

氯代苯胺类化合物微生物降解的研究进展*

任华峰^{1,2} 李淑芹² 刘志培^{1* * *}

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)¹ (东北农业大学资源与环境学院 哈尔滨 150030)²

摘要: 对氯代苯胺类化合物 (Chloroanilines, CAS) 好氧微生物降解的研究现状进行了系统的综述, 内容包括具有降解氯代苯胺类化合物能力的微生物、氯代苯胺类化合物的代谢途径及相关代谢酶的分析、降解质粒和关键代谢酶的基因克隆和表达, 并提出了氯代苯胺类化合物好氧微生物降解研究中存在的问题和尚需进一步研究的方面。

关键词: 氯代苯胺类化合物, 降解菌, 代谢途径, 降解酶, 基因克隆

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0120-06

A Brief Review on the Biodegradation of Chloroanilines*

REN Hua-Feng^{1,2} LI Shu-Qin² LIU Zhi-Pei^{1* * *}

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)¹

(College of Environment and Resource, North East Agricultural University, Harbin 150030)²

Abstract: Since 1970's, lots of studies on biodegradation of chloroanilines (CAS) have been done, especially, in these aspects: species and capability of the microbes; metabolic pathway; gene cloning, expression of degradation plasmid and pivotal metabolic enzymes. It is necessary for us to review the study on biodegradation of chloroanilines in order to summarize some useful results and the problems in this study.

Key words: Chloroanilines, Biodegradation, Metabolic pathway, Enzyme, Gene cloning

氯代芳烃类化合物是一类污染面积广、毒性较大的化合物, 广泛存在于纺织、皮革鞣制、干洗废液等工业废水中, 且大多具有致畸、致癌、致突变效应。作为环境外来物, 天然微生物缺乏降解此类化合物的酶或酶系, 通常难以生物降解, 持久滞留于环境, 并易于生物富集, 对生态环境和人体健康构成威胁。在美国环保署 (EPA) 所列的 129 种优先污染物中占 25 种之多, 受到人们的日益关注。作为氯代芳烃化合物的一族, 氯代苯胺类化合物在杀虫剂、染料、塑料和药物等的合成中大量使用, 广泛污染环境。另外, 除了直接进入自然界的氯代苯胺外, 它又是氯代硝基芳烃化合物和除草剂的常见中间代谢产物。据报道, 由于物理和化学吸收、土壤及其腐质基质的吸附作用, 施用除草剂的土壤在多年后仍有氯代苯胺的存在。但物理化学方法的高成本及产生二次污染, 研究氯代苯胺类化合物的微生物降解, 具有重要的生态环境和社会效益。多年来, 国外研究者对氯代苯胺的微生物降解研究做了大量工作, 发现和分离了一些可以降解此类化合物的降解菌, 并对其降解特性、降解机理、代谢途径及相关降解酶甚至降解基因的调控表达进行了较深入的研究。本文旨在将有关方面的研究做一简要介绍。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2002AA601150)

Project of Chinese National Program for High Technology Research and Development (No. 2002AA601150)

* * 联系人 E-mail: liuzhipei@hotmail.com

收稿日期: 2003-08-18, 修回日期: 2003-12-30

1 氯代苯胺降解菌

迄今为止,已经发现和分离了一些可以降解氯代苯胺化合物的降解菌。表 1 列举了活性较高的微生物,其中大部分属于变形菌纲(Proteobacteria)。Zeyer 和 Kearney 在 1982 年首次在纯培养条件下,从土壤中分离出一株以氯代苯胺类化合物为唯一碳源、氮源和能源的假单胞菌 G (*Pseudomonas* sp.),该菌在好氧条件下可完全降解 3 mmol/L (385 mg/L) 的对氯苯胺(4-CA),通过测定¹⁴C 标记的 4-CA 的降解,发现 64% 的碳以 CO₂ 的形式释放,14% 的碳成为生物有机体^[1]。Micheal 等从土壤中分离出 4 株食酸假单胞菌(*P. acidovorans*) CA26、CA28、CA37 和 CA45,他们都能够以苯胺、3-CA 和 4-CA 为唯一碳源、氮源和能源。其中菌株 CA28 降解能力最强,在 25℃,pH6.0~6.25 的条件下,72h 内可完全降解 260 mg/L (2.02 mmol/L) 的 3-CA,延缓期为 10~12 h,降解速率 1.63 mmol/g/生物量/h,细胞倍增时间(G)为 7.7 h,但 CA28 不能完全降解 4-CA,且基本不降解 2-CA^[2]。Surovtsevad 等从被一种除草剂(propanide)长期污染的黑钙土中分离出一株缺陷假单胞菌(*P. diminuta*) INMI KS-7,在 28℃,pH7,0.32 g 细胞干重/g 底物条件下,可完全降解 300 mg/L (2.35 mmol/L) 的 4-CA,同时也可降解 50 mg/L (0.31 mmol/L) 的 3,4-二氯苯胺(3,4-DCA)^[3]。Javier 等通过假单胞菌属的苯胺或甲苯胺降解菌 JL 和氯代邻苯二酚消化菌 B13 进行自然基因交换,得到降解性能都有所提高的 5 株杂交菌,其中菌株 JL5 对 3-CA 的降解能力最强^[4]。Christel 等从菌株 CA28 降解底物 3-CA 和 2-CA 混合培养液中经过底物诱导分离到一株以 2-CA 为唯一碳源、氮源和能源的食酸假单胞菌(*P. acidovorans*) CA50,在 pH6.1 条件下,3 d 内菌株 CA50 可完全降解 190 mg/L 的 2-CA^[5]。Nicot 等从活性污泥中分离出能够降解 3-CA 的睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*) I2,接种于活性污泥中,进行实验室规模半连续活性污泥试验(SCAS),经过 6 d 的适应期后,2 周时间内 3-CA 便被完全降解^[6]。Franz 等在利用外加降解菌与土著菌治理氯代苯胺污染土壤的可行性研究中认为,在 30℃ 温度下、6 周时间内土著菌可部分降解 2 mmol/L 3-CA 和 3,4-DCA (50% 去除率),而接入 8×10⁶ 个菌/克干土的食酸假单胞菌(*P. acidovorans*) BNM 3.1 和 FRB 4.5 后,24 h 便可降解 86% 的 3-CA^[7]。

表 1 降解氯代苯胺活性较高的降解菌

菌株	底物	最高浓度 (mmol/L)	参考文献
<i>Pseudomonas</i> sp.	3-CA + 4-CA	3.00	[1]
<i>P. acidovorans</i> CA28	3-CA	2.02	[2]
	4-CA	1.47	
<i>P. sp.</i> strain JL5	3-CA	2.00	[4]
<i>P. acidovorans</i> CA50	2-CA	1.50	[5]
<i>Comamonas testosteroni</i> strain I2	3-CA	1.57	[6]
<i>P. acidovorans</i> strain BN3.1	3-CA + 3, 4-DCA	2.00	[7]
<i>Moraxella</i> sp. strain G	3-CA	1.00	[1, 8]

注: 4-CA 为对氯代苯胺, 3-CA 为间氯代苯胺, 2-CA 为邻氯代苯胺, 3, 4-DCA 为 3, 4 二氯苯胺

2 代谢途径

目前为止,人们对氯代芳烃类化合物的好氧微生物降解代谢途径已做了较深入的研究。多数研究者认为,氯代芳烃的降解代谢有两种途径:修饰邻位开环裂解途径(1,2位开环)和间位开环裂解途径(2,3位或1,6位开环)。这两种代谢途径都是以氯代邻苯二酚为中间代谢产物的,所以与邻苯二酚的降解代谢有许多相似之处。以氯代苯胺类化合物为例(图1),2-CA、3-CA、4-CA经苯胺双加氧酶初始氧化和羟基化生成3-氯邻苯二酚和4-氯邻苯二酚,然后再经过氯代邻苯二酚1,2-双加氧酶或氯代邻苯二酚2,3-双加氧酶以及其他一系列酶的作用下,最后进入三羧酸循环(TCA),生成 CO_2 、 H_2O 和 Cl^- ^[4]。但氯代芳烃的间位开环裂解途径(2,3位开环)经常导致“死”产物(dead-end product)的形成,即可使相关代谢酶失活的某些中间代谢产物如2-氯-4-草酰巴豆酸。Zeyer等认为能够以氯代苯胺类化合物为唯一碳源、氮源和能源的微生物应该同时具有两个基本的性质:(1)含有专一性低的苯胺双加氧酶;(2)具有修饰邻位开环裂解途径(1,2位开环)^[8]。Janke和Tresselt通过研究氯代芳烃降解菌An 117、An 213和IMET 7481,也得出类似的结论,否则就会有“死”产物的产生。

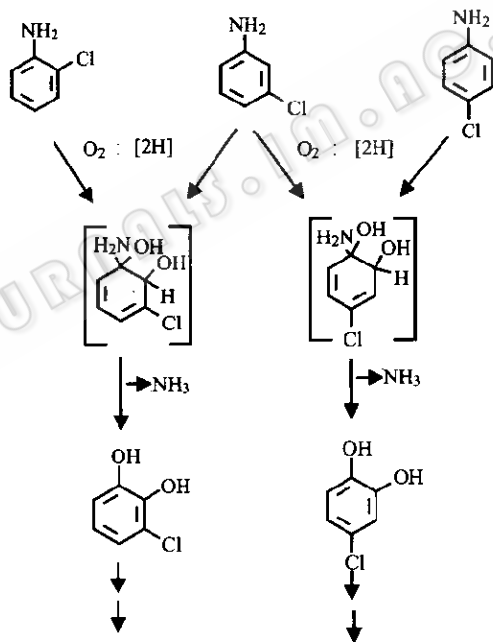


图1 氯代苯胺类化合物好氧微生物降解的初始化反应^[4]

2.1 修饰邻位开环裂解途径 Zeyer等认为,虽然“普通”(normal)邻位开环裂解途径广泛存在于芳烃类化合物(苯胺、苯甲酸、苯酚等)的微生物降解中,但芳烃类化合物降解菌的“普通”邻位开环途径(C120 I)不能分解代谢氯代芳烃,故推断氯代芳烃的代谢途径不是“普通”邻位开环裂解途径,而是经过修改的,所以人们把氯代芳烃邻位开环裂解途径称为“修饰”(modified)邻位开环裂解途径(C120 II)^[8]。这个概念首先被Javier等在研究氯代苯胺类降解菌间的基因自然交换时提出,并在*P. sp.* B13

中发现^[4]，随后在 3-氯苯甲酸降解菌 JMP134 中也发现了此代谢途径。相对于间位开环裂解途径 (C230)，修饰邻位开环裂解途径被认为是大多数氯代芳烃类化合物的好氧微生物降解代谢的一条最有效和较普遍的完全降解途径。许多降解菌都是通过此途径进行代谢的，故研究者对此降解途径研究较多和深入。氯代芳烃类化合物经初始氧化酶氧化产生氯代邻苯二酚，氯代邻苯二酚首先在氯代邻苯二酚 1, 2-双加氧酶作用下开环产生氯代康粘酸，然后经氯代康粘酸环异构酶和氯代康粘酸去卤酶作用下产生顺-或反-二烯内酯，在二烯内酯水解酶的作用下产生顺丁烯二酰基乙酸，再经顺丁烯二酰基乙酸还原酶生成 3-氧代己二酸，最后进入 TCA 循环。当然这只是一个基本的修饰邻位开环裂解途径，对于不同的底物、不同的降解菌，其各种代谢酶及中间代谢产物是有差异的。图 2 为浑浊红球菌 (*Rhodococcus opacus*) 1CP 降解 2-氯苯酚的修饰邻位开环代谢途径^[9]。

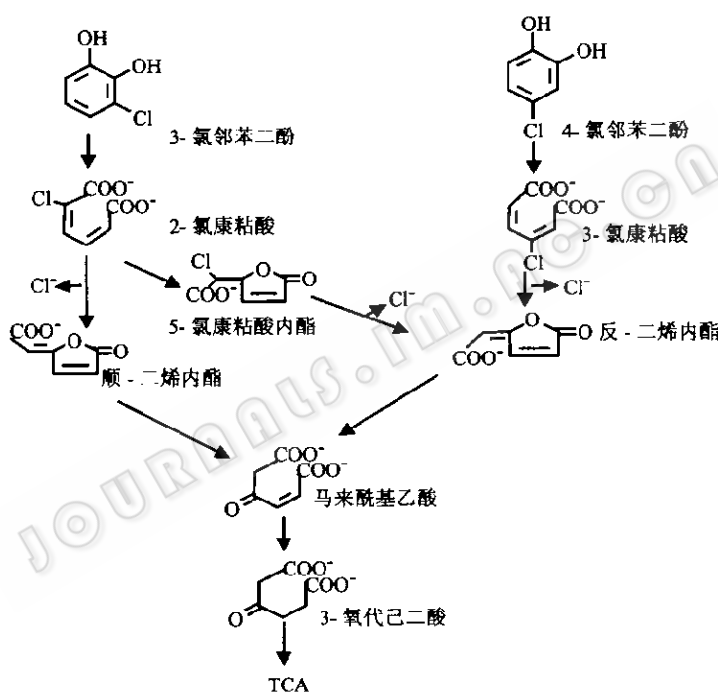


图 2 在 *Rhodococcus opacus* 1CP 中 2-氯苯酚的部分修饰邻位开环裂解途径代谢途径^[9]

2.2 间位开环裂解途径 普遍认为，氯代芳烃类化合物不能通过 3-氯邻苯二酚途径进行间位开环裂解代谢。因为 3-氯邻苯二酚通过间位开环裂解产生的一种酰基氯化物 (如恶臭假单胞菌 PaW1)，甚至 3-氯邻苯二酚本身，都可通过与氯代邻苯二酚 2, 3-双加氧酶 (C230) 中的 Fe^{2+} 发生螯合作用，从而导致 C230 发生不可逆失活 (如恶臭假单胞菌 F1)。通常 4-氯邻苯二酚也是一种可使酶失活的“死”产物，但有些降解菌却可以通过 4-氯邻苯二酚的间位开环裂解代谢途径进行降解，但十分缓慢。Mars 等报道认为氯代芳烃和甲基芳烃的代谢也可通过 3-氯邻苯二酚途径进行间位开环裂解代谢，因为通过研究一株恶臭假单胞菌 (*P. putida*) GJ31 对氯苯和甲基苯的代谢途径及酶作用机

理,发现菌株 GJ31 的间位裂解酶 C230 能够不被酰基氯代物所失活,并且在菌株 GJ31 的细胞中没有检测到修饰邻位开环裂解途径的相关酶活,证明菌株 GJ31 是通过间位途径进行开环裂解代谢的,这是很难得的,因为它推翻了从前普遍认为的氯代芳烃类化合物不能通过间位开环裂解代谢途径进行好氧微生物降解的观点,其代谢途径见图 3^[10]。

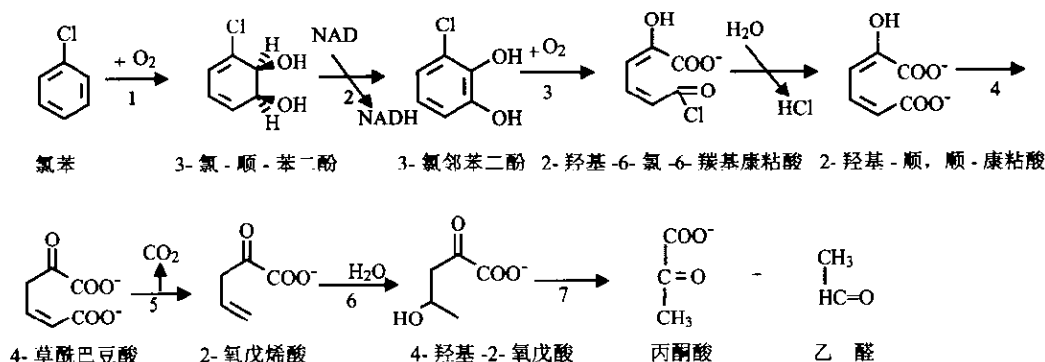


图3 甲苯和氯苯降解菌 *P. putida* GJ31 的推测间位开环裂解途径^[10]

相关酶: 1 氯苯双加氧酶, 2 氯苯双氢二醇脱氢酶, 3 邻苯二酚 2, 3 双加氧酶, 4 4-草酰巴豆酸异构酶, 5 4-草酰巴豆酸脱羧酶, 6 2-氧-4-戊烯酸水合酶, 7 4-羟基-2-氧戊酸水合酶, 其中 2, 3, 5 号酶已测出

3 主要相关降解酶的分离纯化和克隆、表达

随着分子生物学和相应实验应用技术的发展,邻苯二酚 1, 2-双加氧酶 (C120) 和邻苯二酚 2, 3-双加氧酶 (C230) 是氯代苯胺类化合物微生物代谢途径中最为重要的降解酶,所以这两种酶的分离纯化、机理及克隆和表达成为近年来人们的研究热点。研究认为,大多数氯代芳烃类化合物的微生物降解是由质粒控制的^[11]。Winnie 等从被 3-CA 和 3, 4-DCA 污染的土壤中分离得到 12 株降解菌,通过研究它们的相关降解质粒多样性首次证明:所有降解菌中的相关降解质粒都属于 IncP-1 β 类质粒,进而表明 IncP-1 β 是一类在氯代芳烃类化合物的微生物降解中起重要作用的质粒^[11]。Astrid 等进一步对恶臭假单胞菌 GJ31 中一段包含有 C230 基因 (*cbzE*) 的 3.1kb 长的基因簇 DNA 片段进行了克隆和测序,发现 *cbzE* 存在于质粒中,并与其他 C230 基因: *TdnC* (恶臭假单胞菌 UCC2)、*TbuE* (*Ralstonia pickettii* PKO1) 具有 71% 和 51% 的同源性^[12]。Plumeier 等对 3-氯苯甲酸降解菌 JMP134 的降解功能基因的研究初步认为,其修饰邻位开环裂解途径主要降解酶 (邻苯二酚 1, 2 双加氧酶、氯代康粘酸环异构酶、二烯内酯水解酶和顺丁烯二酰基乙酸还原酶) 的编码基因由位于质粒 pJP4 中的 *yfdC* (I) D (I) E (I) F (I) 和 *yfdC* (II) D (II) E (II) F (II) 两个基因簇组成,通过这两组功能基因簇分别克隆到运载质粒 pBBR1MCS-2 中,再分别把含有 *yfdI* 和 *yfdII* 的运载质粒转导到宿主菌 *R. eutropha* JMP222 (JMP134 的缺陷型) 和 *P. putida* KT2442 中,比较两株宿主菌相关降解酶的活性,得出两组基因簇 *yfdI* 和 *yfdII* 在 3-氯苯甲酸降解菌 JMP134 (pJP4) 中都是必须的,在这些开放阅读框中, *yfdC* 编码邻苯二酚 2, 3-双加氧酶^[13]。Liu 等克隆、分析了 3-或 4-氯苯甲酸降解菌 Nk8 的修饰邻位开环裂解途径相关基因,得到编码邻苯二酚 1, 2 双加氧酶、氯代康粘酸环异构酶、二烯内酯水解酶和顺丁烯二酰基乙酸还原酶的相关基因 *yfdT*、*yfdC*、*yfdD*、*yfdE* 和 *yfdF*, 它们与已知的邻苯二酚降解

基因簇 *tdfT-CDEF* 非常相似, 并与菌株 JMP134 的降解质粒 pJP4 氨基酸序列 79% ~ 88% 同源^[14]。但氯代苯胺类化合物降解菌在此方面的报道却没有见到。

4 研究展望

20 世纪 70 年代以来, 国外研究者在氯代苯胺类化合物的微生物降解基础研究方面做了大量工作得到一些降解菌, 并对其降解因素、降解机理、代谢途径、相关降解酶及降解基因的调控表达进行了较深入的研究, 使人们对其规律有了初步认识。而国内, 在氯代苯胺类化合物微生物降解研究方面却没有报道。研究工作虽然取得一定进展, 但也存在一些问题: (1) 自然界中难以得到此类化合物的高效降解菌; (2) 由于“死”产物的生成和积累使代谢途径中断, 即不完全降解。这便使氯代苯胺类化合物成为氯代芳烃类化合物微生物降解研究中的一个难点。因此, 利用基因工程的手段, 在已有的研究基础上构建出降解氯代苯胺类化合物的高效工程菌应当是今后工作的研究重点。随着我国此类化合物土壤、水体污染情况日益严重, 目前阶段, 除了进行氯代苯胺类化合物微生物降解的基础研究外, 还要在借鉴国外研究成果的基础上, 从我国实际国情出发, 尽快进行微生物处理氯代苯胺类化合物土壤和水体的工艺可行性研究, 以解决当前迫切的环境问题, 服务于人类生存环境质量的提高和社会、经济的可持续发展。而对于处理工艺的可行性研究, 研究者认为氯代芳烃类化合物的共代谢降解机理和厌氧-好氧交替处理条件下的氯代苯芳烃化合物微生物降解性研究, 应当是今后工作的两个重点研究方向。

参考文献

- [1] Zeyer J K. *Pesticide Biochemi and Physiol*, 1982, 17: 215 ~ 213.
- [2] Michael L, Christel H. *Arch Microbiol*, 1990, 155: 56 ~ 61.
- [3] Surovtseva E G, Ivoilov V S, Karasevich Yu N, *et al.* *Mikrobiologiya*, 1985, 6 (54): 948 ~ 952.
- [4] Javier L, Walter R, Hans-J K. *Arch Microbiol*, 1984, 140: 159 ~ 165.
- [5] Christel H, Michael L, Franz S. *J Basic Microbiol*, 1994, 34 (2): 77 ~ 85.
- [6] Nico B, Johan G, Paul D V, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2000, 7: ~ 29062913.
- [7] Franz R R, Walter R. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 40: 402 ~ 407.
- [8] Zeyer J, Alain W, Kenneth N T. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 8: 447 ~ 453.
- [9] Olga V M, Inna P S, Stefan R K, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, 184 (19): 5282 ~ 5292.
- [10] Astrid E, Thomas K, Stefan R K, *et al.* *J Bacteriol*, 1997, 179 (14): 4530 ~ 4537.
- [11] Winnie D, Johan G, Ann D, *et al.* *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 42: 315 ~ 325.
- [12] Astrid E M, Jaap K, Stefan R K, *et al.* *J Bacteriol*, 1999, 181 (4): 1309 ~ 1318.
- [13] Plumeier I, Perez-Pantoja D, Heim S, *et al.* *J Bacteriol*, 2002, 184 (15): 4054 ~ 4064.
- [14] Liu S, Ogawa N, Miyashita K. *Gene*, 2001, 268 (1-2): 207 ~ 214.