

苯并[a]芘高效降解菌筛选及其降解特性研究

刘海滨,王翠苹,张志远,许伟,郝智能,孙红文*

(南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程及基准教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要: 为获得苯并[a]芘(BaP)污染修复的新菌株,通过梯度提高无机盐培养基(MSM)中BaP浓度的方法,本研究从北京焦化厂污染土壤中筛选出1株能够对液体中高浓度BaP(100 mg/L)降解的霉菌,鉴定结果为可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)。并首次对*L. theobromae*在液体中降解BaP的性能进行了研究。结果表明,*L. theobromae*能够利用BaP作为唯一碳源和能源,实验进行10 d, BaP降解率为 $52.5\% \pm 1.5\%$ 。与察氏无机盐体系(CMM)相比,MSM更适合*L. theobromae*的生长,后者比前者中BaP的10 d降解率高2.8个百分点,MSM中加入土豆培养基(PDA)在降解初期显著提高了BaP的降解速率,第2 d时BaP降解率提高了19.2个百分点;但后期促进效果减弱,10 d后BaP降解率比单纯MSM体系高5.4个百分点。*L. theobromae*可耐受较广的pH范围,在pH=5时对BaP的降解率最高。底物水杨酸和琥珀酸钠促进了*L. theobromae*对BaP的降解,10 d降解率分别提高了6.2个百分点和4.2个百分点。*L. theobromae*同样能降解高浓度的菲和芘,三者单独和混合加入时,10 d的降解率分别是 $70.0\% \pm 1.0\%$ 、 $59.2\% \pm 3.2\%$ 和 $52.5\% \pm 1.5\%$,及 $21.6\% \pm 2.1\%$ 、 $14.5\% \pm 5.5\%$ 和 $11.9\% \pm 2.2\%$ 。对三者的降解能力:菲>芘>BaP,但是三者混合存在时,单个多环芳烃的降解率均降低。本研究为环境多环芳烃污染修复提供了新的修复菌种。

关键词: 菌株筛选; 菌株鉴定; 可可毛色二孢菌; BaP; 多环芳烃; 液体降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)09-2696-07

Isolation of Highly-effective Benzo[a]pyrene Degrading Strain and Its Degradation Capacity

LIU Hai-bin, WANG Cui-ping, ZHANG Zhi-yuan, XU Wei, HAO Zhi-neng, SUN Hong-wen

(Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: One new mycete, which could degrade high concentration (up to 100 mg/L) of benzo[a]pyrene (BaP) in liquid, was isolated from contaminated soil of Beijing Coking Plant by gradually increasing the concentration of BaP in mineral salt medium (MSM) in order to get new microorganism species for remediation of BaP contamination. The strain was identified as *Lasiodiplodia theobromae*, and its biodegradation ability in liquid was further investigated. The results showed that *L. theobromae* could utilize BaP as sole carbon and energy sources. The experiment was conducted for 10 days, and the biodegradation rate of BaP was $52.5\% \pm 1.5\%$. Compared to Czapek's mineral medium, MSM was more suitable for *L. theobromae*, and biodegradation rate was 2.8 percent greater than that by using Czapek's mineral media after 10 days' cultivation. Potato-dextrose nutrient medium could accelrate the biodegradation in early stage, and biodegradation rate of BaP increased by 19.2 percent in the second day. However, the accelration was not significant in the latter period, biodegradation rate was only increased by 5.4 percent after 10 days' cultivation. *L. theobromae* could tolerate a wide pH range, with the optimum pH of 5. Addition of salicylic and sodium succinate enhanced the biodegradation rates by 6.2 percent and 4.2 percent, respectively, after 10 days' cultivation. Besides BaP, *L. theobromae* could also degrade high concentration (200 mg/L) of phenanthrene and pyrene, and the biodegradation rates were $70.0\% \pm 1.0\%$, $59.2\% \pm 3.2\%$, and $52.5\% \pm 1.5\%$ when they were single substrate and were $21.6\% \pm 2.1\%$, $14.5\% \pm 5.5\%$, and $11.9\% \pm 2.2\%$ when they existed in mixture, respectively. The biodegradation rate followed an order of phenanthrene > pyrene > BaP. The co-existence of the three substrates led a reduction in biodegradation. This study provides a new microorganism species for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in the environment.

Key words: isolation; identification; *L. theobromae*; BaP; PAHs; biodegradation in liquid

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是环境中广泛存在的有机污染物,因为某些PAHs具有“三致”效应,16种PAHs被美国环保局列为环境优先监测污染物^[1],其中五环的PAH——苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)因其高的致癌和致畸作用而被广泛关注,是中国环境主要污染物

之一^[2]。

收稿日期: 2010-10-22; 修订日期: 2010-12-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2008AA06Z333); 国家自然科学基金项目(20907024); 天津市基础研究重点项目(10JCZDJC24200)

作者简介: 刘海滨(1986~),男,硕士研究生,主要研究方向为生物修复技术,E-mail: rmphaoyoulhb@163.com

* 通讯联系人, E-mail: sunhongwen@nankai.edu.cn

微生物修复技术是去除 PAHs 污染最主要的方式^[3]。虽然,微生物修复技术具有经济、高效、适用范围广等优点,但是 PAHs 污染的微生物修复却因高环(四环以上)PAHs 的难降解性而受到限制^[4]。研究者发现了一系列的菌株能够降解、共代谢氧化或是矿化部分高环多环芳烃,其中包括红球菌、洋葱伯克氏菌、少动鞘氨醇假单胞菌等,它们能以四环多环芳烃(如芘和蒽)为唯一的碳源和能源进行降解作用,但能够利用 BaP 作为唯一的碳源和能源进行降解的菌株非常少见。Boonchan 等^[5]报道了由真菌-微紫青霉菌和细菌-嗜麦芽糖寡养单胞菌组成的复配菌群可以利用 BaP 作为唯一的碳源和能源进行降解,但 2 株菌单独使用时都不能利用其作为唯一的碳源和能源,这增加了实际修复中的难度。Rafin 等^[6]筛选出 1 株腐皮镰孢霉菌,能以 BaP 为唯一的碳源和能源进行降解,但对 BaP(100 mg/L)的 12 d 降解率仅为 4%。因此,筛选 1 株能单独、高效降解 BaP 的菌株具有科学价值和环境污染修复现实意义。

本研究从北京焦化厂污染土壤中筛选分离出 1 株能够高效降解 BaP 的活性菌株——*Lasiodiplodia theobromae*,其作为 BaP 高效降解菌进行研究尚属首次,为生物修复增加了新的菌种。对 *L. theobromae* 在液体中 BaP 降解性能进行了详细研究,为其应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试土壤

分离筛选菌种所用土样为北京焦化厂长期受 PAHs 污染的土壤。

1.1.2 试剂

菲(PHE)、芘(PYR)(Acros organics, New Jersey, USA)和 3,4-苯并[a]芘(BaP)(TCI, Tokyo, Japanese);甲醇(色谱纯,上海瑞尔化学有限公司);其它溶剂与试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 BaP 降解菌的筛选

参考并适当改进文献[5,7~9]的方法,从焦化厂污染土壤中驯化筛选能降解 BaP 的菌株。具体方法:45 mL 无机盐培养基(MSM)^[7]中加入 5 g 焦化厂污染土壤和 20 颗玻璃珠,摇床振荡培养 12 h 后静置。取 5 mL 静置分层后的上清液于含有 45 mL MSM(BaP 浓度 25 mg/L)的灭菌三角瓶中,30℃、

150 r/min 避光振荡培养。5 d 后,取 5 mL 菌液转移至 BaP 浓度为 50 mg/L 的 MSM 中,重复上述步骤,依次提高 BaP 浓度为 25、50、75、100 mg/L。在富集培养过程中,在 MSM 中加入了少量葡萄糖(每 100 mL MSM 加入 0.1 g 葡萄糖)加快微生物生长。在加入 BaP 丙酮储备液的同时加入 1 mL 的甲醇促进 BaP 在 MSM 中的溶解。

将最后一周期的培养液涂布于含有 BaP(100 mg/L)的牛肉膏固体培养基^[10]和土豆培养基(PDA)^[11]平板(60 mg/L 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)上,30℃ 恒温培养。菌落生长至大小适中后,经过数次平板划线分离后得到单一 BaP 降解细菌和真菌。上述所有操作都在无菌条件下进行。

1.2.2 菌悬液的制备

无菌条件下,从斜面上挑取一环菌,接种于液体营养培养基中,真菌和细菌分别置于 30℃,150 r/min 的摇床上培养 24 h 和 72 h。培养后的菌液 3 000 r/min 离心分离 20 min,倒掉上清液,加入一定量的灭菌 MSM 清洗,重复上述清洗步骤 3 次,用 MSM 定容得到所需浓度的菌悬液。

1.2.3 BaP 液体降解实验

无菌条件下,加入 18 mL MSM 于 50 mL 三角瓶中,2 mL 菌悬液和一定体积的 BaP 丙酮储备液和 1 mL 甲醇,使细胞或菌丝湿重浓度分别达到 10^4 个/mL 或 0.01 g/mL^[5],BaP 的浓度达到 100 mg/L,30℃、150 r/min 条件下避光振荡培养。分别在 1、2、4、7、10 d 取样测定 BaP 的残留量。空白对照实验采用高温灭菌(121℃,30 min)菌悬液。各实验组中每一处理均为 3 个重复。

在上述研究基础上,分别研究不同培养基(MSM, CMM 和 PDA(1 mL)-MSM)、MSM 的 pH 值、添加水杨酸和琥珀酸钠(200 mg/L)为底物、以及单独及混合的 PHE 和 PYR(200 mg/L)共底物对菌株降解 BaP 的影响。

1.2.4 PHE、PYR 和 BaP 分析方法

PHE、PYR 和 BaP 的提取:由于 BaP 的低溶解性及丙酮和甲醇的挥发,可能会造成降解过程中少量 BaP 晶体的析出,因此采用整瓶批次取样的方法减少实验误差。液体样品全部转入 40 mL 美国 EPA 标准瓶中,用 20 mL 乙酸乙酯振荡萃取残留目标污染物 3 次,合并提取液于梨形瓶中旋转蒸发至 2 mL,转移至安谱瓶,氮气吹干后,甲醇定容,用 HPLC 分析。

HPLC(Agilent1200, 美国)测定条件:色谱柱:

Venusil XBP C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 150 Å, Agela Technologies) 反相色谱柱; 流动相: 甲醇/水 (9/1, 体积比); 流速: 1.00 mL/min; 紫外检测器; 波长: 249 nm (PHE)、238 nm (PYR) 和 263 nm (BaP); 进样量: 1 μL.

应用此方法测定样品中 PHE、PYR 和 BaP 的回收率均大于 90%, 含量的计算已经对于可回收部分进行了校正.

1.3 数据处理方法

差异显著性测验采用 SPSS 13.0 版数据处理软件完成.

2 结果与讨论

2.1 BaP 降解菌的筛选和鉴定

焦化厂污染土壤中共筛出 5 株降解 BaP 的活性菌株. 其中细菌两株, 分别命名为 B-1 和 B-2; 真菌 3 株, 分别命名为 F-1、F-2 和 F-3, 制备 5 株菌的菌悬液后进行 MSM 中 BaP (100 mg/L) 液体降解实验, 10

d 后测定菌株对 BaP 的降解能力 (见表 1).

表 1 筛选菌株的 BaP 降解率比较
Table 1 Comparison of biodegradation rates of benzo[a] pyrene among the screened strains

菌株	细菌		真菌		
	B-1	B-2	F-1	F-2	F-3
BaP 降解率/%	17.8	26.2	52.5	33.4	23.6

选取细菌和真菌中降解效率高的菌株 B-2 和 F-1, 送至中科院微生物研究所鉴定, 根据培养形态、细胞形态、生理生化数据和基因序列数据进行分析.

菌株 B-2 的鉴定结果为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), *P. aeruginosa* 是文献中常见的多环芳烃降解菌^[12,13], 本文对其未做深入研究.

菌株 F-1 的鉴定结果为 *L. theobromae*, 其形态见图 1, 与薛振南等^[14]描述的肉桂枝枯病菌及杨卫君等^[15]描述的杨木变色菌相似, 两者鉴定为 *L. theobromae*. *L. theobromae* 作为 BaP 降解菌进行鉴定尚属首次.

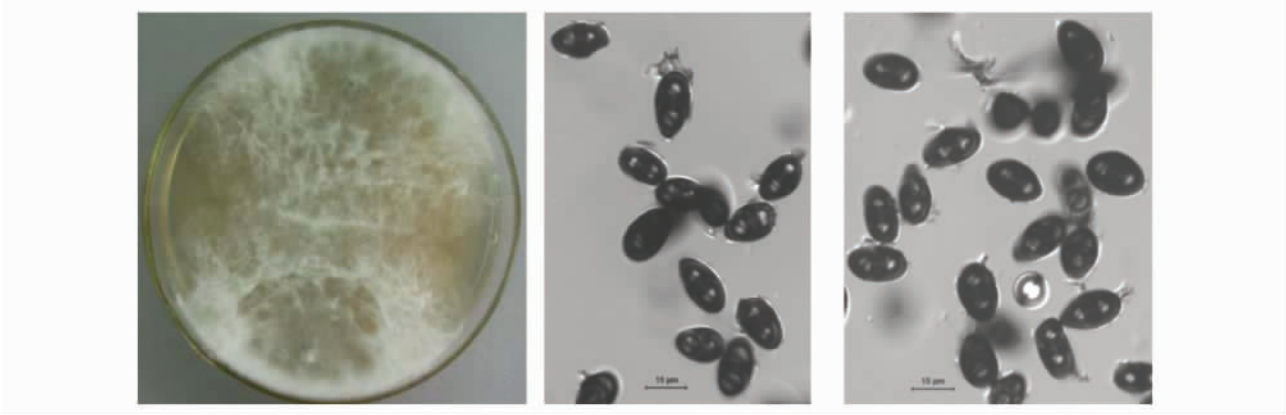


图 1 可可毛色二孢菌的形貌特征
Fig. 1 Morphological characterization of *L. theobromae*

薛振南等^[14]报道 *L. theobromae* 可导致树枝表面形成病斑, 最终深达木质部, 造成病变部位肿胀呈溃疡斑. 从描述可以判断其类似白腐真菌对树木木质部溃疡腐烂过程, 推测 *L. theobromae* 可分泌木质素降解酶系, 这些酶可能对 BaP 降解起主要作用, 并且分泌的这些胞外酶将 PAHs 转变成水溶性更高的代谢产物^[16], 本课题组在研究中讨论了黄孢原毛平革菌分泌木质素酶系对 PAHs 的降解机制^[11]. 这是首次发现 *L. theobromae* 对 BaP 有好的降解特性, 因此, 对其降解性能和最优条件进行了较系统的研究.

2.2 不同培养基体系对 *L. theobromae* 降解性能的影响

图 2 描述了 *L. theobromae* 分别在 MSM、察氏培养基的无机盐 (CMM) 和 PDA-MSM 复合体系 (MSM 中加入 1 mL PDA) 中对 BaP 的 10 d 降解情况. 首先对比研究了用于 *L. theobromae* 筛选的 MSM 和用于霉菌培养的 CMM 效果. 两体系中 *L. theobromae* 在初始阶段均未出现降解迟滞现象, 这是因为在菌株的驯化筛选过程中, *L. theobromae* 能够适应高浓度 (100 mg/L) 的 BaP, 并能对其进行快速的降解. 实验的降解结果都有一个共同的趋势, 前 4 d 降解速率快, 随后出现缓慢的趋势. 苏丹等^[17]提到按照反应动力学理论, 起初反应系统 BaP 浓度较大, 因而反应速度较快, 随后出现的缓慢趋势的原因为: 其一, BaP 浓度降低导致反应速度减慢; 其二, BaP 不易被

微生物利用的主要原因是水溶性低, BaP 降解过程是逐步进行的, 反应体系中存在一系列的转化中间产物, 他们的分子结构中有一些亲水基团, 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. 因此, 中间产物与 BaP 也可能发生竞争代谢. 而且, 一些中间产物有着与 BaP 相似的“K”区和“湾”区结构, 它们对微生物的毒性作用往往更强, 中间产物的毒性积累也可能造成微生物降解速率降低^[18].

在第 4 d, MSM 和 CMM 中 BaP 的降解率分别是 $41.0\% \pm 4.0\%$ 和 $25.2\% \pm 2.1\%$, 前者比后者要高 15.8 个百分点. 但是在降解整体趋势上, MSM 与 CMM 相近, 第 10 d, 两体系中 BaP 的降解率分别为 $52.5\% \pm 1.5\%$ 和 $48.3\% \pm 1.4\%$.

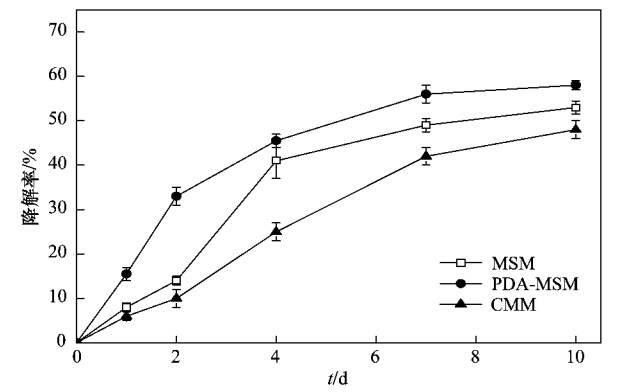


图 2 MSM、CMM 及 PDA-MSM 中 *L. theobromae* 对 BaP 的降解

Fig. 2 Biodegradation rates of benzo[a]pyrene by *L. theobromae* in MSM, CMM and MSM added by Potato-dextrose medium

微生物的生长需要多种营养物质及某些微量营养元素, 需要维持一定量的 C、N、P 比例. 许多研究者^[19]指出 PAHs 微生物修复需要最佳的 C:N:P 比值, 而白腐真菌对 PAHs 的降解一般需要高 C/N 的培养条件, 在非优化条件下, 其产酶量大大降低, 从而降低 PAHs 的降解^[20]. MSM 和 CMM 中的 C:N:P 比值分别为 630:10:8.6 和 95:10:5, 前者中 C/N 值明显高于后者, 且前者含有 Ca、Mn、Zn、Mo 等微量元素, 这些可能都是 MSM 在对 BaP 的初期降解效率优于 CMM 的原因. 因此, 选择 MSM 为液体降解培养基. 但结果显示 CMM 替代 MSM 对于 *L. theobromae* 降解 BaP 的影响不显著 ($p > 0.05$), 可能是因为两者都可以提供足够无机营养盐, *L. theobromae* 对无机盐体系中 C、N 和 P 的比例及微量元素要求并不苛刻有关.

从图 2 可以看出, 在 MSM 和 PDA-MSM 两培养体系中 *L. theobromae* 对于 BaP 的降解在前 4 d 为快速降解过程, 其降解率分别达到 $41.0\% \pm 3.8\%$ 和 $45.5\% \pm 1.5\%$. 之后进入慢速降解过程, 在第 10 d 时降解率分别为 $52.5\% \pm 1.5\%$ 和 $58.2\% \pm 1.1\%$, 仅比第 4 d 的降解率提高了 11.5 个百分点和 12.7 个百分点.

PDA-MSM 复合体系中, 初期 *L. theobromae* 对于 BaP 的降解有明显的优势, 特别是在前 2 d, 降解率提高了 19.2 个百分点, 但随着降解时间的延长, 降解促进作用逐渐减弱, 在第 10 d 时, 两体系中 BaP 的降解率趋于相近, 前者比后者中 BaP 降解率提高了 5.4 个百分点.

苏丹等^[21]和刘世亮等^[22]指出加入碳源是促进菌株对多环芳烃降解的重要途径. 实验室前期研究发现葡萄糖能促进白腐真菌对 BaP 的降解. 本研究不是加入单一碳源, 而是加入了 *L. theobromae* 的生长培养基——含有大量碳源的营养物 PDA, 使得 BaP 初始降解率得到提高. 这是因为培养基改变了微生物的碳源和能源的底物结构, 增加了微生物繁殖; 同时, 也增大了其对碳源和能源的选择范围, 促进了 *L. theobromae* 孢子的萌发和降解酶的分泌, 使难降解的 BaP 最终被降解; 而且土豆培养基中的碳源在氧化过程中产生 NADH, 为降解酶提供辅助因子^[21,22], 进而提高微生物对 BaP 的降解率. 此种加入废弃培养基的修复方法更易于在实际微生物修复工程应用. 但结果显示, PDA 的加入对于 *L. theobromae* 降解 BaP 影响并不显著 ($p > 0.05$), 这可能是因为 *L. theobromae* 能以 BaP 为唯一的碳源和能源进行降解, 因此弱化了额外碳源加入对于 *L. theobromae* 降解 BaP 的促进作用, 这也是 *L. theobromae* 区别于其它依靠共代谢才能降解 BaP 的微生物的优势.

2.3 pH 对 *L. theobromae* 降解 BaP 的影响

文献[19,20]报道, 除了营养物质, 无机离子和微量元素外, 体系 pH 对于 BaP 的降解效率有很大的影响. 本研究考察了不同 pH (2~12) 条件下, *L. theobromae* 在 MSM 中培养 2 d 和 7 d 时对 BaP 的降解状况 (图 3). 在所考察的 pH 条件下, *L. theobromae* 对 BaP 均有降解作用, 但降解率不同. 在 pH=5 时, 菌株对 BaP 降解效果最好, 2 d 和 7 d 的降解率分别为 $15.5\% \pm 1.1\%$ 和 $49.8\% \pm 2.5\%$.

L. theobromae 在较宽的 pH 范围内 (2~12) 对 BaP 都有一定的降解效果, pH 对于 *L. theobromae* 降

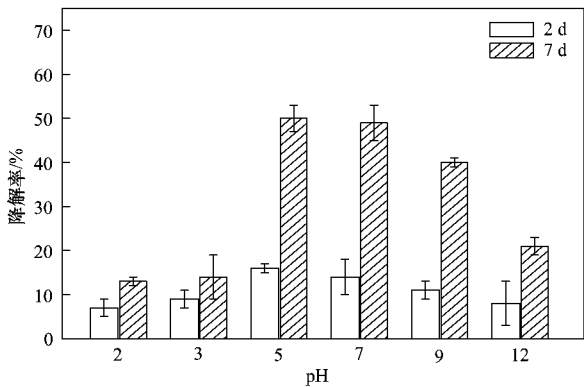


图3 不同 pH 下 *L. theobromae* 对 BaP 的降解
Fig. 3 Biodegradation rates of BaP by *L. theobromae* under different pH

解 BaP 的影响并不显著($p > 0.05$),可见菌株对于体系 pH 的耐受范围很广,因此具有广泛的实际应用价值. 这与杨卫君等^[15]报道的 *L. theobromae* 在 pH 值 2 ~ 11 范围内均能生长,最低可生长 pH 值为 2,最适 pH 值为 5 ~ 8 的结论相一致. 同时,也与薛振南等^[14]报道的 *L. theobromae* 最适 pH 为 5.5,在偏酸性的环境中生长和孢子萌发较好相符. *L. theobromae* 在碱性的体系下对 BaP 降解效果优于酸性的体系,可能是因为 BaP 在降解过程中会产生一些酸性的降解中间产物,一定程度地加重了酸性和中和了碱性^[23].

2.4 水杨酸和琥珀酸钠对 *L. theobromae* 降解 BaP 的影响

图 4 显示了加入底物水杨酸和琥珀酸钠 (200 mg/L) 对 *L. theobromae* 在 MSM 中降解 BaP 的影响. 第 10 d,在加入水杨酸和琥珀酸钠的体系中 BaP 的降解率提高了 6.2 个百分点和 4.2 个百分点,两者

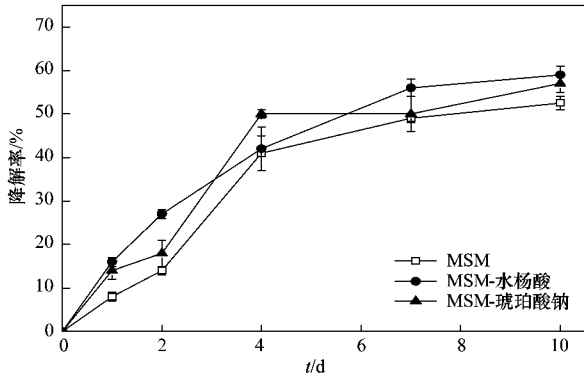


图4 添加不同代谢底物时 *L. theobromae* 对 BaP 的降解
Fig. 4 Biodegradation rates of benzo[a]pyrene by *L. theobromae* with addition of different metabolism media

提高幅度相差不大,水杨酸略优. Rentz 等^[24]在研究水杨酸促进 *S. yanoikuyae* JAR02 对 BaP 的降解和矿化时提到,水杨酸的水溶性高、无毒以及能够被微生物完全降解的特性使得它在 PAHs 的共代谢降解中得到广泛的应用.

文献中提到在一定共代谢底物存在时,能够提供足够的碳源和能源供微生物生长,并诱导产生相应的降解酶促进对 BaP 进行降解^[25]. 共代谢底物可以是与 BaP 结构相似的有机物,或者是其代谢中间产物:如琥珀酸钠、水杨酸、联苯、邻苯二甲酸等^[26]. 本研究中所筛选的 *L. theobromae* 能够利用 BaP 作为唯一的碳源和能源,但体系中加入底物(水杨酸和琥珀酸钠)时,BaP 降解率也有所提高,说明底物加入改变了微生物的碳源和能源的底物结构,从而增大了其对碳源和能源的选择范围,促进了 *L. theobromae* 孢子的萌发和降解酶的分泌,进而提高微生物的降解率. 结果显示,水杨酸和琥珀酸钠的加入对于 *L. theobromae* 降解 BaP 的促进作用不显著($p > 0.05$),原因应与 PDA 加入对 BaP 降解促进作用不显著相似.

2.5 PHE、PYR 共存对 *L. theobromae* 降解 BaP 的影响

图 5 描述了 *L. theobromae* 在 MSM 中对 PHE (200 mg/L)、PYR(200 mg/L) 和 BaP(100 mg/L) 单独加入和混合加入时的降解效率. 单独存在时,三者在第 10 d 降解率分别为 70.0% ± 1.0%、59.2% ± 3.2% 和 52.4% ± 1.5%;而混合存在时,降解率分别为 21.6% ± 2.1%、14.5% ± 5.5% 和 11.9% ± 2.2%. 底物混合存在时,单个化合物降解率均明显下降.

L. theobromae 对 PHE、PYR 和 BaP 的降解效率

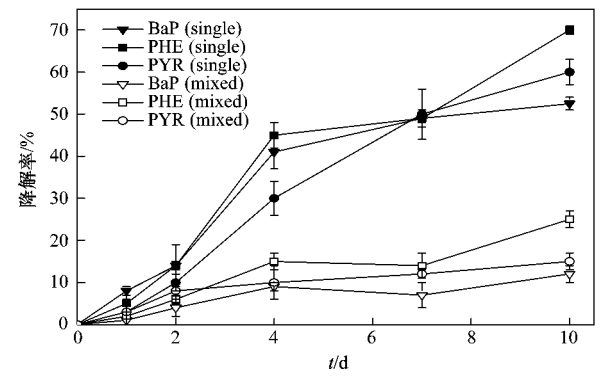


图5 *L. theobromae* 对 PHE、PYR 和 BaP 的降解比较
Fig. 5 Comparison of biodegradation rates of PHE, PYR and BaP by *L. theobromae*

为, $PHE > PYR > BaP$, 与三者的苯环数呈反比. 这与很多报道一致, 取决于 PAHs 的毒性、溶解度及可降解性等因素^[11]. 从图 5 中还可以看出, 在降解的后期, 虽然 3 种多环芳烃的降解都趋于缓慢, 但 PHE 和 PYR 的降解曲线还有继续上升的趋势, 同样表明 *L. theobromae* 对低环芳烃的降解能力要强于高环芳烃.

PHE 和 PYR 等低环 PAHs 共存时, 菌株对 BaP 的降解存在不同的影响. 巩宗强等^[27]报道 PHE 的存在促进了镰刀菌对 BaP 的降解, 却抑制了青霉菌和毛霉菌对 BaP 的降解; PYR 的存在抑制青霉菌对 BaP 的降解, 镰刀菌和毛霉菌对 BaP 的降解基本不受影响. 张锡辉等^[28]概括了共代谢的特点, ①微生物用一种易于摄取初级底物作为碳和能量来源; ②有机污染物作为第二底物被降解; ③污染物与初级底物存在竞争; ④污染物的共代谢产物对细胞可能有毒害作用. 结果显示, PHE 和 PYR 的加入对 *L. theobromae* 降解 BaP 有显著影响 ($p < 0.05$), 臧淑艳等^[29]提到低分子量 PAHs 作为外加碳源对于促进微生物降解 BaP 的作用有一定的局限性: 一方面它们可能与 BaP 共同使用同一种降解酶, 无法避免竞争性抑制作用; 另一方面这些添加物本身也具有一定毒害性, 存在对微生物的危害风险. 这也可能是 *L. theobromae* 对 BaP 的降解率没有因为 PHE 和 PYR 这些低分子量 PAHs 的加入而提高, 反而, 使得 BaP 的降解效率显著下降的原因. 同时也证实了 *L. theobromae* 对 BaP 降解受水杨酸和琥珀酸钠的影响机制区别于 PHE 和 PYR 低环 PAHs 共存时的影响机制.

3 结论

(1) *L. theobromae* 能够利用 BaP 作为唯一碳源和能源进行降解, BaP 的 10 d 降解率为 $52.5\% \pm 1.5\%$; MSM 比 CMM 更适合 *L. theobromae* 的生长, 后者比前者中 BaP 的 10 d 降解率高 2.8 个百分点; PDA 能够促进 *L. theobromae* 对 BaP 的降解, 在初期效果明显, 2 d 降解率提高了 19.2 个百分点, 但随着降解时间延长, 两者的差别逐渐减小, 在第 10 d, 仅比 MSM 中的 BaP 的降解率提高了 5.4 个百分点.

(2) *L. theobromae* 对 pH 值有比较广泛的耐受范围, 在 pH 为 2~12 条件下均能降解 BaP, 在 pH = 5 时, 降解效果最好, 2 d 和 7 d 的降解率分别为 $15.5\% \pm 1.1\%$ 和 $49.8\% \pm 2.5\%$.

(3) 加入底物水杨酸和琥珀酸钠能够提高 *L.*

theobromae 对 BaP 的降解, 10 d 降解率分别提高了 6.2 个百分点和 4.2 个百分点.

(4) *L. theobromae* 同样能够降解高浓度 (200 mg/L) 的 PHE 和 PYR, 三者单独和混合存在时, 10 d 降解率分别是 $70.0\% \pm 1.0\%$ 、 $59.2\% \pm 3.2\%$ 和 $52.5\% \pm 1.5\%$ 及 $21.6\% \pm 2.1\%$ 、 $14.5\% \pm 5.5\%$ 和 $11.9\% \pm 2.2\%$. 三者的降解能力: $PHE > PYR > BaP$; 混合存在时, 单个化合物的降解率降低.

参考文献:

- [1] Kanaly R A, Harayama S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2000, **182**(8): 2059-2067.
- [2] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 真菌对土壤中苯并[a]芘的共代谢降解[J]. 环境科学研究, 2001, **14**(6): 36-39.
- [3] Gao D W, Liang H, Du L N, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosa* isolated from the boreal forest in Northeast China[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, **9**(41): 6888-6893.
- [4] 张银萍, 王芳, 杨兴伦, 等. 土壤中高环多环芳烃微生物降解的研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, **37**(2): 280-288.
- [5] Boonchan S, Britz M L, Stanley G A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(3): 1007-1019.
- [6] Rafin C, Veignie E, Fayeulle A, et al. Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins[J]. Bioresource Technology, 2009, **100**(12): 3157-3160.
- [7] Tao X Q, Lu G N, Dang Z, et al. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils[J]. Process Biochemistry, 2007, **42**(3): 401-408.
- [8] 陈晓鹏, 易筱筠, 陶雪琴, 等. 石油污染土壤中芘高效降解菌群的筛选及降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2008, **2**(3): 413-417.
- [9] Vaishampayan P A, Kanekar P P, Dhakephalkar P K. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. Strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium from rhizospheric soil[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, **60**(4): 273-278.
- [10] 侯树宇, 张清敏, 余海晨, 等. 多环芳烃芘高效降解菌的筛选及其降解性能的研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2006, **39**(2): 71-74.
- [11] Wang C P, Sun H W, Li J M, et al. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils[J]. Chemosphere, 2009, **77**(6): 733-738.
- [12] 张宏波, 林爱军, 刘爽, 等. 芘高效降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2010, **31**(1): 243-248.
- [13] 强婧, 尹华, 彭辉, 等. 铜绿假单胞菌 S6 分泌的生物表面活性

性剂特性[J]. 环境科学学报, 2009, **29**(1): 102-110.

[14] 薛振南, 黄式玲, 李孝忠. 肉桂枝枯病菌及其生物学特性研究[J]. 广西农业生物科学, 2003, **22**(4): 275-279.

[15] 杨卫君, 王有科, 赵桂华, 等. 杨木变色菌的分离鉴定及其生物学特性的研究[J]. 湖北农业科学, 2009, **48**(5): 1225-1228.

[16] Warshawsky D, Ladow K, Schneider J. Enhanced degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. in conjunction with green alga[J]. Chemosphere, 2007, **69**(3): 500-506.

[17] 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.

[18] Zang S Y, Li P J, Li W X, *et al.* Degradation mechanisms of benzo [a] pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation [J]. Chemosphere, 2007, **67**(7): 1368-1374.

[19] Klinge C, Gejlsbjerg B, Ekelund F, *et al.* Effects of sludge-amendment on mineralization of pyrene and microorganisms in sludge and soil [J]. Chemosphere, 2001, **45**(4-5): 625-634.

[20] 宁大亮, 王慧, 王立华, 等. 难降解有机物对白腐真菌 P450 的诱导及 P450 的作用 [J]. 中国环境科学, 2009, **29**(4): 407-412.

[21] 苏丹, 李培军, 王鑫. 共基质对 10 株细菌降解芘的作用 [J]. 应用生态学报, 2007, **18**(3): 636-640.

[22] 刘世亮, 骆永明, 吴龙华, 等. 污染土壤中苯并[a]芘的微生物共代谢修复研究 [J]. 土壤学报, 2010, **47**(2): 364-369.

[23] Zang S Y, Li P J, Yu X C, *et al.* Degradation of metabolites of benzo [a] pyrene by coupling *Penicillium chrysogenum* with KMnO_4 [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, **19**(2): 238-243.

[24] Rentz J A, Alvarez P J, Schnoor J L. Benzo [a] pyrene degradaton by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02 [J]. Environmental Pollution, 2008, **151**(3): 669-677.

[25] 董春娟, 吕炳南. 处理生物难降解物质的有效方式——共代谢 [J]. 化工环保, 2003, **23**(2): 82-85.

[26] 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.

[27] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 真菌对土壤中苯并[a]芘的共代谢降解 [J]. 环境科学研究, 2001, **14**(6): 36-39.

[28] 张锡辉, Bajpai R. 以关键酶为基础共代谢模型的建立——以甲烷细菌共代谢三氯乙烯为例 [J]. 环境科学学报, 2000, **20**(5): 558-562.

[29] 臧淑艳, 李培军, 张英, 等. 污染土壤中苯并[a]芘的微生物降解途径研究进展 [J]. 生态学杂志, 2006, **25**(8): 978-982.