

DDT 降解菌 DH7 的分离鉴定与降解特性研究

李红权, 马玉波, 李红梅, 昌艳萍, 赵盛, 陈淑兰, 周艳春

(1. 河北大学基础医学院, 河北保定 071000; 2. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

摘要 [目的] 研究 DDT 降解菌的生物学、降解特性及其发酵条件的优化。[方法] 从化工厂采集土样, 分离、筛选到 1 株能够在好氧条件下 DDT 降解率较高的菌株 DH7, 并对其进行研究。[结果] 通过 16S rDNA 序列分析结合传统分类学方法初步确定菌株 DH7 为铜绿假单胞菌。对菌株降解 DDT 特性的研究表明, 该菌株对 DDT 降解 10 d 的降解率为 73.6%。在优化培养条件后, 该菌株 10 d 的降解率达 81.4%。[结论] 该研究结果为 DDT 污染土壤的生物修复提供依据。

关键词 铜绿假单胞菌; DDT 降解; 16S rDNA

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2009)13 - 05851 - 02

Study on Isolation and Characterization of a DDT Degradation Bacterium Strain DH7

LI Hong-quan et al (School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071000)

Abstract [Objective] The purpose of this research was to study biological characteristics, degradation characteristics and the optimization of fermentation conditions of DDT degradation bacterium. [Method] A bacterium strain DH7 having capability of degrading DDT was isolated from the DDT contaminated soil of a chemical factory. The characteristics of DH7 were studied. [Result] Based on the phenotype, physiological and biochemical characteristics, and the phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence, the strain DH7 was identified preliminarily as *Pseudomonas aeruginosa*. This strain could degrade DDT with degradation efficiency of 73.6% in 10 days. The degradation efficiency was up to 81.4% after the conditions of culture was optimized. [Conclusion] This study will provide the references for bioremediation of contaminated soil by DDT.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*; DDT degradation; 16S rDNA

DDT 是一种耐热、耐酸、脂溶性大、残留期较长的有机氯类广谱杀虫剂。我国从 1984 年起已经禁止使用 DDT, 但不同地区土壤中仍有不同程度的 DDT 残留^[1-5], 利用微生物降解 DDT 作为一种最清洁、最经济的处理方式现在越来越被人们所重视。

笔者通过筛选降解 DDT 的细菌, 研究其生物学特性、降解特性及其 DDT 降解细菌发酵条件的优化, 为 DDT 污染土壤的生物修复提供依据, 达到恢复土壤生物多样性, 保护环境和人类健康的目的。

1 材料与方 法

1.1 菌种 土样采自某化工厂受 DDT 污染的厂区, 并运至实验室 4℃ 保存。

1.2 菌的富集培养、分离纯化 参考文献[6] 进行。称取 2 g 土样, 加入到基础盐酵母膏培养基(DDT 含量 20 ng/L) 中, 培养 10 d。吸取 2 ml 菌液加入到 98 ml 分离纯化培养基(DDT 含量 20 ng/L) 中, 培养 10 d。在分离纯化培养中转接 4 次。吸取 0.2 ml 的菌液, 涂布到 LB 平板上, 从 LB 平板上挑取有透明圈的单菌落, 接种到 LB 斜面上。

1.3 菌种 DDT 降解率的测定 参考文献[7] 进行。将分离出来的菌株接种到含 DDT 的基础盐酵母盐液体培养基中, 在 30℃、200 r/min 条件下振荡培养, 测定 DDT 残余情况。吸取 4 ml 菌液加到干净试管中, 再加入 4 ml 的三氯乙烷, 振荡混匀, 静置分层, 水相用 4 ml 三氯乙烷再抽提 1 次, 收集 2 次抽提的有机相, 加入过量的无水硫酸钠, 吸收少量残存的水分。取约 3 ml 经过处理的抽提液, 置于石英比色皿中, UV-2800AH 型紫外可见分光光度计在波长 242 nm 处进行测定。

气相色谱分析采用 SP-6000 气相色谱仪, ECD 监测器, 毛

细管柱 SPB-5(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 进样口温度 260℃, 柱温 240℃, 检测器 280℃, N₂ 流速 25 ml/min, 取 1 ml 培养液, 离心, 收集上清液加等体积的正己烷, 剧烈振荡后静置分层, 收集有机相, 水相再用等体积正己烷抽提 1 次, 收集有机相过无水硫酸钠柱, 收集液体, N₂ 吹干, 正己烷定容至 2 ml, 上机检测。外标法定量。测定培养初始与终止时 DDT 浓度计算降解率。培养用 DDT 纯度为 75.0%, 测定用 DDT 纯度为 99.7%。

1.4 16S rDNA PCR 扩增及序列测定 CTAB 法提取细菌总 DNA, 设计引物 DF(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), DR(5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增 16S rDNA 片段, DNA 序列由北京三博远志生物技术有限公司测定。

1.5 系统发育树的构建 将所得 0.766 kb 的序列与 GenBank 中核酸数据进行 Blast 分析, 利用 Clustal X 1.81 进行比对, 通过 MEGA4 软件生成系统发育树。

1.6 生理生化特性 参照东秀珠等的方法进行^[8]。

2 结果与分析

对 DDT 降解菌进行筛选, 选取具有透明圈的细菌, 经过反复驯化、富集培养、划线分离与纯化、紫外法进行初筛, 选取了 1 株降解率较高的菌株, 编号为 DH7。

2.1 菌株 DH7 的形态及生理生化特征 革兰氏染色为阴性; 半固体穿刺接种显示具有游动性, 有鞭毛; 鞭毛染色出现了极生的单鞭毛; O/F 试验显示菌为氧化型, 非发酵型菌; 能够液化明胶; 接触酶试验为阳性; 41℃ 能够生长; 4℃ 不能生长; 氧化酶试验呈阳性; 不能够水解淀粉; 能产生绿脓菌素; 精氨酸水解酶试验阳性。

2.2 16S rDNA 的扩增和系统发育树的构建 根据菌株 DH7 的 16S rDNA 0.766 kb 序列结果(GenBank 核酸登录号 FJ795687) 与 GenBank 中核酸数据进行 Blast 分析, 利用 Clustal X 1.81 进行比对, 通过 MEGA4 软件分析生成系统发育树(图 1)。由图 1 可见, 菌株 DH7 位于 *Pseudomonas* 分支上,

基金项目 河北省教育厅基金(2008309); 河北省自然科学基金(C2007-000188)。

作者简介 李红权(1968-), 男, 河北保定人, 博士, 副教授, 从事微生物分子生物学研究。

收稿日期 2009-03-27

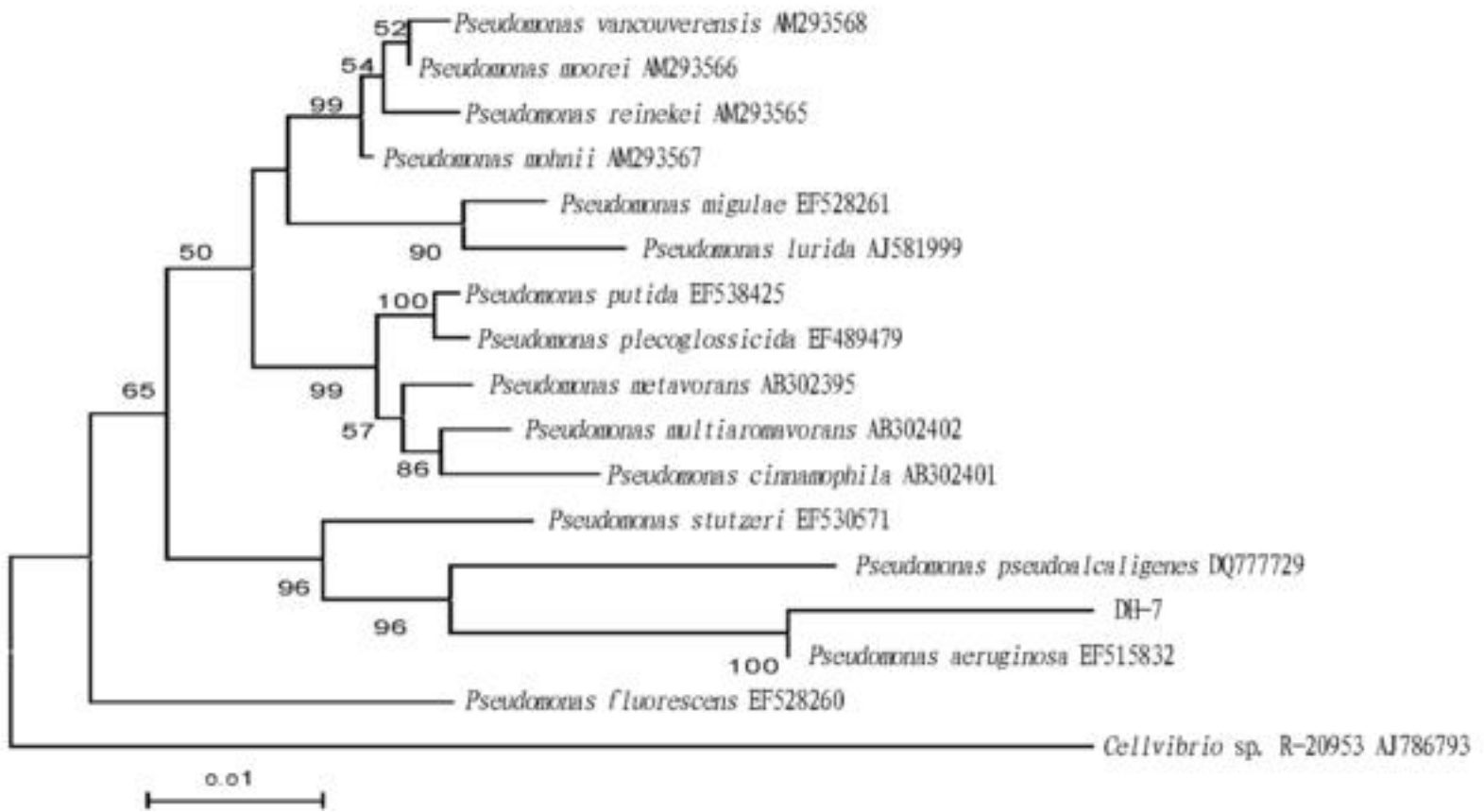


图1 基于 DDT 降解菌株 DH7 亲缘关系相近菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.1 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the relevant strains of DDT degradation strain DH7

同源性比较发现, 菌株 DH7 与假单胞菌属细菌的 16S rDNA 序列相似性为 98%, 根据 Kimura 的双参数模型计算菌株 DH7 与铜绿假单胞菌的进化距离, 为 0.011。结合表型特征与生理生化性质, 确定菌株 DH7 属于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

2.3 DH7 的降解特性 通过对培养液中 DDT 含量的测定, 发现菌株 DH7 对 DDT 具有明显的降解效果。

为研究菌株的降解率与培养基成分及溶氧的关系, 寻找最佳降解条件, 对葡萄糖、装液量、酵母膏和 $FeCl_3$ 的添加量作 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验。试验的其他条件为: 基础盐酵母培养基, 500 ml 摇瓶、DDT 初始浓度 40 mg/L, 300、200 r/min 摇床培养, 培养 10 d 后 DDT 降解率依前述方法测定。正交试验设计各因素水平如表 1 所示, 正交试验结果见表 2。

表1 正交试验设计因素与水平

Table 1 The factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平 Level	酵母膏 (A) mg/L Yeast extract	$FeCl_3$ (B) mg/L	葡萄糖 (C) mg/L Glucose	装液量 (D) ml Liquid volume in flask
1	40	4	10	50
2	50	6	15	75
3	60	8	20	100

表2 正交试验结果

Table 2 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号 No.	A	B	C	D	降解率 % Degradation rate
1	1	1	1	1	79.2
2	1	2	2	2	65.8
3	1	3	3	3	76.9
4	2	1	2	3	73.3
5	2	2	3	1	81.4
6	2	3	1	2	73.3
7	3	1	3	2	78.3
8	3	2	1	3	71.7
9	3	3	2	1	77.4
K_1	73.967	76.933	74.733	79.333	
K_2	76.000	72.967	72.167	72.467	
K_3	75.800	75.867	78.867	73.967	
R	2.033	3.966	6.700	6.866	

注: K_1 、 K_2 、 K_3 分别表示试验结果的极差分析数据; R 表示试验的极差值。

Note: K_1 , K_2 and K_3 stand for the range analysis data of the test results; R stands for range value of the test.

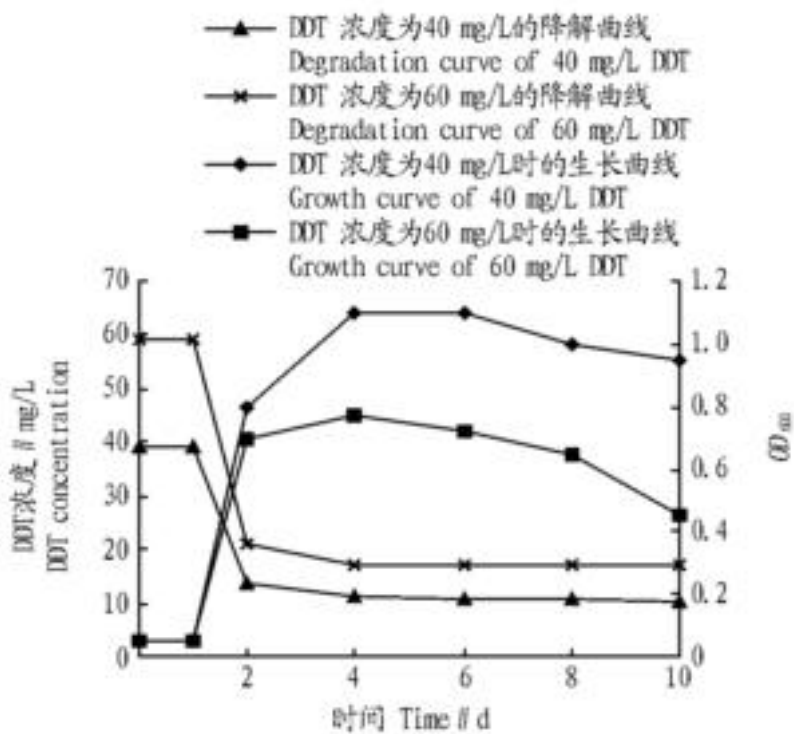


图2 DH7 生物量对 DDT 降解的影响

Fig.2 Effects of DH7 biomass on the degradation of DDT

由图 2 可知, 这株菌在第 1~2 天内的降解率最快, DH7 的生物量也迅速增加, 2 d 以后降解率迅速下降, 生物量也趋于稳定。10 d 后测定 DH7 降解 DDT 的平均降解率为 73.6%。

2.4 发酵正交试验优化 葡萄糖和酵母膏为菌株生长的碳源和氮源, 考察在基础盐酵母培养基中添加葡萄糖和改变酵母膏浓度对降解率的影响。在自然条件下, 铁盐溶液有促进 DDT 分解的特性, 且菌株 DH7 对 DDT 降解为好氧分解, 因此摇瓶装液量和 $FeCl_3$ 添加量也可能与降解率密切相关。

割分离,转入分化壮苗培养基中培养,原球茎一般30 d左右分化,继续培养60~90 d,形成完整的小植株(图3),待小苗长至高5 cm左右时出瓶(图4),定植于水苔为基质的穴盘中(图5),经常喷水,保持温度18~25℃。1个月后统计移栽成活率,达到95%左右。

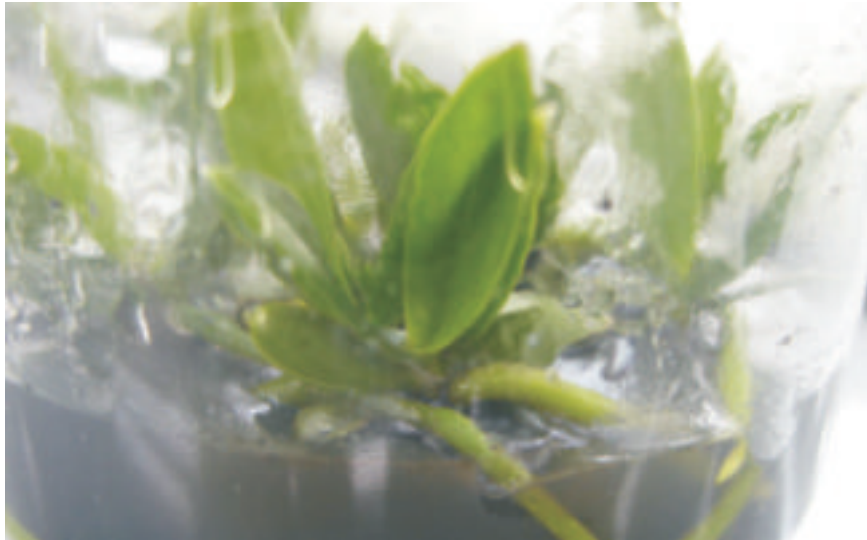


图3 萼脊兰壮苗与生根

Fig.3 The seedling cultivation and rooting of *S. japonica*



图4 萼脊兰出瓶小苗

Fig.4 The young seedlings of *S. japonica* outside the bottle

3 结论与讨论

兰花的繁殖方式和其他大多数植物一样,可分为有性繁

(上接第5852页)

由表2可知,各因素对菌株降解率的影响装液量>葡萄糖>FeCl₃>酵母膏,即通气量和葡萄糖的添加对菌体降解率影响显著,而添加FeCl₃次之,酵母膏对降解率的影响最小。试验选取的最优组合为:葡萄糖20 mg/L、装液量50 ml/500 ml、FeCl₃6 ng/L和酵母膏50 ng/L,降解率达81.4%。

3 结论

通过对从某化工厂取回的土样进行富集培养和分离筛选,得到30株能降解DDT的菌株。用紫外分光光度法初筛,得到降解活性较大的4株菌。复筛后得到1株降解活性较高的菌株DH7。经过测序、16S rDNA的比对和部分生物学特征的鉴定,初步确定分离出的菌株为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。用含DDT的基础盐酵母膏培养基培养DH7并测定DDT降解特性,DH7在对数生长期降解率最高,10 d后其最终降解率为73.6%。根据发酵正交



图5 萼脊兰的小苗

Fig.5 The young seedlings of *S. japonica*

殖和无性繁殖。然而一株健壮的兰花每年只能长出一至数个芽,繁殖系数极低^[2],一般只能增殖1~3倍,不能满足市场的需求。而用组织培养法繁殖,不但繁殖系数高,大大提高增殖率,而且生产的同一批苗性状基本一致,具有较高的商业价值^[3]。笔者通过组织培养技术,对萼脊兰原球茎的增殖及其分化进行了研究,建立起一套杂交兰快速繁殖及成苗的途径,为以后的生产研究奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 陈心启,吉占和.中国兰花全书[M].北京:中国林业出版社,1998:18-69.
- [2] 卢思聪.兰花栽培入门[M].北京:科学出版社,1988.
- [3] 卢思聪.中国兰与洋兰[M].北京:金盾出版社,1994.
- [4] LIU H M, LIU G H, KANG X B. The study on induction and proliferation of tube bulbs in *Lilium brownii* [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(1): 18-20, 53.
- [5] 王慧瑜,张晓申,杨录军,等.蝴蝶兰的胚培养技术及其快速繁殖研究[J].*北方园艺*, 2003(5): 57.
- [6] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its in vitro rooting technique [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 47-49, 52.
- [7] 李娜.蝴蝶兰组培快繁技术的研究进展[J].*广东农业科学*, 2007(11): 44-46.

优化试验结果可知,在培养条件为葡萄糖20 mg/L、装液量50 ml/500 ml、FeCl₃6 ng/L和酵母膏50 ng/L的基础盐酵母膏培养基上,10 d降解率达81.4%。

参考文献

- [1] 韩文亚,黄俊,杨波,等.华北某农药厂周边的滴滴涕污染状况初步研究[J].*环境污染与防治*, 2008, 30(1): 76-78.
- [2] 陆继龙,王旭辉,郝立波,等.吉林省中部农业土壤中滴滴涕的残留特征[J].*吉林大学学报:地球科学版*, 2008, 38(5): 859-863.
- [3] 龚钟明,王学军,李本纲.天津地区土壤中DDT的残留分布研究[J].*环境科学学报*, 2003, 23(4): 447-451.
- [4] 邱黎敏,张建英,骆永明.浙江农田土壤中HCH和DDT的残留及其风险[J].*农业环境科学学报*, 2005, 24(6): 1161-1165.
- [5] 赵炳梓,张佳宝,周凌云,等.黄淮海地区典型农业土壤中六六六(HCH)和滴滴涕(DDT)的残留量研究:表层残留量及其异构体组成[J].*土壤学报*, 2005, 42(5): 761-768.
- [6] 李红权,李红梅,蒋继志,等.一株DDT降解菌的筛选、鉴定及降解特性的初步研究[J].*微生物学通报*, 2008, 35(5): 696-699.
- [7] 张明星,洪青,何健,等.DDT降解菌株DB1的分离、系统发育及降解特性[J].*中国环境科学*, 2005, 25(6): 674-677.
- [8] 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: 349-370.