

苯酚降解菌株 GXY-1 分离鉴定、降解及其粗酶特性研究

周集体*, 关晓燕, 曲媛媛, 李昂, 苟敏, 艾芳芳

(大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 从处理石化废水的活性污泥样品中分离得到一株能以苯酚为唯一碳源生长的菌株 GXY-1. 通过形态特征、生理生化及 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定菌株 GXY-1 属于布鲁氏杆菌属 (*Brucella sp.*). 实验结果表明, 菌株 GXY-1 对土霉素和四环素不敏感, 其降解苯酚的最佳条件为温度 30 ℃, pH 7.0. 在最佳条件下, GXY-1 对 600 mg/L 苯酚的降解率在 60 h 时达 99% 以上. 同时 GXY-1 还可以利用苯胺、萘、氯苯等芳香化合物为唯一碳源生长. 测定了降解途径中相关酶的活性, 表明菌株 GXY-1 是通过邻苯二酚 1,2 双加氧酶催化开环来降解苯酚. 该菌株粗酶的最适反应 pH 为 7.8, 最适反应温度为 40 ℃.

关键词: 苯酚; 生物降解; 布鲁氏杆菌; 邻苯二酚 1,2 双加氧酶

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

0 引言

工业的不断发展造成了大量有毒污染废水的排放, 苯酚作为工业生产原料或中间体, 是工业排放废水中的主要有害污染物. 含酚废水主要来源于制药、炼焦、石油精炼、塑料等行业^[1]. 苯酚对水生生物具有很强的毒害作用, 危害人类的神经, 已被美国环保署列入优先控制污染物和 65 种有毒污染物的黑名单中^[2].

处理含酚废水的方法很多, 其中生物降解法是一种经济有效且无二次污染的方法, 许多学者在这方面进行了大量研究. 近年来从酚污染的环境中分离到多种降解苯酚的微生物菌种, 主要包括蜡状芽孢杆菌属 (*Bacillus cereus*)、醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[3~5] 等.

本文从中石化大连石油分公司污水处理站的活性污泥中分离筛选到一株高效苯酚降解菌, 对其进行 16S rDNA 的系统发育分析, 考察其降解特性, 并初步分析该菌株降解苯酚的粗酶特性, 以期找到对酚类处理效果好的优势菌株, 并为深入开发该菌用于污水处理奠定基础.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源 样品为中石化大连石油分公司污水处理站的活性污泥.

1.1.2 培养基

(1) 无机盐培养基 (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, KH_2PO_4 2, Na_2HPO_4 1.3, FeCl_3 0.000 25; 去离子水 1 000 mL; 按实际需要加入相应浓度的苯酚和其他碳源.

(2) LB 培养基 (g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10; 去离子水 1 000 mL. pH 7.0. 固体培养基另加入 20 g/L 琼脂.

(3) 分离纯化培养基: 无机盐培养基中加入 20 g/L 琼脂.

1.2 实验方法

1.2.1 苯酚降解菌的富集、分离与纯化 污泥样品按 10% 的接入量接种于含有 200 mg/L 苯酚的无机盐培养基中, 摇床 150 r/min, 30 ℃ 培养. 培养基混浊后, 以 10% 接入量接种于培养基中, 以梯度压力式驯化法驯化, 苯酚浓度梯度为 400、500、600 mg/L, 总驯化时间为 3 个月. 当苯酚浓

度增加到 600 mg/L 时,进行平板涂布,将平皿放于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 72 h,挑取单菌落,转入液体无机盐培养基中,经反复涂布,最后筛选出一株以苯酚为唯一碳源生长的菌株。

1.2.2 细菌总 DNA 的提取 细菌总 DNA 采用溶菌酶-SDS-蛋白酶 K 的方法进行提取,并用乙醇沉淀进行纯化^[6]。

1.2.3 16S rDNA 基因扩增、序列测定及同源性比较 用于扩增反应的引物为一对通用引物。上游引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物为 5'-TACCTTGTTACGACTT-3',扩增片段长度约为 1 500 bp。PCR 反应体系总体积为 25 μ L,包括:超纯水 16.2 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,引物(25 pmol/ μ L)各 1 μ L,Ex-taq(5 U/ μ L) 0.3 μ L。将总 DNA 进行稀释,取 2 μ L 作模板加入反应体系中。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,经过 30 个循环,其中 98 ℃ 变性 20 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1.5 min,30 个循环后,再在 72 ℃ 延伸 7 min。取 PCR 产物 1 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后紫外检测。用琼脂糖凝胶纯化试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司 TaKaRa)切胶回收 PCR 产物,将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体上,转化大肠杆菌感受态细胞。16S rDNA 的测序工作由宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.2.4 系统发育分析 将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中 16S rDNA 基因序列进行同源性比较。从 GenBank 中得到相关菌株的序列,与本文所测得序列一起输入 ClustalX1.8 程序进行 DNA 同源序列排列,以邻接法构建进化树并进行系统发育分析。

1.2.5 细菌浓度及苯酚含量的测定 菌体生物量和苯酚含量通过 JASCO UV-560 紫外-可见分光光度计进行测定。其中菌体生物量用在 660 nm 下测定的吸光度值(OD_{660})表示。

苯酚含量以在其最大特征吸收峰 269 nm 下测定的吸光度值(A_{269})表示,苯酚降解率 η 由下式计算:

$$\eta = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%$$

其中 A_0 为 0 时刻苯酚的吸光度; A_t 为 t 时刻苯酚的吸光度。

1.2.6 抗生素敏感实验 为考察菌株对抗生素的敏感性,将常用的 6 种抗生素:氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、链霉素、四环素、土霉素分别加到固体 LB 培养基中,30 ℃ 培养 48 h,观察菌落生长情况,以不加任何抗生素的实验组为对照。

1.2.7 生长与降解实验 在无机盐培养基中,加入 600 mg/L 苯酚,分别考察不同 pH、温度、接种量以及摇床转速对苯酚降解以及菌株生长的影响。

在无机盐培养基中,加入 600 mg/L 苯酚,在其最佳降解条件下,定时取样测定菌体生长量和苯酚降解情况。

1.2.8 细胞粗酶液的制备 将菌液在 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,以 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0)洗涤 3 次,置于 0 ℃ 的冰-水混合水浴中,用 CPX 750(USA)超声波破碎仪破碎细胞。22 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,上清液即为粗酶液。

1.2.9 酶活力测定 酶活力 A 的单位(U)定义为反应条件下每分钟催化生成 1 μ mol 产物所需的酶量。邻苯二酚 1,2 双加氧酶(C12O)活力以在单位时间内反应产物粘康酸在 260 nm 处的光吸收值测定。邻苯二酚 2,3 加氧酶(C23O)活力以单位时间反应生成的 2-羟基粘康酸半醛在 375 nm 处的光吸收值测定^[7]。粘康酸的摩尔消光系数 $\epsilon = 16 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$,2-羟基己二烯半醛的摩尔消光系数 $\epsilon = 12 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。蛋白浓度测定采用 Bradford 法^[8]。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离与鉴定

从污泥样品中分离到一株能以苯酚为唯一碳源生长的菌株 GXY-1。该菌株菌落呈乳白色,圆形,隆起,表面湿润、光滑。革兰氏染色为阴性,不形成芽孢和荚膜,杆状,细菌专性需氧,最适生长温度 37 ℃,最适 pH 6.6~7.4。SEM 照片如图 1 所示。该菌株 16S rDNA 基因序列与布鲁氏芽孢杆菌(*Brucella sp.* CGL-1)的 16S rDNA 同源性为 99%,综合其形态特征、生理生化及 16S rDNA 序列分析,鉴定该菌为布鲁氏芽孢杆菌,命名为 GXY-1 菌株(*Brucella sp.* GXY-1)。

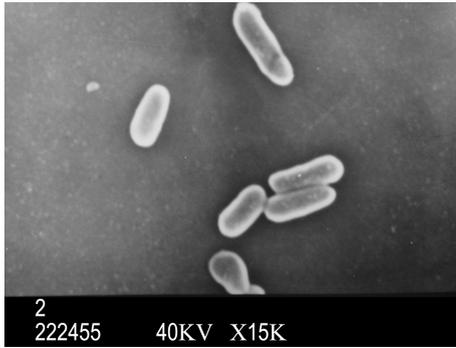


图1 GXY-1菌株的扫描电镜照片

Fig.1 SEM of GXY-1

2.2 菌株 GXY-1 的系统发育分析

菌株 GXY-1 的 16S rDNA 基因序列已登录 GenBank, 登录号为 EF514908. 将得到的序列通过 BLAST 软件与 GenBank 核酸序列库中的序列进行局部同源性比较 (BLASTn), 结果表明 GXY-1 菌株与 *Brucella sp.* 的 16S rDNA 序列有较高的同源性, 其中与 *Brucella sp.* CGL-1 有 99% 的同源性. 参考 GXY-1 菌株 16S rDNA 在 GenBank 的比较结果, 利用 ClustalX1.8 软件构建系统发育树 (见图 2). 结合表观特征和生理生化, 确定菌株 GXY-1 属于变形菌门, α 变形菌纲, 根瘤菌目, 布鲁氏菌科, 布鲁氏菌属.

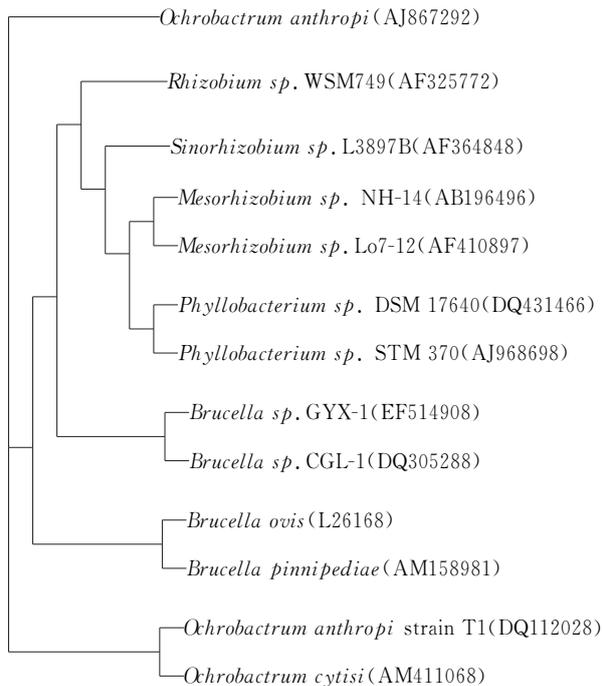


图2 GXY-1菌株16S rDNA系统发育树

Fig.2 16S rDNA phylogenetic tree of GXY-1

2.3 菌株 GXY-1 的抗性实验

菌株 GXY-1 对常见抗生素的敏感性如表 1 所示. GXY-1 对链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素和氯霉素都极为敏感, 对四环素和土霉素在工作浓度下均有抗性.

表1 菌株 GXY-1 抗性实验

Tab.1 Experiments of GXY-1 resistance to antibiotics

抗生素	储存浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	工作浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	实验结果
链霉素	10 (水)	50	-
四环素	5 (乙醇)	50	+
土霉素	5 (乙醇)	100	+
氨苄青霉素	50 (水)	100	-
卡那霉素	10 (水)	50	-
氯霉素	34 (乙醇)	170	-

注: + 有抗性; - 无抗性

2.4 环境条件对菌株 GXY-1 生长及苯酚降解的影响

图 3 分别显示了 pH、温度、接种量和摇床转速对菌株生长及苯酚降解的影响. 由图可见, 菌株 GXY-1 降解苯酚的最佳条件为 pH 7.0, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 接种量 10%, 摇床转速 150 r/min.

2.5 菌株 GXY-1 生长降解曲线

图 4 显示了在最佳条件下菌体生长和苯酚降解曲线 (图中 ρ 为苯酚浓度). 如图所示, 菌株 GXY-1 生长经过 12 h 停滞期后进入对数生长期, 42 h 以后菌株处于稳定生长期. 由降解曲线可以看出, 苯酚的降解主要发生在对数生长期. 600 mg/L 的苯酚在 60 h 时降解率可以达到 99% 以上. 生长曲线的测定对菌株的培养及生长特性提供了参考.

近几年的苯酚降解研究中分离出大量的苯酚降解菌. 唐赞等^[9]分离出的嗜热菌 BF80 降解 6 mmol/L (约为 564 mg/L) 的苯酚需要 120 h; 章杰等^[10]分离出的苯酚降解菌 JF-2 降解 600 mg/L 的苯酚需要 13 d; 刘广金等^[11]分离出的一株假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) 降解 500 mg/L 的苯酚需要 60 h. 菌株 GXY-1 降解能力明显高于上述诸多已分离出的苯酚降解菌株.

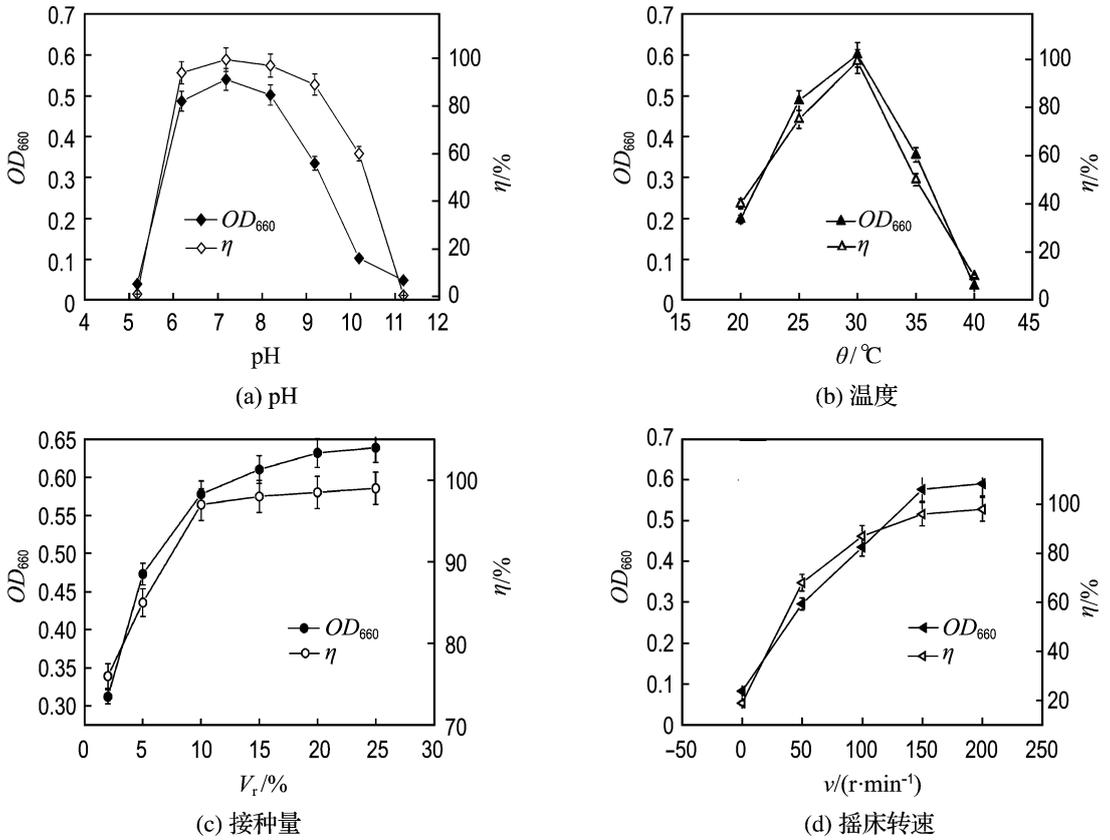


图3 pH、温度、接种量和摇床转速对 GXY-1 生长及苯酚降解的影响

Fig. 3 Effects of pH, temperature, inoculum and rotating rate on growth of GXY-1 and phenol degradation

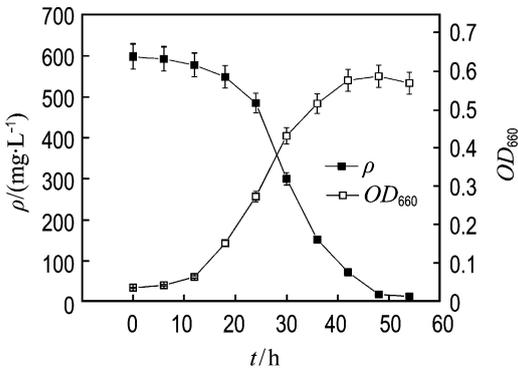


图4 菌株 GXY-1 生长和苯酚降解曲线

Fig. 4 The curves of GXY-1 growth and phenol degradation

2.6 底物广谱性实验

为测定菌株 GXY-1 对其他难降解有机物的降解情况, 将该菌株接种于浓度分别为 50、100 mg/L 的苯胺、儿茶酚、苯甲酸等培养基溶液中, 并测定 48 h 时菌株对它们的降解率, 实验采用菌体的接种量为 10%。实验结果如表 2 所示, 菌株 GXY-1 除了可以利用苯酚作为碳源生长以外, 还可以利用苯胺、氯苯、儿茶酚等 8 种芳香化合物为唯一碳源生长。因此, 可以推测菌株 GXY-1 具有多样的降解酶系, 不仅可以催化单环芳香化合物

的降解, 也可催化稠环芳香化合物的降解。菌株 GXY-1 可以作为研究芳烃降解酶的良好微生物资源, 以便开发出高效微生物酶剂。

表 2 菌株 GXY-1 对不同底物的降解率
Tab. 2 Degradation ratio of different substrates by GXY-1 %

有机物	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	
	50	100
苯胺	95.44	92.12
儿茶酚	97.78	93.45
苯甲酸	96.43	92.36
氯苯	87.34	75.23
甲苯	76.34	67.89
萘	56.45	43.21
菲	48.98	40.64
联苯	65.23	56.26
4-氯儿茶酚	0	0

2.7 菌株 GXY-1 邻苯二酚双加氧酶的测定

苯酚的好氧微生物降解首先在羟化酶的作用下生成邻苯二酚, 再由邻苯二酚 1,2-双加氧酶或邻苯二酚 2,3-双加氧酶作用, 经邻位或间位途径开环裂解, 最后形成三羧酸循环中间物。不同的微生物降解苯酚的机制不同, 有些菌株通过邻位或

间位途径开环裂解,也有些菌株同时具备这两种途径^[12].实验检测了菌株 GXY-1 的粗酶活性,表 3 结果显示 GXY-1 具有邻苯二酚 1,2-双加氧酶酶活力,而不具有邻苯二酚 2,3-双加氧酶酶活力,因此推测该菌株是经邻位途径开环降解苯酚的.同时,负责该反应的邻苯二酚 1,2-双加氧酶只有在底物存在时才能进行表达,属于诱导酶,这与菌株 *Rhodococcus sp.* AN-22 中 C12O 的情况相反^[13].而菌株在含有邻苯二酚的 LB 培养基中生长时,仅有少量的活性被检测到,这可能是由于 GXY-1 优先利用了培养基中的高营养组分,从而被邻苯二酚诱导表达的 C12O 较少.

表 3 不同基质 GXY-1 菌株的粗酶液中邻苯二酚双加氧酶酶活力

Tab. 3 Activities of catechol oxygenases of crude enzyme made from cells of GXY-1 growing on different substrates

基质	底物	A/(U·mg ⁻¹)	
		邻苯二酚 1,2 双加氧酶	邻苯二酚 2,3 双加氧酶
苯酚+无机盐	邻苯二酚	4.80	0
LB	邻苯二酚	0.05	0
LB	—	0	0

2.7.1 温度对酶活力的影响 用水浴加热,控制反应温度 20~70 °C,将粗酶液与底物在不同温度下反应,检测反应体系中邻苯二酚 1,2 双加氧酶的酶活力.图 5 显示了温度对酶活力的影响.如图所示,邻苯二酚 1,2 双加氧酶的酶活力在 40 °C 达到顶峰,随后随着温度的升高,降解酶活力逐渐降低.

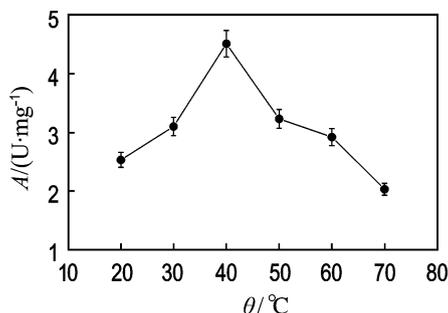


图 5 温度对 C12O 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on C12O activities

2.7.2 pH 对酶活力的影响 在 pH 3.6~10.7 内配制不同缓冲溶液(醋酸-醋酸钠、磷酸缓冲液、Tris-HCl 及 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液),设置不同的 pH 环境,将粗酶液与底物在不同 pH 缓冲溶液中反应,检测反应体系中邻苯二酚 1,2 双加

氧酶的酶活力.图 6 显示了 pH 对酶活力的影响.如图所示,邻苯二酚 1,2 双加氧酶的最适反应 pH 为 7.8,随后随着 pH 的升高邻苯二酚 1,2 双加氧酶的酶活力下降.在 pH 5.8~9.4 内,该酶能保持 50% 以上的活力.

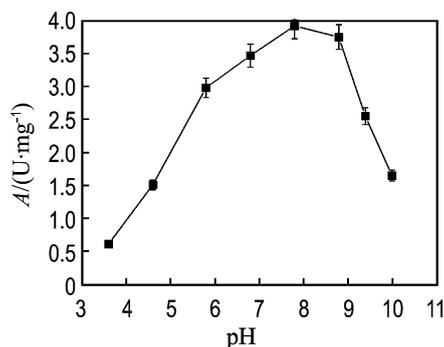


图 6 pH 对 C12O 酶活力的影响

Fig. 6 Effect of pH on C12O activities

2.7.3 金属离子对酶活力的影响 在粗酶反应最适温度和 pH 条件下,将粗酶与底物在含有不同重金属离子的缓冲溶液中反应,检测反应体系中邻苯二酚 1,2 双加氧酶的活性.表 4 显示了重金属离子对酶活力的影响.在酶反应体系中加入浓度为 1 mmol/L 金属离子后,30 °C 测定酶活.如表 4 所示,Fe³⁺、Ba²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、K⁺ 对酶活力有不同程度的促进作用,其中作用最显著的是 Fe³⁺;Pb²⁺、Co²⁺、Hg²⁺、Ni²⁺、Mg²⁺ 对酶活力有不同程度的抑制作用,Cu²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺ 对酶活力有较强的抑制作用,几乎没有酶活力.

表 4 金属离子对 C12O 酶活力的影响

Tab. 4 Effect of metal ions on C12O activities

金属离子	A _r /%	金属离子	A _r /%
—	100	Co ²⁺	75.5
Fe ³⁺	179	Ni ²⁺	55.9
Ca ²⁺	141	Pb ²⁺	42.6
Mn ²⁺	135	Hg ²⁺	34.0
K ⁺	106	Cu ²⁺	0
Ba ²⁺	104	Zn ²⁺	0
Mg ²⁺	92.3	Fe ²⁺	0

3 结 论

(1) 从污泥样品中分离得到一株能以苯酚为唯一碳源生长的菌株 GXY-1,初步鉴定该菌株属于布鲁氏杆菌属(*Brucella sp.* GXY-1).

(2) 该菌株降解苯酚的最佳条件为 pH 7.0,温度 30 °C,转速 150 r/min,接种量 10%;在此条件下,对 600 mg/L 苯酚的降解率在 60 h 时可达

99%以上。

(3) 在以苯酚为唯一碳源生长的培养基中,检测到了与苯酚降解相关的主要酶(邻苯二酚 1,2 双加氧酶)的活性,表明该菌株通过邻苯二酚 1,2 双加氧酶催化开环途径降解苯酚。邻苯二酚 1,2 双加氧酶的粗酶反应最佳条件为 pH 7.8, 温度 40 °C。

(4) 金属离子的存在对酶活力有不同程度的影响, Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 等对酶活力有促进作用, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 等对酶活力有抑制作用。

参考文献:

[1] 金相灿,程振华,徐南妮,等. 有机化合物污染化学: 有毒有机物污染化学[M]. 北京:清华大学出版社, 1990

[2] 刘琼玉,李太友. 含酚废水的无害化处理技术进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2002, **20**(3):62-64

[3] 李淑彬,陈振军,丘李莉. 蜡状芽孢杆菌菌株 Jp-A 的分离鉴定及其降解苯酚特性[J]. 应用生态学报, 2006, **17**(4):920-924

[4] 徐玉泉,张维,陈明,等. 一株苯酚降解菌的分离和鉴定[J]. 环境科学学报, 2000, **20**(4):450-455

[5] ANNADURAI G, JUANG R S, LEE D J. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge [J]. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2002, **22**(7):703-710

[6] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 3版. 颜子颖,王海林,金冬雁,译. 北京:科学出版社, 2001

[7] 沈锡辉,刘志培,王保军,等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株(*Rhodococcus sp.* strain PNAN5)的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. 环境科学学报, 2004, **24**(3):482-486

[8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**(7):248-254

[9] 唐赞,刘沐之,梁凤来,等. 一株嗜热菌的分离鉴定及其苯酚降解特性[J]. 微生物学通报, 2006, **33**(5):39-44

[10] 章杰,何泽超,梁川. 一株降解苯酚微生物的研究[J]. 四川环境, 2006, **25**(1):8-10

[11] 刘广金,张袖丽. 苯酚高效降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 现代农业科技, 2007, **11**:202-203

[12] 刘和,吴坚阳,陈英旭. 丛毛塞丸酮单胞菌 ZD4-1 和铜绿假单胞菌 ZD4-3 降解芳香烃化合物的机理[J]. 微生物学报, 2004, **44**(1):107-110

[13] MATSUMURA E, OOI S, MURAKAMI S, *et al.* Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus sp.* AN-22[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, **98**(2):71-76

Research on isolation, identification of a phenol-degrading strain GXY-1 and characteristics of its degradation and crude enzyme

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

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

Abstract: A strain which can utilize phenol as sole carbon source is isolated from activated sludge of petrochemical wastewater and identified as *Brucella sp.* GXY-1 according to morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The experimental results suggest that the strain can tolerate oxytetracycline and tetracycline. The optimum conditions for the degradation of phenol are temperature 30 °C, pH 7.0. Under the optimum conditions, GXY-1 can decompose over 99% of phenol (600 mg/L) within 60 h. GXY-1 is able to degrade other aromatic compounds, such as aniline, naphthalene and chlorobenzene. Determination of enzymes activities in the degradation process indicates that the degradation of phenol is catalyzed by catechol 1,2-dioxygenase. The optimum conditions for the enzymatic reaction are pH 7.8 and 40 °C.

Key words: phenol; biodegradation; *Brucella sp.*; catechol 1,2-dioxygenase