

多环芳烃的微生物降解与生物修复

郭楚玲, 郑天凌, 洪华生

(厦门大学 环境科学研究中心, 教育部海洋环境科学重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 生物修复在治理多环芳烃污染环境中的作用日益突出, 其应用研究越来越受到重视。文中概述了生物修复技术发展的基础——多环芳烃微生物降解, 论述了降解微生物分离、驯化、种类、降解机制等, 探讨了提高多环芳烃降解速率的途径及其存在的一些问题, 并对今后的发展趋势进行了展望。

关键词: 多环芳烃; 生物降解; 生物修复; 展望

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2000)03-0024-06

Biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons

GUO Churling, ZHENG Tianling, HONG Hua-sheng

(Environmental Science Research Center, Key Lab of Marine Environmental Science SED, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Microbial degradation of PAHs is considered to be the major decomposition process for these contaminants in nature and is of great practical interest for implementation of bioremediation. The reviews on the foundation of bioremediation biodegradation: the isolation and purification of degraded bacteria, microbial community, degradation mechanism and methods were done. The prospects on this field are discussed.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs); biodegradation; bioremediation; prospect

多环芳烃(PAHs)是一类广泛分布于海洋环境中的含有两个苯环以上的有机化学污染物,随着苯环数量增加,其脂溶性越强,水溶性越低,在环境中存在时间越长,遗传毒性越高,其致癌性随着苯环数的增加而增强^[1]。每年有数百万吨石油产品和原油从炼油厂和石化厂的废弃物中排放到世界范围的海洋环境中;由于多环芳烃的潜在毒性、致癌性及致畸诱变作用,对人类健康和生态环境具有很大的潜在危害,已引起各国环境科学家的极大重视。美国环保局在 80 年代初把 16 种未带分支的多环芳烃确定为环境中的优先污染物,我国也把多环芳烃列入环境污染的黑名单中。研究表

明,微生物降解是沉积环境中多环芳烃去除最主要的途径。生物修复技术(bioremediation)是在生物降解的基础上发展起来的一种新兴的清洁技术,多环芳烃的生物修复与其他清洁技术如焚烧、填埋等相比较,具有二次污染少、价格低等优点,已成为现场去除多环芳烃的重要途径。

1 多环芳烃的微生物降解

纯培养微生物的单一菌株及混合菌株的多环芳烃降解的研究已有很多年了。为了更好地应用生物修复技术治理被多环芳烃污染的环境,有必要对降解微生物、降解机制、环境

收稿日期: 1999-12-17, 修改稿收到日期: 2000-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(4976302)

作者简介: 郭楚玲(1976-),女,福建泉州人,硕士,主要从事海洋微生物对多环芳烃降解的研究。

影响因子等因素进行进一步的研究,从而选择出最优化的方案来治理污染环境。

1.1 降解多环芳烃的微生物的分离与计数

1.1.1 单层平板直接分离法^[2]

在固体无机培养基(MSM)上涂上一层PAHs的丙酮或乙醇溶液,待有机溶剂充分挥发后,接入样品溶液,均匀分布在多环芳烃表面上;1~3星期后,在菌落的旁边可形成一圈光斑,则为多环芳烃降解菌。该方法优点在于便于分离。

1.1.2 双层平板分离法^[3]

双层平板分离法是在对单层平板法改进的基础上形成的,克服了单层平板法的许多不足,不同之处在于,样品先接种到已含有多环芳烃的熔化的琼脂糖无机培养基中,然后倾入含无机培养基的固体平板上,上层含有样品的培养基可均匀分布在下层培养基上。该方法形成的菌斑易于确认,便于计数。

1.1.3 多环芳烃多管发酵法^[4]

当需要测定不同的污染区域,包括污染程度、盐度等环境因素不同时,样品数量很多,一般采用PAH-MPNs方法。如在海上、野外采样,时间较长,需在现场马上做实验,无需携带大量的玻璃试管仪器,可采用改进的96孔微平板PAH-MPNs法^[5],则比较方便可行。首先,对样品进行不同程度的稀释,一般采用五管发酵法,即在试管中或96孔板先加入液体培养基,再加入一定量的单种多环芳烃(菲)丙酮或乙醇溶液,过夜,让有机溶剂充分挥发,然后接种不同稀释度的样品溶液。培养一段时间后,溶液发生浊度或颜色的变化为阳性管。从阳性管中,采用方法一(RPA),可进一步分离出多环芳烃降解菌。

1.1.4 PCR分析测定法^[6]

传统的微生物计数方法常存在着培养时间长短难以控制、培养基成分本身局限以至低估环境中存在可降解微生物的数量等问题。随着分子生物学方法的发展,采用PCR扩增及DNA杂交方法,已逐渐成为一种选择,其

中关键在于降解菌的基因序列测试。据报道,在多环芳烃降解过程中存在着一种转切酶(GST),与存在于许多多环芳烃降解菌代谢基因紧密相关,其携带的基因具有成为测定环境中多环芳烃降解菌的探针潜力。

1.2 多环芳烃降解菌的富集培养与驯化

微生物对于污染物的降解往往需要一定的适应时间。Heitkamp^[7],Wang^[8]等研究表明,在被多环芳烃污染的沉积物中,微生物降解多环芳烃的能力远远高于未受污染区域。为了缩短微生物的适应时间,提高降解速率,常常从受污染土壤中分离并富集培养降解速率最大的微生物种类,进行富集培养和驯化一段时间后,再把它们用于污染土壤的生物治理。在我们的研究中,对从码头沉积物样品进行富集培养,培养基分别是灭菌的无机培养基和未受污染天然海水,提供以芘为唯一碳源和能源,经过约两周的培养,得到如图1所示的微生物细胞生长曲线图。混合培养微生物在天然海水的生长速率远远低于无机培养基。原因可能在于人工配制的培养基含有适合于微生物生长的N和P的比值,促进降解微生物的生长,有利于快速分离出高效的降解菌。

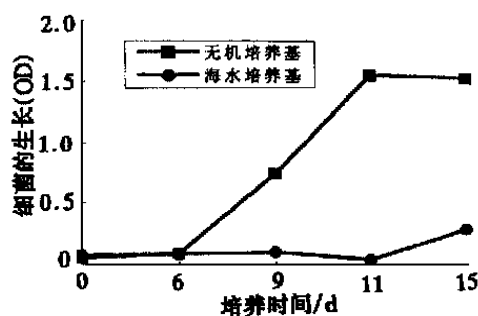


图1 不同培养基对微生物生长的影响

Fig.1 Effect of different cultivation medium on microbes growth

1.3 降解多环芳烃的微生物

许多细菌、真菌及藻类都具有降解多环芳烃的能力。一般来说,随着多环芳烃苯环数量的增加,其降解速率越来越低。因此,低分子量的多环芳烃在环境中能较快被降解,在环境

中存在的时间较短;而高分子量的多环芳烃则难于降解,较长期存在于环境中。研究表明,许多微生物能以低分子量多环芳烃(双环或三环)作为唯一碳源和能源,并将其完全无机化。从海洋环境中分离出来的,有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、弧菌属(*Vibrio*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、解环菌属(*Cycloclasticus*),其中属于海洋细菌的,目前有报道的只有海杆菌属、解环菌属、*Neptunomonas naphthovorans*。然而,高分子量的多环芳烃,由于其自身的结构和特性,在环境中较稳定,难于降解,能矿化多环芳烃并以其作为唯一碳源和能源的细菌的研究报道很少。许多四环或多环高分子量多环芳烃的降解是以共代谢(cometabolism)的方式进行的。研究表明,大多数细菌对四环或多环芳烃的矿化作用一般以共代谢的方式开始;真菌对三环以上的多环芳烃的代谢也多属共代谢。

1.4 多环芳烃的微生物降解方式

1.4.1 多环芳烃微生物降解的一般途径

原核生物和真核生物对多环芳烃的微生物降解都需要氧气的参与,产生氧化酶,使苯环降解。因此,多环芳烃苯环的降解取决于微生物产生加氧酶的能力,且由于酶对于多环芳烃降解的专一性,环境中多环芳烃的多样性,多环芳烃的降解需要多种微生物参与。

微生物加氧酶有两种,即单加氧酶和双加氧酶。丝状真菌一般产生单加氧酶,对多环芳烃降解的第一步是羟基化多环芳烃,即把一个氧原子加到底物中形成芳烃化合物,继而氧化为反式双氢乙醇和酚类;细菌主要产生双加氧酶,对多环芳烃降解的第一步是苯环的裂解,把两个氧原子加到底物中形成双氧乙烷,进一步氧化成顺式双氢乙醇,双氢乙醇可继续氧化为儿茶酸、原儿茶酸和龙胆酸等中间代谢物,接着苯环断开,产生琥珀酸、延胡索酸、乙酸、丙酮酸和乙醛。降解中的产物被微生物用来合成自身的生物量,同时产生 CO_2 和 H_2O 。

多环芳烃最初的氧化即苯环的加氧是多环芳烃微生物降解反应的速控步,此后降解进程加快,没有或很少有中间代谢物的积累。多环芳烃的酶降解具有很强的区域性和选择性。在环境中,还存在着其他多环芳烃降解机制,如甲烷单氧酶、几丁质超氧化酶等酶代谢。

1.4.2 多环芳烃的无氧降解

海洋沉积环境中多环芳烃的有氧降解已有了广泛的研究。然而大部分有机物富集的海洋沉积环境处于无氧条件,越来越多的研究对多环芳烃在无氧条件下分解感兴趣。研究表明,在反硝化的条件下,多环芳烃可以发生无氧降解,以硝酸盐作为电子受体。在硫酸盐还原环境,多环芳烃的微生物降解仍然存在,以硫酸盐作为电子受体,可以降解萘、菲、荧蒹等等^[9]。Hayes^[10]研究表明,环境中微生物暴露于污染物时间的长短是多环芳烃能否发生无氧降解的关键因素。

1.5 多环芳烃降解微生物的分子学研究

如上所述,细菌对于多环芳烃降解的第一步是产生双氧酶。在萘降解中,已知双氧酶中的铁硫蛋白(ISP)基因起着关键的作用^[11];一种转切酶(GST)编码基因在小分子量如萘、菲、蒽、芘的降解中发挥着关键的作用^[6];降解小分子量多环芳烃双氧酶的编码基因的克隆、序列分析等基因调控机制有较广泛的研究;而对于质粒、基因如何在高分子量多环芳烃中降解起调控作用,报道仍很少。

1.6 影响多环芳烃微生物降解的因子

影响多环芳烃微生物降解的有生物和非生物因素,如温度、盐度、pH值、土壤类型、通气状况、营养盐、所处的深度、扩散速率、微生物适应性、生物利用率、季节因素、多环芳烃的浓度、多环芳烃微生物的理化特性等。

2 多环芳烃的生物修复

2.1 表面活性剂的使用

多环芳烃的解吸是决定其降解程度的关键因素。表面活性剂通过降低多环芳烃在环

境中的毛细管张力和提高其在水中的溶解度,多环芳烃从固相转移到水相,促进了多环芳烃的生物利用率^[12]。具有9个或12个环氧单位的辛苯环氧树脂或壬苯环氧树脂对促进水土悬浮液中多环芳烃(蒎、菲、芘)的解吸效果最好。宋玉芳等^[13]研究了吐温80对土壤中多环芳烃降解的影响,实验中发现,凡是投加吐温80的土壤中,其表面和土壤空隙中布满了微生物菌落,表明了表面活性剂促进了微生物对多环芳烃的利用;进一步的研究发现,当投加吐温浓度不同时,土壤表面微生物优势菌落不同,原因可能在于不同微生物群落对土壤环境因子改变的竞争适应关系。Arino^[14]、Deziel等^[15]发现,微生物在降解多环芳烃(蒎、菲)过程中自身能产生以糖脂形式(鼠李糖脂混合物)存在的生物表面活性剂,促进多环芳烃的降解和微生物的生长。同时,在有些研究中,也发现在表面活化剂存在的条件下,抑制多环芳烃的生物降解^[16]。Tsomides等^[17]阐述了表面活化剂的不同效应,原因可能在于不同的实验条件。化学表面活化剂处理成本较高,且易产生二次污染;而生物表面活性剂乳化能力高于化学活化剂,且利用微生物自身产生的功能,可大大地降低处理成本,不会产生污染,已引起越来越多科学家的重视。

2.2 外加营养盐

在现场环境中,营养盐的缺乏常是限制微生物活性的重要因素。为了使污染物达到完全的降解,适当添加营养物可以明显地促进污染物的降解。目前,外加营养盐主要用于受石油烃化合物污染环境的生物修复。添加酵母膏或酵母废液可以促进石油烃化合物的降解。在我们的研究中,分别以灭菌的天然海水培养基和外加酵母膏的海水培养物,加入芘,得出如图2所示的结果,进一步证实了以上的结论。1989年,Exxon公司和美国环保局成功地实施了“阿拉斯加研究计划”,主要采用生物修复技术来清除溢油的污染,这也是目前为止

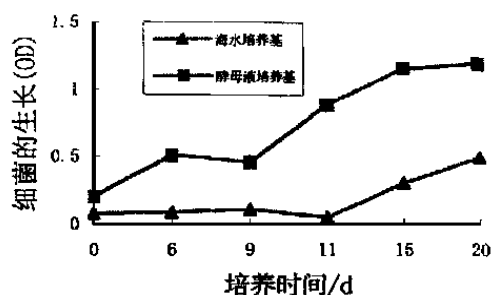


图2 外加营养盐对微生物生长的影响

Fig. 2 Effect of nutrients on microbes growth

规模最大的现场生物修复工程。工程实施过程中在一些受污染的海滩有控制地添加两种亲油的微生物营养成分,发现相对于对照海滩,加入营养盐的海滩“变白”了,分析表明该海滩沉积物表面和次表面的异养菌和石油降解菌的数量增加了1~2个数量级,石油污染物的降解速度提高了2~3倍,多环芳烃成分也降低了,使整个净化过程加快了近两个月^[18]。

在封闭环境的现场处理中,如生物反应器,也常通过外加营养盐,以维持微生物生长的最佳条件。在Lewis^[19]研究反应器内多环芳烃降解中,加入 177 mg L^{-1} 氮作氮源和 27 mg L^{-1} 正磷酸盐作为磷源,以维持营养盐最佳的比例,进一步促进多环芳烃的降解。

2.3 引入微生物

微生物对污染物的降解能力常取决于微生物暴露于污染物时间的长短。为了提高多环芳烃降解速率,常需引入外来微生物。Grosser等^[20]报道,从受多环芳烃污染的土壤中分离细菌,培养2d后,再回到土壤中,芘的降解速率提高了55%,此时每克土壤中的细菌高达 $10^6 \sim 10^8$ 个。在现场环境中,引入微生物的作用常不如外加营养盐明显,一方面在于外来微生物的适应性或与土著微生物的营养竞争;另一方面在于,营养盐常是环境中多环芳烃降解的限制因子。所以,实际处理时,要考虑实验室培养的菌种在生物治理中的存活率。

随着分子生物学技术的发展,采用细胞融合技术等遗传工程手段可以将多种降解基因转入同一微生物中,使之获得广谱的降解能力,即合成基因工程菌(GEM)。多环芳烃在沉积物中多以混合物存在,可把从小分子量多环芳烃降解菌中提取的质粒融合到大肠杆菌上,但菌群发生激烈的竞争以及会产生其他的变化,有关这方面的研究仍有待于深入。

3 展 望

生物降解是环境中去除多环芳烃的主要途径,是现场多环芳烃生物修复的主要过程。了解多环芳烃生物降解机制是成功应用生物修复技术的前提。有关小分子量多环芳烃的生物降解已有较广泛详细的研究,但以下几方面的研究仍有待于进一步深入:

(1) 分离能以四环以上高分子量多环芳烃,尤其是苯并[a]芘,作为唯一碳源和高效降解菌株。

(2) 深入研究生物表面活性剂产生的机理及其在实际处理中的应用。

(3) 研究多环芳烃降解过程中共代谢的机理,一种多环芳烃的降解对另一种降解的影响,因环境中多环芳烃多以混合物形式存在,且大多数高分子量多环芳烃是通过这条途径被降解。

(4) 有关多环芳烃降解过程中的调控机制研究仍很少,需深入研究其降解过程中基因调控机制。

(5) 多环芳烃的生物修复受到多方面环境因素的影响,处理前,应因地制宜,开展调查,研究环境因子对多环芳烃生物降解的影响。

参考文献:

[1] JACOB J, KARCHER W. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance [J]. *Fresenius Z Anal Chem*, 1986, 323: 1-10.

[2] SHIARIS M P, COONEY J J. Replica plating method for estimating phenanthrene-utilizing and phenanthrene-cometabolizing microorganisms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45: 706-710.

[3] BOGARDT A H, HEMMINGSEN B B. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2 579-2 582.

[4] GEISELBRECHT A D, HERWIG R P, DEMING J W, et al. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget sound sediments[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 3 344-3 349.

[5] STIEBER M, HAESLER F, WERNER P, et al. A rapid screening method for microorganisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbon in microplates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 40: 753-755.

[6] LLOYD-JONES G, LAURIE A D, HUNTER D, et al. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29: 69-79.

[7] HEITKAMP M A, CERNIGLIA C E. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of PAHs in freshwater and estuarine ecosystems[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1987, 6: 535-546.

[8] WANG X, BARTHA R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil[J]. *Environmental Science and Technology*, 1990, 24: 1 086-1 089.

[9] COATES J D, WOODWARD J, ALLEN J, et al. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 3 589-3 593.

[10] HAYES L A, NEVIN K P, LOVLEY D R. Role of prior exposure on anaerobic degradation of naphthalene and phenanthrene in marine harbor sediments[J]. *Organic Geochemistry*, 1999, 30: 937-945.

[11] EATON R W, CHAPMAN P J. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1, 2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174: 7 542-7 554.

[12] LIU Z, LASA S, LUTHY R G. Surfactant solubilisation of PAH compounds in soil-water suspensions[J]. *Water Sci Technol*, 1991, 23: 475-485.

[13] 宋玉芳,孙铁珩,许华夏.表面活性剂 TW-80 对土壤中多环芳烃生物降解的影响[J]. *应用生态学报*,

- 1999,10(2):230-232.
- [14] ARINO S, MARCHAL R, VANDECASTEELE J P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996,45:162-168.
- [15] DEZIEL E, PAQUETTE G, VILLEMUR R, *et al.* Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996,62:1 908-1 912.
- [16] LASA S, LUTHY R G. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems[J]. *Environ Sci Technol*, 1991,25:1 920-1 930.
- [17] TSOMIDES H J, HUGHES J B, THOMAS J M, *et al.* Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1995,14:953-959.
- [18] PRITCHARD H P, COSTA C F. EPA 'S Alaska oil spill bioremediation report [J]. *Environ Sci Technol*, 1991,25:372-379.
- [19] LEWIS R F. Site demonstration of slurry-phase biodegradation of PAH contaminated soil [J]. *Air and Waste*, 1993,43:503-508.
- [20] GROSSER R J, WARSHEWSKY D, ROBIE V J. Indigenous and enhanced mineralisation of pyrene, benzo(a)pyrene and carbazole in soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991,57:3 462-3 469.

《海洋环境科学》简介

《海洋环境科学》系我国海洋环境科学与研究领域里唯一的学术期刊,由国家海洋局海洋环境保护研究所暨国家海洋环境监测中心和中国海洋环境科学学会主办,创刊于 1982 年,每期 80 页,国内外公开发刊。

《海洋环境科学》同时出版光盘版(《中国学术期刊光盘版·理工 B 辑》)、电子版并入网“万方数据(Chinainfo)系统科技期刊群”。

《海洋环境科学》系我国环境科学类核心期刊和海洋学类核心期刊,获第二届全国优秀科技期刊评比三等奖,国家海洋局首届科技期刊评比三等奖。

《海洋环境科学》为国内外著名检索机构的来源期刊之一,其中包括美国《化学文摘》(CA)、《动物学记录》(ZR)和联合国《水科学和渔业文摘》(ASFA)。国内主要有《中国无机分析化学文摘》、《海洋文摘》、《中国水产文摘》、《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊评价数据库》、《中国人文社科数据库》和《中国生物学文献数据库》。

《海洋环境科学》在《被引频次最高的中国科技期刊 500 名排行表》中占有重要位置。1994—1998 年分别排名为第 312、373、360、320 和第 195 名。其中 1998 年本刊的影响因子为 0.222,在全国 1286 种科技期刊中排名第 321 位。在同类期刊中排名第 14 位。

本刊编辑部真诚感谢社会各界多年来的支持和关怀,愿与广大作者、读者一道,为繁荣我国的海洋环境科学事业不懈努力!

《海洋环境科学》编辑部