

应用双层平板技术评估海水沉积物中多环芳烃-芘的污染研究*

田 蕴 郑天凌**

(厦门大学生命科学学院应用与环境微生物研究所 厦门 361005)

摘要 应用双层平板计数技术对厦门西海域海水沉积物中4环多环芳烃-芘降解菌数量调研结果表明,除靠近马銮湾养殖区站位Ⅵ外,芘污染较严重站位Ⅳ样品中芘降解菌数量为4.7万个/g(干物质量),而芘污染相对较轻站位Ⅱ样品中芘降解菌数量为1.2万个/g(干物质量),海水沉积物中芘含量与芘降解菌数量呈正相关。

关键词 双层平板计数技术 多环芳烃-芘 降解菌 污染

The application of an overlayer technique in evaluation of Pyrene-contaminated sites. TIAN Yun, ZHENG Tian-Ling (Institute of Applied and Environmental Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005), *CJEA*, 2004,12(1):23~25

Abstract Pyrene-contaminated sites of Xiamen western sea sediments are evaluated by using overlayer technique. The results show that the samples collected from the sediments with a high concentration of Pyrene contain 47 thousand Pyrene-degrading bacteria per gram while the samples collected from the sediments with a low concentration of Pyrene contain 12 thousand Pyrene-degrading bacteria per gram. The number of Pyrene-degrading bacteria is positively related with the concentration of Pyrene.

Key words Overlayer technique, Pyrene, Degrading bacteria, Pollution

利用微生物为主体的生物修复技术清除土壤和水体污染的作用日显重要。由于自然环境中存在溶解氧(或其他电子受体)不足、营养盐缺乏和高效降解微生物生长缓慢等限制因素,微生物自然净化速度很慢,需提供 O₂ 或其他电子受体、添加营养盐等手段,促进土著降解菌生长以迅速去除污染物。生物修复前对污染现场的评价常涉及有机污染物降解菌数量检测,微生物在消除有机污染物时种群数量表现很高,尤其是有机污染物降解菌数量,并随污染物浓度的下降而降解菌数量下降,因此需要1种迅速安全、价格便宜且能提供准确结果的计数技术。单层平板细菌培养技术可提供活的降解菌数目^[3],但一些非降解菌可能依靠已污染的琼脂和实验室空气中有有机物或降解菌代谢产物而生长于平板上,因此这种计数技术可能会高估降解菌真正数目。而多管发酵计数技术使用含有机污染物成分的液体无机培养基,虽克服了其他因素干扰,但需大量玻璃器皿且培养时间长,需1~4个月才能得到满意结果^[4,5]。本研究采用改进的双层平板计数技术,调查检测了厦门西港海水沉积物中4环多环芳烃-芘降解菌数量,避免了污染并通过芘消失而产生的透明圈有效识别降解菌。

1 研究方法

于2001年7月10日采集样品,在厦门西海域设6个采样站位(见图1),站位Ⅰ位于厦门西海域进入台湾海峡的主航道,站位Ⅱ位于非主航道,站位Ⅲ靠近筲湖排出口,站位Ⅳ居东渡码头附近,站位Ⅴ近临宝珠岛养殖区,站位Ⅵ靠近马銮湾养殖区。海水表层沉积物用抓斗采泥器采集样品,每站位均采样3次,将样品混合后分装,用于多环芳烃分析的沉积物样品立即冷冻;用于微生物分析的沉积物在采集后24h内接种。沉积物样品经冷冻干燥后

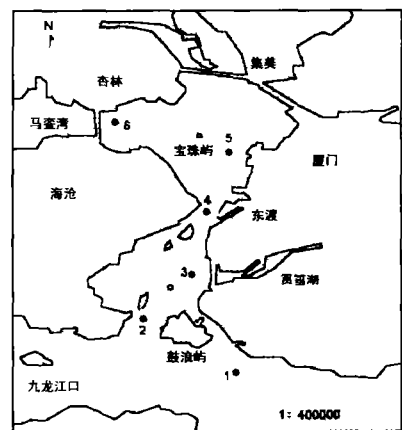


图1 厦门西海域采样站位图

Fig.1 Sampling stations of Xiamen western sea

* 国家自然科学基金项目(30070157)及河口海岸动力沉积和动力地貌综合国家重点实验室开放课题基金资助

** 通讯作者

收稿日期:2003-03-31 改回日期:2003-04-30

研磨过 100 目筛,称取沉积物样品 20g 并加入 1g 铜粉和 20 μ L 替代物再加入有机溶剂进行超声萃取,经皂化、浓缩后过硅胶柱分离出多环芳烃,用 HP6890Plus 气相色谱法配以 HP5973 型质谱检测器(MSD)测定海水沉积物中芘含量。采用双层平板计数,称取 10g 沉积物样品并加入 90mL 无菌水和一定数量玻璃珠,于 150r/min 摇床中震荡 3h,静置 30min 后取上清液按 10 倍稀释法将接种液分别稀释成 100mL/L、10mL/L 和 1mL/L 等浓度菌悬液。将 0.1mL 不同稀释浓度样品融入 3.5mL 30 $^{\circ}$ C 无机琼脂培养液中[该培养液中已混有 0.2mL 芘-乙醇溶液(0.5mg/mL)]。无机琼脂培养液(SSM)配方为(NH₄)₂SO₄ 1000mg/kg、Na₂HPO₄ 800mg/kg、KH₂PO₄ 200mg/kg、MgSO₄·7H₂O 200mg/kg、CaCl₂·2H₂O 100mg/kg、FeCl₃·6H₂O 5mg/kg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 1mg/kg, pH 值为 7.2,琼脂 1 万 mg/kg,于 121 $^{\circ}$ C 灭菌 15min。将上述琼脂液混匀后均匀铺于已凝固的无机琼脂底板上(该无机琼脂底板上琼脂含量为 1.5 万 mg/kg,并含 0.1mL/L 维生素母液),每个稀释度作 3 个平行样,并以空白为对照(CK),于 25 $^{\circ}$ C 黑暗下培养 21d 后进行芘降解菌数量计数,菌落周围带有透明圈的为芘降解菌^[6]。

表 1 不同采样站位海水沉积物中芘含量及芘降解菌数量比较

Tab.1 Concentration of Pyrene and numbers of Pyrene-degrading bacteria in sediments

站 位 Sites	芘*/ng·g ⁻¹ Pyrene	芘降解菌/万个·g ⁻¹ Pyrene-degrading bacteria
I	192.6	4.3
II	111.0	1.2
III	140.5	3.6
IV	244.3	4.7
V	183.3	3.8
VI	1016.1	1.2

* 干物质量。

2 结果与分析

2.1 不同采样站位海水沉积物中多环芳烃-芘含量比较

监测表明 6 个采样站位海水沉积物中芘含量有所不同(见表 1),以站位 VI 海水沉积物中芘含量最高,为 1016.1ng/g(干物质量),这与该站位居海水养殖区水体交换量小,养殖海域自身有机污染在湾内积累、超过水体自净能力有关;其次为站位 IV,其海水沉积物中芘含量为 244.3ng/g(干物质量),这与该站位的码头机动船含油废水排放、汽油和柴油燃烧及煤污染有关^[7];站位 II 海水沉积物中芘含量最低,这可能与位于非主航道受油污染较轻有关。

2.2 海水沉积物中芘降解菌数量及其与芘含量的关系

3.5mL 琼脂液中乙醇浓度为 50g/kg,其浓度低于对细菌产生损伤的水平,且 30 $^{\circ}$ C 温度琼脂液散布于底板上 2~3min 内即凝固并使乙醇迅速挥发,但其热的影响是短暂的,故制作平板过程不会剧烈影响细菌生长。海水沉积物样品培养 5d 后即可观察到菌落周围芘的消失,但大多数菌落培养 7d 或 14d 后出现。除站位 VI 外,海水沉积物中芘污染较轻的站位芘降解菌数量偏低,且其菌落需更长时间才能形成。站位 II 海水沉积物样品培养至 7d 仅有 15% 的降解菌出现,至 14d 出现 70% 的降解菌。而芘污染较重站位 IV 海水沉积物样品培养至 7d 已有 60% 的降解菌出现,至 14d 全部降解菌基本出现(见图 2)。环境中多环芳烃降解微生物

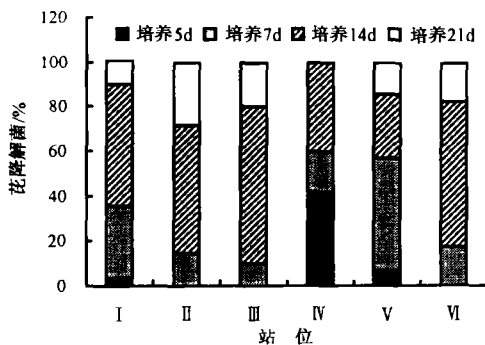


图 2 不同采样站位海水沉积物中芘降解菌在双层平板出现时间

Fig.2 Time of appearance in Pyrene-containing agarose overlayers of Pyrene-degrading bacteria obtained from samples of sediments

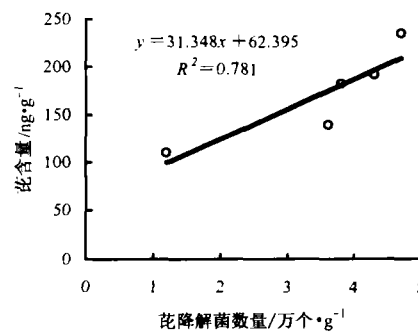


图 3 海水沉积物中芘含量与芘降解菌数量的关系

Fig.3 Relationship between Pyrene concentration and Pyrene-degrading bacteria numbers in the sediments

与多环芳烃含量密切相关,Bogardt A. H. 等^[8]调查发现多环芳烃污染区域如汽油、柴油及杂酚油污染的土壤降解微生物数量达 10 万个/g 以上,而未受多环芳烃污染的土壤如水库、沙漠中降解微生物含量在检测限以下。McNally D. L. 等^[9]对 Keweenaw 湾和 Trenton 海峡调查发现 2 区域异氧菌总数和多环芳烃降解微生物数量相当,而微生物的优势菌株不同,Keweenaw 湾微生物种类(68 种)多于 Trenton 海峡(57 种),但 Keweenaw 湾 PAH 降解微生物种类(3 种)明显少于 Trenton 海峡(18 种),两者区别原因在于受多环芳烃污染的程度不同。本研究发现受多环芳烃污染最严重的站位 VI 海水沉积物中芘降解菌数量与其他站位相比却最少,且除站位 VI 外

其他5个站位海水沉积物中芘降解菌数量与芘含量呈正相关(见图3)。Bogardt A. H. 等^[8]研究表明污染物浓度过高或其他毒性物质存在可抑制降解菌生长。马銮湾养殖海域受 PAHs 污染较明显,芘含量偏高,但并未超过生物影响均值(ER-M)^[10]及生物影响阈值(ISQV-low)^[11],故站位VI海水沉积物中芘降解菌数量少可能与养殖区环境特征有关。据暨卫东^[1]研究马銮湾水体4m层以下严重缺O₂,6m层以下溶解氧几乎被有机质氧化分解所消耗殆尽,H₂S含量为20mg/L以上,其表层沉积物可能处于厌氧环境;另一方面为预防养殖疾病而大量使用抗生素以及净化局部环境的消毒水造成海域中有毒成分增加,使养殖区致病菌产生抗药性并抑制有益菌的生长,导致养殖海域细菌生物量下降^[2],生物自净能力削弱,使积蓄于海水沉积物中多环芳烃生物降解受阻,故养殖海域海水沉积物中多环芳烃含量明显高于非养殖区,除与该海域水动力条件及沉积物性质有关外,海域有机污染严重及毒性成分存在使多环芳烃降解菌数量低下是不容忽视的因素。

3 小 结

双层平板计数技术方便且稳妥,可提供证明某个菌落能降解芘的可视性证据,既可用于生物修复前多环芳烃降解菌的调查以指示多环芳烃污染程度,亦可用于生物修复过程中多环芳烃降解菌数量和活性的监测。

参 考 文 献

- 1 暨卫东. 厦门马銮湾有机污染、富营养化状况下的生化关系. 海洋科学, 1998, 20(1):134~143
- 2 郑天凌, 陈 瑛, 李福东等. 控制对虾弧菌病药物的实验研究[J]. 水产学报, 1994, 3(18):213~218
- 3 Yuan S. Y., Wei S. H., Chang B. V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. Chemosphere, 2000, 41:1463
- 4 Mills A. L., Breuil C., Colwell R. R. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. Can. J. Microbiol, 1978, 24:552~557
- 5 Geiselbrecht A. D. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from puget sound sediments. Appl. Environ. Microbiol, 1996, 62:3344~3349
- 6 Kästner M., Mahro B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1994, 41:257~273
- 7 Tam N. F. Y., Ke L., Wang X. H. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. Environmental Pollution, 2001, 114:255~263
- 8 Bogardt A. H. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. Appl. Environ. Microbiol, 1992, 58:2579~2582
- 9 McNally D. L., Michellic J. R., Lueking D. R. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation microorganisms in Great Lakes sediments. Journal of Great Lakes Research, 1998, 24:392~403
- 10 Long E. R., MacDonald D. D., Smith S. L., et al. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediment. Environmental Management, 1995, 19:81~97
- 11 Chapman P. M., Allard P. J., Vigers G. Development of sediment quality values for Hongkong Special Administration Region: A possible model for other jurisdictions. Marine Pollution Bulletin, 1999, 38(3):161~169