

张丽平, 汪文君, 李 智, 等. 对羟基苯甲酸甲酯降解菌的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 337–340.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.084

对羟基苯甲酸甲酯降解菌的初步研究

张丽平, 汪文君, 李 智, 许超艳, 姜安杰, 彭 学

(江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要:对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid, 4HBA)酯类是目前公认的比较安全的防腐剂, 应用于食品、化妆品、医药等的抑菌保鲜。4HBA 酯类的大量使用, 加剧了水体的污染。研究报告显示, 4HBA 酯类具有弱雌激素活性, 人体长期接触可能会诱发乳腺癌或男性不育。以 4HBA 甲酯为唯一能源, 从海洋环境中分离出能降解 4HBA 甲酯的菌株 B1, 探究 B1 菌株的生理生化等特征, 初步了解该菌对 4HBA 甲酯的降解机制, 为研究海洋环境中微生物对 4HBA 酯类的降解奠定基础。研究结果显示, B1 菌株属革兰氏阴性菌, 在 30 ℃、pH 值 7.5 左右的环境下生长良好。通过高效液相色谱可检测出该菌株对 4HBA 甲酯的降解情况。通过 16S rDNA 系统进化树分析发现, 该菌和 *Bacillus timonensis* 的相似性最高, 相似度为 99.5%。*B. timonensis* 是革兰氏阴性厌氧菌, 可从哺乳动物消化道中分离出来, 通常对人体有益。

关键词:4HBA 甲酯; 4HBA 甲酯降解菌; 海洋微生物; 革兰氏阴性菌

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0337-04

对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid, 4HBA)酯类是一种广谱且高效的抑菌剂, 在 pH 值 3~8 内都能够有效地抑制微生物的生长, 4HBA 酯类都具有酚羟基结构, 同苯甲酸、山梨酸相比, 其抗菌性较强且安全性高, 由此被广泛应用于食品和药品领域^[1]。4HBA 酯类包括 4HBA 甲酯、4HBA 乙酯、4HBA 丙酯、4HBA 丁酯、4HBA 辛酯等。尽管 4HBA 酯类被认为是比较安全高效的防腐剂, 但因其大量使用造成的危害也越来越引起人们的重视。4HBA 酯类在食品、药品、化妆品

中的过量添加对人体产生了一定的毒性^[2], 轻者造成人体肠胃不适, 经皮肤粘膜吸收导致发炎症状, 重者则会因其中的雌性激素造成雌性荷尔蒙升高, 是男性不育的诱因, 严重危害人体健康^[3]。4HBA 酯类排放到空气或水体中, 也造成了环境污染, 潜在地威胁着人类的健康^[4-5]。4HBA 甲酯作为 4HBA 酯类的一种, 同样广泛应用于各个领域。4HBA 甲酯的杀菌效果较低, 一般与 4HBA 丙酯一同使用来提高其防腐抗菌效果。4HBA 甲酯的抑菌效果受溶液的 pH 值影响较大, 酸性的环境更有利于其防腐作用^[6]。但若遇到明胶蛋白质、甲基纤维素等高分子化合物, 其防腐效果会被抑制。4HBA 甲酯除了用作防腐杀菌剂, 同时还用于有机合成的护腐添加剂。

随着 4HBA 甲酯的大量使用与排放, 对环境 and 人体的危害也越来越受到人们的关注, 探索出一条安全且高效的降解 4HBA 甲酯的途径至关重要。在外界环境中, 目前 4HBA 酯类的降解方式有臭氧处理、光催化、光降解、紫外光解和物理

收稿日期: 2017-06-01

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31570028); 江苏省科技厅项目(编号: BK20141148)。

作者简介: 张丽平(1992—), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: 1224682385@qq.com。

通信作者: 彭 学, 博士, 教授, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: pengxueinchina@163.com。

[11] 李永强, 王雅楣, 杨越超, 等. 几种硝化抑制剂和包硫尿素(SCU)对土壤 N 素形态和小麦产量的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2016, 33(3): 230–237.

[12] 元文田, 李 彦, 刘兆辉, 等. 氮肥配施硝化抑制剂对菠菜安全品质及土壤氮素的影响[J]. 江西农业学报, 2016, 28(7): 58–62.

[13] 刘建涛, 许 靖, 孙志梅, 等. 氮素调控剂对不同类型土壤氮素转化的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(10): 2901–2906.

[14] 方玉凤, 王晓燕, 庞荔丹, 等. 硝化抑制剂对春玉米氮素利用及土壤 pH 值和无机氮的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2015(6): 18–22.

[15] 朱永超, 李玉娥, 秦晓波, 等. 控释肥和硝化抑制剂对华北春玉米 NO 排放的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(7): 1421–1428.

[16] 吴得峰, 姜继韶, 高 兵, 等. 添加 DCD 对雨养区春玉米产量、氧化亚氮排放及硝态氮残留的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(1): 30–39.

[17] 张 婧, 李 虎, 王立刚, 等. 京郊典型设施蔬菜地土壤 N₂O 排放特征[J]. 生态学报, 2014, 34(14): 4088–4098.

[18] 杨柳青, 季加敏, 巨晓棠. 硝化/脲酶抑制剂对石灰性潮土 N₂O 减排效果及氮素转化的比较[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(3): 605–612.

[19] 熊 舞, 夏永秋, 周 伟, 等. 菜地氮肥用量与 N₂O 排放的关系及硝化抑制剂效果[J]. 土壤学报, 2013, 50(4): 743–751.

[20] 张苗苗, 沈菊培, 贺纪正, 等. 硝化抑制剂的微生物抑制机理及其应用[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(11): 2077–2083.

[21] 许 超, 邝丽芳, 吴启堂, 等. 2-氯-6(三氯甲基)吡啶对菜地土壤氮素转化和径流流失及菜心品质的影响[J]. 水土保持学报, 2013, 27(6): 26–30.

[22] 姜 亮. 硝化抑制剂 2-氯-6(三氯甲基)吡啶微胶囊对土壤氮素转化和玉米生长的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016: 1–57.

[23] 杨 威. 氮肥与双氰胺配施对温室番茄生长及氮素损失的影响研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013: 1–53.

吸附等,但这些方法都不能完全除去 4HBA 酯类,在空气和环境水体中还有一定的残留,降解效果并不理想^[7]。在人体胃肠道内,4HBA 甲酯的代谢方式和去路也有待进一步探索^[8]。从浙江海底泥沙中分离出来的 B1 菌株具有降解 4HBA 甲酯的能力,降解效率高,且 B1 菌株易于培养。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

海底泥沙取自浙江近海。所用试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基的制备 人工海水培养基:ONR7a^[9]。

MB 液体培养基(1 L):Marine Broth 37.4 g,蒸馏水溶解后定容至 1 L,高压蒸汽灭菌 15 min。

唯一碳源培养基(0.05%):4HBA 甲酯、4HBA 乙酯、4HBA 丙酯、4HBA 丁酯各 11.6 g,95% 乙醇溶解并定容至 10 mL,制备成 5% 碳源浓缩液。200 mL 海水培养基中加入 2 mL 碳源浓缩液,分别制备成 4HBA 甲酯、4HBA 乙酯、4HBA 丙酯、4HBA 丁酯培养基。

50 × TAE(100 mL)缓冲液:24.2 g Tris、3.72 g Na₂EDTA · 2H₂O、5.71 mL 的冰醋酸,pH 值 8.2 ~ 8.5,备用。

1 × TAE 缓冲液(100 mL):50 × TAE 稀释使用。

1% 琼脂糖凝胶:1 g 琼脂糖溶于 100 mL 1 × TAE 缓冲液,加热溶解。

1.2.2 菌种的分离 采用涂布平板法进行初筛,划线法进行复筛,最后用 40% 甘油和单一菌种 1:1 保存,储存在 -80 °C 冰箱中。

1.2.3 革兰氏染色 以大肠杆菌(G-菌)为对照,对 B1 菌株进行染色观察,整个染色过程包括涂片、初染、媒染、脱色、复染、镜检等。

1.2.4 B1 菌株的最适温度 挑取单菌落 B1,预培养后离心,加入少量 4HBA 甲酯培养基混匀制备成菌液浓缩液,取等量加入到其他 4HBA 甲酯液体培养基中,每组 3 个平行,分别放在 20、25、30、35、40、45 °C 摇床中培养 18 h,测定吸光度 $D_{600\text{ nm}}$ 值,绘制该菌种的最适温度曲线。

1.2.5 B1 菌株的最适 pH 值 取等量菌液浓缩液分别加入到不同 pH 值的 4HBA 甲酯液体培养基中,pH 值梯度为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0。每组 3 个平行,30 °C 摇床中培养 18 h,测定吸光度 $D_{600\text{ nm}}$ 值,绘制该菌种的最适 pH 值生长曲线。

1.2.6 B1 菌株的生理生化反应 吸取 5 μL 菌液浓缩液滴在生化反应管内,30 °C 培养箱中培养 24 h 后,观察生化反应管内培养液的颜色变化情况。

1.2.7 菌种鉴定 试剂盒提取 B1 全基因组:新鲜菌液离心浓缩,加入 200 μL GA、20 μL Proteinase K、220 μL GB 混合均匀,70 °C 水浴 10 min;再加入 220 μL 无水乙醇,混合后转移至收集管中,离心,弃废液;使用 600 μL PW 清洗 2 次,离心弃废液,室温静置;使用 TE 将吸附柱上的 DNA 洗脱后保存。

B1 菌株的 16S rDNA PCR:在 PCR 反应管中加入超纯水 27.8 μL、10 × PCR Buffer 5 μL、dNTP Mix 5 μL、MgCl₂ 4 μL、Primer1(27F)3 μL、Primer2(1492R)3 μL、模板 DNA 2 μL、

Tag DNA polymerase 0.2 μL 混合均匀。反应管放入 PCR 仪中,设置程序:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环;循环结束后 72 °C 保温 10 min。

核酸电泳:1.2% 琼脂糖溶胶液,加入 2% GoldenView 混匀,倒入胶板冷却凝固;装胶后将 Marker、DNA 样品(与溴酚蓝染液混合均匀后)上样;接上电源,设置电泳条件,当溴酚蓝跑到距末端 1 cm 左右结束电泳,凝胶成像系统扫描和拍照,观察结果。

测序:取 PCR 扩增获得的 16S rDNA 30 μL,浓度 > 50 ng/μL,送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序部进行测序,得到测序结果。

绘制系统进化树:根据测序的结果找出与该菌株相似度较高的其他菌株,绘制系统进化树,深入了解该菌株。

1.2.8 采用 HPLC 检测 B1 菌株对 4HBA 甲酯的降解率 由于利用唯一碳源培养基培养该菌株生长比较慢,而且浓度比较低,先用 MB 培养基培养,至其浓度到 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.5,离心,洗涤后转移至唯一碳源培养基中继续培养,每 2 h 取 1 次样,采用 HPLC 记录培养基中 4HBA 甲酯的降解情况。

1.2.9 B1 菌株对其他 4HBA 酯类的降解情况 将降解 4HBA 甲酯的 B1 菌株,分别接种在 4HBA 甲酯、4HBA 乙酯、4HBA 丙酯、4HBA 丁酯的固体和液体培养基中,培养 2 d,观察该菌的生长情况。

2 结果与分析

2.1 B1 菌株的菌落形态

利用含 0.05% 4HBA 甲酯的海水培养基,以海底泥沙作为样品,在液体培养中多次富集培养后,经过多次划线培养筛选出 B1 菌株,该菌株在固体平板上的菌落形态见图 1。B1 菌株的菌落形态为乳白色不透明,边缘整齐,外观湿润,表面光滑略凸起。

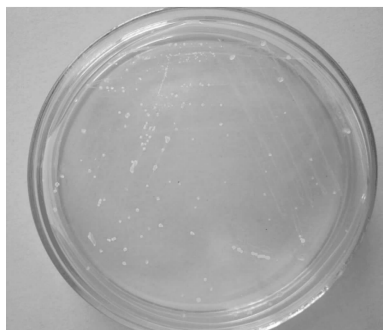


图1 B1 菌株的菌落形态

2.2 B1 菌株的革兰氏染色

经过革兰氏染色后,B1 菌株被染成红色(图 2),故该菌为革兰氏阴性菌。

2.3 B1 菌株的最适温度

根据不同培养温度下 B1 菌液的浓度绘制出最适温度曲线,从图 3 中可知,在 25 ~ 37 °C B1 菌株生长良好,30 °C 时菌液浓度最高,即 B1 菌株的最适生长温度为 30 °C。

2.4 B1 菌株的最适 pH 值

由图 4 可知,在不同 pH 值海水培养基中,30 °C 培养 18 h

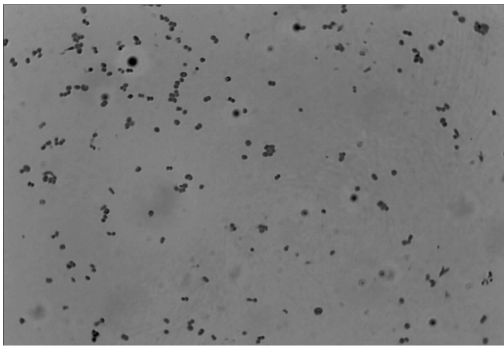


图2 B1 菌株的革兰氏染色结果

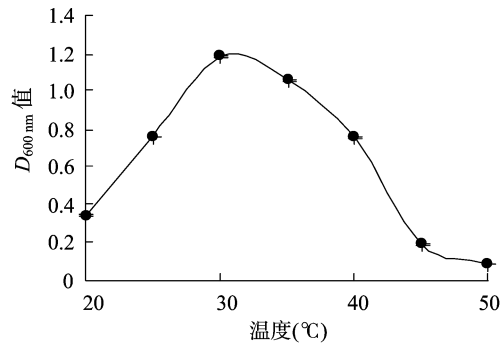


图3 B1 菌株的最适温度

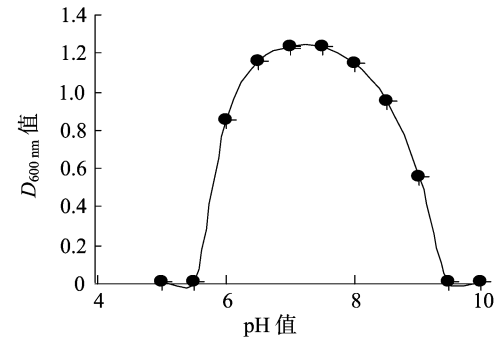


图4 B1 菌株的最适 pH 值

后测定菌液浓度,pH 值在 7.0 ~ 7.5 时 B1 菌株生长速度较快。

2.5 B1 菌株的生理生化反应

将 B1 菌株接种在含不同物质的生化管中,30 ℃ 培养后观察管内颜色变化情况。由表 1 可知,在检测的各种物质中,B1 菌株可以利用绝大多数的糖类、氨基酸等物质,但是不能利用硫化氢和尿素。

表 1 B1 菌种对各种物质的利用情况

糖类代谢		氨基酸代谢	
底物	生长情况	底物	生长情况
葡萄糖	+	精氨酸	+
果糖	+	赖氨酸	+
蔗糖	+	鸟氨酸	+
乳糖	+	其他	
麦芽糖	+	丙二酸盐	+
棉籽糖	+	尿素	-
山梨糖	+	七叶甘	+
D-核糖	+	硫化氢	-
甘露糖	+	β-半乳糖苷	+

2.6 B1 菌株的 16S rDNA 电泳结果

以 B1 菌株的浓缩液为模板,扩增所使用的引物是 27F、1 492R,16S rDNA 片段大小为 1 500 bp,条带明亮单一(图 5),可直接进行测序。

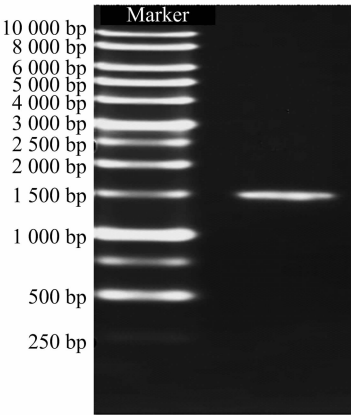


图5 B1 菌种的 16S rDNA PCR 扩增结果

2.7 B1 菌株的测序结果及系统进化树

将 B1 菌株送到测序公司得到测序结果并提交到数据库中,获得的编码为 KY941134。根据测序结果,利用 MEGA 绘制系统进化树(图 6)。由图 6 可知,B1 菌株和 *Bacillus timonensis* 的相似度最高,为 99.5%。*B. timonensis* 是从人体肠道中分离出来的是一种革兰氏阴性厌氧菌,属棒状杆菌属,是人类肠道中最大的属之一,但是目前没有关于该菌株降解 4HBA 酯类的报道。

2.8 利用 HPLC 检测 B1 菌株对 4HBA 甲酯的降解情况

从图 7 可以看出,B1 菌株能够将 4HBA 甲酯分解为 4HBA 和相应的醇类物质,12 h 左右 4HBA 甲酯被降解完全。

2.9 B1 菌株对其他 4HBA 酯类的降解情况

将 B1 菌株分别接种在含 4HBA 甲酯、4HBA 乙酯、4HBA 丙酯、4HBA 丁酯的固体培养基上,30 ℃ 培养一段时间,观察菌落生长情况。从图 8 中可以看出,B1 菌株不仅能在 4HBA 甲酯的唯一培养基上生长,还能在 4HBA 乙酯、4HBA 丙酯上生长,但是在 4HBA 丁酯上不能生长,其具体的降解规律有待进一步研究。

3 讨论

从浙江海底泥沙筛选出的 B1 菌株可以有效地降解 4HBA 甲酯,同时也发现它有降解 4HBA 乙酯、4HBA 丙酯的能力。在这些 4HBA 酯类中,B1 菌株对 4HBA 甲酯的降解率最高。

4HBA 酯类因常被用作防腐剂而被人体大量摄入,威胁人体健康。4HBA 酯类在人体内积累后降解规律及其代谢去向还尚未知晓^[10]。通过本研究可以初步获悉人体肠道微生物具有降解 4HBA 酯类的能力,为研究 4HBA 酯类在人体内的降解机制奠定一定的理论基础。同时,对 B1 菌株的深入探究,有助于将其开发为降解环境中 4HBA 酯类的工业菌株,缓解由于 4HBA 酯类的大量应用造成的水体和环境污染。但此次研究只是初步了解此菌株,并未深入全面地认识到其降解规律,还未探究其中的关键基因,未掌握 B1 菌株的降解谱,所以后面的工作还有很多,对于 B1 菌株的进一步研究将

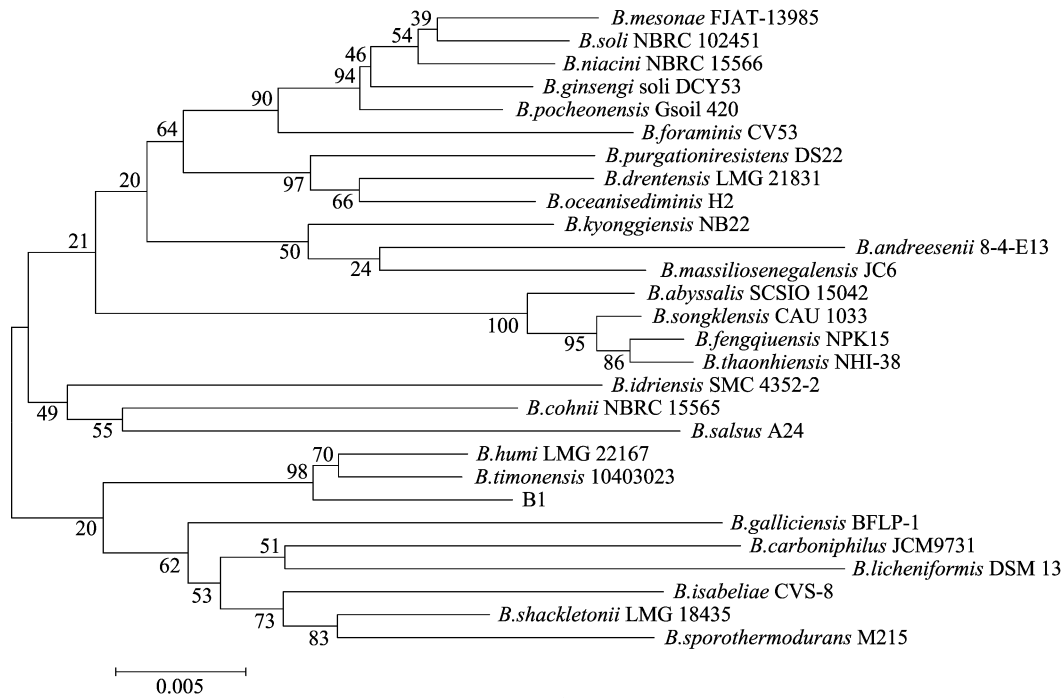


图6 B1 菌种的系统进化树

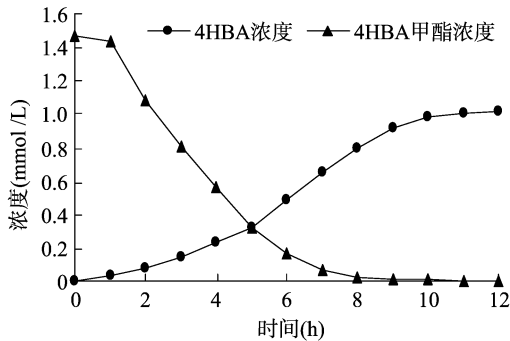


图7 B1 菌株对 4HBA 的降解情况

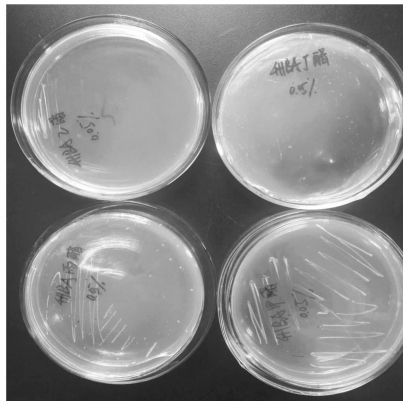


图8 B1 菌株在其他 4HBA 酯类培养基上的生长情况

会有趣而艰巨,值得深入探索。

参考文献:

[1] 石金娥,刘静秋,尚淑霞,等. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂在酱油、

食醋中应用状况分析[J]. 中国调味品,2011,36(7):11-12.
[2] 陈建文,厉华明,周荣荣. 食品中对羟基苯甲酸酯类的应用现状与检测方法[J]. 中国酿造,2008(8):4-5.
[3] 袁凤琴,王 佳,孙佳美,等. 高压液相色谱法检测酸性乳饮料及酸奶中对羟基苯甲酸酯类[J]. 食品安全质量检测学报,2013(3):890-894.
[4] 王文清,高春丽,蔡 钰. 高效液相色谱法测定对羟基苯甲酸甲酯的含量及有关物质[J]. 中国药师,2009,12(1):70-72.
[5] 郑金琪,韩加怡,李会林. HPLC 测定对羟基苯甲酸甲酯的含量及有关物质[J]. 中国现代应用药学,2012,29(1):72-76.
[6] Valkova N, Lépine F, Bollet C, et al. prbA, a gene coding for an esterase hydrolyzing parabens in *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* strains [J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (18): 5011-5017.
[7] Huang Y, Zhao K X, Shen X H, et al. Genetic and biochemical characterization of a 4 - hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1):75-83.
[8] Valkova N, Lépine F, Labrie L, et al. Purification and characterization of PrbA, a new esterase from *Enterobacter cloacae* hydrolyzing the esters of 4 - hydroxybenzoic acid (parabens) [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(15):12779-12785.
[9] Hassanshahian M, Boroujeni N A. Enrichment and identification of naphthalene - degrading bacteria from the Persian Gulf [J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 107(1):59-65.
[10] Costa J R, Campos M S, Lima R F, et al. Endocrine - disrupting effects of methylparaben on the adult gerbil prostate [J]. Environmental Toxicology, 2017, 32(6):1801-1812.