

白腐真菌和细菌对芘的协同生物降解研究

侯树宇, 张清敏, 多 淼, 余海晨, 孙红文

(南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘 要: 采用室内培养试验方法, 在芘降解试验中引入一株白腐真菌——黄孢原毛平革菌, 通过优化培养条件, 成功地将白腐真菌和芽孢杆菌进行了混合扩大培养。结果表明, 该方法大大提高了降解性能, 最终芘的去除率高达 99.5%, 除去菌体吸附, 芘的同化吸收率也高达 90%, 同时大大降低了芘的残留阈值, 从 12% 降低到 0.5%, 降低了芘在环境中的生态风险。本文研究了关键中间代谢产物 1-羟基-2-萘酸 (1H2N) 及其等价物的积累与利用情况, 混合菌产生的 1H2N 等价物最大浓度为 $5.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 为其理论产量的 110.9%, 这进一步证明了芘的降解途径首先是生成多酚化合物。

关键词: 白腐真菌; 芽孢杆菌; 生物降解; 芘

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2005)02 – 0318 – 04

Coordinated Biodegradation of Pyrene by a Consortium of White Rot Fungus and Bacteria

HOU Shu-yu, ZHANG Qing-min, DUO Miao, YU Hai-chen, SUN Hong-wen

(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Two *Bacillus* sp. have been tamed and isolated from an aged PAHs contaminated soil at previous research in our lab. It has been proven that they are both pyrene degrading bacteria. The degradation of PAHs by white rot fungi has been extensively examined in experiments both using liquid culture and in situ. In this study, a white rot fungus – *Phanerochaete chrysosporium* was added into the pyrene degradation experiments. Through optimizing culture conditions such as component of nutrition, pH, temperature and DO, *P. Chrysosporium* has successfully cultivated cooperated with above two *Bacillus* sp. . The individual growth of bacteria and white rot fungus in the consortium was also investigated to find out the coordinated conditions of them. The consortium of them greatly increased pyrene degradation rate (PDR). The overall PDR by the consortium was up to 99.5%, indicating much greater than the separate microorganism. Except for the adsorption to the cell wall, pyrene assimilation rate (PAR) was also up to 90%. Furthermore, the consortium reduced the threshold of pyrene from 12% to 0.5% in the extreme. Consequently, ecological risk of pyrene to environment was reduced to a minimum level. Intermediate metabolite compounds such as 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2N) were isolated and identified in the degradation experiment. The accumulation and utilization of 1H2N and its equivalents were measured. The high level accumulation of 1H2N and its equivalents were found in degradation experiments and up to $5.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, equivalent to 110.9% of its theoretical yield, which further proved that polyphenolic substances are firstly generated in pyrene degradation pathway.

Keywords: white rot fungi; *Bacillus* sp. ; biodegradation; pyrene

多环芳烃 (PAHs) 是一类由 2 个或多个芳香环构成的化合物, 是石油、煤炭等化石燃料燃烧过程及能源转化过程的副产物^[1], 多数 PAHs 具有致癌性和突变性, 目前已被许多国家列为优先控制的环境污染

物, 并受到广泛的关注^[2]。芘 (pyrene) 是 PAHs 的四环代表物, 属难降解有机污染物, 已被列入具有致癌性的 PAHs 之列, 在环境中广泛存在, 是检测多环芳烃污染的指示物^[3]。

微生物降解被认为是 PAHs 在自然界中降解的主要途径, 许多细菌、真菌及藻类具有降解 PAHs 的能力^[4-7]。近年来分离到的 PAHs 降解菌主要有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、假单

收稿日期: 2004 – 07 – 15

基金项目: 国家自然科学基金资助 (402173036); 南开大学学生创新基金

作者简介: 侯树宇 (1979—), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, 从事环境生物技术研究。E-mail: shuyu_hou@126.com

胞菌属 (*Pseudomonas*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等细菌; 真菌氧化芳香烃的能力是普遍的, 其中研究较多的为白腐真菌 (*White Rot Fungi*), 其产生的木质素降解酶的底物特异性较低, 可以催化多种 PAHs 的降解^[8~10]。

目前, 在真菌和细菌混合培养降解 PAHs 方面, 国内外还鲜有报道。本文通过白腐真菌和芽孢杆菌的混合扩大培养, 进一步提高了芘的去除率, 降低了芘的阈值, 同时又研究了混合菌细胞对芘的同化吸收率降解中间产物的关系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

细菌: 采用本实验室驯化、筛选、分离得到的 2 株 PAHs 降解菌 Py1 和 Py4, 均为芽孢杆菌, 已证实具有高效的 PAHs 降解性能。

白腐真菌: 采用一株比较典型的 PAHs 降解菌——黄胞原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*), 购自中国科学院微生物研究所微生物菌种保藏中心。

1.1.2 试验材料

PDA 培养基^[12]: 称取去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加 1 000 mL 蒸馏水, 煮沸 1 h, 用双层纱布过滤加水补充因蒸发而减少的水分, 再加入 20 g 葡萄糖。固体培养基加琼脂 15~20 g。115 ℃ 灭菌 20~30 min, 保存备用。

营养肉汤培养基^[11]: 牛肉膏 3~5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min, 保存备用。

孟加拉红琼脂培养基^[12](Martin 培养基): KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 10 g, 孟加拉红 0.033 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8。(加压灭菌后冷却至 42 ℃~45 ℃ 时, 无菌的加入经过滤除菌的链霉素 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

低氮培养液: 葡萄糖 10 g, 酒石酸铵 0.368 g, 无水 CaCl_2 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.028 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 70 mL TE 溶液 (微量元素混合液), 蒸馏水 1 000 mL, 115 ℃ 灭菌 20~30 min, 保存备用。TE 溶液 (L^{-1}): 氨基乙酸 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g, NaCl 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CoSO_4 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, H_3BO_3 0.01 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot$

$2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g。

磷酸缓冲溶液: $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4 + 0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0, 0.1 MPa, 121 ℃, 灭菌 20 min。

1.1.3 主要化学试剂及仪器

称取适量芘 (纯度 > 98%) 溶于丙酮, 配制成标准溶液。工作溶液采用逐级稀释法配制。

Waters 1525 型高效液相色谱仪, 配有 Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector (荧光检测器); 超声波水浴箱; 高速冷冻离心机; 恒温摇床。

1.2 试验方法

1.2.1 白腐真菌和芽孢杆菌的混合培养

混合菌悬液的制备: 从保存斜面上分别挑取白腐真菌、Py1 和 Py4 各一环到 100 mL PDA 培养液中, 经 37 ℃ 恒温振荡培养 24~48 h, 至对数生长期 OD₆₀₀ 约为 2.0, 再 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 无菌条件下, 用磷酸缓冲液洗涤沉淀 2~3 遍, 定容, 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 细菌、白腐真菌及混合菌对芘的降解试验

移取 200 μL 的芘-丙酮溶液 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 至 100 mL 锥形瓶中, 室温下振荡过夜, 使丙酮挥发; 向其中加入 36 mL 灭菌低氮培养液, 在无菌条件下分别加入预先培养到对数生长期且具有相同生物量的细菌、白腐真菌和混合菌悬液 4 mL, 最终芘浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 37 ℃ $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 通过灭菌棉塞控制通气量。定时取样测定溶液中芘的浓度。

1.2.3 芘的测定方法

培养到一定时间后, 将培养液全部转移到 50 mL 玻璃离心管中, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液加入 20 mL 乙酸乙酯, 恒温振荡提取 2 h; 置分液漏斗中剧烈混合, 静置 10 min, 收集乙酸乙酯层, 向水相中再加入 10 mL 乙酸乙酯, 重复提取两次, 合并提取液, 压缩空气吹干, 用色谱级甲醇定容, 用液相色谱专用膜过滤, 液相色谱法 (HPLC) 测定芘的浓度。

液相色谱法: Waters Symmetry Shield™ RP₁₈ 色谱柱 ($5 \mu\text{m}$, $3.9 \times 150 \text{ mm}$), 荧光检测器激发波长为 333 nm, 荧光发射波长为 390 nm, 流动相为乙腈: 水 (80: 20), 进样体积为 20 μL , 检出限为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.4 菌体对芘的吸附

取 1.2.3 中离心分离得到的菌体, 加入 20 mL 乙酸乙酯, 超声提取 2 h, 方法同上, 提取后 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 菌体再次用 10 mL 乙酸乙酯提取 2 次, 合并提取液, 压缩空气吹干, 用色谱

级甲醇定容,用液相色谱专用膜过滤,液相色谱法测定。

1.2.5 降解产物

四环及四环以上的 PAHs 生物降解途径比较复杂,最近的研究表明^[13]:1-羟基-2-萘酸(1H2N)是关键的中间代谢产物,无论是细菌还是真菌,代谢产物中都发现了 1H2N 的存在。

为了考察中间产物 1H2N 及其等价物的积累与利用的情况,以 1H2N 作为参比物,用 4-氨基安替吡啉分光光度法测定 1H2N 及其等价物的浓度。取培养到一定时间的培养液,离心后,取一定量的上清液,定容至 50 mL,加入 0.5 mL 20% NH₄OH-NH₄Cl 缓冲液(pH10.0),混匀,加入 1 mL 2% 4-氨基安替吡啉,混匀,再加入 1.0 mL 8% 铁氰化钾,混匀静置 10~15 min,于 510 nm 测定吸光值,内标法定量($Y=1.2994X$, $r^2=0.9986$),3 次测量取平均值。

2 结果与分析

2.1 混合菌的生长曲线以及细菌和白腐真菌的生长情况

根据 1.2.2 方法培养,定时取样,测 600 nm 下的光密度,以生长时间为横坐标,以 OD₆₀₀ 为纵坐标作图,如图 1 所示。由图中可以看出,0~4 h 为迟缓期,4~14 h 为对数生长期,14 h 后进入稳定生长期和衰亡期。

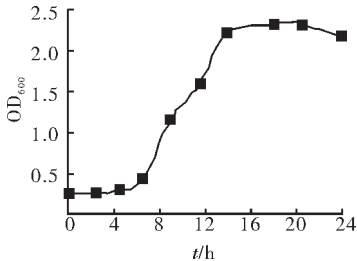


图 1 混合菌的生长曲线

Figure 1 Growth curve of mixed consortia culture

取 10 mL 培养 24 h 的混合培养液,80℃ 恒温水浴 10 min 后,用稀释平板法测定混合培养液中芽孢杆菌数,测得混合培养液中芽孢杆菌数为 3×10^9 CFU · mL⁻¹。再取 1 mL 混合培养液,用浓度为 30 μg · mL⁻¹ 的链霉素抑制细菌,用稀释平板法在孟加拉红琼脂平板上测定白腐真菌数,测得混合培养液中白腐真菌数为 2×10^6 CFU · mL⁻¹。

2.2 不同降解菌对芘的生物降解

以培养时间为横坐标,以芘残余率为纵坐标作图,如图 2 所示。从图 2 可见,芽孢杆菌对芘的降解经

过一个短暂的适应期(大约 2 h)后,进入迅速降解期(2~12 h),大约 16 h 完成降解,最终去除率达 88%;白腐真菌生长速度比芽孢杆菌慢,故适应期较长(大约 4~6 h),之后为迅速降解期(4~20 h),大约 24~26 h 完成降解,最终去除率为 59.5%;混合菌则介于两者之间,适应期为 2~4 h,迅速降解期为 2~20 h,大约 24~26 h 完成降解,虽然开始阶段芽孢杆菌的去除效率比混合菌的高,但混合菌最终去除率高达 99.5%,其残留阈值大大降低,从 12% 降低到 0.5%,这是白腐真菌和芽孢杆菌共生协同作用的结果。不同降解菌在迅速降解期的芘降解率(PDR)如表 1 所示,均具有较好的线性关系。

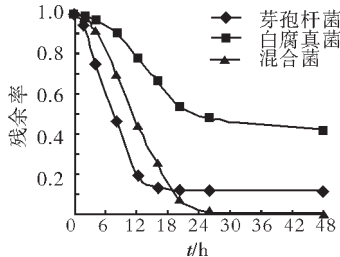


图 2 不同降解菌对芘的生物降解

Figure 2 The biodegradation of pyrene at different cultures

表 1 不同降解菌在迅速降解期芘的降解率(PDR)

Table 1 Degradation rates of pyrene by different microorganisms in rapid degradation period

菌株	PDR	r^2	培养阶段	最终去除率
	/mg · L ⁻¹ · h ⁻¹ (线性相关系数)		/h	/%
芽孢杆菌	0.372	0.995	2~12	88
白腐真菌	0.138	0.990	4~20	59.5
混合菌	0.261	0.996	2~20	99.5

2.3 菌体对芘的吸附与同化吸收

以培养时间为横坐标,以溶液中的芘浓度为纵坐标作图,如图 3 所示,白腐真菌和混合菌对芘均有较强的吸附作用,吸附最大浓度分别为 0.72 mg · L⁻¹ 和 0.68 mg · L⁻¹,开始阶段迅速吸附,分别在 16 h 和 6 h 达到最大吸附量,之后随着降解的进行,吸附量逐渐降低。试验表明,培养液中芘浓度的迅速下降,其原因为细胞的同化吸收和胞壁的物理吸附。故:同化吸收率=降解率-吸附率。以同化吸收率为纵坐标,时间为横坐标作图,如图 4 所示,白腐真菌和混合菌对芘的同化吸收率分别为 46% 和 90%。

2.4 降解产物

以培养时间为横坐标,以 1H2N 及其等价物浓度为纵坐标作图,如图 5 所示,白腐真菌和混合菌的降解产物中,1H2N 及其等价物的浓度先增加后减小,最大浓度分别为 2.06 mg · L⁻¹ 和 5.16 mg · L⁻¹。这

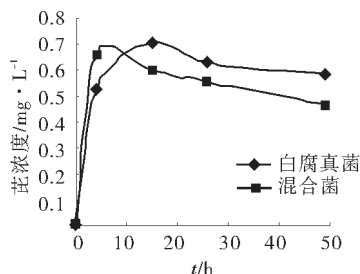


图3 芘的菌体吸附曲线

Figure 3 Adsorption curve of pyrene in the cell

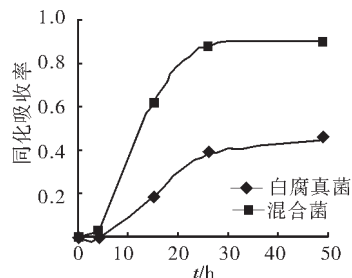


图4 芘的菌体同化吸收曲线

Figure 4 The assimilation of pyrene by the cells

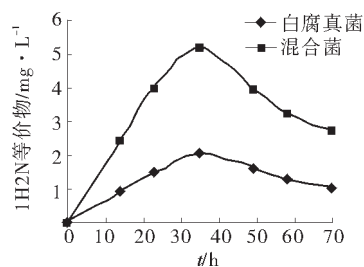


图5 1H2N 及其等价物的积累与利用曲线

Figure 5 Accumulation and utilization of 1H2N

表明,菌体对芘真正的降解发生在初始的同化吸收与物理吸附之后。而混合菌中间代谢产物——1H2N 及其等价物的最高浓度水平为其理论产生量的110.9%,这是由于多酚化合物存在所致。

3 结论

(1)根据白腐真菌和芽孢杆菌快速生长以及降解芘所需的各项理化条件、营养因子,设计适合两者共生长的培养液,找到它们共同的最佳理化条件,成功地完成了白腐真菌和细菌的混合扩大培养,并且其对芘的去除效果明显优于单独的白腐或芽孢杆菌,最终芘去除率达99.5%,除去菌体吸附,芘的同化吸收率也高达90%。

(2)以芘降解中公认的关键中间代谢产物1-羟基-2-萘酸(1H2N)为参比物,研究了1H2N及其等价物在培养液中的积累与利用情况。结果表明,1H2N及其等价物的浓度先增加后减少,这表明菌体对芘真正的降解发生在初始的同化吸收与物理吸附之后;混

合菌1H2N及其等价物的最大浓度为 $5.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,为理论产量的110.9%,这是由于中间代谢产物中存在多酚化合物所致。

(3)微生物对外源物质的降解往往存在着一定的阈值,也就是降解到一定浓度后就不再降解,这一问题在自然界中普遍存在。研究表明,利用白腐真菌胞外氧化还原酶系丰富,底物专一性低,对外源物质的降解不受其浓度大小的影响等优点,在能降解芘的芽孢杆菌中加入白腐真菌,通过它们的共生协同作用,提高芘的降解率和降低其阈值。结果表明,混合菌大大降低了芘的残留阈值,从12%降低到0.5%,大大降低芘等多环芳烃在环境中造成的生态风险,这对于人类健康和生态环境的平衡有着极为重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 郭楚玲,郑天凌,洪华生. 多环芳烃的微生物降解与生物修复[J]. 海洋环境科学,2000,19(3):24-29.
- [2] 马 沛,钟建江. 微生物降解多环芳烃(PAHs)的研究进展[J]. 生物加工工程,2003,1:42-46.
- [3] 巩宗强,李培军,王 新,等. 芘在土壤中的共代谢降解研究[J]. 应用生态学报,2001,12(3):447-450.
- [4] Yuan S, Wei S H, Chang B V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture[J]. *Chemosphere*, 2000, 41:1463-1468.
- [5] Ravelet C, Krivobok S, Sage L, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi[J]. *Chemosphere*, 2000, 40:557-563.
- [6] Nubia Ramirez, Teresa Cutright, Lu - Kwang Ju. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium[J]. *Chemosphere*, 2001, 44:1079-1086.
- [7] Klaus Rehmann, Harald P Noll, Christian E W. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. Strain KR2[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(14):2977-2992.
- [8] John A Bumpus, Ming Tien, David Wright, etc. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. *Science*, 1985, 228:1434-1436.
- [9] David P Barr, Steven D Aust. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants[J]. *Environmental Science and Technology*, 1994, 28(2):78A-87A.
- [10] 李慧蓉. 白腐真菌的研究进展[J]. 环境科学进展, 1996, 4(6):69-77.
- [11] 杜连祥,等. 工业微生物学实验技术[M]. 天津:天津科学技术出版社,1992. 275-279.
- [12] 土壤微生物研究会[日]. 土壤微生物实验法[M]. 北京:科学出版社,1983. 135-142.
- [13] Lei Tian, Pei Ma, Jian - jiang Zhong. Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37:1431-1437.