

文章编号:1673-1689(2005)06-0006-04

降解萘的假单胞菌 ND24 菌株的分离和 萘污染土壤的生物修复

蔡宝立, 李永君, 梁靖, 赵化冰

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 用富集培养法从石油工业废水中分离到高效降解萘的 ND24 菌株. 该菌株能以萘为惟一碳源生长, 在 48 h 内将无机盐培养基中 2 g/L 的萘降解 98.4%. 该菌株还能降解水杨酸、对羟基苯甲酸、邻苯二甲酸和苯乙酸. 16S rRNA 基因测序和同源序列比对表明, ND24 菌株属于假单胞菌(*Pseudomonas* sp.). 将 ND24 菌株接种到含有 0.2 g/dL 萘的灭菌土壤中, 经过 14 d 室温培养以后, 萘的去除率为 98.2%.

关键词: 萘; 生物降解; 假单胞菌; 土壤修复

中图分类号: Q 625.23

文献标识码: A

Isolation of Naphthalene-Degrading *Pseudomonas* sp. ND24 and Bioremediation of Naphthalene-Contaminated Soils

CAI Bao-li, LI Yong-jun, LIANG Jing, ZHAO Hua-bing

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: With the method of enrichment culture, a high efficient naphthalene-degrading strain, ND24, was isolated from petroleum wastewater. The strain was capable of utilizing naphthalene as a sole carbon source for growth and degrading naphthalene upto 98.4% of existed in minimal medium (2 g/L) within 48 hours. The strain also showed the capability of degrading salicylic acid, p-hydroxybenzoic acid, o-phthalic acid and phenylacetic acid. 16 S rRNA gene sequencing identified the strain ND24 as a *Pseudomonas* sp. After inoculating strain ND24 into the autoclaved soils containing 0.2% naphthalene and incubating it at room temperature for 14 days, 98.2% naphthalene was removed.

Key words: naphthalene; biodegradation; *Pseudomonas* sp.; bioremediation of soils

多环芳香烃(PAHs)是一类广泛存在于环境中的污染物, 其分子含有两个或多个苯环. 这些化合物大多具有毒性、致突变性和致癌性, 包括萘、菲、蒽和芘等在内的 16 种 PAHs 已被美国环境保护署

(EPA)列为重点污染物^[1]. 由于它们在中环境中存在的普遍性、持久性、低水溶性和易与土壤颗粒结合等特点, 所以污染位点的修复引起广泛重视. 通过蒸发和吸附等方法可以减少土壤中 PAHs 的浓

收稿日期: 2005-08-21; 修回日期: 2005-09-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270274)资助课题.

作者简介: 蔡宝立(1945-), 男, 河北兴隆人, 教授, 博士生导师.

度,但更为有效和经济的方法是生物修复.萘是最为常见的 PAHs 污染物,在过去的 30 年中,对萘生物降解的生物化学和遗传学机制进行了广泛研究,证明萘降解基因主要位于细菌的大质粒上,大约 20 个降解基因组成 2 个操纵子,上游操纵子编码的酶将萘氧化成水杨酸,下游操纵子编码的酶再将水杨酸降解成可进入三羧酸循环的小分子物质^[2~4].虽然对萘在水和空气中的生物降解已进行了大量研究,但是萘在土壤中的生物降解规律和测定方法的报道尚不多见^[5]. Filonov 等用 *Pseudomonas putida* G7 菌株进行了土壤中的萘降解实验,建立了一种数学模型,用于评价萘的降解效率^[5].作者从石油工业废水中分离到高效降解萘的假单胞菌 ND24 菌株,并对该菌株的降解特性和对污染土壤的修复能力进行了研究.

1 材料与方法

1.1 培养基和培养条件

萘降解菌株的分离和培养使用以萘为惟一碳源(2 g/L)的 MM 培养基,成分见文献[6].高压灭菌冷却后加入萘粉末.标准培养条件是:萘质量浓度 2 g/L,pH 7.2,30 ℃,150 r/min 振荡培养.制备萘平板时,培养基加入 2 g/L 琼脂粉,高压灭菌,待温度降到 85 ℃左右时加入萘粉末,摇匀后倒平板.

1.2 萘降解菌株的分离

取 5 mL 工业废水,与 45 mL MM 培养基混合,加入终质量浓度为 2 g/L 的萘粉末,于 30 ℃摇床振荡培养 3 d.取 5 mL 菌液接种于 45 mL 含萘 MM 培养基,继续培养,如此重复 3 次.用接种环蘸取菌液,在萘平板上划线,30 ℃培养,分离单菌落.单菌落再划线纯化 2 次,得到纯化菌株.

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、克隆、测序和同源性比对

具体操作见文献[7].

1.4 萘质量浓度的测定

用二氯甲烷萃取培养液或土壤中的萘,经过滤和脱水后用岛津 GC-9A 气相色谱仪测定萘残留量.分析条件:进口温度 260 ℃,氮气体积流量 50 mL/min,柱温 200 ℃;检测条件:检测器(FID)温度 260 ℃,空气体积流量 50 mL/min,氢气体积流量 70 mL/min;色谱柱为 SE-52 型,长 30 m,直径 0.32 mm.

1.5 菌株的萘降解特性分析

1.5.1 最适降解条件 用不同 pH 值、添加不同微量元素和不同萘质量浓度的 MM 培养基,在不

同温度下培养 ND24 菌株,于不同时间取样,测定 OD₆₀₀ 值,通过培养液 OD₆₀₀ 值的高低判断细菌生长的快慢,OD₆₀₀ 值越高,说明萘的降解性越好.

1.5.2 碳源实验 在 MM 培养基中添加不同化合物作为细菌生长的惟一碳源,质量浓度为 2 g/L,在标准条件下培养 ND24 菌株,2 d 后培养液明显变浑,说明该化合物可作为惟一碳源.

1.6 萘污染土壤的生物修复

取校园土壤研碎过筛,180 ℃干热灭菌 2 h,取 20 g 放入直径为 6 cm 的培养皿中,加入 40 mg 萘,混匀,再加 2 mL ND24 菌液和 4 mL 液体 MM 培养基,混匀,加盖,室温(20~23 ℃)保存,每天喷少许蒸馏水保持土壤湿润,每隔 2~4 d 取出 1 个培养皿,密封后存放于-30 ℃冰箱,14 d 后用 GC 测定萘的残留量.对照实验不加菌液,其它条件不变.

2 结果与讨论

2.1 萘降解菌株 ND24 的分离和鉴定

用富集培养法,从石油工业废水中分离到 24 个能以萘为惟一碳源生长的细菌菌株,其中一个在萘平板中菌落较大的命名为 ND24.该菌株含有一个大质粒,具有氨苄青霉素、四环素、氯霉素和链霉素抗性.用 PCR 引物 27F 和 1492R 扩增 ND24 菌株的 16S rRNA 基因^[7],得到 1 485 bp 的 DNA 片段,GenBank 注册号为 DQ133572.将该序列与 GenBank 中的类似序列进行 Blast 比对以后发现,它与 15 个假单胞菌(*Pseudomonas*)菌株的 16S rRNA 基因的同源性在 98%以上,所以 ND24 菌株被鉴定为 *Pseudomonas* sp. 15 个 *Pseudomonas* 菌株的 GenBank 注册号分别是:*P. putida* KT2440, E016774; *Pseudomonas* sp. WBC-3, AY040872; *P. plecoglossicida*, AB009457; *P. putida* ATCC17642, AF094744; *P. putida* ND6, AY589689; *P. asplenii*, Z76655; *Pseudomonas* sp. WDL5, AF538932; *P. cremoricolorata*, AB060137; *P. fulva* IAM1541, AB046999; *P. fulva* AJ2130, AB047001; *P. monteilii*, AF181576; *P. entomophila* L48, AY907566; *Pseudomonas* sp. ML2, AF378011; *P. cf. monteilii*, AF181576; *Pseudomonas* sp. K2, AF532866.上述菌株的 16S rRNA 基因序列的系统树见图 1.

2.2 ND24 菌株的降解特性

温度试验表明,ND24 菌株在 25~30 ℃生长时 A₆₀₀ 值相对较高,表明其生长和萘降解较好.20 ℃培养时,在前 30 h 其 A₆₀₀ 值较 25~30 ℃培养略低,

30 h 后趋于一致。在 37 ℃,ND24 菌株不能在以萘为惟一碳源的 MM 培养基中生长(见图 2)。

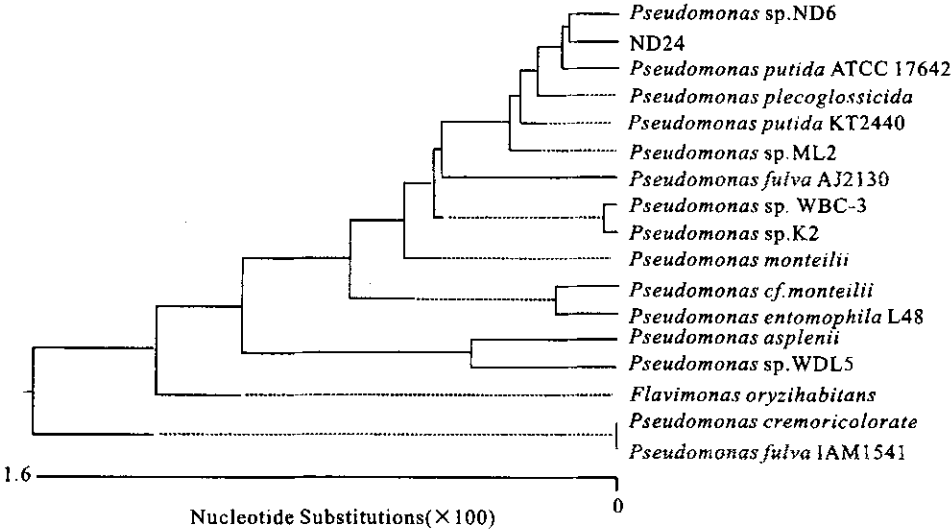


图 1 ND24 和其它相关菌株的 16S rRNA 基因序列的系统树
Fig. 1 16S rRNA gene phylogenetic tree of ND24 and related strains

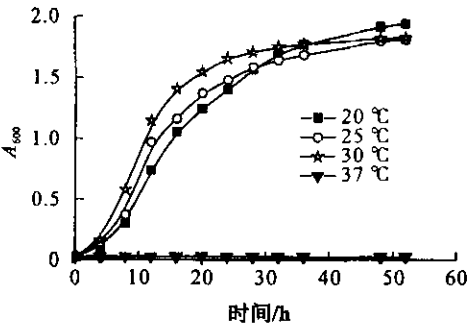


图 2 温度对 ND24 菌株生长的影响
Fig. 2 Effect of temperature on the growth of strain ND24

pH 值试验表明,用于 ND24 菌株生长的 MM 培养基的最适 pH 值范围为 6.5~8.5,pH 值为 6.0 时生长受到明显抑制,pH 值为 5.0 或 9.0 时基本不能生长(结果见图 3)。

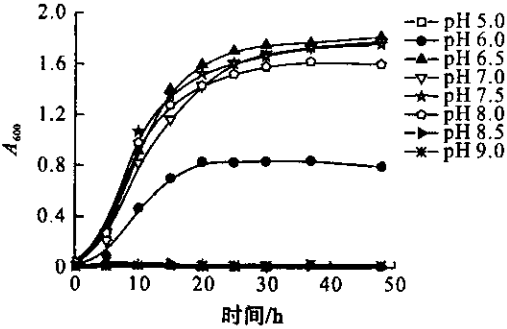


图 3 pH 值对 ND24 菌株生长的影响
Fig. 3 Effect of pH on the growth of strain ND24

萘质量浓度试验表明,当萘质量浓度为 2 g/L 时 ND24 菌株的生长最快。萘质量浓度为 0.5 g/L

时 A_{600} 值偏低,表明碳源不足。萘质量浓度为 4~10 g/L 时 A_{600} 值明显降低,表明菌株生长受到抑制(结果见图 4)。

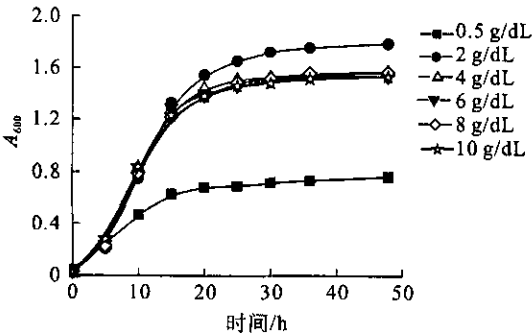


图 4 萘质量浓度对 ND24 菌株生长的影响
Fig. 4 Effect of naphthalene concentration on the growth of strain ND24

微量元素试验表明:在培养基中不加微量元素,加入混合微量元素^[6]和加入终质量浓度为 25 mg/L 的 FeSO_4 的 3 种情况下,加入 FeSO_4 能促进 ND24 菌株的生长,这是由于萘降解途径中催化儿茶酚开环的儿茶酚 2,3-双加氧酶是一种含有 Fe^{2+} 的酶^[8],加入 FeSO_4 有利于保持该酶的活性,从而促进对萘的降解。混合微量元素中虽然也含有 Fe^{2+} ,但质量浓度较低,仅为 1 mg/L^[6],不能满足细菌生长的需要。

根据以上结果,ND24 菌株的优化培养条件是:MM 培养基的 pH 值为 7.2,萘质量浓度为 2 g/L,加入终质量浓度为 25 mg/L 的 FeSO_4 ,30 ℃ 振荡培养。在此条件下可将 MM 培养基中 2 g/L 的萘

在 48 h 内降解 98.4% (结果见图 5)。

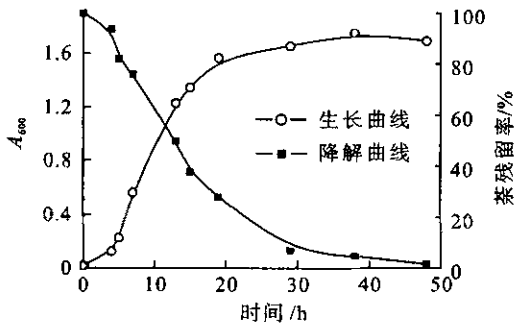


图 5 ND24 菌株的生长和萘降解曲线

Fig. 5 The growth and naphthalene degradation curves of strain ND24

碳源利用实验表明,可被 ND24 菌株作为惟一碳源利用的芳香化合物包括邻苯二甲酸(水杨酸)、邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸和苯乙酸,而它们的类似物间苯二甲酸、对苯二甲酸、间羟基苯甲酸不能作为惟一碳源利用。

2.3 ND24 菌株对萘污染土壤的生物修复

为了排除土著菌对 ND24 菌株降解萘的干扰和影响,作者使用灭菌土壤。在含萘土壤(2 mg/g)中加入少量液体 MM 培养基主要是为萘降解菌的生长提供磷源和氮源。试验结果表明,经过 4,8,12,14 d 室温培养,萘的残留率分别为 20.8%,14.8%,4.5%,1.8%,没有加入菌液的对照组 14 d 后萘的残留率为 34.1%。对照组中萘的损失是由于挥发造成的(结果见图 6)。从图 6 可见,ND24 菌液的加

入大大加速了土壤中萘的降解,所以 ND24 可以用作萘和石油污染土壤生物修复的候选菌株。

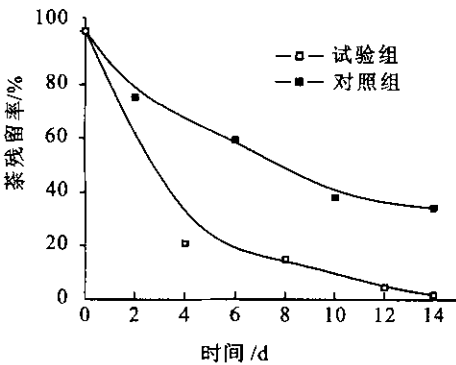


图 6 ND24 菌株对萘污染土壤的生物修复

Fig. 6 Bioremediation of naphthalene-contaminated soil by strain ND24

3 结 论

1)从石油工业废水中分离到高效降解萘的 *Pseudomonas* sp. ND24 菌株,该菌株的最适培养条件是:使用 pH 值为 7.2 的无机盐培养基,萘质量浓度为 2 g/L,加入终质量浓度为 25 mg/L 的 Fe-SO_4 ,30℃振荡培养,在此条件下可将 2 g/L 的萘在 48 h 内降解 98.4%。

2) *Pseudomonas* sp. ND24 菌株对土壤中的萘具有良好的降解效果,将该菌株接种到质量浓度 0.2 g/dL 萘的灭菌土壤中,加入适量的磷源和氮源,经过 14 d 室温培养以后,萘的去除率为 98.2%。

参考文献:

[1] Habe H, Omori T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria[J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2003, 67:225—243.

[2] Yen K M, Seder C M. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonas*[J]. **Crit Rev Microbiol**, 1988, 15:247—268.

[3] Li W, Shi J, Wang X. Complete nucleotide sequence and organization of thenaphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6[J]. **Gene**, 2004, 336:231—240.

[4] Dennis J J, Zylstra G J. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4[J]. **J Mol Biol**, 2004, 341:753—768.

[5] Filonov A E, Puntus I F, Karpov A V, et al. Efficiency of naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 in soil [J]. **J Chem Technol Biotechnol**, 2004, 79:562—569.

[6] 蔡宝立,王淑芳,黄今勇,等. 黄杆菌 ND3 菌株的分离和降解萘的研究[J]. **环境化学**, 1998, 17(5):434—438.

[7] Cai B, Han Y, Liu B, et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China[J]. **Lett Appl Microbiol**, 2003,36: 272—276.

[8] Williams P A, Sayers J R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*[J]. **Biodegradation**, 1994, 5:195—217.

(责任编辑:李春丽,朱 明)