

蒽降解菌烟曲霉 A10 的分离及降解性能研究

强婧, 尹华*, 彭辉, 叶锦韶, 秦华明, 何宝燕, 张娜

(暨南大学环境工程系, 广州 510632)

摘要:从污染环境中筛选出1株蒽降解菌A10,经鉴定为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*),其对蒽的降解率随时间的延长逐渐升高,在12~84 h,蒽降解率增长速率较快;此后降解率的增加趋于平缓,最终(168 h)能够达到83%左右.当无机盐培养液中蒽初始浓度为10 mg/L, A10投菌量为50 g/L(以湿重计),菌龄为36 h时,5 d内蒽降解率为79.37%.蒽浓度对菌发挥降解作用有较大影响,浓度为5 mg/L时,降解率最高,达92.17%.培养液初始pH为5.0~7.5时,降解率维持在60%左右;温度为30℃、氧氣量为4.30 mg/L时蒽降解效果较好.一定量的营养盐的添加能在一定程度上促进蒽的降解.共代谢底物乳糖的添加,能使蒽的降解率提高37.15%.对蒽降解过程的初步研究表明,菌株A10对蒽的降解是一个胞外吸附/胞内降解的动态变化过程.红外光谱分析显示,在微生物作用下,蒽的结构发生改变,生成了含有1~2个苯环的芳香酸、芳香酮、芳香醛和饱和碳氢化合物等一系列降解产物.

关键词:蒽;生物降解;烟曲霉;性能

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)05-1298-08

Isolation of an Anthracene-Degrading Strain *Aspergillus fumigatus* A10 and Its Degradation Characteristics

QIANG Jing, YIN Hua, PENG Hui, YE Jin-shao, QIN Hua-ming, HE Bao-yan, ZHANG Na

(Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: An anthracene-degrading strain (A10) was isolated from contaminated environment and identified as *Aspergillus fumigatus*. The experimental results showed that the biodegradation rate of anthracene increased with the increasing time. Between 12-84 h interval, the biodegradation performed rapidly, while after this, the increase of biodegradation rate tended to become slow, and ultimately the biodegradation rate could achieve approximately 83%. The degradation rate of anthracene reached 79.37% within 5 days when the initial concentration of anthracene in mineral salts medium (MSM) was 10 mg/L, the inoculum dosage was 50 g/L (wet weight) and the cell age was 36 h. The concentration of anthracene had notable influence on degradation function of strain A10 and the highest degradation rate (92.17%) was achieved when anthracene concentration was 5 mg/L. The degradation rate could maintain about 60% with initial pH of MSM in the range of 5.0-7.5, and also, the anthracene could be better broken down when the temperature was 30℃ and dissolved oxygen was 4.30 mg/L. Certain amount of nutrition salts promoted the biodegradation of anthracene to some extent. Addition of lactose as co-metabolic substrate most favorably accelerated degradation of anthracene by about 37.15%. The mechanism research revealed that the biodegradation by strain A10 was a dynamic process in which extracellular sorption and intracellular degradation were included. FT-IR analysis exhibited that the structure of anthracene changed with the action of microbe, generating a series of metabolites, such as aromatic acid, aromatic ketone, aromatic aldehyde with one or two benzene rings, as well as saturated hydrocarbons.

Key words: anthracene; biodegradation; *Aspergillus fumigatus*; characteristics

随着社会经济的发展,各国都加快了对油气资源的开发利用.石油在其开采、运输、装卸、使用过程中,给环境带来严重的污染^[1,2].多环芳烃(PAHs)是石油组分中对生态系统破坏性最大的化合物之一,其分量很大,是最常见的石油团块的基本成分之一. PAHs 作为一类持久性有毒有机化合物,难于生物降解,能在生物组织和器官中富集,缓慢、长期地实施其毒性.由于 PAHs 的“三致”效应、生物积累、生物放大等特性,构成了对自然环境的严重污染和人体健康的严重威胁^[3].基于 PAHs 的污染特性,如何治理 PAHs 污染受到了各国环境学者极为密切的关注.大量研究表明,微生物降解是环境中 PAHs 去除

的主要途径^[4~7].与其它清洁技术如焚烧、填埋等相比较,生物降解具有二次污染少、费用低等优点,被认为是最有前途的方法.

目前很多学者对萘、菲等 PAHs 的生物降解,包括对其降解途径均进行了大量研究,取得了较好的成果^[8,9].对于蒽降解的研究,主要是针对菌株的筛选^[10,11],少数学者进行酶学方面的初步探讨^[12,13],有学者利用 GS-MS 进行降解过程的分析^[14,15].然而对

收稿日期:2008-06-23;修订日期:2008-09-08

基金项目:国家自然科学基金项目(50578070, 50778081)

作者简介:强婧(1984~),女,硕士研究生,主要研究方向为水环境污染控制与修复, E-mail: qjing1984@yahoo.cn

* 通讯联系人, E-mail: ohjgc@jnu.edu.cn

于蒽降解条件的研究尚不多见. 本实验探讨 1 株蒽降解菌烟曲霉对蒽的降解性能, 同时利用红外光谱分析蒽降解机制, 以期为蒽的生物修复及代谢途径的进一步研究提供基础数据.

1 材料与方法

1.1 样品采集

从广州石化采集氧化沟污水和回流污泥, 同时采集某加油站附近长期被石油污染的土壤.

1.2 药品与试剂

蒽(纯度 97%)、HPLC 级甲醇购自 Sigma-Aldrich 公司; 葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、酵母粉、CH₂Cl₂、无水 Na₂SO₄、MgSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、MnSO₄·H₂O、FeSO₄·7H₂O、CaCl₂·2H₂O、NH₄NO₃、KH₂PO₄、K₂HPO₄·3H₂O 等均购自广州化学试剂厂, 均为 AR 级.

1.3 培养基与培养条件

营养培养基: 葡萄糖 5 g, 蛋白胨 2 g, 酵母提取物 1 g, 水 1 000 mL, pH = 7.5.

霉菌培养基(PSA): 去皮马铃薯 200 g, 切块, 加水 1 000 mL, 煮沸 30 min, 用纱布滤去马铃薯块, 将滤液补足至 1 000 mL, 加蔗糖 20 g, 无需调 pH 值.

无机盐培养基(MSM): NH₄NO₃ 3 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g, 无机盐溶液 2 mL, 水 1 000 mL, pH = 7.5. 无机盐溶液: MgSO₄·7H₂O 2 g, CuSO₄·5H₂O 0.5 g, MnSO₄·H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.5 g, CaCl₂·2H₂O 0.5 g, 水 500 mL. 以上若是固体培养基, 则加入琼脂 15~20 g/L.

所有培养基经 110℃ 高压蒸汽灭菌 30 min.
培养条件: 如无特别说明, 均为 30℃ 振荡培养, 转速 130 r/min; 恒温培养箱 30℃ 培养.

1.4 蒽降解菌的筛选、分离

将水样和土壤分别按一定比例稀释后接入以蒽为唯一碳源的无机盐培养液及固体培养基中, 分别于摇床或恒温培养箱中培养, 将得到的混合菌经多次划线分离, 得到对蒽有良好耐受性及降解性能的菌株. 此步骤反复多次, 以确保菌株的纯度和降解性能的稳定.

1.5 降解能力测定

将蒽降解菌接入含蒽 10 mg/L 的 MSM 中, 振荡培养 5 d, 取样测定蒽含量.

蒽的萃取方法: 蒽在水中的溶解度约 0.045 mg/L^[16], 在溶液中是以不均匀的晶体状态分布的, 其浓度的测定必须整瓶样品全部萃取. 步骤如下: 调

培养液 pH 为 2.0, 转移至分液漏斗, 用等体积 CH₂Cl₂ 萃取 2 次, 有机相经无水 Na₂SO₄ 脱水, 用旋转蒸发器 40℃ 浓缩, 用 CH₂Cl₂ 将瓶壁黏附物洗下, 转移至色谱进样瓶, 定容至 1 mL. 将其用 HPLC 级甲醇稀释 100 倍, 尽快分析.

蒽的浓度采用高效液相色谱仪测定(Shimadzu, Japan). 分析条件: 分离柱为 C18 反相柱(150 mm); 使用紫外检测器, 检测波长 254 nm; 流动相为甲醇/水(85/15, 体积比), 流速: 1 mL/min; 分析时间: 10 min; 进样量 20 μL. 回收率实验表明该萃取方法对蒽的回收率在 75.7%~107.49% 之间.

1.6 蒽降解菌的鉴定

通过以上筛选、驯化等步骤, 得到 1 株对蒽具有较好降解能力的菌, 根据其形态特征, 初步判断为霉菌. 将其接种于不同培养基, 生长一定时间后, 进行菌落形态观察; 同时进行显微镜形态特征观察. 另外, 提取霉菌 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增产物送至上海英骏生物技术有限公司测序.

1.7 蒽降解性能实验

针对筛选得到的蒽降解菌, 分别考察投菌量、菌龄、蒽浓度、初始 pH、培养温度、营养盐、通氧量、共代谢底物对降解能力的影响.

1.8 蒽降解机制初探

1.8.1 蒽降解模式分析

蒽是一种难溶于水的有机物, 在水中的分布是不均匀的, 其降解主要发生在水-微生物界面^[17]. 初步推测蒽的降解模式为发生在微生物表面的吸附/降解变化过程. 实验设计如下: 将微生物作用一定时间后的水样于 5 000 r/min 下离心 10 min 去菌体, 分别萃取上清液及菌体表面的蒽; 然后, 将经萃取的菌体浸于 CH₂Cl₂ 中, 超声破壁(工作 5 s, 间隔 10 s, 功率 600 W, 超声 50 次), 提取菌体内部的蒽.

1.8.2 蒽降解产物的红外光谱分析

为了解蒽降解过程中活性基团的变化, 进而推测其结构的改变, 用 CH₂Cl₂ 萃取降解 5 d 后的水样, 将萃取液经无水 Na₂SO₄ 脱水、减压蒸馏至一定体积, 用傅里叶变换红外吸收光谱仪(EQUINOX55, 德国布鲁克)分析, 以不加微生物的为对照.

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选结果

通过 2 轮驯化, 得到 9 株对蒽具有较强耐受性的菌. 按 1.5 所述进行降解实验, 各菌的降解率如表 1 所示.

表 1 降解率测定结果¹⁾

Table 1 Results of degradation rate measurement

菌	A1	A2	A3	A4	A5	A7	A8	A9	A10
降解率/%	9.69	—	—	31.99	—	17.81	32.83	12.41	62.09

1) “—”代表降解率接近于 0

由表 1 可以看出, A10 的降解率明显高于其它菌株. 为了确认其降解性, 将一定量 A10 投加到蒽浓度为 10 mg/L 的 MSM 中, 于不同时间取样测定蒽降解率, 绘制降解曲线, 结果见图 1. 从中可知, 蒽降解率随时间的延长而上升, 在 12~84 h, 蒽降解率增长速率较快; 此后降解率的增加趋于平缓, 最终(168 h)能够达到 83% 左右. 说明菌株 A10 对蒽具有较好的降解能力.

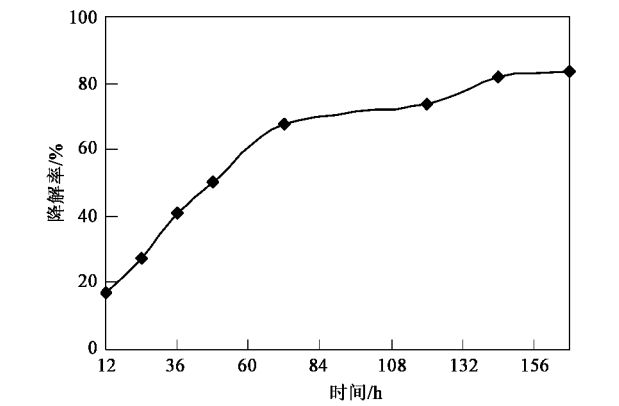


图 1 A10 对蒽的降解曲线

Fig. 1 Degradation curve of anthracene by strain A10

2.2 A10 的鉴定

显微镜观察发现 A10 分生孢子头为球形或半球形, 直径 2.5~4 μm; 顶囊烧瓶状, 直径 20~30 μm, 呈不同程度的浅灰绿色; 产孢结构单层. 分子鉴定显示其 ITS 序列与烟曲霉的同源性达 99.7%; 形态特征与烟曲霉最相似. 因此, 鉴定其为半知菌类从梗孢科曲霉属烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*).

目前, 有学者利用烟曲霉治理污染环境, 主要是关于染料脱色、多酚类化合物生物降解、木质素降解等方面^[18~20], 关于利用烟曲霉降解 PAHs 的研究尚未见报道.

2.3 投菌量对降解率的影响

A10 在 PSA 中生长为淡青色菌丝球(含水率 95.66%), 将培养液经纱布过滤并用双蒸水反复冲洗菌球以去除原有碳源. 按投菌量分别为 10、20、40、50、60、80、100 g/L(以菌体湿重计, 下同), 将 A10 投入 MSM 中(蒽浓度为 10 mg/L, 下同), 振荡培

养 5 d, 测定蒽降解率, 结果如图 2 所示. 从中可知, 投菌量为 10~50 g/L 时, 降解率随投菌量的增大而升高; 但投菌量为 50~100 g/L 时, 降解率稳定在 79% 左右, 并没有呈现出随投菌量增加而继续升高的趋势. 原因在于: 投菌量较多时, 培养液中的营养物质相对不足导致菌体无法得到充足的营养从而影响其生长, 此时菌体发挥降解作用受营养条件的限制, 营养的缺乏使微生物不能产生相关的酶作用于蒽的降解, 因此降解率较低. 图 2 也说明了在降解过程中, 降解率受菌体投加量的影响较大, 但并不是投菌量越多越好. 投菌量为 50~100 g/L 时, 降解率比较接近. 考虑到节约成本等因素, 在以后的实验中选择投菌量为 50 g/L.

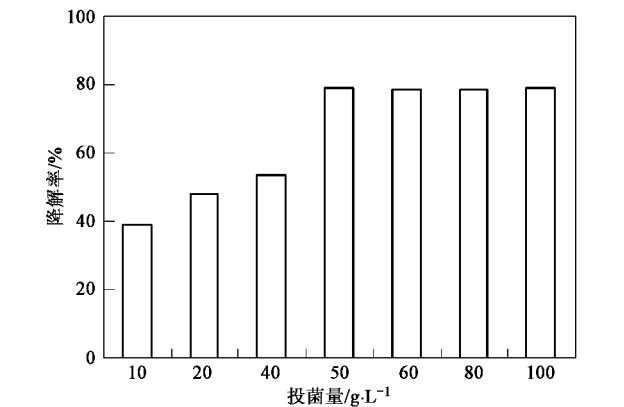


图 2 A10 投菌量对蒽降解率的影响

Fig. 2 Effect of inoculum dosage of A10 on degradation

2.4 菌龄对降解率的影响

将菌龄分别为 24、36、48、60、72 h 的菌株投入 MSM 中, 振荡培养 5 d, 测定蒽降解率, 结果如图 3 所示, 其中显示微生物的菌龄对蒽的降解有较大影响. 在生物降解过程中, 微生物利用有机物作为唯一碳源和能源时, 主要依靠自身产生的酶. 酶活性越大, 降解效果越趋于良好, 而微生物体内酶活性与培养时间相关. 从 24~48 h, 蒽降解率都维持在 70% 以上; 菌龄为 36 h 时, 降解效果最佳(79.37%), 此后, 蒽降解率随菌龄的延长逐渐降低. 出现这种变化的原因在于, 菌龄为 24 h 时, A10 正处于其对数生长

期,已分泌了一定数量的酶,并且酶的活性也处于较为良好的状态;菌龄为 36 h 时,A10 分泌的酶数量最多且活性最佳,所以降解效果最好.此后,随着时间的延长,A10 逐渐进入稳定期后期及衰亡期,其分泌与降解有关的酶的能力减弱,因此蒽降解率下降.由此可知,在接种微生物进行生物降解时,应选择合适的接种时间,以便达到最佳效果,加快生物降解速率.

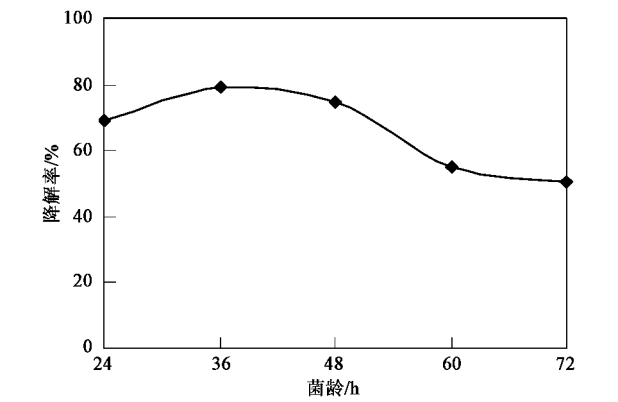


图 3 A10 菌龄对蒽降解率的影响
Fig.3 Effect of cell age of A10 on degradation

2.5 蒽浓度的影响

设置蒽浓度分别为 2、5、10、15、20 mg/L,投加 A10,振荡培养 5 d,测定蒽降解率,结果如图 4 所示.从中可知,蒽浓度为 5 mg/L 时,降解率最大,达 92.17%;而当蒽浓度为 2 mg/L 时,降解率反而较低.原因可能在于此时体系中碳源(蒽)不足,使得菌体生长、繁殖受限,影响了其对蒽的降解.蒽浓度 > 5 mg/L 时,降解率随其浓度的增加而逐渐降低,说明高浓度的蒽对菌体有一定的毒害作用;另外,较高的蒽浓度增加了菌对污染物的适应期,菌株需要对难降解的蒽适应一段时间后,才能开始对其进行有效的降解.此实验反映了污染物浓度的增加可在一定程度上促进菌体对其的降解;但超过某一浓度后,降解率开始下降.

2.6 初始 pH 的影响

调节培养液初始 pH 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、10.0,投加 A10,振荡培养 5 d,测定蒽降解率,结果如图 5 所示.

环境中 pH 值对微生物生长的影响较大,pH 的主要效应是引起细胞膜电荷的变化以及营养物质离子化程度,从而影响微生物对营养物的可利用性^[21].由图 5 可知,在 pH 为 5.0~7.5 时,降解率均能维持在 60% 左右;而当 pH 为 4.0 时,降解率稍低,为 49.41%;pH 为 8.0 和 10.0 时,降解效果更

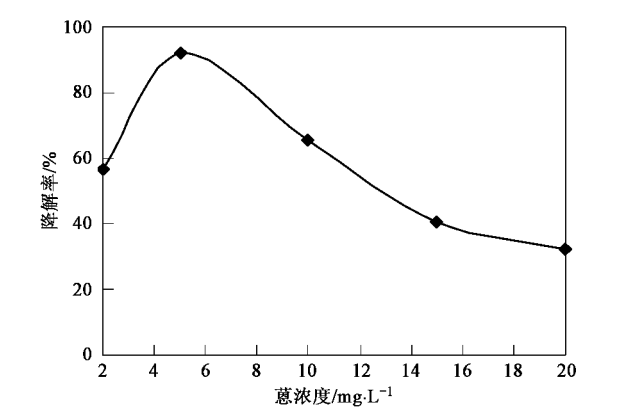


图 4 蒽浓度对降解率的影响
Fig.4 Effect of concentration of anthracene on degradation

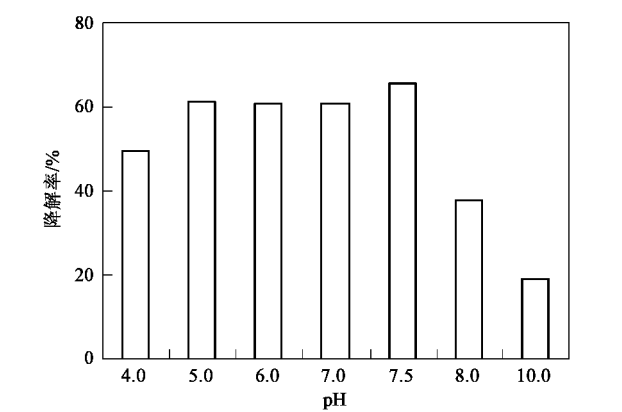


图 5 pH 对蒽降解率的影响
Fig.5 Effect of pH on degradation

差,均低于 40%.这种情况说明菌株 A10 能在 pH 为 5.0~7.5 范围内较好地降解蒽;在 pH 为 4 的较酸环境以及 pH 为 8.0、10.0 的碱度较大的环境中,降解较差;相比起来,A10 对酸性环境的适应强于碱性环境,证明菌株 A10 对体系酸碱度一定范围内的变化具有良好的适应性.Jacques 等^[10]研究了从石化污泥中筛出的 1 株菌 *P. aeruginosa* 312A 对蒽的降解情况.他们的研究表明,菌株 312A 在 pH 为 5.0~9.0 范围内能较好地降解蒽,而在 pH 为 10.0 时,降解率明显下降.这与本实验的结果有类似之处.

2.7 培养温度的影响

考虑到实际环境中温度是变化的,因此应考察不同温度下菌株对蒽的降解情况.培养液接种 A10 后,分别于 20、25、30、35、40℃ 下振荡培养 5 d,测定蒽降解率.发现培养温度为 40℃ 时,培养液已近干,原因为较高温度下,水和蒽的挥发作用增强,水样中蒽的减少主要通过挥发.因此,只测定了 20、

25、30、35℃下葱的降解率,结果如图 6 所示.

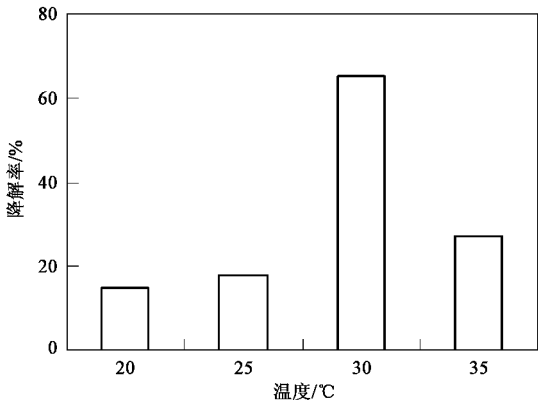


图 6 培养温度对葱降解率的影响
Fig.6 Effect of temperature on degradation

温度直接影响葱降解菌生长代谢和降解活性,与葱的降解密切相关.微生物体内发挥降解作用的酶有其最适温度;当环境温度低于该最适温度时,酶无法发挥其功能;而当环境温度过高,酶可能失活.由图 6 可知,培养温度对葱的降解有非常明显的影响,其最适温度为 30℃,此时葱降解率达 65.37%.从 20~30℃,降解率随温度的升高而增高,但温度从 20℃升至 25℃时,葱降解率变化幅度极小;而当温度升至 30℃时,降解率明显增高;然而,进一步的升温并不能带来更高的降解率.在 35℃时,降解率仅为 27.12%,但从图 6 可以看出,此时葱降解率仍高于 20℃、25℃时的情况.这也说明低温比高温更不利于葱的降解.

2.8 营养盐的影响

设置 8 瓶水样,分别投加 A10. 其中 1 号无任何营养盐;2 号添加 NH_4NO_3 ;3 号添加 K_2HPO_4 ;4 号添加 KH_2PO_4 ;5 号添加 NH_4NO_3 和 K_2HPO_4 ;6 号添加 NH_4NO_3 和 KH_2PO_4 ;7 号添加 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 ;8 号添加 NH_4NO_3 、 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 . 其中 NH_4NO_3 的浓度为 3 g/L, K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 浓度均为 0.5 g/L,振荡培养 5 d,测定葱降解率,结果如图 7 所示,其中非常明显地反映了营养盐的添加对菌株降解葱的影响. 2、6 号为添加了营养盐的样品,但葱的降解率反而低于 1 号;在其它样品中,降解率均高于 1 号,说明添加一定量的营养物质能在一定程度上促进菌株对葱的降解,这是因为菌的生长需要营养物质,但并不是任何一种营养物质都能对葱的降解产生促进作用.实验结果显示,P 盐比 N 盐更能促进菌株 A10 对葱的利用.这 2 种营养盐的共同添加更有利于葱

的降解(8 号样品).

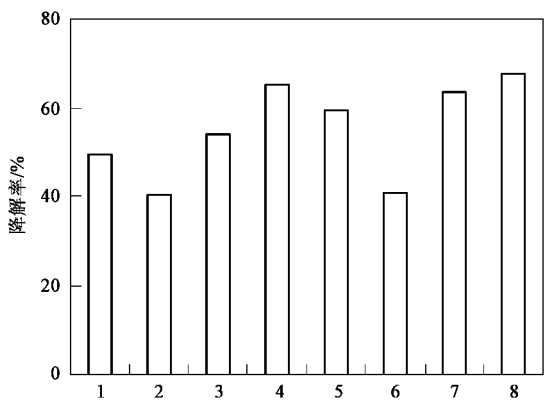


图 7 营养盐对葱降解率的影响
Fig.7 Effect of nutrient salts on degradation

2.9 通氧量的影响

控制培养液通氧量,接种 A10,振荡培养 5 d,测定葱降解率,结果如图 8 所示.从中可知,培养液中 $\text{DO} < 4.30 \text{ mg/L}$ 时,葱的降解率随着通氧量的增加不断升高.这是因为葱降解需要充分的电子受体,而溶解氧是生物降解中优先利用的电子受体.一定含量的溶解氧有利于微生物的生长,因而可加快生物降解速率.同时充足的通氧量能促进菌体对营养物质的摄取,加速代谢物的分散.由于水体中营养物质的限制,当溶解氧浓度上升至一定程度,即使通氧量继续增加,其对降解率的进一步上升也影响不大,甚至出现下降的情况.如图 8 所示,当 DO 为 4.66 mg/L 时,降解率反而处于较低的水平.产生这种情况的原因可能是过高的氧分压对微生物产生了毒性作用.

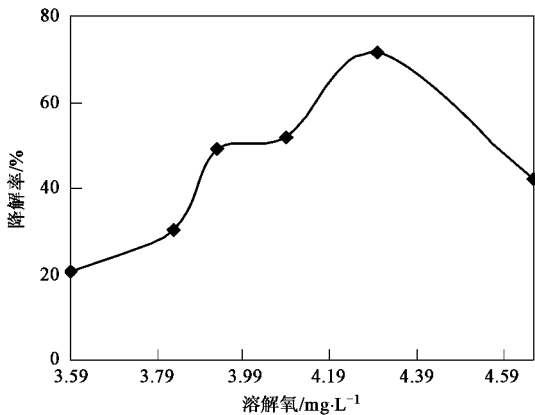


图 8 通氧量对葱降解率的影响
Fig.8 Effect of DO on degradation

2.10 共代谢底物的影响

之前的研究已证实菌株 A10 能够以葱为唯一

碳源和能源生长,但由于 PAHs 是一类难降解物质,本身对微生物有毒害作用,并不是微生物所必需的,微生物对其利用需要一个适应过程.为了缩短微生物的适应期,促进污染物降解,通过添加一些其它微生物易利用的营养物质(一级基质)可能达到这个目的,即共代谢作用^[22].选择葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉、蛋白胨、酵母粉、苯酚、乙酸、水杨酸、琥珀酸钠、石蜡作为微生物降解的一级基质,添加到 MSM 中,其中各底物浓度均为 10 mg/L,培养液接种 A10,振荡培养 5 d,测定蒽降解率,结果如图 9 所示.

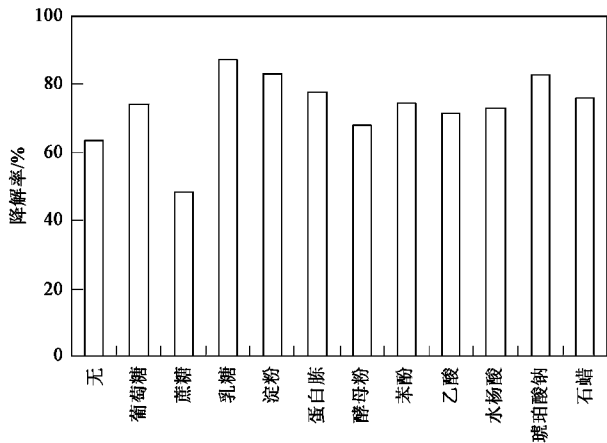


图 9 不同共代谢底物下蒽的降解率

Fig. 9 Degradation rate with different co-metabolic substrates addition

图 9 表示了在有/无一级基质存在时,蒽的降解情况.从中可知,除蔗糖外,其余底物均在不同程度上提高了蒽的降解率.其中,乳糖的促进作用最为明显(降解率提高了 37.15%);而酵母粉的促进作用最弱(降解率仅提高了 7.04%),表明在微生物的共代谢中,采用不同种类的一级基质对降解性能的影响有差异.在有蔗糖存在的情况下,蒽的降解率反而低于对照组(此时的降解率为 48.49%),菌株的降解效能低.产生这种情况的原因在于蔗糖是菌株 A10 较易利用的碳源(A10 的扩大培养中,采用的碳源即为蔗糖).当体系中存在一定量的速效碳源时,菌株大量利用该碳源从而抑制了降解基因的表达,因此蒽的降解较为缓慢. Ambrosoli 等^[23]在研究菲、芘的生物降解时也发现,采用葡萄糖和醋酸盐作为共代谢底物时,前者的效果不及后者,说明速效碳源的添加可能对污染物的降解产生负面影响. Lee 等^[24]研究了外加碳源对恶臭假单胞菌 G7 降解萘的影响,结果表明,丙酮酸盐不会抑制萘的生物降解从而能够被作为外加碳源以促进降解菌的生长.本实验证明了其余 10 种底物可加速蒽降解,和蒽无竞争

抑制作用.

3 蒽降解机制初步研究

3.1 降解模式分析

按 1.8.1 所述进行实验.用峰面积表征残留蒽浓度,结果见表 2. 从中可知,上清液中蒽的残留最少;菌体表面吸附了一定量的蒽,部分残留的蒽进入了菌体内部.这反映出蒽的微生物降解过程是:菌体首先将蒽吸附于其表面,之后蒽进入菌体逐渐被降解,即这是一个胞外吸附/胞内降解的过程.

表 2 菌体表面/内部残留蒽含量			
Table 2 Residual anthracene in external/internal strain			
不同部位的蒽	离心后上清液	菌体表面	菌体内部
蒽的峰面积	111 898.1	324 171.5	330 482.4

为了更详细地了解蒽的吸附/降解动态变化过程,连续 7 d 按照同样的方法进行实验,结果见图 10. 从中可知,上清液中蒽残留最少,并且随着时间的延长呈下降趋势;减少的蒽一部分是因为降解,一部分是吸附于菌体表面.在 3~4 d 内,菌体表面和内部的蒽含量呈相反的变化,由此推断此时大量蒽吸附于菌体表面还未进入内部,已进入内部的蒽被降解;也有可能降解作用发生在水-微生物界面.之后,表面吸附的蒽进入菌体内部被降解.在降解后期(5~7 d),各部分的蒽含量变化不大,基本平稳,表明此时吸附/降解过程达到平衡. Xia 等^[17]研究了黄河沉积物对 PAHs 生物降解的影响,结果表明,PAHs 能够被吸附于固相颗粒上从而使其降解发生于水-沉积物界面.结合本实验结果,证明 PAHs 的吸附/降解这种模式是存在的.

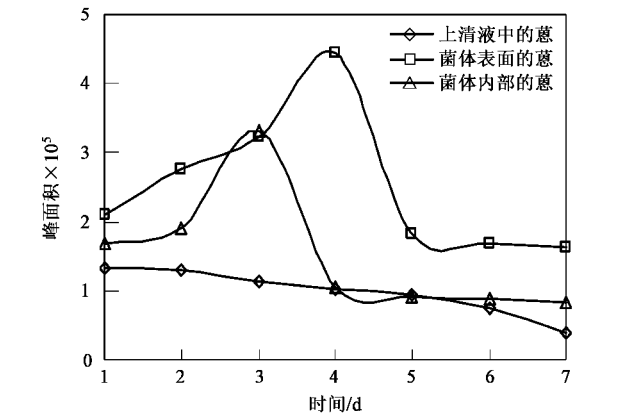


图 10 微生物作用下蒽的吸附/降解动态变化过程

Fig. 10 Dynamic process of sorption/degradation of anthracene

3.2 傅里叶红外光谱结果分析^[25]

利用 FT-IR 分析微生物作用 5 d 后, 有机物结构的变化, 结果如图 11、12.

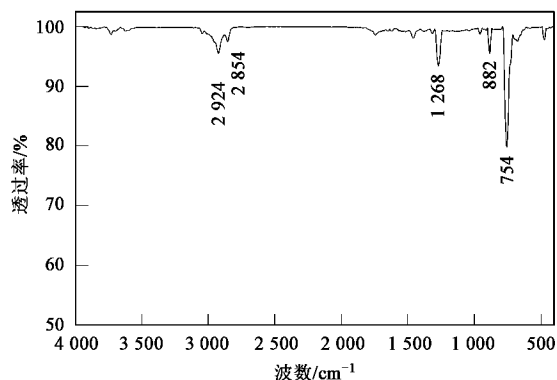


图 11 空白样 FT-IR 扫描图

Fig. 11 FT-IR spectra of sample without strain

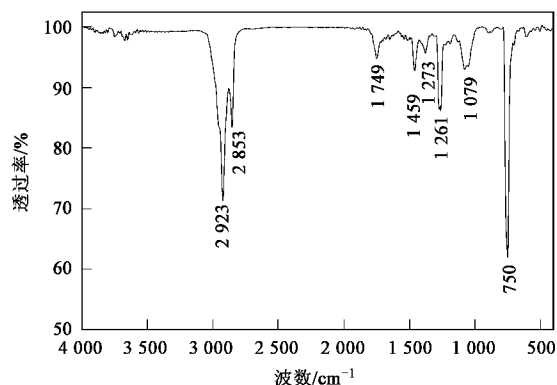


图 12 加菌样品 FT-IR 扫描图

Fig. 12 FT-IR spectra of sample with strain

图 11 中, 2923 cm^{-1} 、 2853 cm^{-1} 处的峰来自于 CH_3 、 CH_2 、 CH 基团中 C-H 伸缩振动. 根据葱的结构推测, 此处的吸收峰是 CH . 峰强度随分子中 CH 数目的增多而增强. A10 降解 5 d 后, 此峰明显增强, 可能由于苯环中的 $\text{C}=\text{C}$ 断开形成 CC , 从而产生了 CH 或 CH_2 . 说明葱经微生物降解后生成饱和碳氢化合物.

与图 11 相比, A10 降解 5 d 后增加了 1749 cm^{-1} 、 1079 cm^{-1} 这 2 个峰. $1758\sim 1735\text{ cm}^{-1}$ 是芳香酸的特征峰; $1225\sim 1075\text{ cm}^{-1}$ 的峰是 $\text{CCC}=\text{O}$ 骨架振动. 此两处的峰说明产物中含有芳香酸和芳香酮的结构.

$1600\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ 的峰来自于苯环 $\text{C}=\text{C}$ 键伸缩

振动. 图 12 中, 1459 cm^{-1} 的峰增强, 原因可能是产物中苯环结构的物质增多. 降解后葱的 3 个苯环断开, 生成了具有 1 个或 2 个苯环的物质.

$1320\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ 的峰是芳香醛的特征峰. 图 12 中, 此范围内的峰 (1273 、 1261 cm^{-1}) 比图 11 中的峰有所增强, 说明葱的降解产物中也存在醛基.

苯环上孤立的 $=\text{CH}$ 键面外弯曲振动峰多数在 $900\sim 860\text{ cm}^{-1}$ 区. 图 11 中 882 cm^{-1} 处的峰在图 12 中消失. 此处的峰代表葱的三环结构的中间那个苯环上的孤立氢. 微生物作用后此峰消失, 说明三环结构被打开生成 2 环或 1 环的化合物从而使结构中不存在孤立氢.

4 个相邻氢的苯核在 $770\sim 735\text{ cm}^{-1}$ 出现强吸收峰, 同时在 $710\sim 690\text{ cm}^{-1}$ 区无吸收峰, 此时 $770\sim 735\text{ cm}^{-1}$ 的峰是邻位双取代苯核的特征峰. 图 11、12 中, 此范围内均有强吸收峰出现. 图 11 中 754 cm^{-1} 的峰来自于葱结构中两侧苯环上的 4 个相邻氢. 当苯环上取代基减少, 相邻氢增多时, 特征峰往低波数处移动, 吸收也随之加强. 图 12 中, 750 cm^{-1} 的峰吸收增强, 说明降解后苯环断开使相邻氢增多.

通过以上分析可推知, 葱降解过程中, 三环结构被破坏, 生成了含有 1~2 个苯环的芳香酸、芳香酮、芳香醛及饱和碳氢化合物等一系列降解产物.

4 结论

(1) 筛选到 1 株对葱具有良好降解能力的烟曲霉 A10.

(2) A10 的投菌量为 50 g/L 、菌龄为 36 h 时, 降解效果最佳. 培养液初始 pH 值、温度、营养盐、通氧量在一定程度上影响葱的降解效果.

(3) 降解体系中添加共代谢底物乳糖能最大程度地促进葱的降解.

(4) 葱的降解是一个胞外吸附/胞内降解的动态变化过程.

(5) 红外扫描分析显示在微生物作用下, 葱的结构发生改变, 生成含有 1~2 个苯环的芳香酸、芳香酮、芳香醛及饱和碳氢化合物等一系列降解产物.

参考文献:

- [1] 胡凌燕, 孙东平, 边晖, 等. 生物处理石油污染的研究概况 [J]. 生物学杂志, 2006, 23(3): 1-3.
- [2] Sarkar D, Ferguson M, Datta R, et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation [J]. Environ Pollut, 2005, 136(1): 187-195.

- [3] Sartoros C, Yerushalmi L, Béron P, *et al.* Effects of surfactant and temperature on biotransformation kinetics of anthracene and pyrene [J]. *Chemosphere*, 2005, **61**(7): 1042-1050.
- [4] Herwijnen R V, Wattiau P, Bastiaens L, *et al.* Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Sphingomonas* sp. LB126 [J]. *Res Microbiol*, 2003, **154**(3): 199-206.
- [5] Moon H S, Kahng H Y, Kin J Y, *et al.* Determination of biodegradation potential by two culture-independent methods in PAH-contaminated soils [J]. *Environ Pollut*, 2006, **140**(3): 536-545.
- [6] Johnsen A R, Wick L Y, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil [J]. *Environ Pollut*, 2005, **133**(1): 71-84.
- [7] Ladislao B A, Real J L, Beck A J. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal tar contaminated soil under in-vessel composting conditions [J]. *Environ Pollut*, 2006, **141**(3): 459-468.
- [8] Tao X Q, Lu G N, Dang Z, *et al.* A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils [J]. *Process Biochem*, 2007, **42**(3): 401-408.
- [9] 贾燕, 尹华, 叶锦韶, 等. 假单胞菌 N7 的蒽降解特性及其降解途径研究 [J]. *环境科学*, 2008, **29**(3): 756-762.
- [10] Jacques R J S, Santos E C, Bento F M, *et al.* Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2005, **56**(3): 143-150.
- [11] Santos E C, Jacques R J S, Bento F M, *et al.* Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. [J]. *Biores Technol*, 2008, **99**(7): 2644-2649.
- [12] Eibes G, Chau T L, Feijoo G, *et al.* Complete degradation of anthracene by Manganese Peroxidase in organic solvent mixtures [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **37**(4): 365-372.
- [13] Eibes G, Cajthaml T, Moreira M T, *et al.* Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone [J]. *Chemosphere*, 2006, **64**(3): 408-414.
- [14] Binet P, Portal J M, Leyval C. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass [J]. *Org Geochem*, 2001, **32**(2): 217-222.
- [15] Cajthaml T, Erbanová P, Šašek V, *et al.* Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus [J]. *Chemosphere*, 2006, **64**(4): 560-564.
- [16] 朱利中, 冯少良. 混合表面活性剂对多环芳烃的增溶作用及机理 [J]. *环境科学学报*, 2002, **22**(6): 774-778.
- [17] Xia X H, Yu H, Yang Z F, *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the natural waters of the Yellow River: Effects of high sediment content on biodegradation [J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(3): 457-466.
- [18] Wang B E, Hu Y Y, Xie L, *et al.* Biosorption behavior of azo dye by inactive CMC immobilized *Aspergillus fumigatus* beads [J]. *Biores Technol*, 2008, **99**(4): 794-800.
- [19] Monica C D, Sylvain G, Nathalie M, *et al.* Degradation of procyanidins by *Aspergillus fumigatus*: Identification of a novel aromatic ring cleavage product [J]. *Biochimie*, 2006, **88**(12): 1899-1908.
- [20] Sahoo D K, Gupta R. Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent [J]. *Process Biochem*, 2005, **40**(5): 1573-1578.
- [21] 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1996. 40-42.
- [22] 臧淑艳, 李培军, 周启星, 等. 苯并(a)芘及其代谢产物的连续降解研究 [J]. *环境科学*, 2006, **27**(12): 2531-2535.
- [23] Ambrosoli R, Petruzzelli L, Minati J L, *et al.* Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions [J]. *Chemosphere*, 2005, **60**(9): 1231-1236.
- [24] Lee K, Park J W, Ahn I S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 [J]. *J Hazard Mater*, 2003, **105**(1-3): 157-167.
- [25] 谢晶曦. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1987. 152-165.