

一株苯并芘高效降解菌的筛选鉴定

弓玉红, 李军, 高平, 王莉, 赵君 (吕梁学院, 山西离石 033000)

摘要 为了寻找可降解苯并芘的高效降解菌, 从长期受苯并芘污染的焦化厂周边土壤和废水中取样, 以苯并芘为唯一碳源反复驯化, 分离、筛选出 1 株高效降解苯并芘的菌株 A18。经形态特征和分子生物学分析, 初步鉴定为木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)。菌株 A18 在苯并芘溶液浓度为 5 mg/L 下, 28 °C 振荡培养 12 d, 苯并芘的降解率达到 44.8%。该菌株首次被证实具有降解苯并芘的能力。

关键词 苯并芘; 高效降解菌; 筛选; 鉴定

中图分类号 S182; X172 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)11-003-02

Isolation and Identification of a BenzoPyrene-Degrading Strain

GONG Yu-hong, LI Jun, GAO Ping et al (Lvliang University, Lishi, Shanxi 033000)

Abstract To find degrading strain of benzo(a)pyrene, sampled from the soil and waste water surrounding the coking plant which was polluted by benzo(a)pyrene in a long time. An efficient degradation bacterium strain A18 was isolated from soil by repeated subculture in liquid medium with benzo(a)pyrene as sole carbon source. To confirm the classification of A18, morphological characteristics and molecular biology analysis were applied, the strain A18 was identified as *Fusarium equiseti*. In a mineral salts medium with 5 mg/L benzo(a)pyrene, the highest degradation rate of 44.8% was obtained after 12 days at 28 °C. The strain is for the first time confirmed has the ability to degrade the benzo(a)pyrene.

Key words Benzo(a)pyrene; Degrading strain; Screen; Identification

苯并芘, 分子式为 $C_{20}H_{12}$, 分子量是 252^[1], 极不易溶于水。这是它在环境中难于被降解的因素之一^[2-4]。苯并芘是一种强致癌物, 具有致癌、致畸、致突变性^[5-7]。苯并芘存在于石油、食品、大气和煤焦油中, 在土壤中也易残留^[8-9]。许多国家都进行过土壤中苯并芘含量调查, 残留浓度取决于污染源的性质与距离^[10]。在焦化厂附近土壤中苯并芘含量为 200 mg/kg, 在被污染的土壤中高至 650 mg/kg^[11]。笔者在山西吕梁市离石区焦化厂周边耕地中采集被苯并芘污染的土壤和废水样品, 分离、筛选到一株苯并芘降解能力较强的菌株 A18。经鉴定, 它属于木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)。该菌株首次被证实具有降解苯并芘的能力, 具有从环境介质中清除苯并芘的较好效果, 在苯并芘污染的微生物修复上具有很高的应用价值。

1 材料与与方法

1.1 材料 样品采自山西吕梁市离石区焦化厂周边耕地耕层土壤和废水。富集用培养基^[12-14] 1 L: $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, $NaNO_3$ 0.5 g, $CaCl_2$ 0.02 g, KH_2PO_4 1.0 g, NaH_2PO_4 1.0 g, $MgSO_4$ 0.2 g, 溶解苯并芘 5 mg 于丙酮后加水至 1 L, pH 7.5。2216E 培养基 1 L: 蛋白胨 5 g, 酵母浸膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, pH 7.6~7.8。

1.2 苯并芘降解菌分离方法 称取 10 ml 土样和水样的混合样, 加入到 90 ml 无菌水中, 加入适量玻璃珠, 振荡 3 h^[15-17]。30 min 静置后, 取 5 ml 上清液到 45 ml 含有苯并芘浓度为 1 mg/L 的无机盐培养基中, 28 °C, 150 r/min 摇床避光培养。每隔 7 d 移取 10 ml 菌液至灭菌的 90 ml 无机盐-苯并芘液体培养基中富集培养, 每转接一次苯并芘的浓度提高 1 mg/L, 如此 4 次后, 苯并芘的最后浓度为 5 mg/L。将最

后一次的培养液稀释不同的梯度($10^{-1} \sim 10^{-7}$), 涂布于表面涂有苯并芘的选择性固体培养基平板上, 28 °C 培养 2 d。分别挑取单菌落, 接种到 2216E 固体平板液体培养基中, 反复划线, 分离, 经 28 °C 培养箱倒置培养 2 d, 得到纯培养物, 并且观察菌落形态, 测量菌落大小, 记录结果后斜面保存菌株。

1.3 降解菌的鉴定

1.3.1 分离菌株形态特征分析。 菌株形态特征分析参照《常见细菌系统鉴定手册》、《真菌鉴定手册》^[18] 等进行。

1.3.2 16S rDNA 的测序及系统发育树的构建。 挑取适量菌株于含有 100 μ l ddH₂O 的 1.5 ml 离心管, 研磨形成菌液, 将 77.5 μ l 菌液分别加入每管含有 10 μ l buffer、12.5 μ l DTT 的 PCR 管中, 65 °C 水浴处理 20 min, 然后离心, 置于冰上进行 20 min 处理, 取上清为 PCR 反应的模板。把总 DNA 稀释至 100 ng/ μ l, 用稀释液为 PCR 扩增反应的模板, 以蒸馏水为阴性对照, 50 μ l 反应体系进行目的片段的扩增, 然后对 PCR 扩增产物进行纯化, 产物送上海桑尼生物工程公司测序。测序结果在 NCBI 中进行序列搜索比对后, 选择亲缘关系较近的几种菌株作为参比菌株, 用 MEGA 软件构建系统发育树^[19]。

1.3.3 苯并芘含量的测定。 采用萃取-紫外分光光度法, 测定苯并芘含量^[20]。用二氯甲烷试剂, 配制梯度苯并芘标准溶液, 用紫外分光光度计在 300 nm 波长处测定其梯度吸光度, 作标准曲线。同时, 在筛选得到的每种菌株的无机盐液体培养基中加入丙酮-苯并芘母液, 使得苯并芘的终浓度达到 5 mg/L。在转速 150 r/min、温度 28 °C 的条件下振荡培养 12 d, 同时设不接菌对照。用紫外分光光度计分别在 300 nm 波长处测定其吸光度, 在标准曲线上计算出样品中剩余的苯并芘含量。

1.3.4 苯并芘降解率的计算。 利用标准曲线计算样品中剩余苯并芘的含量, 再利用公式 $c = (a - b) / a \times 100\%$ 计算降解率。式中, c 为降解率; a 为空白样品中苯并芘的含量; b 为处理后剩余苯并芘的含量。

基金项目 吕梁学院校级科技创新项目(20133061)。

作者简介 弓玉红(1987-), 男, 山西兴县人, 助教, 硕士, 从事食品科学方面的研究。

收稿日期 2015-03-12

2 结果与分析

2.1 苯并芘降解率的测定 以苯并芘为唯一碳源从焦化厂周边耕地耕层土壤和废水中筛选出一株降解菌,命名为A18。对A18进行苯并芘降解率测定。

由图1可知,试验得到苯并芘浓度在1.0~3.0 mg/L的范围内呈良好线性关系。对样品的吸光度值测定,样品的吸光度值为0.069,对照为0.135。用标准曲线的 $y = 0.4274x - 0.1035$ 计算得出对照的降解率(a)为0.557,样品的降解率(b)为0.307。利用公式 $c = (a - b) / a \times 100\%$ 计算降解率

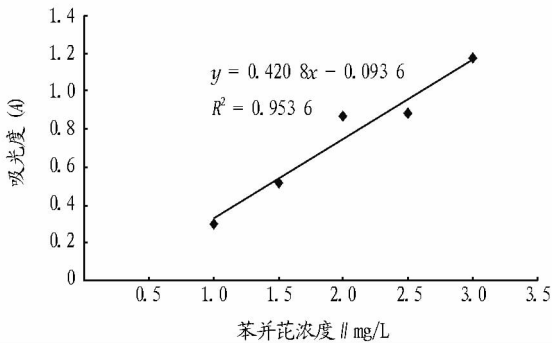


图1 A18的降解标准曲线

(c),为44.8%。由此可知,菌株A18在苯并芘浓度为5 mg/L,转速150 r/min,温度28℃的条件下,振荡培养12 d,苯并芘的降解率为44.8%。

2.2 苯并芘降解菌的筛选与鉴定 菌株A18在PDA培养基上为气生菌丝,米黄色,较疏松,棉絮状。大型分生孢子纺锤形或镰刀形,基部有明显的脚胞,顶端细胞均匀地逐渐变细,平直或稍弯曲。小型分生孢子较少,为长矩圆形或椭圆形,分生孢子梗为短梗形。厚垣孢子顶生或间生,成结节状或成串。根据上述形态特征,参考Booth镰刀菌分类系统,鉴定该菌株为木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)。

2.3 系统发育分析 经PCR扩增获得的A18号菌的18S rRNA序列(NCBI序列号为GQ505743.1),与GenBank中已报道的镰孢霉属(*Fusarium* LK. ex Fr.)真菌的18S rRNA序列有98%的同源性。系统发育分析结果显示,A18与弯孢镰孢霉组(赤霉属*Gibbosum/Gibberella*)真菌的一些已鉴定菌株(序列号为AY147368及AY147363)同属于一个簇群。根据A18的形态学特征、18S rRNA序列分析结果,参照镰孢霉属的分类学,将其鉴定为一种木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)。其系统发育关系见图2。

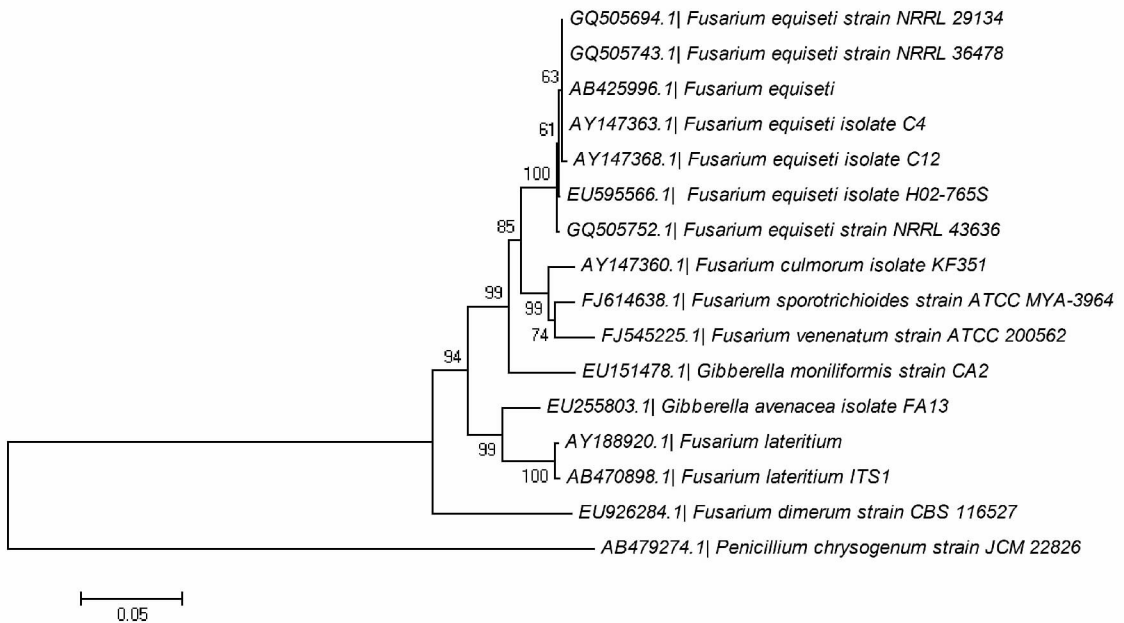


图2 A18号菌的基于18S rRNA序列同源性构建的系统发育树

3 结论

以苯并芘为唯一碳源,从焦化厂周边耕地耕层土壤和废水中筛选出一株高效降解菌A18,经鉴定为木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)。在苯并芘浓度为5 mg/L,转速150 r/min,温度28℃的条件下,振荡培养12 d,该菌的苯并芘降解率为44.8%。

参考文献

- [1] 李艳秋,刘君. 苯并芘降解菌SL-1的筛选、鉴定及其降解特性[J]. 北方环境,2010,22(2): 74-77.
- [2] 冉飞亚. 环境中苯并[a]芘的研究进展[J]. 上海环境科学,2010(2): 82-84,92.
- [3] 杨美娟. 浅析3,4-苯并芘的危害及其预防[J]. 农产品加工,2011,10: 71-72.

- [4] 王连生. 有机污染物化学[M]. 北京: 科学出版社,1991.
- [5] 杜锦华. 浅议土壤环境污染[J]. 内蒙古农业科技,2010(6): 13-14.
- [6] 王春梅,张朝霞. 陕北地区土壤环境污染现状及对策[J]. 内蒙古农业科技,2011(5): 17-18.
- [7] 王辰,王翠苹,刘海彬,等. 微生物对芘和苯并[a]芘污染土壤的修复[J]. 环境科学与技术,2011(3): 23-28.
- [8] 盛下放,何琳燕,胡凌飞. 苯并[a]芘降解菌的分离筛选及其降解条件的研究[J]. 环境科学学报,2005(6): 791-795.
- [9] 陆军,王菊思,赵丽辉. 苯系化合物好氧降解菌的驯化和筛选[J]. 环境科学,1996,17(6): 1-4.
- [10] 权桂芝. 土壤的农药污染及修复技术[J]. 天津农业科学,2007(1): 35-38.
- [11] 夏来坤,郭天财,康国章,等. 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): 88-92.

128.0 (s, C-9), 117.2 (d, C-10), 112.4 (s, C-4), 111.6 (s, C-15), 104.2 (s, C-3), 39.9 (t, C-8)。以上数据与文献[8]对照基本一致,因此将化合物6鉴定为 Oroidin。

化合物7 白色粉末;ESI-MS m/z 224, 310 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO) δ_H : 6.60 (s, H-3), 3.52 (dd, $J = 2.5, 3.15$ Hz, H-8), 2.80 (dd, $J = 2.53, 3.15$ Hz, H-9); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C : 194.0 (s, C-10), 161.1 (s, C-6), 129.3 (s, C-5), 124.4 (s, C-4), 110.6 (d, C-3), 105.2 (s, C-2), 43.1 (t, C-9), 36.01 (t, C-8)。以上数据与文献[9]对照基本一致,因此将化合物7鉴定为 2-bromoaldisine。

化合物8 白色粉末;UV ϵ_{max} 240, 254 nm; ESI-MS m/z 229 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO) δ_H : 12.63 (brs, H-NH), 7.82 (t, $J = 6.2, 6.2$ Hz, H-2), 7.41 (brt, $J = 6.9, 4.1$ Hz, H-5), 7.11 (s, H-7), 6.94 (d, $J = 6.9$ Hz, H-6), 6.34 (d, $J = 6.2$ Hz, H-3), 4.11 (s, H-OCH₃), 3.80 (s, H-OCH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C : 156.7 (s, C-9), 149.8 (s, C-3a), 142.1 (d, C-2), 133.9 (s, C-9a), 132.8 (s, C-6a), 131.1 (s, C-8), 129.7 (d, C-5), 116.5 (s, C-9b), 112.5 (d, C-6), 100.8 (d, C-7), 98.0 (d, C-3), 60.1 (q, C-OCH₃), 56.3 (q, C-OCH₃)。以上数据与文献[10]对照基本一致,因此将化合物8鉴定为 Aaptamine。

化合物9 ESI-MS m/z 215 $[M + H]^+$; 1H NMR (600 MHz, DMSO) δ_H : 12.62 (brs, H-NH), 10.11 (brs, H-OH), 7.83 (t, $J = 6.6, 6.7$ Hz, H-2), 7.26 (brt, $J = 5.1, 7.2$ Hz, H-5), 7.12 (s, H-7), 6.81 (d, $J = 7.2$ Hz, H-6), 6.34 (d, $J = 7.1$ Hz, H-3), 3.93 (s, H-OCH₃); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ_C : 152.1 (s, C-9), 151.6 (s, C-8), 149.6 (s, C-3a), 141.9 (d, C-2), 129.3 (d, C-5), 128.7 (s, C-9a), 127.9 (s, C-6a), 116.8 (s, C-9b), 112.8 (d, C-6), 97.1 (d, C-3), 56.2 (q, C-OCH₃)。以上数据与文献[11]对照基本一致,因此将化合物9鉴定为 demethylaaptamine。

3 结论

笔者对南海海绵 *Pseudoceratina purpurea* 的化学成分进行了系统的研究,共从中分离得到9个化合物,分别为 hyrtiosin A (1), 5-羟基-1H-吡啶-3-羧酸 (2), 11-hydroxy-12-(5-hydroxy-1H-indole-3-yl)-ethanone (3), Stevensine (4), Spongiacidin A (5), Oroidin (6), 2-bromoaldisine (7), Aaptamine (8), demethylaaptamine (9)。这些化合物均为首次从海绵中分离得到。这些化合物是否有活性、有何种活性,还待进一步研究。

参考文献

- [1] 彭学东, 邓松之, 肖定军, 等. 南海海绵 *Pseudoceratina purpurea* 活性成分的研究[J]. 中国海洋药物, 2004(1): 11-13.
- [2] 吴旭东. 南海海绵 *Haliclona cymaeformis* 和海绵 *Topsentia* sp. 海绵化学成分和生物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [3] 李云秋, 王宾, 杨斌, 等. 南海海绵 *Haliclona* sp. 的化学成分研究[J]. 热带海洋学报, 2011, 30(1): 124-126.
- [4] 彭学东, 邓松之, 肖定军, 等. 南海海绵 *Pseudoceratina purpurea* 活性成分研究[J]. 广州化学, 2003, 28(2): 1-4.
- [5] KOBAYASHI H, OHTA T, NOZOE S, et al. Hytiosins A and B, new indole alkaloids from the Okinawa marine sponge, *Hyttius erecta*[J]. Tetrahedron, 1990, 46(23): 7699-7702.
- [6] INABA K, SATO H, TSUDA M, et al. Spongiacidins A D, new bromopyrrole alkaloids from the Hymeniacidons sponge[J]. J Nat Prod, 1998, 61: 693-695.
- [7] FORENZA S, MINALE L, RICCIO R, et al. New bromo-pyrrole derivatives from the sponge *Agelas oroides*[J]. J Chem Comm D, 1971(18): 1129-1130.
- [8] SCHMITZ F J, GUNASEKERA S P, TILLEKERATNE L M V. Marine natural products: pyrrolactams from several sponges[J]. J Nat Prod, 1985, 48(1): 47-53.
- [9] WALZ A J, SUNDBERG R J. Synthesis of 8-methyl-1-methyl-1H-benzo [de] [1,6] naphthyridin-9-ol (Isoaaptamine) and analogues[J]. J Org Chem, 2000, 65(23): 8001-8010.
- [10] SUGINO E, CHOSHI T, HIBINO S. Process in total syntheses of marine alkaloids, aaptamines[J]. Heterocycle, 1999, 50(1): 543-557.
- [11] NAKAMURA H, KOBAYASHI J, OHIZUMI Y. Isolation and structure of aaptamine a novel heteroaromatic substance possessing α blocking activity from the sea sponge *Aaptosapta*[J]. Tetrahedron Lett, 1982, 23(52): 5555-5558.

(上接第4页)

- [12] 苏丹, 李培军, 台培东. 共基质对10株细菌降解苯并芘的作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(1): 290-294.
- [13] 朱婷婷, 倪晋仁. 不同碳源对苯并[a]芘降解菌生长和降解性能影响的研究[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2012(2): 343-346.
- [14] 苏丹, 李培军, 鞠京丽. 六株真菌对土壤中芘和苯并芘的降解及其动力学[J]. 中国环境科学, 2006(2): 188-191.
- [15] 许丽, 高振, 罗霖, 等. 一株高效降解芘的细菌分离、鉴定及其降解效果[J]. 微生物学报, 2011(3): 313-319.
- [16] 盛下放, 何琳燕, 胡凌飞. 苯并[a]芘降解菌的分离筛选及其降解条件的研究[J]. 环境科学学报, 2006, 25(6): 791-795.

- [17] 苏丹, 李培军, 王鑫, 等. 3株细菌对土壤中芘和苯并芘的降解及其动力学[J]. 环境科学, 2007(4): 4913-4917.
- [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, 1999.
- [19] 弓玉红, 郝林, 郭凯凯. 一株苯并[a]芘高效降解菌的分离鉴定[J]. 山西农业科学, 2012, 40(5): 490-492.
- [20] 弓玉红, 郝林, 郭凯凯. 萃取-紫外分光光度法测定土壤中3,4-苯并芘含量[J]. 山西农业科学, 2012(4): 383-385.