



混合菌群 DBFC 对二苯并呋喃的降解特性及其代谢途径

孙倩姝^{1,2}, 白洁², 李辉², 于浩³, 胡春辉^{1*}

¹青岛农业大学中心实验室, 山东 青岛 266109

²中国海洋大学环境科学与工程学院, 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100

³青岛农业大学生命科学学院, 山东 青岛 266109

摘要: 【目的】二苯并呋喃(DBF)是研究多环芳烃降解过程的模式化合物, 研究其代谢过程和代谢途径对于阐明多环芳烃的代谢机制有重要意义。【方法】从辽河河口区石油污染土壤中筛选到1个高效降解DBF的混合菌群DBFC。提取总DNA对菌群的生物多样性进行分析, 通过稀释涂布平板法对菌株进行分离纯化。通过测定 OD_{600} 的吸收值对混合菌群的最适生长条件进行研究。在最适生长条件下研究底物浓度、底物谱、营养物质及表面活性剂对菌群降解效率的影响。利用超高分辨质谱检测混合菌群降解DBF的中间代谢物质, 并推测其代谢途径。【结果】生物多样性分析表明该混合菌群的组成为类芽孢杆菌(84.06%)、无色杆菌(8.17%)、假单胞菌(0.77%)、其他菌株(2.13%)。分离得到苍白杆菌、无色杆菌、寡养单胞菌和细杆菌。生长测定结果显示苍白杆菌、无色杆菌、寡养单胞菌和细杆菌均不能在DBF培养基中生长。混合菌群DBFC的最适生长条件为30 °C、pH 8.0。在该条件下, 混合菌群DBFC能将1.0 g/L的DBF在8 d内完全降解。在DBF浓度1.0 g/L条件下, 混合菌群DBFC的最大降解速率为0.031 mmol/(L·h)。在培养基中添加葡萄糖、酵母粉和蛋白胨能将菌群降解DBF的效率分别提高1.38倍、1.14倍和1.24倍。在培养基中添加十二烷基磺酸钠或Triton-X-100能够抑制混合菌群降解DBF的效率。利用超高分辨质谱检测到4种中间代谢物质(2,2',3-三羟基联苯、2,4-己二烯酸、龙胆酸和水杨酸), 并推测了DBF代谢途径。【结论】本研究分离到高效DBF降解菌群, 该菌群能在碱性(pH 8.0)条件下完全降解DBF, 为该类污染物的原位修复提供优良菌系; 利用超高分辨质谱分析得到了DBF降解途径, 为该类物质的混合菌群代谢研究提供了参考。

关键词: 二苯并呋喃, 微生物降解, 菌群, 降解特性, 降解途径

基金项目: 国家自然科学基金(31600086); 青岛农业大学博士启动基金(663/1119047); 山东省自然科学基金青年基金(ZR2016CQ06)

*通信作者。Tel: +86-532-58957543; E-mail: hollyhuchunhui@163.com

收稿日期: 2021-02-02; 修回日期: 2021-04-03; 网络出版日期: 2021-08-23

二噁英是二苯并呋喃、联苯、二苯并等的多氯衍生物,是一种持久性的环境污染物(persistent organic pollutants, POPs),这类化合物具有毒性大、难降解等特点,能在环境中长期稳定存在。研究表明,多氯二苯并呋喃(polychlorinated dibenzofuran, PCDFs)能随着灰尘进行转移富集,在水鸟蛋、羊奶和人奶^[1]中检测到 PCDFs 的含量远高于环境中 PCDFs 的含量。其中二苯并呋喃(dibenzofuran, DBF)是多环芳烃(polycyclic aromatic compounds, PACs)和多氯二苯并呋喃降解过程研究的模式化合物之一,同时 DBF 也是一种常见的环境污染物,是原油、煤焦油、造纸废水的重要组成成分。

常用的 DBF 去除方法有光降解法、化学-电化学氧化还原法和生物降解法等,其中生物降解法具有反应条件温和、成本低、操作简单、不会产生二次污染等优点,是去除环境中 DBF 污染物的一种理想方法。由于长期暴露在 DBF 污染的环境中,土著的微生物菌群中会产生能利用 DBF 的酶。目前已从 DBF 污染的土壤中筛选到多株能够降解 DBF 的菌株,大多数为细菌,少量为真菌。能够降解 DBF 的细菌主要有 *Pseudomonas fluorescens* TTC1^[2]、*Sphingomonas* sp. RW1^[3]、*Pseudomonas* sp. strain HH69^[4]、*Sphingomonas* sp. HH69^[5]、*Terrabacter* sp. DBF63^[6]、*Brevibacterium* sp. DPO1361^[7]、*Pseudomonas putida* strain B6-2^[8]、*Pseudomonas aeruginosa* strain FA-HZ1^[9]、*Rhodococcus* sp. strain p52^[10]。已有的降解 DBF 菌株主要是单菌。虽然单菌有较高效率,研究方便,但并不符合自然条件下的真实情况,而混合菌群相对于单菌更加稳定,并且能够更好地适应环境,从而实现对污染物的完全降解^[11]。

微生物对 DBF 的降解以好氧为主。早期的研究发现 DBF 是在联苯降解酶的作用下通过开环反应被降解^[12];近期研究发现,微生物在双加氧酶的作用下在苯环上随机引入 2 个氧原子^[4-5,8-9,13]。微生物降解是一个实时动态的过程,在降解过程中,有的降解产物不稳定,很难用常规的气相色谱或液相色谱的方法进行检测和鉴定;另外,微生物代谢是一个连续的过程,一个反应的产物通常是下一个反应的底物,因此取样时间对检测分析结果有较大的影响。目前报道的 DBF 代谢途径大多是通过有限的化合物鉴定推测得到。

本研究从辽河河口石油污染的土壤中筛选出一个能以 DBF 为唯一碳源进行生长的混合菌群,利用生物多样性分析对混合菌群的菌株构成进行研究,对混合菌群的降解条件进行探索,确定其最适生长条件,研究了几种辅助营养物质对降解效率的影响,同时利用超高分辨质谱分析手段,对休止细胞反应过程中的化合物进行分析,得到完整的 DBF 降解途径,为环境中 DBF 污染物的生物修复提供了菌质资源和理论研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂: DBF、*N,N*-二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)、二苯并噻吩(dibenzothiophene, DBT)、联苯(diphenyl)、咪唑(carbazole)、芴(flourene)、邻苯二酚(catechol)、龙胆酸(gentistic acid)和水杨酸(salicylic acid)等试剂均为分析纯,购自阿拉丁试剂有限公司。酵母粉、葡萄糖和蛋白胨购自生工生物工程(上海)股份有限公司。所用甲醇和二氯甲烷等有机溶剂

均为质谱纯度, 均购自安捷伦科技有限公司。

1.1.2 培养基:无机盐-氯化铵培养基(MSMN, g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 12.6, KH_2PO_4 3.4, Na_2SO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NH_4Cl 1.0, 金属盐溶液 1 mL, 蒸馏水定容到 1 L, pH 8.0、115 °C 灭菌 30 min。

金属盐溶液(g/L): $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.008, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04, $ZnSO_4$ 0.05, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.1, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 0.05, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.038, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.02, H_3BO_3 0.0124, 蒸馏水定容到 1 L^[14]。

DBF 培养基: MSMN 培养基中加入 1.0 g/L DBF, DBF 用 DMF 溶解配置(终浓度 25%)。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, 氯化钠 10.0, 蒸馏水定容到 1 L, pH 7.0、121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 固体培养基: LB 液体培养基中添加 2.0% 的琼脂。

1.2 混合菌群的筛选和鉴定

称取 5 g 辽河口湿地石油污染的土壤置于 DBF 培养基中, 置于 150 r/min、30 °C 恒温振荡摇床中培养 5 d, 取 5 mL 上清液转移到新的 DBF 培养基中继续培养, 重复该过程 8–10 次, 得到混合菌群。

将菌群稀释涂布于 LB 固体培养基平板上, 挑取单菌落, 接种到 LB 培养基中, 获得纯的单菌。

利用基因组提取试剂盒提取混合菌群总 DNA, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行生物多样性测序分析。

1.3 菌群生长条件及降解效率

将菌群以 2% 的接种量接种到 DBF 培养基中, 分别置于 25、30、37 °C 摇床中培养, 摇床

转速为 150 r/min, 每 24 h 取样 1 mL, 10000×g 离心 1 min, 蒸馏水重悬, 用分光光度计测定 600 nm 处的吸光度值(OD_{600}), 表征微生物的生长量。每个温度条件做 3 组平行, 取平均值, 绘制生长曲线。

将菌群以 2% 的接种量接种到不同 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0) 的 DBF 培养基中, 置于 150 r/min、30 °C 摇床中培养, 每 24 h 取样 1 mL, 测量 OD_{600} 的吸收值绘制生长曲线。每个 pH 条件做 3 组平行, 取平均值, 绘制生长曲线。

将菌群以 2% 的接种量接种到不同 DBF 浓度 (0.1、0.2、0.5、1.0 g/L) 的 DBF 培养基中, 置于 150 r/min、30 °C 摇床中培养, 每 24 h 取样测定生长情况, 每个反应条件重复 3 次, 绘制生长曲线, 并测定培养基中剩余 DBF 的含量并计算降解效率。

1.4 混合菌群的底物谱

将菌群按照 1% 的接种量分别接种到联苯(终浓度 0.6 g/L)、吡啶(终浓度 0.6 g/L)、二苯并噻吩(终浓度 0.6 g/L)、茚(终浓度 0.6 g/L)、龙胆酸(终浓度 1.0 g/L)、水杨酸(终浓度 1.0 g/L)、邻苯二酚(终浓度 1.0 g/L) 和 DMF (终浓度 0.6 g/L) 的 MSMN 培养基中, 每 12 h 取样测定 OD_{600} 的吸收值, 每种底物培养条件做 3 个平行, 取平均值用于表征菌群的生长情况。

1.5 添加营养物质对混合菌群降解 DBF 的影响

分别在 DBF 培养基中添加葡萄糖(0.1%, W/V)、酵母粉(0.1%, W/V)、胰蛋白胨(0.1%, W/V)、十二烷基磺酸钠(SDS, 0.02%, W/V)、Tween-80 (0.02%, V/V)、Triton-X-100 (0.02%, V/V), 每 12 h 取样测定 OD_{600} 的吸收值, 每个反应重复 3 次, 计算平均值用于表征菌群生长情况。

1.6 休止细胞反应

将菌群接种到 DBF 培养基中培养至对数后期, 8000×g 离心 10 min, 收集菌体, 超纯水洗涤菌体 2 次, 用超纯水(pH 8.0)重悬至 OD_{600} 为 6.0, 作为休止细胞。加入 DBF (终浓度 1.0 g/L), 在 30 °C、120 r/min 下反应, 每 24 h 取样, 10000×g 离心 1 min, 取上清, 加入等体积的甲醇稀释, 用超高分辨液相色谱-质谱(ultra-high performance liquid chromatography, UPLC-MS/MS)对代谢中间物质进行分析。

1.7 检测底物浓度及鉴定代谢中间产物

紫外全波长扫描法测定 DBF: 用二氯甲烷提取溶液中剩余的 DBF 三次, 在 200–900 nm 进行全波长扫描, DBF 的最大吸收峰为 280 nm, OD_{280} 的吸收峰值变化跟 DBF 浓度呈正相关, 可用于表征 DBF 浓度的变化。

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测 DBF: 高效液相色谱仪为安捷伦公司的 1100, 色谱柱为安捷伦公司的 Welch Xtimate (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) C₁₈ 反向色谱柱, 温度为 30 °C, 检测器为二极管阵列检测器, 流动相为 30% 的甲醇和 70% 的超纯水(V/V), 流速为 1.0 mL/min。

超高分辨液相质谱仪鉴定代谢中间产物: 超高分辨液相质谱仪为赛默飞科技有限公司的 Orbitrap Fusion Lumos, 配有 U3000 HPLC 液相系统, ESI 离子电离源, 三重四级杆检测器、离子阱检测器和超高分辨(orbitrap)检测器。分析柱为安捷伦公司的 ZORBAX RRHD Eclipse Plus (2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m) 色谱柱, 进样体积为 1 μ L, 流动相为 30% 的甲醇和 70% 的超纯水(V/V), 流速为 0.2 mL/min, 保留时间为 10 min,

扫描 m/z 50–500 的阴离子和阳离子, 并对检测到的离子利用 HCD 进行二级碎裂得到离子的二级质谱图。离子源温度为 250 °C。

HPLC 和 UPLC-MS/MS 的样本制备: 收集样品 1 mL, 10000×g 离心 10 min, 取上清用甲醇稀释(1:10, V/V), 0.22 μ m 滤膜过滤。

2 结果和分析

2.1 混合菌群的筛选与鉴定

经过连续半年以上的传代(5–7 d 传 1 代), 得到了一个生长曲线和降解效率稳定的混合菌群 DBFC。混合菌群能够在 DBF 培养基中进行连续培养, 经过 7 d 培养, 培养物中 DBF 消失, 全波长扫描和 HPLC 显示并无中间代谢产物积累, 证明 DBF 被混合菌群完全降解。菌群 DBFC 的生物多样性分析表明菌群中类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)占 84.06%、无色杆菌(*Achromobacter* sp.)占 8.17%、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)占 0.77% 和其他菌株(unclassified)为 4.87% (图 1-A)。对挑取的单菌落进行 16S rRNA 基因测序, 得到 4 株纯菌, 粉红色菌落对应的菌株为苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)、淡黄色菌落对应的菌株为无色杆菌(*Achromobacter* sp.)、黄色菌落对应的菌株为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)、白色菌落对应的菌株为细杆菌(*Microbacterium* sp.) (图 1-B)。没有得到生物多样性分析中丰度最高的类芽孢杆菌。将分离到的苍白杆菌、无色杆菌、寡养单胞菌和细杆菌分别接种到 DBF 培养基中, 测定 OD_{600} , 结果表明分离出的单菌均不能在 DBF 培养基中生长。将筛选到的 4 株菌等比例混合后接种到 DBF 培养基中, 测定 OD_{600} , 混合后的菌群也不能在 DBF 培养基中生长。

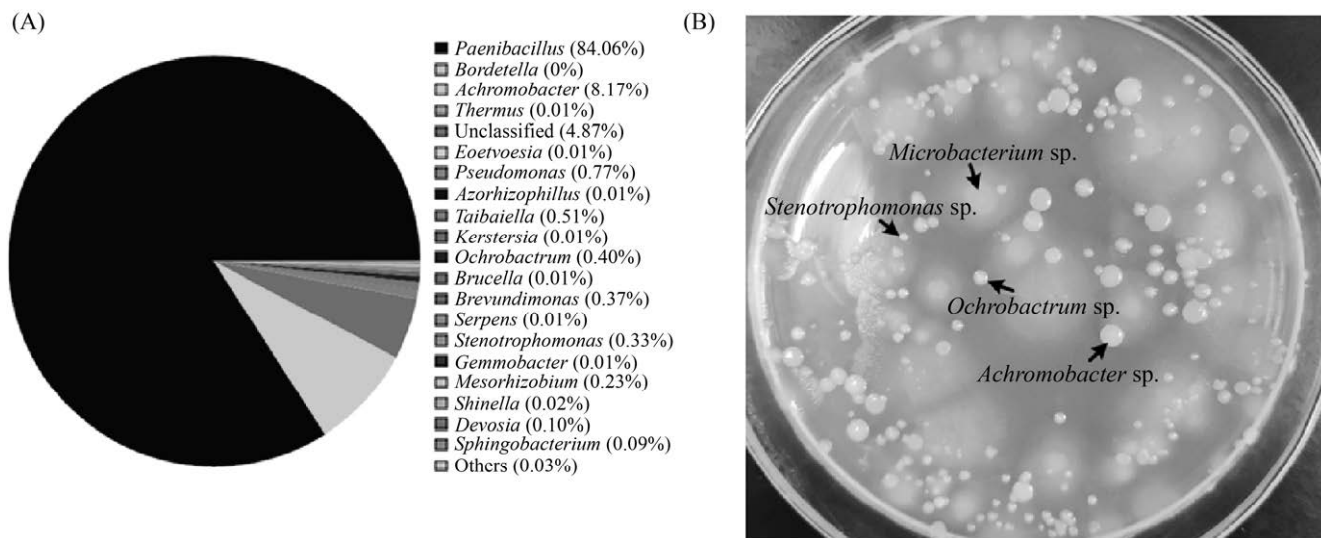


图 1. 样本物种丰度饼图 2D 图(A)和菌落形态(B)

Figure 1. Relative abundance of the most abundant in genus level (A) and colonial morphology (B).

2.2 混合菌群的最适生长条件及降解效率

按照 2% 接种量, 初始 DBF 浓度为 0.5 g/L, 在不同温度(25 °C、30 °C、37 °C) MSMN 培养基中培养菌群 DBFC, 检测 DBFC 在不同条件下的生长情况。在 25 °C 下培养的 DBFC 生长较慢, 在第 9 天达到最大生物量; 在 30 °C 条件下 DBFC 的生长速度较快, 生物量最大; 随着温度的进一步升高(37 °C), 菌群前期的生长速率较快, 但是

最大的生物量变小(图 2-A)。因此, 本研究选择 30 °C 作为后续试验的培养温度。

按照 2% 接种量, 初始 DBF 浓度为 0.5 g/L, 30 °C 培养条件下, 检测 DBFC 在不同 pH 条件下的生长情况。DBFC 在较宽的 pH (7.0–10.0) 范围内都可以生长, 在 pH 为 8.0 和 9.0 条件下菌株生长最好, 其次是 pH 10.0 和 pH 7.0, 因此选择 pH 8.0 的培养条件进行后续试验(图 2-B)。

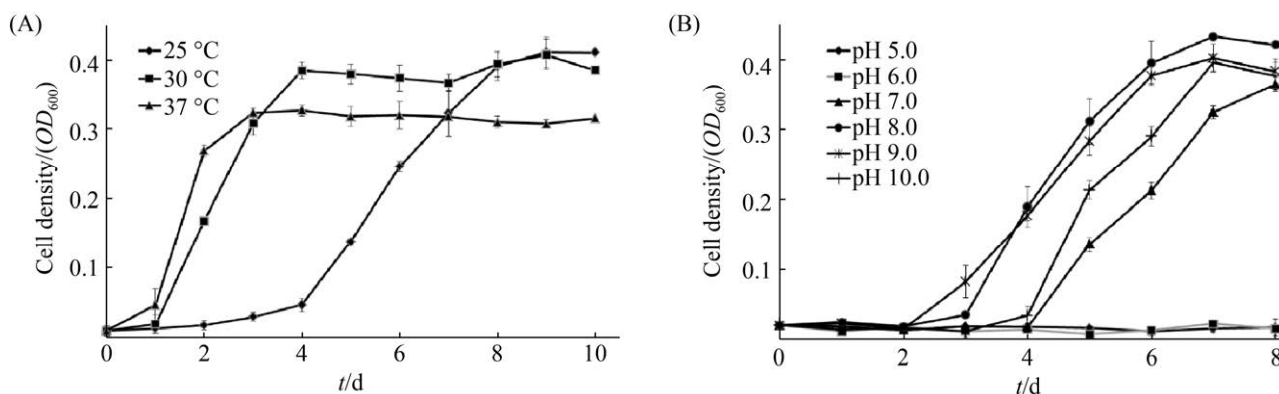


图 2. 不同温度(A)和 pH (B)条件下 DBFC 的生长曲线

Figure 2. Growth of DBFC at different temperature (A) and pH (B).

在 pH 8.0、培养温度 30 °C 条件下, 将 DBFC 接种到 MSMN 培养基中, 研究底物浓度对 DBFC 生长情况的影响。随着底物浓度的增加, 菌液终 OD_{600} 吸收值增加, 表明 DBFC 的生物量增加。DBF 浓度为 1.0 g/L 时, 菌液 OD_{600} 的吸收值可达到 0.7 (图 3-A)。降解速率随着底物浓度的升高而不断降低, 但最终的降解效率都可以达到 100%, 显示出了 DBFC 对 DBF 有较强的耐受和降解能力(图 3-B)。选择 DBF 浓度为 1.0 g/L 的培养条件

进行后续试验。

2.3 混合菌群的底物谱

DBFC 能以 DBF 为唯一碳源进行生长, 不能利用联苯、咪唑、二苯并噻吩、芴、DMF 作为底物进行生长, 在龙胆酸和水杨酸中可以生长, 在邻苯二酚中能进行微弱生长(表 1)。说明菌群 DBFC 可以利用龙胆酸和水杨酸, 推测龙胆酸和水杨酸可能是菌群 DBFC 降解 DBF 的代谢中间物质。

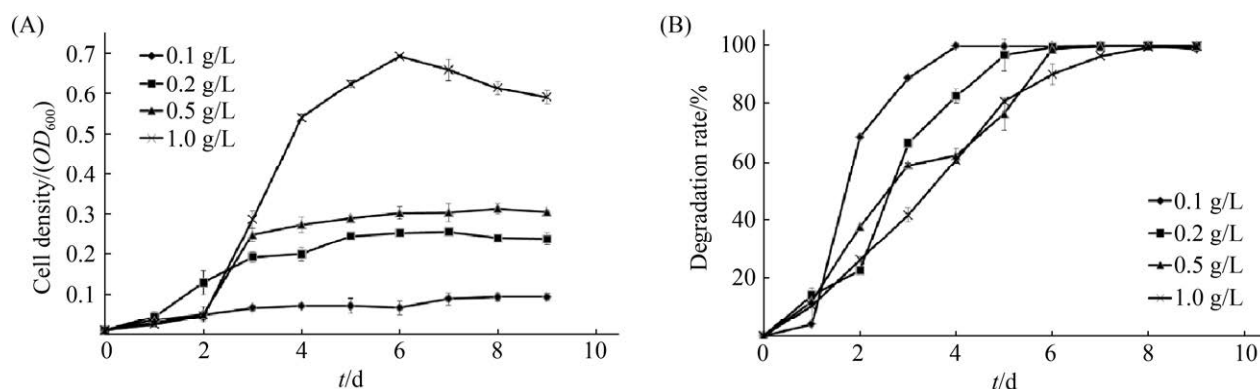


图 3. DBFC 在不同 DBF 浓度 MSMN 培养基中的生长曲线(A)和降解曲线(B)

Figure 3. Growth (A) and degradation rate (B) by DBFC at different concentrations of DBF.

表 1. 混合菌群 DBFC 在不同底物下 OD_{600} 吸收值(培养时间 4 d)

Table 1. The absorption of OD_{600} by DBFC in different substrates after cultivation for 4 days

Substrates	Concentration/(g/L)	OD_{600}
Diphenyl	0.6	0.042±0.011
Carbazole	0.6	-0.031±0.016
Dibenzothiophene	0.6	0.031±0.001
Fluorene	0.6	0.037±0.012
Catechol	1.0	0.106±0.018
Gentistic acid	1.0	0.832±0.001
Salicylic acid	1.0	0.927±0.005
Dimethylformamid	1.0	-0.021±0.013

2.4 添加外源营养物质对混合菌群降解 DBF 的影响

在 pH 值为 8.0、温度 30 °C、DBF 浓度 1.0 g/L 的培养条件下研究营养物质(葡萄糖、酵母粉和蛋白胨)和表面活性剂 Tween-80 对 DBFC 生长情况和对 DBF 降解效率的影响(图 4)。加入葡萄糖、酵母粉和蛋白胨后, DBFC 生长速度加快, 降解效率提高, 到第 3 天降解效率分别提高了 1.38、1.14 和 1.24 倍(图 4-A)。可能是由于营养物质的加入使微生物数量增加从而提高了对 DBF 的降解能力。添加表面活性剂 Tween-80 后, 降解速率降

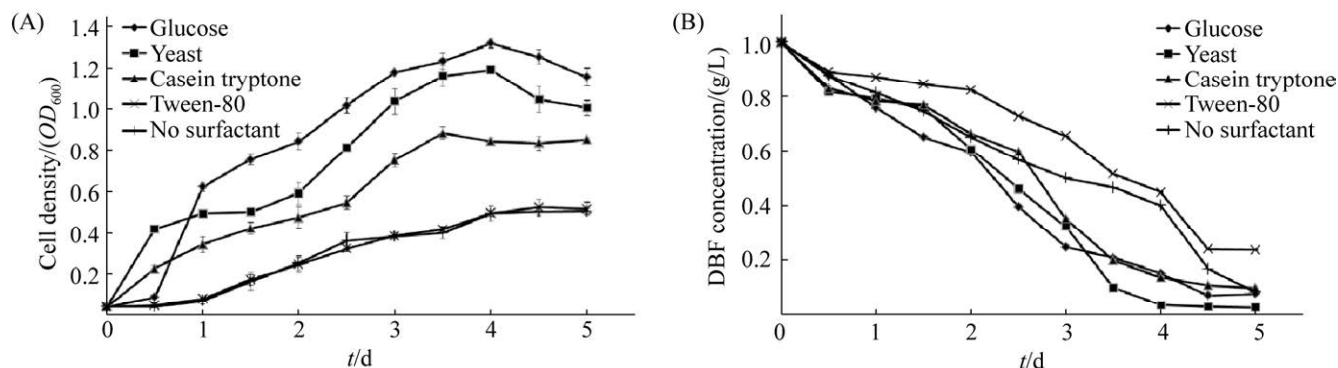


图 4. 不同添加物对 DBFC 生长(A)和降解效率(B)的影响

Figure 4. Growth of DBFC (A) and DBF degradation by DBFC (B) at different organic and inorganic sources.

低了 1.29 倍(图 4-B)。可能是由于表面活性剂对细菌的毒性, 或者 Tween-80 被优先作为碳源利用。

2.5 中间代谢产物的鉴定

利用超高分辨质谱对混合菌群 DBFC 降解 DBF 休止细胞反应中的化合物进行分析, 分别在正离子模式和负离子模式下分析 m/z 为 50–500 的离子峰和二级质谱的离子碎片, 然后用 Compound Discovery (CD)软件对收集到的化合物进行分析, 得到 DBF 代谢相关的离子信息(图 5), 其中在正离子模式下分析得到 2,2',3-三羟基联苯 (2,2',3-trihydroxybiphenyl, m/z 为 203.06781), 负离子模式下分析得到 2,4-己二烯酸 (2,4-hexadienoic acid, m/z 为 233.04449)、水杨酸 (m/z 为 137.02437) 和龙胆酸 (m/z 为 153.01985)。据此, 得到混合菌群 DBFC 降解 DBF 的代谢途径(图 6): DBF 在双加氧酶作用下发生羟化, 进一步开环生成 2,2',3-三羟基联苯, 加氧生成 2,4-己二烯酸, 进一步生成水杨酸和龙胆酸, 然后进入三羧酸循环实现完全转化。

3 讨论

已报道的 DBF 降解菌多为单一菌株, 跟单一菌株相比混合菌群 DBFC 的最大降解速率较

高。在 DBF 浓度 1.0 g/L 条件下, 混合菌群 DBFC 对 DBF 的最大降解速率为 0.031 mmol/(L·h)。菌株 *Ralstonia* sp. SBUG290 对 DBF 的最大降解速率为 0.0029 mmol/(L·h)^[15]; 菌株 *Pseudomonas* sp. strain C3211 对 DBF 的最大降解速率为 0.006 mmol/(L·h)^[16]; 菌株 *P. putida* B2-6 对 DBF 的最大降解速率为 0.0083 mmol/(L·h)^[8]; 菌株 *P. areuginosa* FA-HZ1 对 DBF 的最大降解速率为 0.025 mmol/(L·h)^[9]。混合菌群 DBFC 降解 DBF 的效率高于单一菌株的降解效率, 推测可能是由于菌群中微生物之间存在协同作用。单一菌株中某一关键酶的表达量或活性不足可能会影响整个代谢通路的效率, 某个中间代谢产物的累积也可能通过反馈抑制。Wittich 等^[17]研究发现 *Sphingomonas* sp. RW16 和 *Pseudomonas* sp. RW10 组成的混合菌群能降解含氯二苯并呋喃, 但单一菌株不具备降解能力, 两株需要协同作用完成降解。Prashant 等^[18]以氯代水杨酸为唯一碳源筛选到具有降解 DBF 能力的混合菌群, 该混合菌群中包含 6 株细菌, 进一步研究表明菌群中的 *Serratia marcescens* 具有降解 DBF 的能力。目前从环境中分离并在实验室进行纯培养的微生物

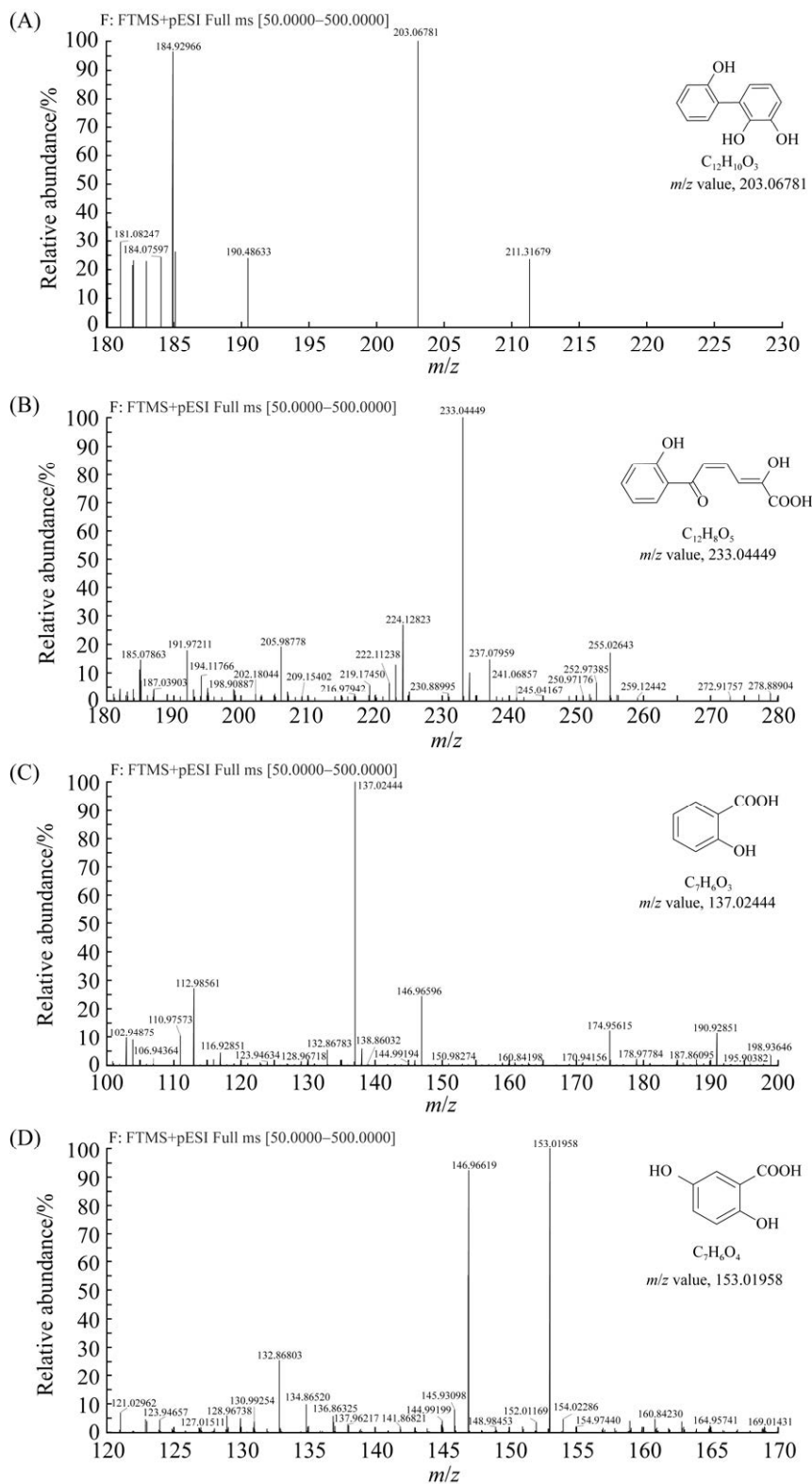


图 5. 利用超高分辨质谱仪检测 DBF 的中间代谢产物

Figure 5. Identification of intermediates of DBF degradation by UPLC-MS/MS. A: 2,2',3-trihydroxybiphenyl; B: 2,4-hexadienoic acid; C: gentisic acid; D: salicylic acid.

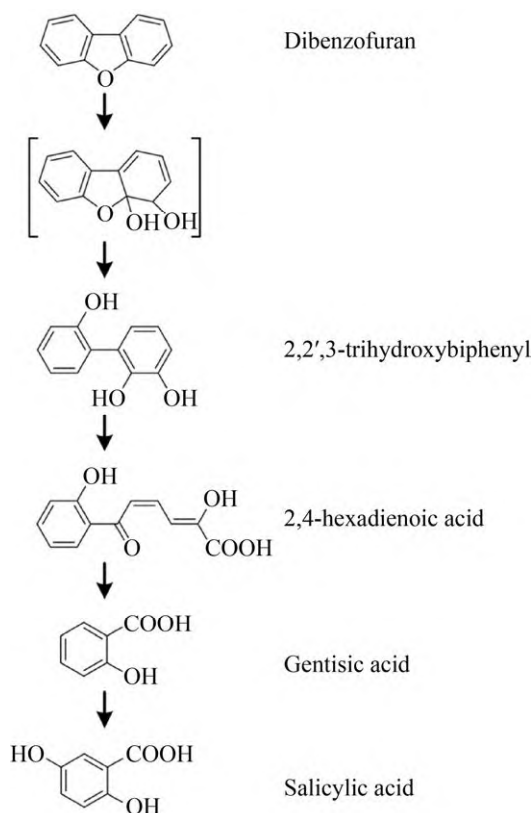


图 6. 混合菌群 DBFC 降解 DBF 的代谢途径

Figure 6. The proposed degradation pathway of DBF by bacterial consortium DBFC.

还是少数, 有大量不可培养的微生物, 这些不可培养微生物中蕴藏有新的代谢途径和代谢基因。随着测序技术和生物信息学的发展, 可以将环境中所有的 DNA 进行深度测序, 不依赖纯培养分析环境中微生物的群落组成。本研究提取了混合菌群 DBFC 在 DBF 培养基中的总 DNA 分析其群落组成, 结果表明 DBFC 中主要菌株为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) 占 84.06%、无色杆菌(*Achromobacter* sp.) 占 8.17%、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) 占 0.77%, 其他菌株(unclassified)为 4.87%。对混合菌群进行单菌分离, 得到 4 株单菌分别为苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)、无色杆菌(*Achromobacter* sp.)、寡养单胞菌

(*Stenotrophomonas* sp.) 和细杆菌(*Microbacterium* sp.), 没有得到类芽孢杆菌的单菌, 可能是由于 DBFC 的降解条件为寡营养环境, 而实验室筛选菌株用的培养条件为高营养环境, 微生物早期能够迅速繁殖, 但是在此过程中可能会产生群体感应信号分子或有害物质, 这些物质的积累会抑制部分微生物的生长, 进一步抑制其他共生微生物的生长。目前已报到的 DBF 降解菌株多为红球菌属、假单胞菌属和无色杆菌属, 尚未有类芽孢杆菌属菌株降解 DBF 的报道。将分离的 4 株单菌分别接种到 DBF 培养基中均不能生长, 推测混合菌群中菌株可能是通过共同作用完成对 DBF 的降解, 而类芽孢杆菌属的微生物在 LB 条件下生长无优势或者培养条件不合适。

不同微生物的生长和降解条件存在较大差异, 菌株 *P. areuginosa* FA-HZ1 的最适生长和降解条件为 37 °C、pH 5.0^[9], 适宜于酸性环境中 DBF 的降解; 菌株 DBF63 的最适生长和降解条件为 30 °C、pH 7.0^[13], 适宜于中性环境中 DBF 的降解; 混合菌群 DBFC 的最适生长条件为 30 °C、pH 8.0, 适宜于偏碱性环境中 DBF 的降解, 这跟辽河口区纬度高、偏碱性土壤环境条件一致。

底物浓度对于菌株的降解能力也有较大影响。底物浓度过低, 不能被微生物感应, 不足以激发相关基因的表达, 尤其是自然环境中还可能不存在其他更容易代谢的化合物, 导致污染物不能被彻底清除; 而底物浓度过高, 可能会对微生物产生毒性, 影响微生物的生长和降解。混合菌群 DBFC 在 DBF 浓度从 0.1–1.0 g/L 的范围内均能较好地生长, 对 DBF 的降解效率均为 100%, 在 4–8 d 内彻底降解环境中的 DBF。在微生物代谢多环芳烃的过程中需要自由电子的帮助, 因此添

加富含自由电子的物质能够提高多环芳烃的降解效率^[19]。另外在原位修复过程中通常会有其他的底物存在,尤其是容易被微生物利用的碳源可能会对降解过程产生影响^[10]。在培养基中添加葡萄糖、酵母粉和蛋白胨后,混合菌群 DBFC 对 DBF 的降解速率分别提高了 1.38、1.14 和 1.24 倍,最终的降解效率仍为 100%,说明混合菌群中的微生物能够利用这些营养物质进行增殖迅速提高细菌数量同时不影响对 DBF 的降解能力。DBF 在水中的溶解性差,提高了降解难度,已有的研究表明表面活性剂能够提高 PAHs 降解菌的降解效率^[20]。在培养基中添加 SDS 和 Triton-X-100,DBFC 不能生长;在培养基中添加 Tween-80,对混合菌群的生长几乎没有影响,但是前期抑制了 DBFC 对 DBF 的降解,使其降解速率降低了 1.29 倍,说明混合菌群优先利用 Tween-80 作为碳源。

微生物主要是通过加氧途径降解 DBF,即在双加氧酶的作用下在苯环上随机引入 2 个氧原子。目前已报道的 DBF 有氧代谢有:菌株 *Staphylococcus auriculans* DBF63 降解 DBF 的休止细胞反应中检测到水杨酸和龙胆酸^[13];在菌株 FA-HZ1 降解 DBF 的休止细胞反应中检测到水杨酸和邻苯二酚^[9];在菌株 *Pseudomonas putida* strain B6-2 降解 DBF 的休止细胞反应中检测到 2-烯酸(2-enoic acid)、2-羟基-4-(3'-氧代苯并呋喃-2'-yl)butanoic acid]、3-(3'-氧代苯并呋喃-2'-基)丙酸 [3-(3'-oxobenzofuran-2'-yl)propanoic acid]、3-羟基-3-(3'-氧代苯并呋喃-2'-基)丙酸 [3-Hydroxy-3-(3'-oxobenzofuran-2'-yl)propanoic acid]、2-(3'-氧代苯并呋喃-2'-基)乙酸[2-(3'-oxobenzofuran-2'-yl)acetic acid]、3-羟基-2,3-二氢苯并呋喃-2-羧

酸 (3-hydroxy-2,3-dihydrobenzofuran-2-carboxylic acid)和水杨酸(salicylic acid)^[8];菌株 *Rahodococcus opacus* strain SAO101 中检测到水杨酸和邻苯二酚^[21],根据检测到的中间代谢产物推测其代谢途径。本研究利用超高分辨质谱仪对休止细胞不同反应时间的代谢物进行检测,分别收集 m/z 在 50-500 范围内的正负离子,并对其进行二级碎裂,收集 MS₂ 的离子碎片。利用 CD 软件对 LC-MS 数据进行分析,将已报道的 DBF 降解途径中的化合物搜索比对,找到 4 个与 DBF 代谢相关的化合物:2,2',3-三羟基联苯(阳离子, m/z 为 203.06781)、2,4-己二烯酸(阴离子, m/z 为 233.04449)、水杨酸(阴离子, m/z 为 134.024371)和龙胆酸(阴离子, m/z 为 153.01958)。得到混合菌群 DBFC 降解 DBF 完整的代谢途径:在双加氧酶作用下在 4,4a 位置引入 2 个氧原子,生成 4,4a-二羟基-二氢二苯并比呋喃,该化合物非常不稳定,难以被检测到,进一步转化成 2,2',3-三羟基联苯(2,2',3-trihydroxybiphenyl),2,2',3-三羟基联苯(2,2',3-trihydroxybiphenyl)为黄色,因此培养基会变成明亮的黄色。2,2',3-三羟基联苯被氧化开环生成 2,4-己二烯酸,进一步氧化生成水杨酸和龙胆酸,进入三羧酸循环被完全降解。

多环芳烃类污染物是一种重要的环境污染物,微生物降解是处理该类污染物的有效手段。DBF 是多环芳烃研究的模式化合物之一,研究其代谢过程对于阐明多环芳烃代谢机制有重要意义。本研究从环境中分离 DBF 降解菌群,该菌群对 DBF 的降解效率高,最大降解速率高于单一菌株,适用于偏碱性(pH 8.0)环境,通过超高分辨质谱分析得到完整的 DBF 降解途径,为该类物质的代谢机制研究提供参考。

参 考 文 献

- [1] Focant JF, Fréry N, Bidondo ML, Eppe G, Scholl G, Saoudi A, Oleko A, Vandentorren S. Levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in human milk from different regions of France. *Science of the Total Environment*, 2013, 452/453: 155–162.
- [2] Bianchi D, Bosetti A, Cidaria D, Bernardi A, Gagliardi I, D'Amico P. Oxidation of polycyclic aromatic heterocycles by *Pseudomonas fluorescens* TTC1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47(5): 596–599.
- [3] Wilkes H, Wittich R, Timmis KN, Fortnagel P, Francke W. Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 367–371.
- [4] Fortnagel P, Harms H, Wittich RM, Krohn S, Meyer H, Sinnwell V, Wilkes H, Francke W. Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and the mixed culture HH27. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(4): 1148–1156.
- [5] Harms H, Wilkes H, Wittich R, Fortnagel P. Metabolism of hydroxydibenzofurans, methoxydibenzofurans, acetoxydibenzofurans, and nitrodibenzofurans by *Sphingomonas* sp. strain HH69. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(7): 2499–2505.
- [6] Kasuga K, Nojiri H, Yamane H, Kodama T, Omori T. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF₆₃. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 84(5): 387–399.
- [7] Strubel V, Engesser KH, Fischer P, Knackmuss HJ. 3-(2-hydroxyphenyl)catechol as substrate for proximal meta ring cleavage in dibenzofuran degradation by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(6): 1932–1937.
- [8] Li QG, Wang XY, Yin GB, Gai ZH, Tang HZ, Ma CQ, Deng ZX, Xu P. New metabolites in dibenzofuran cometabolic degradation by a biphenyl-cultivated *Pseudomonas putida* strain B6-2. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(22): 8635–8642.
- [9] Ali F, Hu HY, Wang WW, Zhou ZK, Shah SB, Xu P, Tang HZ. Characterization of a Dibenzofuran-degrading strain of *Pseudomonas aeruginosa*, FA-HZ1. *Environmental Pollution*, 2019, 250: 262–273.
- [10] 丁鹏飞. 一株红球菌(*Rhodococcus* sp. strain p52)降解二苯并呋喃途径基因的表达及功能验证. 山东大学硕士学位论文, 2017.
- [11] Vaidya S, Devpura N, Jain K, Madamwar D. Degradation of chrysene by enriched bacterial consortium. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1333.
- [12] Seeger M, Cámara B, Hofer B. Dehalogenation, denitration, dehydroxylation, and angular attack on substituted biphenyls and related compounds by a biphenyl dioxygenase. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3548–3555.
- [13] Gibson DT, Parales RE. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(3): 236–243.
- [14] Zhao SX, Hu CH, Guo LZ, Li KR, Yu H. Isolation of a 3-hydroxypyridine degrading bacterium, *Agrobacterium* sp. DW-1, and its proposed degradation pathway. *AMB Express*, 2019, 9(1): 65.
- [15] Becher D, Specht M, Hammer E, Francke W, Schauer F. Cometabolic degradation of dibenzofuran by biphenyl-cultivated *Ralstonia* sp. strain SBUG 290. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4528–4531.
- [16] Jensen AM, Finster KW, Karlson U. Degradation of carbazole, dibenzothiophene, and dibenzofuran at low temperature by *Pseudomonas* sp. strain c3211. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(4): 730.
- [17] Wittich RM, Strömpl C, Moore ERB, Blasco R, Timmis KN. Interaction of *Sphingomonas* and *Pseudomonas* strains in the degradation of chlorinated dibenzofurans. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1999, 23(4/5): 353–358.
- [18] Jaiswal PK, Thakur IS. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Serratia marcescens* from alkalophilic bacterial consortium of the chemostat. *Current Microbiology*, 2007, 55(5): 447–454.
- [19] Vaidya S, Jain K, Madamwar D. Metabolism of Pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech*, 2017, 7(1): 1–15.
- [20] Mangwani N, Kumari S, Das S. Marine bacterial biofilms in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) under terrestrial condition in a soil microcosm. *Pedosphere*, 2017, 27(3): 548–558.
- [21] Kimura N, Kitagawa W, Mori T, Nakashima N, Tamura T, Kamagata Y. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(2): 474–484.

Characterization of dibenzofuran biodegradation by a bacterial consortium DBFC

Qianshu Sun^{1,2}, Jie Bai², Hui Li², Hao Yu³, Chunhui Hu^{1*}

¹Central Laboratory, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China

²Key Laboratory of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

³College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] Dibenzofuran (DBF) is a highly toxic compounds and widely spread in environment, used as a model compound in studying the microbial degradation of polycyclic aromatic compounds. [Methods] A bacterial consortium DBFC was isolated from petroleum contaminated soil in Liao River China. The total DNA was extracted to analyze the biodiversity of DBFC, and the strain was isolated and purified by plate dilution coating method. The optimum growth conditions of mixed bacteria were studied through measuring the absorption value of OD_{600} . The effects of substrate concentration, substrate, adding nutrient and surface-active substance on the degradation efficiency were studied under the optimum growth conditions. The intermediate metabolites of DBF degradation were detected by ultra-high resolution mass spectrometry, and the metabolic pathway was speculated. [Results] Microbial diversity analysis showed 84.06% of the strains identified in DBFC were *Paenibacillus* sp., 8.17% were *Achromobacter* sp., 0.77% were *Pseudomonas* sp., other strains contain only 2.13%. Four strains, belong to *Ochrobactrum* sp., *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp. and *Microbacterium* sp., were isolated. Through cultivated in mineral-NH₄Cl salt medium adding DBF as the carbon source, the four stains could not grow. The optimal growth temperature and pH value was 30 °C and 8.0, respectively. Under optimal conditions, DBFC could completely degrade up to 1000 g/L of DBF in 8 days. The maximum degradation rate of DBFC was 0.031 mmol/(L·h) under 1.0 g/L of DBF. Adding glucose, yeast and peptone, the degradation rate of DBF were increased by 1.38, 1.14, and 1.24 fold, respectively. Adding sodium dodecyl sulfonate and Triton-X-100, the degradation rate were inhibited; while adding Tween-80, the degradation rate was decreased. Metabolites 2,2',3-trihydroxybiphenyl, 2,4-hexadienoic acid, gentisic acid and salicylic acid were identified by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC). The bacterial consortium DBFC could also use gentisic acid and salicylic acid as sole carbon and energy source, which were response with the previous results. [Conclusion] The bacterial consortium DBFC had high efficient in degrading of DBF under pH 8.0 condition, which could be further exploited *in situ* remediation of polycyclic aromatic compounds contaminated sites. Through UPLC-MS/MS analysis, the metabolites were identified, which provides methods and directions for the study of metabolic process of the polycyclic aromatic compounds.

Keywords: dibenzofuran, microbial degradation, bacteria consortium, degradation characteristics, degradation pathway

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31600086), by the Qingdao Agricultural University Scientific Research Foundation (663/1119047) and by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2016CQ06)

*Corresponding author. Tel: +86-532-58957543; E-mail: hollyhuchunhui@163.com

Received: 2 February 2021; Revised: 3 April 2021; Published online: 23 August 2021

actamicro@im.ac.cn