

两株萘降解菌的降解特性及动力学分析

王萧燕, 花文鑫, 张云云, 李加兴, 高宇*

山东科技大学安全与环境工程学院, 山东 青岛

收稿日期: 2024年3月10日; 录用日期: 2024年3月29日; 发布日期: 2024年4月25日

摘要

研究不同萘初始浓度条件下, 铜绿假单胞菌ZS1和红球菌b1对萘的降解特性。ZS1和b1菌株最适萘初始质量浓度为分别为200 mg/L和300 mg/L。培养120 h菌株ZS1和b1对萘的降解率分别达到80.45%和87.13%。通过动力学拟合, 证实两种菌株对萘的降解过程均符合一级降解动力学方程, 降解常数K分别为0.01843 kd/h^{-1} 和0.02832 kd/h^{-1} 。通过气相色谱-质谱(GC-MS)分析了萘降解阶段的中间产物, 并推测了两种菌株降解萘的途径分别为邻苯二甲酸途径和水杨酸途径。

关键词

铜绿假单胞菌, 红球菌, 萘, 降解动力学, 降解途径

Degradation Characteristics and Kinetic Analysis of Two Strains of Naphthalene-Degrading Bacteria

Xiaoyan Wang, Wenxin Hua, Yunyun Zhang, Jiaying Li, Yu Gao*

College of Safety and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao Shandong

Received: Mar. 10th, 2024; accepted: Mar. 29th, 2024; published: Apr. 25th, 2024

Abstract

The degradation characteristics of naphthalene by *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 and *Rhodococcus* b1 under different initial concentrations of naphthalene were studied. The optimum initial naphthalene concentrations of ZS1 and b1 were 200 mg/L and 300 mg/L, respectively. After 120 hours of culture, the degradation rate of naphthalene by strain ZS1 and b1 reached 80.45% and 87.13%.

*通讯作者。

respectively. Through kinetic fitting, it was confirmed that the degradation process of naphthalene by the two strains conformed to the first-order degradation kinetic equation, and the degradation constants K were $0.01843 \text{ kd/h}^{-1}$ and $0.02832 \text{ kd/h}^{-1}$, respectively. The intermediate products of naphthalene degradation stage were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the pathways of naphthalene degradation by the two strains were speculated to be phthalic acid pathway and salicylic acid pathway.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, *Rhodococcus*, Naphthalene, Degradation Kinetics, Degradation Pathway

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

多环芳烃(PAHs)是环境中常见的持久性有机污染物,海上运输、石油开发、溢油事故以及工业生活污水排放是海洋环境中 PAHs 的主要来源[1]。多环芳烃已被广泛用于识别石油泄漏,因为它们是石油中毒性最大、最常被检测到的碳氢化合物之一,在石油中含量足够高,而且它们在石油中的分布与其他来源不同。目前去除污水中 PAHs 的方法有物理、化学和生物方法[2]。其中微生物降解 PAHs 的生物方法具有经济、高效、二次污染少等优势,因此成为去除污水中 PAHs 的理想方法[3]。萘是一种典型的多环芳烃类化合物,目前的研究表明,多种细菌和真菌可通过不同的降解机制降解萘,能够利用多环芳烃作为碳源和能源的微生物在受污染的水、土壤和沉积物中很常见[4]。

已报道的萘降解菌很多,主要有反硝化产碱菌(*Alcaligenes denitrificans*)、分支杆菌(*Mycobacteria*)、假单胞菌(*Pseudomonas*),红球菌(*Rhodococcus*)等。这些菌株分布广泛,从陆地到海洋的许多环境生态中都能发现其存在。研究表明假单胞菌菌株在 48 h 内对 800 mg/L 萘降解率可达到 77% [5];从沉积物中分离出可以高效降解菲、蒽和芘的菌群,其降解率能达到 91.7% [6]。铜绿假单胞菌和红球菌株都具有降解难降解有机污染物的能力,是研究有机污染物生物降解最有研究价值的菌属。萘降解的第一步反应中的关键酶是萘双加氧酶。在萘双加氧酶的作用下,萘的水溶性和稳定性都发生了较大改变,生物降解性显著升高[7]。此外,在萘的降解过程中,降解基因 *nahY* 也发挥着重要作用,在该酶的作用下细菌向萘及其代谢中间产物游动,使得菌株更易接近目标化合物,促进了菌株对萘的降解[8]。在萘的降解过程中,催化邻苯二酚开环裂解的酶是邻苯二酚 2,3-双加氧酶或邻苯二酚 1,2-双加氧酶 *CatA* [9]。

本实验利用从青岛市黄岛区输油管道爆炸海域筛选出的两种高效石油降解菌铜绿假单胞菌(ZS1)和红球菌(b1),对其的萘降解特性进行分析,以对萘的降解率为评价指标,研究以不同初始浓度萘为底物对菌株降解的影响,对降解产物进行 GC-MS 测定,对降解途径进行预测,为微生物降解多环芳烃的应用提供理论参考,对多环芳烃修复技术的发展具有重要意义。

2. 材料与方法

2.1. 菌种来源

实验中使用的菌株是中国山东省青岛输油管道爆炸期间从油污染区(36.07 N, 120.38 E)海水中分离出的两株高效油降解菌。经 16 次 sRNA 测序,鉴定为铜绿假单胞菌(ZS1)和红球菌(b1)。

2.2. 主要试剂及培养基

萘、环己烷、甲醇自上海麦克林生化科技有限公司。LB 培养基由 10 g/L 肽酯、5 g/L 酵母、5 g/L 氯化钠、10~15 g/L 琼脂(固体培养基)和 4 mL/L 微量元素溶液组成。

2.3. 实验方法

2.3.1. 菌种活化和样品的制备

制备了浓度为 1 g/L 的萘 - 甲醇溶液, 并通过 0.22 μm 的有机滤膜进行过滤以去除细菌。随后, 在无菌操作台上放置过夜, 使甲醇充分挥发。按照预定的浓度比例, 将挥发后的溶液加入液体无机盐培养基中, 从而确保体系中萘的最终浓度分别为 100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L、700 mg/L 和 800 mg/L。

将用 LB 培养基培养至处于对数生长期的 ZS1 和 b1 菌液进行离心处理(>5000 g, 5 min), 随后进行重悬。使用无机盐培养基稀释菌液, 直至其 OD_{600} 值为 1.0 时得到菌悬液。按照 10% 的接种量, 将菌悬液接种至无机盐培养基中。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm 的条件下进行恒温震荡培养, 持续 7 天。期间, 每隔 1 天取样, 并使用可见分光光度计测定 OD_{600} 值, 以此反映生物量的变化 2.3.2 降解率的测定

2.3.2. 萘降解率的测定

按比例取 50 mg/L 的 PAHs 溶液分别配置浓度为 10、20、30、40、50 mg/L 的 PAHs 标准溶液, 以萘浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制出标准曲线。采用了液 - 液萃取法, 环己烷作为萃取剂, 按 1:1 的比例与样品混合, 完成萃取后, 分离并收集有机相。使用 1 cm 石英比色皿和紫外分光光度计, 在 275 nm 波长处测定了该有机相的吸光度值。每组实验设 3 平行, 以无菌萘 - 无机盐培养基三角瓶为非生物对照(CK)。

在连续培养完成后, 取 20 mL 培养液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 \times g 的条件下离心 10 min。吸取 10 mL 上清液, 用 5 mL 环己烷进行萃取, 萃取完成后, 吸取上层液体用正己烷定容至 10 mL。以环己烷为空白对照, 用 1 cm 石英比色皿在萘最大吸收波长处测其吸光值, 与不接菌的培养基进行对比, 得到菌株对萘的最大降解率。

连续培养结束后, 取出 20 mL 的培养液, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8000 \times g 的条件下离心处理 10 min。从中吸取 10 mL 的上清液, 并使用 5 mL 环己烷进行萃取。萃取完成后吸取上层液体并用正己烷将其定容至 10 mL。为了测量萘的吸光值, 使用 1 cm 石英比色皿在萘的最大吸收波长处进行了测量, 并以环己烷作为空白对照。通过与未接种菌株的培养基进行对比, 得出菌株对萘的最大降解率。

2.3.3. 降解中间产物测定

萃取样经无水硫酸钠脱水处理, 先用 0.22 μm 孔径有机滤膜过滤, 经 GC-MS 测定分析。GC-MS 接口温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 色谱柱 DB-5MS (30 m \times 0.25 μm \times 0.25 mm), 色谱条件: 初始柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 保留 1 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ /min 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$, 之后 5 $^{\circ}\text{C}$ /min 升温至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保留时间 4 min。质谱条件为: 离子温度 230 $^{\circ}\text{C}$, 扫描范围(m/z) 40~500, 载气为氦气, 流速为 1 mL/min。

3. 结果与讨论

3.1. 不同萘浓度下萘降解菌生物量分析

本实验选取 8 个不同的萘浓度作为初始底物浓度进行试验。将菌株接种于含只含萘的无机盐液体培养基中, 每隔 1 d 取样进行测定培养液的 OD_{600} 值, 绘制菌株的生长曲线如图 1。碳源是菌株生长的必要条件, 所以培养基中所含萘的浓度与菌株的生长量有直接关系, 当不额外添加碳源时, 菌株在无机盐液

体培养基中均无法正常生长, 在以萘为唯一碳源的培养基中, 萘的浓度会影响菌体的生长, 进而影响其生物降解效果[10]。菌株 ZS1 和 b1 在以萘为单一碳源的无机盐培养基中的生长再次证实了对萘的降解能力。图 1(a)中当萘初始质量浓度为 200 mg/L 时, ZS1 的生长量最大 7 天后达到 0.72; 图 1(b)中萘浓度为 300 mg/L 时, b1 的生长量最大达到 0.63。萘浓度的八个水平之间均呈显著性差异($P < 0.05$), 表明初始萘浓度的各水平对菌株的生长均有很大的影响。两菌株在 6 d 后进入延滞期, 这可能是由于自然环境中的萘浓度较低, 加入外源萘后, 高浓度的萘对菌体产生了一定的毒害作用; 又由于萘的结构稳定不易被降解利用, 而且溶解度相对于分离培养基中的碳源(如酵母粉、蛋白胨)较低。碳源的缺乏也会抑制菌株的生长繁殖, 但同时也会诱导一些微生物产生和分泌活性降解酶, 之后菌株的生长加快, 同时也加快了培养液中萘的降解[11]。

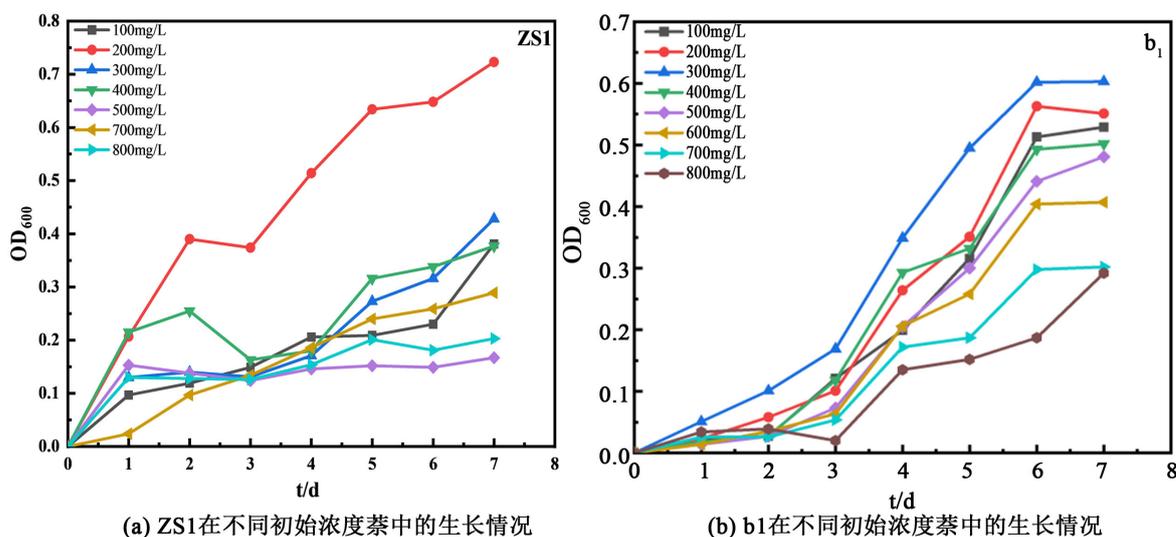


Figure 1. Growth curves of two strains under different naphthalene concentrations
图 1. 不同萘浓度条件下两菌株生长曲线

3.2. 萘降解特性及降解动力学分析

为了进一步研究 ZS1 和 b1 生长量和降解萘之间的关系, 一级动力学模型可以被用来描述萘的降解, 两菌株降解萘的速率可以用以下公式描述:

$$C = C_0 e^{-\lambda t}$$

式中: C 为 t 时间介质中残留的萘浓度(mg/L); C_0 为介质中萘初始浓度(mg/L); λ 为反应速率常数(d^{-1}); t 为时间(d)。

如图 2, 随着 ZS1 与 b1 生物量增长, 萘降解率迅速提高。0~24 h 降解率增长较慢, 24~48 h 降解率快速提高, 培养 48 h 菌株 ZS1 和 b1 对萘降解率分别为 56.65% 和 60.68%, 均达到 50% 以上。72~120 h 降解增长缓慢, 培养 120 h 菌株 ZS1 和 b1 对萘的降解率达到 80.45% 和 87.13%。总体上 b1 比 ZS1 降解萘效果更好。

两菌株降解萘的动力学模型与一级动力学模型吻合较好, 由表 1 可知, ZS1 降解动力学方程为 $C/C_0 = e^{-0.01843t - 0.26658}$ ($R^2 = 0.98873$), b1 降解动力学方程为 $C/C_0 = e^{-0.02832t - 0.16377}$ ($R^2 = 0.99185$), b1 的降解速率常数 k 值 0.02832 大于 ZS1 的 K 值 0.01843, 表明 b1 比 ZS1 对萘降解速率更快。研究发现菌株 Na-S 和菌株 Na-b 对萘的降解符合一级动力学, 降解萘的动力学方程的相关性系数 R^2 为 0.983 和 0.953 [12]。

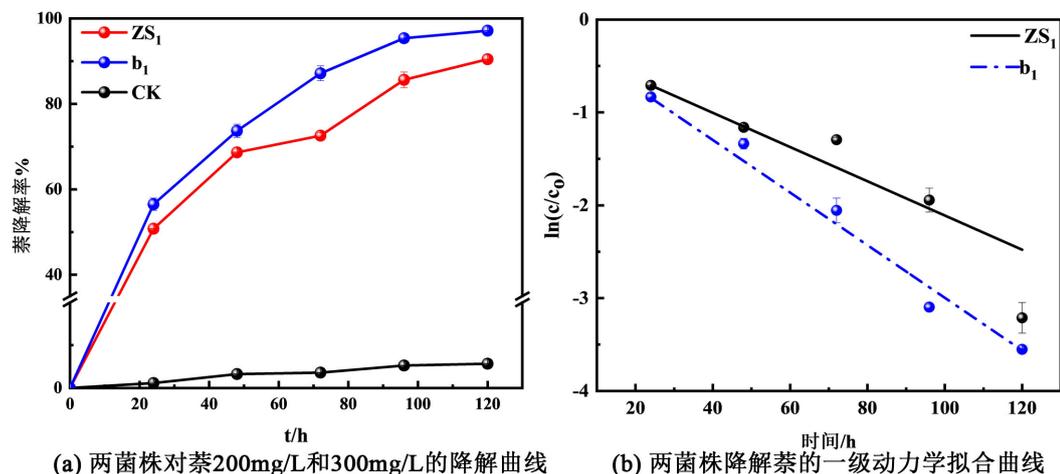


Figure 2. Degradation curves and first-order kinetic fitting curves of the two strains

图 2. 两菌株降解萘曲线及一级动力学拟合曲线

Table 1. First-order kinetic fitting equation for naphthalene degradation by strains ZS1 and b1

表 1. 菌株 ZS1 与 b1 降解萘的一级动力学拟合方程

菌株	拟合方程	降解速率常数 kd/h^{-1}	R^2	动力学方程
ZS1	$\ln(C/C_0) = -0.01843t - 0.26658$	0.01843	0.98873	$C/C_0 e^{-0.01843t - 0.26658}$
b1	$\ln(C/C_0) = -0.02832t - 0.16377$	0.02832	0.99185	$C/C_0 e^{-0.02832t - 0.16377}$

3.3. 降解中间产物鉴定

用 GC-MS 对铜绿假单胞菌 ZS1 和红球菌 b1 降解萘过程的中间产物进行了定性分析, 结果见图 3。由图 3 可知, 在不同时间段均发现大量的直链醇, 因此推断萘在降解过程中逐渐被开环氧化。 t_R 为 12.96、13.19 和 14.61 min 是邻-羟基-顺-苯丙酮酸与其他中间代谢物(存在环状结构)发生反应后的产物; t_R 为 13.70 min 是邻-羟基-顺-苯丙酮酸与其他中间代谢物发生反应开环后的产物; t_R 为 15.52 min 是邻苯二甲酸二正庚酯的特征峰[2]。

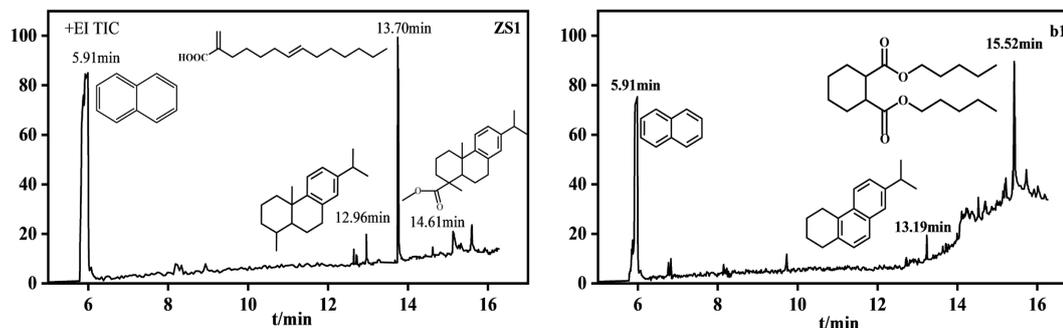


Figure 3. GC-MS diagram of degradation intermediates of the two strains (a) ZS1; (b) b1

图 3. 两菌株降解中间产物 GC-MS 图(a) ZS1; (b) b1

3.4. 降解途径分析

加氧酶在多环芳烃化合物的生物降解过程中特别是在羟基化和环裂解反应中起着重要的催化作用。根据 GC-MS 分析结果, 推测菌株 ZS1 和 b1 对萘的可能降解途径有 2 条如图 4: 一条是邻苯二甲酸途径。

萘先代谢为 1-羟基-2-萘甲酸，然后在双加氧酶、醛缩水合酶和脱氢酶作用下转化为邻苯二甲酸；另一条是水杨酸途径。萘在双加氧酶作用下生成 1,2-二羟基萘，接着被 1,2-双羟基萘双加氧酶转化为 2-羟基-苯并呋喃-2-羧酸，在异构酶作用下生成邻-羟基-顺-苯丙酮酸而后被催化为水杨醛，在脱氢酶在作用下生成水杨酸。水杨酸通过羟化酶进一步转化为邻苯二酚和己二烯半醛酸，最后形成乙醛和丙酮酸，这些物质最终通过三羧酸循环(TCA)生成二氧化碳和水[13]。

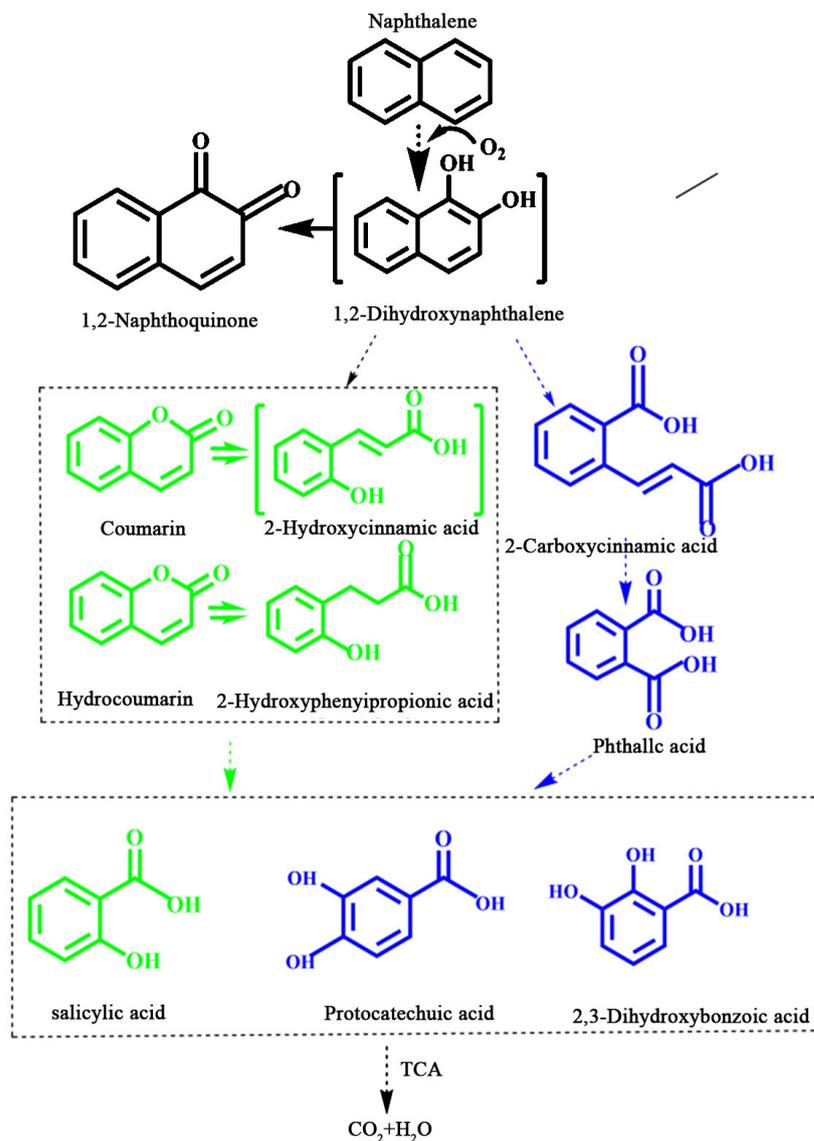


Figure 4. Prediction of degradation pathway of naphthalene

图 4. 萘的降解途径预测

4. 结论

1) 设置 8 个浓度的萘 - 无机盐液体培养基，以萘为唯一碳源对菌株进行培养，筛选出最适萘降解初始浓度。当萘初始质量浓度为 200 mg/L 时，ZS1 的生长量最大 7 天后达到 0.72；萘浓度为 300 mg/L 时，b1 的生长量最大达到 0.63。

2) 培养 120 h 菌株 ZS1 和 b1 对萘的降解率分别达到 80.45% 和 87.13%。同时, 动力学拟合发现, 两菌株对萘的降解过程都符合一级降解动力学方程。ZS1 降解动力学方程为 $C/C_0 = e^{-0.01843t - 0.26658}$, b1 降解动力学方程为 $C/C_0 = e^{-0.02832 - 0.16377}$, 降解速率常数 k 值分别为 0.01843 和 0.02832

3) 经 GC-MS 分析萘降解阶段的中间产物, 检测到 t_R 为 12.96 min 邻-羟基-顺-苯丙酮酸和 t_R 为 13.70 min 邻苯二甲酸二正庚酯的特征峰。初步确定了两菌株对萘的降解途径: 一条是邻苯二甲酸途径; 另一条是水杨酸途径。萘首先被氧化成 1,2-二羟基萘, 之后脱氢酶作用再开环生成水杨酸、邻苯二酚, 最后经过羟化酶等的作用下形成乙醛和丙酮酸, 进入三羧酸循环(TCA)。

参考文献

- [1] Feng, X., Deng, M., Yu, J., *et al.* (2024) Highly Efficient Removing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Coking Wastewater by Bio-Augmentation Activated Sludge with *Nocardioides* sp. JWJ-L0 through Sodium Acetate Co-Metabolism. *Journal of Water Process Engineering*, **58**, Article 104844. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.104844>
- [2] Yang, H., Qian, Z., Liu, Y., *et al.* (2024) Comparative Genomics Reveals Evidence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation in the Moderately Halophilic Genus *Pontibacillus*. *Journal of Hazardous Materials*, **462**, Article 132724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132724>
- [3] 许琪. 一株石油源 *Bacillus firmus* 对萘的降解特性及蛋白组学研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 辽宁大学, 2022.
- [4] 郑淑奇. 四株红球菌的分类鉴定及其降解多环芳烃的途径[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2022.
- [5] Huang, H., Wu, K., Khan, A., *et al.* (2016) A Novel *Pseudomonas gessardii* Strain LZ-E Simultaneously Degrades Naphthalene and Reduces Hexavalent Chromium. *Bioresource Technology*, **207**, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.015>
- [6] 王岩. 近海沉积物中几种多环芳烃的生物降解研究[D]: [博士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [7] Li, S.X., Ji, F.L., Lv, J., *et al.* (2024) Removal of PAHs in Paddy Fields: How Natural Periphytic Biofilm Enhances the Removal Process and the Mechanisms Involved. *Environmental Technology & Innovation*, **33**, Article 103533. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103533>
- [8] 郭亚男, 张馨予, 胥梦, 等. 低温萘降解菌的筛选、鉴定及降解条件优化[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 100-107.
- [9] Maryam, F., Mohammadsaeed, S. and Amir, M.G. (2023) Potential Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Petroleum Hydrocarbons by Indigenous Fungi Recovered from Crude Oil-Contaminated Soil in Iran. *Scientific Reports*, **13**, Article No. 22153. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49630-z>
- [10] 郑兰健. 高产生物表面活性剂菌株的筛选及其对多环芳烃降解性能的研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 长春工业大学, 2022.
- [11] 邹晓爽. 苯并[a]芘好氧降解菌 *Acinetobacter* XS-4 的分离筛选、降解性能及机理研究[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- [12] 梁雪涛, 苏俊杰, 王震, 等. 两株菲降解菌的降解特性及动力学[J]. *净水技术*, 2020, 39(S2): 40-48.
- [13] 张惠. 石油降解菌的分离鉴定及对芳香烃萘的协同降解性能的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽建筑大学, 2020.