



研究报告

糙皮侧耳和鞘脂菌 NS7 对多环芳烃污染土壤的生物强化与协同作用

杜志德^{1,2} 戴叶亮² 李艳洁² 吴宇澄² 林先贵² 叶旭红^{*1} 曾军^{*2}

1 沈阳农业大学土地与环境学院 辽宁 沈阳 110866

2 中国科学院南京土壤研究所 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室 江苏 南京 210008

摘要:【背景】真菌和细菌被认为在多环芳烃污染土壤生物修复过程中发挥协同作用,目前在真实土壤体系中开展真菌-细菌协同降解研究较少。【目的】研究真菌和细菌对不同种类多环芳烃降解的差异及对蒽和苯并[a]蒽的生物强化与协同作用。【方法】选用多环芳烃降解真菌和细菌各一株,在液体纯培养体系下分析它们对不同种类多环芳烃降解的差异,在土壤体系中采用放射性同位素示踪技术研究2种微生物对蒽和苯并[a]蒽的生物强化与协同作用。【结果】供试细菌鞘脂菌 NS7 能够很好地降解低环种类多环芳烃,以蒽作为唯一碳源时可以将其完全降解,在复合污染条件下对菲、蒽、荧蒽、芘等降解效果突出(>90%),对苯并[a]芘降解效果较差(9.76%)。相比而言,供试真菌糙皮侧耳菌对苯并[a]芘具有更好的降解效果(21.18%),对低环多环芳烃降解效果明显不如降解菌 NS7。在自然土壤中,蒽和苯并[a]蒽具有明显不同的矿化效率,分别为 18.61%和 4.28%,在蒽污染土壤中加入鞘脂菌 NS7 并未显著提高蒽的矿化率($P>0.05$),相比而言,苯并[a]蒽污染土壤中加入糙皮侧耳显著提高了污染物矿化效率(2.24倍),表明真菌和细菌在土壤环境中的定殖存活能力可能影响了生物强化效果。采用灭菌土壤排除土著微生物的竞争排斥作用,研究了真菌菌丝对生物强化降解的影响,发现在蒽污染土壤中,真菌菌丝的迁移作用显著提高了细菌鞘脂菌 NS7 对污染物的矿化率,从 1.75% 提高到 5.91%;而在苯并[a]蒽灭菌污染土壤中,接种糙皮侧耳却没有发现苯并[a]蒽矿化率提高的现象,表明自然土壤中真菌强化降解苯并[a]蒽的作用可能是源于真菌菌丝促进污染物和土著降解菌的接触,而非直接来自真菌本身。【结论】细菌能够很好地降解低环种类多环芳烃,而真菌对高环种类多环芳烃降解效果较好。真菌可能通过菌丝促进土著微生物在土壤中的迁移,增大多环芳烃和土著降解菌的接触,从而促进了多环芳烃降解。研究加深了对多环芳烃污染土壤生物强化修复的认识,对发展基于真菌-细菌协同作用的生物强化与调控技术提供理论指导。

关键词: 多环芳烃, 生物强化, 真菌, 细菌, 同位素示踪

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2019YFC1805703); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20181512)

***Corresponding authors:** E-mail: YE Xuhong: dzdaa11@163.com; ZENG Jun: jzeng@issas.ac.cn

Received: 10-03-2021; **Accepted:** 21-04-2021; **Published online:** 23-06-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1805703); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20181512)

***通信作者:** E-mail: 叶旭红: dzdaa11@163.com; 曾军: jzeng@issas.ac.cn

收稿日期: 2021-03-10; **接受日期:** 2021-04-21; **网络首发日期:** 2021-06-23

Bioaugmentation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil with *Pleurotus ostreatus* and *Sphingobium* sp. NS7 and their synergistic effect

DU Zhide^{1,2} DAI Yeliang² LI Yanjie² WU Yucheng² LIN Xiangui² YE Xuhong^{*1}
ZENG Jun^{*2}

1 College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

2 CAS Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation; Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China

Abstract: [Background] Fungi and bacteria are considered to play a synergistic role in the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. However, there are limited studies on their synergistic degradation in soil. [Objective] This paper aims to investigate the different PAHs-degrading abilities of *Pleurotus ostreatus* and *Sphingobium* sp. NS7 and reveal their synergistic role in the biodegradation of anthracene and benzo[*a*]anthracene in soil. [Methods] The PAH degradation by *P. ostreatus* and *Sphingobium* sp. NS7 was performed in liquid culture. Soil microcosms were set up with radiolabeled anthracene and benzo[*a*]anthracene to investigate the fate of PAHs after bioaugmentation. [Results] NS7 can efficiently degrade low-molecular-weight (LMW) PAHs, as it removed almost all the anthracene when anthracene was the only carbon source. In the case of compound contamination, the bacterium removed >90% of phenanthrene, anthracene, fluoranthene, and pyrene while degraded benzo[*a*]pyrene with a low rate (9.76%). By contrast, *P. ostreatus* demonstrated relatively high removal rate (21.18%) of benzo[*a*]pyrene. The degradation rate of LMW PAHs by *P. ostreatus* was much lower than that by NS7. In the natural soil, the mineralization rate of anthracene and benzo[*a*]anthracene was 18.61% and 4.28%, respectively. *P. ostreatus* promoted benzo[*a*]anthracene mineralization in natural soil (increased by 2.24 folds) but NS7 failed to significantly improve anthracene mineralization. Thus, the competition of indigenous microbial communities might affect the survival of exogenous microorganisms. A sterile soil system excluding the microbial competition was used to investigate the helper role of fungal hyphae in the synergistic degradation. With the help of fungal hyphae, the mineralization of anthracene was enhanced by NS7 (mineralization rate up from 1.75% to 5.91%), but no promotion effect was observed in benzo[*a*]anthracene mineralization. Therefore, the reason for the enhancement of benzo[*a*]anthracene mineralization in natural soil by *P. ostreatus* might be that the fungal hyphae promoted the migration of indigenous PAHs-degrading bacteria in soil matrix and thus enhanced the contact of them with the contaminant. [Conclusion] Bacteria can efficiently degrade LMW PAHs while fungi showed high degradation rate of high-molecular-weight PAHs like benzo[*a*]pyrene. Enhanced PAH mineralization in natural soil was observed after *P. ostreatus* inoculation, and the mechanism might be that the fungal hyphae promoted migration of indigenous bacteria in the soil matrix. This study deepens our understanding of the synergistic degradation of PAHs in soil by fungus and bacterium and lays a theoretical basis for soil bioremediation based on the synergistic effect of fungi and bacteria.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, bioaugmentation, fungus, bacterium, radiolabeling

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是环境中广泛存在的有机污染物, 由2个或多个苯环以线状、角状或簇状排列稠环而成^[1], 此类污染物主要来源于石油泄漏和有机物质的不完全燃烧, 如煤气生产、汽车尾气、森林火灾和

废物焚烧等^[2], 具有低水溶性、热稳定性和难降解等性质^[3], 在土壤中容易持久性残留。因其致癌、致突变和致畸等“三致”效应, 对人类健康和生态环境具有潜在风险^[4], 已有16种多环芳烃化合物列入美国土壤保护局(Environmental

Protection Agency, EPA)的优先污染物清单^[5],我国土壤多环芳烃点位超标率达到 1.4%^[6],并于2019年1月1日起开始实施《土壤污染防治法》^[7],土壤污染治理迫在眉睫。

微生物降解和转化作用是自然环境中去除多环芳烃的主要过程。微生物修复技术具有环境友好、绿色经济等特点,在多环芳烃污染土壤的原位修复中展现出良好的应用前景^[8-9],生物强化和生物刺激是其两大基础应用方式。其中,生物强化是通过向污染土壤中添加高效污染物降解菌株而实现多环芳烃污染土壤生物修复的方式^[10]。目前已从不同环境中分离出许多能降解多环芳烃的微生物菌株,细菌如分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Spingomonas*)、鞘脂菌属(*Spingobium*)、玫瑰杆菌属(*Roseovarius*)等^[11-14],真菌如雅致小克银汉霉(*Cunninghamella elegans*)、蜜环菌属(*Armillaria*)、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)等^[15-16]。据已有研究,真菌和细菌在多环芳烃降解过程中多呈现出协同降解的特征^[17],真菌可以通过提高多环芳烃的生物利用率与细菌共同代谢多环芳烃。真菌一般不能完全降解高环种类多环芳烃,但可以利用胞外酶将其转化为极性更高的代谢物,利于细菌后续降解^[18]。有研究表明,在被多环芳烃污染的土壤中接种真菌-细菌共培养物,可以显著促进高环种类多环芳烃的降解^[19-20]。除了协同代谢的作用,当没有流水、蚯蚓或正在生长的植物根等媒介时,土壤中的细菌运动可以忽略不计,而且土壤的吸附性、水路的不连续性和土壤质地也限制了细菌在非饱和土壤中的迁移^[21],真菌菌丝有“真菌高速公路”和“脉管作用”,可以为细菌提供运动通道,与细菌发挥协同作用^[22-24],也能转移土壤中有有机污染物,既促进了污染物低浓度区域微生物对其降解利用^[25-27],也降低因污染物浓度高对自身生长的限制。细菌-真菌组合对有机污染物的降解效果比单一微生物的降解效果更为显著^[28],目前协同机

制研究多在模拟体系下进行,而在真实土壤介质中开展的研究相对较少。

本研究为解析土壤介质中真菌和细菌对多环芳烃的协同降解作用,选用了多环芳烃降解细菌鞘脂菌 NS7 和降解真菌糙皮侧耳,分别研究了2种类型的降解菌在纯培养体系和土壤体系对多环芳烃的降解,并采用菌丝迁移降解的研究体系初步探讨了2类微生物在降解土壤多环芳烃中的协同作用与限制因子,以期发展为污染土壤生物强化修复技术提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 土壤和菌种

土壤采集于南京钢铁工业区周围受污染农田土壤,其中16种EPA-PAHs浓度为1.30 mg/kg。土壤经过自然风干,去除植物根系、石砾等,过2 mm筛,储存于4 °C冰箱备用。

供试细菌为Zeng等^[29]前期筛选的鞘脂菌NS7(CGMCC 1.16286),供试真菌糙皮侧耳购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC 50136)。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

实验使用的多环芳烃包括菲、蒽、荧蒽、芘、苯并[a]蒽、苯并[a]芘(纯度>98%),Sigma-Aldrich公司;¹⁴C-蒽和¹⁴C-苯并[a]蒽(纯度>99%),ARC公司;碱性闪烁液,Zinsser Analytic公司。

超快速高分离液相色谱仪、气相色谱-质谱联用仪,岛津企业管理(中国)有限公司;液体闪烁分析仪,Beckman公司;生物氧化燃烧仪,华利达实验设备有限公司。

LB培养基按照徐德强等^[30]的方法进行配制,用于细菌培养;PDA培养基按照林先贵^[31]的方法进行配制,用于真菌培养;无机盐基础(Minimal Medium, MM)培养基按照宋立超等^[32]的方法进行配制,用于细菌对多环芳烃的降解实验;葡萄糖无机盐基础培养基(Glucose Minimal Medium, MM-Glu):在MM培养基基础上,加入葡萄糖

10.0 g/L, 用于真菌对多环芳烃的降解实验。

1.3 纯培养体系的真菌和细菌对多环芳烃的降解

降解实验分别以多环芳烃为单一污染物和混合污染物形式进行添加。其中, 细菌降解实验单一多环芳烃为蒽(20.0 mg/L), 真菌降解实验单一多环芳烃为苯并[a]芘(10.0 mg/L)。混合污染物为菲、蒽、荧蒽、芘、苯并[a]芘混合物(菲、蒽、荧蒽、芘浓度各为 20.0 mg/L, 苯并[a]芘浓度为 10.0 mg/L)。

细菌用 LB 培养基培养, 28 °C、160 r/min 条件下避光振荡培养 3 d, 5 000×g 离心 10 min 收集菌体, 无菌水清洗菌体 3 遍后重新悬浮菌体, 将菌悬液作为接种物; 真菌用 PDB 培养基培养, 30 °C、120 r/min 条件下避光振荡培养 3 d, 瓶内加入小玻璃球避免形成个体较大的真菌菌丝球, 用前端剪一小口的移液枪头吸取真菌菌液, 用匀浆机打匀后作为真菌接种物。取 250 mL 三角瓶(1×10⁵ Pa 灭菌 20 min)向灭菌三角瓶内加入所需多环芳烃, 三角瓶放置摇床中以 28 °C、80 r/min 条件下振荡使瓶内丙酮挥发。待丙酮挥发后加入 25 mL MM 培养基(细菌实验)或 MM-Glu 培养基(真菌实验), 按照 10% (体积分数)接种量接入制备好的细菌或真菌培养物。在恒温培养振荡器上以 28 °C、160 r/min 条件下避光振荡培养 2 周, 实验处理包括空白均为 3 个重复。培养结束后, 向三角瓶内分 3 次加入总量为 25 mL 的乙腈, 充分将瓶内残留污染物进行提取并定容至 50 mL, 吸取 1 mL 混合液过 0.22 μm 滤膜, 采用高效液相色谱仪测定残留污染物。

1.4 土壤微域中细菌和真菌对蒽和苯并[a]芘的生物强化降解

将水加入采集的土壤至约 40%最大含水量, 在 28 °C 恒温下静置预培养 1 周平衡土壤微生物, 细菌接种物采用 1.3 的方法制备, 每管中加入 0.25 mL, 真菌接种物为从 PDA 培养基上切取的一小块带菌丝琼脂。蒽和苯并[a]芘人工污染土壤

采用 Brinch 等^[33]的方法制备, 简要步骤为:

(1) 将非标记多环芳烃与 ¹⁴C-多环芳烃按所需比例混合; (2) 取部分风干试验土壤按照污染物 5 倍使用浓度分别加入蒽和苯并[a]芘; (3) 将土壤与污染物充分混合后放置通风橱过夜使丙酮挥发; (4) 取等量污染土壤(约 1.0 g)与经平衡的试验土壤(4.0 g)于 50 mL 试验玻璃管中混合, 制备人工污染土壤。试验污染土壤中外加多环芳烃污染物终浓度为 10.0 mg/kg, 放射性标记量通过测试而得, 分别为蒽 318.3 Bq/管, 苯并[a]芘为 2 766.7 Bq/管。

人工污染土壤中分别接种细菌(蒽降解实验)或真菌(苯并[a]芘降解实验), 补充含水量约 60%, 于 28 °C 恒温下静置培养。试验管用橡胶塞封口, 橡胶塞下悬挂一内含 1 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液的小管, 试验管在恒温培养室中培养 9 周, 每周收集并更新管内氢氧化钠溶液, 以供测试培养过程中生成的 ¹⁴CO₂ 量, 实验处理包括空白均为 3 个重复。培养结束后, 土壤样品风干, 取 2.0 g 用 60 mL 二氯甲烷在索氏装置中提取 24 h, 30 °C 旋转蒸发后用 2.0 mL 环己烷溶解, 取 0.5 mL 测试二氯甲烷可提取态中的放射性含量。提取后的剩余土壤再进行风干, 测试结合态残留的放射性含量。将 3 管平行样的剩余环己烷溶解液合并, 取 1 mL 用氮气吹干, 溶解于 0.5 mL 乙腈进行液相色谱分析, 每隔 1 min 收集色谱流出液, 通过分析流出液中放射性含量判定标记代谢产物出峰时间。另取剩余合并的环己烷溶解液, 氮气吹干后溶解于 0.5 mL 正己烷, 采用气相色谱-质谱联用分析产物结构。

1.5 灭菌土壤微域中蒽和苯并[a]芘生物降解的真菌菌丝迁移作用

供试土壤经 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min, 间隔 1 d 后同样条件再次灭菌, 参照 1.4 的实验步骤制备人工污染土壤, 灭菌土壤无需预平衡。实验土壤中多环芳烃污染物终浓度为 10.0 mg/kg, 蒽放射性

标记量为 1 233.3 Bq/管, 苯并[a]蒽为 3 333.3 Bq/管。在 50 mL 试验管底部先加入空白琼脂块, 再引入细菌菌液作为细菌接种(25 μ L), 真菌接种方式为加入预先生长有真菌菌丝的琼脂块。琼脂块上铺设约 1 cm 厚的细玻璃珠(直径约 1 mm), 在玻璃珠上再铺设 5.0 g 灭菌人工污染土壤。微域实验分别为蒽或苯并[a]蒽的污染土壤, 分别接种细菌、真菌、真菌-细菌处理。试验管参照 1.4 悬挂内含氢氧化钠溶液的小管, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养, 每周收集并更新管内氢氧化钠溶液, 测试培养过程中生成的 14 CO₂ 量, 实验设置 3 个重复。蒽实验组从第 1 周开始取样, 监测至第 8 周, 苯并[a]蒽实验组从第 4 周开始取样, 监测至第 10 周。

1.6 分析与统计方法

超快速高分离液相色谱仪分析多环芳烃含量, 气相色谱-质谱联用仪分析提取态中代谢产物结构, 液体闪烁分析仪测定氢氧化钠溶液、有机溶剂提取物及液相色谱流出液中的放射性物质含量, 生物氧化燃烧仪将土壤中的放射性物质完全燃烧生成 14 CO₂, 用碱性闪烁液吸收后经液体闪烁分析仪测定其放射性强度。采用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析(One-Way Analysis of Variance, ANOVA)并进行多重比较(Duncan 方法)。用学生 *t* 检验(Student's *t*-test)对处理间作差异分析。使用 Origin 2021 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 纯培养体系中真菌和细菌对多环芳烃的降解

研究分别测试单一污染物和混合污染物形式下多环芳烃的降解(图 1)。结果表明, 供试细菌鞘脂菌 NS7 在以蒽为唯一碳源形式下能很好地将其降解, 降解率接近 100%。在混合多环芳烃降解体系中, 菌株 NS7 对菲、蒽、荧蒽和芘都具有很好的降解效果, 培养结束后 4 种多环芳烃降解率分别为 91.68%、96.94%、92.25%和 86.47%。相比而言, 混合多环芳烃降解体系中苯并[a]芘的降解效果相对较低, 为 9.76%。

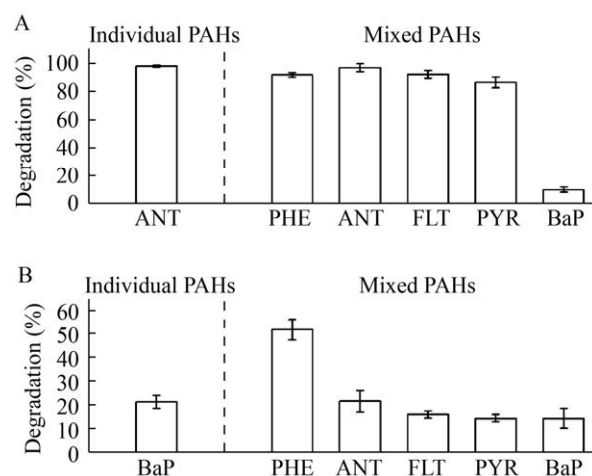


图 1 细菌鞘脂菌 NS7 (A)和真菌糙皮侧耳(B)在以 PAHs 作为单一污染物和混合污染物条件下的降解

Figure 1 The degradation of PAHs by *Sphingobium* sp. NS7 (A) and *Pleurotus ostreatus* (B), with the PAH as an individual or mixed pollutants

注: ANT: 蒽; PHE: 菲; FLT: 荧蒽; PYR: 芘; BaP: 苯并[a]芘

Note: ANT: Anthracene; PHE: Phenanthrene; FLT: Fluoranthene; PYR: Pyrene; BaP: Benzo[a]pyrene

供试真菌糙皮侧耳在以葡萄糖作为共代谢底物的条件下, 能够降解 21.18%的苯并[a]芘, 而混合多环芳烃降解体系中对苯并[a]芘的降解率稍有降低(14.24%, $P>0.05$)。复合多环芳烃降解体系中, 供试真菌对其他多环芳烃的降解率普遍低于细菌 NS7, 其中, 菲的降解率为 51.75%, 蒽为 21.54%, 荧蒽为 15.90%, 芘为 14.27%。

2.2 土壤微域中真菌和细菌对蒽和苯并[a]蒽的生物强化降解

依据供试细菌和真菌对不同多环芳烃的降解特征, 在自然土壤中研究了 2 株降解菌对低环多环芳烃(蒽)和高环多环芳烃(苯并[a]蒽)环境归趋的影响。实验选用苯并[a]蒽而非苯并[a]芘, 是因为苯并[a]芘在土壤中矿化率极低, 不易体现生物强化作用。自然土壤中蒽矿化较快, 9 周培养结束后矿化率为 18.61%, 土壤中加入鞘脂菌 NS7 后, 蒽的矿化率未显著提高($P>0.05$) (图 2A)。相比而言, 自然土壤中苯并[a]蒽矿化率不高, 9 周培养

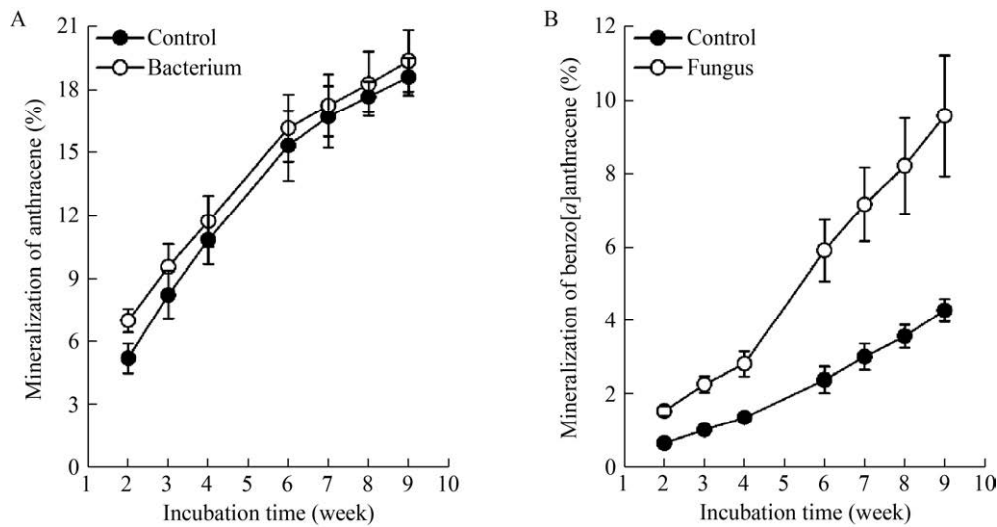


图 2 接种细菌鞘脂菌 NS7 (A)和真菌糙皮侧耳(B)对土壤 PAHs 矿化的影响

Figure 2 The mineralization of PAHs in the soil after inoculation with *Sphingobium* sp. NS7 (A) and *Pleurotus ostreatus* (B)

结束后矿化率只有 4.28%，土壤中加入糙皮侧耳后，苯并[a]蒽矿化提高了 2.24 倍(图 2B)。

培养结束后，大部分多环芳烃依然保留在土壤中，蒽残留率为 79.56%–82.31%，苯并[a]蒽为 88.61%–96.07%。其中，多环芳烃主要进入土壤基质形成结合态残留，蒽结合态比例为 75.32%，苯并[a]蒽为 52.72%。土壤中加入鞘脂菌 NS7 未显著提高蒽的矿化率，但显著降低了结合态残留(降低 3.47%， $P<0.05$)，并增加了可提取态含量(提高 2.71%， $P<0.05$) (图 3A)。相比之下，苯并[a]蒽土壤中加入糙皮侧耳并未显著影响污染物可提取态和结合态残留($P>0.05$) (图 3B)。

结合放射性信号分析可提取态中代谢产物，研究发现对照处理中蒽和苯并[a]蒽在实验土壤中自身即存在转化过程，分别于 9.5 min (图 4A)和 26.8 min (图 4B)产生了带有标记信号的主要代谢产物，产物经质谱鉴定分别为蒽醌(图 4C)和苯并[a]蒽醌(图 4D)。培养结束后，蒽醌标记量占所提取液总标记量的 72%，而苯并[a]蒽醌占比约为 63%。与对照相比，土壤中接种糙皮侧耳和细菌鞘脂菌 NS7 并未发现其他新的代谢产物。

2.3 灭菌土壤微域中蒽和苯并[a]蒽生物降解的真菌菌丝迁移作用

根据自然土壤生物强化结果，认为鞘脂菌 NS7 可能是受到土著微生物的竞争排斥从而没有

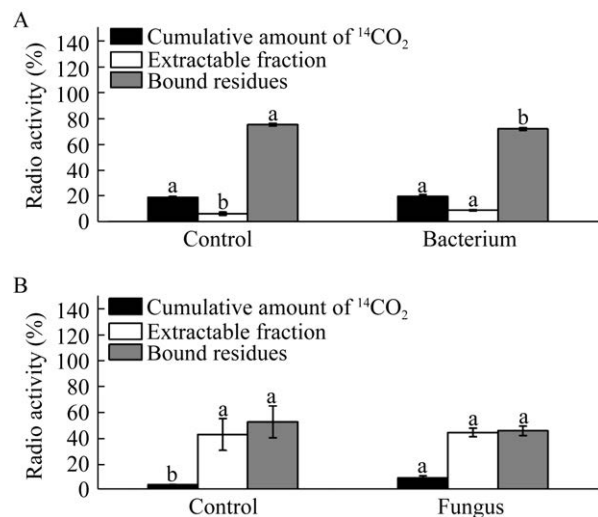


图 3 9 周培养结束后放射性标记物在各组间分布

Figure 3 The distribution of radiolabel after 9 weeks soil incubation

注: A: 鞘脂菌 NS7 生物强化降解蒽; B: 真菌糙皮侧耳生物强化降解苯并[a]蒽; 不同小写字母表示处理间差异显著性($P<0.05$)
 Note: A: Anthracene microcosm with *Sphingobium* sp. NS7 inoculation; B: Benzo[a]anthracene microcosm with *Pleurotus ostreatus*; Different lowercase letters indicated significant differences among treatments ($P<0.05$)

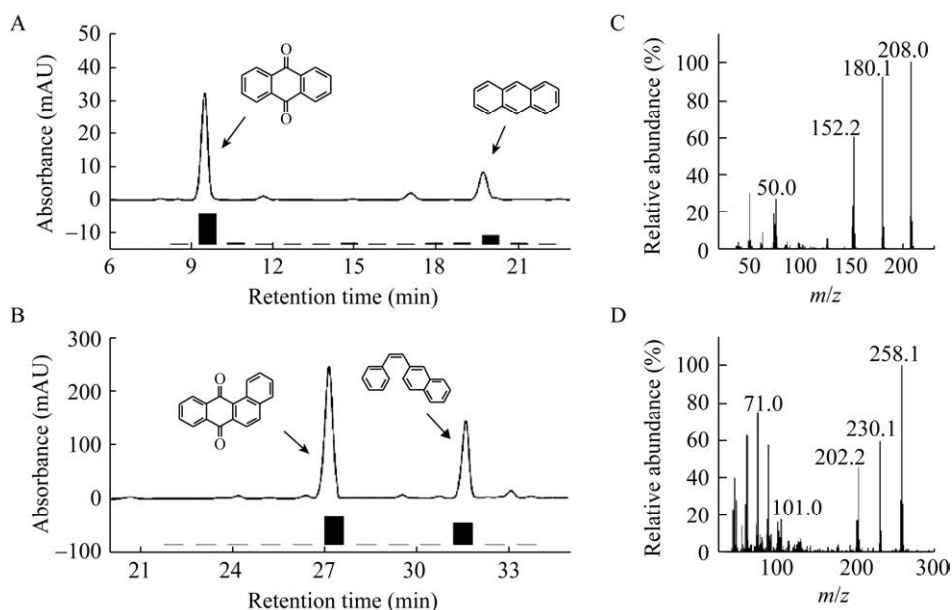


图 4 蒽和苯并[a]蒽土壤微域实验可提取态主要代谢物的高效液相色谱(A, B)和质谱分析(C, D)

Figure 4 High performance liquid chromatographic analysis (A, B) and mass spectra (C, D) of the main products in anthracene and benzo[a]anthracene microcosms

注: 插图为主要代谢产物的放射性信号分析

Note: The inserts were the radio-chromatograms for each sample

体现出强化效果(图 2A), 因此研究选用灭菌土壤开展菌丝迁移降解的研究。结果表明, 灭菌土壤中蒽和苯并[a]蒽的矿化率都很低, 蒽的矿化率为 1.58%–5.91%, 苯并[a]蒽的矿化率更是不到 0.1%, 说明自然非灭菌土壤中多环芳烃矿化主要由土著微生物的生物降解作用引起。蒽污染土壤中, 单独接入鞘脂菌 NS7 或糙皮侧耳均未显著提高污染物降解, 而混合接种显著提高蒽的矿化率(提高 3.38 倍), 从 1.75% 提高到 5.91% (图 5A)。相比而言, 在苯并[a]蒽污染土壤中, 单接种或者混合接种均没有提高污染物矿化(图 5B)。

3 讨论与结论

本研究分别在液体培养体系和土壤微域体系比较了真菌糙皮侧耳和细菌鞘脂菌 NS7 对多环芳烃生物降解的差异。结果表明, 真菌和细菌虽然在多环芳烃生物降解性上存在明显差异, 但是在真实土壤中, 这种微生物降解性还受微生物适应性、迁移性等因素影响, 呈现不同的微生物修复

潜能。

细菌鞘脂菌 NS7 对低环多环芳烃具有较好的降解性能(图 1A), 而真菌糙皮侧耳对低环多环芳烃降解效率虽不高, 但在降解高环多环芳烃能力上却优于细菌(图 1B)。许多研究报道, 细菌和真菌对多环芳烃的降解特性和途径不同^[17,34]。其中, 细菌对 4 环及以下多环芳烃具有较好的矿化作用, 多环芳烃羟基化双加氧酶是其限速步骤酶, 该酶初始催化多环芳烃形成顺式(*cis*-)二氢二醇, 再经过一系列脱氢、开环双加氧的步骤实现污染物矿化^[17]。多环芳烃降解菌对多种多环芳烃的降解能力取决于其羟基化双加氧酶的广谱性转化, 具有较大的催化口袋的酶能够容纳不同大小的多环芳烃底物而实现对不同污染物的催化^[35]。相比之下, 真菌对多环芳烃降解多采用共代谢方式进行, 主要包括木质素降解酶和 P450 单加氧酶催化为主的 2 条途径^[34]。真菌对高环多环芳烃具有很好的降解效果, 但往往只是将污染物

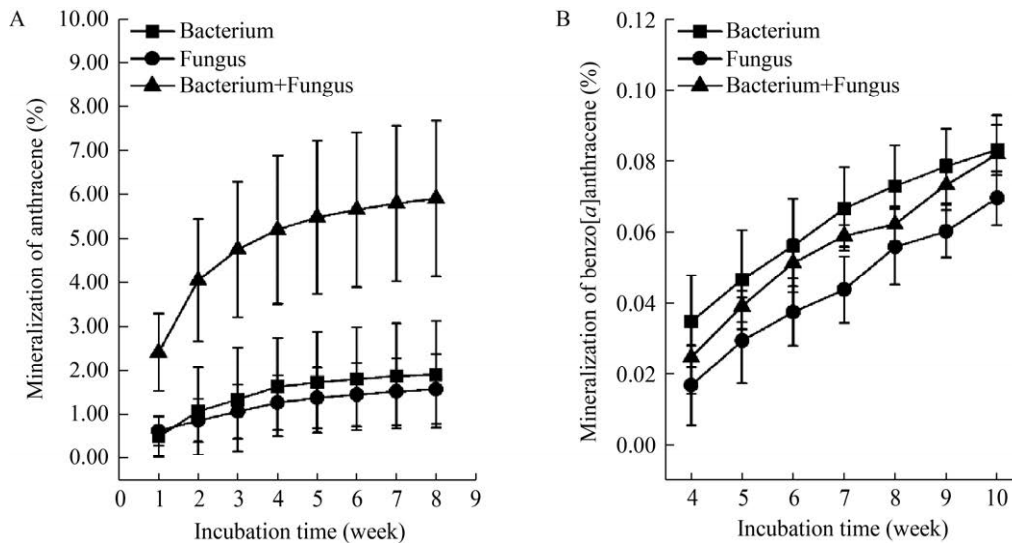


图 5 细菌鞘脂菌 NS7 和真菌糙皮侧耳混合接种对灭菌土壤中蒽(A)和苯并[a]蒽(B)矿化的影响

Figure 5 The effect of co-inoculation by *Sphingobium* sp. NS7 and *Pleurotus ostreatus* on the mineralization of anthracene (A) and benzo[a]anthracene (B) in sterile soil

转化为极性更高的代谢产物而非完全矿化^[36], 有研究发现, 真菌虽然对 5 环苯并[a]芘转化率高达 70%–80%, 但是其矿化率却不到 10%^[37]。然而水溶性更高的代谢产物, 提高了高环多环芳烃的生物可利用性, 从而促进其他降解细菌的后续降解, 有研究发现二者联合可以显著提高苯并[a]芘的矿化效率^[20,38]。

虽然纯培养体系实验表明鞘脂菌 NS7 对蒽具有较好的降解效果, 但是将其接种至非灭菌的蒽污染土壤中却未观察到明显的强化修复效果(图 2A, 图 3A), 但在灭菌土壤中明显表现出强化作用(图 5A), 这种差异很好地体现了非灭菌土壤中土著生物对外接微生物的竞争排斥^[39]。结果还发现, 灭菌土壤接种微生物最多实现约 6%的污染物矿化(图 5A), 明显不如土壤土著微生物所产生的矿化效果(图 2A)。该结果与 Zeng 等^[40]前期研究结果类似: 土著微生物能够提高漆酶氧化苯并[a]芘的产物矿化, 提升效果明显优于灭菌土壤加外接菌处理, 这凸显了土壤污染物修复过程中土著微生物的作用, 也暗示刺激土著微生物提高污染

物降解潜能的重要作用。同样受到土著生物潜在的竞争排斥, 接种真菌糙皮侧耳却显著提高非灭菌土壤中苯并[a]蒽的矿化(图 2B), 苯并[a]蒽的 $\lg K_{ow}$ 比蒽高, 意味着苯并[a]蒽在土壤中吸附性是高于蒽的, 但真菌却提高了该污染物矿化。相比而言, 该强化作用并未对污染物可提取态、结合态及产物种类上产生显著影响(图 3B、图 4B)。一方面该污染物在土壤中的矿化相对较低, 虽外接真菌能显著提高污染物矿化, 但这种强化作用不足以对占绝大比例的可提取态和结合态造成显著影响(图 3B)。另一方面, 虽然污染物发生了生物转化作用, 但由于土壤有机质对转化产物的强烈吸附作用, 可能导致大部分生物代谢产物直接结合进入土壤基质。结果发现, 污染物进入土壤后自身即会发生转化过程, 形成多环芳烃-醌类的氧化代谢产物(图 4)。据报道, 该过程可能是由土壤吸附的金属离子产生的非生物氧化过程形成, 也可能是由木质素真菌分泌的胞外木质素降解酶类生物氧化而成^[41]。结果发现, 灭菌土壤中单独接种真菌并未真正实现土壤多环芳烃的矿化(图 5B),

说明糙皮侧耳在土壤介质中实际上并没有发挥多环芳烃降解作用。在葱污染灭菌土壤的实验结果中,细菌和真菌联合接种显著高于任何单接种效果(图 5A),可解释为细菌具有降解能力但迁移能力弱,真菌有迁移力但缺乏降解力,当二者结合后真菌菌丝的延伸辅助细菌迁移进入土壤基质,从而实现了目标污染物降解^[42]。因此,非灭菌土壤中糙皮侧耳能够促进土壤苯并[a]葱矿化,其作用可能是来自菌丝对土著微生物的迁移,并非真菌本身的生物降解。

通过比较不同介质中真菌和细菌对多环芳烃的降解,本研究表明真菌和细菌在多环芳烃降解种类上具有不同偏好性,它们在土壤环境中的适应、迁移性存在差异,土壤中发挥真菌-细菌联合作用则需从生物降解和土壤环境影响等方面进行综合考量。

REFERENCES

- [1] Li Z, Gu GZ, Zhao CC, Zhao DF, Yang L. Co-metabolism biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with high relative molecular mass[J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2015, 31(3): 720-725 (in Chinese)
李政, 顾贵洲, 赵朝成, 赵东风, 杨磊. 高相对分子质量多环芳烃的生物共代谢降解[J]. *石油学报(石油加工)*, 2015, 31(3): 720-725
- [2] Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6(1): 278-309
- [3] Bojes HK, Pope PG. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2007, 47(3): 288-295
- [4] Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2005, 80(7): 723-736
- [5] Keith LH, Telliard WA. Priority pollutants. I. A perspective view[J]. *Environmental Science & Technology*, 1979, 13(4): 416-423
- [6] Report on the national general survey of soil contamination [EB/OL]. (2014-04-17). http://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/t20140417_270670.htm (in Chinese)
全国土壤污染状况调查公报 [EB/OL]. (2014-04-17). http://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/t20140417_270670.htm
- [7] Law of the People's Republic of China on the prevention and control of soil pollution [EB/OL]. (2018-08-31). http://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/201809/t20180907_549845.shtml (in Chinese)
中华人民共和国土壤污染防治法 [EB/OL]. (2018-08-31). http://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/201809/t20180907_549845.shtml
- [8] Haleyr N, Shahsavari E, Jain SS, Koshlaf E, Ravindran VB, Morrison PD, Osborn AM, Ball AS. Influence of bioaugmentation and biostimulation on PAH degradation in aged contaminated soils: response and dynamics of the bacterial community[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 238: 49-58
- [9] Simarro R, González N, Bautista LF, Molina MC. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a wood-degrading consortium at low temperatures[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(2): 438-449
- [10] Lipińska A, Wyszowska J, Kucharski J. Microbiological and biochemical activity in soil contaminated with pyrene subjected to bioaugmentation[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2021, 232(2): 1-18
- [11] Zeng J, Lin XG, Zhang J, Li XZ. Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183(1/3): 718-723
- [12] Willison JC. Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 241(2): 143-150
- [13] Fu B, Li QX, Xu T, Cui ZL, Sun Y, Li J. *Sphingobium* sp. FB3 degrades a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 87: 44-51
- [14] Zhang YH, Ahmad M, Dong JD, Yang QS, Zhou WG, Ling J. Isolation, identification and degradation characteristics of a phenanthrene degrading bacteria derived from seagrass sediment[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 1841-1853 (in Chinese)
张煜航, Manzoor Ahmad, 董俊德, 杨青松, 周卫国, 凌娟. 一株海草沉积物非降解菌的筛选、鉴定和降解特性[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 1841-1853
- [15] Hadibarata T, Kristanti RA. Fate and cometabolic degradation of benzo[a]pyrene by white-rot fungus

- Armillaria* sp. F022[J]. Bioresource Technology, 2012, 107: 314-318
- [16] Igbiri S, Udowelle NA, Ekhaton OC, Asomugha RN, Igweze ZN, Orisakwe OE. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible mushrooms from Niger Delta, Nigeria: carcinogenic and non-carcinogenic health risk assessment[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017, 18(2): 437-447
- [17] Zeng J, Wu YC, Lin XG. Advances in microbial remediation of soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(12): 2804-2815 (in Chinese)
曾军, 吴宇澄, 林先贵. 多环芳烃污染土壤微生物修复研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(12): 2804-2815
- [18] Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1369
- [19] Jacques RJS, Okeke BC, Bento FM, Teixeira AS, Peralba MCR, Camargo FAO. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(7): 2637-2643
- [20] Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(3): 1007-1019
- [21] Kohlmeier S, Smits THM, Ford RM, Keel C, Harms H, Wick LY. Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(12): 4640-4646
- [22] Otto S, Banitz T, Thullner M, Harms H, Wick LY. Effects of facilitated bacterial dispersal on the degradation and emission of a desorbing contaminant[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(12): 6320-6326
- [23] Warmink JA, Nazir R, Corten B, Van Elsas JD. Hitchhikers on the fungal highway: the helper effect for bacterial migration via fungal hyphae[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(4): 760-765
- [24] Knudsen BE, Ellegaard-Jensen L, Albers CN, Rosendahl S, Aamand J. Fungal hyphae stimulate bacterial degradation of 2,6-dichlorobenzamide (BAM)[J]. Environmental Pollution, 2013, 181: 122-127
- [25] Furuno S, Foss S, Wild E, Jones KC, Semple KT, Harms H, Wick LY. Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(10): 5463-5470
- [26] Schamfuß S, Neu TR, Van Der Meer JR, Tecon R, Harms H, Wick LY. Impact of mycelia on the accessibility of fluorene to PAH-degrading bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(13): 6908-6915
- [27] Wick LY, Remer R, Würz B, Reichenbach J, Braun S, Schäfer F, Harms H. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(2): 500-505
- [28] Han HL, Chen Z, Yang JM, Miao CC, Zhang K, Jin WB, Liu Z. Field scale demonstration of fungi-bacteria augmented remediation of petroleum-contaminated soil[J]. Environmental Science, 2008(2): 2454-2461 (in Chinese)
韩慧龙, 陈镇, 杨健民, 苗长春, 张坤, 金文标, 刘铮. 真菌-细菌协同修复石油污染土壤的场地试验[J]. 环境科学, 2008(2): 2454-2461
- [29] Zeng J, Zhu QH, Li YJ, Dai YL, Wu YC, Sun YH, Miu LY, Chen H, Lin XG. Isolation of diverse pyrene-degrading bacteria via introducing readily utilized phenanthrene[J]. Chemosphere, 2019, 222: 534-540
- [30] Xu DQ, Wang YM, Zhou DQ. Microbiology Experiment[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2019: 286-289 (in Chinese)
徐德强, 王英明, 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2019: 286-289
- [31] Lin XG. Principles and Methods of Soil Microbiology Research[M]. Beijing: Higher Education Press, 2010: 364 (in Chinese)
林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 364
- [32] Song LC, Li PJ, Liu W, Xiao YN, Zhang YL. Isolation, identification and degradation characteristics of a PAHs-degrading bacteria from salt-alkaline soil[J]. Microbiology China, 2011, 38(2): 282-287 (in Chinese)
宋立超, 李培军, 刘宛, 肖亦农, 张玉龙. 盐碱土壤 PAHs 降解菌的筛选鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(2): 282-287
- [33] Brinch UC, Ekelund F, Jacobsen CS. Method for spiking soil samples with organic compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1808-1816
- [34] Peng RH, Xiong AS, Xue Y, Fu XY, Gao F, Zhao W, Tian YS, Yao QH. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 927-955
- [35] Kweon O, Kim SJ, Freeman JP, Song J, Baek S, Cerniglia CE. Substrate specificity and structural characteristics of the novel rieske nonheme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases NidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1[J]. mBio, 2010, 1(2): e00135-10.
- [36] Wu J, Liu J, Chen J. Degradation of single and mixed PAHs by *Irpex lacteus* F17[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020,

- 60(12): 2734-2746 (in Chinese)
吴涓, 刘俊, 陈婕. 乳白耙齿菌 F17 对单一和复合多环芳烃的降解差异解析[J]. 微生物学报, 2020, 60(12): 2734-2746
- [37] Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M. Degradation of benzo[*a*]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3957-3964
- [38] Kotterman MJ, Vis EH, Field JA. Successive mineralization and detoxification of benzo[*a*]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2853-2858
- [39] Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinomen I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review[J]. International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, 2015, 3(1): 28-39
- [40] Zeng J, Zhu QH, Wu YC, Shan J, Ji R, Lin XG. Oxidation of benzo[*a*]pyrene by laccase in soil enhances bound residue formation and reduces disturbance to soil bacterial community composition[J]. Environmental Pollution, 2018, 242: 462-469
- [41] Titaley IA, Simonich SLM, Larsson M. Recent advances in the study of the remediation of polycyclic aromatic compound (PAC)-contaminated soils: transformation products, toxicity, and bioavailability analyses[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2020, 7(12): 873-882
- [42] Worrlich A, König S, Miltner A, Banitz T, Centler F, Frank K, Thullner M, Harms H, Kästner M, Wick LY. Mycelium-like networks increase bacterial dispersal, growth, and biodegradation in a model ecosystem at various water potentials[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(10): 2902-2908