第 51 卷 第 1 期 中山大学学报（自然科学版） Vol. 51 No. 1
2012 年 1 月 ACTA SCIENTIARUM NATURALIUM UNIVERSITATIS SUNYATSENI Jan. 2012

一株菲降解菌的生长特性及其对荧蒽和芘的降解能力*

杨秀虹[1,2]，汤婉环[1]，李适宇[1,2]
（1. 中山大学环境科学与工程学院，广东 广州 510275；
2. 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室，广东 广州 510275）

摘 要：研究了一株固氮螺菌属（*Azospirillum*）的菲降解菌 PE1501-1 在不同培养条件（温度、初始 pH 值、菲初始浓度、共基质）下的生长特性，并初步考察了该菌株在液体培养基和土壤中对 4 环 PAHs—荧蒽和芘的潜在降解能力。结果表明，在含菲 50 mg/L 的无机盐液体培养基中，该菌株的最适生长温度为 30℃；偏酸性环境更有利于菌株生长，液体培养基初始 pH 5.0 时菌株生长最好；该菌株能耐受菲的初始浓度超过 200 mg/L，但菲初始浓度较高时菌株生长出现较明显的延迟期；添加乙酸、溶解性富里酸或溶解性胡敏酸作为菲的共基质对菌株生长有短暂的促进作用；在液体培养基中菌株能以菲或荧蒽为唯一碳源和能源充分生长，并对荧蒽有一定程度的去除能力，但对芘的降解能力很低；将该菌株接种到灭菌污染土壤中，可有效提高菲、荧蒽或芘的去除效果。

关键词：菲降解菌；培养条件；生物降解；荧蒽；芘
中图分类号：X172 **文献标志码**：A **文章编号**：0529－6579（2012）01－0107－08

The Growth Characteristics and Fluoranthene and Pyrene Degradation Potential of a Phenanthrene-degrading Strain

YANG Xiuhong[1,2], *TANG Wanhuan*[1], *LI Shiyu*[1,2]
(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Environmental Pollution Control and Remediation Technology, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The effects of different culture conditions including temperature, pH, initial phenanthrene concentration and co-substrates on the growth of a phenanthrene-degrading strain PE1501-1 affiliated to the genus *Azospirillum* were studied. The potential degradation of fluoranthene and pyrene by strain PE1501-1 in liquid culture medium or soil microcosm were investigated. The strain shows better growth under slightly acid culture conditions. Optimal temperature and pH are as 30 °C and 5.0 respectively in a mineral salts liquid medium with phenanthrene at 50 mg/L as the sole substrate. The strain is able to tolerate higher initial phenanthrene concentration than 200 mg/L, while an obvious lag phase is observed when the strain is exposed to high initial phenanthrene concentration. The growth of strain PE1501-1 is transitorily enhanced by the individual addition of acetic acid, dissolved fulvic acid or dissolved humic acid as the co-substrate of phenanthrene. Strain PE1501-1 is able to grow in liquid culture media by utilizing phenanthrene or fluorenthene as the sole carbon and energy source with the potential to degrade fluorenthene but not pyrene. The removal of phenanthrene, fluorenthene or pyrene is enhanced by adding strain PE1501-1 in sterile soils.

Key words: phenanthrene-degrading strain; culture conditions; biodegradation; fluoranthene; pyrene

---

* 收稿日期：2011－05－26
基金项目：广东省自然科学基金资助项目（04009791）；广东省环境污染控制与修复技术重点实验室开放研究基金资助项目（2006K0018）
作者简介：杨秀虹（1975 年生），女，讲师；通讯作者：李适宇；E-mail：eeslsy@mail.sysu.edu.cn

多环芳烃（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons，简称PAHs）是一类性质稳定、具有致癌、致畸和致突变的“三致”作用的有毒有机污染物，它们广泛存在各种环境介质中，对人体健康和生态环境具有潜在的危害性，已被多个国家列为优先控制污染物。土壤是这类污染物的重要归宿地。土壤中残留PAHs的自然衰减主要依赖于微生物的代谢作用。以微生物代谢作用为主的生物修复技术具有成本低、效果好、无二次污染等优点，是目前PAHs污染土壤修复最具有潜力的修复手段之一。为了提高待修复地PAHs的去除效果，生物修复工程中常用的一种措施是利用通过富集培养技术从污染区土壤中分离得到的土著微生物的降解能力[1-2]。目前已经从受到石油、PAHs等污染的土壤中分离出许多能以某种PAH组分（如菲）为单一碳源和能源生长的的降解菌株[3-8]。在应用分离的降解菌对实际污染场地进行修复之前，还需要对菌株的最适培养条件、降解活性及其环境适应性等方面进行一系列的评价。另一方面，多种低环和高环的PAHs组分共存是实际污染环境的重要特征之一。从各种污染生境中筛选分离出能够同时有效降解不同种类PAHs的菌种成为采用微生物修复污染土壤的重要前提。

我们的前期研究已经从污染土壤中筛选分离得到10株能利用菲为唯一碳源和能源生长的菌株，并对其中3株具有较高降解能力的菌株进行了初步鉴定[7]。其中属于固氮螺菌（*Azospirillum* sp.）的菌株PE1501-1对菲的降解效果是所有分离菌中最好的。*Azospirillum* 属的细菌具有代谢有机氯化合物或芳香化合物的能力[9,10]，但在PAHs微生物降解研究中很少有来自该属的降解菌的相关报道。本文对菌株PE1501-1在不同培养条件（温度、初始pH值、菲初始浓度、共基质等）下的生长特性进行研究；并初步研究了该菌株分别在无机盐液体培养基和土壤环境中对4环PAHs——荧蒽和芘的潜在降解能力，为该菌株在实际污染场地的生物修复工程中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

菲降解菌株PE1501-1分离自PAHs污染土壤，初步鉴定为固氮螺菌（*Azospirillum* sp.）[7]。

1.2 主要培养基

实验中用到的无机盐液体培养基、含菲的无机盐液体培养基、牛肉膏蛋白胨固体培养基等主要培养基的配方同参考文献［7］。

1.3 培养条件对菌株PE1501-1生长的影响研究

1.3.1 *温度的影响* 在含菲初始浓度为50 mg/L的无机盐液体培养基中，按10%（体积分数）接种量接种菌悬液（菌体初始浓度约为10^8个/mL），分别在20、25、30、35、37℃下120 r/min摇床培养，每隔24 h测定菌体生物量（A_{600}）。

1.3.2 *无机盐液体培养基初始pH值的影响* 配制pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5及8.0的含菲初始浓度为50 mg/L的无机盐液体培养基；按10%（体积分数）接种量接种菌悬液（菌体初始浓度约为10^8个/mL），30 ℃下120 r/min摇床培养，每隔48 h测定菌体生物量（A_{600}）。

1.3.4 *不同菲初始浓度的影响* 配置含菲初始浓度分别为35、69、139和208 mg/L的无机盐液体培养基，按10%（体积分数）接种量接种菌悬液（菌体初始浓度约为10^9个/mL），30 ℃下120 r/min摇床培养，每隔48 h测定菌体生物量（A_{600}）。

1.3.5 *共存基质的影响* 本实验选取乙酸、溶解态富里酸（FA）和胡敏酸（HA）作为天然可溶性碳源的代表，用于研究可溶性有机物（DOM）与菲共存条件下，菌株PE1501-1生长特性的变化。

溶解态腐殖酸的制备方法参考文献[11]，但有所修改：称取5 g商品腐殖质于50 mL离心管，加入20 mL 0.1 mol/L的NaOH溶液，摇床振荡5 h使腐殖酸充分溶解，转移至2 000 mL烧杯中，缓慢加入0.01 mol/L HCl溶液，调节pH至3.0，静置4 h分层，过滤，用0.01 mol/L HCl洗涤滤渣。其中滤液用0.01 mol/L NaOH调节pH至7.0，过0.45 μm滤膜，滤液于70℃水浴中蒸至近干，然后冷冻干燥，制得可溶性固体富里酸（FA）；滤渣用0.1 mol/L NaOH重新溶解，用0.01 mol/L HCl调节pH至7.0，过0.45 μm滤膜，滤液于70℃水浴中蒸至近干，然后冷冻干燥，制得可溶性固体胡敏酸（HA）。

取一定量DOM组分（乙酸、FA或HA）添加到含菲初始浓度为50 mg/L的无机盐液体培养基中，使其浓度分别为10、50和500 mg/L，每个组分每个浓度设2个平行，接种菌悬液（菌体初始浓度约为10^9个/mL），30℃、120 r/min摇床培养，定时测定菌体生物量（A_{600}）。

1.4 菌株PE1501-1的生长降解特性测定

研究最优生长条件下菌株PE1501-1的生长曲线及其对菲的降解曲线。菌株按照10%（体积分

数）接种量（菌体初始浓度约为 10^7 个/mL）加入到含菲初始浓度为 50 mg/L 的已灭菌无机盐液体培养基中，调节培养液初始 pH 为 5，30℃下 120 r/min 摇床培养，设 3 个平行，2 个不接种的空白。每隔 48 h 取样测定培养液中菲的残余浓度和菌体生物量（A_{600}），并绘制菌株 PE1501-1 对菲的降解曲线及其生长曲线。

培养液中菌体生物量（A_{600}）及菲浓度的测定方法参见文献［7］。

1.5　菌株 PE1501-1 对荧蒽和芘的降解能力研究

该研究菌株 PE1501-1 分离自城郊表层 PAHs 污染土壤。据报道，4 环的荧蒽和芘等通常是城市表层土壤中几种含量较高的共存组分[12,13]。因此，选择 4 环的荧蒽和芘作为高环 PAHs 的代表，初步研究了非降解菌株 PE1501-1 分别在无机盐液体培养基和土壤中对这些组分的潜在降解能力。

1.5.1　*无机盐液体培养基中的降解试验*　配置含荧蒽或芘的已灭菌无机盐液体培养基，按照 10%（体积分数）接种量接种菌悬液（菌体初始浓度约为 10^9 个/mL），30 ℃、120 r/min 摇床培养，分别在第 0 d、15 d 取样测定培养液的菌体生物量 A_{600} 及荧蒽或芘的含量。每种处理 3 个平行，同时设置不接种的对照组。

1.5.2　*污染土壤中的降解试验*　取采自城郊林地的两个 PAHs 低污染的表层土样为供试土壤，其本底 15 种 USEPA 优控 PAHs 总含量（不包括萘）及基本理化性质见表 1。

表 1　供试土壤的 PAHs 总含量及基本理化性质

Table 1　Total PAHs concentrations and physico-chemical properties of soils studied

土样	PAHs 总含量（μg · kg^{-1}）	pH	有机碳含量（g · kg^{-1}）	全氮含量（g · kg^{-1}）	田间饱和含水量 %
1#	1.4	4.85	3.36	0.402	42.3
2#	1.7	4.34	9.00	1.03	37.7

土样风干后过 20 目筛，取两份土样等量充分混匀，于 105℃烘 6 h 去除水分，取 30.0 g 分装于 100 mL 三角瓶中，121℃高温高压灭菌 60 min，冷却后添加一定量菲、荧蒽或芘的正己烷溶液，使其初始浓度为 50 mg/kg，于暗处放置过夜，待溶剂挥发后按 10% 接种量接种菌悬液（菌体初始浓度约为 10^8 个/mL），每瓶定量加入灭菌高纯水，并在培养过程中定时补充水分，使土样含水率保持在田间饱和含水量的 60%。塞上棉塞，置 30℃恒温箱中避光培养，分别在培养的第 0、15 d 取样测定土壤中 PAH 含量（菲、荧蒽或芘），并测定开始培养时（第 0 d）土壤的多酚氧化酶活性。每种处理 3 个平行，同时设置不接种的对照组。

1.6　分析方法

1.6.1　*无机盐液体培养基及土壤中 PAH 含量的测定*　无机盐液体培养基中荧蒽或芘的测定方法：采用整瓶提取法，将样品全部转移至 100 mL 分液漏斗，加入等量环己烷，激烈振荡后静置分层，取上层溶液过硅胶（1.0 g，100 ~ 200 目）层析柱，用二氯甲烷/正己烷混合液（1∶1，体积比）淋洗出芳烃。洗脱液经高纯氮吹脱，GC-MSD 分析前加入一定量的内标化合物（六甲基苯，购自 Supelco 公司），正己烷定容，留待上机。

土壤中菲、荧蒽或芘的测定方法：采用超声萃取法提取土壤中的 PAH，经硅胶层析柱净化后进行 GC-MSD 分析。具体测定步骤及仪器分析条件见参考文献［12］。

样品中 PAH 通过标准样品的保留时间进行定性，并通过质谱的分子离子峰进行确认，用内标法定量。无机盐液体培养基中菲、荧蒽和芘的平均回收率分别为：83.9%、83.6% 和 82.2%；平行测定的相对标准偏差介于 0.01% ~ 7.62% 之间，大部分集中在 0.40% ~ 6.00% 范围内。土壤中菲、荧蒽和芘的平均回收率分别为：88.7%、82.4% 和 81.4%；平行测定的相对标准偏差介于 0.38% – 7.76%，大多数不超过 5%。

1.6.2　*土壤多酚氧化酶活性的测定*　多酚氧化酶活性采用邻苯三酚比色法[14]测定，即在样品中加入邻苯三酚后，在 30℃恒温培养 1 h，在多酚氧化酶作用下使邻苯三酚氧化成有色的没食子素，酶的活性单位以 1 g 土壤在 1 h 内生成的没食子素的毫克数表示（mg/(g · h)）。

2　结果与讨论

2.1　培养条件对菌株 PE1501-1 生长的影响

2.1.1　*温度的影响*　不同温度条件下培养液中菌株 PE1501-1 生长量的变化见图 1。

由图 1 可见，与较低的培养温度（20 和 25 ℃）相比，30 及 30 ℃以上的培养条件下，菌株 PE1501-1 的生长延迟期明显缩短（从 3 d 缩短到 1 d）。从菌株的生长量随时间的变化趋势来看，大部分培养温度下（30℃除外）菌体生物量在第 4 或第 5 d 达到最高峰后出现明显下降，此后保持较平稳的生长状态。而 30℃培养条件下，菌体生物

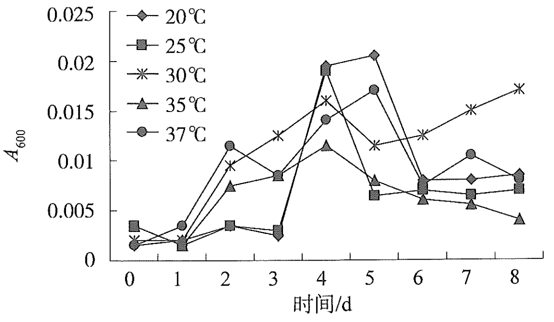

图1 不同培养温度对菌株PE1501-1生长的影响

Fig. 1 Effects of different temperatures on growth of strain PE1501-1

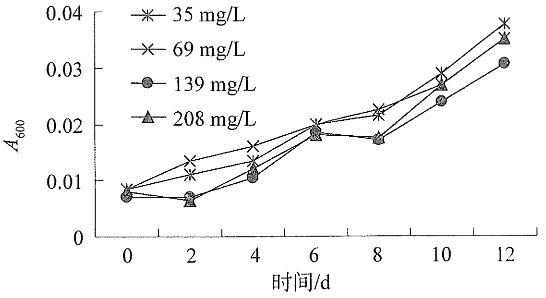

图3 液体培养基中不同菲初始浓度对菌株PE1501-1生长的影响

Fig. 3 Effects of different phenanthrene concentrations of liquid culture medium on growth of strain PE1501-1

量在第4 d出现第一个高峰值后稍有下降，但之后又出现持续上升状态，到第6 d后菌体生物量已超过了其他温度条件下培养液的菌体生物量，表明菌株一直保持比较良好的生长趋势。综合以上分析，可确定30 ℃为该菌株的最适培养温度。

2.1.2 *初始pH的影响* 液体培养基不同初始pH对菌株PE1501-1生长量的影响见图2。

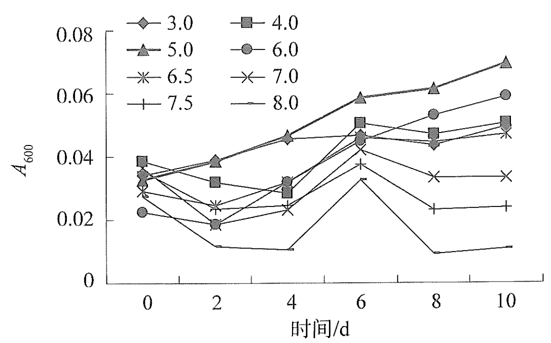

图2 液体培养基不同初始pH对菌株PE1501-1生长的影响

Fig. 2 Effects of different initial pH of liquid culture medium on growth of strain PE1501-1

由图2可见，菌株PE1501-1较适合在偏酸性环境中生长，在该培养条件下菌体生长更快，延迟期较短。其中，当液体培养基初始pH值为5.0时，菌体生长没有明显的延迟期，且生长量一直保持上升趋势并高于其他培养条件下的生长量，表明在整个培养期菌株生长旺盛，故pH 5.0为该菌株最适培养pH值条件。而中性和偏碱性条件下（pH 7.0－8.0），菌株生长受到明显的抑制。

2.1.3 *菲初始浓度的影响* 液体培养基中不同菲初始浓度对菌株PE1501-1生长的影响见图3。

从图3可知，在实验设定的菲初始浓度范围内，菌株PE1501-1均呈现较好的生长趋势，说明该菌株能耐受初始浓度为208 mg/L的菲，并可利用菲作为碳源进行生长。但菲初始浓度较高时（139和208 mg/L），在培养的前两天菌株PE1501-1的生长出现较明显的延迟期，而且整个培养期间菌体生物量稍低于菲初始浓度较低（35和69 mg/L）的培养液。

2.1.4 *菌株PE1501-1的生长曲线及其对菲的降解曲线* 在最适培养条件下对菌株PE1501-1进行摇瓶培养，根据每2 d测定的液体培养基A_{600}和菲的残留量，绘制菌株PE1501-1的生长曲线及其对菲的降解曲线，如图4所示。

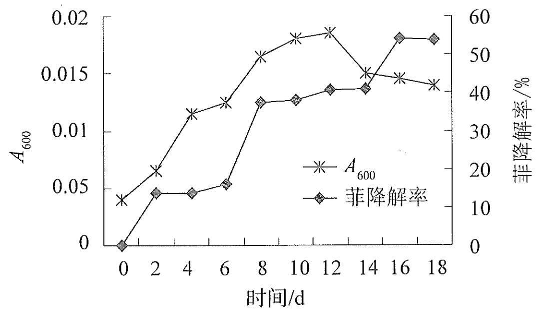

图4 菌株PE1501-1的生长曲线和降解曲线（初始菲浓度50 mg/L，初始pH 5.0，30℃）

Fig. 4 Growth and phenanthlene degradation by strain PE1501-1 at 30℃ with initial pH of 5.0 with phenanthelene concentration of 50 mg/L

菌株对菲的降解曲线表现出阶梯式的上升趋势，菲降解率在前6 d维持在一个相对平稳的低水平（17%以下），而这段时间菌株处于快速增长期；到第8～12 d，菌株生长进入高峰期，同时菌株对菲的降解能力有较大的提高，降解率升至40%；到培养后期（14～18 d）菌株生长进入稳定

期，降解率则继续缓慢增长，实验结束时菌株对菲的降解率达到 53.9%。总体来说，菌株对菲的降解与其生长保持相似的增长趋势，说明菌株对菲有较高的降解活性，并能以菲作为唯一的碳源进行生长。

2.1.5　共基质的影响　本实验研究了在含菲的无机盐液体培养基中添加不同浓度的各种共存 DOM（乙酸、FA 或 HA）对菌株 PE1501-1 生长的影响，结果如图 5 所示。

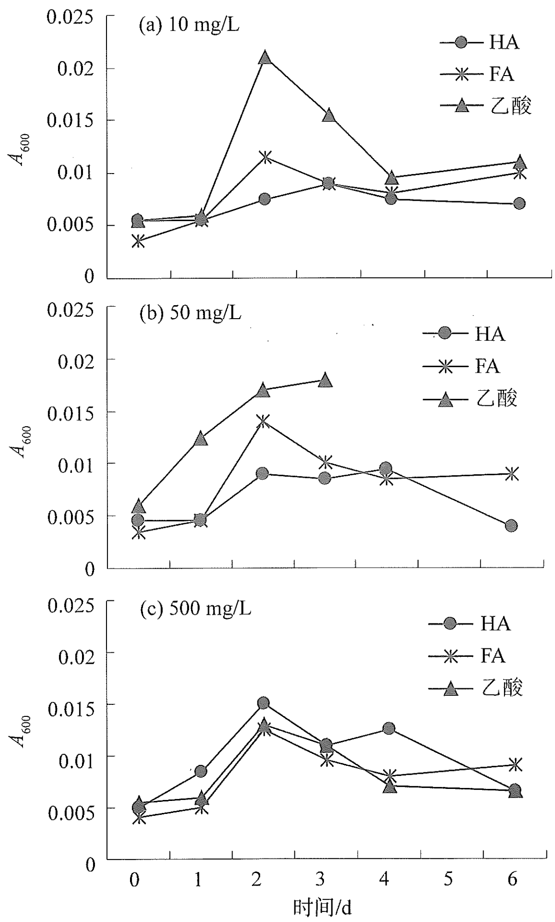

图 5　含菲无机盐液体培养基中添加不同浓度的乙酸、FA 或 HA 对菌株 PE1501-1 生长的影响

Fig. 5　Effects of individual addition of different concentrations of acetic acid, dissolved fulvic acid or dissolved humic acid as the co-substrate with phenanthrene in mineral salts liquid media on growth of strain PE1501-1

由图 5 可见，与只加菲的无机盐液体培养基相比，菌株 PE1501-1 在 DOM 与菲共存的无机盐液体培养基中的生长曲线明显不同。所添加的三种 DOM 对菌株的生长均有短暂促进作用，菌体生物量在第 2 d 或第 3 d 已到达最大值，但此后菌株的生长出现快速下降。三种 DOM 中，乙酸在中低浓度（10 mg/L 和 50 mg/L）条件下对菌株生长的促进作用最大，但高浓度条件下（500 mg/L）的影响不如 HA 明显。这可能与乙酸的分子量较低、结构简单、容易被菌株利用有关，但高浓度时会大幅度降低培养液 pH 值，反而限制了菌株生长。总体上，添加更易利用的共存碳源短时间内有利于菌株的快速生长。

多种有机碳源（包括多种天然有机物、有机污染物等）共存是野外土壤环境的重要特征之一。作为土壤有机物重要组成部分的 DOM，是微生物生存和生长的重要天然碳源和能量来源，是影响土壤微生物活性的重要指标。同样，在 PAHs 和 DOM 共存的多底物体系中，DOM 的含量和特性可能对 PAHs 降解菌的生存、生长和代谢活性等方面产生影响，并最终可能影响 PAHs 的生物去除效果。尽管天然 DOM 是一类成分复杂的混合物，但一般均包含一些低分子量有机酸和溶解性的腐殖酸，因此实验中选择了乙酸、溶解性 FA 和 HA 作为 DOM 的替代物进行研究。从上述分析可知，添加外来 DOM 可在短期内促进菌株 PE1501-1 的生长，其可能的作用机制包括：① 外来 DOM 作为比菲更易利用的碳源（如乙酸）可被菌株快速代谢而明显促进其种群的增长；② DOM 对低溶解性菲的增溶作用使得菌株更易获得可利用碳源，从而得到快速增长。PAHs 降解菌群的大量增长有利于提高 PAHs 的降解速率。因此，有研究者建议可以通过添加某些易溶性有机物（如腐殖酸或含腐殖酸的物质）来增强对 PAHs 污染场地的生物修复效果[15,16]。但本研究中，菌株 PE1501-1 只出现短暂的快速增长，这是否有利于提高菲的降解效果还有待进一步的研究确认。

2.2　菌株 PE1501-1 对无机盐液体培养基中荧蒽和芘的降解能力

为了考察菲降解菌株 PE1501-1 对其他 PAH 组分的降解能力，将菌株接种到以荧蒽或芘为唯一碳源的无机盐液体培养基进行为期 15 d 的降解试验，结果如图 6 所示。

两种 PAH 组分在无接种对照中均有一定程度的损失（约 10%）。以荧蒽为唯一碳源时，菌株表现出一定的降解能力，对荧蒽的净降解率为 13.6%；以芘为单一碳源时，与无接种对照培养液中芘的损失（约 10%）相比，接种培养液中芘的降解率只增加了约 2%。由此可知，该分离菌株除了对菲有较高的降解活性之外，也能在一定程度上降解 4 环的荧蒽，但对 4 环芘的降解能力则很低。

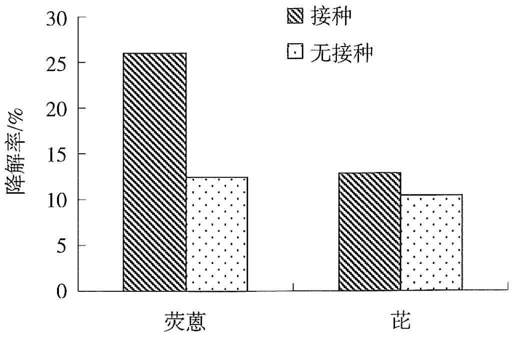

图6 接种菌株PE1501-1对无机盐液体培养基中荧蒽或芘去除的影响

Fig. 6 Effect of inoculation with strain PE1501-1 on removal of fluoranthene or pyrene in mineral salts liquid media

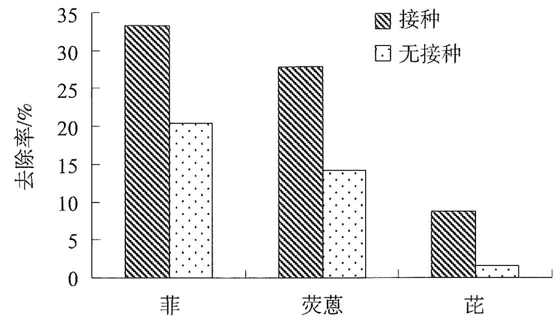

图8 接种菌株PE1501-1对灭菌土壤中菲、荧蒽或芘去除的影响

Fig. 8 Effect of inoculation with strain PE1501-1 on removal of phenanthrene, fluoranthene or pyrene in sterile soils

两种选择性培养液中菌株的生长如图7所示。经过15 d的摇瓶培养，菌株在培养液中的生长密度均有不同程度的上升，但以荧蒽为单一碳源时菌体生物量增长明显大于以芘为单一碳源时的菌体生物量增长，这与菌株对芘的低利用能力相符。

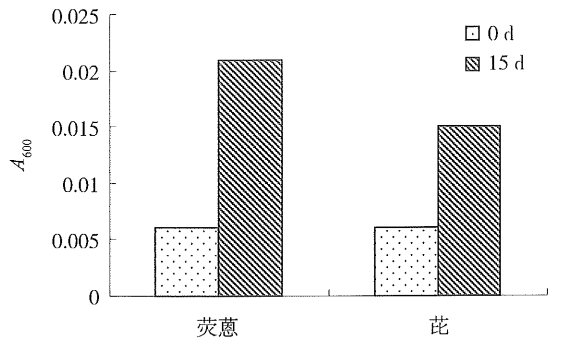

图7 含荧蒽或芘的无机盐液体培养基中菌株PE1501-1的生长

Fig. 7 Growth of strain PE1501-1 in mineral salts liquid media with fluoranthene or pyrene as the sole substrate

2.3 菌株PE1501-1对土壤中菲、荧蒽和芘的降解能力

室内液体培养基的培养环境与实际复杂的土壤环境相差甚远，为了使分离菌株能最终应用到实际污染场地的生物修复工程中，本文通过室内土壤模拟降解试验，初步研究了该菌株在人为污染土壤环境中对菲、荧蒽和芘的降解潜力，结果见图8。

由图8可知，无接种对照土壤中3种PAH组分均有不同程度的非生物损失，损失率由大到小依次是：菲为20%、荧蒽为14%、芘为1.6%。好氧培养期间对照土壤中PAH的非生物损失主要是挥发、化学氧化等过程造成的。

培养15 d之后，接种土壤中3种PAH组分的去除率明显高于无接种对照土壤，分别为：菲33%、荧蒽28%、芘为9%。这说明接种菲降解菌PE1501-1可有效提高土壤中PAH的去除效果。但如果扣除无接种对照土壤中的相应损失率，接种土壤中菌株对菲、荧蒽和芘的净降解率分别降为13%、14%和7%，这与无机盐液体培养基中的研究结果不太一致。土壤环境比含单一PAH组分的无机盐液体培养基复杂得多，并非纯粹的单一碳源环境，除了外加的PAH之外，土壤中还存在其他碳源，特别是在灭菌处理之后，死亡的菌体也是微生物重要的可利用碳源。有研究发现，如果存在比有机污染物（如PAHs）更易利用的其他碳源，则微生物可能优先代谢这些更易利用的底物，故而不利于难降解有机污染物的微生物代谢去除。例如，Slater等人[17]采用分子^{14}C检测技术，分析了受石油污染的盐沼沉积物中被微生物利用的碳源种类。结果显示，微生物并没有利用残留在沉积物中的石油碳氢化合物，而可能选择代谢比荧蒽和芘更易获得的天然有机碳源。另外，Keuth和Rehm[18]早在1991年就报道了添加低浓度的葡萄糖（0.45 g/L）能够加快菲的降解，但是添加高浓度葡萄糖（3 g/L）反而使菲的矿化率下降。

另一方面，与含单一PAH组分的无机盐液体培养基相比，土壤环境中PAHs的生物可利用性较低，而且N、P等营养物质较缺乏，这些不利因素也是造成土壤接种培养中菲的去除效果不如无机盐液体培养基的重要原因。但芘在接种土壤中的净降解率反而升高，这可能与土壤环境中存在的其他碳源促进了微生物对芘的代谢或共代谢作用有关。

为了检测接种了菌株PE1501-1的土壤对PAHs的降解活性是否升高，在培养开始时还测定了土壤中与PAHs降解密切相关的多酚氧化酶活性[19,20]，

结果见图 9。接种菌株的菲污染土壤以及芘污染土壤中，多酚氧化酶活性明显高于无接种的对照污染土壤，分别增加了 33% 和 55%，这说明接种的菲降解菌株可快速适应新的土壤环境，从而表现出接种土壤对 PAHs 降解活性的迅速提高。自然土壤中多酚氧化酶（Polyphenol Oxidase，简称 PPO）主要来源于土壤微生物、植物根系分泌物及动植物残体分解释放的酶，与天然芳香族化合物的氧化分解密切相关，对 PAHs 等芳香族有机污染物的转化也起到重要作用。有研究表明，土壤中外来的 PAHs 可作为底物诱导土壤多酚氧化酶活性的增加，与土壤 PAHs 含量存在显著相关关系[21]。本研究中的试验土壤先经过高温灭菌，接种后土壤多酚氧化酶活性的增加主要来源于接种的固氮螺菌属（*Azospirillum*）的菲降解菌 PE1501-1 在外加 PAHs 诱导下的分泌释放。但值得注意的是，添加了荧蒽的接种土壤与不接种土壤中多酚氧化酶活性并没有明显差别，这可能与接种初期该处理土壤中菲降解菌株还处于适应期有关。

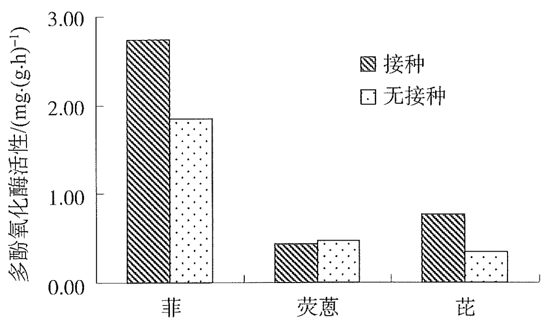

图 9　添加菲、荧蒽或芘的灭菌接种或不接种土壤中多酚氧化酶的活性

Fig. 9　Polyphenol Oxidase activities in sterile soils artificially contaminated with phenanthrene, fluoranthene or pyrene after inoculation or non-inoculation

3　结　论

较高培养温度有利于缩短菲降解菌株 PE1501-1 的生长延迟期，其最适生长温度为 30℃；偏酸性环境更有利于该菌株生长，无机盐液体培养基初始 pH 5.0 时菌株生长最好，而中性和偏碱性条件下（pH7.0－8.0），菌株生长受到明显的抑制；该菌株能耐受初始浓度为 208 mg/L 的菲，但菲初始浓度较高时菌株生长出现较明显的延迟期；添加可溶性有机物组分（乙酸、溶解性富里酸或溶解性胡敏酸）作为菲的共基质对菌株生长有短暂的促进作用，但这是否有利于提高菲的降解效果还有待进一步的研究确认。

在无机盐液体培养基中菌株 PE1501-1 能以菲或荧蒽为唯一碳源和能源而充分生长，并对荧蒽有一定程度的去除能力，但对芘的降解能力很低；在灭菌的土壤环境中，接种该菌株可有效提高菲、荧蒽或芘的去除效果。

参考文献：

[1]　BIDAUD C, TRAN-MINH C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation in the soil of a former gas-works site: selection and study of PAH-degrading micro-organisms[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1998, 5: 417－421.

[2]　SAMANTA S K, SINGH OM V and JAIN R K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation[J]. TRENDS in Biotechnology, 2002, 20(6): 243－248.

[3]　DEAN-ROSS D, CERNIGLIA C E. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46: 307－312.

[4]　TIAN L, MA P and ZHONG J J. Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*[J]. Process Biochemistry, 2002, 37: 1431－1437.

[5]　仉磊，袁红莉．一株菲降解细菌的分离及其特性[J]．环境科学，2005，26(1)：159－163.

[6]　艾芳芳，曲媛媛，周集体，等．菲降解菌株的分离鉴定及特性研究[J]．环境科学，2008，29(4)：1066－1071.

[7]　杨秀虹，汤婉环，李适宇，等．污染土壤中菲降解菌的分离鉴定及其降解能力[J]．环境科学研究，2009，22(6)：675－681.

[8]　HARITASH A K, KAUSHIK C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169: 1－15.

[9]　刘婷，陈朱蕾，曹丽，等．16S rDNA-RFLP 分析六氯苯好氧降解菌群的结构及其多样性[J]．微生物学报，2006，46(5)：758－762.

[10]　BARKOVSKII A L, KORSHUNOVA V E and POZDNYACOVA L I. Catabolism of phenol and benzoate by *Azospirillum* strains[J]. Applied Soil Ecology, 1995, 2(1): 17－24.

[11]　中国科学院南京土壤研究所土壤系统分类课题组．土壤实验室分析项目及方法规范（中国土壤系统分类用）[M]．北京：科学出版社，1991：36－39.

（下转第 121 页）

象科技,2007, 35(1):26－30.

[4] 丁一汇,任国玉,石广玉,等.气候变化国家评估报告(Ⅰ):中国气候变化的历史和未来趋势[J].气候变化研究进展,2006, 2(1):3－8.

[5] ZHAI P M, ZHANG X B, WAN H, et al. Trends in total precipitation and frequency of daily precipitation extremes over China[J]. J Climate, 2005, 4:1096－1107.

[6] 翟盘茂,任福民,张强.中国降水极值变化趋势检测[J].气象学报,1999, 57(2):208－216.

[7] 钱维宏,符娇兰,张玮玮,等.近 40 年中国平均气候与极值气候变化的概述[J].地球科学进展,2007, 22(7):673－684.

[8] 闵屾,钱永甫.我国近 40 年各类降水事件的变化趋势[J].中山大学学报:自然科学版,2008, 47(3):105－111.

[9] 鲍名,黄荣辉.近 40 年我国暴雨的年代际变化特征[J].大气科学,2006, 30(6):1057－1067.

[10] 秦大河,丁一汇,苏纪兰.中国气候与环境演变评估(Ⅰ):中国气候与环境变化及未来趋势[J].气候变化研究进展,2006, 1(1):4－9.

[11] 蔡敏,丁裕国,江志红.我国东部极端降水时空分布及其概率特征[J].高原气象,2007, 26(2):309－317.

[12] 张婷,魏凤英.华南地区汛期极端降水的概率分布特征[J].气象学报,2009, 67(3):442－451.

[13] 肖伟军,陈炳洪,刘云香,等.近 45 a 华南夏季降水时空演变特征[J].气象研究与应用,2009, 30(1):12－22.

[14] 李威,翟盘茂.中国极端强降水日数与 ENSO 的关系[J].气象变化研究进展,2009, 5(6):336－342.

[15] 李明华,黄健,杨柳,等.惠州城区 50 年来雨日的气候统计和变化特征[J].广东气象,2008, 30(2):27－30.

[16] KALNAY E, KANAMITSU M, KISTLER R, et al. The NCEP/NCAR 40-year reanalysis project[J]. Bull Amer Meteor Soc, 1996, 77(3):437－471.

[17] TORRENCE C, COMPO G P. A practical guide to wavelet analysis. Bull Amer Meteor Soc, 1998, 79: 61－78.

[18] 林良勋,冯业荣,黄忠,等.广东省天气预报技术手册[M].北京:气象出版社,2006:22.

[19] 李丽平,章开美,王超,等.近 40 年华南前汛期极端降水时空演变特征[J].气候与环境研究,2010, 15(4):443－450.

(上接第 113 页)

[12] 杨秀虹，李适宇，李岚，等. 广州市工业、交通区表层土壤中多环芳烃分布特征初探 [J]. 中山大学学报：自然科学版，2008，47 (1)：93－97.

[13] 马骁轩，冉勇，邢宝山，等. 珠江三角洲一些菜地土壤中多环芳烃的含量及来源 [J]. 环境科学学报，2007，27 (10)：1727－1733.

[14] 许光辉，郑洪元主编. 土壤微生物分析方法手册 [M]. 北京：农业出版社，1986：258－260.

[15] HADERLEIN A, LEGROS R and RAMSAY B. Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by the addition of humic acids or composted contaminated soil [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56: 555－559.

[16] HOLMAN H-Y N, NIEMAN K, SORENSEN D L, et al. Catalysis of PAH biodegradation by humic acid shown in synchrotron infrared studies [J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36: 1276－1280.

[17] SLATER G F, WHITE H, EGLINTON T I, et al. Determination of microbial carbon sources in petroleum contaminated sediments using molecular ^{14}C analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39: 2552－2558.

[18] KEUTH S, REHM H J. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991, 34: 804－808.

[19] 朱凡，田大伦，闫文德，等. 四种绿化树种土壤酶活性对不同浓度多环芳烃的响应 [J]. 生态学报，2008，28 (9)：4195－4202.

[20] SHENG X F, GONG J X. Increased degradation of phenanthrene in soil by *Pseudomonas* sp. GF3 in the presence of wheat [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38 (9): 2587－2592.

[21] 张晶，张惠文，张勤，等. 长期石油污水灌溉对东北旱田土壤微生物生物量及土壤酶活性的影响 [J]. 中国生态农业学报，2008，16 (1)：67－70.