

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*

崔中利 张瑞福 何 健 李顺鹏**

(南京农业大学微生物学系 南京 210095)

摘 要:分离到一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) P3, 该菌能够以对硝基苯酚为唯一碳源和氮源进行生长。在有外加氮源条件下, P3 降解对硝基苯酚并在培养液中积累亚硝酸根。P3 有比较广泛的底物适应性, 对多种芳香族化合物都有降解能力。不同金属离子对 P3 降解对硝基苯酚有不同的作用。葡萄糖的存在对 P3 降解对硝基苯酚无明显促进作用, 而微量酵母粉可以大大促进 P3 对硝基苯酚的降解。以 P3 为受体菌, 通过接合转移的手段将甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 克隆至 P3 菌中, 获得了表达甲基对硫磷水解酶活性的基因工程菌 PM, PM 能够以甲基对硫磷为唯一碳源进行生长。工程菌 PM 具有较高的甲基对硫磷降解活性及稳定性。

关键词:对硝基苯酚, 生物降解, *mpd* 基因, 基因工程菌

中图分类号: Q784; X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0019-08

硝基芳香族化合物是重要的化工原料, 被广泛地用作医药、染料、农药、塑料等的合成前体, 常常在生产和使用过程中被释放到环境中, 对生态系统造成影响^[1], 是一类重要的环境污染物质。有机磷农药甲基对硫磷在环境中水解也会释放出对硝基苯酚, 虽然农药的毒性降低但产生的对硝基苯酚仍具有相当高的毒性。芳香环上硝基的引入使得这类化合物的生物降解变得更加困难。硝基苯酚属于优先监测污染物^[2], 国外对其生物降解的研究已有较长时间^[3-6], 但对其生物降解途径尚未完全确定^[7-11], 对硝基苯酚降解菌的分离对于研究对硝基苯酚的降解机制具有重要意义, 并为对硝基苯酚污染的生物修复提供了优良的材料。

1 材料和方法

1.1 培养基与仪器

基础培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.3, MgSO_4 0.2, NaCl 0.5, 加入适量对硝基苯酚作为唯一碳源, pH7.0; 无碳无氮培养基(g/L): K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.3, MgSO_4 0.2, NaCl 0.5, pH7.0; 牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 5, NaCl 5, pH7.2; 富集培养基: 基础培养基中加少量酵母膏; LBMP 培养基: Luria-Bertani 琼脂培养基

* 863 计划资助项目(SZ0308)

** 联系作者

作者简介: 崔中利(1972—), 男, 山东人, 博士, 主要从事环境微生物及环境生物技术研究。

E-mail: czl@njau.edu.cn

收稿日期: 2001-02-26, 修回日期: 2001-07-09

加 200mg/L 甲基对硫磷。对硝基苯酚为化学纯试剂。紫外分光扫描光度计型号 SHIMADZU UV-2401PC。

1.2 菌株与质粒

Escherichia coli WD803 具有 str^r (染色体编码, 耐受浓度为 20mg/L) 和 $kanamycin^r$ (质粒 pRK2013 编码, 耐受浓度为 50mg/L), 购自 CCMCG。 *Pseudomonas* sp. P3 (str^r , 耐受浓度为 50mg/L) 为本实验室分离的高效对硝基苯酚降解菌。pUC19 (Amp^r) 质粒和 *E. coli* DH5 α ($recA1$ $endA1$ $hsdR17$ $DlacU169$ ($\phi 80lacZDM15$)) 为本实验室保存。pIJ2925 (Amp^r) 和 pTR102 (Amp^r , Tc^r , tra^+ , mob^-)^[13] 由华中农业大学周俊初教授赠送。pMT1, pMT12 和 pMTT 为本实验室构建, 分别为携带 2.2kb 含甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 片段的 pUC19, pIJ2925 和 pTR102。pRK2013 (mob^+) 为辅助转移质粒。

1.3 菌种的富集与分离

来自农药厂的污泥用 100mg/L 的对硝基苯酚富集 7d, 以 10% 的接种量转接至新鲜的富集培养基继续培养, 观察培养液的颜色变化。由于含对硝基苯酚的培养液在 pH7 时呈黄色, 黄色的消失与否可作为对硝基苯酚是否发生降解的指示。对硝基苯酚颜色消失后, 进行分菌。在肉汤培养基平板上划线, 待菌落长出后接种于对硝基苯酚作唯一碳源的培养基中, 观察各菌的降解能力。

该试验培养条件为 30℃ 恒温旋转摇床培养, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 采用 37℃ 培养。

1.4 对硝基苯酚的降解实验

1.4.1 P3 降解能力的测试: 本实验除非特别说明, 对硝基苯酚浓度均为 1.5mmol/L, 培养温度为 30℃, 180r/min 旋转摇床振荡培养 30h。重金属离子浓度为 0.01mmol/L。测定 P3 对对硝基苯酚的耐受情况时, 对硝基苯酚的浓度采用 100、200、300、400、500 及 600mg/L 6 个梯度。样品提取: 按上述方法处理好的样品用混合溶剂提取, 溶剂组成为三氯甲烷: 乙醚 (1:1 V/V), 用混合溶剂剧烈振荡提取 10min, 静置分层后用烘干的无水硫酸钠过滤, 即获得提取液。紫外扫描法分析对硝基苯酚降解产物: 将提取液稀释 10 倍后, 直接进行紫外扫描测定。测定条件为波长 180 ~ 350nm 连续光谱扫描。对硝基苯酚降解产生的亚硝酸根采用对氨基苯磺酸- α -萘酚比色法测定。

1.4.2 P3 底物范围的测试: 由于 P3 具有苯环双加氧酶开环酶活性, 测定了 P3 对多种芳香族化合物的降解能力。

1.5 DNA 操作方法^[12]

质粒的小量提取采用碱裂解法, 具体方法参照 [12], 大量提取采用修改的碱裂解法, 100mL 的过夜培养物用碱裂解法抽提质粒, 溶于 3mL TE (pH8.0) 中, 加入等体积预冷的 5mol/L LiCl, 置冰上 5min, 10 000 \times g 离心 10min, 取上清加入 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀质粒, 10 000 \times g 离心回收质粒 DNA, 70% 乙醇洗涤, 冷冻真空抽干, 溶于 500 μ L 含 40mg/L Rnase 的 TE (pH8.0) 中, -20℃ 保存。

质粒的酶切、连接、脱磷均按照生产厂家提供的产品说明书进行。限制性内切酶、DNA 连接酶购自华美生物工程公司, 小牛肠碱性磷酸酯酶购自 Promega 公司, Glassmilk DNA 回收试剂盒购自加拿大 Biostar 公司。

*E. coli*DH5 α 感受态细胞的制备及质粒转化参照[12]。

1.6 接合转移构建基因工程菌

受体菌 P3、供体菌 *E. coli*DH5 α (含 pMTT)及辅助转移菌 *E. coli*WD803(pRK2013)分别接种加入含相应抗生素的 3mL LB 液体培养基培养过夜,按 1:2:1 的比例混合后 7500 \times g 离心,用生理盐水洗涤菌体沉淀,重悬于 100 μ L 生理盐水中,将菌悬液全部涂到一张铺在 LB 平板上的无菌滤膜上,培养 12h。刮取菌体进行适当稀释后涂含 Tc 50mg/L, Str 50mg/L, Amp 50mg/L 的选择性平板,培养过夜挑取接合子,验证其抗生素抗性及其甲基对硫磷水解酶活性。

1.7 菌种鉴定方法 参照文献[14]。

1.8 基因序列来源

mpd 基因为本实验室克隆所得^[15], Genbank 登录号为: AF 338729。

2 结果和讨论

2.1 菌株分离结果

富集后的培养液划线于肉汤培养基平板后,获得了 5 个菌落及菌体形态不同的菌株,分别命名为 P1、P2、P3、P4 和 P5。将 5 株菌接种于 5mL 肉汤培养基中过夜培养,离心后用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,以去除培养液中的营养物质,整个过程保持无菌操作,按 5% 的接种量接种以 100mg/L 对硝基苯酚为唯一碳源的液体培养基,培养过夜观察培养基的颜色变化,发现 5 株菌中只有 P3 具有较强的对硝基苯酚降解能力。

2.2 菌种初步鉴定

菌株 P3 菌体形态为杆状,菌体大小 0.5 μ m \times 3 μ m,革兰氏染色阴性,不产芽孢,周生鞭毛,氧化葡萄糖产酸,不发酵葡萄糖,过氧化氢酶和氧化酶反应阳性,不能氧化乙醇为乙酸,甲基红反应阴性,在金氏培养基上产水溶性黄色色素,初步鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)。

2.3 P3 对对硝基苯酚降解能力的测定

P3 对对硝基苯酚的降解能力和对其中间代谢产物 NO₂⁻ 的分析结果见图 1 和图 2。由图可见,在 300mg/L 的起始浓度条件下,P3 的生长有较长的延滞期,长达近 30h。随着生长的开始,对硝基苯酚迅速被降解,约 6h 降解即完全结束,同时几乎按化学反应计量释放出亚硝酸根。当在无碳无氮培养基中加入 300mg/L 对硝基苯酚进行培养时,P3 还可利用释放的 NO₂⁻ 作为氮源进行生长。

P3 对对硝基苯酚耐受程度的实验及几种重金属离子对 P3 降解对硝基苯酚能

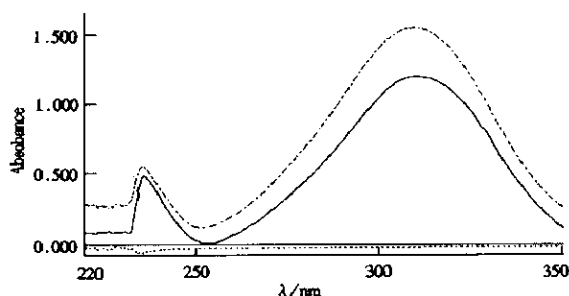


图 1 P3 降解对硝基苯酚扫描图谱

Fig.1 The UV scanning spectrum of the degradation of *p*-nitrophenol by P3

— Degradation for 0h; Degradation for 10h;
— · — Degradation for 24h.

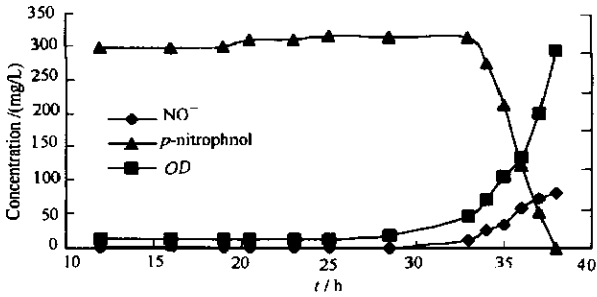


图2 P3菌利用对硝基苯酚的生长及其对对硝基苯酚的降解和NO₂⁻的形成

Fig. 2 Growth curve of P3 and production of NO₂⁻ during p-nitrophenol degradation by P3

力的影响结果分别见表1和图3。

由表1可知, P3菌对对硝基苯酚有较强的耐受能力, 最高耐受浓度为500mg/L, 但随着浓度的升高, 延滞期较长, 说明高浓度对硝基苯酚对降解菌的生理活动有一定的抑制作用。由图3可知, 多种金属离子对对硝基苯酚降解菌的降解能力有影响, Zn²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺对P3降解对硝基苯酚有促进作用, 其中锌离子的促进作用最明显, 而Cu²⁺、Co²⁺对对硝基苯酚的降解有抑制作用。P3对各种芳香族化合物的利用能力实验结果见表2。

表1 P3菌对对硝基苯酚的耐受

Table 1 The tolerance to nitrophenol of P3

Concentration/(mg/L)	150	200	300	400	500	600
Time to completely degrade/h	20	24	38	40	50	-

" - " No growth in determination time.

表2 P3菌对底物的利用

Table 2 Substrates utilization by P3

Substrates	<i>o</i> -Catechol	<i>p</i> -catechol	<i>m</i> -nitrophenol	Nitrobenzene	Phenylacetic acid	Benzoic acid	Salicylic acid	Benzene
Growth of P3	+++	--	--	--	+++	--	+++	--

" + + + " Growth good; " - - " No growth.

结果表明, P3菌不能利用2,4-二硝基苯酚、硝基苯和苯, 能利用邻苯二酚但不能利用对苯二酚, 此外P3对苯乙酸及水杨酸有很强的利用能力, 但苯甲酸却不能作为底物被利用。

2.4 彻底矿化甲基对硫磷基因工程菌PM的构建

甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 来源于甲基对硫磷降解菌邻单胞菌 M6 (*Plesiomonas* sp, 简称 M6)。M6菌可以将甲基对硫磷水解为对硝基苯酚和二甲基硫代磷酸, 使其毒性降低为母体的1/100。但其降解产物对硝基苯酚仍具有相当高毒性, 而P3可以以对硝基苯酚为唯一碳源进行生长并将其彻底降解。因此将甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 克隆到P3中可以获得能完全矿化甲基对硫磷的基因工程菌。

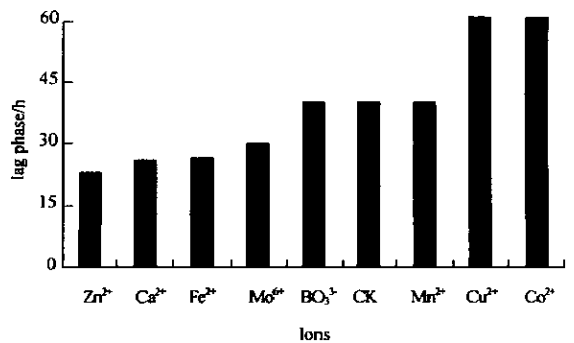


图3 金属离子对P3降解对硝基苯酚的影响

Fig. 3 Effect of metal ions on the degradation of p-nitrophenol by strain P3

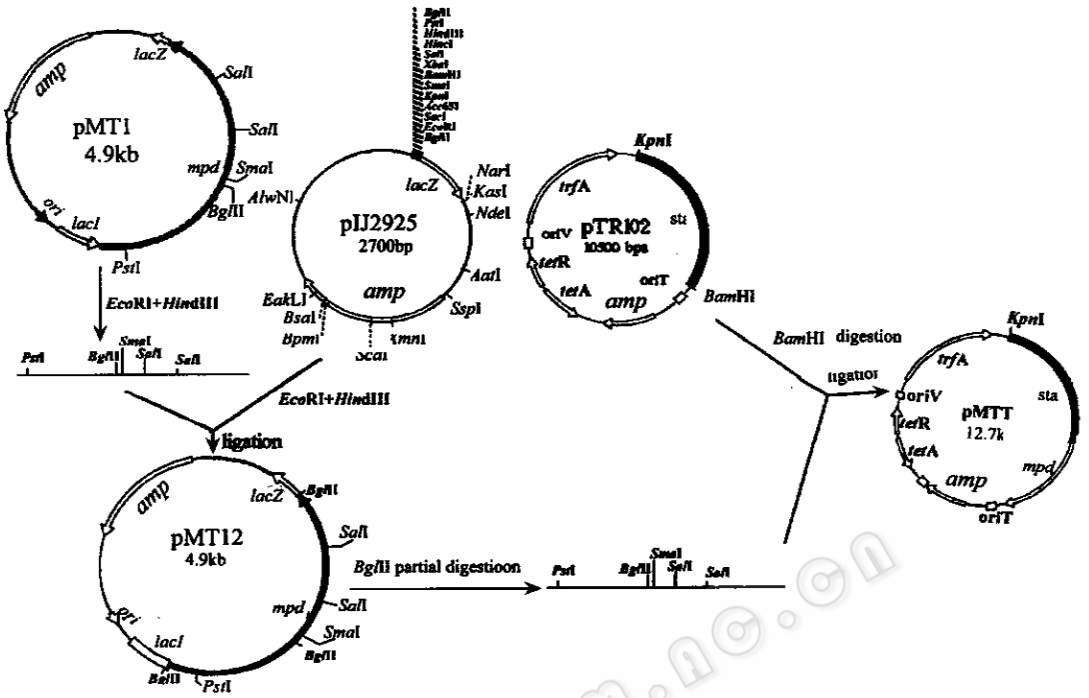


图 4 重组质粒 pMTT 的构建路线图

Fig.4 Construction strategy of the recombinant plasmid pMTT

2.4.1 广宿主可转移重组质粒 pMTT 的构建(图 4): 由于常规用克隆和表达载体只能在大肠杆菌内稳定存在,且很难用常规分子克隆方法转移至其他菌株中,因此要构建基因工程菌必须选择合适的载体,为后续工作打下良好基础。本实验选用的载体 pTR102 是广宿主的稳定性质粒,可以在多个属的革兰氏阴性菌中稳定遗传,有助于外源基因在工程菌中的稳定存在,且是 *tra*⁺ 和 *mob*⁻, 可以在辅助质粒的帮助下转移,但不能自主转移,避免了基因扩散引起的生物安全问题。

由于 pMT1 上没有合适的酶切位点来回收 *mpd* 基因片段,为将其克隆到广宿主质粒载体 pTR102,故将 pMT1 上的 *mpd* 片段通过 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切回收,克隆到 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切的 pIJ2925 质粒上,获得重组质粒 pMT12。在 pMT12 上可以通过 *Bgl*II 单酶切回收 *mpd* 基因片段并克隆到 pTR102 的 *Bam*HI 酶切位点上。

由于 2.2kb 外源片段上有一个 *Bgl*II 酶切位点,因此用 *Bgl*II 部分酶切 pMT12 以回收完整的 *mpd* 基因片段。酶切后进行 TAE 电泳(图 5),在紫外灯下切下相应条带用 glassmilk 试剂盒回收

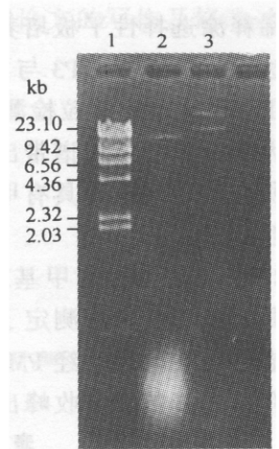


图 5 重组质粒 pMTT 的电泳图谱

Fig.5 Electrophoresis profile of the recombinant plasmid pMTT 1. λ DNA/*Hind*III marker; 2. recombinant plasmid pMTT; 3. Vector plasmid pTR102.

2.2kb 片段,与经 *Bam*HI 酶切并脱磷处理的 pTR102 连接,酶连产物转化 *E. coli*DH5 α 感受态细胞,涂布含 Tc 的 LBMP 平板,培养过夜后挑取单菌落,并进行质粒检查,所得重组质粒即为 pMTT。将质粒 pMTT 进行酶切分析,结果表明其中有 2.2kb 片段插入(图 6)。

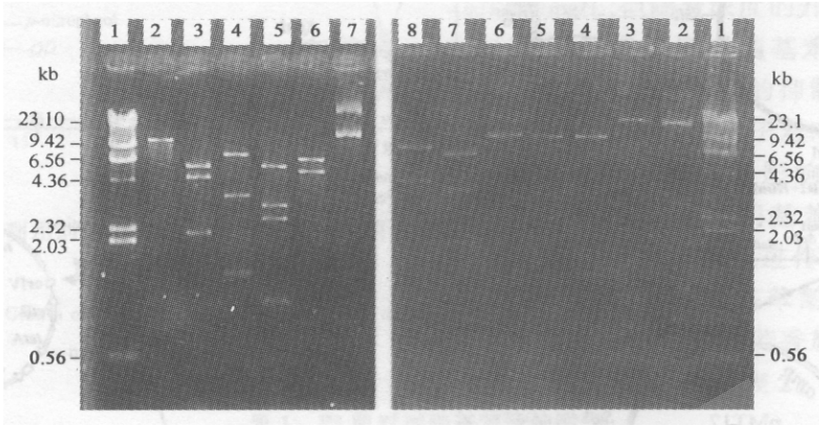


图 6 重组质粒 pMTT 和载体 pTR102 的酶切图谱

Fig. 6 Restriction endonuclease digestion of the recombinant plasmid pMTT and vector pTR102

Left is the digestion of pMTT: 1: λ DNA/*Hind*III marker; 2: *Bgl*II; 3: *Eco*RI + *Hind*III; 4: *Sma*I; 5: *Sal*I; 6: *Pst*I; 7: pMTT. Right is the digestion of pTR102: 1: λ DNA/*Hind*III marker; 2: *Bgl*II; 3: *Eco*RI + *Hind*III; 4: *Sma*I; 5: *Sal*I; 6: *Pst*I; 7: *Pst*I; 8: pTR102.

2.4.2 基因工程菌株的构建:以含 pMTT 质粒的 *E. coli*DH5 α 为供体菌, P3 为受体菌在辅助转移质粒 pRK2013 的介导下进行平板滤膜杂交。杂交完成后,适当稀释涂选择性平板培养获得了大量接合子。pMTT 质粒的接合频率可达 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 。P3 与 pMTT 接合后获得的接合子相应的命名为 PM。工程菌 PM 的质粒检测图谱见图 7。可以看出 PM 中有一新的与 pMTT 大小一致的质粒谱带出现,将该质粒转化 *E. coli*DH5 α 感受态细胞,则所有的转化子均具有甲基对硫磷水解酶活力,说明该质粒就是重组质粒 pMTT。

2.4.3 工程菌对甲基对硫磷的降解性能及稳定性测定:用紫外扫描和高效液相色谱法测定了接合子 PM 对甲基对硫磷的降解能力。紫外扫描测定结果表明经 PM 降解处理后的甲基对硫磷被全部降解,并且没有对硝基苯酚吸收峰出现。液相色谱测定结果见表 3。

表 3 P3 及 PM 对甲基对硫磷的降解

Table 3 Degradation of methylparathion by P3 and PM

Strain	Control/(mg/L)	Treatment/(mg/L)	Rate of degradation/%
P3	227	238	0
PM	227	trace (< 0.05)	100

从表 3 可知,受体菌 P3 对甲基对硫磷没有降解作用,而工程菌 PM 对甲基对硫磷有很强的降解能力,其降解率可达近 100%。为测试工

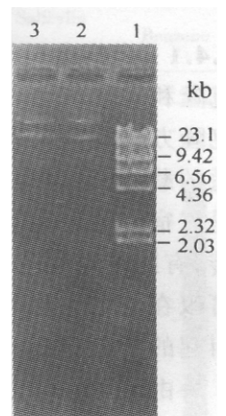


图 7 接合子 PM 的质粒检测电泳图谱

Fig. 7 Electrophoresis profile of the plasmid content of the conjugant PM

1. λ DNA/*Hind*III marker; 2. Conjugant PM; 3: *E. coli*DH5 α (pMTT).

程菌的稳定性,将 PM 在无抗性的 LB 平板和加 50mg/L Tc 的 LB 平板上连续传代,并定期测定水解酶活力的稳定性。测定结果见表 3,可见 PM 菌具有比较高的稳定性,在无抗生素抗性选择压力的 LB 平板上连续传代 15 代,重组质粒在 PM 中的稳定性维持在 90% 以上。在 Tc 抗性平板上传代 20 代也未发现有水解酶活力丢失现象,说明外源片段在 P3 中是稳定的。

3 讨论

对硝基苯酚是一种重要的环境污染物,已被美国国家环保局列为优先污染物^[2],治理与监测此类化合物对保证人类健康和环境清洁具有重要意义。利用生物修复技术处理此类化合物造成的污染具有效率高成本低的优势。

本文报道了一株高效对硝基苯酚降解菌 P3(*Pseudomonas* sp.)菌株,可以降解浓度高达 500mg/L 的对硝基苯酚。P3 可以利用对硝基苯酚作为唯一碳源和氮源进行生长,并对邻苯二酚、苯乙酸和水杨酸有较强的降解作用。Zn、Fe、Ca 和 Mo 对 P3 降解对硝基苯酚有促进作用,其中 Zn 的促进作用最强,而 Cu 和 Co 却抑制降解。对硝基苯酚是有机磷农药对硫磷和甲基对硫磷的中间代谢产物,以往的文献中将对硫磷水解酶基因 *opd* 克隆到对硝基苯酚降解菌中以构建矿化对硫磷的基因工程菌的工作未能取得成功^[1]。本文通过接合转移的途径将甲基对硫磷水解酶基因 *mpd* 克隆至 P3 中获得了能完全矿化甲基对硫磷的基因工程菌 PM,PM 能以甲基对硫磷为唯一碳源进行生长,且 *mpd* 基因在 PM 中具有较高的稳定性。

致谢 特别感谢国家环保总局南京环境科学研究所李祥敏硕士在本论文的写作及修改过程中花费的大量心血和提出的宝贵意见。

参 考 文 献

- [1] 沈 标,李顺鹏,赵硕伟,等.土壤学报,1997,34(3):309~314.
- [2] Federal R. *Fed Regist*, 1998, 63:67547~67558.
- [3] Cuneyt M S, David T G. *Bio/Technology*, 1985, 3:567~571.
- [4] Douglas M M, Dennis P H H. *Applied Microbiology*, 1974, 28(2):212~217.
- [5] Jim C S, David T G. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(3):812~819.
- [6] Jim C S, Orville W, David T G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1979, 88(2):634~641.
- [7] Josef Z, Hans P K. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(4):1789~1794.
- [8] Josef Z, Philip C K. *J Agric Food Chem*, 1984, 32:238~242.
- [9] Hanne L F, Kirk L L, Appel S M, et al. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(10):3505~3508.
- [10] Rakesh K J, Joseph H D, Jim C S. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60:3030~3032.
- [11] Venkateswarlu K, Jim C S. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7):2479~2484.
- [12] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. N Y: Cold Spring Harbor, 1989.
- [13] Weinstein M, Rorberts R C, Helinski D R. *J Bacteriol*, 1992, 174:7468~7489.
- [14] 中国科学院微生物研究所.细菌鉴定手册.北京:科学出版社,1979.
- [15] Cui Zhongli, Li Shunpeng, Fu Guoping. *Appl Environ Microbiol*, 67:4922~4925.

Isolation and Characterization of A *p*-Nitrophenol Degradation *Pseudomonas* sp. Strain P3 and Construction of a Genetically Engineered Bacterium

Cui Zhongli Zhang Ruifu He Jian Li Shunpeng

(Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: A *Pseudomonas* strain P3 was isolated in this work. P3 can grow with *p*-nitrophenol as the sole carbon and nitrogen source. Growth in media with nitrogen, P3 can degrade *p*-nitrophenol to accumulate nitrite in the culture media. P3 can utilize a series of aromatic compounds as sole carbon sources. Different heavy metal ions have different effects on the degradation of *p*-Nitrophenol by P3. Glucose had no effect on the degradation of *p*-nitrophenol, while trace yeast extract greatly increased the degradation rate. Methyl parathion hydrolase gene *mpd* was clone into P3 by conjugation and genetically engineered bacterium PM was obtained. Methyl parathion hydrolase was expressed by PM. PM could grow on methyl parathion as sole carbon source. PM could degrade methyl parathion with relatively high activity and stability.

Key words: *p*-Nitrophenol, Biodegradation, *mpd* gene, Genetically engineered bacterium