

碳同位素标记法鉴别芳烃降解菌研究

胡恒宇, 赵东风, 刘春爽

(中国石油大学化学工程学院, 山东青岛 266580)

摘要:从油田采出水中富集培养石油烃降解菌,利用 ^{13}C 标记的甲苯作为碳源和变性梯度凝胶电泳技术,从中鉴定和考察能够降解甲苯的细菌群落。结果表明:从采出水中富集培养的复合菌群经过 500 d 的厌氧降解,对石油烃降解率达到 36.4%,甲烷产量为 201.2 μmol ;以 ^{13}C 标记的甲苯为碳源,经过 60 d 的培养,复合菌群对其降解率达到 67%, ^{12}C 标记的甲苯降解率为 69%,两种碳源标记甲苯的降解率差异不显著;将离心中的重带 ^{13}C -DNA 片段回收测序,鉴别出 3 种芳烃降解菌。

关键词:碳同位素;菌株鉴定;CsCl 密度梯度;DGGE 分析;芳烃

中图分类号:T 992.4

文献标志码:A

引用格式:胡恒宇,赵东风,刘春爽.碳同位素标记法鉴别芳烃降解菌研究[J].中国石油大学学报(自然科学版),2015,39(6):57-62.

HU Hengyu, ZHAO Dongfeng, LIU Chunshuang. Identification of arene degradation bacteria using carbon isotope labeling method[J]. Journal of China University of Petroleum (Edition of Natural Science), 2015, 39(6): 57-62.

Identification of arene degradation bacteria using carbon isotope labeling method

HU Hengyu, ZHAO Dongfeng, LIU Chunshuang

(College of Chemical Engineering in China University of Petroleum, Qingdao 266580, China)

Abstract: The degradation bacteria of petroleum hydrocarbon were enriched and cultured from the oilfield water. Using ^{13}C -toluene as carbon source and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technology to identify and investigate the bacterial community which could degrade the toluene. The results show that after 500 days anaerobic degradation the petroleum hydrocarbon degradation rate is 36.4% by complex bacterium, and the methane yield is 201.2 μmol . It is also found that after 60 days culture the carbon source ^{13}C -toluene degradation rate is 67% by the complex bacterium. Meanwhile, after 60 days culture the ^{12}C -toluene degradation rate is 69%, and two kinds of toluene degradation rate are not significantly different. ^{13}C -DNA is recovered and identified for three types of aromatic hydrocarbon degrading bacteria.

Keywords: carbon isotope; bacteria identification; CsCl density gradient; DGGE analysis; arene

油藏环境中的有机物质(特别是残余原油)降解过程中会产生大量副产物和气体,参与石油降解的菌群形成互营共生关系,最终使有机质一步步地降解^[1]。油藏环境中的微生物群体是由微好氧菌和兼性厌氧型细菌组成的,油藏中的脂肪烃提供了它们存活的基础。油藏中的菌群有发酵菌、硫酸盐/硝酸盐还原菌、铁还原菌、厌氧产甲烷菌等^[2-4],分属于不同

的菌属,在自然状态下可以降解和利用石油烃,但是单纯利用内源微生物,在自然状态下的石油烃降解效率低^[5]。现有的细菌群落分析技术,如通过聚合酶链式反应(PCR)扩增和变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术,虽然可以很好地分析石油烃降解微生物的群落结构,但不能准确分离降解芳烃的菌^[6]。用稳定性同位素探针(SIP)和 DGGE 技术结合可以准确分析和鉴定

石油降解菌群的结构^[7-8]。笔者利用¹³C 标记的和未标记的芳烃分别作为碳源,使菌群利用碳源合成自身的核酸(DNA),带有¹³C 的 DNA 片段会在氯化铯(CsCl)密度梯度中和其他 DNA 片段分离,从而鉴别分离出高效芳烃类降解菌。

1 试验设计与方法

1.1 药品与仪器

¹³C 标记的甲苯标准品(国家标准物质信息中心购买,美国)、¹²C 标记的甲苯标准品(色谱纯)、氯化铯 CsCl、己烷(分析纯)、二硫化碳、厌氧工作站(Plas Labs, Lansing, MI, USA)、OIL-510 型红外分光测油仪、贝克曼库尔特高速离心机 Optima L-XP(美国)、日本爱宕手持折射仪 R-5000、吉尔森 Minipuls 3 蠕动泵。

1.2 石油降解菌群的初级培养

菌溶液为复合石油降解菌群,经过实验室

长期培养和保存。具体培养方法为:采集来自油田的采出水,从采油井泵取保存于塑料桶(约 10 L)中,立即送到实验室并富集培养。取样地油井的油层温度为 50~65℃,油层压力为 9~10 MPa,原油密度(0.929±0.04) g/cm³,原油黏度(168.4±3.0) mPa·s,总矿化度 9.563 g/L,饱和分(33.9±0.7)%,芳香分(32.7±0.7)%,胶质(28.6±0.6)%,沥青质(4.9±0.1)%。驱油类型为聚丙烯酰胺驱。

在厌氧操作箱中,首先进行初级培养,用红外测油仪测定采出水中石油烃含量为 0.05 g/mL。后取 50 mL 的采出水和 5 g 原油、50 mL 灭菌无机盐培养基充入到 150 mL 无菌瓶中,进行 50℃的富集培养,以灭菌作为对照,多组培养。经过实验室 500 d 的培养,筛选出高效降解石油烃的复合菌群,表 1 是其石油降解率、CH₄ 产量随着天数的变化情况,每次测定重复 5 次。

表 1 复合石油降解菌的降解参数

Table 1 Characteristics of complex hydrocarbon degradation bacteria

时间/d	降解率/%	降解率标准差/%	甲烷产量/μmol	时间/d	降解率/%	降解率标准差/%	甲烷产量/μmol
50	3.4	±0.2	—	300	12.7	±0.3	—
100	3.8	±0.1	—	350	18.2	±0.5	—
150	3.9	±0.2	—	400	25.4	±0.5	130.7
200	4.1	±0.2	—	450	32.1	±0.5	155.2
250	7.7	±0.3	—	500	36.4	±0.5	201.2

对降解前后的石油烃萃取后进行四组分分离,再通过气相色谱质谱连用得知其降解前后的石油中饱和烃变化情况,结果见图 1 和图 2,可以确定这是高效石油降解菌群,可以在后续试验时,从中鉴别出哪些是芳烃类降解菌。

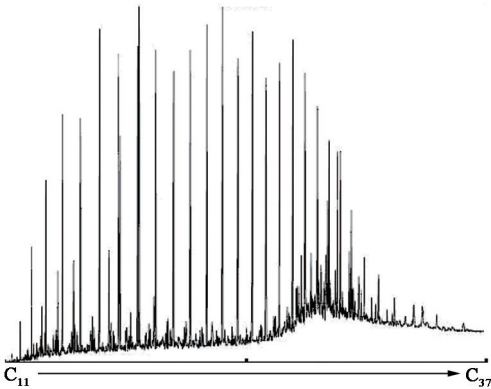


图 1 降解前饱和烃的气相色谱-质谱总离子图
Fig. 1 Saturated hydrocarbon GC-MS TIC map before degradation

g; NH₄Cl 5.0 g; NaCl 1.0 g; MgCl₂ 2.0 g; CaCl₂ 0.1 g; 酵母粉 1.0 g; L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g; 定容到 1 L; pH 值 7.0~7.2。

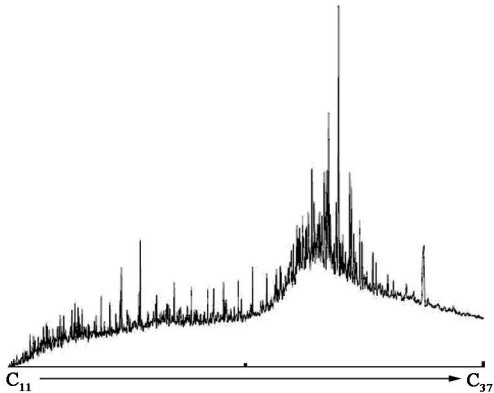


图 2 降解后饱和烃的气相色谱-质谱总离子图
Fig. 2 Saturated hydrocarbon GC-MS TIC map after degradation

1.3 芳烃降解培养

通过《化学化工物性数据手册》查得,在本实验的 50℃下,1 L 水中最多可以溶解 0.588 g 甲苯,所

所用无机盐培养基:KH₂PO₄ 5.0 g; K₂HPO₄ 5.0

以进行本实验时应该控制甲苯的使用质量浓度为小于 0.5 g/L。在厌氧操作箱中,先取上述经过初培养的复合菌液,取清液并且过滤,滤掉油和杂质,利用气相色谱测定培养液中和培养瓶上层空气中的甲苯的初始含量,由于清液过滤也可能含有极少量的石油烃,在后期培养时,测定的甲苯降解率只是相对值。再分别取 0.5 g ^{12}C 和 ^{13}C 标记的甲苯标准品,分别加入到 1 L 培养基中,再分装为 50 mL 同时转入到 150 mL 无菌培养瓶中,再加入 50 mL 的复合菌液,以加菌液灭菌和不加菌液为对照,分别做多组重复,每次测定取样重复 5 次,培养 60 d。所用选择无机盐培养基: KH_2PO_4 5.0 g; K_2HPO_4 5.0 g; NH_4Cl 5.0 g; NaCl 1.0 g; MgCl_2 2.0 g; CaCl_2 0.1 g; L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g; 硫酸亚铁铵 0.5 g; 定容到 1 L; pH 值 7.0 ~ 7.2。

1.4 SIP 和 DGGE 分析方法

取 ^{12}C 和 ^{13}C 标记的甲苯处理培养液离心收集菌体 (12 000 r/min, 15 min), 除去杂质, 用 DNA 提取试剂盒提取菌液 DNA (Tiangen Biotech 公司)^[9]。再用等密度梯度离心法使 DNA 在氯化铯溶液中高速离心, 达到分离的目的^[10]。离心时氯化铯的初始密度为 1.692 g/mL, 并用手持折射仪矫正^[11]。上述提取的 DNA 2 mg 和 1.5 mL 溴化乙啶 (4 mg/mL, 对 DNA 进行染色以便观察)、200 mL CsCl TE 缓冲溶液充分混合。然后再取 0.2 mL 混合液和 4.8 mL 的氯化铯 TE 缓冲溶液在 5.1 mL 的快封离心管中准备离心。离心参数为 48 000 r/min, 离心时间 25 h, 温度 4 ℃。离心结束后在离心管底部用针刺穿, 然后以一定的流速通过蠕动泵在离心管顶部加入水, 在顶部形成恒定的压力, 这样底部的氯化铯溶液以恒定的速率流出, 收集不同密度的氯化铯溶液, 分装。再用聚乙二醇除去氯化铯, 回收 DNA 并用 70% 的乙醇冲洗, 保存在 4 ℃ 条件下备用^[11]。上述离心得到的 DNA 经 16SrDNA 基因的扩增, 采用引物 341F 和 534R, 使用的 PCR 仪器为 9700PCR^[12], 所用程序为 94 ℃ 5 min, 55 ℃ 60 s, 72 ℃ 1 min, 一共进行 35 个循环, 温度为 4 ℃。将扩增得到的 16SrDNA 进行 DGGE 分离, 仪器为 DCode System, 所用变性剂质量分数为 30% ~ 60%, 在电压 20 V 下电泳 30 min, 然后 150 V 下电泳 8 h, 温度为 60 ℃。然后切胶回收测序^[13], 得到序列后在数据库中比对, 以确定相似菌种^[14]。

1.5 石油烃的测定方法

采用红外分光光度测油仪时, 参照 GB/T16488

-1996, 首先将培养液转移到分液漏斗中, 然后酸化到 $\text{pH} \leq 2$, 用 CCl_4 洗涤 3 次, 加入 NaCl 振荡, 静置分层后, 取下层萃取液加入含有 Na_2SO_4 的玻璃砂心漏斗中, 并用真空泵抽滤; 与此同时, 对上层溶液在重复刚才的操作。然后将漏斗中的滤液转移到容量瓶中, CCl_4 定容。稀释一定倍数以后, 用红外分光测油仪确定石油烃含量^[15-16]。

1.6 甲苯的测定方法

每次取样时对培养瓶中的溶液进行萃取, 培养液加入 CS_2 , 然后常温下进行水浴振荡 2 h, 4 ℃ 保存过夜。用梨形漏斗收集下层有机相于三角瓶中, 对上层水相继续加入 CS_2 振荡 10 min, 重复 3 次, 将三角瓶中的有机相溶液用无水硫酸钠过滤并且进行减压蒸发, 用 CS_2 定容。而后进行甲苯回收率的检测, 配成甲苯的 0.5 g/L 的溶液, 振荡溶解, 然后稀释若干浓度梯度, 50 ℃ 过夜, 按照上述萃取方法进行萃取, 最后通过色谱检测甲苯, 计算回收率。用岛津 GC-2010 气相色谱仪测定甲苯含量。色谱柱为弹性石英毛细柱 (50 m × 0.2 mm × 0.5 μm), 检测器 FID 温度 180 ℃、进样口温度 150 ℃。先用甲苯标准溶液逐级稀释, 用色谱检测, 然后计算甲苯含量^[17]。

1.7 气相色谱和质谱连用的测定方法

GC-MS 分析。采用 Agilent 6890N 气相色谱/5975i 质谱联用仪。弹性石英毛细柱 (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。进样口温度 300 ℃, 程序升温初温 50 ℃ 进行 1 min, 以 20 ℃/min 的速度提升温度到 120 ℃, 再以 4 ℃/min 的速度升温到 250 ℃, 最后以 3 ℃/min 的速度升温到 310 ℃, 维持 30 min。质谱 EI 源, 70 eV, 照射灯丝电流 100 μA , 进行全扫描^[17-18]。

1.8 数据分析

采用 Origin8.0 画图软件, 数据分析采用 SPSS 统计软件, 采用标准差 (SD) 和最低显著性检验 (LSD) 比较和分析各组数据之间的差异。

2 结果分析

2.1 细菌降解石油烃的分析

通过油藏中的采出水富集培养石油烃降解菌, 从表 1 可以看出, 在培养初期 50 ~ 200 d, 石油烃降解率很低, 到 200 d 时, 达到 4.1%。从 250 d 开始, 石油烃降解率逐渐升高, 并在各个测量时间点的时候差异显著, 最终在 500 d 时达到 36.4%。直到 400 d 时开始有甲烷产生, 为 130.7 μmol ; 到 500 d 时, 甲烷产量为 201.2 μmol 。

有研究^[19]表明, 甲烷是石油烃降解的终端产

物。近年来有学者从油藏采出水中分离得到降解石油的菌群^[20]。这些菌群中包含有专门降解芳香烃的菌群^[21-22],可以为降解石油提供丰富的菌源。从图 1 和图 2 (0 ~ 90 min) 可以看出,饱和烃分布完整,且图 2 中从左到右大部分的饱和烃都被降解,表明这种降解菌的降解效果很理想。

2.2 细菌降解甲苯的分析

图 3 为¹²C 和¹³C 标记甲苯的降解情况。可以看出甲苯的降解率随着培养天数的增加而显著增加。其中¹³C 标记的甲苯处理的甲苯降解率在 60 d 达到 67%,而¹²C 标记甲苯处理的甲苯降解率,在 60 d 达到 69%,两种标记处理的甲苯降解率差异不显著。在培养瓶顶部空气中也未检出甲苯,说明甲苯没有挥发,完好地溶解于培养液中。对照处理的甲苯降解率为 0,说明甲苯的降解与培养基溶液无关。

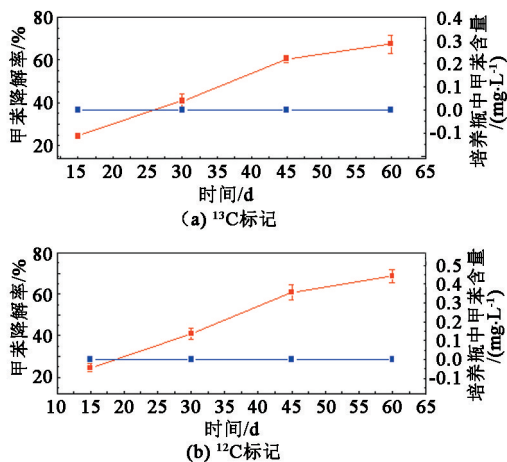


图 3 ¹²C 和¹³C 标记甲苯的降解

Fig.3 Degradation situation of ¹²C-toluene and ¹³C-toluene

2.3 降解¹²C 和¹³C 标记甲苯的细菌群落分析

由于不同轻重同位素组成的化合物具有相同的物理化学性质,所以细菌可以代谢它们来合成自身的物质(如 DNA 核酸)。用¹³C 标记的石油烃经过微生物菌群的降解合成了自身的¹³C-DNA,通过在氯化铯溶液中高速离心,就可以把¹³C-DNA 和¹²C-DNA 分开^[10]。重同位素取代轻同位素将导致其相对分子质量增加,所以在离心的时候就呈现出分离,¹²C-DNA 在上层,密度小,¹³C-DNA 在下层,密度大^[11]。本实验经过 60 d 的降解后提取菌液 DNA,在离心后收集到 1.64 ~ 1.73 g/mL DNA 的氯化铯溶液,然后进行 DGGE 分析,结果见图 4 和图 5。由图 4 看出,细菌降解¹²C 标记的甲苯时,在低密度中含有丰富的细菌群落,回收条带多,而在高密度中没有细菌群落,这与用普通的¹²C

标记甲苯进行培养相符。这是因为经过离心,¹³C-DNA 会在高密度中,¹²C-DNA 会在低密度中。细菌降解¹³C 标记的甲苯时,在高密度溶液中回收了大量条带,而在低密度溶液中回收的条带偏少。这是因为细菌降解了¹³C 标记的甲苯,形成¹³C DNA 在高密度溶液。所以在图 5 中,从高密度梯度中切胶(如红色箭头标明)回收¹³C-DNA,然后进行测序用于后期分析鉴定降解甲苯的细菌。有研究表明,通过碳源标记的方法,可以鉴定出降解特定化合物的细菌群落^[11]。

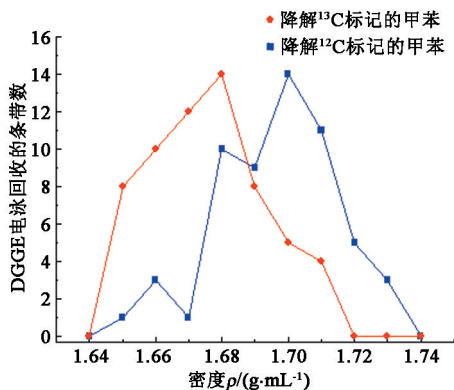


图 4 细菌降解¹²C 和¹³C 甲苯处理的 DGGE 电泳回收条带数

Fig.4 Bacterial degradation DGGE recovery bands of ¹²C-toluene and ¹³C-toluene treatments

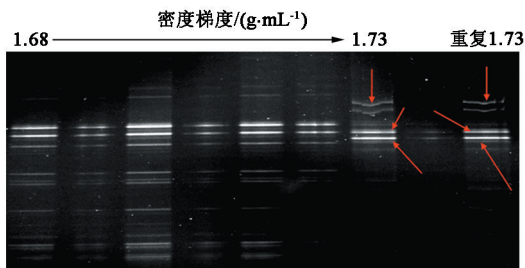


图 5 细菌降解¹³C 标记的甲苯处理的 DGGE 分析

Fig.5 Bacterial degradation DGGE analysis of ¹³C-toluene treatment

2.4 芳烃降解菌的鉴定分析

将高密度的¹³C DNA 条带回收送测序公司克隆测序,测出 3 株(a、b、c)该芳烃降解菌的序列,见表 2。通过 NCBI 数据库进行比对,从中得知相似度 92% 是 1 株降解氯苯的细菌和 1 株柴油降解菌,相似度 90% 的是 1 株高效石油烃降解菌。从中得知,本实验室培养的是高效石油烃降解菌,其中¹³C 标记甲苯培养时,从重密度溶液中分离得到芳烃降解菌条带,从而鉴别出了此芳烃降解菌的相似序列,可以在以后应用此菌群进行石油降解和生物修复。

表 2 芳烃降解菌的分析和鉴定

Table 2 Analysis and identification of aromatic hydrocarbon degrading bacteria

菌株条带	最相似序列名称	NCBI 数据库中的号码	相似度/%
a	Uncultured bacterium clone MES_rTCB90	AB275987.1	92
b	Uncultured bacterium clone B8259126_B04_015	GU216599.1	92
c	Uncultured Clostridia bacterium clone	HM992534	90

3 结 论

(1)从油田采出水中富集培养复合的石油烃降解菌群,在 500 d 对石油烃降解率达到 36.4% ,并且在 400 d 开始产气为 130.7 μmol。

(2)以¹³C 标记的甲苯为碳源和以¹²C 标记的甲苯培养菌群,经过 60 d 的培养,测得甲苯降解率分别为 67% 和 69%。

(3)通过回收高密度的¹³C-DNA,进行测序发现有 3 株相似序列,其中有 2 种石油烃降解菌,还有 1 种为氯苯降解菌。

参考文献:

[1] GIEG L M, DUNCAN K E, SUFLITA J M. Bioenergy production via microbial conversion of residual oil to natural gas [J]. Appl Environ Microbiol, 2008,74(10): 3022-3029.

[2] PHAM V D, HNATOW L L, ZHANG S, et al. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods [J]. Environ Microbiol, 2009,11(1):176-187.

[3] GRAY N D, SHERRY A, LARTER S R, et al. Biogenic methane production in formation waters from a large gas field in the North Sea [J]. Extremophiles, 2009,13(3): 511-519.

[4] DUNCAN K E, GIEG L M, PARISI V A, et al. Biocorrosive thermophilic microbial communities in Alaskan north slope oil facilities [J]. Environ Sci Technol, 2009,43(20):7977-7984.

[5] JONES D M, HEAD I A, GRAY N D, et al. Crude oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs [J]. Nature, 2008,451(7175):176-180.

[6] BAMFORTH S M, SINGLETON I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions [J]. Journal Chemical Technology Biotechnology, 2005,80(7):723-736.

[7] CHEN Y, MURRELL J C. When metagenomics meets

stableisotope probing: progress and perspectives [J]. Trends in Microbiology, 2010,18(4):157-163.

[8] XIA W, ZHANG C, ZENG X, et al. Autotrophic growth of nitrifying community in an agricultural soil [J]. The ISME Journal, 2011,5(7):1226-1236.

[9] GU G Zh, LI Z, ZHAO D F, et al. Isolation and characterization of a thermophilic oil-degrading bacterial consortium [J]. China Petroleum Processing and Petrochemical Technology, 2013,15(2):82-90.

[10] FREITAG T E, CHANG L, PROSSER J I. Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater marine gradient [J]. Environ Microbiol, 2006,8(4):684-696.

[11] ZHANG L M, OFFREA P R, HE J Zh, et al. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea [J]. PNAS, 2010,107(40):17240-17245.

[12] KE S Z, ZHANG M, SHI Z, et al. Phenol degradation and microbial characteristics in up flow anaerobic sludge blanket reactors at ambient and mesophilic temperatures [J]. International Journal of Environment and Pollution, 2008,32(1):68-77.

[13] WATANABE K, KODAMA Y, HARAYAMA S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001,44(3):253-262.

[14] 李政,赵朝成,张云波,等. 16 种 EPA-PAHs 复合污染土壤的菌群修复[J]. 中国石油大学学报(自然科学版), 2012,36(1):175-181.

LI Zheng, ZHAO Chaocheng, ZHANG Yunbo, et al. Bioremediation of 16 EPA-PAHs combined contaminated-soil with microbial consortium [J]. Journal of China University of Petroleum (Edition of Natural Science), 2012,36(1):175-181.

[15] MISHRA S, JYOT J, KUHAD R C, et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil [J]. Applied Environmental Microbiology, 2001,67(4):1675-1681.

[16] 刘春爽,赵东风,吴文华,等. 芦苇修复新疆石油污染土壤效果[J]. 中国石油大学学报(自然科学版), 2012,36(2):186-190.

LIU Chunshuang, ZHAO Dongfeng, WU Wenhua, et al. Phytoremediation of petroleum contaminated soil by reed in Xinjiang [J]. Journal of China University of Petroleum (Edition of Natural Science), 2012,36(2):186-190.

[17] 吴伟林. 石油烃厌氧降解菌的筛选及其降解特性研

究[D]. 青岛: 中国石油大学, 2011.

WU Weilin. Study on the screening and degrading characteristics of anaerobic hydrocarbon degrading bacteria [D]. Qingdao: China University of Petroleum, 2011.

[18] MCFARLIN K M, PRINCE R C, PERKINS R, et al. Biodegradation of dispersed oil in arctic seawater at -1 °C [J]. Plos One, 2014,9:e84297.

[19] GROSSI V, CRAVO L C, GUYONEAUD R, et al. Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: a summary [J]. Organic Geochemistry, 2008,39(8):1197-1203.

[20] AITKEN C M, JONES D M, LARTER S R. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs [J]. Nature, 2004,431(7006):291-294.

[21] SAYARA T, POGNANI M, SARR M, et al. Anaerobic degradation of PAHs in soil: impacts of concentration and amendment stability on the PAHs degradation and biogas production [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2010,64(4):286-292.

[22] DOU J, LIU X, HU Z, et al. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008,151(2/3):720-729.

(编辑 刘为清)