

Burkholderia sp. FDS-1 降解硝基苯酚类化合物的特性研究

张忠辉¹, 洪青^{1,2}, 洪元范¹, 赵子如¹, 李顺鹏^{1*}

(1. 南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095; 2. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008)

摘要: 从长期受农药污染的土壤中分离到 1 株高效杀螟硫磷降解菌株 *Burkholderia* sp. FDS-1, 它能以 3-甲基-4-硝基苯酚 (MNP) 为唯一碳源和氮源进行生长. 该菌能在 9h 内将 $0.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MNP 完全转化成邻甲基对苯二酚 (MHQ), 并能继续降解 MHQ. 该菌降解 MNP 的最适温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.0, 菌株降解 MNP 的速率和起始接种量呈正相关. 降解 MNP 的酶为诱导酶.

关键词: 生物降解; 硝基苯酚类化合物; 亚硝酸盐; 诱导酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)03-0582-04

Biodegradation of Nitrophenols by *Burkholderia* sp. FDS-1

ZHANG Zhong-hui¹, HONG Qing^{1,2}, HONG Yuan-fan¹, ZHAO Zi-ru¹, LI Shun-peng¹

(1. Key Laboratory of Agricultural Environment Microbiological Engineering, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Science, Nanjing 210008, China)

Abstract: Strain *Burkholderia* sp. FDS-1 was isolated from long time pesticide polluted soil, which was capable of utilizing 3-methyl-4-nitrophenol (MNP) as the sole carbon and nitrogen source to support its growth. It could transform 0.6mmol/L MNP into methylhydroquinone (MHQ) completely in 9h and continue to degrade MHQ. The optimal temperature and pH for the degradation were 30℃ and 7.0 respectively. The degradation speed correlated positively to the initial inoculation amount. The MNP degrading related enzyme in this bacterium was the inducible enzyme.

Key words: biodegradation; nitrophenols; nitrite; inducible enzyme

芳香族硝基化合物 (Nitroaromatic compounds, NACs) 主要包括硝基苯类化合物和硝基苯酚类化合物. 硝基苯类化合物在工业上广泛用于制造苯胺、染料、炸药及肥皂等^[1]. 硝基苯酚类化合物是化工生产中重要的有机合成原料, 不仅是染料、农药和医药的重要中间体, 还广泛应用于光化学品、防腐剂等生产过程^[2,3]. 它们具有苯环结构, 在环境中残留时间较长, 尤其是硝基苯酚类化合物, 由于同时含有硝基和羟基, 硝基的吸电子性使得苯环上的电子云密度下降, 从而使氧化酶的亲电子攻击受阻. 而且本身具毒性, 很容易使微生物中毒^[4], 所以一直被认为是高毒性的环境污染物^[5]. 目前人们对芳香族污染物的微生物降解进行了许多研究^[6~9]. 笔者筛选到 1 株能利用农药杀螟硫磷为唯一碳源进行生长的菌株 *Burkholderia* sp. FDS-1, 现对菌株降解硝基苯酚类化合物的特性进行研究, 为其在生物修复中的应用提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 菌株

Burkholderia sp. FDS-1 是本实验室分离和保存的 1 株高效降解农药杀螟硫磷的细菌^[10].

1.2 菌株培养

从平板上挑取一单菌落, 接种于 50mL LB 液体培养基中, 于 30℃, 摇床 $200\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养至 $A_{600\text{nm}} \approx 3.00$. 细菌的生长量通过分光光度法测定, 以 600nm 处的光密度表示, 培养后菌液经洗涤, 加入等体积无菌水后测定^[11].

收稿日期: 2005-03-18; 修订日期: 2005-04-29

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2004AA214102); 国家自然科学基金项目 (30400013, 40471073); 农业部丰产项目 (2004BA520A13)

作者简介: 张忠辉 (1980~), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物学与环境微生物工程.

* 通讯联系人, E-mail: lsp@njau.edu.cn

1.3 培养基及试剂

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00 (pH7.0~7.5). 改良基础盐培养基(MM)(g/L): NaCl 1.00, NH_4NO_3 1.00, K_2HPO_4 1.50, KH_2PO_4 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, pH7.0~7.5, 以硝基苯酚类化合物为碳源, 浓度视需要添加. 磷酸盐缓冲液(PBS), 溶液 A: KH_2PO_4 27.20g $\cdot\text{L}^{-1}$, 溶液 B: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 45.60g $\cdot\text{L}^{-1}$, 溶液 A 16.0mL, 溶液 B 84.0mL, 加水至 200mL 得到 0.1mol $\cdot\text{L}^{-1}$ pH7.5 的 PBS.

1.4 硝基苯酚类化合物及亚硝酸盐的含量测定

取培养液 5.0mL, 置于具塞刻度试管中, 加入 5.0mL 丙酮, 混匀; 加入足量 NaCl, 振荡, 将刻度试管放入沸水浴中加热, 此时丙酮会沸腾, 取上层有机相 1.0mL 置于微量离心管中, 氮气吹干; 加入 0.70mL 甲醇(色谱纯)和 0.30mL H_2O 溶解, 样品于 HPLC 测定. 亚硝酸盐含量参照文献[12]测定.

1.5 粗酶液的制备

从平板上挑取一单菌落, 接种到 50mL LB 液体培养基中, 于 30℃, 摇床 200 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 培养, 当 $A_{600\text{nm}} \approx 3.00$, 收集菌液于 4000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min, 去上清液, 菌体用 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH7.5) 缓冲液洗涤, 重复上述操作 2 次, 然后用 10.0mL PBS (pH7.5) 缓冲液重悬细胞, 在冰浴中超声波粉碎 20min, 破碎细胞时要间隔操作, 细胞破碎液于 12000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min, 弃沉淀, 上清液在 0~4℃ 条件下边搅拌边加入研细的固体硫酸铵粉末, 分段盐析, 收集 20%~80% 的蛋白沉淀, 将蛋白沉淀溶于少量的 0.1mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH7.5) 缓冲液中, 在相同的缓冲液于 4℃ 透析 48h, 将透析的酶液冷冻真空干燥, 后重新溶于 1.0mL 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH7.5) 缓冲液中, 得到粗酶液分装后于 20℃ 冰箱保存.

1.6 蛋白质含量的测定

粗酶液蛋白质含量按 Bradford 法测定^[13], 以 BSA 作为标准蛋白.

1.7 降解 MNP 的酶活力测定

酶学反应体系如下: 0.05mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MNP, 0.2mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ NADH, 0.02mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ FAD, 1mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 , 0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH7.5) 缓冲液, 0.1mg 蛋白质, 总体积为 1.0mL. 30℃ 条件下反应 30min 后, 参照文献[14]测定亚硝酸盐增加量.

2 结果与讨论

2.1 FDS-1 对 MNP 的降解

在改良基础盐培养基中加入 0.6mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MNP, 以 1% 的接种量接入 FDS-1 种子液($A_{600\text{nm}} \approx 3.00$), 在 30℃ 200r $\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 每隔 1h 取样 1 次, 测定 $A_{600\text{nm}}$ 及 MNP 和 NO_2^- 的浓度. 结果见图 1, FDS-1 能以 MNP 为唯一碳源进行生长, 在 9h 内, 能将 MNP 完全转化为 MHQ. 由于菌体受到硝基酚类物质的毒害, 在最初的几小时, 菌体生长缓慢, 处于延滞期, 随着菌体生长速度加快, 降解硝基酚类物质的酶类也大量产生, 硝基酚类物质被快速降解, 同时检测到 NO_2^- 产生, 但实际测的 NO_2^- 生成量要比理论上算出的低, 经推测, FDS-1 降解 MNP 是通过脱- NO_2 作用生成 NO_2^- , 并且菌体以 NO_2^- 为氮源进行生长.

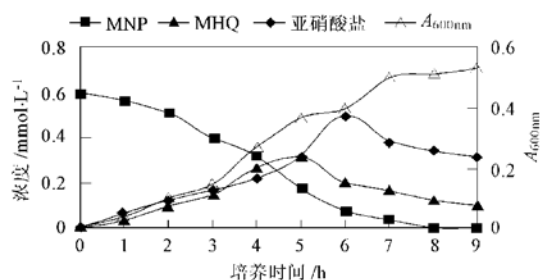


图 1 FDS-1 对 MNP 的降解

Fig. 1 Degradation of MNP by *Burkholderia* sp. strain FDS-1

2.2 MNP 初始浓度对 FDS-1 降解 MNP 的影响

在改良基础盐培养基中加入 MNP, 使终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mmol $\cdot\text{L}^{-1}$; 以 1% 的接种量接入 FDS-1 种子液($A_{600\text{nm}} \approx 3.00$), 于 30℃, 摇床 200r $\cdot\text{min}^{-1}$ 培养, 每 1h 取样 1 次, 样品处理后, 于 HPLC 检测, 结果见图 2, FDS-1 对低浓度的 MNP 有很好的降解效果, 在 3h 内将 0.4mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MNP 完全降解, 在 6h 内将 0.6mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MNP 完全降解, 当 MNP 的浓度达到 0.8mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 需要 15h 才能将 MNP 完全降解, 当浓度达到 1.0mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 时, FDS-1 几乎不能降解 MNP, 且菌体生长量几乎未变化, 说明高浓度的 MNP 对菌体的生长有抑制作用, 这与文献上报道相符合^[4].

2.3 pH 对 FDS-1 降解 MNP 的影响

在 pH 为 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的改良基础盐培养基中, 加入 0.4mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MNP, 以 1% 的接种量接入 FDS-1 种子液($A_{600\text{nm}} \approx 3.00$), 于

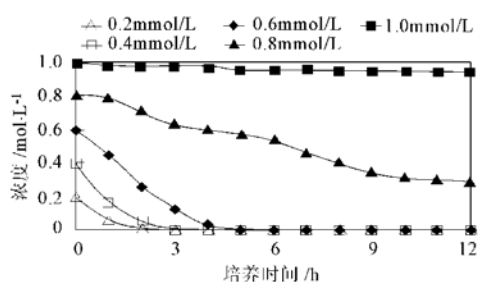


图2 初始浓度对 FDS-1 降解 MNP 的影响

Fig. 2 Effect of MNP initial concentration on its degradation by strain FDS-1

30℃, 摇床 200r·min⁻¹ 培养, 每 1h 取样 1 次, 样品经处理后, 于 HPLC 检测, 结果见图 3, FDS-1 在 pH7.0 时对 MNP 降解最好, 3h 内就能完全降解 0.4mmol·L⁻¹ MNP. 在低 pH 条件下降解率很低, 在 pH3.0 和 pH4.0 条件下, 9h 时, 降解率为 13.8% 和 33.3%, 在 pH5.0, pH6.0, pH8.0 条件下分别需用 6h, 4h, 7h.

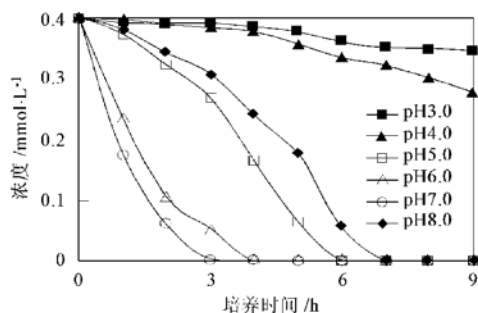


图3 pH 值对 FDS-1 降解 MNP 的影响

Fig. 3 Effect of pH on MNP degradation by strain FDS-1

2.4 温度对 FDS-1 降解 MNP 的影响

在改良基础盐培养基中加入 0.4mmol·L⁻¹ MNP, 以 1% 的接种量接入 FDS-1 种子液 ($A_{600nm} \approx 3.00$), 于不同温度下, 摇床 200r·min⁻¹ 培养, 每 1h 取样 1 次, 样品经处理后, 于 HPLC 检测, 结果见图 4, 温度对其降解影响明显, FDS-1 在 30℃ 条件下

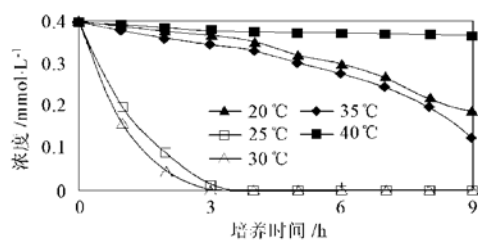


图4 温度对 FDS-1 降解 MNP 的影响

Fig. 4 Effect of temperature on MNP degradation by strain FDS-1

3h 内能将 MNP 完全降解, 在 20℃, 35℃, 40℃ 条件下, 即使到 9h 时降解率也只有 53.5%, 69.8%, 8.0%.

2.5 接种量对 FDS-1 降解 MNP 的影响

在改良基础盐培养基中加入 0.4mmol·L⁻¹ MNP, 以 1%, 3%, 5%, 10% 和 15% 的接种量接入 FDS-1 的种子液 ($A_{600nm} \approx 3.00$), 于 30℃, 摇床 200 r·min⁻¹ 培养, 每 0.5h 取样 1 次, 样品经处理后, 于 HPLC 检测, 结果见图 5, FDS-1 降解 MNP 的速率和起始接种量呈正相关.

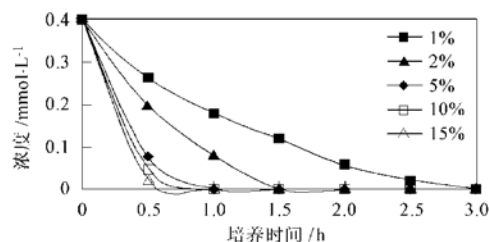


图5 接种量对 FDS-1 降解 MNP 的影响

Fig. 5 Effect of inoculum on the degradation of MNP by strain FDS-1

2.6 亚硝酸盐对 FDS-1 生长的影响

在无氮改良培养基中加入 3, 6, 9, 12, 15 mmol·L⁻¹ 亚硝酸盐, 以无氮改良培养基为对照, 以 1% 的接种量接入 FDS-1 种子液 ($A_{600nm} \approx 3.00$), 于 30℃, 摇床 200r·min⁻¹ 培养, 每 3h 取样 1 次, 测定 A_{600nm} , 结果见图 6, FDS-1 能利用亚硝酸盐为唯一氮源进行生长, 当浓度达到 9mmol·L⁻¹ 时, 亚硝酸盐对菌体的生长有一定抑制作用, 当浓度达到 15mmol·L⁻¹ 时, 亚硝酸盐完全抑制其生长, 证实菌株 FDS-1 确实能够利用 MNP 的代谢产物 NO₂⁻.

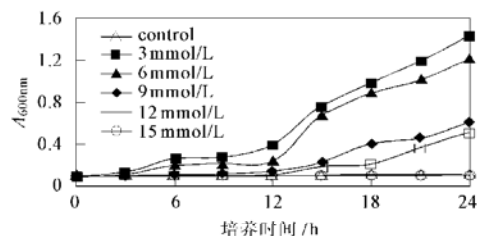


图6 菌株 FDS-1 对亚硝酸盐的利用情况

Fig. 6 Utilization of nitrite by strain FDS-1

2.7 FDS-1 对不同硝基苯酚类化合物的降解

在改良基础盐培养基中分别加入 MNP, 2-硝基酚, 3-硝基酚, 4-硝基酚, 使其终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹, 以 1% 的接种量接入 FDS-1 种子液 ($A_{600nm} \approx 3.00$), 于 30℃, 摇床 200r·min⁻¹ 培养, 每 3h 取样 1 次, 样品经处理后, 于 HPLC 检测, 结果见

图 7, FDS-1 对不同硝基苯酚类化合物的降解效果差异较大, 对 MNP 和 4-硝基酚有很好的降解效果, 能在 3h 内完全降解底物, 对 2-硝基酚和 3-硝基酚有一定的降解作用, 推断可能是由于降解硝基酚类化合物的酶对底物的专一性导致。

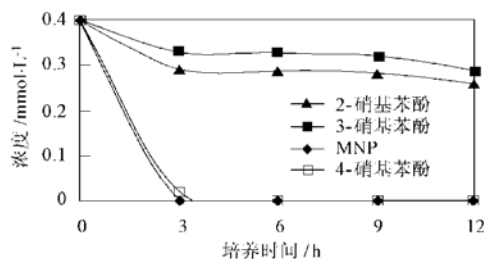


图 7 菌株 FDS-1 对不同硝基苯酚类化合物的降解

Fig. 7 Degradation of nitrophenols by strain FDS-1

2.8 降解 MNP 的酶活性测定

在 LB 培养基中加入 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MNP, 对照中不加 MNP, 以 1% 的接种量接入 FDS-1 的种子液 ($A_{600\text{nm}} \approx 3.00$), 于 30°C , 摇床 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 30h, 菌体离心、破碎后经处理得粗酶液, 通过酶活测定, 结果见图 8, 菌体在未受到底物诱导时, 降解酶的酶活很低, 只能维持在一个基础表达的水平上, 在受到底物诱导后, 酶活提高近 15 倍, 这说明 FDS-1 对硝基酚类化合物的降解酶为诱导酶。

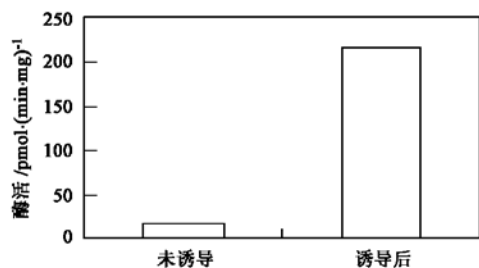


图 8 MNP 降解酶酶活

Fig. 8 Activity of enzyme for degrading MNP

3 结论

(1) 从长期受农药污染的土壤中分离到 1 株能降解杀螟硫磷的高效降解菌株 *Burkholderia* sp. FDS-1, 该降解菌株能利用 MNP 为唯一碳源和氮源进行生长, 将 MNP 转化为 MHQ, 同时生成 NO_2^- , 并利用 NO_2^- 为氮源进行生长。

(2) 该菌降解 MNP 的最适 pH 为 7.0, 最适温度为 30°C , 降解 MNP 的速率与接种量呈正相关, MNP 的初始浓度对降解影响较大, 在 $0.2 \sim$

$0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, FDS-1 对 MNP 有很好的降解效果, 当 MNP 的浓度为 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 由于酚类物质对菌体的毒害, 降解速率变慢, 当达到 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, FDS-1 几乎不能降解 MNP。

(3) 通过酶学试验表明, 降解酚类物质的酶属于诱导酶。

参考文献:

- [1] 王灿, 高士祥, 杨光俊, 等. 环糊精对硝基化合物混合体系微生物降解影响[J]. 中国环境科学, 2004, 24(4): 429~432.
- [2] Ashvini Chauhan, Asit K Chakraborti, et al. Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae* [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 270(3): 733~740.
- [3] Leung T Kam, Campbell Steve. The *Sphingomonas* species UG30 pentachlorophenol 4-monooxygenase in *p*-nitrophenol degradation[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 173(1): 247~253.
- [4] 王菊思, 赵丽辉. 合成有机物的生物降解性研究[J]. 环境化学, 1993, 12(3): 161~172.
- [5] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants. I. A perspective view[J]. Environ. Sci. Technol., 1979, 13: 416~423.
- [6] Jain R K, Dreisbach J H, Spain J C. Biodegradation of *p*-nitrophenol via 1, 2, 4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(8): 3030~3032.
- [7] Spain J C, Gibson D T. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in *Moraxella* sp. [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57: 812~819.
- [8] Leung K T, Tresse O, Errampalli D et al. Mineralization of *p*-nitrophenol by pentachlorophenol-degrading *Sphingomonas* spp. [J]. FEMS Lett., 1997, 155(2): 107~114.
- [9] Kadiyala V, Spain J C. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905 [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64(7): 2479~2484.
- [10] 张忠辉, 洪青, 张国顺, 等. 杀螟硫磷降解菌 FDS-1 的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2005, 25(1): 52~56.
- [11] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988. 75~78.
- [12] Montgomery H A C, Dymock J F. The determination of nitrite in water [J]. Analyst, 1961, 86: 414~416.
- [13] Bradford M R M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248~255.
- [14] Daniels L, Hanson R S, Phillips J A. Chemical analysis, In: Gerhardt P, Murray R G E, Wood W A, Krieg N R (eds), Methods for general and molecular bacteriology [M]. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 512~554.