

文章编号 1674-7054(2018)02-0156-07

赤子爱胜蚓肠道中苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的分离鉴定及其降解能力的测定

李森楠,刁晓平,王海花,龚莹

(海南大学 热带农林学院 / 南海海洋资源利用国家重点实验室 海口 570228)

摘 要 苯并[a]芘是环境中广泛分布的持久性有机污染物,利用赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)肠道中的微生物有效降解苯并[a]芘,是当前对环境中苯并[a]芘污染进行生物修复的新途径。本研究以苯并[a]芘($8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)作为唯一碳源对赤子爱胜蚓肠道微生物进行胁迫培养5代,使用平板稀释涂布法分离筛选出1株苯并[a]芘高效降解菌株 BJ-1,通过形态学观察、生理生化试验以及16S rRNA 基因测序分析确定其分类地位,并采用高效液相色谱法(HPLC)检测菌株 BJ-1 对苯并[a]芘的降解能力。结果显示,菌株 BJ-1 鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*),且在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 无机盐培养基中苯并[a]芘质量浓度为 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下,胁迫培养28 d后,菌液 $OD_{600\text{ nm}}$ 值增长至0.424,菌株降解率可达86.01%。研究表明,赤子爱胜蚓肠道中能筛选出有效降解苯并[a]芘的微生物,丰富了降解有机污染物苯并[a]芘的微生物资源,从而为环境中苯并[a]芘污染的生物修复提供了新思路。

关键词 赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*) 苯并[a]芘 微生物降解 假单胞菌属

中图分类号 X172

文献标志码 A

DOI:10.15886/j.cnki.rdswwb.2018.02.005

多环芳烃(PAHs)是含2个以上苯环的一类广泛分布并稳定存在于自然环境中的持久性有机污染物。由于其具有典型危害三致(致癌、致畸、致突变)作用,对人类健康和生态环境存在潜在危害^[1],美国国家环境保护局(United States Environmental Protection Agency, USEPA)已将16种PAHs列为环境中优先监测的污染物,其中苯并[a]芘由于性质稳定、分布广泛、致癌性最强已成为国内外环境监测的重要指标之一^[2]。苯并[a]芘[Benzo[a]Pyrene(BaP)]是一种由5个苯环组成的多环芳烃化合物,具有强烈致癌性。由于PAHs属于疏水性有机污染物,辛醇—水分配系数高,分配时会优先进入非水相体系,所以,土壤便作为其最主要的环境介质之一^[3]。而PAHs在土壤中的降解过程主要是通过土壤多相系统中的微生物降解作用进行。文献[4]表明,高分子量的PAHs(四环以上)在土壤环境中的挥发作用、光解和水解作用对PAHs的消除可忽略不计,因此对于微生物降解高分子量PAHs的研究显得非常重要。蚯蚓是最重要的土壤动物之一,被称为土壤和生态系统的“工程师”^[5],在促进土壤的物质循环和能量传递、促进作物生长、改善土壤结构、增加土壤肥力等许多方面发挥着重要作用^[6]。蚯蚓不仅能够通过被动吸收和生物积累的方式移除多环芳烃,而且还可以通过刺激土壤微生物的生长来加快多环芳烃的生物降解^[7]。有研究结果表明,蚯蚓体内的cytochrome-P450酶可有效利用苯并[a]芘^[8]。Singleton DR等研究结果表明,蚯蚓肠道中存在假单胞菌、酸杆菌和产碱菌属等可降解烃类物质的微生物群落^[9]。王富强研究发现蚯蚓处理城市污泥后苯并[a]芘含量显著下降,同时污泥中假单胞菌、类芽孢杆菌等降解PAHs相关微生物的表达量升高^[10],但从蚯蚓肠道中分离获得苯并[a]芘降解菌却鲜有报道。为此,笔者从赤子爱胜蚓肠道中分离筛选获得苯并[a]芘降解菌株,并通过形态学观察、生理生化试验以及16S rRNA 基因序列分析等方法确定菌株分类地

收稿日期 2017-12-12 修回日期 2018-01-14

基金项目:海南省重大科技计划项目(ZDKJ2017002);蚯蚓处理热带农业废弃物综合利用技术与示范推广项目(HDNY 201702)

作者简介:李森楠(1991-)男,海南大学热带农林学院2015级硕士研究生. E-mail: 632934094@qq.com

通信作者:刁晓平(1963-)女,博士,教授,研究方向:生态毒理学. E-mail: diaoxip@hainu.edu.cn

位,并测定其对苯并[a]芘的降解能力,旨在将获得的降解菌株应用于苯并[a]芘污染的微生物修复,为土壤环境中有机污染物的生物修复提供可应用的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 蚯蚓样品采集 收集经发酵腐熟无苯并[a]芘污染的牛粪饲养至成体的赤子爱胜蚓(海南大学热带农林学院蚯蚓养殖基地提供),用无菌水清洗体表泥土,放于灭菌湿润滤纸上进行清肠 12 h,75%的乙醇进行体表灭菌,无菌水清洗 3 次除尽乙醇,解剖蚯蚓,获得肠道及内容物 0.2 g 后用灼烧过的解剖剪刀剪碎,备用。

1.2 试剂 3-4-苯并[a]芘标准品(Sigma),PCR 扩增体系(Promega),胶回收试剂盒(上海生工生物技术公司);上游引物 27F(5'-AGA GTT TGA TCMTGG CTC AG-3'),下游引物 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')购于上海生工生物技术公司。

1.3 培养基

(1) 无机盐培养基: K_2HPO_4 1 g·L⁻¹, NaH_2PO_4 1 g·L⁻¹, $CaCl_2$ 0.02 g·L⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g·L⁻¹, $NaCl$ 0.5 g·L⁻¹, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g·L⁻¹, NH_4NO_3 1 g·L⁻¹, 苯并[a]芘标准品 8 mg, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.0, 121 °C, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

(2) 固体分离培养基 加入 15~20 g·L⁻¹ 琼脂粉至上述无机盐培养基中, 121 °C, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

(3) 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 5 g·L⁻¹, 蛋白胨 10 g·L⁻¹, $NaCl$ 5 g·L⁻¹, 121 °C, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.4 仪器设备 722s 可见光分光光度计(上海棱光技术有限公司), 凝胶成像系统(美国 BIO-RED 公司), PCR 仪(美国 BIO-RED 公司), 高效液相色谱仪(德国 Agilent 1260), 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)等。

1.5 苯并[a]芘降解菌株的分离纯化 将制备好的蚯蚓样品加入 30 mL 灭菌无机盐培养基中振荡 30 min, 静置 5 min, 移取 5 mL 上清液接种到 45 mL 含有苯并[a]芘终质量浓度为 8 mg·L⁻¹ 的无机盐培养基中, 30 °C, 150 r·min⁻¹ 避光培养, 每隔 14 d 移取 5 mL 培养物接种到上述新鲜的培养基中, 胁迫培养 5 代。使用稀释涂布平板法将第 5 代培养液涂布于以苯并[a]芘为唯一碳源的固体分离培养基, 30 °C 条件下, 培养 5 d, 挑选生长旺盛的单菌落, 分离纯化并命名为 BJ-1。

1.6 菌株 BJ-1 的形态学观察及生理生化特征 挑取单菌落进行革兰氏染色, 深紫色为革兰氏染色阳性细菌, 红色为革兰氏染色阴性细菌。将菌株划线接种到牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 48 h 后进行菌落特征观察, 包括大小和形状、表面、透明度、边缘、隆起形状、培养基及菌落的颜色等, 并进行氧化酶、接触酶、甲基红等生理生化试验。

1.7 菌株 BJ-1 的 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序分析 将分离纯化得到的降解菌 BJ-1 放置于牛肉膏蛋白胨培养基中培养 24 h, 提取纯培养物总 DNA, 以 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 50 μL 体系: mix Green 29 μL, 10 μmol·L⁻¹ 27F 2 μL, 10 μmol·L⁻¹ 1492R 2 μL, 模板 2 μL, ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 10 min, 进入 PCR 循环: 95 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保温 1 h; 20 °C 保存。将 PCR 产物进行胶回收纯化后送往上海生工生物技术公司进行测序。将测序获得的序列通过在线软件 Ez BioCloud(<https://www.ezbiocloud.net>)上的 Identify 程序与已有的序列进行比对分析, 挑选出同源序列, 用软件 clustalW 和 MEGA 6 进行序列排列和系统发育分析, 系统进化树使用邻接法构建。

1.8 菌株 BJ-1 的降解能力测定

1.8.1 样品中苯并[a]芘的萃取 将待测菌液通过 C18 SPE 小柱进行固相萃取。依次用 10 mL CH_2Cl_2 , 10 mL CH_3OH , 10 mL ddH₂O 对 C18 SPE 小柱进行活化。将待测菌液以自然流速通过活化的 C18 SPE 小柱。萃取结束后, 用 15 mL CH_2Cl_2 洗脱, 收集洗脱液, 使用高纯氮气轻柔吹干, 用乙腈定容至 1 mL, 上样检测前使用一次性有机滤器过滤。

1.8.2 高效液相色谱检测苯并[a]芘的方法 采用高效液相色谱法(HPLC), 测定苯并[a]芘的残留量, 色谱柱为 Agilent EclipseXDB-C18 柱(5 μm, 150 mm× 4.6 mm), 检测波长为 290 nm, 流动相为 $V_{乙腈}$ (色谱纯):

$V_{\text{超纯水}}=75:25$ 进样量为 $5.00\ \mu\text{L}$ 流速为 $1.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。配制 $0.1\sim 10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的苯并[a]芘(色谱纯)标准品, 样品峰的定性以苯并[a]芘标品的保留时间为准, 定量则采用外标法以峰面积计算, 然后建立峰面积(Y)与浓度(X)之间的关系, 制作出标准曲线方程。同时, 该萃取方法的回收率采用标样加入法进行测定, 即在空白样品中加入苯并[a]芘标准品, 采用与样品相同萃取方法处理后, 检测苯并[a]芘的浓度。回收率计算公式如下:

$$\text{回收率} = (\text{加标样品浓度} - \text{样品浓度}) / \text{标准品浓度} \times 100\%$$

1.8.3 苯并[a]芘残留量及菌株 BJ-1 生长曲线测定 将菌株 BJ-1 的纯培养物接种于牛肉膏、蛋白胨培养基中进行富集培养 24 h 后, 对培养液进行 $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后获得菌体, 用不含苯并[a]芘的灭菌无机盐培养液清洗菌体 3 次后, $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后弃上清, 获得菌体, 将菌体接种于含苯并[a]芘($8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的无机盐培养基中, 使其 $OD_{600\ \text{nm}}$ 值约为 0.1, $30\ ^\circ\text{C}$ 培养 28 d。每隔 7 d 取样 1 次, 测定苯并[a]芘的残留量和培养液中菌浓度($OD_{600\ \text{nm}}$)。实验均设置 3 个重复, 空白对照设置为不加菌的苯并[a]芘无机盐培养基。

1.8.4 苯并[a]芘降解率的计算 降解率计算公式: $\text{降解率} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$, C_t 表示取样时实验组浓度, C_0 表示实验组初始浓度。

2 结果与分析

2.1 苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的形态学特征 经过 5 代驯化, 水相逐渐由澄清变得浑浊, 降解能力强的菌株不断富集形成相对稳定的微生物群落。通过常规稀释涂布平板法分离, 得到降解菌株 BJ-1, 菌株 BJ-1 在固体培养基上生长 48 h 后观察其菌落形态(图 1-A)。通过革兰氏染色得到其菌体形态特征(图 1-B)。如图 1-A 所示, 菌落呈圆形, 淡黄色半透明, 表面湿润有光泽, 边缘整齐, 整个菌落呈高台状, 菌落与培养基间结合而不紧密, 易于用接种环挑取。如图 1-B 所示, 菌体的形态为短杆状, 无芽孢, 革兰氏阴性, 在液体培养基中呈浑浊, 且不形成菌膜。

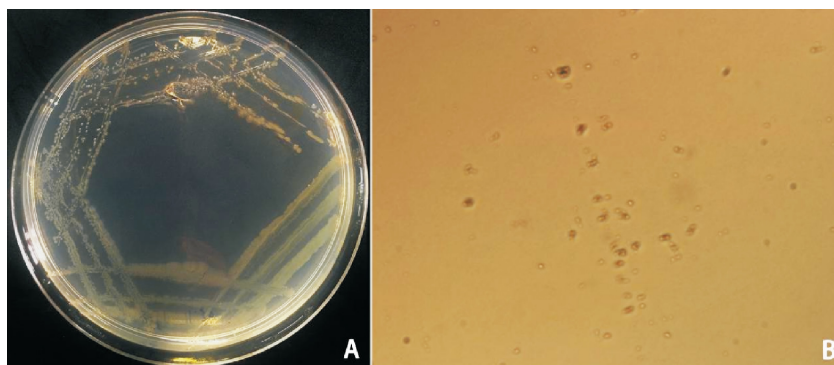


图 1 苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的菌落形态(A)和菌体形态(B)

Fig. 1 Colony morphology(A) and mycelia morphology(B) of benzo[a]pyrene degrading bacteria BJ-1

2.2 苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的生理生化特征 由如表 1 可见, 菌株 BJ-1 的氧化酶、接触酶和葡萄糖发酵试验均为阳性, 表明菌株 BJ-1 能够使细胞色素 C 氧化、催化过氧化氢产生氧气和水, 可在有氧条件下使葡萄糖氧化。甲基红试验和 V-P 试验分别为阳性和阴性, 说明菌株 BJ-1 不能够利用葡萄糖产生有机酸, 也不能利用葡萄糖产生二乙胺。淀粉水解、脂质水解试验均为阳性, 表示菌株 BJ-1 能合成淀粉酶和脂酶。明胶水解、纤维素水解以及乙酰胺试验均为阴性, 则显示菌株 BJ-1 不能分泌分解明胶的蛋白酶, 也不能合成纤维素酶和乙酰胺酶。结合形态特征和生理生化特征, 根据《常见细菌系统分类手册》^[11], 菌株 BJ-1 与假单胞菌比较相似, 初步确定菌株 BJ-1 属于假单胞菌属。

表 1 苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的生理生化特征
Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of benzo[a]pyrene degrading bacteria BJ-1

项目 project	结果 results	项目 project	结果 results
氧化酶(Oxidase)	+	葡萄糖发酵(Glucose fermentation)	+
接触酶(Catalase)	+	乙酰胺(Acetamide)	-
甲基红(Methyl red)	-	纤维素水解(Cellulose hydrolysis)	-
乙酰甲基甲醇(Vogues proskaeur)	-	淀粉水解(Starch hydrolysis)	+
脂质水解(Lipid hydrolysis)	+	明胶水解(Gelatin hydrolysis)	-

注：+ 表示阳性；- 表示阴性
Note:+ :indicates positive；- :indicates negative

2.3 苯并[a]芘降解菌 BJ- 1 的 16S rRNA 序列分析鉴定 经过 5 代苯并[a]芘胁迫培养后 ,进行分离纯化 ,获得 1 株降解苯并[a]芘菌株 BJ-1 ,进行菌株 BJ-1 总 DNA 提取和 16S rRNA 基因扩增及测序 ,得到菌株 BJ-1 的 16S rRNA 基因序列 ,序列碱基数为 1 438 个。提交菌株 BJ-1 的 16S rRNA 基因序列至 GenBank ,申请获得基因登录号为 KY963532 ,通过在线软件 Ez BioCloud(<https://www.ezbiocloud.net>)上的 Identify 程序与已有的序列进行比对分析。结果如表 2 所示 ,菌株 BJ-1 与 *Pseudomonas stutzeri* strain ATCC 17588、*Pseudomonas songnenensis* strain NEAU-ST5-5、*Pseudomonas zhaodongensis* strain NEAU-ST5-21 等假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株均有较高同源性 ,表明该株苯并[a] 芘降解菌归属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

表 2 苯并[a]芘降解菌 BJ- 1 序列比对结果
Tab. 2 Sequence alignment result of benzo[a]pyrene degrading bacteria BJ- 1

菌株编号(基因登录号) Strain number (Accession number)	相似菌株(基因登录号) Similar strains (Accession number)	相似性 Identity/%
BJ- 1 (KY963532)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ATCC 17588 (CP002881)	98.96
	<i>Pseudomonas songnenensis</i> strain NEAU- ST5- 5 (JQ762269)	98.26
	<i>Pseudomonas zhaodongensis</i> strain NEAU- ST5- 21 (JQ762275)	98.22
	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> strain IPL- 1 (DQ916277)	97.60
	<i>Pseudomonas hunanensis</i> strain LV (JX545210)	97.52
	<i>Pseudomonas guariconensis</i> strain LMG 27394 (FMYX01000029)	97.36
	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> strain HL22- 2 (JQ246444)	97.15
	<i>Pseudomonas xanthomarina</i> strain DSM 18231(T)(jgi.1021496)	97.08
	<i>Pseudomonas otitidis</i> strain MCC10330(T)(AY953147)	97.08

将同源序列 ,用多重序列比对软件 clustalW 和 MEGA6 进行序列排列和系统发育分析 ,系统进化树采用邻接法构建(图 2) ,经过 Bootstrap 稳定性验证 1 000 次随机抽样评估系统进化树的置信度。基于 16S rDNA 序列的 BJ-1 菌株与同源性菌株之间的系统发育树 ,由图 2 可见 ,菌株 BJ-1 与菌株 *Pseudomonas stutzeri* strain ATCC 17588 遗传距离为 0 ,同源性为 98.96% ,确定菌株 BJ-1 属于 *Pseudomonas* 属的 *stutzeri* 种 ,中文名称为施氏假单胞菌。

2.4 苯并[a]芘降解菌 BJ-1 在不同时间段降解率的变化 通过高效液相色谱法(HPLC)测定苯并[a]芘标准品的浓度 ,建立峰面积 Y 与苯并[a]芘浓度 X 之间的标准方程为 $Y = 95.264X - 2.4898$, $R^2 = 0.9997$ 。结果显示 ,在 $0.1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 ,苯并[a]芘的峰面积与浓度有良好的线性关系。该萃取方法的回收率以标样加入法测定 ,其回收率为 97.4%。

BJ-1 降解菌株对苯并[a]芘胁迫 28 d 后的降解能力如表 3 和图 3 所示 ,在以苯并[a]芘为唯一碳源胁迫培养 28 d 后 ,降解率随着胁迫时间延长不断升高 ,由培养初期(7 d)的 51.00% ,上升至培养末期(28 d)的 86.01%。菌株 BJ-1 在以苯并[a]芘为唯一碳源和能源的灭菌无机盐培养基中缓慢生长 ,迟缓期长 ,随着对苯

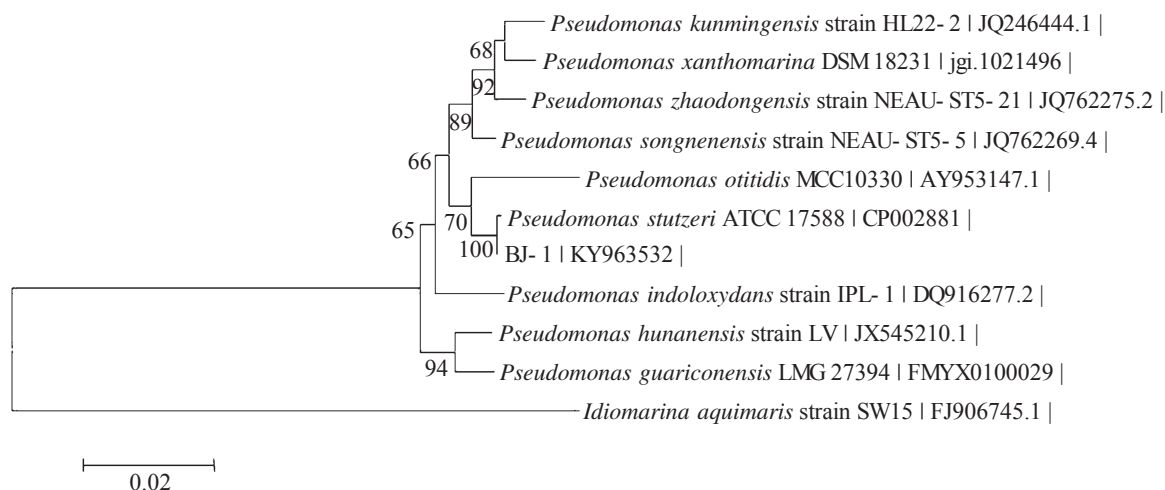


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16s rRNA gene sequences of benzo[a]pyrene degrading bacteria BJ-1

并[a]芘的转化利用速度的加快,菌浓度也快速增长,到 7 d 时达到一个峰值,稳定期(7~21 d)时,菌株生长速度减慢,苯并[a]芘的降解速率也趋于平缓,培养至 21 d,菌株再次快速生长,到 28 d 降解率增加了 35%。其原因可能是由于菌株 BJ-1 降解苯并[a]芘产生的中间代谢产物与苯并[a]芘发生了共代谢。在第 28 天时,菌株培养液中苯并[a]芘浓度较低,由此说明从蚯蚓肠道中能够筛选到苯并[a]芘高效降解菌。

表 3 BJ-1 降解苯并[a]芘的残留量和降解率

Tab. 3 The degradation rate and residues of benzo[a]pyrene degraded by BJ-1

时间/d	残留量 Residues / (mg·L ⁻¹)	降解率 Degradation rate/%
0	8.302 5	-
7	4.067 9	51.00
14	3.722 8	55.16
21	4.019 0	51.59
28	1.161 2	86.01

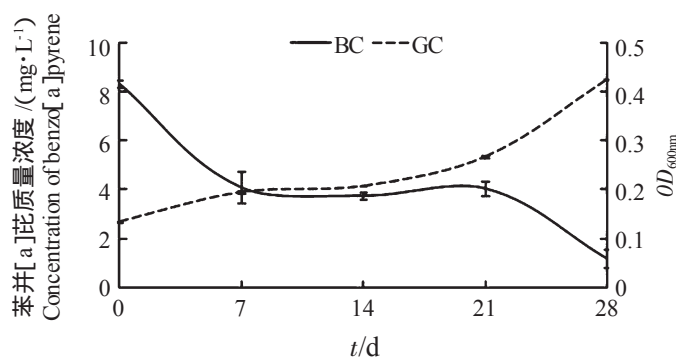


图 3 苯并[a]芘降解菌 BJ-1 的生长曲线(GC)和苯并[a]芘的降解曲线(BC)

Fig. 3 Growth curve (GC) and benzo[a]pyrene degradation curve (BC) of benzo[a]pyrene degrading bacteria BJ-1

3 讨 论

目前国内外有关微生物降解苯并[a]芘的研究,主要关注在海洋微生物^[12-13]、石油污染土壤微生物^[14-15]、以及污染沉积物等环境中微生物^[16-17],而蚯蚓肠道中分离苯并[a]芘降解菌的研究尚未见报道。能够有效降解苯并[a]芘的菌株主要归属为鞘氨醇菌属(*Sphingomonas* sp.)^[18-19]、分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)^[20]、假单胞

菌属(*Pseudomonas* sp.)^[21]、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[22]等。本研究从蚯蚓肠道中筛选获得1株苯并[a]芘降解菌,鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*) 28 d对苯并[a]芘的降解率达86.01%;李艳秋等从土壤中分离筛选1株以苯并[a]芘为唯一碳源的降解菌 SL-1,并鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),该菌株28℃振荡培养10 d后对5 mg·L⁻¹苯并[a]芘的降解率为35.7%^[23];袁爽等从多环芳烃污染土壤中分离筛选到1株多环芳烃降解菌 B3,初步鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),该菌株在28℃培养基中菲、芘和苯并[a]芘的质量浓度分别为50、50、5 mg·L⁻¹的复合底物条件下,培养28 d后,B3对菲、芘和苯并[a]芘的降解率分别为88.4%、54.0%和68.4%^[24]。经笔者鉴定,菌株 BJ-1 归类于假单胞菌属,Singleton DR 等^[9]、王富强^[10]通过分子生物学技术研究表明,蚯蚓肠道中存在假单胞菌属,说明笔者从蚯蚓肠道中分离筛选到的1株施氏假单胞菌确实为蚯蚓肠道微生物,且对苯并[a]芘降解能力较强,显示蚯蚓肠道中蕴含降解苯并[a]芘的微生物资源。

采用高效液相色谱法,分析了菌株 BJ-1 对苯并[a]芘的降解特性,结果表明:以8 mg·L⁻¹苯并[a]芘为唯一碳源和能源的条件下,培养0~7 d时,菌株 BJ-1 能够快速利用苯并[a]芘进行增殖(菌浓度 $OD_{600\text{nm}}$ 升高),在7~21 d期间,菌株 BJ-1 对苯并[a]芘的降解缓慢,菌浓度增长缓慢,培养21~28 d时,菌株 BJ-1 进行二次生长,苯并[a]芘降解速度明显加快,这可能是由于菌株 BJ-1 降解苯并[a]芘后产生的中间代谢产物与苯并[a]芘进行共代谢引起的^[25]。本研究从蚯蚓肠道中分离获得的菌株 BJ-1 以8 mg·L⁻¹苯并[a]芘胁迫培养28 d后,对苯并[a]芘的降解率达86.01%。明显高于Liang L 等^[26]分离自海洋沉积物的菌株 *Pseudomonas* sp. JP1,对苯并[a]芘降解40 d后的降解率为30%;Wu Y R 等^[27]从海洋沉积物中获得的1株苯并[a]芘降解菌 *Ochrobactrum* sp. BAP5,对苯并[a]芘降解30 d后的降解率达20%;盛下放等^[28]从石油污染土壤中分离筛选出的1株高效苯并[a]芘降解菌 JL-14,对苯并[a]芘降解10 d后的降解率为48.9%。由此可见,蚯蚓肠道中分离到的苯并[a]芘降解菌降解能力较强,具有广泛应用前景。目前正在进行对苯并[a]芘污染土壤的修复研究,初步结果显示菌株 BJ-1 能够在苯并[a]芘污染土壤中生存并有一定的降解能力,本实验室准备对降解条件进一步优化,以期能够广泛应用于环境中有机污染物的处理。

参考文献:

- [1] Keith L H, Telliard W A. Priority pollutants. I. A perspective view [J]. Environmental Science & Technology, 1979, 13(4): 416-423.
- [2] 郑天凌, 骆苑蓉, 曹晓星, 等. 高分子量多环芳烃——苯并[a]芘的生物降解研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 884-890.
- [3] Zhang Y, Guan Y, Shi Q. Simulating the dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in contaminated soil through composting by COP-Compost model [J]. Environmental science and pollution research international, 2015, 22(4): 3004-3012.
- [4] Grosser R J, Vestal J R, Warshawsky D. Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1995, 14(3): 375-382.
- [5] Ayuke F O, Brussaard L, Vanlauwe B, et al. Soil fertility management: Impacts on soil macrofauna, soil aggregation and soil organic matter allocation [J]. Applied Soil Ecology, 2011, 48(1): 53-62.
- [6] 李培军, 熊先哲, 杨桂芬, 等. 动物生物标志物在土壤污染生态学研究中的应用 [J]. 应用生态学报, 2003, 14(12): 2347-2350.
- [7] Eijsackers H, Van Gestel CAM, De Jonge S, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted dredged peat sediments and earthworms: A mutual interference [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 10(1): 35-50.
- [8] Driscoll S B K, McElroy A E. Elimination of sediment-associated benzo [a] pyrene and its metabolites by polychaete worms exposed to 3-methylcholanthrene [J]. Aquatic Toxicology, 1991, 39(1): 77-91.
- [9] Singleton DR, Hendrix P F, Coleman D C, et al. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta) [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(12): 1547-1555.
- [10] 王富强. 蚯蚓——微生物协同处理城市污泥的研究 [D]. 海口: 海南大学, 2016.
- [11] 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.
- [12] 郑天凌, 庄铁城, 蔡立哲, 等. 微生物在海洋污染环境中的生物修复作用 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 524-534.

- [13] 骆苑蓉. 多环芳烃降解菌的降解特性与降解途径研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [14] 刘海滨, 王翠苹, 张志远, 等. 苯并[a]芘高效降解菌筛选及其降解特性研究 [J]. 环境科学, 2011, 32(9): 2696-2702.
- [15] 李贺. 微生物对高分子量多环芳烃苯并芘的降解研究 [J]. 延安大学学报(自然科学版), 2013, 32(1): 58-61.
- [16] Dalal S, Panigrahi D P, Randhawa G S, et al. Molecular characterisation of high-strength polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)-degrading and phenol-tolerant bacteria obtained from thermal power plant wastewater [J]. Chemistry and Ecology, 2012, 28(2): 187-192.
- [17] 徐莹. 高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及其降解特性研究 [D]. 南京: 南京大学, 2014.
- [18] 刘芳, 梁金松, 孙英, 等. 高分子量多环芳烃降解菌 LD29 的筛选及降解特性研究 [J]. 环境科学, 2011, 32(6): 799-1804.
- [19] 郑伟, 田蕴, 郑天凌. 基于均匀设计优化新鞘氨醇菌 US6-1 对高分子量多环芳烃的降解条件 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(6): 875-887.
- [20] Moody J D, Freeman J P, Fu P P, et al. Degradation of benzo[a]pyrene by *mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 340-345.
- [21] Harayama S. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1997, 8(3): 268-273.
- [22] Lily M K, Bahuguna A, Dangwal K, et al. Degradation of benzo[a]pyrene by a novel strain *Bacillus subtilis* BMT4i (MTCC 9447) [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40(4): 884-892.
- [23] 李艳秋, 刘君, 高鹏, 等. 苯并[a]芘降解菌 SL-1 的筛选、鉴定及其降解特性 [J]. 北方环境, 2010, 22(2): 74-77.
- [24] 袁爽, 梁成华, 李凤梅, 等. 多环芳烃降解菌的筛选与降解能力测定 [J]. 生态学杂志, 2011, 30(2): 315-319.
- [25] Juhasz A L, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, 45: 57-88.
- [26] Liang L, Song X, Kong J, et al. Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp. JP1 [J]. Biodegradation, 2014, 25(6): 825-833.
- [27] Wu Y R, He T T, Zhong M Q, et al. Isolation of marine benzo[a]pyrenedegrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins characterization [J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(10): 1446-1451.
- [28] 盛下放, 何琳燕, 胡凌飞. 苯并[a]芘降解菌的分离筛选及其降解条件的研究 [J]. 环境科学学报, 2005, 25(6): 791-795.

Isolation and Identification of Benzo[a]Pyrene-degrading Strain BJ-1 and Determination of its Degrading Capability in the Gut of *Eisenia fetida*

LI Sennan, DIAO Xiaoping, WANG Haihua, GONG Ying

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry/State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract Benzo[a]pyrene (BaP) is a widely distributed persistent organic pollutant in the environment. Isolating microbes from the gut of earthworm *Eisenia fetida* is a new bioremediation technique for degradation of BaP. A strain (BJ-1) was isolated from the gut of earthworm through spread plate after $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BaP stress culture. This strain was identified by the methods of morphologic observation, physiological and biochemical experiments as well as 16S rRNA gene sequence analysis. The BaP degradation ability of BJ-1 was tested by using high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the strain BJ-1 was a Gram-negative bacterium, which belonged to *Pseudomonas stutzeri*. After being cultured in BaP ($8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) as the sole carbon source for 28 days at 30°C , the BJ-1 degraded BaP at a rate of 86.01% and a density of 0.424 ($OD_{600 \text{ nm}}$). The results indicated that the BaP-degrading strain could be isolated from the gut of earthworm, enriching the microbial resources for degrading BaP. It provides a new view for the bioremediation of BaP in the environment.

Keywords *Eisenia fetida*; Benzo[a]pyrene; micro-biological degradation; *Pseudomonas*

(责任编辑: 叶 静)