

一株十二烷基苯磺酸钠降解菌的分离鉴定及降解特性研究

吴 楚*

(温州大学生命与环境科学学院 温州 325027)

摘 要: 从受污染河水中筛选分离得到一株能以十二烷基苯磺酸钠(Sodium dodecyl benzene sulfonate, SDBS)为唯一碳源和能源生长的菌株 WZR-A。经对其形态特征、生理生化、以及 16S rDNA 序列分析,将 WZR-A 初步鉴定为人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)。研究表明该菌株利用 SDBS 生长的最适温度为 30℃,最适 pH 为 7.0。SDBS 浓度低于 400mg/L 时菌株对 SDBS 的降解率可在 80% 以上。菌株细胞蛋白 SDS-PAGE 结果显示,菌株在 SDBS 诱导前后的细胞蛋白组成有明显差异。酶的定域试验表明,该菌株的相关降解酶为胞内酶。相关降解酶活性及降解底物测试结果表明,该菌株可能通过邻位途径裂解芳环并具有对多种芳香族化合物降解的能力。此外,利用质粒检测和消除试验发现菌株 WZR-A 中含有大质粒且该菌株的相关降解基因初步定位于该质粒。

关键词: 生物降解;十二烷基苯磺酸钠;人苍白杆菌

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2006)06-0988-06

直链烷基苯磺酸盐(Linear alky benzenesulfonates, LASs)是用量最大的阴离子表面活性剂,在全球用量达 2.5×10^6 t/y,主要用于生产洗衣粉^[1]。其中十二烷基苯磺酸钠(Sodium dodecyl benzene sulfonate, SDBS)是其主要成分。它不易被生物降解,从而成为环境中最常见、分布最广的有机污染物。烷基苯磺酸对人体的皮肤、血液、肝脏、电解质代谢都有一定危害,严重时对遗传也有一定影响^[2]。此外,对河川中的生物危害也很大,特别是鱼类,十分容易吸收 LAS^[3]。LAS 通过生活污水、垃圾及工业废水、废渣等多种途径进入水体和土壤,造成不同程度的环境污染。且由于 LAS 在水中易形成泡沫,对污水处理造成困难,因此除去水体中的 LAS 等表面活性剂已成为污水处理的一大课题。

直链烷基苯磺酸钠(LAS)降解菌的筛选及其降解特性的研究,国内外的报道已很多^[4~9],但国内外对降解机理及降解途径的研究尚不多见。本文从温州地区受污染的河水中分离纯化到一株能高效降解十二烷基苯磺酸钠(Sodium dodecyl benzene sulfonate, SDBS)的细菌菌株,根据其生理生化性状和 16S rDNA 序列进行了分类鉴定,并研究了该菌株降解十二烷基苯磺酸钠的特性和初步探讨了该菌株对烷基苯磺酸的降解途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: ①牛肉膏蛋白胨培养基(LB);②无机盐培养基(MS)每升含 NH_4NO_3 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 1g, NaCl 0.2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g, SDBS 适量,蒸馏水, pH7.2;③富集培养基每升加酵母粉 0.1~0.5g, SDBS 适量,其余同基础培养基。

1.1.2 主要试剂和仪器: 十二烷基苯磺酸钠为化学纯,其余化学试剂均为分析纯。*Taq* 酶以及生化试剂购自大连宝生物公司或北京鼎国生物技术有限公司。PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。常用仪器:恒温摇床(Thermo Electron, United States), French 压力破碎仪(Thermo Electron, United States), 冷冻离心机(Eppendorf, German), 紫外可见分光光度计(SHIMADZU UV-2401 PC, Japan), PCR 仪(Biometra, German), GelDoc-It 凝胶成像系统(UVP, United States)。

1.2 菌种的富集筛选和分离纯化

分离水样采自温州地区的河道。将所取的水样以 10% 接种于含 SDBS 的液体富集培养基中进行驯化。经过数次转接培养,最后将培养液涂布于含 SDBS 固体 MS 培养基,挑取长势良好的菌落于液体

基金项目 温州市科技计划项目(G2004084)

作者简介 吴 楚(1974 -),浙江温州人,男,讲师,主要从事环境微生物研究。Tel :86-577-81232996; Fax :86-577-86512890; E-mail : wuchu2003@tom.com

收稿日期 2006-02-28 接受日期 2006-04-04 修回日期 2006-04-23

MS 培养基中继续培养后再涂布,反复划线纯化。分离纯化获得一株能降解 SDBS 的细菌。该试验培养条件为 30℃、180r/min 恒温旋转摇床培养。

1.3 分离菌株生理鉴定

在 Biolog 96 孔平板上,除对照孔不含碳源外,每孔都含有四唑紫(Tetrazolium violet)缓冲营养培养基和不同碳源。被鉴定的细菌细胞悬浮于微孔中,培养 4h、16h 后用 Biolog 细菌自动鉴定仪检测供试菌株的代谢指数。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序

采用菌落 PCR 扩增 16S rDNA,用于 16S rDNA PCR 反应的引物为一对通用引物。正向引物 BSF8/20:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物 BSR1541/20:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应条件:94℃ 3min;94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 2min,循环 29 次;72℃ 10min。琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物的测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

得到的降解菌 16S rDNA 序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析。

1.5 降解菌生长和降解特性的测定试验

SDBS 浓度的测定方法按文献[10]方法进行。SDBS 的特征吸收峰在 270nm,且吸光度与浓度成正比。配置标准溶液,作标准曲线。

为研究十二烷基苯磺酸钠浓度、培养基初始 pH 和温度对菌株生长和降解的影响,预先在含 0.1% SDBS 的富集培养基中培养降解菌($OD_{600} = 0.1$),洗涤 2 次后以 1%接种量接入相应的 MS 液体培养基。设 3 个重复,30℃、180r/min 条件下摇瓶培养 8d。

1.5.1 高浓度底物下降解菌生长情况:接种于含 5g/L SDBS 的 MS 培养基培养,每 24h 取出培养液测 OD_{600} 值来观察细菌生长情况。

1.5.2 底物浓度对降解菌生长和降解能力的影响:1%接种到 SDBS 浓度分别是 50mg/L、100mg/L、200mg/L、400mg/L、800mg/L 的 MS 培养基中。然后在 30℃下振荡培养 7d,每 24h 测培养液 OD_{600} 值。再取 4mL 的培养液离心后,测 OD_{270} 值,计算降解率。

1.5.3 培养基初始 pH 值对降解菌生长影响:将培养基初始 pH 值分别调至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0,灭菌后再测定 pH 以核定培养基最终 pH。接种后培养 5d。每 24h 测培养液 OD_{600} 值,观察细菌的生长情况。

1.5.4 温度对降解菌生长影响:接种到含 200mg/L

SDBS 的 MS 培养基,分别在 20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、35℃、40℃、45℃ 条件下培养 5d。每 24h 测培养液 OD_{600} 值,观察细菌的生长情况。

1.5.5 菌株降解 SDBS 的测定:将降解菌菌株接种在 SDBS 浓度为 1g/L, pH7.0 的 MS 培养基中,于 30℃、180r/min 的条件下培养 7d。采用 TOC 测定仪测定总有机碳(Total organic carbon, TOC)残留浓度。

1.6 降解酶性质的测定

1.6.1 菌种的培养:同上 1%接种于 1% SDBS 富集培养基中,30℃、200r/min 培养 48h。

1.6.2 降解酶的分步提取:提取方法按文献[11, 12]按下列步骤分步提取。取菌液以 6000r/min 离心 10min,上清(S_1)冻存;沉淀(P_1)用 10mL (pH8.0) 10mmol/L Tris·Cl 重悬,离心(6000r/min, 10min),洗涤 2 次,上清(S_2)冻存;沉淀(P_2)以 25%的蔗糖溶液 10mL 重悬,于 25℃振荡 10min,以 13000r/min 离心 10min,上清(S_3)冻存;沉淀(P_3)加冷超纯水重悬,在冰浴中振荡 10min,以 13000r/min 离心 10min,上清(S_4)冻存;沉淀(P_4)于 10mmol/L (pH7.5) Tris·Cl 10mL 溶液中重悬,在冰浴中超声波破碎 1min,间隔 1min,重复 5 次,以 15000r/min 离心 20min,上清(S_5)冻存;沉淀(P_5)弃去。将 S_1 、 S_2 和 S_3 合并,即为胞外提取液, S_4 为周质提取液, S_5 为膜内提取液。粗酶液制备:French 高压破碎细胞,压力采用 160MPa,破碎 2 次。

1.6.3 酶提取液降解能力的测定:2950 μ L 磷酸缓冲液(0.15mol/L, pH7.5)与 250 μ L SDBS(0.4g/L), 50 μ L 酶提取液混合,对照不加去离子水,而是加失活的等量酶液,以除去酶在相同波长处的干扰。每管的总体积均为 3250 μ L。反应 1h,测 260nm 和 270nm 处的吸光度(代表 SDBS 被开环裂解)变化。比较胞外、膜周、膜内提取液的降解能力。SDBS 降解率 = $\frac{[S_0] - [S]}{[S_0]} \times 100\%$, 反应液的值为 $[S]$, 对照液的值为 $[S_0]$ 。

1.6.4 降解酶诱导性的确定:1%接种 0.1%蔗糖的基础培养基培养 1d,加入 0.1% SDBS 后再培养 3d。将加入 SDBS 前和后培养菌液分别离心,取菌体,加入 50mg/L 的 SDBS 溶液于 30℃,振荡 24h,测定 SDBS 降解率。SDS-PAGE 后通过凝胶成像系统分析电泳结果。

1.6.5 邻苯二酚-1,2-双加氧酶和邻苯二酚-2,3-双加氧酶活性的测定:分别参考文献[13, 14]方法以酶反应产物粘糠酸在 260nm 处和 2-羟基粘糠酸半醛在

375nm 处测定光吸收值。

1.7 降解广谱性试验与降解底物的降解测定

试验的底物有:间苯二酚,对氯苯甲酸,5-磺基水杨酸,邻氯苯甲酸,对硝基苯甲酸,对羟基苯甲酸,甲苯-4-磺酸,3,4-二羟基苯甲酸,间羟基苯甲酸,磺胺,邻苯二胺,苯甲酸,对苯二酚,苯胺,邻苯二酚,苯酚,2,4-二氯苯酚,水杨酸。采用两种处理,将菌株分别在以上述底物为唯一碳源的 MS 培养基平板上涂布,底物浓度为 1‰。同时以不含底物的无机培养基作细菌生长的阴性对照。每种处理都作 3 个重复,在 30℃ 培养,每隔 24h 观察菌株在上述不同底物平板上的生长情况。

有选择性地选取 4 种该降解菌能迅速利用的碳源 3,4-二羟基苯甲酸,对氨基苯磺酸,5-磺基水杨酸和对羟基苯甲酸配制成碳源浓度为 1‰ 的 MS 培养基,1% 接种量,培养 3d。每隔 12h,离心取上清液,用紫外分光光度计测定底物最大吸收峰的变化。

1.8 质粒的检测和消除试验

采用碱裂解法、煮沸法和 Kado 法快速检测质粒。质粒消除采用吡啶橙法,将菌液接种于 4mL 不同浓度吡啶橙的 LB 培养基中,30℃、180r/min 培养 48h。取菌体能生长且吡啶橙浓度最大的试管,稀释至 10^{-3} ,涂布于 LB 平板。取平板上的同一菌落接种于 LB 和含 SDBS 的 MS 培养基上,观察是否产生质粒消除的突变株。

2 结果

2.1 菌株的分离纯化与形态

经富集筛选和分离得到一株能以 SDBS 为唯一碳源的菌株,命名为 WZR-A。其菌落 2~3mm 左右,表面较湿润,中央为乳白色而边缘透明且不整齐为波齿状。菌体细胞形态为杆状,革兰氏染色为阴性,电镜下观察具有 2 根亚极生鞭毛(图 1)。接触酶、氧化酶阳性。

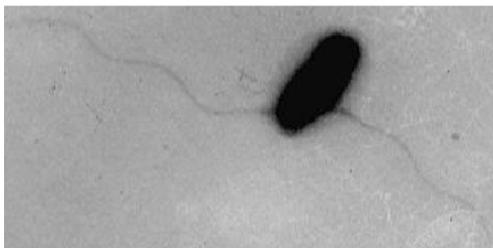


图 1 WZR-A 菌株的电镜照片(8000×)

Fig.1 Electron micrograph of WZR-A strain(8000×).

2.2 WZR-A 菌株生理鉴定

将 WZR-A 菌株细胞悬浮液接种到 95 种碳源的 Biolog GN 板微孔中,培养 4h,16h 后,分别测定菌株代谢指数。经 Biolog 细菌鉴定系统分析 WZR-A 菌株的代谢指数与人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)的相似性为 100%。

2.3 WZR-A 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

PCR 扩增结果显示 16S rDNA PCR 产物约 1.5kb 左右,符合预期产物长度。WZR-A 菌株的 16S rDNA 序列(GenBank 登陆号:DQ417342)输入 GenBank 以 Blast 进行序列同源性比较表明,WZR-A 菌株 16S rDNA 序列与 *Ochrobactrum anthropi* 种的 16S rDNA 序列相似性高达 100%。结合上述的形态、生理鉴定,Biolog 测试结果与 16S rDNA 分析结果将 WZR-A 菌株鉴定为人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)。

2.4 WZR-A 菌株生长和降解 SDBS 的特性

2.4.1 底物浓度对 WZR-A 菌株生长和降解的影响由于十二烷基苯磺酸钠中的烷基链可被 ω -氧化和 β -氧化,作为细菌碳源,所以 WZR-A 菌株在低浓度 SDBS 时就能表现出较好的生长情况。但随着 SDBS 浓度的增加对代谢的抑制作用就会增强,从而表现为降解率呈下降趋势(图 2)。结果表明 WZR-A 菌株在 200mg/L SDBS 的培养基中生长最好,且降解率最高。在低浓度时,一般只需 4d 该菌株就可生长

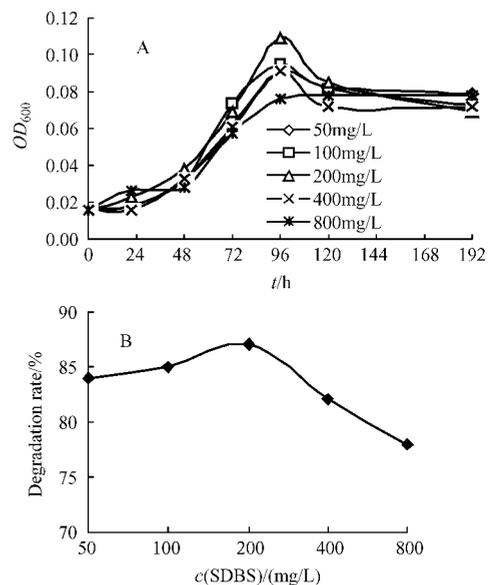


图 2 SDBS 浓度对 WZR-A 菌株生长的影响(A)和降解能力的影响(B)

Fig.2 Effect of SDBS concentration on growth of WZR-A strain(A) and degradation of SDBS by WZR-A strain(B).

到对数期。WZR-A 菌株在高浓度 SDBS(如 5g/L)的 MS 培养基中也能生长,但需较长时间(9d)生长才能达到对数期。这些结果表明,WZR-A 在 1g/L SDBS 以下的低浓度时相对来说生长较快且降解率较高。

2.4.2 培养基初始 pH 值和温度对菌株生长的影响 实验结果表明,WZR-A 菌株可以在 pH6~8 范围内较好生长,该菌生长和降解 SDBS 的最佳 pH 为 7.0。培养后,测得初始培养基 pH 为 6~8 的培养液最终 pH 值都下降至 6 左右。这可能是降解过程中产生酸性产物所致。实验结果表明 WZR-A 在 28-32℃ 生长较好,它的最适生长温度在 30℃ 左右。

2.4.3 残留总有机碳测定 TOC 测定总有机碳残留率 27% 左右,与图 2-B 中菌株对高浓度 SDBS 的降解率下降趋势相符。这说明高浓度 SDBS 下,该菌株不能达到 80% 以上的降解率。

2.5 相关降解酶特性的测定

降解酶的定域 试验结果表明,胞外提取液和周质提取液对 SDBS 无降解作用,而膜内提取液 1h 内 SDBS 降解率可达到 61.6%。由此可见该菌株的 SDBS 降解酶主要定域于细胞腔,应属于胞内酶。

降解酶的诱导 试验结果表明无 SDBS 培养基中生长的菌体没有 SDBS 降解能力,而经 SDBS 诱导的菌体能降解 SDBS。说明只有在 SDBS 存在的情况下菌体才会合成 SDBS 相关的降解酶。加 SDBS 前培养的菌体与加 SDBS 后培养的菌体 SDS-PAGE 结果经凝胶成像系统分析,观察到加有 SDBS 后培养的菌体泳道中部分蛋白条带的含量增加并多出几条新的蛋白条带(图 3),其含量可占总蛋白量的 5%,这显示 SDBS 有可能诱导产生了一些特异的蛋白。

对 SDBS 降解过程中邻苯二酚-1,2-双加氧酶和邻苯二酚-2,3-双加氧酶两种酶活性的测定结果表

明,菌株 WZR-A 有邻苯二酚-1,2-双加氧酶活性,比活为 0.086 units/mg,而未测到邻苯二酚-2,3-双加氧酶活性,据此推测该菌在降解 SDBS 过程中可能以邻位裂解方式催化开环反应。

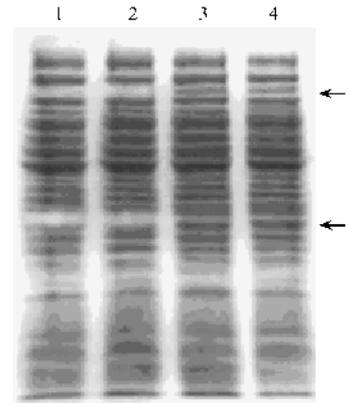


图 3 SDS-PAGE 图谱(分离胶浓度 12%)

Fig.3 Whole cell protein SDS-PAGE profile of WZR-A strain. 1, 2. Strain before induction by SDBS; 3, 4. Strain after induction by SDBS.

2.6 WZR-A 菌株降解底物谱研究

菌株涂布在平板上培养 1~2 周,进行观察,结果见表 1。WZR-A 菌株对多种芳香化合物底物利用情况如下:在 3,4-二羟基苯甲酸、5-磺基水杨酸、间羟基苯甲酸、甲苯-4-磺酸、对硝基苯甲酸、对氯苯甲酸、邻氯苯甲酸、对羟基苯甲酸、磺胺、邻苯二胺、水杨酸等为唯一碳源的培养基上降解菌 2d 内出现菌落。其中在 5-磺基水杨酸、对羟基苯甲酸、3,4-二羟基苯甲酸、甲苯-4-磺酸、水杨酸等基质中 24h 内便长出菌落。菌落直径为 0.5cm 左右,清晰可见。而间苯二酚、苯甲酸、苯胺、邻苯二酚在 3~5d 内逐渐长出菌落,但较难观察到。其菌落小,模糊,颜色非常淡。对苯二酚、苯酚、2,4-二氯苯酚则基本不出现菌落。可见,5-磺基水杨酸、对羟基苯甲酸、间羟基

表 1 菌株对芳香族化合物的降解

Table 1 Degradation of aromatic compound

t/d	Protocatechuic acid	5-Sulfosalicylic acid	Toluene-4-sulfonic acid	4-Hydroxybenzoic acid	Salicylic acid	Sulfonamides
1	+++	+++	+++	+++	+++	-
2	+++	+++	+++	+++	+++	+
	m-Hydroxybenzoic acid	4-nitrobenzoic acid	4-Chlorobenzoic acid	2-Chlorobenzoic acid	1,2-Phenylene diamine	benzoic acid
2	++	++	++	++	++	-
5	++	++	++	++	++	+
	Resorcinol	aniline	Catechol	2,4-Dichloro Phenol	Hydroquinone	Phenol
5	++	+	+	-	-	-
7~14	++	+	+	-	-	-

苯甲酸、3,4-二羟基苯甲酸等化合物可能为降解酶的作用底物或底物类似物,也可能为酶降解过程中的中间代谢物及类似物,所以菌株 WZR-A 才能快速利用它们。

初步分析 WZR-A 菌株 SDBS 降解酶的活性中心可接纳苯环对位上存在烷基、磺胺基、磺基、硝基、氨基、羧基、羟基、氨基、甲基;邻位上可存在氨基、羧基、氨基、羟基,在大基团如磺基、羧基的间位上可存在羧基、羟基。该菌在 SDBS 诱导下降解的最适底物为 3,4-二羟基苯甲酸,而不以邻苯二酚途径降解 SDBS。

为了分析该菌株对 SDBS 的降解途径及代谢中间产物,选取了 3,4-二羟基苯甲酸,对氨基苯磺酸,5-磺基水杨酸,对羟基苯甲酸 4 种底物作进一步分析。在培养 12h 后观察到底物开始降解,24h 后底物已降解过半,72h 后,基本观察不到底物的紫外吸收峰。降解基本完成。将培养液离心,沉淀洗涤后破碎制成粗酶液。以这 4 种化合物为底物,按 1.6 中的方法配置反应体系,用紫外可见分光光度计扫描反应液,发现在 290nm 处出现下降,这是 4-磺基邻苯二酚或原儿茶酸邻位裂解途径的特征。这些结果表明该菌株可能具有原儿茶酸途径邻位裂解途径的酶系。推测 5-磺基水杨酸有可能是通过水杨酸羟化酶脱羧羟化形成 4-磺基邻苯二酚后,再进一步开环裂解^[15,16]。

2.7 质粒检测和消除结果

采用碱裂解法和煮沸法均未能检测到质粒,表明该菌株不带有小于 15kb 的质粒。Kado 法 0.7% 琼脂糖凝胶电泳发现菌株具有一较大的质粒,大小大于 23kb。发现经吡啶橙法质粒消除后,菌株只能在 LB 培养基平板中生长而不能在只含 SDBS 浓度为 0.4% 的 MS 培养基平板上生长。这表明经质粒消除后的菌体不能利用 LAS 作为唯一碳源进行生长。而消除后的菌株未检测到质粒。因此可以初步确定 SDBS 相关的降解基因位于 Kado 法所检测出的大质粒上。这为进一步研究 WZR-A 菌株 SDBS 的降解途径和降解基因提供了较好的基础。

3 讨论

前人的研究表明细菌降解苯环类化合物有邻苯二酚、龙胆酸、原儿茶酸等途径。普遍认为 SDBS 生物降解首先进行烷基侧链的末端 ω -氧化和 β -氧化,然后再发生脱磺基和苯环的断裂。据文献报道^[16],烷基苯磺酸的生物降解一般包括这几步反应:首先经氧化生成磺基苯羧酸再生成 4-磺基邻苯二酚,之

后在加氧酶的作用下苯环开裂生成 3-磺基-2,4-二烯己二酸,再经过一系列的反应后水解脱去磺基,生成可被细胞利用的物质进入 TCA 循环。又据文献报道^[17,18],对氨基苯磺酸生物降解也是首先经氧化脱氨基生成 4-磺基邻苯二酚,再开环降解。本研究结果表明 WZR-A 菌株可能是通过修饰的原儿茶酸途径降解苯磺酸类化合物,但还未排除龙胆酸途径,如 4-羟基水杨酸裂解或 3-羟基和 5-羟基水杨酸裂解。

对芳香化合物主要代谢途径的研究揭示了由不同酶完成起始的转化步骤,但都转变为有限的中心中间代谢产物,如原儿茶酸和(取代的)儿茶酚。这些双羟基中间代谢产物进一步代谢都是通过两种途径之一即间位裂解途径和邻位裂解途径,最终这两种途径都进入三羧酸循环。对该菌底物利用和降解结果以及它利用对羟基苯甲酸生长速度快于对羟基苯磺酸等情况综合分析后,作者认为该菌株可能是通过原儿茶酸途径邻位裂解来降解十二烷基苯磺酸钠,即是先脱磺酸根产生 3,4-二羟基苯甲酸再开环。是否通过 3,4-二羟基苯甲酸裂解开环还是 4-磺基邻苯二酚开环的主要差别在于磺酸基团是在开环前脱下还是在开环后脱下,这还需要进一步证明。但由于该菌株也能快速降解 5-磺基水杨酸和水杨酸,所以还不能排除修饰的龙胆酸途径^[16]即可能存在的 5-磺基水杨酸 1,2-双加氧酶裂解苯环后降解十二烷基苯磺酸钠。降解底物的广谱性表明该菌株在多种底物 MS 平板上生长较好且具有广谱降解性,所以也可能该菌株同时存在多条降解途径。一种菌株能够同时有效地降解多种有机污染物的还不多,所以 WZR-A 菌株具有较好的应用前景。

4 结论

本研究从温州地区的河水中筛选分离得到一株能以 SDBS 为唯一碳源生长的细菌,初步鉴定为人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*),命名为 WZR-A。经过长时间驯化它能耐受高浓度的底物并生长。该菌株降解 SDBS 的最佳条件为 28~32℃,pH7.0 左右,且 SDBS 浓度在 200mg/L 以下时,可维持较高的降解率。对该菌的相关降解酶性质研究表明该菌株的相关降解酶位于胞内,只有诱导后的菌体才能降解 SDBS,并且诱导后的菌体有邻苯二酚-1,2-双加氧酶的活性。菌株细胞蛋白 SDS-PAGE 结果显示,菌株在 SDBS 诱导前后的细胞蛋白组成有明显差异,研究表明参与 SDBS 降解的酶系是诱导型酶系。通过质粒的检测和消除发现该菌株具有一个较大的质

粒且 SDBS 相关降解基因可能位于这个质粒上。此外,对降解底物广谱性研究表明该菌株能降解多种芳香族化合物。

参 考 文 献

- [1] Schulz S , Dong W , Groth U , et al . Enantiomeric degradation of 2-(4-Sulfophenyl)Butyrate via 4-sulfocatechol in *Delftia acidovorans* SPB1 . *Appl Environ Microbiol* 2000 **66**(5):1905 - 1910 .
- [2] 郭 伟 ,李培军 .阴离子表面活性剂(LAS)环境行为与环境效应 .安全与环境学报 ,2004 **4**(6):37 - 42 .
- [3] 陈加平 ,徐立红 ,吴振斌 .家用洗涤剂对鱼生物标志物的影响 .中国环境科学 ,2001 **21**(3):248 - 251 .
- [4] 张蔚文 ,张 灼 .直链烷基苯磺酸钠优势降解菌的筛选及其降解性的初步研究 .云南大学学报(自然科学版) ,1994 **16**(2):159 - 163 .
- [5] 柯 娜 ,肖昌松 ,应启锋 ,等 .一个可降解直链烷基苯磺酸盐的新种 .微生物学报 ,2003 **43**(1):1 - 7 .
- [6] 尹 静 ,李君文 ,王新为 ,等 .直链烷基苯磺酸钠(LAS)降解菌的分离鉴定及其降解特性 .应用与环境生物学报 ,2005 **11**(4):483 - 485 .
- [7] Jimenez L , Breen A , Thomas N , et al . Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium . *Appl Environ Microbiol* 1991 **57**(5):1566 - 1569 .
- [8] Schleheck D , Tindall BJ , Rossello-Mora R , et al . *Parivibaculum lavamentivorans* gen. nov. , sp. nov. , a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzenesulfonate . *Int J Syst Evol Microbiol* 2004 **54** :1489 - 1497 .
- [9] Schleheck D , Knepper TP , Fischer K , et al . Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate by defined pairs of heterotrophic bacteria . *Appl Environ Microbiol* 2004 **70**(7):4053 - 4063 .
- [10] 裴力民 ,王宏伟 ,于 波 ,等 .紫外分光光度法测定洗涤剂中十二烷基苯磺酸钠的含量 .黑龙江环境通报 ,1998 **22**(1):46 - 47 .
- [11] 戴树桂 ,庄源益 ,陈勇生 ,等 .两种假单胞菌中二氯酚降解酶活性及其定域研究 .环境科学学报 ,1996 **16**(2):173 - 178 .
- [12] 张承东 ,张爱茜 ,韩朔睽 ,等 .含硫芳香族化合物降解酶的定域及胞内产物的鉴定 .环境科学 ,2000 **21**(4):90 - 93 .
- [13] Nakazawa T , Yokota K . Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (*arvilla*) mt-2 : demonstration of two benzoate pathway . *J Bacteriol* 1973 **115**(1):262 - 267 .
- [14] Murray K , Williams PA . Role of catechol and the methylcatechols as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida* . *J Bacteriol* 1974 **117**(3):1153 - 1157 .
- [15] 赵化冰 ,刘 斌 ,马 琳 ,等 .假单胞菌 ND6 菌株水杨酸羟化酶基因(nahG)的核苷酸序列分析和酶鉴定 .南开大学学报(自然科学版) ,2004 **37**(4):95 - 99 .
- [16] Hintner JP , Lechner C , Riegert U , et al . Direct ring fission of salicylate by a salicylate 1 , 2-dioxygenase activity from *Pseudaminobacter salicylatoxidans* . *J Bacteriol* 2001 **183**(23):6936 - 6942 .
- [17] van Haperen AM , van Velde JW , van Ginkel CG . Biodegradation of p-toluenesulfonamide by a *Pseudomonas* sp. . *FEMS Microbiol Lett* 2001 **204**(2):299 - 304 .
- [18] Cook AM , Laue H , Junker F . Microbial desulfonation . *FEMS Microbiol Rev* 1998 **22**(5):399 - 419 .

Isolation and characterization of a sodium dodecyl benzene sulfonate degrading bacterial strain

WU Chu*

(School of Life & Environmental Sciences , Wenzhou University , Wenzhou 325027 , China)

Abstract : A bacterial strain , designated as WZR-A , which could utilize sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) as sole carbon and energy source for growth , was isolated from contaminated river . The strain was identified as *Ochrobactrum anthropi* based on its morphological and physiological properties , and 16S rDNA sequence analysis . The optimum pH and temperature for cell growth and SDBS degradation were 7.0 and 30°C , respectively . The degradation rate of SDBS by strain WZR-A was higher than 80% when its concentration was lower than 400mg/L . The results of whole cell protein SDS-PAGE electrophoresis showed that there were very obvious differences in the total cell protein composition of the strain between before and after SDBS induction . The enzyme distribution experiment showed that the enzymes relative SDBS degradation in the bacterium was intracellular one . Results from the characterization of degradation substrates together with the detection of activities of relative catabolic enzymes in crude extracts indicated that the aromatic ring cracking of SDBS by the strain probably via the modified *ortho* cleavage pathway and the strain could use broader spectrum substrates . A large plasmid was detected by utilizing plasmid isolating and curing technique and it was found that the genes involved in SDBS degradation were likely located on the plasmid .

Keywords : Sodium dodecyl benzene sulfonate ; Biodegradation ; *Ochrobactrum anthropi*

* Corresponding author . Tel : 86-577-81232996 ; Fax : 86-577-86512890 ; E-mail : wuchu2003@tom.com