

Mn²⁺ 在黄杆菌 FCN2 菌株降解芘过程中的作用研究

吴蔓莉, 聂麦茜, 王晓昌, 苏君梅

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055)

摘要: 利用紫外分光光度法和原子吸收分光光度法研究了 Mn²⁺ 在菌株 FCN2 生长细胞、悬浮细胞、粗酶液降解芘时的影响作用。在菌体生长期加入 0.1~5 mmol/L 的 Mn²⁺, 对菌体的生长及生长量无影响, 但对芘的降解均有促进作用, 以加入 0.1 mmol/L 的 Mn²⁺ 效果最好, 其对芘的平均降解率是对照的 1.26 倍。此时菌株富集的 Mn²⁺ 为 0.025 mmol/L; 在用无外加 Mn²⁺ 培养的菌株 FCN2 悬浮细胞降解芘时, 加入 0.5 mmol/L 的 Mn²⁺, 芘的平均降解率为对照的 1.67 倍。降解反应发生 72 h 后菌株富集的 Mn²⁺ 为 0.18 mmol/L; 在酶促降解时加入 0.1 mmol/L Mn²⁺, 平均降解率为对照的 1.30 倍。结果表明, 在不同时期加入的 Mn²⁺ 对降解芘均有一定的促进作用。

关键词: 黄杆菌属; 芘; 生物降解; Mn²⁺

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2008)07-1982-04

Effect of Mn²⁺ on Pyrene Degradation by *Flavobacterium* sp. FCN2

WU Man-li, NIE Mai-qian, WANG Xiao-chang, SU Jun-mei

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: Mn²⁺ concentration affecting polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene degradation by the *Flavobacterium* sp. FCN2 was investigated by adding Mn²⁺ during several periods, which including bacteria cultivation period, bacteria degrading pyrene and enzymatic degradation period. Results show the concentration of Mn²⁺ was beneficial for pyrene degradation, and Mn²⁺ was no influential to bacteria growth and magnitude. When Mn²⁺ was added during culturing strain FCN2 period, bacteria FCN2 can enrich Mn²⁺, and pyrene removal efficiency by Mn²⁺ enrichment bacteria is 1.26 times more than that of without Mn²⁺ enrichment bacteria. As well as the situation that adding Mn²⁺ during FCN2 degrading pyrene period that pyrene removal efficiency is 1.67 times more than that of without Mn²⁺. And when adding Mn²⁺ during enzymatic degradation periods, the elimination efficiency of pyrene was 1.30 times more than that of without Mn²⁺.

Key words: *Flavobacterium* sp.; pyrene; biodegradation; Mn²⁺

多环芳烃(PAHs)是环境中广泛存在的一类具有致癌、致畸活性的有机污染物,主要来源于人类的生产活动和能源的利用过程,如石化产品的燃烧、石油的泄漏等^[1,2]。利用微生物降解途径去除环境中的多环芳烃被认为是最有效的途径^[3~6]。文献报道较多的有关多环芳烃的微生物降解主要集中在利用白腐真菌属^[7~9]和分支杆菌属^[10~12]对多环芳烃进行降解方面。Zheng 等^[13]报道在用白腐真菌降解多环芳烃时,向培养液中加入 Mn²⁺ 是提高胞外酶系锰过氧化物酶产量的一个关键因素。有关外加 Mn²⁺ 在白腐菌降解多环芳烃时的作用,已有大量相关报道^[14~16]。但文献报道 Mn²⁺ 的影响作用时,仅是研究了活菌体降解多环芳烃时外加 Mn²⁺ 的促进作用。对于细胞生长期及酶促降解时外加 Mn²⁺ 对多环芳烃降解的影响作用,未做深入的研究。

课题组在前期工作中,经分离筛选得到可降解多环芳烃的黄杆菌 FCN2 菌株,并对其降解特性进行了深入的研究^[17]。进一步研究发现,在 FCN2 降解多环芳烃的过程中,起主要作用的是胞内酶^[18,19]。但有关外加 Mn²⁺ 对黄杆菌属降解多环芳烃的作用,尚

鲜见报道。

微生物对多环芳烃的降解作用,主要是依靠其产生的酶的促进作用完成的^[20]。白腐菌和黄杆菌在分类学上属于不同的界,但都能有效降解多环芳烃。对白腐菌所产可降解多环芳烃的酶系,已有详细报道^[21]。而黄杆菌 FCN2 的多环芳烃降解酶系,是否与白腐菌降解多环芳烃的酶系有一定的相关性,有待进一步探讨。本研究探讨了 FCN2 菌株的生长细胞、悬浮细胞及粗酶液对芘的降解及 Mn²⁺ 在此过程中的作用。并与文献报道的白腐菌降解芘时 Mn²⁺ 的作用相比较,以期得出在用黄杆菌属和白腐菌属两类不同的菌属降解同一类型有机污染物多环芳烃时的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

液体培养基:牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl

收稿日期:2007-09-04;修订日期:2007-11-05

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划项目(07JK298);陕西省自然科学基金项目(2006Z04)

作者简介:吴蔓莉(1974~),女,博士研究生,主要研究方向为环境陌生性有机污染物的微生物降解技术, E-mail: wumanli@xauat.edu.cn

5.0 g, 水 1 000 mL pH 7.4 ~ 7.6. 磷酸盐缓冲液: $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ 21.75 g, KH_2PO_4 8.7 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 33.4 g, NH_4Cl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL. 菌株 FCN2: 本实验室以焦化厂焦化废水排水沟底泥为优良菌源, 通过驯化筛选获得.

1.2 胞内酶的提取方法

将保存在斜面上的菌株 FCN2 接种于经高压蒸汽灭菌的液体培养基中, 32℃ 好氧振荡培养 48 h, 室温下 6 000 r/min 离心 30 min, 以磷酸盐缓冲液洗涤并离心 3 次. 收集菌体, 用同一缓冲液制成菌悬液(稀释 10 倍后的 $D = 0.262$).

将 30 mL 的 FCN2 菌悬液, 置于 0℃ 冰-水混合浴中用 JY88-II 型超声波细胞粉碎机处理 20 次, 每次 2 min. 粉碎功率为 450 W. 10 000 r/min 离心分离 30 min 除去细胞碎片, 取上清液为胞内粗酶液.

1.3 茚的测定

将反应瓶中的水样用环己烷萃取 3 次, 合并萃取液, 用 Na_2SO_4 脱水后, 定容至 10.0 mL, 用紫外光度法(工作波长为 242 nm)测定茚的吸光度, 利用标准曲线法计算茚的浓度.

1.4 反应体系描述

1.4.1 Mn^{2+} 在菌体生长时的作用实验

经高压蒸汽灭菌后, 在无菌操作条件下, 分别接种 FCN2 菌种于外加 Mn^{2+} 浓度为 0、0.1、0.5、5 mmol/L 的 150 mL 的液体培养基中, 在 32℃ 的条件下恒温培养 48 h 后, 用 pH 电位计测定培养液的 pH 值. 离心后将菌体分别制成 20.0 mL 的菌悬液, 测定其 D 值, 以确定不同条件下, FCN2 生长繁殖量的差异.

菌体中 Mn^{2+} 的含量测定: 从上述菌悬液中分别取出 16 mL, 用浓硝酸消解. 以 (1 + 1) HCl 1.5 mL 溶解残渣, 过滤、用 1% 盐酸定容到 25.0 mL, 用原子吸收光度法测定金属离子 Mn^{2+} 的含量.

茚的降解实验: 加入 19 mL 蒸馏水于 16 个样瓶, 分别准确加入 5 g/L 的茚的丙酮溶液, 使茚的浓度为 25 mg/L. 曝气 30 min, 充分挥发丙酮. 样瓶分 4 组, 第 1 组 4 个样瓶均加入无外加 Mn^{2+} 时培养获得的菌悬液 1.0 mL, 第 2、3、4 组各 4 个样瓶中分别加入外加 0.1、0.5 和 5 mmol/L Mn^{2+} 培养获得的菌悬液 1.0 mL. 摇匀, 于恒温水浴振荡器中 32℃ 下反应, 分别在 10、24、48 和 72 h 时采样, 再各加入 1 mL (1 + 1) HCl 终止反应, 用环己烷萃取茚, 测定茚的浓度, 每个体系做 3 次平行实验, 同时设不加菌悬液的对照组.

1.4.2 Mn^{2+} 在菌体降解茚时的作用实验

茚的降解实验: 取 16 个样瓶, 分别在样瓶中加

入 19 mL 蒸馏水, 准确加入 5 g/L 的茚丙酮溶液 0.10 mL, 使茚的浓度为 25 mg/L. 充分挥发丙酮后, 每个样瓶中均加入无外加 Mn^{2+} 时培养的菌悬液 1.0 mL, 再将样瓶分为 4 组, 从第 2 组起, 依次向每组样瓶中加入不同量的 0.1 mol/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 溶液, 使 4 组样瓶中外加 Mn^{2+} 的浓度依次为 0、0.1、0.5 和 5 mmol/L. 于恒温水浴振荡器中 32℃ 反应, 在 10、24、48 和 72 h 时, 采样, 加入 1 mL (1 + 1) HCl 终止反应, 用环己烷萃取茚 3 次, 按 1.3 的方法测定茚的浓度; 每个体系做 3 次平行实验, 同时设不加菌悬液的对照组.

菌体中 Mn^{2+} 的含量测定: 将萃取后的水相离心后收集菌体, 将菌体溶于水后, 置于烧杯中消解(方法见 1.4.1), 用原子吸收光度法测定金属离子 Mn^{2+} 的含量.

1.4.3 Mn^{2+} 在酶促降解茚时的作用研究

取 12 个样瓶, 分别在样瓶中加入 19 mL 蒸馏水, 准确加入 5 g/L 茚的丙酮溶液, 使茚的初始浓度为 25.0 mg/L. 充分挥发丙酮. 样瓶分为 4 组, 从第 2 组起, 依次向每组样瓶中加入不同量的 0.1 mol/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 溶液, 使 4 组样瓶中外加 Mn^{2+} 的浓度依次为 0、0.1、0.5 和 5 mmol/L. 于恒温水浴振荡器中 32℃ 反应, 在 10 min、30 min、1 h 和 2 h 时采样, 用环己烷萃取茚 3 次, 按 1.3 的方法测定茚的浓度; 每个体系做 3 次平行实验, 同时设不加粗酶液的对照组.

2 结果与分析

2.1 培养菌体时加入 Mn^{2+} 对茚降解的影响

培养菌体时加入不同浓度的 Mn^{2+} 对降解茚的影响如图 1 所示. 反应 72 h 内, 与不加 Mn^{2+} 时培养的菌株相比较, 加入 0.1 mmol/L Mn^{2+} 培养的菌株对茚的降解效果最好. 整个降解过程中, 其平均降解率是对照组的 1.26 倍; 当培养菌株时加入的 Mn^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时, 与无外加 Mn^{2+} 培养的菌株对茚的降解相比, 在降解反应后 48 h 内, 可对茚的生物降解起到促进作用, 超过 48 h 后, 促进作用慢慢减弱, 到 72 h 时, Mn^{2+} 对降解的促进作用几乎消失; 当培养时加入 5 mmol/L 的 Mn^{2+} 时, 24 h 内对降解起到促进作用, 超过 24 h 促进微生物降解的作用消失.

在加入 Mn^{2+} 培养菌株时, 无论初始加入的 Mn^{2+} 浓度如何, 在培养 48 h 后, 测得的加 Mn^{2+} 和不加 Mn^{2+} 培养所得的菌体的光密度值及 pH 不变 (pH = 8.5; 光密度 $D = 0.262$, 稀释 10 倍后测定), 说明培养时加入 Mn^{2+} 对菌株的生长并无影响. 而加入

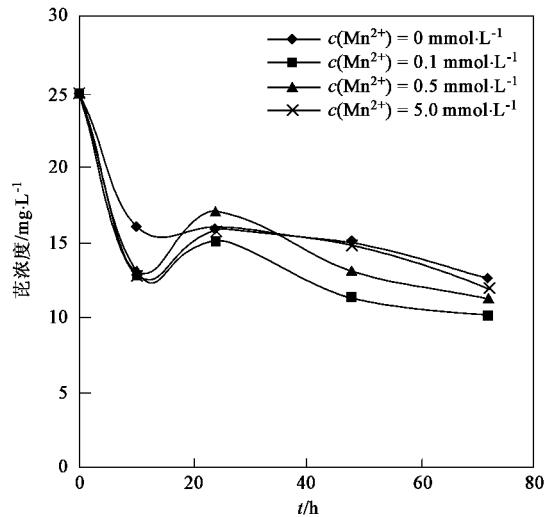


图 1 培养菌株 FCN2 时加入金属离子 Mn^{2+} 对降解芘的影响

Fig.1 Effect on degrading pyrene by adding Mn^{2+} in culturing periods
0.1 mmol/L Mn^{2+} 培养的菌体对芘的降解效果优于无外加 Mn^{2+} 培养的菌体,原因可能是由于菌体对 Mn^{2+} 的富集作用,并且富集的 Mn^{2+} 对菌体的胞内酶有激活作用.

用原子吸收光谱法测定菌株富集的 Mn^{2+} 量.结果如表 1 所示.在培养 48 h 后,没有加 Mn^{2+} 培养的菌体内 Mn^{2+} 的含量为 0.005 1 mmol/L;加 0.1、0.5 和 5 mmol/L Mn^{2+} 培养的菌体内富集的 Mn^{2+} 量分别为 0.025、0.11、0.21 mmol/L,由于各菌悬液的 pH 值及菌生长量基本相同,说明能使菌株降解芘的速度加快的原因是由于菌株富集的 Mn^{2+} 的影响作用.根据表 1 的结果可大致推测:当菌株 FCN2 富集的 Mn^{2+} 量为 10^{-2} mmol/L 个数量级时,菌体对多环芳烃的降解有促进作用;当菌株富集的 Mn^{2+} 量超过 10^{-1} mmol/L 个数量级时,随着菌株富集的 Mn^{2+} 量的增大,菌株对多环芳烃降解的促进作用逐渐减小.

2.2 Mn^{2+} 在菌体降解芘时的作用研究

按 1.4.2 的实验方法,测得降解反应不同时间内芘的浓度,结果如图 2 所示.可以看出,与无外加 Mn^{2+} 时菌株对芘的降解作用相比较,在降解反应后 72 h 内,当外加金属离子 Mn^{2+} 为 0.5 mmol/L 时,FCN2 对芘的降解效果最好;当外加 Mn^{2+} 为 0.1 mmol/L 时,较短时间(48 h)内, Mn^{2+} 的加入会对降解起到促进作用,降解反应发生 72 h 时, Mn^{2+} 对 FCN2 降解芘的促进作用就不明显了;而当外加 Mn^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时,24 h 内会对降解起到促进作用,但当降解反应发生 48 h 后, Mn^{2+} 对生物降解会起到抑制作用.

按 1.4.2 的实验方法,用原子吸收光度法测定菌体中金属离子 Mn^{2+} 的含量.所得实验结果见表 2.

表 1 培养 48 h 菌株富集的 Mn^{2+} 的含量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 1 Content of Mn^{2+} in strain FCN2 by adding Mn^{2+} during culturing periods/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

培养时加入 Mn^{2+} 量	培养 48 h 后测定菌株中富集的量
0	0.005 1
0.1	0.025
0.5	0.11
5	0.21

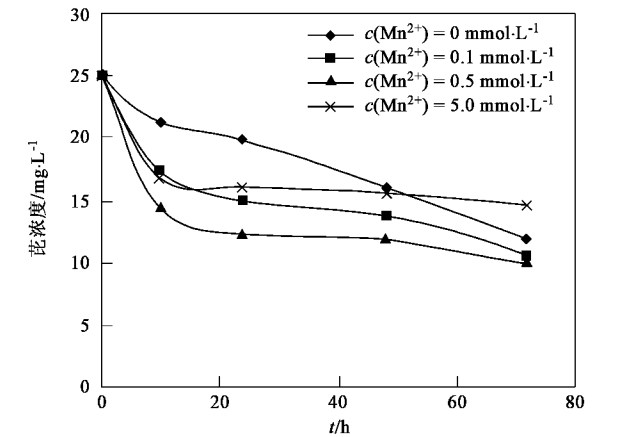


图 2 菌株 FCN2 降解芘时加入金属离子 Mn^{2+} 对降解的影响

Fig.2 Effect of Mn^{2+} on degrading pyrene by adding Mn^{2+} in degrading periods

表 2 外加 Mn^{2+} 降解芘时菌株 FCN2 富集的 Mn^{2+} 含量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Table 2 Content of Mn^{2+} in strain FCN2 by adding Mn^{2+} during degrading periods/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

外加 Mn^{2+} 的量	降解 24 h 后富集的 Mn^{2+} 量	降解 48 h 后菌株富集的 Mn^{2+} 量	降解 72 h 后菌株富集的 Mn^{2+} 量
0	0.021	0.021	0.028
0.1	0.030	0.041	0.058
0.5	0.065	0.125	0.18
5	0.33	0.48	1.52

在不加入 Mn^{2+} 的降解体系中,随着降解时间的增加,菌体内富集的 Mn^{2+} 量几乎不发生变化(菌体内的量可能来源于培养基中);当外加 Mn^{2+} 的含量分为为 0.1、0.5 和 5 mmol/L 时,随着降解时间的增加,菌体内富集的 Mn^{2+} 量也随之增加.结合图 2 的分析结果可知,当外加 Mn^{2+} 的浓度为 0.5 mmol/L,即菌株内富集的 Mn^{2+} 为 0.065 ~ 0.18 mmol/L 时,对芘的降解效果最为明显.说明在菌株 FCN2 降解芘时,菌株内富集的 Mn^{2+} 对芘的降解起到促进作用.另外,当外加金属离子的浓度为 0.1 mmol/L,即菌株内富集的量 0.030 ~ 0.058 mmol/L 时,也对降解起到促进作用.这与图 1 及表 1 的结果不一致.可能的原因是:在菌株 FCN2 降解芘时,当胞外液中存在 Mn^{2+} 时,菌株分泌的胞外活性物质也可能对降解起到一定的作用.其具体原因,有待于进一步深入研究.

2.3 Mn^{2+} 在酶促降解芘时的作用研究

酶促降解时加入 Mn^{2+} 的影响作用如图 3 所示. 在酶促降解时加入 0.1 ~ 0.5 mmol/L 金属离子 Mn^{2+} 对酶促降解芘有较强的促进作用; 当外加 Mn^{2+} 为 0.1 mmol/L 时, 酶促降解的效果最好. 其平均降解率为无外加 Mn^{2+} 时的 1.30 倍; 而当加入 5 mmol/L Mn^{2+} 时, 对芘的酶促降解会有很强的抑制作用.

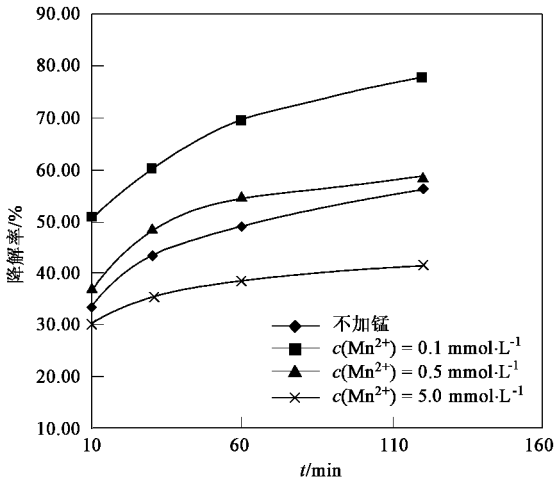


图 3 Mn^{2+} 对酶促降解芘的影响

Fig.3 Effect of Mn^{2+} on enzymatic degrading pyrene

3 结论

(1) 在培养菌体时加入 Mn^{2+} 对菌体的生长速度及生长量情况无影响. 但在菌体培养期加入 0.1 mmol/L 的 Mn^{2+} 、菌体降解芘时加入 0.5 mmol/L 的 Mn^{2+} 、酶促降解时加入 0.1 mmol/L Mn^{2+} 均可提高芘的生物转化率.

(2) AAS 法测定结果表明, Mn^{2+} 可在菌体内富集. 由于在不同的降解体系中, 加入的菌量 (D 值) 都一样. 所以导致降解速率和多环芳烃去除率增加的因素只能是菌体内富集的 Mn^{2+} 或胞外液中 Mn^{2+} 的作用, Mn^{2+} 对胞内酶起到激活作用.

(3) 白腐菌降解多环芳烃时, Mn^{2+} 可对降解起到促进作用. 实验结果表明, 黄杆菌 FCN2 降解芘时, Mn^{2+} 对芘降解同样起到促进作用, 其促进作用主要是对胞内酶具有激活作用引起的. 白腐菌和黄杆菌尽管在细胞分类学上属于不同属的菌, 但在降解共同的底物多环芳烃时, 有可能存在相同的胞内氧化酶系.

参考文献:

[1] Menzie C A, Potocki B B, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment[J]. Environ Sci Technol, 1992, 26: 1278-1284.
[2] Poster D L, Schantz M M, Sander L C, et al. Analysis of polycyclic

aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples. a critical review of gas chromatographic (GC) methods[J]. Anal Biamual Chem, 2006, 386: 859-881.
[3] Strobel B W. Influence of Vegetation on Low-Molecular-weight Carboxylic Acids in Soil solution-A Review[J]. Geoderma, 2001, 99: 169-198.
[4] Head I M. Bioremediation: towards a credible technology[J]. Microbiology, 1998, 144: 599-608.
[5] Ting Y P, Hu H L, Tan H M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. Resources and Environmental[J]. Biotechnology, 1999, 2: 197-218.
[6] Semple K T, Redi B J, Femor T R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants[J]. Environmental Pollution, 2001, 112: 269-283.
[7] Matsubara M, Lynch J M, de Leij F A. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39 (7): 1365-1372.
[8] Valentín L, Feijoo G, Moreira M T, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006, 58: 15-21.
[9] Valentín L, Lu-Chau T A, López C, et al. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus Bjerkandera sp. BOS55[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 641-648.
[10] Ramirez N, Cutright T, Ju L K. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by Mycobacterium PYR21 and enriched consortium[J]. Chemosphere, 2001, 44(5): 1079-1086.
[11] Pagnout C, Rast C, Veber A M, et al. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by Mycobacterium sp. strain SNP11[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 65(2): 151-158.
[12] 苏丹, 李培军, 王鑫, 等. 3 株细菌对土壤中芘和苯并芘的降解及其动力学[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 913-917.
[13] Zheng Z M, Obbard J P. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by the white rot fungus, Phanerochaete chrysosporium[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 3-9.
[14] Tekere M, Read J S, Mattiasson B. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(4): 367-377.
[15] Baborová P, Möder M, Baldrian P, et al. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus Irpex lacteus, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(3): 248-253.
[16] Vicentim M P, Ferraz A. Enzyme production and chemical alterations of Eucalyptus grandis wood during biodegradation by Ceriporiopsis subvernispora in cultures supplemented with Mn^{2+} , corn steep liquor and glucose[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(4): 64-652.
[17] 聂麦茜, 张志杰, 孙先锋, 等. 特效黄杆菌对萵、菲、芘降解性能研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 32-36.
[18] 聂麦茜, 吴蔓莉, 王晓昌, 等. 一株黄杆菌及其粗酶液对芘降解的动力学特征研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(2): 181-185.
[19] 吴蔓莉, 聂麦茜, 王晓昌, 等. 萵和菲的酶促降解条件及动力学特征[J]. 环境化学, 2007, (3): 314-318.
[20] Cemiglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1993, 4(3): 331-338.
[21] Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation[J]. FEMS Microbiol Rev, 1994, 13: 125-135.