

Isolation and Identification of Phenanthrene-degrading Strain and Its Degradation Property

Qiyang Ran^{1,3} Minxi Wu² Yayu Fang^{1,3} Hanjun Xing^{1,3}

1. Hunan Hengkai Environmental Protection Techonlogy Investment Co., Ltd., Changsha, Hunan, 410000, China

2. Hunan Institute of Microbiology, Changsha, Hunan, 410000, China

3. Hunan Province Organic Pollutants Site Remediation Engineering Technology Research Center, Changsha, Hunan, 410000, China

Abstract

A Philippines-degrading bacterium WLX6A was screened from the soil of a pesticide production site in Zhuzhou, Hunan, China. The strain was identified as *pseudomonas chengduensis* by morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree analysis. The effects of culture temperature, initial pH value, inoculation amount and initial concentration of phenanthrene on the growth of the strain and its degradation performance to the target contaminant (phenanthrene) were studied. The optimum culture conditions were determined as follows: culture temperature 30 °C, initial pH value 7, inoculation amount 4% and initial concentration of Phenanthrene 25mL/L. Under the optimum conditions for 10 days, the degradation rate of strain WLX6A could reach 97.6%, and the degradation effect was good, which was suitable for in situ microbial remediation of phenanthrene in medium and low concentration organic pesticides and similar sites.

Keywords

organic pollution; soil remediation; POPs

一株菲高效降解菌的筛选、鉴定及降解性能研究

冉启洋^{1,3} 吴民熙² 方雅瑜^{1,3} 邢汉君^{1,3}

1. 湖南恒凯环保科技投资有限公司, 中国·湖南长沙 410000

2. 湖南省微生物研究院, 中国·湖南长沙 410000

3. 湖南省有机污染场地修复工程技术研究中心, 中国·湖南长沙 410000

摘 要

从中国湖南株洲某农药生产遗留场地土壤中筛选得到一株菲降解菌WLX6A, 经形态特征、生理生化特征、16S rDNA序列分析及系统发育树分析等对其进行鉴定, 确定菌株WLX6A属于成假单胞菌(*Pseudomonas chengduensis*)。并通过试验研究了培养温度、初始pH值、接种量和菲的初始浓度等条件对菌株生长的影响及其对目标污染物(菲)的降解性能。确定该菌株最适宜培养条件为: 培养温度30℃、初始pH值7、接种量4%和菲的初始浓度25mL/L。在最适宜的条件下培养10d, 菌株WLX6A对菲的降解率可达97.6%, 降解效果良好, 较适合用于中低浓度有机农药及类似的场地中菲的原位微生物修复。

关键词

有机污染; 土壤修复; POPs

1 引言

持久性有机污染物(POPs)指人类合成的能持久存在于环境中, 对人类健康造成有害影响的有机化学物质, 其具有难降解、生物蓄积性强和高毒性等特点, 对人类健康和环境具有严重危害^[1-2]。由于POPs对全球环境造成潜在威胁,

对人类健康造成巨大的潜在危害。近年来已经越来越引起各国政府、学术界、工业界和公众的广泛关注, 成为备受关注的全球性环境焦点, 也成为科研院所和企业的研究热点^[3,4]。

中国曾大规模生产使用有机农药类 POPs, 虽然现在限制了 POPs 的生产和使用, 但在 POPs 生产及使用场地仍残留严重^[5-7]。近年来, 中国积极推进有机土壤修复及治理技术的研究与应用, 开展复示范工程。物理/化学修复成本高、破坏土壤理化性质及微生物结构、易造成二次污染, 修复费用高^[8], 生物修复技术成为目前研究和应用的首选^[9]。

菲(Phenanthrene)是一种非常典型的持久性有机污染物, 常被作为模式化物质研究^[10-11]。已报道分离出多种菲降

【基金项目】环洞庭湖水环境生态综合治理与资源绿色利用技术创新示范项目(项目编号: 2019SK2191)。

【作者简介】冉启洋(1989-), 男, 中国四川达州人, 硕士, 工程师, 从事环境修复研究。

解菌,但是高效降解菌株鲜有。本研究从湖南某已搬迁农药生产场地土壤中筛选分离获得了 1 株可降解菲的菌株,并对该菌株进行了鉴定,同时研究了环境因素对该菌株降解菲的影响,以期为中国 POPs 污染土壤的微生物修复提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与培养基

样品:取自湖南某农药生产遗留厂址中受污染土壤表层(0~12cm)土壤及水体样品。

主要试剂:通用引物购自上海康朗生物科技有限公司;菲购自国药集团化学试剂公司。

2.2 菌株的富集、分离与筛选

10 g 供试土样加入 90mL 无机盐培养基中,恒温摇床富集培养 5 天(30℃,180r/min),其后取体积分数 10% 溶液接入相同体积的无机盐培养基中再次富集培养 5 天,如此重复 3 次。

完成富集培养后,培养液稀释至各目标梯度,分别涂布于 LB、BP 和 PDA 培养基,置于 30℃ 恒温箱中培养 72h。挑取具有不同形态特征的单菌落,平板划线。

2.3 菌株的鉴定

菌株形态特征和生理生化特征参照东秀珠编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[12],采用 16S rDNA 基因序列分析。

2.4 菌株的生长特性

2.4.1 生长曲线的测定

用接种环挑取一环筛选到的菌株,并用生理盐水稀释至 OD₆₀₀=0.1 时制成菌悬液,吸取 1mL 菌悬液接入 BP、99mL LB 或 PDA 液体培养基中。进行振荡培养(30℃、180r/min),每 2 小时取一次样,检测菌液的 OD₆₀₀ 值。

2.4.2 菌株对菲的降解率测定

以各添加浓度为 25mg/L 菲为碳源的液体无机盐培养基(pH=7)为基础,依次将对数生长期的菌按一定比例(4%接种量)接入培养基中,进行振荡培养(30℃、180r/min)5 天、10 天、15 天。用有机溶剂(环己烷)振荡分液漏斗萃取 3 次,萃取液经定容后用紫外分光光度计分析。

3 结果

3.1 菌株的形态及分子生物学鉴定

3.1.1 菲降解菌株的形态及生理生化特性分析

筛选得到一株以菲为唯一碳源生长的菌株,命名为 WLX6A。该菌株(BP 培养基)呈半透明色,凸起,边缘不整齐,潮湿,不易挑起。

该菌株能产生色素使培养基变成深绿色,随着培养时间的延长菌体颜色越来越浅(图 1)。菌体呈短小杆状,革兰氏染色呈阴性(图 2),菌株血琼脂平板培养实验,菌落周边未出现水解圈,菌株溶血性为阴性(图 3)。

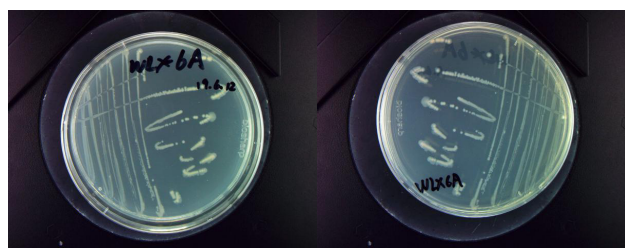


图 1 WLX6A 的菌落形态

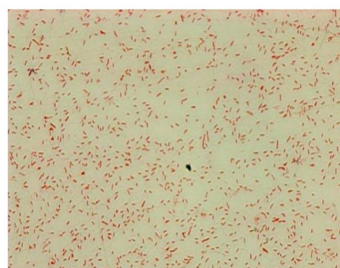


图 2 WLX6A 光学显微镜下形态(10×100)



图 3 WLX6A 溶血性分析

3.1.2 菌株 16S rDNA 序列同源性比对分析与系统发育树的构建

菌株 WLX6A 与 Genbank 发布的多株假单胞菌菌株序列的相似度达到 99%(图 4)。初步确定 WLX6A 在生物学上的分类属于假单胞属(*Pseudomonas* sp.)。

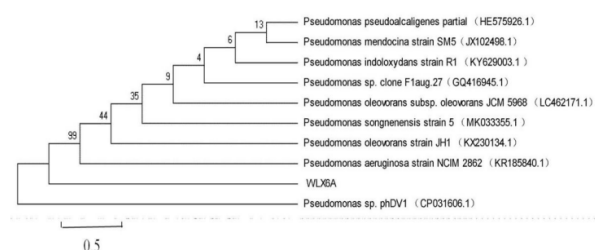


图 4 利用邻近法构建的基于 16S rDNA 的菌株 WLX6A 系统发育进化树

3.2 降解试验结果

WLX6A 菌株以菲为唯一碳源进行代谢活动,在分别培养到 5、10、15 天时菲降解率分别达 16.6%、97.6%、77.9%(图 5)。由于菲对细菌体有一定的毒性,随着细菌体内毒素的累积,其新陈代谢变慢,降解效率有所下降,同时,说明所筛选菌株 WLX6A 具有较强的降解菲的能力。

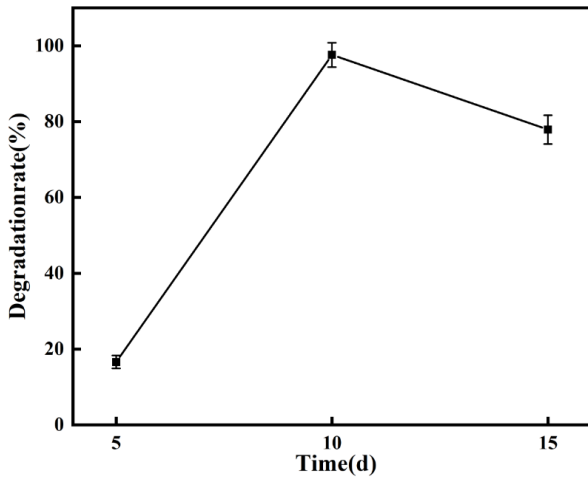


图 5 不同培养时间菌株 WLX6A 对菲的降解率

3.3 菲降解菌株的生长曲线

该菌株生长较快，接种 2h 后就度过生长延缓期，并于 2~10h 进入对数生长期，在 10~58h 之间进入生长稳定期，于 58h 后开始进入衰亡期（图 6）。

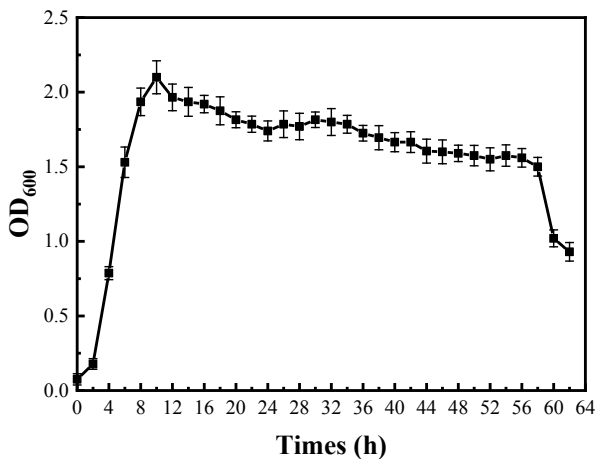


图 6 菲降解菌株 WLX6A 的生长曲线

3.4 不同培养条件对降解菌株生长的影响

3.4.1 菲初始浓度对菌株 WLX6A 生长的影响

浓度是降解菌生长的关键因素，浓度越低可参与降解的微生物越多。由图 7 可知，溶液中菲的浓度低于 50mg/L 时，菌株能够较好地适应环境，菌株生物量与菲初始浓度成反比，浓度越低，生物量越多。而当培养 20 天后，菲浓度高于 50mg/L 培养基中的菌株生物量只有低于 50mg/L 浓度培养基中生物量的二分之一。而菌株在高浓度菲（100mg/L）条件下，0~8 天内生物量一直在减少，10 天后生物量很低，并且几乎没有增长。

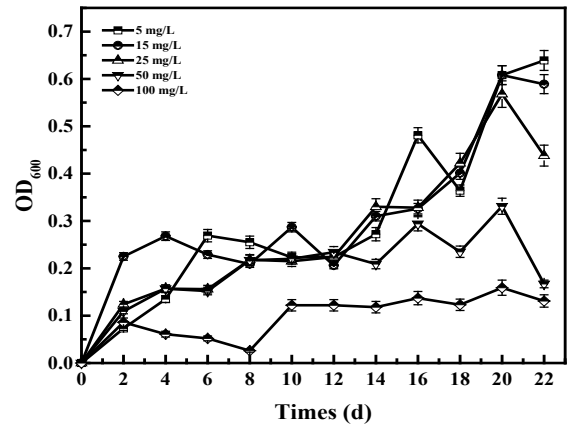


图 7 菲初始浓度对菌株 WLX6A 生长的影响

3.4.2 初始 pH 值对菌株 WLX6A 生长的影响

WLX6A 对 pH 的适应范围较窄（6~8），在酸性条件下的生长量更高，菌株 WLX6A 的最适 pH 为 7（图 8）。

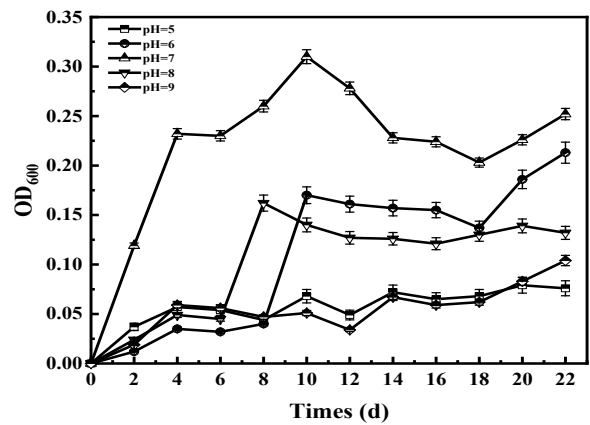


图 8 pH 对菌株 WLX6A 生长的影响

3.4.3 培养温度对菌株 WLX6A 生长的影响

测定了不同的培养温度对 WLX6A 生长的影响。结果表明，菌株适宜温度顺序依次为 30℃、35℃、40℃、25℃、20℃，最适宜的温度为 30℃和 35℃，其生长明显高于其他温度条件下的生物量，尤其以 30℃为最（图 9）。

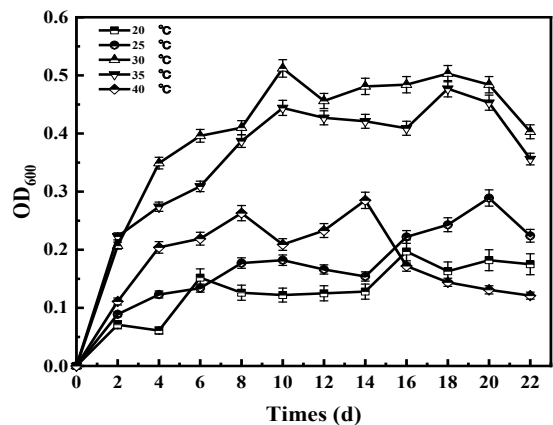


图 9 培养温度对菌株 WLX6A 生长的影响

3.4.4 接种量对菌株 WLX6A 生长量的影响

由图 10 可知, 接种量 8%、10% 的生物量在前 4 天增长速度较快, 而接种量 2% 的溶液中, 菌株直到 14 天后生物量才逐步有所增加, 说明接种量越大, 菌株适应环境的能力越强。

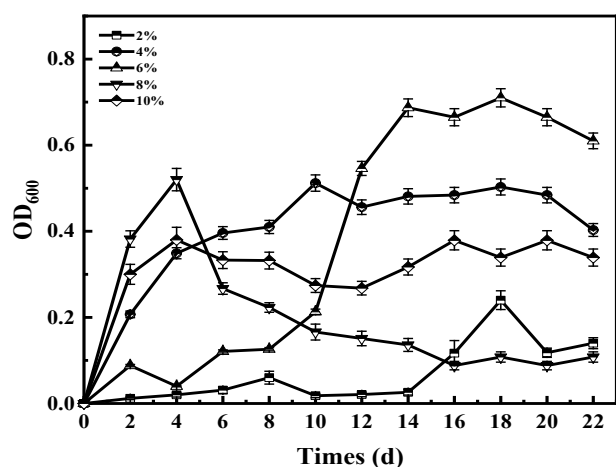


图 10 接种量对菌株 WLX6A 生长的影响

4 讨论

细菌对菲的降解通过两步实现, 首先双加氧酶对苯环进行裂解, 形成双氧乙烷。进而氧化形成顺式双氢乙醇、儿茶酸和龙胆酸等中间代谢物。其后苯环断开, 产生琥珀酸、丙酮酸和乙醛^[13-15]。降解过程中的中间产物被微生物利用, 合成自身的生物量, 同时产生 CO_2 和 H_2O ^[16]。

菲的第一步降解氧化是产生双加氧, 当营养物质含量丰富时, 反应进程加快, 几乎没有中间代谢物的积累, 因此初期降解效率较高; 随着菌株数量大, 生长快速, 大量消耗溶液中的营养物质, 导致培养 4 天后, 接种量 8% 的生物量迅速下降, 接种量 10% 的生物量几乎没有增长, 接种量 6% 的菌株在培养 10 天后的生物量快速升高, 而接种量 4% 的菌株在培养 10 天后生物量的增长趋于平稳, 成功论证了该菌株降解菲的过程符合生物及化学规律, 试验得出的数据科学。

5 结论

本试验从农药生产场地土壤中分离筛选出降解菲活性菌, 得到了一株降解能力较强的菌株 WLX6A。

该菌株在 BP 培养基中菌落呈半透明色, 凸起, 边缘不整齐, 潮湿, 不易挑起, 菌体呈短小杆状, 革兰氏染色呈阴

性。初步鉴定菌株 WLX6A 为成都假单胞菌 (*Pseudomonas chengduensis*)。

菌株 WLX6A 在菲浓度为 25mg/L 的液体无机盐培养基中降解率最高, 可达到 97.6%。综合菌株的生长条件、降解能力以及场地有机污染的原始浓度值等条件, 菌株 WLX6A 较适合用于中低浓度有机农药及类似的场地中菲的原位微生物修复。

参考文献

- [1] 翟付群, 刘学擎, 曹晓. POPs 污染场地修复技术筛选探讨[J]. 环境与发展, 2020, 32(10): 112-113.
- [2] 余刚, 黄俊, 张彭义. 持久性有机污染物: 倍受关注的全球性环境问题[J]. 环境保护, 2001(4): 37-39.
- [3] 刘玮婷, 郭楚玲, 刘沙沙, 等. 微塑料对近岸多环芳烃降解菌群结构及其降解能力的影响[J]. 环境科学学报, 2018, 38(10): 4052-4056.
- [4] 邢汉君, 蒋俊, 李晶, 等. 有机氯农药污染土壤异位热脱附修复研究[J]. 湖南农业科学, 2019(11): 62-64.
- [5] 陈刚, 程莉蓉, 丁爱中. 金属离子对长期污染土壤中多环芳烃解吸的影响[J]. 环境科学学报, 2012, 32(7): 1708-1716.
- [6] 钟茂生, 姜林, 夏天翔, 等. 基于土壤中多环芳烃解吸特性的生物修复效果评价[J]. 环境科学学报, 2012, 32(3): 726-730.
- [7] 张学良, 李群, 周艳, 等. 某退役溶剂厂有机物污染场地燃气热脱附原位修复效果试验[J]. 环境科学学报, 2018, 38(7): 2868-2875.
- [8] 韩凤. 溶解性有机质对有机污染土壤化学氧化修复影响及应用[D]. 济南: 济南大学, 2019.
- [9] 冯琦. PAHs 污染对农田土壤微生物群落组成的影响[D]. 大连: 大连理工大学, 2019.
- [10] 王仁女. 一株菲降解菌 CFP312 筛选及其增溶生物降解研究[D]. 赣州: 江西理工大学, 2020.
- [11] 邢汉君, 吴民熙, 郭照辉, 等. 一株正十六烷降解菌的分离鉴定及其降解性能研究[J]. 化学与生物工程, 2020, 37(1): 38-42.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 韦璇, 郝雅芳, 李光, 等. 菲污染土壤的微生物修复机制[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(6): 114-124.
- [14] 卫昆, 陈烁娜, 尹华, 等. 蜡状芽孢杆菌对菲的降解特性及降解酶研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(2): 506-512.
- [15] 丁洁, 王银善, 沈学优, 等. 白腐真菌对菲和芘的吸附-脱附作用及影响因素[J]. 环境科学学报, 2010, 30(4): 825-831.
- [16] 徐成斌, 王闻焯, 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.