

# *Pseudomonas* sp. W2 双酚 A 代谢途径的研究\*

贾凌志 李君文\*\*

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

**摘要:** 利用气相色谱质谱联用技术 (GC-MS)、液相色谱紫外检测技术 (LC-UV) 和基因比对分析对 *Pseudomonas* sp. W2 菌株双酚 A (Bpa) 代谢途径进行了初步研究, 发现对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸、对羟基苯乙酮, 为中间代谢产物; 并发现该菌株具有原儿茶酸双加氧酶基因 (*pcaG*)。

**关键词:** 双酚 A, 生物降解, 色谱分析, 原儿茶酸双加氧酶基因

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-2654 (2006) 01-0078-06

## *Pseudomonas* sp. W2 Metabolic Pathway of Bisphenol A\*

JIA Ling-Zhi LI Jun-Wen\*\*

(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300050)

**Abstract:** With GC-MS, LC-UV and gene analysis, we studied *Pseudomonas* sp. W2 metabolic pathway of bisphenol A (Bpa). It was discovered that 4'- (trimethylsiloxy) -Acetophenone, p-Hydroxy benzaldehyde and p-Hydroxy benzoic acid are medium metabolites and that the bacteria has *pcaG*.

**Key words:** Bisphenol A, Biodegradation, Chromatographic analysis, *pcaG*

双酚 A 是一种重要的化工原料, 主要用来生产环氧树脂和聚碳酸酯等, 广泛的用于日常生活用品的制造, 2001 年世界年产量已超过 640,000 吨。双酚 A 具有明显的雌激素效应, 其污染已经引起世界各国尤其发达国家高度重视。目前, 国际上对双酚 A 降解的研究开展较多, 已经发现某些细菌和真菌可降解双酚 A。Jay Spivack 等人对他们所分离菌株的双酚 A 代谢途径进行了研究, 发现双酚 A 经过两条途径被菌株降解为单苯环的物质, 但对其开环途径未做研究<sup>[1]</sup>。该论文对本实验室分离的 *Pseudomonas* sp. W2 的双酚 A 降解途径进行了研究, 并对降解产物的苯环开环途径进行了探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

*Pseudomonas* sp. W2, 本实验室筛选、保存。

### 1.2 检测用培养基 FQ

Bpa 2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 6.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g, NH<sub>4</sub>Cl 2.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.41g, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.056g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01g, CaCl<sub>2</sub> 0.022g, H<sub>2</sub>O 定容至 1,000mL, pH6.9。1 × 10<sup>5</sup>Pa 高压灭菌 20min。

\* 国家自然科学基金 (No. 30371202)

天津市自然科学基金 (No. 0436075)

\*\* 通讯作者 Tel: 022-84655345, E-mail: junwenli@eyou.com

收稿日期: 2005-04-18, 修回日期: 2005-06-09

### 1.3 菌株培养

取冻存的 W2 菌液少许, 加入培养基 FQ, 摇床 30℃, 120r/min 培养, 细菌浓度长到  $OD_{600}$  0.5 左右时, 在培养基 FQ 与 1.5% 的琼脂糖配制的固体培养基上划线分离单菌落。挑单菌落接种到培养基 FQ 中, 30℃, 120r/min 摇床培养, 细菌浓度长到  $OD_{600}$  为 1 左右时, 取出。

### 1.4 菌株对 Bpa 的降解

菌液 4℃, 7,000g 离心 5min, 弃去上清, 用生理盐水洗涤沉淀, 得到干净的菌体。适量菌体加入到培养基 FQ 中, 摇床 30℃, 120r/min 培养。细菌浓度生长到  $OD_{600}$  为 1 左右时取出, 立即进行分析。设立未接菌的空白对照。

### 1.5 气相色谱质谱联用分析 (GC-MS)<sup>[2]</sup>

1.5.1 仪器: HP5890 II GC—5971MSD 气相色谱—质谱联用分析仪; 色谱柱: HP-5; 载气: 高纯氮气。

1.5.2 样品处理: 标准溶液 6,000r/min 离心 10min, 取上清 20mL 用 5mL 二氯甲烷萃取, 重复 1 次, 合并有机相, 加入 1g 无水硫酸钠, 静置 30min, 过滤, 氮气吹扫浓缩, 用二氯甲烷定容至 1mL。

1.5.3 衍生化: 加入 100 $\mu$ L N, O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA), 室温下静置 1h, 仪器分析。

1.5.4 分析条件: 进样口温度: 280℃; 传输线温度: 280℃; 程序升温: 50℃, 2 min; 20℃/min 升至 200℃; 10℃/min 升至 300℃; 分析: 全扫描方式。

### 1.6 液相色谱紫外检测分析 (LC-UV)

1.6.1 仪器: waters 600 泵; waters 2487 紫外检测器; 色谱柱: ZORBAX SB-C18 规格: 0.3cm  $\times$  10cm 填料粒径 3.5 $\mu$ m。

1.6.2 样品处理: 样品经 10,000g 离心 10min, 取上清, 用 0.2 $\mu$ m 孔径的尼龙滤膜过滤。

1.6.3 分析条件: 流动相比: 甲醇: 乙腈: 四氢呋喃: 水 = 43: 20: 19: 17 (V/V/V/V), 加 0.3% 的乙酸; 流速: 0.4mL/min; UV 检测波长: 275nm; 上样量: 2 $\mu$ L。

### 1.7 *pcaG* 基因的扩增测序与序列分析

1.7.1 菌株纯化扩增与基因组 DNA 的提取: 取冻存的 W2 菌液少许, 加入培养基 FQ 中, 30℃, 120r/min 摇床培养, 细菌浓度长到  $OD_{600}$  为 0.5 左右时, 在培养基 FQ 与 1.5% 的琼脂糖配制的固体培养基上划线分离单菌落。挑单菌落接种到培养基 FQ 中, 摇床 30℃, 120r/min 培养, 细菌浓度长到  $OD_{600}$  为 1 左右时, 取出 1mL 菌液 4℃, 7000g 离心 10min, 弃上清。加 200 $\mu$ L 生理盐水洗涤沉淀, 加入 200 $\mu$ L 蒸馏水, 沸水浴 10min, 10,000g 离心 10min, 取上清。

1.7.2 引物设计与 PCR 扩增: 从 NCBI 的数据库中下载所有 *pseudomonas* 的原儿茶酸双加氧酶 *pcaG* 基因序列, 利用程序 Vector NTI 9.0 的 align 模块多序列比对分析, 然后运用 alignment PCR list 模块设计引物 (5'-GCCGGCAACCCGACCCG -3', 5'-TCGATCAG-GTTGACACCCG -3')。反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 0.5min, 55℃ 0.5min, 72℃ 2min, 30 个循环; 72℃, 7min。

1.7.3 PCR 产物凝胶电泳分析、测序: 根据预测的目标 PCR 产物的大小, 选取相应的条带进行测序 (宝生物公司完成), 暂命名该序列为 W2-*pcaG*。

1.7.4 序列分析: 将 W2-*pcaG* 序列提交 GenBank 进行 blast 分析。利用程序 Vector NTI

9.0 进行 W2-pcaG 与所有 *pcaG* 基因比对分析。

### 1.8 *Pseudomonas* sp. W2 对几种苯衍生物的利用情况研究

以 F 培养基为基础，不加 Bpa，分别加入各种苯衍生物，浓度均为 100mg/L，130r/min，30℃ 摇床培养。

## 2 结果

### 2.1 GC-MS 分析结果

培养基 F 经过 W2 菌作用后，Bpa 的峰（30min 左右）减小，同时产生了多个小峰，推测可能是 Bpa 的降解产物。（见图 1、2）

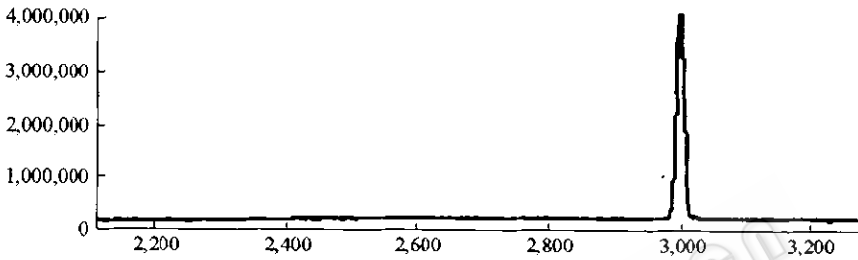


图 1 培养基在细菌作用前的 GC - MS 分析图

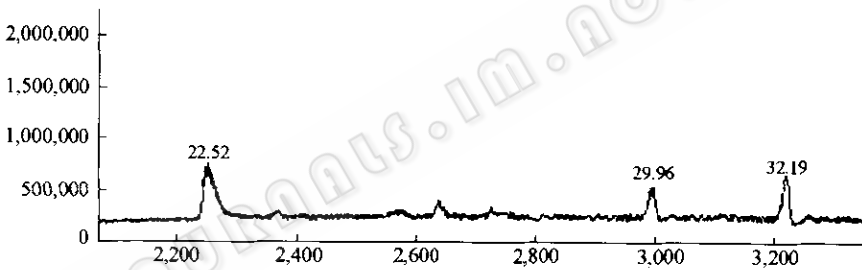


图 2 培养基在细菌作用后的 GC - MS 分析图

保留时间为 22.52 物质所产生的质谱图（图 3），经在谱图库 Nbs75k.1 中检索，发现与 Acetophenone, 4'- (trimethylsiloxy) - 的匹配达到 91%，该物质是 4-羟基-苯乙酮与衍生化试剂 BSTFA 的产物。推测 4-羟基-苯乙酮是一种中间代谢产物。

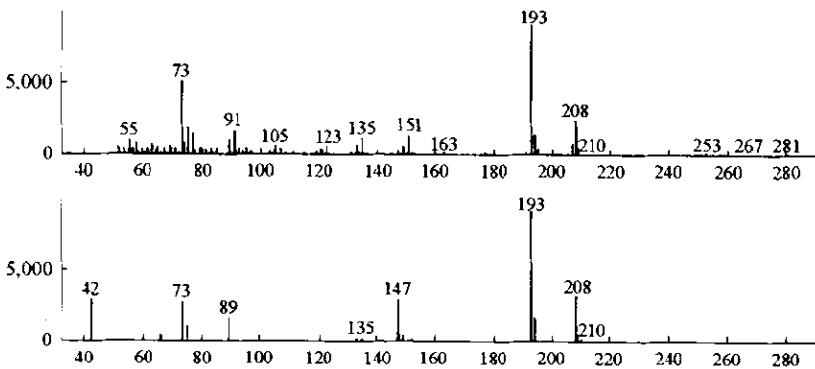


图 3 保留时间为 22.52min 的物质与对羟基苯乙酮的质谱图比较

a 保留时间 22.52min 物质的质谱图, b 对羟基苯乙酮的质谱图

保留时间 32.18min 的物质产生的质谱图 (图 4) 分析: 在谱图库里未能找到匹配度较好的谱图, 人工分析认为: 358 为分子离子峰, 357 为失去一个 H 的峰, 179 为苯基断裂产生的峰。结合微生物学知识与 Bpa 的结构特点, 推测该物质的结构式可能为:

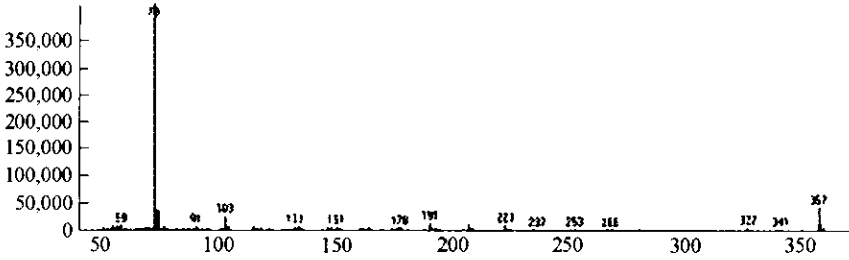
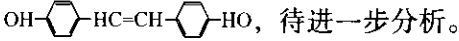


图 4 保留时间为 32.18min 物质的质谱图

## 2.2 LC-UV 分析结果

2.2.1 培养基在细菌作用前后的 LC-UV 比较分析: 在细菌作用前, 培养基只在 1.21min 与 1.08min 位置有峰 (图 5)。经过细菌作用产生了 5 个明显的峰, 保留时间分别为: 2.44、3.35、4.21、4.95 和 5.20min (图 6)。

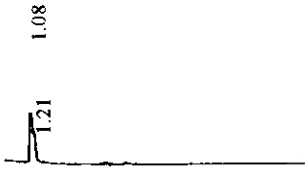


图 5 培养基在细菌作用前的 LC-UV 分析图

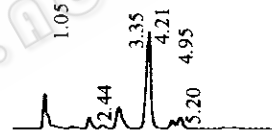


图 6 培养基在细菌作用后的 LC-UV 分析图

2.2.2 保留时间 4.95min 与 4.21min 峰的鉴定: 图 7, 图 8, 图 9, 图 10。根据对羟基苯甲醛的纯水溶液和经过细菌作用的培养基中补加对羟基苯甲醛的 LC-UV 分析, 推断保留时间 4.95min 峰为对羟基苯甲醛。保留时间的少许差别是由系统误差所致。同样方法推断保留时间 4.21min 峰为对羟基苯甲酸。

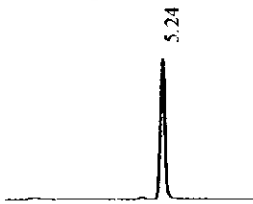


图 7 对羟基苯甲醛的纯水溶液分析

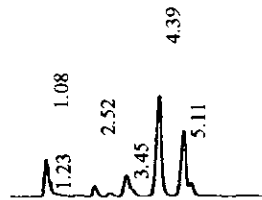


图 8 培养基中补加对羟基苯甲醛的 LC-UV 分析

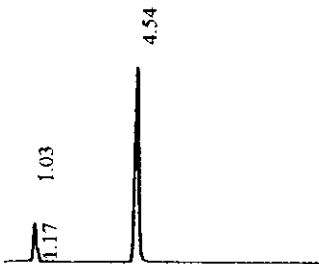


图 9 对羟基苯甲酸的纯水溶液分析

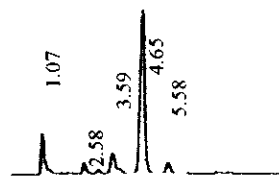


图 10 培养基中补加对羟基苯甲酸的 LC-UV 分析

### 2.3 *pcaG* 基因的扩增测序与序列分析

2.3.1 PCR 扩增结果：见图 11。

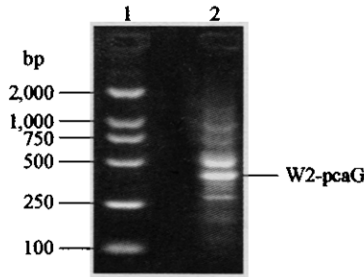


图 11 PCR 产物凝胶电泳图

1 Marker DL-2000 (宝生物产), 2 PCR product

2.3.2 W2-*pcaG* 片段测序结果：该序列长度为 390bp，将该 W2-*pcaG* 序列提交 GenBank 进行 blast 检索，与 W2-*pcaG* 同源性最高的几条 DNA 序列均为已发现的 *pcaG* 基因的序列，其中与 *Pseudomonas putida* KT2440 的 *pcaG* 基因同源性最高，相似性达到 93%，故可认为该片段属于 *pcaG* 基因，与 *Pseudomonas putida* KT2440 的 *pcaG* 基因亲缘关系最近。该序列已经提交 GenBank (AY691651)。

W2-*pcaG* 序列 (5'-3'):

CAGGAAATCTGGAACCGCCTGGCCAAGCCGGACGCGCCGGGCGGAGCACATCCTGC  
 TGATCGGCCAGGTGTATGACGGTAACGGCCACCTGGTGC GCGATTTCGTTCTCGAGGTG  
 TGGCAAGCCGATGCCAACGGCGAGTACCAGGATGCCTACAACCTGGAAAACGCCTTCA  
 ACAGCTTCGGCCGCACCGCCACCACCTTCGATGCCGGTGAGTGGACCCTGCACACGGTC  
 AAGCCGGGCGTGCTGAACAACGCTGCGGGCGTGCCGATGGCGCCGCACATCAACATCA  
 GCCTGTTTGC CCGGGGATCAACATCCACCTGCACACGCGGCTGTATTTTCGATGACGAG  
 GCCGAGGCCAATGCCAAGTGCCCGGTGCTCAACCTGATCGAA

### 2.4 *Pseudomonas* sp. W2 对几种苯衍生物的利用情况研究

见表 1。

表 1 W2 对几种苯衍生物的利用情况 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

碳源	48h 细菌浓度 $OD_{600}$	碳源	48h 细菌浓度 $OD_{600}$
对羟基苯甲酸	0.1242 ± 0.0542	对苯二酚	0.0046 ± 0.0005
对羟基苯甲醛	0.0343 ± 0.0154	甲苯	0.0024 ± 0.0005
苯	0.0012 ± 0.0004	苯酚	0.0001 ± 0.0000

该菌株可以利用对羟基苯甲酸、对羟基苯甲醛为唯一碳源与能源生长，利用对羟基苯甲酸生长较快，但不能利用苯、苯酚、甲苯、对苯二酚。

### 3 讨论

本研究确定了 *Pseudomonas* sp. W2 对双酚 A 的 3 个代谢产物，与 Jay Spivaeks 所分离研究的细菌的双酚 A 代谢产物相同，推测它们具有类似的双酚 A 代谢过程<sup>[1]</sup>。

我们也发现对羟基苯甲醛与对羟基苯甲酸是可以被菌株作为唯一碳源与能源利用

的, 也从一个侧面更加肯定了这两种物质是 *Pseudomonas* sp. W2 对 Bpa 的中间代谢产物。

目前, 细菌在好氧条件下使苯环开环的分子机制已经比较清楚, 开环途径主要有两条: 原儿茶酸途径, 儿茶酚途径<sup>[3,4]</sup>。由于该菌株含有原儿茶酸双加氧酶基因 *pcaG* 基因, 所以推断该菌株通过原儿茶酸途径打开苯环。

目前双酚 A 代谢途径是根据检测到的中间代谢产物推断的, 没有涉及酶学的研究, 所以可能还有一些中间代谢产物未检测到。如果此推断正确, 那么由于 Bpa 直接降解产物至今未能检测到, 给双酚 A 降解酶与基因的研究工作带来了巨大困难。真正的探明降解途径, 对将来酶的纯化与降解基因的鉴定具有相当意义。但是微生物的代谢途径多种多样, 并且由于中间代谢产物并不积累, 某些浓度极低, 使代谢途径的完全确定具有很大困难。

根据 W2-*pcaG* 序列分析, *Pseudomonas* sp. W2 与 *Pseudomonas putida* 亲缘关系最近, 这些结果与依据 16S rDNA 进行的种属研究结果是相吻合的。

### 参 考 文 献

- [1] Spivaek J, Leib T K, Lobos J H. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 7323 ~ 7329.
- [2] 齐文启, 孙宗光. 痕量有机污染物的检测. 北京: 化学工业出版社, 2001. 137 ~ 140.
- [3] Harwood C S, Nichols N N, Kim M K, *et al.* *J Bacteriol*, 1994, **176**: 6479 ~ 6488.
- [4] 陆卫平, 周德庆, 郭杰炎, 等. 普通微生物学. 上海: 复旦大学出版社, 1990. 415 ~ 421.