

## 一株降解对氯硝基苯的 *Comamonas* sp. CNB1 的分离鉴定及其降解特性

吴建峰 沈锡辉 周宇光 刘双江\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 从处理某化工厂污水的活性污泥中分离到一株降解对氯硝基苯的细菌 CNB1 菌株。经过对其形态特征、生理生化、以及 16S rDNA 序列分析,该菌株初步鉴定为 *Comamonas* sp., 进一步研究表明,该菌株能够以对氯硝基苯为唯一碳源、氮源和能源生长。生长过程中,氯离子释放同步于对氯硝基苯降解,且氯离子的释放量与对氯硝基苯的降解量相当。该细菌利用对氯硝基苯生长的最适生长温度和 pH 分别为 28℃和 9.0。测定了降解途径中相关酶的活性,表明初始降解过程是由对氯硝基苯还原酶催化的硝基还原反应,芳环的裂解是由 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶催化。

**关键词** 对氯硝基苯,生物降解,丛毛单胞菌

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2004)01-0008-05

氯代硝基苯类化合物(Chloronitrobenzenes, CNBs)作为重要的化工中间体被广泛用于生产和制造橡胶、染料、农药、医用药品等,以对氯硝基苯为例,我国 2000 年产量为 12 万吨。氯代硝基苯等芳香族化合物具有多种途径进入环境成为污染物,例如残留在生产过程中排放的废水,或者由环境中含芳香环化合物的不彻底降解和转化而来,例如硝基苯胺和氯代硝基苯胺是农药、染料、颜料等不彻底分解产生的<sup>[1]</sup>,我国自来水供应多采用氯化消毒,氯代硝基苯是检测到的氯化消毒副产物之一<sup>[2]</sup>。欧共体早已宣布氯代硝基苯是一种特别有害的化合物且在环境中难以降解<sup>[3]</sup>,其危害包括引起人和动物的高铁血红蛋白血症(Methemoglobinemia),并且是一种诱变剂和致癌剂,五氯硝基苯破坏肺、肝、肾的功能,并直接损害神经系统<sup>[4,5]</sup>。因此,研究氯代硝基苯类化合物的生物降解对于保护环境及提高人类健康具有重要意义。

目前,国内外就氯代苯类或者硝基苯类有机物的生物降解进行了大量研究,而对芳环上同时存在氯原子和硝基的氯代硝基苯类化合物的研究报道则较少,其主要原因是当氯原子和硝基同时存在时,由

于二者的吸电子特性,导致芳环裂解更加困难。许多能够降解氯代苯或硝基苯等芳烃衍生物的菌种并不能降解对氯硝基苯。迄今,除了个别报道之外<sup>[6,7]</sup>,单一菌种或混合菌种对氯硝基苯的降解能力、降解性质等所知甚少。本文报道从处理对氯硝基苯生产工厂废水的活性污泥中分离到一株能降解对氯硝基苯的丛毛单胞菌属(*Comamonas*)的细菌 CNB1 菌株,并对该细菌降解对氯硝基苯的特性进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂和器材

对氯硝基苯购自北京金龙化学试剂有限公司。高效液相色谱仪购自美国惠普公司,型号为 HP-1050。离子浓度计为美国产奥利龙 868 型离子浓度计,电极采用 ORION CHN170 型氯离子复合电极。

#### 1.2 菌种富集、分离纯化和培养基组成

试验样品取自南京化工总厂污水处理车间。污泥样品按 10% 的接入量接种于培养基中,于 30℃、130 r/min 的摇床上振荡培养一周左右,取样测定对氯硝基苯降解情况,待对氯硝基苯的浓度降低后,再

基金项目 国家自然科学基金(30230010),国家 863 计划(2002AA601170),中国科学院知识创新工程(KSCX2-SW-102-05)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-62527118; Fax: 86-10-62652317; E-mail: shuangjiang@hotmail.com

作者简介 吴建峰(1976-)男,安徽安庆人,博士研究生,研究方向是环境微生物学。E-mail: jifu@263.net

收稿日期 2003-05-22,修回日期 2003-10-08

按 1% 的接入量转接到新的培养基中培养一周左右,如此重复 3 次。然后在琼脂平板上划线分离,直至得到纯的单菌落。

培养基(MSB)组成:每升含磷酸氢二钠 1g,磷酸二氢钾 0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g,微量元素溶液<sup>[8]</sup> 5mL,对氯硝基苯 1.27mmol, pH 7.0。固体培养基中加入 15g/L 的琼脂。

### 1.3 细菌生长测定和生理生化指标测定

细菌生长以光吸收值  $OD_{600}$  表示。革兰氏染色、碳源利用等指标测定参照文献[9]方法进行。

### 1.4 16S rDNA 扩增和序列测定

从平板中直接挑取一环菌体,加入 100  $\mu\text{L}$  无菌重蒸水中,漩涡混匀后,沸水浴 2 min, 12000 r/min 离心 5 min, 上清液直接用于 PCR。用于 16S rDNA 扩增的 PCR 反应的引物为一对通用引物<sup>[10]</sup>。正向引物 Pf: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 Pr: 5'-ACGGCTACCTGTTACGACT-3', 分别对应于大肠杆菌的 16S rRNA 基因的 8~27 和 1495~1514 碱基。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ )为:10  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  4  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , 30 pmol/L 引物各 1  $\mu\text{L}$ , BSA 0.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  37  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA 酶 0.4  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:95 $^\circ\text{C}$  4min; 95 $^\circ\text{C}$  1min, 48 $^\circ\text{C}$  1min, 72 $^\circ\text{C}$  1min, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$  10min。PCR 产物的纯化和测序由上海申能博彩生物科技有限公司完成。CNB1 菌株 16S rDNA 基因序列在 GenBank 中的登记号为 AY291591。

### 1.5 酶活的测定

**1.5.1 细胞培养及细胞裂解液制备:**菌株 CNB1 接入 MSB 培养基中,于 30 $^\circ\text{C}$ 、130 r/min 的摇床上振荡培养,待对氯硝基苯降解完后,按 1.27 mmol/L 的浓度补加底物一次,直到  $OD_{600}$  为 0.2。8000 r/min 离心收集 100mL 培养液中的细胞,以 pH 7.0 的 50 mmol/L 的磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次,然后重新悬浮于 1 mL 相同的缓冲液中制成细胞悬液。细胞悬液经过超声细胞破碎器破碎,于 4 $^\circ\text{C}$ , 20000g 离心 2h, 弃沉淀,取上清液测定酶活。

**1.5.2 对氯硝基苯硝基还原酶活性测定:**对氯硝基苯硝基还原酶的酶活按照文献[11]所述方法进行。1 个单位的酶活力定义为 1 mg 蛋白每分钟转化 1 nmol 的 NADPH。

**1.5.3 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶活性测定:**2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶的酶活按文献[12]所述方法进行。1 个单位的酶活力定义为 1 mg 蛋白每分钟生

成 1 nmol 的 2-氨基粘康酸半醛。

**1.5.4 邻苯二酚 1,2-双加氧酶和邻苯二酚 2,3-双加氧酶活性测定:**分别参照文献[13,14]方法测定。

### 1.6 蛋白含量的测定

紫外分光光度计测定 280nm 处的吸收值,换算出粗蛋白含量。

### 1.7 对氯硝基苯和氯离子的测定

对氯硝基苯浓度的测定采用高效液相色谱法,选用 C-18 反向柱,检测波长为 210 nm,流动相为乙腈:水 = 60:40(V/V),流速为 1.0 mL/min,对氯硝基苯的停留时间为 5.6 min 左右。溶液中的氯离子浓度用离子浓度计配合氯离子复合电极测定。氯离子释放率为试验样品中的氯离子浓度与对照试验中的氯离子浓度之差(mmol/L)和对氯硝基苯初始浓度(mmol/L)的比值。

## 2 结果

### 2.1 样品的富集培养和菌种分离纯化

污泥样经过 4 次(约一个月)富集培养后,得到的混合培养物可以在含有 1.27 mmol/L 的对氯硝基苯的培养基中生长,在培养过程中通过测定培养液中的对氯硝基苯和氯离子的浓度,发现对氯硝基苯的含量不断减少而氯离子浓度不断增加,说明该混合培养物能降解对氯硝基苯并产生氯离子。

上述混合培养物在含有对氯硝基苯的平板上进行划线分离,挑取单菌落,经过复筛、纯化后得到一株能以对氯硝基苯为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌菌株 CNB1。

菌株 CNB1 在 LB 培养基平板上生长时,表面光滑,边缘整齐。细胞为革兰氏阴性、直或稍弯曲杆菌,大小约为 0.45  $\mu\text{m}$   $\times$  1.5  $\mu\text{m}$ (图 1)。氧化酶和接触酶阴性,严格好氧,细胞内有聚羟基丁酸颗粒,无

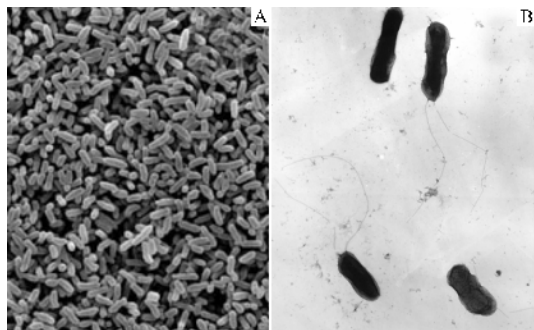


图 1 菌株 CNB1 的形态特征

Fig.1 Electron micrographs of strain CNB1

A. Scanning electron micrograph( 5000  $\times$  );

B. Transmission electron micrograph( 20000  $\times$  ).

内生芽孢。可以利用  $\beta$ -丙氨酸、柠檬酸生长。透射电镜观察,发现菌株 CNB1 在一端生有两根鞭毛。

扩增菌株 CNB1 的 16S rRNA 全长基因,序列测定后进行同源性分析,结果表明该菌株与睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)亲源关系最近,16S rRNA 基因相似性为 99%。结合菌株的形态和生理生化特征,菌株 CNB1 初步鉴定为 *Comamonas* sp.。

## 2.2 *Comamonas* 菌株 CNB1 利用对氯硝基苯生长和氯离子释放

预先在 MSB 培养基上培养的 CNB1 菌株培养液( $OD_{600} = 0.2$ )按 1% 的接入量接种于含有对氯硝基苯(1.27 mmol/L)的培养基中,在 30℃,130 r/min 的摇床上振荡培养,定时取样测定菌体生长、对氯硝基苯含量和氯离子浓度。图 2 表明,CNB1 菌的生长和对氯硝基苯的降解都有个短暂的迟缓期,然后进入对数期,到第 20 h 时达到最高生长量,此时降解率达 87%,并且对氯硝基苯摩尔数的减少与氯离子摩尔数的增加相当。从图 2 中同时可以知道,氯离子的释放和对氯硝基苯的降解是同步的,鉴于氯离子测定的简便性,在以后的试验中采用氯离子的释放率来代替对氯硝基苯的降解率。

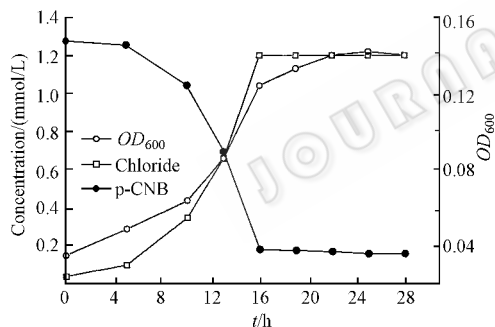


图2 *Comamonas* 菌株 CNB1 利用对氯硝基苯生长和氯离子释放

Fig.2 Degradation of *p*-chloronitrobenzene and release of chloride during cultivation of *Comamonas* CNB1  
*p*-chloronitrobenzene was used as sole carbon, nitrogen and energy sources.

## 2.3 温度和培养基初始 pH 对菌株 CNB1 生长和对氯硝基苯降解的影响

预先在 MSB 培养基上培养的 CNB1 菌株培养液( $OD_{600} = 0.2$ )按 1% 的接入量接种于含有对氯硝基苯(1.27 mmol/L)的培养基中,分别在 130 r/min 的摇床,不同的温度条件下和不同初始 pH 的培养基振荡培养 1 d,测定细胞的生长和氯离子释放。图 3-A 表明,以对氯代硝基苯为唯一碳源和氮源培养,CNB1 菌株的细胞生长和对氯硝基苯降解受温度变

化的影响显著,在 28℃ 左右达到最高生长水平和最高底物降解率,高于或低于此温度时细胞生长和对氯硝基苯的降解都受到明显影响。图 3-B 表明,菌株 CNB1 比较适合在碱性条件下生长,同时,在碱性的条件下的底物降解率也比较高,而且它的生长和降解随 pH 的变化是一致的,pH 9.0 是细胞生长和对氯硝基苯降解的最佳 pH。

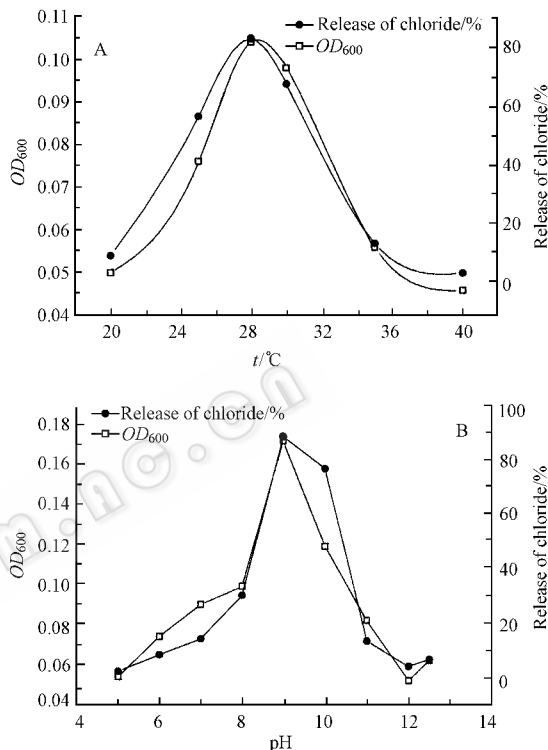


图3 温度(A)和 pH(B)对菌株 CNB1 利用氯代硝基苯生长和氯离子的释放的影响

Fig.3 Influence of temperature (A) and pH (B) on the growth of *Comamonas* CNB1 and release of chloride during *p*-chloronitrobenzene degradation

## 2.4 CNB1 菌株的相关酶活测定

为了研究对氯硝基苯的降解途径,测定了以对氯硝基苯为唯一碳源和氮源培养的 CNB1 细胞内与芳烃降解相关的关键酶活性,发现了细胞中存在有催化对氯硝基苯降解初始反应的对氯硝基苯硝基还原酶和催化芳环裂解的 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶活,没有测出邻苯二酚 1,2-双加氧酶或 2,3-双加氧酶的活性。

同时测定了以不同培养基培养的细胞中上述两种酶的活性。从表 1 中可以看出无论对氯硝基苯存在与否,即无论是在 LB 或 MSB 上培养的 CNB1 细胞,都可以测到对氯硝基苯硝基还原酶和 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶的活性,可见这两种酶都是菌株 CNB1 的组成酶,这一点与 Katsivela 等人发现在乙酸

钠培养基上培养的细胞同样具有 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶的活性<sup>[6]</sup>的报道相同。

表 1 CNB1 细胞内对氯硝基苯硝基还原酶和 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶的酶活

Table 1 Activities of *p*-chloronitrobenzene nitroreductase and 2-aminophenol 1,6-dioxygenase in cell extracts of strain CNB1

| Media | <i>p</i> -chloronitrobenzene nitroreductase / ( U/mg ) | 2-aminophenol 1,6-dioxygenase / ( U/mg ) |
|-------|--|--|
| LB    | 21.37  | 20.79                                    |
| MSB   | 28.46  | 26.31                                    |

### 3 讨论

本研究从南京化工总厂污水处理车间的污泥样品中分离得到一株能够利用对氯硝基苯作为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌,初步鉴定为 *Comamonas* sp.,命名为 CNB1。菌株 CNB1 降解对氯代硝基苯的最佳条件是温度 28℃,pH 9.0,在此条件下菌株 CNB1 能达到最佳生长状况和最大降解率。初始浓度为 1.27 mmol/L 的对氯硝基苯,经过 20 h 培养,菌株 CNB1 的降解率为 87%,而 Katsivela 等人分离的 *Acidovarax* sp. 达到同样的效率需要 30 h 以上<sup>[6]</sup>。

在以对氯硝基苯为碳、氮源的培养基中测到了与对氯硝基苯降解相关的酶活性,对氯硝基苯硝基还原酶以 NADPH 为氢供体,还原对氯硝基苯形成 2-氨基-5-氯苯酚,这一产物的化学稳定性较低,经 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶催化的双加氧作用后,芳环裂解产生开环后的第一个产物 2-氨基-5-氯粘康酸半醛。据文献报道,2-氨基-5-氯粘康酸半醛是一个极不稳定的化合物,它可以自发闭环形成 5-氯吡啶羧酸,5-氯吡啶羧酸是一个不可被继续分解的产物<sup>[15,16]</sup>。在本研究中没有发现 5-氯吡啶羧酸的产生或积累,表明菌株 CNB1 在形成 2-氨基-5-氯粘康酸半醛之后,后续的酶能够迅速把它进一步代谢,产生供细胞生长需要的能量或其他产物。参照其它芳烃化合物的代谢途径,通常情况下,这后续的代谢反应由环化异构酶(Cycloisimerases)催化完成,但是,无论是在 *Acidovarax* sp. LW1 菌株<sup>[6]</sup>或者 *Comamonas* sp. CNB1 菌株中,都没有测到该类酶的活性。因此,2-氨基-5-氯粘康酸半醛是如何被进一步代谢,值得特别关注。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Häggblom M M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesti-

cides and related compounds. *FEMS Microbiol Rev*, 1992, **103**: 29 – 72.

[ 2 ] 岳舜琳. 上海自来水氯化消毒产物研究. 中国给水排水, 1992 **8**(5): 8 – 11.

[ 3 ] European Economic Community. Communication from the commission to the council on dangerous substances which might be included in list I of council directive 76/464/EEC. Brussels: European Economic Community, 1982.

[ 4 ] Linch A L. Biological monitoring for industrial exposure to cyanogenic aromatic nitro and amino compounds. *Am Ind Hyg Assoc J*, 1974, **35**: 426 – 432.

[ 5 ] Weisburger E K, Russfield F, Homburger J, et al. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *Environ Pathol Toxicol*, 1978, **2**: 325 – 356.

[ 6 ] Katsivela E, Wray V, Pieper D H, et al. Initial reactions in the biodegradation of 1-chloro-4-nitrobenzene by a newly isolated bacterium, strain LW1. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 1405 – 1412.

[ 7 ] Park, H S, Lim S-J, Chang Y K, et al. Degradation of chloronitrobenzenes by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Rhodococcus* sp.. *Appl Environ Microbiol*, 1999 **65**: 1083 – 1091.

[ 8 ] Kaminski U, Janke D, Prauser H, et al. Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An117 and a pseudomonad: a comparative study. *Z Allg Mikrobiol*, 1983, **23**: 235 – 246.

[ 9 ] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.

[ 10 ] Devereux R, Willis S G. Molecular Microbial Ecology Manual. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995, 1 – 11.

[ 11 ] Somerville C C, Nishino S F, Spain J C. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 3837 – 3842.

[ 12 ] Shirley F N, Spain J C. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 2520 – 2525.

[ 13 ] Hayaish O, Katagiri M, Rothberg S. Studies on oxygenase. *J Biol Chem*, 1957, **229**: 905 – 920.

[ 14 ] Sala-Trepat J M, Evans W C. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species. *Eur J Chem*, 1971, **20**: 400 – 413.

[ 15 ] Lendenmann U, Spain J C. 2-Aminophenol 1,6-dioxygenase: a novel aromatic ring cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 6227 – 6232.

[ 16 ] Spiess T, Desiere F, Spain J C, et al. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in *Mycobacterium* strain. *Appl Environ Microbiol*, 1998 **64**: 446 – 452.

Characterization of *p*-chloronitrobenzene-degrading *Comamonas* sp. CNB1  
and its Degradation of *p*-chloronitrobenzene

WU Jian-Feng   SHEN Xi-Hui   ZHOU Yu-Guang   LIU Shuang-Jiang\*

( Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

**Abstract** : A bacterial strain that degrades *p*-chloronitrobenzene was isolated from activated sludge of wastewater treatment plant treating wastewater from a chemical factory producing chloronitrobenzene. This strain was identified as *Comamonas* sp. CNB1 based on its morphology , physiological , biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis. Results indicated that strain CNB1 took *p*-chloronitrobenzene as sole carbon , nitrogen and energy resources. During cultivation , chloride anion was released simultaneously and stoichiometrically to *p*-chloronitrobenzene degradation. The optimal pH and temperature for cell growth and for *p*-chloronitrobenzene degradation was 9.0 and 28℃ , respectively. Enzymatic analysis showed that initial reactions of *p*-chloronitrobenzene degradation with *Comamonas* sp. CNB1 were catalyzed by *p*-chloronitrobenzene nitroreductase and 2-aminophenol 1,6-dioxygenase.

**Key words** : *p*-chloronitrobenzene , Biodegradation , *Comamonas*

Foundation item : National Nature Science Foundation of China ( 30230010 ) ; Chinese National Programs for High-Technology Research and Development ( 2002AA601170 ) ; Chinese Academy of Sciences ( KSCX2-SW-113 )

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62527118 ; Fax : 86-10-62652317 ; E-mail : shuangjiang@hotmail.com

Received date : 05-22-2003

常见基金项目的英文译名

1. 国家自然科学基金  
Chinese National Natural Science Foundation
2. 国家“ 863 计划 ”, 又名 国家高技术研究发展计划项目  
Chinese National Programs for High Technology Research and Development
3. 国家“ 973 项目 ”, 又名 国家基础研究发展规划项目( 有两种资助方式 )  
( 1 )国家重点基础研究发展规划( 973 计划 )项目  
Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development( 973 program )  
( 2 )国家重大基础研究发展规划( 973 计划 )项目  
Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development
4. 国家科技公关项目  
Chinese National Programs for Science and Technology Development
5. 国家“ 十五 ”重点科技攻关项目  
The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China
6. 国家杰出青年科学基金  
National Science Foundation for Distinguished Young Scholars
7. 国家杰出人才科学基金  
Chinese National Science Foundation for Outstanding Scholarship
8. 农业部农业微生物重点实验室项目  
Key Laboratory Project on Agromicrobiology of Chinese Agriculture Ministry
9. 科技部转基因植物研究与产业化专项  
National R. & D. Project of Transgenic Crops of Ministry of Science and Technology of China
10. 中澳科技合作项目  
Science and Technology Cooperation Project of China and Australia