

## 研究报告

## 磁性纳米颗粒介导分离技术筛选土壤中多氯联苯降解菌及其降解特性

朋婷婷<sup>1,2</sup>, 项兴佳<sup>\*1</sup>, 冯有智<sup>2</sup>, 何世颖<sup>3</sup>, 吴宇澄<sup>2</sup>, 张锋<sup>1</sup>, 曾军<sup>\*2</sup>, 林先贵<sup>2</sup>

1 安徽大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230601

2 中国科学院南京土壤研究所 土壤环境与修复重点实验室, 江苏 南京 210008

3 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014

朋婷婷, 项兴佳, 冯有智, 何世颖, 吴宇澄, 张锋, 曾军, 林先贵. 磁性纳米颗粒介导分离技术筛选土壤中多氯联苯降解菌及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3771-3783.

PENG Tingting, XIANG Xingjia, FENG Youzhi, HE Shiying, WU Yucheng, ZHANG Feng, ZENG Jun, LIN Xiangui. Magnetic nanoparticle-mediated isolation and degradation characterization of a PCB-degrading strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3771-3783.

**摘要:** 【背景】磁性纳米颗粒介导分离(magnetic nanoparticle-mediated isolation, MMI)技术是近年来发展起来的一种无须底物标记就能从复杂菌群中分离活性功能微生物的方法, 目前尚无研究报道该技术应用于难降解污染物 3,3',4,4'-四氯联苯(3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, PCB77)。【目的】从土壤中筛选 PCB77 活性降解菌并研究其污染物降解特性。【方法】利用磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs)富集原位活性 PCB77 降解菌群, 通过高通量测序分析细菌群落变化, 经平板筛选得到 PCB77 降解菌, 并研究其对多氯联苯和多溴联苯醚的降解特性。【结果】基于 MMI 技术获取的富集培养液能够高效地转化 PCB77, 与对照组相比底物降解效率从 6%提升至 79.3%, 同时该富集培养液中细菌物种多样性显著降低, 群落组成发生明显变化。从对照组和 MMI 处理组中分别筛选到 PCB77 降解菌红球菌 CT2 和类芽孢杆菌 MT2, 发现红球菌为对照组中唯一的优势物种, 而 MMI 处理组的优势物种由红球菌和类芽孢杆菌共同组成。菌株 MT2 对 PCB77 具有优异的降解能力, 唯一碳源条件下对 PCB77 的降解率高达 65.2%, 接近于富集菌群的降解效果, 并显著高于菌株 CT2 (26.3%)。同时, 菌株 MT2 也对多种多氯联苯和多溴联苯醚表现出相对更好的降解效果。【结论】通过 MMI 技术有效富集出 PCB77 的高效降解菌群, 并从中筛选到多氯联苯高效降解菌 *Paenibacillus* sp. MT2, 为发展高效的多氯联苯污染土壤生物修复技术提供了理论参考。

**关键词:** PCB77; 磁性纳米颗粒介导分离技术; 类芽孢杆菌; 多氯联苯; 多溴联苯醚

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFC1803700); 国家自然科学基金(42277022)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1803700) and the National Natural Science Foundation of China (42277022).

\*Corresponding authors. E-mail: XIANG Xingjia, xjxiang@ahu.edu.cn; ZENG Jun, jzeng@issas.ac.cn

Received: 2022-12-16; Accepted: 2022-12-27; Published online: 2023-02-16

# Magnetic nanoparticle-mediated isolation and degradation characterization of a PCB-degrading strain

PENG Tingting<sup>1,2</sup>, XIANG Xingjia<sup>\*1</sup>, FENG Youzhi<sup>2</sup>, HE Shiyang<sup>3</sup>, WU Yucheng<sup>2</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, ZENG Jun<sup>\*2</sup>, LIN Xiangui<sup>2</sup>

1 School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu, China

3 Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] Magnetic nanoparticle-mediated isolation (MMI) is a culture-independent approach for identifying active degraders from complex microbial communities. However, there are few studies about the MMI-based identification of active bacteria involved in the degradation of recalcitrant 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77). [Objective] To isolate active PCB77 degraders from soil and assess the pollutant degradation capacity. [Methods] Magnetic nanoparticles (MNPs) were used to enrich the active PCB77 degraders in soil. The change in bacterial community composition was determined by high-throughput sequencing. A PCB77 degrader was isolated from MNP-enriched culture, and its performance of degrading polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) was assessed. [Results] The MNP-enriched culture was capable of degrading PCB77 with high efficiency compared with the control, which increased from 6% to 79.3%. The treatment with MNPs decreased the bacterial diversity and changed the community composition. PCB-degrading *Rhodococcus* sp. CT2 and *Paenibacillus* sp. MT2 were isolated from the control and MMI culture, respectively. *Rhodococcus* was dominant in the control group, while the dominant degraders included both *Rhodococcus* and *Paenibacillus* in the MMI group. The strain MT2 degraded 65.2% of PCB77 serving as the sole carbon source, and this degradation rate was close to that in MNP-enriched culture and significantly higher than that (26.3%) of strain CT2 under the same condition. In addition, the performance of *Paenibacillus* sp. MT2 in degrading PCBs and PBDEs was better than that of *Rhodococcus* sp. CT2. [Conclusion] MMI is a powerful approach to enrich active PCB77 degraders from complex microbial communities, with which *Paenibacillus* sp. MT2 having high PCB degradation efficiency was isolated. The study lays a theoretical basis for developing efficient approaches to remediate the soil contaminated by PCBs.

**Keywords:** 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl; magnetic nanoparticle-mediated isolation; *Paenibacillus*; polychlorinated biphenyls; polybrominated diphenyl ethers

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)属于持久性有机污染物, 半衰期长<sup>[1]</sup>、脂溶性高、易在生物体内富集<sup>[2]</sup>, 具有致畸、致癌、

致突变等“三致”作用<sup>[3]</sup>, 超过一定剂量会引起生物体内分泌紊乱、免疫功能失调, 对人类健康和生态系统造成危害<sup>[4]</sup>。自然条件下, PCBs 的

去除主要通过微生物降解或转化作用而实现, 由此发展的生物修复技术具有成本低、可原位修复等特点<sup>[5]</sup>, 是推进污染环境绿色修复的关键环节。

自 1973 年首次报道可利用 PCBs 的无色杆菌(*Achromobacter*)<sup>[6]</sup>以来, 陆续有多种 PCBs 降解菌被分离研究。据报道, PCBs 毒性和降解性与其形成共面结构的能力有关<sup>[7]</sup>, 其中 3,3',4,4'-四氯联苯(3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, PCB77)是联苯骨架上间位、对位被氯原子对称取代的四氯多氯联苯, 是毒性最大的共平面结构组分之一<sup>[8]</sup>, 其二噁英类结构使其比其他四氯联苯更难以生物降解<sup>[9]</sup>, 而目前所获取的菌株针对 PCB77 降解效率普遍不高。自然环境中微生物群落结构十分复杂, 从中定位到功能微生物更是存在较大挑战, 磁性纳米颗粒介导分离(magnetic nanoparticle-mediated isolation, MMI)技术是近年发展的能从复杂菌群中分离活性功能微生物的有效方法, 其通过生物相容性磁性纳米颗粒(magnetic nanoparticles, MNPs)对群落中微生物进行非特异性磁化, 引入特定生长底物会促使活性功能菌生长分裂而失去磁性, 继而依据菌体磁性能够区分出活性功能微生物类群<sup>[10]</sup>, 通过进一步纯培养明确活性微生物的生理及降解特性<sup>[11]</sup>。

目前 MMI 技术在苯酚、烷烃等污染物的活性功能微生物方面有一些研究<sup>[11-12]</sup>, 但针对更难降解的 PCB77 尚未见报道。本研究采用 MMI 技术富集并筛选 PCB77 活性降解菌, 以期对 PCBs 污染土壤微生物修复提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

土壤采集自苏州某化工厂地下土壤(深度>3 m), 现场将样品装入梅森瓶并用地下水封

口带回实验室, 储存于 4 °C 冰箱备用。

富集培养基为 LB 培养基<sup>[5]</sup>; 无机盐培养基(MM) (g/L):  $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.20,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.40,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.60,  $\text{MnSO}_4$  0.02,  $\text{NaNO}_3$  1.00,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.60, pH 7.0。

PCB47、PCB77、PCB110、BDE28、BDE47、BDE77 (纯度均>98%), 百灵威科技有限公司; 正己烷、丙酮, Tedia 公司; 2×Pro *Taq*, 湖南艾科瑞生物工程有限公司; Premix *Taq*<sup>TM</sup>, TaKaRa 公司; TIANamp Bacteria DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen 公司。气相色谱仪、气相色谱/质谱联用仪, 安捷伦科技有限公司; PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司; Quantus<sup>TM</sup> Fluorometer, Promega 公司; 测序工作委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

### 1.2 MNPs 的制备

MNPs 采用共沉淀法制备<sup>[13]</sup>, 具体步骤: 在三口烧瓶中加入 300 mL 超纯水, 室温下搅拌 30 min, 同时通氮气将烧瓶中的空气吹净。准确称取 4.490 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和 2.307 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  放入烧瓶中, 搅拌至完全溶解, 呈橙红色。向上述混合物中缓慢注入 30 mL 浓氨水, 随即生成大量黑色沉淀, 在 60 °C 水浴及氮气保护条件下继续搅拌 2 h, 然后室温下搅拌至冷却, 通过磁铁吸附加以分离。对得到的反应物进行清洗, 超纯水 5 次、无水乙醇 3 次, 60 °C 的真空炉中干燥 20 h, 得到块状  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 。在研钵中研磨至粉末状, 并在无菌水中用 40 kHz 的超声波摇晃 10 min, 留待备用。

### 1.3 基于 MMI 技术富集 PCBs 降解菌群

采用丙酮将 PCB47 引入 250 mL 灭菌(121 °C, 30 min)三角瓶中, 待丙酮挥发后加入 100 mL MM 培养基和 20 g 土壤制备成含有 5 mg/L

PCB47 的土壤泥浆,三角瓶于 28 °C、160 r/min 培养 2 个月。富集结束后,取土壤悬液于 1 400 r/min 离心 3 min,去除土壤大颗粒及杂质,得到初始富集培养物(SOC)。

将 SOC 均分两份,其中一份加入 3% MNPs 恒温培养 1 h 对微生物进行磁化处理(M 组);另一份不进行磁化处理作为对照组(C 组)。分别取 1 mL 磁化/非磁化培养物接入含有 PCB77 (5 mg/L) 和联苯(0.1%)的 5 mL MM 培养基中,28 °C、160 r/min 培养 15 d,培养结束后分析 PCB77 的降解率。同时针对 M 组设置 HgCl<sub>2</sub> (10%)灭菌对照,以排除 MNPs 的非生物转化影响。实验处理包括对照均为 3 个重复。

将磁铁置于 M 组培养瓶壁一侧吸附磁化菌群 20 min,未被吸附的菌液为 M 组菌群(MOC);C 组菌液(COC)为对照菌群。分别取 SOC、COC 和 MOC 菌液各 5 mL,14 000×g 离心 5 min 收集菌体,按 TIANamp Bacteria DNA Kit 说明书提取菌体 DNA,采用引物 515F (5'-GTGCCAGC MGCCGCGG-3')和 907R (5'-CCGTCAATTCMT TTRAGTTT-3')对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行 PCR,PCR 反应体系(20 μL): 2×Pro Taq 10 μL,上、下游引物(5 μmol/L)各 0.8 μL, DNA 模板(10–50 ng) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 45 s, 29 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。使用 QIAquick PCR Purification Kit 对 PCR 产物进行纯化,用 Quantus™ Fluorometer 进行定量检测,将所有 PCR 产物等摩尔混合后提交至 Illumina MiSeq 测序平台进行扩增子测序。

#### 1.4 PCB77 降解菌的筛选与鉴定

分别取 MOC 和 COC 培养物做梯度稀释( $10^{-1}$ – $10^{-4}$ ),涂布于双层平板<sup>[14]</sup>筛选 PCB77 降解菌,其中平板下层为含 1.5%琼脂的 MM 固体培养基,上层为以 20 mg/L PCB77 为唯一碳源

的 MM 固体培养基(1%琼脂)。平板于 28 °C 恒温箱培养至长出单菌落,结合菌落形态和数量分别挑选 MOC 和 COC 的优势菌,并在 LB 平板上反复划线纯化。降解菌在 LB 培养基中扩大培养并按 TIANamp Bacteria DNA Kit 说明书提取菌体 DNA,采用引物 27F (5'-AGTTTGAT CMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTT GTTACGACTT-3')对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR,PCR 反应体系(50 μL): Premix Taq™ 25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板(50–100 ng) 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 21 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行测序,序列在 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)中进行菌株同源比对,并在 NCBI 数据库中下载相关菌株的 16S rRNA 基因序列,采用 MEGA 11 软件构建系统发育树<sup>[15]</sup>,进行同源性分析。

#### 1.5 降解菌对 PCB77 的降解效果测定

PCB 降解菌采用 LB 培养基于 28 °C、160 r/min 培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 0.6), 5 000×g 离心 10 min 收集菌体,MM 培养基清洗菌体 3 轮后按 10% (体积分数)接种。降解实验于 20 mL 灭菌培养瓶进行,分别考察唯一碳源和共代谢条件下 PCB77 的降解,其中唯一碳源为 5 mg/L PCB77,共代谢条件为额外添加 0.05%酵母抽提物,有机污染物通过丙酮预先引入培养瓶,培养瓶于 28 °C、160 r/min 培养 9 d。同时在唯一碳源条件下设置功能菌加 MNPs (简称为 M-降解菌)对照,以排除 MNPs 可能存在的生物降解促进作用。实验处理包括对照均为 3 个重复。培养结束后向瓶内加入 2 倍体积的正己烷提取残留污染物,吸取 1 mL 有机相过 0.22 μm 滤膜,

采用气相色谱仪测定残留污染物。

## 1.6 降解菌对其他卤代污染物的降解效果测定

测试 PCB 降解菌对不同卤代数目的 PCBs 和 PBDEs 的降解, 实验体系建立、培养条件和污染物提取同 1.5。分别以单一污染物和混合污染物实验, 单一组实验分别添加单个污染物作为微生物碳源: PCBs 种类有 PCB47 和 PCB110, 使用浓度均为 5 mg/L; PBDEs 种类有 BDE28、BDE47 和 BDE77, 使用浓度均为 0.1 mg/L。混合组实验添加混合污染物作为碳源: PCBs 组为 PCB47、PCB77 和 PCB110 三者的混合物, 使用浓度各 5 mg/L; PBDEs 组为 BDE28、BDE47 和 BDE77 三者的混合物, 使用浓度各 0.1 mg/L。培养瓶置于 28 °C、160 r/min 的培养箱培养 9 d, 实验处理包括空白均为 3 个重复。培养结束后, 有机提取液采用 GC 测定 PBDEs; 因 GC 无法区分混合组中 PCB77 和 PCB110, 因此采用气相色谱/质谱联用仪测定 PCBs 浓度。

## 1.7 分析与统计方法

高通量测序得到的原始数据在 QIIME2 v2020.11 平台进行处理分析, 使用 cutadapt 插件切除序列两端的引物, 通过 DADA2 插件对去引序列进行质控、去噪和合并, 最后得到扩增子序列变异体(amplicon sequence variants, ASV) (按 100%序列相似性)特征表, 并依据 Silva 细菌数据库对得到的 ASV 进行分类注释。使用“vegan”软件包(R 4.2.1)计算物种丰富度(observed species)和香农指数(Shannon index), 用以表征群落的  $\alpha$  多样性。GC 色谱柱为 HP-5M, 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m, 分析条件为: 载气为氮气, 1.5 mL/min; 进样口温度 250 °C, 检测器温度 300 °C; 分流比为 20:1; 程序升温, 120 °C 保持 3 min, 8 °C/min 提升至 270 °C。GC-MS 色谱柱为 TG-5SILMS, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m,

分析条件为: 载气为氦气, 1.0 mL/min; 进样口温度 250 °C, 传输线温度 280 °C; 不分流; 程序升温, 120 °C 保持 2 min, 10 °C/min 提升至 280 °C。采用学生 *t* 检验(student's *t*-test)分析两处理组间的差异显著性( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于 MMI 技术富集的 PCB77 降解菌群

鉴于 PCB77 不易生物降解的特性, 研究采用两轮富集的方式尝试筛选 PCB77 降解菌, 其中首轮采用了更容易降解的 PCB47 对降解菌进行初步富集, 次轮底物更换为 PCB77 并加入 MNPs 尝试富集 PCB77 活性降解菌。结果表明, 经过正常的两轮富集 PCB77 降解率并不高, 而在 MNPs 作用下降解率显著提高, 从 6% 提升至 79.3% ( $P<0.05$ , 图 1), 显著高于其他研究中菌群的降解效果(26.7%, 100 mg/L)<sup>[16]</sup>, HgCl<sub>2</sub> 灭菌处理组排除了 MOC 组中由 MNPs 导致的非生物转化因素及生物吸附作用(CK, 6.16%, 图 1)。

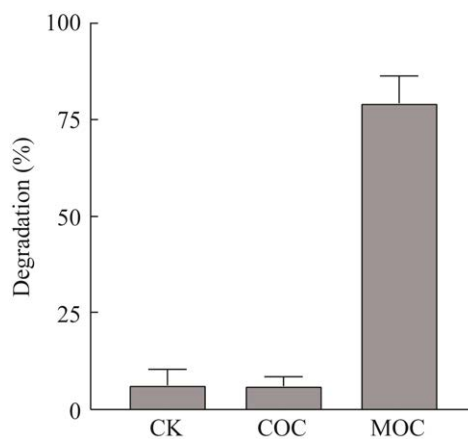


图 1 富集培养结束后体系 PCB77 降解率 CK: MMI 处理组的灭菌对照(HgCl<sub>2</sub>); COC: 对照组富集培养物; MOC: MMI 处理组富集培养物

Figure 1 The degradation of PCB77 after enrichment. CK: HgCl<sub>2</sub>-sterilized magnetized culture; COC: Non-magnetized culture; MOC: Magnetized culture.

## 2.2 富集培养过程中细菌群落组成的变化

以 PCB77 为底物的富集培养过程中细菌群落组成发生了改变, 经过第 2 轮富集培养细菌物种丰富度减少了 90.6%, 香农指数降低了 60.9% (SOC vs. COC,  $P < 0.01$ , 图 2A、2B); MMI 处理后物种丰富度进一步降低了 37.3% (COC vs. MOC,  $P < 0.05$ , 图 2A), 香农指数表现出一定的降幅 (COC vs. MOC,  $P > 0.05$ , 图 2B)。

高通量测序分析发现, 物种群落组成发生了明显的改变。在门水平下(变形菌门用纲展示), SOC 中物种相对较为丰富, 优势菌类群(相对丰度  $> 5\%$ ) 包括酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、 $\gamma$ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)等; 相比之下, 富集过程中物种组成比较单一, 以放线菌门(*Actinobacteria*)和 *Gammaproteobacteria* 为主导, 正常培养下两者丰度占比接近 1:1, 但在 MNPs 作用下, *Gammaproteobacteria* 进一步富集, 丰度占比提升至 91.5% (图 3A)。与门水平变化趋势一致, 属水平下 SOC 物种组成最为丰富, 正常富集(COC)显著提高了红球菌属(*Rhodococcus*)的

相对丰度, 约 49.1%, 较 SOC 的 1.5% 增长近 31.7 倍, 加入 MNPs 后, 红球菌的丰度降低至 8.06%, 取而代之的是贪铜菌属(*Cupriavidus*)的大量增殖, 丰度占比高达 88.4% (图 3B)。

以 PCB77 为生长底物进行培养时, 活性菌发生分裂生长导致装配在细胞上的 MNPs 逐渐被稀释, 丧失其磁性从而实现与非活性菌的分离, 因而 MOC 组微生物群落变化可能主要源于活性 PCB77 降解菌的富集, 进而使其与 COC 在物种组成上产生较大差异。不过需要注意纳米颗粒本身也可能会直接影响微生物群落组成<sup>[16]</sup>, 虽然本研究无法排除 MNPs 对群落组成的直接影响, 但基于 MNPs 不存在非生物转化 PCB77 (图 1) 的现象, 推测高效降解 PCB77 的现象主要还是源于功能菌群的富集。而且 MMI 技术已被证实能够有效甄别原位活性降解微生物类群, 如 Zhang 等<sup>[11]</sup>研究了生物污泥中原位苯酚降解活性菌, 结合污染物降解特征和稳定性同位素核酸探针技术(DNA-stable isotope probing, DNA-SIP)等证实伯克霍尔德菌(*Burkholderiales*)

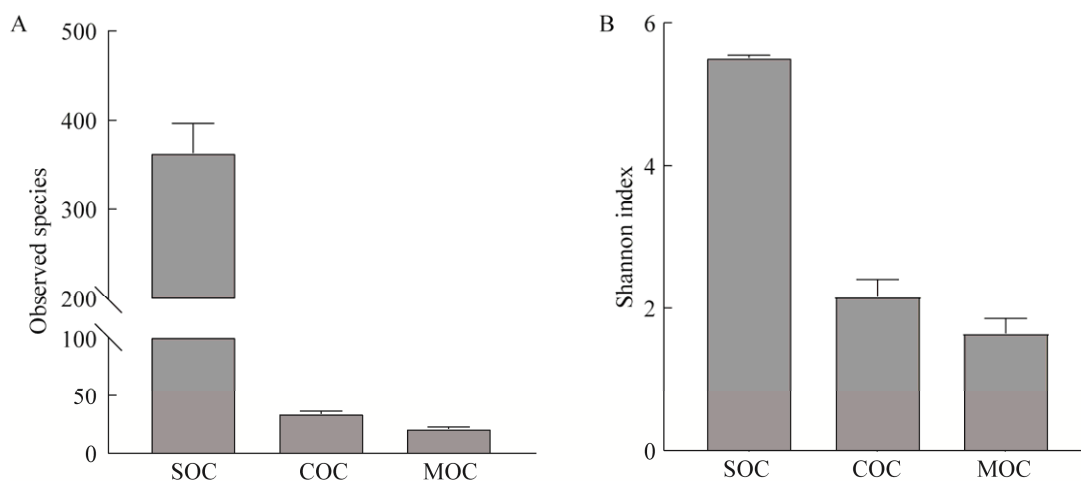
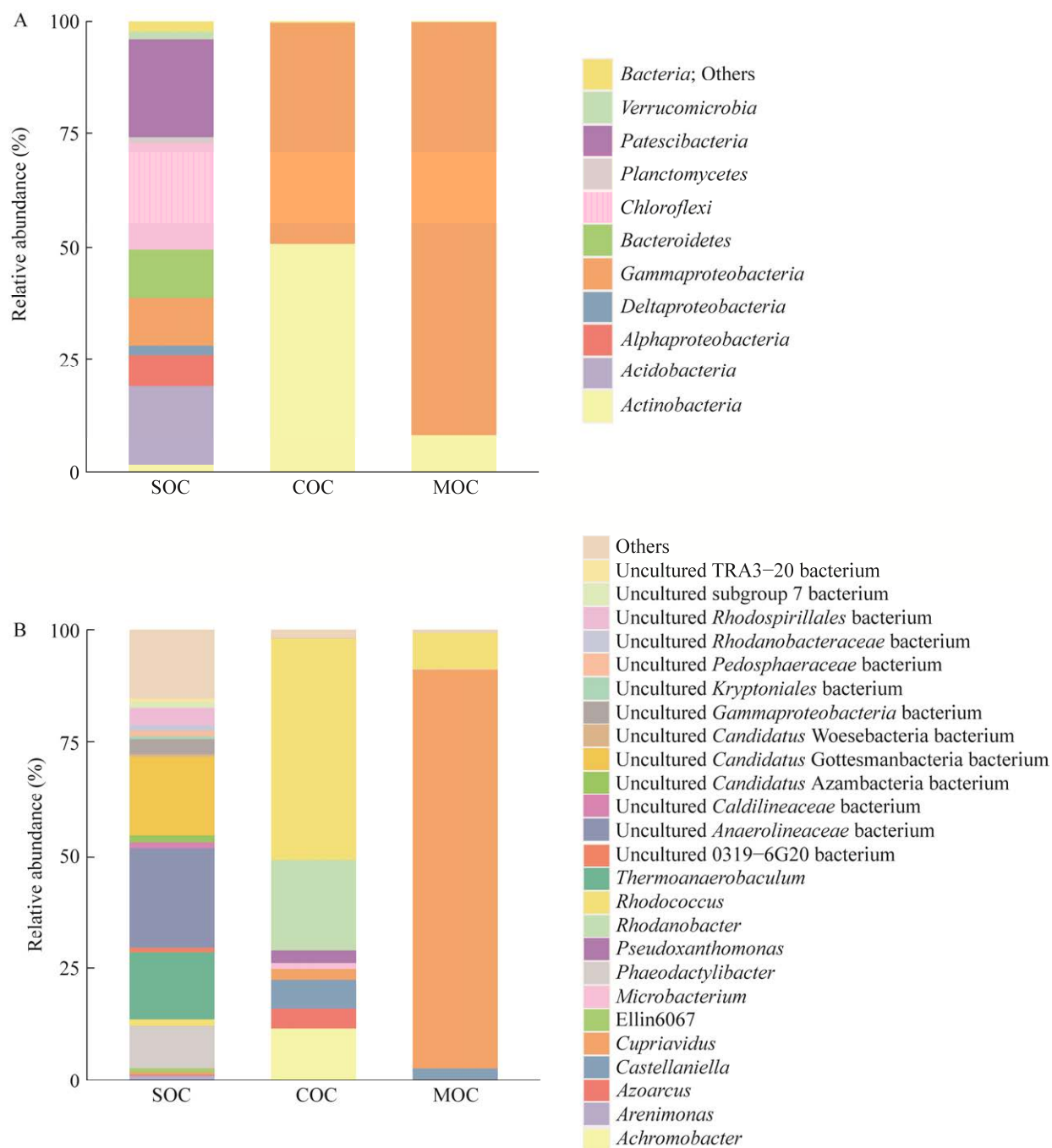


图 2 富集培养过程中细菌物种丰富度(A)和香农指数(B)的变化 SOC: 首轮富集培养; COC: 对照组富集培养; MOC: MMI 处理组富集培养

Figure 2 The change in bacterial Observed species (A) and Shannon index (B) during enrichment. SOC: Initial PCB47-fed culture; COC: Non-magnetized culture; MOC: Magnetized culture.





**图 3** 富集培养过程中细菌群落组成在门/纲水平(A)和属水平(B)的变化 门/纲水平和属水平下, 分别展示相对丰度 $\geq 1\%$ 和 $\geq 0.5\%$ 的类群, 小于该丰度的类群合并为“Others”. SOC: 首轮富集培养; COC: 对照组富集培养; MOC: MMI 处理组富集培养

Figure 3 Relative abundance of taxa at phylum/class (A) and genus (B) level during enrichment. The group accounting for  $\geq 1\%$  at phylum/class and  $\geq 0.5\%$  at genus levels are shown, while those not match the criterion are integrated into “Others”. SOC: Initial PCB47-fed culture; COC: Non-magnetized culture; MOC: Magnetized culture.

为原位苯酚降解功能类群。Li 等<sup>[17]</sup>将 MMI 技术与 DNA-SIP 相结合,使废水中原位非降解菌的甄别更加聚焦,证实了嗜染料菌(*Pigmentiphaga*)在原位废水中菲代谢的重要作用。

### 2.3 PCB77 降解菌的筛选与鉴定结果

采用以 PCB77 为唯一碳源的 MM 平板对 COC 和 MOC 富集液中潜在降解菌进行分离培养,发现对照组(COC)中 PCB77 降解菌的数量( $1.36 \times 10^6$  CFU/mL)要显著高于 MMI 处理组(MOC,  $1.61 \times 10^4$  CFU/mL),多出近 2 个数量级。从各处理组中挑选出菌落形态存在差异的平板优势菌进行 16S rRNA 基因比对分析,发现 COC 平板组成较为单一,COE 中优势菌 CT2 ( $1.29 \times 10^6$  CFU/mL)的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 OP709841)与 *Rhodococcus* sp. JC435<sup>T</sup> 相似度最高(100%, 图 4A),菌落形态为红色、表面隆起、边缘光滑,细胞呈短杆状,革兰氏染色阳性(图 4B)。MOC 中优势菌由红球菌( $8.8 \times 10^3$  CFU/mL)和类芽孢

杆菌(MT2,  $6.7 \times 10^3$  CFU/mL)共同组成,MT2 (GenBank 登录号为 OP709842)与 *Paenibacillus populi* strain LAM0705<sup>T</sup> 最为相似(98.0%, 图 4A),菌落为白色,表面隆起、边缘光滑,革兰氏阳性,长杆状且有芽孢形成(图 4B)。

红球菌是一类常见的 PCBs 降解菌,广泛存在于土壤和沉积物环境中<sup>[18]</sup>,其代表菌株 RHA1<sup>[19]</sup>和 *Burkholderia xenovorans* LB400<sup>[20]</sup>、类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) KF707 等都是研究 PCBs 生物降解的模式菌株;与红球菌相比,关于类芽孢杆菌的纯培养研究相对较少,但有研究表明其在原位土壤 PCBs 降解过程发挥着重要作用,Uhlik 等<sup>[21]</sup>和 Lee 等<sup>[22]</sup>基于 DNA-SIP 分析发现类芽孢杆菌参与了土壤和沉积物中 PCBs 的降解过程;Ouyang 等<sup>[23]</sup>在研究生物碳固定菌群降解 PCB118 的研究中也发现了类芽孢杆菌的富集;Li 等<sup>[24]</sup>采用激光诱导可视化弹射分离技术也分离得到了降解联苯的类芽孢杆菌。

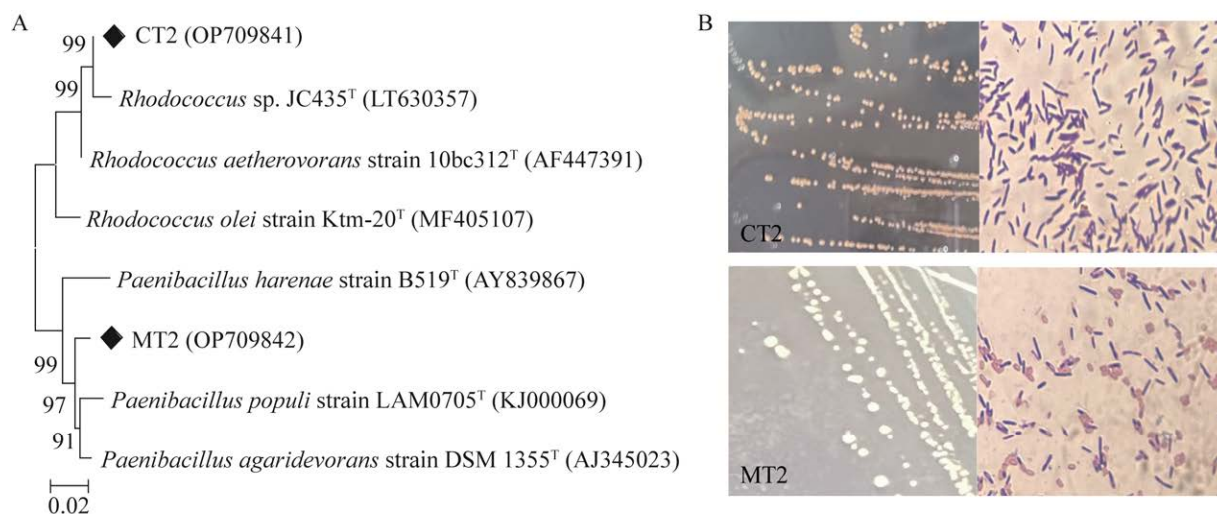


图 4 PCB 降解菌 CT2 和 MT2 的系统发育树(A)和菌落细胞形态(B) Bootstrap 次数设置为 1 000,分支处数字表示 bootstrap 支持率;括号内代表序列 GenBank 登录号;标尺 0.02 代表序列偏差值

Figure 4 The phylogenetic tree (A), colony and cell morphology (B) of PCB-degrader CT2 and MT2. Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are indicated at the branch points; Accession numbers are shown in parentheses and the value of 0.02 represents the sequence deviation value.



尽管有研究表明 *Cupriavidus* 具备 PCBs 降解能力<sup>[25-26]</sup>, 然而, PCB77 平板始终未从 MOC 中分离到测序结果对应的优势菌属 *Cupriavidus*, 相反地, 却分离到占比极低的 *Paenibacillus* (相对丰度<1%)。该现象与 Zhang 等<sup>[27]</sup>的报道类似, 他们发现夜蛾幼虫取食聚氯乙烯膜后在肠道大量富集了肠球菌(*Enterococcus*, 最高 37%), 而在后期降解菌筛选实验中获得的是低丰度的克雷伯氏菌(*Klebsiella*, 最高 1.7%)。徐丰俊等<sup>[28]</sup>通过传统平板法和微生物单细胞水平微流体筛选技术分离联苯降解菌的研究中也发现被富集的种类并不一定能够纯培养, 有的分离菌株甚至在测序分析中未曾检出。这暗示了微生物物种组成和功能上的差异, 可能它们的分离受限与现有培养条件, 也可能这些菌是通过改变微生物互作关系进而影响降解效果。

## 2.4 PCBs 降解菌对 PCB77 的降解

比较了两株降解菌在唯一碳源和共代谢条件下对 PCB77 的降解能力。唯一碳源条件下, COC 组高丰度的红球菌 CT2 并未达到高效降解 PCB77 的效果(26.3%, 图 5A), 而 MOC 组中低丰度的类芽孢杆菌 MT2 却能高效降解污染物

(65.2%, 图 5A), 降解效果接近于富集液 MOC 中 PCB77 的降解(图 1)。该结果与 Sakai 等<sup>[29]</sup>的报道类似, 他们从土壤中分离得到类芽孢杆菌 KBC101, 发现其不仅具有广谱的 PCBs 降解能力, 而且较模式降解菌能更好地降解共平面结构的 PCB77。与之前研究报道过的菌株相比, MT2 具有更好的降解效果, 如 Wang 等<sup>[7]</sup>报道一株苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*), 12 d 内 PCB77 (5 mg/L)的降解率为 29.6%; 李方卉等<sup>[30]</sup>报道的苜蓿中华根瘤菌对 PCB77 (5 mg/L)的降解率为 40.0%; 蔡慧等<sup>[31]</sup>报道了一株铜绿假单胞菌, 7 d 内可降解 49.6%的 PCB77 (1 mg/L)。同时 MNPs 的加入并未显著改变降解菌对 PCB77 的降解效果, 排除了其可能存在的生物降解促进作用(M-CT2、M-MT2,  $P>0.05$ , 图 5A)。

酵母抽提物能够有效地促进红球菌 CT2 对 PCB77 的降解(59.7%, 图 5B), 却抑制类芽孢杆菌 MT2 的降解效率(33.2%, 图 5B), 其具体影响机制尚不明确, 但推测与不同降解菌的联苯双加氧酶 BphA 特性存在密切关联<sup>[32]</sup>。有研究表明, BphA 是负责启动 PCBs 降解的关键酶, 基于红球菌 RHA1 的研究发现 BphA 催化口袋

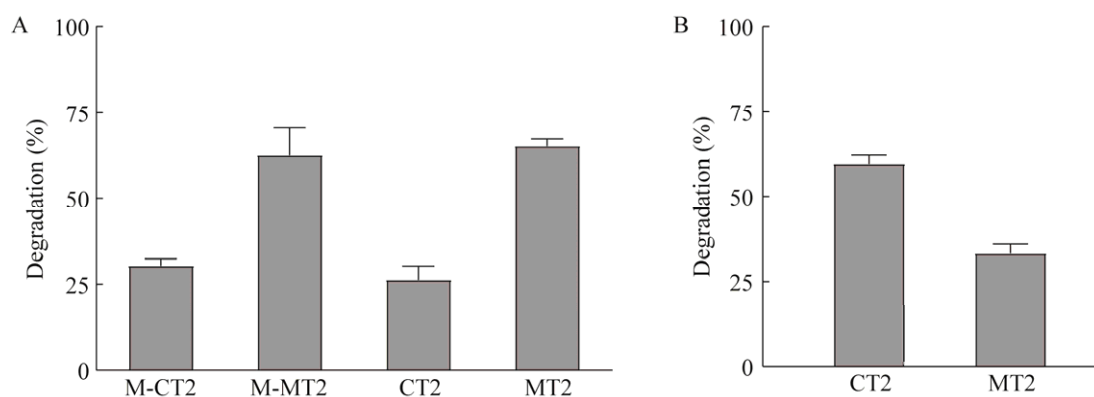


图 5 菌株 CT2 和 MT2 在唯一碳源(A)和共代谢(B)条件下对 PCB77 的降解 M-CT2: 菌株 CT2+MNPs; M-MT2: 菌株 MT2+MNPs

Figure 5 The degradation of PCB77 by strain CT2 and MT2 with the pollutant as the sole carbon source (A) and the co-metabolism degradation (B). M-CT2: Strain CT2+MNPs; M-MT2: Strain MT2+MNPs.

很小,底物结合可诱导蛋白结构发生改变有利于底物催化<sup>[33]</sup>,有研究通过对其编码基因 *bphA* 进行分子进化,有效扩展了酶的底物催化谱,并提高包括 PCB77 在内的多种 PCBs 的转化效率,促进 *bphA* 的表达可显著提高生物反应器中 PCBs 的生物降解效率<sup>[34-36]</sup>。

## 2.5 PCB 降解菌对其他 PCBs 和 PBDEs 的降解

分别在单一污染物和混合污染物条件下研究了降解菌对不同卤代数量 PCBs 和 PBDEs 的降解。结果表明,红球菌 CT2 和类芽孢杆菌 MT2 对供试污染物均有较好的降解表现,在单一 PCBs 作为碳源的条件下,CT2 对 PCB47 和 PCB110 的降解率分别为 29.9%和 28.4%,MT2 分别为 38.0%和 50.5% (图 6A)。在单一 PBDEs 作为碳源的条件下,CT2 对 BDE28、BDE47 和

BDE77 的降解率分别为 28.4%、41.7%和 50.1%,MT2 分别为 41.8%、62.2%和 65.7% (图 6B)。整体而言,菌株 MT2 对 PCBs 和 PBDEs 的降解能力优于 CT2,其中对 PCB110、BDE47 和 BDE77 的降解差异达到显著水平( $P<0.05$ ,图 6)。相比单一污染降解条件,除了 CT2 对 PCB77 有一定促进作用(49.3% vs. 37.8%,  $P>0.05$ ,图 1 和图 6A),大部分污染物混合条件下表现为降解受到抑制的趋势,其中具有显著差异( $P<0.05$ )的处理包括 CT2 对 BDE77 的降解(44.8% vs. 50.1%,图 6B)、MT2 对 BDE47 的降解(37.6% vs. 62.2%,图 6B)、MT2 对 BDE77 的降解(42.0% vs. 65.7%,图 6B)等。

对于不同种类的污染物,CT2 和 MT2 均未表现卤代数量增加而污染物降解率随之降低的趋势,可能暗示 2 种 PCB77 降解菌对高卤代污染物具有更好的降解效果。而且 PCBs 降解菌 CT2

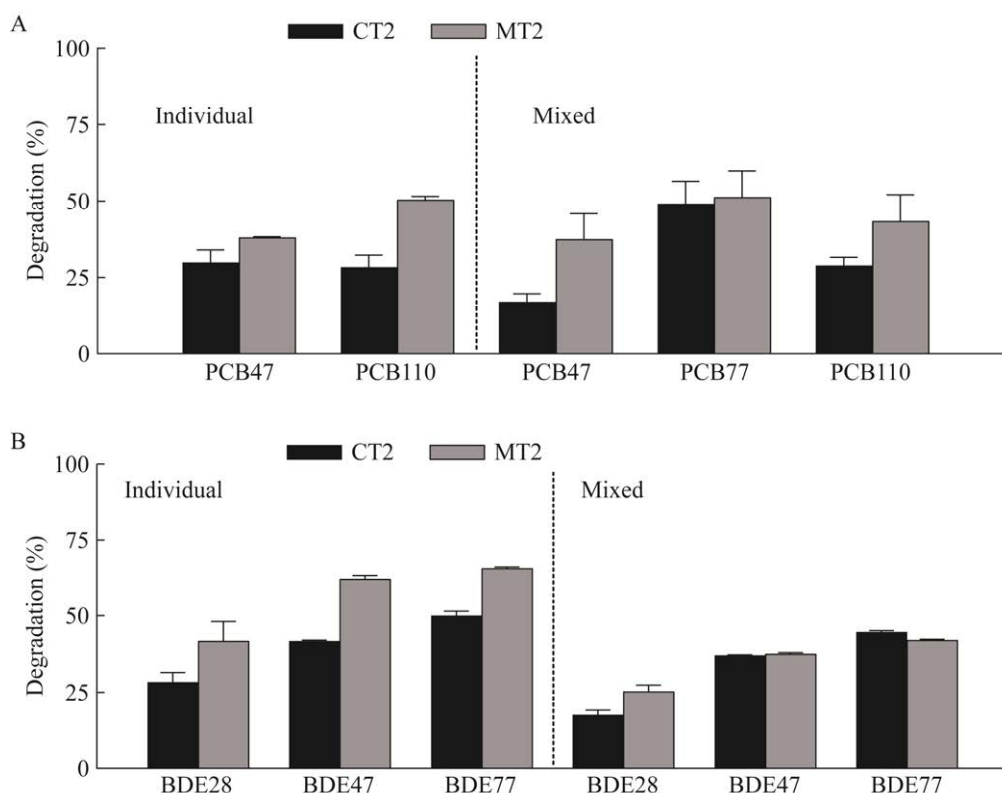


图 6 菌株 CT2 和 MT2 对其他 PCBs (A)和 PBDEs (B)的降解

Figure 6 The degradation of individual or mixed PCBs (A) and PBDEs (B) by strain CT2 and MT2.

和 MT2 能够有效地降解 PBDEs, 主要因为 PBDEs 和 PCBs 具有类似的结构, 这与 Robrock 等<sup>[37]</sup>报道的结果类似, 通过酶学研究进一步证实了红球菌 RHA1 联苯双加氧酶对 PBDEs 具有转化作用<sup>[38]</sup>。然而在混合体系下污染物降解被抑制的现象(图 6), 其可能原因是这些污染物骨架结构都一样, 混合条件下用于酶催化的底物浓度增加从而导致降解率下降。该特征和多环芳烃生物降解显著不同, 通常低环多环芳烃可用于诱导羟基化双加氧酶, 从而提高高环多环芳烃的降解效率<sup>[39]</sup>。

### 3 讨论与结论

MMI 技术是甄别原位活性降解微生物类群的有力手段, 目前该技术多针对较易降解的苯酚、菲、烷烃等污染物<sup>[11-12]</sup>, 其磁化功能菌群能够基本重现原始菌群中污染物降解效率, 而本研究首次采用针对难以生物降解的 PCB77, 发现加入 MNPs 通过改变物种组成大幅度提高了该污染物的降解效率, 并从中筛选到具有高效降解 PCB77 作用的类芽孢杆菌 MT2。与对照组获取的红球菌相比, MT2 降解效率更高, 接近于 MMI 处理富集液中 PCB77 的降解效果, 同时 MT2 也对多种 PCBs 和 PBDEs 表现出相对更好的降解效果。鉴于富集培养液中红球菌大量增殖却未能高效降解 PCB77 的结果, 我们推测类芽孢杆菌在 PCB77 原位降解中可能发挥更重要的作用。本研究结果并不足以说明该类群在原位 PCB 降解中发挥活性作用, 未来仍需结合 qPCR 或 DNA-SIP 等分子生态学手段对其原位活性进行验证。

### REFERENCES

[1] PIEPER DH. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(2): 170-191.

[2] WANG SQ, CHNG KR, WILM A, ZHAO SY, YANG KL, NAGARAJAN N, HE JZ. Genomic characterization of three unique *Dehalococcoides* that respire on persistent polychlorinated biphenyls[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(33): 12103-12108.

[3] PATHIRAJA G, EGODAWATTA P, GOONETILLEKE A, TE'O VSJ. Solubilization and degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by naturally occurring facultative anaerobic bacteria[J]. Science of the Total Environment, 2019, 651: 2197-2207.

[4] SUN S, XIE SX, CHEN H, CHENG YB, SHI Y, QIN X, DAI SY, ZHANG XY, YUAN JS. Genomic and molecular mechanisms for efficient biodegradation of aromatic dye[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 302: 286-295.

[5] SU XM, LI S, CAI JF, XIAO YY, TAO LQ, HASHMI MZ, LIN HJ, CHEN JR, MEI RW, SUN FQ. Aerobic degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by a resuscitated strain *Castellaniella* sp. SPC4: kinetics model and pathway for biodegradation[J]. Science of the Total Environment, 2019, 688: 917-925.

[6] AHMED M, FOCHT DD. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1973, 19(1): 47-52.

[7] WANG XM, TENG Y, LUO YM, DICK RP. Biodegradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by *Sinorhizobium meliloti* NM[J]. Bioresource Technology, 2016, 201: 261-268.

[8] MEGGO RE, SCHNOOR JL, HU DF. Dechlorination of PCBs in the rhizosphere of switchgrass and poplar[J]. Environmental Pollution, 2013, 178: 312-321.

[9] LIANG Y, MEGGO R, HU DF, SCHNOOR JL, MATTES TE. Enhanced polychlorinated biphenyl removal in a switchgrass rhizosphere by bioaugmentation with *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. Ecological Engineering, 2014, 71: 215-222.

[10] LIN Z, XU YF, ZHEN Z, FU Y, LIU YQ, LI WY, LUO CL, DING AZ, ZHANG DY. Application and reactivation of magnetic nanoparticles in *Microcystis aeruginosa* harvesting[J]. Bioresource Technology, 2015, 190: 82-88.

[11] ZHANG DY, BERRY JP, ZHU D, WANG Y, CHEN Y, JIANG B, HUANG S, LANGFORD H, LI GH, DAVISON PA, XU J, ARIES E, HUANG WE. Magnetic nanoparticle-mediated isolation of functional

- bacteria in a complex microbial community[J]. The ISME Journal, 2015, 9(3): 603-614.
- [12] WANG XZ, ZHAO XH, LI HB, JIA JL, LIU YQ, EJENAVI O, DING AZ, SUN YJ, ZHANG DY. Separating and characterizing functional alkane degraders from crude-oil-contaminated sites via magnetic nanoparticle-mediated isolation[J]. Research in Microbiology, 2016, 167(9/10): 731-744.
- [13] 荣楠, 张建伟, 包远远, 何世颖, 冯有智, 林先贵. 基于磁性纳米颗粒分选的土壤活性纤维素降解微生物富集研究[J]. 土壤学报, 2022, 59(5): 1457-1468.
- RONG N, ZHANG JW, BAO YY, HE SY, FENG YZ, LIN XG. The responses of active cellulose-degrading bacterial community to different fertilization in paddy soils as revealed by magnetic nanoparticle-mediated isolation method[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(5): 1457-1468 (in Chinese).
- [14] ZENG J, LIN XG, ZHANG J, LI XZ. 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.
- [15] TAMURA K, STECHER G and KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [16] AFZAL S, SINGH NK. Effect of zinc and iron oxide nanoparticles on plant physiology, seed quality and microbial community structure in a rice-soil-microbial ecosystem[J]. Environmental Pollution, 2022, 314: 120224.
- [17] LI JB, LUO CL, ZHANG G, ZHANG DY. Coupling magnetic-nanoparticle mediated isolation (MMI) and stable isotope probing (SIP) for identifying and isolating the active microbes involved in phenanthrene degradation in wastewater with higher resolution and accuracy[J]. Water Research, 2018, 144: 226-234.
- [18] WAGNER-DÖBLER I, BENNASAR A, VANCANNEYT M, STRÖMPL C, BRÜMMER I, EICHNER C, GRAMMEL I, MOORE ER. Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 3014-3022.
- [19] SETO M, KIMBARA K, SHIMURA M, HATTA T, FUKUDA M, YANO K. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3353-3358.
- [20] BOPP LH. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1986, 1(1): 23-29.
- [21] UHLIK O, JECNA K, MACKOVA M, VLCEK C, HROUDOVA M, DEMNEROVA K, PACES V, MACEK T. Biphenyl-metabolizing bacteria in the rhizosphere of horseradish and bulk soil contaminated by polychlorinated biphenyls as revealed by stable isotope probing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(20): 6471-6477.
- [22] LEE TK, LEE J, SUL WJ, IWAI S, CHAI BL, TIEDJE JM, PARK J. Novel biphenyl-oxidizing bacteria and dioxygenase genes from a Korean tidal mudflat[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3888-3891.
- [23] OUYANG XF, YIN H, YU XL, GUO ZY, ZHU MH, LU GN, DANG Z. Enhanced bioremediation of 2,3',4,4',5-pentachlorodiphenyl by consortium GYB1 immobilized on sodium alginate-biochar[J]. Science of the Total Environment, 2021, 788: 147774.
- [24] LI AL, CHEN KZ, LI B, LIANG P, SHEN CF. Biphenyl-degrading bacteria isolation with laser induced visualized ejection separation technology and traditional colony sorting[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2022, 109(3): 571-576.
- [25] WITTICH RM, WOLFF P. Growth of the genetically engineered strain *Cupriavidus necator* RW112 with chlorobenzoates and technical chlorobiphenyls[J]. Microbiology (Reading, England), 2007, 153(Pt 1): 186-195.
- [26] ABBEY AM, BEAUDETTE LA, LEE H, TREVORS JT. Polychlorinated biphenyl (PCB) degradation and persistence of a *gfp*-marked *Ralstonia eutropha* H850 in PCB-contaminated soil[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 63(2): 222-230.
- [27] ZHANG Z, PENG HR, YANG DC, ZHANG GQ, ZHANG JL, JU F. Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae[J]. Nature Communications, 2022, 13: 5360.
- [28] 徐丰俊, 刘泽钊, 彭睿琪, 张逸岚, 沈超峰. 单细胞水平微流体技术筛选北极沉积物中的联苯降解菌[J]. 环境科学学报, 2022, 42(9): 1-8.
- XU FJ, LIU ZF, PENG RQ, ZHANG YL, SHEN CF. Isolation of biphenyl-degrading bacteria in Arctic sediments by single-cell level isolation of microfluidics (SLIM) technology[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(9): 1-8 (in Chinese).
- [29] SAKAI M, EZAKI S, SUZUKI N, KURANE R.

- Isolation and characterization of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Paenibacillus* sp. KBC101[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(1): 111-116.
- [30] 李方卉, 徐莉, 张腾昊, 陈雄, 张振, 李伟明, 李辉信, 胡锋. 一株 PCBs 降解菌的降解特性及发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(7): 1299-1307.  
LI FH, XU L, ZHANG TH, CHEN X, ZHANG Z, LI WM, LI HX, HU F. Degradation characteristics and fermentation conditions optimization of a PCBs-degrading strain[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(7): 1299-1307 (in Chinese).
- [31] 蔡慧, 郑家传, 史广宇, 徐嘉玥, 何理, 施维林. 一株多氯联苯降解菌的筛选鉴定及降解性能研究[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(4): 1219-1225.  
CAI H, ZHENG JC, SHI GY, XU JY, HE L, SHI WL. Isolation, identification and characterization of a PCB77-degrading strain[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(4): 1219-1225 (in Chinese).
- [32] IWASAKI T, TAKEDA H, MIYAUCHI K, YAMADA T, MASAI EJ, FUKUDA M. Characterization of two biphenyl dioxygenases for biphenyl/PCB degradation in a PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(4): 993-1002.
- [33] FURUSAWA Y, NAGARAJAN V, TANOKURA M, MASAI EJ, FUKUDA M, SENDA T. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 342(3): 1041-1052.
- [34] MOHAMMADI M, VIGER JF, KUMAR P, BARRIAULT D, BOLIN JT, SYLVESTRE M. Retuning Rieske-type oxygenases to expand substrate range[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(31): 27612-27621.
- [35] LI JD, MIN J, WANG Y, CHEN WW, KONG YC, GUO TY, MAHTO JK, SYLVESTRE M, HU XK. Engineering *Burkholderia xenovorans* LB400 BphA through site-directed mutagenesis at position 283[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(19): e01040-e01020.
- [36] HARA T, TAKATSUKA Y, NAKATA E, MORII T. Augmentation of an engineered bacterial strain potentially improves the cleanup of PCB water pollution[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): e0192621.
- [37] ROBROCK KR, COELHAN M, SEDLAK DL, ALVAREZ-COHENT L. Aerobic biotransformation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by bacterial isolates[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(15): 5705-5711.
- [38] ROBROCK KR, MOHN WW, ELTIS LD, ALVAREZ-COHEN L. Biphenyl and ethylbenzene dioxygenases of *Rhodococcus jostii* RHA1 transform PBDEs[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(2): 313-321.
- [39] ZENG J, ZHU QH, WU YC, CHEN H, LIN XG. Characterization of a polycyclic aromatic ring-hydroxylation dioxygenase from *Mycobacterium* sp. NJS-P[J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 67-74.