

复合固定化法固定微生物去除芘*

李 婧¹ 党 志^{1,2,3**} 郭楚玲^{1,2} 卢桂宁¹ 卢 静¹

(1. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广州, 510006; 2. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州, 510006; 3. 纸浆造纸工程国家重点实验室, 广州, 510640)

摘 要 通过“玉米秸秆吸附-包埋-交联”复合固定化方法固定多环芳烃降解菌 GY2B 和 GP3B, 提高对芘的降解性能, 并对其作用过程进行初步研究. 结果表明, 游离态单细菌 GY2B、GP3B 和混合菌 GY2B + GP3B 的 7 d 降解率分别为 14.0%、55.0% 和 73.6%, 而固定化 GY2B + GP3B 秸秆小球在 5 d 内即达 98.2%, 去除率得到了显著的提高; 对固定化微生物小球的比表面积、孔隙率和扫描电镜图分析, 说明载体表面具有较高的比表面积, 内部是具有大量孔隙的骨架结构, 在内部生长的微生物和基质有充分的接触面积和机会; 固定化 GY2B + GP3B 秸秆小球类似于一个吸附降解一体化的微型反应器. GY2B + GP3B 混合菌芘代谢产物有菲-4-羧酸、二甲基酞酸、1-羟基-2-萘酸、1-萘酚和水杨酸, 推测芘的降解是 GY2B + GP3B 混合菌集体代谢的综合作用的结果, GP3B 的中间转化产物作为 GY2B 生长代谢的基质, 使得芘得到更完全的降解.

关键词 芘, 固定化微生物, 生物降解, 玉米秸秆, 代谢产物.

多环芳烃(PAHs)广泛存在于环境中的有机污染物, 生物降解是 PAHs 从环境中去除的重要途径^[1]. 具有四环结构的芘是 PAHs 污染监测的指标物, 以芘为模型物研究 PAHs 的生物降解具有重要意义^[2-3].

固定化微生物技术可固定筛选出的特定优势菌属, 能使生物处理系统的专一性、耐受性增强, 处理效果稳定^[4]. 吸附、包埋、交联等传统的固定化方法有着明显的优点, 但同时各自都存在难以克服的缺陷^[4]. 为了得到具有高固定化强度和高微生物活性的微生物固定化系统, 可使用两种或两种以上的固定化方法结合起来的复合固定化法, 克服单一固定化法的缺陷与不足^[4], 获得单一固定化方法所无法达到的性能. 聚乙烯醇和海藻酸钠是固定化生物技术的载体材料中使用最为广泛的, 适当混合聚乙烯醇和海藻酸钠作为固定化载体制作而成的固定化生物小球, 具有生物兼容性好、稳定性强、通透性高等特点, 被广泛用于含特定有机物的废水处理研究中^[5].

本研究选择使用聚乙烯醇(PVA)以及海藻酸钠(SA)作为固定化微生物细胞的固定化包埋载体, 利用“玉米秸秆吸附-包埋-交联”相结合的复合固定化方法固定多环芳烃高效降解菌, 提高其降解性能, 研究其作用过程和作用机理, 以便用于实际污染水体的修复.

1 材料与方法

1.1 实验菌株

GP3B: 伯克菌属(*Pandoraea pnomenusa*), GenBank ID 号为 EU233279, 由本实验室从长期受石油污染的土壤中驯化筛选得到的一株芘降解菌, 7 d 内可将 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芘降解 44.7%^[6]; GY2B: 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.), GenBank ID 号为 DQ139343, 由本实验室从广州油制气厂附近污染土壤筛选得到的一株菲降解菌, 48 h 内对 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 菲降解率达到 99.1%^[7]. 两菌预先在芘为唯一碳源的无机盐基础培养基中进行了浓度梯度驯化.

取 1 mL 纯菌液, 加入到 50 mL 肉汤富集培养基中, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇瓶培养 24 h 后, 于 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下高速离心后用生理盐水洗涤, 此过程重复 3 次后收集菌体, 再用生理盐水将菌体

2012 年 2 月 25 日收稿.

* 广东省自然科学基金项目(9351064101000001); 广州市环保局科技成果应用示范项目; 广州市珠江新星项目资助.

** 通讯联系人, E-mail: chzdang@scut.edu.cn

定容成 $OD_{600}=0.5$ 的菌悬液,放置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用. GP3B 和 GY2B 混合菌悬液体积比为 1:1, $OD_{600}=0.5$.

1.2 仪器与试剂

UV-2450 型紫外光谱仪(日本岛津)、JSM-6360LV 扫描电子显微镜、全自动 ASAP 2020M 比表面孔径分析仪、Agilent 6890N 气相色谱仪(FID;HP-5 毛细管柱, $30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 1.00\text{ }\mu\text{m}$)、Thermo Fisher Scientific DSQ II 单四极杆气质联用仪(HP-5MS 石英毛细管柱, $30\text{ m}\times 0.32\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$).

苈(pyrene)购于 Aldrich 公司,纯度为 98%;聚乙烯醇(分子量 1750 ± 50),国药集团化学试剂有限公司;海藻酸钠,化学纯,国药集团化学试剂有限公司;正己烷、二氯甲烷、乙腈、甲醇均为色谱纯(天津市化学试剂一厂);萃取过程中用到的所有玻璃器皿均用重铬酸钾洗液清洗后,放置备用.

无机盐基础培养液(MSM)^[7]的配置: KH_2PO_4 $42.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $108.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $167\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4Cl $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, MgSO_4 $67.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, CaCl_2 $36.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 微量元素溶液 1.0 mL . 其中微量元素溶液: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $34.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $39.9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ $42.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 和 NaOH 溶液调节无机盐培养基(MSM) pH 值为 7.0 左右. 在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 101.33 KPa 灭菌 20 min 后使用.

肉汤富集培养基: $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 牛肉膏, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 调节 pH 值为 7.0.

苈无机盐培养液:以正己烷溶解苈配制 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 苈标准储备液. 取适量苈储备液,置于灭菌的 100 mL 三角瓶瓶底,待正己烷挥发完后加入经高压蒸汽灭菌冷却后的无机盐培养基,如无特殊说明,本实验中苈的初始浓度均为 $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.3 实验方法

1.3.1 固定化微生物小球的制备

玉米秸秆经清洗、烘干、粉碎干燥后过 80 目筛,取筛下备用. 称取干重 0.5 g 玉米秸秆吸附载体倒入锥形瓶,加入 30 mL 无机盐培养基后灭菌备用. 在固定化培养基中加入适量菌悬液,摇床培养 8 h . $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心清洗得吸附载体(A),加入无菌水定容至 20 mL 备用.

将 PVA 和 SA 加入 60 mL 蒸馏水浸泡过夜,次日高温灭菌,冷却至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右. 加入 20 mL 吸附载体(A),无菌水定容至 100 mL 后充分混匀,最终 PVA 浓度 10%,SA 为 0.5%,包埋微生物量为 10%. 将混合物逐滴滴入 5% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中,浸渍 1 h ,然后将小球在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h ,再在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 12 h ,最后在室温解冻^[8],所得即为固定化微生物秸秆小球(E),如图 1 所示. 以不含微生物和玉米秸秆的空白球(B)、只含玉米秸秆的空白秸秆球(C)、只含微生物的固定化微生物球(D)作为对比试验材料.

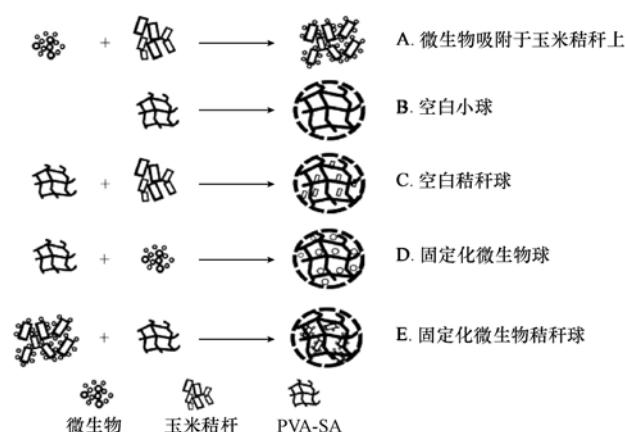


图 1 不同固定化示意图

Fig. 1 Different immobilization

1.3.2 固定化小球各项物理参数测定

固定化小球直径的测定(mm):随机选取 20 个大小均匀的固定化小球,用游标卡尺测其直径,计算平均直径.

传质性(%):于 50 mL 蒸馏水中滴入 3 滴亚甲基蓝溶液,加入 50 颗小球, 24 h 后,以空白水为参比,

于 665 nm 处分别测定小球的亚甲基蓝溶液的吸光度和原亚甲基蓝溶液的吸光度,计算固定化小球吸附的亚甲基蓝百分比。

强度系数(%):将 100 个小球放入 125 mL 锥形瓶,加入 50 mL 去离子水,以 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡,观察 24 h 后完好小球占原小球总数的比率,表示小球的强度系数。

比表面积和孔隙度测定:利用全自动 ASAP 2020M 比表面孔径分析仪,测定小球在 77 K 条件下的吸附等温线。比表面积和孔径则是由 BET 比表面积测定方法测定^[9]。

1.3.3 固定化菌对茚去除率的测定

将一定量的固定化微生物小球加入含茚培养基中, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温摇床中培养,一定时间段后用正己烷萃取,采用气相色谱法测定萃取液中残留茚浓度。Agilent 6890N 气相色谱仪;FID 检测器,HP-5 毛细管柱,进样量 $1 \text{ } \mu\text{L}$,不分流进样,进样口的温度是 $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$,检测器的温度为 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$,升温程序为:初温 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$,恒温 2 min;以 $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升到 $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$,恒温 5 min。

$$\text{茚去除率}(\%) = \frac{\text{初始茚含量} - \text{残留茚含量}}{\text{初始茚含量}} \times 100\%$$

1.3.4 扫描电镜观察

为了观察包埋情况如何,菌体是否能良好地生长和繁殖,利用扫描电子显微镜(SEM)观察混合菌的生长情况。使用 2.5% 戊二醛-1% 四氧化锇双固定法进行样品前处理,镀金膜约 10 nm,使用 JSM-6360LV 扫描电子显微镜对样品进行观察。

1.3.5 茚代谢产物的测定

通过测定代谢产物以推测降解代谢途径,采用 C18 固相萃取柱萃取样品后,进气相色谱-质谱(GC-MS)测定代谢产物。

固相萃取操作步骤:活化 C18 柱子:依次加入 5 mL 二氯甲烷、5 mL 的甲醇和 5 mL 的超纯水,以 $1\text{--}2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率通过柱子,以去除小柱中的杂质和残留,真空抽滤;过样:将样品 pH 值调节为 2,以约 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率通过小柱,让待测组分被保留在吸附柱上,真空抽滤,再用柔和的氮气将小柱吹干;洗脱:先后用 7 mL 二氯甲烷、3 mL 乙腈以 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率通过吸附柱,将待测组分洗脱出来^[10]。所得的溶剂经旋转蒸发后转移到 2 mL 样品瓶中。

GC-MS 设置条件:不分流进样,进样量 $1.0 \text{ } \mu\text{L}$,电子电离源(EI),电离能量 70 eV,离子源温度 $260 \text{ }^{\circ}\text{C}$,进样口温度 $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$,载气为高纯氦气,载气流量 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。升温程序:始温 $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min),以 $15 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,全扫描。

2 结果与讨论

2.1 固定化小球物理参数的分析

固定化小球的各物理参数如表 1 所示。从表 1 可见,相比于空白球(B),固定化 GP3B 秸秆球(E)的传质性高、机械强度系数较高,具有更好的强度和稳定性。由于菌体的加入量很少,对膨胀系数和机械强度的影响可忽略不计,因此其结果应该主要是由于玉米秸秆的加入而引起的。微生物-聚合物的混合物滴入到 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液 1 h 后将小球在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h,再在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 12 h,最后在室温解冻。这种循环冷冻解冻法作为一种物理交联法,相比于传统的硼酸交联法制备的载体,因接触化学交联试剂时间短,所以对微生物的活性影响较低,但所得载体仍具有较大的水溶性,故稳定性不佳^[10],而本文通过加入玉米秸秆的办法解决了这个问题。

本文考察了小球的 BET 比表面积和孔径大小。由表 1 可看出固定化 GP3B 秸秆球(E)具有较高的比表面积和较大的孔径,比起空白球(B),GP3B 秸秆球(E)内部生长的微生物与基质会有更加充分的接触机会和生长空间,同时也说明适量玉米秸秆的添加,增加了支撑小球内部空间的骨架结构,这有利于小球孔隙率的提高,从而增加了小球的通透性。

2.2 单一和混合菌株对茚的去除效果比较

将等量的游离态和固定化微生物加入到以茚为唯一碳源的培养基中,菌株分别为 GY2B、GP3B 以及混合菌株(GY2B:GP3B = 1:1),培养 7 d 后的结果见表 2。可以看到,无论是游离态菌还是固定化,混合

菌的降解效率都要明显高于单一菌,这表明 GY2B + GP3B 混合菌可提高对茚的降解效率. 当两种菌株混合,它们可能有着不同的酶系统或代谢作用,从而合作降解污染物^[11],机理需要进一步研究.

表 1 固定化小球的物理参数

Table 1 Physical parameters of immobilized biological beads		
物理参数	空白球 (B)	GP3B 玉米球 (E)
密度/(g·cm ⁻³)	1.5	1.3
初始直径/mm	3.1	3.7
传质性/%	93	100
机械强度系数/%	83	100
比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	0.328	0.585
孔径/nm	573.67	1397.48
茚去除率/%	15.93	96.41

表 2 游离菌和固定化菌的 7 d 茚去除率 (%)

Table 2 Comparison of the 7 d pyrene removal rate between free and immobilized bacteria				
细菌	游离菌	游离菌 + 秸秆	固定化微生物球	固定化微生物秸秆球
GY2B	14.0	26.5	31.0	51.2
GP3B	55.0	69.6	91.1	96.4
GY2B + GP3B	73.6	83.2	98.0	100.0

2.3 固定化 GY2B + GP3B 秸秆小球去除茚连续实验

为了了解固定化 GY2B + GP3B 秸秆小球去除茚的机理,本文对比了固定化微生物秸秆小球 (E) 和空白球 (B)、只含玉米秸秆的空白秸秆球 (C)、游离态的 GY2B + GP3B、预吸附于玉米秸秆的 GY2B + GP3B (A)、固定化 GY2B + GP3B 球 (D) 对茚的去除效果,结果见图 2.

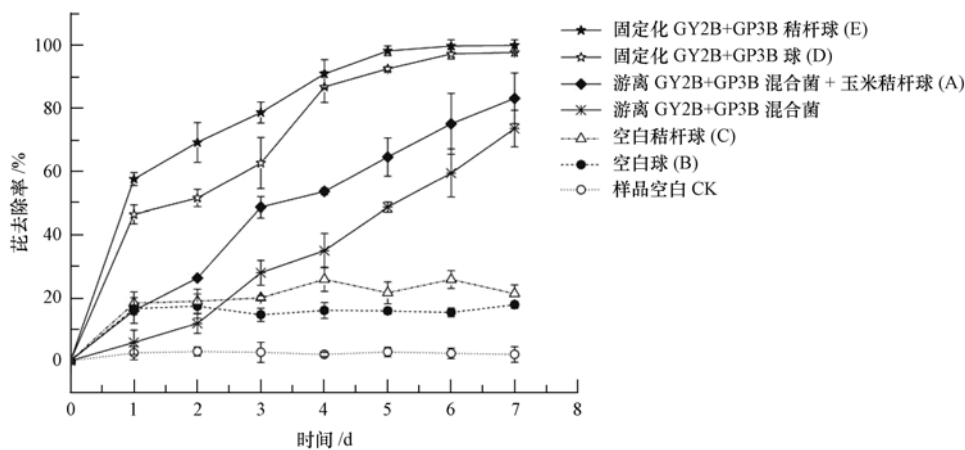


图 2 游离态和固定化 GY2B + GP3B 连续去除茚的效果

Fig. 2 Pyrene removal profiles using free and immobilized mixed GY2B and GP3B bacteria

样品空白 (CK) 对茚的 7 d 去除率为 2.0%, 可能是由于实验操作误差和仪器误差造成的, 在误差范围之内. 空白球 (B)、只含玉米秸秆的空白球 (C) 对茚的 7 d 去除率分别是 17.8%、21.4% 左右, 并在 24 h 内就达到稳定水平; 对比空白, 可推测固定化载体本身对茚就具有吸附作用, 并且在 24 h 内即达到吸附饱和. 而游离态的 GY2B + GP3B 的 7 d 的去除率为 73.6%、预吸附于玉米秸秆的 GY2B + GP3B (A) 为 83.2%、固定化 GY2B + GP3B 球 (D) 为 97.8%, 固定化 GY2B + GP3B 秸秆球 (E) 为 100.0%. 虽然固定化 GY2B + GP3B 球 (D) 在第 7 天也基本完全去除了茚, 但固定化 GY2B + GP3B 秸秆球 (E) 在第 5 天就达到 98.2%. 这更进一步验证了玉米秸秆的加入在一定程度上提高了茚的去除效率. 在制备过程中适量玉米秸秆的添加, 增加了支撑小球内部空间的骨架结构, 这有利于小球孔隙率的提高, 进而增加了小球的通透性, 降低了扩散阻力, 增强了小球的吸附能力, 提高了小球孔隙内部茚的浓度, 从而提高微生物的相对活性. 同时推测固定化 GY2B + GP3B 玉米小球处理茚首先进行的是吸附作用, 然后依靠吸附和

生物降解的协同作用去除茈。

试验结果表明,游离态的 GY2B + GP3B 有 48 h 左右的迟滞期,而当其被固定化后迟滞期则明显缩短.原因可能在于固定化微生物玉米小球具有吸附作用,在小球内部的微生物可以得到更多接触茈的机会,从而使得降解菌能更好地摄取底物,促进底物的降解;而游离态的微生物,由于茈在水中的溶解度很低,游离态的菌不能高效地利用茈.因此,固定化微生物比游离态的微生物有更强的适应性.

2.4 扫描电镜图

由图 3(a)可观察到固定化小球外表面凹凸不平,富有空隙,而空隙的大小也符合所测得的 BET 空隙大小;由图 3(b)可观察到固定化小球内部形成了网络状结构,是具有大量孔隙的骨架结构,这为微生物在内部的良好生长提供了微环境.而无论是表面的空隙结构还是内部的骨架结构,都说明了在内部生长的微生物和基质会有充分的接触面积和机会,利于营养物质的传递.

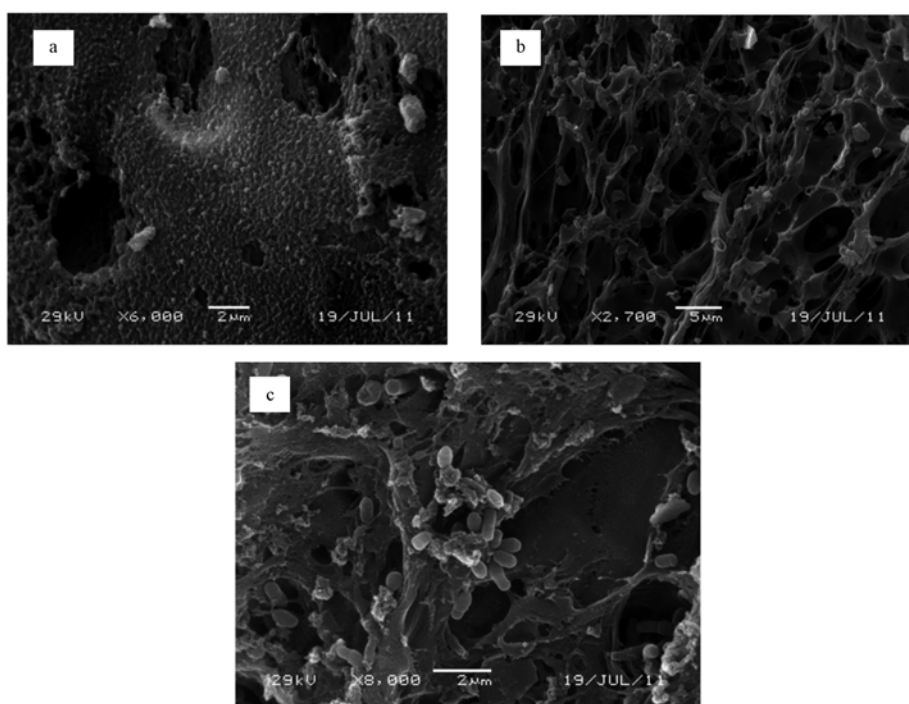


图 3 固定化 GY2B + GP3B 秸秆小球表面、内部微观结构

Fig. 3 SEM image of the surface and internal microstructure of immobilized CS GY2B + GP3B beads

图 3(c)说明微生物被载体固定化后,大部分菌体被包埋孔隙内附着生长,形成以单菌和小菌团生长的现象. GY2B + GP3B 菌在载体内部生长良好,且形态未发生异变,为降解茈提供了必要的基础.

2.5 降解代谢产物

为探讨 GY2B + GP3B 混合菌降解茈的机理,通过测定微生物代谢产物以推测降解代谢途径.培养固定化 GY2B + GP3B 秸秆球的培养基中并不能检测到明显的代谢产物,可能是因为微生物被包埋在载体中,而代谢产物集中在球体内,在培养基中含量太低.因此,本文萃取分析了游离 GY2B + GP3B 混合菌以茈为唯一碳源培养的培养基,具体结果见图 4.

通过分析中间代谢产物的质谱图和参考已有的研究报道^[14-17],对谱图中与茈降解有关的化合物进行了初步鉴定.发现混合菌 GY2B + GP3B 的茈代谢中间物质 A, $t_R = 11.39$ min,母离子 m/z 为 138,主要离子碎片 $m/z = 120$ ($M^+ - 18$, $-H_2O$), $m/z = 92$ ($M^+ - 46$, $-H_2O$ 和 $-CO$),代表着 $-OH$ 和 $-COOH$,确定为水杨酸;物质 B $t_R = 14.21$ min,母离子 m/z 为 144,离子碎片 $m/z = 115$ ($M^+ - 29$, $-COH$) 和 $m/z = 89$ ($M^+ - 55$, $-CHO$ 和 $-C_2H_2$),确定为 1-萘酚;物质 C $t_R = 17.04$ min,母离子 m/z 为 188,主要离子碎片 $m/z = 170$ ($M^+ - 18$, $-H_2O$), $m/z = 142$ ($M^+ - 46$, $-COOH_2$), $m/z = 114$ ($M^+ - 74$, $-H_2O - CO$ 和 $-CO$),确定为 1-羟基-2-萘酸;物质 D $t_R = 19.26$ min,母离子 m/z 为 194,主要离子碎片 $m/z = 163$ ($M^+ - 31$, $-OCH_3$), $m/z = 133$ ($M^+ - 30$, $-OCH_2$),确定为二甲基酞酸;物质 E $t_R = 21.02$ min,母离子 m/z 为 202,

对比空白确定为茚;物质 F $t_R = 23.69$ min,母离子 m/z 为 236,主要离子碎片 $m/z = 221$ ($M^+ - 15$, $-CH_3$), $m/z = 205$ ($M^+ - 31$, $-OCH_3$), $m/z = 177$ ($M^+ - 59$, $-COOCH_3$),确定为菲-4-羧酸。

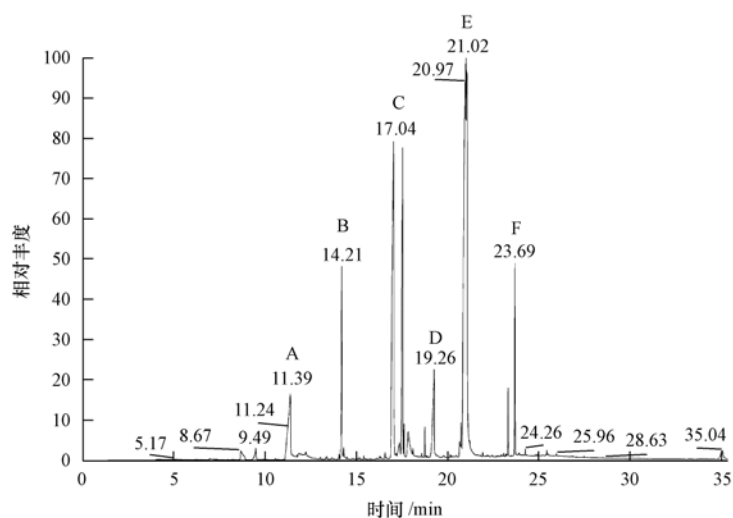


图4 GY2B + GP3B 代谢产物 GC-MS 分析总离子流图

A. 水杨酸; B. 1-萘酚; C. 1-羟基-2-萘酸; D. 二甲基酞酸; E. 茚; F. 菲-4-羧酸

Fig. 4 TIC of metabolic products by GY2B + GP3B

实验中检测到茚的代谢产物二甲基酞酸和菲-4-羧酸^[16,18]。在多环芳烃的诱导下,微生物会分泌单加氧酶或双加氧酶^[12]。在这些酶的催化作用下,把氧加到苯环上,形成 C—O 键,再经过加氢、脱水等作用使 C—C 键断裂,苯环数减少^[13]。前人的研究表明,二甲基酞酸和菲-4-羧酸是茚经双加氧酶攻击后产生的代谢产物^[16,18],由此推断 GP3B 作为茚降解菌的代谢过程为双加氧酶作用的。另外检测到中间代谢产物水杨酸,1-萘酚和 1-羟基-2-萘酸,三者都是细菌降解菲过程中普遍存在的物质^[15,17]。因此猜测茚被混合菌降解过程:首先由 GP3B 使茚开环后,陆续降解生成菲-4-羧酸、二甲基酞酸;而因为菲高效降解菌 GY2B 的存在,GY2B 利用 GP3B 的代谢产物,从而进入到菲降解途径,生成 1-羟基-2-萘酸、1-萘酚和水杨酸后,进入到三羧酸循环中^[16]。茚的降解是混合培养的微生物集体代谢的综合作用的结果,GP3B 的中间转化产物作为 GY2B 生长代谢的基质,使得茚得到更彻底的降解。

3 结论

(1)“玉米秸秆吸附-包埋-交联”相结合的复合固定化方法固定 GY2B 和 GP3B,使得茚的去除率得到了显著的提高,固定化 GY2B + GP3B 秸秆球在 7 d 内能基本完全去除初始浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茚。游离态 GY2B、GP3B 和 GY2B + GP3B 的 7 d 降解率分别为 14.0%、55.0% 和 73.6%,而固定化 GY2B + GP3B 秸秆球在 5 d 内对茚的去除率达到 98.2%。

(2)通过测定固定化微生物球比表面积、孔隙率和扫描电镜观察,可看出载体表面具有较高的比表面积和较大的空隙,内部是具有大量孔隙的骨架结构。玉米秸秆的加入增加了支撑小球内部空间的骨架结构,这有利于小球孔隙率的提高,进而增加了小球的通透性,降低了扩散阻力,增强了小球的吸附能力,从而提高微生物的相对活性。

(3)经 GC-MS 分析,GY2B + GP3B 混合菌茚代谢产物有菲-4-羧酸、二甲基酞酸、1-羟基-2-萘酸、1-萘酚和水杨酸,推测茚的降解是 GY2B + GP3B 混合菌集体代谢的综合作用的结果,GP3B 的中间转化产物作为 GY2B 生长代谢的基质,使得茚得到更彻底的降解。

参 考 文 献

- [1] Peng R, Xiong A, Xue Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 927-955

- [2] Martorell I, Perelló G, Martí-Cid R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend[J]. *Journal of Food Protection*, 2010, 36(5): 424-432
- [3] Somtrakoon K, Suanjit S, Pokethitiyook P, et al. Phenanthrene stimulates the degradation of pyrene and fluoranthene by *Burkholderia* sp. VUN10013[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, 24(4): 523-531
- [4] 曲洋,张培玉,郭沙沙,等. 复合固定化法固定化微生物技术在污水生物处理中的研究应用[J]. *四川环境*, 2009, 28(3): 78-84
- [5] 包木太,巩元娇,李一鸣. 固定化微生物在降解含油污水中的应用[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2010, 56(1): 109-114
- [6] 陈晓鹏,易筱筠,陶雪琴,等. 石油污染土壤中芘高效降解菌群的筛选及降解特性研究[J]. *环境工程学报*, 2008, 2(3): 413-417
- [7] Tao X, Lu G, Dang Z, et al. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils[J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(3): 401-408
- [8] Wang Y, Yang X, Tu W, et al. High-rate ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* with complex of PVA and sodium alginate[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(2): 212-217
- [9] 白雪,周林成,李彦锋,等. 聚乙烯醇载体制备及其固定化微生物处理污水研究进展[J]. *离子交换与吸附*, 2010, 26(4): 377-384
- [10] 李先国,张庆红,刘思敏,等. 多环芳烃的海洋环境行为及其代谢产物的研究进展[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(3): 467-475
- [11] Yang S, Jin H, Wei Z, et al. Bioremediation of oil spills in cold environments: A review[J]. *Pedosphere*, 2009, 19(3): 371-381
- [12] Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Biodegradation*, 1992, 3(2): 351-368
- [13] Romero M C, Salvioi M L, Cazau M C, et al. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi[J]. *Environmental Pollution*, 2002, 117(1): 159-163
- [14] Li X, Cullen W R, Reimer K J, et al. Microbial degradation of pyrene and characterization of a metabolite[J]. *Science of the Total Environment*, 1996, 177(1-3): 17-29
- [15] Prabhu Y, Phale P S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(4): 342-351
- [16] Dean-Ross D, Cerniglia C E. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996, 46: 307-312
- [17] 陶雪琴,卢桂宁,易筱筠,等. 非高效降解菌的筛选及其降解中间产物分析[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(1): 190-195
- [18] Kim S, Kweon O, Jones R C, et al. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(2): 464-472

Removal of pyrene using immobilized microorganism

LI Jing¹ DANG Zhi^{1,2,3*} GUO Chuling^{1,2} LU Guining¹ LU Jing¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510006, China;

2. The Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou, 510006, China;

3. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

ABSTRACT

In order to improve the degradation of pyrene, immobilized PAHs-degrading bacteria GY2B and GP3B were prepared that involved pre-adsorption on corn stalk (CS), entrapment and cross-linking. The degradation rates and process were studied. Free GY2B, free GP3B and free mixed GY2B + GP3B were incubated individually to test their own pyrene degradation rates in 7 d, which were 14.0%, 55.0% and 73.6%, respectively. On the other hand, the pyrene removal rate of immobilized CS GY2B + GP3B reached 98.2% in 5 d. The analysis of specific surface area, porosity and scanning electron microscopy showed that the interior of the support had a large number of pores and full of skeleton structure. The microorganisms inside had sufficient contact with the substrate. With the addition of corn stalks, the adsorption capacity was enhanced and the removal of pyrene was improved to certain extent. From the GC-MS results of GY2B + GP3B metabolites, phenanthrene-4-carboxylate, dimethylated phthalic acid, 1-hydroxy-2-naphthoic acid, 1-naphthol and salicylic acid were identified. It is likely that degradation of pyrene was the cooperative result by mixed GY2B + GP3B bacteria. And the intermediate metabolites of GP3B were used as the substrates by GY2B, which made the pyrene degradation more complete.

Keywords: pyrene, immobilization, biodegradation, corn stalk, metabolism.