

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2015.0022

路薇, 罗娜, 董文, 等. 2015. 一株降解荧蒹的铜绿假单胞菌的筛选鉴定及其特性[J]. 环境科学学报, 35(11): 3486-3492

Lu W, Luo N, Dong W, et al. 2015. Identification and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 in fluoranthene biodegradation[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 35(11): 3486-3492

一株降解荧蒹的铜绿假单胞菌的筛选鉴定及其特性

路薇, 罗娜, 董文, 马艳玲*

西部资源与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 西北大学生命科学学院, 西安 710069

收稿日期: 2014-12-22 修回日期: 2015-01-15 录用日期: 2015-01-15

摘要: 荧蒹是一种疏水性极强的高分子量多环芳烃, 在环境中能持久存在且难以被微生物降解. 本研究从石油污染土壤中分离获得一株能够以荧蒹为唯一碳源和能源而生长良好的菌株, 命名为 DN1. 通过形态观察、生理生化特性鉴定及 16S rRNA gene 同源序列分析, 鉴定其为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*). 研究发现, 菌株 DN1 的最适生长温度为 34~37 °C, 最适 pH 为 5.5~7.5, 并具有良好的产鼠李糖脂能力, 摇瓶培养 7 d 内最高产量可达 22.90 g·L⁻¹. DN1 这一特性有利于荧蒹乳化进而促使其生物降解, 0.50 g·L⁻¹ 荧蒹 14 d 内的降解率达到 90.2%. 酶活检测显示, 邻苯二酚 1,2-双加氧酶活性显著高于邻苯二酚 2,3-双加氧酶活性, 表明其在荧蒹生物降解中起主导作用.

关键词: 荧蒹; 生物降解; 铜绿假单胞菌; 鼠李糖脂; 双加氧酶

文章编号: 0253-2468(2015)11-3486-07 中图分类号: X172 文献标识码: A

Identification and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 in fluoranthene biodegradation

LU Wei, LUO Na, DONG Wen, MA Yanling*

Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069

Received 22 December 2014; received in revised form 15 January 2015; accepted 15 January 2015

Abstract: Fluoranthene is a member of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons with four fused benzene rings in the environment, and the highly hydrophobic property made fluoranthene very difficult to degrade by microorganisms. A bacterial strain DN1, which can use fluoranthene as the sole carbon and energy source was isolated from heavily petroleum-contaminated soil. This strain was identified as *Pseudomonas aeruginosa* through morphological observation, physiological and biochemical determination and 16S rRNA gene homological sequencing. The optimum growth temperature and the optimum pH of the strain was 34~37°C and 5.5~7.5, respectively. Strain DN1 had capability of producing rhamnolipids, and the best rhamnolipids yield could reach to 22.90 g·L⁻¹ when the strain was cultured under optimum conditions for 7 days. The strain's emulsifying properties greatly increased the biodegradation of fluoranthene in the environment. The degradation rate was up to 90.2% when strain DN1 was cultivated with 0.50 g·L⁻¹ fluoranthene as the sole carbon and energy source for 14 days. During the biodegradation of fluoranthene, the enzyme activity of catechol-1,2-dioxygenase (C120) was remarkably higher than that of catechol-2,3-dioxygenase (C230), indicating that C120 played a major role in fluoranthene biodegradation by strain DN1.

Keywords: fluoranthene; biodegradation; *Pseudomonas aeruginosa*; Rhamnolipid Dioxygenase

1 引言 (Introduction)

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是一类在环境中广泛分布的芳香族化合物,

主要来源于石油、煤、塑料等有机物的不完全燃烧, 因其较长的半衰期和致癌、致畸、致突变性质而受到广泛关注 (Tervahauta *et al.*, 2009). 其中, 高分子量多环芳烃 (High Molecular Weight PAHs, HMW

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31000069); 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室开放基金 (No.ZS12007); 陕西省教育厅产业化培育项目 (No.15JF032); 西北大学生物学基地科研训练及科研能力提高项目 (No. J1210063)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31000069), the Open Fund of the Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education (No.ZS12007), the Industrialized Cultivation Project of Shaanxi Education Department (No. 15JF032) and the National Science Foundation for Fostering Talents in Basic Research of the National Natural Science Foundation of China (No. J1210063)

作者简介: 路薇 (1990—), 女, E-mail: luwei9527@126.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: mayanling@nwu.edu.cn

Biography: LU Wei (1990—), female, E-mail: luwei9527@126.com; * **Corresponding author**, E-mail: mayanling@nwu.edu.cn

PAHs)是指四环及四环以上的多环芳烃,随着芳香环数和分子量的增加,其疏水性和稳定性相应提高,降解难度远大于低分子量 PAHs(Yuliani *et al.*, 2012),因而 HMW PAHs 污染已成为一个亟待解决的环境问题,严重影响着人类生存环境的质量(Kanaly *et al.*, 2010).因此,寻找快速高效地去除 HMW PAHs 的方法,减少 HMW PAHs 对环境的污染问题已成为当今环境研究中的热点.在 20 世纪 90 年代发展起来的微生物治理 PAHs 污染是众多途径中效率最高、研究最多的,因其具有成本低、操作简单且无二次污染等特点而越来越受到关注(Lu *et al.*, 2011).

荧蒽(Fluoranthene)是一种典型的高分子量多环芳烃,广泛存在于石油污染土壤中(Lee *et al.*, 2007),以荧蒽为对象研究微生物对 HMW PAHs 的降解作用,具有一定的代表性.2009 年 Wu 等(2009)从海洋沉物中筛得一株 *Ochrobactrum* sp. BAP5, 鉴定其可利用苯并[α]芘为唯一碳源生长,同时也可降解荧蒽等 PAHs.周惠娟等(2013)从 PAHs 污染土壤中分离得到一株能够良好降解荧蒽的 *Achromobacter xylosoxidans*, 结果表明,生物降解过程中多种蛋白的表达有显著变化.据研究报道,微生物通过 4 条途径对荧蒽开环:分别在 C-1,2 位、C-2,3 位、C-7,8 位和 C-8,9 位开裂,最终氧化成邻苯二甲酸(张银萍等, 2010);此外,还有水杨酸途径和龙胆酸途径等(赵渝, 2007).细菌氧化 PAHs 主要依靠双加氧酶,这类酶属于非血红素类铁氧化-还原蛋白,其中,邻苯二酚-1,2-双加氧酶(catechol-1,2-dioxygenase, C120)催化生成内二元醇,邻苯二酚-2,3-双加氧酶(catechol-1,2-dioxygenase, C230)催化生成外二元醇,促使芳香环彻底开裂,是关键的限速酶(周鑫森等, 2007).2013 年,陈志丹从石油污染土壤中筛选到一株降解芘的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. B2, 优化培养条件并对其 C230 进行活性测定和序列分析,进而构建了表达质粒(陈志丹, 2013).然而,荧蒽因其分子结构含有 4 个苯环而极难溶于水,在一些研究中通过直接添加表面活性剂以降低溶液表面张力,促进 HMW PAHs 的乳化,进而促进其生物降解.如 Xu 等(2011)从泥浆中分离得到一株可降解荧蒽的 *Herbaspirillum chlorophenicum*, 发现在适当浓度范围内吐温-80 可显著增强菌株对荧蒽的降解.其他研究显示,生物表面活性剂鼠李糖脂可以显著促进 HMW PAHs 的生物降解(Nie *et al.*, 2010),并能

促进原油的乳化和降解(汤晓等, 2008).

基于此,本研究以一株从石油污染的土壤中分离得到的能够以荧蒽为唯一碳源而生长良好的菌株 DN1 为对象,通过生理生化特性及 16S rRNA gene 保守序列分析初步确定其为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),并探究该菌株产鼠李糖脂的能力、荧蒽的生物降解特性和在荧蒽降解过程中关键酶邻苯二酚 1,2-双加氧酶和邻苯二酚 2,3 双加氧酶的活性变化,为进一步研究荧蒽的微生物降解提供理论基础.

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 实验材料

2.1.1 土壤样品的采集 供试土壤采集于陕西延长油田下寺湾采油厂(36°27'36"N, 108°55'12"E)内石油污染程度不同的土壤,分别于 3 个地点收集地表下 2 cm 深的土壤样品各约 100 g,各平行收集 3 份混合后置于冰盒中保存.新鲜土壤样品过 2 mm 筛,于暗处 4 °C 保存,以供筛选 PAHs 降解菌用.

2.1.2 培养基 实验用培养基有 LB 培养基、M9 无机盐培养基、BPLM 培养基、各种鉴定实验所需培养基和反应体系等,配制方法见文献(东秀珠等, 2001;沈萍等, 2007;周德庆, 2006).除特殊说明外,配置时均用蒸馏水定容至 1000 mL, 121 °C 灭菌 30 min,需要用固体培养基时,在此配方基础上加 14.00 g·L⁻¹琼脂.

LB 培养基:每 1000 mL 中含蛋白胨 10.00 g,酵母提取物 5.00 g,氯化钠 10.00 g, pH 7.0~7.2.

M9 无机盐培养基:每 1000 mL 中含 NH₄Cl 1.00 g, Na₂HPO₄ 6.00 g, KH₂PO₄ 3.00 g, NaCl 0.50 g, MgSO₄ 0.24 g, pH 7.0.

BPLM 培养基:每 1000 mL 中含 5 mL 磷酸盐缓冲液(K₂HPO₄·3H₂O 25.82 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 8.70 g·L⁻¹, Na₂HPO₄·12H₂O 33.40 g·L⁻¹, NH₄Cl 5.00 g·L⁻¹), 3 mL MgSO₄溶液(22.50 g·L⁻¹), 1 mL CaCl₂溶液(36.40 g·L⁻¹), 1.0 mL FeCl₃溶液(0.25 g·L⁻¹), 1 mL 微量元素溶液(MnSO₄ 39.90 mg·L⁻¹, ZnSO₄·H₂O 42.80 mg·L⁻¹, (NH₄)₇MoO₂₄·4H₂O 34.70 mg·L⁻¹), 添加 2%总体积的棕榈油为碳源, 5.00 g NaNO₃为氮源, pH=7.0.

2.2 实验方法

2.2.1 荧蒽降解菌株的分离与筛选 称取 10.00 g 新鲜土壤,加入到装有 100 mL M9 无机盐液体培养

基(荧蒽浓度为 $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)的三角瓶中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下振荡培养 1 周.按 10%接种量转接到新鲜的荧蒽无机盐培养基中,继续培养 1 周,反复 5 次.最后吸取 0.1 mL 培养液稀释不同梯度涂布于 LB 培养基平板上,挑取单菌落,将平板划线纯化后的单菌落再接种到荧蒽无机盐液体培养基中,选取总生物量最大的菌株 DN1 作为研究菌株.

2.2.2 形态及生理生化鉴定 将充分活化的菌株 DN1 接至 LB 液体培养基, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 下振荡培养 24 h,挑取一环菌液进行革兰氏染色,显微观察菌体形态并以测微尺测量大小.同时在 LB 固体培养基上划线接种, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中倒置培养 48 h,观察菌落形态并测量大小.

生理生化特征测定方法见参考文献(沈萍等, 2007;东秀珠等, 2001;周德庆, 2006),根据《常见细菌系统鉴定手册》进行形态和生理生化鉴定.

2.2.3 16S rRNA gene 的 PCR 扩增、测序及系统发育分析 以菌 DN1 热裂解液为粗模板,以细菌的 16S rRNA gene 通用引物 27F、1492R(Hanano *et al.*, 2014)为引物,扩增其 16S rRNA gene 片段.PCR 条件为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 40 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 90 s, 30 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 8 min. PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测产量及大小,以试剂盒回收纯化,送上海生工测序部测序. 16S rRNA gene 的测序结果经 Blast 程序与 GenBank 中已有的核酸序列进行比对,用软件 MEGA 5.0 构建系统发育树,分析方法采用邻接法(Neighbor Joining),其 GenBank 登录号为 KP119458.

2.2.4 最适生长温度、pH 及其生长曲线的测定 将活化过夜的 DN1 菌液分别接入同体积 LB 液体培养基,测定 DN1 在不同温度和 pH 下的生长情况,定时取菌液稀释 3 倍,测量 600 nm 处的吸光值,每组 3 个平行.绘制 DN1 在以荧蒽($0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)为唯一碳源的 M9 液体中的生长曲线,定时取菌液稀释涂布,计量菌落数(以 CFU 表示).

2.2.5 鼠李糖脂的产生及荧蒽的生物降解 将 LB 活化过夜的 DN1 菌液按 2% 总体积的接种量接入含有 200 mL BPLM 培养基的三角瓶中,并添加 $5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaNO_3 为氮源, 2% 棕榈油为碳源,摇瓶培养 7 d,每日取定量培养液以硫酸-萘酚法(Abidi *et al.*, 2010)测定鼠李糖脂浓度,绘制鼠李糖脂的产生曲线.菌株生物量结合浊度法,所得结果以菌体浓度表示.

将菌株 DN1 接种于 BPLM (2% 棕榈油,

$5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaNO_3) 液体培养基,在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下培养 48 h 获得种子培养液.将种子液按照 1% 总体积的接种量接种于以荧蒽($0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)为唯一碳源的 M9 液体培养基中,在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下培养.每 24 h 取样,用等体积环己烷萃取 3 次,取上层有机相旋转蒸发,用甲醇定容后过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜后,在 232 nm 处测其紫外吸收值,与荧蒽标准曲线进行比对得到残余浓度,测量荧蒽的降解能力.

荧蒽降解组分的分析采用气相色谱测定:取降解后的溶液 1 mL , $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min,吸取上清液 $100 \text{ }\mu\text{L}$,用甲醇萃取, $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下再次离心 5 min,取上清液过 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后加入进样瓶中,以 $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧蒽溶液为对照, C14、C15、C6 为标品,用 Agilent 6890 气相色谱分析.色谱条件:色谱柱 HP-5($0.32 \text{ mm}\times 0.25 \text{ }\mu\text{m}\times 30 \text{ m}$);进样口温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$,不分流进样,检测器为 FID 氢火焰离子检测器;检测器温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$,程序升温,从 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 升温至 $280 \text{ }^\circ\text{C}$,保持 3 min,载气 N_2 ,燃气 H_2 .

2.2.6 降解酶活性测定 将 LB 活化过夜的 DN1 菌液按 10% 总体积的接种量接入 BPLM 培养基,添加荧蒽为唯一碳源,使终浓度达到 $0.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,最适条件下振荡培养,定时取菌液测定邻苯二酚-1,2-双加氧酶和邻苯二酚-2,3-双加氧酶的活性,方法见参考文献(Kojima *et al.*, 1961)并加以改进.将每分钟吸光值增加 0.01 定义为一个酶活力单位,蛋白质浓度用 Bradford 法(Bradford, 1976)蛋白质定量试剂盒进行定量.

3 结果(Results)

3.1 菌株形态特征及生理生化特性

经荧蒽选择培养基反复筛选,从多株降解菌中

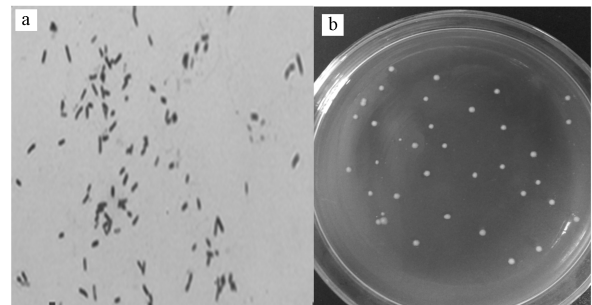


图 1 DN1 菌株形态(a.革兰氏染色,b.平板培养)

Fig.1 Morphological observation of strain DN1 (a. Gram stain, b. Plate cultivation)

选出生长状态最好的菌株 DN1 作为研究菌株.菌株 DN1 肉眼可看到清晰的单菌落,菌落呈不规则圆形,表面不光滑,边缘不整齐,直径约为 2.0~3.0 mm (图 1).显微镜下观察该菌菌体为直或稍弯、两端钝圆的杆菌,长 1.5~3.0 μm,宽 0.5~0.8 μm,为革兰氏阴性菌.实验显示的 DN1 部分生理生化特性见表 1.

表 1 菌株 DN1 部分生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain DN1			
实验内容	结果	实验内容	结果
氧化酶	+	脂酶(Tween80)	+
接触酶	+	脲酶	-
芽孢	-	硝酸盐还原	+
荚膜	-	亚硝酸盐还原	+
明胶水解	+	反硝化	+
淀粉水解	-	苯丙氨酸脱氨酶	-
V.P.试验	-	鸟氨酸脱氨酶	-
甲基红实验	-	赖氨酸脱氨酶	±
吲哚实验	±	精氨酸脱氨酶	+
柠檬酸盐	+	精氨酸双水解酶	+
荧光色素	+	果聚糖	±
H2S 试验	-	氯霉素	有抗性

注: +表示结果为阳性,±表示结果不明显,-表示结果为阴性.

3.2 16S rRNA gene 序列与系统发育分析

用 16S rRNA gene 通用引物进行 PCR 扩增得到目的 DNA 片段,最终得到约 1.4 kb 的 16S rRNA gene 部分保守序列,测序结果利用 GenBank Blast 软件进行序列同源性比较,显示菌株 DN1 的 16S rRNA gene 序列与多种铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 具有高度同源性.从 GenBank 基因数据库中下载与菌株 DN1 序列相似性大于 97% 的 16S

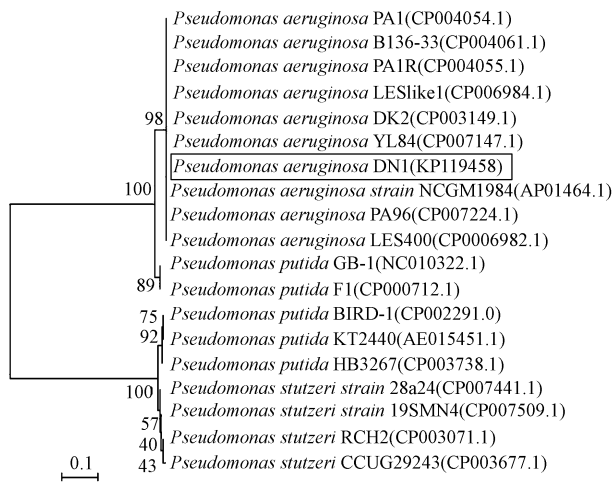


图 2 基于菌株 DN1 的 16S rRNA gene 片段序列构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from strain DN1

rRNA gene 序列,通过 ClustalX 软件进行聚类分析后,利用 MEGA5.0 软件以 Neighbor-Joining 计算方式生成系统发育树(图 2).从图 2 可以看出, DN1 与铜绿假单胞菌属具有高度的同源性.

3.3 最适生长温度、pH 及其生长曲线的测定

3.3.1 不同温度对菌株 DN1 生长的影响 菌株 DN1 接种于 pH 7 的 LB 液体培养基中,于温度分别为 25、28、31、34、37、42 °C 的条件下摇床培养 42 h.每隔一定时间取样,于 600 nm 处测其吸光值.为保证实验结果,做 3 组平行实验,结果如图 3 所示, DN1 从 28 °C 到 42 °C 均可良好生长,且在 34~37 °C 时生长最好,当温度低于 28 °C 时生长较为缓慢,延滞期增长.

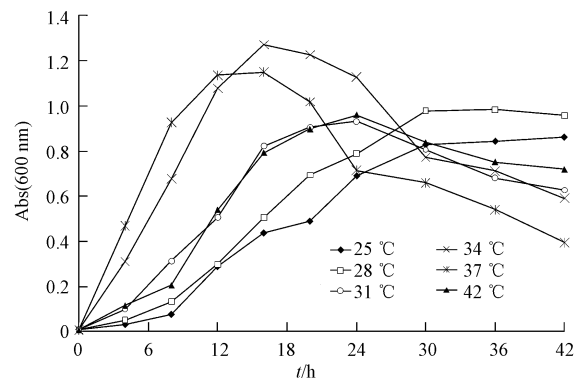


图 3 不同温度对菌株 DN1 生长的影响

Fig.3 Effect of different temperatures on the growth of strain DN1

3.3.2 pH 对菌株 DN1 生长的影响 将菌株 DN1 接种于初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 LB 液体培养基中,置于 34 °C 条件下摇床培养 42 h.每隔一定时间取样,于 600 nm 处测其吸光值.为保证实验结果,做 3 组平行实验,结果如图 4 所示,

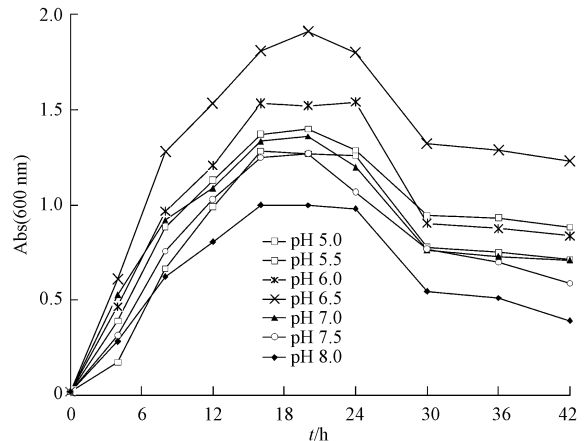


图 4 不同初始 pH 对菌株 DN1 生长的影响

Fig.4 Effect of different initial pH on the growth of strain DN1

该菌对 pH 的适应范围较广, pH 为 5~8 的条件下均能生长,且在 pH 为 5.5~7.5 时生长最好,但在碱性的环境中较为受到抑制,适宜在酸性环境中生长。

3.3.3 菌株 DN1 在荧蒽中的生长曲线 在最适条件下,将 DN1 的活化菌液接入以荧蒽 ($0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 为唯一碳源的 M9 液体培养基,相同时间间隔取样测定 CFU,绘制生长曲线.由图 5 可知,菌株在培养 6 d 后进入对数生长期,在第 8 d 时生长总量达到最大,11 d 之后进入衰亡期。

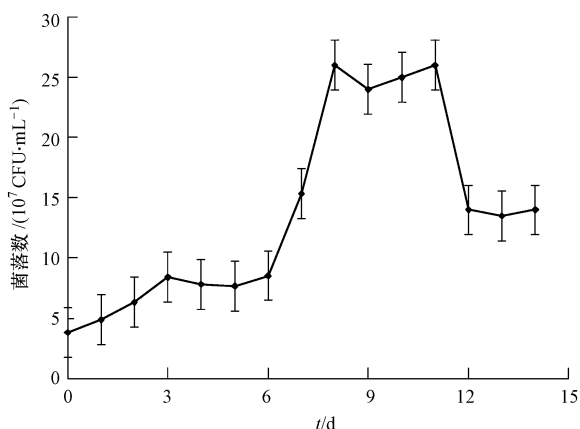


图 5 菌株 DN1 以荧蒽为唯一碳源的生长曲线

Fig.5 Growth curve of strain DN1 with fluoranthene as the sole carbon source

3.4 菌株 DN1 产生鼠李糖脂的能力

将菌株 DN1 接种于含有 200 mL BPLM ($5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3$ 为氮源,2% 棕榈油为碳源) 液体培养基中,在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养 7 d,按相应的测定方法分别测定其产生鼠李糖脂的量及菌体浓度,结果如图 6 所示.由图 6 可知,培养的前 4 d 鼠李糖脂含量呈累积上升趋势,鼠李糖脂产量在第 4 d 达到峰值,最高可达 $22.90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;之后含量开始下

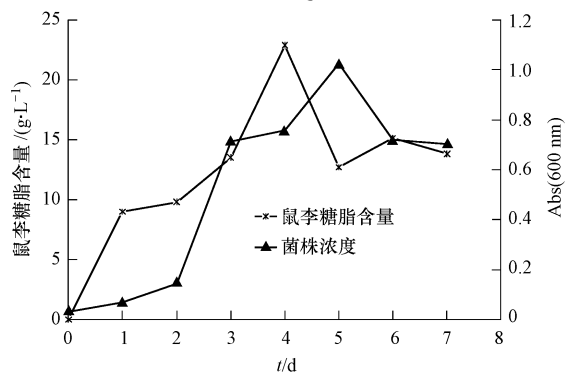


图 6 最适条件下 DN1 的生长曲线与鼠李糖脂产量

Fig.6 Growth and rhamnolipid concentration profiles of strain DN1 during cultivation at optimum conditions

降并保持在 $14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右的中等水平.同时,菌体浓度测定结果显示,发酵至第 2 d 进入对数生长期并在第 5 d 达到最大生长总量,随后开始衰亡。

3.5 菌株 DN1 对荧蒽的降解能力测定

在以荧蒽为唯一碳源时,菌株 DN1 表现出良好的降解能力(图 7),48 h 内对荧蒽的降解速率最大,降解率达到 38.5%,在培养至第 8 d 后降解速率趋于平缓,14 d 内总降解率达到 90.2%.对降解结果进行气相色谱鉴定,结果如图 8 所示.对照中荧蒽 ($0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 11.445 min 出峰,峰高为 86.82685 mAu,

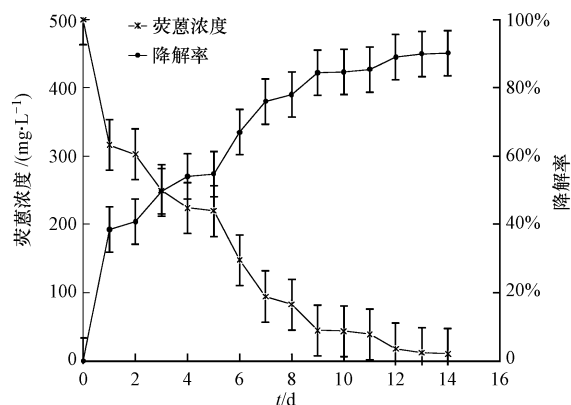


图 7 菌株 DN1 对荧蒽的降解

Fig.7 Biodegradation of fluoranthene by strain DN1

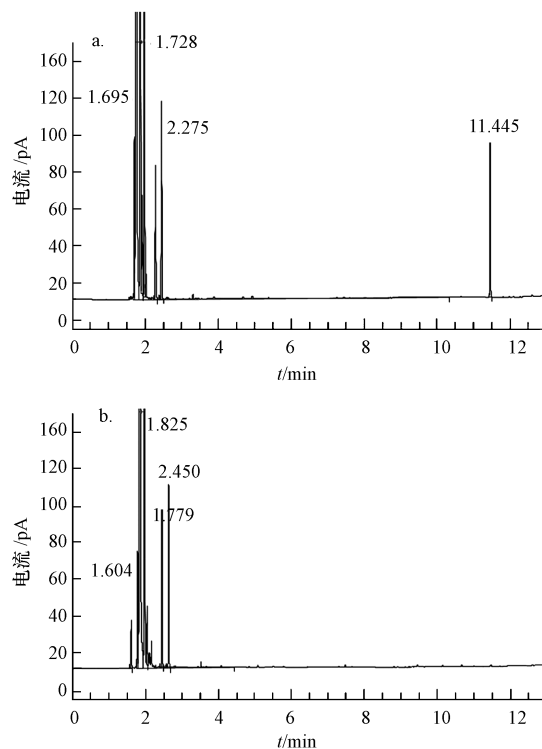


图 8 降解初始荧蒽(a)及降解后残余荧蒽(b)的气相色谱图谱

Fig.8 Gas chromatography analysis of initial (a) and residual (b) fluoranthene after inoculation with strain DN1

峰面积为 $110.74163 \text{ mAu} \cdot \text{s}$, 降解后的样品因荧蒽浓度过低无法检测出具体数值, 这表明培养液中的绝大多数荧蒽都几乎被完全降解。

3.6 降解酶活性测定

在 $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧蒽诱导下, 菌株 DN1 中邻苯二酚-1,2-双加氧酶 (C12O) 与邻苯二酚-2,3-双加氧酶 (C23O) 的活性随时间变化情况如图 9 所示。C12O 和 C23O 是诱导酶, 其活性与污染物的去除效率呈正相关性。单个样本 T 检验结果表明, 两种酶活性均在诱导至后显著升高, 且在 48 h 后显著降低 (以 * 表示差异显著 ($0.01 \leq p < 0.5$)), 以 ** 表示差异极显著 ($p < 0.01$)). 对两种酶的活性进行独立样本 T 检验, 方差齐性检验显示两样本差异极显著, 不接受方差相等假设, 而接受方差不相等假设, 该假设下两种酶活性差异极显著。整个培养过程中 C12O 活性明显比 C23O 活性高, 尤其是在 24 ~ 48 h 内 C12O 活性是 C23O 活性的 2 倍以上, 表明在降解过程中 C12O 起着主导作用。

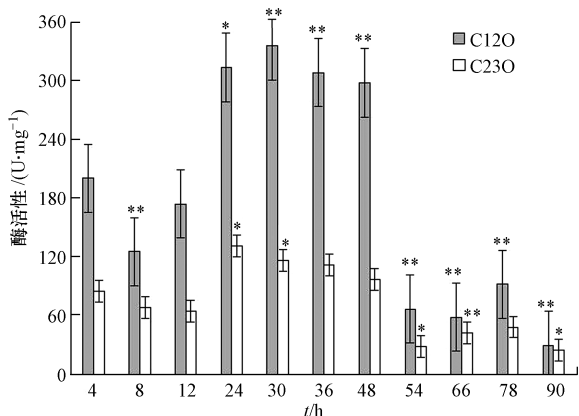


图 9 荧蒽降解过程中 C12O 和 C23O 的活性变化

Fig.9 Enzymatic activity of C12O and C23O in the presence of strain DN1 during the fluoranthene degradation

4 讨论 (Discussion)

荧蒽是石油污染土壤中主要存在的一种高分子量多环芳烃 (Lee *et al.*, 2007), 利用微生物降解土壤中的荧蒽, 是一种高效率低成本的治理方式。然而, 对于高分子量的 PAHs, 即 4 环以上的, 由于其化学结构的复杂性及在水环境中的低溶解度, 难以被微生物直接降解。研究表明, 大多数微生物对 4 环以上的高分子量 PAHs 的降解是以共代谢 (co-metabolism) 的方式进行的 (许光素等, 2013)。铜绿假单胞菌是常见的烃类降解菌, 通常从废水、石油污

染土壤及油田中分离得到, 也有报道该菌与其他混合菌群共培养来提高 HMW PAHs 的生物降解能力 (Kweon *et al.*, 2010)。铜绿假单胞菌能够降解烃类化合物的原因, 与其分泌鼠李糖脂的能力相关。鼠李糖脂可有效降低油水界面张力, 使烃类乳化甚至增溶, 因而可促进 HMW PAHs 的生物降解。

本研究从石油污染土壤中分离得到一株铜绿假单胞菌, 能单独以荧蒽为唯一碳源生长, 且可以产生生物表面活性剂鼠李糖脂作为乳化剂增强其对荧蒽的生物降解能力。综合 DN1 的生长特性、鼠李糖脂的产生与降解特性及酶活性变化规律, 推测菌株 DN1 在荧蒽 ($0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 生物降解中持续大量分泌鼠李糖脂至稳定期, 促进了荧蒽的乳化, 使其易于被菌体利用降解, 降解速率维持在较高水平, 与毛健等 (2008) 降解率为 84.5% 的副球菌相比有一定的提高。

一般认为双加氧酶是微生物降解多环芳烃的关键酶之一 (Jakoncic *et al.*, 2007)。常见的双加氧酶有邻苯二酚-1,2-双加氧酶 (C12O)、邻苯二酚-2,3-双加氧酶 (C23O) 等, 是一种诱导酶。双加氧酶可将 PAHs 的苯环裂解, 将 2 个氧原子作用于底物形成双氧乙烷, 然后氧化为顺式二氢乙醇, 最终进入三羧酸循环。在荧蒽的生物降解过程中, C12O 和 C23O 两种酶的活性与降解效率呈正相关性, 且 C12O 活性显著高于 C23O, 推测菌株 DN1 可能主要经 C12O 催化进行最终的开环作用, 倾向于经内二元醇途径开环。

5 结论 (Conclusions)

研究表明, 菌株 DN1 生长条件宽松, 易于培养, 具有较强的产鼠李糖脂能力, 能够以荧蒽为唯一碳源和能源而良好生长并将其高效地降解, 且降解方式有鲜明的特征, 可应用于多环芳烃污染土壤的生物修复。后续的实验将对荧蒽的具体降解机制进行探索, 对于其主要的代谢途径和代谢中间物进行深入研究。

责任作者简介: 马艳玲, 女, 副教授, 主要从事环境宏基因组学、分子微生物学、有机污染物生物降解等研究工作。E-mail: mayanling@nwu.edu.cn.

参考文献 (References):

Abidi N, Hequet E, Cabrales L. 2010. Changes in sugar composition and cellulose content during the secondary cell wall biogenesis in cotton

- fibers[J].Cellulose, 17(1): 153-160
- Bradford M M.1976.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J].Analytical Biochemistry, 72(1/2): 248-254
- 陈志丹.2013.多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及邻苯二酚-2, 3-双加氧酶基因克隆与表达[D].乌鲁木齐:新疆大学.1-66
- 东秀珠,蔡妙英.2001.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社
- Hanano A, Ammoun H, Almously I, et al. 2014. Traceability of polychlorinated dibenzo-dioxins/furans pollutants in soil and their ecotoxicological effects on genetics, functions and composition of bacterial community[J].Chemosphere, 108: 326-333
- Jakoncic J, Jouanneau Y, Meyer C, et al.2007.The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 352(4): 861-866
- Kanally R A, Harayama S.2010.Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria [J].Microbial Biotechnology, 3(2): 136-164
- Kojima Y, Itada N, Hayaishi O, et al.1961.Metapyrocatechase: a new catechol-cleaving enzyme[J].Journal of Biological Chemistry, 236(8): 2223-2228
- Kweon O, Kim S -J, Freeman J P, et al.2010.Substrate specificity and structural characteristics of the novel rieske nonheme Iron aromatic Ring-Hydroxylating oxygenases nidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J].mBio, 1(2): e00135-10
- Lee S E, Seo J S, Keum Y S, et al.2007.Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14 [J]. Proteomics, 7(12): 2059-2069
- Lu X Y, Zhang T, Fang H H P. 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 89(5): 1357-1371
- 毛健,骆永明,滕应,等.2008.一株高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J].微生物学通报,35(7): 1011-1015
- Nie M Q, Yin X H, Ren C Y, et al.2010.Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3[J].Biotechnology Advances, 28(5): 635-643
- 沈萍,陈向东.2007.微生物学实验(第4版)[M].北京:高等教育出版社
- 汤晓,张国亮,孟琴.2008.铜绿假单胞菌分泌鼠李糖脂能力对原油降解影响的研究[J].高校化学工程学报,22(1): 88-93
- Tervahauta A I, Fortelius C, Tuomainen M, et al. 2009. Effect of birch (*Betula* spp.) and associated rhizoidal bacteria on the degradation of soil polyaromatic hydrocarbons, PAH-induced changes in birch proteome and bacterial community[J].Environmental Pollution, 157(1): 341-346
- Wu Y R, He T T, Zhong M Q, et al.2009.Isolation of Marine benzo[a] pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins characterization [J]. Journal of Environmental Sciences, 21(10): 1446-1451
- 许光素,崔志松,郑立,等.2013.高分子量多环芳烃降解过程中菌种间的相互作用[J].应用与环境生物学报,19(4): 677-682
- Xu H X, Wu H Y, Qiu Y P, et al.2011.Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenicum* from activated sludge[J].Biodegradation, 22(2): 335-345
- Yuliani H, Hermansyah H, Sahlan M, et al. 2012. Dioxygenase gene of PAHs degrading a *Bacillus* strain isolated from marine indonesian environment and its biosurfactant production ability[J].International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(4): (B) 380-(B) 390
- 张银萍,王芳,杨兴伦,等.2010.土壤中高环多环芳烃微生物降解的研究进展[J].微生物学通报,37(2): 280-288
- 赵渝.2007.芳香烃生物降解途径蛋白质组学研究[D].上海:华东师范大学.1-134
- 周德庆.2006.微生物学实验教程(第2版)[M].北京:高等教育出版社
- 周惠娟,马艳玲.2013.一株荧蒽降解菌的筛选鉴定及降解特性[J].环境工程学报,7(5): 1984-1988
- 周鑫淼,陈洁君,耿立召,等.2007.邻苯二酚 2, 3-双加氧酶的结构和功能研究进展[J].生物技术通报, (4): 51-54