菌株 CB001 对氯苯的降解能力主要由培养液中氯苯的诱导产生。不同驯化条件下得到的菌株对氯苯的降解过程都表现出了一定的延滞期,即菌体细胞进入新的生长环境后要经过一段时间的调整 and 适应,以合成多种酶,并完善体内的酶系统和细胞的其它成分,然后才对氯苯表现出较强的降解能力。

### 2.3 菌株 CB001 对氯苯的降解和菌体细胞的生长

图 3 表明,以氯苯为唯一碳源和能源时,菌体细胞能不断繁殖,数量明显增加;随着细胞的不断增殖,氯苯的浓度不断下降,120 h 后氯苯的降解率达到了 98.2%。加入葡萄糖后,菌体细胞繁殖速度加快,细胞密度变大,但氯苯的降解率并没有增加,在实验中期反而有所下降。这说明葡萄糖在为细胞的生长和繁殖提供碳源和能源的同时,也降低了氯苯对菌株的诱导作用,导致单位细胞的降解能力明显

下降。

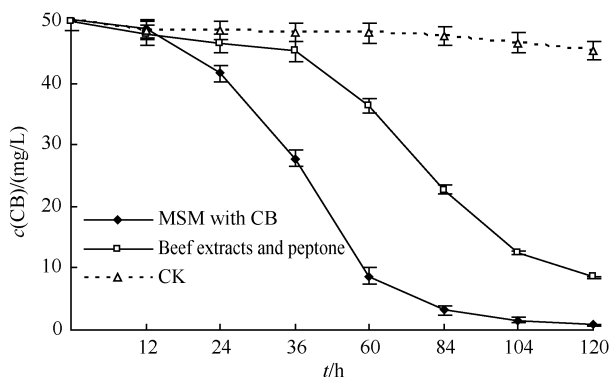


图 2 不同条件下驯化的菌体细胞对氯苯的降解

Fig.2 Degradation of CB by cells of the strain acclimated under different conditions.

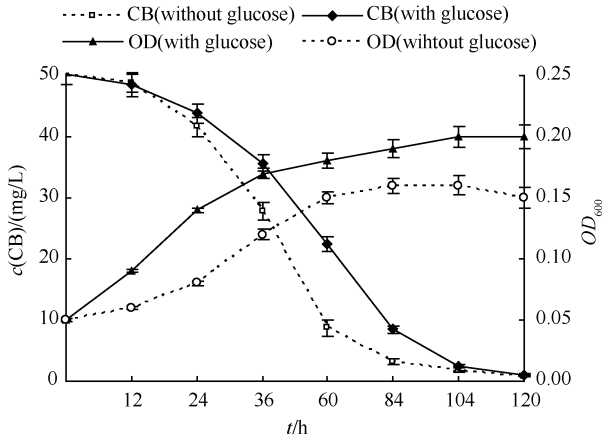


图3 氯苯降解率和细胞生物量变化

Fig. 3 Degradation rate of CB and biomass increase.

## 2.4 氯离子的释放和积累

对加入和未加入葡萄糖的两种培养液中的氯离子进行了测定,结果显示(图4),氯苯的降解过程伴随着氯离子的释放,随着氯苯的不断降解,氯离子的浓度逐渐增加。以氯苯为唯一碳源和能源时,氯离子净释放量和氯苯降解量的摩尔比范围为1:1.85-1:1.39。加入葡萄糖后,实验后期,氯离子的释放量明显增加,氯离子的净释放量和氯苯降解量的摩尔比达到了1:1.8。

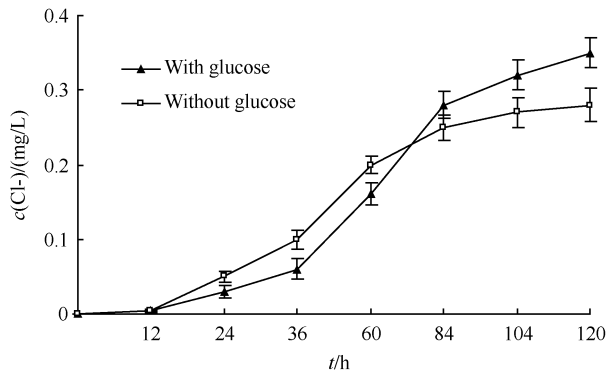


图4 氯苯降解过程中氯离子释放的变化

Fig. 4 Change in release of chloride ion in the process of degradation of CB liquids.

## 2.5 邻苯二酚双加氧酶的活性

不同培养条件下获得的菌体细胞粗提液中邻苯二酚双加氧酶的活性如表3所示。结果表明,在以氯苯为碳源和能源的培养体系中,菌体细胞的粗提液中皆可测出邻苯二酚1,2-双加氧酶和邻苯二酚2,3-双加氧酶的活性,但邻苯二酚1,2-双加氧酶的活性远远高于邻苯二酚2,3-双加氧酶的活性。这说明菌株CB001在降解氯苯的过程中邻苯二酚1,

2-双加氧酶起到了重要的催化作用下,可能通过邻位开环裂解途径降解氯苯。无机盐培养基中无碳源,降解菌不生长,两种加氧酶的活性都未检出。在牛肉膏蛋白胨培养基中培养的菌体细胞的粗提液中邻苯二酚1,2-双加氧酶的活性非常低,而邻苯二酚2,3-双加氧酶的活性则未检出。说明邻苯二酚1,2-双加氧酶为诱导酶,只有在诱导或胁迫条件下微生物才产生降解酶。

表2 不同基质中生长的菌体细胞粗提液中邻苯二酚双加氧酶活性

Table 2 Activities of catechol dioxygenase in crude extracts of cells grown on different substrates

Growth substrates	Catechol 1,2-dioxygenase U/mg (protein)	Catechol 2,3-dioxygenase U/mg (protein)
MSM with CB	0.538 ± 0.035	0.020 ± 0.012
Only MSM	-	-
Beef extracts and peptone medium	0.083 ± 0.013	-

"-" No detection

## 2.6 菌株CB001对共存氯苯类化合物的降解

图5表明,二氯苯和三氯苯共存时,氯苯的降解率为82.5%,菌株对氯苯的降解能力明显降低,但对二氯苯显示出了一定的降解能力,对三氯苯无明显的降解作用。菌株对二氯苯的降解能力大小顺序为:1,3-二氯苯 > 1,2-二氯苯 > 1,4-二氯苯。原因可能为:氯苯类化合物共存体系中的三氯苯对降解菌的生长产生了抑制效应,影响了菌株对氯苯和二氯苯类化合物的降解;菌株加入到氯苯类化合物共存体系后适应期可能会延长,在实验期间内表现出了降解能力的降低;化合物之间或者微生物对各化合物进行降解的过程中发生了联合作用,如三氯苯的存在抑制了菌株对氯苯的利用,而氯苯的存在又促进了菌株对二氯苯类化合物的降解。

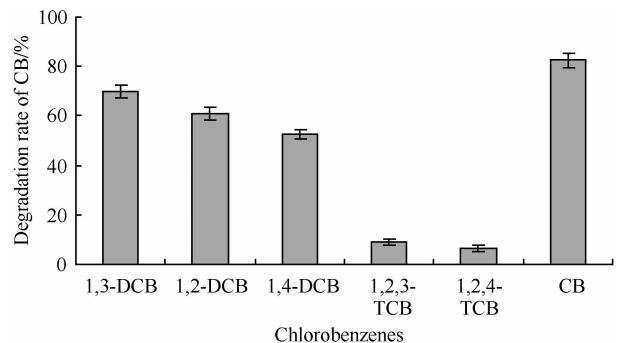


图5 菌株对共存氯苯类化合物的降解

Fig. 5 Degradation of coexisting CBs by the strain.

### 3 讨论

氯苯类化合物进入环境的历史已经有几十年了,自然界中的微生物可通过变异或形成诱导酶来适应氯苯污染环境,并且对氯苯产生降解作用。本研究利用采集的混合菌源进行好氧降解菌的驯化和富集,并进行了降解活性方面的研究,以期对氯苯污染环境的生物修复和含氯苯化工废水的生物处理提供优势菌株。

Monferrán 等人在以 1,2-二氯苯为唯一碳源的条件分离出了一株 *Acidovorax avenae* 菌,该菌株可将 1,2-二氯苯完全降解,并且将苯环上取代的氯离子全部释放出来,同时对 1,3-二氯苯和 1,4-二氯苯也表现出了一定的降解能力<sup>[14]</sup>。Adebusoye 等人分离出的多氯联苯降解菌 *Enterobacter* sp. SA-2 和 *Pseudomonas* sp. SA-6 可分别以二氯苯和三氯苯类化合物为唯一碳源进行生长<sup>[15]</sup>。Rehfuss 和 Urban 分离出一株 *Rhodococcus phenolicus* 菌能分别以苯酚、氯苯和二氯苯为唯一碳源进行生长<sup>[7]</sup>。但在 GenBank 中未发现可降解氯苯类化合物的 *Acinetobacter* 属菌株,因此菌株 CB001 的分离进一步丰富了可降解氯苯类化合物的菌种资源。由于 *Acinetobacter* 属菌株广泛分布于水、土和污物中,菌株 CB001 在有机污染物的生物降解方面具有很好的应用前景。

一般认为微生物对氯苯类化合物的好氧降解包括氧化形成氯邻苯二酚和由氯修饰的邻苯二酚 1,2-双加氧酶或 2,3-双加氧酶催化的邻位或间位裂环脱氯<sup>[16,17]</sup>。在以氯苯为唯一碳源和能源时,菌株 CB001 的细胞粗提液中邻苯二酚 1,2-双加氧酶的活性较高,并且培养液中氯离子的浓度随着氯苯浓度的降低而增加。因此,可推断菌株 CB001 通过邻位裂环途径降解氯苯,实现部分氯苯的彻底降解。葡萄糖共存于降解体系中时,在提供了碳源和能源促进细胞生长的同时也降低了氯苯的诱导作用,导致单位细胞降解能力的下降。表明,菌株 CB001 在缺乏易利用碳源时对氯苯可保持较高的降解活性,因此在含高浓度有机有毒污染物的化工废水生物处理方面具有较高的应用价值。在二氯苯和三氯苯共存的培养液中,菌株对氯苯的降解能力有所降低,但对二氯苯显示出了一定的降解能力,对三氯苯则无明显的降解作用。这可能是由于氯苯类化合物的

毒性随着氯原子的增加而增加,低氯苯可能对高氯苯的降解起到共代谢作用,而高氯苯则可能对菌体细胞的活性产生毒性作用<sup>[18]</sup>。

### 参考文献

- [1] US Environmental Protection Agency. National recommended water quality criteria. EPA-822-R-02-047, 2002, 13.
- [2] 刘玉萍. 松花江水体氯苯类污染物的污染研究. 环境科学与管理(*Environmental Science and Management*), 2006, 31(5): 91-92, 101.
- [3] Golden KA, Wong CS, Jeremiasion JD, Eisenreich SJ, Sanders G, Hallgren J, Swackhamer DL, Engstrom DR, Long DT. Accumulation and preliminary inventory of organochlorines in Great Lakes sediments. *Water Science & Technology*, 1993, 28: 19-31.
- [4] Brahushi F, Doerfler U, Schroll R, Munch JC. Stimulation of reductive dechlorination of hexachlorobenzene in soil by inducing the native microbial activity. *Chemosphere*, 2004, 55: 1477-1484.
- [5] Wu Q, Milliken, CE, Meier GP, Watts JE, Sowers KR, May HD. Dechlorination of chlorobenzenes by a culture containing bacterium DF-1, a PCB dechlorination microorganism. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36: 3290-3294.
- [6] Field JA, Sierra-Avlaréz R. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation*, 2008, 19(4): 463-480.
- [7] Rehfuss M, Urban J. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov. a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Systematic & Applied Microbiology*, 2005, 28: 695-701.
- [8] Vogt C, Alfrieder A, Lorbeer H, Hoffmann D, Wuenschea L, Babela W. Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2004, 68: 121-141.
- [9] Li MT, Hao LL, Sheng LX, Xu JB. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 6878-6884.
- [10] 东秀珠, 蔡妙莫. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Hayaish O, Katagiri M, rothberg S. Studies on oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 229: 905-920.

- [12] Sala-Trepat JM, Evans WC. The meta cleavage of catechol by *Azobacter* species. *European Journal of Chemistry*, 1971, 20: 400-413.
- [13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 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, 332-333.
- [14] Monferrán MV, Echenique JR, Wunderlin DA. Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer. *Chemosphere*, 2005, 61: 98-106.
- [15] Adebuse SA, Picardal FW, Ilori MO, Amund OO, Fuqua C, Grindle N. Aerobic degradation of di- and trichlorobenzene by two bacteria isolated from polluted tropical soils. *Chemosphere*, 2007, 66: 1939-1946.
- [16] Sommer C, Gorisch H. Enzymology of the degradation of (di) chlorobenzenes by *Xanthobacter flavus* 14p1. *Archives of Microbiology*, 1997, 167: 384-391.
- [17] Mars AE, Kingma J, Kaschabek SR, Reineke W, Janssen DB. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 1309-1318.
- [18] 瞿福平, 张晓健, 何苗, 顾夏声. 氯苯驯化污泥中氯苯类同系物共存对氯苯生物降解影响. *中国环境科学 (China Environmental Science)*, 1998, 18(3): 202-205.

## Identification and characterization of an aerobic bacterium degrading chlorobenzene

Mingtang Li<sup>1,2</sup>, Linlin Hao<sup>3</sup>, Juntao Cui<sup>1</sup>, Guojun Cao<sup>1\*</sup>, Jingbo Xu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Resources and Environment, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(<sup>2</sup>Department of Environmental Science and Engineering, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

(<sup>3</sup>College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To isolate and characterize aerobic bacteria to degrade effectively chlorobenzene (CB). [ **Methods** ] We used enrichment culture to isolate and characterized bacterial strain through the observation of morphological and biochemical characters and analysis of 16S rRNA gene sequences. We determined the concentration of CB, other chlorobenzenes and released Cl<sup>-</sup>, densities of strain cells and activities of catechol dioxygenase in crude extracts from cells in pure culture liquid. [ **Results** ] We isolated a bacterium able to effectively degrade CB and assigned as strain CB001. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene showed the similarity of 98.5% between strain CB001 and *Acinetobacter calcoaceticus*. In pure culture with CB as the sole carbon and energy source, 98.2% of CB at initial concentration of 50 mg/L was degraded; the molar ratio of the amount of net released Cl<sup>-</sup> to the amount of CB degraded by strain CB001 ranged from 1:1.85 to 1:1.39; the average activity of catechol 1,2-dioxygenase in crude extracts was 0.538 U/mg protein. The addition of glucose increased significantly the density of cells and the concentration of net released Cl<sup>-</sup>, but decreased obviously the ability of per cell to degrade CB. The capacity of strain CB001 to degrade CB was inhibited in di-chlorobenzenes and tri-chlorobenzenes coexisting culture system. The order in which strain CB001 readily degraded di-chlorobenzenes was 1,3-dichlorobenzene > 1,2-dichlorobenzene > 1,4-dichlorobenzene. [ **Conclusion** ] The results showed that strain CB001 belonged to the genus *Acinetobacter*, which showed capacity to degrade CB, di-chlorobenzenes. Strain CB001 possibly degraded CB through the pathway of meta ring cleavage. The addition of CB in the culture liquid increased significantly the ability of strain CB001 to degrade CB and the activity of catechol 1,2-dioxygenase.

**Keywords:** *Acinetobacter*; phylogenetic analysis; chlorobenzene; catechol dioxygenase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB426308) and the Program of Science and Technology Development Plan of Jilin Province (20090413)

\* Corresponding author. Tel: +86-431-84532955; E-mail: cgj72@126.com

Received: 15 October 2009/ Revised: 3 February 2010