

# 苯胺降解菌 *Rhodococcus* sp. E2 的分离 与苯胺氧化酶基因簇的初步鉴定

李云翔, 陈雪婷, 周潮洋, 裴涛, 刘永闯, 洪青, 闫新\*, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

**摘要:**从江苏省南通市某农药厂的活性污泥中分离出一株苯胺降解菌株 E2, 根据表型特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析, 将其鉴定为红球菌属(*Rhodococcus* sp.) 的细菌。菌株 E2 降解苯胺的最适温度为 30 ℃、最适 pH 为 7.0, 降解苯胺的最高浓度为 800 mg·L<sup>-1</sup>。该菌能降解苯胺、邻甲基苯胺、对甲基苯胺和 2,5-二氯苯胺, 与已报道的苯胺降解菌的底物谱显著不同。通过扩增高度保守的片段和染色体步移, 获得了菌株 E2 中负责苯胺降解的基因簇, 该基因簇在基因组成、排布及同源性方面和已报道的基因簇有较大差异, 是研究苯胺降解分子机理的较好材料。

**关键词:**苯胺; *Rhodococcus* sp. E2; 基因簇

中图分类号: S154.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)05-0882-08 doi:10.11654/jaes.2014.05.008

## Isolation of Aniline-degrading Bacterium *Rhodococcus* sp. E2 and Characterization of Aniline Dioxygenase Gene Cluster

LI Yun-xiang, CHEN Xue-ting, ZHOU Chao-yang, PEI Tao, LIU Yong-chuang, HONG Qing, YAN Xin\*, LI Shun-peng  
(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Aniline and its derivatives have become environmental pollutants. The existing aniline-degrading bacteria have narrow substrate spectrum toward aniline derivatives and can degrade parts of these compounds. Here we isolated an aniline-degrading bacterium E2 from activated sludge originated from an insecticide factory, and revealed its molecular nature. The strain E2 was identified as *Rhodococcus* sp. based on morphological, physiological and biochemical properties, and homology analysis of 16S rDNA sequence. The optimum temperature and pH value for the degradation by the strain E2 were 30 ℃ and 7.0, respectively. The highest aniline concentration at which the strain E2 could degrade was 800 mg·L<sup>-1</sup>. It could degrade aniline, *o*-Toluidine, *p*-Toluidine and 2,5-dichloroaniline. Aniline-degrading gene cluster was cloned from the strain E2 by amplifying the highly conserved fragment and chromosome walking. This cluster was significantly different from the current ones in composition, arrangement and homology of genes. It would be a valuable material for investigating the molecular mechanisms of aniline degradation.

**Keywords:** aniline; *Rhodococcus* sp. E2; gene cluster

苯胺俗称阿林尼油, 是一种无色、油状、可燃且高毒性液体, 有类似腐蛋的臭味。苯胺及其衍生物是重要的有机化工原料中间体, 被广泛应用于国防、印染、塑料、油漆、农药和医药等行业<sup>[1]</sup>, 是一类严重污染环境和危害人体健康的有害物质<sup>[2]</sup>。例如, 氯代苯胺是许多广泛应用的苯胺除草剂, 如敌草隆、利谷隆和绿谷

隆等的主要中间代谢产物, 由于它们的化学稳定性较强, 其在环境样品中的检出率比它的母体除草剂还要频繁, 危害更加严重<sup>[3-4]</sup>。

在自然环境中, 苯胺及其衍生物主要通过微生物进行降解<sup>[5]</sup>。微生物降解苯胺有好氧和厌氧两种途径。在厌氧条件下, 苯胺经硫酸盐或硝酸根还原生成 4-氨基苯甲酸盐, 然后通过氨基苯甲酰辅酶去氨基生成苯酰, 然后再进一步代谢分解<sup>[6]</sup>。在好氧条件下, 苯胺可以在苯胺氧化酶的作用下转化为邻苯二酚, 接着以邻苯二酚作为开环底物, 由邻苯二酚 1,2-双加氧酶<sup>[7]</sup>

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J1210056)

作者简介: 李云翔(1989—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境微生物。E-mail: liyunxiang2014@163.com

\*通信作者: 闫新 E-mail: yanxin@njau.edu.cn

和邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化,分别通过邻位<sup>[8]</sup>和间位代谢途径开环。当通过邻位开环途径代谢时,在邻苯二酚两个羟基之间断开苯环,生成黏康酸,再经多步反应产生三羧酸循环的中间代谢物琥珀酸和乙酰辅酶 A;而通过间位开环途径代谢时,则在邻苯二酚其中一个羟基的旁侧断开苯环,生成 2-羟基黏康酸半醛,最后产生丙酮酸和乙醛。

目前,已报道的苯胺降解菌株主要来自产碱杆菌属<sup>[9]</sup>、假单胞菌属<sup>[10]</sup>、不动杆菌属<sup>[11]</sup>、红球菌属<sup>[12]</sup>、弗拉托菌属<sup>[13]</sup>、莫拉菌属<sup>[14]</sup>、诺卡氏菌属<sup>[14]</sup>及代尔夫特氏菌属<sup>[15]</sup>等。但这些苯胺降解菌株都只能降解部分苯胺衍生物,底物谱较窄。如 *Pseudomonas putida* UCC22<sup>[16]</sup>与 *Delftia tsuruhatensis* AD9 只能降解苯胺、间甲基苯胺和对甲基苯胺(不能降解邻甲基苯胺);*Acinetobacter* sp. YAA<sup>[17]</sup>只能降解苯胺和邻甲基苯胺(不能降解间甲基苯胺和对甲基苯胺);*Delftia* sp. AN3 只能降解苯胺。

在基因水平上,1997年,苯胺氧化酶基因簇从菌株 *Pseudomonas putida* UCC22 和 *Acinetobacter* sp. YAA 中被克隆到,后来发现的苯胺氧化酶基因簇与其在组成和排列方式上基本相似。该基因簇含有 5 个功能基因(*QTA<sub>1</sub>A<sub>2</sub>B*),编码 4 个组分,分别是谷氨酰胺合成酶类蛋白(Q)谷,氨酰胺转移酶类蛋白(T)、苯胺双加氧酶大小亚基(*A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>*)及还原酶(B)<sup>[18]</sup>。B 的作用很可能是为 *A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>* 提供电子。2013年,Takeo 等<sup>[19]</sup>证明苯胺双加氧酶不能直接氧化苯胺,苯胺先被 Q 转化为  $\gamma$ -谷氨酰苯胺,然后再被 *A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>* 转化为邻苯二酚。但关于这个多组分酶的催化机理还不完全清楚,还不了解底物谱由哪些组份决定,这限制了人们对该多组分酶的改造。

积累具有不同降解谱的菌株和基因资源,研究其降解苯胺的分子机理,将为通过杂交或突变来构建广谱的苯胺衍生物降解菌打下基础。在本研究中,我们分离得到一株苯胺及其衍生物降解菌 *Rhodococcus* sp. E2,与已报道的苯胺降解菌相比,其降解谱显著不同。通过扩增高度保守的片段和染色体步移<sup>[20]</sup>,我们获得了菌株 E2 中负责苯胺降解的基因簇;该基因簇在基因组成、排布及同源性方面和已报道的基因簇有较大差异,是研究苯胺降解分子机理的较好材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土样来源

苯胺污染土壤样品采集自江苏省南通市某农药

厂排水口活性污泥。

#### 1.1.2 试剂与培养基

基础盐培养基:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{NaCl}$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 去离子水 1000 mL, pH 7.0。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g,  $\text{NaCl}$  10 g, 去离子水 1000 mL。固体 LB 培养基加入  $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂粉。

苯胺及其衍生物原药(纯度>99%)均购自阿拉丁公司,溶解在甲醇中配置成  $20\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液备用。高效液相色谱分析用的甲醇为色谱纯试剂,购自南通汉邦科技有限公司。PCR 反应所用试剂购自 TaKaRa 公司(大连)。二氯甲烷等其他化学试剂均为普通的分析纯试剂。

#### 1.2 降解菌株的筛选

取活性污泥 10 g 用 500 mL 去离子水重悬,  $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床振荡 30 min。取 5 mL 悬浮液加入 100 mL、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  苯胺基础盐培养基中,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养。每隔 7 d 以 5% 接种量转接至新的含苯胺基础盐培养基中,按同样的培养富集方式转接 4 代。经高效液相色谱(HPLC)检测有降解效果后,将富集培养液稀释涂布于  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  苯胺基础盐固体培养基平板,选择不同形态特征的单菌落,重新转接到  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  苯胺基础盐培养基中,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养,验证其降解效果,保存有降解效果的纯培养做下一步研究。

#### 1.3 苯胺浓度的测定

每次取样 10 mL 至离心管中,立即向所取的样品中添加等体积的二氯甲烷,剧烈振荡抽提底物。 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心使水相和有机相快速分层,移去上层水相,将有机相置于通风橱中挥发干,用  $500 \mu\text{L}$  色谱纯甲醇重新溶解样品,然后再用  $0.22 \mu\text{m}$  孔径的一次性有机相细菌滤器过滤,过滤完的样品用岛津高效液相色谱仪进行分析,分析用色谱柱为 Kromasil 100-5 C18 填充的色谱分离柱(内径 4.6 mm、长 25 cm)。流动相为甲醇:水(80:20, V:V),流速为  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,使用紫外检测器检测,检测波长为 250 nm,进样量为  $20 \mu\text{L}$ 。为了绘制标准曲线,将  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  苯胺母液逐级稀释,分别配制成浓度为 1、5、10、25、50、100、250、500、1000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的苯胺标准溶液,以峰面积( $y$ )为纵坐标、苯胺浓度( $x$ )为横坐标,绘制标准曲线。苯胺标准物浓度的线性回归方程为  $y=36\,172x+1.4 \times 10^5$ ,相关系数为 0.999 2,线性范围为 1~1000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 1.4 影响菌株 E2 降解苯胺的因素分析

### 1.4.1 温度对菌株 E2 降解苯胺的影响

在基础盐培养基中添加苯胺浓度至  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 5%接种量接入菌株 E2 菌液, 设接种灭活的 E2 为对照, 分别在 15、20、25、30、35、40 °C 的条件下  $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养 3 d 后取样测定苯胺含量。

### 1.4.2 pH 对菌株 E2 降解苯胺的影响

在 pH 5~11 的基础盐培养基中添加苯胺浓度至  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 5%接种量接入菌株 E2 菌液, 设接种灭活的 E2 为对照, 30 °C、 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 3 d 后取样测定培养液中苯胺含量。

### 1.4.3 苯胺起始浓度对菌株 E2 降解苯胺的影响

在基础盐培养基中添加不等量的苯胺, 使其终浓度为 100、200、500、800、1000、2000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以 5%接种量接入菌株 E2 菌液, 设接种灭活的 E2 为对照, 30 °C、 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养 3 d 后取样测定苯胺含量。

## 1.5 菌种鉴定

### 1.5.1 形态及生理生化指标鉴定

对分离到的菌株进行形态及生理生化特性检测<sup>[21]</sup>。

### 1.5.2 菌株 16S rDNA 扩增及序列测定

提取菌株 E2 的总 DNA。以总 DNA 为模板, 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 扩增反应的引物为一对 16S 通用引物:

正向引物: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

反向引物: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

PCR 反应体系 (50  $\mu\text{L}$ ) 为: 10×PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTP ( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 正反引物 ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 33.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 5 min。反应结束后取 3  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 条带清晰明亮则用 PCR 回收试剂盒 (AXYGEN 公司) 回收纯化, TA 克隆后进行测序。测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成, 测序结果在 NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 与相关的 16S rDNA 序列进行同源性比对分析, 菌株的系统发育分析采用 Mega 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) 软件完成。

### 1.6 菌株 E2 的底物降解谱

在基础盐培养基中添加苯胺衍生物浓度至  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 5%接种量接入菌株 E2 菌液, 设接种灭活的 E2 为对照, 30 °C、 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养 3 d 后取样检测苯胺衍生物的降解情况。每种苯胺衍生物的降解实

验设 3 个重复, 苯胺衍生物的浓度检测方法同苯胺。

## 1.7 苯胺降解基因簇的遗传排列比较

我们先利用 Kayashima<sup>[23]</sup>报道的简并引物扩增菌株 E2 的高度保守片段。扩增反应的简并引物如下:

正向引物: 5'-GAYAAAYGCNGGNGAYGGNTAYC-3'

反向引物: 5'-NCGNCCNGGYTGNGGNC-3'

PCR 反应体系与反应条件同上。PCR 产物回收纯化, TA 克隆后进行测序。然后利用扩增的高度保守片段, 通过染色体步移获得菌株 E2 中负责苯胺降解的基因簇。SEFA-PCR 引物设计: 为扩增的高度保守片段的上下游分别设计引物:

为扩增上游设计的 SEFA-PCR 引物为:

QSp1: GGTGTTCCAGAACTACCGGGACCCTC

QSp2: CCTCATCGGACCATCGTCGGGGTCTTG

QSp3: CGAGTAGCGACCTGTNNNNNNNNNATG-GAT

为扩增下游设计的 SEFA-PCR 引物为:

RSp1: TACCATCCATCGTTCTCACACAGGTCCG

RSp2: AAGACCCCGACGATGGTCCGATGAGGG

RSp3: CGAGGGTCCCGGTAGNNNNNNNNNCAA-CCA

SEFA-PCR 扩增:

扩增体系: 15  $\mu\text{L}$  2×GC buffer I, 5  $\mu\text{L}$   $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 2  $\mu\text{L}$   $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Sp3, 1.5 U LA-Taq, 1.5  $\mu\text{L}$  模板 (扩增的高度保守片段), 总体积 30  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件: 94 °C 1 min; 94 °C 30 s, 40 °C 3 min, 以每秒增加 0.2 °C 的速度升至 70 °C, 70 °C 5 min。取出 PCR 管加入 2  $\mu\text{L}$   $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Sp1 作为引物后继续进行 PCR, 反应条件: 94 °C 30 s, 60 °C 5.5 min, 25 个循环。接下来进行 8 轮不对称 PCR: 94 °C 30 s, 60 °C 5.5 min, 2 个循环; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 1 个循环; 8 轮不对称 PCR 完成后再 70 °C 延伸 5 min。

SEFA-PCR 产物的扩增:

扩增体系: 15  $\mu\text{L}$  2×GC buffer I, 5  $\mu\text{L}$   $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs, 2  $\mu\text{L}$   $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Sp2, 1.5 U LA-Taq, 1.5  $\mu\text{L}$  SEFA-PCR 扩增产物 (作为模板), 总体积 30  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 5 min, 33 个循环; 72 °C 10 min。

PCR 产物回收纯化, TA 克隆后进行测序。利用 BioEdit 等软件对克隆序列进行序列的拼接。将得到的 DNA 片段进行 ORF (开放阅读框) 在线查找分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), 并采用 BLASTX 对每一个 ORF 进行同源性比对, 推测各基

因功能,并与已报道的苯胺降解基因簇在基因组成、排布及同源性等方面进行比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离及鉴定

利用富集培养法,我们从农药厂的活性污泥中分离到多株苯胺降解菌,由于菌株 E2 与已报道的苯胺降解菌相比,其降解谱显著不同,所以本文以菌株 E2 作为研究材料。菌株 E2 为革兰氏阳性菌,菌落呈红色圆形、中间隆起、表面光滑不透明、边缘整齐,细胞形态为球状或短杆状,不产芽孢,无鞭毛,不运动。以菌株 E2 的基因组 DNA 为模板,用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,得到长度为 1486 bp 的 16S rDNA 基因序列(GenBank 登录号为 JN712914),其与模式菌株嗜吡啉红球菌 (*Rhodococcus pyridinivorans*) 的 16S rDNA 序列相似率达 99.9%(图 1),结合形态和生理生化特征,我们将菌株 E2 鉴定为 *Rhodococcus* sp. 属的细菌。

### 2.2 影响菌株 E2 降解苯胺的因素分析

#### 2.2.1 温度和 pH 对菌株 E2 降解苯胺的影响

分别调节菌株 E2 降解苯胺的温度和 pH,测定对菌株 E2 降解苯胺的影响。结果显示(图 2 和图 3),菌

株 E2 在较低和较高的温度下对苯胺的降解率在 50%以下;在 30~35 °C 时降解效果较好,降解率能达到 80%以上;降解的最适温度为 30 °C。在 pH 7~9 之间苯胺的降解较好,降解率都达到 80%以上,降解的最适 pH 为 7.0。

#### 2.2.2 苯胺浓度对菌株 E2 降解苯胺的影响

苯胺终浓度为 100、200、500、800、1000、2000 mg·L<sup>-1</sup> 的基础盐培养基中,以 5% 接种量接入菌株 E2 菌液,30 °C、170 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养,分时取样测定苯胺含量。结果显示(图 4 和图 5),当苯胺浓度在 100 mg·L<sup>-1</sup> 以下时,菌株 E2 能在 1 d 内完全降解苯胺;当苯胺浓度在 100~800 mg·L<sup>-1</sup> 之间,菌株 E2 能在 4 d 内降解苯胺;而当苯胺浓度在 1000 mg·L<sup>-1</sup> 以上,6 d 后测定苯胺浓度仍在 80%以上,说明该浓度严重抑制菌株 E2 对苯胺的降解。

### 2.3 菌株 E2 对苯胺衍生物的降解

为了研究菌株 E2 的底物谱,我们选择了 16 种常见的苯胺类衍生物(表 1)。HPLC 检测结果显示,在 3 d 内,菌株 E2 对邻甲基苯胺、对甲基苯胺和 2,5-二氯苯胺降解率分别为 97%、96%和 93%,而对其他底物无显著降解效果。如上所述,菌株 UCC22 与 AD9 只能降解苯胺、间甲基苯胺和对甲基苯胺(不能降解

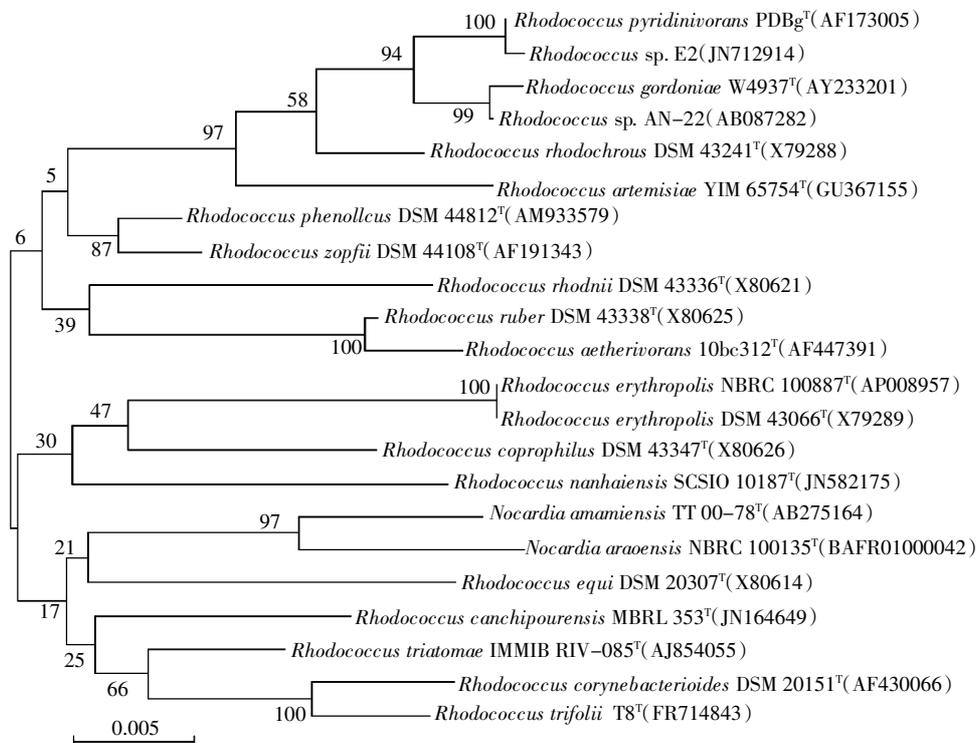
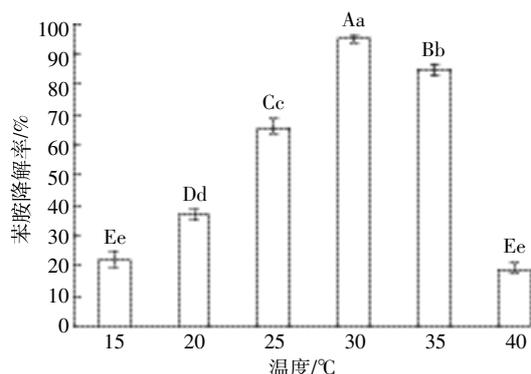


图 1 菌株 E2 和相关菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree constructed by neighbor-joining analysis based on 16S rRNA gene sequences of strain E2 and related species



图中不同大写和小写字母分别代表差异极显著( $P<0.01$ )和差异显著( $P<0.05$ ),下同

Different capital and small letters show significant differences at  $P<0.01$  and  $P<0.05$ , respectively. The same as below

图2 温度对菌株 E2 降解苯胺的影响

Figure 2 Effect of temperate on aniline degradation by strain E2

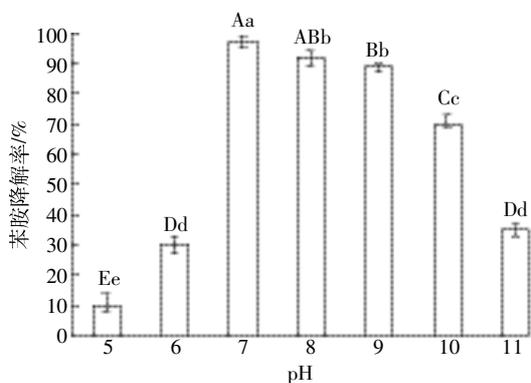


图3 pH 值对菌株 E2 降解苯胺的影响

Figure 3 Effect of pH on aniline degradation by strain E2

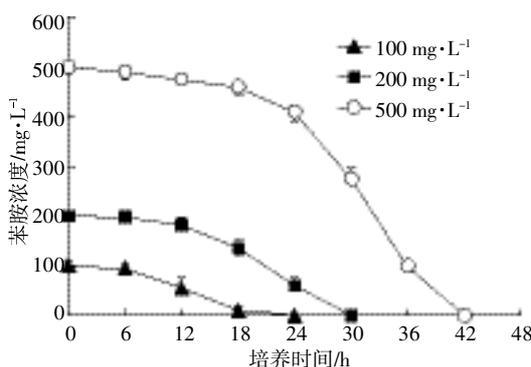


图4 苯胺低初始浓度对菌株 E2 降解苯胺的影响

Figure 4 Effect of low initial concentrations of aniline on its degradation by strain E2

邻甲基苯胺);菌株 YAA 只能降解苯胺和邻甲基苯胺(不能降解间甲基苯胺和对甲基苯胺);菌株 AN3 只能降解苯胺。菌株 E2 的底物降解谱与目前已报道的苯胺降解菌的有显著差异,尤其是它可以同时降解邻

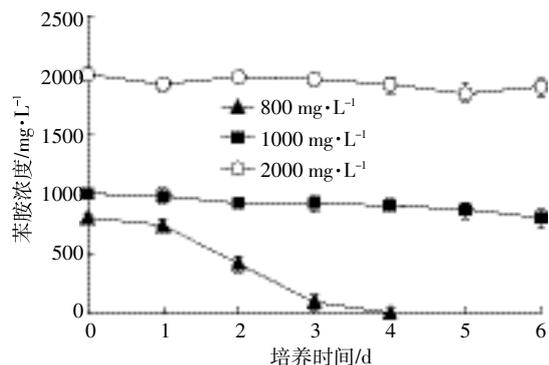


图5 苯胺初始浓度对菌株 E2 降解苯胺的影响

Figure 5 Effect of high initial concentrations of aniline on its degradation by strain E2

表1 菌株 E2 的底物降解谱

Table 1 Substrate spectrum of strain E2

底物	降解情况
苯胺	+
邻甲基苯胺	+
间甲基苯胺	-
对甲基苯胺	+
4-异丙基苯胺	-
邻氯苯胺	-
间氯苯胺	-
对氯苯胺	-
2,4-二甲基苯胺	-
3,4-二甲基苯胺	-
3,5-二甲基苯胺	-
3-氯-4-甲基苯胺	-
2,3-二氯苯胺	-
2,4-二氯苯胺	-
2,5-二氯苯胺	+
3,4-二氯苯胺	-
3,5-二氯苯胺	-

注: +为可降解;-为不降解。

甲基苯胺和对甲基苯胺,却不能降解间甲基苯胺,这暗示其具有不同的分子机制。

## 2.4 苯胺降解基因簇的克隆与分析

为了获得菌株中负责苯胺氧化的基因,我们利用 Kayashima 等<sup>[22]</sup>报道的简并引物进行扩增,这些引物被证明对已报道的苯胺氧化酶基因有较好的敏感性和特异性。利用简并引物我们成功获得了 224 bp 的高度保守片段,并进一步通过染色体步移技术得到了 8825 bp 包含苯胺氧化酶基因簇的 DNA 片段(GenBank 上登录号为 KJ473713)。

将得到的 DNA 片段进行 ORF 在线查找分析,并

采用 BLASTX 对每一个 ORF 进行同源性比对 (表 2), 推测各基因功能。从对每一个 ORF 的分析比对结果来看, 菌株 E2 的苯胺降解基因与已报道的基因在氨基酸水平上有比较高的同源性, 最高相似度均在 50%~100% 之间。在高的同源性比对相似度情况下推测目标基因的功能具有很高的可信度, 因此, 我们根据比对结果推测了基因簇上每一个 ORF 的可能功能, 依次为编码 IclR 家族调节基因 (IclR)、RpiR 家族调节基因 (RpiR)、苯胺双加氧酶大小亚基 (A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>)、谷氨酰胺氨基转移酶 (T<sub>1</sub>T<sub>2</sub>)、谷氨酰胺合成酶 (Q)、2Fe-2S 还原蛋白 (Fd) 及苯胺双加氧酶还原酶 (B)。

菌株 E2 的苯胺降解基因簇与已报道的基因簇比较结果 (图 6) 显示, 因为同属红球菌, 所以菌株 E2 和 AN-22<sup>[23]</sup> 的基因簇在基因组成、排列方式及氨基酸的相似性方面非常接近。菌株 E2 和 AN-22 在氧化酶大小亚基以及铁氧还蛋白方面具有极高的相似性 (> 90%), 但在谷氨酰胺氨基转移酶 (T<sub>1</sub>T<sub>2</sub>)、谷氨酰胺合成酶 (Q) 以及还原酶 (B) 方面相似性较低 (55%~79%), 说明在红球菌中苯胺基因簇既有一定的保守性, 也有一定的菌株特异性。

菌株 E2 和 AN-22 的苯胺基因簇与来自革兰氏阴性菌的有较大差别。首先, 在功能基因组成上, 革兰

表 2 8825 bp DNA 片段 ORF 功能推测

Table 2 Speculated functions of each ORF identified within 8825 bp DNA fragment

ORF	Identity(aa sequence)	Homologue protein	Homologue protein source(GenBank ID)
IclR	74%	IclR family transcriptional regulator	WP_003934520
RpiR	68%	RpiR family transcriptional regulator	WP_005193789
A <sub>1</sub>	95%	large subunit of aniline dioxygenase	BAH56716
A <sub>2</sub>	96%	small subunit of aniline dioxygenase	BAH56717
T <sub>1</sub>	61%	glutamine amidotransferase	WP_005193781
Q	79%	glutamine synthetase	ETA08098
Fd	90%	2Fe-2S ferredoxin	BAH56719
B	73%	aniline dioxygenase reductase	BAH56720
T <sub>2</sub>	55%	glutamine amidotransferase	WP_006333791

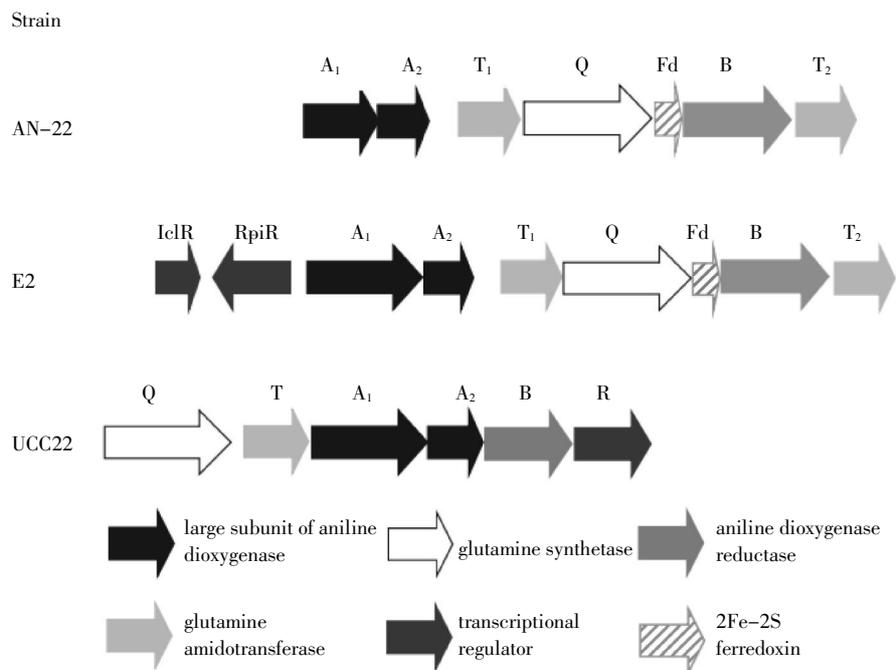


图 6 菌株 E2 苯胺降解基因簇与已报道的具有代表性的基因簇比较

Figure 6 Comparison of aniline-degrading gene clusters with existing ones

氏阴性菌的苯胺基因簇含有5个功能基因( $QTA_1A_2B$ ),而菌株E2和AN-22多出一个T和一个铁氧还蛋白(Fd)。其次,在基因的排布上,革兰氏阴性菌为 $QTA_1A_2B$ ,而菌株E2和AN-22则为 $A_1A_2T_1QFdBT_2$ 。最后,各个亚基在氨基酸水平上的相似性较低(最高相似度<51%)。

根据Kweon等<sup>[24]</sup>提出的还原酶分类方法,菌株E2和AN-22的还原酶B是GR-type(其中不含铁硫还原蛋白结构域),该类还原酶在为氧化酶提供电子时需要铁氧还蛋白的配合,这可以解释为何这两个基因簇中多了铁氧还蛋白。相反,来自革兰氏阴性菌基因簇的B可能是FNR<sub>C</sub>-type或FNR<sub>N</sub>-type,这两种B都含有铁硫还原蛋白结构域,所以在为氧化酶提供电子时不需要额外的铁氧还蛋白。

2007年,Ang等<sup>[25]</sup>发现氧化酶大亚基A<sub>1</sub>在控制底物范围和酶活性方面起重要作用。2013年,Takeo等发现 $Acinetobacter$  sp. YAA的氧化酶亚基A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>不能直接作用于苯胺,而是必须先通过Q将苯胺转化为 $\gamma$ -谷氨酰苯胺,然后才能被A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>转化为邻苯二酚。因此,我们推测苯胺基因簇的底物谱可能由A<sub>1</sub>和Q共同决定,下一步我们将分别研究Q、A<sub>1</sub>和T的功能,解释底物谱和催化效率分别由哪些亚基决定,为该多组分的改造、拓宽其底物谱提供参考。

### 3 结论

本研究从江苏省南通市某农药厂的活性污泥中分离出一株苯胺降解菌株E2。根据表型特征、生理生化特性和16S rDNA序列系统发育分析,将其鉴定为红球菌属( $Rhodococcus$  sp.)。菌株E2降解苯胺的最适温度为30℃,最适pH为7.0。能降解苯胺的最高浓度为800 mg·L<sup>-1</sup>。菌株E2能降解苯胺、邻甲基苯胺、对甲基苯胺和2,5-二氯苯胺,其底物谱与已报道的苯胺降解菌不同。通过扩增高度保守的片段和染色体步移,我们获得了菌株E2中负责苯胺降解的基因簇。该基因簇在基因组成、排布及同源性方面和已报道的基因簇有较大差异,是研究苯胺降解分子机理的较好材料。根据文献报道,我们推测苯胺基因簇的底物谱可能由Q和A<sub>1</sub>共同决定,下一步我们将分别研究Q、A<sub>1</sub>和T的功能,解释底物谱和催化效率分别由哪些亚基决定,并利用定向进化拓宽其底物谱。

#### 参考文献:

[1] 张逸飞,何卿,焦涛,等.微生物降解苯胺的研究进展[J].污染防

治技术,2009,22(1):35-39.

ZHANG Yi-fei, HE Qing, JIAO Tao, et al. Research progress of micro-biological degradation of aniline[J]. *Pollution Control Technology*, 2009, 22(1):35-39.

[2] 张印德,高玉芝,傅鸣远.苯的氨基、硝基化合物中毒的防治[M].北京:化学工业出版社,1982.

ZHANG Yin-de, GAO Yu-zhi, FU Ming-yuan. Aromatic amino, nitro compounds poisoning prevention[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1982.

[3] Padmanabhan J, Parthasarathi R, Subramanian V, et al. Theoretical study on the complete series of chloroanilines[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2006, 110(32):9900-9907.

[4] Argese E, Bettiol C, Agnoli F, et al. Assessment of chloroaniline toxicity by the submitochondrial particle assay[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(4):826-832.

[5] Lyons C D, Katz S, Bartha R. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(3):491-496.

[6] Kahung H Y, Kukor J J, Oh K H. Characterization of strain HY99, a novel microorganism capable of aerobic and anaerobic degradation of aniline[J]. *FEMS Microbiol Letters*, 2000, 190(2):215-221.

[7] Murakami S, Nakanishi Y, Shinke R, et al. Catechol 1, 2-dioxygenase isozymes in soil bacteria metabolizing aromatic compounds[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, 23(9):815-819.

[8] Zeyer J, Wasserfallen A, Timmis K N. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an ortho-cleavage pathway[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(2):447-453.

[9] Rhodes M E. Aniline utilization by  $Alcaligenes faecalis$ : a taxonomic reappraisal[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1970, 33(4):714-720.

[10] Anson J G, Mackinnon G. Novel  $Pseudomonas$  plasmid involved in aniline degradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(4):868-869.

[11] Kim S I, Leem S H, Choi J S, et al. Cloning and characterization of two catA genes in  $Acinetobacter lwoffii$  K24[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(16):5226-5231.

[12] Aoki K, Shinke R, Nishira H. Metabolism of aniline by  $Rhodococcus erythropolis$  AN-13[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1983, 47(7):1611-1616.

[13] Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, et al. Rapid biodegradation of aniline by  $Frateriia$  species ANA-18 and its aniline metabolism[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(4):856-872.

[14] Bachofer R, Lingens F, Schafer W. Conversion of aniline into pyrocatechol by a  $Nocardia$  sp. incorporation of oxygen-18[J]. *FEBS Letters*, 1975, 50(2):288-290.

[15] Liang Q F, Takeo M, Chen M, et al. Chromosome-encoded gene cluster for the metabolic pathway that converts aniline to TCA-cycle intermediates in  $Delftia tsuruhatensis$  AD9[J]. *Microbiology*, 2005, 151(10):3435-3446.

[16] Fujii T, Takeo M, Maeda Y. Plasmid-encoded genes specifying aniline oxidation from  $Acinetobacter$  sp. Strain YAA[J]. *Microbiology*, 1997, 143(1):93-99.

- [17] Fukumori F, Saint C P. Nucleotide sequences and regulational analysis of gene involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22 (pTDN1)[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(2): 399-408.
- [18] Takeo M, Fujii T, Maeda Y. Sequence analysis of the genes encoding a multicomponent dioxygenase involved in oxidation of aniline and *o*-toluidine in *Acinetobacter* sp. strain YAA[J]. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 1998, 85(1):17-24.
- [19] Takeo M, Ohara A, Sakae S, et al. Mechanism of bacterial aniline oxidation via  $\gamma$ -glutamylamide: Function of a glutamine synthetase-like protein[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 10:1128.
- [20] Wang S M, He J, Cui Z L, et al. Self-formed adaptor PCR: A simple and efficient method for chromosome walking[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15):5048-5051.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [22] DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Common bacterial system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [22] Kayashima T, Suzuki H, Maeda T. Real-time PCR for rapidly detecting aniline-degrading bacteria in activated sludge[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(9):1338-1343.
- [23] Matsumura E, Ooi S, Murakami S. Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1, 2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus* sp. AN-22[J]. *Journal of Bio-science and Bioengineering*, 2004, 98(2):71-76.
- [24] Kweon O, Kim S J, Baek S. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases[J]. *BMC Biochemistry*, 2008, 9:11.
- [25] Ang E L, Obbard J P, Zhao H M. Probing the molecular determinants of aniline dioxygenase substrate specificity by saturation mutagenesis[J]. *FEBS Journal*, 2007, 274(4):928-939.



## 新书推荐



### 气候变化与土地利用/覆被变化的水文响应

《气候变化与土地利用/覆被变化的水文响应》是作者对太湖地区西苕溪小流域进行研究的成果总结。

全书共分为7章, 内容主要包括绪论、流域土地利用、覆被变化与景观格局分析、流域降水径流变化及其关系分析、径流对气候变化和人类活动的响应、基于 InVEST 模型的流域径流模拟、未来情景的水文水资源响应、结论与展望。

※书号: 9787122196712      ※定 价: 58.0 元  
 ※开本: 16                      ※出版日期: 2014年5月



### 煤矿区三废治理技术及循环经济

本书从技术层面系统地介绍了煤矿区三废治理技术及循环经济发展模式。全书共分成两篇: 上篇是末端治理技术, 包括煤矿区废水(矿井水、生活污水、洗煤废水)来源及处理技术, 煤矿区固体废物(煤矸石、粉煤灰、生活垃圾、煤泥)来源及处理、处置技术, 煤矿区废气(瓦斯气、粉尘、烟气)来源及治理技术, 及煤矿区生态治理与修复技术等内容; 下篇为清洁生产及循环经济, 包括煤炭开采、加工及利用过程中的清洁生产技术和煤矿区循环经济发展模式、实例等。

※书号: 9787122191236      ※定 价: 68.0 元  
 ※开本: 16                      ※出版日期: 2014年3月

如需更多图书信息, 请登录 [www.cip.com.cn](http://www.cip.com.cn)

服务电话: 010-64518888, 64518800(销售中心)

网上购书可登录化学工业出版社天猫旗舰店: <http://hxgyCBS.tmall.com>

邮购地址: (100011)北京市东城区青年湖南街13号 化学工业出版社

如要出版新著, 请与编辑联系, 联系电话: 010-64519525。