

菲降解菌株的分离鉴定及特性研究

艾芳芳, 曲媛媛*, 周集体, 李昂, 关晓燕, 苟敏

(大连理工大学环境与生命学院, 大连 116024)

摘要:从某石化公司污水处理厂的活性污泥中分离到 1 株对菲具有降解活性的菌株 AFF, 该菌株能够以菲为唯一碳源和能源生长. 根据形态特征及 16S rRNA 基因序列分析, 该菌株初步鉴定为 *Burkholderia* sp.. 在以菲为唯一碳源的培养基中, 84 h 内菌株对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 菲的降解率可达 74.1%. 通过液相-质谱联用及紫外可见分光光度法分析, 推测该菌株代谢菲的途径为水杨酸途径. 测定了降解途径中相关酶的活性, 表明该菌株降解酶系中具有邻苯二酚 2, 3-双加氧酶活性, 并证明该酶为诱导酶; 确定了粗酶降解邻苯二酚的动力学常数: 米氏常数 K_m 为 $10.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最大反应速率 $V_{\max}$ 为 $106.38 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, 说明酶与邻苯二酚的亲和力较大, 邻苯二酚是该酶的良好底物.

关键词:生物降解; 菲; 水杨酸途径; 邻苯二酚 2, 3-双加氧酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)04-1066-06

Isolation and Characterization of a Phenanthrene-Degrading Bacterial Strain

AI Fang-fang, QU Yuan-yuan, ZHOU Ji-ti, LI Ang, GUAN Xiao-yan, GOU Min

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: A bacterial strain that degrades phenanthrene was isolated from activated sludge of wastewater treatment plant from a chemical corporation. The strain can utilize phenanthrene as sole source of carbon and energy. It was identified as *Burkholderia* sp. according to morphological and 16S rRNA gene sequence analysis. Phenanthrene ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was removed 74.1% within 84 h by this strain. It was suggested that the strain possessed the salicylic acid pathway by LC-MS and UV methods. And the strain contains an inductive catechol 2, 3-dioxygenase (C23O). The kinetic constants K_m and $V_{\max}$ were $10.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $106.38 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, receptively. It indicates that the affinity of the endoenzyme to catechol is great and catechol is a better substrate.

Key words: biodegradation; phenanthrene; salicylic acid pathway; catechol 2, 3-dioxygenase

多环芳烃类化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) 是常见的污染物, 普遍存在于环境中, 并在环境中不断积累, 其化合物多具有“三致性”. 菲是一种三环芳烃, 具有一个“湾”区 (Bay region) 和一个“K”区 (K region), 这 2 种结构与 PAHs 的致癌性有着非常密切的关系^[1]. 菲凭借其独特的化学结构, 成为 PAHs 研究的模式化合物, 用于研究 PAHs 的毒性、降解途径、机制以及影响 PAHs 生物利用率、生物降解潜力和降解率等各种因素. 目前, 国内外广大学者对菲的微生物降解展开广泛研究, 分离出一些降解菌株, 主要有 *Mycobacterium vanbaalenii*^[2]、*Sphingomonas*^[3]、*Pseudomonas*^[4,5]、*Nocardioideis*^[6]、*Burkholderia*^[5,7]、*Gordonia*^[8] 等, 且探讨了菲的生物降解机理^[2,4], 并对编码主要代谢酶的基因进行了克隆与表达^[6,7]. 然而, 现有的微生物资源有限, 为了深入研究以菲为代表的稠环芳烃生物降解多样性, 筛选分离高效菌株并研究其特性是必要的, 也是开展各项研究的重要前提.

本实验室从活性污泥中筛选到 1 株可以降解菲的细菌, 该菌株能够以菲为唯一碳源和能源生长, 根

据形态学特征以及 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定该菌株为 *Burkholderia* sp.. 考察了菌株的生长降解特性、底物多样性、降解机理, 并研究了该菌株的粗酶及其降解邻苯二酚的动力学特性. 旨在为 PAHs 污染的生物修复和治理提供高效的微生物菌剂.

1 材料与方法

1.1 样品来源及菲降解细菌的富集、分离和纯化

样品是来自中石化大连石油分公司污水处理厂的活性污泥. 采用一次性投加高浓度化合物的驯化方法^[9], 从中分离出菲混合降解菌. 然后逐步减少外加碳源浓度进行驯化. 经过一段时间的驯化培养, 得到能够以菲为唯一碳源和能源生长的菌液. 经反复平板涂布, 最后筛选出 1 株对菲具有降解能力的菌株.

1.2 培养基

收稿日期: 2007-05-20; 修订日期: 2007-07-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50608011)

作者简介: 艾芳芳 (1982 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境污染治理技术.

* 通讯联系人, E-mail: qyy007@126.com

无机盐培养基^[10]: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Na_2HPO_4 1.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$, 自然 pH, 菲 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 固体培养基^[11]: 蛋白胨 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0, 2% 琼脂粉, 菲 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 富集培养基采用无机盐培养基中加入蛋白胨 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和适量的菲. 以丙酮溶解一定量的菲, 取适量置于灭菌的三角瓶中, 待丙酮挥发完毕后使用.

1.3 试剂

实验用菲由北京化工厂生产, 分析纯; 其它常用试剂均采用分析纯.

1.4 16S rRNA 测序及系统发育树的构建与形态鉴定

细菌总 DNA 采用溶菌酶-SDS-蛋白酶 K^[12] 的方法进行提取. 16S rRNA 基因测序工作由大连宝生物公司完成, 将扩得长度 1 450 bp 的序列用 BLAST 软件与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 并用 Clustal X 1.8 软件进行系统发育树的构建^[13]. 扫描电镜 (JEH-1200 EX) 观察菌株的形态, 放大 10 000 倍.

1.5 菲含量测定及生物量测定

溶液中的菲用乙酸乙酯萃取后, 无水硫酸钠脱水, 再用膜 (ϕ 0.45 μm) 过滤, 高效液相色谱 (HP1100) 测定含量^[14]. 分离柱为 CN4 色谱柱 (ZORBAX, P N 880952-705), 柱子尺寸 6 mm $\times$ 25 cm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 分析流动相为 30% ~ 100% 色谱纯甲醇/水溶液, 流速为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量为 20 μL , 测定时间为 30 min, 测定波长为 254 nm^[15].

离心收集菌体, 用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 振荡清洗、悬浮, 超声波破碎, 释放菌体蛋白. 采用考马斯亮蓝法^[16], 用牛血清蛋白质作标准曲线, 测定 595 nm 处光密度值, 计算菌体蛋白量.

1.6 生长降解实验

菌株接种量 10% 加入到装有 100 mL 无机盐培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 摇床培养. 每隔 12 h 取样 1 瓶, 摇均后平均分 2 份, 一份用于高效液相色谱法测定菲含量, 另一份用于考马斯亮蓝法测定生物量^[16].

1.7 底物广谱性实验

在装有 25 mL 无机盐培养基的 50 mL 三角瓶中, 分别加入芳香化合物灭菌. 接种量为 10%, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 摇床培养. 每隔 24 h 取样, 底物降解情况可通过 JASCO UV-560 紫外-可见分光光度计 (Japan, JASCO) 在 200 ~ 600 nm 波长范围内进行扫描监测, 菌体生长浊度在 660 nm 下测定.

1.8 菲的降解途径

通过液相-质谱联用和紫外可见分光光度法分析来推测菌株降解菲的途径. 菌株在以菲为唯一碳源和能源的无机盐培养基中生长. 分别于 30、68 和 167 h 取样, 采用液相-质谱联用仪 (HP1100LC-MSD, 美国) 分析. 液相分析: 分离柱为 Rx-C18 色谱柱, 柱子尺寸 2.1 mm $\times$ 150 mm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 分析流动相为以甲醇梯度 15% ~ 100% 的 1% 乙酸/色谱纯甲醇溶液, 流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 20 μL , 测定时间 75 min, 测定波长 254 nm. 质谱分析: 离子电压 50 ~ 500 u, 雾化器压 0.31 MPa, 干气体温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 干气体流速 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

1.9 全细胞粗提物(粗酶)实验

1.9.1 粗酶的制备

将菌体投入 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 菲富集培养基 100 mL 中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 48 h. 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体. 菌体用 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲溶液振荡清洗 2 次后悬浮, 于冰浴中用超声波破碎仪破碎细胞 30 min, 脉冲 1.0. 然后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 22 000 r/min 离心 20 min, 超滤浓缩上清液. 所得即为粗酶液.

1.9.2 酶促降解实验

酶活力利用 JASCO UV-560 紫外-可见分光光度计测定. 测定系统总体积为 2 mL Tris-HCl 缓冲溶液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0), 粗酶液 100 μL , 反应底物 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 20 $^{\circ}\text{C}$ 反应, 选取邻苯二酚为反应底物. 邻苯二酚 1, 2-双加氧酶 (catechol 1, 2-dioxygenase, C120) 和邻苯二酚 2, 3-双加氧酶 (catechol 2, 3-dioxygenase, C230) 的活性分别以酶反应产物顺, 顺-己二烯二酸在 260 nm [$\epsilon_{260} = 16\,000\text{ L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$]^[17] 和 2-羟粘糠酸半醛在 375 nm [$\epsilon_{375} = 44\,000\text{ L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{cm})^{-1}$]^[18] 处的光吸收测定. 蛋白浓度用考马斯亮蓝法^[16] 测定. 根据文献报道的方法^[19-21] 并结合实际测定中得到的结果, 酶活力单位 (U) 定义为: 室温下, 每 min 内生成 1 μmol 底物所需酶量. 酶的比活为单位蛋白的酶活力.

1.9.3 邻苯二酚 2, 3-双加氧酶的动力学常数测定

以邻苯二酚为底物, 以酶的反应速度对不同底物浓度作图. 按 Lineweaver-Burk 作图法^[22] 计算出此酶的动力学米氏常数 K_m 及最大反应速率 V_{max} .

2 结果与分析

2.1 菌株 AFF 的分离

通过多次驯化, 分离得到 1 株能够以菲为唯一碳源和能源生长的菌株, 命名为 AFF. 如图 1 所示,

菌株细胞为杆状,大小为 $(0.3 \sim 0.4) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 1.5) \mu\text{m}$,无鞭毛,在固体培养基上呈淡黄色,较小,边缘整齐,表面干涩,易挑起,革兰氏阴性.

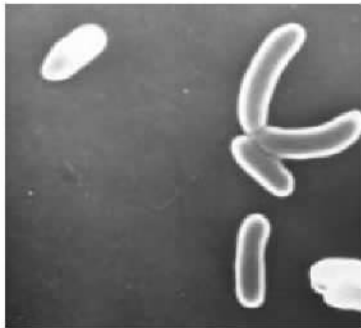


图 1 菌株 AFF 的形态($\times 10\,000$)
Fig.1 Strain AFF by SEM ($\times 10\,000$)

2.2 菌株 AFF 的 16S rRNA 基因序列分析

将菌株 AFF 16S rRNA 基因测序结果登录 GenBank,并用 BLAST 与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行同源比较.菌株 AFF 的 16S rRNA 基因在 GenBank 中登录的序列号为 EF506612.发现菌株 AFF 的 16S rRNA 基因与 *Burkholderia fungorum* 的 16S rRNA 基因序列同源性达 98%.为确定该菌株的系统发育位置,选取了一些伯克霍尔德氏菌构建系统发育树^[23].并选择大肠杆菌作为外群,各菌株名称及序列号见图 2.

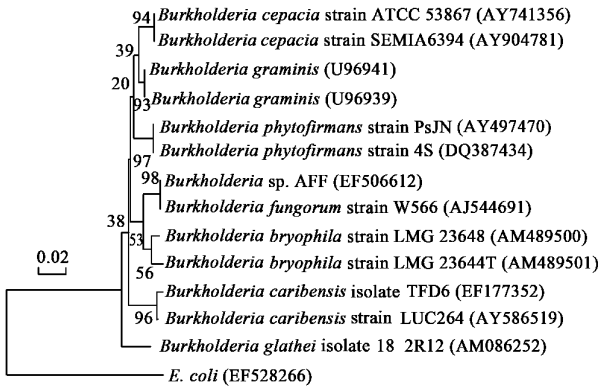


图 2 菌株 AFF 的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of strain AFF

2.3 菌株 AFF 对菲的降解特性

菌株 AFF 具有菲降解活性,84 h 内对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 菲的降解率达 74.1%,降解能力高于已报道的菲降解菌^[24].

由图 3 可见,开始阶段菲未被降解,主要由于菌株 AFF 的生长在培养初期有短暂的停滞期,这是微生物对外源异生物质的适应过程,之后微生物繁殖

很快,菲在溶液中的含量也随之降低,84 h 时降解率达 74.1%.菲的降解发生在菌株 AFF 的对数生长期.

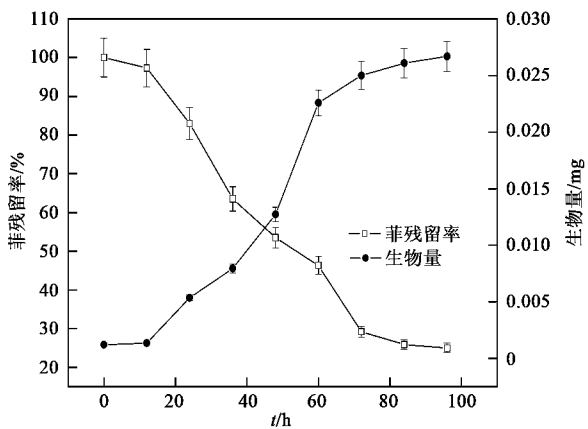


图 3 在唯一碳源培养基中菌株 AFF 的生长-菲降解曲线
Fig.3 Curves of degrading rate of phenanthrene and growth of strain AFF in sole carbon medium

2.4 底物广谱性实验

在无机盐培养基中分别加入下列芳香化合物(终浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).如表 1 所示,菌株 AFF 对杂取代类芳香化合物、联苯及杂环类芳香化合物均无降解作用;在羧化类芳香化合物中不利用邻苯二甲酸;对于羟化类芳香化合物中的苯酚亦不利用.

表 1 菌株 AFF 底物广谱性¹⁾

Table 1 Diversity of degradable substrates by strain AFF		
项目	底物	降解情况
I 杂取代类	苯胺	ND
	硝基苯	ND
	氯苯	ND
II 羧化类	苯甲酸	+
	邻苯二甲酸	ND
	水杨酸	+
	原儿茶酸	++
III 羟化类	苯酚	ND
	对苯二酚	++
	邻苯二酚	+
IV 稠环类	萘	++
	联苯	ND
	菲	++
V 杂环类	吡啶	ND
	8-羟基喹啉	ND
	4-氢呋喃	ND

1) ++ 表示生长良好, + 表示可以生长, ND 表示不降解

2.5 菌株 AFF 对菲降解途径的初步探讨

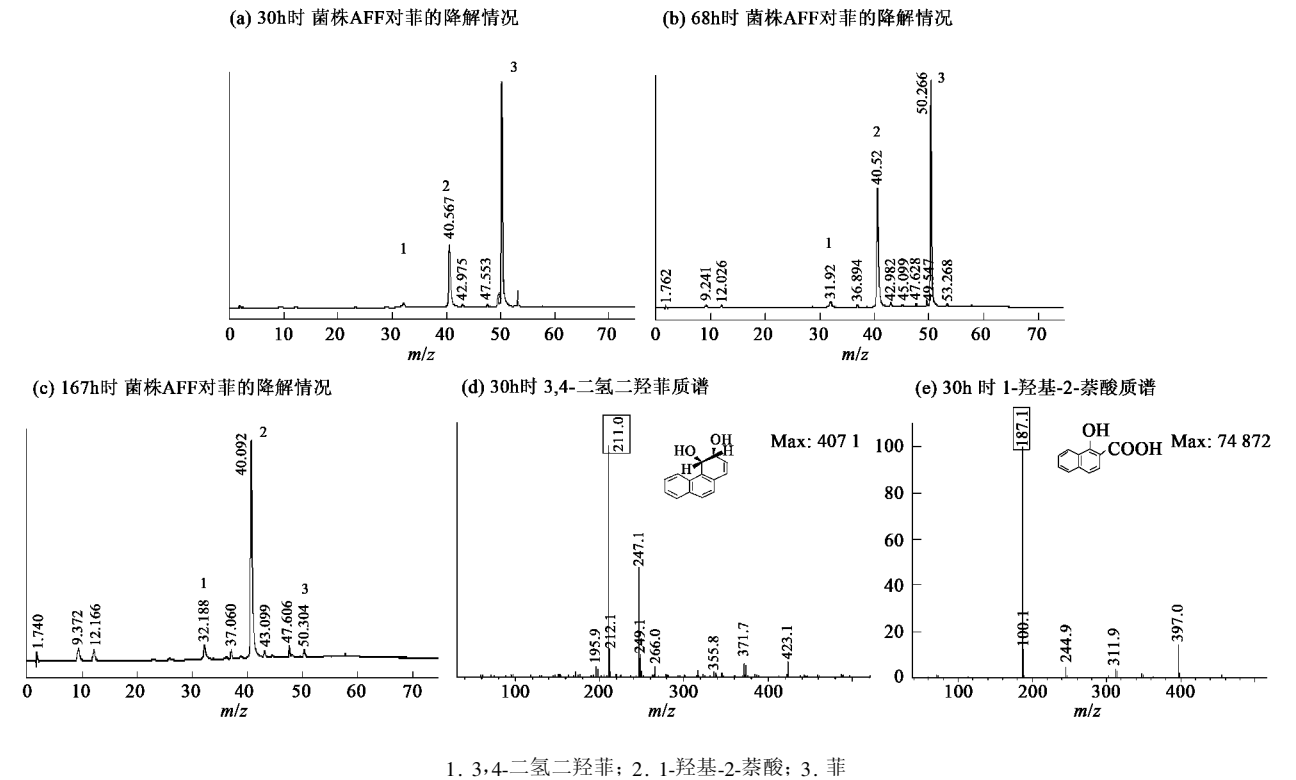
目前,对菲的降解途径已经有所研究,一般为有 2 个途径:邻苯二甲酸途径和水杨酸途径^[1].本实验

将液相-质谱联用和紫外可见分光光度法分析结合起来探讨菌株 AFF 对菲的降解途径.

2.5.1 液相-质谱联用分析结果

利用液相-质谱联用对菌株降解菲过程的中间产物进行定性分析.结果见图 4.

根据萃取中间代谢产物的液相-质谱联用图谱



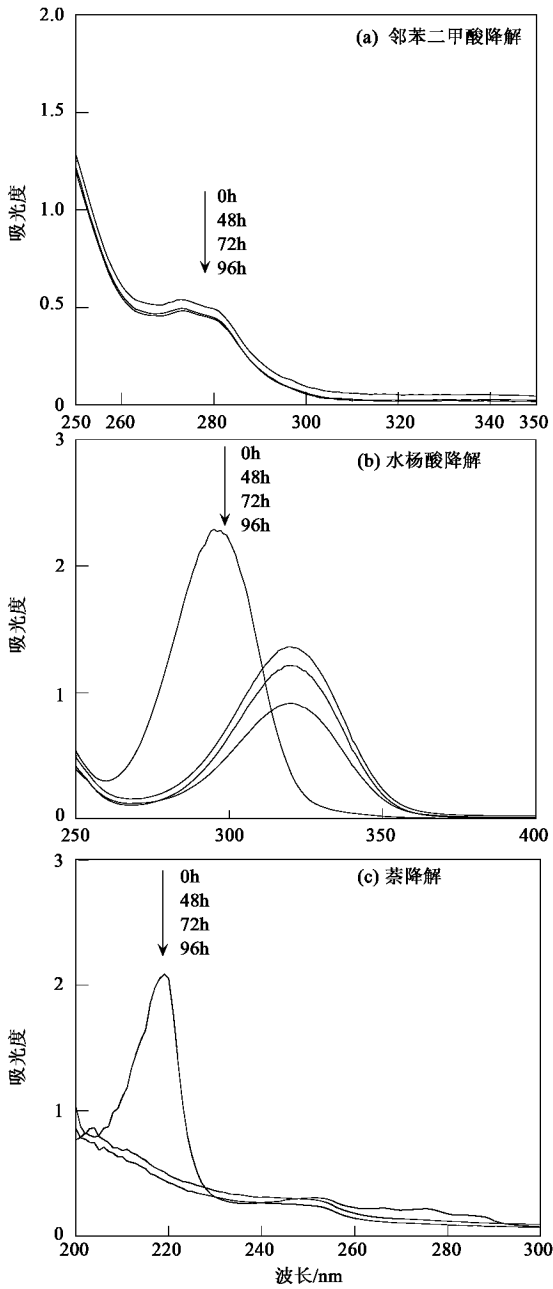


图 5 菌株 AFF 降解菲中间产物的紫外可见分光光度法分析结果

Fig.5 Results of UV analysis of phenanthrene metabolites produced in strain AFF culture

苯二酚的米氏常数 K_m 为 $10.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最大反应速率 V_{max} 为 $106.38 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$.

K_m 愈大酶与底物的亲和力愈小; K_m 愈小酶与底物的亲和力大, 表示不需要很高的底物浓度, 便可容易地达到最大反应速度^[27]. K_m 值的变化范围很大, 大多介于 $10^{-6} \sim 10^{-1} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[28]. 菌株 AFF 的 C23O 对邻苯二酚的 K_m 较小, 证明它与邻苯二酚的亲和力较大, 邻苯二酚是该酶的良好底物.

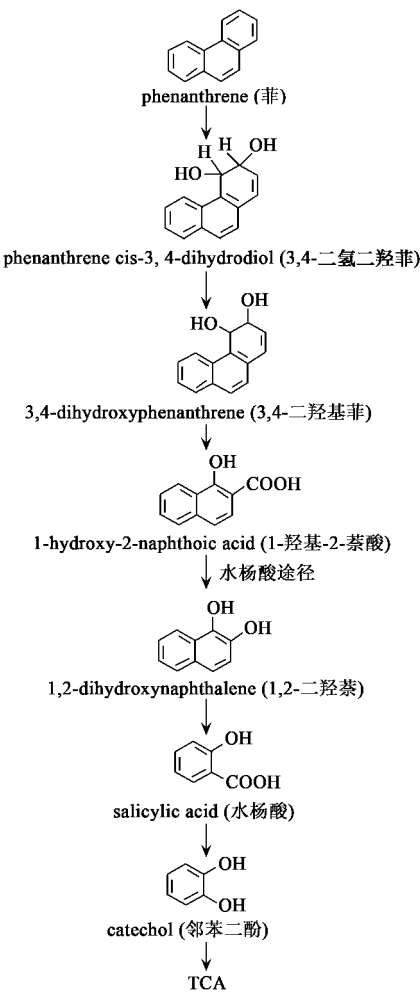


图 6 菌株 AFF 降解菲的途径

Fig.6 Proposed pathway of degradation of phenanthrene in AFF culture

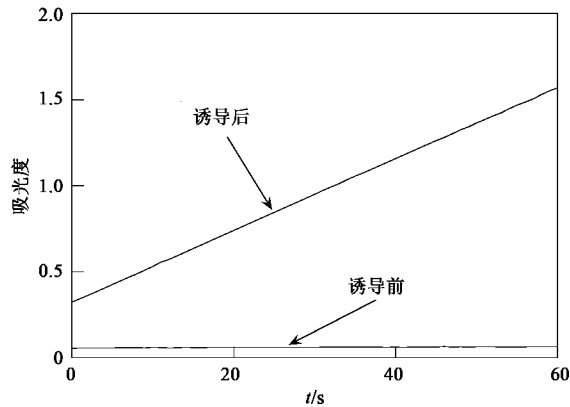


图 7 菲诱导对菌株 AFF 的 C23O 酶活性的影响

Fig.7 Effect of phenanthrene induction on C23O activity of strain AFF

3 结论

- (1) 从活性污泥中筛选到 1 株高效菲降解菌, 菌株能够以菲为唯一碳源和能源生长.
- (2) 通过形态学及 16S rRNA 基因序列分析, 初

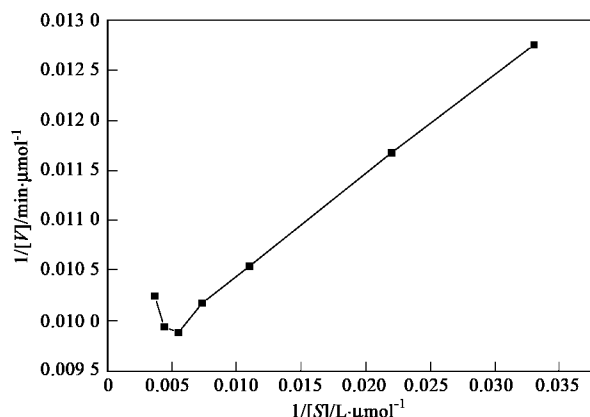


图 8 菌株 AFF 粗酶的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig.8 Double reciprocal Lineweaver-Burk curve of crude enzyme

步鉴定该菌株为 *Burkholderia* sp. .

(3) 84 h 内, 菌株在唯一碳源培养基中对 100 mg·L⁻¹ 菲的降解率能够达到 74.1% .

(4) 经液相-质谱联用及紫外分光光度法分析, 推测该菌株代谢菲的途径为水杨酸途径.

(5) 菌株粗酶具有 C23O 活性, 且为诱导酶, 粗酶降解邻苯二酚的动力学米氏常数 K_m 为 10.93 μmol·L⁻¹, 最大反应速率 V_{max} 为 106.38 μmol·min⁻¹, 说明酶与邻苯二酚的亲合力较大, 邻苯二酚是该酶的良好底物.

参考文献:

[1] 夏颖. 多环芳烃菲对微生物生态毒理研究、菲降解菌的分离鉴定及降解基因克隆与表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.

[2] Stingley R L, Khan A A, Cerniglia C E. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, **322**(1): 133-146.

[3] 陶雪琴, 卢桂宁, 党志, 等. 菲降解菌株 GY2B 的分离鉴定及其降解机理[J]. 中国环境科学, 2006, **26**(4): 478-481.

[4] Prabhu Y, Phale P S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, **61**(4): 342-351.

[5] Balashova N V, Kosheleva I A, Golovchenko N P, et al. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains[J]. Process Biochemistry, 1999, **35**: 291-296.

[6] Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, **182**(8): 2134-2141.

[7] Laurie A D, Lloyd-jones G. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. Strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism[J]. Journal of Bacteriology, 1999, **181**(2): 531-540.

[8] 刘磊, 李习武, 刘双江, 等. 降解多环芳烃的菌株 *Gordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在非污染土壤修复过程中的动态变化[J]. 环境科学, 2007, **28**(3): 617-622.

[9] 金若菲, 王竞, 张劲松, 等. 蒽醌染料中间体的微生物降解脱色研究[J]. 环境科学研究, 1999, **12**(6): 32-35.

[10] 黄丽萍, 周集体, 杨凤林, 等. 菌株 HP3 降解溴氨酸特性研究[J]. 大连理工大学学报, 2000, **40**(5): 557-561.

[11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著, 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德译. 分子克隆实验指南[M]. (第二版). 北京: 科学出版社, 1998.

[12] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 著, 颜子颖, 王海林, 金冬雁译. 精编分子生物学实验南[M]. (第三版). 北京: 科学出版社, 2001.

[13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biological Evolutionary, 1987, **4**: 406-425.

[14] 陶雪琴, 卢桂宁, 易筱筠, 等. 菲高效降解菌的筛选及降解中间产物分析[J]. 农业环境科学学报, 2006, **25**(1): 190-195.

[15] Natalia V, Balashova I A, Kosheleva N P, et al. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains[J]. Process Biochemistry, 1999, **35**(3-4): 291-296.

[16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, **72**: 248-254.

[17] Volkova O V, Ankhina T O, Puntus I F. Effects of naphthalene degradative plasmids on the physiological characteristics of rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas* [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2005, **41**(5): 525-529.

[18] Junca H, Plumeier I, Hecht H. Difference in kinetic behaviour of catechol 2,3-dioxygenase variants from a polluted environment[J]. Microbiology, 2004, **150**: 4181-4187.

[19] Jangho M. Characterization of the gene encoding catechol 2, 3-dioxygenase of *Alcaligenes* sp. KF711: overexpression, enzyme purification, and nucleotide sequencing [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, **332**(2): 248-254.

[20] Wang Y S. Purification and some characterizations of phenolic acid degradation *Pseudomonas* catechol 2,3-dioxygenase[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1983, **15**(1): 44-48.

[21] Feng Y M, Khoo H E, Poh C L. Purification and characterization of gentisate 1,2-dioxygenases from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 and *Pseudomonas putida* NCIB 9669 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(3): 946-950.

[22] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. Journal of the American Chemical Society, 1934, **56**(3): 658-666.

[23] Coenye T, Laevens S, Willems A. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, **51**: 1099-1107.

[24] 许华夏, 李培军, 巩宗强, 等. 双加氧酶活力对细菌降解菲的指示作用[J]. 生态学杂志, 2005, **24**(7): 845-847.

[25] 张杰, 刘永生, 孟玲, 等. 多环芳烃降解菌筛选及其降解特性[J]. 应用生态学报, 2003, **14**(10): 1783-1786.

[26] 罗贵民. 酶工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 26-29.

[27] 吕鹏. 洋葱伯克霍尔德氏菌 L68 菌株邻苯二酚 2,3-双加氧酶分离纯化、酶学性质、基因筛选及应用的研究[D]. 济南: 山东大学, 2006.

[28] 聂麦茜, 吴蔓莉, 王晓昌, 等. 一株黄杆菌及粗酶液对萘降解的动力学特性研究[J]. 环境科学学报, 2006, **26**(2): 181-185.