

一株菲降解菌的降解条件优化及生长动力学研究

吕蒙蒙

中科鼎实环境工程有限公司，北京

收稿日期：2022年7月30日；录用日期：2022年9月1日；发布日期：2022年9月9日

摘要

在实验室摇瓶规模下进行试验研究，确定一株属于假单胞菌属的菲降解菌的最适培养条件，最适pH为6.0，30℃，接种量10%，添加1000 mg/L丙酮酸钠作为共代谢底物可以达到最佳的降解效果，7 d可以将100 mg/L的菲降解92.76%。对于多种PAHs底物广谱性试验表明，7 d可以将30 mg/L的萘完全降解，对30 mg/L菲的降解率达93.53%，对30 mg/L芘的降解率为47.16%。本文的研究成果对于利用微生物修复实际污染土壤具有较好的参考意义。

关键词

微生物降解，多环芳烃，高效降解菌株

Optimization of Degradation Conditions and Growth Kinetics of a Phenanthrene-Degrading Bacteria

Mengmeng Lv

China State Science Dingshi Environmental Engineering Co., Ltd., Beijing

Received: Jul. 30th, 2022; accepted: Sep. 1st, 2022; published: Sep. 9th, 2022

Abstract

An experimental study was carried out on a laboratory shake flask scale to determine the optimum culture conditions for a phenanthrene-degrading bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*. The optimum pH was 6.0, 30°C, and the inoculation amount was 10%. The addition of 1000

mg/L sodium pyruvate as co-metabolism substrate could achieve the best degradation effect. And the bacteriacould degrade 100 mg/L of phenanthrene by 92.76% in 7d. For a variety of PAHs substrate broad-spectrum test showed that it can completely decompose 30 mg/L naphthalene, the degradation rate of phenanthrene to 30 mg/L was 93.53%, and the degradation rate to 30 mg/L technetium was 47.16% after 7 days. The research results in this paper have good reference significance for the use of microorganisms to remediate actual contaminated soil.

Keywords

Microbial Degradation, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Efficient Degradation Strains

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 微生物降解多环芳烃的研究进展

微生物是生物修复的主体，在污染物的迁移转化乃至最终清除的过程中占有重要地位。微生物修复是开发利用微生物的新陈代谢能力及基因的多样性为基础的修复方式。由于环境中微生物资源非常丰富，可供选择的降解菌范围广，而且微生物易于快速培养。因此，相对于其他非生物修复方式，利用微生物修复 PAHs 的方式具有经济，设备简单，二次污染少，修复彻底等优点[1]。对于以吸附态存在于土壤和水体沉积物中的 PAHs，微生物降解是使其从环境体系消失的最主要且最有效的途径。

从 20 世纪 60 年代发现土壤微生物对 PAHs 的降解作用以来，微生物降解和修复 PAHs 研究已经进行了近五十年。研究工作主要集中在以下几方面：1) 高效降解菌株及高效降解菌群的筛选；2) 以吸附态存在于土壤和水体沉积物中的可生物利用性研究；3) 生物代谢终产物及其代谢机制；4) 增强微生物修复的途径和方法。其中高效降解菌群，特别是对高环、高毒性有降解能力的降解菌的筛选和降解机制的研究是微生物修复的基础，因此一直是该领域研究的重点之一。

1.1. 微生物对 PAHs 的降解方式

微生物对 PAHs 降解的难易程度取决于化合物的结构复杂性及降解酶的适应性[2]。目前的研究表明，微生物对 PAHs 的降解主要以下面两种方式进行：1) 以低分子量的 PAHs (双环或三环)为唯一碳源和能量来源；2) 对于四环及以上的高环 PAHs，需要与其他有机质一起进行共代谢即以易利用的物质作为微生物生长繁殖的营养物质，同时降解另一种物质，但后一种物质的降解及转化并不会提供共代谢微生物生长所需的能源及碳源。微生物的共代谢作用在难降解污染物 PAHs 的彻底降解及矿化中起主要作用[3] [4]。

1.2. 微生物降解 PAHs 的机理

近年来，微生物降解萘、菲等低分子量的 PAHs 的机理研究较为透彻，但对于高分子 PAHs 的代谢途径了解还较为有限，主要原因是目前分离出的能高效降解高分子 PAHs 的菌株较少。微生物降解 PAHs 的机理研究是探究微生物对 PAHs 降解能力及代谢产物的基础，也是将其应用于环境修复的必要条件。

萘、蒽和菲等低分子量 PAHs 广泛存在于整个环境中，并被指定为原型多环芳烃，作为检测多环芳烃污染的标志性化合物。萘代表最简单的多环芳烃，而蒽和菲的结构在许多致癌性 PAHs (如苯并[a]芘，

苯并[a]蒽)中被发现,而菲代表最小的同时具有湾区和K区的多环芳烃[5]。因而非常被用作研究致癌PAHs的模型底物。以下将重点介绍菲的降解机理。

目前的研究表明,菲的降解主要存在以下两种:即以代谢中间产物命名的水杨酸途径和邻苯二甲酸途径。在有氧条件下,细菌通常通过双加氧酶攻击菲的苯环,不同降解菌攻击位置有所不同。以伯克霍尔德菌属为例,其对菲的苯环攻击方式有两种方式:一是利用双加氧酶攻击C-1和C-2,生成顺式-1,2-二羟基菲;第二种是攻击C-3和C-4,生成顺式-3,4-二羟基菲[6]。此外,节杆菌属P1-1菌株可通过在1,2-,3,4-和9,10-C位置双氧化而降解菲,中间产物菲-1,2-,3,4-和9,10-二醇主要发生间位裂解并转化为萘-1,2-二醇[7]。

多环芳烃最终能否被彻底降解,与苯环能否被彻底裂解有关。各个菲降解菌属以不同的代谢中间产物进入三羧酸循环,主要是由于其中间代谢途径的不同。绝大部分菌株的代谢产物是以水杨酸和邻苯二酚的形式进入三羧酸循环的。而能够降解菲,但是无法利用萘为唯一碳源和能源进行生长的菌株则是通过邻苯二甲酸和原儿茶酸途径最终进入三羧酸循环[8]。此外,邻苯二酚又在邻苯二酚-1,2-双加氧酶和邻苯二酚-3,4-双加氧酶的作用下,形成间位和邻位两种结构从而又分支为两种代谢途径[9]。由此可见菲的降解途径较为复杂。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

1) 主要试剂

菲(Phenanthrene)≥97%(美国CNW);芘(Pyrene)≥97%(美国CNW);萘(Naphthalene)≥99.5%(国药集团化学试剂有限公司);色谱级乙酸乙酯;色谱级正己烷。配制1mol/L的NaOH溶液和0.1mol/L的盐酸溶液用于调节pH。

2) 培养基

① MSM培养基:NaNO₃ 34.0 g、NH₄Cl₂ 2.0 g、KH₂PO₄ 41.5 g、Na₂HPO₄ 40.5 g、CaCl₂ 0.01 g、MgCl₂ 0.2 g、1 mL微量元素溶液、去离子水1 L,调至pH=7.0,121℃灭菌20 min。

② 选择培养基(固体培养基):NaNO₃ 34.0 g、KH₂PO₄ 41.5 g、Na₂HPO₄ 40.5 g、CaCl₂ 0.01 g、MgCl₂ 0.2 g、琼脂20.0 g、微量元素溶液1 mL、去离子水1 L,pH=7.0,121℃灭菌20 min。

③ 富集培养基:蛋白胨10.0 g、酵母膏5.0 g、NaCl 10.0 g,溶于1 L去离子水中,用NaOH及HCl调至pH=7.0,121℃灭菌20 min。

④ 菌种保藏培养基:牛肉膏3.0 g、蛋白胨10.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂20.0 g、去离子水1 L,调至pH=7.0,121℃灭菌20 min。

3) 种子液制备

取保存的斜面培养基于室温条件下放置2 h,使用无菌滴管吸取0.5 mL无机盐培养基滴入到斜面上,轻微震荡后,取0.2 mL菌悬液于固体培养基上划线分离培养96 h。从固体培养基上挑取生长状况良好的菌株,接种到添加菲的无菌无机盐培养基中,其中菲的浓度为100 mg/L,在30℃,180 rpm条件下作为接种种子液。为保证试验结果的一致性,接种菌液均通过无机盐培养基调节到相同OD₆₀₀值进行接种。

2.2. 细菌生物量的测定方法

本试验通过测量在600 nm下的细菌培养物的光密度(OD₆₀₀)来监测细胞生长量,并以去离子水进行校正。为了校正由溶解的细胞外的物质产生的吸光度,将样品通过0.22 μm的PTFE过滤器过滤以除去细胞,并将滤液的600 nm处的吸光度从未过滤样品中扣除。使用实验校准曲线将获得的值转换成每克细胞

干重克数(生物量浓度(g/L) = 0.5415*吸光度)。

2.3. 液体培养基中菲的萃取方法

使用移液器吸取 1 mL 菌液注入 2 mL 离心管中, 并加入 1 mL 乙酸乙酯, 将离心管置于涡旋混匀器上, 震荡 20 min, 使其混匀完全, 接着以 5000 r/min 离心 10 min。吸取上层有机相, 向离心管中再次加入 1 mL 乙酸乙酯, 重复混匀、离心, 将两次有机相合并于一个新的离心管中, 定容至 2 mL。使用一次性注射器抽取, 过 0.22 μm 有机系滤膜注入 GC-MS 进样瓶, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 待上机测定。

2.4. 初始 pH 对菌株生长及降解的影响

pH 对于有机物的降解具有显著地影响。一方面, pH 会影响微生物的生长; 另一方面, 与有机物降解相关的酶的活性及环境中的离子强度及电子传递也与 pH 有较大关系。本部分试验利用 1 mol/L 的 NaOH 溶液和 0.1 mol/L 的盐酸溶液将灭菌的无机盐培养基的初始 pH 分别调节到 5、6、7、8、9 五个梯度, 研究不同 pH 条件下, 菌株 Lphe-2 的生长状况及其对菲降解效果的影响。各试验组菲的浓度均为 100 mg/L, 装液量均为 100 mL/250 mL, 接种量 5% (OD600 = 0.6), 每组设置 3 个平行, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 的恒温震荡箱中培养 5d 后, 取样测定其 OD600, 萃取后测定其中菲的浓度, 并计算其降解率。

2.5. 温度对菌株生长及降解的影响

温度对于有机物的降解具有至关重要的影响, 各种细菌的降解酶都有自己的最适温度范围。本部分试验通过调节恒温震荡箱的温度分别为 15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 五个梯度, 研究温度对于菌株 Lphe-2 生长状况及降解效果的影响。各试验组菲的浓度均为 100 mg/L, 装液量均为 100 mL/250 mL, 初始 pH 均为 7.0, 接种量 5% (OD600 = 0.6), 每组设置 3 个平行, 摇床转速均为 180 rpm, 培养 5 d 后, 取样测定其 OD600, 萃取后测定其中菲的浓度, 并计算其降解量。

2.6. 接种量对菌株生长及降解的影响

接种量是指种子液体积占接种后培养基总体积的比例。接种量的大小与菌株在培养基中的生长速度密切相关, 接种量较大时有助于缩短菌株在培养基中的适应延滞期, 使其迅速成为优势菌种并降低其感染杂菌的几率。本部分试验通过调节接种量分别为 1%、2%、5%、10%、15% 五个梯度, 种子液 OD600 = 0.6, 研究接种量对于菌株 Lphe-2 生长及降解效果的影响。各试验组菲的浓度均为 100 mg/L, 装液量均为 100 mL/250 mL, 初始 pH 均为 7.0, 每组设置 3 个平行, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 的恒温震荡箱中培养 5 d 后, 取样测定其 OD600, 萃取后测定其中菲的浓度, 并计算其降解量。

2.7. 添加不同共代谢物对菌株生长及降解的影响

一些高分子量的 PAHs 很难直接被微生物以唯一碳源的方式降解, 需要以共代谢方式降解。通过添加葡萄糖、乙酸钠、苯酚、丙酮酸钠四种小分子碳源, 浓度均为 200 mg/L, 研究添加不同共代谢物对于菌株 Lphe-2 的生长及降解效果的影响, 以不加其他碳源的一组作为对照组。各组中菲的浓度为 100 mg/L, 装液量为 100 mL/250 mL, 初始 pH 7.0, 接种量 5% (OD600 = 0.6), 每组设置 3 个平行, 放置于 30 $^{\circ}\text{C}$, 180 rpm 的恒温震荡箱中培养 5 d 后, 取样测定其 OD600, 萃取后测定其中菲的浓度, 并计算其降解量。

2.8. 共代谢物浓度对菌株生长及降解的影响

共代谢物的种类及浓度都会对 PAHs 降解菌的生长及降解产生影响。本部分试验在 1.7 确定最佳共代谢物种类的基础上进一步研究其共代谢物的最佳添加浓度。设置浓度梯度为 200 mg/L、500 mg/L、1000

mg/L、1500 mg/L 及 2000 mg/L，以不添加共代谢物的为空白对照。各组中菲的浓度为 100 mg/L，装液量为 100 mL/250 mL，初始 pH = 7.0，接种量 5% (OD600 = 0.6)，每组设置 3 个平行，放置于 30℃，180 rpm 的恒温振荡箱中培养 5 d 后，取样测定其 OD600，萃取后测定其中菲的浓度，并计算其降解量。

2.9. 菌株 Lphe-2 的降解曲线及生长动力学

在上述各影响因素的最佳水平确定后，将菌株 Lphe-2 的各环境参数均调到最佳条件，即在最适 pH、最适温度、最佳接种量、最佳共代谢物及最佳浓度的条件下，培养菌株 Lphe-2。设置 3 个平行，放置于 180 rpm 的恒温振荡箱中培养，从接种的第 0 d 起，每天在固定时间取样测定 OD600 及菌液中剩余菲的浓度。连续测定若干天，以培养时间为自变量，细菌生物量及菲的降解率为因变量，将结果绘制成菌株的生长曲线及降解曲线。

由于微生物生物量有时被用作研究污染物生物降解动力学的工具，所以建模模拟其生长参数可以对生物修复过程有更好的了解。由于本试验底物菲对于细菌具有毒害作用，因此选用细胞生长底物抑制模型对菌株 Lphe-2 降解过程中的生长进行模拟。Haldane 模型是一种在 Monod 模型上进行改进的底物抑制模型。方程式如下所示：

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_i}\right)} \quad (1)$$

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

其中， μ ——比增长速率(h^{-1})； μ_{\max} ——最大比增长速率(h^{-1})； S ——底物浓度(mg/L)； K_s ——半饱和系数； K_i ——底物抑制常数； X ——细菌浓度(mg/L)； X_0 ——细菌初始浓度(mg/L)。

2.10. 菌株 Lphe-2 对多组分 PAHs 的降解特性研究

众所周知，自然环境中多环芳烃通常以多组分混合物的形式存在，因而研究底物相互作用在生物降解中的作用对于理解 PAHs 的命运具有重要意义。本部分试验以三种多环芳烃混合物作为底物，即萘(nap)，菲(phen)，芘(pyr)，浓度均为 30 mg/L，接种菌株 Lphe-2，研究其降解特性。以未添加菌株 Lphe-2 的作为对照组。每组设置 3 组平行，每天相同时间取样，连续取样 7 d 测定其中 PAHs 的浓度并计算其降解率。

3. 结果与讨论

3.1. 初始 pH 对菌株生长及降解的影响

培养基初始 pH 设置为 5、6、7、8、9 五个梯度，在 30℃，180 rpm 的恒温振荡培养箱中培养菌株 Lphe-2 5d 后，取样测定其中 Phe 的浓度及菌株生长情况，结果如图 1 所示。

由图 1 可知，当培养基的初始 pH 值在 5-7 范围时，菌株 Lphe-2 的生物量较大，且初始 pH 为 6 左右时，生物量最大。当初始 pH 大于 7 时，菌株生长量会有较大幅度的降低。由此可以推断，菌株 Lphe-2 适宜在弱酸性的环境下生长，且最适合生长的 pH 值为 6。同样，当培养基的初始 pH 值在 5~7 范围时，菌株 Lphe-2 对菲的降解量也较高，且 pH 为 6 左右时，菌株 Lphe-2 对菲的降解量最高，可达到 68.19 mg/L。当初始 pH 不在此范围内时，菌株对菲的降解效果会有所下降。pH 值从 8~9 时，菌株 Lphe-2 对菲的降解量均小于 15 mg/L，说明此范围内的初始 pH，菌株对菲的降解能力较差。说明菌株 Lphe-2 不适用于碱性环境生长，但在弱酸性环境中具有较高的降解率。最终，确定菌株 Lphe-2 降解菲的最适 pH 值为 6。

另外，从图 1 也可以看出，菌株 Lphe-2 的生长量及对菲的降解量随初始 pH 值的变化呈现大体一致的趋势，这就说明培养基中的初始 pH 值对菌株 Lphe-2 的生长情况及对菲降解能力的影响大体上是相同的。

文献资料显示[10][11],一些耐酸革兰氏阳性菌,如分支杆菌属,芽孢杆菌属及酿酒酵母菌,在酸性条件下均显示出对 PAHs 更好的降解效果,原因在于低的 pH 可以诱导细菌对于疏水性有机物产生更好的渗透性,从而增加其生物利用度。

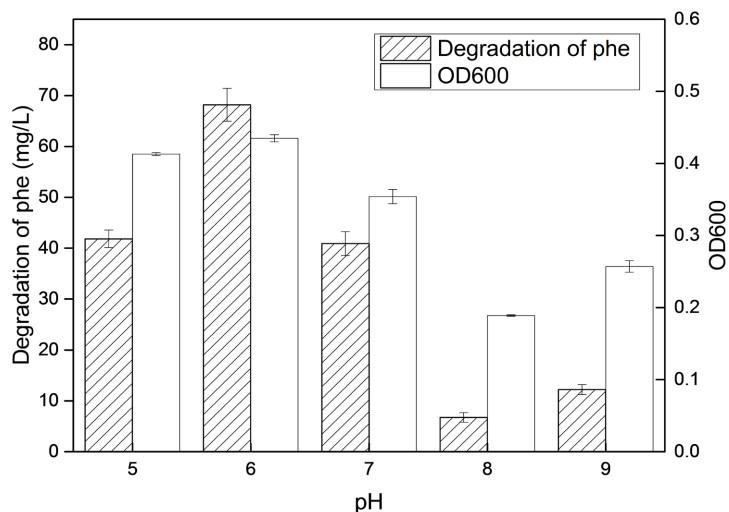


Figure 1. Effect of pH on the growth of strain Lphe-2 and its phe degradation ability
图 1. pH 对菌株 Lphe-2 的生长及 phe 降解能力的影响

3.2. 温度对菌株生长及降解的影响

考察培养温度对菌株 Lphe-2 生长及降解的影响,设置温度分别为 15℃、25℃、30℃、35℃、45℃ 五个梯度。在恒温震荡培养箱中以 180 rpm,培养 5 d 后取样测定其中 Phe 的浓度及菌株生长情况,结果如图 2 所示。

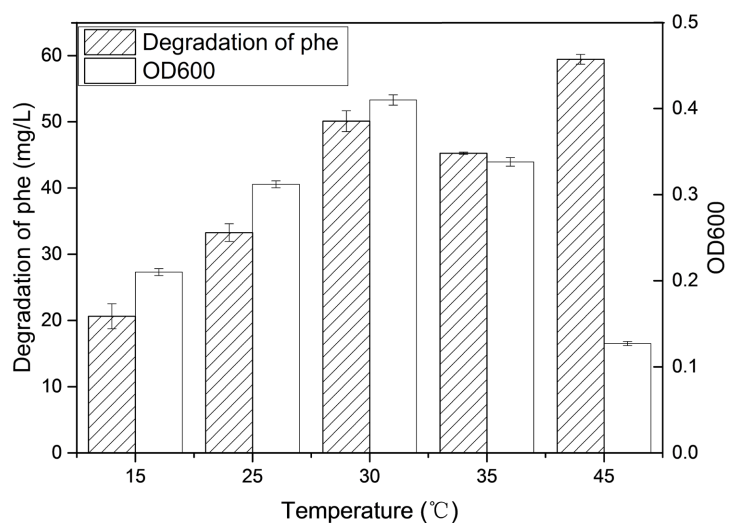


Figure 2. Effect of temperature on the growth of strain Lphe-2 and its phe degradation ability
图 2. 温度对菌株 Lphe-2 的生长及 phe 降解能力的影响

分析图 2 可知,菌株较为适宜生长的温度在 30℃~35℃ 附近,在此温度范围内,菌株生长量较大,且降解效果较好。当温度低于 25℃ 或高于 35℃ 时,菌株生长量较低,说明菌株 Lphe-2 是嗜中温微生物。

观察到一个异常情况,即温度为 45℃时, phe 浓度减少最多,而此条件下的菌株生长量并不大,明显低于温度为 30℃的情况,考虑到 phe 的半挥发性,故推测此时 phe 的减少并非单纯由于微生物的降解作用,主要是由于高温下的挥发作用导致的。综合考虑菌株生长量及降解效果,确定菌株 Lphe-2 的最佳培养温度为 30℃,此时菌株生长量也最大。此时,降解量可达 50.1 mg/L。一般而言,当培养温度升高时,PAHs 的溶解度也增加。反过来会增加其生物利用度;另一方面,随着温度的升高,液体培养基中的溶解氧水平降低,对于好氧型嗜温微生物而言,会导致其代谢活性降低,同样不利于污染物的微生物降解。对于菌株 Lphe-2 而言,温度在 30℃~35℃范围内,对 phe 的 5 d 降解量均可达 45 mg/L 以上,这对于实际 PAHs 污染场地的修复具有重要意义。

3.3. 接种量对菌株生长及降解的影响

设置接种量分别为 1%、2%、5%、10%和 15%五个梯度,考察接种量对菌株 Lphe-2 生长及降解效果的影响,在恒温震荡培养箱中以 180 rpm, 30℃条件培养 5 d 后,取样测定其中 phe 的浓度及菌株生长情况,结果如图 3 所示。

分析图 3 可知,接种量为 10%时菌株的降解量最大,为 56.52 mg/L。接种量从 2%到 10%菌株的生长状况都较好,OD600 均大于 0.55。但接种量为 1%时,降解量显然较低,原因可能是较低的接种量导致单位 phe 被降解的时间较长。而随着接种量增加,菌种浓度也随之增加,在接种量达到 15%时,降解量不增反降,可能是由于细胞过量生长导致营养匮乏,或是高的初始菌株接种量导致生成物中某些有害物质积累速度过快,提前抑制了底物的进一步降解。因此最佳接种量确定为 10%。

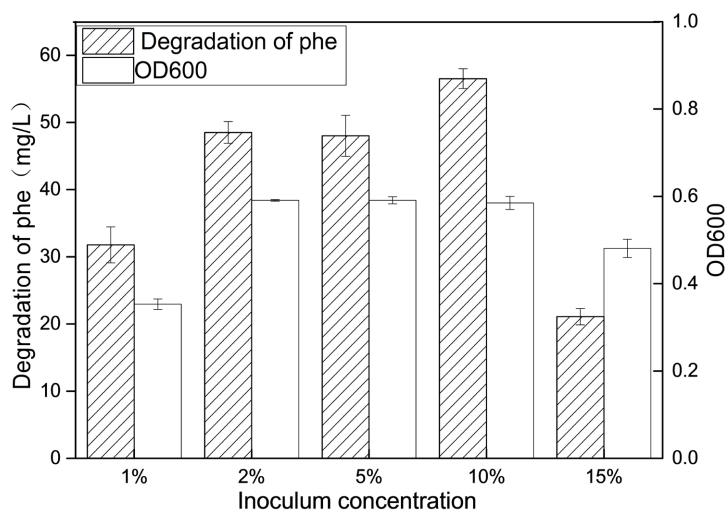


Figure 3. Effect of inoculum concentration on the growth of strain Lphe-2 and its phe degradation ability

图 3. 接种量对菌株 Lphe-2 生长及 phe 降解能力的影响

3.4. 添加不同共代谢物对菌株生长及降解的影响

以葡萄糖、乙酸钠、苯酚、丙酮酸钠为辅助碳源,进行菌株 Lphe-2 共代谢试验,考察共代谢作用对菌株 Lphe-2 生长及降解效果的影响。结果如图 4 所示。

分析图 4 可知,与不添加共代谢物的对照组相比,添加葡萄糖和乙酸钠的两组,菌株生物量均有所增加,但降解量却偏低,说明这两种小分子碳源能为菌株 Lphe-2 提供生长能量来源,但同时也与 phe 形成碳源竞争关系,细菌倾向于利用分子量小、结构简单的碳源,导致对 phe 的降解效果变差。添加苯酚

和丙酮酸钠作为共代谢物时,降解量高于空白对照组。原因可能是苯酚能够诱导开环的酶,这些开环酶同时可以用于对于 phe 的开环降解;而丙酮酸钠已经被证明[12]是一种可以添加到 PAHs 污染土壤中的碳源候选物,可以刺激土壤中 PAHs 降解微生物的生长。本试验结果与其相符。菌株 Lphe-2 降解 phe 的最佳共代谢物为丙酮酸钠,降解量可达到 77.79 mg/L。

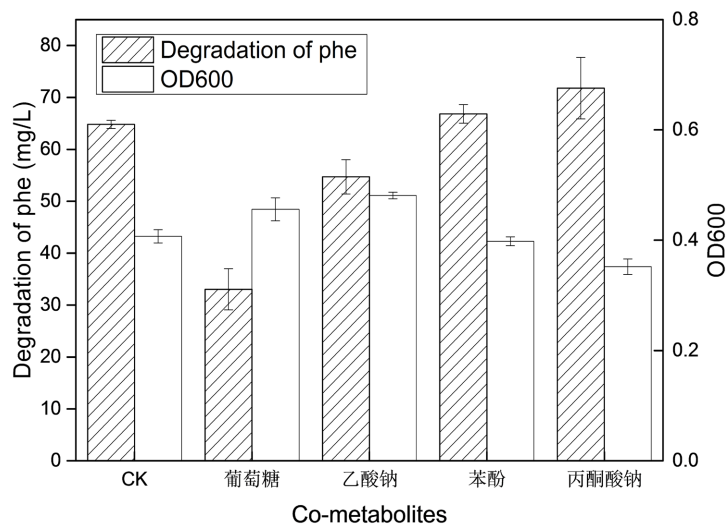


Figure 4. Effect of co-metabolites on the growth of strain Lphe-2 and its phe degradation ability

图 4. 共代谢对菌株 Lphe-2 生长及 phe 降解能力的影响

3.5. 共代谢物浓度对菌株生长及降解的影响

前文已经确定菌株 Lphe-2 降解 phe 的最佳共代谢物为丙酮酸钠,本部分试验进一步确定丙酮酸钠添加浓度对于菌株生长状况及降解效果的影响。设置丙酮酸钠的添加浓度分别为 200 mg/L、500 mg/L、1000 mg/L、1500 mg/L、2000 mg/L。试验结果如图 5 所示。

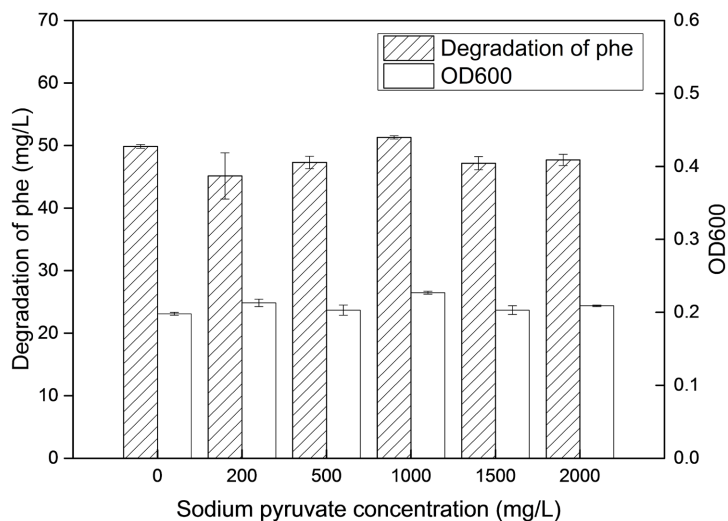


Figure 5. Effect of the addition of different concentrations of sodium pyruvate on the growth of strain Lphe-2 and its phe degradation ability

图 5. 添加不同浓度丙酮酸钠对菌株 Lphe-2 生长及降解能力的影响

由图 5 可知，当丙酮酸钠添加浓度为 0~2000 mg/L，菌株 Lphe-2 的生长量均在 0.3 左右，说明丙酮酸钠添加量对菌株生长没有明显影响，但对于 phe 的降解情况而言，添加浓度为 1000 mg/L 时，降解效果最好，为 57.3 mg/L。而低于或高于 1000 mg/L 时，菌株对 phe 的降解量均偏低。原因为添加少于最佳量的共代谢物质会导致生物降解缓慢，而由于生物量的过度增加，超过最佳量的共代谢物质可能会阻碍细菌与 phe 的接触，从而导致生物修复的停止。

3.6. 菌株 Lphe-2 的菲的降解及动力学

3.6.1. 菌株 Lphe-2 的生长曲线和菲的降解曲线

根据前文所做试验确定最佳培养条件为：初始 pH = 6.0，温度 30℃，接种量 10%，添加 1000 mg/L 丙酮酸钠作为共代谢物质，考察初始 phe 浓度分别为 50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L、250 mg/L、300 mg/L 时菌株的生长状况及降解效果。试验结果如图 6、图 7 所示。

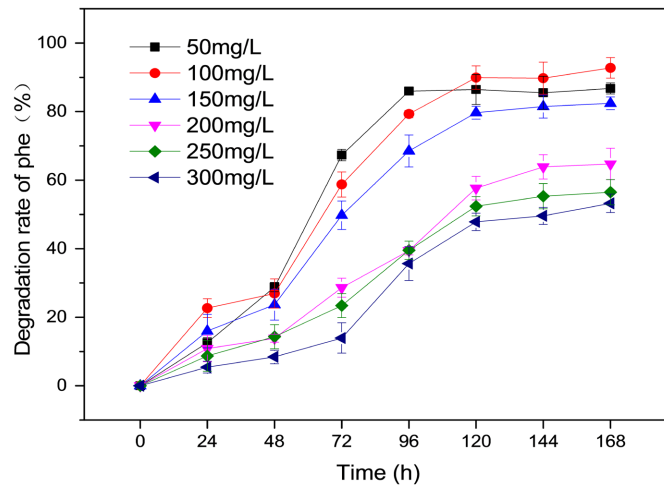


Figure 6. Growth curve of strain Lphe-2

图 6. 菌株 Lphe-2 的生长曲线

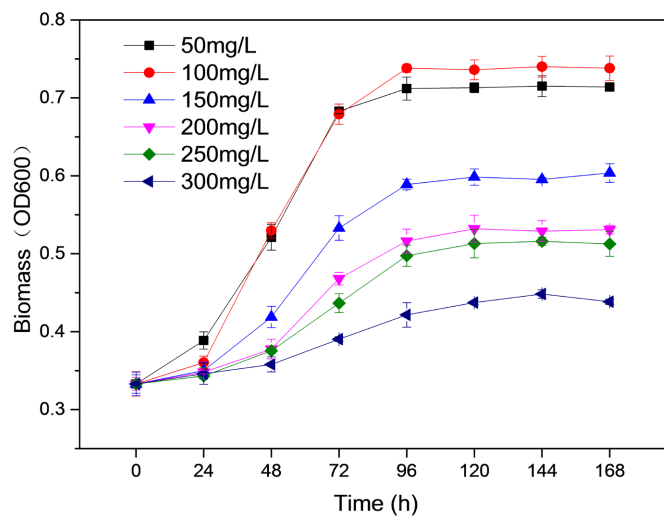


Figure 7. Degradation curve of phe with different concentrations of strain Lphe-2

图 7. 菌株 Lphe-2 对不同浓度菲的降解曲线

由图 6 可知, 菌株 Lphe-2 在非浓度为 50 mg/L 至 300 mg/L 的环境中均能够生长, 但在接种初始的 24 h 内生长较为缓慢, 且非浓度越高, 生长越缓慢。非初始浓度 250 mg/L 时, 接种 24 h 后菌株 OD600 仅为 0.343, 而初始浓度为 300 mg/L 时, 接种 48 h 时菌株 OD600 值也仅为 0.358。在 24 h~72 h 内, 菌株的生物量增长最快, 而 72 h 后增长速度变缓, 在 96 h 左右已基本达到最大生物量。随着非初始浓度的增大, 菌株的最大生物量整体呈减小趋势, 如初始浓度为 100 mg/L 时, 最大 OD600 值达到 0.714, 而初始浓度为 300 mg/L 时, 菌株最大 OD600 值仅为 0.448, 说明高浓度的底物对于菌种生长存在抑制作用。

分析图 7 可知, 菌株 Lphe-2 对菲的降解在前 48 h 内均十分缓慢, 对照图 6 菌株的生长曲线, 菌株生长加速的阶段总在降解率加速之前, 推测原因是从菌株中活性酶的产生到其真正反应具有一定的延滞时间。随着非初始浓度的提高, 降解率加速的时间节点逐渐后移, 说明菌株对高浓度的菲需要更长的适应时间。另外, 观察图 3~7 可以发现, 底物浓度增大后最大降解率降低。以 96 h 为例, 100 mg/L 的非降解率为 73.83%, 而 200 mg/L 的非降解率为 51.62%, 300 mg/L 的非降解率仅为 42.16%。菌株 Lphe-2 对 100 mg/L 的 phe 的 5 d 降解率达到 89.91%, 优于孙海波[1]筛选的芽孢杆菌属 3A, 其在 15 d 内对 100 mg/L 的 phe 可降解 70%。但与其他一些报道相比, 仍有一定差距。如 He-ping Zhao 等筛选的 *Pseudomonas* sp. ZP25d 将 250 mg/L 的 phe 几乎降解完全[13]; Xue-qin Tao 筛选的鞘氨醇单胞菌属 GY2B2d 将 100 mg/L 的 phe 降解 70% [14]。

3.6.2. 菌株 Lphe-2 的生长动力学模型

以菲的浓度从 50 mg/L 至 300 mg/L 时的菌株生长量拟合 Haldane 模型。菌株比增长速率 μ 表示细胞一次分裂所需时间。通过菌种质量 X 与时间 t 的半对数曲线最小二乘拟合得到。拟合结果如图 4~8 所示, 得到的 Haldane 方程如下:

$$\mu = \frac{25.32S}{59304.6 + S \left(1 + \frac{S}{0.1128} \right)}$$

对照 Haldane 模型可知, 其方程参数分别为 $\mu_{\max} = 25.32$, $K_s = 59304.6$, $K_i = 0.1128$, 相关系数 $R^2 = 0.9403$ 。由于半饱和系数越小说明底物抑制作用越显著, 本试验菌株的 K_i 很小, 说明菌株 Lphe-2 的生长符合 Haldane 模型。

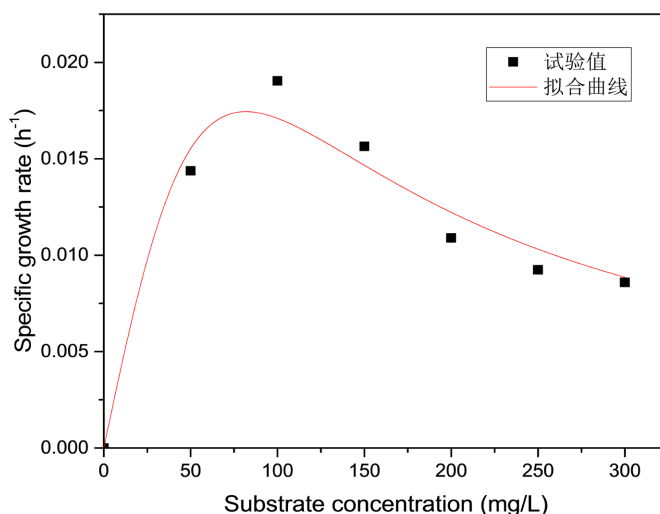


Figure 8. Growth kinetics of strain Lphe-2

图 8. 菌株 Lphe-2 的生长动力学

由图 8 可以发现, 底物浓度在 0~100 mg/L 范围内, 菌株 Lphe-2 的比增长速率随底物浓度增加而增加, 浓度超过 100 mg/L 后则随着底物浓度的增加而减小。由此可见, 高浓度的底物对菌株 Lphe-2 确实存在生长抑制作用, 导致菌株生长速率的降低。在 phe 浓度较低时(100 mg/L 左右)具有最大的比增长速率。

3.7. 菌株 Lphe-2 对多种 PAHs 降解的广谱性研究

本部分试验以三种多环芳烃混合物作为底物, 即萘(nap), 菲(phe), 芘(pyr), 浓度均为 30 mg/L, 接种菌株 Lphe-2, 研究其降解特性。以未添加菌株 Lphe-2 的一组作为对照组。试验结果如图 9 所示。

分析结果可知, 未接种菌株的空白对照组中, phe 和 pyr 的浓度基本稳定不变, 而 nap 的浓度在前 2 d 变化不大, 后面迅速下降。分析原因为 nap 是易挥发性物质, 而 phe 和 pyr 是半挥发性物质。对比接种组和空白组, 可以发现接种菌株 Lphe-2 对 phe 和 pyr 具有显著的降解效果, phe 的降解率达 93.53%, pyr 的降解率达 47.16%。然而对于 nap 而言, 虽然未接种情况下也会挥发减少, 但最终浓度还维持在 9 mg/L 左右, 而接种后 1 d 即迅速降解到 2.34 mg/L, 且 4 d 后几乎降解完全。可见菌株 Lphe-2 在多种 PAHs 降解具有广谱性, 因此菌株 Lphe-2 在实际土壤修复工程中具有很好的应用前景。

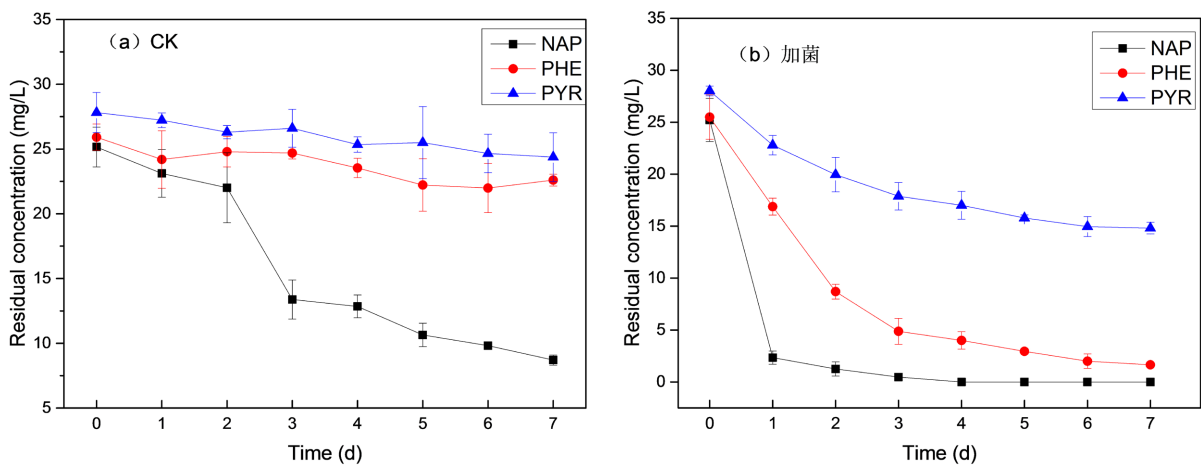


Figure 9. Broad-spectrum test of multiple PAHs by strain Lphe-2

图 9. 菌株 Lphe-2 对多种 PAHs 的广谱性试验

4. 结论

1) 本文考察了初始 pH、温度、接种量、添加共代谢物及共代谢物浓度对于菌株 Lphe-2 的生长及降解效果的影响。确定了最佳 pH 为 6.0, 温度为 30℃, 菌株接种量为 10%, 添加丙酮酸钠作为共代谢物具有最优的降解效果, 且其最佳添加浓度为 1000 mg/L。

2) 利用 Haldane 模型拟合菌株 Lphe-2 的生长动力学模型, 得到的方程参数为 $\mu_{\max} = 25.32$, $K_s = 59304.6$, $K_i = 0.1128$, $R^2 = 0.9403$, 相关性良好。

3) 对于多种 PAHs 底物广谱性试验表明, 7 d 可以将 30 mg/L 的萘完全降解, 对 30 mg/L 菲的降解率达 93.53%, 对 30 mg/L 芘的降解率为 47.16%, 菌株 Lphe-2 对 PAHs 降解具有一定广谱性。

参考文献

[1] 孙海波. 多环芳烃降解菌的筛选、鉴定, 降解特性及邻苯二酚-2, 3-双加氧酶的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 济

- 南: 山东大学, 2009.
- [2] 王蕾. 降解多环芳烃优良菌的筛选分离及代谢性能研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西安建筑科技大学, 2007.
- [3] 吉云秀, 邵秘华. 多环芳烃的污染及其生物修复[J]. 交通环保, 2003, 24(5): 33-36.
- [4] 张兰英. 现代环境微生物技术[M]. 北京: 清华大学出版社, 2007.
- [5] Yuan, S.Y., Shiung, L.C. and Chang, B.V. (2002) Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Inoculated Microorganisms in Soil. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, **69**, 66-73. <https://doi.org/10.1007/s00128-002-0011-z>
- [6] Mallick, S., Chakraborty, J. and Dutta, T.K. (2011) Role of Oxygenases in Guiding Diverse Metabolic Pathways in the Bacterial Degradation of Low-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *Critical Reviews in Microbiology*, **37**, 64. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.512268>
- [7] Simarro, R., González, N., Bautista, L.F., *et al.* (2011) Optimisation of Key Abiotic Factors of PAH (Naphthalene, Phenanthrene and Anthracene) Biodegradation Process by a Bacterial Consortium. *Water Air & Soil Pollution*, **217**, 365-374. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0593-8>
- [8] Moscoso, F., Teijiz, I., Deive, F.J., *et al.* (2012) Efficient PAHs Biodegradation by a Bacterial Consortium at Flask and Bioreactor Scale. *Bioresource Technology*, **119**, 270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.095>
- [9] Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., *et al.* (2007) Degradation of Phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: Initial 1,2- and 3,4-Dioxygenation and Meta- and Ortho-Cleavage of Naphthalene-1,2-Diol. *Biodegradation*, **18**, 123-131. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9048-8>
- [10] Saito, A., Iwabuchi, T. and Harayama, S. (2000) A Novel Phenanthrene Dioxygenase from *Nocardioides* sp. Strain KP7: Expression in *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology*, **182**, 2134-2141. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2134-2141.2000>
- [11] Chakrabarty, A.M. (1972) Genetic Basis of the Biodegradation of Salicylate in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, **112**, 815-823. <https://doi.org/10.1128/jb.112.2.815-823.1972>
- [12] Lee, K., Park, J.W. and Ahn, I.S. (2003) Effect of Additional Carbon Source on Naphthalene Biodegradation by *Pseudomonas Putida* G7. *Journal of Hazardous Materials*, **105**, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2003.08.005>
- [13] Zhao, H.P., Liang, S.H. and Yang, X. (2011) Isolation and Characterization of Catechol 2,3-Dioxygenase Genes from Phenanthrene Degraders *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Pseudomonas* sp. ZP2. *Environmental Technology*, **32**, 1895-1901. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.568007>
- [14] Tao, X.Q., Lu, G.N., Dang, Z., *et al.* (2007) A Phenanthrene-Degrading Strain *Sphingomonas* sp. GY2B Isolated from Contaminated Soils. *Process Biochemistry*, **42**, 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.018>