

文章编号: 1000-5862(2012)03-0317-04

苯酚降解菌的筛选及降解性能研究

王启明, 彭 仁*, 陈文静, 杜芸芸, 杨贵娟, 简敏菲

(江西师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330022)

摘要: 从腐烂的树木枯枝和污染的淤泥中分离出苯酚的高效降解菌. 通过对它们的形态和 16S rDNA 分析, 筛选到的新菌株分别命名为 *Acinetobacter sp.* SD1, *Pseudomonas sp.* SD2 和 *Rhodococcus sp.* SD3. 在筛选到的 3 株菌中, *Rhodococcus sp.* SD3 的苯酚降解性能最好, 该菌株在 72 h 内几乎能将浓度为 1.0 g/L 的苯酚完全降解.

关键词: 红球菌; 假单胞菌; 不动杆菌; 苯酚降解

中图分类号: X 172

文献标志码: A

0 引言

苯酚是石油化工、造纸、农业、医药合成等行业的原料或中间体, 是工业废水中的主要污染物. 苯酚属芳香族化合物, 有毒而且很难降解. 含酚污水不经过处理而任意排放会污染生态环境^[1], 若进入生物体, 还会引起蛋白质变性和凝固, 所以苯酚被许多国家的环保组织列入优先控制的污染物^[2-3]. 目前对苯酚污染的处理方法主要有微生物降解法、溶剂萃取法、树脂吸附法、光催化法等^[4-6]. 微生物降解法处理苯酚不但经济、有效, 并且无二次污染, 因而越来越受到人们的关注. 目前国内外已经分离到一些能够降解苯酚的微生物, 大部分属于革兰氏阴性菌, 革兰氏阳性菌只占较小的比例^[7-13]. 本文从腐烂的树木枯枝和污染的淤泥中分离出 3 株苯酚的高效降解菌, 并研究了它们降解苯酚的性能, 以期能为治理苯酚污染的工业废水提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

样品取自潮湿环境中自然腐烂的树木枯枝和南昌市艾溪湖边受污染的淤泥. 采样后, 用无菌保鲜袋将样品带回实验室. TIANamp Bacteria DNA Kit、TIANgel Midi Purification Kit、TIAprep Mini Plasmid Kit 购自 TIANGEN BIOTECH 公司, CloneJETPCR

Cloning Kit #K1231、#K1232 购自 Fermentas 公司, *E. coli* DH5 α 为本实验室保存.

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 以无酚蒸馏水^[14]配制 1 000 mL 含胰蛋白胨质量分数为 1.0%、酵母提取物质量分数为 0.5%、NaCl 质量分数为 1.0%的培养基, 以 5 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值为 7.0, 121 °C 高温蒸汽灭菌 20 min. LB 琼脂平板培养基中需加入质量分数 2% 的琼脂.

1.2.2 苯酚无机盐培养基 NaCl 1.0 g, NH₄Cl 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 3.0 g, K₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, 苯酚 0.5 g, 以无酚蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 °C 高温蒸汽灭菌 20 min. 苯酚无机盐平板培养基需加入质量分数 2% 的琼脂.

1.2.3 无机盐培养基 NaCl 1.0 g, NH₄Cl 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 3.0 g, K₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, 用无酚蒸馏水定容至 1 000 mL, 121 °C 高温蒸汽灭菌 20 min.

1.3 方法

1.3.1 苯酚降解菌株的分离和纯化 将适量样品 (10 g 左右) 加入 100 mL 无菌水中, 充分震荡 30 min. 静置后取上清液 1 mL 在 4 000 rpm 下离心 2 min, 小心吸取并弃去 800 μ L 上清液, 将剩下的 200 μ L 悬液吹吸均匀, 并涂布于苯酚无机盐平板培养基上, 35 °C 培养 2~3 d. 用接种环挑取长势较好的菌落, 然后在苯酚无机盐平板培养基上分区划线, 35 °C 培养 2~3 d, 多次纯化后, 挑取细菌单菌落于 LB 培养基斜面上扩增培养, 最后用斜面保藏法保存于 4 °C 或 -20 °C 环境中备用^[15].

收稿日期: 2011-12-11

基金项目: 国家自然科学基金(41161035)和江西师范大学博士启动基金资助项目.

作者简介: 彭 仁(1972-), 男, 江西丰城人, 副教授, 博士, 主要从事生物催化与生物转化研究.

1.3.2 苯酚降解菌株降解率的测定方法 将上述保存的菌株用LB培养基培养,取10 mL处于对数期^[15-17]的菌液,离心分离菌体,加入等体积的无菌水配制成菌悬液,然后取上述菌悬液1 mL加入到100 mL的苯酚无机盐培养基中,在35℃、200 r/min下培养72 h.培养结束后取1 mL培养液,用无酚蒸馏水稀释至100 mL,采用4-氨基安替比林分光光度法测定苯酚的浓度^[14].

1.3.3 苯酚降解率的计算 苯酚降解率=(1-培养结束时苯酚质量浓度/未接种时苯酚质量浓度)×100%.

1.3.4 菌株的形态特征 试验方法分别参照文献^[18-20]的方法进行.

1.3.5 菌株的16S rDNA分析 取保存的纯菌株接种于LB液体培养基中,在35℃、200 r/min摇床上震荡培养12~15 h作为种子液,取1 mL种子液接种于新鲜的LB液体培养基中,在35℃、200 r/min摇床上震荡培养4~8 h,取200~800 μL菌液于12 000 r/min离心2 min,弃去上清液.然后用TIANamp Bacteria DNA Kit提取菌体总DNA.利用PCR技术从总DNA中扩增其16S rDNA片段.PCR反应体系(25 μL)如下:无菌去离子水14.7 μL,10×Buffer 2.5 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)2.0 μL,MgCl₂(2.0 mmol/L)1.5 μL,引物分别为5'-AG AGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(10 pmol/L)1 μL(正向)和5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(10 pmol/L)1 μL(反向)^[21].Taq plus聚合酶(5 U/μL)0.3 μL,模板DNA 2.0 μL.试剂全部加好后,混匀后瞬时离心,将所有试剂收集到管底.PCR反应条件为:(1)94℃预变2 min;(2)94℃变性20 s;(3)58℃退火20 s;(4)72℃延伸1.5 min;(5)重复步骤(2)~(4)35次;(6)72℃最终延伸3 min.PCR反应产物经质量分数为1%的琼脂糖凝胶电泳后用EB替代品染色.用TIANGel Midi Purification Kit回收琼脂糖凝胶上的PCR产物,用pJET1.2/blunt Cloning Vector(50 ng/μL)克隆回收的PCR产物.克隆所用的受体菌为*E. coli* DH5α感受态细胞,再用TIAPrep Mini Plasmid Kit提取重组质粒,并用琼脂糖凝胶电泳进行检测.将重组的*E. coli* DH5α送至上海生工测序,然后将测序结果用BLAST软件与GenBank中相关菌属的16S rDNA进行比对.

1.3.6 苯酚降解菌株的降解性能研究 将1.3.2节中制备的菌悬液1 mL接种于100 mL无机盐培养基中,其中无机盐培养基中分别加入了不同质量浓度(0.5、0.7、1.0、1.3、1.8、2.0 g/L)的苯酚,然后于35℃、

200 r/min下震荡培养72 h.取1 mL培养液,用无酚蒸馏水稀释至100 mL,采用4-氨基安替比林分光光度法测定苯酚的浓度.

2 结果与讨论

2.1 苯酚降解菌的筛选

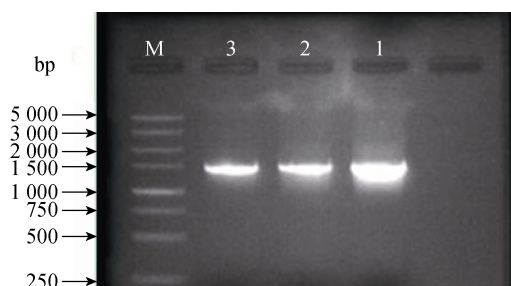
经过分离和纯化,筛选出3株降解苯酚能力较强的菌株(SD1、SD2和SD3).这3株菌在72 h内降解质量浓度为500 mg/L的苯酚的效率都达到99.9%.目前,国内外曾报道了一些能够降解苯酚的微生物,其中*Rhodococcus sp.* PNAN5菌株在苯酚浓度为2~10 mmol/L(约188~945 mg/L)范围内降解效率保持在80%~100%之间^[12],醋酸钙不动杆菌PHEA-2最佳降解苯酚的质量浓度为300 mg/L^[22],钱奕忠等^[23]发现的一株假单胞菌降解质量分数为472 mg/L的苯酚需要78 h.

2.2 苯酚降解菌的形态特征

菌株SD1的生长菌落为圆形突起,湿润,粘稠,不透明,表面光滑,乳白色,隆起,易于挑起,边缘整齐.SD2的生长菌落为圆形突起,湿润,粘稠,不透明,表面光滑,乳黄色,隆起,易于挑起,边缘整齐.SD3的生长菌落较小,湿润,粉末状,圆形,橘红色,不透明,易于挑起,边缘整齐.革兰氏染色后,镜检菌株SD1细胞呈球状,菌株SD2细胞呈杆状略弯,菌株SD3细胞呈球状;菌株SD1和菌株SD2革兰氏成阴性,菌株SD3革兰氏成阳性.

2.3 16S rDNA基因的测序和比对

以菌株的总DNA为模板,PCR扩增16S rDNA,得到约1.5 kb的产物,见图1.测序后,将菌株SD1、SD2和SD3的16S rDNA序列向GenBank进行了提交,其序列登录号分别为JN256940、JN801160和JN896994.



注:泳道1、2、3分别为菌株SD1、SD2和SD3的16S rDNA的PCR产物电泳图,M为DNA Marker.

图1 菌株SD1、SD2和SD3的16S rDNA的PCR产物电泳图谱

将菌株 SD1、SD2 和 SD3 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行比对,其中菌株 SD1 的 16S rDNA 序列与 *Acinetobacter sp.* KL1(2010)的 16S rDNA 序列同源性为 99%。根据菌株 SD1 的形态特征和 16S rDNA 序列分析,菌株 SD1 命名为 *Acinetobacter sp.* SD1。菌株 SD2 的 16S rDNA 序列与 *Pseudomonas sp.* CO-44 的 16S rDNA 序列同源性为 99%。根据菌株 SD2 的形态特征和 16S rDNA 序列分析,菌株 SD2 命名为 *Pseudomonas sp.* SD2。菌株 SD3 的 16S rDNA 序列与 *Rhodococcus sp.* Z25 的 16S rDNA 序列同源性为 99%。根据菌株 SD3 的形态特征和 16S rDNA 序列分析,菌株 SD3 命名为 *Rhodococcus sp.* SD3。

2.4 菌株的降酚性能分析

将 *Acinetobacter sp.* SD1、*Pseudomonas sp.* SD2 和 *Rhodococcus sp.* SD3 以 1%接种于含苯酚质量浓度分别为 0.5、0.7、1.0、1.3、1.8 和 2.0 g/L 的无机盐培养基中,在 35 °C、200 r/min 摇床上震荡培养 72 h 后,取样测定苯酚浓度,结果见图 2。图 2 表明:当苯酚浓度为 0.5 g/L 时,3 株菌的培养基中的苯酚均几乎能完全降解;当苯酚浓度高于 0.5 g/L 时, *Acinetobacter sp.* SD1 和 *Pseudomonas sp.* SD2 的降酚能力急剧下降;在苯酚浓度为 0.7 g/L 时, *Acinetobacter sp.* SD1 和 *Pseudomonas sp.* SD2 的降解率仅分别为 52.9%和 38.9%。在筛选到的 3 株菌中, *Rhodococcus sp.* SD3 的降酚能力高于 *Acinetobacter sp.* SD1 和 *Pseudomonas sp.* SD2,它在苯酚浓度为 1.0 g/L 时几乎能将苯酚完全降解,但当苯酚浓度高于 1.0 g/L 时降酚能力下降,在苯酚浓度为 1.3 g/L 时,降解率为 35.2%。3 株菌在苯酚浓度为 2.0 g/L 时,降酚能力均较低。目前筛选到的一些能够降解苯酚的微生物中,革兰氏阳性菌只占较小的比例,只有 *Rhodococcus* 属内的微生物。本文筛选到的菌株 *Rhodococcus sp.* SD3 的 16S rDNA 序列和苯酚降解菌 *Rhodococcus sp.* PNAN5^[12] 的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号 AY090021)、*Rhodococcus sp.* BFXJ-2 的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号 EU017404)、*Rhodococcus sp.* 3HYL 的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号 FJ887962)和 *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 (ATCC11048)^[24] 的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号 AJ620506)同源性分别为 96.6%、97.8%、97.6%和 96.0%。一般来说,16S rDNA 序列相似性(94.4±0.4)%可视为属的界限,16S rDNA 序列相似性在 98.7%~99.0%可视为种的界限^[25]。

因此, *Rhodococcus sp.* SD3 和已报道的苯酚降解菌 *Rhodococcus sp.* PNAN5、*Rhodococcus sp.* BFXJ-2、*Rhodococcus sp.* 3HYL、*Rhodococcus erythropolis* CCM2595(ATCC11048)为同一个属,但可能为不同的种。

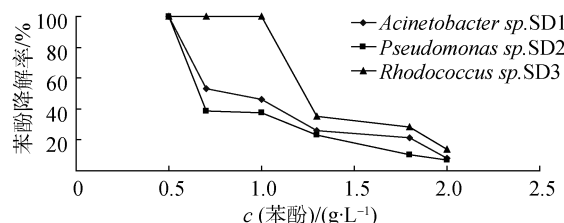


图2 *Acinetobacter sp.* SD1、*Pseudomonas sp.* SD2 和 *Rhodococcus sp.* SD3 的苯酚降解性能

3 参考文献

- [1] 陈明, 张维, 徐玉泉, 等. 醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 对苯酚的降解特性研究 [J]. 中国环境科学, 2001, 21(3): 226-229.
- [2] 刘琼玉, 李太友. 含酚废水的无害化处理技术进展 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, 3(2): 62-66.
- [3] Angeletti G, Bjørseth A. Organic micropollutants in the aquatic environment [M]. Bjørseth: Kluwer Academic Publishers, 1991.
- [4] 张锦, 李圭白, 马军. 含酚废水的危害及处理方法的应用特点 [J]. 环境工程, 2001, 83(2): 36-37.
- [5] 蒋珍茂, 崔丹丹, 李爱民. 超高交联吸附树脂处理复合污染物的模拟研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(3): 119-126.
- [6] 金显春. 烟曲霉 JX-5 对造纸黑液的处理研究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2008, 32(5): 555-558.
- [7] Wang Yujing, Song Jing, Zhao Wei, et al. In situ degradation of phenol and promotion of plant growth in contaminated environments by a single *Pseudomonas aeruginosa* strain [J]. J Hazard Mater, 2011, 192(1): 354-360.
- [8] 王云端, 董小军, 王茜, 等. 自然土壤中苯酚降解菌的分离和系统发育分析 [J]. 环境科学, 2007, 2(3): 623-626.
- [9] Al-Zuhair S, El-Naas Mu. Immobilization of *Pseudomonas putida* in PVA gel particles for the biodegradation of phenol at high concentrations [J]. Biochem Eng J, 2011, 56(1/2): 46-50.
- [10] Arutchelvan V, Kanakasabai V, Elangovan R, et al. Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis* [J]. J Hazard Mater, 2006, 129(1/2/3): 216-222.
- [11] Thomas S, Sarfaraz S, Mishra L C, et al. Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture [J]. World J Microb Biot, 2002, 18(1): 57-63.
- [12] 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株 (*Rhodococcus sp.* strain PNAN5) 的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究 [J]. 环境科学学报, 2004, 24(3): 482-486.
- [13] Irene T, Michalis A, Michael K, et al. Mass spectrometric

- mapping of the enzymes involved in the phenol degradation of an indigenous soil *pseudomonad* [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1700(1): 117-123.
- [14] 国家环保局. 水质挥发酚的测定 4-氨基安替比林分光光度法 (HJ 503—2009) [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009.
- [15] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2008.
- [16] 徐威, 海滨. 高效苯酚降解菌的选育及降解特性 [J]. 微生物学杂志, 2008, 28(1): 68-71.
- [17] 袁利娟, 姜立春, 彭正松, 等. 一株高效苯酚降解菌的选育及降解性能研究 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 587-592.
- [18] 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.
- [19] 沈萍, 陈向东. 微生物实验 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [20] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学实验指导 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [21] Weisburg W G, Barns S M, Pellatier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703.
- [22] 陈明, 张维. 醋酸钙不动杆菌 PHEA22 对苯酚降解特性研究 [J]. 中国环境科学, 2001, 21(3): 226-229.
- [23] 钱奕忠, 张鹏, 谭天伟. 假单胞菌降解含苯酚废水 [J]. 实验过程工程学报, 2001, 1(4): 439-441.
- [24] Cejkova A, Masak J, Jirku V, et al. Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism [J]. World J Microb Biot, 2005, 21(3): 317-321.
- [25] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.

The Study on Screening of Phenol-Degrading Microbes and Their Degradation Performance

WANG Qi-ming, PENG Ren*, CHEN Wen-jing, DU Yun-yun, YANG Gui-juan, JIAN Min-fei

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: Phenol-degrading microbes were isolated from rotting wood and polluted sludge. These strains were identified as *Acinetobacter* sp. SD1, *Pseudomonas* sp. SD2 and *Rhodococcus* sp. SD3 according to their morphological feature and 16S rDNA sequence, respectively. The phenol-degrading performance of *Rhodococcus* sp. SD3 strain was best among three strains, which almost completely degraded 1.0 g/L phenol in 72 hours.

Key words: *Rhodococcus*; *Pseudomonas*; *Acinetobacter*; phenol degradation

(责任编辑: 刘显亮)

我校实现国家级科研平台“0”的突破 国家单糖化学合成工程技术研究中心成功获批立项建设

2012 年 1 月, 科技部正式下文批准对以江西师范大学为依托单位的“国家单糖化学合成工程技术研究中心”立项建设, 标志着我校第 1 个、全国师范院校第 2 个国家工程技术研究中心的诞生, 实现了我校国家级科研平台“0”的突破, 这也是我省实施科技创新“6 个 1”工程以来在国家级研发平台建设工作上取得的又一重要成果。

作为国家科技发展计划的重要组成部分, 国家工程技术研究中心是科研开发、技术创新和产业化重要基地, 承载着培养一流人才、推进技术创新、引领产业发展的重要使命。通过多年的努力, 学校在单糖化学合成领域已形成一支学术水平高、人才结构好、创新能力强的研发队伍, 在工程化、分析测试手段等方面具有良好基础, 拥有配套设施齐全的产业化基地, 承担了多项国家、省、市重大科技项目, 取得了多项拥有自主知识产权的创新成果并得到了实际应用, 走出了一条产学研紧密结合的示范型道路。

国家单糖化学合成工程技术研究中心将着力解决我国单糖化学及相关产业发展所面临的关键共性技术难题, 全力打造成为具有国际先进水平的单糖化学合成研发、中试及成果转化平台和糖基化合物、精细化学品的产业化基地, 有力推动全国单糖化学合成战略性新兴产业的快速发展。