

苯并(a)芘及其代谢产物的连续降解研究

臧淑艳^{1,2,3}, 李培军^{1*}, 周启星^{1,2}, 王新⁴, 林桂凤¹, 王娟³

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 沈阳化工学院应用化学系, 沈阳 110142; 4. 沈阳工业大学理学院, 沈阳 110023)

摘要:在以驯化过的芽孢杆菌(BA-07)降解BaP的过程中, 鉴定出2个BaP的未开环代谢产物顺式-4, 5-二氢-4, 5-二醇-BaP(*cis*-BP4, 5-dihydrodiol)和顺式-7, 8-二氢-7, 8-二醇-BaP(*cis*-BP7, 8-dihydrodiol)。由于该产物对微生物有一定毒性, 所以难于进一步降解。为提高BaP降解的同时, 降低*cis*-BP4, 5-dihydrodiol和*cis*-BP7, 8-dihydrodiol的累积, 对2种降解方法(即单纯用BA07降解和运用高锰酸钾与BA-07耦合的方法降解)进行了比较, 并且优化了连续降解的参数。结果表明, ①对BaP及其代谢产物的连续降解, 化学氧化与微生物耦合(高锰酸钾与BA-07)的降解效果明显好于单纯利用微生物(细菌BA-07)的降解; ②在同一时间取样, *cis*-BP4, 5-dihydrodiol的残留率均高于*cis*-BP7, 8-dihydrodiol; ③当BaP的浓度为40μg/mL, 培养基的最佳pH为7.0, 以琥珀酸钠为共代谢底物, 可以显著提高BaP降解率, 降低*cis*-BP4, 5-dihydrodiol和*cis*-BP7, 8-dihydrodiol的累积。同时提出了化学氧化与微生物协同的方法可以有效促进环境中持久有机污染物的连续降解。

关键词: 苯并(a)芘; 累积; 代谢产物; 化学氧化; 耦合; 多环芳烃

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)12-2531-05

Study on Continued Degradation of BaP and Its Metabolites

ZANG Shuyan^{1,2,3}, LI Peirjun¹, ZHOU Qixing^{1,2}, WANG Xin⁴, LIN Guifeng¹, WANG Juan³

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of Chemistry Science, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang 110142, China; 4. College of Science, Shenyang University of Technology, Shenyang 110023, China)

Abstract: Two metabolites, *cis*-BP4, 5-dihydrodiol and *cis*-BP7, 8-dihydrodiol, were identified by high-performance liquid chromatography (HPLC) during the degradation of BaP by *Bacillus*-07 (BA-07). The two metabolites were hardly further metabolized for their toxicity to microorganism. To promote degradation of BaP and decrease accumulation of *cis*-BP4, 5-dihydrodiol and *cis*-BP7, 8-dihydrodiol, two methods (degradation only by BA-07, degradation by coupling the BA-07 and KMnO_4) were compared. In addition, parameters of continued degradation of BaP and the two metabolites were optimized under the experiment conditions. The results showed that ①the method of coupling the chemical oxidation and biodegradation (BA-07 and KMnO_4) was better than only biodegradation (BA-07); ②residue rate of *cis*-BP4, 5-dihydrodiol was higher than that of *cis*-BP7, 8-dihydrodiol when the samples were determined in the same time; ③the effect of continued degradation was the best when the initial concentration of BaP was 40 μg/mL, pH value of the culture was 7.0, co-metabolic substrates was sodium succinate. Meanwhile, it was put forward that the method of coupling the chemical oxidation and biodegradation was effective on continued degradation of persistent organic contaminants in the environment.

Key words: benzo[a]pyrene; accumulation; metabolites; chemical oxidation; coupling; polycyclic aromatic hydrocarbons

苯并(a)芘(BaP)是一种具有致畸、致癌和致突变作用的多环芳烃化合物, 在环境中分布很广, 人们通过大气、水、食品、吸烟等都能摄取^[1]。它主要是石油、煤炭、木材、气体燃料和纸张等碳氢化合物的不完全燃烧以及在还原过程中热分解而产生的^[2]。20世纪80年代初, 谢重阁^[3]等的测定结果表明, 我国石油污灌的沈抚灌渠中, 渣油BaP的含量高达29~30 mg·kg⁻¹。一些多环芳烃污染区附近的土壤中, BaP的含量高达28~82 mg·kg⁻¹^[4]。虽然, 近年来国内外有关污染土壤中BaP的微生物降解有较多的文献^[5~7], 但是对BaP及其降解过程中产生的有毒代谢产物的连续降解研究却鲜见报道。过去人

们研究BaP污染土壤的修复主要着眼于提高苯并(a)芘的降解率, 很少考查其中间产物的生成与再降解的影响因素。然而, 这些未开环中间产物仍然具有1个“湾”区和1个“K”区^[8]。据报道, 这2个结构与多环芳烃的致癌性有着非常密切的关系^[9]。在降解方法上, 主要是倾向于用各种经驯化的微生物。仅靠微生物来降解这些有毒污染物, 在实际应用方面有

收稿日期: 2005-12-18; 修订日期: 2006-03-27

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418506); 国家高技术研究发展计划(863)项目(2004AA649060); 国家自然科学基金重点项目(20337010)

作者简介: 臧淑艳(1973~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为有机分析与污染生态学, E-mail: zangshuyan@126.com

* 通讯联系人

很大局限性. 据报道, 采用化学氧化与微生物协同降解具有显著的优越性^[10]. 因此运用我国特定地域筛选出的菌株, 辅助一些物理化学的处理方法, 研究 BaP 及其有毒中间产物的连续降解, 优化其降解参数, 在实际环境中, 可以更好地为指导实地污染的治理与修复提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料及药品

1.1.1 供试药品

供试药品: BaP(购自 Fluka 公司), 纯度大于 97%; *cis*-BP4, 5-dihydrodiol 和 *cis*-BP7, 8-dihydrodiol 标准品由美国国家癌症研究所(NCI)赠送, 纯度大于 98%. 琥珀酸钠、二氯甲烷和培养基中无机盐为分析纯, 甲醇和乙腈为色谱纯; 实验用微生物为该实验室从辽河油田石油污染土壤中分离而得, 并经液体培养用 BaP 驯化.

细菌培养基 I: 牛肉膏 5 g; 蛋白胨 5 g; 葡萄糖 5 g; 去离子水 1L; pH 7.2.

细菌培养基 II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g; KH_2PO_4 0.4 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g; NH_4NO_3 1 g; 葡萄糖 0.5 g; 去离子水 1L; pH 7.0~7.6.

1.1.2 主要仪器

惠普 1090- II 液相色谱仪(配有自动进样器), 二极管阵列检测器(DAD), C18 烷基硅胶反相色谱柱; 旋转蒸发仪; 酸度计; 摇床; 分析天平; 超声清洗器.

1.2 研究方法

1.2.1 液体菌种的制备

将保存于斜面的菌种接至上述细菌培养基 I, 培养 16h 后, 在无菌室中转到样品中.

1.2.2 芽孢杆菌(BA-07)降解 BaP

在 150mL 三角瓶中加入 30mL 上述细菌培养基 II(含 BaP 的浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用丙酮溶解), 在无菌条件下按 10% 的量接种芽孢杆菌(BA-07). 对照组不接菌, 表明非酶降解.

1.2.3 芽孢杆菌(BA-07)与酸性高锰酸钾耦合方法降解

采用上述培养基 II, 以 0.05% 的高锰酸钾对 BaP 进行欲处理, 48h 后接种芽孢杆菌(BA-07), 于 30 $^{\circ}\text{C}$, 160 r/min 摇床暗处培养, 分别在 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5d 取样.

1.2.4 BaP 的初始浓度的选择

采用芽孢杆菌(BA-07)与酸性高锰酸钾耦合的方法降解 BaP, 实验设为 3 组, 每组 3 个重复. 在 150mL 三角瓶中加入 30mL 细菌培养基 II, 每组 BaP 的浓度分别为 10、40、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 12d 取样, 其它操作条件同上.

1.2.5 培养基酸度的选择

设计几个实验组, 每组用 1 mol/L NaOH 调 pH 分别为 7.0、7.3、7.6. 利用上述实验结果, 选用最佳 BaP 浓度. 其它同 1.2.4.

1.2.6 共代谢底物的选择

每个实验组分别加入琥珀酸钠, 水杨酸, 邻苯二甲酸, 联苯作为共代谢底物, 按与 BaP 的浓度比 2:1 加入. 其它同 1.2.5.

1.3 样品分析

分离与提取: 定时定量取样, 用 20mL 二氯甲烷或乙酸乙酯超声萃取残留目标污染物 3 次, 合并提取液, 并定容到 25 mL 容量瓶中. 用微量移液管取 0.1mL 于 K.D. 浓缩器, 氮气吹干后, 再以甲醇定容到 1mL. 当 BaP、*cis*-BP4, 5-dihydrodiol 和 *cis*-BP7, 8-dihydrodiol 含量很低时, 将合并的提取液用旋转蒸发仪浓缩近干, 再以甲醇定容到 1mL, 移入色谱进样瓶, 用高效液相色谱测定^[11,12].

HPLC 条件: 检测波长: 254nm; 柱温 38 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈: 水(90:10); 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 20 μL .

2 结果与讨论

2.1 BaP 及其易累积代谢产物的定性与定量

利用惠普 1090- II 液相色谱仪, 在检测波长为 254nm 处, 用纯品作对照, 以保留时间做定性. 鉴定出 BaP、*cis*-BP4, 5-dihydrodiol 及 *cis*-BP7, 8-dihydrodiol(见图 1). 它们的保留时间分别为 10.361、6.835、5.468min.

细菌降解 BaP 在双加氧酶的进攻下, 一般先生成顺式二氢二醇-BaP, 然后相应的二氢二醇-BaP 之间的化学键分别断裂, 生成开环化合物, 该类化合物进一步降解就比较容易了. 通常, 不同菌种降解 BaP 的途径是各不相同的. 从上述取样时间的鉴定的结果上看, 芽孢杆菌(BA-07)降解 BaP, 双加氧酶首先进攻 C-4, -5 和 C-7, -8 位置, 生成相应的顺式二氢二醇-BaP. 然后相应碳位的二氢二醇-BaP 之间的化学键分别断裂, 生成开环化合物, 一般为萘的衍生物. BaP 第 1 个苯环打开后, 继续降解就比较容易了. 由于该类物质毒性很强, 不易降解, 容易累积, 所

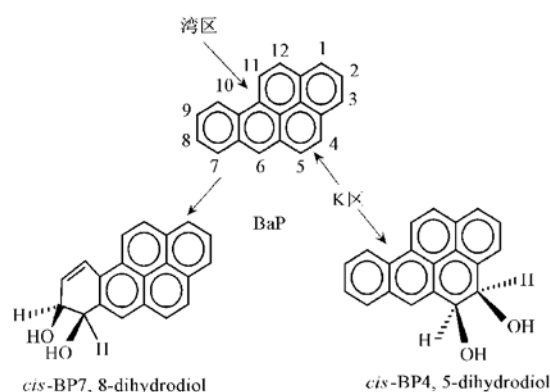


图1 芽孢杆菌(BA-07)降解 BaP 的易累积代谢产物

Fig. 1 Accumulated metabolites of BaP by *Bacillus*-07

以在降解 BaP 的过程中,有必要监测这 2 种物质的生成与再降解.

2.2 2 种降解方法对 BaP 及其代谢产物连续降解的影响

从图 2 可以看出,0~12d 内 BaP 的降解速度较快,12d 后趋于平缓; *cis*-BP4, 5-dihydrodiol 和 *cis*-BP7, 8-dihydrodiol 在 12d 内生成速度大于降解速度,结果表现为累积.在纯培养基中,6~9d 内,2 种代谢产物的累积率基本达到最高点,且 *cis*-BP4, 5-dihydrodiol 的累积率高于 *cis*-BP 7, 8-dihydrodiol.

虽然图 2(b)中 BaP 的降解率只是略高于图 2(a),但是图 2(b)中 2 个代谢产物的累积率却明显低于图 2(a).说明采用化学氧化与高效降解菌耦合的方法,对于 BaP 及其代谢产物的连续降解更有效.因此有必要进一步优化该方法对 BaP 及其易累积代谢产物的连续降解条件.

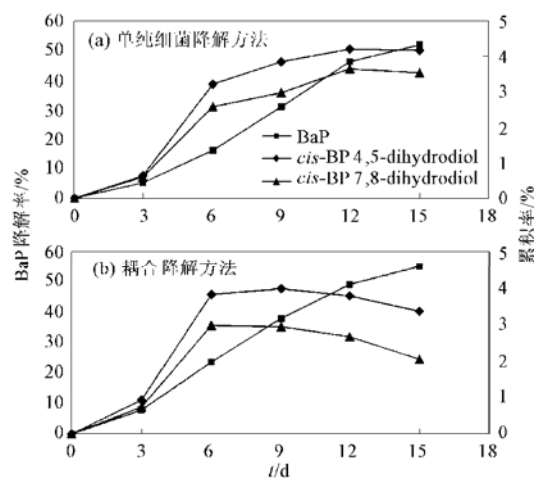


图2 在不同方法中 BaP 及其易累积代谢产物的连续降解比较

Fig. 2 Comparison of different method for continued degradation of BaP and its accumulated metabolites

2.3 BaP 初始浓度的选择

在实验条件下,当 BaP 的初始浓度过高或过低,均不利于 BaP 及其代谢产物的连续降解.当 BaP 的初始浓度过高时,BaP 及其代谢产物对微生物有很高的毒性,降解速率缓慢;当 BaP 的初始浓度过低时,不利于微生物的利用.从图 3 可以看出,在此实验条件下,BaP 的初始浓度在 40 mg/L 时,有利于 BaP 及其易累积代谢产物的连续降解.

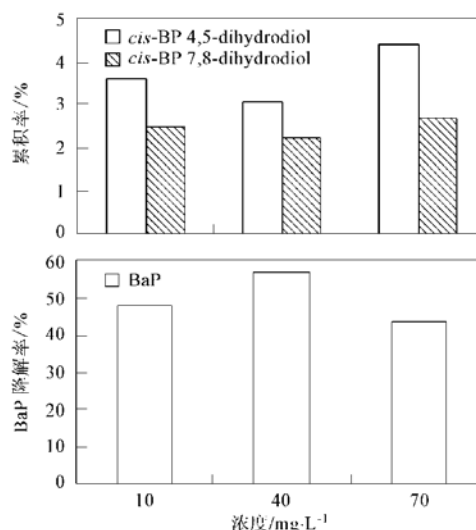


图3 BaP 初始浓度对连续降解的影响

Fig. 3 Effect of the initial concentration of BaP on continued degradation

2.4 pH 值对连续降解的影响

在酸性、中性和碱性条件下,高锰酸钾对有机物均有一定的氧化作用,尤其是酚类和醇类;但是多数细菌需要在弱碱性条件下生存.通过间接耦合,能够较好协调二者之间的关系.从图 4 可以看出,在上述实验条件下,当 pH 值在 7.0 和 7.3 时,BaP 及其易累积代谢产物的变化不大;但是 pH 值 7.6 时的连续降解效果明显次于 pH 7.0.以下降解实验培养基的初始 pH 值均采用 7.0.

2.5 共代谢底物对持续降解的影响

虽然多环芳烃的去除途径主要靠微生物降解,但 BaP 因其分子结构内苯环的高度密集,及其高的辛醇水分配系数,而具有很强的难降解性^[1].研究表明,共代谢被认为是这类难降解有机物的主要方式.许多种类的微生物能在合适的共代谢基质条件下不同程度降解 BaP^[13,14].这种代谢是指当一级基质存在时,一级基质的代谢能够提供足够的碳源和能源供微生物生长,并诱导产生相应的降解酶来降解二级基质.常见的 BaP 微生物共代谢底物是同

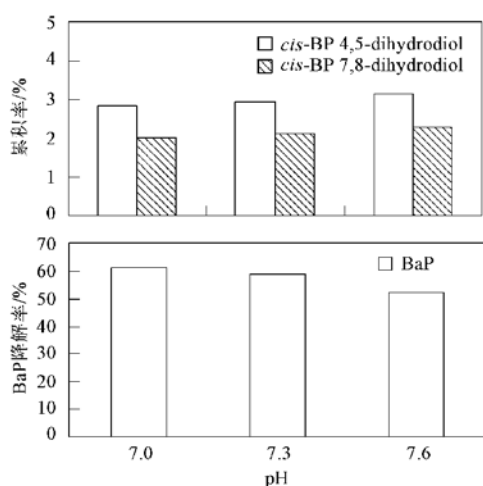


图 4 pH 值对连续降解的影响

Fig. 4 Effect of pH value on continued degradation

BaP 本身结构相似的有机物, 或者是其中间代谢产物。

依据上述文献, 本实验选用了水杨酸, 邻苯二甲酸, 琥珀酸钠, 联苯作为共代谢底物(图 5)。从降解效果上看, 这几种代谢产物对 BaP 及其产物的降解程度区别不大, 以琥珀酸钠的效果最好, 邻苯二甲酸次之, 而联苯最差。这是因为琥珀酸钠易溶于水, 在细菌培养基中易于被微生物利用, 从而诱导产生更多能降解目标污染物的酶蛋白。

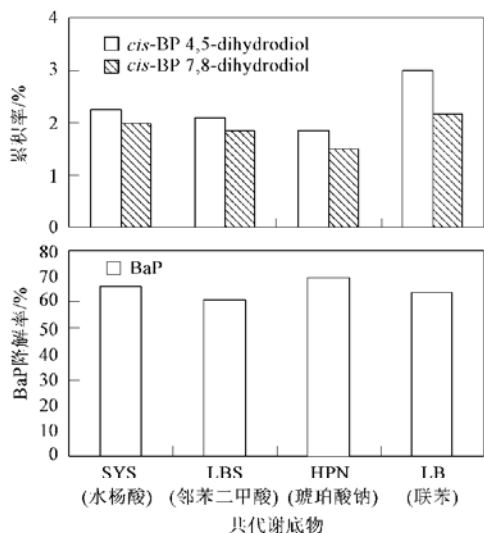


图 5 共代谢底物对持续降解的影响

Fig. 5 Effect of co-metabolic substance on continued degradation

3 讨论

实验过程中发现在相同的取样时间里, *cis*-BP4, 5-dihydrodiol 的残留率高于 *cis*-BP 7, 8-dihydrodiol。可能是因为前者的 2 个氢原子和 2 个羟

基位于该分子的“K 区”, 使该物质的毒性增强, 使微生物更难降解。

通常添加合适的共代谢底物能促进 BaP 的降解, 但是对于不同的微生物和不同的降解条件, 添加的共代谢底物的种类及其浓度是不一样的。有些共代谢底物甚至会抑制微生物对目标产物的降解^[15, 16]。因此, 用不同微生物降解 BaP 时, 共代谢底物的种类和含量的选择还需要结合其它因素, 进行全面优化。

作为化学氧化剂, KMnO_4 对酚、醇、醚等有机物有很强的氧化性; 但 KMnO_4 对微生物的生长也有一定的抑制作用。通过驯化, 很多菌在一定浓度范围内, 仍然能很好地生存。实验表明, 间接耦合的方法好于直接耦合的方法。利用 KMnO_4 与微生物耦合的方法降解某些难降解的有机物, 是一种很好的物理、化学与微生物联合作用的方法。

对微量成分的测定分析, 关键在于提取和测定方法是否灵敏。由于提取需要多个步骤, 所以需要精密的仪器和专业的人员进行严格认真地操作。当 BaP 及其代谢产物的含量极低时, 为减小测定误差, 每次用旋转蒸发仪浓缩时水温要一致; 每次用同一微量进样器定容; 保持高效液相色谱测定条件不变; 适当增加平行样的数量或者加大色谱进样量。

4 结论

(1) 细菌与高锰酸钾耦合方法对 BaP 及其易累积代谢产物连续降解的效果明显好于单纯细菌降解的方法。说明化学氧化与微生物协同的方法可以有效促进环境中持久有机污染物的连续降解。

(2) 作为细菌(芽孢杆菌 BA-07)降解 BaP 的中间代谢产物, 在同一时间取样, *cis*-BP4, 5-dihydrodiol 的残留率高于 *cis*-BP7, 8-dihydrodiol, 说明前者更易累积。

(3) 在耦合降解方法中, 当 BaP 的浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 培养基的最佳 pH 为 7.0, 以琥珀酸钠为共代谢底物, 可以显著提高 BaP 降解率, 并且降低 *cis*-BP4, 5-dihydrodiol 和 *cis*-BP7, 8-dihydrodiol 的累积。

- 参考文献:
- [1] Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, et al. Degradation of pyrene benzo [a] anthracene, and benzo [a] pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJG11-135, isolated from a former coal gasification site[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 13~19.
 - [2] Sims R C, Overcash M R. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil plant system[J]. Residue Rev., 1983, 88(3): 1~68.

- [3] 高拯民. 土壤-植物系统污染生态研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1986. 237~ 243.
- [4] 孟范平, 吴方正. 土壤中的 PAHs 污染及其生物治理技术进展[J]. 土壤学进展, 1995, **23**(1): 32~ 44.
- [5] Field J A, Jong E D, Costa G F, *et al.* Biodegradation of PAH by new isolates of white rot fungi [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**(7): 2219~ 2226.
- [6] 李培军, 许华夏, 张春桂, 等. 污染土壤中苯并(a) 芘的微生物降解[J]. 环境污染治理技术与设备, 2001, **2**(5): 37~ 40.
- [7] Charlotte K, Geilbjerg B, Ekelund F, *et al.* Effects of sludgeamendment on mineralization of pyrene and microorganisms in sludge and soil [J]. Chemosphere, 2001, **45**(6): 625~ 634.
- [8] 王连生. 有机污染物化学[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 1~ 3.
- [9] 戴树桂. 环境化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 324~ 329.
- [10] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 真菌对土壤中苯并(a) 芘的共代谢降解[J]. 环境科学研究, 2001, **14**(6): 36~ 39.
- [11] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物样品中多环芳烃(PAHs) 分析方法研究[J]. 应用生态学报, 1995, **6**(1): 92~ 96.
- [12] 汤加云, 高恩革. 工业废水中苯并(a) 芘的高效液相色谱法测定[J]. 化学研究与应用, 1998, **10**(3): 308~ 310.
- [13] Cerniglia C E, Gibson D T. Oxidation of benzo[a] pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella legans* [J]. Biol. Chem., 1979, **254**(23): 12174~ 12180.
- [14] 董春娟, 吕炳南. 处理生物难降解物质的有效方式——共代谢[J]. 化工环保, 2003, **23**(2): 82~ 85.
- [15] Mackinnon L K, Thomson N R. Laboratory-scale *in situ* chemical oxidation of a perchloroethylene pool using permanganate[J]. Journal of Contaminant Hydrology, 2002, **56**(2): 49~ 61.
- [16] Li Z. Surfactant-enhanced oxidation of trichloroethylene by permanganate proof of concept [J]. Chemosphere, 2004, **54**(3): 419~ 423.

关于反对个别作者一稿两投行为的联合声明

为保证所发表论文的首创性和学术严谨性,《环境科学》、《中国环境科学》、《环境科学学报》编辑部和《Journal of Environmental Sciences》编辑部特发表如下联合声明。

我们明确反对个别作者的一稿两投或变相一稿两投行为。自 2006 年 5 月 1 日起, 我们各刊在接受作者投稿时, 要求论文全体作者就所投稿件作出以下承诺(附在投稿上):

1) 来稿所报道的研究成果均系全体作者的原创性研究成果, 文中报道的研究成果(含图、表中数据的全部或部分) 未曾发表亦未曾投其它科技期刊。

2) 在接到所投期刊编辑部关于稿件处理结果之前, 所投稿件的全部或部分内容不再投其它科技期刊。

我们将认真对待作者所作的上述承诺, 并建立信息共享机制, 对违背上述承诺的作者(包括在文中署名的全体作者) 采取联合行动。

净化学术环境、促进学术繁荣是学术期刊作者和编者的共同责任。我们诚恳地希望广大作者能够了解我们的上述立场和做法, 并积极宣传和配合。

《环境科学》编辑部

《中国环境科学》编辑部

《环境科学学报》编辑部

《Journal of Environmental Sciences》编辑部

2005 年 12 月 1 日