

苯扎贝特降解菌的筛选及降解特性

杨兴, 薛罡, 赵晓祥*, 刘亚男

(东华大学环境科学与工程学院, 上海 201620)

摘要:【目的】药品苯扎贝特在水环境中频繁检测出,对环境的潜在危害不容忽视。我们筛选分离降解苯扎贝特的细菌,并研究其降解特性。【方法】根据分离菌株的细胞形态结构、生理生化特征及其 16S rRNA 基因序列分析鉴定降解菌,高效液相色谱法测定苯扎贝特,以判定该菌株的降解能力。【结果】分离菌株 B-31 属恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),降解机制是共代谢。降解最佳条件为 30℃、pH 7。此条件下,以 1% 甲醇为初级基质,30mg/L 苯扎贝特的 5 日降解率为 48%。当分别以 5 g/L 葡萄糖、蛋白胨、酵母粉为初级基质时,可使降解率提高到 61%、72.6%、76.67%。【结论】这是国内首次报道恶臭假单胞菌可以通过共代谢降解苯扎贝特,该研究为利用细菌发酵消除水环境中苯扎贝特污染提供基础。

关键词: 药品和个人护理品; 苯扎贝特; 生物降解; 恶臭假单胞菌

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0797-06

近年来,药品和个人护理品(Pharmaceutical and personal care products, PPCPs)作为新污染物,成为研究的热点。迄今为止,人们对 PPCPs 在水环境中的毒理作用及其去除作了大量研究^[1-3]。苯扎贝特(Bezafibrate,图 1)属于 PPCPs 的一种,广泛应用于治疗高血脂,已列入世界上最常用的药品名单^[4]。其在污水处理厂的污水、地表水甚至是饮用水中常被检出^[2,5-7]。虽然环境中低浓度的苯扎贝特不会对生物产生急性或慢性的毒性作用^[8],但最新研究表明它对人体有类雌激素作用^[9],而且已被列入有害物质^[10]。苯扎贝特在环境中的降解效果不一^[11]。报道指出微生物降解是其转化的重要途径^[12-13],但尚不知是何种微生物。本实验采用含有高纯度苯扎贝特的无机盐培养基,筛选分离到一株 *Pseudomonas putida* B-31,可以通过共代谢途径降解苯扎贝特。

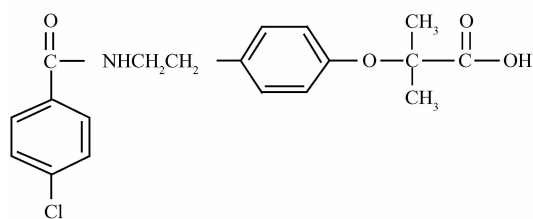


图 1 苯扎贝特的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of bezafibrate.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 甲醇(Honeywell Burdick & Jackson 公司)色谱纯,苯扎贝特(Dr. Ehrenstorfer 公司),纯度 = 99.5%。日本电子 JSM-5600LV 扫描电子显微镜,Agilent 1100 型高效液相色谱仪,色谱数据工作站,Eclipse XDB C18 分析色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5μm),EASYTAK 型 12 管 SPE 固相萃取

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-07-0175);上海市基础研究重点项目(08JC1400500);上海市自然科学基金(10ZR1401100);教育部博士点基金新教师项目(200802551001);长江水环境教育部重点实验室开放基金项目(YRWEF08003)

* 通信作者。Tel: +86-21-67792549; Fax: +86-21-67792522; E-mail: zxx@dhu.edu.cn

作者简介: 杨兴(1985-),湖北恩施人,硕士研究生,研究方向为微生物在水处理中的应用。E-mail: yangxinwww@163.com

收稿日期: 2009-11-25; **修回日期:** 2010-02-07

真空富集装置(上海泉岛公司), C18 固相萃取柱(500 g/3 L)(VARIAN 公司), QSC-12T 型可调氮吹仪(上海泉岛公司), TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.1.2 培养基:无机盐液体培养基^[14];富集培养基:在牛肉膏蛋白胨培养基的基础上加 200 mg/L 苯扎贝特。

1.2 苯扎贝特降解菌的富集驯化及分离

污泥样品采自上海松江污水处理厂。取污泥样品约 2 g 加入 100 mL 含苯扎贝特的无机盐培养基中,并以梯度压力式驯化法驯化,即 100 mL 无机盐培养基中含苯扎贝特依次为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg。由于苯扎贝特几乎不溶于水,为加强其生物可利用性,添加 1 mL 甲醇助溶。培养条件为 30℃、160 r/min。总驯化时间为两个月。然后将培养液 10 倍梯度稀释,涂布在富集培养基平板上,挑取菌落,划线分离得到纯的单菌落。再挑取各纯的单菌落,经过复筛、纯化得到一株可以降解苯扎贝特的菌株 B-31。

1.3 电镜观察

取对数生长期新鲜菌液,离心收集菌体,离心力为 4390 × g,送交东华大学测试中心,利用 JSM-5600LV 扫描电子显微镜观察细胞。

1.4 分离菌株的常规鉴定

菌落的形态观察、革兰氏染色、生理生化等指标测定参照文献[14-15]。

1.5 分离菌株的分子鉴定

对处于对数生长期的菌株 B-31 进行 16S rRNA 基因序列分析,菌株的基因测序分析工作由上海基康生物技术有限公司协助完成。将所得的 DNA 序列,利用 Ribosomal Database Project II 软件 Classifier,对分离的菌株进行分类^[16];同时通过 Blast 检索,在 GenBank 中的已知序列中进行同源性分析,确定与分离菌株同源程度最高的序列。

1.6 分离菌株降解苯扎贝特特性分析

1.6.1 甲醇对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:从富集培养基中收集 B-31 菌体,用生理盐水洗涤,接种到 100 mL 无机盐培养基,其中含 30 mg/L 的苯扎贝特和 1% 甲醇。按 1% 接种量($OD_{600} = 0.01$), 30℃、160 r/min 条件下避光振荡培养。定时取样,测定微生物的生物量(用 OD_{600} 表示)。

同时取样加入 1 mL 甲醇后离心,取上清液,移入活化好的固相萃取柱。将萃取过的小柱用氮吹仪吹干之后,用 8 mL 洗脱液洗脱固相萃取柱,选择分

步洗脱的方法,用试管收集滤液并用氮吹仪吹干,最后加入 1 mL 甲醇:高纯水 = 60:40(V:V) 溶液定溶,利用 HPLC 检测苯扎贝特残留。以上实验组各重复 3 次,下同。

色谱分析条件:Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相^[17]为甲醇:磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L 磷酸二氢钾用磷酸调节 pH 至 3.8) = 6:4(V:V),流速为 1 mL/min,柱温为 25℃,检测波长为 226 nm,进样量为 20 μL。

1.6.2 营养物质对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:在 100 mL 无机盐培养基中分别加入 0.5 g 酵母粉、蛋白胨、葡萄糖,以不加任何营养物质为对照,再加入 3.0 mg 苯扎贝特。每隔 1 d 接种,按 1% 接种量($OD_{600} = 0.01$), 30℃、160 r/min 条件下避光振荡培养。5 d 后,取样检测葡萄糖的浓度变化。另外,分别加入 1 mL 甲醇后离心,上清液经固相萃取后检测经不同时间的苯扎贝特降解情况。

1.6.3 pH 值对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:将 100 mL 无机盐培养基的 pH 调至 5、6、7、8、9,加 0.5 g 酵母粉和 3.0 mg 苯扎贝特。按 1% 接种量($OD_{600} = 0.01$), 30℃、160 r/min 条件下避光振荡培养。5 d 后,检测苯扎贝特降解情况。

1.6.4 温度对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:在 100 mL 无机盐培养基中,加 0.5 g 酵母粉和 3.0 mg 苯扎贝特。按 1% 接种量($OD_{600} = 0.01$), 160 r/min 条件下避光振荡培养。培养温度分别选取 15、20、25、30 和 35℃。5 d 后,检测苯扎贝特降解情况。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离纯化及其形态特征

经过 2 个月的梯度压力式驯化后,在富集培养

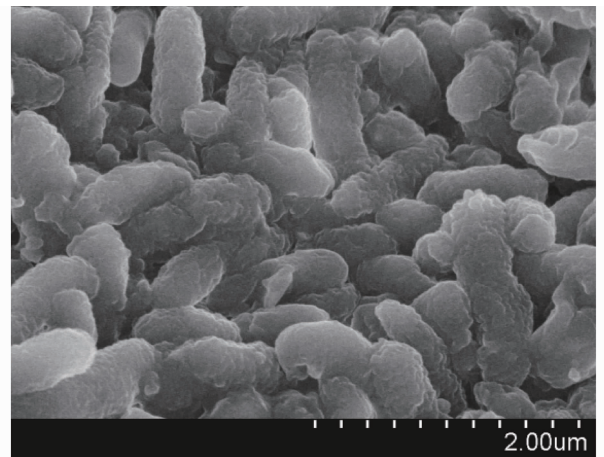


图 2 菌株 B-31 的扫描电镜照片(20000 ×)

Fig. 2 Scan electron micrograph of strain B-31(20000 ×).

基平板上进行划线分离,挑取单菌落,反复纯化后得到 1 株能降解苯扎贝特的菌株 B-31。当温度 30℃ 时,其在富集培养基平板上生长 24 h 后,菌落直径大小为 0.5 mm - 1.5 mm,圆形、湿润、低突起、边缘整齐、表面光滑。菌体的扫描电镜照片见图 2。

2.2 分离菌株的鉴定

菌株 B-31 革兰氏染色、淀粉水解、蔗糖、吡啶、明胶液化、甲基红、V-P、乙醇氧化、产硫化氢等试验呈阴性,过氧化氢酶、葡萄糖分解、柠檬酸盐、运动性、氧化酶、硝酸盐还原等试验呈阳性。参照《常见细菌系统鉴定手册》,初步鉴定为假单胞菌属

(*Pseudomonas*)。

16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号为 GU001818。利用 16S rRNA 专业网站 Ribosomal Database Project II 提供的工具 Classifier,对菌株 B-31 的核酸序列进行分析,同样认定为假单胞菌属细菌。在 Blast 网站,对 16S rRNA 基因序列进行对比分析,发现与恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 同源性达到 99% 以上。因此,确定该菌为恶臭假单胞菌。选出与该序列相关性较高的核酸序列,利用 MEGA 4.0 程序构建系统发育进化树,如图 3 所示。

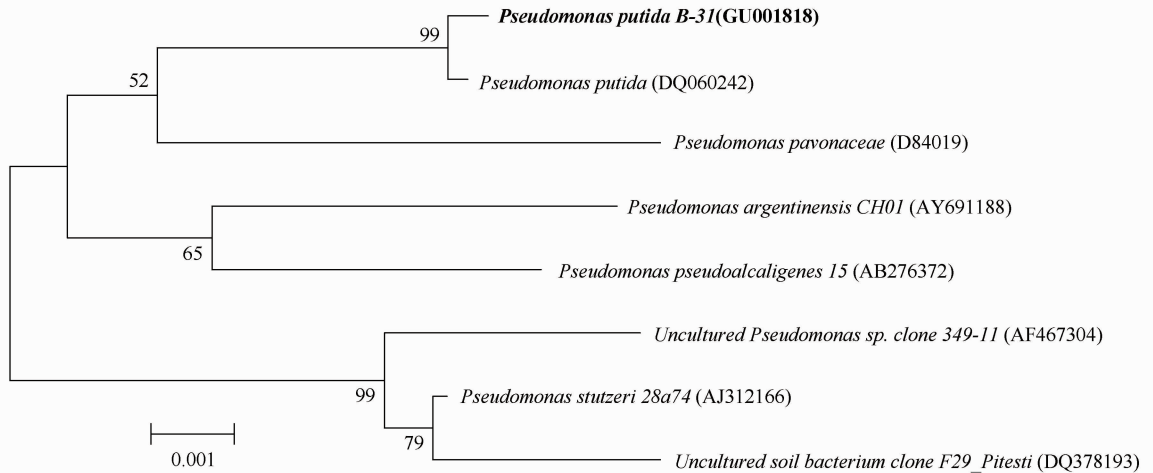


图 3 基于 16S rRNA 序列的菌株 B-31 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of strain B-31. Note: The trees were constructed by using the neighbor-joining method. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching points. The scale bar represents 0.001 substitution per nucleotide site and GenBank accession numbers are in parentheses.

2.3 菌株 B-31 对苯扎贝特的降解

2.3.1 甲醇对菌株 B-31 降解苯扎贝特的影响: 对照组苯扎贝特没有检测到降解,也没有观察到有菌

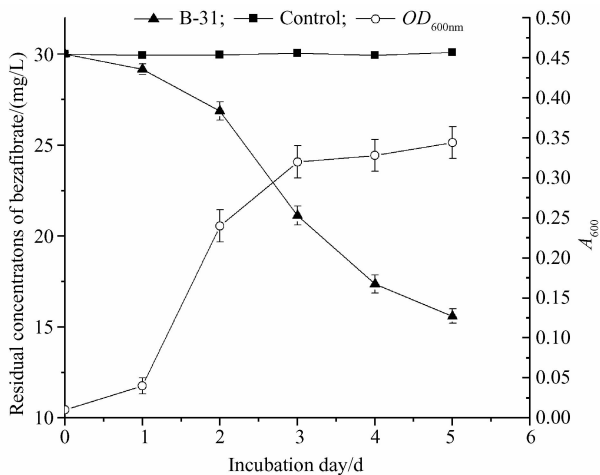


图 4 甲醇对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响

Fig. 4 Effect of methanol on bezafibrate degradation by strain B-31.

体生长。实验组 B-31 的生长情况和降解苯扎贝特的结果如图 4 所示。结果表明菌株 B-31 只能在添加甲醇的条件下,降解苯扎贝特。苯扎贝特的降解与菌体生长呈正相关。菌株在培养 1 d 内,生长处于滞留期,生长较慢,苯扎贝特降解也较慢;1 d 后,菌体生长速度加快,苯扎贝特降解也加速,3 d 后,细菌生长趋于稳定,至第 5 天时,降解率达到 48%。

高效液相色谱检测苯扎贝特降解 0 d 和 5 d 的图谱,见图 5。从图中看出,经过 5 d 的降解,苯扎贝特的含量明显减少。图中 2 min 左右出现的峰是甲醇。4 min 左右出现的峰有可能是代谢产物,有待进一步研究。

2.3.2 营养物质对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:图 6 表明,在不加任何营养物质条件下,菌株 B-31 对苯扎贝特几乎不降解,分别加入酵母粉、蛋白胨、葡萄糖后,苯扎贝特降解率明显增加。尤其是加入酵母粉后,5 d 降解率达 76.67%。结合 2.3.1 节

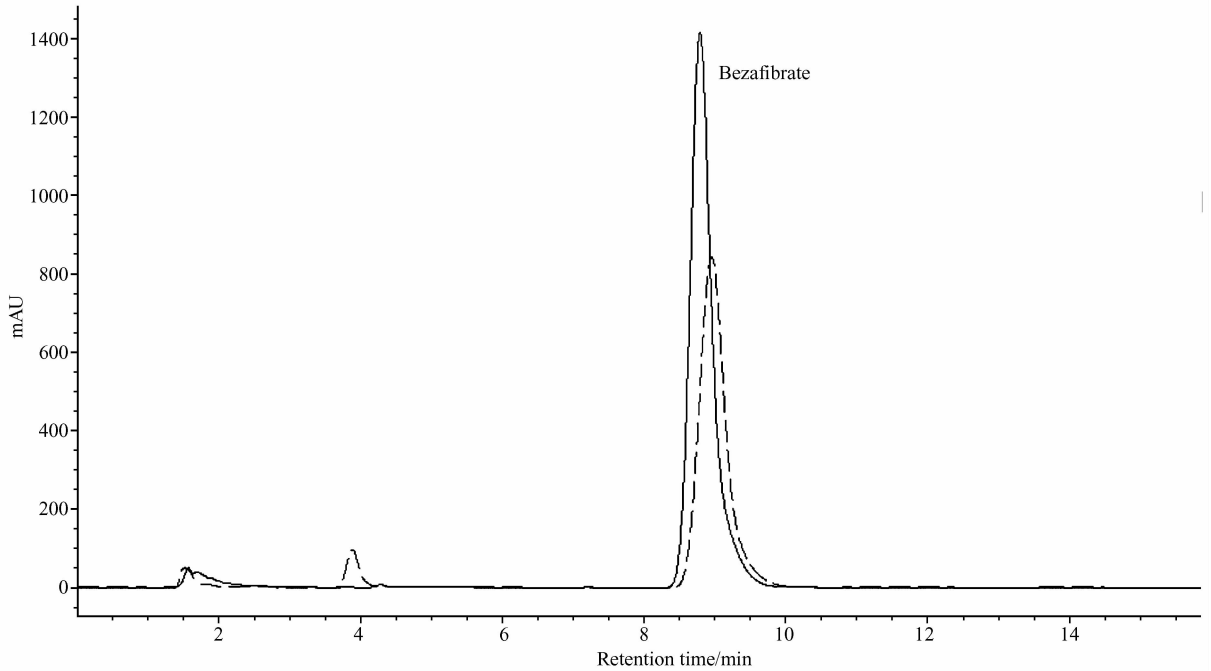


图5 苯扎贝特降解 0 d(实线)和 5 d(虚线)的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of bezafibrate degradation by strain B-31 on day 0 (solid line) and day 5 (dashed line).

的结果,说明菌株 B-31 是以共代谢机制降解苯扎贝特。这印证了 Quintana 的实验结果。Quintana 等以苯扎贝特为唯一碳源和能源,添加新鲜的活性污泥,经过 28 d,没有发现苯扎贝特有被降解的迹象。而在对照组加入了牛奶,结果苯扎贝特可以完全转化,说明活性污泥中的微生物是通过共代谢机制降解苯扎贝特^[13]。已知恶臭假单胞菌能降解芳香族化合物等难降解物质,在环境中广泛存在^[18]。因此,苯扎贝特在环境中的降解应与恶臭假单胞菌有关。

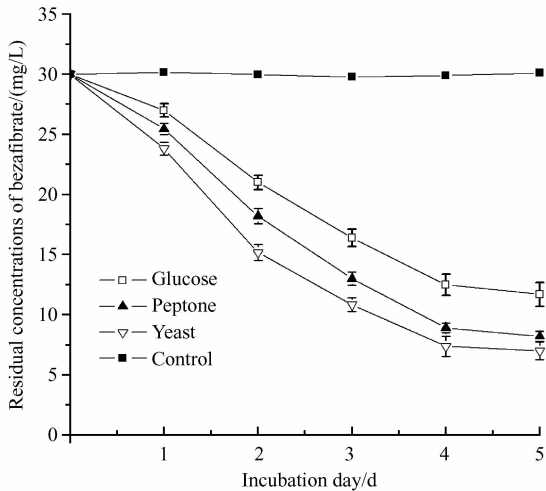


图6 营养物质对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响

Fig. 6 Effect of different nutrients on bezafibrate degradation by strain B-31.

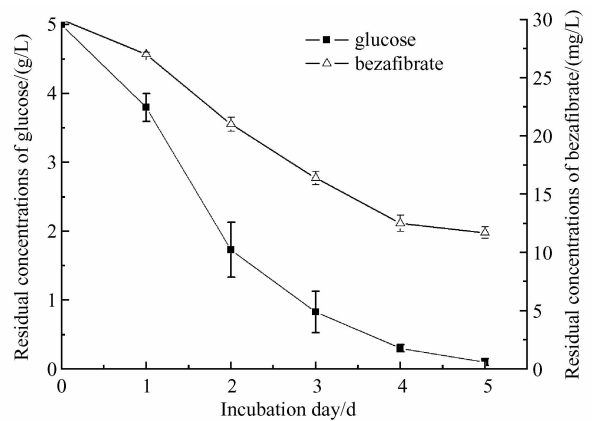


图7 苯扎贝特的降解与葡萄糖的消耗之间的关系

Fig. 7 Relationship between bezafibrate removal and glucose consumption.

糖消耗过程接近零级反应动力学,其生物降解动力学方程为: $c = -1.635t + 5.145$, $R^2 = 0.9769$ 。说明葡萄糖浓度相对于细菌生物量来说是饱和的。2-5 d时,葡萄糖消耗过程接近一级反应动力学,其生物降解动力学方程为: $\ln c = -0.957t + 2.5632$, $R^2 = 0.9924$ 。说明葡萄糖浓度相对于细菌生物量来说是不足的,葡萄糖浓度成了其消耗速率的制约因素。0-4 d时,苯扎贝特的降解过程接近零级反应动力学,其生物降解动力学方程为: $c = -4.56t + 30.5$, $R^2 = 0.9916$ 。这可能与苯扎贝特不易溶解于水,体系中苯扎贝特的浓度相对稳定有关。而在 4 d 之后,葡萄糖的量很少,苯扎贝特的降解速率随之

从图7的葡萄糖消耗曲线来看,0-2 d时,葡萄

减慢。

2.3.3 初始 pH 值对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:从图 8 可以看出, 菌株 B-31 降解苯扎贝特的最适初始 pH 为 7。当初始 pH 低于或高于 7 时, 菌株 B-31 对苯扎贝特的降解效果较差, 如培养基的初始 pH 为 5.0 时, 苯扎贝特的降解最低 (22.4%); 在碱性条件下 (pH = 9) 降解率为 26.5%。

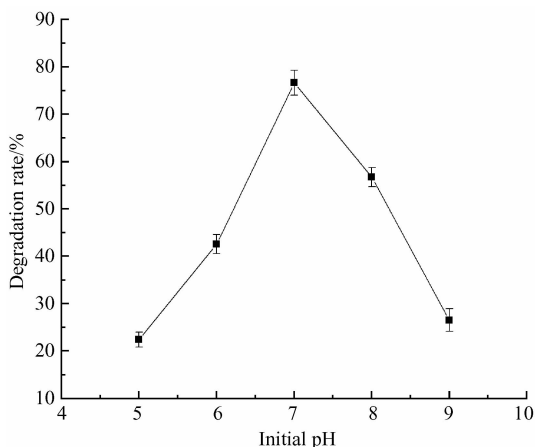


图 8 初始 pH 值对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响

Fig. 8 Effect of initial pH on bezafibrate degradation by strain B-31.

2.3.4 温度对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响:由图 9 可见, 在 30℃ 培养条件下, 菌株对苯扎贝特降解效果好, 培养 5 d 后降解率达到 76.67%, 而在 15℃ 时降解率仅为 11.5%。

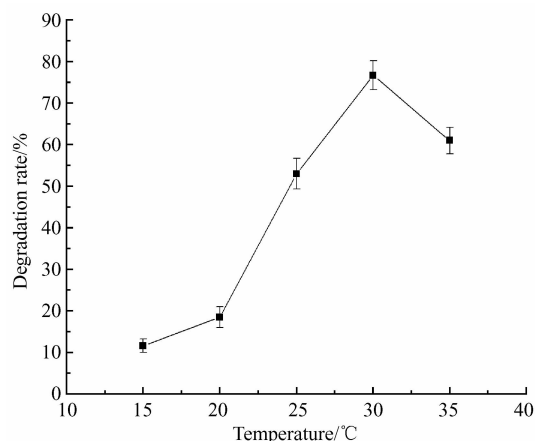


图 9 温度对 B-31 菌株降解苯扎贝特的影响

Fig. 9 Effect of temperature on bezafibrate degradation by strain B-31.

3 结论

从活性污泥中分离到可以共代谢降解苯扎贝特的菌株 B-31。根据生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析, 确定分离菌株 B-31 属于恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)。据我们所知, 这是国内首次

报道恶臭假单胞菌可以通过共代谢降解苯扎贝特。其代谢产物有待于进一步研究。

菌株 B-31 降解苯扎贝特的最适条件为: 培养基初始 pH 值 7.0, 温度 30℃。高效液相色谱法分析, 最适条件下, 菌株 B-31 在含有 1% 甲醇和 30 mg/L 的苯扎贝特的无机盐培养基中生长 5 d 后, 苯扎贝特的降解率为 48%。与甲醇相比, 酵母粉、蛋白胨、葡萄糖等营养物质可以使苯扎贝特降解率明显增加, 尤其是加入 5 g/L 酵母粉后, 5 d 降解率达 76.67%。

参考文献

- [1] Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 2002, 131(1-2): 5-17.
- [2] Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(2): 122-159.
- [3] Onesios KM, Yu JT, Bouwer EJ. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation*, 2009, 20(4): 441-466.
- [4] Cermola M, Dellagreca M, Iesce MR, Previtera L, Rubino M, Temussi F, Brigante M. Phototransformation of fibrates drugs in aqueous media. *Environmental Chemistry Letters*, 2005, 3(1): 43-47.
- [5] Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research*, 1998, 32(11): 3245-3260.
- [6] Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 2005, 122(3): 205-209.
- [7] Jones OA, Lester JN, Voulvoulis N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water?. *TRENDS in Biotechnology*, 2005, 23(4): 163-167.
- [8] Rosal R, Rodea-Palomares I, Boltes K, Fernández-Piñas F, Leganés F, Gonzalo S, Petre A. Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, 17(1): 135-144.
- [9] Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, Parrella A. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environment International*, 2009, 35(5): 826-829.

- [10] Quinn B, Gagne F, Blaise C. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *The Science of the Total Environment*, 2008, 389(2-3): 306-314.
- [11] Lindqvist N, Tuhkanen T, Kronberg L. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*, 2005, 39(11): 2219-2228.
- [12] Kunkel U, Radke M. Biodegradation of acidic pharmaceuticals in bed sediments: insight from a laboratory experiment. *Environmental science & technology*, 2008, 42(19): 7273-7279.
- [13] Quintana JB, Weiss S, Reemtsma T. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 2005, 39(12): 2654-2664.
- [14] 沈萍,陈向东. 微生物学实验. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [15] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73(16): 5261.
- [17] 吴洁. 反相高效液相色谱法测定苯扎贝特的含量. 化学试剂 (*Chemical Reagents*), 2004, 26(005): 285-286.
- [18] Loh KC, Cao B. Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*—A review of proteomics studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43(1): 1-12.

Isolation of a bacterial strain capable of bezafibrate-degrading and biodegradation characteristics

Xing Yang, Gang Xue, Xiaoxiang Zhao*, Yanan Liu

(College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: [**Objective**] Bezafibrate is one of the most frequently detected pharmaceuticals at relatively high concentration in surface water and even in drinking water. Biodegradation is an important way to solve the problem. This study aimed to isolate, identify and characterize a bezafibrate-degrading bacterium. [**Methods**] Strain B31 capable of degrading bezafibrate by cometabolism was isolated from activated sludge of sewage treatment plant in Shanghai, China, and identified based on its morphology, physiology and phylogenetic analysis of 16S rRNA sequence. To evaluate the ability of degradation, the concentration of bezafibrate was detected by high performance liquid chromatography. [**Results**] Strain B31 was identified to be closely related to *Pseudomonas putida*. The optimum condition of degrading bezafibrate was at 30°C, pH 7. After 5 days, Strain B31 could degrade 30 mg/L bezafibrate by 48% in liquid mineral salt medium with 1% methanol as primary substrate. And the rate of degradation could enhance to 61%, 72.6%, 76.67%, when 5g/L glucose, peptone and yeast extract as primary substrate, respectively. [**Conclusion**] The strain has the potential for bezafibrate biodegradation.

Keywords: Pharmaceutical and Personal Care Products; Bezafibrate; Biodegradation; *Pseudomonas putida*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University of China (NECT-07-0175), the Shanghai Key Basic Research Program of China (08JC1400500), Shanghai natural science foundation(10ZR1401100), Ph. D. Programs Foundation of Chinese Ministry of Education (No. 200802551001) and Key Laboratory Fund Project of Yangtze water environment of Ministry of Education (YRWEF08003)

* Corresponding author. Tel: +86-21-67792549; Fax: +86-21-67792522; E-mail: zxx@dhu.edu.cn

Received: 25 November 2009/ Revised: 7 February 2010