

研究报告

## 多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性

黄兴如<sup>1,2</sup> 张彩文<sup>1</sup> 张瑞杰<sup>1,2</sup> 章俊<sup>1</sup> 张晓霞<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

(2. 首都师范大学资源环境与旅游学院 北京 100048)

**摘要:**【目的】多环芳烃(PAHs)是一类普遍存在于环境中且具有高毒性的持久性有机污染物,高效降解菌的筛选对利用生物修复技术有效去除环境中的多环芳烃具有重要意义。研究拟从供试菌株中筛选多环芳烃高效降解菌,并分析其降解特性,为多环芳烃污染环境的微生物修复提供资源保障和科学依据。【方法】采用平板法从 25 株供试菌株中筛选出以菲和芘为唯一碳源和能源的高效降解菌,经 16S rRNA 基因序列进行初步鉴定,通过单因素实验法分析其在液体培养基中的降解特性。【结果】筛选出的 3 株多环芳烃高效降解菌 SL-1、02173 和 02830 经 16S rRNA 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 为本课题组发表新类群 *Rhizobium petrolearium* 的模式菌株;降解实验表明,菌株 SL-1 3 d 内对单一多环芳烃菲(100 mg/L)和芘(50 mg/L)的降解率分别达到 100% 和 48%,5 d 后能够降解 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 内对混合多环芳烃中萘(200 mg/L)、芴(50 mg/L)、菲(100 mg/L)和芘(50 mg/L)的降解率均分别超过 97%。【结论】筛选出的 3 株 PAHs 降解菌 SL-1、02173 和 02830 不仅可以高效降解低分子量 PAHs,还对高分子量 PAHs 具有很好的降解潜力。研究表明,由于共代谢作用低分子量多环芳烃可促进高分子量多环芳烃的降解,而此时低分子量多环芳烃的降解将受到抑制。

**关键词:** 多环芳烃, 生物降解, 高效降解菌

**Foundation item:** National High Technology Research and Development Program of China (No. 2012AA101403); Key “948” Project of Ministry of Agriculture of China (No. 2011-G25)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-82108651; E-mail: xxzhang@caas.ac.cn

**Received:** November 19, 2015; **Accepted:** January 27, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 03, 2016

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA101403); 农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目(No. 2011-G25)

**\*通讯作者:** Tel: 86-10-82108651; E-mail: xxzhang@caas.ac.cn

收稿日期: 2015-11-19; 接受日期: 2016-01-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-03

## Isolation, identification and degrading properties of PAHs-degrading bacteria

HUANG Xing-Ru<sup>1,2</sup> ZHANG Cai-Wen<sup>1</sup> ZHANG Rui-Jie<sup>1,2</sup> ZHANG Jun<sup>1</sup>  
ZHANG Xiao-Xia<sup>1\*</sup>

(1. Agricultural Culture Collection of China, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

(2. College of Resources Environment and Tourism, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** [Objective] Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are known as high-toxic and persistence organic contaminants in the environment. Screening highly efficient degrading bacteria is important for bioremediation of PAHs-contaminated environment. This study aimed to isolate and identify high efficient PAHs-degrading bacteria from the candidate strains, then to characterize degrading properties of these target strains. [Methods] PAHs-degrading bacteria were screened by the plate-culture method, and then these target strains were identified by the 16S rRNA gene phylogenetic analysis. Degrading properties of PAHs-degrading bacteria were determined by single factor experiments. [Results] Three PAHs-degrading bacterial strains SL-1, 02173 and 02830, which utilized phenanthrene and pyrene as the sole carbon and energy source for growth, were obtained from the candidate strains. The strain SL-1 was the type strain of *Rhizobium petrolearium*. 02173 and 02830 were highly homologous to *Pseudomonas alcaliphila* and *Pseudomonas corrugate*, respectively. The strain SL-1 could degrade 100% of single phenanthrene (100 mg/L) and 48% of single pyrene (50 mg/L) in 3 days, and the degradation rate of pyrene was up to 74% in 5 days; it also could degrade 75.89% and 81.98% of mixed phenanthrene and pyrene within 3 days. The strain 02173 and 02830 could degrade a mixture of PAHs completely in 3 days, including naphthalene (200 mg/L), fluoranthene (50 mg/L), phenanthrene (100 mg/L) and pyrene (50 mg/L). [Conclusion] Three PAHs-degrading bacterial strains SL-1, 02173 and 02830 have high-efficient degradation ability not only for low-molecular-weight PAHs but also high-molecular-weight PAHs. These strains were the ideal candidates for bioremediation of PAHs-contaminated environment. Low-molecular-weight PAHs can promote high-molecular-weight PAHs degradation due to con-metabolism effect, while the biodegradation of low-molecular-weight PAHs will be suppressed.

**Keywords:** PAHs, Biodegradation, High-efficient PAHs-degrading bacteria

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是指由两个或两个以上的苯环稠合在一起的一类持久性有机污染物,主要源于石油、煤等化石燃料以及木材、天然气、秸秆等有机物的不完全燃烧或者在还原条件下经热分解而生成,其环境中普遍存在<sup>[1]</sup>。PAHs 具有高毒性、热稳定性、生物富集性、疏水性、不易降解等特点<sup>[2-3]</sup>,极易在环境中累积,并可通过食物链传递而在生物体内富集,对人类健康和生态环境具有很大的危害性<sup>[4]</sup>;因此美国环保局于 1976 年将 16 种多环芳烃列为优先控制污染物名单<sup>[5]</sup>。PAHs 依据苯环数量可分为低环和高环(苯环≥4) PAHs 两类,且研

究发现,随着环数的增加,其毒性越高,生物可利用性越差,越不易被降解<sup>[6]</sup>。

释放到自然环境中的 PAHs 能够通过多种途径移除,包括挥发、光氧化、化学氧化、生物富集、微生物降解和土壤吸附等,大量的研究证明微生物降解是去除环境中 PAHs 的最主要途径<sup>[7]</sup>。PAHs 的微生物修复因其经济、高效且无二次污染等特点,已成为去除环境中 PAHs 的理想方法和重要手段<sup>[8]</sup>。目前,研究人员已从环境中分离出多种 PAHs 降解菌,主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)<sup>[9]</sup>、红球菌属(*Rhodococcus*)<sup>[10]</sup>、气单胞菌属(*Aeromonas*)<sup>[11]</sup>、芽孢杆菌属

(*Bacillus*)<sup>[12]</sup>、伯克氏菌属(*Burkholderia*)<sup>[13]</sup>、分支杆菌属(*Mycobacterium*)<sup>[14]</sup>和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)<sup>[15]</sup>等,但其中所涵盖的高效降解菌株并不多<sup>[16]</sup>,特别是高环 PAHs 降解菌更为稀少。因此筛选 PAHs 高效降解菌或混合菌系,具有重要的现实意义。本研究从中国海洋微生物菌种保藏中心和中国农业微生物菌种保藏中心获得的 25 株细菌中筛选高分子量 PAHs 的高效降解菌,分析其在液体培养基中的降解特性,为 PAHs 污染环境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 实验材料

**1.1.1 供试菌株:**从中国海洋微生物菌种保藏中心和中国农业微生物菌种保藏中心获取 25 株具有耐受或降解 PAHs 功能的细菌,相应的编号分别为:01990、02172、02173、02588、02830、02755、10542、10543、11238、11239、11240、11241、11242、11243、11244、11245、11246、14971、K13(H25)、S23(1)、MCT5、F44-8、RC99-3、SL-1、F11,用于筛选多环芳烃高效降解菌。

**1.1.2 多环芳烃:**萘、菲、芴、蒽、苯并[a]蒽(浓度>97%)均购于中国国家标准物质研究中心。

**1.1.3 培养基:**无机盐基础培养基(g/L)<sup>[17]</sup>:NH<sub>4</sub>Cl 1.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, NaCl 0.5, KCl 0.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, FeSO<sub>4</sub> 0.001, CaCl<sub>2</sub> 0.01, 微量元素混合液 1 mL, pH 7.0, 固体培养基则再加 20 g 琼脂。TSB 合成培养基(g/L):胰蛋白胨 17, 大豆胨 3, 葡萄糖 2.5, 氯化钠 5, 磷酸氢二钾 2.5, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.3±0.2。微量元素参照参考文献[18]配制。

### 1.2 多环芳烃降解菌的筛选

将获得的 25 株菌依次点接到无机盐培养基平板上,以菲为底物,采用平板升华法<sup>[19]</sup>将 PAHs 镀于平板上,而后置于 30 °C 恒温培养箱中培养,4~5 d 后观察降解结果。对出现明显降解圈的菌株再次进行平板复筛,通过牛津杯使加入的菌苔的

直径定量为 6 mm,以蒽为底物,培养 5 d 后定量测定降解圈直径,筛选高分子量 PAHs 的高效降解菌株。

### 1.3 菌种鉴定

采用热裂解法提取菌体总 DNA<sup>[20]</sup>,并利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。25 μL 扩增体系为:DNA 模板 2 μL, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 27F (10 μmol/L)和 1492R (10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。PCR 扩增程序为:95 °C 5 min; 95 °C 50 s, 55 °C 50 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。获得的 PCR 产物采用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测后,送往北京美吉生物科技有限公司完成测序工作。降解菌 16S rRNA 基因序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中核酸数据进行比对分析。然后利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树,采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析。

### 1.4 降解菌株生长曲线的测定

将筛选出的降解菌株接种于 TSB 液体培养基中,摇床振荡(30 °C、180 r/min)培养活化 20 h,取出 2 mL 菌液转入盛有 100 mL TSB 的 300 mL 三角瓶中,充分摇匀后依次吸取 10 mL 菌液于无菌试管中,将试管 30 °C、180 r/min 振荡培养。每隔 4 h 取出试管,以未接种 TSB 液体培养基作空白对照,利用 UV-1800 紫外分光光度仪测定不同培养时间的细菌菌液的 OD<sub>600</sub> 值。

### 1.5 降解菌生理学特征

**1.5.1 NaCl 生长浓度范围及最适值:**在含有不同 NaCl 浓度(0、1%、2%、3%、4%、5%和 6%)的 TSB 液体培养基中接种相同浓度的菌液(1%接种量,体积比,并设立不接菌液为对照组,每个浓度设 3 个平行),30 °C 振荡培养 24 h,用 UV-1800 紫外分光光度仪测量 600 nm 处的吸光值。

**1.5.2 生长 pH 范围及最适值:**在已确定的最适 NaCl 生长浓度培养液中用 HCl 或 KOH 调 pH 值至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0,接菌后置

于 30 °C 振荡培养 24 h, 用 UV-1800 紫外分光光度计测量 600 nm 处的吸光值。

**1.5.3 生长温度范围及最适值:** 在已确定的最适 NaCl 生长浓度和生长 pH 的培养液中接入菌液, 分别在 15、20、25、30、35、40 °C 条件下振荡培养, 24 h 后利用 UV-1800 紫外分光光度计测定细菌菌液的  $OD_{600}$  值。

## 1.6 菌株的降解特性

**1.6.1 菌悬液的制备:** 在无菌条件下将菌株接种于添加菲(100 mg/L)的 TSB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d, 离心(10 000 r/min, 6 min)收集菌体, 并用无菌水反复洗涤 3 次, 再用无机盐培养基将菌悬液调至所需浓度备用。

**1.6.2 菌株对混合 PAHs 的降解:** 向盛有 50 mL 无机盐培养基的 150 mL 三角瓶中加入适量的 PAHs 母液, 使每个三角瓶内的萘、菲、芴、芘的浓度为 200、50、100、50 mg/L, 每株菌设 3 个平行, 每个平行设 3 个重复, 并设一不加菌空白对照组, 30 °C、170 r/min 条件下避光振荡培养, 分别于 24、48 和 72 h 后取样, 对样品中的全部 PAHs 进行萃取。

**1.6.3 菌株对单一 PAH 的降解:** 向无机盐培养基中分别加入适量的菲和芘, 使其终浓度达到 100 mg/L 和 50 mg/L, 其中菲设 3 个平行, 每个平行设 3 个重复, 并设一不加菌空白对照; 芘设 3 个平行, 每个平行设 5 个重复, 并设一不加菌空白对照, 30 °C、170 r/min 条件下避光振荡培养, 分别于 24、48 和 72 h 后取样, 对样品中的全部 PAHs 菲和芘进行萃取。

**1.6.4 溶液中多环芳烃的提取与分析:** 培养基中的 PAHs 利用 50 mL 乙酸乙酯进行两次中性和两次酸性萃取(pH 2.0), 合并萃取液后用无水  $Na_2SO_4$  去除水分。而后将萃取液用高纯氮吹干, 残留物用色谱级甲醇重新溶解, 用高效液相色谱(HPLC)测定。HPLC 使用色谱柱为  $C_{18}$  反相柱(Agilent, USA, 250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为甲醇:水=80:20, 流速为 1 mL/min 进行线性洗脱, 进样量 20  $\mu$ L, 检测波长为 254 nm, 柱温为 40 °C。

**1.6.5 共代谢底物对菌株降解多环芳烃的影响:** 取 2 mL 菌悬液接入 100 mL 无机盐培养基中(芘浓度为 100 mg/L), 向三角瓶中添加邻苯二酚母液, 使液体中邻苯二酚的终浓度分别为 10、20、50 和 100 mg/L, 30 °C、170 r/min 振荡培养 7 d, 采用 1.6.4 节的方法萃取和测定培养基中残留的芘, 以未加邻苯二酚的培养基为对照。每个浓度均设置 3 个平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 多环芳烃降解菌的筛选

以菲为底物进行平板初筛, 从供试菌株中筛选出 10 株能以 PAH 菲为唯一碳源和能源生长的降解菌株。而后以芘为底物进行平板复筛, 最终获得 3 株降解圈直径大于 13 mm 的菌株, 分别为 02830、02173 和 SL-1 (图 1)。

### 2.2 多环芳烃高效降解菌的鉴定

对以菲和芘作为唯一碳源的 PAHs 高效降解菌株进行基因组 DNA 的提取, 并完成 16S rRNA 基因测序, 将得到的序列与 GenBank 中已知序列进行比对, 并对两种未知的降解菌 02173 和 02830 分别构建系统发育树, 结果如图 2 所示。根据 16S rRNA 序列同源性比对表明, 菌株 02173 与假单胞菌属(*Pseudomonas*)中的 *Pseudomonas alcaliphila* 同源性最近, 序列相似性高达 99%; 02830 则与假单胞菌属(*Pseudomonas*)中的 *Pseudomonas corrugata* 同源性最近, 其序列相似性达 96.75%; 而菌株 SL-1 为

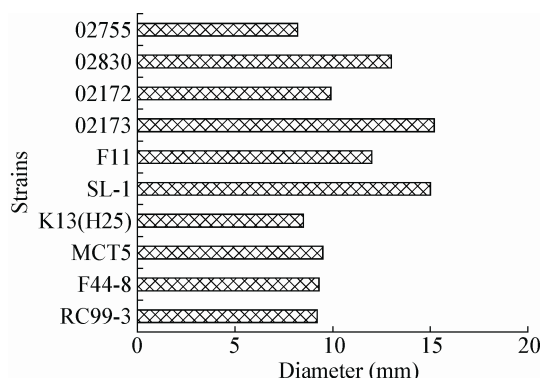


图 1 降解菌株在固体平板上的降解圈直径  
Figure 1 Diameter of the transparent circle created by the degradative strains in the solid plate

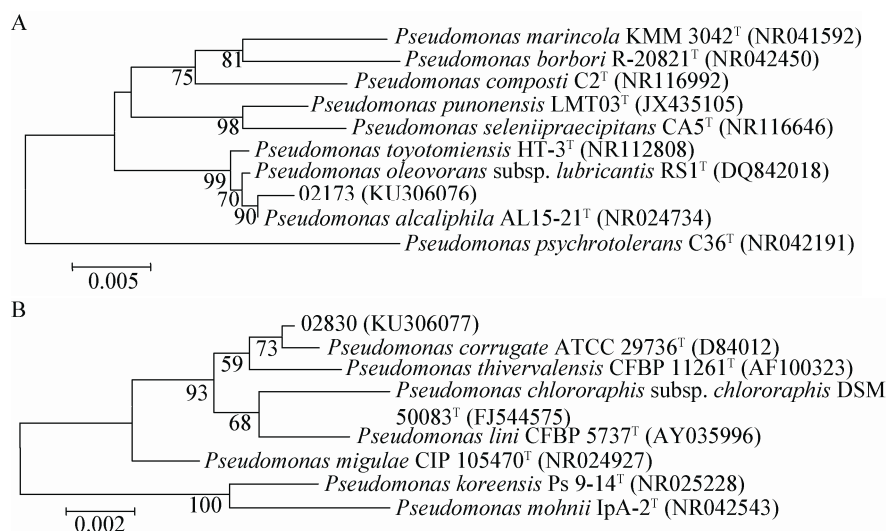


图 2 基于菌株 02173 和 02830 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences of strains 02173 and 02830

Note: The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1 000 resampled data sets; only values above 50% are given. GenBank accession numbers are given in brackets. The scale bar represents 0.005 (A)/0.002 (B) substitutions per nucleotide position.

本课题组发表新类群 *Rhizobium petrolearium* 的模式菌株。菌株 02173 和 02830 所测序列提交到 GenBank 数据库, 获得序列登录号分别为 KU306076 和 KU306077。

### 2.3 降解菌株生长曲线

由图 3 可知, 3 株菌均适宜在 TSB 培养基中生长, 延滞期都较短, 菌株 02173 和 02830 于 4 h 后进入对数期, 随着培养基中营养物质的消耗, 24 h 后开始逐渐进入稳定期; SL-1 的延滞期稍长, 8 h 后开始进入对数期。3 株菌的生长趋势大致保持一致, 其中 02173 与 02830 的长势最好, 略高于 SL-1 的生物量。

### 2.4 降解菌生理学特征

如图 4A 所示, 降解菌 02173 和 02830 在各个盐浓度下长势良好, 盐度在 0–5% 之间时  $OD_{600}$  值均高于 1, 其中菌株 02173 最适宜盐度为 3%–4%, 菌株 02830 最适宜盐度为 1%–2%。菌株 SL-1 对盐度的变化较为敏感, 当盐浓度大于 4% 时, 其生长受到抑制, 最适宜生长盐浓度为 1%。3 株菌最适宜的 pH 值均为 7.0, 且发现菌株 SL-1 在 pH 11.0 时生长受到抑制(图 4B)。由图 4C 可知, 所有菌株

最适宜生长温度为 30 °C, 其中菌株 02173 适宜生长温度范围较广, 在 20–40 °C 下生长良好; 菌株 02830 适宜生长温度为 20–35 °C, 不耐受高温; 而菌株 SL-1 生长温度范围较为受限(25–35 °C), 低温和高温均不适宜其生长。总之, 菌株 02173 和 02830 对逆境的耐受能力较 SL-1 略强。

### 2.5 降解菌对多环芳烃降解特性

2.5.1 菌株对混合多环芳烃的降解: 污染环境中的多环芳烃均以混合形式存在, 通过测定菌株对混合 PAHs 中高低环 PAHs 的降解率, 相对于单一 PAHs 更加实际。如图 5A 所示, 3 株菌对混合

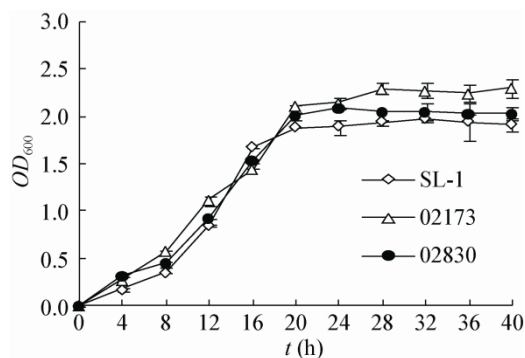


图 3 降解菌株生长曲线

Figure 3 Growth curve of degradative strains

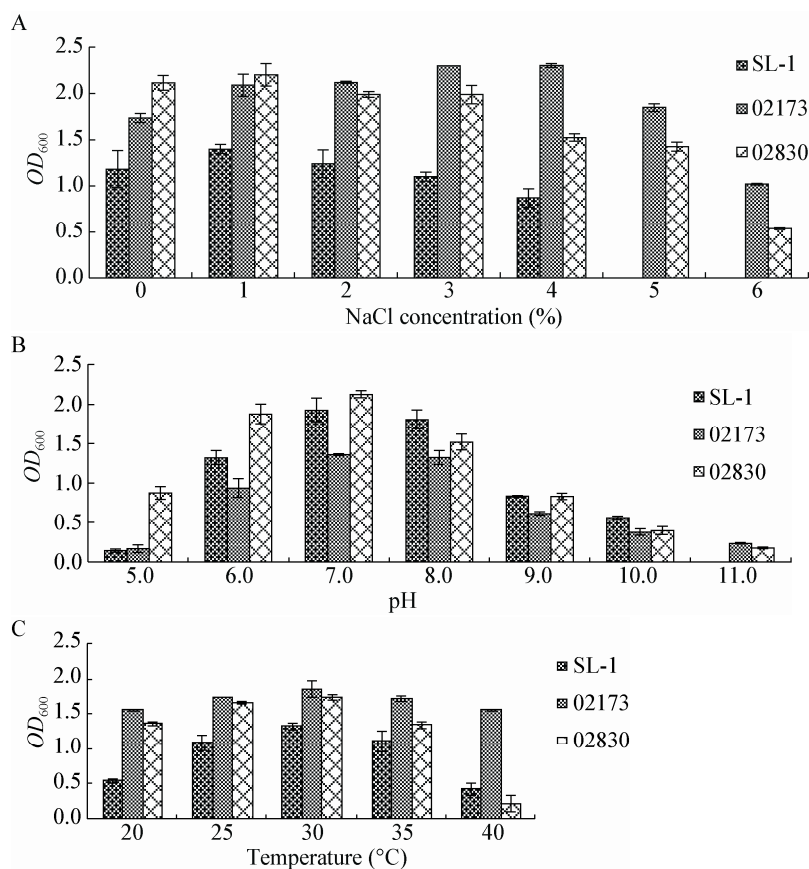


图4 不同盐浓度(A)、pH(B)、温度(C)条件下菌株的生物量

Figure 4 Biomass of each strain in the condition of different salinity (A), pH (B) and temperature (C)

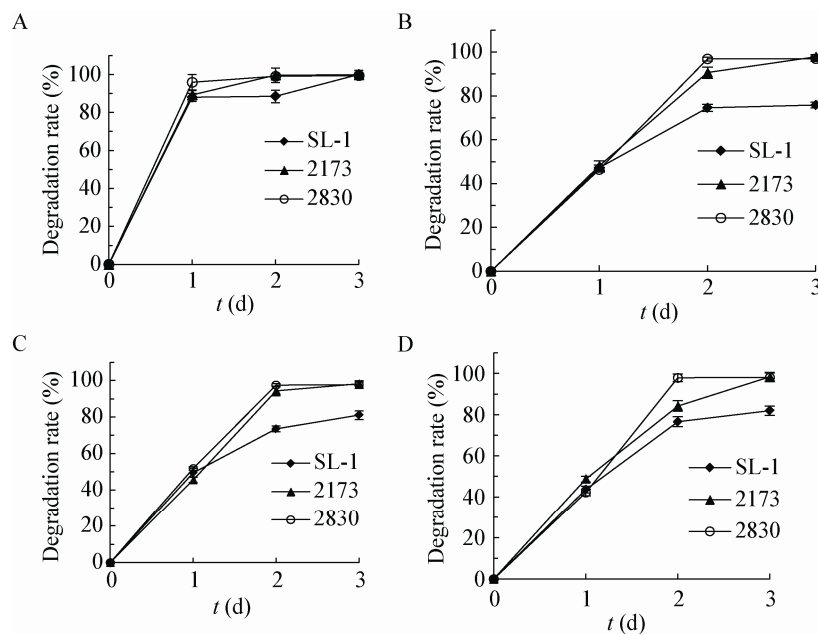


图5 供试菌株对混合PAHs 萘(A)、菲(B)、芴(C)和芘(D)的降解特性

Figure 5 Degradation of Nap (A), Phe (B), Flu (C) and Pyr (D) in the mixed PAHs by functional strains



PAHs 中萘(200 mg/L)的降解主要发生在 1 d 内, 降解率均达到了 87% 以上, 而菲(100 mg/L)、芴(50 mg/L)和芘(50 mg/L)的降解主要发生在 2 d 内(图 5B, C, D), 降解速率明显弱于萘。研究发现, 3 d 后 3 株菌对萘的降解率均达到或接近 100%; 与此同时, 菌株 02173 和 02830 对菲、芴和芘的降解率均达到 97% 以上, 而菌株 SL-1 对 PAHs (菲、芴和芘)的降解要明显弱于菌株 02173 和 02830, 3 d 后对菲、芴和芘的降解率分别达到 75.89%、81.04% 和 81.98%。

**2.5.2 菌株对单一多环芳烃的降解:** 为分析多环芳烃降解特征, 以菌株 SL-1 为代表, 分析其对单一 PAH 菲和芘的降解率。如图 6 所示, 3 d 后菌株 SL-1 对菲(100 mg/L)和芘(50 mg/L)的降解率分别达到 100% 和 48%, 而培养 5 d 后能够降解 74% 的芘, 且发现接种后 1 d 内菲和芘的降解率最高。

## 2.6 共代谢底物对菌株降解多环芳烃的影响

选取 PAHs 降解途径中最普遍的中间产物邻苯二酚作为共代谢底物, 分析其对高分子量 PAHs 降解的影响。如图 7 所示, 添加外加碳源邻苯二酚对菌株 SL-1 降解芘产生了一定的影响。实验结果表明, 第 7 天的时候, 添加了邻苯二酚浓度为 10、20、50、100 mg/L 的培养基中芘的降解率分别为 69.79%、78.86%、86.93%、61.44%, 而未添加外源碳源的空白对照的降解率为 60.83%。由此可见, 共代谢底物邻苯二酚的添加, 能促进高分子

量 PAHs 芘的降解, 当邻苯二酚达到一定浓度时, 芘的降解反而被抑制。

## 3 讨论

利用微生物处理法解决自然环境中的 PAHs 污染问题已越来越受大家青睐<sup>[21]</sup>, 其优点在于费用低、二次污染少、修复彻底等, 是一类低耗高效和环境安全的生物修复技术<sup>[22]</sup>, 而筛选分离 PAHs 高效降解菌是该项技术的关键环节<sup>[23]</sup>。本研究从 25 株供试菌株中分离到 3 株可高效降解低环和高环 PAHs 的细菌 SL-1、02173 和 02830, 通过 16S rRNA 基因序列比对确定 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 属于模式菌株 *Rhizobium petrolearium* SL-1。已有研究表明, 根瘤菌具有较好的有机污染物降解能力, 如多氯联苯<sup>[24]</sup>、三硝基甲苯<sup>[25]</sup>、二苯并噻吩<sup>[26]</sup>、2,4-二硝基甲苯<sup>[27]</sup>等, 而利用其降解 PAHs 的研究较少。本研究所筛选的根瘤菌 SL-1 能够以菲和芘为唯一碳源和能源, 3 d 内对菲(100 mg/L)和芘(50 mg/L)的降解率分别达到 100% 和 48%, 虽然菌株 SL-1 在 50 mg/L 的芘液体培养基中生长比较缓慢, 但是培养 5 d 后能够降解 74% 的芘。陈芳艳等<sup>[28]</sup>从某焦化厂生物处理装置的活性污泥中分离筛选出一株游离茄镰孢菌, 经过 108 h 对菲的降解效率达到 49.25%; 毛健等<sup>[29]</sup>筛选出一株可降解芘的副球菌, 该菌株在芘浓度为 50 mg/L 的培养基中 7 d 内

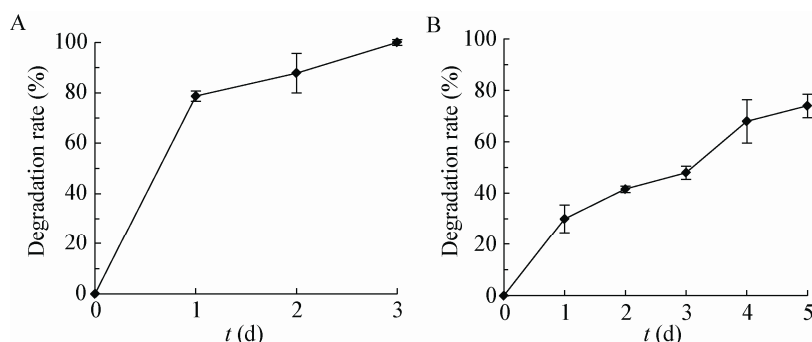


图 6 菌株 SL-1 对单一 PAHs 菲(A)和芘(B)的降解特性  
Figure 6 Degradation of Phe (A) and Pyr (B) by strain SL-1

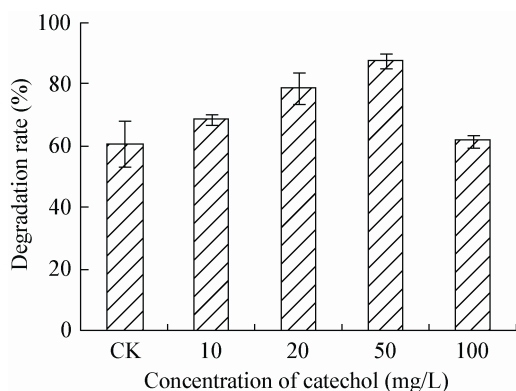


图7 不同邻苯二酚浓度对SL-1降解芘的影响

Figure 7 Different concentration of catechol affecting the Pyr degradation by strain SL-1

可降解47.2%的芘；相较而言，菌株SL-1具有较高的降解能力，且对高分子量PAHs具有很好的降解潜力。与此同时，菌株02173和02830对PAHs也同样表现出高效的降解能力，3 d内对混合多环芳烃中萘(200 mg/L)、芴(50 mg/L)、菲(100 mg/L)和芘(50 mg/L)的降解均分别超过97%，虽然多有研究表明，假单胞菌对PAHs具有较好的降解能力，但主要针对四环以下的PAHs<sup>[30-32]</sup>。由此可见，该研究筛选出的3株菌不但对低分子量PAHs具有较好的降解能力，还可以高效降解高分子量PAHs，为多环芳烃污染土壤的生物修复技术提供宝贵的微生物资源。

污染环境中的多环芳烃均以混合形式存在，通过测定菌株对混合PAHs中高低环PAHs的降解率，相对于单一PAHs更具有现实意义。本研究中3株降解菌对混合多环芳烃均表现出高效的降解能力，尤其是菌株02173和02830；且研究发现，混合多环芳烃中萘的降解主要发生在1 d内，降解率均达到了87%以上，而芴、菲和芘的降解主要发生在2 d内，且降解速率明显弱于萘；说明多种PAHs存在的情况下，降解菌优先选择低环PAHs作为碳源和能源。菌株SL-1 3 d内对混合PAHs中菲和芘的降解分别为75.89%和81.98%，与单一PAHs菲和芘的降解相较而言，小分子量PAHs菲的降解率有所

下降，而大分子量PAHs芘的降解率明显上升，这说明小分子量PAHs可促进大分子量PAHs的降解，而与此同时，小分子量PAHs的降解会受到抑制。这与目前已报道的多环芳烃降解方式相符，低环PAHs可以作为菌株生长的唯一碳源和能源而被直接降解，但高环PAHs需与其它有机质共代谢(或共氧化)而被降解<sup>[33-34]</sup>。该研究也同时发现，适当的共代谢底物邻苯二酚能促进高分子量PAHs芘的降解，当随着共代谢底物浓度的不断提高，芘的降解反而被抑制。由此可见，共代谢作用因改变了微生物碳源与能源的底物结构，增大微生物对碳源和能源的选择范围，从而使得难降解PAHs最终被微生物利用降解；而随着共代谢底物的不断提高，引起了竞争抑制，从而使得PAHs降解率下降。

## 参考文献

- [1] Wilcke W. Synopsis polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil—a review[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2000, 163(3): 229-248
- [2] Arulazhagan P, Vasudevan N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(2): 388-394
- [3] Feng TC, Cui CZ, Dong F, et al. Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4): 779-789
- [4] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1/3): 1-15
- [5] Keith L, Telliard W. ES & T special report: priority pollutants: I—a perspective view[J]. *Environmental Science & Technology*, 1979, 13(4): 416-423
- [6] Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6(1): 278-309
- [7] Patel V, Patel J, Madamwar D. Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 74(1): 199-207
- [8] Rockne KJ, Strand SE. Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture[J]. *Water Research*, 2001, 35(1): 291-299
- [9] Lin M, Hu XK, Chen WW, et al. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 176-181
- [10] Finkelstein ZI, Baskunov BP, Golovlev EL, et al. Fluorene transformation by bacteria of the genus *Rhodococcus*[J]. *Microbiology*, 2003, 72(6): 660-665
- [11] Sááguá MC, Baeta-Hall L, Anselmo AM. Microbiological characterization of a coke oven contaminated site and evaluation of its potential for bioremediation[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(9): 841-845
- [12] Feitkenhauer H, Müller R, Märkl H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 6 070 °C by



- Thermus* and *Bacillus* spp.[J]. Biodegradation, 2003, 14(6): 367-372
- [13] Weissenfels WD, Beyer M, Klein J. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 32(4): 479-484
- [14] Li QX, Fan BQ, Gong MB, et al. Isolation, identification of a pyrene-degrading strain *Mycobacterium* sp. M11 and its degrading characteristics[J]. Environmental Science, 2008, 29(3): 763-768 (in Chinese)  
李全霞, 范丙全, 龚明波, 等. 降解芘的分枝杆菌 M11 的分离鉴定和降解特性[J]. 环境科学, 2008, 29(3): 763-768
- [15] Roy M, Khara P, Dutta TK. meta-Cleavage of hydroxynaphthoic acids in the degradation of phenanthrene by *Sphingobium* sp. strain PNB[J]. Microbiology, 2012, 158(3): 685-695
- [16] Jia YH, Qu YY, Zhou JT, et al. Characteristics and enzyme purification of *Burkholderia* sp. AFF for phenanthrene biodegradation[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(5): 21-25 (in Chinese)  
贾玉红, 曲媛媛, 周集体, 等. 菲降解菌的特性及其降解酶纯化研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(5): 21-25
- [17] Yan QX, Wang YX, Li SP, et al. *Sphingobium qiguonii* sp. nov., a carbaryl-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(12): 2724-2728
- [18] Zhang XF, Hiorshi O. Study on isolation, identification and characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria[J]. Shanghai Environmental Science, 2003, 22(8): 544-547 (in Chinese)  
张小凡, 小柳津广志. 多环芳烃化合物菲分解菌的分离鉴定及分解特性研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(8): 544-547
- [19] Alley JF, Brown LR. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 439-442
- [20] Zhang XX, Sun L, Qiu FB, et al. *Rheinheimera tangshanensis* sp. nov., a rice root-associated bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(10): 2420-2424
- [21] Gibson DT, Mahadevan V, Jerina DM, et al. Oxidation of the carcinogens benzo[a] pyrene and benzo[a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium[J]. Science, 1975, 189(4199): 295-297
- [22] Yang H, Wang HX, Li XJ, et al. Research progress on the bioremediation technology of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 1427-1429, 1431 (in Chinese)  
杨辉, 王海霞, 李晓军, 等. 多环芳烃污染土壤生物修复技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3): 1427-1429, 1431
- [23] Tao XQ, Lu GN, Yi XY, et al. Isolation of phenanthrene-degrading microorganisms and analysis of metabolites of phenanthrene[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(1): 190-195 (in Chinese)  
陶雪琴, 卢桂宁, 易筱筠, 等. 菲高效降解菌的筛选及其降解中间产物分析[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(1): 190-195
- [24] Damaj M, Ahmad D. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by rhizobia: a novel finding[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 218(3): 908-915
- [25] Labidi M, Ahmad D, Halasz A, et al. Biotransformation and partial mineralization of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by rhizobia[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(6): 559-566
- [26] Frassinetti S, Setti L, Corti A, et al. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(3): 289-297
- [27] Dutta SK, Hollowell GP, Hashem FM, et al. Enhanced bioremediation of soil containing 2,4-dinitrotoluene by a genetically modified *Sinorhizobium meliloti*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(5): 667-675
- [28] Chen FY, Liang LL, Tang YB, et al. Isolation and identification of a fungous strain for degrading phenanthrene and its immobilized conditions[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 30(12): 19-21, 25 (in Chinese)  
陈芳艳, 梁林林, 唐玉斌, 等. 一株菲降解菌的分离鉴定及其固定化条件研究[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(12): 19-21, 25
- [29] Mao J, Luo YM, Teng Y, et al. Isolation and characterization of a high-molecular-weight (HMW) PAHs degrading bacterial strain[J]. Microbiology China, 2008, 35(7): 1011-1015 (in Chinese)  
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
- [30] Masakorala K, Yao J, Cai MM, et al. Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 263: 493-500
- [31] Cai ZQ, Shi S, Li SS, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. nai8 capable of naphthalene degradation[J]. Asian Journal of Chemistry, 2014, 26(1): 164-168
- [32] Zhou W, He D, Li X, et al. Isolation and characterization of naphthalene-degrading strains, *Pseudomonas* sp. CZ2 and CZ5[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(1): 13-19
- [33] Johnsen AR, Karlson U. PAH degradation capacity of soil microbial communities—does it depend on PAH exposure?[J]. Microbial Ecology, 2005, 50(4): 488-495
- [34] Zhong Y, Zou SC, 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