

# 苜蓿根瘤菌对多氯联苯降解转化特性研究

徐莉, 滕应, 骆永明\*, 李振高

(中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室, 南京 210008)

**摘要** 采用溶液摇瓶实验研究了苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)对三氯代联苯(2,4,4'-trichlorobiphenyl)单体以及 18 种多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)混合物的降解转化能力。结果表明, 接入苜蓿根瘤菌转化 7d 后, 随着溶液中底物 2,4,4'-TCB 浓度的增加, 该菌株对其的降解能力也逐渐提高, 在 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度条件下该菌对 2,4,4'-TCB 的降解率分别为 34.0%、48.3%、69.7%、96.0%、98.5%, 并且通过气相色谱分析, 发现溶液中出现了一些新的代谢产物。同时, 苜蓿根瘤菌对不同浓度下 18 种 PCBs 同系物混合物的降解能力, 随着底物浓度的升高呈现出从低到高, 然后降低, 并趋于平衡的趋势, 其最高降解率可达 54.7%, 并存在高氯代 PCBs 向低氯代 PCBs 的转化过程。

**关键词** 苜蓿根瘤菌; 多氯联苯; 微生物降解; 生物转化

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)01-0255-05

## Effects of *Rhizobium meliloti* on PCBs Degradation and Transformation in Solution Culture

XU Li, TENG Ying, LUO Yong-ming, LI Zhen-gao

(Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

**Abstract** The capability of *Rhizobium meliloti* on degrading 2,4,4'-trichlorobiphenyl and 18 kinds of polychlorinated biphenyl congener mixtures was studied by shaking flask experiment. The results showed that the degradation capability of *Rhizobium meliloti* to 2,4,4'-trichlorobiphenyl increased gradually with the increasing concentration of 2,4,4'-trichlorobiphenyl. After 7 days, the degradation rates of 2,4,4'-trichlorobiphenyl under 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 mg·L<sup>-1</sup> concentration of 2,4,4'-trichlorobiphenyl were 34.0%, 48.3%, 69.7%, 96.0%, 98.5% respectively. Meanwhile some new intermediate products were found in the solution culture. The capability of *Rhizobium meliloti* on degrading 18 kinds of polychlorinated biphenyls congener mixtures appeared in a trend from low to high, then decreased to a certain balance with the increasing concentration of the mixture. The highest degradation rate was 54.7%, and moreover, a transformation process from higher chlorinated PCBs congeners to lower chlorinated PCBs congeners emerged.

**Key words** *Rhizobium meliloti*; polychlorinated biphenyls; microbial degradation; biotransformation

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是国际上关注的持久性有机污染物之一, 它的微生物降解及其在土壤中的消减行为成为研发 PCBs 污染土壤生物修复技术的关键环节<sup>[1,2]</sup>。自从 1973 年 Ahmed 和 Focht 筛选出 2 株能降解卤代联苯的无色杆菌(*Achromobacter*)以来, 至今已分离出多株种能够降解 PCBs 的细菌菌株。其中根瘤菌作为一种特殊菌种, 在环境中具有 2 种存在状态, 即游离态和共生态, 引起了广大研究者的兴趣<sup>[3,4]</sup>。Damaj 等<sup>[5]</sup>发现, 游离态的根瘤菌能够耐受并且转化 PCBs。随后 Mehmannaavaz 等<sup>[6]</sup>发现与紫花苜蓿共生状态下的根瘤菌可以在一定程度下促进植物对 PCBs 污染土壤的修复。最近, 本课题组的研究也发现接种苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)不仅能够促进紫花苜蓿的生长, 而且显著促进紫花苜蓿对土壤 PCBs 污染的修复, 同时在植物的根瘤中积累了高浓度的 PCBs<sup>[7,8]</sup>。那么, 苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)本身是否可以

降解 PCBs, 其降解途径如何等, 这些都几乎没有相关报道, 亟待进一步的研究。由于细菌通常对低氯代 PCBs 同系物具有较好的降解能力, 特别是 Komancova 等<sup>[9]</sup>已提出了关于假单胞菌对低氯代 2,4,4'-trichlorobiphenyl(2,4,4'-TCB)单体存在的可能转化途径。鉴于此, 本实验拟以苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)作为供试菌株, 采用液体摇瓶转化实验来研究该菌株对低氯代 PCBs, 即 2,4,4'-TCB 单体以及 18 种包括从二氯到十氯代的 PCBs 混合物的降解能力, 并初步探讨其对 PCBs 转化的可能过程, 以期为进一步研发 PCBs 污染土壤的根瘤菌修复

收稿日期: 2008-09-05 修订日期: 2009-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(40621001, 40701080); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB410809); 中国科学院知识创新工程项目(KZCX2-YW-404)

作者简介: 徐莉(1981~), 女, 博士, 主要研究方向为土壤环境微生物生态及其生物修复, E-mail: xuli602@126.com

\* 通讯联系人, E-mail: ymluo@issas.ac.cn

及其与植物联合修复技术提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 苜蓿根瘤菌的发酵培养

供试菌株:苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*),由中国农业科学院提供。甘露醇酵母汁琼脂培养基(YMA)组成:甘露醇 10.0 g,磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ ) 0.5 g,硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.2 g,氯化钠(NaCl) 0.1 g,酵母汁(1%) 100 mL,碳酸钙( $CaCO_3$ ) 3.0 g,蒸馏水 900 mL,固体培养基中加入 18.0 g·L<sup>-1</sup>琼脂粉。先将菌种接种于 YMA 固体平板上 28℃活化 24 h,后接入 50 mL YMA 液体种子培养基中扩大培养,然后以 1%的接种量再次转接到 50 mL YMA 液体培养基中 28℃ 200 r·min<sup>-1</sup>培养 48 h。

### 1.2 PCBs 的苜蓿根瘤菌转化实验

将上述发酵培养的苜蓿根瘤菌悬液离心,收集菌体,用 pH 7.0 的 0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液洗涤 2 次,然后转入同体积的不同浓度 PCBs 的无机盐培养基中 28℃ 200 r·min<sup>-1</sup>转化 7 d,以接入灭活菌液处理为对照。

转化液由无机盐培养基添加 PCBs 组分制成,分为 2 组,一组是以 2,4,4'-TCB 为唯一碳源,设计 5 个浓度梯度,1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mg·L<sup>-1</sup>;另一组是以 18 种 PCBs 的混合物作为碳源,也设计 5 个浓度梯度(按照每个单体的浓度)0.1、0.2、0.5、1、2 mg·L<sup>-1</sup>,总浓度梯度为 1.8、3.6、9、18、36 mg·L<sup>-1</sup>。

无机盐培养基配方为:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.7g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 5.2g, NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g,微量金属盐溶液 1mL,补水至 1000 mL。

微量金属盐溶液(去离子水 1000 mL):FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.3 g, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.038 g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.02 g, ZnCl<sub>2</sub> 0.014 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.0124 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.04 g, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.0034 g。

标准 PCBs 混合样品(PCB8、18、28、52、44、66、101、77、118、153、138、126、128、180、200、170、206、209)和 2,4,4'-TCB 标准样品均购自北京百灵威化学技术有限公司。

### 1.3 转化液中 PCBs 的提取和测定

苜蓿根瘤菌对 PCBs 转化后,采用等体积(50 mL)的乙酸乙酯萃取 3 次,加入无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水,后旋转蒸发至干,以正己烷定容待测。其中乙酸乙酯、正己烷均为色谱纯。采用带有电子俘获检测器和自

动进样器的 Varian 3800 型气相色谱仪分析。色谱柱:CP-sil 24CB(30 m×0.25 mm×0.25 mm),进样温度为 260℃,检测器温度为 300℃。程序升温:初始温度为 120℃,0.5 min,10℃·min<sup>-1</sup>梯度升温至 180℃,持续 1 min,然后 15℃·min<sup>-1</sup>梯度升温至 250℃,持续 25 min。无分流进样 1 μL,载气为高纯氮,流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,用外标法进行测定。

### 1.4 2,4,4'-TCB 转化产物的 GC/MS 分析

将上述提取浓缩的样品用于 GC/MS 分析,使用 TraceGC/PolarisQ 气相色谱/质谱联用仪,色谱柱为 DB-5MS,程序升温:80℃保持 2.0 min,8.0℃·min<sup>-1</sup>升至 160℃,4.0℃·min<sup>-1</sup>升至 270℃,保持 25 min。进样口温度为 250℃,传输线温度为 270℃,载气为氦气,流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。进样量为 1 μL,电离源为 EI 源,离子源温度 250℃,扫描质量范围为 50~450 u。

### 1.5 数据处理方法

降解率(%)=(灭菌处理溶液浓度-活菌处理溶液浓度)/灭菌处理溶液浓度×100%

数据偏差分析以及图形制作均在 Excel 2003 中完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 苜蓿根瘤菌对溶液体系单体 2,4,4'-TCB 的降解转化效率

由表 1 可见,接入苜蓿根瘤菌转化 7 d 后,溶液中 2,4,4'-TCB 降解率显著增加,与灭菌对照相比,在 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mg·L<sup>-1</sup>浓度条件下该菌对 2,4,4'-TCB 的降解率分别达到了 34.0%、48.3%、69.7%、96.0%、98.5%,并且随着底物浓度的增加,苜蓿根瘤菌对其的降解能力逐渐增加。这与 Cho 等<sup>[10]</sup>的研究结果类似,即在低浓度范围内,微生物对 PCBs 的降解率随其底物浓度的增加而呈直线增加,最后达到平稳。这可能是由于微生物对污染物的降解过程是一种酶促降解过程,底物的浓度可以影响酶促反应,在一定范围内,即底物浓度不对微生物产生毒害作用时,底物浓度的增加可以促进微生物自身降解酶的诱导形成,从而提高对底物的降解效率<sup>[11]</sup>。

苜蓿根瘤菌对单体 2,4,4'-TCB 降解转化的 GC 图谱如图 1 所示。从中可知,相比于灭菌处理(对照)活菌处理下,底物 2,4,4'-TCB 的色谱峰大大减小,并且出现一系列小峰,这些可能是菌种自身的代谢产物,也有可能是 2,4,4'-TCB 的转化产物,因此

表 1 苜蓿根瘤菌对不同浓度 2,4,4'-TCB 的降解率

Table 1 Degradation rate of 2,4,4'-TCB by *Rhizobium meliloti* under different concentrations

项目	初始浓度/mg·L <sup>-1</sup>				
	1.0	5.0	10.0	25.0	50.0
灭菌对照溶液浓度	0.68 ± 0.06	2.25 ± 0.34	3.65 ± 0.60	7.44 ± 1.10	21.8 ± 2.59
活菌处理溶液浓度	0.45 ± 0.01	1.17 ± 0.76	1.17 ± 0.17	0.30 ± 0.15	0.33 ± 0.17
降解率/%	34.0	48.3	69.7	96.0	98.5

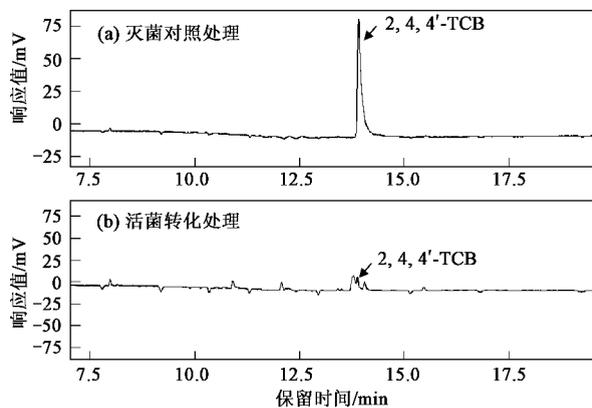


图 1 苜蓿根瘤菌对 2,4,4'-TCB 的转化作用

Fig. 1 Transformation of 2,4,4'-TCB by *Rhizobium meliloti*

本实验采取气相色谱联用的方法进一步对产物结构进行分析.

## 2.2 苜蓿根瘤菌对单体 2,4,4'-TCB 的降解产物初步分析

苜蓿根瘤菌对 2,4,4'-TCB 转化的 GC/MS 结果如图 2 所示. 从中可以看出, 灭菌对照的 GC/MS 图谱中, 除了底物 2,4,4'-TCB (保留时间为 21.02 min) 外, 还存在一些杂峰, 这些峰可能是苜蓿根瘤菌的自身分泌物. 经苜蓿根瘤菌转化处理后, 底物 2,4,4'-TCB 的质谱峰几乎全部消失, 同时在质谱图中出现了一些在灭菌对照图谱中没有的新峰, 如保留时间为 36.34 min 的峰, 但与质谱自带的标准谱图库进行

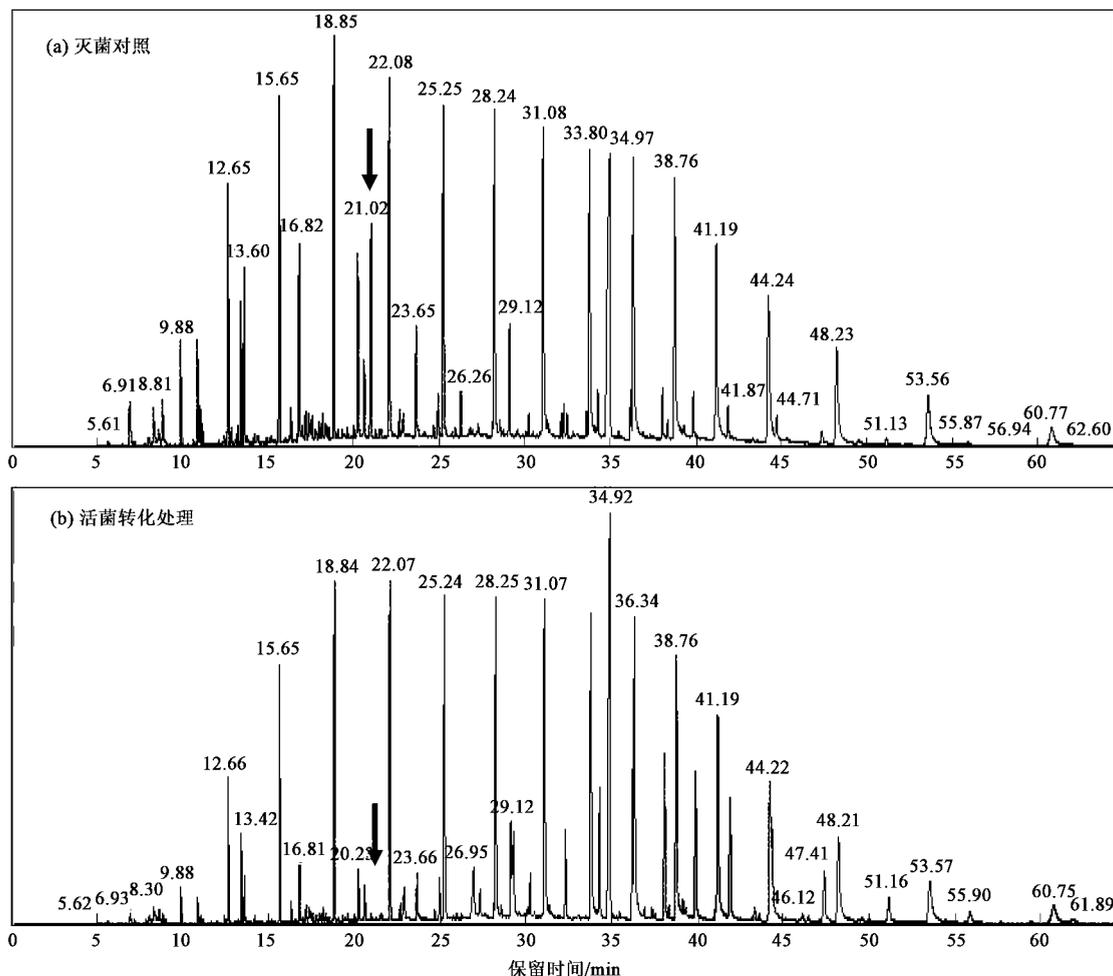


图 2 苜蓿根瘤菌对 2,4,4'-TCB 的转化 GC/MS 图谱

Fig. 2 GC/MS figure of the transformation of 2,4,4'-TCB by *Rhizobium meliloti*

比对,并没有找到相应的产物结构,无法确定是何物质.同时,根据现有文献报道<sup>[9]</sup>的假单胞菌降解 2,4,4'-TCB 的可能代谢产物 2,4-二氯苯甲酸也没有在本实验转化产物中发现.究其原因,一方面可能转化产物浓度很低,并且很可能为羟基化合物,而气质联用对此类物质检测灵敏度较低,因而未能测出.另一方面,苜蓿根瘤菌在转化过程中可能伴随自身代谢分泌物的产生,这些杂质未能去除,从而影响了产物的分析.因此,如何纯化产物,提高产物浓度,进而确定苜蓿根瘤菌代谢 2,4,4'-TCB 的中间产物,还有待在方法学上开展进一步的深入研究.

### 2.3 苜蓿根瘤菌对 PCBs 混合物的降解效果

由表 2 可以看出,苜蓿根瘤菌对不同浓度的 PCBs 混合物的降解效率总体低于对单体 2,4,4'-TCB 的降解效率,这与 PCBs 混合物中存在难以降解、甚至对菌体存在毒性的高氯 PCBs 同系物有关.接入苜蓿根瘤菌培养 7 d 后,溶液中 18 种 PCBs 的降解率明显增加,与灭菌对照相比,在 1.8、3.6、

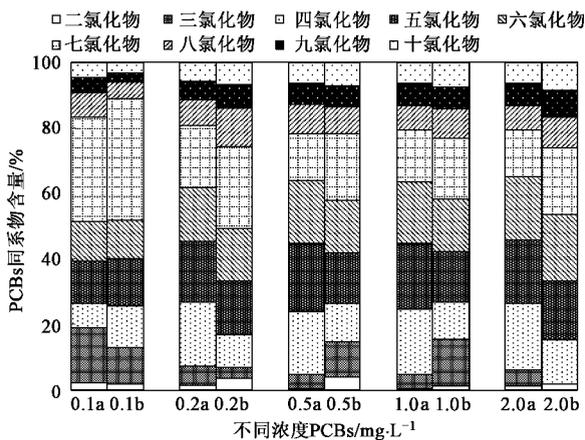
9.0、18.0、36.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度条件下其降解率分别达到 23.8%、38.4%、54.7%、41.0%、48.7%,呈现出降解能力随浓度增高,然后又有所降低,并趋于平衡的趋势.这与酶促反应的特点相一致.可见,苜蓿根瘤菌对 PCBs 的降解存在浓度效应,低浓度的 PCBs 可能达不到菌株的反应浓度要求,其降解率偏低.随着浓度增加,降解率逐渐增加,而较高浓度的 PCBs 可能会对菌株产生了一定程度的毒害作用,从而抑制根瘤菌对其的降解.

从图 3 苜蓿根瘤菌对不同浓度 PCBs 同系物的降解效果可知,低氯成分的 PCBs (< 6 氯)的含量总体呈现减少的趋势,则高氯组分含量增加.这符合低氯 PCBs 组分容易被微生物转化,而高氯组分不易被转化的一般规律<sup>[3,12]</sup>.此外,在 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 1.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度下,二氯、三氯的低氯代 PCBs 组分的含量却出现了显著增加,推测在苜蓿根瘤菌的转化过程中可能存在高氯代化合物向低氯代化合物的转化过程.

表 2 苜蓿根瘤菌对不同浓度 PCBs 混合物的降解率

Table 2 Degradation rate of mixed PCBs by *Rhizobium meliloti* under different concentrations

项目	初始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				
	1.8	3.6	9.0	18.0	36.0
灭菌对照溶液浓度	$0.84 \pm 0.14$	$2.28 \pm 0.29$	$5.08 \pm 0.62$	$11.1 \pm 0.25$	$22.4 \pm 1.88$
活菌处理溶液浓度	$0.64 \pm 0.04$	$1.40 \pm 0.94$	$2.30 \pm 0.52$	$6.55 \pm 0.65$	$11.5 \pm 0.34$
降解率/%	23.8	38.4	54.7	41.0	48.7



a: 转化前, b: 转化后

图 3 苜蓿根瘤菌转化不同浓度 PCBs 同系物的含量变化

Fig. 3 Mass fraction of PCBs congeners under transformation of *Rhizobium meliloti*

## 3 结论

(1) 苜蓿根瘤菌能够转化降解多种 PCBs,特别

是低氯的 PCBs 同系物.在对 2,4,4'-TCB 的转化过程中,随着底物浓度的增加,根瘤菌的降解效率不断增加,最高达到了 98.5%,同时产生一些新的代谢产物.

(2) 菌株在转化 PCBs 混合物的过程中,其降解效率随浓度增加逐渐增加,最高达到 54.7%,但由于 PCBs 混合物中存在难以转化和毒性较大的高氯 PCBs 同系物,因而苜蓿根瘤菌对 PCBs 混合物的降解能力要低于 PCBs 单体.苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)对 PCBs 降解具有一定的潜力.

参考文献:

- [1] Xing Y, Lu Y L, Richard W D, et al. A spatial temporal assessment of pollution from PCBs in China[J]. Chemosphere, 2005, **60**(6):731-739.
- [2] Wagner-Döbler I, Bennisar A, Vancanneyt M, et al. Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**(8):3014-3022.
- [3] Ahmed M, Focht D D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of achromobacter[J]. Can J Microbiol, 1973, **19**(1):47-

- 52.
- [ 4 ] Ahmad D , Mehmannaavaz R , Damaj M. Isolation and characterization of symbiotic  $N_2$ -fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic/chloroaromatic hydrocarbons : PAHs and PCBs [ J ]. Int Biodeterior Biodegradation , 1997 , **39**( 1 ) 33-43.
- [ 5 ] Damaj M , Ahmad D. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by rhizobia : a novel finding [ J ]. Biochem Biophys Res Commun , 1996 , **218**( 3 ) 908-915.
- [ 6 ] Mehmannaavaz R , Prasher S O , Markarian N , *et al.* Biofiltration of residual fertilizer-nitrate and atrazine in saturated and unsaturated sterile soil columns [ J ]. Environ Sci Technol , 2001 , **35**( 8 ) :1610-1615.
- [ 7 ] 徐莉 , 滕应 , 张雪莲 , 等. 多氯联苯污染土壤的植物-微生物联合田间原位修复 [ J ]. 中国环境科学 , 2008 , **28**( 7 ) :646-650.
- [ 8 ] 滕应 , 骆永明 , 高军 , 等. 多氯联苯污染土壤菌根真菌-紫花苜蓿-根瘤菌联合修复效应 [ J ]. 环境科学 , 2008 , **29**( 10 ) :2925-2930.
- [ 9 ] Komancova M , Jurcova I , Kochankova L , *et al.* Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by *Pseudomonas* sp. 2 [ J ]. Chemosphere , 2003 , **50**( 4 ) 537-543.
- [ 10 ] Cho Y C , Sokol R C , Rhee G Y. Kinetics of polychlorinated biphenyl dechlorination by Hudson River , New York , USA , sediment microorganism [ J ]. Environ Toxicol Chem , 2002 , **21**( 4 ) :715-719.
- [ 11 ] 方振炜 , 徐德强 , 张亚雷 , 等. 2,6-二叔丁基酚降解菌的降解特性研究 [ J ]. 环境科学 , 2004 , **25**( 3 ) 98-101.
- [ 12 ] Sayler G S , Shon M , Colwell R R. Growth of an estuarine *Pseudomonas* sp. on polychlorinated phenyl [ J ]. Microb Ecol , 1977 , **3**( 3 ) 241-255.