

不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)降解 4-氯酚的特性及机制研究

吴为中¹, 冯叶成², 王建龙^{2*}

(1. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; 2. 清华大学核能与新能源技术研究院环境技术研究室, 北京 100084)

摘要: 富集培养从受污染土壤中分离到的能够以 4-氯酚为唯一碳源和能源的微生物, 16S rDNA 序列分析表明, 该微生物为 *Acinetobacter* sp.。其降解 4-氯酚的机制为邻位裂解途径, 氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶的活性可以通过氯酚的诱导显著提高。当氯酚的初始浓度范围为 2~8 mmol/L 时, 该微生物能够很好地生长, 并能有效地降解氯酚。除 4-氯酚外, 该微生物还可以降解 2-氯酚、3-氯酚和 2,4-二氯酚, 有较宽的底物范围。添加柠檬酸等共基质不仅能够改善微生物的生长, 还可以提高氯酚的降解效率, 这对于实际受污染环境的生物修复非常重要。

关键词: 氯酚; 生物降解; 优先污染物; 酶活性; 裂解途径

中图分类号: X131.3; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3185-04

Characteristics of 4-chlorophenol Degradation by a Soil Bacterium *Acinetobacter* sp.

WU Wei-zhong¹, FENG Ye-cheng², WANG Jian-long²

(1. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Laboratory of Environmental Technology, INET, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The bacterium capable of degrading 4-chlorophenol (4-CP) was enriched and isolated from agricultural soil. It was gram-negative, rod-shaped bacterium, and identified as *Acinetobacter* sp. based on the analysis of the 16S rRNA gene fragment. It was able to utilize 4-CP as a sole carbon source. The degradation mechanism of 4-CP by this isolate was proposed as a modified ortho-cleavage pathway, the activity of chlorocatechol 1,2-dioxygenase was markedly induced. The bacterial isolate grew well and exhibited a high degradation efficiency when the initial concentration of 4-CP was between 2-8 mmol/L. It was able to survive in the presence of 4-CP at higher concentrations (up to 8 mmol/L). Not only 4-CP, but also 2-chlorophenol, 3-chlorophenol, phenol, and 2,4-dichlorophenol, were also growth substrates for the isolate. The results of co-substrate supplementation illustrated the suitable conditions of the isolate to improve growth rate and 4-chlorophenol biodegradation efficiency. The results suggested that the isolate had a potential use for bioremediation of the site contaminated with 4-chlorophenol.

Key words: chlorophenol; biodegradation; priority pollutant; enzymatic activity; cleavage pathway

氯酚类化合物(CPs)广泛应用于农药、医药、造纸、防腐剂等工业中, 大量氯酚类化合物在生产及其产品的使用过程中进入环境, 对自然生态系统, 尤其对水体和土壤造成了严重污染。美国 EPA 和中国环境监测总站的优先污染物名单中多种氯酚均名列其中^[1]。

氯酚类化合物由于其本身的芳环结构以及取代基氯原子的存在, 因此具有很强的抗降解能力, 难以用传统的物化和生化方法进行有效处理^[2~4]。此外, 氯酚类污染物大多具有生理毒性和“三致”效应, 对人类健康和生态系统的危害极大。

关于氯酚类污染物的处理技术研究, 主要有物理、化学和生物方法。本课题组对氯酚类污染物的治理技术开展了较为系统深入的研究工作, 包括纳米铁脱氯^[5,6]、臭氧氧化^[7]、电化学氧化^[8]、辐照分

解^[9]、生物吸附和生物降解等^[10,11]。

本研究从受污染土壤分离到 1 株能够高效降解 4-氯酚的微生物, 分析了其生物降解特性、降解途径以及共基质对氯酚降解的影响。

1 材料与方法

1.1 微生物及培养基

从受氯酚污染的土壤中富集分离得到对 4-氯酚具有高效降解能力的微生物混合菌群, 利用平板划线法从混合微生物菌群中分离出可以利用 4-氯酚为唯一碳源和能源的纯种微生物(经鉴定为

收稿日期: 2007-11-01; 修订日期: 2007-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(50325824, 50678089); 教育部优秀青年教师计划项目

作者简介: 吴为中(1963~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: wuweizhong@pku.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

Acinetobacter sp.)。

富集培养基组成为(g/L):蛋白胨 10;牛肉膏 5;NaCl 5;以及 4-氯酚 1 mmol/L。

氯酚降解培养基组成为(g/L)^[10]: (NH₄)₂SO₄ 0.1; KH₂PO₄ 0.02; CaCl₂·2H₂O, 0.02; MgSO₄·7H₂O 0.02 以及 FeCl₃ 0.01 mg/L; 4-氯酚 2~10 mmol/L。

1.2 氯酚生物降解实验

在 250 mL 三角瓶装入 100 mL 氯酚降解培养基,微生物接种量为 5% (体积分数),于 30℃,250 r/min 下培养,定时取样分析氯酚的浓度、氯离子浓度及培养液的 *D* 值。

1.3 分析方法

氯酚的浓度用 HPLC(型号为 Agilent 1200)进行分析.色谱柱为 XDB-C¹⁸ 反相柱,流动相为甲醇:水=85%:15%(体积比),流速 1 mL/min.检测波长为 280 nm.4-氯酚降解过程中释放的氯离子由离子选择性电极测定.细菌生长通过测定 600 nm 下的 *D* 值确定,利用微生物生长的 *D* 值计算微生物的生长速率。

1.4 无细胞抽提液的制备及酶分析

菌体培养后通过离心收集,用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 为 7.8)反复洗涤至少 3 次,然后进行细胞破碎、离心,取上清液进行酶活性分析.蛋白质浓度分析采用 Lowry 方法^[12]。

酶活性采用分光光度法测定,邻苯二酚 1,2-双加氧酶(C12O)和氯代邻苯二酚 1,2-双加氧酶(CC12O)的活性测定根据参考文献[13],邻苯二酚 2,3-双加氧酶(C23O)和氯代邻苯二酚 2,3-双加氧酶(CC23O)的活性测定根据参考文献[14]。

2 结果与讨论

2.1 微生物的分离及鉴定

从受氯酚污染的土壤中采集样品,利用富集培养基进行富集培养,分离得到对 4-氯酚具有高效降解能力的微生物混合菌群,利用平板划线法从混合微生物菌群中分离出可以利用 4-氯酚为唯一碳源和能源的纯种微生物.利用形态学、生物化学和分子生物学方法对 4-氯酚降解菌进行鉴定.DNA 的提取采用传统方法,利用细菌扩增专用引物:正向引物 63F(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') 和反向引物 1387R(5'-GGGCGWGTGTACAAGGC-3') 对其 16S rRNA 基因片断进行 PCR 扩增^[15].反应条件为:变性,94℃ (3 min),扩增,95℃ (1 min)进行 30 次循环,退火,55℃ (1 min),延伸,72℃ (5 min).16S rDNA 序列分析表明,该

微生物为 *Acinetobacter* sp.。

2.2 氯酚的生物降解特性

利用氯酚降解培养基,其中 4-CP 浓度为 2 mmol/L,并且 4-CP 为唯一碳源和能源,研究了氯酚降解过程中微生物的生长、氯酚浓度变化以及氯离子释放等情况,结果如图 1 所示。

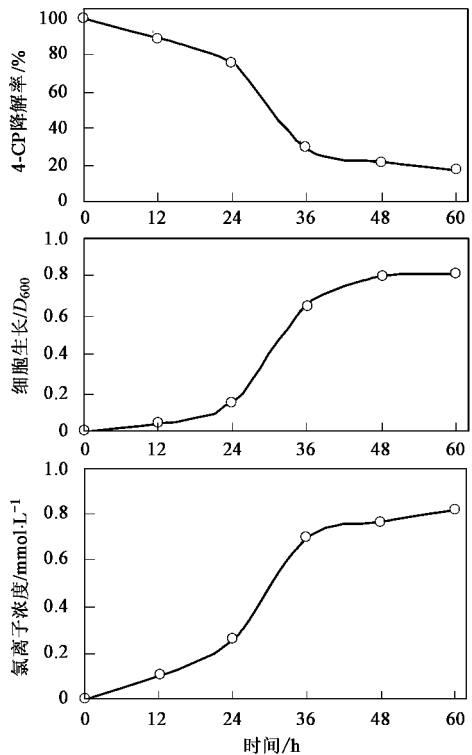


图 1 微生物生长、氯酚降解及氯离子释放情况
Fig.1 Change of microbial growth, 4-chlorophenol degradation and chloride release

利用未接种微生物的实验作为对照实验,考察了挥发、器壁吸附等非生物因素对氯酚浓度减少的贡献,结果表明,这些非生物因素引起的氯酚浓度降低可以忽略.从图 1 可以看出,随着氯酚浓度的降低,微生物浓度逐渐升高,这表明微生物可以利用氯酚作为唯一碳源和能源进行生长.从氯离子浓度变化情况可以判断,在 4-氯酚的降解过程中,脱氯反应是其第一步。

调节氯酚降解培养基中氯酚的初始浓度为 2~10 mmol/L,接种后培养,3 d 后取样分析,研究氯酚的初始浓度对其生物降解的影响,结果如图 2 所示。

图 2 结果表明,当氯酚浓度范围为 2~8 mmol/L 时,该微生物都能够对其进行有效降解.但是,随着氯酚浓度的增加,微生物的生长速率逐渐下降.与氯酚初始浓度为 2 mmol/L 时相比,当氯酚浓度为 4~8 mmol/L 时,微生物的生长速率下降了 15%~35%。当

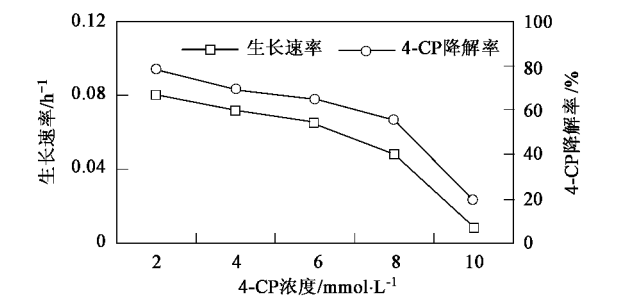


图 2 不同氯酚浓度下微生物生长及氯酚降解情况
Fig.2 Bacterial growth and 4-CP degradation at different 4-CP concentrations

氯酚浓度增加至 10 mmol/L 时,微生物的生长几乎完全受到抑制。另一方面,从图 1 可以看出,该微生物在 60 h 内可以达到较高的菌体量。对难降解有机污染物来说,微生物的生长速率及生物量是 2 个至关

重要的因素,它们会直接影响污染物的生物降解效率^[16]。

2.3 氯酚的降解机制探讨

通过测定氯酚降解过程中涉及到的关键酶的活性,探讨了该微生物降解 4-氯酚的可能途径。从原理上讲,氯酚的降解过程主要涉及到 2 种关键酶:一种是加氧酶,将氯酚转化为相应的氯代邻苯二酚;另一种是专一性的双加氧酶,使相应的氯代邻苯二酚的苯环裂解。在所有的氯代芳香化合物的生物降解过程中,双加氧酶的作用是非常关键的步骤^[14]。因此,本研究主要测定了在 LB(Luria-Bertani)培养基中添加或不添加 4-氯酚时,氯酚降解过程中几种双加氧酶的活性,包括 C12O(邻位裂解途径)、CC12O(修饰的邻位裂解途径)、C23O 和 CC23O(间位裂解途径)。实验结果如表 1 所示。

表 1 氯酚降解过程中涉及的关键酶活性/nmol·(mg·min) ⁻¹				
Table 1 Specific activity of key enzymes involving 4-CP degradation pathway/nmol·(mg·min) ⁻¹				
培养基种类 ¹⁾	Catechol 1,2-dioxygenase	Chlorocatechol 1,2-dioxygenase	Catechol 2,3-dioxygenase	Chlorocatechol 2,3-dioxygenase
LB	1.6±0.4	5.6±1.2	0	0
LB 4-CP	2.4±0.3	11.2±2.5	0.6±0.2	0.5±0.1
MMY-4-CP	40.2±1.5	152.2±31.4	5.1±0.9	3.8±0.5

1) 培养基如下:LB 为没有添加 4-CP 的 LB 培养基;LB-4-CP 为添加 2 mmol/L 4-氯酚的 LB 培养基;MMY-4-CP 为含 0.1% 酵母膏和 2 mmol/L 4-氯酚的无机盐培养基,所有数据均为 4 次测量结果的平均值

从表 1 可以看出,与生长在 LB-4-CP 培养基上的微生物相比,生长在含 4-氯酚的无机盐-酵母膏培养基(MMY)上的微生物,其 C12O 和 CC12O 酶的活性得到诱导,酶活显著提高,而 C23O 和 CC23O 酶活几乎没有被诱导,酶活性很低。

表 1 的结果还表明,该微生物降解氯酚途径不可能为间位途径,而是邻位裂解途径。Hartmann 等^[17]发现,对于邻苯二酚和氯代邻苯二酚,酶的专一性不同。本研究结果发现,与生长在以 4-氯酚为唯一碳源培养基中的 C12O 活性相比,负责修饰的邻位裂解途径的酶 CC12O,其活性得到显著诱导。因此,在有毒化合物 4-氯酚存在时,该微生物能够迅速适应这种特殊环境条件,诱导出高活性的酶,降解这种毒性化合物。该微生物为了适应这种污染物并改进代谢效率,其分解代谢酶逐渐从底物范围较广的 C12O 变成底物范围较窄的 CC12O。

2.4 对其它氯酚的降解情况

利用 2-氯酚、3-氯酚和 2,4-二氯酚为唯一碳源,研究了该微生物对其降解情况,结果如表 2 所示。可以看出,该微生物能够利用 2-氯酚和 3-氯酚为唯一

碳源很好地生长,并且对它们的降解率也分别达到了 63% 和 72%,说明该微生物的底物范围较宽,这对于实际的生物修复应用非常有利。

表 2 以不同氯酚为基质时微生物生长和氯酚降解情况		
Table 2 Bacterial growth and degradation of different chlorophenols		
氯酚(2 mmol·L ⁻¹)	生长速率/h ⁻¹	降解率/%
2-CP	0.071	63
3-CP	0.086	72
4-CP	0.082	82
2,4-DCP	0.028	16

2.5 共基质的影响

利用柠檬酸、丁二酸和苯酚为共基质,探讨了这些化合物存在时对微生物生长和 4-氯酚降解效率的影响。因为柠檬酸、丁二酸是常见的植物根际分泌物^[18],在实际土壤的生物修复过程中是可能遇到的化合物,它们通常可以作为微生物的能源。之所以选择苯酚,有两方面的原因。一方面,苯酚可以作为氯酚降解的诱导物;另一方面,苯酚也可能是氯酚降解过程中脱氯后形成的中间产物。柠檬酸、丁二酸和苯

酚对 4-氯酚降解和微生物生长的影响总见表 3.

表 3 的结果表明,柠檬酸可以提高微生物的生长速率,促进 4-氯酚的降解过程;而丁二酸则会抑制微生物生长和 4-氯酚的生物降解.添加苯酚并没有刺激 4-氯酚的降解,事实上,4-氯酚的降解效率有所下降.另一方面,苯酚的添加明显地促进了微生物的生长.

表 3 共基质对微生物生长及氯酚降解的影响

Table 3 Effect of co-substrates on the bacterial growth and degradation of 4-CP

加入的共基质(2 mmol•L ⁻¹)	生长速率/h ⁻¹	降解率/%
无	0.082	82
柠檬酸	0.084	85
丁二酸	0.048	32
苯酚	0.095	48

3 结论

从受污染土壤中分离得到能够以 4-氯酚为唯一碳源和能源的微生物,16S rDNA 序列分析表明,该微生物为 *Acinetobacter* sp.,其可以利用初始浓度范围为 2 ~ 8 mmol/L 氯酚为唯一碳源,并且能够有效地将其降解.对氯酚的降解途径为邻位裂解.除 4-氯酚外,该微生物还可以降解 2-氯酚、3-氯酚和 2,4-二氯酚,有较宽的底物范围,这对于实际受污染环境的生物修复非常重要.

参考文献:

[1] 王建龙.生物固定化技术与水污染控制[M].北京:科学出版社,2002.248-299.

[2] 王建龙,Hegemann W.微生物群落对多氯酚的脱氯特性及机制研究[J].中国科学(B 辑),2003,33:47-53.

[3] Pera-Titus M, Garcia-Molina V, Banos M A. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processed-a general review[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2004, 47: 219-256.

[4] Piringer G, Bhattacharya S K. Toxicity and fate of pentachlorophenol in anaerobic acidogenic systems[J]. Water Res, 1999, 33: 2674-2682.

[5] Cheng R, Wang J L, Zhang W X. Comparison of reductive

dechlorination of *p*-chlorophenol using Fe⁰ and nanosized Fe⁰ [J]. Journal of Hazardous Material, 2007, 144: 334-339.

[6] 程荣,王建龙,Zhang W X. 纳米 Fe⁰ 作用下 4-氯酚的脱氯特性及机制[J]. 环境科学, 2007, 28(3): 578-583.

[7] Pi Y Z, Wang J L. The formation and influence of hydrogen peroxide during ozonation of *para*-chlorophenol [J]. Journal of Hazardous Material, 2007, 141: 707-712.

[8] Wang H, Wang J L. Electrochemical Degradation of 4-Chlorophenol Using a New Gas Diffusion Electrode [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2007, 77: 58-65.

[9] Hu J, Wang J L. Degradation of chlorophenols in aqueous solution by gamma radiation [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2007, 76: 1489-1492.

[10] Wang J L, Qian Y. Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels [J]. Chemosphere, 1999, 38: 3109-3114.

[11] Wang J L, Qian Y, Horan N, *et al.* Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass[J]. Bioresour Technol. 2000, 75: 157-161.

[12] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.

[13] Dom E, Knackmuss H J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1, 2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown *Pseudomonas* [J]. Biochem J, 1978, 174: 73-84.

[14] Urata M, Uchida E, Nojiri H, *et al.* Genes involved in aniline degradation by *Delftia acidovorans* strain 7N and its distribution in the natural environment[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68: 2457-2465.

[15] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, *et al.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 795-799.

[16] van Veen J A, van Overbeek L S, van Elsas J D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61: 121-135.

[17] Hartmann J T, Reineke W, Knackmuss H J. Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro-, and 3, 5-dichlorobenzoate by a *Pseudomonas* [J]. Appl Environ Microbiol, 1979, 37: 421-428.

[18] Dinkla I J, Janssen D B. Simultaneous growth on citrate reduces the effects of iron limitation during toluene degradation in *Pseudomonas* [J]. Microb Ecol, 2003, 45: 97-107.