

1 株咔唑降解菌的分离、鉴定及其降解特性研究

张小凡, 何义亮*

(上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要: 利用微生物分离技术, 从土壤中分离到 1 株咔唑降解菌 KH-6. 菌株 KH-6 能够以咔唑为唯一的碳源和能源良好地生长, 同时还可以利用 3-甲基咔唑、4-羟基咔唑和 2,2'-二羟基联苯生长. 经过对其形态特征、生理生化、以及 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定为黄杆菌属细菌. 该菌株对咔唑的降解性是通过在液体培养基内菌体的增加及底物的减少来证实的, 其利用咔唑生长的最适温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.5. 静止细胞反应试验表明, 菌株 KH-6 除了咔唑以外还可降解其它杂环化合物. 咔唑污染土壤中的生物降解实验表明, 在灭菌土壤中 90% 的咔唑被降解, 菌株 KH-6 对土壤中的咔唑有很好的生物降解效果.

关键词: 咔唑; 生物降解; 杂环化合物; 16S rRNA; 土壤

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2166-05

Isolation and Characterization of a Carbazole-Degrading Bacterial Strain

ZHANG Xiao-fan, HE Yi-liang

(School of Environmental Science and Engineering Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: A bacterial strain was isolated from soil samples using plate screening techniques. Results indicated this isolated were able to use carbazole as sole source of carbon and energy, simultaneously, including N-Methylcarbazole, 4-Hydroxycarbazole and 2,2'-Biphenol. It was identified as *Flavobacterium* sp. according to its morphology, and biochemical properties, and 16S rDNA sequence analysis. Utilization of carbazole by the isolates was confirmed by the increase in bacterial biomass and the decrease in substrate concentration in liquid cultures. The optimal pH and temperature for cell growth and carbazole degradation were 7.5 and 30℃, respectively. Resting cells grown in Luria broth also showed activity for decomposing other heterocyclic compounds. In addition, biodegradation of carbazole was carried out with carbazole degrading strain KH-6. The results indicated that 90% of the carbazole could be degraded in the sterilized soil. And strain KH-6 could enhance the degradations of carbazole significantly.

Key words: carbazole; heterocyclic compounds; biodegradation; 16S rRNA; soil

含氮杂环化合物咔唑是煤焦油中经济价值最高的成分之一, 世界上 90% 的咔唑是从煤焦油中得到的. 咔唑可用于生产染料、颜料、炸药、杀虫剂、润滑剂、橡胶抗氧剂、光电导体、感光材料、特种油墨等^[1]. 同时这类含氮化合物也是影响炼油工艺、产品性能和环境质量的主要因素之一. 化石燃料燃烧后有机含氮化合物以 NO_x 的形式排入大气, 严重地影响大气的质量, 而 NO_x 的释放又与酸雨形成有关^[2].

一些含氮化合物及其衍生物还具有致癌、致突变性^[3], 尤其是含苯环类有机氮, 在环境中可与氯或溴等元素结合形成致癌、剧毒的化合物. 这些化合物在环境中更难以被降解^[4-7], 形成严重危害人类的持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs).

目前工业上采用的主要脱氮方法是酸洗、加氢和吸附等技术, 但都不能高效地除去这些含氮化合物. 因此, 研究咔唑的生物降解具有重要的意义.

关于咔唑类化合物生物脱氮的研究, 目前国外已有很多报道, 如咔唑代谢途径、咔唑降解酶与咔唑

降解基因簇等^[8-21], 相比之下, 我国在这方面的研究还比较少. 郭维强等^[22]利用混合菌株对咔唑的降解性进行了研究. 李力等^[23]研究了咔唑降解菌 XLDN4-9 休止细胞体系对原油、润滑油及柴油的脱氮效果. 黄杰勋等^[24]对咔唑降解菌 LSSE-H2 的 *car* 基因簇进行了同源性研究.

本研究以咔唑降解菌为对象, 在实验室条件下, 对其特性及对咔唑的降解性进行了探讨, 并对该菌在土壤中的咔唑降解作用进行了分析, 旨在探讨其石油脱氮性能.

1 材料与方法

1.1 培养基

用于菌种分离的培养基为无机盐培养基: Na₂HPO₃ 2.2 g, KH₂PO₃ 0.8 g, NH₄NO₃ 3.0 g,

收稿日期: 2009-11-09; 修订日期: 2010-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50978161); 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2009ZX07211-002)

作者简介: 张小凡 (1960 ~), 男, 博士研究生, 副教授, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: xf_zhang@sjtu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: yllhe@sjtu.edu.cn

MgSO₄·7H₂O 0.2 g, FeSO₄·7H₂O 10 mg, CaCl₂·2H₂O 10 mg, 酵母膏 50 mg, H₂O 1 000 mL, pH 为 7. 用于菌种纯培养的培养基为 LB 培养基: 酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、H₂O 1 000 mL. 固体培养基加 2% 的琼脂.

1.2 菌种分离与鉴定

菌种分离是以咔唑为唯一的碳源和能源, 在无机盐培养基内进行. 在试管中加入 5 mL 含咔唑 (0.2 g·L⁻¹) 的无机盐培养基及 0.5 g 土壤, 30℃ 振荡培养 5 d 后, 转接到另一含有上述新鲜无机盐培养基的试管内继续培养 2 d. 经 3 次培养后, 转接到牛肉汁蛋白胨固体培养基培养、保存.

菌种鉴定是在革兰氏染色、过氧化氢反应、以及氧化反应的基础上, 利用分子生物学方法完成的. 革兰氏染色、过氧化氢反应及氧化反应采用常规生理生化试验方法, 分子生物学方法是利用 16S rRNA 序列进行检索分类. DNA 提取采用苄基氯法^[25].

1.3 不同条件下的菌种生长试验

菌种在牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养 12 h (30℃、180 r/min), 当 $D_{560} \approx 1$ 时, 离心分离菌体, 用生理盐水洗涤 2 次, 并悬于 10 mL 无菌水中. 以 2% 的接种量接种于无机盐培养基中, 按设定的温度、pH、及不同碳源进行振荡培养. 测定最适生长温度时, 设 15、20、25、30 和 35℃ 这 5 种不同温度, pH 值为 7.0; pH 值影响试验时, 设 pH 值 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 9.0 这 7 个梯度, 温度为 30℃; 以上试验均于 100 mL 的小三角摇瓶中分别加入含咔唑 (0.2 g·L⁻¹) 的无机盐培养基 30 mL. 测定不同碳源对菌种生长的影响试验时, 于 100 mL 的小三角摇瓶中分别加入 30 mL 的无机盐培养基, 并加入相当 0.2 g·L⁻¹ 咔唑当量的吡啶、3-甲基咔唑、4-羟基咔唑、2,2'-二羟基联苯、甲基噻吩、5-甲基苯并噻吩、及二苯并噻吩等, 在 pH 值为 7.0, 30℃ 的条件下培养.

1.4 最佳生长条件下对咔唑的降解试验

在最佳 pH 7.5 的条件下, 接种微生物于含咔唑 (0.2 g·L⁻¹) 的无机盐培养基内, 30℃ 振荡培养. 每隔 6 h 取样测定 D_{560} 值及底物的浓度变化.

样品经纤维滤纸过滤后用 C18 固相萃取柱进行浓缩. 固相萃取柱的活化条件: 5 mL 二氯甲烷, 5 mL 甲醇, 5 mL 超纯水; 上样速度: 3~5 mL/min; 洗脱条件: 分别用 5 mL 二氯甲烷和 5 mL 正己烷洗脱后混合; 洗脱液在微弱的氮气下吹干, 然后用正己烷定容至 1 mL, 供 GC-MS 分析.

1.5 微生物静止细胞与杂环化合物的反应

菌种在牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养 12 h (30℃, 180 r/min), 用 50 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.5) 洗净, 并加原培养液 1/10 体积的磷酸缓冲液制成静止细胞溶液. 待测化合物溶于乙醚后加入静止细胞溶液中 (0.5 g·L⁻¹), 振荡反应 3 h. 用 2.5 mol/L HCl 将反应液 pH 调至 3, 并用醋酸乙酯抽提, 供 GC-MS 分析.

1.6 菌株 KH-6 对土壤中咔唑的生物降解实验

采取的土壤为 20~40 cm 深的表层土. 土壤过筛 (5 mm) 后, 于高压灭菌锅中 121℃ 间歇灭菌 3 次, 灭菌时间 20 min, 歇灭时间 8 h.

菌液的制备在 500 mL 三角瓶内进行. 接种菌株 KH-6 于 LB 培养液中培养 18 h, 离心、洗涤后, 用无菌水制备成菌悬液 ($D_{560} \approx 4$), 备用.

将灭菌土壤与未灭菌土壤分别装入 1 L 的玻璃瓶中 (每瓶装土 500 g), 同时混入 1 g 杂环化合物咔唑, 使其最终浓度为 0.2 mg·g⁻¹, 菌液投加量为 0.01 mL·g⁻¹ 土, 最后用无菌水调整含水量至 15%, 密封、培养. 生物降解实验是在 30℃ 的温度条件下进行的. 空气、水分补充及取样均同前实验. 对照实验使用未投加菌株的 2 种土壤, 在同样条件下进行.

土壤中咔唑的抽提方法如下: 称取约 5 g 土样于 60℃ 干燥 16~20 h, 用二氯甲烷索氏抽提 14 h, 提取液通过硅胶氧化铝层析柱, 采用不同极性的溶剂进行萃取、浓缩后, 供 HPLC 分析.

1.7 仪器分析

PCR 扩增仪为 Touchdown Thermal Cycler (Hybaid, Teddington Middlesex). 50 μL 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 4 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP mixture (Applied Biosystems), 0.2 mmol/L 引物各 1.5 μL (8F 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 1 Unit Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, U. S. A) 和 2 μL 模板 DNA. DNA 模板解链为 95℃ (5 min); 95℃ (30 s), 50℃ (30 s), 72℃ (90 s) 为一个循环反应, 共进行 30 个循环反应; 延长反应为 72℃ (3 min). 扩增产物用 Micro SpinTMS-400 HR 柱 (Amersham Pharmacia Biotech Inc, U. S. A) 提纯后进行 DNA 测序.

薄层层析用 0.25 mm 荧光硅胶板 (Whatman 滤纸有限公司, 德国). 分离液为己烷-乙酸乙酯-醋酸混合液 (10:10:1, 体积比).

GC-MS (Agilent 6890 配有 EPC), 谱柱 DB-1 (0.25 mm × 30 m), 汽化室温度 230℃, 载气(He): 2.2 mL/min, 50:1 分流, 升温程序为起始温度 65℃ (3 min), 升温速率为 25℃/min, 最终温度为 250℃. 进样量 2 μL.

HPLC 为 LC 10A 高效液相色谱仪 (Shimadzu, Ltd., Japan), 色谱柱为 Supelcosil LC-PAH (RP-18 column 25 cm × 4.6 mm 5 mmol/L packing), 流动相为 H₂O/Acetonitrile (both HPLC grades), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 柱温 25℃, 进样量为 10 μL.

1.8 试剂

吡啶、吡嗪、2,3-二羟基联苯、甲基噻吩、5-甲基苯并噻吩、二苯并噻吩、4-羟基吡嗪及 3-甲基吡嗪均从东京化学工业有限公司(日本)购入.

2 结果与讨论

2.1 微生物的分离与鉴定

以吡嗪为唯一碳源和能源, 通过连续 3 次的富集培养, 其中 1 个土样的培养物表现出良好的吡嗪降解活性, 经过涂布选择性平板和划线分离, 得到 1 个吡嗪降解菌株. 该菌株在固体培养基上菌落呈圆形、黄色、表面光滑、无褶皱, 边缘规则, 为短杆菌. 细胞染色为革兰氏阴性, 过氧化氢反应、氧化酶反应均为阳性. 16S rRNA 的测序及分析结果, 菌株与 *Flavobacterium Columnare* 的同一性为 98.3%, 与 *Flavobacterium breve* 的同一性为 98.1%, 与 *Flavobacterium aquatile* 的同一性为 97.8%, 与 *Flavobacterium proteus* 的同一性为 97.3%. 菌株被鉴定为黄杆菌属细菌 (*Flavobacterium* sp.), 被命名为 *Flavobacterium* sp. KH-6. 有关 *Flavobacterium* sp. 在生物降解方面的报道很多^[6-9], 在应用方面具有一定的潜力.

2.2 不同条件对菌株 KH-6 生长的影响

以吡嗪作为唯一的碳源和能源, 菌株 KH-6 在不同温度条件下的生长情况见图 1. 从图 1 可见, pH 值为 7.0 的条件下, 菌株 KH-6 在 25~35℃ 的温度范围内呈现出良好的生长, 温度在 30℃ 时, 生长最好, 在培养 36 h 后, D_{560} 可达到 0.87 左右.

在 30℃ 的条件下, 菌株 KH-6 在不同 pH 条件下的生长情况见图 2, 从中可知, 菌株 KH-6 在 pH 7~8 之间, 呈现出良好的生长状态, pH 在 7.5 时生长最好, 在培养 36 h 后 D_{560} 为 0.89.

在 pH 值为 7.0, 30℃ 的条件下, 菌株 KH-6 在不

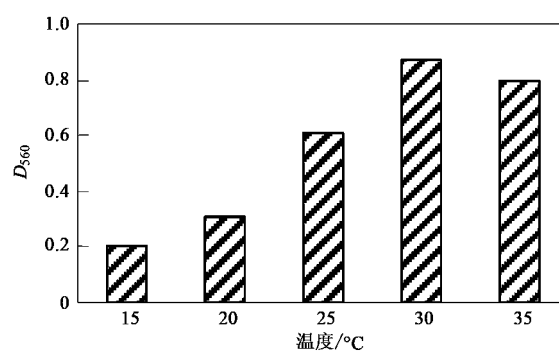


图 1 不同温度对菌株 KH-6 生长的影响

Fig. 1 Effects of temperature on growth of strain KH-6

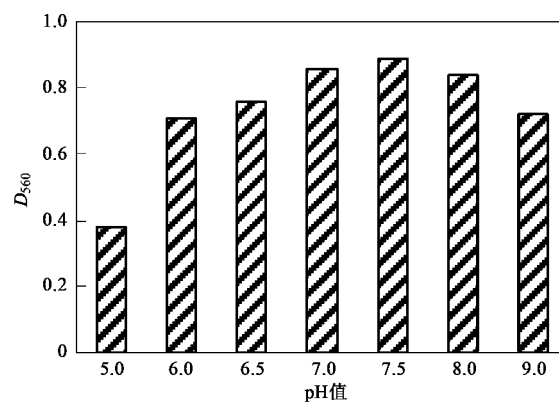


图 2 不同 pH 值对菌株 KH-6 生长的影响

Fig. 2 Effects of pH on growth of strain KH-6

同碳营养条件下的生长如表 1 所示. 在所选择的杂环化合物中, 菌株 KH-6 只能利用 3-甲基吡嗪、4-羟基吡嗪和 2,2'-二羟基联苯等为唯一碳源和能源生长. 吡啶、甲基噻吩、5-甲基苯并噻吩、及二苯并噻吩等不能被菌株 KH-6 所利用. 但在固体培养基中, 吡啶可使菌株 KH-6 的克隆变成黑色 (数据未显示). 表明菌株 KH-6 的酶可使吡啶生成靛 (indigo).

通过菌株 KH-6 静止细胞的底物变色反应、薄层层析 Rf 值、及 GC-MS 分析结果可以看出, 作为生长底物不被菌株 KH-6 所利用的吡啶、甲基噻吩、5-甲基苯并噻吩、及二苯并噻吩等多种杂环化合物也可与静止细胞反应. 表明这些化合物可能对微生物有一定毒性, 但依然可能被微生物所产生的酶所分解.

2.3 最佳生长条件下菌株 KH-6 对吡嗪的降解性

在 100 mL 吡嗪液体培养基内, 菌株 KH-6 的生长曲线见图 3. 从图 3 可见, 随着菌体 (D_{560} 值) 的增加, 代谢底物吡嗪的量明显减少. 初始浓度 0.2

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的咔唑经过 36 h 大部分被降解,降解速率以接种后 12~30 h 之间最高,经过 36 h 降解率达到 76%。该菌株具有较强的咔唑降解活性。

表 1 菌株 KH-6 降解的杂环化合物 ¹⁾		
Table 1 Degradation of heterocyclic compounds by strain KH-6		
化合物	代谢底物	静止细胞反应
吲哚	-	+
咔唑	+	+
3-甲基咔唑	+	+
4-羟基咔唑	+	+
2,2'-二羟基联苯	+	+
甲基噻吩	-	+
5-甲基苯并噻吩	-	+
二苯并噻吩	-	+

1) - 表示阴性, + 表示阳性

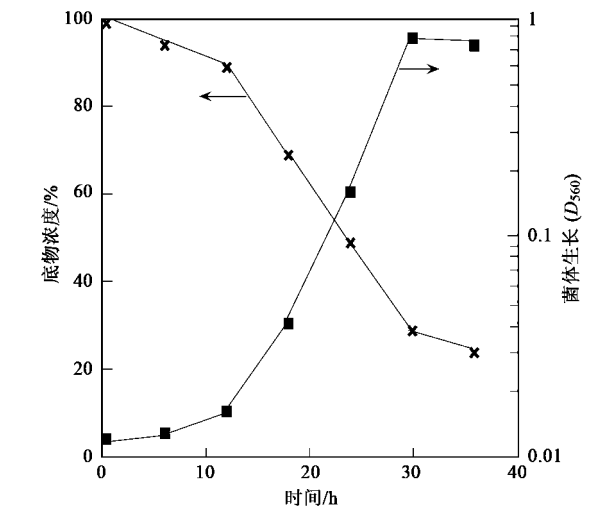


图 3 在 100 mL (0.2 mg/mL) 咔唑液体培养基内, 菌株 KH-6 的生长曲线和底物浓度变化
Fig.3 Growth of strain KH-6 and degradation of carbazole in 100 mL (0.2 mg/mL) of CFM

2.4 菌株 KH-6 对土壤中咔唑的生物降解作用

利用菌株 KH-6 对土壤中的咔唑进行生物降解,实验结果如图 4 所示.在灭菌土壤的投加实验中,投加组的生物降解速率明显高于对照组,30 d 内约有 90% 的咔唑被降解,而且呈现出明显地降解趋势.而在对照试验中只有近 34% 的咔唑被降解,降解曲线几乎处于平稳状态.实验结果表明,在灭菌土壤中投加菌株 KH-6 能够有效地降解咔唑。

3 结论

(1) 利用微生物分离技术,从土壤中分离到具有降解咔唑能力的菌株 KH-6,经生理生化试验及 16S rRNA 分析,鉴定为黄杆菌属细菌。

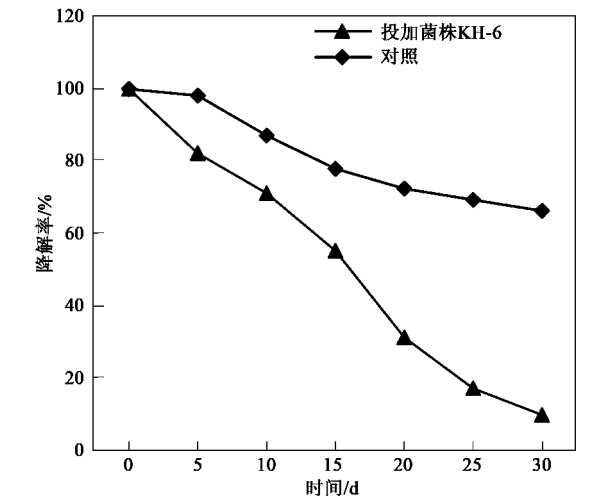


图 4 菌株 KH-6 在灭菌土壤中对咔唑的降解作用
Fig.4 Curves of carbazole degradation by strain KH-6 in sterilized soil sample

(2) 菌株 KH-6 能利用咔唑为唯一碳源和能源良好生长,同时还能以 3-甲基咔唑、4-羟基咔唑和 2,2'-二羟基联苯等为唯一碳源和能源生长.其利用咔唑生长的最适温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.5.在此条件下,咔唑的 36h 降解率为 76%。静止细胞反应结果表明,除上述可用于菌体生长的底物外,菌株 KH-6 的酶可降解吲哚、甲基噻吩、5-甲基苯并噻吩及二苯并噻吩等多种杂环化合物。

(3) 咔唑降解菌 KH-6 的投加效果实验表明,咔唑在灭菌土壤中的降解率为 90%,说明菌株 KH-6 对土壤中的咔唑有很好的生物降解效果。

参考文献:

[1] Kirimura K, Nakagawa H, Tsuji K, *et al.* Selective and continuous degradation of carbazole contained in petroleum oil by resting cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63(9): 1563-1568.

[2] Hiroyuki N, Kohtaro K, Takako N, *et al.* Recycle use of *Sphingomonas* sp. CDH-7 cells for continuous degradation of carbazole in the presence of MgCl_2 [J]. Curr Microbiol, 2002, 44: 251-256.

[3] Jha A M, Bharti M K. Mutagenic profiles carbazole in the male germ cells of Swiss albino mice[J]. Mutat Res, 2002, 500(1-2): 97-101.

[4] Benedik M J, Gibbs P R, Riddle R R, *et al.* Microbial denitrogenation of fossil fuels[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(9): 390-395.

[5] Xu P, Yu B, Li F L, *et al.* Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(9): 398-405.

[6] Li L, Li Q G, Li F L, *et al.* Degradation of carbazole and its

- derivatives by a *Pseudomonas* sp. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **73**: 941-948.
- [7] Seo J S, Keum Y S, Li Q X. Bacterial degradation of aromatic compounds[J]. J Environ Res Public Health, 2009, **6**(1): 278-309.
- [8] Lisa M G, Albin O, Phillip M F. Carbazole degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: Metabolic characteristics and the identification of some metabolites [J]. Environ Sci Technol, 1996, **30**(2): 575-585.
- [9] Nojiri H, Sekiguchi H, Maeda H K, et al. Genetic characterization and evolutionary implications of a car gene cluster in the carbazole degrader *Pseudomonas* sp. [J]. J Bacteriol, 2001, **183**(12): 3663-3679.
- [10] Maeda K, Nojiri H, Shintani M, et al. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin- degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676 [J]. J Mol Biol, 2003, **326**(1): 21-33.
- [11] Miyakoshi M, Urata M, Habe H, et al. Differentiation of carbazole catabolic operons by replacement of the regulated promoter via transposition of an insertion sequence [J]. J Biol Chem, 2006, **281**(13): 8450-8457.
- [12] Ashikawa Y, Uchimura H, Fujimoto Z, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the ferredoxin reductase component in the Rieske nonhaem iron oxygenase system carbazole 1,9a-dioxygenase [J]. Acta Crystallogr F, 2007, **63**(6): 499-502.
- [13] Santos S C, Alviano D S, Alviano C S, et al. Characterization of *Gordonia* sp. strain F. 5.25.8 capable of dibenzothiophene desulfurization and carbazole utilization [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **71**(3): 355-362.
- [14] Uchida E, Ouchi T, Suzuki Y, et al. Secretion of bacterial xenobiotic-degrading enzymes from transgenic plants by an apoplastic expressional system: an applicability for phytoremediation [J]. Environ Sci Technol, 2005, **39**: 7671-7677.
- [15] Urata M, Uchimura H, Noguchi H, et al. Plasmid pCAR3 contains multiple gene sets involved in the conversion of carbazole to anthranilate [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, **72**: 3198-3205.
- [16] Shintani M, Yano H, Habe H, et al. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, **72**: 3206-3216.
- [17] Inoue K, Habe H, Yamane H, et al. Characterization of novel carbazole catabolism genes from Gram-positive carbazole degrader *Nocardioides aromaticivorans* IC177 [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, **72**: 3321-3329.
- [18] Miyakoshi M, Shintani M, Terabayashi T, et al. Transcriptome Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 Harboring the Completely Sequenced IncP-7 Plasmid pCAR1 [J]. J Bacteriol, 2007, **189**: 6849-6860.
- [19] Takahashi Y, Shintani M, Yamane H, et al. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmids [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, **73**(3): 744-746.
- [20] Takahashi Y, Shintani M, Li L, et al. Carbazole-degradative IncP-7 plasmid pCAR1.2 is structurally unstable in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, which accumulates catechol, the intermediate of the carbazole degradation pathway [J]. Appl Environ Microbiol, 2009, **75**: 3920-3929.
- [21] Inoue K, Ashikawa Y, Umeda T, et al. Specific interactions between the ferredoxin and terminal oxygenase components of a class IIB Rieske nonheme iron oxygenase, carbazole 1, 9a-dioxygenase [J]. J Mol Biol, 2009, **392**: 436-451.
- [22] 郭维强, 胡吉军, 陈元芬, 等. 稳定混合菌协同降解唑啉研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2008, **14**(5): 654-657.
- [23] 李力, 许平, 史权, 等. 一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 石油脱有机氮分析 [J]. 生物工程学报, 2008, **24**(6): 1080-1084.
- [24] 黄杰勋, 熊小超, 李望良, 等. *Klebsiella* sp. LSSE-H2 的唑啉降解 [J]. 过程工程学报, 2007, **7**(1): 113-117.
- [25] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNA from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. Nucleic Acids Res, 1993, **21**: 5279-5280.