

芳香烃化合物降解菌的降解特性及降解基因

邓琦 常萍 周 围 程国军 * *

中南民族大学微生物与生物转化重点实验室, 武汉 430074

摘要 以苯酚作为碳源从化工厂污水样品中富集筛选出降解能力较强的降解菌 CP5, 该菌能利用多种芳香烃化合物生长。16S rDNA 序列系统发育分析表明, 该菌属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。CP5 可以在 48 h 内将 500 mg/L 的苯酚完全降解。从该菌株中扩增获得邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因, 该基因编码氨基酸序列与 *P. putida* NCIB 9816-4 以及 *P. fluorescens* PC20 的双加氧酶具有最高同源度, 均为 99%。CP5 菌株对芳香烃化合物的生物修复有较大的应用前景。

关键词 芳香烃化合物降解菌; 假单胞菌属; 邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0185-04

芳香烃化合物是分子结构含有苯环的化合物, 单环芳香族化合物普遍用作工业溶剂, 多环芳香族化合物广泛应用于塑料、石油、化工、煤加工、纺织和制药等行业中。芳香烃化学结构复杂, 分子结构稳定, 具有极强的诱变性。化工厂排放的污水, 其中大量芳香烃化合物在进入环境中后不能被高效降解, 残留在环境中易导致水体和土壤环境质量下降, 危及生态安全。因此, 对于环境中芳香烃化合物污染的治理和修复, 已成为当今可持续发展中诸多研究的难点和热点^[1]。

传统方法多采用化学法和物理法, 如焚烧、溶剂萃取法、活性炭吸附、大孔聚苯乙烯树脂吸附脱酚等^[1], 这些方法不但成本高、效率低而且容易造成二次污染^[2]。利用微生物技术治理、清除或降解转化这些高毒性芳香烃化合物, 则是一种既经济又环保的方法。目前研究发现假单胞菌^[3] (*Pseudomonas*)、气单胞菌^[4] (*Aeromonas*)、镰孢霉属 (*Fusarium*)、球菌属 (*Rhodococcus*)、根瘤菌 (*Rhizobia*) 以及真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 等都具有降解芳香烃化合物的能力。

笔者从武汉市某化工厂的污水样品中筛选到 1 株芳香烃降解细菌 CP5, 研究其对苯酚的降解能力以及不同芳香烃化合物的利用能力, 并对其相关降解基因进行了初步研究。

材料与方法

材 料

污水样品采自湖北省武汉市某有机化工厂污水排放口。

筛选培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, MgSO_4 0.2 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, NaH_2PO_4 0.5 g/L, 加入芳香烃化合物使其最终质量浓度分别为 50、200、500、800、1 000 mg/L, pH 6.5 ~ 7.5^[5]。

富集培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。

芳香烃化合物降解菌的筛选

将采集的样品接种到富集培养基中, 加入苯酚使其最终质量浓度为 100 mg/L, 于 30 °C 摇床振荡培养。待菌体长出后, 按 2% 的接种量转移到液体筛选培养基中振荡培养 48 h, 如此连续转接 4 次, 培养基中的苯酚分别按 200、500、800、1 000 mg/L 等质量浓度逐渐适量递增, 完成菌株的驯化过程。然后将驯化的菌液用平板稀释法涂布于含苯酚为 1 000 mg/L 的筛选培养基平板, 30 °C 培养 48 h 后获得单菌落。

的基因克隆、序列测定及系统发育分析

将菌体震荡培养至对数期, 离心收集菌体, 抽提细菌基因组总 DNA。通过 PCR 方法从细菌基因组

收稿日期: 2009-04-17; 修回日期: 2010-01-22

* 国家自然科学基金项目 (30800021) 和中南民族大学自然科学基金重点项目 (yzz06013) 资助

* * 通讯作者。E-mail: cgj0117@sohu.com

邓琦, 女, 1987 年生, 本科生。研究方向: 环境生物学。E-mail: ayumi1220@163.com

中扩增其 16S rDNA。扩增所用引物为:上游引物(5'-AA GGA GGTGA TCCA GCC-3')和下游引物(5'-A GA GTTTGA TCCTGGCTCA G-3')。PCR 反应(50 μ L)体系为:基因组总 DNA 2 μ L、10 mmol/L 上游引物和下游引物各 1 μ L、10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L、dNTP 2 μ L、5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 1 μ L、无菌去离子水 38 μ L。PCR 程序:94 预变性 3 min;94 变性 30 s,56 退火 1 min,72 延伸 2 min;循环 35 次;72 延伸 10 min^[6]。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶回收后,克隆到大连宝生物公司的 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 的感受态细胞。16S rDNA 的测序工作由北京三博远志公司完成。

通过 Blast 程序,将测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。选取同源性高的菌株,采用 Bioedit 和 MAGE 4.0 软件以邻位相连(neighbor-joining)法构建进化树,进行系统发育分析^[7]。

芳香烃化合物降解种类及苯酚降解率测定

将所分离的细菌接种于添加了 50 mg/L 芳香烃化合物的筛选培养基平板,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后,观察菌体生长情况,检测细菌芳香烃化合物降解种类。本试验所用芳香烃化合物为:萘、蒽、间苯二酚、邻氨基苯甲酸、对硝基苯甲酸、水杨酸。

将 CP5 菌株按 5%量接种到含 500 mg/L 苯酚的液体筛选培养基中,30 $^{\circ}$ C 振荡培养,每隔 12 h 测定 1 次苯酚含量,计算降解率。苯酚含量的测定采用 4-氨基安替比林法^[8]。

邻苯二酚-双加氧酶基因的扩增

根据已经报道的细菌邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因序列^[9]设计了 1 对引物:CAT2-3f 5'-TGATCGAGATG-GACCGTGACG-3'; CAT2-3r: 5'-TCA GGTCA G-

CACGGTCATGAA-3'。PCR 程序:94 预变性 3 min;94 变性 30 s,55 退火 1 min,72 延伸 2 min;循环 35 次;72 延伸 5 min。PCR 产物的大小约 800 bp^[9]。将基因片段克隆至 pMD18-T 载体,并测序。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析,并翻译成氨基酸序列。将获得的儿茶酚 2,3-双加氧酶氨基酸序列构建系统发育树,方法同 1.3。

结果与分析

芳香烃化合物降解菌的筛选与分离

经过富集、从样品中分离到 1 株能在质量浓度为 1 000 mg/L 的苯酚中生长良好的菌株 CP5。将 CP5 菌株在含有单一芳香烃化合物的筛选培养基中培养 3 d 后测定其对各种芳香烃化合物的利用能力。结果表明:CP5 菌株除了能够很好地利用苯酚外,还能够分别利用萘、蒽、间苯二酚、邻氨基苯甲酸、对硝基苯甲酸、水杨酸等芳香烃化合物作为唯一的碳源生长。因此,CP5 菌株被认定为芳香烃化合物降解菌株。

菌株分析

扩增 CP5 的 16S rDNA 基因,测序后在 NCBI 上进行 BLAST 比较分析。结果表明,该菌株与 *Pseudomonas* 属中 *P. extremaustralis*、*P. veronii* 以及 *P. marginalis* 等多个种菌株的 16S rDNA 亲缘关系最近,其同源性均达到 99%。

选取 *Pseudomonas* 属中同源性高的菌株进行比较,做出系统发育树(图 1)。可以看出:虽然 CP5 菌株的 16S rDNA 序列与 *Pseudomonas* 属中许多种有很高的同源性,但在进化地位上则相对独立,与 *Pseudomonas* 属的芳香烃化合物降解菌株,如 *P. antarctica*^[10]、*P. rhodesiae*^[11] 之间的差异都比较大。

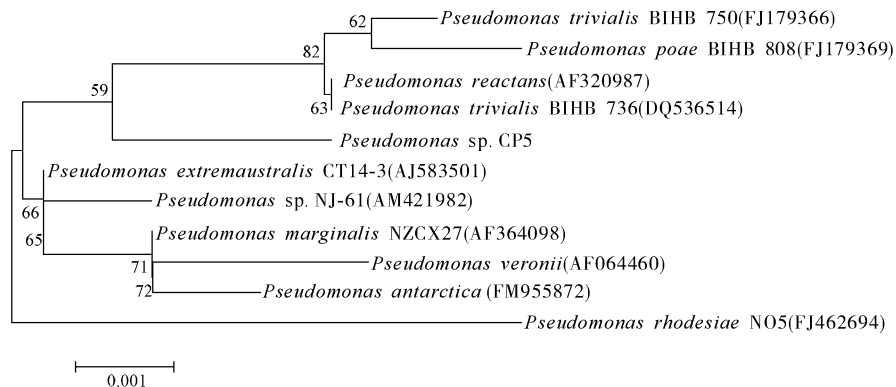


图 1 基于 16S rDNA 序列的 *Pseudomonas* sp. CP5 菌株系统发育树

Fig. 1 A phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence of *Pseudomonas* sp. CP5

菌株苯酚降解率测定

将 CP5 菌株接种到含苯酚的液体无机盐培养基(苯酚最终质量浓度为 500 mg/L)中,30 振荡培养,并每隔 12 h 测定 1 次溶液中苯酚含量,计算苯酚降解率。由图 2 可以看出:在生长的最初阶段,苯酚的降解速率很慢,在 24 h 内只降解了 30%,而一旦达到生长对数期,苯酚降解速度加快,并且能在 48 h 内将苯酚完全降解。

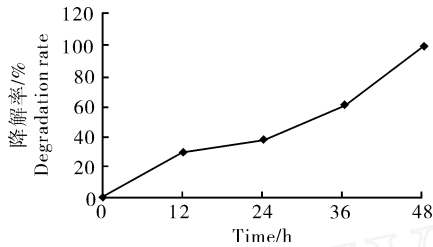


图 2 Pseudomonas sp. CP5 菌株的苯酚降解能力

Fig. 2 PhenoI-degrading rate by Pseudomonas sp. CP5

邻苯二酚 2,3-双加氧酶序列的比较分析

邻苯二酚 2,3-双加氧酶存在于一些能分解芳香族化合物的细菌中,它能催化苯环的邻位裂解,是细菌降解芳香烃化合物的一个关键酶^[12]。由已经报道的细菌邻苯二酚 2,3-双加氧酶基因序列设计引物,对 CP5 菌株基因组总 DNA 进行扩增并测序,序列在 NCBI 上经 Blast 比对发现其与 *P. putida* NCIB 9816-4 所含质粒 pDTG1 以及 *P. fluorescens* PC20 所含质粒 pNA H20 上编码的双加氧酶基因具最高的相似性,均为 99%。

将 CP5 菌株的基因编码的蛋白序列,与 NCBI 数据库中同源性高的菌株进行比较,构建了系统进化树(图 3),可以看出:CP5 菌株的邻苯二酚 2,3-双加氧酶和 *P. putida* 以及 *P. fluorescens* 的双加氧酶具有较近的进化距离,在进化地位上三者构成一簇。

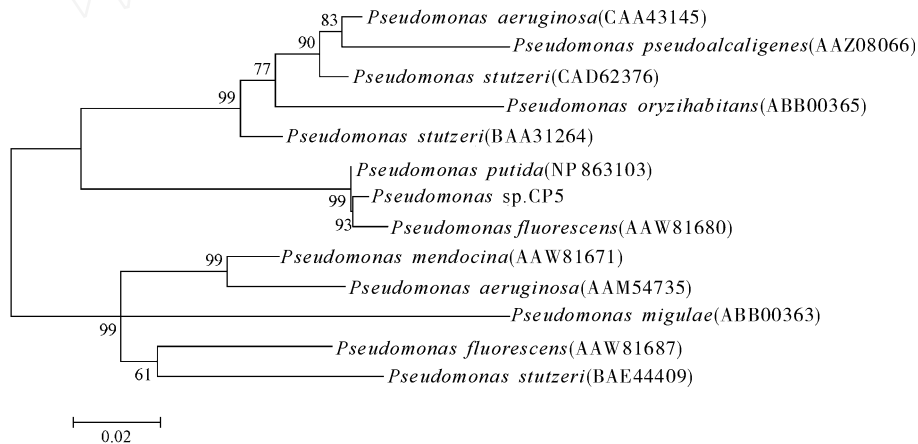


图 3 Pseudomonas sp. CP5 双加氧酶氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 A phylogenetic tree based on catechol 2,3-dioxygenase of Pseudomonas sp. CP5

讨 论

菌株 CP5 是从化工厂污水排放口获得的,该菌株能高效降解苯酚,在 48 h 内将 500 mg/L 的苯酚完全降解。钱弈忠等^[13]报道了 1 株高效苯酚降解假单胞菌菌株,78 h 后才能将 472 mg/L 的苯酚溶液全部降解;晁群芳等^[14]也分离到 1 株苯酚降解菌,48 h 后能将 300 mg/L 全部降解。与已有的苯酚降解菌相比,菌株 CP5 表现出较高的降解能力。同时,该菌株能分别利用萘、蒽、间苯二酚、邻氨基苯甲酸、对硝基苯甲酸、水杨酸等多种芳香烃化合物作为唯一的碳源生长。因此,CP5 菌株为芳香烃化合物降解菌株。

菌株 CP5 在 16S rDNA 序列上与 *Pseudomonas* 属中芳香烃化合物降解菌株有较高的同源性,但它们之间的系统进化关系则较远。菌株 CP5 以邻位形式开环,该菌中所含 2,3-双加氧酶与 *P. putida* NCIB 9816-4 以及 *P. fluorescens* PC20 的双加氧酶最为接近,相似度高达 99%,在进化地位上构成一簇。

参 考 文 献

- [1] 李淑彬,陈振军. 微生物降解酚类化合物的研究进展[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2005,4(4):136-142.
- [2] 魏甜甜,叶甜甜,程国军,等. 1 株抗铜细菌的分离、鉴定及其还原特性的研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(3):387-390.
- [3] RODRIGO J S, JACQUES E C S, FATIMA M B, et al. An-

- thracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site[J]. *Int Biodeter & Biodegr*, 2005, 56: 143-156.
- [4] 殷波, 顾继东. 环境污染物萘、蒽、菲、芘的好养微生物降解[J]. *热带海洋学报*, 2005, 4(24): 14-21.
- [5] 杨光, 向阳, 夏雷. 一株苯酚高效降解菌的分离及其分解能力的初步研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2003, 25(4): 3-6.
- [6] 周围, 李友国, 程国军, 等. 1株抗重金属铬细菌的分离、鉴定及抗性基因型的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 248-250.
- [7] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [8] 韦进宝, 吴峰. 环境监测手册[M]. 北京: 化工出版社, 2006: 208.
- [9] ALQUATIC, PAPANICHINI M, RICCARDI C, et al. Diversity of naphthalene-degrading bacteria from a petroleum contaminated soil [J]. *Annals of Microbiology*, 2005, 55(4): 237-242.
- [10] RANYA A A, MAHMOUD M N, EHAB R E. Biodegradation of monocyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated *Pseudomonas* strain[J]. *Biotechnology*, 2008, 7(4): 630-640.
- [11] KAHNG H Y, NAM K, KU KOR J J, et al. PAH utilization by *Pseudomonas rhodesiae* KKI isolated from a former manufactured-gas plant site[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2002, 60: 475-480.
- [12] 吴宇澄, 骆永明, 滕应, 等. 石油污染土壤中芳烃降解菌及邻苯二酚-2,3-双加氧酶的克隆[J]. *土壤*, 2006, 38(5): 640-644.
- [13] 钱弈忠, 张鹏, 谭天伟. 假单胞菌降解含苯酚废水实验[J]. *过程工程学报*, 2001, 1(4): 439-441.
- [14] 晁群芳, 周俊, 方新湘, 等. 苯酚降解菌 ZI-1 的分离及降解特性研究[J]. *生物技术*, 2009, 19(2): 57-59.

Degradation Characteristics of an Aromatic Compounds-Degrading Bacterium *Pseudomonas* sp. CP5 and Its Degrading Gene

DENG Qi CHANG Ping ZHOU Wei CHENG Guo-jun

Key Laboratory for Microorganism and Biological Transformation, South Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract A bacterial strain CP5 was isolated from a sewage water sample of a chemical factory using enrichment cultivation with phenol as a carbon source. Several aromatic compounds could be used as carbon sources for its growth. Analysis of the 16S rDNA sequence showed that it belonged to *Pseudomonas*. A DNA fragment of catechol-2,3-dioxygenase gene was obtained by PCR. Its coding protein showed a sequence similarity (99%) with the dioxygenases of *P. putida* NCIB 9816-4 and *P. fluorescens* PC20. Strain CP5 has potential use in the bioremediation of environmental contamination with aromatic compounds.

Key words aromatic compounds-degrading bacterium; *Pseudomonas*; catechol-2,3-dioxygenase gene

(责任编辑: 张志钰)