

高效芘降解菌 N12 的分离鉴定与降解特性^{*}

胡凤钗^{1,2} 苏振成² 孙 健² 李 旭^{2**} 张惠文² 孙军德¹

(¹ 沈阳农业大学土地与环境学院, 沈阳 110161; ² 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

摘 要 以芘为目标降解物, 利用选择性富集培养方法, 从沈抚灌区污染土壤中分离到一株高效芘降解菌 N12, 经生理生化试验和 16S rDNA 测序分析, 该菌被鉴定为分枝杆菌属 (*Mycobacterium* sp.). 菌株 N12 能以菲、蒽、芴和芘为唯一碳源和能源生长, 不能以蒽、萘和苯并芘为唯一碳源和能源生长. 在菲和芘共同存在的情况下菌株 N12 可降解苯并芘, 9 d 内对苯并芘降解率可达 79.0%. 摇瓶降解试验表明, 菌株 N12 可在 7 d 内将 100 mg · L⁻¹ 的芘降解 94.4%, 14 d 内将其完全降解; 可将 600 mg · L⁻¹ 的芘在 7 d 内降解 56.1%, 14 d 内降解 95.5%. 添加葡萄糖可促进 N12 对芘的降解. 菌株 N12 是一株优良的多环芳烃降解菌, 可作为多环芳烃污染土壤生物修复的菌种资源.

关键词 分枝杆菌 多环芳烃 芘 微生物降解

文章编号 1001-9332(2011)06-1566-07 **中图分类号** Q939.9 **文献标识码** A

Isolation and identification of a highly efficient pyrene-degrading *Mycobacterium* sp. strain N12. HU Feng-chai^{1,2}, SU Zhen-cheng², SUN Jian², LI Xu², ZHANG Hui-wen², SUN Jun-de¹ (¹College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ²Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2011, 22(6): 1566–1572.

Abstract: By using selective enrichment method, a highly efficient pyrene-degrading bacterium strain N12 was isolated from an oil-contaminated soil collected from Shenfu irrigation area of Shenyang. Based on the physiological and biochemical characteristics and the phylogenetic similarity of 16S rDNA gene sequence, the strain N12 was identified as *Mycobacterium* sp., which could utilize phenanthrene, acenaphthene, fluorine, and pyrene, but not anthracene, naphthalene, and benzo(a)pyrene as the sole carbon and energy source. However, when the strain N12 was cultured with pyrene and phenanthrene, 79.0% of benzo(a)pyrene could be co-metabolized within 9 days. The degradation rate of 100 mg · L⁻¹ of pyrene by the strain N12 was 94.4% within 7 days and 100% after 14 days, and that of 600 mg · L⁻¹ of pyrene was 56.1% within 7 days and 95.5% within 14 days. The addition of glucose promoted the degradation of pyrene. It was suggested that the strain N12 was an efficient PAHs-degrading bacterium, being a potential candidate for the bioremediation of PAHs-contaminated soils.

Key words: *Mycobacterium*; PAHs; pyrene; microbial degradation.

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs) 是分子中含有两个以上苯环的碳氢化合物, 包括萘、菲、蒽、芘和苯并芘等 150 余种化合物^[1]. 广泛分布于土壤、水体和空气中, 是持久性有机污染物 (POPs) 的重要组成部分^[2], 在自然环境中主要由煤、石油等化石能源不完全燃烧形成. PAHs 有较强

的疏水性, 很容易吸附在土壤颗粒或有机物上, 导致土壤逐渐成为 PAHs 的主要归宿^[3]. 由于 PAHs 的三致作用, 对人类健康和生态环境都有很大的潜在危害, 已引起各国的极大重视, 美国环保局在 20 世纪 80 年代初就把 16 种未带分支的多环芳烃确定为环境的优先污染物, 我国也把 PAHs 列入环境污染的黑名单中^[4]. 一般来说, 少于等于 3 环为低分子量多环芳烃, 具有 4 环或 4 环以上的称高分子量多环芳烃. 多环芳烃所具有的环数越多, 其毒性越大, 也越难降解. 芘是具有 4 个苯环的稠环芳烃, 其结构与

^{*} 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-053-2) 资助.

^{**} 通讯作者. E-mail: lixu@iae.ac.cn

2010-11-14 收稿, 2011-03-23 接受.

一些致癌的高分子量 PAHs 相似,因而常被作为 PAHs 模式化合物及检测环境 PAHs 污染的指示物来研究,芘本身遗传毒性较低,但其酮类代谢物比母体毒性更大且有致突性^[5]。

在诸多污染土壤的治理方法中,生物修复技术由于具有经济、有效、无二次污染等优点而被认为具有广阔的应用前景^[6]。通常,PAHs 污染土壤中存在大量能降解 PAHs 的微生物,微生物降解已成为 PAHs 污染土壤生物修复的重要技术手段^[7]。早在 1928 年,Tausson^[8]就从巴库油田的油浸土样中分离得到了蒽和菲的同化细菌。迄今已经筛选到多种 PAHs 的降解细菌,如芽孢杆菌、假单胞菌、分枝杆菌、诺卡氏菌、红球菌、戈登氏菌等,其中,放线菌类分枝杆菌因其被筛选到的频率高、降解高分子量 PAHs 的能力突出而引起众多科学工作者的广泛兴趣。Heitkamp 等^[9]首次报道了从土壤中分离到一株能降解芘的分枝杆菌 PYR-1 (*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1),也是最早报道的可降解高分子量 PAHs 的微生物之一。之后,国外陆续报道从污染土壤、底泥和废水等不同环境中分离到具有降解 PAHs 能力的分枝杆菌^[10-12],国内也有相关报道但较少^[13-14]。

许多研究发现,不同的筛选方法对降解菌的筛选结果影响很大。富集培养法可提高筛选的成功率,但却降低筛出菌的多样性;而直接涂板法筛出的降解菌多样性高^[15]。选择性富集培养方法是用于筛选能以某一特定化合物为唯一碳源和能源的单一菌或菌系的有效方法。本研究采用该方法筛选到一株高效芘降解菌,并对其进行分类鉴定和降解特性研究,旨在为多环芳烃污染土壤的修复提供菌种资源和技术支持。

1 材料与方法

1.1 降解菌的分离和筛选

1.1.1 土壤样品采集 污染土壤样品采自沈抚石油污水灌区渠首稻田土壤(41°50′55″N,123°44′56″E),土壤主要理化性质为:有机质 23.9 g·kg⁻¹,全氮 1.94 g·kg⁻¹,速效氮 106.3 mg·kg⁻¹,全磷 0.19 g·kg⁻¹,有效磷 15.7 mg·kg⁻¹,全钾 3.72 g·kg⁻¹,速效钾 87.2 mg·kg⁻¹,pH(土:水=1:5)7.3,物理性粘粒 14%,泥沙 27%,砂粒 59%,含水量 16%。该灌区是中国最大的石油污水灌区之一,长期污灌已造成土壤 PAHs 含量严重超标,对该地区的土壤生态安全及居民健康造成极大的威胁。

采集得到的土样一部分风干后用于土壤理化性质分析,一部分放在-70℃冰箱内供基因组 DNA 提取及分析,一部分保存于 4℃,用于筛选 PAHs 降解菌。

1.1.2 培养基 无机盐基础培养基成分及用量(g·L⁻¹):MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂·2H₂O 0.02, FeSO₄·7H₂O 0.01, KH₂PO₄ 0.4, Na₂HPO₄ 0.6, MnSO₄·H₂O 0.02, NH₄NO₃ 1.0。固体培养基中加入 2% 琼脂,芘用丙酮配制成 1000 mg·L⁻¹ 的母液,调 pH 值接近污染土壤的自然 pH 值,121℃蒸汽灭菌 30 min。

菌株保藏用牛肉膏蛋白胨培养基,成分及用量(g·L⁻¹):牛肉膏 3,蛋白胨 10,NaCl 5,琼脂 20,调整 pH 7.0~7.2。其中加入芘,使其终浓度为 50 mg·L⁻¹。

1.1.3 富集培养及分离方法 富集培养采用 3 种方法:无机盐培养基富集法(1 g 土壤+99 mL 无机盐培养基);泥浆富集法(25 g 土壤+75 mL 无菌水);污染土壤富集法(污染土壤 100 g)。每周向上述 3 种富集培养物中施加芘,施加量为:第 1~4 周 40 mg·kg⁻¹;第 5~8 周 80 mg·kg⁻¹;第 9~12 周 120 mg·kg⁻¹。无机盐培养基富集法和泥浆富集法施加芘的方法为:取一定量的芘丙酮溶液,加入到 250 mL 三角瓶中,待丙酮挥发完毕,添加新鲜的无机盐培养基或泥浆;土壤富集法加芘方法为:取芘丙酮溶液均匀喷施到土壤中,搅拌均匀,待丙酮挥发完毕,回填入 250 mL 三角瓶中。在 28℃避光条件下连续驯化 12 周后,从无机盐培养基富集培养物中取 1 mL 富集培养液,梯度稀释后涂无机盐培养基平板并加芘膜;分别取富集后的泥浆 1 mL、土壤 1 g 作为菌源加入 99 mL 无机盐培养基,以芘(100 mg·L⁻¹)为唯一碳源,28℃200 r·min⁻¹培养 1 周,再分别取 1 mL 培养液转接至 99 mL 新鲜的芘无机盐培养基中培养,如此连续转接 4 次后,分别稀释涂无机盐培养基平板并加芘膜。芘膜制备方法参照文献[16]进行。28℃避光培养 1~4 周,挑取降解圈产生菌进行复筛。

1.2 菌株的鉴定

1.2.1 形态观察与生理生化鉴定 采用光学显微镜进行革兰氏染色和抗酸染色观察。菌株鉴定的生理生化试验参照文献[17]进行,主要进行了淀粉水解、硝酸盐还原、明胶液化等试验。

1.2.2 16S rDNA 序列的 PCR 扩增与测序 PCR 扩增菌株 N12 的 16S rDNA 序列进行比对,扩增反应采用的前引物 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-

CAG-3') 和后引物 1492R (5'-TACGGHTACCTTGT-TACGACTT-3'), 分别来源于大肠杆菌 16S rDNA 的 8~27 和 1492~1513 基因片段^[18]. 反应程序如下: 在 96℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min. 反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 经切胶纯化送华大基因公司测序. 序列登陆 Gene-Bank 进行 blast 分析, 用分枝杆菌 N12 的序列和下载的 16S rDNA 序列通过 clustalX 进行聚类分析后, 应用 MEGA4.0 软件、采用 Neighbor-Joining 方法和 Jukes-Cantor 模式构建系统发育树.

1.3 菌株 N12 对 PAHs 降解能力的测定

单基质 PAHs 的残留量测定方法参照齐邦峰等^[19]确定的紫外分光光度分析法. 混合 PAHs 残留采用高效液相色谱测定^[20].

1.4 菌株 N12 降解特性研究

1.4.1 温度对 N12 的生长与芘降解的影响试验 取培养 6 d 的菌液, 用 0.01 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液 (pH 为 7.0) 将细胞清洗 3 次, 最后用等体积无菌水悬浮, 吸取菌悬液 1 mL 接于 50 mL 摇瓶中, 分别于 15、20、25、30 和 35℃ 下培养 10 d, 每日测定菌浓度 (OD₆₀₀). 以未接菌的液体培养基为对照, 3 次重复.

1.4.2 不同起始浓度芘的降解试验 取菌悬液 (方法同上) 1 mL 接入芘浓度分别为 200、400、600、800、1000 mg·L⁻¹ 的无机盐培养基中, 30℃ 150 r·min⁻¹ 摇床培养 14 d, 用二氯甲烷萃取培养基中残留的芘, 测定芘残留量, 确定其降解率. 以未接菌的培养基为对照, 3 次重复.

1.4.3 不同浓度葡萄糖对芘降解的影响试验 按 2% 的接菌量接种于葡萄糖浓度分别为 0、10、50、100、500、1000 和 5000 mg·L⁻¹ 的芘无机盐液体培养基中, 30℃ 150 r·min⁻¹ 避光培养. 同时分别以接种 2% 的灭菌超纯水的培养基作对照, 3 次重复.

1.4.4 苯并(α)芘的共代谢降解试验 将菲、芘和苯并(α)芘的混合物添加到无机盐培养基中, 浓度分别为 100 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹, 150 r·min⁻¹ 摇床培养 9 d, 测定残留的 3 种 PAHs 含量, 并确定其降解率. 以未接菌的无机盐液体培养基为对照, 3 次重复.

1.5 菌株 N12 降解基因的检测分析

Nid 和 Pdo2 是分枝杆菌降解 PAHs 的两个关键降解酶, 根据 Pagnout 等^[21]设计的引物对其编码基因进行扩增和序列分析. 引物序列为 nidA-F (5'-TGATGTCAGCGAACTGGAAG-3') 和 nidA-R (5'-

AGTCCATGCCCCATTTTCGTAG-3'), pdoA2-F (5'-ACG-CAGACTCCACAAGCTC-3') 和 pdoA2-R (5'-ACTTC-CATCGTCGTGTGA-3'). PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min 后进行 35 个循环: 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 最后 72℃ 延伸 5 min; 扩增结束后, 取 5 μL 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳.

2 结果与分析

2.1 降解菌的筛选

以芘为目标降解物, 利用选择性富集培养方法, 经过多次分离和纯化, 初步筛选到芘降解细菌 30 株. 通过对这 30 株菌的微生物学特性分析及降解效率测定, 从中挑选出降解率最高的 1 株菌 N12 作进一步研究.

2.2 菌株 N12 的鉴定

N12 菌体形态 (图 1) 为短杆状, 两端钝圆, 革兰氏阳性, 但不易被染色, 抗酸染色为阳性. 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上单菌落呈金黄色, 圆形垫状、边缘整齐、表面光滑, 与培养基结合牢固. 该菌生长缓慢, 经 30℃ 培养 7 d 才能形成清晰可见的单菌落. 生理生化反应结果表明, 吡啶、柠檬酸盐、乙酰甲基甲醇、甲基红 (M. R.) 和淀粉试验均为阴性, 产氨、硝酸盐还原、过氧化氢酶和产硫化氢试验都是阳性反应. 能以果糖、蔗糖、麦芽糖、鼠李糖、棉子糖和肌醇为唯一碳源生长, 而不能以木糖、山梨糖、阿拉伯糖为唯一碳源生长.

将菌株 N12 的 16S rDNA 序列 (1406 bp) 与 GeneBank 中已知序列进行比对, 结果表明, 其与 *Mycobacterium gilvum* isolate VM0442 的序列相似性为 100%, 与 *Mycobacterium* sp. TA27 等菌株的序列相似性为 98%~99%. 菌株 N12 与这些菌株的系统发育关系见图 2. 菌株 N12 的 16S rDNA 序列在

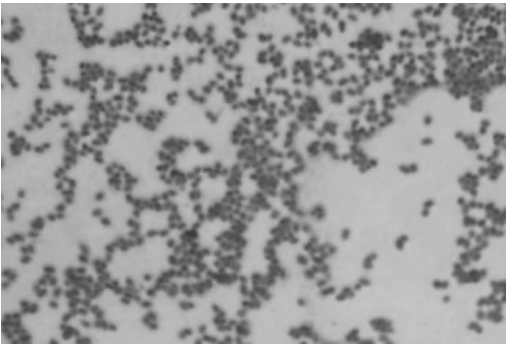


图 1 菌株 N12 的显微形态
Fig. 1 The micro-morphology of strain N12.

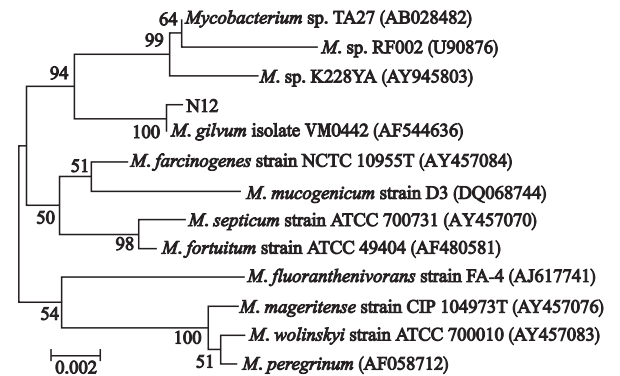


图2 邻位相连法建立的菌株 N12 系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of N12 conducted by Neighbour-joining method.

分支上的数字为 Bootstrap 抽样检验 500 个循环的自展值 (仅显示支持率高于 50% 的), 物种或菌名后标注了 GeneBank 登录号 Bootstrap values above 50 were shown representing the percentage support for the cluster out of 500. Species or strain names were preceded by GeneBank accession numbers.

GeneBank 登录号为 DQ512892. 结合形态学、生理生化特征和 16S rRNA 比对结果初步鉴定菌株 N12 为分枝杆菌.

2.3 菌株 N12 的最佳生长温度和最佳降解温度

菌株 N12 接种到无机盐培养基中, 分别在 15、20、25、30、35 ℃ 下培养. 从图 3 可以看出, 在 15 ℃ 下, 菌体总量随时间逐渐增多, 而其他 4 个温度包含了延滞期、对数期、成熟期和衰亡期 4 个时期. 在 25 ℃ 和 30 ℃ 条件下, 菌株 N12 均在生长 6 d 时数量达到最高. 而 20 ℃ 和 35 ℃ 下分别在 8 d 和 4 d 达到最高. 30 ℃ 下菌株的菌体总量最高. 相比较而言, 30 ℃ 的温度条件最适合菌株 N12 生长.

为了验证生长和降解的最适温度是否一致, 进一步测定菌株 N12 在不同温度下的降解率. 将菌株接种到芘浓度为 100 mg · L⁻¹ 的无机盐培养基中, 分别在 15、20、25、30 和 35 ℃ 下培养, 在第 10 天测定

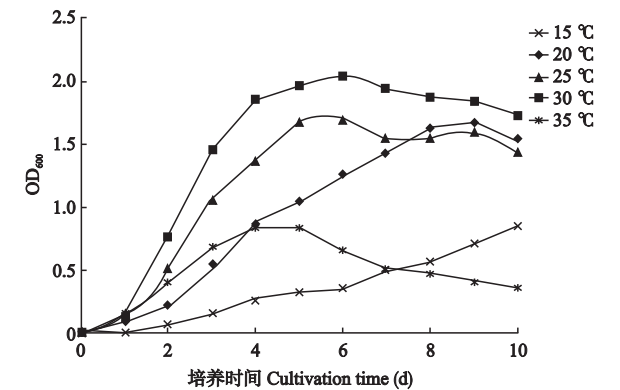


图3 温度对菌株 N12 生长的影响

Fig.3 Effect of temperature on the growth of N12.

芘的残留量, 得到各个温度下的降解率. 芘降解率在 15 ℃ 下最低, 仅为 40.0%, 随着温度的升高, 降解率提高, 在最适生长温度 30 ℃ 下达到最高 (98.8%). 温度继续升高, 降解率急速降低, 在 35 ℃ 下的降解率 (62.8%) 甚至低于 20 ℃ (76.1%) 和 25 ℃ (89.3%).

2.4 菌株 N12 对芘的降解动力学及其降解谱

将菌株 N12 接种到含芘 (100 mg · L⁻¹) 的液体培养基中 (图 4), 随着菌体数量的增加, 芘的降解率也逐渐增大, 在培养至第 6 天时, 菌体数量达到最大, 而芘的降解率仍缓慢增加, 但是速率明显下降, 这可能是在对数生长前期菌体吸附和吸收了大量的芘, 体内积累了大量的代谢产物, 致使降解速率降低, 随着时间延长, 逐渐降解代谢, 降解率又开始增加. 培养 10 d 后降解率达到 98.8%, 表明菌株 N12 具有较强的降解能力.

由图 5 可见, 菌株 N12 可以在 14 d 内将芘浓度为 100 mg · L⁻¹ 的无机盐培养基中的芘降解完全, 随着芘浓度的增加, 降解率逐渐降低, 当浓度达到 1000 mg · L⁻¹ 时, 降解率仅为 27.4%.

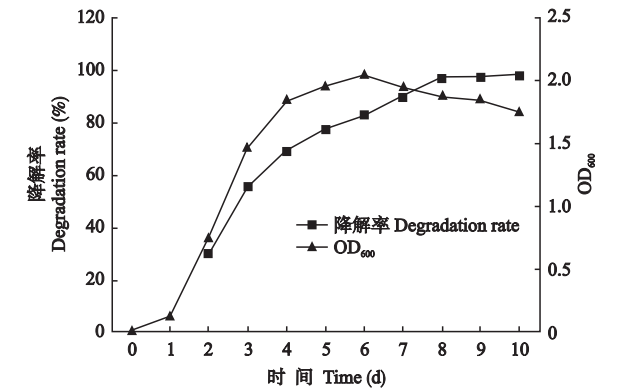


图4 菌株 N12 的芘降解曲线和生长曲线

Fig.4 Pyrene degradation and strain N12 growth curves.

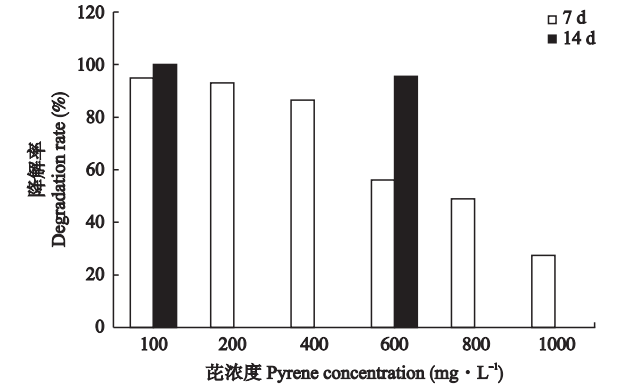


图5 不同芘浓度对菌株 N12 芘降解率的影响

Fig.5 Effect of concentration of pyrene on degradation rate of pyrene by N12.

菌株 N12 还能以菲、芘、芴为唯一碳源和能源生长,在浓度均为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的菲、芘、芴无机盐液体培养基中培养 7 d,降解率可分别达到 99.4%、71.8% 和 45.3%。菌株 N12 不能以蒽、萘、苯并芘为唯一碳源和能源生长。

2.5 葡萄糖对芘降解的影响

由于分枝杆菌生长代谢缓慢,本试验选取葡萄糖为外加碳源,观测其对菌株 N12 降解芘的影响。结果表明(图 6),葡萄糖可以明显促进芘的降解,其中,外加 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖效果最明显,与对照相比,外加 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖培养 6 d 的芘降解率(94.7%)即可达到对照组培养 8 d 的降解率(94.8%),降解时间缩短约 25%。

2.6 菌株 N12 对共代谢条件下 3 种 PAHs 的降解

对菌株 N12 进行菲、芘和苯并芘 3 种典型多环芳烃混合降解试验(表 1),结果表明,原本不能被降解的苯并芘在菲和芘的参与下,降解率达到 79.0%。

2.7 多环芳烃降解基因检测

根据已报道的分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. strain SNP11 的双加氧酶(Nid 和 Pdo2)编码基因设计引物进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳得到 *nidA*(615 bp)和 *pdoA2*(808 bp)两个片段(图 7)。

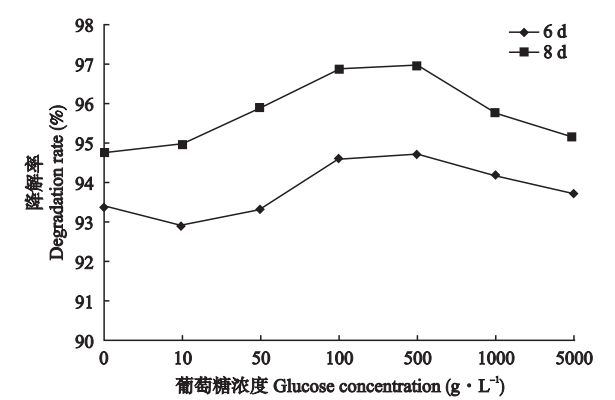


图 6 葡萄糖对菌株 N12 降解芘的影响
Fig. 6 Effect of glucose on the degradation of pyrene by N12.

表 1 菌株 N12 对共代谢条件下的 3 种 PAHs 的降解
Table 1 Co-metabolization of three PAHs by strain N12

	菲 Phenanthrene	芘 Pyrene	苯并芘 Banzo[α] pyrene	3 种总量 Total of three substrates
残留浓度 Remain concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.22	0.70	8.49	9.40
降解率 Degradation rate (%)	99.7	99.0	79.0	94.8

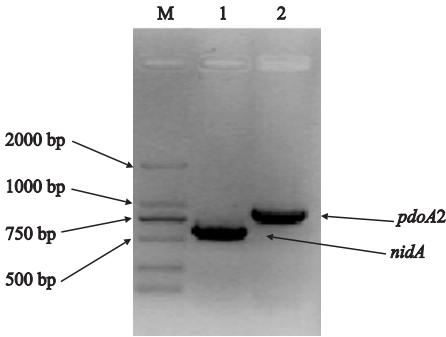


图 7 菌株 N12 *nidA* 和 *pdoA2* 基因的凝胶电泳
Fig. 7 Gel electrophoresis of *nidA* and *pdoA2* genes from strain N12.

将序列输入 GenBank 以 Blast 软件进行序列同源性比较,结果显示,菌株 N12 与 *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1 和 *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK 的 *nidA* 同源性均高达 99%,与 *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1、*Mycobacterium* sp. strain 6PY1 和 *Mycobacterium* sp. strain SNP11 的 *pdoA2* 同源性均高达 99%。说明菌株 N12 中具有与以上分枝杆菌高度同源的双加氧酶基因。*nidA* 和 *pdoA2* 基因的系统发育树见图 8a 和图 8b。

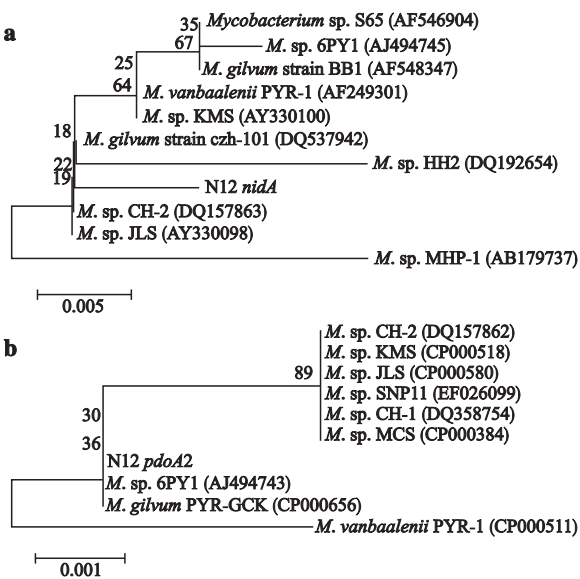


图 8 N12 和亲缘关系相近的分枝杆菌 *nidA* (a) 和 *pdoA2* (b) 序列的系统发育树
Fig. 8 Phylogenetic trees based on the gene sequences of *nidA* (a) and *pdoA2* (b) from strain N12 and closely related *Mycobacterium* strains.

3 讨 论

芘在自然界中一般难于降解,其降解菌在不另外提供碳源和能源时,对芘的降解率通常比较低,例如在巩宗强等^[13]的研究中,芘的降解率仅为 57%,

有共代谢底物存在时降解率达 80%; 在 Ramirez 等^[22]的研究中分枝杆菌 PYR-1 的降解率为 63%; 刘艳峰等^[23]筛选到的 6 株菌中放线菌 DP2 为芘的高效降解菌, 其降解率为 83.2%; 王新等^[14]研究证明, 固定化混合菌的降解率高于单菌固定, 固定后的降解效果明显好于游离菌, 将芽孢杆菌 2 号和动胶杆菌 9 号混合固定后芘的降解率为 61.8%。在芘的诸多降解菌中分枝杆菌被研究的较多, 降解效果较好, 例如李全霞等^[16]筛选到的分枝杆菌 M11 在芘浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 16 d 的降解率可达 91.8%。本试验所得到的分枝杆菌 N12 在同样条件下, 14 d 时降解率为 100%, 可见 N12 确为芘的高效降解菌之一。

微生物降解多环芳烃的难易度取决于其化学结构的复杂性和降解酶的适应程度。研究表明, PAHs 降解方式一般有两种: 一种是以多环芳烃为唯一碳源和能源; 另一种是将多环芳烃与其他有机质进行共代谢。对于土壤中低分子量的多环芳烃类化合物, 微生物的代谢方式多是第一种; 而对于难降解的 4 环或 4 环以上的高分子量 PAHs, 微生物多以共代谢方式进行降解^[24]。

共代谢是由于污染物在微生物降解过程中产生的一种或多种代谢中间产物的作用, 诱导某些关键降解酶的表达, 并最终促进了 PAHs 的降解。Gottfried 等^[25]证明添加中间产物水杨酸可诱导菲代谢过程中的趋向行为并提高酶活性, 而且添加代谢中间产物对 PAHs 矿化速率的提高效果高于添加普通碳源^[26]。本试验把菲、芘和苯并芘这 3 种典型的多环芳烃混合进行降解试验, 结果原本不能被降解的苯并芘在菲和芘的参与下, 不仅能够降解, 而且降解率高达 79.0%。这是因为, 首先菲和芘可能是菌株 N12 降解苯并芘的诱导底物; 其次 N12 在优先降解菲和芘的过程中可产生多种诱导性的代谢中间产物, 如水杨酸、邻苯二甲酸等, 促进苯并芘的降解。

Nid 和 Pdo2 是分枝杆菌降解 PAHs 过程中起关键作用的两个截然不同的双加氧酶, 由基因 *nidA* 和 *pdoA2* (特指 *phdA*) 编码。 *nidA* 为芘的主要降解基因, 而 *phd* 基因簇是非转化降解的双加氧酶基因。近来, Stingley 等^[27-28]研究 *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1 的 *nidA* 区的基因, 将其在大肠杆菌中表达, 检测到一些能降解芘和菲的酶, 可以将菲降解生成顺-3,4-二氢菲和 1-羟基-2-萘酸, 再生成邻苯二甲酸, *phd* 区间的表达产物能将邻苯二甲酸降解为 3,4-二羟基邻苯二甲酸。Pagnout 等^[21]研究表明, Pdo2

位于 *phdA* 区, 该区间能编码菲顺-3,4-二氢脱氢酶和 3,4-二羟基邻苯二甲酸脱羧酶。可见, 这两个区间的基因极可能是互补的, 为 N12 能以菲和芘为唯一碳源提供了基因方面的证据, 同时还旁证了苯并芘的共代谢机制。

4 结 论

本研究从自然原位污染土壤中筛选出一株高效芘降解菌 N12, 经生理生化和 16S rDNA 分析被鉴定为分枝杆菌 (*Mycobacterium*)。实验室模拟条件下, N12 的最佳生长和最佳降解温度均为 30 °C, 7 d 对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率为 94.4%, 14 d 降解率可达 100%, 7 d 对 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的降解率为 56.1%, 14 d 降解率为 95.5%, 是目前国内报道的最优良的芘降解菌株之一。

菌株 N12 能以菲、芘、芴为唯一碳源和能源生长, 不能以蒽、萘、苯并芘为唯一碳源和能源生长, 但在菲和芘存在的条件下, 可将难降解的苯并芘降解, 降解率高达 79.0%。对高效降解菌 N12 的共代谢芘条件进行了优化, 优化后芘降解时间缩短 25%。

菌株 N12 同时具有 *nidA* 和 *pdoA2* 两个双加氧酶降解基因, 是其高降解率在基因方面的依据。

参考文献

- [1] Blumer M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in nature. *Scientific American*, 1976, **234**: 35-45
- [2] Jamroz T, Ledakowicz S, Miller JS, et al. Microbiological evaluation of toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons and their decomposition products formed by advanced oxidation processes. *Environmental Toxicology*, 2003, **18**: 187-191
- [3] Moon HS, Kahng HY, Kim JY, et al. Determination of biodegradation potential by two culture independent methods in PAH contaminated soils. *Environmental Pollution*, 2006, **140**: 536-545
- [4] Guo C-L (郭楚玲), Zheng T-L (郑天凌), Hong H-S (洪华生). Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Science* (海洋环境科学), 2000, **19**(3): 24-29 (in Chinese)
- [5] Ravelet C, Krivobok S, Sage L, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 2000, **40**: 557-563
- [6] He L-J (何良菊), Wei D-Z (魏德洲), Zhang W-Q (张维庆). Research of microbial treatment of petroleum contaminated soil. *Advances in Environmental Science* (环境科学进展), 1999, **7**(3): 110-115 (in Chinese)
- [7] Zhang J (张 杰), Liu Y-S (刘永生), Meng L (孟玲), et al. Isolation and characteristics of PAHs-de-

- grading strains. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2003, **14**(10): 1783–1786 (in Chinese)
- [8] Tausson WO. Oxidative metabolism of phenanthrene in the Baku oil fields. *Planta*, 1928, **5**: 239–273 (in Russian)
- [9] Heitkamp MA, Cerniglia CE. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **54**: 1612–1614
- [10] Boldrin B, Tiehm A, Fritzsche C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 1927–1930
- [11] Churchill SA, Harper JP, Churchill PF. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 549–552
- [12] Miller CD, Hall K, Liang YN, *et al.* Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates from soil. *Microbial Ecology*, 2004, **48**: 230–238
- [13] Gong Z-Q (巩宗强), Li P-J (李培军), Wang X (王新), *et al.* Co-metabolic degradation of pyrene in soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2001, **12**(3): 447–450 (in Chinese)
- [14] Wang X (王新), Li P-J (李培军), Song S-Z (宋守志), *et al.* Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by immobilized microorganisms. *Journal of Northeastern University* (Natural Science) (东北大学学报·自然科学版), 2006, **27**(10): 1154–1156 (in Chinese)
- [15] Dunbar J, White S, Forney L. Genetic diversity through the looking glass: Effect of enrichment bias. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 1326–1331
- [16] Li Q-X (李全霞), Fan B-Q (范丙全), Gong M-B (龚明波), *et al.* Isolation and identification of a pyrene-degrading strain *Mycobacterium* sp. M11 and its degrading characteristics. *Environmental Science* (环境科学), 2008, **29**(3): 763–768 (in Chinese)
- [17] Dong X-Z (东秀珠), Cai M-Y (蔡妙英). *Manual of Common Determinative Bacteriology*. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [18] Cavalca L, Hartmann A, Rouard N, *et al.* Diversity of *tfdC* gene: Distribution and polymorphism among 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, **29**: 45–58
- [19] Qi B-F (齐邦峰), Zhang H-C (张会成), Chen L-R (陈立仁), *et al.* The determination of 3,4-benzopyrene content in microstalfine wax with the solvent extraction and UV absorption method. *Analysis and Testing Technology and Instruments* (分析测试技术与仪器), 2003, **9**(3): 169–172 (in Chinese)
- [20] Lei P (雷萍), Nie M-Q (聂麦茜), Wen X-M (温晓玫), *et al.* Study to degradation characters of preponderant flavobacterials strains in a mixture of anthracene, phenanthrene and pyrene. *Journal of Xi'an Jiaotong University* (西安交通大学学报), 2004, **38**(6): 657–660 (in Chinese)
- [21] Pagnout C, Frache G, Poupin P, *et al.* Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. *Research in Microbiology*, 2007, **158**: 175–186
- [22] Ramirez N, Cutright T, Ju LK. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. *Chemosphere*, 2001, **44**: 1079–1085
- [23] Liu Y-F (刘艳锋), Zhou Z-M (周作明), Li X-L (李小林), *et al.* Isolation and purification of pyrene degrading strains and measurement of their degradation capability. *Journal of Huaqiao University* (Natural Science) (华侨大学学报·自然科学版), 2008, **29**(2): 267–269 (in Chinese)
- [24] Chen SH, Aitken MD. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science & Technology*, 1999, **33**: 435–439
- [25] Gottfried A, Singhal N, Elliot R, *et al.* The role of salicylate and biosurfactant in inducing phenanthrene degradation in batch soil slurries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, **86**: 1563–1571
- [26] Basu A, Das D, Bapat P, *et al.* Sequential utilization of substrates by *Pseudomonas putida* CSV86: Signature of intermediate metabolites and online measurements. *Research in Microbiology*, 2009, **164**: 429–437
- [27] Stingley RL, Brezna B, Khan AA, *et al.* Novel organization of genes in a phthalate degradation operon of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Microbiology*, 2004, **150**: 3749–3761
- [28] Stingley RL, Khan AA, Cerniglia CE. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, **322**: 133–146

作者简介 胡凤钗,女,1983年生,硕士研究生.主要从事环境微生物及 PAHs 污染修复研究. E-mail: hufengchai0314@126.com

责任编辑 肖红
