微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn

OCT 20, 2009, 36(10): 1496~1450
© 2009 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

一株对硝基苯胺降解菌 *Microbacterium* sp. PNA8 的分离鉴定及其降解条件研究

沈晓莉[1,2] 王健鑫[3] 陈小龙[1*] 赵芝清[2]

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院 浙江 杭州 310032)
(2. 浙江工业大学浙西分校化学与制药工程系 浙江 衢州 324000)
(3. 浙江海洋学院海洋科学学院 浙江 舟山 316004)

摘 要: 从污泥中分离得到一株能以对硝基苯胺为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌菌株 PNA8。经过对其形态特征、生理生化特性、以及 16S rRNA 序列分析, 该菌株初步鉴定为 *Microbacterium* sp.。进一步研究表明, 菌株 PNA8 利用对硝基苯胺生长和降解的最适温度和 pH 分别是 30°C 和 7.0。培养基中添加定量酵母膏有利于菌株的生长及其对对硝基苯胺的降解。最适条件下, 在培养液中添加 0.4 g/L 酵母膏, 4 d 内 0.3 mmol/L 对硝基苯胺降解率可达 100%。

关键词: 对硝基苯胺, 生物降解, 微杆菌

Condition of *p*-nitroaniline Degrading *Microbacterium* sp. PNA8 and Its Degradation of *p*-nitroaniline

SHEN Xiao-Li[1,2] WANG Jian-Xin[3] CHEN Xiao-Long[1*] ZHAO Zhi-Qing[2]

(1. *College of Biological and Environmental Engineering*, *Zhejiang University of Technology*, *Hangzhou*, *Zhejiang* 310032, *China*)
(2. *West Branch of Zhejiang University of Technology*, *Quzhou*, *Zhejiang* 324000, *China*)
(3. *Marine Science College*, *Zhejiang Ocean University*, *Zhoushan*, *Zhejiang* 316004, *China*)

Abstract: A bacterial strain capable of utilizing *p*-nitroaniline as sole carbon source to growth was isolated from sewage sludge. This strain was identified as *Microbacterium* sp. PNA8 based on its morphology, physiological, biochemical properties and 16S rRNA sequence analysis. Results indicated that the optimal temperature and pH for cell growth and for *p*-nitroaniline degradation was 30°C and 7.0. Strain PNA8 growth and *p*-nitroaniline degradation was considerably faster in the presence of yeast extract. Optimum conditions, in the culture medium added to 0.4 g/L yeast extract, 0.3 mmol/L *p*-nitroaniline degradation rate to 100% in 4 days.

Keywords: *p*-nitroaniline, Biodegradation, *Microbacterium* sp.

对硝基苯胺(*p*-nitroaniline)是印染、橡胶、制药、塑料和油漆等行业的重要原料, 是染料工业的中间体。它可通过呼吸道、消化道而摄入体内, 使氧和血红蛋白结合变为高铁血红蛋白, 影响组织细胞供氧而造成窒息, 对人体有很强的致癌性[1]。对硝基苯胺废水毒性大, 治理困难, 国内研究较少。至今绝大

*通讯作者: Tel: 86-571-88320379; ✉: richard_chen@zjut.edu.cn
收稿日期: 2009-03-09; 接受日期: 2009-05-11

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

多数采用物理、化学法加以处理，但这些方法处理费用偏高，操作要求较为严格。因此，研究对硝基苯胺的生物降解，对于保护环境及提高人类健康具有重要意义。目前，国外就对硝基苯胺废水的生物降解报道甚少[1−7]，国内仅有杨彬等人采用混合生物法降解的研究报道[8]，采用单一菌降解对硝基苯胺的研究至今未见报道。本研究从污泥中分离到一株具有降解对硝基苯胺能力的微杆菌属(*Microbacterium* sp.)细菌菌株 PNA8，并对该菌株降解对硝基苯胺的条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源：样品采集于某化工厂污水处理池污泥。

1.1.2 培养基：LB 培养基(g/L)：酵母膏 5，蛋白胨 10，NaCl 10。基础无机盐培养基(mg/L)：KH_2PO_4 1000，$Na_2HPO_4·12H_2O$ 7000，柠檬酸铁 40，$CaCl_2·2H_2O$ 100，$MgSO_4·7H_2O$ 300，pH 7.0。对硝基苯胺作为碳源和氮源，浓度根据需要添加，固体培养基添加 2%琼脂。

1.1.3 主要试剂和仪器：对硝基苯胺购自国药集团化学试剂有限公司；高效液相色谱购自美国戴安公司，型号为 DIONEX P680，722 可见分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司。

1.2 样品的富集培养和菌种分离纯化

称取样品 5 g 加到含 0.15 mmol/L 对硝基苯胺的 50 mL 基础无机盐培养基中，添加少量酵母膏，置于 30°C，120 r/min 的恒温摇床振荡培养，每隔 10 d 取 5 mL 培养液转接至新鲜培养基，逐步提高新鲜培养基中对硝基苯胺浓度。富集培养至培养液在 2 d~3 d 内褪色，再将培养物接种至含 1.5 mmol/L 对硝基苯胺的固体培养基上划线分离，直至得到纯的单菌落。

1.3 细菌生物量和对硝基苯胺浓度的测定

取培养液于 8000 r/min 离心 15 min，上清液用于对硝基苯胺浓度的测定，方法采用高效液相色谱法[9]，沉淀以等量蒸馏水悬浮后采用分光光度法测定 OD_{600} 值。

1.4 细菌形态特征和生理生化指标测定

通过芽孢染色(革兰氏法染色)、荚膜染色、鞭毛染色，在光学显微镜下观察菌体形态、大小等特征，采用穿刺接种法观察细菌运动性。菌株常规生理生化反应参照伯杰氏细菌鉴定手册方法[10]进行。

1.5 基因组 DNA 的提取和电泳检测

基因组 DNA 的提取参照文献[11]所述方法进行，电泳检测使用 1%琼脂糖制凝胶(含 EB 0.5 μg/mL，取 10 μL 总 DNA 与 2 μL 上样缓冲液混匀后上样，用 1×TAE 电泳缓冲液，100 V 电泳 30 min~40 min。

1.6 16S rRNA 序列分析

使用大连宝生物公司的 TaKaRa 16S rRNA Bacterial Identification PCR Kit，以 Forward/Reverse Primer2 为引物进行扩增，PCR 扩增条件：94°C 5 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 5 min。采用 TaKaRa 切胶回收试剂盒回收 PCR 产物，送宝生物(大连)有限公司测序。序列用 Blast 软件在 GenBank/EMBL/DDBJ 等数据库中进行相似性分析，用 GlustalW 1.8 软件包中的邻接法(Neighbour-joining)构建系统进化树。

2 结果

2.1 菌株的富集培养和菌种的分离纯化

样品经富集培养后得到的混合培养物能在含 0.7 mmol/L 对硝基苯胺的培养基中生长，在培养过程中，培养基黄色逐渐褪去，说明该混合培养物能降解对硝基苯胺。

将上述混合培养物接种至含 1.5 mmol/L 对硝基苯胺的平板上划线分离，挑取单菌落，经过复筛、纯化得到一株能以对硝基苯胺为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌菌株 PNA8。

表 1 菌株 PNA8 的常规生理生化反应特征
Table 1 Tradition taxonomical properties of the strain PNA8

鉴定指标 Indentification index	鉴定结果 Indentification result
氧化酶试验 Oxidase test	–
接触酶试验 Catalase test	+
葡萄糖产酸 Glucose acid production	+
葡萄糖产气 Gas from Glucose	–
甲基红试验 Melthy red test	–
吲哚试验 Indole test	–
乙酰甲基甲醇试验 V-P test	–
硝酸盐还原 Nitrate reduction	–

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.2 菌株的形态学和生理生化特性

PNA8 菌株在肉汤培养基上为黄色不透明菌落，革兰氏阴性短杆菌，单个或成对排列，不形成菌丝体。大小为(0.4~0.6) μm×(1.0~2.0) μm。能滑行运动，无芽孢和荚膜。

2.3 菌株 16S rRNA 基因的克隆和系统发育分析

序列分析结果表明，菌株 PNA8 的 16S rRNA 序列全长 1401 bp，(G+C)%为 56.3%。将序列输入 Genbank，用 Blast 进行相似性搜索比较并绘制系统进化树(图 1)，共搜索出 15 个相似度大于 99%的结果。该菌株的 16S rRNA 序列已提交 GenBank，登录号为 FJ805433。结合菌株的形态和生理生化特征，菌株初步鉴定为 *Microbacterium* sp.。

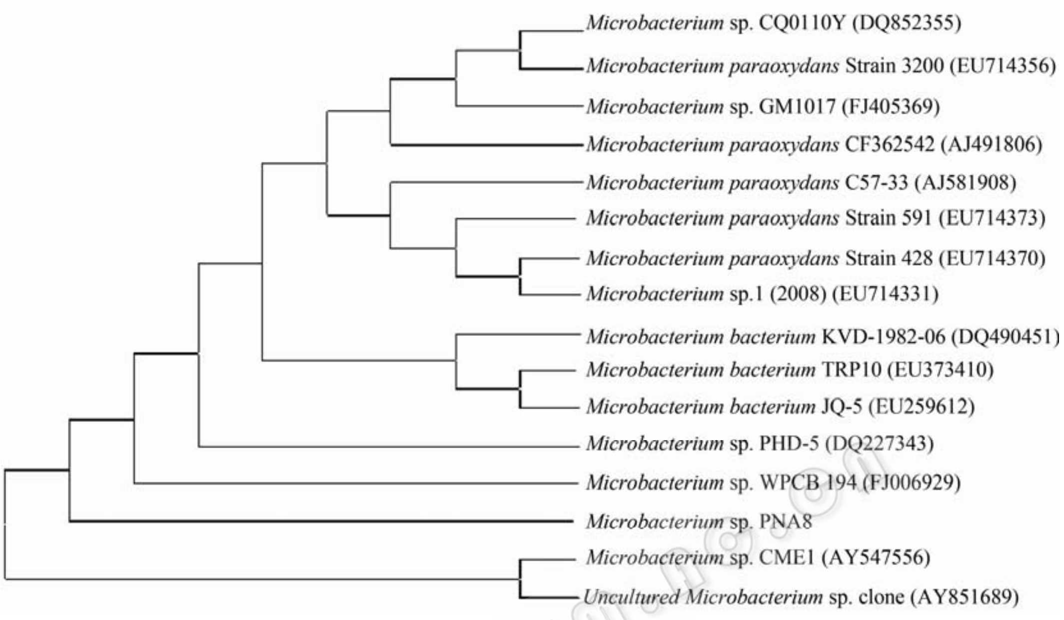

图 1　基于 **16S rRNA** 序列构建的菌株 **PNA8** 以及相关种、属的系统发育进化树

Fig. 1　The NJ evolutionary tree based on completed sequence of 16S rRNA

2.4 PNA8 菌株利用对硝基苯胺生长和对硝基苯胺的降解

先将 PNA8 菌株在 LB 培养基上培养至 OD_{600}≈0.2，再将菌液通过离心洗涤，用等体积无菌水悬浮，按 1%的接种量接种至含 0.3 mmol/L 对硝基苯胺、0.4 g/L 酵母膏的无机盐培养基中，隔 1 d 取样检测培养液中对硝基苯胺的浓度和菌株生长量。随着培养时间的延长，PNA8 菌株生长量逐渐增加，同时培养液中对硝基苯胺的浓度逐渐降低，4 d 后 PNA8 菌株能完全降解培养液中 0.3 mmol/L 对硝基苯胺，最大生物量为 0.13(图 2)。

2.5 温度和培养基初始 pH 对菌株 PNA8 生长和对硝基苯胺降解的影响

先将 PNA8 菌株在 LB 培养基上培养至 OD_{600} 约 0.2，再按 1%的接种量分别接种于初始 pH 值和培养温度不同的含 0.3 mmol/L 对硝基苯胺、0.4 g/L 酵母膏的基础无机盐培养基中，置于 120 r/min 恒温摇床振荡培养至培养液黄色褪去，测定细菌的生长和对硝基苯胺降解情况。图 3A 表明，菌株 PNA8 的细胞生长和对硝基苯胺的降解受温度变化影响显著，于 30°C 达到最佳生长水平和最高底物降解率；高于或低于此温度，细胞生长和对硝基苯胺的降解都明

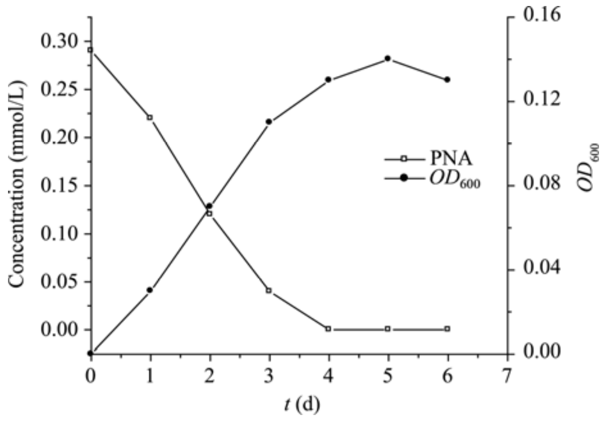

图 2　***Microbacterium*** 菌株 **PNA8** 利用对硝基苯胺生长和对硝基苯胺降解的影响

Fig. 2　Degradation of p-nitroaniline the growth of *Microbacterium* PNA8

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

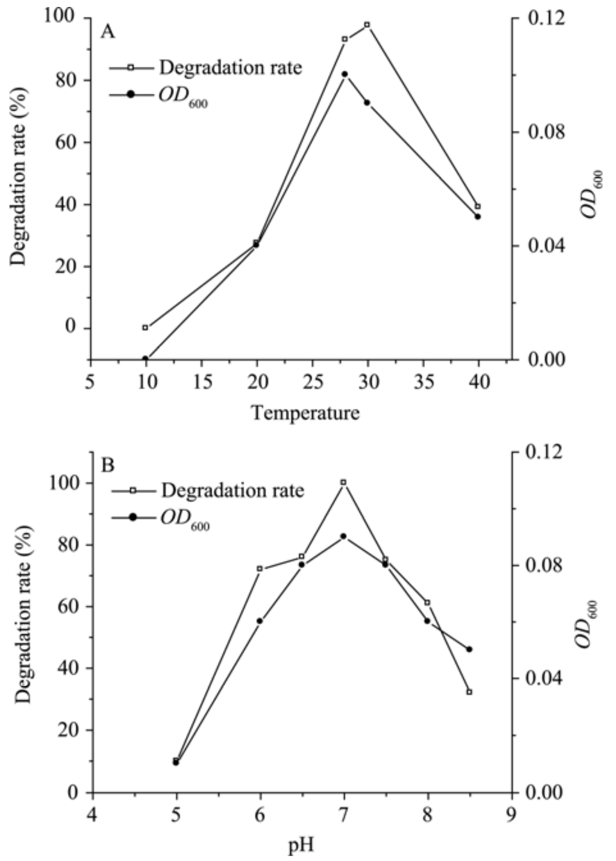

图 3 温度(A)和 pH(B)对 PNA8 菌株利用对硝基苯胺生长和对硝基苯胺降解的影响

Fig. 3 Influence of temperature (A) and pH (B) on the growth of *Microbacterium* PNA8 and degradation of *p*-nitroaniline

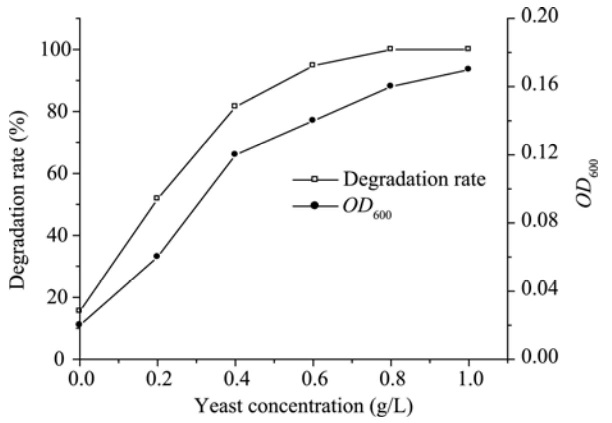

图 4 酵母膏浓度对 PNA8 菌株利用对硝基苯胺生长和对硝基苯胺降解的影响

Fig. 4 Influence of yeast concentration on the growth of *Microbacterium* PNA8 and degradation of *p*-nitroaniline

显下降。图 3(B)表明, 菌株 PNA8 生长和对底物的降解随 pH 值变化一致, pH 7.0 是细胞生长和对硝基苯胺降解的最佳 pH。

2.6 酵母膏浓度对菌株 PNA8 生长和对硝基苯胺降解的影响

先将 PNA8 菌株在 LB 培养基上培养至 OD_{600} 约 0.2, 再按 1%的接种量分别接种于含 0.3 mmol/L 对硝基苯胺, 酵母膏浓度不同的无机盐培养基中, 置于 30°C、120 r/min 恒温摇床振荡培养 4 d, 测定细菌的生长和对硝基苯胺降解情况。图 4 表明, 若培养基中未添加酵母膏, 4 d 内对硝基苯胺的降解率仅为 18%, 菌株生长情况欠佳; 若培养基添加酵母膏, 菌株生长量与之成正比增加; 当酵母膏添加量大于 0.6 g/L, 0.3 mmol/L 对硝基苯胺可被完全降解。在含对硝基苯胺的基础无机盐培养基中添加定量酵母膏可以极大的促进菌株对对硝基苯胺的降解。

3 讨论

1) 从污泥中分离到一株能以对硝基苯胺作为唯一碳源、氮源和能源生长的细菌菌株 PNA8, 初步鉴定为 *Microbacterium* sp.。该菌株具有降解对硝基苯胺的能力。王云端等人曾从自然土壤中分离到一株 *Microbacterium* sp.菌株 PHD-5, 能以苯酚作为唯一碳源生长[12]。说明微杆菌属营养要求复杂, 且具有降解苯环类有机物的能力。

2) PNA8 菌株降解对硝基苯胺的最佳温度和 pH 分别是 30°C 和 7.0。在此条件下, 该菌 4 d 后可完全降解 0.3 mmol/L 对硝基苯胺。Zeyer 等人曾在纯培养条件下, 分离到一株假单胞菌 *Pseudomonas* sp. strain P6, 该菌在 pH 7.0、28°C 条件下, 8 d 后 1.5 mmol/L 对硝基苯胺降解率达 73%[4]; Khalid 等人从活性污泥中筛选到 3 株对硝基苯胺降解菌 *Acinetobacter* sp., *Citrobacter freundii* 及 *Klebsiella oxytoca*, 经过好氧混合培养, 72 h 内可降解 100 μmol/L 对硝基苯胺[6]。可见, 自然界中存在多种具有降解对硝基苯胺能力的微生物。

3) PNA8 菌株在以对硝基苯胺作为唯一碳源和氮源的培养液中生长, 生长速度缓慢, 同时对对硝基苯胺的降解效率低, 若在初始培养液中添加少量酵母膏可促进细菌的生长及底物的降解。任华峰等人筛选出一株降解对氯苯胺的菌株 *Diaphorobacter* sp. PCA039, 经过实验发现, 在 MSB 培养基中添加酵母粉同样可以极大的促进菌株对对氯苯胺的降解[13]。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

单一菌降解对硝基苯胺废水, 无论从降解浓度、时间、还是降解效率来看, 都还存在很大的发展空间, 筛选出更多的具有降解对硝基苯胺能力的菌株, 提高菌株的降解能力、研究降解机理是今后研究的方向。

参 考 文 献

[1] Adrian S. Hight rate biodegradation of 3-and 4-nitroaniline. *Fraunhofer Management*, 1999, **39**(13): 2325–2346.

[2] Udod VM. Use of *p*-nitroaniline as a carbon and nitrogen source by microorganisms of the genus Canida. *Nauchnye Osnory Tekhnologii obrabotki Vody*, 1975, **2**: 145–147.

[3] Udod VM. Degradation of *p*-nitroaniline under continuous cultivation conditions by a microorganism mixture. *Nauchnye Osnovy Tekhnologii Obrabotki Vody*, 1975, **2**: 151–152.

[4] Zeyer J, Kearney PC. Microbial Metabolism of 14C-Nitroanilines to 14C-Carbon Dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983, **31**(2): 304–308.

[5] Janeczko A. Intermediate products from biochemical degradation of *p*-nitroaniline. *Inz Plynow Nienewtonow sckich*, 1985, **1**: 265–276.

[6] Khalid A, Arshad M, Crowley DE. Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater. *Water Research*, 2009, **43**(4): 1110–1116.

[7] Qureshi A, Verma V, Kapley A. Degradation of 4-nitroaniline by *Stenotrophomonas* strain HPC 135. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, **60**(4): 215–218.

[8] 杨 彬, 雷乐成. 混合培养微生物好氧降解对硝基苯胺的特性研究. 环境工程, 2003, **21**(3): 73–75.

[9] 徐水平, 姜 焕. 高效液相色谱法测定水中对硝基苯胺. 中国环境监测, 2003, **19**(3): 14–16.

[10] RE 布坎南, NE 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.729–737.

[11] 徐 平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, **30**(4): 82–84.

[12] 王云端, 董小军, 王 茜, 等. 自然土壤中苯酚降解菌的分离和系统发育分析. 环境科学, 2007, **28**(3): 623–626.

[13] 任华峰. 一株对氯苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性研究. 东北农业大学硕士学位论文, 2004.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，原“高等院校教学”，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名师名课”版块，原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn