

对硝基苯酚降解菌 *Pseudomonas* sp. HY1 的 分离与活性分析

吴萍^{1,2} 张海燕² 李梅² 颜忠诚^{1*} 邱星辉^{2**}

(1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; 2. 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)

摘 要

通过驯化富集, 从受污染的土壤中分离出一株降解对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP)的细菌. 16S rDNA 序列分析鉴定该菌为恶臭假单胞菌 *Pseudomonas* sp. HY1. 在有氧, pH7 和 30 °C 条件下, 该菌能利用 PNP 为碳源和能源生长并将中等浓度(100 mg/L)的 PNP 快速彻底的降解, 高浓度(300 mg/L) PNP 条件下未检测到菌的生长和降解活性. 该菌在 15~40 °C 和 pH 值 5~10 的条件下具有降解 PNP 活性, 其中碱性条件(pH 8~10)和 30 °C 时活性最高.

关键词: 对硝基苯酚, 生物降解, 假单胞菌.

中图分类号: Q939.9

硝基苯酚(Nitrophenols, NP) 是一类重要的化工原料, 广泛应用于生产杀虫剂、染料、炸药、除草剂、医药等, 常常在生产和使用过程中被释放到环境中^[1]. 许多有机磷农药如甲基对硫磷、对硫磷在环境中水解以及其它硝基苯酚除草剂的使用, 也会造成硝基苯酚在土壤中的累积^[2]. 硝基苯酚具有较高的毒性和致突变性^[3], 有些甚至是潜在的致癌物质^[2], 已被美国环保总署列为优先污染物^[4]. 从使用量和潜在的危害性来看, 对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP) 是最重要的单硝基酚类化合物^[5]. PNP 对许多生物有毒并可在食物链中富集^[6], 因此具有健康和环境风险, PNP 的毒性及其污染的处理技术是国内外研究的一个重要课题.

生物修复因其成本相对较低而且没有二次污染的特点, 是目前用来大规模消除环境污染的适用技术^[7]. 自然界中存在的微生物种类繁多、适应性强, 具有分解多种多样人工合成的有机物的功能, 对于减少污染、净化环境具有很大的潜力, 是环境生物修复的重要资源^[8]. 筛选出高效降解菌是生物法消除有机污染的关键步骤, 因此降解菌的分离不仅可为污染物的生物修复提供候选的资源, 对污染物的生

物降解途径的研究也具有重要意义. 目前已经分离出不少可降解 PNP 的菌株, 包括 *Arthrobacter*^[9,10], *Burkholderia*^[12], *Ochrobactrum*^[13], *Pseudomonas*^[14-16], *Rhodobacter*^[17], *Rhodococcus*^[18,19], *Stenotrophomonas*^[20] 等, 但由于 PNP 的强细胞毒性, 大多数降解菌只是在较低 PNP 浓度的条件下具有降解活性^[20]. 本研究的目的是分离筛选高效降解 PNP 的细菌, 为 PNP 的生物修复开发资源, 并分析 PNP 浓度、pH 值和温度对其活性的影响, 为降解菌的优先利用打下基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PNP(分析纯, 北京市兴津化工厂); 乙腈(色谱纯); 盐酸 N-(4-氨基)-乙二胺(分析纯, 北京化学试剂公司); 对氨基苯磺酸(分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 琼脂粉(Difco); 琼脂糖(Sigma); IPTG(Merck); *Taq* 酶(TakaRa); pGM-T 载体和 T4 DNA 连接酶、1 kb DNA 分子量标准(TIANGEN).

1.2 培养基

LB 培养基^[21]: 胰蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, NaCl 10 g, ddH₂O 1 L, pH 7.0.

富集培养基^[22]: 蛋白胨 10 g, NaCl 11.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, 葡萄糖 1.0 g, ddH₂O 1 L, pH7.0.

无机盐培养基^[23]: MgSO₄·7H₂O 112 mg, ZnSO₄·7H₂O 5 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 2.5 mg, KH₂PO₄ 340 mg,

收稿日期: 2008-10-13

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-128)资助

** 通讯作者: Yanzc20032003@yahoo.com.cn, qixuh@ioz.ac.cn

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 670 mg, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 14 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.13 mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500 mg, ddH_2O 1 L, pH7.0.

1.3 PNP 降解菌株的富集和分离

将 5 g 采自河南安阳农药厂厂内、车间仓库及厂外玉米地土样加入富集培养基中培养 7 d. 按 5% 的接种量将富集培养物转接到 50 mL 无机盐培养基中, 以 PNP 作为唯一碳源, 驯化富集 PNP 降解菌, PNP 的初始浓度为 5 mg/L, 在 30 °C, 150 rpm 条件下避光振荡培养. PNP 的亮黄色消失后, 再转接到新鲜的无机盐培养基中. 如此转接驯化 6 代, PNP 的浓度从 5 mg/L 逐步提高到 50 mg/L. 将最后一代无机盐驯化培养液梯度稀释 10^{-5} 后, 涂布于含有 50 mg/L PNP 的无机盐琼脂平板上, 30 °C 恒温培养. 长出单菌落后, 挑取周围变为无色的形态不同的单菌落, 连续划线纯化, 得到 PNP 降解菌的纯培养物.

1.4 16S rDNA 基因克隆与测序

提取菌株的基因组 DNA^[24], 以基因组 DNA 为模板, 以 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 为上游引物, 5'-TAC GGT TAC CTT GIT ACG ACT T-3' 为下游引物^[25], PCR 扩增 16S rDNA 序列. PCR 循环条件: 94 °C, 3.5 min; 30 个循环(95 °C 变性 1 min, 41 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1.5 min); 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物经 TA 克隆后, 选取阳性克隆菌株, 进行测序(上海英骏生物技术有限公司北京测序部).

1.5 菌株对 PNP 降解试验

选取活性较高的菌株接种到 50 mL LB 培养基中(PNP 的终浓度为 50 mg/L), 同时加入 50 mg/L PNP, 30 °C, 150 rpm, 驯化培养 36 h, 分别取 1 mL 培养液于 1.5 mL 的无菌离心管中, 4 000 g, 4 °C 离心 10 min, 弃去上清液. 将沉淀细胞用无机盐培养基洗涤三次, 重悬于 1 mL 无机盐培养基中, 作为接种用的种子液. 向 50 mL pH7.0 的无机盐培养基中加入 1 mL 种子液, 使初始 OD_{600} 为 0.1, 再加入 50 μL 50 mg/mL 的 PNP 母液, 使其终浓度为 50 mg/L. 每个处理设定三个重复, 同时设定三个未接菌的空白对照, 置于 30 °C, 150 rpm, 培养. 在 0、2、4、6、8、10、12, 取样, 分别测定 PNP 的残留量, 菌密度(OD_{600}) 以及 NO_2^- 的生成量.

1.6 菌株对 PNP 耐受浓度范围的测定

方法同 1.5, 细胞培养体系中 PNP 终浓度分别为 100 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L. 每个浓度设置 2 个重复, 每隔一天取样一次, 连续取样观察一周, 测定 OD_{600} 和 PNP 的残留量.

1.7 温度与 pH 对菌株降解活性的影响

设定 6 个温度(分别是 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C, pH= 8.0) 和 6 个 pH(分别为 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 温度 30 °C). 50 mL 培养体系中含 50 mg/L 的 PNP, 菌液初始 OD_{600} 为 0.10, 于 150 rpm, 避光振荡培养. 培养 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 各时间点分别检测菌的生长状况(OD_{600}) 和亚硝酸根离子的浓度.

1.8 分析方法

PNP 的定量采取 HPLC 法. 取 0.5 mL 培养液, 离心, 上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进行高效液相色谱(HPLC)分析, 测定底物 PNP 的残留量和 NO_2^- 含量. HPLC 测定条件为^[13]: HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column, DAD 检测器, 波长 291 nm, 柱温 30 °C, 柱压 71 bar, 进样量 20 μL , 流动相: 乙腈: 水(水中含有乙酸 650: 1; pH 3.8) 15: 85, 流速 0.7 mL/min.

NO_2^- 含量的测定采取 Montgomery and Dymock (1961) 方法^[26]. 吸取 50~100 μL 上清液于 10 mL 的比色管中, 加无菌双蒸水至 2.5 mL, 按绘制标准曲线的步骤进行操作, 测定样品在 540 nm 处的吸光度值, 从标准曲线上查得 NO_2^- 的含量.

2 结果与讨论

2.1 PNP 降解菌株的分离与鉴定

土壤培养物在加入 PNP 为碳源的无机盐培养基驯化富集培养 6 代后, 从中分离到 3 株可以降解 PNP 的菌株, 选取活性较高的菌株 HY1 做进一步鉴定和降解特性的研究. 用 16s rRNA 基因序列引物, 以该菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出大约 1.5 Kb 的产物(图 1), 将其纯化后连接到 pGM-T 载体上, 转化到 *E. coli* TOP10(TIANGEN) 感受态细胞中, 蓝白斑筛选出阳性克隆后进行测序.

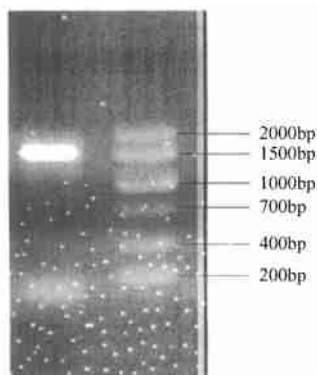


图 1 菌株 HY1 16S rRNA 基因的 PCR 产物

用 BLAST 软件对菌株 HY1 的 16S rRNA 基因序列和 GenBank 中已经登录的序列进行相似性比较, 结果发现菌株 HY1 与多株恶臭假单胞菌属的序列高度同源(表 1), 说明该菌在分子系统发育分类学上属于 γ -变形细菌假单胞菌科假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 属于革兰氏阴性菌, 在此命名为 *Pseudomonas* sp. HY1.

表 1 与菌株 HY1 16S rRNA 基因序列相似性高的微生物

菌株	登记号	相似性
<i>Pseudomonas putida</i>	DQ060242	1 496/1 496(100%)
<i>Pseudomonas putida</i> flt2	DQ192174	1 495/1 496(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> BCNU106	DQ229315	1 493/1 494(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> JG01	DQ458961	1 499/1 501(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> IH-2000	AB029257	1 468/1 470(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> DLL-E4	AF447394	1 498/1 501(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> PD39	DQ836052	1 496/1 499(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> PBM11	DQ087528	1 495/1 498(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC17390	AF094737	1 492/1 495(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> Szhy	AM411058	1 497/1 501(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> S18	AY741157	1 478/1 482(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> WAB1935	AM184274	1 468/1 472(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> Z24zhy	AM411067	1 496/1 501(99%)
<i>Pseudomonas putida</i> IM2	DQ989291	1 496/1 501(99%)
<i>Pseudomonas</i> sp. PHD-8	DQ301785	1 499/1 500(99%)
<i>Pseudomonas</i> sp. ONBA-17	DQ079062	1 495/1 496(99%)
<i>Pseudomonas</i> sp. EP27	AM403529	1 496/1 498(99%)
<i>Pseudomonas</i> sp. WBG-3	AY040872	1 497/1 501(99%)

2.2 菌株对 PNP 降解活性的测定

菌株 HY1 能以 PNP 作为唯一碳源生长, HY1 在 10 h 内能完全降解 50 mg/L 的 PNP, 在 PNP 降解过程中, 以化学反应计量关系释放出亚硝酸根离子, 在 PNP 完全降解时菌增长达到最大(图 2).

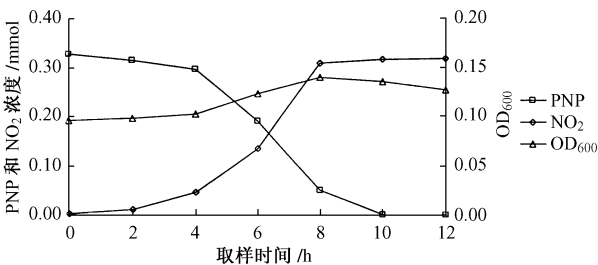


图 2 PNP 降解、 NO_2^- 生成和菌株 HY1 的生长曲线

2.3 菌株对 PNP 耐受浓度范围的测定

图 3 是菌株 HY1 在含 100、300、500 mg/L PNP 的无机盐培养基中的生长情况。可见, 当 PNP 浓度为 100 mg/L 时, 菌株 HY1 在第一天时的生长达到最大。菌的生长与 PNP 的降解是同步的, PNP 浓度为 100 mg/L, 24 h PNP 被全部降解。当 PNP 的浓度高达

300 mg/L 时, 培养液中的 PNP 含量没有明显变化, 菌密度无明显的增长(图 4)。含苯酚结构的化合物在水中的溶解度高, 在其浓度超过 0.5 mmol/L 时可抑制大多数微生物的生长^[27]。有些细菌可以在高浓度的 PNP 下具有降解活性, 但往往要经历较长时间的生长延滞期^[16, 19]。本研究表明在中性 pH 值条件下, HY1 不能耐受高浓度的 PNP, 但能耐受中等浓度的 PNP, 并将 100 mg/L 的 PNP 迅速降解。有研究表明, 在碱性条件下, PNP 毒性降低, 因此适当提高培养液的 pH 值, 有可能提高 HY1 的耐受范围。

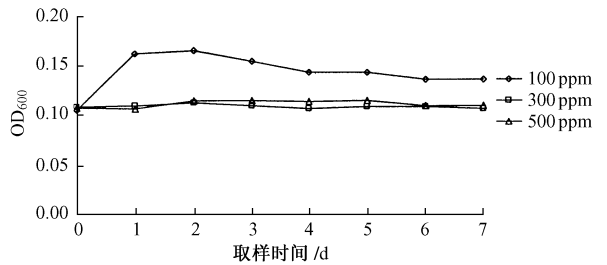


图 3 菌株 HY1 在不同浓度 PNP 下的生长曲线

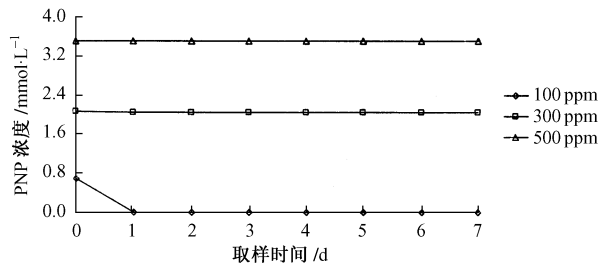


图 4 菌株 HY1 在不同浓度 PNP 下的降解曲线

2.4 温度对菌株代谢活性的影响

温度是影响生物生长和酶促反应的重要因素。从图 5 可以看到, 在 15~40 °C 范围内, HY1 均能耐受, 表现出一定的降解活性。在 30 °C 的培养条件下, 菌株降解活性最高, 6 h 将 50 mg/L 的 PNP 完全降解, NO_2^- 生成量达到最大; 温度低于 30 °C, 随温度的升高, PNP 的降解效果增强。在 40 °C 下, HY1 只表现微弱的降解活性。

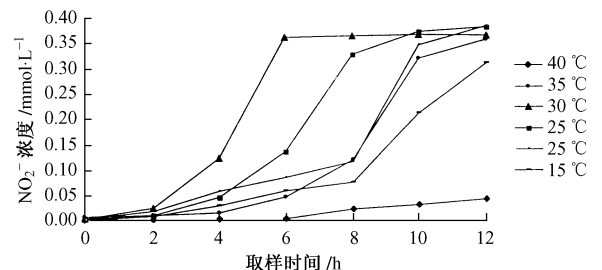


图 5 不同温度条件下 NO_2^- 生成量

2.5 pH 值对菌株代谢活性的影响

合适的 pH 环境是生物赖以生长的基本条件, pH 值直接影响细胞的生长. 此外, 培养液的 pH 值还可以改变 PNP 的细胞毒性. HY1 在不同的 pH 条件下对 PNP 的降解活性如图 6. 在酸性条件下, 菌株降解 PNP 速率较慢, 随着 pH 的增大, 降解速率加快, 在 pH 为 9 的培养条件下, 菌株降解 PNP 的速率达到最快, 6 h NO_2^- 生成量在 pH 为 8, 9, 10 时基本一致, 可见 HY1 适合碱性条件并有较宽的碱性适应范围. 但当 pH 达到 11 时, 由于菌株的大量死亡, 基

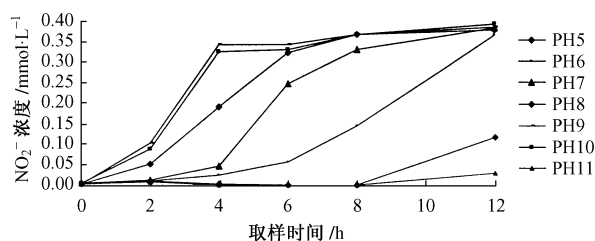


图 6 不同 pH 值条件下 HY1 对 PNP 的降解

本没相位测到 NO_2^- 的生成. 有研究表明, PNP 的毒性随 pH 的降低而增强, 生物在酸性条件下对 PNP 的降解活性下降, 这一结论与我们的研究结果相一致.

3 结 语

Pseudomonas sp. HY1 能以 PNP 为碳源和能源生长, 在 pH 7.0、温度 30 °C 时, 当起始菌的 OD_{600} 为 0.1 时, HY1 在 10 h 内可将 50 mg/L 的 PNP 完全降解, 在 24 h 内能将 100 mg/L 的 PNP 降解完全, 并以化学计量关系释放出亚硝酸根离子, 在 PNP 降解完全时, 菌株生长也达到最大. PNP 对 HY1 具有一定的细胞毒性, HY1 能耐受中等浓度的 PNP, 当 PNP 的浓度达到 300 mg/L 和 500 mg/L 时, HY1 菌的生长都受到抑制, 经过 7 d 的培养, 未检测到 PNP 被降解. pH 值和温度对 HY1 降解 PNP 的活性有较大影响, 在碱性条件 (pH 8~10), 温度 30 °C, 该菌的降解能力最强.

参 考 文 献

- [1] Spain J C. Biodegradation of nitro-aromatic compounds[J]. Annu Rev Microbiol, 1995.
- [2] Bruhn C, Lenke H, Knackmuss H J. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53: 208- 210.
- [3] Spain J C, Hughes J B, Knackmuss H J. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives[M]. Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publishers, 2000. 1- 6.
- [4] US Environmental Protection Agency. Water quality criteria[S]. Washington DC: US Environmental Protection Agency. 1976.
- [5] Karin K, Gupta S K. Effects of alternative carbon sources on biological transformation of nitrophenols[J]. Biodegradation, 2002, 13: 353- 360.
- [6] Donlon B A, Razo-Flares E, Lettiga G, et al. Continuous detoxification, transformation and degradation of nitrophenol in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 51: 439- 449.
- [7] Ammann P R, Koch G S. Technical and economic analyses in the development of bioremediation processes[J]. Remediation, 1993, 4(1): 115- 128.
- [8] 尹萍, 杨彦希. 微生物降解硝基芳香烃及其在环境保护中的应用[J]. 环境科学, 1998, 19(6): 79- 82.
- [9] Chauhan A, Chakraborti A K, Jain R K. Plasmid encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arothrobacter protophormiae*[J]. J Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270: 733- 740.
- [10] Jain R K, Dreisbach J H, Spain J C. Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1, 2, 4-benzenetriol by an *Arothrobacter* sp[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 3030- 3032.
- [11] Kadiyala V, Semets B F, Chandrank, et al. High affinity *p*-nitrophenol oxidation by *Bacillus sphaericus* JS905[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 166: 115- 120.
- [12] Bhushan B, Chauhan A, Samanta S K, et al. Kinetics of biodegradation of *p*-nitrophenol by different bacteria[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 274: 626- 630.
- [13] Qi X H, Zhong Q Z, Li M, et al. Biodegradation of *p*-nitrophenol by methyl parathion-degrading *Ochrobactrum* sp. B2[J]. International Biodeterioration Biodegradation, 2007, 59: 297- 301.
- [14] Prakash D, Chauhan A, Jain R K. Plasmid encoded degradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 224(2): 375- 381.

- [15] Kulkarni M, Chaudhari A. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas putida*[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 982–988.
- [16] 崔中利, 张瑞福, 何健, 等. 对硝基苯酚降解菌 P3 的分离、降解特性及基因工程菌的构建[J]. *微生物学报*, 2002, 42(1): 19–25.
- [17] Roldan M D, Blasco R, Caballero F J, et al. Degradation of *p*-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*[J]. *Arch Microbiol*, 1998, 169(1): 36–42.
- [18] Gemini V L, Gallego A, Oliveira V M, et al. Biodegradation and detoxification of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus uratislawiensis*[J]. *International Biodeterioration Biodegradation*, 2005, 55: 103–108.
- [19] 万年升, 顾继东, 郝伏勤, 等. *Rhodococcus* sp. Ns 对硝基苯酚的好氧生物降解[J]. *环境科学*, 2007, 28(2): 431–435.
- [20] Liu Z, Yang Ch, Qiao C. Biodegradation of *p*-nitrophenol and 4-chlorophenol by *Stenotrophomonas* sp[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 277: 150–156.
- [21] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Press. 2001.
- [22] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. *农业微生物学实验技术*[M]. 北京: 农业出版社. 1996, 140–141.
- [23] Silvia F, Pesce, Daniel A, et al. Biodegradation of lindane by a native bacterial consortium isolated from contaminated river sediment[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, 54: 255–260.
- [24] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed[M]. John Wiley & Sons, Inc. 1995.
- [25] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697–703.
- [26] Montgomery H A C, Dymock J F. The determination of nitrite in water[J]. *Analyst*, 1961, 86: 414–416.
- [27] Bhatti Z I, Toda H, Funukawa K. *p*-nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens[J]. *Water Research*, 2002, 36: 1135–1142.

Biodegradation of *p*-Nitrophenol by *Pseudomonas* sp. HY1

Wu Ping^{1,2} Zhang Haiyan² Li Mei² Yan Zhongcheng^{1*} Qiu Xinghui^{2*}

(1 College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048;

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

Abstract

A bacterial strain (HY1), capable of using *p*-nitrophenol (PNP) as a sole source of carbon and energy, was isolated from the pesticide-polluted soil. Analysis of the 16s rDNA gene sequence suggested that Y1 had a close relationship to *Pseudomonas putida* and was designated as *Pseudomonas* sp. HY1. Degradation studies showed that PNP was degraded quickly under aerobic condition, complete depletion of 50 mg/L and 100 mg/L of PNP was achieved in 10 h and 24 h respectively by HY1 at pH of 7 and temperature of 30 °C. No growth of HY1 and PNP degradation by HY1 were detected when PNP concentration reached 300 mg/L in the minimal salt media. The greatest growth of HY1 was observed at temperature of 30 °C and alkaline pH (pH 8–10).

Key words: *para*-nitrophenol, biodegradation, *Pseudomonas*.