

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.

GU Ping, ZHOU Qi-xing, WANG Xin, et al. The screening-out and degradation character of an indigenous benzo[a]pyrene-degrading bacteria[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(5): 926–932.

一株土著 B[a]P 降解菌的筛选及降解特性研究

顾平^{1,3}, 周启星^{2*}, 王鑫², 伍跃辉¹, 陈威¹, 张倩茹³, 龚起⁴, 周爱申¹

(1.黑龙江省环境监测中心站, 哈尔滨 150056; 2.南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室/天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071; 3.中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 4.黑龙江省环境应急与事故调查中心, 哈尔滨 150090)

摘要:通过在液体培养基中添加苯并[a]芘(B[a]P)作为唯一碳源反复驯化培养, 从长期受石油烃和多环芳烃(PAHs)污染的土壤中分离出 8 株能够降解 B[a]P 的细菌, 其中一株细菌(命名为 BB-1)具有最大降解效果。采用 16sRNA 基因测序结果表明, BB-1 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)同源率为 100%。为了研究 BB-1 的降解特性, 在 pH7.0、30 °C 条件下培养 8 d, 菌株 B[a]P 的降解率高达 66.36%。为了考察培养基初始 pH 和外加蔗糖浓度对 BB-1 降解 B[a]P 的影响, 30 °C 下振荡培养 8 d, 当设置培养基初始 pH 为 4.0、6.0、8.0 和 10.0 时, BB-1 对 B[a]P 的降解率分别为 12.14%、39.61%、55.21% 和 30.03%, 可见 pH 为 8.0 时其降解效果最优; 当添加 0.1% 蔗糖和 0.5% 蔗糖为外加碳源时, 菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解率分别为 70.56% 和 74.89%, 表明 0.5% 蔗糖的降解效果最优。

关键词: PAHs; B[a]P; 污染土壤; 生物降解

中图分类号: S154.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)05-0926-07 doi:10.11654/jaes.2017-0954

The screening-out and degradation character of an indigenous benzo[a]pyrene-degrading bacteria

GU Ping^{1,3}, ZHOU Qi-xing^{2*}, WANG Xin², WU Yue-hui¹, CHEN Wei¹, ZHANG Qian-ru³, GONG Qi⁴, ZHOU Ai-shen¹

(1. Heilongjiang Provincial Environmental Monitoring Center Station, Harbin 150056, China; 2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria Ministry of Education/Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 4. Environmental Emergency and Accident Investigation Center of Heilongjiang Province, Harbin 150090, China)

Abstract: Eight bacteria strains were isolated from the soil contaminated with petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using repeated subcultures in liquid medium with added benzo[a]pyrene (B[a]P) as the sole carbon source. One of the bacterial strains named BB-1 had an optimal degradation effect (100% homologous to *Bacillus megaterium*) through the 16sRNA gene sequencing method. In order to explore the degradation character of BB-1, the strain was cultured under pH=7.0, 30 °C for 8 days, after which the B[a]P degradation rate reached a maximum of 66.36%. In order to investigate the degradation rate of BB-1 under varying conditions of initial pH and additional sucrose concentration in the culture medium, the incubation was carried out at 30 °C for 8 days, with various values of initial pH including 4.0, 6.0, 8.0, and 10.0. The results showed that the degradation rates of B[a]P were 12.14%, 39.61%, 55.21%, and 30.03%, respectively. In other words, the highest degradation efficiency was achieved for pH 8.0. With the addition of 0.1% and 0.5% sucrose as an additional carbon source, the degradation rate of B[a]P reached 70.56% and 74.89%, respectively. It was thus clear that the highest degradation efficiency occurred in the media with the addition of 0.5% sucrose.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); benzo[a]pyrene (B[a]P); contaminated soil; biodegradation

收稿日期: 2017-07-06 录用日期: 2017-12-22

作者简介: 顾平(1983—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 从事污染修复研究及环境空气噪声质量评价工作。E-mail: guping2708@163.com

* 通信作者: 周启星 E-mail: zhouqx@nankai.edu.cn

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目

Project supported: A Special Fund for Basic Scientific Research Services of Central Colleges and Universities

多环芳烃(PAHs)是土壤环境中普遍存在的一类有机污染物,由于其毒性和潜在的致癌性已受到普遍关注^[1-7]。苯并[a]芘(B[a]P)是一种具有5环结构的强致癌性 PAHs^[8-11],主要存在于石油污染的土壤^[12]、煤矿区和河流中,已被美国环保局列入优先控制的有毒有机污染物黑名单^[13],在其2008年1月公布的28种有毒有机物中,排名第三^[14]。有学者已对 B[a]P 降解菌做了一些研究,例如:Boonchan 等^[8]用真菌-微紫青霉菌和细菌-嗜麦芽糖寡养单胞菌组成的复合菌群,能利用 B[a]P 为唯一碳源生长并降解之;Rafin 等^[9]筛选出一株腐皮镰孢霉菌,以 B[a]P 为唯一碳源并进行降解实验,12 d 后的降解率为 4%。目前,国内公布的降解 B[a]P 的微生物主要集中在真菌^[15-16]。国外的报道也多以真菌为主,如 Hadibarata 等^[17]研究了一株白腐真菌对 B[a]P 的降解,结果显示,在以 B[a]P 为唯一碳源的情况下,培养 30 h 后此菌株对 B[a]P 降解率为 38%。由于细菌本身生理特性的多样性以及对植物的相对安全性,在微生物修复技术中比真菌更具有优越性,更能适应不同的环境条件^[18-19]。因此,获得高效降解 B[a]P 的细菌是丰富微生物修复技术的关键环节,也是生物刺激和生物强化^[20]等技术的基础,对高效降解微生物的筛选和降解特性研究,也成为 PAHs 污染土壤修复的第一步。为此,本研究以 B[a]P 为唯一碳源,从长期受石油污染的土壤中筛选优势土著降解菌株,并考察其降解特性,进而对降解特性最佳的一株菌进行菌种鉴定,旨在为今后污染土壤修复提供物质基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土样来源

污染土壤采自沈抚污灌区四方台大棚南石油污水灌溉多年的蔬菜田的表层土壤(0~20 cm)。土壤理化性质:pH 6.9,有机质 17.95 g·kg⁻¹,全 N 1.32 g·kg⁻¹,全 P 1.39 g·kg⁻¹,速效 K 144.4 mg·kg⁻¹。总 Cd 2.71 mg·kg⁻¹,Cd 含量超过国家土壤环境质量标准 GB 15618—1995 的农业用地 2 级标准(pH 介于 6.7~7.5 之间,Cd 含量为 0.6 mg·kg⁻¹)的 3.5 倍;16 种 PAHs 总量为 0.569 mg·kg⁻¹,2~4 环 PAHs 含量为 0.462 mg·kg⁻¹,5~6 环 PAHs 含量为 0.106 mg·kg⁻¹,B[a]P 含量为 0.041 mg·kg⁻¹。

1.1.2 主要试剂

B[a]P 购于北京百灵威化学技术有限公司,纯度 ≥95%;实验所用其余有机溶剂均购于山东禹王实

业有限公司化工分公司,气谱用正己烷为色谱纯,其余常用试剂如二氯甲烷、丙酮、正己烷、层析用硅胶(200~300 目)均为分析纯。

磷酸缓冲溶液:0.02 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄,0.02 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄,pH 7.0,0.1 MPa,121 °C,灭菌 20 min^[21]。

1.1.3 培养基

富集驯化培养基:所用碳源为 B[a]P(5 mg·L⁻¹),以丙酮溶液加入。(NH₄)₂SO₄ 2.0 g,KH₂PO₄ 0.5 g,Na₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄ 0.3 g,酵母膏 0.2 g,水 1000 mL,pH=7.0,121 °C,蒸气灭菌 30 min。

降解用液体培养基:(NH₄)₂SO₄ 0.5 g,NaNO₃ 0.5 g,CaCl₂ 0.02 g,MgSO₄ 0.2 g,KH₂PO₄ 1.0 g,NaH₂PO₄·H₂O 1.0 g,水 1000 mL,pH7.0,灭菌条件同上,所用碳源为 B[a]P(5 mg·L⁻¹),以丙酮溶液加入。

降解菌选择性固体培养基:其无机盐配方同上,琼脂浓度 20 g·L⁻¹。灭菌条件同上。

活化富集培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1000 mL,pH7.0,灭菌条件同上。

1.2 实验方法

1.2.1 B[a]P 降解菌富集分离和筛选

将采集的筛菌土样充分混合后取 1 g,放入装有 50 mL 已灭菌的富集驯化培养基的三角瓶中。开始添加 B[a]P 的浓度为 5 mg·L⁻¹,30 °C、120 r·min⁻¹ 摇床振荡培养,培养开始后每 8 d 转接 1 次,以 20%的接种量接种到新鲜 B[a]P 富集驯化液体培养基中,如此连续富集直至培养到溶液呈现明显的浑浊及颜色变化(此过程约为 30 d)。采用梯度稀释法在不同 B[a]P 浓度的选择性固体培养基上分离培养,经 5 个周期反复平板划线分离后,得到 8 个菌株样品,分别纯化后保存于牛肉膏蛋白胨斜面。

在无菌条件下,将 8 个待测菌株样品制成供试菌悬液(方法见 1.2.2),分别接入装有已灭菌的 100 mL 降解用液体培养基的三角瓶中,然后加入 B[a]P 的丙酮溶液,使瓶中 B[a]P 的浓度达 5 mg·L⁻¹,同时设不接菌对照 CK,各 3 个重复,在 30 °C、200 r·min⁻¹ 恒温下振荡培养。自接种开始 1~10 d 每日固定时间取样,同时测定培养液中残留 B[a]P 浓度和 OD₆₀₀ 值,以便选取降解曲线趋势最好和降解率最高的菌株作为降解特性研究对象。

1.2.2 菌悬液的制备

将分离纯化后的菌种从斜面各挑取一环接入活化富集培养基中,30 °C 摇床振荡培养 48 h(此时处于对数生长期)后,分别取 3 mL 菌液于离心管内,离心

10 min (8000 r·min⁻¹), 用磷酸缓冲溶液清洗后离心 15 min (10 000 r·min⁻¹), 反复 3 次, 制成一定浓度的菌悬液冷藏备用。以上操作在无菌条件下进行, 目的是洗去培养基中的碳源^[18]。

1.2.3 菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解实验

无菌条件下, 将去掉碳源的供试菌悬液 10 mL 接入 B[a]P 浓度为 5 mg·L⁻¹ 的三角瓶中。同时设不接菌对照 CK, 各 3 个重复, 每个重复两瓶。培养条件及取样时间同 1.2.1, 一瓶分析培养液中残留 B[a]P 浓度, 另一瓶测定 OD₆₀₀ 值。以时间为横坐标, 以 B[a]P 含量和 OD₆₀₀ 为纵坐标画出曲线。

在上述研究基础上, 分别研究不同 pH 值和添加不同浓度葡萄糖作为底物对菌株 BB-1 降解 B[a]P 的影响。

1.2.4 菌种鉴定

采用 16sRNA 基因序列分析、革兰氏染色、形态观察法鉴定菌株。其中, 16sRNA 基因序列分析引物为: 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'), 扩增条件为: 94℃预变性 5 min, 1 个循环; 94℃变性 1 min, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 35 个循环; 72℃保温 10 min。PCR 扩增产物用上海生工的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, DNA 测序由大连宝生物公司完成, 将测序结果用 Blast 软件同 Genbank 中 DNA 序列进行同源性比较。

1.2.5 微生物生长曲线测定

在 30℃、200 r·min⁻¹ 摇床振荡培养并定时定量吸取培养液, 采用蛋白核酸测定仪测定其 OD₆₀₀ 值以表示其微生物生长密度。

1.2.6 B[a]P 的测定

B[a]P 含量的分析采用 GC-FID 法。设备条件: HP-6890, PLUS GC (Version A.03.07) 气相色谱仪, 装有氢火焰检测器 (FID), HP-5 毛细管色谱柱 (30.0 m×0.25 mm×0.25 μm); 采用自动进样方式, 进样口无分流模式, 温度 250℃; 柱流量 1.5 mL·min⁻¹; 高纯氮气 (99.999%) 作载气; 炉温 80℃; 氢火焰离子化检测器 (FID) 温度: 310℃。B[a]P 在 1.3~9.75 mg·L⁻¹ 的浓度范围内, 峰面积呈较好的线性关系, 线性方程为 $y=10.408x-2.1324$, 其中 y 为峰面积, x 为 B[a]P 浓度, 决定系数 $R^2=0.9935$ 。

对样品进行加标回收率测定, 加标浓度为 5 mg·L⁻¹, 回收率测定结果为 93.6%~108.1%, 符合 100%±25% 的规定, 且对空白加标样品进行 7 次平行测定,

相对标准偏差为 4.6%, 小于 5%, 说明该方法可以用于培养液中 B[a]P 含量的测定。

培养后的样品瓶从培养箱中取出后立即放入冰箱中 (4℃) 平衡 1 h 以上。拿出后分别用移液管均匀取适量移至分液漏斗。然后加入 15 mL 二氯甲烷, 振荡萃取 10 min, 静置后收集有机相, 经过无水硫酸钠去水后存于茄形瓶中。向水相中再加入 10 mL 二氯甲烷, 振荡萃取 5 min, 同样过无水硫酸钠去水, 合并 2 次萃取的有机相, 于氮吹仪上将其溶剂蒸至微干。最后用色谱纯的正己烷定容至 5 mL, 立即转移到气谱进样瓶中上机测定。

1.2.7 数据处理

平均值之间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 显著性水平为 $P<0.05$, 数据处理由 SPSS 16.0、Excel 2007、Origin 8.0 软件完成。

2 结果与讨论

2.1 菌种的分离筛选与鉴定

由于降解污染物的巨大潜力, 目前, 多数生物修复工程中应用的是土著微生物, 而接种的外源微生物在环境中难以保持较高的活性导致工程菌的应用受到较严格的限制^[22]。基于这一原则, 许多研究人员均采用从污染土壤中筛选 PAHs 降解菌的策略^[23-25], 以获取大量微生物作为污染土壤生物修复的基础。

本研究以沈抚污灌区长期受石油污染的土壤为筛选降解菌的目标土壤, 利用细菌富集液体培养基得到能利用 B[a]P 的富集液, 然后将其涂布于以不同浓度 B[a]P 为唯一碳源的固体培养基中, 分离筛选到 8 株形态各异的能利用 B[a]P 的微生物。为进一步验证各菌株的降解能力, 将其分别接入以 B[a]P 为唯一碳源的降解用液体培养基中, 定时取样, 通过测定培养液中 B[a]P 残留率及菌悬液光密度值 (OD₆₀₀), 筛选到一株降解 B[a]P 能力最强的细菌命名为 BB-1。显微镜下观察 BB-1 菌株为芽孢杆状, 革兰氏染色阳性, 在牛肉膏蛋白胨培养基上其菌落为圆形、扩展、边缘整齐、淡黄色、有光泽。该菌株为好氧化能异养菌。以其总 DNA 为模板, 采用细菌 16sRNA 基因特异引物 F27 和 R1492 进行扩增, 获得 1.5 Kb 大小的 PCR 产物, 用 Blast 软件将该片段测序结果和 GenBank 中已登录的核苷酸序列进行同源性比较, 发现菌株 BB-1 与 *Bacillus megaterium* 同源性为 100%。根据形态及序列特征, 菌株 BB-1 被鉴定为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 其序列特征见图 1。

1	ATTAGCGGC	TAGCTCCTTA	CGGTTACTCC	ACCGACTTCG	GGTGTACAA
51	ACTCTCGTG	TGTGACGGG	GGTGTGTACA	AGGCCCGGGA	ACGTATTAC
101	CGCGCATGC	TGATCCGGA	TACTAGCGA	TCCAGCTTC	ATGTAGCGA
151	GTTGCAGCCT	ACAATCCGAA	CTGAGAATGG	TTTTATGGGA	TTGCTTGAC
201	CTCGCGTCT	TGCAGCCCTT	TGTACCATCC	ATTGTAGCAC	GTGTGTAGCC
251	CAGGTCATAA	GGGGCATGAT	GATTTGACGT	CATCCCCACC	TTCTCCGGT
301	TTGTCACCGG	CAGTCACCTT	AGAGTGCCCA	ACTNAATGCT	GGCAACTAAG
351	ATCAAGGGTT	GCGCTCGTTG	CGGGACTTAA	CCCAACATCT	CACGACACGA
401	GCTGACGACA	ACCATGCACC	ACCTGCTACT	CTGTCCCCCG	AAGGGGAACC
451	CTCTATCTCT	AGAGTTGTCA	GAGGATGTCA	AGACCTGGTA	AGGTTCCTCG
501	CGTTGCTTCG	AATTAACCA	CATGCTCCAC	CGCTTGTGCG	GGCCCCCGTC
551	AATTCCTTTG	AGTTTCAGTC	TGCGACCGT	ACTCCCCAGG	CGGAGTGCTT
601	AATGCGTTAG	CTGCAGCACT	AAAGGGCGGA	AACCCTCTAA	CACCTAGCAC
651	TCATCGTTTA	CGGCTGGAC	TACCAGGTA	TCTAATCTCTG	TTTGCTCCCC
701	ACGCTTTCCG	GCCTCAGCGT	CAGTTACAGA		

图1 菌株 BB-1 的 16sRNA 基因序列

Figure 1 16sRNA gene sequence of strain BB-1

目前,PAHs 降解菌的研究大多集中在 3~4 环有机物上,也达到比较理想的降解效果,如黄兴如等^[26]筛选出的 3 株 PAHs 降解菌 SL-1、02173 和 02830,经 16sRNA 基因序列分析,02173 和 02830 分别与假单胞菌属中的 *Pseudomonas alcaliphila* 和 *Pseudomonas corrugate* 同源性最近,SL-1 为新类群 *Rhizobium petrolearium* 的模式菌株,其降解实验表明,菌株 SL-1 3 d 内对单一 PAHs,即菲($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和芘($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的降解率分别达 100%和 48%,5 d 后能降解 74%的芘;而其 3 d 内对混合 PAHs 中菲和芘的降解率分别为 75.89%和 81.98%。菌株 02173 和 02830 3 d 内对混合 PAHs 中萘($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、芴($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、菲($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和芘($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的降解率均分别超过 97%。但能够利用 B[a]P 作为唯一碳源和能源并对其有降解作用的菌株很少见。已经报道过的有霉菌可可毛色二孢菌^[24]、绿色木霉^[16]、细菌-真菌^[27]、氮单胞菌^[19],以及铜绿假单胞菌(报道较多)等。尽管芽孢杆菌属的很多细菌具有强降解 PAHs 能力,如张宏波等^[28]从 PAHs 污染的土壤中分离到一株以芘作为碳源生长的高效降解菌,属于短短芽孢杆菌属(*Brevibacillus parabrevis*),能耐受含芘 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐液体培养基,在含芘 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐液体培养基中 7 d 的降解效率达到 51.02%,而且对培养基具有较广泛的 pH 适应范围,在去除环境污染方面发挥着重要作用^[29],但芽孢杆菌属对 B[a]P 有较强的降解能力的菌株还鲜有报道。

2.2 菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解特性

2.2.1 菌株 BB-1 的降解曲线

根据 1.2.3 所述测定方法,采用处于对数期(48 h)的菌悬液,在培养基 pH 值为 7.0 的条件下考察菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解能力。由图 2 可以看出,培养初期,菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解能力较弱,随着培养

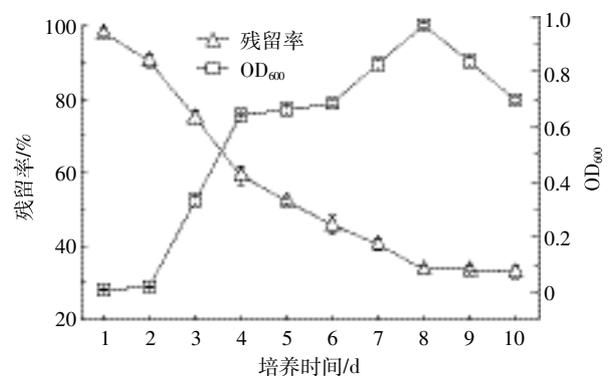


图2 菌株 BB-1 的生长曲线和对 B[a]P 的降解

Figure 2 Growth and benzo[a]pyrene degradation curves of strain BB-1

时间的延长,其降解 B[a]P 的能力逐渐增强。菌株 BB-1 在培养 24 h 后就开始降解 B[a]P。培养 4 d 时,降解率已经显著提高,达到 40.74%。6 d 后,降解率继续逐渐升高,液体培养基中 B[a]P 的残留率仅有 $45.78\% \pm 2.44\%$,菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解率为 54.22% 。到第 8 d, B[a]P 的残留率降低最明显,达到 $33.64\% \pm 1.18\%$ (降解率为 66.36%)。之后 2 d 降解率变化不明显,而未投加菌株的培养基在 8 d 后测得的 B[a]P 降解率为 $3.69\% \pm 0.63\%$,和投加菌株的降解率对比差异明显。10 d 后,投加菌株 BB-1 的液体培养基中 B[a]P 的残留率仅为 $32.96\% \pm 1.63\%$ 。光密度 OD₆₀₀ 结果显示:培养 1 d 后 OD₆₀₀ 值仅为 0.0073 ± 0.0022 ;培养第 3 d 开始细菌数量显著增加,说明其生长曲线存在一定的延滞期;第 6 d OD₆₀₀ 值为 0.6839 ± 0.0083 ;到第 8 d 达到最高值 0.9676 ± 0.0074 。这些结果都说明菌株 BB-1 可以利用 B[a]P 作为主要碳源进行生长繁殖并对其有很高的降解能力。

从 B[a]P 残留率和降解时间的曲线趋势可以看出,菌体对 B[a]P 的降解经过了很短的延滞期到快速

降解期,最后进入平缓期。说明菌体在反应初期对外源物质有一个适应过程,一方面 B[a]P 自身毒性抑制了菌体生长,但另一方面,菌体在 B[a]P 的诱导下开始产生降解酶,所以此时降解率较低。2 d 后,菌体已经适应了外来碳源,菌体繁殖速度加快,在大量降解酶作用下对 B[a]P 利用率增加,使得体系里 B[a]P 的残留率迅速下降,如图中 2~8 d 的曲线所示。而 8~10 d,曲线趋于平缓,变化不明显,且 OD₆₀₀ 急速下降,说明菌体的生长受到抑制,可能是由于随着降解的进行,产生了很多有机酸^[30-31],改变了体系 pH,影响了菌体的代谢;或者是小分子的产物与 B[a]P 形成了碳源之间的竞争,降低了 B[a]P 的降解率;也可能是因为产生了一些毒性中间产物在菌体内累积,菌体为了降解中间产物又要进入一轮新的适应期。

菌株 BB-1 是通过为期 30 d 的 B[a]P 富集培养后筛选得到的,并且在接入含 B[a]P 液体培养基前又再次进行了细菌驯化。从图 2 中 B[a]P 残留率曲线可以发现菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解延滞期非常短,这表明引进菌种的驯化对于降解微生物的实际应用是十分必要的。

另外,根据刘海滨等^[24]的研究,可可毛色二孢菌经过 10 d 降解, B[a]P (初始浓度为 100 mg·L⁻¹) 的降解率为 52.5%±1.5%。可见,多数研究都集中在高浓度的降解上,对于比较接近真实情况的中低浓度且高降解率细菌的研究很少,本研究筛出的 BB-1 具有很强的实践性。

2.2.2 菌株 BB-1 降解 B[a]P 最佳 pH

微生物对有机污染物的生物降解受环境中多种因素的制约,为了确定菌株 BB-1 降解 B[a]P 的最佳 pH 值,测定了不同初始 pH 值下 8 d 后的 B[a]P 降解率。由表 1 可以看出,菌株 BB-1 对酸碱性有很强的适应能力,在 pH 4~10 范围内都可以利用 B[a]P 作为唯一碳源生长,且均可不同程度地降解 B[a]P,只是不同 pH 值条件对 B[a]P 降解能力的影响存在显著差异。由表 1 可知,在中性条件下,该菌株 8 d 后对 B[a]P 的降解率最高,达 66.36%, OD₆₀₀ 值为 0.967 6±0.007 4;在弱碱(pH 值为 8)条件下,8 d 后其对 B[a]P 的降解效果也比较好,降解率为 55.21%, OD₆₀₀ 值为 0.812 1±0.010 3;但在强碱(pH 值为 10)和酸性(pH 值为 6 和 4)条件下,菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解率普遍偏低,均未超过 40%, OD₆₀₀ 值很低。说明在中性和弱碱体系中 BB-1 的降解效果优于酸性和强碱体系。这可能是因为 B[a]P 在降解过程中会生成小分子的有机酸类,与

表 1 不同 pH 值对菌株 BB-1 降解 B[a]P 的影响(±S.D)

Table 1 The influence of different pH on B[a]P degradation by strain BB-1

pH	降解率%	OD ₆₀₀ 值
4	12.14±2.40e	0.105 7±0.000 3e
6	39.61±1.43c	0.401 8±0.009 2c
8	55.21±2.00b	0.812 1±0.010 3b
10	30.03±2.37d	0.306 5±0.005 9d
7	66.36±1.18a	0.967 6±0.007 4a

注:同一列内不同字母代表不同 pH 值之间差异显著($P<0.05$)。

Note: The different letters in the same column represent the significant difference among the different pH values ($P<0.05$).

碱性体系中和或趋向弱酸性,这都利于微生物的生长繁殖和代谢降解^[32-33]。而在强酸强碱条件下,菌株 BB-1 的生长活性和降解能力都受到抑制作用,而细胞表面也可能受到破坏,或者出现结构改变,进而影响其对 B[a]P 的降解。综上,菌株 BB-1 的最佳降解 pH 值为 7~8。蔡瀚等^[33]的研究也发现:在 pH=7 时, B[a]P 降解率达到最高,为 46.32%。

2.2.3 不同含量蔗糖对菌株 BB-1 降解 B[a]P 的影响

为了考察外加无毒害碳源对 BB-1 降解 B[a]P 的影响情况,选择加入不同浓度的蔗糖,测定相应的 B[a]P 降解率。当培养基中添加易被细菌利用的蔗糖并同样经过 8 d 培养时,对比未添加蔗糖的培养基,降解效能有明显改变,见图 3。在 0.1% 蔗糖与 5 mg·L⁻¹ B[a]P 共存条件下,促进了菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解,降解率为 70.56%±2.02%;当蔗糖浓度增加至 0.5% 时,进一步促进了该菌株的降解效能,降解率增加至 74.89%±1.34%,而 OD₆₀₀ 也由 0.996 3±0.079 6 增加至 1.271 3±0.027 3。

目前普遍认为, PAHs 系一类难降解污染物,尤其是高分子量且结构复杂的 B[a]P 更难被微生物降解^[26,34]。

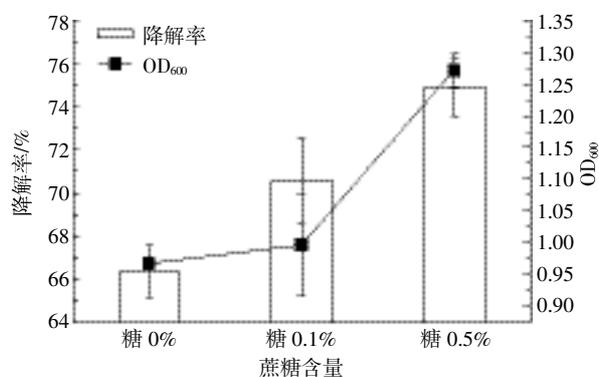


图 3 不同含量蔗糖对菌株 BB-1 降解 B[a]P 的影响

Figure 3 The effect of various added sucrose concentrations on B[a]P degradation by strain BB-1

共代谢是被广泛认可的提高微生物降解PAHs的有效方式^[20]。它是通过改变微生物碳源与能源的底物结构,增大微生物对碳源与能源的选择范围,从而达到微生物利用并降解 PAHs 的目的^[35]。常见的共代谢底物多为和 PAHs 本身结构相似的有机物或其中间代谢产物^[23],但这些物质除来源有限,还存在竞争性抑制和一定的毒害性等弊端^[15,36]。有研究表明,选择较易被利用的碳源如蔗糖、葡萄糖等作为有机污染物的共代谢底物能够明显提高微生物对 PAHs 的降解率,并具有来源广泛、无毒害,和 PAHs 无竞争性抑制作用等优点^[18-19,36]。本研究也表明,蔗糖能够促进菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解,但这种促进作用与糖的浓度有关。因此,选择合适的共代谢底物并调整至适宜的浓度是应用共代谢作用降解 B[a]P 的关键问题之一。

此外,如果将 BB-1 菌株直接投入到受 B[a]P 污染的土壤中,其降解特性不一定十分理想,还需要对菌株进行驯化,使降解基因恢复活性,并通过环境条件控制和外源底物添加促使降解菌能够在一定程度上抵御土著微生物的竞争抑制作用。

3 结论

(1)通过富集培养,获得了一株能以 B[a]P 为唯一碳源的新的降解菌株 BB-1,它在 B[a]P 浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下,30 °C 振荡培养 8 d,对 B[a]P 的降解率提高最快,达到 $66.36\% \pm 1.18\%$;

(2)运用 16sRNA 基因扩增、Blast 软件分析等鉴定方法,初步鉴定降解菌株 BB-1 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*);

(3)强酸、强碱条件对菌株 BB-1 的生长具有抑制作用,培养基初始 pH 值为 7 时,B[a]P 的降解率最大;

(4)共代谢底物蔗糖可促进菌株 BB-1 对 B[a]P 的降解,当 0.5% 蔗糖与 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ B[a]P 共存时,明显促进了菌株 BB-1 的降解效能,第 8 d 降解率已经达到 $74.89\% \pm 1.34\%$ 。

参考文献:

- [1] Ohura T, Amagai T, Fusaya M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor environments and factors affecting their concentrations[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(1):77-83.
- [2] Kanaly R A, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(8):2059-2067.
- [3] Kipoulou A M, Manoli E, Samara C. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetables grown in an industrial area[J]. *Environmental Pollution*, 1999, 106(3):369-380.
- [4] Robert J G, David W, J R V. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(12):3462-3469.
- [5] 苏慧,赵波,张素坤,等.广州市小学生多环芳烃内暴露水平[J]. *环境科学*, 2015, 36(12):4567-4573.
SU Hui, ZHAO Bo, ZHANG Su-kun, et al. Internal exposure levels of PAHs of primary school students in Guangzhou[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(12):4567-4573.
- [6] 周启星.复合污染生态学[M].北京:中国环境科学出版社,1995.
ZHOU Qi-xing. Ecology of combined pollution[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1995.
- [7] 张雪娜,贾海滨,王伟,等.不同载体材料固定化 *Fusarium. sp* 修复老化污染土壤中 HMW-PAHs 的研究[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(3):1107-1114.
ZHANG Xue-na, JIA Hai-bin, WANG Wei, et al. Impact of different immobilization materials for *Fusarium. sp* on the remediation of aged soils polluted with HMW-PAHs[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(3):1107-1114.
- [8] Boonchan S, Britz M L, Stanley G A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3):1007-1019.
- [9] Rafin C, Veignie E, Fayeulle A, et al. Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(12):3157-3160.
- [10] 包贞,潘志彦,杨晔,等.环境中多环芳烃的分布及降解[J]. *浙江工业大学学报*, 2003, 31(5):528-544.
BAO Zhen, PAN Zhi-yan, YANG Ye, et al. The distribution and decomposition of PAHs in the environment[J]. *Journal of Zhejiang University of Technology*, 2003, 31(5):528-544.
- [11] Jules G E, Pratap S, Ramesh A, et al. In utero exposure to benzo[a]pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life[J]. *Toxicology*, 2012, 295(1/2/3):56-67.
- [12] 王红旗,王帅,宁少尉,等.土壤铅-苯并[a]芘复合污染对小麦种子生长的影响研究[J]. *环境科学*, 2011, 32(3):886-894.
WANG Hong-qi, WANG Shuai, NING Shao-wei, et al. Effects of combined pollution of lead and benzo[a]pyrene on seed growth of wheat in soils[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(3):886-894.
- [13] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants I: A perspective review[J]. *Environ Sci Technol*, 1979, 13(4):416-423.
- [14] Gan S, Lau E V, Ng H K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172:532-549.
- [15] 巩宗强,李培军,王新,等.真菌对土壤中苯并[a]芘的共代谢降解[J]. *环境科学研究*, 2001, 14(6):36-39.
GONG Zong-qiang, LI Pei-jun, WANG Xin, et al. Cometabolic degradation of benzo[a]pyrene in the soil by the introduced fungi[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2001, 14(6):36-39.
- [16] 顾平,张倩茹,周启星,等.一株苯并[a]芘高效降解真菌的筛选与

- 降解特性[J]. 环境科学学报, 2010, 30(1):1-6.
- GU Ping, ZHANG Qian-ru, ZHOU Qi-xing, et al. Isolation of a fungal strain capable of degrading benzo[a] pyrene and its degradation characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(1):1-6.
- [17] Hadibarata T, Kristanti R A. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107:314-318.
- [18] 孙铁珩, 宋玉芳, 许华夏, 等. 植物法生物修复 PAHs 和矿物油污染土壤的调控研究[J]. 应用生态学报, 1999, 10(2):225-229.
- SUN Tie-heng, SONG Yu-fang, XU Hua-xia, et al. Research of bioremediation of contaminated soil by PAHs and mineral oil with plants act[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1999, 10(2):225-229.
- [19] 盛下放, 何琳燕, 胡凌飞, 等. 苯并[a]比降解菌的分离筛选及其降解条件的研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(6):791-795.
- SHENG Xia-fang, HE Lin-yan, HU Ling-fei, et al. Isolation of a benzo[a]pyrene-degrading strain and its degradation conditions [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(6):791-795.
- [20] 吴蔓莉, 陈凯丽, 叶茜琼, 等. 堆肥-生物强化对重度石油污染土壤的修复作用[J]. 环境科学, 2017, 38(10):4412-4419.
- WU Man-li, CHEN Kai-li, YE Xi-qiong, et al. Remediation of petroleum-contaminated soil using a bioaugmented compost technique[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(10):4412-4419.
- [21] 侯树宇, 张清敏, 余海晨, 等. 多环芳烃比高效降解菌的筛选及其降解性能的研究[J]. 南开大学学报:自然科学版, 2006, 39(2):71-74.
- HOU Shu-yu, ZHANG Qing-min, YU Hai-chen, et al. Optimized cultivation of high-efficient degradation bacterial strains and their degradation ability towards pyrene[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2006, 39(2):71-74.
- [22] 周启星, 魏树和, 张倩茹, 等. 生态修复[M]. 北京:中国环境科学出版社, 2006.
- ZHOU Qi-xing, WEI Shu-he, ZHANG Qian-ru, et al. Ecological remediation[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2006.
- [23] 胡凤钗, 苏振成, 孙健, 等. 高效比降解菌 N12 的分离鉴定与降解特性[J]. 应用生态学报, 2011, 22(6):1566-1572.
- HU Feng-chai, SU Zhen-cheng, SUN Jian, et al. Isolation and identification of a highly efficient pyrene-degrading *Mycobacterium* sp. strain N12[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(6):1566-1572.
- [24] 刘海滨, 王翠苹, 张志远, 等. 苯并[a]比高效降解菌筛选及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(9):2696-2701.
- LIU Hai-bin, WANG Cui-ping, ZHANG Zhi-yuan, et al. Isolation of highly-effective benzo[a]pyrene degrading strain and its degradation capacity[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(9):2696-2701.
- [25] 陈思尹, 吕卫光, 张娟琴, 等. 萘降解菌的分离及其联合修复作用的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(7):152-159.
- CHEN Si-yin, LÜ Wei-guang, ZHANG Juan-qin, et al. Review on isolation of naphthalene degradation bacterium in different habitats and the combined remediation[J]. *Environmental Science and Technology*, 2017, 40(7):152-159.
- [26] 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.
- HUANG Xing-ru, ZHANG Cai-wen, ZHANG Rui-jie, et al. Isolation, identification and degrading properties of PAHs-degrading bacteria[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5):965-973.
- [27] 李培军, 许华夏, 张春桂, 等. 污染土壤中苯并(a)芘的微生物降解, 环境污染治理技术与设备[J]. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(5):37-40.
- LI Pei-jun, XU Hua-xia, ZHANG Chun-gui, et al. The degradation of B(a)P by microorganism in contaminated soil[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2001, 2(5):37-40.
- [28] 张宏波, 林爱军, 刘爽, 等. 比高效降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(1):243-248.
- ZHANG Hong-bo, LIN Ai-jun, LIU Shuang, et al. Identification of pyrene degrading strains and the degrading characteristics research[J]. *Environmental Science*, 2010, 31(1):243-248.
- [29] 周乐, 盛下放, 张士晋, 等. 一株高效非降解菌的筛选及降解条件研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(12):2399-2402.
- ZHOU Le, SHENG Xia-fang, ZHANG Shi-jin, et al. Screening of a phenanthrene-degrading bacterium and its degradation conditions[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(12):2399-2402.
- [30] Joanna D M, James P F, Peter P F, et al. Degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1):340-345.
- [31] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, et al. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(1):13-19.
- [32] Zang S Y, Li P J, Yu X C, et al. Degradation of metabolites of benzo[a]pyrene by coupling *Penicillium Chrysogenum* with $KMnO_4$ [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(2):238-243.
- [33] 蔡瀚, 尹华, 叶锦韶, 等. 1株苯并[a]比高效降解菌的筛选与降解特性[J]. 环境科学, 2013, 34(5):1938-1943.
- CAI Han, YIN Hua, YE Jin-shao, et al. Isolation of an effective benzo[a]pyrene degrading strain and its degradation characteristics[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(5):1938-1943.
- [34] 王立红, 丁克强, 刘廷凤, 等. 比和苯并[a]比复合污染土壤中的环糊精-微生物连续修复[J]. 环境工程学报, 2017, 11(6):3813-3822.
- WANG Li-hong, DING Ke-qiang, LIU Ting-feng, et al. Continuous remediation of pyrene and benzo[a]pyrene-contaminated soil by cyclodextrin-microbial remediation[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(6):3813-3822.
- [35] Kanaly R A, Bartha R. Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1999, 18(10):2186-2190.
- [36] 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.
- ZHANG Jie, LIU Yong-sheng, MENG Ling, et al. Isolation and characteristics of PAHs-degrading strains[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(10):1783-1786.