



研究报告

盐胁迫条件下古菌超氧化物歧化酶增强细菌降解硝基酚

刘娟¹ 翁国永^{2,3} 冯莉¹ 许楹^{*1} 周宁一¹

1 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

2 浙江省城市供水水质监测网台州监测站 浙江 台州 318020

3 浙江黄岩自来水公司 浙江 台州 318020

摘要:【背景】*Burkholderia* sp. SJ98 利用对硝基酚和 2-氯-4-硝基酚为唯一碳源和能源进行生长, 通过异源表达嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227 中的超氧化物歧化酶 SodA, 使菌株 SJ98 在 500 mmol/L NaCl 条件下仍具有降解对硝基酚的能力。然而该重组细菌在普通和高盐条件下其降解基因的转录和降解酶比活力的高低, 以及该菌在高盐条件下是否还能降解对硝基酚衍生物尚未知晓。【目的】研究 *Burkholderia* sp. SJ98 的耐盐上限, 观察含有 *sodA* 的细菌 SJ98 在普通和高盐条件下降解对硝基酚和 2-氯-4-硝基酚的能力, 检测重组菌中 *pnpA* 基因的转录和硝基酚单加氧酶的活力。【方法】在添加葡萄糖、对硝基酚或 2-氯-4-硝基酚的无机盐培养基(分别含 400–800 mmol/L NaCl)或 M9 培养基(含 0 和 500 mmol/L NaCl)中培养细菌 SJ98 及其重组菌。通过紫外分光光度计和高效液相色谱法检测菌株生长和底物降解。通过实时荧光定量 PCR 分别以两种硝基酚为诱导物, 检测未添加和添加 500 mmol/L NaCl 时, 硝基酚单加氧酶编码基因 *pnpA* 的转录量变化。利用紫外分光光度计分别以两种硝基酚为底物, 检测在添加 500 mmol/L NaCl 时, 重组菌和空载体菌的粗酶液中硝基酚单加氧酶对两种底物的活力变化。【结果】野生型菌株 SJ98 以葡萄糖为碳源生长的 NaCl 耐受浓度是 600 mmol/L。未添加 NaCl 时, 重组菌 SJ98[pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp*]生长和降解对硝基酚的能力远优于野生菌。添加 500 mmol/L NaCl 时, 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]仍保持了利用 2-氯-4-硝基苯酚底物生长和降解该底物的能力, 而空载体菌 SJ98[pBBR1MCS-2]的生长和降解能力完全丧失; 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]粗酶液中单加氧酶对于对硝基酚和 2-氯-4-硝基酚的活力均约为野生菌的 1/3。分别以两种硝基酚为诱导物时, 无论是否添加 NaCl, 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]中硝基酚单加氧酶编码基因 *pnpA* 的转录量比野生型中高出约 17–25 倍; 但添加 500 mmol/L NaCl 时, *pnpA* 的转录均受到部分抑制。【结论】本研究为利用古菌超氧化物歧化酶对细菌进行改造以提高普通环境和高盐环境中细菌降解硝基芳烃污染物能力的应用提供了潜在的可行性。

关键词: 超氧化物歧化酶, *Burkholderia* sp. SJ98, 耐盐, 对硝基酚, 2-氯-4-硝基酚

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

Received: 23-02-2020; **Accepted:** 27-04-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200)

***通信作者:** Tel: 021-34208261; E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-23; **接受日期:** 2020-04-27; **网络首发日期:** 2020-05-21

Archaeal superoxide dismutase enhances bacterial degradation of nitrophenols under salt stress

LIU Juan¹ WENG Guo-Yong^{2,3} FENG Li¹ XU Ying^{*1} ZHOU Ning-Yi¹

¹ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² Taizhou Monitoring Station of Urban Water Quality Monitoring Network of Zhejiang Province, Taizhou, Zhejiang 318020, China

³ Zhejiang Huangyan District Water Supply Company, Taizhou, Zhejiang 318020, China

Abstract: [Background] *Burkholderia* sp. SJ98 utilizes *para*-nitrophenol or 2-chloro-4-nitrophenol as the sole carbon and energy source for its growth. The superoxide dismutase SodA from *Haloferax* sp. D1227 endows strain SJ98 with the ability to degrade *para*-nitrophenol with 500 mmol/L NaCl. However, it is unknown whether strain SJ98 containing *sodA* can degrade *para*-nitrophenol derivatives under conditions with high salt concentration. [Objective] We are aiming to study the salt tolerance of strain SJ98, and the degradation of *para*-nitrophenol and 2-chloro-4-nitrophenol by strain SJ98 containing *sodA* under normal and high salt concentrations. We also hope to detect the transcriptions of *pnpA* and the activities of the nitrophenols monooxygenase in the recombinants of strain SJ98. [Methods] Strain SJ98 and its recombinants were cultured in minimal medium (containing 400 to 800 mmol/L NaCl) or M9 medium (containing 0 and 500 mmol/L NaCl, respectively) supplemented with glucose, *para*-nitrophenol or 2-chloro-4-nitrophenol, respectively. The strains growth and substrates degradation were detected by UV spectrophotometer and high-performance liquid chromatography, respectively. The transcriptions of *pnpA* (nitrophenol monooxygenases encoding gene) induced by two nitrophenols were detected by quantitative real-time PCR. The activities of nitrophenols monooxygenase in the crude enzyme solutions were detected by UV spectrophotometer using two above substrates. [Results] The NaCl tolerance concentration of strain SJ98 was 600 mmol/L with glucose as the carbon source. The growth and *para*-nitrophenol degradation by strain SJ98[pCM-*pnpR*-P*pnpA*-*sodA*-*rfp*] were much better than those by the wild-type strain. With 500 mmol/L NaCl, strain SJ98[pBBR-*sodA*] still maintained the ability of degrading and growing on 2-chloro-4-nitrophenol, while strain SJ98[pBBR1MCS-2] completely lost these abilities; the activities of the nitrophenols monooxygenase against two above substrates in the crude enzyme solutions of strain SJ98[pBBR-*sodA*] were both about 1/3 of those in the wild strain. When two nitrophenols were used as inducers, the transcriptions of *pnpA* in strain SJ98[pBBR-*sodA*] were about 17–25 times higher than those in the wild-type strain, regardless of the presence of NaCl. However, when 500 mmol/L NaCl was added, the transcriptions of *pnpA* were partially inhibited. [Conclusion] This study provides a potential possibility for the application of superoxide dismutase from archaea to improve the ability of nitroaromatics degradation under normal and high salt concentrations by bacteria.

Keywords: Superoxide dismutase, *Burkholderia* sp. SJ98, Salt tolerance, *para*-nitrophenol, 2-chloro-4-nitrophenol

随着现代工业的飞速发展,大量的工业废水也随之产生。医药、农药、染料等行业需要硝基酚等芳香类化合物作为生产原料^[1-2],因此这些生产企业所排放的工业废水往往含有大量难降解的有机污染物,同时伴随有高盐和高化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)的特点,给自然

环境带来了巨大的危害。高盐废水是指总含盐质量分数至少为1% (约170 mmol/L)的废水^[3]。含盐废水的产生途径广泛,废水量也逐年增加。去除含盐废水中的有机污染物从而避免对环境造成的影响至关重要。采用物理、化学方法处理高盐废水存在投资大、成本昂贵、容易造成二次污染以及

难以得到预期效果等问题而不能广泛采用, 因此采用生物法处理高盐废水一直是国内外研究的热点。虽然目前已有许多利用微生物降解有机污染物研究报道^[4-7], 但是由于高浓度盐对微生物的抑制作用, 盐胁迫环境中利用微生物降解有机污染物仍具有一定的难度, 特别是高盐环境中微生物降解氯代硝基芳烃尚无研究报道。

对硝基酚(*para*-nitrophenol, PNP)和 2-氯-4-硝基酚(2-chloro-4-nitrophenol, 2C4NP)都是硝基芳烃化合物, 被广泛应用于工业和农业的生产中。但此两种物质对许多活的有机体有毒, 可能在食物链中积累, 且一直存在很难被降解, 特别是 PNP 被美国环境保护署(U.S. Environmental Protection Agency)列为“优先污染物”。*Burkholderia* sp. SJ98 可以利用 PNP 和 2C4NP 作为唯一的碳源和能源进行生长^[8-9], 其降解 PNP 和 2C4NP 的代谢途径也已被阐明^[10-13]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC:1.15.1.1)具有特殊的生理活性, 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质, 是生物体内重要的抗氧化酶。目前关于古菌的 SOD 研究较少且主要集中于嗜热古菌中的嗜热 SOD 相关特性^[14-16]。已有报道表明将来源于嗜盐古菌 *Natrinema* sp. 的 SOD 在水稻中过表达可以提高水稻的耐盐性^[17], 而将嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227 的 SOD 异源表达可以增强细菌耐盐性和芳烃污染物的降解性能; 嗜盐古菌 D1227 的 SodA 是典型的超氧化物歧化酶 Fe/Mn-SOD 家族成员, 在细菌 SJ98 中的跨域异源表达具有超氧化物歧化酶活性, 同时赋予重组细菌在 500 mmol/L NaCl 条件下仍可以降解对硝基酚的能力^[3]。但该重组细菌在普通和高盐条件下降解对硝基酚时其关键降解基因的转录水平和降解酶比活力, 以及该菌在高盐条件下是否也可以降解对硝基酚的衍生物均尚未知晓。

本研究通过进一步分析细菌 SJ98 耐盐能力,

并研究 SodA 在细菌 SJ98 中跨域表达的重组菌在高 NaCl 浓度条件下生长及其降解 PNP 和 2C4NP 能力的变化; 同时检测了高 NaCl 条件下, 对硝基酚/2-氯-4-硝基酚单加氧酶 PnpA 编码基因的转录水平及其酶活。本研究为利用古菌 SOD 对细菌进行改造, 以提高细菌在盐胁迫条件下降解有机污染物的性能提供了潜在的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基和缓冲液

LB 培养基^[18]、BSYT 丰富培养基^[19]、无机盐培养基(minimal medium, MM)^[20]和 M9 培养基(包含 NaCl 的浓度约为 8.5 mmol/L)^[21]。50 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液和 20 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液参照文献[3]配制。

1.1.2 菌株、质粒和培养条件

实验所用菌株及相关质粒如表 1 所示。

E. coli 菌株均在 LB 培养基中于 37 °C、180 r/min 培养过夜, 其中 *E. coli* WM3064^[9]培养时加入 0.3 mmol/L 的 2,6-二氨基庚二酸[(6R,2R)-diaminopimelic acid, DAP]。*Burkholderia* sp. SJ98 (菌种保藏编号为 DSM23195)是一株能以 PNP 和 2C4NP 等芳香化合物为唯一碳源生长的菌株^[8]。菌株 SJ98 及其重组菌株均在 MM 或者 M9 中于 30 °C、180 r/min 培养 2-3 d。当培养基为 MM 时补加 3 mmol/L 硫酸铵和 2 mmol/L 葡萄糖作为氮源和补充碳源; 当培养基为 M9 时补加 0.01%酵母粉。培养时根据其导入质粒的抗性来添加抗生素。所用的抗生素终浓度如下: 盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, Tc)为 15 µg/mL, 卡那霉素(kanamycin sulfate, Km)为 50 µg/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器

PCR 所用的 DNA 聚合酶、dNTPs、PCR Mix、In Fusion 一步克隆试剂盒和 DNA Marker 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 对硝基酚

表 1 实验中所用菌株和质粒
Table 1 Strain and plasmid used in this study

菌株和质粒	特征	来源
Strain and plasmid	Characteristics	Reference or source
Strains		
<i>Haloferax</i> sp. D1227	Wild type; isolated from soil contaminated with highly saline oil brine	[22]
<i>Burkholderia</i> sp. SJ98	<i>para</i> -nitrophenol (PNP) and 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) utilizer	[9,23]
<i>Pseudomonas</i> sp. strain WBC-3	Wild-type; PNP utilizer	[20]
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Novagen
<i>E. coli</i> WM3064	Donor strain for conjugation, 2,6-diaminopimelic acid auxotroph, <i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> Δ M15 RP4-1360 Δ (<i>araBAD</i>)567 Δ <i>dapA1341::</i> (<i>erm pir</i> [wild type])	Novagen
Plasmids		
pCM <i>gfp-lacZ</i>	Tc ^r , pCM <i>gfp</i> containing <i>lacZ</i>	[24]
pCM- <i>pnpR-PpnpA-sodA-rfp</i>	Tc ^r , <i>lacZ</i> in pCM <i>gfp-lacZ</i> was substituted with <i>pnpR-PpnpA</i> _{WBC-3} - <i>sodA-rfp</i>	This study
pBBR1MCS-2	Km ^r , broad-host-range vector	[25]
pBBR- <i>sodA</i>	Km ^r , <i>sodA</i> cloned into pBBR1MCS-2	[3]

(*para*-nitrophenol , PNP) 和 2- 氯 -4- 硝 基 酚 (2-chloro-4-nitrophenol, 2C4NP)标准品购自 Sigma 公司；内切酶购自 New England Bio Labs 公司；用于回收胶、纯化、质粒和基因组提取所用试剂盒均购自 Omega 公司；RNA 提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司；其他化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

紫外分光光度计，PerkinElmer 公司；酶标仪，Gene 公司；高效液相色谱仪，Waters 公司；PCR 仪和荧光定量 PCR 仪，Bio-Rad 公司；冷冻离心机，Eppendorf 公司；超纯水仪，Millipore 公司；超声波破碎仪，宁波新芝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组的提取

Haloferax sp. D1227 菌株按照文献[3]所述方法培养，利用基因组提取试剂盒参照说明书提取基因组 DNA 作为 *sodA* 基因扩增的模板。*Pseudomonas* sp. strain WBC-3 的基因组 DNA 也利用基因组提取试剂盒提取，用作扩增 *pnp* 代谢基因簇的调控蛋白编码基因 *pnpR* 和单加氧酶编码基因 *pnpA* 启动子序列的模板。

1.2.2 重组菌的构建

为了在底物存在的条件下诱导 SodA 的大量表

达，构建重组质粒 pCM-*pnpR-PpnpA-sodA-rfp*，其中涉及到的多个基因通过重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension PCR)进行连接，引物根据 In Fusion 一步克隆试剂盒提示设计，如表 2 所示。普通 PCR 扩增得到 WBC-3 的 *pnpR* 和 *PpnpA*，以及古菌 D1227 的 *sodA* 和常用荧光标记基因 *rfp*^[26]。PCR 反应体系：2×Phanta Max Buffer 5 μ L，dNTP Mix (10 mmol/L) 0.2 μ L，基因组模板 1 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.3 μ L，Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/ μ L) 0.2 μ L，加蒸馏水补足至 10 μ L。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 30 s；95 $^{\circ}$ C 15 s，退火(其中 *pnpR* 扩增时退火温度为 55 $^{\circ}$ C，其他基因均为 60 $^{\circ}$ C) 15 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，共 30 个循环；72 $^{\circ}$ C 2 min。

将上述 PCR 产物纯化回收后作为模板，然后利用其重叠部分进行重叠延伸 PCR 扩增(反应体系和反应条件均和上述 PCR 一致，退火温度均为 60 $^{\circ}$ C)，随后将纯化回收的 PCR 产物与经过双酶切去 *lacZ* 的 pCM*gfp* 线性化载体相连接得到重组质粒，将该重组质粒转入大肠杆菌 DH5 α 中，经过测序(上海派森诺生物科技有限公司)验证确认基因扩增无误后，再将其转入菌株 WM3064，通过接合作用^[7]将质粒导入菌株 SJ98，成功构建重组菌 SJ98[pCM-*pnpR-PpnpA-sodA-rfp*]。

表 2 实验中所用引物
Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	目的 Purposes
pnpR-F	CGAACATCGTTCGTTTTTCGC	To amplify <i>pnpR</i> from strain WBC-3 for fusion
pnpR-R	CTGCCTTGCT GAGGTAGTAC GCAGT	To amplify <i>pnpR</i> from strain WBC-3 for fusion
PpnpA-F	TGTAGCGTGACATGTCGGTTTCCTTGATAAAAATA	To amplify the promoter of <i>pnpA</i> from strain WBC-3 for fusion
PpnpA-R	CAAGTTCGTAGTCTGACATTTTATTTTCTATAGAAAACGGCTC	To amplify the promoter of <i>pnpA</i> from strain WBC-3 for fusion
sodA-F	AATGTCAGACTACGAACCTTGACCCC	To amplify <i>sodA</i> from D1227 for fusion
sodA-R	TACCTGTCCGTTACTCGAAGAGTTCGACGGCC	To amplify <i>sodA</i> from D1227 for fusion
rfp-F	CCGTCGAACCTTCGAGTAATATTCACACAGGAAACAGCTATG GT	To amplify <i>rfp</i> gene for fusion
rfp-R	TCACATGGTACCGCTCTGCAGCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	To amplify <i>rfp</i> gene for fusion
SJ98-RTq-16S-F	CGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAG	To amplify a 142 bp fragment of 16S rRNA gene from strain SJ98 for RT-qPCR
SJ98-RTq-16S-R	GACATCGTTTAGGGCGTGGAC	To amplify a 142 bp fragment of 16S rRNA gene from strain SJ98 for RT-qPCR
SJ98-RTq-pnpA-F	CGTCGCAACGAATGTCTTCTATG	To amplify a 172 bp fragment of <i>pnpA</i> from strain SJ98 for RT-qPCR
SJ98-RTq-pnpA-R	CATACGACGACGCACTTCCTC	To amplify a 172 bp fragment of <i>pnpA</i> from strain SJ98 for RT-qPCR

1.2.3 细菌耐盐性生长曲线测定

菌株 SJ98 及其重组菌株于 LB 培养基 30 °C、180 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.3$ (其中重组菌株培养时加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素)作为种子液。然后将种子液按 1% 的体积比接种到 MM 培养基中(添加 2 mmol/L 葡萄糖和 3 mmol/L 硫酸铵), 30 °C、180 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.3$, 再加入 0.3 mmol/L 的 PNP 和 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h。待底物颜色将要褪去时, 于室温条件下 8 000 $\times g$ 离心 15 min 收集菌体, 用 MM (不含碳氮源和微量元素)洗涤 3 次, 并重悬于 MM 中($OD_{600} \approx 1.0$)。将重悬的菌液按 1% 接种到分别含有 10 mmol/L 葡萄糖和 0.3 mmol/L PNP 的 50 mL 的 MM 培养基中培养, 并在培养基中分别添加 NaCl 至 400、500、600、700 和 800 mmol/L, 定时取样, 测定菌液 OD_{600} 值。本文 1.2.3–1.2.6 的所有实验均重复 3 次。

1.2.4 高盐下以 2-氯-4-硝基酚为唯一碳源的生长及底物降解检测

重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 与空载体菌 SJ98[pBBR1MCS-2]培养和检测其生长的方法参照文献[3]进行。利用 HPLC 检测 2C4NP 及其降解

中间产物的方法参照文献[9]进行, 其中 2C4NP 的保留时间为 11.1 min。

1.2.5 对硝基酚单加氧酶和 2-氯-4-硝基酚单加氧酶编码基因(*pnpA*)转录水平的测定

参照文献[9], 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR)测定 *pnpA* 的转录水平。具体步骤如下: 与测定生长曲线相似, 将菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]和 SJ98[pBBR1MCS-2]分别在 M9 培养基中(2 mmol/L 葡萄糖作为碳源), 于 30 °C、180 r/min 培养至 $OD_{600} \approx 0.3$, 然后每种菌按照 1% 比例分别接种到装有 5 mL 新鲜的 M9 培养基(分别包含 0 或 500 mmol/L NaCl)的 PA 瓶中, 培养 8 h 左右, 直到 OD_{600} 值再次到达约 0.3。向其中一瓶加入 0.3 mmol/L 的 PNP 或 2C4NP, 另一瓶加入等体积的灭菌水作为对照, 所有菌液均再培养 5 h。然后按照试剂盒的说明书提取 RNA, 并将其反转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, 用表 2 中相关引物进行 RT-qPCR 扩增, 16S rRNA 基因作为内参基因。按照文献[27]中报道的方法处理实验所得到的数据, 利用 Origin 9.1 绘制成条状图。

1.2.6 对硝基酚单加氧酶和 2-氯-4-硝基酚单加氧酶 (PnpA) 粗酶的比活力测定

重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 和对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2] 在 M9 培养基中 (2 mmol/L 葡萄糖作为碳源) 培养至对数生长期 (OD_{600} 约为 0.5), 加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 和 0.3 mmol/L 的 PNP 或 2C4NP 于 30 °C 诱导 5 h, 8 000×g 离心 20 min 收集菌体, 重悬于 50 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液中, 然后 300 W 功率下超声破碎 (破碎 3 s, 停歇 5 s) 20 min, 10 000×g 离心 1 h 收集上清液, 利用紫外分光光度计进行酶活力检测分析。

根据已有文献报道的方法^[3,9,28]检测单加氧酶 PnpA 对于对硝基酚和 2-氯-4-硝基酚的比活力。底物 PNP ($\lambda_{\max}=400$ nm, 摩尔吸光系数 $\varepsilon_{420}=7\ 000$ L/(mol·cm)) 和 2C4NP ($\lambda_{\max}=405$ nm, 摩尔吸光系数 $\varepsilon_{405}=14\ 580$ L/(mol·cm)) 在 PnpA 的催化下发生氧化反应, 同时伴随着 NADH ($\lambda_{\max}=340$ nm) 的消耗。在 1 mL 的反应体系中包括: 20 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液, 0.03 mmol/L FAD, 0.1 mmol/L NADPH, 10 μ g 粗酶液和 25 μ mol/L 底物, 反应温度为 30 °C, 添加底物以起始反应。对照体系中除不含底物外, 其他组分与反应体系完全相同。PnpA 酶活单位(U)定义: 每分钟 1 μ mol 底物的减少所需的酶量为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 野生型 SJ98 高盐条件下生长和降解能力检测

在分别添加高浓度 NaCl (400、500、600、700、800 mmol/L) 的 MM 培养基中, 以 10 mmol/L 葡萄糖为底物对野生型 SJ98 菌株进行生长实验, 结果显示 (图 1): 在添加 400 mmol/L NaCl 时, 菌株生长没有受到影响, 与之前的报道未添加 NaCl 的生长情况^[16]是一样的; 在添加 500 mmol/L 和 600 mmol/L NaCl 时, 菌株生长均受到抑制但仍可生长, 并且随着 NaCl 浓度的升高, 生长抑制更加明显; 添加 700 mmol/L 和 800 mmol/L NaCl 时, 菌株均丧

失了生长能力。由此可见在以葡萄糖为碳源时, 野生型菌株 SJ98 生长的 NaCl 耐受浓度上限为 600 mmol/L。

如图 2 所示, 以 0.3 mmol/L PNP 为底物的降解实验显示, PNP 在培养基中溶解呈现黄色。经过约 70 h 培养, 在添加 400 mmol/L NaCl 时, 菌株降解 PNP 的能力没有受到影响, 黄色彻底消失, 与未添加 NaCl 的菌株具有相同的降解能力; 在添加 500 mmol/L 和 600 mmol/L NaCl 时, 菌株仍然具有降解 PNP 的能力, 但是降解能力均受到抑制, 黄色的 PNP 有部分未被降解, 并且随着 NaCl

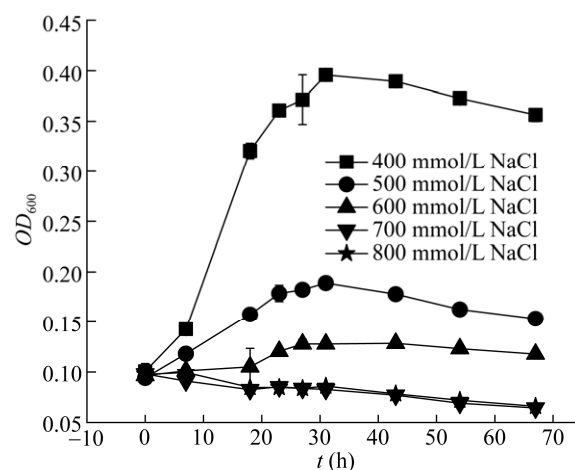


图 1 不同 NaCl 浓度下野生型 SJ98 的生长曲线

Figure 1 The growth curves of wild-type strain SJ98 at various NaCl concentrations

注: 培养基为含有 10 mmol/L 葡萄糖和 10 mmol/L 硫酸铵的 MM 培养基。

Note: Culture medium is MM medium with 10 mmol/L glucose and 10 mmol/L ammonium sulfate.

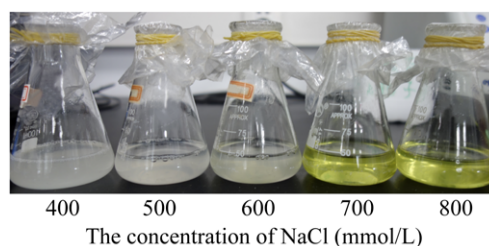


图 2 不同 NaCl 浓度下野生型 SJ98 降解 PNP 表型图

Figure 2 PNP degradation by wild-type strain SJ98 at various NaCl concentrations

浓度的升高,抑制更加明显;添加 700 mmol/L 和 800 mmol/L NaCl 时菌株则丧失了降解能力,培养基中黄色的 PNP 未消失,与作为对照的未加菌的 PNP 溶液几乎完全一样。

上述降解实验结果(图 2)与不同盐浓度下的生长实验结果(图 1)吻合,从而说明:在添加 400 mmol/L NaCl 时,野生型 SJ98 菌株生长和降解 PNP 的能力均不受影响;添加 600 mmol/L NaCl 时,其仍具有生长和降解 PNP 的能力,但是均受到明显的抑制;在 700 mmol/L 或更高浓度的 NaCl 时,其丧失生长和降解 PNP 的能力。

2.2 超氧化物歧化酶促进重组菌的生长能力和对硝基酚的降解速率

在未添加 NaCl 但含有 10 mmol/L 葡萄糖和 0.3 mmol/L PNP 的 MM 培养基中,对野生菌 SJ98 和重组菌 SJ98[pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp*]进行生长和 PNP 降解实验。结果显示(图 3):相比野生型菌株,导入了 pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp* 质粒的重组菌株其生长速率和最终生物量都明显提升,并且在 55 h 内将 0.3 mmol/L PNP 彻底降解。

2.3 重组菌在高 NaCl 条件下仍具有降解 2-氯-4-硝基酚的能力

在 M9 培养基(添加 0.01%酵母粉)中以 0.3 mmol/L

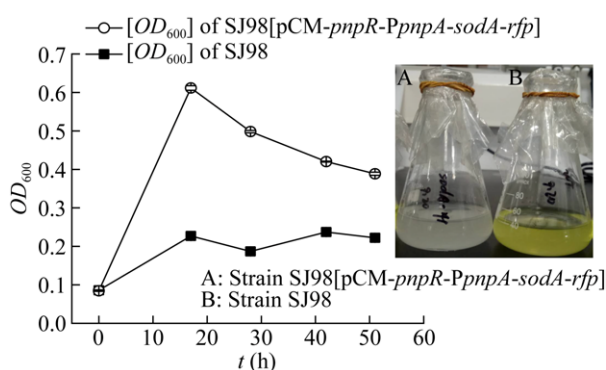


图 3 菌株 SJ98 和 SJ98[pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp*]的生长曲线和 PNP 降解情况

Figure 3 Growth curves and PNP degradation of strains SJ98 and SJ98[pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp*]

注: A: 菌株 SJ98[pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp*]; B: 菌株 SJ98.
Note: A: Strain SJ98[pCM-*pnpR*-*PpnpA*-*sodA*-*rfp*]; B: Strain SJ98.

2C4NP 为碳源进行生长和底物降解实验。不添加 NaCl 时,重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]生长和降解 2C4NP 能力略差于对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2],但均在 40 h 内将 2C4NP 完全降解(图 4A);在添加 500 mmol/L NaCl 时,重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]仍具有微弱地降解 2C4NP 的能力,而对照菌 SJ98[pBBR1MCS-2]则完全丧失了降解该底物的能力(图 4B)。

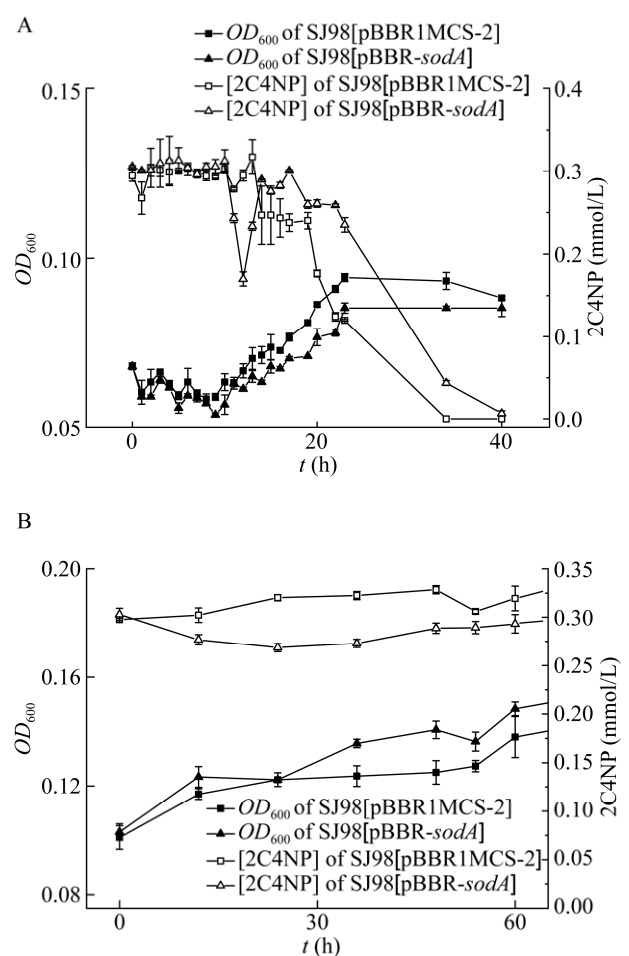


图 4 菌株 SJ98[pBBR-*sodA*]与 SJ98[pBBR1MCS-2]以 2C4NP 为底物在 M9 培养基(含有 0.01%酵母提取物)中的生长曲线与 2C4NP 降解情况

Figure 4 Growth curves and 2C4NP degradation by strains SJ98[pBBR-*sodA*] and SJ98[pBBR1MCS-2] in M9 with 0.01% yeast extract

注: A: 不加入 NaCl; B: 500 mmol/L NaCl.

Note: A: No NaCl added; B: 500 mmol/L NaCl.

2.4 重组菌中单加氧酶编码基因 *pnpA* 的转录增加

对分别用 PNP 和 2C4NP 诱导前后的空质粒菌株和重组菌株进行 *pnpA* 转录分析, 如图 5 所示: PNP 或 2C4NP 为诱导物, 无论是否添加 NaCl (0 和 500 mmol/L NaCl), 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 中 *pnpA* 的转录均比导入空质粒的菌株 SJ98[pBBR1MCS-2]高出约 17–25 倍。但是在高盐条件下(500 mmol/L NaCl), 无论是在重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*] 还是空质粒菌株 SJ98[pBBR1MCS-2]中, *pnpA* 的转录均受到抑制, 特别是在重组菌中, 以 PNP 和 2C4NP 分别为

诱导物时, 添加 500 mmol/L NaCl 的 *pnpA* 转录量比不添加时大约下降 30% 和 35%。

2.5 高 NaCl 浓度下重组菌粗酶液中单加氧酶 (PnpA) 的比活力

M9 培养基(添加 2 mmol/L 葡萄糖和 500 mmol/L NaCl)中培养的重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]和空载体菌 SJ98[pBBR1MCS-1], 分别用 PNP 和 2C4NP 诱导后, 经超声破碎得到细胞抽提液。分别检测在 PNP 和 2C4NP 诱导的重组菌和空载体菌粗酶液中对硝基酚单加氧酶和 2-氯-4-硝基酚单加氧酶(PnpA)的比活力, 如图 6 结果显示: 重组菌 SJ98[pBBR-*sodA*]中对硝基酚单加氧酶比

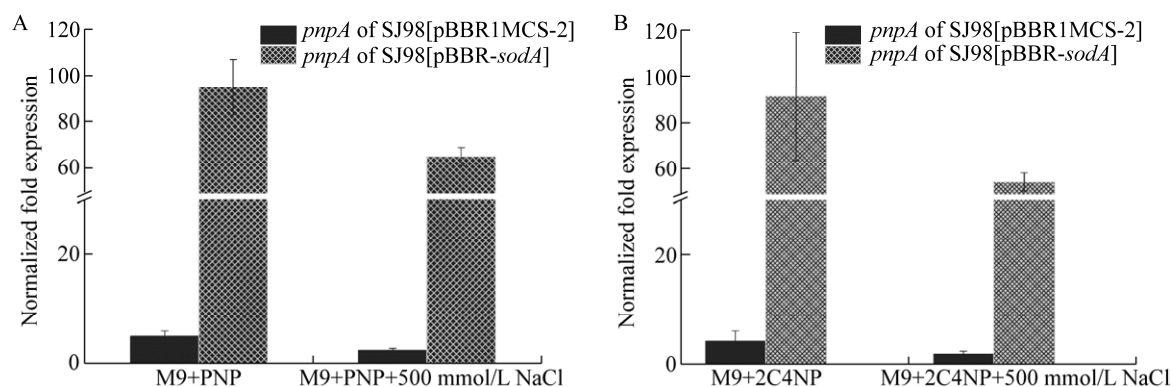


图 5 低浓度和高浓度 NaCl 情况下 *pnpA* 的转录分析

Figure 5 Transcriptional analysis of *pnpA* at two NaCl concentrations

注: A: PNP 诱导; B: 2C4NP 诱导.

Note: A: Cells induced by PNP; B: Cells induced by 2C4NP.

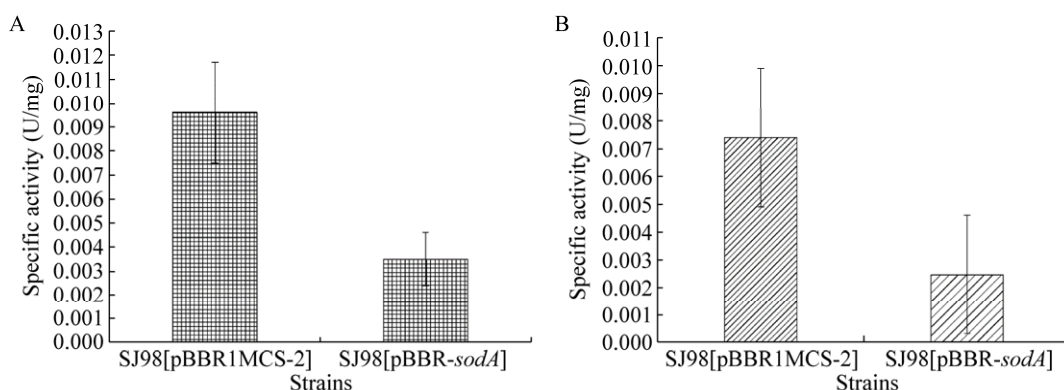


图 6 高 NaCl 条件下两种硝基酚单加氧酶(PnpA)的比活力

Figure 6 Specific activities of two nitrophenols monooxygenases at the high concentration of NaCl

注: A: 菌体细胞粗酶液中对硝基酚单加氧酶比活力(PNP 诱导); B: 2-氯-4-硝基酚单加氧酶比活力(2C4NP 诱导).

Note: A: Specific activity of PNP monooxygenase in the crude enzyme solution of cells induced by PNP; B: Specific activity of 2C4NP monooxygenase induced by 2C4NP.

活 ($0.003\ 5 \pm 0.001\ 1\ \text{U/mg}$) 明显低于空载体菌 SJ98[pBBR1MCS-1] ($0.009\ 6 \pm 0.002\ 1\ \text{U/mg}$) (图 6A); 重组菌中 2-氯-4-硝基酚单加氧酶的比活力 ($0.002\ 5 \pm 0.002\ 2\ \text{U/mg}$) 同样地明显低于空载体菌 ($0.007\ 4 \pm 0.002\ 5\ \text{U/mg}$) (图 6B)。重组菌中两种硝基芳烃单加氧酶的比活力都仅约为空载体菌中活力的 1/3。

3 讨论与结论

高盐环境会使得胞外渗透压高于胞内, 导致细胞失水皱缩, 失去活力甚至直接死亡, 也因此降低了菌株降解有机污染物的能力^[29]。本研究中来嗜盐古菌的超氧化物歧化酶基因在细菌 SJ98 中跨域异源表达, 不仅可以提高重组菌在普通条件下降解 PNP 的能力, 同时重组菌在高盐条件下还保留降解 2C4NP 的能力。已有研究表明, 在盐胁迫条件下, 细胞体内外的渗透压和离子平衡都会被打破, 更多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)在体内积累, 对细胞膜脂质、蛋白质等结构造成氧化性损伤, 也因此对细胞本身造成毒害作用。SOD 可以帮助细胞清除 ROS, 从而保护细胞免受氧化性损伤^[30]。因此, 分析上述研究结果其原因可能是: (1) 根据研究报道可知菌株 SJ98 本身是在低盐环境中生存的^[8]。在其生长环境中存在大量 NaCl 时, 在高浓度 NaCl 和底物的双重压力下, 菌株 SJ98 体内迅速产生大量活性氧, 而现有的抗氧化系统可能不能及时清除过量的 ROS, 所以对对照菌株明显降解能力和生长情况受到抑制。(2) 重组菌株因为导入了外源 SOD, 其清除 ROS 的能力也进一步增强, 可以及时清除产生的大量 ROS, 所以表现出良好的生长状况, 相应的降解活力也较好。(3) 多项研究也表明, 除盐胁迫外的例如低温和干旱等胁迫条件也会导致 ROS 的积累, 将 SOD 导入植物体内可以通过清除 ROS 减少细胞损伤来提高其在逆境中的生存能力^[31-32]。因此, 可以推测 SOD 可能通过提高微生物在逆境中的生存能力从而间接提高其降解其他物质的能力, 但对于此推测仍需要进一步的研究证实。

同时本研究证明, 重组菌中 PNP 和 2C4NP 降解的起始酶 PnpA 编码基因的转录水平, 无论是普通条件还是高浓度 NaCl 条件下均大幅度上调 (图 5); 而 PnpA 酶比活力却在高盐水平时仅约为空载菌(即野生型)中酶比活力的 1/3 (图 6)。根据已有的研究报道 H_2O_2 可以作为信号分子存在, 引起底物降解相关代谢基因的表达上调^[33], 因此推断正是由于重组菌株中过量表达的 SodA 导致了 PNP 和 2C4NP 降解的起始酶 PnpA 编码基因的转录上调。虽然 SodA 在细菌 SJ98 中过量表达可能减少了一部分 ROS 的积累, 提高了细菌宿主的耐盐能力, 但是高浓度的 NaCl 对宿主细胞带来的伤害是不可避免的, 从而导致了即使 *pnpA* 转录的大幅度上调仍旧无法抵消 PnpA 酶比活力的下降。虽然酶比活力受到了抑制, 下降为空载菌(即野生型)中酶比活力的 1/3, 但是仍使得重组菌在高 NaCl 条件下保持降解 PNP 和微弱地降解 2C4NP 的能力。也许在今后的菌株改造中可以适当提高酶的表达, 或者选择不受 ROS 影响的同工降解酶, 使工程菌保持原有的降解能力, 从而适应潜在的高盐环境中 2C4NP 污染的修复应用。本研究有利于更好地理解古菌 SOD 赋予细菌耐盐性和对降解硝基芳烃污染物能力的影响, 也为今后利用合成生物学在盐胁迫环境下开展微生物降解有机污染物的应用提供参考和资源储备。

REFERENCES

- [1] Bhatti ZI, Toda H, Furukawa K. *p*-Nitrophenol degradation by activated sludge attached on nonwovens[J]. Water Research, 2002, 36(5): 1135-1142
- [2] Kuşçu ÖS, Sponza DT. Kinetics of *para*-nitrophenol and chemical oxygen demand removal from synthetic wastewater in an anaerobic migrating blanket reactor[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(2-3): 787-799
- [3] Feng L, Xu Y, Zhou NY. Enhancement of bacterial salt tolerance by a newly identified superoxide dismutase from archaea *Haloferax* sp. D1227[J]. Microbiology China, 2018, 45(8): 1611-1620 (in Chinese)
冯莉, 许楹, 周宁一. 嗜盐古菌 *Haloferax* sp. D1227 中超氧化物歧化酶功能鉴定及其增强细菌耐盐性的研究[J]. 微生物学通报, 2018, 45(8): 1611-1620
- [4] Shen WJ, Liu WD, Zhang J, et al. Cloning and

- characterization of a gene cluster involved in the catabolism of *p*-nitrophenol from *Pseudomonas putida* DLL-E4[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7516-7522
- [5] Wei M, Zhang JJ, Liu H, et al. A transposable class I composite transposon carrying *mph* (methyl parathion hydrolase) from *Pseudomonas* sp. strain WBC-3[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 292(1): 85-91
- [6] Schenzle A, Lenke H, Fischer P, et al. Catabolism of 3-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP 134[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1421-1427
- [7] Xiao Y, Zhang JH, Liu H, et al. Molecular characterization of a novel *ortho*-nitrophenol catabolic gene cluster in *Alcaligenes* sp. strain NyZ215[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(18): 6587-6593
- [8] Samanta SK, Bhushan B, Chauhan A, et al. Chemotaxis of a *Ralstonia* sp. SJ98 toward different nitroaromatic compounds and their degradation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269(1): 117-123
- [9] Min J, Zhang JJ, Zhou NY. The gene cluster for *para*-nitrophenol catabolism is responsible for 2-chloro-4-nitrophenol degradation in *Burkholderia* sp. strain SJ98[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(19): 6212-6222
- [10] Chauhan A, Pandey G, Sharma NK, et al. *p*-Nitrophenol degradation via 4-nitrocatechol in *Burkholderia* sp. SJ98 and cloning of some of the lower pathway genes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(9): 3435-3441
- [11] Kumar S, Vikram S, Raghava GP. Genome sequence of the nitroaromatic compound-degrading bacterium *Burkholderia* sp. strain SJ98[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(12): 3286
- [12] Pandey J, Heipieper HJ, Chauhan A, et al. Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by *Burkholderia* sp. strain SJ98[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(3): 597-607
- [13] Vikram S, Pandey J, Bhalla N, et al. Branching of the *p*-nitrophenol (PNP) degradation pathway in *Burkholderia* sp. strain SJ98: Evidences from genetic characterization of PNP gene cluster[J]. *AMB Express*, 2012, 2(1): 30
- [14] Lee HJ, Kwon HW, Koh JU, et al. An efficient method for the expression and reconstitution of thermostable Mn/Fe superoxide dismutase from *Aeropyrum pernix* K1[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(4): 727-731
- [15] Li MC, Zhu L, Wang W. Improving the thermostability and stress tolerance of an archaeon hyperthermophilic superoxide dismutase by fusion with a unique N-terminal domain[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 241
- [16] Yamano S, Sako Y, Nomura N, et al. A cambialistic SOD in a strictly aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1999, 126(1): 218-225
- [17] Chen Z, Pan YH, An LY, et al. Heterologous expression of a halophilic archaeon manganese superoxide dismutase enhances salt tolerance in transgenic rice[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2013, 60(3): 359-366
- [18] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 1-7
- [19] Fu WJ, Oriel P. Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227[J]. *Extremophiles*, 1999, 3(1): 45-53
- [20] Liu H, Zhang JJ, Wang SJ, et al. Plasmid-borne catabolism of methyl parathion and *p*-nitrophenol in *Pseudomonas* sp. strain WBC-3[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 334(4): 1107-1114
- [21] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [22] Emerson D, Chauhan S, Oriel P, et al. *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds[J]. *Archives of Microbiology*, 1994, 161(6): 445-452
- [23] Bhushan B, Samanta SK, Chauhan A, et al. Chemotaxis and biodegradation of 3-methyl-4-nitrophenol by *Ralstonia* sp. SJ98[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275(1): 129-133
- [24] Zhang WM, Zhang JJ, Jiang X, et al. Transcriptional activation of multiple operons involved in *para*-nitrophenol degradation by *Pseudomonas* sp. strain WBC-3[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 220-230
- [25] Hao LK, Liu XM, Wang HY, et al. Detection and validation of a small broad-host-range plasmid pBBR1MCS-2 for use in genetic manipulation of the extremely acidophilic *Acidithiobacillus* sp.[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 90(3): 309-314
- [26] Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(12): 1567-1572
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [28] Youn HD, Kim EJ, Roe JH, et al. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp.[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 318(3): 889-896
- [29] Kargi F, Dinçer AR. Enhancement of biological treatment performance of saline wastewater by halophilic bacteria[J]. *Bioprocess Engineering*, 1996, 15(1): 51-58
- [30] Liu ZB, Zhang WJ, Gong XD, et al. A Cu/Zn superoxide dismutase from *Jatropha curcas* enhances salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(1): 2086-2098
- [31] Lee SH, Ahsan N, Lee KW, et al. Simultaneous overexpression of both Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164(12): 1626-1638
- [32] Tseng MJ, Liu CW, Yiu JC. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(10/11): 822-833
- [33] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399