植物营养与肥料学报 2007,13(4):725 - 729
Plant Nutrition and Fertilizer Science

木糖氧化无色杆菌反硝化亚种细菌的分离鉴定及其菲降解特性研究

武凤霞[1], 范丙全[2*], 刘建玲[1]
(1 西北大学生命学院, 陕西西安 710069; 2 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 利用选择性富集培养及升华法,从石油污染的土壤中分离到 2 株菲降解细菌,它们在以菲为唯一碳源的培养基上生长良好。应用 BIOLOG 细菌鉴定系统和分子生物学方法对两株细菌进行鉴定,两株菌分别为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)和木糖氧化无色杆菌反硝化亚种(*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*),两株菌均具有邻苯二酚氧化酶活性。两株细菌在液体培养条件下都表现较强降解菲的能力,液体培养 60 h 约 90% 的加入菲被降解。通过测定液体培养基中菲浓度和菌体密度变化发现,菌株降解菲的量与其生长密度相关; 随着菌体浓度(吸光度)的增加,代谢底物菲的浓度明显降低,两株菌混合使用能够大幅度提高降解菲的能力。

关键词: 多环芳烃; 菲; 降解; 坚强芽孢杆菌;木糖氧化无色杆菌反硝化亚种
中图分类号: S154.38+1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**:1008-505X(2007)04-0725-05

Isolation of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* and it's degradation of phenanthrene

WU Feng-xia[1], FAN Bing-quan[2*], LIU Jian-ling[1]
(*1 Collage of Life Science, Northwest University; Xi'an 710069, China;*
2 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing.100081, China)

Abstract: Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria was conducted in plate medium using selective enrichment culture. Two isolates of FC31 and FC32 were obtained by the means of sublimation from petroleum-contaminated soil. Both strains grew well on sole carbon of phenanthrene and degraded it efficiently. FC31 was identified as *Bacillus firmus* and FC32 as *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* based on analysis of 16S rDNA sequence and Biolog-GN profile. Both strains were of catechol dioxygenase activity and higher phenanthrene-degrading capacities in the broth assay with about 90% of phenanthrene added being degraded during 60 hours incubation. The quantity of phenanthrene degradation was correlated with the *OD* value. The results indicated that the ability of phenanthrene-degrading was strongly increased when they were used as a mixture.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs); phenanthrene; degradation; *Bacillus firmus*; *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*

多环芳烃(PAHs)是由两个或两个以上的苯环以线形排列、弯接或簇聚方式构成的一类化合物。菲(Phenanthrene)是多环芳烃的一种,由三个苯环连接而成。菲不仅在污染环境中的含量高,对人的呼吸道和皮肤有毒害作用,而且有着与致癌 PAHs 类似的区域结构,即: 一个"湾"区和一个"K"区[1],这两个独特的区域结构使得菲经常被作为研究 PAHs 的模式化合物[2]。PAHs 在环境中分布广泛且具有潜在的致癌、致畸、致突变作用[3]。自从 20 世纪 60 年代发现土壤微生物对多环芳烃具有降解作用以

收稿日期: 2006-04-19　　**修改稿收到日期**: 2006-07-25
基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB410809)资助。
作者简介: 武凤霞(1980—),女,河北怀安人,硕士,主要从事应用微生物研究。Tel: 13521378082, E-mail: wufengxia0570@163.com
* 通讯作者 Tel: 010-68918683, E-mail: bqfan@caas.ac.cn

来[4]，各国科学家在生物降解 PAHs 方面做了大量研究，包括筛选高效降解 PAHs 菌株及微生物降解 PAHs 的作用效果、降解机理和修复手段等，研究表明微生物在降解 PAHs 方面具有广阔的应用前景。其中筛选高效降解 PAHs 菌株作为资源占有着重要地位。目前已报道的可降解 PAHs 菌株主要集中在鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）[5]等几个属。我国近年来在 PAHs 降解菌筛选方面也做了大量的研究。张杰[6]、夏颖[7]等分离筛选出一批高效降解多环芳烃的菌株，但是到目前国内外对木糖氧化无色杆菌（*Achromobacter xylosoxidans*）降解菲的研究鲜见报道。本研究从土壤中分离得到 2 株高效降解多环芳烃菌株，应用 Biolog 微生物鉴定系统、分子生物学方法鉴定出其中一株菌为木糖氧化无色杆菌，并在实验室条件下对这两菌株降解多环芳烃菲的效果进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品采自燕山石油化工厂多年石油污染土壤，新鲜样品装于保鲜袋中封口，置于 4℃冰箱保存。

用于菌种分离的培养基为无机盐培养基[8]。组成和用量如下（g/L）：NH_4Cl 1.1、K_2HPO_4 1.0、NaCl 0.5、KCl 0.2、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2、$FeSO_4$ 0.001、$CaCl_2$ 0.01；微量元素混合溶液 1 mL，组成为（mg/L）：H_3BO_3 57、$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 43、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 43、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 40、$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 37、$Co(NO_3) \cdot 6H_2O$ 25。固体培养基加 20% 的琼脂。

其它生化试剂包括：Taq 酶、dNTP、10 × Taq Bufer、2.5U Taq 酶均购自天为时代有限公司（北京），16S rDNA 的通用引物 P1（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）、P2（5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'）由北京华大中生科技发展有限公司合成。

主要仪器：高效液相色谱（Agilent 1100 HPLC 化学工作站）；PCR 仪（GeneAmp PCR system 9700）；电泳仪（DYY-6C 型）；低温高速离心机（Sorvall Biofuge stratos）；BIOLOG 细菌鉴定系统（美国 BIOLOG 公司）。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离 菌种分离是在以菲为唯一碳源和能源的液体无机盐培养基内进行。将污染土壤 1 g 加入盛有 30 mL 液体培养基（含菲浓度为 50 μg/mL）的三角瓶中，28℃ 170 r/min 避光振荡培养 5 d，吸取 1 mL 培养液转接到另一盛有含菲新鲜液体培养基的三角瓶继续培养，用此方法连续转接 4～5 次。从最后培养液中吸取 1 mL 进行系列稀释，涂布无机盐琼脂培养基平板，然后采用升华法形成菲结晶膜，置于 28℃培养箱培养，每天观察菌株周围水解圈形成情况[10]。选取水解圈较大的菌株转接斜面，保存，供继续研究使用。

1.2.2 菌种的鉴定 BIOLOG 法使用 BIOLOG 细菌鉴定系统进行；分子生物学鉴定是以细菌总 DNA 为模板，反应液体积 50 μL：10 × Taq Bufer 5 μL、dNTP Mixture 1 μL、P1 和 P2 各 1 μL、2.5U Taq 酶 0.75 μL、ddH_2O 41.25 mL。扩增条件为 94℃预变性 3 min、94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min，30 个循环，72℃保温 5 min。取 2 μL 反应液在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。PCR 产物测序由北京华大中生科技发展有限公司完成。

1.2.3 菲降解特性及生长性的研究

菲的萃取[11]：将分离得到的具有较高降解菲活性的菌株接种于液体牛肉膏培养基中，28℃170 r/min 避光振荡培养至对数期（菌体浓度 1.0×10^9 cfu/g）。取 3 mL 培养液接种于 30 mL 含菲（50 μg/mL）的液体无机盐培养基中，28℃170 r/min 避光振荡培养。分别于 12、24、36、48、60 h 取样 0.8 mL，取样后立即进行菲的萃取和测定。萃取方法：待测样品分别加入 10 mL CH_2Cl_2 混合振荡 3 min 萃取培养基中残留的菲，静置 10 min，微孔滤膜（Φ25 μm）过滤后用 HPLC 测定。以未接菌的含 50 μg/mL 的菲液体培养基为对照，每个样品次测定均设置 3 个重复。

HPLC 测定[6]：上述萃取液用 HPLC 法测定底物菲的残留浓度。测定用色谱柱为美国 RAINBOW 公司的 Kromasil C18 柱（Φ 4.6 mm × 250 mm，5 μm），流动相为甲醇/水（体积比：90/10），流速 0.8 mL/min，检测波长 254 nm，进样体积为 5 μL，测定时间 12 min。

菌体浓度的测定：上述萃取步骤取样的同时每处理再取样 2 mL 用作菌体浓度测定，5000 r/min 离心 2 min 后，将细胞洗净并稀释到原浓度后，用光密度法测定菌体数量。

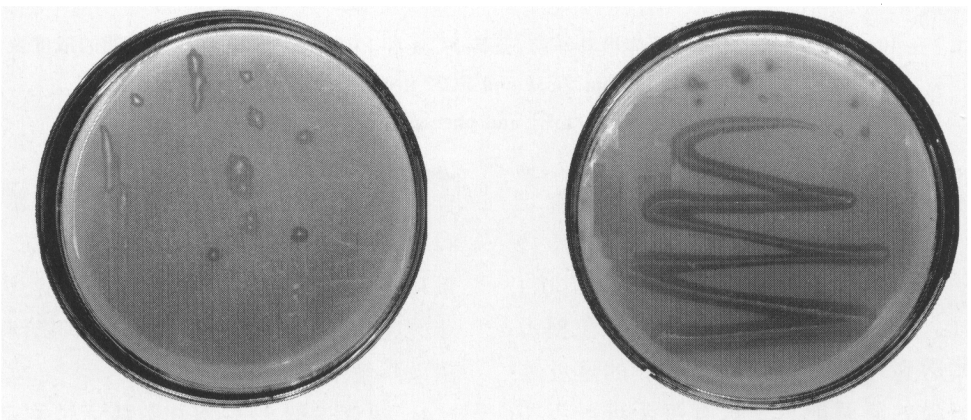
邻苯二酚氧化酶活性测定[8]：两株细菌分别于加菲（50 g/mL）无机盐培养基中培养 10 h，10000 r/min 4℃离心 10 min，培养物以 20 mmol/L 的磷酸钾缓冲液洗涤 2 次，制成细胞悬液经超声破碎仪破碎 4℃12000 r/min 离心 10 min，上清液为粗酶液。粗酶

液 0.3 mL 加蒸馏水 0.7 mL，邻苯二酚（0.2 mol/L）3 mL 混匀，30℃水浴反应 2 min，495 nm 测光吸收值。

2 结果分析

2.1 菌种分离结果

利用富集升华法筛得 2 株有较强菲降解活性细菌，分别命名为 FC31、FC32。该两株菌均可在以菲为唯一碳源和能源的无机盐培养基上生长，并形成明显水解圈（图 1）。此方法虽然可以在固体培养基表面形成薄薄一层菲的晶膜，但仅靠控制升华时间很难控制晶膜厚度，无法进行定量计算，但可以通过比较水解圈的大小初步定性判断菌株对菲降解能力大小。



菌株 FC31 在含菲无机盐培养基上的生长　　菌株 FC32 在含菲无机盐培养基上的生长

Halo of strain FC31 on solid culture medium with phenanthrene　　Halo of strain FC32 on solid culture medium with phenanthrene

图 1　菌株 FC31 和 FC32 在含菲无机盐培养基上形成的水解圈

Fig.1　Halo of strain FC31 and strain FC32 on solid culture medium with phenanthrene

2.2 菌种鉴定结果

2.2.1　分离菌株的形态学特征　由牛肉膏固体培养基的菌株生长实验，观察到菌株 FC31 在固体培养基上生长 3 d 后为乳黄色的圆形菌落，大小均匀直径约 2 mm～3 mm，且透明，菌落边缘不整齐，表面湿润光滑，显微镜下细胞形态为细小杆状，革兰氏染色阴性。菌株 FC32 在固体培养基上生长 3 d 后为浅黄色的圆形菌落，大小均匀直径约 0.5 mm～1 mm，边缘整齐且光滑，显微镜下细胞形态呈杆状略小，革兰氏染色阴性。

2.2.2　BIOLOG 法鉴定结果　将上述菌株分别接种于 Biolog－GN 板培养 28 h 后，利用 BIOLOG 细菌鉴定系统进行鉴定，得到如下结果：菌株 FC31 为坚强芽孢杆菌（*Bacillus firmus*），菌株 FC32 为木糖氧化无色杆菌反硝化亚种（*Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*）。

2.2.3　分子生物学手段鉴定结果　FC31、FC32 两菌株经 PCR 扩增后测序，测序结果用 Blast 软件与 GenBank 中的序列进行比较，结果菌株 FC31（登录号：AB161691）与 *Bacillus* 的相似程度达 97%，可以确定菌株 FC31 在分子系统发育分类学上属于 *Bacillus*；菌株 FC32（登录号：DQ478956）与 *Achromobacter xylosoxidans* 的多个菌株序列相似性都达到 98%，可以确定菌株 FC32 在分子系统发育分类学上属于 *Achromobacter xylosoxidans*。两株菌的分子生物学鉴定结果均与细菌自动鉴定系统的鉴定结果吻合。

2.3 菌株对菲降解特性及生长性

通过 HPLC 测定培养液中残留菲浓度及菌体浓度测定，得到单一菌株 FC31 和 FC32 的底物浓度变化趋势和生长曲线（图 2）。

图 2 可见，两株细菌在液体培养条件下，培养 36 h 之前菲降解速度较慢，后期降解速度加快。菌株 FC31（图 2a）的 *OD* 值达 0.120（24 h）时降解速度加快，*OD* 值为 0.207（60 h）时菲的残留率仅为 14.40%。FC32（b）的 *OD* 值达到 0.118（36 h）时降解速度加快，*OD* 值为 0.143（60 h）时菲的残留率为 16.80%。表明培养液中菲的降解量与菌体生长密度相关，随着菌体（吸光度）的增加代谢底物菲的量明显减少；同时培养液的颜色也从最初的无色经黄色变成茶色。底物的颜色变化也证明了芳香环化合物被微生物分解利用[9]。

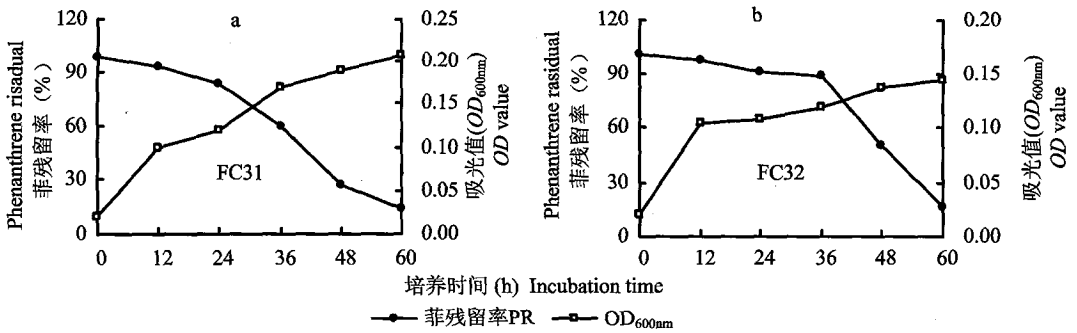


图2 在100 mL (50 μg/mL)菲液体培养基内，菌株FC31和FC32的生长曲线和底物菲的浓度变化

Fig. 2 The curves of strain FC31 and FC32 growth(incubated in 100 mL of CFM with 50 μg/mL) and phenanthrene degradation

比较图2a、b两图可以发现，两菌株加快降解菲的速率，FC31是从培养24 h开始，而FC32延迟12 h(从培养36 h开始)，但二者的 *OD* 值却都达到0.1以上(FC31达0.12，而FC32达0.118)。该现象提示我们，只有菌体达到一定的浓度其降解菲的速度才会加快，表现出强的降解能力。这有待于进一步实验去证明。

另外，从混合菌系MFC3(FC31和FC32按自然比例混合)和单一菌种菌株(FC31和FC32)的底物浓度变化趋势(图3)可以看出，在液体培养条件下，前12 h混合菌系(MFC3)和单一菌株的降解菲的速度差别很小，培养12 h后混合菌系(MFC3)降解菲的速度开始加快；而单一菌株(FC31、FC32)是在培养36 h后降解菲的速度才开始加快。而且培养48 h后混合菌系降解了加入菲量的85%，而单一菌株FC31和FC32分别降解了65.80%、49.40%。比较混合菌系和单一菌株的降解速率可以看出，混合菌系降解菲的速率明显快于单一菌株的单独作用，表明混合菌系降解PAHs具有优势。

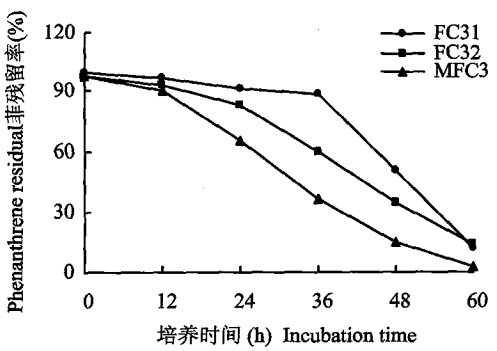


图3 混合菌系(MFC3)*和单一菌株(FC31、FC32)降解菲的比较

Fig. 3 Phenanthrene degradation of FC31、FC32 and the microbial population (MFC3)*

(* 为菌株FC31和FC32按自然比例混合，即指从土壤中分离得到两株菌的混合态后，没有人为将二者分离纯化而是以原有比例接种试验 * Means the natural mixture of strain FC31 and FC32 as a symbiotic for mutualism without further separation)

2.4 邻苯二酚2,3-双加氧酶活性测定

由邻苯二酚2,3-双加氧酶活性测定结果(图4)可见，2株菌均具有邻苯二酚2,3-双加氧酶活性。

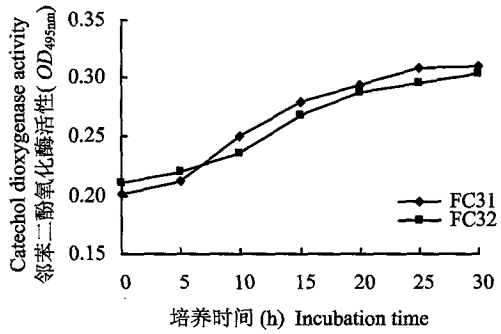


图4 菌株FC31和FC32的邻苯二酚2,3-双加氧酶活性

Fig.4 Catechol 2, 3-dioxygenase activity of strain FC31 and strain FC32

3 小结

本研究从多年石油浸泡污染的土壤中利用选择性富集培养和升华法分离得到具有降解多环芳烃化合物菲(Phenanthrene)能力的细菌FC31和FC32，经BIOLOG细菌鉴定系统和分子生物学手段鉴定分别为坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)和木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)。这两株细菌均具有邻苯二酚2,3-二双加氧酶活性。菌株FC31和FC32均能以菲为唯一碳源和能源生长，通过测定液体培养基中菲浓度和菌体密度变化可以看出，菌株降解

菲的量与其生长密度相关，随着菌体浓度（吸光度）的增加，代谢底物菲的量明显减少。通过比较单一菌株（FC31 和 FC32）与 MFC3（FC31 和 FC32 自然混合）降解菲的结果，发现自然混合的菌系降解菲的速率快于单一菌株的降解速率；液体培养条件下 48h 后混合菌系降解了加入菲量的 85%，而单一菌株 FC31 和 FC32 分别降解了 65.80%、49.40%。推测该现象体现了微生物群落的协同作用优势。

参 考 文 献：

[1] Samanta S K, Singh O, Jain R K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation [J]. Trends Biotechn., 2002, 20 (6): 225-242.

[2] Bucker M. Mutagenicity of phenanthrene and phenanthrene K-region-deriveatives[J]. Mutat. Res., 1979, 66: 337-348.

[3] Goldman R. Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in hunman lung tissue [J]. Cancer Res. 2001, 61: 6367-6371.

[4] Evans W C, Fernley H N, Griffiths E. Oxidation metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonads*[J]. Biochem. J., 1965, 95(3): 819-831.

[5] Wilson S C, Jones K C. Bioremediation of soil contaminated with Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review [J]. Environ. Pollut., 1993, 81(3): 229-249.

[6] 张杰，刘永生，孟玲，等. 多环芳烃降解菌筛选及其降解特性[J]. 应用生态学报，2003，10(14)：1783-1786.
Zhang J, Liu Y S, Meng L *et al*. Isolation and characteristics of PAHs-degrading strains [J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2003, 10(14): 1783-1786.

[7] 夏颖，闵航，周德平，等. 两株菲降解菌株的特性及其系统发育分析[J]. 中国环境科学，2003，23(2)：162-166.
Xia Y, Min H, Zhou D P *et al*. Characteristics and phylogenetic analysis of two phenanthrene-degrading bacteria [J]. China Envrion. Sci., 2003, 23(2):162-166.

[8] 夏颖. 多环芳烃菲对微生物生态毒理研究、菲降解菌的分离鉴定及 降解基因克隆与表达[D]. 浙江大学博士论文，2004. 68-69.
Xia Y. Studies on microbial ecology toxicity of phenanthrene and isolation, characterization of phenanthrene degrader as well as cloning and expression of degradation genes [D]. Hangzhou: Ph D thesis of Zhejiang University, 2004. 68-69.

[9] Bastiaens L, Springael D, Wattiau P *et al*. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-Adsorbing carries [J]. Environ. Microbiol., 2000, 66(5): 1834-1843.

[10] Alley J F and Brown L R. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates[J]. Appl. Environ. Microbiol, 2000, 66: 439-442.

[11] Vila J, Lopez Z, Sabate J *et al*. 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 [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67: 5497-5505.