

持久性有机污染物 γ -六六六生物降解研究进展*张海燕^{1,2} 李梅¹ 邱星辉^{1,*}

(中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101) (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 γ -六六六(γ -Hexachlorocyclohexane, γ -HCH)是一种有机氯杀虫剂,由于它具有持久性和很高的毒性,成为顽固性的世界性污染物。目前从世界上不同的受 HCH 污染的地区中已经分离出许多能够降解 HCH 的微生物,其中一些微生物对 γ -HCH 的降解途径得到了阐明,降解基因/酶也得到了鉴定。综述了 γ -HCH 降解菌的多样性、降解途径、降解基因和酶,为 γ -HCH 的生物修复提供了参考。

关键词 γ -六六六,持久性,生物降解,lin 基因,lin 酶

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0965-05

Advances in Biodegradation of Organochlorine Insecticide γ -HCH*ZHANG Hai-Yan^{1,2} LI Mei¹ QIU Xing-Hui^{1,*}

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract γ -Hexachlorocyclohexane (γ -HCH) is an organochlorine insecticide, it has been listed recalcitrant worldwide pollutant due to its toxicity, environmental persistence. Microorganisms capable of degrading γ -HCH have been isolated, several genes encoding the enzymes involved in the degradation of γ -HCH have been cloned and characterized. In this article, we summarized the current progress regarding γ -HCH biodegradation, with emphasis on the diversity of microorganisms degrading γ -HCH, the biodegradative pathway and relevant genes and enzymes.

Key words γ -Hexachlorocyclohexane, Persistence, Biodegradation, lin genes, Lin enzymes

六六六(Hexachlorocyclohexane, HCH, 图 1)是一种广谱性的有机氯杀虫剂,主要由 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种异构体构成,在这 4 种异构体中,只有 γ -HCH 具有杀虫活性,主要用来防治农作物害虫^[1]。

HCH 由于低水溶性和高氯状态,在环境中非常稳定。在斯德哥尔摩公约中, HCH 已经被列为 12 种持久性有机污染物之一。其异构体的相对持久性与氯原子在环己烷结构上的排列方式有关,持久性顺序为 β -HCH > δ -HCH > γ -HCH > α -HCH^[2,3]。HCH 具有挥发性,能通过大气传播,导致全球范围的污染^[4]。研究表明, HCH 为环境内分泌干扰物,具有类雌激素行为,干扰体内正常内分泌物质的合成与代谢,可导致生殖和发育障碍,残留的 HCH 对人类和动物的健康构成了严重的威胁^[5]。

目前对有机氯杀虫剂的脱毒措施主要依赖于

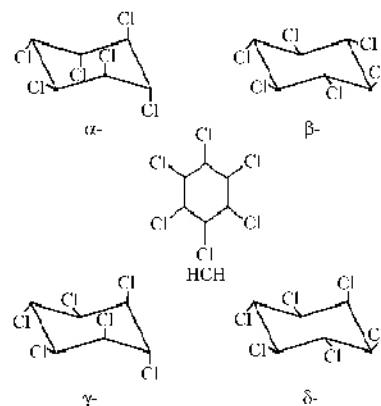


图 1 HCH 的化学结构

化学处理、焚烧、填埋,而这些方法都不能彻底解决问题,而且代价昂贵。生物修复是用生物体来去除环境污染物,已成为一种可靠的有前途的修复技术。因此,能够降解 γ -HCH 的微生物受到了人们的

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-SW-128)

** 通讯作者 Tel 010-64807231, E-mail: qiuqxh@ioz.ac.cn

收稿日期:2006-11-23,修回日期:2007-02-17

高度重视,它们成为污染地生物修复的重要资源。本文综述了降解 γ -HCH 的微生物、 γ -HCH 的生物降解途径、降解基因和酶。

1 降解 γ -HCH 的微生物

通过富集培养分离出许多能够降解 γ -HCH 的

微生物(表 1),包括细菌、真菌等。细菌由于其生化上的多种适应能力以及易诱发突变菌株,在降解 γ -HCH 的微生物中占重要地位。

表 1 降解 HCH 的微生物

微生物	降解特性	参考文献
Bacteria	Aerobic degradation	
<i>Sphingomonas</i> sp. DS3-1	Dechlorination (α γ δ and β -HCH)	6
<i>Sphingomonas</i> sp. BHC-A	Mineralization (α γ δ and β -HCH)	7
<i>Pseudomonas</i> sp.	Dechlorination (γ -HCH)	8
<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	Dechlorination (α and γ -HCH)	9
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> B90	Mineralization (α β δ and γ -HCH)	10
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> UT26	Mineralization(γ -HCH); Dechlorination (α and δ -HCH)	11
<i>Microbacterium</i> sp. ITRC1	Mineralization (α γ δ and β -HCH)	12
	Anaerobic degradation	
<i>Citrobacter freundii</i>	Dechlorination (γ -HCH)	13
<i>Clostridium rectum</i> S-17	Dechlorination (γ -HCH)	14
<i>Clostridium sphenoides</i> UQM780	Utilized as sole carbon source (α β δ and γ -HCH)	15
Fungi	Aerobic degradation	
<i>Cyathus bulleri</i>	Dechlorination (γ -HCH)	16
white rot fungus DSPM95	Dechlorination (γ -HCH)	17
<i>Phanerochaete sordida</i>	Dechlorination (γ -HCH)	16
<i>Trametes hirsutus</i>	Dechlorination (γ -HCH)	18
<i>Penicillium camemberti</i>	Dehalogenation(γ -HCH)	19

2 γ -HCH 的降解途径

2.1 厌氧降解途径

在稻田土壤中 γ -HCH 厌氧降解较快^[20]。分离出来的第一株 γ -HCH 厌氧降解菌是 *Clostridium sphenoides* UQM780^[15],它降解 γ -HCH 产生 γ -3,4,5,6-四氯环己烯^[21]。*Clostridium rectum* S-17 是从稻田土壤中分离出来的,它厌氧降解 γ -HCH 也产生 γ -3,4,5,6-四氯环己烯^[14]。四氯环己烯也是 *Citrobacter freundi*、*Clostridium* sp. 和 *Bacillus* sp. 厌氧降解 γ -HCH 的中间代谢物^[13]。 γ -HCH 的厌氧降解途径如图 2^[13,21]所示。

2.2 好氧降解途径

在好氧条件下,虽然 γ -HCH 在土壤中非常持久^[22],但至今已经分离到多株可在好氧条件下降解

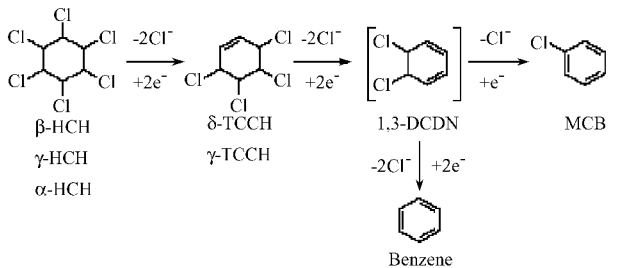


图 2 HCH 的厌氧降解途径

HCH 六六六, TCCH 四氯环己烯, 1,3-DCDN 1,3-二氯环己二烯, MCB 单氯苯, Benzene 苯

γ -HCH 的细菌(表 1)。*Sphingomonas paucimobilis* UT26 是从日本连续 12 年施用 γ -HCH 的旱田土壤中分离出来的^[23], γ -HCH 的好氧降解途径在 UT26 中研究的最为清楚,由上游途径和下游途径组成(图 3)^[24,25]。在上游途径中, γ -HCH 被转化成 2,5-二氯

氢醌^[24],在下游途径中,2,5-二氯氢醌脱氯形成氯氢醌,氯氢醌再被转化为马来酰乙酸^[24]。马来酰乙酸是酚类化合物降解途径中的一个主要中间代谢物,它被转化为 β -酮己二酸^[25]。 β -酮己二酸能被广泛分布于土壤中的细菌和真菌代谢降解,最终导致 γ -HCH的矿化^[26]。

Sphingomonas paucimobilis B90 和 *Rhodanobacter lindaniclasticus* 分别是印度和法国土壤中分离出来的,这两株菌好氧降解 γ -HCH时都产生了和 UT26 相似的中间代谢物^[27,28],推测它们具有相似的降解途径。

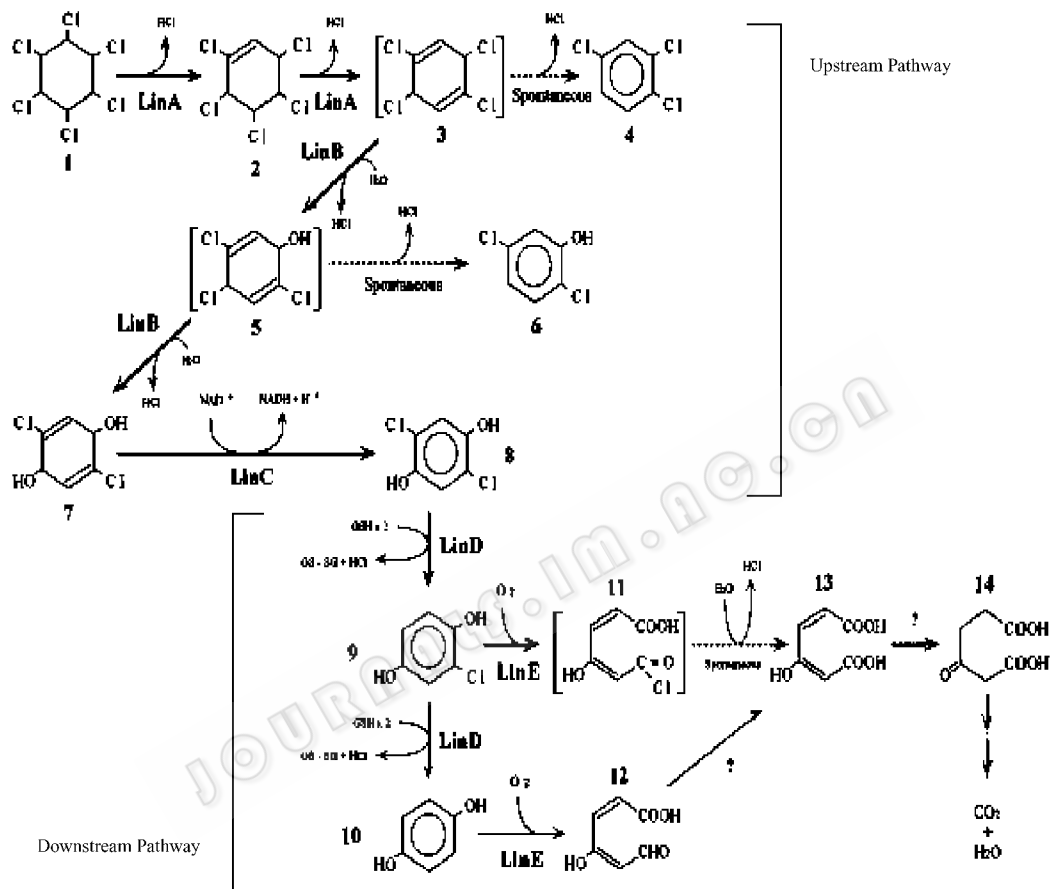


图3 γ -HCH 的好氧降解途径

1 γ -六六六, 2 γ -五氯环己烯, 3 1,4-四氯环己二烯, 4 1,2,4-三氯苯, 5 2,4,5-三氯环己二烯醇, 6 2,5-二氯酚, 7 2,5-二氯环己二烯醇, 8 2,5-二氯氢醌, 9 氯氢醌, 10 氢醌, 11 酰氯, 12 羟基己二酸半醛, 13 马来酰乙酸, 14 β -酮己二酸, GSH 谷胱甘肽

3 γ -HCH 的降解基因和酶

γ -HCH 是一种高度氯化的化合物,每个分子含有 6 个氯原子,脱氯是降解过程中非常重要的步骤^[24]。 γ -HCH 的降解基因最先是在 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 中发现的,命名为 *lin* 基因^[24]。在 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 中,分离到 6 个结构基因(*linA*、*linB*、*linC*、*linD*、*linE*、*linF*)^[22,25,29~32]和一个调节基因 *linR*^[33]。另外也鉴定了 *linX*,它编码的蛋白质和 *LinC* 具有相似的活性^[30]。已知的 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 的 γ -HCH 降解基因

和酶如下:

3.1 *linA*/*LinA* (γ -HCH dehydrochlorinase)

linA 由 465bp 组成,编码 γ -HCH 脱氯化氢酶(*LinA*),分子量为 17.2 kD^[22]。*LinA* 催化起始的两步脱氯化氢反应,将 γ -HCH 经过 γ -五氯环己烯转化为不稳定的代谢物 1,4-四氯环己二烯,1,4-四氯环己二烯能自发脱氯形成 1,2,4-三氯苯^[11]。

LinA 底物范围很窄,除了 γ -HCH、 γ -五氯环己烯、 α - δ -HCH 外,对 β -HCH 和其他氯化物没有活性^[34]。*LinA* 脱氯化氢时,不需要辅助因子,和其它酶也没有同源性,被归为一类新的脱氯化氢酶^[22]。

3.2 *linB*/*LinB* (1,4-TCDN halohydrase)

linB 由 885bp 组成,编码 1,4-四氯环己二烯卤化物水解酶(*LinB*),分子量为 32 kD^[29]。*LinB* 催化两步水解脱卤反应,将 1,4-四氯环己二烯经过 2,4,5-三氯环己二烯醇转化为 2,5-二氯环己二烯醇,2,4,5-三氯环己二烯醇也能自发脱氯形成 2,5-二氯酚^[29]。1,2,4-三氯苯和 2,5-二氯酚是两个致死终端产物,分别是从不稳定的二烯中间物 1,4-四氯环己二烯和 2,4,5-三氯环己二烯醇自发形成的稳定产物^[29]。

LinB 属于 α/β 水解酶家族,与 *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 的卤代烷烃脱卤酶 *DhlA* 有 29.3% 的相似性^[29]。*LinB* 偏好长链卤代烷烃,而 *DhlA* 偏好短链卤代烷烃^[35]。*LinB* 的底物范围比较广,对单氯烷烃($C_3 \sim C_{10}$)、二氯烷烃、溴代烷烃、氯代脂族醇都有活性^[35]。最近报道 *LinB* 也能转化 β -HCH 和 δ -HCH 为 2,3,4,5,6-五氯环己醇^[36]。

3.3 *linC*/*LinC* (2,5-DDOL dehydrogenase)

linC 由 750bp 组成,编码 2,5-二氯环己二烯二醇脱氢酶(*LinC*),分子量为 25.6 kD^[30]。*LinC* 催化一步脱氢反应,将 2,5-二氯环己二烯二醇转化为 2,5-二氯氢醌^[30]。*linX* 也由 750bp 组成,编码的蛋白质 *LinX* 和 *LinC* 具有 33.1% 的相似性,似乎催化相同的反应,都被归为短链醇脱氢酶超家族^[30]。

3.4 *linD*/*LinD* (2,5-DCHQ reductive dehalogenase)

linD 由 1038bp 组成,编码 2,5-二氯氢醌还原脱卤酶(*LinD*),分子量为 38.7 kD^[31]。*LinD* 催化两步脱卤反应,将 2,5-二氯氢醌经过氯氢醌转化为氢醌^[31]。尽管 *LinD* 能将氯氢醌转化为氢醌,但反应非常慢^[31]。氯氢醌降解的替代途径在 UT26 中也存在^[32]。*linD* 的表达受到 2,5-二氯氢醌的诱导,在谷胱甘肽存在的情况下,表达在 *E. coli* 中 *LinD* 的活性增加了 3.7 倍。因此, *LinD* 是一个谷胱甘肽依赖的还原脱卤酶^[31]。它与 *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 的 *PepC* 有一些相似性^[31]。

3.5 *linE*/*LinE* (CHQ 1,2-dioxygenase)

linE 由 963bp 组成,编码氯氢醌 1,2-双加氧酶(*LinE*),分子量为 36.0 kD^[32]。*LinE* 对氢醌的活性较底,它裂解氯氢醌产生酰氯,酰氯自发地与水发生反应,脱去一个氯化氢形成马来酰乙酸^[32]。*LinE*

对氯氢醌的活性比 *LinD* 高,氯氢醌很可能主要被 *LinE* 降解,通过氢醌途径降解是很微弱的^[24]。

LinE 与 *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 的 *PcpA* 具有 51% 的相似性,而与间位裂解双加氧酶的同源性很低,是一类新型的间位裂解双加氧酶,是第一个被报道的偏好在对位上具有两个羟基的氢醌类和酚类化合物的酶^[32]。

linA、*linB*、*linC* 位于 UT26 的基因组上,它们相互独立存在,组成型表达,在上游途径中起作用^[24]。*linD* 和 *linE* 形成一个操纵子,在下游途径中发挥作用,是在氢醌类化合物(氯氢醌、氢醌、2,5-二氯氢醌)存在的情况下被诱导表达^[31,32],它们的表达受到转录调节因子 *LinR* 的正调控^[33]。

3.6 *linR*/*LinR* (transcriptional regulator)

linR 是一个调节基因,由 909bp 组成,编码转录调节因子(*LinR*),分子量为 33.6 kD^[33]。*linR* 具有一个 TN11A 的回文序列,是 *LinR* 识别结合的部位^[37]。*LinR* 特异性的识别单氯氢醌和二氯氢醌类化合物,调节 *linD* 和 *linE* 的诱导表达^[33]。*LinR* 和 *LysR* 类转录调节因子(LTRs)具有相似性,LTRs 家族是原核细胞中普遍存在的^[37]。

3.7 *linF*/*LinF* (MA reductase)

linF 由 1056bp 组成,编码马来酰乙酸还原酶(*LinF*),分子量为 38.0 kD^[25]。*LinF* 能将马来酰乙酸转化为 β -酮己二酸,对 UT26 利用 γ -HCH 是必需的,它与 *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 的 *PcpE* 具有 92% 的相似性^[25]。在氯酚化合物的降解中,*LinF* 不仅能转化马来酰乙酸,也能转化马来酰氯乙酸为 β -酮己二酸^[25]。

在其它降解菌株中也陆续发现了和 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 相似或同源的 *lin* 基因。从 *Rhodanobacter lindaniaceticus* 中克隆到的 *linA* 和 *linB* 与 UT26 的 *linA* 和 *linB* 高度同源^[28]。*Sphingomonas paucimobilis* B90 有两个不同的 *linA* 拷贝,命名为 *linA*₁ 和 *linA*₂, *linA*₁ 和 *linA*₂ 具有 92% 的相似性^[27]。*linA*₁ 与 UT26 的 *linA* 具有 88% 的相似性,*linA*₂ 与 UT26 的 *linA* 具有 99% 的相似性^[38]。从 *Sphingomonas paucimobilis* B90 中克隆到的 *linB*、*linC* 和 *linX* 基因与 UT26 中相应的基因具有 99% 的相似性^[27]。*Sphingomonas paucimobilis* B90A 的 *LinB* 也能将 β -HCH 和 δ -HCH 转化为 2,3,4,5,6-五

氯环己醇,还能将 2,3,4,5,6-五氯环己醇进一步转化为相应的四氯环己二醇^[36]。*Sphingomonas* sp. BHC-A 的 LinB 能将 β -HCH 转化为 2,3,4,5,6-五氯环己醇,也能将 2,3,4,5,6-五氯环己醇转化为 2,3,5,6-四氯-1,4-环己二醇^[39]。

4 结语

随着新的降解微生物、降解酶的发现以及分子生物学技术的发展,生物降解技术将在包含 γ -HCH 在内的持久性有机污染物的清除中起着越来越重要的作用。目前正在对 *lin* 基因的组织 and 多样性进行研究,通过对 *lin* 基因的分子遗传学、多样性、分布以及降解 HCH 异构体潜力的进一步了解,有助于发展有效的生物降解技术,用于 HCH 污染地点的生物修复。

参考文献

- [1] Willett K L, Ulrich E M, Hites R A. Environ Sci Technol, 1998, **32**: 2197 ~ 2207.
- [2] Deo P G, Karanth N G, Karanth N G K. Crit Rev Microbiol, 1994, **20**: 57 ~ 78.
- [3] Beurskens J E M, Stams A J M, Zehnder A J B, et al. Ecotoxicol Environ Saftey, 1991, **21**: 128 ~ 136.
- [4] Galiulin R V, Bashkin V, Galiulina R A. Water Air Soil Pollut, 2002, **137**: 179 ~ 191.
- [5] 刘国红, 杨克敌, 刘西平, 等. 卫生研究, 2005, **34**(5): 524 ~ 528.
- [6] Boltner D, Moreno-Morillas S, Ramos J L. Environmental Microbiology, 2005, **7**(9): 1329 ~ 1338.
- [7] 马爱芝, 武俊, 汪婷, 等. 微生物学报, 2005, **45**(5): 728 ~ 732.
- [8] Nawab A, Aleem A, Malik A. Biores Technol, 2003, **88**: 41 ~ 46.
- [9] Thomas J C, Berger F, Jacquier M, et al. J Bacteriol, 1996, **178**: 6049 ~ 6055.
- [10] Adhya T K, Apte S K, Raghu K, et al. Biochem Biophys Res Commun, 1996, **221**: 755 ~ 761.
- [11] Nagasawa S, Kikuchi R, Nagata Y, et al. Chemosphere, 1993, **26**: 1719 ~ 1728.
- [12] Manickam N, Mau M, Schlomann M. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, **69**: 580 ~ 588.
- [13] Jagnow G, Haider K, Ellwardt P. Arch Microbiol, 1977, **115**: 285 ~ 292.
- [14] Ohisa N, Yamaguchi M. Agric Biol Chem, 1978, **42**: 1819 ~ 1823.
- [15] MacRae I C, Raghu K, Bautista E M. Nature, 1969, **221**: 859 ~ 860.
- [16] Singh B K, Kuhad R C. Pest Manag Sci, 2000, **56**: 142 ~ 146.
- [17] Tekere M, Ncube I, Read J S, et al. Environ Technol, 2002, **23**: 199 ~ 206.
- [18] Singh B K, Kuhad R C. Lett Appl Microbiol, 1999, **28**: 238 ~ 241.
- [19] Taseli B K. B Environ Contam and Tox, 2006, **77**(6): 882 ~ 887.
- [20] MacRae I C, Raghu K, Castro T F. J Agric Food Chem, 1967, **15**: 911 ~ 914.
- [21] Heritage A D, MacRae I C. Appl Environ Microbiol, 1977, **33**: 1295 ~ 1297.
- [22] Imai R, Nagata Y, Fukuda M, et al. J Bacteriol, 1991, **173**: 6811 ~ 6819.
- [23] Senoo K, Wada H. Soil Sci Plant Nutr, 1989, **35**: 79 ~ 87.
- [24] Nagata Y, Miyauchi K, Takagi M. J Ind Microbiol Biotechnol, 1999, **23**: 380 ~ 390.
- [25] Endo R, Kamakura M, Miyauchi K, et al. J Bacteriol, 2005, **187**: 847 ~ 853.
- [26] Harwood C S, Parales R E. Annu Rev Microbiol, 1996, **50**: 553 ~ 590.
- [27] Kumari R, Subudhi S, Suar M, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 6021 ~ 6028.
- [28] Thomas J C, Berger F, Jacquier M, et al. J Bacteriol, 1996, **178**: 6049 ~ 6055.
- [29] Nagata Y, Nariya T, Ohtomo R, et al. J Bacteriol, 1993, **175**: 6403 ~ 6410.
- [30] Nagata Y, Ohtomo R, Miyauchi K, et al. J Bacteriol, 1994, **176**: 3117 ~ 3125.
- [31] Miyauchi K, Suh S K, Nagata Y, et al. J Bacteriol, 1998, **180**: 1354 ~ 1359.
- [32] Miyauchi K, Adachi Y, Nagata Y, et al. J Bacteriol, 1999, **181**: 6712 ~ 6719.
- [33] yauchi K, Lee H S, Fukuda M, et al. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 1803 ~ 1807.
- [34] Nagata Y, Hatta T, Imai R, et al. Biosci Biotech Biochem, 1993, **57**: 1582 ~ 1583.
- [35] Nagata Y, Miyauchi K, Damborsky J, et al. Appl Environ Microbiol, 1997, **63**: 3707 ~ 3710.
- [36] Sharma P, Raina V, Kumari R, et al. Applied and Environmental Microbiology, 2006, **72**(9): 5720 ~ 5727.
- [37] Schell M A. Annu Rev Microbiol, 1993, **47**: 597 ~ 626.
- [38] Dogra C, Raina V, Pal R, et al. J Bacteriol, 2004, **186**: 2225 ~ 2235.
- [39] Wu J, Hong Q, Han P, et al. Appl Microbiol Biot, 2007, **73**(5): 1097 ~ 1105.