

文章编号:1006-9941(2020)09-0942-09

# 球形红细菌降解 PNP 的不同因素影响及代谢机理

白红娟,孙慧敏,张晴

(中北大学环境与安全工程学院,山西太原 030051)

**摘要:** 通过拟合 Haldane 动力学方程,分析球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)H 菌株降解对硝基苯酚(PNP)的生长动力学特性;考察营养因素(碳源、金属离子和 NaCl 浓度)对 H 菌株降解 PNP 的影响以及 H 菌株对酚类物质的底物广谱性,并对 H 菌株降解 PNP 的代谢机理进行推测。结果表明,H 菌株降解 PNP 的生长动力学符合 Haldane 模型( $R^2=0.9990$ );H 菌株降解 PNP 的最适碳源和金属离子分别是苹果酸和  $Ca^{2+}$ ,NaCl 浓度耐受值为  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;酚类物质中邻苯二酚对 PNP 降解影响最大;利用高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MC)对菌株代谢 PNP 的产物进行分析,发现中间产物主要为对苯二酚(HQ)、4-羟基粘糠酸半醛(4-HS)和马来酰胺乙酸(MA),同时酶活性分析表明底物 HQ 在粗酶液中对苯二酚 1,2-双加氧酶作用下生成 4-HS,由此推测 H 菌株可能利用的是对苯二酚代谢途径。

**关键词:** 对硝基酚(PNP);球形红细菌;Haldane 方程;降解特性;代谢途径

中图分类号: Tj55; X172

文献标志码: A

DOI:10.11943/CJEM2019265

## 1 引言

对硝基酚(*p*-nitrophenol, PNP)作为重要的工业原料广泛应用于制造炸药、染料、杀虫剂、药物和合成材料等领域<sup>[1]</sup>。研究报到了有关 PNP 对人、动物和真菌会产生毒性,使人和动物血液中的高铁血红蛋白含量升高,导致血液携带氧气能力下降<sup>[2]</sup>;在酿酒发酵过程中酵母受 PNP 诱导,会引起基因重组或进行有丝分裂<sup>[3]</sup>。美国环保署已将 PNP 归为优先控制有毒污染物<sup>[4]</sup>。

目前研究报道的微生物降解 PNP 的代谢途径主要有两条,一条途径是将 PNP 转化为 4-硝基儿茶酚再进行开环,该降解途径为偏苯三酚代谢途径(1,2,4-Benzene-triol, BT);另一条途径是将 PNP 转化为对苯二醌,再通过对苯二酚(Hydroquinone, HQ)开环,该降解途径为对苯二酚代谢途径。已报道的 *Moraxella sp.*<sup>[5]</sup>、*Pseu-*

*domonas sp.*1-7<sup>[6]</sup>和 *Pseudomonas sp.*WBC-3<sup>[7]</sup>菌属均利用 HQ 途径代谢,而 *Pseudomonas putida*.<sup>[8]</sup>和 *Arthrobacter sp.*JS443<sup>[9]</sup>菌株利用 BT 途径代谢。不同的微生物降解 PNP 时所生成的代谢产物不同,因此,其降解途径也不同。研究具有较好环境适应性的降解菌能够为生物降解及环境修复等相关生物技术提供重要的菌种资源。

光合细菌能在厌氧光照条件下进行不放氧光合作用,特别是紫色非硫细菌如球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)不仅能在厌氧光照的条件下进行光能异养生长,而且能在好氧黑暗条件下进行好氧异养生长。光合细菌这种随着生存环境而灵活地改变代谢类型的特性,使其较其它微生物材料具有优越性。本课题组前期研究表明<sup>[10]</sup>,球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)H 菌株能在 168 h 降解 PNP 达到 91.1%,具有高效降解 PNP 的作用,由于尚未系统开展该菌株对 PNP 降解特性的研究,不能完全揭示其对 PNP 的降解途径,同时,不同菌株降解酚类的能力与碳源<sup>[11]</sup>、金属离子<sup>[12]</sup>和 NaCl 浓度<sup>[13]</sup>等营养因素有很大关系,为此,本研究对影响球形红细菌 H 菌株降解 PNP 的营养因素及降解 PNP 的中间产物进行研究,为完善 PNP 的降解途径及其在环境中对 PNP 的降

收稿日期:2019-10-14;修回日期:2019-12-16

网络出版日期:2020-06-22

基金项目:山西省回国留学人员科研资助项目(2016-084),山西省重点研发计划(社会领域)科研资助项目(No.201903D321083)

作者简介: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

引用本文:白红娟,孙慧敏,张晴.球形红细菌降解 PNP 的不同因素影响及代谢机理[J].含能材料,2020,28(9):942-950.

BAI Hong-juan, SUN Hui-min, ZHANG Qing. Effects of Different Factors on PNP Degradation by *Rhodobacter sphaeroides* and Metabolic Mechanisms[J]. Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao), 2020, 28(9):942-950.

解应用提供数据参考。

## 2 材料与实验

### 2.1 试剂及仪器

试剂:对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP, 纯度98%),购自天津市凯通化学试剂公司;苹果酸、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 均为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂开发中心;实验用水为二次去离子水。

主要仪器:人工气候箱(KRQ-300型,上海德州市昊诚实验仪器有限公司);可见分光光度计(UV2100型,上海龙尼柯仪器有限公司);超声波细胞破碎仪(JY92-II型,宁波新芝科学器材研究所);Heal Force高速冷冻离心机(Neofuge 15R型,上海力申科学设备有限公司);电泳仪(DYCZ-24A型,北京六一生物科技有限公司);紫外分光光度计(UV2902PC型,上海亚津电子科技有限公司);岛津高效液相质谱仪(HPLC/MS-QP5050A型,上海泽百机电设备有限公司)。

### 2.2 菌种及培养

菌株: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<sup>[10]</sup>。

基础培养基:苹果酸2.5 g、酵母膏1.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.25 g、 $\text{MgSO}_4$  0.2 g、 $\text{CaCl}_2$  0.07 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.9 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 g、蒸馏水1000 mL。

H菌株驯化培养:将15%原始菌液接入PNP含量为 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的驯化培养基,在 $30^\circ\text{C}$ 、2500 lx人工气候箱中厌氧驯化培养10 d作为驯化菌种。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 H菌株生长及PNP降解特性实验

##### (1) H菌株降解PNP生长动力学实验

在含不同浓度PNP( $50$ 、 $80$ 、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $130 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的液体培养基<sup>[14]</sup>,接种一定量的指数生长期的菌体培养液( $\text{OD}_{590 \text{ nm}}$ 为0.182),置于光照强度为2500 lx,温度为 $30^\circ\text{C}$ 人工气候箱中培养,每隔24 h取样,离心10 min(8000 rpm),弃上清液,将细胞沉淀重悬于5 mL去离子水中,在 $\text{OD}_{590 \text{ nm}}$ 测定生物量。

(2) 不同营养因素对H菌株降解PNP的影响实验

a. 不同种类碳源、金属离子和NaCl浓度对PNP降解的影响实验

在PNP浓度为 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础培养基中接种H菌株( $\text{OD}_{590 \text{ nm}}$ 为0.182),分别考察不同碳源(蔗糖、

乳糖、葡萄糖和麦芽糖)、NaCl浓度(0、10、20、30、 $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和金属离子( $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 和KCl)对PNP的去除及菌株生长的影响。规定条件为:碳源为苹果酸、不加NaCl和金属离子 $\text{CaCl}_2$ ,实验过程中,改变1个影响因素,固定其它2个条件,进而确定最适的生长与降解条件。在 $30^\circ\text{C}$ 人工气候箱培养,7 d后取样5 mL,在8000 rpm下离心10 min,用可见分光光度计(UV2100型)测定上清液中残留的PNP含量 $\text{OD}_{400 \text{ nm}}$ ,将细胞沉淀重悬于5 mL蒸馏水,测H菌株生物量 $\text{OD}_{590 \text{ nm}}$ <sup>[15]</sup>。

##### b. 不同因素对H菌株产生酶蛋白的影响实验

依据上节中所得结果,选取对PNP降解率影响较大的因素,将培养好的H菌株制备成粗酶液进行SDS-PAGE实验。分别在以下8种不同的培养基中培养H菌株:不添加PNP、添加 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  PNP、添加 $0.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 和KCl、添加 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl、添加 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖,生物量 $\text{OD}_{590 \text{ nm}}$ 约2.0时取样。参照文献[16]的方法,制备粗酶液。将样品在8000 rpm下离心10 min收集H菌株细胞,用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 7.5的Tris-HCl缓冲液洗涤2次,将其重悬于1 mL缓冲液,在冰浴条件下超声破碎细胞,时间20 min(每次间隔3 s破碎1 s),之后在高速冷冻离心机中10000 rpm离心10 min,弃沉淀,上清液即为细胞粗酶液,于 $-20^\circ\text{C}$ 保存备用。

参照文献[17]的方法,对粗酶液中酶蛋白含量进行研究。其中实验条件为在垂直电泳装置中,加入质量浓度为12%的分离胶和质量浓度为4%的浓缩胶,在点样孔加入样品 $30 \mu\text{L}$ ( $15 \mu\text{L}$ 的样品, $15 \mu\text{L}$ 的SDS上样缓冲液,煮沸2 min)。先恒压100 V样品通过浓缩胶后再恒压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。

##### (3) 不同酚类混合物对PNP降解的影响实验

为研究不同酚类混合物对H菌株降解PNP的影响,实验选用邻苯二酚(A)、甲苯酚(B)、苯酚(C)、对苯二酚(D)进行研究,设置四个水平0、10、25和 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,使用SPSS软件<sup>[18]</sup>设计 $L_{16}(4^4)$ 正交实验,实验方案如表1所示,在含PNP浓度为 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础培养基中依次添加不同酚类物质,接种一定量的指数生长期的菌体培养液( $\text{OD}_{590 \text{ nm}}$ 为0.182)测定PNP降解率。

#### 2.3.2 H菌株降解PNP中间产物及酶活性测定实验

##### (1) H菌株降解PNP中间产物分离

在PNP浓度为 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础培养基中接种H

表1 不同酚类混合物对H菌株降解PNP影响的 $L_{16}(4^4)$ 正交实验设计及结果

Table 1  $L_{16}(4^4)$  orthogonal experimental design and results of different phenolic mixtures on degradation of PNP by H Strain

number	A /mg·L <sup>-1</sup>	B /mg·L <sup>-1</sup>	C /mg·L <sup>-1</sup>	D /mg·L <sup>-1</sup>	PNP degradation rate /%
1	0	0	0	0	90.9
2	0	10	50	50	72.9
3	25	25	25	0	70.1
4	10	25	50	25	70.9
5	10	10	10	0	76.6
6	50	0	10	25	17.9
7	0	25	10	10	87.6
8	0	50	25	25	83.1
9	50	10	25	10	43.2
10	10	50	0	10	68.2
11	50	50	50	0	69.7
12	25	50	10	50	22.4
13	25	0	50	10	79.9
14	50	25	0	50	6.1
15	25	10	0	25	49.7
16	10	0	25	50	66.8

菌株( $OD_{590\text{nm}}$ 为0.182),在30℃、2500 Lx人工气候箱中培养。H菌株生长到对数期( $OD_{590\text{nm}}$ 约为0.6)后,每隔24 h取样,离心10 min(8000 rpm),取上清液倒入分液漏斗,用等体积乙酸乙酯进行多次萃取,待分层后取上层有机相,将其旋转蒸发至近干,用甲醇定容至5 mL,过0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜,利用高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)检测。

### (2) 酶活性测定实验

在PNP浓度为80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的基础培养基中接种H菌株( $OD_{590\text{nm}}$ 为0.182),培养至生物量 $OD_{590\text{nm}}$ 约2.0时取样,按照2.3.1(2)b中的方法制备粗酶液。

#### a. 粗酶液活性分析

反应体系中含有110  $\mu\text{M}$  PNP,1.5 mM还原性辅酶(NADH),50 mM Tris-HCl缓冲液(pH值为7.0),200  $\mu\text{L}$ 粗酶液,终体积为2 mL<sup>[19]</sup>。反应从加入NADH后开始,在30℃下反应30 min,之后在90℃下加热10 min终止反应。将样品在10000 rpm下离心10 min,利用UV2902PC型紫外分光光度计扫描320~500 nm。

#### b. 对苯二酚1,2-双加氧酶活性分析

反应体系中含有10  $\mu\text{L}$  HQ二甲基甲酰胺(DMF)溶液(50 mM),100  $\mu\text{L}$ 粗酶液(预先在10 mM的 $\text{FeSO}_4$ 溶液中培养1 min),50 mM的磷酸盐缓冲溶液(pH为

7.0),终体积为1 mL<sup>[20]</sup>。反应从加入粗酶液开始,在30℃下反应60 min,之后在90℃下加热10 min终止反应。将样品在10000 rpm下离心10 min,利用UV2902PC型紫外分光光度计扫描260~350 nm。

## 2.4 分析方法

PNP浓度的测定:

用UV2100型可见分光光度计测定PNP的残留量<sup>[13]</sup>。PNP降解率的计算公式如下:

$$\eta = (C_0 - C)/C_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中, $\eta$ 为降解率,%; $C_0$ 为初始浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;C为剩余浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

PNP降解中间产物检测:利用HPLC-MS对样品进行检测,质谱配置电喷雾电离源(ESI),以100%甲醇作为流动相,流速0.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,采用直接注射进样1  $\mu\text{L}$ ,负离子模式进行电击,毛细管电压为3.5 kV,载气(325℃)为高纯氮气(99.999%),流速为8  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,产生的负离子通过扫描模式进行检测,通过Mass hunter(vA.02.00)对数据进行收集及分析<sup>[8]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 H菌株生长及PNP降解特性研究

#### 3.1.1 H菌株降解PNP生长动力学

在不同PNP浓度(50、80、100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和130  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )下,测得H菌株生长量随时间变化如图1所示。由图1可知,随着底物PNP浓度的增加,H菌株的生长趋势逐渐变缓。

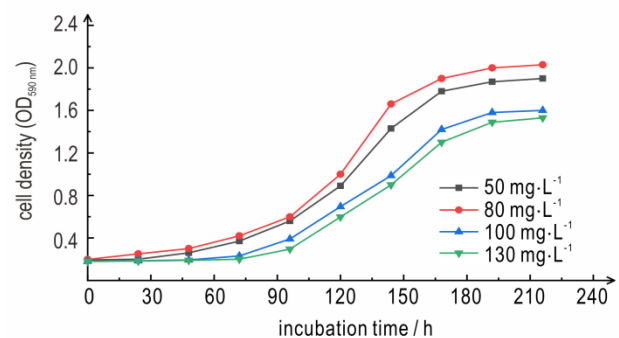


图1 不同PNP浓度下H菌株的生长曲线

Fig.1 Growth curve of H strain under the different PNP concentration

建立生长动力学模型对H菌株的理论研究和实际应用都有重要意义。参照文献[15]的方法采用Haldane模型<sup>[21]</sup>,分析PNP浓度对H菌株生长量的抑制作用。首先利用式(2)计算出不同浓度下对应的比生长速率,然后通过Haldane生长抑制模型式(3),模



拟H菌株在不同初始PNP浓度下的生长动力学过程。方程如下所示:

$$\mu = \frac{d c_x}{d t} \times \frac{1}{C_0} \quad (2)$$

式中, $\mu$ 为比生长速率, $h^{-1}$ ;  $C_0$ 为初始接入培养基H菌株生物量。

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{S}{K_s + S + S^2/K_i} \quad (3)$$

式中, $\mu$ 为比生长速率, $h^{-1}$ ;  $\mu_{\max}$ 为最大比生长速率, $h^{-1}$ ;  $S$ 为底物饱和浓度, $mg \cdot L^{-1}$ ;  $K_s$ 为饱和常数;  $K_i$ 为抑制常数。

通过origin 8.0软件<sup>[22]</sup>利用非线性最小二乘法对实验数据进行拟合,拟合结果如图2所示。由图2可以看出,随着PNP浓度的升高,比生长速率先上升后下降,H菌株为典型的抑制生长模式。PNP浓度为 $80 mg \cdot L^{-1}$ 时,比生长速率达到最大 $0.043 h^{-1}$ ; PNP浓度大于 $100 mg \cdot L^{-1}$ 后,比生长速率开始下降。分析原因,由于培养基中PNP浓度过高以及代谢过程中产生有毒物质的积累,导致H菌株的生长量递减,底物PNP的抑制作用递增。结果表明,PNP浓度高于 $100 mg \cdot L^{-1}$ ,对H菌株生长产生明显抑制作用<sup>[23]</sup>。

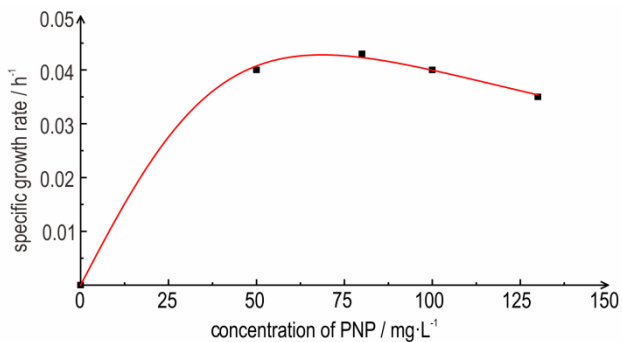


图2 PNP为底物H菌株比生长速率与Haldane模型拟合曲线  
Fig.2 Fitting curve between specific growth rate of H strain with PNP as substrate and Haldane model

H菌株降解PNP过程中的细胞生长动力学参数为:最大比生长速率 $\mu_{\max}$ 为 $0.189$ ,抑制常数 $K_i$ 为 $125.09 mg \cdot L^{-1}$ ,半饱和常数 $K_s$ 为 $41.56 mg \cdot L^{-1}$ ,拟合参数 $R^2$ 为 $0.999$ 表明Haldane动力学模型的拟合度良好。因此,生长动力学方程为:

$$\mu = 0.189 \times \frac{S}{41.56 + S + S^2/125.09} \quad (4)$$

### 3.1.2 不同营养因素对H菌株生长量及PNP降解的影响

#### (1) 不同种类碳源的影响

PNP有毒性且苯环上存在硝基而不易被微生物降解,需要补充营养物质促进H菌株生长和PNP降解。为此,选用苹果酸、乳糖、葡萄糖、麦芽糖和蔗糖5种营养物质作为碳源,研究不同种类碳源对H菌株生长和PNP降解的影响,见图3。由图3可以看出,添加苹果酸H菌株降解率为 $91.0\%$ ,生长量 $OD_{590 nm}$ 为 $2.151$ 。添加不同种类碳源对PNP降解的影响依次是:苹果酸>乳糖>葡萄糖>麦芽糖>蔗糖,降解率分别为 $91.0\%$ 、 $60.0\%$ 、 $31.8\%$ 、 $24.4\%$ 和 $10.6\%$ ,H菌株生长量 $OD_{590 nm}$ 分别为 $1.255$ 、 $0.932$ 、 $1.074$ 和 $1.059$ 。表明,碳源对H菌株生长和PNP降解影响较大,其中蔗糖对H菌株降解PNP的抑制作用最强,添加苹果酸效果最佳能提高H菌株对PNP降解能力,提供H菌株生长所需碳源和能源<sup>[24]</sup>。

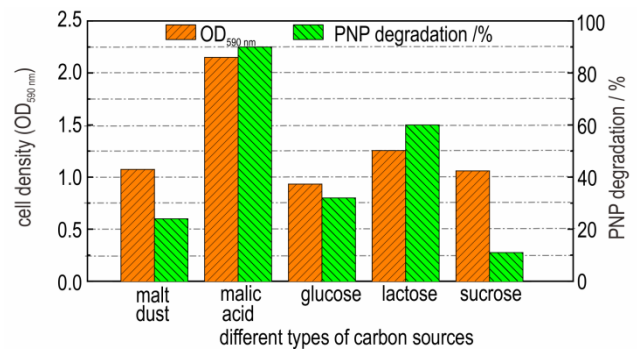


图3 5种碳源对H菌株生长和PNP降解的影响  
Fig.3 Effects of five nutrition factors on the degradation rate of PNP

#### (2) 不同浓度NaCl的影响

图4为不同浓度的NaCl对H菌株生长和PNP降解的影响,由图4可以看出,培养基中不添加NaCl菌株生长和降解率最好;当NaCl浓度为 $10 mg \cdot L^{-1}$ 和 $20 mg \cdot L^{-1}$ 时,PNP降解率为 $88.2\%$ 和 $60.0\%$ ,生长量 $OD_{590 nm}$ 为 $2.142$ 和 $0.704$ ; NaCl浓度升高到 $20 mg \cdot L^{-1}$ 后,随着浓度升高PNP降解率逐渐下降,而生长量基本保持不变。结果表明,NaCl浓度在 $10 mg \cdot L^{-1}$ 以内对H菌株影响较小,NaCl浓度达到 $20 mg \cdot L^{-1}$ 以后,降解率与NaCl浓度呈负相关,而生长量能够维持在一定水平。因此,NaCl浓度升至 $20 mg \cdot L^{-1}$ 后,由于NaCl浓度升高导致H菌株的细胞脱水,引起蛋白质变性失活、酶蛋白减少<sup>[25]</sup>,进而降低PNP降解率。

#### (3) 不同金属离子对H菌株降解PNP的影响

图5为不同金属离子对H菌株生长和降解PNP的影响,由图5可以看出,不添加金属离子的空白对照实

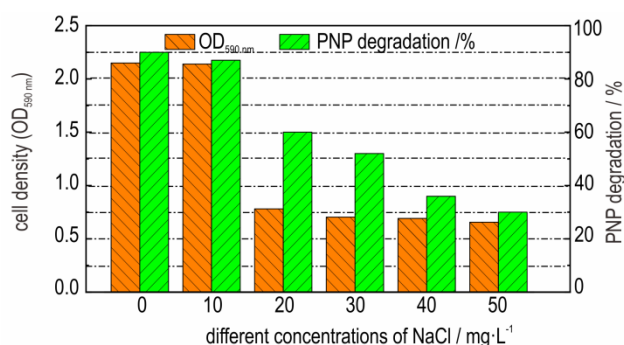


图4 不同浓度的NaCl对H菌株生长和PNP降解的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of NaCl on the growth of H strain and PNP degradation

验中,PNP降解率为82.3%,生长量OD<sub>590 nm</sub>为2.195;添加Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>和Fe<sup>2+</sup>时,降解率分别为91.0%、88.0%和87.6%,生长量OD<sub>590 nm</sub>为2.201、2.170和2.082;与对照实验相比这几种离子不同程度促进H菌株生长代谢。添加Mn<sup>2+</sup>时,PNP降解率为77.4%,生长量OD<sub>590 nm</sub>为1.960,比对照实验结果略低。添加Zn<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>时,PNP降解率分别为60.3%和15.9%,生长量OD<sub>590 nm</sub>为1.422和0.410,与对照实验相比均抑制H菌株生长代谢,并且Cu<sup>2+</sup>抑制作用更强。结果表明,不同种类金属离子对PNP降解和H菌株生长影响程度不同,其中Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>离子促进作用明显,与Young Gyun Cho等人<sup>[26]</sup>研究结论一致,由于Ca<sup>2+</sup>可以提高脱氢酶活性,促进了降解中4-HS转变为MA,Fe<sup>2+</sup>可以提高双加氧酶活性,促进降解中HQ转变成4-HS,从而提高H菌株生长和PNP降解;Cu<sup>2+</sup>对菌株产生抑制作用明显,这与文献<sup>[27]</sup>的结果相同。

### 3.1.3 不同因素对H菌株产生酶蛋白的影响

依据以上实验分别选取:碳源中对降解率抑制性最强的蔗糖,NaCl浓度上升为20 mg·L<sup>-1</sup>降解率明显开始受到抑制,除Cu<sup>2+</sup>外的不同种类金属离子(Cu<sup>2+</sup>抑制H菌株生长无法制备粗酶液),研究这些因素对H菌株产生酶蛋白含量的影响。图6为不同因素下H菌株全细胞蛋白电泳,其中M为标准蛋白质分子量条带。由图6可以看出,各个泳道的蛋白分子量主要分布在26~120 KD,并且条带之间存在一定差异。泳道1、5、6、7和8蛋白条带清晰且颜色较深,说明酶蛋白

表2 不同因素下H菌株蛋白条带灰度值比较

Table 2 Comparison of gray value of protein bands of strain H under different factors

number	1	2	3	4	5	6	7	8	9
gray value	29821	21282	6620	2952	22901	22541	26935	26759	21154

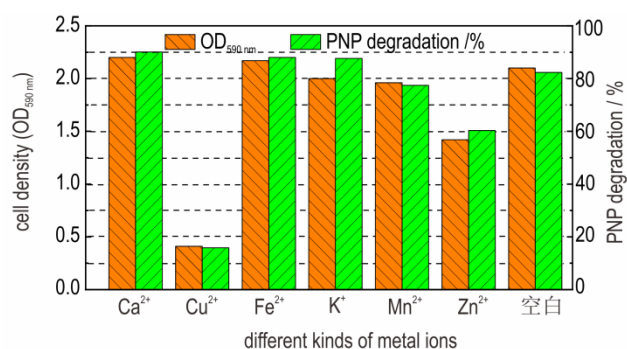


图5 不同金属离子对H菌株生长和降解PNP的影响

Fig.5 Growth of H strain by different metal ions effect of PNP degradation

含量较高,此处与图5中PNP降解结果一致;泳道2、3、4和9蛋白条带颜色较浅,说明蛋白含量相对较少,此处与图3、4和5中PNP降解结果一致。因此,不同因素会影响H菌株酶蛋白产量<sup>[28]</sup>,进而影响PNP降解率。

应用Image J软件<sup>[19]</sup>分析泳道中分子质量为90 KD蛋白条带的灰度值,结果如下表2所示,泳道3和4中灰度值(gray value)分别为6620和2952,蛋白含量明显较少;结果表明,添加20 mg·L<sup>-1</sup>的NaCl和蔗糖均会抑制90 KD酶蛋白产生。

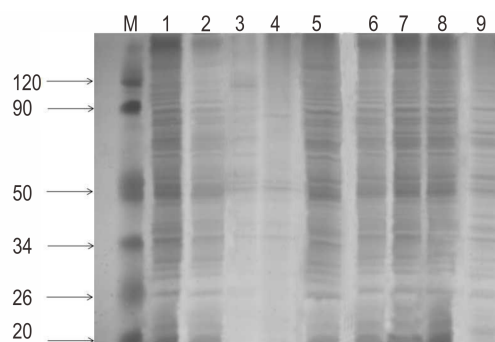


图6 不同因素下H菌株全细胞蛋白电泳

(1—添加80 mg·L<sup>-1</sup>PNP, 2—未添加PNP, 3—添加20 mg·L<sup>-1</sup>的NaCl, 4—添加蔗糖, 5—未添加金属离子, 6—添加Mn<sup>2+</sup>, 7—添加Fe<sup>2+</sup>, 8—添加K<sup>+</sup>, 9—添加Zn<sup>2+</sup>)

Fig.6 Whole cell protein electrophoresis of H strain under different factors

(1—added PNP 20 mg·L<sup>-1</sup>, 2—not added PNP, 3—added NaCl 20 mg·L<sup>-1</sup>, 4—added sucrose, 5—not added metal ion, 6—added Mn<sup>2+</sup>, 7—added Fe<sup>2+</sup>, 8—added K<sup>+</sup>, 9—added Zn<sup>2+</sup>)

### 3.1.4 不同酚类混合物对H菌株降解PNP的影响

分析不同酚类物质对H菌株降解PNP的影响,选取四种酚类物质进行研究,并参考文献[29]中细菌能降解这四种物质。利用SPSS软件<sup>[18]</sup>对正交实验结果进行分析,表3中 $R^2$ 为0.993调整后为0.982,表示实验数据与模型的拟合程度良好。概率 $P$ 值(sig.)小于0.05时说明影响显著, $P$ 值大于0.05时说明无显著影响。因素A、B、C和D的概率 $P$ 值分别为:0.025、0.197、0.153和0.058,说明只有A对降解率造成了显著影响,B、C和D对降解率无显著影响。四种酚类物质对PNP降解效率影响强弱: $A>D>C>B$ ,即邻苯二酚对PNP降解影响显著。

表3 不同酚类混合物对H菌株降解PNP影响的 $L_{16}(4^4)$ 正交实验的方差分析

Table 3 Variance analysis of  $L_{16}(4^4)$  orthogonal experiment on effect of nitrophenol mixture on degradation of PNP by H strain

source	sum of squares	df	mean square	F-statistic	sig.
corrected model	9633.135 <sup>1)</sup>	12	802.761	6.938	0.069
intercept	59536.000	1	59536.000	514.535	0.000
A	5405.630	3	1801.877	15.573	0.025
B	555.415	3	180.472	1.160	0.917
C	1304.015	3	434.672	3.757	0.153
D	2868.075	3	956.025	8.262	0.058
E (error)	347.125	3	115.708		
total	69516.260	16			
corrected total	9980.260	15			

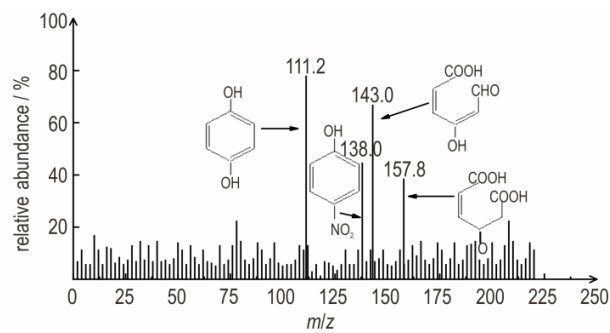
Note: 1)  $R^2=0.993$  (adjusted  $R^2=0.982$ ). 2) df: degrees of freedom.

## 3.2 H菌株降解PNP酶活性分析及代谢途径推测

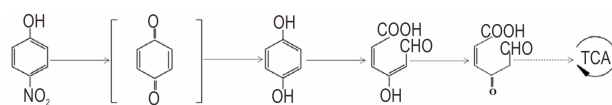
### 3.2.1 HPLC-MS检测中间产物

对H菌株降解PNP的样品进行HPLC-MS检测,得到H菌株降解PNP过程中产生的中间产物种类,结果见图7a。通过查阅相关文献<sup>[30-31]</sup>和化学专业数据库(Chemistry Database),根据质荷比确定中间产物种类。由图7a可以看出,中间产物包含:对硝基苯酚(PNP)吸收峰( $m/z=138.0$ )、对苯二酚(HQ)吸收峰( $m/z=111.2$ )、4-羟基粘糠酸半醛(4-HS)吸收峰( $m/z=143.0$ )和马来酰胺乙酸(MA)吸收峰( $m/z=157.8$ )。图7b为H菌株降解PNP的可能代谢途径(括号中的物质未检测出),由图7b可以看出,PNP在酶催化作用下先脱硝基生成对苯二醌,然后在还原酶的作用下对苯二醌生成HQ,HQ在双加氧酶的作用下生成4-HS,最

后,在脱氢酶的作用下4-HS生成MA,最终进入TCA循环,即对苯二酚代谢途径<sup>[6]</sup>。



a. detection of intermediates by HPLC-MS



b. possible metabolic pathway of PNP degradation by H strain

图7 H菌株降解PNP中间产物检测和可能的代谢途径分析

Fig.7 Detection and metabolic pathway analysis of PNP intermediate degradation by H strain

### 3.2.2 酶活性分析

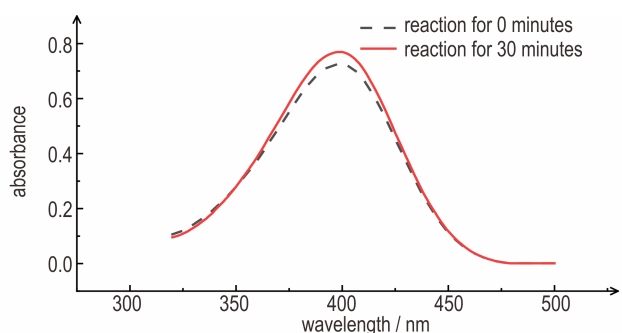
为了进一步确认H菌株利用对苯二酚代谢途径,在以上中间产物检测分析的基础上,测定代谢过程中产生酶的活性,即:粗酶液和对苯二酚1,2-双加氧酶活性。

#### (1) 粗酶液酶活性分析

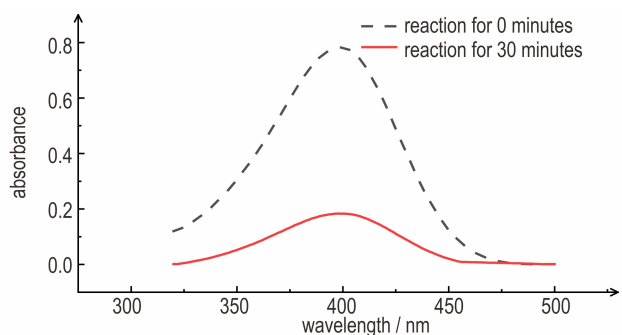
图8a为对照实验H菌株未经PNP诱导产生的粗酶液活性,由图8a可以看出,反应30 min后在400 nm处,吸收峰值下降0.0572。图8b为经过PNP诱导H菌株产生粗酶液活性测定,由图8b可以看出,在400 nm处吸收峰值下降0.5859。结果表明,经过PNP诱导H菌株产生的粗酶液可以降解PNP,粗酶液具有活性。

#### (2) 对苯二酚1,2-双加氧酶活性分析

进一步研究粗酶液中HQ 1,2-双加氧酶的活性。参考文献[32]分别在0、30、60 min检测得到如图9结果,HQ的最大特征吸收峰在289 nm处,4-HS的最大特征吸收峰为320 nm。图9a为对照实验未经PNP诱导H菌株产生的粗酶液降解HQ,由图9a可以看出,吸收峰基本没有变化(图9a中检测的三条曲线基本重合)。图9b为H菌株经PNP诱导后产生的粗酶液降解HQ,由图9b可以看出,随着反应的进行HQ在289 nm处的吸收峰逐渐向320 nm偏移,由于反应中4-HS积累引起320 nm处曲线上移,表明在对苯二酚



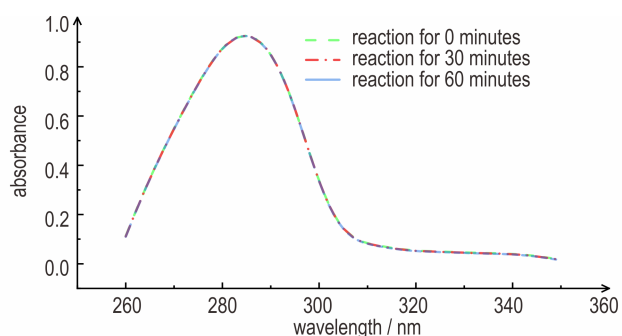
a. degradation of PNP by crude enzyme solution produced by uninduced H strain



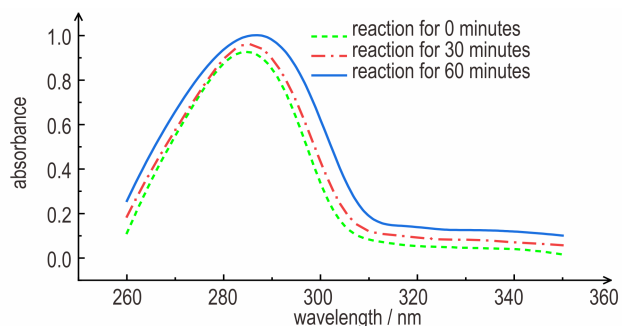
b. degradation of PNP by crude enzyme solution produced by induced H strain

图8 H菌株粗酶液活性测定

Fig.8 Determination of crude enzyme activity of strain H



a. degradation of HQ by uninduced H strain



b. degradation of HQ by induced H strain

图9 H菌株粗酶液中HQ1,2-双加氧酶活性

Fig.9 Hydroquinone 1,2-dioxygenase activity in crude enzyme solution of strain H

1,2-双加氧酶作用下HQ转化为4-HS。

根据以上HPLC-MS测定中间产物和酶活性分析,结合相关文献报道<sup>[8]</sup>:细菌降解PNP代谢途径可以按照革兰氏阳性菌和阴性菌进行划分,革兰氏阴性菌中多存在对苯二酚代谢途径,本研究选用的H菌株属于革兰氏阴性菌。因此,推测H菌株降解PNP利用对苯二酚代谢途径。

## 4 结论

(1)PNP抑制H菌株的生长动力学符合Haldane方程( $R^2$ 为0.9990),最大比生长速率 $\mu_{max}$ 为0.189,抑制常数 $K_i$ 为125.09  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

(2)不同营养因素(碳源、金属离子和NaCl浓度)对H菌株降解PNP影响实验表明,苹果酸为最适碳源, $\text{Ca}^{2+}$ 促进作用明显,NaCl浓度高于20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降解率开始下降;通过SDS-PAGE分析酶蛋白含量,发现培养基中添加20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl及碳源蔗糖时,均抑制H菌株产生90 KD的酶蛋白。此外,四种酚类物质对PNP降解效率影响强弱顺序为:邻苯二酚>对苯二酚>苯酚>甲苯酚,即:邻苯二酚对PNP降解影响较显著。

(3)通过HPLC-MS检测出的主要代谢中间产物为:对苯二酚(HQ)、4-羟基粘糠酸半醛(4-HS)和马来酰胺乙酸(MA),同时,酶活性分析表明HQ在对苯二酚1,2-双加氧酶作用下生成4-HS,由此推测H菌株按照革兰氏阴性菌途径降解PNP,即:对苯二酚代谢途径。

## 参考文献:

- [1] 任磊,史延华,贾阳,等.菌株 *Arthrobacter* sp. CN2降解对硝基苯酚的特性与动力学[J].环境科学,2015,36(5):1757-1762.  
REN Lei, SHI Yan-hua, JIA Yang, et al. Biodegradation characteristics and kinetics of *p*-nitrophenol by strain *Arthrobacter* sp. CN2[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(5): 1757-1762.
- [2] Oubina A., Galve R, Marco M P, et al. Development and optimization of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for 4-nitrophenol[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 387(3): 255-266.
- [3] Zimmermann F K, Vonborstel R C, Von Halle E S, et al. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the US environmental protection agency gene-tox program [J]. *Mutation Research*, 1984, 133(3): 199-244.
- [4] 万年升,顾继东,黄锦辉,等. *Achromobacter xylosoxidans* NS12的分离和对硝基苯酚的降解[J].环境科学,2007,28(2): 422-426.  
WAN Nian-sheng, GU Ji-dong, HUANG Jin-hui, et al. Isolation of *Achromobacter xylosoxidans* NS12 and degradation of



- nitrophenols [J]. *Environmental Science*, 2007, 28 (2): 422-426.
- [5] Jim C, Spain, David T, et al. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella sp*[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1991, 57(3): 802-809.
- [6] ZHANG Shuang-yu, WEN Sun, LI Xu, et al. Identification of the *para*-nitrophenol catabolic pathway and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway in *Pseudomonas sp.* 1-7 [J]. *BMC Microbiology*, 2012, 27(2): 471-476.
- [7] ZHANG Jun-jie, HONG Liu, YI Xiao, et al. Identification and characterization of catabolic *para*-nitrophenol 4-monoxygenase and *para*-benzoquinone reductase from *Pseudomonas sp.* strain WBC-3 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (8): 2703-2710.
- [8] 任磊, 刘斌, 蔺中, 等. 一株耐盐对硝基苯酚降解菌的分离及其降解机理研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9):17-26.  
REN Lei, LIU Bin, LIN Zhong, et al. Isolation of a *p*-nitrophenol degrading bacterium and investigation of its degrading mechanism[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 17-26.
- [9] Ezezi O C, Haddad S C, Todd J, et al. Distinct effector-binding sites enable synergistic transcriptional activation by benM alysrtype regulator [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(3): 616-629.
- [10] 孙慧敏, 白红娟, 张晴, 等. 球形红细菌降解对硝基酚特性及响应面优化[J]. *含能材料*, 2019, 27(7):542-549.  
SUN Hui-min, BAI Hong-juan, ZHANG Qing, et al. Degradation of *p*-nitrophenol by *Rhodobacter Spheroides* and optimization of response surface methodology[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao)*, 2019, 27(7): 542-549.
- [11] ZHANG Jing-shun, SUN Zhong-tao, LI Ying-ying, et al. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus sp.* CN6 with high cell surface hydrophobicity[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163(2-3): 723-728.
- [12] 孙纪全, 徐莲, 陈福明, 等. *Diaphorobacter sp.* J5-51 降解酚类污染物的特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(3): 393-396.  
SUN Ji-quan, XU Lian, CHEN Fu-ming, et al. Degradation characteristics of phenolics by *Diaphorobacter sp.* strain J5-51 [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(3): 393-396.
- [13] 张秀霞, 徐娜娜, 秦丽姣, 等. 固定化微生物降解石油的影响因素研究[J]. *安全与环境学报*, 2011, 11(5):77-80.  
ZHANG Xiu-xia, XU Na-na, Qin Li-jiao, et al. Treatability evaluation of oil-fracturing fluid sewage based on the water matrix [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2011, 11(5): 77-80.
- [14] 陈正军. 黄河兰州段铬还原菌和对硝基酚降解菌的分离筛选及其在微生物燃料电池中的应用研究[D]. 甘肃: 兰州大学, 2016.  
CHEN Zheng-jun. Isolation and screening of strains for chromate reduction and *p*-nitrophenol degradation from the Lan Zhou reaches of the yellow river and their applications in microbial fuel cells[D]. Gan Su: Lan Zhou universit y, 2016.
- [15] 范春华, 王力, 夏本立, 等. 菌群FYD降解偏二甲肼的动力学研究[J]. *含能材料*, 2014, 22(5):630-634.  
FAN Chun-hua, WANG Li, XIA Ben-li, et al. Degradation kinetic study of UD MH by flora FYD[J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao)*, 2014, 22(5): 630-634.
- [16] Oh B T, Sarath G, Shea P J, et al. TNT nitroreductase from a *pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT-contaminated soil [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33 (7): 875-880.
- [17] 赵婷婷, 白红娟, 康鹏洲, 等. 光合细菌球形红细菌降解 HMX [J]. *含能材料*, 2018, 26(4):352-358.  
ZHAO Ting-ting, BAI Hong-juan, KANG Peng-zhou, et al. Degradation of HMX by photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao)*, 2018, 26(4): 352-358.
- [18] 徐向宏, 何明珠. 试验设计与 Design-Expert、SPSS 应用[M]. 1. 北京: 科学出版社, 2010: 1-208.  
XU Xiang-hong, HE Ming-zhu. Test design and application of Design-Expert and SPSS [M]. Beijing: Science Press, 2010: 1-208.
- [19] 白红娟, 赵婷婷, 康鹏洲, 等. 球形红细菌降解 HMX 的途径及产酶特性[J]. *含能材料*, 2019, 27(7):550-557.  
BAI Hong-juan, ZHAO Ting-ting, KANG Peng-zhou, et al. Degradation pathway of HMX and the property of crude enzyme produced by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *Chinese Journal of Energetic Materials (Hanneng Cailiao)*, 2019, 27(7): 550-557.
- [20] Joanna Z, Danuta W, Katarzyna H, et al. Paracetamol etoxicity and microbial utilization *Pseudomonas Moorei* KB4 as a case study for exploring degradation pathway [J]. *Chemosphere*, 2018, 206(3): 192-202.
- [21] Felshia S C, Ashwin K N, Thilagam R, et al. Elucidation of 2, 4-dichlorophenol degradation by *Bacillus licheniformis* strain SL10 [J]. *Environmental Technology*, 2018, 14(9): 89-112.
- [22] 马小丽, 岳秀萍, 王国英. 苯系物降解菌群的降解特性分析及模拟应用[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(10):42-46.  
MA Xiao-li, YUE Xiu-ping, WANG Guo-ying. Degradation characteristics of benzene-degrading bacteria group and its application in simulated environment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 41(10): 42-46.
- [23] 葛启隆, 岳秀萍, 王国英, 等. 好氧反硝化苯酚降解菌分离鉴定及动力学[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(6):2605-2610.  
GE Qi-long, YUE Xiu-ping, WANG Guo-ying, et al. Isolation and identification of aerobic denitrifying phenol degrading strain and its kinetic [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(6): 2605-2610.
- [24] 罗玮, 姜宏亮, 马浩, 等. 一株乙草胺降解菌的分离及其降解特性研究[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(12):2678-2685.  
LUO Wei, JIANG Hong-Liang, MA Hao, et al. Isolation and degradation characteristics of an acetochlor-degrading strain [J]. *Microbiology China*, 2016, 43(12): 2678-2685.
- [25] Sardinh M, Torsten M, Schmeisky H, et al. Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions [J]. *Applied Soil Ecology*, 2003, 23(3): 237-244.
- [26] Denton R M, Randle P J, Martin B R. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase [J]. *Biochemical Journal*, 1972, 128(1): 161-163.
- [27] 吴锦华, 韦朝海, 李平. 金属离子及盐度对硝基苯厌氧生物降解过程的影响[J]. *环境科学研究*, 2009, 22(1):99-102.  
WU Jin-hua, WEI Chao-hai, Li Ping. The effect of metal ions and salinity on anaerobic biodegradation of nitrobenzene [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2009, 22(1): 99-102.
- [28] 吴涓, 钟升, 王光云, 等. 一株降解微囊藻毒素菌种的鉴定及其



- 活性研究[J]. 中国环境科学, 2011, 31(1):116-122.
- WU Juan, ZHONG Sheng, WANG Guang-yun, et al. Identification and activity of a bacterial strain for the biodegradation of microcystins [J]. *China Environmental Science*, 2011, 31(1): 116-122.
- [29] Chen Hui-lun, Yao Jun, Wang Fei, et al. Study on the toxic effects of diphenol compounds on soil microbial activity by a combination of methods [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167(1): 846-851.
- [30] 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]. *Environmental microbiology*, 1998, 64(7): 2479-2484.
- [31] Cho Y G, Yoon J H, Park Y H, et al. Simultaneous degradation of *p*-nitrophenol and phenol by a newly isolated *Nocardioidea* sp [J]. *Microbiology*, 1998, 44(1): 303-309.
- [32] 邓梦, 杨正凤, 黄遵锡, 等. 粪便微生物宏基因组来源的热稳定性邻苯二酚 1,2-双加氧酶异源表达及酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8):1947-1957.
- DENG Meng, YANG Zheng-feng, HUANG Zun-xi, et al. Expression and characterization of thermostable catechol 1,2-dioxygenase from a fecal microbial metagenome of *nycticebus pygmaeus* [J]. *Microbiol China*, 2017, 44(8): 1947-1957.

## Effects of Different Factors on PNP Degradation by *Rhodobacter sphaeroides* and Metabolic Mechanisms

BAI Hong-juan, SUN Hui-min, ZHANG Qing

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

**Abstract:** The growth kinetics of PNP degradation by *Rhodobacter sphaeroides* H strain was analyzed by fitting the Haldane kinetic equation. The effects of nutrition factors (carbon source, metal ions and NaCl concentration) on the degradation of PNP by H strain and the substrate broad spectrum of phenol by H strain were investigated, and the metabolic mechanism of degradation of PNP by H strain was speculated. Results show that the growth kinetics of H strain degrading PNP conforms to Haldane model ( $R^2=0.9990$ ). The most suitable carbon source and metal ions for degrading PNP by strain H are malic acid and  $Ca^{2+}$ , respectively, and the tolerance value of NaCl concentration is  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Influence of the catechol on PNP degradation is the greatest among phenols. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MC) was used to analyze the metabolites of PNP produced by the strain. It is found that the intermediate products are mainly hydroquinone (HQ), 4-hydroxybenzoic acid semialdehyde (4-HS) and maleamic acid (MA). Meanwhile, enzyme activity analysis shows that the substrate HQ produces 4-HS under the action of hydroquinone 1,2-dioxygenase in crude enzyme solution, thus suggesting that strain H may utilize the metabolic pathway of hydroquinone.

**Key words:** PNP; *Rhodobacter sphaeroides*; Haldane equation; degradation characteristics; metabolic pathway

**CLC number:** TJ55; X172

**Document code:** A

**DOI:** 10.11943/CJEM2019265

(责编:姜梅)