

多氯代二苯并-对-二噁英的微生物降解

杜秀英,竺乃恺,夏希娟,包志诚,徐晓白(中国科学院生态环境研究中心,北京 100085)

摘要:从多氯代二苯并-对-二噁英(PCDDs)污染的土壤和含氧沉积物中分离筛选出 8 株降解 PCDDs 的菌株,均能以一氯代和二氯代二噁英为单一碳源和能源生长并使其降解,多数几乎不能降解三氯代二噁英.但是,用邻二氯苯作为初级营养共代谢物,可以增强菌株对较高氯代二噁英(如三氯代和四氯代二噁英)的降解能力.利用所筛选菌株中的 1 株,经鉴定为假单胞菌 EE41(*Pseudomonas* sp. EE41).降解试验结果表明,1,2,3- TrCDD 在浓度为 1.2 mg/L 时 3 周内可降解 33%,2,3,7,8- TCDD 在 0.1 mg/L 时 3 周内最多可降解 37.8%.试验的高氯代二噁英(P-CDD, H6-CDD, H7-CDD 和 OCDD)则只被菌体强烈吸收并积累,却不能被降解.

关键词:多氯代二苯并-对-二噁英(PCDDs);微生物降解;生物积累;降解菌筛选;菌种鉴定

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2001)03-03-0097

Microbial Degradation of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins

Du Xiuying, Zhu Naikai, Xia Xijuan, Bao Zhicheng, Xu Xiaobai (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: PCDDs-degrading bacterial strains were isolated from soil and oxic-sediments polluted by PCDDs. One of them was identified as *Pseudomonas* sp. EE41. They are capable of growing on and degrade mono- and di-chlorinated dibenzo-*p*-dioxins as a sole carbon source. The biodegradability of TrCDD and TCDD can be enhanced through primary nutrient of co-metabolism of *o*-CDB, thus, 1,2,3- TrCDD and 2,3,7,8- TCDD were degraded by 33% (at the concentration of 1.2 mg/L, within 3 weeks) and 37.8% (at the concentration of 0.1 mg/L, within 3 weeks) respectively. Most highly chlorinated dibenzo-*p*-dioxins (P-CDD, H6-, H7-CDD and OCDD) tested in this study were accumulated in bacterial cells, but could not be degraded.

Keywords: polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), microbial degradation, bioaccumulation, bacterial isolation, identification of bacterial strains

多氯代二苯并-对-二噁英(polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, PCDDs)是化学性质极为稳定且极难溶于水的一类环境污染物.这类化合物毒性很强且在环境中极为保守.在我国,PCDDs 进入环境主要通过 2 种途径^[1]:氯苯生产各种农药的过程和大量使用五氯酚钠用以杀灭血吸虫或用于木材防腐.关于 PCDDs 的生物降解性的研究已有大量文献报道^[2~6],其研究结果表明,一氯代和二氯代二噁英容易被微生物降解,而且随着氯代程度的增加而降解率降低.本文报道 PCDDs 降解菌的筛选和运用所选菌株 *Pseudomonas* sp. EE41 进行的降解性及增强降解性的研究.

1 材料和方法

1.1 PCDDs 试验溶液的制备

PCDDs 由本实验室合成,纯度在 99% 以上.被试 PCDDs 溶液的组成如表 1.

1.2 PCDDs 降解菌的筛选与鉴定

从某氯苯生产车间附近采集土样和泥样,又从多年使用五氯酚钠(Na-PCP)的某湖区采集含氧沉积物样品,供分离筛选 PCDDs 降解菌.在无机盐合成培养基^[4]的琼脂平皿表面,涂抹 0.5 ml No.1 PCDDs 溶液和邻二氯苯的混合液(PCDDs 溶液:邻二氯苯,8:2),30 min 后,平皿上形成一层 PCDDs 膜,然后立即接种.将采集的富含 PCDDs 降解菌的样品用灭菌的无机盐合成培养液适当稀释,在 30℃ 下振荡培养 2h,取其上清液为接种液.将接种后的平皿置于 30℃

基金项目:国家自然科学基金项目(29837180)

作者简介:杜秀英(1944~),女,副研究员,主要研究方向为环境毒理学.

收稿日期:2000-07-14

下培养 48h ~ 72h 直到长出菌落.挑选周围出现透明圈的阳性菌落,观察和记录菌落特征,将有代表性的菌落分别转接到斜面培养基上保存.被分离出的菌株分别就其以 PCDDs 为单一碳源生长的能力和对 PCDDs 的降解能力进行筛选试验.择其中降解能力最强的 1 株按照细菌鉴定方法^[7-9]进行鉴定,被鉴定为假单胞菌 EE41(*Pseudomonas* sp. EE41) .

表 1 PCDDs 溶液的组成(溶剂丙酮)/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Table 1 Component of PCDDs solution (acetone solvent)		
编号	成分	含量
1	2- CDD	5000
	2,3- DCDD	600
	2,3,7- TrCDD	600
2	2,3,7,8- TCDD	12.5
	1,2,3,7,8- PCDD	16
	1,2,3,4,7,8- H ₆ CDD +	30
	1,2,3,4,6,7,8- H ₇ CDD	
	OCDD	12

1.3 降解试验

50ml 已灭菌的种子基质接种分离出的 PCDDs降解菌,置于 30℃下振荡培养 48h.取全部种子培养液离心,弃去上清液,沉淀物用无菌缓冲液(pH 7.2) 洗 3 次后用作降解试验的种

表 2 不同菌株对 PCDDs 的降解能力/ %

Table 2 Capacity of different strains for biodegrading PCDDs										
PCDDs	含量	对照	菌 株							
	/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$		No. 63	No. 41	No. 20	No. 33	No. 560	No. 530	No. 44	No. 23
2- CDD	50	0	30	45	21	37	26	40	23	27
2,3- DCDD	6	0	15	24	20	28	11	29	21	27
2,3,7- TrCDD	6	0	2.7	14	N	21	N	N	N	5

用一氯代和二氯代二噁英为单一碳源并使其降解,多数菌株不能降解 2,3,7- TrCDD. Klecka (1980)^[6]报道从 *Beijerinckia* sp. 的 2- CDD 培养基中分离出二氢二酚(*cis*- dihydrodiols) 并鉴别为一氯代二噁英的初级代谢产物.

2.2 共代谢对降解能力的影响

50ml 灭菌无机盐合成培养基加 0.1 % σ CDB(或不加) ,加 No.1 被试溶液,接种 *Pseudomonas* sp. EE41,置于 30℃下振荡培养 3 周.结果见表 3 和表 4.

子.种子培养基组成:每升无机盐合成培养液中加葡萄糖 1g,牛肉膏 0.5g,调 pH 7.0.降解试验用培养基组成:无机盐合成培养基加被试溶液,加或不加邻二氯苯(σ CDB) .

1.4 GC 分析

全部 50ml 试验溶液经超声波处理破碎细胞后用 2 $\times$ 20ml 石油醚萃取,合并萃取液并经无水硫酸钠脱水后定容至 50ml,待分析测定.

岛津 663-50 GC 分析仪配 ECD 检测器,采用 DB-5 毛细管柱(0.25 mm $\times$ 30 m i. d.) ,高纯氮为载气.温度控制为程序升温:160℃温热 5min,然后以 5℃/ min 升温至 230℃,保持 20min.在此条件下,各个不同的 PCDDs 可得到很好的分离.

2 结果和讨论

2.1 低氯代二噁英的生物降解

50ml 灭菌无机盐合成培养基加 No.1 PCDDs 溶液使 2- CDD,2,3- DCDD 和 2,3,7- TrCDD 最终浓度分别为 50mg/ L,6mg/ L,6mg/ L,用分离的 PCDDs 降解菌接种,置于 30℃下振荡培养 3 周.结果见表 2.

从表2看出,8个菌株都能不同程度地利

表 3 *Pseudomonas* sp. EE41 以 σ CDB 为初级营养共代谢物对 PCDDs 的降解作用

Table 3 Biodegradation of PCDDs by <i>Pseudomonas</i> sp. EE41 using σ CDB as primary nutrient co metabolism			
PCDDs	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	不接菌降解/ %	接菌降解/ %
2- CDD	2.5	- 10.9 ¹⁾	63.7
2,3- DCDD	0.3	8.2	70.5
2,3,7- TrCDD	0.3	- 4.0 ¹⁾	39.7

1) 不接菌的降解率出现负值,视为分析误差所致.

实验表明,PCDDs 的生物降解性可通过与 σ CDB 共代谢而得到提高. Haigler(1988)^[10]报

表 4 共代谢对较高浓度 PCDDs 降解性的影响

Table 4 Effect of co-metabolism on biodegradability of PCDDs in higher concentration

PCDDs	浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	加 σ -DCB 降解 / %	不加 σ -DCB 降解 / %
2- CDD	1.0	28.5	15.2
2,3- DCDD	1.2	20.0	17.8
2,3,7,8- Tr- CDD	1.2	33.1	9.5

道 *Pseudomonas* sp. 能够以 σ -CDB 为单一碳源和能源生长,在初始阶段, σ -CDB 通过双氧化作用(dioxygenation)形成邻-二氯代二氢二酚化合物(σ -dichlorinated dihydrodiols),第二步邻-二氯代二氢二酚化合物通过单氧化作用(monooxygenation)形成 3,4-二氯代儿茶酚(3,4-dichloro-

表 5 高氯代 PCDDs 的降解及其在细菌细胞中的积累

Table 5 Biodegradation and bioaccumulation of highly chlorinated PCDDs

PCDDs	2,3,7,8- TCDD	1,2,3,7,8- PCDD	H6- CDD	H7- CDD	OCDD
浓度/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	100	128	120	120	96
降解/ %	37.8	0.9	0.6	6.5	1.3
积累/ %	57.1	76.0	34.6	46.1	56.2

3 结论

(1) 一氯代和二氯代二噁英比较容易被新分离筛选的菌株降解并作为单一碳源和能源生长.

(2) 用邻二氯苯作为初级营养共代谢物,可以增强 *Pseudomonas* sp. EE41 菌株对较高氯代二噁英(如三氯代和四氯代二噁英)的降解能力.

(3) 试验的高氯代二噁英(P-CDD, H6-CDD, H7-CDD 和 OCDD) 仅被菌体强烈吸收并积累,却不能被降解.

参考文献:

1 Zheng M H et al. Polychlorinated dibenzo-dioxins and dibenzofurans in lake sediments from Chinese schistosomiasis areas. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1997, **59**:653 ~ 656.

2 Omori Toshio et al. Biodegradation of cabazole and related compounds. In Hinchee R E, Anderson D B. Pap. Int. In situ on-site Bioreclam Symp 3rd, 1995, 209 ~ 216.

3 Quensen S F, Matsumara F. Oxidative degradation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by microorganisms. Environ Toxicol

catechols),后者可作为苯环裂解酶的基质.而且, *Pseudomonas* sp. 降解氯苯过程中所涉及酶类的专一性相对较弱^[1].事实上,在环境中PCDDs常与氯苯类化合物共存,这一点对于PCDDs污染环境的生物修复来说具有十分重要的意义.

2.3 高氯代 PCDDs 的生物积累与生物降解

50 ml 灭菌无机盐合成培养基溶液加 0.1 % σ -CDB,加 No. 2 被试溶液,接种 *Pseudomonas* sp. EE41,置于 30℃下振荡培养 3 周,结果见表 5.

从表 5 看出,高氯代 PCDDs 容易在细菌细胞中积累,不容易降解,这与早先的研究结果是一致的^[7].但是,在本实验中,由于以 σ -CDB 为初级营养共代谢物,2,3,7,8- TCDD 也能降解达 37.8 % (浓度为 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$,处理 3 周).

Chem., 1983, **2**:261 ~ 268.

4 Parsons J R, Storms M M. Biodegradation of chlorinated dibenzo-p-dioxins in batch and continuous cultures of strain JBI. Chemosphere, 1989, **19**:1297 ~ 1308.

5 Matsumura F, Benezet H J. Studies on the bioaccumulation and microbial degradation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-dioxin. Environ Health Perspect, 1973, **5**:253 ~ 258.

6 Klecka G M, Gibson D T. Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzo-p-dioxins by a *beijerinckia* species. Appl. Environ. Microbiol., 1980, **39**:208 ~ 296.

7 Gerhardt P et al. Manual of methods for general bacteriology. Washington D.C: American Society of Microbiology, 1981, 409 ~ 443.

8 中国科学院微生物所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978. 132 ~ 185.

9 Palleroni N J. Gram negative aerobic rods and cocci, In: Kriey N R, Holt J G. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Baltimore, Md: The Williams & Wilkings Co., 1984, 140 ~ 199.

10 Haigler B E, Nishino S F, Spain J C. Degradation of 1,2-dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**:294 ~ 301.

11 Spain J C, Nishino S F. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol., 1987, **53**:1010 ~ 1019.