

青岛农业大学

毕业论文（设计）

题目：黄杆菌 PABD 菌株的 4-氨基苯甲酸
的降解研究

姓名：周依才

学院：生命科学学院

专业：生物技术（食用菌）

班级：2015 级 01 班

学号：20150041

指导教师：于浩

2019 年 5 月 29 日

青島农业大学

毕业论文（设计）诚信声明

本人郑重声明：所呈交的本科毕业论文（设计）是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文（设计）作者签名：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
引言.....	1
1 材料与方法.....	1
1.1 实验材料.....	1
1.1.1 化学试剂.....	1
1.1.2 实验器皿及器具.....	2
1.1.3 主要实验仪器.....	2
1.1.4 培养基和菌株来源.....	2
1.2 实验方法.....	2
1.2.1 菌株活化与 16SrRNA 基因序列分析.....	2
1.2.2 菌株生长与降解条件优化.....	3
1.2.3 底物浓度对于菌体生长和底物降解的影响.....	4
1.2.4 休止细胞反应.....	4
1.2.5 HPLC 检测中间代谢产物.....	5
2 结果.....	5
2.1 菌株 PABD 分离与鉴定.....	5
2.2 pH 对于 PABD 菌株生长和对氨基苯甲酸降解的影响.....	7
2.3 温度对于 PABD 菌株生长和对氨基苯甲酸降解的影响.....	9
2.4 底物浓度对于 PABD 菌株生长和对氨基苯甲酸降解的影响.....	11
2.5 休止细胞反应降解对氨基苯甲酸.....	13
2.6 中间代谢产物检测.....	15
3 讨论.....	17
参考文献.....	18
致谢.....	19

黄杆菌 PABD 菌株降解 4-氨基苯甲酸的研究

生物技术专业（食用菌） 周依才

指导老师 于浩

摘要：菌株 PABD 能以对氨基苯甲酸为唯一碳源和氮源进行生长。本研究对该菌株的 16S rRNA 基因进行了扩增和比对分析，鉴定菌株 PABD 为黄杆菌，命为黄杆菌 PABD。对菌株 PABD 的生长条件和降解条件优化实验表明，菌株 PABD 在 pH 为 7.0 时生长最好，在 pH 为 6.0-9.0 时均能够完全降解对氨基苯甲酸，降解率均在 94.6%以上；菌株在温度为 30℃时生长最好，在温度 25℃-30℃时均能够完全降解对氨基苯甲酸。将菌株 PABD 在不同底物浓度下进行培养，结果发现菌体生长最适浓度为 1.0 mg/mL-2.0 mg/mL 之间，在对氨基苯甲酸浓度为 4.0 mg/mL 的时候，仍然能够完全降解对氨基苯甲酸，显示出菌株 PABD 具有较强的对氨基苯甲酸降解能力。休止细胞反应的结果表明，经过对氨基苯甲酸诱导的菌株能够迅速降解对氨基苯甲酸，但是非诱导菌株不能降解对氨基苯甲酸，说明降解对氨基苯甲酸的酶的基因是诱导基因。HPLC 检测，发现菌株 PABD 在降解对氨基苯甲酸过程中会生成 4-氨基-3 羟基苯甲酸，本研究为进一步研究微生物降解对氨基苯甲酸的代谢机理提供了参考。

关键词：黄杆菌 PABD；4-氨基苯甲酸；降解；休止细胞反应；HPCL

Study on Degradation of 4-Aminobenzoic Acid by

Flavobacterium sp. PABD

Student majoring in Biotechnology Zhou Yicai

Tutor Yu Hao

Abstract: The strain PABD can grow with p-aminobenzoic acid as the sole carbon source and nitrogen source. In this study, the 16S rRNA gene of this strain was amplified and compared, and the strain PABD was identified as *Flavobacterium* and its life was *Flavobacterium* PABD. The growth conditions and degradation conditions of the strain PABD showed that the strain PABD grew best at pH 7, and completely degraded p-aminobenzoic acid at pH 6.0-9.0, the degradation rate was above 94.6%; the strain was at temperature It grows best at 30 ° C and completely degrades p-aminobenzoic acid at temperatures between 25 ° C and 30 ° C. The strain PABD was cultured at different substrate concentrations. The results showed that the optimal concentration of bacterial growth was between 1.0 mg/mL and 2.0 mg/mL. When the concentration of p-aminobenzoic acid was 4.0 mg/mL, it was still completely degradable. Aminobenzoic acid showed that the strain PABD had strong degradation ability to p-aminobenzoic acid. The results of the resting cell reaction indicated that the p-aminobenzoic acid-induced strain was able to rapidly degrade p-aminobenzoic acid, but the non-inducing strain could not degrade p-aminobenzoic acid, indicating that the gene for the degradation of p-aminobenzoic acid was an inducible gene. HPLC analysis showed that strain PABD produced 4-amino-3hydroxybenzoic acid during the degradation of p-aminobenzoic acid. This study provides a reference for further study on the metabolic mechanism of microbial degradation of p-aminobenzoic acid.

Key words: *Flavobacterium* ; 4-aminobenzoic acid; Degradation resting cell reaction; HPLC

引言

氨基苯甲酸类物质是一类重要的环境污染物,多数产生于工业生产和农业活动中。也有很多氨基苯甲酸类物质能够在硝基芳香族化合物或者其他 N 杂环化合物的降解过程中产生。对氨基苯甲酸(PABA)是氨基苯甲酸物质的典型代表。研究报道,河流湖泊,生活污水,污泥等环境介质中菌能检出 PABA,甚至鱼体、人尿、血浆等样品中也发现该类污染物^[1]。对氨基苯甲酸是在低浓度的时候是叶酸的前驱体,高浓度的存在情况下,可以抑制细菌的生长。这些化合物对于人类和其他生物体的健康造成了严重威胁,因此去除环境中的该类化合物十分重要。

微生物降解是消除环境中氨基苯甲酸物质的有效手段之一。能分解对氨基苯甲酸的菌有伯克霍尔菌属和包囊拉尔斯托尼亚菌等,很多是从对硝基苯甲酸或者对氨基苯甲酸含量极高的场所分离出来的,如兵工厂附近,含有大量的此类物质,第一批被发现的能以对硝基苯甲酸或者对氨基苯甲酸为唯一碳源的伯克霍尔菌属和包囊拉尔斯托尼亚菌属就在二战时期德国兵工厂附近^[2]。虽然有一些降解对氨基苯甲酸的菌株已经报道,但是对氨基苯甲酸的代谢途径和代谢机理仍然是未知的。

本实验从自然界中得到一株能够以对氨基苯甲酸作为唯一碳氮源生长的菌株 PABD,利用 16S 分析对该菌株进行了鉴定。另外本实验对其最适合的生长环境条件进行优化,并对该菌株代谢对氨基苯甲酸的代谢途径进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 化学试剂

表 1 主要试剂

试剂名称	厂家
对氨基苯甲酸(PABA)	国药集团化学试剂有限公司
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	莱阳市康德化工有限公司
葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)	莱阳市康德化工有限公司
硫酸钠(Na_2SO_4)	天津市巴斯夫化工有限公司
氯化铵(NH_4Cl)	天津市北方天医化学试剂有限公司
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	天津市鼎鑫化工有限公司

1.1.2 实验器皿及用具

量筒、离心管、三角瓶、烧杯、移液枪、培养皿。

1.1.3 实验仪器

表 2 主要实验仪器

仪器名称	型号	厂家
电热恒温培养箱	DRD-9082	上海森信实验仪器有限公司
全自动高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋电子生物有限公司
电子天平	AR1140	Ohaus Corp.pine Brook,NJ,USA
双层全温培养床	QYC2112	上海福玛实验设备有限公司
磁力加热搅拌器	79-1 型	常州国华电器有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
Eppendorf Biophotometer	Plus	常州诺基设备有限公司
离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司

1.1.4 培养基和菌株来源

LB 液体培养基:称取 25.0 g LB 肉汤粉末,定容至 1 L,121℃灭菌备用。

无机盐对氨基苯甲酸液体培养基:按 1.0 mg/mL 称取对氨基苯甲酸,加入无机盐培养基 (MSM) 中,调至 pH 至 7.0。

无机盐培养基(MSM): (每升) 12.6 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3.4 g KH_2PO_4 , 1.0 g Na_2SO_4 , 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.5 mL 微量元素金属溶液。所含微量金属溶液 (每升溶于 0.1 mM HCl 中) 0.05 g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0.05 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.008 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.04 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g $ZnSO_4$, 0.1 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.05 g $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, 0.038 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.02 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 和 0.0124 g H_3BO_3 ^[3]。

无机盐葡萄糖培养基: 称取葡萄糖 (50 mg/mL), 115℃灭菌备用作为储存液; 将 1 mg/mL 氯化铵加入 MSM 培养基, 121℃灭菌。使用将 1 mL 葡萄糖储藏液加入 50 mL 氯化铵 MSM 培养基中混合。

菌株来源: 本实验所用的菌株来源是能够以对氨基苯甲酸为唯一碳源、氮源的混合菌群中。通过平板划线, 挑取单菌, 最终获得能够在对氨基苯甲酸中生长的单菌, 将之命名为 PABD^[4]。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化与 16S rRNA 基因序列分析

菌株活化：打开超净工作台，灭菌 30 min；灭菌过程中，从制冰机中取出少量冰块，放于冰盒中，取于-80℃冰箱中甘油管保藏的菌株，放于冰盒的冰上，自然融化；融化后，于超净工作台中，使用移液枪，选用 1 mL 无菌枪头抽取整管菌液，加入 50 mL LB 肉汤培养基；在 30℃、120 rpm 恒温培养箱中进行培养。

将在 LB 培养基中生长后的 1 mL PABD 菌株加入 50 mL 对氨基苯甲酸无机盐培养基中，待菌体出现浑浊，再接种下一轮，一共培养两轮，所有实验操作皆是在无菌条件下进行。

16S rRNA 基因序列分析：以菌液作为模板，利用细菌通用引物 27 F 和 1492 R，对菌株 PABD 的 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 扩增体系：10×Buffer 2.5 μL，MgCl₂ 2 mmol/L，dNTP 0.4 mmol，上游引物 1 μL，下游引物 1 μL，5.5 μL Taq 酶，DNA 菌液模板 1 mL，ddH₂O 15 μL，总体积 25 μL。PCR 反应条件：95℃预变性 5 min，94℃变性 1 min，55℃退火，72℃延伸 1 min，35 个循环，72℃保温 5 min，4℃保存。将扩增后的片段送到上海生物工程公司进行测序，测序结果通过在 NCBI 数据库上面对 16S rRNA 基因序列进行比较，确定菌株 PABD 的分类。

1.2.2 菌株生长与降解条件优化

pH 对于菌株生长与对氨基苯甲酸降解的影响：按 1.0 mg/mL 的浓度称取对氨基苯甲酸，加入无机盐培养基（MSM）中，使用缓冲液将 pH 调至 5.0，6.0，7.0，8.0，9.0。115℃ 30 min 灭菌备用。将在对氨基苯甲酸无机盐培养基中生长的 PABD 菌株，分别接种 1 mL 到不同 pH（5.0，6.0，7.0，8.0，9.0）培养基中，对氨基苯甲酸浓度为 1.0 mg/mL，于 30℃，120 rpm 恒温摇床中培养；接种后，分别于 0 h，6 h，12 h，18 h，24 h，30 h，36 h 进行取样，（除了接入诱导培养菌液的时候是无菌操作，剩下的各种按时取样无须无菌操作）。实验以不接菌的处理为对照组，每个处理设置三个重复。每次将取出来的样品，都放置于-20℃的冰箱中，直至样品都取完，一起测量对氨基苯甲酸的浓度和菌体生长浓度。

温度对于菌株生长与对氨基苯甲酸降解的影响：将在对氨基苯甲酸无机盐培养基中生长的 PABD 菌株，接种到对氨基苯甲酸浓度为 1.0 mg/mL pH 为 7.0 的无机盐培养基中。分别置于不同温度（25℃，30℃，37℃，40℃）恒温培养，培养条件为 120 rpm。接种后，分别于 0 h，6 h，12 h，18 h，24 h，30 h，36 h

进行取样，并进行保存（同 pH 实验）。

对氨基苯甲酸的浓度测定：测样品中的对氨基苯甲酸前，通过全波长扫描，确定对氨基苯甲酸的特征吸收峰。将收集起来的样品自然状态下融化，通过 120 rpm 离心 1 min，取其上清 20 μ L，加入含有 780 μ L 超纯水的比色皿中，上下颠倒，混匀，放置在 Eppendorf Biophotometer Plus 中，280 nm 处测其吸光值，并记录下各个数值。

对菌体生长浓度的测定：将收集起来的样品自然状态下融化，12000 rpm 离心 1 min，弃去上清，使用 800 μ L 超纯水重悬沉淀菌体，使用 Eppendorf Biophotometer plus 在 600 nm 处测其吸光值并进行记录。

1.2.3 底物浓度对于菌体生长和底物降解的影响

分别按照下面的对氨基苯甲酸浓度配制无机盐培养基：0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、3.0 mg/mL、4.0 mg/mL，将培养基的 pH 调整到 7.0。

将在对氨基苯甲酸无机盐培养基中生长的 PABD 菌株，接种到不同浓度的对氨基苯甲酸无机盐培养基中。于 30°C，120 rpm 恒温摇床中培养。接种后，分别于 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h、42 h、48 h、54 h、60 h、66 h、72 h 各吸取 800 μ L 菌液至 1.5 mL 离心管中。实验中以不接菌为空白对照，每个相同条件下的处理设置三个重复。将取样所得样品放置于-20°C冰箱中，直至所有样品取完，一起测定对氨基苯甲酸的浓度和菌体生长浓度

对氨基苯甲酸的测定：将收集起来的样品自然状态下融化，通过 120 rpm 离心 1 min，取其上清。按照不同的对氨基苯甲酸的浓度，进行相应倍数的稀释。在 Eppendorf Biophotometer Plus 中，280 nm 处测其吸光值，并记录下各个数值。由于测量时候的稀释倍数不相同，最终测量数值按照稀释倍数 $\times$ 分光光度计数值计算。菌体浓度的测定与前面描述一致。

1.2.4 休止细胞反应

对氨基苯甲酸培养（诱导菌株）：将在对氨基苯甲酸无机盐培养基中生长的 PABD 菌株，在对氨基苯甲酸无机盐培养基中转接 3 轮。3 轮生长过后，吸取 3 mL PABD 菌株培养物至 5 瓶以对氨基苯甲酸为唯一碳源，浓度为 1.0 mg/mL 的无机盐培养基中，每瓶培养体积为 50 mL，培养 30 h。

葡萄糖-氯化铵培养（非诱导菌株）：将在对氨基苯甲酸无机盐培养基中生长的 PABD 菌株接种至葡萄糖-氯化铵无机盐培养基中。待培养液出现浑浊后，再接种 1 mL 菌液至葡萄糖-氯化铵无机盐培养基中，进行新一轮培养，一共接种三轮。使用第三轮葡萄糖-氯化铵无机盐培养基培养的菌液，分别接种 3 mL 至 5 瓶以葡萄糖-氯化铵为唯一碳源、氮源的无机盐培养基中，培养 30 h。

将对氨基苯甲酸为唯一碳源培养的菌体和以葡萄糖为唯一碳源培养的菌体分别于 TGL20M 离心机中，8000 rpm 离心 5 min，弃上清，收集菌体。将离心管中沉淀的菌体用超纯水悬浮起来，再次离心，弃上清，对菌体进行洗涤，并此步骤重复一次，菌体即为休止细胞。

用少量 1.0 mg/mL 对氨基苯甲酸溶液，分别重悬管中菌体沉淀，加入到 150 mL 三角瓶中测定重悬菌液的 OD 值，并用 1.0 mg/mL 对氨基苯甲酸溶液，将菌液的 OD₆₀₀ 值调整为 8.0。将三角瓶放入 30°C 摇床中 120 rpm 进行反应。

每隔一小时，吸取 1 mL 的培养物，一共取七个小时，每次取样后都将样品离心，12000 rpm，1 min。离心过后，转移上清液到另外一个新的 1.5 mL 离心管中，做好标记，置于 -20°C 冰箱中保存，待所有样品取完，一起进行对氨基苯甲酸降解检测。

对氨基苯甲酸降解检测：取出取样处理过的休止细胞反应样品，自然状态下融化。将分光光度计的全波长扫描范围设置为 200 nm 到 400 nm，峰值设定是 6。以空白对照（超纯水）作为基准。吸取 20 μ L 融化后的样品，加入 780 μ L 的超纯水中，加入比色皿中，上下颠倒，混匀，放置于全波长扫描分光光度计中进行全波长扫描^[5]。

1.2.5 HPLC 检测中间代谢产物

取上一步在对氨基苯甲酸中培养的休止细胞反应样品 100 μ L 与 900 μ L 甲醇混合，并用 0.22 μ m 滤膜进行过滤。过滤后利用 C18 柱子进行 HPLC 检测。HPLC 为 Waters Alliance (USA)，流动相为 20% 甲醇，80% 1 mM 甲酸，流速为 1 mL/min，温度为 30°C^{[6] [7]}。

2 结果

2.1 菌株 PABD 分离与鉴定

以菌株 PABD 作为模板进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增，利用琼脂糖凝胶电泳检测发现扩增条带单一为 1.5 kb 左右，将扩增片段送到生工生物工程(上海)有限公司进行测序，测序结果如下：

>16S rRNA partial sequence of strain PABD

GGCAGCTCCTGTTACGGTCACCGACTTCAGGTACCCCAGACTTCCATGGCT
TGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCT
GATGCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATAGAGTCGAGTTGCAGACTCC
AATCCGAAGTGAAGACCGGCTTTTCGAGATTTGCATCACATCGCTGTGTAGCT
GCCCTCTGTACCGGCCATTGTATTACGTGTGTGGCCCAAGACGTAAGGGCC
GTGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCTCTACTTGCGTAGGCAGTCTC
ACTAGAGTCCCCAACTGAATGATGGCAACTAGTGACAGGGGTTGCGCTCGT
TGCAGGACTTAACCTAACACCTCACGGCACGAGCTGACGACAACCATGCA
GCACCTTGAAAATTGCCCCGAAGGAGGATCTATTTCTAAATCTGTCAATTCCC
ATTTAAGTCTTGGTAAGGTTCTCTCGCGTATCATCGAATTAAACACATAATC
CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAACCTGCGTTC
GTACTCCCCAGGTGGCTAACTTATCACTTTTCGCTTAGTCTCTGAATCCGAAA
ACCCAAAAACGAGTTAGCATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA
TCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGTCCATCAGCGTCAGTTAAGACATAGTAA
CCTGCCTTCGCAATTGGTGTCTAAGTAATATCTATGCATTTACCGCTACAC
TACTTATTCCAGCTACTTCTACCTTACTCAAGACCTGCAGTATCAATGGCAG
TTTCATAGTTAAGCTATGAGATTTACCACTGACTTACAGATCCGCCTACGG
ACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCGTACAGTACCTTCAGCTT
TCCACACGTGGAAAGGTTTATCCCTGTACAAAAGAAGTTTACAACCCATAG
GGCCGTCGTCCTTCACGCGGGATGGCTGGATCAGGCTCTCACCCATTGTCC
AATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTATGAGTCTGGTCCGTGTCTCAGTACCA
GTGTGGGGGATCACCTCTCAGGCCCCCTAAAGATCATTGACTTGGTGAGC
CGTTACCTCACCAACTATCTAATCTTGCGCGTGCCCATCTCTATCCACCGGA
GTTTTCAATAACAAGTGATGCCACTCATTATATTATGGGGTATTAATCTCCCT
TTCGAAAGGCTATCCCCCAGATAAAGGCAGGTTGCACACGTGTTCCGCACC

CGTGCGCCGCTCTCAAGATTCCGAAGAATCTCTACCGCTCGGCTGCA

将 16S rRNA 基因序列放到 NCBI 的 Nr 数据库进行 Blastn 比对，比对结果显示 PABD 属于黄杆菌科。因此将菌株 PABD 命名为黄杆菌 PABD。

2.2 pH 对于 PABD 菌株生长和对氨基苯甲酸降解的影响

由图 1 可见，在酸性范围 pH 为 5.0-6.0 的范围内，对氨基苯甲酸的降解明显受到抑制，pH 为 5.0 时，对氨基苯甲酸几乎一直都不降解。当 pH 大于 7.0 时，对氨基苯甲酸的降解率总得来说是比在酸性条件下增长得快。Zeyer 等报道硝基苯类化合物的毒性是随着 pH 的降低而增强，因此在酸性环境中其生物可降解性降低，与之相反，随着 pH 的增加，对硝基苯类的毒性也将降低，从而提高了其生物可降解性^{[8],[9]}。由于微生物在降解硝基类芳香族化合物的时候，可能会产生以氨基类芳香族化合物的中间产物。由此推测，可能随着 pH 的降低，对氨基苯甲酸的毒性在增强，因此在酸性环境中，对氨基苯甲酸的生物可降解性降低，与之相反，pH 的增加，对氨基苯甲酸的毒性也降低，其降解速率明显比在酸性条件下增长得快。pH 为 9.0 时，降解率在 0 h-18 h 之间的升高速率比 pH 为 7.0，8.0 慢，达到降解率峰值时长较长。以上结果说明该菌比较适宜在 pH 为 7.0-8.0 内生长；结合图 2，除了 pH 为 5.0，该菌对对氨基苯甲酸的最终降解率都大概为 98%，说明只要该菌能生长起来，无论速生长速度快慢，都能对生长环境中的对氨基苯甲酸进行降解，并且降解率都能接近 100%。

由图 2 可见，在酸性条件下，pH 为 5.0 下，PABD 菌株几乎不生长。pH 为 6.0，7.0，8.0 的条件，菌体浓度在 0 h-6 h 期间，生长缓慢，是 PABD 菌的生长迟缓期；6 h-24 h 属于对数时期，菌体浓度迅速升高，24 h 之后进入稳定期，虽然底物在不断地消耗，但是菌体的浓度几乎每怎么改变，都保持在 1.6 左右。除了 pH 为 5.0，菌体不生长的情况下，只要菌体生长，菌体浓度的最大值都能达到 1.6 左右，对于比较早进入稳定期的实验组，在 36 h 前已经有进入衰退期的趋势。以上结果，综合图 1 和图 2 的情况，说明 PABD 菌株的最适生长 pH 为 7.0-8.0 之间^[10]。

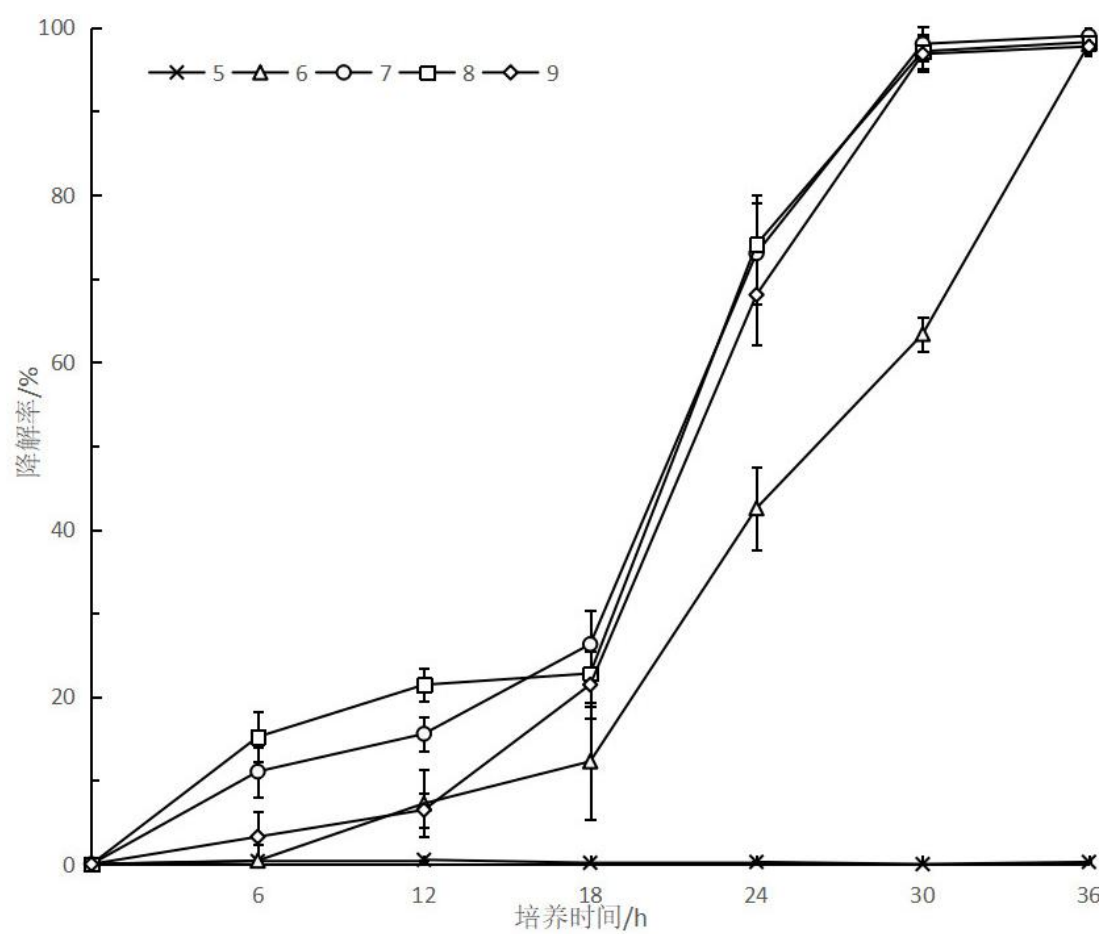


图 1：菌株在不同 pH 条件下对对氨基苯甲酸降解率的影响

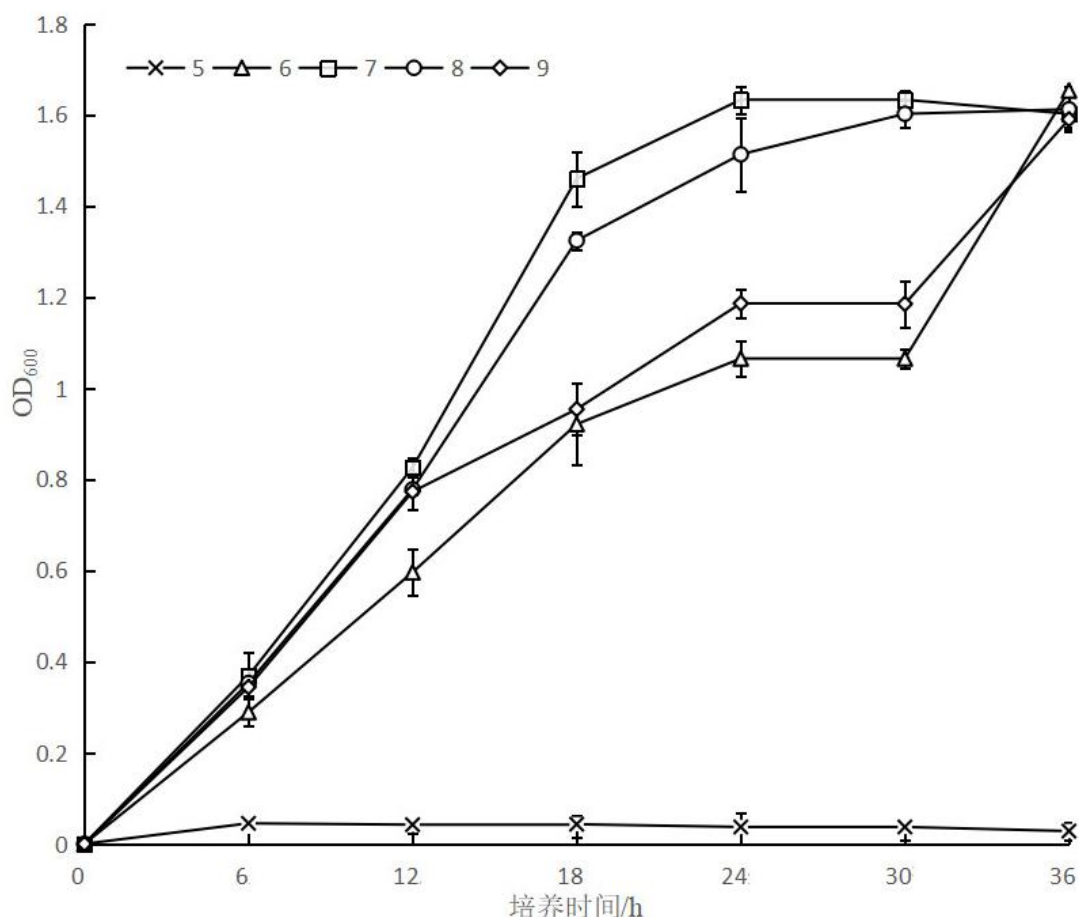


图 2：菌株在不同 pH 条件下 OD₆₀₀ 的变化值

2.3 温度对于 PABD 菌株生长和对氨基苯甲酸降解的影响

由图 3 可见，PABD 菌株在温度 25°C-30°C 之间，对氨基苯甲酸的降解率升高数值远远比 37°C 和 40°C 要快，说明该菌降解对氨基苯甲酸的最适温度在 25°C-30°C 之间。之前了解报道过的，分解对氨基苯甲酸的菌群的最适生长温度是在 30°C 以下的。分解某一种物质，是需要某一类酶或者某一种酶，酶都是在一定温度下拥有生物活性，并且在某一温度下获得最大酶活。同理可得，从侧面证明 PABD 降解对氨基苯甲酸的最适温度在 25°C-30°C 之间。温度达到 37°C 和 40°C 的时候，对氨基苯甲酸的降解十分缓慢，即使在 36 h 的时候，在 37°C 中，对氨基苯甲酸才降解 30% 左右，远远低于几乎降解饱和的 25°C 和 30°C 培养的 PABD 菌株。说明，37°C 和 40°C，能严重抑制降解对氨基苯甲酸的蛋白酶酶活，导致降解缓慢。25°C 和 30°C 下培养的菌株，最终所达到的降解率是 97.5% 左右。以上说明，降解对氨基苯甲酸的最适温度在 25°C-30°C 之间。

由图 4 可见，不同温度条件下，能明显影响菌体的生长情况。当温度在 25°C

时，只需 30 h 就能达到稳定期。然而 30℃的条件下，菌体生长达到稳定期只需更短的 24 h，比 25℃的培养时间少了四分之一。在菌体生长过程中，菌体长的慢，菌体生长过程中，菌体死亡，导致菌体浓度降低，菌体生长的量=菌体的死亡量数值低，37℃和 40℃培养情况下，想达到 25℃培养和 30℃培养的最大菌体浓度，是不可能的。PABD 菌株不管在 25℃和 30℃培养，菌体浓度都能达到几乎相同的菌体浓度，所以，菌体的最适生长环境温度条件应该在 25℃以上，靠近 30℃的范围。由于实验室培养条件有限，没有更好的确定优化 PABD 菌株的最适生长环境条件温度。综合图 3 和图 4，可见 PABD 菌株在比较适宜生长的情况下，进入对数期是在培养 12 h 左右，进入稳定期在培养 24 h-30 h 之间，衰退期在培养 30 h 以后。以上说明 PABD 菌株的最适生长环境条件是 25℃-30℃之间。

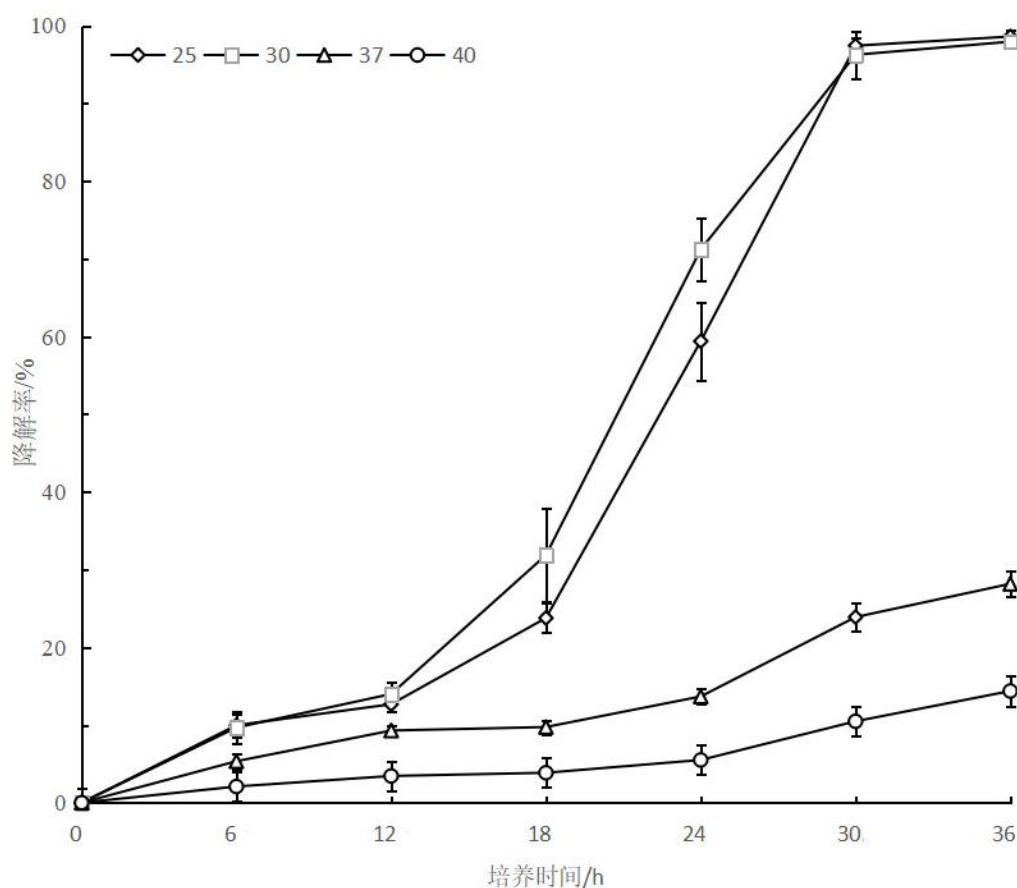


图 3：不同温度条件下对对氨基苯甲酸降解率的影响

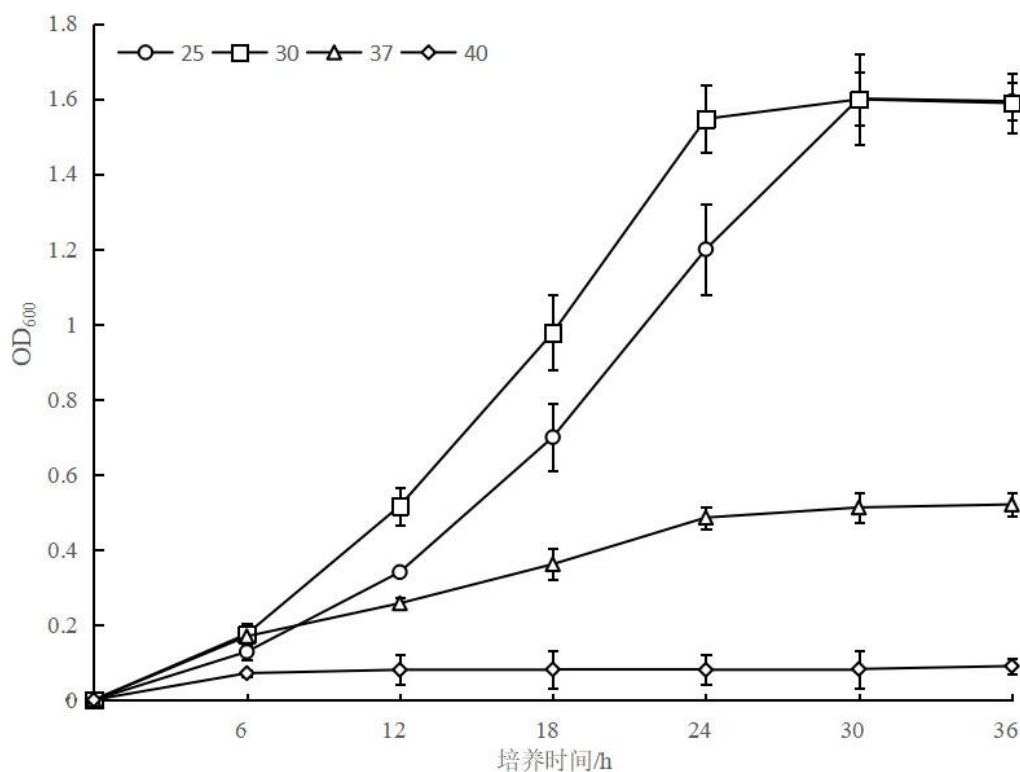


图 4: 菌株在不同温度条件下的 OD₆₀₀ 的变化值

2.4 底物浓度对于 PABD 菌株生长和对氨基苯甲酸降解的影响

由图 5 可知, 底物浓度低的组别, 降解对氨基苯甲酸的降解率比较快升高, 因为底物浓度低的培养基, 菌体在一样时间, 生长同样的量上, 消耗的底物也比较高。对于底物浓度比较高的组别, 降解率上升的比较慢, 可能是因为前期菌体的生长, 底物浓度过于饱和, 来不及消耗, 导致增长速率比较低; 也可能是高浓度的底物, 会产生一定毒性影响, 抑制 PABD 菌株前期的生长, 导致 PABD 菌株需要一定的适应期。通过以上分析, 无论组底物的浓度如何, PABD 菌株对其的降解率都能高达 94% 以上。以上说明, 只要出现降解率的升高现象, 底物浓度的高低几乎不影响 PABD 菌株的最终对氨基苯甲酸的降解率。

由图 6 可知, 底物浓度较低的情况下, 菌体的浓度值在生长初期, 0 h-18 h 是比较快升高的, 可能一定高浓度的底物浓度具有一定的毒性, 能对 PABD 的生长进行抑制。结合图 5, 不同底物浓度下的底物降解率, 存在高浓度情况下, 曲线增长得比较慢得情况。前面提到, pH 较低时可能导致该类氨基芳香族化合物毒性更高。调节其 pH, 降低其毒性, 将其调至弱碱性区间, 可能是 pH 为 9.0 时, 底物浓度是 4 时, PABD 菌株会生长得更好。对于最适的 pH 和底物浓度协调值

和该菌最高忍受浓度值，还须后续的实验研究。底物浓度的倍数和菌体的最大生长浓度大致呈一定的线性关系，0.5 mg/mL 的实验组菌体浓度是 1.0 左右，1.0 mg/mL 的实验组则是 1.7 左右，2.0 mg/mL 则是 3.1 左右，3.0 mg/mL 则是 4.2 左右，4.0 mg/mL 则是 5.2 左右。底物浓度越低的虽然越快进入稳定期，但是进入衰退期时间比较漫长；底物浓度高的组别，虽然进入稳定期比较慢，但是稳定期过渡到衰退期的区间时长短，衰退的速率也较底物浓度低的快得多。综合比对各个生长曲线进入稳定期的时间和菌体的浓度，实验组中 1.0 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的组别，几乎在同一时间进入稳定期，并且 1.0 mg/mL 的组别菌体最高峰浓度大概是 0.5 mg/mL 的两倍。2.0 mg/mL 的菌体最高峰是 1.0 mg/mL 的两倍，但是生长时间却是 1.0 的 1.5 倍，想大量工厂化生产这些菌株，用以各种工业用途，选择最好的优化条件在 1.0 mg/mL-2.0 mg/mL 之间。由于上述提到的底物浓度毒性和 pH 的相互影响，以上只能说明，在 30℃，pH 为 7 时，底物浓度最为有效的培养 PABD 菌株的对氨基苯甲酸浓度最好在 1.0 mg/mL-2.0 mg/mL 之间。

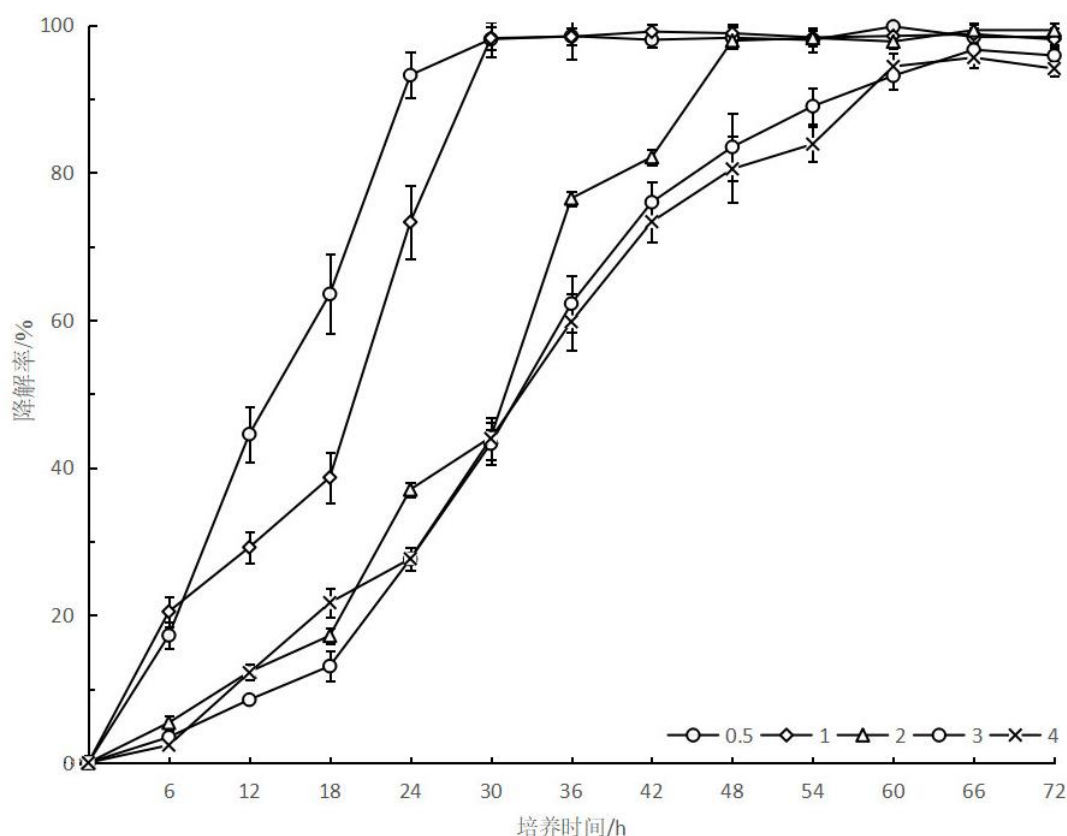


图 5：不同底物浓度条件下对对氨基苯甲酸降解率的影响

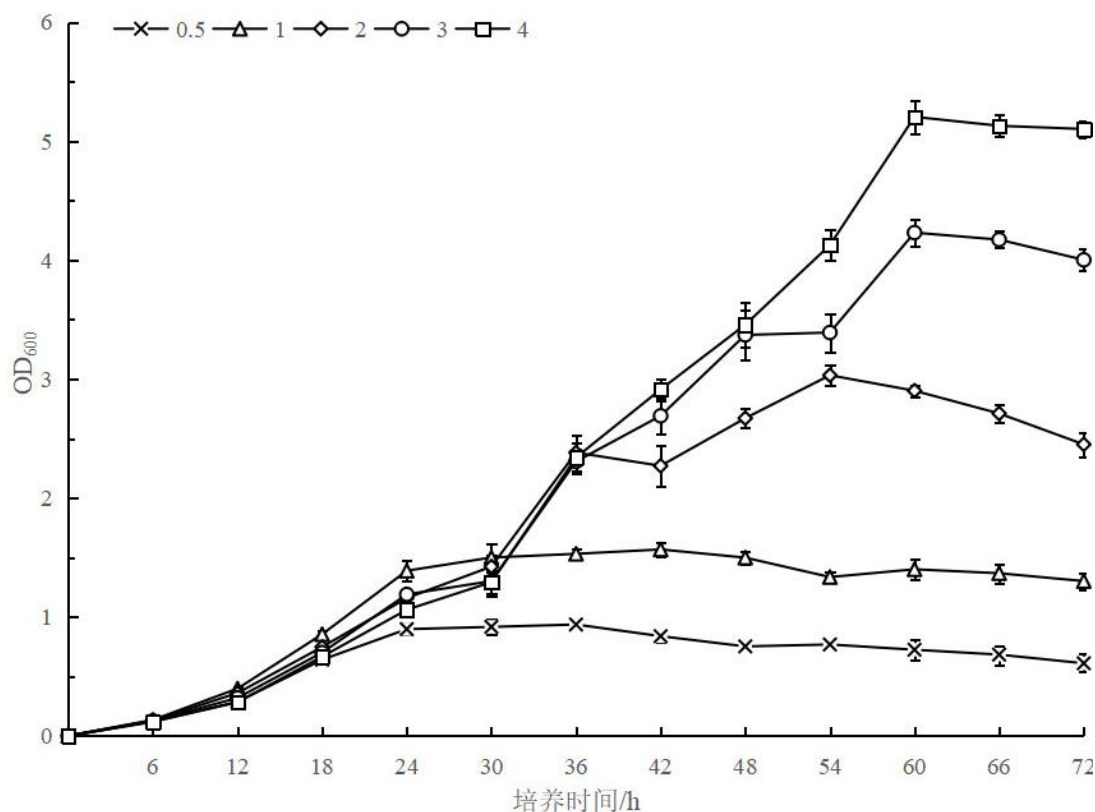


图 6: 菌株在不同底物浓度条件下 OD₆₀₀ 的变化值

2.5 休止细胞反应降解对氨基苯甲酸

由图 7 可见, 休止细胞反应实验中的诱导培养能在 7 h 内完全降解对氨基苯甲酸。在 0 h-2 h 内, 无论对氨基苯甲酸诱导型培养菌株, 还是葡萄糖非诱导型培养菌株, 降解率都几乎为零, 过了 2 h 之后, 两种不同类型培养过的菌株, 在降解对氨基苯甲酸的速度上出现明显差异。诱导型的菌株开始降解对氨基苯甲酸, 但是非诱导型几乎没有降解。诱导型培养的菌株, 在 7 h 的时候, 降解 1 mg/mL 的对氨基酸, 能高达 95.6%。以上的分析, 说明 PABD 菌株产生降解对氨基苯甲酸的酶的基因是诱导型基因, 在优质碳源培养后, 需要逐步加入对氨基苯甲酸进行诱导, 才能激活降解对氨基苯甲酸的酶的基因。

由图 8 和图 9 可见, 非诱导型培养的菌株样品, 全波长的图谱没有变化; 诱导型培养的菌株样品, 在扫描全波长中得到的曲线形状, 逐渐由高耸的峰状, 变为矮平的曲线, 在 280 nm 处的最高值 2.3 逐渐降低为 0.17 左右。通过这两个峰图的大致形状和各个数值比对, 也证明黄杆菌 PABD 产生分解对氨基苯甲酸的酶的基因是诱导型的。结合图 7, 图 8 和图 9, 休止细胞反应中的诱导培养的饥饿

状态细胞虽然处于休眠状态，不进行生长繁殖，但仍含有各种酶系，具有氧化和发酵能力；非诱导型培养的细胞，体内降解对氨基苯甲酸能力的酶没有被诱导产出，因此不能够降解对氨基苯甲酸。

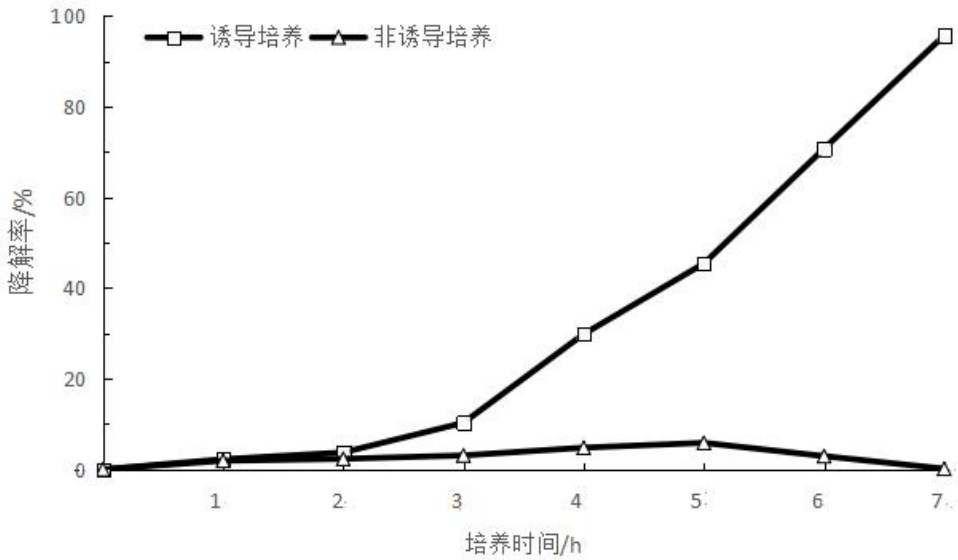


图 7：休止细胞反应降解对氨基苯甲酸的速率

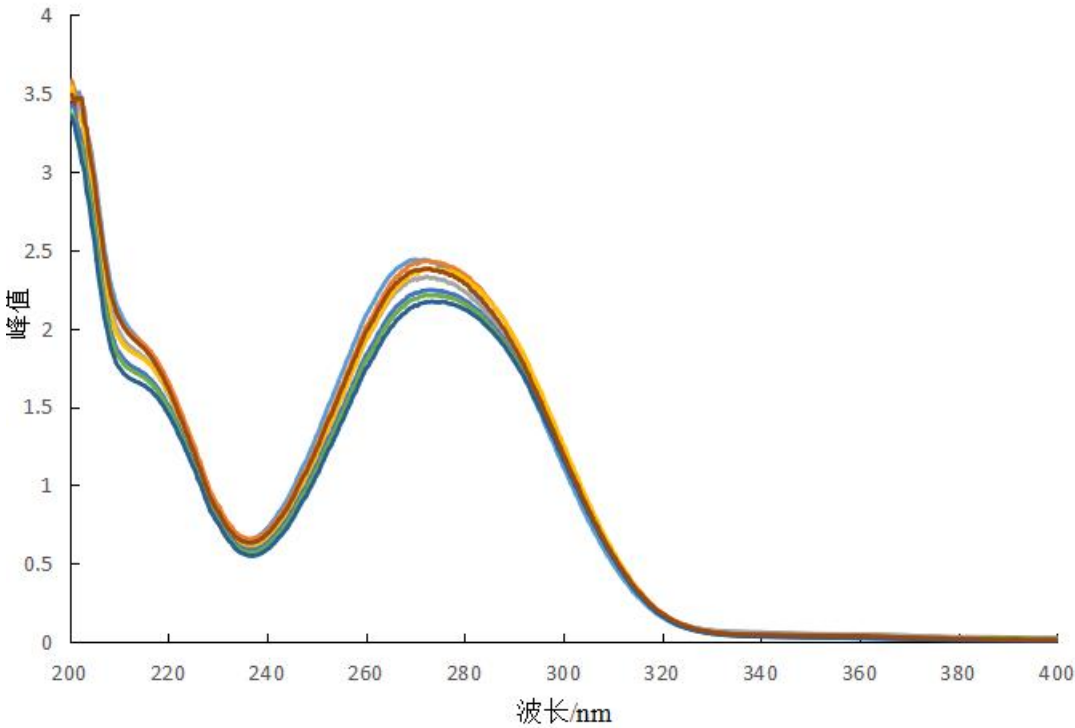


图 8：非诱导型培养的菌株扫描全波长

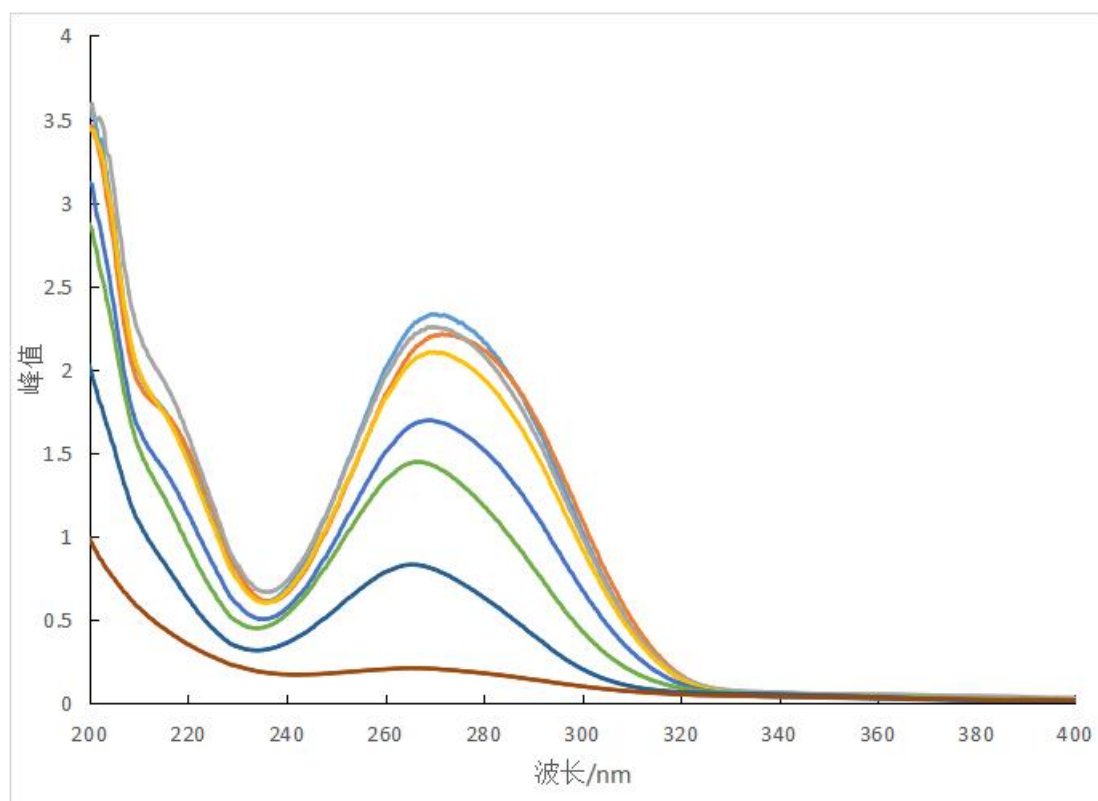


图 9：诱导型培养的菌株扫描全波长

2.6 中间代谢产物检测

利用 HPLC 对休止细胞反应后的样品进行分析,对氨基苯甲酸的吸收峰出现在 13 min。除此之外,在 HPLC 图谱中发现一个新的吸收峰出现在 9 min。推测该吸收峰为黄杆菌 PABD 在降解对氨基苯甲酸的过程中,产生中间产物。

根据已报道的芳香族化合物的代谢过程可以预测,在对氨基苯甲酸的降解过程中会在苯环上面添加一个羟基。因此中间代谢产物可能是 4-氨基-3-羟基苯甲酸,也有可能是 4-氨基水杨酸。因此我们使用这两种化合物的标准品进行了 HPLC 分析。结果表明 4-氨基-3-羟基苯甲酸的图谱与 9 min 出现的新的化合物的吸收峰完全一致。因此我们可以确定黄杆菌 PABD 分解对氨基苯甲酸该中间产物是 4-氨基-3-羟基苯甲酸。该发现可能为以后研究对氨基苯甲酸的降解奠定基础 [11]。

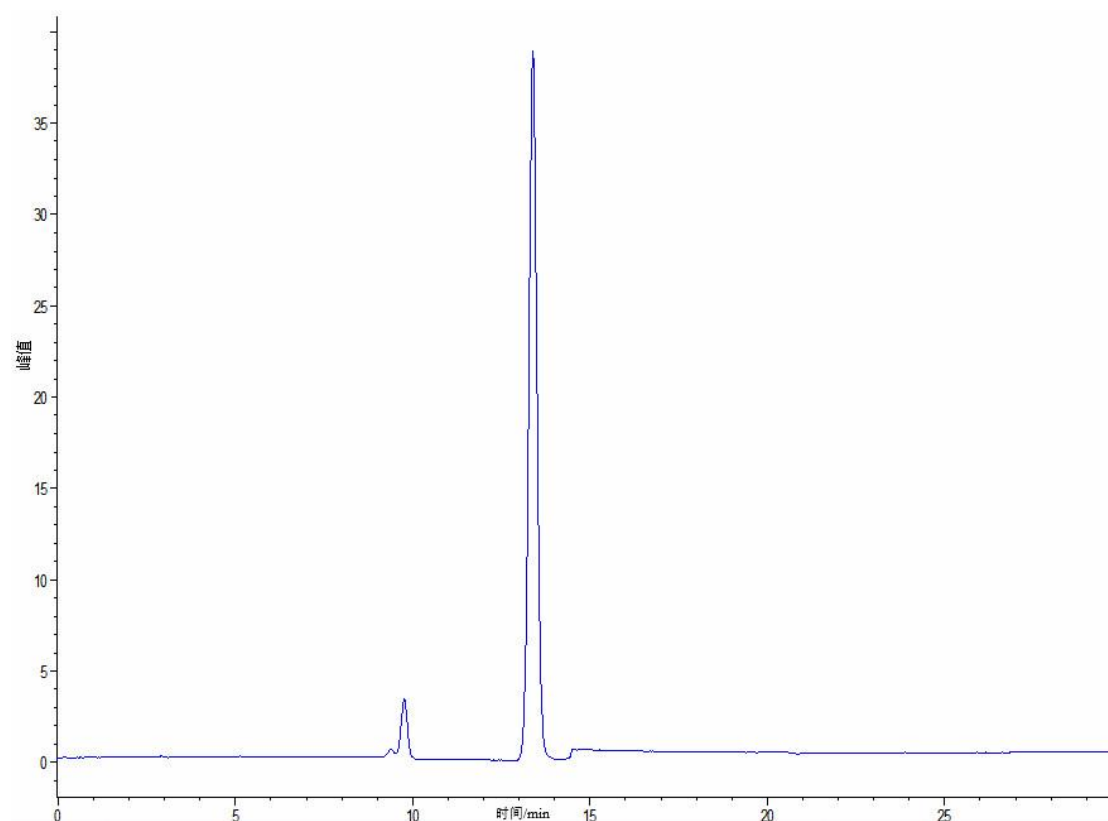


图 10: HPLC 图谱

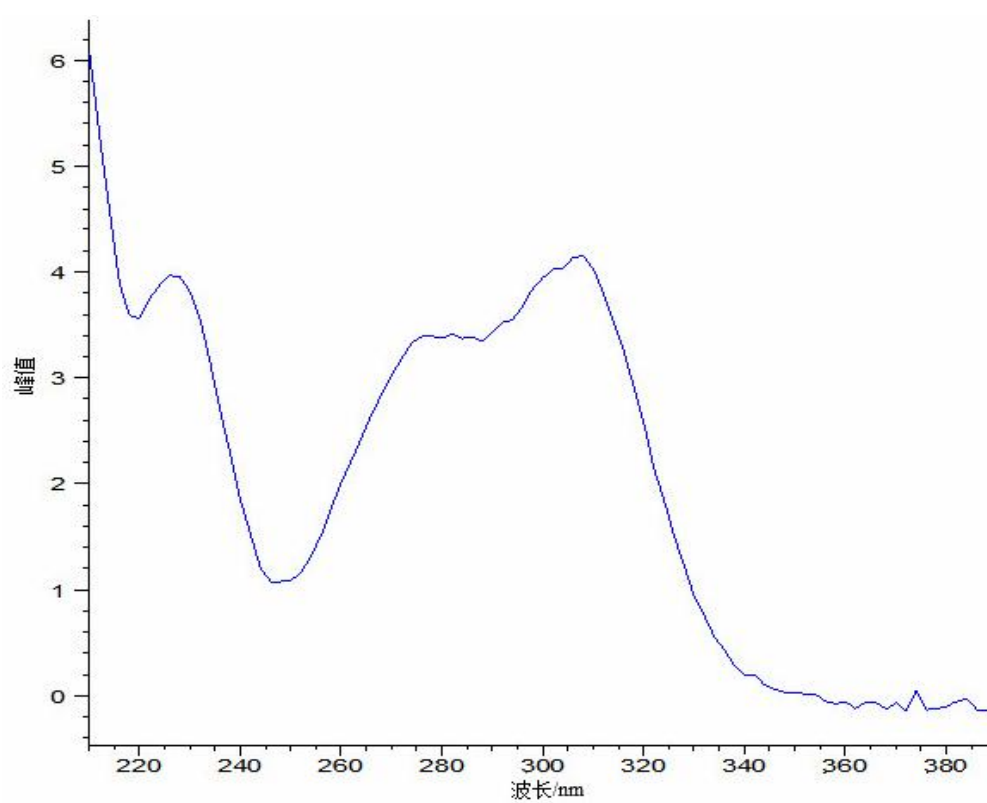


图 11: 中间代谢产物图谱

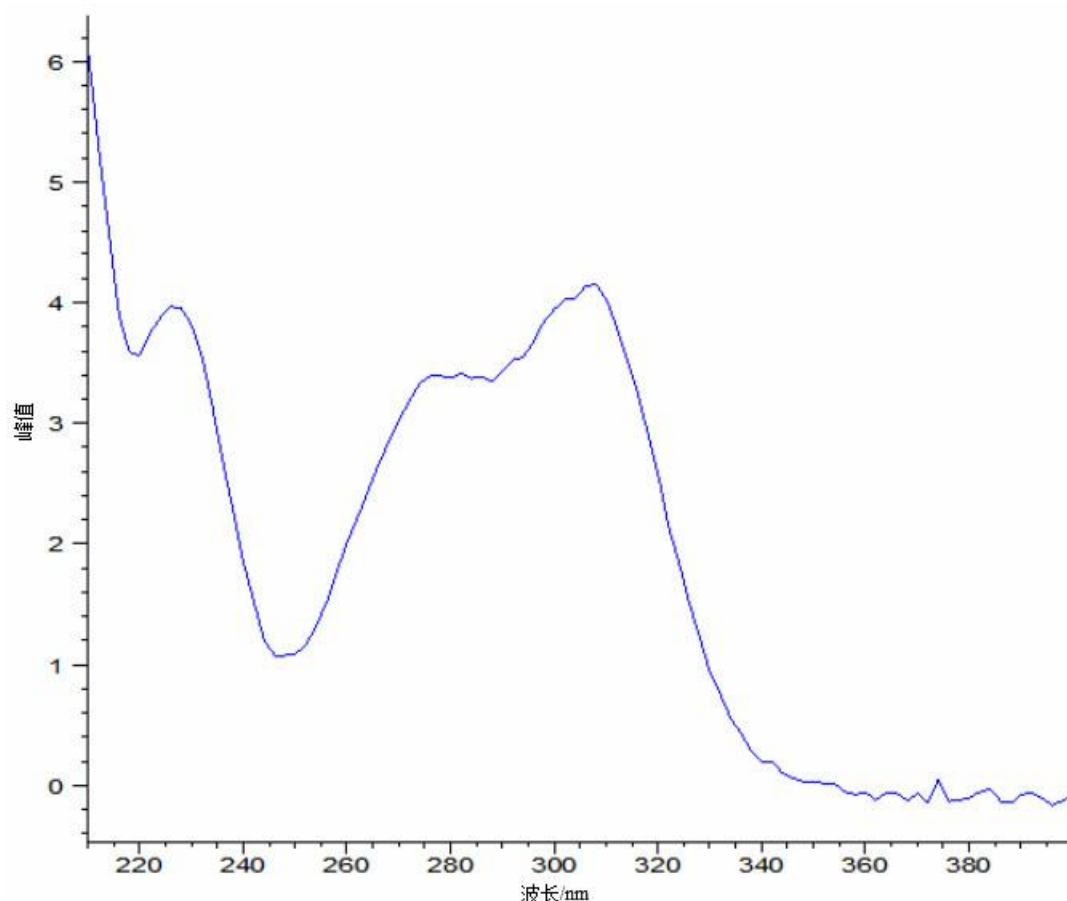


图 12： 4-氨基水杨酸标准图谱

3 讨论

黄杆菌 PABD 能够以对氨基苯甲酸作为唯一碳氮源和能源进行生长,能够高效降解对氨基苯甲酸,在对氨基苯甲酸浓度为 4.0 mg/mL 的时候仍然能够正常生长,并完全降解对氨基苯甲酸。该菌株的最适生长条件和降解条件为 25°C-30°C, pH 为 7.0-8.0。HPLC 检测诱导型培养样品时,发现生成了中间产物,初步推断是 4-氨基-3 羟基苯甲酸,但是想要真正确定其化学结构组成,还需要后续验证。可使用制备型 HPLC,获取图 10 保留时间 9.3 min-9.8 min 的样品,再使用 Thermo Fisher 高分辨 LC-MS 去进行定性分析。与 4-氨基-3 羟基苯甲酸标准品对比,进一步验证推测的中间产物是否正确。可以通过全基因组测序,比对找到与对氨基苯甲酸降解有关的基因,从基因水平和蛋白水平进一步阐述对氨基苯甲酸的降解途径,为解决对氨基苯甲酸引起的环境污染等问题提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 吴强,陈建挺,郭黎,等.紫外/过硫酸盐降解水中对氨基苯甲酸的研究[J].生物化工,2019,5(01):83-86.
- [2] Caroline M. Peres,Rainer Russ,Hiltrud Lenke,Spiros N. Agathos. Biodegradation of 4-nitrobenzoate, 4-aminobenzoate and their mixtures: new strains, unusual metabolites and insights into pathway regulation[J]. FEMS Microbiology Ecology,2001,37.
- [3]Hao Yu, Shuxue Zhao, Weidong Lu,etal.A novel gene, encoding 3-aminobenzoate 6-monooxygenase, involved in 3- aminobenzoate degradation in Comamonas sp. strain QT12[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2018,102(11):4843-4852.
- [4] 张清,温玉娟,任何军,等.一株对硝基苯酚降解菌的筛选鉴定及其降解特性[J].环境污染与防治,2013,35(02):17-21.
- [5] 王玉萍,谭训刚,陈师勇,等.肉碱脱水酶突变株的获得及其休止细胞反应条件的优化[J].生物技术通讯,2000(04):261-263.
- [6] 张旦亚,杨吉兴.高效液相色谱分类及工作原理[J].化工管理,2017(20):113.
- [7] 叶南,刘飞.高效液相色谱概况及其在水质监测中的应用[J].水利水电快报,2016,37(11):51-54.
- [8] Zeyer J, Kocher H P, Timmis K N. Influence of parasubstituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 52 (2) :334-339.
- [9] 王宏,王呈玉,卢振兰,等.对硝基酚降解菌的降解特性及动力学[J].吉林农业大学学报,2018,40(06):727-733.
- [10] 朱鹏程,赵薇,章琦.复合固定硝化细菌降解小型景观水体中的氨氮[J].水处理技术,2019,45(02):18-22.
- [11] 徐伟慧,刘帅,王志刚.一株 DMP 降解菌的分离鉴定及特性研究[J].农业环境科学学报,2018,37(08):1724-1732.

致谢

本实验论文能够得以顺利完成,首先要感谢的就是对我进行指导的于浩老师,还有、卢伟东老师。如果没有老师们在方方面面的殷切指导和答疑解惑,实验在很多个难关面前都会停滞不前。在老师们的指导下,我不仅增长和锻炼了自身的专业知识和实验技能,他们对于实验谨慎求实的态度,刻苦钻研、不畏失败的精神也使我受益匪浅。实验室王同海、赵建俊、杨霆师兄和赵书雪、王菲、高杰、孙倩姝师姐也给予了我很多帮助,还有与我一起实验的同学们的相互帮助,在此对他们的无私帮助表示感谢。还要感谢学校为我实验的进行提供场所、仪器和试剂,药品的支持。最后,我要感谢我的家人和朋友精神上的支持,使我能愉快地完成实验。