

细菌降解多环芳烃上游途径的遗传学研究进展*

张春杨

(山东理工大学生命科学院 淄博 255049)

摘要: 多环芳烃是一类毒性较大的环境污染物。微生物降解和转化是消除此类污染物的理想方法, 已发现多种细菌具有这种功能。主要针对细菌在多环芳烃降解中上游途径的代谢酶及基因簇的组成进行综述, 阐述了酶的遗传学特点, 并探讨了 PAHs 代谢基因的进化。这有助于了解 PAHs 的细菌降解机制, 并为有效实施生物修复提供理论依据。

关键词: 多环芳烃, 生物降解, 酶, 基因簇, 水平基因转移

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0161-06

Genetics Advances in Upper Catabolic Pathways of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation by Bacteria*

ZHANG Chun-Yang

(College of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo 255049)

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread environmental pollutants with high toxicity. It is a potent way to remove these pollutions by microbe degradation and conversion, and many bacteria have been found performing this function. Here the bacterial catabolic enzymes and genes participating in upper pathway of PAHs degradation were revealed, the genetic properties were illuminated, and the gene evolution of PAHs catabolism was further discussed. It would contribute to elucidating PAHs degrading mechanisms in bacteria and provide theoretical evidence for achieving efficient bioremediation.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Biodegradation, Enzymes, Gene clusters, Horizontal gene transfer

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是指含两个及以上芳环的烃类化合物, 广泛分布于自然界和工农业废水中。因其毒性大、具有致畸和致突变等危害而成为严重的环境污染物。美国环保署 (Environmental Protection Agency, EPA) 确定 16 种 PAHs 化合物为重点污染物。

利用微生物来降解和清除 PAHs 污染源, 具有成本低和无二次污染的优点, 越来越引起人们的关注。关于细菌降解 PAHs 的生理生化和分子生物学研究逐渐增多^[1-3]。而要通过基因工程优化降解菌, 更有效地修复 PAHs 污染, 以及监控环境中此类菌的活动, 对 PAHs 生物降解途径的了解是重要前提。其中, 上游途径对转化毒性污染物为弱毒或无毒化合物最关键。本文主要针对 PAHs 降解上游的途径及其遗传学研究作一综述, 以便更好地了解 PAHs 生物降解的分子机理。

1 细菌的 PAHs 降解途径

1.1 萘 (Naphthalene)、菲 (Phenanthrene) 和蒽 (Anthracene) 的降解 萘、菲、

* 山东理工大学博士科研启动基金资助项目 (No. 04KQ25)

通讯作者 Tel: 0533-2781329, Email: zhangcy@sdut.edu.cn

收稿日期: 2005-08-30, 修回日期: 2005-10-26

蒽都属于低分子 PAHs, 其中双环芳烃萘已被用作 PAHs 降解的模式化合物。细菌对萘的降解也研究得最清楚。土壤中假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 对萘的降解最早报道于 1964 年, 后来在恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) OUS82 株中进行了深入研究。虽然有人提出在嗜热油芽孢杆菌 (*Bacillus thermoleovorans*) Hamburg 2 中, 萘可能通过 2, 3-位的初始双加氧化 (initial dioxygenation) 而分解^[4], 但更明确的发现是萘通过 1, 2-位初始双加氧化而分解, 即目前已知的萘上游分解代谢基本途径 (图 1A)^[5]。在该途径中, 每一步反应都包括了特定的酶: 萘双加氧酶 (naphthalene dioxygenase, NDO) (NahAaAbAcAd) (A1 步), 顺-萘双氢二醇脱氢酶 (*cis*-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase) (NahB) (A2 步), 1, 2-双羟萘双加氧酶 (1, 2-dihydroxynaphthalene dioxygenase) (NahC) (A3 步), 2-羟-2H-苯并吡喃-2-羧基异构酶 (2-hydroxy-2H-chromene-2-carboxylate isomerase) (NahD) (A4 步), 反-*o*-羟基苯脱萘丙酮酸水合-醛缩酶 (*trans*-*o*-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase) (NahE) (A5 步), 以及水杨醛脱氢酶 (salicylaldehyde dehydrogenase) (NahF) (A6 步)。

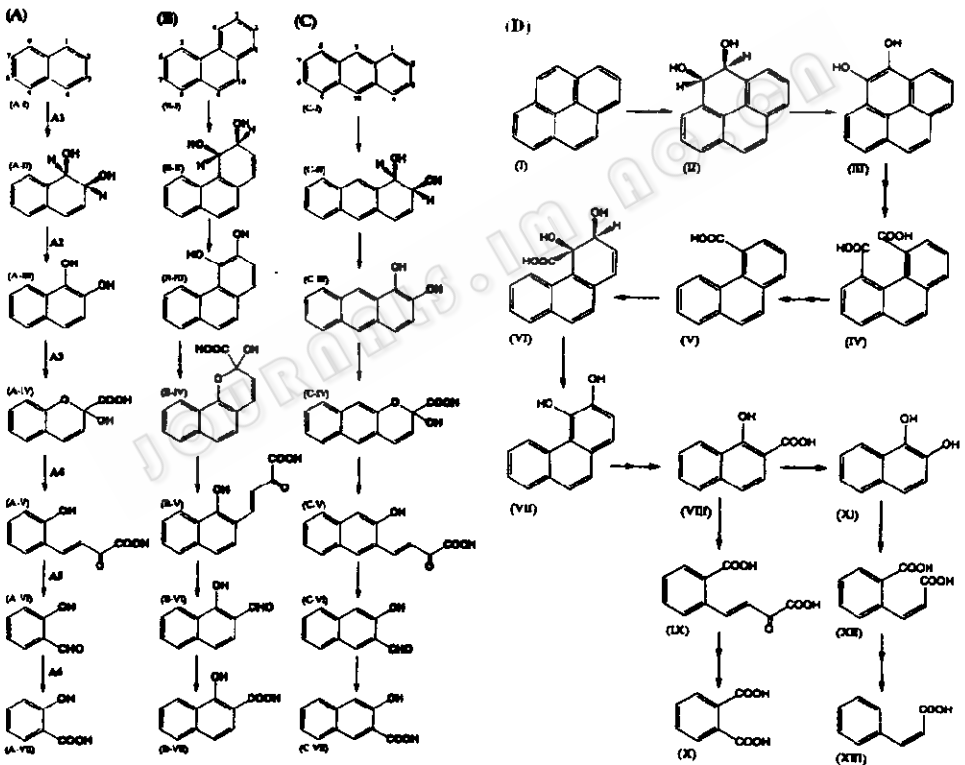


图1 被提议的细菌降解萘(A)、菲(B)、蒽(C)和芘(D)的上游途径

菲和蒽也常被用作 PAHs 生物降解的模式化合物。而萘转化为水杨酸 (salicylate) 所涉及的酶, 也可通过相似的代谢步骤降解菲和蒽, 分别形成 1-羟-2-萘酸 (1-hydroxy-2-naphthoate) 和 2-羟-3-萘酸 (2-hydroxy-3-naphthoate) (图 1B, C)。已知菲降解的主要路径是通过 3, 4-位双加氧化而开始的。但 Pinyakong 等曾提出鞘氨醇单胞菌 P2 株 (*Sphingomonas* sp.) 可通过 1, 2-位双加氧化而降解菲, 与主要路径稍有差异^[6]。

1.2 芘 (Pyrene) 的降解 芘通常被作为高分子 PAHs (含有 3 个以上芳环) 降解的模式化合物。细菌主要通过 4, 5-位初始双加氧化而降解芘 (图 1D), 如分枝杆菌

(*Mycobacterium* sp.) PYR-1 株^[5]。PYR-1 株初始氧化攻击芘, 可以产生顺-和反-4, 5-芘双氢二醇 (4, 5-pyrenedihydrodiols)。双氢二醇重新环化及随后的剪切形成了 4, 5-菲二羧酸 (4, 5-phenanthrene dicarboxylic acid) (IV), 并进一步代谢成 4-菲酸 (4-phenanthroic acid) (化合物 V)。通过第二双加氧酶反应, 形成随后的中间代谢物顺-3, 4-菲双氢二醇-4-羧酸 (*cis*-3, 4-phenanthrene- dihydrodiol-4-carboxylic acid) (VI)。它重新环化产生 3, 4-二羟菲 (3, 4-dihydroxyphenanthrene) (VII), 该化合物也是菲降解的中间物。随后的代谢沿类似于菲的代谢途径而进行。

其他 PAHs, 如荧蒽 (fluoranthene)、苯并 [a] 芘 (benzo [a] pyrene) 等的降解途径曾基于代谢产物分别被提出^[7, 8], 但其酶系组成还不清楚。

2 PAHs 降解的遗传基础

已被证明某些编码 PAHs 降解酶的基因簇位于染色体上, 而另外一些位于质粒上。

2.1 萘和菲降解酶的基因簇 假单胞菌的多个种由于分布广泛且具有多样化的底物降解能力, 因而其降解萘和菲的基因簇被研究得较深入。许多分解萘的质粒已进行序列分析, 结果发现这些质粒非常相似。后来报道了多种假单胞菌萘上游分解代谢酶基因簇的核苷酸序列, 它们是恶臭假单胞菌 NCIB9816 株的 *ndo* 基因簇 (M23914), G7 株的 *nah* 基因簇 (M83949, U09057), NCIB9816-4 株的 *nah* 基因簇 (AF491307), C18 株的 *dox* 基因簇 (M60405), BS202 株的 *nah* 基因簇 (AF010471), OUS82 株和铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) PaK1 株的 *pah* 基因簇 (AB004059, D84146), 以及施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) AN10 株的 *nah* 基因簇 (AF039533)。这些基因簇被称作“经典的 *nah*-样基因簇” (图 2)。有关基因排列顺序为: *nahAaAbAcAdBFCQED*, 其中 *nahAa* 编码 NDO 铁氧还蛋白还原酶 (ferredoxin reductase), *nahAb* 编码 NDO 铁氧还蛋白, *nahAc* 编码 NDO α -亚基, *nahAd* 基因编码 NDO β -亚基, *nahB* 编码顺-萘双氢二醇脱氢酶, *nahF* 编码水杨醛脱氢酶, *nahC* 编码 1, 2-双羟萘双加氧酶, *nahQ* 为未知功能的开放阅读框 (open reading frame, ORF), *nahE* 编码反-*o*-羟基苯脱萘丙酮酸水合-醛缩酶, *nahD* 编码 2-羟-2*H*-苯并吡喃-2-羧基异构酶, 除了 AN10 株有 *nahQ* 基因的缺失^[1, 5]。

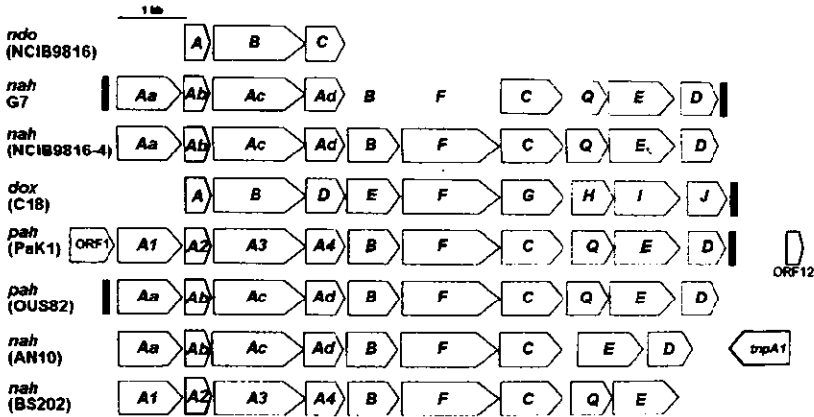


图 2 假单胞菌各株降解萘的上游路径基因组织

从其他细菌中也获得了相似的编码低分子 PAHs 降解酶的基因簇, 如拉尔氏菌 (*Ralstonia* sp.) U2 株的 *nag* 基因簇 (AF036940) 和伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia*

sp.) RPO07 株的 *phn* 基因簇 (AF061751)。这些相似基因簇的报道大多来自革兰氏阴性细菌 (Gram-negative bacteria)。

同时, 革兰氏阳性细菌 (Gram-positive bacteria) 如红球菌 (*Rhodococcus* sp.) 和诺卡氏菌 (*Nocardioideis* sp.) 等也被发现能代谢 PAHs。报道的诺卡氏菌 KP7 株具有编码将菲转化成 1-羟-2-萘酸的酶的 *phd* 基因簇 (AB017794, AB017795, AB031319) 的核苷酸序列 (*phdEFABGHCD*, 图 3)^[9]。研究发现编码转化菲的双加氧酶 4 个组分的基因 *phdA*, *phdB*, *phdC* 和 *phdD* 与其他报道的基因序列具有中度相似性 (不超过 60%), *PhdABCD* 的底物特异性在表达其基因的工程菌株中进行了验证^[10]。*PhdE*、*PhdF*、*PhdC*、*PhdH* 与双氢二醇脱氢酶、外双加氧酶、水合-醛缩酶和醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase) 分别具有较大的相似性。值得注意的是 *phd* 基因簇不含编码异构酶的 ORF, 而此酶在已报道的革兰氏阴性细菌 PAHs 代谢基因簇中都具有。这显示了两类细菌 PAHs 代谢基因簇的差异。有关非代谢酶的特异活性有待于研究。

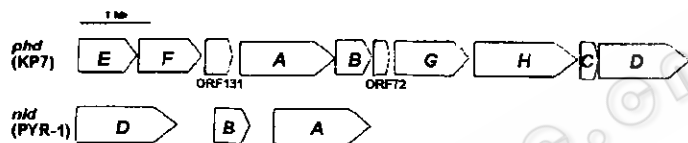


图 3 诺卡氏菌 KP7 株降解菲和分枝杆菌 PYR-1 株降解萘的上游途径的基因组织

2.2 萘代谢酶的基因簇 最近, 编码萘双加氧酶的相关基因已从分枝杆菌 PYR-1 株中克隆出, 并进行了测序和表达^[2]。PYR-1 株能够矿化多种底物, 如萘、荧蒽、菲、蒽、苯并 [a] 萘等。该菌株利用单或双加氧酶系统来催化对 PAHs 的初始攻击。PAHs 降解所涉及的蛋白质已通过蛋白质组学的方法进行了测定。根据蛋白质序列设计探针, 对双加氧酶阳性克隆进行克隆和测序, 结果获得了编码脱氢酶、双加氧酶 β 亚基和双加氧酶 α 亚基的基因, 它们分别是 *nidD*、*nidB* 和 *nidA* (AF249300, AF249301, AF249302) (图 3)。用含有 *nidDBA* 基因的克隆进行双加氧酶的功能分析显示, *NidBA* 可以催化萘向萘酚-4, 5-双氢二醇的生物转化。然而, 此双加氧酶对其他 PAHs 的底物特异性仍然不清楚。

此后, Stingley 等 (2004) 对 *nidA*-阳性克隆 pFOS608 进行序列分析 (AY365117), 揭示了分枝杆菌 PYR-1 株对 PAHs (萘、菲等) 的降解还涉及大量附加基因^[3]: 有 18 个 ORFs 位于 *nidD* 上游, 有 14 个 ORFs 位于 *nidA* 下游。其中一个假定的操纵子含有降解邻苯二甲酸 (phthalate) 所涉及的基因, 另一个操纵子含有编码假定 ABC 转座子的基因。此区域发现的大量基因与非通过苯二酸 (phthalic acid) 途径降解所涉及的基因具有同源性。大多数的降解基因位于假定的转座酶基因之间。进一步提出了 PAHs 降解的上中游途径^[3], 与 Habe and Omori^[5] 提出的上游途径一致。

2.3 其他 PAHs 代谢的基因簇 对其他 PAHs 如芘 (acenaphthene) 和芘烯 (acenaphthylene) 等生物降解酶和基因的研究是近几年的事情, 这主要来源于对鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.) A4 株的研究。该菌株只利用 PAHs 中的芘或芘烯作为碳源能源生长, 而不利用其他低分子的 PAHs, 人们推测这样特异的底物可能对应于特异的降解酶系。Pinyakong 等 (2004) 对鞘氨醇单胞菌 A4 株进行了基因组文库的构建和活性酶基

因的筛选^[11]。从中筛选和克隆了编码 PAHs 初始双加氧酶的一个新氧化酶组分的一套基因及其上下游序列 (AB161232), 包括 6 个 ORF 组分 (图 4)。其中 ORF1 与食芳鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas aromaticivorans*) F199 株的 ORF1042 蛋白具有同源性, 推测可能是菌株的外膜蛋白; ORF2 的功能尚不清楚; ORF3 和 ORF4 与降解 PAHs 的伯克霍尔德氏菌 RP007 株的 *arhA1* 和 *arhA2* 具有中度同源性 (56% 和 45%), 可能分别负责编码双加氧酶的大亚基和小亚基; 下游的 ORF5 与产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes*) NCIMB 9867 株龙胆酸 (gentisate) 降解途径中的马来酰丙酮酸异构酶 (maleylpyruvate isomerase) 具有同源性; ORF6 与萘降解菌拉而氏菌 U2 株的铁氧还蛋白还原酶具有同源性。这些基因序列及其功能推测提示高分子 PAHs 降解酶的基因很可能也是成簇排列, 然而这些 ORF 的具体生物学功能有待于进一步的实验证明。

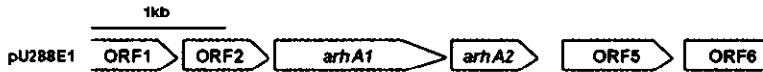


图 4 来自鞘氨醇单胞菌 A4 株的含 *arhA1* 和 *arhA2* 基因及其侧翼区的 pU288E1 质粒的基因组织

3 PAHs 代谢基因的进化

3.1 水平基因转移 (horizontal gene transfer) 经典的 *nah*-样基因几乎具有相同的组织排列或核苷酸序列 (图 2)。鉴于这些基因常位于质粒上, 称为 NAH 质粒, 它们属于不兼容的 P7 群或 P9 群, 通常很大, 可以自我转移, 并对分解代谢基因簇在假单胞菌属的萘降解成员间的广泛分布具有贡献^[12]。然而, NAH 质粒的大小因菌株而异, 质粒在宿主菌之间的转移可能会导致结构改变。

某些 *nah*-样基因位于染色体上, 有几种机制可以解释水平基因转移的发生。(1) 恶臭假单胞菌 G7 株 NAH7 质粒上的 *nah* 基因被发现位于缺陷型的二类转座子 Tn4655 上, 因此, 分解代谢基因的细胞间重排可能会发生。(2) Ravatn 等报道整合酶 (integrase) (Int-B13) C-末端 220 个氨基酸残基与 PaK1 株 *pah* 基因簇的侧翼区的 ORF1 相似, 这显示 ORF1 是移动原件的一部分, NAH 质粒可能像其他质粒那样自我整合到假单胞菌的染色体上^[13]。

3.2 基因结构的改变 移动性 NAH 质粒在许多宿主菌间转移时可能经历了某些插入或缺失^[14]。在 *nah*-样上游操纵子^[15] 和 U2 株 *nag* 基因^[16] 内, 也发现了基因重排的痕迹。Ferrero 等报道从西部地中海分离的密切相关的萘降解假单胞菌株可能独立拥有两种不同的 *nahAc* 基因型——AN10 型和 C18 型, 这些基因与其他上游路径基因可在同一宿主菌内共存^[15]。这些结果支持了有相似序列的酶参与的降解途径之间能发生自然重组的假说。

4 展望

作者认为, 深入了解细菌降解 PAHs 的关键基因对消除 PAHs 污染、成功实现生物修复至关重要。降解基因的鉴定有助于揭示 PAHs 的降解机制、酶活性中心等, 将为菌株的基因工程改造和优化提供依据^[17]; 同时, 利用降解菌的特异基因还可确定环境中 PAHs 降解菌的物种多样性, 对监测环境生物修复的潜能具有一定的指导意义^[18, 19]。

目前关于萘、蒽、菲等低分子 PAHs 降解基因的报道已较多,但对芴、茚、茚烯和 4 个芳环以上的高分子 PAHs 降解基因的研究还非常有限,而对基因之间相互作用的研究更是稀少。有必要加强这方面的研究,而对微生物学、分子生物学、生物化学和遗传学相关理论及技术的综合运用将加快研究的进程。

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所东秀珠研究员审校此文。

参考文献

- [1] Takizawa N, Kaida N, Torigoe S, *et al.* J Bacteriol, 1994, **176**: 2444 ~ 2449.
- [2] Khan A A, Wang R F, Cao W W, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, **67**: 3577 ~ 3585.
- [3] Stingley R L, Khan A A, Cerniglia C E. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **322**: 133 ~ 146.
- [4] Annweiler F, Richnow H H, Antranikian G, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 518 ~ 523.
- [5] Habe H, Omori T. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, **67**: 225 ~ 243.
- [6] Pinyakong O, Habe H, Supaka N, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2000, **191**: 115 ~ 121.
- [7] Kelley I, Freeman J P, Evans F E, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, **59**: 800 ~ 806.
- [8] Moody J D, Freeman J P, Fu P P, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2004, **70**: 340 ~ 345.
- [9] Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. J Bacteriol, 2000, **182**: 2134 ~ 2141.
- [10] Shindo K, Ohnishi Y, Chun H K, *et al.* Biosci Biotechnol Biochem, 2001, **65**: 2472 ~ 2481.
- [11] Pinyakong O, Habe H, Kouzuma A, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2004, **238**: 297 ~ 305.
- [12] Herrick J B, Stuart-Keil K G, Ghiorse W C, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1997, **63**: 2330 ~ 2337.
- [13] Ravatn R, Studer S, Zehnder A J B, *et al.* J Bacteriol, 1998, **180**: 5505 ~ 5514.
- [14] Bosch R, Garcia-Valds E, Moore E R B. Gene, 2000, **245**: 65 ~ 74.
- [15] Ferrero M, Llobet-Brossa E, Lalucat J, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 957 ~ 962.
- [16] Zhou N Y, Al-Dulayymi J, Baird M S, *et al.* J Bacteriol, 2002, **184**: 1547 ~ 1555.
- [17] Furukawa K. Curr Opin Biotechnol, 2000, **11**: 244 ~ 249.
- [18] Widada J, Nojiri H, Kasuga K, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2002, **58**: 202 ~ 209.
- [19] Leys N M, Ryngaert A, Bastiaens L, *et al.* Microb Ecol, 2005, **49**: 443 ~ 450.