



# 一株有色金属矿山 1-亚硝基-2-萘酚降解菌的筛选、鉴定和降解特性

李欣媛, 孟行, 姚俊, 李浩, 朱潇哲, 赵陈晨, 刘建丽\*

中国地质大学(北京) 水资源与环境学院, 北京 100083

李欣媛, 孟行, 姚俊, 李浩, 朱潇哲, 赵陈晨, 刘建丽. 一株有色金属矿山 1-亚硝基-2-萘酚降解菌的筛选、鉴定和降解特性. 微生物学报, 2022, 62(11): 4385–4396.

Li Xinyuan, Meng Hang, Yao Jun, Li Hao, Zhu Xiaozhe, Zhao Chencheng, Liu Jianli. Isolation, identification, and degradation characteristics of a 1-nitroso-2-naphthol-degrading strain derived from nonferrous metal (loid) tailings. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4385–4396.

**摘要:** 1-亚硝基-2-萘酚是一类有色选矿药剂代表性的新型浮选药剂, 在采选冶行业为了提高低品位矿物资源的利用率, 被大量投入使用, 该药剂的高稳定性进一步增大了矿山环境中重金属与有机选冶药剂复合污染的治理难度。微生物修复作为稠环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)类污染物重要技术手段之一, 具有安全、经济、高效和无二次污染等特点。【目的】本研究从我国广西河池市周边的典型有色金属尾矿环境中分离出 1 株高效降解 1-亚硝基-2-萘酚的菌株, 并分析其降解特性及其潜在的代谢途径, 从而探究矿山复合污染生态系统中稠环芳烃类污染物的微生物修复技术的应用前景。【方法】从有色金属尾矿样本中筛选到以 1-亚硝基-2-萘酚为唯一碳源的菌株, 经 16S rRNA 基因序列鉴定, 结合气相色谱-质谱联合(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)检测分析菌株对 1-亚硝基-2-萘酚的降解特性及中间代谢产物, 并推测可能的代谢途径。【结果】筛选获得 1 株高效降解 1-亚硝基-2-萘酚的 *Pseudomonas putida* CUGB-JL11 菌株, 经鉴定为革兰氏阴性杆的恶臭假单胞菌。该菌株最适温度为 30 °C 左右, 最适 pH 值范围为 6–8 条件下, 菌株 5 d 内对 40 mg/L 1-亚硝基-2-萘酚的降解率高达 81%。降解中间代谢产物主要为苯环类物质: 苯甲羟肟酸甲酯和苯丙胺, 但其母体及大部分中间产物都降解为小分子物质或者被完全降解。【结论】恶臭假单胞菌 *P. putida* CUGB-JL11 具有良好的 1-亚硝基-2-萘酚降解能力和较强的环境适应性, 有进一步

**基金项目:** 国家重点研发计划(2020YFC1807600, 2019YFC1803500); 国家自然科学基金(42007289); 中央高校基本业务经费(53200759777)

Supported by the Major National Research and Development Projects for Chinese Ministry of Science and Technology (2020YFC1807600, 2019YFC1803500), by the National Natural Science Foundation of China (42007289) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (53200759777)

\*Corresponding author. E-mail: ljl2489@cugb.edu.cn

Received: 10 March 2022; Revised: 28 June 2022; Published online: 15 July 2022

被开发为微生物菌剂以用于稠环芳烃类污染修复的巨大潜力,为有色金属矿山生态系统中重金属和有机选冶药剂复合污染的微生物修复研究提供了理论依据和可利用的微生物资源。

**关键词:** 有色金属选冶渣场; 1-亚硝基-2-萘酚降解菌; 分子鉴定; 气相色谱-质谱(GC-MS)

## Isolation, identification, and degradation characteristics of a 1-nitroso-2-naphthol-degrading strain derived from nonferrous metal (loid) tailings

LI Xinyuan, MENG Hang, YAO Jun, LI Hao, ZHU Xiaozhe, ZHAO Chenchen, Liu Jianli\*

School of Water Resource and Environment Engineering, China University of Geosciences (Beijing), Beijing 100083, China

**Abstract:** As a new representative flotation reagent, 1-nitroso-2-naphthol is widely used in the mining and metallurgical industry to improve the utilization rate of low-grade mineral resources. It is highly stable, posing a challenge to the treatment of heavy metal pollution and organic smelting agent pollution in mine. Among the crucial techniques for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), bio-remediation is safe and efficient with low cost and no secondary pollution. **[Objective]** To screen an efficient 1-nitroso-2-naphthol-degrading strain from the typical non-ferrous metal tailings in the periphery of Hechi city, Guangxi Zhuang autonomous region in China, analyze the degradation characteristics and potential metabolic pathways, and thereby examine the conditions for the microbial remediation of the mine polluted by compound pollutants including PAHs. **[Methods]** The strain which used 1-nitroso-2-naphthol as the only carbon source was screened and identified by 16S rRNA gene sequencing. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed to analyze degradation characteristics of 1-nitroso-2-naphthol and the intermediate metabolites, and the metabolic pathways were predicted. **[Results]** An efficient strain was screened out and identified as the Gram-negative *Pseudomonas putida* CUGB-JL11. Under the optimal conditions of 30 °C and pH 6–8, the 5-day degradation rate of 40 mg/L 1-nitroso-2-naphthol by the strain was up to 81%. The main intermediate metabolites were the benzodiazepines methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate and amphetamine, but the organic substances and most of the intermediates were degraded into small molecules or completely degraded. **[Conclusion]** CUGB-JL11 boasts high 1-nitroso-2-naphthol-degrading efficiency and strong environmental adaptability. It has a huge potential for the treatment of PAHs. This study lays a theoretical basis and provides microbial resources for bioremediation of nonferrous metal mine polluted by both heavy metals and flotation reagents.

**Keywords:** nonferrous metal(loid) tailings; 1-nitroso-2-naphthol-degrading bacterium; molecular identification; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

随着矿山资源的枯竭,贫、杂和细的难选矿的选冶过程主要依赖于大量选矿药剂的投入使用,同时其品种也越来越多。全世界有机选冶药剂的年规模已达千万吨级<sup>[1]</sup>,这也导致矿

山环境中选冶药剂的含量是土壤环境中农药含量的 3 倍之多<sup>[2]</sup>。据统计,我国仅赣南地区,每天进入选冶渣场及尾矿库环境中的选矿药剂就达 3 380 t<sup>[3]</sup>。有机选冶药剂的中间代谢产物高达 800 多种,矿山环境中小环芳烃和大环芳烃的污染问题越来越引起人们的关注<sup>[4]</sup>。而 1-亚硝基-2-萘酚(1-nitroso-2-naphthol)作为有色选矿药剂代表性的新型浮选药剂被大量使用,是一类多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)萘的衍生物,具有致癌、致畸和致突变效应<sup>[5-6]</sup>。已有研究证实,1-亚硝基-2-萘酚在热活化和光解等过程中,生成了一些不易降解的芳香腈类化合物,如邻萘二酮和邻羟基萘醌等<sup>[7]</sup>。但该药剂的生物降解和演化是否会形成二次污染物以及二次污染物是否会对环境产生深层次的污染问题,有待于进一步的探究。

稠环芳烃污染物的微生物修复,是利用细菌、真菌等进行降解和转化为低毒性或无毒化合物,具有安全、经济、高效、无二次污染和无需大型设备等优点<sup>[8-10]</sup>。随着稠环芳烃微生物修复研究的深入,研究人员从水和土壤等环境中筛选出大量的稠环芳烃高效降解菌,如微黄分支杆菌(*Mycobacterium gilvum* CP13)和白腐真菌(*Phanerochaete chrysosporium*)<sup>[10-12]</sup>。然而,近年来矿山生态系统中稠环芳烃污染的生物修复研究甚少,多数关注于油砂尾砂<sup>[13]</sup>。1-亚硝基-2-萘酚作为稠环芳烃类的矿山浮选药剂之一,其微生物修复研究具有广阔的探索前景。

本研究从我国广西河池市周边的典型有色金属尾矿环境中分离出 1 株高效降解 1-亚硝基-2-萘酚的菌株 CUGB-JL11,通过形态学观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列比对等多相分类分析,鉴定该菌株为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),并在实验条件下探究了该菌株对 1-亚硝基-2-萘酚的降解特性及其中间

代谢产物,为污染地提供经济、高效且不产生二次污染的原位修复菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与培养基

#### 1.1.1 样本采集与处理

典型有色金属尾矿样本于 2017 年 6 月采集于我国广西壮族自治区河池市南丹县的 A 尾矿库(24°50'01"N, 107°37'36"E)表层 0-10 cm 处。该尾矿库面积为 1.4 hm<sup>2</sup>,根据中国土壤环境监测技术规范(HJ/T 166—2004)采用“十字交叉”布点的方式,布设 6 个采样点,每个采样点的样品均由 3 个平行样均匀混合为一个,对应样本标记为 T1、T2、T3、T4、T5 和 T6。每个样品约采集 1 000 g 左右,且分装为非生物样品(500 g)和生物样品(500 g)。本研究所有采集的生物样品直接装进塑封袋并放置于 4 °C 医用保温箱中,于 2 d 之内运送回中国地质大学(北京),之后保存于-20 °C 的环境内,用于 1-亚硝基-2-萘酚降解菌的富集培养。而非生物样品运回后保存于 4 °C 环境内,经 24 h 风干,过 100 目(US 标准, 0.149 mol/L)和 200 目(US 标准, 0.075 mol/L)筛,用于环境因子分析,环境因子数据见表 1。

#### 1.1.2 主要试剂、仪器和培养基

1-亚硝基-2-萘酚(C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>),阿法埃莎化学有限公司;胰蛋白胨(tryptone),安琪酵母股份有限公司;酵母提取物(yeast extract)和氯化钠(NaCl),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;戊二醛固定液(C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>,电镜专用,2.5% H<sub>2</sub>O, pH 7.2-7.4,麦克林 Macklin);细菌 DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司;双人垂直净化工作台(SW-CJ-2FD),苏州智净净化公司;翻转式振荡器, BRE-48 常州市国旺仪器制造有限公司;高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司。

表 1 样本的基本理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of samples

Physico-chemical properties	T1	T2	T3	T4	T5	T6
pH	5.61±0.03	6.90±0.03	6.38±0.03	6.58±0.03	7.33±0.04	5.14±0.02
TN	177.00±0.88	287.00±1.44	327.00±1.64	743.00±3.71	357.00±1.79	329.00±1.65
TOC	26 000.00±130.00	21 400.00±107.00	14 200.00±71.00	25 400.00±127.00	18 100.00±90.40	12 000.00±59.80
TP	3 650.00±18.30	4 650.00±23.30	2 340.00±11.70	4 720.00±23.60	6 880.00±34.40	4 290.00±21.40
As	16 300.00±81.60	16 400.00±82.20	5 090.00±25.40	7 690.00±38.40	2 960.00±14.80	2 510.00±12.50
Cd	361.00±1.80	201.00±1.01	50.40±0.25	104.00±0.52	51.70±0.26	39.70±0.20
Cu	1 440.00±7.21	681.00±3.41	140.00±0.70	551.00±2.75	210.00±1.05	114.00±0.57
Cr	57.00±0.28	80.40±0.41	57.90±0.29	81.50±0.41	56.10±0.28	56.40±0.28
Fe	84 600±423	83 200±416	29 000.00±145.30	48 000±240	5.00±0.03	17 200.00±85.90
Mn	5 800.00±29.00	7 980.00±39.90	5 010.00±25.10	8 570.00±42.90	1 120.00±5.58	4 370.00±21.80
Pb	583.00±2.91	545.00±2.72	330.00±1.65	928.00±4.64	622.00±3.11	646.00±3.23
Sb	74.20±0.37	131.00±0.66	94.40±0.66	61.60±0.31	179.00±0.90	123.00±0.62
Zn	19 600.00±98.00	6 220.00±31.10	1 850.00±31.10	4 640.00±23.20	4 070.00±23.20	2 050.00±10.20

Unit for TN, TOC, TP, and concentration of metal(loid)s is mg/kg, except for pH.

LB 培养基用来预培养富集菌种。筛选培养基为无机盐培养基，培养基配方为：4.0 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 g  $\text{CaCl}_2$ 、0.03 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g  $\text{NaNO}_3$ 、1.0 mL 微量元素/L 培养基 (AML291 1 000×SL-10 微量元素溶液，北京酷来搏科技有限公司)。富集过程中，1-亚硝基-2-萘酚浓度由 10 mg/L 逐渐增加到 40 mg/L。固体培养基中再加入 15.0 g/L 的琼脂。用 1.0 mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 至 7.50。各培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 下高温湿热灭菌 20 min 后使用。

## 1.2 1-亚硝基-2-萘酚降解菌种的分离筛选

研究发现，1-亚硝基-2-萘酚作为捕收剂的适宜用量为 1 200 mg/kg<sup>[6]</sup>，其中 48.6% 的药剂在使用过程中无法回收，随着尾砂排入环境<sup>[14]</sup>。而我国将近 80% 的矿山废弃物以尾砂的形式堆存在尾矿库中，残余的浮选药剂主要通过水解、光解、高级氧化降解及生物降解等消减<sup>[1,15]</sup>。因此，本研究取 100 g 尾矿砂放入装有 200 mL 超纯水的塑料三角瓶中，于翻转振荡器以 60 r/min

的速度振荡 30 min，之后静置 30 min。取 1 mL 上清液于 LB 液体培养基中用来预培养富集菌种。之后取 1 mL 预富集菌种于无机盐富集培养基中 [其中，加入 1-亚硝基-2-萘酚(终浓度为 40 mg/L)]，恒温培养箱中 28 °C 培养 10 d。取 1 mL 培养液，将上清液按照  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  浓度梯度进行稀释，之后涂布于 LB 固体培养基(1-亚硝基-2-萘酚终浓度为 40 mg/L)上，置于恒温培养箱中 28 °C 培养 5 d。待菌落生长后，将得到的单菌落经 3 次纯化后，分别接种于以 40 mg/L 1-亚硝基-2-萘酚为唯一碳源的 LB 培养基中，再置于 28 °C、180 r/min 摇床中培养 5 d。所有纯化的菌株保存于 -80 °C 冰箱。共得到纯化的菌株 13 株。

培养 5 d 后使用高效液相色谱法测定各菌株对 1-亚硝基-2-萘酚的降解率，最终获得 1-亚硝基-2-萘酚的高效降解菌株并命名为 CUGB-JL11。

样品制备流程如下：实验样品在石英瓶中按  $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{实验样品}}=1:2$  的体积比添加乙酸乙酯，

随即进行振荡。一段时间后, 转移适量的上层(有机层)溶液于气相小瓶中, 通过 GC-MS 检测分析。

仪器设置如下: GC 部分: 进样量为 1  $\mu\text{L}$ , 不分流模式, 进样口温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ 。色谱柱升温程序: 初始温度 50  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 2 min, 以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 150  $^{\circ}\text{C}$ , 然后以 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 200  $^{\circ}\text{C}$ , 最后以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速度升至 290  $^{\circ}\text{C}$ 。整个过程需要 31 min。

MS 部分: 离子源和四极杆的温度分别为 230  $^{\circ}\text{C}$  和 150  $^{\circ}\text{C}$ 。Scan 模式,  $m/z$  记录范围是 50–500。使用质谱搜索程序(NIST 14)分析数据, 并将实测谱图与 NIST 库中的标准谱图进行比较。

### 1.3 菌株鉴定

#### 1.3.1 菌株形态特征

在 LB 培养基中将菌株 CUGB-JL11 活化并扩培至  $OD_{600}=0.6$  时, 于 LB 固体培养基上轻轻反复划线, 并对生化培养箱中 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后的菌落进行观察, 记录其菌落形状、颜色、透明度和边缘是否光滑等特征。

取  $OD_{600}=0.6$  的细菌悬浮液 800  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 的 EP 管内, 将离心管里的细菌轻轻吹散后转移至新管内, 转速 800–1 000 r/min 离心 5 min 成团(细胞团大小约绿豆大小), 垂直静置自然沉降 1 h 后弃上清液(留 1 mL 左右)。再沿管壁缓慢加入 1 mL 预冷的 2.5% 戊二醛, 将所得重悬菌液吸取 7–10  $\mu\text{L}$ , 滴加于玻片表面, 烘箱烘干后样品喷金, 进行扫描电子显微镜观察。

#### 1.3.2 16S rRNA 基因分子生物学鉴定

按照细菌 DNA 提取试剂盒的使用说明书提取菌株 SCSIO 43702 的基因组 DNA, 并以其为模板, 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物对 27F (5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增基因。

PCR 反应体系: 10 $\times$ Ex Taq Buffer (20 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  plus) 2.0  $\mu\text{L}$ , Ex Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mol/L dNTPs Mix 1.6  $\mu\text{L}$ , 5p 27F Primer (10.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , 5p 1492R Primer (10.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (25.0 ng/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min<sup>[1]</sup>。

PCR 产物于上海美吉生物测序公司的 Illumina MiSeq 平台进行测序。测序结果通过 NCBI 数据库进行相似性比对, 并使用 MEGA 11 的邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。NCBI 登录号为: SUB10505279。

### 1.4 1-亚硝基-2-萘酚菌株降解特性研究

#### 1.4.1 菌株生长曲线

菌液培养: 在 LB 液体培养基中将菌株 CUGB-JL11 活化并扩培至  $OD_{600}=0.6$ 。

实验组: 在 250 mL 锥形瓶中, 加入 1-亚硝基-2-萘酚终浓度为 40 mg/L 的 100 mL 的无机盐培养基, 再加入 5 mL 上述制备好的菌液。

对照组: 用等量的无机盐液体培养基替代, 不添加菌液。

实验组和对照组各设置 3 个重复, 封口后放入摇床中于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养, 每 12 h 测量培养液的  $OD_{600}$  值。

#### 1.4.2 温度对 1-亚硝基-2-萘酚降解的影响

按照 1.4.1 实验组和对照组的配制和设置方法, 将实验组和对照组的温度分别设定为: 15、20、25、30 和 40  $^{\circ}\text{C}$ 。于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养, 每 12 h 测量培养液的  $OD_{600}$  值。

#### 1.4.3 pH 对 1-亚硝基-2-萘酚降解的影响

按照 1.4.1 实验组和对照组的配制和设置方法, 将实验组和对照组的 pH 分别设定为: 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0。于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min

条件下培养, 每 12 h 测量培养液的  $OD_{600}$  值。

#### 1.4.4 样品处理

1-亚硝基-2-萘酚降解实验进行到第 5 天时, 将培养菌液于  $12\ 000\times g$  离心 5 min, 收集菌体和上清液。将收集的菌体用超声波破碎后的混合液重新离心, 收集上清液, 并将其与第 1 次的上清液混合。

按  $V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{上清液}}=1:2$  的体积比添加色谱纯乙酸乙酯, 以萃取中间代谢产物, 共萃取 3 次。

$$\text{降解率}(\%) = \frac{\text{对照组样本中有机物含量} - \text{实验组样本中有机物含量}}{\text{对照组样本中有机物含量}} \times 100 \quad \text{公式(1)}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 采样区域样本环境因子分析

采样区矿山样本偏弱酸性, pH 值介于 5.14–7.33 之间。TOC、TN、TP 和 TS 值分别介于 14 900–23 100、232–535、2 020–2 790 和 605–1 065 mg/kg 之间(表 1)。较之于广西河池市土壤环境硫元素的背景值(278 mg/kg), 总硫含量属于超标, 但远低于酸化的铅/锌矿尾矿环境(均值为 12 600 mg/kg)<sup>[16]</sup>。重金属总量可以将

萃取后的产物通过氮吹法在旋转蒸发仪上浓缩至 0.8 mL, 取 1  $\mu\text{L}$  上样, 进行气相色谱-质谱联合(GC-MS)检测分析, 并与 NIST 质谱数据库(National Institute of Standards and Technology: <http://chemdata.nist.gov/>)比对, 鉴定代谢产物。

### 1.4.5 数据分析

1-亚硝基-2-萘酚的降解率按照公式(1)计算。

使用数据处理软件 SPSS 25.0 对实验所得数据进行显著性分析。

采样区域划分为轻度[(9 260 $\pm$ 46.3) mg/kg]、中度[(41 700 $\pm$ 208) mg/kg]和重度[(129 000 $\pm$ 644) mg/kg]污染区。因此, 本研究选取重金属浓度均值最高的重度污染区[(129 000 $\pm$ 644) mg/kg]为微生物菌种库, 开展菌种筛选工作(标记为 T1 和 T2)。

### 2.2 菌株的鉴定

菌株 CUGB-JL11 的初步形态观察结果显示, 该菌株为革兰氏阴性杆的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 呈杆状, 乳白色不透明, 有鞭毛, 中间凸起, 长 0.59  $\mu\text{m}$  左右。菌落形态及电镜观图见图 1。

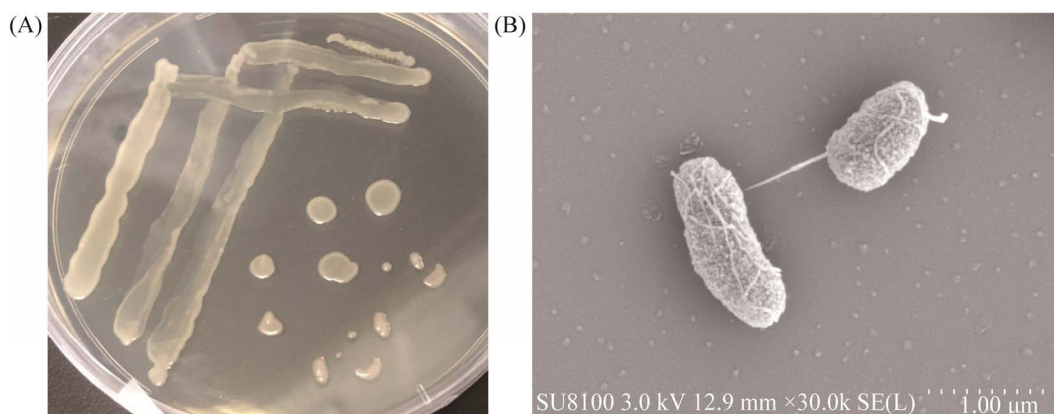


图 1 恶臭假单胞菌菌株 *P. putida* CUGB-JL11 的菌落形态(A)及扫描电子显微镜图(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and scanning electron microscope (SEM) graph (B) of *P. putida* CUGB-JL11.



基于菌株 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中相似菌株序列比对结果可知: 菌株 CUGB-JL11 序列与 *Pseudomonas putida* (OL314839.1) 相似度为 100%, 该菌株属于 *Pseudomonas* sp.。已有研究报道假单胞菌属 *Pseudomonas putida* 具有苯系物等有机物的降解能力<sup>[17-18]</sup>。本研究选取了已报道的 *Pseudomonas* 属微生物与 CUGB-JL11 构建了系统发育进化树(图 2), 命名其为 *Pseudomonas putida* CUGB-JL11, 简称 *P. putida* CUGB-JL11。

### 2.3 菌株生长特性研究

菌株 *P. putida* CUGB-JL11 在以 1-亚硝基-2-萘酚为唯一碳源的培养基中的生长曲线(图 3A)。可以看出: 在营养充足的培养基中, 菌株经 20 h 的适应期后大量生长繁殖, 并在约 90 h 后达到生长繁殖的峰值, 此后菌株进入平台期, 生长繁殖相对趋于稳定。

本实验在最佳培养时间(36 h 内), 以温度为

变量的培养实验结果表明, 该菌株在 20–30 °C 温度范围内具有很好的适应性。广西河池市的年均温度为 20.5 °C<sup>[2]</sup>, 该菌株较为广泛的温度适应性为菌株后期的修复应用提供了有利的条件。同时 *P. putida* CUGB-JL11 的最适生长温度为 30 °C 左右(图 3B)。已有研究发现, 菌株 *Pseudomonas* sp. LY1 在 30–37 °C 的温度范围内对吡啶乙酸具有较高的适应性<sup>[19]</sup>。相对地, 不同于嗜热菌, 如 *Pseudomonas mendocina* NR802 (28–37 °C), 或者嗜冷菌, 如: *Pseudomonas* sp. BZD-33 (8–15 °C), 对菲(100 mg/L)和邻苯二甲酸二乙酯(400 mg/L)的降解率分别高达 82.9% 和 90.0%<sup>[20-21]</sup>。本研究的恶臭假单胞菌 *P. putida* CUGB-JL11 作为嗜温菌, 其在培养温度高于 30 °C 或低于 20 °C 生长速度均显著降低, 但仍具有一定的生存能力, 体现了该菌株对温度变化具有一定的适应能力。

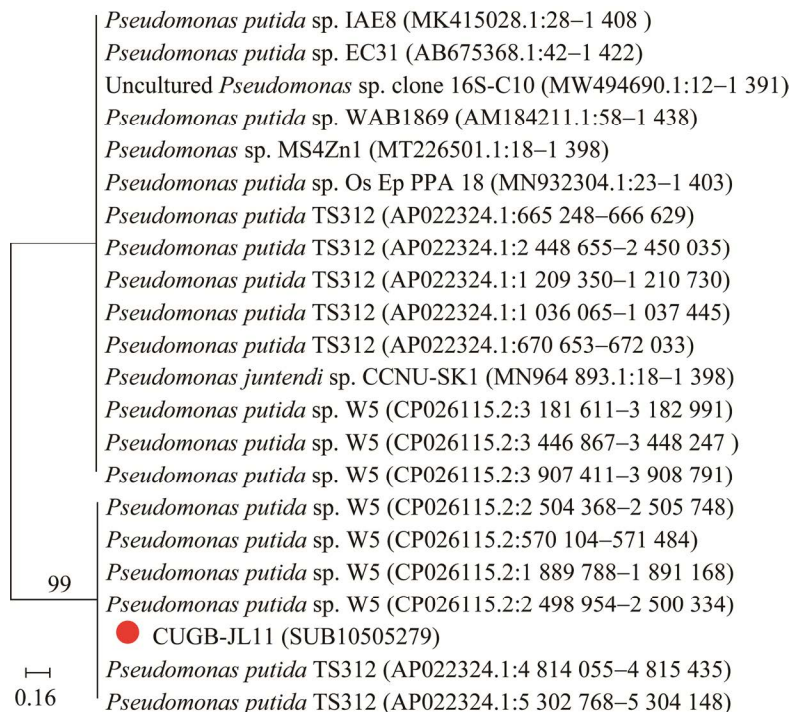


图 2 菌株 *Pseudomonas putida* CUGB-JL11 的 16S rRNA 基因系统进化发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of *Pseudomonas putida* CUGB-JL11. Numbers in parentheses are accession numbers of related strains. Numbers in each branch points are percentage supported by bootstrap. The bar=0.16 is nucleotide divergence.

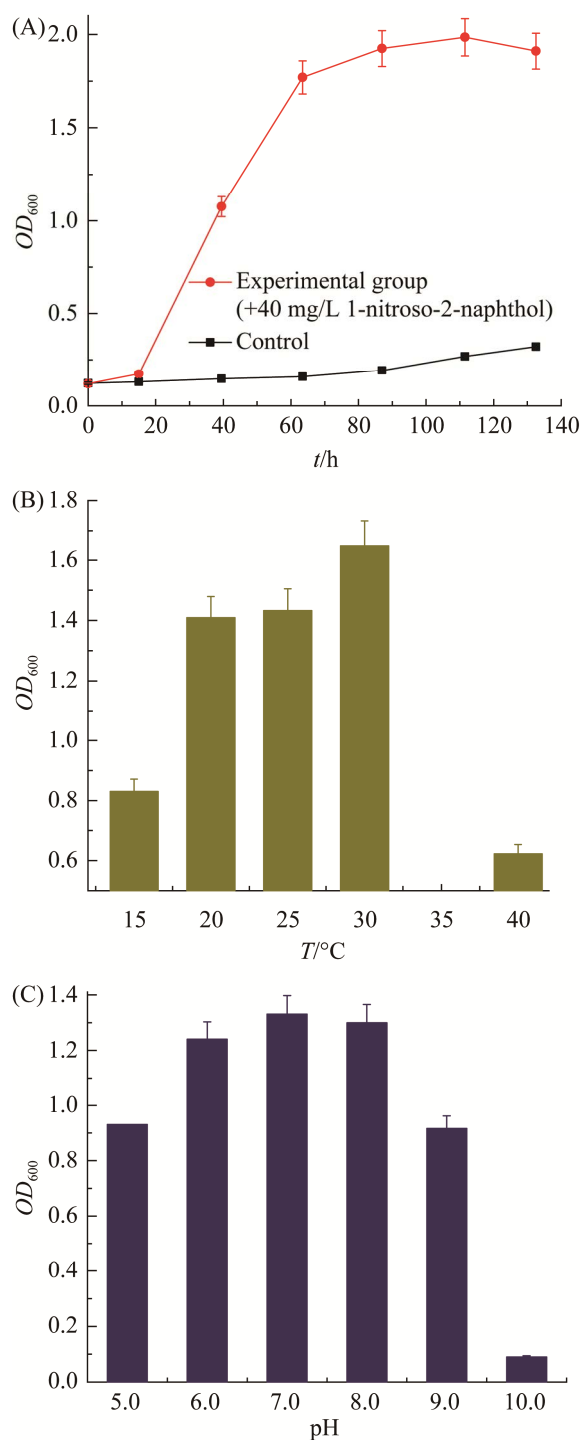


图3 菌株 *Pseudomonas putida* CUGB-JL11 的生长曲线(A)及温度(B)和 pH (C)对菌株生长的影响  
Figure 3 The growth curve (A) and effects of temperature (B) and pH (C) on the growth of *Pseudomonas putida* CUGB-JL11. Relative standard deviation in present study is below 5%.

Salunke 等<sup>[22]</sup>报道中提出, 温度和 pH 与 *P. baetica* SUHU25 纤维蛋白分解酶的活性具有一定的相关性。因此, 本研究同时测定了不同 pH 值 (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0) 对菌株生长的影响(图 3C)。pH 值对培养 2 d 的菌株 *P. putida* CUGB-JL11 的生长有显著影响, 菌株最适 pH 值为 7.0。在 pH 5.0、9.0、10.0 时, 菌株的生长情况存在显著差异性, 表明该菌株的 pH 适应范围为 6.0–8.0。同样地, Duca 等<sup>[19]</sup>研究发现, *Pseudomonas aeruginosa* NR1 在 pH 低于 5.0 或者高于 10.0 的培养条件下, 菌株的生长速率明显低于中性培养条件下的生长速率。这可能与 1-亚硝基-2-萘酚的中间代谢产物(如: 邻氰基苯甲酸、邻苯二甲酸、2-羟基甲基苯甲酸和(2E)-3-(2-羟基苯基)-2-丙烯酸)有关<sup>[23]</sup>。本研究的恶臭假单胞菌 *P. putida* CUGB-JL11 能在 pH 值为 6–8 这一范围内具有良好的适应能力。

#### 2.4 1-亚硝基-2-萘酚降解产物物质谱鉴定

为了探究菌株对 1-亚硝基-2-萘酚的降解特性, 在 pH 为 7.0, 温度为 28 °C 的环境下将纯化后的 *P. putida* CUGB-JL11 菌株接种到初始浓度为 40 mg/L 1-亚硝基-2-萘酚为唯一碳源的培养基中培养, 同时设置不接种菌液的对照组(图 4)。培养 5 d 时, 1-亚硝基-2-萘酚的降解率为 81%, 明显高于对照组, 说明 *P. putida* CUGB-JL11 菌株最适生长条件下具有高效降解 1-亚硝基-2-萘酚的潜力。同时培养过程中, 发现起初培养液颜色呈绿色, 在培养过程中逐渐变为棕黄色(图 4), 这一现象可能是由于 1-亚硝基-2-萘酚开环过程中积累了一些有颜色的有机化合物积累所致。

为了明确菌株 *P. putida* CUGB-JL11 对 1-亚硝基-2-萘酚的生物降解路径, 本研究利用 GC-MS 分析了该菌株的代谢产物, 对实验组体系中第 5 天的样品进行检测鉴定。通过质谱搜



索程序(NIST 14)分析数据, 并将实测谱图与 NIST 库中的标准谱图进行比较, 基于全扫描模式下获得质谱图(图 5)。菌株 *P. putida* CUGB-JL11 降解 1-亚硝基-2-萘酚的中间代谢产物, 共鉴定到 6 种主要的转化产物, 各代谢产物结构式及具体的保留时间( $t_R$ )见表 2, 并推测出 1-亚硝基-2-萘酚可能的代谢途径。

Lu 等研究表明, 1-亚硝基-2-萘酚的降解起始于-NO (亚硝基)基团被氧化成-NO<sub>2</sub> (硝基), 形成 1-亚硝基-2-萘酚<sup>[7]</sup>。目前尚未有关微生物降解的报道。菌株 *P. putida* CUGB-JL11 在 1-亚硝基-2-萘酚的好氧生物降解过程中, 在 135 min 的降解时间内, 通过一系列的氧化还原反应形成中间体: 苯甲羟肟酸甲酯和苯丙胺, 其保留时间依次为: 5.952-5.998 min 和 8.411-8.483 min (表 2)。之后通过苯环开环代谢路径进一步降解生成无毒或者低毒性的小分子物质, 如丙酸乙酯、戊酸、异戊酸等(表 2), 最终通过生成碳氧化物(CO<sub>x</sub>)、氮氧化物(NO<sub>x</sub>)和 H<sub>2</sub>O。表明生物降解过程中, *P. putida* CUGB-JL11 菌株可以将 1-亚硝基-2-萘酚母体及时降解。有研究表明, 在有机物降解过程中即使产生难降解性的中间代谢产物, 其母体及中间代

谢产物也可作为二级基质通过共代谢作用被微生物降解<sup>[24]</sup>。Lu 等研究发现, 1-亚硝基-2-萘酚

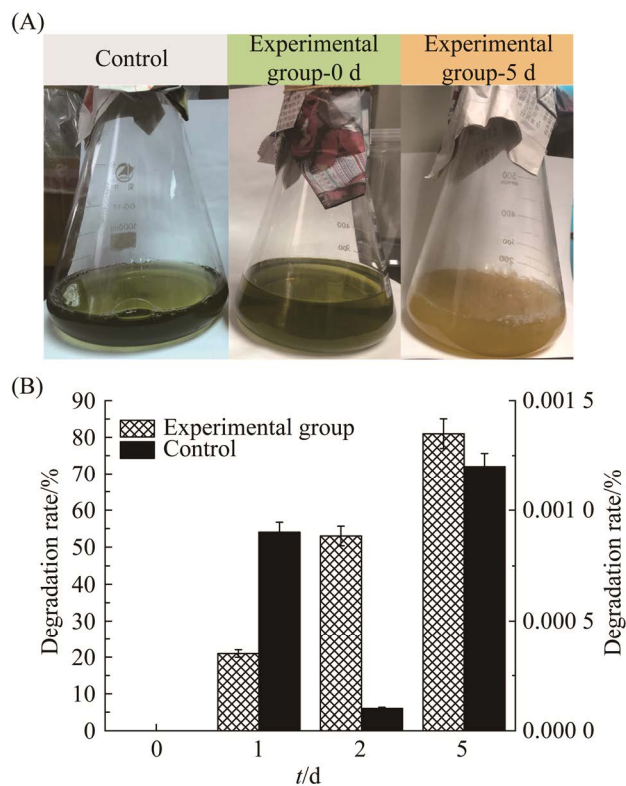


图 4 1-亚硝基-2-萘酚微生物降解特性  
Figure 4 Bio-degradation characteristics of 1-nitroso-2-naphthol. Relative standard deviation in present study (B) is below 5%.

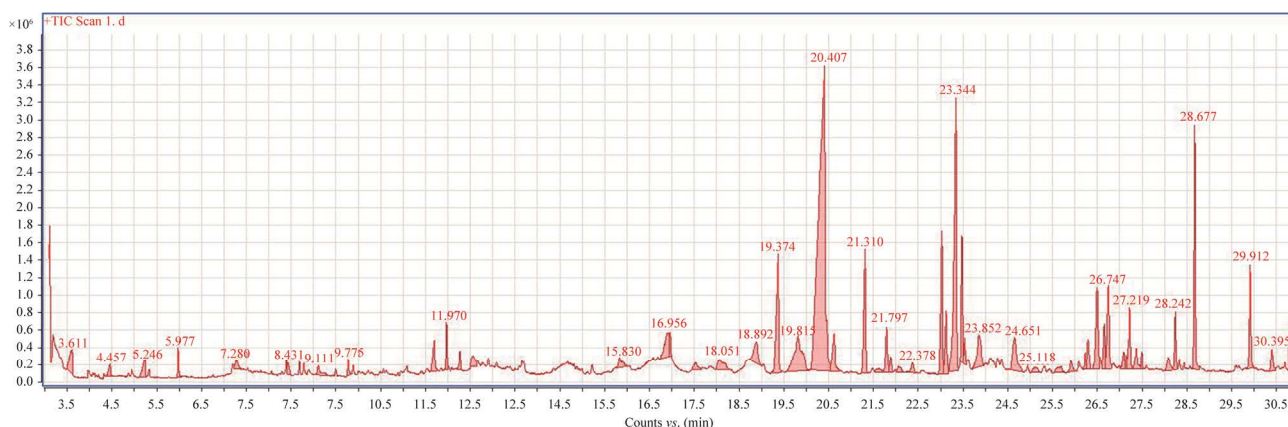
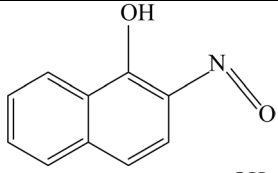
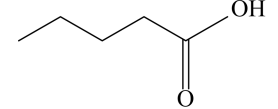
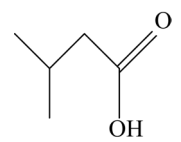
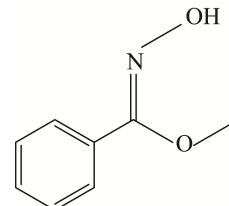
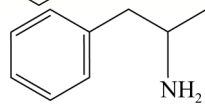
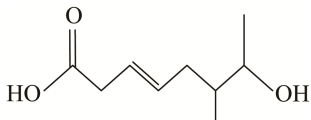
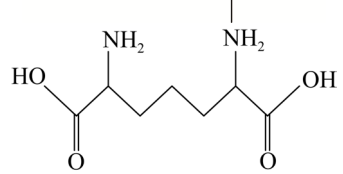


图 5 1-亚硝基-2-萘酚降解产物全一级质谱图  
Figure 5 The GC-MS spectrum of 1-nitroso-2-naphthol products.

表 2 1-亚硝基-2-萘酚在微生物降解过程中潜在的转化产物鉴定

Table 2 The identified 1-nitroso-2-naphthol and its proposed intermediates products during the microbial-degradation processes

The proposed intermediates products	$t_R$	Molecular formula	CAS number	Chemical structure
1-nitroso-2-naphthol		$C_{10}H_7NO_2$	131-91-9	
Valeric acid	4.389–4.472	$C_5H_{10}O_2$	109-52-4	
Isovaleric acid	5.131–5.251	$C_5H_{10}O_2$	503-74-2	
Methyl N-hydroxybenzenecarboximidoate	5.952–5.998	$C_8H_9NO_2$	Not available	
Amphetamine	8.411–8.483	$C_9H_{13}N$	300-62-9	
7-hydroxy-6-methyl-oct-3-enoic acid	9.080–9.308	$C_9H_{16}O_3$	Not available	
Heptanedioic acid,2,6-diamino-	17.984–18.264	$C_7H_{14}N_2O_4$	583-93-7	

在光降解过程中，会形成难降解的芳香腈类物质：邻氰基苯甲醛和邻氰基苯甲酸等<sup>[7]</sup>。一般来说，细菌在有氧降解多环芳烃时，在双加氧酶的作用下可将 2 个氧原子直接加到苯环上<sup>[25]</sup>。由此得出，1-亚硝基-2-萘酚的光降解路径不同于微生物降解路径，在好氧微生物作用下，苯甲羟肟酸甲酯和苯丙胺代谢路径参与了菌株 *P. putida* CUGB-JL11 对 1-亚硝基-2-萘酚的降解过程。本研究为进一步探究 1-亚硝基-2-萘酚

在微生物作用下的降解机理奠定了理论基础。

### 3 结论

本研究从广西河池市的某尾矿环境中筛选得到 1 株 1-亚硝基-2-萘酚的高效降解菌 CUGB-JL11，经形态特征及 16S rRNA 基因分析鉴定，该菌株属于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)，命名为 *P. putida* CUGB-JL11。菌株 *P. putida* CUGB-JL11 对 1-亚硝基-2-萘酚在 5 d

内降解率高达 81.0%，说明该菌株具有潜在的矿山修复应用能力。GC-MS 检测到 6 种中间代谢产物，并生成了一些有毒的苯环类物质：苯甲羟肟酸甲酯和苯丙胺，但是 1-亚硝基-2-萘酚母体及其大部分中间产物都降解为小分子物质(如丙酸乙酯、戊酸、异戊酸等)或者被完全降解。

## 参考文献

- [1] Liu JL, Yao J, Wang F, Ni W, Liu XY, Sunahara G, Duran R, Jordan G, Hudson-Edwards KA, Alakangas L, Solevic-Knudsen T, Zhu XZ, Zhang YY, Li ZF. China's most typical nonferrous organic-metal facilities own specific microbial communities. *Scientific Reports*, 2018, 8: 12570–125580.
- [2] Liu JL, Yao J, Zhu XZ, Zhou DL, Duran R, Mihucz VG, Bashir S, Hudson-Edwards KA. Metagenomic exploration of multi-resistance genes linked to microbial attributes in active nonferrous metal(loid) tailings. *Environmental Pollution*, 2021, 273: 115667.
- [3] 陈彩霞, 李华昌, 栾和林, 姚文. 矿山药剂的降解与二次复合污染. 有色金属, 2007(2): 86–89.  
Chen CX, Li HC, Luan HL, Yao W. Degradation and secondary complex pollution of mine reagents. *Nonferrous Metals*, 2007(2): 86–89. (in Chinese)
- [4] Zhang YY, Wang F, Hudson-Edwards KA, Blake R, Zhao FR, Yuan ZM, Gao W. Characterization of mining-related aromatic contaminants in active and abandoned metal(loid) tailings ponds. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(23): 15097–15107.
- [5] Pozdnyakova N, Nikiforova S, Turkovskaya O. Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. *Open Life Sciences*, 2010, 5(1): 83–94.
- [6] 周伟.  $\alpha$ -亚硝基- $\beta$ -萘酚在异极矿浮选中活化行为的研究. 湖南大学硕士学位论文, 2010.
- [7] Lu C, Yao J, Knudsen TŠ, Amde M, Gu JH, Liu JL, Li H, Zhang JY. Degradation of  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol by UVA-B activated peroxide, persulfate and monopersulfate oxidants in water. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 238: 117942.
- [8] 李羽, 罗丽娟, 杨旭楠, 许玫英, 栾天罡. 红树林湿地多环芳烃的微生物降解. 微生物学报, 2022, 62(2): 489–507.  
Li Y, Luo LJ, Yang XN, Xu MY, Luan TG. Advances in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove wetlands. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 489–507. (in Chinese)
- [9] 陈秀鹏, 姜丽佳, 孙靖云, 周月, 陈英文, 沈树宝. 微生物降解多环芳烃的研究进展. 现代化工, 2018, 38(10): 34–37.  
Chen XJ, Jiang LJ, Sun JY, Zhou Y, Chen YW, Shen SB. Research progress in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Modern Chemical Industry*, 2018, 38(10): 34–37. (in Chinese)
- [10] Alao MB, Adebayo EA. Fungi as veritable tool in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-polluted wastewater. *Journal of Basic Microbiology*, 2022, 62(3/4): 223–244.
- [11] Ma L, Deng FC, Yang C, Guo CL, Dang Z. Bioremediation of PAH-contaminated farmland: field experiment. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(1): 64–72.
- [12] Ding YJ, Wyckoff KN, He Q, Cao XJ, Huang BS. Biodegradation of waste asphalt shingle by white rot fungi. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 310: 127448.
- [13] Yu XX, Lee K, Ma B, Asiedu E, Ulrich AC. Indigenous microorganisms residing in oil sands tailings biodegrade residual bitumen. *Chemosphere*, 2018, 209: 551–559.
- [14] 栾和林, 姚文, 吴萌. 湿法冶金中的一些污染新问题的探讨. 矿冶. 2002, 11: 280–282.  
Luan HL, Yao W, Wu M. Discussion of some new pollution problems in hydrometallurgy. *Mining Metallurgy*, 2002, 11: 280–282. (in Chinese)
- [15] Zhang D, Wu LP, Yao J, Herrmann H, Richnow HH. Carbon and hydrogen isotope fractionation of phthalate esters during degradation by sulfate and hydroxyl radicals. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 347: 111–118.
- [16] Shu WS, Ye ZH, Lan CY, Zhang ZQ, Wong MH. Acidification of lead/zinc mine tailings and its effect on heavy metal mobility. *Environment International*, 2001, 26(5/6): 389–394.
- [17] Khan AU, Rehman MU, Zahoor M, Shah AB, Zekker I. Biodegradation of brown 706 dye by bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa*. *Water*, 2021, 13(21): 2959.
- [18] Révész F, Farkas M, Kriszt B, Szoboszlai S, Benedek T, Táncsics A. Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading either benzene or toluene and the identification of *Malikia spinosa* (*Comamonadaceae*) as prominent aerobic benzene-,

- toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(25):
- [19] Duca D, Rose DR, Glick BR. Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas* sp. strain UW4 that converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4640–4649.
- [20] Khan AH, Topp E, Scott A, Sumarah M, Macfie SM, Ray MB. Biodegradation of benzalkonium chlorides singly and in mixtures by a *Pseudomonas* sp. isolated from returned activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 299: 595–602.
- [21] Premnath N, Mohanrasu K, Rao RGR, Dinesh GH, Prakash GS, Ananthi V, Ponnuchamy K, Muthusamy G, Arun A. A crucial review on polycyclic aromatic hydrocarbons - environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, 2021, 280: 130608.
- [22] Salunke AS, Kharat AS. Data on isolation and purification of fibrinolytic enzyme from *Pseudomonas baetica* SUHU25. *Data in Brief*, 2019, 26: 104369.
- [23] Rehman NNMA, Dixit PP. Influence of light wavelengths, light intensity, temperature, and pH on biosynthesis of extracellular and intracellular pigment and biomass of *Pseudomonas aeruginosa* NR1. *Journal of King Saud University - Science*, 2020, 32(1): 745-752.
- [24] 张煜航, Manzoor Ahmad, 董俊德, 杨清松, 周卫国, 凌娟. 一株海草沉积物非降解菌的筛选、鉴定和降解特性. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 1841–1853.  
Zhang YH, Ahmad M, Dong JD, Yang QS, Zhou WG, Ling J. Isolation, identification and degradation characteristics of a phenanthrene degrading bacteria derived from seagrass sediment. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 1841–1853. (in Chinese)
- [25] Annweiler E, Richnow HH, Antranikian G, Hebenbrock S, Garms C, Franke S, Francke W, Michaelis W. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 518–523.