

一株茶碱降解菌的分离和鉴定^{*}

许玫英^{1 2 3} 岑英华^{2 3} 邓穗儿^{2 3} 孙国平^{2 3**}

(¹ 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

(² 广东省微生物研究所 广州 510070)

(³ 广东省菌种保藏选育重点实验室 广州 510070)

摘 要: 从制药废水生物处理系统的活性污泥中经富集分离到一株能以茶碱作为唯一碳、氮源生长的茶碱降解菌 Ten3, 该菌株可以利用茶碱的最高浓度为 3 000 mg/L。当茶碱浓度为 1000 mg/L 时被彻底降解的时间仅需 48 h。Ten3 菌株降解茶碱的最适 pH 为 8.0。K⁺ 是该菌株降解茶碱的必需元素。采用 16S rDNA 序列分析及传统的生理生化特征鉴定法对该菌株进行鉴定, 结果表明, Ten3 的 16S rDNA 的核苷酸序列与善变副球菌 (*Paracoccus versutus*) ATCC 25364 的同源性为 99.7%, 在细菌系统发育分类学上属于变形菌 α 亚类, Rhodobacter 组, 副球菌属, 善变副球菌。

关键词: 茶碱, 生物降解, 16S rDNA, 善变副球菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2002)05-0526-08

茶碱为甲基黄嘌呤类衍生物, 普遍存在于茶叶、咖啡、可可等食品中。在临床医学上, 茶碱以其具有强心利尿、促进支气管舒张、抗炎和免疫调节等作用而被广泛应用。随着医药方面需求量的增长, 以及含茶碱食品在食品工业中的广泛应用, 在工业废水中茶碱的污染也越来越严重。大量的研究也表明, 茶碱的生物安全性较窄, 当血药浓度超过 20 mg/L 时, 易产生不良反应, 甚至造成死亡^[1-3]。由此可见, 有必要寻找快速、有效地消除环境中的茶碱的方法。但目前国内外对于这方面的污染问题的治理并没有相关的报道。本研究从某制药厂废水处理系统的活性污泥中分离到一株能以茶碱为唯一碳、氮源生长的茶碱高效降解菌株, 并研究了该菌株降解茶碱的特性。随着分子生物学的发展, 人们逐渐认识到单靠菌株的常规生理生化特征为指标, 而缺乏基因水平的数据作支持, 已不足以对细菌鉴定提供充分有力的证据^[4]。16S rDNA 序列分析法已被广泛地应用于分子系统发育分类学研究中^[5]。本研究同时采用 16S rDNA 序列分析法和传统的菌种生理生化特征鉴定法对该菌株进行鉴定, 确定了 Ten3 在系统分类学上的准确地位。

1 材料和方法

1.1 样品

试验所用样品采自广州某制药厂废水生物处理系统中的活性污泥。

^{*} 广东省自然科学基金资助项目

^{**} 通讯联系人

作者简介: 许玫英(1974-), 女, 广东省饶平县人, 广东省微生物研究所助理研究员, 中国科学院武汉病毒研究所在职硕士研究生, 主要从事环境生物工程研究。

收稿日期: 2001-12-05, 修回日期: 2002-01-25

1.2 培养基

以茶碱为唯一碳、氮源的培养基: K_2HPO_4 1.6 g, KH_2PO_4 0.4 g, MgSO_4 0.06 g, FeSO_4 3 mg, CaCl_2 1 mg, CuSO_4 0.05 mg, ZnSO_4 0.05 mg, HBO_3 0.03 mg, 茶碱 1 g, 定容至 1 L, pH7.0。

以茶碱为唯一碳源的培养基:在上述培养基的基础上每升添加 NH_4Cl 1.0 g。

1.3 菌种的驯化、分离和纯化

将采集到的污泥接种于上述两种培养基, 30℃ 摇床培养, 以一周为一驯化周期, 观察生长情况。当培养基出现浑浊时, 稀释涂布于上述培养基平板上, 挑取单菌落, 接种于上述培养基斜面。

1.4 细菌生长的测定

以波长 600 nm 处的浊度表示。

1.5 茶碱的测定

紫外分光光度法:以波长 274 nm 处的浊度表示^[6]。

高压液相色谱法(HPLC):C18 柱, 测定波长为 271 nm, 流动相为甲醇:水 = 28:72, 流速为 1.0 mL/min, 茶碱的停留时间约为 5.3 min。

1.6 不同 pH 培养基的配制

采用 Na_2HPO_4 — KH_2PO_4 缓冲液(1/15 mol/L)配制以茶碱为唯一碳、氮源的培养基, pH 分别为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0。

1.7 细菌总 DNA 的提取

采用 SDS-蛋白酶 K 裂解, 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀细菌碎片和多糖, 再用异丙醇沉淀提取总 DNA^[7]。

1.8 PCR 引物

采用细菌 16S rDNA 通用引物 F27(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 R1522(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')^[8]。

1.9 PCR 扩增

PCR 扩增体系总体积为 100 μL :超纯水 73.5 μL , 10 $\times$ PCR buffer 10 μL , 2.0 mmol/L dNTP 8 μL , F27 引物 2 μL , R1522 引物 2 μL , 1 U/Taq 酶 2.5 μL , 总 DNA 稀释 50 倍后取 2 μL , 反应为 35 个循环, 其中, 94℃ 变性 20s, 52℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 3min, 35 个循环后延伸 10min, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外凝胶成像系统分析结果。

1.10 16S rDNA 的测序和同源性比较

PCR 扩增产物由欧瑞卡生物技术公司直接测序。测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行同源性比较。

2 结果和讨论

2.1 茶碱降解菌的分离和筛选

通过半年多时间的驯化、富集、筛选, 分别得到两株以茶碱为唯一碳源生长的细菌和三株以茶碱为唯一碳、氮源生长的细菌, 在同一培养条件下培养 48 h 后, 比较这些菌株及其混合菌群的生长情况及对茶碱的降解情况(表 1)。混合菌对茶碱降解的迟滞期比单菌落短得多, 培养 24 h 的时候, 降解率已达到 50% 左右, 但从对茶碱降解的彻底性来看, 菌

株 Tcn3 对茶碱达到彻底降解所需的时间是最短的。由此确定 Tcn3 为优势菌株。

表 1 细菌的生长情况及对茶碱的降解

Table 1 The growth of Tcn3 and the biodegradation of theophylline

Type of medium	Strain	24 h			48 h		
		OD ₆₀₀	Relative concen. of theophylline/ (mg/L)	Degradation rate/ %	OD ₆₀₀	Relative concen. of theophylline/ (mg/L)	Degradation rate/ %
Theophylline as the carbon and nitrogen source	Group 1 of rich gather	0.1427	496	50.4	0.2009	24	97.6
	Tcn1	0.1717	884	11.6	0.2492	520	48
	Tcn2	0.0667	1000	0	0.1085	944	5.6
	Tcn3	0.1861	776	22.4	0.3333	0	100
Theophylline as the sole carbon source	Group 2 of rich gather	0.0904	558	44.2	0.1419	160	84.0
	Tc1	0.1849	356	64.4	0.2192	146	85.4
	Tc2	0.2535	572	42.8	0.3698	106	89.4

2.2 菌株 Tcn3 降解茶碱特性的研究

2.2.1 pH 的影响 将 Tcn3 接种于 pH 分别为 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0 培养基中,在 30℃、150 r/min 条件下摇床培养 30 h 取样测定菌体的生长情况(图 1),结果表明 Tcn3 菌株细胞生长的最适 pH 为 8.0,在该 pH 条件下,Tcn3 达到最大的生长量,对茶碱的降解率也达到最高。菌株 Tcn3 生长的 pH 范围很宽,无论培养基最初 pH 小于 6.0 或大于 11.0,菌株 Tcn3 经过一段迟滞期之后,可以将培养基的 pH 调节为接近中性,菌株均可快速繁殖。

2.2.2 K⁺ 对 Tcn3 生长的影响 在研究不同 pH 对 Tcn3 生长的影响情况的过程中,发现在不含有 K⁺ 的磷酸钠盐缓冲系统中,菌株在所有的 pH 条件下的生长均受到严重的抑制,当向系统中加入少量的 KCl 后,菌株又恢复到原有的活性。为了进一步验证 K⁺ 在 Tcn3 生长过程中的重要性,配制 pH 相同的无钾磷酸钠盐培养基,并向其中的一组培养基加入 0.2% 的 KCl,30℃、150 r/min 摇床培养观察菌株的生长情况,结果如图 2 所示。在含有

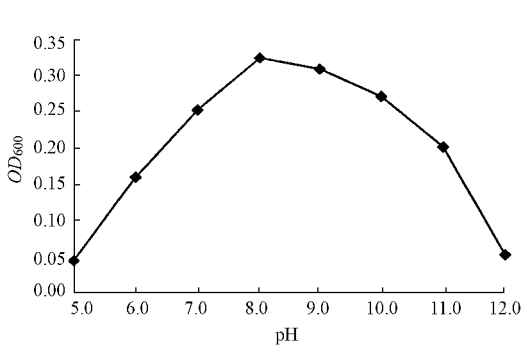


图 1 pH 对茶碱降解的影响

Fig.1 Effect of pH on theophylline degradation

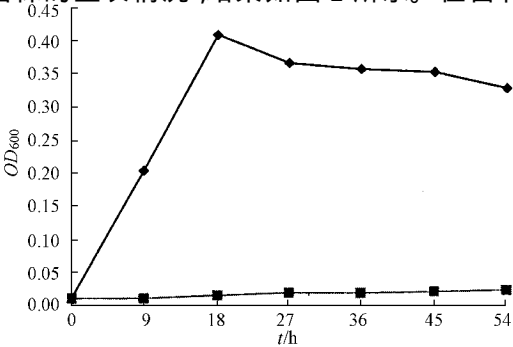


图 2 K⁺ 对 Tcn3 生长的影响

Fig.2 Effect of K⁺ on the growth of Tcn3

—◆— with K⁺ ; —■— without K⁺ .

K⁺的培养基中,Tcn3 的生长量远高于在不含有 K⁺的培养基中的生长量。而用于 Tcn3 的筛选、驯化的培养基中并不含有 Na⁺,由此可见在 Tcn3 的生长中 K⁺是必需元素,Na⁺则是非必需元素。

2.2.3 不同茶碱浓度对菌株 Tcn3 细胞生长及降解茶碱动力学的影响 :以 10%的接种量将 Tcn3 菌株接种到含不同茶碱浓度的培养基中,在 30℃、150 r/min 摇床培养,测定细菌的生长和对茶碱的降解情况(图 3 A)。当茶碱的浓度由 500 mg/L 增加到 3 000 mg/L 时,Tcn3 达到最大生长量及降解率的时间也随着延长,同时细胞的最大生长量也随着茶碱浓度的提高而增加,而当茶碱浓度达 4 000mg/L 时,细胞基本不能生长,底物抑制作用非常明显,对茶碱的降解率也非常低,这说明了 Tcn3 菌株对茶碱的降解负荷量最高不宜超过 3 000 mg/L。

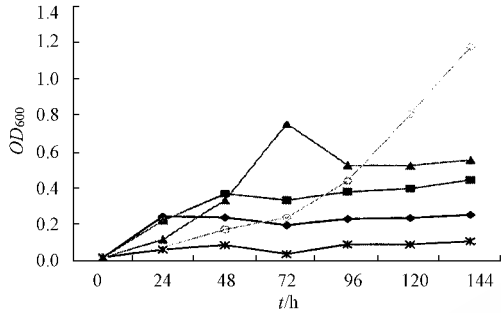


图 3 不同茶碱浓度对 Tcn3 生长的影响

Fig.3 Effect of different concentration of theophylline on the growth of strain Tcn3

◆ 500 mg/L ; ■ 1 000 mg/L ; ▲ 2 000mg/L ;
○ 3 000 mg/L ; ✱ 4 000 mg/L.

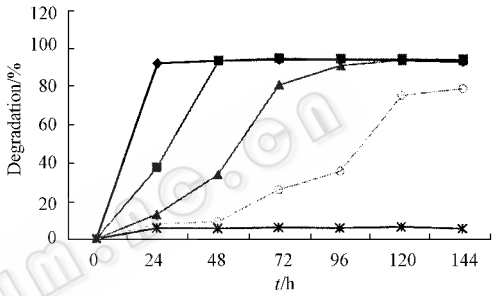


图 4 不同茶碱浓度对菌株 Tcn3 降解茶碱的影响

Fig.4 Effect of different concentration of theophylline on the growth of strain Tcn3

◆ 500 mg/L ; ■ 1 000 mg/L ; ▲ 2 000mg/L ;
○ 3 000 mg/L ; ✱ 4 000 mg/L.

2.2.4 菌株 Tcn3 生长细胞降解茶碱的动力学 :以茶碱为唯一碳、氮源,在 30℃、150 r/min 条件下摇床培养不同时期取样测定菌体的生长情况和培养基中茶碱的残留浓度,结果表明(图 5)Tcn3 菌株细胞的生长和对茶碱的降解是同步的,菌株生长的迟滞期很短,在摇床培养 24 h 后菌量得到迅速增长,这时菌株对茶碱的降解率也达到 72.68%,到 48 h 后菌株基本上达到最大的生长量,培养基中检测不到茶碱的存在,这一结果也已通过 HPLC 进一步得到证实(图 6~8),随着培养时间的延长,茶碱(停留时间约为 5.3min)的峰面积逐渐变小,48 h 时茶碱峰已完全消失。由于茶碱的完全消耗,Tcn3 菌株没有碳、氮源的供应,细胞自溶,这时进一步培养,培养液的浊度将下降。

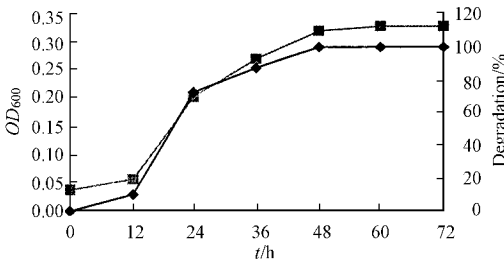


图 5 菌株 Tcn3 对茶碱的降解情况

Fig.5 The growth and degradation curve of Tcn3

■ OD₆₀₀ ; ◆ degradation.

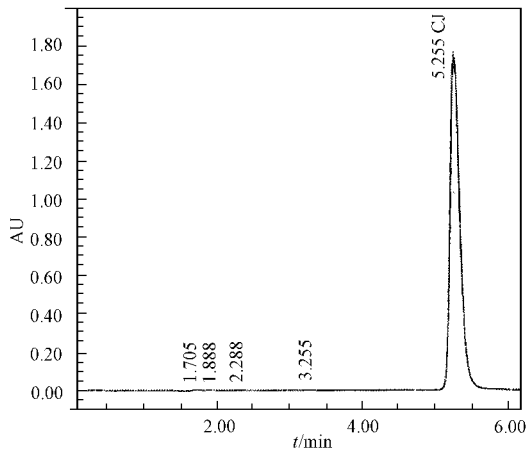


图 6 0 h 时茶碱的 HPLC 降解曲线

Fig.6 HPLC analysis of theophylline degradation
by Tcn3 in 0 h

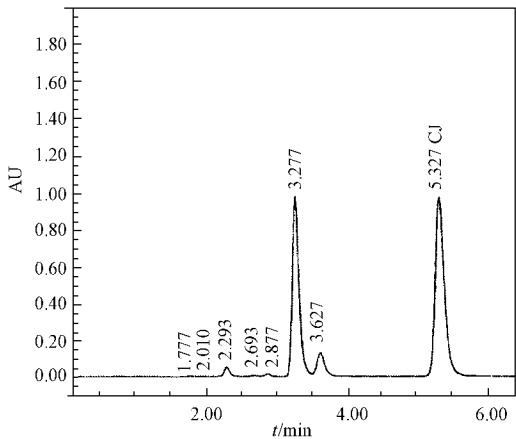


图 7 24 h 时茶碱的 HPLC 降解曲线

Fig.7 HPLC analysis of theophylline degradation
by Tcn3 in 24 h

2.3 Tcn3 生理鉴定

采用梅里埃 (API) 细菌鉴定系统 根据 Tcn3 菌株的菌落形态、染色反应、氧化酶反应 , 以及生理生化特征 结果显示菌株 Tcn3 与洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)的相似度达到 94.1%。

2.4 Tcn3 16S rDNA 序列分析及其同源性比较

以 Tcn3 总 DNA 为模板 利用对细菌 16S rDNA 特异的引物 F27 和 R1522 进行 PCR 扩增 得到长约 1.5kb 的 PCR 扩增产物 (图 9) ,将该产物直接进行序列测定(图 10) ,该核苷酸序列已被 GenBank 收录 ,登录号为 AF437875。

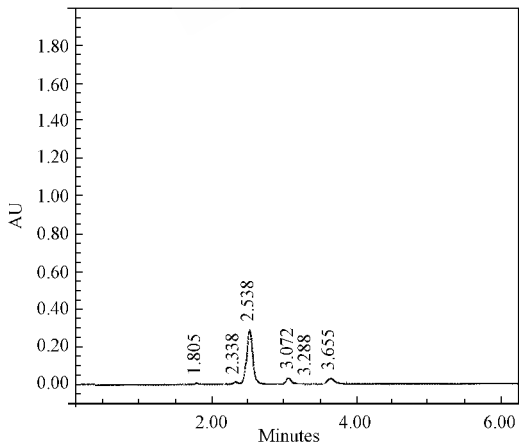


图 8 48 h 时茶碱的 HPLC 降解曲线

Fig.8 HPLC analysis of theophylline degradation
by Tcn3 in 48 h

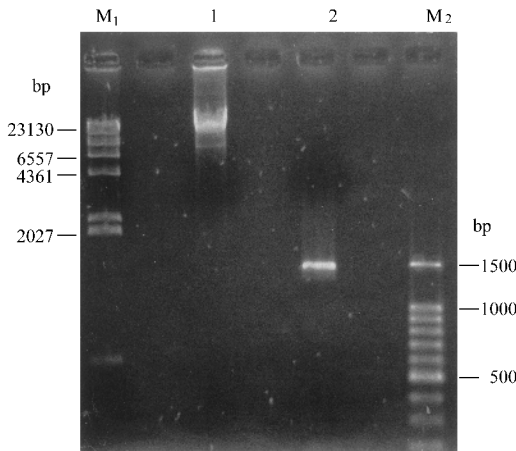


图 9 Tcn3 的总 DNA 及 16S rDNA 扩增带谱

Fig.9 The total DNA of Tcn3 and 16S rDNA PCR
amplified spectrum

M₁ : λDNA/ Hind III ; 1. Tcn3 total DNA ;

用 BLAST 程序对 Tcn3 的 16S rDNA 序列和 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较,结果发现与多株副球菌属的 16S rDNA 序列的同源性达到 99% 以上,其中与已报道的善变副球菌 ATCC 25364 的同源性达到 99.7%。

GGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCACCTTCGGGTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGAATATGCCCTTT
GGTACGGAATAGTCCTGGGAACTGGGGGTAATACCGTATGCGCCCTTCGGGGGAAAGATTATCGCCAAAGGATTAGCCC
GCGTTGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGCCGACGATCCATAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGGGCAACCCTGATCTAGC
CATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGCTGGGAAGATAATGACGGTACCAGCAGAAGAAG
CCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GTAGGCGGACCGGAAAGTTGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTCAAACTATCGGTCTGGAGTTC
GAGAGAGGTGAGTGGAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCA
CTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAATGCCAGTCGTCGGGCAGCATGCTGTTCCGTTGACACACCTAACGGATTAAGCATTCGCGCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGATTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGCAGAA
CCTTACCAACCCTTGACATCCCAGGACCGGCCGAGACGGGTCTTTCACCTTCGGTGACCTGGAGACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTCCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTTCCAGTTGCCATCATTTGGT
TGGGCACTCTGGAAGAACTGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGTTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGTTAATCCCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTC
GACCCCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAACAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC
CCGTACACCATGGGAGTTGGGTCTACCCGACGGCGTGCGCTAACCAGCAATGGGGGCAGCGGACCACGGTAGGCTCA
GCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAT

图 10 Tcn3 16S rDNA 核苷酸序列

Fig.10 The sequence of 16S rDNA fragment of Tcn3

2.5 Tcn3、善变副球菌和 *Burkholderia cepacia* 的特性比较

为了进一步明确 Tcn3 在细菌分类学上的地位,根据 *Burkholderia cepacia* 和善变副球菌的生理生化特征,增加了菌株对甲醇的利用和对硫代硫酸钠的利用等试验,并从细胞形态及其生理生化特征等方面,将菌株 Tcn3 与 *Burkholderia cepacia*^[9] 和善变副球菌的模式菌株 ATCC 25364^[10,4] 进行比较,结果如表 2 所示。*Burkholderia cepacia* 与善变副球菌无论是在菌体特性还是在对底物的利用上都存在很多相似之处。两者最大的区别在于反硝化作用,以及对甲醇、硫代硫酸钠、尿素和色氨酸的利用上。

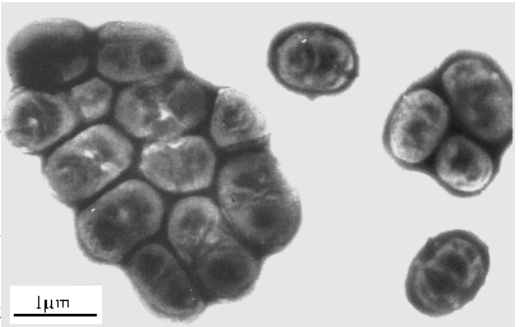


图 11 菌株 Tcn3 的电镜照片

Fig.11 Electronmicrograph of Tcn3

菌株 Tcn3 在营养琼脂上的菌落为乳白色、不透明的圆形凸起 ,培养 48 h 后菌落的直径为 2 mm ~ 3 mm ,最适生长温度为 30℃ ~ 37℃ ,生长的 pH 范围很宽 ,最适 pH 为 pH8.0 ,菌体为短杆状 ,不具鞭毛 ,单个、成对或堆状存在 (图 11) ,这些性状与副球菌属的很多种类类似。从底物的利用情况看来 ,除了在甲醇的利用能力上有微弱的差异外 ,Tcn3 与善变副球菌极其相似 ,而与 *Burkholderia cepacia* 则存在一定的差距。Tcn3 与善变副球菌一样都为混合营养型 ,既能利用甲醇等一碳化合物作为碳源和能源进行生长 ,又能利用 Na₂S₂O₄ 等进行化能自养 ,同时又能广泛地利用有机物进行化能异养。也就是说 Tcn3 在分子系统发育分类学上的地位属于副球菌属 ,善变副球菌。

善变副球菌 Tcn3 既能行甲基营养生长 ,又能行化能自养生长和化能异养生长 ,具有利用广泛碳源和能源的能力 ,是一种能在多种贫劣的环境下顽强生存的细菌在国内尚属首次报导 ,这些基础的研究工作对于利用微生物技术治理环境污染具有较高的研究和应用价值。

表 2 Tcn3、善变副球菌和 *Burkholderia cepacia* 的特征比较

Table 2 The differentiation of Tcn3 , <i>Paracoccus versutus</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>			
Characteristic	Tcn3	<i>Paracoccus versutus</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Motility	-	- / + *	+
Cell shape	rod	rod	rod
Gram reaction	-	-	-
Poly-β-hydroxybutyrate accumulated	+	+	-
Denitrification	+	+	+
Growth factors	-	-	-
Utilization of :			
D-glucose	+	+	+
D-galactose	+	+	+
Maltose	+	+	-
Sucrose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Mannitol	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
L-malate	+	+	+
Benzoate	+	+	+
Methanol	+	w	-
Na ₂ S ₂ O ₃	+	+	-
Urea	-	-	+
L-tryptophan	-	-	+

+ . Utilized ; - . Not utilized ; w. Weak growth ; * . Only one.

参 考 文 献

[1] Stavric B. *Food Chem Toxicol* ,1988 **26** (6) :541.
[2] Stavric B. *Food Chem Toxicol* ,1988 **26** (8) :725.
[3] 李志婷 徐力东.现代中西医结合杂志 2000 **9** (11) :1046.
[4] Katayama Y , Hiraishi A , Kuraishi H. *Microbiology* ,1995 **141** :1469 ~ 1477.
[5] Vandamme P , Pot B , Gillis M , *et al* . *Microbiol Reviews* ,1996 **60** :407 ~ 438.
[6] 张国华 王永金.沈阳药学院学报 ,1994 **11** (4) :257.
[7] Zhou J Z , Bruns M A , Tiedje J M. *Appl Environ Microbiology* ,1996 **62** (2) :316 ~ 322.
[8] Edwards U , Rogall T , Blocker H , *et al* . *Nucleic Acids Research* ,1989 **17** (19) :7843 ~ 7853.
[9] Holt J G , Krieg N R , Sneath P H A , *et al* . *Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology* (9 edition). Baltimore :The Williams & Wilkins Co. ,1994. 151.
[10] Harrison A P JR. *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1983 **33** (2) :211 ~ 217.

Isolation and Identification of a Theophylline-degrading Bacterial Strain

Xu Meiying^{1 2 3} , Cen Yinghua^{2 3} , Deng Shuier^{2 3} , Sun Guoping^{2 3}

¹ Wuhan Institute of Virology , Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430071 , China)

(² Guangdong Institute of Microbiology , Guangzhou 510070 , China)

(³ Guangdong Provincial Laboratory of Microbial Culture Collection and Breeding , Guangzhou 510070 , China)

Abstract : Bacterial strain Tcn3 was isolated from the activated sludge of a pharmaceutical wastewater treatment system , which could grow with theophylline as the sole source of carbon and energy. The maximum concentration of theophylline degraded by Tcn3 is 3 000mg/L. When the concentration of theophylline is 1 000mg/L , a complete degradation only needs 48h. For Tcn3 degrading theophylline , the optimal pH is 8.0 and K⁺ is the necessary element. The sequence analysis of a 1 500bp 16SrDNA fragment amplified from total DNA of strain Tcn3 and the traditional identification methods was used to identify Tcn3. The results showed that Tcn3 shares 99.7% 16S rDNA sequence homology with *Paracoccus versutus* type strain ATCC 25364. In phylogenetic framework of bacterial classification , Tcn3 belongs to proteobacteria ; alpha subdivision ; Rhodobacter group : *Paracoccus versutus* .

Key words :Theophylline , Biodegradation , 16S rDNA , *Paracoccus versutus*

《微生物学报》第八届编辑委员会

主 编 李季伦
副主编 谭华荣 陆德如 王敖全 徐建国 曲音波
编 委 田 波 翟中和 范云六 陈永青 朱宝泉 诸葛健
杨苏声 钱世钧 陆承平 黄 力 唐 宏 东秀珠
谢 红 蔡永峰 郑天凌 郭 俊 胡福全 胡远扬
邵一鸣 王 平 闵 航 程 池 盛 军