

优势黄杆菌对蒽、菲、芘混合物的降解特征研究

雷萍¹, 聂麦茜², 温晓玫², 葛碧州², 张志杰², 赵文明¹

(1. 西安交通大学生命科学与技术学院, 710049, 西安; 2. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 710055, 西安)

摘要: 为探索混合多环芳烃的生物降解特征, 利用两株优势黄杆菌, 对混合蒽、菲、芘进行了降解研究. 高效液相色谱分析表明, 混合多环芳烃的降解 56.3% ~ 69.6% 在前 10 h 内完成, 其生物降解进程和单基质相似, 但降解效率低于单基质. 混合体系中蒽、菲、芘在不同菌株作用下有按特定优先顺序降解的特征, 但两株黄杆菌 (FCN1 和 FCN2) 的混合菌并不促进混合多环芳烃的降解. 降解 130 h 后, 体系中蒽、菲、芘消除, 但总有机碳去除率仅达到 60.1% ~ 72.7%, 说明部分多环芳烃转化为中间代谢产物. 菌数测定表明, FCN1 和 FCN2 利用多环芳烃及其降解中间产物繁殖生长, 菌数最高时分别增长 200 倍和 100 倍, 但菌数增长滞后于多环芳烃的浓度变化. 研究表明, 混合多环芳烃之间具有降解竞争抑制特征, 且其生物降解具有规律性.

关键词: 优势黄杆菌; 多环芳烃; 混合体系; 竞争抑制; 代谢产物

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253 - 987X(2004)06 - 0657 - 04

Study to Degradation Characters of Preponderant Flavobacterials Strains in a Mixture of Anthracene, Phenanthrene and Pyrene

Lei Ping¹, Nie Maiqian², Wen Xiaomei², Ge Bizhou², Zhang Zhijie², Zhao Wenming¹

(1. School of Life Science and Technology, Xi an Jiaotong University, Xi an 710049, China; 2. College of Municipal and Environmental Engineering, Xi an University of Architecture and Technology, Xi an 710055, China)

Abstract: The bio-degradation characters of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), containing anthracene, phenanthrene and pyrene, by employing two preponderant *flavobacteria* (FCN1 and FCN2) for degradation, were studied. The results analyzed by high performance liquid chromatograph showed that 56.3% - 69.6% degradation of mixed substrates (PAHs) occurred during the first 10 hours of degradation, the degrading courses of them were similar to the sole-substrates, but the degrading ratio of mixed substrates was lower than that of sole-substrates. It is found that the 3 PAHs in mixture are degraded in a specified order by the two different strains, but FCN1 and FCN2 cannot collaboratively promote the degradation. The PAHs in the mixture system disappeared after incubation for 130 h, however, the total organic carbon degrading ratio was only 60.1% - 72.7%, and it suggested that part of the PAHs was degraded into intermediary metabolites. The number of FCN1 and FCN2 has increased to be 200 and 100 times respectively, revealing their assimilation to mixed PAHs, but the increase has lagged behind the descent periods of the PAHs. Degradation of PAHs in mixture is characterized by competitive inhibition, and some rules could be found in the degradation process.

Key words: *preponderant flavobacterium*; *polycyclic aromatic hydro carbons*; *mixture system*; *competitive inhibition*; *metabolites*

由两个或两个以上苯环耦合在一起的多环芳烃 (PAHs) 是迄今为止人类已知最大的一类化学致癌

收稿日期: 2003 - 10 - 09. 作者简介: 雷萍 (1968 ~), 女, 博士生; 赵文明 (联系人), 男, 教授, 博士生导师. 基金项目: 国家高技术研究发展计划专项基金资助项目 (2002AA601120).

物,近几十年来,环境中多环芳烃的含量不断增加^[1,2],其生物降解方法和代谢进程成为研究热点,亦取得了相当的进展^[3,4].这些研究的绝大部分是针对单一多环芳烃进行的,然而造成环境污染的多环芳烃大多以混合形式出现,它们的相互作用使混合多环芳烃的生物降解更为困难和复杂.葱、菲、芘是3种典型难降解多环芳烃,目前对其混合物的深入生物降解研究尚未见报导.本文利用两株优势特效黄杆菌的单菌株和混合菌株,对葱、菲、芘混合物进行降解试验,并和单一多环芳烃的降解情况进行对比.同时,通过测定细菌在其中的生长繁殖情况和体系中总有机碳(TOC)的去除情况,探讨混合体系中多环芳烃的代谢特征和趋势,为应用优势菌进行混合多环芳烃降解奠定基础.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本实验使用的两株黄杆菌(flavobacterium)是作者1999年从长期被焦化废水浸渍的泥土中分离出来的,并保存于含葱、菲、芘混合物的培养基中,关于它们的分离、鉴定和对几种PAHs的降解效果已在文献[5,6]等中做过描述.

1.2 菌悬液的诱导制备

在无菌操作条件下,将其接种于含有葱、菲和芘混合物(总质量浓度为75 mg/L,3种PAHs的质量浓度分别为25 mg/L)的牛肉汁培养基,28℃下150 r/min振荡培养48 h,离心收集菌体并用磷酸盐缓冲液反复洗涤3次,再用磷酸盐缓冲液将细菌浓度调至所需备用.

1.3 基础反应液的构成

取5.0 mL磷酸盐缓冲液($K_2HPO_4 \cdot H_2O$ 21.75 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 33.4 g, KH_2PO_4 8.7 g, NH_4Cl 5.0 g, 水1 000 mL)、3.0 mL $MgSO_4$ 溶液($MgSO_4$ 22.5 g, 水1 000 mL)、1.0 mL $CaCl_2$ 溶液($CaCl_2$ 36.4 g, 水1 000 mL)、1.0 mL $FeCl_3$ 溶液($FeCl_3$ 0.25 g, 水1 000 mL)、1.0 mL 微量元素溶液[$MnSO_4$ 39.9 mg, $ZnSO_4 \cdot H_2O$ 42.8 mg, $(NH_4)_2MoO_7 \cdot 4H_2O$ 34.7 mg, 水1 000 mL],用水定容至1 000 mL,高压蒸汽灭菌备用.此反应溶液pH值为7.0.

1.4 PAHs降解试验

配制单基质反应体系时,在400 mL基础反应液中加入葱、菲或芘,使质量浓度分别为40 mg/L,配制混合多环芳烃按1.2节中的方法.反应时,加入1.2中所述的制备菌悬液后混匀,使细胞密度为 1.6

$\times 10^7$ 个/mL(细胞密度单位中的个为1个菌落形成单位(CFU)).利用FCN1(黄杆菌1)及FCN2(黄杆菌2)的混合菌进行降解时,在反应瓶中加入两种菌的混合物(FCN1和FCN2各占50%).每组反应分别设定不加制备菌悬液的对照组,反应在静态反应瓶中进行,28℃下进行静态曝气反应.

1.5 葱、菲、芘含量分析

定时、定量地从反应瓶中采取水样,1 000 $\times g$ 离心10 min去除细胞,用环己烷萃取上清液,萃取液经自然浓缩、定容后进行高效液相色谱分析.分析用流动相为93%色谱纯甲醇水溶液,流速为1.0 mL/min,分离柱为PAH分配色谱柱,柱温为25℃,进样量5.0 μL ,分析所选波长为254 nm^[6].

1.6 TOC的测定

按1.4节的方法曝气反应130 h后,采各反应瓶水样,11 000 $\times g$ 离心10 min除菌体,测定上清液的TOC值^[7].

1.7 细菌数量测定

在300 mL三角瓶中,利用基础反应液配制葱、菲、芘混合溶液100 mL(混合多环芳烃浓度为40 mg/L),加入制备菌悬液,使细菌密度为 1.6×10^7 个/mL.28℃恒温振荡培养,定时采取培养液,利用梯度稀释平板计数法测细菌总数.

2 结果与讨论

2.1 单菌株对多环芳烃单质的降解结果

经两株优势黄杆菌作用后,葱、菲和芘的含量下降(图1和图2),而对照试验中,130 h后,3种多环芳烃的含量未发生显著变化.

从图1和2可见,在反应开始后10 h内,葱、菲、芘的含量在两菌株作用下迅速降低,在FCN1作用下,葱和芘的质量降解率达到80%以上,菲仅为40.6%;在FCN2作用下,葱和芘的质量降解率达到70%以上,菲高达86%.此结果说明,FCN1对葱和芘的降解效果好于菲,而FCN2正相反,这反映了不

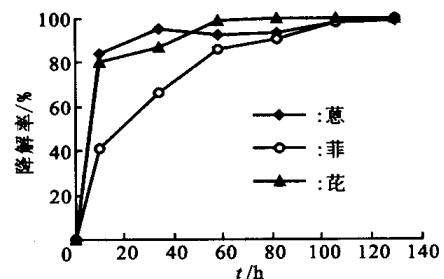


图1 黄杆菌FCN1对葱、菲、芘的降解结果

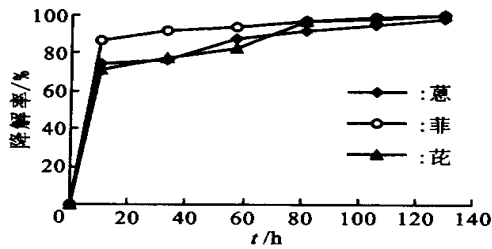


图2 黄杆菌 FCN2 对蒽、菲、芘的降解结果
同菌株降解性能之间的差异。同时,3种多环芳烃的生物降解也存在规律,10 h后,两菌株作用下的蒽、菲、芘出现降解停滞(FCN1 作用下的菲除外),其后继续降解,但速率相对缓慢。在 FCN1 作用下,芘约在 60 h 时完全降解,蒽和菲则在 130 h 时完全降解;在 FCN2 作用下,蒽在 130 h 时完全降解,而菲和芘则在 80 h 时即接近完全降解。

2.2 单菌株对混合多环芳烃的降解结果

单菌株对混合多环芳烃的降解结果见图3和图4,与图1和图2比较,混合体系中的多环芳烃含量也在前10 h内有迅速下降,10 h末,在FCN1作用下,蒽、菲和芘的含量分别下降了63.2%、69.6%和28.1%;在FCN2作用下,其分别下降了69.3%、69.6%和56.3%。与单一多环芳烃相似的降解停滞期也在10 h后出现。本组试验的对照组与2.1的有相同的结果。

在混合体系下,两株黄杆菌对3种多环芳烃仍能加以利用,但降解进程与单一基质降解时有较大差异,且两个菌株的降解特征不同,FCN2在82 h时将各PAHs完全降解转化,而FCN1经110 h才达到同样的降解效果。反应开始10 h后,FCN1对蒽和芘、FCN2对3种化合物的降解率均低于单一基质时,但FCN1对菲的降解率高于蒽和芘,比在单

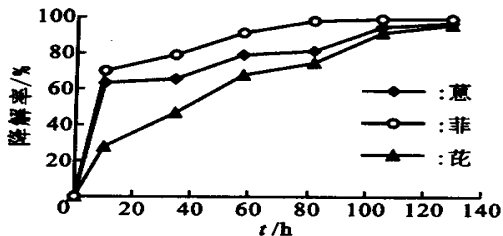


图3 黄杆菌 FCN1 对蒽、菲、芘混合体的降解结果

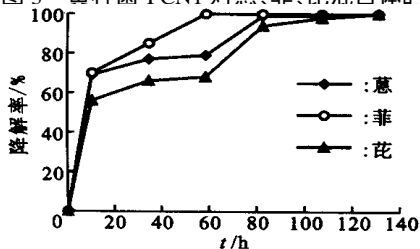


图4 黄杆菌 FCN2 对蒽、菲、芘混合体的降解结果

一基质时的降解率提高60%。在两株细菌的作用下,混合体系中均出现芘降解最慢、蒽次之、菲最快的现象,表现出PAHs降解混合体系中存在竞争抑制现象^[8],其中菲的竞争抑制能力最大,芘最小。从化学结构看,蒽与菲是由3个苯环稠合形成的有机分子,芘则由4个苯环稠合而成,与蒽、菲相比,芘难以降解转化。蒽和菲同属3环分子,但前者为线性分子,后者为角性分子。据相关文献,多环芳烃分子中芳环个数越多的,其生物可利用性越差,反之则生物可利用性强;分子量相同的条件下,角性多环芳烃在水中的溶解度大于线性分子^[9,10],由此可解释混合体系中菲、蒽、芘可利用性由强到弱的原因。

利用优势单菌株强化常规工艺,可大大改进有机物难降解的情况。从本试验菌株对混合多环芳烃的降解结果来看,它们可以应用于混合多环芳烃废水的处理中,例如在投菌法^[11]强化活性污泥处理工艺中,投加培养的优势菌株,以强化降解混合多环芳烃。

2.3 混合菌对蒽、菲、芘混合体系的降解结果

FCN1和FCN2混合,对多环芳烃混合体系的降解结果如图5所示,与图3、图4相比,FCN1和FCN2混合菌对芘、蒽、菲混合体系的降解优先次序基本和单一菌降解时类似,但在20 h前,蒽和芘的降解优先次序相反。在58 h内,芘的降解转化比单独使用FCN1快,与单独使用FCN2相近。在随后的反应时间内,芘含量的下降空间小于蒽和菲。从该实验结果来看,FCN1与FCN2共存对多环芳烃混合物的降解效果并不加和互补,尤其在反应进行到58 h后,对芘的降解转化显然还发生了相互抑制。

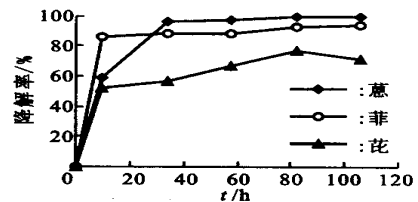


图5 FCN1与FCN2混合对蒽、菲、芘混合体的降解结果

2.4 TOC的测定结果

按照1.2节的方法进行实验,采用1.6节中的实验方法进行TOC测试,结果见表1。反应130 h

表1 TOC的测定结果

| | 降解试验使用菌株 | | |
|---------------------------------|----------|-------|-------------|
| | FCN1 | FCN2 | FCN1 + FCN2 |
| 起始 (TOC)/g·mL ⁻¹ | 70.95 | 70.95 | 70.95 |
| 130 h后 (TOC)/g·mL ⁻¹ | 19.76 | 28.32 | 19.39 |
| 降解率/% | 72.1 | 60.1 | 72.7 |

后,测定的 TOC 去除率在 60.1%~72.7%之间,说明起始反应的蒽、菲、芘虽已降解完全,但尚未完全矿化或同化为细菌生物量,还存在代谢中间产物,形成残留的 TOC.

2.5 多环芳烃混合体系中的菌体密度测定结果

结果如图 6 所示,两菌株在混合多环芳烃中具有相似的生长曲线.菌体密度在反应前 4 天缓慢增长,96 h 时分别达到 1.8×10^8 个/mL 和 1.2×10^8 个/mL,以后增长速度加快,第 8 天时达到最高,分别为 3.2×10^9 个/mL 和 1.7×10^9 个/mL,之后不再增长.此结果证实两株黄杆菌能利用混合多环芳烃作为碳源和能源繁殖生长.图 6 与图 3 和图 4 比较,10 h 内多环芳烃的含量下降较快,但这时测定的菌数并无明显增长,出现菌数增长滞后于多环芳烃浓度下降的现象.本文试从微生物对多环芳烃的代谢进程加以解释:反应开始阶段,菌株主要分解多环芳烃,且可能有菌体吸附现象,因而菌体无明显增长;中间代谢产物积累以后,菌株才利用其作为碳源和能源而繁殖生长,这符合多环芳烃的微生物代谢理论^[10],也是菌株在多环芳烃消耗后(130 h,见图 3 和图 4)还能继续增长的原因.

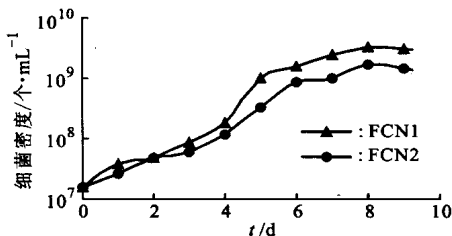


图 6 两株黄杆菌在混合体系中的生长繁殖曲线

两株黄杆菌能在混合多环芳烃中繁殖生长,说明它们能在生物处理工艺中保持稳定,具有工程应用潜力.例如,它们可在菌体固定技术中应用,或引入生物膜,在多环芳烃废水中发挥降解作用.

3 结论

在本研究中,混合体系中的蒽、菲、芘降解进程与单基质相似,相同菌株作用下的混合多环芳烃与单基质之间、不同菌株作用下的混合多环芳烃之间均存在一定的降解差异.相比于单基质多环芳烃,混合体系中的蒽、菲、芘降解总体受到阻碍.在两株菌作用下,3种多环芳烃相互产生竞争抑制,其中菲的竞争代谢能力最大,芘最小,且 FCN2 与 FCN1 混合对多环芳烃的降解转化能力并不加和.从 TOC 测定结果看,反应进行 130 h 后,两株黄杆菌使多环芳烃大部分矿化或同化为生物量,同时有中间代谢产物

存留.两株黄杆菌能在混合多环芳烃中繁殖生长,在反应进行到第 8 天时菌体密度增至最大.综合来看,在本文的实验条件下,FCN2 对蒽、菲、芘混合体系的降解效果较好.本研究显示 3 种混合多环芳烃生物降解和单基质降解一样,具有特定的代谢特征,有待进行更为深入的研究.

参考文献:

- [1] Seed T, Al-Bloushi A. Assessment of levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in the oil from Kuwait oil lake [J]. *Arc of Environ Contamin Toxicity*, 1995, 29(1): 45~51.
- [2] Lui M, Baugh P J, Hutchinson S M, et al. Historical record and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in core sediments from the Yangtze estuary, China [J]. *Environ Pollution*, 2000, 110(2): 357~365.
- [3] Barr D P, Aust S D. Mechanisms of white rot fungi used to degrade pollutants [J]. *Environ Sci Technol*, 1994, 28(1): 78A~87A.
- [4] Romero M G, Cazau M C. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(1): 237~241.
- [5] 雷萍, 聂麦茜, 张志杰, 等. 一株多环芳烃降解菌在焦化废水降解中的应用研究 [J]. *西安交通大学学报*, 2001, 35(10): 1 055~1 058.
- [6] 聂麦茜, 张志杰, 赵桂芳, 等. 共基质对优势菌降解多环芳烃的作用研究 [J]. *环境科学研究*, 2001, 14(5): 30~32.
- [7] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [8] Jerome F J, Chikashi S, Raul C, et al. Composting of polycyclic aromatic hydrocarbons in simulated municipal solid waste [J]. *Water Environ Res*, 1992, 70(3): 356~361.
- [9] Stringfellow W T, Aitken M D. Competitive metabolism of naphthalene methynaphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(1): 357~362.
- [10] Thomas J M, Yordy J R, Amador J. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 52(2): 290~296.
- [11] 苏月来, 张建中, 谢雨生, 等. 有毒难降解有机废水处理的生物强化技术 [J]. *环境污染与防治*, 1998, 21(2): 36~39.

(编辑 杜秀杰)