

平菇诱变菌株(*Pleurotus ostreatus* SG0056)对多环芳烃菲的生物降解特性及其途径分析*

桂琳¹ 王曼¹ 张伟文¹ 潘中武¹ 戚之琳¹ 葛飞²

(1.皖南医学院微生物与免疫学教研室,安徽 芜湖 241000;2.安徽工程大学生物与化学工程学院,安徽 芜湖 241000)

摘要 研究平菇诱变菌株(*Pleurotus ostreatus* SG0056)去除菲的效果、生物降解特性,并考察不同金属离子、诱导物对菌株培养过程中漆酶的影响。结果表明:(1)*Pleurotus ostreatus* SG0056 菌体对菲有一定的吸附作用,但贡献较小,漆酶在菲的生物降解过程中促进作用显著。(2) Cu^{2+} 和木质素对漆酶分泌有明显促进作用。(3)*Pleurotus ostreatus* SG0056 对菲的代谢途径存在多种可能。

关键词 多环芳烃 菲 平菇 气相色谱质谱 降解途径

DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2018.07.010

Biodegradation characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons phenanthrene and analysis of degradation pathway by *Pleurotus ostreatus* SG0056 GUI Lin¹, WANG Man¹, ZHANG Weiwen¹, PAN Zhongwu¹, QI Zhilin¹, GE Fei². (1. Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241000; 2. College of Biology and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu Anhui 241000)

Abstract: The phenanthrene removal performance, biodegradation characteristics and effects of different metal ions and inducers on laccase activity during fermentation of *Pleurotus ostreatus* SG0056 were observed. The results showed that: (1) *Pleurotus ostreatus* SG0056 had little effect on phenanthrene adsorption, biodegradation played a major role, the mycelium had some effects on phenanthrene biodegradation. (2) Laccase activity could be stimulated by Cu^{2+} and lignin significantly. (3) There were many possible metabolic pathways of phenanthrene by *Pleurotus ostreatus* SG0056.

Keywords: PAHs; phenanthrene; *Pleurotus ostreatus*; GC-MS; degradation pathway

多环芳烃(PAHs)是含有2个或2个以上苯环,广泛分布于水体、土壤中,具有持久性、迁移性的有机污染物^[1-2]。PAHs具有致癌、致畸、致突变等作用,严重威胁人类健康,必须对其进行有效治理^[3-5]。由于菲的独特化学结构,已成为研究PAHs的模式化合物^[6-7]。利用微生物代谢作用治理PAHs污染具有成本低、效果好、对环境友好等特点,应用前景较好。

近年来,国内外学者在微生物法降解PAHs类污染物方面开展了大量研究。JANIKOWSKI等^[8]研究了鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)对蔡、菲、葱的降解特性,发现其降解效率最高可达98 mg/(L·h)。LIU等^[9]通过比较蛋白质组学的方法,研究了吐温-80可增强*Sphingomonas* sp. GY2B对菲的生物降解效率的机理。JING等^[10]研究了培养液中添加线虫和葡萄糖对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)降解菲效率的影响,结果发现,添加线虫可刺激儿茶酚2,3-双加氧酶的分泌,增强菌株

对菲的去除。倪雪等^[11]从PAHs污染区植物体内分离得到两株能降解液体培养基中高浓度菲的植物内生细菌寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),在一定条件下两株菌株对菲的降解率均高于90%。

目前,国内外有关平菇(*Pleurotus ostreatus*)对菲的降解特性和途径分析方面的研究鲜有报道。本研究在前期菲高效降解菌株筛选实验中,获得了1株具有较高降解率的平菇诱变菌株——*Pleurotus ostreatus* SG0056,并研究其生物降解特性及途径,为更好利用微生物资源治理有机污染物提供实验数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

实验菌株:经离子束诱变获得的*Pleurotus ostreatus* SG0056。

第一作者:桂琳,女,1980年生,博士,副教授,主要从事应用微生物学研究。

* 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目(No.KJ2017A251);国家级大学生创新创业训练计划项目(No.201510368004);安徽省大学生创新创业训练计划项目(No.201510368068)。

环境污染与防治网 <http://www.zjepc.com>

主要培养基:(1)固体培养基,马铃薯 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L、 MgSO_4 1.5 g/L、 KH_2PO_4 3 g/L、pH 7.0。(2)液体摇瓶培养液,马铃薯 20 g/L、葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 5 g/L、 MgSO_4 1.5 g/L、 KH_2PO_4 3 g/L、维生素 B1 0.01 g/L、pH 7.0。

主要试剂:菲,阿拉丁试剂;蛋白胨、葡萄糖、琼脂、无水 MgSO_4 、 KH_2PO_4 、维生素 B1、甲醇、环己烷、无水乙醇、愈创木酚、丁二酸、乙酸乙酯、无水 Na_2SO_4 、苯甲醇、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、木质素、水杨酸、曲拉松、吐温-80 等均为国产分析纯。

主要仪器设备:GCMS-QP2010 plus 气相色谱质谱联用仪;QHZ-123B 型组合式全温振荡培养箱;JH-723 型紫外分光光度计;L550 型台式离心机;JK-2200 型数控超声波清洗器;LDZX-50KB 型立式蒸汽灭菌锅;SW-CJ-2FD 无菌操作台;RV10 型旋转蒸发仪。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

将斜面保存的 *Pleurotus ostreatus* SG0056 转接至固体平板,置于光照培养箱中,28 °C 静置培养 10 d,待菌丝布满平板。

1.2.2 菌体摇瓶培养

用无菌打孔器从菌丝布满的平板中取直径 10 mm 菌片数片,按每 15 mL 接入 1 片直径 10 mm 菌片的方式,进行液体摇瓶培养液接种。在 28 °C、140 r/min、装液量 30%(体积分数)的条件下,摇床振荡培养。

1.2.3 培养液中菲的添加方法

用电子天平准确称取一定质量的菲,溶解于甲醇试剂,配制 10 mg/mL 菲甲醇溶液。将 100 mL 空三角瓶灭菌后,用烘箱烘干,于无菌操作台加入 0.3 mL 的上述菲甲醇溶液,待甲醇完全挥发后,加入 30 mL 灭菌后的液体摇瓶培养液。

1.2.4 培养液、菌体对菲的降解测定方法

将 *Pleurotus ostreatus* SG0056 在正常液体摇瓶培养液中培养 10 d,4 000 r/min 离心 15 min,进行菌体和培养液的固液分离。配置菲为 20 mg/L 的液体摇瓶培养液,无菌操作条件下取 1.0 g 菌体放入 100 mL 三角瓶中。在 28 °C、140 r/min 条件下,摇床振荡培养。参照文献[12]、[13]测定培养液中菲残留浓度、漆酶酶活及菌体生物量。

设定菌体摇瓶培养过程中菲初始质量浓度为 100 mg/L,每组实验设 3 个平行。在 28 °C、140 r/min 条件下,摇床培养。17 d 培养结束,分别测定超声波处理前后培养液中菲残留浓度。超声条件为超声频率 40 kHz、30 °C、20 min。

1.2.5 金属离子对漆酶酶活影响的测定方法

在菌体摇瓶培养过程中,分别添加 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} ,使其摩尔浓度均为 0.2 mmol/L,以不添加任何金属离子作为空白对照。在 28 °C、140 r/min 条件下,摇床振荡培养,培养第 13 天取样测定漆酶酶活。

1.2.6 诱导物对漆酶酶活影响的测定方法

在菌体摇瓶培养过程中,分别添加诱导物苯甲醇、CMC-Na、木质素、水杨酸、曲拉松、吐温-80、愈创木酚,使其质量浓度均为 0.5 g/L,以不添加任何诱导物作为空白对照,在 28 °C、140 r/min 条件下,摇床振荡培养,培养第 13 天取样测定漆酶酶活。

1.2.7 菲降解产物的提取、分析

将 *Pleurotus ostreatus* SG0056 液体摇瓶培养后的培养液进行固液分离所得菌体用研钵研磨后与培养液合并,浓 HCl 调 pH 至 2.0,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液。用等体积乙酸乙酯进行萃取,充分静置后,取上层有机相,加入过量无水 Na_2SO_4 进行脱水处理,静置 24 h,旋转蒸发仪浓缩至 2.0 mL,供气相色谱质谱分析用。

1.2.8 气相色谱质谱分析方法

色谱分析条件:色谱柱 Rxi-5MS 30.00 m×0.25 mm×0.25 μm ;进样口温度 250 °C;载气为高纯 He;分流进样,分流比 20(体积比);柱温控制为 60 °C 保持 1 min,以 25 °C/min 升温到 150 °C,再以 10 °C/min 升温到 260 °C 保持 10 min。

质谱分析条件:溶剂延迟 4.5 min;接口温度 280 °C;离子源为电子轰击源(EI);200 °C,70 eV;扫描范围 50~350 质荷比。

2 结果与讨论

2.1 *Pleurotus ostreatus* SG0056 生长曲线、漆酶酶活变化及菲降解情况

由图 1 可见,在菌体生长的初期阶段(1~5 d),培养液中菲残留率较高,维持在 80% 以上,菌体处在适应期阶段,细胞生长、代谢产物积累均较缓慢,对菲的降解效率较低,第 5 天时生物量为 2.68 g/L、培养液中漆酶酶活为 6.86 U/mL、菲残留率为 82.6%。5 d 后,培养液中菲残留率迅速降低,直到第 11 天下降趋势变缓。11~19 d,菲残留率仅从 21.3% 降低到 7.8%,分析原因可能是由于培养液中营养物质消耗殆尽,菌体自溶所致。同时,在培养液中菲含量迅速减少阶段,生物量和漆酶酶活增长较快,推测菲的去除可能和漆酶的大量分泌及菌体的

吸附作用有关。

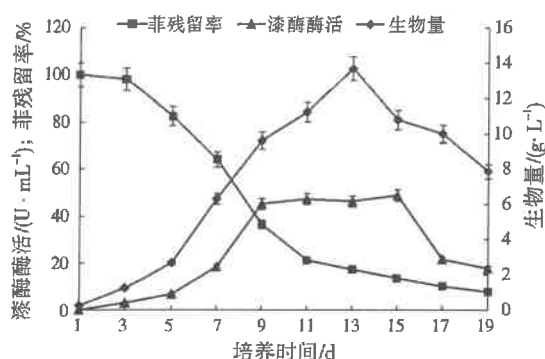


图1 *Pleurotus ostreatus* SG0056 生长曲线、漆酶酶活及菲残留率

Fig.1 Growth curve of *Pleurotus ostreatus* SG0056, laccase activity and phenanthrene degradation rate

Pleurotus ostreatus SG0056 对 PAHs 菲具有较高的降解效率,培养 19 d 时菲降解率可达 92.2%,与文献[14]、[15]比较,降解效率具有一定优势。

2.2 菌体吸附作用、漆酶酶活对菲降解率的影响

从表 1 可看出,*Pleurotus ostreatus* SG0056 对菲的去除效果主要依赖于生物降解作用,单纯的菌体吸附作用对菲的去除贡献较小。菌体对菲有一定的吸附作用,吸附量随培养时间的延长先略有增加;培养后期,当菌体进入衰亡期后,菌体细胞产生自溶现象,生物量减少,菌体对菲的吸附量随之减少。同时,将不同培养条件下的 *Pleurotus ostreatus* SG0056 培养液中的漆酶酶活、非残留率进行测定,发现含菲的共培养体系中,相同培养时间时,漆酶酶

表 1 超声处理前后菲残留质量浓度变化情况

Table 1 Phenanthrene residual concentration before and after ultrasonic treatment

培养时间/d	菲残留质量浓度/(mg·L ⁻¹)		菌体吸附量/(mg·L ⁻¹)
	超声前	超声后	
5	92.36	95.24	2.88
9	35.67	40.52	4.85
13	9.53	15.26	5.73
17	4.22	9.01	4.79

活越高,菲残留率越低。因此,初步判断 *Pleurotus ostreatus* SG0056 对菲的降解效果与培养体系中漆酶酶活关系密切,能促进培养过程中漆酶酶活升高的因素均有利于培养液中菲的去除。菌体对菲有一定的吸附作用,但贡献较小,漆酶在菲的生物降解过程中促进作用显著,这与文献[16]、[17]的结果相吻合。

2.3 金属离子对 *Pleurotus ostreatus* SG0056 漆酶酶活影响

由图 2 可知,与空白对照相比,Cu²⁺ 的添加对 *Pleurotus ostreatus* SG0056 的漆酶酶活提高作用最明显,培养液中漆酶酶活几乎提高了 1 倍,漆酶酶活达到了 48.9 U/mL。分析原因是由于 Cu²⁺ 可在基因转录水平对漆酶基因进行诱导表达。Ca²⁺、Fe²⁺ 的抑制作用显著,培养液中漆酶酶活仅为 19.3、19.9 U/mL;其他金属离子对漆酶酶活影响较小。

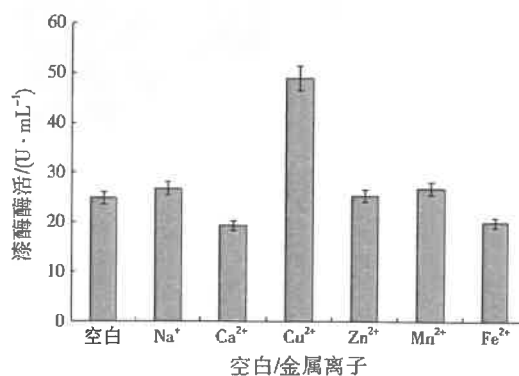


图2 金属离子种类对 *Pleurotus ostreatus* SG0056 漆酶酶活影响

Fig.2 Enzyme activity of *Pleurotus ostreatus* SG0056 under different metal ions conditions

2.4 诱导物对 *Pleurotus ostreatus* SG0056 漆酶酶活影响

由图 3 可知,添加木质素后培养液中漆酶酶活提高显著,为 57.8 U/mL。其原因可能与木质素具有的特殊化学结构有关,可有效刺激菌体合成漆酶。吐温-80 效果次之,酶活为 35.1 U/mL。这可能与

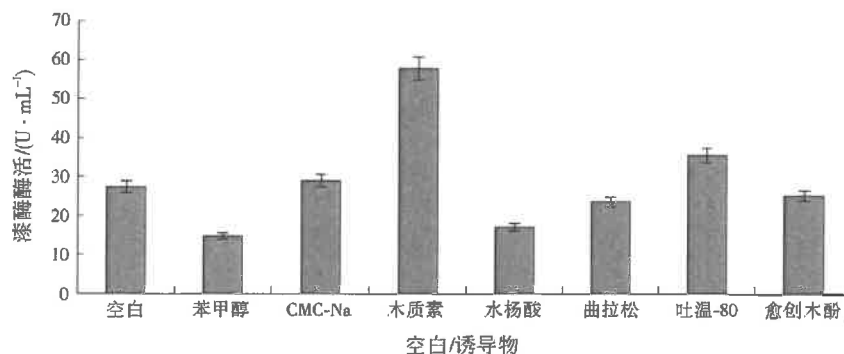


图3 不同诱导物对 *Pleurotus ostreatus* SG0056 漆酶酶活影响

Fig.3 Enzyme activity of *Pleurotus ostreatus* SG0056 under different inducers conditions

吐温-80 能增大菌体细胞膜的通透性,使菌体合成的漆酶易于分泌到胞外,使得漆酶酶活提升。苯甲醇和水杨酸则对漆酶分泌有明显的抑制作用,酶活仅为 14.7、16.9 U/mL。

2.5 *Pleurotus ostreatus* SG0056 对菲的降解产物分析

将加菲培养液中不同培养时间的培养产物进行

气相色谱质谱分析,并与质谱标准图谱数据库进行比对,发现 *Pleurotus ostreatus* SG0056 对菲的中间代谢产物有 3-菲酚、9,10-二氢二醇、联苯二甲酸酐、萘并噻吩和 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(见图 4)。查阅相关资料发现,3-菲酚和 9,10-二氢二醇为较常见的菲代谢中间产物^[16-21];萘并噻吩、联苯二甲酸酐和

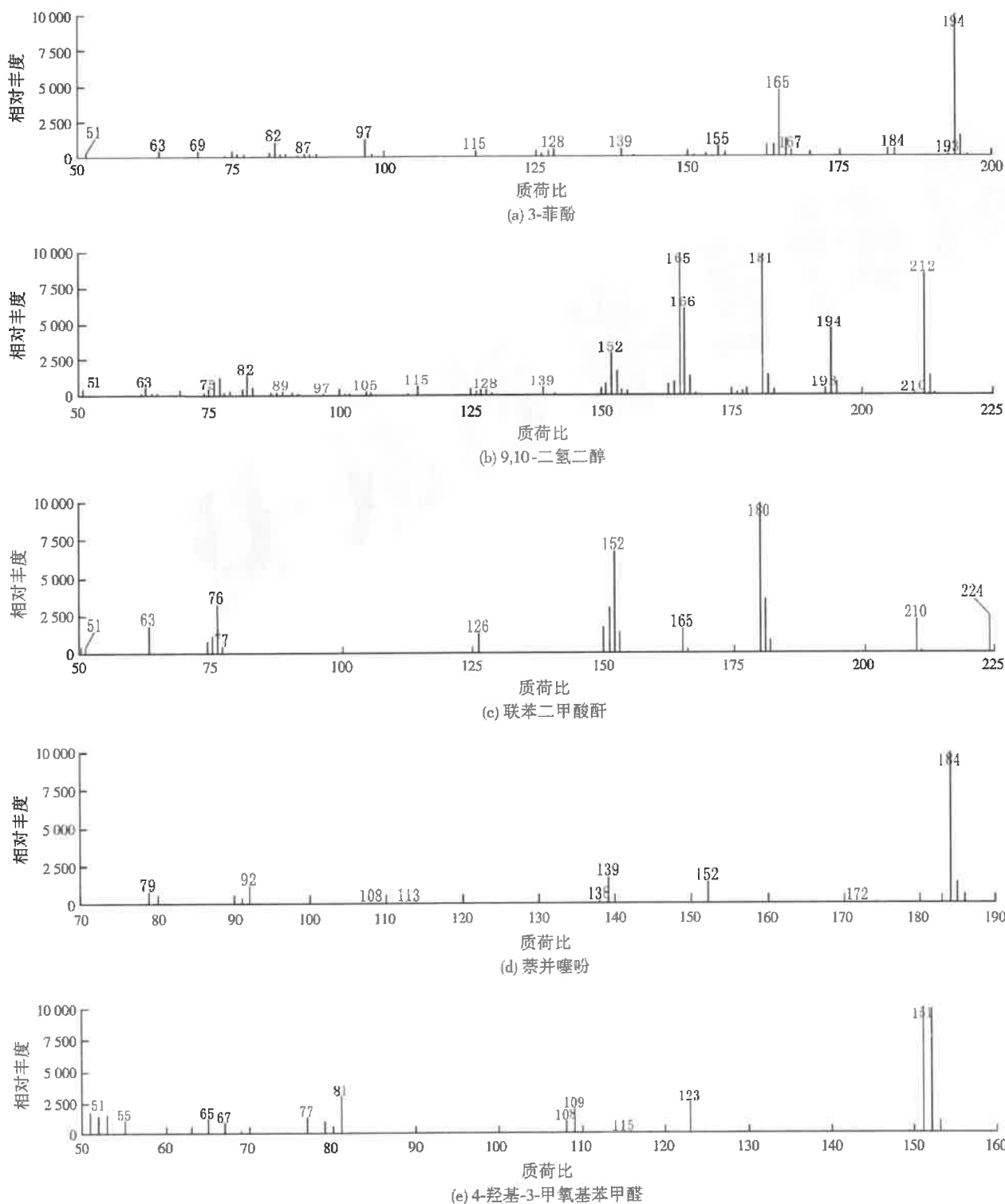


图 4 代谢产物质谱图

Fig. 4. Mass spectrogram of metabolites

http://www.zjzjpc.com

4-羟基-3-甲氧基苯甲醛未见相关文献报道。同时,这5种中间代谢产物在未添加菲的培养液中均未检测到,说明它们均为菲的降解中间产物或诱导菌体分泌的相关代谢产物。

基于以上的非降解中间代谢产物的鉴定分析,*Pleurotus ostreatus* SG0056对菲的代谢途径存在多种可能,更详细的代谢步骤可借助于蛋白质组学等分析方法进行进一步的深入研究。在此基础上,推测可能的一条降解途径为:细胞色素P-450单加氧酶氧化菲,使菲转化为9,10-环氧化菲,并在环氧化物水解酶作用下水解成9,10-二氢二醇,再经过开环、脱水等作用,最终代谢为CO₂和H₂O^[22]。

由于部分代谢产物分解速度较快,取样未能检测到,导致实际降解过程中部分代谢产物缺失,还有部分代谢产物本身含量极少,前处理及操作方面的因素均可能导致其丢失或未被检测到,因此可能存在其他降解途径。

3 结 论

(1) *Pleurotus ostreatus* SG0056菌体对菲有一定的吸附作用,但贡献较小,漆酶在菲的生物降解过程中促进作用显著。

(2) Cu²⁺和木质素对漆酶分泌有明显促进作用。

(3) *Pleurotus ostreatus* SG0056对菲的代谢途径存在多种可能,推测可能的一条降解途径为:细胞色素P-450单加氧酶氧化菲,使菲转化为9,10-环氧化菲,并在环氧化物水解酶作用下水解成9,10-二氢二醇,再经过开环、脱水等作用,最终代谢为CO₂和H₂O。

参考文献:

- [1] MOUTTAKI H, JOHANNES J, MECKENSTOCK U R. Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(10): 2770-2774.
- [2] 田华, 刘哲, 赵璐, 等. 土壤中多环芳烃菲的自然降解特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(8): 4055-4060.
- [3] LIANG X, GUO C, LIAO C, et al. Drivers and applications of integrated clean-up technologies for surfactant-enhanced remediation of environments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 129-140.
- [4] LI J, LI F, LIU Q, et al. PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: evidence from isotopes and hydrochemistry [J]. *Chemosphere*, 2017, 178: 143-153.
- [5] 李凤梅, 郭书海, 张灿灿, 等. 多环芳烃降解菌的筛选及其在焦化场地污染土壤修复中的应用[J]. *环境污染与防治*, 2016, 38(4): 1-5.
- [6] LI J, SHANG X, ZHAO Z, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil and plants of the Aojiang River waterway in Wenzhou, China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 173(1/2/3): 75-81.
- [7] 徐成斌, 王闻焯, 李鲜珠, 等. 一株非降解菌的鉴定及降解特性[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(3): 684-691.
- [8] JANIKOWSKI T B, VELICOG D, PUNT M, et al. Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(2/3): 368-376.
- [9] LIU S, GUO C, DANG Z, et al. Comparative proteomics reveal the mechanism of Tween 80 enhanced phenanthrene biodegradation by *Sphingomonas* sp. GY2B [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 137: 256-264.
- [10] JING Y, LI Y, LIU Z, et al. Effects of bacterial-feeding nematodes and glucose on phenanthrene removal by *Pseudomonas putida* [J]. *Pedosphere*, 2017, 27(1): 165-171.
- [11] 倪雪, 刘娟, 高彦征, 等. 2株降解菲的植物内生细菌筛选及其降解特性[J]. *环境科学*, 2013, 34(2): 746-752.
- [12] 葛飞, 张慧敏, 龚倩, 等. 杏鲍菇产漆酶培养条件优化及其对菲的降解特性研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(14): 221-225.
- [13] 林俊芳, 刘志明, 陈晓阳, 等. 真菌漆酶的酶活测定方法评价[J]. *生物加工过程*, 2009, 7(4): 1-8.
- [14] 杨滨银, 晁群芳, 陈志丹, 等. 一株非降解菌的筛选及降解动力学分析[J]. *环境污染与防治*, 2013, 35(4): 62-66.
- [15] 许晓毅, 苏攀, 姬宇, 等. 沉积物中2株多环芳烃降解菌的分离鉴定及其对菲、荧蒹的降解特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(3): 1513-1520.
- [16] 瞿晶晶. 白腐真菌对模拟土壤中含氮杂环类化合物的降解研究[D]. 武汉: 武汉科技大学, 2011.
- [17] 潘澄, 郝婷, 吴宇澄, 等. 产漆酶真菌筛选及其对PAHs污染土壤修复的初步研究[J]. *土壤学报*, 2011, 48(6): 1253-1259.
- [18] CERNIGLIA C E, YANG S K. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47(1): 119-124.
- [19] SUTHERLAND J B, SELBY A L, FREEMAN J P, et al. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(11): 3310-3316.
- [20] CASILLAS R P, CROW S A, HEINZE T M, et al. Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi [J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1996, 16(4): 205-215.
- [21] SACK U, HOFRICHTER M, FRITSCH W. Degradation of phenanthrene and pyrene by *Nematoloma frowardii* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1997, 37(4): 287-293.
- [22] 陶雪琴, 卢桂宁, 易筱筠, 等. 菲高效降解菌的筛选及其降解中间产物分析[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(1): 190-195.

编辑: 黄 苇 (收稿日期: 2017-06-28)

