

假单胞菌 ZWL73 降解 4-氯硝基苯的代谢途径研究

镇 达^{1,2} 陈茂彬^{1*}

(1. 湖北工业大学生物工程学院 武汉 430068)

(2. 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要: 氯代硝基芳香烃是一类环境中难以降解的有毒污染物。一株高效分解 4-氯硝基苯的假单胞菌分离于 4-氯硝基苯污染土壤, 可以完全降解 4-氯硝基苯, 并以之为 C 源、N 源生长。为阐明其降解 4-氯硝基苯的代谢途径, 通过对以底物生长的降解菌的酶学分析, 检测到其还原降解的两个关键酶即初始酶硝基还原酶和苯环开环酶 2-氨基-5-氯酚 1, 6-双加氧酶的活性; 结合其它检测如培养液中降解产物分析、相关底物生长实验结果, 确定了其降解途径是通过部分还原途径。

关键词: 4-氯硝基苯, 生物降解, 部分还原途径, 硝基还原酶, 2-氨基 5-氯酚 1, 6-双加氧酶

Identification of Metabolic Pathways of 4-Chloronitrobenzene Degradation by *Pseudomonas* Strain ZWL73

ZHEN Da^{1,2} CHEN Mao-Bin^{1*}

(1. College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068)

(2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Abstract: Chloro- and nitro- substituted aromatics are toxic and persistent in the environment. *Pseudomonas putida* ZWL73, isolated from 4-chloronitrobenzene (4CNB) polluted soil, can grow on 4CNB as carbon and nitrogen sources. Enzymatic analyses were carried out in order to illuminate the degradation pathway. Two key enzymatic activities were found to be involved in the degradation: the nitroreductase activity that catalyzing the first step and the ring-cleavage dioxygenase activity leading the substrate to be mineralized. The degradation was therefore decided to process through a partial reductive pathway together with the proofs of the results of degradation intermediates test and growth substrate test.

Keywords: 4-chloronitrobenzene, Biodegradation, Partial reductive pathway, Nitroreductase, 2-amino 5-chlorophenol 1,6-dioxygenase

氯代及硝基芳香烃是一类环境中难以降解的有毒污染物, 对这类污染物的生物降解研究受到广泛关注, 从 20 世纪 80 年代开始有大量关于硝基和氯代芳香烃污染物生物降解的研究, 显示了微生物降解途径的多样性^[1]。由于氯和硝基的同时取代使氯

代硝基芳香烃芳环的不易于活化, 导致比单取代芳香烃更难以降解。尽管如此, 近年来国内外陆续分离到降解氯代硝基芳香烃的菌株, 其中分别属于 *Ralstonia*、*Comamonas* 的 3 株菌的降解机理得到深入研究^[2-6], 但是有关降解机理和特性的研究仍然

很少, 相对于单取代芳香烃, 对这类污染物的生物降解机理的了解还很全面。

这株高效降解菌株由本实验室分离于武汉一个化工厂的氯代硝基苯(4CNB)污染的土壤中。菌体呈杆状, 革兰氏阴性。通过 16S rRNA 基因分析鉴定为 *Pseudomonas putida*^[7,8]。与前人分离到的菌株相比属于不同的属, 命名为 ZWL73。ZWL73 菌株可以以 4CNB 为唯一的 C、N 源生长, 4CNB 培养的菌体能够快速转化加入的 4CNB 同时释放接近等量的氯离子和铵离子。通过 GC-MS 对培养液的分析检测到 4-氯亚硝基苯的存在(未发表), 这对推测 4CNB 的降解途径提供了一定的证据。ZWL73 菌还利用邻氨基酚(2AP), 2-氨基-5-氯酚(2A5CP) 和硝基苯(NB)为 C、N 源生长, 而不能利用 4-氯苯胺(4-chloroaniline), 苯胺(aniline)等生长^[7]。

为了更深入地研究 *Pseudomonas putida* ZWL73 菌株利用 4CNB 生长的降解代谢途径及进一步克隆相关基因, 我们对代谢途径的初始代谢及开环途径进行了详细的酶学分析, 为以后的研究提供了有利条件。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养方法

Pseudomonas putida ZWL73, 4CNB 完全降解菌。平板培养: ZWL73 菌培养在无机盐培养基上, 30℃, 培养皿盖子上放置适量可挥发性底物如 4CNB 粉末。培养好的平板可作短期保存之用, 亦可用于进一步的液体培养。液体培养前, 4CNB 溶于无机盐培养液(终浓度 1 mmol/L), 经 0.22 μm 滤膜无菌过滤后接种, 在 30℃、250 r/min 下摇动培养。

无机盐培养基: 每升含 Na₂HPO₄·12H₂O 14.3 g, KH₂PO₄ 3 g, MnSO₄·H₂O 0.28 mg, FeSO₄·7H₂O 0.3 mg, MgSO₄·7H₂O 0.06 mg, CaCl₂ 1 mg, CuSO₄ 0.05 mg, ZnSO₄ 0.05 mg 和 H₃BO₃ 0.05 mg。用 NaOH 调 pH 7.0, 高压蒸汽灭菌(1×10⁵ Pa) 20 min 后备用。固体培养需要添加 1.5% 的琼脂粉。

1.2 试剂

4-氯硝基苯(4-chloronitrobenzene), 分析纯(上海精化科技研究所); 2-氨基-5-氯酚(2-amino-5-chlorophenol), 分析纯(Aldrich); 还原型辅酶(NADPH) (Sigma)。

1.3 降解菌细胞提取物(粗酶)的制备^[9,10]

含有 4CNB 的 100 mL 液体无机盐培养基接种培养 ZWL73 菌, 从培养 24 h 后的菌液(*OD*₆₀₀=0.8)离心 8000 r/min、5 min 回收菌体, 用等量的冰冷的 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0, 简称 PBS)将菌体清洗 2 次, 再用冰冷 5 mL 缓冲液悬浮菌体, 超声波破碎(Vibra cell, VC750, 功率 270W), 总时间为 4 min(每破碎 5 s, 停 9 s), 将所得的破碎液在 4℃、15000 r/min 离心 30 min, 取上清即为粗酶, 放置冰上备用。蛋白浓度测定使用碧云天蛋白浓度测定试剂盒, 采用 Bradford 的方法^[11]。

1.4 硝基还原酶活性测定^[12]

用分光光度法检测(双光束紫外可见分光光度计 Lambda 25, Perkin Elmer), 反应在 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 30℃ 下进行。1 mL 反应体系中含有 0.035 mg 粗酶蛋白及 200 μmol/L NADPH, 在样品杯中加入 0.1 mmol/L 4CNB 时反应开始(即对照杯中仅含相同浓度的酶、NADPH、缓冲液); 测定 340 nm 处辅酶 NADPH 特征吸收值的减小。NADPH 的摩尔消光系数 *E*₃₄₀ 为 6220/mol·cm, 一个单位(U)的酶活定义为每分钟 1 μmol 底物/辅酶消失或产物生成的酶量, 比活力表示为每毫克蛋白的酶活。

1.5 2A5CP 间位开环酶活性测定^[13]

用分光光度法测定, 1 mL 的 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)体系中含有 0.3 mg 酶蛋白, 样品杯中加入 125 μmol/L 2A5CP, 室温下测定产物 2-氨基-5-氯粘康酸半醛的 395 nm 特征吸收峰的上升, 摩尔消光系数 *E*₃₉₅: 21000/mol·cm。

2 结果与分析

2.1 ZWL73 菌的硝基还原酶活性及其与 4CNB 代谢的关系

在含底物的无机盐培养基上生长的 ZWL73 菌体, 经破碎后得到粗酶液。根据 Park 和 Kim 的方法^[12], 在室温下 1 mL 10 mmol/L pH 7.0 的磷酸钾缓冲液体系中, 含有 0.035 mg 蛋白和 200 μmol/L NADPH, 在样品杯中加入 0.1 mmol/L 4CNB 时反应开始, 在 280 nm–370 nm 范围内, 每 2 min 扫描一次如图 1。其中底物 4CNB 在 283 nm 的吸收峰 26 min 后下降到接近 0, 而 NADPH 在 340 nm 的吸收峰 22 min 时下降到 -1.1 左右, 然后开始上升, 这是因

为样品杯的NADPH被不断消耗至底物消耗完毕,随着对照杯中的NADPH的自然氧化,对照杯与样品杯的NADPH浓度差距减小。根据前 2 min 内 OD_{340} 的变化计算粗酶液活性为 0.37 U/mg。当没有底物 4CNB 加入反应体系时,则没有NADPH的吸收峰的变化,可见NADPH的氧化与 4CNB 的转化是直接相关的。ZWL73 菌的硝基还原酶活性的测出,对于确定 4CNB 的降解途径具有重要意义。

除了根据NADPH与 4CNB 的转化的直接相关的证据外,我们从培养液中检测到了大量铵离子生成(见引言),说明 4CNB 的降解是通过还原途径。另一个证据是通过GC-MS检测到对氯亚硝基苯存在于培养液中,这相似于硝基苯的部分还原:硝基还原酶还原硝基苯的第一步反应的产物是亚硝基苯,亚硝基苯进一步还原为羟氨基苯并通过变位酶作用生成 2-氨基酚^[14]。

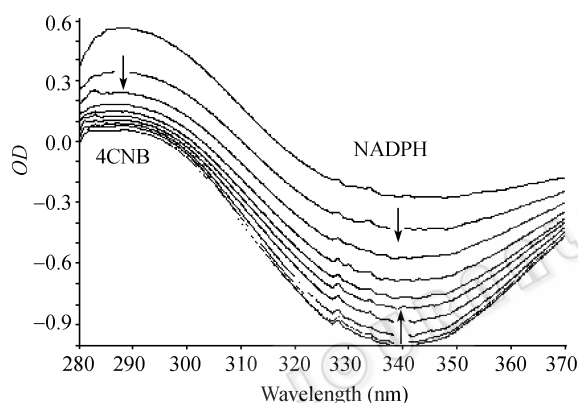


图1 ZWL73 菌粗酶液对 4CNB 的硝基还原酶活性

Fig.1 Nitroreductase activity towards 4CNB in cell extract of ZWL73

以 4CNB 为底物生长的 ZWL73 菌的粗酶液对 4CNB 的硝基还原酶活性的测定, 283 nm 处是底物 4CNB 的吸收峰, 340 nm 处是 NADPH 的吸收峰, 随着 4CNB 被转化, NADPH 被不断消耗, 直到底物消耗完毕, NADPH 不再减少。当对照杯的 NADPH 浓度由于自然氧化减少时, 样品杯的 NADPH 的相对浓度上升, 导致 OD_{340} 的吸收值开始上升。

The cell extracts was prepared from ZWL73 cells grown on 4CNB. The spectra indicated 4CNB absorbance at 283 nm, NADPH at 340 nm. With the transformation of 4CNB, NADPH was consumed until the substrate was used up. When the amount of NADPH decreased in the control for the reason of natural oxidation by oxygen, the relative amount of NADPH in the sample cup increased, causing OD_{340} to rise.

这样可以确定 ZWL73 菌降解 4CNB 的初始代谢是经过还原途径; 同时结合降解菌的代谢过程如释放铵离子的特性, 可以排除芳香环加氢还原的可能(以没有硝酸根离子浓度上升为依据)。因此有必要

对第一种还原方式进行仔细分析。硝基还原酶为特征的初始还原反应中, 有完全还原和部分还原两种可能。在以硝基苯为代表的部分还原方式中, 硝基苯的部分还原产物经过变位酶作用形成邻氨基酚的中间产物, 然后通过开环进一步降解; 而关于硝基在在有氧条件下完全还原的例子还很少, 还不能确定有这样的途径的普遍存在^[1,15]。ZWL73 菌不可能是完全还原途径的另一个证据是氯代苯胺(可能的完全还原产物)不能作为经 4CNB 诱导的 ZWL73 细胞生长的底物(见前言)。所以推测经过部分还原途径的可能性很大。根据 Katsivela 等对 LW1 菌降解 4CNB 的推测途径^[2], 开环底物是否是 2-氨基-5-氯酚 (2A5CP) 是确定降解途径的关键。

2.2 ZWL73 菌对 2A5CP 的活性及与 4CNB 代谢的关系

我们通过检测 ZWL73 菌对化学合成的 2A5CP 及其结构类似物邻氨基酚 (2AP) 的活性为确定 2A5CP 是 ZWL73 菌的部分降解途径的开环中间产物提供有利证据。

粗酶液在 20 mmol/L pH8.0 磷酸钾缓冲液, 1 mL 体系含 0.3 mg 蛋白, 样品杯中加入 125 μ mol/L 2A5CP 时反应开始。一个黄色的中间产物很快出现并在数分钟内消失。用紫外可见分光光度计每分钟扫描一次见图 2; 底物吸收峰 293 nm 在 6 min 内下降到 0, 而 395 nm 产物吸收峰由低到高上升到 1.7, 从 2 min 后开始下降到 0.1 左右; 在第 1 次扫描时, 产物吸收峰已经达到 0.8 左右, 说明反应速度很快。同时在 272 nm 处的吸收峰在 8 min 内一直上升到 1.0 左右。通过计算第 1 个 1 min 内的开环产物生成速度, 得到酶液的比活为 0.144 U/mg。

已经报道的唯一完全降解 4CNB 的菌株是从毛单胞菌科 (Comamonadaceae) LW1 菌株。Katsivela 等用 4CNB 生长的细胞在厌氧条件下转化 4CNB, 将获得的中间产物用 ^1H 及 ^{13}C NMR 和 GC-MS 分析, 鉴定了开环底物为 2-氨基-5-氯酚 (2A5CP), 并通过紫外分光光度法测定了 LW1 细胞及粗酶液对 4CNB 及 2A5CP 的活性及发表了催化过程的吸收曲线图^[2]。中间产物的获得是基于开环双加氧酶需要 O_2 的原理, 当严格缺氧时开环双加氧酶的底物积累。对 ZWL73 菌降解途径来说, 这是一个重要的参考依据。

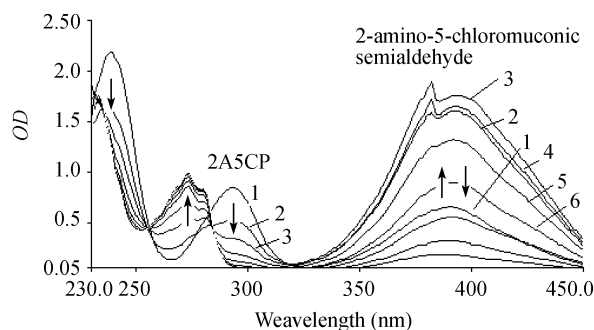


图2 ZWL73 菌粗酶液对 2A5CP 的有氧转化

Fig.2 Oxidative transformation of 2A5CP by cell extract of ZWL73

以 4CNB 为底物生长的 ZWL73 菌粗酶液对 2A5CP 的有氧转化在室温下进行, 20 mmol/L pH8.0 磷酸钾缓冲液中, 在 395 nm 有开环产物生成继而减少, 而 272 nm 处有自发的产物 5-氯吡啶甲酸生成, 1-6 分别指示 0 min-5 min 的扫描曲线, 箭头表示特定波长吸收值的变化趋势。Oxidative transformation of 2A5CP was carried out at room temperature with cell extracts of ZWL73 previously grown on 4CNB. In the phosphate buffer of 20 mmol/L (pH8.0), ring-cleavage product (395 nm) increased first and then decreased, spontaneous product appeared at 272 nm. The reaction mixture was scanned at the intervals of 1 min (spectra 1 to 6), arrows indicate the direction of spectral changes.

相比而言, ZWL73 粗酶液对 2A5CP 的有氧转化过程与 LW1 菌株的过程完全一致。伴随 2A5CP 的吸收峰不断下降, 在 272 nm 处的吸收峰上升, 表示有新的物质生成。272 nm 吸收的产物被鉴定为不稳定的开环产物自发形成的 5-氯吡啶甲酸^[2]。这也与 2AP 1, 6-双加氧酶(2APDO)催化 2AP 的反应非常相

似。Lendenmann 和 Spain 对 2AP 的开环产物形成的非酶催化生成的物质进行了仔细分析: 通过与标准品比较包括 HPLC、UV 光谱、GC-MS 等分析, 证明由 2APDO 催化 4 种 2AP 结构类似物开环能生成相应的吡啶甲酸化合物。一方面说明以 2AP 为底物的开环方式是间位开环, 另一方面说明了这个产物是自发生成的, 而不是降解代谢途径中的一个中间产物, 因为吡啶甲酸化合物不被粗酶液继续转化, 也不能被降解菌利用生长^[13]。这也证明了 ZWL73 菌的 2A5CP 双加氧酶同样为间位开环方式。

2.3 ZWL73 菌降解 4CNB 的部分还原途径

通过硝基还原酶活性的检测分析和 GC-MS 分析检测到 4-氯亚硝基苯存在于降解过程中, 可以确定 4CNB 的降解经过还原途径, 并以 4-氯苯胺(即完全还原的中间产物)不能作为降解菌的生长底物的证据, 说明 4CNB 的降解可能是经过部分还原途径, 即由 4-氯亚硝基苯还原为 4-氯羟氨基苯, 而后者经变位酶作用生成 2A5CP。邻氨基酚化合物是硝基苯部分还原途径的开环中间产物, 在 4CNB 生长的 ZWL73 菌的粗酶中检测到 2A5CP 间位开环双加氧酶活性。因此我们确定 4CNB 的降解经过了 2A5CP 作为中间产物。图 3 是推测的 ZWL73 菌降解 4CNB 的部分还原途径。

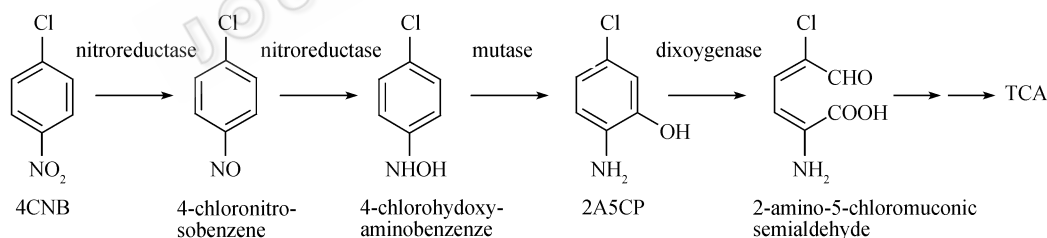


图3 ZWL73 菌降解 4CNB 推测的部分还原降解途径

Fig.3 Proposed partial reductive pathway of 4CNB degradation by ZWL73

参考 *Comamonas* 菌株 LW1 的 4CNB 降解途径^[2] 及 *P. pseudoalcaligenes* JS45 降解硝基苯的途径^[13]。

Referenced by the 4CNB degradation pathway of *Comamonas* strain LW1 and the nitrobenzene degradation pathway of *P.pseudoalcaligenes* JS45.

3 讨论

芳香烃化合物的生物降解取决于两个主要环节即芳香环的活化和开环。根据已有的了解, 有氧条件下, 硝基和氯代芳香烃的芳环的活化主要通过开环前的羟化作用; 对不同的底物羟化作用的类型也有不同, 对低程度取代的芳香烃, 当硝基和氯取代

基同时存在时首先作用于硝基^[3,16]。通常芳香环脱硝基有氧化和还原两种方式: 氧化方式分为双加氧和单加氧两种, 均需要氧气分子和 NAD(P)H, 释放亚硝酸根离子; 而还原方式也分两种: 一种是需要 NAD(P)H 的硝基还原酶的还原, 还原硝基为氨基, 最终以多种方式脱除氨基, 释放铵离子; 另一种是芳香环加氢还原, 硝基以亚硝酸的方式脱落, 这个

过程同样需要NADPH作为辅酶, 这个方式通常出现在二硝基或者多硝基芳香烃降解中^[1]。对于 *Pseudomonas putida* ZWL73 菌对 4CNB 的降解, 通过酶学特性和其它证据初步鉴定为部分还原途径, 这也得到其它试验结果的支持, 即没有检测到底物培养的菌体破碎液中存在明显的双加氧酶或单加氧酶活性。

根据相关研究文献, 前述两个降解 4CNB 的菌株 *Comamonas* LW1、CNB-1 的 4CNB 降解途径是通过部分还原途径, 加上 *Ralstonia eutropha* JMP134 菌降解 2-氯 5-硝基酚(2-chloro-5-nitrophenol)也是通过部分还原途径; 目前仅有得到阐明的 4 个菌株来源于 3 个不同属, 它们具有相同的降解类型, 可能在土壤环境中基因的水平转移导致了相同降解类型(基因)的传播^[17]。Nishino 和 Spain 还观察到降解硝基苯的 155 株菌中, 只有 1 株是通过氧化脱硝基作用, 而 154 株都是部分还原途径。可见氯代硝基苯和硝基苯的有氧条件下的生物降解中部分还原途径占明显优势^[9,18]。另外, 我们也检测到 ZWL73 的粗酶液具有对硝基苯的硝基还原酶活性和对 2AP 的开环酶活性, 说明 4CNB 降解途径的两个关键酶对硝基苯及其部分还原降解中间产物也具有活性, 这解释了 ZWL73 能够利用硝基苯生长的原因。尽管如此, ZWL73 菌降解 4CNB 的降解途径还需通过进一步的基因克隆和功能分析进行验证。

致 谢: 本研究是在中国科学院武汉病毒研究所周宁一研究员实验室完成的, 菌株分离及有关背景研究主要由刘虹和王淑君老师等完成, 在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Ye J, Singh A, Ward OP. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World J Microbiol Biotech*, 2004, **20**: 117-135.
- [2] Katsivela E, Wray V, Pieper DH, *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.
- [3] Schenzle A, Lenke H, Spain JC, *et al.* Chemoselective nitro group reduction and reductive dechlorination initiate degradation of 2-chloro-5-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP134. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6): 2317-2323.
- [4] 吴建峰, 沈锡辉, 周宇光, 等. 一株降解对氯硝基苯的 *Comamonas* sp. CNB1 的分离鉴定及其降解特性. *微生物学报*, 2004, **44**(1): 8-11.
- [5] 李 宁, 陈井影, 李 莉, 等. 五氯硝基苯降解菌株的分离筛选及应用效果. *吉林农业大学学报*, 2005, **27**(2): 205-208.
- [6] 赵晓松, 李 宁, 王玉军. 五氯硝基苯降解菌的降解效能及影响因素研究. *农业环境科学学报*, 2006, **125**(6): 1664-1648.
- [7] 赵 非, 刘 虹, 王淑君, 等. *Pseudomonas* sp. ZWL73 对 4-氯硝基苯及多种芳香烃化合物的趋化性. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, **30**(6): 624-627.
- [8] Zhen D, Liu H, Wang SJ, *et al.* Plasmid-mediated degradation of 4-chloronitrobenzene by newly isolated *Pseudomonas putida* strain ZWL73. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**(4): 797-803.
- [9] Nishino SF, Spain JC. Degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 2520-2525.
- [10] Takenaka S, Murakami S, Shinke R, *et al.* Metabolism of 2-aminophenol by *Pseudomonas* sp. AP-3: modified meta-cleavage pathway. *Arch Microbiol*, 1998, **170**: 132-137.
- [11] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [12] Park HS, Kim HS. Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J Bacteriol*, 2000, **182**(3): 573-580.
- [13] Lendenmann U, Spain JC. 2-Aminophenol 1,6-dioxygenase: a novel aromatic ring-cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J Bacteriol*, 1996, **178**: 6227-6232.
- [14] Somerville CC, Nishino SF, Spain JC. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J Bacteriol*, 1995, **177**(13): 3837-3842.
- [15] Chauhan A, Jain RK. Degradation of *o*-nitrobenzoate via anthranilic acid (*o*-aminobenzoate) by *Arthrobacter protophormiae*: a plasmid-encoded new pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **267**: 236-244.
- [16] Wu JF, Sun CW, Jiang CY, *et al.* A novel 2-aminophenol 1,6-dioxygenase involved in the degradation of *p*-chloro-nitrobenzene by *Comamonas* strain CNB-1: purification, properties, genetic cloning and expression in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 2005, **183**: 1-8.
- [17] Top EM, Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**: 262-269.
- [18] Nishino SF, Spain JC. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(6): 2308-2313.