

宋立超, 张 薇, 钮旭光, 等. 焦化厂区地肤根际芘降解细菌筛选和促生潜力研究[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(11):2275–2280.

SONG Li-chao, ZHANG Wei, NIU Xu-guang, et al. Screening of pyrene-degrading bacteria from *Kochia scoparia* rhizosphere in coking plant and study of plant growth-promoting ability[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(11):2275–2280.

焦化厂区地肤根际芘降解细菌筛选和促生潜力研究

宋立超, 张 薇, 钮旭光, 李 瑞, 曹 阳, 赵浩宇, 周立炀

(沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110866)

摘 要:为强化焦化厂土壤多环芳烃原位植物-微生物修复的应用, 提供具有降解多环芳烃功能的植物促生菌, 分别以芘和 1-氨基环丙烷-1-脱氨酶(ACC 脱氨酶)为唯一碳源和氮源, 采用富集培养法对某焦化厂优势植物地肤根际土壤中的功能菌株进行分离。研究分离的菌株对芘的降解能力和对植物的促生特性; 通过种子萌发试验, 以芘为碳源, 研究菌株对地肤种子发芽率和根长的影响。多次富集后, 得到 7 株菌, 经鉴定命名为考克氏菌 KSB1、芽孢杆菌 KSB2、类香味菌 KSB3、沙雷菌 KSB4、副球菌 KSB5、松鼠葡萄球菌 KSB6、芽孢杆菌 KSB7。经过 14 d 的降解实验, 菌株 KSB1、KSB2、KSB4、KSB5 和 KSB7 均可降解约 58% 以上的芘。菌株 KSB2、KSB4 和 KSB7 的 ACC 脱氨酶活性大于 $3.5 \text{ M } \alpha\text{-KB} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。在种子萌发实验中, 菌株 KSB2、KSB4 和 KSB7 均可显著提高芘胁迫下(芘浓度 $10 \sim 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)地肤种子的发芽率和芽长, 其中 KSB7 的效果最好, 与对照相比对地肤发芽率和芽长分别提高了 56.76% 和 88.9%, 表明菌株 KSB7 在焦化厂污染土壤的地肤-微生物联合修复中具有较大的应用潜力。

关键词:根际促生菌; 地肤; 多环芳烃; 降解

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2017)11-2275-06 doi:10.11654/jaes.2017-0997

Screening of pyrene-degrading bacteria from *Kochia scoparia* rhizosphere in coking plant and study of plant growth-promoting ability

SONG Li-chao, ZHANG Wei, NIU Xu-guang, LI Rui, CAO Yang, ZHAO Hao-yu, ZHOU Li-yang

(College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to enhance in situ bioremediation of coking plant soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and obtain plant growth-promoting bacteria that can degrade PAHs, functional strains in the rhizosphere of *Kochia scoparia*, which is a typical plant in coking plants, were obtained using the enrichment culture method. Pyrene and 1-amino cyclopropane-1-deaminase (ACC) were used as the sole carbon and nitrogen sources, respectively. The pyrene degradation ability and plant growth-promoting characteristics of the isolated strains were studied. The effect of the strains on the germination rate and root length of *Kochia scoparia* seeds were also analyzed using pyrene as the carbon source. After several enrichment times, 7 strains were identified and named as *Kocuria* sp. KSB1, *Bacillus* sp. KSB2, *Myroides* sp. KSB3, *Serratia* sp. KSB4, *Paracoccus* sp. KSB5, *Staphylococcus sciuri*. KSB6, and *Bacillus* sp. KSB7. In the degradation experiment, more than 58% of pyrene could be degraded in 14 days by strains KSB1, KSB2, KSB4, KSB5, and KSB7. The activity of ACC deaminase was more than $3.5 \text{ M } \alpha\text{-KB} \text{ mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in KSB2, KSB4, and KSB7. Strains KSB2, KSB4, and KSB7 significantly improved the germination rate and root length under pyrene stresses of $10 \sim 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared to CK, KSB7 increased the germination rate by 56.76% and shoot length by 88.9%, respectively. The results show that strain KSB7 has great potential in the bioremediation of contaminated soils of coking plants using *Kochia scoparia*.

Keywords: plant growth-promoting rhizobacteria; *Kochia scoparia*; polycyclic aromatic hydrocarbons; degradation

收稿日期: 2017-07-17 录用日期: 2017-10-16

作者简介: 宋立超(1979—), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 讲师, 从事土壤有机污染生物修复方面的研究。E-mail: slch_1979@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(41703103, 31401322); 农业部东北耕地保育重点实验室项目(2015NYBKFT-4)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (41703103, 31401322); Laboratory of Northeast Arable Land Conservation of Ministry of Agriculture (2015NYBKFT-4)

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是环境中普遍存在的一类持久性有机污染物,给人类健康和生态环境造成了严重的危害^[1-2],它是焦化厂污染土壤中的主要污染物之一,主要来源于炼焦过程中煤的不完全燃烧^[3]。李凤梅等^[4]报道沈阳某焦化厂土壤中13种PAHs质量浓度总和为5 672.00 mg·kg⁻¹,且以4环和5环为主,占PAHs总和的75.21%。冯嫣等^[5]报道北京某焦化厂车间土壤中PAHs质量浓度为144.81 mg·kg⁻¹,以3环和4环为主。近年,由于环境污染和城市规划等原因,一些市中心的焦化厂开始搬迁,而遗留的场地将被改为居住和商业用地。因此,如何有效地清除或降低焦化厂地PAHs污染风险便成为人们重点关注的问题。

针对焦化厂目前已有的PAHs修复技术包括化学淋洗、化学氧化、电动修复、微生物修复和植物修复等^[6]。其中微生物修复和植物修复方法由于低耗、经济有效且环境友好等特点,已成为目前污染土壤修复的主要方式^[7-8]。Sun等^[9]从焦化厂土壤筛选分离出菌株*Kocuria* sp. P10,液体培养14 d对芴、荧蒹和芘的降解率分别为83.2%、76.5%和59.6%。但由于游离降解菌难于在土壤中存活,导致单纯的微生物修复技术难以大面积推广。Smith等^[10]选取了高羊茅、紫羊茅、黑麦草、红车轴草和三叶草分别修复焦化厂污染的土壤,结果表明植物对3环和4环的PAHs具有一定的修复能力。但由于PAHs具有一定的毒性,可影响植物的生长,致使单纯通过植物修复的效率并不高,如何提高植物对PAHs毒性的抗性、提高植物的生物量、降低PAHs的浓度成为提高植物修复效率的重要途径^[11]。微生物和植物联合修复技术可弥补各自缺点,微生物可部分降解PAHs,降低土壤PAHs的浓度,减轻PAHs对植物的毒害,而植物的根际区可为共生菌提供良好的生长环境,利于菌株的存活,此外根际共生菌往往还具有促生功能,能够提高植物的生物量^[12-13]。Guo等^[12]向农田污染土壤中添加降解PAHs的分枝杆菌,可提高黑麦草对PAHs的去除率和土壤中降解PAHs功能微生物的数量。然而,目前关于焦化厂原位优势植物根际区专性降解PAHs促生菌的研究还未见报道。

笔者对沈阳某弃用焦化厂土壤PAHs进行检测,结果表明4环芘的含量最高,占PAHs总量的15.11%,故该试验选择芘为PAHs的代表模型。利用富集法,从焦化厂区优势植物地肤根际分离具芘降解能力的促生菌,研究它们的促生潜能、降解芘的能力

以及对地肤种子生长的影响,以期为焦化厂土壤PAHs污染植物-微生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

芘(纯度>97%)购自Fluka公司;1-氨基环丙烷-1-脱氨酶(1-amino cyclopropane-1-deaminase, ACC)、吲哚乙酸(Indoleacetic Acid, IAA)购自华中海威(北京)基因科技有限公司。

1.1.2 主要培养基

①液体无机盐培养基(g·L⁻¹): MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂HPO₄ 0.8, (NH₄)₂SO₄ 1.0, KH₂PO₄ 0.2, NaCl 20.0, CaCl₂·2H₂O 0.1, 葡萄糖 0.05, 调节pH至8.0。

②DF盐培养基(g·L⁻¹): 葡萄糖 2.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, Na₂HPO₄ 6.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, KH₂PO₄ 4.0, 葡萄糖酸 2.0, 柠檬酸 2.0, 调节pH至8.0。

③ADF培养基:用ACC替代DF培养基中(NH₄)₂SO₄,将ACC溶于灭菌蒸馏水后,再过0.22 μm有机滤膜除菌,使其最终浓度为3.0 mmol·L⁻¹。

④PKO培养基(g·L⁻¹): Ca₃(PO₄)₂ 5.0, 葡萄糖 5.0, NaCl 20.0, KCl 0.3, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MnSO₄·4H₂O 0.03, MgSO₄·7H₂O 0.3, FeSO₄·7H₂O 0.03, 琼脂 20.0, 调节pH至8.0。

1.1.3 土样的采集及理化性质测定

2016年7月,在沈阳某弃用焦化厂区外(41°48'N, 123°20'E)采集生长优势植物地肤,采用五点采样法取样,每点掘出面积为10 cm×10 cm,深度为10 cm的包含地肤根系的整块土壤样本,实验室无菌条件下将根际和非根际土壤刮下备用,于4℃冰箱保存。测定土壤有机质、pH值、速效N、速效P、速效K以及土壤和地肤中16种PAHs含量。16种PAHs的测定参考Khan等^[14]的方法。PAHs的方法检出限为0.021~0.103 mg·kg⁻¹(干重),土壤基质加标回收率为84.21%~108.36%。

1.2 根际土壤中具促生能力的芘降解细菌的筛选

取5 g地肤根际土加入到45 mL液体无机盐培养基中(含芘浓度为25 mg·L⁻¹),28℃、120 r·min⁻¹振荡培养7 d;取上述培养液5 mL再次加入到45 mL含芘的液体无机盐培养基中,28℃、120 r·min⁻¹培养7 d,重复3次,稀释平板法LB固体培养基计数芘耐受菌的数量。

吸取1 mL上述富集液加入到30 mL DF盐培养

基中,28 ℃、120 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h,按上述方法再次转接 1 mL 至 30 mL 的 ADF 液体培养基中,28 ℃、120 r·min⁻¹ 培养 24 h,重复 3 次,通过 ADF 固体培养基进行稀释分离单菌落。

1.3 芘降解细菌的鉴定

利用细菌 16S rRNA 通用引物(F27:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', R1492:5'-TACGYTACCTTGTTACGACT-3')序列进行 PCR 扩增,具体参照宋立超等^[13]的方法。获得产物进行测序,然后将所测得序列在 GenBank 中进行比对。同时常规方法对分离菌的形态、革兰氏染色、芽孢以及菌落特征进行分析。

1.4 分离细菌的特点

1.4.1 促生特性测定

所分离菌株的 ACC 脱氨酶活性测定参照 Liu 等^[16]的方法,解磷能力参照张国壮等^[17]的方法,产物 IAA 的检测采用 Salkowski 方法^[18],产铁载体能力参照 Payne 的^[19]方法。

1.4.2 分离菌种的降解特征

以浓度 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的投菌量和含芘 25 mg·L⁻¹ 液体无机盐培养基为基础,分别投加所筛选细菌,以不加任何菌株作为对照,28 ℃、120 r·min⁻¹ 恒温振荡培养,分别在 7 d 和 14 d 取样分析芘残留量。每个处理设 3 次重复。溶液中芘的萃取参照宋立超等^[15]的方法,芘的测定采用液相色谱法。

1.5 芘胁迫下菌株对地肤种子的促生能力

地肤种子的前处理参照 Liu 等^[13]的方法,先将地肤种子用 70% 的酒精表面消毒 2 min,然后再用 1% 次氯酸钠消毒 10 min,最后用无菌水冲洗 3 遍,20 粒消毒后的种子放入铺有两层滤纸的培养皿中,分别添加不同浓度的芘溶液(0、10、25 mg·L⁻¹)和 1 mL 的菌悬液(OD_{600nm}=0.6~0.8),28 ℃ 培养 5 d,测定种子的发芽率和芽长。

1.6 统计分析

统计分析使用 SPSS 16.0,样品均值的比较采用 LSD 检验($\alpha=0.05$),数据处理使用软件 Origin 8.1。

2 结果与分析

2.1 供试土壤性质

地肤根际和非根际土壤理化性质见表 1,可见该地区土壤为弱碱性,地肤根际区的有机质、速效 N、速效 P 和速效 K 均显著高于非根际区。根际区 PAHs 质量浓度与非根际区相比,减少了 25.1 mg·kg⁻¹,而地肤中 PAHs 浓度却为 7.69 mg·kg⁻¹,且根际区含有大量的 PAHs 耐受菌,这部分菌株具有降解 PAHs 的潜能,表明地肤根际区 PAHs 的去除可能是由植物累积和微生物降解协同作用完成。

2.2 分离菌株的鉴定

以芘和 AAC 为唯一碳源和氮源从地肤根际富集分离出可培养细菌 7 株,分别编号为 KSB1、KSB2、KSB3、KSB4、KSB5、KSB6 和 KSB7,其菌落形态及鉴定结果列于表 2。菌株 KSB2 和 KSB7 均为芽孢杆菌属,长杆、有芽孢、革兰氏染色为阳性、白色菌落;KSB4 为沙雷氏菌,短杆、革兰氏染色阴性、白色菌落。

2.3 分离菌株的促生特性

分离菌株促生特性结果列于表 3,除了菌株 KSB3 和 KSB6 以外,其余 5 株菌 ACC 脱氨酶活性均大于 1.0 M α -丁酮酸 mg⁻¹·h⁻¹ (M α -KB mg⁻¹·h⁻¹),其中菌株 KSB2、KSB4 和 KSB7 的 ACC 脱氨酶活性在 3.55~5.21 M α -KB mg⁻¹·h⁻¹;7 株菌均具有产 IAA 的能力,范围为 6.33~108.71 mg·L⁻¹;铁载体为定性检测,菌株 KSB3 能力最强;菌株 KSB2 和 KSB5 不具溶磷特性,菌株 KSB7 溶磷效果最好。综上,除了铁载体以外,在所有菌株中 KSB7 具有最高水平的 ACC 脱氨酶、IAA 产物和溶磷活性。

2.4 分离菌株对芘的降解特征

筛选分离所得 7 株细菌,经 14 d 培养后其对芘降解效果如图 1 所示。各菌株对芘均具有一定的降解能力,其中菌株 KSB2 和 KSB5 对芘的降解启动速率较快,在培养 7 d 后对芘的降解率分别为 35.81% 和 38.57%,然而菌株 KSB7 在 14 d 后对芘的降解率却

表 1 供试土壤主要理化性质
Table 1 Characteristics of experimental soil

土样	pH(H ₂ O)	速效 N/ mg·kg ⁻¹	速效 P/ mg·kg ⁻¹	速效 K/ mg·kg ⁻¹	有机质/ g·kg ⁻¹	PAHs/mg·kg ⁻¹		PAHs 耐受菌/ CFU×10 ⁵ ·g ⁻¹
						根际	地肤	
根际土	7.69±0.04a	3.19±0.02a	13.17±1.31a	12.43±0.16a	15.36±0.13a	43.4±2.81b	7.69±1.04	24±5b
非根际土	7.75±0.03a	3.07±0.01b	8.24±0.73b	9.64±0.21b	14.29±0.49b	68.5±3.22a	—	31±6a

注:表中数据为平均数±标准差(n=3);不同字母表示 0.05 水平上差异显著(LSD 检验)。下同。

Note: Data in the table showed mean ± standard deviation(n=3); Different letters refer to significant differences at 0.05 level(LSD test). The same below.

表 2 分离菌株的鉴定
Table 2 Identification of isolates

菌株	最相似的物种	同源性	生理特性	菌落形态
KSB1	<i>Kocuria</i> sp.NO19(KC200019)	99%	革兰氏阳性,球形	玫瑰红色,光滑
KSB2	<i>Bacillus</i> sp.KT15(KJ734005)	96%	革兰氏阳性,杆形,有芽孢	白色,光滑,不透明
KSB3	<i>Myroides</i> sp.12.2KSS(HE575905)	97%	革兰氏阴性,短杆	淡黄色,光滑
KSB4	<i>Serratia</i> sp.TF1-13(KJ127205)	98%	革兰氏阴性,短杆	白色,不透明
KSB5	<i>Paracoccus</i> sp.CY-b28(JX997853)	96%	革兰氏阴性,球形	乳白色,光滑
KSB6	<i>Staphylococcus sciuri</i> ISB2(KJ507203)	96%	革兰氏阳性,葡萄球菌	橙黄色,不透明
KSB7	<i>Bacillus aryabhattai</i> T245(KC764988)	98%	革兰氏阳性,杆形,有芽孢	白色,光滑,不透明

表 3 分离菌株的促生特点
Table 3 PGP features of isolated strains

菌株	ACC/M α-KB mg ⁻¹ ·h ⁻¹	IAA/mg ⁻¹ ·L ⁻¹	溶磷 (HD/CD)	产铁载体 (A/Ar)
KSB1	1.21±0.24cd	54.21±8.43c	1.93±0.14b	+
KSB2	3.55±0.53b	6.33±1.57f	0	+
KSB3	0.31±0.07e	63.19±4.27c	1.37±0.17cd	+++
KSB4	4.06±0.32b	89.46±9.05b	1.16±0.11d	+
KSB5	1.57±0.22c	31.27±2.28d	0	+
KSB6	0.83±0.11de	17.09±5.15e	1.62±0.26c	++
KSB7	5.21±0.42a	108.71±6.4a	2.21±0.11a	+

注: A/Ar 0.4~0.6 +++; 0.6~0.8 ++; 0.8~1.0 +。

最高, 达到 90.23%, 表明在根际区菌株 KSB2 和 KSB5 可能对芘的降解起先导作用, 作为共代谢底物促进菌株 KSB7 对芘的降解, 进而提高根际区对 PAHs 的降解效率。

2.5 不同芘浓度下菌株对地肤种子的影响

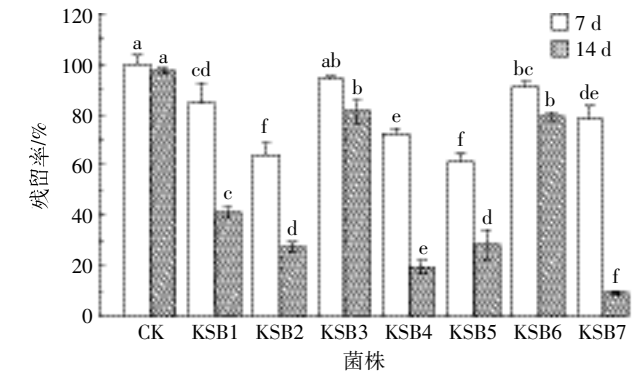
综合上述菌株的促生特性和对芘的降解能力, 选取菌株 KSB2、KSB4 和 KSB7, 考察它们对地肤种子的

促生能力。经过 5 d 培养后其对种子发芽率和芽长的影响如表 4 所示。不添加任何菌时, 发芽率和芽长随着芘浓度的增加而降低; 接种后, 无芘胁迫下各菌株与 CK 相比促生能力无显著差别, 而伴随着芘浓度的增加, 它们则可显著提高地肤的发芽率和芽长; 菌株 KSB7 表现出最好的促生能力, 与 CK 相比 10 mg·L⁻¹ 芘胁迫下发芽率和芽长分别提高了 14.74% 和 50%, 25 mg·L⁻¹ 芘胁迫下提高了 56.76% 和 88.9% (KSB7-CK/CK), 表明菌株 KSB7 对高浓度芘胁迫下的地肤种子的萌发和生长具有显著的影响。

表 4 不同芘浓度下菌株对地肤种子生长的影响

Table 4 Effects of strains on the growth of *Kochia scoparia* grown in different concentrations pyrene

菌株	发芽率/%			芽长/mm		
	0	10 mg·L ⁻¹	25 mg·L ⁻¹	0	10 mg·L ⁻¹	25 mg·L ⁻¹
CK	95±3a	81±3c	32±1d	2.3±0.1a	1.1±0.1d	0.2±0d
KSB2	97±1a	87±4b	44±5c	2.1±0.1a	1.4±0.2c	0.9±0.1c
KSB4	93±5a	92±2ab	57±6b	2.2±0.2a	1.8±0b	1.3±0.1b
KSB7	95±2a	95±3a	74±3a	2.3±0.3a	2.2±0.1a	1.8±0.2a



图中不同字母表示同一时间不同菌株处理下
芘残留率有显著差异(P<0.05)

图 1 各菌株对芘的降解效果

Figure 1 Biodegradation rate of pyrene by strains

3 讨论

目前, 国内外研究者主要通过添加功能微生物 (根际促生菌、PAHs 降解菌株) 来强化植物对 PAHs 类有机污染物的吸收降解作用^[20]。Liu 等^[13]在石油污染土壤高羊茅根际筛选出 1 株具促生能力的 *Klebsiella* sp. D5A, 接种后高羊茅对石油烃的降解率提高了 16.2%, 地上和地下生物量各提高了 75.2% 和 42.2%。刘魏魏等^[11]研究表明接种 PAHs 专性降解菌可使紫花苜蓿对 PAHs 的降解率提高 49.6%, 而同时接种植物促生菌和 PAHs 专性降解菌时紫花苜蓿对 PAHs 的降解率提高了 60.1%。基于此, 利用降解 PAHs 的促生菌联合植物修复 PAHs 污染的焦化厂具

有一定的应用潜力,植物和共生功能菌株的筛选是关键。地肤对环境适应性强,土壤生长范围广,具有一定耐碱特性,Moubasher 等^[21]研究表明地肤能有效去除干旱地区土壤中石油烃,去除率为 31.2%~57.7%,但有关其根际细菌与地肤联合修复有机污染的研究还未见报道。本研究从 PAHs 污染焦化厂地肤根际分离筛选出 7 株具茈降解特性的促生菌株,研究了菌株对茈的降解能力。结果表明,摇床培养 14 d 后菌株 KSB1、KSB2、KSB4、KSB5 和 KSB7 对茈的降解率均在 58%以上(茈 25 mg·L⁻¹)。分离菌株经鉴定分别属于考克氏菌属(*Kocuria* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、类香味菌属(*Myroides* sp.)、沙雷菌属(*Serratia* sp.)、副球菌属(*Paracoccus* sp.)、松鼠葡萄球菌属(*Staphylococcus sciuri*)和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。KSB2、KSB4、KSB5 和 KSB7 所在属的菌株具有降解 PAHs 的功能已有报道,系统发育分析与 KSB2 亲缘关系较近的菌株 *Bacillus* sp.SPL-4 可去除土壤中 35.1%的 4 环 PAHs,53.5%的 5 环和 6 环 PAHs^[22],且有多项研究表明该属菌可产生生物表面活性剂^[22-23]。本研究中菌株 KSB2 培养 7 d 对茈的降解率最高,表明该属菌株是一类降解 PAHs 的优势菌群。Liu 等^[24]研究表明接种菌株 *Bacillus* sp. DZ13 可提高花生植株 13.8%的生物量。本研究发现菌株 KSB2、KSB4 和 KSB7 的 ACC 脱氨酶活性大于 3.5 M α-KB mg⁻¹·h⁻¹,7 株菌均具有产 IAA 的能力,范围为 6.33~108.71 mg·L⁻¹,具有较强的促生潜力。

根际促生菌可提高种子的发芽率和芽长,进而提高植株的生物量。但植物对所分离的功能菌株是否具有根际效应,是菌株发挥功能的关键。Chen 等^[25]发现接种 *Microbacterium* sp. KL5 和 *Candida tropicalis* C10 可提高黑麦草和东南景天的生物量和对 PAHs 的去除率,但黑麦草与东南景天比,具有较好的根际效应。为此,我们在促生特性和茈降解能力实验的基础上,选取菌株 KSB2、KSB4 和 KSB7,做了促生试验,结果表明无茈胁迫下菌株的促生特性与对照相比无显著差别,然而随着茈浓度的升高,显著增加了地肤的发芽率和芽长(表 4)。菌株 KSB7 在茈胁迫下表现出了良好的促生能力,浓度 25 mg·L⁻¹ 与 10 mg·L⁻¹ 相比,其促生功能所发挥的相对作用更强,表明菌株 KSB7 在污染胁迫下,降解功能起先导作用,先缓解了高浓度茈对种子的毒害作用,进而达到促生的效果。关于菌株 KSB7 对土壤 PAHs 地肤修复的影响在今后工作中将做进一步的研究。

4 结论

本研究从焦化厂优势植物地肤根际土壤筛选分离出 7 株具 PAHs 降解能力的根际促生菌,其中菌株 KSB7 具有较高的茈降解能力和促生活性,鉴定属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),接种该菌株可显著提高地肤种子对茈的抗性,在 25 mg·L⁻¹ 茈浓度下,与对照相比地肤发芽率和芽长分别提高了 56.76%和 88.9%。表明菌株 KSB7 在焦化厂污染土壤的地肤-微生物联合修复中具有较大的应用潜力。

参考文献:

- [1] Han X M, Hu H W, Shi X Z, et al. Effects of different agricultural wastes on the dissipation of PAHs and the PAH-degrading genes in a PAH-contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2017, 172:286-293.
- [2] Wilcke W. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil[J]. *Geoderma*, 2007, 141:157-166.
- [3] 卢晓霞,李秀利,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.
LU Xiao-xia, LI Xiu-li, MA Jie, et al. Enhanced bioremediation of coking plant soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(3):864-869.
- [4] 李凤梅,郭书海,张灿灿,等. 多环芳烃降解菌的筛选及其在焦化厂场地污染土壤修复中的应用[J]. *环境污染与防治*, 2016, 38(4):1-5.
LI Feng-mei, GUO Shu-hai, ZHANG Can-can, et al. Isolation of PAHs degrading bacteria and its application to mediation of polluted soil in coking site[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2016, 38(4):1-5.
- [5] 冯 媛,吕永龙,焦文涛,等. 北京市某废弃焦化厂不同车间土壤中多环芳烃(PAHs)的分布特征及风险评价[J]. *生态毒理学报*, 2009, 4(3):399-407.
FENG Yan, LÜ Yong-long, JIAO Wen-tao, et al. Distribution and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from different workshops of an abandoned coking factory in Beijing[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(3):399-407.
- [6] 叶 茂,付 榕,杨 光. 焦化厂多环芳烃污染土壤修复技术[J]. *煤气与热力*, 2012, 32(4):17-19.
YE Mao, FU Rong, YANG Guang. Remediation technology for soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons at coking plant[J]. *GAS & HEAT*, 2012, 32(4):17-19.
- [7] Teng Y, Shen Y Y, Luo Y M, et al. Influence of rhizobium meliloti on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186:1271-1276.
- [8] Gan S, Lau E V, Ng H K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(2/3):532-549.
- [9] Sun G D, Jin J H, Xu Y X, et al. Isolation of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading strain and its enhancing the removal of HMW-PAHs from heavily contaminated soil[J]. *International*

- Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 90:23–28.
- [10] Smith M J, Flowers T H, Duncan H J, et al. Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils; Comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 192:1219–1225.
- [11] 刘魏魏, 尹睿, 林先贵, 等. 多环芳烃污染土壤的植物-微生物联合修复初探[J]. 土壤, 2010, 42(5):800–806.
LIU Wei-wei, YIN Rui, LIN Xian-gui, et al. Interaction of phytoremediation-microorganism to remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) polluted soils[J]. *Soils*, 2010, 42(5):800–806.
- [12] Guo M X, Gong Z Q, Miao R H, et al. Microbial mechanisms controlling the rhizosphere effect of ryegrass on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in an aged-contaminated agricultural soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113:130–142.
- [13] Liu W X, Hou J Y, Wang Q L, et al. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated[J]. *Chemosphere*, 2014, 117:303–308.
- [14] Khan S, Waqas M, Ding F H, et al. The influence of various biochars on the bioaccessibility and bioaccumulation of PAHs and potentially toxic elements to turnips (*Brassica rape* L.)[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 300:243–253.
- [15] 宋立超, 李培军, 刘宛, 等. 盐碱土壤 PAHs 降解菌的筛选鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2):282–287.
SONG Li-chao, LI Pei-jun, LIU Wan, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a PAHs-degrading bacteria from salt-alkaline soil[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(2):282–287.
- [16] Liu W X, Sun J Y, Ding L L, et al. Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Festuca arundinacea* L.)[J]. *Plant and Soil*, 2013, 371(1/2):533–542.
- [17] 张国壮, 李海超, 孙永林, 等. 5 株产 ACC 脱氨酶细菌的筛选与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(6):189–196.
ZHANG Guo-zhuang, LI Hai-chao, SUN Yong-lin, et al. Isolation and identification of rhizobacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2014, 42(6):189–196.
- [18] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(2):793–796.
- [19] Payne S M. Detection, isolation, and characterization of siderophores[J]. *Methods Enzymol*, 1994, 235:329–344.
- [20] 宋立超, 钮旭光, 张玉龙, 等. 盐渍化土壤翅碱蓬根际促生细菌的筛选及对多环芳烃的降解特性[J]. 生态学杂志, 2016, 35(1):199–204.
SONG Li-chao, NIU Xu-guang, ZHANG Yu-long, et al. Screening of a plant growth-promoting rhizobacterium from *Suaeda salsa* (L.) in saline soil and its ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(1):199–204.
- [21] Moubasher H A, Hegazy A K, Mohamed N H, et al. Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 98:113–120.
- [22] Bezza F A, Nkhalambayausi C E M. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 309:563–576.
- [23] Zeng J, Zhu Q, Wu Y C, et al. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and co-per independence[J]. *Chemosphere*, 2016, 148:1–7.
- [24] Liu D, Yang Q Q, Ge K, et al. Promotion of iron nutrition and growth on peanut by *Paenibacillus illinoisensis* and *Bacillus* sp. strains in calcareous soil[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, 48(4):656–670.
- [25] Chen F, Tan M, Ma J, et al. Efficient remediation of PAH-metal co-contaminated soil using microbial-plant combination; A greenhouse study[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 302:250–261.