

微生物降解对氯苯胺的一条新代谢途径

张 涛^{1,2}, 刘双江¹, 刘志培^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所环境微生物中心 北京 100080)

(² 中国科学院研究生院 北京 100039)

摘 要 迄今为止的研究报道表明,对氯苯胺的生物降解只能以邻位途径或修饰邻位途径进行。采用 HPLC、液相色谱质谱联用技术(LC/MS)对 *Diaphorobacter* PCA039 菌株降解对氯苯胺的中间代谢产物进行了分析和鉴定,结果表明,对氯苯胺经 PCA039 菌株的降解形成了氯代邻苯二酚、5-氯-4-草酰巴豆酸、5-氯-2-氧戊烯酸、5-氯-2-氧-4-羧戊酸、氯代乙酸等中间代谢产物,这些都是典型的间位代谢途径(*meta*-pathway)的中间物质,说明 *Diaphorobacter* PCA039 菌株以间位裂解途径对对氯苯胺进行降解。这对于对氯代胺的生物降解代谢研究、代谢机理及其遗传表达调控研究具有意义。

关键词: 对氯苯胺;生物降解;LC-MS;邻位途径;间位途径

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)01-0083-05

氯代苯胺类化合物是一类重要的化工原料,在杀虫剂、染料、塑料和药物的合成中大量使用,广泛污染环境,具致畸、致癌、致突变效应。作为一种环境异源物质,它又是氯代硝基芳烃化合物和除草剂(苯脲、苯胺甲酸酯、酰基苯胺)的常见中间代谢产物^[1]。作为氯代芳烃化合物的一族,它们难以生物降解,持久滞留于环境,并容易生物富集,对生态环境(可危害土壤中的微生物系统)和人体健康造成威胁,已被美国环保署(EPA)和欧盟列入优先控制污染物名单之中^[2]。多年来,国内外研究者在氯代苯胺类化合物的微生物降解方面做了大量的工作,尤其从分子生物学的角度研究其它芳烃化合物的微生物降解途径已经较多。文献资料表明^[3-5],虽然邻位开环途径(C12DI)广泛存在于芳烃类化合物(苯胺、苯甲酸、苯酚等)的微生物降解中,但该途径并不能代谢氯代芳烃。氯代芳烃类化合物好氧微生物降解只能通过修饰邻位途径降解(C12D II)^[3-6](图1),为一类特殊的邻位降解途径。氯代芳烃很少通过间位途径(C23D)进行降解,因为容易形成致死产物使关键酶失活,如作为一种中间产物3-氯邻苯二酚可自身抑制邻苯二酚2,3-双加氧酶(C23D)或与其活性中心的Fe²⁺形成螯合物而使该酶不可逆失活^[7,8],也可生成一种酰基氯化物(3-氯邻苯二酚代谢产物)使C23D酶失活。Janke等^[5,6]通过研究氯代

芳烃降解菌 *Rhodococcus* sp. An 117 及 An 213 提出氯代苯胺降解菌株得以完全降解 PCA 所应满足的条件(1)存在广谱芳香族化合物氧化酶系,即专一性低的苯胺氧化酶(2)无或阻断间位降解代谢途径(3)含有修饰邻位降解途径(图1)。至今尚未见以间位途径降解对氯苯胺或其他氯代苯胺的报道。

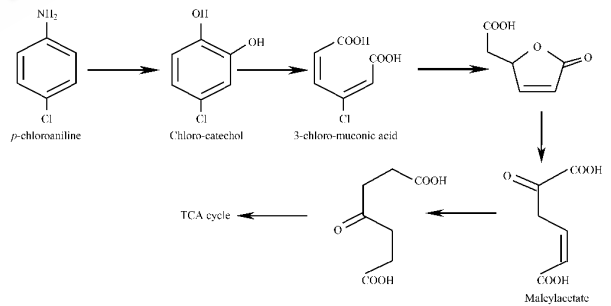


图1 *Moraxella* sp. G 菌株降解对氯苯胺(PCA)的修饰邻位降解途径^[3]

Fig. 1 Proposed modified *ortho*-pathway of PCA degradation by *Moraxella* sp. G.^[3]

本实验室从化工厂污水处理厂中分离到一株能以对氯苯胺为唯一碳源、氮源和能源生长的 *Diaphorobacter* PCA039 菌株。该菌株含有诱导型邻苯二酚2,3-双加氧酶(C23D),不含有邻苯二酚1,2-双加氧酶^[9]。本文采用 HPLC、液相色谱质谱联用技术(LC/MS)及质谱技术分析和鉴定该菌株降解对氯苯胺的中间代谢产物,表明该菌株确是通过间位

基金项目:国家“863计划”(2002AA601150)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62653757; E-mail: zhuizhp@sun.im.ac.cn

作者简介:张涛(1980-),男,山东临沂人,硕士研究生,研究方向为环境微生物。

收稿日期:2006-05-22;接受日期:2006-07-24;修回日期:2006-09-19

裂解途径 (*meta*-pathway) 降解对氯苯胺的, 丰富了对氯苯胺生物降解代谢途径, 同时为研究该菌株降解对氯苯胺的机理及其遗传表达调控奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: *Diaphorobacter* PCA039 是本实验室从某化工厂污水处理车间好氧活性污泥中筛选得到的 1 株降解对氯苯胺的细菌, 能以 PCA 为唯一碳源、氮源和能源。无机盐培养基 (MSB) 配方见文献 [9]。

1.1.2 试剂和仪器: 氯代苯胺 (购自 Sigma 公司), 乙酸乙酯、甲醇等化学试剂均为化学分析纯。主要仪器有 Beckman Allegra 64R 离心机、旋转蒸发器 RE-52AA SHZ-III D 型循环水蒸空泵 (上海亚荣生化仪器厂); Waters HPLC 及惠普 HPLC-1050 高效液相色谱仪; Biospec-1601 型紫外分光光度计; 岛津 GC/MS-QP5050A 型质谱仪; LCQ Advantage 型液/质联用仪 (Applied Biosystems 产品)。

1.2 样品及其处理

将 PCA039 菌株接种于无机盐培养基中 (含对氯苯胺 300mg/L), 30°C、150r/min 摇床培养。分别在培养后 2d (样品 1)、3d (样品 2)、5d (样品 3) 取样 (3 个重复各 200mL), 样品经过高速离心 (10000r/min, 10min) 后收集上清, 经 0.2 μ m 微孔滤膜过滤除菌后用甲酸酸化至 pH4.0, 乙酸乙酯等体积萃取, 萃取液经旋转蒸发器蒸干后重新溶于 1mL 甲醇中, 平均分成 2 份, 分别进行 LC/MS 和 MS 分析。

1.3 高效液相色谱分析 (HPLC)

采用 Waters HPLC 设备, Breeze 软件操作平台下进行, Agilent Zorbax Extend-C₁₈ 反向柱 (14.6 × 150mm), 进样量为 20 μ L。检测波长为 254nm, 流动相为甲醇 (色谱纯): 水 = 70 : 30 (V/V), 流速为 0.7mL/min。

1.4 质谱分析

将收集到的中间产物的样品 400 μ L 浓缩到 200 μ L 甲醇中作为质谱分析样品。采用 ESI 源, 正离子扫描模式, 可扫描 *m/z* 从 50 到 2000u 的单电荷化合物离子及带有多电荷的化合物, 扫描时间 0.5s。质谱分析时高纯氮气作为干燥气和雾化气, 碰撞气为氩气。雾化气温度 400°C, 干燥气流速为 500L/h, 电喷雾电压 4.5kV, 加热毛细管温度 250°C。以不接菌含底物的无机盐培养基作为对照。

2 结果和讨论

2.1 不同样品的高效液相色谱和质谱技术联用 (LC/MS) 分析

对 PCA039 菌株降解对氯苯胺动态过程的不同样品进行了 LC/MS 分析 (图 2), 其中 A、B、C、D 分别为对氯苯胺标样、培养 2d 的样品、培养 3d 的样品和培养 5d 的样品。图 2 的结果表明, 随着降解的进行, 各种物质呈现动态变化, 底物及各种不同中间产物均表现出有序的发生和消失规律。HPLC 分析表明, 对氯苯胺经过 2d 的降解 (图 2-B), 其对氯苯胺主峰面积 (5.394m) 明显减小, 同时出现了 1 个较大的峰 (4.850m) 和 2 个较小的峰 (6.905m 和 14.412m); 经过 3d 的降解后 (图 2-C), 对氯苯胺主峰以及 4.850m 处的峰均已经消失, 而 6.905m 和 14.412m 处的 2 个峰面积明显增加, 同时在 10.452m 处出现了 1 个新峰, 经过 5d 的降解后 (图 2-D), 14.412m 处的峰面积已经有所减小, 6.905m 处的峰面积有所增加, 而 10.452m 处的峰面积明显增加。对以上各峰的质谱分析表明, 4.850m 处产物的分子量为 143 (负离子扫描), 与 4-氯邻苯二酚 [C₆H₅O₂Cl] 的质谱图一致, 应为 4-氯邻苯二酚; 14.412m 处产物的分子量为 193 (正离子扫描), 与 5-氯-4-草酰巴豆酸 (马来酰化乙酸) [C₆H₅O₃Cl] 一致, 应为 5-氯-4-草酰巴豆酸; 6.905m 处产物的分子量为 162.5 (负离子扫描), 与 5-氯-4-羟-2-酮戊酸 [C₅H₇O₄Cl] 相符, 应为 5-氯-4-羟-2-酮戊酸; 10.452m 处产物的分子量为 146.5 (正离子扫描), 与 5-氯-2-酮戊烯酸相符。以上结果表明, PCA039 菌株降解对氯苯胺过程中, 依次形成 4-氯邻苯二酚、5-氯-4-草酰巴豆酸、5-氯-2-酮戊烯酸、5-氯-2-羟-2-酮戊酸等中间代谢产物。

2.2 不同样品的质谱分析

微生物降解有机污染物的过程中, 可形成一系列不同的中间产物, 有些产物的含量很少或很不稳定, 有些产物不具有紫外吸收特性, 特别是开环之后的小分子产物。因此只进行 LC/MS 分析还不能反映微生物降解污染物的代谢途径, 还必须有其他方法进行补充, 为此, 对 PCA039 菌株降解对氯苯胺过程的不同样品进行了质谱分析 (正离子扫描), 结果如图 3 所示, 其中 A、B、C 分别为培养 2d、3d 和 5d 的样品。图 3 的结果表明, 对氯苯胺在经过 PCA039 菌株培养降解 2d 后 (图 3-A), 其质谱图中除了对氯苯胺的吸收峰 (*m/z* = 128.7) 外, 还出现了新的吸收峰 (*m/z* = 145.3), 表明形成了新的物质, 而 *m/z* = 145.3

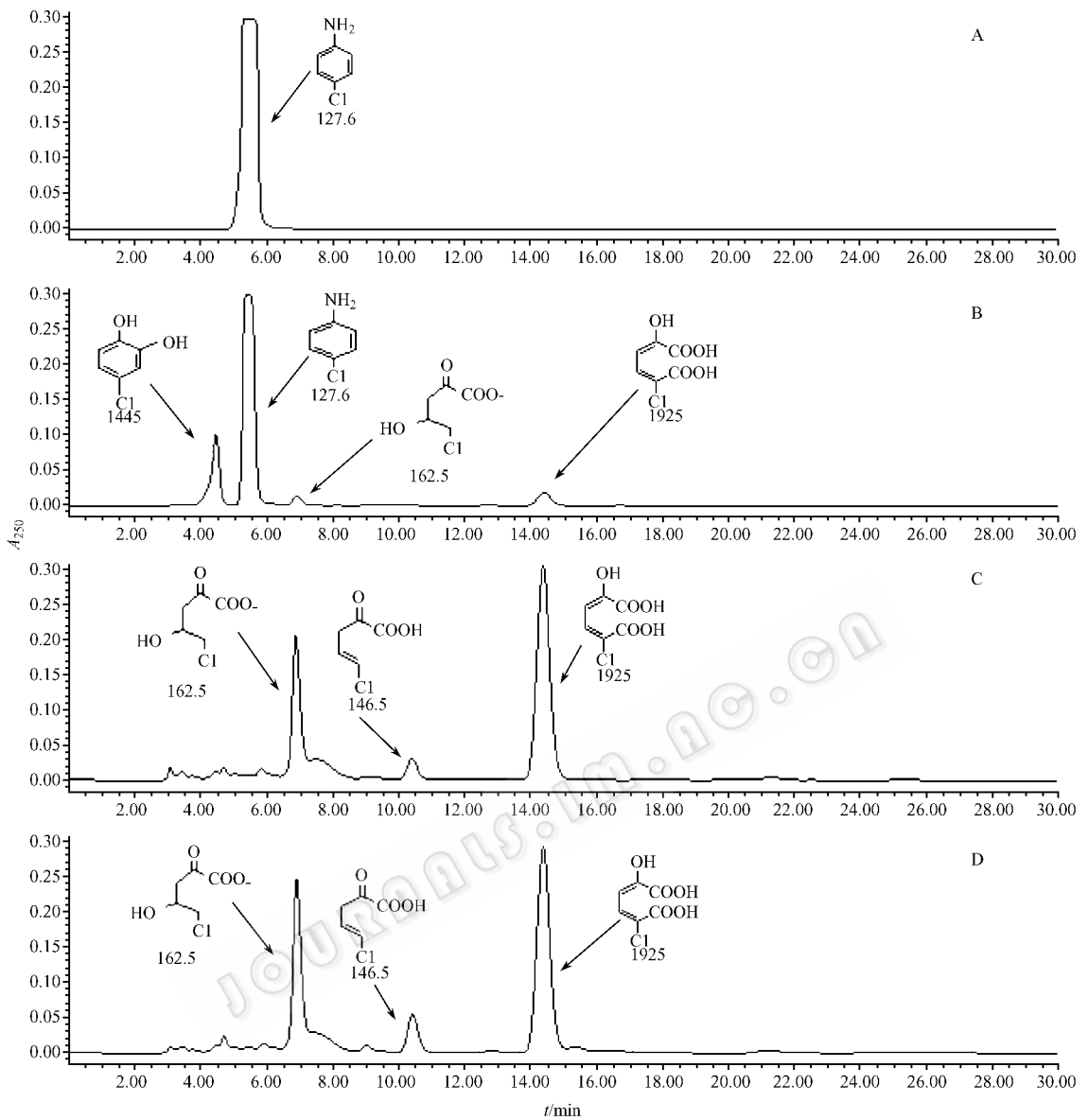


图2 样品的LC/MS分析结果

Fig.2 LC/MS analysis of samples. A Standard *p*-chloroaniline ;B Sample 1 ;C Sample 2 ;D : Sample 3.

的吸收峰根据质谱数据分析应为氯代邻苯二酚 [$C_6O_2H_5Cl$] 的吸收峰,该结果说明对氯苯胺经 PCA039 菌株降解后首先形成了氯代邻苯二酚,与 LC/MS 的结果一致。经过 3d 降解后(图 3-B),其质谱图中峰的数量明显增加,除氯代邻苯二酚 ($m/z = 145.3$) 外,还出现了 2 个新的吸收峰 ($m/z = 163.2$ 和 $m/z = 192.5$);经过 5d 降解后(图 3-C),也出现了新的吸收峰,说明又形成了新的中间产物。 $m/z = 95.6$ 和 $m/z = 146.9$ 的吸收峰结合质谱数据分析和文献 [10~12] 应为氯代乙酸 $CH_2ClCOOH$ 和 5-氯-2-烯戊烯酸 $[C_5H_3O_3Cl]$ 。同时在图 3-C 中已经没有了 $m/z = 128.3$ 的吸收峰,表明对氯苯胺已经被彻底降解。

2.3 讨论

迄今为止的研究表明氯代苯胺化合物的降解须经过修饰邻位代谢途径^[1-4],即使在其他氯代芳烃的微生物降解中,也只有少数通过间位途径(C23D)降解,如 *Pseudomonas putida* GJ31^[13]对 3-氯邻苯二酚以及 *Comamonas testosteroni* I2^[10]对氯代苯酚的降解,具有很高的 C23D 酶活,而没有 C12D 酶活,因此它们是通过间位代谢途径降解相应底物,我们先前的工作发现^[9],*Diaphorobacter* PCA039 菌株在降解对氯苯胺时具有很高的诱导型 C23D 酶活,而没有 C12D 酶活,推测其也是通过间位代谢途径降解对氯苯胺。质谱分析的手段已广泛用于药物合成中的分析和微生物降解代谢过程的研究中,如史相国等^[14]建立了

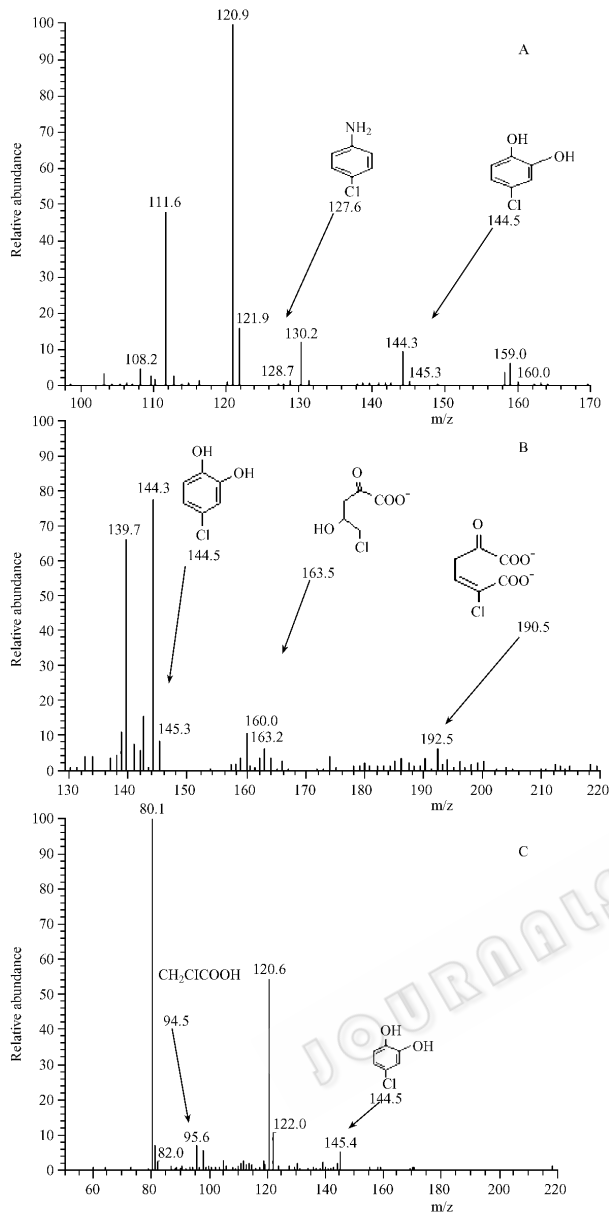


图3 不同样品的 MS 图谱

Fig. 3 Mass spectrometry analysis of samples. A: Sample 1; B: Sample 2; C: Sample 3.

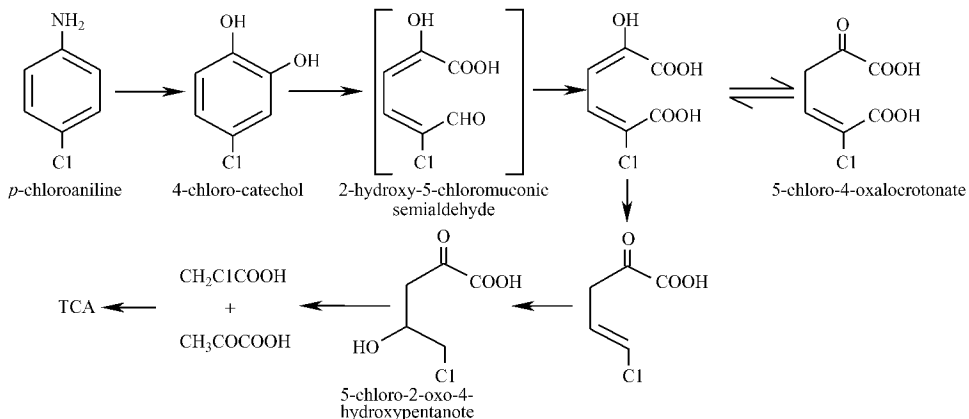


图4 推测的 *Diaphorobacter* sp. PCA039 菌株降解对氯苯胺代谢途径

Fig. 4 Proposed metabolic pathway of the degradation of *p*-chloroaniline by *Diaphorobacter* sp. PCA039.

快速分析抗生素新药必特螺旋霉素中复杂多组分的液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析方法,采用电喷雾离子化源,正离子检测方式对各主要成分进行一级扫描,将对应的准分子离子峰进行二级全扫描质谱分析,通过与对照品的色谱和质谱行为对比,探讨了所得到的10种螺旋霉素类衍生物及其化学结构。Hollender等^[10]用HPLC和ESI-MS手段来分离和鉴定 *Comamonas testosteroni* JH5 降解对氯苯酚的中间代谢产物来分析其代谢途径,Boon^[2],Loid^[11],Schukat^[12]也用质谱手段做了相应的工作。本研究采用LC/MS技术分析了PCA039菌株降解对氯苯胺的中间产物,检测到了4-氯邻苯二酚、5-氯-4-草酰巴豆酸、5-氯-2-氧戊烯酸、5-氯-4-羟-2-酮戊酸等,这些都是典型间位途径的中间代谢产物。间位途径中,还应当存在苯环裂解产物的2-羟基粘糠酸半醛,但在LC/MS图谱中我们却没有找到2-羟基-5-氯-粘糠酸半醛($C_6H_5O_4Cl$, $m/z = 176.5$)的相应质谱峰,其原因可能是该物质在质谱操作中的不稳定性,或该产物在代谢中很快被转化而不积累。PCA039菌株具有很强的诱导型C23D酶活^[9],该酶能以邻苯二酚以及4-氯邻苯二酚为底物,催化形成相应的产物2-羟基粘糠酸半醛或2-羟基-5-氯-粘糠酸半醛;同时PCA039菌株还能以邻苯二酚、4-氯邻苯二酚、2-羟-5-氯-粘糠酸半醛等间位裂解途径的中间产物为唯一碳源进行生长(数据未显示)。依PCA039在降解对氯苯胺时的诱导型邻苯二酚2,3-加双氧酶酶活、以间位裂解途径的中间产物为唯一碳源进行生长的特点,结合LC/MS分析结果,推测其降解对氯苯胺的间位代谢途径如图4,这是对氯苯胺的微生物降解中未曾报道的新降解途径。这仍需分子生物学、生物信息学等相关手段进一步验证,找到相应代谢基因簇,并异源表达分析验证,此工作仍在进行之中。

3 结论

通过降解培养实验、HPLC 和 LC-MS 手段成功鉴定和分析 *Diaphorobacter* sp. PCA039 降解对氯苯胺的代谢中间产物,从而从另一个角度获得代谢对氯苯胺的整个生化代谢途径的推测,证实氯代苯胺通过间位代谢途径是行的通的,并没有形成致死产物。间位代谢途径作为对氯苯胺的除邻位代谢途径的又一个重要的代谢途径,是对氯苯胺微生物降解研究的一个完善。

致谢 质谱工作和分析由北京市理化分析测试中心完成,感谢夏敏老师和北京工业大学任海燕博士的帮助。液质联用工作和分析是在中国科学院化学研究所质谱中心完成,感谢熊少祥老师的帮助。

参 考 文 献

- [1] Helia R, Robinson GK, Bull AT. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology*, 2003, **149**: 3279 - 3287.
- [2] Boon N, Goris J, De Vos P, et al. Genetic diversity among 3-chloroaniline-and aniline-degrading strains of the *Comamonadaceae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(3): 1107 - 1115.
- [3] Zeyer J, Wasserfallen A, Timmis KN. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an *ortho*-cleavage pathway. *Appl Environ Microbiol*, 1985, **50**(2): 447 - 453.
- [4] Hinteregger C, Loidl M, Streichsbier F. Characterization of isofunctional ring-leaving enzymes in aniline and 3-chloroaniline degradation by *Pseudomonas acidovorans* CA28. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **97**(3): 261 - 266.

- [5] Janke D, Ihn W, Tresselt D. Critical steps in degradation of chloroaromatics by *Rhodococci*. IV. Detailed kinetics of substrate removal and product formation by resting pre-adapted cells. *J Basic Microbiol*, 1989, **29**(5): 305 - 314.
- [6] Janke D, Al-Morfarji T, Straube G, et al. Critical steps in degradation of chloroaromatics by *Rhodococci*. I. Initial enzyme reactions involved in catabolism of aniline, phenol and benzoate by *Rhodococcus* sp. An 117 and An 213. *J Basic Microbiol*, 1989, **28**(4): 509 - 518.
- [7] Bartels I, Knackmuss HJ, Reineke W. Suicide inactivation of catechol 2, 3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **47**(3): 500 - 505.
- [8] Klecka GM, Gibson DT. Inhibition of catechol 2, 3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl Environ Microbiol*, 1981, **41**(5): 1159 - 1165.
- [9] 任华峰, 李淑芹, 刘志培. 一株降解对氯苯胺的 *Diaphorobacter* sp. PCA039 的分离鉴定及其降解特性. *环境科学*, 2005, **26**(1): 154 - 158.
- [10] Hollender J, Hopp J, Dott W. Degradation of 4-chlorophenol via the *meta*-cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(11): 4567 - 4572.
- [11] Loidl M, Hinteregger C, Ditzelmueller G, et al. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-borne *Pseudomonas acidovorans* strains. *Arch Microbiol*, 1990, **155**(1): 56 - 61.
- [12] Schukat B, Janke D, Krebs D, et al. Cometabolic degradation of 2- and 3-chloroaniline because of glucose metabolism by *Rhodococcus* sp. An117. *Curr Microbiol*, 1983, **9**(1): 81 - 86.
- [13] Mars AE, Kingma J, Kaschabek SR, et al. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2, 3-dioxygenases and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. *J Bacteriol*, 1999, **181**(4): 1309 - 1318.
- [14] 史相国, 钟大放. LC-MS/MS 法在必特螺旋霉素 I 期临床研究中的应用. *质谱学报*, 2003, **4**(24): 460 - 463.
- [15] Boon N, Goris J, De Vos P, et al. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(7): 2906 - 2913.

A novel metabolism pathway for the biodegradation of chloroanilines

ZHANG Tao^{1, 2}, LIU Shuang-jiang¹, LIU Zhi-pei^{1*}

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Up to date, *p*-chloroaniline was reported to be biodegraded only through *ortho*-or modified *ortho*-cleavage pathway. In this paper, the intermediates of *p*-chloroaniline metabolized by strain *Diaphorobacter* PCA039 were analyzed and identified by HPLC and LC/MS methods. The results showed that intermediates such as 4-chlorocatechol, 2-hydroxy-5-chloromuconic semialdehyde, 5-chloro-4-oxalocrotonate, 5-chloro-2-oxo-4-hydroxypentanote, chloro-acetate were formed and consumed in order during the degradation of *p*-chloroaniline by strain *Diaphorobacter* PCA039. These compounds are the intermediates of a typical *meta*-cleavage pathway. In addition, strain *Diaphorobacter* PCA039 could produce the induced catechol 2, 3-dioxygenase when it grows on *p*-chloroaniline as sole carbon, nitrogen and energy sources, and use the intermediates of the *meta*-cleavage pathway such as catechol, 4-chlorocatechol, 2-hydroxy-5-chloromuconic semialdehyde as sole carbon and energy sources. Combining its physiological and biochemical properties and the results of LC/MS analysis, it was concluded that strain *Diaphorobacter* PCA039 could also degrade *p*-chloroaniline through *meta*-cleavage pathway as Fig. 4, which is a new pathway for the biodegradation of *p*-chloroaniline. It is significant to the study of biodegradation, metabolic mechanism, properties of the enzymes and the expression and regulation of the genes involved in the degradation of *p*-chloroaniline.

Keywords: *p*-chloroaniline; Biodegradation; LC/MS; *ortho*-cleavage pathway; *meta*-cleavage pathway