

卡马西平降解菌的筛选及降解特性研究

崔长征 胡洪营* 于亚琦 于茵

(清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084)

摘要: 药品和个人护理品类污染物日益成为新兴污染物研究的重点, 药品卡马西平因具有多种药效被广泛使用, 在环境中频繁被检出, 且浓度较高, 不易去除, 通常作为环境中药品和个人护理品污染状况的指示化合物。本研究从某制药厂的污水处理厂中分离到一株细菌 HY-7, 能以卡马西平为唯一碳源、氮源和能源生长, 通过生理生化以及 16S rDNA、*gyrB* 基因序列分析鉴定并命名为 *Acinetobacter* sp. HY-7。该菌株生长和降解卡马西平的最适条件为 25°C 和 pH 6.0, 经 HPLC 分析 10 d 内能将初始浓度为 20 mg/L 的卡马西平降解 48%。菌株 HY-7 还能以邻苯二酚、吲哚、茶、萘等芳香族化合物为唯一碳源生长。

关键词: 新兴污染物, 药品和个人护理品, 卡马西平, 生物降解, 不动杆菌

Isolation of a Bacterial Strain Capable of Carbamazepine-degrading and Biodegradation Characteristics

CUI Chang-Zheng HU Hong-Ying* YU Ya-Qi YU Yin

(Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Quite recently, among new emerging contaminants, pharmaceutical and personal care products (PPCPs) and their active metabolites are an emerging environmental issue, due to their presence in the aquatic environment and potential for impacts on wildlife and humans. Carbamazepine is one of the most frequently and at the relatively high concentration levels detected pharmaceuticals in surface water and even in drinking water. Moreover, this drug has displayed high chronic ecotoxicity. A strain of carbamazepine-degrading bacterium was isolated from activated sludge treating pharmaceutical wastewater in Suzhou, China. It was identified as *Acinetobacter* sp. HY-7, based on biochemical test, 16S rRNA and *gyrB* gene sequence analysis. Strain HY-7 could grow in liquid mineral salt medium with carbamazepine as sole source of carbon, nitrogen and energy. HPLC analysis revealed the carbamazepine degradation percentage by HY-7 after 10 days was 48% at pH 6.0 and 25°C. Among carbamazepine and the similar structure compounds, indole, catechol, naphthalene, anthracene could also be utilized by strain HY-7 for growth, which exhibited a very broad substrate profile.

Keywords: Emerging contaminants, Pharmaceutical and Personal Care Products, Carbamazepine, Biodegradation, *Acinetobacter* spp.

随着分析检测水平的不断提高,发现地表水、污水处理厂的出水、甚至饮用水中含有微量药品和个人护理品(Pharmaceutical and personal care products, PPCPs)类化合物,这些新兴污染物在水中的长期存在,对野生生物和人类都有潜在的影响,尤其具有药物活性化合物(Pharmaceutical active compounds, PhACs)备受关注^[1,2]。目前我国是世界药品消费和原料药生产大国,我国的PPCPs污染现状、生态毒性、迁移规律等应引起高度关注。

在常见的PPCPs化合物中,抗生素、消炎药、抗癫痫药物在各类环境介质中的检出频率较高^[3]。其中抗癫痫药卡马西平(Carbamazepine, CBZ)(分子结构如图1所示)由于药效显著,常作为治疗癫痫病和神经痛的首选药物被大量使用^[4],然而卡马西平是含氮的芳香杂环化合物,目前传统的污水处理方法(如吸附、活性污泥、生物膜、紫外、光催化降解等方法)不能够有效去除,使其被频繁检出、且检出浓度相对较高,具有一定的生态毒性,是目前最受关注的PPCPs类污染物之一^[5-8]。有研究者将其作为人为影响水环境的一种指示化合物,来评价PPCPs的污染状况^[9]。评价这些药物活性化合物及其代谢产物的环境风险非常重要,然而人们对卡马西平的微生物降解还未见报道。

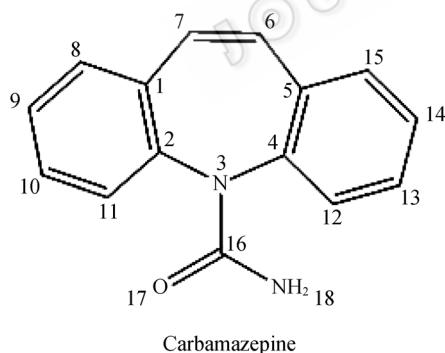


图1 卡马西平的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of the carbamazepine

本实验室从苏州某原料药制药厂废水处理系统的活性污泥中分离到一株卡马西平降解菌株 HY-7,该菌株能够以卡马西平为唯一碳源、氮源和能源生长。本研究结合生理生化、16S rDNA、*gyrB* 序列分析研究了菌株 HY-7 的系统发育地位,并进一步研究该菌株降解卡马西平的特性。

1 材料和方法

1.1 材料

主要仪器:LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SPD-M20A 紫外检测器、CTO-20A 柱温箱、LC-20AD 泵、Shimadzu VP-ODS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm i.d., 50 μm)(日本岛津公司),LC-Solution 色谱工作站;Mili-QA10 型纯水仪(MILIPORE),氮吹仪,岛津 UV-2401PC 紫外-可见分光光度计。

主要试剂:甲醇、乙腈为色谱纯,其它为分析纯。卡马西平购自中国药品生物制品鉴定所。

培养基:无机盐培养基(Mineral Salt Medium, MSM): KH_2PO_4 1.6 g, K_2HPO_4 2.4 g, Na_2SO_4 2.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.007 g, 1 mL 微量元素,蒸馏水 1000 mL^[10]。

丰富和保存培养基:胰蛋白胨 2 g, 酵母粉 1 g, 氯化钠 5 g, 卡马西平 200 mg, 水 1000 mL, pH 为 7.2, 固体培养基中加 15 g 琼脂粉。

1.2 卡马西平降解菌株的富集、分离

污泥样品来自苏州某原料药制药厂的污水处理厂。为了筛选出卡马西平降解菌株,以卡马西平为唯一碳源、氮源的无机盐培养基(MSM)进行细菌的富集培养。取污泥样品约 2 g 加入 100 mL 含 200 mg/L 卡马西平的无机盐培养基,30°C、200 r/min 条件下培养 10 d,再按 10% 的接种量转接到新的培养基中培养,如此重复 3 次。然后将培养液进行倍比稀释,涂布在含 200 mg/L 卡马西平的丰富培养基平板上,挑取生长较快、不同颜色、菌落形态等的菌落,分别接种到含 20 mg/L 卡马西平的 MSM 中培养,选取 OD_{540} 值较大的再进一步进行高效液相色谱分析。

1.3 电镜观察

取对数生长期新鲜菌液,5000 r/min 离心收集菌体,用 HITACHI H-600 透射电子显微镜观察细胞,并测定其大小。

1.4 细菌生长测定、生理生化指标和脂肪酸测定

细菌生长以光吸收值 OD_{540} 表示。革兰氏染色、碳源利用等指标测定参照文献^[11]进行。

1.5 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列分析

用 CTAB 法提取细菌的基因组 DNA。以 HY-7 基因组 DNA 为模板,分别扩增 16S rDNA、*gyrB* 基

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primes and sequence primers used in this study

PCR Primers	Sequence (5'-3')
16S rDNAF27	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
16S rDNAR1492	TACGGTTACCTTGTACGACTT
<i>gyrBF</i>	CAGGAAACAGCTATGACCAYGSNGGNGGNAARTTYRA
<i>gyrBR</i>	TGTA AACGACGCGCCAGTGCNGGRTCYTTYTCYTGRCA

因, 采用的引物如表 1 所示, 引物均由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应体系 (50 μ L) 为: 10 \times LA PCR buffer (Mg^{2+}) 5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 8 μ L, 20 μ mol/L 引物各 1 μ L, ddH₂O 33.5 μ L, LA *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 基因组DNA 1 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 50 $^{\circ}$ C 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。不同扩增片段其 PCR 反应条件做适当调整, PCR 产物分别经凝胶回收纯化试剂盒后, 与 pMD18-T 载体连接后, 再转化到 *E. coli* DH5 α 菌株, 在含氨苄青霉素的平板上培养, 挑选菌落活化, 经 PCR 和酶切验证后, 由上海生工生物技术公司测序。

1.6 卡马西平降解试验及分析测定

在 50 mL 的锥形瓶中加入 20 mL 卡马西平浓度为 20 mg/L 的无机盐培养基。从丰富培养基中收集 HY-7 菌体, 用生理盐水洗涤, 按 1% 接种量(OD_{540} = 0.01), 25 $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下避光振荡培养。定时取样, 分别测定微生物的生物量(OD_{540})和卡马西平的残留。空白对照只含卡马西平不加细菌。

向经不同时间的卡马西平降解体系中, 加入等体积的乙酸乙酯剧烈振荡萃取 30 min, 静置分层后, 取上层有机相。重复萃取 1 次, 合并有机相, 取 5 mL 在 40 $^{\circ}$ C 氮吹干燥, 用 5 mL 色谱级甲醇溶解残留物再进行 HPLC 分析。

色谱柱为 Shimadzu VP-ODS 色谱柱(150 mm \times 4.6 mm i.d., 50 μ m); 流动相: 乙腈: 甲醇: 水=150: 350: 500, $V/V/V$; 流速 1 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

1.7 菌株 HY-7 对其他底物的降解

取适量萘和蒽的二氯甲烷溶液加入灭菌的三角瓶中, 待二氯甲烷挥发完全后加入 100 mL 灭菌的 MSM, 邻苯二酚和吡啶溶于 MSM 培养基后, 过滤除菌, 4 种底物终浓度均为 100 mg/L, 接菌量及培养方式同卡马西平的降解。培养 10 d 后检测底物的降

解情况。
取 5 mL 培养液, 4 $^{\circ}$ C、1000 r/min 离心 10 min, 上清液用来全波长扫描, 波长扫描范围: 200 nm~600 nm, 扫描光谱宽度: 1 nm, 扫描速度: 120 nm/min。

2 结果与讨论

2.1 样品的富集培养及菌种分离纯化

污泥样品经过 3 次富集培养后, 得到的混合微生物的培养物, 在培养过程中通过测定培养液中的 OD_{540} , 发现它可以在含有 200 mg/L 的卡马西平的无机盐培养基中生长, 说明该混合微生物培养物能以卡马西平为唯一碳源、氮源和能源生长。

上述混合培养物在含卡马西平的丰富培养基平板上稀释涂布, 挑选生长较快、不同颜色、形态的单菌落, 经过复筛、纯化后得到一株能以卡马西平为唯一碳源、氮源和能源生长且生长速率较快的菌株 HY-7。

菌株 HY-7 在丰富培养基平板上 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d 的菌落为乳白色、扁平圆形、湿润、半透明、易挑起, 直径在 3 mm 左右; 革兰氏阴性, 球状, 直径 0.5 μ m~0.8 μ m(如图 2)。该菌株能够利用葡萄糖和

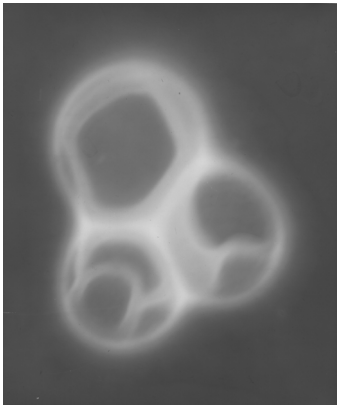


图 2 HY-7 菌株的透射电镜照片($\times 40000$)
Fig. 2 Transmission electron micrograph of strain HY-7 ($\times 40000$)

蔗糖产酸,硝酸盐还原反应阴性,明胶水解阴性。

2.2 HY-7 的鉴定

菌株HY-7的生理生化指标如表2所示。利用表1中的引物分别扩增菌株HY-7的16S rRNA、*gyrB*的部分基因,在GenBank中的登录号分别为EU580738 (16S rDNA)、EU681951 (*gyrB*)。序列分析表明该菌株16S rRNA与*Acinetobacter gernerii* DSM 14967^T的相似性最高为97.4%,利用MEGA 3.1构建系统发育进化树,如图3所示。虽然16S rRNA基因具有广泛分布、即保守又可变等特性,被广泛应用于研究细菌的系统发育地位,但大量研究表明,16S rRNA基因也表现出了不容忽视的不足,高保守型使其不能很好的区分属内不同的物种。*gyrB*基因是编码DNA促旋酶(DNA gyrase)B亚单位的基因,其显著优点是基因进化率较快,碱基替换频率较高,

对于亲缘关系更接近的属内各菌种之间的检测和鉴别方面比16S rRNA基因更具优越性。*gyrB*基因序列分析发现与已报道的*Acinetobacter* spp.的相似性最高为83%。

结合菌株的形态、生理生化特征、16S rDNA和*gyrB*序列分析,菌株HY-7鉴定并命名为*Acinetobacter* sp. HY-7,且该菌株有可能为*Acinetobacter* spp.一新种,有待进一步鉴定分析。

2.3 卡马西平的降解

在以卡马西平为唯一碳源、氮源和能源生长的条件下, HY-7的降解结果如图4所示,菌株HY-7在pH为6.0,温度25℃的最佳生长条件下,10 d能够将20 mg/L卡马西平降解48%,同时能够观察到菌体不断生长。而仅有卡马西平的对照培养基中,卡马西平没有被降解,也没有观察到有菌体生长。据

表2 降解菌HY-7的生理生化特性
Table 2 Biochemical properties of strain HY-7

Test	Results	Test	Results	Test	Results	Test	Results
Bacterial shape	Cocci	Gram stain	Negative	Oxidase	-	Catalase	+
Water	-	D-melbiose	-	p-hydroxy phenylacetic acid	+	L-histidine	-
α -cyclodextrin	-	β -methyl-D-glucoside	-	Itaconic acid	-	Hydroxyl-L-proline	+
Cyclodextrin	-	D-psicose	-	α -keto butyric acid	+	L-leucine	-
Glycogen	+	D-raffinose	-	α -ketoglutaric acid	+	L-omithine	-
Tween-40	+	L-rhamnose	-	α -keto valeric acid	+	L-phenylalanine	-
Tween-80	+	D-sorbitol	-	D,L-lactic aci	+	L-proline	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	Sucrose	-	Maloric acid	-	L-pyrogutamic acid	+
N-acetyl-D-glucosamine	-	D-trehalose	-	Propionic acid	+	D-serine	-
Adonitol	-	Turanose	-	Quinic acid	-	L-serine	-
L-arabbinose	+	Xylitol	-	D-saccharic acid	-	L-threonine	-
D-arabitol	-	Methyl pyruvate	+	Sebacic acid	+	D,L-camitine	+
Cellobiose	-	Mono-methyl succinate	+	Succinic acid	+	γ -amino butyric acid	+
I-erythritol	-	Acetic acid	+	Bromo succinic acid	+	Urocanic acid	-
D-fructose	-	Cis-acoritic acid	-	Succinamic acid	+	Inosine	-
L-fucose	-	Citric acid	+	Glucuronamide	+	Uridine	-
D-galactose	+	Formic acid	-	Alaninamide	-	Thymidine	-
Gentiobiose	-	D-galactonic acid lactone	-	D-alanine	+	Phenyl ethylamine	-
α -D-glucose	+	D-galacturonic acid	-	L-alanine	+	Putrescine	-
m-inositol	-	D-gluconic acid	-	L-alanyl-glycine	-	2-amino ethanol	-
α -D-lactose	-	D-glucosaminic acid	-	L-asparagine	+	2,3-butanediol	+
Lactulose	-	D-glucuronic acid	-	L-aspartic acid	+	Glycerol	-
Maltose	-	α -hydroxybutyric acid	+	L-glutamic acid	+	D,L-glycerol phosphate	-
D-mannitol	-	β -hydroxybutyric acid	+	Glycyl-L-aspartic acid	-	D-glucose-1-phosphate	-
D-mannose	+	γ -hydroxybutyric acid	+	Glycyl-L-glutamic acid	-	D-glucose-6-phosphate	-

Note: +: Positive; -: Negative.

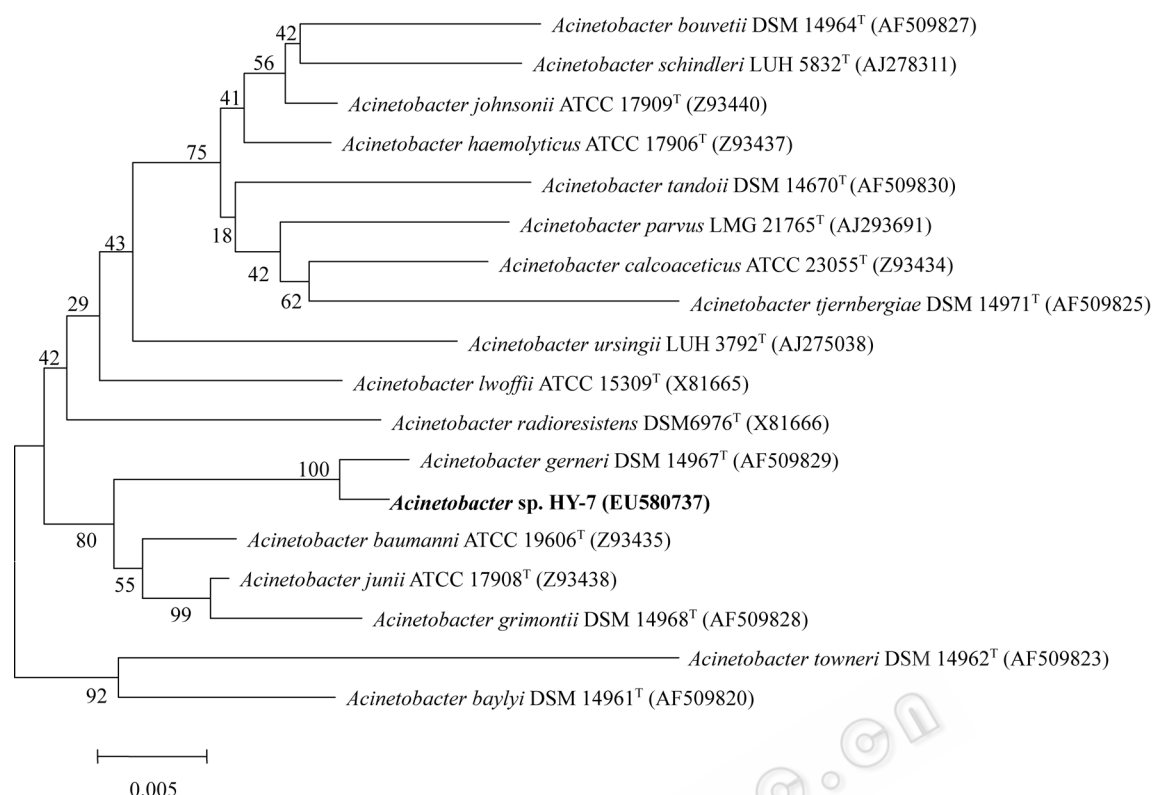


图3 基于菌株 HY-7 和亲缘关系相近菌株的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain HY-7 and related species

Note: The trees were constructed by using the neighbour-joining method. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching points. The scale bar represents 0.005 substitution per nucleotide site and GenBank accession numbers are in parentheses.

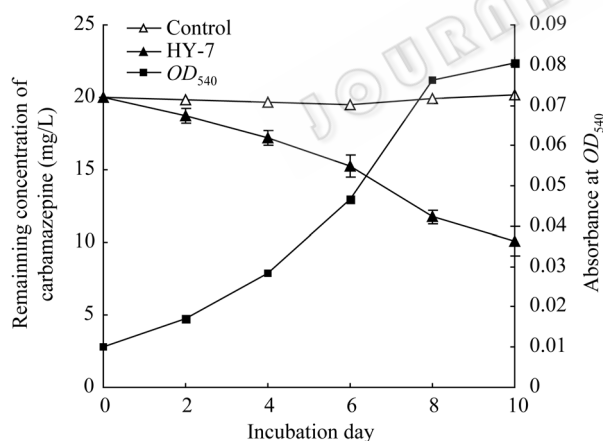


图4 菌株 HY-7 对卡马西平的降解

Fig. 4 Time course of cell growth and carbamazepine degradation of *Acinetobacter* sp. HY-7

我们所知, HY-7 是目前国内外唯一报道能够降解卡马西平的菌株。同时发现补加微量 0.01% 的酵母粉和少量的邻苯二酚或吡啶能够促进卡马西平降解(数据没有显示)。卡马西平为含氮的杂环类化合物, 杂环化合物不同于非杂环化合物, 不仅在元素组成上, 而且杂环化合物一般毒性更高, 在环境中更稳

定, 也广泛存在, 因此, 针对微量杂环化合物的生物降解研究应受到关注。

Acinetobacter 属在环境中广泛存在, 该属大多菌株降解底物广泛, 能够在简单的培养基中较好生长, 在生物修复中具有重要作用。

2.4 菌株 HY-7 降解其他底物的 UV-Vis 分析

菌株 HY-7 除了能以卡马西平为唯一碳源生长外, 还能分别以一定浓度的邻苯二酚、吡啶、萘、蒽等化合物为唯一碳源生长。本实验以 100 mg/L 的邻苯二酚和吡啶为研究对象, 来探讨菌株 HY-7 降解这些底物的途径。

由图 5 可知加入 HY-7 菌液后邻苯二酚在 276 nm 处的特征吸收峰消失, 且在 260 nm 处又出现较明显的吸收峰, 推测是邻苯二酚降解产生的中间产物吸收峰。根据文献报道, 邻苯二酚的微生物降解有邻位开环和间位开环两种途径^[12], 其中邻苯二酚在 1,2-双加氧酶催化邻位裂解生成产物己二烯二酸, 该化合物在 260 nm 处有最大吸收峰。由此推测菌株 HY-7 通过邻位开环途径降解邻苯二酚。

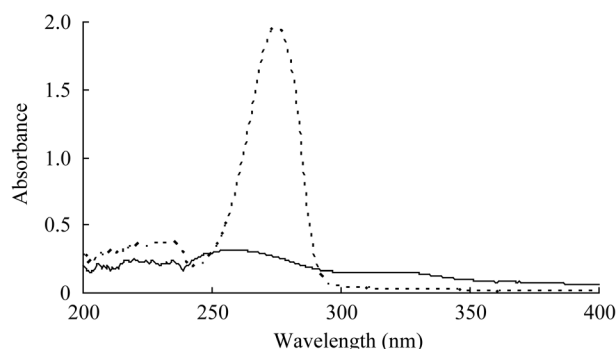


图5 邻苯二酚的 UV-Vis 扫描图谱

Fig. 5 The UV-Vis absorption spectra of catechol degraded by strain HY-7 (solid line) and absence of strain HY-7 (dashed line)

菌株HY-7 能够利用吲哚为唯一碳源和能源快速生长,由图6可知加入HY-7菌液后吲哚的特征吸收峰消失,并能够观察到培养液有少许蓝色染料颗粒生成。根据文献报道^[13],细菌降解吲哚一般有2条代谢途径,当吲哚作为唯一碳源和能量来源时,通常细菌无论在厌氧还是在好氧条件下,容易通过吲哚-氧化吲哚-靛红途径矿化吲哚,或者在好氧条件下,通过吲哚-羟基吲哚-靛青途径矿化吲哚。通过对菌株HY-7降解吲哚和邻苯二酚的途径分析,菌株HY-7具有加氧酶,对深入研究卡马西平等杂环化物的降解途径和特性具有参考价值。

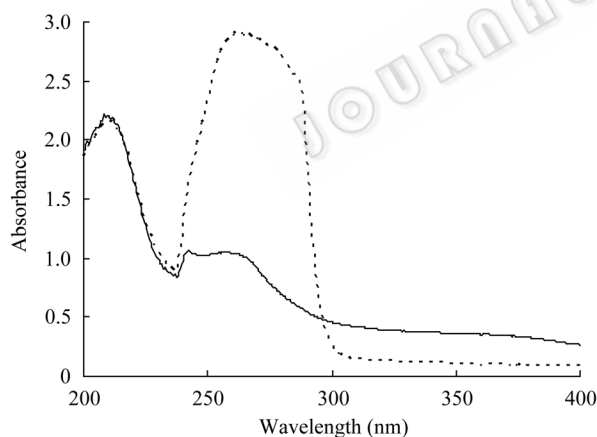


图6 吲哚的 UV-Vis 扫描图谱

Fig. 6 The UV-Vis absorption spectra of indole degraded by strain HY-7 (solid line) and absence of strain HY-7 (dashed line)

3 结论

1) *Acinetobacter* sp. HY-7 能够以卡马西平为唯一碳源、氮源和能源良好生长,在10 d内能够将20 mg/L的卡马西平降解48%,是目前首次报道能够降解卡马西平的菌株。

2) *Acinetobacter* sp. HY-7 从生理生化特征,16S

rDNA 和 *gyrB* 序列分析显示,该菌株有可能为 *Acinetobacter* spp. 一新种。

3) *Acinetobacter* sp. HY-7 的代谢底物广泛,能够以吲哚、邻苯二酚、萘、蒽等为唯一碳源生长。

参考文献

- [1] 胡洪营,王超,郭美婷.药品和个人护理用品(PPCPs)对环境的污染现状与研究进展.生态环境,2005,14(6): 947-952.
- [2] Marta Carballa, Francisco Omil, Juan M Lema, *et al.* Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*, 2004, 38: 2918-2926.
- [3] Carballa M, Omil F, Lema JM. Calculation methods to perform mass balances of micropollutants in sewage treatment plants: application to pharmaceutical and personal care products (PPCPs). *Environmental Science and Technology*, 2007, 41: 884-890.
- [4] Marta Carballa, Francisco Omil, Thomas Ternes, *et al.* Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, 2007, 41: 2139-2150.
- [5] Adriano Joss, Elvira Keller, Alfredo C Alder, *et al.* Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 2005, 39: 3139-3152.
- [6] Loos R, Bernd Manfred Gawlik, Giovanni Locoro, *et al.* EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, 2009, 117: 561-568.
- [7] Benotti MJ, Brownawell BJ. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environmental Pollution*, 2008, 118: 1-9.
- [8] Ferrari Benoit, Nicklas Paxeus, Roberto Lo Giudice, *et al.* Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 55: 359-370.
- [9] Clara M, B Strenn, N Kreuzinger. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research*, 2004, 38: 947-954.
- [10] Cui Chang Zheng, Zeng Chi, Wan Xia, *et al.* Effect of rhamnolipids on degradation of anthracene by two newly isolated strains, *Sphingomonas* sp. 12A and *Pseudomonas* sp. 12B. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2008, 18: 63-66.
- [11] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001.
- [12] 任华峰,李淑芹,刘双江,等.一株对氯苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性.环境科学,2005,26: 154-158.
- [13] 王莹莹,叶彩云,范延臻,等.吲哚类杂环芳香族有机物在好氧和厌氧条件下的微生物降解途径.矿物岩石地球化学通报,2003,22: 170-173.