

分枝杆菌 TZh51 菌株的分离鉴定及其生物修复污染土壤的特性

贾宝亮^{1,2}, 范丙全^{1*}, 隋新华², 龚明波¹

(¹ 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

(² 中国农业大学生物学院微生物与免疫学系, 北京 100094)

摘要: 【目的】为获得降解芘的微生物菌株, 并用其生物修复被多环芳烃污染的土壤。【方法】芘降解菌的分离采用平板升华法。根据表型观察、生理生化特性和 16S rDNA 的序列同源性分析, 对菌株进行分类学鉴定。通过活菌计数、HPLC 测定多环芳烃的残留量, 研究菌株在固体、液体无机盐培养基以及在污染土壤中降解多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)的能力。【结果】分离到 4 株能降解芘的菌株 TZh51、TZh52、TG42 和 TG52。实验结果表明, TZh51 降解 PAHs 的能力强于其余 3 株菌。TZh51 被鉴定为分枝杆菌属 (*Mycobacterium* sp.), 但与已发表的分枝杆菌菌株 M11 为不同的种。TZh51 接种在芘膜的固体无机盐培养基上, 测定获得最大芘降解量的条件是培养温度为 35℃和芘膜厚度为 130 ng/mm²。在芘浓度为 50、100 mg/L 的液体无机盐培养基中培养, 6 天时 TZh51 的芘降解率分别达到 91.9%、71.8%, 10 天时菌体数量分别达到最大值为 2.0、6.0×10⁸ cfu/mL; TZh51 降解芘的效果强于 M11。在种植作物的处理中, 到第 6 周时 TZh51 的菌体数量达到每克干土含 7.2×10⁸ 个菌落数, 到第 8 周时菲、荧蒹和芘的降解率分别达到 91.4%、86.9%和 85.8%; 【结论】TZh51 具有很强降解 PAHs 的能力; 另外, TZh51 与作物联合生物修复污染土壤的效果明显。

关键词: 多环芳烃; 芘; 鉴定; 生物修复; 分枝杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1214-07

近百年来,随着国内工业的迅猛发展和化石燃料的广泛使用,国内许多地区已遭受多环芳烃的严重污染^[1]。多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类由 2 个或 2 个以上苯环以线状、角状或簇聚方式构成的稠环芳香烃化合物。PAHs 由于普遍具有三致性、生物蓄积性、长距离迁移性和半挥发性并能在环境中持久存在,被列入持久性有机污染物的行列,并受到广泛关注^[2-4]。芘是典型难降解的具有 4 个苯环的高分子量 PAHs; 它普遍存在于环境中,而且它的一些衍生物具有更强的毒性。

微生物降解 PAHs 由于具有廉价、彻底和无二次污染的优点而倍受科研工作者的重视^[5]。早在

1928 年, Tausson 就从巴库油田的油浸土壤样品中分离得到了蒽和菲的同化细菌^[6]。之后, 科研人员又陆续发现许多能降解低分量 PAHs 的微生物。由于四环 PAHs 不易被微生物降解的缘故, 四环 PAHs 降解菌的获取难度也随之增大。近二十几年来, 能降解 4 个苯环的芘和荧蒹、甚至 5 个苯环的苯并[a]芘的菌株不断被报道。其中, 分枝杆菌是一类非常重要的降解菌。 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 是第一株被分离到的能降解芘的分枝杆菌^[7, 8]。美国 Cerniglia 实验室对它的研究最为深入, 已经完成全基因组的测序工作 (<http://img.jgi.doe.gov>); 并且, 通过系统生物学方法, 率先破解了芘和荧蒹

基金项目: 国家“973 项目”——重点基础研究发展规划(2002CB410809)

*通讯作者。Tel: +86-10-68918689; Fax: +86-10-68918636; E-mail: bqfan@caas.ac.cn

作者简介: 贾宝亮(1981-), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, 从事环境微生物及 PAHs 污染修复研究。E-mail: jbl882007@163.com

收稿日期: 2008-03-14; 修回日期: 2008-05-22

的完整代谢途径^[9, 10]。

随着科研人员对污染土壤进行生物修复的深入研究,发现有些植物能促进微生物对污染土壤的修复作用。植物在修复过程中,会释放促进化学反应的根际分泌物和酶,根际作用增加了微生物降解菌的数量,另一方面是因为植物分泌有机物为微生物提供了共代谢的基质底物^[11~13]。

目前,分枝杆菌降解 PAHs 的研究在国内只有一篇报道,是本实验室发表的分枝杆菌菌株 M11^[14]。本研究继续筛选能降解芘的分枝杆菌,对其进行分类鉴定和降解能力研究,同时重点研究它和作物联合修复污染土壤的能力,旨在为多环芳烃污染土壤的生物修复提供高效菌种资源和技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品:从河北唐山市轧钢厂、唐山钢厂及山西临汾市钢厂采集表层 0 cm ~ 10 cm 的土壤与污泥共 55 个样品,分别编号为 TZh1 ~ TZh20、TG1 ~ TG15 和 LG1 ~ LG20,放于自封袋中封口,置于 4 °C 冰箱保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:芘(纯度为 98.6%),购于内蒙古包头佩璋工贸有限公司;菲和荧蒹(纯度 > 97%),购于辽宁省鞍山市贝达合成化工厂;分别用丙酮配成 5 g/L 母液,用 0.45 μm 尼龙膜过滤灭菌。其它试剂均为分析纯。无机盐培养基和营养肉汁培养基成分见参考文献^[14]。

植物营养液的组成成分:KNO₃ 0.7 g、Ca(NO₃)₂ 0.7 g、Ca₃(PO₄)₂ 0.8 g、MgSO₄ 0.28 g、FeSO₄·7H₂O 0.12 g、MnSO₄ 0.6 mg、ZnSO₄ 0.6 mg、CuSO₄ 0.6 mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.6 mg,自来水 1 L;pH=5.5 ~ 6.0。

高效液相色谱仪为 Agilent 1100,色谱柱为美国 RAINBOW 公司的 Kromasil C18 柱(Φ 4.6 mm× 250 mm, 5 μm),使用 Agilent 1100 HPLC 化学工作站的 VWD 检测器。PCR 仪为 GeneAmp system 9700。光学显微镜为 Olympus BH-2。

1.2 芘降解菌的分离

芘降解菌的分离采用平板升华法^[15]。

1.3 芘降解菌的分类鉴定

将分离到的菌株在固体肉汁培养基上划线,于 30 °C 培养,进行表型观察。生理生化实验参照文献进行^[16, 17]。

PCR 扩增菌株的 16S rDNA 序列,引物为 P1: 5'-GCGGCGTGCTTAACACAT-3 和 P2: 5'-GTTACGAC-TTCGTCCCAAT-3, P1 和 P2 分别对应 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 的 16S rDNA 的 12 ~ 29 和 1431 ~ 1451 位核苷酸。反应程序:94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 63 °C 50 s, 72 °C 1 min, 30 次循环; 72 °C 7 min, 4 °C 下保存。

测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。序列登陆 GenBank 进行同源性比较,应用 MEGA4.0 软件进行聚类分析,并用 Neighbor-Joining 方法、Jukes-Cantor 模式构建 16S rDNA 的系统发育树。

1.4 在固体和液体无机盐培养基中降解芘的能力

芘降解量由透明降解圈面积与单位面积芘含量的乘积求得。前者由透明降解圈直径求得;后者计算过程如下:(1)有 3 种制膜时间的空白平板,每种选择 6 个,用直径 18 mm 的小试管口端从中间向外侧打孔 10 个,收集;(2)加 3 mL 丙酮萃取孔片上的芘;(3)用孔径 0.45 μm 的尼龙膜过滤,HPLC 测定芘的吸收峰,然后与 50 mg/L 芘标液的吸收峰对比。

芘降解率由芘初始接入量与芘残留量的差值除以芘初始接入量求得。芘降解量由芘初始接入量与芘残留量的差值乘于培养体积求得。芘初始接入量分为 50、100 mg/L,培养体积为 10 mL。实验进行 16 d,设 2、6、8、10、12 和 16 d 共 6 个阶段。每个阶段为独立的培养体系,并同时设 3 个重复。在每个阶段,分别测定培养液中的芘残留量,同时采用活菌平板计数法测定细菌数量。芘残留量的计算过程如下:在 10 mL 培养液中加入 5 mL 环己烷,萃取 2 次培养液中的芘,吸取上层有机相,定容到 10 mL;下面步骤同 1.4 (3)。

1.5 在污染土壤中的生物修复能力

1.5.1 实验的布置和管理:土壤来自浙江嘉兴市农科院实验基地水稻土和菜园土(未受到任何 PAHs 的污染);晒干后过 2 mm 筛,121 °C 湿热灭菌 3 次;按每克土壤含有 100 μg 菲、200 μg 荧蒹和 200 μg 芘的用量,配制污染土壤。玉米和小白菜种子、花盆要用 0.4% 的次氯酸钠消毒。种子要在光照培养箱中 30 °C 催芽。培养的菌体溶液与灭菌草炭均匀混合,制成接种菌剂(菌剂含水量达 75%),每千克污染土壤中菌剂加入量为 15 g。实验共设 2 个对照和 4 个处理(对照 1,菜园土中不接菌、不种作物;对照 2,水稻土中不接菌、不种作物;处理 1,菜园土中接菌、不种作

物；处理 2，菜园土中接菌、种小白菜；处理 3，水稻土中接菌、不种作物；处理 4，水稻土中接菌、种玉米），每个对照和处理 4 次重复。培养期间浇植物营养液。

1.5.2 菲、荧蒽和芘的残留量的测定：(1) 在第 2、4、6 和 8 w，分别用灭菌的打孔器和钥匙从每个盆中取 5 个点，混匀后风干过 1 mm 筛；(2) 称 2 g 风干样品于 50 mL 离心管中，加入丙酮漩涡振荡，在 50 超声波水浴中萃取 20 min，然后 8000×g 离心 2 min；(3) 转移上清液到新离心管中，再重复 2 次，定容到 10 mL；(4) 用孔径 0.45 μm 的尼龙膜过滤，HPLC 测定菲、荧蒽和芘的吸收峰；(5) 配制不同浓度的菲、荧蒽和芘含量的土壤标准样品，用上面(1)~(4) 步骤处理；以菲、荧蒽和芘的吸收峰面积为横坐标，以三者的标准浓度为纵坐标，绘制三者残留量的标准曲线；(6) 在标准曲线中求得待测土壤样品中菲、荧蒽和芘的残留量。

1.5.3 降解菌的菌体数量的测定：方法同 1.2，为更早形成透明降解圈，用菲膜代替芘膜。为了消除土壤中水分对菌体数量的影响，首先测定土壤的含水量，然后换算成每克干土中所含的菌体数量。

1.6 HPLC 的测定条件

流动相为甲醇/水，流速为 1 mL/min，检测波长为 254 nm，进样体积为 5 μL。在 1.4(3) 中，甲醇与水的体积比 95/5，测定时间为 10 min；在 1.5.2(4) 中，甲醇与水的体积比 78/22，测定时间为 17 min。

1.7 实验数据处理

应用 SAS 统计软件 (SAS Institute Inc.) 分析所得的实验数据，应用 Microsoft Office Excel 2003 软件作图。

2 结果和讨论

2.1 芘降解菌的分离

在平板上起初会长些杂菌落；培养到 15 d 左右，出现针尖大小的菌落；继续培养 7 d，在菌落周围形成透明降解圈，此菌落就是芘降解菌。在固体营养肉汁培养基中经过多次分离、纯化，然后在芘膜固体无机盐平板上再次复验，最后共筛选到 4 株芘降解菌；根据编号分别取名为 TZh51、TZh52、TG42 和 TG52。实验结果表明，并不是所有的土壤样品中都分离到芘降解菌。原因可能是有些样品中根本不存在降解芘的土著微生物，或者是存在但不适合用此种方法筛选，还有可能是杂菌太多，竞争抑制了芘降解菌的生长，从而没能形成透明圈等。

将 4 株菌接种在菲膜、荧蒽膜和芘膜的无机盐固体培养基上培养 14 d 后，TZh51 的降解圈直径大于其余 3 株菌。TZh51 在含有菲、荧蒽和芘的液体无机盐培养基中培养 4 d 和 8 d 时的菌体数量明显高于其余 3 株菌。这表明在两种培养条件下菌株 TZh51 降解菲、荧蒽和芘的能力强于其余 3 株菌。然后，对 TZh51 进行了分类学鉴定，并研究了它在固体、液体无机盐培养基中及在污染土壤的生物修复中降解 PAHs 的能力。

2.2 菌株 TZh51 的分类鉴定

将菌株 TZh51 接种在营养肉汁平板上 30℃ 培养，在第 5 d 出现肉眼可见的透明菌落。随后，菌落颜色由起初的乳白色逐渐变为橘黄色。在颜色上 TZh51 与 M11 有细微差别，但其他表型特征和 M11 相似。TZh51 的生理生化实验结果见表 1。

利用细菌 16S rDNA 的通用引物未能扩增出结果，

表 1 菌株 TZh51 的生理生化特性
Table 1 physiological and biochemical characteristics of the strain TZh51

Characteristic	Result	Characteristic	Result
Catalase activity(foam height>45 mm)	++	Citrate	-
Nitrate reduction	++	Dicarboxyl	+
Tween 80 hydrolysis(10 days)	+	Hydroxy-butanedioic acid	+
Growth at 45℃	-	Butanedioic acid	++
Indole production	+	Sodium benzoate	-
Tellurite reduction(7days)	-	Galactitol	+
Fe ³⁺ absorption	+	Trehalose	-
Aromatic sulfatase(3days)	-	Dulcitol	+
Christensen's(7days)	++	Gatactose	+
Growth on:		Inositol	+
5% Sodium chloride	+	Rhamnose	+
0.2% Chrysolepic acid	+	D-Manntiol	+
Sodium glutamate and glucose	-		

Note: +, growth or positive reaction; ++, marked growth or positive reaction; -, no growth or negative reaction.

这表明通用引物不适合扩增菌株 TZh51。根据分枝杆菌属细菌的 16S rDNA 保守序列设计了引物 P1 和 P2, 扩增出 1400 bp 的基因片段。在 NCBI 上进行同源性比较, TZh51 与 *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK 的同源性高达 98%; M11 与 *Mycobacterium monacense* B9-21-178 的同源性达到 98%。下载相似性大于 96% 的 16S rDNA 序列, 构建系统发育进化树(见图 1)。从系统发育树上可以清楚地看出, TZh51 与 M11 在不同的分支上, 为分枝杆菌属的不同种。

2.3 在固体、液体无机盐培养基中降解芘的能力

2.3.1 培养温度和芘膜厚度对 TZh51 降解芘的影响: 制膜时间分别为 30、60、90 s, 对应的单位面积芘含量的测定结果为 50、130、300 ng/mm²。培养温度为 25、30、35 。培养温度和芘膜厚度共有 9 种组合, 每种组合有 6 次重复。吸 15 μL 浓菌液接种到芘膜无机盐培养基上, 从第 3 d 开始测定降解圈直径。不同组合间 TZh51 的芘降解量 (Q) 见图 2。

同一时间内随着温度的升高, 相同芘膜厚度的芘

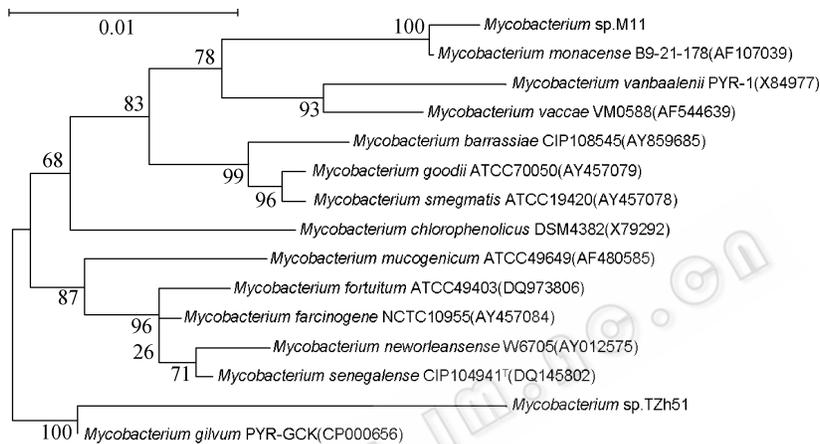


图 1 菌株 TZh51 和 M11 的 16S rDNA 的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequences of the strain TZh51 and M11. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in Gene-Bank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis of 1000 resampled data sets. Bar 0.01 represent sequence divergence.

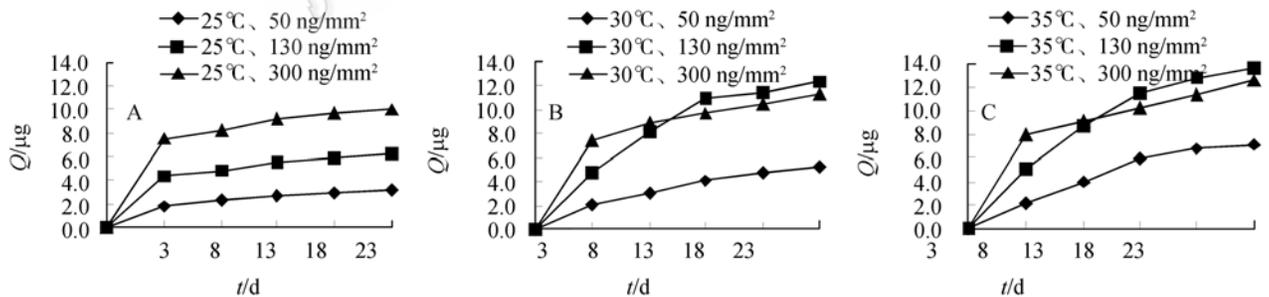


图 2 培养温度和芘膜厚度对芘降解量的影响

Fig. 2 Effects of incubation temperature and pyrene film's thickness on pyrene-degrading quantity (Q).

降解量是逐渐升高的。原因可能是: 25°C 时温度过低, 离最适生长温度 37 较远, TZh51 降解芘的能力下降。另外, 在 25 时, 芘膜越厚, TZh51 的芘降解量越大(图 2-A); 30 和 35 时, 3~8 d 期间, 芘降解量大小按芘膜厚度的排列顺序依次为 300、130 和 50 ng/mm²; 8~23 d 期间, 排列顺序变为 130、300 和 50 ng/mm²(图 2-B、C)。

根据图 2, 培养温度和芘膜厚度对 TZh51 降解芘有

明显的影响。综合这 2 个因素, TZh51 的芘降解量的最佳条件是培养温度为 35 和芘膜厚度为 130 ng/mm²; 此时, 在 9 种组合中芘降解量达到最大值 13.7 μg。

2.3.2 芘浓度对 TZh51 降解芘的影响: 实验设 2 个对照, 一个是只加入芘而不加入 TZh51, 目的是测定芘的非生物降解情况; 另一个是只加入 TZh51 而不加芘, 目的是测定在没有碳源的情况下 TZh51 的生长情况。芘残留量 (R)、芘降解率 (PR)、菌体数量 (N)

和芘降解量 (M) 的变化见图 3。

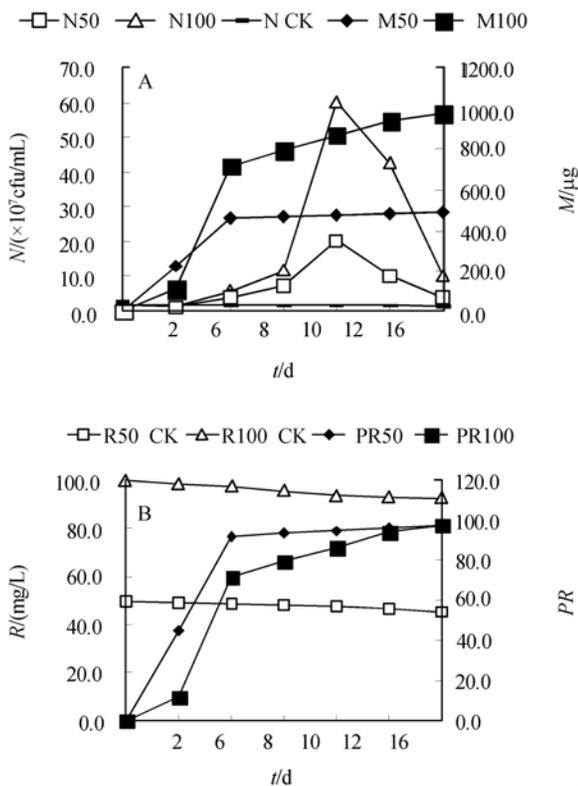


图 3 芘浓度对菌株 TZh51 降解芘的影响
Fig. 3 Effects of pyrene concentrations on the strain TZh51's ability to degrade pyrene.

根据母液平板计数可知, TZh51 初始接种量为 1.5×10^7 cfu/mL。在 8~10 d, TZh51 的菌体生长有一

个飞跃; 在 50、100 mg/L 的芘浓度下, 菌体数量的最大值分别为 2.0 、 6.0×10^8 cfu/mL。但对照中, TZh51 的菌体数量几乎没有变化。这说明 TZh51 只有当芘作为碳源时才能生长, 并且随着芘浓度的升高, 菌体数量也随之增多 (图 3-A)。

芘在培养基期间会发生光氧化、挥发等非生物降解过程。根据对照中芘的残留量数据, 可以看出非生物降解对实验结果的影响不大。TZh51 降解芘的时间集中在前 6 d; 在 50、100 mg/L 的芘浓度下, TZh51 在 6 d 时芘降解率已达到 91.9%、71.8% (图 3-B); 然而在此时, M11 芘降解率只有 30.5%和 40.2%^[14]。TZh51 的菌体生长旺盛期也比 M11 提前 2 d, 这可能与 TZh51 降解芘的能力有关。在 16 d 时, 尽管 TZh51 在 2 种芘浓度下芘降解率相差无几, 但芘降解量却相差甚大; TZh51 在 100 mg/L 芘浓度时芘降解量达到 979 μg , 是 50 mg/L 芘浓度时的 2 倍 (图 3-A)。

2.4 菌株 TZh51 在污染土壤中的修复能力

根据菲、荧蒹和芘的标准曲线, 分别求得 2、4、6 和 8 周时不同处理间菲、荧蒹和芘的残留量 (H), 结果显示 (表 2): (1) 菲在土壤中的残留时间要明显短于荧蒹和芘; (2) 对照 1 的残留量小于对照 2; 处理 1 中菲、荧蒹和芘的残留量普遍小于处理 3 (3) 前 4 周, 种植作物的处理 (处理 2 和处理 4) 与未种植作物的处理 (处理 1 和处理 3) PAHs 残留量差异不明显, 4 周后差异明显, 种植作物的处理的 PAHs 残留量明显小于未

表 2 4 个处理间菲、荧蒹和芘的残留量
Table 2 Residual quantity of phenanthrene, fluoranthrene and pyrene among four treatments

Treated style	$c(H)$ ($\mu\text{g/g}$) t/week	$H_{\text{phenanthrene}}$				$H_{\text{fluoranthrene}}$				H_{pyrene}			
		2	4	6	8	2	4	6	8	2	4	6	8
Treat.1		63.1 ^c	42.8 ^{bc}	34.4 ^d	20.2 ^d	153.1 ^b	108.0 ^c	75.3 ^c	64.0 ^b	168.5 ^b	121.5 ^c	92.2 ^c	67.1 ^c
Treat.2		70.0 ^{bc}	45.8 ^{bc}	29.6 ^{dc}	12.0 ^c	166.2 ^b	120.4 ^d	70.9 ^c	35.6 ^c	171.9 ^b	129.2 ^{bc}	84.3 ^c	36.2 ^d
Treat.3		70.7 ^b	47.7 ^b	42.6 ^c	27.1 ^c	166.4 ^b	128.6 ^c	86.1 ^b	57.0 ^b	175.5 ^b	135.4 ^b	112.2 ^b	84.8 ^b
Treat.4		71.7 ^b	41.6 ^c	25.9 ^c	5.2 ^f	185.4 ^a	139.5 ^b	78.6 ^{bc}	29.3 ^c	172.2 ^b	118.8 ^c	53.6 ^d	20.1 ^c
CK1		90.3 ^a	85.6 ^a	79.6 ^b	75.9 ^b	191.8 ^a	186.5 ^a	179.3 ^a	175.6 ^a	190.5 ^a	185.7 ^a	180.1 ^a	174.4 ^a
CK2		94.6 ^a	89.9 ^a	85.6 ^a	82.6 ^a	196.6 ^a	190.8 ^a	185.4 ^a	179.2 ^a	195.4 ^a	191.5 ^a	188.6 ^a	181.7 ^a

The different letters means significant at 5% level.

种植物的处理; (4) 处理 4 的修复效果普遍好于处理 2。

有研究表明, 土壤中的 PAHs 只有进入液体介质中的那一部分才能被生物吸收^[18]。菲是三环 PAHs, 疏水性相对较弱, 溶解度大, 蒸汽压较低, 容易被生物吸收, 同时也容易挥发进入大气进行非生物降解。这可能是产生现象 (1) 的主要原因。产生现象 (2) 的主要原因可能与土壤的理化性质有关。有报道表明, 土壤中有有机质含量越高, 土壤中 PAHs 的降解速度越慢^[19]。实验测定菜园土、水稻土的有机质含量分

别是 0.90%、1.01%; 由于前者有机质含量低, 吸附菲、荧蒹和芘的程度低。现象 (3) 产生的原因可能是前 4 周作物要生长, 和 TZh51 竞争土壤中的碳源、氮源以及其他营养元素, TZh51 降解能力和菌体生长受到抑制; 后 4 周时, 作物根系已经非常发达, 能分泌并释放根际分泌物和酶, 来刺激根际 TZh51 的活性和生物转化作用^[20]。第 8 周时, 对照中的菲、荧蒹和芘的残留量明显高于 4 个处理, 这说明生物修复起到很重要的作用。处理 4 与处理 2 的不同之处在于,

前者种植的作物是玉米,后者是小白菜。玉米的根系发达程度远好于小白菜,使得玉米的修复效果要好于小白菜^[19, 20]。这是产生现象(4)的主要原因。

为比较 TZh51 在 4 个处理间 2、4、6 和 8 周的菌体数量(S),以及到第 8 周对菲、荧蒹和芘的降解率(F),绘制了菌体数量和菲、荧蒹和芘的降解率柱状图(图 4)。

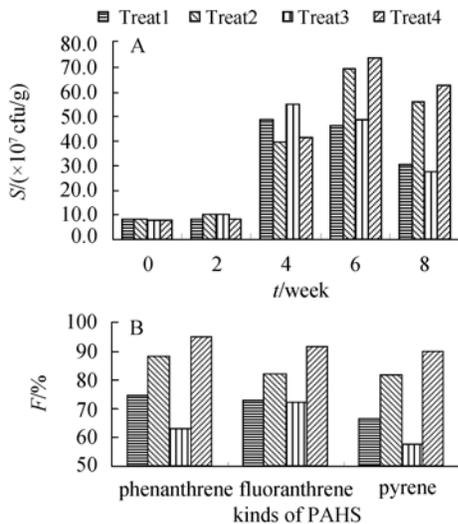


图 4 处理间对污染土壤生物修复的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on PAHs-contaminated soil bioremediation.

根据图 4-A, TZh51 菌剂初始接入土壤时,在每克干土中 4 个处理间的菌体数量为 $7.6 \times 10^7 \sim 8.4 \times 10^7$ 个菌落数;第 2 周时,处理间菌体数量变化不明显,可能是 TZh51 要适应土壤的生态环境所致;第 4 周时,4 个处理的菌体数量明显增长,但未种植作物的菌体数量大于种植作物的处理;第 6 周时,种植作物的处理菌体数量仍继续增长,在每克干土中的平均值达到 7.2×10^8 个菌落数(处理 2 和处理 4 中 TZh51 的菌体数量平均值),超过处于下降趋势的未种植作物的处理。这种现象可能是在种植作物的处理中,作物根系分泌并释放根际分泌物和酶,促进了 TZh51 的生长。第 8 周时,4 个处理的菌体数量都在下降。

根据图 4-B,菲、荧蒹和芘的降解率与处理有关,种植作物的处理要好于未种植作物的处理。可以清楚地看出,种植作物的处理中,菲、荧蒹和芘的降解率分别达到 91.4%、86.9%和 85.8%(处理 2 和处理 4 中菲、荧蒹和芘降解率的平均值);而未种植作物的处理中,3 种 PAHs 的降解率分别为 76.4%、72.3%和 62.0%。

从整个修复效果来看,种植作物的处理生物修复的效果好于未种植作物的处理。在前者中, TZh51 的菌体数量增长时间长;到第 8 周时,菲、荧蒹和芘的降解率明显高于未种植作物的处理。

3 结论

(1) TZh51 在 4 株芘降解菌中降解 PAHs 的能力较强,并且降解芘的能力也强于 M11;

(2) 经过传统的表型观察、生理生化特性和 16S rDNA 的序列同源性分析, TZh51 被鉴定为分枝杆菌属,但与 M11 为不同的种;

(3) TZh51 与作物联合修复污染土壤时,菌体数量增长时间长,菲、荧蒹和芘的降解率高;修复效果明显强于未种植作物的处理。

参 考 文 献

- [1] 葛成军,安琼,董元华.钢铁工业区周边农业土壤中多环芳烃(PAHs)残留及评价.农村生态环境(Rural Eco-Environment), 2005, 21(2): 66-69.
- [2] Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mut*, 2005, 45: 106-114.
- [3] 王佩华.持久性有机污染物对人类及环境的危害.环境科学与管理(Environ Sci Manag), 2006, 31(1): 96-99.
- [4] Erickson RJ, Ankley GT, DeFoe DL, et al. Additive toxicity of binary mixtures of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons to the oligochaete lumbricus variegates. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 154: 97-105.
- [5] Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Environ Pollut*, 1993, 81(3): 229-249.
- [6] Tausson WO. Ueber die Oxydation der Wachse durch Microorganismen. *Biochem*, 1928, 88: 83-92.
- [7] Hetikamp MA, Franklin W, Cernigia CE. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *App Environ Microbiol*, 1988, 54(6): 1612-1614.
- [8] Heitkamp MA, Freeman JP, Miller DW, et al. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *App Environ Microbiol*, 1988, 54: 2556-2565.
- [9] Kim SJ, Kweon O, Jones RC, et al. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *J Bacteriol*, 2007, 189(2): 464-472.
- [10] Kweon O, Kim SJ, Jones RC, et al. A polyomic approach To elucidate the fluoranthene degradative pathway in *Mycobacterium*

- vanbaalenii* PYR-1. *J Bacteriol*, 2007, 189(13): 4635–4647.
- [11] Leyval C, Binet P. Effect of poluaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *J Environ Qual*, 1998, 7: 402–407.
- [12] 邹德勋, 骆永明, 徐凤花, 等. 土壤环境中多环芳烃的微生物降解及联合生物修复. *土壤(Soils)*, 2007, 39(3):334–340.
- [13] 桑伟莲, 孔繁翔. 植物修复研究进展. *环境科学进展(Advan Environ Sci)*, 1999, 7(3): 40–44.
- [14] 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. *环境科学(Environ sci)*, 2008, 29(3): 763–768.
- [15] Alley JF, Brown LR. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(1): 439–442.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001.
- [17] 庄玉辉, 王国志, 翟秉祥, 等. 结核病诊断细菌学检验规程. 北京: 中国防痨协会. 1995.
- [18] 罗雪梅, 刘昌明, 何孟常. 土壤与沉积物对多环芳烃类有机物的吸收作用. *生态环境(Ecol Environ)*, 2004, 13(3): 394–398.
- [19] 占新华, 周立洋. 多环芳烃(PAHs)在土壤-植物系统中的环境行为. *生态环境(Ecol Environ)*, 2003, 12(4): 487–492.
- [20] 刘世亮, 骆永明, 曹志洪, 等. 多环芳烃污染土壤的微生物与植物联合修复研究进展. *土壤(Soils)*, 2002, 5: 257–265.

Isolation, identification of a pyrene-degrading *Mycobacterium* sp. strain TZh51 and its characteristics for contaminated soil bioremediation

Baoliang Jia^{1, 2}, Bingquan Fan^{1*}, Xinhua Sui², Mingbo Gong¹

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

⁽²⁾ Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: [Objective] To obtain pyrene-degrading microorganism strains, and to use them for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil. [Methods] pyrene-degrading strains were isolated by agar plate subliming method. They were identified based on morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and on analysis of their 16S rDNA gene sequence homology. Their ability to degrade PAHs in solid and liquid mineral salt medium, and in PAHs-contaminated soil, was studied by counting their live cells and measuring residual PAHs' quantity by HPLC. [Results] Four pyrene-degrading strains TZh51, TZh52, TG42 and TG52 were isolated. The results indicated that TZh51's ability to degrade PAHs was stronger than the other three strains. TZh51 was identified as *Mycobacterium* sp.; however, it did not belong to the same species with the reported *Mycobacterium* sp. strain M11. Our results indicated that the effects on maximal pyrene-degrading quantity were incubation temperature at 35 °C and pyrene film thickness for 130ng/mm² when TZh51 was incubated on solid mineral salt medium coated with pyrene films. When TZh51 was incubated in liquid mineral salt medium containing 50 and 100 mg/L pyrene, 91.9% and 71.8% pyrene was degraded after 6 days. On the 10th day, maximal vital cells reached 2.0×10⁸ and 6.0×10⁸ cfu/mL, respectively. TZh51's ability to degrade pyrene was stronger than strain M11. Moreover, TZh51's vital cells reached 7.2×10⁸ cfu/g dry soil on the 6th week and 91.4% phenanthrene, 86.9% fluoranthrene and 85.8% pyrene was degraded after 8 weeks, when both TZh51 and plants were used for bioremediation of PAHs-contaminated soil. [Conclusion] TZh51 had strong ability to degrade PAHs. In addition, combined bioremediation of TZh51 and plants was effective for PAHs-contaminated soil bioremediation.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs); pyrene; identification; bioremediation; mycobacterium