

文章编号: 1000-5013(2008)02-0267-03

芘降解菌的分离纯化及其降解性能测定

刘艳锋, 周作明, 李小林, 荆国华, 方柏山

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 通过对某炼油厂生化反应池的活性污泥的富集与驯化, 得到一组能以芘为唯一碳源的混合微生物 DP. 将混和菌 DP 分离纯化, 可得到 6 种芘降解菌 DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 和 DP6. 通过显微镜观察各降解菌的菌落特征及革兰氏染色实验, 初步判断 DP1 为细菌, 其他为放线菌. 在芘质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中培养 44 h 后, 6 种菌对芘的降解率分别为 46.2%, 83.2%, 23.6%, 11.3%, 53.3%, 13.6%, 其中 DP2 为芘的高效降解菌.

关键词: 芘; 降解菌; 分离; 纯化; 生物降解

中图分类号: X 172; TQ 241.5

文献标识码: A

多环芳烃(PAHs)是一类广泛存在于环境中的难降解有机污染物. 在一定范围内, PAHs 的遗传毒性和致癌性随着苯环数目的增加而增加, 在 4~5 个环时其毒性最高^[1]. 芘是具有 4 个苯环的稠环芳烃, 被确立为检测 PAHs 污染的指示物, 其代谢物醌(Quinone)比芘毒性更大, 且具有致突变性^[2]. 研究表明, 土壤/沉积物和水环境中绝大部分 PAHs 是通过生物降解途径慢慢消失的, 因此 PAHs 的生物降解受到广泛关注^[3-5]. 本文以芘为唯一碳源, 对取自某炼油厂生化反应池的活性污泥进行富集与驯化, 筛选得到能高效降解芘的菌株, 并进一步研究其对芘的降解性能.

1 材料与方法

1.1 培养基

(1) LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g NaCl, 加去离子水定容至 1 L, pH 值为 7.0, 在 121 的条件下高压湿热灭菌 20 min. (2) 无机培养基(MSM): $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, pH = 7.2, 在 121 的条件下灭菌 15 min.

1.2 试剂与仪器

芘(质量分数为 98%, 德国 Sigma 公司), 二氯甲烷(色谱纯), 其他化学试剂均为分析纯. H-2050R 型高速冷冻离心机(湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司), UV-4802H 型紫外可见分光光度计(上海尤尼科公司), 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), CH20BIMF200 型显微镜(日本奥林巴斯公司).

1.3 实验方法

1.3.1 高效液相色谱(HPLC) 测定条件: 色谱柱为 ODS-C₁₈ 柱(Hypersil ODS 25 μm , 4.6 mm \times 250 mm, 辽宁大连依利特分析仪器有限公司); 流动相为体积分数为 80% 的甲醇和 20% 的超纯水, 使用前过 0.22 μm 有机膜, 并超声 15 min; 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 波长 239 nm, 温度 30, 进样量 20 μL .

1.3.2 降解菌的驯化与分离 菌种取自某炼油厂生化反应池, 以芘为唯一碳源, 逐步提高芘的质量浓度进行驯化. 摇床温度为 25、转速为 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 无光照培养. 待培养基浑浊后, 转接于新鲜培养基中, 驯化期间每 24 h 测定培养液的光密度值(D). 富集 4 次后, 当芘的质量浓度达到 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,

收稿日期: 2007-12-06

作者简介: 刘艳锋(1980-), 女; 通讯作者: 方柏山(1957-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物生化的研究. E-mail: fangbs@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(D0710019); 国务院侨办科研基金资助项目(06QZR09)

即使再提高芘质量浓度,微生物也不再生长.将培养所得的混合菌命名为 DP,在 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 芘的 MSM 固体培养基平板上对 DP 进行分离.

2 结果与讨论

2.1 芘最大吸收波长的确定

配制一定质量浓度的芘-甲醇溶液,以甲醇为参比液,用 UV-4802H 双光束紫外可见分光光度计对芘进行全波长扫描($190\sim1\,100\text{ nm}$)扫描,确定芘的最大吸收波长(λ_{max}).结果发现,波长为 500 nm 时芘的吸光性很小,在 $200\sim500\text{ nm}$ 范围内扫描得到芘的最大吸收波长为 239 nm .

2.2 芘的添加回收率

取一定量芘标准贮备液至 10 mL 的二次水中,使芘最终质量浓度分别为 $10,30,50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,每种标准混合液重复测 3 次,取平均值,计算添加回收率.结果表明,水样中芘的添加回收率介于 $80\%\sim120\%$ 之间,相对标准偏差介于 $0.48\%\sim6.52\%$ 之间.说明,采用的芘分析方法回收率高、重现性好,能较准确地反映样品中芘的质量浓度,符合 PAHs 提取标准的要求^[6].

2.3 芘标准曲线的绘制

采用外标法,即对样品中所含有的每一组分,都用标准样作质量浓度与峰面积的关系图.用保留时间和峰面积测定芘,定量计算 PAHs 的质量浓度^[7].结果表明,芘在 $1.0\sim50.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内,质量浓度和峰面积呈良好的线性关系,其相关系数 R^2 为 $0.994\,1$.

2.4 芘初始质量浓度对微生物生长的影响

PAHs 在降解过程中会产生某些中间产物,使培养液的颜色发生变化^[8].反应样品中加入芘作为唯一碳源和能源进行富集培养,经过约一个星期后,培养液颜色出现如下变化:乳白色(透明无色的无机培养基加入一定浓度芘后变为乳白色) 白色混浊 淡黄色 稳定不变.在随后各阶段的富集培养中,均可以看到以上颜色变化过程,变化所需时间逐渐缩短,表明培养液中的微生物利用芘的能力不断增强,发生阳性反应的时间缩短,微生物的酶体系适应了芘存在的环境,可将其作为生长基质.驯化期间,每 24 h 测定培养液的 $D(600)$ 值(图 1),混合菌随着芘质量浓度()的增大,生长均受到不同程度的抑制.当芘质量浓度达到 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,生长明显受到抑制,生长缓慢.通过驯化培养,得到芘降解混合菌 DP.

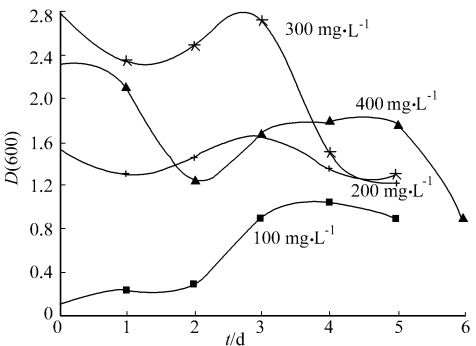


图 1 芘的质量浓度对微生物生长的影响
Fig. 1 Effect of initial concentration of pyrene on growth

2.5 菌种的分离纯化及降解特性

在 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 芘的 MSM 固体培养基平板上多次划线,对 DP 进行分离,获得 6 种纯菌,分别为 DP1,DP2,DP3,DP4,DP5 和 DP6.参考常规方法,对降解菌的菌落特征和菌体形态进行观察^[9],如表 1 所示.根据菌落特征与革兰氏染色实验,通过显微镜观察菌体的形态,对菌种初步鉴定 DP1 为细菌,其他 5 种均为放线菌.在芘质量浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6 组培养液中分别接入 6 种菌,经过 44 h 培养后,芘的降解率(),如表 1 所示.降解过程中,各菌种在培养初期均受到芘的抑制作用,呈现不适应现象,

表 1 6 种芘降解菌的形态观察与降解率

Tab. 1 Culture characteristics and degradation rates of six pyrene degradating strains									
菌种	颜色	干湿	形状	透明度	边缘	高度	显微镜观察	初步鉴定	/ %
DP1	乳白色	粘稠	圆形	不透明	不规则	光滑	菌体为杆状,呈单个排列,部分有芽孢,革兰氏阴性	芽孢杆菌	46.2
DP2	褐色	干燥	圆形	不透明	放射状	隆起	菌体为线状,菌体紧密连接,革兰氏阳性	放线菌	83.2
DP3	黄褐色	干燥	圆形	不透明	放射状	隆起	菌体为树枝状,呈放射状排列,革兰氏阳性	放线菌	23.6
DP4	灰褐色	干燥	圆形	不透明	放射状	隆起	菌体为丝状分支,呈网状排列	放线菌	11.3
DP5	灰褐色	干燥	圆形	不透明	放射状	隆起	菌体为管状的细丝,透明且有隔,较粗,革兰氏阳性	放线菌	53.3
DP6	灰褐色	干燥	圆形	不透明	放射状	隆起	菌体为线状,无隔,相互交织,革兰氏阳性	放线菌	13.6

延滞期长. 培养一段时间后,各菌种出现不同程度的生长. DP3 和 DP4 菌生长最好,但芘的利用率不高,降解率仅为 23.6 %和 11.3 %. DP1, DP2, DP5 和 DP6 在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芘环境下生长缓慢,微生物数量逐渐减少,但芘的利用效率较高. 芘在自然界中一般难于降解,其降解菌在不另外提供碳源与能源时,对芘的降解率通常比较低^[10-11]. 实验中所得到的第 2 种菌 DP2 为芘的高效降解菌.

3 结束语

本文以芘为唯一碳源,对取自某炼油厂生化反应池的活性污泥进行富集与驯化,筛选得到 6 种能高效降解芘的菌株. 根据菌落形态和显微镜观察进行了初步鉴定,并进一步研究其对芘的降解性能,为研究 PAHs 生物降解的分子机制及 PAHs 的生物修复提供实验依据.

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] RAVEL ET C, KRIVOBOK S, SAGEL, et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi [J]. Chemosphere, 2000, 40: 557-563.
- [3] CERNIGLIA C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Biodegradation, 1992, 3(2-3): 351-368.
- [4] DEAN-ROSS D, MOODY J, CERNIGLIA C E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 41(1): 1-7.
- [5] 周德平,夏颖,韩如旻,等. 三株菲降解细菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2003, 23(1): 124-128.
- [6] US National Exposure Research Laboratory. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/ mass spectrometry method 8270C[S]. Environmental Protection Agency, 1996.
- [7] 张杰,刘永生,孟玲,等. 多环芳烃降解菌筛选及其降解特性[J]. 应用生态学报, 2003, 14(10): 1783-1786.
- [8] 田蕴. 海洋环境中多环芳烃污染的微生物修复作用研究[D]. 厦门:厦门大学, 2002.
- [9] 沈萍,范秀容. 微生物学实验[M]. 3版. 北京:高等教育出版社, 1999.
- [10] NUBIA R, TERESA C, LU K J. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR21 and enriched consortium [J]. Chemosphere, 2001, 44: 1079-1085.
- [11] 聂麦茜,张志杰,王晓昌,等. 两株假单胞菌对蒽菲芘的降解作用[J]. 环境科学学报, 2002, 22(5): 630-633.

Isolation and Purification of Pyrene Degrading Strains and Measurement of their Degradation Capability

LIU Yan-feng, ZHOU Zuo-ming, LI Xiao-lin,
JING Guo-hua, FANG Bai-shan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Fujian Province University, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: A microbial consortium named DP was cultivated from the refinery activated sludge with pyrene as the single carbon and energy source. Six pure strains were isolated and purified from DP, which were named as DP1, DP2, DP3, DP4, DP5 and DP6. DP1 was a species of bacteria and the others were species of actinomycetes according to morphological observations, including colony observation and light microscope examination basing on the Gram staining of the strains. To measure their degradation capability, the removal efficiencies of pyrene were 46.2 %, 83.2 %, 23.6 %, 11.3 %, 53.3 % and 13.6 % respectively after 44 hours in the mineral salts medium under initial pyrene concentration of $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. DP2 was a kind of high-efficient degrading strain towards pyrene.

Keywords: pyrene; degrading strains; isolation; purification; microbiological degradation

(责任编辑: 黄仲一 英文审校: 陈国华)