

芘降解菌群驯化过程中的演变

李晓明¹, 张明江¹, 金京华², 刘双江¹, 姜成英^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

²轻工业环境保护研究所, 北京 100089

摘要: 【目的】筛选、驯化获得芘的高效降解菌群, 为利用其对多环芳烃污染土壤进行生物修复奠定理论基础。【方法】利用芘作为底物在矿物盐培养基 (MSM) 中富集驯化, 得到了一个混合菌群 PYR, 利用分光光度计和 HPLC 测定混合菌群的生长与降解的关系, 并对混合菌群降解多环芳烃底物的广谱性和降解芘性能的稳定性进行了测定; 通过冷冻干燥的方法对菌群进行了保藏, 通过 HPLC 的方法对保藏后复壮的菌群的降解性能进行了测定; 通过培养和非培养方法对菌群的多样性进行了调查, 通过构建 16S rRNA 基因文库的方法, 分析焦化厂原始土壤中菌群组成和混合菌群转接 3 次 (PYR-3)、6 次 (PYR-6) 和 9 次 (PYR-9) 后的组成变化。【结果】该混合菌群可以利用芘作为唯一碳源和能源生长, 12 d 对芘的降解率为 89%, 对于菲 (86%) 及荧蒽 (49%) 也具有较高的降解率, 但不能降解萘和茚并芘, 并且该菌群的降解活性经过多次转接和冷冻干燥保藏保持稳定, 从混合菌群中分离得到了 9 株菌, 这 9 株菌分布在无色杆菌属 (*Achromobacter*), 芽胞杆菌属 (*Bacillus*), 节杆菌属 (*Arthrobacter*), 微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和类土地杆菌属 (*Parapedobacter*)。系统进化分析表明变形菌门是土壤原样 (100%) 及以芘为底物富集的混合菌群中的主要类群 (PYR-3, 83%), 与原土壤样品相似, PYR-3 中 γ -Proteobacteria (占变形菌门的 77%) 中假单胞菌属的菌依然占主导地位, 但由于菌群的多样性增加, 假单胞菌属所占比例减少。随着富集代数的增加, 菌群的多样性进一步增加, γ -Proteobacteria 的比例在混合菌群中的比例下降 (PYR-6 中占变形菌门的 33%, PYR-9 中占变形菌门的 18%), 而 β -Proteobacteria 在混合菌群中的比例上升 (PYR-3 中占变形菌门的 13%, PYR-6 中占变形菌门的 36%, PYR-9 中占变形菌门的 55%)。【结论】混合菌群具有很强的芘的降解性能, 并且随着传代次数的增加, 菌群的组成趋于稳定。

关键词: 芘, 细菌群落, 菌群结构, 16S rRNA 基因文库, 生物降解

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1260-08

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是指 2 个或 2 个以上苯环以线状、角状或簇状排列的稠环化合物, 在环境中普遍存在。环境中的多环芳烃除极少量来源于生物体 (某些藻类、植

物和细菌) 内合成, 森林草原自燃起火、火山喷发等自然活动外, 绝大部分由人为活动污染造成, 主要来自于两个方面: (1) 煤、石油和木材及有机高分子化合物的不完全燃烧, 即热解成因; (2) 原油在开采运

基金项目: 国家“863 计划” (2007AA061101)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: jiangcy@sun.im.ac.cn

作者简介: 李晓明 (1985 -), 女, 河北省衡水市人, 硕士研究生, 从事环境微生物及 PHAs 污染研究。E-mail: lxmgucas@126.com

收稿日期: 2012-05-04; 修回日期: 2012-06-02

输、生产和使用过程中的泄露及排污,即石油的稳定性与疏水性增强,遗传毒性更高^[1]。多环芳烃(尤其是四环以上的多环芳烃)易于吸附在富含有机物的土壤和沉积物中^[2],从而在环境中长期滞留,并进入食物链,在生物体内富集,具有致癌、致畸、致突变的危害性,对自然界生物安全和人类健康构成巨大威胁。例如,菲对皮肤有刺激作用和致敏作用也有研究发现,菲是引起姐妹染色单体交换的一种诱导剂并且是阻断细胞间通讯的一种潜在的抑制剂^[3]。

微生物遗传变异较快,容易获得新的降解基因,因此具有很强的分解代谢能力和多种代谢途径,虽然多环芳烃是一种极为稳定的难降解物质,但因其分布广泛,环境中的一些微生物可以经过适应和诱导,对多环芳烃进行代谢分解,甚至矿化,因此成为治理环境中多环芳烃污染物最有效的“武器”。

目前研究报道有许多属的细菌均可以代谢多环芳烃,然而,大多数菌株只能降解低分子量的多环芳烃,能够降解高分子量多环芳烃的菌则相对较少^[4-5]。微生物对两环和三环多环芳烃的降解机理已经研究的比较透彻^[6],而对四环和四环以上高分子量多环芳烃的生物降解途径的认识还不足,至今仍是研究的热点。

芘是多环芳烃的主要代表物,在空气、水体和沉积物中广泛存在,它常被作为监测多环芳烃污染的指示物和其它多环芳烃光化学降解、生物降解的模型分子^[7]。因此,本实验室从焦化厂污染土壤中以芘作为底物富集得到了一个混合菌群。通过构建16S rRNA文库,分析比较在不同时期混合菌群组成的差异,以此来推断在芘的降解过程中起主要作用的菌株,为多环芳烃的生物降解奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品:样品取自北京焦化厂污染土壤,该厂主要生产焦炭、煤气、煤焦油和其他煤化工产品,有近50年的污染历史。样品选地表10 cm下的表层土壤。

1.1.2 主要仪器和试剂:液相色谱(HPLC, Agilent 1200, 美国);紫外-可见分光光度计(1601UV-visible spectrophotometer, Shimadzu); PCR仪(Biometra)。

芘(fluoranthene), 芘(pyrene)(化学纯,购自百灵威化学试剂公司);二氯甲烷(分析纯,北京化工厂);乙酸乙酯(分析纯,北京化工厂);甲醇(色谱纯, Fisher 化学试剂公司, 美国)、乙腈(色谱纯, Fisher 化学试剂公司, 美国);基因组纯化试剂盒(Beijing SBS Genetech); PCR产物纯化试剂盒(Tiangen, 北京); pGEM-T载体(Promega公司, 美国)。

1.1.3 培养基:MSM培养基: K_2HPO_4 : 1.60 g、 KH_2PO_4 : 0.40 g、 NH_4NO_3 : 1.0 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2 g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.10 g、NaCl: 0.10 g、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$: 0.01 g、Trace element solution^[8]: 2 mL、Vitamin solution: 0.1 mL、蒸馏水: 1000 mL; pH = 7.0。121℃灭菌20 min。Vitamin solution: 生物素: 100 mg、烟酸: 350 mg、盐酸硫胺素: 300 mg、对氨基苯甲酸: 200 mg、盐酸吡哆辛: 100 mg、泛酸钙: 100 mg、钴胺素: 50 mg、蒸馏水: 1000 mL。LB培养基: 胰蛋白胨: 10 g、酵母提取物: 5 g、NaCl: 10 g、pH = 7.4

1.2 芘降解菌群的富集及多环芳烃降解能力的测定

在装有玻璃珠(10 mm)的灭菌500 mL三角瓶内分别加入2 mL浓度为20 mg/mL的芘的二氯甲烷溶液,置于通风橱中,待 CH_2Cl_2 挥发完毕后,再向其中添加200 mL MSM,使培养液中芘的浓度为200 mg/L。取5 g土壤添加到培养液中,于30℃暗处振荡培养(100 r/min),培养7 d后,取上清进行转接,连续转接3代。

将100 mL PYR-I(驯化3代后的混合菌群)的培养液6882 × g离心10 min,收集菌体。利用7 mL MSM悬浮,将菌悬液接种到含有200 mg/L芘的20 mL MSM中,以不接种菌液的添加芘的MSM培养基作为空白对照,在不添加芘的MSM中,接种相同量的菌液,每组做3个平行,30℃,100 r/min暗处培养12 d。培养液分别在0 d, 2 d, 4 d, 6 d, 8 d, 10 d, 12 d取样,利用分光光度计测定菌群 OD_{600} 。添加芘的培养液均利用10 mL乙酸乙酯萃取2次,提取MSM中残留的芘,将萃取有机相合并后定容至20 mL,取1 mL萃取液用0.22 μm滤膜过滤,利用HPLC进行检测,检测流动相为乙腈:水(65:35);流速1.2 mL/min;检测波长254 nm;进样量为5 μL^[9]。

将混合菌群 PYR-1 无菌离心后,加保护剂,真空冷冻干燥,4℃ 保藏于安瓿管。为了了解混合菌群冷冻保藏后萘降解能力的稳定性,将保藏菌群接种于 20 mL 含萘的 MSM 培养液中,使培养液中萘的最终浓度为 200mg/L,30℃,100 r/min 培养 12 d 后进行萘降解能力检测,测定的具体条件见 1.2.2。

为了测定 PYR-6(富集 6 代后的混合菌群)降解底物的广谱性,在装有玻璃珠(10 mm)的灭菌 50 mL 三角瓶内分别加入萘、菲、芘、荧蒹、茚并芘的二氯甲烷溶液 200 μL,其中萘、菲、芘、荧蒹母液的浓度均为 20 mg/mL,而茚并芘母液的浓度为 2 mg/mL,将三角瓶置于通风橱中待二氯甲烷挥发完毕后,再向其中添加 20 mL MSM,使培养液中萘、菲、芘、荧蒹的终浓度均为 200 mg/L,茚并芘的浓度为 20 mg/L。分别接种,30℃,100 r/min 培养,7 d 后萃取并检测,方法如 1.2.2,除萘的检测波长设为 220 nm,茚并芘的检测改为梯度洗脱,即前 27 min 为 65% 的乙腈,35% 的水,27 - 50 min,乙腈的浓度逐渐上升到 100%^[9]。

1.3 萘降解菌群中单菌的分离鉴定

富集得到的降解菌群利用 LB 平板划线分离,将分离、纯化得到的单菌落以 27F,1492R 为引物进行 PCR 扩增,PCR 产物送测序公司测序。测序结果在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)利用 Blast 进行序列比对。

1.4 焦化厂土壤样品及萘降解菌群的群落结构分析

焦化厂土壤样品细菌多样性及萘降解菌群群落结构变化调查通过构建和分析不同时期样品的 16S rRNA 文库进行,四个文库的构建分别为焦化厂初始样品、驯化 3 代(PYR-3)、6 代(PYR-6)及 9 代(PYR-9)后的混合菌群。

1.4.1 样品总 DNA 的提取及纯化:首先根据样品或收集菌体的量,在三角瓶中加入玻璃珠(0.1 mm)与 DNA 提取液,利用涡旋混合器剧烈震荡 10 min,再加入溶菌酶、蛋白酶 K,混合均匀,37℃ 水浴 40 min,上下颠倒 4 次,然后加入 SDS buffer,68℃ 水浴 40 min,上下颠倒 4 次,12235 × g 离心,收集上清。加入 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,剧烈振荡 10 min,4℃ 14359 × g 离心 10 min;收集上清液,再加入氯仿:异戊醇(24:1)溶液剧烈振荡 5 min,14359 × g 离心 10 min;上清液中加入等体积的异丙

醇,冰上沉淀 40 min,14359 × g 离心 10 min,弃去上清;加入 0.5 mL 70% 乙醇纯化 DNA,4℃,14359 × g 离心 15 min.,室温干燥,溶解于 20 μL ddH₂O 中,-20℃ 储藏备用。将 DNA 粗提物经基因组纯化试剂盒纯化获得 DNA 纯化产物。

1.4.2 PCR 扩增及克隆文库的构建:以 DNA 纯化产物作为模板进行 16S rRNA 基因扩增。扩增引物为细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 907R(5'-CCGTC AATTCCTTTRAGTTT-3')。PCR 扩增产物用 MiniElute PCR 产物纯化试剂盒纯化后,与 pGEM-T 载体 4℃ 过夜连接,并转化到大肠杆菌 DH5α 中,在含有 IPTG 和 Xgal 的氨苄平板上 37℃ 过夜培养。挑取阳性克隆,进行菌落 PCR 及测序。测序引物为 M13F:5'-TGTA AACGACGGC CAGT-3', M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'。利用 Mega(version 4)^[10] 软件对测序所得结果进行分析,生成 FASTA 文件,将 FASTA 文件上传至 Ribosomal database project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) 数据库进行分析,以得到混合菌群各属的组成情况。将 16S rRNA 序列相似性大于 97% 的克隆划为同一个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)^[11],利用 Dotur 软件统计文库中仅有 1 个克隆的 OTU 数,利用公式(1)进行文库覆盖率(Coverage)计算。

$$C = [1 - n1/N] \times 100\% \quad (1)$$

其中 N 为文库阳性克隆数,n1 为文库中仅有 1 个克隆的 OTU 数^[12]。

2 结果

2.1 萘降解菌群的富集及多环芳烃降解能力的测定

以萘为底物,对焦化厂污染土壤样品富集 3 次后,得到了混合菌群 PYR-3,该菌群可以以萘做为唯一碳源和能源生长。对该菌群以萘为底物进行分离纯化,未得到能够利用萘进行生长的纯菌株。

萘为底物时,经 12 d 培养,混合菌群 PYR-3 的生长从延迟期发展到衰亡期,对萘的降解率逐渐增大,12 d 时,降解率达到 89%。前 8 d,萘的降解速率达到 18.9 mg/(L·d),随后降解速率减小。而混合菌群在不加萘的 MSM 中培养时,没有生长,表明混合菌群利用萘作为唯一碳源和能源生长(图 1)。

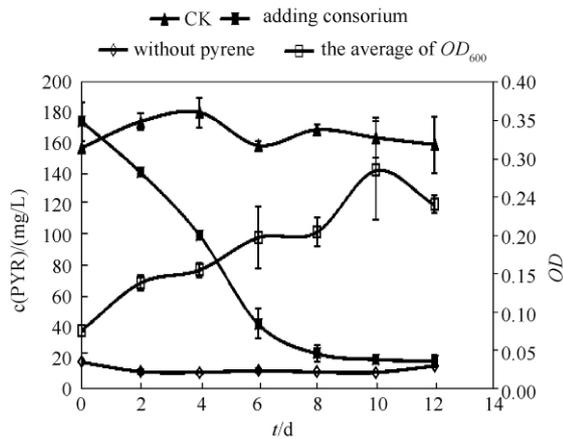


图1 混合菌群随着培养时间延长对芘的降解及 OD₆₀₀的变化

Fig. 1 Growth of consortium and the degradation of pyrene

PYR-3 经冷冻干燥保藏 3 个月活化后, 培养 12 d 后, 菌群对芘的降解率为 93%, 这说明混合菌群保持了降解活性。混合菌群 PYR-6 对于菲 (86%)、芘 (83%)、荧蒹 (49%) 具有较好的降解率, 而对萘和茚并芘并不发生降解, 说明了不同微生物对于多环芳烃有一定的偏好性。

2.2 混合菌群中单菌的分离鉴定结果

利用 LB 培养基, 从以芘作为底物富集得到的混合菌群中分离得到了 9 株菌, 通过 16S rRNA 序列分析和 Blast 比对表明: 9 株菌中 2 株属于无色杆菌属 (*Achromobacter*), 4 株属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 剩余 3 株分别属于节杆菌属 (*Arthrobacter*), 微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 和类土地杆菌属 (*Parapedobacter*)。(表 1)

表 1 平板划线分离得到的单菌落的鉴定结果

Table 1 the identification results of the isolated bacteria

Strain	Genus	Identity / %
XM-1	<i>Arthrobacter</i>	99
XM-2	<i>Exiguobacterium</i>	99
XM-3	<i>Bacillus</i>	99
XM-3'	<i>Achromobacter</i>	99
XM-3''	<i>Bacillus</i>	99
XM-4	<i>Parapedobacter</i>	94
XM-5	<i>Bacillus</i>	99
XM-5'	<i>Bacillus</i>	99
XM-6	<i>Achromobacter</i>	99

2.3 焦化厂土壤样品及芘降解菌群的群落结构分析

2.3.1 焦化厂土壤样品群落结构分析: 挑选 200 个

阳性克隆进行测序。土壤样品文库分析结果发现, 焦化厂初始污染样品中可检测到的菌群种类较少, γ -Proteobacteria 中假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的菌占绝大多数, 约为 95%。其余的菌为 α -Proteobacteria 中食酸菌属 (*Acidovorax*) 的菌 (0.5%), 伯克霍尔德里氏菌属 (*Burkholderia*) (0.5%), β -Proteobacteria 的 *Diaphorobacter* (2%) 以及未培养菌 (2%) (图 2)。

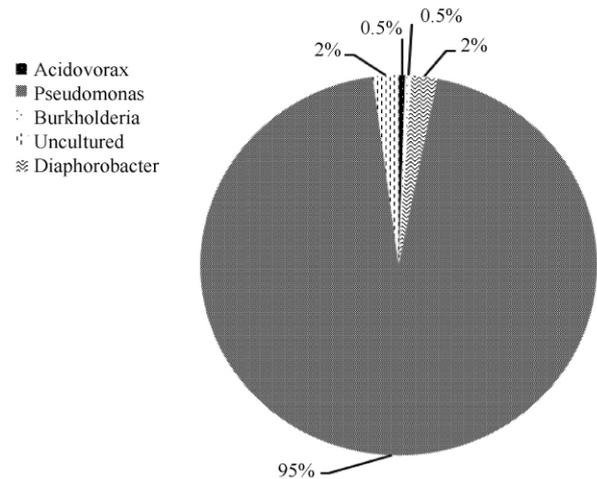


图 2 焦化厂污染土壤样品菌群结构

Fig. 2 The bacterial constitution of the contaminated soil of Beijing Coking Chemical Plant.

2.3.2 芘降解菌群的群落结构分析: 从 PYR-3、PYR-6、PYR-9 构建文库中分别挑取阳性克隆 221 个、217 个和 182 个进行测序, 将序列比对结果相似性 97% 以上的克隆子定义为一个 OTU, 克隆文库 PYR-3、PYR-6 和 PYR-9 的覆盖率分别为 85%、74% 和 55%。文库分析结果显示: 经过芘富集后, 菌群结构发生了较大改变。虽然经过 3 次 (PYR-3)、6 次 (PYR-6) 和 9 次 (PYR-9) 富集后的优势菌群依然是变形菌门 (分别为 83%、71% 和 67%), 但变形菌门中各纲的组成发生了改变, PYR-3 中 γ -Proteobacteria (占变形菌门的 77%) 中假单胞菌属的菌依然占主导地位, 但由于菌群的多样性增加, 假单胞菌属所占比例减少 (表 2)。随着富集代数的增加, 菌群的多样性进一步增加, γ -Proteobacteria 的比例在混合菌群中的比例下降 (PYR-6 中占变形菌门的 33%, PYR-9 中占变形菌门的 18%), 而 β -Proteobacteria 在混合菌群中的比例上升 (PYR-6 中占变形菌门的 36%, PYR-9 中占变形菌门的 55%) (图 3)。

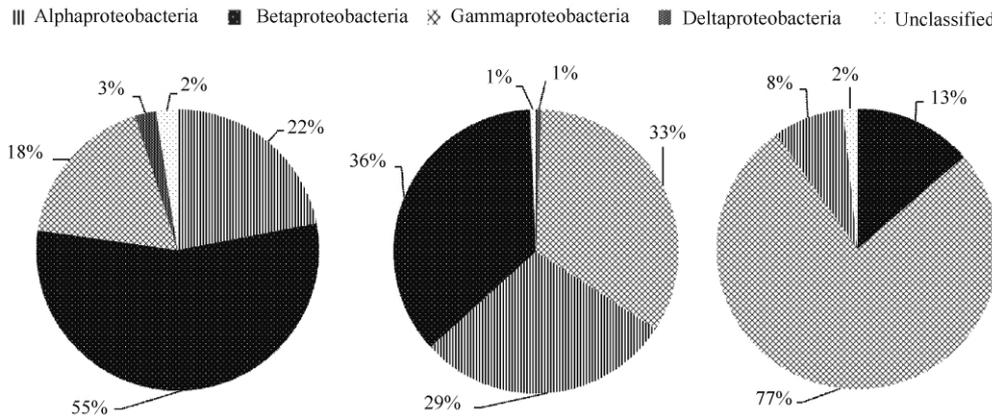


图3 混合菌群 PYR-9, PYR-6, PYR-3 中变形菌门中各纲的组成情况

Fig.3 The class constitution of bacterial consortia in PYR-9, PYR-6, PYR-3.

将变形菌纲中的菌群进一步分类到属,结果表明,随着传代的进行,混合菌群的组成趋于稳定。在 α -Proteobacteria中,混合菌群PYR-3中的主要菌群为未分类菌(1.8%)和苍白杆菌属(*Ochrobactrum*, 1.8%)组成,混合菌群PYR-6由未分类菌(9.2%)和短波单胞菌属(*Brevundimonas*, 3.7%)组成, PYR-9中主要由未分类(8.2%)和*Brevundimonas*(3.8%)组成,而短波单胞菌属在PYR-3中也存在,不过所占的比例较低(0.5%);在 β -Proteobacteria中, PYR-3的主要菌群为未分类菌群(4.5%),*Xenophilus*(2.7%)和*Achromobacter*(2.7%)组成,而在混合菌群PYR-6主要菌群组成为*Pigmentiphaga*(8.3%), PYR-9中主要菌群组成为未分类菌(21.4%)和*Pigmentiphaga*(9.9%),*Xenophilus*和*Achromobacter*在PYR-6和PYR-9中依然存在,但是所占的比例相对于PYR-3有所降低; γ -Proteobacteria中,混合菌群PYR-3的主要类群为假单胞菌属(*Pseudomonas*, 31.7%)和类固醇杆菌属(*Steroidobacter*, 25.8%),混合菌群PYR-6, PYR-9的主要类群均为*Steroidobacter*,所占比例分别为8.3%, 9.9%;此外,混合菌群PYR-6和PYR-9中均发现了 δ -Proteobacteria中的菌(表2)。

3 讨论

目前,许多研究着眼于单一菌株对多环芳烃的降解研究^[13-14],但是单一菌株对高分子量多环芳烃的降解能力是有限的,而在环境中多环芳烃并不是单一存在的,所以筛选甚至构建高效的多环芳烃降

解菌群,为多环芳烃污染土壤的生物修复提供菌种资源具有很好的应用前景。本实验室曾富集获得了一个高效降解芘、荧蒹和苯并芘的混合菌群1-18-1,并对菌群结构进行了分析^[15],但由于没有合适的保藏法,致使该菌群经过长期转接后,失去了降解活性。本研究利用芘为底物从焦化厂污染土壤中经富集、传代培养,得到了芘的高效降解菌群,并且尝试找到一种合适的菌种保藏法,菌群保藏3个月后活化,通过检测,该菌群具有较高的降解率,说明经过传代及合适的保藏以后,混合菌群的降解效率并没有减弱,这为今后利用混合菌群进行多环芳烃污染地点的修复提供了菌种资源。

通过构建16S rRNA基因克隆文库的方法分析了降解菌群组成的变化情况,分析发现混合菌群主要由变形菌门组成。通过对建库结果分析发现,混合菌群组成随驯化时间的延长发生了改变,菌群多样性增加,组成趋于稳定;随驯化代数增加,芘富集得到的混合菌群中, γ -Proteobacteria所占比例减少, β -Proteobacteria所占比例增大;有些起初没有检测到的菌在新菌群出现,但也有部分菌种从混合菌群中消失;降解菌群对不同多环芳烃化合物降解能力不同,说明不同的微生物对于多环芳烃有一定的偏好性。从文库分析结果可以看出,存在于混合菌群中的菌大多是以往发现的具有含苯环污染物降解能力的菌属^[16-18],但这些菌单独存在时,一般只适合低分子量芳烃化合物的降解,而且降解活性较低。本研究从被污染原位环境筛选具有芘降解能力的菌群并进行驯化,最终得到了降解活性较高且较稳定的芘降解菌群。

表 2 混合菌群 PYR-3, PYR-6 和 PYR-9 中各属百分比组成及变化
Table 2 The proportions of genus in bacteria consortia PYR-3, PYR-6 and PYR-9

class	P-9		P-6		P-3	
	genus	%	genus	%	genus	%
α-proteobacteria	<i>Brevundimonas</i>	3.8	<i>Brevundimonas</i>	3.7	<i>Brevundimonas</i>	0.5
	<i>Devosia</i>	0.5	<i>Devosia</i>	1.4	<i>Devosia</i>	0.9
	/	/	<i>Bosea</i>	3.2	<i>Bosea</i>	0.5
	<i>Hyphomicrobium</i>	0.5	<i>Hyphomicrobium</i>	0.5	/	/
	<i>Prosthecomicrobium</i>	0.7	<i>Prosthecomicrobium</i>	0.9	/	/
	/	/	<i>Methylobacterium</i>	0.9	/	/
	<i>Sphingopyxis</i>	0.5	/	/	/	/
	/	/	<i>Porphyrobacter</i>	0.9	/	/
	unclassified	8.2	unclassified	9.2	unclassified	1.8
	/	/	/	/	<i>Ochrobactrum</i>	1.8
	/	/	/	/	<i>Phenylobacterium</i>	0.5
	<i>Afipia</i>	0.5	/	/	/	/
	/	/	<i>Shinella</i>	1.8	<i>Shinella</i>	0.5
	<i>Xenophilus</i>	1.1	<i>Xenophilus</i>	6.5	<i>Xenophilus</i>	2.7
β-proteobacteria	<i>Achromobacter</i>	0.5	<i>Achromobacter</i>	0.9	<i>Achromobacter</i>	2.7
	<i>Pigmentiphaga</i>	9.9	<i>Pigmentiphaga</i>	8.3	<i>Pigmentiphaga</i>	0.9
	/	/	<i>Massilia</i>	0.5	/	/
	/	/	<i>Variovorax</i>	0.5	/	/
	<i>Ottowia</i>	2.2	<i>Ottowia</i>	3.2	/	/
	<i>Hydrogenophaga</i>	1.6	/	/	/	/
	<i>Bordetella</i>	0.5	/	/	/	/
	unclassified	21.4	unclassified	4.1	unclassified	4.5
	<i>Steroidobacter</i>	9.9	<i>Steroidobacter</i>	8.3	<i>Steroidobacter</i>	25.8
	/	/	<i>Pseudoxanthomonas</i>	1.8	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.5
	/	/	<i>Acinetobacter</i>	1.4	/	/
	/	/	<i>Citrobacter</i>	0.5	/	/
	/	/	<i>Escherichia/Shigella</i>	2.8	/	/
	γ-proteobacteria	<i>Thermomonas</i>	1.1	<i>Thermomonas</i>	7.4	/
/		/	unclassified	1.8	/	3.1
<i>Pseudomonas</i>		0.5	/	/	<i>Pseudomonas</i>	31.7
/		/	/	/	<i>Stenotrophomonas</i>	0.5
<i>Luteimonas</i>		0.5	/	/	/	/
δ-proteobacteria	unclassified	1.6	unclassified	0.5	/	/
unclassified		1.6		0.5		1.4

由于克隆文库不可能完全覆盖混合菌群中所有类群的菌株,所以在分析不同时期各属的变化情况时,存在一定的局限性,为此我们采取培养和非培养两种方法进行菌群分析。对混合菌群进行分离培养,当以芘为底物进行分离时,未得到能够利用芘为碳源和能源进行生长的纯菌株,而以 LB 培养基进行分离纯化时,得到了 9 株菌,其中 2 株属于 *Achromobacter*, 4 株属于 *Bacillus*, 剩余 3 株分别属于 *Arthrobacter*, *Exiguobacterium* 和 *Parapedobacter*。这些属的菌曾经在许多芳烃污染物降解的研究中分离得到过,如骆苑蓉等人^[19]的研究中筛选得到一苯并芘降解菌群,从中分离得到 5 株纯菌,其中包括

Exiguobacterium, *Arthrobacter* 和 *Bacillus*。目前的研究工作正在对分离菌株的生理特性进行调查。由菌群分析结果及以往文献报道可以看出,在不同的多环芳烃降解体系中,存在许多相似菌属,因此,对这些菌如何共同作用,执行自然环境中污染物降解任务的研究是污染土壤生物修复的基础。

参考文献

- [1] Jacob J, Karcher W, Wagstaffe PJ. Polycyclic aromatic compounds of environmental and occupational importance. *Fresenius Z Analytic Chemistry*, 1986, 317: 101-114.

- [2] Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995, 143:79-165.
- [3] Weis LM, Rummel AM, Masten SJ, Trosko JE, Upham BL. Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of gap junctional intercellular communication. *Environmental Health Perspective*, 1998, 106:17-22.
- [4] Zhang H, Kallimanis A, Koukoku AI, Drinas C. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65 (1):124-131.
- [5] Luan TG, Yu KS, Zhong Y, Zhou HW, Lan CY, Tam NF. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere*, 2006, 65 (11):2289-2296.
- [6] 张丹, 李兆格, 包新光, 李江波, 梁海华, 段康民, 沈立新. 细菌降解萘、菲的代谢途径及相关基因的研究进展. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2010, 26 (6):726-734.
- [7] Lei AP, Hu ZL, Wong YS, YeeTam NF. Removal of xanthene and pyrene by diverent microalgal species. *Bioresource technology*, 2007, 98:273-280.
- [8] Konopka A. Isolation and characterization of subsurface bacterium that degrades aniline and methylaniline, *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 111, 93-100
- [9] 环境保护部. 水质多环芳烃的测定液液萃取和固相萃取高效液相色谱法. 中华人民共和国国家环境保护标准 (HJ 478-2009), 行业标准-环保, 2009, 1-15
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8):1596-1599.
- [11] Allison E, Mccaig L, Anne G, James IP. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65 (4):1721-1730.
- [12] 王剑飞, 萨仁高娃, 李铁刚, 申之义, 于心科. 苏禄海深海沉积物古菌群落结构多样性研. *地球科学进展 (Advances in earth science)*, 2010, 25 (7):766-774.
- [13] 王春明, 李大平, 王春莲. 微杆菌 3-28 对萘、菲、蒽、芘的降解. *应用与环境生物学报 (Chinese Journal of Applied and Environmental Biology)*, 2009 (03):361-366.
- [14] Tiwari JN, Reddy MMK, Patel DK, Jain SK, Murthy RC, Manickam N. Isolation of pyrene degrading *Achromobacter xylooxidans* and characterization of metabolic product. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26 (10):1727-1733.
- [15] Sun R, Jin JH, Sun GD, Liu Y, Liu ZP. Screening and degrading characteristics and community structure of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial consortium from contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2010, 22 (10):1576-1585.
- [16] Baek SH, Kim KH, Yin CR, Jeon CO, Im WT, Kim KK, Lee ST. Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Degrading Phenol and Reducing Nitrate Under Low-Oxygen Conditions. *Current Microbiology*, 2003, 47 (6):462-466.
- [17] Wan NS, Gu JD, Yan Y. Degradation of p-nitrophenol by *Achromobacter xylooxidans* Ns isolated from wetland sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 59 (2):90-96.
- [18] Blumel S, Busse HJ, Stolz A, Kämpfer P. *Xenophilus azovorans* gen. nov., sp. nov., a soil bacterium that is able to degrade azo dyes of the Orange II type. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51:1831-1837.
- [19] 骆苑蓉, 胡忠, 郑天凌, 黄栩. 红树林沉积物中的微生物对苯并 [a] 芘的降解研究. *厦门大学学报 (Journal of Xiamen University)*, 2005, 44:75-79.

Population shift and degrading characteristics of a pyrene-degrading bacterial consortium during incubation process

Xiaoming Li¹, Mingjiang Zhang¹, Jinghua Jin², Shuangjiang Liu¹, Chengying Jiang^{1*}

¹ Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Environmental Protection Research Institute of Light Industry, Beijing 100089, China

Abstract: [Objective] The work aimed to obtain pyrene-degrading bacterial consortium and use it for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil. [Methods] We enriched and incubated a bacterial consortium utilizing pyrene as the sole carbon source from the contaminated soil of Beijing Coking Chemical Plant. We analyzed the degrading ability and growth of the consortium by high performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometer. We investigated the degradation activities of the consortium after several times transfer and freeze-drying deposit. We also investigated the shift of bacterial consortium composition after several times transfer by combining of culture-dependent and culture-independent methods. We constructed and analyzed the 16S rRNA gene clone libraries at different transfer times (3 times PYR-3, 6 times PYR-6 and 9 times PYR-9) for monitoring the bacterial population changes. [Results] The degradation rate of pyrene, phenanthrene and fluoranthene reached 89%, 86% and 49% respectively after incubation of the consortium for 12 days. The degradation activities of the consortium were stable after several times transfer and freeze-drying deposit. We isolated nine strains from the consortium, affiliated to genus of *Achromobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Exiguobacterium* and *Parapedobacter*. Phylogenetic analyses showed that Proteobacteria were the main group at contaminated soil sample (100%) and bacterial consortium incubated in pyrene (PYR-3, 83%). Bacterial community structure was shifted and biodiversity was increased during the transfer process, the proportions of γ -Proteobacteria was decreased from 77% (PYR-3) to 33% (PYR-6) and 18% (PYR-9), while β -Proteobacteria increased from 13% (PYR-3) to 36% (PYR-6) and 55% (PYR-9). [Conclusion] The bacterial consortium could utilize pyrene as sole carbon and energy source for growth and the degradation ability for pyrene was stable.

Keywords: pyrene, bacterial consortium, bacterial community structure, 16S rRNA gene library, biodegradation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA061101)

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: jiangcy@sun.im.ac.cn

Received: 4 May 2012 / Revised: 2 June 2012