

# 微生物降解菲的机理研究进展\*

王靖 徐宏科 刘元琴 李素娟

(中国石油大学化学科学与工程学院生物化工实验室 北京 102249)

**摘要:** 针对微生物降解菲的机理研究进展, 论述了细菌、真菌在好氧、厌氧条件下代谢菲的产物以及推测的降解途径; 在此基础上概括了催化反应的酶系以及编码酶系的基因簇。简要介绍了基因探针的应用, 并结合本实验室的初步研究, 指出了该领域有待深入探讨的问题。

**关键词:** 菲, 降解途径, 酶, 基因

**中图分类号:** X17    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0138-07

## Advances in Mechanism of Microbial Degradation of Phenanthrene\*

WANG Jing XU Hong-Ke LIU Yuan-Qin LI Su-Juan

(Biochemical Engineering Laboratory of Faculty of Chemistry and Chemical Engineering in China University of Petroleum, Beijing 102249)

**Abstract:** This review is outlined in terms of the advances in mechanism about microbial degradation of phenanthrene. The degradation pathways of phenanthrene by bacteria and fungus, including aerobic and anaerobic conditions, are discussed respectively. Furthermore, both the enzymes involved in the reactions and the gene clusters encoding for the enzymes are summarized. The application of gene probe is introduced briefly. Based on the preliminary results of our laboratory, it is found that some questions should be taken into more consideration.

**Key words:** Phenanthrene, Degradation pathways, Enzyme, Gene

作为多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 的其中一种, 菲具有一般性质, 同时又有其自身的特异性。它由 3 个苯环成一定角度联结而成。虽然菲本身没有明显的致癌性, 但其衍生物大都具有微弱或中等强度的致癌性。同时, 菲因兼具 K 区和湾区结构, 故是致癌 PAHs 的最小结构单元<sup>[1]</sup>。另外研究表明, 人体摄入后经肠道菌群代谢会转化成雌激素类的物质<sup>[2]</sup>。

菲在总的 PAHs 中的含量也不低, Tam 等<sup>[3]</sup>调查了香港 4 个地方 PAHs 各成分的含量, 研究表明总 PAHs 含量从  $157 \pm 56 \text{ ng/g}$  干土到  $2,515 \pm 1,726 \text{ ng/g}$  干土, 而非的比例最高达 15% 左右, 菲/蒽 (max) = 9.51, 芴/芘 (max) = 1.30。Tang 等<sup>[4]</sup>分析了北京市区土壤 PAHs 的污染情况, 结果显示 PAHs 含量从  $366 \text{ ng/g} \sim 27,825 \text{ ng/g}$  干土, 而非的比例在所有 PAH 中居第 7 位左右。

本文根据国内外最新的研究报道, 就菲降解途径、催化酶系及编码酶系的基因簇做相关综述, 为降解途径的人工调控、基因探针的制备、基因工程菌的构建、体外酶的模拟以及直接使用酶制剂进行生物修复提供理论依据。

\* 中国石油大学 (北京) “十五” 211 基金校人才引进科研启动基金

教育部留学回国人员科研启动基金

通讯作者 Tel: 010-89733974, E-mail: swhgwj898@cup.edu.cn

收稿日期: 2005-11-18, 修回日期: 2006-02-20

## 1 微生物降解非途径

对某种微生物降解非途径的推测主要是基于对非的代谢产物的检测。而完整的降解途径, 需要进一步研究催化反应的酶系以及调控整个降解途径的遗传学信息来加以证实。

### 1.1 细菌降解途径

1.1.1 好氧降解途径: 细菌对非的好氧降解一般是从双加氧酶催化的加氧反应开始的。在此酶的作用下, 非 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 位上分别加入两个氧原子, 形成顺式二氢二醇, 后者进一步转化为 1-羟基-2-萘酸, 至最后生成带一个苯环的醇酸, 最终环氧化裂解形成三羧酸循环的中间代谢产物前体参与细胞的合成或分解途径中去 (图 1 和表 1)<sup>[5-7]</sup>。

表 1 催化非降解反应的酶系

序号	酶	序号	酶
A1	非双加氧酶	D1	水杨酸 5-羟化酶
A2	二氢二醇脱氢酶	D2	龙胆酸 1, 2-双加氧酶
A3	外二醇双加氧酶	D3	顺丁烯二酰异构酶
A4	异构酶	D4	延胡索酰丙酮酸水解酶
A5	水合酶-缩醛酶	E1	水杨酸羟化酶
A6	醛脱氢酶	E2	儿茶酚 1, 2-双加氧酶
B1	1-羟基-2-萘甲酸双加氧酶	E3	顺, 顺, -粘康酸内酯化酶
B2	2'-羧基苯亚甲基丙酮酸水合酶-缩醛酶	E4	粘康酸内酯异构酶
B3	2-羧基-苯甲醛脱氢酶	E5	$\beta$ -酮己二酸烯醇内酯水解酶
B4	邻苯二甲酸双加氧酶	E6	$\beta$ -酮己二酸: 琥珀酰 CoA 转移酶
B5	邻苯二甲酸二氢二醇脱氢酶	E7	$\beta$ -酮己二酸单酰 CoA 硫解酶
B6	邻苯二甲酸脱羧酶	F1	儿茶酚 2, 3-双加氧酶
C1	1-羟基-2-萘甲酸羟化酶	F2	羟基粘康酸半醛水解酶
C2	外二醇双加氧酶	F3	水合酶
C3	异构酶	F4	2-O-4-羟基戊酸醛缩酶
C4	水合酶-缩醛酶	F5	乙醛脱氢酶
C5	醛脱氢酶	G1	羟基粘康酸半醛脱氢酶
		G2	4-草酰丁烯酸异构酶
		G3	4-草酰丁烯酸脱羧酶

随着分离得到的细菌的增多, 新的降解途径不断被揭示。Baboshin 等人<sup>[8]</sup>在研究非和萘的微生物转化时, 发现 *Rhodococcus rhodnii*135, *Pseudomonas fluorescens* 26K, 和 *Arthrobacter* sp. K3 在代谢非时共有 15 种中间代谢产物。其中 *P. fluorescens* 26K 和 *Arthrobacter* sp. K3 能产生较多的中间物, 而 *R. rhodnii* 135 只产生一种物质, 即 3-羟基非。Kim 等<sup>[9]</sup>研究了 pH 对 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 降解非和萘的影响, 发现非的降解途径也有变化。对于此新途径 (图 2), 需要研究相关的酶系及遗传学信息来进一步确认。

1.1.2 厌氧降解途径: 对于多环芳烃的厌氧降解, 只有萘的降解途径研究地比较透彻<sup>[10]</sup>。而非的厌氧降解与萘相似, 起初的关键反应也是羧基化反应, 而且主要是外围的 C<sub>2</sub> 或 C<sub>3</sub> 上, 不是 C<sub>9</sub> 上, 这是因为 C<sub>2</sub> 或 C<sub>3</sub> 的电负性较大。羧基化后会形成安息香酸

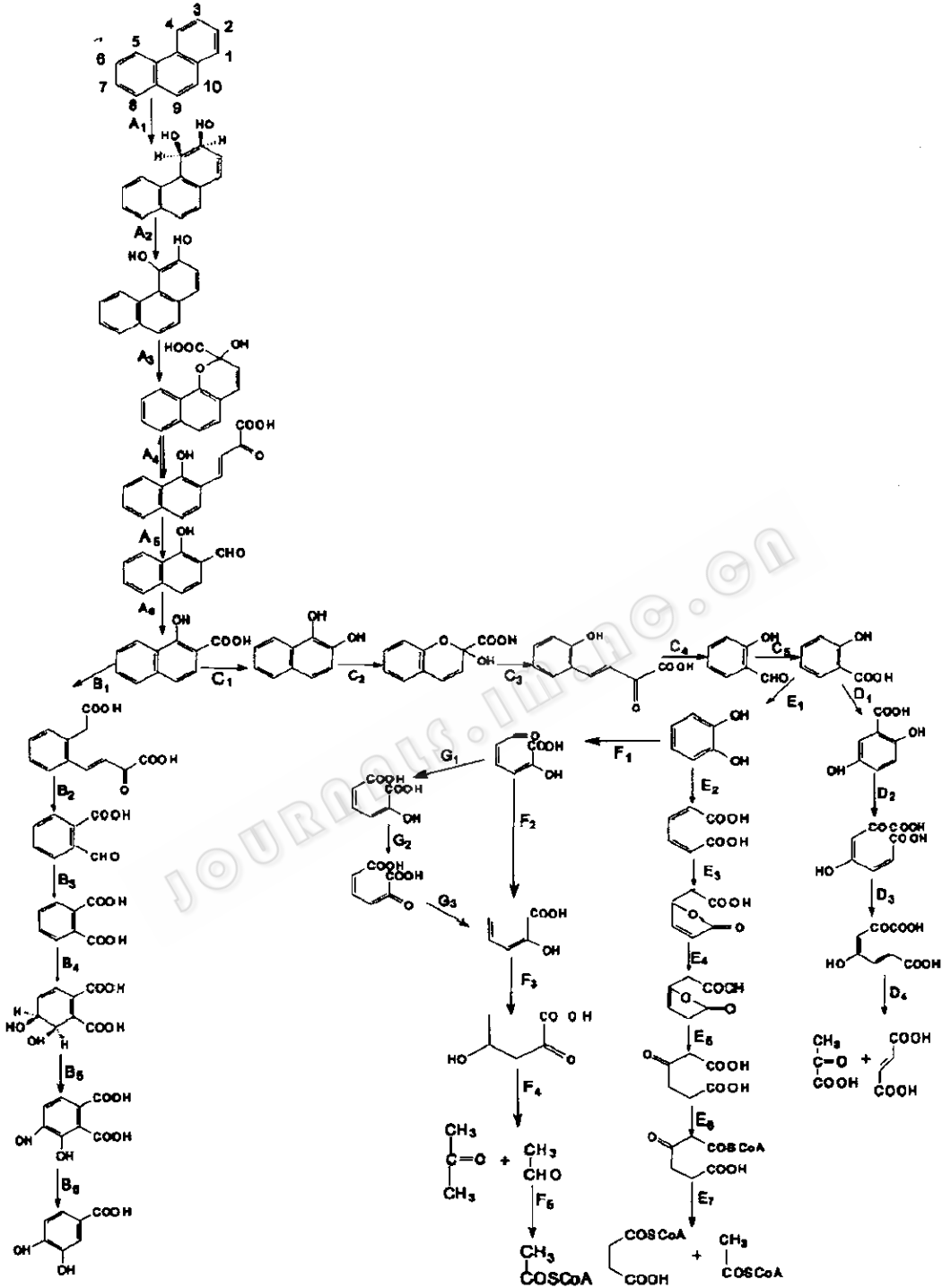


图1 推测的细菌好氧降解菲的一般途径

类似物。同时芳香环的羧基化反应说明只有在芳香环被破坏或活化后才能进行加氢作用(图3)<sup>[11]</sup>。即:

1.2 真菌降解菲的途径 Silva等<sup>[12]</sup>研究了腔胞类的丝状真菌 *Cyclotryrium* sp. 对菲的降解(图4),发现其代谢产物中最多的是反-9,10-二氢二醇菲,占90%左右;其次是

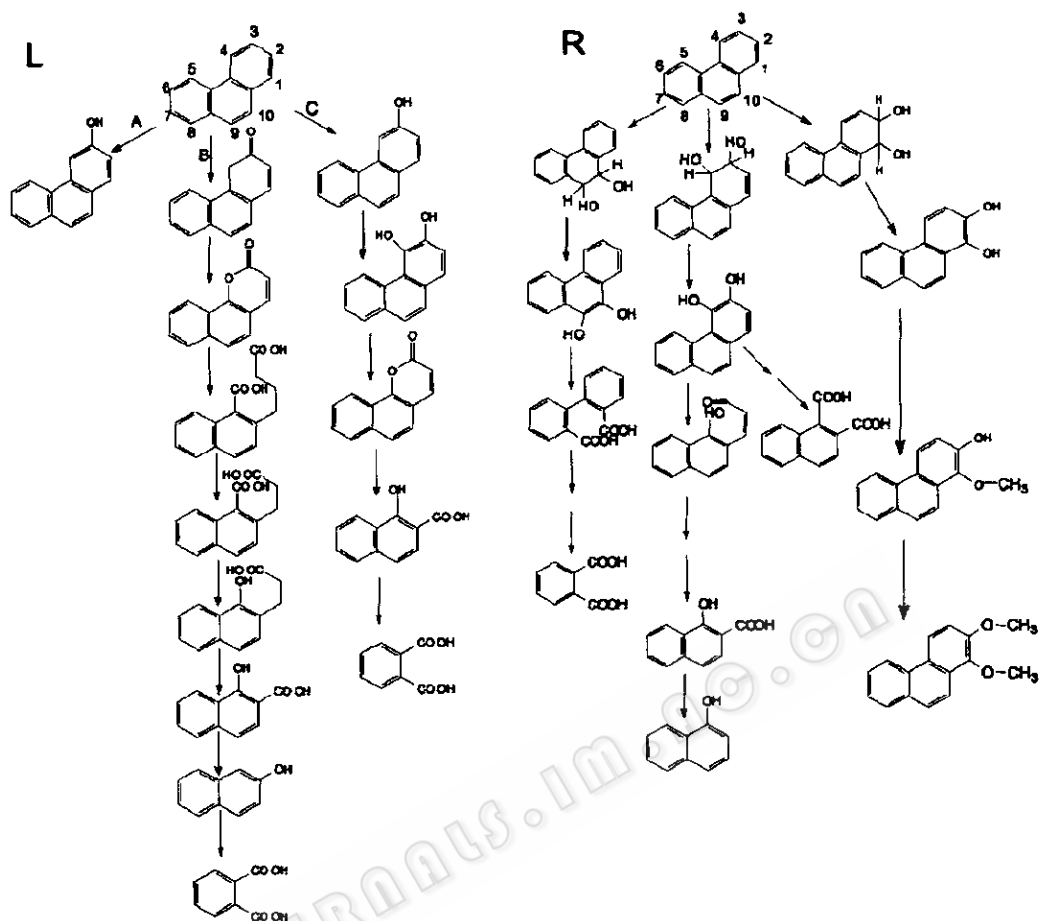


图 2 新推测的细菌好氧降解途径

L A: *Rhodococcus rhodnii* 135, B: *Pseudomonas fluorescens* 26K, C: *Arthrobacter* sp. K3

R *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1

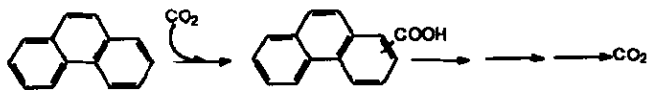


图 3 细菌厌氧降解非的途径

反-3, 4-二氢二醇菲; 而 1-羟基菲、3-羟基菲、4-羟基菲的含量非常少。这些代谢产物与其他文献报道的相一致, 而研究中也出现了一种新的代谢产物是 2-羟基-7-甲氧基菲。同时, 反-9, 10-二氢二醇菲以及反-3, 4-二氢二醇菲其立体结构分别以 (9R, 10R) 和 (3R, 4R) 为主, 表明酶促反应的立体选择性; 而反应位点以 K 区为主, 则证明了酶的区域选择性。

## 2 非降解酶系及基因簇

由于萘双加氧酶对 PAHs 的通用性, 近年来较多研究分析萘双加氧酶的结构以指导这一大类酶的结构、功能和底物专一性的研究。萘双加氧酶是由二聚物形成的三聚体 ( $\alpha_3\beta_3$ )。每个  $\beta$  亚基含有氧化还原活性基团、一个  $Fe_2S_2$  中心和一个单核中心, 起催化作用。活性部位由两个  $\beta$  亚基组成, 其中一个提供  $Fe_2S_2$  中心, 另一个提供单核 Fe 中

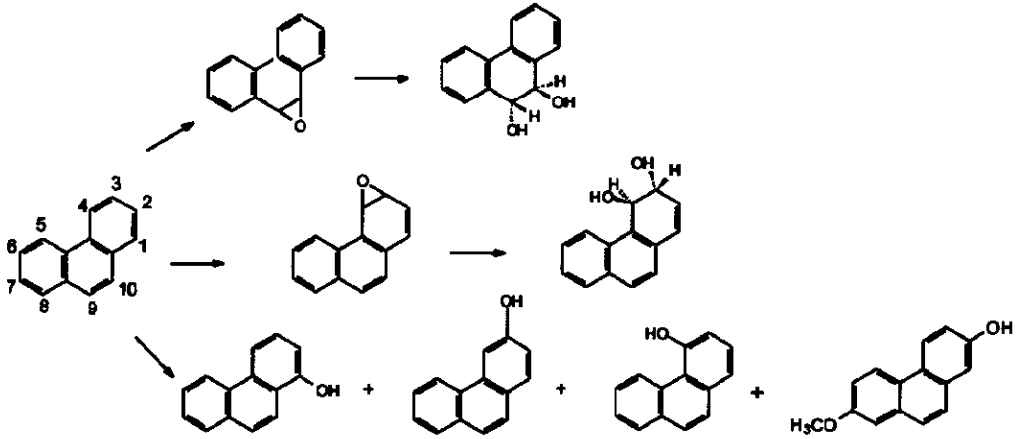


图4 假设的真菌降解萘的途径

心。排在活性部位的氨基酸大部分是疏水残基，它连接  $Fe_2S_2$  中心和单核中心，并将电子由前者传递给后者<sup>[13]</sup>。

有关萘降解菌的基因簇及其所编码的酶系总结如下<sup>[5,7,14~16]</sup> (表2)。

表2 萘降解基因簇及其所编码的酶系

菌种	位点	底物	基因	编码蛋白或功能			
<i>Nocardioides</i> sp. KP7	染色体	萘	<i>phdA</i>	菲双加氧酶的 $\alpha$ 亚基			
			<i>phdB</i>	菲双加氧酶的 $\beta$ 亚基			
			<i>phdC</i>	铁氧还蛋白			
			<i>phdD</i>	铁氧还蛋白还原酶			
			<i>phdE</i>	二氢二醇脱氢酶			
			<i>phdF</i>	外二醇双加氧酶			
			<i>phdG</i>	水合酶-缩醛酶			
			<i>phdH</i>	乙醛脱氢酶			
			<i>phdI</i>	1-羟基-2-萘酸双加氧酶			
			<i>phdJ</i>	反-2'-羧基苯亚基丙酮酸水合酶-缩醛酶			
			<i>phdK</i>	2-羧基苯甲醛脱氢酶			
			<i>Burkholderia</i> sp. RP007	质粒	萘、菲	<i>phnR</i>	调控作用
						<i>phnS</i>	调控作用
<i>phnF</i>	乙醛脱氢酶						
<i>phnE</i>	水合酶-缩醛酶						
<i>phnC</i>	外二醇双加氧酶						
<i>phnD</i>	异构酶						
<i>phnAc</i>	萘双加氧酶大亚基 ([2Fe-2S])						
<i>Alcaligenes faecalis</i> AFK2	质粒	萘	<i>phnAd</i>	萘双加氧酶小亚基			
			<i>phnB</i>	二氢二醇脱氢酶			
			<i>phnAb</i>	铁氧还蛋白			
			<i>phnAa</i>	铁氧还蛋白还原酶			
			<i>phnB</i>	顺-二氢二醇脱氢酶			
			<i>phnAc</i>	菲双加氧酶 $\alpha$ 亚基			
<i>phnAd</i>	菲双加氧酶 $\beta$ 亚基						

续表2

			<i>phnD</i>	2-羟基烯-2-羧酸异构酶
			<i>phnH</i>	谷光苷肽-S-转移酶, 反-2-羧基苯亚甲基丙酮酸水合酶-缩醛酶
			<i>phnG</i>	1-羟基-2-萘甲酸双加氧酶
			<i>phnI</i>	2-羧基苯甲醛脱氢酶
			<i>phnC</i>	3, 4-二羟基萘双加氧酶 (与 <i>phnI</i> 基因相距 2.2kb)
			<i>phnF</i>	1-羟基-2-萘乙醛脱氢酶
			<i>phnE</i>	反-邻-羟基苯亚甲基丙酮酸 水合酶-缩醛酶 (与 <i>phnF</i> 相距 6.7kb)
<i>Comamonas testosteroni</i> GZ39	质粒	非等	<i>phdAb</i>	铁氧还蛋白
			<i>phdAa</i>	铁氧还蛋白还原酶
			<i>phdB</i>	顺-二氢二醇脱氢酶
			<i>phdAc</i>	铁硫蛋白 (ISP) $\alpha$ 亚基
			<i>phdAd</i>	铁硫蛋白 (ISP) $\beta$ 亚基
			<i>phdD</i>	异构酶
			<i>phdE</i>	一个未知阅读框, 谷 光苷肽-S-转移酶, 水合酶-缩醛酶
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	染色体	非等	<i>nidA</i>	萘双加氧酶大亚基
			<i>nidB</i>	萘双加氧酶小亚基
			<i>nidD</i>	乙醛脱氢酶
			<i>phdF</i>	外二醇加氧酶
			<i>phdG</i>	水合酶-缩醛酶
			<i>phdI</i>	1-羟基-2-萘酸双加氧酶
			<i>phdJ</i>	2'-羧基苯亚甲基丙酮酸水合酶-缩醛酶
			<i>phdAaAbAcAd</i>	邻苯二甲酸双加氧酶
			<i>phdB</i>	邻苯二甲酸二氢二醇脱氢酶
<i>Pseudomonas</i> sp. C18	质粒	非等	<i>doxA</i>	萘双加氧酶
			<i>doxB</i>	DoxA-铁氧化还原蛋白
				DoxB- Fe-S 蛋白大亚基
				DoxD- Fe-S 蛋白小亚基
			<i>doxD</i>	
			<i>doxE</i>	顺-萘二醇双加氧酶
			<i>doxF</i>	水杨醛脱氢酶
			<i>doxG</i>	1, 2-二羟基萘双加氧酶
			<i>doxH</i>	异构酶 (与 <i>doxJ</i> 可互换?)
			<i>doxI</i>	水合酶-缩醛酶
			<i>doxJ</i>	异构酶
<i>Pseudomonas putida</i> OUS82	染色体	非等	<i>pahAa</i>	铁氧还蛋白还原酶
			<i>pahAb</i>	铁氧还蛋白
			<i>pahAc</i>	Fe-S 蛋白大亚基
			<i>pahAd</i>	Fe-S 蛋白小亚基
			<i>pahB</i>	顺-二氢二醇脱氢酶
			<i>pahC</i>	萘双加氧酶
			<i>pahD</i>	异构酶
			<i>pahE</i>	水合酶-缩醛酶
			<i>pahF</i>	脱氢酶

### 3 应用

从基础理论研究而言, 对非降解机理的研究有助于了解细菌适应异生化化合物的机理。从实际应用来看, 遗传学信息有利于监测污染土壤中降解 PAHs 的细菌种群, 从而为更有效的进行生物修复提供依据。Hall 等人<sup>[17]</sup>用来自 *Mycobacteria* JLS, KMS, 和 MCS 的 3 套 PCR 引物设计了一种基因探针, 通过检测编码 PAHs 诱导的双加氧酶的两个亚基的基因来确定土壤中存在的降解 PAHs 的 *Mycobacteria* 菌。

### 4 展望

相关文献结合本实验室初步研究表明, 石油污染土壤存在着降解菲的不同属微生物, 而且许多是难以人工培养的。为了有效利用这些本源微生物, 需要进一步结合免培养法, 全面研究降解菲及 PAHs 的微生物, 从宏观上把握每个属降解菲的机理以及不同属之间、属与环境之间的相互作用。另外, 需要研究其它石油烃类有机物对微生物降解菲的影响, 进一步探讨菲及其 PAHs 降解过程中的基因调控机制, 以便更好地进行生物修复。

### 参考文献

- [1] 孙胜龙. 环境污染与生物变异. 北京: 化学工业出版社, 2003. 7.
- [2] Wiele T V D, Vanhaecke L, Boeckert C, *et al.* Environmental Health Perspectives, 2005, **113** (1): 6 ~ 10.
- [3] Tam N F Y, Guo C L, Yau W Y, *et al.* Marine Pollution Bulletin, 2002, **45**: 316 ~ 324.
- [4] Tang L, Tang X Y, Zhu Y G, *et al.* Environment International, 2005, **31**: 822 ~ 828.
- [5] Stingley R L, Khan A A, Cerniglia C E, *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, **322**: 133 ~ 146.
- [6] 马 沛, 钟建江. 生物加工过程, 2003, **1** (1): 42 ~ 46.
- [7] Habe H, Omori T. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, **67** (2): 225 ~ 243.
- [8] Baboshin M. A, Baskunov B P, Finkelstein Z I, *et al.* Microbiology, 2005, **74** (3): 303 ~ 309.
- [9] Kim Y H, Freeman J P, Moody J D, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2005, **67**: 275 ~ 285.
- [10] Meckenstock R U, Safinowski M, Griebler C, *et al.* FEMS Microbiology Ecology, 2004, **49**: 27 ~ 36.
- [11] Zhang X M, Yong L Y. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63** (12): 4759 ~ 4764.
- [12] Silva M D, Esposito E, Moody J D, *et al.* Chemosphere, 2004, **57**: 943 ~ 952.
- [13] 沈德中主译. 生物催化和生物降解. 北京: 化学工业出版社, 2005. 1.
- [14] Van Hamme J D, Singh A, Ward O P, *et al.* Microbiol Mol Biol Rev, 2003, **67** (4): 503 ~ 509.
- [15] Kiyohara H, Nagao K, Kouno K, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 1982, **43** (2): 458 ~ 461.
- [16] Goyal A K, Zylstra G J. American Society for Microbiology, 1996, **62** (1): 230 ~ 236.
- [17] Hall K, Miller C D, Sorensen D L, *et al.* Biodegradation, 2005, **16**: 475 ~ 484.