

# 盐碱土壤 PAHs 降解菌的筛选鉴定及其降解特性

宋立超<sup>1,2</sup> 李培军<sup>2</sup> 刘宛<sup>2</sup> 肖亦农<sup>1</sup> 张玉龙<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳农业大学土地与环境学院 辽宁 沈阳 110866)

(2. 中国科学院沈阳应用生态研究所 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 采用富集培养的方法, 从天津大港油田 PAHs 污染盐碱化土壤中分离出一株能以菲、芘为唯一碳源和能源的优势菌 TJB5。经形态观察和 16S rDNA 序列分析结果表明, 该菌株为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。采用液体培养的方法, 研究了 pH、盐度、菲芘的初始浓度对 TJB5 菌株降解菲芘效果的影响, 确定了最佳降解条件。结果表明, 该菌对菲、芘的降解具有较广泛的 pH、盐度范围和良好的降解效果。在菲、芘浓度分别为 50 mg/L、pH 6.8–9.5、盐度 2%–3%、温度 30 °C 条件下, 接种 15 d 后菲降解率在 93.3% 以上, 芘降解率在 20% 以上。

**关键词:** 盐碱化, 多环芳烃降解菌, 16S rDNA, 降解特性

## Isolation, identification and degradation characteristics of a PAHs-degrading bacteria from salt-alkaline soil

SONG Li-Chao<sup>1,2</sup> LI Pei-Jun<sup>2</sup> LIU Wan<sup>2</sup> XIAO Yi-Nong<sup>1</sup> ZHANG Yu-Long<sup>1\*</sup>

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

(2. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China)

**Abstract:** A predominant PAHs-degrading strain TJB5 was isolated from PAHs-contaminated salt-alkaline soil in Dagang Oilfield of Tianjin, which can use phenanthrene and pyrene as sole carbon source for growth in the selective culture medium. Strain TJB5 was identified as *Pantoea agglomerans* according to the results of morphology and the phyogenetical analyses of 16S rDNA sequence. The effect of initial concentration of phenanthrene and pyrene, inoculating pH and salinity on degradation efficiencies was investigated. The optimal degradations were determined. The results indicated that the degrading characteristics of the strain were fine. More than 93.3% of phenanthrene and 20% of pyrene in the medium were degraded in the liquid medium with 50 mg/L phenanthrene and pyrene, pH 6.8–9.5 and salinity ranging from 2% to 3% after 15 days at 30 °C.

**Keywords:** Salinization, PAHs-degrading strain, 16S rDNA, Biodegradation characteristics

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(京津塘区域环境污染调控技术与示范)子课题(No. kzcx1-yw-06-03)

\* 通讯作者: Tel: 86-24-88487155; E-mail: ylzsau@163.com

收稿日期: 2010-07-28; 接受日期: 2010-11-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

随着经济的快速发展,人们对土地资源的开发规模不断扩大,同时存在着不合理利用现象,导致大面积土壤的盐碱化,我国的盐碱化土壤面积约为  $9.9 \times 10^4 \text{ hm}^2$ <sup>[1]</sup>,并有越来越多的有机污染物通过各种途径进入盐碱土壤,使得土壤的有机质含量下降,污染日趋严重。其中,对盐碱土壤环境影响最大的污染物除了石油、重金属等外,还包括在环境中含量少、但危害性极大的难降解有机污染物如多环芳烃(PAHs)。PAHs 是一类广泛分布于环境中的含有 2 个或 2 个以上苯环的有毒有害污染物,其具有潜在毒性、致癌性及致畸诱变作用<sup>[2]</sup>,可通过生物累积及食物链的传递,给生态环境和人体健康造成极大危害,因此受到广泛关注<sup>[3-4]</sup>。

微生物降解被公认是去除环境中 PAHs 的重要途径之一<sup>[6-7]</sup>。近年来,国内外对 PAHs 的微生物降解研究表明,能够在盐碱与 PAHs 同时并存条件下降解 PAHs 的微生物资源还很少<sup>[8-9]</sup>。事实上,环境中越来越多的盐碱土壤受到 PAHs 的污染<sup>[10-11]</sup>,如我国的大庆油田、胜利油田、大港油田周围就存在大面积的 PAHs 污染盐碱土壤。因此,筛选能够在高盐碱条件下降解 PAHs 的微生物,具有重要的现实意义。

本文拟通过富集培养,从天津大港油田地区 PAHs 长期污染盐碱土壤中筛选 PAHs 的高效降解菌,分析其降解特性,为盐碱水土环境 PAHs 类污染物的微生物修复提供资源保障和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 供试土壤:** 天津大港油田 PAHs 污染的表层(0-10 cm)滩涂盐碱土壤,过 1 mm 筛,放入自封袋中,封口,4 °C 冰箱保存。基本理化性质: 有机质 0.73%,盐度 2.28%,pH 8.6,PAHs 总量 221.17  $\mu\text{g/g}$ 。

**1.1.2 培养基:** (1) 液体无机盐培养基(g/L)<sup>[12]</sup>:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1, NaCl 20 和微量元素  $[\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.012,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001], 调节 pH 8.6。

(2) 菲、芘的液体无机盐培养基: 菲、芘用丙酮配成 5 g/L 的母液,0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤灭菌备用,按适当的浓度加入灭菌的液体无机盐培养基中。

(3) LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, NaCl 20, 琼脂粉 20, pH 8.6。

**1.1.3 药品:** 菲(纯度大于 90%)和芘(纯度大于 97%),购自 Fluka 公司;二氯甲烷(分析纯),丙酮(分析纯),甲醇(色谱纯),无水硫酸钠(分析纯),均购自天津康科德公司。无水硫酸钠马福炉中烘干 3 h (400 °C),冷却后干燥器中备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 降解菌的筛选与纯化:** 称取供试土样 5 g,加入 45 mL 以菲、芘为碳源的液体无机盐培养基中,第一轮富集培养菲、芘总浓度为 50 mg/L。30 °C 恒温摇床 150 r/min 富集培养 7 d,移取富集培养液按 10% 的体积比例接入 45 mL 以菲、芘为碳源的液体无机盐培养基中,进行富集培养,共重复 4 次,每转接一次,菲、芘总浓度提高 50 mg/L。最后吸取 0.1 mL 培养液稀释不同梯度涂布于 LB 固体培养基,置于 30 °C 恒温箱中培养 48 h,挑取具有不同形态特征的单菌落,将分离纯化后的单菌落再接种到菲、芘液体无机盐培养基中,选取生长速度最快的菌株作为研究菌株。

**1.2.2 菌种的鉴定:** 结合形态学、生理生化和分子生物学 3 方面对该菌株进行鉴定。通过电子显微镜观察菌体形态。分子生物学鉴定采用 16S rDNA 全长基因序列分析和构建系统发生树: 平板划线得到降解菌单菌落,挑取单菌落进行 PCR 扩增。引物: 上游引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和下游引物 1492R (5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物的测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。根据常见细菌系统鉴定手册<sup>[13]</sup>对该菌株做进一步的生理生化鉴定。

**1.2.3 菌株生长曲线的测定:** 取生长 24 h 的菌液,以 10% (V/V) 的接种量接种到含 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形摇瓶中,每隔一段时间取一定

量菌液, 采用 UNICO™ 7200 可见分光光度计在 600 nm 波长下测定吸光度, 绘制吸光度与培养时间关系曲线即得生长曲线。

**1.2.4 菌株对菲、芘的降解特性:** (1) 菌悬液的制备: 在无菌条件下将菌株接种于 LB 液体培养基中, 30 °C 下 150 r/min 振荡培养 24 h, 离心收集菌体, 并用磷酸盐缓冲液反复洗涤 3 次, 再用磷酸盐缓冲液将菌悬液调至  $OD_{600}=0.8-1.0$  备用。

(2) pH 对菲、芘降解效率的影响: 将 10% 的菌悬液投入 30 mL 液体无机盐培养基中(盐浓度 2%, 菲、芘各 50 mg/L), 调节 pH 分别为 5.3、6.8、7.7、8.6、9.5、11.3。30 °C 下 150 r/min 振荡培养 15 d, 取样分析培养基中菲、芘的残留浓度, 每个处理设 3 个重复。

(3) 盐浓度对菲、芘降解效率的影响: 在 pH 8.6 时, 调节液体无机盐培养基中盐浓度分别为 0、1%、2%、3%、5%、10%。菲、芘投加及接菌量同上。

(4) 菲、芘初始浓度对降解菲、芘效率的影响: 向液体无机盐培养基中加入菲、芘丙酮溶液调节菲、芘浓度分别为 25、50 和 75 mg/L, 接菌量同上。

(5) 溶液中菲、芘的提取与分析: 向待测溶液中加入 10 mL 二氯甲烷, 180 r/min 恒温振荡 5 min, 倒入 100 mL 分液漏斗中, 静置 5 min, 将下层有机相经无水硫酸钠脱水, 重复萃取 3 次。混匀萃取液, 移取一定体积过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜至烧杯, 氮气吹干, 1 mL 甲醇定容。采用高效液相色谱法(Agilent-1200 高效液相色谱仪)测定。色谱仪主要设定参数为: 流动相: 100%甲醇; 流速: 0.8 mL/min; VWD 检测波长: 254 nm; 柱箱温度: 35 °C; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。菲、芘的回收率为  $101.7\%\pm 2.6\%$  和  $98\%\pm 2.0\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定

经筛选分离, 得到一株以菲、芘为碳源生长的细菌, 命名为 TJB5。在 LB 固体培养基上进行生理生化检测的结果如下:  $G^-$ , 周生鞭毛, 无芽孢, 葡萄糖、乳糖发酵产酸, 不产气。氧化酶试验、吲哚试验、赖氨酸试验、鸟氨酸脱羧酶试验、精氨酸双水

解试验阴性, 接触酶试验、MR 试验阳性。显微镜下, TJB5 呈短杆状, 大小(0.5–1.0)  $\mu\text{m}\times(1.0-3.0) \mu\text{m}$ , 见图 1。在 LB 固体平板上, 菌落圆形, 黄色, 边缘整齐, 低凸, 光滑, 直径约 1.5 mm, 见图 2。

16S rDNA 的序列测定得到 1 438 bp, 将获得的菌株 TJB5 的 16S rDNA 的序列在 GenBank 中 BLAST 进行同源性比对。结果表明, TJB5 菌株与 *Pantoea agglomerans* 多个菌株基因序列同源性达到了 99%。通过 MEGA 4.0 和 Clustal X1.83 软件构建系统发育树, 采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析结果见图 3。

根据菌株 TJB5 形态特征、生理生化实验和系统发育位置结果, 可确定菌株 TJB5 为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)。

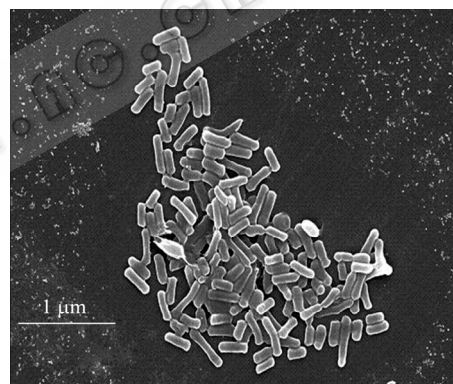


图 1 扫描电子显微镜下菌株 TJB5 形态( $\times 4\ 500$ )

Fig. 1 The morphous of strain TJB5 obtained by SEM ( $\times 4\ 500$ )

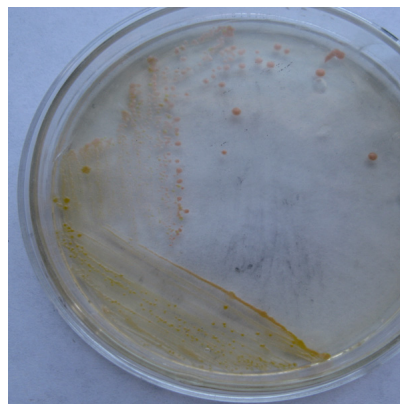


图 2 菌株 TJB5 的菌落特征

Fig. 2 The colony characteristic of strain TJB5

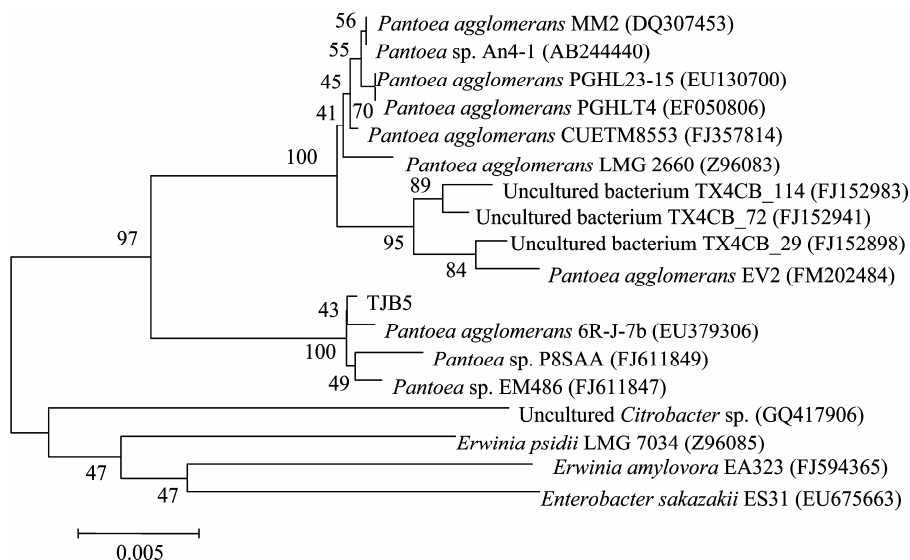


图3 菌株 TJB5 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain TJB5

注: 分支点的数字为聚类置信度(%); 括号中的序号 GenBank 数据库中的登录号。

Note: The data at branchpoint are cluster analysis confidence (%). The serial numbers in bracket are accession number in GenBank database.

## 2.2 降解菌株的生长曲线

绘制菌株 TJB5 的 52 h 内生长曲线, 见图 4。可以看出: 在 0–9 h, 该菌株处于迟缓期, 菌体生长繁殖缓慢; 在 10–28 h, 该菌株处于对数生长期, 菌体大量繁殖, 生长速度逐渐增加; 在 28–37 h, 该菌株处于稳定期; 在 37 h 后, 菌体的生长进入衰亡期。因此, 在整个实验过程中以生长 24 h 处于对数生长期的菌体作为接种研究对象。

## 2.3 pH 对菲、芘降解效率的影响

菌株 TJB5 对菲、芘降解具有较广泛的 pH 范围, 在菲、芘浓度各 50 mg/L, 盐浓度 2%,

pH 5.3–11.3 的液体条件下, 菌株 TJB5 对菲、芘都有一定的降解效率(图 5)。pH 6.8–9.5 时菲的降解率在 15 d 达到 93.3% 以上, 芘的降解效果与菲比较低, pH 6.8 时芘降解率最高为 56.5%。结果表明 pH 6.8 时, 菌株 TJB5 对菲、芘降解效果最佳。这与许多研究结果相似, 细菌对 PAHs 的降解的最适 pH 为中性<sup>[11,14]</sup>。然而却存在着不同, 菌株 TJB5 对菲、芘降解是在 2% 盐浓度胁迫条件下进行。当 pH 升至 9.5 时菌株 TJB5 对菲、芘降解率为 93.3% 和 20.1%, 证明该菌对于碱胁迫条件下菲、芘的降解具有较强的耐受性。

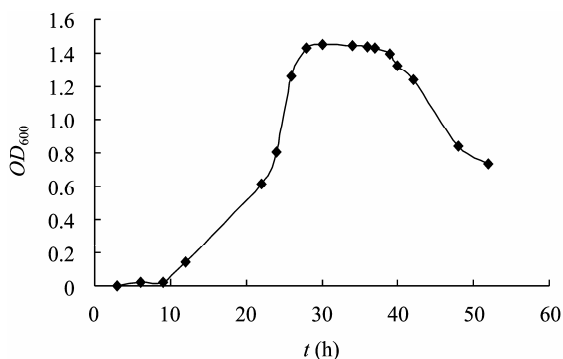


图4 菌株 TJB5 的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of strain TJB5

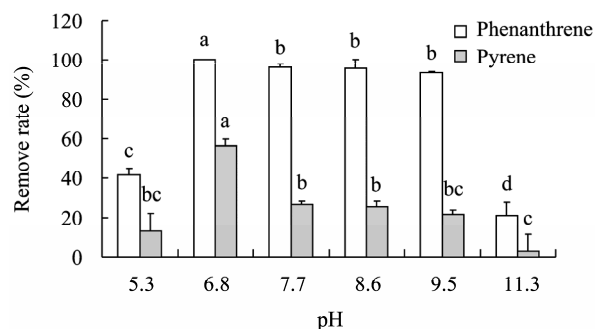


图5 培养液初始 pH 对 TJB5 菌株降解效率的影响

Fig. 5 Effect of initial pH of medium on degrading efficiency of TJB5

## 2.4 盐浓度对菲、芘降解效率的影响

菌株 TJB5 对菲、芘降解具有较广泛的盐度范围(图 6)。图 6 显示盐浓度 2%–3%时对菲、芘降解率较高分别为 95.6%和 25.6%、93.9%和 20.1% ( $P<0.05$ )。盐浓度 0–3%时对菲的降解无显著性差异, 分别为 94.3%、94.5%、95.7 和 93.9% ( $P<0.05$ )。Dariush 等<sup>[15]</sup>报道在中性 pH 条件下一耐盐菌群在 1%盐浓度条件下对 PAHs 降解率为 35%, 而菌株 TJB5 在盐浓度升至 5%时对菲、芘降解率为 81.5%和 21.7%, 10%时降解率为 45.2%和 6.3%。从而证明菌株 TJB5 是一株能高效降解菲、芘的中度嗜盐菌。

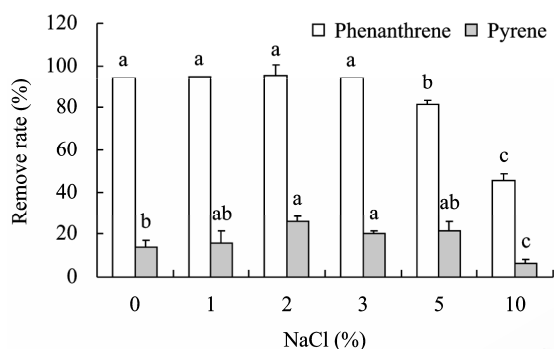


图 6 培养液初始盐浓度对 TJB5 菌株降解效率的影响  
Fig. 6 Effect of initial NaCl of medium on degrading efficiency of TJB5

## 2.5 菲、芘初始浓度对降解效率的影响

菌株 TJB5 按 10%接种到菲、芘浓度均为 25、50、75 mg/L 的液体无机盐培养基中, 15 d 菲、芘降解率为 100%和 72.9%、95.6 和 21.6%、62.3%和 9.0%(图 7)。结果表明, 菲浓度 50 mg/L 时 TJB5

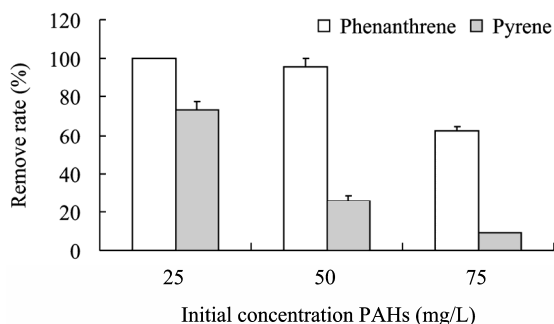


图 7 多环芳烃初始浓度对 TJB5 菌株降解菲芘的影响  
Fig. 7 Effect of initial PAHs concentrations on the degradation of phenanthrene and pyrene by TJB5

降解效果最好, 基本上都能去除; 对于芘来说, 25 mg/L 这个浓度较适合 TJB5 的生长, 可能是四环的芘毒性较大, 再加上高的盐碱条件, 而增强了其对 TJB5 菌株的毒性作用, 从而影响芘降解效果。这与盛下放等<sup>[16]</sup>的报道结果相一致。

## 3 讨论

近些年来关于微生物修复 PAHs 的研究报道很多<sup>[5-6,8-10]</sup>, 而盐碱土壤 PAHs 的微生物修复国内外还未见报道, 目前只有少数降解在单一高盐或高碱条件下 PAHs 的微生物修复的研究报道, Tam 等<sup>[12]</sup>报道 3.5%盐浓度胁迫下菌株 SKY 在对菲的降解率为 35.7%; Zhao 等<sup>[8]</sup>分离出一株降解菲的中度嗜盐 Halophilic bacterial, 在 15%盐浓度条件下对菲降解率 100%, Gerbeth 等<sup>[9]</sup>报道菌株 SK16 四周对芘的降解从 pH 9.8 的 10%提高到 pH 8.5 时的 100%。有研究表明, 当盐浓度>3%, pH>9 时, 非嗜盐碱微生物的代谢会受到抑制, 使其生物修复效率明显降低, 甚至丧失修复能力<sup>[17]</sup>, 即便是盐碱条件下驯化的菌株暴露于无盐碱的环境下, 其耐盐碱特征也会很快消失。而本研究所筛选菌株 TJB5 在盐浓度 2%, pH 9.5 盐碱胁迫条件下对菲、芘降解率达到 93.3%和 21.7%, 证明其对盐碱具有很强的耐受特性。

本研究从 PAHs 长期污染的盐碱土壤中所筛选出的这株中度嗜盐碱成团泛菌 TJB5, 不仅能抵抗外界高浓度的盐碱环境, 而且能适应大范围的盐碱波动, 并具有较强的 PAHs 降解能力, 菌株 TJB5 的发现可为研发 PAHs 污染的盐碱土壤的生物修复技术提供宝贵的生物资源。目前有关成团泛菌降解 PAHs 的研究国内外还未见报道, 其降解 PAHs 途径正在进一步研究中。

## 参考文献

- [1] 王遵亲. 中国盐渍土[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 132.
- [2] Chiari M, Ettori C, colonna S, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids, as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376–377.

- [3] Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. Environ Pollut, 1993, 81(3): 229–249.
- [4] 马沛, 钟建江. 微生物降解多环芳烃(PAHs)的研究进展[J]. 生物加工过程, 2003, 1(1): 42–46.
- [5] Silva IS, Grossman M, Durrant LR. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(2): 224–229.
- [6] Tian Y, Luo YR, Zheng TL, et al. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 56(6): 1184–1191.
- [7] 韩慧龙, 汤晶, 江皓, 等. 真菌-细菌修复石油污染土壤的协同作用机制研究[J]. 环境科学, 2008, 29(1): 190–195.
- [8] Zhao BS, Wang H, Mao XW, et al. Biodegradation of phenanthrene by a halophilic bacterial consortium under aerobic conditions[J]. Current Microbiology, 2009, 58(3): 205–210.
- [9] Gerbeth A, Krause S, Gemende B, et al. Search of microorganisms that degrade PAHs under alkaline conditions[J]. Engineering in Life Sciences, 2004, 4(4): 311–318.
- [10] Fernández-Luqueño F, Marsch R, Espinosa-Victoria D, et al. Remediation of PAHs in a saline-alkaline soil amended with wastewater sludge and the effect on dynamics of C and N[J]. Science of the Total Environment, 2008, 402(1): 18–28.
- [11] 王震宇, 赵建, 李锋民, 等. 盐渍化土壤中土著菌的石油降解潜力研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7): 1416–1421.
- [12] Tam NFY, Guo CL, Yau WY, et al. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 45: 316–324.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 66–69.
- [14] 姚治华, 王红旗, 刘敬奇, 等. 石油污染土壤中苯降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1498–1503.
- [15] Dariush MT, Saeed M, Ali H. Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 82: 170–184.
- [16] 盛下放, 何琳燕, 胡凌飞. 苯并[a]芘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.
- [17] 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.

## 稿件书写规范

### 论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如:  $t$  (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。