

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: B21620060153304

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

来源于红树林湿地沉积物的细菌对多环芳  
烃 (PAHs) 降解的研究

Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)  
by bacteria isolated from mangrove sediment

郑 伟

指导教师姓名: 郑天凌 教授

田 蕴 副教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2011 年 11 月 1 日

论文答辩日期: 2011 年 12 月 8 日

学位授予日期: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 12 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(厦门大学生命科学学院郑天凌课题组)的研究成果,获得国家自然科学基金(40576054;40476047;40976069)和国家科技部863项目(2008AA09Z408)课题经费或实验室的资助,在(滨海湿地生态系统教育部重点实验室)完成。

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 目 录

目 录 .....	1
Contents .....	1
摘 要 .....	1
Abstract .....	III
<b>第一章 前 言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1. 多环芳烃 (PAHs) 在环境的分布与危害 .....</b>	<b>1</b>
1.1 PAHs 简介 .....	1
1.2 PAHs 的来源与分布 .....	1
1.3 PAHs 的危害 .....	2
<b>2. PAHs 污染环境的微生物修复 .....</b>	<b>5</b>
2.1 PAHs 环境中的归宿 .....	5
2.2 PAHs 的生物修复 .....	5
2.3 PAHs 降解微生物 .....	6
<b>3. PAHs 微生物降解机制研究 .....</b>	<b>7</b>
3.1 酶学研究进展 .....	7
3.2 基因组学研究进展 .....	10
3.3 转录组学研究进展 .....	15
3.4 蛋白组学研究进展 .....	16
3.5 代谢组学研究进展 .....	21
<b>4. 本论文研究的内容与意义 .....</b>	<b>22</b>
<b>第二章 多环芳烃降解菌的筛选与鉴定 .....</b>	<b>24</b>
<b>1. 材料与方法 .....</b>	<b>24</b>
1.1 样品来源 .....	24
1.2 主要材料 .....	24
1.3 主要方法 .....	28

<b>2. 结果与分析</b> .....	<b>43</b>
2.1 驯化过程中 ETSA 测定.....	43
2.2 改良的平板升华法筛选 PAHs 降解菌 .....	45
2.3 降解菌的 BOX-PCR 分析 .....	48
2.4 PAHs 降解菌的形态特征 .....	50
2.5 降解菌的 16S rRNA 基因系统发育分析.....	52
2.6 DNA-DNA 杂交结果.....	63
2.7 最适生长条件测定.....	63
2.8 API 细菌鉴定系统鉴定结果 .....	64
2.9 抗生素敏感性测定.....	68
2.10 菌株与同属近源模式种之间特征比对.....	68
2.11 脂肪酸组成测定.....	71
2.12 磷脂种类测定.....	73
<b>3. 讨论</b> .....	<b>76</b>
3.1 多环芳烃降解菌的筛选.....	76
3.2 多环芳烃降解菌的鉴定.....	78
<b>4. 小结</b> .....	<b>79</b>
<b>第三章 降解菌对 PAHs 降解条件优化</b> .....	<b>80</b>
<b>1. 材料与方法</b> .....	<b>80</b>
1.1 实验菌株.....	80
1.2 主要材料.....	80
1.3 基本方法.....	81
<b>2. 结果与分析</b> .....	<b>85</b>
2.1 PAHs 诱导下菌株 US6-1 的 C23O 活力测定 .....	85
2.2 降解菌对菲和芘的降解能力测定.....	85
2.3 不同处理条件下菌株 US6-1 对 HMW-PAHs 的降解.....	87
2.4 芘、荧蒹及苯并[a]芘降解力模型的构建及降解潜力的预测 .....	88
2.5 降解潜力的检验.....	90
<b>3. 讨论</b> .....	<b>91</b>

3.1 菌株 US6-1 对菲、芘的降解能力评价 .....	91
3.2 菌株 US6-1 的降解条件优化 .....	92
4. 小结 .....	94
<b>第四章 新鞘氨醇菌对 PAHs 降解机制研究 .....</b>	<b>95</b>
<b>1. 材料与方法 .....</b>	<b>95</b>
1.1 实验菌株 .....	95
1.2 实验材料 .....	96
1.3 基本方法 .....	99
<b>2. 结果与分析 .....</b>	<b>115</b>
2.1 菌株 F2 在 PAHs 诱导下 C23O 酶活测定 .....	115
2.2 菌株 F2 在 PAHs 诱导下 ETSA 酶活测定 .....	115
2.2 超声破碎参数的优化 .....	116
2.3 蛋白载样量对双向电泳分离效果的影响 .....	118
2.4 聚焦伏时数对双向电泳的影响 .....	119
2.5 不同蛋白提取缓冲液对双向电泳的影响 .....	120
2.6 PAHs 诱导下菌株 F2 的蛋白差异表达分析 .....	122
2.7 差异蛋白点的 MALDI-TOF-TOP 串联质谱鉴定 .....	126
2.8 质粒 DNA 的提取 .....	129
2.9 PAHs 降解关键酶基因的克隆 .....	130
2.10 关键酶基因的序列分析 .....	131
2.11 C23O 基因表达载体的构建 .....	135
2.12 降解过程中降解关键酶基因在转录水平的调控 .....	139
<b>3. 讨论 .....</b>	<b>142</b>
3.1 适用于新鞘氨醇菌 PAHs 代谢机制研究的双向电泳分析平台的建立 .....	142
3.2 菌株 F2 在 PAHs 诱导下的 C23O 酶活变化 .....	146
3.3 菌株 F2 参与 PAHs 代谢的蛋白 .....	146
3.4 细菌的 PAHs 代谢途径 .....	149
3.5 降解关键酶基因转录水平的调控 .....	151

---

4. 小结 .....	152
<b>第五章 结论与展望 .....</b>	<b>153</b>
1. 结论 .....	153
2. 主要创新点 .....	154
3. 展望 .....	154
<b>参考文献 .....</b>	<b>156</b>
<b>附录 .....</b>	<b>170</b>
硕博连读期间参与课题: .....	170
发表和待发表的学术论文: .....	170
缩略语对照表 .....	171
<b>致谢 .....</b>	<b>173</b>

## Contents

<b>Abstract(in Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract(in English)</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introduction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)</b> .....	<b>1</b>
1.1 The structure and characteristics of PAHs .....	1
1.2 The sources and distribution of PAHs.....	1
1.3 The toxicity and harm of PAHs.....	2
<b>2. Bioremediation of PAHs contaminate environment</b> .....	<b>5</b>
3.1 The fate of PAHs in the environment.....	5
3.2 Bioremediation of PAHs .....	5
3.3 PAH-degrading microorganisms.....	6
<b>3. Study of PAHs biodegradative mechanism</b> .....	<b>7</b>
3.1 Advances in zymologies research .....	7
3.2 Advances in genomics research .....	10
3.3 Advances in transcriptomics research.....	15
3.4 Advances in proteomics research.....	16
3.5 Advances in metabolomics research .....	21
<b>4. Purpose and significance of this study</b> .....	<b>22</b>
<b>Chapt 2 Isolation and identification of PAHs-degraders</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Materials and Methods</b> .....	<b>24</b>
1.1 Sources of bacteria .....	24
1.2 Materials .....	24
1.3 Basic Methods.....	28
<b>2. Results and analysis</b> .....	<b>43</b>
2.1 ETSA test .....	43



2.2 Isolation of PAHs-degraders Using Modified Sublimate-plate Method	45
2.3 BOX-PCR analysis of PAHs-degraders .....	48
2.4 Description of strains .....	50
2.5 Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene .....	52
2.6 DNA-DNA hybridization.....	63
2.7 The optimal conditions of bacteria growth .....	63
2.8 Results of bacteria identification .....	64
2.10 Antibiotics analysis .....	68
2.11 Differential phenotypic characteristics of isolated and the type strains of related species.....	68
2.12 Analysis of cellular fatty acid .....	71
2.13 Analysis of cellular lipids.....	73
<b>3. Discussion.....</b>	<b>76</b>
3.1 Isolation of PAHs-degraders .....	76
3.2 Identification of PAHs-degraders.....	77
<b>4. Conclusions.....</b>	<b>79</b>
<b>Chapt 3 Optimize Degradation of PAHs by bacteria .....</b>	<b>80</b>
<b>1. Materials and Methods.....</b>	<b>80</b>
1.1 Strains .....	80
1.2 Main materials .....	80
1.3 Basic methods .....	81
<b>2. Results and analysis .....</b>	<b>85</b>
2.1 C23O activity of strain US6-1 induced with PAHs .....	85
2.2 Abilities of phenanthrene and pyrene degradation by bacteria .....	85
2.3 HMW-PAHs degradation by strain US6-1 under different treatments ..	87
2.4 Construction of HMW-PAHs-degrading models .....	88
2.5 Verified experiment of abilities of PAHs degradation .....	90
<b>3. Discussion.....</b>	<b>91</b>
3.1 Evaluation the abilities of phenanthrene and pyrene degradation by	

PAHs-degraders .....	91
3.2 Optimization degradation of PAHs by US6-1.....	92
<b>4. Conclusions.....</b>	<b>94</b>
<b>Chapt 4 Study on the mechanism of PAHs degradation.....</b>	<b>95</b>
<b>1.Materials and methods .....</b>	<b>95</b>
1.1 Strains .....	95
1.2 Main materials .....	96
1.3 Basic methods .....	99
<b>2.Results and analysis .....</b>	<b>115</b>
2.1 C23O activity of strain F2 induced with PAHs.....	115
2.2 ETSA of strain F2 induced with PAHs .....	115
2.2 Optimization of ultraphonic condtions .....	116
2.3 Affection of protein loading amount.....	118
2.4 Isoelectric focusing conditons.....	119
2.5 Different kinds of protein extraction buffers .....	120
2.6 Differential protein expression of strain F2 induced with PAHs .....	122
2.7 MALDI-TOF-TOP MS identification.....	126
2.8 Plasmid DNA extration .....	129
2.9 Cloning of key enzyme genes .....	130
2.10 Gene sequences analysis.....	131
2.11 Construction of Catechol 2,3- dioxygenase Gene (C23O) expression vector.....	135
2.12 Regulation of key enzym gene expression.....	139
<b>3. Discussion.....</b>	<b>142</b>
3.1 Key factors of dimensional electrophoresis .....	142
3.2 C23O activity of strain F2 induced with PAHs.....	146
3.3 Proteins involing in PAHs catabolism .....	146
3.4 Pathway of PAHs degredation by strain F2 .....	149
3.5 Regulation of key enzym gene expression.....	151

4. Conclusions.....	152
<b>Chapt 5 Conclusion and Prespective.....</b>	<b>153</b>
1. Conclusions.....	153
2. New Insights .....	154
3. Prespectives .....	155
<b>References.....</b>	<b>156</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>170</b>
Projects.....	170
Publications .....	170
Abbreviations .....	171
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>173</b>

厦门大学博硕士论文摘要

## 摘 要

多环芳烃 (PAHs) 是一类由两个或两个以上苯环组成的持久性有机化合物, 在环境中广泛分布, 以其致癌、致畸、致突变性严重威胁着生态环境和人类健康。微生物降解是环境中 PAHs 去除的主要途径, 而对 PAHs 微生物降解机制的阐明成为 PAHs 生物修复领域中的研究热点。

本研究将采集自漳州浮宫红树林湿地沉积物样品, 在持续性的高浓度、混合 PAHs 选择压力下进行富集驯化, 获得新型、具有高效 PAHs 降解能力的微生物, 同时对筛选获得的 PAHs 降解菌从生理生化角度、基因组学、蛋白质组学和转录组学等方面进行了探索性的研究, 探讨其降解特性, 捕捉相关功能基因及功能酶, 并在这些基础上推测其代谢途径。通过研究, 获得的主要结果如下:

1. 利用高浓度 ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ )、混合 PAHs (菲、芘、荧蒹和苯并[a]芘) 为碳源, 结合改良的平板升华法, 从漳州浮宫红树林湿地沉积物样品筛选到 3 株具有 PAHs 降解能力的可培养单菌, 编号为 F2, F19 和 B17。16S rRNA 基因鉴定结果显示这三株细菌分别为新鞘氨醇菌属 (*Novosphingobium*)、海细菌属 (*Marinobacterium*) 和海杆菌属 (*Marinobacter*)。菌株 F2 与 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup> 的相似度为 99.9%, 菌株 F19 与 *Marinobacterium litorale* IMCC1877<sup>T</sup> 相似度最高, 达到 96.8%, 菌株 B17 与 *Marinobacter mobilis* CN46<sup>T</sup> 的相似度最高, 达到 97.9%。通过生理生化特性、脂肪酸成分的分析, G+C mol% 的测定和 DNA-DNA 杂交结果表明菌株 F19 和 B17 分别为海细菌属和海杆菌属的一个新种。

2. 分别测定了菌株 F2、F19、B17 和 US6-1 对菲、芘的降解能力, 并采用均匀设计方法优化了菌株 US6-1 对芘、荧蒹和苯并[a]芘等高分子量 PAHs 的降解条件。优化后, US6-1 对芘、荧蒹和苯并[a]芘的降解能力分别达到了  $6.46 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 、 $6.86 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  和  $4.74 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 。这是首次将均匀设计方法运用于海洋细菌 PAHs 降解条件优化的研究报道。

3. 运用双向电泳技术 (2-DE) 比较分析了 *Novosphingobium* sp. F2 在菲、芘诱导下蛋白表达图谱, 从中获得在芘诱导 24h 后表达量上升的 12 个蛋白, 以及

在菲诱导 24 h 后增量表达的 11 个蛋白，经 MALDI-TOF-TOF-MS 鉴定获得包括单加氧酶、双加氧酶，脱氢酶、脱羧酶等参与 PAHs 代谢的关键酶，以及调控其它生理代谢过程的蛋白。

4. 以蛋白鉴定结果为依据，成功克隆得到 PAHs 降解代谢过程中起关键作用的酶环羟基化双加氧酶（RHD）和邻苯二酚 2, 3-双加氧酶（C23O）的编码基因。经序列分析，该 C23O 基因为尚未报道过的新基因，并实现了 C23O 基因在宿主 *E. coli* BL21（DE3）中的表达。

5. 利用实时荧光定量 PCR 技术（real-time PCR）从转录水平上分析了 RHD 基因和 C23O 基因在菲、芘和苯并[a]芘诱导下的表达，结果表明菲和苯并[a]芘可以促进两基因的表达，而芘则抑制其表达。

**关键词：**多环芳烃（PAHs），红树林湿地，生物降解，蛋白质组学，基因表达，代谢途径

## Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), one class of organic pollutants consisting of two or more fused benzene rings, are widely distributed in the natural environment. They are carcinogenic, teratogenic, and mutagenic to living organisms and people health. The principle processes for their successful removal are currently believed to be microbial transformation and degradation. The fates of these compounds in the environment and the remediation of PAH-contaminated sites are, therefore, of high public interest.

This research aims at obtaining new type PAHs degrading bacteria from Fugong mangrove sediment, capturing the key enzymes and genes involved in PAHs biodegradation with genomic, proteomic and transcriptomic technologies, and elucidating PAHs biodegradation mechanism. The main results were as follows:

1. Three PAHs degrading bacteria were isolated from mangrove sediment with high concentration of mix-PAHs. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences indicated that strain F2 belonged to the genus *Novosphingobium*, with highest sequence similarity to *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1<sup>T</sup> (99.9 %), strain F19 belonged to the genus *Marinobacterium*, with highest sequence similarity to *Marinobacterium litorale* IMCC1877<sup>T</sup> (96.8% ) and strain B17 belonged to the genus *Marinobacter*, with highest sequence similarity to *Marinobacter mobilis* CN46<sup>T</sup> (97.9 %). The results of DNA-DNA hybridization experiments and physiological characterization also indicate that the F19 and B17 represents the novel species of *Marinobacterium* and *Marnobacter* respectively;

2. The uniform design was used to optimize the degradation of three HMW-PAHs by *N. pentaromativorans* strain US6-1. The degraded pyrene, fluoroanthene and benzo[a]pyrene were 6.46 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 6.86 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and 4.74 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> respectively. It is the first report that optimizing the degradation of HMW-PAHs by the marine bacterium with the uniform design;

3. A proteome analysis of cells exposed to phenanthrene and pyrene was

conducted to identify proteins involved in the degradation. There were 12 protein spots increased after phenanthrene induced and 11 protein spots increased after pyrene induced. Several differential protein spots were indentified to be the key enzymes involved in PAHs degradation, including monooxygenase, dioxygenase, dehydrogenase, decarboxylase and some regulators which participate in other physiological metabolisms;

4. The genes encoding ring hydroxylating dioxygenase alpha subuni (RHD $\alpha$ ) and catechol-2,3- dioxygenase(C23O), which are two key enzymes in PAHs degradation, were cloned and the C23O gene was overexpressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3);

5. Real-Time PCR was used to compare the ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunit (RHD $\alpha$ ) and catechol-2,3- dioxygenase (C23O) gene expression induced by phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene. The results indicated that the gene of these two enzymes were variously unregulated after exposure to phenanthrene and benzo[a]pyrene, and downregulated after exposure to pyrene.

**Keywords** PAHs; Mangrove; Biodegradation; Proteomics; Gene expression; Biodegradative mechanism

## 第一章 前言

### 1. 多环芳烃（PAHs）在环境的分布与危害

#### 1.1 PAHs 简介

多环芳烃（PAHs）是由两个或两个以上的苯环以线形排列、弯接或簇聚的方式而构成的有机物。相邻的苯环通过两种不同的方式构成 PAHs 分子：第一种方式中，两个苯环间通过一个碳原子相连，形成非稠环结构，这种方式构成的 PAHs 各类较少，包括联苯，联三苯等；另一种被称为稠环结构，即两个苯环共用两个相邻的碳原子，大部分 PAHs 分子均以这种方式构成，代表者包括菲、芘等。PAHs 是由苯环为主体构成的碳氢化合物，分子内苯环数量的多少决定了它的理化性质。一般来说，把含有三个或三个以下苯环结构的 PAHs 称为 LMW-PAHs（Low Molecular Weight PAHs），如萘、菲等；含有四个或四个以上苯环的 PAHs 通常被称为 HMW-PAHs（High Molecular Weight PAHs），常见包括芘、苯并[a]芘等。目前已经确定的 PAHs 及其衍生物超过了 400 种<sup>[1]</sup>。PAHs 在常温下通常以固体形态存在，其粉末呈白色或黄绿色，随着苯环数量的增加，分子间极性降低，其水溶性降低而脂溶性增大，熔点、沸点也随之升高。

#### 1.2 PAHs 的来源与分布

环境中 PAHs 的来源包括天然生成和人为活动产生。自然界中天然生成的 PAHs 通过森林、草原的天然火灾；火山的喷发、地下煤层的自燃；微生物、藻类和植物的生物合成等几条途径生成。自然生成的 PAHs 仅占环境中 PAHs 总量的很小一部分，人类活动是 PAHs 产生的最主要因素<sup>[2]</sup>。这些人为活动包括以下几个方面：（1）工业生产。工业生产是产生 PAHs 的重要途径之一。钢铁冶炼、石油化工、焦炭加工等工业活动中产生大量 PAHs，通过三废物质的排放进入到大气、水体和土壤环境中。（2）化石燃料的开采和运输。石油中包含有复杂的 PAHs 成分，其中柴油和杂酚油中 PAHs 含量分别达到 30-40% 和 85-90%<sup>[3]</sup>。石油被称为现在工业社会的黑色血液。现代社会对石油的需求与日剧增，石油的开采



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库