

噬氨副球菌HPD-2对苯并[a]芘的降解特性及代谢途径初探^①

刘增俊^{1,2}, 滕应^{1,2}, 骆永明^{1,2*}, 李振高^{1,2}

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

Benzo[a]pyrene Degradation Characteristics and Metabolic Pathway by *Paracoccus aminovorans* HPD-2

LIU Zeng-jun^{1,2}, TENG Ying^{1,2}, LUO Yong-ming^{1,2}, LI Zhen-gao^{1,2}

(1 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

摘要: 通过溶液培养的方法初步探讨了噬氨副球菌 HPD-2 对苯并[a]芘 (B[a]P) 的降解特性及代谢途径。结果表明, 噬氨副球菌 HPD-2 对 B[a]P 的降解率随其初始浓度的增大而逐渐减小。当 HPD-2 在 B[a]P 初始浓度分别为 5.0、50.0 mg/L 的培养液中生长 5 天后, B[a]P 的降解率分别为 66.1% 和 31%。经衍生化后 GC-MS 鉴定结果发现, 8-羧酸-7-羟基芘和双羟基菲为噬氨副球菌 HPD-2 降解 B[a]P 的两种主要代谢中间产物。

关键词: 苯并[a]芘; 噬氨副球菌 HPD-2; 降解特性; 代谢途径

中图分类号: X172; S154.3

苯并[a]芘 (Benzo[a]pyrene, B[a]P) 是由 5 个苯环组成的一种多环芳烃 (PAHs) 化合物, 致癌性极强, 是国内外环境监测的重要指标之一, 因而环境中 B[a]P 的微生物降解与代谢途径研究受到人们的高度重视。通常认为, PAHs 的环数越高, 越难被微生物降解利用。许多研究表明, 自然界环境中能降解芘、屈、菲等的菌株较多^[1-3], 而关于纯培养物能够直接利用 B[a]P 作为唯一碳源和能源的报道甚少^[4]。近年来, 本实验室从 PAHs 污染土壤中筛选到一株能够以 B[a]P 为唯一碳源和能源生长的噬氨副球菌 HPD-2 (*Paracoccus aminovorans* HPD-2)^[5]。鉴此, 本研究将进一步分析该菌株对不同浓度 B[a]P 的降解特性, 采用 GC-MS 手段鉴定 B[a]P 降解的中间代谢产物, 初步推断该菌降解 B[a]P 的代谢途径, 为深入探讨高分子量 PAHs 污染土壤的微生物修复机理提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌株为噬氨副球菌 HPD-2 (*Paracoccus aminovorans* HPD-2), 该菌为革兰氏阴性, 其生长最

适温度范围 28℃ ~ 36℃; pH 范围为 6 ~ 9, 最适生长 pH 为 7; NaCl 浓度在 2% 时 HPD-2 生长最好; 最佳碳源为乳酸, 葡萄糖和蔗糖次之; 最佳氮源为牛肉膏和酵母膏, 蛋白胨次之。B[a]P (分析纯) 购自美国 Sigma 公司。

1.2 培养基

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0。

(2) 无机盐培养基 (MS): K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 5.5 g, Na₂SO₄ 2.0 g, KCl 2.0 g, NH₄NO₃ 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, 微量金属盐溶液 1.0 ml, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0。

(3) 含 PAHs 的无机盐培养基: 以二甲基二酰胺 (DMF) 配制 5000 mg/L 的 B[a]P 溶液, 按适当的浓度加入灭菌的无机盐培养基。

1.3 菌悬液的制备

在无菌条件下将菌株接种于含 5.0 mg/L B[a]P 的无机盐液体培养基中, 28℃ 下 200 r/min 振荡培养 7 天, 离心收集菌体, 并用磷酸盐缓冲液反复洗涤 3 次, 再用磷酸盐缓冲液将菌悬液调至 OD 值为 1.0 时备。

①基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (KZCX2-YW-404, CXTD-Z2005-4) 和国家“863”计划项目 (2007AA061101) 资助。

* 通讯作者 (ymluo@issas.ac.cn)

作者简介: 刘增俊 (1980—), 男, 河南封丘人, 博士研究生, 主要从事土壤环境生物修复方面研究。E-mail: zjliao@issas.ac.cn

1.4 HPD-2 菌株对 B[a]P 的降解

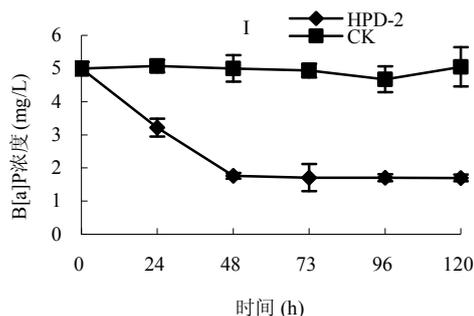
将 10% 的菌悬液加入 30 ml 液体培养基中, 加入 B[a]P, 使 B[a]P 的最终浓度约为 5.0 mg/L 和 50.0 mg/L, 同时以加灭活菌悬液的处理作为对照 (CK), 每个处理设 3 个重复。28℃ 下 200 r/min 避光振荡培养 5 天, 在不同时段 (0、24、48、72、120 h) 取样, 4℃ 冷冻保存。测定其溶液中 B[a]P 的浓度。

1.5 溶液中 B[a]P 及其转化产物的提取与分析

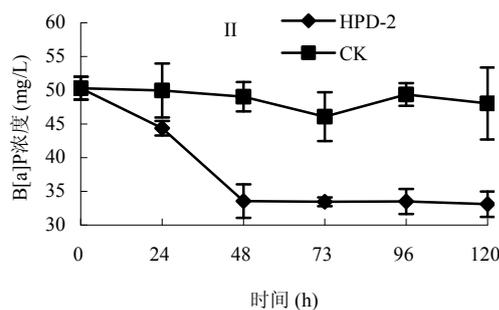
将三角瓶中的降解液全部倒入分液漏斗, 加入 30 ml (等体积) 乙酸乙酯提取 3 次, 合并提取液后用无水 Na₂SO₄ 脱分, 旋转蒸发浓缩至干, 加 2.0 ml 乙腈溶解, 用高效液相色谱 (HPLC) 测定^[6]。B[a]P 降解产物的检测具体方法见文献^[7]。

2 结果与分析

2.1 噬氨副球菌 HPD-2 对不同初始浓度 B[a]P 的降解率



无机盐液体培养基中不同初始浓度 B[a]P 的浓度随时间的变化如图 1 所示。由图 1 可知, 该菌株在接种入含 B[a]P 为唯一碳源的液体培养基中时虽然存在一个降解延滞期, 但其降解延滞期较短, 能很快适应环境从而降解 B[a]P。B[a]P 初始浓度分别为 5.0 mg/L 和 50.0 mg/L 时, B[a]P 的浓度从培养初期开始下降, 第 24 h 至 48 h 时其降低最快, 分别下降了 64.8% 和 33.3%, 48 h 后其浓度下降速率变缓, 5 天后 B[a]P 的降解率分别为 66.1% 和 34.2%。而该菌在 24 h 到 48 h 时生长最快, 细胞数目急剧增加, 处于指数生长期, 而 48 h 以后处于稳定期, 说明 B[a]P 的降解与该菌的生长呈现出一定的对应关系。由图 1 可知, 随着培养液中 B[a]P 浓度的增加, 该菌株对 B[a]P 的降解能力下降, 这可能与高浓度的 B[a]P 对菌株 HPD-2 产生了一定的毒害作用有关^[8]。在加灭活菌悬液处理 (CK) 中, B[a]P 的浓度也有所降低, 可能是由于非生物因素造成。



(I: B[a]P 初始浓度为 5.0 mg/L; II: B[a]P 初始浓度为 50.0 mg/L)

图 1 培养液中不同初始浓度 B[a]P 随时间的变化

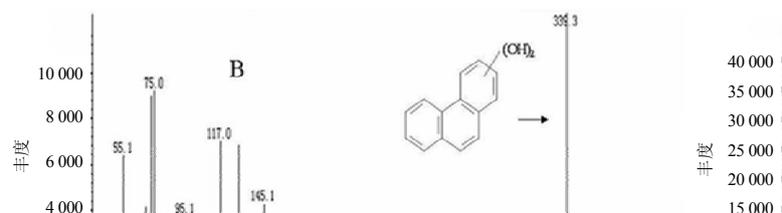
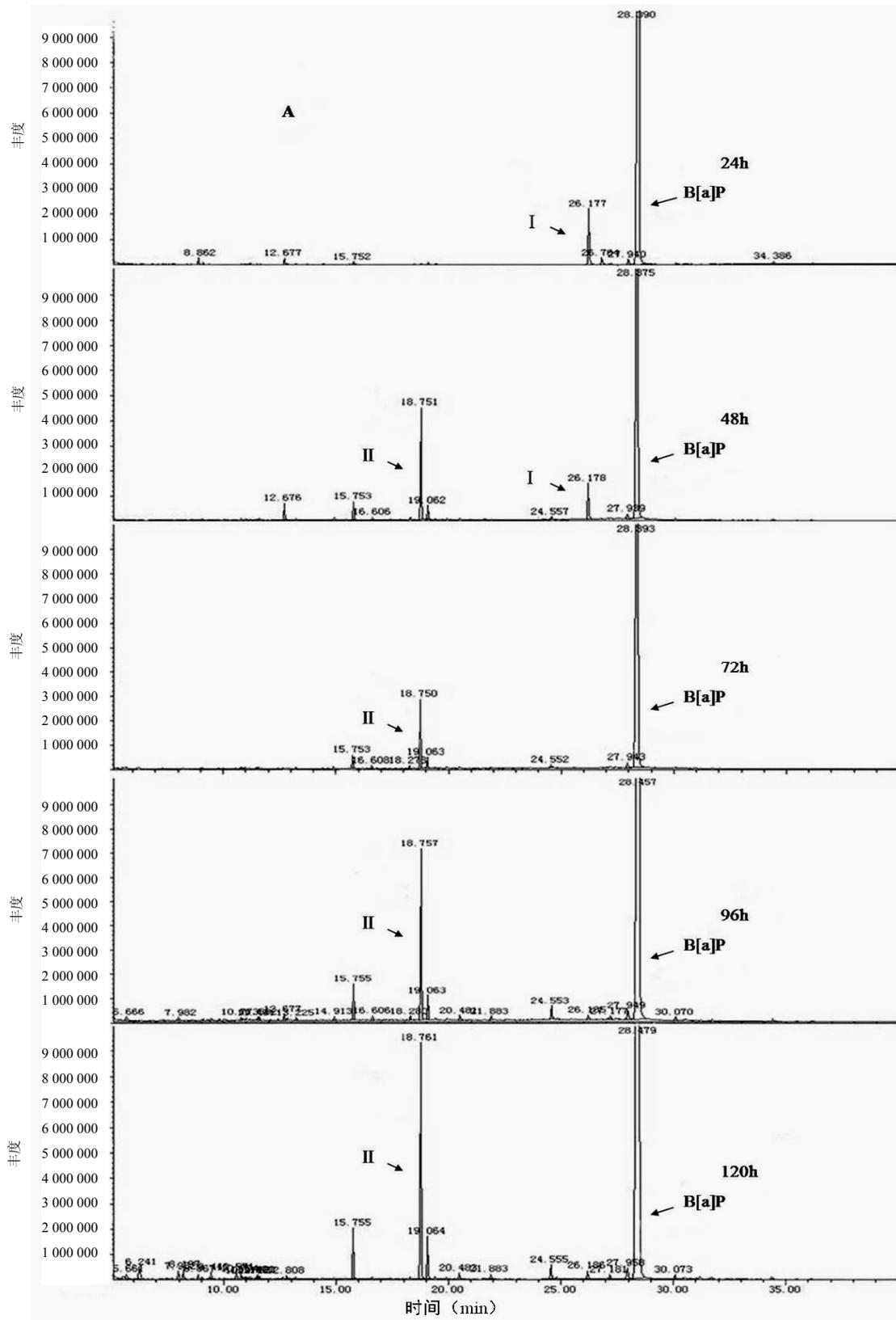
2.2 噬氨副球菌 HPD-2 降解 B[a]P 的中间产物

图 2A 为 B[a]P 初始浓度为 50.0 mg/L 时不同培养时间的 GC 图谱。由图 2A 可以看出, 在培养 24 h 后, GC 图谱出现代谢中间产物峰 I, 随培养时间增加逐渐减少, 3 天后完全消失。在培养 48 h 时, 出现代谢中间产物 II, 且随着时间的延长, 呈现出累积的趋势。根据分子离子峰的 m/z 为 339.3, 可以确定 HPD-2 代谢 B[a]P 的主要代谢产物 II 为双羟基菲 (图 2B), 根据分子离子峰的 m/z 为 217, 可以确定中间代谢产物 I 为 8-羧酸-7-羟基芘 (图 2C), 这与 Jeremy 等^[9]报道的结果相一致。

2.3 噬氨副球菌 HPD-2 降解 B[a]P 的可能代谢途径推断

根据以上实验结果, 初步推断 HPD-2 对 B[a]P 的降解可能途径如图 3 所示。通常情况下, 细菌对 B[a]P 降解机理通常是启动双加氧酶将氧分子中的两个氧原子同时结合进入苯环分子产生二氧化合物中间体, 继而

氧化为顺式-二氢二醇 B[a]P 和三羟基化合物, 然后再转化为细胞蛋白质, 或者转化为 CO₂ 和水。Gibson 等^[10]报道了菌株 *S.yanoikuyae* B8/36 能够降解 B[a]P, 并确定 7,8-二氢二醇 B[a]P 为其代谢产物。Schneider 等^[11]虽然没有分离到以上产物, 但在分离到顺式-4-(8-羟基芘基-7-基)-2-氧代-3-丁羧酸后, 亦可推断出上述中间产物的产生。根据本研究 GC-MS 分析鉴定结果, 在保留时间为 26.1 min 时, 出现了代谢中间产物峰, 由其分子离子峰 m/z (271) 可知为 8-羧酸-7-羟基芘, 同样推断出可能有顺式-4-(8-羟基芘基-7-基)-2-氧代-3-丁羧酸的生成。同时, 在保留时间为 18.75 min 时, 出现了代谢中间产物双羟基菲生成, 并出现了积累。Walte 等^[12]报道菌株 *Rhodococcus* sp. UW1 可以降解芘, 并确定双羟基菲为其代谢产物。



(A: 初始浓度为 50.0 mg/L, B: 代谢产物 I 的质谱图, C: 代谢产物 II 的质谱图)

图2 嗜氨副球菌 HPD-2 对不同初始浓度 B[a]P 降解产物的 GC-MS 图谱

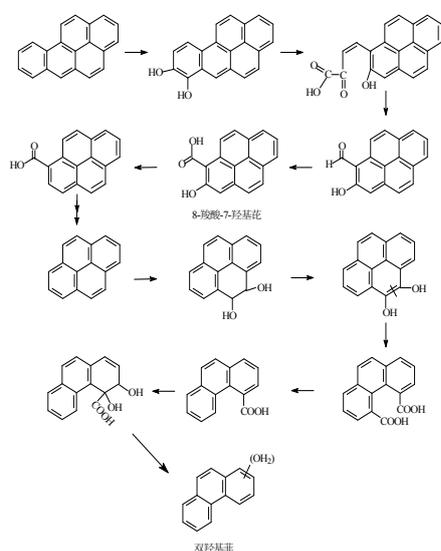


图3 嗜氨副球菌 HPD-2 降解 B[a]P 的可能途径

3 结论

嗜氨副球菌 HPD-2 在 2 天内能使 B[a]P 浓度大幅度降低, 且随着初始浓度的增大, B[a]P 的降解率逐渐递减。当 HPD-2 在 B[a]P 初始浓度分别为 5.0、50.0 mg/L 的培养液中生长 5 天后, B[a]P 的降解率分别为 66.1%、34.2%。经 GC-MS 鉴定分析, 确定 8-羧酸-7-羟基芘和双羟基菲为 HPD-2 降解 B[a]P 的主要代谢中间产物。

参考文献:

- [1] Tsai JC, Kumar M, Lin JG. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164: 847-855
- [2] Stingley RL, Khan AA, Cerniglia CE. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322: 133-146
- [3] Seo JS, Keum YS, Hu YT, Lee SE, Li QX. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: Initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and *meta*- and *ortho*-cleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation*, 2007, 18: 123-131
- [4] Ye D, Siddiqi MA, Macubbin AE, Kumar S, Sikka HC. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas. Paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30: 136-142
- [5] 毛键, 骆永明, 滕应, 李振高, 吴宇澄. 一株高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1 011-1 015
- [6] 钱薇, 倪进治, 骆永明, 李秀华, 邹德勋. 高效液相色谱-荧光检测法测定土壤中的多环芳烃. *色谱*, 2007, 25(2): 221-225
- [7] Luan T, Fang S, Zhong Y, Lin L, Chan SM, Lan C, Tam NF. Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatogr A*, 2007, 1173 (1/2): 37-43
- [8] 盛下放, 何琳燕, 胡凌飞. 苯并[a]芘降解菌的分离筛选及其降解条件的研究. *环境科学学报*, 2005, 25(6): 791-795
- [9] Jeremy A, Rentz PJJ, Alvarez JLS. Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental Pollution*, 2008, 151: 669-677
- [10] Gibson DT, Mahadevan V, Jerina DM, Yagi H, Yeh HJC. Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 1975, 189: 295-297
- [11] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by *Mycobacterium* sp strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(1): 13-19
- [12] Walter U, Beyer M, Klein J, Rehm HJ. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34: 671-676