



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202305098 中图分类号 X172 文献标识码 A

李洁, 张新雨, 李晓红, 等. 好氧微生物降解林丹过程中碳-氯二维稳定同位素的分馏特性[J]. 环境工程学报, 2023, 17(7): 2361-2368. [LI Jie, ZHANG Xinyu, LI Xiaohong, et al. Fractionation characteristics of two-dimensional stable isotopes of carbon-chlorine in the process of Lindane degradation by aerobic microorganisms[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(7): 2361-2368.]

## 好氧微生物降解林丹过程中碳-氯二维稳定同位素的分馏特性

李洁<sup>1</sup>, 张新雨<sup>2</sup>, 李晓红<sup>2</sup>, 蒋中伟<sup>3</sup>, 刘峰<sup>4,✉</sup>, 单永平<sup>4</sup>, 刘亚青<sup>2</sup>

1. 南宁职业技术学院, 南宁 530000; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 南宁 530004; 3. 广西现代物流集团有限公司, 南宁 530299; 4. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

**摘要** 六氯环己烷 (HCH) 是一种持久性污染物, 环境存量较大时会造成污染, 定量研究其在环境中的迁移转化过程具有重要意义。研究了 3 种好氧微生物 *Sphingobium quisquiliarum* P25、*Sphingobium ummariense* RL-3 和 *Sphingobium* sp. F2 降解  $\gamma$ -HCH (林丹) 的过程, 应用单体稳定同位素分析技术 (CSIA) 探究了不同微生物对 HCH 的降解效果, 及其对 HCH 转化与迁移行为的影响。结果表明: 1) 3 种微生物降解  $\gamma$ -HCH 的过程符合一级反应动力学原理; 2) 降解过程中碳分馏系数 ( $\epsilon_C$ ) 分别为  $- (4.3 \pm 0.4) \%$ ,  $- (1.6 \pm 0.1) \%$  和  $- (5.7 \pm 0.5) \%$ , 氯同位素分馏系数 ( $\epsilon_{Cl}$ ) 分别为  $- (1.1 \pm 0.6) \%$ ,  $- (1.5 \pm 0.2) \%$  和  $- (1.5 \pm 0.4) \%$ ; 3) 二维同位素分馏系数 ( $A_{C-Cl}$ ) 分别为  $(3.0 \pm 0.3)$ ,  $(1.1 \pm 0.1)$  和  $(2.7 \pm 0.2)$ 。本研究结果可为应用单体稳定同位素分析技术解析复杂环境中 HCH 的迁移转化过程并评估 HCH 污染场地修复效果提供参考。

**关键词** 同位素分馏; 好氧微生物; 六氯环己烷 (六六六); 单体稳定同位素分析技术 (CSIA)

六六六, 学名六氯环己烷 (Hexachlorocyclohexane, HCH), 是典型有机氯农药, 在我国的产量占全世界生产总量的 33%<sup>[1-2]</sup>。HCH 作为持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs) 可通过多种环境介质传播, 危害人类健康。目前, 我国存在环境中 HCH 残留量过高的问题, 特别是曾经作为农药大量使用的林丹 ( $\gamma$ -HCH), 在农田、湖泊等环境中存在残留<sup>[3-5]</sup>。因此, 亟需探索 HCH 在环境中的迁移转化过程的有效解析方法, 以制定污染防治策略。

林丹在环境介质中的浓度可能受到吸附、挥发等物理过程的影响, 单一的检测数据易造成污染物减少的假象, 并不能准确地反映其在环境中的迁移转化过程<sup>[6-8]</sup>。单体稳定同位素分析技术 (compound-specific isotope analysis, CSIA) 能避免因产物浓度变化和复杂实地环境产生的干扰, 弥补传统测试方法的不足, 近年来在环境领域的应用中发展较快<sup>[9-10]</sup>。在有机物降解过程中, 一般含轻同位素  $^{12}C$  化学键的断键速度快于含重同位素  $^{13}C$  的化学键, 从而导致底物中  $^{13}C$  的富集<sup>[11]</sup>。重同位素的丰度与轻同位素的丰度值之比为同位素比值。CSIA 技术可通过测定并对照反应前后污染物中某元素的同位素比值变化来追踪污染物的来源并解析其在环境中的迁移转化过程<sup>[12]</sup>, 为解析有机

收稿日期: 2023-05-24; 录用日期: 2023-06-20

基金项目: 广西自然科学基金资助 (任务书编号: 2021GXNSFBFA196092); 广西科技基地和人才专项资助 (任务书编号: AD22080067); 国家自然科学基金资助项目 (52270144); 中国博士后科学基金资助项目 (2022M713300)

第一作者: 李洁 (1983—) 女, 硕士, 讲师, 工程师, 269513125@qq.com; ✉通信作者: 刘峰 (1985—), 男, 博士, 助理研究员, fengliu@rcees.ac.cn

污染物在环境中的迁移转化过程提供了新思路<sup>[9,13]</sup>。

好氧微生物降解是 HCH 在环境中转化的重要途径。目前,有多达 30 多种好氧微生物被证实具有降解 HCH 的能力<sup>[14]</sup>。然而,这类微生物在降解 HCH 过程中的同位素分馏特性不明,极大限制了应用稳定同位素技术解析 HCH 在环境中的迁移转化行为。BASHIR 等<sup>[15]</sup>利用碳同位素分馏特性表征了 *Sphingobium indicum* strain B90A 和 *Sphingobium japonicum* strain UT26 对  $\alpha$ -HCH 和  $\gamma$ -HCH 的降解过程,并计算了同位素富集系数  $\epsilon$  值。这两种微生物降解  $\alpha$ -HCH 过程中的  $\epsilon$  值分别为  $-(1.0\pm 0.2)\%$  和  $-(1.6\pm 0.3)\%$ , 降解  $\gamma$ -HCH 过程中的  $\epsilon$  值分别为  $-(1.5\pm 0.1)\%$  和  $-(1.7\pm 0.2)\%$ 。

基于已经报道的  $\epsilon$  值,用式 (1) 计算了地下水中 HCH 的降解程度 (B%), 与实测结果进行对照,发现部分采样点的计算结果与实际测试值并不相符<sup>[10,16]</sup>。

$$B\% = \left[ 1 - \left( \frac{\delta_t + 1}{\delta_0 + 1} \right)^{1/\epsilon} \right] \times 100 \quad (1)$$

式 (1) 表明, 污染物降解程度评估的准确性取决于  $\epsilon$  值, 然而, 已见报道的  $\epsilon$  值还很有限, 限制了技术在解析环境中林丹降解程度以及污染场地修复效果评估中的应用。此外, 实际环境中林丹的降解可能由多个微生物共同参与完成, 而同一污染场地中不同微生物降解林丹过程中的同位素分馏特性是否相同亦为制约 CSIA 技术应用的关键, 故尚需开展进一步研究。

以 3 种从同一污染场地分离纯化获取的好氧微生物 *S. quisquiliarum* P25、*S. ummariense* RL-3 和 *Sphingobium* sp. F2 为研究对象<sup>[17-19]</sup>, 对比分析其降解林丹过程中的降解动力学特性、单体稳定同位素分馏效应、二维稳定同位素分馏及表观动力学同位素特性。拟揭示不同好氧微生物在降解 HCH 过程中的同位素分馏特性, 并基于二维同位素分析, 解析不同微生物降解林丹过程中同位素分馏特性的差异。以期为建立模型解析实际环境中 HCH 的迁移转化过程提供重要参考值, 为应用 CSIA 评估林丹污染场地修复效果的实际应用提供数据基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用林丹 ( $\gamma$ -HCH, 分析纯)、六氯苯 (HCB, 分析纯)、正己烷 (分析纯), 均由 Sigma-Aldrich 公司提供。

### 1.2 实验方法

1) 降解实验: 将 *S. quisquiliarum* P25、*S. ummariense* RL-3 和 *Sphingobium* sp. F2 在 LB 培养基中进行预培养。当  $A_{600}$  达到 0.5~0.6 时, 取 100  $\mu$ L 菌液 (基于前期预实验结果确定) 到 50 mL 无机盐培养基中 (120 mL 血清瓶), 每瓶添加 5.5  $\mu$ L  $\gamma$ -HCH 储备液 (0.1 mol·L<sup>-1</sup>) 并添加葡萄糖作为碳源, 开展序批实验。每组实验设置 15 个平行培养体系, 其中包括 2 个非生物对照组, 在微生物最适温度 30  $^{\circ}$ C 下进行恒温培养。在达到不同降解程度时 (基于前期预实验结果确定) 分别向培养瓶中添加 1 mL 硫酸和硫酸钠混合饱和溶液 (pH=2) 以终止反应。将终止反应后的培养瓶置于 4  $^{\circ}$ C 的冰箱内冷藏保存, 至实验结束后统一萃取 HCH。

2) 萃取实验: 以正己烷为萃取液, HCB 为内标, 通过液液萃取提取 HCH。内标浓度约为 HCH 初始浓度的一半 (2.5  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)。具体方法详见文献 [8]。

### 1.3 测试方法

1) 浓度测试: HCH 的浓度采用气相色谱 (GC, 安捷伦 6890) 连接火焰离子化检测器 (FID, 安捷伦 7820A, 美国) 由安捷伦 HP-5 毛细管柱 (30 m $\times$ 0.32 mm ID $\times$ 0.25  $\mu$ m FD) 测定, 载气流速为 2.0 mL·min<sup>-1</sup>。升温程序设置为初始温度 35  $^{\circ}$ C 保持 5 min, 然后以 8  $^{\circ}$ C·min<sup>-1</sup> 的升温速率升至 180  $^{\circ}$ C, 接着以 2  $^{\circ}$ C·min<sup>-1</sup> 的速度升高至 195  $^{\circ}$ C, 最后以 8  $^{\circ}$ C·min<sup>-1</sup> 的速度升高至 220  $^{\circ}$ C 并保持 2 min<sup>[8]</sup>。

在建立计算曲线的基础上计算 HCH 浓度。

2) 稳定同位素测试: 碳稳定同位素值 ( $\delta_t^{13}\text{C}$ ) 采用 GC (安捷伦 6890) 连接同位素质谱仪 (IRMS, 赛默飞 MAT253) 测定, 色谱柱为 ZB1 (60 m×0.32 mm×1  $\mu\text{m}$ , Phenomenex), 载气流速为 2.0 mL·min<sup>-1</sup>。升温程序设置为 40 °C 的初始温度保持 5 min, 然后以 6 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升高至 200 °C, 再以 3 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升温至 260 °C, 最后以 20 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升高至 300 °C 并保持 5 min<sup>[7]</sup>。氯稳定同位素值 ( $\delta_t^{37}\text{Cl}$ ) 采用 GC 耦合多集电极电感耦合等离子体质谱仪 (GC-MC-ICPMS) 测定, GC (安捷伦 6890) 所用色谱柱及参数设置与碳同位素设置一致<sup>[20-22]</sup>。

#### 1.4 数据分析方法

1) 酶促反应动力学。用 Michaelis-Menten 动力学方程<sup>[23]</sup> 来表征酶促反应, 计算式如式 (2)。

$$v = k_{\text{cat}} \times [E]_0 \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

式中:  $v$  为反应速率, mol·L<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>;  $k_{\text{cat}}$  为催化常数, s<sup>-1</sup>;  $K_M$  为米氏常数;  $[E]_0$  为酶的初始浓度。

2) 同位素分馏的定量分析。 $\gamma$ -HCH 降解过程中的碳同位素值变化的快慢可以通过碳同位素分馏系数 ( $\varepsilon_C$ ) 来定量,  $\varepsilon_C$  利用瑞利方程计算, 如式 (3) 所示。

$$\ln\left(\frac{\delta^{13}\text{C}_t + 1}{\delta^{13}\text{C}_0 + 1}\right) = \varepsilon_C \times \ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) \quad (3)$$

式中:  $\varepsilon_C$  基于  $\ln(C_t/C_0)$  vs  $\ln[(\delta^{13}\text{C}_t+1)/(\delta^{13}\text{C}_0+1)]$  的斜率获得; 其误差范围在线性回归 95% 的置信区间。

3) 二维同位素定量分析。通过同位素分馏实验获取的  $\delta^{13}\text{C}$  和  $\delta^{37}\text{Cl}$ , 计算二维同位素分馏系数 ( $A$ ) 来表征 C—Cl 的断键机理, 表观动力学同位素分馏常数 (apparent kinetic isotope effect, AKIE), 计算如式 (4)。

$$A_{\text{C-Cl}} = (\delta^{13}\text{C}_t - \delta^{13}\text{C}_0) / (\delta^{37}\text{Cl}_t - \delta^{37}\text{Cl}_0) \quad (4)$$

表观动力学同位素分馏常数 (AKIE) 可在考虑物质结构的基础上表征不同物质降解过程中同位素变化的速度, 从而实现不同物质在相同降解作用下的对比分析。AKIE 根据式 (5) 计算<sup>[24]</sup>。

$$\text{AKIE}_C = \frac{1}{1 + \frac{nz}{x} \times \varepsilon_C / 1000} \quad (5)$$

式中:  $n$  为底物分子中所有碳原子数量;  $x$  为反应点位上的碳原子数量;  $z$  为不可区分的反应点位数量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 降解动力学分析

微生物降解反应的核心是酶促反应, 这些酶均由跟 HCH 降解酶相关的基因 (*lin* 基因) 表达而来, 如 *LinA*、*LinB*、*LinC* 等<sup>[25]</sup>。当底物浓度远远小于 Michaelis 常数, 即  $[S] \ll K_M$  时, Michaelis-Menten 动力学方程可以简化为式 (6)。

$$v = -k \times [S] \quad (6)$$

式中:  $k = \frac{k_{\text{cat}} \times [E]_0}{K_M}$  为一级反应动力学常数, 由动力学模型计算得出。

因此, 当  $[S] \ll K_M$  时, 酶促反应符合一级反应动力学模型。前期实验证实, 当 HCH 浓度低于 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 满足  $[S] \ll K_M$  的条件, 且  $\gamma$ -HCH 降解酶的反应符合一级反应动力学模型<sup>[26]</sup>。在本研究中,  $\gamma$ -HCH 初始浓度为 5.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 低于实验中初始浓度的 1/4, 故本研究实验条件满足  $[S] \ll K_M$ , 则所涉及的酶促反应符合一级反应动力学模型。

## 2.2 降解速率分析

如图1所示, *Sphingobium* sp. F2, *S. ummariense* RL-3 和 *S. quisquiliarum* P25 均可降解  $\gamma$ -HCH。空白对照组  $\gamma$ -HCH 浓度稳定, 可排除非生物降解对污染物浓度的影响。在对 HCH 持续降解 25 h 后, *Sphingobium* sp. F2 组中  $\gamma$ -HCH 从  $5.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  降至  $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 降解率达到 86%, 降解速率为  $0.08 \text{ h}^{-1}$ ; *S. ummariense* RL-3 组在培养 10 h 后, 降解率达到 97%, 降解速率为  $0.36 \text{ h}^{-1}$ ; 而 *S. quisquiliarum* P25 组 5 h 内降解率达到 94%, 降解速率为  $0.52 \text{ h}^{-1}$ 。在相同培养条件下 3 种微生物降解  $\gamma$ -HCH 速率差异较大, 原因是微生物降解 HCH 的关键酶是水解脱氢酶的变体<sup>[17-19]</sup>, 3 种微生物的不同的水解脱氢酶对  $\gamma$ -HCH 的降解速率有较大影响。BASHIR 等<sup>[15]</sup>也报道过 *Sphingobium indicum* strain B90A 和 *Sphingobium japonicum* strain UT26 在同等条件下降解  $\gamma$ -HCH 的降解速率不同。

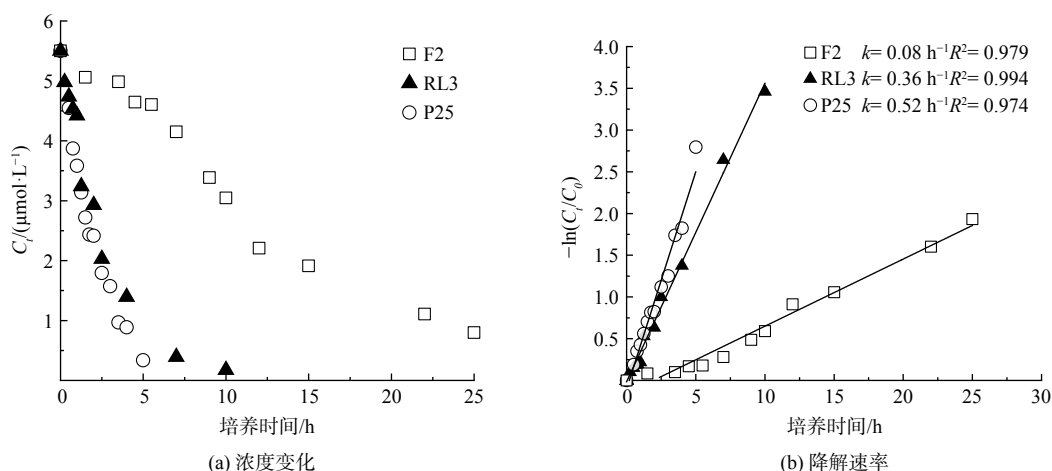


图1 3种菌对 $\gamma$ -HCH的降解情况

Fig. 1 Degradation of  $\gamma$ -HCH by three species of bacteria

## 2.3 稳定同位素分馏效应分析

如图2(a)所示, 3组实验  $\gamma$ -HCH 降解过程中均发生了明显的碳稳定同位素分馏现象。其中, 在 *Sphingobium* sp. F2 的降解过程中, 当  $\gamma$ -HCH 降解率达到 86% 时,  $\delta^{13}\text{C}$  由  $-(27.2\pm 0.2)\text{‰}$  富集为  $-(16.5\pm 0.3)\text{‰}$ ; 在 *S. ummariense* RL-3 的降解过程中, 当  $\gamma$ -HCH 降解率达到 97% 时,  $\delta^{13}\text{C}$  由  $-(27.2\pm 0.2)\text{‰}$  富集为  $-(21.7\pm 0.4)\text{‰}$ ; 当 *S. quisquiliarum* P25 降解  $\gamma$ -HCH 达到 94% 时,  $\delta^{13}\text{C}$  由  $-(27.2\pm 0.2)\text{‰}$

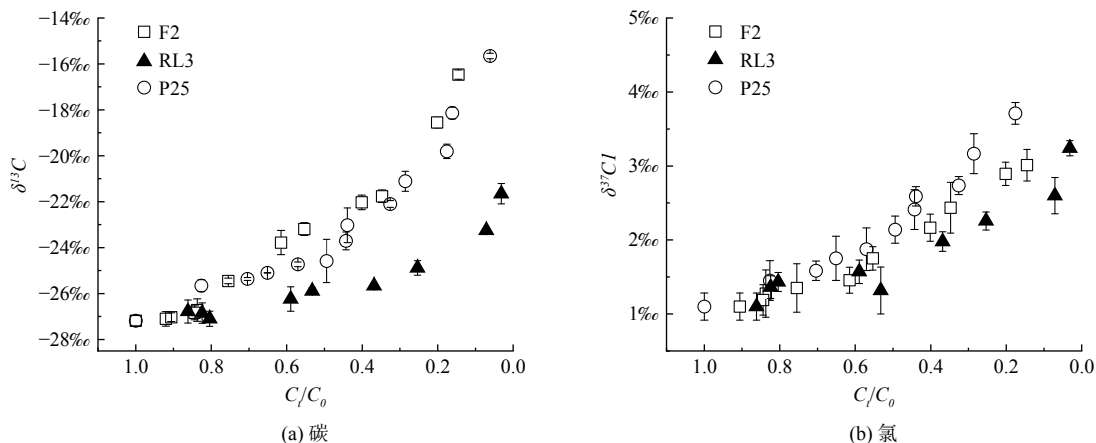


图2  $\gamma$ -HCH 降解过程中的稳定同位素分馏

Fig. 2 Stable isotope fractionation during  $\gamma$ -HCH degradation

富集为 $-(15.7\pm 0.3)\text{‰}$ 。3组降解实验中 $\delta^{13}\text{C}$ 的富集差值( $\Delta\delta^{13}\text{C}=\delta^{13}\text{C}_t-\delta^{13}\text{C}_0$ )分别达到了 $(10.7\pm 0.49)\text{‰}$ ( $\gamma\text{-HCH}$ 降解速率为 $0.08\text{ h}^{-1}$ ,降解率为86%)、 $(5.5\pm 3.24)\text{‰}$ ( $\gamma\text{-HCH}$ 降解速率为 $0.36\text{ h}^{-1}$ ,降解率为97%)、 $(11.5\pm 0.73)\text{‰}$ ( $\gamma\text{-HCH}$ 降解速率为 $0.52\text{ h}^{-1}$ ,降解率为94%)。对于同一物质的同一降解反应,降解率越高,同位素富集效应越明显。值得注意的是,*Sphingobium* sp. F2的降解率只有86%,而 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 值却明显比降解率更高(97%)的*S. ummariense* RL-3的更大。这表明*Sphingobium* sp. F2和*S. ummariense* RL-3降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程中有明显不同的同位素分馏特性。同时,*S. ummariense* RL-3和*S. quisquiliarum* P25降解率相近,但 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 值差别同样较为明显。因此,根据降解率和碳稳定同位素分馏效应分析,这3种菌降解 $\gamma\text{-HCH}$ 的过程存在明显差异。这一结果与BASHIR等<sup>[15]</sup>研究*Sphingobium indicum* strain B90A和*Sphingobium japonicum* strain UT26降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程所产生的同位素分馏效应的结果类似。

如图2(b)所示,3种微生物在降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程中,氯稳定同位素分馏也较为明显。在*Sphingobium* sp. F2降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程中,当降解率为65%时,底物中 $\gamma\text{-HCH}$ 的 $\delta^{37}\text{Cl}$ 值为 $(3\pm 0.2)\text{‰}$ ;在*S. ummariense* RL-3的降解过程中,当降解率达到75%时,底物中 $\gamma\text{-HCH}$ 的 $\delta^{37}\text{Cl}$ 值为 $(3.2\pm 0.1)\text{‰}$ ;在*S. quisquiliarum* P25的降解 $\gamma\text{-HCH}$ 达到82%时, $\gamma\text{-HCH}$ 的 $\delta^{37}\text{Cl}$ 值为 $(3.7\pm 0.1)\text{‰}$ 。氯元素的稳定同位素分馏相对于碳稳定同位素分馏较小,故3种微生物在降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程中氯稳定同位素分馏的差异也较小。

#### 2.4 同位素富集过程的定量分析

为消除降解率不同的干扰,进行了基于瑞利方程的同位素富集过程的定量分析。如图3(a)所示,*Sphingobium* sp. F2,*S. ummariense* RL-3和*S. quisquiliarum* P25在降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程中的 $\epsilon_c$ 分别为 $-(5.7\pm 0.5)\text{‰}$ 、 $-(1.6\pm 0.1)\text{‰}$ 和 $-(4.3\pm 0.4)\text{‰}$ 。协方差分析结果显示,这3组 $\epsilon_c$ 值具有显著性差异( $p<0.005$ ),且任意两组 $\epsilon_c$ 值之间同样具有显著性差异。与 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 值的排序对比可知, $\epsilon_c$ 值的计算有效的排除了降解率的干扰,更准确的反应了 $\gamma\text{-HCH}$ 降解过程中的同位素分馏特性。基于同位素分馏形成的机制,由于遮蔽效应的存在,过高的降解速率可能会降低同位素富集效果<sup>[7]</sup>。在本实验中,*S. ummariense* RL-3降解 $\gamma\text{-HCH}$ 的速率( $0.36\text{ h}^{-1}$ )比*S. quisquiliarum* P25的降解速率( $0.52\text{ h}^{-1}$ )低,但后者的 $\epsilon_c$ 值明显高于前者,故同位素遮蔽效应不是导致同位素分馏系数差异的原因。导致 $\epsilon_c$ 不同的原因是不同微生物酶降解 $\gamma\text{-HCH}$ 时的同位素分馏特性不同。这与BASHIR等<sup>[15]</sup>对*Sphingobium indicum* strain B90A和*Sphingobium japonicum* strain UT26在相同培养条件下降解 $\gamma\text{-HCH}$ 过程中的同位素分馏系数类似的结果存在一定差异。此外,与报道的土壤实验结果对比发现,在土壤环境中*S.*

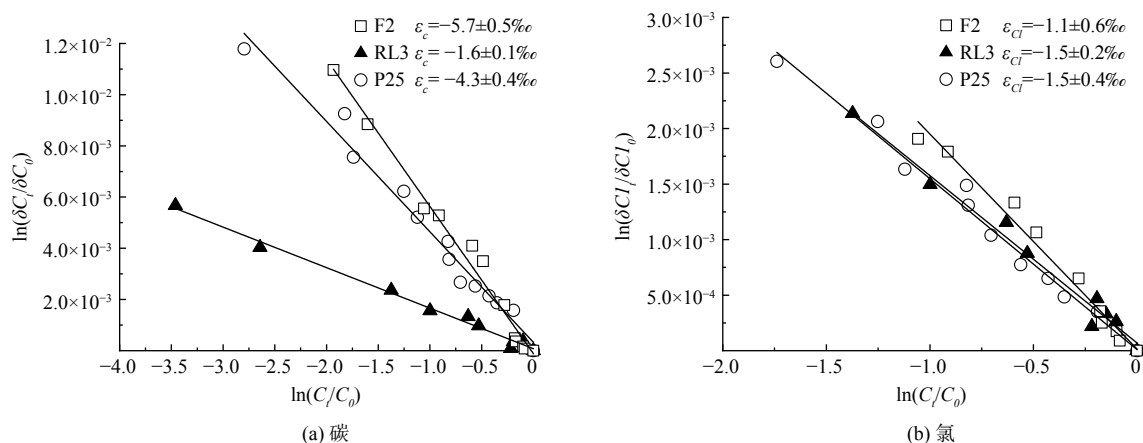


图 3 基于瑞利方程的碳和氯同位素分馏特性分析

Fig. 3 Analysis of carbon and chlorine isotope fractionation based on Rayleigh equation

*quisquiliarum* P25 降解  $\gamma$ -HCH 所产生的  $\epsilon_C$  值 ( $-3.2\%$ )<sup>[27]</sup>, 较本实验结果  $\epsilon_C$  值偏低。这是由于土壤相对于液体环境来说是非均质环境, HCH 在非均质环境中不均匀的分散是导致局部降解过程中出现同位素遮蔽效应的主要原因。

如图 3 (b) 所示, *Sphingobium* sp. F2, *S. ummariense* RL-3 和 *S. quisquiliarum* P25 在降解  $\gamma$ -HCH 过程中均发生明显的氯同位素分馏, 经瑞利方程拟合得到的  $\epsilon_{Cl}$  值分别为  $-(1.1\pm 0.6)\%$ ,  $-(1.5\pm 0.2)\%$  和  $-(1.5\pm 0.4)\%$ 。基于协方差分析结果, *Sphingobium* sp. F2 的  $\epsilon_{Cl}$  值与其他 2 组具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ); *S. ummariense* RL-3 和 *S. quisquiliarum* P25 的  $\epsilon_{Cl}$  值不具有显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 这与 3 组实验碳同位素分馏过程中的  $\epsilon_C$  值都具有显著性差异的结果不同, 表明单一元素的同位素分馏对断键过程的表征具有一定的局限性。有报道显示纯化后的水解脱氢酶 LinA1 和 LinA2 降解  $\gamma$ -HCH 过程中  $\epsilon_{Cl}$  值分别为  $-(2.7\pm 0.3)\%$  和  $-(2.5\pm 0.4)\%$ , 明显高于微生物降解过程中的  $\epsilon_{Cl}$  值, 这与跨膜传质过程可能会导致同位素分馏遮蔽效应的结论一致<sup>[7]</sup>。

## 2.5 二维稳定同位素分析

如图 4 所示, *Sphingobium* sp. F2, *S. ummariense* RL-3 和 *S. quisquiliarum* P25 在降解  $\gamma$ -HCH 过程中的碳/氯二维同位素分馏系数 ( $A_{C-Cl}$ ) 分别为  $(3.0\pm 0.3)$ ,  $(1.1\pm 0.1)$  和  $(2.7\pm 0.2)$ 。基于协方差分析结果, *S. ummariense* RL-3 与其他 2 种微生物的  $A_{C-Cl}$  值具有显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 然而 *Sphingobium* sp. F2 和 *S. quisquiliarum* P25 的  $A_{C-Cl}$  值不具有显著性差异 ( $p > 0.05$ )。由于传质过程对反应点位的 C 和 H 的影响是同步的, 因此二维同位素可以有效消除传质过程中同位素的遮蔽效应<sup>[21]</sup>。基于二维同位素分析结果, 认定 *Sphingobium* sp. F2 和 *S. quisquiliarum* P25 在降解  $\gamma$ -HCH 过程中具有相同的降解机理, 且与 *S. ummariense* RL-3 的降解机理不同。这可能是由于 *Sphingobium* sp. F2 和 *S. quisquiliarum* P25 与 *S. ummariense* RL-3 的 *lin* 基因表达了不同的 HCH 降解酶。例如, 前者是 LinB 酶, 而后者是 LinA 酶等。LIU 等<sup>[28]</sup>的研究结果为纯化后得水解脱氢酶 LinA1 和 LinA2 降解  $\gamma$ -HCH 过程中的  $A_{C-Cl}$  值分别为  $(2.7\pm 0.2)$  和  $(2.9\pm 0.2)$ , 与本研究中 *Sphingobium* sp. F2 和 *S. quisquiliarum* P25 的值一致, 无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。这一结果与分析微生物降解与纯酶降解单一同位素富集系数存在差异的结果形成对照, 进一步表明二维同位素分析可消除同位素分馏的遮蔽效应, 并表征污染物的断键机理。

## 2.6 表观动力学同位素分馏常数解析

HCH 的降解是一个脱氯化氢的过程, 利用公式 (5) 分别计算了 3 种微生物降解  $\gamma$ -HCH 过程中的  $AKIE_C$  值。由于在 HCH 的 6 个 C—Cl 键中, 处于轴向的 C—Cl 键比处于横向的 C—Cl 键更容易断键, 因此,  $\gamma$ -HCH 处于轴向的 3 个 C—Cl 键都是可能的反应点位, 而不可区分的反应点位有 2 个。在计算  $AKIE_C$  的时候, 总碳原子数、反应点位数和不可区分反应点位数分别为  $n=6$ ,  $x=3$ ,  $z=2$ 。经计算, *Sphingobium* sp. F2, *S. ummariense* RL-3 和 *S. quisquiliarum* P25 降解实验中的  $AKIE_C$  值分别为  $(1.023\pm 0.002)$ ,  $(1.006\pm 0.001)$  和  $(1.018\pm 0.002)$ 。3 种菌降解  $\gamma$ -HCH 所获得的  $AKIE_C$  值均低于 Streitwieser-半经典极限中 C—Cl 断键产生的  $AKIE_C$  值 1.057<sup>[24]</sup>。SCHILLING 等<sup>[26]</sup>的研究中水解脱氢酶 LinA 酶降解  $\gamma$ -HCH 过程中获得的  $AKIE_C$  值分别为  $(1.024\pm 0.001)$  和  $(1.023\pm 0.001)$ 。文献 [15] 的结

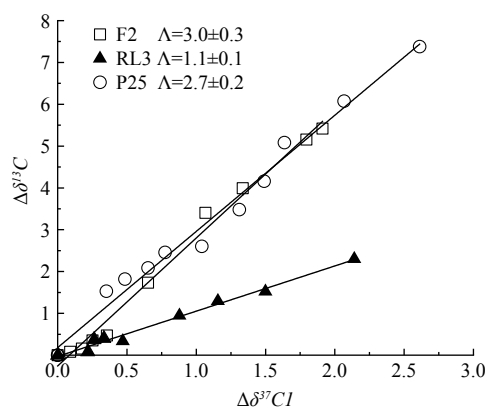


图 4 3 种微生物降解  $\gamma$ -HCH 过程中的二维稳定同位素分析

Fig. 4 Two-dimensional stable isotope analysis of  $\gamma$ -HCH degradation by three microbial species

果表明, *Sphingobium indicum* strain B90A 和 *Sphingobium japonicum* strain UT26 降解  $\alpha$ -HCH 过程中所产生的 AKIE<sub>C</sub> 值分别为 (1.003±0.001) 和 (1.005±0.001), 均与 *Sphingobium* sp. F2 降解  $\gamma$ -HCH 所获得的 AKIE<sub>C</sub> 值 (1.023±0.002) 接近。AKIE<sub>C</sub> 的计算中已考虑物质结构差异的影响, 故不同物质相似的 AKIE<sub>C</sub> 表明反应机理一致。此外, 不同的微生物在降解不同物质过程中可能产生类似的同位素分馏效应。如 *Sphingobium japonicum* strain UT26 和 *S. ummariense* RL-3 在分别降解  $\alpha$ -HCH 和  $\gamma$ -HCH 过程中碳同位素分馏特性类似。这表明这 2 种微生物在脱氯化氢过程中机理相同。有报道称 *Sphingobium japonicum* strain UT26 的 *lin* 基因所表达的 HCH 降解酶为 LinA 酶<sup>[25]</sup>, 故推断 *S. ummariense* RL-3 的 *lin* 基因所表达的酶为 LinA 酶。

### 3 结论

本研究中所涉及的 3 种微生物降解林丹的过程均符合一级反应动力学, 并且降解过程中林丹均发生了明显的碳/氯同位素分馏效应。基于组内对照及前期研究对比, 不同好氧微生物降解林丹过程中同位素分馏效应差异较大。*Sphingobium quisquiliarum* P25、*Sphingobium ummariense* RL-3 和 *Sphingobium* sp. F2 降解林丹过程中  $\epsilon_C$  值分别为  $-(4.3\pm 0.4)\%$ ,  $-(1.6\pm 0.1)\%$  和  $-(5.7\pm 0.5)\%$ ;  $\epsilon_{Cl}$  值分别为  $-(1.1\pm 0.6)\%$ ,  $-(1.5\pm 0.2)\%$  和  $-(1.5\pm 0.4)\%$ ;  $A_{C-Cl}$  值分别为 (3.0±0.3), (1.1±0.1) 和 (2.7±0.2); AKIE<sub>C</sub> 值分别为: (1.023±0.002), (1.006±0.001) 和 (1.018±0.002)。基于二维同位素分析和 AKIE<sub>C</sub> 分析, 这种同位素分馏效应的差异是由不同微生物的 HCH 降解酶不同引起的, 并推测 *S. ummariense* RL-3 的 *lin* 基因所表达的酶为 LinA 酶。以上结论可为应用 CSIA 技术解析林丹在自然条件下的迁移转化过程, 以及分析在微生物修复过程中不同微生物的贡献提供数据支撑。

### 参 考 文 献

- [1] VIJGEN J, DE BORST B, WEBER R, et al. HCH and lindane contaminated sites: European and global need for a permanent solution for a long-time neglected issue[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 248: 696-705.
- [2] 赵玲, 滕应, 骆永明. 我国有机氯农药场地污染现状与修复技术研究进展[J]. *土壤*, 2018, 50(3): 435-445.
- [3] TANG M, XU C, CHEN K, et al. Hexachlorocyclohexane exposure alters the microbiome of colostrum in Chinese breastfeeding mothers[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 254: 112900.
- [4] MA Y, YUN X, RUAN Z, et al. Review of hexachlorocyclohexane (HCH) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) contamination in Chinese soils[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 749: 141212.
- [5] 葛锋, 张转霞, 扶恒, 等. 我国有机污染场地现状分析及展望[J]. *土壤*, 2021, 53(6): 1132-1141.
- [6] 胡泉, 樊耀波, 王敏健. 影响有机污染物在土壤中的迁移、转化行为的因素[J]. *环境科学进展*, 1999(5): 14-22.
- [7] LIU Y, WU L, KOHLI P, et al. Enantiomer and carbon isotope fractionation of  $\alpha$ -hexachlorocyclohexane by *Sphingobium indicum* strain B90A and the corresponding enzymes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(15): 8715-8724.
- [8] LIU Y, LIU J, RENPENNING J, et al. Dual C-Cl isotope analysis for characterizing the reductive dechlorination of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by two *Dehalococcoides mccartyi* strains and an enrichment culture[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(12): 7250-7260.
- [9] 刘佳, 黄振友, 卜婧函. 单体稳定同位素分析在有机物降解中的应用研究进展[J]. *环境化学*, 2020(10): 2722-2732.
- [10] BASHIR S, HITZFELD K L, GEHRE M, et al. Evaluating degradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers within a contaminated aquifer using compound-specific stable carbon isotope analysis (CSIA)[J]. *Water Research*, 2015, 71: 187-196.
- [11] SAUNDERS JR W H. Heavy atom isotope effects in elimination reactions. An ab initio study[J]. *Croatica Chemica Acta*, 2001, 74(3): 575-591.
- [12] SCHMIDT T C, ZWANK L, ELSNER M, et al. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges[J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004, 378: 283-300.
- [13] NIJENHUIS I, RICHNOW H H. Stable isotope fractionation concepts for characterizing biotransformation of organohalides[J]. *Current opinion in biotechnology*, 2016, 41: 108-113.
- [14] PHILLIPS T M, SEECH A G, LEE H, et al. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms[J]. *Biodegradation*, 2005, 16(4): 363-392.
- [15] BASHIR S, FISCHER A, NIJENHUIS I, et al. Enantioselective carbon stable isotope fractionation of hexachlorocyclohexane during aerobic biodegradation by *Sphingobium* spp[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(20): 11432-11439.
- [16] LIU Y, BASHIR S, STOLLBERG R, et al. Compound specific and enantioselective stable isotope analysis as tools to monitor transformation of hexachlorocyclohexane (HCH) in a complex aquifer system[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(16): 8909-8916.
- [17] GARG N, BALA K, LAL R. *Sphingobium lucknowense* sp. nov., a hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium isolated from HCH-contaminated soil [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 3): 618-623.

- [18] KOHLI P, DUA A, SANGWAN N, et al. Draft genome sequence of *sphingobium ummariense* strain RL-3, a hexachlorocyclohexane-degrading bacterium[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(6): 1-2.
- [19] KUMAR SINGH A, SANGWAN N, SHARMA A, et al. Draft genome sequence of *sphingobium quisquiliarum* strain P25T, a novel hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium isolated from an HCH dumpsite[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(5): 1-2.
- [20] HORST A, RENPENNING J, RICHNOW H-H, et al. Compound specific stable chlorine isotopic analysis of volatile aliphatic compounds using gas chromatography hyphenated with multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(17): 9131-9138.
- [21] RENPENNING J, HORST A, SCHMIDT M, et al. Online isotope analysis of  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  universally applied for semi-volatile organic compounds using GC-MC-ICPMS[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2018, 33(2): 314-321.
- [22] WU L, MOSES S, LIU Y, et al. A concept for studying the transformation reaction of hexachlorocyclohexanes in food webs using multi-element compound-specific isotope analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1064: 56-64.
- [23] 王志鹏, 车子良, 马新雨. 酶促反应动力学教学刍议: 米氏方程衍生公式与图像[J]. *化学教育*, 2021, 42(8): 105-110.
- [24] ELSNER M, ZWANK L, HUNKELER D, et al. A new concept linking observable stable isotope fractionation to transformation pathways of organic pollutants[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(18): 6896-6916.
- [25] LAL R, PANDEY G, SHARMA P, et al. Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(1): 58-80.
- [26] SCHILLING I E, HESS R, BOLOTIN J, et al. Kinetic isotope effects of the enzymatic transformation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by the lindane dehydrochlorinase variants LinA1 and LinA2[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(5): 2353-2363.
- [27] QIAN Y, CHEN K, LIU Y, et al. Assessment of hexachlorocyclohexane biodegradation in contaminated soil by compound-specific stable isotope analysis[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 254: 113008.
- [28] LIU Y, FU J, WU L, et al. Characterization of hexachlorocyclohexane isomer dehydrochlorination by LinA1 and LinA2 using multi-element compound-specific stable isotope analysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(23): 16848-16856.

## Fractionation characteristics of two-dimensional stable isotopes of carbon-chlorine in the process of Lindane degradation by aerobic microorganisms

LI Jie<sup>1</sup>, ZHANG Xinyu<sup>2</sup>, LI Xiaohong<sup>2</sup>, JIANG Zhongwei<sup>3</sup>, LIU Feng<sup>4,\*</sup>, SHAN Yongping<sup>4</sup>, LIU Yaqing<sup>2</sup>

1. Nanning College for Vocational Technology, Nanning 530000, China; 2. College of Light Industry & Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. Guangxi Modern Logistics Group, Nanning 530299, China; 4. Research Center for Eco-Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

\*Corresponding author, E-mail: fengliu@rcees.ac.cn

**Abstract** Hexachlorocyclohexane (HCH) is a persistent pollutant that causes pollution in large quantities in the environment, it is very important to quantitatively study its migration and transformation process in the environment. The degradation process of  $\gamma$ -HCH (Lindane) by three aerobic microorganisms, *Sphingobium quisquiliarum* P25, *Sphingobium ummariense* RL-3 and *Sphingobium* sp. F2 were studied. Monomer stable isotope analysis (CSIA) was used to investigate the degradation of HCH by different microorganisms and their effects on the transformation and migration of HCH. The results showed that the degradation of  $\gamma$ -HCH by three kinds of microorganisms was consistent with the principle of first-order reaction kinetics. Carbon fractionation coefficient ( $\epsilon_{\text{C}}$ ) was  $-(4.3 \pm 0.4)\text{‰}$ ,  $-(1.6 \pm 0.1)\text{‰}$  and  $-(5.7 \pm 0.5)\text{‰}$ , respectively. Chlorine isotope fractionation coefficient ( $\epsilon_{\text{Cl}}$ ) was  $-(1.1 \pm 0.6)\text{‰}$ ,  $-(1.5 \pm 0.2)\text{‰}$ , and  $-(1.5 \pm 0.4)\text{‰}$ , respectively. Two-dimensional isotope fractionation coefficients ( $A_{\text{C-Cl}}$ ) was  $(3.0 \pm 0.3)$ ,  $(1.1 \pm 0.1)$  and  $(2.7 \pm 0.2)$ , respectively. The results of this study can provide a reference for the application of monomer stable isotope analysis technology to analyze the migration and transformation process of HCH in complex environments and evaluate the restoration effect of HCH contaminated sites.

**Keywords** isotope fractionation; aerobic microorganism; Hexachlorocyclohexane (HCH); compound-specific isotope analysis(CSIA)