

丛毛鞣丸酮单胞菌 ZD 4-1 和铜绿假单胞菌 ZD 4-3 降解芳香烃化合物的机理

刘 和 吴坚阳 陈英旭*

(浙江大学环境工程系 杭州 310029)

摘 要 从某农药厂二沉池污泥中筛选分离得到两株革兰氏阴性的芳香烃降解菌 ZD4-1 和 ZD4-3。经鉴定,它们分别属于 *Comamonas testosteroni* 和 *Pseudomonas aeruginosa*。基于 16S rDNA 序列的系统分类分析,结果表明,在分类地位上菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 分别属于两个不同的分类亚组。苯酚降解产物紫外光谱扫描和双加氧酶检测证明,菌株 ZD4-1 利用邻裂途径降解苯酚,而 ZD4-3 则通过间裂途径降解苯酚,邻裂途径的 1,2-双加氧酶和间裂途径的 2,3-双加氧酶都是可诱导的双加氧酶,其活性强烈的依赖于降解底物的出现。芳香烃降解试验结果表明,邻裂和间裂两种途径的降解性能不一样,虽然 ZD 4-3 降解苯酚的效率要高于菌株 ZD4-1,但是 ZD4-1 降解苯酚的 pH 值范围以及芳烃利用基质谱宽于后者。

关键词 芳烃化合物,苯酚,生物降解,邻裂途径,间裂途径,双加氧酶

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)01-0107-04

芳香烃类污染物是一类难降解污染物,尽管如此,自然界的微生物在长期的进化过程中,逐渐对环境中芳香烃类污染物产生了适应能力,并能够降解此类污染物。大量研究表明,尽管微生物对芳香烃的降解途径多样,但是它们大多数都要形成几种共同的中间代谢产物,即邻苯二酚或取代邻苯二酚,然后通过 1,2-双加氧酶(Catechol 1,2-dioxygenase)催化的邻裂途径或者 2,3-双加氧酶(Catechol 2,3-dioxygenase)催化的间裂途径裂解开环,并最终进入三羧酸循环^[1,2]。研究证实,苯环裂解开环步骤是芳香烃类污染物生物降解过程中的一个重要步骤,在苯、甲苯、二甲苯及苯甲酸等许多种芳香烃的降解过程中,催化邻苯二酚邻裂或间裂开环的双加氧酶甚至起到限速酶的作用^[3]。

为了解决日益严重的环境污染问题,人们一直致力于研究微生物对芳香烃类污染物的降解机理,构建高效的基因工程菌为提高芳香烃类污染物的降解效率提供了崭新的前景^[4,5],但这需要对芳香烃的生物降解机理、限速步骤、降解基因定位以及克隆等背景知识有着详细、全面地了解。目前人们已经并正在对微生物降解芳香烃的降解途径、降解基因等机理进行深入、细致的研究^[6,7]。本文以苯酚作为唯一的碳源和能源,从农药厂的二沉池污泥中分离到两株分别以邻裂和间裂途径降解芳香烃化合物的细菌,系统地研究了两株菌的降解途径以及这两种降解途径的降解效率等降解机理,希望为高效基因工程菌的构建提供基础依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基 无机盐培养基(MS):每升含 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, KH_2PO_4 0.68 g, K_2HPO_4 1.73 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, NH_4NO_3 1.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g,调 pH 为 7.0。必要时加入相应浓度的苯酚,LB 培养基:每升含胰蛋白胨 10g,酵母抽提物 5g,NaCl 10g, pH 7.0~7.2。

1.1.2 主要试剂和仪器 :Taq 酶以及生化试剂购自上海生物工程有限公司,PCR 产物纯化试剂盒购自上海博雅生物技术有限公司。除特别提及外,试验中所用试剂均为分析纯。主要的分析仪器有高效液相色谱(HPLC, Agilent, 1100),总有机碳测定仪(TOC, Apollo 9000),紫外-可见分光光度计(Shimadzu, uv-1206)。

1.2 芳香烃降解菌的分离和纯化

从某农药厂二沉池污泥中采集污泥样品,称取 1g 污泥置于预先灭菌的 250mL 的锥形瓶中,加入 100mL 苯酚浓度为 500mg/L 的无机盐培养基,棉塞盖好后,30℃ 摇床振荡培养 3d。然后转接 10%(10mL)到含相应浓度的酚无机盐培养液中,继续振荡培养。按此方式转接 4 次,直到培养液由澄清变浑浊。吸取 0.1mL 培养液稀释涂布到酚浓度为 500mg/L 的琼脂糖平板上,30℃ 培养 24 h。待菌落长好后,从培养平板上选取几株长势良好、在营养培养基固体平板上反复划线分离纯化,分离得到 3~5 株细菌,将两株长势较好的细菌分别命名为 ZD4-1 和 ZD4-3。

1.3 菌株的系统发育学分析

抽提细菌总 DNA,应用细菌通用引物对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增、测序^[8]。引物的序列分别为:BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 BSR1541/20: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。50μL 反应体系包括:ZD4-3 菌基因组 DNA 模板 1μL(100ng/μL),10× Buffer 5μL, MgCl_2 (25mmol/L)

* 通讯作者。Tel 86-571-86971411, Fax 86-571-86971898, E-mail: jxchen@zju.edu.cn

作者简介:刘 和(1974-)男,江西省吉安人,博士生,主要研究方向为环境生物技术。E-mail: liuhe@zju.edu.cn

收稿日期:2003-03-28,修回日期:2003-08-29

3μL dNTP(5mmol/L)2μL 正向引物和反向引物各(20mmol/L) 1μL ,Taq 酶 2.5 U ,重蒸水 37.5 μL。循环参数为 :94℃ 2min ; 94℃ 1min 58℃ 1min 72℃ 2min ,循环 29 次 72℃ 10min。PCR 产物经 PCR 纯化试剂盒纯化后备用。引物合成以及 PCR 产物测序均由上海博雅生物技术有限责任公司完成。

在 GenBank 中搜索得到 16 株细菌的 16S rDNA 序列作为构建系统发育树的参比菌株。应用系统发育分析软件 PHYLIP3.6 进化树生成软件 Treeview 构建进化树。

1.4 细菌对苯酚的降解试验

将菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 分别接种在酚浓度为 500mg/L 的酚无机盐培养基中 ,恒温摇床内 30℃ 振荡培养 ,每隔 12 h 取样一次 ,分别测定降解液中苯酚残留浓度 ,总有机碳(Total organic carbon ,TOC)残留浓度以及降解液在 600nm 波长下的光密度。

1.5 细菌对其它芳香烃类污染物的利用实验

选取具有代表性的芳香族化合物 ,包括含卤素的 2,4-二氯酚、五氯酚(化学纯) ,含硝基取代基的对硝基苯酚 ,含多个环的萘、蒽、菲。分别制作只含这些化合物(浓度约为 50mg/L) 为唯一碳源和能源的无机盐培养基琼脂平板 ,将经苯酚诱导和未诱导的菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 分别接种到平板上 ,定性观察细菌的生长情况。

1.6 双加氧酶活性测定

粗酶提取液的制备 :将菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 分别接种在 LB 培养基中 30℃ ,150 r/min 摇床振荡培养过夜。培养液在 10000 r/min 4℃ 离心 10min ,沉淀物以冰冷的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.5)清洗两次 ,然后重悬。将悬浮液在冰水浴条件下超声波破碎 ,循环 99 次 ,每次 3 s ,振荡 3 s ,功率 120W。悬浮液在 12000 r/min 4℃ 离心 30min ,得到的上清液为粗酶提取液。邻苯二酚 2,3 双加氧酶和邻苯二酚 1,2 双加氧酶的活性检测参照文献 [1] ,在 25℃ 条件下每分钟生成 1μmol 产物所需要的酶的量定义为 1 个活性单位。

蛋白质浓度的测定采用 Brad-ford 法 [9] ,用小牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.7 苯酚降解液的扫描

将菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 的磷酸缓冲液(菌浓度约为 1~3 × 10⁹ /mL)加入到酚浓度为 500mg/L(1000mg/L)的无机盐培养中 ,震荡培养 5h 后 10000r/min 离心 ,取上清液进行紫外-可见光谱扫描。

1.8 苯酚以及总有机碳测定方法

苯酚的测定采用高效液相色谱法 ,TOC 的测定采用 TOC 测定仪进行。

2 结果和讨论

2.1 细菌的分离和鉴定

经过富集、筛选 ,得到数株苯酚降解菌 ,挑选降解效果较好的两株菌 ZD4-1 和 ZD4-3 作进一步研究。菌株 ZD4-1、ZD4-3 均为革兰氏染色阴性杆菌。ZD4-3 在 LB 培养基上能产生墨绿色色素。电镜下 ,ZD4-1 呈杆状或椭圆形 ,极生或者两端生有一根或者数根鞭毛 ,分离菌大小为(0.6μm ~ 0.8μm) ×(1.2μm ~ 1.7μm) ,ZD4-3 在电镜下呈短杆状或椭圆形 ,无鞭毛 ,菌体大小为(0.5μm ~ 0.6μm) ×(0.8μm ~ 1.1μm) ,图 1 为两株菌的电镜照片。

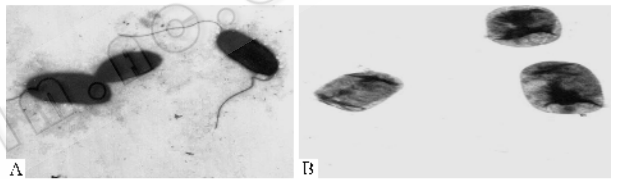


图 1 ZD4-1 和 ZD4-3 两株菌的电镜照片
Fig.1 Electron micrograph of strains ZD4-1 and ZD4-3
A. ZD4-1 (10000 ×) ,B. ZD4-3 (15000 ×) .

2.2 两株菌的系统分类研究

应用细菌的通用引物扩增 ZD4-1 和 ZD4-3 的 16S rDNA 序列 ,测序后获得 16S rDNA 部分序列 ,共约 510bp。从 Gen-Bank 中搜索得到其它 16 株细菌作为参比菌株 ,并以其 16S rDNA 序列和 ZD4-1、ZD4-3 的 16S rDNA 序列一起构建系统发育树(图 2)。

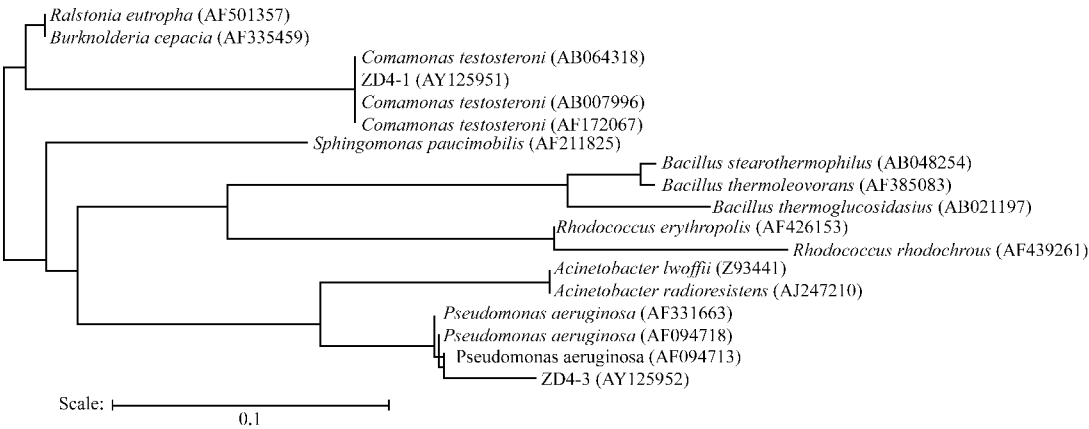


图 2 基于 18 个菌株的 16S rDNA 序列的无根的系统发育树
Fig.2 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of stain ZD4-1 , ZD4-3 and sequences of sixteen validly described bacteria

从系统发育树可见,依据 16S rDNA 序列的同源性密切程度,18 株细菌可以分成两个大的亚组,而 ZD4-1 和 ZD4-3 则分别属于两个不同的亚组。运用 Blast 程序在 GenBank 中搜索 ZD4-1 和 ZD4-3 分别与 *Comamonas testosteroni* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 的匹配程度最高,同源性均在 97% 以上,说明 ZD4-1 和 ZD4-3 分别为丛毛鞣丸酮单胞菌(*Comamonas testosteroni*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。菌株 ZD4-1 在系统发育地位上属于 Bacteria、Proteobacteria、Beta sub-division、Comamonadaceae 和 *Comamonas*, 菌株 ZD 4-3 在系统发育地位上属于 Bacteria、Proteobacteria、gamma subdivision、Pseudomonadaceae 和 *Pseudomonas*。

2.3 苯酚降解液的扫描

对两株菌的苯酚降解液进行紫外-可见光谱扫描。结果显示(图 3) ZD4-1 的降解液在 280nm 处出现一个峰,而苯酚经 ZD4-3 降解后,在 375nm 处还出现一个新的峰。研究表明,苯酚的降解中间产物邻苯二酚是分别在 2,3-双加氧酶或者 1,2-双加氧酶催化下以间裂或者邻裂途径开环,其中间裂途径开环的产物 2-羟基粘康酸半醛(2-hydroxymuconic semialdehyde, HMS)在 375nm 处有一特征性的吸收峰^[10]。根据两株菌的扫描结果,可以认为 ZD4-1 和 ZD4-3 是通过不同的途径降解苯酚,并且 ZD4-3 是通过间裂途径降解苯酚的。

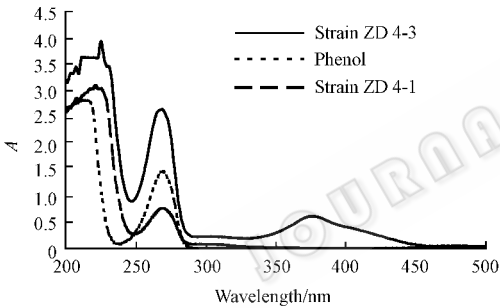


图 3 ZD 4-1 和 ZD 4-3 苯酚降解液的紫外-可见扫描光谱

Fig.3 The UV-VIS absorbance curves of two strains ZD 4-1 and ZD 4-3

2.4 双加氧酶活性测定

为了进一步考察 ZD4-1 和 ZD4-3 代谢利用芳香烃的途径以及机理,分别在诱导及未诱导条件下测定了两株菌中 C12O 和 C23O 的酶活性(表 1)。从表 1 可以看出,经诱导后 C12O 的活性是诱导前的 15 倍,而 C23O 在诱导后的酶活性是诱导前的近 100 倍。由此可以看出,C12O 和 C23O 都是一种诱导酶,酶活性强烈地依赖于其诱导底物的出现,这与其它研究者得到的结果是一致的^[11]。另外,菌株 ZD4-1 中只出现 C12O 酶活性,而没有检测到 C23O 酶活。而在 ZD4-3 中只检测到 C23O 酶活性,没有 C12O 酶活性。由于苯酚的中间降解产物邻苯二酚是经 C12O 催化的邻裂途径或者经 C23O 催化的间裂途径开环,从而进入后续降解步骤。实验中在 ZD4-1 和 ZD4-3 分别只检测到 C12O 和 C23O 的酶活性,这说明 ZD4-1 以 C12O 催化的邻裂途径降解苯酚,而 ZD4-3 则以 C23O 催化的间裂途径降解苯酚。

表 1 菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 的细胞粗提液中双加氧酶的活性

Table 1 Specific activities of catabolic enzymes in crude extracts of strains ZD4-1 and ZD 4-3

Strains and enzymes		Activity/(U/mg)	
		Before induction	After induction
ZD 4-1	C12O	0.1406 ± 0.1108	2.1392 ± 0.0986
	C23O	ND	ND
ZD 4-3	C23O	0.1181 ± 0.0698	10.058 ± 0
	C12O	ND	ND

ND : Not detected.

2.5 两株菌对芳烃的降解

2.5.1 两株菌对苯酚的降解及矿化 :为研究两株菌(即两种降解途径)对苯酚的降解性能,分别测定了它们对苯酚的降解以及矿化效果。两株菌分别在降解 24 h 及 48 h 后残留液中检测不到苯酚,但 ZD4-3 的降解效率明显高于 ZD4-1。TOC 测定结果与苯酚降解相似,也是 ZD4-3 快于 ZD4-1。但是两株菌不能完全矿化苯酚,TOC 分别在 24 d 以及 48 d 达到一个较低的水平后维持不变,说明在降解过程中可能有中间产物的积累,苯酚没有完全矿化成 CO₂ 和 H₂O。另外,两株菌在不同的 pH 值条件下对苯酚的降解效果也不相同,测试结果表明,ZD4-1 在 pH 为 7~10 时都有比较好的降解效果,其中 pH 为 10 时降解率最高,而 ZD4-3 在 pH 为 7 左右时降解效果最好,偏离这一 pH 值时,降解效果大幅度下降。

2.5.2 两株菌对其它芳香烃的利用试验 :为了解 ZD4-1 和 ZD4-3 对其它芳香烃化合物的利用情况,选取数种具有代表性的芳香族化合物作为细菌的唯一生长碳源和能源,考察两株菌在经苯酚诱导前以及诱导后对这些化合物的利用情况(表 2),诱导前 ZD 4-1 只能利用 2,4-二氯酚和对硝基酚,诱导后还能利用萘、蒽、菲。ZD 4-3 在诱导前能利用 2,4-二氯酚、对硝基苯酚以及五氯酚,诱导后能利用三环的菲,但不能利用萘、蒽。总之,ZD4-1 利用芳香烃化合物的范围要宽于 ZD4-3。

表 2 菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 的芳香烃化合物底物降解利用谱

Table 2 Growth of strains ZD 4-1 and ZD 4-3 on aromatic compounds

Substrates	Growth of ZD 4-1		Growth of ZD 4-3	
	Uninduced cells	Induced cells	Uninduced cells	Induced cells
2,4-dichlorophenol	+	+	+	+
p-nitrophenol	+	+	+	+
Pentachlorophenol	-	-	+	+
Phenanthrene	-	+	-	+
Naphthalene	-	+	-	-
Anthracene	-	+	-	-

+ :Grow ; - :Not grow.

以上降解试验结果表明,尽管 ZD4-1 和 ZD4-3 都能降解利用苯酚,但是两株菌对苯酚的降解途径不同,ZD4-1 是以邻裂途径而 ZD4-3 是通过间裂途径进行。就两种途径的降解

效率而言, C23O 催化的间裂途径要高于 C12O 催化的邻裂途径。但是 ZD4-1 降解苯酚的 pH 值适应范围要宽于 ZD4-3, 而且在经过苯酚诱导后, ZD4-1 能够降解利用的芳烃化合物的种类要多于 ZD4-3。因此, 两株菌对芳烃化合物的降解性能各有优劣, 这就提示我们如果把 ZD4-3 中的 C23O 的编码基因克隆出来并转移到 ZD4-1 中, 将两种降解途径的优势整合到一株菌中, 有可能构建得到既提高了降解效率, 又具有较宽的芳香烃化合物降解利用谱的基因工程菌。

3 结论

筛选到两株芳香烃降解细菌 ZD4-1 和 ZD4-3, 它们都属于革兰氏阴性杆菌, 经鉴定分别属于 *Comamonas testosteroni* 和 *Pseudomonas aeruginosa*。基于 16S rDNA 序列进行系统分类分析结果表明, 菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 分别属于两个不同的分类亚组。两株菌的 1, 2 和 2, 3-双加氧酶都是可诱导的双加氧酶, 其活性强烈的依赖于其降解底物的出现。菌株 ZD4-1 和 ZD4-3 分别利用邻裂和间裂途径降解苯酚, 两种途径的降解性能不一样, 虽然 ZD4-3 的降解效率要高于菌株 ZD4-1, 但是 ZD4-1 的适宜 pH 值范围以及芳烃利用基质谱宽于前者。

参 考 文 献

- [1] Heinaru E, Jaak T, Ulrich S, *et al.* Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **31**: 195–205.
- [2] Clauben M, Schmidt S. Biodegradation of phenol and *p*-cresol by the

hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol*, 1998, **149**: 399–406.

- [3] Okuta A, Ohnishi K, Harayama S. PCR isolation of catechol 2, 3-dioxygenase gene fragments from environmental samples and their assembly into functional genes. *Gene*, 1998, **212**: 221–228.
- [4] Pieper D H, Reineke W. Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**: 262–270.
- [5] 刘 和, 陈英旭. 环境生物修复中高效基因工程菌的构建策略. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, **28**(2): 208–212.
- [6] Shirley F, Spain J C. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(8): 2520–2525.
- [7] Dufferin F M, Kirchner U, Bauer M P, *et al.* Phenol/cresol degradation by the *Thermophilic bacillus thermoglucosidasius* A7: Cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, 2000, **256**: 215–221.
- [8] 韩如昶, 闵 航, 陈美慈, 等. 嗜热厌氧纤维素降解细菌的分离、鉴定及其系统发育分析. 微生物学报, 2002, **42**(2): 138–144.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997, 1–3.
- [10] Fujii T, Takeo M, Maeda Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from *Acinetobacter* sp. strain YAA. *Microbiology*, 1997, **143**: 93–99.
- [11] Dong F M, Wang L L, Wang C M, *et al.* Molecular cloning and mapping of phenol degradation genes from *Bacillus stearotherophilus* FDTP-3 and their expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(8): 2531–2535.

Biodegradation Mechanism of Aromatic Compounds by *Comamonas testosteroni* ZD 4-1 and *Pseudomonas aeruginosa* ZD4-3

LIU He WU Jian-Yang CHEN Ying-Xu*

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract To investigate the characteristic and biochemical mechanism about the biodegradation of aromatic compounds by bacteria, bacterial strains ZD 4-1 and ZD 4-3 were isolated from pesticide manufacturing factory sludge, by growth on phenol as the sole source of carbon and energy, and were identified as *Comamonas testosteroni* and *Pseudomonas aeruginosa*. Based on the sequences of 16S rDNA, bacterial strains ZD 4-1 and ZD 4-3 were positioned into two different subgroups. The identification of the intermediates and the detection of the corresponding catabolic enzymes in crude extracts indicated that the strains ZD 4-1 and ZD 4-3 metabolized phenol via *ortho*-pathways and *meta*-pathways, respectively. The results of induction experiment showed that the catechol dioxygenases, both catechol 1, 2-dioxygenase (C12O) and catechol 2, 3-dioxygenase (C23O), were all inducible. Finally, the results of biodegradation and enzyme assays showed that the biodegradation efficiency of phenol by *meta*-pathways was higher than that by *ortho*-pathways but the former is in an inferiority position in terms of adaptation to pH fluctuation and of growth ability on other aromatic compounds compared with the latter.

Key words Aromatic compounds, Phenol, Biodegradation, *Ortho*-pathways, *Meta*-pathways, Dioxygenase

* Corresponding author. Tel 86-571-86971411, Fax 86-571-86971898, E-mail yxchen@zju.edu.cn

Received date: 03-28-2003