

## 一株 PCBs 降解菌的降解特性及发酵条件优化

李方卉 徐莉 张腾昊 陈雄 张振 李伟明 李辉信 胡锋\*

(南京农业大学 资源与环境科学学院 江苏 南京 210095)

**摘要:**【目的】针对一株多氯联苯的高效降解菌, 考察其对多氯联苯(PCBs)的降解特性, 并对降解条件进行优化。【方法】以不同浓度的 2,4,4'-TCB 与 3,3',4,4'-TCB 为唯一碳源, 研究苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium melilon*)对不同多氯联苯的降解转化能力, 并进行发酵条件优化以及共代谢试验。【结果】接入菌株转化 7 d 后, 随着底物浓度的增加, 该菌对 2,4,4'-TCB 的降解能力呈下降趋势。在最低浓度 1.0 mg/L 时降解率最高, 为 93.3%; 而在最高浓度 50.0 mg/L 时为 65.1%。对于较难降解的四氯联苯 3,3',4,4'-TCB, 菌株在最低浓度 1.0 mg/L 时降解率为 56.2%, 最高浓度 25.0 mg/L 时为 22.8%。在温度 30 °C、pH 7.0、接种量 4.5 mL、装液量 25 mL 时, 获得菌株转化 10.0 mg/L 2,4,4'-TCB 的最优发酵条件, 7 d 的降解率由原来的 54.8% 提高到 83.6%。柠檬烯、香芹酮及甘露醇作为共代谢底物也可较好地提高菌株降解效果。【结论】苜蓿中华根瘤菌对 PCBs 有很好的降解效果, 研究结果对 PCBs 的微生物降解及环境中 PCBs 的生物修复具有较好的意义和应用价值。

**关键词:** 苜蓿中华根瘤菌, 多氯联苯, 发酵优化, 共代谢

## Degradation characteristics and fermentation conditions optimization of a PCBs-degrading strain

LI Fang-Hui XU Li ZHANG Teng-Hao CHEN Xiong ZHANG Zhen LI Wei-Ming  
LI Hui-Xin HU Feng\*

(College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** [Objective] This study was aimed to investigate the degradation characteristics and fermentation optimization of a PCBs-degrading strain. [Methods] The capability of *Sinorhizobium melilon* on PCBs degradation was studied with different concentrations of 2,4,4'-TCB and 3,3',4,4'-TCB as the sole carbon source separately. The optimum PCBs-degrading conditions were researched by orthogonal experiment and co-metabolism experiment. [Results] The degradation rate of *Sinorhizobium melilon* to 2,4,4'-TCB was decreased gradually with the concentration increase of 2,4,4'-TCB. The degradation rates for 2,4,4'-TCB were 93.3% of 1.0 mg/L and 65.1% with the highest concentration up to 50.0 mg/L for 7 days, respectively. The degradation rates were 56.2% of 1.0 mg/L and 22.8% with the highest concentration of 25.0 mg/L for 3,3',4,4'-TCB, individually. The

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(No. BK2011655); 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所)开放基金资助项目; 江苏省优势学科资助项目

\*通讯作者: Tel: 86-25-84395815; 信箱: fenghu@njau.edu.cn

收稿日期: 2013-09-02; 接受日期: 2014-01-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-18

orthogonal experiment showed that the optimal conditions for degradation process were as follows: pH 7.0, temperature 30 °C, inoculation volume 4.5 mL, medium cubage 25 mL/250 mL. Under these conditions, the degradation rate of the strain was increased from 54.8% to 83.6%. In addition, the degradation rate of PCBs was increased with limonene, corvone and mannitol as co-metabolism substrates by *Sinorhizobium melilon*. **[Conclusion]** *Sinorhizobium melilon* is effective in degrading PCBs and our results have significant application on the study of microbial degradation and environment bioremediation of PCBs.

**Keywords:** *Sinorhizobium melilon*, PCBs, Fermentation optimization, Co-metabolism

多氯联苯(Polychlorinated biphenyls, PCBs)是国际上关注的 12 种持久性有机污染物之一。该化合物是在金属催化剂的作用下,由联苯经过逐渐氯化合成获得。因其具有热稳定性、化学惰性、不易燃、高电阻率和低急性毒性,曾广泛应用于工业生产中。尽管早已禁止生产,它们依然大量蓄积在环境中成为亟待解决的问题<sup>[1-3]</sup>。

微生物修复具有廉价、易操作、无污染等优点,是最有潜力的污染修复方法之一<sup>[4]</sup>。目前国内外已报道了许多高效 PCBs 降解菌,真菌如白腐真菌(Ligninolytic fungi);细菌如伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞属(*Sphingomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)等<sup>[5-11]</sup>。根瘤菌作为固氮菌,既可以游离状态存在,又可以共生状态与豆科植物联合,对有机污染土壤的修复具有良好的效果<sup>[12-14]</sup>。Damaj 等<sup>[15]</sup>首次报道了根瘤菌 *Rhizobium meliloti* Zb57 可降解 PCBs。随后的研究也表明根瘤菌有耐受并降解广谱芳香烃化合物的能力<sup>[16]</sup>。Chen 等<sup>[17]</sup>利用基因工程技术,构造了一株具有多氯联苯降解功能的根瘤菌,与植物联合后可提高植物对污染土壤的修复能力。徐莉等<sup>[18]</sup>也发现一株苜蓿根瘤菌对低氯代多氯联苯及混合 PCBs 有较好的降解效果。本实验以筛选获得的苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium melilon*)为供试菌株,以 2,4,4'-TCB 与 3,3',4,4'-TCB 为唯一碳源,采用液体摇瓶实验对该菌株的降解特性进行了初步分析,并对其发酵过程进行优化,以提高其降解效果。以期 PCBs 污

染土壤的生物修复提供菌种资源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和培养基

菌株为本实验室从台州某典型 PCBs 污染的农田土壤中经富集、筛选获得。标准品 2,4,4'-TCB (PCB28)与 3,3',4,4'-TCB (PCB77)购于北京百灵威化学技术有限公司。乙酸乙酯与正己烷为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

甘露醇酵母汁琼脂培养基(YMA, g/L): 甘露醇 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaCl 0.1, 酵母汁(1%) 100 mL, CaCO<sub>3</sub> 3.0, 蒸馏水 900 mL, pH 7.0-7.2。

无机盐基础培养基(g/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.7, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 5.2, NH<sub>4</sub>Cl 1.0, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, 微量金属盐溶液 1 mL, 补水至 1 000 mL, pH 7.0-7.5。

微量金属盐溶液(g/L): FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.300 0, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.038 0, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.020 0, ZnCl<sub>2</sub> 0.014 0, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.012 4, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.040 0, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.003 4, 去离子水 1 000 mL。

以上培养基均于 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min 后备用。

### 1.2 PCBs 降解菌的分离和纯化

取 10 g 新鲜土壤加入到 10 mg/L 2,4,4'-TCB 为唯一碳源的无机盐培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 1 周后, 按 10%的接种量转接入新鲜的 2,4,4'-TCB 无机盐培养基中, 连续富集 3 次。再用梯度稀释法和在 2,4,4'-TCB 为唯一碳源的平板上涂布获得单一菌株, 后经休眠体系对 2,4,4'-TCB 转

化液的转化功能实验,验证该菌具有 2,4,4'-TCB 的降解能力。以该菌株作为研究菌株,命名为 SL1。

1.3 菌株 SL1 生理生化及分子学鉴定

1.3.1 生理生化测定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》进行形态和部分生理生化鉴定<sup>[19]</sup>。

1.3.2 菌株分子学鉴定: 将处于对数生长期的菌株 SL1 离心收集菌体,采用 SDS-CTAB 法提取细菌总基因组 DNA。以总 DNA 为模板,PCR 扩增 16S rRNA 的基因序列,通用引物为 27f (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,测序由上海英潍捷基贸易有限公司完成。测序结果在 GenBank 中进行同源性比较,采用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

1.4 降解菌休眠体系对不同浓度 2,4,4'-TCB 和 3,3',4,4'-TCB 的降解转化

降解菌休眠体系制备: 将菌种接种于 YMA 固体平板上 30 °C 活化 24 h,挑取单菌落接入 30 mL 液体种子 YMA 培养基中扩大培养,然后以 3%的接种量(质量体积比)再次转接到 30 mL YMA 液体培养基中,30 °C、180 r/min 培养 48 h。将发酵培养的根瘤菌悬液离心(10 000 r/min、5 min),收集菌体,用 pH 7.0 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 2 次后重悬。

将菌体转接入同等体积含有不同浓度的 2,4,4'-TCB 或 3,3',4,4'-TCB 的无机盐培养基中,30 °C、180 r/min 摇床培养,以接入灭活菌液的处理

作为对照。测定计算转化 7 d 后 2,4,4'-TCB 或 3,3',4,4'-TCB 的降解率。

转化液由无机盐培养基添加 PCBs 制成,分为两组,一组以 2,4,4'-TCB 为唯一碳源,浓度设定为 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mg/L; 另一组以 3,3',4,4'-TCB 为唯一碳源,浓度设定为 1.0、5.0、10.0、25.0 mg/L。2,4,4'-TCB、3,3',4,4'-TCB 均以丙酮配制成 1 000 mg/L 的溶液,按不同浓度加入灭菌后的无机盐培养基,放置一段时间待丙酮挥发后使用。

1.5 正交实验优化 SL1 降解的发酵条件

将活化后的菌株 SL1 在种子液中扩大培养,后接入 YMA 液体培养基中进行发酵。在菌株发酵过程中,选取 pH、温度、接种量、装液量 4 因素 5 水平进行正交实验,因素各水平如表 1 所示。液体摇瓶振荡培养 48 h 后离心收集菌体制备成休眠体系,转接入以 10 mg/L 的 2,4,4'-TCB 为唯一碳源的无机盐培养基中,30 °C、180 r/min 培养 7 d,测定菌株 SL1 对 2,4,4'-TCB 降解率,并确定菌株降解多氯联苯的最佳发酵条件组合。

1.6 共代谢底物优化 SL1 降解的转化条件

制备菌株 SL1 的休眠体系,转接入含有 10 mg/L 2,4,4'-TCB 的无机盐培养基中,培养基中再分别加入浓度为 1 mg/L 的葡萄糖、蔗糖、甘露醇、联苯、香芹酮、柠檬烯。30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 7 d,以接入灭活菌液作为对照。测定菌株 SL1 对 2,4,4'-TCB 的降解率。

表 1 实验因素与水平表				
Table 1 Factors and levels of orthogonal design				
水平 Level	A 温度 Temperature (°C)	B pH pH value	C 接种量 Inoculum volume (mL)	D 装液量 Culture capacity (mL)
1	20	5.0	0.5	25
2	25	6.0	1.5	50
3	30	7.0	3.0	75
4	35	8.0	4.5	100
5	40	9.0	6.0	150

1.7 休眠体系中 2,4,4'-TCB、3,3',4,4'-TCB 的提取和测定

菌株 SL1 对 PCBs 转化 7 d 后,全部菌液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,充分混合静置后,合并上层提取液,加入无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水,然后使用旋转蒸发仪旋转蒸发至干,以正己烷定容至 1 mL 待测。

采用带有电子俘获检测器的 Varian 3800 型气相色谱仪分析。色谱柱: CP-sil24CB (30 m×0.25 mm×0.25 μm),进样温度为 260 °C,检测器温度为 300 °C。程序升温:初始温度为 120 °C,0.5 min,10 °C/min 梯度升温至 180 °C,持续 1 min,然后 15 °C/min 梯度升温至 250 °C,持续 25 min。无分流进样 1 μL,载气为高纯氮,流速 1.0 mL/min。

1.8 数据处理方法

降解率(%)=(灭菌处理溶液浓度-活菌处理溶液浓度)/灭菌处理溶液浓度×100。

数据分析等在 Excel 2003 及 SPSS 18.0 中完成。

2 结果与分析

2.1 PCBs 降解菌的分离和鉴定

从 PCBs 污染土壤中筛选一株 PCBs 降解菌,命名为 SL1。菌株在平板上培养 48 h 后,菌落较小、成白色、圆球状隆起、半透明、边缘整齐、表面光滑伴有粘液。部分生理生化指标如表 2 所述。

经 16S rRNA 基因测序并与 GenBank 中已登录

的核苷酸序列进行同源性比较,发现菌株 SL1 (GenBank 登录号为 KF98277)与 *Sinorhizobium meliloti* (X67222)的一致性达到 99%,并采用 MEGA 4.0 软件 N-J 方法构建 SL1 的 16S rRNA 系统发育树,见图 1。结合生理生化特征结果,将菌株 SL1 鉴定为苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhizobium melilon*)。

2.2 菌株 SL1 对 2,4,4'-TCB 的降解效果

如图 2 所示,以 2,4,4'-TCB 为唯一碳源时,接入苜蓿中华根瘤菌 SL1 转化 7 d 后,溶液中 2,4,4'-TCB 含量明显减少,与灭菌对照相比,在初始浓度为 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 mg/L 条件下该菌株对 2,4,4'-TCB 的降解率分别为 93.3%、85.7%、54.8%、57.5%、65.1%。随着污染物浓度的增加,菌株对底物的降解率先下降后略有上升,这可能是由于 2,4,4'-TCB 浓度增加对菌株产生了一定的毒害,导致降解率下降。在较高浓度时,其降解率趋于平衡,说明该菌株对高浓度的 2,4,4'-TCB 有一定的适应性。

菌株 SL1 对单体 2,4,4'-TCB 降解转化的 GC 图谱如图 3 所示,与灭菌处理相比,SL1 活菌处理下,底物 2,4,4'-TCB 的色谱峰有了明显的减小,底物峰附近有一系列小峰,可能为代谢物质,也有可能是菌自身代谢产物或是带入的其他杂质。如何减小杂质的影响及确定产物结构还需要进一步的研究。

表 2 菌株 SL1 的生理生化特征 Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain SL1			
项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
革兰氏染色 Gram-staining	—	淀粉水解 Hydrolysis of starch	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—	M.R.反应 Methyl red test	—
V-P 试验 Voges-Proskauertest	—	过氧化氢酶试验 Catalase test	+
氧化酶试验 Oxidase test	—	葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sucrose	+	乳糖 Lactose	—

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应。  
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

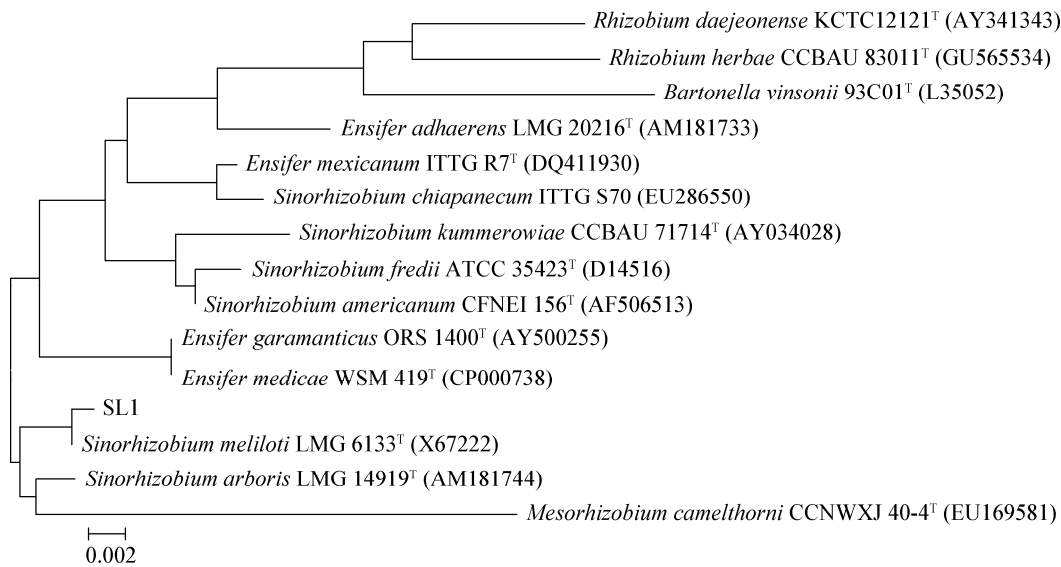


图 1 SL1 菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree established using the Neighbor-Joining method, based on 16S rRNA sequences of SL1 and the related strains

注: 括号中编号是菌株在 GenBank 中的序列号; 标尺代表 0.002 核苷酸距离。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. Scale bar equals approximately 0.002 nucleotide divergence.

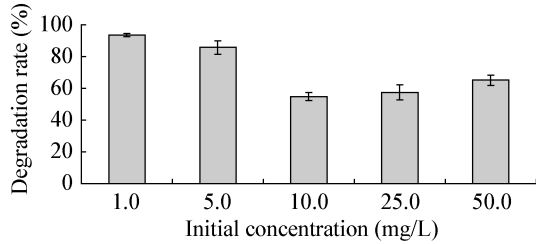


图 2 SL1 菌对不同浓度的 2,4,4'-TCB 的降解效率  
Figure 2 Degradation rate of 2,4,4'-TCB by SL1 under different concentrations

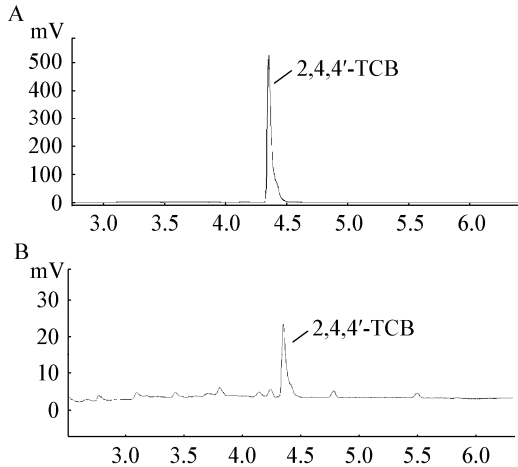


图 3 不同处理下 2,4,4'-TCB 的 GC 图谱  
Figure 3 GC spectra of 2,4,4'-TCB under different treatments  
Note: A: Sterilization treatment; B: Strain SL1 treatment.

### 2.3 菌株对 3,3',4,4'-TCB 的降解效果

除选取低氯代三氯联苯外, 本实验还选取对位和间位均有氯原子取代, 呈平面分子结构, 毒性最强最难降解的一类 PCB 物质<sup>[20-21]</sup>, 如 3,3',4,4'-TCB 为目标底物, 设置不同浓度, 接入苜蓿中华根瘤菌降解转化。由图 4 可以看出, 菌株对 3,3',4,4'-TCB 的降解率整体低于对 2,4,4'-TCB 的降解率, 在 1.0、5.0、10.0、25.0 mg/L 初始浓度条件下, 其降解率分别为 56.2%、40.0%、32.8%、22.8%。同样呈现出随污染物浓度增加, 降解率随之下下降的趋势。

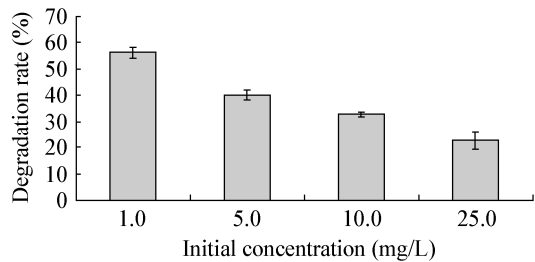


图 4 SL1 菌对不同浓度的 3,3',4,4'-TCB 的降解效率  
Figure 4 Degradation rate of 3,3',4,4'-TCB by SL1 under different concentrations

2.4 菌株发酵条件的优化

不同的发酵条件不仅会影响微生物的生物量，还会对微生物代谢产物产生影响。为提高菌株 SL1 对 10 mg/L 2,4,4'-TCB 的降解效果，对菌株发酵条件进行正交试验优化。正交试验测定结果见表 3。

由表 3 可知，在本试验中，温度 30 ℃、pH 7.0、接种量 4.5 mL、装液量 25 mL 时，菌株 SL1 对 2,4,4'-TCB 降解率最高，达到 83.6%。对试验中不

同因素进行极差 *R* 分析，来表达因素在试验范围内对目标函数影响的大小。从表 3 的 *R* 值可以看出，pH 对 SL1 菌株的降解率影响最大，各因素对 SL1 菌株降解率的影响主次因素依次为：pH>温度>装液量>接种量。比较同一因素在不同水平下所对应的 PCB28 降解率的大小，可得知最佳培养组合为 A<sub>2</sub>B<sub>4</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>，即温度 25 ℃、pH 8.0、接种量 3 mL、装液量 50 mL。

表 3 正交试验结果直观分析表 Table 3 The direct-viewing analysis of orthogonal experiment						
序号 No.	A 温度 Temperature (°C)	B pH pH value	C 接种量 Inoculum volume (mL)	D 装液量 Culture capacity (mL)	空白 Blank	降解率 Degradation rate (%)
1	2(25)	2(6.0)	5(6.0)	1(25)	2	59.5
2	5(40)	5(9.0)	2(1.5)	1	5	33.1
3	3(30)	4(8.0)	5	2(50)	1	74.9
4	5	2	4(4.5)	3(75)	1	32.9
5	1(20)	5	5	5(150)	3	52.3
6	5	3(7.0)	5	4(100)	4	43.1
7	2	1(5.0)	4	5	4	41.3
8	3	2	3(3.0)	5	5	56.1
9	3	1	2	4	2	33.8
10	1	1	1(0.5)	1	1	15.9
11	4(35)	1	5	3	5	15.7
12	4	2	1	4	3	36.6
13	2	5	3	4	1	71.7
14	1	4	4	4	5	81.6
15	5	1	3	2	3	66.2
16	3	3	4	1	3	83.6
17	4	4	3	1	4	60.1
18	1	3	3	3	2	74.0
19	3	5	1	3	4	57.4
20	1	2	2	2	4	72.6
21	2	4	2	3	3	72.6
22	4	3	2	5	1	14.7
23	2	3	1	2	5	80.7
24	5	4	1	5	2	64.6
25	4	5	4	2	2	50.3
K <sub>1</sub>	59.3	34.6	51.0	50.4	42.0	
K <sub>2</sub>	65.1	51.6	45.4	68.9	56.4	
K <sub>3</sub>	61.1	59.2	65.6	50.5	62.2	
K <sub>4</sub>	35.5	70.8	57.9	53.4	54.9	
K <sub>5</sub>	48.0	52.9	49.1	45.8	53.4	
R	29.7	36.2	20.3	23.1	20.2	

采用 SPSS 18.0 软件对正交试验进行方差分析, 由表 4 所知: pH ( $F>3.84$ )对实验结果有显著影响, 这也与直观分析的结果相一致。其他三因素均未达到显著影响, 可见在本实验设定范围内时, 菌株 SL1 对温度、接种量、装液量均具有较好的适应性。

2.5 共代谢底物对菌株 SL1 降解率的影响

由表 5 可以看出, 与不加共代谢底物相比, 加入柠檬烯、甘露醇、香芹酮能提高 SL1 对 10 mg/L 2,4,4'-TCB 的降解率, 其中柠檬烯可使降解率从 54.8%提高到 89.4%; 而联苯、蔗糖、葡萄糖则对菌株降解效果存在一定的抑制作用。柠檬烯和香芹酮均为具有不饱和异戊二烯结构的萜

烯类化合物, 水溶性比联苯强且不具有污染风险, 有研究表明, 植物根系分泌物中萜类物质可诱导 PCBs 的降解<sup>[22]</sup>, Kwon 等<sup>[23]</sup>通过添加植物萜类物质诱导沉积物中 PCBs 的去除, 表明这些物质可能有助于产生 PCBs 共代谢转化酶系, 提供 PCBs 共代谢降解所需的还原剂等。而本研究中联苯的加入会降低降解率, 这与 Sierra 等<sup>[24]</sup>、张国英<sup>[25]</sup>的实验结果相类似, 表明联苯并非对所有多氯联苯降解菌都具有诱导作用。葡萄糖、蔗糖并未提高降解效果, 这可能由于培养液中有足量的速效碳源存在, 已可满足菌株生长繁殖需要, 从而抑制了降解多氯联苯基因的表达, 导致降解率下降。

表 4 正交试验方差分析					
Table 4 Variance analysis of orthogonal experiment					
方差来源	平方和	df	均方	Value of F	P
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares		Sig.
A	0.290	4	0.073	3.495	0.062
B	0.351	4	0.088	4.222	0.040*
C	0.127	4	0.032	1.528	0.282
D	0.158	4	0.040	1.906	0.203
误差 Error	0.166	8	0.021		

注: \*: 该因素对实验影响显著. 从 F 分布表中查出临界值  $F_{\alpha}(f_j, f_E)$ , 比较 F 值与临界值的大小; 若  $F_j>F_{\alpha}(f_j, f_E)$ , 因素对实验结果有显著影响; 若  $F_j<F_{\alpha}(f_j, f_E)$ , 因素对实验结果无显著影响.

Note: \*: The factor have significant effect on the experiment result. Comparing the value of F and  $F_{\alpha}$  which searched form F-distribution table; The factor have significant effect on the experiment result when  $F_j>F_{\alpha}(f_j, f_E)$ , no significant effect when  $F_j\leq F_{\alpha}(f_j, f_E)$ .

表 5 不同共代谢物质对菌株 SL1 降解 2,4,4'-TCB 的影响			
Table 5 Effect of different co-metabolism substrates on 2,4,4'-TCB degradation rate of SL1			
共代谢物质	活菌处理下 2,4,4'-TCB 浓度	灭菌处理下 2,4,4'-TCB 浓度	降解率
Co-metabolism substrate	Concentration of 2,4,4'-TCB in SL1 treatment (mg/L)	Concentration of 2,4,4'-TCB in autoclaved control (mg/L)	Degradation rate (%)
不加 Ck	0.700±0.450	1.56±0.55	54.8
柠檬烯 Limonene	0.190±0.001	1.77±0.29	89.4
蔗糖 Sucrose	0.870±0.230	0.95±0.03	8.5
甘露醇 Mannitol	0.400±0.160	1.80±0.31	77.8
葡萄糖 Glucose	0.760±0.005	1.56±0.26	51.7
香芹酮 Carvone	0.470±0.056	1.41±0.13	66.6
联苯 Biphenyl	0.830±0.390	1.54±0.17	46.1

### 3 结论

多氯联苯大量蓄积在土地中,其结构稳定半衰期在几年到几十年之间。相对于容易造成二次污染的处理方法,生物法处理多氯联苯有更广泛的前景。迄今报道的多氯联苯高效降解菌多为革兰氏阴性菌,其中根瘤菌能够降解多氯联苯却较少见到。根瘤菌作为可促进植物生长的固氮菌种,若同时能降解污染物,可以和植物联合很大程度地强化植物修复土壤中的有机污染。本实验所涉及的苜蓿中华根瘤菌 SL1 (*Sinorhizobium melilon*),能够降解三氯的 2,4,4'-TCB 和四氯的 3,3',4,4'-TCB。该菌株对低氯代联苯 2,4,4'-TCB 最高的降解效率可达 93.3%,对相对难降解的 3,3',4,4'-TCB,降解率最高也可达到 56.2%,这个降解效果要高于目前已有根瘤菌降解多氯联苯的报道<sup>[8]</sup>。而与之之前广泛报道的高效革兰氏阴性降解菌 KF707<sup>[26]</sup>、LB400T<sup>[26]</sup>相比,菌株 KF707 不能有效降解共平面的 3,3',4,4'-TCB, LB400T 对 3,3',4,4'-TCB 的降解率则为 6%,而本菌株则对共平面的 3,3',4,4'-TCB 具有较好的降解效果,这些研究都显示根瘤菌 SL1 在降解多氯联苯方面具有很好的潜力。

通过对菌株 SL1 的发酵过程进行正交试验优化,得到在温度 30 °C、pH 7.0、接种量 4.5 mL、装液量 25 mL 条件下,菌株对 10 mg/L 的 2,4,4'-TCB 降解率可由 54.8%提高到 83.6%。pH 是影响菌株降解效果的重要因素。实验表明根瘤菌 SL1 有较强的环境调节能力,对温度、装液量和接种量,有较广泛的适应范围。在生长底物方面,以往的方法是加入联苯来提高多氯联苯降解菌的降解效果,但联苯也是一种污染物。本研究中加入低浓度柠檬烯、香芹酮、甘露醇可提高菌株 SL1 的降解率,且对环境不会产生污染。根瘤菌 SL1 对多氯联苯具有良好的降解效果,为环境中多氯联苯的去除提供优良菌种。后续可以通过分子生物学技术和基因工程技术探明其降解基因,将其在微生物中克隆和表达,将成为环境治理与修复中降解多氯联苯的新资源。

### 参考文献

- [1] Aronstein BN, Paterek JR. Effect of nonionic surfactant on the degradation of glass-sorbed PCB congeners by integrated chemical-biological treatment[J]. *Environment Toxicology Chemistry*, 1995, 14(5): 749-754.
- [2] Yoshiiyuk O, Yuji N, Kazuhide K, et al. Expression of the bph genes involved in biphenyl/PCB degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 induced by the biphenyl intermediate degradation, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid[J]. *Gene*, 2000, 256(1): 223-228.
- [3] Michaela K, Irena J, Lucie K, et al. Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by *Pseudomonas* sp. 2[J]. *Chemosphere*, 2002, 50(4): 537-543.
- [4] Furukawa K, Fujihara H. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: Biochemical and molecular features[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(5): 433-449.
- [5] 黄丹莲, 曾光明, 黄国和, 等. 白腐真菌的研究现状及其在堆肥中的应用展望[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(2): 112-116.
- [6] Monika C, Zdena K, Alena F, et al. Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(11): 1317-1323.
- [7] Seto M, Okita N, Hatta T, et al. Catabolic potential of multiple PCB transformation systems in *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. *Biotechnology Letters*, 1996, 18(11): 1305-1308.
- [8] Sakai M, Ezaki S, Suzuki N, et al. Isolation and characterization of a novel polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Paenibacillus* sp. KBC101[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(1): 111-116.
- [9] Tu C, Teng Y, Luo YM, et al. Potential for biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Sinorhizobium melilon*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(2/3): 1438-1444.
- [10] Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, et al. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400<sup>T</sup> and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1677-1681.
- [11] 贾凌云. 多氯联苯降解菌的筛选及降解性能研究[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2008.
- [12] 徐莉, 滕应, 张雪莲, 等. 多氯联苯污染土壤的植物-微生物联和田间原位修复[J]. *中国环境科学*, 2008, 28(7): 646-650.
- [13] 滕应, 骆永明, 高军, 等. 多氯联苯污染土壤菌根真菌-紫花苜蓿-根瘤菌联合修复效应[J]. *环境科学*, 2008, 29(10): 2925-2930.
- [14] Veronika K, Petr S, Uhlik O, et al. Plant-microorganism interactions in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil[J]. *New Biotechnology*, 2012, 30(1): 15-22.
- [15] Damaj M, Ahmad D. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by rhizobia: a novel finding[J]. *Biochemical and*



- Biophysical Research Communications, 1996, 218(3): 908-915.
- [16] Bae HS, Im WT, Suwa YC, et al. Characterization of diverse heterocyclic amine-degrading denitrifying bacteria from various environments[J]. Archives of Microbiology, 2009, 191(4): 329-340.
- [17] Chen YQ, Adam A, Toure O, et al. Molecular evidence of genetic modification of *Sinorhizobium meliloti*: enhanced PCB bioremediation[J]. Environmental Biotechnology, 2005, 32: 561-566.
- [18] 徐莉, 滕应, 骆永明, 等. 苜蓿根瘤菌对多氯联苯降解转化特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(1): 255-259.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-412.
- [20] Josephine B, Donna MT, Joseph A, et al. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1999-2013.
- [21] Safe S. Development, validation and limitations of toxic equivalency factors[J]. Chemosphere, 1992, 25: 61-64.
- [22] Roman T, Barbara B, Katarina D. The effect of terpenes on the biodegradation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas stutzeri*[J]. Chemosphere, 2001, 44(7): 1547-1555.
- [23] Kwon SH, Hong MH, Kim E, et al. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 54(6): 838-843.
- [24] Sierra I, Valera JL, Marina ML, et al. Study of biodegradation process of polychlorinated biphenyls in liquid medium and soil by a new isolated aerobic bacterium (*Janibacter* sp.)[J]. Chemosphere, 2003, 53(6): 609-618.
- [25] 张国英. 多环芳烃、多氯联苯优良降解菌的分离鉴定及降解特性研究[D]. 山东: 山东大学博士学位论文, 2009.
- [26] Gibson DT, Cruden DL, Haddock JD, et al. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175: 4561-4564.

## 编辑部公告

### 关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn), 请在邮件主题中注明:“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: [tongbao@im.ac.cn](mailto:tongbao@im.ac.cn)