

几种芳香化合物对苯并芘在泥浆反应器中降解的影响

巩宗强¹, 李培军¹, 王新², 台培东¹, 张海荣¹ (1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016, E-mail: gong-zq@yahoo.com; 2. 沈阳工业大学理学院, 沈阳 110023)

摘要: 苯并芘在土壤中难于被生物降解, 其降解方式通常以共代谢方式进行. 本研究考查了几种多环芳烃及 2 种单环芳香化合物对苯并芘降解的影响. 先把几种芳香化合物投入到供试无污染土壤中进行 3d 的预培养, 然后向土壤中加入苯并芘并使土壤在三角瓶内形成泥浆系统, 放在摇床上培养. 42d 的实验表明, 用菲对土壤进行预处理消除了苯并芘的降解滞后期, 并提高了苯并芘的降解率. 蒽、芘未能改变苯并芘的降解模式, 而苯并蒽则相对抑制了苯并芘的降解. 水杨酸和邻苯二甲酸同样消除了苯并芘降解的滞后阶段, 且促进了苯并芘的降解, 但质量差别未对苯并芘的降解产生影响.

关键词: 苯并芘; 预处理; 多环芳烃; 共代谢; 降解率

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2002)06-05-0069

Effects of Aromatics on the Degradation of Benzo(a) pyrene in Slurry Reactors

Gong Zongqiang¹, Li Peijun¹, Wang Xin², Tai Peidong¹, Zhang Hairong¹ (1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of sciences, Shenyang 110016, China E-mail: gong-zq@yahoo.com; 2. School of Science, Shenyang University of Technology, Shenyang 110023, China)

Abstract: Benzo(a) pyrene (BaP) can't be biodegraded in the soil easily, the degradation of BaP is known as a cometabolic process. This paper dealt with the effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and two kinds of monoaromatics on the degradation of BaP. The test soil was pre-incubated with the aromatics for 3d and spiked with BaP stock solution, which eventually formed into slurry system in Erlenmeyer flasks and was incubated on rotary shaker. 42 d experiment demonstrated that lag period in degradation process of BaP disappeared due to the preexposure to phenanthrene, and degradation rate of BaP was enhanced. On the contrary, degradation pattern of BaP was not obviously improved by the preexposure to anthracene or pyrene, and was even inhibited by benz(a)anthracene. The lag period also disappeared after the preexposure to salicylic acid or phthalic acid, and the degradation of BaP was accelerated by both monoaromatics, even though the impact of mass difference on the degradation of BaP was not detected.

Key words: benz(a)pyrene; pre-exposure; PAHs; cometabolism; degradation rate

多环芳烃是一类广泛存在于环境中的有机污染物,也是最早被发现和研究的化学致癌物. 苯并芘是一种具有 5 个芳环结构的多环芳烃,有很强的致畸性、致突变性、致癌性, Ames 实验阳性,能够导致染色体畸变、染色体交换、无序的 DNA 合成,具有很强的难降解性^[1]. 微生物转化是去除污染地带多环芳烃的重要途径,但象苯并芘这样的多环芳烃却能长期残留. 虽然很多文献报道了微生物降解低分子量多环芳烃的机制和过程,但高分子量多环芳烃的生物

降解的报道还相对较少^[2~4]. 多环芳烃这类疏水化合物在土壤中可给性差,难于被微生物利用,这是生物处理的限制性因素之一^[5]. 由于苯并芘的前述特征,能促进它快速降解的条件也因此倍受关注,很多学者都在努力找到一条切

基金项目: 国家自然科学基金项目(29977021); 中国科学院知识创新项目(KZCX2-401).

作者简介: 巩宗强(1975~),男,博士研究生,主要从事生态环境工程研究、生态毒理学研究.

收稿日期: 2001-11-07; 修订日期: 2002-01-02

实可行的生物修复途径.生物反应器是新近发展的一种生物处理手段,它使得生物修复过程的反应条件容易控制,土壤微生物及其它添加物充分混合,提高了污染物的可给性^[6].本研究以生物泥浆反应器为手段,探索土壤内不同多环芳烃及单环芳香化合物对苯并芘降解的影响.

1 材料与方法

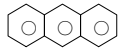
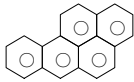
表 1 供试土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of the soil

pH	TP/ %	KN/ %	TK/ %	OC/ %	CEC/ cmol·kg ⁻¹	土壤质地/ %			BaP 背景值
						砂土	壤土	粘土	
7	0.04	0.11	0.593	1.78	23.7	21.4	46.5	32.1	未检出

表 2 部分多环芳烃的特征

Table 2 Characteristics of some PAHs for experiment

多环芳烃	分子式	结构式	遗传毒性	致癌性 ¹⁾	产地
蒽(Ant)	C ₁₄ H ₁₀				British drug house LTD
苯并芘(BaP)	C ₂₀ H ₁₂		+ Ames	+ ,UDS ,SCE ,CA	Fluka Chem

1) UDS:无序的 DNA 合成;SCE:姐妹染色体交换;CA:染色体畸变

1.2 实验设计

将各多环芳烃、水杨酸或邻苯二甲酸分别溶于甲醇中制成标准溶液.取 9 个 500 mL 三角瓶,每个三角瓶内盛有 60g 供试土壤.用注射器分别向其中 2 个三角瓶内均匀加入菲或蒽标准溶液,控制其浓度为 150 mg/kg 土,向另外 2 个三角瓶加入芘或苯并蒽溶液,控制其浓度为 90 mg/kg 土.向另外 4 个三角瓶加入水杨酸或邻苯二甲酸,控制其浓度分别为 150 mg/kg、300 mg/kg 土.另有一个三角瓶为对照.向各三角瓶加入 21 mL 水,1g 前期多环芳烃降解实验的同类型土壤作为微生物接种.将以上泥浆系统放在摇床上以 140 r/min 培养 3d 后,再向各三角瓶中加入苯并芘,使苯并芘的浓度为 30 mg/kg (以土壤干重计).将三角瓶放在摇床上振荡 3h,使多环芳烃及其它有机物在土壤中分布均匀,然后向各三角瓶中加入 120 mL 马铃薯培养液,形成土壤泥浆系统,以此时刻记为 0 时,继续进行摇床培养,在 0、6、18、30、42d 用移液管

1.1 供试土壤及药品

供试土壤采自中国科学院沈阳生态站旱田小区表层 0~20cm 土壤,土壤类型为草甸棕壤,且过 1 mm 筛,其基本理化性质见表 1.供试药品:菲(Phe)、芘(Pyr)、苯并蒽(BaA),以上几种多环芳烃的结构和毒理学特性见参考文献[7],蒽(Ant)和苯并芘(BaP)的性质见表 2,水杨酸、邻苯二甲酸、甲醇、二氯甲烷等.

取出 10 mL 泥浆样品,分析测定.

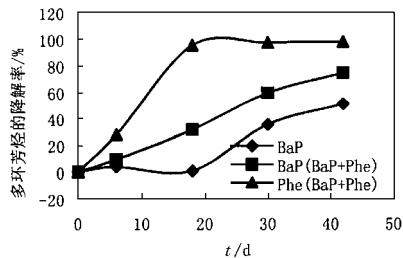
1.3 样品分析

泥浆样品放入玻璃离心管,然后在离心机内以 4000r/min 离心 5~10 min.以前实验证明液相中多环芳烃含量很少,可以忽略,故本实验只进行离心后土壤样品的分析.离心后土样风干,研磨.称取 1g 土样,放入玻璃离心管后加入 20 mL 二氯甲烷,超声水浴提取 2h.提取液离心后上清液转移到 1g 硅胶的预处理柱中,用 1:1 的正己烷/二氯甲烷混合液淋洗.收集洗脱液于 K.D.浓缩器,用氮气吹干,甲醇定容到 1 mL,高效液相色谱测定.液相色谱操作条件:惠普 1090 液相色谱仪,配有自动进样器、二极管阵列检测器(DAD)、C18 烷基硅胶色谱柱,流动相为甲醇,流速 0.8 mL/min,柱温 38℃.检测波长为:菲 251 nm,蒽 251 nm,芘 240 nm,苯并蒽 265 nm,苯并芘 290 nm.

2 结果与讨论

2.1 几种多环芳烃对苯并芘降解的影响

图 1 是土壤用菲预处理 3 d 后,泥浆内菲和苯并芘的降解,以及对照中苯并芘的降解.从图 1 对照曲线可以看出,苯并芘进入土壤环境后,至少要经过 18 d 的滞后期,然后才能被降解.而当土壤用菲预处理 3 d 后,苯并芘的降解未出现滞后期,而且整个实验过程中降解速率非常均匀,降解呈直线型,42 d 时降解率为 74.6 %.菲自身的降解相对较快,18 d 的降解率已达 95.2 %.比较图 1 中苯并芘的 2 条降解曲线,可以看出苯并芘进入用菲预处理的土壤环境后,降解率高于对照处理,也就是说,土壤环境中菲的存在及降解促进了苯并芘的降解.

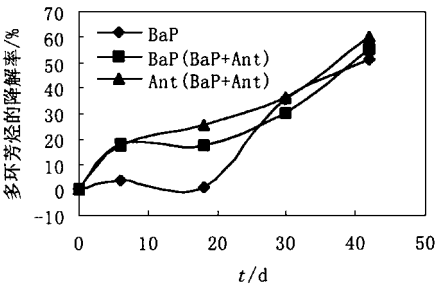


BaP:对照中苯并芘的降解;BaP(BaP+Phe):土壤用菲预处理后苯并芘的降解;Phe(BaP+Phe):菲的降解

图 1 苯并芘和菲在泥浆中的降解

Fig.1 Degradation of BaP and Phe in slurry

而当土壤用蒽预处理 3 d 后,苯并芘的降解结果完全不同于用菲处理后的结果.从图 2 中可以看出,土壤用蒽预处理后,苯并芘的降解在实验前后 2 个阶段都很缓慢,虽然在开始阶段



BaP:对照中苯并芘的降解;BaP(BaP+Ant):土壤用蒽预处理后苯并芘的降解;Ant(BaP+Ant):蒽的降解

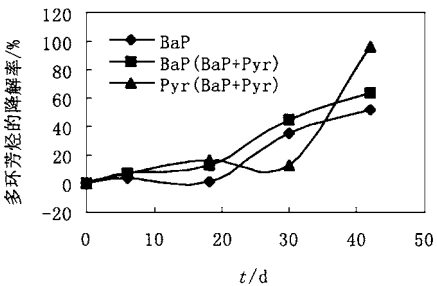
图 2 苯并芘和蒽在泥浆中的降解

Fig.2 Degradation of BaP and Ant in slurry

苯并芘略有降解,但 6 d 后降解几乎停止,即使在后 24 d 内苯并芘的降解率也只有 37.8 %.蒽

和菲同是含 3 个芳环的多环芳烃,但蒽自身却并未出现快速降解的现象,其降解模式和共存于泥浆中的苯并芘的降解模式类似,42 d 时蒽的降解率为 60.1 %.这说明蒽未能促进苯并芘在泥浆中的降解,且自身的降解率也比较低.

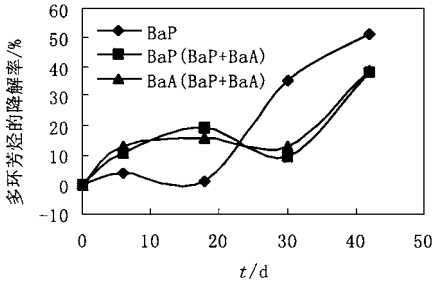
图 3 是土壤用芘预处理 3 d 后,泥浆中芘及苯并芘的降解及对照中苯并芘的降解.可以看出,尽管土壤用芘进行了预处理,但泥浆中苯并芘的降解仍然出现了相对滞后阶段,14 ~ 42 d 内苯并芘的降解也同对照相似.芘自身的降解也可以分为滞后期和降解期 2 个阶段,滞后期内芘的降解率仅为 12.6 %,但周期却长达 30 d.在随后的 12 d 内芘的降解率为 84.1 %,42 d 时芘的降解率为 96.7 %.这说明土壤用芘预处理未明显改变苯并芘的降解,在这种条件下芘也有很长滞后期,但最终芘还是被降解.当土壤用苯并蒽预处理后,泥浆中苯并芘和苯并蒽的降解率均很小(见图 4).整个实验过程中苯并芘



BaP:对照中苯并芘的降解;BaP(BaP+Pyr):土壤用芘预处理后苯并芘的降解;Pyr(BaP+Pyr):芘的降解

图 3 苯并芘和芘在泥浆中的降解

Fig.3 Degradation of BaP and Pyr in slurry



BaP:对照中苯并芘的降解;BaP(BaP+BaA):土壤用苯并蒽预处理后苯并芘的降解;BaA(BaP+BaA):苯并蒽的降解

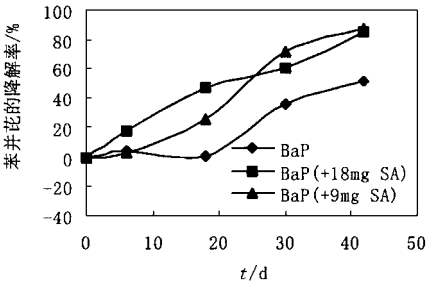
图 4 苯并芘和苯并蒽在泥浆中的降解

Fig.4 Degradation of BaP and BaA in slurry

和苯并蒽的降解非常缓慢,42d 时二者降解率分别为 38.2 %和 38.9 %,其中苯并蒽的降解率甚至于低于对照,说明苯并蒽的降解受到了共存的苯并蒽的抑制。

2.2 单环芳香化合物对苯并蒽的降解影响

本研究还考查了 2 种芳香化合物,水杨酸和邻苯二甲酸,对泥浆中苯并蒽降解的影响。这 2 种芳香化合物是多环芳烃降解矿化过程中的产物^[8]。图 5 为用 18 mg 或 9 mg 水杨酸对供试土壤进行预处理后,苯并蒽在泥浆中的降解,及对照中苯并蒽的降解。用水杨酸对土壤进行预处理后,苯并蒽降解过程中未出现明显的滞后阶段,42d 时苯并蒽已被部分降解,降解率分别为 85 %和 88 %。用邻苯二甲酸对土壤进行预处理后,也同样得到了类似的结果(见图 6)。这说明当土壤用水杨酸或邻苯二甲酸预处理后,苯并蒽一进入土壤环境就能被逐渐降解,滞后阶段消失,苯并蒽的降解率有大幅度提高。但实验中未发现水杨酸和邻苯二甲酸的质量差别对结果的影响,说明用这些芳香化合物预处理土壤的最佳量还待确定。



BaP:对照中苯并蒽的降解;BaP(+18 mg SA):土壤用 18 mg 水杨酸预处理后苯并蒽的降解;BaP(+9 mg SA):土壤用 9 mg 水杨酸预处理后苯并蒽的降解

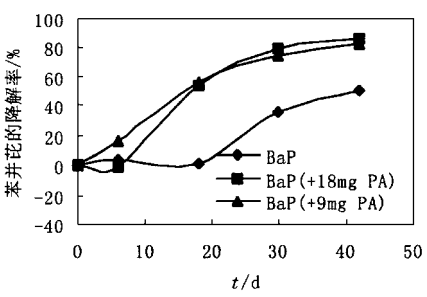
图 5 土壤经水杨酸预处理后苯并蒽的降解

Fig.5 Degradation of BaP after the soil was preexposed to salicylic acid

2.3 讨论

有机污染物间的关系问题已有研究报道,Arnsley 曾报道微生物经萘、菲预处理后能提高对这 2 种污染物的降解率^[9]。Bauer 曾研究了苯及萘、菲、蒽在降解过程中的相互关系,发现菲的存在促进了蒽的降解,萘虽然不能促进蒽的

降解,但促进了菲的降解,但他并未提出多环芳烃在降解过程中可能有相互抑制作用。本研究则主要研究了土壤用各种芳香化合物预处理后,对泥浆中苯并蒽降解的影响,其中苯并蒽相对抑制了苯并蒽的降解。Bauer 研究发现用苯对土壤进行预处理后土壤微生物降解萘和蒽的能力明显增强,本研究中相似的结果是单环化合物水杨酸和邻苯二甲酸都明显促进了苯并蒽的降解^[10]。研究中选取这 2 种芳香化合物是因为它们是多环芳烃的代谢中间产物,其存在及降解可能激发诱导了土壤微生物及相关降解酶^[11,12]。Kanaly 报道了很多依靠其他底物进行生长的微生物可以共代谢氧化苯并蒽,他在研究中把苯并蒽溶入原油加入土壤,结果发现苯并蒽进入土壤环境后,其含量在前 21 天内没有任何减少,而在实验的开始阶段就有 CO₂ 被释放出来。这说明在实验初期土壤微生物还不能降解苯并蒽,但却能降解原油^[13]。为了消除苯并蒽降解中的滞后阶段,明确各种芳香化合物对苯并蒽降解的影响,本研究采用先用各种芳香化合物对土壤进行预培养的方法,结果证明经过若干天的预培养,有可能消除苯并蒽降解的滞后阶段。在另一研究报道中 Kanaly 发现原油可以促进苯并蒽的降解,但原油也使苯并蒽的矿化产生了滞后阶段。他认为原油中不但包含了促进苯并蒽矿化的成分,同时也包含了抑制苯并蒽降解的成分。只有这些抑制成分被挥发或降解后,苯并蒽矿化的滞后阶段才能停止。本研究中考查的 6 种芳香化合物有的可以促进苯并蒽降解,有的则抑制了苯并蒽的降解。Kanaly 认为原油中的挥发性成分是使苯并蒽的矿化滞后的主要因子,而本研究中抑制苯并蒽降解的是难降解高分子量多环芳烃,生物可降解性强的芳香化合物却促进了苯并蒽的降解^[14]。本研究中最明显促进苯并蒽降解的是水杨酸和邻苯二甲酸,这可解释为它们的辛醇-水分配系数低,在土壤泥浆系统中生物可给性强,其苯环结构较容易被微生物降解,因此相关微生物及其酶系降解机制被更好地激发。比较 6 种芳香化合物也可看出,随着 K_{ow} 、 K_{oc} 的升高,



BaP:对照中苯并芘的降解;BaP(+18 mg PA) :土壤用
18 mg 邻苯二甲酸预处理后苯并芘的降解;BaP(+9 mg PA) :
土壤用 9 mg 邻苯二甲酸预处理后苯并芘的降解
图 6 土壤经邻苯二甲酸预处理后苯并芘的降解

Fig.6 Degradation of BaP after the soil
was preexposed to phthalic acid

芳香化合物对苯并芘降解的促进作用也逐渐变为抑制作用。Kästner 比较了多环芳烃在土壤/堆腐混合态、土壤/堆腐/水混合泥浆态、水/微生物态的降解率,发现经过 9d 的降解,土壤/堆腐/水混合泥浆态下多环芳烃的降解率明显高于其他二者,而多环芳烃在水/微生物状态下很难被降解,因此本研究也采用了土壤泥浆系统来考查苯并芘的降解^[15]。研究多种多环芳烃降解过程中的相互关系,选择恰当的物质作为初级底物来支持难降解多环芳烃的共代谢过程,将会促进苯并芘及其他多环芳烃污染土壤的生物修复技术的发展。

3 结论

- (1) 苯并芘进入土壤泥浆后,难于被立即降解,经过 18d 的滞后阶段,才出现降解趋势,但降解速率缓慢。当土壤用菲预处理后,苯并芘在泥浆中的降解未出现滞后阶段,降解率也明显提高。用蒽对土壤进行预处理后,苯并芘的降解未受到明显影响,且蒽自身的降解也很缓慢。
- (2) 芘和苯并蒽对土壤的预处理也未提高苯并芘的降解率,芘在土壤泥浆中降解也有相对滞后阶段,但经 42d 的实验,大部分芘能被降解。而苯并蒽不但自身难于被降解,还相对抑制了苯并芘的降解。
- (3) 用水杨酸、邻苯二甲酸对土壤进行预处理可以消除苯并芘降解初期的滞后现象,提高

苯并芘在泥浆中的降解率,二者对苯并芘降解的影响相似,实验中质量差异产生的影响不明显。

参考文献:

- 1 Park K S, Sim R C, Dupont R R. Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.*,1990,9: 187 ~195.
- 2 Cerniglia C E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*,1992,3: 351 ~ 368.
- 3 Shuttleworth K L, Cerniglia C E. Environment aspects of PAH degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*,1995,54: 291 ~ 302.
- 4 Kanaly R A, Harayama S. Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.*,2000,182: 2059 ~ 2067.
- 5 Mihelcio J R, Lueking D R, Mitzell R J et al. Bioavailability of sorbed and separate phase chemicals. *Biodegradation*, 1993,4:141 ~153.
- 6 Wilsom S C, Jones K C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.*,1993,81: 229 ~ 249.
- 7 巩宗强,李培军,郭书海等. 多环芳烃污染土壤的生物泥浆法修复. *环境科学*,2001,22(5):112 ~116.
- 8 Cerniglia C E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.*,1984,30:31 ~ 71.
- 9 Arnsley E A. Bacterial oxidation of naphthalene and phenanthrene. *J. Bacteriol.*,1983,153: 1069 ~ 1071.
- 10 Bauer J E, Capone D G. Effects of co occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.*,1988,54(7) :1649 ~1655.
- 11 Heitcamp M A, Cerniglia C E. Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*,1987,6:535 ~ 546.
- 12 Herbes S E, Schwall L R. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*,1978,35: 306 ~ 316.
- 13 Kanaly R, Bartha R, Fogel S et al. Biodegradation of [¹⁴C] benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. *Appl. Microbiol. Environ.*,1997,63(11): 4511 ~ 4515.
- 14 Kanaly R A, Bartha R. Co metabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil. *Environ. Toxicol. Chem.*,1999,18(10): 2186 ~ 2190.
- 15 Kästner M, Mahro B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,1996,44:668 ~ 675.