

## · 研究报告 ·

**潘涛** 理学博士，江西理工大学资源与环境工程学院副教授，环境与生物工程系副主任。江西省科技特派员，江西理工大学清江优秀人才。近年来，主要从事环境微生物学方面的教学和科研工作，主攻环境有机污染物的微生物修复。针对疏水性的有机污染物问题，重点研究基于介质工程的修复机理以及环境胁迫与微生物代谢响应。



# 一株多环芳烃降解菌及其在多种强化体系中降解菲的潜力

刘聪洋<sup>1</sup>，王美妮<sup>1</sup>，张佳梦<sup>1</sup>，钱柚粉<sup>2</sup>，肖锐<sup>1</sup>，王仁女<sup>1</sup>，董伟<sup>1</sup>，潘涛<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 江西理工大学 资源与环境工程学院江西省矿冶环境污染与控制重点实验室，江西 赣州 341000

<sup>2</sup> 广东省微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室，广东 广州 510070

刘聪洋，王美妮，张佳梦，等. 一株多环芳烃降解菌及其在多种强化体系中降解菲的潜力. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3696-3707.

Liu CY, Wang MN, Zhang JM, et al. A polycyclic aromatic hydrocarbon degrading strain and its potential of degrading phenanthrene in various enhanced systems. Chin J Biotech, 2021, 37(10): 3696-3707.

**摘要:** 多环芳烃是一类普遍的环境污染物，因其潜在的环境暴露和对人类健康的危害而备受关注。从石化品污染土壤样品中分离到一株以菲为唯一碳源和能源的中温菌 (15–37 °C, 最佳 30 °C) 菌株 CFP312。经菌落和菌体形态观察、生理生化测试和 16S rRNA 同源性分析鉴定属于莫拉氏菌 *Moraxella* sp.。这是 *Moraxella* 属中多环芳烃降解菌种的首次报道。研究表明，当菲浓度为 400 mg/L 时，在 48 h 和 60 h 时，菲的去除率分别为 84% 和 90%，降解速率达到 1.21、1.29 mg/(L·h)。在菲的降解过程中，检测到 3,4-二氢-3,4-二羟基菲为中间产物。据此推断降解菌通过在菲的 3,4 位进行双加氧完成其生物降解的第一个关键步骤。在水-有机溶剂两相分配体系、胶束水溶液体系和浊点体系中检测了降解菌对不同的菲强化降解体系的适应性。结果表明，降解菌对不同降解体系都表现出了良好的适应性。另外，降解菌可在泥浆-水体系中快速降解污染土壤中的多环芳烃菲，表明其在环境修复方面具有很大的应用潜力。

**关键词:** 多环芳烃，生物降解，菲，莫拉氏菌，泥浆

**Received:** March 15, 2021; **Accepted:** June 17, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21866015, 21407070), Natural Science Foundation of Jiangxi Province, China (No. 20192BAB203016), Program of Qingjiang Excellent Young Talents in Jiangxi University of Science and Technology, China (No. JXUSTQJYX2019011).

**Corresponding author:** Tao Pan. Tel/Fax: +86-797-8312431; E-mail: t.pan@jxust.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21866015, 21407070)，江西省自然科学基金 (No. 20192BAB203016)，江西理工大学清江青年英才支持计划资助 (No. JXUSTQJYX2019011) 资助。

# A polycyclic aromatic hydrocarbon degrading strain and its potential of degrading phenanthrene in various enhanced systems

Congyang Liu<sup>1</sup>, Meini Wang<sup>1</sup>, Jiameng Zhang<sup>1</sup>, Youfen Qian<sup>2</sup>, Kun Xiao<sup>1</sup>, Rennü Wang<sup>1</sup>, Wei Dong<sup>1</sup>, and Tao Pan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Jiangxi Province Key Laboratory of Mining and Metallurgy Environmental Pollution Control, School of Resource and Environmental Engineering, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou 341000, Jiangxi, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, Guangdong, China

**Abstract:** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of common environmental pollutants that pose threats to human health. In this study, a mesophilic bacterial strain CFP312 (grown at 15–37 °C, optimal at 30 °C) was isolated from PAHs-contaminated soil samples. It was identified as *Moraxella* sp. by morphological observation, physiological and biochemical test, and 16S rRNA gene phylogeny analysis. This is the first reported PAHs degrading strains in *Moraxella*. Degradation analysis showed that 84% and 90% of the loaded phenanthrene (400 mg/L) were degraded within 48 h and 60 h, and the degradation rates reached 1.21 and 1.29 mg/(L·h), respectively. During the degradation of phenanthrene, phenanthrene-3,4-dihydrodiol was detected as an intermediate. Based on this, it was proposed that double oxygenation at the positions 3 and 4 of phenanthrene was the first step of biodegradation. Adaptability of strain CFP312 to different enhanced phenanthrene-degradation systems was tested in aqueous-organic system, micellar aqueous system, and cloud point system. Strain CFP312 showed good adaptability to different systems. In addition, the bacterium can rapidly degrade the phenanthrene in contaminated soil in slurry-aqueous system, indicating great potential in environmental remediation.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons, biodegradation, phenanthrene, *Moraxella*, slurry

多环芳烃是一类疏水性有机污染物, 通常吸附于土壤颗粒罅隙内或与稠密的非水相液体 (如杂酚油或煤焦油) 混溶引入地下, 是典型的持久性污染源<sup>[1]</sup>。由于具有致癌性、致突变性和致畸性, 多环芳烃成为人们广泛关注的污染物<sup>[2]</sup>。微生物降解是处理多环芳烃污染的主要手段<sup>[3]</sup>。自然界中, 能利用多环芳烃的细菌主要分布于变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门<sup>[4]</sup>。大多数关于多环芳烃生物降解的研究都与假单胞菌属、分枝杆菌属和希瓦氏菌属的细菌有关, 例如恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* ATCC 17514<sup>[5]</sup>、分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. strain PYR-1<sup>[6]</sup>、希瓦氏菌 *Shewanella* sp. 13-24<sup>[7]</sup>等。然而, 莫拉氏菌属 *Moraxella* 中可以降解多环芳烃的菌株尚未见报道, 即使有关环境有机污染物 *Moraxella* 属生物

降解菌种的信息也十分有限。几株未鉴定到种的 *Moraxella* sp. 可以分别降解羟基化、甲氧基化和羧基化苯衍生物<sup>[8]</sup>, 苯二甲酸盐、水杨酸盐<sup>[9]</sup>和 2,6-二磺酸萘<sup>[10]</sup>等。其中, 虽然 *Moraxella* sp. ASL4 能够以多环芳烃萘的衍生物 2,6-二磺酸萘和 1,6-二磺酸萘为底物, 但是该菌对萘本身的降解活性低于 5%<sup>[10]</sup>。

强疏水性及在环境中的赋存状态, 导致了多环芳烃的生物利用度极低, 造成了污染的持久性。因此, 各种强化修复手段被发展以促进多环芳烃的快速降解<sup>[11]</sup>。其中, 添加非水相溶剂形成的水-有机溶剂两相分配体系 (Aqueous-organic two-phase systems, AOTS)<sup>[12-14]</sup>、添加化学或生物表面活性剂形成的胶束水溶液体系 (Micellar aqueous system, MAS)<sup>[15-16]</sup>和添加浊点低于室温

的非离子表面活性剂形成的浊点体系 (Cloud point system, CPS)<sup>[17-18]</sup>, 得到广泛应用。然而, 目前有相当数量降解多环芳烃的微生物菌种无法适应这些强化修复手段, 因此难以实际应用。由低浓度表面活性剂 Triton X-100 形成的 MAS 中, 一株假单胞菌和一株分枝杆菌对固体萘的降解被抑制<sup>[19]</sup>。Pan 等发现, 相比 CPS, MAS 对鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas polyaromaticivorans* 降解菲产生了更强的细胞毒性<sup>[20]</sup>。因此, 对于新发掘的多环芳烃生物降解微生物菌种资源, 测试其对这些强化修复手段的适应性, 是判断其应用潜力的主要依据。

本研究从石化污染土壤中分离出一株以菲为唯一碳源和能源的多环芳烃降解菌。通过生理生化、菌落与菌体形态和 16S rRNA 基因同源性分析, 综合判断其分类。优化菲降解条件并通过代谢产物分析, 判断其降解机理。最后, 探索该菌株在不同降解体系中对菲的降解情况, 分析其应用潜力, 为后期菲污染土壤生物修复的工程实践提供理论和应用依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

菲, 色谱纯, 购自国药控股化学试剂有限公司; 槐糖脂 SL50, 浓度 500 g/L, 纯度 95%, 购自青岛新科绿环生物科技有限公司; 邻苯二甲酸二辛酯 (Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)、Triton X-114 及其他化学试剂皆为分析纯。

### 1.2 培养基

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.0。LB 固体培养基在此配方上添加 20 g 琼脂粉制成。LB 培养基主要用于培养种子液和斜面菌种保藏。

无机盐培养基 (Minimal salt medium, MSM):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g,

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001 g,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{FeCl}_3\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.005 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.2。在 MSM 中添加菲后用于生物降解实验。

### 1.3 土壤样品采集

从江西省赣州市周边长期受石化品污染的土壤中采集样品, 采集深度为 5–10 cm。随机采集 3 个点, 每点采集 50 g 土壤样品。样品用灭菌自封袋密封后, 置于 4 °C 冰箱保存。

### 1.4 菲降解菌分离

取 20 g 混合土样加入到含有 100 mL 无菌水和少量灭菌玻璃珠的 250 mL 三角瓶中, 在 30 °C、150 r/min 的恒温摇床内振荡 30 min 后, 静置一段时间, 将上清液用 4 层无菌纱布过滤杂质。滤液经 0.45 μm 滤膜抽滤后, 用少量无菌水将菌膜洗脱后, 加入到菲起始浓度为 100 mg/L 的 MSM 中, 30 °C、150 r/min 培养至溶液浑浊或变色。取 10% 培养液转移至新的 MSM 中, 菲以 100 mg/L 为梯度逐渐提高到 400 mg/L, 富集培养完成。采用平板涂布、划线分离得到纯菌种。选择菲降解率最高的一株细菌, 4 °C 冰箱保存。

### 1.5 菌种鉴定和保藏

形态特征鉴定: 将降解菌划线于含有菲的 MSM 固体平板上, 30 °C 培养 48 h 后观察菌落形态特征。采用细菌革兰氏染色法判断该降解菌的革兰氏类型。利用扫描电子显微镜 (Scanning electron microscope, SEM) 观察降解菌的显微结构。

生理生化鉴定: 参考《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[21]</sup> 和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup> 鉴定降解菌的生理生化指标, 包括糖发酵、ONPG 测定、VP 实验、吲哚实验、明胶水解、接触酶、氧化酶、精氨酸双水解酶、氨基酸脱羧酶、尿素酶、柠檬酸盐利用、产硫化氢、硝酸盐还原、反硝化和产氮测定。

16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析: 采用细菌 16S rRNA 基因通用上下游引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增降解菌的 16S rRNA 基因。测序由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成, 测序结果采用 NCBI-BLAST 进行同源分析, 系统发育树采用 MEGA-X 软件构建。

### 1.6 菲降解条件的优化

在水溶液体系中, 测试降解菌对菲降解的最佳条件。分别以 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C、40 °C、45 °C 作为温度实验组, 以 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.5、11.5 作为 pH 实验组, 以 50、100、150、200、250、300 r/min 作为摇床转速实验组, 以 100、200、400、600、800、1 200 mg/L 的菲浓度作为底物耐受性实验组。以上各组实验, 每组设置 3 个平行, 对照组加菲但不接种降解菌, 150 r/min 摇床避光培养 48 h 后, 检测细胞生长和菲的残留。

### 1.7 代谢产物分析

在最佳菲降解条件下, 分别取 50 mL 降解前期和降解后期的细胞培养液, 混合后经二氯甲烷萃取、HCl (1:5, V/V) 调酸、2 mol/L NaOH 调碱、无水硫酸钠干燥以及硅烷化 (BSTFA 和 TMCS, 体积比: 99/1) 等步骤后, 利用气相色谱-质谱联用 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 检测菲代谢产物。

### 1.8 降解体系

在 MSM 基础上, 添加不同试剂或材料后制成不同的降解体系。以下体系中, 未加特殊说明时, 菲的浓度皆为 400 mg/L。

水溶液体系 (Aqueous system, AS): 取 1 个 500 mL 的已灭菌干燥三角瓶, 在瓶底添加 3 mL 菲浓度为 20 g/L 的菲-二氯甲烷母液。缓慢转动三角瓶, 使母液均匀分布在三角瓶瓶底。待二氯甲烷完全挥发, 瓶底出现一层透明的菲晶体层。向

体系中加入 150 mL MSM, 并接种降解菌, 30 °C、150 r/min 避光培养。

AOTS: 采用改进的恒定界面面积法进行设置<sup>[23]</sup>。具体为: 取 1 个 500 mL 的三角瓶, 装入 150 mL MSM。取 1 根通心试管 (上下平齐开口, 管底部对称切割 4 个宽 2 mm 深 4 mm 的凹槽, 以允许管内外液体交换), 插入到液面以下。将 0.1 g 菲溶解到 2 mL DEHP 中后转移到试管内液面上方。接种后置于磁力搅拌器上, 30 °C 避光培养。

MAS: 在水溶液体系中, 添加浓度为 5 个临界胶束浓度 (Critical micelle concentration, CMC) 的槐糖脂。接种降解菌后, 30 °C、150 r/min 避光培养。

CPS: 在水溶液体系中, 加入 20 g/L 非离子表面活性剂 Triton X-114 形成浊点系统。降解试验在 30 °C、150 r/min 避光条件下进行。

### 1.9 菲污染土壤修复

采用泥浆-水体系 (Slurry-aqueous system, SAS), 利用 CPF312 修复多环芳烃菲污染土壤。取石化品污染土壤风干后过 100 目筛去除沙砾等杂质。取 18 g 土置于 50 mL 塑料离心管中, 再加入 0.4 mL 30 g/L 菲二氯甲烷溶液母液。随后, 利用漩涡混匀仪将离心管中的菲二氯甲烷溶液与土壤混匀。待二氯甲烷挥发完全后, 将菲污染土壤避光保存 7 d 使菲老化。取 15 g 菲老化土壤加入到 250 mL 锥形瓶中, 加入 35 mL MSM 培养基, 土水比为 3:7。系统中, 菲总浓度约为 200 mg/L。CFP312 菌种经 LB 培养基活化后, 调  $OD_{600}$  值为 0.5 后接种 1 mL 到 SAS 系统中。随后, 将 SAS 降解体系置于 30 °C、150 r/min 避光培养 3 d。

### 1.10 取样、分析和检测方法

对于以上 4 种降解体系, 培养完成后, 取 1 mL 水相培养液, 置于 1.5 mL 塑料离心管中于 8 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液。细胞沉淀用蒸馏水洗涤 3 次后, 用蒸馏水重悬, 并采用双

光束紫外可见分光光度计 (760 CRT, 上海精密科学仪器有限公司) 在 600 nm 处检测细胞的光密度值 (Optical density, *OD*)。

AS 中菲的检测: 培养完成后, 弃去上清液, 用适量乙腈溶解瓶底吸附的残留菲, 适当稀释后经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后检测。

MAS 中菲的检测: 除需要考虑瓶底吸附的菲以外, 还要考虑被胶束增溶到水相中菲的残留情况。培养完成时, 取 0.2 mL 水相培养液加入 0.8 mL 乙腈于 1.5 mL 塑料离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min 后取 0.8 mL 上清液用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后检测残留菲。

AOTS 中, 菲主要存在于有机相中。因此, 培养结束后, 用移液枪吸取 0.1 mL 有机相溶解于 0.9 mL 乙腈中, 过滤除菌后检测残留菲。

CPS 中, 瓶底的菲已全部被增溶到溶液中。培养结束时, 单手握持并晃动三角瓶保持体系均匀混合, 然后用移液枪吸取 0.1 mL 培养液溶解于 0.9 mL 乙腈中, 过滤除菌后检测残留菲。

SAS 中, 上清液中菲的测定: 将泥浆样品转移至 1.5 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min, 取 0.6 mL 体积上清液和等体积乙腈混合, 然后将混合液过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜后检测菲含量; 土壤中菲的测定: 将锥形瓶中泥浆样品装入 50 mL 离心管内, 5 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心后倒去上清液, 将 10 g 土壤沉淀经冷冻干燥后, 取 3 g 冻干土置于 100 mL 三角瓶中。随后, 参考 Reid 等的方法<sup>[24]</sup>, 加入 25 mL 羟丙基- $\beta$ -环糊精, 150 r/min 振荡 20 h 提取土壤中可生物利用的残留菲。取 1.5 mL 上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后用于检测菲的含量。

菲浓度利用 Agilent 1260 高效液相色谱 (Agilent 公司, 美国) 进行分析。具体条件为: C18 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 150 mm $\times$ 4.6 mm), 紫外检测器, 检测波长为 254 nm, 乙腈: 水 (80:20) 作为流动相, 流速为 1 mL/min, 菲的保留时间为 2.7 min。菲降解率的计算公式如下:

降解率 (%)=(菲残留浓度/菲起始浓度) $\times$ 100。

菲的降解速率如下表示:

降解速率 (mg/(L·h))=(菲起始浓度-菲残留浓度)/时间。

GC-MS 检测菲代谢产物采用 Agilent 5977A-7890B 气相色谱-质谱联用仪 (Agilent 公司, 美国)。气相色谱条件: 色谱柱 HP-5 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ) 弹性石英毛细管柱。升温程序: 初始温度 60  $^{\circ}\text{C}$ , 以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 180  $^{\circ}\text{C}$ , 保持时间 1 min, 运行时间 9 min; 再以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升温至 300  $^{\circ}\text{C}$ ; 保持 10 min, 运行时间 31 min; 传输线温度 280  $^{\circ}\text{C}$ ; 不分流进样, 进样量 1  $\mu\text{L}$ ; 载气为氦气 (纯度 99.999%), 流量 1 mL/min; 溶剂延迟 4.0 min。质谱条件: 电子轰击 (EI) 离子源; 离子源温度 230  $^{\circ}\text{C}$ , 四极杆温度 150  $^{\circ}\text{C}$ , 质子扫描范围  $m/z$  (质荷比) 为 40-500。

## 2 结果与分析

### 2.1 菲降解菌的分离

经过富集培养、稀释涂布及划线纯化等步骤, 分离出一株菲降解菌, 命名为 CFP312。该菌以多环芳烃菲为唯一碳源和能源。在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0、150 r/min 条件下培养 48 h, 该菌可以将菲从 400 mg/L 降到 64 mg/L, 降解率为 84 %。

在 LB 平板上, CFP312 的菌落呈现白色略黄、圆形、个头较小、略显透明、表面光滑湿润、易于挑起、边缘齐整、有光泽。革兰氏阴性, 不产芽孢 (图 1A-B)。扫描电镜下观察到细胞为长杆状, 菌体大小 (0.6-0.8)  $\mu\text{m}\times$ (2.2-2.7)  $\mu\text{m}$ , 好氧 (图 1C-D)。

### 2.2 生理生化与分子生物学鉴定

CFP312 菌株不能发酵 D-葡萄糖、D-甘露醇、肌醇、D-山梨醇、L-鼠李糖、蔗糖、D-(+)-蜂蜜二糖、苦杏仁苷、L-阿拉伯糖、D-(+)- $\alpha$ -乳糖、D-木糖等 11 种糖类。柠檬酸盐利用、明胶水解、吡啶实验、VP 实验、产硫化氢、产氨以及  $\beta$ -半乳糖苷酶、精氨酸双水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱

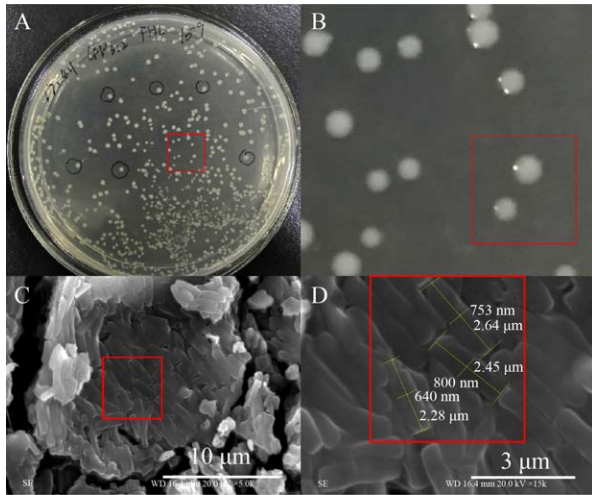


图1 CFP312 菌落形态 (A、B) 和菌体 SEM 图像 (C、D)  
Fig. 1 Morphological observation of strain CFP312. (A–B) A photograph of the colony on LB medium. (C–D) A scanning electron micrograph of the strain.

羧酶和尿素酶等皆为阴性。接触酶和氧化酶阳性，能够还原硝酸盐为亚硝酸盐和将硝酸盐反硝化为氮气。

利用 NCBI-BLAST 对降解菌 16S rRNA 基因进行同源性分析时发现，CFP312 与 *M. osloensis*

的同源性达到 99%。说明该菌在分子系统分类学上应归属于 *Moraxella* 属。利用 MEGA-X 软件，采用 NJ 法构建 CFP312 的系统发育树如图 2 所示。因此，结合该降解菌菌落形态、菌体大小和生理生化等特征，综合推断该菌株为 *Moraxella* sp.。将 CFP312 的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank 数据库获取基因登录号为 MK283753。随后，菌种已送至广东省微生物菌种保藏中心 (GDMCC) 保藏，保藏编号为 GDMCC 60595。

### 2.3 菲代谢机理分析

GC-MS 分析结果如图 3 所示，除底物菲外，还检测到了 3,4-二氢-3,4-二羟基菲 (Phenanthrene-3,4-dihydrodiol)。目前，有关菲的有氧代谢途径，最关键的第一步加氧反应有 4 种途径，分别由菲-1,2-双加氧酶、菲-3,4-双加氧酶、菲-9,10-双加氧酶和菲-9,10-单加氧酶催化完成<sup>[25]</sup>。据此推断，降解菌 CFP312 是通过在菲的 3,4 位进行双加氧随后开环并进一步降解的 (图 3)。这说明降解菌主要通过 3,4 位双加氧途径降解菲并将其作为唯一的碳源和能源。

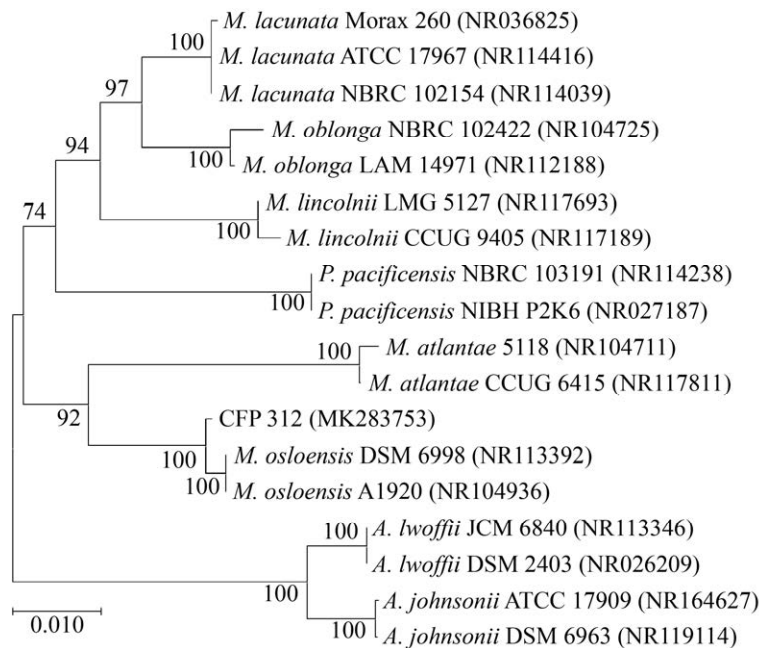


图2 菌株 CFP312 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA genes of strain CFP312.

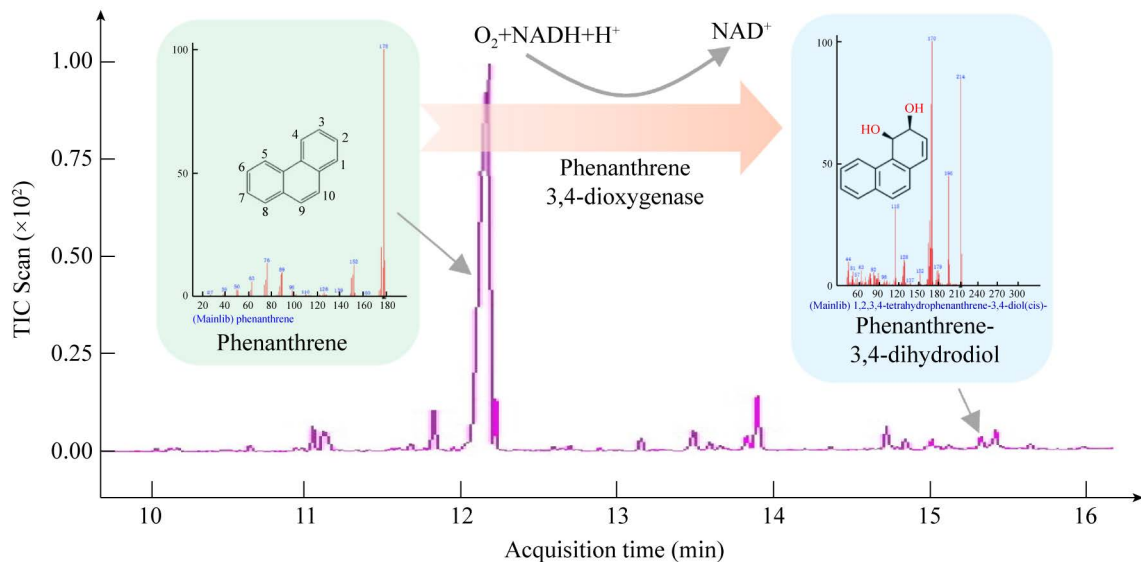


图3 菲代谢产物的GC-MS检测及开环催化步骤

Fig. 3 GC-MS spectra of phenanthrene metabolites and the proposed ring-opening reaction.

#### 2.4 菲降解条件的优化

温度对降解菌 CFP312 的影响如图 4A 所示。该菌株对高温比较敏感，当培养温度超过 40 °C 时，细胞生长和菲降解都受到明显的影响。相比之下，低温更适合该菌的生长。即使培养温度低至 15 °C，菲的降解率也能达到 50% 左右。这可能与降解菌来源于土壤有关。一般情况下，土壤温度相对较低。菌株对碱性 pH 的耐受性比较宽泛，pH 7.0–10.0 之间能保持 60% 以上的菲降解率且细胞生长良好 (图 4B)。酸性条件 (pH 6.0) 下，细胞生长和菲降解明显下降。细胞生长和菲降解随着摇床转速升高而逐步增加，但总体来说，影响不大 (图 4C)。这可能和三角瓶中培养基总量不多、溶氧消耗不大有关。菲浓度在 100–600 mg/L，菲降解率超过 80% (图 4D)。而非菲浓度超过 800 mg/L 以后，48 h 的降解率已降到 50% 以下，但菌体生长并未受到影响。这表明该降解菌对高浓度菲耐受性较好，若进一步延长培养时间，应该可以获得更高的降解率。综合以上结果，CFP312 降解菲的最佳条件为：温度 30 °C、pH 7.0、摇床转速 150 r/min、菲的底物浓度 400 mg/L。

在最佳条件下，降解菌在 AS 中的细胞生长曲线和菲的生物降解曲线如图 5 所示。前 24 h，细胞增殖很快并伴随着菲的快速生物降解。随后，菲的降解趋缓而细胞增殖也开始减慢。总体上，细胞生长和菲呈现负相关，表明该菌株利用菲进行生长。培养到 60 h，菲在 AS 系统中的残留少于 30 mg/L，降解率超过 90%。在 48 h 和 60 h 时，菲的降解速率分别为 2.00、2.14 mg/(L·h)。在表 1 所列的菲降解菌株中，Mishra 等报道刘志恒菌 *Zhihengliuella* sp. ISTPL4 在第 3、7 天时，对 250 mg/L 菲的降解速率分别达到了 1.21、1.29 mg/(L·h)<sup>[26]</sup>。而假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 能将 300 mg/L 菲的降解速率提高到 1.78 mg/(L·h)<sup>[27]</sup>。相比之下，菌株 CFP312 对无机盐培养基中菲的降解效率明显更高。

#### 2.5 降解菌在不同体系中对菲的生物降解

如图 6 所示，培养 48 h 后，与 AS 系统相比，AOTS 中菲的降解和细胞生长都显示出明显的滞后。这可能与 AOTS 系统中有限的传质界面有关。细胞在 MAS 和 CPS 系统中的生长与在 AS 中没有显著的差别，说明 MAS 和 CPS 中表面活性剂

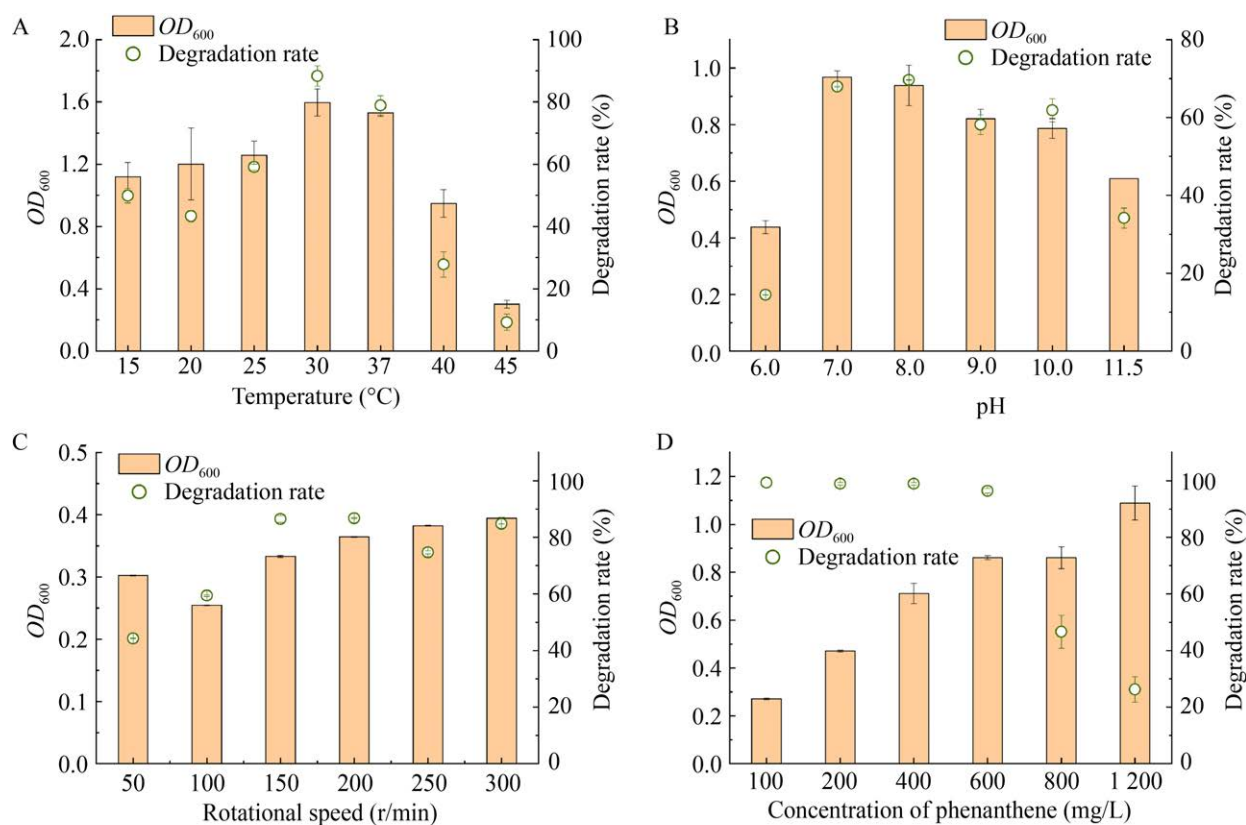


图4 不同因素对菌株 CFP312 降解菲的影响

Fig. 4 Effects of different factors on the degradation of phenanthrene by strain CFP312.

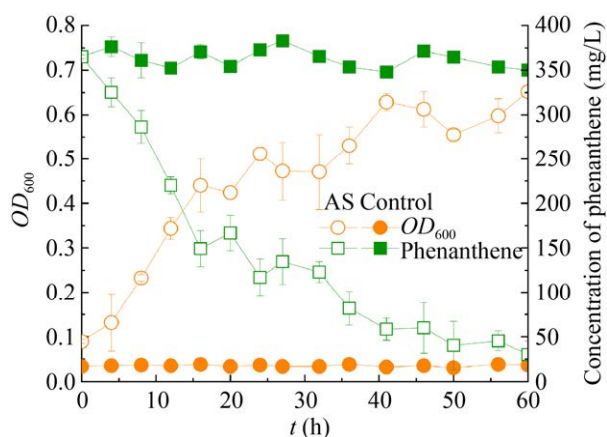


图5 菌株 CFP312 的细胞生长和菲的降解曲线

Fig. 5 Cell growth and phenanthrene degradation profile strain of CFP312.

的添加不会抑制菌株 CFP312 的生长。但菲在 CPS 中的降解率明显更低，这可能是因为部分菲被增溶到浊点系统中的凝聚层相后，不能被水相中的细胞摄取。总的来说，MAS 中降解菌保持较高细

胞增长的同时完成了菲的高效降解，表明降解菌具有利用表面活性剂强化其原位处理土壤菲污染的潜力。

## 2.6 降解菌菲污染土壤的生物修复

如图 7 所示，培养 3 d 后，与对照相比，添加了菌株 CFP312 的 SAS 中，无论是上清液还是土壤中，可生物利用的菲明显残留更少。上清液中，可生物利用的菲从 1.8 mg/L 下降到 0.6 mg/L 左右；而在土壤中，可生物利用的菲从 120 mg/L 降低到 50 mg/L 左右。这充分说明，降解菌的添加强化了污染土壤中菲的降解。

## 3 讨论

*Moraxella* 属可以降解多环芳烃的菌株尚未见报道。本研究从石化品污染土壤中分离到 1 株多环芳烃降解菌，经菌落和菌体形态观察（图 1）、



表 1 不同菌株对菲生物降解的比较

Table 1 Comparison of phenanthrene biodegradation by different strains

Bacterial strains	Initial phenanthrene concentration (mg/L)	Degradation time (d)	Degradation rate (%)	Degradation speed (mg/(L·h))	References
<i>Mycobacterium</i> sp. strain PYR-1	26.7	14	90	0.14	[6]
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> strain 9	50	7	100	0.30	[28]
<i>Mycobacterium</i> SCSH	50	7	100	0.30	[29]
<i>Rhodococcus</i> sp. strain p52	200	9	53	0.63	[30]
<i>Zhihengliuella</i> sp. ISTPL4	250	3, 7	81, 87	1.21, 1.29	[26]
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. DMVP2	300	5	100	1.78	[27]
<i>Moraxella</i> sp. CFP312	400	2, 2.5	84, 90	2.00, 2.14	This study

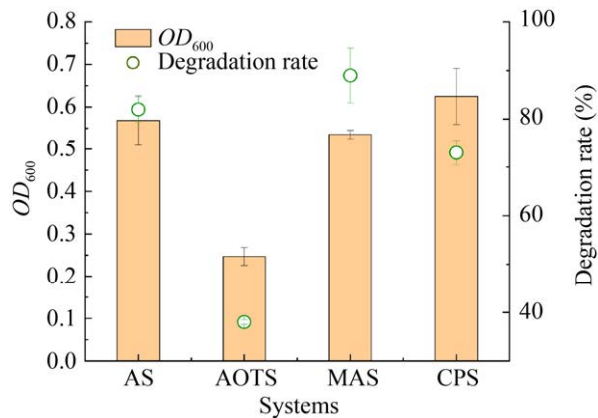


图 6 不同体系中菌株 CFP312 对菲的生物降解

Fig. 6 Biodegradation of phenanthrene by strain CFP312 in different systems.

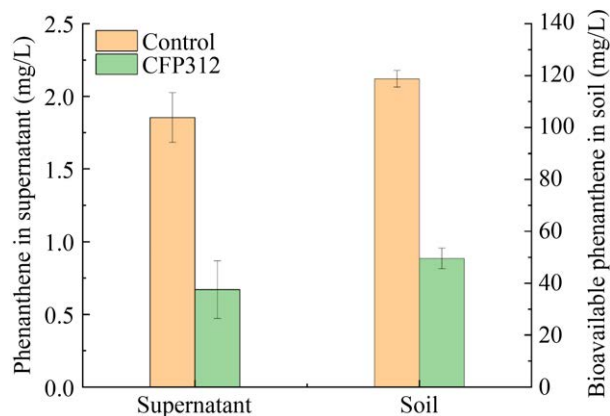


图 7 泥浆水体系中菌株 CFP312 对菲污染土壤的生物修复

Fig. 7 Bioremediation of phenanthrene-contaminated soil by strain CFP312 in slurry-aqueous system.

生理生化检测和 16S rRNA 基因同源性分析 (图 2) 鉴定属于莫拉氏菌 *Moraxella* sp.。在 30 °C、pH 7.2、150 r/min 条件下培养 48 h, 该菌可将 400 mg/L 菲降解 84% 以上。该菌株的发现, 极大地拓宽了 *Moraxella* 属菌种在环境有机污染物治理的应用潜力。

GC-MS 结果表明, 降解菌 CFP312 有可能是利用菲-3,4-双加氧酶将菲氧化, 完成菲生物降解途径的第一个关键步骤 (图 3)。细菌通过 3,4 位双加氧降解菲在环境中是比较普遍的。如 *M. vanbaalenii* PYR-1<sup>[31]</sup>、*Pseudomonas* sp. strain PP2<sup>[32]</sup>、*Zhihengliuella* sp. ISTPL4<sup>[26]</sup> 等。但该途径在 *Moraxella* 属中, 属首次发现。CFP312 的适合生长条件为温度 15–37 °C (最佳 30 °C) 和 pH 7.0–10.0 (最佳 7.0) (图 4A–B)。当环境温度超过 40 °C 时, CFP312 对菲的降解活性显著降低。对于 *Moraxella* 属的已知菌种, 如 *M. osloensis* SUB4, 同样对高温敏感<sup>[33]</sup>。当培养温度超过 40 °C 时, SUB4 的脱色活性明显下降<sup>[33]</sup>。而当培养温度为 25 °C 时, 400 mg/L 菲在 48 h 的降解率降低到了 60% 左右。这主要归因于以下事实: 在高温时, 细菌体内的降解酶系易失活; 而在较低温度下, 酶催化的反应变慢, 导致细胞增殖减缓, 随后菲的降解降低。菲浓度的增高并不影响降解菌 CFP312 的细胞生长 (图 4C)。Patel 等发现 *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 即使在菲浓度高

达 4 000 mg/L 时, 依然代谢旺盛<sup>[27]</sup>。这可能与菲的饱和溶解度低 (1.6 mg/L, 25 °C) 有关。无机盐培养基降解体系中的菲浓度虽高, 但主要以晶体形式存在, 无法直接接触培养基中的游离细胞, 故不影响细胞的生长。

最佳生长条件下, 菌株 CFP312 在 48 h 和 60 h 内, 菲的降解速率分别为 2.00、2.14 mg/(L·h) (图 5)。与已报道的诸多菌种相比 (表 1), 具有高效率的优势。污染物的快速降解, 意味着菌种 CFP312 在环境多环芳烃菲污染治理中, 有极大的应用潜力。菲作为一种疏水性强、半衰期长的难降解有机污染物, 溶解于土壤水系中可供生物利用的部分是极少的<sup>[34]</sup>。通常情况下, 此类污染物或吸附于土壤颗粒罅隙内、或被土壤中非水相溶剂所捕获, 很难被微生物降解<sup>[35]</sup>。AOTS<sup>[36]</sup>、MAS<sup>[20,37]</sup>和 CPS<sup>[18]</sup>是 3 种常见的多环芳烃污染强化降解手段, 旨在克服此类污染物的低生物利用度<sup>[38]</sup>, 应用广泛。

AS、AOTS、MAS、CPS 这 4 种系统中, AS 常用于分析降解菌对晶体菲的生物降解<sup>[6,26-30]</sup>, AOTS 常用于分析降解菌对溶解于疏水性溶剂中菲的生物降解<sup>[13]</sup>, MAS 和 CPS 分别是强化多环芳烃原位和异位生物降解的两种手段<sup>[16,20]</sup>。因此, 检测降解菌 CFP312 是否能适应以上降解系统, 是判断该菌是否具有广泛应用价值的重要前提。如图 6 所示, 降解菌 CFP312 在 MAS 和 CPS 系统中, 细胞生长和菲降解相对较快, 具有良好的适应性。这主要是因为在这两种系统中菲的表现溶解度增加加速了菲向细胞的传质<sup>[20]</sup>。在 AOTS 中, 细胞生长和菲降解受到明显的影响。García-Junco 等通过添加生物表面活性剂, 强化了菲在 AOTS 系统中的生物降解<sup>[15,23]</sup>。然而这一策略是否对降解菌 CFP312 有用, 还有待实验验证。

在 SAS 中测试了 CFP312 对菲污染土壤的降解能力 (图 7)。结果发现, 接种 CFP312 后, 污染土壤中可生物降解的菲明显降低。这说明降解

菌具有实际处理多环芳烃污染土壤的能力。

多环芳烃在环境中污染范围广、影响大, 其生物降解受到强疏水性和低生物利用度等限制。尽管目前已发掘大量可降解多环芳烃的微生物, 但在各种强化修复手段的应用中效果难以估计。菌株 CFP312 不仅具有高效的菲降解能力, 同时适应诸多多环芳烃强化修复方法, 具有可观的应用潜力。

## REFERENCES

- [1] Alegbeleye OO, Opeolu BO, Jackson VA. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environ Manage*, 2017, 60(4): 758-783.
- [2] Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, et al. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 2017, 168: 944-968.
- [3] Peng RH, Xiong AS, Xue Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(6): 927-955.
- [4] Mallick S, Chakraborty J, Dutta TK. Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Crit Rev Microbiol*, 2011, 37(1): 64-90.
- [5] Rodrigues AC, Wuertz S, Brito AG, et al. Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: kinetics and physiological aspects. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90(3): 281-289.
- [6] Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, et al. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(4): 1476-1483.
- [7] Hilyard EJ, Jones-Meehan JM, Spargo BJ, et al. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(4): 1176-1182.

- [8] Vasudevan N, Paulraj LS. Plasmid-mediated degradation of hydroxylated, methoxylated, and carboxylated benzene derivatives in *Moraxella* sp.. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 721: 399-406.
- [9] Rani M, Prakash D, Sobti RC, et al. Plasmid-mediated degradation of o-phthalate and salicylate by a *Moraxella* sp.. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220(2): 377-381.
- [10] Wittich RM, Rast HG, Knackmuss HJ. Degradation of naphthalene-2,6-and naphthalene-1,6-disulfonic acid by a *Moraxella* sp.. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(7): 1842-1847.
- [11] Hwang HM, Hu X, Zhao X. Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2007, 25(4): 313-352.
- [12] 李力, 于波, 许平. 双液相系统中疏水化合物的微生物降解. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(S1): 107-111.  
Li L, Yu B, Xu P. Biodegradation of hydrophobic compound in two-liquid-phase system. *China Biotechnol*, 2005, 25(S1): 107-111 (in Chinese).
- [13] Ortega-Calvo JJ, Alexander M. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(7): 2643-2646.
- [14] 魏连爽, 谢文娟, 林爱军. 两相分配生物反应器治理高浓度有机污染研究进展. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(3): 511-517.  
Wei LS, Xie WJ, Lin AJ. Advance in researches on degradation of organic pollutants with high concentration in a two-phase partitioning bioreactor. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, 18(3): 511-517 (in Chinese).
- [15] García-Junco M, Gomez-Lahoz C, Niqui-Arroyo JL, et al. Biosurfactant-and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(13): 2988-2996.
- [16] Xiao K, Wang RN, Liu CY, et al. Influence of Triton X-100 and  $\beta$ -cyclodextrin on the bioavailability and biodegradation of crystalline phenanthrene covered with biofilms. *Process Biochem*, 2021, 102: 173-179.
- [17] Pan T, Deng T, Zeng X, et al. Extractive biodegradation and bioavailability assessment of phenanthrene in the cloud point system by *Sphingomonas polyaromaticivorans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(1): 431-437.
- [18] Pan T, Wang RN, Xiao K, et al. Continuous degradation of phenanthrene in cloud point system by reuse of *Sphingomonas polyaromaticivorans* cells. *AMB Express*, 2019, 9(1): 1-8.
- [19] Chen P, Pickard MA, Gray MR. Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation*, 2000, 11(5): 341-347.
- [20] Pan T, Liu C, Zeng X, et al. Biototoxicity and bioavailability of hydrophobic organic compounds solubilized in nonionic surfactant micelle phase and cloud point system. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24(17): 14795-14801.
- [21] Balows A. Bergey's manual of determinative bacteriology. eighth edition. *Am J Public Heal*, 1975, 65(3): 315.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.  
Dong XZ, Cai MY. Identification of common bacterial systems manua. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [23] García-Junco M, De Olmedo E, Ortega-Calvo JJ. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environ Microbiol*, 2001, 3(9): 561-569.
- [24] Reid BJ, Stokes JD, Jones KC, et al. Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(15): 3174-3179.
- [25] Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, et al. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Front Microbiol*, 2016, 7: 1369.
- [26] Mishra A, Rathour R, Singh R, et al. Degradation and detoxification of phenanthrene by actinobacterium *Zhihengliuella* sp. ISTPL4. *Environ Sci Pollut Res*, 2020, 27(22): 27256-27267.
- [27] Patel V, Cheturvedula S, Madamwar D.

- Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP<sub>2</sub> isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *J Hazard Mater*, 2012, 201/202: 43-51.
- [28] Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, Naidu R, et al. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: overexpression of amidohydrolase induced by *Pyrene* and BaP. *Sci Total Environ*, 2019, 651(pt 1): 813-821.
- [29] Guo CL, Dang Z, Wong Y, et al. Biodegradation ability and dioxigenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2010, 64(6): 419-426.
- [30] Yang HY, Jia RB, Chen B, et al. Degradation of recalcitrant aliphatic and aromatic hydrocarbons by a dioxin-degrader *Rhodococcus* sp. strain p52. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, 21(18): 11086-11093.
- [31] Stingley RL, Khan AA, Cerniglia CE. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322(1): 133-146.
- [32] Krishnan S, Prabhu Y, Phale PS. o-Phthalic acid, a dead-end product in one of the two pathways of phenanthrene degradation in *Pseudomonas* sp. strain PP2. *Indian J Biochem Biophys*, 2004, 41: 227232.
- [33] Karunya A, Rose C, Valli Nachiyar C. Biodegradation of the textile dye Mordant Black 17 (Calcon) by *Moraxella osloensis* isolated from textile effluent-contaminated site. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(3): 915-924.
- [34] Weissenfels WD, Klewer HJ, Langhoff J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 36(5): 689-696.
- [35] Ortega-Calvo JJ, Birman I, Alexander M. Effect of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries. *Environ Sci Technol*, 1995, 29(9): 2222-2225.
- [36] Lee JY, Kwon TS, Lee YC. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil in a two-phase partitioning bioreactor. *Korean J Chem Eng*, 2017, 34(9): 2418-2422.
- [37] Posada-Baquero R, Grifoll M, Ortega-Calvo JJ. Rhamnolipid-enhanced solubilization and biodegradation of PAHs in soils after conventional bioremediation. *Sci Total Environ*, 2019, 668: 790-796.
- [38] Leech C, Tighe MK, Pereg L, et al. Bioaccessibility constrains the co-composting bioremediation of field aged PAH contaminated soils. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2020, 149: 104922.

(本文责编 郝丽芳)