

# 一株高效菲降解菌的筛选及降解条件研究\*

周乐 盛下放\*\* 张士晋 刘静

(南京农业大学生命科学学院 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**【摘要】** 从南京某石化厂排污口附近采集土样,以菲为碳源的选择性培养基分离筛选到一株菲高效降解菌 F10a,根据形态和生理生化特性初步鉴定为芽孢杆菌属,并对其降解菲的特性及各种影响因素进行了研究.结果表明,F10a在  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的条件下,28 ℃ 振荡培养 27 h,菲的降解率达到 98.12%;静置培养 84 h,菲的降解率达到 98.47%.pH 值分别为 4、6、8 时,F10a 对菲具有良好的降解效能;pH 值为 10 时 F10a 不生长. $\text{Zn}^{2+}$  与  $\text{Pb}^{2+}$  的存在不影响 F10a 的降解效能, $\text{Cu}^{2+}$  可以延缓菲的降解, $\text{Cr}^{2+}$  对 F10a 有毒性.F10a 在菲浓度为  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,28 ℃ 振荡培养 84 h,降解率为 99.6%.菲的降解程度与细菌数量的增长呈正相关关系.

**关键词** 降解 菲 多环芳烃 芽孢杆菌

**文章编号** 1001-9332(2005)12-2399-04 **中图分类号** Q93;X172 **文献标识码** A

**Screening of a phenanthrene-degrading bacterium and its degradation conditions.** ZHOU Le, SHENG Xiafang, ZHANG Shijin, LIU Jing (Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2005, 16(12): 2399-2402.

Several PAHs-degrading bacteria were isolated from the soil near a petrochemicals factory, and one strain F10a identified as *B. sphaericus* was chosen for use. The study on the phenanthrene-degradation potential of the strain and its affecting factors showed that at 28 ℃, the degradation rate of phenanthrene ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was 98.12% after 27 hours rotary culture, and 98.47% after 84 hours static culture. F10a had a good phenanthrene-degradation capability when the pH was 4, 6 and 8, but its growth was inhibited when pH was 10.  $\text{Cr}^{2+}$  was toxic to the strain,  $\text{Cu}^{2+}$  could delay the degradation of phenanthrene, while  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  had no significant effects. The degradation rate of phenanthrene ( $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was 99.6% after 84 hours rotary culture. A significant positive relationship was found between bacterial growth and phenanthrene degradation.

**Key words** Degradation, Phenanthrene, Polycyclic aromatic hydrocarbons, *B. sphaericus*.

## 1 引言

多环芳烃(PAHs)是指 2 个或 2 个以上苯环的疏水性芳香族化合物.在环境中,多数 PAHs 因具有难降解性、致癌性、致畸性和致突变性,所以受到严重关注<sup>[8, 11, 19, 20]</sup>.多环芳烃(PAHs)随三废排入环境中的量逐年增加,造成长期、广泛的污染.我国许多城郊地区土壤中均报道存在较为严重的 PAHs 污染<sup>[4, 13]</sup>.

菲为三环多环芳烃代表物,生物降解是污染环境中菲去除的主要途径<sup>[5, 7, 15]</sup>.菲的降解已有不少报道<sup>[14, 16, 17]</sup>,但目前已知的菌株对菲的降解速度及其效能不甚理想.本研究在长期被石油与重金属污染的土壤中筛选高效、快速菲降解菌株,并研究其降解条件,针对目前土壤中大多存在重金属与多环芳烃复合污染的状况,研究菲与重金属共存条件下菌株对菲的降解效能,以期对菲污染土壤的生物修复提供科学依据与试验材料<sup>[20, 21]</sup>.

## 2 材料与方法

### 2.1 主要培养基

**2.1.1 有氮培养基** 蔗糖 10 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0.0.1 MPa, 121 ℃, 蒸汽灭菌 30 min.

**2.1.2 菲降解培养基**  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0.0.1 MPa, 121 ℃, 蒸汽灭菌 30 min.

**2.1.3 菲降解菌筛选固体培养基** 菲降解培养基倒平板,表面喷涂菲丙酮溶液.

### 2.2 菌种分离鉴定及菌液制备

称取 1 g 所采集土样加入到 50 ml 菲降解液体培养基中,28 ℃ 振荡培养,采用定时定量逐步提高菲浓度的方法(浓度为  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),3 d 一个周期,2 周后经反复平板划线

\* 国家自然科学基金资助项目(40371070).

\*\* 通讯联系人.

2005-01-07 收稿,2005-04-12 接受.

得到单一菌落,将得到的菌株点接在非降解菌筛选固体培养基上,其中一株点接后1 d即产生明显降解圈且长势旺盛<sup>[6]</sup>,故选取此菌株进行降解效能的测定.将其命名为F10a.

菌悬液的制备:菌株接种到有氮液体培养基上,振荡28℃培养48 h,离心,弃去上清液加入无菌去离子水振荡混匀,再次离心,重复2次.将细胞浓度调整到 $1.50 \times 10^{10}$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>,备用.

本研究采取一般分类方法,根据细菌的形态特征及其生理生化特征将菌种鉴定到属<sup>[2]</sup>.

### 2.3 降解反应

**2.3.1 菌株对非的降解** 1)振荡条件下降解:加入菌悬液至20 ml非降解液体培养基,使反应瓶中细胞浓度为 $7.5 \times 10^8$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>(下同).加入非丙酮溶液,使瓶中非浓度达50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>(下同),28℃振荡培养,从接种后15 h开始,每隔3 h整瓶提取培养液,按文献<sup>[9]</sup>方法测定培养液中非浓度,稀释平板涂布法测定细菌数量.2)静置条件下降解:100 ml摇瓶装入50 ml非降解液体培养基,放入28℃恒温箱静置培养,从接种后24 h开始,每隔12 h整瓶提取培养液,测定非浓度和细胞数量.

**2.3.2 不同影响因素对F10a降解非效能的影响** 1)不同pH值的降解:将非降解液体培养基的pH值分别调至4、6、8、10,28℃振荡培养24 h后测定非浓度和细菌数量.2)不同重金属离子的作用:非降解液体培养基中加入重金属离子,Cu<sup>2+</sup>浓度为50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、Zn<sup>2+</sup>浓度为100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、Pb<sup>2+</sup>浓度为200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、Cr<sup>2+</sup>浓度为50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>,28℃振荡培养27 h后测定非浓度和细菌数量.3)不同浓度非的降解:向加入菌悬液(最终细胞浓度为 $7.5 \times 10^8$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>)的非降解液体培养基中加入非丙酮溶液,使瓶中非浓度分别为100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>,28℃振荡培养,从接种后第18 h开始,每隔12 h整瓶提取培养液,测定非浓度和细菌数量.

### 2.4 分析方法

**2.4.1 细菌数量测定** 采用平板稀释涂布法测定培养液中的活菌数量<sup>[12]</sup>.

**2.4.2 非含量测定** 定时整瓶提取培养液,经环己烷萃取,并用硅胶G薄层层析法分离,石油醚溶解提取后,在252 nm测定紫外吸光度,以非标准溶液梯度建立标准曲线,得出培养液中的非浓度.

## 3 结果与分析

### 3.1 菌株F10a对非的降解效能

**3.1.1 振荡培养条件下对非的降解** 试验结果表明(图1a),菌株F10a在培养15 h后开始降解非,27 h的降解率达98.12%,细菌数量从 $7.5 \times 10^8$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>增至 $1.26 \times 10^{10}$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>,说明F10a可以利用非作为主要碳源进行生长繁殖.

**3.1.2 静置培养条件下对非的降解** 24 h的降解情

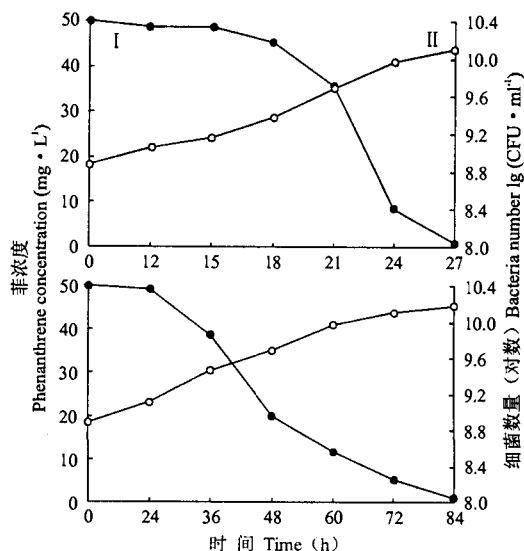


图1 振荡(a)和静置(b)培养条件下F10a对非的降解

Fig. 1 Degradation of phenanthrene by F10a in rotary (a) and static (b) conditions.

I. 非浓度 Phenanthrene concentration; II. 细菌数量 Bacteria number. 下同 The same below.

况与对照相比没有差别,48 h的降解率为60.1%,72 h的降解率为89.46%,84 h的降解率达到98.47%.细菌数量增加到 $1.49 \times 10^{10}$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>.说明菌株F10a在低氧情况下对非仍具有很高的降解效能(图1b).

### 3.2 环境条件对F10a降解非效能的影响

**3.2.1 不同pH值条件下非的降解** 测定结果表明,在弱酸性或中性环境中,F10a对非具有良好的降解效能,细菌数量亦明显增加.而在碱性条件下,F10a的生长受到强烈抑制,非几乎没有降解,测得细菌数量为 $8.53 \times 10^6$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>,说明细菌在pH为10时已开始死亡.

表1 不同pH值对非降解的影响

Table 1 Effect of different pH on degradation of phenanthrene

pH	降解率 Degradation rate (%)	细菌数量 Bacteria number ( $\times 10^9$ CFU $\cdot$ ml <sup>-1</sup> )
4	63.46 $\pm$ 10.09	8.54
6	88.81 $\pm$ 9.60	10.30
8	82.79 $\pm$ 8.78	9.04
10	2.90 $\pm$ 0.04	0.00853
CK(pH=7)	83.38 $\pm$ 7.46	9.27

### 3.2.2 重金属离子对菌株F10a降解非的影响

Zn<sup>2+</sup>(100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)与Pb<sup>2+</sup>(200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)对F10a的降解效能几乎没有影响.含有Cr<sup>2+</sup>(50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)的培养基中,细菌不生长,说明对F10a有毒性.在含有Cu<sup>2+</sup>(50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)的培养基中细菌生长缓慢,非的降解效能较低,继续培养至96 h,细菌数量大量增加,非降解基本完全,说明Cu<sup>2+</sup>(50 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)对F10a降解非的效能有延缓作用.

表 2 重金属离子对非降解的影响

Table 2 Effect of different heavy metal ions on degradation of phenanthrene

重金属离子 Heavy metal ions	降解率 Degradation rate (%)	细菌数量 Bacteria number ( $\times 10^9$ CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ )
Pb $^{2+}$	98.62 $\pm$ 0.57	13.70
Zn $^{2+}$	92.96 $\pm$ 4.01	12.20
Cu $^{2+}$	3.00 $\pm$ 1.30	1.21
Cr $^{2+}$	1.30 $\pm$ 0.97	0.000691
CK	98.12 $\pm$ 0.05	12.62

3.2.3 不同浓度菲的降解试验 F10a 在 24 h 时对 100 mg $\cdot$ L $^{-1}$  菲的降解率为 50.7%; 48 h 时为 98.15%, 细菌数量增加到 2.14  $\times 10^{10}$  个 $\cdot$ ml $^{-1}$ 。振荡培养 84 h, 200 mg $\cdot$ L $^{-1}$  菲的降解率为 99.6%, 细菌数量增加到 4.06  $\times 10^{10}$  个 $\cdot$ ml $^{-1}$ , 说明 F10a 也可以利用高浓度的菲(图 2)。

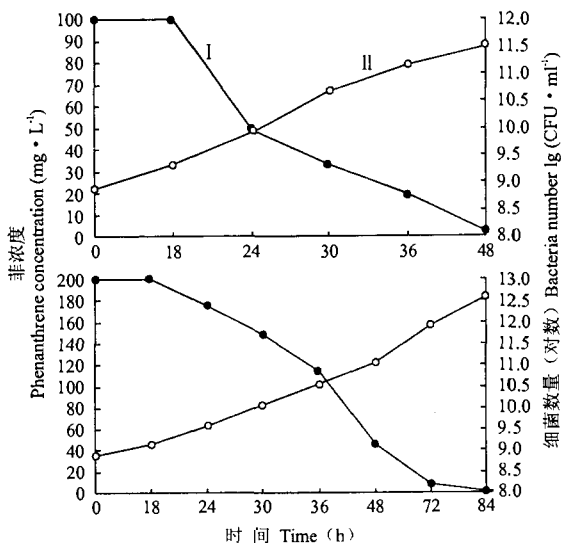


图 2 F10a 对不同浓度菲的降解

Fig. 2 Degradation of different concentrations phenanthrene by F10a. a) 100 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ; b) 200 mg $\cdot$ L $^{-1}$ .

### 3.3 菌株鉴定

菲降解菌株 F10a, 革兰氏染色为阳性, 芽孢染色可观察到明显的绿色芽孢, 菌落直径 2~3 mm, 呈黄色, 外形光滑, 隆起, 边缘不整齐, 菌体为短杆状, 根据形态和生理生化反应特性, 初步鉴定为芽孢杆菌属。

## 4 讨 论

研究表明, 在被 PAHs 污染的土壤中, 微生物降解 PAHs 的能力远远高于未受污染的土壤<sup>[18]</sup>。从这些土壤中分离筛选高效 PAHs 降解菌, 是开展 PAHs 污染土壤生物修复的基础。在相同条件下, 本研究分离得到的菌株对菲的降解效能高于目前已报道的高效降解菌株对菲的降解效能<sup>[9, 14, 16]</sup>, 而具有重金属

抗性的 PAHs 降解菌未见报道。目前土壤中大多存在有机与无机复合污染, 而无机污染又以重金属污染为主, 本研究分离得到的一株芽孢杆菌 F10a, 由于长期处于石油与重金属复合污染环境下, 具有高效降解菲与抗重金属胁迫的特性。该菌株在摇瓶培养条件下, 30 h 内对菲 (50 mg $\cdot$ L $^{-1}$ ) 的降解率可达 98% 以上并可降解较高浓度的菲。研究发现培养液 pH 值随细菌数量增长而下降, 说明菲降解过程中产生了酸性官能团, 与文献<sup>[1, 3]</sup>报道的菲降解机理相一致。在弱酸性、中性及弱碱性环境中, 降解效能不受影响, 在碱性环境中, 菌株的生长受到抑制。在低氧条件下, F10a 对菲仍具有很高的降解效能。本研究表明在一定浓度下, Zn $^{2+}$ 、Pb $^{2+}$  等重金属对 F10a 降解菲的效能没有影响, Cu $^{2+}$  可以延缓菌株对菲的降解, 但降解率不受影响。本研究说明菌株 F10a 不仅具有很强的菲降解效能而且具有较强的环境适应性。菌株 F10a 在 PAHs 污染土壤中的存活状况、菲的降解效能及其影响因素、抗重金属胁迫机理值得进一步研究。

### 参考文献

- Cheng G-L (程国玲), Li P-J (李培军), Wang F-Y (王凤友), et al. 2003. The progress of phytoremediation and microbial remediation on PAHs contaminated soil. *Techn Equip Environ Poll Contr* (环境污染治理技术与设备), 4(6): 30~36 (in Chinese)
- Dong X-Z (东秀珠), Cai M-Y (蔡妙英), Liu P-T (刘澎涛), et al. 2001. Manual of Determinative Bacteriology. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- Guo C-L (郭楚玲), Zheng T-L (郑天凌), Hong H-S (洪华生). 2000. Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Sci* (海洋环境科学), 19(3): 24~29 (in Chinese)
- Jiang C-L (姜昌亮), Sun T-H (孙铁珩), Li P-J (李培军), et al. 2001. An off site petroleum-contaminated soil bioremediation technology: Soil composting in windrow. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 12(2): 279~282 (in Chinese)
- Kastner M, Mahro B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. *Appl Microbiol Biotechnol*, 44: 668~675
- Kiyohara H, Nagao K, Yana K. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl Environ Microbiol*, 43: 454~457
- Mahmood SK, Rao PR. 1993. Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 50(4): 486~491
- Mihelcic JR, Luthy RG. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl Environ Microbiol*, 54(5): 1182~1187
- Nie M-Q (聂麦茜), Zhang Z-J (张志杰), Lei P (雷萍), et al. 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a preponderant *Brevibacterium*. *Environ Sci* (环境科学), 22(6): 83~85 (in Chinese)
- Nie M-Q (聂麦茜), Zhang Z-J (张志杰), Sun X-F (孙先锋), et al. 2001. The study of degradation of anthracene, phenanthrene and pyrene by effective *flavobacterium*. *Microbiology* (微生物学通报), 28(5): 32~36 (in Chinese)
- Sim JL, Sim RC, Matthews JE, et al. 1990. Approach to bioremedi-

- ation of contaminated surface soil. *EPA*, **60**(1):2006~2010
- 12 Shen P(沈萍), Fan X-R(范秀蓉), Li G-W(李广武). 1999. *Microbiology Experiments*. Beijing: Higher Education Press. 92~94 (in Chinese)
- 13 Song Y-F(宋玉芳), Zhou Q-X(周启星), Xu H-X(许华夏), et al. 2002. Eco-toxicological effects of phenanthrene, pyrene and 1, 2, 4-trichlorobenzene in soils on the inhibition of root elongation of higher plants. *Acta Ecol Sin* (生态学报), **22**(11): 166~171 (in Chinese)
- 14 Tam NFY, Guo CL, Yau WY, et al. 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Mar Poll Bull*, **45**: 316~324
- 15 Zhang C-G(张春桂), Xu H-X(许华夏), Jiang Q-N(姜晴楠). 1997. Advances in researches of growth form of the clonal plant. *Chin J Ecol* (生态学杂志), **16**(4): 52~58 (in Chinese)
- 16 Zhang Z-J(张志杰), Nie M-Q(聂麦茜), Ge B-Z(葛碧洲). 2003. Degradation of anthracene phenanthrene and pyrene by a *Bacillus*. *Technol Water Treat* (水处理技术), **29**(5): 276~278 (in Chinese)
- 17 Zhou D-P(周德平), Xia Y(夏颖), Han R-Y(韩如扬), et al. 2003. Isolation, identification and degradation characteristics of three phenanthrene-degrading bacteria. *Acta Sci Circ* (环境科学学报), **23**(1): 124~128 (in Chinese)
- 18 Zhou Q-X(周启星). 2002. Technological reformation and prospect of contaminated soil remediation. *Technol Equip Environ Poll Contr* (环境污染治理技术与设备), **3**(8): 36~40 (in Chinese)
- 19 Zhou Q-X(周启星), Sun S-J(孙顺江). 2002. International trends of applied ecology and its future development in China. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **13**(7): 879~884 (in Chinese)
- 20 Zhou Q-X(周启星), Sun T-H(孙铁珩). 2000. Current situation of pollution eco-chemistry and its prospects. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **11**(5): 795~798 (in Chinese)
- 21 Zhou Q-X(周启星), Wei S-H(魏树和), Zhang Q-R(张倩茹), et al. 2003. Origin of SARS from accelerated evolution of a virus by combined pollution. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **14**(8): 1374~1378 (in Chinese)

---

**作者简介** 周乐,男,1981年生,硕士生.研究方向为土壤有机污染微生物修复技术. 025-84395125; E-mail: linktozl@yahoo.com.cn

---

## 欢迎订阅 2006 年《生态学杂志》

《生态学杂志》(1982年创刊)是由中国生态学会主办、中国科学院沈阳应用生态研究所承办和科学出版社出版的学术期刊,亦是全国中文核心期刊,2002年入选中国期刊方阵.读者对象为从事生态学、生物学、地学、林农牧渔、海洋、气象、环保、经济、卫生和城建部门的科研、教学、科技工作者、有关决策部门的科技管理人员、大专院校师生和中学教师.

本刊主要刊登具有创新性的生态学研究论文以及有关专题的综述和评论,研究方法和新技术的应用,学术讨论与争鸣;国外生态学研究(包括译文,但必须取得原著作权人的授权);国内外学术消息和动态;生态学知识讲座和生态学新书刊介绍等.

《生态学杂志》为A4开本,月刊,112页,每册定价40元,全年480元.国内外公开发行.国内邮发代号:8-161,全国各地邮局均可订阅.如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系订阅.

地址:沈阳市文化路72号中国科学院沈阳应用生态研究所转《生态学杂志》编辑部

邮编:110016

电话:024-83970394

传真:024-83970394 E-mail: cje@iae.ac.cn