

一株 DMP 降解菌的分离鉴定及其降解特性

金德才 吴学玲* 梁任星 代沁芸 王洋洋 杨宇

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

摘要: 从山东省潍坊市污染河流底泥中筛选到 1 株能够以酞酸酯(Phthalic acid esters, PAEs)为唯一碳源和能源生长的微生物, 命名为 JDC-3, 根据形态学观察、生理生化指标测定和分子生物学鉴定结果, 将该菌株初步鉴定为戴尔福特菌属(*Delftia* sp.), 以一对简并引物, 首次在该属中扩增出编码邻苯二甲酸双加氧酶的基因片段。同时以邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate, DMP)为目标测试物, 利用高效液相色谱(HPLC)测定了 JDC-3 的降解性能, 得出该菌对 DMP 降解的最佳条件为: pH 7.0~8.0、温度 30°C~35°C; 在不同 DMP 初始浓度下研究了该菌的降解动力学, 结果表明当浓度低于 300 mg/L 时的降解动力学方程为 $\ln C = -0.06837 t + A$, 半衰期为 12.48 h, 当初始浓度不断增加, DMP 对 JDC-3 的抑制能力增强, JDC-3 对 DMP 的降解速率不断下降, 半衰期增大。

关键词: 邻苯二甲酸二甲酯, 16S rDNA, 高效液相色谱, 降解动力学

Isolation, Identification and Degradation Characteristics of a DMP-degrading Strain

JIN De-Cai WU Xue-Ling* LIANG Ren-Xing DAI Qin-Yun
WANG Yang-Yang YANG Yu

(School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: A bacterial strain which could grow well on the substrate of PAEs as the sole source of carbon and energy was isolated from contaminated sludge in the river of WeiFang in ShangDong province and it was designated as JDC-3. Based on the morphology, biophysical and biochemical properties as well as molecular characteristics, this isolate was preliminarily identified as *Delftia* sp.. A fragment of phthalate dioxygenase gene was successfully amplified from the genus of *Delftia* for the first time using a set of degenerate primers. Meanwhile, the degradation capability of JDC-3 was determined by HPLC using DMP as test substrate. The results showed that the optimal pH and temperature were at 7.0~8.0 and 30°C~35°C respectively. The degradation kinetics of JDC-3 was studied in different initial DMP concentration under optimal conditions. The results indicated that the degradation dynamic equation was $\ln C = -0.06837 t + A$ when DMP concentration was lower than 300 mg/L, with half life of 12.48 h. The degradation rate decreased and half life of JDC-3 prolonged as the initial concentration kept on increasing.

Keywords: DMP, 16S rDNA, HPLC, Degradation kinetics

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30770388)

*通讯作者: Tel: 86-731-8804873; ✉: xueling0714@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-12-17; 接受日期: 2009-03-20

邻苯二甲酸酯 (Phthalic acid esters, PAEs), 又名酞酸酯, 是目前世界上生产量大、应用面广的人工合成有机化合物, 特别是在塑料工业中得到广泛应用。随着塑料工业的快速发展及塑料产品的广泛应用, PAEs 已普遍存在于大气, 土壤, 水体中, 成为无处不在的污染物^[1]。国外已称它们为“第二个全球性的 PCB 污染物”。已有研究表明, PAEs 作为环境雌激素的典型代表, 能通过食物链在生物体内逐渐富集, 且可转移到下一代, 具有致癌、致畸、破坏免疫和生殖功能等毒性^[2], 引起了各国的普遍关注。美国环境保护署(EPA)和中国环境监测总站已先后将该类化合物列为优先控制的污染物^[3,4]。由于邻苯二甲酸酯的水解和光解非常缓慢, 微生物降解是自然环境中邻苯二甲酸酯完全矿化的主要途径^[5]。目前分离到的邻苯二甲酸酯降解菌有 *Pseudomonas* sp.^[6]、*Bacillus* sp.^[7]、*Burkholderia* sp.^[8]、*Rhodococcus ruber*^[9]等。而关于利用戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)降解 PAEs 的报道只有 1 篇, 本实验室分离到一株邻苯二甲酸酯降解菌 JDC-3, 经初步鉴定为戴尔福特菌属(*Delftia* sp.)的细菌, 并首次在该菌中克隆出编码邻苯二甲酸酯双加氧酶的基因片段。另外, 在最适降解条件下, 在不同的底物浓度下, 对该菌的降解动力学做了初步分析。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和培养基

邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二辛酯(DOP)、邻苯二甲酸二异辛酯(DIOP)购自中国医药集团上海化学试剂公司, 含量 99.5%, 甲醇(分析纯)和乙酸乙酯(分析纯)由天津市大茂化学试剂厂生产, 色谱级甲醇购自美国 Sigma 公司。

无机盐培养基(g/L): K_2HPO_4 5.8, KH_2PO_4 4.5, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgCl_2$ 0.16, $CaCl_2$ 0.02, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0024, $FeCl_3$ 0.0018, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0015, pH 调至 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。固体培养基每 1 L 加入 20 g 琼脂。

DMP 无机盐培养液: 以正己烷配制 10 g/L 的 DMP 溶液, 取一定量的 DMP 溶液, 置于灭菌的三角瓶中, 待正己烷挥发完毕加入灭菌的无机盐基础培养液。

富集培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 水 1 L, pH 7.0。培养基 1×10^5 Pa 灭菌

30 min。固体培养基每 1 L 加入 20 g 琼脂。

1.2 菌株富集、分离与纯化

土样为山东省潍坊市污染河流底泥。从样品中称 10 mg 的污泥于含 200 mg/L 邻苯二甲酸酯(DMP、DEP、DBP、DOP 各为 50 mg/L)的 100 mL 无机盐培养液中, 采用梯度压力法驯化, 30°C 振荡培养 7 d, 逐步转接至含 240 mg/L、280 mg/L、320 mg/L、360 mg/L、400 mg/L 邻苯二甲酸酯的无机盐培养液后, 用接种针蘸取少量菌液, 在 PAEs 固体平板上划线, 选择菌落较大、形态和颜色各异的菌落转接到新的固体培养基上划线, 重复 5 次后, 挑取单菌落重新接到富集培养基中培养。

1.3 细菌生理生化特性测定

生理生化鉴定参考文献[10,11]进行。

1.4 细菌的 16S rDNA 的扩增和系统发育树的构建

16S rDNA 扩增和序列测定: 正向引物(FC27)为: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物(RC1492)为: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。50 μ L 反应体系中 10 \times PCR buffer 5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μ L, 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.5 μ L, 5 pmol/ μ L 引物各 1 μ L, DNA 模板 4 μ L, 加 ddH₂O 补齐 50 μ L, 扩增程序: 95°C 5 min; 94°C 45 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。取全部反应液进行琼脂糖凝胶电泳。用 E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit (Omega)进行胶回收, PCR 纯化产物的测序工作由上海生工公司完成。用 Clustal X1.8 软件进行全序列比对, 并用 Mega 4 构建系统发育树。

1.5 细菌邻苯二甲酸双加氧酶的扩增及其分析

参考 Chao 等^[12]的简并引物进行细菌邻苯二甲酸双加氧酶基因的 PCR 扩增, 正向引物: 5'-ACACSCCBCARACSCACAC-3'; 反向引物: 5'-CTTGTCC TGCTACAGCTCTTG-3'。扩增体系如下: 50 μ L 扩增体系为 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L $MgCl_2$ 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 4 μ L, 3'端和 5'端引物各 1 μ L, *Taq* polymerase 0.5 μ L, DNA 模板 100 ng 左右, 加 ddH₂O 至 50 μ L, PCR 反应条件: 95°C 10 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。电泳回收 PCR 产物, 将回收纯化的 DNA 和 PGM-T 载体相连接, 4°C 过夜。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 涂布到含有氨苄青霉素(50 μ g/mL)琼脂 LB 平板上进行蓝白筛选, 挑白斑做菌落 PCR 确定, 将阳性克隆子送至上海生工测序, 测序所得序列

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的非冗余核苷酸序列数据库进行 Blastx 同源性搜索与分析。

1.6 DMP 的生物降解试验

取菌株于 100 mL 活化富集培养基中振荡培养 12 h~24 h, 离心(10000 r/min) 5 min, 收集菌体, 用 pH 7.0, 0.02 mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液洗涤 3 次, 用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液将菌体配成 pH 7.0、 $OD_{600}=0.2$ 的菌悬液, 吸取 1 mL 菌悬液于含一定 DMP 浓度的 50 mL 无机盐培养液中, 实验基本条件为初始 pH 7.0, 温度 30°C, 摇床转速为 150 r/min, 实验中固定其中 2 个条件, 改变另一个条件进而确定最佳的降解条件。以上试验处理均为 3 次重复。

1.7 分析方法

1.7.1 样品处理: 于试样瓶中加入 20 mL 乙酸乙酯, 振荡萃取 10 min, 收集有机相, 水相再用 20 mL 乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 旋转蒸发器挥发后用甲醇定容至 10 mL, 用高效液相色谱仪测定 DMP 的残留量。

1.7.2 液相色谱条件: 色谱柱 SinoChrom ODS-BP (4.6 mm × 200 mm × 5 μm), 柱温 35°C, 流动相甲醇:水=90:10, 流速为 0.5 mL/min。检测器波长为 230 nm, 进样量为 20 μL。

2 结果

2.1 菌株 JDC-3 的分离与部分生理生化测定

河流底泥样品经过 10 次以上转接培养后, 摇瓶中的混合培养物能够在 400 mg/L 邻苯二甲酸酯的无机盐培养液中很好的生长, 说明降解菌株在此过程中得到了富集。经过复筛、纯化后筛选得到一株能以 DMP 为惟一碳源生长的菌株, 命名为 JDC-3。JDC-3 菌株在 LB 平板上 30°C 恒温培养 1 d 后, 菌落呈淡黄色、微凸、湿润、透明、无芽孢。革兰氏阴性、VP 反应阴性、甲基红实验阴性、接触酶阳性、氧化酶阳性、硝酸盐还原阳性。能够利用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、L-亮氨酸、L-苯丙氨酸等。在显微镜下观察, 细胞初期至后期一直为球状, 大小为(0.83~0.91) μm×(0.96~1.06) μm。JDC-3 菌株的电镜照片如图 1 所示。

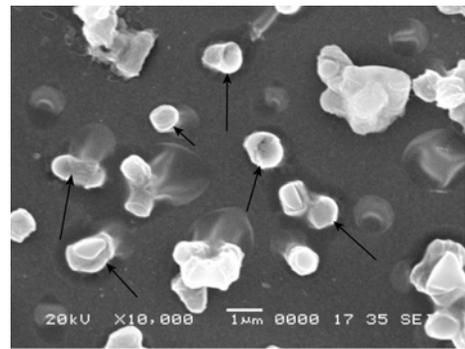


图 1 菌株 JDC-3 的扫描电镜照片(×10000)

Fig. 1 Scan electron micrograph of strain JDC-3 (×10000)

2.2 菌株 JDC-3 的 16S rDNA 分析

采用 PCR 技术, 扩增出 16S rDNA 基因, 测序的序列长度为 1439 bp, 在 GenBank 中的序列登录号为 FJ378038。将该序列结果输入 GenBank 以 Blast 进行序列同源性比较, 结果显示 16S rDNA 序列与 *Delftia* sp. TS33(EU073099) 的亲缘关系最近, 相似度为 99%。以 *Curvibacter* sp. A6 为外群, 构建系统发育树如图 2 所示, 基本可以判定 JDC-3 属于戴尔福特菌属。

2.3 细菌邻苯二甲酸双加氧酶的克隆及其相关序列同源性分析

测序所得一段长度为 887 bp 的核酸序列, 在 GenBank 中的序列登录号为 FJ528992。根据推定的氨基酸序列在 NCBI 网站通过 Blastx 进行同源性查询, 结果表明该氨基酸序列和 *Terrabacter* sp. DBF63、*Arthrobacter keyseri* 菌邻苯二甲酸 3,4-双加氧酶大亚基(PhtAa)的相似度分别为 86%、85%。基于氨基酸序列构建系统发育树, 结果如图 3 所示。

2.4 初始 pH、温度对 DMP 降解的影响

2.4.1 初始 pH 值对菌株 JDC-3 生长及 DMP 降解率的影响: 在 30°C、摇瓶转速为 150 r/min 的条件下, 考察了 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 时 DMP 作为单一基质情况下的生物降解的情况, 24 h 测定的实验结果如图 4 所示。

结果表明, 在 pH 5.0~11.0 的范围内, 菌株 JDC-3 生长量随初始 pH 值升高先增加, 在初始 pH 为 7.0 时降解率最大, 达到 51.62%, pH 为 8.0 时降解率也达到了 49.91%, 而在 pH 为 5.0 时降解率仅为 7.73%, 说明 JDC-3 适合在偏碱性的条件下生长, 这可能是由于 DMP 在降解过程中会代谢成邻苯二甲酸、原儿茶酸等酸性物质所致。

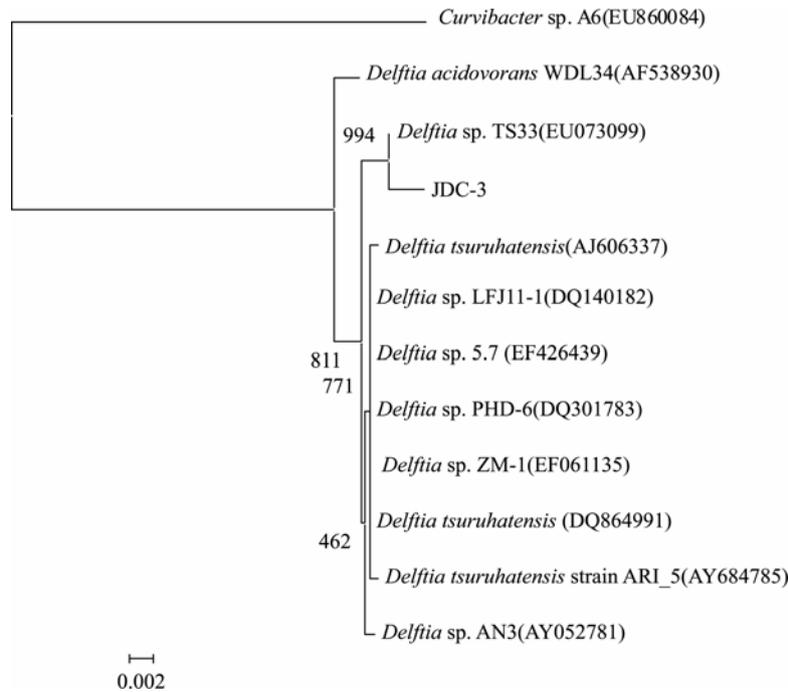


图 2 JDC-3 菌株的 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA gene sequence of JDC-3 and sequences of relating species

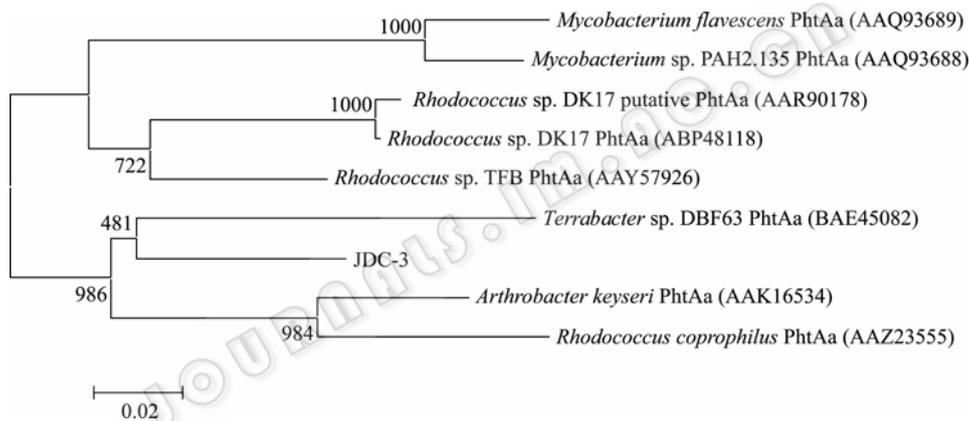


图 3 JDC-3 的邻苯二甲酸酯双加氧酶系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of phthalate dioxygenase of strain JDC-3

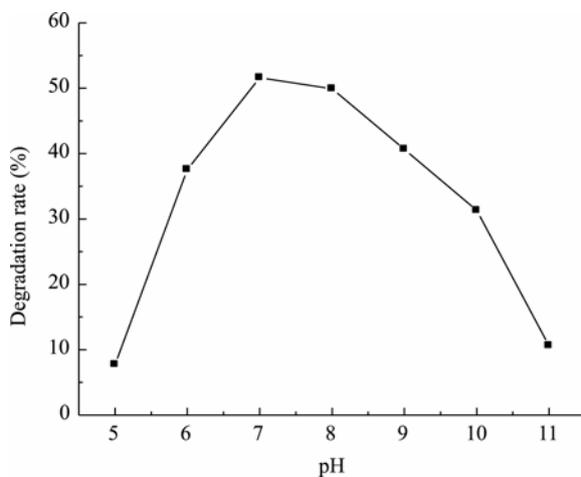


图 4 pH 值对 JDC-3 降解 DMP 的影响

Fig. 4 Effect of pH value on DMP degradation by strain JDC-3

2.4.2 温度对菌株 JDC-3 生长及 DMP 降解率的影响：在 pH 为 7.0、摇瓶转速为 150 r/min 的条件下，考察了 25°C、30°C、35°C、40°C、45°C 五种温度下，DMP 作为单一基质情况下的生物降解的情况，24 h 后测定的试验结果如图 5 所示。

结果表明，在温度为 25°C~45°C 的范围内，DMP 的降解率刚开始随着温度的升高而增大，在温度为 30°C 时降解率为 52.04%，35°C 时降解率达到最大为 54.62%，而后随着温度的不断升高降解率反而下降，直到 45°C 时降解率仅为 21.65%，这表明在 30°C~35°C 之间最适合 JDC-3 生长，温度过低或者过高都会对该菌的生长产生抑制作用，从而造成该菌的降解能力下降。

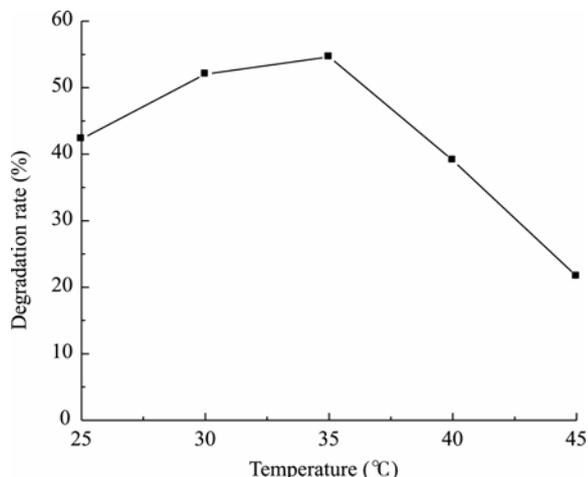


图 5 温度对 JDC-3 降解 DMP 的影响

Fig. 5 Effect of temperature on DMP degradation by strain JDC-3

2.5 降解动力学

在最适合 pH 值和温度条件下,进行了菌株 JDC-3 对 DMP 的降解动力学研究,分别配制不同初始浓度(100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、500 mg/L、750 mg/L、1000 mg/L)的 DMP 无机盐培养基,每隔 6 h 测定 DMP 的降解情况,结果如图 6 所示。

假设 JDC-3 对 DMP 生物降解反应遵循一级反应动力学方程,即: $\ln(\rho/\text{mg/L}) = -k t + A$, 其中 k 为 DMP 降解速率的动力学常数, ρ 为 DMP 的浓度(值 $\rho/\text{mg/L}$), t 为生物降解时间(单位: h), A 为常数。根据图 6 结果,利用公式可求得表 1 的动力学方程。

从表 1 可以看出,当 DMP 初始浓度小于 300 mg/L 时, JDC-3 对 DMP 降解的半衰期相近,符合降解动力学方程为 $\ln C = -0.06837 t + A$, 半衰期为 12.48 h, 当初始浓度大于 300 mg/L 时,降解速率常数 k 值随初始的邻苯二甲酸二甲酯浓度增加而降低,说明高浓度的邻苯二甲酸二甲酯对其降解有抑制作用,且随邻苯二甲酸二甲酯初始浓度增加而增加。

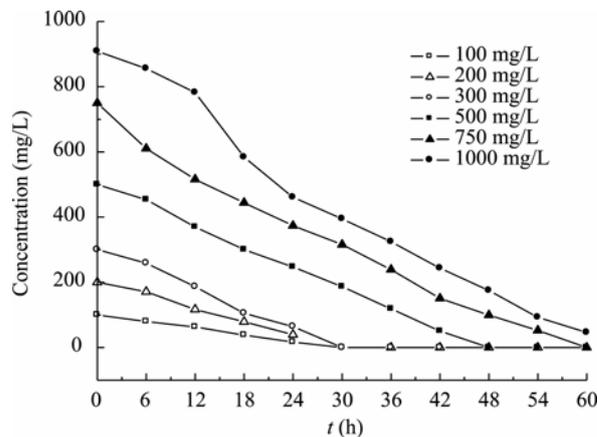


图 6 菌株 JDC-3 对不同初始浓度 DMP 的降解曲线

Fig. 6 DMP degradation curve in different initial concentration by strain JDC-3

3 讨论

1) *Delftia* sp. 是一类在有机污染物处理中具有重要价值的微生物,该属降解有机物的报道很多,但是关于该属菌降解 PAEs 鲜有报道,本研究从污染河流底泥中分离纯化到 1 株菌,经形态学,生理生化和 16S rDNA 鉴定,初步鉴定为戴尔福特菌属 (*Delftia* sp.), 目前国内还没有关于该属菌降解 PAEs 的报道,这对于扩大国内 PAEs 降解菌资源库具有一定的意义。

2) 邻苯二甲酸酯的生物降解反应首先由微生物酯酶作用水解形成邻苯二甲酸单酯,再生成邻苯二甲酸和相应的醇^[13]。在好氧条件下,在革兰氏阳性菌中,邻苯二甲酸在邻苯二甲酸 3,4-双加氧酶作用下生成 3,4-二羟基邻苯二甲酸^[14], 革兰氏阴性菌中邻苯二甲酸通过邻苯二甲酸 4,5-双加氧酶作用生成 4,5-二羟基邻苯二甲酸^[15], 均进一步形成原儿茶酸等双酚化合物,芳香环再开裂形成相应的有机酸,进而转化成丙酮酸、琥珀酸、延胡羧酸等进入三羧酸循环,最终转化为 CO_2 和 H_2O ^[16,17]。印度学

表 1 JDC-3 对不同初始浓度 DMP 生物降解的动力学方程

Table 1 DMP degradation kinetics equation in different initial concentration by strain JDC-3

初始浓度 Initial concentration(mg/L)	动力学方程 Kinetics equation	半衰期 Half-life(h)	相关系数 Correlation coefficient(r)
100	$\ln C = -0.07192 t + 4.78277$	12.11	0.95732
200	$\ln C = -0.06673 t + 5.45141$	12.56	0.97387
300	$\ln C = -0.06648 t + 5.85879$	12.77	0.97791
500	$\ln C = -0.04950 t + 6.46373$	19.04	0.94810
750	$\ln C = -0.04528 t + 6.83319$	20.01	0.96474
1000	$\ln C = -0.04411 t + 7.22431$	22.89	0.96450

者 Neelakanteshwar 等人^[18]报道 DBP 在 *Delftia* sp. TBKNP-05 菌的降解下是通过邻苯二甲酸 4,5-双加氧酶的作用生成 4,5-二羟基邻苯二甲酸。但在本研究中,以一对简并引物首次在 *Delftia* sp. JDC-3 中扩增出基因片段,在 NCBI 中进行同源性分析,发现该片段推导的氨基酸序列与 *Terrabacter* sp. DBF63、*Arthrobacter keyseri* 菌邻苯二甲酸 3,4 双加氧酶大亚基(PhtAa)的相似度分别为 86%、85%。而与革兰氏阴性菌中的邻苯二甲酸 4,5-双加氧酶并没有同源性,该结果与目前国际上普遍认为的代谢途径不一致,预示着在邻苯二甲酸到原儿茶酸这一关键步骤中,革兰氏阴性菌也可能存在着和革兰氏阳性菌相同的降解途径,明确的结论需要进一步验证,这是首次从分子水平上得出的与现有途径不一致的结论。

3) 在不同初始浓度的条件下,首次以 DMP 为唯一碳源,研究了 *Delftia* sp. JDC-3 的降解动力学,结果表明当浓度低于 300 mg/L 时,该菌的降解速率基本一致,当浓度超过 300 mg/L 时,随着浓度的不断增加,降解速率逐渐减小,说明高浓度的 DMP 对 *Delftia* sp. JDC-3 有一定的毒害作用,延长了该菌的适应期。

参 考 文 献

- [1] Li J, Gu JD, Pan L. Transformation of dimethylphthalate, dimethylisophthalate and dimethylterephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modeling the process using the modified Gompertz model. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2005, **55**(3): 223–232.
- [2] 蔡 晶, 柴丽月, 胡秋辉. 食品中邻苯二甲酸酯的检测及安全评价. *食品科学*, 2005, **12**: 242–245.
- [3] Keith LH, Telliard WA. Priority pollutants. I: A perspective view. *Env Sci Technol*, 1979, **13**: 416–423.
- [4] Wang JL, Liu P, Qian Y. Microbial degradation of di-n-butylphthalate. *Chemosphere*, 1995, **31**(9): 4051–4056.
- [5] Staple AC, Peterson DR, Parkerton TH, et al. The environmental fate of phthalic esters: a literature review. *Chemosphere*, 1997, **35**(4): 667–749.
- [6] Xu XR, Li HB, Gu JD. Biodegradation of an endocrine disrupting chemical di-n-butylphthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2005, **55**(1): 9–15.
- [7] Quan CS, Liu Q, Tian WJ, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexylphthalate by *Bacillus subtilis* No.66. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **66**(6): 702–710.
- [8] Chang HK, Zylstra GJ. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J Bacterio*, 1998, **180**(24): 6529–6537.
- [9] 李 俊, 舒为群, 陈济安, 等. 降解 DBP 菌株 CQ0302 的分离鉴定及其降解特性. *中国环境科学*, 2005, **25**(1): 47–51.
- [10] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》编译组译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] Chao WL, Lin CM, Shiung II, et al. Degradation of dibutyl-phthalate by soil bacteria. *Chemosphere*, 2006, **63**(8): 1377–1383.
- [13] Ribbons DW, Keyser P, Kunz DA, et al. Microbial degradation of phthalates. In: Gibson D T. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc., 1984, pp.371–397.
- [14] Eatons RW, Ribbons DW. Biotransformation of 3-methylphthalate by *Micrococcus* sp. strain 12B. *Gen Microbiol*, 1987, **133**: 2473–2476.
- [15] Batie CJ, LaHaie E, Ballou DP. Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*. *Biol Chem*, 1987, **262**(4): 1510–1518.
- [16] Habe H, Miyakoshi M, Chung J, et al. Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**(1): 44–54.
- [17] 曾 锋, 傅家谟, 盛国英. 邻苯二甲酸酯类有机污染物生物降解性研究进展. *环境科学进展*, 1999, **7**(4): 1–13.
- [18] Neelakanteshwar KP, Rajesh K, Yogesh S, et al. Degradation of Plasticizer Di-n-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. *Curr Microbiol*, 2006, **52**(3): 369–374.