

双菌种协同代谢酚类化合物的机制研究

刘蛟, 贾晓强*, 闻建平

(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:以恶臭假单胞菌和热带假丝酵母为对象,进行了苯酚、间甲酚和 4-氯酚的生物降解实验,研究了 2 种菌的纯培养和混合培养方式下 3 种酚的降解特性和代谢机制.结果表明,当苯酚、间甲酚和 4-氯酚的初始浓度分别为 100、50 和 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,相对于纯培养,混合培养的动力学常数 k 的绝对值分别提高了 19.0%、2.6% 和 46.4%.苯酚羟化酶和邻苯二酚 1, 2-双加氧酶的活性测定表明,2 种菌降解苯酚均经过邻位裂解途径.采用液相色谱(HPLC)和液质联用技术(LC-MS)进一步分析表明,混合培养中热带假丝酵母降解苯酚和 4-氯酚分别积累的中间代谢物顺,顺-粘糠酸和 4-羧基亚甲基丁-2-烯-4-交脂,以及降解间甲酚过程中积累的中间代谢物二羟基苯甲酸、3-羟基顺,顺粘糠酸和 3-羧基己二酸能够被恶臭假单胞菌协同代谢,从而促进 3 种酚的降解.

关键词:协同代谢;酚类化合物;恶臭假单胞菌;热带假丝酵母;生物降解

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)10-3053-06

Co-metabolism of Dual Culture in the Degradation of Phenolic Compounds

LIU Jiao, JIA Xiao-qiang, WEN Jian-ping

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The biodegradation of phenol, *m*-cresol and 4-chlorophenol by the pure and mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Candida tropicalis* was investigated. The results showed that, with the initial concentrations of 100, 50 and 60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for phenol, *m*-cresol and 4-chlorophenol, respectively, and an increase in the absolute value of the kinetic constant k of 19.0%, 2.6% and 46.4% for the degradation of phenol, *m*-cresol and 4-chlorophenol, respectively, was reached by dual culture compared with pure culture. The activity assays of phenol hydroxylase and catechol 1, 2-dioxygenase demonstrated phenol was degraded via the *ortho*-cleavage pathway in both of the two species. Further experiments via high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry techniques (LC-MS) suggested the degradation of three phenolic compounds could be accelerated due to co-metabolism by *Pseudomonas putida* of *cis*, *cis*-muconic acid, and 4-carboxymethylenebut-2-en-4-olide accumulated in phenol and 4-chlorophenol degradation, respectively, 3, 4-dihydroxybenzoic acid, 2-maleylacetate, and 3-oxoadipate in the degradation of *m*-cresol by *Candida tropicalis* in dual culture.

Key words: co-metabolism; phenolic compounds; *Pseudomonas putida*; *Candida tropicalis*; biodegradation

苯酚及其衍生物是一类芳香族污染物,广泛存在于制药、炼焦、炼油、塑料、造纸和纺织等工业废水中^[1],对人类和环境造成了极大危害^[2],国内外相继把苯酚列入环境优先污染物名单^[3].生物法处理含酚废水由于经济、高效和无二次污染等优点被广泛研究和应用.目前,大量高效苯酚降解菌已经被筛选出来^[4-6],但是含酚废水往往同时含有多种难降解化合物^[7],限制了纯菌株生物降解的应用发展.

研究发现多种微生物的混合培养有利于它们代谢功能的有机结合^[8],增强降解能力和扩大降解范围. Zeng 等^[9]利用 *Micrococcus* sp. 和 *Alcaligenes faecalis* JH 1013 混合培养能降解苯酚的浓度高达 3 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Jiang 等^[10]证实 *Propioniferax*-like PG-02 和 *Comamonas* sp. PG-08 联合培养时降解苯酚的能力强于单一菌株.李旭春等^[11]发现红串红球菌 F-10 与混合菌降解烷基酚时具有协同作用. Bae

等^[12]发现 *Arthrobacter* sp. CPR706 在与 *Pseudomonas* sp. TCP114 共同培养时获得了降解苯酚、对氯酚和三氯苯酚的能力.多种微生物混合培养形成好氧颗粒在废水处理中的应用^[13-15]和 Brusbach 等^[16]采用 4 种假单胞菌混合降解 13 种氯代苯胺、氯代苯甲酸和氯苯类化合物的报道,也表明了多菌种降解复杂污染物的可行性.然而很少有报道从代谢角度阐明多菌种混合培养的相互作用机制.

本研究选取恶臭假单胞菌和热带假丝酵母进行苯酚、间甲酚和 4-氯酚降解实验,并检测酚类降解过程中的胞外中间代谢物及其变化,分析了 2 菌种混合培养协同代谢机制,以期复合菌群降解污染

收稿日期:2010-12-06;修订日期:2011-05-16

基金项目:国家自然科学基金项目(20906070, 20976124)

作者简介:刘蛟(1987~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境生物技术, E-mail: sophia_heart@ sina. com

* 通讯联系人, E-mail: xqjia@ tju. edu. cn

物提供基础数据.

1 材料与方法

1.1 菌种及其培养

恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* WQ-03 购于中国科学院北京微生物研究所, 热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心.

恶臭假单胞菌和热带假丝酵母的活化与富集分别采用 LB 培养基和 YEPD 培养基. 酚类降解实验采用无机盐培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NH_4Cl 0.4, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, CaCl_2 0.02, 痕量微量元素 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), pH 7.0. 培养条件均为 30°C , $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$.

1.2 酚类降解实验

恶臭假单胞菌和热带假丝酵母分别接种于 LB 培养基和 YEPD 培养基富集培养, 在指数增长阶段后期离心收获, 用无机盐培养基清洗 2 次并分别稀释成适宜浓度的菌悬液备用. 单一酚类的降解实验在 250 mL 锥形瓶中进行, 取适宜量的恶臭假单胞菌、热带假丝酵母和混合菌悬液接种于 50 mL 无机盐液体培养基中, 并使其初始 D_{600} 为 0.3, 其中混合菌种中的恶臭假单胞菌和热带假丝酵母的接种量分别是其纯培养的一半, 苯酚、间甲酚和对氯苯酚初始浓度分别为 100、50 和 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 每隔一定时间测定细胞浓度和底物浓度.

1.3 样品分析

苯酚、间甲酚和对氯酚的浓度测定均采用高效液相色谱 (HPLC). 吸取 1 mL 培养液经 0.22 μm 微孔膜过滤后测定含量. 色谱条件如下: 色谱柱为 Venusil-C18(L) (5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm); 流动相为 $V(\text{甲醇}): V(\text{水}) = 4:3$; 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 30°C ; 检测波长为 280 nm.

细胞含量采用分光光度计测定, 用 D_{600} 表示.

1.4 酶活性的测定

苯酚羟化酶、邻苯二酚 1, 2-双加氧酶和邻苯二酚 2, 3-双加氧酶的活性测定参考文献 [17], 采用分光光度法. 蛋白质含量测定采用 Bradford 法 [18].

1.5 高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 分析

样品及其预处理方法: 样品经过高速离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 后收集上清后采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 再用甲酸酸化至 pH 4.0, 然后用乙酸乙酯等体积萃取, 萃取液经旋转蒸发仪蒸

干后重新溶于 1 mL 甲醇中.

液质联用由高效液相色谱 (Agilent Technologies 1200 Series, Agilent Inc., USA) 和质谱 (microTOF-Q II mass spectrometer of Bruker Daltonik, Bremen, Germany) 组成. 高效液相色谱条件同 1.3 节, 质谱采用 ESI 离子源, 负离子扫描模式, 扫描范围 (m/z): 50 ~ 3 000, 毛细管柱压为 2.6 kV, 源温为 180°C , 干燥气和雾化气为氮气, 流速分别为 6.0 和 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 质谱通过 Bruker Data-analysis 4.0 分析结果.

2 结果与分析

2.1 3 种酚类降解特性

图 1 显示, 恶臭假单胞菌、热带假丝酵母和混合菌完全降解苯酚所用时间分别为 28、24 和 22 h, 混合培养比纯培养的降解速率略有提高; 而纯培养和

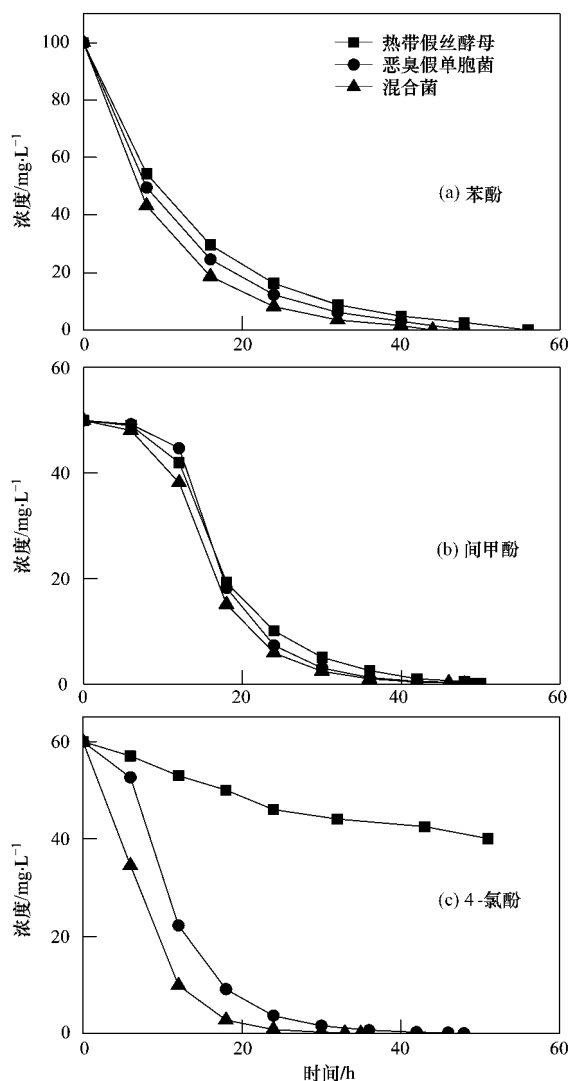


图 1 纯培养和混合培养降解苯酚、间甲酚和 4-氯酚
Fig. 1 Phenol, *m*-cresol and 4-chlorophenol degradation
by pure and dual cultures

混合培养完全降解间甲酚所用的时间在 48 ~ 50 h 之间,混合培养不能够明显提高间甲酚的降解速率;恶臭假单胞菌降解 4-氯酚在 51 h 内浓度仅仅下降了 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,热带假丝酵母则能够在 48 h 内完全降解.与热带假丝酵母相比,混合培养完全降解 4-氯酚所用时间缩短至 36 h,混合菌能够明显地促进 4-氯酚的降解.

在底物浓度较低的情况下,底物抑制效应可以忽略不计,并且细胞增长量很小,因此降解动力学方程可以表达为: $\ln c = -kt + A$,式中 k 为降解速率动力学常数^[19].

由表 1 可见在苯酚和 4-氯酚的初始浓度分别为 100 和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,底物降解很好地符合一级动力学特征,而间甲酚初始浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,纯菌株与混菌均有明显的迟滞期,为考察最大降解速率,拟合动力学方程的数据不包含迟滞期部分.表 1 中热带假丝酵母降解苯酚、间甲酚和 4-氯酚的降解动力学常数 k 的绝对值均高于恶臭假单胞菌.与热带假丝酵母相比,混合菌降解苯酚和 4-氯酚的动力学常数 k 的绝对值分别提高了 19.0% 和 46.4%.而混合菌降解间甲酚 k 值的绝对值仅仅提高了 2.6%.混合菌对 4-氯酚的降解具有明显的促进作用.

2.2 胞外代谢物液相色谱检测

在 4-氯酚降解过程中,热带假丝酵母和混合培养菌的胞外培养液的液相色谱图有 2 个色谱峰,其中保留时间为 8.2 min 的是 4-氯酚的色谱峰,另外

表 1 纯培养和混合培养降解苯酚、间甲酚和 4-氯酚的动力学方程
Table 1 Dynamic equation of degradation of phenol, *m*-cresol and 4-chlorophenol in pure and dual cultures

底物	菌株	动力学方程	相关系数 (R^2)
苯酚	恶臭假单胞菌	$\ln c = -0.1591t + 4.6576$	0.9967
	热带假丝酵母	$\ln c = -0.1745t + 4.6038$	0.9995
	混合菌株	$\ln c = -0.2077t + 4.5928$	0.9998
间甲酚	恶臭假单胞菌	$\ln c = -0.1226t + 5.2234$	0.9983
	热带假丝酵母	$\ln c = -0.1521t + 5.6482$	0.9992
	混合菌株	$\ln c = -0.1560t + 5.5318$	0.9980
4-氯酚	恶臭假单胞菌	$\ln c = -0.0080t + 4.0688$	0.9603
	热带假丝酵母	$\ln c = -0.1470t + 4.9076$	0.9982
	混合菌株	$\ln c = -0.2152t + 4.8523$	0.9995

一个是保留时间为 2.9 min 的色谱峰,而在恶臭假单胞菌的胞外培养液中只检测到 4-氯酚的色谱峰.

如图 2,热带假丝酵母降解 4-氯酚的过程中保留时间为 2.9 min 的色谱峰随着 4-氯酚的降解逐渐增至最大,而混合菌株降解 4-氯酚过程中该色谱峰随着 4-氯酚的降解,先增大后减小,并在 4-氯酚降解完全后逐渐消失.以上分析说明热带假丝酵母降解 4-氯酚过程中不断产生并积累代谢产物,而该代谢产物在混合菌中可以再吸收降解.相似的代谢物积累的现象也出现在热带假丝酵母降解苯酚和间甲酚过程中(数据未显示).

2.3 酶活性测定

在苯酚代谢途径中,由苯酚羟化形成邻苯二酚,邻苯二酚在不同的菌中各由邻苯二酚 1, 2-双加氧酶或邻苯二酚 2, 3-双加氧酶开环裂解,即分别经邻

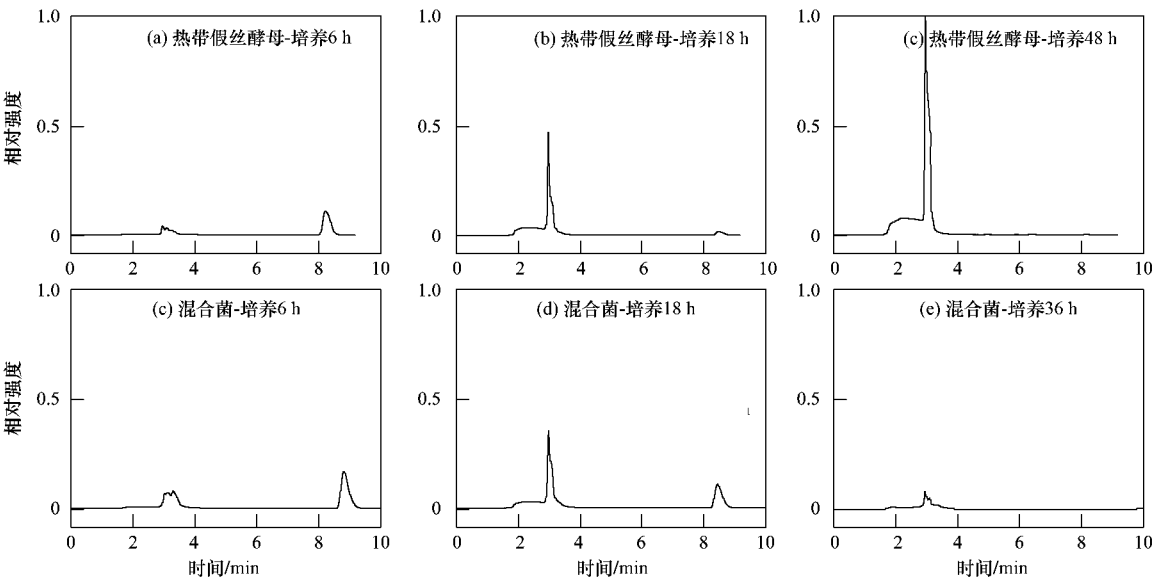


图 2 热带假丝酵母和混合菌株降解 4-氯酚过程液相色谱图的对比
Fig. 2 Comparison of chromatograms during the degradation of 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* and dual culture

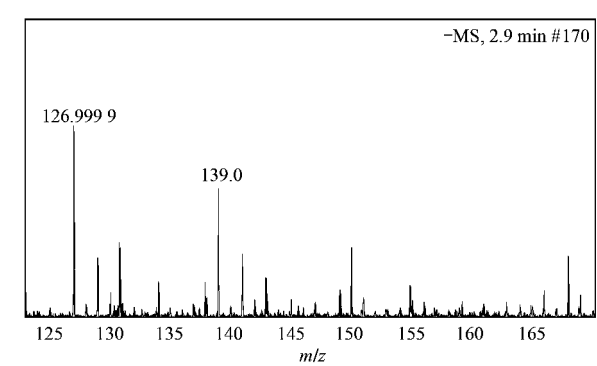


图 4 热带假丝酵母降解 4-氯酚的胞外代谢物液质谱图
Fig. 4 LC-MS spectrum of a extracellular metabolites of 4-chlorophenol degraded by *Candida tropicalis*

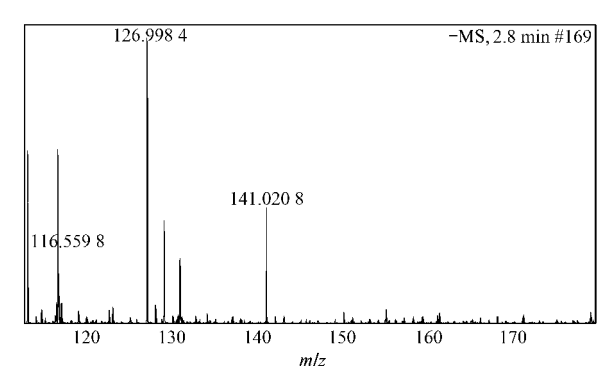


图 5 热带假丝酵母降解苯酚某胞外代谢物液质谱图
Fig. 5 LC-MS spectrum of a extracellular metabolites of phenol degraded by *Candida tropicalis*

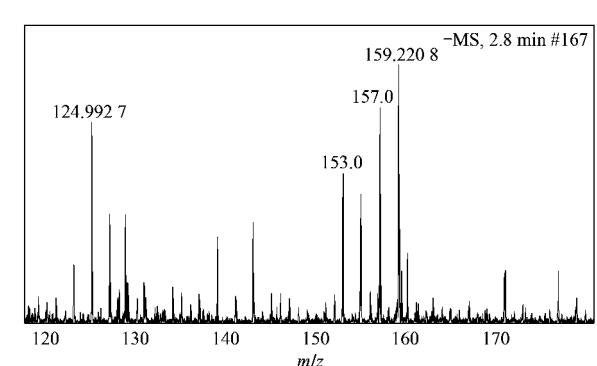


图 6 热带假丝酵母降解间甲酚胞外代谢物液质谱图
Fig. 6 LC-MS spectrum of a extracellular metabolite of m-cresol degraded by *Candida tropicalis*

3 讨论

多菌种混合培养降解污染物已经有过报道,混合菌株能够通过消除底物毒性或抑制效应^[21, 22]促进污染物降解,或能通过紧密结构空间^[15]促进信号的流通和微生物的生长. 酚类降解过程中中间代谢

物积累的现象已有发现^[23, 24],而中间代谢物在混合菌种代谢中的作用机制很少有报道. 与前面提到的混合菌相互作用机制不同,本研究发现热带假丝酵母和恶臭假单胞菌通过分解互补中间代谢物的作用促进酚类物质降解.

根据前一节的结果分析,热带假丝酵母和恶臭假单胞菌降解酚类苯环开环均遵循邻位裂解机制. 与恶臭假单胞菌相比,热带假丝酵母的苯酚羟化酶和邻苯二酚 1, 2-双加氧酶具有较高的活性,苯环开环前的代谢速率较快,然而采用 LC-MS 检测到热带假丝酵母在苯酚和 4-氯酚代谢中分别积累了中间代谢物顺,顺-粘糠酸(粘康酸内酯、3-羧基己二酸二烯醇内酯和顺,顺-粘糠酸是能相互转化的同分异构体)和 4-羧基亚甲基丁-2-烯-4-交脂. 中间代谢物的积累,产生抑制效应在酚类降解过程中起着关键的作用^[25]. 而在恶臭假单胞降解酚类过程中没有检测到代谢物的积累,且在混合培养降解苯酚和 4-氯酚过程中能吸收降解热带假丝酵母积累的中间代谢物,降低抑制效应,从而促进了苯酚和 4-氯酚的代谢.

间甲酚碳链结构明显区别于苯酚和 4-氯酚,热带假丝酵母降解间甲酚先氧化甲基再形成邻苯二酚结构,且在整个代谢过程中检测到二羟基苯甲酸、3-羟基顺,顺粘糠酸、(2-马来酰乙酸)和 3-羧基己二酸的积累,因此可看出热带假丝酵母降解间甲酚苯环开环前后代谢受到限制. 由于苯酚羟化酶和邻苯二酚 1, 2-双加氧酶活性较低,即使恶臭假单胞菌在混合培养降解间甲酚过程中吸收降解二羟基苯甲酸开环后积累的中间代谢物,也不能明显提高间甲酚整体代谢速率. 与苯酚和 4-氯酚相比,可能是苯环上的甲基空间阻位及代谢途径的差异对酶的诱导形成及降解活性有很大的影响,成为了间甲酚降解速率的限制因素. 间甲酚降解初期有明显的迟滞期,也说明了上面的推论.

4 结论

- (1) 当苯酚、间甲酚和 4-氯酚的初始浓度为 100、50 和 60 mg·L⁻¹ 时,混合培养的动力学常数 *k* 的绝对值相对于纯培养分别提高了 19.0%、2.6% 和 46.4% .
- (2) 在热带假丝酵母和恶臭假单胞菌细胞提取物中检测到苯酚羟化酶和邻苯二酚 1, 2-双加氧酶活性,未检测到邻苯二酚 2, 3-双加氧酶活性,2 种菌降解苯酚均遵循邻位裂解机制.

(3) 采用 HPLC 检测到热带假丝酵母在降解 3 种酚的过程中积累了胞外中间代谢物,未检测到恶臭假单胞菌胞外中间代谢物的积累.2 种菌混合培养能吸收再利用胞外中间代谢物,促进 3 种酚的降解.

(4) 采用 LC-MS 进一步分析,热带假丝酵母在降解苯酚和 4-氯酚过程中积累的中间代谢物分别为顺,顺-粘糠酸(粘糠酸内酯、3-羰基己二酸二烯醇内酯)和 4-羧基亚甲基丁-2-烯-4-交脂,在降解间甲酚过程中积累了二羟基苯甲酸、3-羟基顺,顺粘糠酸(2-马来酰乙酸)和 3-羰基己二酸.

参考文献:

- [1] Wang P, Qu Y Y, Zhou J T. Changes of microbial community structures and functional genes during biodegradation of phenolic compounds under high salt condition [J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, **21**(6): 821-826.
- [2] Liu Y J, Zhang A N, Wang X C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. XA05 and *Sphingomonas* sp. FG03 [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, **44**(2-3): 187-192.
- [3] 任河山, 王颖, 赵化冰, 等. 酚降解菌株的分离、鉴定和在含酚废水生物处理中的应用 [J]. 环境科学, 2008, **29**(2): 482-487.
- [4] Jiang Y, Cai X, Wu Di, et al. Biodegradation of phenol and *m*-cresol by mutated *Candida tropicalis* [J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, **22**(4): 621-626.
- [5] Ho K L, Lin B, Chen Y Y, et al. Biodegradation of phenol using *Corynebacterium* sp. DJ1 aerobic granules [J]. Bioresource Technology, 2009, **100**(21): 5051-5055.
- [6] 曹军伟, 董纯明, 曹宏斌, 等. 焦化废水中酚降解菌及其降解基因的研究 [J]. 环境科学, 2011, **32**(2): 560-566.
- [7] Godbole A, Chakrabarti T. Biodegradation in upflow anoxic fixed film-fixed bed reactors of resorcinol, catechol and phenol in mono and binary substrates matrices [J]. Water Research, 1991, **25**(9): 1113-1120.
- [8] Grenier D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* [J]. Infection and Immunity, 1992, **60**(12): 5298-5301.
- [9] Zeng H Y, Jiang H, Xia K, et al. Characterization of phenol degradation by high-efficiency binary mixed culture [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2010, **17**(5): 1035-1044.
- [10] Jiang H L, Tay J H, Maszenan A M, et al. Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains [J]. Environmental Science & Technology, 2006, **40**(19): 6137-6142.
- [11] 李旭春, 刘桂芳, 马军, 等. 1 株壬基酚降解菌的分离鉴定及其降解特性研究 [J]. 环境科学, 2008, **29**(1): 231-236.
- [12] Bae H S, Lee J M, Lee S T. Biodegradation of the mixture of 2, 4, 6-trichlorophenol, 4-chlorophenol, and phenol by a defined mixed culture [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1997, **43**(2): 97-103.
- [13] Shih I L, Kuo C Y, Hsieh F C, et al. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation [J]. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 2008, **39**(6): 635-643.
- [14] Malik A, Kakii K. Pair-dependent co-aggregation behavior of non-flocculating sludge bacteria [J]. Biotechnology Letters, 2003, **25**(12): 981-986.
- [15] Jiang H L, Tay J H, Maszenan A M. Bioaugmentation of coexistence of two functionally similar bacterial strains in aerobic granules [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **75**(5): 1191-1200.
- [16] Brunsbach F R, Reineke W. Degradation of mixtures of chloroaromatic compounds in soil slurry by mixed cultures of specialized organisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, **43**(3): 529-533.
- [17] Jiang Y, Wen J P, Jia X Q, et al. Mutation of *Candida tropicalis* by irradiation with a He-Ne laser to increase its ability to degrade phenol [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, **73**(1): 226-231.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein2 dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, **72**(7): 248-254.
- [19] 付柳, 任源, 韦朝海. 间甲酚高效降解菌的筛选及其降解特性 [J]. 化工进展, 2008, **27**(7): 1032-1037.
- [20] Cai W, Li J, Zhang Z. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. [J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, **148**(1-2): 38-42.
- [21] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, **43**(1): 156-164.
- [22] Klecka G M, Maier W J. Kinetics of microbial growth on mixtures of pentachlorophenol and chlorinated aromatic compounds [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1988, **31**(4): 328-335.
- [23] Potrawfke T, Timmis K N, Wittich R M. Degradation of 1, 2, 3, 4-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(10): 3798-3806.
- [24] Morsen A, Rehm H J. Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptococcus elinii* adsorbed on activated carbon [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987, **26**(3): 283-288.
- [25] Wang S J, Loh K C. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, **25**(3-5): 177-184.