

一株蕈降解菌的分离鉴定及其降解特性研究

唐玉斌^{1,2}, 毛莉², 吕锡武¹, 陈芳艳², 梁林林²

(1.东南大学环境工程系,南京 210096; 2.江苏科技大学生物与环境工程学院,镇江 212018)

摘要:从石油污染土壤中筛选出一株蕈的高效降解菌株 JUST-1,JUST-1 可在以蕈为唯一碳源的培养基中生长,能利用蕈的最高浓度为 70mg/L 左右。经形态学观察并进行 ITS 序列分析,初步判断菌株 JUST-1 属于尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)或该菌的一个株系。JUST-1 的菌丝呈白色或粉红色,并存在三类孢子,分别为小型分生孢子(*microconidia*)、大型分生孢子(*macroconidia*)和厚垣孢子(*chlamydospores*),但大孢子分隔数较少,隔膜 1~2 个。JUST-1 菌株为好氧菌。投菌量、初始蕈浓度、pH 和 H₂O₂ 浓度是影响蕈降解效率的因素。JUST-1 菌株对蕈的最适宜降解条件为:蕈浓度 40mg/L,投菌量 10%~20%,pH7.0~8.0。在此条件下,摇床培养 5d 后,蕈去除率可达 70%以上。

关键词:蕈降解菌; 分离筛选; ITS 序列; 水体生物修复

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-6504(2007)09-0011-03

多环芳烃(PAHs)是一类在环境中广泛分布的污染物,它具有潜在的致癌、致畸、致突变特性^[1]。它是一类憎水性物质,脂溶性较强,易于吸附在水体沉积物中,在沉积物中的浓度比在水体中的浓度高出几个甚至几十个数量级^[2]。微生物降解是水体沉积物环境中 PAHs 降解的主要途径^[3]。要对多环芳烃污染水体进行生物修复,就必须首先获得可高效降解多环芳烃的优势菌株。本研究从自然环境中筛选出一株蕈的高效降解菌株,对其进行菌种鉴定并考察其降解性能,旨在为多环芳烃污染水体的生物强化修复提供基础数据和参考。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

驯化用菌源来自江苏油田某油井附近石油污染土壤,该土壤呈黑褐色。试验采用三种培养基:选择性液体培养基、选择性固体培养基和富集培养基,用作降解菌的驯化筛选、培养、纯化分离和保存。

选择性液体培养基由无机盐和蕈组成,无机盐成分如下^[4]:KH₂PO₄ 1g;K₂HPO₄·3H₂O 1.3g;MgSO₄ 0.2g;NH₄NO₃ 1g;CaCl₂ 0.02g;FeCl₃ 0.05g;ZnSO₄·7H₂O 5mg;MnSO₄·H₂O 5mg;Na₂MoO₄·2H₂O 1mg;CuSO₄·5H₂O 0.5mg;H₂O 1L。将 pH 值调到 7.0,在高压蒸气灭菌锅内于 121℃条件下灭菌 20min,备用。蕈的丙酮溶液用 0.22 针筒式过滤器过滤后加入到已灭菌的无机盐中,待丙酮挥发完后使用。

选择性固体培养基:同选择性液体培养基,加入

2%琼脂。

富集培养基:NaCl 5g;蛋白胨 10g;牛肉膏 5g;水,1L。

缓冲溶液的配制参考文献[5]。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的筛选分离

将采集的土样加入蒸馏水后空曝 24h,静置后取 10mL 上清液混于 100mL 已灭菌的选择性液体培养基中,在振荡速度 120r/min、恒温 30℃的水浴摇床中驯化 5d 后,取 10mL 培养液移接至新鲜培养基中,如此反复 7 个周期后,倒平板进行划线分离,5 个周期后分离纯化出单一菌株。

1.2.2 菌种的鉴定

从形态学和分子生物学两方面对菌种进行鉴定。采用德国蔡司光学显微镜观察菌体形态及大小。在此基础上对菌株进行生理生化鉴定:提取菌株的核糖体 rDNA^[6],以菌株总 DNA 为模板,使用 050-801TGradient 96 型 PCR 扩增仪,并以 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 和 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'作为引物进行 PCR 扩增^[7],扩增条件为:95℃预变性 3min,94℃30s,54℃40s,72℃1min,30 个循环,最后在 72℃保温 10min。PCR 扩增产物用 Omega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。DNA 测序由上海博亚生物科技公司完成,将测序结果用 Blast 软件同 Genbank 中 DNA 序列进行同源性比较。

1.2.3 悬菌液的制备

分离纯化后的菌种挑取一环接入富集培养基中,30℃摇床振荡培养 48h 后(此时处于对数生长期),以

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2005057);江苏省高校自然科学基金计划项目(03KJD610013)

作者简介:唐玉斌(1964-),男,副教授,博士,研究方向为环境生物技术,(电话)0511-5637630(电子信箱)ybbill@163.com。

磷酸盐缓冲溶液反复洗涤3次,将细胞个数调到 1×10^8 个/mL后冷藏备用。

1.2.4 微生物生长曲线的测定

定时定量吸取培养液,采用751紫外/可见分光光度计在600nm处测定其吸光度值。

1.2.5 菌株对葱的降解作用

将一定浓度的葱溶液置于250mL的三角瓶中,接入一定量的供试悬菌液,在30℃条件下进行摇床培养,间隔一定时间取样,分析培养液中残留葱浓度。

1.2.6 葱的测定

培养液中葱的测定采用气相色谱法(GC)。培养液中加入环己烷作为萃取剂,重复萃取两次,合并萃取液并定容至25mL,在GC-14C气相色谱测定。测定条件为:毛细管SE-54柱,柱长30m,内径0.33mm,柱温180℃,进样口温度280℃,检测器300℃,分流比10:1。

2 结果与讨论

2.1 葱降解菌株的分离和鉴定

经多次驯化筛选、平板划线分离获得一株能以葱为唯一碳源和能源生长的真菌,命名为JUST-1。在蔡司光学显微镜下可见菌丝体和分生孢子,见图1。该菌丝体呈树枝状,颜色呈白色或粉红色,菌丝内有横隔膜将一根长菌丝分隔成若干段,每一段含有细胞质和多个核,属于多细胞的菌丝体。存在三类孢子,分别为小型分生孢子(microconidia)、大型分生孢子(macroconidia)和厚垣孢子(chlamydospores),但大孢子分隔较少,隔膜1~2。

TGACATACCACCTTGTTCCTCGCGGATCAGCCCCCTCCCGGTAAACGCGGACGCCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATG
TAACCTCTGAGTAAACCATAATAAATCAAACTTTCAACAACGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAG
CGTCAATTTCAACCCTCAAGCCCTCGGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGCCCCGAAATCTAGTGCGGGTCTC
GCTGCAGCCTCCATTGCGTAGTAGTAAACCCCTCGCAACTGGAACGCGCGCGGCCAAGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGTCGGAGGAA (503 bp)

图3 JUST-1菌的ITS序列

表1 序列相同或相似菌株的属、种及同源性

属	种	同源性(%)
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i> f. sp. <i>Nelumbic</i>	100
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i> (共20株)	100
<i>Fusarium</i>	sp. 03051121	99
<i>Fusarium</i>	sp. 7-4	99
<i>Fusarium</i>	<i>acutatum</i>	99
<i>Fusarium</i>	<i>dlaminii</i>	99
<i>Fusarium</i>	<i>Proliferatum</i> (共6株)	99
<i>Fusarium</i>	<i>annulatum</i>	99
<i>Fusarium</i>	sp. 03001	99
<i>Fusarium</i>	<i>Fujikuroi</i> (共4株)	99
<i>Fusarium</i>	sp. 03042779	99
<i>Fusarium</i>	sp. <i>Dzf2</i>	99
<i>Fusarium</i>	sp. <i>NRRL22903</i>	99
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	99
<i>Fusarium</i>	<i>redolens</i>	99
<i>Fusarium</i>	sp. <i>NRRL26794</i>	99
<i>Fusarium</i>	<i>Uncultured soil fungus</i>	98

2.2 菌株 JUST-1 的生长曲线及葱的降解曲线



图1 菌株JUST-1的形态学特征

按文献[6]提取菌株 JUST-1 的核糖体 rDNA,将提取的 rDNA 进行 PCR 扩增,通过 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测其扩增(见图2)。图2中“+”代表反应体系中加样品 DNA,“-”代表反应体系中未加 DNA,Marker 为 1kb。根据电泳结果,JUST-1 菌株的 PCR 产物约为 500bp。对 PCR 产物的序列进行测定,结果见图3。

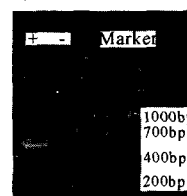


图2 JUST-1菌株的PCR电泳图

将图3所示的测序片断用Blast软件进行分析,通过与GenBank中的DNA序列进行同源性比较,菌株 JUST-1 与尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum* (共20株)的同源性为100%,与其它同属不同种的菌株的同源性在98%~99%,表1列出了相同或相似序列的菌株的属、种及同源性。根据 JUST-1 菌的 ITS 序列分析结果,结合菌丝形态和分生孢子类型的显微观察,初步认定 JUST-1 菌为尖镰孢菌或该菌的一个株系。

在培养过程中,培养液的颜色由透明变为乳白色,再变为乳黄色,最后呈现出淡紫色,并出现大量的微生物絮体。由图4可见,该微生物迟滞期较长,这与鉴定该菌株为真菌相一致。54h后,微生物生长量开始增加,同时葱逐渐开始降解。反应进行到115h,检测培养液剩余葱浓度为14.1mg/L,说明菌株 JUST-1 对葱的确有降解作用。

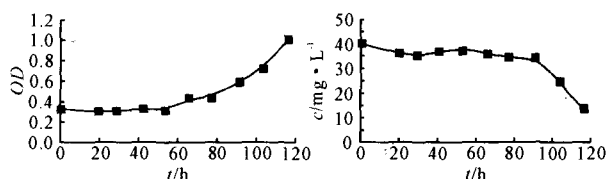
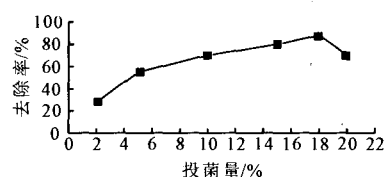


图4 菌株JUST-1生长曲线及葱降解曲线

2.3 投菌量对蒽的降解效率的影响

从图 5 结果可见,随着投菌量的增加,蒽去除率逐渐增大,当投菌量为 18% 时,去除率可高达 88.3%,当继续增加投菌量时,去除率开始下降,这表明投菌量过大会导致微生物间的竞争抑制作用,从而使去除率下降。

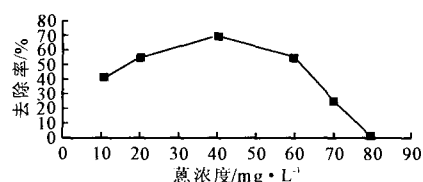


初始蒽浓度40mg/L, pH7.0, 水温30℃, 120r/min培养120h

图5 投菌量对JUST-1降解蒽的影响

2.4 初始蒽浓度对蒽的降解效率的影响

初始蒽浓度对菌株 JUST-1 降解蒽的性能影响较为显著(见图 6)。当蒽浓度较低时,没有足够的碳源和能源,使得微生物发生竞争抑制而导致活性降低。在蒽的初始浓度 < 40mg/L 时,去除率随着蒽浓度的增加而提高,但当蒽的初始浓度增加到一定值时,水中较高浓度的蒽表现出对菌株 JUST-1 的抑制作用,去除率显著下降。例如,当蒽初始浓度为 80mg/L 时,菌株 JUST-1 对蒽无降解作用。

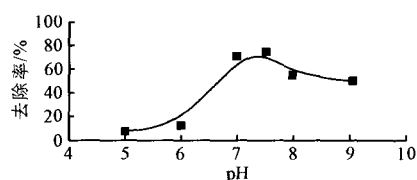


加菌量10%, pH7.0, 水温30℃, 120r/min, 培养120h

图6 蒽浓度对JUST-1降解蒽的影响

2.5 初始 pH 对蒽的降解效率的影响

菌株 JUST-1 在不同 pH 条件下对蒽的降解能力不同,见图 7。JUST-1 对蒽进行降解的最适宜 pH 条件为 7.0~7.5。在 pH 为 8~9 时也有较好的去除效果,而酸性的环境条件对 JUST-1 表现出明显的抑制作用,这说明中性和偏碱性的 pH 条件有利于菌株 JUST-1 的生长和发挥对蒽的降解作用。



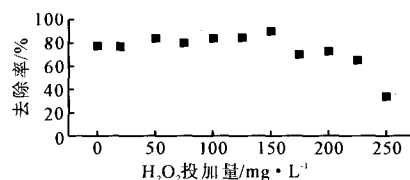
初始蒽浓度40mg/L, 加菌量10%, 水温30℃, 120r/min, 培养120h

图7 pH对JUST-1降解蒽的影响

2.6 H₂O₂ 浓度对蒽的降解效率的影响

水中溶解氧的含量对好氧微生物的降解活性影响较大。由于 H₂O₂ 在水中分解成 H₂O 和 O₂, 而 O₂ 可被水中的好氧微生物利用。故本研究采用投加 H₂O₂ 的方法来考察溶解氧的影响。从图 8 可见, 当 H₂O₂ 浓度为 0~150mg/L 时, 均可获得较高的降解率(78%~90%), 且蒽的

降解率随 H₂O₂ 浓度的增加而略有提高, 这说明 JUST-1 为好氧菌, 也说明在摇床转速为 150r/min 的振荡条件下, 微生物可通过大气复氧作用获得充足的溶解氧。但当 H₂O₂ 浓度超过 150mg/L 时, 蒽降解率迅速降低, 这说明过量的 H₂O₂ 对好氧微生物细胞具有毒害作用, 能降低微生物的活性, 这与有关研究结果相一致^[4]。



初始蒽浓度40mg/L, 加菌量10%, pH7.0, 水温30℃, 培养120h

图8 H₂O₂对JUST-1降解蒽的影响

3 结论

(1) 从江苏油田石油污染土壤中筛选分离出的菌株 JUST-1 能以蒽为唯一碳源和能源生长繁殖。经形态学观察、提取菌种 DNA 并进行 ITS 碱基序列的 PCR 扩增且对 PCR 产物进行纯化及测序, 对 DNA 序列进行 Blast 分析, 初步认定 JUST-1 菌株为尖镰孢菌或该菌的一个株系。

(2) JUST-1 菌株为好氧菌。投菌量、初始蒽浓度、pH 和 H₂O₂ 浓度是影响蒽降解效率的因素。JUST-1 菌株对蒽的最适宜降解条件为: 蒽浓度 40mg/L, 投菌量 10%~20%, pH7.0~8.0。在此条件下, 摇床培养 5d 后, 蒽去除率可达 70% 以上。

【参考文献】

- [1] Menzie CA, Potoki BB, Santodonato J. Exposure to Carcinogenic PAHs in the Environment [J]. Environ Sci Technol, 1992, 26(7): 1278-1284.
- [2] 于秀艳, 丁永生. 多环芳烃的环境分布及其生物修复研究进展[J]. 大连海事大学学报, 2004, 30(4): 55-59.
- [3] 郭楚玲, 郑天凌, 洪华生. 多环芳烃的微生物降解与生物修复[J]. 海洋环境科学, 2000, 19(3): 24-29.
- [4] 张小凡, 小柳津广志. 多环芳烃化合物非分解菌的分离鉴定及分解特性研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(8): 544-547.
- [5] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001.
- [6] 穆军, 焦炳华, 孙炳达, 等. 一株具有抗菌和细胞毒活性的海洋嗜盐菌 XD20 的筛选和鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(1): 8-11.
- [7] Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. New York: Academic Press Inc, 1990. 315-322.
- [8] 叶淑红, 丁鸣, 马达, 等. 微生物修复辽东湾油污污染湿地研究[J]. 环境科学, 2005, 26(5): 143-146.

(收稿 2006-11-01; 修回 2006-12-16)