

研究报告

紫金牛叶杆菌 RC6b 及其诱变菌株对二苯砷酸的降解特征

宋芳^{1,2} 涂晨¹ 朱濛^{1,2} 刘颖¹ 骆永明^{1,2*}

(1. 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 烟台海岸带研究所 山东 烟台 264003)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【目的】阐明紫金牛叶杆菌 *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b 及其诱变菌株对二苯砷酸(Diphenylarsinic acid, DPAA)的降解特征与代谢产物。【方法】以紫金牛叶杆菌 RC6b 为出发菌株,分别以蔗糖、葡萄糖和乙酸钠为外加碳源,优化共代谢降解条件;采用亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG)对出发菌株进行化学诱变,比较诱变前后菌株对 DPAA 降解能力的变化,鉴定诱变菌株对 DPAA 的降解代谢产物。【结果】以 DPAA 为唯一碳源时,培养 28 d 后 RC6b 菌株对 DPAA 的降解率低于 2%;分别添加蔗糖、葡萄糖和乙酸钠为外加碳源培养 28 d 后,DPAA 的降解率显著提高,分别达到 14.08%、15.21%和 15.05%;采用 250 μg/mL 的 NTG 诱变后获得 3 株诱变菌,在以 DPAA 为唯一碳源培养 28 d 后,3 株诱变菌对 DPAA 的降解率与出发菌株相比均显著提高,其中 N-RC6b2 对 DPAA 的降解率最高,达 36.71%;代谢产物鉴定结果表明,诱变菌株 N-RC6b2 对 DPAA 的代谢产物中有单羟基化 DPAA 的生成。【结论】RC6b 出发菌株难以直接利用 DPAA 为唯一碳源生长,外加蔗糖、葡萄糖和乙酸钠等共代谢碳源可显著提高菌株 RC6b 对 DPAA 的降解率;NTG 化学诱变可进一步提高 RC6b 菌株对 DPAA 的降解效果,代谢产物为单羟基化 DPAA。

关键词: 二苯砷酸,紫金牛叶杆菌,共代谢降解,化学诱变,代谢产物

Diphenylarsinic acid degradation by *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b and its mutants

SONG Fang^{1,2} TU Chen¹ ZHU Meng^{1,2} LIU Ying¹ LUO Yong-Ming^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Coastal Environmental Process and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

(2. University of Chinese Academic of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] To clarify the ability of *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b and its mutant strains to degrade diphenylarsinic acid (DPAA). [Methods] The conditions for the co-metabolic degradation of DPAA were optimized with *P. myrsinacearum* RC6b as the original strain and with sucrose, glucose and sodium acetate as different external carbon sources. Strain

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41230858, 41571310)

*Corresponding author: Tel: 86-535-2109007; E-mail: ymluo@yic.ac.cn

Received: January 14, 2017; Accepted: May 08, 2017; Published online (www.cnki.net): June 06, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41230858, 41571310)

*通讯作者: Tel: 86-535-2109007; E-mail: ymluo@yic.ac.cn

收稿日期: 2017-01-14; 接受日期: 2017-05-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-06

RC6b was chemically mutated using treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). The DPAA degradation rate was compared before and after chemical mutagenesis, and the metabolite of DPAA by RC6b mutants was also analyzed. **[Results]** The DPAA degradation rate was <2% after 28 days of incubation when using DPAA as the sole carbon source. After addition of sucrose, glucose and sodium acetate as external carbon sources the DPAA degradation rate increased significantly, by 14.08%, 15.21% and 15.05%, respectively. Three mutant strains of strain RC6b were obtained using 250 $\mu\text{g/mL}$ NTG as chemical mutagen. All three RC6b mutants showed significantly higher DPAA degradation rates than did the original strain. Mutant strain N-RC6b2 showed the highest DPAA degradation rate of 36.71% after 28 days of incubation when using DPAA as the sole carbon source. The main degradation metabolite of DPAA by strain N-RC6b2 was identified as monohydroxylated DPAA. **[Conclusion]** The original RC6b strain grew only sparingly using DPAA as the sole carbon source. Addition of co-metabolic carbon sources such as sucrose, glucose and sodium acetate significantly enhanced the biodegradation of DPAA. The chemical mutagen NTG further enhanced the biodegradation of DPAA, with monohydroxylated DPAA as the main intermediate product.

Keywords: Diphenylarsinic acid, *Phyllobacterium myrsinacearum*, Co-metabolic degradation, Chemical mutagenesis, Metabolites

二苯砷酸(Diphenylarsinic acid, DPAA)是含砷化学武器的主要降解产物之一。在一战和二战期间,大量苯砷类化合物用于制造化学武器。其中,二苯氰砷和二苯氯砷是典型的刺激性毒气,也是日军在我国大陆使用最多的被标记为“红剂”的砷霜类毒物联苯化砷^[1]。战后,这类化学武器主要通过就地掩埋或投入江河湖海等方式进行处置^[2-4]。我国是日军遗留化学武器最大的受害者,目前我国19个省市近百个地点发现了约200万枚日军遗留化学武器,其中大部分集中在东北地区^[5-6]。埋藏在土壤或水体中的化学武器经长期腐蚀,弹体内的苯砷类化合物极易释放进入环境中,其中,二苯氰砷和二苯氯砷在环境中极不稳定,易发生水解氧化并生成稳定的DPAA^[7]。DPAA具有较强的神经毒性和遗传毒性,并能够通过食物链等途径危害人体健康^[3,8-9]。因此,亟需开展有关污染土壤和地下水中DPAA的降解特征与修复技术研究。

基于降解的微生物修复因具有成本低、修复面积广和不易造成二次污染等优点^[10],已被广泛应用于有机污染土壤和地下水的修复治理中。但目前国际上有关DPAA污染土壤和地下水微生物修复的研究仍非常有限,其中主要原因之一是由

于DPAA的细胞毒性较高,难以筛选获得能直接利用DPAA为唯一碳源的DPAA高效降解微生物菌株^[11]。共代谢降解是微生物应对此类高毒性、难降解类有机污染物的一种重要代谢方式,原本不能或不易被降解代谢的污染物在外加碳源或小分子共代谢基质的情况下能够被共代谢降解^[12-13]。Nakamiya等^[11]以甲苯为共代谢基质,从DPAA污染土壤中筛选出了一株栖息微球菌(*Kytococcus sedentarius*) NK0508,该菌株可在DPAA浓度为0.03 $\mu\text{mol/L}$ 的矿物盐培养基中存活3 d。此外,化学诱变和基因组重组技术也常被用于快速改变微生物的表型特征,进而影响微生物对有机污染物的降解代谢能力^[14]。亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, NTG)是烷化剂类诱变剂的一种,其诱变机理是使DNA分子上的碱基及磷酸部分烷化,导致DNA在复制时碱基配对错误而产生突变,进而影响微生物代谢途径^[15-17]。而目前国际上有关利用共代谢手段提高微生物对DPAA降解能力的研究仍非常罕见,有关化学诱变强化DPAA微生物降解的效应与机理的研究尚无报道。因此,筛选我国本土的DPAA高效降解菌种资源,研究DPAA降解菌的共代谢降解与化学诱变强化效应,并阐明降解菌及其诱变菌株对DPAA的降解

特征,对于发展我国化学武器残留区有机砷污染土壤的微生物修复原理与技术具有重要的科学与现实意义。

鉴于此,本研究以课题组前期从镉、锌、砷等重金属复合污染土壤中筛选获得的一株重金属高耐性菌株——紫金牛叶杆菌(*Phyllobacterium myrsinacearum*) RC6b 为供试菌株^[18],比较研究了添加不同共代谢碳源以及采用 NTG 进行化学诱变前后,RC6b 菌株对 DPAA 的降解特征,鉴定了 RC6b 诱变菌株对 DPAA 的代谢产物,旨在为研发 DPAA 污染土壤和地下水的高效微生物修复技术提供菌株资源和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本实验所用菌株为实验室前期筛选保存的一株植物内生菌紫金牛叶杆菌(*Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b, CGMCC 6621)。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

DPAA 标准品购于日本 Wako 公司,纯度 97%,其分子结构如图 1 所示。

LB 液体培养基(富集培养基, g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 6.8–7.0。R2A 培养基(g/L): 酵母提取物 0.50, 蛋白胨 0.50, 酪蛋白氨基酸 0.50, 葡萄糖 0.50, 可溶性淀粉 0.50, K_2HPO_4 0.30, 丙酮酸钠 0.30, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, 固体培养基添加 15%–20%琼脂。矿物盐培养基(g/L): NH_4NO_3 0.500, KH_2PO_4 1.000, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.200, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005, 维生素溶液 10.0 mL, 微量元素溶液 10.0 mL, pH 7.0; 其中维生素溶液

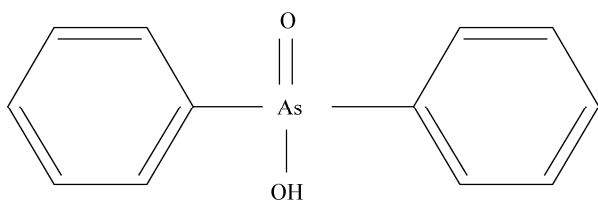


图 1 二苯砷酸的分子结构图

Figure 1 Molecular structure of diphenylarsinic acid

(mg/L): 维生素 H 10.0, 泛酸钙 25.0, 烟酸 100.0, 4-氨基苯甲酸 500.0, 氰钴胺 20.0, 硫铵 50.0, 吡哆胺 250.0; 微量元素溶液(mg/L): EDTA 二钠 500.0, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 5.0, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 24.0, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 5.0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10.0, H_3BO_4 30.0, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5.0, $Ca(OH)_2$ 50.0。DPAA 降解培养基: 向矿物盐培养基中添加 2 mg/L DPAA 粉末溶解。柠檬酸盐缓冲溶液(g/L): 柠檬酸 21.0, NaOH 8.8, 用 2 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 5.5。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS, g/L): NaH_2PO_4 8.3, Na_2HPO_4 4.8, pH 7.2–7.4; 0.01 mol/L PBS: NaH_2PO_4 7.8, Na_2HPO_4 17.9, pH 7.0。亚硝基胍(NTG)储备液: 称取亚硝基胍 10 mg 于 1.0 mL 丙酮中溶解后,加水定容至 10 mL, 制成 1.0 mg/mL 的 NTG 储备液,新鲜制备。

DPAA 浓度采用高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS/MS)分析(TSQ Quantum Access MAX, 美国 Thermo 公司),具体液相分离条件和质谱参数见文献[19]。降解菌生长情况采用 Genesys 10S UV-VIS 分光光度计(美国 Thermo 公司)测定 OD_{600} 值进行评价。

1.3 实验方法

1.3.1 不同共代谢碳源对 RC6b 菌株降解二苯砷酸特征的影响试验: 挑取 RC6b 菌株于 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 避光恒温振荡培养。将培养至对数生长期的 RC6b 菌株于 5 000 r/min 离心 5 min, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次后离心(同前)收集菌体, 用矿物盐培养基重悬, 调节 OD_{600} 值至 1.0 左右, 制成 RC6b 菌悬液备用。

按 10%接种量接种上述 RC6b 菌悬液于 DPAA 降解培养基(含 DPAA 2 mg/L)中, 分别添加蔗糖、葡萄糖和乙酸钠于 DPAA 降解培养基中, 各碳源的浓度均为 2 mg/L, 同时设置灭活菌株作为对照组, 每个处理设 3 个重复, 于 28 °C、180 r/min 进行避光振荡培养, 并分别于 0、3、7、14、21 和 28 d 取样测定溶液中 DPAA 的浓度和降解菌生长情况。DPAA 的降解率按公式(1)计算。

降解率 =

$$\frac{\text{对照组DPAA浓度} - \text{实验组DPAA浓度}}{\text{对照组DPAA浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 菌株 RC6b 的 NTG 化学诱变试验: NTG 诱变的实验方法参考 Miller^[20] 并做适当修改。将 RC6b 菌株在 R2A 液体培养基中培养 48 h, 于 4 °C、9 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体, 用 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液清洗 2 遍后, 将获得的菌体重悬于 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液, 分别添加不同浓度(50、100、250 μg/mL)的 NTG 诱变剂, 于 37 °C 水浴中静置反应 45 min 后离心收集菌体^[21], 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 将获得的菌体重悬于 10 mL R2A 液体培养基中培养过夜。将培养过夜的菌液稀释后涂布于 R2A 固体培养基上, 置于 28 °C 恒温培养。待诱变处理的菌液长出菌落后进行计数, 以未经诱变的菌液作对照, 按公式(2) 计算致死率。

致死率 =

$$\frac{\text{未诱变对照菌落数} - \text{亚硝基胍诱变菌落数}}{\text{未诱变对照菌落数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3 RC6b 诱变菌株对 DPAA 的降解性能测试: 从达到致死率要求的处理平板中选取菌落较大、边缘整齐且相对较早长出的单个菌落进行划线培养, 进一步分离纯化获得诱变菌株。选择长势较好的 3 株诱变菌株, 按 10% 接种量接种菌悬液于 DPAA 降解培养基中, 同时设置灭活菌株作为对照组。每个处理设 3 个重复, 于 28 °C、180 r/min 进行避光振荡培养, 并分别于 0、3、7、14、21 和 28 d 取样测定溶液中 DPAA 的浓度和降解菌生长情况, 测定方法同 1.3.1。

1.3.4 降解菌对 DPAA 代谢产物的鉴定分析: 代谢产物均用 Thermo Fisher LCQ Fleet 型离子阱质谱鉴定, 检测模式为正离子模式, 色谱分离条件同 DPAA 检测的分离条件。

1.3.5 数据处理与分析: 采用 Microsoft Excel 2010 进行数据统计并作图, 采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同外加碳源对溶液中 RC6b 菌株共代谢降解 DPAA 效率的影响

添加不同碳源后, RC6b 菌株对 DPAA 的降解率及菌株 OD_{600} 值随培养时间的变化曲线分别如图 2 和图 3 所示。由图 2 和图 3 可知, 在以 DPAA 为唯一碳源的溶液培养体系中, RC6b 菌株对 DPAA 的降解率低于 2%, 且细菌数量在整个培养期内几乎没有增长, 这提示菌株 RC6b 难以直接利用 DPAA 为唯一碳源和能源而生长。分别添加蔗糖、葡萄糖和乙酸钠作为外加碳源后, DPAA 的降解率均得到显著提高($P < 0.05$), 培养 28 d 后

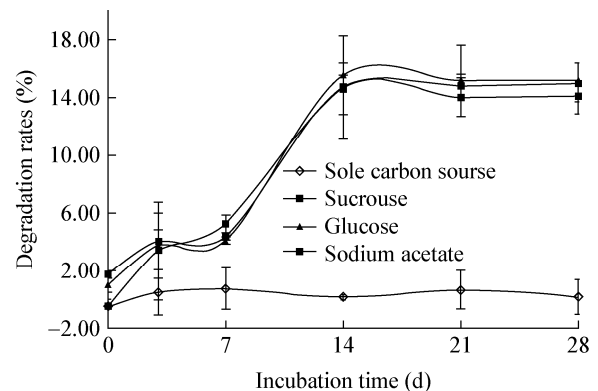


图 2 不同碳源条件下菌株 RC6b 对 DPAA 的降解率
Figure 2 Degradation rates of DPAA by strain RC6b utilizing different carbon sources

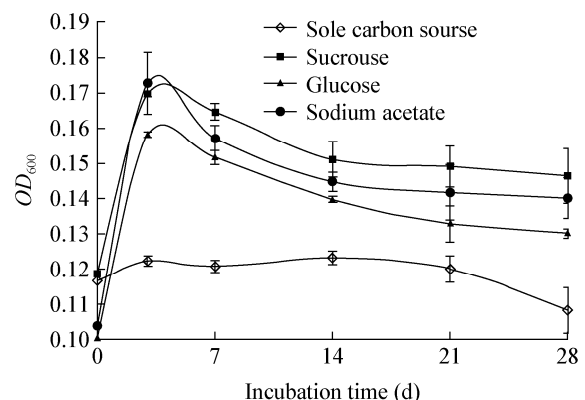


图 3 不同碳源条件下液体培养系统菌株 RC6b 的生长情况
Figure 3 Growth of strain RC6b in a liquid culture system with different carbon sources

对 DPAA 的降解率分别达到 $14.08\% \pm 1.20\%$ 、 $15.21\% \pm 1.21\%$ 和 $15.05\% \pm 1.36\%$, 但不同碳源处理之间的 DPAA 降解率无显著性差异 ($P > 0.05$)。因此, 后续实验选取降解效率相对较高的葡萄糖作为诱变菌株共代谢降解的外加碳源。

从图 3 可以看出, 外加碳源处理组在培养前 3 天 RC6b 快速生长, OD_{600} 值从 0.11 左右快速升高至 0.17 左右, 与此同时 DPAA 基本未发生降解; 随后溶液 OD_{600} 值缓慢下降, DPAA 降解率有所提高, 并在培养至 14 d 时达最大值, 然后逐渐趋于稳定(图 2)。造成此现象的原因可能是, RC6b 在培养前期主要利用外加碳源进行快速生长繁殖, 由于易利用的外加碳源的存在, 抑制了 RC6b 对 DPAA 的降解; 随着外加碳源浓度的降低, 细菌开始利用部分 DPAA 作为碳源, 使培养后期 DPAA 降解率逐渐提高。但由于 DPAA 的毒性抑制了细菌的继续增殖, 导致培养后期的 OD_{600} 值逐渐下降^[22], 同时 DPAA 的降解率也趋于稳定。这一趋势与 Nakamiya 等^[11]的研究结果相似, 该研究先以 DPAA 为唯一碳源, 拟从污染土壤中筛选富集 DPAA 降解菌但未能成功; 考虑到 DPAA 的苯环结构及其生物毒性, 改为向溶液体系中添加甲苯为唯一碳源后, 成功地从 DPAA 污染土壤中筛选出了一株栖息微球菌(*Kytococcus sedentarius*) NK0508, 该菌株可在 DPAA 浓度为 $0.03 \mu\text{mol/L}$ 的矿物盐培养基中存活 3 d; 此后, DPAA 的毒性仍抑制了菌株 NK0508 的进一步生长与增殖。

2.2 RC6b 的 NTG 化学诱变株对 DPAA 的降解效应

首先探讨了化学诱变剂亚硝基胍(NTG)的不同剂量对菌株 RC6b 生长的影响。随着诱变剂 NTG 浓度的提高, RC6b 菌株的致死率显著提高。当 NTG 的浓度分别为 50、100、250 $\mu\text{g/mL}$ 时, RC6b 菌株的致死率分别为 33.9%、64.4% 和 78.0%。张春玲(2004)^[23]和田雪娇等(2014)^[24]分别采用 NTG 诱变选育高产海藻糖菌株和高产苯乳酸菌株时均发现, 当 NTG 浓度控制在诱变致死率为 75%–80% 时的诱

变效果较好, 且更有利于增加正向突变频率。因此, 本实验选择 NTG 的诱变浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$, 此时的菌株诱变致死率为 78%。

经 NTG 诱变后获得 3 株长势良好的诱变菌株, 分别编号为 N-RC6b1、N-RC6b2 和 N-RC6b3, 3 株诱变菌对 DPAA 的降解率及溶液 OD_{600} 值随培养时间的变化曲线如图 4 和图 5 所示。

由图 4 可见, 3 株诱变菌对 DPAA 的降解能力均呈现随培养时间延长不断提高的趋势。在以 DPAA 为唯一碳源的条件下培养 28 d 后, N-RC6b1、N-RC6b2 和 N-RC6b3 对 DPAA 的降解率分别达到 $26.29\% \pm 0.52\%$ 、 $36.71\% \pm 0.62\%$ 和 $24.21\% \pm 0.62\%$ 。与出发菌株相比, 3 株诱变菌对 DPAA 的降解能力

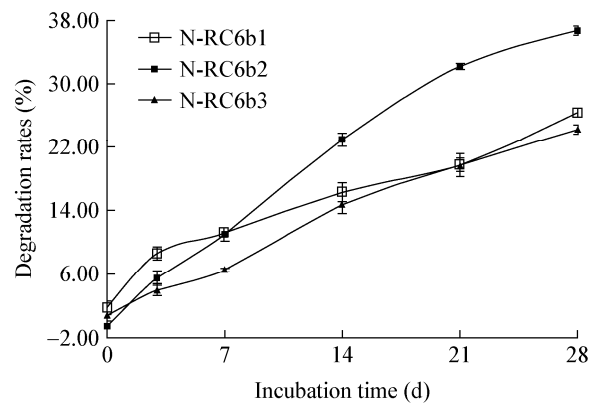


图 4 RC6b 的诱变菌株对 DPAA 的降解率
Figure 4 Degradation rates of DPAA by mutant strain RC6b

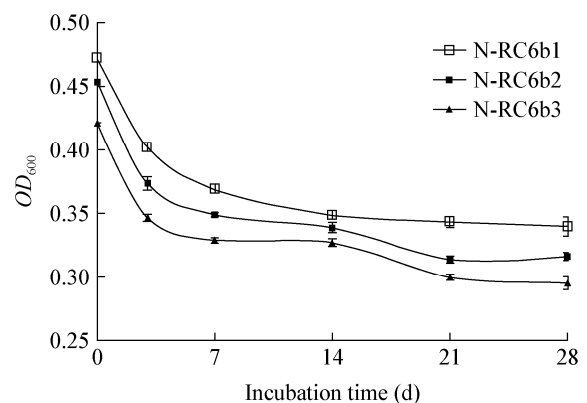


图 5 唯一碳源条件下溶液中诱变菌株的生长情况
Figure 5 Growth of mutant strains in a solution system with sole carbon sources

均得到了显著提高。Ren 等^[25]的研究发现,诱变剂 NTG 对亚硝酸降解菌——乳酸杆菌同样具有较强的诱变效应。与出发菌株相比,诱变菌株对亚硝酸盐的降解率可显著提高 5.8%–12.7%。然而在整个培养过程中,溶液 OD_{600} 值呈先快速后缓慢下降,最后趋于稳定的趋势。其原因可能是 NTG 化学诱变改变了菌株 RC6b 对 DPAA 的代谢方式,激活了细菌中原本未表达的基因,使诱变菌株对 DPAA 的降解能力较出发菌株有显著提高。然而,DPAA 的降解可能产生了毒性更强的中间代谢产物,导致降解菌的增殖速度减缓、死亡速率增加,从而使溶液 OD_{600} 值表现出下降趋势。

图 6 显示了以葡萄糖作为外加碳源条件下,3 株诱变菌株对 DPAA 的降解动态。由图 6 可知,外加葡萄糖作为共代谢基质时,3 株诱变菌对 DPAA 的降解率均随时间增加而逐渐提高,且外加碳源显著促进了诱变菌株在反应初期(7 d 内)对 DPAA 的快速降解;但到反应后期(14–28 d),诱变菌对 DPAA 的降解速率显著减缓,到培养结束时(28 d),3 株诱变菌株对 DPAA 的降解率最高仅为 $23.81\% \pm 2.07\%$,与以 DPAA 为唯一碳源的处理相比反而略有降低。可能的原因是,在外源添加葡萄糖后的 0–7 d 内,培养基中存在大量的速效碳源供菌株生长繁殖需要,同时也加快了诱变菌对 DPAA 的降解速率。但这在一定程度上也抑制了诱变菌

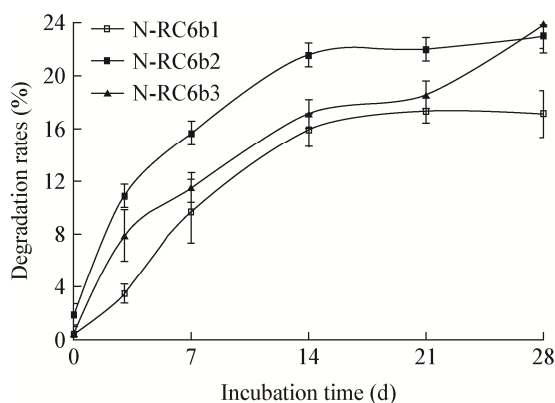


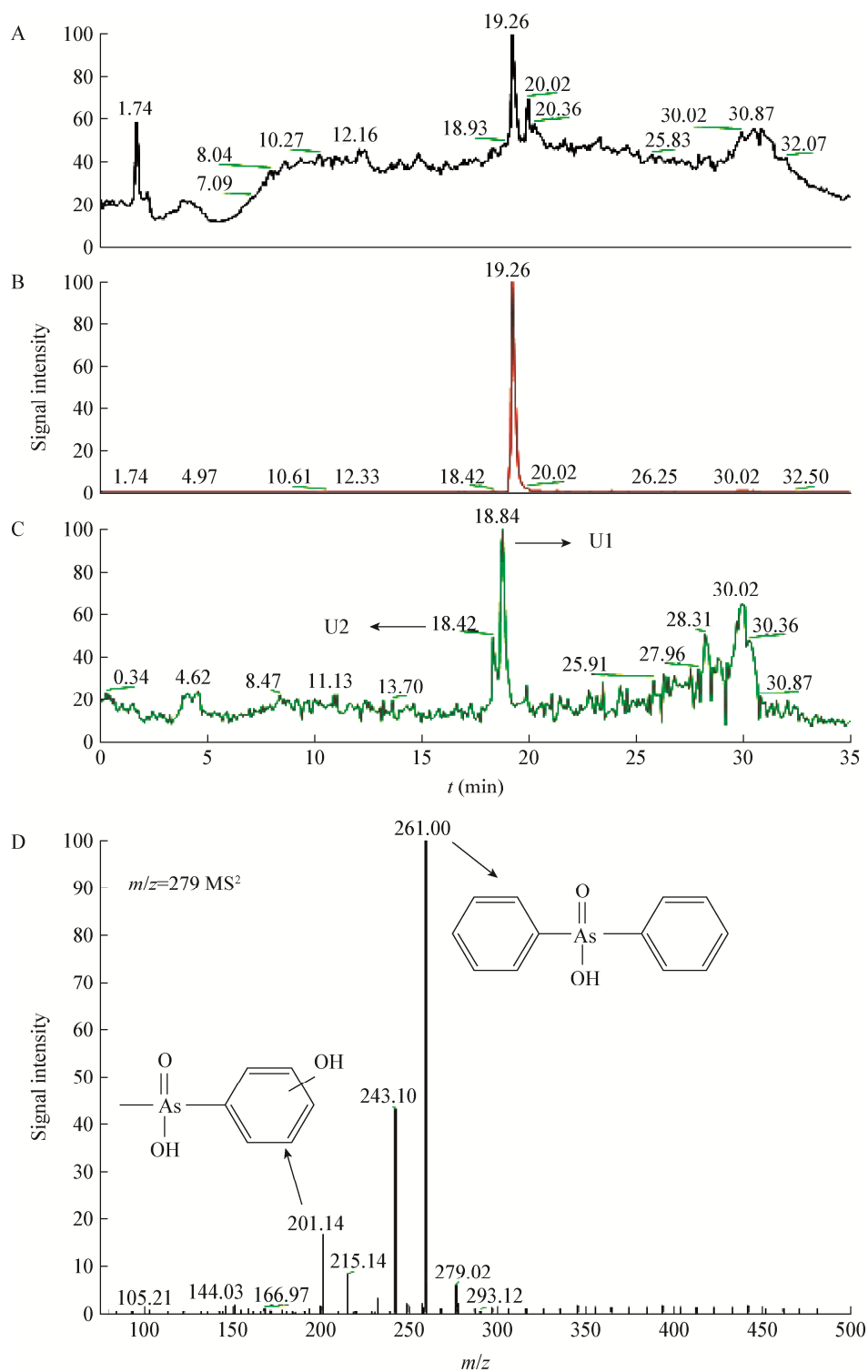
图 6 外加葡萄糖条件下诱变菌株对 DPAA 的降解率
Figure 6 Degradation rates of DPAA by mutagenic strains with glucose addition

降解 DPAA 相关基因的表达,导致在反应后期溶液中的速效碳源被逐渐耗竭时,诱变菌株因启动表达 DPAA 降解基因的迟滞效应而对 DPAA 降解速度减缓,降解效率降低。这一结果与李方卉等^[26]的研究结果相似,其在优化菌株 SL1 对多氯联苯的降解率时发现,添加葡萄糖和蔗糖为共代谢底物时,菌株 SL1 对多氯联苯的降解率反而下降,可能与速效碳源的存在抑制了菌株降解多氯联苯基因的表达有关。

2.3 诱变菌株 N-RC6b2 降解 DPAA 的中间产物

以 DPAA 作为唯一碳源,接种诱变菌株 N-RC6b2 培养 28 d 后溶液的 HPLC-MS/MS 分析结果如图 7 所示。除保留时间为 19.26 min 处的 DPAA 外,在保留时间分别为 18.42 min 和 18.84 min 处出现 2 个新的未知色谱峰(U1 和 U2),这 2 个未知物具有相同的 $[M+H]^+$ 离子峰($m/z=279.10$)。因为 DPAA 的分子量为 262.0,而羟基的分子量为 17.0,由此可初步鉴定该代谢产物可能为单羟基化的二苯砷酸。对照 DPAA 和苯砷酸 PAA 的标准品,进一步分析二级质谱中的碎片离子发现, m/z 为 261.00 的碎片应为单羟基化 DPAA 脱羟基的产物; m/z 为 201.14 的碎片应为单羟基化 DPAA 脱去一个苯环的产物。通过对代谢产物二级质谱碎片离子的结构分析,以及与文献^[27]中单羟基化 DPAA 质谱图的比对分析,进一步证明了这 2 个未知代谢产物 U1 和 U2 分别为 DPAA 在苯环不同位点处的单羟基化产物。但由于单羟基化 DPAA 没有化学标准品,具体取代位点有待通过标准品的合成及比对后做进一步确定。单羟基化 DPAA 的分子结构如图 8 所示。

Harada 等^[27]的研究也发现,剑菌属 *Ensifer adhaerens* 菌株 L2406 与 L2413 在降解 DPAA 的产物中有单羟基化产物生成,且单羟基化 DPAA 进一步脱苯环生成了苯砷酸、砷酸盐等结构相对简单、毒性相对较低且更易去除的代谢产物。据此推断,虽然在本研究中目前就仅检测到 DPAA 的羟基化反应,但 DPAA 羟基化后很可能利于其进一步发生降解转化。

图 7 DPAA 降解液的总离子流图、选择离子流图及代谢产物 MSⁿ 图Figure 7 Total ion current (TIC) and extracted ion current (EIC) in HPLC-EIS(+)-MS/MS analysis of DPAA degradation solutions and mass spectra of ESI(+)-MSⁿ for metabolites注: A: 总离子流图; B: $m/z=263.11$, DPAA; C: $m/z=279.10$; D: 代谢产物 MSⁿ 图.Note: A: Total ion current; B: $m/z=263.11$, DPAA; C: $m/z=279.10$; D: Mass spectra of ESI(+)-MSⁿ for metabolite.

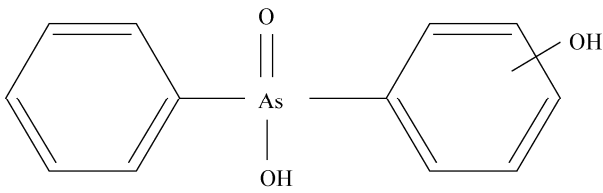


图 8 单羟基化二苯砷酸的分子结构图

Figure 8 Molecular structures of mono-hydroxylated diphenylarsinic acids

3 讨论

大量研究表明,微生物对砷的代谢转化过程在砷的地球化学循环中起到了十分重要的作用,国内也已有多名研究者综述了微生物对无机砷的代谢转化作用机制^[28-34],但目前有关利用微生物降解转化 DPAA 等有机砷污染物的机理研究仍非常有限,有关利用微生物降解修复化学武器残留地区有机砷污染土壤的应用研究仍为空白。因此,筛选 DPAA 高效降解菌种资源并阐明其对 DPAA 的降解特征,优化提升微生物对土壤中 DPAA 的降解转化潜力,对发展化学武器残留地区土壤中二苯砷酸等有机砷污染物的生物修复技术具有重要的科学意义与应用价值。

提高微生物降解修复 DPAA 污染土壤效率的途径主要包括:外加营养元素、筛选耐性/抗性较强的微生物菌株,以及利用分子生物学技术及基因工程等手段^[33]。微生物在生长代谢过程中需要适合的碳源、氮源等营养元素。在适当的水分条件下,通过外源添加营养元素,一方面满足微生物生长发育过程中的物质需求,使之正常生长;另一方面可以作为共代谢基质,刺激土著降解性微生物对难降解性有机污染物进行共代谢降解。本研究利用课题组前期筛出的一株植物根际促生菌——紫金牛叶杆菌菌株 RC6b,比较了蔗糖、葡萄糖和乙酸钠等不同外加碳源对 DPAA 降解的影响效果,发现 RC6b 菌株难以直接利用 DPAA 为唯一碳源生长,外加蔗糖、葡萄糖和乙酸钠等碳源均可显著加快菌株 RC6b 的生长与增殖活性,同时作为共代谢底物,显著提高菌株对 DPAA 的共代谢降解效率。

然而,由于 DPAA 具有较高的水溶性和较强的细胞毒性,外加碳源仅将 DPAA 的降解率提高至 15% 左右,Harada 等^[27]报道筛选的菌株 L2406 和 L2413 对 DPAA 的降解率分别为 55% 和 25%,与之相比,菌株 RC6b 对 DPAA 的降解效率仍有进一步的提升空间。

利用化学诱变与基因工程等手段对降解菌进行驯化和遗传改造则成为提高微生物对难降解有机污染物降解能力的另一重要途径。本研究首次探讨了化学诱变剂亚硝基胍(NTG)诱变菌株对 DPAA 的降解效果与代谢产物。研究发现,当 NTG 浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DPAA 为唯一碳源时,3 株诱变菌对 DPAA 的降解率与出发菌株相比均显著提高,最高可达 36.71%。与目前国际上仅有的关于 DPAA 好氧微生物降解的效果相比^[27],NTG 诱变菌对 DPAA 的降解能力已明显高于菌株 L2413 (25%),但仍低于菌株 L2406 (55%)。虽然 NTG 诱变可以显著提高微生物对特定底物的降解能力,但 NTG 诱变的精确机制尚不明确,可能的机制包括改变菌株的 DNA 分子结构,以及阻碍菌株 DNA 复制过程中双链的解开等^[24,26]。

有关 DPAA 的微生物降解代谢产物与代谢途径,Arao 等^[34]最早发现 DPAA 在厌氧环境下能被土壤微生物转化为无机砷,其可能的代谢途径为 DPAA \rightarrow PAA \rightarrow 砷酸盐。随后,Nakamiya 等^[11]发现栖息微球菌 *Kytococcus sedentarius* 菌株 NK0508 对 DPAA 的代谢产物包括砷酸盐和二苯基甲基砷氧化物(DPMAO),推测 DPAA 的降解可能主要是苯环的氧化和开环作用所致。Harada 等^[27]发现剑菌属 *Ensifer adhaerens* 菌株 L2406 与 L2413 对 DPAA 的降解代谢途径为 DPAA \rightarrow 单羟基化 DPAA \rightarrow PAA \rightarrow 砷酸盐。其中,单羟基化 DPAA 的出现表明 DPAA 在生物体内的转化可能由单加氧酶所介导。本研究发现诱变菌株 N-RC6b2 对 DPAA 的代谢产物中有 2 种 DPAA 不同位置单羟基化代谢产物的生成,但 DPAA 的脱苯环产物苯砷酸 PAA 以及无机砷酸盐却未检出,这一方面可能是由于

DPAA 的初始浓度较低, 导致其代谢产物的浓度低于检测限; 另一方面也可能与不同降解菌株对 DPAA 的代谢途径与代谢机理的特异性有关。

土壤污染修复是一项复杂的系统工程, 微生物修复是目前土壤污染生物修复研究的热点, 也是治理有机砷污染土壤的主要手段之一。今后需进一步筛选具有高耐性的 DPAA 高效降解菌种资源, 积极发展物理化学、植物-微生物联合修复技术, 为我国化学武器遗留地区有机砷污染土壤的生物修复提供理论依据与技术原理。

参 考 文 献

- [1] He YZ, Ding RG. Casualties by the Japanese chemical weapons abandoned in China (1)—introduction of chemical weapon and the Japanese chemical weapons abandoned in China[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2005, 17(8): 452-453 (in Chinese)
何跃忠, 丁日高. 日本遗弃在华化学武器造成人员伤亡的有关问题(1)—化学武器与日本遗弃在华化学武器情况介绍[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(8): 452-453
- [2] Pitten FA, Müller G, König P, et al. Risk assessment of a former military base contaminated with organoarsenic-based warfare agents: uptake of arsenic by terrestrial plants[J]. Science of the Total Environment, 1999, 226(2/3): 237-245
- [3] Cui YL, Jin H, Zhang X, et al. Analysis of arsenic species contaminated by Japanese-abandoned chemical weapons[A]// Proceedings of the 7th National Symposium on Trace Elements Research and Progress[C]. Sanya: Chinese Chemical Society, 2007 (in Chinese)
崔玉玲, 金华, 张霞, 等. 对日本遗弃化学武器染毒土壤及水体中含砷物质的分析[A]//第七届全国微量元素研究和进展学术研讨会论文集[C]. 三亚: 中国化学会, 2007
- [4] Fu XJ. A study on chemical weapons abandoned by Japan in China[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2010 (in Chinese)
付小军. 日本遗弃在华化学武器问题研究[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2010
- [5] Shi JH, Zhou XZ. Technical Code for Recycling of Chemical Weapons Abandoned by Japan[M]. Beijing: China Economic Publishing House, 2007 (in Chinese)
石建华, 周学志. 日本遗弃化学武器回收技术规程[M]. 北京: 中国经济出版社, 2007
- [6] Zhang FC, Wang YS, Shi FH, et al. Study on the abandoned chemical weapons by Japanese in China with an attempt to explore the burying location and pollution disposal[J]. Earth and Environment, 2011, 39(4): 567-570 (in Chinese)
张福存, 王雨山, 石奉华, 等. 日本在华遗弃化学武器埋藏地调查及其污染处置方法研究[J]. 地球与环境, 2011, 39(4): 567-570
- [7] Ishii K, Tamaoka A, Otsuka F, et al. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan[J]. Annals of Neurology, 2004, 56(5): 741-745
- [8] Ishizaki M, Yanaoka T, Nakamura M, et al. Detection of bis(diphenylarsine)oxide, diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, compounds probably derived from chemical warfare agents, in drinking well water[J]. Journal of Health Science, 2005, 51(2): 130-137
- [9] Kroening KK, Solivio MJV, García-López M, et al. Cytotoxicity of arsenic-containing chemical warfare agent degradation products with metallomic approaches for metabolite analysis[J]. Metallomics, 2009, 1(1): 59-66
- [10] Zheng JL, Li JW, Chao FH. Advance in study on biodegradation of aniline, nitrobenzene and trinitrotoluene[J]. Microbiology China, 2001, 28(5): 85-88 (in Chinese)
郑金来, 李君文, 晁福寰. 苯胺、硝基苯和三硝基甲苯生物降解研究进展[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 85-88
- [11] Nakamiya K, Nakayama T, Ito H, et al. Degradation of arylarsenic compounds by microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 274(2): 184-188
- [12] Janke D, Fritsche W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics[J]. Journal of Basic Microbiology, 1985, 25(9): 603-619
- [13] Xie S, Liu JX, Li L, et al. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates[J]. Journal of Environmental Science, 2009, 21(1): 76-82
- [14] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature, 2002, 415(6872): 644-646
- [15] Fiedurek J, Gromada A. Screening and mutagenesis of molds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20(5): 344-347
- [16] Cheng M, Cui CB, Li CW, et al. Chemical mutation technique applied in microorganism breeding[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2009, 36(6): 412-417 (in Chinese)
程明, 崔承彬, 李长伟, 等. 化学诱变技术在微生物育种研究中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(6): 412-417
- [17] Li HM, Miao XY, Wei M, et al. Screening of high-yield polysaccharide *Athelia rolfsii* by UV and NTG[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(20): 244-247,262 (in Chinese)
李鸿梅, 苗琇岩, 魏明, 等. 紫外与亚硝基胍复合诱变选育高产多糖罗耳阿太菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 244-247,262
- [18] Ma Y, Rajkumar M, Luo YM, et al. Phytoextraction of heavy metal polluted soils using *Sedum plumbizincicola* inoculated with metal mobilizing *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b[J]. Chemosphere, 2013, 93(7): 1386-1392
- [19] Zhu M, Tu C, Hu XF, et al. Degradation of diphenylarsinic acid in soil by Fenton and Fenton-like reactions[J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(6): 1078-1085 (in Chinese)
朱濛, 涂晨, 胡学锋, 等. Fenton 法和类 Fenton 法降解土壤中的二苯砷酸[J]. 环境化学, 2015, 34(6): 1078-1085
- [20] Miller JH. Experiments in Molecular Genetics[M]. Cold Spring

- Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972
- [21] Wu HH, Niu F. Selection for low temperature-resistant strain by composite mutagenesis of lactic acid bacteria[J]. Microbiology China, 2013, 40(4): 631-645 (in Chinese)
吴慧昊, 牛锋. 乳酸菌低温菌株的复合诱变选育[J]. 微生物学通报, 2013, 40(4): 631-645
- [22] Feng SJ. Microbial-hyperaccumulator combined remediation of the diphenylarsinic acid contaminated soil[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2015 (in Chinese)
冯仕江. 微生物-超富集植物联合修复二苯砷酸污染土壤研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2015
- [23] Zhang CL. UV/NTG mutagenesis for breeding of a high trehalose-producing strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2009, 30(21): 188-191 (in Chinese)
张春玲. 紫外线与亚硝基胍复合诱变选育高产海藻糖菌株的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 188-191
- [24] Tian XJ, Zhang LP. Screening of high-yield phenyllactic acid strains by NTG mutation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(4): 104-110 (in Chinese)
田雪娇, 张丽萍. 亚硝基胍法诱变选育高产苯乳酸菌株[J]. 中国食品学报, 2014, 14(4): 104-110
- [25] Ren DY, Chen P, Li WT, et al. Screening, mutagenesis of nitrite-degrading lactobacilli in Chinese traditional fermented sauerkraut and its application in the production of sauerkraut[J]. Journal of Food Safety, 2016, 36(4): 474-481
- [26] Li FH, Xu L, Zhang TH, et al. Degradation characteristics and fermentation conditions optimization of a PCBs-degrading strain[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1299-1307 (in Chinese)
李方卉, 徐莉, 张腾昊, 等. 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
- [27] Harada N, Takagi K, Baba K, et al. Biodegradation of diphenylarsinic acid to arsenic acid by novel soil bacteria isolated from contaminated soil[J]. Biodegradation, 2010, 21(3): 491-499
- [28] Luo T, Jing CY. Research progress on mechanisms of arsenic mobilization in groundwater[J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(1): 77-83 (in Chinese)
罗婷, 景传勇. 地下水砷污染形成机制研究进展[J]. 环境化学, 2011, 30(1): 77-83
- [29] Yang J, Zhu YG. Progress in study of mechanisms of microbial arsenic transformation in environment[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(6): 761-769 (in Chinese)
杨婧, 朱永官. 微生物砷代谢机制的研究进展[J]. 生态毒理学, 2009, 4(6): 761-769
- [30] Wu J, Xie MJ, Yang Q, et al. Current researches in microbial remediation of arsenic pollution[J]. Environmental Science, 2011, 32(3): 817-824 (in Chinese)
吴佳, 谢明吉, 杨倩, 等. 砷污染微生物修复的进展研究[J]. 环境科学, 2011, 32(3): 817-824
- [31] Wang GJ, Wang Q, Chen F, et al. Research progress of microbial arsenite oxidation regulation[J]. Journal of Microbiology, 2014, 34(5): 1-7 (in Chinese)
王革娇, 王倩, 陈芳, 等. 微生物砷氧化调控研究进展[J]. 微生物学杂志, 2014, 34(5): 1-7
- [32] Köhler M, Hofmann K, Völsgen F, et al. Bacterial release of arsenic ions and organoarsenic compounds from soil contaminated by chemical warfare agents[J]. Chemosphere, 2001, 42(4): 425-429
- [33] Yu TH, Li HS. Mechanism of bioremediation in arsenic contaminated soil and its research progress[J]. Environmental Pollution & Control, 2014, 36(12): 77-82 (in Chinese)
余天红, 黎华寿. 砷污染土壤微生物修复机制及其研究进展[J]. 环境污染与防治, 2014, 36(12): 77-82
- [34] Arao T, Maejima Y, Baba K. Uptake of aromatic arsenicals from soil contaminated with diphenylarsinic acid by rice[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(4): 1097-1101