

DOI :10.3969/j.issn.1004-6933.2012.03.014

# 混合 PAHs 生物降解过程中的竞争和协同作用解析

王 蕾<sup>1,2</sup>, 聂麦茜<sup>2</sup>, 杨学福<sup>3</sup>, 解 宏<sup>1</sup>, 赵荣娜<sup>1</sup>

(1. 陕西省环境监测中心站, 陕西 西安 710054; 2. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055;  
3. 西安工业大学建筑工程学院, 陕西 西安 710032)

**摘要** 通过恒温摇床实验研究 5 株 PAHs 优良细菌对 3 种多环芳烃 (PAHs) 在单一基质和混合基质下的生物降解特征, 并对优良菌降解混合 PAHs 时底物之间的竞争和协同代谢作用进行解析。结果表明 5 株细菌对混合 PAHs 好氧降解效果由大到小依次为菲、蒽、芘; 反应初期简单 PAHs 和难降解的复杂 PAHs 存在竞争代谢, 造成短期内难降解 PAHs 的降解率偏低, 随着反应的进行, 复杂 PAHs 的降解率最终被提高, 且对降解能力越强的菌株, 这种提高作用越明显; 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri* sp. HY7) 对混合基质中的蒽、芘的降解率分别比单一基质蒽、芘的降解率提高 12.7%、5.5%。

**关键词** 多环芳烃; 优良菌; 竞争代谢; 协同代谢

**中图分类号** :X703      **文献标识码** :A      **文章编号** :1004-6933(2012)03-0068-04

## Analysis of competitive and cooperative metabolism in biodegradation of mixed PAHs

WANG Lei<sup>1,2</sup>, NIE Mai-qian<sup>2</sup>, YANG Xue-fu<sup>3</sup>, XIE Hong<sup>1</sup>, ZHAO Rong-na<sup>1</sup>

(1. Shaanxi Province Environmental Monitoring Center, Xi'an 710054, China;

2. School of Environment and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China;

3. Department of Civil Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an 710032, China)

**Abstract** : Degradation characteristics of anthracene, phenanthrene, and pyrene under the conditions of single and mixed substrates by five PAH predominant strains were investigated through isothermal cultured experiments in a rotary shaker. The competitive and cooperative metabolism between different kinds of PAHs in the biodegradation of mixed PAHs was analyzed. The results show the following decreasing order of competitive ability: phenanthrene, anthracene, and pyrene, in the mixed culture with five predominant bacteria. There was obviously a competitive metabolism between simple PAHs and complex PAHs in the initial period of the biodegradation process, leading to a low biodegradation rate of complex PAHs. As the reaction carried on, the biodegradation rate of complex PAHs could finally be enhanced. Moreover, the greater the biodegradation capability a certain strain had, the more obvious enhancement it displayed. For *Pseudomonas stutzeri* sp. HY7, the biodegradation rates of anthracene and pyrene under the condition of mixed substrates could be enhanced by 12.7% and 5.5%, respectively, compared with those under the condition of a single substrate.

**Key words** : PAHs; predominant bacteria; competitive metabolism; cooperative metabolism

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, 简称 PAHs) 是一大类广泛存在于环境中的有机污染物, 也是最早被发现和研究的化学致癌物。近年来关于

PAHs 的生物降解的研究很多, 但大多是针对纯种菌降解单一 PAH 的研究报道<sup>[1-3]</sup>。然而, 在实际污染环境 PAHs 污染大都以混合形式出现, 其生物降

基金项目 陕西省教育厅自然专项(07JK290)

作者简介 王蕾(1983—), 女, 工程师, 博士研究生, 研究方向为难降解有机物的微生物处理技术及环境监测数据综合分析。E-mail: yimi003@sina.com

解过程非常复杂<sup>[4]</sup>。因此在寻找 PAHs 优势降解菌的同时,研究各 PAHs 被降解时分子间的相互作用关系尤为重要,但国内外对此的研究鲜见报道。笔者通过研究单一 PAH 和混合 PAHs 的生物降解特征,对优良菌降解 PAHs 时底物之间的竞争和协同代谢进行解析,以期为 PAHs 污染严重区快速去除 PAHs 提供基础理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

#### 1.1.1 受试菌种

实验分离筛选出的 5 株 PAHs 降解细菌<sup>[5]</sup>,包括 HY1~HY3 菌、HY6 菌和 HY7 菌。

#### 1.1.2 主要试剂和主要培养基

3 种混合 PAH 的甲醇标准溶液(作标准曲线用)准确称量葱、菲、芘标准试剂各 0.005 0 g,混合后用甲醇溶解,定容至 50.0 mL。5.0 g/L 葱(或菲或芘)丙酮标准溶液,磷酸盐缓冲液,无机盐培养基,牛肉膏蛋白胨液体培养基参见文献[6]。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌悬液的制备方法

菌悬液的制备方法参见文献[6]。

#### 1.2.2 优良菌对混合葱、菲、芘的降解实验方法

实验设计:在好氧条件下,优良细菌与 PAHs 充分接触,优良菌在其最佳生长条件下分别对 PAHs 单基质和混合基质降解。具体为将浓 PAHs 丙酮标准溶液加入无机盐培养基中,在 30 ℃、160 r/min 恒温摇床中挥发丙酮并分散 PAHs,然后加入一定量的优良菌启动反应。该反应体系中无机盐培养基(测得 pH=7.4)为优良菌提供了充足的营养和良好的反应环境,30 ℃为优良菌的最佳生长温度,160 r/min 为优良菌的最佳生长转速(保证体系内一定的氧量和使优良菌与体系中的 PAHs 充分接触)<sup>[5]</sup>。

优良菌对单一 PAHs 的降解方法:向 150 mL 锥形瓶中分别准确加入 18 mL 无机盐培养基和 0.2 mL 的 5.0 g/L 葱(或菲或芘)丙酮标准溶液,使降解体系质量浓度为 50 mg/L,30 ℃、160 r/min 恒温摇床振荡 45 min 挥发丙酮后,加入 2 mL 一定浓度的某菌悬液(稀释 10 倍后光密度  $OD_{600nm} = 0.8$ ),最后以 8 层纱布封口,重新放入摇床好氧振荡,以不加菌悬液的体系为空白对照。实验设 3 组平行样。定时采取水样,用紫外分光光度法测定剩余 PAHs 浓度。

优良菌对 3 种混合 PAHs 的降解实验方法:在上述方法中将碳源改为加入  $\rho = 5.0$  g/L 的葱、菲、芘的丙酮溶液各 67  $\mu$ L,混合体系中葱、菲、芘含量用高效液相色谱法 (high performance liquid

chromatography, 简称为 HPLC)测定,方法见 1.2.3 中混合 PAHs 的测定。

#### 1.2.3 混合 PAHs 的测定方法

采用 LC-2000 高效液相色谱系统(日本分光公司)测定实验中的 PAHs 的残留量。

色谱条件:色谱柱为正相 C18 柱,柱温为 25 ℃;流动相组成为甲醇 85%、水 15%;流速为 1.0 mL/min,进样量为 20  $\mu$ L,洗脱条件为等梯度,紫外检测器波长范围为 200~600 nm,定量波长为 254 nm。

标准曲线绘制:从 3 种混合 PAHs 甲醇标准溶液中分别取 0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.7 mL、1.0 mL 于 10 mL 比色管中,用色谱甲醇稀释至刻度并摇匀。所得系列标准溶液 3 种 PAHs 单一质量浓度分别为 0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、7 mg/L、10 mg/L。准确配置 6 个质量浓度梯度的 PAHs 混合标样,进行色谱分析,根据峰面积对其含量绘制标准曲线,标准曲线及相应系数见表 1。

表 1 3 种 PAHs 外标法定量标准曲线及相应系数

PAHs	保留时间/ min	标准工作曲线	相关系数
菲	10.13	$A = 0.0240C - 0.0005$	0.9995
葱	11.17	$A = 0.0532C + 0.0148$	0.9995
芘	15.29	$A = 0.0030C - 0.0004$	0.9995

萃取液的浓缩和处理:将盛有萃取液的浓缩管放入恒温水浴中,在 70~80 ℃的水温下浓缩近干,用色谱级甲醇溶解并定容至 10 mL,稀释到合适倍数后用 0.45  $\mu$ m 有机相用针筒式滤膜过滤装入进样瓶中测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 优良菌对混合葱、菲、芘的生物降解特征

5 株菌分别对葱、菲、芘 PAHs 混合基质降解,由图 1 可见 5 株菌均可以降解葱、菲、芘。从考察时间的整个降解过程看,在葱、菲、芘的混合体系中,5 菌株均更易降解菲,葱次之,芘最不易被降解。此结果与 PAHs 的生物可利用性随着环数的增加而降低的结果是一致的。对 PAHs 来说,所含苯环数目越多,分子间作用力越大,结合力越强,越难被微生物降解。另外,从 PAHs 的分子结构看,葱是线性分子,菲和芘是角性分子,从一些实验研究<sup>[7]</sup>结果可知,一般来说,角性分子比线性分子在水中的溶解度大,比如葱与菲都是 3 个芳环稠合所得的分子,但菲在水中的溶解度约是葱的水溶解度的 20 倍。分子量越大的非极性分子在水中的溶解度越小,芘是 4 个芳环稠合而成的分子,分子量比葱的大,但由于芘是角性分子,它在水中的溶解度大约是葱水溶解度的 2 倍。从以往的研究<sup>[8-9]</sup>结果看,PAHs 的生物降解速

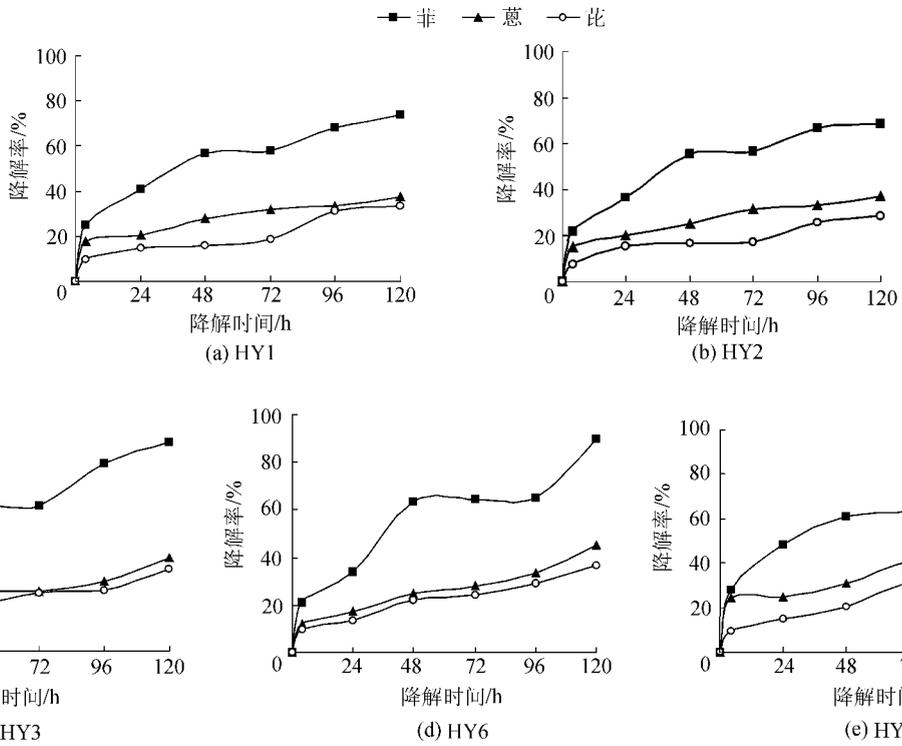


图1 5株优良菌对混合葱、菲、芘的降解效果

率与其水溶性有很大的关系。当微生物细胞表面是亲水性时,碳源的水溶性越大,被微生物氧化代谢的速率越快。由于菲在水中的溶解度较大,菲及其被微生物降解转化生成的中间产物应该易于被微生物利用。对于葱来说,它本身的水溶性低,但从图1可见各体系中葱的浓度随时间而降低的速率并不慢,这说明体系中有适合于葱转化的环境。微生物以芘为碳源时,去除率最低,这主要是微生物氧化代谢有机物时,开环反应是逐步进行的,芘分子中多一个芳环,其被氧化代谢的步骤就多。

对菲来说,5株菌在120 h内对其累积降解率在68.4%~92.5%之间,其中HY3菌降解的最快,120 h累积降解率达92.5%,其次是HY6菌和HY7菌,120 h累积降解率均在86.3%以上;对于葱,120 h累积降解率在37.1%~45.0%之间,其中HY6和

HY7降解的最快,120 h累积降解率分别为44.9%和45.0%,其次是HY3,120 h累积降解率为41.3%;对于芘,120 h累积降解率在28.4%~41.8%之间,其中HY7降解的最快,120 h累积降解率为41.8%,其次是HY3和HY6,120 h累积降解率均为36.4%。

## 2.2 优良菌对单一基质和混合基质 PAHs 的生物降解对比

由于各菌反应初始的短期反应速率和反应进行一段时间之后的长期反应速率不同<sup>[10]</sup>,研究选取4 h代表反应初期降解情况,120 h代表长期降解情况。单一基质和混合基质下优良菌对葱、菲、芘的降解结果见图2。

从图2(a)看,对于HY1菌、HY2菌和HY6菌,4 h内单一基质条件下葱的降解率比混合基质中的葱降解率分别提高8.4%、0.6%和6.5%,这可能

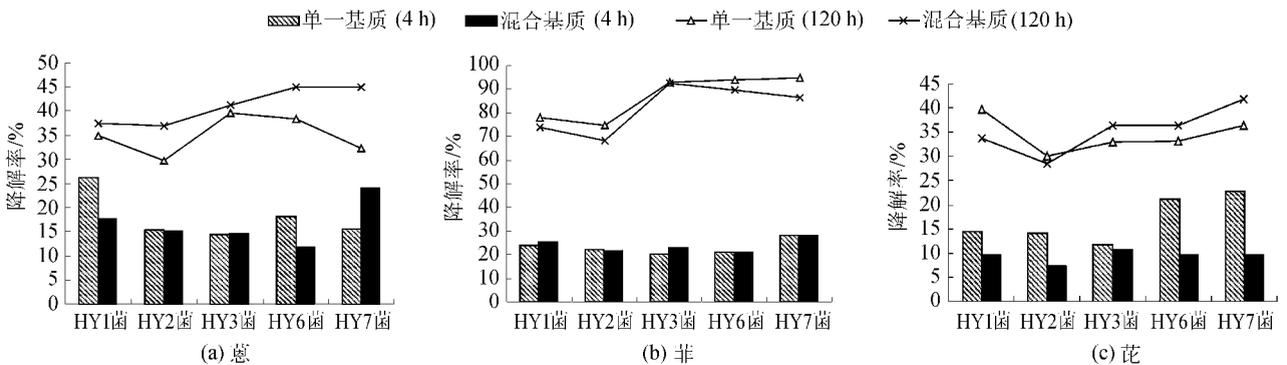


图2 单一基质和混合基质下优良菌对葱、菲、芘的降解

是反应初始 HY1 菌、HY2 菌和 HY6 菌产生的酶的非特异性,造成菲、芘对其的竞争降解。随着反应的进行,到 120h 时,混合基质条件下 5 株菌对蒽的降解率均高于单一基质下蒽的降解(提高了 1.6% ~ 12.7%),这说明菲、芘对蒽的协同代谢作用随着反应的进行逐渐明显。

从图 2(b)看,对于各菌 4h 时,单一基质下和混合基质下菲的降解没有明显差别( $< \pm 3\%$ ),这可能是由于菲比较容易降解,在有蒽、芘存在的混合基质中降解不受影响。从 120h 的结果看,混合基质的菲降解率稍低于单一基质菲(降低了 0.1% ~ 8.7%),总的来看,蒽和芘的存在对菲的降解率影响不大。

从图 2(c)看,对于各菌 4h 时,单一基质下的芘降解率均大于混合基质下的芘降解率(相差 1.5% ~ 13.1%),这可能是由于芘分子较大,难降解,竞争力小。但从 120h 的结果看,除 HY1 菌和 HY2 菌外,其他各菌在混合基质中的芘降解率均高于单一基质的芘降解率,说明随着反应的进行,有 PAHs 的中间转化产物产生,可能和芘产生共代谢作用从而提高其降解率,由于体系中有菲和蒽的存在,120h 内, HY3 菌、HY6 菌和 HY7 菌,芘降解率可分别提高 3.5%、3.3% 和 5.5%。

通过实验过程观察发现,混合降解体系与单一降解体系相比,通常乳化严重,这可能是由于菌体代谢 PAHs 产生的一些表面活性物质引起的,文献 [11] 报道乳化作用能对溶解度小的 PAHs 有增溶作用。因此,从短期内的降解结果看,混合条件下,蒽或芘的生物降解受到一定程度的影响。但是从长期的降解效果看,由于菲和芘的存在,可以提高蒽的生物降解率,由于蒽和菲的存在,可以提高芘的生物降解率。但蒽和芘同时存在于降解体系中时,菲的降解率影响不大。

### 3 结 论

通过研究 5 株优良菌对单一 PAH 和混合 PAHs 的生物降解特征,描述优良菌降解 PAHs 时底物之间的竞争和协同代谢。得到以下结论:

a. 细菌对混合 PAHs 好氧降解效果由大到小依次为菲、蒽、芘,说明分子结构越简单竞争代谢能力越强,越易被降解;物质的溶解度越大,竞争中被代谢的可能性越大;分子的大小比溶解度的大小在竞争中的作用占有更大的比例,而分子大小差别不明显时,溶解度越大,越易于被代谢。

b. HY7 菌株是降解 PAHs 的一种强势菌种。在 PAHs 单基质及其混合基质条件下,对菲、蒽、芘均有

良好的降解能力。该菌经分子生物学初步鉴定为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri* sp.),目前该菌对 PAHs 的降解研究鲜有报道。

c. 混合 PAHs 在生物降解过程中,分子间存在竞争或协同作用。反应初期简单 PAHs 和难降解的复杂 PAHs 存在竞争代谢,造成短期内难降解 PAHs 的降解率偏低,但是从长期来看,随着反应的进行,由于 PAHs 对菌细胞中氧化酶的诱导作用及其中间代谢产物产生的共代谢作用和乳化增溶作用等,使得混合 PAHs 存在情况下,复杂 PAHs 的降解率提高。对降解能力越强的菌株,这种提高作用越明显。HY7 菌对蒽菲芘混合基质中的蒽、芘降解率分别比单一基质蒽、芘的降解率提高 12.7%、5.5%。

### 参考文献:

- [1] 李永君,赵化冰,任河山,等. 萘降解细菌的分离及其降解基因的分子检测[J]. 生态学杂志, 2006, 25(7): 738-742.
- [2] 刘磊,李习武,刘双江,等. 降解 PAHs 的菌株 *Gordonia* sp. He4 的分离鉴定及其在非污染土壤修复过程中的动态变化[J]. 环境科学, 2007, 28(3): 617-622.
- [3] MROZIK A, LABUZEK S, PIOTROWSKA-SEGET Z. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation[J]. Microbiological Research, 2005, 160(2): 149-157.
- [4] 徐虹,章军,刘陈立,等. PAHs 降解菌的分离、鉴定及降解能力测定[J]. 海洋环境科学, 2004, 23(3): 61-64.
- [5] 惠艳. 优良菌种降解烃类污染物相互作用关系研究[D]. 西安:西安建筑科技大学, 2009.
- [6] 王蕾,聂麦茜,王志盈,等. 外加碳源对优良菌降解芘的影响研究[J]. 水处理技术, 2009, 35(6): 24-27.
- [7] MILTON L L, MILOS V N, KEITH D B. Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds[M]. New York: Academic Press, 1981: 9-10.
- [8] LAHA S, LUTHY R G. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water system[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40(11): 1367-1380.
- [9] PARK A J, CHA D K, HOLSEN T M. Enhancing solubilization of sparingly soluble organic compounds by biosurfactants produced by *Nocardia erythropolis*[J]. Water Environment Research, 1998, 70(3): 351-355.
- [10] 王蕾,聂麦茜,苏君梅,等. PAHs 代谢物对 PAHs 生物降解的影响作用[J]. 西安建筑科技大学学报:自然科学版, 2010, 41(1): 77-82.
- [11] LI J L, CHEN B H. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants[J]. Chemical Engineering Science, 2002, 57(14): 2825-2835.

(收稿日期 2011-11-18 编辑 徐娟)