

枯草芽孢杆菌对多环芳烃的降解能力研究

李 丽¹, 钟 鸣^{1*}, 周启星², 李 坤¹, 杨 铮¹, 姜树坤¹

(1. 沈阳农业大学 辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁 沈阳 110161;

2. 中国科学院 沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 从长期受多环芳烃污染的土壤中分离出 1 株菲降解菌——菌 II, 经生理生化及 16S rDNA 分析鉴定, 该菌株为枯草芽孢杆菌。在单基质菲、芘反应体系中, 该菌株具有较强的降解能力。菌 II 不但可以在高浓度的多环芳烃存在下生长良好而且对高浓度多环芳烃有较高的降解能力。多环芳烃与重金属 Cu^{2+} 的加入对多环芳烃降解菌有很大的影响。在 Cu^{2+} 浓度小于 15 mg/L 时, 菌 II 能以多环芳烃为唯一碳源的培养基中生长良好, Cu^{2+} 浓度过高将导致菌体死亡。

关键词: 多环芳烃; 生物降解; 枯草芽孢杆菌; 铜离子

中图分类号: O625. 15 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 3268(2007)04 0062 04

Study on Characteristics of *Bacillus subtilis* strain II for the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

LI Li¹, ZHONG Ming^{1*}, ZHOU Qi xing, LI Kun², YANG Zheng¹, JIANG Shu kun¹

(1. Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province,

Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. Key Laboratory of Terrestrial

Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110161, China)

Abstract: Most of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are carcinogenesis and environmental pollutant. A phenanthrene degrading strain, strain II isolated from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil was studied and the experiment showed that the strain was able to utilize phenanthrene as the sole carbon source. Based on physical-biochemical characteristics and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence, strain II was identified as *Bacillus subtilis*. Strain II was able to utilize phenanthrene or pyrene as the sole carbon source for growth. After 15 days of cultivation, the concentrations of PAHs could approach 0. PAHs and heavy metal Cu^{2+} could influence the growth of strain II. Strain II could grow well in the medium containing PAHs as sole carbon source when concentrations of Cu^{2+} was lower than 15 mg/L; High Cu^{2+} concentrations inhibited the growth of strain II and even resulted in its death.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Biodegradation; *Bacillus subtilis*; Cu^{2+}

多环芳烃(PAHs)是一类广泛存在于环境中的有机污染物。石油化工产品的采集与使用、各种有机物的不完全燃烧及化学工业生产等过程产生的多

环芳烃由于不易降解且易在生物体内积累而备受关注^[1]。多环芳烃污染的治理工作大多处于研究阶段, 分离降解多环芳烃的优势菌仍然是解决多环芳

收稿日期: 2006 12 26

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA649060); 中国科学院陆地生态过程重点实验室开放课题资助项目; 辽宁省自然科学基金项目(20062111)

作者简介: 李 丽(1982), 女, 辽宁北票人, 在读硕士研究生, 主要从事污染土壤的生物修复研究。

通讯作者: 钟 鸣(1974), 女, 辽宁沈阳人, 副教授, 主要从事生物化学的教学工作。

烃污染问题的重要内容。一些研究报道表明^[2], 降解 PAHs 的菌株很多, 但是能够有效降解高浓度 PAHs 的菌株目前报道的还很少, 大部分菌对多环芳烃的降解效果十分有限。

自然土壤中, 重金属对土壤微生物的毒性作用会导致微生物活性和数量的降低, 从而影响到多环芳烃的生物降解。重金属与多环芳烃之间产生的交互作用对微生物的存活有着极重要的影响^[3]。笔者从长期被石油污染的土壤中分离出一株枯草芽孢杆菌, 研究了其对单基质菲、芘的降解, 并初步研究了该菌在不同浓度重金属 Cu^{2+} 存在下的生长情况。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

在抚顺受石油污染的地点采样, 以菲为唯一碳源, 采用定向富集法, 逐级驯化, 共筛选到 3 株优势生长菌, 其中菌 II 生长迅速、外形较大, 选做供试菌株。

1.2 主要试剂

菲 (HPLC > 99%)、芘 (HPLC > 97%), 其他试剂均为 AR 级国产试剂。用于细菌 16S rDNA 序列扩增的引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 染色、形态观察及生理生化鉴定^[4] 个体形态观察: 将已充分活化的菌 II 接种到 LB 液体培养基中, 30 °C 培养 18 h, 在光学显微镜下观察细胞形态、大小。

菌落特征: 将活化菌种在 LB 平板上划线接种, 30 °C 培养箱中倒置培养 2 d, 观察菌落形态, 并测量菌落大小。芽孢染色采用孔雀绿法。

1.3.2 16S rDNA 序列分析法鉴定^[5] 以 CTAB / NaCl 法提取菌 II 的总 DNA 为模板, P1 和 P2 通用引物对菌的 16S rRNA 基因进行扩增:

P1: 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'

P2: 5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3'

反应条件: 95 °C 5 min; 55 °C 1 min; 72 °C 2 min; 39 个循环, 72 °C 10 min。在 25 μL 的反应体系中加入 15.8 μL ddH₂O, 2.5 μL 10 \times buffer, 0.5 μL 10 mmol/L dNTP 混合物, 2 μL 5 mmol/L 引物, 15 ng/ μL 模板 2 μL , 5 U/ μL TagE 0.2 μL 。

将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中 16S rRNA 基因序列进行同源性比较。

1.4 菌株 II 对菲、芘降解能力的研究

MS 液体培养基中加入不同浓度的菲, 使其终浓度分别为 50, 100, 150, 200, 250 和 300 mg/L, 分别装入小三角瓶, 每瓶 20 mL, 高温高压灭菌 0.5 h。加入配制好的菌悬液后混匀, 使细胞密度为 1×10^8 个/mL, 于 30 °C 下 150 r/min 振荡培养。

培养过程中每天取样 1 次, 每次取 7 mL, 做 3 次平行, 分别用环己烷超声波萃取 3 次, 萃取液经定容 25 mL 后进行高效液相色谱 (安捷伦 - 1100 型液相色谱仪) 分析。分析流动相为 78% 色谱纯甲醇水溶液, 流速为 1.0 mL/min, 分离柱为 C18 反相色谱柱, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL , 检测波长 254 nm。菌 II 对不同浓度芘降解能力的研究方法同上。

1.5 不同浓度 Cu^{2+} 对菌 II 生长的影响

菌体湿重的测定方法: 将菌 II 菌株接种于以菲为唯一碳源 MS 培养基, 并分别加入 5, 10, 15, 20, 25 mg/L Cu^{2+} , 培养 5 d, 离心后称重。

1.6 多环芳烃对菌 II 蛋白质含量的影响

菌 II 接种到 LB+ 多环芳烃培养基和 LB 培养基 (对照)。取相同湿重的菌体, 利用考马斯亮蓝方法进行菌 II 总蛋白质含量的测定。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态学鉴定 菌 II 在以菲为唯一碳源的固体培养基上生长呈圆形乳白色菌落, 边缘光滑。显微镜下观察为杆状, 有芽孢。

2.1.2 培养特征 菌 II 革兰氏染色反应为阴性, 无荚膜, 菌体呈杆状, 侧面平行, 两端钝圆, 好氧, 最适温度 26 ~ 38 °C。菌落圆形, 直径 2.8 ~ 4 mm。边缘光滑, 菌落与培养基紧贴, 灰白色、湿润、不透明。不易挑取, 在斜面上生长的菌苔清亮, 无沉淀。

2.1.3 生理生化特征 对菌 II 的生理生化特征进行了测定, M. R 阴性, 接触酶阳性, Y - P 阳性, 明胶液化阳性, 不耐盐, 硝酸盐还原阳性, 淀粉水解阳性, 甘露醇、谷氨酸、酪氨酸、蔗糖、葡萄糖利用阳性。根据《常见细菌系统鉴定手册》的标准鉴定, 初步判断菌 II 应该归属于枯草芽孢杆菌属。

2.1.4 菌 II 16S rDNA 基因的 PCR 扩增和序列分析 PCR 扩增和测序结果表明, 以菌 II 总 DNA 为模板, 用 16SrDNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 琼脂糖浓度为 1.5%, 得到 1 条约 1.5 kb 的片段将扩增片段回收、测序, 用 BLAST 软件与 GenBank 中的序列

进行比较, 该扩增片段长为 1460bp, 与 *Bacillus subtilis* 的 16S rRNA 基因序列相似性为 99%。

2.2 多环芳烃降解细菌的降解能力

菌 II 菲降解率测定结果见图 1, 接种后的第 2 天降解速度开始增加, 菌 II 在 100mg/L 和 150 mg/L 菲浓度下的降解效果近似, 到第 10 天, 降解率可分别达到 96.3%和 99.3%。芘降解测定结果表明, 菌 II 在以 150mg/L 芘为唯一碳源下, 第 10 天其降解率可达 94.3%(图 2)。随着菲和芘浓度的升高, 菌 II 降解能力有所下降, 表明高浓度多环芳烃对该菌株有一定的抑制作用。

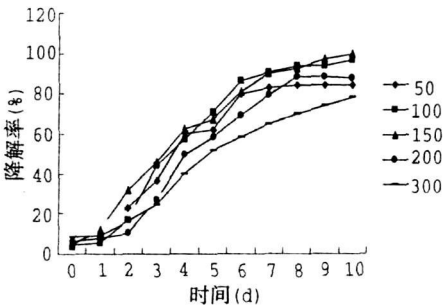


图 1 菌 II 对不同浓度菲的降解率

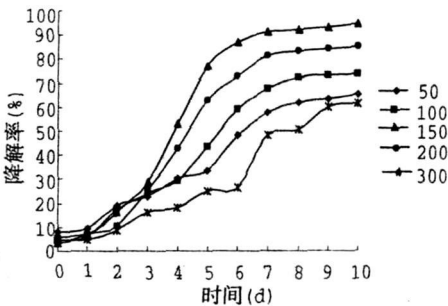


图 2 菌 II 对不同浓度芘的降解率

2.3 不同浓度 Cu²⁺ 对菌 II 生长的影响

菌 II 在不同浓度 Cu²⁺ 培养基中培养一段时间后, 取相同体积的培养液 100 mL, 离心后进行湿重测定, 结果见表 1。

表 1 不同浓度 Cu²⁺ 对菌 II 菌体湿重的影响

项目	Cu ²⁺ 浓度(mg/L)					
	0	5	10	15	20	25
湿重(mg)	11.605	11.358	9.383	6.790	0.988	0.370

由表 1 可以看出, 由于 Cu²⁺ 的加入, 影响了菌 II 的生长, 在 Cu²⁺ 浓度小于 15mg/L 的情况下, Cu²⁺ 对菌 II 的生长影响不大, 表明该菌株可以在重金属存在下的环境中生长存活, 浓度过高导致菌体死亡。

2.4 多环芳烃对菌 II 蛋白质含量的影响

取菌 II 接种到 LB、LB+菲、LB+芘培养基中, 培养 5d 后, 取相同湿重的菌体 50 mg, 超声波破碎后, 进行菌体蛋白质含量的测定, 见表 2。

表 2 菌 II 蛋白质含量的测定结果

项目	LB	LB+菲	LB+芘
OD ₅₉₅	0.069	0.103	0.107
蛋白质含量(mg)	8.519	12.716	13.210

注: 表中数据均为 3 次重复的平均值

由上述数据可以看出, 菌 II 经过菲或芘诱导培养后, 其蛋白质含量呈明显增加的趋势; 在相同菌体的情况下, 与对照组相比其产生了大量的蛋白, 由于在培养基中加入了多环芳烃, 初步推测菌 II 产生了与降解多环芳烃相关的酶和蛋白。

3 讨论

1) 能够降解多环芳烃的细菌有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 等^[6]。枯草芽孢杆菌属是土壤中最常见的一类, 其芽孢的抵抗力很强, 在干燥状态下可生存数十年。并可迅速形成菌膜, 具有生物拮抗作用, 能够起到生物屏障和抑菌作用, 能够产生生物表面活性物质等代谢产物^[7]。综合菌 II 的生长条件和降解能力, 本试验筛选的菌 II 适合用于降解多环芳烃的土壤原位修复。

2) 有报道表明, 环境中存在的多环芳烃会诱导菌体双加氧酶量增加^[8], 其蛋白质含量增加, 这主要是由于土壤微生物对污染物的忍耐性和适应性以及对污染物的降解和吸附作用引起了污染物生物可利用性的改变, 使降解过程得以完成^[9], 本试验中, 菌 II 在降解多环芳烃时, 有大量的蛋白产生, 它们是否是降解过程中诱导出来的酶或其他相关蛋白, 还需进一步的分离纯化鉴定才可以得出。

3) 污染土壤的重金属元素铜, 对土壤磷酸酶和过氧化氢酶活性具有不同程度的抑制作用, 有效铜和土壤代谢熵呈极显著的正相关, 而与微生物生物量碳、微生物生物量氮、微生物熵 (下转第 71 页)

3 结论

本研究以褐土为供试土壤,以小白菜作指示植物,通过盆栽模拟试验研究在土壤 Pb, Zn 复合污染条件下,小白菜对 Pb, Zn 的吸收规律。结果表明:小白菜对 Pb 的吸收量与土壤中 Pb 的添加量的相关系数为 0.969^{**},小白菜对 Zn 的吸收量与土壤中 Zn 的添加量的相关系数为 0.972^{**},都达到了极显著的正相关。土壤中 Pb 的存在对小白菜吸收 Zn 未产生明显影响,而土壤中 Zn 的存在则对小白菜吸收 Pb 产生抑制作用。重金属在小白菜体内的分布不同。小白菜主要将 Pb 积累于根部,而 Zn 则更多的被积累在地上部。说明 Pb 在小白菜体内迁移能力较差,而 Zn 则在小白菜体内迁移能力强,将积累的 Zn 大部分转移到茎叶部位。

参考文献:

[1] 夏来坤, 郭天财, 康国章. 土壤重金属污染与修复技术研究进展[J]. 河南农业科学, 2005(5): 88 - 102.

[2] 李博文, 杨志新, 谢建治. 土壤 CdZn Pb 复合污染对植物吸收重金属的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23 (5): 908 - 911.

[3] 白 瑛, 张祖锡. 灌溉水污染及其效应[M]. 北京: 北京

农业大学出版社, 1988.

[4] 李学德, 华日茂, 岳永德, 等. 合肥市蔬菜中铬铅镉和铜污染现状评价[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(2): 143 - 147.

[5] 张志权, 束文圣, 蓝崇钰, 等. 定居植物对重金属的吸收和再分配[J]. 植物生态学报, 2001, 25(3): 306 - 311.

[6] 席玉英, 上官铁梁, 张红, 等. 矮牡丹体内无机元素分布规律的研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(1): 136 - 139.

[7] 谢建治, 张书廷, 赵新华, 等. 潮褐土镉锌复合污染对小白菜生长的影响[J]. 天津大学学报, 2005, 38(5): 426 - 431.

[8] GB17138 - 97, 土壤质量 铜、锌的测定——火焰原子吸收分光光度法[S].

[9] 严森, 凌其聪, 鲍征宇. 微波消解 - 火焰原子吸收光谱法测定芦苇秆中的镉[J]. 环境监测管理与技术, 2006 (2): 25 - 26.

[10] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 1981.

[11] 王松良, 郑金贵. 13 种小白菜基因型对 Cd, Pb, As 累积特征比较[J]. 福建农林大学学报, 2005, 34(3): 304 - 308.

[12] 张春荣, 李红, 夏立江, 等. 镉锌对紫花苜蓿种子萌芽及幼苗的影响[J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 96 - 99.

(上接第 64 页)

均呈显著负相关^[10]。Cu²⁺ 浓度对菌 II 的生长有很大的影响,在 10mg /L 以下,多环芳烃和 Cu²⁺ 共同存在菌 II 生长良好,但随着 Cu²⁺ 浓度的升高而逐渐导致菌体死亡。重金属和多环芳烃复合污染中主要是多环芳烃降解菌对重金属的耐性机制,有些研究还表明,重金属对生物体的胁迫存在离子效应,重金属离子的不同价态,以及阴、阳离子形态影响生物体的胁迫程度^[11]。在林地土壤中, Cu²⁺ 对土壤细菌的毒害很大^[12]。鉴于土壤环境污染的日趋复杂和多样化,本研究中筛选出来的菌 II 能够适应低浓度重金属 Cu²⁺ 的影响,其在多环芳烃和重金属双重污染的土壤中有一定的应用价值。

参考文献:

[1] Susan C Wilson, Kenvin C Jones. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. Environ Pollut, 1993, 81: 229 - 249.

[2] 金赞芳, 陈英旭. 环境的 PAHs 污染及其生物修复技术研究进展[J]. 农业环境保护, 2001, 20(2): 123 - 125.

[3] Gogolev A, Wilke B M. Combination effects of heavy metals and fluoranthene on soil bacteria[J]. Soil Fertil Soils, 1997, 25: 274 - 278.

[4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349 - 370.

[5] F 奥斯伯, R 布伦特. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 332 - 333.

[6] 王秀丽, 徐建民, 姚槐应, 等. 重金属铜、锌、镉、铅复合污染对土壤环境微生物群落的影响[J]. 环境科学学报, 2003, 23(1): 22 - 27.

[7] 马沛, 钟建江. 微生物降解多环芳烃(PAHs)的研究进展[J]. 生物加工过程, 2003, 1(1): 42 - 46.

[8] 邵宗泽, 许晔, 马迎飞, 等. 2 株海洋石油降解细菌的降解能力[J]. 环境科学, 2004, 25(5): 133 - 137.

[9] 钟鸣, 周启星, 许华夏, 等. 降解性细菌对菲诱导的蛋白及酶活性应答反应[J]. 应用生态学报, 2004, 15(5): 871 - 875.

[10] 蔺昕, 李培军, 孙铁珩, 等. 石油污染土壤的生物修复与土壤酶活性关系[J]. 生态学杂志, 2005, 24(10): 1226 - 1229.

[11] Baath E. Measurement of heavy metals tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization centrifugation[J]. Soil Biol Biochem, 1992, 24(11): 1167 - 1172.

[12] Wang YP, Liu CL, Wu L, *et al.* Effect of copper zinc, cadmium and chromium on soil microorganisms and plant growth[J]. J Agric For, 1986, 35(2): 97 - 109.