

文章编号: 1006-9941(2018)03-0279-06

球形红细菌生物转化 2,4-二硝基甲苯及硝基还原酶性质

王寿艳, 白红娟, 赵婷婷, 康鹏洲

(中北大学环境与安全工程学院, 山西 太原 030051)

摘要: 为了探索球形红细菌生物转化 2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT)的中间产物变化趋势及硝基还原酶性质,研究了不同氮源组合对球形红细菌生物转化 2,4-DNT 的效率及球形红细菌细胞生长的影响,测定了 2,4-DNT 及 2,4-DNT 生物转化产物在不同时间的浓度变化,用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native-PAGE)法分析了硝基还原酶的同工酶谱,测得了硝基还原酶的动力学参数。结果表明,球形红细菌转化 2,4-DNT 的最适组合氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /酵母膏;球形红细菌能够高效还原 2,4-DNT 为 4-氨基-2-硝基甲苯(4A2NT)和 2-氨基-4-硝基甲苯(2A4NT),但 4A2NT 的含量远大于 2A4NT 的含量,它们没有进一步还原为 2,4-二氨基甲苯(2,4-DAT)。当 2,4-DNT 初始浓度为 20、40 和 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对球形红细菌产生硝基还原酶活力有明显的促进作用,当 2,4-DNT 初始浓度为 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对该酶活力有抑制作用;当 pH 值为 7 时,球形红细菌产生的硝基还原酶活力最高。球形红细菌中硝基还原酶的动力学参数,最大反应速率 v_{\max} 和米氏常数 K_m ,分别为 0.0507 $\text{mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 和 0.1772 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 球形红细菌; 2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT); 氮源; 生物转化产物; 硝基还原酶; 同工酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: TJ55; X172

文献标志码: A

DOI: 10.11943/j.issn.1006-9941.2018.03.013

1 引言

2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT)被广泛应用于军工生产中,它是火箭推进剂生产中的主要成分^[1]以及 TNT 炸药生产过程的主要副产物^[2]。然而生产使用 2,4-DNT 过程中的不恰当操作使得军工厂周围的环境受到严重污染。2,4-DNT 具有显著的生物毒性^[3],美国环保署已经将 2,4-DNT 列为优先控制污染物名单^[4]。

微生物转化 2,4-DNT 一直以来被认为是最有效的途径,国内外大多数学者已经对微生物降解 2,4-DNT 进入了深入的研究。然而研究降解 2,4-DNT 的微生物要么在严格的厌氧条件下,要么在好氧条件下进行。在厌氧条件下,2,4-DNT 一般会转化为 2-氨基-4-硝基甲苯、4-氨基-2-硝基甲苯,进而转化为 2,4-二氨基甲苯^[5-6],2,4-DNT 虽然可以转化成易降解的中间产物,但却不能将其完全矿化,因而厌氧转化需要借助于好氧菌后续处理;在好氧条件下,2,4-DNT 一般先羟化生成 4-甲基-5-硝基儿茶酚、2-羟基-5 甲基苯

醌和 2,4,5-三羟基甲苯^[7-8],而 2,4-DNT 从化学结构特点上来看,很难直接进行氧化反应,且可能生成毒性更大或几乎不能降解的代谢产物;而兼性细菌可以首先进行缺氧还原 2,4-DNT,然后再经过好氧来开环、矿化,可以将 2,4-DNT 彻底转化为无毒无害的小分子物质。

球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)属于光合细菌紫色非硫菌群的红细菌属,它是兼性细菌,也是益生菌。它既能在厌氧条件下利用光照进行生长,也能在好氧条件下利用有机物生长^[9]。因此,相比较其他细菌,更具有优越性。前期研究表明,菌株 *Rhodobacter sphaeroides* 能以 2,4-DNT 为唯一有机碳源 72 h 将其完全转化,120 h 彻底矿化^[10];球形红细菌生物转化 2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT)过程中会生成重要的中间产物 2-氨基-4-硝基甲苯(2A4NT)和 4-氨基-2-硝基甲苯(4A2NT)^[11],而 2,4-DNT 能否被高效还原为这两种中间产物直接影响 2,4-DNT 的最终矿化,硝基还原酶是该生物转化过程中的关键酶。为此,本研究在文献[10]和[11]的基础上,对不同氮源、中间产物变化过程及硝基还原酶性质进行深入研究,进一步确定了反应条件、明确了硝基还原酶的性质,为今后在硝基苯类化合物废水污染治理中的应用提供理论依据。

收稿日期: 2017-09-19; 修回日期: 2017-11-15

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目(2016-084)

作者简介: 王寿艳(1993-),女,硕士,主要从事环境微生物技术研究。
e-mail: 1345406573@qq.com

通信联系人: 白红娟(1969-),女,博士,教授,硕士生导师,主要从事环境微生物技术研究。e-mail: bhj44871@163.com

2 实验部分

2.1 试剂和仪器

球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)H菌株系紫色非硫菌群红细菌属光合细菌,由山西大学光合细菌研究室分离、鉴定并保存^[12]; 2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT,纯度99%)、2-氨基-4-硝基甲苯(2A4NT,纯度99%)、4-氨基-2-硝基甲苯(4A2NT,纯度99%),2,4-二氨基甲苯(2,4-DAT,99%),均购自阿拉丁公司。

美国 Waters 公司的 E2695 型高效液相色谱仪(HPLC); 宁波新芝科学器材研究所的 JY92-II 型超声波细胞破碎仪; 上海安亭科学仪器厂的 LXJ-IIB 型低速大容量多管离心机和 TGL-16G 高速冷冻离心机; 北京六一生物技术有限公司的 DY CZ-24A 型电泳仪; 上海嘉鹏科技有限公司的 ZF-368 型凝胶成像系统; 上海龙尼柯仪器有限公司 WFZ UV-200 型紫外可见分光光度计。

2.2 培养基的配制

基础培养基参照文献[12]进行配置: 苹果酸 2.5 g、酵母膏 1.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.25 g、 MgSO_4 0.2 g、 CaCl_2 0.07 g、 KH_2PO_4 0.6 g、 K_2HPO_4 0.9 g、蒸馏水 1000 mL,pH 值为 7.0。

液体驯化培养基: 将 2,4-DNT 作为唯一有机碳源配制培养基,使 2,4-DNT 溶于甲醇溶液中,待甲醇挥发后直接加入除苹果酸以外基础培养基。

2.3 不同氮源对球形红细菌生长及转化 2,4-DNT 的影响试验

实验考察了不同有机氮源(酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、尿素),不同无机氮源(NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ 、 KNO_4),复合氮源:(NH_4NO_3 /酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ /酵母膏)对球形红细菌转化 2,4-DNT 的影响。按照文献[10]实验方法,在最适条件下接种球形红细菌,培养 36 h 后取样,用高效液相色谱仪(HPLC)测定溶液中残留的 2,4-DNT 浓度,并用紫外可见分光光度计在 590 nm 处测定细菌的吸光度,以 OD_{590} 表示,各设 3 个平行样。

2.4 球形红细菌转化 2,4-DNT 及其中间产物试验

参照文献[10]方法,在最适条件下接种球形红细菌,在 0,24,48,72,96,120 h 各取 10 mL 样品,用高速离心机在 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。上清液中残留的 2,4-DNT、生成的 2A4NT、4A2NT 和 2,4-DAT 浓度用 HPLC 测定,各设 3 个平行样。

2.5 分析方法

2,4-DNT、2A4NT、4A2NT 和 2,4-DAT 通过高效液相色谱仪(HPLC)测定,选用的色谱柱为 C_{18} 反相柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$), 20°C 下测量,流速为 $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相为 0~6 min 为 50%(V/V) 甲醇,7~10 min 为 70%(V/V) 甲醇。探测波长设定为 254 nm,进样体积为 $20 \mu\text{L}$ 。

2,4-DAT 的流动相为乙睛: 磷酸盐缓冲液($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 7.0)(30 : 70, V/V),流速为 $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长为 224 nm,进样体积为 $20 \mu\text{L}$ 。

2.6 粗酶液的制备

参照文献[13]的方法。取培养好的菌液,用 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min,收集菌体,用 $33 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次,悬浮于 1 mL 的缓冲液中。将其在冰水浴条件下用超声波细胞粉碎仪破碎细胞,破碎 20 min(每次间隔 3 s 破碎 1 s)。然后,在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的高速冷冻离心机中离心 10 min,弃沉淀,上清液即细胞粗酶液,于 -20°C 保存备用。

2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

考察了在培养条件下,2,4-DNT 的初始浓度分别为 0,20,40,60,80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和初始 pH 值分别为 5,6,7,8,9,对全细胞进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的影响。参照文献[14]的方法,对制备的粗酶液进行聚丙烯酰胺凝胶电(PAGE),电泳在垂直电泳装置中进行,分离胶质量浓度为 12%,浓缩胶质量浓度,4%,每点样孔加样量 $30 \mu\text{L}$ (取 $15 \mu\text{L}$ 的样品,加入等体积的 SDS 上样缓冲液,煮沸 2 min)。先恒压 100 V,样品通过浓缩胶后恒压 120 V。电泳结束后进行考马斯亮蓝 G-250 染色,染色 1 h 后,进行脱色,直到背景变清晰后进行拍照。

2.8 Native-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Native-PAGE 是在变性的 SDS-PAGE 基础上,将蛋白变性剂 SDS 和巯基乙醇去除,使得蛋白在电泳中依旧可以保持其天然的活性。考察了在培养基中 2,4-DNT 的初始浓度为 0,20,40,60,80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和初始 pH 值为 5,6,7,8,9 条件下,对硝基还原酶同工酶的影响。电泳在垂直电泳装置中进行^[15],分离胶为 10%,浓缩胶为 4%,加样量为 $30 \mu\text{L}$,电泳开始时先恒定电压为 90 V,样品通过浓缩胶后,恒定电压为 120 V。电泳结束后,进行活性染色。活性染色液体体系为: $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 值为 7.5),

50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADH, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-DNT, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氮蓝四唑, 总体积为 500 mL。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 30 min, 直到紫色条带出现, 用凝胶成像系统进行拍照。

2.9 硝基还原酶的动力学参数

采用米氏方程^[15]来确定硝基还原酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{\max} 。取 0.02~0.32 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-DNT 作为底物, 加入 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tri-HCl 缓冲液 (pH 7.0), 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPH, 0.2 mL 的粗酶液, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行反应, 在波长为 340 nm 条件下, 采用紫外可见分光光度计测定 NADH 的消耗量。以酶的反应速度对不同底物的浓度作图, 并按 Lineweaver-Burk 作图法^[15]计算动力学表征参数 v_{\max} 和 K_m 。

3 结果与分析

3.1 不同氮源对球形红细菌的生长及转化 2,4-DNT 的影响

实验考察了有机氮源、无机氮源、复合氮源对球形红细菌的生长及转化 2,4-DNT 效果的影响, 如图 1 所示。

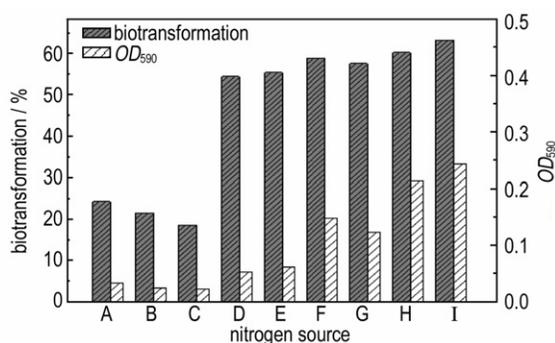


图 1 降解 36 h 内不同氮源对球形红细菌生长及转化 2,4-DNT 的影响

A— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, B— NH_4NO_3 , C— KNO_3 , D—尿素, E—蛋白胨, F—酵母膏, G—牛肉膏, H—酵母膏/ NH_4NO_4 , I—酵母膏/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Fig.1 Effect of different nitrogen sources on 2,4-DNT biotransformation and *Rhodobacter sphaeroides* growth during 36 h of degradation

A— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, B— NH_4NO_3 , C— KNO_3 , D—urea, E—peptone, F—yeast extract, G—beef extract, H—yeast extract/ NH_4NO_4 , I—yeast extract/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

由图 1 可看出, 有机氮源包括尿素、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏对 2,4-DNT 的转化率分别为 54.4%、55.4%、57.6% 和 58.9%, OD_{590} 值分别为 0.05、0.06、

0.13 和 0.15, 其效果表现为酵母膏>牛肉膏>蛋白胨>尿素。比较无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 和 KNO_3 , 其转化率分别为 24.3%、21.4% 和 18.6%, OD_{590} 值分别为 0.033、0.025 和 0.018。复合氮源组合以酵母膏为有机氮源时, 添加无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时效果最佳, 36 h 转化率为 63.3%; OD_{590} 最大, 为 0.24; 而添加无机氮源 NH_4NO_3 时, 转化效果为 60.2%, OD_{590} 值为 0.22。结果显示, 添加复合氮源 36 h 的转化率在 60% 以上; 添加有机氮源时转化率均达到 50% 左右; 而添加无机氮源时, 转化率仅有 20% 左右。因此, 有机氮源比无机氮源更有利于 2,4-DNT 的生物转化和球形红细菌的生长, 但低于复合氮源对 2,4-DNT 的转化和球形红细菌的生长。

3.2 球形红细菌生物转化 2,4-DNT 的中间产物及其分析

之前的研究^[11]表明球形红细菌转化 2,4-DNT 过程中产生两种中间产物 2-氨基-4-硝基甲苯 (2A4NT) 和 4-氨基-2-硝基甲苯 (4A2NT), 不同时间点的浓度如图 2 所示。

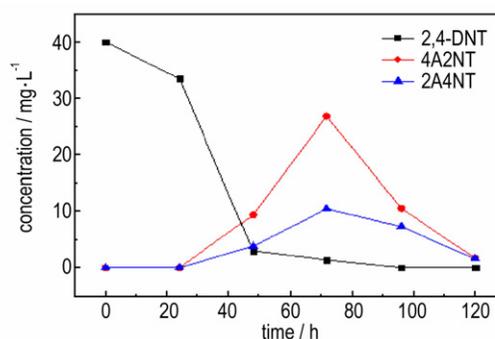


图 2 2,4-DNT 及生物转化产物在不同采样时间点的浓度

Fig.2 The concentrations of 2,4-DNT and biotransformation products at different sampling time

由图 2 可知, 这两种中间产物开始出现的时间为降解 24 h 之后, 72 h 浓度达到最大, 120 h 内被完全转化。值得注意的是, 24 h 后 4A2NT 和 2A4NT 两种中间产物出现时, 4A2NT 的总量远大于 2A4NT, 这与之前的一些研究结果一致^[16-17]。

在研究中可以发现, 4A2NT 的转化速率比 2A4NT 的速率快, 因此, 相比较邻位硝基比对位硝基位置更开阔, 溶剂化程度相对更高, 所以更容易接受电子进行下一步的还原。但在转化过程中, 并未检测到 2,4-DAT, 表明两种中间产物 4A2NT 和 2A4NT 均没有进一步还原为 2,4-DAT。

3.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

不同培养条件下,球形红细菌降解 2,4-DNT 的细菌全细胞蛋白电泳如图 3,左侧数据为标准蛋白的分子质量。图 3a 和图 3b 分别表示不同浓度 2,4-DNT 和不同初始 pH 对全细胞蛋白的影响。图 3a 中各个泳道分别为 2,4-DNT 的初始浓度为 0, 20, 40, 60, 80 mg · L⁻¹,图 3b 中各个泳道分别为初始培养 pH 为 5,6,7,8,9 下球形红细菌在降解 2,4-DNT 过程中的全细胞蛋白的变化,这 5 个泳道共有 14 条主蛋白带,其分子质量主要密集在 26~120 kD。

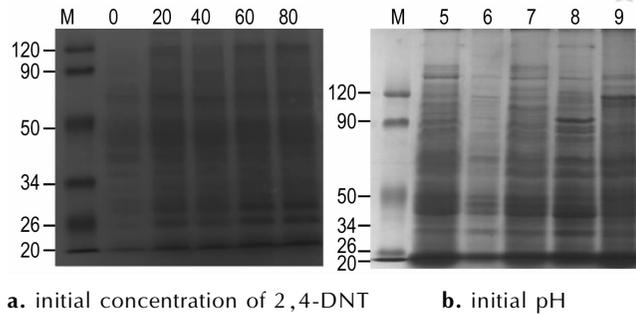


图 3 不同培养条件下球形红细菌全细胞蛋白电泳

Fig.3 Whole cell protein electrophoresis of *Rhodobacter sphaeroides* under various culture conditions

图 3a 可看出泳道 1 的蛋白条带颜色较浅,说明其蛋白含量较低;泳道 5 的蛋白条带颜色较深,但其条带较密,分辨率较差;而在泳道 2、泳道 3、泳道 4,其蛋白含量较高,且条带清晰。分子质量主要分布在 26~120 kD。从图 3b 中可看出,pH 值为 6 时,其泳道的

颜色较浅,蛋白含量较低;在 pH 为 5 和 9 时,泳道 1 和泳道 5 的条带出现了拖尾现象,分辨率较差;而泳道 3 和泳道 4 的蛋白含量高,且分辨率较好。

从以上结果上可以看出,不同反应条件下条带数量并无差异,但是条带颜色深浅、蛋白条带强度明显有所不同,所以 2,4-DNT 初始浓度和初始 pH 的变化会影响全细胞蛋白含量。这是由于当 2,4-DNT 的浓度和 pH 值发生变化时,会影响球形红细菌的生长,从而影响蛋白酶量变化^[18]。

3.4 硝基还原酶的同工酶谱分析

硝基还原酶的同工酶谱如图 4 所示。图 4a 和图 4b 分别表示不同浓度 2,4-DNT 和不同初始 pH 对硝基还原酶的影响。采用 Genetool 软件分析各个泳道的条带,使用峰高来表示各个条带的表达量,结果如表 1 和表 2 所示。

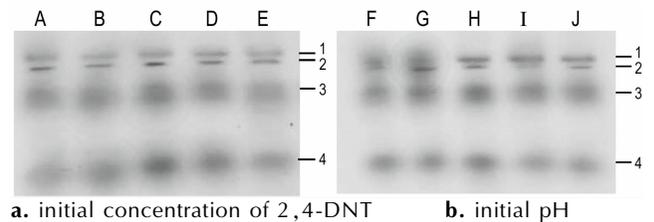


图 4 不同培养条件下球形红细菌中硝基还原酶的同工酶谱

Fig.4 The patterns of isoenzymes of nitroreductase in *Rhodobacter sphaeroides* under various culture conditions

由图 4 可知,球形红细菌中的硝基还原酶在不同条件处理组都表达出 4 种同工酶,可以看出在变化初

表 1 不同初始浓度下球形红细菌中硝基还原酶的同工酶表达量

Table 1 Expressive value of the pattern of isoenzyme of nitroreductase in *Rhodobacter sphaeroides* under different initial concentration

number	expressive value								
A 1	10830	B 1	11841	C 1	11983	D 1	11431	E 1	11023
A 2	7310	B 2	8085	C 2	7497	D 2	8235	E 2	8699
A 3	38446	B 3	52201	C 3	60577	D 3	44151	E 3	40173
A 4	38830	B 4	53531	C 4	68470	D 4	54571	E 4	40823

表 2 不同初始 pH 下球形红细菌中硝基还原酶的同工酶表达量

Table 2 Expressive value of the pattern of isoenzyme of nitroreductase in *Rhodobacter sphaeroides* under different initial pH

number	expressive value								
F 1	10740	G 1	11766	H 1	11966	I 1	11682	J 1	11344
F 2	7957	G 2	8121	H 2	8660	I 2	8371	J 2	8456
F 3	39497	G 3	46974	H 3	60489	I 3	54234	J 3	43934
F 4	30657	G 4	44404	H 4	62511	I 4	461144	J 4	45203

始 2,4-DNT 的浓度和初始 pH 条件下,不会诱导其他酶,且对第一种同工酶和第二种同工酶的影响不大。在 pH=7,不同初始 2,4-DNT 浓度条件下,将图 4a 中的 A ($0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 设为对照组,从表 1 可知,2,4-DNT 的初始浓度对第三和第四种同工酶明显有所差别,B($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、C($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、D($60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的表达明显高于对照组,随着 2,4-DNT 初始浓度的变化至 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (E) 时,表达明显变弱,且第三种和第四种同工酶影响较大;在初始浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,不同 pH 条件下,将图 4b 中的 H (pH=7) 设为对照组,表 2 结果可知,初始 pH 变化对第三种和第四种同工酶影响较大,且 F (pH=5)、G (pH=6)、I (pH=8)、J (pH=9) 的表达明显低于对照组 H,初始 pH=7 时,其第三种和第四种同工酶表达量达到最大,分别为 60489、62511。

结果表明,当 2,4-DNT 的初始浓度和初始 pH 发生变化时,硝基还原酶的活性发生了变化,这说明硝基还原酶的活性与 2,4-DNT 的初始浓度、pH 存在的一定的相关性。2,4-DNT 初始浓度发生变化时,硝基还原酶的酶活变化是由于没有 2,4-DNT 存在时,碳源的缺乏会影响体系中硝基还原酶酶量的产生,从而影响硝基还原酶活力,而 2,4-DNT 浓度过高会导致细胞产生毒性,阻碍降解菌的生长,从而影响硝基还原酶活力^[18]; pH 值会影响酶活性催化基团的解离状态,因此 pH 的改变会使得酶活性中心的基团解离,从而影响酶的活性^[19]。另外,降解 2,4-DNT 以及菌株生长的最适条件为中性^[10],此时产生的硝基还原酶酶量较多,相应的硝基还原酶的活性较高^[20]。这种结果变化趋势与之前研究^[11]的硝基还原酶酶活性变化趋势一致。

3.5 硝基还原酶的动力学参数

硝基还原酶的动力学参数符合米氏方程,按照 Lineweaver-Burk 的双倒数法(图 5)求出,结果如表 3 所示。由图 5 可得出其方程为 $y=3.4919x+19.707$ ($R^2=0.9939$),由该方程的截距和斜率很容易得出硝基还原酶的动力学参数 v_{\max} 和 K_m 分别为 $0.0507 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ 和 $0.1772 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。越低的 K_m 说明酶与底物反应更加完全。

表 3 硝基还原酶的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of the nitroreductase

kinetic parameters	values
$v_{\max} / \text{mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$	0.0507
$K_m / \text{mmol} \cdot \text{L}$	0.1772
$(v_{\max} / K_m) / \text{min}^{-1}$	0.286

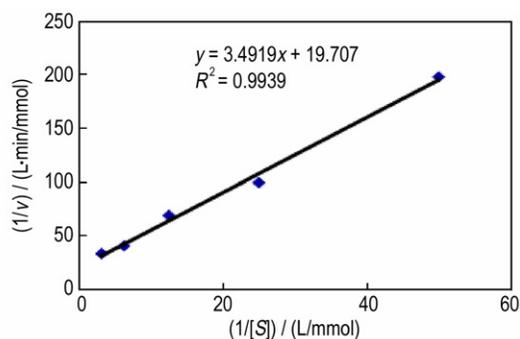


图 5 硝基还原酶反应速率的倒数 ($1/v$) 与底物浓度倒数 ($1/[S]$) 之间的关系

Fig.5 The relationship between $1/v$ and $1/[S]$ of nitroreductase (v is reaction rate, $[S]$ is concentration of substrate)

4 结论

(1) 在球形红细菌生物转化 2,4-DNT 的过程中,有机氮源比无机氮源转化 2,4-DNT 的效果好,复合氮源比有机氮源更有利于细菌生长和对 2,4-DNT 的生物转化。因此,确定了最佳氮源为复合氮源(酵母膏/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$)。

(2) 进一步研究发现,在降解 24 h 后,4-氨基-2-硝基甲苯的含量比 2-氨基-4 硝基甲苯的含量高,但均没有进一步还原为 2,4-二氨基甲苯(2,4-DAT)。

(3) 硝基还原酶是球形红细菌生物转化 2,4-DNT 生成 4A2NT 和 2A4NT 两种中间产物的关键酶。2,4-DNT 的初始浓度为 20、40 和 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对球形红细菌产生硝基还原酶活力有明显的促进作用,而当 2,4-DNT 浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,会对硝基还原酶的活力起到抑制作用;当 pH 值为 7 时,硝基还原酶活力最高。硝基还原酶为球形红细菌生物转化 2,4-DNT 中的关键酶,其动力学参数最大反应速率 v_{\max} 和米氏常数 K_m 分别为 $0.0507 \text{ mmol} / (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ 和 $0.1772 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

后续研究拟将分离纯化一种天然的球形红细菌硝基还原酶,并克隆得到一种球形红细菌硝基还原酶基因及其重组蛋白。这些研究将为芳香硝基化合物还原提供一种新的生物催化剂和酶源,为其在化学工业及环境修复中的应用提供理论指导和技术支持。

参考文献:

- [1] Christopher H J, Boardman G D, Freedman D L. Aerobic biological treatment of 2, 4-dinitrotoluene in munitions plant wastewater[J]. *Water Research*, 2000, 34(5): 595-1603.
- [2] Hughes J B, Wang C Y, Zhang C L. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: A pathway through dihydroxylamino intermediates[J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(7):

- 1065–1070.
- [3] Smock L A, Stoneburner D L, Clark J R. The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow[J]. *Water Research*, 1976, 10(6): 537–543.
- [4] Keith L, Telliard W. Priority Pollutants: I-a Perspective View[J]. *Environmental Science and Technology*, 1979, 13(4): 416–423.
- [5] Cheng J, Suidan M T, Venosa A D. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene with ethanol, methanol, acetic acid and hydrogen as primary substrates[J]. *Water Research*, 1998, 32(10): 2921–2930.
- [6] 黄杰勋, 陈星, 李非里, 等. 厌氧条件下 *Shewanella oneidensis* MR-1 对 2,4-二硝基甲苯的还原转化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1734–1741.
HUANG Jie-xun, CHEN Xing, LI Fei-li, et al. Reductive biotransformation of 2,4-dinitrotoluene by *Shewanella oneidensis* MR-1 under anaerobic conditions [J]. *Microbiology China*, 2013, 40(9): 1734–1741.
- [7] Snellinx Z, Taghavi S, Vangronsveld J, et al. Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: isolation and characterisation[J]. *Biodegradation*, 2003, 14(1): 19–29.
- [8] Nishino S F, Paoli G C, Spain J C. Aerobic Degradation of Dinitrotoluenes and Pathway for Bacterial Degradation of 2,6-Dinitrotoluene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2139–2147.
- [9] 龙思思, 谢数涛, 段舜山, 等. 光合细菌及其应用现状[J]. 生态科学, 2002, 21(1): 91–94.
LONG Si-si, XIE Shu-tao, DUAN Shun-shan, et al. Photosynthetic bacteria and their applied actualities [J]. *Ecological Science*, 2002, 21(1): 91–94.
- [10] 梁芳楠, 白红娟, 柴春镜, 等. 球形红细菌厌氧降解 2,4-二硝基甲苯(英文)[J]. 微生物学通报, 2016, 42(2): 279–284.
LIANG Fang-nan, BAI Hong-juan, CHAI Chun-jing, et al. Anaerobic biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Microbiology China*, 2016, 42(2): 279–284.
- [11] 白红娟, 王寿艳, 梁芳楠, 等. 球形红细菌降解 2,4-二硝基甲苯的途径及酶学性质[J]. 火炸药学报, 2017, 40(5): 82–87.
BAI Hong-juan, WANG Shou-yan, LIANG Fan-nan, et al. Degradation pathway and properties of enzyme of 2,4-dinitrotoluene by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Chinese Journal of Explosives and Propellants*, 2017, 40(5): 82–87.
- [12] 姚竹云, 张肇铭. 几株光合细菌的表型特征及 DNA-DNA 同源性分析[J]. 应用与环境生物学报, 1996, 2(1): 84–89.
YAO Zhu-yun, ZHANG Zhao-ming. Phenotypic features and DNA-DNA homology analyses of some photosynthetic bacteria [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 1996, 2(1): 84–89.
- [13] Oh B T, Sarath G, Shea P J. TNT nitroreductase from a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT-contaminated soil. [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(7): 875–881.
- [14] Simpson R J. Proteins and proteomics: a laboratory manual[J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 3(4): 694–694.
- [15] 谢波. 链霉菌催化芳香硝基还原及其关键酶的分离与克隆表达[D]. 大连: 大连理工大学, 2010.
XIE Bo. Streptomyces-catalyzed nitroaromatic reduction and the purification, cloning and expression of its nitroreductase [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2010.
- [16] Bradley P M, Chapelle F H, Landmeyer J E, et al. Microbial transformation of nitroaromatics in surface soils and aquifer materials.[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1994, 60(6): 2170–2175.
- [17] Noguera D R, Freedman D L. Reduction and Acetylation of 2,4-Dinitrotoluene by a *Pseudomonas aeruginosa* Strain [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2257–63.
- [18] 刘波, 熊健, 吕浩, 何冰芳, 等. 生物质对红球菌菌株 lawq 生长和脱硫酶活性的影响[J]. 化学工程, 2005, 33(6): 35–39.
LIU Bo, XIONG Jiang, HE Bing-fang, et al. Effect of biomaterials on the growth of *Rhodococcus sp.* strain lawq and the activities of desulfurization enzymes[J]. *Chemical Engineering*, 2005, 33(6): 35–39.
- [19] 曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 等. 超高压处理对砀山梨汁中过氧化物酶活性的影响[J]. 农业工程学报, 2004, 20(4): 199–202.
ZENG Qing-mei, PAN Jian, XIE Hui-ming, et al. Effect of high pressure treatment on peroxidase activity in pear juice [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2004, 20(4): 199–202.
- [20] 高璇, 王亮亮, 李响, 等. 金针菇产漆酶发酵条件的优化[J]. 资源开发与市场, 2013, 29(7): 683–685.
GAO Xuan, WANG Liang-liang, LI Xiang, et al. Optimization of *Flammulia velutipes* fermentation for laccase production [J]. *Resource Development & Market*, 2013, 29(7): 683–685.

Biotransformation of 2,4-Dinitrotoluene and Properties of Nitroreductase by *Rhodobacter Sphaeroides*

WANG Shou-yan, BAI Hong-juan, ZHAO Ting-ting, KANG Peng-zhou

(School of Environment and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: To explore the change trend of intermediate products in biotransformation of 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) and properties of nitroreductase produced by *Rhodobacter sphaeroides*, the effect of different combination of nitrogen sources on the efficiency of biotransformation 2,4-DNT by *Rhodobacter sphaeroides* and the growth of *Rhodobacter sphaeroides* cells was studied. The concentration changes of 2,4-DNT and biotransformation products of 2,4-DNT were measured at different time. The patterns of isoenzymes of nitroreductase was analyzed using native-polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) method, and kinetic parameters of the nitroreductase were measured and obtained. Results show that the optimum combination of nitrogen sources to biotransformation of 2,4-DNT by *Rhodobacter sphaeroides* is complex nitrogen sources composed of yeast extract and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Using *Rhodobacter sphaeroides*, 2,4-DNT can efficiently reduced as 4-amino-2-nitrotoluene (4A2NT) and 2-amino-4-nitrotoluene (2A4NT). However, the content of 4A2NT is far greater than that of 2A4NT, they have not been further reduced to 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT). When the initial concentration of 2,4-DNT is 20, 40 and 60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, there is an obvious promoting effect on the activity of nitroreductase produced by *Rhodobacter sphaeroides*. While, when the initial concentration of 2,4-DNT is 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the activity of nitroreductase is inhibited. The activity of nitroreductase produced by *Rhodobacter sphaeroides* is the highest at the initial pH=7. The kinetic parameters, the maximum reaction rate V_{\max} and Michaelis constant K_m , for the nitroreductase in *Rhodobacter sphaeroides* are 0.0507 $\text{mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ and 0.1772 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

Key words: *Rhodobacter sphaeroides*; 2,4-dinitrotoluene; nitrogen source; biotransformation products; nitroreductase; isoenzyme; polyacrylamide gel electrophoresis

CLC number: TJ55; X172

Document code: A

DOI: 10.11943/j.issn.1006-9941.2018.03.013