

梁文涓,牛明芬,武肖媛,等. 2 株四氯联苯降解菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):383-387.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.119

2 株四氯联苯降解菌的分离及鉴定

梁文涓,牛明芬,武肖媛,刘 欢

(沈阳建筑大学市政与环境工程学院,辽宁沈阳 110168)

摘要:以多氯联苯(3,3',4,4'-四氯联苯)为选择培养基,从污水处理厂生物处理过程的活性污泥中分离出 2 株能以 3,3',4,4'-四氯联苯为唯一碳源的菌株,分别命名为 J-4、J-5;观察 2 株菌的形态特征,并对其 16S rRNA 基因序列进行分析,构建了系统发育树。结果表明,J-4 菌与红球菌属(*Rhodococcus* sp.)的细菌具有较高的序列同源性,J-5 菌与鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)的细菌具有较高的序列同源性。初步判定 J-4 为红球菌属(*Rhodococcus* sp.)的细菌,J-5 为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)的细菌。本研究结果为多氯联苯的生物降解提供了理论依据,有利于多氯联苯降解菌库的充实和完善。

关键词:多氯联苯;生物降解;16S rRNA;序列同源性

中图分类号:S182;X172

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2015)12-0383-04

多氯联苯(polychlorinated biphenyls,PCBs)是重要的化工原料,微生物降解被认为是 PCBs 污染场址修复的主要途径,相关研究十分普遍。可以独立降解 PCBs 的微生物并不丰富^[1],越来越多研究发现,不同种属的微生物可以共代谢降解 PCBs^[2]。目前发现好氧降解 PCBs 的革兰氏阴性菌包括伯克霍尔得氏菌(*Burkholderia* sp.)、产碱菌(*Alcaligenes* sp.)、鞘氨醇杆菌(*Sphingomonas*)、丛毛单胞菌(*Comamonas*)、无色杆菌(*Achromobacter*)以及不动杆菌(*Acinetobacter*)等;革兰氏阳性菌有红球菌(*Rhodococcus*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)以及芽孢杆菌(*Bacillus*)等^[3]。好氧降解一般开环破坏 PCBs,且一般限于 5~6 个氯原子以下的同系物;而厌氧降解催化 PCBs 还原脱氯,使高氯取代的同系物转变成低氯代同系物^[4]。生物好氧化和厌氧还原协同作用,可以实现 PCBs 的彻底降解。有关白腐真菌降解 PCBs 的研究也有许多^[5],金孢霉(*Phanerochaete chrysosporium*)、平菇菌丝(*Pleurotus ostreatus*)是白腐真菌中被研究较多的种属,具有降解多氯联苯混合物 Aroclor 1242-1260 较宽范围同系物的能力^[5-6]。白腐真菌降解 PCBs 的速率和范围与氯含量成正比,这与好氧菌相似,但白腐真菌降解四氯代以上的同系物比较困难^[4]。本研究从污水处理厂生物处理过程的活性污泥中筛选出 2 株能够以多氯联苯作为唯一碳源快速生长的微生物,通过分析该菌株的 16S rRNA 基因序列对菌种进行鉴定,有利于多氯联苯降解菌库的充实和完善。

1 材料与方法

1.1 菌种来源及培养基

菌种来自天津市纪庄子污水处理厂生化处理过程中的活

性污泥。

基本培养基制备:分别称取 2.93 g KH_2PO_4 、5.87 g K_2HPO_4 、0.3 g MgSO_4 、0.01 g FeSO_4 、2.0 g NaCl 、5.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,分别溶解后加蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 7.0。

选择培养基制备:分别称取 2.93 g KH_2PO_4 、5.87 g K_2HPO_4 、0.3 g MgSO_4 、0.01 g FeSO_4 、2.0 g NaCl 、5.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、5.0 mg 3,3',4,4'-四氯联苯,分别溶解后加蒸馏水定容至 1 000 mL,使 3,3',4,4'-四氯联苯的浓度为 0.005 g/L,调节 pH 值至 7.0。

LB 培养基制备:分别称取 10 g 蛋白胨、5 g 酵母膏、10 g NaCl ,分别溶解后用蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 7.0,在液体培养基中加入琼脂粉(使浓度为 20 g/L),配制 LB 固体培养基。LB 培养基用于纯化菌株的扩增培养。

1.2 降解菌的筛选及形态观察

取 10 mL 活性污泥悬浮液接种到 40 mL 选择培养基中,置于恒温培养箱中培养,温度设置为 30 ℃。每隔 5 d 按 20% 的接种量重新转接到新鲜培养基中继续培养,共转移 4 期。

取 1 mL 经富集培养的菌液,加入盛有 9 mL 灭菌生理盐水的试管中,采用 10 倍稀释法制成不同稀释浓度的菌液,取 0.1 mL 3 种稀释度(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7})菌液涂布于 LB 培养基的平板中,于 30 ℃培养箱中倒置培养 3~5 d。

挑取在不同稀释度平板上生长较好的单菌落,在平板培养基上连续划线分离,直到菌株分离纯化。纯化好的菌株接种于 LB 培养基斜面上保存。将分离纯化得到的菌株经革兰氏染色后置于光学显微镜下观察。

1.3 16S rRNA 基因序列分析

1.3.1 降解菌 DNA 的提取 按 Biospin Bacteria Genomic DNA 提取试剂盒的使用说明对降解菌的 DNA 进行提取。

1.3.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系见表 1,阴性对照使用 1 μL 的 16S-free- H_2O 替代模板 DNA,正向引物为 E-coli27F(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'),反向引物为 E-coli492R(5'-TACCTGTACGACT-3')。

收稿日期:2015-06-05

基金项目:中央级科研项目(编号:Z1515021)。

作者简介:梁文涓(1990—),女,山西长治人,硕士研究生,主要从事持久性有机污染物生物降解研究。E-mail:liangwenjuan100@163.com。

PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 2 min;95 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72.0 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 2 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。电泳条件:电压 120 V,上样液为 6 × Loading Buffer,上样比例为 10 μL DNA 溶液: 2 μL 6 × Loading buffer,每个泳道上样量为 20 μL,marker 为 λ Hind III,电泳时间为 50 min。

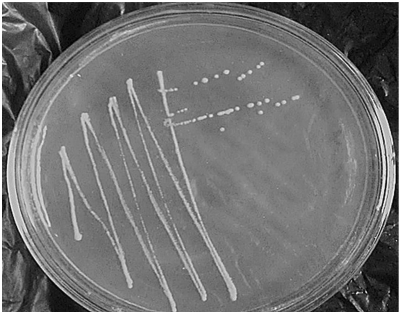
表 1 PCR 反应体系	
反应体系成分	用量(μL)
模板 DNA	1.0
dNTP mix (10 mmol/L)	0.5
正向引物(10 μmol/L)	0.5
反向引物(10 μmol/L)	0.5
10 × Taq reaction Buffer	2.5
DNA 聚合酶 (5 μg/μL)	0.2
16S - free H ₂ O	44.8
总体系	50.0

1.3.3 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树构建 将得到的目的 DNA 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序。将所得 DNA 序列与美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,NCBI)的 GenBank 核酸数据库进行同源比对,利用 MEGA 4 软件构建系统发育树。

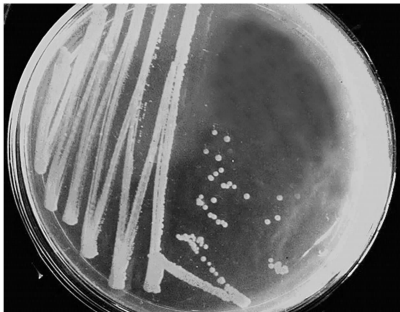
2 结果与分析

2.1 形态特征

经过 0.005 g/L 3,3',4,4' - 四氯联苯的富集驯化,最终得到 2 株在好氧条件下能以 3,3',4,4' - 四氯联苯为唯一碳源快速生长的细菌,分别命名为 J-4、J-5。菌株 J-4、J-5 在 LB 固体培养基平板上的菌落形态见图 1。革兰氏染色后发现,J-4 为革兰氏阳性菌,J-5 为革兰氏阴性菌,显微镜观



a. J-4

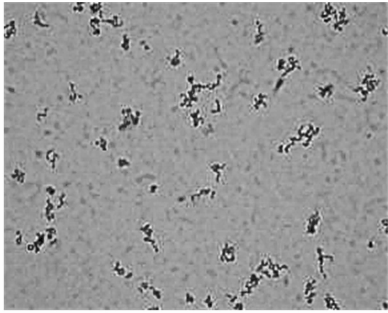


b. J-5

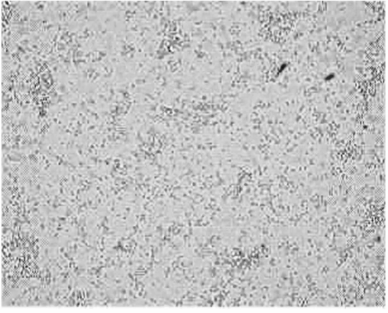
图1 菌株 J-4、J-5 的菌落形态

察结果见图 2。

将 2 株菌的菌落形态与显微镜观察结果汇总,见表 2。



a. J-4



b. J-5

图2 菌株 J-4、J-5 的革兰氏染色显微镜观察结果

表 2 分离出的 PCBs 降解菌 J-4、J-5 的形态特征

细菌	革兰氏染色结果	细菌形状	菌落大小	形状	边缘	颜色	表面特征	侧面
J-4	G+	杆状	很小	圆形	整齐	奶白 色	光滑,湿润, 有光泽	高凸
J-5	G-	杆状	较小	圆形	整齐	黄色	光滑,湿润	高凸

2.2 16S rRNA 基因序列分析

2.2.1 菌株 DNA 提取 2 株菌的总 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3,DNA Marker 从上至下大小依次为 23 130、9 416、6 557、4 361、2 322、2 027、564、125 bp(最小的 2 个值在图中没有出现)。以 J-4 菌为例,电泳结果出现 3 个条带,1 个条带大小在 20 kb,另 2 个条带在 500 bp 左右。经分析,较大条带应为细菌总 DNA,较小条带可能为杂带,可能是在提取 DNA 时未对 RNA 进行处理,导致出现 RNA 杂带^[7]。用 20 mg/mL 的 RNA 酶(RNAase)加入到细菌总 DNA 提取过程中,以去除细菌体内 RNA 的干扰,电泳结果见图 4。

图 4 中,J-4、J-5 仅出现了 20 kb 左右的条带(每种菌有 2 个上样点)。DNA 条带清晰,代表不含任何蛋白质、RNA、单核苷酸,表明菌株总 DNA 提取成功,符合作为 PCR 扩增模板的条件。

2.2.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 回收纯化的细菌总 DNA 片段,以其作为模板,进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增^[3]。扩增产物的电泳结果见图 5,可见菌株 J-4、J-5 已经扩增出 16S rRNA 基因序列,长度约为 1.5 kb。

2.2.3 基因测序 采用生工生物工程(上海)股份有限公司的 UNI-Q-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物,用以测序。经测序,菌株 J-4 16S rDNA 序列大小为 1 424 bp,菌株 J-5 16S rDNA 序列大小为 1 418 bp。

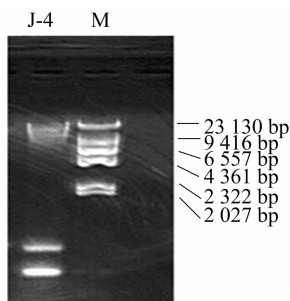


图3 未添加 RNA 酶时 J-4 菌 DNA 电泳结果

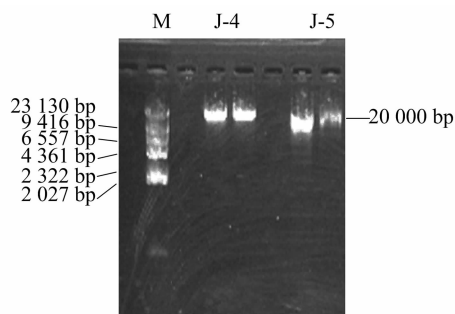


图4 添加 RNA 酶时 J-4、J-5 菌的 DNA 电泳结果

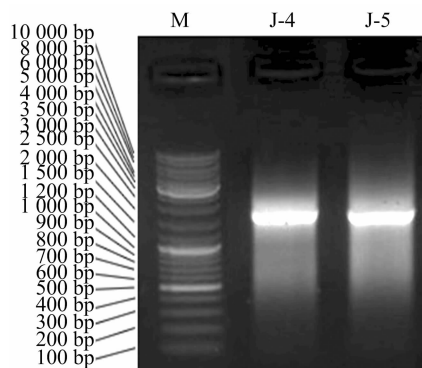


图5 PCR 产物电泳图谱

表 3 菌株 J-4 与相关细菌 16S rDNA 序列比较结果

细菌来源	相似性(%)
<i>Rhodococcus zopfii</i> strain DSM 44108	99 (1 422/1 424)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> strain 372	98 (1 397/1 427)
<i>Rhodococcus ruber</i> strain DSM43338	98 (1 394/1 426)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> EK5	97 (1 394/1 430)
<i>Rhodococcus koreensis</i> strain DNP505	97 (1 382/1 428)

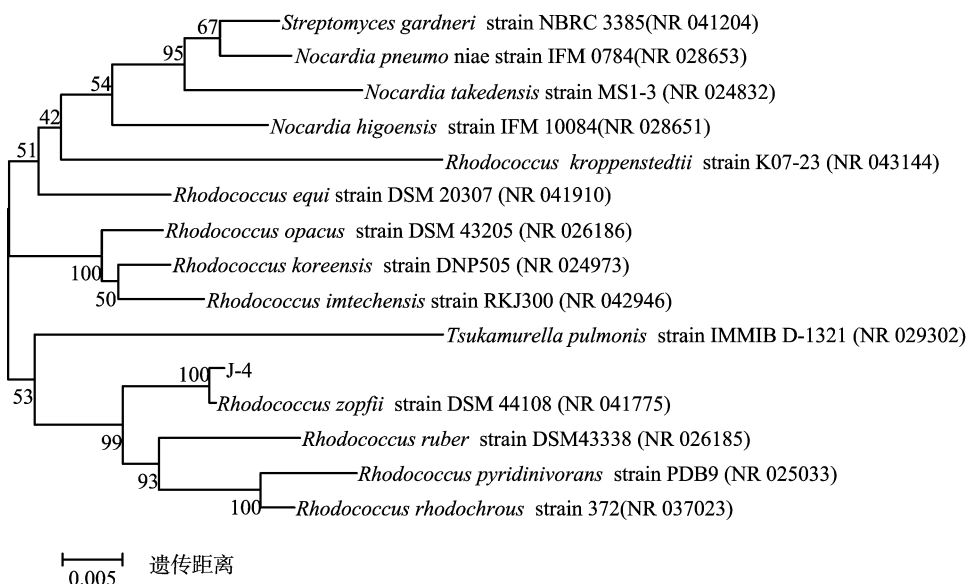
注:括号中为具体数据比。表 4 同。

表 4 菌株 J-5 与相关细菌 16S rDNA 序列比较

细菌来源	相似性(%)
<i>Sphingobacterium mizutaii</i> DSM 11724	98 (1 392/1 419)
<i>Sphingobacterium daejeonense</i> TR6-04	97 (1 374/1 421)
<i>Sphingobacterium composti</i> strain T5-12	94 (1 312/1 399)
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> 10C	93 (1 316/1 422)
<i>Sphingobacterium thalpophilum</i> strain DSM 11723	93 (1 316/1 421)

2.2.4 16S rRNA 基因序列分析与系统发育树构建 将测序得到的 1.5 kb 左右的基因序列上传至 NCBI 的 GenBank 数据库中,用 BLAST 工具查找相似序列,将降解菌与已知的相似基因序列进行同源性比较。菌株 J-4 与相关细菌 16S rDNA 序列比较结果见表 3,菌株 J-5 与相关细菌 16S rDNA 序列比较结果见表 4。

从 GenBank 中调出与降解菌具有较高相似性菌株的 16S rDNA 序列,通过 Clustal 1.8 进行多重序列对比,再利用 MEGA 4 软件构建系统发育树^[3],结果见图 6、图 7。



图中数字表示数据的可信度。括号内为菌株在 GenBank 上的登录号。图 7 同

图 6 基于 16S rDNA 核酸序列的 J-4 系统发育树

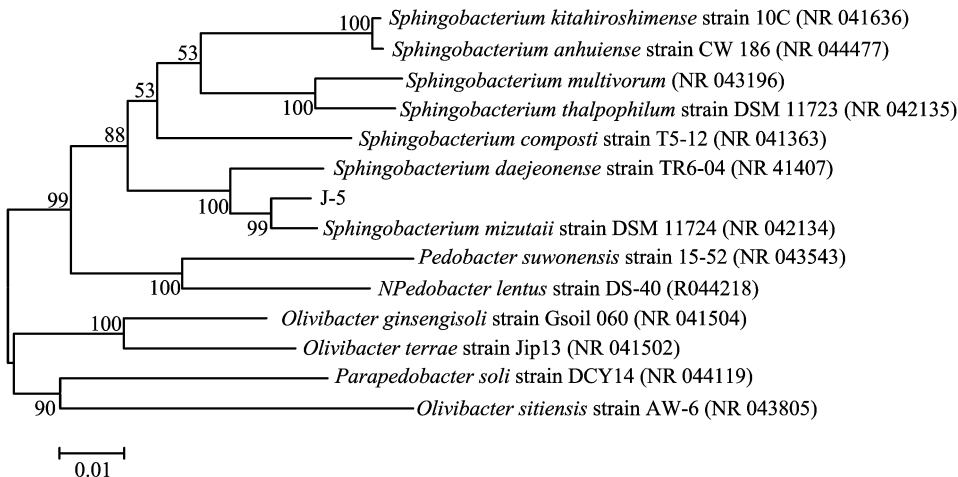


图7 基于16S rDNA 核酸序列的J-5 系统发育树

从图 6 可以看出,菌株 J-4 和 *Rhodococcus zopfii* strain DSM 44108、*Rhodococcus ruber* strain DSM43338、*Rhodococcus pyridinivorans* strain PDB9、*Rhodococcus rhodochrous* strain 372 等菌株的相似性最高,可初步将菌株 J-4 归入红球菌属 (*Rhodococcus*)。

红球菌是一种革兰氏阳性细菌^[8],广泛存在于水体、土壤、底泥、植物体内,甚至在昆虫内脏中都可以发现红球菌的存在。红球菌可以在含有天然或者人工合成的有机化合物的环境中生长,并具有催化复杂有机物降解的酶基因,对有机物具有极强的降解能力,是生物修复过程的重要参与者。目前,红球菌降解石油烃类的研究比较多见,红球菌降解芳香化合物的研究引起学者们的普遍关注。联苯、氯苯、二甲苯、对硫代氨基甲酸盐、硫代三嗪、苯并噻唑、2-巯基苯并噻唑等很难生物降解的杂环化合物都能被红球菌微利用^[9-11]。

有关红球菌降解多氯联苯的研究近年也有报道。Ohmori 等在 2011 年报道了红球菌 (*Rhodococcus jostii* RHA1) 在降解多氯联苯的时候能积累氯苯甲酸^[12];Egorova 等在 2011 年也发现了 2 株红球菌,可高效降解不同氯取代的多氯联苯^[13];Petrić 等研究了在长期多氯联苯污染的土壤中降解菌群的功能,并人为加入红球菌 Z6,研究修复土壤中微生物群落情况,结果发现修复土壤中含有大量类似红球菌的微生物,表明红球菌在降解多氯联苯过程中发挥主要作用^[14];杨秀清等也研究了红球菌对不同氯代联苯的降解^[15]。本研究发现红球菌 J-4 可以利用 3,3',4,4'-四氯联苯进行生长,为今后多氯联苯的生物修复提供基础。

从图 7 可以看出,菌株 J-5 和 *Sphingobacterium mizutaii* strain DSM 11724、*Sphingobacterium daejeonense* strain TR6-04、*Sphingobacterium composti* strain T5-12 等菌株的相似性最高,可初步将菌株 J-5 归入鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*)。

鞘氨醇单胞菌属的细菌不仅存在于陆地环境,而且也广泛存在于海洋环境中,鞘氨醇单胞菌可以降解原油、工业油中的烃类、杂环化合物菲等,还可以产生生物表面活性剂^[16]。此外,该属细菌还可以降解包括联苯^[17]、DDT^[18]、PAHs^[19] 等在内的芳香化合物,但是目前有关鞘氨醇单胞菌可降解多氯

联苯的报道不多。

3 结论与讨论

通过富集驯化,从污水处理厂活性污泥中分离出 2 株能以 3,3',4,4'-四氯联苯作为唯一碳源快速生长的细菌 J-4、J-5。对 2 株菌进行了形态观察和 16S rRNA 基因测序,将降解菌与已知的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较,得出菌株 J-4 为红球菌属 (*Rhodococcus*) 的细菌,菌株 J-5 为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*) 的细菌。

初步研究结果表明,菌株 J-4、J-5 可以耐受 0.005 g/L 的 3,3',4,4'-四氯联苯;关于菌株的降解特性,还需进一步研究。本研究为多氯联苯的生物降解提供了理论依据,有利于多氯联苯降解菌库的充实和完善。

参考文献:

- [1] 陈 蕾. 天然有机质介导的多氯联苯环境转化与降解机制[D]. 杭州:浙江大学,2012.
- [2] 刘云兴,王国梁. 多氯联苯生物降解技术研究进展[J]. 环境科学与管理,2012,37(12):72-75.
- [3] 齐 云. 氯苯甲酸降解菌的分离筛选及降解特性研究[D]. 天津:天津大学,2007.
- [4] 张国英. 多环芳烃、多氯联苯优良降解菌的分离鉴定及降解特性研究[D]. 济南:山东大学,2009.
- [5] Tam N F, Guo C L, Yau W Y, et al. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 45(1-12):316-324.
- [6] Ash C, Farrow J A E, Wallbanks S, et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences[J]. Letters in Applied Microbiology, 1991, 13(4):202-206.
- [7] 孟 浩,彭 贞,王 闯,等. 血液总 RNA 提取方法的比较[J]. 塔里木大学学报,2014,26(1):46-49.
- [8] Fang H H, Zhang T, Liu Y. Characterization of an acetate-degrading sludge without intracellular accumulation of polyphosphate and glycogen[J]. Water Research, 2002, 36(13):3211-3218.

方光远,茅慧华,郭宇飞,等. 分解鸽羽毛地衣芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):387-390.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.120

分解鸽羽毛地衣芽孢杆菌的分离与鉴定

方光远,茅慧华,郭宇飞,宋丁全,胡志华,蒋加进,孙静静,陈俊红,戴鼎震

(金陵科技学院动物科学与技术学院,江苏南京 210038)

摘要:在江苏省南京地区土壤内分离到 1 株细菌 NJ-01,对该菌株进行一系列的细菌形态大小、菌落形态、生化反应、16S rDNA 鉴定试验,结果表明分离和鉴定该菌株为地衣芽孢杆菌。该菌株能够很好地分解鸽羽毛,37 ℃ 培养 5 d 鸽羽毛开始分解,37 ℃ 培养 15 d 时鸽羽毛小羽枝、羽毛梗全部分解为碎片,对鸽羽毛粉消化分解率为 85%。

关键词:地衣芽孢杆菌;分离;鉴定;鸽羽毛;分解率

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0387-04

随着肉鸽养殖业的迅速发展,肉鸽养殖场产生的大量鸽羽毛废弃物对环境造成了严重污染,为了寻找处理鸽羽毛废弃物的方法,笔者所在项目组成员寻找能够分解鸽羽毛的细菌,对鸽羽毛进行分解处理,从江苏省南京地区土壤分离到 1 株细菌,对该细菌进行多次分离培养获得纯培养菌株,该菌株能够分解鸽羽毛。通过对该菌株进行一系列细菌形态大小、菌落培养特性、生化反应、16S rDNA 鉴定,结果表明,该菌株为地衣芽孢杆菌。现将试验过程及有关内容报道如下。

收稿日期:2015-08-09

基金项目:江苏省南京市科技发展规划(编号:201201026);江苏省教育厅高校自然科学研究项目(编号:12KJD23001);江苏省自然科学基金(编号:BK2011090)。

作者简介:方光远(1965—),男,江苏宿迁人,硕士,副教授,从事兽医微生物学、兽医生物制品学教学及研究工作。E-mail:fanggy126@126.com。

通信作者:戴鼎震,博士,教授,硕士生导师,从事兽医微生物学、中药学教学及研究工作。E-mail:daimingrui@jit.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分解鸽羽毛细菌 从南京地区土壤分离获得 1 株细菌,由本校兽医微生物实验室保存。

1.1.2 培养基 普通营养琼脂平板(营养琼脂 38 g,蒸馏水 1 000 mL,初始 pH 值为 7.5);营养肉汤(牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,K₂HPO₄ 1 g,蒸馏水 1 000 mL,初始 pH 值为 7.5);分解羽毛基础培养基(K₂HPO₄ 0.04%,NaCl 0.05%,初始 pH 值为 7.5);羽毛粉发酵培养基(鸽羽毛粉 2%,K₂HPO₄ 0.04%,NaCl 0.05%,初始 pH 值为 7.5)。

1.1.3 染色液 革兰氏染色液 1 套。

1.1.4 微量生化发酵管 微量生化发酵管购自杭州天和微生物试剂有限公司,共计 16 种:尿素、苯丙氨酸、硫化氢、葡氨酸、靛基质、葡磷胨水、枸橼酸盐、半固体、赖氨酸、鸟氨酸、葡萄糖、蔗糖、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖、氨基酸对照。

[9]孙艳,钞亚鹏,钱世钧.嗜吡啉红球菌 R04 的联苯降解途径的研究[J].微生物学报,2003,43(5):653-658.

[10]Vasilyeva G K,Strijakova E R. Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls[J]. Microbiology, 2007,76(6):639-653.

[11]Jung I G,Park C H. Characteristics of rhodococcus pyridinovorans PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, *m*-xylene (BTX), and their mixtures[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2004,97(6):429-431.

[12]Ohmori T,Morita H,Tanaka M,et al. Development of a strain for efficient degradation of polychlorinated biphenyls by patchwork assembly of degradation pathways[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2011,111(4):437-442.

[13]Egorova D O,Demakov V A,Plotnikova E G. Destruction of mixture of tri- to hexa-chlorinated biphenyls by *Rhodococcus* genus strains[J]. Applied Biochemistry and Microbiology,2011,47(6):599-606.

[14]Petrić I,Hršak D,Fingler S,et al. Insight in the PCB-degrading functional community in long-term contaminated soil under bioremediation[J]. Journal of Soils and Sediments,2011,11(2):290-

300.

[15]杨秀清,郑媛,李鹏丽,等.红球菌-R04 生物降解多卤代联苯的影响因素研究[J]. 中国环境科学,2010,30(5):694-698.

[16]Janbandhu A,Fulekar M H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment[J]. Journal of Hazardous Materials,2011,187(1/2/3):333-340.

[17]Romine F,Stillwell C,Saffer D,et al. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199[J]. Journal of Bacteriology,1999,181(5):1585-1602.

[18]Fang H,Dong B,Yan H,et al. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil[J]. Journal of Hazardous Materials,2010,184(1/2/3):281-289.

[19]Demanèche S,Meyer C,Micoud J,et al. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Applied and Environmental Microbiology,2004,70(11):6714-6725.