

土壤微生物对苯的降解研究

张小啸,王红旗*,刘敬奇,姚治华,陈延君

(北京师范大学环境学院环境模拟与污染控制国家重点实验室,北京 100875)

摘要:使用大庆油田石油污染土壤中分离出优势菌种(革兰氏阴性 G^- 、黄杆菌属 *Flavobacterium*) ,在实验室可控条件下,研究了该菌种对苯的降解规律和特点.研究发现:微生物对苯浓度耐受范围 $8.8 \sim 17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,大于 $17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对该菌株产生明显的抑制作用.降解体系在 pH 为 $6.5 \sim 7.0$ 之间达到对苯的较高降解水平,最佳降解率出现在苯初始浓度 $7.04 \sim 13.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间;苯在微生物细胞内外的浓度变化趋势呈现一致. $-\lg P$ (P 为有机溶剂苯在细胞膜和水相中的分配系数的比值)的变化能够较好的表征苯在微生物细胞内外的降解趋势和毒性变化;当体系中苯的初始浓度大于 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苯的降解率与 P 值变化趋于一致.

关键词:土壤;石油污染物;微生物降解;苯

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2005)06-0148-05

Study on Benzene Degraded by Soil Microorganism

ZHANG Xiao-xiao, WANG Hong-qi, LIU Jing-qi, YAO Zhi-hua, CHEN Yan-jun

(State Key Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The experiments were made in laboratory to analyze the characteristics and principle of benzene's biodegradation using the microorganism (G^- , *Flavobacterium*) taken from Daqing oil fields. Results show that the maximal concentration of benzene, which microorganisms could endure is between $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; microorganisms were inhibited as benzene's concentration was beyond $17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Trends of benzene's concentration in and out of microorganism's cell are almost same; the biodegradation could be achieved efficiently as the pH range of $6.5 \sim 7.0$ and benzene initial concentration range of $7.04 \sim 13.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Change of $-\lg P$ (P is the distributive ratio of benzene in membrane and water) could be illustrated the trends of toxicity and degradation of benzene in and out of microorganism's cell; the biodegradation rate varied simultaneously with the change of P as initial concentration of benzene was beyond $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: soil; oil pollutants; biodegradation; benzene

石油污染土壤修复技术主要是物理、化学和生物的手段.其中,使用微生物方法治理土壤石油污染出现于 20 世纪 80 年代后期,研究发现:使用微生物降解土壤中的石油污染组分,费用低、效果好、无二次污染,是比较理想的修复手段^[1,2].因此,微生物对有机污染物质的代谢、转化及降解作用,是环境污染研究中最活跃的领域之一.然而,土壤有机污染物-微生物系统仍然是一个黑箱,微生物降解有机污染物质的机理,尤其是石油中各种组分及各组分之间的降解机理、规律仍不清楚.

苯作为石油烃类污染物质中的重要组分之一,具有强烈“三致”作用,日益得到人们的重视和关注^[3,4].鉴于土壤石油污染物组分复杂,各种因素交错影响着石油烃的微生物降解,因此有必要分别探讨石油中的不同组分的生物降解规律,从而为解决土壤石油污染提出整体解决方案和建议.本研究通过实验室模拟,探索石油烃类组分中苯与土壤微生物之间的作用关系,探讨其内在的规律性,从而为高

效降解土壤石油污染组分中的多环芳烃类物质提供理论依据和技术支持.

1 材料和方法

1.1 实验材料和方法

微生物是从大庆油田石油污染土壤中分离出的优势菌种(革兰氏阴性 G^- 、黄杆菌属 *Flavobacterium*) ,经长期驯化培养.

根据向培养液中添加苯初始浓度的不同分为 4 个组,每组 3 个,在生化培养箱中避光进行培养,将 10%菌液接种入装有 100 mL 培养基的 500 mL 三角瓶中,温度 30°C ,培养时间为 44h.

(1) 菌株细胞外苯的分离测定 将 500 mL 发酵 44h 后的培养液,通过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,真空抽滤

收稿日期:2004-10-31;修订日期:2005-04-21

基金项目:国家自然科学基金项目(40472129)

作者简介:张小啸(1980~),男,硕士研究生,主要从事石油污染土壤的修复治理研究, E-mail: murphylzu@sohu.com

* 通讯联系人

去除溶液中的微生物,无菌低温(4℃)保存截留了菌株的微孔滤膜,以正己烷-丙酮(体积分数为1:1)混合液为提取液,采用超声萃取的方法提取培养液中的苯,在紫外分光光度计下测定苯含量。

(2) 菌株细胞质内苯的分离测定 用正己烷-丙酮(体积分数为1:1)混合液冲洗上步骤中抽滤后截留了菌株的微孔滤膜,冲洗液收集于离心管内,反复冲洗3次,将冲洗液以3 000 r/min离心15 min,除去上清液,用超声波细胞粉碎机打破细胞(也可放入玻璃珠,在混合振荡器上中速振荡),菌体破碎后,将溶液转移至25 mL比色管,以正己烷-丙酮(体积分数为1:1)混合液定容,用紫外分光光度法254 nm处测

$$\text{苯降解率} = \frac{(\text{因素水平} - \text{细胞外苯浓度} - \text{细胞质内苯浓度} - \text{细胞膜苯浓度})}{\text{因素水平}} \times 100\% \quad (1)$$

(4) 降解液的鉴定 取5 mL发酵44 h的降解液,加入CS₂ 20 mL,放置12 h后振荡30 min,高速离心提取样品中的有机物,用色质联用测定提取液中有机物,仪器型号:岛津GC-17A,色谱柱型号为HP-SE-54毛细管柱(60 m × 320 μm × 0.25 μm),柱温从100℃以4℃/min的速率升到300℃,采用Voyage质谱检测仪。

1.2 lg P 的研究方法

从有机溶剂的深层次毒害机理来看,对微生物的主要毒害位置是细胞膜,有机溶剂在细胞膜中的浓度基本决定了毒性的大小^[5,6],而有机溶剂在膜中的浓度与通过lg P_{o/w}值来度量的极性密切相关^[7],De Bont等^[8]提出了一个参考公式,描述不同极性的溶剂在膜中达到平衡时可能的浓度:

$$\lg P_{m/w} = 0.97 \lg P_{o/w} - 0.64 \quad (2)$$

其中,lg P_{m/w}:溶剂在细胞膜和水相中分配系数的对数值;lg P_{o/w}:溶剂在辛醇和水相中的分配系数的对数值。

研究认为:lg P_{o/w}值能很好地表征有机溶剂对细胞毒性的影响^[9],但一些有机溶剂对细胞的毒性随着有机溶剂的lg P_{o/w}值变化规律不完全一致,苯的相关梯度并不明显^[7]。笔者参考前人的研究成果^[9],发现不同有机溶剂的lg P_{m/w}数值呈现出较好的线形关系,如图1所示。

鉴于目前国际上提出了lg P的研究方法^[7,8],本实验借用lg P的概念,进一步探索苯的微生物降解与lg P的关系。因为lg P与环境中有有机物质的毒性存在着一定的关系,苯的微生物降解及其毒性与lg P之间存在内在联系,定义如下:

定苯浓度。

(3) 菌株细胞膜上苯的含量测定 先将菌悬液置于pH8.0磷酸缓冲液中,用超声波破碎菌体,菌体破碎后,先用3 000 r/min离心5~10 min,上清液再以15 000~16 000 r/min离心,得到破碎的细胞壁、膜,沉淀物再用pH8.0磷酸缓冲溶液、95%的乙醇分别清洗2次,然后在2%的乙醇KOH溶液中皂化(37℃振荡2~3 d),再用95%乙醇、正己烷-丙酮(体积分数1:1)混合液冲洗,最后定溶于25 mL比色管,紫外分光光度计254 nm处测定苯的含量。

分别测定菌株细胞内外及膜上苯的含量,并且计算出苯的降解率,公式如(1):

$$P = \frac{c_m}{c_l} \quad (3)$$

其中,c_m为溶剂苯在细胞膜的浓度;c_l为溶剂苯在培养液(正己烷-丙酮混合液)中的浓度。

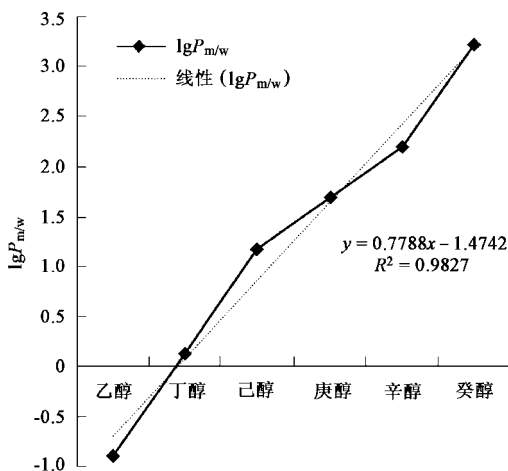


图1 烷醇的lg P_{m/w}变化

Fig. 1 Change of lg P_{m/w} in Alkanol

2 结果与讨论

2.1 实验结果

不同因素水平(均指培养体系初始时刻)条件下,苯在菌株细胞内外的分布变化如图2和图3所示(图2中培养体系初始pH值为6.8,苯初始浓度为8.8 mg·L⁻¹;图3中培养体系初始苯浓度为8.8 mg·L⁻¹;相关系数p ≥ 0.95)。同时,经质谱检测,发现降解液中有丁二酸生成。

2.2 苯的微生物降解与 -lg P

图2为不同因素条件下,苯的浓度变化和 -lg P变化。由图2可以明显看出,微生物细胞质内和细胞

外的苯的浓度变化趋于一致;苯的浓度逐渐升高,微生物细胞膜上苯的富集量逐渐减小,细胞质内苯的

含量逐渐升高,这说明苯可以比较容易的进入膜中,从而在细胞内得到降解,这种变化与 De Bont^[9]的

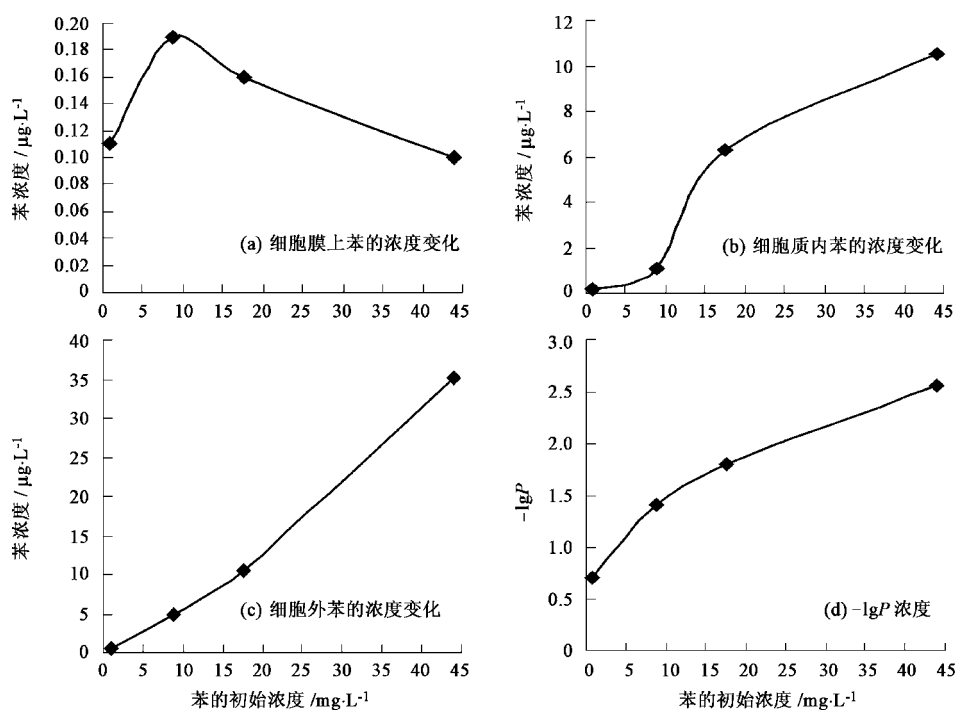


图2 不同因素条件下苯的浓度变化和 $-\lg P$ 变化

Fig.2 Concentration changes of benzene and $-\lg P$ in different factors

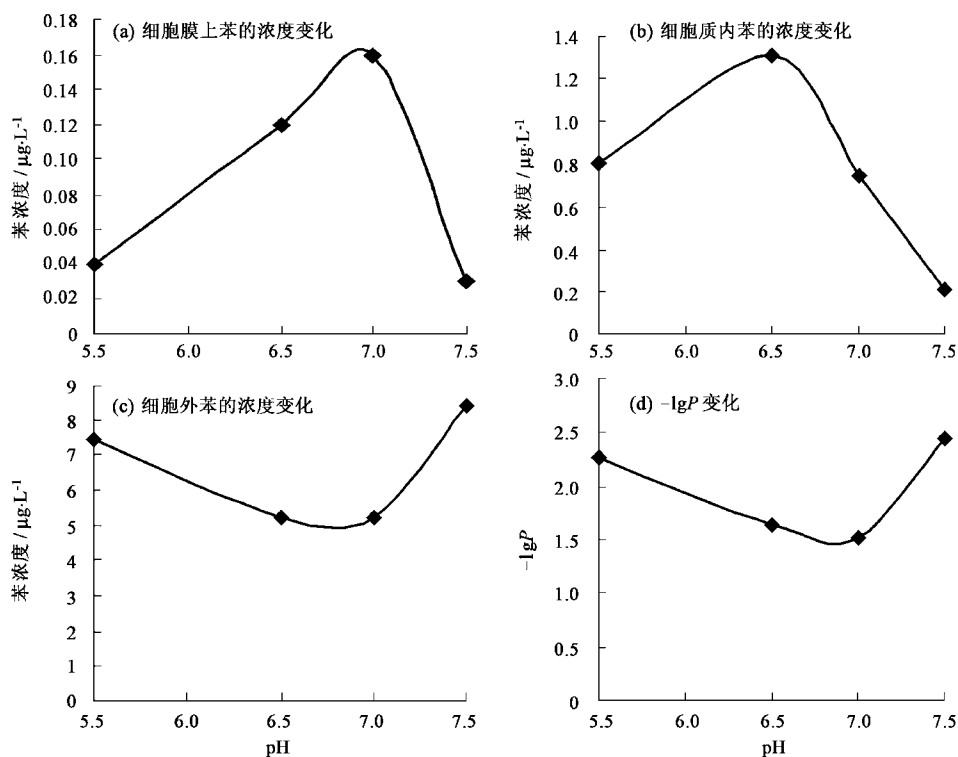


图3 不同 pH 条件下,苯的浓度变化及 $-\lg P$ 变化

Fig.3 Concentration changes of benzene and $-\lg P$ in different pH

研究结论相一致.同时, $-\lg P$ 值的变化也与苯在细胞内的降解呈现出相似的变化.由此可推断 $-\lg P$ 可以较好的表征苯在微生物细胞内部的浓度变化.

从图 2 看到,相对于细胞内部的浓度变化,苯在微生物细胞外(即培养液中)的浓度变化较为平缓,这主要是因为培养液中苯的浓度比较大;细胞外酶对于苯的降解要小于微生物细胞内的胞内代谢;细胞膜对于苯的进出起到了屏蔽作用,将苯的浓度控制在微生物细胞的耐受范围内,从而抑制了有机溶剂苯对细胞的毒性.此外,在图 2 (b)和(d)中,细胞质内苯的浓度变化曲线和 $-\lg P$ 曲线在同一浓度水平($17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)附近各自存在一个拐点.

图 3 为不同 pH 条件下,苯的浓度变化和 $-\lg P$ 变化.由图 3 可见:在 pH 5.5 ~ 7.5 区间内,微生物细胞内部苯的浓度呈现出倒 U 型,微生物细胞质内和细胞膜上苯的浓度变化趋势相似;随着 pH 值逐渐升高,微生物细胞膜上苯的富集量逐渐减小.该菌株可能适合在微酸的环境中生长,但却不利于细胞膜对苯的吸附,在实际工程应用中,需要考虑微生物膜对生长环境的适应性^[10],它决定污染物最初的降解速率和最终的降解效果.此外,微生物细胞膜和细胞质上苯的浓度变化都呈现出先增加后降低(见图 3 (a)和(b)),但二者变化并不同步,当 pH = 7 (中性条件下),微生物细胞膜上苯的富集浓度最大.

综合分析 2 个不同因素下苯的浓度变化以及 $-\lg P$ 的变化,可以看出:不同酸度条件下,有机溶剂苯对微生物细胞膜的影响极为显著,这可能是因为酸度的变化,引起细胞膜电位的变化,进而影响细胞各组分的组成^[11,12],导致苯进入细胞内部更加困难,从而影响微生物对苯的降解.

2.3 苯的微生物降解与 P 的关系

图 4 为不同苯初始浓度下,苯的浓度变化和 $-\lg P$ 变化图.从图 4 可知,实验结束(44h)时,苯初始浓度为 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品组降解率最高,达到 38.6%,当培养液中苯初始浓度大于 $17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,使得降解率迅速降低,对该菌株的生长产生明显的抑制作用.这说明:培养体系初始苯浓度(即苯污染强度)对其在细胞膜上的吸附量和降解效率有一定的影响.苯初始浓度为 $44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品组降解率最低,只有 8.38%,在 4 组不同苯浓度样品中,其降解苯的总量是最高的.值得注意的是,苯初始浓度为 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品组降解苯的总量接近于 $44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品组,这可能是因为生物降解时间不充足,未能完全释放出微生物降解有机溶剂苯的

潜力.

总体上说,微生物对苯的降解是先增加后减小,当达到最大降解率后,开始小幅度逐渐降低,降幅比较平缓.从图 4 中分析得出:微生物对苯的最佳降解率出现在 $7.04 \sim 13.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 因素水平之间,与此同时,苯在微生物细胞膜内的浓度也达到最大.此外,当苯的初始浓度大于 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苯的降解率与 P 的变化开始趋于一致.

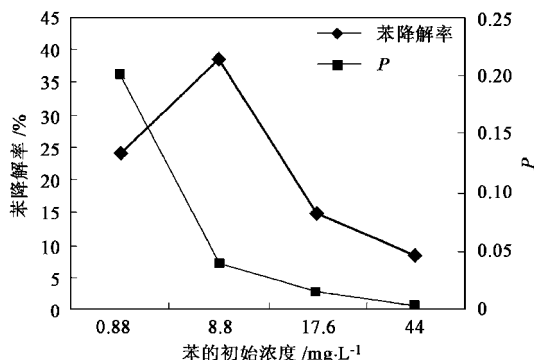


图 4 苯降解率与 P 之间的关系

Fig. 4 Relationship between degradation rate of benzene and P

不同初始 pH 条件下(苯的初始浓度为 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),苯的降解率和 P 的关系,如图 5 所示.实验结束(44h)时,苯初始 pH 为 7 的样品组降解率最高,达到 38.9%;从降解趋势上看,pH 在 5.5 ~ 7.5,苯降解率呈现出倒 U 型, P 的变化呈现出斜的倒 V 型(偏态分布).在 pH 为 6.5 ~ 7.0 之间,微生物降解体系达到对苯的较高降解水平($> 30\%$),同时, P 也达到峰值(0.308).可以认为: P 和降解率有很好的响应关系,具有一定的指示作用;当培养液中 pH 大于 7.5 时,降解率迅速下降,这说明微生物对苯的降解能力逐渐降低,降解体系不利于苯的降解,有机

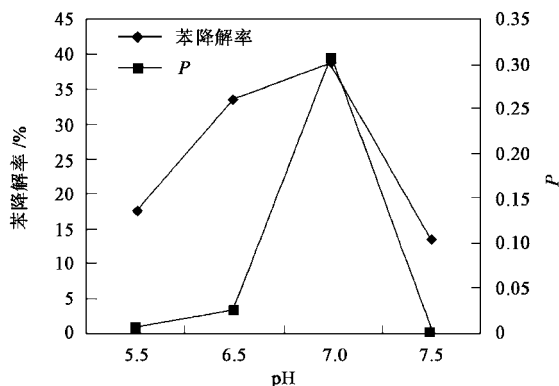


图 5 不同 pH 条件下,苯降解率与 P 之间的关系

Fig. 5 Relationship between degradation rate of benzene and P in different pH

溶剂苯对该菌株的抑制作用开始增强,即毒性开始增强。

结合以上 2 种条件下苯的降解率变化以及 P 的变化分析,在不同 pH 条件下,苯的降解率与 P 之间的变化趋向于一致,但有一定的偏移。当苯的初始浓度大于 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苯的降解率与 P 的变化会有一些偏移,但其总体趋势相同。

3 结论

(1) 苯的微生物降解率变化趋势是增加,当达到最大值后,逐渐降低,降幅比较平缓。最佳降解率出现在苯初始浓度 $7.04 \sim 13.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,大于 $17.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对该菌株产生明显的抑制作用。

(2) 苯在微生物细胞内外的浓度变化趋势呈现一致。降解体系在 pH 为 $6.5 \sim 7.0$ 之间达到对苯的较高降解水平,当 pH 大于 7.5 时,降解率迅速下降。

(3) 当体系中苯的初始浓度大于 $8.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苯的降解率与 P 值变化趋于一致。 $-\lg P$ 值的变化能够较好的表征苯在微生物细胞内的降解趋势和毒性变化。

致谢:感谢兰州大学环境科学系张成君教授对本文提出的宝贵建议。

参考文献:

- [1] Margesin R. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, 46(1): 3~10.
- [2] 齐永强,王红旗,刘敬奇.土壤中石油污染物微生物降解及其降解去向[J].中国工程科学,2003,5(8):70~75.

- [3] Fang J, Lovanh N, Alvarez P J J. The use of isotopic and lipid analysis techniques linking toluene degradation to specific microorganisms: applications and limitations [J]. Water Research, 2004, 38(10): 2529~2536.
- [4] 周国泰,吕海燕,张海峰.危险化学品安全技术全书[M].北京:化学工业出版社,1997.17~18.
- [5] Heipieper H J, Löffeld B, Keweloh H, et al. The cis/trans isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for environmental stress due to organic compounds[J]. Chemosphere, 1995, 30(6): 1041~1051.
- [6] Kieboom J, Bruinenberg R, Keizer Gunnink I, et al. Transposon mutations in the flagella biosynthetic pathway of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 result in a decreased expression of solvent efflux genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 198(2): 117~122.
- [7] 王庆利,何丹,郑晓冬,等.有机溶剂对细胞的毒害及细胞的耐受性机制[J].微生物通报,2002,29(4):81~85.
- [8] De Bont J A M. Solvent tolerant bacteria in biocatalysis[J]. TIBtech, 1998, 16(12): 493~499.
- [9] Weber F J, De Bont J A M. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1286(3): 225~245.
- [10] Kets E P W, De Bont J A M, Heipieper H J. Physiological response of *Pseudomonas putida* S12 subjected to reduced water activity[J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 139(23): 133~137.
- [11] Fang J, Barcelona M J, Alvarez P J J. Phospholipid compositional changes of five pseudomonad archetypes grown with and without toluene [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 54C(3): 382~389.
- [12] Kieboom J, Dennis J J, De Bont J A M, et al. Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(1): 85~91.