

姜春阳,贾春云,张丽芳,等. 微生物胞外聚合物对土壤中芘降解效果的促进作用[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):303-306.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.100

微生物胞外聚合物对土壤中芘降解效果的促进作用

姜春阳¹, 贾春云², 张丽芳¹, 谷 玥³, 巩宗强²

(1. 沈阳理工大学, 辽宁沈阳 110168; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所污染生态与环境工程重点实验室, 辽宁沈阳 110016;
3. 沈阳师范大学, 辽宁沈阳 110034)

摘要:研究外加不同浓度胞外聚合物(EPS)对芽孢杆菌和黑曲霉降解土壤中芘效果的影响。结果表明,在 100 mg/kg 芘污染土壤中添加芽孢杆菌 EPS 由 411.78 mg/kg 增加到 2 779.54 mg/kg,土壤中芘的残余浓度减少 6.27 mg/kg;向土壤中接种芽孢杆菌 0.86 亿 CFU/kg,芘的降解率为 36.99%,EPS 由 411.78 mg/kg 增加到 2 779.54 mg/kg,芘残留浓度下降到 47.72 mg/kg。黑曲霉 EPS 由 1 387.68 mg/kg 增加到 3 844.37 mg/kg,土壤中芘的残余浓度由 42.36 mg/kg 降至 31.12 mg/kg;向土壤中接种黑曲霉 1.0 亿 CFU/kg,EPS 浓度由 1 387.68 mg/kg 增加到 3 844.37 mg/kg,芘残留浓度降至 38.15 mg/kg。因此,真菌和细菌的 EPS 具有较强的降解土壤中芘的能力,且 EPS 浓度越高土壤中芘的降解效果越好。

关键词:胞外聚合物(EPS);芘;芽孢杆菌;黑曲霉;土壤;降解

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0303-04

土壤环境中持久性有机污染物的生物修复技术是国际污染修复领域研究的热点^[1]。在多环芳烃(PAHs)污染土壤的多种生物修复技术中,微生物修复技术应用最广泛,主要是通过驯化土著微生物或人为投加外源微生物对土壤中 PAHs 进行转化、降解与去除^[2-3]。目前,有关 PAHs 污染土壤的微生物修复技术及降解机理已有许多文献报道^[4-6],包括高效降解菌分离筛选与鉴定、微生物对 PAHs 的代谢途径、PAHs 降解酶等,且取得了很大进展。有关微生物胞外聚合物(extracellular polymeric substances,EPS)在有机污染土壤修复过程中作用的研究还未见报道。胞外聚合物是一定环境条件下微生物分泌于体外的一种高分子黏性聚合物,还包括一些细胞脱落物以及从环境中吸附的有机物^[7]。EPS 主要由多糖、蛋白质和腐殖酸等组成^[8-9]。EPS 可分为溶解性 EPS

(soluble EPS,sEPS)和结合态 EPS(bound EPS,bEPS)。bEPS 呈现有流变性的双层结构,可分为紧密黏附的内层(tightly bound EPS,TB)和松散附着的外层(loosely bound EPS,LB)。EPS 在水体中重金属和有机污染物的去除中起到了很重要作用,Foster 等研究了活性污泥胞外聚合物紧密层和松散层的提取及其对金属离子的吸附,并预测出松散层 EPS 使细胞对金属离子产生了抗毒性^[10-11]。Makoto 等报道,向石油污染海水中同时加入 rhodochrous 的胞外聚合物和矿物能乳化石油,并能提高石油中 PAH 的降解能力^[12]。关于 EPS 在 PAHs 污染土壤修复过程中的作用,Dohse 等指出,胞外聚合物能增加疏水性污染物在土壤中的移动性,并且污染物与 EPS 作用阻止了微生物对污染物的直接消化降解^[13]。可见,EPS 在微生物降解 PAHs 过程中起到了重要的衔接作用。本研究以土壤中芘为研究对象,添加芽孢杆菌 EPS 和黑曲霉 EPS,研究外加 EPS 对土壤中芘降解效果的影响,并通过扫描电子显微镜和透射电子显微镜对微生物及 EPS 的形态进行表征,探索 EPS 对土壤中芘降解效果的促进作用。

1 材料与方法

1.1 试验所用土壤

试验所用土壤采自中国科学院沈阳应用生态研究所生态

收稿日期:2014-07-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:41201310、41271336、41101295、40930739);沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室资金。

作者简介:姜春阳(1989—),女,硕士研究生,主要从事土壤污染生态研究。E-mail:396429901@qq.com。

通信作者:贾春云,博士,助理研究员,主要从事土壤污染生态研究。Tel:(024)88087789;E-mail:jiachunyun@126.com。

[16] Sullivan J O, Thomas R J, Bouw W J. Effect of imazethapyr and imazamox soil residues on several vegetable crops grown in Ontario [J]. Canadian Journal of Plant Science, 1998, 78(4): 647-651.

[17] Zhang C P, Xu J, Liu X G, et al. Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils [J]. Chemosphere, 2010, 81(6): 800-806.

[18] Nemeth - Konda L, Füleky G, Morovjan G, et al. Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil [J]. Chemosphere, 2002,

48(5): 545-552.

[19] Hees P A, Johansson E, Jones D L. Dynamics of simple carbon compounds in two forest soils as revealed by soil solution concentrations and biodegradation kinetics [J]. Plant and Soil, 2008, 310: 11-23.

[20] 滕 应, 骆永明, 李振高, 等. 多氯联苯复合污染土壤的土著微生物修复强化措施研究 [J]. 土壤, 2006, 38(5): 645-651.

[21] 王庆仁, 刘秀梅, 崔岩山, 等. 土壤与水体有机污染的生物修复及其应用研究进展 [J]. 生态学报, 2001, 21(1): 159-163.

实验站,为深层(40 cm 以下)草甸棕壤清洁土。土壤风干后过 1 mm 尼龙筛,备用。土壤理化性质检测结果:pH 值 6.8,有机质含量 0.88%,全碳含量 0.51 g/kg,全氮含量 64.5 mg/kg,全磷含量 35.1 mg/kg,全钾含量 2.448 g/kg。

1.2 试验用菌种及培养

试验用细菌芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的培养基配方:(1)斜面培养基。0.3% 牛肉膏,1.0% 蛋白胨,0.5% NaCl,1.5% ~ 2.0% 琼脂,pH 值 7.0 ~ 7.2。(2)种子培养基。1.25% 葡萄糖,0.25% 酵母膏,0.1% NH_4NO_3 ,0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.02% KCl,pH 值 7.0 ~ 7.2。在生物洁净台上接种后于 HZQ-C 恒温振荡培养箱中(30 ℃,150 r/min)培养。

试验用真菌黑曲霉(*Aspergillus niger*,SF)的培养基配方:(1)斜面培养基(PDA)。马铃薯去皮后洗净,称取 200 g 切成小块,加 1 L 水煮沸 20 min,滤去马铃薯块,冷却后加入 20 g 葡萄糖,用水定容至 1 L,0.101 3 MPa 灭菌 30 min。(2)种子培养基。蔗糖 4.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,维生素 B_1 0.005%,pH 值 6.5。在 250 mL 三角瓶中装入液体种子培养基 150 mL,高压蒸汽灭菌 20 min,冷却后接入筛选出的菌种,在摇床上振荡培养,培养温度 25 ℃,转速 120 r/min,培养至菌丝球长好为止。

1.3 高效降解菌 EPS 提取

取生长到稳定期的菌体培养液 40 mL,于 2 000 r/min 离心 10 min;弃去上清液,补充无菌水至原体积,于 2000 r/min 离心 3 min;弃去上清液补充无菌水至原体积,重复 2 次,去除液体培养基中的杂质,然后用加热法提取 EPS。将上述菌悬液放入 60 ℃ 的水浴锅中加热 30 min,然后样品在 8 000 r/min 离心 10 min,上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后,得到的无色透明溶液为 EPS 溶液。

1.4 EPS 形貌特征

EPS 样品经过固定、脱水、浸透、包埋、制备超薄切片等处理后,进行透射电子显微镜(TEM)观察与测试。

1.5 微生物及 EPS 对土壤中芘(Pyr)的降解试验

称取 60 g 土样放入烧杯中,加入一定体积的 1 mg/mL 芘溶液,使其初始浓度均为 50、100 mg/kg,放置 2 d 待有机溶剂

丙酮挥发完全;分别加入对数期菌液(10%)和各种浓度的 EPS 溶液,搅拌均匀,用纱布包扎后放入温度为 25 ℃ 的恒温培养箱(DHP-500BS,中国)中培养,以不加菌液和 EPS 为对照(CK)。通过称质量法定时补充土壤水分(使土壤含水率保持在 30% 左右),分别于 0、7、14、21、28、35 d 取样,然后冷冻干燥土壤样品进行 Pyr 浓度的测定。每个样品处理 3 次重复。

1.6 土壤中 PAHs 的提取方法

取 3 g 土壤样品置于 100 mL 离心管中,加入 15 mL 二氯甲烷,于超声水浴中超声萃取 2 h;水温控制在 40 ℃ 以下,4 000 r/min 离心 5 min;取一定量上清液过 1 g 硅胶柱净化,并分别用 1、2 mL 的 1:1 二氯甲烷和正己烷混合液洗脱;收集洗脱液用氮气吹干,用色谱纯正己烷定容,GC-FID 分析。

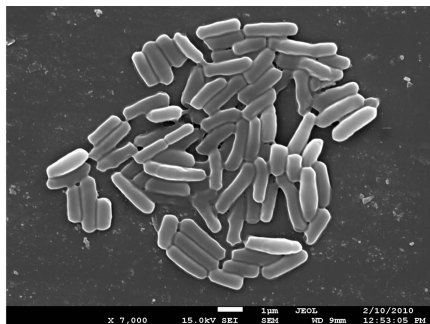
1.7 芘的分析测定方法

土壤中 Pyr 提取后用气相色谱(GC)分析。分析条件:DB-5 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);采用自动进样方式;进样口无分流模式,温度 250 ℃;柱流量 1.5 mL/min;柱箱初始温度 80 ℃ 保持 1 min,以 15 ℃/min 升到 275 ℃ 保留 1 min,以 10 ℃/min 升到 285 ℃ 保留 1 min,再以 5 ℃/min 升到 295 ℃ 保留 1 min;氢火焰离子化检测器(FID)温度 300 ℃。

2 结果与分析

2.1 微生物及 EPS 的形貌

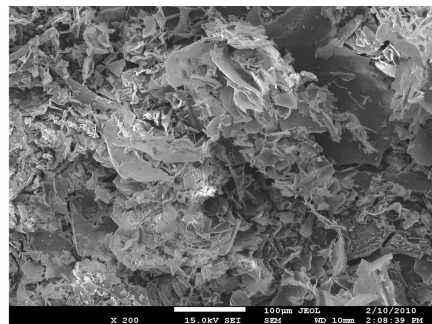
2.1.1 芽孢杆菌及 EPS 形貌 由图 1-a 扫描电子显微镜图片可以看出,芽孢杆菌的细胞为长棒状,细胞短径 0.3 ~ 0.5 μm 、长径 1.0 ~ 1.5 μm ,两端钝圆,芽孢位于亚极端,使菌体中央部分略微鼓起变粗,芽孢几乎看不到。通过透射电子显微镜图片可以清楚观察到芽孢的横截面,细菌周围分泌大量胞外聚合物,部分脱落到胞体空缝间。从图 1-b 芽孢杆菌的透射电子显微镜图片可以看出,胞外聚合物的紧密层与细胞表面结合较紧,稳定地附着在细胞壁外,具有一定的外形。而松散层则结构松散,无明显边缘,并向周围环境中扩展。图 1-c 为从微生物培养液中提取 EPS 的扫描电子显微镜图片,可以看出芽孢杆菌 EPS 颗粒比较大,呈小片状。



a.芽孢杆菌扫描电子显微镜照片



b.芽孢杆菌透射电子显微镜照片



c.芽孢杆菌EPS扫描电子显微镜照片

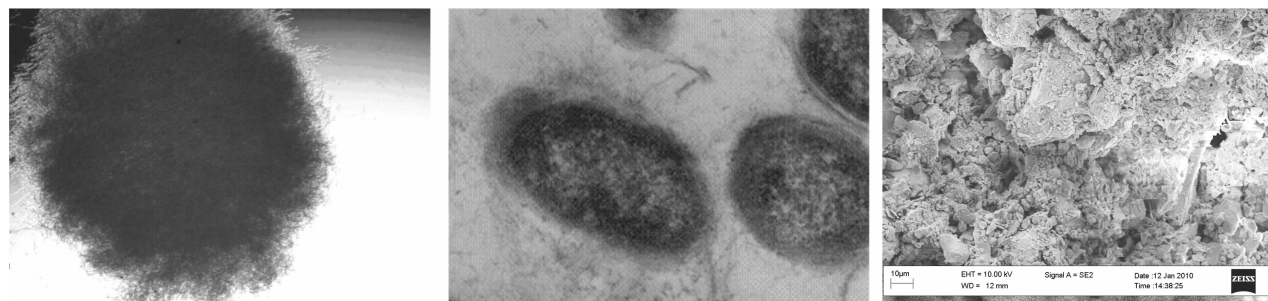
图1 芽孢杆菌及其 EPS 形貌

2.1.2 黑曲霉及 EPS 形貌 由图 2-a 可以看出,黑曲霉直径 15 ~ 20 μm ,长 1 ~ 3 μm ,壁厚而光滑。顶部形成球形顶囊,其上全面覆盖 1 层梗基和 1 层小梗,小梗上长有成串褐黑色的球状分生孢子。通过图 2-b 观察到,黑曲霉生长到稳定期(鞭毛逐渐脱落)时,细菌向周围分泌大量胞外聚合物,聚合

物和菌体一起可形成生物膜。从图 2-c 可以看出,黑曲霉产生的 EPS 呈不规则块状,颗粒表面比较光滑、有棱角,颗粒较大,且结块。

2.2 添加 EPS 对芽孢杆菌降解土壤中 Pyr 的影响

图 3-a 为外加不同浓度的芽孢杆菌 EPS 时土壤中含

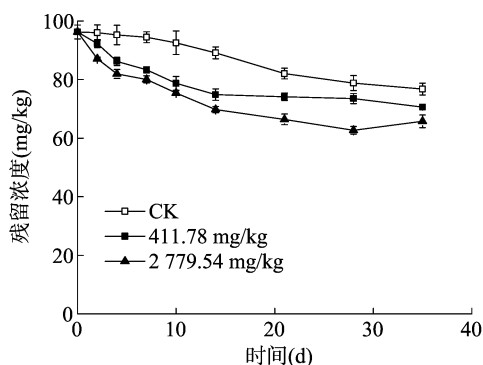


a.黑曲霉扫描电子显微镜照片

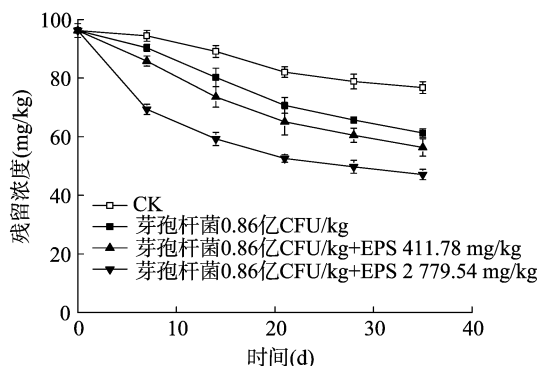
b.黑曲霉透射电子显微镜照片

c.黑曲霉EPS扫描电子显微镜照片

图2 黑曲霉及其 EPS 形貌



a.芽孢杆菌 EPS 对土壤中 100 mg/kg 芘的去除作用



b.芽孢杆菌及其EPS对土壤中100 mg/kg芘的去除作用

图3 外加芽孢杆菌及其 EPS 对土壤中芘的去除作用

100 mg/kg 芘的降解情况, 试验周期 35 d, 外加芽孢杆菌 EPS 411.78、2779.54 mg/kg 均能促进土壤中芘浓度降低。从图 3-a 中可以看出, 试验后 35 d, 芘污染的土壤自净率 17.9%。试验后 21 d, 芘的降解情况基本达到平衡, 外加芽孢杆菌 EPS 的浓度为 411.78 mg/kg 时, 土壤中芘的残余浓度减少了 24.69 mg/kg, 外加芽孢杆菌 EPS 的浓度为 2779.54 mg/kg 时, 土壤中芘的降解率增加了 36.02%。试验后 35 d, 外加芽孢杆菌 EPS 的浓度由 411.78 mg/kg 增加到 2779.54 mg/kg, 土壤中芘的残余浓度减少了 6.27 mg/kg, 所以在 411.78 ~ 2779.54 mg/kg 范围内增加芽孢杆菌 EPS 的浓度, 对土壤中芘的降解有促进作用。

从图 3-b 为外加芽孢杆菌及其 EPS 时土壤中 100 mg/kg 芘的降解情况, 在整个试验周期 35 d 内, 外加芽孢杆菌及 EPS 均能促进土壤中芘的降解。从图 3-b 中可以看出, 培养 35 d, 0.86 亿 CFU/kg 芽孢杆菌对芘污染的土壤的降解率可以达到 36.99%, 芽孢杆菌及 411.78 mg/kg EPS 对芘污染的

土壤的降解率为 43.61%, 芽孢杆菌及 2779.54 mg/kg EPS 对芘污染的土壤的降解率为 53.77%, 土壤自身也有一定的自净能力, 芘污染的土壤自净率达到 17.9%。加入芘初始时刻, 土壤自身负荷相对较低, 自净率最高。15 d 后土壤自净能力逐渐饱和, 其自净率也逐渐降低。芘污染土壤接种芽孢杆菌后 0~7 d 的降解率较低, 只有 8.35%, 21 d 时, 降解率达到 28.93%, 降解率逐渐增加可能是芽孢杆菌逐渐适应了这一生长环境。

由图 3 综合分析得出, 35 d 时, 土壤加菌量为 0.86 亿 CFU/kg 芽孢杆菌对芘污染的土壤的降解率为 36.99%, 仅添加芽孢杆菌 EPS 浓度为 411.78 mg/kg 时, 土壤中芘的降解率为 32.14%, 外加芽孢杆菌 EPS 浓度为 2779.54 mg/kg 时, 土壤中芘的降解率为 38.41%, 外加芽孢杆菌及 411.78 mg/kg EPS 时, 土壤中芘的降解率为 43.61%, 外加芽孢杆菌及 2779.54 mg/kg EPS 时, 土壤中芘的降解率为 53.77%。所以, 芽孢杆菌 EPS 对土壤中芘的降解能力随其浓度增大而增大, 芽孢杆菌 EPS 对芽孢杆菌降解土壤中的芘有促进作用, 且随 EPS 浓度增大而增大。

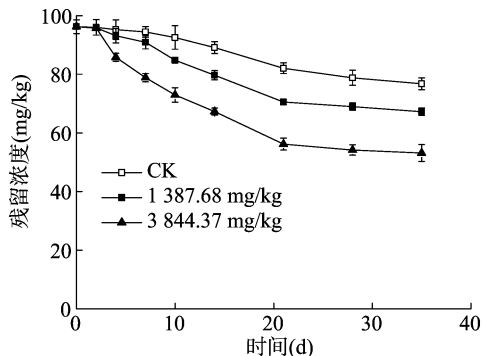
2.3 添加 EPS 对黑曲霉降解土壤中 Pyr 的促进作用

外加黑曲霉 EPS 时土壤中污染物芘的降解情况见图 4-a。与芽孢杆菌相似, 外加黑曲霉 EPS 能明显促进土壤中 100 mg/kg 芘的降解。从图 4-a 可以看出, 试验后 35 d, 芘污染的土壤自净率 22.12%。试验后 21 d, 基本达到芘降解平衡, 黑曲霉 EPS 的浓度为 1387.68 mg/kg 时, 土壤中芘的残余浓度减少了 31.12 mg/kg, 黑曲霉 EPS 的浓度为 3844.37 mg/kg 时, 土壤中芘的残余浓度减少了 42.36 mg/kg。试验后 35 d, 外加芽孢杆菌 EPS 的浓度由 1387.68 mg/kg 增加到 3844.37 mg/kg, 土壤中芘的残余浓度减少了 16.63 mg/kg, 所以外加黑曲霉 EPS, 对土壤中芘的降解有促进作用, 且在 1387.68 ~ 3844.37 mg/kg 范围内增加芽孢杆菌 EPS 的浓度, 对土壤中芘的降解有促进作用。

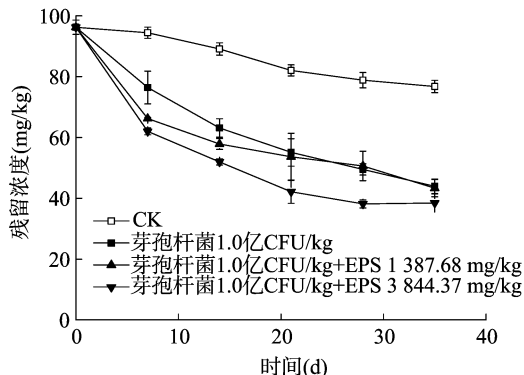
图 4-b 为外加黑曲霉及其 EPS 时土壤中 100 mg/kg 芘的降解情况, 在整个试验周期 35 d 内, 外加黑曲霉及 EPS 均能促进土壤中芘降解。从图 4-b 中可以看出, 培养 35 d 时, 向土壤中接种黑曲霉达 1.0 亿 CFU/kg, 对芘污染的土壤的降解率可以达到 56.61%, 黑曲霉及 1387.68 mg/kg EPS 对芘污染的土壤的降解率为 57.93%, 黑曲霉及 3844.37 mg/kg EPS 对芘污染土壤的降解率为 62.33%。

由图 4 综合分析得出, 35 d 时, 1.0 亿 CFU/kg 黑曲霉对芘污染的土壤的降解率为 56.61%, 外加黑曲霉 EPS 浓度为

1 387.68 mg/kg 时,土壤中芘的降解率为 33.65%;外加黑曲霉 EPS 浓度为 3 844.37 mg/kg 时,土壤中芘的降解率为 57.71%;外加黑曲霉及 1 387.68 mg/kg EPS 时,土壤中芘的降解率为 57.93%;外加黑曲霉及 3 844.37 mg/kg EPS 时,土壤中芘的降解率为 62.33%。所以,黑曲霉 EPS 对土壤中芘的降解能力随其浓度增大而增大,黑曲霉 EPS 对黑曲霉降解土壤中的芘有促进作用,且随 EPS 浓度增大而增大,这是由于 EPS 可以被处于饥饿状态的它们自己的产生者和其他微生物降解。EPS 可以作为有机底物,其碳水化合物被利用的速率比蛋白质快,为微生物降解土壤中的芘提供碳源^[14]。



a. 黑曲霉 EPS 对土壤中 100 mg/kg 芘的去除作用



b. 黑曲霉及其 EPS 对土壤中 100 mg/kg 芘的去除作用

图4 外加黑曲霉及其 EPS 对土壤中芘的去除作用

3 结论与讨论

芽孢杆菌与黑曲霉对土壤中芘均有较好的去除效果。土壤芽孢杆菌接种达 0.86 亿 CFU/kg, 土壤中芘的降解率为 36.99%, 接种量达 1.0 亿 CFU/kg 黑曲霉, 土壤中芘的降解率为 56.61%, 所以真菌对芘污染土壤中芘的降解能力高于细菌。

仅添加 EPS 能够降解土壤中的芘。培养 35 d 时, 外加芽孢杆菌 EPS 浓度由 411.78 mg/kg 提高到 2 779.54 mg/kg 时, 土壤中芘的降解率提高了 6.27%; 黑曲霉 EPS 浓度由 1 387.68 mg/kg 提高到 3 844.37 mg/kg 时, 土壤中芘的降解率提高了 24.06%, 所以真菌和细菌的 EPS 对土壤中的芘均有一定的降解作用, 且随 EPS 浓度的增大而增大。

外加菌体及不同浓度 EPS 能够促进土壤中芘降解。添加 411.78 mg/kg EPS, 芽孢杆菌对土壤芘的降解效果提高了

6.62%, 添加 2 779.54 mg/kg EPS, 芽孢杆菌对土壤芘的降解效果提高了 16.78%; 添加 1 387.68 mg/kg EPS, 黑曲霉对土壤芘的降解效果提高了 1.32%, 添加 3 844.37 mg/kg EPS, 黑曲霉对土壤芘的降解效果提高了 5.72%, 所以真菌和细菌的 EPS 对其降解土壤中的芘都有一定的促进作用, 且随浓度的增大而增大。

参考文献:

- [1] Jones K C, de Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science[J]. Environmental Pollution, 1999, 100(1/2/3): 209 - 221.
- [2] Janbandhu A, Fulekar M H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 187(1/2/3): 333 - 340.
- [3] Akay O, Özer A T, Fox G A, et al. Behavior of sandy slopes remediated by EPS - block geofoam under seepage flow[J]. Geotextiles and Geomembranes, 2013, 37: 81 - 98.
- [4] Zhang Z Q, Xia S Q, Wang X J, et al. A novel biosorbent for dye removal: extracellular polymeric substance (EPS) of *Proteus mirabilis* TJ-1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(1): 279 - 284.
- [5] Jia C Y, Li P J, Li X J, et al. Degradation of pyrene in soils by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from liquid cultures[J]. Process Biochemistry, 2011, 46(8): 1627 - 1631.
- [6] Jurelevicius D, Alvarez V M, Peixoto R, et al. Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring - hydroxylating dioxygenases (PAH - RHD) encoding genes in different soils from King George Bay, Antarctic Peninsula[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 55: 1 - 9.
- [7] Wingender J, New T R, Flemming H C. Microbial extracellular polymeric substances: characterisation, structure and function[M]. Berlin: Springer, 1999: 123.
- [8] 黄敏婷, 陆春. 生物膜胞外聚合物的检测技术与功能的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(6): 82 - 85.
- [9] 皋德祥, 邓欢欢, 张明华, 等. 微生物胞外聚合物的研究进展[J]. 温州医学院学报, 2012, 42(3): 297 - 301.
- [10] Foster L, Moy Y P, Rogers P L. Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(22): 1757 - 1760.
- [11] Sophie C, Gilles G, Michel B. Biosorption properties of extracellular polymeric substances resulting from activated sludged according to their type: soluble or bound[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(4): 815 - 823.
- [12] Urai M, Anzai H, Ogiwara J, et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2[J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(6): 766 - 775.
- [13] Dohse D M, Lion L W. Effect of microbial polymers on the sorption and transport of phenanthrene in a low - carbon sand[J]. Environmental Science & Technology, 1994, 28(4): 541 - 548.
- [14] Zhang X Q, Bishop P L. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances[J]. Chemosphere, 2003, 50(1): 63 - 69.