

羊角月牙藻(*Selenastrum carpicornutum*) 对1,2,4-三氯苯的降解效应研究

杜青平, 林壮立, 黄斌艳, 张占生, 李彦旭, 许燕滨

(广东工业大学环境科学与工程学院, 广州 510006)

摘要:研究了羊角月牙藻对1,2,4-三氯苯(1,2,4-Trichlorobenzene, 1,2,4-TCB)的降解效应。结果显示,羊角月牙藻对初始浓度为0.5、1.0、5.0、10、20、30 mg·L⁻¹的1,2,4-TCB均有一定降解能力。1,2,4-TCB初始浓度不同,藻类的降解能力不同,其中1,2,4-TCB浓度为1.0 mg·L⁻¹时,降解率最高达到52.8%,其降解半衰期为6.62 d。当1,2,4-TCB的初始浓度为5 mg·L⁻¹以上时,羊角月牙藻早期生长受到抑制,但是当藻类度过适应期后,藻类的生长能力逐渐恢复,说明1,2,4-TCB对藻细胞的损伤属于非致死性损伤。应用气质联用仪对降解产物测定结果表明,苯环上氯取代基被其他较活泼基团所取代的反应是羊角月牙藻降解1,2,4-TCB的主要途径。

关键词:羊角月牙藻;1,2,4-三氯苯;降解

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)05-0932-05 doi:10.11654/jaes.2013.05.008

The Degradation Characteristics of 1,2,4-Trichlorobenzene by *Selenastrum carpicornutum*

DU Qing-ping, LIN Zhuang-li, HUANG Bin-yan, ZHANG Zhan-sheng, LI Yan-xu, XU Yan-bin

(Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The degradation effects and mechanism of 1,2,4-Trichlorobenzene (1,2,4-TCB) in *Selenastrum carpicornutum* were discussed in this paper. The results showed that the degradation abilities differs with initial 1,2,4-TCB concentrations. The highest degradation rate was 52.8% occurs at 1.0 mg·L⁻¹, and the half life of degradation was 6.62 d. The growth of *Selenastrum carpicornutum* was inhibited when initial concentration of 1,2,4-TCB was above 5 mg·L⁻¹, but the growth ability of *Selenastrum carpicornutum* was recovered when the alga lived through the adaptive phase. Further determination with GC-MS analysis technique showed that the major degradation pathway of 1,2,4-TCB was the replacement of chloric substituent by other active groups.

Keywords: *Selenastrum carpicornutum*; 1,2,4-TCB; degradation

1,2,4-三氯苯(1,2,4-Trichlorobenzene, 1,2,4-TCB)被广泛运用于工业,属于中度挥发性有机物,是美国环保署(EPA)优先控制污染物之一^[1],其化学性质稳定,采用物化方法较难去除,因此生物降解法成为去除1,2,4-TCB的主要手段^[2]。已有研究表明,某些特定种类的细菌对氯苯表现出较强的去除能力^[3],其中能够降解1,2,4-TCB的微生物主要有假单胞菌(*Pseudomonas* sp.P51)^[4]、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri* THSL-1)^[5]、博德特氏菌属(*Bordetella* sp.)^[6]、红球菌(*Rhodococcus* sp.MS11)^[7]以及伯克霍尔德氏菌

(*Burkholderia* sp.PS12 和 *Burkholderia* sp.PS14)^[8-9]等。藻类作为水生生态系统初级生产者,具有个体小、分布范围广、生长周期短、代谢迅速、吸附作用快、净化效率高等特点^[10],对有机物也有一定的降解能力。例如 Shivaramaiah H M 等研究了蓝绿藻和鱼腥藻对杀虫剂硫丹的降解过程,并分析了降解途径^[11]。但藻类对有机物的研究报道还较少,大多数研究集中在有机污染物对藻类的毒性研究方面。羊角月牙藻(*Selenastrum carpicornutum*)是绿藻的一种,在一定条件下对多环芳烃(PAHs)如苯并(a)芘(BaP)具有很强的降解能力^[12],罗树生等^[13]研究并分析了羊角月牙藻对芘的降解行为及降解途径。但目前有关羊角月牙藻对氯苯类化合物降解及代谢途径还未见报道。本研究以羊角月

收稿日期:2012-09-22

基金项目:国家自然科学基金(40971251,31100264)

作者简介:杜青平(1972—),女。E-mail:qpdu2008@126.com

牙藻为对象,研究了其对不同浓度1,2,4-TCB的降解能力,并对其代谢途径进行了初步分析,为今后利用藻类降解水环境中氯苯类化合物,实现生态修复提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验藻种

羊角月牙藻(*Selenastrum carpicornutum*)藻种购自中国科学院武汉水生研究所藻种库,藻种编号为FACHB-271,实验所用藻细胞处于对数增长期。

1.2 主要试剂和仪器

试剂:1,2,4-三氯苯(1,2,4-TCB)购自环境保护部标准样品研究所,用丙酮促溶,浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;丙酮和正己烷为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

仪器:GC-MS(Agilent7890/5975C);生物培养箱;紫外分光光度计;细胞破碎仪;气相色谱仪;冷冻离心机。

1.3 实验方法

1.3.1 羊角月牙藻的培养

藻种培养选用BG11培养基^[14],将藻细胞接种在250 mL锥形瓶中,放于生物培养箱中,培养昼夜温度分别为 $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度为 3990 lx ,光暗比为14 h:10 h。用血球计数板法测藻细胞个数,当藻细胞个数达到 10^6 左右时,藻种进入对数增长期。

1.3.2 羊角月牙藻降解1,2,4-TCB实验方法

取对数增长期藻种,置于250 mL的锥形瓶中培养,每瓶加入BG11培养基100 mL,初始藻种以叶绿素a含量计为 $(12.12\pm0.32)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,藻细胞适应生长1 d后,加入1,2,4-TCB贮藏液至终浓度分别为0.5、1.0、5.0、10、20、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,按培养时间0.5、1、2、3、4、5、6、7 d取样,每次取4 mL,样品设3个平行。此外,设置不加藻种和不加1,2,4-TCB的空白对照组。

1.3.3 羊角月牙藻叶绿素a含量的检测方法

按常规叶绿素a测定法测定,叶绿素a含量($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)计算公式参照戴荣继等^[15]方法计算。

叶绿素a含量= $11.64(\text{OD}_{663})-2.16(\text{OD}_{645})+0.10(\text{OD}_{630})$

1.3.4 1,2,4-TCB提取与检测方法

1.3.4.1 培养液中1,2,4-TCB提取

取1,2,4-TCB处理后的培养液4 mL,离心机转速为 $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,离心5 min,然后取上清液2 mL,用10 mL正己烷分两次萃取,合并萃取液,移至填充有1 cm Na_2SO_4 和1 g硅胶的固相萃取柱内作净化处理,用10 mL正己烷混合液进行洗脱,收集固

相萃取柱内洗脱液,用氮吹仪浓缩定容至1 mL待测。

1.3.4.2 1,2,4-TCB的检测

试验分析鉴定条件参照文献[16]。

(1)气相色谱条件

色谱柱:毛细管色谱柱HP-5MS($30\text{ m}\times0.25\text{ mm}$, $0.25\text{ }\mu\text{L}$,5%苯甲基硅氧烷)。升温程序: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持4 min,以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2 min)。载气:氮气,纯度大于99.999%,恒流控制 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;分流进样模式,分流比为10:1;进样口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

(2)质谱条件

离子源:EI,70 eV,温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$;传输线温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,四极杆温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$;扫描范围为 $m/z\ 35\sim260\text{ amu}$;检出限为 $0.004\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,回收率为96%,相对标准偏差为4.01%。

1.3.5 1,2,4-TCB降解中间产物的检测

取降解实验过程中培养液提取物,用GC-MS测定,根据产物的质荷比(m/z),利用GC-MS附加软件Agilent工作站进行分析鉴定。

1.3.6 1,2,4-TCB降解率的计算方法

$$Y_t=(C_0-C_t)/C_0$$

式中: Y_t 和 C_t 分别表示 t 时刻1,2,4-TCB降解率和培养基中残留的1,2,4-TCB浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C_0 为1,2,4-TCB的初始浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4 统计学处理

统计处理实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。根据不同样本,分别采用单因素卡方检验,并用SPSS Statistics软件进行统计学分析, $P<0.05$ 有显著统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 藻细胞对1,2,4-TCB降解动力学

不同浓度的1,2,4-TCB在藻液中的变化如图1所示。由图1a可知,当1,2,4-TCB浓度为0.5、1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,藻细胞对1,2,4-TCB降解效果较好,7 d降解率分别达到42.6%和52.8%;由图1b和图1c可知,随着加入1,2,4-TCB浓度的提高,1,2,4-TCB 7 d降解率逐渐降低,5、10、20、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的降解率分别为31.7%、22.7%、20.8%和17.08%。只添加培养基的无藻种空白组,培养液中1,2,4-TCB浓度基本上无明显变化,表明羊角月牙藻对1,2,4-TCB的降解起着直接作用。根据图1对1,2,4-TCB的降解反应进行拟合,发现羊角月牙藻对不同浓度1,2,4-TCB的降解反应能采用一级反应动力学方程描述,即

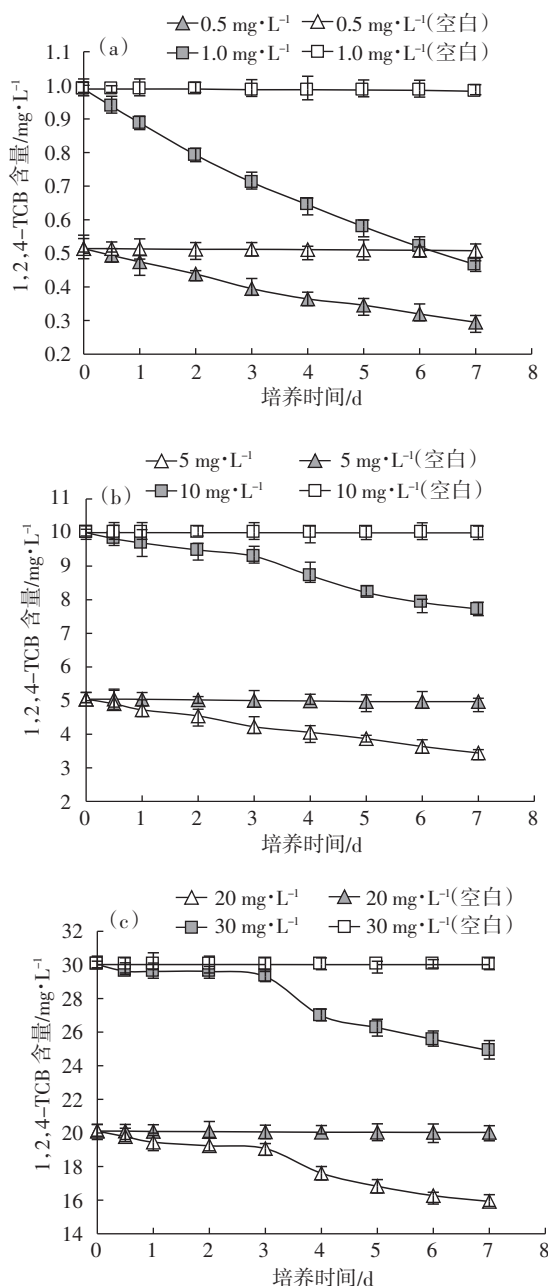


图1 羊角月牙藻对不同初始浓度1,2,4-TCB降解效应
Figure 1 Degradation level of 1,2,4-TCB in *Selenastrum carpicornutum* at different initial concentration

$$C_t = C_0 \times e^{-kt}$$

$$t_{1/2} = 1/k \times \ln 2$$

式中: C_t 为 t 时刻培养基中残留的 1,2,4-TCB 浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C_0 为 1,2,4-TCB 的初始浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; k 为降解速率常数, d^{-1} ; t 为降解时间, d ; $t_{1/2}$ 为 1,2,4-TCB 降解 50% 所需要的时间, d 。

起始浓度为 0.5、1.5、10、20、30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 拟合后的降解动力学方程式分别为 $W_t = 0.514e^{-0.793t}$ ($R^2 = 0.986$)、 $W_t = 0.989e^{-0.107t}$ ($R^2 = 0.989$)、 $W_t = 5.042e^{-0.0545t}$ ($R^2 = 0.994$)、 $W_t =$

$9.998e^{-0.0368t}$ ($R^2 = 0.980$)、 $W_t = 20.011e^{-0.0333t}$ ($R^2 = 0.962$) 和 $W_t = 30.023e^{-0.0267t}$ ($R^2 = 0.932$)。

由图 1b 和图 1c 可知, 10、20、30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 反应在前 3 d 降解量很小, 说明高浓度 1,2,4-TCB 在前 3 d 抑制了藻类的降解。

2.2 1,2,4-TCB 的降解半衰期

根据羊角月牙藻的降解动力学曲线计算藻细胞对 1,2,4-TCB 降解半衰期。由图 2 可知, 在初始浓度为 0.5、1.0、5.0、10、20、30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其降解半衰期分别为 8.74、6.62、12.7、18.83、20.8 d 和 25.9 d。随着 1,2,4-TCB 浓度的增高, 藻细胞对 1,2,4-TCB 的降解半衰期延长。

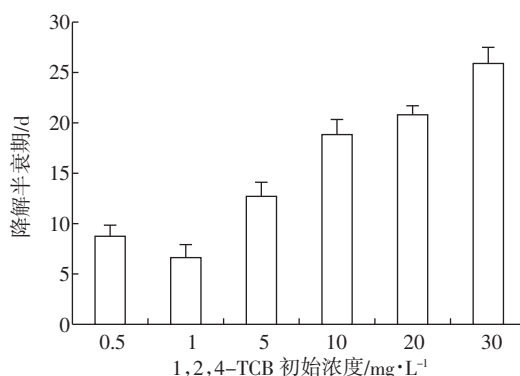


图2 藻液中 1,2,4-TCB 的降解半衰期

Figure 2 Half life of 1,2,4-TCB degradation in *Selenastrum carpicornutum*

2.3 降解过程中羊角月牙藻细胞叶绿素 a 含量的变化

羊角月牙藻的生长与 1,2,4-TCB 降解具有密切联系, 叶绿素 a 是绿藻生长变化的一个重要指标。实验测定了 1,2,4-TCB 降解过程中羊角月牙藻叶绿素 a 的变化。由图 3 可知, 初始浓度为 0.5、1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1,2,4-TCB 均未对羊角月牙藻的正常生长产生抑制作用, 而当 1,2,4-TCB 的初始浓度提高到 10、20、30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 藻细胞叶绿素 a 在 5 d 内明显低于对照, 说明 1,2,4-TCB 对羊角月牙藻生长产生抑制, 这与图 1b 和 1c 结果对应。但当藻类在 1,2,4-TCB 培养液中度过适应期后, 藻类生长能力恢复, 藻细胞正常生长。这表明 1,2,4-TCB 对藻细胞的损伤属于非致死性损伤, 且羊角月牙藻对 1,2,4-TCB 的毒性有一定的耐受性。

2.4 藻细胞降解 1,2,4-TCB 机理的初步分析

取羊角月牙藻降解过程中培养液提取物, 用气质联用仪分析。在取样检测的 7 d 内, Agilent 质谱工作站的分析结果显示, 从 1,2,4-TCB 处理的 3 d 开始,

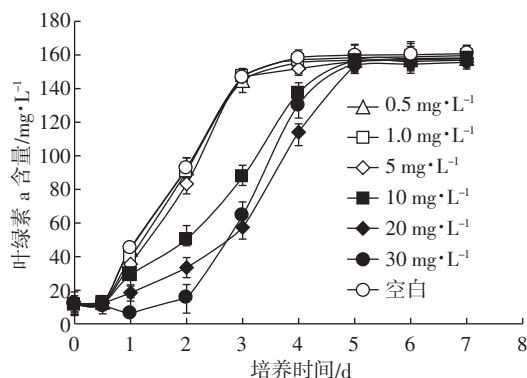


图3 羊角月牙藻降解1,2,4-TCB过程叶绿素a变化规律

Figure 3 Change of chlorophyll a concentration during 1,2,4-TCB degradation by *Selenastrum carpicornutum*

羊角月牙藻细胞内逐步检测到6-硝基-8-甲氧基-苯并呋喃和苯酚(图4a和4b)等中间产物,这与Can WANG等^[17-18]测定结果相似,而不加藻种和不加1,2,4-TCB处理的空白对照组均未检测到相应的中间产物。通过对产物分析表明,1,2,4-TCB降解过程

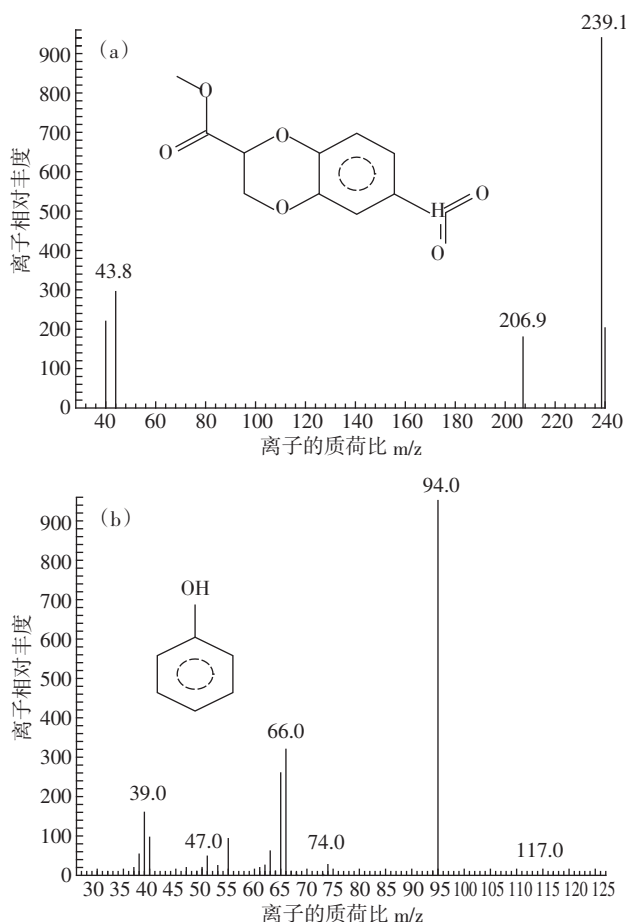


图4 羊角月牙藻降解1,2,4-TCB过程主要代谢产物质谱图

Figure 4 Mass spectra of the 1,2,4-TCB metabolites produced by *Selenastrum carpicornutum*

中,其苯环上氯取代基被其他较活泼的基团所取代,降解反应并未使苯环断裂。这与大多数细菌对1,2,4-TCB的降解采用先脱氯后开环^[19]或先开环后脱氯途径^[20-22]机理不同,因而其降解机理与降解途径还需进一步研究。

3 结论

(1)羊角月牙藻对不同初始浓度1,2,4-TCB均有一定生物降解能力,降解反应符合一级动力学方程。当1,2,4-TCB初始浓度为1 mg·L⁻¹时,7 d降解率最高达52.8%,降解半衰期最短为6.62 d,是1,2,4-TCB最适降解浓度。

(2)当1,2,4-TCB初始浓度提高到5 mg·L⁻¹以上时,对羊角月牙藻生长产生抑制作用。

(3)1,2,4-TCB降解过程中,由于其苯环上氯取代基被其他较活泼的基团所取代,降解反应并未使苯环断裂。

参考文献:

- [1] Cuex N, Peitsch, M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb viewer: An environment for comparative protein modeling[J]. *Electrophoresis*, 1997, 18:2714-2723.
- [2] 姜 健, 王 慧, 高静思, 等. 1, 2, 4-三氯苯双加氧酶和脱氢酶基因克隆与序列分析[J]. *环境科学*, 2008, 29(6): 1655-1659.
JIANG Jian, WANG Hui, GAO Jing-si, et al. Cloning and sequence analysis of 1, 2, 4-trichlorobenzene dioxygenase and dehydrogenase genes[J]. *Environment Science*, 2008, 29(6): 1655-1659.
- [3] 王 灿, 席劲璞, 胡洪营, 等. 白腐真菌生物过滤塔处理氯苯气体的研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(2): 500-505.
WANG Can, XI Jin-ying, HU Hong-ying, et al. White rot fungi biofilter treating waste gas containing chlorobenzene[J]. *Environment Science*, 2008, 29(2): 500-505.
- [4] Jan Roelof van der Meer, Wim Roelofsen, Gosse Schraa, et al. Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1, 2, 4-trichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. strain P51 in nonsterile soil columns[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1987, 45(6): 333-341.
- [5] 宋 蕾, 王 慧, 施汉昌, 等. 1, 2, 4-三氯苯降解菌的分离及其降解质粒的研究[J]. *中国环境科学*, 2005, 25(4): 385-388.
SONG Lei, WANG Hui, SHI Han-chang, et al. Studies on isolation of 1, 2, 4-trichlorobenzene degrading strain and its degradative plasmid[J]. *China Environment Science*, 2005, 25(4): 385-388.
- [6] 王 芳, Dörfler U, Schmid M, 等. 1, 2, 4-三氯苯矿化菌的鉴定与功能分析[J]. *环境科学*, 2007, 28(5): 1082-1087.
WANG Fang, Dörfler U, Schmid M, et al. Identification of 1, 2, 4-trichlorobenzene-mineralizing bacteria and their function analysis[J]. *Environment Science*, 2007, 28(5): 1082-1087.
- [7] Rapp P, Timmis K N. Degradation of chlorobenzenes at nanomolar con-

- centrations by *Burkholderia* sp. strain PS14 in liquid cultures and in soil [J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65:2547-2552.
- [8] Rapp P, Gabriel-Jurgens L H E. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes and production of biosurfactants by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase[J]. *Microbiology*, 2003, 149:2879-2890.
- [9] Sander P, Wittich R M, Fortnagel P, et al. Degradation of 1, 2, 4-trichlorobenzene and 1, 2, 4, 5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains[J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 57:1430-1440.
- [10] 陆开形, 唐建军, 蒋德安. 藻类富集重金属的特点及其应用展望[J]. *应用生态学报*, 2006, 17(1):118-122.
- LU Kai-xing, TANG Jian-jun, JIANG De-an. Characteristics of heavy metals enrichment in algae and its application prospect[J]. *Chinese Journal Applied Ecology*, 2006, 17(1):118-122.
- [11] Shivaramaiah H M, Sanchez-Bayo F, Al-Rifai J, et al. The fate of endosulfan in water[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2005, 40(5):711-720.
- [12] Warshawsky D, Cody T, Radike M, et al. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light[J]. *Chemical and Biological Interactions*, 1995, 97:131-148.
- [13] 罗树生. 植物激素与羊角月牙藻-分枝杆菌联合降解芘的关系研究[D]. 广州:中山大学, 2010.
- LUO Shu-sheng. Relation between phytohormones and biodegradation of pyrene by *Selenastrum capricornutum* *Mycobacterium* sp. consortia [D]. Guangzhou: SUN Yat-sen University, 2010.
- [14] R Abdel-Basset, T Friedl K, I Mohr N, et al. High growth rate, photosynthesis rate and increased hydrogen(ases) in manganese deprived cells of a newly isolated *Nostol*-like cyanobacterium(SAG 2306)[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36(19):12200-12210.
- [15] 戴荣继, 黄春, 佟斌, 等. 藻类叶绿素及其降解产物的测定方法[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2004, 13(1):75-80.
- DAI Rong-ji, HUANG Chun, TONG Bin, et al. Determination of glgal chlorophylls and their degradation products[J]. *Journal of the CUN (Natural Sciences Edition)*, 2004, 13(1):75-80.
- [16] 李雪芳, 吴文俊, 刘文军, 等. 吹扫捕集-气相色谱-质谱联用法测定水中氯苯类有机物[J]. *化学分析计量*, 2010(3):22-24.
- LI Xue-fang, WU Wen-jun, LIU Wen-jun, et al. Determination of chlorobenzene in water by GC-MS with purge and trap[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2010(3):22-24.
- [17] WANG Can, XI Jin-ying, HU Hong-ying, et al. Biodegradation of gaseous chlorobenzene by white-rot fungus *phanerochaete chrysosporium*[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2008, 21(6):474-478.
- [18] WANG Can, XI Jin-ying, HU Hong-ying, et al. Chemical identification and acute biotoxicity assessment of gaseous chlorobenzene photodegradation products[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(8):1167-1171.
- [19] Marinucei A C, Bartha R. Biodegradation of 1, 2, 3-trichlorobenzene and 1, 2, 4-trichlorobenzene in soil and in liquid enrichment culture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(5):811-817.
- [20] Van der Meer J R, van Neerven A R W, De Vries E J, et al. Cloning and characterization of plasmid-encoded genes for the degradation of 1, 2-dichloro-1, 4-dichloro and 1, 2, 4-trichlorobenzene of *Pseudomonas* sp. strain P51[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(1):6-15.
- [21] Van der Meer J R, Eggen R I L, Zehnder A J B, et al. Sequence analysis of the *Pseudomonas* sp. strain P51 tcb gene cluster which encodes metabolism of chlorinated catechols evidence for specialization of catechol 1, 2-dioxygenases for chlorinated substrates[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(5):2425-2434.
- [22] Van der Meer J R, Frijters A C J, Levean J H J, et al. Characterization of the *Pseudomonas* sp. strain P51 gene tcbR, a *lysR*-type transcriptional activator of the *tbcDEF* chlorocatechol oxidative operon and analysis of the regulatory region[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(12):3700-3708.