

DOI: 10.11766/trxb202110010341

方文雯, 李晓宁, 吴仕希, 王芳, 张银萍. 腐殖酸对 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘的影响[J]. 土壤学报, 2023, 60 (1): 164–174.
FANG Wenwen, LI Xiaoning, WU Shixi, WANG Fang, ZHANG Yinping. Effects of Humic Acid on Biodegradation of Pyrene by *Mycobacterium* sp. NJS-1[J]. Acta Pedologica Sinica, 2023, 60 (1): 164–174.

腐殖酸对 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘的影响*

方文雯^{1, 3}, 李晓宁^{1, 3}, 吴仕希^{1, 3}, 王芳², 张银萍^{1, 2, 3†}

(1. 南京师范大学分析测试中心, 南京 210046; 2. 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008, 3. 南京师范大学化学与材料科学学院, 南京 210046)

摘要: 为研究腐殖酸(Humic acid, HA)对微生物降解环境中多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)的影响,以四环芘为典型PAHs及HA为代表性溶解性有机质,选取芘高效降解菌*Mycobacterium* sp. NJS-1于有无HA条件下降解芘,应用傅里叶变换回旋离子共振质谱(FT-ICR-MS),激光共聚焦显微镜(CLSM),及光谱技术分析降解过程中芘的残留特征、中间产物信息及菌落的变化特征。结果显示:未添加HA,芘降解率为 $35.33\% \pm 3.27\%$;添加HA后,其降解率明显提高,达到 $88.33\% \pm 3.40\%$,表明HA对高效菌*Mycobacterium* sp. NJS-1降解芘有明显的促进作用。不添加HA,菌落*Mycobacterium* sp. NJS-1分泌的双加氧酶只进攻芘的C_{4,5}位点,而添加HA后增加了进攻芘的C_{1,2}位点,因此增加了芘的代谢途径。添加HA后,CLSM结果显示无死亡细胞出现而且团聚明显,表明HA能够提高细胞的存活率并促进微生物膜的形成。同时,在降解芘的过程中,产生了酪氨酸类蛋白质和可见光类富里酸,表明添加HA反而提高了降解菌活性,而且形成了三维结构的生物膜。光谱分析部分发现:蛋白酰胺、酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸发生红移,表明HA的添加引起了细胞表面官能团作用力的变化。可见降解菌不仅通过细胞表面官能团相互作用形成微生物膜促进降解,而且外源HA能够促进菌落之间的作用,加快降解的进行。

关键词: 腐殖酸; 芘; 生物降解; 微生物膜

中图分类号: X53 **文献标志码:** A

Effects of Humic Acid on Biodegradation of Pyrene by *Mycobacterium* sp. NJS-1

FANG Wenwen^{1,3}, LI Xiaoning^{1,3}, WU Shixi^{1,3}, WANG Fang², ZHANG Yinping^{1,2,3†}

(1. Nanjing Normal University Center for Analysis and Testing, Nanjing 210046, China; 2. CAS Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Nanjing 210008, China; 3. School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: 【Objective】Pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs)in the soil environment has become a serious problem. In recent years, microbial degradation of PAHs to achieve soil remediation has become an important method. However,

* 国家自然科学基金项目(42177276)和国家重点研发计划重点专项(2020YFC1807000)共同资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42177276) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFC1807000)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyinping@njnu.edu.cn

作者简介: 方文雯(1998—),女,安徽池州人,硕士研究生,主要从事环境化学研究。E-mail: 1563828148@qq.com

收稿日期: 2021-10-01; 收到修改稿日期: 2022-01-24; 网络首发日期(www.cnki.net): 2022-01-30

microbial degradation is not a very efficient and ideal process for the remediation of PAHs-polluted environments. In this study, humic acid(HA)was added during the degradation process to explore its effect on the microbial degradation of PAHs.

【Method】Using pyrene as a typical PAH and HA as representative dissolved organic matter, *Mycobacterium* sp. NJS-1 with high pyrene degradation efficiency was selected to degrade pyrene with or without HA. Fourier transform cyclotron resonance mass spectrometry(FT-ICR-MS), laser confocal microscopy(CLSM), and techniques such as infrared and Raman spectroscopies were used to analyze the residual characteristics of pyrene, intermediates and colony changes during degradation. 【Result】Results show: 1)The presence of HA significantly accelerated pyrene biodegradation. Approximately $88.33\% \pm 3.40\%$ of pyrene was biodegraded within 7 days of incubation with the addition of HA, but only $35.33\% \pm 3.27\%$ was biodegraded without HA; 2)The FT-ICR-MS results indicated that addition of HA induced two biodegradation pathways - attacking of 1, 2-positions and 4, 5-positions of pyrene by dioxygenase, whereas in the absence of HA only the 4, 5-position was attacked; 3)The CLSM results showed that HA enhanced the growth of *Mycobacterium* sp. NJS-1 with no death of bacteria cells. Simultaneously, tyrosine proteins and fulvic acid-like compounds under visible light were detected and showed that HA enhanced bacterial activity by biofilm formation; 4)The results of the spectral analysis showed that a series of bands, mainly including protein amide, tyrosine, tryptophan and phenylalanine, red-shifted, implying that the interacted forces from the functional groups of bacterial surfaces changed in the presence of HA. 【Conclusion】HA can improve the degradation efficiency by increasing the degradation pathway of pyrene and inducing the interaction of functional groups on the cell surface to form a microbial membrane. Meanwhile, the addition of exogenous HA could also promote the interactions among colonies and accelerate the degradation.

Key words: Humic acid; Pyrene; Biodegradable; Microbial film

随着我国经济的快速发展，人为活动对环境造成了很多的影响，其中煤、石油、木材等不完全燃烧以及石油加工过程中产生的多环芳烃（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs）的激增严重威胁了土壤的生态环境、农产品安全和人体健康^[1-2]，并影响到我国社会经济的可持续发展。因此，针对土壤污染特点，调控影响土壤净化功能的关键过程，研发 PAHs 污染土壤修复技术是改善土壤环境质量的有效措施。

微生物转化是自然环境中有机污染物消除的主要途径之一，也是有机污染物控制与环境修复的核心技术方法^[3]，潜在发展空间很大。采用不同驯化和富集手段从 PAHs 污染环境中富集分离得到多株高效降解菌，主要包括分枝杆菌属（*Mycobacterium*）、红球菌属（*Rhodococcus*）、鞘氨醇菌属（*Sphingomonas*）和假单胞菌属（*Pseudomonas*）^[4]，这些菌属能够以某一种或者几种 PAHs 为唯一碳源和能源生长，甚至能够共代谢某些高环 PAHs。然而，接种外源高效菌难以适应自然复杂水体和土壤环境的瓶颈问题，大大限制了微生物技术的实地修复^[5]。尤其是当外源高效降解菌

进入环境界中时，会与溶解性有机质作用。

溶解性有机质（Dissolved organic matter, DOM）是土壤和自然水体中的一种重要组分，由碳含量约 50%的有机分子和氧、氮、磷和硫等各种杂原子按照一定比例组成^[6]，形成了含有一系列芳香基、脂基、羟基等官能团结构且化学性质各异的复杂化合物。DOM 由于其特殊结构同时具有亲水和疏水的作用，因此对环境中的有机物有两面影响：DOM 的亲水性使土壤中的有机污染物溶解度提高，使其易于迁移转化^[7]；而 DOM 的疏水性可以使有机污染物被土壤表面所吸附并结合^[8]，从而迁移能力变弱。但 DOM 对高效降解菌的代谢有机污染物的影响又如何呢？

基于以上所述，本研究以污染土壤中最常见的四环芘作为代表性 PAHs，以腐殖酸（Humic acid, HA）为代表性 DOM 设置添加和未添加实验，利用高效菌株 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘。借助电喷雾电离源结合傅里叶变换离子回旋共振质谱仪（ESI-FT-ICR-MS）技术解析中间产物，利用光谱技术追踪细胞表面的变化特征，进而从细胞官能团变化趋势探明由菌株代谢芘引起的 HA 在细胞表面的作用。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

芘降解菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 保藏于中国典型培养物典藏中心, 编号为 CCTCC M 2011011,

能够以芘为唯一碳源生长。芘(分析纯)购置于 Janssen Chimica 公司; 甲醇和乙腈(色谱纯)购置于德国默克公司。Calcein/PI 活死细胞染色剂购于东仁化学科技有限公司。HA 购置于阿拉丁公司, 其主要成分见表 1。

表 1 腐殖酸的成分及元素组成

Table 1 The molecular class and element composition of humic acid

样品 sample	碳水化合物 Carbohydrate/%	氨基糖 Aminosugars/%	蛋白质+脂质 Proteins+Lipids/%	单宁 Tannins/%	木质素 Lignins/%	不饱和烃 Unsaturated Hydrocarbon/%
腐殖酸 HA	0.20 ± 0.04	0.55 ± 0.06	67.71 ± 3.22	0.37 ± 0.01	30.15 ± 1.00	0.95 ± 0.03
样品 sample	稠环芳烃 Condensed Aromatic Structures/%	C/%	H/%	O/%	N+P+S/%	
腐殖酸 HA	0.07 ± 0.008	62.85	9.02	18.01	10.12	

1.2 实验设计

实验分为两组, 一组不添加 HA, 另一组添加 HA, 评价 HA 的添加对菌降解芘的效率以及对菌落生长情况的影响; 同时设置两个不接种菌的对照组, 同样一组不添加 HA, 另一组添加 HA, 评价芘在有无 HA 添加的情况下的挥发损失。分别移取芘浓度为 1 g·L⁻¹ 溶液 10 μL、100 μL 和 1 mL 置于每个组的三角瓶中, 待丙酮挥发完全后, 向添加 HA 的组分中加入 5 mg 灭菌后的 HA 以及 90 mL 的灭菌无机盐溶液, 然后按照 10% 的菌液接种比例在实验组中加入 10 mL *Mycobacterium* sp. NJS-1 菌液, 细菌的初始密度约为 1.6 × 10⁷ CFU·mL⁻¹, 芘的初始浓度分别为 0.1、1、10 mg·kg⁻¹。每组重复 3 次, 所有三角瓶置于摇床中避光培养 7 d, 并间隔 1 d 取出样品用于分析, 整个过程中摇床转速为 160 r·min⁻¹。

1.3 样品处理及测定方法

取出培养 7 d 的菌悬液, 加入 20 mL 正己烷和 10 mL 0.1 mol·L⁻¹ HCL 溶液, 超声 10 min (50 Hz)。待液面分层稳定后吸取上层液体, 得到有机相正己烷溶液, 随后采用氮吹仪换相到乙腈溶液中, 最后使用 0.45 μm 滤头过滤并采用 ESI-FT-ICR-MS 分析其碎片离子。具体条件如下: 毛细管电压-3.8 kV 和

120 μL·h⁻¹ 的流量, 正离子模式下, 为-4.0 kV 喷雾电压和-4.5 kV 的毛细管柱引入电压; 负离子模式下, 为 4.0 kV 喷雾电压和 4.5 kV 的毛细管柱引入电压和 240 V 毛细管柱端电压。

向间隔 1 d 取出的样品中分别添加正己烷 20 mL, 并超声 20 min (50 Hz), 移取正己烷相 10 mL, 采用旋转蒸发浓缩、氮气换相于乙腈的方法进行纯化^[9-10], 并最终定容至 2 mL。随后, 将溶液过孔径 0.45 μm 的滤膜, 并采用高效液相色谱仪 (HPLC) 分析。测试条件为: C18 反相柱 (4.6 × 250 mm), 激发波长为 270 nm, 发射波长为 390 nm, 流动相为乙腈和超纯水 (9: 1, v/v), 固定流速为 1.5 mL·min⁻¹ 且柱温度为 40℃, 时间为 6.0 min。

取培养 7 d 后的样品, 离心并收集沉淀, 冷冻干燥后, 使用共聚焦拉曼光谱仪 (HR Evolution, France) 测试样品, 激发波长为 633 nm, 扫描范围为 100~2 000 cm⁻¹。冷冻后样品采用 KBr 压片, 使用红外光谱测定其官能团变化特征, 样品扫描范围为 4 000~400 cm⁻¹。瞬态三维荧光光谱 (EEM) 在室温下测定, 将菌液溶液置于四通常量比色皿中。设置测定参数: 激发波长 (Ex) 和发射波长 (Em) 都为 220~550 nm, 狭缝宽度为 5 nm。

菌落的成活及生长特性采用激光共聚焦显微镜 (CLSM, N-STORM, Nikon) 检测, 取培养 7 d 后的菌悬液 100~150 μL , 置于专用培养小皿中心位置, 恒温培养 24 h。待菌沉降附着至皿底后将多余培养液用移液枪吸掉, 然后用 100 μL 配置好的 Calcein/PI 染色剂缓慢加进培养皿中, 使菌落浸泡且置于暗处染色 15 min。随后采用磷酸缓冲液清洗染色液, 并置于激光共聚焦下观察。CLSM 所设参数: 发射激光波长为 488 nm 和 561 nm, 物镜倍数为 20 倍。同时, 取 10 μL 菌悬液梯度稀释后并采用平板计数法统计隔天菌落的生长特征。

1.4 数据处理

ESI-FT-ICR-MS 的结果利用 Bruker Data Analysis 进行分析, 高效液相质谱及其他光谱测试结果均由统计软件 Microsoft Excel 2016 和 Origin 2018 进行数据处理和作图。

2 结果与讨论

2.1 芘的降解特征

如图 1 所示, 芘降解及菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 生长受 HA 影响显著。未接种芘降解菌时, 芘未出现明显减少, 其降解率低于 5%, 表明在整个降解过程中, 并未出现明显的挥发损失。未添加 HA 时, 经过 7 d 培养, 芘降解率最高达到 $35.33\% \pm 3.27\%$; 但是在相同培养条件下, 添加 HA 后, 其降解率明显

提高, 达到 $88.33\% \pm 3.40\%$ (图 1a)。表明添加 HA 促进芘降解。监测芘降解菌的生长情况发现: 在降解芘的过程中, 降解菌呈明显增长趋势, 添加 HA 后, 菌落生长速率明显加快, 当芘浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 降解菌的增长速率最快, 最高达到 $6.5 \times 10^7 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 1b)。根据芘降解速率及菌落生长可以得出 HA 促进了微生物的生长及对芘的降解。HA 作为一种载体^[11], 能改变 PAHs 在细胞内外的转运方式。

2.2 中间产物鉴定及降解途径推断

为确定高效菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘的途径, 进一步采用 ESI-FT-ICR-MS 测定其中间产物, 得到芘降解的中间产物信息结果如表 2 所示, 由表中信息可知当不添加 HA 时, 检测到化合物 $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_2$ 和 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$, 分别是 4, 5-芘二氢二醇和 3, 4-菲二醇; 然而添加 HA 时, 检测到 $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_2$ 和 $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{O}_2$, 分别是 1, 2-二甲氧基芘和 4, 5-二酮芘。Peng 等^[12]指出 *Mycobacterium* sp. NJS-1 的生物降解由双加氧酶启动, 因此根据产物 4, 5-芘二氢二醇推断可得: 在降解芘的过程中, 菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 分泌的双加氧酶进攻芘的 $\text{C}_{4,5}$ 位点, 随后发生加氧开环及脱羧反应, 进而生成 3, 4-菲二醇。然而添加 HA 后, 由中间产物 4, 5-二酮芘可推断双加氧酶进攻芘的 $\text{C}_{4,5}$ 位点, 由 1, 2-二甲氧基芘推断双加氧酶进攻芘的 $\text{C}_{1,2}$ 位点, 降解路径如图 2 所示。表明添加 HA 增加了双加氧酶的进攻位点, 优化了降解途径, 从而加快了降解。HA 含有双键、芳环

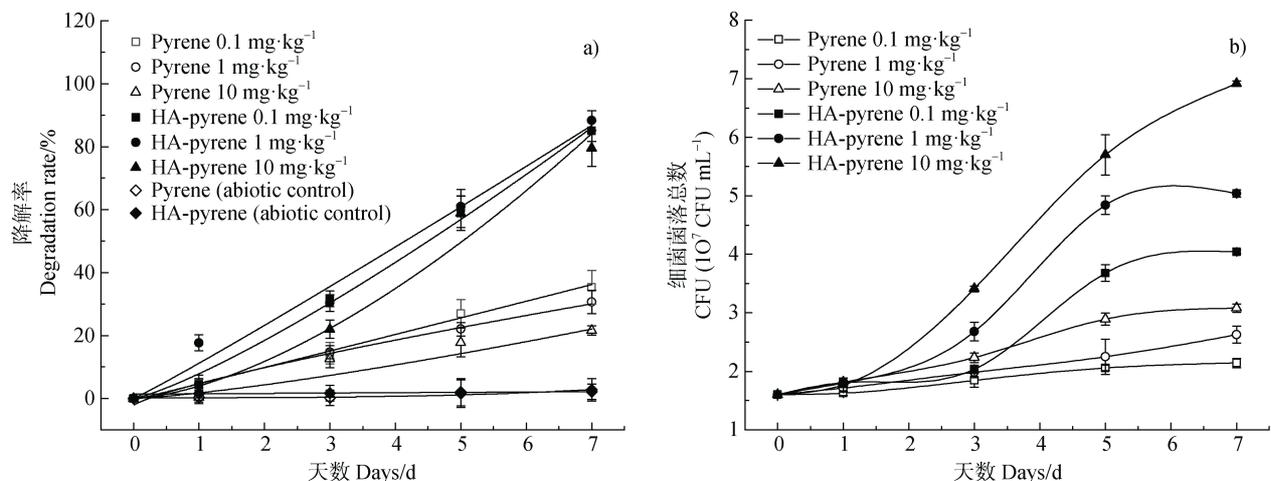


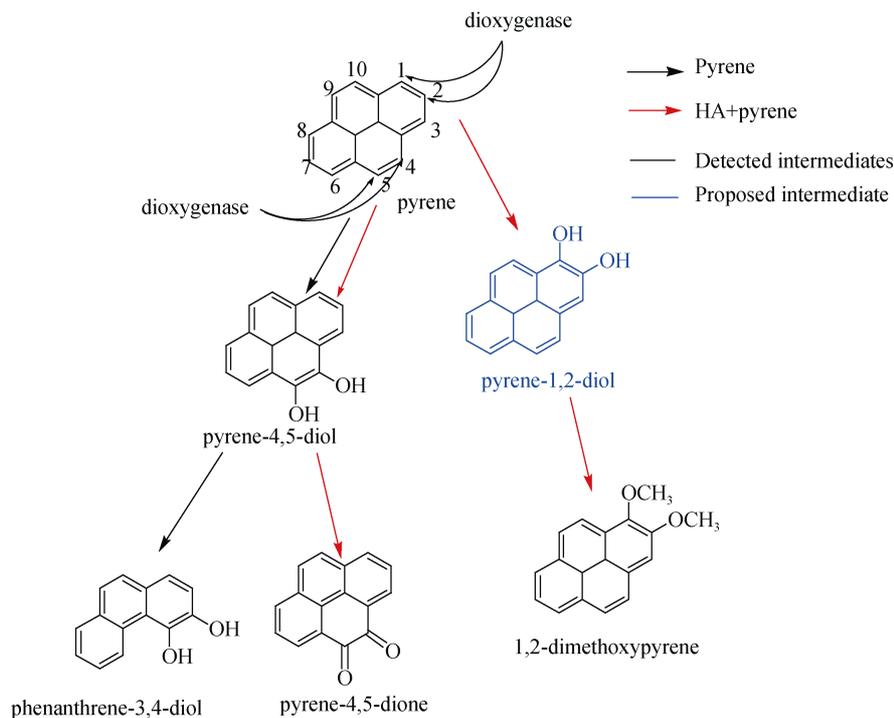
图 1 培养期间分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘的效率 (a) 及菌落的生长 (b)

Fig. 1 Biodegradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. NJS-1 of incubation (a), and its cell growth (b) during culture

表 2 ESI-FT-ICR-MS 检测芘降解的中间产物信息

Table 2 The intermediate products of pyrene degradation detected by ESI-FT-ICR-MS

样品类型	分子式	检测质量	理论质量
Sample type	Formula	Observed mass/Da	Theoretical mass/Da
芘	C ₁₄ H ₁₀ O ₂	421.145 ([2M+H] ⁺)	210.068
Pyrene	C ₁₆ H ₁₀ O ₂	279.040 ([M+Na ₂ -H] ⁺)	234.068
腐殖酸-芘	C ₁₈ H ₁₄ O ₂	566.242 ([2M+C ₂ H ₃ N+H] ⁺)	262.099
HA-pyrene	C ₁₆ H ₈ O ₂	274.085 ([M+CH ₃ CN+H] ⁺)	232.052

图 2 菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘的路径分析Fig. 2 Biodegradation pathways for pyrene by *Mycobacterium* sp. NJS-1

等官能团^[13], 能够与芘分子作用, 减弱芘分子的电负性; HA 还富含极性的官能团^[14], 能与细胞表面的膜蛋白作用, 从而有利于菌落细胞的酶与芘分子作用。

2.3 微生物膜细胞的形态特征

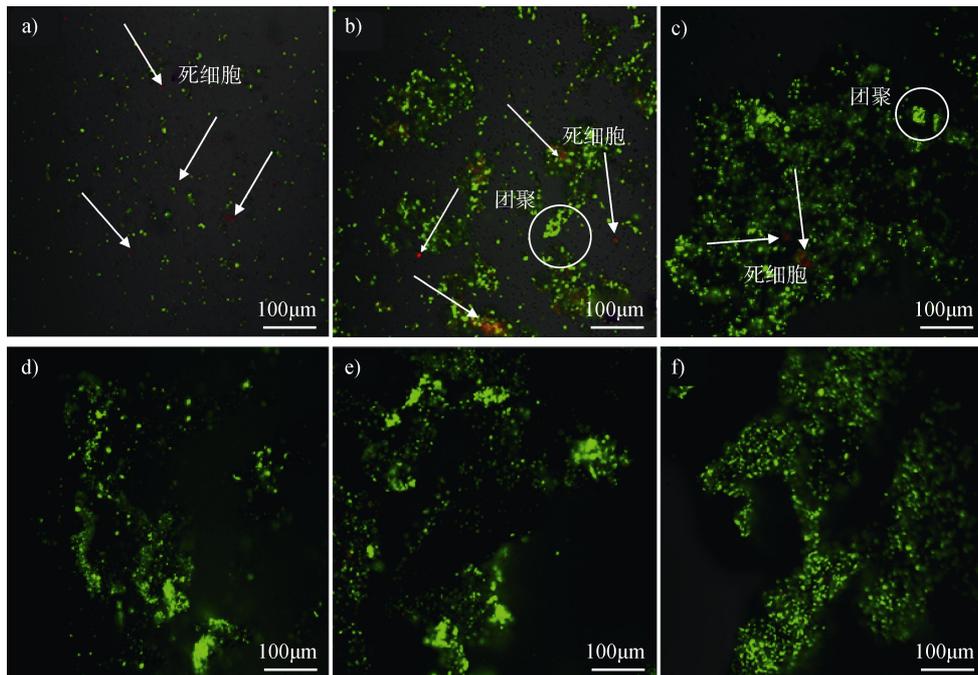
为确定菌落在芘降解过程中的作用机制及 HA 的影响, 需要明确菌落的活性及赋存形态。图 3 激光共聚焦 (CLSM) 的结果显示, 当芘浓度较低为 0.1 mg·kg⁻¹ 时 (图 3a), 经过 7 d 培养, 降解菌分布较为分散, 团聚并不明显。随着芘浓度逐渐增加, 细菌出现明显团聚现象, 并形成生物膜 (图 3b, 图 3c)。表明随着芘浓度增大, 为了应对芘的毒性及疏水性并降解芘时, 降解菌通过形成生物膜调整

其存活方式, 使其适应外界环境。生物膜形成是一个动态过程, 主要包括细菌粘附、生物膜形成、生物膜生长、生物膜成熟等阶段^[15]。但是, 芘作为一种四环的代表性化合物, 其毒性较强^[16], 因此在降解过程中, 尽管有微生物膜形成, 但仍然出现部分红色细胞, 预示着部分细胞死亡。

然而, 添加 HA 后, 生物膜形成速度加快, 尤其芘浓度较低时, 快速形成了微生物膜 (图 3d-图 3f)。而且, 添加 HA 后, 无红色细胞出现, 表明添加 HA 后, 未出现细胞死亡。芘在 HA 表面发生吸附行为^[17], 减少了芘与细胞表面直接接触, 削弱芘对细胞毒性, 从而无死亡细胞出现。Cai 等^[18]研究了森林凋落物释放的 HA 对 PAHs 降解影响, 发

现 HA 为降解菌提供了蛋白质和酪氨酸等营养物质，刺激了降解菌的活性，从而提高了降解菌的生长及活性。此外，HA 也提高了 PAHs 的生物利用度，从而促进 PAHs 降解^[5]。在自然环境中，绝大多数微生物以生物膜的结构形态赋存环境界中，并且生物膜细胞通过分泌胞外聚合物调节细胞表面的结构^[19]。

本研究采用的分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 能够于细胞表面分泌分枝菌酸^[20]，分枝菌酸的官能团以及细胞表面的官能团与 HA 的官能团分子容易发生物理或者化学键合。因此添加 HA 能够促进细胞与细胞之间相互作用，从而增强降解菌的代谢活性。



(a) 芘 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (b) 芘 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (c) 芘 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (d) 腐殖酸-芘 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (e) 腐殖酸-芘 $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (f) 腐殖酸-芘 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。(a) pyrene $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (b) pyrene $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (c) pyrene $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (d) HA-pyrene $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (e) HA-pyrene $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, (f) HA-pyrene $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

图 3 有无 HA 添加时菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解不同浓度芘时的激光共聚焦图

Fig. 3 The CLSM images of degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. NJS-1 with or without HA

2.4 微生物细胞的光谱变化特征

红外光谱技术能反应细胞表面官能团的变化信息^[21]，不同浓度芘降解的红外特征峰如图 4 所示。首先， 3441 cm^{-1} 归属于 N-H 伸缩振动、 $2950\sim 2880 \text{ cm}^{-1}$ 归属于脂肪酸、 2426 cm^{-1} 归属于羧酸类 O-H 多重复合谱带、 1656 cm^{-1} 归属于酰胺 I 带， 1542 cm^{-1} 归属于酰胺 II 带、 1240 cm^{-1} 归属于酰胺 III 带^[22]，表明微生物细胞表面存在含有酰胺、羧酸和碳水化合物类物质。同时在芘降解过程中，于 1150 cm^{-1} 、 984 cm^{-1} 、 943 cm^{-1} 处产生了归属于多糖、醇类、羧酸或酯类 C-O 伸缩振动和 C-H 弯曲振动峰。说明菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 细胞表面发生了明显的性能变化，分泌了大量糖类生物大分子物质。

同时，HA 与芘共存时，其红外特征峰变化趋

势明显。N-H 伸缩振动峰由 3464 cm^{-1} 红移至 3227 cm^{-1} ；O-H 伸缩振动峰由 2335 cm^{-1} 蓝移至 2424 cm^{-1} ；N-H 弯曲振动峰由 1587 cm^{-1} 红移至 1537 cm^{-1} ；C-O 伸缩振动峰由 1098 cm^{-1} 红移至 1068 cm^{-1} 。由峰位移推断：HA 添加诱导了细胞表面、HA、芘之间的相互作用力。而且，在芘降解过程中于 1656 cm^{-1} 、 1448 cm^{-1} 、 1294 cm^{-1} 、 1240 cm^{-1} 、 1151 cm^{-1} 处出现一系列新峰，它们分别归属于羧酸酯类酰胺谱带的 C-O 伸缩振动、酰胺 III 带 C-N 伸缩振动、N-H 弯曲振动、芳香类 C-N 伸缩振动和酸酐 C-O 伸缩振动。表明 HA 添加不仅促进芘降解而且有利于菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 的生长，使得菌落表面蛋白类官能团的信息逐步显现出来。

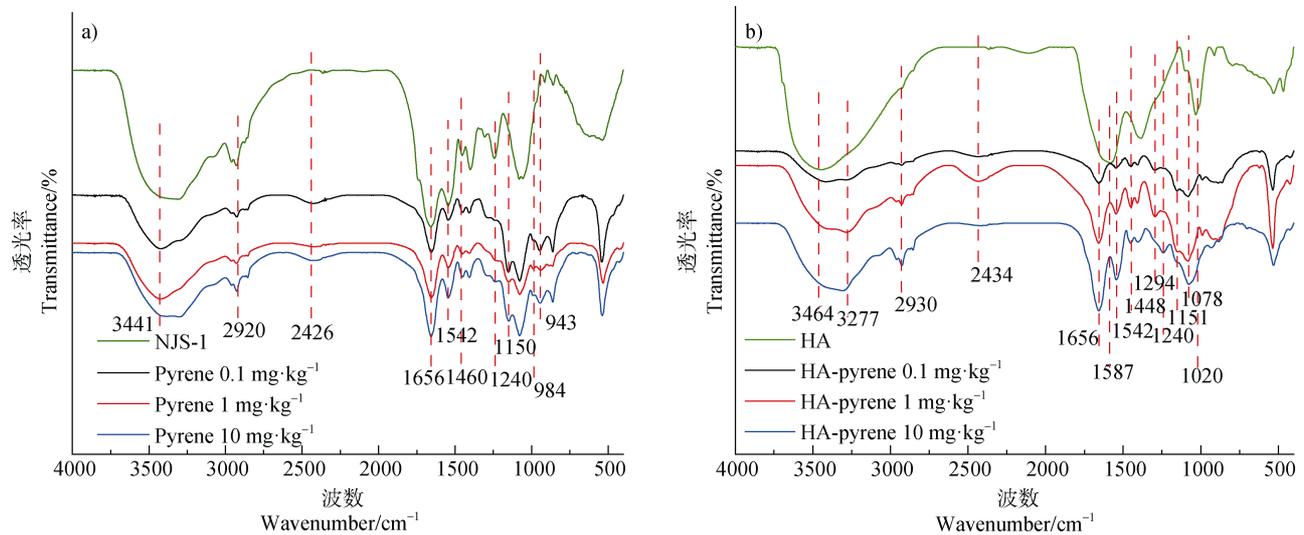


图4 菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘 (a) 及有 HA 时降解芘 (b) 的红外光谱图

Fig. 4 Infrared spectrum of *Mycobacterium* sp. NJS-1 degradation of pyrene without (a) and with (b) presence of HA (HA-pyrene)

2.5 微生物细胞的拉曼光谱变化特征

拉曼光谱技术分析生物样品,能给出生物细胞表面蛋白的变化特征^[23]。不同浓度芘降解过程中特征峰的归属总结如图5所示:1666 cm⁻¹、1518 cm⁻¹和1249 cm⁻¹分别归属于蛋白酰胺 I、II 和 III 谱带;1458 cm⁻¹和1338 cm⁻¹分别归属于蛋白质和脂质的 C-H 弯曲振动峰(图5a)^[24]。与初始培养菌株相比,接种菌株细胞表面无明显的蛋白峰和氨基酸峰,但是接种的菌株经过芘降解过程,细胞表面出现了明显的蛋白峰和氨基酸峰,表明芘作为碳源被微生物降解时,引起了细胞内蛋白外泄到细胞表面。然而,随着芘浓度的增加,蛋白质 C-H 振动峰和酰胺 III 带逐渐显现出来,并且出现了色氨酸呼吸振动峰;当芘浓度增至 10 mg·kg⁻¹时,拉曼峰图出现了明显的蛋白酰胺组峰,而且出现酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的特征峰,分别在 1162 cm⁻¹、1006 cm⁻¹和 745 cm⁻¹^[25]。这意味着蛋白组分的增加以及生物膜的生长,表明微生物降解芘过程中,细胞表面的蛋白组分呈现增加趋势,细胞表面蛋白分子能起到信号传输的作用^[26]。说明微生物由细胞内向细胞表面外泄蛋白是应对并降解疏水性有机污染物芘的一种生长策略。

当加入 HA 后,如图5b所示,部分谱带发生了由高波数向低波数的红移。蛋白酰胺 I、II 和 III 谱带分别位移至 1620 cm⁻¹、1450 cm⁻¹和 1214 cm⁻¹,酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸也均稍微发生红移。表

明 HA 的添加引起了细胞表面官能团作用力的变化。此外,当芘浓度为 1 mg·kg⁻¹时,1620 cm⁻¹处酰胺 I 峰相较其他浓度芘的峰明显强度较大,以及 1450 cm⁻¹和 1358 cm⁻¹处的蛋白质和脂质 C-H 振动峰,也较其他浓度的峰更强。这说明当 HA 参与时,芘浓度过高或过低均不利于细胞生长代谢和生物膜的生长。

2.6 微生物细胞的三维荧光光谱变化特征

为获取微生物降解芘过程中的细胞表面的腐殖化程度,进一步采用三维荧光光谱(EEM)分析了溶液体系及菌落团聚体的谱学变化特征。如图6所示,当只添加 HA 或只添加芘时,溶液中主要检测到色氨酸类蛋白质。据研究,类色氨酸荧光峰起源于细胞内^[27],类色氨酸是衡量微生物活性的依据,其构建了用于生长和代谢的蛋白质,这些均说明了降解菌的活性。此外,在只添加芘组发现了少量的类富里酸峰,这是细菌代谢的产物。

添加不同浓度芘后,检测到的 EEM 图像如图7所示。随着芘浓度增加,上清液中短波 HA 和可见光富里酸的组成变化并不明显。当芘浓度增至 10 mg·kg⁻¹时,HA 峰面积增加显著,根据文献报道^[28],此类物质是微生物代谢过程中产生的水溶性产物,表明 *Mycobacterium* sp. NJS-1 在生长及代谢过程中,生成的可溶性 HA 量显著增加。但是,菌落团聚体的 EEM 图像表现出明显变化特征。芘浓度为 0.1 mg·kg⁻¹时,只有类色氨酸一个蛋白峰(图7b)。

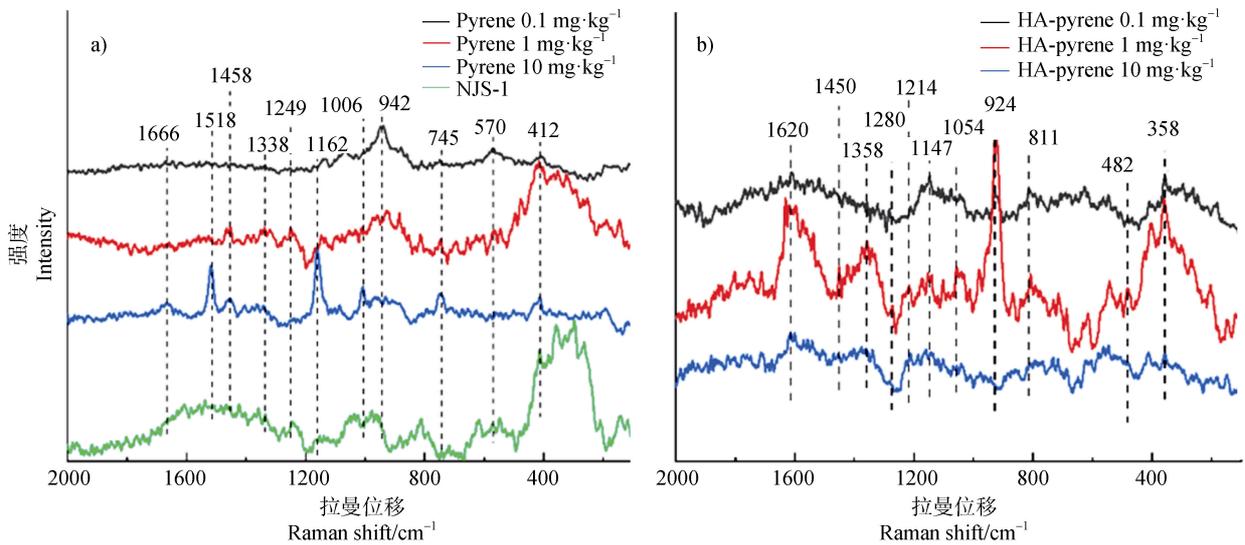


图 5 菌落 *Mycobacterium* sp. NJS-1 降解芘 (a) 及添加 HA 时降解芘 (b) 的拉曼光谱图

Fig. 5 Raman spectrum of *Mycobacterium* sp. NJS-1 degradation of pyrene without (a) and with (b) presence of HA (HA-pyrene)

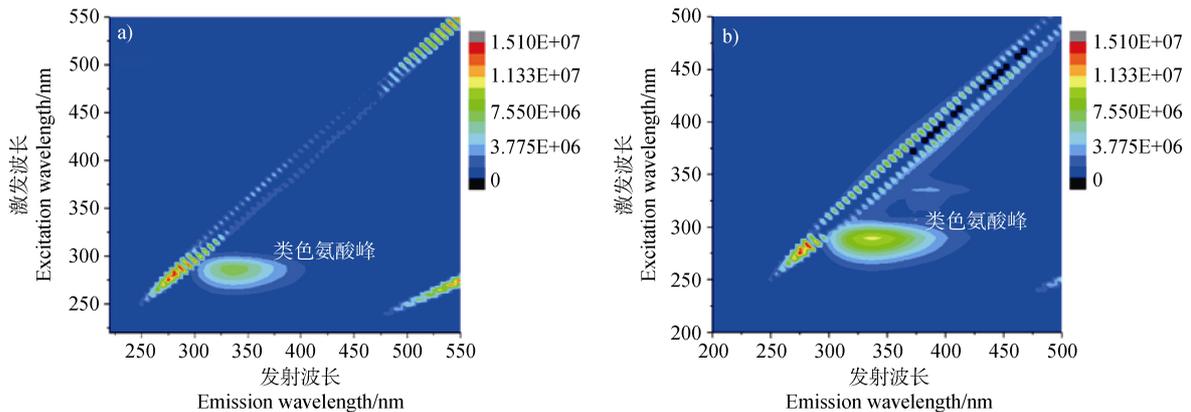


图 6 分支杆菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 在只添加芘 (a) 或 HA (b) 培养 7 天后的 EEM 图像

Fig. 6 The EEM images of *Mycobacterium* sp. NJS-1 added pyrene (a) or HA (b) after 7 days of culture

随着芘浓度增加, 产生了酪氨酸类蛋白质峰和可见光类富里酸峰, 其强度随着浓度增加而随之增大, 生物膜形成及增长过程中分泌大量胞外聚合物^[29], 胞外蛋白中可能会含有酪氨酸类蛋白质和可见光类富里酸^[30], 而且胞外聚合物能形成三维的多孔结构, 能吸附固定此类水溶性物质。而且, 在整个降解过程中, 蛋白峰和 HA 峰整体出现红移现象, 这表明羰基、羟基和羧基等^[31]等官能团在细胞表面发生了作用, 进一步证实了红外和拉曼光谱的结果。由此可见, 降解菌在代谢利用芘疏水性碳源时, 降解菌不仅通过细胞表面官能团相互作用形成微生物膜促进降解, 而且外源 HA 能够促进菌落之间的作用, 加快降解的进行。

3 结 论

溶解性有机质深刻影响着芘的降解。HA 不仅能通过增加降解途径的方式促进高效降解菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 利用芘, 还能够提高细胞的存活率并有利于其活性增强, 促进微生物膜的形成。同时, HA 促进高效菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 在代谢过程中分泌酪氨酸类蛋白质等其他物质, 这些物质通过官能团之间的物理或者化学键合形成三维结构, 不仅保护细胞免受外在环境胁迫, 而且有利于细胞保持代谢活性促进降解。HA 能够在利用微生物技术消除土壤污染物的过程中发挥重要作用。

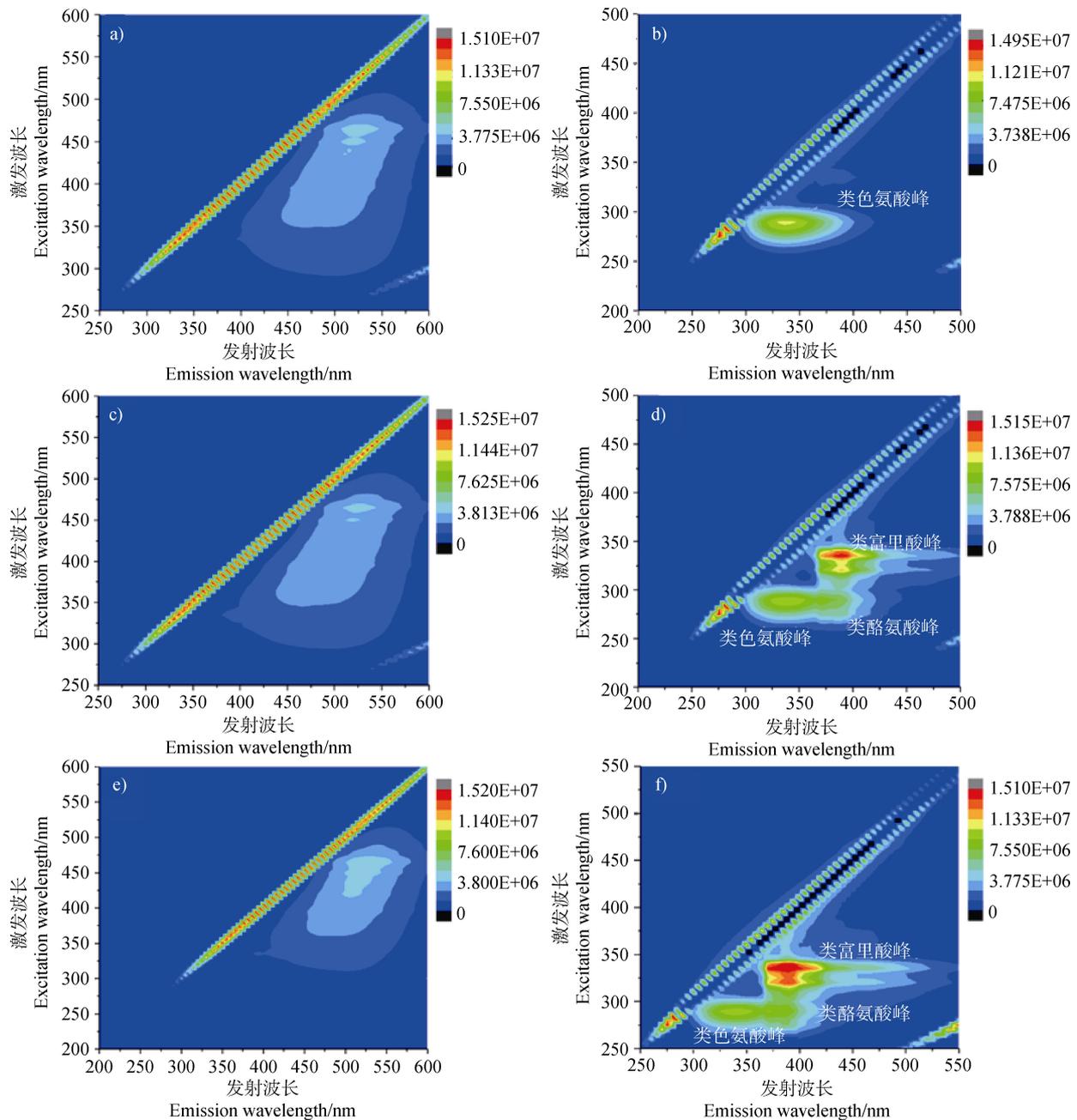


图7 分支杆菌 *Mycobacterium* sp. NJS-1 在添加 HA 和不同浓度比 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 培养 7 天后上清液 (a, b, c) 和菌沉淀 (d, e, f) 的 EEM 图像

Fig. 7 The EEM images of *Mycobacterium* sp. NJS-1 added HA and different concentrations of pyrene ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) after 7 days of cultivation, the supernatant (a, b, c) and bacterial pellet (d, e, f)

参考文献 (References)

- [1] Zakaria M P, Takada H, Tsutsumi S, et al. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rivers and estuaries in Malaysia: A widespread input of petrogenic PAHs[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36 (9): 1907—1918.
- [2] Ni N, Song Y, Wang F, et al. A review of researches on intensified bio-remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (3): 561—571. [倪妮, 宋洋, 王芳, 等. 多环芳烃污染土壤生物联合强化修复研究进展[J]. *土壤学报*, 2016, 53 (3): 561—571.]
- [3] Kotterman M J, Vis E H, Field J A. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and

- indigenous microflora[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (8): 2853—2858.
- [4] Chen X J, Jiang L J, Sun J Y, et al. Research progress in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Modern Chemical Industry, 2018, 38 (10): 34—37.[陈秀鹏, 姜丽佳, 孙靖云, 等. 微生物降解多环芳烃的研究进展[J]. 现代化工, 2018, 38(10): 34—37.]
- [5] Breedveld G D, Sparrevik M. Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site[J]. Biodegradation, 2000, 11 (6): 391—399.
- [6] Zhang J, Dai J L, Wang R Q, et al. Adsorption and desorption of divalent mercury(Hg^{2+}) on humic acids and fulvic acids extracted from typical soils in China[J]. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, 2009, 335 (1/2/3): 194—201.
- [7] Pan B, Ghosh S, Xing B S. Dissolved organic matter conformation and its interaction with pyrene as affected by water chemistry and concentration[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42 (5): 1594—1599.
- [8] Zhao X L, Bi E P. Effects of dissolved organic matter on the sorption of organic pollutants to soils[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33 (2): 256—261.[赵晓丽, 毕二平. 水溶性有机质对土壤吸附有机污染物的影响[J]. 环境化学, 2014, 33 (2): 256—261.]
- [9] Zhang Y P, Wang F, Yang X L, et al. Extracellular polymeric substances enhanced mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons in the two-liquid-phase system for biodegradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90 (3): 1063—1071.
- [10] Zhang Y P, Wang F, Wang C Y, et al. Enhanced microbial degradation of humin-bound phenanthrene in a two-liquid-phase system[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186 (2/3): 1830—1836.
- [11] Smith K E C, Thullner M, Wick L Y, et al. Sorption to humic acids enhances polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43 (19): 7205—7211.
- [12] Peng R H, Xiong A S, Xue Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32 (6): 927—955.
- [13] Zheng Y Y, Zhang J B, Tan J, et al. Chemical composition and structure of humus relative to sources[J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56 (2): 386—397.[郑延云, 张佳宝, 谭钧, 等. 不同来源腐殖质的化学组成与结构特征研究[J]. 土壤学报, 2019, 56 (2): 386—397.]
- [14] Zhang G C. Study on spectral fingerprint characteristics and migration and transformation mechanism of organic matter of sediments in moguhu reservoir[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2019.[张广彩. 蘑菇湖沉积物中有机质光谱指纹特征与迁移转化机制研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2019.]
- [15] Stoodley P, Sauer K, Davies D G, et al. Biofilms as complex differentiated communities[J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 187—209.
- [16] Yang Z W. Advances of the degradation of PAHs in soils[J]. Shandong Chemical Industry, 2008, 37 (1): 30—33.[杨占文. 土壤中多环芳烃菲和芘降解的研究进展[J]. 山东化工, 2008, 37 (1): 30—33.]
- [17] Zhang L L, Zhu D Q, Wang H, et al. Humic acid-mediated transport of tetracycline and pyrene in saturated porous media[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012, 31 (3): 534—541.
- [18] Cai D, Yang X H, Wang S Z, et al. Effects of dissolved organic matter derived from forest leaf litter on biodegradation of phenanthrene in aqueous phase[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324: 516—525.
- [19] Decho A W, Gutierrez T. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 922.
- [20] Zeng J, Lin X G, Zhang J, et al. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) -degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 183 (1/2/3): 718—723.
- [21] Mantsch H H, Casal H L. Biological applications of infrared spectrometry[J]. Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie, 1986, 324 (7): 655—661.
- [22] Hu S H, Wu Y G, Yi N, et al. Chemical properties of dissolved organic matter derived from sugarcane rind and the impacts on copper adsorption onto red soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24 (27): 21750—21760.
- [23] Rong X, Huang S S, Liu H. Progress in application of Raman spectroscopy on the cell biology studies[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2010, 19 (1): 136—142.[荣曦, 黄庶识, 刘红. 拉曼光谱分析技术在细胞生物学研究中的应用进展[J]. 激光生物学报, 2010, 19 (1): 136—142.]
- [24] Francioso O, Ciavatta C, Sánchez-Cortés S, et al. Spectroscopic characterization of soil organic matter in long-term amendment trials[J]. Soil Science, 2000, 165 (6): 495—504.
- [25] Yu Q, Chen Y P, Guo J S. Screening of antibiotic-resistant bacteria in activated sludge and study of their Raman spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38 (9): 2788—2793.[禹强, 陈猷鹏, 郭劲松. 活性污泥中抗性细菌筛选及拉曼光谱检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38 (9): 2788—2793.]
- [26] Qu Y Y. Study of pathway of absorbed proteins mediating cells adhesion and growth on biomaterials[D]. Nanjing: Southeast University, 2015.[曲亚运. 生物材料表面吸

- 附蛋白质介导细胞粘附和生长的生物学信号通路研究[D]. 南京: 东南大学, 2015.]
- [27] Fox B G, Thorn R M S, Anesio A M, et al. The *in situ* bacterial production of fluorescent organic matter; an investigation at a species level[J]. *Water Research*, 2017, 125: 350—359.
- [28] Susic M. Replenishing humic acids in agricultural soils[J]. *Agronomy*, 2016, 6 (4): 45.
- [29] Decho A W, Gutierrez T. Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 922.
- [30] Dai J Y, Zhou J M, Qin S P. Dynamic changes of chemical composition of dissolved organic matter during decomposition of organic materials[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35 (6): 724—727. [代静玉, 周江敏, 秦淑平. 几种有机物料分解过程中溶解性有机物质化学成分的变化[J]. *土壤通报*, 2004, 35 (6): 724—727.]
- [31] Chen J, Gu B H, LeBoeuf E J, et al. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions[J]. *Chemosphere*, 2002, 48 (1): 59—68.

(责任编辑: 卢 萍)