

一株喹啉降解菌的分离与鉴定

张秀霞^{1,2}, 王基成¹, 吴伟林², 房苗苗², 鲁 军¹

(1.华东理工大学资源与环境工程学院,上海 200237; 2.中国石油大学(华东)化学化工学院环境科学与工程系,山东 257061)

摘 要:为了研究石油污染土壤中含氮杂环化合物的降解情况,本文采用选择性富集培养的方法,以喹啉作为目标污染物,从 45 份石油污染土壤样品中,分离得到 155 株降解喹啉污染物的高效降解菌株,其中降解效率最高的一株喹啉降解菌命名为 Q5,在 72 h 内对于浓度为 500 mg·L⁻¹ 喹啉的降解率达到 72.6%。并通过形态学、生理生化试验和 16S rDNA 序列比对分析对 Q5 进行了鉴定。结果表明,株菌 Q5 为革兰氏阳性菌,在 LB 平板上菌落呈圆形,边缘整齐,乳白色,表面光滑,有黏稠感,是发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus*),属酵母菌,与 *Lactobacillus fermentum* 同源性最高,为 99.6%。

关键词:喹啉;降解菌株;筛选;鉴定

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-0959-05

Isolation and Identification of a Strain for Quinoline Degradation

ZHANG Xiu-xia^{1,2}, WANG Ji-Cheng¹, WU Wei-lin², FANG Miao-miao², LU Jun¹

(1.College of Resource & Environmental Engineering of East China University of Science & Technology, Shanghai, 200237, China; 2.Department of Environmental Science and Engineering, College of chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum, Dongying 257061, China)

Abstract:In order to investigate the biodegradation of nitrogenous heterocyclic compounds in petroleum contaminated soil, 155 strains of high-efficient quinoline degradation bacteria were isolated from 45 petroleum contaminated soil samples by selective enrichment culture when quinoline was chosen as module contaminants. The most high-efficient degradation was named Q5, its degradation rate could reach 72.6% within 72 hours when the concentration of quinoline was 500 mg·L⁻¹. At last, Q5 was identified with 16S rDNA sequence, morphological, biochemical and physiological experiments. It was found that strain Q5 was gram-positive bacteria whose colonies were round, milky white, glossy, viscous and had regular edge on the LB plate. At the same time, the colony was *Lactobacillus*, a kind of yeast, sharing the highest homology (99.6%) with *Lactobacillus fermentum*.

Keywords: quinoline; degradation microbes; screening; identification

含氮杂环化合物广泛应用于石油、食品和医药工业。它们大都是有毒且难降解的有机物,不易受代谢过程的破坏,属于污染面广的难降解有机物,对生态系统和人类健康会产生潜在的长远的危害^[1-4]。

喹啉是一种具有代表性的碱性含氮杂环物质,其结构不仅不会被许多微生物所具有的酶系识别,而且还会对许多微生物产生毒害作用,因而是一种难生物降解的有机物^[5]。目前,喹啉及其同系物广泛用于医

药、染料、农药和化学助剂等领域,成为重要的精细化工原料^[6],因此会广泛存在于焦化、医疗和染料废水及石油污染土壤中^[7-9]。在石油勘探、开采、运输及储存作业过程中产生的落地原油及含油污水会对土壤造成污染。近年来,我国的石油污染土壤问题在不断恶化,并因此导致了其他的环境问题,致使生物品质下降,进而危害人类健康^[10]。

国内外已有较多关于废水中喹啉的生物降解的研究^[8,10-12]。对于石油污染土壤中的喹啉,单纯依靠土著菌群进行降解处理,短时间内很难见效,所以对石油污染土壤中喹啉等含氮杂环化合物的生物降解研究鲜有报道^[13,14]。胜利油田原油中碱氮质量分数为

收稿日期:2007-08-17

基金项目:中国石油天然气集团公司中青年创新基金项目(06E1023)

作者简介:张秀霞(1966—),女,副教授,主要研究方向为石油污染的生物修复。E-mail: zhxiuxia@mail.hdpu.edu.cn

91~2 580 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 占总氮的 28%~57%, 并随馏分加重而增加; 而重馏分在自然环境中难以生物降解^[5]。本研究希望通过对典型的石油污染土壤进行高效喹啉降解菌的筛选分离及鉴定, 探寻高效降解菌的种属关系, 从而为喹啉污染土壤的生物修复进行有益的基础研究。

1 试剂与方法

1.1 主要设备与试剂

分光光度计, UV-2100 (上海第三分析仪器厂), 721(上海第三分析仪器厂);

振荡培养箱, HZQ-X100(哈尔滨东联电子技术开发公司);

生化培养箱, SPX-250 型(上海跃进医疗器械厂);
喹啉(Quinoline), 医药集团上海化学试剂公司出品, 含量 $\geq 98.0\%$ 。

1.2 喹啉降解菌筛选方法

菌株筛选采用富集培养的方法。将采集到的土样取一勺加入 50 mL 无菌水, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床振荡摇匀, 取上层悬液接入到筛选培养基, 于 250 mL 锥形瓶, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇瓶培养 3 d。达到驯化浓度后, 初步判断喹啉降解状况, 选择培养液混浊的样品, 在喹啉筛选培养基平板上分离。挑选菌落边缘清晰的菌落, 经平板划线纯化直至获得单菌落, 分别考察单菌株降解喹啉能力后, 以斜面保藏降解性能优良菌株。

1.2.1 土样的采集

采集胜利油田、淄博齐鲁石化公司炼油厂等受石油污染区域的土壤样品共 45 份, 碾碎后经 2 mm 筛分, 封存备用。

1.2.2 培养基与培养条件

筛选培养基 (去离子水 1 000 mL): K_2HPO_4 12 g, KH_2PO_4 10 g, Na_2SO_4 2.0 g, NaCl 2.0 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NH_4Cl 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, 酵母膏 0.8 g, 葡萄糖 10 g, pH 7.0, 121 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌 20 min。固体培养基加 1.5%~2%琼脂。

菌株筛选过程中, 喹啉加入量由 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐增加到 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时培养基中的 NH_4Cl 含量由 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 减至 0, 酵母膏含量也逐渐减至 0。

喹啉降解培养基(去离子水 1 000 mL): K_2HPO_4 12 g, KH_2PO_4 10 g, Na_2SO_4 2.0 g, NaCl 2.0 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, 葡萄糖 10 g, pH 7.0, 121 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌 20 min, 灭菌后加入喹啉 500 mg。固体培养基加 1.5%~2%琼脂。

LB 培养基(去离子水 1 000 mL): 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 5 g, NaCl 10 g, 琼脂 15 g, pH 值 7.0, 121 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌 20 min。

实验中用水为去离子水, 其余化学试剂均为分析纯。

1.2.3 喹啉降解定性判断与定量检测方法

(1) 定性判断

含喹啉的液体培养基中喹啉的降解与否, 可通过观察培养液由澄清变混浊的现象进行初步判断。

(2) 定量分析

采用 UV-2100 紫外分光光度计测定喹啉的浓度, 操作简单, 测试费用低^[6]。

测样时, 先将液体培养基在 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 再以乙酸乙酯萃取离心后的上清液, 稀释一定倍数, 最后在特征波峰处, 测定吸光度 A, 根据标准曲线计算其浓度。

1.2.4 喹啉降解率的计算

喹啉降解率的计算公式如下:

$$\eta = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

式中: η —喹啉的降解率, %;

C_0 —起始时间喹啉的浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;

C_1 —降解后喹啉的浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2.5 细菌生长量分析方法

采用 721 分光光度计在 600 nm 处测定培养液的光密度(OD_{600}), 以确定细菌的生长情况。

1.3 降解实验

将菌株用接种针从斜面挑一环分别接种到若干试管, 在事先准备好的葡萄糖液体培养基中加入喹啉, 使质量浓度达到 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 调好 pH 值后按每管 10 mL 分装在上述试管中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 从接种开始计时, 在菌株生长过程中每 2 h 取一支试管样, 用 1.2.5 的方法测量菌体生长的 OD_{600} 值, 绘制菌体生长曲线, 用 1.2.3 的方法测定喹啉的浓度, 用 1.2.4 的方法计算喹啉的降解率。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 菌株形态特征

(1) 菌落形态特征, 观察菌株在 LB 平板上菌株的菌落形态;

(2) 显微镜下细胞形态观察, 将培养至对数期的菌株进行革兰氏染色处理, 于显微镜下观察。

1.4.2 菌株生理生化特征

依据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版) 和《常见细

菌系统鉴定手册》^[17]对分离菌株进行鉴定。

1.4.3 16S rDNA 序列分析法鉴定

- (1) 用天根 DNA 提取试剂盒提取菌株 Q5 的总 DNA;
 - (2)16S rDNA 的 PCR 扩增及 PCR 产物纯化;
 - (3)PCR 产物的连接;
 - (4)感受态细胞的转化;
 - (5)阳性克隆的筛选;
 - (6)阳性克隆的测序。
- 具体实验步骤略。

1.4.4 系统发育分析

以美国生物工程信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) Genbank 为数据库中序列进行 BLAST 比对, 用 Clustal W1.82、PHYLP 和 MEGA 3.0 软件进行分析, 采用邻接法构建系统发育树。

2 结果与讨论

2.1 喹啉降解菌株筛选与降解能力测定

从 45 个土壤样品中筛选出 155 株能够在喹啉无机盐培养基中生长的菌株。通过进一步的复筛工作, 8 株喹啉降解菌 72 h 降解 500 mg·L⁻¹ 喹啉的降解率 η 在 50%以上, 见图 1。

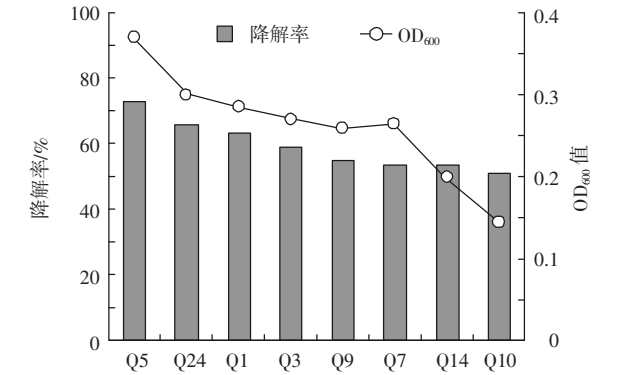


图 1 8 株喹啉降解菌的降解率(η)和 OD₆₀₀ 值
Figure 1 Degradation rate (η) and OD₆₀₀ of quinoline by eight degradation strains

实验结果表明, 80%的菌株存在于含油较多的土壤样品之中, 说明环境的长期污染过程, 实际上也是降解菌的天然富集过程。其中菌株 Q5 的降解性能最好, 72 h 降解 500 mg·L⁻¹ 喹啉的效率达到 72.6%。喹啉降解菌 Q5 的菌株生长与喹啉降解率的关系见图 2。

由图 2 可以看出, 菌株 Q5 在衰亡期之前它的生

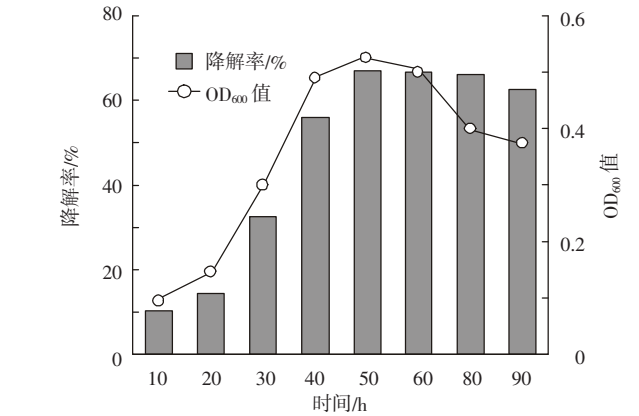


图 2 喹啉降解菌 Q5 的生长情况和降解率(η)曲线
Figure 2 Growth curve and quinoline degradation rate (η) of stain Q5

长趋势和对喹啉的降解过程是同步的, 表明该菌能利用喹啉生长并对喹啉有较好的降解作用。

由于喹啉是一种难降解的含氮杂环化合物, 在最初的 20 h, 菌株处于适应期, 生长极其缓慢, 对喹啉降解也较弱; 在 20~40 h 期间, 菌株处于对数生长期, 菌株利用喹啉中的氮合成自身生长所需要的营养物质, 菌体量增加较快, 对喹啉降解作用加强; 40~60 h 菌株的生长和对喹啉的降解达到最佳状态, 处于最稳定生长阶段; 在 60 h 之后, 菌株开始进入衰退状态, 对喹啉的降解极其缓慢, 此时单纯依靠增加培养时间对提高喹啉的降解效果影响不明显。

2.2 菌株鉴定结果

2.2.1 菌株的形态特征

经过 12 h 培养, 喹啉降解菌株 Q5 在 LB 平板上的培养特征见图 3。

图 3 中, 菌株 Q5 在 LB 平板上菌落呈圆形, 边缘整齐, 乳白色, 表面光滑, 有黏稠感。



图 3 菌株 Q5 在肉膏蛋白胨平板形态
Figure 3 The shape of strain Q5 in plate culture with beef

2.2.2 生理生化特征

菌株 Q5 的生理生化实验结果见表 1。

表 1 Q5 初步鉴定	
Table 1 The preliminary identification of strain Q5	
实 验	Q5
革兰氏染色	+
芽孢	+
芽孢形状	圆形
需氧性	好氧
接触酶反应	+
氧化酶反应	+
硝酸盐还原	-
糖发酵实验	-
淀粉水解	+
甲基红实验	+
V-P 实验	-
吲哚实验	-
明胶液化	+
10%NaCl 耐盐实验	+

注:表中 “+”表示反应呈阳性,“-”表示反应呈阴性。
根据初步的生理生化实验结果、《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版),参考《常见细菌系统鉴定手册》,初步判断:Q5 属于乳酸菌(*Lactobacillus*)。

2.2.3 分离菌株 Q5 的 16S rDNA 基因的 PCR 扩增和序列分析

(1)16S rRNA 基因测序

以 Q5 菌株总 DNA 为模板,每个样品挑 3~5 个克隆送测序公司测序。将测序结果在 GeneBank 数据库中进行序列比对,即可得出最相近微生物的种属。经鉴定 Q5 是发酵乳酸杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 属酵母菌,具有良好的生长繁殖性能和较强的抗逆性。

(2)基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

根据菌株的 16S rRNA 基因序列绘制的系统发育树见图 4。

菌株 Q5 经 BLAST 得到 8 种细菌匹配序列,其中同源性最高的是 *Lactobacillus fermentum*, 为 99.6%, 见图 4。

3 结 论

利用喹啉无机盐筛选培养基,通过富集培养的方法从石油污染土壤中筛选出喹啉降解菌 155 株。其中降解菌 Q5 降解喹啉效率达到 72.6%, 对喹啉有较好的降解效果。通过形态观察、生理生化实验、DNA 鉴

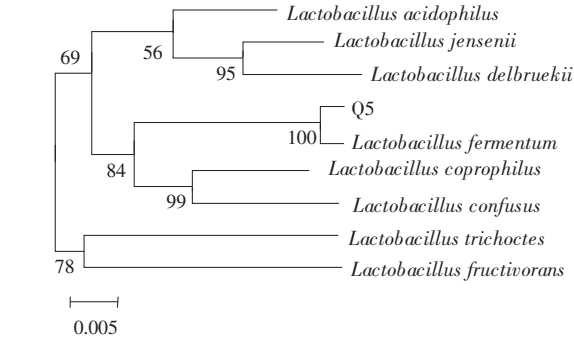


图 4 基于 16S rDNA 基因序列绘制的 Q5 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain Q5 based on 16S rDNA

定分析,菌株 Q5 与 *Lactobacillus fermentum* 同源性最好达到 99.6%,是发酵乳酸杆菌(*Lactobacillus fermentum*),属酵母菌。

参考文献:

[1] 江 敏,顾国维,李咏梅. 6 种含氮杂环化合物对发光细菌的毒性研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(12):931-934.
JIANG Min, GU Guo-wei, LI Yong-mei. Study on toxicity of six kinds of nitrogenous heterocyclic compounds to photobacteria[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 2003,22(12):931-934.
[2] Wang Jianlong, Quan Xiangchuna, Han Lipinga, et al. Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii* [J]. *Water Research*, 2002,36:2288-2296.
[3] Wang Jianlong, Han Liping, Shi Hanchang, et al. Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia* sp [J]. *Chemosphere*, 2001,44: 1041-1046.
[4] Obara T. Degradation of quinoline by microorganisms[J]. *Sekiton Kagaku Kaigi Happyo Ronbunshu*, 1994, 31:312-315.
[5] Edward J O’Loughlin, Staci R Kehrmeier, Gerald K Sims. Isolation, characterization, and substrate utilization of a quinoline-degrading bacterium [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 38(2): 107-118.
[6] Wang Jian-long , Quan Xiang-chun , Han Li-ping, et al. Kinetics of co-metabolism of quinoline and glucose by *Burkholderia pickettii* [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37:831-836.
[7] 全向春,韩力平,王建龙, 等. 固定化皮氏伯克霍而德氏菌降解喹啉的研究[J].环境科学, 2000, 21(3):74-76.
QUAN Xiang-chun, HAN Li-ping, WANG Jian-long, et al. Biodegradation of quinoline by immobilized *Burkholderia pickettii* sp [J]. *Environmental Science*, 2000, 21(3):74-76.
[8] Irene von der Weid, Joana M Marques, Claudia D Cunha, et al. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30:331-339.
[9] Sutton S D, et al. Aerobic biodegradation of 4-methylquinoline by a soil bacterium [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 2910-2914.

- [10] 魏 薇. 白腐菌降解石油污染土壤的研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2005.
- WEI Wei. Study on degradation of petroleum contaminated soil by white-rot fungi[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2005.
- [11] Anne Blineda Thomsen. Degradation of quinoline by wet oxidation-kinetic aspects and reaction mechanisms [J]. *Water Research*, 1998, 32(1):136-146.
- [12] 任大军, 张晓昱, 颜克亮, 等. 白腐菌对焦化废水中喹啉的降解及机理研究[J]. 环境保护科学, 2006, 32(1): 20-23.
- REN Da-jun, ZHANG Xiao-yu, YAN Ke-liang, et al. Study on degradation of quinoline in coking plant wastewater using white rot fungi[J]. *Environmental Protection Science*, 2006, 32(1):20-23.
- [13] Obara T, et al. Microbial degradation of quinoline in heavy oil [J]. *Nippon Enerugi Gakkaishi*, 1995, 74(4):228-232.
- [14] Susanne Meyer, Hans Steinhart. Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/ compost mixture[J]. *Chemosphere*, 2000, 40(4):359-367.
- [15] 梁文杰. 石油化学[M]. 东营: 石油大学出版社, 1996. 42-48.
- LIANG Wen-jie. Petrochemistry[M]. Dongying: University of Petroleum Press, 1996. 42-48.
- [16] 房苗苗, 张秀霞, 王欣, 赵朝成. 石油污染土壤中喹啉降解菌 Q5 的筛选及其喹啉降解性能[J]. 石油学报(石油加工) 2007, 23(5): 111-116.
- FANG Miao-miao, ZHANG Xiu-xia, WANG Xin, ZHAO Chao-cheng. Screening of strain Q5 and its degradation ability for quinoline from oil contaminated soil [J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2007, 23(5): 111-116.
- [17] 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. 267-295.
- DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of Systematic Identification to Familiar Bacteria [M]. Beijing: China Science Press, 2001. 267-295.