

[文章编号] 1003-4684(2023)01-0062-05

一株弯曲固氮菌对多环芳烃的降解特性研究

张宏宏¹, 叶晨¹, 张晓昀², 孟恬¹, 王黎明², 黄玉屏¹

(1 武汉大学生命科学学院, 湖北 武汉 430072; 2 湖北环境修复与治理技术研究有限公司, 湖北 黄石 435000)

[摘要] 微生物修复在多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)污染治理方面有着优良特性。为了获得高效降解 PAHs 的微生物, 以荧蒹为唯一碳源进行筛选, 分离得到一株高效降解细菌, 命名为 CE3。经 16S rDNA 序列分析法鉴定, 菌株 CE3 属于弯曲固氮菌属(*Azoarcus*), 这是首次发现该属菌株对高分子量 PAHs 具有降解能力。菌株 CE3 除了能降解荧蒹, 还能降解苯、菲、芘、荧蒹、苯并[a]蒹、3-4 苯并芘和苯并[b]荧蒹, 且对荧蒹和芘的降解率较高, 均达到 50% 以上。分析各种条件对 CE3 菌降解荧蒹和芘的影响, 发现 CE3 菌能在较广的温度和 pH 范围降解荧蒹或芘, 并且添加酵母提取物、蔗糖和果糖可使 CE3 菌降解能力提高。

[关键词] 多环芳烃; 荧蒹; 芘; 降解; 弯曲固氮菌

[中图分类号] Q939.99; X53 **[文献标识码]** A

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类含有两个及两个以上苯环的有机化合物, 具有遗传毒性、致突变性、致癌性、生物蓄积性和化学稳定性^[1-3], 是我国农用和居住用地土壤评估的重要指标之一。根据环数的不同, PAHs 可以分为高分子量 PAHs(4 环及以上)和低分子量 PAHs(2~3 环), 且高分子量 PAHs 比低分子量 PAHs 具有更高的稳定性、更强的致癌性、致畸性和致突变性, 对人类健康和生态环境产生的危害更大^[4-5]。我国大部分地区表层土壤中整体上都含有一定量的 PAHs, 并多处于中度污染水平, 其中 4 环的 PAHs 荧蒹和芘含量较高, 2 环的 PAHs 含量较低^[6]。例如本研究的供试土壤采样区湖北黄石新冶钢有限公司东钢厂区, 其焦化车间受到的多环芳烃污染十分严重, 其中大部分为高分子量多环芳烃污染物。由于在环境中低分子量的 PAHs 比高分子量的容易降解, 因此对高分子量 PAHs 的污染治理非常重要。在 PAHs 污染治理方法中, 微生物治理方法因其环境友好、成本低、高效等特点, 成为了 PAHs 污染治理的热点^[7]。然而, 目前分离到的降解高分子量 PAHs 菌株非常有限, 对其降解机制所知甚少。为此, 迫切需要分离更多的高分子量 PAHs 降解菌, 探明它们对高分子量 PAHs 的代谢机制, 从而加快微生物在环境污染治理和修复中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土壤样品的采集 本研究所用土壤样品采自湖北省黄石市新冶钢有限公司东钢厂焦化车间, 取距表层 10 cm 下的土壤。

1.1.2 培养基

1) 无机盐培养基(1 L): 338.8 mg KH_2PO_4 、234.0 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、100.0 mg Na_2CO_3 、3.9 mg CaCl_2 、59.3 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、890.7 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL 微量元素母液。

2) 微量元素母液(1 L): 1500 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、190 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、70 mg ZnCl_2 、24 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、24 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、6 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

1.1.3 试剂与仪器 除上述培养基配方中的化学试剂(购自国药集团化学试剂有限公司)外, 本研究试剂主要有: 菲、荧蒹、芘、3-4 苯并芘、苯并[a]蒹、苯并[b]荧蒹、丙酮、二氯甲烷(分析纯)、甲醇(色谱纯)(购自阿拉丁工业公司)。本研究所用实验仪器包括岛津 UV2500 型分光光度计、Agilent 1200 高效液相色谱仪、Ultimate[®] PAH 高效液相色谱柱(5 μm , 250 mm \times 4.6 mm)等。

[收稿日期] 2021-09-18

[基金项目] 湖北环境修复与治理技术研究有限公司与武汉大学合作项目(HER-GCZX-CG-2018-05)

[第一作者] 张宏宏(1994-), 女, 湖北武汉人, 武汉大学硕士研究生, 研究方向为微生物学

[通信作者] 黄玉屏(1968-), 女, 湖北武汉人, 工学博士, 武汉大学副教授, 研究方向为微生物学

1.2 实验方法

1.2.1 多环芳烃降解菌的分离纯化 称取 10 g 混合土壤样品,加入 90 mL 无菌水和适量玻璃珠振荡 3 h;静置待土壤沉降后,取 10 mL 上清液接入加有荧蒽的 90 mL 无机盐培养基中,30℃、180 r/min 培养 7 d。每次均按 10% 的体积比移取培养液接入新鲜的液体无机盐培养基中,进行富集培养,共重复 5 次。富集培养时培养基中荧蒽的浓度依次为 10、20、40、60、80 mg/L。之后,将培养液进行稀释涂布,并将单菌落在平板上进一步划线分离纯化。

1.2.2 降解菌的鉴定

1)菌株形态特征的观察:a)挑取单菌落分别在 LB 平板和含有荧蒽的无机盐平板上划线,30℃ 培养,观察菌落形态,并进行革兰氏染色。b)将菌株接入含有荧蒽的无机盐培养基中,30℃、180 r/min 培养,观察其在液体无机盐培养基中的生长状态。

2) 菌株的分子生物学鉴定:用细菌 16S rDNA 通用引物 (27F: 5'-CAGCGGTACCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-CTCTCTGCAGTACGGCTACCTTGTTACGAC TT-3')进行 PCR 扩增,将 PCR 产物送公司测序。将序列信息输入 NCBI 网站,经 Blast 程序与 GenBank 中已有的核酸序列进行序列同源性比对分析,并用 MEGA 11.0 软件采用 Neighbor-Joining 法构建菌株的系统发育树。

1.2.3 多环芳烃浓度的测定 将活化之后的菌液 8000 r/min 离心 5 min,弃上清,用无机盐培养基洗涤 2 次,再用无机盐培养基将菌体重悬;将菌液 OD₆₀₀ 调至 1.0,按所需的接种量转接于 50 mL 加有多环芳烃为单一碳源的无机盐培养基中,30℃、180 r/min 培养 7 d。

- 1)分光光度法检测多环芳烃
- a)配制各种多环芳烃溶于甲醇的标准品,用岛津 UV2500 分光光度计做全波段扫描,来确定每种多环芳烃对应的最大吸收波长。
- b)分别在各种多环芳烃的最大吸收波长处测定不同浓度梯度标准样品的吸光度,以吸光度值为纵坐标,多环芳烃的浓度为横坐标,绘制标准曲线。测定加标回收率,计算变异系数,分析重复性。
- c)向 50 mL 培养液中加入 25 mL 二氯甲烷,振荡萃取 30 min,之后倒入分液漏斗中,静置 15 min,分层后收集下层的有机相,上层的水相按同样的方法连续萃取 2 次。
- d)合并 3 次萃取获得的有机相,离心去掉有机相中残留的水分,并测量有机相的体积。
- e)测定于上述有机相样品在最大吸收波长下的

吸收值,并根据标准曲线计算多环芳烃的浓度和降解率。

- 2)高效液相色谱法测定荧蒽和芘
- a)绘制荧蒽和芘的标准曲线
- 配制不同浓度梯度的荧蒽和芘的标准样品,上机分析。分析的色谱条件为:流动相为 V(甲醇):V(水)=9:1,紫外检测器室温检测,设置流速为 1 mL/min,进样量为 30 μL,检测波长为 254 nm,分析时间为 30 min。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标分别绘制荧蒽和芘的标准曲线。
- b)培养液中加入等体积的二氯甲烷萃取,振荡萃取 30 min,倒入分液漏斗中,静置 15 min,分层后收集有机相,水相重复萃取 2 次。
- c)将有机相离心,去掉残留的水分后,用旋转蒸发器进行旋转蒸发,水浴温度为 40℃;向蒸干后的圆底烧瓶中加入 50 mL 色谱纯的甲醇,充分溶解多环芳烃。
- d)取 1 mL 上述多环芳烃甲醇溶液,过滤除去杂质,制得待测样品。将待测样品上机检测,根据检测结果和标准曲线计算荧蒽及芘的浓度和降解率。

2 结果与讨论

2.1 菌株 CE3 的形态特征

通过逐次提高培养基中的荧蒽浓度,并用平板划线分离纯化,筛选得到一株高效降解荧蒽的菌株,编号 CE3。菌株 CE3 在 LB 平板(图 1a)和无机盐平板(图 1b)上的菌落呈规则圆形,透明,淡黄色,凸起,表面光滑湿润,质地粘稠易挑起。菌株 CE3 为革兰氏阴性菌,菌体呈略弯曲的棒状(图 1c)。菌株 CE3 在含有荧蒽的无机盐培养基中培养时,随着荧蒽被降解,培养液逐渐变清亮,菌体呈絮状聚集(图 1d)。

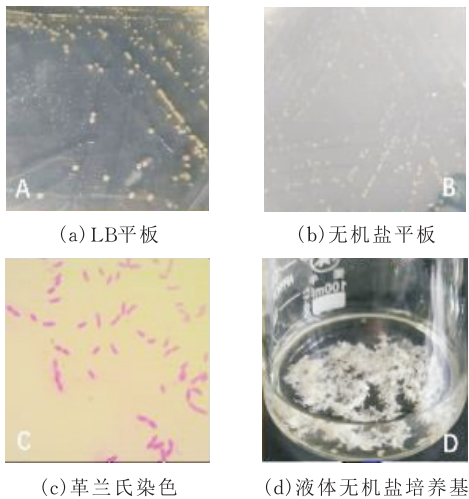


图 1 菌株 CE3 的形态特征

2.2 菌株 CE3 的分子生物学鉴定

菌株 CE3 的 16S rDNA 序列 GenBank 登录号为 MT 498785,Blast 序列同源性比对显示其菌株 CE3 与 *Azoarcus*(固氮弯曲菌)属细菌的 16S rDNA 序列同源性高,核苷酸一致性均达 95% 以上,其中与 *Azoarcus evansii* DQS-4 的 16S rDNA 序列同源性最高。系统发育分析也表明菌株 CE3 与弯曲固氮菌属(*Azoarcus*)的菌株亲缘关系较近(图 2),故初步将菌株 CE3 鉴定为 *Azoarcus* sp. CE3。

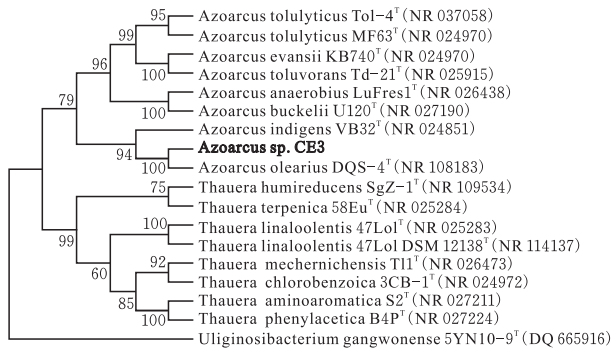


图 2 菌株 CE3 的系统发育树

2.3 菌株 CE3 的多环芳烃利用范围

实验发现,除荧蒹外,菌株 CE3 能在以苯、芘、菲、3-4 苯并芘、苯并[a]蒹、苯并[b]荧蒹为唯一碳源的无机盐培养基中生长。为此,检测了菌株 CE3 对各种高分子量 PAHs 的降解能力(表 1)。结果表明菌株 CE3 对几种高分子量 PAHs 都有一定的降解能力,对荧蒹和芘的降解率超过了 50%。故后续对菌株 CE3 在不同条件下降解荧蒹和芘的能力进行了详细分析。

表 1 菌株 CE3 对几种多环芳烃 7 天的降解率

| 底物名称 | 质量浓度/(mg·L ⁻¹) | 降解率/% |
|---------|----------------------------|-------|
| 芘 | 100 | 54.1 |
| 荧蒹 | 100 | 50.8 |
| 菲 | 1000 | 16.0 |
| 苯 | 500 | 83.3 |
| 3-4 苯并芘 | 50 | 19.6 |
| 苯并[a]蒹 | 50 | 33.9 |
| 苯并[b]荧蒹 | 50 | 13.6 |

2.4 菌株 CE3 降解特性的研究

2.4.1 培养温度对菌株 CE3 降解率的影响 未接种细菌的对照组中荧蒹和芘浓度在不同培养温度下无明显差别,说明温度对荧蒹和芘的自身散逸没有显著影响。菌株 CE3 降解荧蒹和芘的最适温度均为 30℃,温度提高到 35℃时,CE3 菌对芘的降解率略有降低,但对荧蒹的降解率则下降了一半(图 3)。菌株 CE3 在 25~45℃条件下都能生长,但温度超过 40℃时 CE3 菌的生长受到明显抑制,降解率也明显降低。因此,后续的实验都在 30℃条件下进行。

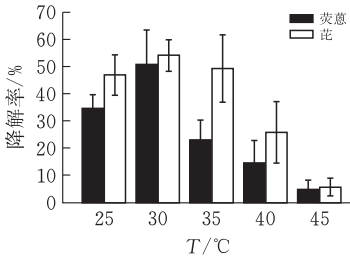


图 3 不同温度下菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率

2.4.2 不同接菌量对菌株 CE3 降解率的影响 降解体系中的 PAHs 含量恒定时,不同的接菌量对降解率也有明显影响。实验结果表明,接菌量从 2% 到 8% 时,菌株 CE3 对荧蒹的降解率逐渐提高,最高降解率达到 58.9%;增加接种量到 10% 时,降解率反而降低。芘的降解率变化与荧蒹的不同,当接菌量为 6% 时,菌株 CE3 对芘的降解率达到最大值 60.2%。其他不同比例接菌量下,芘的降解率无明显差别(图 4)。

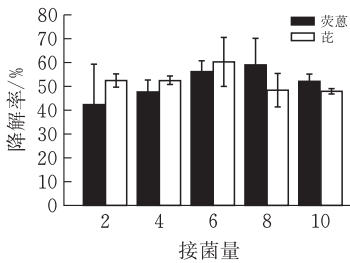


图 4 不同接菌量下菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率

2.4.3 荧蒹或芘初始浓度对菌株 CE3 降解能力的影响 菌株对 PAHs 耐受能力的研究是探究其降解特性的重要一环,本研究测定了不同初始培养浓度下菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解效率(图 5)。初始浓度为 100 mg/L 时,菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率最高,分别达到 50.8% 和 65.3%,因此,后续实验中荧蒹或芘的初始浓度均为 100 mg/L。在荧蒹和芘浓度较高时,菌株 CE3 仍具有一定的降解能力,说明菌株 CE3 能耐受高浓度荧蒹和芘,具有应用于高浓度荧蒹或芘污染治理的潜力。

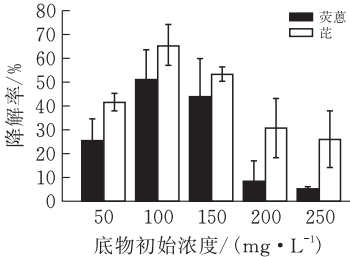


图 5 不同底物浓度下菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率

2.4.4 培养基的初始 pH 对菌株 CE3 降解率的影响 pH 值会影响酶的活性、物质的转运过程和营养物质的利用^[8],从而影响微生物的代谢过程,因此本研究探究了培养基初始 pH 对菌株 CE3 降解荧蒹

和芘效率的影响(图 6)。培养基初始 pH 值在 5~10 之间时,菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率先随着 pH 值的增加而增加,当 pH 为 8 时 CE3 菌对荧蒹的降解率达到最高,随后 pH 越高降解率越低;而菌株 CE3 对芘的降解率在 pH 9 时达到峰值,当 pH 为 10 或 8 时,芘的降解率也没有明显降低。由此可见,菌株 CE3 比较适应弱碱性环境,而酸性环境对其生长和降解活动明显不利。

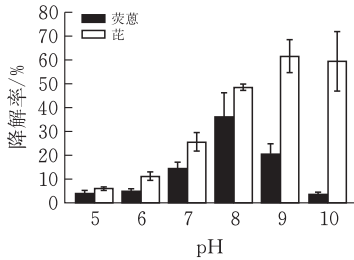


图 6 不同培养基初始 pH 下菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率

2.4.5 不同外源营养物质对菌株 CE3 降解率的影响 微生物需要碳源、氮源、磷源、钾和铁等保证其正常代谢和生长^[9],不同的共代谢底物也是影响微生物降解 PAHs 的因素之一^[10]。本研究选择蔗糖(A)、果糖(B)、葡萄糖(C)、麦芽糖(D)、木糖(E)、酵母提取物(F)、蛋白胨(G)作为外源营养物质,探究它们对菌株 CE3 降解荧蒹和芘能力的影响。结果显示,各种营养物质对菌株 CE3 降解荧蒹和芘的影响不同,酵母提取物使菌株对荧蒹和芘的降解率分别提高了 12.3%和 5.8%,蛋白胨使菌株对荧蒹和芘的降解率分别提高了 5.7%和 3.6%;而蔗糖使菌株对荧蒹的降解率提高了 11.5%,但抑制了对芘的降解;与之相反,果糖使菌株对芘的降解率提高了 13.9%,抑制了对荧蒹的降解(图 7)。因此,为了促进菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解,可在降解体系中添加酵母提取物和蛋白胨,作为共代谢底物促进菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解;如果只需降解荧蒹,可以选取蔗糖作为外源碳源物质促进降解;如果只需降解芘,则可选取果糖作为外源碳源物质促进降解。

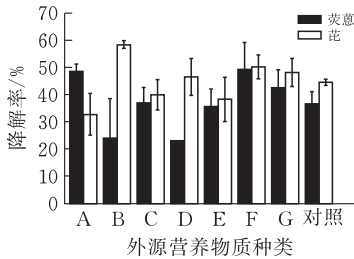


图 7 添加不同外源营养物质时菌株 CE3 对荧蒹和芘的降解率

3 讨论

本文从 PAHs 污染土壤中以荧蒹为唯一碳源分离到一株 PAHs 降解菌 CE3,通过分子生物学方法鉴定,该菌为 *Azoarcus* sp. CE3。虽然早先有报道 *Azoarcus* 属的菌能够厌氧降解含单个苯环的芳香烃和单个六元环结构如间二甲苯、二氧己烷等有机物^[11-13],还有报道通过宏基因组测序发现一种能降解荧蒹和菲的混合菌中 *Azoarcus* 属细菌的含量高达 58.5%^[14],但本研究是首次分离到能降解 PAHs 的 *Azoarcus* 属菌株。CE3 菌能以多种 PAHs 为唯一碳源进行生长,特别是能降解几种高分子量 PAHs,说明 CE3 菌具有应用于环境 PAHs 污染治理的潜力。探究各种环境条件对菌株 CE3 降解荧蒹或芘的影响,发现菌株 CE3 能在较广的温度和 pH 范围降解荧蒹或芘;同时,添加酵母提取物、蔗糖和果糖可使 CE3 菌降解率提高。因此,菌株 CE3 在 PAHs 类污染物的修复中具有广阔的应用前景,本实验为 CE3 菌应用于环境 PAHs 污染治理及修复奠定了良好的基础。

由于目前仅完成实验室水平的液体体系降解测试,为实现 CE3 菌在 PAHs 污染土壤或水体中的应用,后期需要继续探究 CE3 菌在应用于环境治理时是否能保持其高效利用底物的特性,是否会与环境中原有的微生物群落相互作用等问题。

[参 考 文 献]

[1] MOORTHY B, CHU C, CARLIN D J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer [J]. *Toxicological Sciences*, 2015, 145(01): 5-15.

[2] LABIB S, WILLIAMS A, KUO B, et al. A framework for the use of single-chemical transcriptomics data in predicting the hazards associated with complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Archives of Toxicology*, 2017, 91(7): 2599-2616.

[3] IZZO S A, QUINTANA S, ESPINOSA M, et al. First characterization of PAH-degrading bacteria from Rio de la Plata and high-resolution melting: an encouraging step toward bioremediation[J]. *Environmental Technology*, 2019, 40(10): 1250-1261.

[4] SHI W, GUO Y, NING G, et al. Remediation of soil polluted with HMW-PAHs by alfalfa or brome in combination with fungi and starch[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 360: 115-121.

[5] HESHAM A L, KHAN S, TAO Y, et al. Biodegradation of high molecular weight PAHs using isolated yeast mixtures: application of meta-genomic methods

for community structure analyses[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2012, 19(8): 3568-3578.

[6] 马妍, 程芦, 阮子渊, 等. 近 20 年中国表层土壤中多环芳烃时空分布特征及源解析[J]. 环境科学, 2021, 42(03): 1065-1072.

[7] GHOSAL D, GHOSH S, DUTTA T K, et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review [J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1369.

[8] 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(01): 199-207.

[9] LEE K, PARK J W, AHN I S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7[J]. Journal of Hazardous Materials, 2003, 105(01-03): 157-167.

[10] VAIDYA S, DEVPURA N, JAIN K, et al. Degradation of chrysene by enriched bacterial consortium[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1333.

[11] FERNANDEZ H, PRANDONI N, FERNANDEZ-PASCUAL M, et al. *Azoarcus* sp. CIB, an anaerobic biodegrader of aromatic compounds shows an endophytic lifestyle[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110771.

[12] DENG D, PHAM D N, LI F, et al. Discovery of an inducible toluene monooxygenase that cooxidizes 1,4-dioxane and 1,1-dichloroethylene in propanotrophic *Azoarcus* sp. strain DD4[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(17): e01163-20.

[13] BLAZQUEZ B, CARMONA M, DIAZ E. Transcriptional regulation of the peripheral pathway for the anaerobic catabolism of toluene and m-xylene in *Azoarcus* sp. CIB[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 506.

[14] PATEL A B, SINGH S, PATEL A, et al. Synergistic biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by mixed bacterial cultures[J]. Bioresource Technology, 2019, 284: 115-120.

Degradation Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Azoarcus* sp. CE3

ZHANG Honghong¹, YE Chen¹, ZHANG Xiaoyun², MENG Tian¹, WANG Liming², HUANG Yuping¹
(1 College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;
2 Hubei Environmental Remediation & Governance
Technological Research Co., Ltd., Huangshi 435000, China)

Abstract: Microbial remediation has excellent characteristics in the control of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution. In order to obtain microorganisms that can efficiently degrade PAHs, fluoranthene was used as the only carbon source to screen microorganisms. And then a high-efficiency degrading bacterium named CE3 was isolated. Strain CE3 was identified to belong to *Azoarcus* genus based on its 16S rDNA sequence analysis. To our knowledge, this is the first report that the strain of the *Azoarcus* genus has the ability to degrade high molecular weight PAHs. In addition to fluoranthene, strain CE3 also could degrade benzene, phenanthrene, pyrene, fluoranthene, benzo [a] anthracene, benzo [3,4] pyrene and benzo [b] fluoranthene. The degradation rates of fluoranthene and pyrene are more than 50% and higher than the degradation rates of other PAHs. Then, the degradation rates of fluoranthene and pyrene by strain CE3 under various conditions were analyzed in detail by HPLC method. The results showed that *Azoarcus* sp. CE3 could degrade fluoranthene or pyrene in a wide range of temperature and pH; moreover, the addition of yeast extract, sucrose and fructose to the medium could improve its degradation ability.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); fluoranthene; pyrene; degradation; *Azoarcus*

[责任编辑: 张 众]