

一株高浓度苯胺、苯酚降解菌的分离鉴定 及降解特性*

武洪杰 谭周亮 刘庆华 李旭东**

(中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘要 从某生活污水厂活性污泥中分离到一株能够以苯胺或苯酚为唯一碳源、能源生长的高效降解菌菌株ANP. 经形态特征、生理生化及16S rDNA序列分析, 将该菌株鉴定为*Delftia* sp. 进一步研究表明, 该菌株利用苯胺生长的最适温度和pH分别为30 °C和6.0, 最适降解浓度为2 000 mg L⁻¹; 利用苯酚生长的最适温度和pH分别为35 °C和8.0, 最适降解浓度为1 500 mg L⁻¹. 苯胺、苯酚混合培养时该菌株对苯酚的降解过程要滞后于对苯胺的降解过程, 但经过42 h均能彻底降解. 研究了ANP降解苯胺和苯酚的开环途径, 苯胺芳环通过间位途径裂解, 苯酚芳环则是通过邻位途径裂解. 图4 表1 参18

关键词 苯胺; 苯酚; 降解菌; *Delftia* sp.; 邻苯二酚双加氧酶
CLC S172

Isolation and Characterization of an Aniline-degrading and Phenol-degrading Bacterium*

WU Hongjie, TAN Zhouliang, LIU Qinghua & LI Xudong**

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract A bacterial strain ANP capable of efficiently degrading aniline and phenol was isolated from activated sludge of a sewage treatment plant. The strain can be cultivated by using aniline and phenol as its sole carbon and energy sources. It is identified as *Delftia* sp. according to its morphology, biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis. Further study indicated that the optimal pH and temperature for cell growth and aniline degradation were 6 and 30 °C, respectively; the optimal concentration of aniline was 2 000 mg L⁻¹; the optimal pH and temperature for cell growth and phenol degradation were 8 and 35 °C, respectively; and the optimal concentration of phenol was 1 500 mg L⁻¹. When cultivated with both phenol and aniline, strain ANP could only degrade aniline at first, but the both could be degraded thoroughly after 42 h. Enzymatic analysis showed that aniline was degraded in meta cleavage pathway, while phenol in ortho cleavage pathway. Fig 4, Tab 1, Ref 18

Keywords aniline; phenol; multifunctional bacterium; *Delftia* sp.; catechol dioxygenase
CLC S172

苯胺、苯酚及其衍生物被广泛应用于炼油、染料、农药、医药等行业生产中的原料或中间体, 是相关工业排放废水中的主要有害污染物组成成份, 是最常见的水体污染物^[1-2]. 含苯酚废水排入水体, 不仅使生化需氧量增加, 还会危害水生生物繁殖与生存. 苯胺是有毒有害物质, 具有致癌作用, 排放到环境中会严重污染环境和危害人体健康, 因此需严格控制在一定含量范围内^[3]. 近几十年的研究表明, 许多微生物参与了此类有机毒物的具有重要环保意义的生物降解反应^[4]. 微生物对此类污染物的处理具有巨大的潜力, 速度快、消耗低、效率高、成本低、反应条件温和以及无二次污染是其显著优点. 因此, 利用微生物技术处理苯酚及苯胺污染物已成为当今水污染治理的重要途径和研究方向^[5]. 目前已经在许多菌属的微生物中发现了能够降解高浓度苯酚的细菌^[6-7]和能够降解高浓度苯胺的细菌^[8-11], 但能以苯胺和

苯酚为唯一碳源、能源生长的微生物虽有报道但未作深入研究^[7, 9], 基于工业废水中高浓度苯胺、苯酚和相关衍生物经常同时出现的情况^[1-2], 因此分离既能降解苯胺又能降解高浓度苯酚的高效降解菌并深入研究其降解特性就显得十分必要.

本研究分离到一株能以苯胺和苯酚为唯一碳源、能源生长的高效降解菌, 对其进行了鉴定, 研究了其降解苯胺和苯酚的相关特性, 并初步探讨了该菌株降解苯胺和苯酚的不同降解酶体系和途径.

1 材料与方法

1.1 菌种富集、分离纯化与培养基组成

试验样品取自成都第二污水处理厂好氧池活性污泥. 污泥样品按10%的接入量接种于培养基中, 于30 °C、160 r min⁻¹的摇床上振荡培养1 wk左右, 培养基变浑浊后, 再按1%的接入量转接到新的苯胺、苯酚浓度梯度培养基中培养1 wk左右, 如此重复3~5次. 然后在MSB琼脂平板上划线分离, 选择不同形态特征的菌落, 重新转接至加1 000 mg L⁻¹苯胺、500 mg L⁻¹苯酚的MSB培养基中, 相同条件下培养以验证是否具有苯胺、苯酚降解能力, 培养基变浑浊后, 进一步纯化直至得

收稿日期: 2009-02-18 接受日期: 2009-05-06

*国家自然科学基金项目(No. 50678165)和国家“863”重大项目课题(No. 2007AA06A409)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50678165) and the National “863” Program of China (No. 2007AA06A409)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lixd@cib.ac.cn)

到有降解能力的纯培养菌株。

合成培养基 (MSB): 每1 L含 Na_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g (含氮合成培养基加), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, 微量元素溶液^[10] 5 mL, 一定浓度的苯胺、苯酚, pH 7.0. 固体培养基中加入15 g L^{-1} 的琼脂粉. LB培养基: 每1 L含酵母抽提物5 g, 蛋白胨10 g, NaCl 10 g, 调pH值至7.0.

1.2 细菌生长测定和生理生化指标测定

细菌生长以600 nm处的浊度 $D_{600\text{nm}}$ 表示. 革兰氏染色、碳源利用等指标测定参照文献[12~13]方法进行.

1.3 16S rDNA的PCR扩增和序列测定

细菌DNA提取和PCR产物纯化采用北京TIANGEN公司试剂盒, 16S rDNA扩增的PCR反应引物为一对通用引物, 正向引物Pf: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3; 反向引物Pr: 5-ACGGCTACCTGTGACT-3, 分别对应大肠杆菌的16S rRNA基因的8~27和1495~1514碱基. PCR扩增体系 (50 μL): 10 \times Buffer 5 μL 、10 mmol/L dNTP 2 μL 、5 U μL^{-1} Taq酶 1 μL 、25 mmol/L Mg^{2+} 4 μL 、10 pmol μL^{-1} 正向引物 2.5 μL 、10 pmol μL^{-1} 反向引物 2.5 μL 、ddH₂O 30 μL 、模板DNA 3 μL . PCR反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 30 s; 55 $^\circ\text{C}$ 30 s; 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 35个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min. PCR产物纯化后送上海生工测序.

1.4 酶活力测定

邻苯二酚1, 2-双加氧酶和邻苯二酚2, 3-双加氧酶活参照文献[8, 14]所述方法测定. 反应体系包括0.2 μmol 邻苯二酚、50 mmol/L磷酸盐缓冲液1 mL、含有蛋白的细胞提取液1 mL, 酶促反应总体积为3 mL.

1个单位的酶活力定义为在标准测定条件下每1 min生成1 nmol的己二烯二酸或2-羟基己二烯半醛酸所需的酶量. 酶的比活力 (U mg^{-1} 蛋白质): 比活力的大小, 也就是酶含量的大小, 即每1 mg酶蛋白所具有的酶活力.

1.5 蛋白含量测定

采用Bradford比色法^[15]测定蛋白含量.

1.6 苯胺和苯酚测定

苯胺和苯酚的测定均采用标准方法^[16].

2 结果与讨论

2.1 样品富集培养及菌种分离纯化

污泥样品经过富集培养后, 得到混合微生物的培养物, 它可以在含有1 000 mg L^{-1} 苯胺和500 mg L^{-1} 苯酚的合成培养基中生长并降解苯胺和苯酚. 将上述混合培养物在含MSB平板上进行划线分离, 挑取单菌落, 经过复筛、纯化后得到一株既能降解苯胺又能降解苯酚的菌株ANP. 菌株ANP在LB培养基平板上培养3 d的菌落为淡黄色、圆形、边缘整齐、凸状隆起、粘稠, 菌落直径为1.5 mm左右; 革兰氏阴性, 细胞直杆状, 0.5 $\mu\text{m} \times 1.0 \mu\text{m}$. 氧化酶、接触酶阳性; 可利用葡萄糖、柠檬酸盐、乳酸盐等盐类为碳源; 硝酸盐还原阳性, 反硝化阴性. 扩增菌株ANP菌株的16S rRNA部分基因, 长度为1 475 bp, 在GenBank中的登录号为FJ595716. 序列分析表明, 该菌株与多株*Delftia* sp.菌有很高的同源性, 相似性最高为99%. 结合菌株的形态和生理生化特征, 将菌株ANP鉴定为*Delftia* sp.

2.2 ANP菌株生长和降解苯胺、苯酚的最佳条件

2.2.1 最适初始pH 在含苯胺浓度为2 000 mg L^{-1} 、不同pH

值的合成培养基中接种ANP菌株, 30 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min摇床培养3 d后取样测定细胞的生长和苯胺的含量. 在苯酚浓度为500 mg L^{-1} 、不同pH值的合成培养基中接种ANP菌株, 30 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min摇床培养3 d后取样测定细胞的生长和苯酚的含量. 结果 (图1) 表明, 在苯胺培养条件下, ANP菌株对苯胺的降解对pH变化比较敏感, 而细胞生长只对低pH敏感对高pH有一定耐性, 其最佳pH为6; 在苯酚培养条件下, ANP菌株在pH=7~10范围内细胞都能良好生长并对苯酚起到有效的降解, 其最佳pH为8.

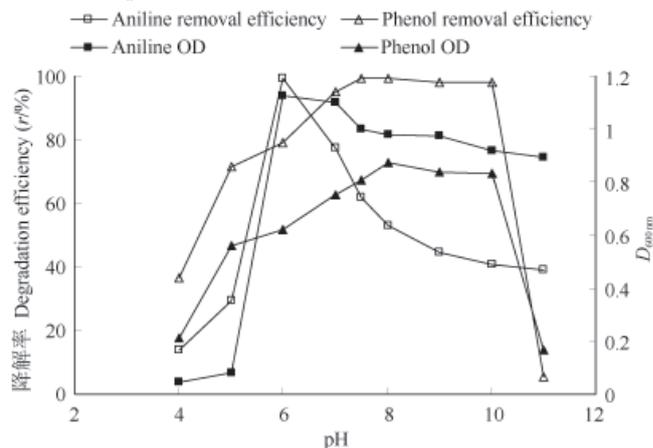


图1 pH值对ANP菌株利用苯胺、苯酚生长及降解率的影响

Fig. 1 Effect of pH on growth and degradation efficiency of strain ANP

菌株在苯胺和苯酚培养条件下的最佳pH不同, 可能是由于苯胺本身电离偏碱性, 所以其最适初始pH偏酸, 而苯酚电离偏酸性, 所以其最适初始pH偏碱.

2.2.2 最适浓度 在含不同浓度 (500~4 000 mg L^{-1}) 苯胺、pH=6的合成培养基中接种ANP菌株, 30 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min摇床培养3 d后取样测定细胞的生长和苯胺的含量. 在含不同浓度 (500~2 500 mg L^{-1}) 苯酚、pH=8的合成培养基中接种ANP菌株, 30 $^\circ\text{C}$ 、160 r/min摇床培养3 d后取样测定细胞的生长和苯酚的含量. 结果 (图2) 表明, 在苯胺培养条件下, ANP菌株对含量为2 000 mg L^{-1} 及其以下的苯胺都能够有效降解, 而2 000 mg L^{-1} 以上浓度的苯胺下其降解和细胞生长都受到强

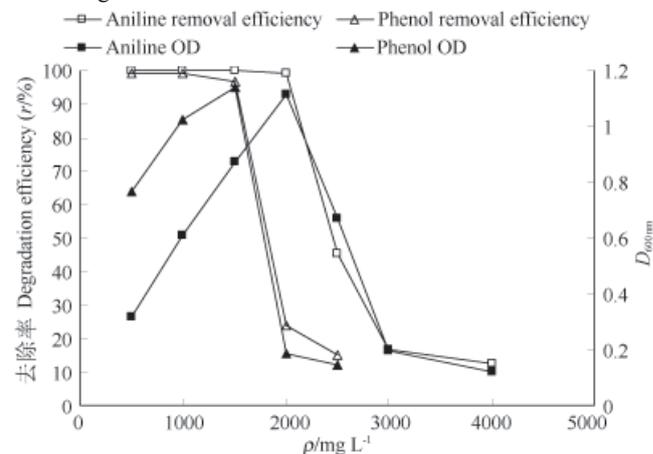


图2 不同苯胺、苯酚浓度下ANP菌株的生长及降解率

Fig. 2 Cell growth and degradation efficiency of strain ANP at different concentrations of aniline and phenol

烈抑制,最适浓度为2 000 mg L⁻¹. 4 000 mg L⁻¹苯胺需要7 d能基本完全降解. 在苯酚培养条件下, ANP菌株在1 500 mg L⁻¹以下浓度都能有效降解,在浓度为2 000 mg L⁻¹及以上时则生长和降解都受到抑制,最适浓度为1 500 mg L⁻¹. 2 500 mg L⁻¹苯酚完全降解需要6 d.

2.3.3 最适温度 在含苯胺浓度为2 000 mg L⁻¹、pH=6的合成培养基中接种ANP菌株,不同温度、160 r/min摇床培养3 d后取样测定细胞的生长和苯胺的含量. 在苯酚浓度为1 500 mg L⁻¹、pH=8的合成培养基中接种ANP菌株,不同温度、160 r/min摇床培养3 d后取样测定细胞的生长和苯酚的含量. 结果(图3)表明,在苯胺培养条件下,ANP菌株对低温较敏感,在30 °C、35 °C时都能有效降解苯胺并生长,其最佳温度为30 °C;在苯酚培养条件下,ANP菌株在30~40 °C范围内都能有效降解和生长,其最佳温度为35 °C.

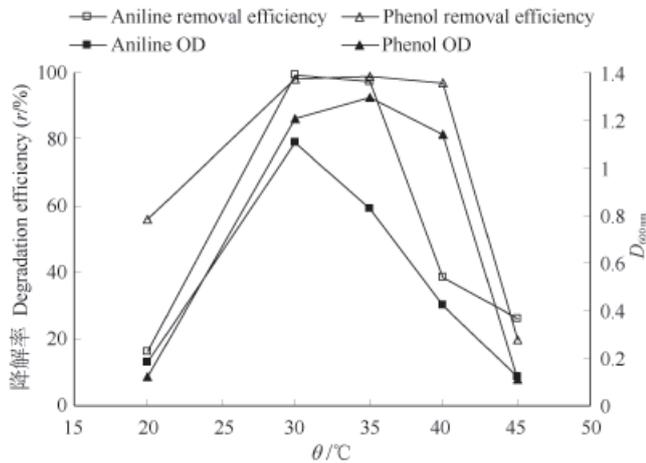


图3 温度对ANP菌株利用苯胺、苯酚生长及降解率的影响
Fig. 3 Effect of temperature on growth and degradation efficiency of strain ANP

2.3 苯胺、苯酚混合条件下的降解

在含苯胺约1 400 mg L⁻¹、苯酚约600 mg L⁻¹的合成培养基中接种ANP菌株,30 °C、pH=6、160 r/min摇床培养每隔6 h取样测定. 结果(图4)表明,在混合培养条件下,ANP菌株对苯胺和苯酚都能很好地降解,在42 h就能完全降解. 42 h后,由于苯胺和苯酚都已被降解完,菌体的生长进入衰退期. 苯胺的降解很迅速,而苯酚的降解有一个相对的延滞期(18 h后才开始迅速降解). 苯胺和苯酚含量在0~6 h大幅降低,而6~12 h降低较少,可能是由于菌株一开始是对苯胺和苯酚进行吸附,而非直接降解造成.

2.4 ANP菌株降解苯胺和苯酚的开环途径

根据文献报道,苯胺降解是首先通过苯胺双加氧酶的催化使苯胺形成邻苯二酚,进而通过邻苯二酚1,2-双加氧酶(C12O)或邻苯二酚2,3-双加氧酶(C23O)的作用开环,产物进入三羧酸循环(TCA)进一步降解作为微生物碳源、能源^[4, 10-11, 17]. 降解苯酚的代谢是通过苯酚羟化酶将苯酚羟基化为邻苯二酚,邻苯二酚由邻苯二酚1,2-双加氧酶(C12O)通过邻位途径,或经邻苯二酚2,3-双加氧酶(C23O)通过间位途径开环,最后形成三羧酸循环中间物进一步降解以供微生物利用^[4, 18].

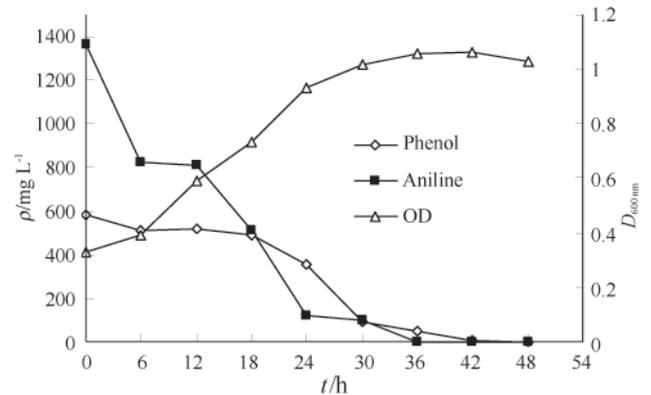


图4 ANP菌株在苯胺苯酚混合培养条件下的降解作用和生长情况
Fig. 4 Degradation and growth of strain ANP under aniline and phenol mixed culture

可见,苯胺和苯酚的降解都要通过邻苯二酚双加氧酶进行开环,邻位和间位途径是两个独立的代谢系统. 邻位途径生成产物为己二烯二酸,间位途径生成产物为2-羟基己二烯半醛酸. 而根据ANP菌株在苯胺和苯酚培养条件下的最适pH的差异和耐受温度的差异(图3),可知其降解苯胺和苯酚的酶体系是大不相同的,通过对菌株在苯胺和苯酚分别培养条件下测定其C12O、C23O,发现在苯胺培养条件下,其C23O活力很高而C12O基本没有;在苯酚培养条件下,其C12O的活力很高而C23O基本没有. 由此可知,ANP菌株对苯胺的降解主要通过间位途径开环,而对苯酚的降解主要通过邻位途径开环. 在LB培养基中培养(非诱导条件)的菌体细胞没有检测到C12O和C23O活力,表明此降解酶应为诱导酶,结果见表1.

表1 不同培养基中C12O和C23O的活力
Table 1 Activities of C12O and C23O in different media

培养基 Media	C12O (μ/U mg ⁻¹)	C23O (μ/U mg ⁻¹)
LB media	0	0
Aniline MSB	48	5~833
Phenol MSB	4125	0

3 结论

本研究从成都一生活污水厂活性污泥中分离出一株既能降解苯胺又能降解苯酚的高效多功能降解菌ANP,能利用苯胺为唯一碳源、能源、氮源,能利用苯酚为唯一碳源、能源进行生长. 将该菌株鉴定为*Delftia* sp.

菌株ANP降解苯胺的最佳条件为pH=6,温度30 °C,在此条件下,菌株能维持良好的生长和降解率,最适浓度为2 000 mg L⁻¹; ANP菌株降解苯酚的最佳条件为pH=8,温度35 °C,最适浓度为1 500 mg L⁻¹,高于已报道的最高水平1 200 mg L⁻¹^[7-8]. 所以,该菌具有用于处理高浓度苯胺、苯酚废水很好的潜力.

在含苯胺约1 400 mg L⁻¹、苯酚约600 mg L⁻¹的混合培养条件下,ANP菌株对苯胺和苯酚都能很好地降解,在42 h就能完全降解. 苯胺的降解很迅速,而苯酚的降解有一个相对的延滞期. 菌株一开始可能是对苯胺和苯酚进行吸附,而非直接降解. 该菌在苯胺、苯酚混合条件下的良好降解能力为降解成分复杂的工业废水提供了应用基础.

研究了ANP菌株降解苯胺和苯酚的不同开环途径,表明

降解苯胺主要是通过间位开环裂解,苯酚则主要通过邻位开环裂解,C12O和C23O是诱导酶。

References

- 1 Kearney PC, Kaufman DD. *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Model of Action*. 2nd ed. New York, USA: Marcel Dekker, 1975
- 2 Meyer U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: Leisinger T, Hutter R, Cook AM eds. *Microbialdegradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*. London, UN: Academic Press, 1981. 371~385
- 3 Talsky G. Higher-order derivative spectrophotometry in environmental analytical chemistry. *Intern J Environ Anal Chem*, 1983, **14** (2): 81
- 4 Harayama S, Timmis KN. Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: Sigel H, Sigel A ed. *Metal Ions in Biological systems*. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1992. 28
- 5 Lyons CD, Katz S, Bartha R. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environment. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**: 491~496
- 6 Heinaru E, Truu J, Stottmeister U. Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol and *p*-cresol degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds *Microbiol Ecol*, 2000, **31**: 195~205
- 7 Gong B (龚斌), Liu J(刘津), Zhae B (赵斌). The isolation and identification of phenol degrading strain and study on its degrading characterization. *Acta Sci Circumst* (环境科学学报), 2006, **26** (12): 2008~2012
- 8 Liu Z, Yang H, Huang Z, Zhou P. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delfiia* sp. AN3. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**: 679~682
- 9 Zhang YF (张逸飞), Gu T(顾挺), Wang GX (王国祥). Isolation and characterization of aniline-degrading bacterial strain AN4. *Environ Poll & Control* (环境污染与防治), 2008, **30** (2): 12~15
- 10 Kaminski U, Janke D, Prauser H. Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An 117 and a pseudomonad: A comparative study. *Z Allg Mikrobiol*, 1983, **23**: 235~246
- 11 Liu ZP (刘志培), Yang HF (杨惠芳), Zhou PJ (周培谨). Study on degradation of aniline by *Comamonas acidovorans* AN3. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5** (2): 185~189
- 12 Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英). 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 128~132
- 13 Jun E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Holt. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984, **1**: 303~307
- 14 JM Sala-Trepat, WC Evans. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species. *Eur J Chem*, 1971, **20**: 400~413
- 15 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (1): 248~254
- 16 国家环保总局. 水和废水监测分析方法. 3版. 北京: 中国环境科学出版社, 1998
- 17 Liu ZP (刘志培), Yang HF (杨惠芳), Zhou PJ (周培谨). Characteristics and metabolism pathway of microbial degradation of aniline. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1999, **5** (Suppl): 9~13
- 18 Arai H, Ohishi T, Chang MY. Arrangement and regulation of the genes for meta-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology*, 2000, **146** (7): 1707~1715