

石油烃类化合物降解菌的研究概况*

李丽 张利平** 张元亮

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要: 综述了国内外对石油烃类化合物的微生物降解的研究情况, 分别就石油烃类化合物各组分微生物降解率、不同组分的微生物代谢途径、降解菌种类、降解性质粒、工程菌构建以及生物修复方法进行了介绍, 以期全面反映此领域的研究成果, 为研究工作者提供一定参考依据。

关键词: 石油、烃类化合物、降解菌、生物修复

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0089-04

自1969年发生第一次超级油船失事以来, 世界上已有超过40处大的海洋泄漏, 据估计每年都有千万公吨以上的石油污染世界海洋, 对生物和生态环境造成了很大危害。石油污染问题引起了人们越来越多的关注, 刺激他们发明有效的技术方法对之进行治理。物理和化学处理方法已研究得比较成熟, 生物降解方法的研究虽仍有很大争论, 但已取得了一些成果。天然微生物的生物降解作用已成为消除环境中石油烃类污染的主要机制^[1]。本文就此进行了综述, 以期全面反映此领域的研究成果, 存在的问题及今后的发展方向。

1 石油烃类化合物的化学组成及其对微生物降解的敏感程度

石油烃类化合物可分为4类: 饱和烃、芳香族烃类化合物、沥青质(苯酚类、脂肪酸类、酮类、酯类、卞啉类)、树脂(吡啶类、喹啉类、卡巴肿类、亚砷类和酰胺类)。

许多学者对各成分的微生物降解率进行了研究^[2], 认为饱和烃的降解率最高, 其次是低分子量的芳香族烃类化合物, 高分子量的芳香族烃类化合物、树脂和沥青质则极难降解。不同烃类化合物的降解率模式是: 正烷烃 > 分枝烷烃 > 低分子量芳香烃 > 多环烷烃。但此模式也并非通用的。如 Jones 等(1983)就发现海洋沉积的粗油中芳香烃的降解率要高于 n-烷烃。

石油烃类化合物组成成分的差异影响其生物降解率。低硫、高饱和烃的粗油最易降解, 高硫、高芳香族烃类化合物的纯油则最难降解。粗油降解后总是留下一些复杂的残留物, (主要是沥青质), 但其并不会产生生态毒性作用, 因此, 对烃类化合物降解的研究主要还应集中于毒性较强的芳香族化合物。

2 石油烃类化合物的微生物代谢途径

许多学者就烃类化合物的微生物代谢途径进行了研究^[3]。他们认为细菌和真菌降解的关键步骤是底物被氧化酶氧化的过程, 此过程需要分子氧的参与。正烷烃先转化

* 河北大学重点科研基金项目

** 通讯作者

收稿日期: 2000-03-01, 修回日期: 2000-06-30

成羧酸而后靠 β -氧化进行深入降解,形成二碳单位的短链脂肪酸和乙酰辅酶A,放出 CO_2 。烷烃也可先转化为酮,但不是其主要代谢方式。多分枝的烯烃主要转化成二羧酸再进行降解,甲基会影响降解的进行。环烷烃的降解需要两种氧化酶的协同氧化,一种氧化酶先将其氧化为环醇,接着脱氢形成环酮,另一种氧化酶再氧化环酮,环断开,之后深入降解。芳香烃一般通过烃基化形成二醇,随着邻苯二酚的形成,环断开,邻苯二酚继而降解为三羧环的中间产物。

真菌和细菌降解石油烃类化合物可形成具有不同的立体化学构型的中间产物。真菌将石油烃类化合物降解成反式二醇,而细菌几乎总是将之降解成顺式二醇(许多反式二醇是潜在的致癌物,顺式二醇则无毒性)。

3 降解石油烃类化合物的微生物种类

降解石油烃类化合物的微生物主要是细菌和真菌,细菌在海洋生态系统中占主导地位,而真菌则是淡水和陆地生态系统中更重要的因子。

海洋中最主要的降解细菌属于:无色杆菌属(*Achromobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、节杆菌属(*Archrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、棒杆菌属(*Coryneforms*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)以及放线菌属(*Actinomycetes*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)。在大多海洋环境中,上述这些细菌是主要降解菌,在真菌中,金色担子菌属(*Aureobasidium*)、假丝酵母属(*Candida*)、红酵母属(*Rhodotorula*)和掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)是最普遍的海洋石油烃降解菌。*Corollospora*、*Dendryphiella*、*Lulworthia*和*Varicosporina*以及一些丝状真菌如曲霉属(*Aspergillus*)、毛霉属(*Mucor*)、镰刀霉属(*Fusarium*)和青霉属(*Penicilium*)也应被归入海洋降解菌中。土壤中主要的降解菌除了上面提到的细菌种类外,还包括分枝杆菌属(*Mycobacterium*)以及大量丝状真菌。曲霉属和青霉属某些种在海洋和土壤两种环境中都有分布。木霉属(*Trichoderma*)和被孢霉属(*Mortierella*)某些种是土壤降解菌。

降解石油烃类化合物的能力依赖于微生物群落的种属组成。Song等(1986)研究发现在长期受到苯污染的土壤中,加入的苯有80%被细菌降解,20%被真菌降解。大量研究表明当菌群处于石油污染环境时,利用烃类化合物的微生物数量急剧增长。Atlas(1981)报道在正常环境下降解菌一般只占微生物群落的1%,而当环境受到石油污染时,降解菌比例可提高到10%。Song等(1990)更发现石油污染使降解菌所占比例超过了90%。

4 降解菌的质粒研究及遗传工程菌构建

许多文献报道当环境受到石油污染时,降解性微生物数量迅速上升,尤其是含降解质粒的微生物。水体污染后,含质粒细菌的比例可提高数倍到数十倍。含质粒细菌在石油污染环境中出现频率和数量比非污染环境高,说明质粒在石油降解中可能起着重要作用。

质粒DNA是一种高度可变的DNA构型,可以通过接合或转化来传递表型(其中包括石油烃类化合物的降解能力)到受体。假单胞菌属某些菌种所携带的质粒可编码萘、水杨酸、樟脑、辛烷、二甲苯、甲苯等代谢基因。分别编码甲苯和萘代谢基因的

降解质粒 TOL 和 NAHT 也已被发现^[4,5]。

复杂的烃类化合物混合物的降解需要有混合菌株的参与,但不同菌株之间可能会产生竞争或拮抗作用,从而对降解产生负面影响。使用可高效降解多种石油烃类化合物的降解工程菌即可避免产生此类问题。降解质粒的存在为降解工程菌的构建提供了可能。含有多个降解质粒的假单胞菌属工程菌株可降解脂肪烃、芳香烃、萜烃、多环芳香族烃类化合物。Burlage 等(1990)将假单胞菌属菌株 NAHT 质粒中编码萘降解基因的片段整合到弧菌的 *Lux* 基因上,*Lux* 基因是控制发光性状的,这样便可利用生物发光来监测此微生物对萘的降解^[5]。

5 生物修复

生物修复是指在污染环境中加入一些物质(如营养、O₂、微生物)或提高这些物质的能力,导致天然生物降解过程加速的活动^[6]。它主要通过两种途径进行,一是加入营养物质或氧气,另一种是通过接种加入合适的降解微生物。

5.1 加氧和营养供应 土壤、地下水、沉积物中烃类化合物的微生物降解会受到氧缺乏的严重制约,可通过加入过氧化氢来解决这一问题。为了防止对微生物产生毒害以及避免由于分解太快形成气阱,过氧化氢在水中的浓度需保持在 100mg/L 左右,且需要同稳定剂一起使用。

微生物的生长需要氮和磷等营养物质,因此在这些营养物质成为降解限制因子的情况下,加入肥料将有助于降解顺利进行。早在 1967 年,就已成功地使用这种生物修复手段对“玛丽王后”号在好望角造成的漏油进行了治理。使用肥料要注意:(1)根据不同情况选择适合的生物修复产品(团粒、颗粒或混合液)。(2)应确保肥料各成分低于毒性水平。(3)加入肥料不应导致水体加富,生成水花。

5.2 接种 一种微生物可代谢的烃类化合物范围有限,污染地区的固有微生物种群可能无法降解复杂的石油烃混合物,因此可以将一些降解微生物包括降解工程菌接种到污染环境,以提高降解速率和程度。已经证明加入氧气、肥料可提高降解率,而在接种微生物的问题上仍存在分歧^[7]。接入的降解菌必须经过详细的分类鉴定,确定其中无人类及其他生物致病菌,对于降解工程菌、更应考虑其安全性及生态毒性等问题。

实地试验结果已证实了生物修复手段作为石油污染治理手段的可行性^[8-10]。生物修复方法比物理和化学方法要经济得多,可彻底清除污染物,且产物是 CO₂ 和水,完全无毒害,因此在治理石油污染方面具有美好的前景。但它与其他技术一样也有不足之处,如见效慢、受理化及环境因子影响大,前期研究困难且费用昂贵,毒性和安全问题需要注意,要不断在以后的研究中加以改进。

6 结论

石油烃类化合物的微生物降解是一个复杂的过程,它的效率和质量取决于石油烃类化合物存在的数量及状态,周围的环境条件以及微生物群落的组成。微生物对石油的降解受环境因素的影响很大,水体环境中降解主要受营养成分(如 N 和 P)、盐度和压力的限制;土壤中影响降解的主要因素则是氧气、营养浓度、温度和 pH 值。关于降解菌和环境的关系需要在实际应用中予以解决,这也是生物修复应主要解决的问题。

总之,微生物育种与常规污染处理方法的联合利用——即生物修复来提高对石油

烃类化合物的降解可能和值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] National Academy of Sciences. Oil in the sea-inputs, fates and effects, Washington D C: National Academy press, 1985.
- [2] Higashihara T, Maruyama A, Kawano Y, *et al.* Environmental Research in Japan, 1995, 95 ~ 96.
- [3] Ronald, M A, Richard B. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In: Advances in microbial ecology, vol. 12, Marshall, K C. (ed.) New York: Plenum Press, 1992.
- [4] Yen K M, Serdar C M. CRC Crit Rev Microbiol, 1988, 15: 247 ~ 268.
- [5] Burlage R S, Saylor G S, Larimer F. J Bacteriol. 1990, 172: 4749 ~ 4757.
- [6] U. S. Congress office of Technology Assessment. Bioremediation of marine oil spills-background paper, OTA-BP-0-70. Washington D C: U S Government Printing Office, 1991
- [7] Kenneth L, Gilles H T, Johanne G. Proceedings of the 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington D C. 1997, 697 ~ 705.
- [8] Hoff R. Mar. Pollut. Bull., 1993, 26: 476 ~ 481.
- [9] Bragg J R, Prince C R, Harner E J, *et al.* Nature, 1994, 368: 413 ~ 418.
- [10] Swannell R P, Lee K, McDonagh M. Microbiological Reviews, 1996, 60: 342 ~ 365.

结核分枝杆菌功能基因组研究的方法学

谢建平^{1,2*} 乐 军¹ 王洪海^{1**}

(复旦大学生命科学学院 上海 200433)¹

(西南师范大学生物科学学院 重庆 400715)²

摘要: DNA 芯片、基因中断、基因互补法、差示荧光诱导法、生物信息学、蛋白质组、DNA 库免疫、细菌人工染色体库是结核分枝杆菌研究的主要方法。综合利用上述技术可能是我们开展结核分枝杆菌功能基因组学研究的最佳切入点。

关键词: 结核分枝杆菌, 耐药机制, 功能基因组学, 细菌人工染色体库, 蛋白质组

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0092-06

结核病 (Tuberculosis-TB) 仍然是全球人类健康的主要威胁。全球被结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis* 以下简称 MTB) 感染者约 17 ~ 20 亿, 结核病人约 2000 万; 每年至少 3000 万人感染 MTB, 约 800 万新结核病患者, 约 200 万人死于结核病; 耐药 (Drug resistance DR) 和耐多药 (Multidrug resistance, MDR) MTB 迅速扩散, 难治疗结核病的范围在扩大, 爱滋病泛滥等使问题更加严峻, 唯一的预防性疫苗 (卡介苗) 的效果不稳定。为数甚少的药物多是 30 年前发现, 且 MTB 对所有一线药物均已产生了不同程度的耐药性。全球急需对付 MTB 的有效措施, 包括预防性和治疗性疫苗、新型药物。我国的问题尤其严峻, 因为中国是世界上除印度以外的第二大结核病重灾区。

结核病的发生、发展是 MTB 和人之间不断相互作用的结果。其相互作用研究至少

* 微生物学博士研究生

** 联系作者

收稿日期: 2000-04-26 修回日期: 2000-10-08