

高浓度氯苯优势降解菌的筛选及其降解酶的纯化

李朝霞¹, 牛仙^{2,3}, 何文艺¹, 仝妍妍¹, 金辉², 丁成^{2*}

¹ 盐城工学院化学与生物工程学院, ² 环境科学与工程学院, 盐城 224051

³ 江苏大学环境学院, 镇江 212013

摘要: 【目的】分离纯化出一株高浓度氯苯优势降解菌株, 对其所产氯苯降解酶进行分离与纯化, 为该菌株及其氯苯降解酶的研究提供理论参考。【方法】利用梯度富集培养技术和无菌滤纸片平板法分离菌株, 通过形态特征及 16S rRNA 基因序列分析初步鉴定菌株, 用气相色谱法测定培养液中氯苯浓度, 以单位细胞氯苯降解率评价菌株对氯苯的降解能力, 以氯苯降解率表示氯苯降解酶的活性。取纯化菌株的发酵酶液制备粗酶液, 经硫酸铵梯度盐析、透析脱盐、DE-52 离子交换层析、G-100 凝胶层析和透析浓缩后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检验酶的纯度并测定酶的分子量。【结果】从氯苯长期驯化的成熟期活性污泥中筛选到一株以氯苯为唯一碳源和能源的氯苯优势降解细菌 LW13, 该菌株在以 2000 mg/L 氯苯为唯一碳源的无机盐培养基中仍能正常生长, 其单位细胞氯苯降解率可达 1.37×10^{-10} 。扫描电镜观察到该菌株细胞大小约为 $2.3 \times 0.8 \mu\text{m}$, 长有数根端生鞭毛。16S rRNA 基因序列相似性比较表明该菌株与 *Lysinibacillus fusiformis* (溶藻菌) 的相似性达 95.5%。所纯化的氯苯降解酶为胞外酶, 带正电荷, 其分子大小约为 57 kDa。整个纯化过程中酶纯化倍数化达 8.0 倍, 酶活回收率达 52.51%, 酶量回收率达 6.57%。纯化后的氯苯降解酶在 30℃ - 55℃ 和 pH 在 6.0 - 8.0 之间都保持较高的酶活性, 其最适反应温度和 pH 分别在 40℃ 和 pH8.0 左右。【结论】所分离的氯苯优势降解菌属于 *Lysinibacillus* 属菌株, 该菌株能有效降解高浓度 (500 - 2000 mg/L) 氯苯废水, 通过逐级分离纯化, 可获得氯苯降解酶纯酶, 纯化指标符合分离纯化基本规律, 纯化效果较为理想。

关键词: 单位细胞氯苯降解率, 溶藻菌, 降解酶, 纯化倍数

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 05-0455-09

氯苯 (chlorobenzene, CB) 主要用作高沸点溶剂, 也可用作乙基纤维素和许多树脂的溶剂, 生产多种其他苯系中间体^[1]。它们的广泛使用会导致环境中氯苯类有机物浓度的增高, 对人体健康可造成严重的影响和对生态系统构成严重的威胁^[2-3]。微生物降解被认为是氯代苯类化合物在自然界中降解的主要途径。研究氯苯类的生物可降解性, 对于污水

处理和资源化利用都有促进作用。为了修复氯苯对环境造成的破坏, 国内外学者从不同环境中分离了多种能降解氯苯等有机氯的微生物及其降解酶, 以期采用生物方法修复被氯苯污染的自然环境, 但研究的重点多集中于对中、低浓度氯苯污染的处理, 而对于因长期积累而导致的高浓度氯苯降解菌及其降解酶的研究却不多。本试验分离纯化出一株高浓度

基金项目: 国家自然科学基金 (21277115); 科技部科技型中小企业技术创新基金 (09C26213203714); 江苏省环保厅项目 (2012025); 2010 年度江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队项目

* 通信作者。Tel: +86-515-88168322; Fax: +86-515-88168611; E-mail: ycdingc@163.com

作者简介: 李朝霞 (1973 -), 女, 湖北孝感人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物学、生物化工 and 环境保护研究。E-mail: lxdzc@163.com

收稿日期: 2012-10-14; **修回日期:** 2013-01-29

氯苯优势降解菌株,对其所产氯苯降解酶进行分离纯化,为该菌株及其降解酶的后续研究提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌源和培养基:菌源来自盐城工学院环境学院自制设备“新型组合式生物氯苯滴滤塔”中经氯苯长期驯化的成熟期泥样。无碳源培养基:不含碳源的无机盐培养基^[4];富集培养基:1 L 无碳源培养基中加入梯度氯苯(250、500、1000、1500、2000 mg);中间培养基:1 L LB 培养基^[4]中添加2000 mg氯苯;鉴别培养基:1 L 无碳源培养基中添加2000 mg氯苯和15g琼脂;发酵培养基:1 L 无碳源培养基中添加1500 mg氯苯。试验用水:为防止自来水中氯离子对试验结果的干扰,所有试验用水均为双蒸水。上述培养基配成后立即于121℃灭菌20–25 min。

1.1.2 主要仪器:7202 可见分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司);TDL-40B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Lentri-fuge5804R 高速冷冻离心机(德国艾本德公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);CXG-1 电脑恒温层析柜(上海沪西分析仪器有限公司);EZ purifier III 核酸蛋白分离纯化系统(上海利穗化工科技有限公司);8C 稳流稳压电泳仪(南达生物技术开发公司);SHA-B 水浴恒温振荡器(金坛福华仪器有限公司);BCD-257SL Haier 冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 氯苯优势降解菌的梯度富集培养

称取泥样5 g,放入装有玻璃珠的500 mL锥形瓶中,向其中加入300 mL双蒸水,超声波振摇约2 h,使土样与水充分混合,形成均匀分散的菌悬液。分别吸取10%菌悬液接种于含250、500、1000、1500、2000 mg/L氯苯的150 mL富集培养基中,在37℃、2.5 × g 的恒温摇床振荡培养4 d。

1.3 氯苯优势降解菌的筛选与鉴定

初筛:采用无菌滤纸片平板法^[5]。适当稀释富集培养菌液,取1 mL涂布于中间培养基上于37℃培养2 d,将长出的菌落逐一挑入事先装有约130 μL中间培养基的96孔平板上培养1 d后,用6 mm无菌滤纸片吸收培养液后贴于鉴别培养基上,每皿均匀地贴5个,于37℃培养2 d,向滤纸片上滴加少量

1 mol/L的AgNO₃,根据滤纸片周围生长圈和显色圈大小,判断菌株的降解能力,挑取3–5株降解能力较大者。

复筛:将初筛得到的菌株活化后制成菌悬液,用平板菌落计数法计数后以10%(V/V)接种量接入250 mL发酵培养基中,于37℃水浴恒温振荡器中发酵培养4 d,以不含菌悬液的发酵培养基为空白对照,按1.7方法测定发酵培养基中氯苯浓度,选单位细胞对氯苯降解率最高的菌株作为试验菌株,按菌种保存方法置于–70℃超低温冰箱中保存。

1.4 菌株的鉴定

细胞形态观察:委托南京农业大学生命科学实验中心通过扫描电子显微镜观察试验菌株的细胞形态。

菌株的16SrRNA序列分析^[5]:试验菌株16S rRNA的PCR扩增和序列测定:取试验菌株对数生长期新鲜菌液,离心收集菌体,提取基因组DNA作为扩增模板。16S rRNA扩增的PCR反应所用的正向引物Pf:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;反向引物Pr:5′-GGTACCTTGTACGACTT-3′,分别对应于菌的16S rRNA基因的8–27和1492–1510碱基。PCR反应体系(50 μL)为:模板2 μL, dNTP(25 mmol/L)5 μL,引物(1 mmol/L)各1 μL,10 × PCR缓冲液5 μL, Mg²⁺(25 mmol/L)4 μL, Taq酶(5 U/μL)0.4 μL,超纯水31.6 μL。PCR反应条件:94℃ 4 min;94℃ 1 min;54℃ 1 min;72℃ 1.5 min,循环30次;72℃延伸7 min。产物进行电泳检测,菌种测序工作委托上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.5 氯苯降解酶的存在部位

将筛选出的菌株活化后制成菌悬液,以10%(V/V)接种量接入500 mL发酵培养基中,37℃水浴恒温振荡器发酵培养4 d,于4℃、1800 × g 冷冻离心10 min后,洗清上清液于4℃、16000 × g 冷冻离心20 min,得胞外粗酶液,装入截留分子量为25000的透析袋于40%的PEG 1000溶液中搅拌脱水浓缩后用pH8.0的Tris缓冲液定容至100 mL。合并离心沉淀物,加入少许pH8.0的Tris缓冲液,冰浴下用细胞破碎机破碎细胞后,于4℃、16000 × g 冷冻离心20 min,得胞内粗酶液,定容至10 mL。分别测定胞内粗酶液和胞外粗酶液的酶活以确定降解酶的存在部位,取酶活大者作为发酵粗酶液。

1.6 氯苯降解酶的分离纯化

按 1.2.4 方法制备发酵粗酶液 500 mL, 将发酵粗酶液用 90% 饱和硫酸铵盐析, 盐析液于 4℃、16000 × g 离心 10 min, 沉淀用双蒸水溶解后装入截留分子量为 25000 透析袋中于 Tris-HCl 8.0 缓冲液中搅拌透析过夜以脱盐, 再于 40% 的 PEG 1000 溶液中搅拌透析浓缩定容至 50 mL。以 0.05 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液为离子交换层析和凝胶层析洗脱液, 以 0.2 mol/L、pH8.0 的 Tris 缓冲液为离子交换层析解吸液, 透析脱盐酶液在层析柱 (内压 0.1 - 0.2 MPa, 内径 1.6 cm, 长度 40 cm) 中按常规操作进行 DE-52 阴离子交换层析后再进行 G-100 凝胶层析, 每次层析加样量均为 2 mL, 层析液每 5 mL 收集一管, 将酶活最大的各管收集于透析袋中浓缩后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳^[7] 判断其纯度, 如此反复直至 SDS-PAGE 凝胶上获得单一条带。以每个蛋白标准的分子量对数对它的相对迁移率作图得标准曲线, 量出未知蛋白的迁移率即可测出其分子量。以样品在 SDS-PAGE 凝胶上的条带判断蛋白纯度。相对迁移率 = 蛋白样品距加样端迁移距离 (cm) / 溴酚蓝区带中心距加样端迁移距离 (cm)。

1.7 氯苯浓度的测定

用气相色谱法测定氯苯浓度。绘制氯苯浓度与峰面积标准曲线: 准确称取 3.000 g 氯苯, 少量丙酮助溶后用正己烷定容至 10 mL 制成氯苯标准储备液, 用正己烷分别稀释氯苯标准储备液至 1500、1000、750、500、250 和 125 mg/L。取 2 只 20 mL 的分液漏斗, 将分液漏斗的上下两个塞子涂抹上凡士林以防泄漏, 用约 4 mL 正己烷反复冲洗 1 mL 氯苯溶液于分液漏斗中进行萃取, 再分别用 2 mL 和 2 mL 正己烷重复萃取 2 次, 每次萃取过程中均应反复振摇并注意放气。收集上层的正己烷于另一分液漏斗中, 再加少量的无水硫酸钠^[8-9] 反复振摇脱水, 直至瓶底出现结晶为止。将萃取液用正己烷定容至 10 mL。萃取后用气相色谱仪测定各浓度下氯苯的峰面积, 每浓度测定 2 次, 取平均值。以氯苯浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

气相色谱条件: 进样量 1 μL, 进样口温度 200℃, 检测器温度 250℃。色谱柱: Agilent 19091J-413 HP-5 (30 m × 320 μm × 0.25 μm)。柱温: 采用程序升温, 初温 70℃, 保留 1 min, 升温速度 10℃/min, 终温 110℃, 保留 1 min。汽化室温度:

200℃。ECD 检测器, 检测室温度: 250℃。气体流速: 载气 (氮气) 45 mL/min, 氢气 40 mL/min, 空气 450 mL/min。进样口分流, 分流比是 20:1, 分流流量为 40.0 mL/min。

以样液代替标准氯苯溶液, 正己烷萃取后用气相色谱仪测定样液中氯苯浓度。

1.8 酶活性测定

将 1 mL 氯苯降解酶液加入 9 mL、pH 7.0、1500 mg/L 的氯苯溶液中, 35℃ 水浴加热 10 min 后, 沸水浴 2 min 以终止酶反应。定义氯苯降解酶液在 35℃、pH 7.0 条件下 1 min 降解 1 mg/L 氯苯浓度称为一个酶活单位 (U)。酶活与比活性的计算公式分别为:

$$\nu(U) = \frac{(y - y_1)}{k_1 \times 114 \times 10} \times B_1 \times V \quad (1)$$

$$\lambda(U/mg) = \frac{\nu}{x} \quad (2)$$

公式 1 中, ν 为酶活, 单位为 U; y 为空白对照液中氯苯的峰面积; y_1 为预处理后酶液中氯苯的峰面积; k_1 为氯苯与峰面积标准曲线线性方程的斜率; B_1 为测酶活时待测酶液稀释倍数; V 为待测酶液的总体积, 单位为 mL。公式 2 中, λ 为比活性, 单位为 U/mg; x 为待测酶液的酶量, 单位为 mg。

为克服测定期间氯苯萃取率、挥发等带来的误差, 每个菌样和酶液均分别设有空白对照菌液和空白对照酶液。空白对照菌液为以蒸馏水代替菌悬液的的发酵培养基, 空白对照酶液除以蒸馏水代替酶液外, 其余处理与酶液相同。

1.9 酶量测定

酶量用 Bradford^[10] 考马斯亮蓝法测定, 牛血清白蛋白为标准蛋白绘制标准曲线。

$$x(mg) = \frac{y_2 - b_2}{k_2} \div 1000 \times B_2 \times V \quad (3)$$

公式 3 中, y_2 为稀释酶液在 595 nm 下的吸光度值; b_2 为标准蛋白浓度与吸光度标准曲线线性方程的截距; k_2 为标准蛋白浓度与吸光度标准曲线线性方程的斜率; B_2 为待测酶液稀释倍数; V 和 x 与公式 1 和公式 2 中相同。

2 结果和分析

2.1 氯苯降解菌的筛选与鉴定结果

2.1.1 氯苯降解菌的筛选结果: 按 1.2 方法梯度富

集培养氯苯降解菌,用 1.3 方法在鉴别培养基平板上初筛到 5 株氯苯优势降解菌,分别命名为 LW2, LW7, LW13, LW18 和 LW24。用 1.3 方法将初筛菌株进行复筛,其结果如表 1。用 1.7 方法测定出空白对照菌液中的氯苯峰面积为 258407,氯苯降解率 = (空白对照菌液中氯苯峰面积 - 样液中氯苯峰面积) / 空白对照菌液中氯苯峰面积。单位细胞氯苯降解率 = 氯苯降解率 / (接种量 × 发酵液体积 × 细胞浓度)。

由表 1 可知,初筛所得的 5 株优势降解菌对氯苯的降解率均在 80% 以上,但相同培养条件下,菌株 LW13 较其它 4 株具有更高的氯苯降解能力,其 10% 接种量下的氯苯降解率和单位细胞氯苯降解率

分别为 93.83% 和 1.37×10^{-10} ,因此选菌株 LW13 作为最终的优势降解菌株。表 1 还表明, LW2 和 LW24 的氯苯降解率相差很大,而其单位细胞氯苯降解率却很接近; LW7 比 LW18 的氯苯降解率高,而 LW7 比 LW18 的单位细胞氯苯降解率却低。这是因为在实际操作过程中,同批培养的不同菌株甚至是同一菌株的不同批次培养中细胞浓度不可能完全相同,因此,虽然接种量 (V/V) 相同,但实际接种的细胞总量却不同。因此,目前多数文献中仅用某底物的降解率来评价某菌株的降解能力的方法不尽合理,合理的评价指标应该是单位细胞底物降解率或相同接种细胞总量下的底物降解率。

表 1. 初筛菌株细胞浓度及其氯苯降解率

Table 1. Growth of the isolated strains and proportional degradation of chlorobenzene (CB) with the strains

Strains by primary screening	Dilution ratio		Cell concentration / (cfu/mL)	Peak area of CB / (Hz*s)	Proportional degradation of CB / %	Proportion of CB degraded per cell
	10^{-6}	10^{-7}				
LW2	186	48	4.8×10^8	50236	80.56	6.71×10^{-11}
LW7	282	35	3.16×10^8	35271	86.35	1.09×10^{-10}
LW13	274	22	2.74×10^8	15942	93.83	1.37×10^{-10}
LW18	268	32	2.94×10^8	46923	81.84	1.11×10^{-10}
LW24	193	42	4.2×10^8	23946	90.73	8.64×10^{-11}

2.1.2 氯苯降解菌的筛选结果:用 1.4 方法对菌株 LW13 进行鉴定,其扫描电镜结果如图 1 所示,其 16S rDNA 序列测定结果已提交 GenBank,登录号为 JN166076。构建的系统发育树如图 2 所示。

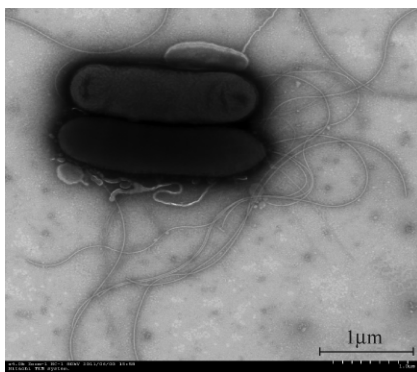


图 1. 菌株 LW13 的扫描电镜图片 (×4000)

Figure 1. Scanning Electron Microscope photograph of strain LW13.

图 1 表明该细胞呈直杆状,直杆两端圆头,细胞大小约为 $2.3 \times 0.8 \mu\text{m}$,长有数根端生鞭毛。

16S rRNA 扩增和序列测定由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,得到的测序结果已上传至 GenBank (登录号为 JN166076)。用 Blast 搜索程

序从 GenBank 中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列,用 CLUSTAL 1.8 进行多序列比对,根据 Kimura 2-parameter 模型估算系统进化距离矩阵,用 MEGA3.0 软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining) 进行聚类分析,其系统发育树如图 2 所示。由图 2 知,菌株 LW13 与 *Lysinibacillus fusiformis* (溶藻菌) 聚在一起,表明该菌属于 *Lysinibacillus* 属的一个菌株。

2.2 发酵粗酶液的选择

取胞内粗酶液和胞外粗酶液各 1 mL,分别作适当稀释,按 1.7 方法测定酶液中氯苯浓度,测定出空白对照酶液中的氯苯峰面积为 255800。按 1.9 方法测定酶液中酶量,按 1.8 方法测定并计算酶液的酶活和比活性。结果如表 2 所示。

由表 2 可知,尽管胞内粗酶液的酶量约为胞外粗酶液的 2.66 倍,但胞外粗酶液的酶活却约为胞内粗酶液的 389 倍,致使胞外粗酶液的比活性为胞内粗酶液的 1032 倍,加之胞内粗酶液的酶活极低,说明氯苯降解酶为胞外酶,应取胞外粗酶液作为后续分离纯化酶液。胞外粗酶液的比活性仅为 1.40 U/mg,说明胞外粗酶液中有效成分纯度极低,还需对其进行多级分离纯化。

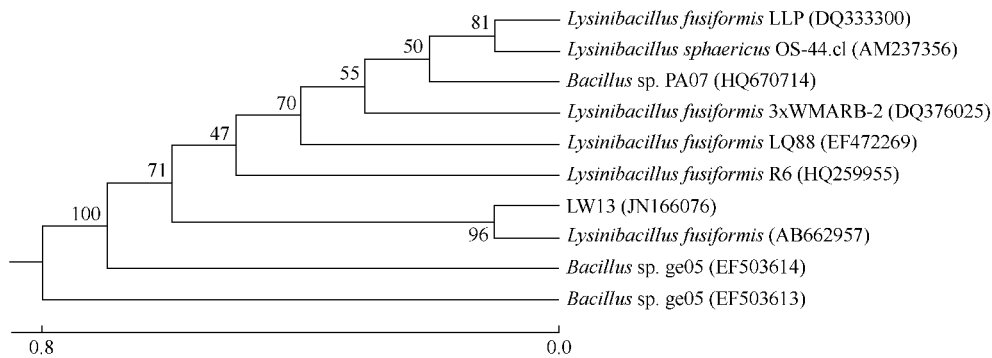


图 2. 基于 16S rRNA 部分基因序列构建的菌株 LW13 及相近物种的 NJ 系统发育树 (结点处数字示 bootstrap 值, 菌株后代码为 GenBank 序列登录号)

Figure 2. NJ tree of LW13 and other similar bacteria resulting from analysis of the 16S rDNA partial sequences based on Kimura 2-parameter model. Numbers at nodes correspond to percentage bootstrap values for 1000 replicates. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

表 2. 发酵粗酶液的酶活与比活性

Table 2. Enzyme activity and specific activity of the crude enzyme

Crude enzyme	Volume of crude enzyme /mL	Dilution times B1	Peak area of CB	Total activity /U	Dilution times B2	A_{595nm}	Total protein /mg	Specific activity / (U /mg)
Intracellular	10	1	236700	0.34	200	0.772	253.7	0.001
Extracellular	100	4	70290	133.44	8	0.726	95.5	1.397

2.3 氯苯降解酶的分离纯化

2.3.1 SDS-PAGE 电泳结果: 用 1.6 方法对胞外粗酶液进行各级分离纯化, 并着重对离子交换洗脱酶液、离子交换解吸酶液和凝胶层析酶液进行了 SDS-PAGE^[7] 分析, 电泳结果见图 3。

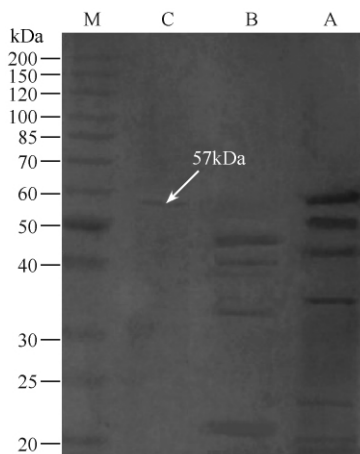


图 3. 层析酶液的 SDS-PAGE 电泳

Figure 3. Analysis of chromatography enzyme solution by SDS-PAGE. A: Eluted enzyme after ion-exchange chromatography; B: Desorbed enzyme after ion-exchange chromatography; C: Enzyme after gel chromatography; M: Protein mark.

由图 3 可知, 离子交换洗脱酶液 (A 液) 和离子交换解吸酶液 (B 液) 中均含有数条带, 且两酶液的条带相互交错, 少有相似条带, 说明两酶液均含有数种分子量大小不同的酶, 且所含酶完全不同。而凝胶层析纯化酶液 (C 液) 仅含一条带, 说明 C 液已纯化完全。C 液的一条带与 A 液中的第一个条带近似等位, 说明目标酶存在于离子交换洗脱液中, 该酶应带正电荷。按 1.6 方法计算蛋白相对迁移率, 确定酶的分子量约为 57 kDa。

2.3.2 降解酶的纯化方案评价: 按 1.9 方法测定各级分离纯化酶液的酶量, 按 1.7 和 1.8 方法测定相应的氯苯浓度并计算酶活和比活性, 进一步可计算出纯化倍数、酶活回收率和酶量回收率, 比较各级纯化过程的分离效果, 结果见表 3。计算公式如下: 纯化倍数 = 每步的比活性 / 粗酶液比活性; 酶活回收率 = 每步的酶活 / 粗酶液的酶活 $\times 100\%$; 酶量回收率 = 每步的酶量 / 粗酶液的酶量 $\times 100\%$ 。

由表 3 可知, 随着酶的不断分离纯化, 其有效成分在不断降低, 回收率减少, 但其比活力在不断地增大, 纯化倍数也随之上升。整个纯化过程中酶纯化倍数达 8.0 倍, 酶活回收率达 52.51%, 酶量回收率达 6.57%, 分离效果较理想。

表 3. 降解酶的纯化方案评价

Table 3. Purification of chlorobenzene-degrading enzyme

Enzyme in each purification step	Total activity /U	Total protein/mg	specific activity/(U/mg)	Purification /fold	activity recovery/%	protein recovery/%
Crude enzyme	667.18	479.03	1.39	1	100	100
After dialysis desalination	558.93	313.87	1.78	1.28	83.77	65.52
After ion-exchange chromatography	446.06	100.81	4.42	3.18	66.86	21.04
After gel chromatography	350.33	31.49	11.13	8.01	52.51	6.57

2.4 氯苯降解纯酶性质的初步研究

2.4.1 最适反应温度测定: 将酶反应体系分别在 20、30、40、50、60、70 和 80℃ 反应 30 min, 测酶活, 结果如图 4 所示。

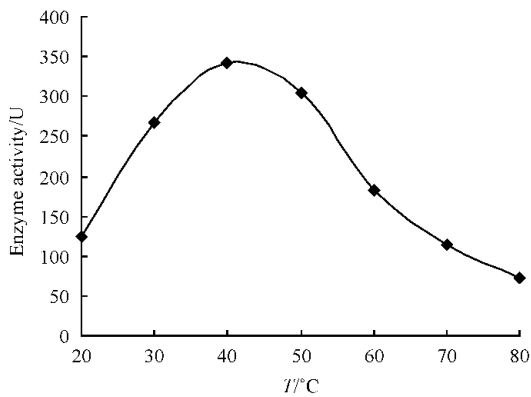


图 4. 温度对氯苯降解纯酶酶活的影响

Figure 4. Effect of temperature on enzyme activity.

由图 4 可知, 氯苯降解纯酶的最适反应温度为 40℃ 左右, 温度适应范围较广, 在 30℃ - 55℃ 都保持较高的酶活性。

2.4.2 最适反应 pH 测定: 将酶反应体系分别在 pH 为 4.0、5.0、6.0 和 7.0 的磷酸盐缓冲液, pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 为 9.0 和 10.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中 30℃ 反应 30 min, 测酶活, 结果如图 5 所示。

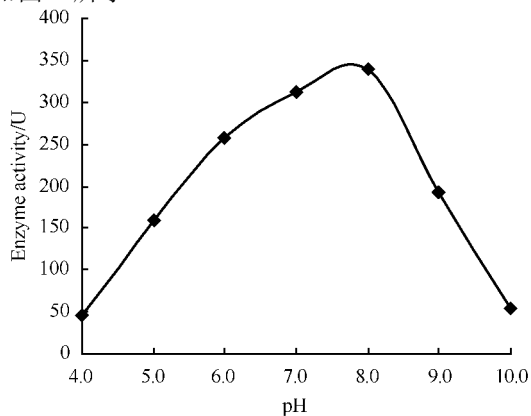


图 5. pH 值对氯苯降解纯酶酶活的影响

Figure 5. Effect of pH on enzyme activity.

由图 5 可知, 氯苯降解纯酶的最适反应 pH 为 8.0, pH 在 6.0 - 8.0 之间都保持较高的酶活。

3 结论和讨论

筛选出一株以氯苯为唯一碳源和能源的氯苯优势降解菌 *Lysinibacillus sp.* LW13, 菌体细胞大小约为 $2.3 \times 0.8 \mu\text{m}$, 长有数根端生鞭毛。 *Lysinibacillus sp.* LW13 在以 2000 mg/L 氯苯为唯一碳源的无机盐培养基中仍能正常生长, 在 37℃、pH 7.0 下发酵 4 d, 其 10% 接种量的氯苯降解率达 93.83%, 其单位细胞氯苯降解率可达 1.37×10^{-10} , 本试验所分离的一种氯苯降解纯酶属于胞外酶, 带正电荷, 分子量大小为 57 kDa 左右。该酶的温度和 pH 的适应范围较广, 分别在 30℃ - 55℃ 和 pH 在 6.0 - 8.0 之间都保持较高的酶活性, 其最适反应温度和 pH 分别在 40℃ 和 8.0 左右。该酶经发酵液、离心分离、盐析、层析至透析等各级分离纯化过程中, 随着分离纯化步骤的增加, 酶的总活力和酶回收率均逐渐下降, 而酶的纯化倍数却成倍增加, 符合酶分离纯化过程中的必然规律。

事实上, 氯苯的完全降解需要几个酶的共同作用才能完成, 而本试验仅分离到一个氯苯降解纯酶。这是因为在从粗酶液至纯酶的分离纯化过程中, 要想分离得到某一目标纯酶, 必须要求该酶在酶液中有足够的量和较高的酶活。酶纯化倍数越高, 所分离的目标酶种类越单一, 在大量的非氯苯降解酶被除去的同时, 不可避免也会损失掉那些含量低却有较高甚至是极强氯苯降解能力的酶。若某些氯苯降解酶有一定含量但酶活却相对较低, 由于分离纯化的是以酶活为标准的氯苯优势降解菌, 所以很容易被淘汰。因此, 本试验所分离的氯苯降解酶侧重于纯度, 而非全部氯苯降解酶。若要得到较多种类的

氯苯降解酶,则需要设计亲和层析等高选择性的分离纯化技术。

杨洪江等^[11]从化工厂排污口污泥样品中先后分离筛选出7株能够以氯苯为唯一碳源的降解氯苯的微生物菌株,分别属于放线菌目的考克氏菌属(KD139)、红球菌属(KD140和KD142)和节杆菌属(KD230和KD232),芽胞杆菌属(KD178),黄色单胞菌目的寡食单胞菌属(KD237)和短小芽胞杆菌^[12](KD131)。其中寡食单胞菌KD237降解氯苯能力最高,24 h内氯苯分解率达60.78%。温钢^[13]从活性污泥中筛选到一株具有降解氯苯功能的菌株JH02,经鉴定该菌株属于链球菌属(*S. treptococcus* sp.),其在最佳条件下氯苯的降解率可达94.7%。李明堂^[14]等从化工厂混合污泥中分离出的氯苯降解菌株为不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*),该菌株以初始浓度为50 mg/L的氯苯为唯一碳源和能源时,120 h内菌株对氯苯的降解率高达98.2%。刘慧慧等^[15],从盐城芦苇湿地根际土壤中分离得到一株可高效降解1,2-二氯苯的菌株DL-1,经鉴定为蜡质芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)。在适宜条件下1,2-二氯苯降解率达到80.3%。戴清华等^[16]从某污水处理曝气池的活性污泥中分离出一株能够以1,4-二氯苯为唯一碳源和能源生长的菌株DEB-1,初步鉴定为黄杆(*Flavobacterium* sp.),1,4-二氯苯降解率最高达94.5%。但在GenBank中未发现可降解氯苯类化合物的*Lysinibacillus fusiformis*菌株,因此菌株LW13的分离进一步丰富了可降解氯苯类化合物的菌种资源。由于该菌株高浓度的氯苯无机盐培养基中仍有极强的氯苯降解能力,所以菌株LW13在高浓度(500-2000 mg/L)氯苯废水的生物降解方面具有很好的应用前景。

通过逐级分离纯化,可以获得具有较高酶活回收率和一定酶量回收率的氯苯降解纯酶,若增加发酵粗酶液量,则有望获得更多的氯苯降解纯酶液乃至该纯酶的结晶,进一步完成该酶的其他酶学性质(如 K_m 、 V_m 、 K_{cat} 、激活剂和抑制剂、温度稳定性、pH稳定性等)、降解氯苯机制、N-端序列或内肽序列测定、反推出其可能的DNA基因结构、构建基因工程菌等后续研究,最终实现规模化生产。

参考文献

- [1] Wang YF, Zhang ZM, Hu YM, Gong J. The research progress of treating chlorobenzenes in wastewater by microorganisms. *Microbiology*, 2008, 35 (6): 949-954. (in Chinese)
王玉芬, 张肇铭, 胡筱敏, 贡俊. 微生物法去除水中氯苯类化合物的研究进展. 微生物学通报, 2008, 35 (6): 949-954.
- [2] Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation*, 2008, 19 (4): 463-480.
- [3] Chen CY, Yue K, Chen ZM, Zhou XY, Zhao HQ. Advances in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Microbiology*, 2007, 27 (6): 100-103. (in Chinese)
陈春云, 岳珂, 陈振明, 周晓云, 赵洪启. 微生物降解多环芳烃的研究进展. 微生物学杂志, 2007, 27 (6): 100-103.
- [4] 黄秀梨, 辛明秀. 微生物学试验指导. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [5] Song DX, Yin R, Lin XG, Wang YM, Zhang HY, Wang JJ. Screening of an antagonistic bacterial strain against salmonella and its application in in-site bioremediation of salmonella-contaminated soils. *Microbiology*, 2010, 37 (1): 30-36. (in Chinese)
宋德显, 尹睿, 林先贵, 王一明, 张华勇, 王纪杰. 一株沙门氏菌拮抗菌的筛选及其在污染土壤原位修复中的应用. 微生物学通报, 2010, 37 (1): 30-36.
- [6] Ding C, Li ZX, Yan JL. Isolation, Identification and Degradation Characterization of *p-Chloroaniline* Degrading Strain. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2011, 86 (4): 454-459.
- [7] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆试验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用. 第二版. 武汉: 武汉大学出版社, 2001.
- [9] Huo T, Lu CX, Li BD, Hu AJ. Capillary gas chromatographic separation and analysis of

- p*-chlorotoluene and *p*-chlorobenzaldehyde. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2006, 23 (4) : 711-714. (in Chinese)
- 霍婷, 吕春绪, 李斌栋, 户安军. 氯苯和对氯苯甲醛的气相色谱法分离分析. *光谱实验室*, 2006, 23 (4) : 711-714.
- [10] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore, DD. 精编分子生物学实验指南. 金由辛, 等译校. 第五版. 北京: 科学出版社, 2008.
- [11] Yang HJ, Lu YZ. Isolation and characterization of chlorobenzene degrading bacteria. *Microbiology*, 2009, 36 (4) : 575-580. (in Chinese)
- 杨洪江, 卢彦珍. 氯苯降解菌的筛选鉴定及降解特性研究. *微生物学通报*, 2009, 36 (4) : 575-580.
- [12] Yang HJ, Lu YZ, Zhang ZZ. Isolation and identification of a chlorobenzene degrading bacterium strain. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2009, 24 (5) : 6-9. (in Chinese)
- 杨洪江, 卢彦珍, 张朝正. 一株氯苯降解菌株的分离鉴定. *天津科技大学学报*, 2009, 24 (5) : 6-9.
- [13] Wen G. Isolation of chlorobenzene-degrading strain and its degradation conditions. *Amino Acids&Biotic Resources*, 2009, 31 (2) : 1-3. (in Chinese)
- 温钢. 氯苯降解菌的筛选鉴定及降解条件研究. *氨基酸和生物资源*, 2009, 31 (2) : 1-3.
- [14] Li MT, Hao LL, Cui JT, Cao GJ, Xu JB. Identification and characterization of an aerobic bacterium degrading chlorobenzene. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (5) :586-592. (in Chinese)
- 李明堂, 郝琳琳, 崔俊涛, 曹国军, 徐镜波. 好氧氯苯降解菌的分离鉴定. *微生物学报*, 2010, 50 (5) : 586-592.
- [15] Liu HH, Yang CS, Ding C. Isolation and characterization of a 1, 2-dichlorobenzene-degrading bacterial strain. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5 (9) : 2151-2155. (in Chinese)
- 刘慧慧, 杨春生, 丁成. 一株1,2-二氯苯降解菌的分离鉴定及其降解特性. *环境工程学报*, 2011, 5 (9) : 2151-2155.
- [16] Dai QH, Cao XD, Sun XW. Study on isolation and characterization of a dichlorobenzene-degrading bacterial strain. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3 (12) : 2219-2222. (in Chinese)
- 戴青华, 曹晓丹, 孙向武. 1,4-二氯苯降解菌的分离及其降解特性研究. *环境工程学报*, 2009, 3 (12) : 2219-2222.

Screening of chlorobenzene-degrading bacterium and purification of its degradation enzyme

Zhaoxia Li¹, Xian Niu^{2,3}, Wenyi He¹, Yanyan Tong¹, Hui Jin², Cheng Ding^{2*}

¹ School of Chemical and Biological Engineering, ² School of Environmental Science and Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224051, China

³ School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: [Objective] We screened a bacterial strain capable of degrading chlorobenzene, and purified the corresponding degradation enzyme. [Methods] The strain was screened by gradient enrichment culture and sterile filter paper plate method, and identified by morphology and 16S rRNA gene sequence. Chlorobenzene concentration in the liquid culture was determined by gas chromatography. Degradation capability was assayed by the proportion of chlorobenzene degraded per cell. The purity quotient and molecular weight of the purified degradation enzyme were determined by gel electrophoresis. [Results] The isolated bacterium, LW13, used chlorobenzene in activated sludge as sole carbon and energy source. Cells were 2.3 μm long and 0.8 μm wide, with several terminal flagella. Strain LW13 was 95.5% similar to *Lysinibacillus fusiformis*, and its degradation enzyme was a positively-charged exoenzyme (molecular weight about 57 kDa). The optimal temperature and pH of the purified enzyme were approximately 40 °C and 8.0, respectively. [Conclusion] Strain LW13 belongs to genus *Lysinibacillus*, and can degrade chlorobenzene (500 – 2000 mg/L).

Keywords: Proportion of Chlorobenzene (CB) degraded per cell, *Lysinibacillus fusiformis*, degradation enzyme, purification

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21277115), by the Innovation Fund for Technology Based Firms of Department of Science and Technology of China (09C26213203714), by the Science Fund of the Environmental department in Jiangsu Province (2012025) and by the Jiangsu Province College “Youth Project” Science and Technology Innovation Team in 2010

* Corresponding author. Tel: +86-515-88168322; Fax: +86-515-88168611; E-mail: ycdingc@163.com, lxdzdc@163.com

Received: 14 October 2012/Revised: 29 January 2013

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内,“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。