

# 萘降解菌的分离、鉴定及降解途径

徐中阳 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 从武汉市金口张公堤处污泥富集分离出2株能以萘为唯一碳源生长的优势降解菌株XA1和XB1, 经形态学观察、生理生化鉴定及16S rDNA测序分析, 确定它们属于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。其最适生长温度均为28℃, 最适生长pH分别为7.5和7.0。在最适生长条件下, 菌株XA1、XB1以3%的接种量对500 mg/L萘的降解率在第3天时分别达到了93.4%和74.7%。采用PCR和琼脂糖凝胶电泳技术检测到XA1、XB1中有儿茶酚2,3-双加氧酶基因(*nahH*)等萘降解过程中的关键酶基因, 与NCBI中发布的基因序列相比较, 相似度均达到99%。

**关键词** 多环芳烃; 萘; 降解; 儿茶酚2,3-双加氧酶; 荧光假单胞菌

**中图分类号** Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0059-07

多环芳烃(PAHs)是由2个或2个以上的苯环以线形排列、弯曲连接或者聚簇状的方式构成的有机化学污染物, 来源于石油、天然气、煤炭、工业废水、废气等一些不完全燃烧的有机化合物中。由于其高疏水性和化学稳定性, 容易在人体内进行富集, 使人体致癌、致畸和致突变<sup>[1-2]</sup>, 对人类健康和生态环境构成重大危害, 因此, 被美国环保局列入了129种优先控制环境污染物的黑名单<sup>[3]</sup>。尽管PAHs是公认的难降解污染物, 但已发现一些厌氧和好养微生物能够通过多种代谢途径将PAHs降解矿化, 目前在污水、淤泥、土壤中均发现了能以PAHs为唯一碳源和能源进行降解的微生物, 微生物在PAHs迁移乃至最终降解过程中起到了重要作用, 因此, PAHs的生物修复越来越受到人们的重视<sup>[4-5]</sup>。由于利用微生物降解PAHs的方法具有成本低廉、二次污染少、修复彻底等优点, 已成为去除环境中PAHs的理想手段<sup>[6]</sup>。目前研究人员从土壤中分离的萘降解菌株主要有*Mycobacterium* sp., *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas putida*, *P. vesicularis*, *P. fluorescens*, *Rhodococcus* sp., *Moraxella* sp. 等<sup>[7-8]</sup>。有研究表明, 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)能有效降解PAHs<sup>[9-14]</sup>, 但是关于该类高效快速的降解菌株报道的并不多, 特别是

从油田污泥中分离出萘降解菌株的研究在国内还鲜见报道。本研究以PAHs模式化合物萘为唯一碳源, 分离鉴定出2株荧光假单胞菌XA1和XB1, 通过形态观察和16S rDNA序列比对分析, 对它们在最优条件下萘的降解效率和降解途径进行了测定和初步分析, 以期探讨菌株XA1和XB1的分子降解机制以及后期构建高效降解PAHs的工程菌株提供理论基础和现实依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

土样: 污泥样品1、2、3号均于武汉市金口张公堤处进行定点采集, 该处土壤长期受多环芳烃污染, 采集深度分别为1号土(A点)地下4 m、2号土(B点)地下1 m、3号土(C点)地下3 m, 将采集到的土样放入无菌的牛皮纸袋中, 密封, 带回实验室置于4℃冰箱保存。

试剂: 萘、环己烷、蛋白胨、琼脂粉、酵母粉、NaCl、CaCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、甘油等均购自国药集团化学试剂有限公司, 所有试剂均为AR级; T4 DNA连接酶购于Fermentas公司, Marker III购自天根生化科技有限公司, 引物、DNA产物纯化试剂盒购自上海生物工程

收稿日期: 2013-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(41071180)

徐中阳, 硕士研究生, 研究方向: 土壤微生物学. E-mail: xzy2988970@163.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

技术有限公司。

## 1.2 菌株的分离与培养

将污泥土样以 10% 的接种量接种于萘选择性无机盐培养基中 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.33 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.75 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.00 g,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2.00 g,  $\text{KNO}_3$  2.00 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.0428 g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.034 g, pH 7.0,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL<sup>[15]</sup>) 逐步提高萘的质量浓度 (100、200、300、400、500 mg/L), 28 °C、180 r/min 下恒温培养 5 d, 进行富集培养, 连续富集 5 次后在筛选的培养基平板上进行多次划线分离纯化, 将挑出的单菌落接于固体 LB 平板上, 菌种置于 -20 °C 保存。

## 1.3 16S rDNA 基因鉴定及系统发育树的构建

采用通用正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', 由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 扩增体系: DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 0.4  $\mu\text{L}$ , 1 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 正反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 补加无菌双蒸水 19.6  $\mu\text{L}$ , 定容至 25  $\mu\text{L}$ , 用纯化的单菌落做 DNA 模板; 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行检测。16S rDNA 测序工作由南京金斯瑞生物工程公司完成, 将 XA1 和 XB1 的 16S rDNA 序列通过 Blast 在 NCBI 上进行比对, 根据最相似序列确定其系统发育地位, 用 Clust X 对序列进行对位排序, MEGA4.1 (molecular evolutionary genetics analysis) 计算遗传距离, 邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统发育树状图。

## 1.4 生长曲线测定

用接种环取一环筛选到的菌株于 5 mL 的无抗 LB 液体培养基中 (胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 无菌水 1 000 mL, pH 7.0) 活化, 之后将活化好的菌液按 2% 的接种量接种到 50 mL 的无抗 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 下振荡培养, 每 2 h 取 1 次样, 用分光光度计于 600 nm 处测定  $D$  值, 2 株菌各设 3 个重复。以  $D_{600}$  表示菌株的生长量。

## 1.5 菌株在以萘为唯一碳源的无机盐培养基中最适生长温度和 pH 的测定

1) 最适生长温度的测定。配制一定体积的萘

(500 mg/L) 无机盐 MM 液体培养基, 将 XA1 和 XB1 接种于 LB 培养基中过夜活化, 取一定体积的 2 种菌悬液, 用 PBS 磷酸缓冲液反复洗涤 3 次, 以 3% 的接种量接种于 50 mL 含有萘 (500 mg/L) 的无机盐液体培养基中, 对照组 (CK) 只加菌液不加萘, 在 28、37 °C 下 180 r/min 振荡培养 4 d, 每隔 12 h 测 1 次  $D_{600}$ , 每组设 3 个重复。

2) 最适生长 pH 值的测定。配制不同初始 pH 值 (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5) 的萘 (500 mg/L) 无机盐液体培养基, 用以上相同的方法将菌悬液接入 50 mL 无机盐培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养, 每隔 12 h 测 1 次  $D_{600}$ , 每组 3 个重复。

## 1.6 菌株降解底物多样性的测定

将培养到对数期的 XA1、XB1 和模式菌株恶臭假单胞菌 KT2440 菌悬液经 PBS 磷酸缓冲液洗涤 2 次后以 10% 的接种量接种到 50 mL 含有不同质量浓度各种多环芳烃的无机盐培养基中 (500 mg/L 萘、500 mg/L 菲、100 mg/L 联苯、80 mg/L 芴、100 mg/L 荧蒽、80 mg/L 苯并芘)。28 °C、180 r/min, 培养 10 d, 检测各个样品中的  $D_{600}$  值, 每组设 3 个重复。

## 1.7 菌株对萘降解能力的测定

1) 标准曲线的绘制。分别配置不同质量浓度 (10、20、30、40 mg/L) 的萘-乙醇溶液, 置于 3 mL 的石英比色皿中, 用紫外分光光度计 (DU730) 分别测定对应工作波长 (268 nm) 下的吸光度值, 以  $D_{268}$  为纵坐标, 萘的质量浓度为横坐标绘制标准曲线<sup>[16]</sup>, 萘的标准工作曲线为:  $y = 0.0297x + 0.408$  ( $R^2 = 0.9992$ )。

2) 降解能力的测定。配制 500 mg/L 萘的无机盐液体培养基, 将培养到对数期的菌悬液按 3% 的接种量接入到 50 mL 的上述培养基中, 28 °C、180 r/min, 恒温振荡培养, 每隔 12 h 取 5 mL, 用有机溶剂 (环己烷) 按 1:1 的比例进行萃取, 萃取液用紫外分光光度计进行分析, 检测其对应波长下的吸光值, 根据标准曲线确定其降解率, 每组 3 个重复。

## 1.8 菌株萘降解途径的研究

以萘降解的中间产物水杨酸、邻苯二甲酸为唯一碳源进行菌株生长情况的测定, 初步研究菌株萘的降解途径。向 50 mL 无机盐液体培养基中分别加入邻苯二甲酸 (0.2 g/L) 和水杨酸 (0.2 g/L), 121 °C 灭菌 20 min<sup>[17]</sup>。分别接种经 LB 液体培养活化并由 PBS 磷酸缓冲液洗涤过的 XA1 和 XB1 菌

体,在 28 ℃、180 r/min 的摇床中振荡培养,以不加菌悬液含萘的无机盐液体培养基为对照,接种后每 12 h 取 1 次样,测定菌体  $D_{600}$ 。

### 1.9 萘降解途径中的部分关键酶基因的 PCR 扩增与鉴定

选取萘降解途径中的关键酶萘双加氧酶的铁硫

*nahAC*: 5'-TGGCGATGAAGAAGCTTTTCC-3'  
 5'-AACGTACGCTGAACCGAGTC-3'

*nahF*: 5'-GGAGACATCATATGAAGACAAAAGTGTTCATCAAT-3'  
 5'-CCAATAAGCTTGAAGGGATATTGCTGCTCGAA-3'

*nahG*: 5'-GGAGACATCATATGAAAAACAATAAACCTGGCTTG-3'  
 5'-CCAATCTCGAGCCCTTGACGTAGCACACCG-3'

*nahH*: 5'-GAATAGGTGATTTTCATGAACAA-3'  
 5'-TTAGGTCATAACGGTCAT-3'

蛋白大亚基基因 *nahAC*(引物序列来自文献[18])、水杨醛脱氢酶基因 *nahF*(引物序列来自文献[19])、水杨酸羟化酶基因 *nahG*(引物序列来自文献[20])及儿茶酚 2,3-双加氧酶基因 *nahH*(引物序列来自文献[21]) 进行 PCR 扩增与鉴定。引物序列如下:

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选及形态学特征

经过初筛和复筛,从污泥土样中筛选出了 2 株能以萘为唯一碳源进行生长的菌株,分别命名为 XA1 和 XB1。这 2 株菌在 LB 固体培养基中培养初期均为乳白色菌落,在培养 3 d 之后 XA1 和 XB1 的菌落颜色均转变成淡黄色且 XA1 的菌落直径为 2.5~3.0 mm,而 XB1 在相同的培养时间里菌落直

径只有 1~2 mm, 2 株菌的菌落特征均为:圆形、较透明、边缘整齐、表面隆起、湿润光滑、易挑起。在 100 倍油镜下观察均为长杆状,革兰氏染色结果均为阴性。

### 2.2 菌株系统发育树的构建及菌种鉴定

将 XA1、XB1 的 16S rDNA 序列通过 Blast 在 NCBI 上进行相似序列比对,结果发现:XA1 和 XB1 与 *Pseudomonas* sp. 多个菌株的序列相似性均达到 99%(图 1)。

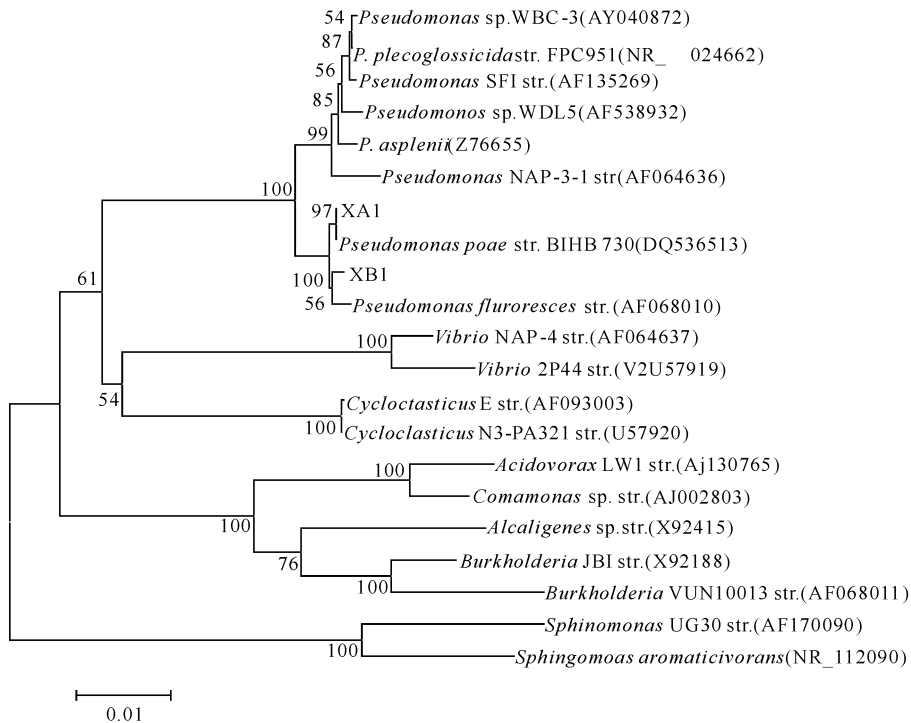


图 1 基于菌株 XA1、XB1 及其他 PAHs 降解菌的 16S rDNA 序列构建的 NJ 进化树

Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree showing relationships between strain XA1 and XB1 and several other strains of PAHs-degrading based on their 16S rDNA sequences

对菌株的形态观察及 16S rDNA 序列比对结果可以确定 XA1 和 XB1 皆属于荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 我们已将所测菌株 XA1、XB1 序列提交到 GenBank 数据库, 序列登录号为 KC773764 和 KC773765。

### 2.3 菌株的生理生化特性

1) 菌株生长曲线的测定。XA1 和 XB1 在 LB 培养基中 96 h 的生长状况如图 2 所示, XA1 在培养的前 36 h 为对数生长期, 36~60 h 为稳定生长期, 60 h 以后进入衰亡期; XB1 在培养的前 32 h 为对数生长期, 32~84 h 为稳定生长期, 84 h 之后进入衰亡期。

2) 菌株最适生长温度的测定。对 XA1 和 XB1 在以萘 (500 mg/L) 为唯一碳源的无机盐培养基 (pH 7.0) 中于 28、37 °C 下的生长状况进行观测, 结果 (图 3) 显示, 2 株菌的最适生长温度均为 28 °C, 在 37 °C 下不能生长。

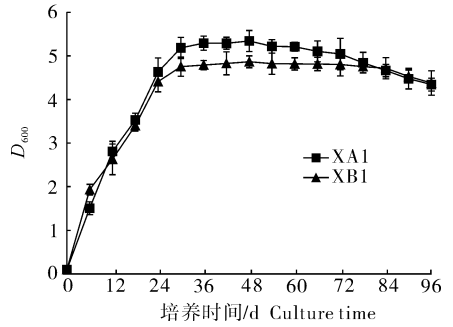


图 2 XA1、XB1 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of XA1 and XB1

3) 菌株最适生长 pH 的测定。对 XA1 和 XB1 在不同 pH 值 (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5) 以萘 (500 mg/L) 为唯一碳源的无机盐 MM 培养基中于 28 °C、180 r/min 振荡培养 4 d 的生长状况进行测定, 结果 (图 4) 显示, XA1 的最适生长 pH 为 7.5, XB1 的最适生长 pH 为 7.0。

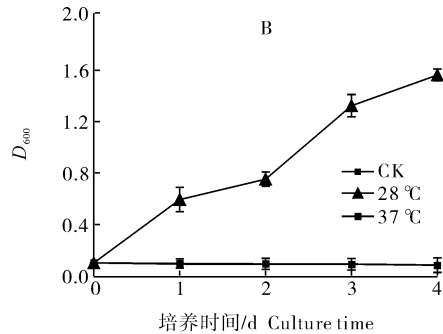
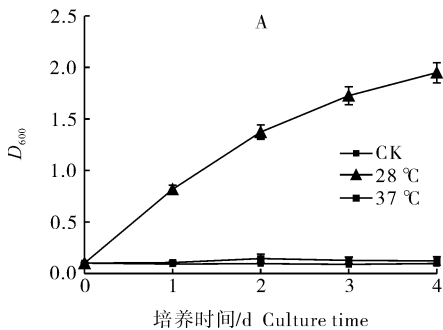


图 3 不同温度下 XA1(A) 及 XB1(B) 在萘培养基中的生长趋势

Fig.3 Growth trend of XA1(A) and XB1(B) in the medium containing naphthalene at different temperature

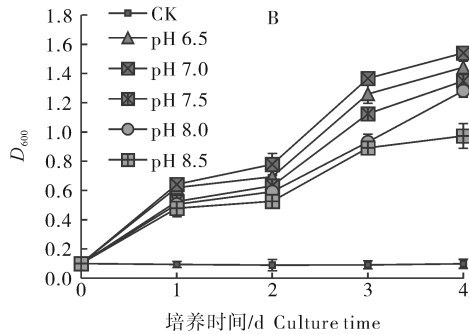
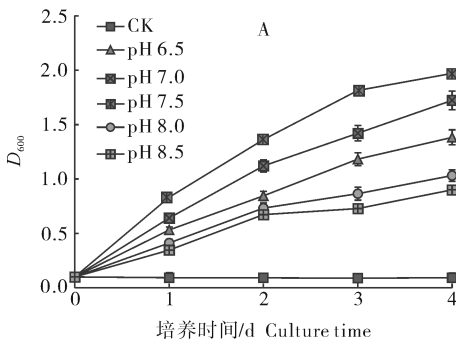


图 4 不同 pH 下 XA1(A) 及 XB1(B) 在萘培养基中的生长趋势

Fig.4 Growth trend of XA1(A) and XB1(B) in the medium containing naphthalene at different pH

4) 菌株降解谱的测定。分别以萘、菲、联苯、芴、荧蒹、苯并芘为唯一碳源, 测定菌株 XA1、XB1 和模式菌株 *Pseudomonas putida* KT2440 于 pH 7.2、180 r/min 下培养 10 d 的生长状况 (图 5), 结

果显示, XA1 能以萘、菲、芴、荧蒹为唯一碳源代谢; XB1 能以萘、菲、荧蒹及苯并芘为唯一碳源进行代谢, XA1、XB1 的降解谱明显比 *P. putida* KT2440 广。

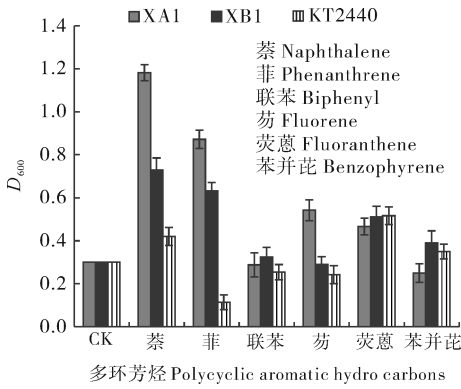


图 5 XA1、XB1 及 KT2440 以不同种类的多环芳烃为底物的代谢图谱

Fig. 5 Metabolic profiles of XA1, XB1 and KT2440 to different kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons

5) 菌株 XA1、XB1 对萘的降解特性。将处于对数生长期的菌株按 3% 的接种量接入萘质量浓度为 500 mg/L 的无机盐液体培养基中, 28 °C、180 r/min 下恒温振荡培养, 由图 6 可知, 培养 3 d 后菌株 XA1 对萘的降解率达到 93.4%, XB1 对萘的降解率达到 74.7%。

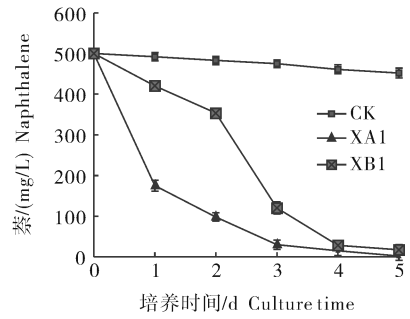


图 6 菌株 XA1、XB1 对萘的降解效果  
Fig. 6 The degradation effect of naphthalene by XA1 and XB1

6) 菌株 XA1、XB1 降解途径的研究。将培养到对数期的 XA1 和 XB1 分别接种到 50 mL 以水杨酸 (SA, 0.2 g/L) 和邻苯二甲酸 (OA, 0.2 g/L) 为唯一碳源的无机盐 MM 培养基中, 28 °C、180 r/min 恒温振荡培养, 结果 (图 7) 表明: XA1 和 XB1 皆存在水杨酸和邻苯二甲酸 2 种代谢途径, 且 XA1 和 XB1 都以水杨酸代谢途径为主。

7) 部分关键酶基因的 PCR 扩增与鉴定。选取水杨酸代谢途径的部分关键酶基因: 萘双加氧酶

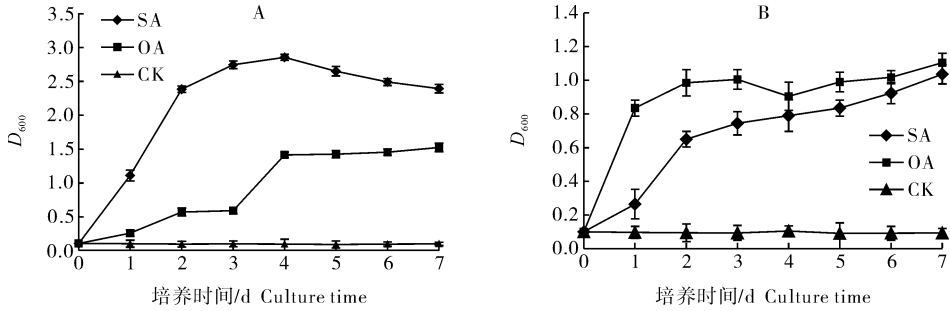


图 7 XA1(A) 及 XB1(B) 在 SA、OA 中的生长曲线  
Fig. 7 Growth curve of XA1(A) and XB1(B) in SA and OA

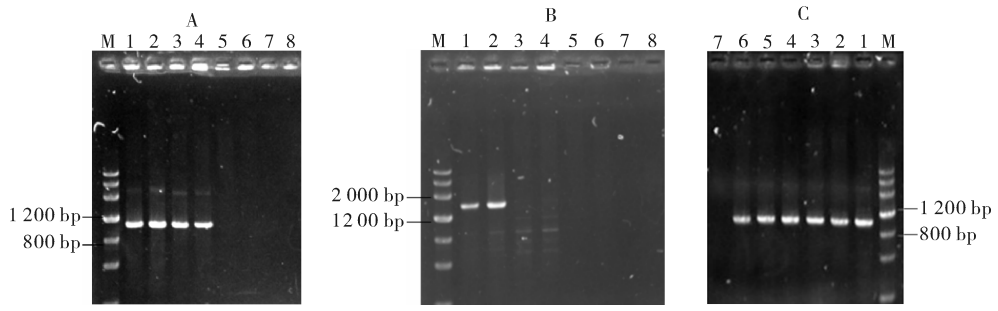


图 8 萘降解途径中的部分关键酶基因 *nahAC* (A)、*nahF* (B) 和 *nahH* (C) 的 PCR 扩增结果  
Fig. 8 PCR specific amplification of *nahAC* (A), *nahF* (B) and *nahH* (C) gene



(*nahAC*)、水杨醛脱氢酶(*nahF*)、水杨酸羟化酶(*nahG*)和儿茶酚 2,3-双加氧酶(*nahH*)进行 PCR 扩增,通过 Blast 比对,结果(图 8)表明:XA1 具有 *nahAC*、*nahF*、*nahH* 三个基因,与文献已报道的基因相似度均达到 99%;XB1 具有 *nahAC* 和 *nahH* 两个基因,与文献已报道的基因相似度也达到 99%。

可以初步确定 XA1 和 XB1 是以水杨酸途径对萘进行降解的,但 2 株菌中都没有基因 *nahG* 存在,证明其还是有别于已知的降解途径。

### 3 讨论

本研究从武汉市金口张公堤污泥样本中富集筛选出 2 株能够降解萘的菌株 XA1 和 XB1,经过形态学观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列检测确定这 2 株菌都属于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。已有研究表明假单胞菌对多种有机物均具有降解能力,如恶臭假单胞菌 KT2440,它最早发现于日本菜园土中,对苯甲酸、对羟基苯甲酸酯、苯丙氨酸、羟基苯等都具有降解能力<sup>[22]</sup>。但是目前得到对 PAHs 尤其是萘具有高效降解能力的假单胞菌却鲜见报道。杨轩等<sup>[23]</sup>富集分离出菌株 BDP01 能在萘的质量浓度为 100 mg/L 的条件下 15 d 降解 89.64% 的萘, Lu 等<sup>[24]</sup>筛选出 1 株能降解萘的反硝化细菌,当萘的质量浓度为 30 mg/L 时,该硝化细菌能在 200 h 内降解 20.2% 的萘。而本研究富集筛选出的 XA1、XB1 能在萘质量浓度为 500 mg/L 的条件下正常生长,在培养 3 d 后降解率分别达到 93.4% 和 74.7%,在耐受能力和降解速度方面都具有明显优势,为利用微生物修复技术治理 PAHs 污染提供了优良菌株资源。

另外,本研究利用唯一碳源试验和分子生物学手段证实了菌株 XA1 和 XB1 具有水杨酸和邻苯二甲酸 2 种代谢途径,可能是其能快速降解萘的一个原因,同时这 2 株菌中均含有水杨酸途径中未知的关键酶基因,这也为进一步研究萘的水杨酸代谢途径提供了良好材料,并且菌株 XA1 和 XB1 与 KT2440 相比对 PAHs 的降解谱更广,可望应用于 PAHs 污染的生物修复。

### 参 考 文 献

[1] MAROON R, BESTETTI G, FRATI F. Naphthalene and biphenyl oxidation by two marine *Pseudomonas* strains isolated

from Venice Lagoon sediment [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 59(1): 25-31.

- [2] CHRISTOPHE P, GILLES F, PASCAL P. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155 [J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(2): 175-186.
- [3] MCVEETY B D, HITES R A. The distribution and accumulation of PAHs in environment [J]. *Atmos Environ*, 1988, 22(1): 511-536
- [4] BELHAJ A, DESNOUES N, ELMERICH C. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB*-related genes [J]. *Res in Microbio*, 2002, 153: 339-344.
- [5] MROZIK A, LABUZEK S, PIOTROWSKA-SEGET Z. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation [J]. *Microbiological Research*, 2005, 160(2): 147-157.
- [6] SIM J L, SIMS R C, MATTHEWS J E. Bioremediation of contaminated surface soils [R]. EPA-600/9-89/073. Washington D C: Environmental Protection Agency, 1989.
- [7] HEDLUND B P, STALEY J T. *Hbriocyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(1): 61-66.
- [8] SAMANTA S K, BHUSHAN B, JAIN R K. Efficiency of naphthalene and salicylate degradation by a recombinant *Pseudomonas puada* mutant strain defective in glucose metabolism [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(5): 627-631.
- [9] 郑乐, 刘宛, 李培军. 多环芳烃微生物降解基因的研究进展 [J]. *生态学杂志*, 2007, 26(3): 449-454.
- [10] 许振文, 张甲耀, 陈兰洲, 等. 固定化外源降解菌强化生物降解作用研究 [J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(3): 19-22.
- [11] 邵宗泽, 许晖, 马迎飞, 等. 2 株海洋石油降解细菌的降解能力 [J]. *环境科学*, 2004, 25(5): 133-137.
- [12] 徐虹, 章军, 刘陈立, 等. PAHs 降解菌的分离鉴定及降解能力测定 [J]. *海洋环境科学*, 2004, 23(3): 61-64.
- [13] RODRIGO J J S, EDER S C, FATIMA B M. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfill site [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 56(3): 143-150.
- [14] LEE K, PARK J W, AHN I S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2003, 105: 157-167.
- [15] RAMIREZ N, CUTRIGHT T, JU L K. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium [J]. *Chemosphere*, 2001, 44: 1079-1086.
- [16] 杨继舜, 殷晓玲, 陈秀敏. 微机紫外光度法测定萘的同归检量线 [J]. *昆明理工大学学报*, 1998, 23(3): 27-31.
- [17] 周德平, 夏颖, 闵航. 三株非降解细菌的分离鉴定及降解特性的

- 研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 414-420.
- [18] LLOYD-JONES G, LAURIE A D, HUNTER D W F. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1999, 29: 69-79.
- [19] LI W, SHI J, WANG X. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6 [J]. Gene, 2004, 336: 231-240.
- [20] ZHAO H, CHEN D, LI Y. Over expression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ND6 [J]. Microbiol Res, 2005, 160: 307-313.
- [21] GHOSAL D, YOU I S, GUNSALUS I C. Nucleotide sequence and expression of gene *nahH* of plasmid NAH7 and homology with gene *xyIE* of TOL pWWO [J]. Gene, 1987, 55: 19-28.
- [22] JIMÉNEZ J I, MI ÑAMBRES B, GARCÍA J L, et al. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440 [J]. Environmental Microbiology, 2002, 4 (12): 824-841.
- [23] 杨轩, 张威, 李师翁, 等. 多环芳烃降解菌的分离鉴定及其生理特性研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(5): 1033-1040.
- [24] LU X Y, ZHANG T. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(1): 204-211.

## Isolation and identification of naphthalene degrading bacteria and characterization of its degradation pathways

XU Zhong-yang CHEN Wen-li

Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** Two strains, named as XA1 and XB1 utilizing naphthalene as the sole carbon source, were isolated from Zhanggong Dam of Jinkou in Wuhan City. XA1 and XB1 were both identified as *Pseudomonas fluorescens* through morphological characterizations, physiological and biochemical identification and alignment analysis of the 16S rDNA sequence. Their optimal growth temperature were both 28 °C and the optimal growth pH value were 7.5 and 7.0, respectively. When XA1 and XB1 were inoculated in the liquid inorganic salts medium with naphthalene as the sole carbon source, the degradation rates of naphthalene after three days were 93.4% and 74.7%, respectively. Catechol 2,3-dioxygenase gene and some other genes were characterized with the PCR method and agarose gel electrophoresis. Results showed that sequences of catechol 2,3-dioxygenase gene and the others all possessed 99% similarity with the sequences in the NCBI.

**Key words** polycyclic aromatic hydrocarbons; naphthalene; degradation; catechol 2,3-dioxygenase; *Pseudomonas fluorescens*

(责任编辑:张志钰)