



Research
Green Plant Protection Innovation—Article

甘油诱导的鼠李糖脂增强伯克霍尔德菌属 C3 中二苯并噻吩的生物降解

Camila A. Ortega Ramirez, Abraham Kwan, Qing X. Li*

Department of Molecular Biosciences and Bioengineering, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2018

Revised 20 May 2019

Accepted 23 July 2019

Available online 25 January 2020

关键词

生物降解

生物修复

生物表面活性剂

生物转化

甘油

微生物代谢

鼠李糖脂

摘要

在高度城市化的地区，人为活动造成的污染损害了土地的完整性，减少了农业耕作的土壤利用率。二苯并噻吩（DBT）是一种城市地区常见的杂环芳香烃，常被用作污染物微生物转化研究的模型化合物。人体接触的可能性及其健康风险使DBT成为一种令人担忧的化学品，因此，需要对DBT进行环境管理。利用甘油刺激伯克霍尔德菌属C3 (*Burkholderia* sp. C3)，降解其中的DBT，内容涉及以下方面：①DBT的生物降解动力学；②细菌生长；③鼠李糖脂（RL）的生物合成；④RL分泌。在甘油与DBT最佳摩尔比的情况下，实验第1天，DBT的生物降解速率常数与单独使用DBT培养基相比提高了18倍，DBT的生物降解率提高了25%~30%。这种增长变化与细菌生长加快和RL生物合成反应的增强有关。蛋白质组学研究揭示了参与RL生物合成作用的上游和主要阶段的酶类。在增添了甘油和DBT的培养基中鉴定出了鼠李糖脂的同系物：Rha-C10-C10、Rha-Rha-C10-C10、Rha-Rha-C10-C12和Rha-Rha-C12-C12，然而，在不含甘油或添加了RL抑制剂的培养物中只鉴定出Rha-C12-C12。研究表明，甘油通过促进RL的合成和细菌的生长来促进DBT的生物降解。根据这些结果，值得进一步研究甘油对环境生物的刺激作用，以促进生物修复技术的发展和提高农业土壤的有效性。

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

土壤和水是农业生产必不可少的自然资源。在高度城市化的地区，人类活动造成的污染损害了农田和河流的完整性，导致土壤功能下降并引发食品安全问题。北非和南亚等地区可用土地的利用率已超过90% [1]。在中国，污水灌溉造成了土壤污染[2]。土壤生物修复可以帮助恢复土地以进行重复利用和农作物生产。生物修复是利用微生物的生命代谢活动去清除环境中的污染物[3,4]。多环芳烃（PAH）是一类典型的人类活动污染物[2]。二苯并噻吩（DBT）是一种重要的含硫PAH [5]，常被用作评估多环芳烃土壤污染[5]的模型化合物。

DBT是一种疏水性化合物，水溶解度为 $7.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，辛醇-水系数为4.44 [6]。DBT的亲脂性使其既能够在环境中富集，又能通过食物链进行生物蓄积，从而引发食品安全和生态毒理风险[7]。研究发现，DBT会明显损害斑马鱼胚胎的心脏功能，并且高浓度的DBT含量与胚胎形态异常和死亡[6]相关。一项研究表明，DBT及其代谢产物在T47D人乳腺癌细胞[8]中充当雌激素类化合物。沉积物和城市地区中DBT的高检测频率、人体接触的潜在风险和健康威胁使其成为一种令人担忧的化学品，因此需要对DBT进行环境管理[5,8]。

疏水性污染物（如DBT）的生物修复经常受到微生物丰度低和化学生物利用度差的限制，导致生物降

* Corresponding author.

E-mail address: qingl@hawaii.edu (Q.X. Li).

解动力学作用降低[9]。除了分解代谢酶[10–12]外,在污染土壤中有意增加能够产生生物表面活性剂的微生物[13,14],也是一种提高化学溶解和生物利用度的方法[15,16]。细菌产生生物表面活性剂和分解代谢酶的现象[17–20]表明,微生物通过进化适应来克服底物利用性低的问题。

伯克霍尔德菌C3是从PAH污染区分离出来的PAH降解菌[21]。它含有负责降解PAH[如菲(phenanthrene)]的双加氧酶基因[22,23]。本研究旨在探讨甘油作为共底物刺激C3菌株降解DBT。我们的初步研究表明,与其他测试底物(如葡萄糖)不同,甘油可以增强DBT的生物降解作用。在添加甘油的培养基过程中,观察到明显的DBT增溶、泡沫形成和C3对DBT的早期降解,而在仅有DBT的培养基中未观察到此现象。这种差异是由一种表面活性剂的分泌造成的。甘油很容易进入 β -氧化和从头合成脂肪酸(FAS II)的脂质代谢途径,从而影响鼠李糖脂(RL)生物表面活性剂和聚羟基烷酸(PHA)的产生[24,25]。关于伯克霍尔德菌属(*Burkholderia* sp.)产生的鼠李糖脂(RL)的报道很少。据我们所知,这是关于甘油诱导的RL生物合成与DBT生物降解直接关联的首次报道。我们的研究表明,甘油生物刺激可提高疏水性污染物的生物利用度,从而实现对环境中DBT的有效降解。因此,本研究中涉及的研究技术可能适用于疏水性污染物(如农药)的生物修复。

2. 材料和方法

2.1. C3 的培养和二苯并噻吩的生物降解

在450 °C下,将实验试管高温烘烤3 h。将溶解在丙酮中的DBT倒入试管中,然后用氮气(N₂)将丙酮完全蒸发。接下来,往试管中加入5 mL的基本培养基(MM)[26]和适量的50%甘油的水溶液。DBT的终浓度为0.54 mmol·L⁻¹[100 ppm (1 ppm = 10⁻⁶)];甘油的终浓度为0、0.05 mmol·L⁻¹、0.5 mmol·L⁻¹、5 mmol·L⁻¹、50 mmol·L⁻¹、200 mmol·L⁻¹或500 mmol·L⁻¹。在LB富集培养基中30 °C过夜培养的C3细胞,用基本培养基(MM)清洗3次,把基本培养基的光密度调整至OD₆₀₀ = 0.5时的水平,在0.05 OD₆₀₀的浓度下,在每支试管中接种0.5 mL的C3细胞。同时,还准备了含甘油但不含DBT的培养物。在RL生物合成抑制实验中,2-溴己酸(HEX)和2-溴辛酸(OC)的终浓度为2 mmol·L⁻¹。在30 °C的旋转振荡器中以200 r·min⁻¹的速度培育培养物。

高压灭菌的C3细胞为对照组。

2.2. 二苯并噻吩的提取和分析

根据参考文献[27]的方法提取和分析DBT。实验过程总结为:在用氯化氢(HCl)将培养物酸化至pH值为2~3后,用乙酸乙酯提取DBT 3次。然后在配有Aqua C18色谱柱(150 mm×4.60 mm,粒径为5 μm;Phenomenex, Inc., USA)的Agilent 1100系列高效液相色谱仪(HPLC)上分析DBT,检测波长为245 nm。流动相为60%的乙腈水溶液(ACN)。

2.3. 数据计算

根据平均值条的标准误差(平均值代表3个或6个生物学重复之间的差异)绘制时间点。降解曲线用一级动力学方程 $C = C_0 \times e^{-kt}$ 拟合,其中, k 是DBT生物降解速率常数, C 是时间 t 时测得的浓度, C_0 是初始浓度(表1)。采用公式 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 计算DBT的半衰期($t_{1/2}$)。采用IBM SPSS Statistics 19软件进行统计学检验,如Tukey真实显著性差异检验法(HSD)测试、最小显著差异法(LSD)测试和Bonferroni法测试。

2.4. 蛋白质的提取

蛋白质的提取方法以研究报告[28]为基础并稍加改动:实验第2天从培养物中收集C3细胞,用过滤和消毒的蒸馏水清洗3次,然后进行蛋白质的提取。将9 mL的9 mol·L⁻¹尿素溶液与1 mL的10×蛋白酶抑制剂溶液混合,制备裂解缓冲液。用Sigma快速蛋白酶抑制剂片剂(Sigma-Aldrich, USA)制备蛋白酶抑制剂溶液。用5850g的离心力完全除去培养基后,将细胞沉淀重新悬浮在700 μL的裂解缓冲液中。将该细胞悬浮液添加到300 μL的裂解缓冲液并将混合液置于螺纹样品瓶中,该螺纹样品瓶(比例为2:3)中预先装有直径为0.5 mm玻璃珠(BioSpec Products, USA)。先后在小型珠磨式组织研磨器(BioSpec Products, USA)和冰上以最大速度循环进行6次珠磨,各持续1 min,破坏细胞膜。在离心力20 820g下离心15 min去除细胞碎片后,用Amicon Ultra-0.5 mL离心过滤器(3 K cutoff; Millipore, USA)过滤培养液的上清液以浓缩蛋白质。然后用500 μL mQ水漂洗过滤器。

2.5. 液相色谱-质谱(LC-MS)分析用蛋白质样品的制备

将36 μg的蛋白质上样到12%的SDS-PAGE。用含考

表1 生物降解速率常数的增强及DBT的半衰期取决于甘油浓度

Substrate	Rate constant (d ⁻¹)	R ²	Half-life (d)	N	Fold change ^a
0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.025 ± 0.01	0.63	27.5	30	0.0
0.05 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.064 ± 0.01	0.84	10.8	15	1.6
0.5 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.359 ± 0.09	0.90	1.9	15	13.2 ^b
5 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.390 ± 0.05	0.99	1.8	15	14.5 ^b
50 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.479 ± 0.02	0.99	1.5	30	18.0 ^b
200 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.229 ± 0.02	0.99	3.0	15	8.1 ^b
500 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT	0.113 ± 0.00	1.00	6.1	15	3.5
0.5 mmol·L ⁻¹ DBT (autoclaved C3 cells)	0.002 ± 0.01	0.31	287.6	27	-0.9
50 mmol·L ⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L ⁻¹ DBT (autoclaved C3 cells)	0.009 ± 0.00	0.99	70.44	15	-0.6

Exponential decay equation, $C = C_0 \times e^{-kt}$ was used for fitting “N” data points where k is rate constant and t is time in day; R^2 is the coefficient of determination.

^aRelative to rate constant of 0.5 mmol·L⁻¹ DBT.

^bBiostimulation at these glycerol concentrations was statistically significant (Tukey HSD; LSD; Bonferroni; $p < 0.001$).

马斯蓝的凝胶给蛋白质条带染色，以便于观察。每个凝胶泳道容积被分级为约1 mm³，并用25 mmol·L⁻¹碳酸氢铵 (NH₄HCO₃) 或50%乙腈 (ACN) 清洗，直至碎片变得清晰可见。先用100% ACN对凝胶碎片脱水，然后在56 °C下进行30 min的二硫苏糖醇还原反应，然后在室温下进行20 min的碘乙酰胺烷基化反应。在37 °C下用胰蛋白酶/Lys-C混合液 (Mass-Spec Grade, Promega, USA) 消化凝胶里的蛋白质，时长16~18 h。将蛋白质消化物脱盐并用Pierce C18 tips (Thermo Scientific, USA) 浓缩，然后在Bruker nanoLC-amaZon速度离子阱质谱仪系统上进行分析。在C18分析柱 (0.1 mm × 150 mm, 3 μm, 200 Å, Bruker, USA) 上用含0.1%甲酸的乙腈溶液 (浓度配比范围: 5%~65%) 梯度洗脱80 min (2 min的运行延迟) 后分离出肽。洗脱90 min后，将流动相更改为含有0.1%甲酸的95% ACN溶液，并保持原样10 min，下一步用含有0.1%甲酸的5% ACN溶液柱平衡20 min。流速为800 nL·min⁻¹。质谱仪的参数设置为: 毛细管电压为1600 V，毛细管温度为149.5 °C。在质荷比 (m/z) 400~3000的范围内进行扫描，然后对10种最丰富的离子进行数据相关串联质谱 (MS/MS) 分析，仪器误差为0.5 Da。动态排斥设置为重复同一前体离子两次，然后排斥0.8 min。

2.6. 蛋白质数据库和数据库检索

使用数据分析软件 (Bruker, USA) 将原始文件 (文件类型为BAF) 转换为mascot 通用格式 (.mgf格式)。峰值提取算法为顶点算法。绝对强度阈值为100。

标准型和同工型蛋白质序列 (492个条目) 数据库为FASTA格式，并从UniProt数据库下载 (2016年4月4日上午9:35)。该数据库由固定搜索词——伯克霍尔德

菌 (*Burkholderia*) (UniProt分类法: 32008) 和其他关键词——不同蛋白质名称组成。使用MyriMatch搜索引擎进行数据库搜索[29]。配置如下: 分析仪器类型为离子阱，前体质量为auto，酶为胰蛋白酶/P (允许鉴定胰蛋白酶/Lys-C混合消化物)，平均前体耐受性为1.5 m/z ，片段耐受性为0.5 m/z ，单体前体耐受性为10 ppm。改性方法为: 氨甲酰甲基 (固定) 和蛋氨酸氧化 (可变)。

2.7. 数据标准化

用IdPicker软件对每次处理中鉴定出的蛋白质进行光谱计数。处理方法如下: A. 0.54 mmol·L⁻¹ DBT; B. 50 mmol·L⁻¹甘油; C. 50 mmol·L⁻¹甘油和0.54 mmol·L⁻¹ DBT; D. 50 mmol·L⁻¹甘油、0.54 mmol·L⁻¹ DBT和2 mmol·L⁻¹ OC。将肽与其MS/MS匹配的过滤器如下: 最大错误发现率 (FDR) 为1%，每个肽和每个匹配项至少有一个光谱。为了使肽与蛋白质相匹配，实验至少允许有两个不同的肽和光谱以及两个最小的附加肽[30,31]。根据参考文献[32]中的假设对数据进行标准化，即MS/MS强度等于1且不考虑肽的长度。应用 $\lg(\text{normalized count} + 1)$ ，并将标准化数据与原始数据进行比较。用DEseq [33]进行方差分析 (ANOVA, $p < 0.05$)，找出具有统计学意义的蛋白质丰度变化。每种蛋白质的甘油与DBT相互作用的 p 值和 \lg Fold change (FC)值如表2所示。 \lg FC表示甘油与DBT相互作用的效应量。在有甘油和DBT相互作用的处理 (即处理C和D) 中， \lg FC值增大表明甘油和DBT的相互作用对该处理中蛋白质的丰度有积极影响。

2.8. 鼠李糖脂的提取和定量

根据参考文献[34]的方法提取鼠李糖脂。方法总

表2 实验第2天处理后, 经鉴定的蛋白质调节伯克霍尔德菌属C3中鼠李糖脂的生物合成作用

UniProt ID	Protein description	Relative abundance by treatment				lg FC	p-value
		A	B	C	D		
U1XYV8	HAA synthase (RhlA)	0.85	—	0.86	1.09	1.52	0.090
A0A0B6RU44	Rhamnosyltransferase 1 (RhlB)	1.46	1.02	—	1.28	-0.57	0.407
C4I4U9	Rhamnosyltransferase 1 (RhlB)	0.85	0.81	—	1.34	-1.20	0.274
Q3JLM3*	Rhamnosyltransferase 2 (RhlC)	1.00	0.43	—	—	-4.34	0.001 ^a
A2RWE5	Rhamnosyltransferase 2 (RhlC)	0.94	0.43	—	—	-4.34	0.001 ^a
E1TAD4	Phosphoglucosyltransferase/ phosphomannosyltransferase (AlgC)	0.45	0.62	0.97	0.54	0.68	0.360
B4ECS6	dTDP-glucose 4,6-dehydratase (RmlB)	—	0.13	0.24	0.27	0.84	0.503
H6TI92	dTDP-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase (RmlC)	1.13	—	0.58	1.24	0.91	0.233
Q2SYI1	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (RmlD)	1.22	0.60	1.10	1.52	2.73	0.030 ^a
Q63S87	β -oxoacyl-ACP synthase 2 (FabF)	—	0.62	1.38	—	0.78	0.235
A0A0D5VAR9	3-oxoacyl-ACP-reductase (FabG)	1.32	1.06	1.36	1.45	-0.58	0.328
A0A0D5VAC6	3-hydroxy-ACP-dehydratase (FabZ)	0.98	—	—	1.10	1.39	0.140
K8R0G3	Acyl-CoA dehydrogenase (FadE)	—	—	0.69	—	1.99	0.089
Q3JVY2	Enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (FadB)	—	1.15	1.14	—	-0.20	0.768

Treatments were A: 0.5 mmol·L⁻¹ DBT; B: 50 mmol·L⁻¹ glycerol; C: 50 mmol·L⁻¹ glycerol and 0.5 mmol·L⁻¹ DBT; D: 50 mmol·L⁻¹ glycerol, 0.5 mmol·L⁻¹ DBT, and 2 mmol·L⁻¹ OC. Three biological replicates were analyzed in each treatment. The mean normalized value was shown in each treatment. The lg FC represented the glycerol*DBT interaction term. ACP: acyl carrier protein; CoA: coenzyme A; HAA: 3-hydroxy alkanolic acid.

^aThe changes in relative abundance among treatments showed significant differences ($p < 0.05$).

结为: 实验第2天, 在离心力5850g下离心10 min后, 用过滤器(孔径为0.2 μ m)过滤分离细胞。用乙酸乙酯(ethyl acetate)萃取培养基3次。在温和的氮气气流下混合并干燥鼠李糖脂萃取物, 收集剩余物, 重新悬浮于0.5 mL的甲醇中。在基本培养基(MM)中, 对溶于5 mmol·L⁻¹或50 mmol·L⁻¹甘油中的RL标准液(50 μ g·mL⁻¹)进行相同的操作。用orcinol测试[35][含0.19% orcinol (m/V)的53%硫酸(V/V)溶液]对鼠李糖脂进行定量检测。收集和干燥250 μ L样本试样, 将其重新悬浮于250 μ L水中并稀释定容。向100 μ L鼠李糖脂萃取物溶液或不同浓度的鼠李糖脂标准液中加入900 μ L苔黑素溶液试样, 然后将混合液在80 $^{\circ}$ C下温育30 min, 在421 nm处测量其吸光值。在0~500 μ g·mL⁻¹的浓度范围内绘制鼠李糖脂的标准曲线。根据参考文献[34]的方法, 用配备有Aqua C18色谱柱(150 mm \times 4.60 mm, 粒径为5 μ m; Phenomenex Inc., USA)的Agilent 1100系列的高效液相色谱仪(HPLC; Agilent Technologies, USA)分离剩余的250 μ L甲醇重悬浮液。分别在时间段(F1)4~5 min处和时间段(F2)5~6 min处收集两个鼠李糖脂馏分, 然后放置在45 $^{\circ}$ C条件下至完全干燥。将馏分重新悬浮于10 μ L 10%的ACN/水混合溶液中, 用Pierce C18 tips (Thermo Scientific, USA)将馏分脱盐。对制造商的方案进行了如下修改: 不使用三氟乙酸。

将F1和F2样本用C18脱盐10次, 用5%的ACN清洗5次, 用10 μ L 70%的ACN洗脱。在45 $^{\circ}$ C下将样本充分干燥, 然后重新悬浮于2 μ L 50%的ACN中, 该溶液中含有40 mg·mL⁻¹的2,5-二羟基苯甲酸(DHB)基质。将1 μ L基质点样到目标板上并风干, 然后点样1 μ L样品/基质混合物。

2.9. 鼠李糖脂的鉴定

按照公开的程序步骤, 用基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI/TOF)ultraflex^{III}质谱仪(Bruker, USA)的正反射子模式操作鉴定出鼠李糖脂的同系物[36]。用聚合度(DP)链校准该仪器: 麦芽三糖水合物(DP3, MW: 504.44 g·mol⁻¹)、麦芽四糖(DP4, MW: 666.57 g·mol⁻¹)、麦芽五糖(DP5, MW: 828.71 g·mol⁻¹)和麦芽六糖(DP6, MW: 990.85 g·mol⁻¹) [37]。从每个聚合度链中提取500 μ mol·L⁻¹试样溶于mQ水中。依次将5 μ L聚合度链混合到20 μ L的DHB基质中, 混合液的最终浓度为62.5 μ mol·L⁻¹。在MALDI目标板上观察2 μ L的混合物试样, 风干试样。质谱仪 m/z 的范围是300~1200, 激光束脉动频率为每次激光发射50次脉动, 激光强度为38%~50%。离子质量被限制在300 Da以下。使用Flexi Analysis软件和Compass Isotope Pattern模拟软件(Bruker, USA)进行质谱分析。根据参考报告[38]的方法创建in

silico 数据库, 为鼠李糖脂分配RL峰, 质量误差为0.5 Da。

使用Agilent 6520A液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪(LC-Q-TOF-MS)(Agilent Technologies, Canada)对样品进行串联质谱(MS/MS)分析。在Luna C18色谱柱(100 mm×2.0 mm, 粒径为3 μm; Phenomenex Com Inc., USA)上, 缓冲溶液从5 mmol·L⁻¹ 5% ACN甲酸铵缓冲水溶液(aqueous ammonium formate buffer)变换到95% ACN甲酸铵缓冲水溶液进行梯度洗脱, 从而分离出20 μL的鼠李糖脂样品, 分离后静置15 min。流动相的流速为0.3 mL·min⁻¹。每次运行仪器之前先平衡色谱柱10 min。电喷雾电离界面设置为负极。毛细管电压为4000 V。碎裂器电压和分离器电压分别为180 V和80 V。当系统处于MS/MS模式时, 干燥和雾化气体设定为氮气, 碰撞气体设定为氦气。气体温度设为350 °C。干燥气流量为10 L·min⁻¹。雾化器压力为25 psi。在 m/z 为50~1700范围内收集全扫描数据。MS/MS模式下的碰撞能量为20 eV。

3. 结果与讨论

3.1. 甘油的生物刺激作用增强了 DBT 的生物降解, 促进了 *Burkholderia* sp. C3 菌株的生长

这项研究采用一种生物刺激策略, 研究甘油对*Burkholderia* sp. C3菌株的DBT生物降解能力的影响。DBT和甘油的共底物实验既没有显示出碳分解代谢抑制现象, 也没有拮抗作用, 这在其他共底物混合物中已被报道[16,39,40]。如图1所示, 结果表明, 用甘油进行生物刺激可促进C3细胞的生长, 同时增强DBT的生物降解。实验表明, DBT的生物降解的增强程度取决于甘油与DBT的摩尔比和培育时间。当用0.5 mmol·L⁻¹、5 mmol·L⁻¹、50 mmol·L⁻¹和200 mmol·L⁻¹的甘油刺激培养物时, 观察到显著差异(Tukey HSD; LSD; Bonferroni; $p < 0.001$)。在这些浓度下, 培育1天后, 甘油将DBT的生物降解率提高了25%~30%。培育7天后, 在甘油(50 mmol·L⁻¹)与DBT摩尔比为92.6:1的培养物中, 菌株C3 100%地降解了0.54 mmol·L⁻¹(100 ppm)的DBT。该甘油的最佳浓度用于蛋白质组学和质谱实验。在此浓度下, DBT半衰期从27.5天降低至1.5天, 降至最低, DBT降解速率常数显示出18倍的增长(表1)。如表1所示, 在高压灭菌细菌的对照培养物中观察到的降解可忽略不计。与添加50 mmol·L⁻¹甘油时的DBT生

物降解动力学相似, 在含有0.5 mmol·L⁻¹的培养物中, C3菌株在第10天降解了0.54 mmol·L⁻¹ DBT的92%。但是, 在此甘油浓度下, C3菌株的生长保持在0.05 OD₆₀₀, 这表明生物量的增加不是DBT生物降解增强的唯一原因, DBT生物降解增强涉及其他分子机制。统计分析表明, 第7天到第10天之间DBT生物降解没有显著差异(Tukey HSD; LSD; Bonferroni; $p < 0.05$)。因此, 在本研究条件下建议生物降解7天。

作为唯一的碳源, DBT不支持菌株C3细胞的生长。培育10天后, OD₆₀₀维持在0.05, 这与初始接种量相等(图1)。在含单一碳源的液体培养物中PAH的生物降解取决于细菌菌株、PAH的结构和浓度。例如, 在第7天, C3菌株降解了40 ppm DBT的94% [22]。我们的结果表明, 在第7天, C3降解了100 ppm DBT的11%~12%。在此浓度下, DBT对细菌没有明显的益处, 甚至观察到生物降解效率降低。这一发现得到了以下事实的支持: 与单用甘油相比, 甘油-DBT混合物中的C3细胞生长受到抑制。例如, 当0.54 mmol·L⁻¹的DBT与甘油组成的混合物的浓度介于50~500 mmol·L⁻¹之间, 在培养1天后开始, C3细胞生长减少, 相对于单独的甘油, 其生长增加到0.3 OD₆₀₀。在较低浓度(0.05~5 mmol·L⁻¹)的甘油中, DBT的生长不受抑制。50~500 mmol·L⁻¹的甘油抑制C3细胞生长可能与DBT、DBT的代谢产物或两者的毒性有关。据报道, PAH的疏水性和致癌性会影响其毒性[16,41,42]。

3.2. RL 生物合成途径在 *Burkholderia* sp. C3 菌株中被激活

甘油是假单胞菌产生RL的良好碳源[38]。它可以被代谢吸收到影响PHA颗粒形成和RL产生的脂质的途径中[24,38,43,44]。表2列出了在四种处理中检测到的酶的相对丰度, 即: A. 0.54 mmol·L⁻¹ DBT; B. 50 mmol·L⁻¹ 甘油; C. 50 mmol·L⁻¹甘油和0.54 mmol·L⁻¹ DBT; D. 50 mmol·L⁻¹甘油、0.54 mmol·L⁻¹ DBT和2 mmol·L⁻¹ OC以及lg FC和 p 值。这些酶负责RL的生物合成, 如图2所示。RL的生物合成需要分别由FAS II [45,46]和(或) β -氧化[24]产生的 R -3-羟基癸酰基-ACP或-CoA脂质前体, 以及dTDP- L -鼠李糖糖前体[43]。一旦脂质和糖的前体产生, RhlABC介导单-或双-RL的形成。在四种处理中检测到了与dTDP- L -鼠李糖生物合成有关的合成代谢酶AlgC和RmlBCD(图2、表2)。RmlD催化dTDP-4-酮-6-脱氧- L -甘露糖合成dTDP-鼠李糖。在不同处理间RmlD

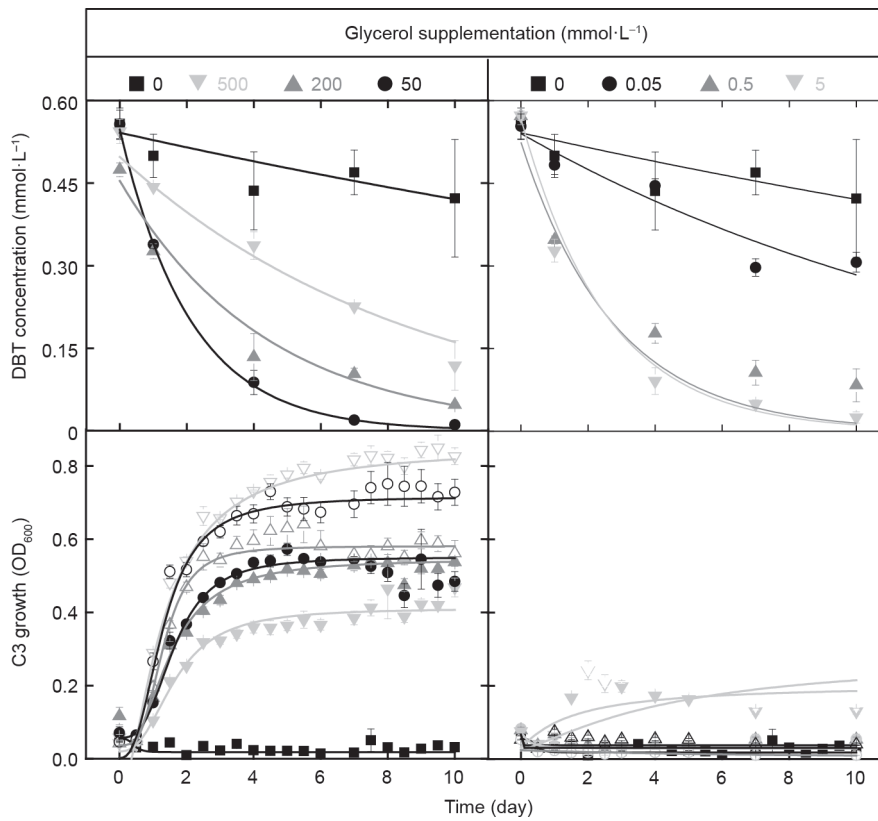


图1. *Burkholderia* sp. C3菌株的DBT生物降解动力学及其在0.54 mmol·L⁻¹ DBT和不同甘油补充量 (0、0.05 mmol·L⁻¹、0.5 mmol·L⁻¹、5 mmol·L⁻¹、50 mmol·L⁻¹、200 mmol·L⁻¹和500 mmol·L⁻¹) 下的10天培养期中的生长。

的相对蛋白丰度变化显著 ($p < 0.05$), 并且lg FC上调。lg FC代表甘油与DBT相互作用项的影响。它的上调表明这种相互作用对含有该项的处理有积极的作用。催化该途径中前一步的酶RmlC也被上调。RmlD和RmlC的相对丰度表明RL生物合成抑制剂2-溴辛酸(OC)不会抑制RL糖前体的合成。

在四种处理中检测到来自FAS II和(或) α -氧化途径的酶(图2、表2)。FabG是通过FAS II途径催化R-3-羟基癸酰ACP合成的最后一步的酶[46]。在所有处理中, FabG的相对丰度均大于1, 表明已检测到该蛋白质。但是, p 值高于0.05, 这意味着它们的相对丰度没有显著差异(表2)。在处理C中, 由FabF催化的先前步骤被上调。处理C中 β -氧化酶FadB和FadE含量丰富(表2)。结果表明, 在培育的第2天, FAS II和 β -氧化途径的后期阶段在C3中是活跃的。

RhlA产生3-羟基链烷酸(HAA), 然后RhlB将其用于单鼠李糖脂的生物合成[47]。鉴定到RhlA, lg FC显示上调。同时鉴定到鼠李糖基转移酶RhlB和RhlC(表2)。RhlB和RhlC分别参与单鼠李糖脂[48,49]和二鼠李糖脂[50]的直接形成。表2中鉴定的蛋白质表明,

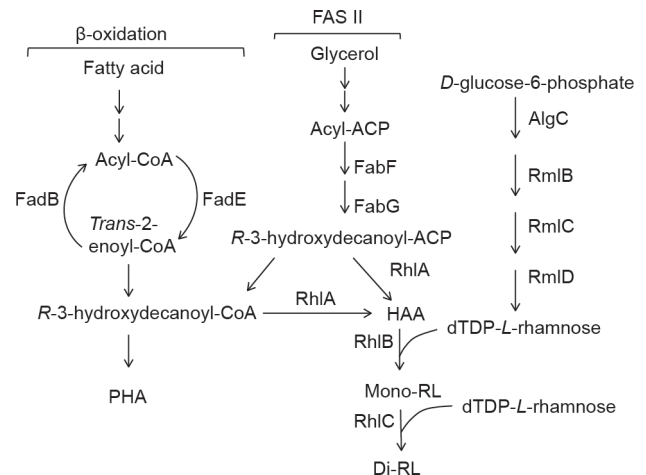


图2. *Burkholderia* sp. C3菌株中与RL生物合成有关的蛋白质的鉴定。粗体蛋白在甘油与DBT相互作用项(lg FC)中显示上调。FadB: 烯脂酰辅酶A水合酶/3-羟酰辅酶A脱氢酶; FadE: 酰基辅酶A脱氢酶; FabF: β -氧代酰基-ACP合酶2; ACP: 酰基载体蛋白; FabG: 3-氧代酰基-ACP-还原酶; RhlA: HAA合酶; HAA: 3-羟基链烷酸; RhlB: 鼠李糖基转移酶1; RhlC: 鼠李糖基转移酶2; AlgC: 磷酸葡萄糖变位酶/磷酸甘露糖变位酶; RmlB: dTDP-葡萄糖4,6-脱水酶; RmlC: dTDP-4-脱水海藻糖-3,5-表异构酶; RmlD: dTDP-4-脱水海藻糖还原酶。

甘油诱导了C3细胞中合成RL生物表面活性剂的脂质前体。数据表明, FAS II和 β -氧化途径都参与了脂质前体的合成。但是, 尚不确定哪条途径占主导地位, 因为这

些途径在细胞中还有其他作用, 如细胞增殖。

3.3. *Burkholderia* sp. C3 菌株中增强的 DBT 生物降解受 RL 生物合成及其抑制作用的影响

DBT 是疏水性的[6], 其生物利用度是生物降解的首要条件[15]。当补充甘油时, 在培养物中观察到 DBT 增溶和泡沫形成。这些观察结果表明了有表面活性剂的分泌。我们的蛋白质组学结果表明, RL 生物表面活性剂的生物合成途径在 C3 中是活跃的。因此, 用草皮酚测定法研究了 RL 与甘油诱导的 DBT 生物降解增强的相关性[51]。

Gutierrez 等[25]表明, 溴链烷酸对于 RhlA 的抑制作用会抑制假单胞菌物种中 RL 和 PHA 的产生, 并且这种抑制作用取决于所用的溴链烷酸。文献[24]中也描述了 RL 和 PHA 的抑制作用。因此, 使用 2-溴链烷酸 (HEX 或 OC) 来探讨 RL 在菌株 C3 降解 DBT 中的作用。如果 RL 在 DBT 生物降解中起作用, 则 HEX 和 OC 应通过抑制 RL 的生物合成来降低 DBT 的生物降解。与单独的 DBT 培养相比, 在甘油/DBT 混合物中培养菌株 C3 时, 可以确定 RL 分泌的增加。由不同浓度的甘油诱导的 RL 生物合成和分泌[图 3 (a)]与降解的 DBT 量密切相关[图 3 (b)], HEX 和 OC 抑制 RL 的生物合成也是如此。结果与蛋白质组学的研究结果相符; RL 生物合成发生在 C3 菌株中, 并与其生物降解能力密切相关。

3.4. RL 同源物由 *Burkholderia* sp. C3 菌株分泌

包含 Rha-Rha-C10-C10 和 Rha-C10-C10 同系物混合物的 RL 标准品用于鉴定实验样品中的 RL。在 4~6 min 之间洗脱 RL 同系物 (图 4)。实验样品的 HPLC 色谱

图与 RL 标准品的色谱图非常吻合 (数据未显示)。用 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DBT 和 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油从实验样品中提取两个组分 F1 和 F2, 还收集了用 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEX 或 OC 抑制剂处理过的培养物的馏分。添加了 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油的培养物, 提取物的 HPLC 色谱峰强度比 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油 HPLC 色谱峰强度高约 10 倍。甘油引起 RL 产量的增加。值得注意的是, 在 OC 色谱图上出现了多个峰[图 4 (c)、(f)]。

RL 同系物的峰最强。在 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘油样品中, C3 分泌了同源物 Rha-C10-C10 ($\text{M1} + \text{Na}^+$)、Rha-Rha-C10-C10 ($\text{M2} + \text{Na}^+$)、钠 ($\text{M3} + \text{Na}^+$) 或钾 ($\text{M3} + \text{K}^+$) 加合物离子形式的 Rha-Rha-C10-C12 和 Rha-Rha-C12-C12 ($\text{M4} + \text{Na}^+$)。在 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油样品和含 HEX 或 OC 抑制剂的样品 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油中) 中鉴定出单鼠李糖脂同源物 Rha-C12-C12 (数据未显示)。用 MS/MS 确认峰 M1 和 M2。Rha-C10-C10 的质谱图如图 4 (h) 所示。观察到 C10 酰基链和鼠李糖糖片段 (Rha) 的丢失。结论是甘油通过 RL 介导的机制支持 C3 细胞生长并促进 DBT 的生物降解。

我们的研究表明, 利用甘油可以有效地生物降解被污染土壤中的持久性有机污染物 (包括有机氯农药和 PAH), 因此可用于恢复土地功能, 这一功能也使其可用于农业用途。这种生物刺激策略可以与合适的微生物联合体的生物增强相结合应用。我们的研究表明, 甘油与 PAH 降解剂和 RL 生产者的混合物可能会在细菌群体中引发较高的响应。为了正确评估生物修复位点, 需要对细菌种群和细胞呼吸进行初步分析, 以及随时间的推移监测 PAH 的生物降解情况。

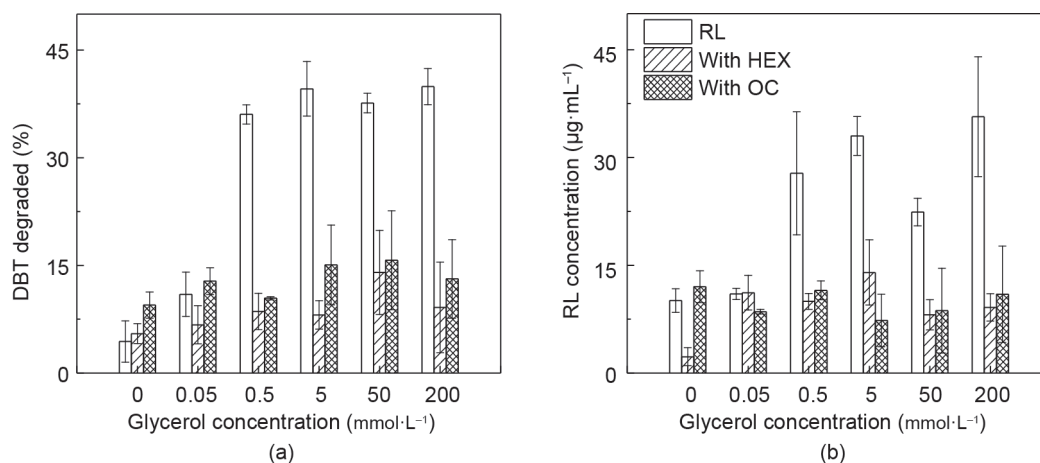


图3. 第2天分泌的RL量 (a) 与第1天在含有 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2-溴己酸 (HEX) 或 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2-溴辛酸 (OC) 和不同的甘油浓度 (0 、 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的情况下被由无抑制剂培育的 *Burkholderia* sp. C3 菌株降解的 DBT 量 (b) 之间的关联。

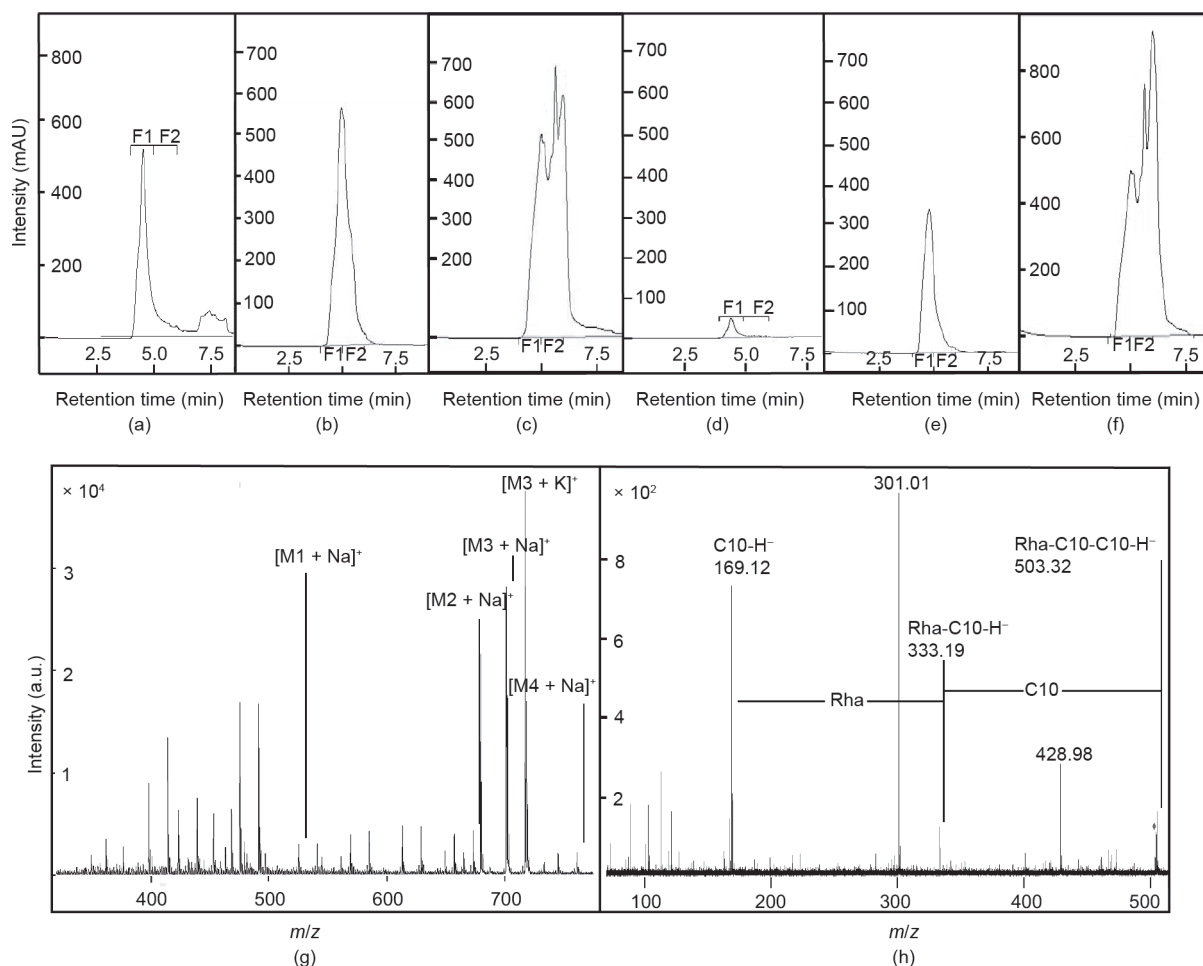


图4. *Burkholderia* sp. C3菌株分泌的RL的HPLC色谱图。其中C3菌株分别用0.54 mmol·L⁻¹ DBT和50 mmol·L⁻¹甘油 (a)、2 mmol·L⁻¹ HEX (b) 或 2 mmol·L⁻¹ OC (c)、0.54 mmol·L⁻¹ DBT (d)、2 mmol·L⁻¹ HEX (e) 或 2 mmol·L⁻¹的OC (f) 培养。(g) 从HPLC色谱图a、馏分2 (F2) 鉴定出的4个RL同系物 (M1、M2、M3和M4) 的MALDI-TOF-MS;(h) Rha-C10-C10 (M1)的LC-Q-TOF-MS2。

4. 结论

RL的两亲性表明了RL生产者和PAH降解剂具有多种功能。一些功能与疏水化学增溶、化学吸收和生物同化有关。我们的研究表明, 培育1天后, 用甘油进行生物刺激, DBT的生物降解率增加了30%。这种增强与 *Burkholderia* sp. C3和细菌的生长增加了鼠李糖脂的生物合成有关。此外, 我们报道了2-溴链烷酸在 *Burkholderia* 中抑制RL生物合成的用途。据我们所知, 这是关于甘油补充与DBT生物降解和RL生物合成相关的第一份报告。结果表明本文所述的生物刺激策略具有潜在的实用性, 可提高生物修复效率并促进此类过程。

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant N00014-12-

1-0496 from the Office of Naval Research and a subcontract with the Western Center for Agricultural Health and Safety (NIOSH grant 2U54OH007550). The authors thank Dr. Margaret R. Baker for her assistance with MALDI/TOF.

Compliance with ethics guidelines

Camila A. Ortega Ramirez, Abraham Kwan, and Qing X. Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Nomenclature

ACN	acetonitrile
CoA	coenzyme A
FabZ	3-hydroxy-ACP-dehydratase

FDR	false discovery rate
HEX	2-bromohexanoic acid
HPLC	high-performance liquid chromatograph
HSD	honestly significant difference
LSD	least significant difference
DHB	dihydroxybenzoic acid
DP	degree of polymerization
OC	2-bromooctanoic acid
DBT	dibenzothiophene
FAS II	<i>de novo</i> fatty acid synthesis
FadB	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
FadE	acyl-CoA dehydrogenase
FabF	β -oxoacyl-ACP synthase 2
ACP	acyl carrier protein
FabG	3-oxoacyl-ACP-reductase
RhIA	HAA synthase
HAA	3-hydroxy alkanolic acid
RhIB	rhamnolipid synthase 1
RhIC	rhamnolipid synthase 2
AlgC	phosphoglucomutase/phosphomannomutase
RmlB	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
RmlC	dTDP-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase
RmlD	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase
MALDI/TOF	matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight
LC-Q-TOF-MS	liquid chromatograph-quadrupole time-of-flight mass spectrometer
MM	minimal medium
MS	mass spectrometry
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon
PHA	polyhydroxyalkanoic acid
RL	rhamnolipid

References

- [1] Kampman B, Brouwer F, Schepers B. Agricultural land availability and demand in 2020: a global analysis of drivers and demand for feedstock, and agricultural land availability. Delft: CE Delft; 2008.
- [2] Gereslassie T, Workneh A, Liu X, Yan X, Wang J. Occurrence and ecological and human health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Wuhan, central China. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15(12):E2751.
- [3] Lim MW, Lau EV, Poh PE. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—present works and future directions. *Mar Pollut Bull* 2016;109(1):14–45.
- [4] Andreolli M, Lampis S, Poli M, Gullner G, Biró B, Vallini G. Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 2013;92(6):688–94.
- [5] Li M, Wang TG, Simoneit BR, Shi S, Zhang L, Yang F. Qualitative and quantitative analysis of dibenzothiophene, its methylated homologues, and benzonaphthothiophenes in crude oils, coal, and sediment extracts. *J Chromatogr A* 2012;1233:126–36.
- [6] Incardona JP, Collier TK, Scholz NL. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196(2):191–205.
- [7] Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health* 2009;6(1):278–309.
- [8] Brinkmann M, Maletz S, Krauss M, Bluhm K, Schiwiy S, Kuckelkorn J, et al. Heterocyclic aromatic hydrocarbons show estrogenic activity upon metabolism in a recombinant transactivation assay. *Environ Sci Technol* 2014;48(10):5892–901.
- [9] Li F, Zhu L, Wang L, Zhan Y. Gene expression of an arthrobacter in surfactant-enhanced biodegradation of a hydrophobic organic compound. *Environ Sci Technol* 2015;49(6):3698–704.
- [10] Demanèche S, Meyer C, Micoud J, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(11):6714–25.
- [11] Singleton DR, Hu J, Aitken MD. Heterologous expression of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes from a novel pyrene-degrading betaproteobacterium. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(10):3552–9.
- [12] Eibes G, Cajthaml T, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 2006;64(3):408–14.
- [13] Szulc A, Ambrozewicz D, Sydow M, Ławniczak Ł, Piotrowska-Cyplik A, Marecik R, et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J Environ Manage* 2014;132:121–8.
- [14] Noordman WH, Janssen DB. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(9):4502–8.
- [15] Makkar RS, Rockne KJ. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 2003;22(10):2280–92.
- [16] Elliot R, Singhal N, Swift S. Surfactants and bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil—unlocking the targets. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2010;41(1):78–124.
- [17] Perfumo A, Banat IM, Canganella F, Marchant R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72(1):132.
- [18] Peng F, Liu Z, Wang L, Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *J Appl Microbiol* 2007;102(6):1603–11.
- [19] Xia W, Du Z, Cui Q, Dong H, Wang F, He P, et al. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Hazard Mater* 2014;276:489–98.
- [20] Bodour AA, Drees KP, Maier RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(6):3280–7.
- [21] Seo JS, Keum YS, Harada RM, Li QX. Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii. *J Agric Food Chem* 2007;55(14):5383–9.
- [22] Tittabutr P, Cho IK, Li QX. Phn and Nag-like dioxygenases metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons in *Burkholderia* sp. C3. *Biodegradation* 2011;22(6):1119–33.
- [23] Seo JS, Keum YS, Hu Y, Lee SE, Li QX. Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and orthocleavage of naphthalene-1,2-diol. *Biodegradation* 2007;18(1):123–31.
- [24] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. A stereospecific pathway diverts β -oxidation intermediates to the biosynthesis of rhamnolipid biosurfactants. *Chem Biol* 2014;21(1):156–64.
- [25] Gutierrez M, Choi MH, Tian B, Xu J, Rho JK, Kim MO, et al. Simultaneous inhibition of rhamnolipid and polyhydroxyalkanoic acid synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by 2-bromoalkanoic acids: effect of inhibitor alkyl-chain-length. *PLoS ONE* 2013;8(9):e73986.
- [26] Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, deWachter R, Verachtert H, et al. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(5):1834–43.
- [27] Akhtar N, Ghauri MA, Anwar MA, Akhtar K. Analysis of the dibenzothiophene metabolic pathway in a newly isolated *Rhodococcus* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2009;301(1):95–102.
- [28] Dephore N, Gygi SP. A solid phase extraction-based platform for rapid phosphoproteomic analysis. *Methods* 2011;54(4):379–86.
- [29] Tabb DL, Fernando CG, Chambers MC. MyriMatch: highly accurate tandem

- mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis. *J Proteome Res* 2007;6(2):654–61.
- [30] Ma ZQ, Dasari S, Chambers MC, Litton MD, Sobecki SM, Zimmerman LJ, et al. IDPicker 2.0: improved protein assembly with high discrimination peptide identification filtering. *J Proteome Res* 2009;8(8):3872–81.
- [31] Holman JD, Ma ZQ, Tabb DL. Identifying proteomic LC-MS/MS data sets with bumbershoot and IDPicker. *Curr Protoc Bioinf* 2012;37(1):13–7.
- [32] Griffin NM, Yu J, Long F, Oh P, Shore S, Li Y, et al. Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nat Biotechnol* 2010;28(1):83–9.
- [33] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15(12):550.
- [34] Irie Y, Parsek MR. LC/MS/MS-based quantitative assay for the secondary messenger molecule, c-di-GMP. *Pseudomonas Methods Protoc* 2014; 1149:271–9.
- [35] Laabei M, Jamieson WD, Lewis SE, Diggle SP, Jenkins AT. A new assay for rhamnolipid detection—important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98(16):7199–209.
- [36] Price NP, Ray KJ, Vermillion K, Kuo TM. MALDI-TOF mass spectrometry of naturally occurring mixtures of monorhamnolipids and dirhamnolipids. *Carbohydr Res* 2009;344(2):204–9.
- [37] Price NP. Oligosaccharide structures studied by hydrogen-deuterium exchange and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78(15):5302–8.
- [38] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86(5):1323–36.
- [39] Hennessee CT, Li QX. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures on degradation, gene expression, and metabolite production in four *Mycobacterium* species. *Appl Environ Microbiol* 2016;82(11):3357–69.
- [40] Deutscher J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(2):87–93.
- [41] Wolfe A, Shimer GH Jr, Meehan T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry* 1987;26(20):6392–6.
- [42] Dabestani R, Ivanov IN. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochem Photobiol* 1999;70(1):10–34.
- [43] Doblér L, Vilela LF, Almeida RV, Neves BC. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *N Biotechnol* 2016;33(1):123–35.
- [44] Costa SG, Déziel E, Lépine F. Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Lett Appl Microbiol* 2011;53(6):620–7.
- [45] Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho YH, Yoon SC. Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative ¹³C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *J Biotechnol* 2011;151(1):30–42.
- [46] Rehm BH, Mitsky TA, Steinbüchel A. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(7):3102–9.
- [47] Zhu K, Rock CO. RhIA converts β-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β-hydroxydecanoylβ-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2008;190(9):3147–54.
- [48] Tavares LF, Silva PM, Junqueira M, Mariano DC, Nogueira FC, Domont GB, et al. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97(5):1909–21.
- [49] Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A, Witholt B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(9):3503–6.
- [50] Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, et al. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 2001;40(3):708–18.
- [51] Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2000;1485(2–3):145–52.