

一株可同时降解多种高环 PAHs 的丝状真菌——宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*)*

李 慧^{1,2} 蔡信德^{1,*} 罗 琳² 陈来国¹ 周井刚¹

(¹ 环境保护部华南环境科学研究所, 广州 510655; ² 湖南农业大学, 长沙 410128)

摘 要 采用液体培养的方法, 分离纯化了丝状真菌宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotii*)并研究了其对苯并[a]蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、茚并[1,2,3-cd]芘的降解效果。结果表明:接种处理 30 d, 该菌株对混合体系中 5 种 PAHs 的降解率为 16.1% ~ 24.6%, 而对单一体系中的降解率为 10.4% ~ 33.3%; 同时, 对单一与混合体系中 PAHs 的降解作用存在一定差异, 苯并[k]荧蒽和苯并[b]荧蒽在单一体系中降解率增大, 而其他种类的则减小。本研究结果为高环多环芳烃共代谢机理研究和多环芳烃复合污染水土环境的生物修复提供了一种新的种质资源。

关键词 高环多环芳烃; 生物降解; 真菌

中图分类号 X592 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2009)09-1842-05

***Paecilomyces variotii*, a filamentous fungus capable of biodegrading high molecular weight PAHs.** LI Hui^{1,2}, CAI Xin-de¹, LUO Lin², CHEN Lai-guo¹, ZHOU Jing-gang¹ (¹South China Institute of Environmental Sciences, MEP, Guangzhou 510655; ²Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China). *Chinese Journal of Ecology* 2009 28(9):1842-1846.

Abstract: Microbial degradation is a feasible treatment technology for the remediation of PAHs-contaminated soils, but its effect depends on many factors including the metabolic activity of microorganisms and the bioavailability of PAHs in contaminated soils. Many researches have focused on the microbes that can degrade high molecular weight (HMW) PAHs. In this paper, a filamentous fungus *Paecilomyces variotii* was isolated and purified from a heavy oil-contaminated soil, and its capability in degrading HMW PAHs Benzo[a]anthracene (BaA), benzo[a]pyrene (BaP), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), and indeno[1,2,3-cd]pyrene (IcdP) was examined with liquid culture. After 30 days inoculation with *P. variotii*, the degradation rate of test PAHs was 16.1%–24.6% in mixed system and 10.4%–33.3% in single system, and there was a definite difference in the degradability of test PAHs in the two systems. In single system, the degradation rate of benzo[k]fluoranthene and benzo[b]fluoranthene increased, while the other PAHs were in adverse. The findings of this study could provide a new germplasm resource in the researches of the co-metabolism mechanisms of HMW PAHs and the bioremediation of soil-water environment contaminated by compound PAHs.

Key words: high molecular weight PAHs; biodegradation; fungi.

多环芳烃是环境中分布极为广泛的一类有机化合污染物。由于这类化合物具有致癌、致畸和致突变的特性而备受关注(丁克强和骆永明 2001)。近

几十年来,环境中的 PAHs 含量不断增加(Juhasz & Naidu 2000)。在工业发达国家,土壤中 PAHs 主要来源于大气沉降(倪进治等 2006)。由于 PAHs 是憎水性物质,在固相中分配率高、水溶性低,可以在土壤环境中不断积累。因此,土壤中 PAHs 含量有增加的趋势,特别是城市周边地区(倪进治等, 2006; Li et al. 2006)。

* 国家环境保护部项目(1440800011)和广州市环境保护局资助项目。

** 通讯作者 E-mail: xindecai@scies.com.cn

收稿日期:2009-01-09 接受日期:2009-04-25

由于 PAHs 的毒性和其对环境的危害,PAHs 在土壤中的行为(吸附、迁移、转化、降解)和 PAHs 的生态风险等方面已开展了大量的研究,并取得了一些进展。自然环境中的 PAHs 可通过化学氧化、光解和挥发等作用而减少,但微生物降解是影响 PAHs 持久性的最关键因素(Jacques *et al.* 2005;苏丹等,2007;杨晓磊等,2007)。生物修复被认为是目前去除环境中 PAHs 的最经济有效的方法(Mohan *et al.*, 2006;Leonardi *et al.* 2007)。研究表明,3 环和小于 3 环的 PAHs(低环 PAHs)容易降解,而高环 PAHs(4 环和高于 4 环的 PAHs)由于水溶性更低、在有机质中的吸附更牢固,生物可利用性更低(Dean-ross *et al.* 2002;Johnsen *et al.* 2005;Mohan *et al.* 2006;郝天凌等,2006)。

关于高环 PAHs 的生物修复方面研究,大部分是一种菌株对单一 PAHs 进行的(李永君等,2006;Rentz *et al.*, 2007;刘磊等,2007),而实际环境中 PAHs 污染大都以混合形式出现,因此它们的相互作用使得混合多环芳烃的生物降解更为复杂(徐虹等,2004)。关于菌株降解高环 PAHs 的报道,主要是以苯并[a]芘(BaP)作为研究对象,如 Potin 等(2004)在含有 BaP 的液体培养基中接种分离纯化的一株半知类真菌 *Cladosporium sphaerospermum*,经过 4 d 的培养,培养基中的 BaP 含量降低了 18%;苏丹等(2007)在 BaP 的初始浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接种芽孢杆菌(*Bacillus* sp. SB02)、动胶杆菌(*Zoogloea* sp. SB09)和黄杆菌(*Flavobacterium* sp. SB10),经 42 d 的培养,土壤中 BaP 的降解率分别为 33.04%、25.39% 和 22.02%;臧淑艳等(2006)对污染土壤中 BaP 的微生物降解途径进行了综述等。

本研究采用从石油污染土壤中分离得到的一株具有高环 PAHs 耐性的菌株进行高环 PAHs 降解的试验,探讨该菌株在混合高环 PAHs 体系和单一体系中 PAHs 的代谢特征和趋势,可为高环 PAHs 共代谢机理研究和高环 PAHs 复合污染水土环境的生物修复提供参考。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

PAHs 和回收率指示物(D-Ant, D12-Bei),16 种 PAHs 混标,内标(六甲基苯)均购自百灵威化学技术有限公司,苯并[a]蒽(99.5% 纯度)、苯并[a]芘(98.7% 纯度)、苯并[b]荧蒽(100% 纯度)、苯并

[k]荧蒽(99.1% 纯度)、茚并[1,2,3-cd]芘(98.2% 纯度)。其他试剂为分析纯,有机试剂重蒸。

1.2 土样来源

土样采自广州某油罐区石油污染场地的表层(0~20 cm)土。

1.3 培养基

真菌培养基(MYEA)。麦芽膏提取物 0.2%;酵母膏提取物 0.2%,pH 7.0,补充 0.02% 氯霉素溶液,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

混合高环 PAHs 培养基。将苯并[a]蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、茚并[1,2,3-cd]芘的丙酮溶液添加到 MYEA 培养基中,每种物质含量均为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

单一高环 PAHs 培养基。将苯并[a]蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、茚并[1,2,3-cd]芘的丙酮溶液分别添加到 MYEA 培养基中,PAH 浓度均为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;其他操作同上。

固体培养基。液体培养基中加 1.5% 的琼脂,121 °C 高压蒸汽灭菌。随后放置于 90 mm 的皮氏培养皿制成平板。

1.4 真菌的分离与纯化

将新鲜土样 10 g 放入装有 90 ml 无菌水的 250 ml 锥形瓶中,在往复震荡器上震荡 30 min(28 °C, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。静置 30 min 后,取部分悬浮液进行稀释得到系列悬浮液 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} ,分别各取 1 ml 悬浮液均匀地涂布在含混合高环 PAHs 的琼脂平板上(3 个平行样),28 °C 培养。经过 5~12 d 的生长,挑选特征不同(菌丝体)且生长旺盛的单菌落,转接至无 PAHs 的 MYEA 培养基中。然后在固体培养基平板上反复划线分离获得纯菌种。纯化的菌种 4 °C 斜面保存(中国科学院南京土壤研究所微生物室,1985;周群英和高廷耀,2000)。

1.5 高环 PAHs 的降解实验

在菌种接种前,先用 5 ml 无菌水冲洗纯化菌的固体斜面,并用接种环轻刮斜面,直至菌体完全洗脱。然后将此孢子悬液接种到装有 95 ml $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 葡萄糖溶液的 250 ml 锥形烧瓶内,摇床培养 36 h(28 °C, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),以诱导孢子萌发和菌丝体的生长。萌发的孢子最终浓度控制在大约 10^7 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 。将 10 ml 孢子悬浮液加到装有 50 ml 高环 PAH 单质(混合)液体培养基的 150 ml 三角瓶内(28 °C, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)培养,另外一份含高环 PAHs

的培养基不接种真菌,作为对照。每个处理设 3 个平行样,均在无菌条件下操作。30 d 后取样分析培养液中的 PAHs 含量及菌株生物量。

1.6 优势菌株的鉴定

按照一般真菌的分类方法(魏景超,1979;戴芳澜,1987),对菌株进行形态特征鉴定。纯化后的菌株保存于固体培养基斜面,提取 DNA 进行纯化、PCR 扩增,扩增产物进行凝胶电泳检测和测序,获得的碱基序列结果输入 GenBank 中进行序列比对(Sambrook & Russell 2002)。

1.7 PAHs 的提取分析

将培养 30 d 的真菌 PAHs 培养基加回收率指示物 D-Ant,D12-Bei,菌丝体用滤纸过滤,并用 50 ml 丙酮冲洗,冷冻干燥之后用 DCM 索氏抽提 16 h,以便萃取菌丝体吸附的未被代谢的 PAHs。剩下的滤液用 50 ml DCM 萃取 3 次。将 2 次操作所得的 DCM 混合,旋转蒸发浓缩后过无水硫酸钠柱,并定容到 100 ml(Potin *et al.* 2004)。适当稀释加内标,用 GC-MSD 进行分析。分析仪器为气相色谱质谱联用仪(HP6890GC/5973MSD),DM-5 柱为 60 m × 0.25 mm × 1.4 μm(norminal),使用程序升温,80 ℃ 保持 2 min,然后以 4 ℃ · min⁻¹升至 300 ℃,保持 30 min(陈来国和冉勇 2004)。

1.8 真菌生物量的测定

采用干重法测定。菌丝球通过纤维滤纸真空装置过滤,冷冻干燥抽提后称量(王灿等 2007)。

1.9 数据处理

PAHs 降解率用 *D* 表示(Potin *et al.* 2004):
$$D = [(M_{CK} - M_T) / M_I] \times 100\%$$
式中,*M_{CK}* 为非生物对照的 PAHs 量,*M_T* 为回收的 PAHs 量,*M_I* 为 PAHs 原始量。

2 结果与分析

2.1 优势菌种对混合高环多环芳烃的降解作用

从广州某油罐区石油污染土壤中分离纯化得到

6 株对高浓度高环 PAHs 具有耐性的真菌,编号 F₁ ~ F₆。为了从 6 株优势菌中挑选出降解能力强、降解速度快的高效降解菌,将 6 株真菌在高环 PAHs 混合培养基中培养 30 d 后测定各 PAHs 的浓度并计算降解率。由表 1 结果可知,6 株真菌对苯并[a]蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、茚并[1,2,3-cd]芘的降解能力存在很大的差异,F₁、F₂、F₃ 真菌对高环 PAHs 基本无降解。F₄、F₅、F₆ 对高环 PAHs 有一定的降解,其中 F₆ 菌株对 5 种 PAHs 的降解能力最强,降解率为 16.06% ~ 24.57%;F₅ 菌株次之,降解率为 10.26% ~ 12.21%;F₄ 菌株为第三,除对苯并[a]芘无降解,其他 4 种均有少量降解,降解率为 5.85% ~ 10.26。生物量方面,F₄、F₅、F₆ 的大小为 F₆ > F₄ > F₅,菌株 F₆ 的生物量最大。因此,选择 F₆ 菌株做下一步试验。

2.2 优势降解真菌的鉴定

根据 GenBank 比对结果,F₆ 菌株的 18S rDNA 序列与拟青霉属(*Paecilomyces*)具有最高同源性达 99.5%,与宛氏拟青霉(*P. variotii*)具第二高同源性达 94.9%,根据形态观察结果,可知 F₆ 菌株其形态特征与拟青霉属最相似,与宛氏拟青霉相接近。因此初步鉴定 F₆ 菌株为宛氏拟青霉。

2.3 优势降解真菌对单一多环芳烃的降解作用

培养 30 d 后,接种菌对单一体系中各 PAHs 的降解大小顺序为苯并[k]荧蒽 > 苯并[b]荧蒽 > 茚并[1,2,3-cd]芘 > 苯并[a]芘 > 苯并[a]蒽。此结果与 PAHs 的生物可利用性随着环数的增加而降低并不一致,可见除 PAHs 环数影响其生物降解外,还有许多其他因素,比如真菌分泌酶(Harayama, 1997)、降解产物(Andersson *et al.* 2003)或者其他的环境因素。

从图 1 可以看出,宛氏拟青霉对单一 PAHs 和混合 PAHs 的降解作用有一定差异。在单一体系中苯并[k]荧蒽和苯并[b]荧蒽的降解率分别为

表 1 6 株真菌对 PAHs 的降解率
Tab.1 PAHs degradation rates of six fungi

菌株	降解率(%)					生物量 (g · L ⁻¹)
	苯并[a]蒽	苯并[a]芘	苯并[b]荧蒽	苯并[k]荧蒽	茚并[1,2,3-cd]芘	
F ₁	0.52 ± 0.31	0.21 ± 0.18	0.05 ± 0.01	0.87 ± 0.62	0	2.19 ± 0.38
F ₂	1.23 ± 0.53	1.21 ± 0.89	0.19 ± 0.03	0.95 ± 0.56	0.47 ± 0.29	2.88 ± 0.29
F ₃	0	0.45 ± 0.32	0.26 ± 0.15	0.38 ± 0.12	0.13 ± 0.06	1.79 ± 0.20
F ₄	9.29 ± 2.13	0	10.26 ± 1.20	5.85 ± 0.08	8.67 ± 1.35	1.92 ± 0.38
F ₅	10.84 ± 2.89	11.24 ± 1.92	10.26 ± 3.58	12.21 ± 0.98	11.56 ± 4.12	1.63 ± 0.14
F ₆	17.18 ± 0.05	16.06 ± 2.58	21.11 ± 1.61	21.12 ± 2.13	24.57 ± 0.12	2.12 ± 0.10

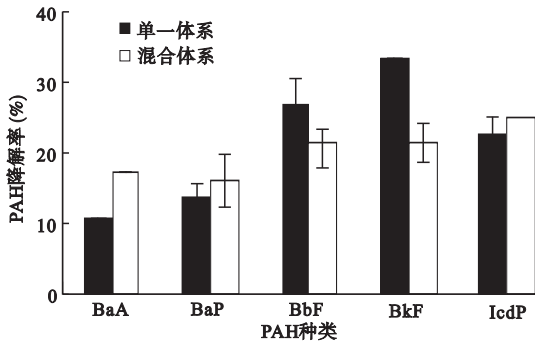


图1 宛氏拟青霉对高环 PAH 的降解率

Fig.1 HMW PAH degradation rates of *Paecilomyces variotii*

33.25%和26.44%,均较混合体系中的降解率(分别为21.12%和21.11%)高;而单一体系中苯并[a]蒽、苯并[a]芘、茚并[1,2,3-cd]芘的降解率比混合体系中的低。这种现象与Dean-ross等(2002)采用分支杆菌(*Mycobacterium flavescens*)和红球菌(*Rhodococcus* sp.)对荧蒽、蒽和芘在单一体系和混合体系降解的结果相似。出现这种现象的原因,可能是由于微生物共代谢降解过程中出现了一些竞争抑制或者是协同促进的现象。混合体系中苯并[k]荧蒽和苯并[b]荧蒽的降解率有所下降,这可能是由于其他PAHs单一或者是联合抑制了其共代谢降解,相反,对于苯并[a]蒽、苯并[a]芘和茚并[1,2,3-cd]芘可能是其他种类PAHs促进了其共代谢降解,使得降解率升高。

通常在PAHs混合体系中,微生物先降解低分子量PAHs(2环或3环),再降解高分子量PAHs(4~6环)混合体系中PAHs的降解速率将会发生由快至慢的变化,一方面是高环PAHs的生物可利用性低;另一方面,共代谢底物的耗尽、营养元素的缺失、中间产物的抑制等对降解速率产生影响(陈春云等2007),因此可以通过相应的调控措施来提高生物修复的效率。宛氏拟青霉降解PAHs的共代谢机理及降解的最适条件有待进一步研究。

Sasek等(2003)研究了2株白腐真菌*Irpex lacteus*和*Pleurotus streatus*对土壤中PAHs的降解,污染土壤接种真菌5周后,土壤中苯并[a]芘和苯并[a]蒽降解率为11%~16%。相比之下,本实验分离的宛氏拟青霉具有更强的降解能力。

3 结 论

从石油污染土壤分离得到的6株菌种都对高浓

度的PAHs有一定耐性,但并非耐性菌株均具有明显降解作用。

分离纯化得到的生物量和降解效果最优的菌株经生理生化试验以及18S rDNA试验,初步鉴定为宛氏拟青霉。该菌株具有同时降解苯并[a]蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[k]荧蒽、茚并[1,2,3-cd]芘的能力。

接种处理30 d后,在混合体系中5种高环PAHs的降解率为16.06%~24.57%,而单一体系中高环PAHs的降解率为10.42%~33.25%。与混合体系中各种PAHs降解率相比,单一体系中苯并[k]荧蒽和苯并[b]荧蒽降解率增大,而苯并[a]蒽、苯并[a]芘、茚并[1,2,3-cd]芘降解率则减小;同一种高环PAHs在不同培养体系中的降解率存在一定差异。

参考文献

- 陈春云,岳珂,陈振明,等. 2007. 微生物降解多环芳烃的研究进展. 微生物学杂志, 27(6):100-103.
- 陈来国,冉勇. 2004. 植物修复多环芳烃研究现状. 环境科学与技术, 27(5):99-101.
- 戴芳澜. 1987. 真菌的形态和分类. 北京:北京科学出版社.
- 丁克强,骆永明. 2001. 多环芳烃污染土壤的生物修复. 土壤, 33(4):169-178.
- 李永君,赵化冰,任河山,等. 2006. 萘降解细菌的分离及其降解基因的分子检测. 生态学杂志, 25(7):738-742.
- 刘磊,李习武,刘双江,等. 2007. 降解多环芳烃的菌株 *Gordonia* sp. He₄ 的分离鉴定及其在非污染土壤修复过程中的动态变化. 环境科学, 28(3):617-622.
- 倪进治,骆永明,魏然. 2006. 土壤有机和无机组分对多环芳烃环境行为影响的研究进展. 土壤, 38(5):559-564.
- 苏丹,李培军,王鑫,等. 2007. 3株细菌对土壤中芘和苯并芘的降解及其动力学. 环境科学, 28(4):913-917.
- 王灿,胡洪营,于茵,等. 2007. 培养基种类和培养条件对白腐真菌生长和产酶特性的影响. 环境科学研究, 20(2):9-13.
- 魏景超. 1979. 真菌鉴定手册. 上海:上海科学技术出版社.
- 徐虹,章军,刘陈立,等. 2004. PAHs降解菌的分离、鉴定及降解能力测定. 海洋环境科学, 23(3):61-64.
- 杨晓磊,陆贻通,曹林奎. 2007. 多环芳烃荧蒽降解菌的筛选鉴定及降解特性研究. 科技通报, 23(1):942-949.
- 臧淑艳,李培军,张英,等. 2006. 污染土壤中苯并(a)芘的微生物降解途径研究进展. 生态学杂志, 25(8):978-982.
- 郑天凌,骆苑蓉,曹晓星,等. 2006. 高分子量多环芳烃——苯并[a]芘的生物降解研究进展. 应用与环境生物

- 学报, **12**(6):884-890.
- 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 1985. 土壤微生物研究. 北京:科学出版社.
- 周德平, 夏颖, 韩如, 等. 2003. 三株菲降解细菌的分离、鉴定及降解特性的研究. 环境科学学报, **23**(1):124-128.
- 周群英, 高廷耀. 2000. 环境工程微生物. 北京:高等教育出版社.
- Sambrook J, Russell DW. (黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译). 2002. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社.
- Andersson BE, Lundstedt S, Tornberg K, et al. 2003. Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**:1238-1243.
- Dean-ross D, Moody J, Cerniglia CE. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, **41**:1-7.
- Harayama S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**:268-273.
- Jacques RJS, Santos EC, Bento FM, et al. 2005. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **56**:143-150.
- Johnsen AR, Wick LY, Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, **133**:71-84.
- Juhasz AL, Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **45**:57-58.
- Leonardi V, Šasek V, Petruccioli M, et al. 2007. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **60**:165-170.
- Li XH, Ma LL, Liu XF, et al. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon in urban soil from Beijing, China. *Journal of Environmental Sciences*, **18**:944-950.
- Mohan SV, Kisa T, Ohkuma T, et al. 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **5**:347-374.
- Potin O, Rafin C, Veignie E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **54**:45-52.
- Potin O, Veignie E, Rafin C. 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **51**:71-78.
- Rentz JA, Alvarez PJJ, Schnoor JL. 2008. Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental Pollution*, **151**:669-677.
- Sasek V, Cajthaml T, Bhatt M. 2003. Use of fungal technology in soil remediation: A case study. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, **3**:5-14.

作者简介 李慧,女,1984年生,硕士研究生。主要从事污染土壤修复研究。E-mail: lihui235@yahoo.com.cn
责任编辑 魏中青
