

营养物质及金属离子对 DLL-E4 菌降解对硝基苯酚的影响*

刘智 张晓舟 何健 林少文 潘结友 李顺鹏[†]

(南京农业大学生命科学学院微生物学系, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要 研究了酵母膏、葡萄糖、蛋白胨、土壤浸液及 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Li^{+} 、 Cu^{+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ni^{2+} 等 13 种金属离子对甲基对硫磷降解菌 DLL-E4 降解对硝基苯酚的影响。结果表明: 适量添加酵母膏、葡萄糖和蛋白胨都能有效提高菌株对对硝基苯酚的降解, 土壤浸液没有影响; 金属离子中, 除 Li^{+} 和 $0.1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$ 外均对 DLL-E4 降解对硝基苯酚的性状有一定的影响, 其中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 影响不大, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 高浓度时影响较大, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^{+} 、 Ni^{2+} 对 DLL-E4 降解对硝基苯酚有较大的影响。

关键词 对硝基苯酚; 降解; 营养物质; 金属离子

中图分类号 S154.39 文献标识码 A

随着农业生产的发展, 农药的使用量也越来越大, 由此造成了严重的环境污染问题。有关微生物降解农药污染的研究很多^[1~3], 生物修复技术是在目前的技术和经济水平上最为适用的用来大规模消除环境污染, 尤其是面源环境污染的技术^[4]。生物修复是指目标化合物在不受任何人为干扰的情况下被降解。只要存在合适的环境条件、营养条件(通常为氮源、磷源、硫源)以及相应的微生物, 就可以进行生物修复。

本研究从长期使用甲基对硫磷的土壤中分离出的一株能以其作为唯一碳源、氮源的细菌 DLL-E1^[5], 经紫外线-氯化锂复合诱变, 获得了一株具有高效降解特性的阳性突变株 DLL-E4^[6]。前面的研究表明, DLL-E4 降解甲基对硫磷到对硝基苯酚的一硫代磷酸酯酶属组成酶, 能在其生长过程中分泌, 但其降解对硝基苯酚的酶(系)却属诱导酶(系), 不同的培养条件及外加因素会对该酶(系)的分泌和(或)作用有很大的影响。现研究实验室条件下外加营养及金属离子对 DLL-E4 降解对硝基苯酚的影响, 为进一步的土壤培育试验打下基础, 为该菌株最终应用于生产实践, 特别是应用于修复农药污染的生态环境提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

甲基对硫磷降解菌 DLL-E4 (*Pseudomonas putida*), 本实验室分离保存。

1.2 菌株培养

斜面接种 DLL-E4 于 LB 培养基中培养过夜, 作为种子液。取 2% 的种子液接种于 50 ml 添加对硝基苯酚 (200 mg L^{-1}) 的基础盐培养基中, 35°C , 100 r min^{-1} 振荡培养, 培养基参见文献[2]。记录培养基中黄色(对硝基苯酚在中性范围的颜色)褪去的时间, 离心, 上清进行紫外扫描, 验证对硝基苯酚的降解, 沉淀用等体积基础盐培养基稀释, 测定 $\text{OD}_{600\text{nm}}$, 考察菌体生长情况。采用 2% 的接种量, 目的是为了大接种量时, 菌体对底物产生酶学降解作用。本文每个实验均 3 个平行, 数据值采用 3 次平行结果的平均值。

1.3 土壤浸液的制备

取南京市卫岗富含有机物的果树园土壤(黄棕壤), 风干, 捣碎, 过粗筛。取土壤 400 g, 加自来水 960 ml, 于 2 L 烧瓶中, 在 121°C 下, 高压灭菌 1 h, 放置过夜, 第 2 天取出, 用滤纸过滤, 分装烧瓶, 每瓶

* 国家 863 项目(2001AA214121, 2002AA246081)、农业科技跨越计划(跨越 2009-15)和国家攻关项目(2002BA516A01)资助

- 通讯作者

作者简介: 刘智(1975~), 湖北黄梅人, 博士, 主要从事环境微生物学研究与应用。现工作单位: 华中科技大学生命科学学院生物医学工程博士后流动站。E-mail: hmliuzhi@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-12-04; 收到修改稿日期: 2003-08-19

300 ml, 在 121 °C 下灭菌 20 min, 室温放置 2 周, 取上清液备用。

1.4 外加营养的添加

于含对硝基苯酚(200 mg L⁻¹)的 50 ml 基础盐培养基中, 分别添加 0、50、100、500、1 000、10 000 mg L⁻¹ 的酵母膏、蛋白胨、葡萄糖以及土壤浸液(土壤浸液单位为 ml L⁻¹), 接种 2% LB 培养基过夜培养的菌液, 于培养液的黄色完全褪去时取样, 离心, UV2401 紫外扫描上清。同时添加不含对硝基苯酚的对照, 于相同时间扫描, 考察营养物质的紫外扫描情况。

1.5 金属离子的添加

参考土壤中金属离子的含量^[7]加入一定浓度的 Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺、Al³⁺、Mn²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Li⁺、Cu⁺、Cu²⁺、Ba²⁺、Ni²⁺ 13 种金属离子, 首先将金属盐 CaCl₂、MgCl₂、FeCl₂、FeCl₃、AlCl₃、MnSO₄、CoCl₂、ZnCl₂、LiCl、CuCl、CuSO₄、BaCl₂、NiSO₄ 用磷酸盐缓冲液(0.02 mmol L⁻¹, pH 7.0) 配备成 1 mol L⁻¹ 的母液, 然后添加到含对硝基苯酚(200 mg L⁻¹) 的基础盐培养基中, 总体积为 50 ml, 金属离子的终浓度分别为 0.1、1、2 mmol L⁻¹ 浓度以及文献[7] 中报道 95% 置信范围内的最小值、几何平均值和最大值的浓度(具体见下文)。

1.6 对硝基苯酚的检测

用 1/10(体积比) 硝酸调整上清 pH 为 4.0, 使用 UV2401 紫外扫描仪, 进行 500 nm 到 200 nm 波段扫描, 观察特征峰(314 nm) 的消失。另外, 对硝基苯酚在 pH7.0 左右具有明显的黄色, 观察黄色消失也是一个直观的检测手段。

2 结 果

2.1 葡萄糖对对硝基苯酚降解的影响

综合分析图 1、图 2, 发现添加葡萄糖对对硝基苯酚降解有很大的影响: 添加 50、100、1 000、10 000 mg L⁻¹ 的葡萄糖时, DLL-E4 降解对硝基苯酚所需时间分别为 18 h、18 h、17.5 h 以及不能降解。不添加营养时, DLL-E4 需要 20 h 左右的时间降解完全底物。值得注意的是, 因为 DLL-E4 利用葡萄糖生长时, 会产生大量的酸性物质, 而在酸性环境中, 对硝基苯酚黄色会消失, 这就是在添加 10 000 mg L⁻¹ 葡萄糖时, 在 15 h 左右培养基褪色, 但经过紫外扫描依然出现很高的吸收峰的原因。图 2 中, 可以看出, 高浓度的葡萄糖在近紫外区也有一定的吸收峰(吸收峰位置 230 nm 左右), 但不干扰对硝基苯酚的检

测(吸收峰位置 314 nm 左右)。为什么在一定浓度范围随着营养物质的添加, DLL-E4 降解能力加快而当营养物质浓度很高时却没有这种作用呢? 可能是因为 DLL-E4 同时利用这些物质, 但偏向于利用较容易利用的碳源物质, 当这些易利用物质太多时, 就会

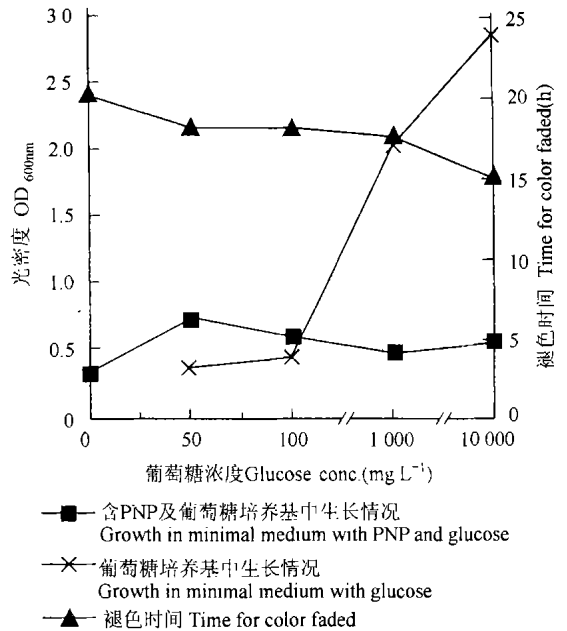
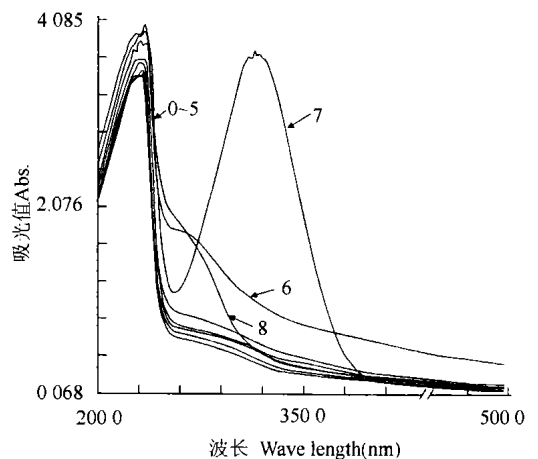


图 1 添加葡萄糖对 DLL-E4 降解 PNP 的影响
Fig 1 Effect of glucose on PNP degradation by DLL-E4



0、1、3、5、7: 添加 0、50、100、1 000、10 000 mg L⁻¹ 葡萄糖及 200 mg L⁻¹ PNP 的培养基 Minimal medium with 200 mg L⁻¹ PNP and 0、50、100、1 000 or 10 000 mg L⁻¹ glucose ; 2、4、6、8 添加 50、100、1 000、10 000 mg L⁻¹ 葡萄糖的培养基 Minimal medium with 50、100、1 000 or 10 000 mg L⁻¹ glucose

图 2 添加葡萄糖对 DLL-E4 降解 PNP 的影响(紫外扫描图谱)

Fig 2 Effect of glucose on PNP degradation by DLL-E4 (UV-scanning)

影响 DLL-E4 对对硝基苯酚的降解。另外,从图 1 中还可以看出,对硝基苯酚的存在对 DLL-E4 的生长有很大的影响,单纯添加葡萄糖时, DLL-E4 的生长情况要好很多,这是因为有毒底物的存在影响了菌体的代谢方式。

2.2 蛋白胨对对硝基苯酚降解的影响

如图 3、图 4 所示,当添加 50、100、500、1 000、10 000 mg L⁻¹ 的蛋白胨浓度时, DLL-E4 降解对硝基

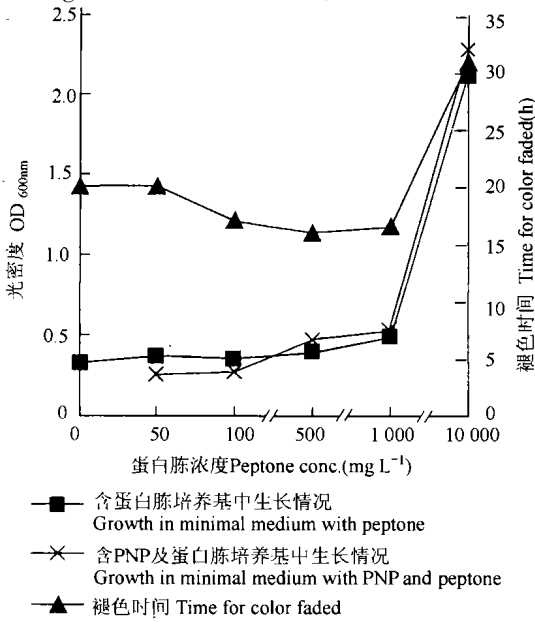
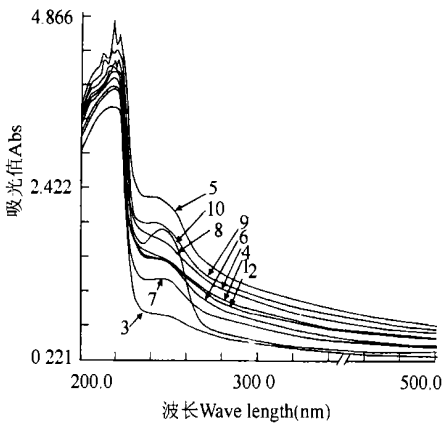


图 3 添加蛋白胨对 DLL-E4 降解 PNP 的影响

Fig 3 Effect of peptone on PNP degradation



1, 3, 5, 7, 9: 添加 50、100、500、1 000、10 000 mg L⁻¹ 蛋白胨和 200 mg L⁻¹ PNP 的培养基 Minimal medium with 200 mg L⁻¹ PNP and 0, 50, 100, 1 000 or 10 000 mg L⁻¹ peptone
 2, 4, 6, 8, 10: 添加 50, 100, 500, 1 000, 10 000 mg L⁻¹ 蛋白胨的培养基 Minimal medium with 0, 50, 100, 1 000 or 10 000 mg L⁻¹ peptone

图 4 添加蛋白胨对 DLL-E4 降解 PNP 的影响(紫外扫描图谱,其中 7、8 稀释 2 倍,9、10 稀释 4 倍)

Fig. 4 Effect of peptone on PNP degradation by DLL-E4(UV-scanning)

苯酚所需时间分别为 24.5 h、17 h、16 h、16.5 h 和 31 h。发现蛋白胨对 DLL-E4 降解对硝基苯酚的影响很大。在 50~ 500 mg L⁻¹ 范围内随着蛋白胨浓度的提高,呈现降解效率提高的现象; 500 mg L⁻¹ 与 1 000 mg L⁻¹ 的浓度时,降解速率相当;而当浓度高达 10 000 mg L⁻¹ 时,降解时间延迟到 31 h。扫描图谱发现,蛋白胨在紫外区有明显的吸收峰(280 nm 左右),但在对硝基苯酚的吸收峰(314 nm 左右)的位置没有发现吸收峰,说明做出的降解完全的结论是正确的。

关于生长和降解情况,添加蛋白胨(图 1、图 2)和葡萄糖(图 3、图 4) 出现很大的差异,可能是因为蛋白胨主要是提供有机氮源,有利于菌体的生长和活性的发挥,而且 DLL-E4 降解对硝基苯酚主要是利用它们作为碳源物质,所以高浓度的氮源有利于菌体降解对硝基苯酚。而当浓度太高时,可能蛋白胨中作为碳源物质的含量已经足够对 DLL-E4 降解底物产生了影响,所以造成了降解的延迟。

试验结果显示,对于 DLL-E4 降解对硝基苯酚,适量添加葡萄糖和蛋白胨可以大大加快降解的进行。同样,图 3 中的生长情况表明,单纯添加蛋白胨培养 DLL-E4 只有在浓度很高的情况下才能引起菌体的大量繁殖,这也说明了主要是碳源物质构成了菌体增殖的物质基础。

2.3 酵母膏对对硝基苯酚降解的影响

如图 5、图 6 所示,添加少量的酵母膏能有效提高菌株对对硝基苯酚的降解。基础盐培养基中分别添加 0、50、100、500 mg L⁻¹ 的酵母膏时,对硝基苯酚降解完全所需时间分别为 20 h、20 h、18 h、13 h;而酵母膏浓度太高是会抑制菌株降解底物的速度,添加 1 000 mg L⁻¹ 的酵母膏时, DLL-E4 需要 16 h 完全降解对硝基苯酚,10 000 mg L⁻¹ 时,菌株不能降解对硝基苯酚。同样,通过紫外扫描验证了结论。

酵母膏中富含大量的维生素、氨基酸等物质,一般添加酵母膏的目的是补充菌体生长所必须的生长因子等。当然,酵母膏本身也可以作为容易被利用的氮源和碳源,促进菌体的生长。从试验结果来看,添加酵母膏得出的结果介于添加葡萄糖和蛋白胨之间,在一定浓度范围以内能很好的促进底物的降解,当浓度太高时,则产生相反的作用。比照生长情况,发现在高浓度酵母膏的情况下,同时含有对硝基苯酚和酵母膏的培养基中,菌株生长情况最好,说明酵母膏对菌体生长和降解的影响并不是单纯的增添容易利用的碳源、氮源的作用,它还具有其他促进生长

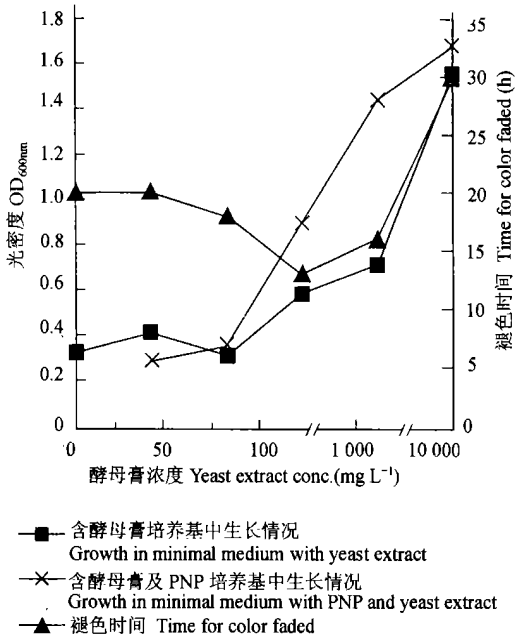
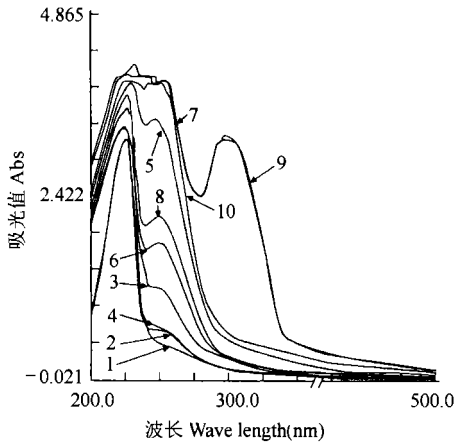


图 5 添加酵母膏对 PNP 降解的影响(添加 10 000 mg L⁻¹ 酵母膏时, 不褪色, 为作图方便, 设为 30 h)

Fig. 5 Effect of yeast extract on PNP degradation by DLL-E4



1, 3, 5, 7, 9: 添加 50, 100, 500, 1 000, 10 000 mg L⁻¹ 酵母膏及 200 mg L⁻¹ PNP 的培养基 Minimal medium with 200 mg L⁻¹ PNP and 50, 100, 500, 1 000 or 10 000 mg L⁻¹ yeast extract;
2, 4, 6, 8, 10: 添加 50, 100, 500, 1 000, 10 000 mg L⁻¹ 酵母膏的培养基 Minimal medium with 50, 100, 500, 1 000 or 10 000 mg L⁻¹ yeast extract

图 6 添加酵母膏对 PNP 降解的影响(紫外扫描图谱, 9、10 稀释 4 倍)

Fig. 6 Effect of yeast extract on PNP degradation by DLL-E4(UV-scanning)

和降解作用。而在高浓度情况下体现出对降解作用的延迟和抑制, 可能是酵母膏中含有的可利用碳源造成的影响。

2.4 土壤浸液对对硝基苯酚降解的影响

添加 50、100、500、1 000、10 000 ml L⁻¹ 的土壤浸液时, DLL-E4 降解对硝基苯酚的性状没有任何变化(图 7)。

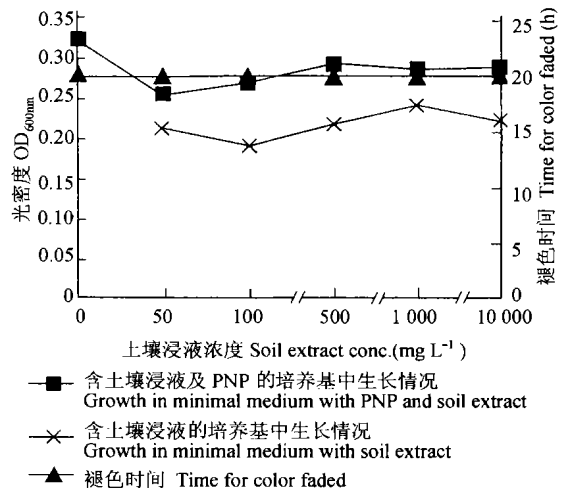


图 7 添加土壤浸液对 PNP 降解的影响

Fig. 7 Effect of soil extract on PNP degradation by DLL-E4

结合菌体生长情况, 说明土壤浸液中含有的营养物质不足以维持菌体的生长和增殖, 这也和一般土壤中营养物质不足以维持外源添加微生物的繁殖一样。在同时含有土壤浸液和对硝基苯酚的培养基中, 菌体生长甚至出现下降的情况, 主要是由于都是较低的吸光值, 这些差别不足以造成菌数上很大的差异。这一点通过计数试验得到了证实, 在以对硝基苯酚为唯一碳源的情况下, 菌株生长量不大, 维持在 10⁸ cfu ml⁻¹ 左右。

2.5 金属离子对对硝基苯酚降解的影响

添加金属离子到含 PNP 200 mg L⁻¹ 的基础盐培养基中, 使金属离子终浓度分别为 0.1、1、2 mmol L⁻¹, 培养至黄色褪去, 记录褪色时间并结合紫外扫描验证 PNP 的降解。其中, 不添加金属离子的褪色时间 20h, OD_{600nm} 为 0.25; 始终不褪色的用“-”表示。结果如表 1 所示。

表 1 金属离子对 PNP 降解的影响

Table 1 Effect of metal ion on PNP degradation by DLL-E4

金属盐 Metal salt	0.1 mmol L ⁻¹		1 mmol L ⁻¹		2 mmol L ⁻¹	
	褪色时间 Duration of fading (h)	OD _{600nm}	褪色时间 Duration of fading (h)	OD _{600nm}	褪色时间 Duration of fading (h)	OD _{600nm}
CaCl ₂	28	0.351	29	0.344	34	0.392
MgCl ₂	25	0.319	26	0.311	26	0.319
FeCl ₃	20	0.403	—	—	—	—
FeCl ₂	22	0.375	33	0.416	—	—
AlCl ₃	29	0.356	—	—	—	—
MnSO ₄	24	0.345	26	0.348	28	0.303
BaCl ₂	—	—	—	—	—	—
CoCl ₂	—	—	—	—	—	—
ZnCl ₂	61	0.261	—	—	—	—
LiCl	20	0.229	20	0.253	19	0.250
CuCl	—	—	—	—	—	—
CuSO ₄	—	—	—	—	—	—
NiSO ₄	—	—	—	—	—	—

根据我国土壤中金属离子的含量^[7], 又设计了下面的试验。

表 2 金属离子对 PNP 降解的影响(95% 置信范围)

Table 2 Effect of metal ion on PNP degradation by DLL-E4(95% reality rate)

金属盐 Metal salt	95% 置信范围内浓度(mg L ⁻¹)		褪色时间 Duration of fading(h)	OD _{600nm}
	Conc. of 95% confidence			
ZnCl ₂	最小值 Min	28.4	40	0.233
	几何平均值 Mean	67.7	40	0.312
	最大值 Max.	161.0	64	0.297
BaCl ₂	最小值 Min	251.0	46	0.275
	几何平均值 Mean	450.0	64	0.249
	最大值 Max.	809.0	—	—
LiCl	最小值 Min	11.1	19	0.152
	几何平均值 Mean	29.1	21	0.166
	最大值 Max.	76.4	17	0.182
CoCl ₂	最小值 Min	4.0	40	0.237
	几何平均值 Mean	11.2	—	—
	最大值 Max.	31.2	—	—
CuSO ₄	最小值 Min	7.3	64	0.400
	几何平均值 Mean	20.0	—	—
	最大值 Max.	55.1	—	—
NiSO ₄	最小值 Min	7.7	—	—
	几何平均值 Mean	53.9	—	—
	最大值 Max.	150.0	—	—

研究表明, 上述金属离子除 Li^+ 和 $0.1 \text{ mmol L}^{-1} \text{Fe}^{3+}$ 外均对 DLL-E4 降解对硝基苯酚的性状有一定的影响, 其中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 影响不大, Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 高浓度时影响较大, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^+ 、 Ni^{2+} 对 DLL-E4 降解对硝基苯酚有较大的影响。

3 讨 论

营养物质对污染物的降解具有重要的影响。Margesin 等研究了在 10°C 下五个不同类型土壤中柴油(Diesel oil)的降解, 并比较了土著微生物和接种能降解柴油的嗜冷菌在土壤中的降解活性以及无机肥料的影响, 而且发现肥料明显促进微生物对柴油的降解^[8]。本文的研究中, 发现添加营养物质对降解菌株 DLL-E4 的降解性能有很大的影响, 当营养物质在一定浓度范围内, 可以大大促进菌株降解性能的发挥, 而当浓度太高时, 菌株反而不能降解目标底物了。这为以后的生产实验和田间施用微生物时提供了借鉴。金属离子对 DLL-E4 的降解性能有一定的影响, 这对在不同土壤中应用降解菌进行生物修复具有很大的参考价值。

参 考 文 献

[1] Chaudhry G R, Chapalamadugu S B. Biodegradation of halogenated

organic compounds. *Microbiological Reviews*, 1991, 55(1): 59~ 79

- [2] Lal R, Saxena D M. Accumulation, metabolism and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiological Review*, 1982, 46: 95~ 127
- [3] Yanze Kontchou C, Gschwind N. Mineralization of the herbicide atrazine as carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60(12): 4 297~ 4 302
- [4] Ammann P R, Koch G S. Technical and economic analyses in the development of bioremediation processes. *Remediation*, 1993, 4(1): 115~ 128
- [5] 刘智, 孙建春, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的分离、鉴定及降解性研究. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(增刊): 147~ 150. Liu Z, Shun J C, Li S P. Isolation, identification and degradation characteristics of methyl parathion degrading strain DLL-1 (In Chinese). *Appl. and Environ. Bio.*, 1999, 5(Suppl): 147~ 150
- [6] 刘智, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的诱变育种. *土壤学报*, 2003, 40(2): 293~ 300. Liu Z, Li S P. Mutant breeding of methyl parathion degrading strain DLL-1 (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 40(2): 293~ 300
- [7] 魏复盛, 等编著. 土壤环境化学. 北京: 中国环境科学出版社, 1995. 25~ 37. Wei F S, et al. *Soil Environ. Chem.* (In Chinese). Beijing: Chinese Environ. Sci. Press, 1995. 25~ 37
- [8] Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3 127~ 3 313

EFFECTS OF NUTRIENT SUBSTANCES AND METAL IONS ON DEGRADATION OF *p*-NITROPHENOL BY DLL-E4 (*Pseudomonas putida*)

Liu Zhi Zhang Xiaozhou He Jian Lin Shaowen Pan Jieyou Li Shunpeng

(Department of Microbiology, Life Science Collage, Nanjing Agricultural University,

Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry

of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract Effects of yeast extract, glucose, peptone, soil extract and metal ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Cu^+ , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} on degradation of *p*-nitrophenol (PNP) by DLL-E4 (*Pseudomonas putida*) were studied. The results show that addition of a proper amount of yeast extract, glucose and peptone could promote the degradation of PNP by DLL-E4, but the addition of soil extract could not. All the metal ions, except Li^+ and 0.1 mmol Fe^{3+} could affect removal of PNP by this strain. The effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} were low, the effects of Fe^{3+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Ba^{2+} and Zn^{2+} were high when in high concentration, whereas the effects of Co^{2+} , Cu^{2+} , Cu^+ and Ni^{2+} were high, too, even in residual concentration.

Key words *p*-nitrophenol; Degradation; Nutrition; Metal ion