

# *Arthrobacter* sp. W1 苯酚降解特性及其羟化酶基因获取

谭东徽<sup>1,2,3</sup>, 曲媛媛<sup>1</sup>, 马放<sup>2</sup>, 周集体<sup>1</sup>, 袁晓东<sup>3</sup>

(1. 大连理工大学 环境学院 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024, qyy007@126.com; 2. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090; 3. 宝生物工程(大连)有限公司, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 为获得适应高盐环境的苯酚降解菌及其相关降解基因, 从活性污泥中筛选得到一株耐盐苯酚降解菌 W1. 利用 16S rRNA 基因序列鉴定该菌株, 并考察了其降解特性; 同时, 采用 Tail-PCR 方法对菌株苯酚羟化酶基因进行侧翼调取. 结果表明: 菌株 W1 为节杆菌 (*Arthrobacter* sp.), 能在质量分数为 1% ~ 10% 的 NaCl 溶液中以苯酚为唯一碳源及能源生长, 并能降解对甲基酚、水杨酸、对苯二酚等多种芳香化合物. 在质量分数为 5% 的 NaCl 溶液中, 菌株 W1 对质量浓度为 1 000 mg · L<sup>-1</sup> 的苯酚降解率高达 90% 以上. 侧翼获取的基因全长约为 6 kb, 其中, 编码苯酚羟化酶大亚基基因的全长序列与 *Alcaligenes* sp. 相应序列具有较高的同源性, 约为 93%.

**关键词:** 苯酚; 羟化酶; Tail-PCR; 生物降解; 耐盐菌

**中图分类号:** TH117.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0367-6234(2010)12-1977-04

## Characteristics of *Arthrobacter* sp. W1 for phenol biodegradation and acquisition of phenol hydroxylase gene

TAN Dong-hui<sup>1,2,3</sup>, QU Yuan-yuan<sup>1</sup>, MA Fang<sup>2</sup>, ZHOU Ji-ti<sup>1</sup>, YUAN Xiao-dong<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education, School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China, qyy007@126.com; 2. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 3. TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd., Dalian 116600, China)

**Abstract:** To obtain novel salt-tolerant phenol-degrading bacteria and amplify the corresponding genes, a bacterium named W1 was isolated from the active sludge samples. 16S rRNA sequence analysis was used to identify the bacterium, and characteristics for phenol biodegradation were also studied. The 5' - and 3' -flanking regions of gene encoding the phenol hydroxylase were amplified from strain W1 by TAIL-PCR method. 1 wt % - 10 wt % was showed that strain W1 was identified as *Arthrobacter* sp. The strain was capable of growing in the medium with 1 wt % - 10wt% NaCl and utilizing phenol as the sole carbon and energy source. And it could also degrade some other aromatic compounds such as *p*-methylphenol, salicylic acid and *p*-hydroquinone, etc. When concentration of NaCl was about 5 wt %, 1 000 mg · L<sup>-1</sup> phenol could be degraded more than 90% by strain W1. The complete gene cluster was about 6 kb, of which the gene encoding the large subunit of phenol hydroxylase exhibited the highest similarity about 93% with the corresponding gene of *Alcaligenes* sp.

**Key words:** phenol; hydroxylase; Tail-PCR; biodegradation; salt-tolerant bacteria

收稿日期: 2009-04-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51078054, 20923006);  
城市水资源与水环境国家重点实验室开放基金  
(QAK201009).

作者简介: 谭东徽(1980—), 女, 硕士研究生;  
周集体(1956—), 男, 教授, 博士生导师.

苯酚是造纸、炼焦、炼油、塑料、纺织等化学工业生产在废水中的主要污染物, 苯酚及其衍生物在水中扩散, 对生态环境造成了破坏, 也威胁着

人类的健康. 在含酚废水的治理技术中, 利用微生物处理苯酚是一种既经济又无二次污染的方法<sup>[1-2]</sup>. 近年来, 从被酚类物质污染的环境中分离得到多种降酚微生物菌株, 包括 *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Variovorax* sp. 等, 同时, 研究者还详细地研究了这些菌株代谢苯酚的途径及其基因调控机制<sup>[3-7]</sup>. 目前, 我国工业特别是化工行业所排放的含酚废水中常常含有很高含量的盐分<sup>[8]</sup>. 因此, 含高盐、难降解有机污染物——工业含酚废水的生物处理是一项非常迫切的任务.

苯酚生物降解的第一步即在苯酚羟化酶催化下, 将苯酚转变为儿茶酚, 这是整个苯酚代谢途径的限速步骤, 决定了苯酚降解的动力学属性<sup>[9]</sup>. 自然环境中有单组分和多组分两种苯酚羟化酶, 其中, 多组分苯酚羟化酶 (mPH) 是自然环境中的优势类型. 编码多组分苯酚羟化酶大亚基的 DNA 片段 (the large subunit of multi-component phenol hydroxylase, LmPH) 已被成功地用作分子标记, 应用于自然环境中降酚菌群的遗传和功能多样性等方面的研究<sup>[10]</sup>.

本文针对工业含酚废水既含苯酚又含高盐的双重性, 采用苯酚和 NaCl 作为选择压力, 筛选出 1 株能够在高盐环境下降解苯酚的节杆菌 *Arthrobacter* sp. W1, 对其特性进行考察. 同时, 利用 Tail-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, 热不对称交错 PCR) 技术从该菌株中成功克隆到苯酚羟化酶基因, 旨在丰富和开发合适的耐盐苯酚降解微生物及酶资源, 对高盐条件下含酚废水的生物修复提供技术支持.

## 1 材料与方 法

本试验所采用的培养基为: 质量浓度为  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  溶液,  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶液,  $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液,  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的苯酚溶液,  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 溶液, pH 约为 7.0.

采用细菌 16S rRNA 通用引物对 W1 基因组进行 PCR 扩增. 反应总体积为  $20 \mu\text{L}$ , 其中  $\text{ddH}_2\text{O}$  为  $13.1 \mu\text{L}$ ,  $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Mg}^{2+}$  为  $4 \mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物均为  $0.8 \mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 为  $0.5 \mu\text{L}$ , Taq 酶 1 U, 模板 DNA 为  $1 \mu\text{L}$  (约  $200 \text{ ng}$ ). PCR 扩增过程为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $50 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $2.5 \text{ min}$ , 循环 30 次, 最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$  结束. 取 PCR 产物  $1 \mu\text{L}$  进行质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外检测. 用琼脂糖凝胶纯

化试剂盒 (大连宝生物公司生产) 切胶回收 PCR 产物进行测序分析, 16S rDNA 的测序工作由大连宝生物公司完成. 实验所用引物列于表 1 中, 其他引物为试剂盒 (TaKaRa genome walking kit) 自带引物, 在此不一一列出.

表 1 实验所用引物

引物名称	序 列
Control specific primer SP1	AAATGCTGCAGCCTCCCTCTCACCC
Control specific primer SP2	AATACCAGAAATGTGCCCTCCCGTG
Control specific primer SP3	TGAGCTGGCAGTTGTAGTCTCTGT
CTB127-F	AGGCATCAAGATCACCGACTG
CTB127-R	CGCCAGAACCATTATCGATC

在苯酚初始质量浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 质量分数分别为 1%、5%、10% 的 NaCl 溶液, pH 为 7.0 的无机盐培养基中接种 W1,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  摇床震荡培养, 每隔 12 h 取样测定生物量 ( $\text{OD}_{660}$ ), 并计算苯酚降解率. 在质量分数为 5% 的 NaCl 溶液的培养基中, 加入  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  苯酚, 温度分别为  $10$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $30$ 、 $35$ 、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$  和  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 48 h 取样测定生物量 ( $\text{OD}_{660}$ ), 并计算苯酚降解率. 在质量分数为 5% 的 NaCl 溶液条件下, 苯酚质量浓度分别为  $100$ 、 $500$ 、 $1\ 000$ 、 $1\ 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每隔 12 h 取样测定苯酚含量, 其余条件同盐度试验. 取  $50 \text{ mL}$  锥形瓶, 每个锥形瓶中加入  $25 \text{ mL}$  无机盐培养基, 以不同的芳香化合物作为唯一碳源和能源进行培养, 48 h 后观察 W1 的生长情况. 以菌株 W1 基因组 DNA 为模板, 使用 TaKaRa genome walking kit (Code No. D316) 扩增苯酚羟化酶基因 5' 端及 3' 端未知侧翼序列, 苯酚羟化酶基因全序列测定由大连宝生物公司完成.

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离鉴定及特性

经过多次传代驯化、反复平板涂布, 分离纯化得到 1 株能够以苯酚为唯一碳源生长的耐盐菌株, 命名为 W1. 菌株 W1 在固体培养基上菌落表面光滑、湿润、粘稠、易挑起, 菌落质地均匀, 正反面和边缘、中央部位的颜色均一, 菌落呈白色. 以菌株 W1 的总 DNA 为模板, 利用通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物经酶切测序, 测序结果登录 GenBank, 并用 BLAST 与 GenBank 中的 16S rRNA 序列进行同源性比较发现菌株 W1 与 *Arthrobacter ricotianae* 的 16S rRNA 序列同源性达到 100%.

菌株 W1 在质量分数为 1% ~ 10% 的 NaCl 溶液条件下均能够进行生长, 并对苯酚有降解能力,

如图 1 所示. 盐度 (NaCl 在其溶液中的质量分数) 在 5% 以下时, 42 h 可完全降解  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的苯酚. 当盐度达 10% 时, W1 的生长量和苯酚的降解率随着盐度的增加而降低,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的苯酚完全降解需要 54 h.

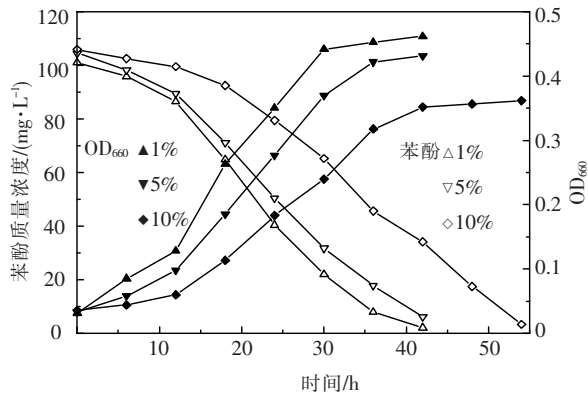


图 1 不同盐度下菌株 W1 的生长降解曲线

温度对菌株 W1 的生长及苯酚降解的影响表明, 菌株 W1 温度为  $20 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$  可以正常生长和降解苯酚,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  时苯酚的降解效率最高达 90%, 因此确定  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  为菌株生长及苯酚降解的最佳温度. 不同 pH 对菌株 W1 的生长及苯酚降解的影响表明, pH 为  $6 \sim 10$  时, 菌株对苯酚降解效果较好, 苯酚降解率均达到 60% 以上. pH = 7.0 为菌株生长及苯酚降解的最佳 pH 条件. 偏酸偏碱都不利于微生物生长, 从而影响苯酚的降解效果.

苯酚质量浓度对菌株 W1 降解苯酚的影响见图 2, 可见, 降解速率随苯酚质量浓度升高而下降, 苯酚质量浓度越高, 延滞期越长, 降解时间也越长. 苯酚质量浓度在  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以下时, 菌株完全降解苯酚大约需要 270 h. 当苯酚质量浓度为  $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 经过 292 h, 苯酚的降解率可达到 52%. 但当苯酚质量浓度为  $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 菌株 W1 已无法生长 (数据未显示), 这表明高质量浓度苯酚对菌株的生长具有一定的抑制作用.

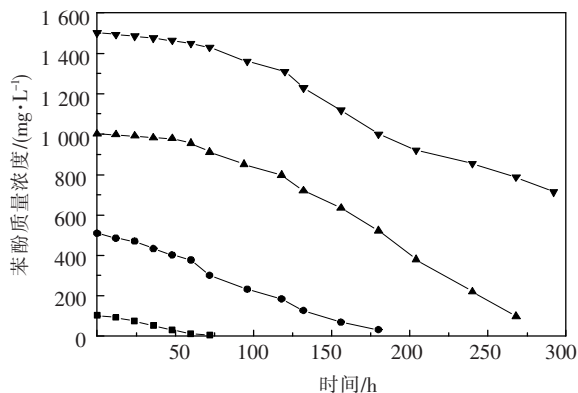


图 2 苯酚质量浓度对菌株 W1 降解苯酚的影响

实验证明, 菌株 W1 能够很好的利用苯甲酸、水杨酸、邻氨基酚、间氨基酚、对甲基酚、对苯二酚等多种芳香化合物作为碳源和能源进行生长. 但是菌株 W1 不能利用硝基苯、邻二硝基苯、硝基苯胺、对氯苯胺等物质. 推断原因为硝基和卤原子的存在降低了苯环的电子云密度, 使得亲电子反应不易进行, 进而底物很难被氧化, 使其可生物降解性降低.

## 2.2 菌株 W1 苯酚水解酶的基因获取

以节杆菌 W1 基因组 DNA 为模板, 扩增得到苯酚羟化酶基因保守区序列, 获得约 500 bp 的基因片段. 使用引物 Raw TEST-F/Raw TEST-R, 对获得的片段进行测序, 在 NCBI 上 Blast, 结果表明, 与其同源性最高的是 *Alcaligenes* sp. 的相应基因, 同源性约为 93%. 使用特异引物 SP1 - 5'、SP2 - 5'、SP3 - 5', 按照上述方法进行侧翼序列获取, PCR 产物各取  $5 \mu\text{L}$  进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 3 所示. 切胶回收 AP3 3rd PCR 产物, 使用引物 SP3 - 5' - 1、SP3 - 5' - 2 对获得的片段进行测序, 测序结果表明此片段为苯酚羟化酶基因 5' 端未知侧翼序列, 并且长度已满足要求. 图中, 编号 M1 为  $\lambda$  - Hind III digest; 编号 1 ~ 3 为 AP 1 1 st 2 nd 3 rd PCR 产物, 编号 4 ~ 6 为 AP 2 1st 2 nd 3 rd PCR 产物, 编号 7 ~ 9 为 AP 3 1 st 2 nd 3 rd PCR 产物, 编号 10 ~ 12 为 AP 4 1 st 2 nd 3 rd PCR 产物, 编号 13 ~ 15 为正对照 1st 2nd 3rd PCR 产物, M2 为 DNA Marker DL2 000.

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M2

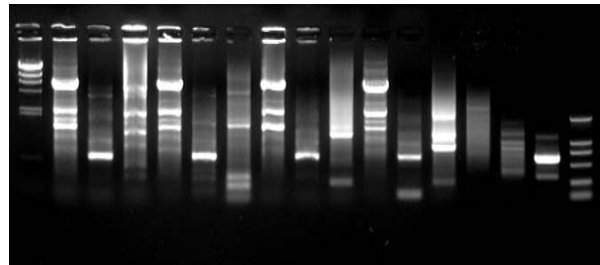


图 3 苯酚水解酶 5' 端侧翼序列的 Tail-PCR 电泳图

通过染色体步移技术进行侧翼序列获取, 成功获得总长约 6 kb 的基因序列. 根据读码框可分为 6 个亚基, 分别为: ORF1 ~ ORF6, 经过 blast 同源比对, 推测其分别编码苯酚羟化酶的 6 个亚基. 其中, ORF4 编码苯酚羟化酶大亚基, 与其同源性最高的是编码产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. 苯酚水解酶大亚基的基因, 同源性约为 93%, ORF4 的系统进化树如图 4 所示.

本研究一次性获得节杆菌 *Arthrobacter* sp.

W1 苯酚羟化酶基因全长序列,即完整的编码基因,为进一步构建含有 *Arthrobacter* sp. 苯酚羟化

酶的基因工程菌提供良好的基因材料,为实际含酚废水的生物修复提供技术支持。

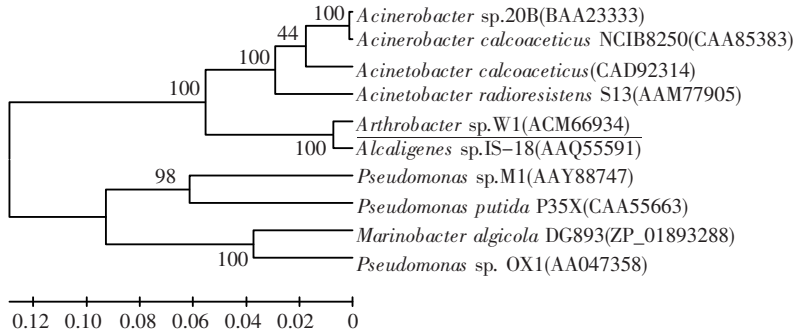


图4 菌株 W1 苯酚羟化酶大亚基的进化树

### 3 结 论

1) 经过多次传代驯化、反复平板涂布,分离纯化得到 1 株能够以苯酚为唯一碳源生长的耐盐菌株,命名为 W1。

2) W1 菌株在质量分数为 1% ~ 10% 的 NaCl 溶液、pH 为 6 ~ 10 和温度为 20 ~ 40 °C 环境下均能进行生长和降解苯酚,最佳降解条件分别为质量分数为 5% 的 NaCl 溶液、pH = 7.0 和温度 30 °C。

3) 菌株 W1 在高盐条件下可耐受的苯酚质量浓度为 1 500 mg · L<sup>-1</sup>,且能够利用苯甲酸、水杨酸、氨基酚、对甲基酚、对苯二酚等多种芳香化合物作为碳源和能源进行生长。

4) 通过染色体步移技术成功获得了总长约 6 kb 的苯酚羟化酶基因,推测其编码苯酚羟化酶的 6 个亚基。其中,ORF4 编码苯酚羟化酶大亚基,与其同源性最高的是编码产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. 苯酚水解酶大亚基的基因,同源性约为 93%。

### 参考文献:

- [1] 王韬,李鑫钢,杜启云. 含酚废水治理技术研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27 (2): 231 - 234.
- [2] 吕荣湖,付强. 高浓度酚降解菌的选育及其降解性能[J]. 环境科学, 2005, 26 (5): 147 - 151.
- [3] WATANABE K, TERAMOTO M, FUTAMATA H, *et al.* Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol degrading bac-

teria in activated sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (11): 4396 - 4402.

- [4] NAKAMURA K, ISHIDA H, IIZUMI T. Constitutive trichloroethylene degradation led by tac promoter chromosomally integrated up stream of phenol hydroxylase genes of *Ralstonia* sp. KN 1 and its nucleotide sequence analysis[J]. J Biosci Bioeng, 2000, 89(1): 47 - 54.
- [5] EHRT S, SCHIRMER F, HILLEN W. Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCB8250 [J]. Mol Microbiol, 1995, 18 (1): 13 - 20.
- [6] WATANABE K, HINO S, ONODERA K, *et al.* Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity [J]. J Ferment Bioeng, 1996, 81(6): 560 - 563.
- [7] 马放,任南琪,杨基先. 污染控制微生物学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2002: 32 - 38.
- [8] HIRAYAMA K K, TOBITA S, HIRAYAMA K. Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*[J]. Water Science and Technology, 1994, 30(9): 59 - 66.
- [9] HINO S, WATANABE K, TAKAHASHI N. Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties[J]. Microbiology, 1998, 144(7): 1765 - 1772.
- [10] WATANABE K, FUTAMATA H, HARAYAMA S. Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies[J]. Antonievan Leeuwenhoek, 2002, 81: 655 - 663.

(编辑 魏希柱)