

海洋菌群厌氧生物降解环己甲酸特性研究

咎帅君¹, 金媛², 樊景凤², 杜苗苗¹, 王竞^{*1}

(1. 大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024;

2. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: 环烷酸是一类具有较强毒性的环境新污染物。目前, 环烷酸生物降解研究主要集中在陆地和好氧环境, 而海洋环境中环烷酸的厌氧生物降解鲜有报道。利用富集的海洋微生物菌群, 考察了环己甲酸在不同条件下的厌氧生物降解特性, 并通过16S高通量测序对微生物群落结构和功能进行了分析。结果表明: 共底物葡萄糖和乙酸钠会抑制环己甲酸的厌氧生物降解; 硝酸钠(200 mg/L)可提高环己甲酸厌氧生物降解速率约70%, 并在100 mg/L亚微米磁铁共存下进一步提高反硝化降解效率约44.5%, 降解过程均符合准一级动力学反应。变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌门; 弧菌属、交替单胞菌属和梭菌属为优势菌属。此外, 细胞膜转运及能量、碳水化合物和氨基酸代谢通路有显著富集。研究拓展了环烷酸在海洋环境中的生物转化行为, 并为海洋环境中环烷酸厌氧生物修复提供了启示。

关键词: 环烷酸; 海洋环境; 厌氧降解; 电子受体; 群落结构

中图分类号: X53

文献标识码: A

doi: 10.7511/dllgxb202302004

0 引言

石油作为全球重要的化石能源被广泛使用, 在推动经济和工业飞速发展过程中引发了一系列环境问题^[1-3]。然而, 随着对环境污染物的深入研究以及分析技术水平的提升, 人们发现石油污染物中导致生态毒性和危害人体健康的成分远不止多环芳烃类物质, 根据近年来的研究报道, 环烷酸(naphthenic acids, NAs)被发现是一类对包括植物、鱼类、两栖动物、浮游动植物和哺乳动物在内的多种生物具有较强毒性的新有机污染物^[4-11]。NAs是一类环烷基直链羧酸化合物, 主要由烷基取代的环脂肪族羧酸和少量的无环脂肪族(石蜡或脂肪酸)组成。NAs作为石油中的天然成分, 其所占比例约为2%, 大量的NAs在石油及其附属品的提炼、加工、运输和废水排放等过程中进入陆地、淡水和海洋等各类环境中^[4, 12-14]。

目前, 已知的NAs环境行为包括光降解、物理吸附、化学氧化、植物降解和微生物降解等^[7, 12, 15]。其中, 由于微生物适应力强、环境分布

广泛等特点, 微生物降解被认为是降解NAs的主要途径, 目前已知细菌微生物可以将NAs用作自身生长和呼吸所需的碳源和能源^[9, 16-18]。例如, Presentato等发现, 土壤中的食碱红球菌BCP1在有氧条件下降解浓度范围为50~500 mg/L的环己甲酸(CHCA)和环戊甲酸(CPCA), 经过10 d降解率可以达到90%以上^[16]。从活性尾矿沉积物中富集的微生物能够在短时间内降解超过95%的商业NAs, 其中包括单环代表物CHCA和双环代表物十氢萘酸^[19]。此外, 研究报道NAs也可被厌氧微生物降解^[20-22], Kung等证明了CHCA可以在反硝化细菌、Fe(III)还原细菌、硫酸盐还原细菌和发酵细菌的作用下被利用^[23]。然而, 以上研究大多为好氧生物降解, 厌氧生物降解研究也都集中在陆地环境。迄今为止, NAs在海洋环境中的生物降解鲜有研究, 尤其是厌氧降解至今未见报道。

为此, 本研究通过近海沉积物富集的海洋微生物菌群, 考察不同共底物、电子受体和电子导体

收稿日期: 2022-02-18; 修回日期: 2022-12-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21876018, 42177375).

作者简介: 咎帅君(1988-), 男, 博士生, E-mail: sjzan527@163.com; 王竞*(1967-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: jwang@dlut.edu.cn.

对 NAs 厌氧降解特性的影响,并通过 16S 高通量测序对微生物群落结构及功能进行分析和预测。

1 材料与方法

1.1 样品和 NAs 储备液

本实验中沉积物样品取自辽宁省大连市大连湾近海(39°05'N, 121°66'E)。用格尺采集沉积物 0~5 cm 表层样品,装入无菌自封袋置于低温保温箱中运回实验室并保存在 4 °C 冰箱备用。实验选取环己甲酸(CHCA, $C_7H_{12}O_2$, CAS: 98-89-5; 纯度>99%)作为 NAs 代表物。将 CHCA 溶解于 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液,制成浓度为 10.0 g/L 的 NAs 储备液,保存于棕色玻璃瓶中备用。

1.2 培养基配制

2216E 菌群富集培养基:将 5.0 g 蛋白胨、1.0 g 酵母浸粉和 0.01 g 磷酸铁超声溶解于 1 000 mL 人工海水。

NAs 降解培养基:50 mL 人工海水中加入 0.1 mL 微量元素储备液,再加入不同浓度的 $NaNO_3$ 溶液和 NAs 储备液。

人工海水组成: $NaCl$ (24.53 g), $MgCl_2$ (11.2 g), Na_2SO_4 (4.10 g), $CaCl_2$ (1.16 g), KCl (0.7 g), $NaHCO_3$ (0.2 g), KBr (0.1 g), H_3BO_3 (0.002 9 g), $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.042 g), NaF (0.003 g), 纯水(1 000 mL)。

微量元素储备液: H_3BO_3 (600 mg), $CoCl_2$ (400 mg), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (200 mg), $MnCl_2$ (60 mg), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (60 mg), $NiCl_2$ (40 mg), $CuCl_2$ (20 mg), 纯水(1 000 mL)。

以上培养基和储备液用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 8.0 ± 0.2 后,经 121 °C 高温灭菌 20 min 后放至室温备用。

1.3 降解菌群的富集

取 30 g 沉积物(湿质量)置于 500 mL 锥形瓶中,加入 300 mL 灭菌人工海水和葡萄糖(终浓度 1 g/L)后充分混匀,置于 25 °C 恒温培养箱静置培养 24 h,进行菌群活化。取活化后的沉积物至新的锥形瓶,加入 NAs 储备液(终浓度 50 mg/L),曝氮气后置于 25 °C 恒温培养箱避光静置培养驯化 30 d,期间定期取样检测 NAs 的浓度。当体系中 NAs 被有效降解后,按 1:10 体积比将驯化后的沉积物加入新的 2216E 液体培养基,并重新加入新的 NAs 储备液后曝氮气继续培养,经过反复多次驯化,得到 NAs 厌氧降解菌群。

1.4 降解实验

近海沉积物环境中存在着各类多糖、有机污染物、电子受体和电子导体等。其中,多糖通过酶催化和水解的方式形成葡萄糖等单糖物质,有机污染物经过发酵最终形成乙酸钠等小分子物质;常见的电子受体包括硫酸盐、硝酸盐和氯酸盐;电子导体主要为不同类型的铁氧化物^[24-26]。本厌氧降解实验中,取 10 mL 对数期的降解菌群进行离心(8 000 r/min),弃掉上清液用灭菌人工海水洗涤后再离心,将离心后的菌块重悬于装有 50 mL 灭菌降解培养基的血清瓶中。结合文献报道,分别加入不同浓度的共代谢代表物(葡萄糖(0.1、0.5、1.0 g/L)和乙酸钠(10、50、100 mg/L))、电子受体(硫酸盐(200、500、1 000 mg/L)、硝酸盐(100、200、500 mg/L)和氯酸盐(50、100、250 mg/L))、电子导体(纳米零价铁、纳米磁铁和亚微米磁铁,浓度均设置为 50、100、250 mg/L),之后曝氮气 10~15 min 后用电胶布封口,置于 25 °C 恒温培养箱避光培养,定期取样检测各体系中 CHCA 的浓度变化。灭菌对照组经高温灭菌处理,以上实验组和对照组均设置 3 个平行实验。

1.5 CHCA 分析

取 1 mL 样品至 2 mL 离心管,加入 50 μ L 的 NaOH 溶液(1 mol/L)后振荡 30 s 混匀。然后离心机离心 10 min(8 000 r/min)并收集上清液。将上清液移至新的 5 mL 离心管,并加入 H_2SO_4 (1 mol/L)将样品酸化至 $pH < 2$,再加入二氯甲烷(体积比 1:1)反复萃取 3 次。收集萃取后的二氯甲烷,经无水 Na_2SO_4 干燥后在 35 °C 下进行闪蒸浓缩,将浓缩后的二氯甲烷转移至 2 mL 液相小瓶。取 100 μ L 衍生试剂(叔丁基二甲基氯硅烷)与 100 μ L 等量的二氯甲烷混合,密封并置于 60 °C 水浴锅中水浴 20 min 后上机检测。样品通过气相色谱-质谱联用仪器(GCMS-QP2020)进行检测。色谱柱为 DB-5(30 m)毛细管柱;初始温度设置为 80 °C,保持 2 min,之后以 10 °C/min 的速度升温至 280 °C 并保持 3 min,总运行时间为 25 min。质谱仪选择全扫描模式(SCAN, $m/z = 50 \sim 250$),通过电子撞击源(EI)获得质谱图和质量离子,扫描频率为 1 scan/s。

为确保检测结果的准确性,实验通过 CHCA 萃取回收率进行了估算,计算公式如下:

$$R = \frac{\rho_2 V_2 - \rho_1 V_1}{\rho_0 V_0} \times 100\%$$

式中: R 表示提取率,%; ρ_0 为CHCA标准溶液的浓度, $\mu\text{g/mL}$; ρ_1 表示不含CHCA标准溶液的空白样品浓度, $\mu\text{g/mL}$; ρ_2 为CHCA测试样品浓度, $\mu\text{g/mL}$; V_0 表示CHCA标准溶液的体积,mL; V_1 为不含CHCA的空白样品体积,mL; V_2 为CHCA测试样品体积,mL. 以上测试样品一式三份.

1.6 高通量测序和数据分析

降解菌群通过 Biomedicals FastDNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒进行DNA抽提. 测序以降解菌群的基因组DNA为模板,选取V4区进行各样品的PCR扩增. 采用常规的515F和806R引物进行扩增,序列碱基:515F,5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3';806R,5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3'^[27]. 样品PCR的反应体系为30 μL ,程序为98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min,共计30个循环(具体循环:98 $^{\circ}\text{C}$,10 s;50 $^{\circ}\text{C}$,30 s;72 $^{\circ}\text{C}$,5 min). 测序设置3个平行样品,每个样品重复扩增3次,最后通过使用Qiagen Gel Extraction试剂盒对得到的PCR产物进行纯化. 将该过程中所得到的扩增子进行上机测序,测序由上海生工股份有限公司完成.

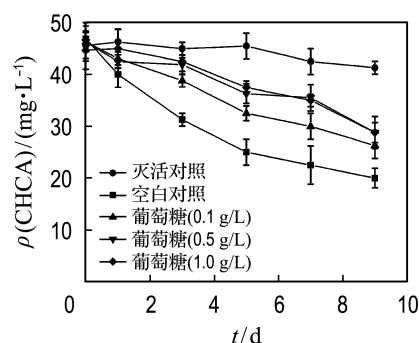
采用软件Uparse(V7.0.1001)进行样品有效序列聚类数据的整理和分析,所有数据均以>97%相似性的序列划分为一个可操作的分类单元(operational taxonomic units,OTUs),其中代表序列为所有OTUs中数量频次最高的序列. 对有代表性的OTUs进行物种注释,通过Greengenes与RDP classifier数据库进行比对和注释^[28]. 分类水平分别在界(Kingdom)、门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)和种(Species)水平上进行各样本的群落组成信息的统计.

2 结果与讨论

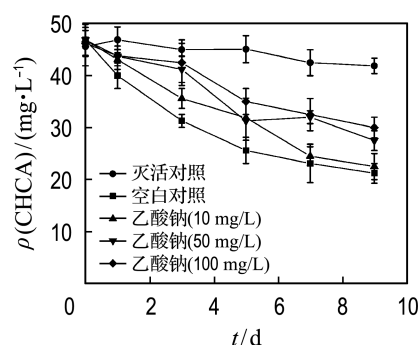
2.1 不同共底物对CHCA厌氧降解特性的影响

利用近海沉积物富集得到的NAs降解菌群,选择常见CHCA为污染物代表,考察了以葡萄糖和乙酸钠为代表的共底物对CHCA厌氧生物降解特性的影响. 实验在温度25 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=8.0\pm0.2$ 的厌氧条件下进行,结果如图1所示.

由图1结果可见,各实验组中CHCA在厌氧条件下均出现不同程度的降解. 其中,图1(a)中不添加葡萄糖空白对照组经过9 d的降解,CHCA浓度由46.6 mg/L 下降到21.4 mg/L ,降解率达



(a) 葡萄糖底物



(b) 乙酸钠底物

图1 不同共底物条件下CHCA厌氧降解曲线

Fig. 1 Anaerobic degradation curves of CHCA under different co-substrate conditions

到54.1%;葡萄糖浓度为0.1 g/L的实验组经过9 d降解后,CHCA平均浓度为27.4 mg/L ,降解率为38.8%;葡萄糖浓度为0.5 g/L的实验组中CHCA在9 d后的降解率为31.9%;葡萄糖浓度为1.0 g/L的实验组中CHCA在9 d后的降解率为30.2%. 同时,乙酸钠空白对照组中CHCA降解率为52.2%;图1(b)中,乙酸钠浓度分别为10、50和100 mg/L 时,对应CHCA降解率为50.7%、41.6%和34.6%,降解后检测到各体系中TOC出现不同程度的下降. 灭活对照组中CHCA浓度在降解前后没有明显变化,表明非生物降解因素对CHCA降解无显著影响. 由以上结果发现,添加葡萄糖和乙酸钠实验组中CHCA的厌氧降解受到明显抑制,且随着葡萄糖和乙酸钠浓度的增大抑制作用愈趋明显. 其原因可能是微生物菌群优先利用易于降解的葡萄糖和乙酸钠,从而减缓了对CHCA的利用. 因此,共底物葡萄糖和乙酸钠的存在不利于CHCA厌氧生物降解.

将最优降解曲线进行拟合,结果显示CHCA厌氧降解过程符合准一级动力学反应(反应速率常数 $k=0.0875\text{ h}^{-1}$, $R^2=0.96$).

2.2 不同电子受体对 CHCA 厌氧降解特性的影响

在不同电子受体(硫酸盐、氯酸盐和硝酸盐)存在的条件下,考察了 CHCA 的厌氧生物降解特性.实验在温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=8.0\pm 0.2$ 的厌氧条件下进行,结果如图 2 所示.

由图 2(a)可见,在不同浓度硫酸盐实验组

中,CHCA 在第 10 d 附近的降解速率最高(约 $4.9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),在第 15 d 降解率达到 90%以上,并且浓度为 $1\text{ }000\text{ mg/L}$ 的硫酸盐实验组 CHCA 降解速率出现下降.氯酸盐实验组中(图 2(b)),CHCA 厌氧降解情况与硫酸盐实验组结果相似,在第 9~10 d 出现最高降解速率(约

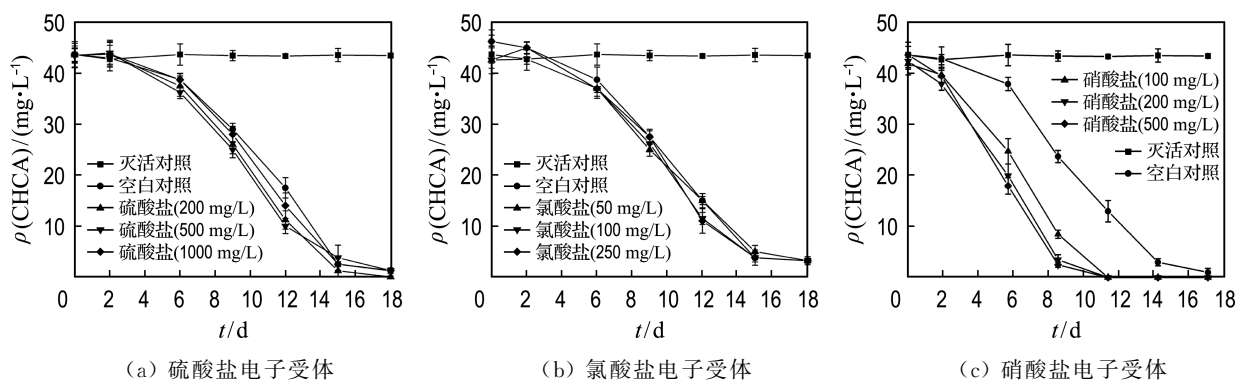


图 2 不同电子受体条件下 CHCA 厌氧降解曲线

Fig. 2 Anaerobic degradation curves of CHCA under different electron acceptor conditions

$4.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),并在实验结束时降解率超过 90%.添加硝酸盐实验组中(图 2(c)),实验组 CHCA 浓度在第 2 d 后开始出现迅速下降,之后在第 9 d 降解率便达到 90%以上;而空白对照组降解速率明显偏低,直到第 15 d 降解率才超过 90%.另外,随着硝酸盐浓度的增大,CHCA 的降解速率加快,当硝酸盐浓度超过 200 mg/L 后,降解速率不再增加.当硝酸盐浓度为 100 mg/L 时,CHCA 最大降解速率约为 $6.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,并在第 12 d 完成 CHCA 的降解;硝酸盐浓度为 $200, 500\text{ mg/L}$ 实验组中的 CHCA 分别在第 6 d 左右测得有最大降解速率(约 $6.4, 6.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),最终在第 10~12 d 完成 CHCA 的降解.过程中测得各降解体系中 TOC 在降解后较降解前下降超过 60%;灭活对照组中的 CHCA 在实验结束后未观察到降解.究其原因,硫酸盐在厌氧条件下被还原会产生有毒的硫化物,从而对微生物产生毒害作用;硝酸盐由于具有更高的氧化还原电位,更容易促进污染物的降解;氯酸盐尽管具有较高的氧化还原电位,但文献报道氯在其含氧酸根离子中处于四面体中心,不易与其他物质发生反应^[29-31].因此,硝酸盐的添加可显著提高 CHCA 厌氧生物降解速率;硝酸盐适宜浓度为 200 mg/L ,期间最大降解速率约 $6.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

d^{-1} 并在第 9 d 降解率超过 90%,降解效率相较空白对照组提高了 70%左右.

选择不同电子受体中降解效果最好的实验组降解曲线进行拟合,结果显示降解过程均符合准一级动力学反应.其中,硫酸盐条件下反应速率常数 $k=0.101\text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.81$),氯酸盐条件下反应速率常数 $k=0.097\text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.86$),硝酸盐条件下反应速率常数 $k=0.225\text{ h}^{-1}$ ($R^2=0.93$).

2.3 不同电子导体对 CHCA 厌氧降解特性的影响

接下来,在适宜浓度硝酸盐条件下,通过加入不同电子导体(纳米磁铁(20 nm)、亚微米磁铁($100\sim 300\text{ nm}$)和纳米零价铁(20 nm))来考察其对 CHCA 厌氧降解的影响,空白对照组不加任何电子导体.实验在温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=8.0\pm 0.2$ 的厌氧条件下进行,结果如图 3 所示.

结果显示,一定浓度的纳米磁铁和亚微米磁铁可以提高 CHCA 的厌氧生物降解速率并缩短降解周期.由图 3(a)可以看到,纳米磁铁浓度为 50 mg/L 时 CHCA 降解速率最高(约 $6.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),其次为 100 mg/L 实验组(约 $6.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和 250 mg/L 实验组(约 $6.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$);图 3(b)中,浓度为 100 mg/L 的亚微米磁铁实验组降解效果优于其他组(第 4 d 测得最大降解速率 $7.9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),其次为 250 mg/L

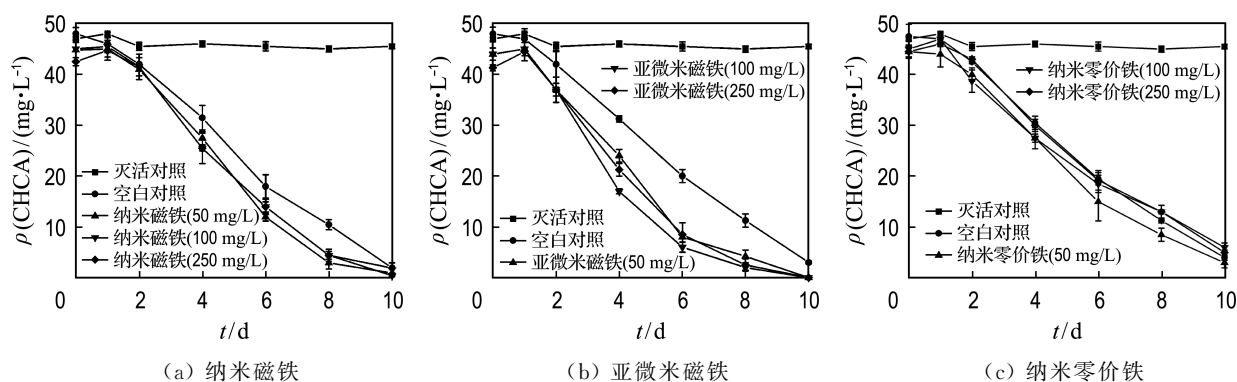


图3 不同电子导体对CHCA厌氧降解的影响

Fig. 3 Effects of different electronic conductors on anaerobic degradation of CHCA

($7.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和 50 mg/L ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)实验组.与此同时,纳米零价铁实验组与空白对照组相比,未观察到明显差异,表明其对CHCA厌氧降解没有促进效果(图3(c));此外,非生物实验组中CHCA浓度未发生显著变化.虽然铁氧化物在污染物的降解中发挥着积极作用,但有研究显示,粒径较小的纳米磁铁和纳米零价铁可以穿透细胞膜对细胞造成毒害^[32-33].这可能是本实验结果中高浓度纳米磁铁和纳米零价铁在降解过程中效果不佳的原因.因此,在硝酸盐(200 mg/L)为电子受体条件下,浓度为 100 mg/L 的亚微米磁铁对于CHCA厌氧生物降解促进作用较明显,在第4 d测得最大降解速率约 $7.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,同时,在第6~8 d降解率达到90%左右,进一步将CHCA厌氧降解效率提高了约44.5%.

对于降解效果最好的实验组降解曲线进行拟合,结果表明CHCA降解过程均符合准一级动力学反应.亚微米磁铁条件下反应速率常数 $k = 0.2585 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0.91$),纳米磁铁条件下反应速率常数 $k = 0.2086 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0.89$),纳米零价铁条件下反应速率常数 $k = 0.1561 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0.91$).综上所述,以硝酸盐为电子受体和亚微米磁铁为电子导体,可以显著提高CHCA的厌氧生物降解速率;其中硝酸盐适宜浓度为 200 mg/L ,亚微米磁铁适宜浓度为 100 mg/L ,两者共同作用下最大可提高厌氧降解效率145%左右.

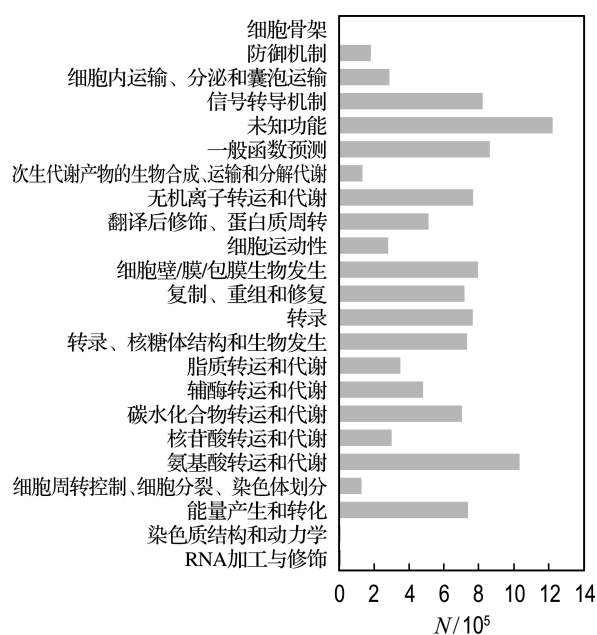
2.4 降解菌群结构与功能预测

通过Illumina高通量测序对富集后的微生物群落结构进行测序和分析,共获得有效序列37 189条,序列平均长度为423 bp,总碱基15 732 401个.选取门和属分类水平上优势丰度的物种进行注释.

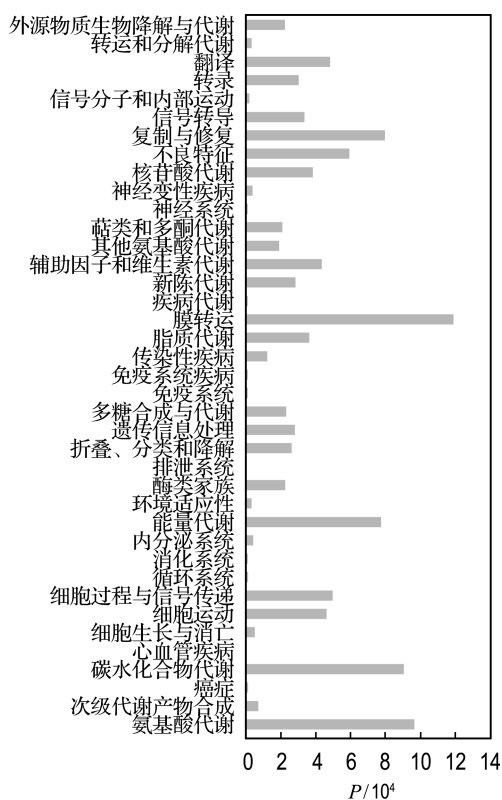
结果显示,在门水平,微生物群落主要包括变形菌门(Proteobacteria, 67.14%)、厚壁菌门(Firmicutes, 23.60%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 9.16%)以及其他门类($<0.1\%$),其中变形菌门占比最高.属水平中,弧菌属(*Vibrio*)占比约52.94%,交替单胞菌属(*Alteromonas*)占比约12.43%,梭菌属(*Clostridium*)占比约10.90%,孙秀琴属(*Sunxiuqinia*)占比8.96%,嗜中温温暖杆菌属(*Tepidibacter*)占比7.98%,肠球菌属(*Enterococcus*)占比1.55%,其他菌属占比5.25%.变形菌门广泛分布于各类环境中,弧菌、交替单胞菌和梭菌为海洋、河口和养殖区中常见的细菌,在海洋生态系统中占据优势地位^[34].文献中报道恶臭假单胞杆菌和艰难梭菌等具有降解NAs的能力^[21].推测交替单胞菌和梭菌可能参与了CHCA的生物降解.

为了解降解菌群的潜在功能,基于PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states)对菌群OTU进行COG和KEGG功能注释,结果如图4所示.

图4(a)中COG功能预测结果显示,菌群中能量产生和转化蛋白(C)、氨基酸转运和代谢蛋白(E)、碳水化合物转运和代谢蛋白(G)、生物膜的合成基因(M)以及信号传递蛋白(T)表现出较高的丰度,推测这些蛋白可能参与了CHCA的生物降解过程.图4(b)中KEGG功能预测结果显示,细胞膜转运、能量代谢、碳水化合物代谢和氨基酸代谢通路有显著富集,推测这些通路的富集在CHCA降解过程中发挥着重要作用.其中,碳水化合物转运与代谢蛋白和生物膜的合成基因可以直接对生物降解起到正面的促进作用,McKew



(a) 基于 COG 数据库的功能分类



(b) 基于 KEGG 数据库的功能分类

图 4 数据库功能注释

Fig. 4 Database function annotation

等在研究商用 NAs 混合物的生物降解过程中,发现菌株 *P. fluorescens* Pf-5, 脂质/脂肪酸代谢蛋白、多膜孔蛋白、转运蛋白和趋化蛋白显著上调, 其他蛋白如 CuNiR 和 Moco 生物合成蛋白也高度上调, 这可能代表了细胞对氧化应激的一般反

应, 以及细胞的解毒机制, 以保护细胞免受环境应激和 NAs 毒性影响^[35]. 因此, 本实验中功能基因的富集可能是菌群对 NAs 的一种生物响应策略, 有利于微生物更好地适应和利用 NAs 污染物.

3 结 论

(1) 葡萄糖和乙酸钠抑制了 CHCA 的厌氧生物降解, 硝酸盐和亚微米磁铁可显著提高 CHCA 的厌氧生物降解效率, 厌氧生物降解过程均符合准一级动力学反应.

(2) 降解过程中, 硝酸盐和亚微米磁铁适宜浓度分别为 200 mg/L 和 100 mg/L; 其中, 硝酸盐可将 CHCA 降解效率提高约 70%, 亚微米磁铁可将厌氧降解效率进一步提高约 44.5%.

(3) 降解菌群中, 变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门为优势菌门; 弧菌属、交替单胞菌属和梭菌属为优势菌属. 测序结果表明, 细胞膜转运、能量代谢、碳水化合物代谢和氨基酸代谢通路有显著富集, 推测其参与了 CHCA 厌氧生物降解.

参考文献:

- [1] DORN P B. Case histories-The petroleum industry [M]// FORD D L. **Toxicity Reduction: Evaluation and Control**. Boca Raton: CRC Press, 1992: 183-223.
- [2] WAN Yi, WANG Beili, KHIM J S, *et al.* Naphthenic acids in coastal sediments after the Hebei Spirit oil spill: A potential indicator for oil contamination [J]. **Environmental Science and Technology**, 2014, **48**(7): 4153-4162.
- [3] GUPTA S, PATHAK B, FULEKAR M H. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: A review [J]. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, 2015, **14**: 241-269.
- [4] WHITBY C. Microbial naphthenic acid degradation [J]. **Advances in Applied Microbiology**, 2010, **70**: 93-125.
- [5] KANNEL P R, GAN T Y. Naphthenic acids degradation and toxicity mitigation in tailings wastewater systems and aquatic environments: A review [J]. **Journal of Environmental Science and Health - Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, 2012, **47**(1): 1-21.
- [6] KAMALUDDIN M, ZWIAZEK J J. Naphthenic acids inhibit root water transport, gas exchange and leaf growth in aspen (*Populus tremuloides*)

- seedlings [J]. **Tree Physiology**, 2002, **22** (17): 1265-1270.
- [7] LEUNG S S, MACKINNON M D, SMITH R E H. The ecological effects of naphthenic acids and salts on phytoplankton from the Athabasca oil sands region [J]. **Aquatic Toxicology**, 2003, **62**(1): 11-26.
- [8] SCARLETT A G, REINARDY H C, HENRY T B, *et al.* Acute toxicity of aromatic and non-aromatic fractions of naphthenic acids extracted from oil sands process-affected water to larval zebrafish [J]. **Chemosphere**, 2013, **93**(2): 415-420.
- [9] MISITI T M. Fate and effect of naphthenic acids in biological systems [D]. Atlanta: Georgia Institute of Technology, 2012.
- [10] FRANK R A, KAVANAGH R, KENT BURNISON B, *et al.* Toxicity assessment of collected fractions from an extracted naphthenic acid mixture [J]. **Chemosphere**, 2008, **72** (9): 1309-1314.
- [11] CLEMENTE J S, FEDORAK P M. A review of the occurrence, analyses, toxicity, and biodegradation of naphthenic acids [J]. **Chemosphere**, 2005, **60**(5): 585-600.
- [12] HEADLEY J V, MCMARTIN D W. A review of the occurrence and fate of naphthenic acids in aquatic environments [J]. **Journal of Environmental Science and Health - Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, 2004, **39**(8): 1989-2010.
- [13] ZAN Shuaijun, WANG Jing, WANG Fengbo, *et al.* Variation and distribution of naphthenic acids in Dalian Bay sediment [J]. **Marine Pollution Bulletin**, 2019, **140**: 597-602.
- [14] WANG Beili, WAN Yi, GAO Yingxin, *et al.* Determination and characterization of oxy-naphthenic acids in oilfield wastewater [J]. **Environmental Science and Technology**, 2013, **47**(16): 9545-9554.
- [15] ROGERS V V, LIBER K, MACKINNON M D. Isolation and characterization of naphthenic acids from Athabasca oil sands tailings pond water [J]. **Chemosphere**, 2002, **48**(5): 519-527.
- [16] PRESENTATO A, CAPPELLETTI M, SANSONE A, *et al.* Aerobic growth of *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 using selected naphthenic acids as the sole carbon and energy sources [J]. **Frontiers in Microbiology**, 2018, **9**: 672.
- [17] LU Xiaoying, ZHANG Tong, FANG H H, *et al.* Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria [J]. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2011, **65**(1): 204-211.
- [18] JOHNSON R J, WEST C E, SWAIH A M, *et al.* Aerobic biotransformation of alkyl branched aromatic alkanolic naphthenic acids via two different pathways by a new isolate of *Mycobacterium* [J]. **Environmental Microbiology**, 2012, **14** (4): 872-882.
- [19] DEL RIO L F, HADWIN A K M, PINTO L J, *et al.* Degradation of naphthenic acids by sediment micro-organisms [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2006, **101**(5): 1049-1061.
- [20] CLOTHIER L N, GIEG L M. Anaerobic biodegradation of surrogate naphthenic acids [J]. **Water Research**, 2016, **90**: 156-166.
- [21] 刘庆龙, 唐景春. 环烷酸的生物降解技术 [J]. 中国科技论文, 2013, **8**(12): 1197-1203.
- LIU Qinglong, TANG Jingchun. Biodegradation technology of naphthenic acids [J]. **China Sciencepaper**, 2013, **8**(12): 1197-1203. (in Chinese)
- [22] MUSAT F, GALUSHKO A, JACOB J, *et al.* Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria [J]. **Environmental Microbiology**, 2009, **11**(1): 209-219.
- [23] KUNG J W, MEIER A K, MERGELSBERG M, *et al.* Enzymes involved in a novel anaerobic cyclohexane carboxylic acid degradation pathway [J]. **Journal of Bacteriology**, 2014, **196**(20): 3667-3674.
- [24] LAUFER K, RØY H, JØRGENSEN B B, *et al.* Evidence for the existence of autotrophic nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria in marine coastal sediment [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2016, **82**(20): 6120-6131.
- [25] OOSTERKAMP M J, MEHBOOB F, SCHRAA G, *et al.* Nitrate and (per)chlorate reduction pathways in (per)chlorate-reducing bacteria [J]. **Biochemical Society Transactions**, 2011, **39**(1): 230-235.
- [26] O'LOUGHLIN E J, GORSKI C A, SCHERER M M, *et al.* Effects of oxyanions, natural organic matter, and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) and the formation of secondary mineralization products [J]. **Environmental Science and Technology**, 2010, **44**(12): 4570-4576.
- [27] MA Qiao, QU Yuanyuan, ZHANG Xuwang, *et al.* Systematic investigation and microbial community profile of indole degradation processes in two aerobic activated sludge systems [J]. **Scientific Reports**,

- 2015, **5**: 17674.
- [28] ISLAM M S, ZHANG Yanyan, MCPHEDRAN K N, *et al.* Next-generation pyrosequencing analysis of microbial biofilm communities on granular activated carbon in treatment of oil sands process-affected water [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015, **81**(12): 4037-4048.
- [29] MOTZER W E. Perchlorate: Problems, detection, and solutions [J]. **Environmental Forensics**, 2001, **2**(4): 301-311.
- [30] CARLSON H K, KUEHL J V, HAZRA A B, *et al.* Mechanisms of direct inhibition of the respiratory sulfate-reduction pathway by (per)chlorate and nitrate [J]. **ISME Journal**, 2015, **9**(6): 1295-1305.
- [31] MUSAT F, WILKES H, BEHREND S, *et al.* Microbial nitrate-dependent cyclohexane degradation coupled with anaerobic ammonium oxidation [J]. **ISME Journal**, 2010, **4**(10): 1290-1301.
- [32] CRUZ VIGGI C, ROSSETTI S, FAZI S, *et al.* Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation [J]. **Environmental Science and Technology**, 2014, **48**(13): 7536-7543.
- [33] 王莹, 刘同旭, 李芳柏. 微生物-矿物间半导体介导电子传递机制研究进展 [J]. 地球科学进展, 2016, **31**(4): 347-356.
- WANG Ying, LIU Tongxu, LI Fangbai. Advances in the semiconductor-mediated electron transfer mechanism at microbe-mineral interface [J]. **Advances in Earth Science**, 2016, **31**(4): 347-356. (in Chinese)
- [34] LUKJANCENKO O, USSERY D W. *Vibrio* chromosome-specific families [J]. **Frontiers in Microbiology**, 2014, **5**: 73.
- [35] MCKEW B A, JOHNSON R, CLOTHIER L, *et al.* Differential protein expression during growth on model and commercial mixtures of naphthenic acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 [J]. **Microbiology Open**, 2021, **10**(4): e1196.

Study of anaerobic biodegradation characteristics of cyclohexanecarboxylic acid by marine consortium

ZAN Shuaijun¹, JIN Yuan², FAN Jingfeng², DU Miaomiao¹, WANG Jing^{*1}

(1. School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. National Marine Environment Monitoring Center, Dalian 116023, China)

Abstract: Naphthenic acids (NAs) are a new class of environmental pollutants with strong toxicity. At present, the biodegradation of NAs is mainly concentrated in the terrestrial environment, and most of them are aerobic degradation, while the anaerobic biodegradation of NAs in the marine environment has rarely been reported. The enriched marine consortium is used to investigate the anaerobic biodegradation characteristics of cyclohexanecarboxylic acid (CHCA) under different conditions, and the microbial community structure and function are analyzed by 16S high-throughput sequencing. The results show that the glucose and sodium acetate of co-substrates can inhibit the anaerobic biodegradation of CHCA, the sodium nitrate (200 mg/L) can increase the anaerobic biodegradation rate of CHCA by about 70%, and the denitrification degradation efficiency is further increased by about 44.5% under the coexistence of 100 mg/L submicron magnets, and the anaerobic biodegradation of CHCA follows the pseudo-first-order kinetic reaction. The Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes are the dominant bacterial phyla; *Vibrio*, *Alteromonas* and *Clostridium* are the dominant bacterial genus. In addition, pathways of cell membrane transport and metabolism of energy, carbohydrate and amino acid are significantly enriched during the CHCA degradation. The study expands the biotransformation behavior of NAs and provides enlightenment for the anaerobic bioremediation of NAs in the marine environment.

Key words: naphthenic acid; marine environment; anaerobic degradation; electron acceptor; community structure