

特效黄杆菌对蒽菲芘的降解性能研究*

聂麦茜 张志杰 孙先锋 雷萍

(西安建筑科技大学环境工程系 西安 710055)

摘要:采用定时、定量、逐步提高驯化所用碳源物浓度的方法,以萘为唯一碳源驯化长期被焦化废水污染的泥土浸出液,7周后,平板划线分离出两株黄杆菌 FCN1 及 FCN2。并对这两株菌降解多环芳烃的特性及无机离子对反应的刺激作用进行了研究。结果表明,FCN1 及 FCN2 能降解转化蒽、菲、芘。加入 FCN1,反应 10h 后,蒽、菲、芘去除率分别为 84%、69%、80%,而加入 FCN2,各物质的去除率分别为 76%、40%、71%。反应进行 106h,FCN1 对蒽、菲、芘所产生的总有机碳(TOC)的去除率分别为 70%、54%、69%,而 FCN2 对相应物的 TOC 去除率分别为 63%、50%、46%。 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 的加入对 FCN1 降解多环芳烃有促进作用。

关键词:黄杆菌,生物降解,多环芳烃

中国分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0032-05

* 陕西省自然科学基金研究计划资助项目: (No. 99SM18)

收稿日期: 2000-09-06, 修回日期: 2000-11-25

THE STUDY OF DEGRADATION OF ANTHRACENE, PHENANTHRENE AND PYRENE BY EFFECTIVE *FLAVOBACTERIUM*

NIE Mai-Qian ZHANG Zhi-Jie SUN Xian-Feng LEI Ping

(Department of Environmental Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xian 710055)

Abstract: Two effective *flavobacterium* strains FCN1 and FCN2 were isolated from the sludge which had been contaminated by coke-plant waste water for a long time. Before isolation, the naphthalene was used to cultivate such sludge for seven weeks as the sole carbon source and its concentration adding to the cultivating system was increased up to 50mg/L gradually. The polycyclic aromatic hydrocarbon degrading characteristics of our isolates themselves and with inorganic ions was studied respectively. The testing results show that our two isolates can transform and degrade anthracene, phenanthrene and pyrene. After 10 hours reaction, the removing rates of anthracene, phenanthrene and pyrene by FCN1 were 84%, 69%, 80% and by FCN2 were 76%, 40%, 71% respectively. After 106 hours, the removing rates of TOC caused by anthracene, phenanthrene and pyrene were 70%, 54%, 69% by FCN1 and 63%, 50%, 46% by FCN2. The Fe^{3+} and Mg^{2+} can accelerate the degrading reaction of FCN1.

Key word: *Flavobacterium*, Biodegradation, Polycyclic aromatic hydrocarbons

石油化工产品的采集与使用、各种有机物的不完全燃烧及化学工业生产等过程产生的多环芳烃已成为一类重要的环境污染物。多环芳烃随三废排入环境中的量逐年增加^[1], 再加上其生物利用率低, 因而这类物质在环境中呈逐年积累的趋势。

关于多环芳烃的净化技术大多处于研究阶段, 现在趋于利用生物过程处理混合多环芳烃的污染物, 然而, 生物降解多环芳烃污染物还没有被证明技术上的可行性^[2]。对于一般的微生物来说, 多环芳烃是难以利用的。所以选择利用优势特效菌净化多环芳烃是解决这类污染问题的有效方法。本研究从长期被焦化废水污染的污泥中筛选分离出降解多环芳烃的两株特效黄杆菌, 并研究了它们对蒽、菲、芘的降解性能及无机离子的存在对其降解效能的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种分离、鉴定及菌液制备

采用间歇式定时、定量逐步提高碳源浓度的方法, 在 28℃, 好氧振荡条件下, 以蒽为唯一碳源驯化长期被焦化废水污染的污泥, 7 周后, 经反复平板划线分离获得纯菌种。

参照文献 [3] 中的驯化培养基, 但驯化用蒽为唯一碳源物。

菌株的鉴定, 本研究采取一般分类方法, 根据细菌的形态特征及其生理生化特征, 先将菌种鉴定到科, 再按各分科检索进行鉴定。

纯种菌悬液的制备: 菌株接种在普通牛肉汁培养基上, 28℃ 振荡培养 48h, 离心, 用磷酸缓冲液洗涤 3 次后, 再用磷酸缓冲液稀释, 将细菌浓度调至 8×10^8 个细胞/mL, 备用。

1.2 降解反应

1.2.1 菌株对单基质蒽、菲、芘的降解实验: 采用静态反应瓶曝气, 反应瓶中加入 400mL 蒸馏水, 加入各单基质丙酮溶液, 使瓶中蒽、菲、或芘浓度均为 40mg/L, 加入上述菌悬液, 使反应瓶中悬浮菌浓度达 1.0×10^8 个细胞/mL。在 25℃ 条件下曝气。

1.2.2 无机离子的作用试验：在上述实验条件下，加入无机离子进行降解试验，反应瓶中， Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等无机离子浓度均为0.2mg/L。

1.3 分析方法

1.3.1 水样中葱、菲、芘浓度的测定：定时、定量采取反应瓶中水样，并用环己烷萃取之，萃取液用硅胶G薄层色谱板分离，以葱、菲、芘的标准溶液作参照，石油醚作展开剂，以碘蒸气作显色剂。刮下色谱板上葱、菲、芘样点，用石油醚溶解，用紫外分光光度计，测其吸光度，然后查找标准曲线，从而得知反应瓶中某时刻葱、菲、芘的浓度。测葱、菲、芘吸光度时，工作波长分别为254nm、252nm和242nm。

1.3.2 TOC测定：曝气反应106h后，采各反应瓶中水样，用16,000r/min的离心机离心1h后，测定各水样上清液中的TOC值，测定值与加入的葱、菲、芘理论TOC值相比较，用以说明葱、菲、芘在处理系统中降解去除状况。

2 结果与讨论

2.1 细菌的鉴定结果

按照1.1方法进行实验，分离出两株菌，均为黄杆菌属，其代号分别为FCN1和FCN2。

2.2 降解反应结果

2.2.1 菌株对葱、菲、芘的降解结果：按照1.2.1中方法进行实验，结果如图1、图2所示。图1结果表明FCN1降解葱、菲、芘时，前10h内，降解转化速度较快，葱与芘的浓度从40mg/L分别降至6.5和7.0 mg/L，菲的浓度则降至12.5mg/L。所以对这两种黄杆菌来说，菲在反应初期相对难以降解转化。随着反应的进行，降解反应速度减慢。反应进行到106h时，葱、菲、芘的浓度均接近于零。图2与图1有着相似的趋势，但FCN1对葱、菲、芘的降解效能比FCN2要好。表1是反应进行106h后，各个水样中TOC的测定结果。该结果说明，这两株黄杆菌在对葱降解时TOC去除率较高。

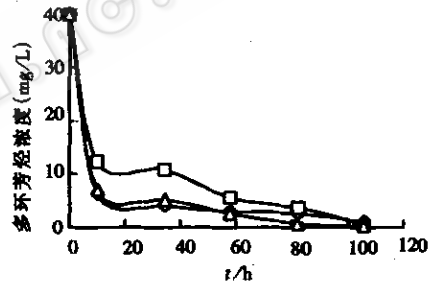


图1 FCN1对葱菲芘的降解结果
—○— 葱, —□— 菲, —△— 芘

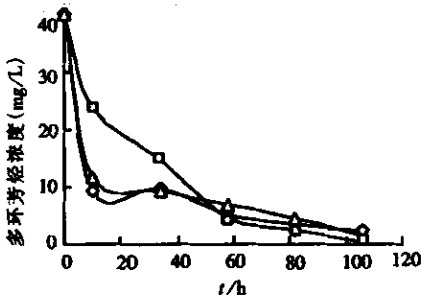


图2 FCN2对葱菲芘的降解结果
—○— 葱, —□— 菲, —△— 芘

表1 TOC测定结果 (mg/L)

| 菌株 | 葱 | 菲 | 芘 |
|------|------|------|------|
| 理论值 | 37.6 | 37.6 | 38.2 |
| FCN1 | 11.2 | 17.0 | 12.0 |
| FCN2 | 13.9 | 18.5 | 20.5 |

2.2.2 无机离子对降解反应的影响：按照1.2.2中方法，选择加入 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等无机离子进行实验，

结果如图3、图4及表2所示。图3结果表明，在10h内，反应体系中所加入的各无机离子，对FCN1降解菲的效能都有不同程度的抑制作用，其中 Cu^{2+} 及 Zn^{2+} 抑制作用较

明显。随着反应的进行, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 逐渐表现出促进作用, 其中 Fe^{3+} 的促进作用最大, 图4与图3有着相似的趋势, 但图4中, 随着反应的进行, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的促进作用不明显。表2结果说明, 无机离子对两菌株彻底去除菲效果不一。对于 FCN1 来说, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 的加入有利于促进系统中菲所产生的总有机碳的去除, 而 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的加入则是不利的。对于 FCN2 来说, Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 的加入, 对 TOC 的去除效果不大, 而 Zn^{2+} 与 Ca^{2+} 则不利于 TOC 的去除。

表2 无机离子存在下优势黄杆菌对菲降解后的 TOC 测定结果 (mg/L)

| 菌株 | 理论值 | - | Fe^{3+} | Mg^{2+} | Cu^{2+} | Zn^{2+} | Ca^{2+} |
|------|------|------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| FCN1 | 37.6 | 16.8 | 7.8 | 10.8 | 19.5 | 25.3 | 28.3 |
| FCN2 | 37.6 | 18.9 | 18.2 | 16.7 | 18.5 | 29.6 | 23.8 |

注: - 只加菲, 没有加任何无机离子

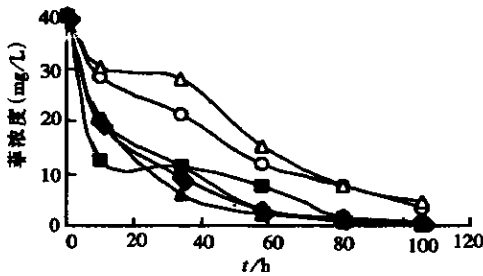


图3 无机离子存在下 FCN1 对菲的降解结果
 —■— 菲, —▲— 菲 Fe^{3+} , —●— 菲 + Mg^{2+} , —○— 菲 Cu^{2+} ,
 —△— 菲 + Zn^{2+} , —◆— 菲 + Ca^{2+}

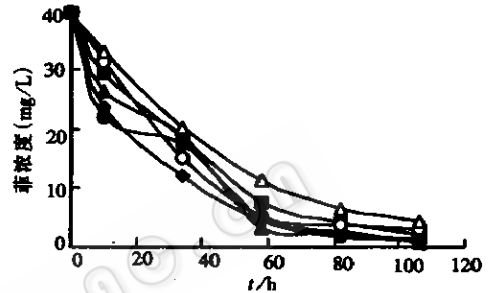


图4 无机离子存在下 FCN2 对菲的降解结果
 —◆— 菲, —■— 菲 Fe^{3+} , —▲— 菲 + Mg^{2+} , —○— 菲 Cu^{2+} ,
 —△— 菲 + Zn^{2+} , —●— 菲 + Ca^{2+}

2.3 讨论

本实验在分离细菌时以萘为唯一碳源进行驯化, 从降解反应的结果可以看出, 分离出的两株黄杆菌也能降解蒽、菲、芘等多环芳烃, 所以这两株黄杆菌有攻击芳环的功效。

实验 2.2.1 及 2.2.2 中的降解结果都有一个共同的趋势: 前 10 h, 降解转化速度快, 随后则出现缓慢的反应趋势。按照反应动力学理论, 起初反应系统各多环芳烃的浓度较大, 因而反应速度较快, 随后出现的缓慢趋势可用下面两个原因解释。其一, 各多环芳烃浓度降低导致反应速度减慢; 其二, 一些研究^[4,5]表明, 多环芳烃不易被微生物利用主要是因为其水溶性低, 同时也表明, 多环芳烃的降解过程是逐步进行的, 也就是说, 在降解过程中, 反应体系中存在一系列转化中间产物。它们的分子结构中除了有未打开的芳环外, 还有一些亲水基团, 如羧基、羰基、环氧基等。这些亲水基使得中间产物易溶于水。它们在反应体系中能被微生物降解或吸收同化, 这一点可从 TOC 测定结果说明。因此, 中间产物与原加入的多环芳烃的竞争代谢也有降低反应速度趋势的可能性。

TOC 的测定结果是保守值, 我们的理论值只考虑了所加入的蒽、菲、芘所产生的 TOC 值。认为经过 106h 的降解反应, 起初随 3 种多环芳烃一起加入的丙酮溶剂已全部转化为 CO_2 或因挥发而离开水体, 并且认为, 经过离心, 水样上清液中无细菌, 即细菌对所测的 TOC 结果无贡献。其实, 测 TOC 的水样中可能有少量细菌, 所以, 我们所测的 TOC 比实际值高。TOC 的测定结果说明, 这两株黄杆菌在降解蒽、菲、芘时, 能

去除各多环芳烃产生的总有机碳。说明 FCN1 和 FCN2 转化葱、菲、芘的酶也能作用于降解反应过程中生成的中间产物。

曾有研究报道^[6]，在 30℃ 条件下降解葱、菲、芘，利用所测出的各多环芳烃的浓度计算它们的去除率时，认为因挥发引起多环芳烃浓度的降低可忽略不计。事实上葱、菲、芘是不易挥发的。所以，在我们的实验中，25℃ 条件下，各多环芳烃浓度及 TOC 值的降低应该是微生物降解转化的结果。

在实验过程中，反应瓶中液体逐渐由原来不透明的乳白色（不溶性的多环芳烃引起的）变为淡黄色的透明液体，并有大量微生物絮体出现，按照活性污泥培养过程中的经验，絮体的出现说明两株黄杆菌在葱、菲、芘中繁殖生长。

3 结论

本研究分离出两株黄杆菌 FCN1 和 FCN2，它们对葱、菲、芘均有降解效能，但对葱的降解效果最好。 Fe^{3+} 与 Mg^{2+} 的加入对 FCN1 降解菲有促进作用。FCN1 和 FCN2 在降解转化葱、菲、芘的同时，也能将反应过程中产生的中间产物逐步转化去除。

参 考 文 献

- [1] Saeed T, Al-Blouahi A, AlMatrouk K. Archives of Environmental Contamination and Toxicity, 1995, 29: 45 ~ 51.
- [2] William T S, Michael D A. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 357 ~ 362.
- [3] 陆军, 王菊思, 赵丽辉, 等. 环境科学, 1996, 17: 1~4
- [4] Zhongbao Liu, Annette M J, Richard G L. Appl Microbiol, 1995, 61: 145 ~ 151.
- [5] Ilia Y J, Richard B. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 2311 ~ 2316.
- [6] Jerome F J, Chikaahi S, Raul C. Water Environ Res, 1998, 70: 356 ~ 361.