

• 环境生物技术 •

一株 1,4-二噁烷降解菌的分离及其降解性能解析

张玥^{1,2}, 赵联芳¹, 田坤^{2,3}, 江煜^{2,3}, 马瑞², 刘云^{2,3*}

1 河海大学 环境学院, 江苏 南京 210098

2 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008

3 中国科学院大学, 北京 100049

张玥, 赵联芳, 田坤, 江煜, 马瑞, 刘云. 一株 1,4-二噁烷降解菌的分离及其降解性能解析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3722-3749.

ZHANG Yue, ZHAO Lianfang, TIAN Kun, JIANG Yu, MA Rui, LIU Yun. Isolation and degradation characterization of a 1,4-dioxane-degrading bacterial strain[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3722-3749.

摘要: 为应对水环境中潜在致癌物质 1,4-二噁烷(1,4-dioxane)的污染, 本研究从 1,4-二噁烷污染的地下水中, 通过富集驯化、分离得到一株 1,4-二噁烷高效降解菌株 DXTK-010。经过形态学观察、16S rRNA 基因序列比对以及基于全基因组的物种分类研究, 鉴定该菌株为解胺胺杆菌(*Aminobacter aminovorans*)。研究表明, 该菌株具有较强的环境适应能力, 在 20–37 °C 及 pH 5.0–8.0 下均能有效降解 1,4-二噁烷。单因素实验表明, 在 30 °C、pH 7.5 条件下降解性能最佳。在优选条件下, 该菌株能在 24 h 内完全降解 200 mg/L 的 1,4-二噁烷, 最大降解速率达 9.367 mg/(L·h)。菌株 DXTK-010 对 1,4-二噁烷的降解动力学采用 Monod 方程进行拟合, 其最大比降解速率(V_{max})为 0.224 mg 1,4-dioxane/(mg protein·h), 半饱和浓度(K_s)为 41.350 mg/L, 细胞产率(Y)为 0.130 mg protein/(mg 1,4-dioxane), 与已报道的降解菌相比, DXTK-010 作为优异的降解菌株, 扩充了生物修复 1,4-二噁烷的菌株资源。全基因组测序揭示其完整基因组包括 1 条环状染色体和 3 个质粒。功能基因分析表明, 丙烷单加氧酶基因簇和醇脱氢酶基因是其高效降解 1,4-二噁烷的关键功能基因。本研究为 DXTK-010 实际应用于 1,4-二噁烷污染修复提供了理论基础。

关键词: 1,4-二噁烷; 解胺胺杆菌(*Aminobacter aminovorans*); 单因素实验; 降解动力学; 全基因组测序

资助项目: 国家自然科学基金(41877504); 江苏省碳达峰碳中和科技创新专项(BK20220004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41877504) and the Science and Technology Innovation Special Foundation for Carbon Peak and Carbon Neutrality of Jiangsu Province (BK20220004).

*Corresponding author. E-mail: yliu@issas.ac.cn

Received: 2024-01-21; Accepted: 2024-04-01

Isolation and degradation characterization of a 1,4-dioxane-degrading bacterial strain

ZHANG Yue^{1,2}, ZHAO Lianfang¹, TIAN Kun^{2,3}, JIANG Yu^{2,3}, MA Rui², LIU Yun^{2,3*}

1 College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Soil & Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, Jiangsu, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To address the potential pollution caused by the carcinogen 1,4-dioxane in aquatic environments, we isolated a highly efficient 1,4-dioxane-degrading bacterial strain, designated as DXTK-010, from the groundwater contaminated by 1,4-dioxane. According to the morphological characteristics, the phylogenetic tree established based on the 16S rRNA gene sequence, and the whole genome sequence, we identified DXTK-010 as *Aminobacter aminovorans*. This strain demonstrated robust degradation capacity within a temperature range of 20 °C to 37 °C and a pH range of 5.0 to 8.0. Furthermore, single-factor experiments indicated the optimal degradation conditions at 30 °C and pH 7.5. Under the optimal conditions, the strain completely degraded 200 mg/L of 1,4-dioxane within 24 h, achieving a maximum degradation rate of 9.367 mg/(L·h). The Monod equation was adopted to fit the degradation kinetics of 1,4-dioxane at different initial concentrations, which revealed a maximum specific degradation rate of 0.224 mg 1,4-dioxane/(mg protein·h), a half-saturation constant (K_s) of 41.350 mg/L, and a cell yield of 0.130 mg protein/(mg 1,4-dioxane). Whole genome sequencing revealed a circular chromosome and three plasmids within DXTK-010. Functional gene annotation and analysis underscored the significance of the propane monooxygenase gene cluster and alcohol dehydrogenase gene in facilitating the efficient degradation of 1,4-dioxane by this strain. DXTK-010 outperformed the existing degraders for 1,4-dioxane, expanding the strain resources for the bioremediation of 1,4-dioxane pollution. This study provides a theoretical basis for the practical application of DXTK-010 in the remediation of 1,4-dioxane pollution.

Keywords: 1,4-dioxane; *Aminobacter aminovorans*; single-factor experiment; degradation kinetics; whole genome sequencing

新污染物 1,4-二噁烷(1,4-dioxane, CAS: 123-91-1, C₄H₈O₂)是具有 2 个对称醚键(C-O-C)的环氧杂环有机化合物,在工业和农业领域广泛应用。作为人工合成化学品,它主要用作稳定剂、溶剂、增塑剂和净化剂,在生活和生产中承担着重要角色^[1-4]。此外,1,4-二噁烷也常作为副产物在塑料和表面活性剂制品、医药及

洗护化妆等消费品生产过程中残留^[5]。由于其高水溶性(20 °C时为 1 000 mg/mL)和低辛醇水分配系数(log K_{ow}=-0.27)^[6],1,4-二噁烷难以被土壤吸附固定^[7],其在土壤中滞留时间短,会迅速淋溶至地下水中。毒理学研究表明,1,4-二噁烷会对动物的多个器官造成影响^[8],并有显著的肿瘤诱导能力^[9],国际癌症研究机

构已将其列为 2B 类潜在致癌物质^[10]。

1,4-二噁烷在水环境中的广泛分布和毒理学特性,已引起包括美国^[11]、德国^[12]、加拿大^[13]、日本^[14]、中国^[15-16]等在内的多个国家学者的密切关注,世界卫生组织将其在饮用水中的指导限值定为 50 $\mu\text{g/L}$ ^[17],而美国环境保护署则建议饮用水中的 1,4-二噁烷健康浓度为 0.35 $\mu\text{g/L}$ ^[18]。鉴于此,探索有效去除 1,4-二噁烷的方法至关重要。由于 1,4-二噁烷特殊的物理化学性质和 C-O 键的高键能(360 kJ/mol)使得传统的水处理技术难以将其有效去除。尽管新型吸附剂^[19]和高级氧化法^[20]能够有效地去除 1,4-二噁烷,但存在二次污染风险且耗能和处理成本较高。因此,生物处理法作为一种高效、环保且经济的处理技术^[21],已成为具有前景的 1,4-二噁烷处理方法。

自发现 1,4-二噁烷降解菌红色红球菌(*Rhodococcus ruber*) 219^[22]和食二氧杂环己烷假诺卡氏菌(*Pseudonocardia dioxanivorans*) CB1190^[23]以来,学术界对 1,4-二噁烷的微生物降解途径与机制进行了深入研究^[24]。目前已分离的 1,4-二噁烷降解菌主要为革兰氏阳性菌,包括假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)^[25]、红球菌属(*Rhodococcus*)^[26]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[27]、黄杆菌属(*Flavobacterium*)^[28]、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)^[29]等。相比之下,革兰氏阴性的 1,4-二噁烷降解菌,如黄色杆菌属(*Xanthobacter*)^[30]、阿菲波菌属(*Afipia*)^[31]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[32]、固氮弧菌属(*Azoarcus*)^[33]等数量较少,但研究显示它们具有更高的细胞产量和降解速率^[34]。关键功能基因和关键酶的研究对于阐明 1,4-二噁烷微生物转化机制和提高降解效率至关重要。在 1,4-二噁烷的好氧降解中,关键的初始开环过程依赖于可溶性双铁单加氧酶(soluble di-iron monooxygenases, SDIMOs)^[35],包括由

thm/dxmADBC、*prmABCD*、*tmoABCDEF* 基因簇编码的四氢呋喃/二噁烷单加氧酶(tetrahydrofuran/dioxane monooxygenase, THMO/DXMO)、丙烷单加氧酶(propane monooxygenases, PrMO)和甲苯单加氧酶(toluene monooxygenase, TMO)等^[35-36],它们催化 2-羟基化过程并断裂高能 C-O 键。后续降解过程涉及醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)、醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)和乙醇酸氧化酶(glycolate oxidase)等,形成乙醛酸(glyoxylate)等中间产物进入微生物代谢^[37]。不同地域环境的微生物群落组成存在显著差异^[38],而寻找强环境适应性的高效降解菌株是开展 1,4-二噁烷微生物修复技术研究的基础。因此,有必要进一步挖掘我国环境中的 1,4-二噁烷降解菌株资源及其关键功能基因。

本研究对 1,4-二噁烷污染的地下水样本进行富集驯化和分离,获得了一株高效降解 1,4-二噁烷的菌株。对该菌株进行了形态学分析和菌种鉴定,并通过单因素实验研究了其在不同环境条件下的降解性能。在最佳降解条件下,进一步探究了该菌株的生长情况和降解动力学特性。此外,通过全基因组测序与功能基因分析,对该菌株降解 1,4-二噁烷的关键基因及代谢途径进行了探讨。本研究结果不仅扩充了 1,4-二噁烷降解的微生物资源库,也为深入了解其微生物转化机制提供了理论支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

采集南京市某实际受 1,4-二噁烷污染的地下水样本,将样本置于无菌容器中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存运输至实验室,立即进行菌株的富集培养实验,剩余样本存储于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.1.2 培养基

基础盐培养基(minimal salt medium, MSM) (g/L): 参考常规 MSM 培养基配制^[39], 并进行了改进, 其中镁盐、钙盐分别使用 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, 并添加微量元素储备液 1.00, 维生素储备液 1.00, 琼脂粉 15.00–20.00 (仅固体培养基), 调节 pH 至 7.5。

微量元素储备液(g/L): 参照 ATCC 微量矿物补充剂(ATCC Trace Mineral Supplement)^[40] 进行配制, 并进行了改进, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02, H_3BO_3 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02。

维生素储备液(g/L): 参照 ATCC 维生素补充剂(ATCC Vitamin Supplement)^[41] 进行配制, 并进行了改进, 叶酸 2.0, 盐酸吡哆醇 10.0, 核黄素 5.0, 生物素 2.0, 硫胺素 5.0, 烟酸 5.0, 泛酸钙 5.0, 维生素 B12 0.1, 对氨基苯甲酸 5.0, 硫辛酸 5.0。

Luria-Bertani (LB)培养基: 参照常規 LB 培养基配制^[42]。

1.1.3 主要试剂和仪器

试剂: 1,4-二噁烷(无水, 纯度 $\geq 99.8\%$)购自西格玛奥德里奇贸易有限公司; 二氯甲烷购自南京化学试剂有限公司; 磷酸盐(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液购自赛默飞世尔科技公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒购自奥美嘉生物技术公司。其他试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

仪器: 气相色谱系统, 安捷伦科技有限公司; 紫外分光光度计, 莱伯泰科仪器股份有限公司; 高速冷冻离心机, 艾本德公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 分光光度计、荧光仪, 赛默飞世尔科技公司; 纳米孔三代测序仪, 牛津纳米孔科技有限公司; 高通量

测序平台, 因美纳科学器材公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的富集、分离纯化和筛选

取 5 mL 地下水样本于含 100 mL 无菌 MSM 培养基的灭菌锥形瓶中, 添加 100 mg/L 的 1,4-二噁烷为唯一碳源并在 30 °C、150 r/min 下进行富集培养。每隔 1 周将 5% 的富集培养液转接到新鲜的含 100 mg/L 1,4-二噁烷的 MSM 培养基中, 继续富集培养。最后, 经过 6 个月的富集培养, 得到可以快速降解 1,4-二噁烷的菌液。

将 1 mL 的菌液以无菌 PBS 缓冲液进行梯度稀释得到 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍的稀释菌液。然后将稀释菌液分别涂布于含有 100 mg/L 1,4-二噁烷的 MSM 琼脂固体平板上, 并放入 30 °C 恒温培养箱培养。培养 5 d 后挑选长势良好的单菌落并通过平板划线得到 1,4-二噁烷降解菌株, 将其编号为 DXTK-010。

1.2.2 菌株的形态学观察

将筛选得到的 1,4-二噁烷高效降解菌株 DXTK-010 在 LB 琼脂平板划线, 30 °C 培养 2–3 d 后, 挑取长势良好的单菌落, 用 LB 液体培养基扩增培养至对数期, 4 °C、5 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 保留菌体沉淀后缓慢加入多聚甲醛-戊二醛固定液(2.0%/2.5%), 用于扫描电镜观察。

1.2.3 菌株的 16S rRNA 基因鉴定及系统发育分析

收集培养至对数期的菌体 DXTK-010 并按照细菌 DNA 提取试剂盒手册提取 DNA。以细菌 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTA CCTTGTTACGACTT-3')对 16S rRNA 基因序列进行扩增。PCR 反应体系(50 μL)选用快速 *Pfu* DNA 聚合酶。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C

延伸 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 10 °C 至使用结束。2% 琼脂糖凝胶电泳检测纯化后 PCR 产物由上海凌恩生物科技有限公司进行测序, 将获得的序列上传至 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中使用 BLAST 进行分析^[43], 使用 MEGA 11.0 软件计算遗传距离, 并以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

1.2.4 降解菌菌悬液的制备及菌株的长期保存

降解菌菌悬液的制备: 挑选单菌落 DXTK-010 接种到 LB 液体培养基中扩增培养至对数期, 4 °C、8 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 弃上清液, 用 PBS 缓冲溶液洗涤 2-3 次。最后用 PBS 缓冲溶液重悬, 即为降解菌菌悬液, 菌悬液细胞密度 OD_{600} 不小于 0.050。菌悬液在 4 °C 下保存供短期内(0-14 d)使用。

DXTK-010 菌株的长期保存: 将菌液与 50% 的甘油以 1:1 的比例在无菌条件下进行混合, 保存于 -80 °C 的冰箱中, 供长期保存 1-2 年。同时, 将该菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(保藏编号为 CGMCC No. 25780)。

1.2.5 环境条件对菌株 1,4-二噁烷降解能力的影响

将活化后的 DXTK-010 降解菌按照 5% 的体积比接种于 30 mL 的 MSM 培养体系中进行降解实验, 定时取样测定 1,4-二噁烷的剩余浓度, 研究温度(20、30、37 °C)、pH 值(4.0、5.0、7.0、7.5、8.0、9.0)和 1,4-二噁烷浓度(2、50、100、200、400、600、800 mg/L)对降解性能的影响, 并进行 1 次 Spiking 实验, 每个实验设 3 个重复, 并设置同体积无菌含有 1,4-二噁烷的 MSM 培养基作空白对照。

对不同分组间降解速率的差异, 使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行单因素方差分析, 在进行方差分析之前, 对数据进行方差齐性分

析, 在单因素方差分析后, 选择 Tukey 检验进行事后比较, 并对 P 值进行 Benjamini-Hochberg 校正, $P < 0.05$ 即认为存在显著性差异。

1.2.6 菌株对 1,4-二噁烷的降解性能

在最佳实验条件下, 将 DXTK-010 降解菌以 5% 的体积比接种至 30 mL MSM 培养基中, 测得菌株的 OD_{600} 约为 0.080, 加入 50、100、200 mg/L 的 1,4-二噁烷作为碳源, 在 1,4-二噁烷完全降解后重新加入对应浓度的 1,4-二噁烷进行 1 次 Spiking 实验, 定时取样测试剩余 1,4-二噁烷浓度和溶液 OD_{600} 。取出 200 μ L 的溶液过 0.22 μ m 滤膜后, 与 200 μ L 二氯甲烷进行等体积萃取, -20 °C 冷冻后倒出有机相, 待测。

溶液 OD_{600} 的测定: 取 700 μ L 样品于比色皿中, 通过紫外分光光度计在 600 nm 处读取的吸光度来检测微生物的生长情况。每个实验设 3 个重复, 并设置同体积含有 1,4-二噁烷的 MSM 培养基作空白对照。

1.2.7 1,4-二噁烷的降解动力学拟合

采用 Logistic 模型^[44][式(1)]、零级反应动力学模型[式(2)]、一级反应动力学模型[式(3)]对 DXTK-010 降解菌对初始浓度为 50、100、200 mg/L 的 1,4-二噁烷降解动力学曲线进行拟合以及 Spiking 降解动力学曲线进行拟合, 来描述反应物浓度(C)与时间(t)之间的关系。采用 Monod 模型[式(4)]来拟合微生物比降解速率(V)与底物浓度(S)之间的关系, 以单位 1,4-二噁烷消耗时菌株 DXTK-010 的蛋白增长量计算降解菌株的细胞产率(Y)。动力学拟合均采用 Origin 9.2 软件。

模型方程如下所示:

$$C = C_{\min} + (C_{\max} - C_{\min}) / [1 + (t / t_{0.5})^b] \quad (1)$$

式中, C 是反应物浓度(mg/L), C_{\min} 是反应终点浓度(mg/L) ($C_{\min}=0$), C_{\max} 为初始底物浓度(mg/L), t 是反应时间(h), $t_{0.5}$ 为 C_{\max} 含量

为一半时的反应时间(h), b 为希尔斜率(与 $t_{0.5}$ 处曲线陡峭度有关)。

$$C_0 - C = k \times t \quad (2)$$

$$\ln(C_0 / C) = k \times t \quad (3)$$

式中, C 是反应物浓度(mg/L), C_0 是初始底物浓度(mg/L), t 是反应时间(h), k 为反应速率常数[mg/(L·h)]。

$$V = V_{\max} \times S / (K_s + S) \quad (4)$$

式中, V 是微生物的比降解速度[mg 1,4-dioxane/(mg protein·h)], V_{\max} 为微生物最大比降解速率[mg 1,4-dioxane/(mg protein·h)], K_s 为半饱和常数(mg/L), S 为单一限制性底物浓度(mg/L)。

1.2.8 1,4-二噁烷浓度的检测及菌株 DXTK-010 蛋白含量的测定

采用气相色谱-氢火焰离子化检测器(gas chromatography-hydrogen flame ionization detector, GC-FID)检测 1,4-二噁烷浓度, 仪器配备 HP Ultra2 色谱分析柱, 以高纯氮气为载气, 设定载气流速 2 mL/min, 柱箱程序升温至 40 °C, 进样口温度 120 °C, 检测器温度 300 °C。

DXTK-010 菌株的蛋白含量测定采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 通过紫外分光光度计在 595 nm 处读取的吸光度来计算微生物的蛋白含量。

1.2.9 菌株全基因组序列的测定和分析

在 LB 琼脂平板上挑取长势良好的 DXTK-010 单菌落转接至 LB 液体培养基扩大培养至对数期, 12 000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集菌体。测序过程按照牛津纳米孔技术公司提供的标准方案执行。采用优化后的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)法提取基因组 DNA, 并用分光光度计和荧光仪检测其纯度。对于三代长读段 Nanopore 测序和二代短读段 Illumina 测序, 分别使用连接测序试剂盒-本地条形码工具包和 DNA 文库制备试剂盒构建测

序文库, 纯化后分别使用纳米孔三代测序仪和高通量平台测序, 得到原始数据分别使用 GUPPY 5.0.16 软件和 fastp 0.23.2 软件过滤得到有效数据, 用于后续组装分析。使用 Flye 2.9 软件将过滤后的三代 Nanopore 数据组装成高质量的细菌基因组骨架(contig), 接着使用 Pilon 1.24 软件结合二代 illumina 数据纠错, 获得最终的精确基因组。最后, 分别用 Minimap2 2.24-r1122 软件和 BWA 0.7.17-r1188 软件将长读段和短读段与拼接完成的基因组进行比对, 并使用 Samtools 1.15.1 的 depth 工具以 2 000 bp 的滑动窗口统计二、三代测序数据的平均测序深度。细菌全基因组测序由武汉贝纳纳科技有限公司完成。

对组装后的基因组使用 Prokka 1.14.6 软件调用 Prodigal 对基因编码序列(coding sequence, CDS)、Aragorn 对 tRNA、RNAmmer 对 rRNA、Infernal 对 miscRNA 进行预测, 并用 R 软件 circize 安装包对预测得到的基因组信息、基因组测序深度、鸟嘌呤和胞嘧啶(guanine and cytosine, GC)分布及基因组结构注释进行整合, 绘制基因组圈图。使用 UniProt Knowledgebase (UniProtKB)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、基因本体(gene ontology, GO)、蛋白质家族分析和建模(protein family analysis and modeling, Pfam)、同源蛋白质簇(cluster of orthologous groups of proteins, COG)、肿瘤免疫治疗基因表达资源家族分析与建模(tumor immunotherapy gene expression resource family analysis and modelings, TIGERfams)、参考序列(reference sequences, RefSeq)、非冗余蛋白质序列数据库(non-redundant protein sequence database, NR)等进行基因库功能注释。

使用 JspeciesWS 和 GGDC 3.0 将菌株

DXTK-010 的全基因组序列与其他胺杆菌的全基因组序列进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)^[45]和数字 DNA-DNA 杂交(DNA-DNA hybridization, dDDH)分析^[46]。通过 BLAST 将菌株 DXTK-010 注释出的关键酶与约氏红球菌(*Rhodococcus jostii*) RHA1、*P. dioxanivorans* CB1190、二氧杂环己烷营养型分枝杆菌(*Mycobacterium dioxanotrophicus*) PH-06 等菌株中已知的关键单加氧酶的蛋白序列进行比对,分析氨基酸同源性^[39]。使用 Mauve 软件将菌株 *Aminobacter aminovorans* strain DXTK-010 的全基因组序列与 1,4-二噁烷降解菌 *R. jostii* RHA1 和 *P. dioxanivorans* CB1190 的全基因组序列进行共线性分析^[47]。

2 结果与分析

2.1 1,4-二噁烷降解菌株 DXTK-010 分离与形态学特征

经富集、分离纯化和筛选后得到一株能够高效降解 1,4-二噁烷的菌株,编号为 DXTK-010。菌株 DXTK-010 在 LB 琼脂平板上形成的单菌落形态特征如图 1A 所示,为直径约 1.0–2.0 mm 的

圆形菌落,表面光滑、边缘整齐。菌落表现为不透明、呈白色。菌株在 LB 液体培养基中生长 24 h 左右至对数期,此时 OD_{600} 为 0.5。扫描电镜观察到菌株 DXTK-010 的细胞呈杆状(如图 1B 所示),细胞长度约 1.0–1.5 μm ,直径约为 0.5 μm 。

2.2 1,4-二噁烷降解菌株 DXTK-010 的鉴定与系统发育分析

将 DXTK-010 菌株测序得到的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行比对,同源性高于 99% 的菌株序列均为胺杆菌属(*Aminobacter*),与 *A. aminovorans* strain DSM 10368 的同源性最高(99.78%),2.5.2 中根据 ANI 和 dDDH 分析确定其物种,因而将其分类命名为 *A. aminovorans* strain DXTK-010,构建的系统发育树如图 2 所示。

2.3 菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的影响因素

2.3.1 温度对菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的影响

菌株 DXTK-010 在 20–37 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均能够快速且完全降解 1,4-二噁烷,其降解速率随温度变化而显著不同($P < 0.05$),降解曲线如图 3A 所

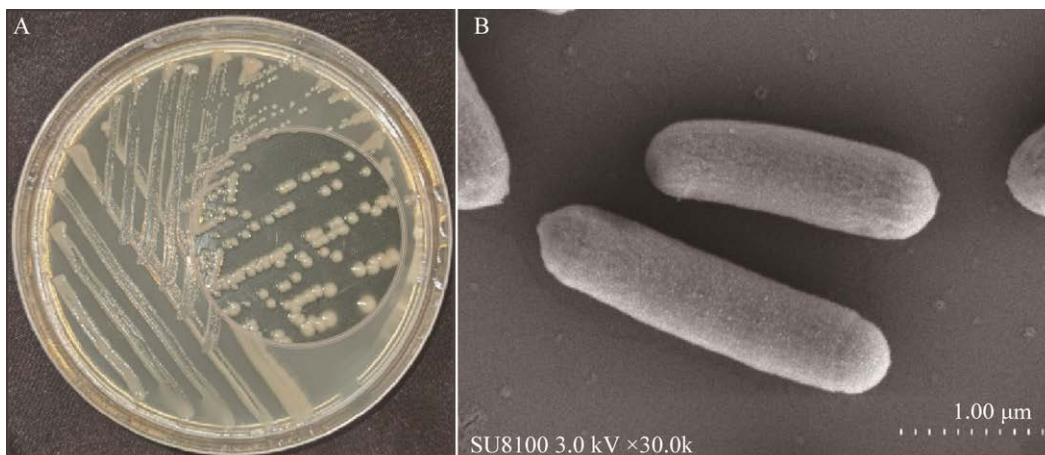


图 1 菌株 DXTK-010 的菌落和菌体形态特征 A: LB 平板上的菌落形态. B: 扫描电镜下的菌体形态
Figure 1 Morphological characterization of colonies and bacteria cells of strain DXTK-010. A: Colony morphology on LB plate. B: Morphology of bacteria under scanning electron microscope.

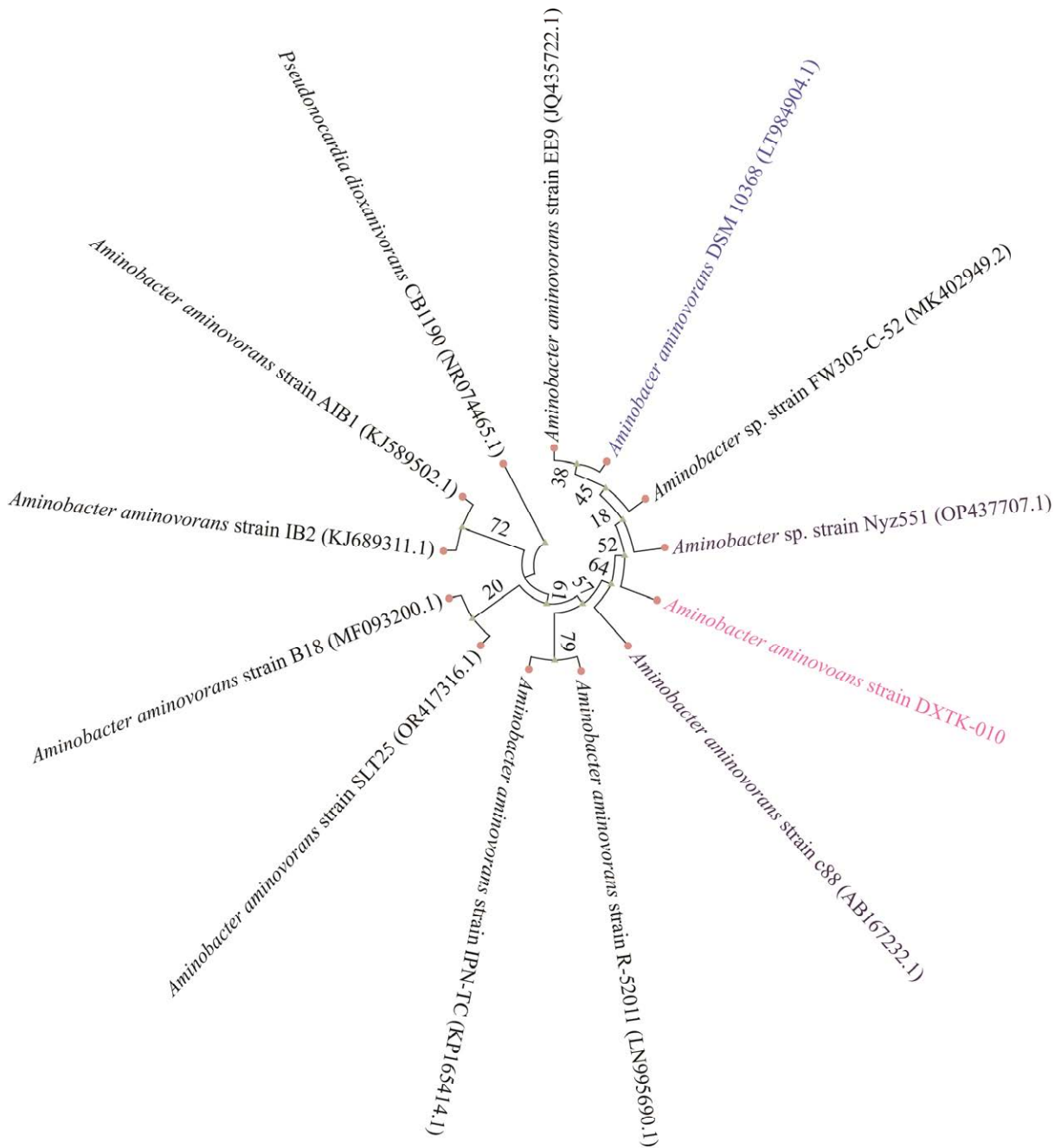


图2 菌株 DXTK-010 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 构建的系统发育树 bootstrap 检验次数设置为 1 000 次, 分支点上的数字为发育距离(%), 括号中的序号对应菌株 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号

Figure 2 Phylogenetic tree of strain DXTK-010 based on 16S rRNA gene sequence. The number of bootstrap tests was set to 1 000. The bootstrap values (%) are shown in branching points. The serial numbers in parentheses correspond to the GenBank accession numbers of the 16S rRNA gene sequences of the strains.

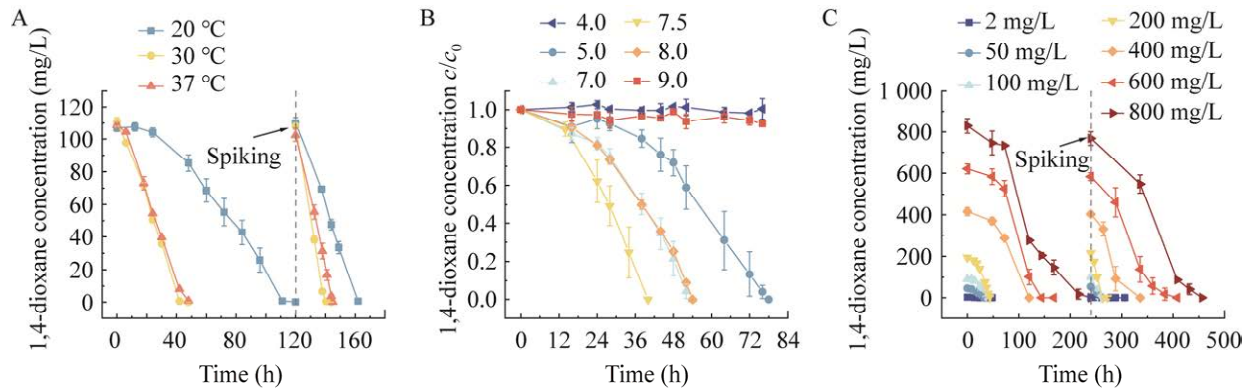


图3 单一因素对 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的影响 A: 温度. B: pH. C: 初始 1,4-二噁烷浓度

Figure 3 Single factor influence on 1,4-dioxane biodegradation by strain DXTK-010. A: Temperature. B: pH. C: Initial concentration of 1,4-dioxane.

示。在 30 °C 时，菌株 DXTK-010 的 1,4-二噁烷降解速率最高，生长降解阶段为 2.637 mg/(L·h)，Spiking 降解阶段该菌株对 1,4-二噁烷降解速率为 4.505 mg/(L·h)。在 37 °C 时，相应的降解速率分别为 2.261 mg/(L·h) 和 4.094 mg/(L·h)，均低于 30 °C 时的降解速率 ($P < 0.05$)。相比之下，当培养温度降至 20 °C 时，菌株 DXTK-010 的降解能力受到明显的不利影响，降解速率为 0.964 mg/(L·h)，Spiking 后的降解速率为 2.622 mg/(L·h)。

2.3.2 pH 对菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的影响

菌株 DXTK-010 能够在较宽 pH 范围内 (pH 5.0–8.0) 以 1,4-二噁烷为唯一碳源完全降解 100 mg/L 的 1,4-二噁烷，其降解曲线如图 3B 所示。在 pH 为 5.0、7.0、7.5、8.0 的条件下，菌株 DXTK-010 对 1,4-二噁烷的降解速率分别为 1.125、1.849、2.637、1.637 mg/(L·h)，存在显著差异 ($P < 0.05$)。其中，在 pH 为 7.5 时，菌株的降解情况最好。而在 pH 为 4.0 和 9.0 时，1,4-二噁烷的降解受到严重抑制 ($P < 0.05$)，降解速率分别为 0.005 mg/(L·h) 和 0.092 mg/(L·h)。

2.3.3 菌株 DXTK-010 对不同初始浓度 1,4-二噁烷的降解性能

菌株 DXTK-010 的 1,4-二噁烷降解速率随

着初始 1,4-二噁烷浓度的增高，呈先增大后减小趋势 (图 3C)。在初始浓度为 200 mg/L 时得到生长降解阶段的最大降解速率为 4.523 mg/(L·h)，在 Spiking 降解阶段可达 9.367 mg/(L·h)，显著高于其他初始浓度下的降解速率 ($P < 0.05$)。随着初始 1,4-二噁烷浓度的增加，菌株 DXTK-010 生长启动迟缓期逐渐延长。即对于生长降解阶段，在 2–200 mg/L 的初始 1,4-二噁烷浓度范围内，菌株 DXTK-010 均能在 3 d 内将其完全降解，并且降解速率随着初始底物浓度增加而提高。然而，当初始浓度增加至 400–800 mg/L 时，菌株 DXTK-010 在 0–3 d 生长和降解速率较低，但在随后的 3–6 d，其降解速率随着底物浓度增加而升高。在 Spiking 降解阶段，菌株 DXTK-010 展现出更高的降解速率，这一趋势在各种初始底物浓度范围内均保持一致。

2.4 菌株 DXTK-010 在优选条件下对不同浓度 1,4-二噁烷的降解动力学

在最优条件下，菌株 DXTK-010 对不同初始浓度 (50、100、200 mg/L) 的 1,4-二噁烷降解曲线及对应的生长曲线如图 4 所示。菌株 DXTK-010 首先经过延滞期，后进入对数生长期直至 1,4-二噁烷完全降解。50 mg/L 组的降解约在 32 h 内完成 (图 4A)，100 mg/L 组约在

40 h 内完成(图 4B), 而 200 mg/L 组则在约 43 h 内完成(图 4C)。在对数生长期, 细菌的增长速率和 1,4-二噁烷的降解速率均达到最大。各浓度组降解终点时的 OD_{600} 值分别为 0.111、0.139、0.210。在 Spiking 实验中, 不同浓度组的 1,4-二噁烷均在 24 h 内完全降解, 降解终点时菌株的 OD_{600} 值分别增长至 0.129、0.222、0.333。

使用 Logistic 模型可以较好地描述菌株 DXTK-010 在初始浓度为 50 mg/L 时的 0–34 h、初始浓度为 100 mg/L 时的 0–40 h 和初始浓度为 200 mg/L 时的 0–43 h 的生长降解阶段 1,4-二噁烷降解和微生物生长之间的关系(图 4, 拟合参数见表 1)。对 Spiking 降解阶段的降解曲线, 零级反应动力学模型可以很好地描述 1,4-

二噁烷的降解动力学, 其中零级反应动力学的反应速率常数 k 随着生物量的提高而增大。

进一步研究了菌株 DXTK-010 对 1,4-二噁烷的降解速率与底物浓度之间的关系。在 50–800 mg/L 的 1,4-二噁烷浓度范围的降解速率(图 5), 该菌株的降解符合单一基质限制且不存在底物抑制的情况, 因而采用 Monod 方程可以较好地描述菌株 DXTK-010 对 1,4-二噁烷的降解动力学。通过该模型, 确定了最大比降解速率(V_{max})和半饱和浓度(K_s)来表示菌株 DXTK-010 的生长特性以及其对 1,4-二噁烷的利用特性, 拟合曲线如图 5 所示。菌株的最大比降解速率(V_{max})为 0.224 mg 1,4-dioxane/(mg protein·h), 半饱和浓度(K_s)为 41.350 mg/L。同时, 细胞产率(Y)达到 0.130 mg protein/(mg 1,4-dioxane)。将菌

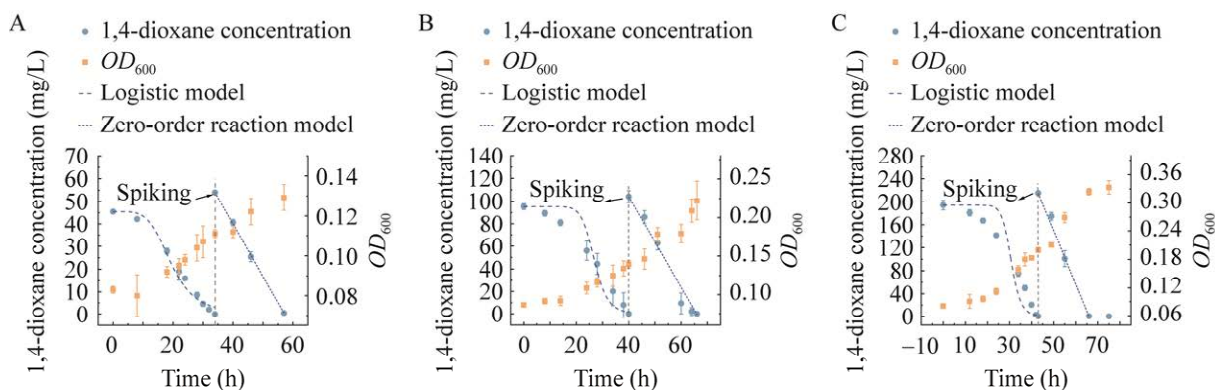


图 4 菌株 DXTK-010 在优选条件下对不同初始浓度 1,4-二噁烷的降解和生长曲线 A: 初始 1,4-二噁烷浓度 50 mg/L. B: 初始 1,4-二噁烷浓度 100 mg/L. C: 初始 1,4-二噁烷浓度 200 mg/L

Figure 4 Degradation and growth curves of strain DXTK-010 for various concentrations of 1,4-dioxane under optimized conditions. A: Initial 1,4-dioxane concentration of 50 mg/L. B: Initial 1,4-dioxane concentration of 100 mg/L. C: Initial 1,4-dioxane concentration of 200 mg/L.

表 1 菌株 DXTK-010 的 Logistic 模型、零级反应动力学模型和一级反应动力学模型拟合参数

Table 1 Kinetic parameters of Logistic model, zero-order reaction model and first-order reaction model of strain DXTK-010

1,4-dioxane concentration (mg/L)	Logistic model			Zero-order reaction model		First-order reaction model	
	$t_{0.5}$ (h)	b	R^2	k (mg/(L·h))	R^2	k (mg/(L·h))	R^2
50	19.300	4.654	0.984	2.340	0.999	0.079	0.950
100	26.876	10.481	0.983	4.360	0.981	0.086	0.928
200	30.750	14.030	0.915	9.596	0.993	0.093	0.909

株 DXTK-010 和其他报道的能以 1,4-二噁烷为唯一碳源生长的降解细菌的 Monod 模型动力学参数进行了对比(表 2), 显示其具有较高的 1,4-二噁烷降解能力。

2.5 菌株 DXTK-010 的全基因组结果与分析

2.5.1 菌株 DXTK-010 的全基因组测序、组装及基因预测

基于 Nanopore 和 Illumina 测序平台对菌株 DXTK-010 进行了全基因组测序。组装后得到菌株 DXTK-010 的完整基因组, 包括一个大小为

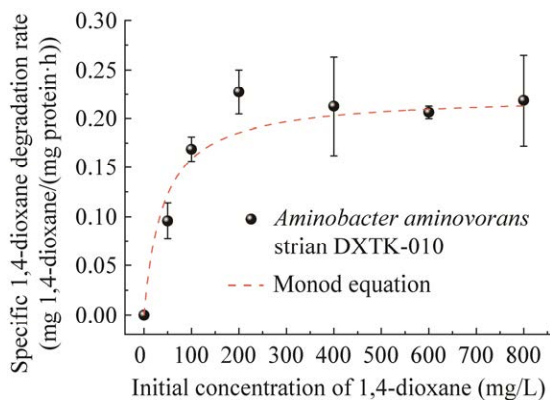


图 5 菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的 V-S 动力学拟合曲线

Figure 5 V-S kinetic fitting curve of 1,4-dioxane degradation by strain DXTK-010.

表 2 菌株 DXTK-010 和其他报道的降解细菌的 Monod 模型动力学参数

Table 2 Monod kinetic parameters of strain DXTK-010 and other reported 1,4-dioxane-degrading bacteria

Strain	V_{max} (mg 1,4-dioxane/(mg protein·h))	K_s (mg/L)	Y (mg protein/(mg 1,4-dioxane))	References
<i>P. dioxanivorans</i> CB1190	0.083	91.80	0.090	[48]
<i>Pseudonocardia</i> sp. N23	0.230	79.90	0.323	[48]
<i>Pseudonocardia</i> sp. D17	0.223	59.70	0.223	[29]
<i>Afipia</i> sp. D1	0.263	25.80	0.185	[29]
<i>Mycobacterium</i> sp. D6	0.139	20.60	0.185	[29]
<i>Mycobacterium</i> sp. D11	0.179	69.80	0.179	[29]
<i>M. dioxanotrophicus</i> PH-06	—	78.00	0.160	[49]
<i>Azoarcus</i> sp. DD4	—	—	0.104	[50]
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> JCM 14343	0.0073	59.20	0.031	[51]
<i>Rhodococcus ruber</i> 219	0.208	0.015	0.240	[41]
<i>A. aminovorans</i> DXTK-010	0.224	41.35	0.130	This study

—: Not reported.

5 286 596 bp 的环状染色体(GC 含量为 63.67%) 和 3 个完整质粒, 质粒长度和 GC 含量分别为 383 674 bp 和 60.82%、44 229 bp 和 61.30%以及 36 325 bp 和 62.57%。染色体二代测序平均深度为 164.3X, 三代测序平均深度为 169.2X。菌株 DXTK-010 染色体的基因组圈图如图 6 所示。通过对组装后的全基因组进行结构及核酸水平预测, 得到编码区基因 5 544 个, 非编码区基因 115 个。

2.5.2 基于全基因组序列的菌株 DXTK-010 物种分类研究

对 *Aminobacter* 属菌株间 ANI 和 dDDH 参数的计算表明(图 7), 菌株 DXTK-010 与菌株 *A. aminovorans* strain DMFA1 和菌株 *A. aminovorans* strain KCTC 2477 的同源性较高, 其 ANI 值分别为 98.52%和 98.45%, dDDH 值分别为 90.10%和 90.10%。而菌株 DXTK-010 与 *Aminobacter niigataensis* strain MD1 和 *Aminobacter* sp. MSH1 的 ANI 值分别为 84.43%和 84.25%, dDDH 值分别为 29.7%和 29.7%。菌株 DXTK-010 与解脲脲杆菌(*A. aminovorans*)菌种细菌的遗传关联性最高(ANI>95%–96%, dDDH>70%), 属于

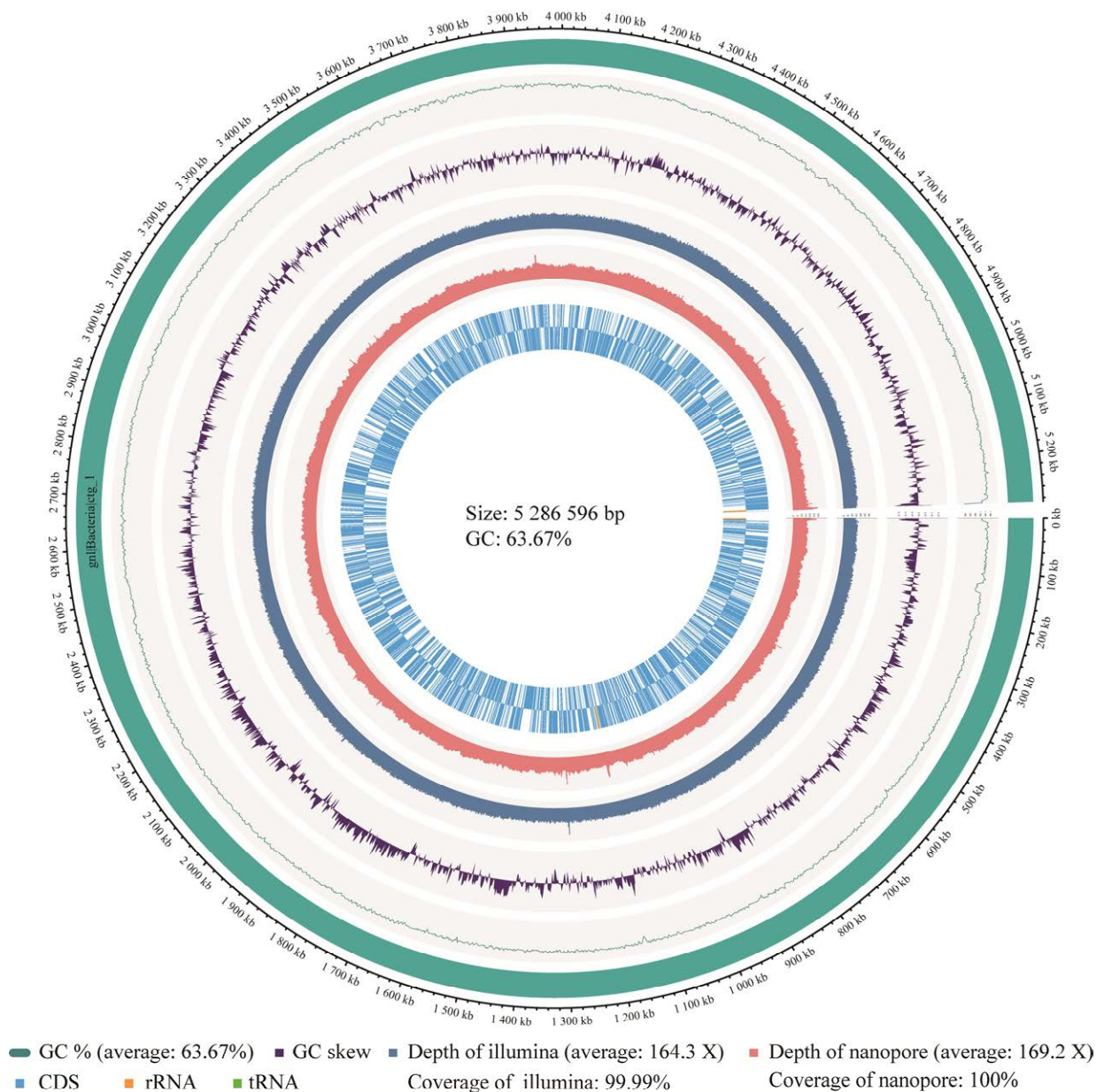


图 6 染色体基因组圈图 由外到内依次为：第一圈，基因组序列信息；第二圈，基因组序列的 GC 含量曲线；第三圈，基因组序列的 GC skew 曲线；第四圈，二代测序深度及覆盖度信息；第五圈，三代测序深度及覆盖度信息；第六圈，展示了参考基因组中的基因编码区以及非编码 RNA 区(rRNA、tRNA)，以内外两层表示，外层代表正链，内层代表负链

Figure 6 Chromosomal genome circular map. The first circle, genome sequence information; The second circle, the GC content curve of the genome sequence; The third circle, the GC skew curve of the genome sequence; The fourth circle, the second-generation sequencing depth and coverage information; The fifth circle, the third-generation sequencing depth and coverage information; The sixth circle, the coding region (CDS) and the non-coding RNA region (rRNA, tRNA) in the reference genome, which are represented by the inner and outer layers, with the outer layer representing the positive strand and the inner layer representing the negative strand (inside-out sequence).

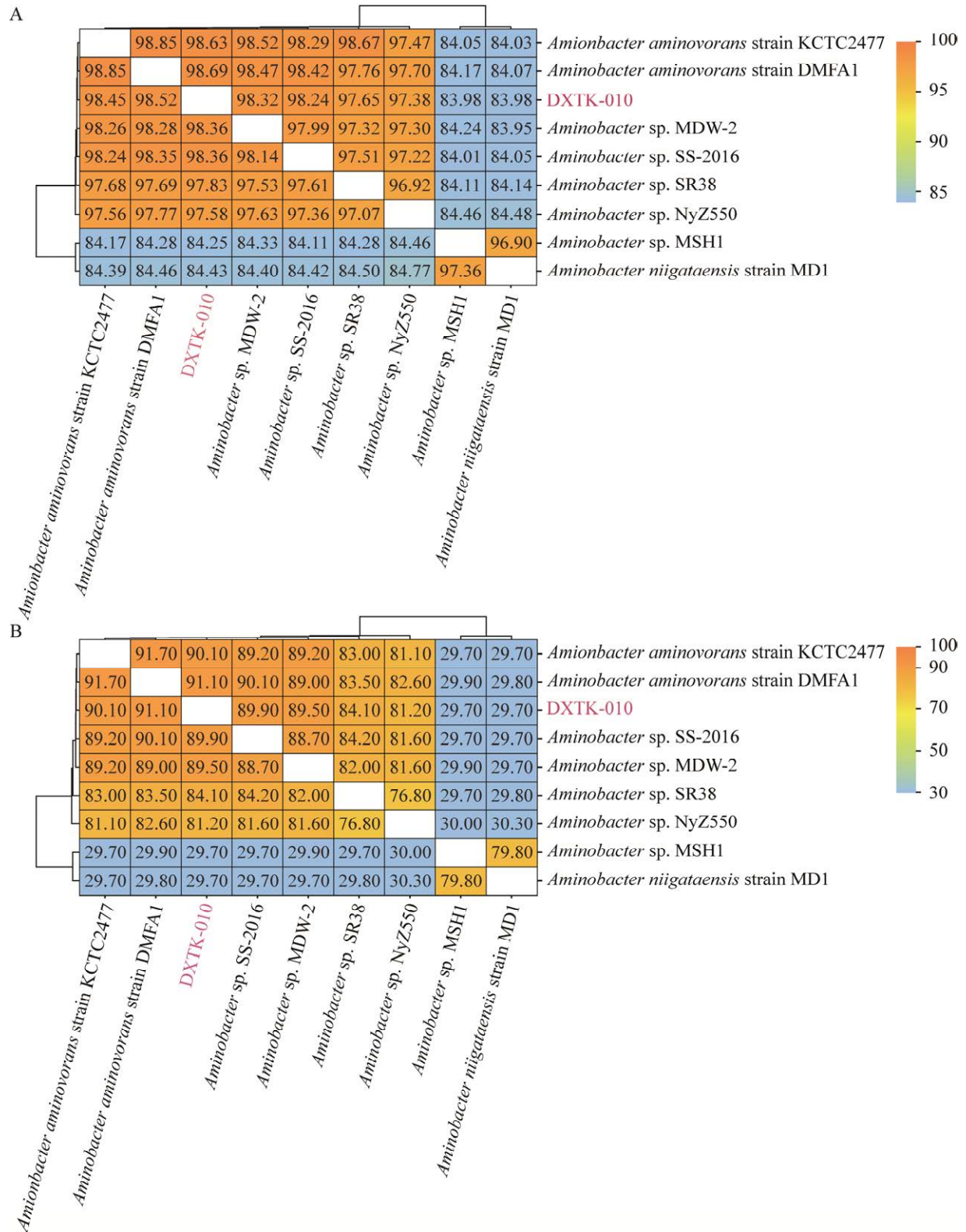


图7 *Aminobacter* 属菌株间的 ANI 和 dDDH 分析 A: ANI 值分析. B: dDDH 值分析

Figure 7 Analysis of ANI and dDDH of *Aminobacter* strains. A: Analysis of ANI. B: Analysis of dDDH.

同一物种。其中 *A. aminovorans* strain KCTC 2477 (与 *A. aminovorans* DSM 10368 同物异名) 为解脞胺杆菌的模式菌株。

2.6 菌株 DXTK-010 全基因组功能基因注释及其参与 1,4-二噁烷降解的功能基因与代谢途径分析

2.6.1 菌株 DXTK-010 全基因组功能基因注释

采用不同数据库对菌株 DXTK-010 的基因功能进行了全面注释,对预测得到的 5 544 个 CDS 达到 100%注释覆盖率。编码基因在不同

数据库的共有注释和特有注释的统计如图 8 所示,有 1 351 个基因被所有数据库注释到。对 COG 基因功能类别分类、Pfam 结构域分类、GO 基因功能分类、KEGG 代谢通路分类、NR 非冗余数据的物种分类结果如图 9 所示。

在 COG 功能分类中,共有 4 776 个功能基因得到注释,占 CDS 的 86.15%。氨基酸转运与代谢类(E|amino acid transport and metabolism)、一般功能预测类(R|general function prediction only)和转录类(K|transcription)注释基因数最

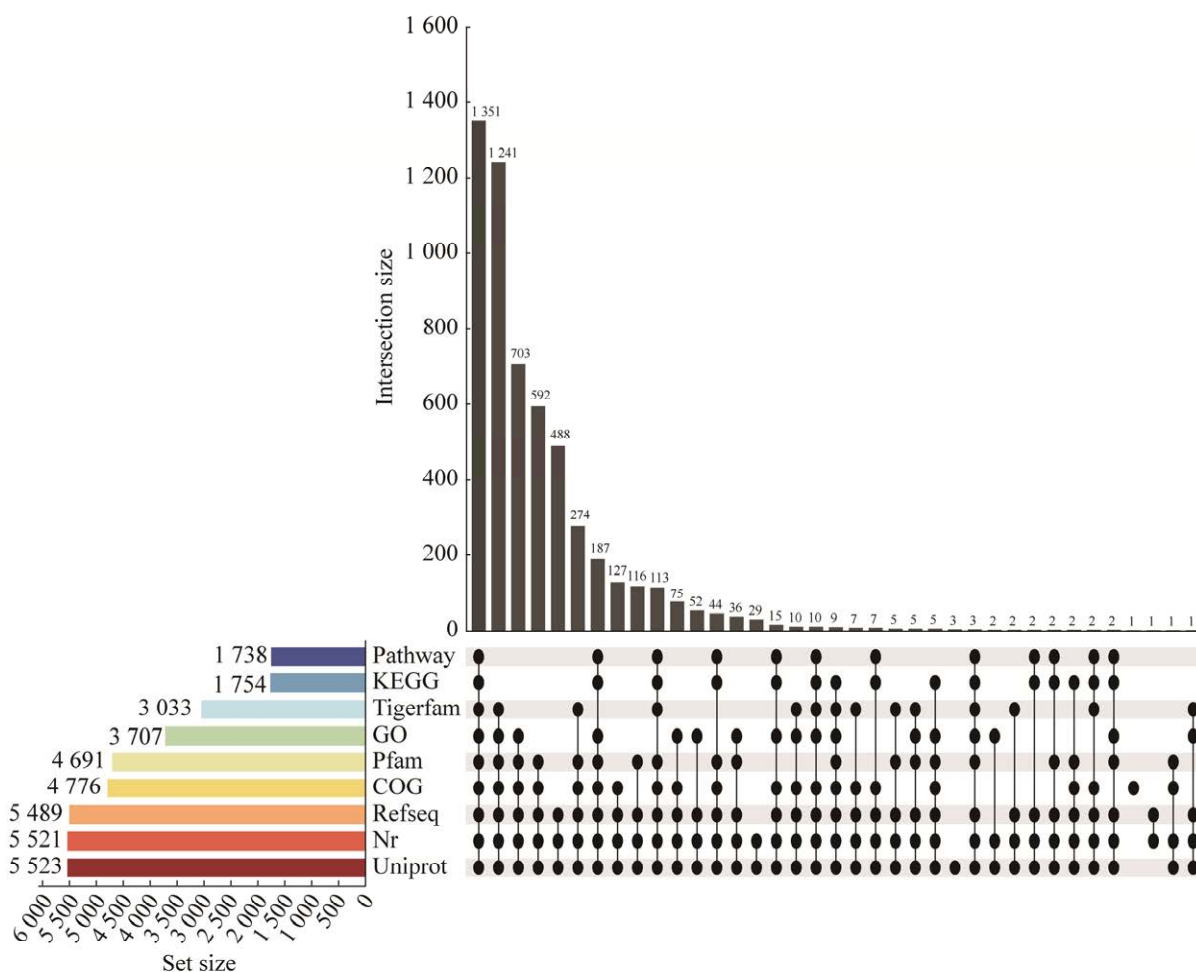
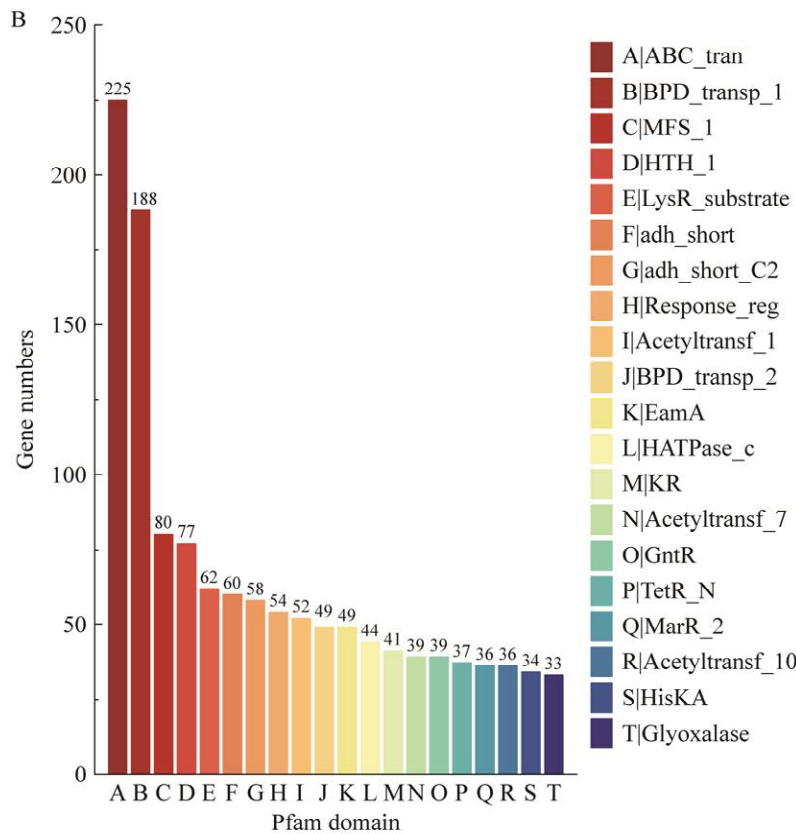
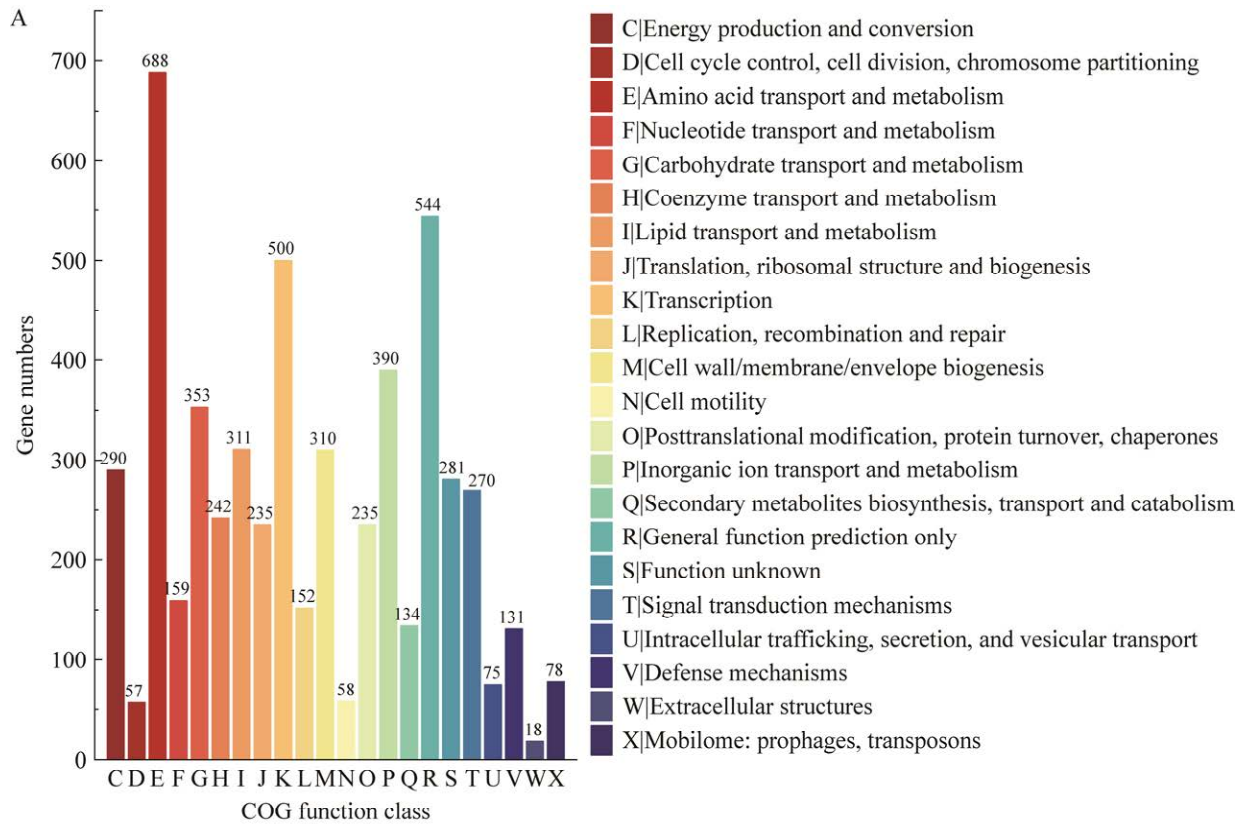
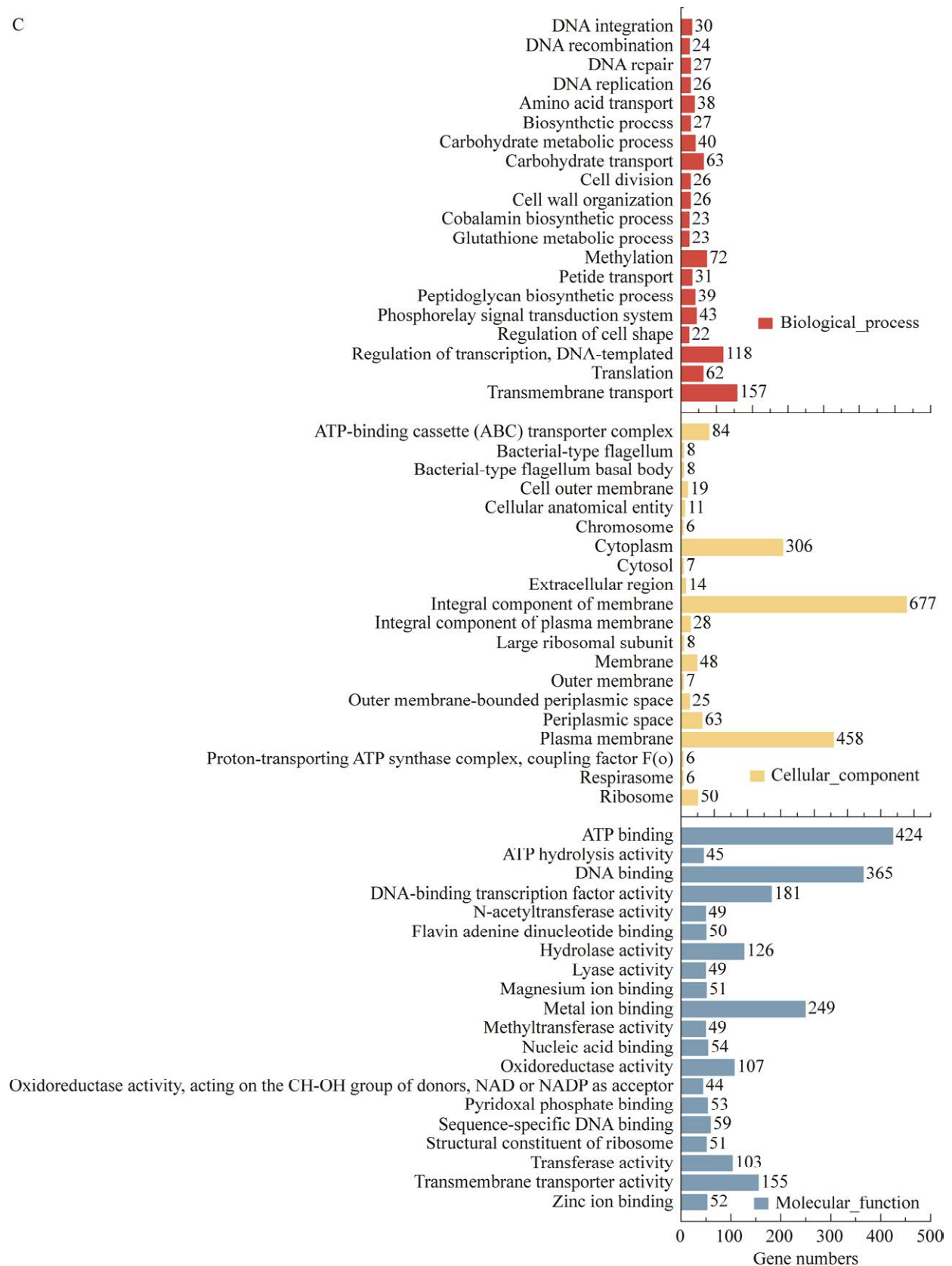


图 8 编码基因通用数据库注释共有和特有注释统计图 左侧为通用数据库基因注释统计;右侧为共有和特有统计

Figure 8 Upset diagram of common and specific annotations in the general database of coding genes. Common databases gene annotation statistics are on the left side; Shared and unique statistics are on the right side.



C



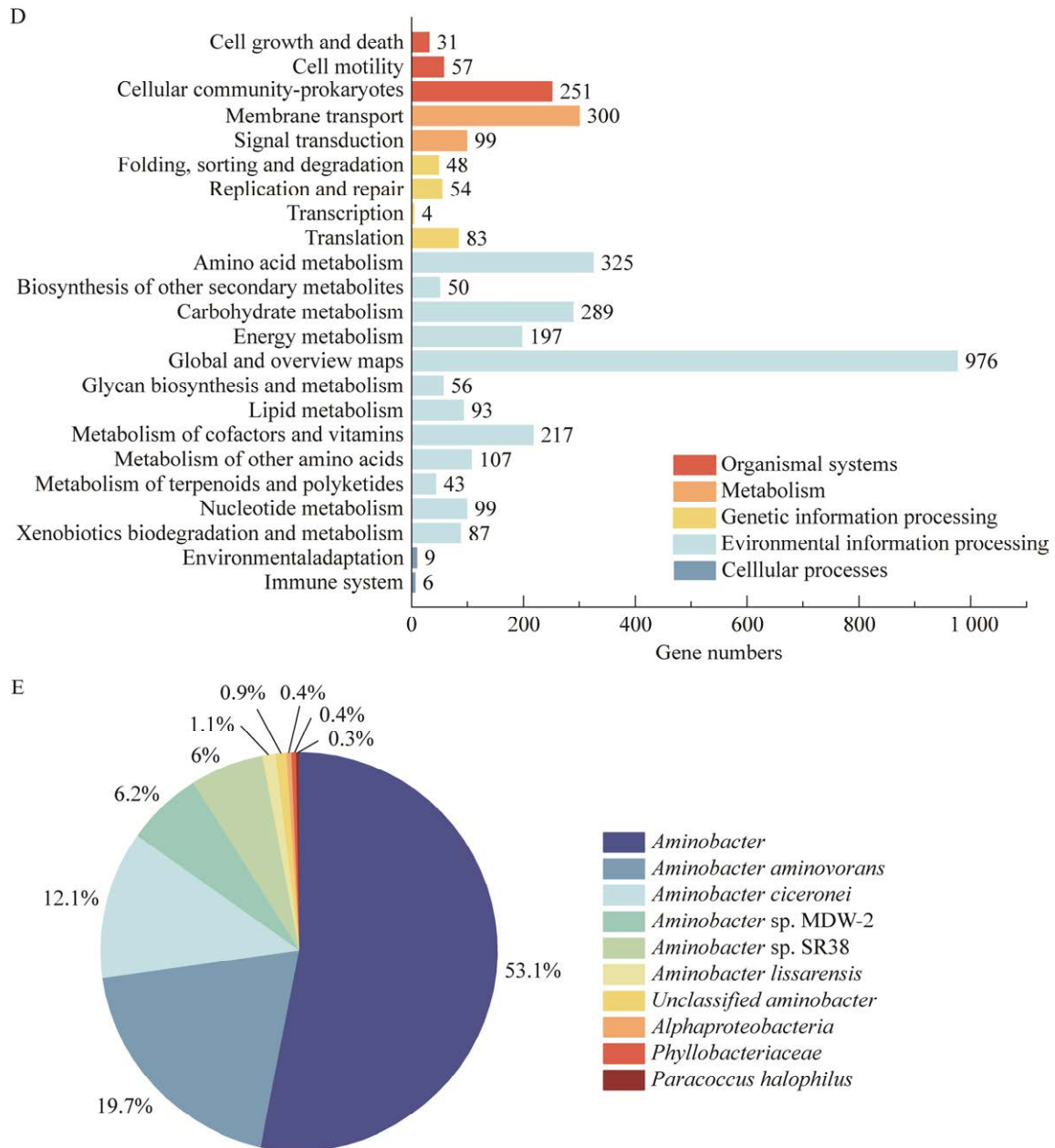


图9 全基因组功能注释及分析 A: COG分类. B: Pfam结构域分类. C: GO分类. D: KEGG代谢通路分类. E: NR注释

Figure 9 Genome-wide functional annotation and analysis. A: COG classification. B: Pfam domain classification. C: Gene ontology classification. D: KEGG pathway classification. E: NR note.

多。利用 Pfam 结构域分类对同源蛋白家族进行了注释, 有 4 691 个功能基因得到成功注释, 占 CDS 的 84.61%, 氨基酸转运蛋白(A|ABC_tran)、结合蛋白依赖转运系统的内膜组分(B|BPD_

transp_1)为注释最多的功能基因结构域。GO 分类识别了 3 707 个功能基因, 占 CDS 的 66.87%, 并从生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个维度进行了汇总。在 KEGG 代谢通路分

类中, 共有 1 754 个基因得到注释, 占 CDS 的 31.64%。注释结果显示基因主要分布于全局和概述图谱(global and overview maps), 其次是氨基酸代谢(amino acid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和辅助因子及维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)等。其中丰富的氨基酸转运和代谢相关基因与胺杆菌属细菌较快的生长代谢有关。此外, 碳水化合物代谢中丁酸甲酯代谢通路(butanoate metabolism, map00650)可能与菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的过程有关。在能量代谢中的甲烷代谢通路(methane metabolism, map00680)中存在三甲胺、三甲胺 N-氧化物、一甲胺代谢相关的基因, 这与胺杆菌属细菌的对甲胺降解特性相关。通过 NR 注释, 对菌株 DXTK-010 的蛋白质进行了全面的分析, 涉及物种层面的分类。在 5 541 个 CDS 中, 共有 5 521 个功能基因在 NR 数据库中获得注释, 注释率达 99.59%, 有 53.09% 的基因与 *Aminobacter* 属相关, 19.66% 与 *A. aminovorans* 种相关, 而 12.06% 与

Aminobacter ciceronei 种一致。

2.6.2 菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的功能基因和代谢途径分析

进行菌株 DXTK-010 的功能基因注释时, 在环形质粒 ctg_2 发现了重要基因, 包括一个属于 SDIMOs 的丙烷单加氧酶基因簇(*prmABCD*)、一个 NAD⁺依赖型醇脱氢酶基因(*adh*)以及一个伴侣蛋白基因(*groEL*), 如图 10 所示。丙烷单加氧酶可以催化 1,4-二噁烷的 2-羟基化过程, 并通过醇脱氢酶氧化形成 1,4-二噁烷-2-酮(1,4-dioxane-2-one), 该结构不稳定自动开环形成[2-羟基乙氧基乙酸(2-hydroxyethoxyacetic acid, HEAA)]。丙烷单加氧酶再次催化 HEAA 的 2-羟基化形成 2-羟基乙氧基-2-羟基乙酸(2-hydroxyethoxy-2-hydroxyacetic acid)和 1,2-二羟基乙氧基乙酸(1,2-dihydroxyethoxyacetic acid), 并通过醇脱氢酶将其氧化并开环形成草酸(oxalic acid)、乙二醇(ethylene glycol)和乙醇酸(glycolate)。菌株 DXTK-010 在染色体 ctg_1 和质粒 ctg_2 中存在甲酰辅酶 A 转移酶和草酰辅

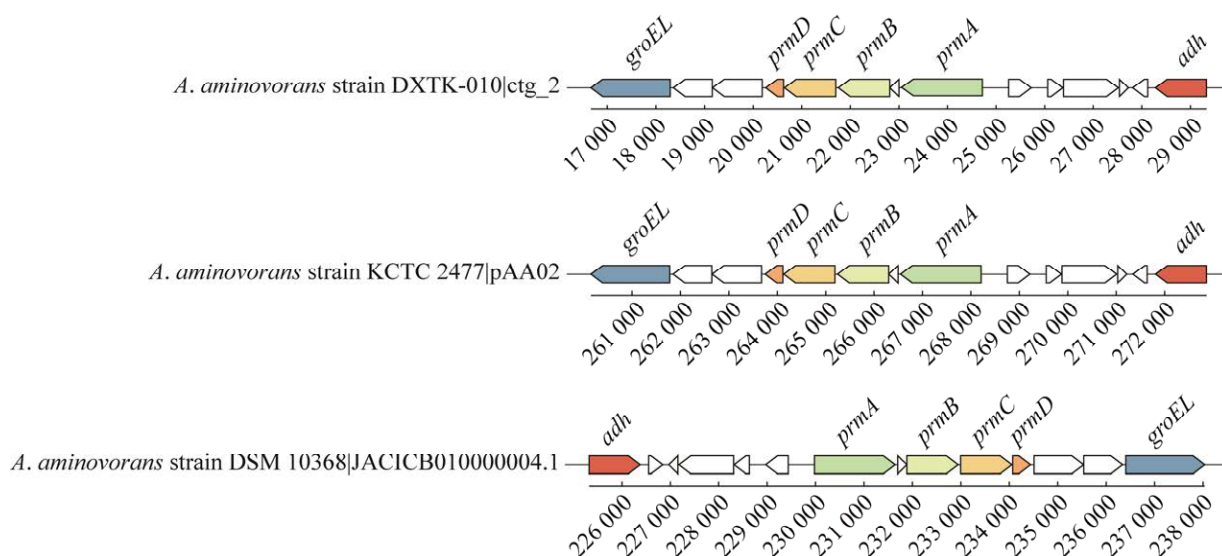


图 10 菌株 DXTK-010 与模式菌株 DSM 10368 和 KCTC 2477 基因组中的丙烷单加氧酶基因簇

Figure 10 Gene cluster of propane monoxygenase in *Aminobacter aminovorans* strains: DXTK-010, DSM 10368 and KCTC 2477.

酶 A 脱羧酶基因(*frc* 和 *oxc*), 甲酰辅酶 A 转移酶(formyl-CoA transferase)和草酰辅酶 A 脱羧酶(oxalyl-CoA decarboxylase)可以将草酸活化脱羧, 催化为甲酸(formate acid)和 CO₂。此外, 其中存在的多种醛脱氢酶、醇脱氢酶和乙醇酸氧化酶基因(*aldh*、*adh* 和 *glc*), 醛脱氢酶、醇脱氢酶和乙醛酸氧化酶将乙二醇和乙醇酸氧化为乙醛酸。结合乙醛酸代谢通路(glyoxylate and dicarboxylate metabolism, map00630)分析, 菌株 DXTK-010 中由 *aceB/glcB* 编码苹果酸合成酶(malate synthase)与乙醛酸反应生成(S)-苹果酸[(S)-malate]进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle), 也可以通过由 *gcl* 编码的乙醛酸聚醛酶(glyoxylate carboligase)、*garR/glxR* 编码的酒石酸半醛还原酶(tartronate semialdehyde reductase)、*gck* 编码的甘油激酶(glycerate 2-kinase)的作用下形成 2-磷酸-D-甘油酸(2-phospho-D-glycerat)进入糖酵解反应生成丙酮酸(pyruvate)后进入三羧酸循环。根据先前研究及全基因分析, 推测菌株 DXTK-010 对 1,4-二噁烷的降解途径如图 11 所示。

对于 DXTK-010 同源性最高的模式菌株(同物异名的 *A. aminovorans* strain KCTC 2477 和 *A. aminovorans* DSM 10368)基因组注释进行分析, 同样发现其质粒上同样存在这一单加氧酶基因簇(图 10), 为后续解胺胺杆菌种成员(*A. aminovorans*)对 1,4-二噁烷降解潜力奠定理论基础。

BLAST 结果表明该丙烷单加氧酶基因与 1,4-二噁烷降解菌 *R. jostii* RHA1 和 *P. dioxanivorans* CB1190 位于 SDIMOs 第 5 族(group-5)的丙烷单加氧酶基因和四氢呋喃/二噁烷单加氧酶基因存在密切发育关系(大亚基氨基酸同源性高于 60%), 其所编码酶的氨基酸同源性均高于 *M. dioxanotrophicus* PH-06 中位于 SDIMOs 第 6 族

(group-6)的丙烷单加氧酶基因所编码酶的氨基酸同源性(表 3)。通过基因共线性分析, 菌株 DXTK-010 与 *R. jostii* RHA1 和 *P. dioxanivorans* CB1190 存在一定进化关系, 但低于 *R. jostii* RHA1 和 *P. dioxanivorans* CB1190 之间的共线性关系(图 12)。

3 讨论

新污染物 1,4-二噁烷广泛存在于水体环境中, 严重威胁水体安全和人类健康。本研究从采集自 1,4-二噁烷污染场地的地下水样本中, 经富集驯化、分离纯化得到一株能以 1,4-二噁烷为唯一碳源且环境适应性强的降解菌株, 经过鉴定命名为 *A. aminovorans* strain DXTK-010。胺杆菌属(*Aminobacter*)是革兰氏阴性好氧菌, 分类学归类为变形菌门、 α -变形菌纲、根瘤菌目、叶杆菌科, 以具有分解甲胺的能力命名^[52]。除甲胺以外, 一些胺杆菌属成员还具有降解甲基卤化物^[53-54]和其他难降解化合物^[55](如草甘膦^[56]、杀线威^[57]、2,6-二氯苯酰胺^[54]、灭多威^[58]、氟啶虫胺脒^[59]、二甲双胍^[60]等)的能力。He 等^[61]通过分析胺杆菌属丰度在 1,4-二噁烷富集过程中的增加, 推测该菌属对 1,4-二噁烷具有潜在代谢能力。本研究中 *A. aminovorans* strain DXTK-010 对 1,4-二噁烷的高效降解能力证实了这一推断。

菌株 DXTK-010 在较宽的环境温度、pH 以及底物浓度下均具有良好的适应性和降解能力。相较于 30 °C 和 37 °C, 在 20 °C 环境温度下无论是在生长降解阶段还是在 Spiking 降解阶段, 1,4-二噁烷的降解速率均有所下降, 这是由于较低的温度影响了菌株 DXTK-010 的生长以及 1,4-二噁烷降解关键酶的活性, 从而降低了其对 1,4-二噁烷的降解能力^[62]。但是菌株 DXTK-010 仍在 20–37 °C 条件下保持较高的降

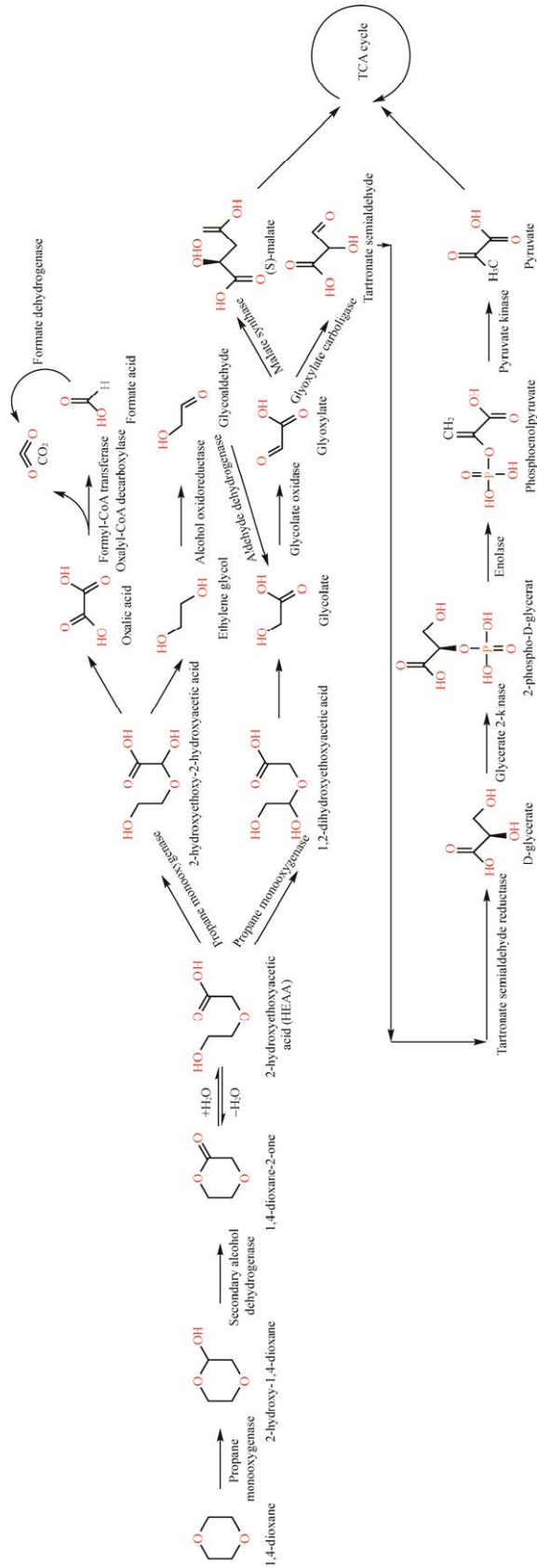


图 11 菌株 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的途径及相关酶

Figure 11 Proposed pathways and enzymes involved in 1,4-dioxane metabolism in strain DXTK-010.

表 3 菌株 RHA1、CB1190、PH-06 与 DXTK-010 的 1,4-二噁烷降解关键酶蛋白组分同源性逐对比较
Table 3 Pairwise comparison of essential enzymatic protein between strain RHA1, CB1190, PH-06 and DXTK-010

Key enzyme component		Hydroxylase α subunit	Reductase	Hydroxylase β subunit	Coupling protein
Group-5 SDIMOs PrMO in DXTK-010	Gene name	<i>prmA</i>	<i>prmB</i>	<i>prmC</i>	<i>prmD</i>
	Number of amino acid residues	555	352	352	122
Group-5 SDIMOs PrMO in RHA1	Gene name	<i>prmA</i>	<i>prmB</i>	<i>prmD</i>	<i>prmC</i>
	Number of amino acid residues	544	370	368	113
	Amino acid identity (%)	64.68	43.47	43.07	44.33
Group-5 SDIMOs THMO/DXMO in CB1190	Gene name	<i>thmA</i>	<i>thmD</i>	<i>thmB</i>	<i>thmC</i>
	Number of amino acid residues	550	351	395	125
	Amino acid identity (%)	60.41	44.57	38.86	41.75
Group-6 SDIMOs PrMO in PH-06	Gene name	<i>prmA</i>	<i>prmD</i>	<i>prmB</i>	<i>prmC</i>
	Number of amino acid residues	512	343	363	105
	Amino acid identity (%)	37.05	36.28	27.16	24.72

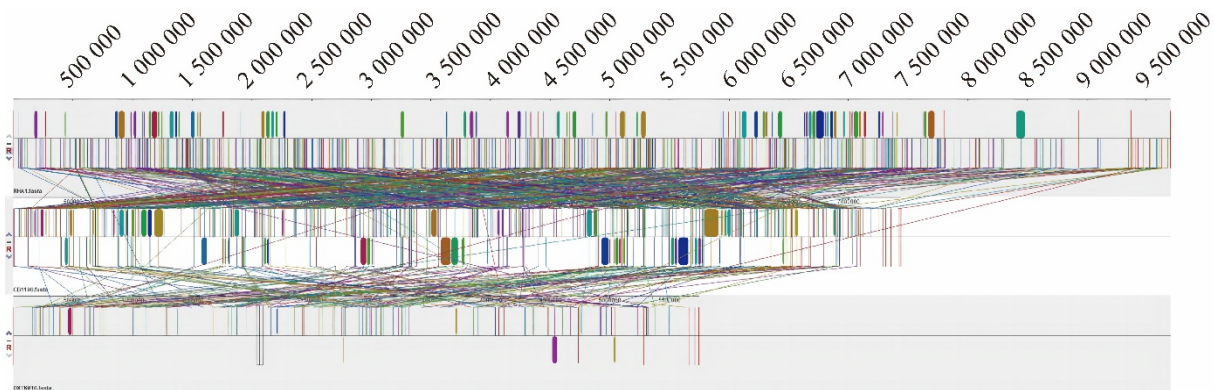


图 12 降解菌株 RHA1、CB1190 和 DXTK-010 的共线性分析

Figure 12 Collinearity analysis of strain RHA1, CB1190 and DXTK-010.

解速率。菌株 DXTK-010 在中性及弱酸性环境中均保持对 1,4-二噁烷较高的降解速率，而在极端的 pH 环境(pH 4.0 或更低，pH 9.0 或更高)中受细胞膜电荷改变从而影响其对营养物质的吸收^[63]。此外，强酸强碱环境还会影响微生物酶的活性，进一步影响细菌的生长，导致

1,4-二噁烷降解速率降低^[62]。随着初始 1,4-二噁烷浓度不断增加，菌株 DXTK-010 的生长延滞期逐渐变长，但降解并未受到抑制，在初始 1,4-二噁烷浓度为 800 mg/L 时，3-6 d 的降解速率可达到 8.149 mg/(L·h)。目前已分离出的大部分降解菌株对环境的适应性有限或降解速率

欠佳。Sei 等^[31]的研究表明降解菌株 *Afipia* sp. D1 和 *Mycobacterium* sp. D6 虽然在 15–35 °C 范围内可完全降解 1,4-二噁烷, 但降解速率受温度影响较大, *Afipia* sp. D1 在 25 °C 时以及 *Mycobacterium* sp. D6 在 35 °C 时菌株的降解速率急剧下降。Inoue 等^[51]对一株不受乙二醇及环醚化合物影响的 1,4-二噁烷降解菌株食醚红球菌(*R. aetherivorans* JCM) 14343 的研究表明, 该菌株可以在较宽的温度范围(5–40 °C)和 pH 范围(4.0–9.0)条件下保持降解活性, 具有耐低温性和耐酸性, 但其降解速率有限。菌株 DXTK-010 在更宽泛的环境条件下具有耐受性和降解能力, 展现出更出色的实际应用潜力。

通过单因素实验优化, 在环境温度为 30 °C, pH 为 7.5, 初始浓度为 50–200 mg/L 的条件下, 菌株 DXTK-010 表现更为优异的降解能力。在生长降解阶段, 可以使用 Logistic 模型很好地描述这一动力学过程, 菌株在进入新的 1,4-二噁烷环境时存在明显迟滞期^[64]。在所有的 Spiking 降解阶段的实验中菌株 DXTK-010 的降解过程可以用零级反应动力学拟合, 菌株在该阶段可以快速利用 1,4-二噁烷促成自身合成代谢, 反应速率保持恒定, 与底物浓度无关, 降解常数随稳定状态下生物量的增大而逐步增大。在与菌株 DXTK-010 相近的实验条件下, 通过 Monod 方程拟合所得参数来对比菌株 DXTK-010 与目前已分离出其他以 1,4-二噁烷为唯一碳源的细菌对 1,4-二噁烷的降解速率, 发现菌株 DXTK-010 的最大比降解速率 V_{max} 与 *Pseudonocardia* sp. N23 和 *Afipia* sp. D1 相近, 而高于大部分已报道的其他菌株^[48]。其中, 包括 Parales 等^[23]在 1994 年分离出的 *P. dioxanivorans* CB1190, 该菌株是迄今为止研究最为深入的菌株^[65]。Yamamoto 等^[48]测定菌株 *P. dioxanivorans* CB1190 在 30 °C 下的 V_{max}

为 0.083 mg 1,4-dioxane/(mg protein·h)。

通过全基因组测序, 获得了 DXTK-010 的完整基因序列, 经过 ANI 和 dDDH 分析进一步确认了该菌株为解胺胺杆菌(*A. aminovorans*)。功能基因分析显示, DXTK-010 菌株含有多个与氨基酸转运与代谢、碳水化合物代谢有关的基因以及与短链脱氢酶相关的基因, 这可能是其高效降解能力的遗传基础。特别值得注意的是, 其质粒 *ctg_2* 上存在一组完整的丙烷单加氧酶基因簇, 上游存在一个醇脱氢酶基因, 下游存在一个伴侣蛋白基因, 这些基因可能参与了该菌株对 1,4-二噁烷的代谢过程。该丙烷单加氧酶有 4 个亚基, 分别是丙烷 2-单加氧酶 α 亚基(由 *prmA* 编码)、丙烷单加氧酶还原酶组分(由 *prmB* 编码)、丙烷 2-单加氧酶 β 亚基(由 *prmC* 编码)以及丙烷单加氧酶偶联蛋白(由 *prmD* 编码)。Mahendra 等^[66]初步验证了母牛分枝杆菌(*Mycobacterium vaccae*) JOB5 携带的丙烷单加氧酶对降解 1,4-二噁烷的作用。Hand 等^[67]推测 *R. jostii* RHA1 所携带的位于 SDIMOs 第 5 族的丙烷单加氧酶相较于该菌所携带的位于 SDIMOs 第 1 族的烷烃单加氧酶^[68]对 1,4-二噁烷具有更强的降解能力。通过与 *R. jostii* RHA1、*M. dioxanotrophicus* PH-06 和 *P. dioxanivorans* CB1190 编码单加氧酶的蛋白序列进行比对, 菌株 DXTK-010 所携带的丙烷单加氧酶与 SDIMOs 第 5 族(而非第 6 族)的丙烷单加氧酶和第 5 族的四氢呋喃/二噁烷单加氧酶具有较高的同源性, 并根据亚基的数量和排列, 推测该丙烷单加氧酶属于可溶性二铁单加氧酶(SDIMOs)的第 5 族^[69]。对菌株 *R. jostii* RHA1、*P. dioxanivorans* CB1190 和 DXTK-010 进行基因共线性分析, 发现相较于 *R. jostii* RHA1 和 *P. dioxanivorans* CB1190 之间有较强的共线性, DXTK-010 与这二者之间共线性相对较低, 表明 DXTK-010 在遗传属

性上与 *R. jostii* RHA1 和 *P. dioxanivorans* CB1190 之间可能存在一定差异, 其遗传特性有待进一步挖掘。

鉴于四氢呋喃/二噁烷单加氧酶和丙烷单加氧酶在 1,4-二噁烷降解机制研究中的关键作用, 这为深入研究菌株 DXTK-010 的功能特性奠定了基础。Vainberg 等^[70]的研究表明, 四氢呋喃单加氧酶能够对 1,4-二噁烷及其相似的环醚进行初步氧化, 形成 2-羟基-1,4-二噁烷, 后被乙醇脱氢酶氧化为 HEAA。Deng 等^[36]也证实了 *M. dioxanotrophicus* PH-06 中位于 SDIMOs 第 6 族的丙烷单加氧酶对 1,4-二噁烷具有生物转化活性, 该单加氧酶通过 2-羟基化催化 1,4-二噁烷分解, 并检测到 HEAA 为中间产物。Mahendra 等^[66]发现菌株 *P. dioxanivorans* CB1190 降解 1,4-二噁烷产生了 HEAA、乙二醇、乙醇酸和草酸等中间产物, 虽然菌株 *P. dioxanivorans* CB1190 通过四氢呋喃/二噁烷单加氧酶完成 1,4-二噁烷起始羟基化, 但其基因组中包含 1 个丙烷单加氧酶基因与菌株 DXTK-010 同属于 SDIMOs 第 5 族, 对 1,4-二噁烷的开环过程也起到一定作用^[71]。Grostern 等^[37]揭示了菌株 *P. dioxanivorans* CB1190 对 1,4-二噁烷的同化机制, 该研究指出 1,4-二噁烷首先通过单加氧酶羟基化作用, 接着经历醇脱氢酶和醛脱氢酶的作用, 生成乙醛酸。乙醛酸作为关键中间产物, 可进一步通过两条不同途径被转化: 一是经过乙醛酸聚醛酶形成磷酸甘油酸通过糖酵解形成丙酮酸(途径一); 二是经过苹果酸合成酶 G 形成苹果酸(途径二), 最终进入三羧酸循环。Wang 等^[72]对 1,4-二噁烷降解菌 *Xanthobacter* sp. YN2 的研究认为甲基营养型细菌可以通过特定酶促反应分解 1,4-二噁烷形成小分子中间产物并进入三羧酸循环。综合以上研究, 推测菌株 DXTK-010 中存在一条完整的 1,4-二噁烷降解

代谢通路, 以 SDIMOs 第 5 族的丙烷单加氧酶催化氧化为 2-羟基-1,4-二噁烷为起点, 随后在乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶、乙醇酸氧化酶的作用下, 完成 1,4-二噁烷开环之后到关键中间产物乙醛酸的降解过程。接着, 通过不同的乙醛酸代谢途径, 经由苹果酸合成酶、乙醛酸聚醛酶、酒石酸半醛还原酶、甘油激酶、烯醇酶和丙酮酸激酶等酶的作用, 分解为苹果酸和丙酮酸进入三羧酸循环过程。

高效降解菌株在实际应用中主要依赖于生物强化技术, 但是目前这些研究仅限于实验室规模以及中试阶段的异位和原位修复实验。在这些实验中, 高效降解菌种被直接或混合投加到 1,4-二噁烷污染废水或地下水中, 或者通过固定化技术将其投入到生物反应器中。Pugazhendi 等^[73]从工业污泥富集菌群中分离出一株 1,4-二噁烷降解菌罗河杆菌(*Rhodanobacter*) AYS5, 在实验室规模的半连续搅拌槽反应器中, 该菌株在短短 5 d 内完全降解了工业废水中高达 263 mg/L 的 1,4-二噁烷, 并实现了生物量的增长。Da Silva 等^[74]通过向含水层流动柱接种菌株 *P. dioxanivorans* CB1190 形成生物强化柱, 并观察到 1,4-二噁烷的降解。然而 *P. dioxanivorans* CB1190 菌体存在聚集现象, 这限制了其在注射口以外的转移和分散效果。Li 等^[71]尝试将菌株 *P. dioxanivorans* CB1190、*M. dioxanotrophicus* PH-06 和 *Azoarcus* sp. DD4 以 1:1:2 的比例混合去除新泽西州垃圾填埋场水样中的 1,4-二噁烷, 在注入丙烷 6-9 d 后, 无论是泵送处理设施的进水和出水样本, 还是羽流源区附近监测井的受污染地下水, 1,4-二噁烷的浓度均低于检测限(即 0.38 $\mu\text{g/L}$), 相较于 *P. dioxanivorans* CB1190 和 *M. dioxanotrophicus* PH-06, *Azoarcus* sp. DD4 具有更高活性和良好的相容性, 更适合作为有效的接种物。此外, Isaka 等^[75]则利用凝胶载体包埋的菌株 *Afipia*

sp. D1 构建了中试生物反应器系统, 该系统能够以 1,4-二噁烷作为唯一的碳源和能量源, 并成功应用于处理某化工厂含 1,4-二噁烷的实际工业废水。值得一提的是, Lippincott 等^[76]利用丙烷生物曝气技术刺激了深层含水层微生物的生长, 并通过引入菌株 *Rhodococcus ruber* ENV425 进行生物强化, 在美国加州范登堡空军基地(Vandenberg air force base, VAFB) 24 号基地的深层含水层中构建了一个丙烷-生物喷射系统; 实验结果表明, 该技术能够有效原位降解 1,4-二噁烷至规定水平。这显示了原位修复技术在处理 1,4-二噁烷污染方面的巨大潜力。虽然生物强化技术在菌株的投加和生物处理系统中的存活与融合方面取得了一定的进展, 但实际应用中需要低成本和较好的环境效益的污水处理技术。因此, 对高效降解菌株的要求更为严格。鉴于此, 新挖掘的 1,4-二噁烷降解菌资源 *A. aminovorans* strain DXTK-010 具有巨大的应用潜力。在后续的实验, 需要进一步深入验证该菌种的功能基因, 为处理实际 1,4-二噁烷污染废水提供技术支持。

本研究明确了胺杆菌属菌株对 1,4-二噁烷的降解能力, 为后续深入研究 1,4-二噁烷的微生物菌群降解机制和降解关键酶提供了参考, 后续的研究将进一步明确 *prmABCD* 基因簇的作用机制, 并开展该菌株在 1,4-二噁烷实际污水处理中的应用研究。

4 结论

本研究从 1,4-二噁烷污染地下水样本中分离获得一株能以 1,4-二噁烷为唯一碳源生长的解胺胺杆菌株 DXTK-010, 丰富了我国 1,4-二噁烷降解菌株资源库, 并拓展了对胺杆菌属在污染物生物降解方面的认知。

菌株 DXTK-010 在温度为 20–37 °C、pH 为

5.0–8.0 和 1,4-二噁烷初始浓度为 2–800 mg/L 的条件下均表现出良好的降解性能。通过单因素实验明确了 DXTK-010 降解 1,4-二噁烷的最适条件: 温度为 30 °C, pH 为 7.5, 1,4-二噁烷初始浓度为 200 mg/L。

在最适条件下, DXTK-010 可以在 24 h 内完全降解 200 mg/L 的 1,4-二噁烷。动力学研究表明, 菌株 DXTK-010 在生长降解阶段符合 Logistic 模型, 而 Spiking 降解阶段由于生物量趋近稳定, 符合零级反应动力学模型。

Monod 模型可以较好地描述菌株 DXTK-010 在不同底物浓度下的降解动力学, 最大比降解速率为 0.224 mg 1,4-dioxane/(mg protein·h), 半饱和浓度为 41.350 mg/L, 细胞产率为 0.130 mg protein/(mg 1,4-dioxane), 表明 DXTK-010 对 1,4-二噁烷具有优异的降解能力。

菌株 DXTK-010 对 1,4-二噁烷的降解可能与其携带的属于 SDIMOs 第 5 族的丙烷单加氧酶基因簇、醇脱氢酶基因、醛脱氢酶基因、乙醇酸氧化酶基因等有关。综上, DXTK-010 是优良的 1,4-二噁烷降解菌, 具备实际水体 1,4-二噁烷污染处理应用的潜力。

REFERENCES

- [1] GÖEN T, von HELDEN F, ECKERT E, KNECHT U, DREXLER H, WALTER D. Metabolism and toxicokinetics of 1,4-dioxane in humans after inhalational exposure at rest and under physical stress[J]. Archives of Toxicology, 2016, 90(6): 1315-1324.
- [2] KIM D-H, BAMAI YA, BELOVA L, BESSEMS J, POMA G, COVACI A. Human exposure to persistent and mobile chemicals: a review of sources, internal levels and health implications[J]. Science of the Total Environment, 2023, 893: 164764.
- [3] TANG YY, MAO XW. Recent advances in 1,4-dioxane removal technologies for water and wastewater treatment[J]. Water, 2023, 15(8): 1535.
- [4] 田坤, 姚丹丹, 赵元添, 郭丽莉, 董元华, 刘云. 环境中 1,4-二(口恶)烷污染处理技术研究进展[J]. 化工

- 进展, 2021, 40(10): 5708-5719.
- TIAN K, YAO DD, ZHAO YT, GUO LL, DONG YH, LIU Y. Advances in 1,4-dioxane remediation methods: a review[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2021, 40(10): 5708-5719 (in Chinese).
- [5] ZENKER MJ, BORDEN RC, BARLAZ MA. Occurrence and treatment of 1,4-dioxane in aqueous environments[J]. *Environmental Engineering Science*, 2003, 20(5): 423-432.
- [6] LIU Y, JOHNSON NW, LIU C, CHEN RH, ZHONG M, DONG YH, MAHENDRA S. Mechanisms of 1,4-dioxane biodegradation and adsorption by bio-zeolite in the presence of chlorinated solvents: experimental and molecular dynamics simulation studies[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(24): 14538-14547.
- [7] GODRI POLLITT KJ, KIM JH, PECCIA J, ELIMELECH M, ZHANG YW, CHARKOFTAKI G, HODGES B, ZUCKER I, HUANG H, DEZIEL NC, MURPHY K, ISHII M, JOHNSON CH, BOISSEVAIN A, O'KEEFE E, ANASTAS PT, ORLICKY D, THOMPSON DC, VASILIOU V. 1,4-dioxane as an emerging water contaminant: state of the science and evaluation of research needs[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 690: 853-866.
- [8] KANO H, UMEDA Y, SAITO M, SENOH H, OHBAYASHI H, AISO S, YAMAZAKI K, NAGANO K, FUKUSHIMA S. Thirteen-week oral toxicity of 1,4-dioxane in rats and mice[J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2008, 33(2): 141-153.
- [9] KANO H, UMEDA Y, KASAI T, SASAKI T, MATSUMOTO M, YAMAZAKI K, NAGANO K, ARITO H, FUKUSHIMA S. Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(11): 2776-2784.
- [10] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 71: re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide[EB/OL]. (1999) IARC Publications Website-Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide (part 1, part 2, part 3).
- [11] ADAMSON DT, PIÑA EA, CARTWRIGHT AE, RAUCH SR, ANDERSON RH, MOHR T, CONNOR JA. 1,4-dioxane drinking water occurrence data from the third unregulated contaminant monitoring rule[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 596/597: 236-245.
- [12] KARGES U, BECKER J, PÜTTMANN W. 1,4-dioxane pollution at contaminated groundwater sites in western Germany and its distribution within a TCE plume[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 619/620: 712-720.
- [13] LESAGE S, JACKSON RE, PRIDDLE MW, RIEMANN PG. Occurrence and fate of organic solvent residues in anoxic groundwater at the Gloucester landfill, Canada[J]. *Environmental Science & Technology*, 1990, 24(4): 559-566.
- [14] ABE A. Distribution of 1,4-dioxane in relation to possible sources in the water environment[J]. *Science of the Total Environment*, 1999, 227(1): 41-47.
- [15] 鹿东华, 夏爱军. 废弃物填埋处理引起有害物质暴露量评价方法研究[J]. *中国环境管理*, 2003(4): 39-40.
- LU DH, XIA AJ. Study of comment method uncovering area for harmful material caused by treatment of waste covering[J]. *China Environmental Management*, 2003(4): 39-40 (in Chinese).
- [16] 王益民. 黄河兰州段水环境污染对鱼类毒性效应研究[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2010.
- WANG YM. The toxic effects of contaminated water on fish species in Lanzhou section of the yellow river[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2010 (in Chinese).
- [17] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda[EB/OL]. (2022-03-21) Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda (who.int).
- [18] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Technical fact sheet 1,4-dioxane[EB/OL]. (2017-11) Document Display|NEPIS|US EPA.
- [19] CHEN RH, LIU C, JOHNSON NW, ZHANG L, MAHENDRA S, LIU Y, DONG YH, CHEN MF. Removal of 1,4-dioxane by titanium silicalite-1: separation mechanisms and bioregeneration of sorption sites[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 371: 193-202.
- [20] CASHMAN MA, KIRSCHENBAUM L, HOLOWACHUK J, BOVING TB. Identification of hydroxyl and sulfate free radicals involved in the reaction of 1,4-dioxane with peroxone activated persulfate oxidant[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 380: 120875.
- [21] KIKANI M, SATASIYA GV, SAHOO TP, KUMAR PS, KUMAR MA. Remedial strategies for abating

- 1,4-dioxane pollution-special emphasis on diverse biotechnological interventions[J]. *Environmental Research*, 2022, 214(Pt 2): 113939.
- [22] BERNHARDT D, DIEKMANN H. Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 36(1): 120-123.
- [23] PARALES RE, ADAMUS JE, WHITE N, MAY HD. Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(12): 4527-4530.
- [24] LI MY, MATHIEU J, YANG Y, FIORENZA S, DENG Y, HE ZL, ZHOU JZ, ALVAREZ PJJ. Widespread distribution of soluble di-iron monooxygenase (SDIMO) genes in Arctic groundwater impacted by 1,4-dioxane[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(17): 9950-9958.
- [25] MASUDA H, McCLAY K, STEFFAN RJ, ZYLSTRA GJ. Biodegradation of tetrahydrofuran and 1,4-dioxane by soluble diiron monooxygenase in *Pseudonocardia* sp. strain ENV478[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(5): 312-316.
- [26] INOUE D, TSUNODA T, SAWADA K, YAMAMOTO N, SAITO Y, SEI K, IKE M. 1,4-dioxane degradation potential of members of the genera *Pseudonocardia* and *Rhodococcus*[J]. *Biodegradation*, 2016, 27(4): 277-286.
- [27] MAHENDRA S, ALVAREZ-COHEN L. Kinetics of 1,4-dioxane biodegradation by monooxygenase-expressing bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(17): 5435-5442.
- [28] SUN BZ, KO K, RAMSAY JA. Biodegradation of 1,4-dioxane by a *Flavobacterium*[J]. *Biodegradation*, 2011, 22(3): 651-659.
- [29] KIM YM, JEON JR, MURUGESAN K, KIM EJ, CHANG YS. Biodegradation of 1,4-dioxane and transformation of related cyclic compounds by a newly isolated *Mycobacterium* sp. PH-06[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(4): 511-519.
- [30] 王樱凝. *Xanthobacter dioxanivorans* sp. nov.降解二噁烷的特性及其基因调控机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2022.
- WANG YN. Characteristics and gene regulation mechanism of 1,4-dioxane degradation by *Xanthobacter dioxanivorans* sp. nov.[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2022 (in Chinese).
- [31] SEI K, MIYAGAKI K, KAKINOKI T, FUKUGASAKO K, INOUE D, IKE M. Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source[J]. *Biodegradation*, 2013, 24(5): 665-674.
- [32] ZHOU YY, HUANG HL, SHEN DS. Multi-substrate biodegradation interaction of 1,4-dioxane and BTEX mixtures by *Acinetobacter baumannii* DD1[J]. *Biodegradation*, 2016, 27(1): 37-46.
- [33] DENG DY, PHAM DN, LI F, LI MY. Discovery of an inducible toluene monooxygenase that cooxidizes 1,4-dioxane and 1,1-dichloroethylene in propanotrophic *Azoarcus* sp. strain DD4[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(17): e01163-20.
- [34] MA F, WANG YN, YANG JX, GUO HJ, SU DL, YU L. Degradation of 1,4-dioxane by *Xanthobacter* sp. YN2[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(3): 992-1005.
- [35] LI MY, MATHIEU J, LIU YY, van ORDEN ET, YANG Y, FIORENZA S, ALVAREZ PJJ. The abundance of tetrahydrofuran/dioxane monooxygenase genes (*thmA/dxmA*) and 1,4-dioxane degradation activity are significantly correlated at various impacted aquifers[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2014, 1(1): 122-127.
- [36] DENG DY, LI F, LI MY. A novel propane monooxygenase initiating degradation of 1,4-dioxane by *Mycobacterium dioxanotrophicus* PH-06[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2018, 5(2): 86-91.
- [37] GROSTERN A, SALES CM, ZHUANG WQ, ERBILGIN O, ALVAREZ-COHEN L. Glyoxylate metabolism is a key feature of the metabolic degradation of 1,4-dioxane by *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3298-3308.
- [38] XIONG Y, MASON OU, LOWE A, ZHOU C, CHEN G, TANG YN. Microbial community analysis provides insights into the effects of tetrahydrofuran on 1,4-dioxane biodegradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(11): e00244-e00219.
- [39] HUANG HL, SHEN DS, LI N, SHAN D, SHENTU JL, ZHOU YY. Biodegradation of 1,4-dioxane by a novel strain and its biodegradation pathway[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2014, 225(9): 2135.
- [40] Dawes EA. Growth and Survival of Bacteria. In: Poindexter JS, Leadbetter ER (eds). *Bacteria in Nature*, vol 3.[M]. Boston, MA: Springer, 1989.
- [41] SIMMER RA, RICHARDS PM, EWALD JM, SCHWARZ C, Da SILVA MLB, MATHIEU J, ALVAREZ PJJ, SCHNOOR JL. Rapid metabolism of

- 1,4-dioxane to below health advisory levels by thiamine-amended *Rhodococcus ruber* strain 219[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2021, 8(11): 975-980.
- [42] SHI L, LIANG ZH, LI JR, XU YC, HUANG KL, TIAN JJ, HE XY, XU WT. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(9): 1879-1885.
- [43] YE J, MCGINNIS S, MADDEN TL. BLAST: improvements for better sequence analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl_2): W6-W9.
- [44] QI MY, LIANG B, ZHANG L, MA XD, YAN L, DONG WC, KONG DY, ZHANG LY, ZHU HZ, GAO SH, JIANG JD, LIU SJ, CORVINI PFX, WANG AJ. Microbial interactions drive the complete catabolism of the antibiotic sulfamethoxazole in activated sludge microbiomes[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(5): 3270-3282.
- [45] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R, OLIVER GLÖCKNER F, PEPLIES J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. Bioinformatics, 2016, 32(6): 929-931.
- [46] AUCH AF, von JAN M, KLENK HP, GÖKER M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison[J]. Standards in Genomic Sciences, 2010, 2(1): 117-134.
- [47] DARLING ACE, MAU B, BLATTNER FR, PERNA NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. Genome Research, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [48] YAMAMOTO N, SAITO Y, INOUE D, SEI K, IKE M. Characterization of newly isolated *Pseudonocardia* sp. N23 with high 1,4-dioxane-degrading ability[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(5): 552-558.
- [49] HE Y, MATHIEU J, YANG Y, YU PF, Da SILVA MLB, ALVAREZ PJJ. 1,4-dioxane biodegradation by *Mycobacterium dioxanotrophicus* PH-06 is associated with a group-6 soluble di-iron monooxygenase[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2017, 4(11): 494-499.
- [50] DENG DY, LI F, WU C, LI MY. Synchronic biotransformation of 1,4-dioxane and 1,1-dichloroethylene by a Gram-negative propanotroph *Azoarcus* sp. DD4[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2018, 5(8): 526-532.
- [51] INOUE D, TSUNODA T, YAMAMOTO N, IKE M, SEI K. 1,4-dioxane degradation characteristics of *Rhodococcus aetherivorans* JCM 14343[J]. Biodegradation, 2018, 29(3): 301-310.
- [52] URAKAMI T. *Aminobacter*, in Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria[EB/OL]. (2015-09-14) *Aminobacter*-Urakami-Major Reference Works-Wiley Online Library.
- [53] HANCOCK TL, COSTELLO AM, LIDSTROM ME, OREMLAND RS. Strain IMB-1, a novel bacterium for the removal of methyl bromide in fumigated agricultural soils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2899-2905.
- [54] COULTER C, HAMILTON JT, McROBERTS WC, KULAKOV L, LARKIN MJ, HARPER DB. Halomethane: bisulfide/halide ion methyltransferase, an unusual corrinoid enzyme of environmental significance isolated from an aerobic methylotroph using chloromethane as the sole carbon source[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4301-4312.
- [55] ARTUSO I, TURRINI P, PIROLO M, LUGLI GA, VENTURA M, VISCA P. Phylogenomic reconstruction and metabolic potential of the genus *Aminobacter*[J]. Microorganisms, 2021, 9(6): 1332.
- [56] GORODYLOVA N, MICHEL C, SERON A, JOULIAN C, DELORME F, BRESCH S, GARREAU C, GIOVANNELLI F, MICHEL K. Modified zeolite-supported biofilm in service of pesticide biodegradation[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(33): 45296-45316.
- [57] OSBORN RK, HAYDOCK PPJ, EDWARDS SG. Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(6): 998-1000.
- [58] ZHANG C, YANG Z, JIN W, WANG X, ZHANG Y, ZHU S, YU X, HU G, HONG Q. Degradation of methomyl by the combination of *Aminobacter* sp. MDW-2 and *Afipia* sp. MDW-3[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(4): 289-296.
- [59] YANG WL, DAI ZL, CHENG X, GUO L, FAN ZX, GE F, DAI YJ. Sulfoxaflo degraded by *Aminobacter* sp. CGMCC 1.17253 through hydration pathway mediated by nitrile hydratase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(16): 4579-4587.
- [60] LI T, XU ZJ, ZHOU NY. Aerobic degradation of the antidiabetic drug metformin by *Aminobacter* sp. strain

- NyZ550[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(3): 1510-1519.
- [61] HE Y, MATHIEU J, Da SILVA MLB, LI MY, ALVAREZ PJJ. 1,4-dioxane-degrading consortia can be enriched from uncontaminated soils: prevalence of *Mycobacterium* and soluble di-iron monooxygenase genes[J]. *Microbial Biotechnology*, 2018, 11(1): 189-198.
- [62] 张甲耀, 宋碧玉, 陈兰洲, 郑连爽. 环境微生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2008.
- ZHANG JY, SONG BY, CHEN LZ, ZHENG LS. *Environmental Microbiology*[M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2008 (in Chinese).
- [63] 陈燕飞. pH 对微生物的影响[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2009, 8(3): 121-124, 131.
- CHEN YF. pH to uygur biology influence[J]. *Journal of Taiyuan Normal University (Natural Science Edition)*, 2009, 8(3): 121-124, 131 (in Chinese).
- [64] ROLFE MD, RICE CJ, LUCCHINI S, PIN C, THOMPSON A, CAMERON ADS, ALSTON M, STRINGER MF, BETTS RP, BARANYI J, PECK MW, HINTON JCD. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(3): 686-701.
- [65] SAMADI A, POUR AK, GAGNON G. Biodegradation of 1,4-dioxane in a continuous-flow bioelectrochemical reactor by biofilm of *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190 and microbial community on conductive carriers[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 337: 122572.
- [66] MAHENDRA S, PETZOLD CJ, BAIDOO EE, KEASLING JD, ALVAREZ-COHEN L. Identification of the intermediates of *in vivo* oxidation of 1,4-dioxane by monooxygenase-containing bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(21): 7330-7336.
- [67] HAND S, WANG BX, CHU KH. Biodegradation of 1,4-dioxane: effects of enzyme inducers and trichloroethylene[J]. *The Science of the Total Environment*, 2015, 520: 154-159.
- [68] SHARP JO, SALES CM, LeBLANC JC, LIU J, WOOD TK, ELTIS LD, MOHN WW, ALVAREZ-COHEN L. An inducible propane monooxygenase is responsible for N-nitrosodimethylamine degradation by *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6930-6938.
- [69] COLEMAN NV, BUI NB, HOLMES AJ. Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1228-1239.
- [70] VAINBERG S, McCLAY K, MASUDA H, ROOT D, CONDEE C, ZYLSTRA GJ, STEFFAN RJ. Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia* sp. strain ENV478[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5218-5224.
- [71] LI F, DENG DY, WADDEN A, PARVIS P, CUTT D, LI MY. Effective removal of trace 1,4-dioxane by biological treatments augmented with propanotrophic single culture versus synthetic consortium[J]. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 2023, 9: 100246.
- [72] WANG YN, MA F, YANG JX, GUO HJ, SU DL, YU L. Adaption and degradation strategies of methylotrophic 1,4-dioxane degrading strain *Xanthobacter* sp. YN2 revealed by transcriptome-scale analysis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10435.
- [73] PUGAZHENDI A, RAJESH BANU J, DHAVAMANI J, YEOM IT. Biodegradation of 1,4-dioxane by *Rhodanobacter* AYS5 and the role of additional substrates[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(4): 2201-2208.
- [74] Da SILVA MLB, HE Y, MATHIEU J, ALVAREZ PJJ. Enhanced long-term attenuation of 1,4-dioxane in bioaugmented flow-through aquifer columns[J]. *Biodegradation*, 2020, 31(3): 201-211.
- [75] ISAKA K, UDAGAWA M, SEI K, IKE M. Pilot test of biological removal of 1,4-dioxane from a chemical factory wastewater by gel carrier entrapping *Afipia* sp. strain D1[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 304: 251-258.
- [76] LIPPINCOTT D, STREGER SH, SCHAEFER CE, HINKLE J, STORMO J, STEFFAN RJ. Bioaugmentation and propane biosparging for *in situ* biodegradation of 1,4-dioxane[J]. *Groundwater Monitoring & Remediation*, 2015, 35(2): 81-92.

(本文责编 郝丽芳)