

一株对高环多环芳烃具有降解性的海杆菌及其应用

技术领域

本发明属于有机污染土壤修复技术领域，具体涉及一株对高环多环芳烃具有降解性的海杆菌及其应用。

背景技术

随着石油化工行业的快速发展，大量的石油烃类污染物通过各种途径进入土壤，对土壤环境造成严重的污染，由于石油化工行业往往产生大量高盐度废水，因而石油污染土壤常伴有盐碱化的发生。多环芳烃（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs）是石油烃中的一类重要成分，具有低水溶性、高毒性、生物蓄积性、半挥发性和难降解性等特征，有些成分有致癌变、致突变、致畸变作用。其中，一些具有 3 个以上苯环数的高分子量的多环芳烃积累在土壤中，其半衰期可达数十年甚至更长，而且，多环芳烃在高盐度环境中的疏水性更强，也更容易在土壤、底泥、悬浮颗粒物或生物体内富集，从而延长了其在环境中的半衰期，对生态环境造成更大的危害。

微生物修复在多环芳烃的降解中起着重要作用。然而，对于具有强疏水性的多环芳烃，其生物可利用性很差，而且容易产生生物毒害。近年来，电动修复技术被越来越多地用于强化土壤有机污染物的生物修复。电动修复技术对土壤的修复作用依赖于一系列的电化学过程，包括电迁移、电渗析、电泳等电动效应以及电化学氧化在土壤中所诱导的氧化还原反应。因此，将电动修复与微生物修复技术联合（电动-微生物修复）使用可通过微生物氧化代谢作用与电动效应或电化学氧化作用之间的耦合效应增强污染物的去除效率。诸多因素影响有机污染土壤的电动-微生物修复效率，如微生物种群性质、污染物的生物可利用性、污染物结构组成和性质、土壤环境条件以及电场强度等。其中，微生物作为生物修复的功能主体，其种类、群落组成、活性、数量等对有机物的降解效率和生物利用途径起着决定性作用。对于低环多环芳烃，即一些 2、3 环的多环芳烃，如萘、蒽、菲、芴等，由于其分子结构较简单，水溶性较高，也较易从自然界分离得到适用的降解菌株。对于一些 3 环以上的高环多环芳烃，如芘、苯并[a]芘等，由于其分子结构复杂、电子云密度高、很难被氧化，而且水溶性差、热稳定性强、固-水分配系数高，较难分离得到适用的降解菌。且在实际应用中，由于土壤环境、污染物性质等不同，导致微生物对多环芳烃的降解效率偏低，如外加电场可能对微生物的活性产生影响，非嗜盐微生物不适于高盐环境中多环芳烃的生物降解等。目前，已分离到的能

摘要附图

够在盐环境中降解高环多环芳烃的菌株还比较少，主要集中在芽孢杆菌属（*Bacillus*）、嗜盐单胞菌属（*Halomonas*）、解环菌属（*Cycloclasticus*）、分枝杆菌属（*Mycobacterium*）和海旋菌属（*Thalassospiras*）等。因此，针对高环多环芳烃污染盐碱土壤，开发能既能适应电场环境，又具有嗜盐碱性的微生物资源，则可在电动-微生物修复中取得良好效果。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供一株对高环多环芳烃具有降解性的海杆菌及其应用，为多环芳烃污染盐碱土壤的电动-微生物修复提供新的微生物资源和方式。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明发现一株降解菌，该降解菌的菌落特征为圆点状、透明、边缘不规则；细胞形态特征为长杆状、无芽孢；生理生化特性为：接触酶实验和淀粉水解实验均呈阳性，具有运动性，吲哚实验、 NaNO_3 还原反应、明胶水解实验、 NaNO_2 还原反应、脂酶反应及革兰氏染色均呈阴性。经鉴定该降解菌为海杆菌属，已于 2021 年 10 月 28 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为湖北省武汉市武昌区八一路 299 号，保藏名称为 *Marinobacter* sp. HWP-1，保藏登记号为 CCTCC NO: M 20211335。

进一步地，所述海杆菌可在盐质量浓度为 0~20% 的无机盐培养液中生长，盐质量浓度优选为 5%。

进一步地，所述海杆菌可在 pH 为 5~11 的条件下生长，pH 优选为 8。

第二方面，本发明提供上述海杆菌在降解高环多环芳烃上的应用。

第三方面，本发明提供上述海杆菌降解高环多环芳烃能力的测定方法，包括以下步骤：配制含高环多环芳烃的无机盐培养液，接种海杆菌菌悬液，于 30~35℃、140~180r/min 条件下避光振荡培养 7~14 天后测定高环多环芳烃含量，并计算降解率，以不接种海杆菌菌悬液的含高环多环芳烃的无机盐培养液为参照。

进一步地，所述含高环多环芳烃的无机盐培养液的盐度不超过 20%，优选为 5%，pH 值为 8.6。

进一步地，所述海杆菌菌悬液的制备方法包括：将茈母液过滤除菌，添加到无机盐培养液中，使茈的终浓度为 50~100 mg/L，置于恒温振荡培养箱中振荡将丙酮挥发尽；无菌条件下，将菌株 HWP-1 接种于含茈的无机盐培养液中，于 30~35℃、140~180 r/min 培养 7~10 d，5000 r/min 离心 5 min，弃掉上清液，用适量新鲜无机盐培养液重悬，再次离心、重悬，获得 OD_{600nm} 值在 0.24~0.26 的菌悬液。

进一步地，所述茈母液的配制：以丙酮为溶剂，配制 5 g/L 的茈的丙酮溶液，并用已灭菌

摘要附图

(121℃, 20 min) 的 0.22 μm 有机滤膜过滤除菌。

第四方面, 本发明提供上述海杆菌在电动-微生物修复高环多环芳烃污染盐碱土壤中的应用。

进一步地, 所述应用的方法包括:

(1) 将高环多环芳烃污染盐碱土壤中添加海杆菌菌悬液混匀, 使土壤中微生物数量达到 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g, 土壤盐分和 pH 值分别为 1~1.5% 和 8.0~9.0, 并控制土壤含水量为 15~20%;

(2) 对混有海杆菌菌悬液的高环多环芳烃污染盐碱土壤施加 1.0~1.5V/cm 的直流电场, 电极极性每 30min 切换一次, 修复时间不少于 98 天。

与现有技术相比, 本发明的有益效果为: 本发明的海杆菌菌株对 4 环以上高环多环芳烃 (茈和苯并[a]茈) 具有良好的降解能力, 且具有广泛的盐度和 pH 生长范围以及较高的耐盐碱性, 对于高环多环芳烃污染盐碱土壤也具有良好的修复效果。同时, 本发明菌株在电场作用下能提高高环多环芳烃的降解率, 且在参与电动修复高环多环芳烃污染盐碱土壤的过程中可保持为优势菌属, 具有良好的适应性和竞争力。

附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解, 构成本发明的一部分, 本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明, 并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

图 1 为菌株 HWP-1 CCTCC NO: M 20211335 的 16S rRNA 基因序列的系统发育树;

图 2 为菌株 HWP-1 CCTCC NO: M 20211335 的可生长盐度范围;

图 3 为菌株 HWP-1 CCTCC NO: M 20211335 的可生长 pH 范围;

图 4 为菌株 HWP-1 CCTCC NO: M 20211335 对茈和苯并[a]茈的降解能力;

图 5 为不同盐度条件下菌株 HWP-1 对茈的降解能力;

图 6 为不同 pH 条件下菌株 HWP-1 对茈的降解能力;

图 7 为菌株 HWP-1 在参与电动-微生物修复茈污染盐碱土壤过程中茈的降解率;

图 8 为菌株 HWP-1 在参与电动-微生物修复茈污染盐碱土壤过程中主要种群变化;

注: 图 2~6 中不同字母表示不同处理间有显著性差异, 相同字母则表示无显著性差异。

具体实施方式

在本发明的描述中, 需要说明的是, 实施例中未注明具体条件者, 按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市售购买获得的常规产品。

摘要附图

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

降解菌的富集、纯化及鉴定

(1) 菌株的富集、纯化

土壤样品为采自延长油田子北采油厂的石油污染土壤。以芘为唯一碳源，采用定时定量转接、逐步提高碳源浓度的方法对多环芳烃降解菌进行富集。具体为：称取 5 g 石油污染土壤，加入到 45 mL 无机盐培养液中，加入芘母液使芘的终浓度为 25 mg/L，30℃恒温摇床避光富集培养 5 d；取菌液 5 mL，加入到 45 mL 新鲜的无机盐培养液中，加入芘母液，使芘的终浓度为 50 mg/L，30℃恒温摇床避光富集培养 5 d。采用同样的方法，将芘的浓度依次提高，直至 100 mg/L，并分别在 30℃恒温摇床避光富集培养 5 d。

将最后一次富集培养的菌液用无机盐培养液进行梯度稀释，取稀释液 100 μL 涂布于无机盐固体培养基上，30℃培养至有肉眼可见的明显菌落，根据菌落外部形态，挑取其中生长旺盛的单菌落进一步于无机盐固体培养基平板中纯化，如此反复多次，直至分离出纯菌。再将该菌落接种于含芘的无机盐培养液中培养以验证其是否能以芘为唯一碳源生长。纯化后的菌种保存于牛肉膏蛋白胨培养基斜面中。

所述培养基盐度均为 5%，pH 均为 8.6，配制方法如下：

无机盐培养液：(NH₄)₂SO₄ 1 g、K₂HPO₄ 0.8 g、KH₂PO₄ 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、CaCl₂·2H₂O 0.1 g、葡萄糖 0.05 g、NaCl 43.5 g、MgCl₂·6H₂O 6.5 g 和微量元素 FeSO₄·7H₂O 0.012 g、MnSO₄·7H₂O 0.003 g、ZnSO₄·7H₂O 0.003 g、CoSO₄·7H₂O 0.001 g、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.001 g，蒸馏水定容至 1 L，pH 为 8.6，121℃灭菌 20 min。

无机盐固体培养基：上述无机盐培养液中加入 2% 的琼脂，pH 8.6，121℃灭菌 20 min，制作培养基平板，待其凝固后取 0.5 mL 已过滤除菌的芘母液（5 g/L）涂于表面，待溶剂挥发后形成一层芘的固体膜。

牛肉膏蛋白胨培养基：牛肉膏 5 g，蛋白胨 10 g，NaCl 43.5 g，MgCl₂·6H₂O 6.5 g，蒸馏水定容至 1 L，pH 8.6，121℃灭菌 20 min。

所述芘母液的配制：以丙酮为溶剂，配制 5 g/L 的芘的丙酮溶液，并用已灭菌（121℃，20 min）的 0.22 μm 有机滤膜过滤除菌。

(2) 菌种的鉴定

①发明菌株菌落特征为圆点状、透明、边缘不规则；细胞形态为长杆状、无芽孢。

②对发明菌株进行生理生化鉴定，接触酶实验和淀粉水解实验均呈阳性，具有运动性，

摘要附图

吡啶实验、 NaNO_3 还原反应、明胶水解实验、 NaNO_2 还原反应，脂酶反应及革兰氏染色均呈阴性。

③将发明菌株交由测序公司进行 16S rRNA 序列测定，将序列信息输入 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库进行 BLAST 分析，与海杆菌属 (*Marinobacter* sp.) 中的多个菌种基因序列相似性达 99% 以上。通过与基因库中典型模式菌株序列构建系统发育树 (图 1)，结合①中菌落和细胞形态特征以及②中生理生化特征，进一步确定发明菌株为 *Marinobacter* sp. 属。将该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏名称为 *Marinobacter* sp. HWP-1，保藏登记号为 CCTCC NO: M 20211335。

实施例 2

菌株 HWP-1 的耐盐碱特性分析

在无机盐培养液的基础上调整盐浓度 (0、1%、5%、8%、10%、15%、20%) 和 pH (5、6、7、8、9、10、11)，121 °C 灭菌 20 min，冷却后加入已过滤除菌的苾母液，使其终浓度为 50 mg/L。将已纯化的菌株 HWP-1 分别接入不同盐度和 pH 的培养液中，30 °C、140 r/min 振荡培养，3 d 后测定降解菌生长情况 (OD_{600})。

从图 2 可以看出，菌株 HWP-1 可生长的盐度范围为 0~20%，最适生长盐度为 5%。从图 3 可以看出，菌株 HWP-1 可生长的 pH 范围为 5~11，最适生长 pH 为 8。

实施例 3

菌株 HWP-1 对多环芳烃降解能力分析

向 5 mL 含有 50 mg/L 苾和 5 mg/L 苯并[a]苾的无机盐培养液中，接种 1 mL 的 HWP-1 菌悬液，30 °C，140 r/min 避光振荡培养，分别测定 7 天后苾和苯并[a]苾的含量，计算降解率。每处理设三个重复，以不接种菌悬液为对照组。

所述菌悬液的制备方法：将苾母液过滤除菌，取 1 mL 添加到 100 mL 无机盐培养液中，使苾的终浓度为 50 mg/L，置于恒温振荡培养箱中振荡将丙酮挥发尽。无菌条件下，将菌株 HWP-1 接种于含苾的无机盐培养液中，30 °C、140 r/min 培养 7 d，5000 r/min 离心 5 min，弃掉上清液，用适量新鲜无机盐培养液重悬，再次离心、重悬，获得 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 值约 0.25 的菌悬液。

从图 4 可以看出，7 d 后菌株 HWP-1 对苾和苯并[a]苾均有明显的降解，其中苾的降解率达 47.8%，苯并[a]苾的降解效率达 42.4%。

实施例 4

菌株 HWP-1 在不同盐度和 pH 条件下对多环芳烃的降解能力

在无机盐培养液的基础上调整盐浓度 (0、1%、5%、8%、10%、15%、20%) 和 pH (5、

摘要附图

6、7、8、9、10、11), 121 °C 灭菌 20 min, 冷却后加入已过滤除菌的茈母液, 使其终浓度为 100 mg/L。置于恒温振荡培养箱中振荡, 使丙酮挥发尽。取 1 mL 菌悬液接种至 5 mL 该培养液中, 30°C, 140 r/min 避光振荡培养, 7 天后测定茈的含量, 计算降解率。每处理设三个重复。

所述菌悬液的制备方法同实施例 3。

分析不同盐度条件下菌株 HWP-1 对多环芳烃的降解能力时, 无机盐培养基的 pH 为 8.6, 分析不同 pH 条件下菌株 HWP-1 对多环芳烃的降解能力时, 无机盐培养基的盐度为 5%。

由图 5 可知, 不同盐度条件下菌株 HWP-1 对多环芳烃的降解能力不同。菌株 HWP-1 在 0% 的盐度下对茈的降解率仅为 9.4%, 在 1%~8% 的盐度范围内对茈的降解效率达 69.0%~79.2%, 后随着盐度的升高, 茈的降解率呈明显下降趋势, 当盐度达到 20% 时, 茈的降解率仅为 7.8%。

由图 6 可知, 在 pH 6~9 的条件下, 菌株 HWP-1 对茈均具有良好的降解效果, 降解率达 70.5%~81.3%, 当 pH 为 5 和 10 时, 茈的降解率呈明显降低, 分别为 49.4% 和 56.0%, pH 达到 11 时, 茈的降解率仅为 6.0%。

实施例 5

菌株 HWP-1 在电动-微生物修复高环多环芳烃污染盐碱土壤中的应用

试验土壤: 实施例中所用土壤采自某实验基地附近 0~30cm, 除去石子颗粒等杂质, 自然风干后过 2 mm 筛。用二氯甲烷将茈溶解, 以 300 mg/kg 的比例加入土壤中, 充分混匀, 室温下避光平衡两周。

HWP-1 菌悬液的制备: 用牛肉膏蛋白胨固体培养基将菌株 HWP-1 活化后, 接种于牛肉蛋白胨液体培养基中, 30°C、140 r/min 培养 3 天, 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用无机盐培养液重悬, 再次离心、重悬, 获得 OD_{600nm} 值约 0.25 的菌悬液。所述培养基的盐度均为 5%, pH 值均为 8.6, 配制方法同实施例 1。

试验共设置四组处理: 电动-微生物修复、微生物修复、电动修复和对照。其中, 电动-微生物修复和微生物修复的茈污染土壤中添加了 HWP-1 菌悬液, 使土壤中的微生物数量达到 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g, 土壤盐分和 pH 值分别为 1% 和 8.0, 土壤含水量为 13%~16%; 电动修复和对照处理的茈污染土壤中添加了相同量的无机盐培养液, 使其盐度、pH 值和水分含量与电动-微生物修复和微生物修复中相同。电动-微生物修复和电动修复施加 1.0 V/cm 的直流电场, 电极极性每 30 min 切换一次。每组处理 1.5 kg 土壤, 每 7 天采一次样检测茈的含量, 并计算其降解率。试验共持续 98 天, 定期向土壤中加入去离子水以保持土壤水分。同时, 选取 0 天和 98 天的土壤样品, 采用高通量测序技术对微生物群落结构进行监测。

摘要附图

由图 7 可知，四组试验处理中芘发生了不同程度的降解。其中，电动-微生物修复效率最高，98 天后芘的降解率达 72.8%，然后依次为微生物修复和电动修复，98 天后芘的降解率分别为 60.7%和 47.0%，对照中芘的降解率最低，仅为 12.4%。这说明菌株 HWP-1 在芘污染盐碱土壤的修复中起到重要作用，而电场的施加可进一步促进菌株 HWP-1 的生物修复效率。

由图 8 可知，不管是在参与微生物修复还是电动-微生物修复的过程中，海杆菌属 (*Marinobacter*) 均为优势菌属，表明菌株 HWP-1 具有良好的适应性和竞争力，是一种适合于电动修复高环多环芳烃污染盐碱土壤的降解菌。

实施例 6

菌株 HWP-1 在电动-微生物修复化工基地多环芳烃污染盐碱土壤中的应用

试验土壤：实施例中所用土壤采自宁东工业园区某化工厂附近，除去石子颗粒等杂质，自然风干后过 2 mm 筛，土壤中总多环芳烃含量约 2708.26 $\mu\text{g/kg}$ 。

HWP-1 菌悬液的制备：同实施例 5。

试验设置四组处理：同实施例 5。

定期向土壤中加入去离子水以保持土壤水分，试验共进行 98 天，分别测定 0 天和 98 天土壤中不同多环芳烃含量，并计算其降解率。

由表 1 可知，从初始土壤中共检测出 12 种多环芳烃，每种多环芳烃含量有所不同。经过 98 d 的修复处理，各处理土壤中 12 种多环芳烃发生了不同程度的降解。其中，电动-微生物修复效率最高，98 天后 2、3、4、5、6 环的多环芳烃平均降解率分别达 96.8%、91.7%、76.4%、44.7%和 27.0%，微生物修复中分别为 83.0%、80.9%、62.0%、31.1%和 15.5%，电动修复中分别为 76.0%、74.9%、47.6%、25.2%和 11.0%，对照中分别为 35.0%、38.8%、6.3%、1.4%和 0.2%。以上结果说明在实际污染土壤成分复杂的情况下，菌株 HWP-1 对不同环数的多环芳烃具有良好的降解作用，而电场的施加可进一步促进菌株 HWP-1 的降解效率。

表 1 菌株 HWP-1 及电场强化作用下对化工基地多环芳烃污染盐碱土壤的修复结果

多环芳烃	环数	初始含量 ($\mu\text{g/kg}$)	98d 后不同修复方式多环芳烃降解率 (%)			
			电动	微生物	电动-微生物	对照
萘	2	1596.11 \pm 105.34	75.9 \pm 2.23	83.0 \pm 2.85	96.8 \pm 2.67	35.0 \pm 1.21
二氢芘	3	2.59 \pm 0.19	88.8 \pm 2.03	90.7 \pm 2.07	99.1 \pm 0.83	49.4 \pm 1.11
芘	3	7.25 \pm 0.18	85.9 \pm 1.05	92.1 \pm 2.04	98.2 \pm 1.02	57.1 \pm 2.13
菲	3	614.06 \pm 32.54	50.0 \pm 2.07	59.8 \pm 2.21	78.0 \pm 3.06	10.0 \pm 1.98

摘 要 附 图

荧蒽	4	171.56±15.93	45.0±2.12	58.1±1.67	76.4±1.78	7.9±1.77
芘	4	145.63±10.08	47.9±1.66	60.1±2.06	73.2±1.79	6.0±2.22
苯并[a]蒽	4	37.82±3.34	49.9±1.45	68.0±1.85	80.0±2.64	4.9±0.78
苯并[b]荧蒽	5	29.77±1.72	30.1±2.12	38.1±2.23	50.5±1.56	2.0±0.56
苯并[a]芘	5	42.88±5.55	26.0±0.98	30.8±1.80	46.6±1.67	1.2±0.57
二苯并[a,h] 蒽	5	17.58±1.04	19.5±1.07	25.1±1.56	38.1±1.18	0.9±0.05
茚并 [1,2,3-cd]芘	6	26.66±1.25	12.0±1.78	16.4±1.19	28.1±0.99	0.3±0.08
苯并[ghi]花	6	16.35±0.08	10.6±0.99	15.0±1.03	26.1±1.01	0.1±0.05
总量		2708.26±171.24				

综上，本发明的海杆菌菌株对 4 环以上高环多环芳烃（芘和苯并[a]芘）具有良好的降解能力，对于高环多环芳烃污染盐碱土壤也具有良好的修复效果。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明的保护范围应以所附权利要求为准。