

降解性细菌对菲诱导的蛋白及酶活性应答反应*

钟 鸣^{1,2} 周启星^{1**} 许华夏¹ 吴晓丹² 李玉双²

(¹中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; ²沈阳农业大学, 沈阳 110161)

【摘要】 测定了3株以菲为唯一碳源的芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株(BA11、BA19和BA27)的降解能力、多酚氧化酶和过氧化氢酶的活性及蛋白变化。结果表明,当菲浓度在 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下时,3株菌多酚氧化酶和过氧化氢酶的活性随菲浓度的提高变化不大,其中BA19和BA27菌株表现出较高的稳定性。当菲浓度为 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,BA27诱导表达了一条分子量为27 000道尔顿的新蛋白条带,同时有些蛋白的合成受到抑制。因此可以认为,诱导产生的新蛋白与其污染条件下的细菌降解能力及稳定性有关。

关键词 菲 降解细菌 酶活性 生物修复

文章编号 1001-9332(2004)05-0871-04 **中图分类号** X171.5 **文献标识码** A

Revulsive response of protein and enzyme activity of degradative *Bacillus* strains by phenanthrene. ZHONG Ming^{1,2}, ZHOU Qixing¹, XU Huaxia¹, WU Xiaodan², LI Yushuang² (Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ²Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15(5): 871~874.

Three strains of *Bacillus* sp. BA11, BA19 and BA27, which can grow when phenanthrene is taken as the sole source of carbon and energy, were isolated from an oil-contaminated soil. Their crude extract was used to test the activities of polyphenol oxidase and catalase. The results demonstrated that all the three strains did not show a significant change in the activity of both enzymes when phenanthrene was lower than $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Under different phenanthrene concentration, the enzyme activities of strains BA19, BA27 showed a higher stabilization than BA11. Using the SDS-PAGE contrasted the difference of proteins between the strains in normal medium and the strains growing on phenanthrene, the results showed that BA27 growing on phenanthrene synthesized a new protein with 27 000 dal of molecular weight. At the same time, the synthesis of some proteins was cancelled. We conjecture that the new protein induced by phenanthrene may be related to the ability of phenanthrene degradation and the stabilization of enzyme activity by the strain.

Key words Phenanthrene, Degradative bacterium, Enzyme activity, Bioremediation.

1 引言

多环芳烃化合物(PAHs)是指含有2个或2个以上苯环的疏水性芳香族化合物。在环境中,多数PAHs因具有难降解性、致癌性、致畸性和致突变性,所以受到严重关注,已成为污染生态学研究的重点污染物[7,8,10,19~24]。近年来,由于化石燃料燃烧、废物焚烧、煤气/焦化污水、家庭洗涤污水以及原油泄漏等污染源的膨胀[20],PAHs排入环境中的数量迅速增加,造成广泛而长期的污染。我国许多城郊地区土壤中均报道存在较为严重的PAHs污染[9,16]。

20世纪90年代以来,污染土壤的生物修复由于具有效率高、速度快、成本低、反应条件温和以及无二次污染等显著优点而得到了迅速发展[6,14,16~18],特别是利用环境微生物灵活的适应性和遗传多样性,定向地富集培养和驯化专性环境微生物,建立以微生物降解过程为核心的生物修复技

术,已成为国际上解决土壤环境污染问题的重要发展方向[2,17,22]。目前,含PAHs污水的治理以及污染水体PAHs的修复研究相对领先[2]。为此,我们开展了石油污染土壤中具有降解功能细菌的分离、降解特性和微观反应研究,为PAHs污染土壤生物修复提供科学依据[23~25]。

2 材料与方法

2.1 非降解菌的富集培养、分离筛选与测定

采集辽河油田曙光采油厂附近受石油污染的草甸棕壤,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 好氧条件下,用以菲为唯一碳源的MS液体培养基,进行非降解菌的驯化富集培养。采用平板划线法[13]初步分离获得长势较好的纯菌株(以600 nm处的浊度表示3株菌BA11号、BA19号和BA27号的生长)。根据细菌的形态特征及其生理生化特征,按照各分科检索进行菌株鉴定[13]。

* 国家杰出青年科学基金项目(20225722)和中国科学院知识创新重要方向资助项目(KZCX2-SW-416)。

** 通讯联系人。

2002-10-12 收稿,2003-02-28 接受。

2.2 菲浓度的测定^[12]

定时、定量取含 50 mg·L⁻¹菲的培养液,经环己烷萃取,并用硅胶 G 薄层层析法分离,石油醚溶解提取后,在 252 nm 下测紫外吸光度,以标准菲浓度梯度建立标准曲线,查出培养液中菲的浓度.

2.3 酶活性的测定

2.3.1 粗酶液的制备 将分离得到的 3 个菌株 BA11 号、BA19 号和 BA27 号分别接入含有不同浓度(0、50、100、150、200 和 250 mg·kg⁻¹)菲的 MS 培养基中,于 30 °C 振荡培养 12 h 后离心,收集菌体,以 0.1 mol·L⁻¹ pH8.0 硼酸缓冲液冰浴中进行超声波破碎,5 600 g 冷冻离心 40 min 后,取上清液(粗酶液).

2.3.2 多酚氧化酶活性的测定 用以邻苯二酚为底物的方法测定.以每分钟 OD₃₉₈ 值变化 0.01 为 1 个酶活单位,用 U·g⁻¹(FW)表示酶的比活性^[3].

2.3.3 过氧化氢酶活性的测定 用改进的 Beers 和 Sizars^[3]方法测定.每分钟 OD₂₄₀ 值降低 0.0436 为 1 个酶活单位,用 U·g⁻¹(FW)表示酶的比活性.

2.4 蛋白表达测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮兰 R₂₅₀ 染色.按 Bradford^[15]的考马斯亮兰 G₂₅₀ 法,测定其蛋白质含量.

3 结果与分析

3.1 降解菌的特征

得到的高效降解菲的纯菌株 BA11 号、BA19 号和 BA27 号,革兰氏染色均为阳性,菌落直径均小于 1 mm,呈乳白色,外形光滑,不透明,菌体为杆状.经生理生化试验初步鉴定,这 3 株菌均属于芽孢杆菌属(*Bacillus*).

3.2 降解反应

3 株芽孢杆菌降解菲的情况见图 1.相对而言,BA27 的降解能力最强,在对数生长期菲的浓度降至 13.7 mg·L⁻¹,而 BA11 的降解能力稍差.3 株菌的降解趋势基本一致,在反应初期(12 h 以内)降解速度较快,降解率均达到 50% 以上.

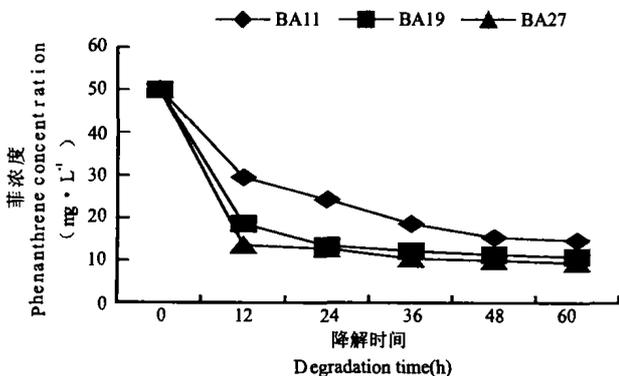


图 1 BA11、BA19、BA27 对菲的降解
Fig.1 Degradation of phenanthrene by BA11, BA19 and BA27 strains.

3.3 酶活性的影响

酶活测定结果表明,在非浓度为 250 mg·L⁻¹ 以下时,菲对 BA19、BA27 两种菌株的过氧化氢酶活性与多酚氧化酶活性的影响均不大,而 BA11 号菌株的两种酶的活性水平高于 BA19、BA27,且对菲的存在,酶活受到一定的影响.随着菲浓度的增加,过氧化氢酶活性有下降的趋势,而多酚氧化酶活性随之略有升高,在 200 mg·L⁻¹ 处达到活性最高状态.由此可见,BA11 对 200 mg·L⁻¹ 浓度的菲较为敏感(图 2、3).

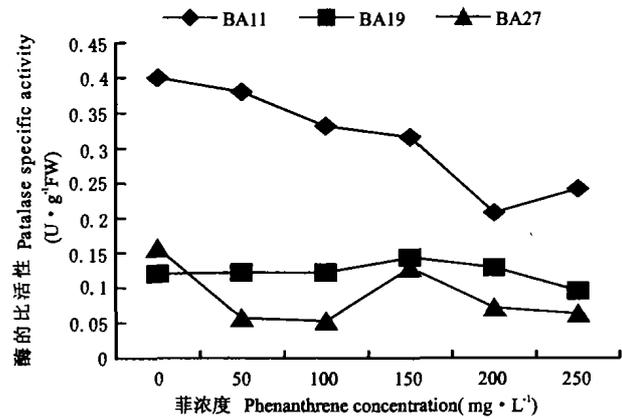


图 2 过氧化氢酶比活变化曲线
Fig.2 Effects of phenanthrene on catalase specific activity of BA11, BA19 and BA27 strains.

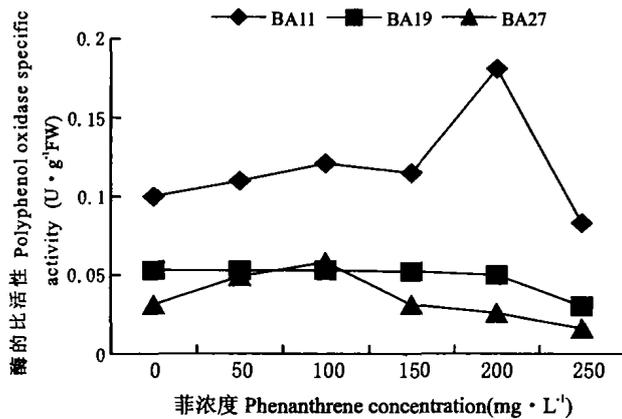


图 3 多酚氧化酶的比活性变化曲线
Fig.3 Effects of phenanthrene on polyphenol oxidase specific activity of BA11, BA19 and BA27 strains.

3.4 菲对菌株蛋白表达的影响

培养 20 h 后,比较 3 株菌在含 200 mg·L⁻¹ 菲及不含菲的 MS 培养基中的可溶性蛋白质含量表明,3 株菌在 200 mg·L⁻¹ 菲中的蛋白含量均高于正常培养基中的可溶性蛋白质含量,尤其是 BA11 菌株,可溶性蛋白含量明显增加(表 1).

同时,比较了在这两种培养基中菌株表达蛋白的情况.从凝胶上看出(图 4),当菲浓度为 200 mg·L⁻¹ 时,菌株产生的蛋白与无非时的蛋白之间存在

着一些差别,特别是 BA27 菌株,200 mg·L⁻¹非诱导其产生了一条 $R_f = 0.65$ 的新蛋白谱带(分子量约为 27 000 Dal)。

表 1 非对芽孢杆菌可溶性蛋白质含量的影响

Table 1 Effects of phenanthrene on the content of soluble protein in *Bacillus*

| MS 培养基中非浓度 Concentration in MS | 菌株 <i>Bacillus</i> strain | | |
|---|---------------------------|------|------|
| | BA11 | BA19 | BA27 |
| 非 ¹⁾ (0 mg·L ⁻¹) | 3.20 | 5.09 | 6.26 |
| 非(200 mg·L ⁻¹) | 4.76 | 5.22 | 7.19 |

1) Phenanthrene.

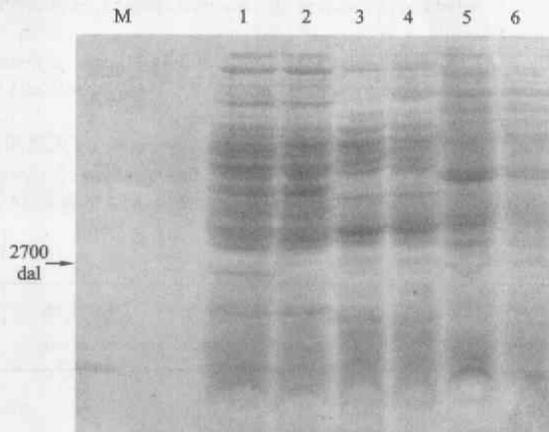


图 4 BA11、BA19、BA27 在不同非浓度下的蛋白电泳图谱

Fig. 4 Protein profiles of BA11, BA19 and BA27 by different concentration of phenanthrene.

1、3、5 分别为 BA27、BA19、BA11 在含 200 mg·L⁻¹非的 MS 培养基中生长的蛋白谱带 Lines 1, 3, 5 were protein profiles of BA11, BA19 and BA27 in MS medium containing 200 mg·L⁻¹ phenanthrene. 2、4、6 分别为 BA27、BA19、BA11 在不含非的 MS 培养基中生长时的蛋白谱带 Lines 2, 4, 6 were protein profiles of BA11, BA19 and BA27 growing in MS medium without phenanthrene. M) 标准蛋白分子量 Standard molecular weight of proteins.

4 讨 论

资料表明,用土壤中 PAHs 或其他烃类对表层或亚表层微生物进行处理或驯化,可以提高降解率^[17]。这是目前开展生物修复的第一步,也是关键的步骤,了解其降解能力及对污染的适应机理,是利用降解性微生物进行原位生物修复技术的必要理论基础。一些研究表明,在被 PAHs 污染的土壤中,微生物降解 PAHs 的能力远远高于未受污染的土壤^[4]。为了缩短筛选时间,本实验采用石油污染土壤,进行分离、筛选、驯化土壤微生物,得到 3 株芽孢杆菌,它们都可能以非为唯一碳源,在培养条件下,降解率均在 50% 以上,其中 BA27 的降解率可达 81.2%。初步认为,3 株芽孢杆菌可作为降解非的微生物资源,进一步用于 PAHs 污染土壤的生物修复。

然而,微生物能够在一个地方生长,并在某个地方建立种群,取决于影响其选择和扩散的多种生态因素。其中能够反映微生物不同代谢过程的生理适

应和遗传适应,是表征生态系统群落结构的重要参数之一。本研究测定了非对多酚氧化酶、过氧化氢酶的影响,结果显示降解能力较强的 BA27、BA19 菌株表现出较好的稳定性和耐受性,而降解能力稍差的 BA11 菌株则对非表现出一定的敏感性。由此推测,经驯化的菌株 BA27、BA19 能在以非为唯一碳源的条件下进行正常代谢,而对自身的生理没有强烈的刺激;BA11 的降解能力及代谢过程有可能受非转化过程中一系列中间产物的影响,使其表现出生理反应。有报道指出,在 PAHs 污染的土壤中,PAHs 的矿化存在共代谢方式^[1,4,5,11],因此作为应用于环境修复技术的预备菌株,可用于探索在复杂条件下细菌的降解能力,使 BA11 在共代谢的途径中充分发挥其生物降解功能。

通过对蛋白表达的研究,可以清楚地看到,BA27 产生了一条新的蛋白条带(27 000 Dal)。由于降解芳烃并不是生物体所必需的活动,在没有污染存在时这部分功能不表达。当生物体受到芳烃物质诱导时,就可以表达这部分降解基因。BA27 很可能在以非为唯一碳源的基础上,诱导表达了参与 PAHs 降解的重要蛋白质,如进一步将此特异蛋白进行分离纯化、活性测定,有可能揭示这种微生物对环境遗传适应的进化机制,探索土壤微生物净化的预警指标及方法。

参考文献

- Guo C, Sun W, Harsh JB, et al. 1997. Hybridization analysis of microbial DNA from fuel oil-contaminated and noncontaminated soil. *Microbiol Ecol*, 34(3): 178~187
- Guo C-L(郭楚玲), Zheng T-L(郑天凌), Hong H-S(洪华生). 2000. Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Sci*(海洋环境科学), 19(3): 24~29(in Chinese)
- Guo J-Y(郭杰严). 1986. Enzyme of Microorganism. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- Heitkamp MA, Freeman JP, Cerniglia CE. 1987. Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: Estimates of degradation rates and characterization of metabolites. *Appl Environ Microbiol*, 53(1): 129~36
- Jensen HL. 1963. Carbon nutrition of some microorganisms decomposing halogen-substituted aliphatic acids. *Acta Agric Scand*, 3: 404~412
- Mahmood SK, Rao PR. 1993. Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 50(4): 486~491
- Mihelcic JR, Luthy RG. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl Environ Microbiol*, 54(5): 1182~1187
- Sim JL, Sim RC, Matthews. 1990. Approach to bioremediation of contaminated surface soil. *EPA*, 60(1): 2006~2010
- Song Y-F(宋玉芳), Zhou Q-X(周启星), Xu H-X(许华夏), et al. 2002. Eco-toxicological effects of phenanthrene, pyrene and 1, 2, 4-trichlorobenzene in soils on the inhibition of root elongation of higher plants. *Acta Ecol Sin*(生态学报), 22(11): 166~171(in Chinese)

- nese)
- 10 Sun T-H(孙铁珩), Zhou Q-X(周启星), Li P-J(李培军). 2001. Pollution Ecology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
 - 11 Wilson SC, et al. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ Poll*, 81: 229~249
 - 12 Xia M-Q(夏麦茜), Zhang Z-J(张志杰), Sun X-F(孙先锋) et al. 2001. The study of degradation of anthracene, phenanthrene and pyrene by effective *Flavobacterium*. *Microbiology* (微生物学通报), 28(5): 32~36
 - 13 Xu G-H(许光辉). 1983. Analytic Method of Soil Microorganism. Beijing: Agricultural Press. (in Chinese)
 - 14 Zhang C-G(张春桂), Xu H-X(许华夏), Jiang Q-N(姜晴楠). 1997. Advances in researches of growth form of the clonal plant. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 16(4): 52~58(in Chinese)
 - 15 Zhang L-X(张龙翔). 1997. The Method and Technology of Biochemistry Experiment. Higher Education Press. (in Chinese)
 - 16 Zhou Q-X(周启星). 1998. Research progress on *in-situ* remediation of polluted land. *Poll Contr Technol* (污染控制技术), 11(4): 207~211(in Chinese)
 - 17 Zhou Q-X(周启星). 2002. Technological reformer and prospect of contaminated soil remediation. *Techn Equip Environ Poll Contrl* (环境污染治理技术与设备), 3(8): 36~40(in Chinese)
 - 18 Zhou Q-X(周启星). 2004. Methodology of enacting standards for remediation of contaminated soils. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 15(2): 316~320(in Chinese)
 - 19 Zhou Q-X(周启星), Cheng Y(程云), Zhang Q-R(张倩茹), et al. 2003. Quantitative analyses of relationships between ecotoxicological effects and combined pollution. *Sci China* (中国科学), 33(6): 566~573(in Chinese)
 - 20 Zhou Q-X(周启星), Huang G-H(黄国宏). 2001. Environmental Biogeochemistry and Global Environmental Changes. Beijing: Science Press. (in Chinese)
 - 21 Zhou Q-X(周启星), Shun S-J(孙顺江). 2002. International trends of applied ecology and its future development in China. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 13(7): 879~884(in Chinese)
 - 22 Zhou Q-X(周启星), Song Y-F(宋玉芳). 2001. Technological implications of phytoremediation and its application in environment protection. *J Saf Environ* (安全与环境学报), 1(3): 48~53(in Chinese)
 - 23 Zhou Q-X(周启星), Song Y-F(宋玉芳). 2004. Remediation of Contaminated Soil: Principles and Methods. Beijing: Science Press. (in Chinese)
 - 24 Zhou Q-X(周启星), Sun T-H(孙铁珩). 2000. Current situation of pollution eco-chemistry and its prospects. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 11(5): 795~798(in Chinese)
 - 25 Zhou Q-X(周启星), Wei S-H(魏树和), Zhang Q-R(张倩茹), et al. 2003. Origin of SARS from accelerated evolution of a virus by combined pollution. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(8): 1374~1378

作者简介 钟鸣,女,1971年生,副教授,主要从事分子生态学研究,发表论文8篇.E-mail: mingzh1@sina.com

欢迎订阅 2004 年《应用生态学报》

《应用生态学报》(1990年创刊)是经国家科委批准、科学出版社出版的国内外发行的综合性学术刊物。本刊宗旨是坚持理论联系实际、结合科研、教学、生产实际,报导生态科学诸领域在应用基础研究方面具有创新的研究成果,交流基础研究和应用研究的最新信息,促进生态学研究为国民经济建设服务。

本刊专门登载有关应用生态学(主要包括森林生态学、农业生态学、草地牧业生态学、渔业生态学、自然资源生态学、全球生态学、污染生态学、化学生态学、生态工程学等)的综合性论文、创造性研究报告和研究简报等。

本刊读者对象主要是从事生态学、地学、林学、农学和环境科学研究、教学、生产的科技工作者,有关专业的大学生及经济管理和决策部门的工作人员。

本刊与数十家相关学报级期刊建立了长期交换关系,《中国科学引文索引》、《中国生物学文摘》、美国《生物学文摘》(BA)、美国《化学文摘》(CA)、英国《生态学文摘》(EA)、日本《科学技术文献速报》(CBST)和俄罗斯《文摘杂志》(PJK)等十几种权威检索刊物均收录本刊的论文摘要(中英文),并被认定为《中国核心期刊(遴选)数据库》和《中国科学引文数据库》来源期刊。本刊的整体质量与水平已达到新的高度,1992年荣获全国优秀科技期刊三等奖和中国科学院优秀期刊二等奖,1996年荣获中国科学院优秀期刊三等奖,2000年荣获中国科学院优秀期刊二等奖,2001年入选中国期刊方阵双效期刊。

本刊为月刊,A4开本,176页,每月18日出版,期定价28.00元,全国各地邮政局(所)均可订阅,邮发代号8-98。错过订期也可直接向本刊编辑部邮购,个人订阅优惠30%。地址:110016辽宁省沈阳市文化72号《应用生态学报》编辑部。电话:(024)83970393,E-mail:cjae@iae.ac.cn