

六六六(HCH)降解菌 *Sphingomonas* sp. BHC-A 的分离 与降解特性的研究

马爱芝 武俊 汪婷 张国顺 李顺鹏*

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 :从长期受六六六污染的土壤中分离得到一株能以 HCH 为唯一碳源的高效降解菌株 BHC-A。通过对其主要生理生化特征分析,以及 16S rDNA 序列的测定和同源性比较分析,将 BHC-A 鉴定为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)。BHC-A 菌株在 12h 以内能够完全矿化浓度分别为 5mg/L 的 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 4 种异构体,特别是对 β -HCH 的降解在国际上也属少例。而前人所报道的 γ -HCH 降解菌 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 菌株对 β -HCH 和 δ -HCH 不产生降解作用,即使经过 24h 的培养,对 5mg/L 的 α -HCH 的降解率也只有 12.6%。在黄瓜的盆钵试验中发现,15d 后 BHC-A 在土壤中对 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 4 种异构体的降解率为 84.3%,能够有效地消除土壤中六六六的污染,缓解植株受药害症状。

关键词 六六六,分离,降解,中间产物

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0728-05

六六六又名六氯环己烷(Hexachlorocyclohexane, HCH 或 BHC),是一种耐热、耐酸、脂溶性大、残效期长的有机氯杀虫剂。六六六中的各种异构体在土壤中的氢解半衰期很长, α -HCH 为 26 年, γ -HCH 为 42 年,而 β -HCH 最稳定,半衰期也最长,毒性最强,是造成环境六六六污染的主要物,且在旱地中的持留期远高于水稻田^[1]。目前六六六仍是国内外农产品出口监控的主要对象。

早期的研究者发现,厌氧条件下有机氯杀虫剂的微生物降解是比较可行的^[2-4],六六六的各异构体在厌氧系统中如水淹土中和湖底污泥中能被迅速降解^[5-7]。目前有关于需氧条件下纯培养物对 β -HCH 降解的报道很少,尽管有报道已分离到降解 α -、 γ -、 δ -HCH 的菌株^[8-11],但他们都不能降解 β -HCH。国际上只有 R Kumari 从印度的水稻根际土壤中分离的少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*) B90 能够降解 β -HCH^[12]。

本研究从长期受六六六污染的土壤中筛选到一株需氧的并能同时矿化六六六 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 4 种异构体的降解菌 BHC-A,并研究了该菌株降解 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 的特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样及培养基 :土壤样品采自河北沧县某一生产过六六六的废弃厂内外环境中,以及山西蒲州受六六六污染的土壤。无机盐培养基:每升含 K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, NH_4NO_3 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $Fe_2(SO_4)_3$ 5mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 5mg, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 5mg, 去离子水 1000mL, pH7.0~7.2, 100kPa 灭菌 20min。细菌培养基(SM):每升含蛋白胨 5g, 酵母膏 2.5g, 葡萄糖 1g, pH7.0~7.2, 55kPa 灭菌 20min。

1.1.2 菌种 :*Sphingomonas paucimobilis* UT26 :日本东京大学生物工艺学院赠送。

1.1.3 试剂和仪器 : α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 标准品(纯度为 99.99%) 本实验室保存。Taq DNA 聚合酶, pMD18-T Vector 购于 TaKaRa 公司。气相色谱仪为岛津 GC-14B。

1.2 菌株的筛选与分离

参考文献[10] 将富集液连续稀释涂布 LB(添加 20mg/L 的 γ -HCH)平板,获得了一株能够降解 γ -HCH 的菌,命名为 BHC-A,该菌经多次转接后进一步纯化。

基金项目:国家自然科学基金(40471073),国家“863 计划”(2003AA241150, 2004AA246070, 2004AA214102),江苏省科技攻关项目(BE2002345, BE2003343, BG2005322)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介:马爱芝(1979-),女,山东人,硕士研究生,研究方向为环境微生物工程。E-mail: maizhizhi@sohu.com

收稿日期:2004-11-18, 修回日期:2005-05-27

1.3 菌株生理生化指标测定

生理生化指标分析参照文献 [13] 方法进行。

1.4 BHC-A 菌株的 16SrDNA 扩增和序列测定

以 BHC-A 的菌体作为模板,利用通用引物:F27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3',R1492 5'-TACCTTGTTACGACTT-3',进行 PCR 扩增。反应体系(25 μ L): Buffer(10 \times)2.5 μ L,Mg²⁺(2.5mmol/L)1.5 μ L,dNTP (2.5mmol/L)2 μ L,引物(25pmol/L)各 1 μ L,Taq 聚合酶(5U/mL)0.5 μ L,H₂O 14.5 μ L,吐温 2 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 2min;94 $^{\circ}$ C 30s,50 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 60s,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 10min,4 $^{\circ}$ C 保温。16S rDNA 序列测定由大连 TaKaRa 公司完成。

1.5 HCH 的气相色谱测定^[14,15]

样品中 HCH 的提取:取待测样品 1mL,按 1:4 的比例加入正己烷,剧烈振荡 5min,静置分层,收集上层有机相正己烷层,加入适量的无水硫酸钠除水后,取 1 μ L 进样,气相色谱测定。

测定条件:ECD 检测器;OV-225 毛细管柱(30m \times 250 μ m \times 0.25 μ m);柱温:210 $^{\circ}$ C;进样口温度:250 $^{\circ}$ C;检测器温度 300 $^{\circ}$ C;载气 N₂;流速 40mL/min;进样量:1 μ L。

2 结果和分析

2.1 菌株的表型性状及鉴定

筛选到一株高效降解 γ -HCH 的细菌,命名为 BHC-A。该降解菌在 SM 琼脂平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 4d 后形成黄色扁平的,具有清晰边缘,不透明的圆菌落。该菌有极生鞭毛,G⁻,直或弯杆菌(图 1),具有过氧化氢酶和氧化酶活性,产黄色色素,菌体周围产荚膜。

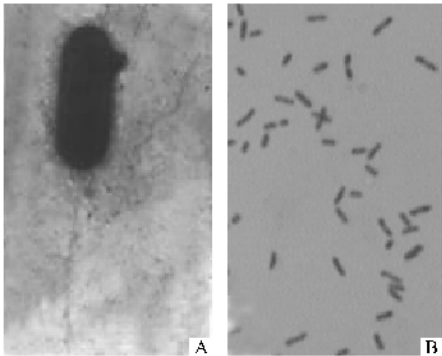


图 1 BHC-A 菌株的形态特征

Fig.1 Electron and microscopy photograph of BHC-A
A:Transmission electron micrograph(19000 \times);B:Microscopy photograph (1000 \times).

2.2 BHC-A 菌株的 16S rDNA 测定

扩增菌株的 16S rDNA 全长基因,序列测定后在

GenBank 进行网上同源性的比对分析,结果发现该菌株与 *Sphingomonas paucimobilis* 的同源性为 99%,综合菌株的形态和生理生化特征,将 BHC-A 菌株鉴定为 *Sphingomonas* sp.。

2.3 BHC-A 菌株产黄色色素的测定

取饱和状态的培养液 3mL,离心收集菌体,加入 2mL 的丙酮,剧烈振荡。含有黄色色素的丙酮层用 UVPC-2401 型紫外可见分光光度计 200nm~600nm 波长扫描,吸收峰在 400nm~550nm 之间,显示了类胡萝卜素的特征(在 424,452 和 479nm 处有可见光吸收)。相同的现象还在 Jean 等^[10]分离的 γ -HCH 降解菌 *Xanthomonas* sp.,Huntijens 等^[16]分离的 α -HCH 降解菌 *P. vesicular*,以及 Jenkins 等^[17]报道的 *Pseudomonas paucimobilis* 中和 Bally 等^[18]报道的 *Flavobacterium* sp. 中发现。

2.4 BHC-A 菌株对六六六异构体(α -、 β -、 γ -、 δ -HCH)的降解

BHC-A 菌株在 SM 中培养至对数期,以 2% 的接种量分别接入到 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH 为 5mg/L 的 100mL 无机盐培养基中,30 $^{\circ}$ C、180r/min 振荡培养,每隔 2h 取样,用正己烷提取后取 1 μ L 气谱测定。

测得降解曲线如图 2。从 6h 取样的 α -HCH 降解气相图谱中发现,培养基中有 γ -HCH($RT_{\alpha\text{-HCH}} = 0.940\text{min}$, $RT_{\gamma\text{-HCH}} = 1.165\text{min}$)的短暂出现(而在相同时间取样的对照中未发现),这可能是 BHC-A 菌株能引起 α -HCH 和 γ -HCH 异构体之间的转化,当转化成的 γ -HCH 来不及被降解时,就会有暂时的累积。

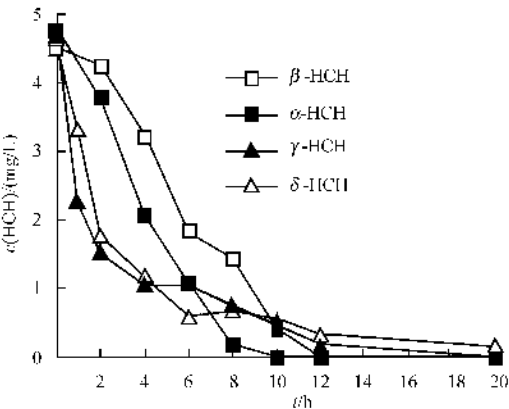


图 2 BHC-A 对 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 的降解曲线

Fig.2 The degradation curve of α -、 β -、 γ -、 δ -HCH by BHC-A strain

β -HCH 降解的 2~12h 中,气相色谱图(图 3-A)一直有一个显著的产物色谱峰出现,随着培养基中 β -HCH 的减少该产物的峰面积逐渐增加,到 12h 时

峰面积值达到最高 ,然后随时间的延长该峰渐渐消失。此产物结构的鉴定还有待进一步研究。国内外有关于微生物对 β -HCH 降解的报道很少 ,这是由于六六六的 4 种异构体中 β -HCH 具独特的化学结构 ,它的化学性质最稳定。BHC-A 菌株能完全矿化 β -HCH ,对菌体本身而言 ,降解途径很独特 ,对环境中六六六污染的修复具有重要的理论和实践意义。

δ -HCH 降解的 0 ~ 20h 过程中(图 3-B) ,气相色谱图上也有一产物峰出现。培养 6 ~ 8h 后 ,培养基中 δ -HCH 被完全降解 ,而该产物在培养基中的浓度也达最高 ,以后峰面积逐渐减小。 δ -HCH 在 BHC-A 菌体内的代谢过程较独特 ,其中间产物不同于 δ -HCH 降解菌 *Sphingomonas paucimobilis* B90 所产生的 δ -PCCH^[12] ,该产物的鉴定还有待于进一步的研究。

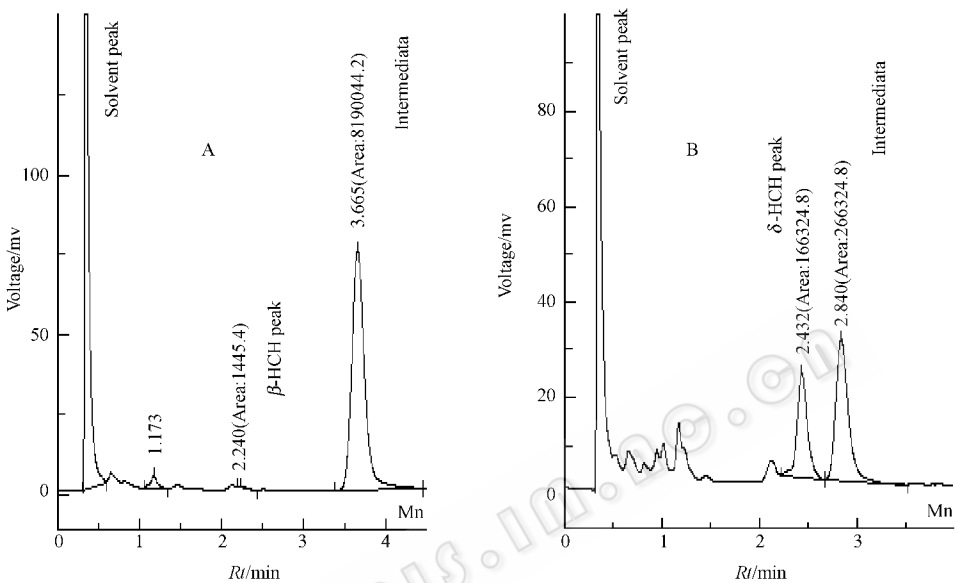


图 3 BHC-A 降解 β -HCH 和 δ -HCH 的中间产物峰
Fig.3 The intermediates in the degradation of β -HCH and δ -HCH by BHC-A strain
A β -HCH degradation ; B δ -HCH degradation.

2.5 BHC-A 菌株与 *S. paucimobilis* UT26 对六六六各异构体降解性能的比较

S. paucimobilis UT26 是由 Senoo 等^[19]在连续 12 年施用 γ -HCH 的旱地中分离得到的 *S. paucimobilis* SS86 的具有萘啶酸抗性的突变菌株^[20] ,它能以 γ -HCH 为唯一的碳源和能源 ,其降解 γ -HCH 的最关键

的酶是由 *linA* 基因编码的脱 HCl 酶^[21~23]。

参照上述的方法 ,在相同的条件下 ,测定 *S. paucimobilis* UT26 对 5mg/L 的 α -HCH、 β -HCH、 γ -HCH、 δ -HCH 的降解曲线(图 4)。

相同条件下经过 24h 的培养后 ,它对 α -HCH 降解率也只有 12.6% ,气相图谱中有明显的中间产物

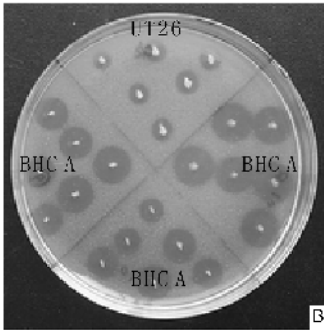
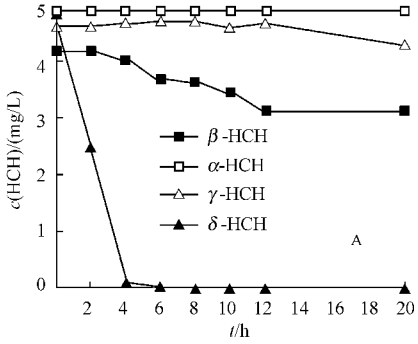


图 4 (A) *S. paucimobilis* UT26 对 HCH 各异构体的降解曲线 (B) BHC-A 菌株与 UT26 菌株在 500mg/L γ -HCH LB 选择性平板上产生的水解圈

Fig.4 (A) The degradation of HCH isomers by *S. paucimobilis* UT26 ; (B) The clear zone on the LB selective plate in the presence of 500mg/L γ -HCH were made by BHC-A and UT26

α -PCCH 色谱峰($RT_{\alpha\text{-PCCH}} = 0.59\text{min}$),而 BHC-A 的降解过程中一直未检测到中间产物,这可能是由于 BHC-A 能够继续利用 α -PCCH 的速率明显的高于 UT26,因此整个降解过程中无 α -PCCH 的积累。

对 β -HCH 和 δ -HCH 这两种异构体,*S. paucimobilis* UT26 不产生降解作用,而 BHC-A 菌株对二者具有独特的代谢途径,体内可能存在不同于 UT26 的特异性脱 HCl 酶 LINA。

BHC-A 和 UT26 降解 γ -HCH 的过程中分别检测到中间产物 γ -PCCH($RT_{\gamma\text{-PCCH}} = 0.54\text{min}$),这两种菌对 γ -HCH 的代谢途径相同,但 BHC-A 菌株降解酶的活性比 UT26 高(图 4-B)。

2.6 BHC-A 菌株用于黄瓜上的盆栽试验

选取六六六农药易产生药害的葫芦科作物黄瓜作为试验对象。

选择籽粒饱满均匀的黄瓜种子(蔬春牌津研四号)先室温下水浸泡 12h,后在 30℃催芽 12h。

称取 30mg 的六六六农药,溶于 10mL 的丙酮中,然后浸泡 5.0g 的硅藻土,使农药被完全吸附。浸泡后的硅藻土置于通风橱中吹干,将其拌入 1000g 的过筛风干土中。将处理好的土样置于花盆中,浇足水后放置 36h 待用。共设添加菌液(BHC-A1, BHC-A2, BHC-A3)、不加菌液(CK1, CK2, CK3)和不添加六六六农药和菌液空白对照(空1,空2,空3)3个处理。在每个花盆中播种已发芽的黄瓜种子 10 粒,在 BHC-A1, BHC-A2, BHC-A3 处理中加入 20mL 新鲜的 BHC-A 培养液,其他的处理则加 20mL 的水补齐,置于室外培养。记录黄瓜生长情况,15d 后取样测定。

添加 BHC-A 菌液的处理经过培养后,与不加菌液的 CK 相比,土壤中的六六六已降为 0.33mg/kg,降解率达到 84.3%。

CK 中黄瓜秧苗产生严重的六六六药害,生长受到明显抑制。叶片墨绿,小且卷曲,伸展度少,植株矮小瘦弱,从茎底部产生黄色枯斑,逐渐萎缩,严重的到 15d 后甚至死亡。而施加 BHC-A 菌液的盆钵中,黄瓜健壮生长,茎直立而叶片完全伸展(图 5)。

就空白处理中和施加 BHC-A 菌液处理中的黄瓜生长状况相比较而言,施加菌液的处理长势略好, BHC-A 菌株对黄瓜植株没有不利生长的影响。

3 结论

本研究是国内首次报道从土壤中分离到需氧条件下高效降解六六六的菌株 BHC-A。该菌株能以

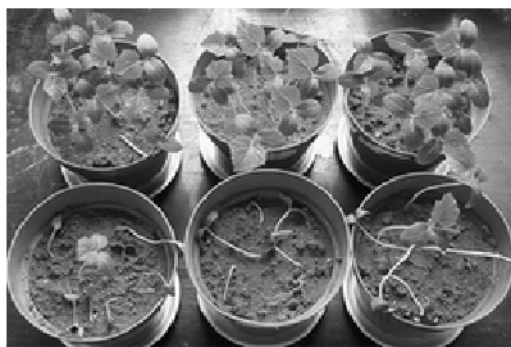


图 5 BHC-A 菌株在黄瓜上的施用 15d 后效果图

Fig.5 The degradation of HCH by BHC-A on cucumber after 15 days

HCH 为唯一碳源生长,为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)。六六六降解菌的分离对于研究 HCH 特别是 β -HCH 的降解机制具有重要意义,并为六六六农药污染的生物修复提供了优良的材料。

BHC-A 菌株能够完全矿化 α -、 β -、 γ -、 δ -HCH 4 种异构体。本研究还发现, BHC-A 在 α -HCH 的降解过程中能引起 α -HCH 和 γ -HCH 异构体之间的转化,降低了 α -HCH 的生物毒性。BHC-A 菌株对 γ -HCH 的代谢过程与 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 的相同,都产生中间产物 γ -PCCH。BHC-A 菌株对 β -HCH 和 δ -HCH 降解代谢途径独特,降解过程中均有未知代谢中间产物的产生,国际上未见相似报道。至于这两种中间产物的化学结构以及代谢途径中脱 HCl 酶的结构如何,特别值得继续关注。

BHC-A 菌株在用于黄瓜上的盆钵试验中能够稳定降解土壤中的 HCH,并有效的缓解植株受六六六药害的症状,为六六六污染的微生物修复提供了理论和实践应用的科学依据。

致谢 日本东京大学生物工艺学院提供 *Sphingomonas paucimobilis* UT26,农业部农业环境微生物重点实验室的陈一楠老师帮助测定六六六的残留量。

参 考 文 献

- [1] 刘相梅,彭平安,黄伟林,等.六六六在自然界中的环境行为及研究动向.农业环境与发展,2001,2:38-42.
- [2] Lal R, Saxena D M. Accumulation, metabolism and toxic effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiol Rev*, 1982, 46: 95-127.
- [3] Martin C, Timm J, Rauzier J, et al. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature*, 1990, 345: 739-743.
- [4] Heritage A D, Macrae I C. Degradation of lindane by cell free preparation of *Clostridium sphenoides*. *Applied Environmental Microbiology*, 1977, 34: 222-224.
- [5] MacRae I C, Raghu K, Castro T F. Persistence and biodegradation of four common isomers of benzenehexachloride in submerged soils.

- [6] Tsukano Y, Kobayashi A. Formation of γ -BTC in flooded rice field soils tested with γ -BHC. *Agric Biol Chem*, 1971, **36**:166–167.
- [7] Ohisa M, Yamaguchi M. Gamma-BHC degradation accompanied by the growth of *Clostridium* isolated from paddy field. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, **42**:1819–1823.
- [8] Siddhartha K S, Kamala K P. Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56** (13):3620–3622.
- [9] Bachmann A W, de Bruin J C, Jumelet H H N, et al. Aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**:548–554.
- [10] Jean C T, Francoide B, Maurice J. Isolation and characterization of a novel γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *J Bacteriol*, 1996, **178**:6049–6055.
- [11] Wada H, Senoo K, Takai Y. Rapid degradation of γ -HCH in upland soil after multiple applications. *Soil Sci Plant Nutr*, 1989, **35**(1):71–77.
- [12] Kumari R, Subudhi S, Suar M, et al. Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Spingomonas paucimobilis* strain B90. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**:6021–6028.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 杨静红, 马亚文, 孙宏宾. 气相色谱法测定茶叶中六六六、DDT. 中国公共卫生 2001, **17**(5):433.
- [15] Johri A K, dua M, Saxena D M, et al. Enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Spingomonas paucimobilis*. *Current Microbiology*, 2000, **41**:309–311.
- [16] Huntjens J L M, Brouwer W, Grobbsen K, et al. Biodegradation of alpha-hexachlorocyclohexane by a bacterium isolated from polluted soil. Contaminated soil'88. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1988, 733–737.
- [17] Jenkins C L, Andrewes A G, Mcquade T J, et al. The pigment of *Pseudomonas paucimobilis* is a carotenoid (Nostoxanthin), rather than a brominated aryl-polyene (Xanthmonadin). *J Lab Clin Med*, 1979, **87**:333–342.
- [18] Bally R A, Givaudan J, Bernillon T, et al. Numerical taxonomic study of three N₂-fixing yellow pigmented bacteria relate to *Pseudomonas paucimobilis*. *Can J Microbiol*, 1990, **36**:850–855.
- [19] Senoo K, Wada H. Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Sci Nutr*, 1989, **35**(1):79–87.
- [20] Nagata Y, Nariya T, Ohtomo R, et al. Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) in *Pseudomonas paucimobilis*. *J Bacteriol*, 1993, **175**:6403–6410.
- [21] Imai R, Nagata Y, Senoo K, et al. Dehydrochlorination of γ -hexachlorocyclohexane (γ -BHC) by γ -BHC-assimilating *Pseudomonas paucimobilis*. *Agric Biol Chem*, 1989, **53**(7):2015–2017.
- [22] Imai R, Nagata Y, Fukuda M, et al. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol*, 1991, **173**:6811–6819.
- [23] Nagata Y, Miyauchi K, Takagi M. Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Shingomonas paucimobilis* UT26. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, **23**:380–390.

Isolation and characterization of a HCH degradation *Sphingomonas* sp. stain BHC-A

MA Ai-zhi WU Jun ZHANG Guo-shun WANG Ting LI Shun-peng*

(Key Laboratory of Agricultural Environment Microbiological Engineering Ministry of Agriculture, Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: An aerobic bacterium was isolated successfully from a long-term contaminated upland field, which was named BHC-A. The bacterium can utilize Hexachlorocyclohexane as a sole carbon source and decompose this substance rapidly and completely. According to its physiological & biochemical characters and the homology analysis of its 16S rDNA sequence, this strain was identified as *Sphingomonas* sp. Stain BHC-A can mineralize not only α , γ and δ -HCH rapidly, but also 5 mg/L β -HCH in 12h completely. However, *Sphingomonas paucimobilis* UT26, a γ -HCH-decomposing bacterium, can only degrade 12.6% of 5 mg/L α -HCH, but not β -HCH and δ -HCH, even for more than 24h in the medium. The seedling of cucumber was selected as the model plant subject to the inhibition of HCH to the growth of cucurbitaceous plants. The results show that the degradation of HCH isomers by BHC-A in soil is even steady and excellent, that BHC-A can eliminate the contamination of the soil and the harm to the plants.

Key words: Hexachlorocyclohexane, Isolate, Biodegradation, Intermediate

Foundation item: National Nature Science Foundation of China(40471073); Chinese National Programs for High Technology Research; Development (2003AA241150; 2004AA246070; 2004AA214102); Jiangsu Province Tech-tackle (BE20022345; BE2003343)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84396314; E-mail: lsp@njau.edu.cn

Received date: 11-18-2004