

适冷假单胞菌 1-2D 降解菲的途径及其酶动力学研究

白红娟*, 卫燕红, 张 晴, 宋 雨, 胡锦涛, 蒋雪琴
(中北大学环境与安全工程学院, 山西 太原 030051)

摘要:为揭示适冷假单胞菌 1-2D 菌株降解菲的机理, 对该菌株的菲降解底物广谱性、代谢产物及酶动力学进行了研究。结果表明, 该菌株具有降解广谱性, 可利用羧酸类、酚类和杂环化合物为唯一碳源进行代谢。菲代谢中间产物有 1-羟基-2-萘甲酸、1-萘酚、水杨酸、邻苯二酚和 β -胡萝卜素, 初步推测菌株 1-2D 的菲降解过程存在水杨酸途径和邻苯二甲酸途径。此外, 菌株 1-2D 代谢菲的酶动力学参数 V_{\max} 为 217 nmol/(min·mg), K_m 为 1.61 μ mol/L。

关键词: 适冷假单胞菌; 菲; 代谢途径; 酶动力学

中图分类号: TQ520.9; TQ241.5; X784

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2022)09-0155-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.09.031

Degradation pathway of phenanthrene by *Pseudomonas extremaustralis* 1-2D and enzyme kinetics

BAI Hong-juan*, WEI Yan-hong, ZHANG Qing, SONG Yu, HU Jin-jun, JIANG Xue-qin
(School of Environment and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: In order to reveal the degradation mechanism of phenanthrene by *Pseudomonas aeromonas* 1-2D strain, the phenanthrene degradation substrates broad spectrum, metabolites and enzyme kinetics of the strain are studied and analyzed. The results indicate that the strain has a broad degradation spectrum and can metabolize carboxylic acids, phenols or heterocyclic compounds as only carbon source. The intermediate metabolites of phenanthrene include 1-hydroxy-2-naphthol, 1-naphthol, salicylic acid, catechol and β -carotene. It is preliminarily speculated there exist salicylic acid and phthalic acid pathways in the phenanthrene degradation process by strain 1-2D. In addition, V_{\max} and K_m , the enzyme kinetic parameters of phenylene metabolism in strain 1-2D, are 217 nmol/(min·mg) and 1.61 μ mol/L, respectively.

Key words: *Pseudomonas extremaustralis*; phenanthrene; metabolic pathway; enzyme kinetics

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是一类由 2 个及 2 个以上苯环所构成的、具有“三致”效应的芳香族化合物^[1]。菲的独特化学结构已成为研究 PAHs 的模式化合物^[2]。大量研究表明, 利用微生物代谢作用治理菲污染具有成本低、效果好、绿色环保及应用前景广阔^[3]。近年来国内外有很多关于菲生物降解的文献报道, 菲降解菌主要有如芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 等^[4-7]。常见的菲降解途径起始于 C3, 4-双加氧反应, 后经过 2 次开环和一系列生化反应进入水杨酸代谢途径或邻苯二甲酸代谢途径, 最终生成二氧化碳和水^[8]。另外, 也有一些细菌能够在菲 C1, 2-或 C9, 10 位进行双加氧反应, 并最终进入水杨酸代谢

途径或邻苯二甲酸代谢途径^[9]。水杨酸在水杨酸-1-羟化酶的催化下生成邻苯二酚或在水杨酸-5-羟化酶的作用下生成龙胆酸^[10-11]。

本课题组前期从某焦化厂废水中分离筛选得到 1 株以菲为唯一碳源和能源的高效降解菌株, 命名为 *Pseudomonas extremaustralis* 1-2D, 该菌在 48 h 内对菲 (50 mg/L) 的降解率达到 99%^[12]。笔者将进一步通过底物广谱性、代谢产物检测和酶动力学分析手段, 对菌株 1-2D 降解菲的代谢机理进行研究。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

菲 (纯度 97%, Aladdin), 分析纯; 牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、NADH, 均为生化试剂; N, O-(三甲基硅烷基)-三氟乙酰胺 (BSTFA)、三甲基氯硅烷 (TMCS);

收稿日期: 2021-09-08; 修回日期: 2022-06-29

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (201903D321083); 中央引导地方科技发展资金项目 (YDZX20201400001443); 中北大学研究生科技立项 (20201767); 中北大学大学生创新创业项目 (20210381)

作者简介: 白红娟 (1969-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事环境微生物技术研究, 通讯联系人, bhj44871@163.com。

其他试剂均为分析纯。

HZ-9511KB 台式恒温双层摇床; UV-2000 紫外分光光度计; 7890B-5977B 气相色谱-质谱联用仪; YRE-201D 旋转蒸发器。

1.2 菌种与培养基

菌种: 适冷假单胞菌 *Pseudomonas extremaustralis* 1-2D 由中北大学微生物实验室分离保存。

培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基和含菲无机盐基础培养基的制备方法参考文献[12]。

1.3 降解实验及底物广谱性实验

菌株 1-2D 菌悬液的制备参考文献[12]。

菲降解实验: 在非质量浓度为 50 mg/L 的无机盐培养基中加入接种量 5% (体积分数) 的 1-2D 菌悬液 ($OD_{600\text{nm}}$ 值为 0.5), 于 30℃ 和 150 r/min 摇床中进行培养。

底物广谱性实验: 将不同底物(1-羟基-2-萘甲酸、1-萘酚、水杨酸、邻苯二甲酸、邻苯二酚、对苯二酚、苯酚、邻菲咯啉或吡啶) 代替菲降解实验中的菲。设置无菌培养液为对照组共同培养, 3 d 后经 11 000 r/min 离心 10 min 得到菌体细胞, 用 20 mL 无菌水制成悬浮液测定细胞的 $OD_{600\text{nm}}$ 。

1.4 代谢产物的分析

1.4.1 紫外-可见光谱分析

菲降解实验 96 h 内每隔 24 h 取样 1 次, 经 11 000 r/min 离心 10 min 得到上清液, 在 225 ~ 600 nm 波长范围内, 利用 UV-2000 紫外分光光度计对样品进行扫描。

1.4.2 GC-MS 分析

在非降解实验 36 h 和 96 h 取样, 经 11 000 r/min 离心 10 min 得上清液。用盐酸调节 pH 至 2.3, 再用等体积的乙酸乙酯萃取, 充分静置后, 取上层有机相, 加入过量无水 Na_2SO_4 进行脱水处理, 静置 24 h, 利用旋转蒸发器浓缩至 2.0 mL, 加入 50 μL 衍生化试剂 [$V(\text{BSTFA}) : V(\text{TMCS}) = 99 : 1$], 在 60℃ 水浴中进行 1 h 硅烷化反应, N_2 吹干后甲醇定容, 滤膜过滤后备用。

色谱条件: Agilent HP-5MS 色谱柱 (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm), 以载气: 氮气分流比 1:2 进样, 进样口温度为 280℃, 流速为 1 mL/min。初始柱温

箱温度为 40℃, 保留 3 min, 按 20℃/min 升至 250℃, 保留 3 min, 最终以 10℃/min 升至 280℃。

质谱条件: 电子离子源 (EI) 电压为 70 eV, 温度为 230℃, 四级杆温度为 150℃, 扫描范围 28 ~ 1 000 m/z 。

1.4.3 傅里叶红外光谱分析

在非降解实验 36 h 取样, 经 11 000 r/min 离心, 取黄色上清液置于 80℃ 恒温干燥箱, 烘 1 h 得黄色固体残渣。利用傅里叶红外光谱仪 (FT-IR) 对样品进行测定, 扫描范围为 600 ~ 4 000 cm^{-1} 。

1.5 菲降解过程中水杨酸及邻苯二甲酸浓度的测定

菌株 1-2D 按照 1.3 中所述的方式进行培养, 5 d 内每隔 12 h 取样, 调节 pH 至 4.5 并超声 10 min, 11 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以空白无机盐培养基为参比, 于 296 nm 和 278 nm 波长分别测定水杨酸和邻苯二甲酸的吸光度, 以标准曲线计算出相应浓度^[13]。

1.6 水杨酸-1-羟化酶的动力学常数

粗酶液制备参照文献[14]中所述的方法。设置不同的底物浓度 25 ~ 150 $\mu\text{mol/L}$, 加入 Tris-HCl 缓冲溶液 50 mmol/L (pH 7.5)、NADH 100 $\mu\text{mol/L}$ 和粗酶液 200 μL , 总体反应系统为 1 mL。在 30℃ 下反应 30 min, 利用紫外-可见分光光度计测定 NADH 的消耗量。以酶的反应速度对不同底物的浓度作图, 并按 Lineweaver-Burk 作图法计算动力学表征参数 V_{max} 和 K_m ^[15]。

2 结果与讨论

2.1 底物广谱性

菌株 1-2D 的底物广谱性分析结果如表 1 所示。由表 1 可知, 菌株 1-2D 能够以羧酸类(1-羟基-2-萘甲酸、水杨酸和邻苯二甲酸)、酚类(1-萘酚和苯酚)及杂环化合物(邻菲咯啉和吡啶)为唯一碳源和能源生长, 菌株 1-2D 可以利用邻苯二酚而不能利用对苯二酚。其中 1-羟基-2-萘甲酸、1-萘酚、水杨酸、邻苯二甲酸以及邻苯二酚属于菲的代谢产物, 初步推测该菌株含有水杨酸和邻苯二甲酸途径, 之后通过紫外-可见分光光度法、GC-MS 和傅里叶红外光谱进一步推测该种菌的菲代谢途径。

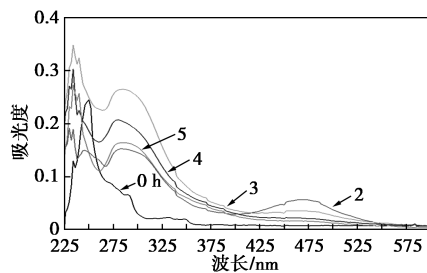
表 1 菌株 1-2D 的底物广谱性分析

底物分类	酸类化合物			酚类化合物				杂环化合物	
	1-羟基-2-萘甲酸	水杨酸	邻苯二甲酸	1-萘酚	邻苯二酚	对苯二酚	苯酚	邻菲咯啉	吡啶
菌株生长	++	++	++	++	++	-	+	+	++

注: “++”表示生长良好; “+”表示可以生长, 但生长缓慢; “-”表示不能生长。

2.2 菲降解中间产物的紫外-可见光谱分析

菌株 1-2D 降解菲过程的紫外-可见光谱如图 1 所示。由图 1 可知,24 h 时 250 nm 处菲特征吸收峰消失,并在 246、278、296 nm 及 460 nm 处出现新吸收峰;在 24~96 h 时,246 nm 处吸收峰消失,278 nm 和 296 nm 处吸收峰先显著增加后降低,460 nm 处吸收峰逐渐降低至消失。据文献[15]可知,220~250 nm 的强吸收峰表明存在共轭双烯或 α 、 β -不饱和醛酮;250~300 nm 的强吸收峰表明存在苯环或芳杂环;300 nm 以上有强吸收峰说明有较大共轭体系,尤其共轭键越多,波长红移越多,越会靠近可见光区(400~760 nm)。由此表明,246 nm 吸收峰为简单的烯烃、醛和酮,而 278 nm 和 296 nm 处的吸收峰代表物质为苯环,并推测其为邻苯二甲酸和水杨酸特征吸收峰^[16];而 460 nm 处吸收峰代表物质含大共轭体系,类胡萝卜素为含有多个共轭双键(C=C)和甲基支链的萜类化合物^[17-18],且其中 β -胡萝卜素特征吸收波长 454 nm 与该吸收峰相近,因此,460 nm 处的物质为 β -胡萝卜素。

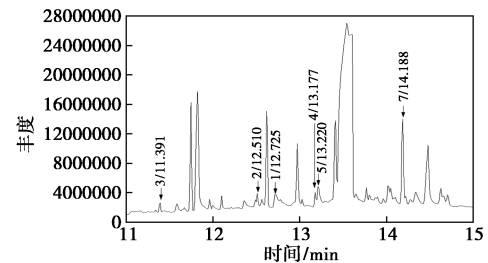


1—0 h; 2—24 h; 3—36 h; 4—60 h; 5—96 h

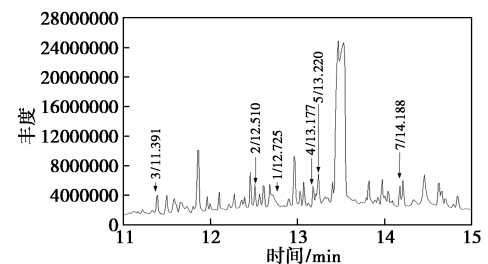
图 1 菌株 1-2D 降解菲过程的紫外-可见光谱

2.3 菲降解中间产物的 GC-MS 分析

菌株 1-2D 代谢菲的色谱如图 2 所示。由图 2 中可以看出,36 h 时可检测到第 1、2、3、4、5 和 7 物质,其出峰时间分别是 12.725、12.510、11.391、13.177、13.220 min 和 14.188 min,将其质谱图的质荷比与化学数据质谱图库进行比对,结果如表 2 所示,从表 2 中可以看出,根据出峰时间检出物质分别为菲、1-羟基-2-萘甲酸、1-萘酚、水杨酸(TMS)、邻苯二甲酸(TMS)和原儿茶酸(TMS)。96 h 时菲(12.725 min)的峰消失,原儿茶酸(TMS)(14.188 min)峰值大幅下降,水杨酸(TMS)(13.177 min)和邻苯二甲酸(TMS)(13.220 min)变



(a) 36 h



(b) 96 h

图 2 菌株 1-2D 菲代谢的色谱图

表 2 菌株 1-2D 降解菲过程中的代谢产物和衍生物

物质峰	产物	保留时间/ min	质荷比(m/z)		菌株 1-2D	
			GC-MS 测试	质谱库	36 h	96 h
1	菲	12.725	178 (100) [M^+], 177 (11), 176 (17), 152(10)	178(100) [M^+], 177(10), 176(17), 152(10)	+	-
2	1-羟基-2-萘甲酸	12.510	170 (100) [$M^+ - H_2O$], 115 (16), 114(47)	188(32) [M^+], 170(100), 115(13), 114(68), 113(12), 71(11)	+	+
3	1-萘酚	11.391	144 (100) [M^+], 116 (43), 115 (83), 57(13)	144(100) [M^+], 116(45), 115(77), 89(11), 63(12), 57(5)	+	+
4	水杨酸(TMS)	13.177	267(31) [$M^+ - CH_3$], 73(100), 45(12), 43(10)	267(16) [$M^+ - CH_3$], 135(17), 73(100), 45(29), 43(16)	+	+
5	邻苯二甲酸(TMS)	13.220	310(14) [M^+], 147(100), 73(12), 45(21), 43(11)	310(3) [M^+], 295(22), 148(17), 147(100), 73(66), 45(16)	+	+
6	龙胆酸(TMS)	14.005	355(100) [$M^+ - CH_3$], 221(7), 147(5), 73(93)	370(3) [M^+], 357(12), 356(24), 355(75), 223(4), 147(6), 73(100), 45(20)	-	-
7	原儿茶酸(TMS)	14.188	370(55) [M^+], 355(37) [$M^+ - CH_3$], 193(100), 147(44), 73(59)	370(42) [M^+], 355(26), 311(15), 193(100), 73(47)	+	+

注: +代表有, -代表无, TMS 代表三甲基硅烷化衍生物。

化较小,1-羟基-2-萘甲酸(12.510 min)和1-萘酚(11.391 min)峰值有所增加,表示该物质的累积。

2.4 菲降解中间产物黄色物质的傅里叶红外光谱分析

菲代谢培养液中黄色色素的傅里叶红外光谱分析结果如表3和图3所示。由表3、图3可知,黄色色素红外光谱中振动频率与类胡萝卜素接近,且最大吸收峰都在振荡频率为 $1\ 340\text{ cm}^{-1}$ 处,该处为C—H对称弯曲振动,包含“ CH_3 ”和“ CH_2 ”,据文献[19]分析可得,7-顺- β -胡萝卜素“ $=\text{C}-\text{H}$ ”和“ CH_3 ”官能团的吸收峰在 $1\ 375\text{ cm}^{-1}$ 处,与本文相差 35 cm^{-1} ,由此可知该菌株产生的色素含有“ $=\text{C}-\text{H}$ ”和“ CH_3 ”,该色素是类胡萝卜素中 β -胡萝卜素。

表3 黄色色素红外光谱分析

化学键	类胡萝卜素 ^[19]	菌株1-2D产生色素
C—O 伸缩振动	1084	1055
C—H 对称弯曲振动	1370	1340
C=C(伸缩振动)	1643	1653

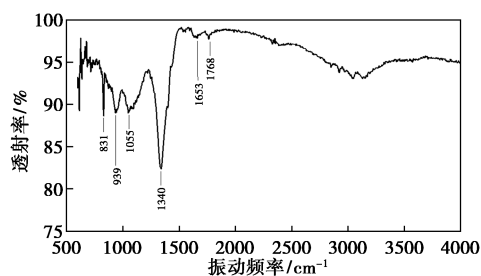
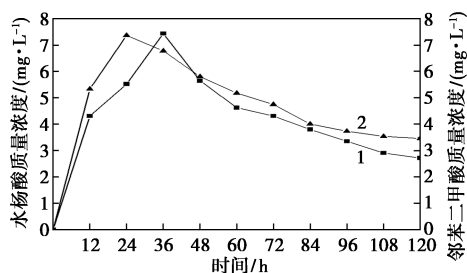


图3 菲代谢培养液中黄色色素的傅里叶红外光谱测定

2.5 菲降解过程中水杨酸及邻苯二甲酸质量浓度变化分析

不同时间水杨酸与邻苯二甲酸质量浓度变化情况如图4所示,由图4可知,菌株1-2D降解初期邻苯二甲酸质量浓度微高于水杨酸质量浓度,且邻苯二甲酸质量浓度先达到顶峰,但两物质质量浓度的



1—水杨酸质量浓度;2—邻苯二甲酸质量浓度

图4 不同时间水杨酸与邻苯二甲酸质量浓度变化情况

最大值相近,均为 7.43 mg/L ;48~120 h两物质同时下降至最低值。由此可见,菌株1-2D能共同利用水杨酸和邻苯二甲酸途径降解菲。

2.6 菌株1-2D降解菲的代谢途径

结合2.1~2.5以及底物广谱性(表1)测定分析结果可知,菌株1-2D可利用菲、1-羟基-2-萘甲酸、1-萘酚、水杨酸、邻苯二甲酸和原儿茶酸,此外,菌株1-2D可利用邻苯二酚。由此推测,菌株1-2D可将菲氧化开环并进一步代谢为1-羟基-2-萘甲酸,但菲的开环位置后续有待研究。之后1-羟基-2-萘甲酸在羟化作用下代谢为1-萘酚组成降解菲的上游途径。菌株下游途径中邻苯二甲酸途径相同,而水杨酸途径不同。邻苯二甲酸途径:邻苯二甲酸氧化生成原儿茶酸并进一步降解成 CO_2 和 H_2O 。菌株1-2D的水杨酸途径:水杨酸经羟化作用生成邻苯二酚,继续氧化开环并进一步生成 CO_2 和 H_2O 。根据文献[20]可知, β -胡萝卜素可由菌株具有的邻苯二甲酸途径和水杨酸途径产生。菌株1-2D降解途径如图5所示(1-2-3-4-5-6和1-2-7-8-9-10)。

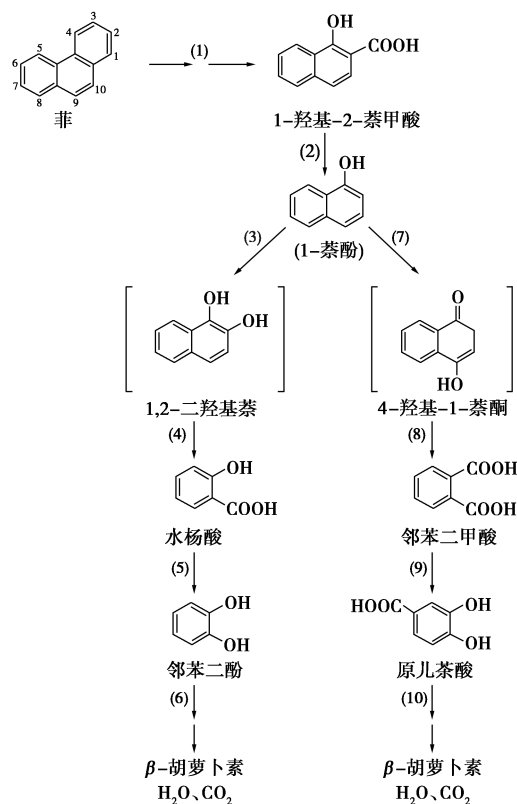


图5 适冷假单胞菌1-2D降解菲的可能代谢途径

2.7 水杨酸-1-羟化酶的酶动力学性质

水杨酸-1-羟化酶催化水杨酸的酶促反应动力学分析结果如图6所示。由图6可知,水杨酸-1-羟

化酶的酶促反应速度(V)与底物浓度($[S]$)呈典型双曲线关系,通过 Hanes-Woolf 作图法得到酶促反应式为 $[S]/V=0.0046[S]+0.0074$ ($R^2=0.9998$),得到该酶酶促反应最大速度 V_{\max} 为 $217 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 和米氏常数 K_m 为 $1.61 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。米氏常数 K_m 是酶的特征常数,用以反应酶与底物亲和力的强弱, K_m 值变化范围大多数在 $1\sim 10^5 \mu\text{mol}/\text{L}$ 之间,且数值越小亲和力越强,水杨酸-1-羟化酶的 K_m 与 Balashova 等^[21]报道水杨酸-1-羟化酶(从恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* BS202-P1 提取)的酶促反应 K_m 为 $1.72 \mu\text{mol}/\text{L}$ 相近, K_m 越小,表明水杨酸-1-羟化酶与底物水杨酸亲和力强。

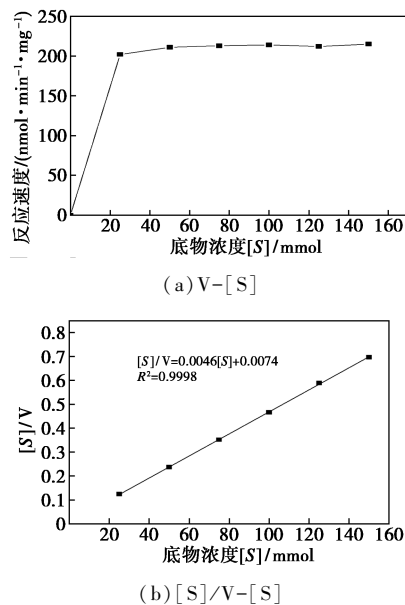


图6 水杨酸-1-羟化酶催化水杨酸的酶促反应动力学

3 结论

(1)通过适冷假单胞菌 1-2D 降解菲的代谢产物检测分析发现,该菌株降解菲经由菲 C3,4-双加氧途径生成 1-萘酚;然后沿着 2 条途径代谢:第 1 途径为水杨酸经龙胆酸生成马来酰丙酮酸直至完全矿化;第 2 条途径为邻苯二甲酸经原儿茶酸生成 β -胡萝卜素及 H_2O 、 CO_2 。

(2)通过水杨酸-1-羟化酶的酶促反应动力学绘图得到米氏方程可知,最大反应速度 V_{\max} 为 $217 \text{ nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,米氏常数 K_m 值为 $1.61 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

参考文献

[1] Marcos M S, Lozada M, Di Marzio W D, et al. Abundance, dynamics, and biogeographic distribution of seven polycyclic

aromatic hydrocarbon dioxygenase gene variants in coastal sediments of Patagonia[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(5): 1589-1592.

- [2] 徐成斌,王闻焯,李鲜珠,等.一株菲降解菌的鉴定及降解特性[J].环境科学学报,2015,35(3):684-691.
- [3] Haritash A K, Kaushik C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169(1/2/3): 1-15.
- [4] Rabodonirina S, Rasolomampianina R, Krier, et al. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites[J]. Journal of Environmental Management, 2019, 232: 1-7.
- [5] Liu S H, Zeng G M, Niu Q Y, et al. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review[J]. Bioresource Technology, 2017, 224: 25-33.
- [6] Nuttapun S, Pairoh P, Kobchai P, et al. Isolation and characterization of a phenanthrene degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism[J]. Science Asia, 2001, 27(1): 21-28.
- [7] 田蕴,郑天凌,胡忠.海洋环境中多环芳烃的微生物降解研究进展[J].应用与环境生物学报,2003,9(4):439-443.
- [8] Mishra A, Rathour R, Singh R, et al. Degradation and detoxification of phenanthrene by *actinobacterium Zhihengliuella* sp. ISTPLA[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(22): 27256-27267.
- [9] Seo J S, Keum Y S, Li Q X. Bacterial degradation of aromatic compounds[J]. Int J Environ Res Public Health, 2009, 6(1): 278-309.
- [10] 董斐,崔长征,冯天才,等.中度嗜盐菌 *Marteella* sp. AD-3 降解菲过程中水杨酸-5-羟化酶的酶学性质[J].微生物学报,2012,52(8):985-993.
- [11] Balashova N V, Stolz A, Knackmuss H J, et al. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1[J]. Biodegradation, 2001, 12: 179-188.
- [12] 张晴,白红娟,孙慧敏,等.非高效降解菌 1-2D 的筛选鉴定及其降解特性[J].精细化工中间体,2019,49(5):59-65.
- [13] 沙美.紫外分光光度法测定次水杨酸铋中总水杨酸的含量[J].中国药师,2010,13(5):751-752.
- [14] 王寿艳,白红娟,赵婷婷,等.球形红细菌生物转化 2,4-二硝基甲苯及硝基还原酶性质[J].含能材料,2018,26(3):279-284.
- [15] 张华.现代有机波谱分析[M].北京:化学工业出版社,2005:190-235.
- [16] 艾芳芳.非降解菌 *Burkholderia* sp. AFF 的分离鉴定及特性研究[D].大连:大连理工大学,2007.
- [17] 刘晓瑞.一株鞘氨醇杆菌合成类胡萝卜素的分子机制和代谢杂环的氧化压力研究[D].上海:上海交通大学,2013:61-63.
- [18] 王微微.温度对 β -胡萝卜素分子结构有序性的影响[D].吉林:吉林大学,2011:2-10.
- [19] 李超.一株产类胡萝卜素戈登氏菌的诱变及其色素产物的研究[D].武汉:湖北工业大学,2013:37-38.
- [20] 彭懿.非高效降解菌的分离鉴定及其降解废水中菲的特性研究[D].湘潭:湘潭大学,2015.
- [21] Balashova N V, Stolz A, Knackmuss H J, et al. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1[J]. Biodegradation, 2001, 12: 179-188. ■