

菲的微生物酶促降解研究

陈继章, 张 卫, 施倬嘉, 乔建江, 徐圣友, 张大年

(华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237)

摘 要: 微生物降解是环境中菲去除的重要途径。为有效开展菲污染的微生物酶学治理, 采用室内模拟的方法, 从菲污染土壤中分离到一株高效降解菌株, 研究了其最适产酶条件。结果表明该菌株最适产酶条件为培养温度 35 ℃, 培养液起始 pH7.0, 培养时间 60 h, 而 Hg^{2+} 对该菌株产酶有显著抑制作用。从该优势菌中提取的粗酶液在 pH7.0 和 30 ℃ 时显示最大的降解活性, 其米氏常数为 $50.30 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最大降解速率为 $171.33 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

关键词: 菲; 酶促降解; 产酶条件; 酶性质

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)04-1623-04

Study on Microbial Enzymatic Degradation of Phenanthrene

CHEN Ji-zhang, ZHANG Wei, SHI Zhuo-jia, QIAO Jian-jiang, XU Sheng-you, ZHANG Da-nian

(School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Phenanthrene is one of most important PAHs, and the US Environmental Protection Agency has listed phenanthrene as priority pollutant for remediation. Therefore, it is essential and urgent to remove phenanthrene from the environment quickly and effectively. phenanthrene could be removed by many processes, including volatilization, photooxidation, chemical oxidation, bioaccumulation, and adsorption in the environment. The principle process for the successful removal and elimination of phenanthrene from contaminated environment is microbial transformation and degradation. In order to effectively carry out removal of phenanthrene, microbial enzymatic degradation of phenanthrene was studied by laboratory simulation. A bacterium which can effectively degrade phenanthrene was isolated from soil contaminated by phenanthrene. The optimal temperature, initial pH value and culture time for enzyme production were 35 ℃, 7.0, 60 h, respectively, and Hg^{2+} can distinctly inhibit enzyme production. The optimal pH value and temperature for enzymatic degradation were 7.0 and 30 ℃. The Michaelis-Menten's constant, maximum reaction rate and degradation rate of the crude enzyme extracted from the dominant bacterium were $50.30 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5.14 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ and $171.33 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Keywords: phenanthrene; enzymatic degradation; enzyme production condition; enzyme property

菲作为一类典型多环芳烃, 在环境中含量正持续增加, 对生态健康已构成严重威胁^[1-3]。近年来研究表明, 微生物降解作用是环境中菲分解与转化的重要途径, 利用微生物治理菲污染是一种有效方法, 已显示出良好的应用前景^[3-9]。微生物降解有机物的本质是酶促降解。作者从被菲长期污染的土壤中分离到一株优势菌, 主要研究了该菌株产酶条件和酶的基本性质,

发现其培养物中提取的粗酶液对菲具有较好的降解效果, 从而为开展菲污染的酶学控制提供了科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

超净工作台、高低速离心机、摇床和超声波细胞破碎机等仪器, 试剂均为 A.R. 级。

1.2 生长量测定

菌株生长量测定以波长为 500 nm 处的 OD 值表示。

1.3 粗酶液提取

1.3.1 胞内酶

将已培养好的优势菌菌体离心处理 (4 000 r ·

收稿日期: 2007-07-31

基金项目: 国家自然科学基金 (20677015); 国家高技术研究发展计划 (2007AA06Z300); 国家科技部世博专项 (2005BA908B16); 中国博士后科学基金 (20070420094)

作者简介: 陈继章 (1977—), 男, 博士生, 主要从事环境污染安全性评价研究。

通讯作者: 张 卫 E-mail: wzhang@ecust.edu.cn

min^{-1})10 min, 去除上清液, 沉淀菌体用 $2 \times 10 \text{ mL}$ pH7.5 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液洗涤。加入适量缓冲液, 然后用超声波细胞破碎机处理 20 min, 处理时间隔操作, 然后用高速冷冻离心机离心 ($15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)10 min, 上清液即为胞内酶粗提液。

1.3.2 胞外酶

将已培养好的优势菌菌体离心处理 ($4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)10 min, 去除沉淀菌体后的上清液, 边搅拌边加入硫酸铵至饱和度为 100%。4 °C 盐析过夜, 离心 ($4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)10 min, 收集沉淀, 用 pH7.5 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液溶解, 再用同一缓冲液透析至无 SO_4^{2-} , 得胞外酶粗提液。

1.4 蛋白质浓度的测定

粗酶液的蛋白含量按 Bradford 法测定^[10]。

1.5 菲浓度的测定

样品菲含量由校分析测试中心岛津高效液相色谱仪 (LC-10ATVP HPLC) 测定。

1.6 优势菌酶促降解

将 9 mL 分别含 10、20、40、50、80 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菲的 pH7.5 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液和 1 mL 优势菌粗酶液在 35 °C 培养箱中反应 20 min, 用三氯醋酸终止反应, 测定浓度对反应速率的影响。一个酶活单位 (U) 定义为每分钟降解 $1 \mu\text{g}$ 菲所需的粗酶液量。

2 结果与分析

2.1 优势菌降解酶的定位

分别测定胞内酶和胞外酶粗提液对菲的降解能力。结果表明, 只有菌体存在时才有降解活性, 而去除沉淀菌体后的上清液对菲没有降解活性, 故可推测降解酶存在于细胞内, 即胞内酶。

2.2 优势菌生长和产酶条件

2.2.1 培养温度对菌株生长和产酶的影响

由图 1 可知, 菌株生长和产酶的最适温度为 35 °C, 此时菌株 OD_{500} 为 0.28, 酶比活达到 $80.5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2.2 培养液 pH 值对菌株生长和产酶的影响

由图 2 可知, 菌株生长和酶活性在 pH 值 6.0~8.0 之间比较稳定, 其中在 pH7.0 时效果最佳, 菌株 OD_{500} 为 0.28, 酶比活达到 $79.6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

2.2.3 金属离子对菌株生长和产酶的影响

取活化后菌株接种于含 0.01% 金属离子 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 和 Ca^{2+} 的培养液中, 培养后菌株生长量和酶活力结果如表 1 所示。

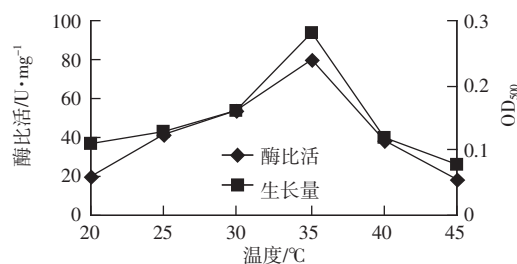


图 1 温度对菌株生长和产酶的影响

Figure 1 The effect of temperature on strain biomass and enzyme production

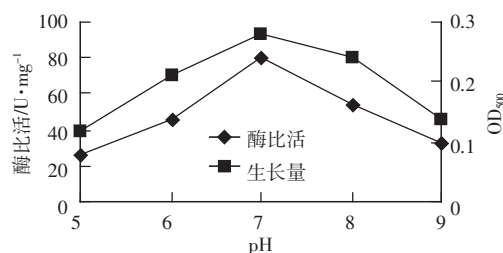


图 2 pH 值对菌株生长和产酶的影响

Figure 2 The effect of pH value on strain biomass and enzyme production

表 1 金属离子对菌株生长和产酶的影响

Table 1 The effect of metal ions on strain biomass and enzyme production

金属离子	生长量	酶比活/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
CK	0.28	80.5
Al^{3+}	0.23	64.8
Fe^{2+}	0.25	72.6
Cu^{2+}	0.21	62.1
Co^{2+}	0.12	21.9
Hg^{2+}	0.05	12.3
Ca^{2+}	0.21	59.7

由表 1 可知, Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 等金属离子对菌株生长和酶活性影响不大, 而 Hg^{2+} 和 Co^{2+} 对菌株生长和酶活性均有明显的抑制作用, 其中以 Hg^{2+} 最为显著, 酶比活只有对照的 15%。

2.2.4 培养时间对菌株生长和产酶的影响

由图 3 可知, 菌株生长量和酶活力具有一定的一致性。开始时菌株生长处于延迟期, 酶活力非常低; 随着菌株进入对数期, 酶活力显著增加, 到 60 h 达到最大值, 为最佳培养时间; 进一步研究发现, 由于营养成分的缺失以及代谢废物的增多, 菌株生长进入衰退期, OD_{500} 值开始下降, 酶活力也相应下降。

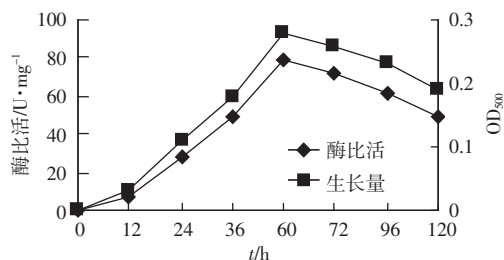


图 3 培养时间对菌株生长和产酶的影响

Figure 3 The effect of culture time on strain biomass and enzyme production

2.3 优势菌粗酶液的基本性质

2.3.1 pH 值对酶活的影响

酶活力以最大活力的百分率表示。由图 4 可知,粗酶液降解菲的最适 pH 值为 7.0, 酶活力在 pH 值 6.5~7.5 之间较稳定,能保持最高酶活的 75% 以上。

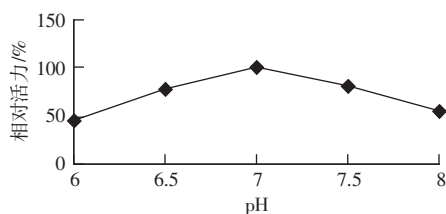


图 4 pH 值对酶活的影响

Figure 4 The effect of pH value on enzyme activity

2.3.2 酶的 pH 值稳定性

由图 5 可知,保温 25 h 后粗酶液在 pH 值 7.0~8.0 活力较稳定,分别能保持初活力的 85% 和 81% 以上,而在 pH 值 6.0 和 pH 值 9.0 时粗酶液易于变性失活,25 h 后其活力仅能保持最高酶活的 43% 和 45%。

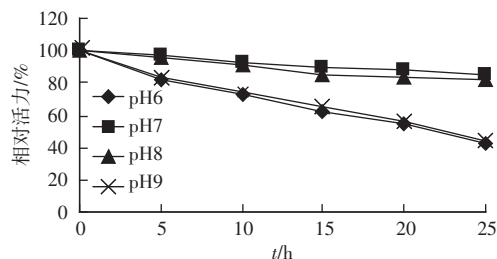


图 5 酶的 pH 值稳定性

Figure 5 Enzyme stability at different pH value

2.3.3 温度对酶活的影响

由图 6 可知,粗酶液在试验温度范围内能保持较好的降解活性,粗酶液降解菲的最适温度为 30 °C,酶活力在 25~35 °C 之间较稳定,温度越高,酶活下降越快。

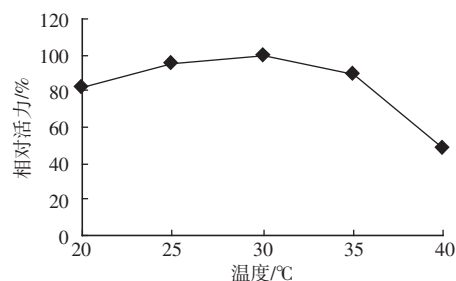


图 6 温度对酶活的影响

Figure 6 The effect of temperature on enzyme activity

2.3.4 酶的热稳定性

由图 7 可知,粗酶液在 25 °C 时较为稳定,保温 25 h 后仍能保持初活力的 88% 以上,30 °C 和 35 °C 时粗酶液稳定性较差,25 h 后其活力仅能保持最高酶活的 44% 和 38%,而 40 °C 时粗酶液活力无法维持稳定,25 h 后剩余酶活仅 20%,可见温度对降解酶活性影响较大。

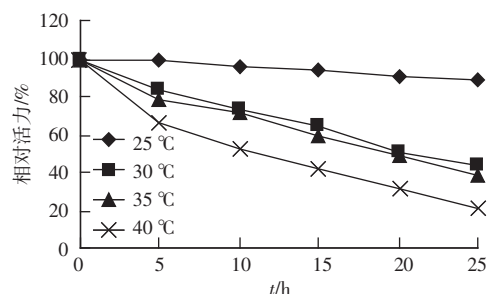


图 7 酶的热稳定性

Figure 7 Enzyme stability at different temperature

2.4 优势菌粗酶液米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})

根据菲浓度和测得的粗酶液反应速率作 Lineweaver-Burk 图(见图 8),求得粗酶液降解菲的米氏常数(K_m)为 50.30 nmol·mL⁻¹,最大反应速率(V_{max})为

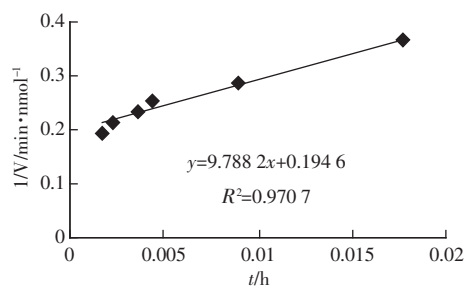


图 8 粗酶液的 Lineweaver-Burk 图

Figure 8 Lineweaver-Burk plot of the crude enzyme

$5.14 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r=0.9852$)。经测定,粗酶液中可溶性蛋白含量为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 因此粗酶液对菲的最大降解速率为 $171.33 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

3 结论

(1)从污染土壤中分离到的优势菌降解酶存在于细胞内,为胞内酶。

(2)优势菌最佳产酶条件:培养温度 35°C , 培养液起始 $\text{pH}7.0$, 培养时间 60 h 。

(3)从优势菌中提取的粗酶液在 $\text{pH}7.0$ 和 30°C 时显示最大的降解活性。

(4)粗酶液米氏常数为 $50.30 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最大反应速率为 $5.14 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$, 最大降解速率为 $171.33 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] Susan C, Wilson, Kevin C, et al. Bioremediation of soil contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Environmental Pollution*, 1993, 81: 229-249.
- [2] 王连生. 环境化学进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995. 315-344.
WANG Lian-sheng. *Advances in Environmental Chemistry* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1995. 315-344.
- [3] 周德平, 夏颖, 韩如昉, 等. 三株菲降解细菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2003, 23(1): 124-128.
ZHOU De-ping, XIA Ying, HAN Ru-yang, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of three phenanthrene-degrading bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2003, 23(1): 124-128.
- [4] 盛下放, 何琳燕, 龚建勋. 二株假单胞菌的疏水性及其对菲的降解能力[J]. 环境科学学报, 2004, 24(5): 942-944.
SHENG Xia-fang, HE Lin-yan, GONG Jian-xun. The hydrophobicity of two strains of pseudomonas and their degradation of phenanthrene[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(5): 942-944.
- [5] 仇磊, 袁红莉. 一株菲降解细菌的分离及其特性[J]. 环境科学, 2005, 26(1): 159-163.
ZHANG Lei, YUAN Hong-li. Screening for phenanthrene-degrading bacteria and its characteristics [J]. *Environmental Science*, 2005, 26(1): 159-163.
- [6] 王新, 李培军, 巩宗强, 等. 固定化微生物降解土壤中菲和芘的研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(4): 636-638.
WANG Xin, LI Pei-jun, GONG Zong-qiang, et al. Degradation of phenanthrene and Pyrene in contaminated soil by immobilized *Zoogloea* sp. and *Fusarium* sp.[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(4): 636-638.
- [7] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 利用改进的生物反应器研究不同通气条件下土壤中菲的降解[J]. 土壤学报, 2004, 41(2): 245-251.
DING Ke-qiang, LUO Yong-ming, LIU Shi-liang, et al. Degradation of phenanthrene in soil at different aeration rates using modified biological reactor[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(2): 245-251.
- [8] 杨建刚, 刘翔, 余刚, 等. 非离子表面活性剂 Tween20 对菲生物降解的影响[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 53-56.
YANG Jian-gang, LIU Xiang, YU Gang, et al. The influence on the biodegradation of phenanthrene by nonionic surfactant, Tween20[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(1): 53-56.
- [9] 聂麦茜, 张志杰, 赵桂芳, 等. 共基质对优势菌降解多环芳烃的作用研究[J]. 环境科学研究, 2001, 14(5): 30-32.
NIE Mai-qian, ZHANG Zhi-jie, ZHAO Gui-fang, et al. The study on effects of co-substrates on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by preponderant bacteria[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2001, 14(5): 30-32.
- [10] Bradford M R M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-255.