

# 一株对硝基酚降解菌的筛选及其植物促生特性

任何军,王聪

吉林大学环境与资源学院,长春 130061

**摘要** 从长期受对硝基酚(para-nitrophenol, PNP)污染的土壤中,分离到一株能够降解对硝基酚并以其作为唯一碳源和氮源生长的菌株,命名为PN-1。经16S rDNA序列分析,初步鉴定该菌株为假单胞菌(Pseudomonas)。通过研究其对PNP的降解、重金属以及抗生素抗性、植物促生等特性,得到如下结果:该菌株对PNP的最大耐受质量浓度为200 mg/L,具有卡那霉素和氯霉素抗性,对4种重金属 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 和 $Cr^{6+}$ 的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)分别为700、500、800和100 mg/L,同时具有产吲哚乙酸(IAA)和铁载体、1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶活性以及溶磷能力。通过用荧光蛋白标记后能在土壤中正常存活,具有能与植物联合修复PNP污染土壤的潜力,有较好的使用前景。

**关键词** 对硝基酚;重金属;抗生素;植物促生特性;荧光蛋白标记

对硝基酚(para-nitrophenol, PNP)是一种重要的化工原料,作为原材料或中间体被广泛应用于农药、制药工业、杀虫剂、炸药以及染料等行业。但是随着工业、农业等的快速发展,PNP的污染日益严重,如有机磷杀虫剂的广泛使用,使得甲基对硫磷经微生物水解作用转化为PNP,继而进入土壤和水体中造成污染。而PNP具有致癌、致畸、致突变的潜在毒性,已被美国环保署列为优先控制污染物名单,其在水体中的限值质量浓度必须小于10 ng/L<sup>[1]</sup>,故PNP的污染治理迫在眉睫。目前,酚类有机污染物的物理处理方法主要包括萃取法、吸附法、离子交换法、超声法、催化氧化法、盐析法等<sup>[2-3]</sup>,化学处理方法包括化学光催化法、化学氧化法、化学沉淀法、电解法等<sup>[4-5]</sup>,生物法包括活性污泥法、生物流化床法、生物修复法等<sup>[6-7]</sup>。其中生物修复主要是利用生物有机体,尤其是微生物的降解作用将污染物分解和无害化的过程,因其具有费用少、耗能低、效果好、过程稳定、操作简单等优点而受到广泛的应用与研究。

尽管PNP是人工合成的环境外来化合物,难以生物降解,但是经过长期的接触驯化,微生物具有的遗传变异以及质粒传递性,使不少微生物具有了降解或部分降解硝基酚的能力。20世纪90年代以后,许多学者注意到了植物和微生物共存体系对污染物超积累去除的重要性。大量研究结果表明,植物体内及根际土壤存在对植物生长具有促进作用的促生菌,它们主要通过产生植物激素吲哚乙酸(IAA),1-氨基环

丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶<sup>[8]</sup>和铁载体等次生物质,有效减少植物有害物质乙烯的产生,刺激植物根系的发育,从而促进植物对重金属和有机污染物的吸收和降解。据不完全统计,国内外已发现包括荧光假单胞菌、芽胞杆菌、根瘤菌、沙雷氏属等20多个种属的根际微生物具有防病促生的潜能,其中最多的是假单胞菌属<sup>[9]</sup>。

基于以上国内外研究现状,本研究的目的是筛选能够降解PNP且具有植物促生特性的菌株,表征其降解PNP的能力及植物促生特性;并用荧光蛋白对其进行标记,考察其能否在土壤中存活,以期利用该菌与植物联合修复PNP污染土壤打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂和培养基

试剂:对硝基酚、葡萄糖、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯;溶液a:0.012 g 铬天青溶于10 mL双蒸水中,并与2 mL 1 mmol/L  $FeCl_3$ 溶液混匀,得溶液a;溶液b:0.015 g HDTMA(十六烷基三甲基溴化铵)溶于8 mL双蒸水中,得溶液b;染液c:溶液a缓慢加入溶液b中,充分混匀即得染液c。

培养基:1)无机盐培养基(g/L): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  3.8,  $KH_2PO_4$  1.0, KCl 3.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2;2)SLP培养基(g/L):葡萄糖 10,  $(NH_4)_2SO_4$  1,  $K_2HPO_4$  0.5,  $MgSO_4$  0.5, NaCl 0.1, 酵母粉

收稿日期:2015-06-04;修回日期:2015-09-24

基金项目:国家自然科学基金项目(20771030,20671025)

作者简介:任何军,副教授,研究方向为微生物技术,电子邮箱:renhejun@126.com

引用格式:任何军,王聪.一株对硝基酚降解菌的筛选及其植物促生特性[J].科技导报,2016,34(2):231-236;doi:10.3981/j.issn.1000-7857.2016.2.039

0.5, CaCO<sub>3</sub> 0.5; 3) LB 培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 5; 4) YEM 培养基(g/L): 甘露醇 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, CaCO<sub>3</sub> 3, 酵母粉 1, FeCl<sub>3</sub> 0.01; 5) 培养基 d: 将 10×MM9 盐溶液(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, NaCl 2.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 5 g, 双蒸水 500 mL) 20 mL, 哌嗪二乙醇磺酸 6.04 g 加入盛有 150 mL 双蒸水的洁净三角瓶中, 混匀后用 50% NaOH 调节 pH 值至 6.8, 再加入琼脂粉 3.2 g, 得培养基 d; 6) 蓝色定性检测培养基: 量取 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 0.2 mL、1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>·Mg<sub>2</sub>O 4 mL、10% 酪蛋白氨基酸 6 mL 及 20% 葡萄糖溶液 2 mL 加入培养基 d 中, 再沿瓶壁加入染液 C, 充分摇匀(但勿产生气泡), 即得蓝色定性检测培养基; 7) MKB 培养基: 酪蛋白氨基酸 5.0 g/L, 甘油 15 mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 g/L; 8) PKO 培养基(g/L): Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3.0~5.0, 蔗糖 10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, KCl 0.2, 酵母粉 0.5, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.03, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03; 9) SM 培养基: 葡萄糖 1.0 g/L, 蔗糖 1.0 g/L, 柠檬酸钠 1.0 g/L, 苹果酸 1.0 g/L, 甘露醇 1.0 g/L, CH<sub>3</sub>COONa 1.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g/L, CuSO<sub>4</sub> 1 mg/L, NiSO<sub>4</sub> 1 mg/L, ZnSO<sub>4</sub> 5 mg/L, FeSO<sub>4</sub> 5 mg/L, MnSO<sub>4</sub> 3 mg/L, CoSO<sub>4</sub> 1 mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2 mg/L; 10) SMA 培养基: 在 SM 培养基中加入经过滤除菌的 ACC, 使其质量浓度为 0.5 g/L, 得 SMA 培养基; 11) SMN 培养基: 在 SM 培养基中加入 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 使其质量浓度为 0.5 g/L, 得 SMN 培养基。

### 1.1.2 主要仪器

HZQ-F160 振荡培养箱(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); 722 型可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); pH 计(德国 sartorius 公司); 荧光显微镜(北京东胜创新生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 对硝基酚降解菌的分离筛选

取 1 g 长期被对硝基酚污染的土壤样品用 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液稀释, 将土壤菌悬液接种到以对硝基酚(50 mg/L) 为唯一碳源和氮源的无机盐固体培养基上。选取能使培养基褪色的生长旺盛的不同形态的单克隆, 接入含有 50~500 mg/L 的对硝基酚的液体无机盐培养基中进行纯化和驯化培养, 选取对硝基酚降解率最大的菌株留用。

### 1.2.2 16S rDNA 序列分析

提取留用菌株的总 DNA, 利用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GATTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系: 10×buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L 2.5 μL, dNTP 0.4 mmol/L 1 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, Taq 酶 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 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 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环。PCR 产物委托长春库美生物工程技术有限公司测序。测序结果通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比分析。

### 1.2.3 菌株的对硝基酚降解

将 OD<sub>600</sub>=1 的菌液 1 mL 接种到 100 mL 无机盐培养基中(对硝基酚质量浓度为 200 mg/L), 于相同时间间隔用分光光度计分别在 400 和 600 nm 下测定对硝基酚的剩余质量浓度和生物量。设对照组, 对照组除不加菌外其他操作均与上述相同。

### 1.2.4 菌株的重金属和抗生素抗性

将菌株分别接种到添加了 Cd<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Cr<sup>6+</sup> 4 种重金属的 SLP<sup>10</sup> 培养基上, 重金属质量浓度范围均为 100~1000 mg/L, 在 28℃ 的培养箱中培养 7 d, 测定其重金属的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。同时将菌株接种到添加了氯霉素、氨基霉素和卡那霉素的 LB 培养基上, 同样条件下培养, 根据其是否能生长判断其抗生素抗性。

### 1.2.5 菌株的植物促生特性

1) 细菌产 IAA 能力检测参照 Bricetal 等<sup>[11]</sup>的方法。(1) 定性测定: 在 YEM 液体培养基<sup>[12,13]</sup> 中加入色氨酸, 并接入菌液培养 12 h 后, 吸取 2 mL 菌液并加入 4 mL 显色液(1 mL 0.5 mol/L FeCl<sub>3</sub> 和 50 mL 35% HClO<sub>4</sub> 混合) 观察。颜色呈粉红色者为阳性, 颜色不改变者为阴性。(2) 定量测定: 取 YEM 培养基培养 12 d 的菌液 4℃ 离心 10 min, 取上清液和 4 mL 显色液加入试管中, 于 30℃ 温箱中显色 30 min, 530 nm 下比色(以标准曲线的“0”调零), 记录 OD 值。

2) 细菌产铁载体能力测定采用常规 CAS 法<sup>[14]</sup>。(1) 定性测定: 将细菌接种在蓝色定性检测培养基上, 28℃ 培养。产生铁载体的菌株在菌苔周围形成橙红色晕圈。(2) 定量测定: 取 MKB 培养基培养 48 h 的培养液离心 15 min, 取上清液 3 mL 加入到 3 mL CAS 检测液中, 充分混匀。30 min 后用分光光度计测定 630 nm 波长处的吸光值(A)。另取 3 mL 铬天青检测液与 3 mL 未接种的 MKB 液体培养基充分混匀, 同法测定吸光值即为参比值(A<sub>r</sub>), A/A<sub>r</sub> 值越小, 反应铁载体的产量越大。

3) 细菌的溶磷能力测定: 将细菌接种于含 5 g 磷酸三钙的 PKO 液体培养基中, 置于摇床上(28℃, 160 r/min) 培养 10 d 后在 4℃ 离心 15 min, 取上清液用钼酸铵比色法<sup>[15]</sup> 测定有效磷的含量。对照除不接种菌株外与上述处理相同。

4) 细菌 ACC 脱氨酶活性的定性检测参照 Belimov 等<sup>[16]</sup>的方法。将 OD<sub>600</sub>=1 的菌液 1 mL 分别等量接入 100 mL SM、SMA、SMN 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 48 h, 用分光光度计测定经不同处理的菌悬液的 OD<sub>600</sub> 值, 并进行比较。在 SM 培养基中不能生长、在 SMA 和 SMN 培养基中可以良好生长的菌株便具有 ACC 脱氨酶活性。

### 1.2.6 菌株的荧光蛋白标记

参照并结合莫才清等<sup>[17]</sup>及 Wilson 等<sup>[18]</sup>的方法。将受体菌、辅助菌和供体菌按 1:1:1 的体积比混合, 离心 5 min 后弃去上清, 向沉淀中加入 LB 培养基 1 mL, 混匀, 离心 5 min, 弃去上清, 重复 2 次。将孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜贴于 LB 平板表面, 并将打散的浓菌液置于滤膜中央, 待滤膜上的液体被

平板吸收后,倒置放于培养箱,28℃培养8 h,随后将其置于4℃条件下避光培养8 h,然后再放置于28℃条件下避光培养8 h。向锥形瓶中加入100 mL LB培养基(含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L氯霉素),并将微孔滤膜放入锥形瓶中,打散菌体,28℃培养2 d。待LB液体培养基变浑浊后,将其接种在LB(含50 mg/L卡那霉素和50 mg/L氯霉素)平板上,用荧光显微镜观察。

### 1.2.7 荧光蛋白标记菌株在对硝基酚污染土壤里的存活

将40 mL无机盐培养基(对硝基酚质量浓度为200 mg/L),200 g土壤和4 mL  $OD_{600}=1$ 的标记菌株加入到500 mL烧杯中,28℃黑暗中培养一周后取1 g上述土样加入到50 mL PBS中,超声10 min,静止2 h,过定量滤纸,将滤液再用黑膜过滤,截留在黑膜上的微生物在荧光显微镜下观察其存活状况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 对硝基酚降解菌的分离及鉴定

经过一系列分离筛选,得到一株耐性较好的菌株。由16S rDNA序列与Genbank中已经登录的基因序列进行分析对比得知,所筛选得到的菌株与假单胞菌 *Pseudomonas monteilii* sp.有99.9%的相似性,如表1所示。本研究将其命名为PN-1。

表1 细菌同源性比对

Table 1 Comparison of bacterium homology

科	种	同源性/%
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99.9
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99.7
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99.6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas fulva</i>	99.2
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas oryzae</i>	99.1
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas putida</i>	98.7
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas parafulva</i>	98.6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	98.6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas asplenii</i>	98.2
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	98.2
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas koreensis</i>	98.2
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas jessenii</i>	98.1

### 2.2 PN-1降解对硝基酚的性能

将PN-1接种到PNP质量浓度为200 mg/L的无机盐培养基中,以PNP作为唯一的碳源、氮源和能源,震荡培养60 h,期间以相同时间间隔测定PNP的残留量和 $OD$ 值。如图1所示,在培养最开始的36 h内,PNP的质量浓度没有明显降低,但生物量有缓慢增长,当生物量积累到一定程度后,PNP的质量浓度呈现急剧下降,经过3 d,对硝基酚被完全降解,溶

液由黄色变为无色。而对照一直呈现亮黄色,PNP质量浓度基本没有改变,说明PN-1具有降解PNP的能力。当PNP的质量浓度大于200 mg/L时,3 d内没有监测到污染物的降解,且生物量也没有增加,该现象与之前报道过的红球菌相似,在高质量浓度时对细菌的生长产生抑制作用<sup>[7,19]</sup>。此结果同时说明PN-1对PNP的毒性耐受限为200 mg/L,超过此质量浓度该菌株不能生长。

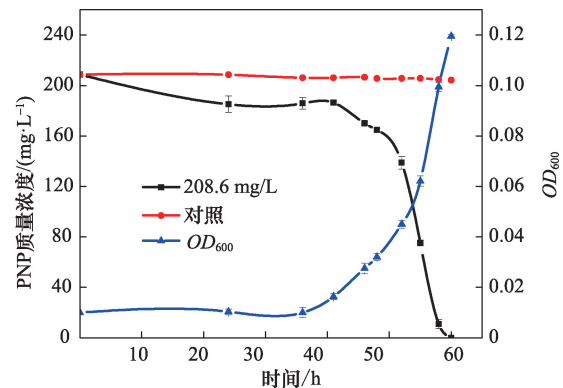


图1 对硝基酚的降解及PN-1的生长曲线

Fig. 1 Degradation of PNP and microbial growth curve

### 2.3 PN-1的重金属和抗生素耐性

将PN-1接种到含有重金属和抗生素的LB培养基上,根据其是否能生长判断其耐性。结果发现,PN-1能在含有卡那霉素和氯霉素的培养基上生长,而在含有氨基糖苷类的培养基上则不能生长,说明其具有卡那霉素和氯霉素抗性。PN-1对4种重金属 $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 和 $Cr^{6+}$ 的最低抑制浓度(MIC)分别为700、500、800和100 mg/L,其中对 $Cd^{2+}$ 和 $Zn^{2+}$ 的耐受性最高,可以与具有金属吸附性的植物联合修复重金属污染的土壤,既能保证其自身繁殖又能促进植物的生长<sup>[20]</sup>。

### 2.4 PN-1的植物促生特性

1) PN-1产IAA能力。经定性检测(图2),加入显色剂显色30 min后,本组实验的3个平行实验的溶液由浅黄色变为

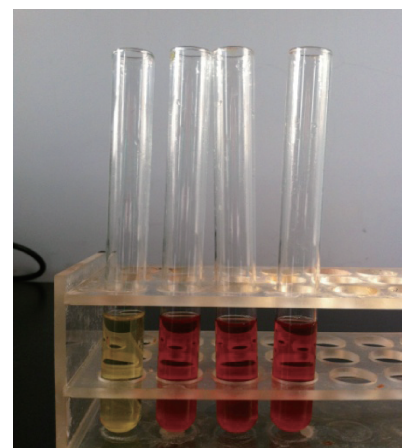


图2 IAA显色反应

Fig. 2 Chromogenic reaction of IAA

深粉色,表明其具有较强的产 IAA 能力。通过进一步的定量检测(图3),在添加了色氨酸的 YEM 培养基中,PN-1 产 IAA 的量随时间不断增加,在 60 h 时达到最大,为  $(12.98 \pm 0.002)$  mg/L,之后随着细菌细胞进入衰亡期,IAA 产量开始下降。

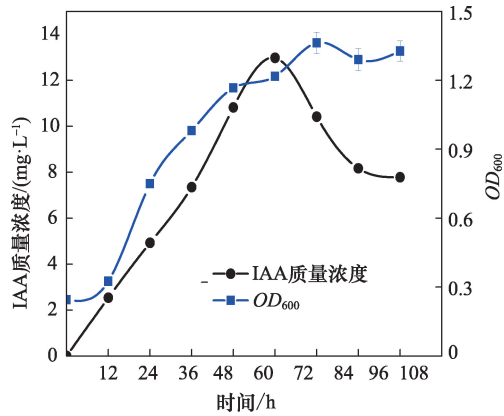


图3 PN-1的 IAA 产量及生长曲线

Fig. 3 IAA production and growth curve

2) PN-1 产铁载体能力。如图4所示,28℃培养 5 d 后,菌苔周围出现橙红色晕圈。进一步的定量检测显示(图5),5 d 时 A/A<sub>r</sub> 值最小,表明此时产生铁载体最多。5 d 后铁载体的量开始下降。整个过程中 pH 值波动不大,表明铁载体的产生未对体系的 pH 值产生显著影响。

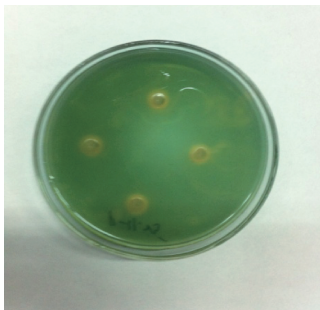


图4 产铁载体现象

Fig. 4 Phenomenon of siderophore production

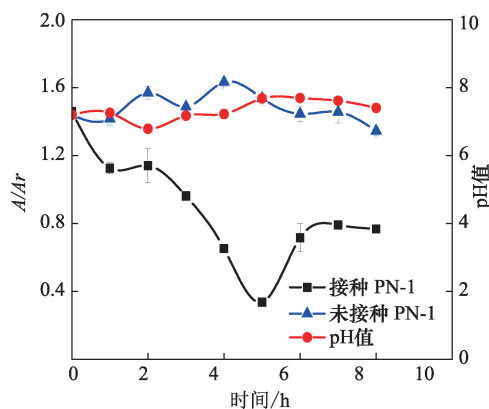


图5 PN-1的 A/A<sub>r</sub> 值及 pH 值变化

Fig. 5 A/A<sub>r</sub> of PN-1 and pH change

3) PN-1 溶磷能力。溶磷检测的结果如图6所示。与未接种 PN-1 的对照相比,接种处理可溶磷的质量浓度有了很大的增加,5 h 后溶解速度开始迅速加快,最高时达  $108.87 \pm 1.03$  mg/L,而且在可溶磷质量浓度增加的过程中,pH 值由最初的中性逐渐下降到酸性,表明 PN-1 是通过降低溶液的 pH 值来达到溶磷目的。

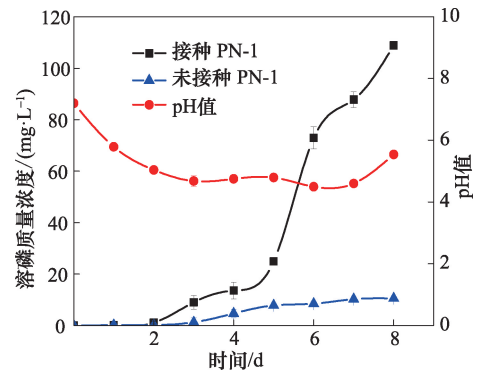


图6 PN-1的溶磷及 pH 值变化

Fig. 6 Phosphate solubilization and pH change

4) PN-1 的 ACC 脱氨酶活性。如图7所示,在 SMA 和 SMN 培养基中,PN-1 能够生长,而在 SM 中则不能,表明 PN-1 能够利用 ACC 作为氮源生长,其具有 ACC 脱氨酶活性。

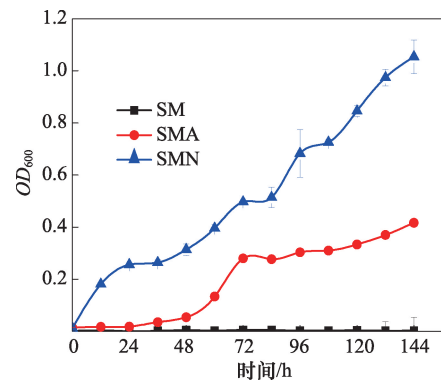


图7 PN-1的 ACC 脱氨酶活性

Fig. 7 ACC deaminase activity

## 2.5 荧光蛋白标记菌株 PN-1 在对硝基酚污染土壤里的存活

荧光显微镜观察到的结果如图8所示,从图中可见带有绿色荧光的菌株,表明供体菌中的目的质粒经结合作用转移到了受体细胞 PN-1 中,标记成功<sup>[21]</sup>。将标记的 PN-1 接种到被对硝基酚污染的土壤中,黑暗中 28℃ 培养 7 d 后,经过预处理在荧光显微镜下观察。由图9可见仍有带绿色荧光的菌株,证明标记后的菌株在对硝基酚污染的土壤中可以正常存活和繁殖。鉴于 PN-1 具有降解 PNP 和植物促生功能,利用其 GFP 标记菌株,可以监测 PN-1 在土壤及植物根际的分布和迁移,深入研究其对土壤多样性的影响<sup>[22,23]</sup>,对进一步联合植物修复 PNP 污染土壤具有重要意义。

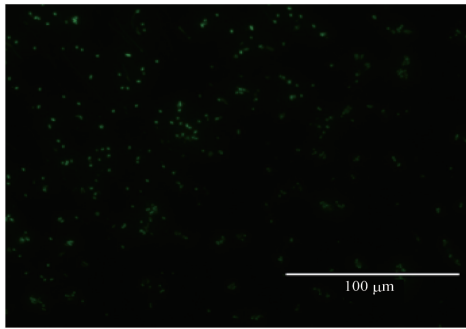


图8 PN-1的荧光蛋白标记  
Fig. 8 GFP-tagged PN-1

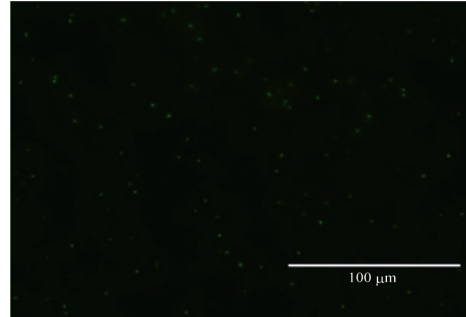


图9 土壤中的PN-1的存活  
Fig. 9 Survival of PN-1 in soil

### 3 结论

从受对硝基酚污染的土壤中分离到一株菌命名为PN-1。它能以对硝基酚做为唯一碳源和氮源,通过16S rDNA序列分析表明其与假单胞菌同源率为99.9%。该菌株对PNP的降解较快,耐受质量浓度可达200 mg/L,且具有产IAA、产铁载体、溶磷及ACC脱氨酶活性4种植物促生特性,用GFP标记后可以在土壤中正常存活和繁殖,具有与植物联合修复对硝基酚污染土壤的前景,也是亟待进一步研究的课题。

#### 参考文献(References)

- [1] Keither L, Telliard W. Special report: Priority pollutants: I—a perspective view[J]. *Environmental Science Technology*, 1979, 13(4): 416–423.
- [2] 肖子瑞, 周寅飞. 超声波技术在含酚有机废水处理中的应用[J]. *河南化工*, 2011, 28(11/12): 22–24.  
Xiao Zirui, Zhou Yinfei. Ultrasound technology for degradation phenol in organic wastewater treatment[J]. *Henan Chemical Industry*, 2011, 28(11/12): 22–24.
- [3] 赵小波, 陈晓昫, 王京平, 等. 工业废水中氯苯酚类化合物的处理技术研究[J]. *广东化工*, 2010, 37(3): 145–146.  
Zhao Xiaobo, Chen Xiaoyun, Wang Jingping, et al. Study on the treatment of chloropenolic compounds in industrial wastewater[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2010, 37(3): 145–146.
- [4] 丛俏, 曲蛟. 高级氧化技术处理含酚炼油废水的研究[J]. *石油炼制与化工*, 2011, 42(6): 103–107.  
Cong Qiao, Qu Jiao. Degradation of refining wastewater containing phenol with super oxidation method[J]. *Petroleum Processing and Petrochemicals*, 2011, 42(6): 103–107.
- [5] 周立, 钟宏, 李雪萍. 气液流化床内氧化法处理含酚废水[J]. *中南大学学报: 自然科学版*, 2011, 42(11): 3284–3288.  
Zhou Li, Zhong Hong, Li Xueping. Phenolic wastewater treatment by fenton reagent in gas-liquid fluidized bed reactor[J]. *Journal of Cental South University: Science and Technology*, 2011, 42(11): 3284–3288.
- [6] 张雯, 苏静静, 曹丽琴. 苯酚降解菌的筛选及其降解性能研究[J]. *环境科学与管理*, 2013, 38(2): 89–94.  
Zhang Wen, Su Jingjing, Cao Liqin. Study on separation and degradation characteristics of phenol degrading bacteria[J]. *Environmental Science and Management*, 2013, 38(2): 89–94.
- [7] 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(2): 17–21.  
Zhang Qing, Wen Yujuan, Ren Hejun, et al. Isolation and characterization of p-nitrophenol degrading bacteria and the degradation character-
- [8] 陈佛保, 柏珺, 林庆祺, 等. 植物根际促生菌(PGPR)对缓解水稻受土壤锌胁迫的作用[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(1): 67–74.  
Chen Fobao, Bai Jun, Lin Qingqi, et al. Application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for reducing zinc on paddy rice[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(1): 67–74.
- [9] 胡江春, 薛德林, 马成新, 等. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. *应用生态学报*, 2004, 15(10): 1963–1966.  
Hu Jiangchun, Xue Delin, Ma Chengxin, et al. Research advances in plant growth promoting rhizobacteria and its application prospects[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(10): 1963–1966.
- [10] He H D, Ye Z H, Yang D J, et al. Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*[J]. *Chemosphere*, 2013, 90(6): 1960–1965.
- [11] Bricetal J M, Bostock R M, Silverstone S E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a Nitrocellulose membrane[J]. *Apple Environ Microbiol*, 1991, 57(2): 535–539.
- [12] Datta C, Basu P S. Indole acetic acid production by a Rhizobium species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*[J]. *Microbiological Research*, 2000, 155(2): 123–127.
- [13] Skerman V B D. 1:A guide to the identification of the Genera of Bacteria with methods and digest of generic characteristics[M]. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1959: 189–191.
- [14] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Chemistry*, 1987, 160(1): 47–56.
- [15] Watanabe F S, Olsen S R. Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO<sub>3</sub> extracts from soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 1965, 29(6): 677–678.
- [16] Belimov A A, Safronova V I, Sergrveva T A, et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(7): 242–252.
- [17] 莫才清, 覃雅丽, 周俊初, 等. 应用发光酶基因对快生型大豆根瘤菌HN01结瘤作用进行检测[J]. *微生物学报*, 1998, 38(3): 213–218.  
Mo Caiqing, Qin Yali, Zhou Junchu, et al. Luxab genes as marker for detecting rhizobium fredii HN01 nodulation functions[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1998, 38(3): 213–218.
- [18] Wilson K J, Sessitsch A, Corbo J C, et al. Beta-Glucuronidase(GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria[J]. *Microbiology*, 1995, 141(7): 1691–1705.
- [19] 万年升, 顾继东, 郝伏勤, 等. *Rhodococcus* sp. Ns 对硝基苯酚的好氧

- 生物降解[J]. 环境科学, 2007, 28(2): 431-435.  
Wan Niansheng, Gu Jidong, Hao Fuqin, et al. Degradation of p-nitrophenol by a mangrove bacterial *Rhodococcus* sp. Ns[J]. Environmental Science, 2007, 28(2): 431-435.
- [20] 樊霆, 叶文玲, 陈海燕, 等. 农田土壤重金属污染状况及修复技术研究[J]. 生态环境学报, 2013, 22(10): 1727-1736.  
Fan Ting, Ye Wenling, Chen Haiyan, et al. Review on contamination and remediation technology of heavy metal in agricultural soil[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(10): 1727-1736.
- [21] 陈力玉. 基于三亲本杂交的荧光标记根瘤菌的构建及其稳定性检测研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.  
Chen Liyu. Establishment and stability test of fluorescence marked rhizobium based on triparental mating[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013.
- [22] Xiong H M, Hua Z G, Zhang Y, et al. Survival of GFP-tagged *Rhodococcus* sp. D310-1 in chlorimuron-ethyl-contaminated soil and its effects on the indigenous microbial community[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 252-253: 347-354.
- [23] 胡婵娟, 刘国华, 吴雅琼. 土壤微生物生物量及多样性测定方法评述[J]. 生态环境学报, 2011, 20(6/7): 1161-1167.  
Hu Chanjuan, Liu Guohua, Wu Yaqiong. A review of soil microbial biomass and diversity measurements[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20(6/7): 1161-1167.

## Isolation of a para-nitrophenol degrading bacterium and characterization of its plant growth-promoting properties

REN Hejun, WANG Cong

College of Environmental and Resource Sciences, Jilin University, Changchun 130061, China

**Abstract** A para-nitrophenol (PNP) degrading strain, named PN-1, was isolated from the PNP-contaminated soil. PN-1 utilized PNP as the sole carbon and nitrogen source during the cultivation. Based on the result of 16S rDNA gene sequence, the strain was preliminarily designated as *Pseudomona*. Experiments were carried out to investigate the degradation of PNP, heavy metal, antibiotic, plant growth-promoting (PGP) properties and GFP-tagging of PN-1. The results showed that the maximum tolerant dose of TM to PNP was 200 mg/L, and the MICs for the following four heavy metals were 700 mg/L for Cd<sup>2+</sup>, 500 mg/L for Pb<sup>2+</sup>, 800 mg/L for Zn<sup>2+</sup>, and 100 mg/L for Cr<sup>6+</sup>. What is more, PN-1 could grow in media with chloromycetin and ampicillin. PGP traits of PN-1 included IAA, siderophore production, ACC deaminase activity and phosphate solubilizing activity. GFP-tagged PN-1 could survive and bioremediate PNP-contaminated soil with plants.

**Keywords** paranitrophenol; heavy metal; antibiotic; plant growth promotion properties; GFP-tagging

(责任编辑 王媛媛)