

# 一株 DDT 降解菌的筛选、鉴定及降解特性的初步研究

李红权<sup>1\*</sup> 李红梅<sup>1</sup> 蒋继志<sup>1</sup> 杨雪丽<sup>1</sup> 郭荣君<sup>2</sup> 平淑珍<sup>2</sup> 张维<sup>2</sup>

(1. 河北大学 保定 071000)

(2. 中国农业科学院 北京 100081)

**摘要:** 从 DDT 污染的土壤中筛选具有 DDT 降解能力的细菌, 经过富集培养、分离纯化得到 56 株细菌, 将其接种到基础盐酵母培养基, 7 d 后用紫外分光光度计法初筛得到降解率较高的一株菌, 编号为 D-1。通过 16S rDNA 序列分析结合传统分类学方法确定该菌为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.) 的一株菌。对菌体降解 DDT 的特性的研究表明, 在培养温度为 30℃, 底物质量浓度为 40 mg/L, pH 7.0, 摇床转速为 200 r/min 的条件下, 该菌株对 DDT 降解 10 d 的降解率为 69.0%。

**关键词:** 寡养单胞菌, DDT 降解, 16S rDNA

## Isolation and Characterization of a DDT Degradation Bacterium Strain D-1

LI Hong-Quan<sup>1\*</sup> LI Hong-Mei<sup>1</sup> JIANG Ji-Zhi<sup>1</sup> YANG Xue-Li<sup>1</sup> GUO Rong-Jun<sup>2</sup>  
PING Shu-Zhen<sup>2</sup> ZHANG Wei<sup>2</sup>

(1. Hebei University, Baoding 071000)

(2. Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** A bacterium strain D-1 capable of degrading DDT was isolated from the DDT contaminated soil. Based on the phenotype, physiological and biochemical characteristics, and the phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence, the strain D-1 was identified preliminarily as *Stenotrophomonas* sp.. This strain could degrade DDT under condition of 30℃, pH7.0, 200 r/min, with degradation efficiency of 69.0% in 10 days.

**Keywords:** *Stenotrophomonas* sp., DDT degradation, 16S rDNA

DDT 是一种有机氯类的广谱杀虫剂, 由于其具有广谱、高效、廉价、急性毒性小等特点而被广泛应用于病虫害防治, 但是该化合物性质稳定, 在自然界极难分解, 残留期较长。欧美等发达国家已

在 20 世纪 70 年代禁止使用 DDT, 我国 1983 年停止生产 DDT, 从 1984 年起禁止使用 DDT。但有研究表明, 在我国食品中仍能检测出 DDT 残留, 且残留的平均值远远高于发达国家。微生物转化降解有机

污染物既是自然界对有机污染物降解的重要途径之一,也是有机污染物污染控制与污染环境修复的有效技术方法。开展 DDT 高效降解微生物的筛选、转化与降解机理的研究对于探索微生物 DDT 降解基因的多样性与进化机制、DDT 分解的代谢调控机制、微生物与环境污染物的互作机理等方面具有较高的科学理论价值,并且为 DDT 高污染环境的生物修复提供新的技术支持。

本研究从华北某化工厂 DDT 高污染的土壤中采样,并从土样中分离、筛选能够在好氧条件下降解 DDT 的细菌菌株,通过 16S rDNA 序列分析及表型特征和生理生化特性的测定,确定其中一株具有较高 DDT 降解能力的细菌为嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomona maltophilia*)。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

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 培养分离方法

**1.2.1 菌的富集培养:**称取 2 g 土样,放于 100 mL 基础盐酵母培养基中( $\text{NaNO}_3$  4.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 g/L,  $\text{FeCl}_3$  0.005 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.01 g/L, 酵母膏 0.04 g/L, DDT 用量随需要定, pH 7.0, 用蒸馏水配)。在 30 °C, 200 r/min 条件下振荡培养 10 d, 吸取 1 mL 培养液转接到 100 mL 基础盐酵母培养基中,继续培养,连续转接 5 次。

**1.2.2 菌种的分离纯化:**将富集培养的菌液涂布到分离纯化培养基( $\text{NaCl}$  1.0 g/L, 酵母膏 0.5 g/L, 蛋白胨 1.0 g/L, 琼脂 20 g/L, DDT 用量随需要定, pH 7.0, 用蒸馏水配制)的平板上, 30 °C 培养, 选取有透明圈的菌落进行进一步分离纯化。

**1.2.3 菌种 DDT 降解率的测定:**参考文献[1]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 °C, 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,收集两次抽提的有机相,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 °C, 柱温 240 °C, 检测器 280 °C,  $\text{N}_2$  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,  $\text{N}_2$  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 DDT 浓度计算降解率。培养用 DDT 纯度为 75%, 测定用 DDT 纯度为 99.7%。

**1.2.4 16S rDNA PCR 扩增及序列测定:**CTAB 法提取细菌的总 DNA, 设计引物 DF(5'-AGAGTTT GATCATGGCTCAG-3'), DR(5'-TACGGTTACCTT GTTACGACTT-3')扩增 16S rDNA 片段, DNA 序列由三博远志生物技术有限公司测定。

**1.2.5 系统发育树的构建:**将所得 1.4 kb 的序列与 GenBank 中核酸数据进行 Blast 分析, 利用 ClustalX 1.81 进行比对, 通过 MEGA4 软件生成系统发育树。

**1.2.6 生理生化特性:**参照东秀珠等的方法进行<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与讨论

在对 DDT 降解菌进行筛选的过程中发现在含有 DDT 的筛选平板上的一些菌落周围具有大小不一的透明圈, 这种现象可能是由于 DDT 的溶解性较差, 在培养基中形成微小的颗粒, 某些细菌降解 DDT 后使这些小颗粒消失而形成透明圈。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, 选取了一株降解特性较高的菌株, 编号为 D-1。

### 2.1 菌株 D-1 的形态及生理生化特征

菌株 D-1, 杆菌, 0.4 μm~0.5 μm × 0.2 μm~0.3 μm, 革兰氏染色阴性, 极生鞭毛, 在营养琼脂上菌落直径 0.5 mm~1 mm, 中央突起, 黄色, 不透明。O/F 试验为非发酵型, 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 硝酸盐还原阴性, 明胶水解阳性, 淀粉水解阴性, 产黄单胞菌素, 赖氨酸脱羧酶阳性。

### 2.2 系统发育树的构建

根据菌株 D-1 的 16S rRNA 基因测序结果 (GenBank 核酸登录号 EU340025) 进行 Blastn 分析表

明, 菌株 D-1 与寡养单胞菌属的相似性最高, 与 *Stenotrophomonas maltophilia* 的相似性为 98%。D-1 与 *Stenotrophomonas* 属其它菌种的分析结果见图 1。图 1 是根据细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树, 此邻接树(Neighbor-Joining tree)基于 16S rDNA 构建<sup>[3]</sup>, 进行了 1000 次重复的自展检验<sup>[4]</sup>。节点处的数值显示了相应拓扑结构的自展值。支长根据相同单位绘制, 显示了各分类群的进化距离。各分类群间进化距离的计算应用了 Maximum Composite Likelihood 模型<sup>[5]</sup>。所有分类群 16S rDNA 的插入和

缺失都被删除, 在最终的矩阵中总共有 1423 个位点被保留。系统分析的构建应用了 MEGA4 软件。该系统发育树选择了 *Dokdonella* 属的 3 个种为外群。菌株 D-1 和其它 4 株已知的 *Stenotrophomonas maltophilia* 构成一个自展值为 100 的单系群, 而且 D-1 和其中的 1 株 *S. maltophilia* 形成一个自展值为 95 的内部分支。D-1 和 4 株已知 *S. maltophilia* 的进化距离也非常接近, 它们的 16S rDNA 仅相差 1.5% ~ 1.9%。这些结果都强烈支持 D-1 属于 *Stenotrophomonas maltophilia*。

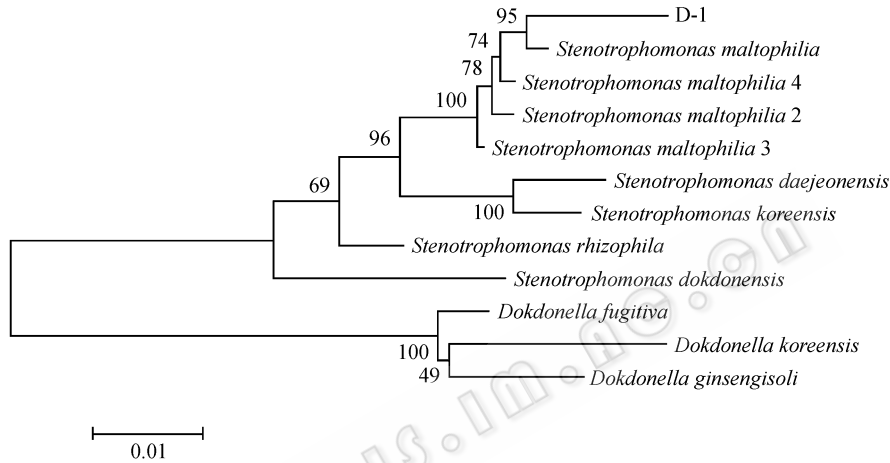


图 1 基于 DDT 降解菌株 D-1 亲缘关系相近菌株 16S rDNA 序列的系统发育树  
 Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain DB-1 and relating species

2.3 D-1 的降解特性研究

通过对培养液中 DDT 含量的测定, 发现菌株 D-1 对 DDT 具有明显的降解效果, 该菌对 DDT 的降解率在菌体的对数期较高, 菌体的生长情况如图 2 所示, 说明在该时期菌体 DDT 降解酶系的酶活力较强。

当 DDT 的起始浓度为 40 mg/L 时, 菌株在第一、二天对 DDT 的降解量较大, 此后降解呈缓慢下降的趋势。在 DDT 的浓度为 40 mg/L 时, 菌株 D-1 对 DDT 的降解率较高, 达到 69.0%, 而当 DDT 的起始浓度为 60 mg/L 时, 菌株 D-1 对 DDT 的降解较少, 降解率仅为 30.7%, 结果如图 2 所示。所以菌株 D-1 降解 DDT 的最佳浓度在 60 mg/L 以下, 观察菌株在浓度为 60 mg/L 液体培养基中的生长情况, 发现明显比同时期的 40 mg/L 液体培养基中菌体澄清, 说明菌体对 60 mg/L 的 DDT 浓度的耐受能力较 40 mg/L 低, 在 60 mg/L 的 DDT 浓度时菌株 D-1 生

长状况较差。

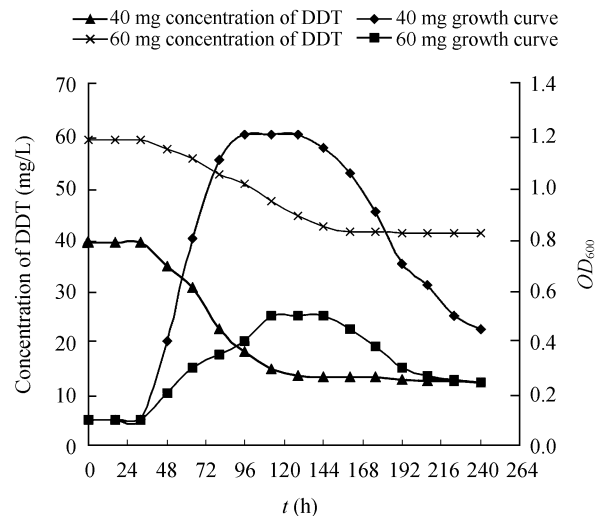


图 2 菌株 D-1 的生长曲线及对 DDT 的降解特性  
 Fig. 2 Growth curve and characteristics of DDT degradation of strain D-1

### 3 结论

1) 从某化工厂车间周围土壤中分离到一株能够好氧降解 DDT 的细菌, 并鉴定为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)。

2) 菌株 D-1 降解 DDT 与其底物质量浓度具有明显相关性。在底物质量浓度为 40 mg/L 时, 10 d 的降解率达到 69.0%。

3) 本研究首次发现寡养单胞菌属细菌降解 DDT 的特性, 为利用寡养单胞菌属细菌降解 DDT, 进行生物修复奠定了基础。

### 参考文献

[1] 张明星, 洪青, 何健, 等. DDT 降解菌株 DB-1 的分

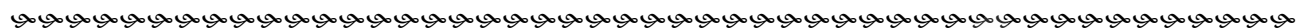
离、系统发育及降解特性. 中国环境科学, 2005, 25(6): 674-677.

[2] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.349-370.

[3] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.

[4] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39(9): 783-791.

[5] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS*, 2004, 101: 11030-11035.



稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t(h)$  (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 ~ 5 不可写成 3~5 ; 3%~6%不可写成 3~6%等。