

文章编号: 1005-8893(2000)03-0030-03

# 黄孢原毛平革菌对多环芳烃菲的生物降解<sup>\*</sup>

陈建海<sup>1</sup>, 李慧蓉<sup>2</sup>

(1. 江苏石油化工学院 化学工程系, 江苏 常州 213016; 2. 江苏石油化工学院 机械工程系, 江苏 常州 213016)

**摘要:** 用高效液相色谱法测定了黄孢原毛平革菌品系 BKM-F-1767 与 10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 的菲共培养液中菲的量的变化。结果表明, 在摇床培养中菲的去除率为 (93~100)%; 而静置培养中, 去除率可达 85%。对培养方式, 培养基与培养容器的体积比, 及缓冲液体系对菲的降解的影响进行了讨论。

**关键词:** 黄孢原毛平革菌; 菲; 生物降解; 高效液相色谱法  
**中图分类号:** X 787; X 172; Q 939.9 **文献标识码:** A

在对人类健康和生态环境构成严重威胁与破坏的异生物质中, 多环芳烃 (PAH) 是一类格外引人关注的有机性污染物。它们普遍分布于大气、土壤及水体之中。由于其水溶性低, 分子量高和毒性大等特点, 一般难以被生物降解, 而易在环境中宿存。

白腐真菌是迄今为止所发现的唯一能降解多环芳烃的一类真核生物, 其典型种——黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium* Burdsall) 凭借细胞外降解酶系统 (主要为木质素过氧化物酶 LiP 和锰过氧化物酶 MnP) 和独特的降解机制, 因能降解多种多环芳烃而成为研究的核心生物种<sup>[1,2]</sup>。

菲具有典型的多环芳烃结构, 同时也是国际上公认的须首先加以控制的有机化合物之一。本文以菲为代表性底物, 研究黄孢原毛平革菌对其的生物降解。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

黄孢原毛平革菌 BKM-F-1767 品系: 美国俄勒冈科学技术研究生院 M. H. Gold 教授提供。

### 1.2 孢子悬浮液的制备

4℃斜面保存的菌种转入 39℃培养箱, 生长 (4~5) d。无菌条件下接种在含固体生长培养基的培养皿上, 39℃平板扩增。大量的白色菌丝长满平板表面, (6~8) d 内形成丰富的白色粉状分生孢子。将孢子无菌地转入灭菌的蒸馏水中, 轻轻摇荡, 使充分分散, 制成乳白色的孢子悬浮液, 4℃保存。

### 1.3 培养基

#### 1.3.1 固体生长培养基

基本组成 (1/L): 200 g 土豆的浸出液, 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 g MgSO<sub>4</sub>。

#### 1.3.2 液体营养限制培养基

基本组成 (1/L): 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 g MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.01 g CaCl<sub>2</sub>, 10 g 葡萄糖, 0.5 mL 有机溶液, 1 mL 无机溶液, 1.2 mmol/L 酒石酸铵。以 20 mmol/L 酒石酸钠或琥珀酸钠为缓冲液。

### 1.4 降解体系的建立

酒石酸钠缓冲液体系: 为摇床培养体系。250 mL 锥形瓶中加入 30 mL 的液体营养限制培养

\* 收稿日期: 2000-08-02

基金项目: 中国石油化工集团公司资助项目 (296081)

作者简介: 陈建海 (1966-), 男, 浙江诸暨人, 工程师。

基, 0.4 mmol/L 的藜芦醇 (Veratryl Alcohol, VA)。按每 10 mL 培养液加 1 mL 的  $2.5 \times 5 \times 10^6$  个孢子/mL 的孢子悬浮液量接种。39 ℃, 120 r/min 恒温摇床培养。6 d 后, 加入 1 g/L Tween 80, 并将溶于丙酮中的菲溶液 (5 mg 菲溶于 100  $\mu$ L 丙酮) 加入瓶内, 使菲的终质量浓度为 10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L。

琥珀酸钠缓冲液体系: 在 100 mL 锥形瓶中进行。(1) 摇床培养体系——40 mL 液体营养限制培养基; 其它同上, 菲终质量浓度为 100 mg/L。(2) 静置培养体系——20 mL 液体营养限制培养基, 39 ℃恒温培养箱静置培养。VA 及 Tween 80 的量同前; 菲的终质量浓度达 100 mg/L。

每 3 d 充纯 O<sub>2</sub> (5~10) min, 30 d 为一降解培育周期。

1.5 培养液的高效液相色谱法测定

共培养 30 d 的菌体与培养液过滤, 得滤液; 将滤得的固体残物用甲醇超声浸取, 并过滤。两部分滤液合并, 甲醇定容。以外标法检测其中菲的含量。

高效液相色谱条件为: 美国 Waters 公司产高效液相色谱仪。Zabox Ods (5  $\mu$ m,  $\phi$  4.6 mm  $\times$  250 mm) 柱, 流动相为甲醇:水= 80:20。检测器 Waters 995, 检测波长为 254 nm。

表 1 黄孢原毛平革菌对菲的生物去除降解率

菌种	培养条件及参数					菲质量浓度/	菲去除降
	培养基与培养容器体积比	培养方式	缓冲液	<i>c</i> (VA) / (mmol/L)	$\rho$ (Tween 80) / (g/L)	(mg/L)	解率, %
BKM—F—1767	30 :250	摇床培养	酒石酸钠	0.4	0.1	10	100
						50	100
						100	100
	20 :100	静置培养	琥珀酸钠			100	85
	40 :100	摇床培养				100	93

实验结果表明: 总体看, 酒石酸钠缓冲液体系对菲的降解效果要好于琥珀酸钠体系; 摇床培养方式相对于静置培养而言, 更有利于对底物菲的去除降解; 液体培养基与培养容器的体积比越小, 降解率就越高; 相同条件下, 在 (10~100) mg/L 质量浓度范围内, 均可达到完全的降解效率。

3 讨论

国外一些实验室报道了利用黄孢原毛平革菌对多环芳烃菲的降解, 所用品系主要是 BKM—F—

2 结果和分析

2.1 现象观察

接种后, (1~2) d 内, 摇床培养体系中, 孢子萌发为菌丝并缠绕形成直径约 1 mm 的白色小团; (5~6) d, 菌团长大成直径 (4~5) mm。菲加样后, 立即以碎膜状细粒在水溶液中析出。加样后 3 d, 这些析出物消失, 菌团增大, 表面出现细刺状结构。显微镜下观察, 刺状物为新生的菌丝。

静置培养体系, 孢子萌发产生的菌丝交织成白色膜状物; (5~6) d 扩展为遍及液面的白色菌垫, 厚约 (0.5~1) mm。加样后, 菲从液体中析出, 约 3 d 后消失, 且菌垫增厚。

接种后 15 d, 菌体仍保持白色, 外观健康, 生物量明显加大。30 d 左右, 菌体略显灰白色。

培养结束时, 从各样品中任挑一些菌体再培养在固体生长培养基上, 39 ℃恒温培育, 菌体均能良好繁殖。说明与各种质量浓度的菲的共培养, 菌仍能保持其生命活力。

2.2 菲的生物降解

高效液相色谱法测定, 与菌共培育 30 d 后各样品菲的生物去除降解率见表 1。

1767, ME—446 及 INA—12 等; 菲的质量浓度也较低, 仅为 14 mg/L<sup>[3]</sup>。采用放射性同位素标记的技术追踪分析菲的降解主途径和主产物, 表明, 菲的降解经历了先氧化成 9, 10—菲醌 (PQ); 再发生环的开裂, 形成 2, 2'-联苯甲酸 (DPA)<sup>[4]</sup>; 部分 DPA 最终氧化为 CO<sub>2</sub><sup>[5]</sup>。

我们的工作重点主要放在培养条件及参数对降解效果的影响作用方面, 因为这是真菌技术的操作关键。实验证明: (1) 黄孢原毛平革菌对 100 mg/L 质量浓度范围内的菲有有效的去除降解能力, 各培养体系均可达 (85~100)% 的降解率; (2) 表面活

性剂 Tween 80 的临界质量浓度的添加, 克服了一般认为的所谓搅动培养对酶活性的破坏<sup>[6]</sup>, 所以各摇床培养体系的样品仍表现出很高的降解率; (3) 摇床培养的效果明显优于静置培养, 一方面是因为采用的系统培养容器容积大, 培养液量少, 与空气接触的液面大, 这有利于 O<sub>2</sub> 的有效利用, 而这是至关重要的; 另一方面, 摇床培养过程的振荡加强了菌、气、液三相的接触及交换。

实验观察到, 底物加入后 (1~3) d 内, 不溶性的菲析出物逐渐消失, 这可能要归因于菌体对菲的迅速吸附能力。Barclay 等证明, 由于菌体的吸附导致的菲的去除最高可占总去除的 40%<sup>[7]</sup>。由此可见, 吸附在菌对底物的去除与降解中发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Paszczynski A, Crawford R L. Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Biotechnol Prog, 1995, 11 (4): 369—379.
- [2] Irvine R L, Sikdar S K. Bioremediation: Principles and Practices (II) [M]. PA: Lancaster Technomic Publishing Co Inc, 1998. 67—109.
- [3] Sutherland J B, Selby A L, Freeman J P, et al. Metabolism of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (11): 3 310—3 316.
- [4] Hammel K E, Gai W Z, Green B, et al. Oxidative Degradation of Phenanthrene by the Lignolytic Fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58 (6): 1 832—1 838.
- [5] Bumpus J A. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55 (1): 154—158.
- [6] Leisola M, Ulmer D, Fiechter A. Problem of Oxygen Transfer During Degradation of Lignin by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Eur J Appl Microbiol Biotechnol, 1983, 176: 113—116.
- [7] Barclay C D, Farquhar G F, Legge R L. Biodegradation and Sorption of Polyaromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 42: 958—963.

### Biodegradation of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*

CHEN Jian—hai<sup>1</sup>, LI Hui—rong<sup>2</sup>

- (1. Department of Chemical Engineering, Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, Changzhou 213016, China;
2. Department of Mechanical Engineering, Jiangsu Institute of Petrochemical Technology, Changzhou 213016, China)

**Abstract:** The change of phenanthrene amounts in co—cultural liquid with BKM—F—1767 strain of *Phanerochaete chrysosporium* and 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L phenanthrene was measured by HPLC in this paper. It was shown that the efficiency of phenanthrene removal was up to (93~100)% in shaking culture and 85% in static culture. The influence of the culture methods, ratio of culture medium volume and flask volume, and buffer system on phenanthrene removal was discussed.

**Key words:** *Phanerochaete chrysosporium*; phenanthrene; biodegradation; HPLC