

甲苯降解菌降解特性及代谢途径初步研究^①

饶佳家¹, 霍丹群²

1. 重庆工学院 生物工程学院, 重庆 400050; 2. 重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044

摘要: 从污泥中分离得到 1 株能以甲苯为唯一碳源和能源生长的细菌菌株, 经过生理生化实验初步鉴定为假单胞菌属。温度在 20~40 ℃ 之间、pH7、甲苯浓度在 316 mg/L 以下, 菌株降解甲苯的效率保持 80%~100% 之间, 甲苯浓度大于 316 mg/L, 出现抑制现象。甲苯降解途径是通过甲苯双加氧酶形成顺甲苯二氢二醇, 再经邻苯二酚 2, 3 双加氧酶开环降解。

关键词: 甲苯; 降解; 甲苯双加氧酶; 代谢途径

中图分类号: X511

文献标识码: A

甲苯是易挥发的芳香簇化合物, 广泛存在于石油、化工行业中, 这类有机化合物具有很强的疏水性和化学稳定性, 同时对人体具有很强的毒性和致畸性^[1]。利用微生物的降解作用是清除环境中芳烃污染的有效途径之一, 由于环境中污染物组成的复杂性, 分离高效广谱降解菌在芳烃的环境整治方面就显得格外重要。

以甲苯为唯一碳源和能源筛选到一株甲苯降解菌, 并对其降解特性和甲苯双加氧酶特性进行了初步研究, 这将有助于了解微生物在污染物消除过程中的作用, 同时也为后续利用该菌株上填料塔降解甲苯废气奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

污泥样品采集于重钢焦化厂脱酚池污水排放口。

1.2 菌株的富集与筛选

将污泥样品按 1% 接种于 LA^[2] 培养基中进行增殖培养。将增殖培养后的菌种接种到 MS 培养基中, 以梯度浓度法对菌种进行驯化, 每隔 3 d 提高甲苯浓度 1 次, 一共驯化了 5 个阶段, 然后在非碳源固体培养基上划线分离, 挑取单菌落, 接种于斜面; 在非碳源培养基平板上反复划线多次, 直至得到纯菌株。在进行菌株利用底物实验时, 选用无机盐 MS^[3] 培养基, LB 培养基^[2] 则用于菌株的保存, 细菌生长以波长 600 nm 处的光吸收表示。

1.3 菌种鉴定

菌株的生理生化鉴定参见文献^[4,5]进行。

1.4 分析方法

① 甲苯采用气相色谱仪测定, 以氮气为载体, 氢火焰法, 汽化室温度为 170 ℃, 检测室温度为 170 ℃,

① 收稿日期: 2007-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 50006015)。

作者简介: 饶佳家(1978-), 女, 重庆江津人, 硕士, 助教, 主要从事环境生物技术。

填充柱为苯系填充柱, 柱箱温度为 80 °C, 载气流速 30 mL/min.

②菌悬液浓度采用分光光度计测定.

③蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝法^[6].

1.5 甲苯降解率的测定

在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 无机盐 MS^[3] 培养基, 再接入 2% 的种子液, 置于 35 °C、160 rpm 摇床上培养, 加入甲苯的浓度分别为 10~150 uL, 每个浓度梯度做 3 个平行样, 然后每隔 2 h 用气相色谱仪测 1 次甲苯浓度和菌悬液浓度 OD600 值.

1.6 不同温度下菌株对甲苯降解速率的影响

在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 无碳源, 调 pH 值为 7, 再接入 5% 的种子液, 置于 160 rpm 摇床上培养, 加入甲苯的浓度为 50 uL, 培养温度从 10~60 °C, 每隔 10 °C 为 1 个温度梯度, 每个温度下做 3 个平行样, 然后每隔 2 h 用气相色谱仪测 1 次甲苯浓度.

1.7 粗酶液的制备及甲苯降解过程中几种酶比活性的测定

在 MS^[3] 培养基中加入甲苯培养至 OD600 值为 0.8~1.0 之间时, 转瓶重新培养, 待菌液 OD600 值为 1.0 时, 高速冷冻离心机(10 000 r/min, 4 °C)离心 10 min 后用磷酸缓冲液洗菌体, 重复 1 次. 菌体悬浮于 Tris-HCl 缓冲溶液中, 超声波离心破碎(4 °C, 工作 3 s, 停 10s, 重复 85 次, 功率 600 w), 然后离心去除细胞碎片, 离心条件和菌悬液制备一样, 取上清液. 盐析选用硫酸铵分级沉淀, 浓度在 40%~50% 之间时为最佳, 最后需用透析袋出盐. 甲苯双加氧酶比活性测定参照文献^[6], 邻苯二酚 1, 2 双加氧酶和邻苯二酚 2, 3 双加氧酶比活性测定参照文献^[7,8].

2 结果及讨论

2.1 样品的富集驯化与筛选

污泥样品通过富集培养之后, 得到混合微生物的培养物, 经 5 次驯化后, 分离得到 1 株细菌, 而且降解甲苯的能力从 72.7 mg/L 提高到 388.8 mg/L, 说明驯化能显著提高菌株对甲苯的耐受能力.

2.2 菌种的鉴定

经驯化, 分离纯化得到 1 株能以甲苯为唯一碳源生长的菌株, 该菌株在 LB^[2] 培养基上菌落表现为圆形、乳白色、突起、光滑, 并且边缘波状. 革兰氏染色鉴定为革兰氏阴性菌, 细菌为短杆状, 鞭毛极生, 能运动, 但不产生芽孢, 其生理生化特征如表 1, 结果显示与假单胞菌属一致.

表 1 菌株的鉴定项目和结果

菌株	菌体形态	鞭毛	革兰氏染色	葡萄糖氧化发酵	氧化酶实验	接触酶实验	硝酸盐实验
筛选菌株	短杆菌	极生	—	氧化产酸	+	+	+
假单胞属对照	杆菌	极生	—	氧化产酸	+	+	+

2.3 不同初始甲苯浓度下菌株比降解速率和比生长速率

试验在含不同甲苯浓度(72.7~779.4 mg/L)的培养基(pH7.0)中, 30 °C 摇床培养进行. 结果(图 1)表明, 当甲苯浓度在 0~316 mg/L 范围内时, 比降解速率随甲苯浓度的增大而迅速增加, 在 316 mg/L 达到 0.236/h, 因此表现为生物与底物的联合控制步骤. 当甲苯浓度大于 316 mg/L 时, 比降解速率开始下降, 在浓度为 388 mg/L 时, 比降解速率降至 0.229/h, 此时在降解实验中发现底物仍能完全降解. 当增加甲苯浓度至 462 mg/L 时, 则不论增加实验降解时间, 甲苯均不能被完全降解. 从图 1 和实验过程分析原因, 比降解速率随时间的变化过程已表现出有毒有机物对生物的抑制效应, 即有机物控制步骤. 因此该菌株对于浓度在 0~316 mg/L 范围内的甲苯可直接进行好氧降解处理. 图 2 显示不同初始甲苯浓度的比生长速率随时间变化趋势, 对比图 1 与图 2, 结果显示比生长速率变化趋势和比降解速率变化趋势吻合, 该菌株生长和降解属基本偶联型^[9].

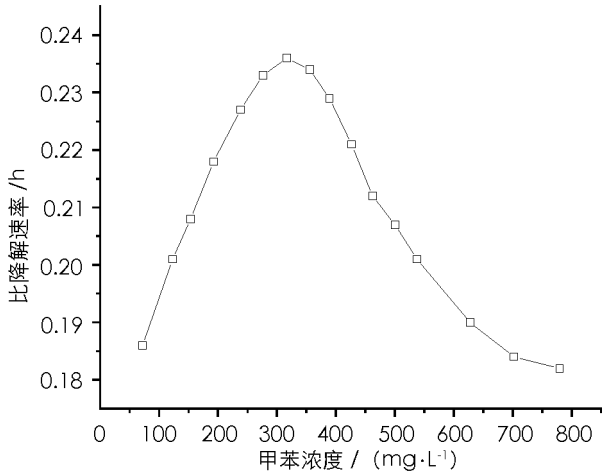


图 1 不同甲苯浓度的比降解速率

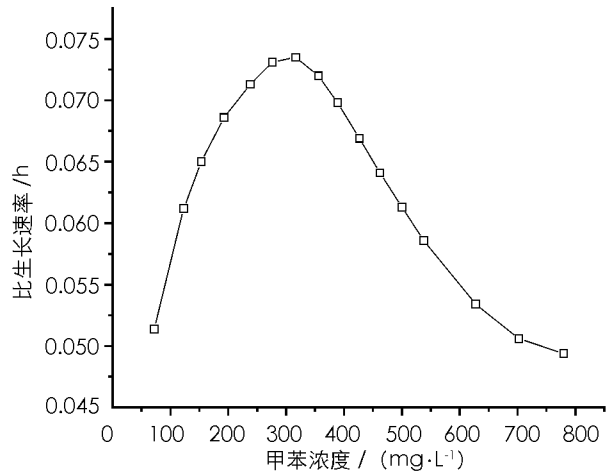


图 2 不同甲苯浓度的生长速率

2.4 不同温度下菌株对甲苯降解速率的影响

图 3 实验结果表明, 温度对菌体生长影响较大. 30 °C 所得降解率最高, 温度增高至 60 °C 或降低至 10 °C, 甲苯几乎不降解. 在 20~40 °C 都有良好的降解特性, 这一实验发现有利于实际应用. 当温度过高, 降解率下降, 提示由于温度高, 甲苯挥发程度明显加大, 伴随酶失活几率增加, 导致降解率大大下降; 同时温度过低, 假单胞菌中酶活性几乎没有, 并进入休眠状态, 因此甲苯也几乎不降解.

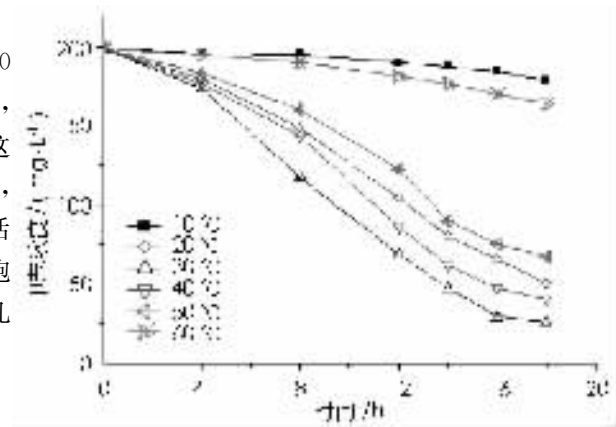


图 3 不同温度下该菌的降解速率

2.5 菌株降解甲苯的代谢途径

研究表明能代谢甲苯的微生物不只一种, 其代谢途径亦有不同. 目前发现甲苯的代谢途径共有 5 种(图 4), 但都是先通过甲苯单加氧酶或双加氧酶形成邻苯二酚这个关键中间产物, 然后通过邻位切割或间位切割开环. 为研究该菌株降解甲苯的途径, 测定了甲苯双加氧酶、邻苯二酚 1, 2 双加氧酶和邻苯二酚 2, 3 双加氧酶的活性. 结果表明在以甲苯为底物时, 菌株甲苯双加氧酶的比活性为 0.281 μ/mg, 在粗酶液中没有检测到邻苯二酚 1, 2 双加氧酶, 邻苯二酚 2, 3 双加氧酶的比活性为 0.514 μ/mg. 由此表明甲苯的代谢途径是顺甲苯二氢二醇途径, 如图 3 中途径 E. 而且由表 2 可以得知, 这两种酶都是诱导酶.

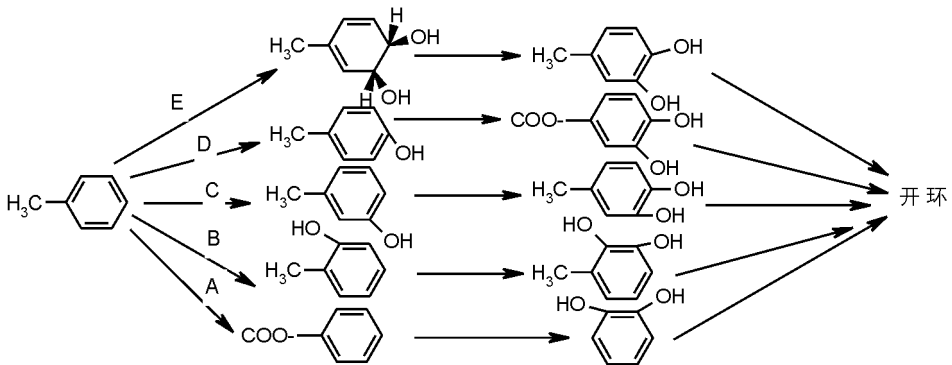


图 4 甲苯的降解途径

3 结论

从焦化厂分离得到一株能以甲苯为唯一碳源的假单胞菌属菌株. 在实际处理污染物中, 该菌在 pH7,

温度在 20~40℃ 之间, 甲苯浓度在 316mg/L 以下时, 降解效率均能保持在 80% 以上, 超过这一值浓度, 会出现抑制作用. 通过对该菌降解途径的初步研究, 发现该菌株通过甲苯双加氧酶得到关键中间产物 3-甲基邻苯二酚, 然后在邻苯二酚 2, 3 双加氧酶的作用下开环进入三羧酸循环.

表 2 不同基质中菌株的粗酶液加氧酶活性

生长基质	酶试底物	甲苯双加氧酶	邻苯二酚 1, 2 双加氧酶	邻苯二酚 2, 3 双加
		$/(\mu \cdot \text{mg}^{-1})$	$/(\mu \cdot \text{mg}^{-1})$	氧酶 $/(\mu \cdot \text{mg}^{-1})$
甲 苯	甲苯, 3-甲基邻苯二酚	0.281	0	0.514
乳酸盐	3-甲基邻苯二酚	0	0	0
LB 培养基	3-甲基邻苯二酚	0	0	0

* 甲苯双加氧酶活力的定义为每分钟生成 1 mg 靛蓝所需酶量为 1 个酶活力单位. 邻苯二酚酶活单位定义为每分钟氧化 1 mmol 的邻苯二酚所需的酶量.

参考文献:

- [1] 饶佳家, 陈炳灿, 孙兴福, 等. 生物法处理挥发性有机废气的研究. 环境污染治理技术与设备[J]. 2004, 5(9): 56-60.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. A Laboratory Manual[M]. New York: Cold spring Harbour press. 1989.
- [3] Cohen-Bazire G, Siström W R, Stanier R Y. Kinetic studies of pigment synthesis by nonsulfur purple bacteria[J]. J Cell Comp Physiol, 1957, 49: 25-32.
- [4] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社. 1984.
- [5] 无锡轻工业学院编. 微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社. 1992.
- [6] Hae-jin Woo, John Sanseverino. The measurement of toluene dioxygenase activity in biofilm culture of *Pseudomonas putida* F[J]. J. Microbiological Methods, 2000, 40: 181-191.
- [7] Liu Z, Yang H, Huang Z, et al. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 679-682.
- [8] Strachan P D, Freer A A, Fewson C A. Purification and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene[J]. Biochem J, 1998, 333(3): 741-747.
- [9] 戚以政, 夏杰编. 生化反应工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.

Analysis of Biodegradation Characteristics and Metabolic Pathway of Toluene-degrading Bacteria

RAO Jia-jia¹, HUO Dan-qun²

1. College of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050;

2. Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044

Abstract: A bacterial strain isolated from waste sludge was identified as *Pseudomonas putida* according to morphological, physiological experiment. It can use toluene as sole carbon and energy sources. Under experimental conditions, the strain degraded 80%~100% of the added toluene at temperature 20~40℃ and pH for 7. The toluene concentrations under 316mg/L can not significantly affect its removal efficiency. The biodegradation pathway of toluene has formed cis-toluene dihydrodiol by toluene dioxygenase.

Key words: toluene; degradation; toluene dioxygenase; metabolic pathway