

文章编号:1673-1689(2008)01-0084-06

末端限制性酶切片段长度多态性分析 一个能够降解聚乙烯醇的混合体系

张颖¹, 堵国成^{2,3}, 刘和^{2,3}, 李光伟^{2,3}, 陈坚^{*2,3}

(1. 江南大学生态纺织教育部重点实验室, 江苏无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122; 3. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 用末端限制性酶切片段长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术在 DNA 水平分析了一个能够彻底降解 1 g/L 聚乙烯醇(PVA)1799 的混合微生物体系在降解 PVA 过程中, 混合体系的微生物种类及数量的变化。并用高效液相法(HPLC)对该混合体系降解 PVA1799 的中间产物进行了初步研究, 发现在降解过程中有乙酸及甲基酮类物质生成, 提出了该混合体系降解 PVA1799 的可能途径。

关键词: 聚乙烯醇(PVA); 混合体系; 生物降解

中图分类号: Q 789

文献标识码: A

A Poly(vinyl alcohol)-Degrading Mixed Culture Analyzed by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

ZHANG Ying¹, DU Guo-cheng^{2,3}, LIU He^{2,3}, LI Guang-wei^{2,3}, CHEN Jian^{*2,3}

(1. Key Laboratory of Eco-Textiels, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The dynamic composition of species and quantity in a mixed culture, which was capable of completely degrading 1 g/L poly (vinyl alcohol) (PVA) 1799, was investigated using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) technology during the degradation process. The process of PVA degradation by the mixed culture was investigated using HPLC, etc. Besides the extracellular PVA-degrading enzymes, the bacterial cells also played a very important role in PVA degradation. Small PVA molecules were found in the cell extract. Acetic acid and methyl-ketone substance were produced during the degradation process. A possible pathway was proposed for PVA degradation by the mixed culture.

Key words: poly (vinyl alcohol); mixed culture; bio-degradation

聚乙烯醇(PVA)是一种人工合成的水溶性高分子化合物, 在纺织、造纸、化工等行业有广泛的用

收稿日期: 2007-01-04.

基金项目: 国家 863 计划项目(2003AA322050); 江苏省高技术项目(BG2005016); 新世纪优秀人才支持计划.

作者简介: 张颖(1974-), 女, 贵州贵阳人, 工学博士, 讲师, 主要从事纺织生物技术的研发.

* 通讯作者: 陈坚(1962-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事工业生物技术及环境治理等方面的研究. Email: jchen@jiangnan.edu.cn

途,但是在自然环境中它很难被降解,是水体中的主要污染物之一,特别是在纺织工业废水中。自从日本学者 Suzuki 在 1973 年分离得到能产胞外 PVA 降解酶的假单胞菌 *Pseudomonas* 0-3 以来^[1],国内外对 PVA 生化降解的研究十分活跃^[2-4]。PVA 生化降解的关键在于筛选到能够高效降解 PVA 的微生物。目前的研究发现,PVA 降解菌在大自然中并不是广泛存在的,并且单一菌株降解 PVA 的效率很低,经过长时间培养仍难以达到彻底降解 PVA 的目的^[4-7]。作者所在研究室前期研究的结果也说明了这一点^[9-11]。有研究者^[12-13]认为,要靠单一微生物实现对 PVA 的彻底降解是非常困难的,只有通过多种微生物的协同作用才能达到对这种高聚物的彻底降解,并对一个能够彻底降解培养体系中 PVA 的混合体系进行了初步研究。混合体系是否通过多种微生物的协同作用完成对 PVA 的彻底降解,如果是,这些微生物是如何作用的?它们通过何种途径降解 PVA?关于这方面的研究目前还未见报道。末端限制性酶切片长度多态性(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术^[8]可以在 DNA 水上平直接研究环境微生物的种群结构,只要各种微生物的靶核酸序列(即 DNA)存在,即使含量比较低,或者存在于复杂的混合物(如土壤中各类微生物的细胞提取液)中,通过 PCR 技术也能够把它们扩增和检测出来。作者所在研究室在前期研究中,从无锡太平洋纺织厂 PVA 退浆车间的下水道口筛选到一个能完全降解 1 g/L PVA1799 的混合体系,采用 T-RFLP 技术分析了降解过程中混合体系中存在的微生物种类及其数量的变化。并用高效液相(HPLC)等方法对该混合体系降解 PVA1799 的过程进行了研究,并提出了该混合体系降解 PVA1799 的可能途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 筛选培养基(g/L):PVA1799 1.0, NH_4NO_3 1.0, 酵母粉 1.0, K_2HPO_4 1.6, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, NaCl 0.02; pH 7.2。

1.1.2 试剂 实验用 PVA(No. 1799, 聚合度 1700, 醇解度 99.0%; No. 124, 聚合度 400, 醇解度 99.0%), 购于四川维尼纶厂;其他实验药品均为分析纯。T-RFLP 实验中所用的酶均购自大连宝生物公司;DNA 提取试剂盒(3SDNA Isolation Kit

V2.1)购自上海申能博彩生物科技有限公司;PCR 纯化试剂盒购自大连宝生物公司;引物由上海基康生物技术有限公司合成并标记。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 将在筛选培养基中培养 4 d 的混合体系用移液管吸取 1 mL 接入装有 30 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中,于 30 °C、200 r/min 振荡培养至培养体系中的 PVA 耗尽。

1.2.2 T-RFLP 分析 提取待测样品的总 DNA,用通用引物扩增 16S rDNA。引物的 5'端有荧光标记,以便给扩增产物加上标记。扩增产物用能够识别碱基位点的内切酶消化,消化产生带荧光标记的 5'末端限制性片段,用自动化 DNA 测序仪分析这些片段的大小和浓度,从而可以知道待测样品中的微生物数量和丰度。

1)DNA 的提取:筛选培养基中培养至不同时间的混合体系细胞约 200 mg,提取总 DNA。向细胞中加入 50 mg 玻璃珠,用细胞破碎仪(Fastprep, ThermoBIO101)破碎细胞(速度 4.5 m/s, 每次 30 s, 4 次),破碎后的细胞用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。用 0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳经 SYBR Gree 染色检验提取总 DNA 片段。

2)细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增和纯化:采用通用引物进行扩增,正向引物为 8-27F(5'-agagtttgatcmtggctcag-3'),反向引物为 1378R(5'-cgggtgtgtacaagcccggaacg-3'),其中正向引物 5'端用 6-羧基四甲基若丹明(FAM)标记。

50 μL 的 PCR 反应体系组成如下: Taq DNA 聚合酶缓冲液 5 μL , MgCl_2 2.5 mmol/L, dNTP (each) 0.2 mmol/L, 正、反向引物各 0.4 mmol/L, 模板 40 ng, Taq 聚合酶(TaKaRa)5 U, ddH_2O 31 μL 。反应程序为:95 °C 预变性 3 min,加 Taq 聚合酶,95 °C 变性 1 min,54.6 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。扩增出来的 PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒纯化。

3)T-RFLP 实验:纯化后的 PCR 产物分别用 *Alu* I、*Hha* I 和 *Hae* III 消化,反应体系 20 μL ,其中 *Alu* I、*Hha* I 或 *Hae* III 8 U,缓冲液 2 μL ,DNA 200 ng。37 °C 消化 2 h,65 °C 灭活 10 min。酶切产物的 T-RFLP 分析由上海基康生物技术有限公司完成。

4)结果分析:用遗传分析仪 AB13700 扫描 16S rDNA 的 *Alu* I、*Hha* I 和 *Hae* III 图谱。酶切图谱上每一个末端限制性酶切片段(TRFs)代表至少一种类型的微生物,峰面积反应该种微生物的相对数量。将获得的 TRFs 数据在 Web 上(<http://>

trflp.limnology.wise.edu/index.jsp)进行检索,确定它们有可能代表的微生物种类^[15]。

1.2.3 甲基酮测定 采用碘仿反应测定体系中的甲基酮^[14]。

1.2.4 HPLC分析 仪器:Agilent 1100,紫外检测器;色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 4.6 mm×150 mm;流动相:0.1 mol/L的K₂HPO₄溶液,用H₃PO₄调节pH 2.5;流速:0.5 mL/min;柱温30℃;进样量5 μL。

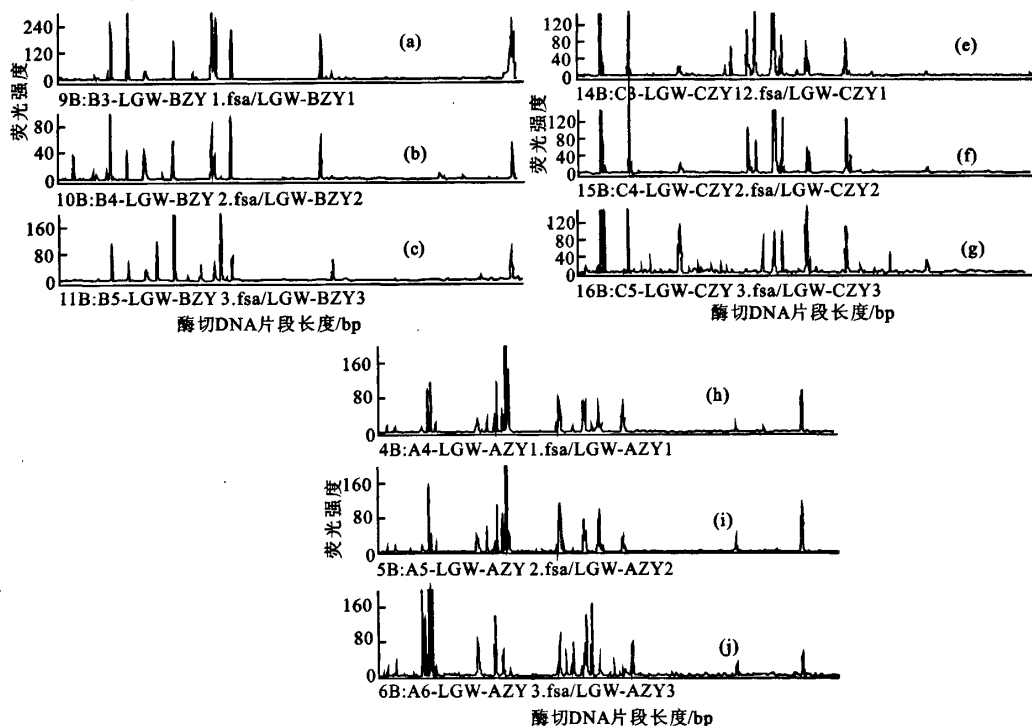
1.2.5 混合体系中PVA降解酶分布测定 将培养体系离心去除细胞,上清液经0.25 μm的膜过滤。取相同体积的滤过液和没有去除细胞的培养体系,考察它们对PVA的降解能力。如果没有去除细胞的培养体系的降解能力总是大于滤过液,就

说明混合体系在降解PVA的过程中,除了分泌到发酵液中的PVA降解酶之外,还有膜上的或者胞内的PVA降解酶参与了PVA的降解^[6]。

2 结果与讨论

2.1 T-RFLP分析混合体系降解PVA1799过程

该混合体系4 d内可基本完全降解1 g/L PVA1799,在降解过程中培养体系的pH值一直呈现下降趋势。用T-RFLP方法分析降解过程中混和体系中微生物种类和数量的变化,通过PCR扩增出来的混合体系16S rDNA分别经Alu I、Hha I和Hae III酶切,酶切后的片段长度分析图谱见图1。根据不同片段长度检索得到不同时间段微生物种类和数量见表1。



a, b, c: 培养 32, 64, 96 h 的混合体系总 16S rDNA 分别被 Hha I 处理; e, f, g: 培养 32, 64, 96 h 的混合体系总 16S rDNA 分别被 Hae III 处理; h, i, j: 培养 32, 64, 96 h 的混合体系总 16S rDNA 分别被 Alu I 处理

图1 T-RFLP实验酶切片段图谱

Fig. 1 T-RFLP results

由表1可见,在降解过程中 *Pseudomonas* sp.、*Flavobacterium* sp.、*Streptococcus* sp. 和 *Micrococcus* sp. 在数量上呈增长趋势,在降解结束时, *Pseudomonas* sp.、*Flavobacterium* sp. 和 *Micrococcus* sp. 分别占了混合体系的30.6%、17.2%和19.7%,成为混合体系中的优势菌群,特别是 *Micrococcus* sp. 是在降解进行到后期才在混合体系中开始占据优势,从降解

进行到64 h时的0.7%增长到降解结束时的19.7%。*Bacillus* sp. 在培养进行到32 h时占混合体系的19.5%,此后呈现减少趋势;*Rhodococcus* sp. 在混合体系中的数量百分比也在降解过程中一直减少。*Sphingomonas* sp. 在降解过程中从32 h的4.9%增加到64 h的11.1%,而在降解结束时只有1.2%;*Paenibacillus* sp. 也呈先多后少的趋势,在降解进行

到 32 h 和 64 h 时分别占混合体系的 24.2% 和 25.4%,而在降解结束时只有 2.0%。

表 1 混合体系降解 PVA1799 过程中的菌群变化的 T-RFLP 分析

Tab. 1 T-RFLP of the mixed culture during degradation of PVA1799

微生物种类	在混合体系中的相对丰度/%		
	培养时间/h		
	32	64	96
<i>Pseudomonas</i> sp.	2.7	6.2	30.6
<i>Sphingomonas</i> sp.	4.9	11.1	1.2
<i>Rhodococcus</i> sp.	7.0	5.5	4.0
<i>Bacillus</i> sp.	19.5	12.8	1.8
<i>Brevibacterium</i> sp.	6.4	7.6	5.8
<i>Flavobacterium</i> sp.	11.6	13.3	17.2
<i>Micrococcus</i> sp.	N	0.7	19.7
<i>Streptococcus</i> sp.	N	0.8	3.6
<i>Leptothrix</i> sp.	8.4	5.0	2.3
<i>Paenibacillus</i> sp.	24.2	25.4	2.0
Unmatched	15.3	11.6	11.8

N: 未发现

混和体系中存在的细菌大部分都能够降解环境中的污染物质^[16-20]。*Pseudomonas* sp.、*Bacillus* sp.、*Sphingomonas* sp. 和 *Rhodococcus* sp. 能够降解 PVA 已有报道^[5,7,16-17]。*Sphingomonas* 属的细菌细胞外膜上含有神经鞘氨糖酯,细胞膜的这

种结构有利于细胞外的物质进入细胞。*Sphingomonas* 还可以在胞内降解聚乙二醇、聚乙烯和聚天门冬氨酸,这些都和它独特的细胞膜结构分不开的^[17]。*Brevibacterium* sp.、*Flavobacterium* sp. 用于降解环境污染物也有报道^[18-20]。

未检索出来的细菌在培养 32、64、96 h 样品中分别占混合体系细菌总数的 15.3%、11.6% 和 11.8%。这些细菌在数据库检索不出,有可能是查询所用的数据库中没有这些细菌的 T-RFLP 实验结果造成的^[21]。

稀释分离混合体系,得到 7 株纯化的细菌,其中 2 株经透明圈法^[4]鉴定为产胞外的 PVA 降解酶,但是这些菌株都不能够单独彻底降解 PVA;将这些分离出的菌株进行混合培养,不能重现原混合体系所具有的彻底降解 PVA 的能力。从细胞型形态来看,分离出来的菌株中有芽孢杆菌。

2.2 混合体系降解过程 HPLC 分析结果

混合体系降解过程 HPLC 分析结果见表 2。根据标样的出峰时间比对,混合体系降解 PVA 过程中有乙酸生成。并且随着培养时间的推移,培养后期图谱中乙酸的峰形逐渐变小,见表 3。90 h 的样品中没有检测出乙酸,说明在降解过程中产生的乙酸能被混合体系逐渐利用。乙酸是 PVA 的结构单元的羧酸形式,有可能是降解的终产物。

表 2 混合体系降解过程的 HPLC 分析结果

Tab. 2 HPLC analysis of PVA biodegradation course by mixed culture

峰 顺序*	保留时间/min							
	培养时间/h							
	0	12	24	36	48	60	72	90
1	3.011	3.731	3.714	3.694	4.767	3.707	3.709	3.708
2	3.261	4.33	4.989**	5.006**	4.989**	4.984**	5.059**	
3		5.085**	6.66	6.669				
4		6.763	12.579					
5		11.562						

* 按照出峰时间排列; ** 乙酸

表 3 混合体系降解 PVA 过程中乙酸峰面积变化趋势

Tab. 3 Acetate peak area change during PVA degradation by mixed culture

培养时间/h	相对峰面积/%
0	0
12	8.5
24	42.9
36	57.6
48	100
60	66.7
72	21.6
90	0

2.3 甲基酮实验

甲基酮测定发现,初始培养基中基本无黄色固体物质产生,12~72 h 培养过程中不同时间段的培养体系均有微量浅黄色固体物质产生,说明培养过程中体系产生甲基酮类物质。

2.4 混合体系降解 PVA 过程讨论

有研究者认为,PVA 先被微生物产生的 PVA 降解酶氧化为 β -双酮类物质,再水解产生带甲基酮和羧基的小分子片段^[6]。这些结论是以一些醇类化合物或者类似乙烯醇的缩合物为底物得到的,PVA 的实际降解过程是否如此,以及在降解过程中

到底产生了一些什么物质,目前还未见报道。

该混合体系可以将培养体系中的 1 g/L PVA1799 彻底降解,降解过程中有乙酸和甲基酮类物质生成。通过测定混合体系中 PVA 降解酶的分布,发现混合体系在降解 PVA 的过程中,除了分泌到发酵液中的 PVA 降解酶之外,细胞也在起作用。说明混合体系中除了有产生胞外 PVA 降解酶的微生物外,还有可能存在产生膜上 PVA 降解酶和胞内 PVA 降解酶的微生物^[6]。并且在降解过程中确

实有相对分子质量较小的 PVA 进入细胞中,并能够进一步被降解掉。

由 T-RFLP 分析结果可知,该混合体系对 PVA 的降解过程是一个动态的过程,各种微生物在降解过程中数量上的变化可能是它们对 PVA 的底物选择性造成的,具有不同底物选择性的各种微生物协同作用,完成对培养体系中 PVA 的彻底降解。混合体系降解 PVA 的可能过程见图 2。

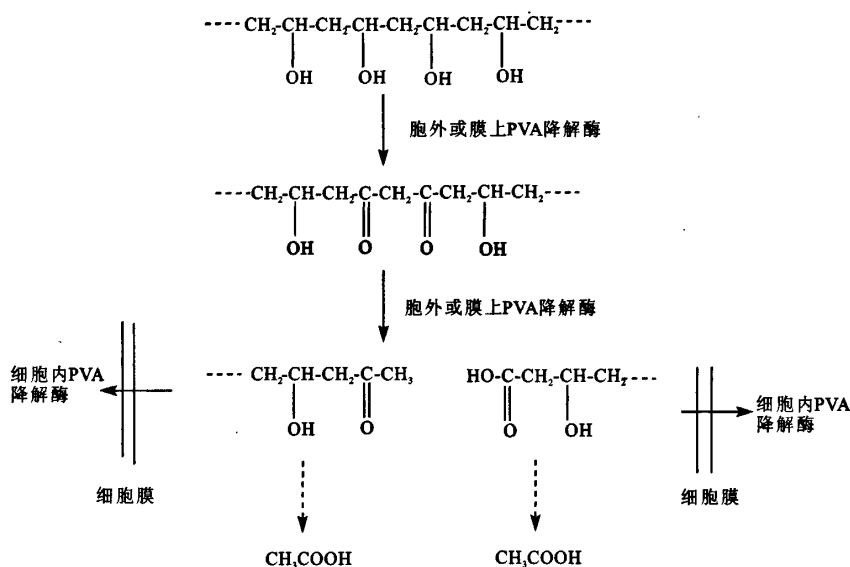


图 2 混合体系降解 PVA 的可能过程
Fig. 2 Possible pathway of PVA degradation by mixed culture

3 结 语

作者用 T-RFLP 方法分析一个能彻底降解 1 g/L PVA1799 的混合体系在降解过程中微生物种类和数量的变化,并用高效液相(HPLC)等方法对该混合体系降解 PVA1799 的中间产物进行了初步

研究。发现在降解过程中有乙酸及甲基酮类物质生成,提出了该混合体系降解 PVA1799 的可能途径。T-RFLP 在 PVA 降解菌群分析中的成功应用为在 DNA 水平分析不同微生物在 PVA 降解过程中的作用建立了一个技术平台,并为 T-RFLP 在更多领域的应用提供了一定的理论依据。

参考文献(References):

- [1] Suzuki T, Ichihara Y, Yamada M, et al. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol [J]. *Agric Biol Chem*, 1973, 37(4):747-756.
- [2] Hoffmann J, Reznickova I, Kozakova J, et al. Assessing biodegradability of plastics based on poly (vinyl alcohol) and protein wastes[J]. *Polym Degrad Stab*, 2003, 79:511-519.
- [3] Tudorachi N, Cascaval C N, Rusu M, et al. Testing of polyvinyl alcohol and starch mixtures as biodegradable polymeric materials[J]. *Polymer Testing*, 2000, 19:785-799.
- [4] 王银善, 庞学军, 方慈祺, 等. 共生细菌 SB1 降解聚乙烯醇的研究—I. 共生细菌 SB1 的分离及某些性质[J]. *环境科学学报*, 1991, 11(2):236-241.

- WANG Yin-shan, PANG Xue-jun, FANG Ci-qi, et al. Degradation of PVA by symbiotic bacteria SB11: Isolation and characterization of symbiotic bacteria SB1[J]. *Acta Sci Circum*, 1991, 11(2):236-241. (in Chinese)
- [5] Mori T, Sakimoto M, Kagi T, et al. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus megaterium* that degrades poly (vinyl alcohol)[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(2):330-332.
- [6] Shimao M, Ninomiya K, Kuno O, et al. Existence of a novel enzyme, pyrroloquinoline quinone-dependent polyvinyl alcohol dehydrogenase, in a bacterial symbiont *Pseudomonas* sp. strain VM15C[J]. *Appl Environ Microbio*, 1986, 52(2): 268-275.
- [7] Kawagoshi Y, Fujita M. Purification and properties of polyvinyl alcohol oxidase with broad substrate range obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. povalolyticus pH[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997,13:273-277.
- [8] Ranjard L, Poly F, Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques; application to soil environment[J]. *Research in Microbiology*, 2000, 151: 167-177.
- [9] Qian D, Du G, Chen J. Isolation and culture characterization of a new polyvinyl alcohol-degrading strain *Penicillium* sp. WSH02-21[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2004, 20: 587-591.
- [10] 宋朝霞, 张颖, 钱鼎, 等. 聚乙烯醇降解酶产生菌的筛选及生物多样性初探[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(4): 100-103.
- SONG Zhao-xia, ZHANG Ying, QIAN Ding, et al. Study on diversity of poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme producing microorganism[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(4): 100-103. (in Chinese)
- [11] 张颖, 李寅, 沈微, 等. 营养条件对青霉菌产聚乙烯醇降解酶的影响[J]. *微生物学报*, 2004, 44(5): 650-653.
- ZHANG Ying, LI Yin, SHEN Wei, et al. Isolation of a *Streptomyces venezuelae* which could produce polyvinyl alcohol degrading enzyme[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 650-653. (in Chinese)
- [12] Corti A, Solaro R, Chiellini E. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) in selected mixed microbial culture and relevant culture filtrate[J]. *Polym Degrad Stab*, 2002, 75:447-458.
- [14] 徐寿昌. 有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1994.
- [15] Kent A D, Smith D J, Benson B J, et al. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 6768-6776.
- [16] 李朝, 贾省芬, 刘志培, 等. 红球菌 J-5 菌株降解聚乙烯醇的研究[J]. *中国环境科学*, 2004, 24(2): 170-174.
- LI Chao, JIA Xing-fen, LIU Zhi-pei, et al. Studies on degradation of polyvinyl alcohol by *Rhodococcus* sp. strain J-5[J]. *China Environmental Science*, 2004, 24(2): 170-174. (in Chinese)
- [17] Kawai F. Sphingomonads involved in the biodegradation of xenobiotic polymers[J]. *J Ind Microbiol Biotech*, 1999, 23, 400-407.
- [18] 郁红艳, 曾光明, 牛承岗, 等. 细菌降解木质素的研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2005, 28(2): 104-106.
- YU Hong-yan, ZENG Guang-ming, NIU Cheng-gang, et al. Advances in biodegradation of lignin by bacteria[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 28(2): 104-106. (in Chinese)
- [19] 陈华, 严莲荷, 王瑛, 等. 难降解有机废水的高效优势菌的研究进展[J]. *工业水处理*, 2005, 25(4): 17-21.
- CHENG Hua, YAN Lian-he, WANG Ying, et al. Progress in the research highly effective degrading bacteria of the refractory organics wastewater[J]. *Industrial Water Treatment*, 2005, 25(4): 17-21. (in Chinese)
- [20] 朱福兴, 王沫, 李建洪. 降解农药的微生物[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(5): 120-123.
- ZHU Fu-xing, WANG Mo, LI Jian-hong. Pesticide degrading microorganisms[J]. *Microbiology*, 2004, 31(5): 120-123. (in Chinese)
- [21] 张汉波, 段昌群, 屈良鹄. 非培养方法在土壤微生物生态学研究中的应用[J]. *生态学杂志*, 2003, 22 (5): 131-136.
- ZHANG Han-bo, DUAN Chang-qun, QU Liang-hu. Culture independent methods for studies on microbial ecology of soils[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2003, 22 (5): 131-136. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)