

## 一株蒽降解细菌的分离及降解特性研究

于瑶瑶 韩伟 王莹莹\*

(南开大学环境科学与工程学院 环境污染过程与基准教育部重点实验室  
天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室 天津 300071)

**摘要:**【目的】从盐碱土壤中筛选蒽降解菌株并分析其降解特性。【方法】采用极度稀释结果流式细胞检测法筛选分离纯化菌株,通过16S rRNA基因序列分析对菌株进行初步鉴定,采用气质联用仪(GC-MS)分析蒽的降解特性。【结果】从盐碱土壤中筛选出一株高效蒽降解菌株。经过16S rRNA基因序列分析,鉴定该菌株为 *Demequina salsinemorus* BJ1。菌株可以利用蒽作为唯一碳源生长,降解率可达92%。在一定浓度范围内,随着蒽浓度的降低,细菌生长速率变快,降解率升高。添加外加碳源后,细菌生长速率明显变快,而对蒽降解率变低。对萃取中间代谢产物的质谱分析表明,降解蒽的中间代谢产物主要有9,10-Anthracenedione(9,10-蒽醌)和Phthalic acid(邻苯二甲酸)等,说明它可能通过邻苯二甲酸途径降解蒽。【结论】筛选得到一株新的耐盐碱蒽降解菌,该菌降解效率高,对修复石油污染的土壤有一定的现实意义。

**关键词:** 蒽, 降解率, 土壤修复, 外加碳源

## Isolation and characterization of an anthracene degradation bacterial strain

YU Yao-Yao HAN Wei WANG Ying-Ying\*

(Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [Objective] We aimed to isolate anthracene-degrading bacterium from saline-alkali soil and analyze its degradation characteristics. [Methods] Extinction dilution was used to isolate and purify the bacterium. Flow cytometry was applied to monitor bacterial growth. Anthracene and metabolites were analyzed by GC-MS. [Results] An anthracene degrading bacterial strain was isolated from highly saline soil. Based on its 16S rRNA gene sequence analysis, the bacteria was identified as *Demequina salsinemorus*. It can use anthracene as sole carbon and energy source. The highest degradation efficiency was 92%. Within a certain concentration range, the bacterial growth rate became faster and the degradation rate increased when the concentration of anthracene was decreasing. After adding exotic carbon source, bacterial growth rate increased significantly. However,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270545); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(No. 12JCZDJC29700)

\*通讯作者: ✉: wangyy@nankai.edu.cn

收稿日期: 2015-02-26; 接受日期: 2015-04-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-08

the degradation efficiency decreased. 9,10-anthracenedione and phthalic acid were identified as the major metabolites. The phthalic acid path way was proposed as the degradation pathway. **[Conclusion]** A bacterial strain with a high anthracene-degrading efficiency was isolated. Our results may have important practical significance for petroleum-contaminated soil remediation.

**Keywords:** Anthracene, Degradation rate, Soil remediation, Exotic carbon source

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类分布于环境中的有毒有害物质,其分子由两个或两个以上苯环组成,具有结构稳定、难生物降解的性质,且大多有致癌、致畸、致突变的三致效应,因此受到严重关注<sup>[1-3]</sup>。多环芳烃在环境中的存在虽然是微量的,但其不断地生成、迁移、转化和降解,并通过呼吸道、皮肤、消化道进入人体,极大地威胁着人类的健康。有研究表明,人类70%–80%的癌症与环境化学致癌物有关,多环芳烃就是一类有代表性的致癌物质<sup>[4]</sup>。它们属于美国环保局公布的129种优先控制污染物,而且全部属于一级污染物<sup>[5]</sup>。

PAHs是石油中芳香族化合物的主要成分,而石油污染常常伴随着盐碱化环境存在<sup>[6]</sup>。目前已报道许多细菌真菌及藻类等都具有降解PAHs的能力<sup>[7-9]</sup>,而高盐碱环境会抑制非耐盐碱微生物的代谢,降低其生物修复效率。因此筛选能够在盐碱环境中高效降解PAHs的微生物,具有重要的现实意义。

蒽是典型的多环芳烃,其在水中的溶解度仅为75  $\mu\text{mol/L}$ ,这大大限制了它的生物可利用性<sup>[10]</sup>,其结构单元在致癌性苯并[a]芘(Ba[a]P)和苯并[a]蒽(Ba[a]A)中同样存在,经常被用作微生物降解PAHs的模型化合物<sup>[11]</sup>。本研究从盐碱土壤中分离到一株蒽的降解菌,对其进行分子生物学鉴定,并分析该菌在不同条件下降解蒽的特性,为PAHs污染的生物修复提供实验依据和理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 土壤:** 采自天津团泊湖地区盐碱土壤。其基本理化性质为: pH 8.54, 全盐 1.2%, 有机质 16.3 g/kg, 全氮 1.18 g/kg, 速效磷 33.23 mg/kg。新鲜土壤过

2 mm 筛,于黑暗 4 °C 保存,以供筛选菌株用。

**1.1.2 蒽的标样:** 蒽购自百灵威科技有限公司,色谱纯。

**1.1.3 培养基:** (1) Bushnell-Haas (BH)无机盐培养基<sup>[12]</sup>(g/L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{CaCl}_2$  0.02,  $\text{FeCl}_3$  0.05。微量元素溶液(g/L):  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0,  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.0,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5.0。无机盐培养基和微量元素溶液添加体积为200:1。调节pH为8.0,盐浓度为2%。(2) 含蒽的无机盐培养基<sup>[13]</sup>: 以丙酮配制10 g/L蒽溶液,0.25 mm 滤膜除菌,取一定量的蒽溶液,置于灭菌三角瓶中,待丙酮完全挥发后,按适当的浓度加入灭菌无机盐培养基中。

### 1.2 方 法

**1.2.1 蒽降解菌的分离纯化:** 称取5 g新鲜土壤,加入装有100 mL无机盐培养基(蒽浓度为50 mg/L)的三角瓶中,根据土样的理化性质,调节pH为8.0,盐浓度2%,30 °C、150 r/min 避光振荡培养10 d。按10%接种量转接到新鲜的含蒽无机盐培养基中,继续培养10 d,重复4次。通过流式细胞技术检测细菌生长情况,荧光染料选用美国Invitrogen公司生产的SYBR Green I。染色方法<sup>[14]</sup>: 取培养液1 mL于流式细胞仪(型号: CyFlow Space,德国Partec公司)专用上样管内,加入10  $\mu\text{L}$  SYBR Green I,振荡混匀,室温下避光静置15 min后上样检测。仪器增益设置为FSC=652,SSC=280,FL1=350,FL3=750,Speed=3。用超纯水适当稀释样品以保证测定过程中流式细胞仪计数速度小于500 cells/s。选择生长最好的培养液进行极度稀释。因菌株具有寡营养特性,无法在平板上形成可见菌落,我们利用极度稀释的方法进行菌株分离纯化<sup>[15]</sup>。极度稀释的培

培养基为无机盐培养基(蕙浓度为 50 mg/L), 在 15 mL 黑盖玻璃瓶中进行, 接种量为 1 cell/bottle, 设 24 个平行样, 培养 10 d, 重复 3 次, 获得纯菌。

**1.2.2 蕙降解菌株的鉴定:** 以降解菌基因组 DNA 为模板, 扩增 16S rRNA 基因, 进行序列分析。DNA 提取按照 QIAGEN 公司的试剂盒[DNAeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (50)]的方法进行。

以降解菌基因组 DNA 为模板, 扩增 16S rRNA 基因。PCR 引物序列<sup>[16]</sup>分别为 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1504R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。PCR 反应体系(50  $\mu$ L)为: 引物 27F 和 1504R (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, Go Taq<sup>®</sup> Colorless Master Mix 2  $\times$  25  $\mu$ L, 基因组 DNA 模板 2  $\mu$ L, 无核酸酶水(Nuclease-Free Water) 21  $\mu$ L。PCR 选用 Bio-Rad S1000<sup>™</sup> Thermal Cycler PCR 仪进行目标基因扩增。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 10 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 65–55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 10 个循环且每个循环退火温度下降 1  $^{\circ}$ C; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 20 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。取 2  $\mu$ L PCR 产物, 用含有 EB 的 1.0% (质量体积比)的琼脂糖凝胶在 1 $\times$ TAE 缓冲液中进行电泳检测。经琼脂糖凝胶电泳检测的 PCR 产物送北京奥科鼎盛公司测序, 测序结果在 GenBank 上进行序列相似性比对分析, 然后利用 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析。

**1.2.3 菌株对蕙的降解特性:** (1) 细菌浓度的测定。蕙的降解在 250 mL 三角瓶中进行, 在 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 避光培养, 每隔 24 h 取样。菌的浓度用流式细胞仪测量。根据以下公式计算细菌生长速率( $\mu$ )<sup>[17]</sup>。 $\mu = [\ln(C_t) - \ln(C_0)] / \Delta t$ 。其中  $C_t$  和  $C_0$  分别为相隔两次取样所测得的细菌浓度,  $\Delta t$  为两次取样间隔的时间。

(2) 细菌的最优生长条件。为了确定细菌降解蕙过程中的最适 pH 和盐浓度, 设计了 2 因素 3 水平实验。正交实验设计见表 1。实验的蕙浓度均为 25 mg/L, 初始接菌浓度为 10<sup>4</sup> cells/mL。

(3) 蕙降解实验。外加碳源实验: 采用葡萄糖作为外加碳源<sup>[18]</sup>。一组培养液中只添加 50 mg/L 蕙, 另一组培养液中同时添加 25 mg/L 蕙和 50 mg/L 葡萄糖,  $TOC_{\text{葡萄糖}}:TOC_{\text{蕙}}=1:1$ 。初始接菌量为 10<sup>4</sup> cells/mL。30  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养, 每 24 h 取一次样, 每次 2 mL, 分析细菌浓度及蕙浓度。

蕙浓度梯度实验: 无机盐培养基中蕙的初始浓度分别为 25、50、75、100 mg/L, 30  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养, 每 24 h 取一次样, 每次 2 mL, 分析细菌浓度及蕙浓度。

**1.2.4 蕙的提取及分析:** 待萃取样品的预处理: 将待测样品在室温下用 6 mol/L 盐酸调节 pH 小于 2.0, 加入 2 mL 甲醇充分混匀, 作为待净化液。固相萃取柱采用 Cleanert S C<sub>18</sub> SPE 小柱(500 g/3 L, 天津博纳艾杰尔科技有限公司), 萃取液用色谱级甲醇定容至 1.5 mL, 再进行气质联用仪(GC-MS)测定。GC-MS 条件<sup>[19]</sup>: 采用安捷伦 Thermo DSQ II 气相色谱-质谱联用仪(质谱仪 Agilent Technologies 5975C; 气相色谱仪为 Agilent Technologies 7890A)。色谱柱为 HP-5 MS 石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m)。进样口温度 280  $^{\circ}$ C; 载气气体为高纯氦气, 流速为 1 mL/min; 进样量为 1  $\mu$ L, 不分流进样; 传输线温度 300  $^{\circ}$ C; 溶剂延迟时间为 6 min; 色谱柱升温程序: 由初始 70  $^{\circ}$ C 按升温速率 15  $^{\circ}$ C/min 升至 150  $^{\circ}$ C, 再以 5  $^{\circ}$ C/min 升至 250  $^{\circ}$ C 并保持 5 min。

表 1 正交实验设计表  
Table 1 Orthogonal design table

| Group | pH   | NaCl concentration (%) |
|-------|------|------------------------|
| 1     | 8.0  | 1                      |
| 2     | 8.0  | 2                      |
| 3     | 8.0  | 3                      |
| 4     | 9.0  | 1                      |
| 5     | 9.0  | 2                      |
| 6     | 9.0  | 3                      |
| 7     | 10.0 | 1                      |
| 8     | 10.0 | 2                      |
| 9     | 10.0 | 3                      |

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

菌株为寡营养细菌,无法在传统平板培养基上生长,利用极度稀释结合流式细胞技术进行了菌株分离纯化。在团泊湖盐碱土中分离纯化出一株耐盐碱的蒽降解菌株,编号为 BJ1。该菌株革兰氏染色阴性,吡啶试验阴性,好氧。流式细胞仪上对菌株的检测见图 1。以菌株 BJ1 的 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 27F 和 1504R 进行 PCR 扩增,所得序列(GenBank 登录号为 KP747457)在 GenBank 中 BLAST 进行同源性比对,发现与 *Demequina* 属相似性最高,与 *Demequina salsinemoris* strain NBRC 105323 有 99% 的相似性,鉴定为 *Demequina salsinemoris* BJ1。选取相关菌株的 16S rRNA 基因序列构建细菌的系统进化树(图 2)。

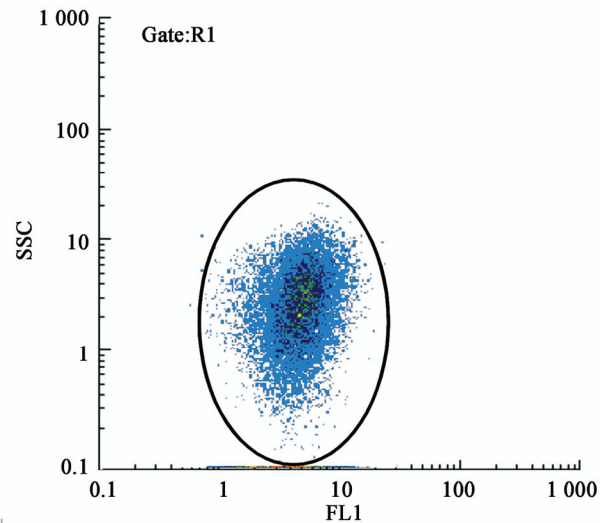


图 1 细菌生长的流式细胞仪检测图

Figure 1 Flow cytometric graph of strain BJ1

注: FL1: 绿色荧光信号; SSC: 侧向角散射光信号。

Note: FL1: Green fluorescence signal; SSC: Sideward scatter signal.

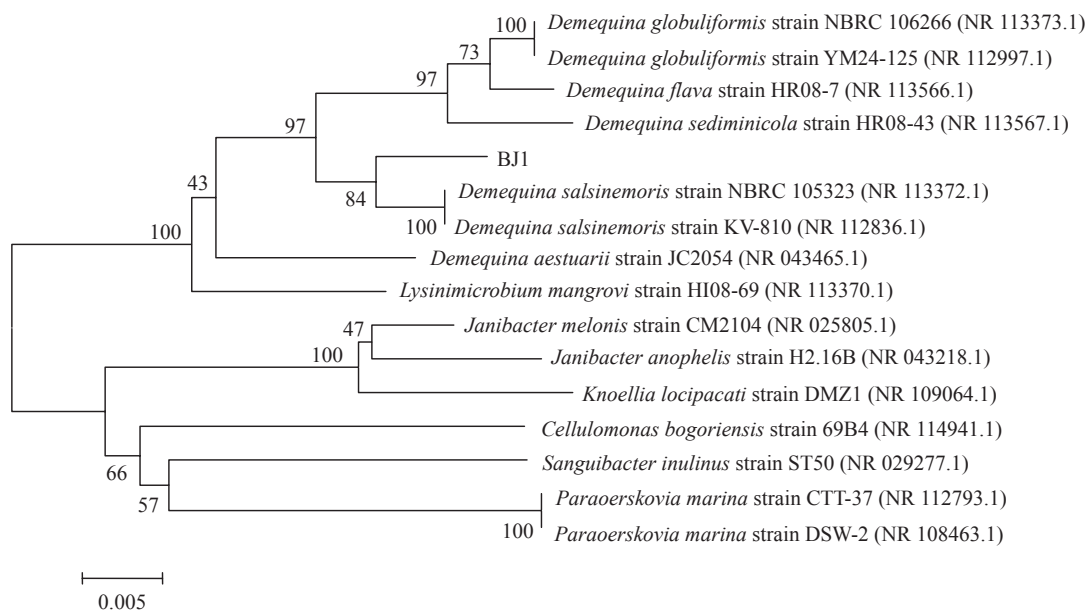


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 BJ1 的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain BJ1 based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号内序号为该物种序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上的序列号, 分支点上的数字表示该分支的支持率, 标尺为该长度表示的物种序列间核苷酸变化率。

Note: Numbers in brackets are serial numbers in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Numbers on branch points are approval ratings of each branch. Scale bar represents the change observed between two sequences.

## 2.2 细菌的最优生长条件

菌株 BJ1 可以在盐碱条件下利用蒽作为唯一碳源生长。细菌在不同 pH 和盐浓度条件下利用蒽作为唯一碳源的生长情况见表 2。从表 2 中可以看出, pH 为 10.0 时, 细菌几乎不生长, 而在 pH 为 8.0、9.0 时可以生长, 说明菌株可以在碱性环境中生长, 但是不是极度耐碱菌, 对碱度的耐受范围有限。细菌在盐浓度 1%–3% 的范围内都可以生长, 说明筛选出的菌株为中度嗜盐菌。从 9 组实验结果可以看出, 细菌的最优生长条件为盐浓度 2%、pH 8.0, 此条件下细菌的浓度最高。后续实验均在此条件下进行。

## 2.3 不同蒽浓度对细菌生长和蒽降解率的影响

在最优盐碱条件下(盐度 2%、pH 8.0), 蒽浓度为 25、50、75、100 mg/L 时细菌的生长速率和降解率见表 3。蒽浓度为 25 mg/L 时, 菌株最早进入对数期, 且菌株生长速率最快。蒽浓度为 100 mg/L 时, 细菌最高浓度可达  $3 \times 10^8$  cells/mL, 明显高于其他组。当蒽浓度低于 50 mg/L 时, 菌株对蒽的降解率比较高, 可以达到 80% 以上。然而蒽浓度较高(75 mg/L 和 100 mg/L)时, 菌株对蒽的降解率降低, 为 60% 左右。

图 3 为蒽浓度为 25 mg/L 时细菌的生长曲线和降解曲线。从图 3 可以看出, 细菌在迟缓期时, 对

表 3 细菌的生长速率和蒽降解率

Table 3 Bacterial growth rates and anthracene degradation efficiency

| Anthracene concentration (mg/L) | Yield (cells/mL)   | $\mu$ ( $h^{-1}$ ) | Degradation efficiency (%) |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|
| 25                              | $2.16 \times 10^8$ | 0.09               | 92                         |
| 50                              | $3.45 \times 10^7$ | 0.01               | 80                         |
| 75                              | $1.72 \times 10^8$ | 0.03               | 67                         |
| 100                             | $3.02 \times 10^8$ | 0.05               | 60                         |

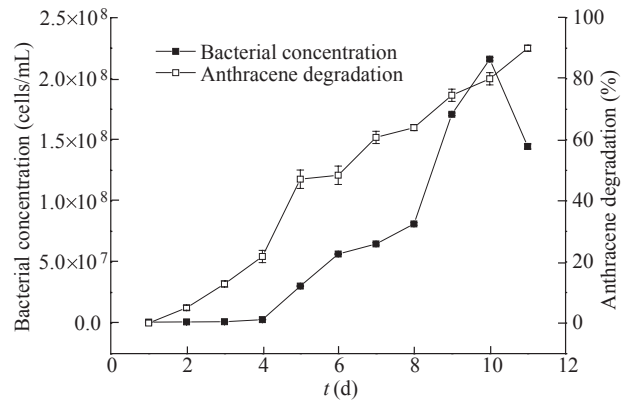


图 3 细菌生长曲线和蒽降解率

Figure 3 The bacterial growth curve and degradation percentage

蒽的降解率为 20% 左右, 但是进入对数期后, 蒽的浓度迅速降低, 降解率为 75% 左右, 表明蒽几乎在细菌的对数期被完全降解。

## 2.4 外加碳源对细菌生长和蒽降解率的影响

以蒽为唯一碳源和添加外加碳源后细菌的生长速率和降解率见表 4。结果显示, 添加外加碳源葡萄糖后, 细菌浓度增高, 生长速率增快, 但是降解率降低。以蒽为唯一碳源的培养液中, 细菌生长缓慢, 第 5 天才进入对数期(图 4)。以碳源比 1:1 添加葡萄糖和蒽的培养液中, 细菌生长非常迅速, 第 2 天进入对数期。通过分析细菌生长和蒽浓度变化发现, 添加外加碳源的培养液中, 蒽的降解主要发生在稳定期(图 4), 推测此组培养液中细菌对数期主要利用葡萄糖生长, 葡萄糖成为细菌的速效碳源, 使细菌对蒽的适应性降低, 降解率降低。

表 2 菌株 BJ1 在不同盐碱条件下的生长情况

Table 2 Bacterial growth under various saline conditions

| Group | Yield (cells/mL)   |
|-------|--------------------|
| 1     | $1.50 \times 10^8$ |
| 2     | $2.16 \times 10^8$ |
| 3     | $5.11 \times 10^7$ |
| 4     | $1.12 \times 10^8$ |
| 5     | $1.41 \times 10^8$ |
| 6     | $6.83 \times 10^7$ |
| 7     | $1.32 \times 10^4$ |
| 8     | $1.44 \times 10^4$ |
| 9     | $1.20 \times 10^4$ |

## 2.5 蒽降解途径

利用气质联用对菌株降解蒽过程的中间产物进行定性分析, 结果见图 5 (蒽浓度为 100 mg/L 培养 3 d 后的气质谱图)。通过对气质谱图分析, 发现细菌代谢蒽的典型中间产物中存在大量的 9,10-蒽醌和邻苯二甲酸酯以及少量的芳香酸、酯类等, 这与最后培养液 pH 呈酸性相吻合。根据生物催化反应的特点推测蒽降解途径(图 6)。化合物 9,10-蒽醌

的出现表明, 蒽在菌株双加氧酶作用下 9,10 位氧化生成双氢二醇, 之后经过脱氢酶作用转化为二羟基化合物或 9,10-蒽醌。二羟基化合物接着开环生成邻苯二甲酸, 邻苯二甲酸又继续被氧化为其他小分子酸类, 这些酸类被细菌用来合成自身的生物量, 同时产生  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。9,10-蒽醌之后可能被降解为芳香酸、酯类等<sup>[20]</sup>。

表 4 不同碳源对菌的生长速率和蒽降解率的影响

Table 4 Effect of glucose on bacterial growth rate and anthracene degradation efficiency

| Carbon source          | Yield (cells/mL)   | $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ ) | Degradation efficiency (%) |
|------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| Anthracene             | $3.45 \times 10^7$ | 0.01                      | 80                         |
| Anthracene and glucose | $1.00 \times 10^8$ | 0.04                      | 50                         |

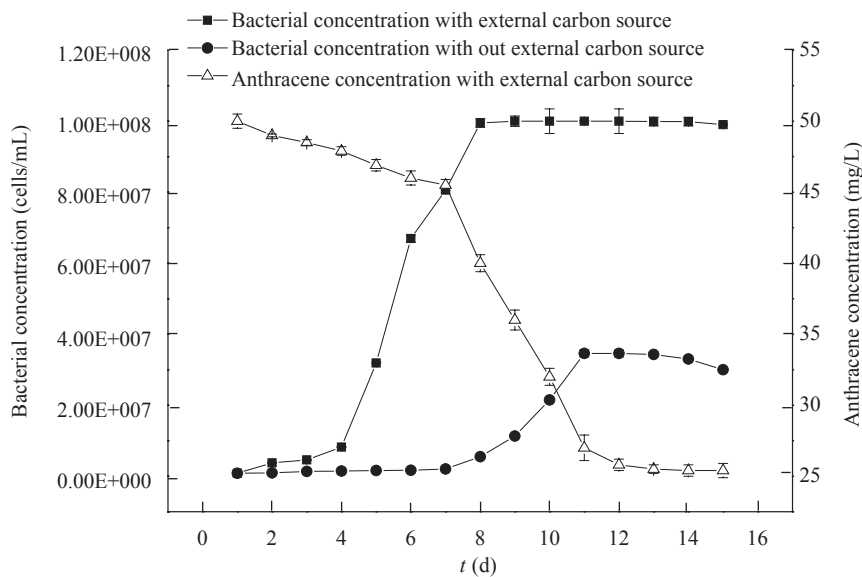


图 4 添加外加碳源对细菌生长及蒽降解的影响

Figure 4 Effect of different concentrations of adding external carbon source on bacterial growth and anthracene degradation



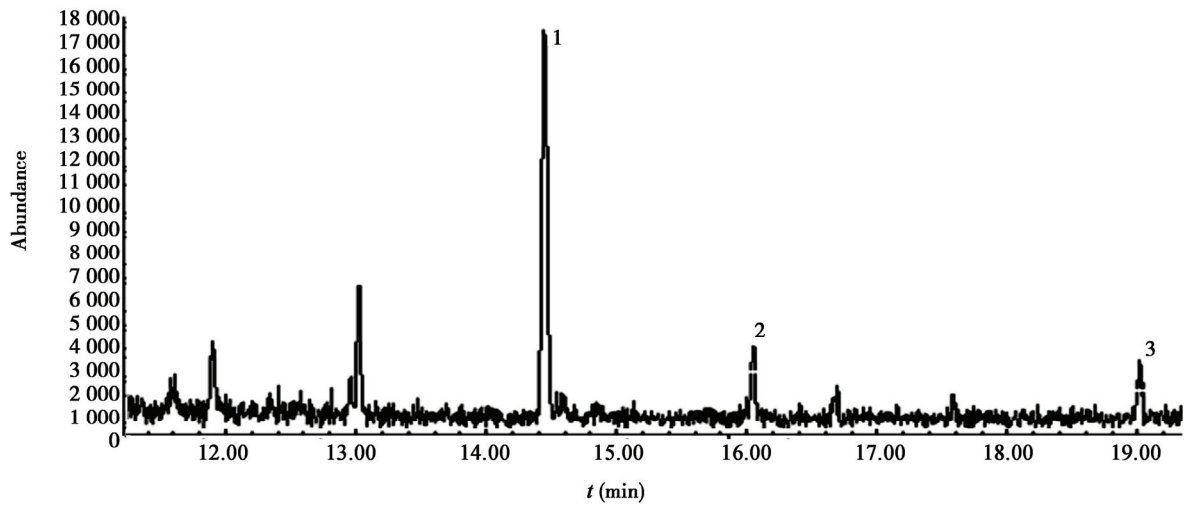


图 5 蒽降解中间产物的气质联用分析

Figure 5 Results of GC-MS analysis of anthracene and main metabolites

注: 1: 蒽; 2: 9,10-蒽醌; 3: 邻苯二甲酸二乙酯.

Note: 1: Anthracene; 2: 9,10-Anthracenedione; 3: Phthalic acid diethyl ester.

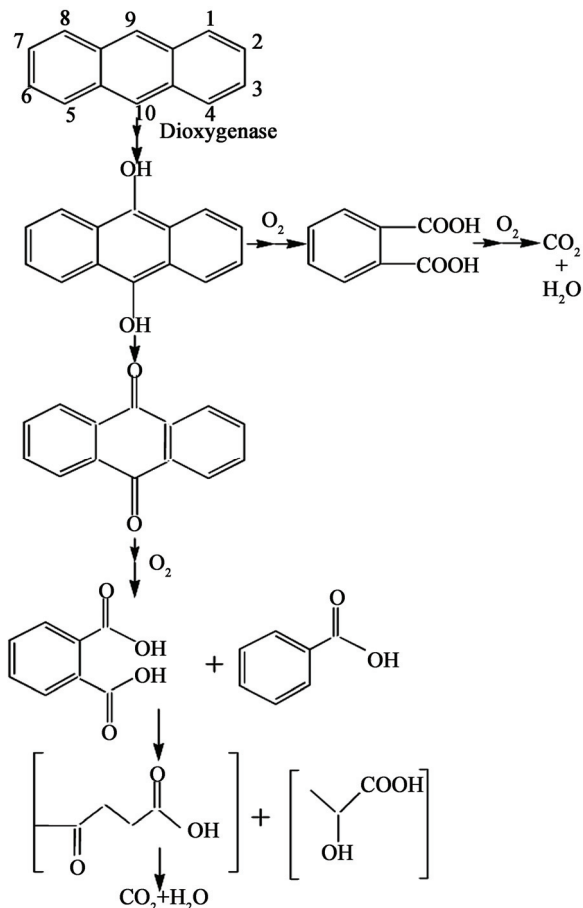


图 6 蒽可能的降解途径

Figure 6 Proposed pathway for anthracene degradation

### 3 结论与讨论

近年来, 分离到的 PAHs 降解菌主要包括红球菌属(*Rhodococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、分歧杆菌属(*Mycobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia*)、假棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)、微球菌属(*Micrococcus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、弧菌属(*Vibrio*)和白腐真菌(*Phanerochate chrysosporium*)等<sup>[21]</sup>。例如 Field 等<sup>[22]</sup>分离出 8 株降解 PAHs 的白腐真菌。2012 年崔长征等<sup>[23]</sup>分离出一株 *Martelella* 菌株, 它对蒽的去除率可达 44.7%。目前有关去甲基醌菌属对 PAHs 的降解研究较少, 至今还未发现能够降解蒽的去甲基醌菌的报道。本研究成功筛选出一株高效降解蒽的菌株 *Demequina salsinemor* BJ1。该菌株可以在盐碱条件下利用蒽作为唯一碳源。宋立超等<sup>[24]</sup>报道菌株 TJB5 在盐浓度 2%、pH 9.5 盐碱胁迫条件下对菲、芘降解率达到 93.3%和 21.7%。迄今有关耐盐碱的蒽降解菌株报道较少, 本研究筛选的菌株 BJ1 最优化生长条件为 pH 8.0、盐度 2%, 对盐碱条件有一定

的耐受性,此外菌株对蒽的降解率比较高(92%),同时该菌株为寡营养细菌,适应低营养条件,可以为 PAHs 污染土壤的生物修复技术提供新的菌种资源。

流式细胞技术近年来在环境微生物领域的应用逐渐发展起来<sup>[25-26]</sup>。利用流式细胞技术检测菌株在降解蒽过程中的生长情况,可以快速、准确地反映菌株的变化,克服了传统检测技术的耗时、误差大等不足。从不同蒽浓度条件下细菌的生长曲线可以看出,细菌的迟缓期都比较长,说明细菌需要一段时间的驯化才能开始大量生长。微生物的适应性对分解环境中的污染物十分重要,它决定污染物最初的降解速率<sup>[27]</sup>。进入对数期后,蒽浓度为 25 mg/L 组,细菌的生长速率明显比其他组高,推测低浓度时,污染物对细菌的毒害作用小,所以相比污染物浓度较高的组,细菌生长速率快。而细菌生长后期,高浓度组生长速率变快,推测可能是蒽分解,苯环破裂,变成低分子量毒性较低的物质,对细菌的抑制作用变弱。同时,BJ1 对蒽的降解率随着初始蒽浓度增加而降低,说明高浓度的蒽对菌株有一定的毒害作用。这与 Ling 等<sup>[28]</sup>报道的 *Bacillus vallismortis* JY3A 对蒽的降解结果一致。

研究选用葡萄糖作为外加碳源。结果显示添加外加碳源后,细菌生长速率明显变快,最高浓度比不添加外加碳源细菌浓度高,但是细菌对蒽的降解率明显降低。蒽降解酶属诱导酶,当加入速效碳源葡萄糖时,可能抑制了蒽降解基因的表达,使细菌对蒽的降解率变低<sup>[29]</sup>。葡萄糖具有来源广泛、无毒害和与蒽无竞争性抑制等特点,且是微生物生长的良好刺激素。慎义勇等<sup>[30]</sup>报道,加入葡萄糖对大于三环的难降解化合物的降解能力有所提高,总去除率提高了 17%–22%。然而周乐等<sup>[31]</sup>报道葡萄糖的加入使得菌株降解化合物的效能降低。可见关于葡萄糖对微生物降解难降解有机物的影响尚有待进一步研究。

目前对于三环及三环以上多环芳烃降解机理的研究还比较有限。有研究发现分歧杆菌属

*Mycobacterium* sp. strain LB501T 可以以邻苯二甲酸和原儿茶酸降解蒽<sup>[32]</sup>。Hadibarata 等<sup>[33]</sup>研究了 *Polyporus* sp. S133 对蒽的降解过程,在代谢产物中发现了蒽醌、邻苯二甲酸、苯甲酸和儿茶酚等。Cui 等<sup>[34]</sup>研究蒽在 *Martelella* sp. AD-3 作用下的降解时发现了 6,7-苯并香豆素、2,3-二羟基萘和水杨酸,认为蒽先转化为 6,7-苯并香豆素,然后化为 2,3-二羟基萘,最后以水杨酸途径代谢。研究中发现了降解中间产物 9,10-蒽醌和邻苯二甲酸。同时培养基的 pH 由初始 8.0 变为 6.0,证明了蒽降解过程中产生了酸性官能团,与宋兴良等<sup>[35]</sup>研究结果相一致。推测蒽在细菌作用下转化为蒽醌然后进一步氧化为邻苯二甲酸,最后以邻苯二甲酸途径代谢<sup>[36]</sup>。

总之,蒽降解菌株 *Demequina salsinemosus* BJ1 的发现丰富了多环芳烃蒽的微生物降解种群,有利于盐碱条件下 PAHs 污染土壤的生物修复。该菌株降解蒽的分子机理正在进一步研究中。

## 参 考 文 献

- [1] Jacob J, Karcher W, Belliaro JJ, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance[J]. Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, 1986, 323(1): 1-10
- [2] Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview[J]. Biotechnology Research International, 2011, 2011: 941810
- [3] Yang YN, Han D. Feasibility of bioremediation for contaminated soil by halophilic bacteria[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(S1): 121-126 (in Chinese) 杨玉楠, 韩冬. 嗜盐菌强化石油污染土壤生物修复的可行性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(S1): 121-126
- [4] Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter decomposing basidiomycetous fungi[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 60(1/2): 212-217
- [5] Mohan SV, Kisa T, Ohkuma T, et al. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2006, 5(4): 347-374
- [6] Kanaly RA, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(8): 2059-2067
- [7] Powell SN, Singleton DR, Aitken MD. Effects of enrichment with salicylate on bacterial selection and PAH mineralization in a microbial community from a bioreactor treating contaminated soil[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(11): 4099-4105
- [8] Diaz MP, Boyd KG, Grigson SJW, et al. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M immobilized onto polypropylene fibers[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 79(2): 145-153



- [9] Zhao BS, Wang H, Li RR, et al. Recent advances in biodegradative mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic bacteria[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(3): 414-420 (in Chinese)  
赵百锁, 王慧, 李瑞瑞, 等. 好氧细菌对多环芳烃降解机制的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(3): 414-420
- [10] Arulazhagan P, Vasudevan N. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(2): 388-394
- [11] Cui CZ, Zeng C, Wan X, et al. Effect of rhamnolipids on degradation of anthracene by two newly isolated strains, *Sphingomonas* sp. 12A and *Pseudomonas* sp. 12B[J]. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2008, 18(1): 63-66
- [12] Tam NFY, Guo CL, Yau WY, et al. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1/12): 316-324
- [13] Eriksson M, Dalhammar G, Borg-Karlson AK. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(5): 619-626
- [14] Simarro R, González N, Fern L, et al. Optimisation of key abiotic factors of PAH (naphthalene, phenanthrene and anthracene) biodegradation process by a bacterial consortium[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2011, 217(1/4): 365-374
- [15] Hollister EB, Engledow AS, Hammett AJM, et al. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments[J]. *The ISME Journal*, 2010, 4(6): 829-838
- [16] Wang YY, Hammes F, Boon N, et al. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(8): 889-902
- [17] Yu H, Ma LL, Mao GN, et al. Fast and safety detection of drinking water in respect of microbial quality[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(8): 1171-1178 (in Chinese)  
余辉, 马丽丽, 毛冠男, 等. 饮用水微生物的安全快速检测[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1171-1178
- [18] Mao J, Luo YM, Teng Y, et al. Isolation and characterization of a high-molecular-weight (HMW) PAHs degrading bacterial strain[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(7): 1011-1015 (in Chinese)  
毛健, 骆永明, 滕应, 等. 一株高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(7): 1011-1015
- [19] Feng W, Sun R, Gao GH, et al. Analysis of cultivable microbial community structure and affiliation in saline-alkaline soil in the Tuanbo Lake area of Tianjin, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(5): 1028-1035 (in Chinese)  
冯伟, 孙瑞, 高广海, 等. 天津团泊湖地区盐碱土壤中可培养微生物群落结构和归属分析[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(5): 1028-1035
- [20] Zhang YP, Wang F, Yang XL, et al. Recent advances in biodegradation of high-molecular weight PAHs in soil[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(2): 280-288 (in Chinese)  
张银萍, 王芳, 杨兴伦, 等. 土壤中高环多环芳烃微生物降解的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 280-288
- [21] Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Environmental Pollution*, 1993, 81(3): 229-249
- [22] Field JA, de Jong E, Costa GF, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(7): 2219-2226
- [23] Cui CZ, Feng TC, Yu YQ, et al. Isolation, characterization of an anthracene degrading bacterium *Marteella* sp. AD-3 and cloning of dioxygenase gene[J]. *Environment Science*, 2012, 33(11): 4062-4068 (in Chinese)  
崔长征, 冯天才, 于亚琦, 等. 降解蒽嗜盐菌 AD-3 的筛选、降解特性及加氧酶基因的研究[J]. *环境科学*, 2012, 33(11): 4062-4068
- [24] Song LC, Liu LZ, Li PJ, et al. Screening and biodegradation characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading consortium from saline-alkali soil[J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2012, 28(1): 161-166 (in Chinese)  
宋立超, 刘灵芝, 李培军, 等. 盐碱土壤多环芳烃降解菌群筛选及其降解特性[J]. *石油学报(石油加工)*, 2012, 28(1): 161-166
- [25] Wang YY, Hammes F, de Roy K, et al. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(8): 416-424
- [26] de Roy K, Clement L, Thas O, et al. Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting[J]. *Water Research*, 2012, 46(3): 907-919
- [27] Pathak H, Jain PK, Jaroli DP, et al. Degradation of phenanthrene and anthracene by *Pseudomonas* strain, isolated from coastal area[J]. *Bioremediation*, 2008, 12(1): 111-116
- [28] Ling JY, Zhang GY, Sun HB, et al. Isolation and characterization of a novel pyrene-degrading *Bacillus vallismortis* strain JY3A[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(10): 1994-2000
- [29] Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, et al. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(22): 7962-7974
- [30] Shen YY, Zhang YN, Liu ZF, et al. Preliminary study on biodegradation of MGP-wastewater influenced by adding glucose[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(6): 114-117 (in Chinese)  
慎义勇, 张轶男, 刘祖发, 等. 葡萄糖对油制气废水生物降解影响的初步研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(6): 114-117
- [31] Zhou L, Sheng XF, Zhang SJ, et al. Screening of aphenanthrene-degrading bacterium and its degradation conditions[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(12): 2399-2402 (in Chinese)  
周乐, 盛下放, 张士晋, 等. 一株高效非降解菌的筛选及降解条件研究[J]. *应用生态学报*, 2005, 16(12): 2399-2402
- [32] van Herwijnen R, Springael D, Slot P, et al. Degradation of anthracene by *Mycobacterium* sp. strain LB501T proceeds via a novel pathway, through o-phthalic acid[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 186-190
- [33] Hadibarata T, Tachibana S, Itoh K. Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(2/3): 911-917
- [34] Cui CZ, Ma L, Shi J, et al. Metabolic pathway for degradation of anthracene by halophilic *Marteella* sp. AD-3[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 89(2): 67-73
- [35] Song XL, Wang JT, Zhang Z. Selection of microorganisms of degraded anthracene and analysis of its middle products[J]. *Marine Environmental Science*, 2010, 29(6): 815-818 (in Chinese)  
宋兴良, 王江涛, 张哲. 多环芳烃蒽高效降解菌的筛选及其降解中间产物分析[J]. *海洋环境科学*, 2010, 29(6): 815-818
- [36] Theurich J, Bahnemann DW, Vogel R, et al. Photocatalytic degradation of naphthalene and anthracene: GC-MS analysis of the degradation pathway[J]. *Research on Chemical Intermediates*, 1997, 23(3): 247-274