1 株高效菲降解不动杆菌的筛选、鉴定及性能研究

马 丹[1], 王永刚[1,2*], 陈吉祥[1], 杨 智[1], 孙尚琛[1,3], 李文新[3]

(1. 兰州理工大学 石油化工学院,甘肃 兰州 730050; 2. 兰州理工大学 生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730050;
3. 兰州石化能源装备工程研究院有限公司,甘肃 兰州 730000)

摘 要 从兰州某化工厂石油废水中分离筛选出 1 株高效降解菲的细菌 F-1 并对其菌种进行鉴定,结合紫外分光光度法及气相色谱-质谱联用(GC-MS)对菌株生长特性、不同烃类化合物降解特性及菲降解动力学等进行了研究,利用 PCR 技术检测了芳香烃代谢相关基因。结果表明,菌株 F-1 属于约翰逊不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*),可在终浓度为 50 ~ 800 mg/L 的含菲基础培养基中正常生长。在温度 30 ℃、pH 7.0、盐度 0.3%(质量分数)、转速 180 r/min 条件下培养 5 d 后菲(终浓度为 100 mg/L)降解率为 43.57%,降解过程符合一级动力学特征。菌株 F-1 也能利用联苯、萘、蒽、芘为唯一碳源生长。GC-MS 分析显示菌株对 C10-C28 部分直链烷烃具有较强的降解能力。PCR 扩增结果表明,菌株 F-1 基因组中存在邻苯二酚-1,2-双加氧酶、苯甲酸盐双加氧酶、铁氧化还原蛋白还原酶、乙醇脱氢酶、二羟酸脱水酶、醛缩酶和氧化还原蛋白基因。研究结果为该菌株应用到含菲废水及多环芳烃污染土壤的处理和深度修复研究提供参考。

关键词 菲; 约翰逊不动杆菌; 分子鉴定; GC-MS; 降解基因

中图分类号 Q93 - 331 **文献标识码** A **文章编号** 1005 - 7021(2018)06 - 0015 - 09

doi: 10.3969/j.issn.1005 - 7021.2018.06.002

Isolation, Identification and Performances of a High-Efficient Phenanthrene-Degrading Strain of *Acinetobacter* sp.

MA Dan[1], WANG Yong-gang[1,2], CHEN Ji-xiang[1], YANG Zhi[1], SUN Shang-chen[1,3], LI Wen-xin[3]

(1. *Schl. of Petrochem. Engin.*, 2. *Schl. of Life Sci. & Engin.*, *Lanzhou Uni. of Technol.*, *Lanzhou* 730050;
3. *Lanzhou Lanshi Equip't Engin. Res. Inst. Co. LTD*, *Lanzhou* 730000)

Abstract A high efficient phenanthrene-degrading bacterial strain was isolated and screened from oil wastewater in a Lanzhou chemical plant and characterized it. The growth, different hydrocarbons degradation features, and phenanthrene biodegradation kinetics etc. of the strain were studied, combined with ultraviolet spectroscopy and GC-MS analysis. The major phenanthrene-degrading related genes of aromatic hydrocarbons metabolism were detected by the PCR amplification. The results showed that the strain F1 belonged to *Acinetobacter johnsonii*. The strain could normally grow on a basic medium containing 50-800 mg/L phenanthrene. Under the cultivation conditions as follows: 30 ℃, pH 7.0, and salinity at 0.3% (w/v) with 180 r/min of shaker, the degradation rate was at 43.57% 5 d after the cultivation with final phenanthrene concentration at 100 mg/L, and the degradation process accorded with the first class kinetic feature. strain could also grow using biphenyl, naphthalene, anthracene and pyrene as sole carbon source. GC-MS analysis showed the strain had capability to degrade part of C10-C28 straight-chain alkanes. PCR amplification results indicated that the strain possessed genes in its genome such as catechol-1,2-dioxygenase, benzoate dioxygenase, ferredoxin reductase, alcohol dehydrogenase, dihydroxy-acid dehydrogenase, aldolase, and redox prote-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31272694); 中石油天然气股份有限公司天然气与管道分公司资助项目(2014D-4610-0501); 兰州兰石能源装备工程研究院资助项目(J17-21)

作者简介: 马丹 女,硕士研究生。现从事微生物技术研究。E-mail: 13772366970@163.com

* 通讯作者。男,副教授。主要从事环境生物技术研究。E-mail: 412316788@163.com

收稿日期: 2018-03-05

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ase genes. The results of the study provided basic data for the strain applying to restoration of the wastewater containing with phenanthrene and PAHs contaminated soil.

Keywords phenanthrene; *Acinetobacter johnsonii*; molecular identification; GC-MS; degradable genes

多环芳烃是一类广泛分布并稳定存在于自然环境中的含 2 个或 2 个以上苯环的有毒有机污染物。菲为一种三环芳烃，是石油和煤炭加工工业的副产品，也是土壤沉积物中最常见的一类多环芳烃污染物[1]。菲具有致癌性、致畸性、致突变性、生物累积性以及内分泌扰乱等特性，对人体健康和自然环境有极大危害。微生物可以通过自身的代谢将多环芳烃进行分解转化，从而降低多环芳烃对生态环境的污染。目前采用微生物去除多环芳烃的方法是最常见的途径之一[2-4]。研究较为广泛的可降解菲的菌属主要有芽胞杆菌属(*Bacillus*)[5-6]、气单胞菌属(*Aeromonas*)[7]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)[8]、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)[9-10]和根瘤菌[11]等。而约翰逊不动杆菌属细菌的研究主要集中在对处理污水和污物中的氮磷化合物，对外界不利条件的抵抗能力以及耐药性和耐药机制等方面。其中研究最深入的是其聚磷与解磷特性及其机制[12-13]。Li 等[14]在低温中筛选出 1 株可以以柠檬酸钠和乙酸钠等为唯一碳源的约翰逊不动杆菌，该菌株呈现出较高的亚硝酸盐积累效率和较低的硝酸盐移除效率。约翰逊不动杆菌还具有较普遍的耐药性[15]。Wang 等[16]从土壤中筛选出 1 株能产脂肪酶的约翰逊不动杆菌。苏丹等[17]以约翰逊不动杆菌 DBP-3 菌株为研究对象，对其冷休克蛋白基因进行了克隆及表达。在环境领域内关于约翰逊不动杆菌对多环芳烃菲降解机制和应用鲜有报道。有部分报道主要是不动杆菌属细菌对其他烃类化合物的降解。刘玉华等[18]概述了不动杆菌属细菌对烷烃、芳香烃等石油组分的降解。周婷等[19]筛选出 2 株不动杆菌，并对菌株的石油降解功能进行研究，而该菌株能够利用一定浓度的烷烃以及多环芳烃进行生长。本研究从兰州某化工厂石油废水中分离筛选出 1 株不动杆菌属的高效菲降解菌，并对该菌株的生长特性、降解特性、降解动力学、菲的相关降解基因及参与菲代谢关键酶酶活进行了研究，以期为菲及其他多环芳烃的生物处理提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 菌株 F-1 分离自兰州某化工厂含油废水的污染水样。

1.1.2 培养基 ①LB 固体培养基: 酵母粉 2.5 g，蛋白胨 5 g，NaCl 5 g，琼脂 10 g，蒸馏水 1 000 mL，pH 7.0，1×10^5 Pa 灭菌 20 min。②液体培养基: 酵母粉 2.5 g，蛋白胨 5 g，NaCl 5 g，蒸馏水 1 000 mL，pH 7.0，121 ℃灭菌 20 min。③基础培养基: NH_4NO_3 3 g，K_2HPO_4 1.5 g，KH_2PO_4 1.5 g，$FeCl_2$ 0.01 g，无水 $CaCl_2$ 0.01 g，$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.1 g，NaCl 0.5 g，蒸馏水 1 000 mL，pH 7.0，1×10^5 Pa 灭菌 20 min。④筛选培养基: 不同浓度菲为唯一碳源的基础培养基。

1.1.3 试剂和仪器 菲(纯度≥97%，天津希恩思)，环己烷、正己烷(色谱纯，天津市彪仕奇)，其他试剂均为分析纯。无菌操作台(SW-CJ-2FD，苏州安泰)，全自动高压灭菌锅(280SA，致微仪器)，恒温振荡器(IS-RDV1，美国精骐)，紫外分光光度计(UV-2102PC，尤尼柯上海仪器)，PCR 扩增仪(TC-96/G/H，杭州博日)。

1.2 方法

1.2.1 菲降解菌的筛选 吸取 1 mL 水样于 100 mL 筛选培养基中，30 ℃、180 r/min 振荡培养 3 d 后，从培养液中吸取 1 mL 置于新的筛选培养基中，重复 3 次。将最后一次的培养液涂布于固体筛选基础培养基上，30 ℃恒温过夜暗室培养后，采用划线分离法进行分离与纯化，-70 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 降解菌株的鉴定 采用细菌 DNA 抽提试剂盒提取菌株基因组 DNA，采用 16S rDNA 通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)与 1492R(5′-GGTTACCTTGTTACGCTT-3′)进行 PCR 扩增。扩增条件: 94 ℃ 5 min，94 ℃ 1 min，58 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，循环 30 次; 72 ℃ 10 min。扩增结束后，产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后，将检测大小正确的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，测序结果提交 NCBI/

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

BLAST 数据库进行比对分析,选取一致性在 98% 以上的近缘性物种，用 MEGA 6.06 软件按照邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,自展值为 1 000。

1.2.3　菲降解菌生长特性　按 2% 接种量将菌株 F-1 接种于以菲(100 mg/L)为唯一碳源的基础培养基中,采用浊度法分别考察菌株 F-1 在不同温度(4、10、20、25、30、40 和 50 ℃)、不同 pH 值(2、3、4、5、6、7、8、9 和 10)、不同盐度(0%、0.3%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6% 和 7%)条件下的生长状况,震荡培养 24 h 后测定 OD_{600} 值,确定菌株 F-1 的最适生长温度、pH 和盐度。

1.2.4　菲降解菌降解特性　取 F-1 菌液转接到以菲(100 mg/L)为唯一碳源的基础培养基中,30 ℃、180 r/min 振荡培养,在 4、8、12、24、28、32、36、48、52、56 h 对其进行取样涂平板计数,计算菌株在该培养基中生长数量。将菌株 F-1 分别接种于含有不同质量浓度菲(50、100、150、200、250、400、600、800 mg/L)为唯一碳源的基础培养基中,30 ℃、180 r/min 震荡培养 24 h 后测定 OD_{600} 值,确定其菲的耐受范围,并采用平板涂布法进行菌落计数。同时考察菌株 F-1 在以联苯、萘、蒽、菲、芘、直链烃(正癸烷、十二烷、十四烷、十六烷、十八烷、二十二烷、二十四烷和二十八烷)为唯一碳源的基础培养基中的降解特性。

1.2.5　菲的测定　以环己烷作溶剂,精确配置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 菲的标准溶液,在波长为 251 nm 处用紫外分光光度计进行菲浓度的测定,绘制菲的标准曲线。同样采用环己烷萃取实验样品,多次萃取,合并萃取液,经无水硫酸钠脱水后,定容至 50 mL,作为待测样品。并于 251 nm 波长处测定吸光度,根据标准曲线计算培养基中残留菲的浓度,从而计算降解率。

1.2.6　降解动力学研究　将多环芳烃菲的浓度随时间变化的趋势与零级、一级、二级动力学方程进行拟合,取相关系数高者为相应的反应级数。

零级降解动力学方程: $c = -\kappa t + c_0$　(1)

$$t_{1/2} = c_0/(2\kappa) \quad (2)$$

一级降解动力学方程: $lnc = -\kappa_1 t + c_0$　(3)

$$t_{1/2} = ln2/\kappa_1 \quad (4)$$

二级降解动力学方程: $1/c = \kappa_2 t + 1/c_0$　(5)

$$t_{1/2} = 1/(\kappa_2 \cdot c_0) \quad (6)$$

式中: c 为菲质量浓度(mg/L); t 为降解时间(h); $t_{1/2}$ 为降解半衰期(h); κ 为零级降解速率常数; κ_1 为一级降解速率常数; κ_2 为二级降解速率常数。

1.2.7　菌株 F-1 对直链烷烃的 GC-MS 分析　分别称取正癸烷、十二烷、十四烷、十六烷、十八烷各 3.75 g,二十二烷、二十四烷及二十八烷各 1.25 g,用正己烷定容至 25 mL,配制成正癸烷、十二烷、十四烷、十六烷、十八烷的终质量浓度为 750 mg/L,二十二烷、二十四烷及二十八烷的终质量浓度为 25 mg/L 的混合液,每 100 mL 基础培养基中加入 2 mL 混合液,并接入 2% 的 F-1 菌液,30 ℃、180 r/min 摇床培养 3 d。采用正己烷萃取实验样品,多次萃取,合并萃取液,经无水硫酸钠脱水后,定容至 50 mL。用 GC-MS 测定其降解率[20],十五烷作内标,在中国科学院兰州化学物理研究所完成。

1.2.8　芳烃降解基因的 PCR 检测　参考菌株 *Acinetobacter johnsonii* XBB1 基因序列(登录号为 CP010350),选择与芳烃降解相关的邻苯二酚-1,2-双加氧酶、苯甲酸盐双加氧酶、铁氧化还原蛋白还原酶、乙醇脱氢酶、二羟酸脱水酶、醛缩酶和氧化还原蛋白基因进行 PCR 扩增。设计特异性引物见表 1,反应条件同 1.2.2。

1.2.9　邻苯二酚-1,2-双加氧酶活力的测定　将菌株 F-1 接种到液体 LB 培养基及菲质量浓度分别为 50、100、150 mg/L 的基础培养基中,过夜培养 16 h,离心收集菌体,用磷酸缓冲液重悬。采用超声破碎仪在冰浴中进行破碎,8 500 r/min、4 ℃下离心 30 min 后取上清液(粗酶液)。石英比色皿中分别加入粗酶液(0.2 mL)、磷酸缓冲液(2.4 mL)和 20 μmol/L 邻苯二酚溶液(0.4 mL),37 ℃恒温水浴锅中反应 30 min。在 253 nm 处测定光吸度值,计算光吸度增加值。酶活力单位(U)定义:37 ℃反应 30 min 条件下,每分钟内 *OD* 值变化 0.001 为 1 个酶活力单位(U)。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1 菌株 F-1 降解基因检测引物

Table 1 Primers for PCR detection of phenanthrene-degrading related genes

降解基因名称	引物	序列(5′-3′)	退火温度 /℃	PCR 产物 /bp
邻苯二酚-1,2-双加氧酶	C12DF	CAAAGCAGGCATTACAGG	58	481
	C12DR	TGCAAAGTCATCCCACAG		
苯甲酸盐双加氧酶	B12DF	AACTGGGTTTACTTAGCAC	50	570
	B12DR	TTCTTTACGTTGTTGGGT		
铁氧化还原蛋白还原酶	FRF	CTTTGGGTAAAGTGGTAA	50	520
	FRR	TCATCTGATTCTTGGGTAT		
乙醇脱氢酶	ADF	GATAATACCATTCGTGCCT	50	970
	ADR	GTAACCGTTCCAGTGCTT		
二羟酸脱水酶	DADF	GGGGATGAAAGACGAAGA	58	1 214
	DADR	CAATGTTACCGTACAGGACA		
	DAD2	CTTTACCCGTCCCTTTGT	50	1 176
	DAD2R	GCTTGAACTTCGCCATCTA		
醛缩酶	AF	GACGGCTTCGCATTTGGT	58	425
	AR	CCGCCATCGCCTTAATCT		
氧化还原蛋白	ISCF	TTAAAGTTCTCCCACATG	50	329
	ISCR	TTAGTGATTTTCAGACGC		

2 结果与分析

2.1 高效降解菲菌株筛选结果

采用筛选培养基从石油废水中共分离获得 6 株可以利用菲的菌株,分别编号为 S-1、S-2、F-1、F-2、F-3、F-4。分别以 2% 的接种量接种到以菲(100 mg/L)为唯一碳源的基础培养基中,30 ℃、180 r/min 振荡培养 5 d 后,菲的降解率如图 1。其中菌株 F-1 降解菲的能力最强,降解率为 43.57%。因此,将菌株 F-1 作为后续研究的主要对象。

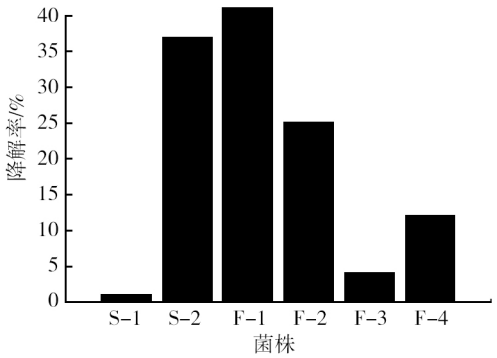

图 1 不同菌株对菲的降解率

Fig. 1 Phenanthrene degradation rate of the different strains

2.2 菌株 F-1 的鉴定结果

菌株 F-1 在 LB 固体培养基上 30 ℃过夜培养后,菌落呈乳白色,表面光滑,革兰染色结果显示为阴性细菌。菌株 F-1 部分生理生化特性结果见表 2,该菌株除精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸及尿素是阳性反应外,其余均为阴性反应。基于 16S rDNA 序列分析比对结果,采用邻接法构建系统发育树,如图 2。从图 2 中可以看出,菌株 F-1 与约翰逊不动杆菌属细菌聚为一类,亲缘关系最近,与 *Acinetobacter johnsonii* ATCC 17909 16S rDNA 序列一致性为 100%。因此,结合菌落形态和生理生化实验结果进一步说明菌株 F-1 为约翰逊不动杆菌属。提交 GenBank 数据库,登录号为 MF447530。

表 2 菌株 F-1 部分生理生化特性

Table 2 Biochemical tests performed on the strain F-1

实验项目	结果	实验项目	结果
精氨酸	+	葡萄糖	-
鸟氨酸	+	木糖	-
赖氨酸	+	麦芽糖	-
枸缘酸盐	-	蔗糖	-
硝酸盐还原	-	尿素	+
七叶苷	-	硫化氢	-
氧化酶	-	β-半乳糖苷	-
靛基质	-		

注 "+"表示阳性反应,"-"表示阴性反应

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

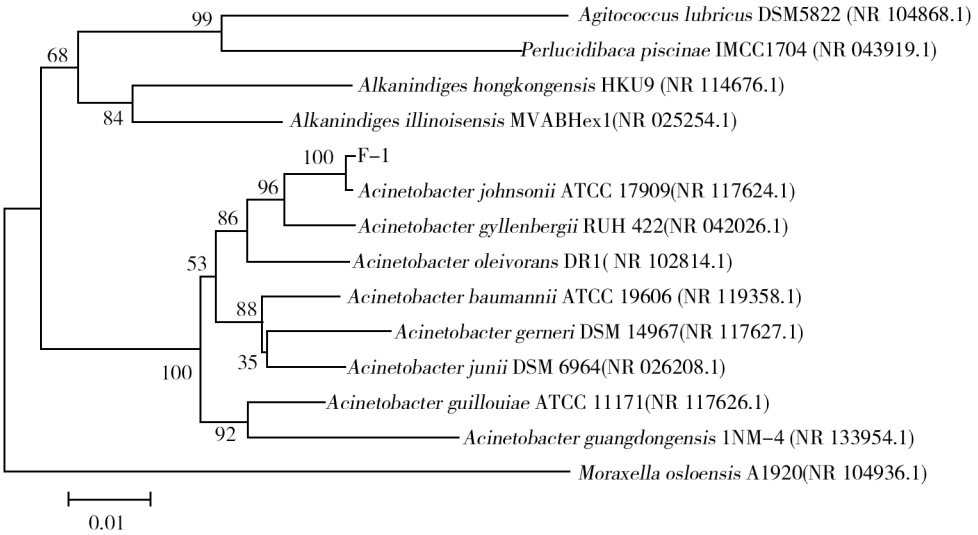

图 2　菌株 F-1 系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of the bacteria F-1 based on the 16S rDNA sequences

2.3　菲降解菌 F-1 的生长特性

菌株 F-1 在不同 pH、温度、初始浓度、盐度及时间的生长情况见图 3。由图 3A 可知，菌株 F-1 在 4 ~ 50 ℃范围内能正常生长。最适生长温度为 30 ℃，生长速度最快; 在低温(4 ~ 20 ℃) 和高温(>50 ℃) 条件下生长较为缓慢。图 3B 显示菌株 F-1 在 pH 为 5 ~ 9 能够正常生长。最适 pH 为 7，偏酸性; 而在 pH 为 2 和 10 时几乎不能生长。图 3C 显示其最适盐度为 0. 3%，随着盐度升高，菌株生长情况逐渐降低，最大耐受盐浓度可达 7%。图 3D 说明菌株 F-1 在菲初始质量浓度为 250 mg/L 时生长最好，在 800 mg/L 的质量浓度下依然可以生长，但生长微弱。可见，该菌株具有较好的环境适应性和较高菲浓度耐受性。

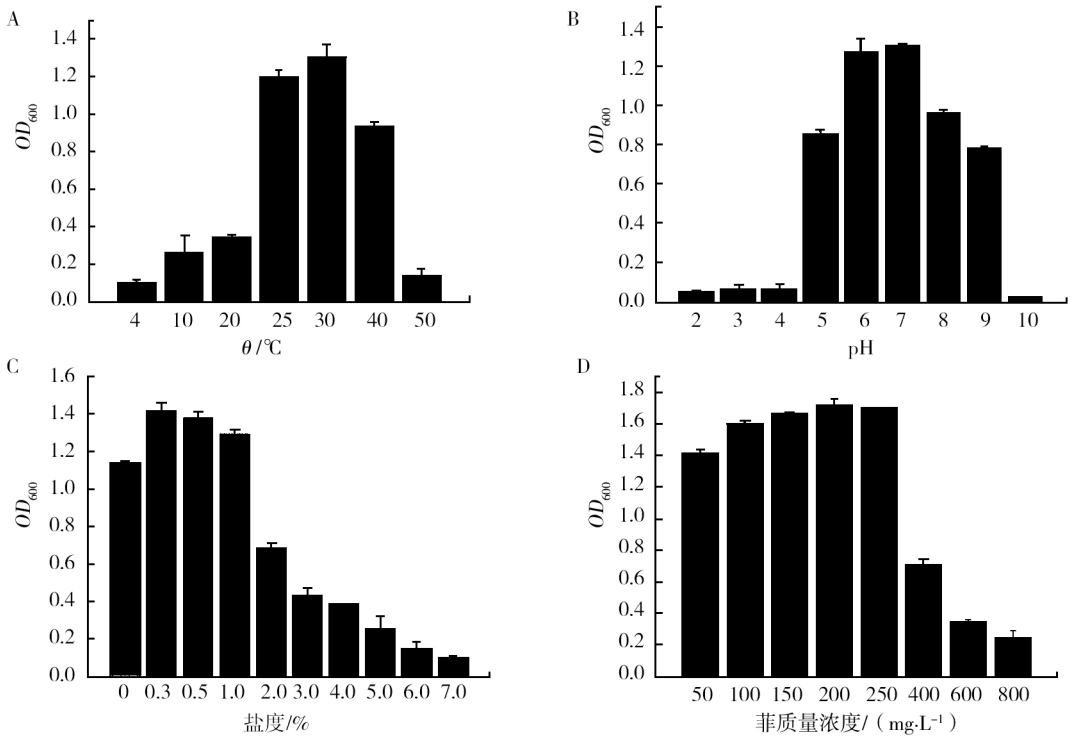

图 3　菲降解菌生长特性

Fig. 3　Growth characteristics of the phenanthrene-degrading bacteria

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 降解动力学

分别将降解率与时间关系用零级、一级、二级动力学方程拟合[21-22]，得到降解动力学拟合方程，结果如图 4。降解半衰期分别为 136.24、143.21 和 153.89 h。从图 4 中可以看出，二级方程拟合系数为 0.986 75，线性相关性良好。在 120 h 内将菲的含量从 100 mg/L 降解到 56.43 mg/L，降解率为 43.57%。

2.5 菌株 F-1 对直链烷烃的 GC-MS 分析

菌株 F-1 在以菲(100 mg/L)为唯一碳源的培养基中生长情况见图 5A，可见在 12～24 h 菌株生长情况最好，24 h 后呈下降趋势。菌株 F-1 在不同芳烃中的生长情况见图 5B，菌株 F-1 分别在联苯、萘、蒽、菲和芘(各终浓度均为 100 mg/L)的基础培养基中生长 24 h 后，测得其在联苯以及菲中生长旺盛，但在萘、蒽和芘中的生长情况较差。采用 GC-MS 分析菌株 F-1 对直链烷烃正癸烷、十二烷、十四烷、十六烷、十八烷、二十二烷、二十四烷、二十八烷的降解效果，GC-MS 检测如图 5C、D，培养 3 d 后，正癸烷的降解率为 25.3%，十二烷为 10.2%，十四烷为 11.6%，十六烷为 15.6%，十八烷为 27.4%，二十二烷为 16%，二十四烷 12%，二十八烷 11%。由此可知，菌株 F-1 不仅可以高效的降解多环芳烃菲，对直链烷烃也有较好的降解效果。

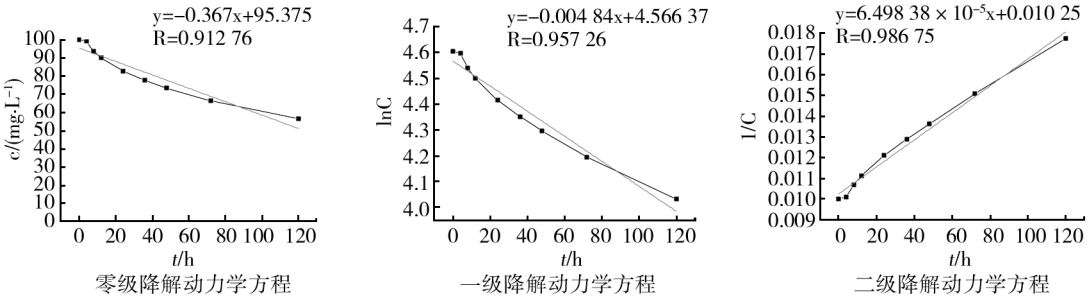

图 4 菌株 F-1 对菲的降解动力学曲线

Fig. 4 Dynamics curve of the degradation of phenanthrene of strain F-1

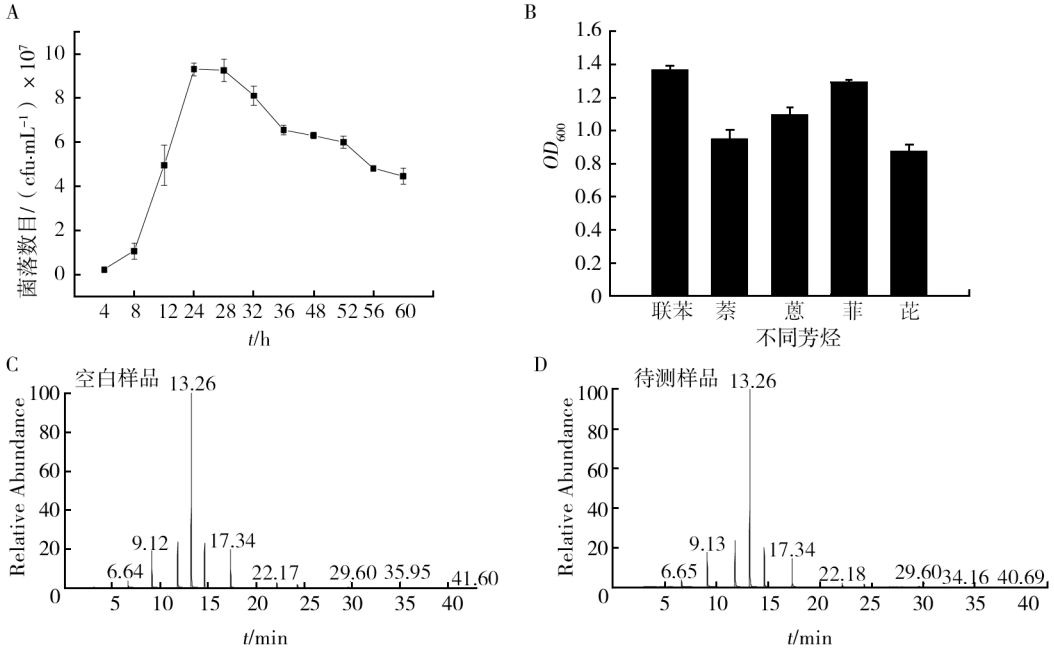

图 5 降解特性及菌株 F-1 降解直链烷烃的 GC-MS 分析

Fig. 5 GC-MS analysis of the straight-chain alkane by the Strain F-1

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.6　菲降解相关基因检测

微生物降解与代谢烃类化合物主要依赖于基因组多种功能性基因协作调控完成的。采用 PCR 特异性扩增从菌株 F-1 全基因组中检测到邻苯二酚-1,2-双加氧酶、苯甲酸盐双加氧酶、铁氧化还原蛋白还原酶、乙醇脱氢酶、二羟酸脱水酶、醛缩酶、氧化还原蛋白 7 种基因存在，电泳结果见图 6。这些基因的存在进一步证明了菌株 F-1 具有降解菲以及其他烃类化合物的能力，具体基因之间如何协作调控还有待进一步研究。

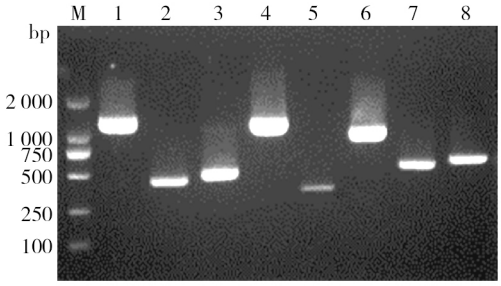

图 6　菌株 F-1 降解基因 PCR 检测电泳图

Fig. 6　Electrophoresis of the phenanthrene-degrading genes of the strains F-1

M: DNA Maker; 1、4: 二羟酸脱水酶 DAD 和 DAD2; 2: 醛缩酶 A; 3: 邻苯二酚-1,2-双加氧酶 C12D; 5: 氧化还原蛋白; 6: 乙醇脱氢酶 AD; 7: 铁氧化还原蛋白还原酶 FR; 8: 苯甲酸盐双加氧酶 B12D

M: DNA Marker; 1,4: dihydroxy-acid dehydratase DAD&DAD2; 2: aldolase A; 3: catechol-1,2-dioxygenase C12D; 5: ferredoxin; 6: alcohol dehydrogenase AD; 7: ferredoxin reductase FR; 8: benzoate-1,2-dioxygenase B12D

2.7　邻苯二酚-1,2-双加氧酶活力

邻苯二酚-1,2-双加氧酶是参与多环芳烃降解的关键性酶[23]。分别将 F1 接种在含不同浓度菲为唯一碳源的培养基和 LB 培养基中，30 ℃、180 r/min 培养 16 h 后，测定邻苯二酚-1,2-双加氧酶活力，结果见图 7。由图 7 可知，随着培养基中菲浓度的升高，邻苯二酚-1,2-双加氧酶活力呈极显著性增加($P<0.01$)，而在 LB 培养基中培养菌株的酶活力仅为 1.3 U。这可能是因为缺少了菲作为底物的诱导，使得邻苯二酚-1,2-双加氧酶在菌体中的组成型表达量减少，由此说明邻苯二酚-1,2-双加氧酶是环境诱导性酶，而且有研究表明，菲浓度与酶活力之间存在正相关关系[24-25]，与本文研究结果一致。

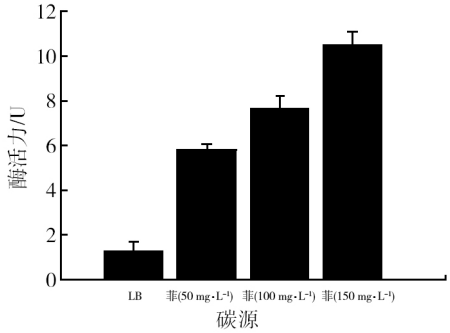

图 7　不同碳源和菲浓度中的酶活力

Fig. 7　Activity of catechol-1,2-dioxygenase under different phenanthrene concentrations and different source of carbon

3　讨　论

石油及化学加工业的快速发展，导致多环芳烃被带入环境，大面积的土壤及水源受到了威胁。由于多环芳烃在环境中的难降解性、致癌性、致畸性及致突变性，使其成为污染生态学研究的重点污染物。菲一直是科研人员在多环芳烃研究中的代表性污染物。因此，筛选出能有效降解菲的菌株更具应用价值。Janikowski 等[26]实验表明鞘氨醇单胞菌属对菲的降解率在 75 h 达 98 mg/(L·h)。邓军等[27]从受多环芳烃污染的土壤中筛选出 1 株氧化节杆菲降解菌，在含菲的基础培养基(初始质量浓度为 50 mg/L) 5 d 降解率可达 60%。徐成斌等[28]从活性污泥中筛选出耳炎假单胞菌，培养 96 h 后降解率为 65.8%。

大量研究表明，微生物对多环芳烃代谢主要通过各种芳烃加氧酶去除芳香环取代基和引入羟基，使芳香环打开后进一步降解。马迎飞等[29]从活性污泥中筛选出假单胞菌属，经 PCR 扩增和体外克隆获得双加氧酶基因。Meyer 等[30]从废水以及土壤中分离出红球菌属和假单胞菌属两种菲降解菌，利用 PCR 技术检测出邻苯二酚双加氧酶。Chang-Hyun Chang 等[31]从土壤中筛选出 3 株菲降解菌，通过 PCR 扩增检测出邻苯二酚 2,3-双加氧酶。Taylo 等[32]、Seo 等[33]相继对 PAHs 降解菌的相关基因做了研究。而细菌对菲的降解主要有两个途径即水杨酸途径和邻苯二甲酸途径[34]。Robin 等[35]筛选出 1 株分枝杆菌，能够降解多环芳烃(PAHs)，验证该菌是通过邻苯二甲酸途径降

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

解菲。何丽娟等[36]从石油污染土壤中分离到1株鞘氨醇杆菌属，对降解途径的初步研究显示，该菌株通过水杨酸途径降解菲。曹军伟等[37]从深海环境筛选出1株 *Celeribacter indicus* P73，通过GC-MS联用技术鉴定出该菌降解菲的两个重要代谢产物为1-羟基-2-萘甲酸和1-萘酚。

多环芳烃由于自身稳定的环状结构以及较差的水溶性，使得其难以被微生物利用。多环芳烃污染的土壤中含有较高浓度的盐类物质，而盐浓度过高会抑制微生物的生长，从而影响微生物对多环芳烃的降解效率。微生物的生理活动也受环境pH值变化的影响，过高或过低的pH值都会影响微生物的生长及降解酶的活性，进而降低对多环芳烃的降解速率[38]。被多环芳烃严重污染的地区，因污染物浓度过高，微生物无法生存，导致污染物无法被有效降解。因此，进一步丰富多环芳烃降解微生物菌种库，阐明多环芳烃的降解机制是至关重要的。

本研究从石油废水中分离到1株以菲为唯一碳源生长的约翰逊不动杆菌属细菌F-1，该菌株有较强的环境适应能力，在25～40 ℃、pH值5.0～9.0、盐度0%～2.0%(质量分数)范围内良好生长。在30 ℃、pH 7.0、盐度0.3%(质量分数)、转速180 r/min条件下，培养5 d对菲(终质量浓度为100 mg/L)降解率为43.57%，降解过程符合一级动力学特征。同时能以联苯、萘、蒽、芘为唯一碳源良好生长。对直链烷烃正癸烷的降解率为25.3%，十二烷为10.2%，十四烷为11.6%，十六烷为15.6%，十八烷为27.4%，二十二烷为16%，二十四烷12%，二十八烷11%。菌株F-1基因组中存在大量与烃类化合物代谢相关的基因，进一步研究对含菲废水及多环芳烃污染的处理和深度修复有着潜在的应用前景。

参考文献:

[1] Gao YZ, Collins CD. Uptake pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons in white clover [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 43(16): 6190-6195.

[2] Supaka N, Pinphanichakarn P, attaragulwanit KP, et al. Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade flu-oranthene and pyrene via cometabolism [J]. Science A-sia, 2001, 27(1): 21-28.

[3] Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, et al. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(7): 2547-2553.

[4] Deanross D, Moody J, Cerniglia CE. Utilization of mixtures of poly-cyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2002, 41(1): 1-7.

[5] 周乐，盛下放，张士晋，等. 一株高效菲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.

[6] 田智刚，李红芳，梁生康，等. 一株菲降解细菌的分离、鉴定及其降解特性研究 [J]. 青岛科技大学学报(自然科学版)，2011，32(1)：38-41.

[7] Kiyohara H, Nagao K, Nomi R. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1976, 40(6): 1075-1082.

[8] Balashova NV, Kosheleva IA, Golovchenko NP, et al. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains [J]. Process Biochemistry, 1999, 35(3): 291-296.

[9] Tao XQ, Lu GN, Dang Z, et al. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(3): 401-408.

[10] 夏颖，闵航，周德平，等. 两株菲降解菌株的特性及其系统发育分析 [J]. 中国环境科学，2003，23(2)：162-166.

[11] Huang X, Shi J, Cui C, et al. Biodegradation of phenanthrene by *Rhizobium petrolearium* SL-1 [J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(6): 1616-1626.

[12] Itoh H, Shiba T. Plolyphosphate synthetic activity of polyphosphate: AMP phosphotransferase in *Acinetobacter johnsonii* 210A [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(15): 5178-5181.

[13] 李明堂，郝林琳，刘梦洋，等. 反硝化耐冷菌 *Acinetobacter johnonii* DBP-3 的低温除磷特性 [J]. 环境科学学报，2012，32(7)：1557-1562.

[14] Li MT, Liu JH, Zhao SJ, et al. The characteristics of nitrate removal by the psychrotolerant denitrifying bacterium *Acinetobacter johnsonii* DBP-3, isolated from a low-temperature eutrophic body of water [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2013, 48(10): 885-892.

[15] 田国忠，崔步云. 约翰逊不动杆菌研究进展 [J]. 中华流行病学杂志，2011，32(3)：316-319.

[16] Wang HK, Shao J, Wei YJ, et al. A novel low-temperature alkaline lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 Suitable for detergent formulation [J]. Food Technology & Biotechnology, 2011, 49(1): 96-102.

[17] 苏丹. 约翰氏不动杆菌 DBP-3 低温生长特性及冷休克蛋白表达研究 [D]. 长春：吉林大学，2016.

[18] 刘玉华，王慧，胡晓珂. 不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌降解石油烃的研究进展 [J]. 微生物学通报，2016，43(7)：1579-1589.

[19] 周婷. 两株不动杆菌的分离鉴定、石油降解功能及生物学特性研究 [D]. 兰州：兰州理工大学，2015.

[20] 杨智，陈吉祥，秦波，等. 3株石油降解红球菌(*Rhodococcus*

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

spp.) 特性及相关基因分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2015,21(5):805-812.

[21] 刘爽,刘娟,凌婉婷,等. 一株高效降解菲的植物内生细菌筛选及其生长特性 [J]. 中国环境科学,2013,33(1):95-102.

[22] 杨滨银,晁群芳,陈志丹,等. 一株菲降解菌的筛选及降解动力学分析 [J]. 环境污染与防治,2013,35(4):62-66.

[23] 吴曼莉. 两株优势菌对多环芳烃的降解机理研究 [D]. 西安: 西安建筑科技大学,2010.

[24] 许华夏,李培军,巩宗强,等. 双加氧酶活力对细菌降解菲的指示作用 [J]. 生态学杂志,2005,24(7):845-847.

[25] 祝儒刚,钟鸣,周启星,等. 一株菲降解细菌的分离鉴定及其特性 [J]. 应用生态学报,2006,17(11):2117-2120.

[26] Janikowski T,elicogna DV,Punt M,et al. Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. [J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2002,59(2-3):368-376.

[27] 邓军,尹华,叶锦韶,等. 菲降解菌的降解特性及菲对其细胞表面形态的影响 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2010,31(1):52-57.

[28] 徐成斌,王闻烨,李鲜珠,等. 一株菲降解菌的鉴定及降解特性 [J]. 环境科学学报,2015,35(3):684-691.

[29] 马迎飞,刘训理,邵宗泽. 菲降解菌的筛选鉴定及其降解酶基因的研究 [J]. 应用与环境生物学报,2005,11(2):218-221.

[30] Meyer S,Moser R,Neef A,et al. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes [J]. Microbiology, 1999,145(7):1731-1741.

[31] Chang-Hyun Chang,Jaeyoon Lee,Bong-Gun Ko. *Staphyolccus* sp. KW-07 contains nahH gene encoding catechol 2,3-dioxygenase for phenanthrene degradation and a test in soil microcosm [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2011,65(1):198-203.

[32] Taylor PM,Medd JM,choenborn LS,et al. Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and inaromatic hydrocarbon-degrading bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters,2002,216(1):61-66.

[33] Seo JS,Keum YS,Hu Y,et al. Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. Pl-1: Initial 1, 2-, 3, 4- and 9, 10-dioxygenation and meta- and ortho-cleavages of naphthalene-1, 2-diol after its formation from naphthalene-1, 2-dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids [J]. Chemosphere,2006,65(11):2388-2394.

[34] Hiroshi H,Toshio O. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria [J]. Biosci Biotechnol Biochem,2003,67(2):225-243.

[35] Robin L. Stingley,Ashraf A. Khan,Carl E. Cerniglia. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2004,322(1):133-146.

[36] 何丽娟,李正华,洪青,等. 一株菲降解菌的特性及相关降解基因的克隆 [J]. 应用与环境生物学报,2009,15(5):682-685.

[37] 曹军伟,赖其良,袁军,等. 深海细菌 *Celeribacter indicus* P73T 对菲的降解机制 [J]. 应用与环境生物学报,2016,22(4):703-707.

[38] 王虎,吴玲玲,周立辉,等. 陕北地区石油污染土壤中不动杆菌属的筛选、鉴定及降解性能 [J]. 生态学报,2014,34(11):2907-2915.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net