



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.201908168

中图分类号 X172

文献标识码 A

高秀荣, 林姗姗, 孙安琪, 等. 一株多环芳烃降解菌的筛选及其降解特性[J]. 环境工程学报, 2020, 14(6): 1668-1678.

GAO Xiurong, LIN Shanna, SUN Anqi, et al. Screening and degradation characteristics of a PAHs-degrading bacteria[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(6): 1668-1678.

## 一株多环芳烃降解菌的筛选及其降解特性

高秀荣<sup>1,2</sup>, 林姗姗<sup>1</sup>, 孙安琪<sup>1,3</sup>, 廖用开<sup>1</sup>, 张又弛<sup>1</sup>, 蔡超<sup>1,\*</sup>

1. 中国科学院城市环境研究所, 中国科学院城市环境与健康重点实验室, 厦门 361000

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 华侨大学化工学院, 厦门 361000

第一作者: 高秀荣(1994—), 女, 硕士研究生。研究方向: 微生物修复技术。E-mail: xrgao@iue.ac.cn

\*通信作者: 蔡超(1976—), 男, 博士, 研究员。研究方向: 土壤与地下水污染控制与修复。E-mail: ccai@iue.ac.cn

**摘要** 微生物修复是治理土壤多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)污染的主要方法, 而高效降解菌筛选是微生物修复技术的重要基础。从北京焦化厂土壤中筛选分离得到一株 PAHs 降解菌 Q3, 通过生理生化 and 16S rDNA 等分析手段鉴定其为 *Rhodococcus rhodochrous*。结果表明: 该菌株对芘的耐受能力较强, 可降解初始浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup> 的芘; 该菌株具有降解广谱性, 可利用苯并[a]芘、苯并[b]荧蒹、二苯并[a,h]蒹、苯并[g,h,i]芘等 9 种 PAHs 为唯一碳源进行代谢, 特别是对苯并[a]芘等高环 PAHs 具有较好的降解效果; 此外, 该菌株可有效降解模拟液中的混合 PAHs, 并且对野外被 PAHs 长期污染的土壤具有较好的强化修复效果。投加菌株处理后的处理组与对照组相比, 土壤 PAHs 总去除率提高了 24%。以上结果表明该菌株对环境中的 PAHs 污染的土壤具有较好的强化修复潜力, 可为 PAHs 污染土壤的微生物修复技术提供技术参考。

**关键词** 多环芳烃; 降解菌; 筛选; 降解特性; 土壤修复

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类持久性有机污染物, 具有致癌、致畸、致突变的特性<sup>[1]</sup>。近代工业的快速发展导致大量 PAHs 排放至环境, 经大气湿沉降、污水灌溉等途径最终汇聚于土壤, 这导致了严重的 PAHs 污染土壤问题, 对人类健康及生态环境构成了巨大威胁<sup>[2]</sup>。目前, 土壤 PAHs 污染修复已成为国内外面临的亟待解决的问题之一。

微生物修复技术具有经济高效、绿色环保等优点, 是目前 PAHs 污染修复的主要方法之一<sup>[3]</sup>, 而获得具有 PAHs 降解能力的微生物是微生物修复技术成功与否的前提<sup>[4]</sup>。许多研究筛选探究了对 PAHs 有分解代谢能力并可显著修复 PAHs 污染的降解菌及其降解特性, 用于发展微生物修复技术<sup>[5]</sup>。黄兴如等<sup>[6]</sup>筛选分离出一株能以菲、芘为唯一碳源的菌株 *Rhizobium petrolearium*。许晓毅等<sup>[7]</sup>筛选出的黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)和克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella* sp.)能高效降解菲和荧蒹。目前, 已有研究中涉及的降解菌只能降解一种或几种 PAHs, 可降解底物种类有限<sup>[8-9]</sup>。而污染土壤中的 PAHs 多以混合形式存在, 各种 PAHs 单体之间会相互影响, 从而增加微生物降解的难度<sup>[10]</sup>。虽已有一些针对 PAHs 降解菌展开的研究, 但是针对具有降解广谱性, 能以多种高环 PAHs 为唯一

收稿日期: 2019-08-30; 录用日期: 2019-11-06

基金项目: 国家水体污染治理与控制科技重大专项(2016ZX05060)

碳源生长代谢,可修复混合 PAHs 污染的降解菌研究仍然较少。因此,筛选具有降解广谱性、尤其对高环 PAHs 具有高效降解能力,可有效修复土壤混合 PAHs 污染的降解菌具有重要意义。

本研究采用富集分离法从北京某焦化厂 PAHs 污染土壤中分离筛选出一株具有降解广谱性且能以多种高环 PAHs 为唯一碳源的菌株,通过观察其形态以及借助分子生物学等手段对该菌株进行了鉴定;并系统研究了该菌株的生长特性及其对单一和混合 PAHs 的降解能力;同时,在实验室条件下考察了降解菌投加对野外 PAHs 污染土壤的强化修复潜力。研究工作可为 PAHs 污染土壤微生物修复技术发展提供一定的科技支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原料

在北京某退役焦化厂厂房附近选取有代表性的、多年未经扰动地段的土壤样地(N 39°51'0.42", E 116°31'38.83")进行采样。供试土壤采自该样地 0~20 cm 的表层土,其 pH 为 8.64,总碳含量为 16.60%,总氮含量为 0.24%,总硫含量为 0.56%,有机质含量为 8.20%。供试土壤中 PAHs 含量如表 1 所示。

本研究所使用的主要药品:萘、菲、苯并[b]荧蒽等多环芳烃(纯度大于 97%,美国 AccuStandard 公司);正己烷、甲醇、丙酮等有机试剂(色谱纯,美国 Tedia 公司);琼脂粉等非有机试剂(分析纯,国药集团化学试剂)。

LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,加蒸馏水定容至 1 000 mL。固体培养基则再加入 2% 琼脂粉。无机盐培养基:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0 g、KCl 2.0 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 g、微量金属盐 1.0 mL (MnSO<sub>4</sub> 39.9 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 42.8 mg, (NH<sub>4</sub>)MoO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 34.7 mg, 蒸馏水 1 000 mL)、蒸馏水 1 000 mL、pH 7.0。固体培养基则再加入 2% 琼脂粉。选择性无机盐液体培养基:在已灭菌的无机盐培养基中加入一定量 PAHs 的丙酮溶液,则可得到含 PAHs 的无机盐液体培养基。PAHs 溶液及无机盐液体培养基加入量根据所需 PAHs 浓度添加。含萘的无机盐固体培养基:采用平板升华法<sup>[1]</sup>,在无机盐固体培养基上镀一层萘膜。

### 1.2 实验方法

1) PAHs 降解菌的富集分离与筛选。采用富集培养法从污染土壤中将 PAHs 降解菌富集,然后用含萘的选择性培养基和平板划线的方法将降解菌分离<sup>[2]</sup>,最后用含苯并[a]萘(50 mg·L<sup>-1</sup>)的选择性培养基对降解菌进行进一步的筛选。将各菌株对数期(OD<sub>600</sub> 为 0.8)菌悬液按 10% 的体积比(5 mL),接种于含 50 mg·L<sup>-1</sup> 苯并[a]萘的选择性无机盐液体培养基(45 mL)中,使液体培养体系为 50 mL,同时设置无菌对照组,每组实验均设置 5 个重复处理。然后置于 180 r·min<sup>-1</sup>, 37 °C 摇床中避光振荡,培养 8 d 后,测定各菌株对苯并[a]萘的降解率,根据降解率对菌株进行二次筛选。

2) PAHs 降解菌的鉴定。在进行分子生物

表 1 供试土壤中 PAHs 含量

Table 1 PAHs concentrations in test soils

多环芳烃	缩写	环数	浓度/(mg·kg <sup>-1</sup> )
萘	NAP	2	1.89±0.27
萘烯	ANY	2	0.44±0.15
萘	ANA	3	2.74±0.37
芴	FLU	3	1.58±0.29
菲	PHE	3	8.99±1.73
蒽	ANT	3	1.88±0.26
荧蒽	FLT	4	21.91±3.87
芘	PYR	4	22.46±2.61
苯并萘	BaA	4	20.78±2.67
蒽	CHR	4	23.52±3.35
苯并[b]荧蒽	BbF	5	31.87±4.43
苯并[k]荧蒽	BkF	5	14.91±2.05
苯并[a]芘	BaP	5	32.05±3.67
芘并[1,2,3-cd]芘	ICP	6	7.36±0.76
二苯并[a,h]蒽	DBA	6	36.03±3.11
苯并[g,h,i]芘	BPE	6	27.07±2.03
Σ16 PAHs			255.47±22.46

学鉴定时,提取菌株 Q3 的 DNA,用 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增其 16S rDNA 基因序列。其中 16S rDNA 通用引物为厦门博瑞生物技术有限公司合成的引物 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1492R: TACGCTACCTTGTACGACTT。扩增体系为 25  $\mu\text{L}$  Premix Ex Taq 酶 (2 $\times$ )、2  $\mu\text{L}$  DNA (DNA 浓度约 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、上游引物和下游引物各 1  $\mu\text{L}$  (引物初始浓度 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、灭菌水补足 50  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  15 s、58  $^{\circ}\text{C}$  35 s、72  $^{\circ}\text{C}$  35 s、40 个循环。将扩增产物送去厦门博瑞生物技术有限公司测序,测序结果在 Ezbiocloud 网站进行相似性比对,用 MEGA 6.0 进行序列相似性分析,构建系统发育树。表型特征鉴定与保藏工作委托中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 完成,保藏编号为 CGMCC No.16446。

3) PAHs 降解菌生长特性分析。将 Q3 菌液分装后,于 3 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  下离心 10 min,弃上清液后,加入等量已灭菌的无机盐液体培养基,即制得 Q3 菌悬液。本研究以菌液在  $\text{OD}_{600}$  处的吸光度为考察指标,考察了 Q3 最适生长温度、pH 及盐度。将对数期 ( $\text{OD}_{600}$  为 0.8) 菌悬液按 10% 的体积比 (5 mL) 接种于含有 1% NaCl 的 LB 培养基 (45 mL) 中,使液体培养体系为 50 mL,同时设置无菌对照组,每组实验均设置 5 个重复处理。设置 LB 培养基初始 pH 分别为 5、6、7、8、9,于 180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中避光振荡培养,再连续取样测定菌液  $\text{OD}_{600}$  变化,以探究菌株 Q3 最适生长 pH。按照上述步骤,将对数期菌液按 10% 的比例接种于 pH 为 7 的 LB 培养基中,将 LB 培养基中的 NaCl 含量分别设置为 0.1%、0.5%、1%、2%、3%、5%,以探究 Q3 最适生长盐度。将对数期菌液按 10% 的比例接种于 pH 为 7、NaCl 含量为 1% 的 LB 培养基中,分别设置摇床温度为 25、30、37、40  $^{\circ}\text{C}$ ,以探究 Q3 最适生长温度。

4) PAHs 降解菌降解性能分析。按照上述方法,制备苾 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 选择性无机盐液体培养基 (45 mL),并接种 10%  $\text{OD}_{600}=0.8$  的 Q3 菌悬液 (5 mL),使液体培养体系为 50 mL,同时设置无菌对照组,每组实验设置 5 个重复处理。然后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床中避光振荡培养,分别于第 2、4、8、12、16 天破坏性取样测定锥形瓶中苾残余量。

在考察不同初始浓度对苾降解的影响时,按照上述步骤,培养 8 d 后,测定该菌株对初始含量分别为 25、50、100、200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  苾的降解率。

在对菌株 Q3 降解广谱性进行研究时,按照上述步骤,分别测定该菌株对菲 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苾 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苯并蒽 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、蒽 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苯并 [a] 苾 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苯并 [b] 荧蒽 (10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苯并 [k] 荧蒽 (10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、二苯并 [a,h] 苾 (10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苯并 [g,h,i] 苾 (10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 培养 8 d 或 16 d 后的降解率。

在考察菌株 Q3 对混合 PAHs 模拟液的降解效果时,按照上述步骤,测定该菌株对包含菲 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苾 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、苯并 [b] 荧蒽 (10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和苯并 [a] 苾 (50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的混合 PAHs 培养 8 d 后的降解率。

在考察菌株 Q3 对土壤 PAHs 的去除效果时,称取 10 g 供试土壤置于 250 mL 锥形瓶中,加入 90 mL 无机盐液体培养基,用灭菌锅灭菌 30 min 后备用。将 Q3 菌悬液按照与土壤体系重量比为 10% 的比例 (10 mL),分别接种于灭菌/未灭菌土壤培养体系 (10 g 供试土壤,90 mL 无机盐液体培养基) 中,同时设置对照组,每组实验设置 5 个重复处理,所有处理均置于 37  $^{\circ}\text{C}$  180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床中,避光振荡培养 24 d 后,测定土壤中 PAHs 去除率。

5) PAHs 含量测定。液相 PAHs 含量的测定参照国标 HJ 478-2009<sup>[13]</sup>。以萃取剂样品比为 3:10 的比例向样品溶液中加入正己烷,于摇床中振荡提取 30 min,静置后分离收集有机相。上述萃取步骤重复 3 次,收集合并所有萃取液旋蒸至 2 mL 左右,并用甲醇定容至 10 mL,取 1 mL 过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜后,置于棕色色谱瓶中待 HPLC 分析。分析仪器为日立 L-2000 液相色谱仪,采用 C18 反

向色谱分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇/水 (体积比 9:1), 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 254 nm, 柱温为 35 °C, 进样体积为 10 μL。

土壤 PAHs 含量检测步骤如下: 将土样置于 ASE350 中萃取, 萃取溶剂采用二氯甲烷:丙酮=1:1 的混合溶剂。萃取条件: 湿度为 100 °C, 时间为 5 min; 大气压为 10 342.5 kPa; 静态提取 5 min, 循环 3 次, 氮气吹扫 100 s。萃取液在 39 °C 水浴锅中完成浓缩与溶剂替换, 溶剂替换为正己烷, 过硅胶-氧化铝净化柱净化后, 氮吹至 1 mL, 装入色谱瓶, 用 GC-MS 测定。本研究中全部样品替代物的回收率为 42%~120%。

以空白对照处理组 PAHs 含量为基础, 菌株对液相 PAHs 的降解率 ( $D_a$ )、对土壤 PAHs 的去除率 ( $D_s$ ) 分别按照式 (1) 和式 (2) 进行计算。

$$D_a = \frac{R_c - R_s}{R_c} \times 100\% \quad (1)$$

$$D_s = \frac{R_m - R_{s1}}{R_m} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $R_c$  为对照组液相 PAHs 残余量, mg·L<sup>-1</sup>;  $R_s$  为实验组液相 PAHs 残余量, mg·L<sup>-1</sup>;  $R_m$  为供试土壤 PAHs 初始含量, mg·kg<sup>-1</sup>;  $R_{s1}$  为实验组土壤 PAHs 残余量, mg·kg<sup>-1</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PAHs 降解菌的筛选与鉴定

本研究以芘为底物进行 PAHs 降解菌的初筛, 以含苯并 [a] 芘的选择性培养基进行复筛, 最终得到一株 PAHs 的高效降解菌 Q3。该菌株在 LB 固体培养基上菌落形态如图 1 所示。

菌株 Q3 经 16S rDNA 测序和 Ezbiocloud 比对结果表明, Q3 与玫瑰色红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 相似性为 99.79%, 其系统发育树如图 2 所示。结合该菌株生理生化特征 (表 2), 初步鉴定菌株 Q3 为玫瑰色红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*)。



图 1 菌株 Q3 在培养基上菌落形态  
Fig. 1 Colony morphology of strain Q3 in medium

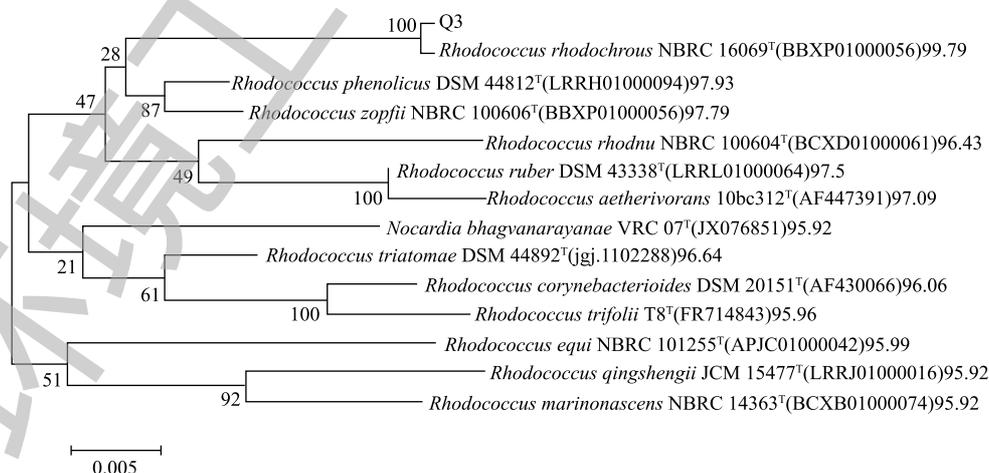


图 2 菌株 Q3 系统发育树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain Q3

## 2.2 PAHs 降解菌的生长特性

通过测定不同 pH、温度及盐度培养条件下菌液 OD<sub>600</sub> 的吸光度变化, 绘制了不同条件下菌株的生长曲线(图 3)。实验结果表明, Q3 最适生长的 pH 为 7, 温度为 30~37 °C, 盐度为 1%。盐度和 pH 是影响 PAHs 降解菌生长代谢的重要因素<sup>[14-15]</sup>。高盐度可能会引起微生物体内蛋白质等大分子物质变形, 破坏微生物细胞结构或抑制一些重要的生物反应; 高盐度也可能使环境中氧浓度减少, 从而降低微生物代谢活性<sup>[14]</sup>。环境 pH 会影响微生物细胞膜所带的电荷, 改变某些化合物分子进入细胞的状态, 从而促进或抑制微生物的生长; 强碱环境可能会破坏细胞质膜、抑制酶活性并影响膜运输蛋白的功能, 从而抑制微生物生长<sup>[15]</sup>。赵百锁等<sup>[16]</sup>的研究表明, 当盐浓度高于 3%、pH 大于 9 时, 微生物的代谢活性显著受到抑制。顾平等<sup>[17]</sup>的研究也发现, 强酸、强碱条件对 PAHs 降解菌株 BB-1 的生长具有抑制作用。而本研究中菌株 Q3 在 pH 为 9, 盐度为 5% 时均可正常生长, 这表明该菌株具有一定的耐盐性和耐碱性。

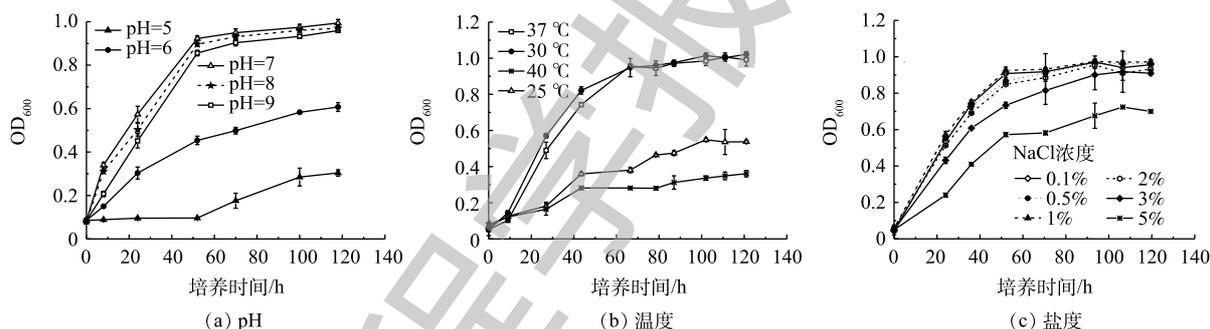


图 3 不同 pH、温度、盐度下 Q3 的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of Q3 under different pH, temperature and salinity

## 2.3 PAHs 降解菌的降解特性

1) 菌株 Q3 对单一芘的降解效率。在实验过程中, 在无菌处理的对照组中, 各采样时间点对应的芘浓度没有发生显著变化。菌株 Q3 对典型 PAHs 芘的降解率见图 4。结果表明, 菌株 Q3 能够降解体系中的芘, 在以 50 mg·L<sup>-1</sup> 芘为唯一碳源的无机盐培养基中, 菌株 Q3 第 4 天对芘的降解率为 33%, 第 8 天可达 47%。在 8~16 d 内, Q3 对芘的降解率没有显著变化, 这可能是由于菌株 Q3 对芘的代谢中间产物具有生物毒性, 从而抑制了该菌株的生长代谢, 进而导致芘去除率相对稳定<sup>[18]</sup>。RAVELET 等<sup>[19]</sup>的研究也表明, 芘的代谢产物醌毒性比芘更大, 对微生物生长具有显著抑制作用。菌株生长处于

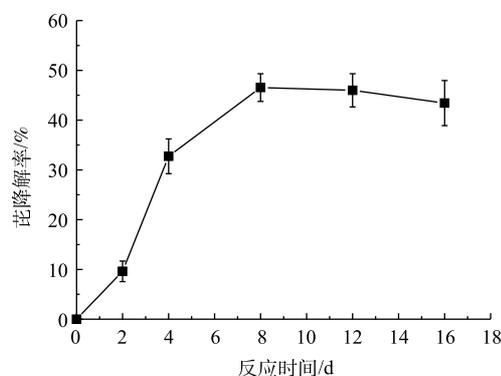


图 4 菌株 Q3 对芘的降解率

Fig. 4 Degradation efficiency of pyrene by Q3

表 2 生理生化测试结果

Table 2 Results of physiological and biochemical test

项目	Q3	空白对照
革兰氏染色	+	-
芽孢染色	-	-
接触酶实验	+	-
明胶水解实验	-	-
硫化氢实验	-	-
吲哚产生	-	-
8% NaCl	+	-
脲酶实验	-	-

注: “+”表示反应为阳性; “-”表示反应为阴性。

稳定期或衰亡期，代谢过程无增加也可能是芘去除率几乎无变化的原因之一<sup>[20]</sup>。王春明等<sup>[21]</sup>的研究也发现了类似的现象，微杆菌培养到第6天时，即在对数期时，培养液中芘浓度开始明显下降；培养到第16天时，菌体处于稳定期，在第16~22天芘几乎不被降解。

2) 不同初始浓度对芘降解的影响。为探究Q3对PAHs的耐受能力，本研究测定了不同芘初始浓度下Q3芘降解量及其芘降解效率(图5)。在实验处理过程中，在各无菌对照处理中芘的浓度未出现显著变化。分析结果表明，菌株Q3能够降解体系中高浓度(200 mg·L<sup>-1</sup>)芘，且对芘具有耐受性，随着初始芘浓度的增加，体系中芘的降解量也随之增加。

3) 菌株Q3降解广谱性。在实验过程中，各无菌对照处理中PAHs单体的浓度均没有显著变化。菌株Q3降解广谱性如表3所示。菌株Q3培养8 d后，对初始浓度为50 mg·L<sup>-1</sup>的菲、芘、苯并蒽、蒽和苯并[a]芘均有显著的降解效果，但对苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、二苯并[a,h]蒽和苯并[g,h,i]芘无降解作用。将上述菌株Q3对其无降解效果的苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、二苯并[a,h]蒽和苯并[g,h,i]芘的初始浓度由50 mg·L<sup>-1</sup>降低至10 mg·L<sup>-1</sup>，并延长培养时间至16 d后，菌株Q3对苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、二苯并[a,h]蒽和苯并[g,h,i]芘产生了显著的降解效果。综上所述，菌株Q3对菲、芘、苯并蒽、蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、二苯并[a,h]蒽、苯并[g,h,i]芘等9种PAHs均具有一定的降解效果，对PAHs的具有降解广谱性。Q3对各类环境标准中的指示污染物——苯并[a]芘既具有较好的耐受能力，可降解初始浓度为50 mg·L<sup>-1</sup>的苯并[a]芘，也具有较高的降解能力，培养8 d后，对其降解率可达65%。

近年来，已有的大量研究从不同环境中筛选分离得到200余种不同类别的PAHs降解菌，但筛选出的菌株普遍降解底物范围较窄<sup>[22]</sup>。有研究表明，玫瑰色红球菌具有较好的有机污染物降解能力，如石油烃<sup>[23]</sup>、二苯并噻吩<sup>[24]</sup>、卤代烷烃<sup>[25]</sup>等，而利用其降解PAHs的研究较少。关于其他种类可降解PAHs的红球菌虽已有所报道，但是其降解率相对较小，且可降解的底物范围较窄。SONG等<sup>[26]</sup>从石油污染的沉积物中筛选分离出一株红球菌*Rhodococcus* sp. P14，其只对菲、芘、苯并[a]芘3种PAHs具有降解效果，且培养30 d后，其对50 mg·L<sup>-1</sup>菲、芘和苯并[a]芘的降解率分别为43%、34%和30%，低于本研究中Q3对菲、芘和苯并[a]芘的降解率。刁硕等<sup>[27]</sup>筛选分离的红球菌DYC-1对苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽无显著代谢作用，只可降解菲、芘、蒽。WALTER等<sup>[28]</sup>报道的赤红球菌可代谢芘，但要在以芘为基质的情况下才可共代谢苯并[a]芘。而本研究从PAHs污染土壤中分离出的降解菌*Rhodococcus rhodochrous* Q3，对苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、苯并[a]芘等9种PAHs均具有显著的降解

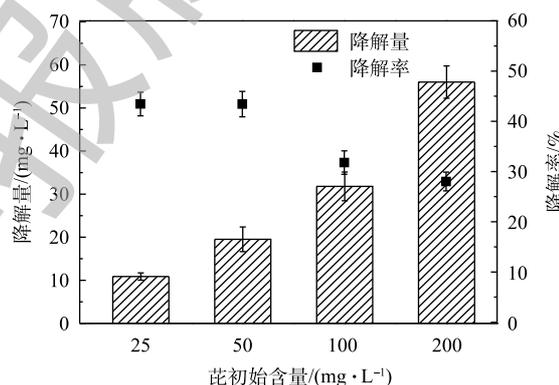


图5 芘的初始浓度对菌株Q3降解芘的影响

Fig. 5 Effect of initial pyrene concentration on pyrene degradation by strain Q3

表3 菌株Q3降解广谱性

Table 3 Broad-spectra property of degradation by strain Q3

PAHs	初始浓度50 mg·L <sup>-1</sup> 第8天的降解率/%	初始浓度10 mg·L <sup>-1</sup> 第16天的降解率/%
菲	98.12±2.7	—
芘	46.54±12.78	—
苯并蒽	35.13±2.92	—
蒽	15.07±4.80	—
苯并[a]芘	64.73±9.40	—
苯并[b]荧蒽	0	21.32±1.03
苯并[k]荧蒽	0	36.75±7.79
二苯并[a,h]蒽	0	82.43±3.85
苯并[g,h,i]芘	0	48.95±4.45

能力,较多数已报道菌株具有更广泛的可降解底物范围。

4) 菌株 Q3 对混合 PAHs 的降解。环境介质中的 PAHs 多以混合物形式存在,考察菌株对混合 PAHs 中高低环 PAHs 的降解效果具有重要的现实意义。在实验过程中,无菌对照处理中 PAHs 的浓度没有显著变化。菌株 Q3 对混合 PAHs 的降解效果如图 6 所示。菌株 Q3 培养 8 d 后,对 4 种 PAHs(菲、芘、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒹)的降解率比对照组提高了 27%,对单一底物菲、芘和苯并[a]芘降解率可达到 98%、47% 和 65%;而对混合 PAHs 中的菲、芘和苯并[a]芘降解率降低至 57%、29% 和 33%。

本研究中菌株 Q3 可以有效地降解混合 PAHs,但菌株 Q3 对混合 PAHs 中菲、芘、苯并[a]芘的降解效果显著低于其对单一菲、芘、苯并[a]芘的降解,表明混合 PAHs 的降解难度远大于 PAHs 单体。这可能是因为 PAHs 种类和浓度的增加显著抑制了降解菌的活性<sup>[29]</sup>。卢晓霞等<sup>[30]</sup>的研究发现了类似的结果,当液体培养基中 16 种 PAHs 总浓度为  $17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,降解菌即可生长良好,且具有降解活性;但当 16 种 PAHs 总浓度为  $166 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,降解菌的生长及其活性均受到抑制。ANNE 等<sup>[31]</sup>的研究也表明,污染物浓度过高或其他毒性物质的存在显著抑制了降解菌生长。另一方面,PAHs 代谢中间产物也可能会转化成有毒物质,进而抑制降解菌的活性,如芘的中间代谢产物——二氢二醇芘会转化成一种有毒中间体二醇芘<sup>[32]</sup>。水杨酸、邻苯二酚等无毒性的代谢中间产物也可能因与 PAHs 共用同一个降解酶系,而对 PAHs 降解产生竞争性抑制作用<sup>[33]</sup>。

菌株 Q3 培养 8 d 后,对单一底物苯并[b]荧蒹不具有显著降解作用,而对混合 PAHs 中的苯并[b]荧蒹降解率显著提高至 24%。这可能是因为微生物利用不同碳源作为生长基质时,会诱导出不同的降解酶系,多种降解底物即碳源的存在可增加混合体系中的降解酶系,从而使苯并[b]荧蒹的降解显著提高<sup>[34-35]</sup>。JAMES 等<sup>[36]</sup>的研究表明,对多环芳烃降解能力有限的加氧酶,能被某些多环芳烃诱导,从而提高活性增强降解作用。巩宗强等<sup>[37]</sup>也报道了类似研究结果,芘和低分子质量多环芳烃菲存在共代谢关系,即对芘具有潜在降解性能的酶因为菲的氧化降解而增强了活性,从而促进了芘的降解。另外,低环 PAHs 作为碳源和能源能支持降解菌的快速生长繁殖,从而分泌更多的降解酶来促进高环 PAHs 和其代谢产物的降解,通过增大生物量来促进难降解物的转化<sup>[38]</sup>。本研究中菲、芘较苯并[b]荧蒹更容易被降解,菲、芘的存在可能进一步促进了降解菌的生长繁殖,从而促进了其对苯并[b]荧蒹的降解。FENG 等<sup>[39]</sup>的研究显示,毕赤酵母(*Pichia anomala*)在萘存在下通过共代谢作用可增加体系中微生物数量,进而促进降解了较难降解的丁烯。李政等<sup>[40]</sup>的研究也表明,芴和菲的存在不仅促进了降解菌的生长繁殖,而且能够促进芘的完全快速降解和芘代谢产物的降解。由此可见:混合体系中存在的多种 PAHs 可能诱导多种降解酶系,从而使难降解的 PAHs 发生变化;也可能增大微生物对碳源和能源的选择范围,促进降解菌的生长繁殖和代谢活动。

5) 菌株 Q3 对土壤 PAHs 的强化修复潜力分析。为了考察菌株 Q3 对污染土壤中 PAHs 的强化修复潜力,本研究采集了野外 PAHs 长期污染土壤用于模拟实验。实验土壤中高环 PAHs 含量显著高于低环,通常这类土壤 PAHs 去除难度较大。菌株 Q3 投加后污染土壤中 PAHs 的去除效果如图 7 所示。菌株 Q3 培养 24 d 后,对灭菌和未灭菌土样中的 PAHs 均具有显著的强化去除效果,对灭菌土壤中 16 种 EPA 优控总 PAHs( $255.47 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )去除率比对照组提高了 24%,且该菌株投加后,灭菌

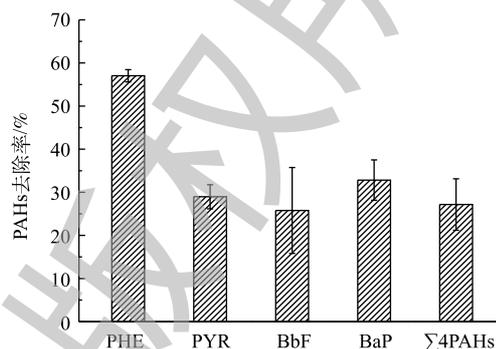


图 6 菌株 Q3 对混合 PAHs 的去除

Fig. 6 Removal of PAHs mixture by strain Q3

土壤中各环 PAHs 的去除率均在 38% 以上。

菌株 Q3 投加处理对灭菌土壤中四环及以下 PAHs 的强化去除显著高于未灭菌土壤。这可能是由于未灭菌土壤培养前期菌株 Q3 正处于适应环境的阶段，与土壤中某些土著菌存在生长竞争，而在微生物降解研究中，低环 PAHs 更容易在培养前期被降解菌优先利用<sup>[41]</sup>。因此，与土著菌的生长竞争影响了 Q3 对四环及以下 PAHs 的代谢降解。陈瑞蕊等<sup>[42]</sup>报道了类似的研究结果，将菌根真菌应用到土壤中时，土著菌群的竞争会影响菌根真菌发挥降解作用。王聪颖等<sup>[43]</sup>的研究也表明，土著微生物和接种的微生物会在一定程度上发生竞争作用，影响总微生物活性，进而影响微生物对 PAHs 的修复效果。随时间的延长，菌株 Q3 逐渐适应土壤环境后，代谢能力会趋于稳定，因此，灭菌与未灭菌土壤中五环及以上和总 PAHs 的去除率没有显著差异。王菲等<sup>[44]</sup>也报道了类似的研究结果，外接降解菌荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.) 逐渐适应新环境后，会由刚接入土壤时的弱势种群逐渐变强，进而发挥了显著的去除作用。由此可见，本研究中菌株 Q3 的适应性较强，对环境中被 PAHs 污染的土壤有较好的强化修复应用潜力。

### 3 结论

1) 红球菌 Q3 最适生长 pH 为 7，温度为 30~37 °C，盐度为 1%；同时，其具有较好的耐盐和耐碱能力。

2) 红球菌 Q3 的性能表征结果表明，该菌株耐受力强，可降解初始浓度为 200 mg·L<sup>-1</sup> 的芘；降解广谱性高，可利用菲、芘、苯并[a]芘、苯并[a]蒽、苯并[b]蒽、苯并[k]蒽、二苯并[a,h]蒽、苯并[g,h,i]芘等 9 种 PAHs 为底物进行代谢，特别是对苯并[a]芘等高环 PAHs 具有较好的降解效果。

3) 红球菌 Q3 对环境中复合 PAHs 污染具有一定的强化修复效果，可有效降解模拟液中的混合 PAHs(菲、芘、苯并[a]芘、苯并[b]蒽)；菌株 Q3 的投加对野外 PAHs 长期污染土壤中 16 种 PAHs 具有较好的强化去除效果，与对照组相比，16 种 PAHs 总去除率提高了 24%。

### 参 考 文 献

- [1] LOMZA P, POSZYTEK K, SKLODOWSKA A, et al. Evaluation of bioremediation of soil highly contaminated by petroleum hydrocarbons[J]. *New Biotechnology*, 2016, 141(33): 14-28.
- [2] 熊丽君, 吴杰, 王敏. 交通道路沿线土壤多环芳烃污染及风险防控综述[J]. *生态环境学报*, 2018, 27(5): 974-982.
- [3] 周际海, 袁颖红, 朱志保, 等. 土壤有机污染物生物修复技术研究进展[J]. *生态环境学报*, 2015, 24(2): 343-351.
- [4] 吴作军, 卢滇楠, 张敏莲, 等. 微生物分子生态学技术及其在石油污染土壤修复中的应用现状与展望[J]. *化工进展*, 2010, 30(5): 789-795.
- [5] 吴泉雄, 王红旗, 刘自力. 多环芳烃污染土壤的微生物修复技术研究进展[J]. *环境与发展*, 2018, 30(7): 108-109.

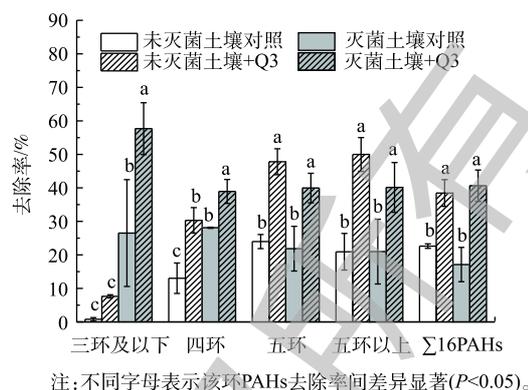


图 7 菌株 Q3 对土壤中不同 PAHs 的去除率

Fig. 7 Removal rate of different PAHs in soil by strain Q3

- [6] 黄兴如, 张彩文, 张瑞杰, 等. 多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 965-973.
- [7] 许晓毅, 苏攀, 姬宇, 等. 沉积物中2株多环芳烃降解菌的分离鉴定及其对菲、蒽的降解特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(3): 1513-1520.
- [8] 田晶, 徐小琳, 康彦顺, 等. 广谱性多环芳烃降解真菌 *Aspergillus flavus* AD-X-1 的筛选及其性能研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(8): 115-122.
- [9] 杨轩, 张威, 李师翁, 等. 多环芳烃降解菌的分离鉴定及其生理特性研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(5): 1033-1040.
- [10] CRAMPON M, BUREAU F, AKPA-VINCESLAS M, et al. Correlations between PAH bioavailability degrading bacteria and soil characteristics during PAH biodegradation in five diffusely contaminated dissimilar soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(13): 8133-8145.
- [11] ALLEY J F, BROWN L R. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 439-442.
- [12] PING L F, ZHANG C R, ZHU Y H, et al. Biodegrading of pyrene by a newly isolated *Pseudomonas putida* PL2[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16: 1000-1008.
- [13] 环境保护部. 水质多环芳烃的测定液液萃取和固相萃取高效液相色谱法: HJ 478-2009[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009.
- [14] 范瑞娟, 刘雅琴, 张琇. 嗜盐碱高环PAHs降解菌的分离及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(6): 1280-1287.
- [15] 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.
- [16] 赵百锁, 王慧, 毛心慰. 嗜盐微生物在环境修复中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1209-1212.
- [17] 顾平, 周启星, 王鑫, 等. 一株土著B[a]P降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(5): 926-932.
- [18] 卫昆, 陈烁娜, 尹华, 等. 蜡状芽胞杆菌对芘的降解特性及降解酶研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 506-512.
- [19] RAVELET C, KRIVOBOK S, SAGE L, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi[J]. Chemosphere, 2000, 40(5): 557-563.
- [20] 毛健, 骆永明, 滕应, 等. 一株高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1011-1015.
- [21] 王春明, 李太平, 王春莲. 微杆菌3-28对萘、菲、蒽、芘的降解[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(3): 361-366.
- [22] 杜彦玲, 台培东, 施秋峰, 等. 多环芳烃降解菌X20的鉴定及降解特性[J]. 生态学杂志, 2010, 29(6): 1208-1212.
- [23] SORKHOH N A, GHANNOUM M A, IBRAHIM A S, et al. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait[J]. Environmental Pollution, 1990, 65(1): 1-17.
- [24] HIROYUKI H, HIROYASU S, IKUO S, et al. High cell density culture of *Rhodococcus rhodochrous* by pH-stat feeding and

- dibenzothiophene degradation[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 85(3): 334-338.
- [25] HELEN C, ORLA F, MICHAEL J L, et al. Haloalkane degradation and assimilation by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064[J]. *Microbiology*, 1994, 140(6): 1433-1442.
- [26] SONG X H, XU Y, LI G M, et al. Isolation, characterization of *Phodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(10): 2122-2128.
- [27] 刁硕, 王红旗, 许洁, 等. 低温耐盐苾降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(2): 677-685.
- [28] WALTER U, BEYER M, KLEIN J, et al. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34(5): 671-676.
- [29] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 多环芳烃菲对淹水土壤微生物动态变化的影响[J]. *土壤*, 2002, 45(4): 229-236.
- [30] 卢晓霞, 李秀丽, 马杰, 等. 焦化厂多环芳烃污染土壤的强化微生物修复研究[J]. *环境科学*, 2011, 32(3): 864-869.
- [31] ANNE H B, BARBARA B H. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petrolim-contaminated sites[J]. *Applied Environment Microbiology*, 1992, 58(8): 2579-2582.
- [32] 唐婷婷, 金卫根. 多环芳烃微生物降解机理研究进展[J]. *土壤*, 2010, 42(6): 876-881.
- [33] 张杰, 刘永生, 孟玲, 等. 多环芳烃降解菌筛选及其降解特性[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(10): 1783-1786.
- [34] CHEN S H, AITKEN M D. Salicylate stimulates the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15[J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(3): 435-439.
- [35] GHAZALI F M, RAHMAN R N Z A, SALLEH A B, et al. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2004, 54(1): 61-67.
- [36] JAMES E B, DOUGLAS G C. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries[J]. *Applied Environment Microbiology*, 1988, 54(7): 1649-1655.
- [37] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 苾在土壤中的共代谢降解研究[J]. *应用生态学报*, 2001, 12(3): 447-450.
- [38] ZHONG Y, ZOU S C, LIN L, et al. Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. strain PheB4 isolated from mangrove sediments[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(11): 2043-2049.
- [39] FENG P, YANG Q X, ZHANG Y, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pichia anomala*[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(10): 803-806.
- [40] 李政, 顾贵洲, 赵朝成, 等. 高相对分子质量多环芳烃的生物共代谢降解[J]. *石油学报*, 2015, 31(3): 720-725.
- [41] 杜丽娜, 高大文. 青顶拟多孔菌对单一和复合多环芳烃的降解特性[J]. *中国环境科学*, 2011, 31(2): 277-282.
- [42] 陈瑞蕊, 林先贵, 尹睿, 等. 有机污染土壤中菌根的作用[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(2): 176-180.

[43] 王聪颖, 王芳, 王涛, 等. 生物强化和生物刺激对土壤中PAHs降解的影响[J]. 中国环境科学, 2010, 30(1): 121-127.

[44] 王菲, 苏振成, 杨辉, 等. 土壤中多环芳烃的微生物降解及土壤细菌种群多样性[J]. 应用生态学报, 2009, 20(12): 3020-3026.

(本文编辑: 曲娜, 郑晓梅, 张利田)

## Screening and degradation characteristics of a PAHs-degrading bacteria

GAO Xiurong<sup>1,2</sup>, LIN Shanna<sup>1</sup>, SUN Anqi<sup>1,3</sup>, LIAO Yongkai<sup>1</sup>, ZHANG Youchi<sup>1</sup>, CAI Chao<sup>1,\*</sup>

1. Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361000, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361000, China

\*Corresponding author, E-mail: ccai@iue.ac.cn

**Abstract** Microbial remediation is the main way to remove polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the contaminated soil. It is essential to screen highly efficient degrading bacteria for bioremediation of PAHs-contaminated environment. A PAHs-degrading strain Q3 was isolated from PAHs contaminated soil in Beijing Coking Plant and identified as *Rhodococcus rhodochrous* by biochemical analysis and 16S rDNA sequence. The results showed the strain Q3 could tolerate pyrene, and could degrade it with initial concentration up to 200 mg·L<sup>-1</sup> in liquid medium. Meanwhile, Q3 showed broad-spectra property for PAHs degradation, and could use nine individual PAHs, including phenanthrene, pyrene, benzoanthracene, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, dibenzo[a, h]anthracene or benzo[g, h, i]perylene, as sole carbon source to perform metabolism. Especially for PAHs with high-ring structures, such as benzo[a]pyrene, a relatively high degradation capacity also occurred. In addition, the strain Q3 could effectively degrade the mixed PAHs in the simulated solution, and had a good effect on enhancing remediation for long-term PAHs contaminated soil. The PAHs removal rate in treatment group increased by 24% compared with the control group. The results can provide a technical reference for the bioremediation technology of PAHs contaminated soil.

**Keywords** PAHs; degradation bacteria; screening; degradation characteristics; soil remediation