

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20131017001

吴 芳, 张振轩, 何欣欣, 等. 利用发光细菌测试方法评价菲和芘生物降解过程的毒性变化[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 445-452

Wu F, Zhang Z X, He X X, et al. Toxicity variation during biodegradation of phenanthrene (Phe) and pyrene (Pyr) based on luminescent bioassay [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 445-452 (in Chinese)

利用发光细菌测试方法评价菲和芘生物降解过程的毒性变化

吴 芳¹, 张振轩¹, 何欣欣¹, 朱亚先², 张 勇^{1,3,*}

1. 厦门大学环境与生态学院近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361102

2. 厦门大学化学化工学院化学系, 厦门 361005

3. 漳州职业技术学院, 漳州 363000

收稿日期: 2013-10-17

录用日期: 2013-12-28

摘要: 将发光细菌毒性测试方法应用于典型多环芳烃生物降解过程的毒性评价, 研究了菲和芘单独及混合状态下生物降解过程中的毒性变化。结果表明: 溶解态的菲和芘在一定浓度范围内对发光细菌均具有毒性, 菲和芘对发光细菌的 10 min-EC₅₀ 值分别为 $1.61 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.31 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。单组分和混合组分的菲和芘经过微生物降解后, 其毒性显著降低。混合组分生物降解体系中由于菲和芘分子之间的互相作用, 使其对发光细菌的毒性效应与其单独存在时有差异。生物降解的各阶段, 混合组分降解体系的毒性均大于单组分菲或芘降解体系的毒性, 且在降解完全的后期, 培养液的毒性有增加的趋势。这与菲和芘降解中间产物的积累变化有关。

关键词: 发光细菌; 多环芳烃; 生物降解; 毒性

文章编号: 1673-5897(2014)3-445-08

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Toxicity Variation During Biodegradation of Phenanthrene (Phe) and Pyrene (Pyr) Based on Luminescent Bioassay

Wu Fang¹, Zhang Zhenxuan¹, He Xinxin¹, Zhu Yaxian², Zhang Yong^{1,3,*}

1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science (Xiamen University), College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China

2. Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3. Zhangzhou Institute of Technology, Zhangzhou 363000, China

Received 17 October 2013

accepted 28 December 2013

Abstract: The present study investigated the toxicity variation during biodegradation process of typical PAHs –phenanthrene (Phe) and pyrene (Pyr) –either singly or in a mixture by using luminescent bioassay. The experimental results indicated that dissolved Phe and Pyr were toxicity to luminescent bacteria in a certain range of concentration. The 10 min EC₅₀ of Phe and Pyr to luminescent bacteria were $1.61 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2.31 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The toxicity of Phe and Pyr was significantly reduced after biodegradation process for both single component and multi-component. Toxicity of multi-component to luminescent bacteria was different from single component due to the interaction of molecules between Phe and Pyr. The toxicity of multi-component biodegradation system was greater than their singly biodegradation system during the overall biodegradation process. In addition the toxicity was increased in later stage of the mixed biodegradation process, possibly due to the generation and changes of metabolites in the bio-

基金项目: 国家自然科学基金(No.21177102.21075102); 教育部博士点基金(No. 20130121130005)

作者简介: 吴芳(1980-), 女, 工程师, 研究方向为环境化学, E-mail: wufang@xmu.edu.cn;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yzhang@xmu.edu.cn

degradation process.

Keywords: luminescent bacteria; PAHs; biodegradation; toxicity

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是环境中一类广泛存在的持久性有机污染物,因其具有的三致效应和内分泌干扰作用对生态系统和人体健康构成潜在的危害,倍受各国环境科学家关注^[1-2]。近年来,海上溢油事件频发,如墨西哥湾溢油事件和我国渤海湾油田溢油事故,使得水环境中 PAHs 污染及其生态毒理效应成为各国环境科学家关注的焦点^[3-4]。

目前,微生物降解被认为是治理环境中 PAHs 污染的最有效手段之一^[5]。多年来,可降解 PAHs 微生物的筛选、PAHs 的降解途径和降解机理等方面的研究已有报道^[6-10],但对于微生物降解与 PAHs 毒性去除之间的关系仍知之甚少。其关键问题是实际环境中 PAHs 较低的赋存浓度和部分代谢物存在时间较短。

发光细菌法快速、简便、灵敏、可靠,近年来在国内外被广泛用于环境中有机污染物包括 PAHs 的毒性评价^[11]。由于发光细菌的发光强度与污染物浓度在一定范围内呈线性关系,能够稳定、灵敏且快速地反映出毒性变化。Repetto 等对比研究了水蚤、发光细菌、小球藻、植物细胞、动物细胞等对环境样品中五氯苯酚毒性的半数反应浓度和暴露时间,结果显示发光细菌法在检测速度与灵敏度上具有综合优势^[12]。尽管发光细菌法已经广泛应用于化学品、污水、土壤和沉积物等的毒性评价^[11],将其应用于 PAHs 生物降解过程毒性变化方面的研究尚不多见。Šepić 等人用发光细菌等水生生物研究了荧蒽的 9 种生物降解产物的毒性,结果显示除了 9-羟基蒽以外,其余荧蒽降解产物的毒性均低于其母体的毒性^[13],但该研究仅仅将不同 PAHs 的代谢产物单独暴露于发光细菌等水生生物。由于不同 PAHs 及其代谢物共存时,其毒性效应并非简单的相加,而是因协同和拮抗作用表现为联合的毒性效应。因此,仅通过单独暴露的方法无法准确评估其混合毒性。El-Alawi 等以二甲亚砜作溶剂研究了几种典型 PAHs 及其光降解产物对发光细菌的毒性^[14],由于二甲亚砜的存在使其无法完全反映现实水环境中溶解态 PAHs 的赋存状态及环境行为,也无法准确评估其毒性。

本文将同步荧光法和发光细菌毒性法相结合,研究了 PAHs 降解菌 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1 strain (以下简称 US6-1)对溶解态菲和芘

单独及混合条件下生物降解过程的毒性变化,以期深入研究 PAHs 的微生物降解过程机理及 PAHs 降解产物的毒性评价提供科学依据和参考。

1 材料和方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

仪器: FLS920 稳态/瞬态荧光光谱仪 (Edinburgh Instrument 公司,英国), Ultrospec 2100 Pro 紫外可见分光光度计 (GE Amersham Bioscience 公司,美国), Sky 2102C 恒温振荡器 (上海苏坤实业有限公司), Universal 320R 高速冷冻离心机 (Hettich 公司,德国), KQ3200 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

试剂: 菲 (纯度 >98%, Alfa Aesar 公司), 芘 (纯度 >98%, Acros Organics 公司), 2216E 液体培养基 (青岛海博生物技术有限公司); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2HPO_4 、 K_2HPO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 NaOH (A.R., 国药化学试剂有限公司); 无水乙醇 (A.R., 西陇化工股份有限公司)。2216E 液体培养基的配制: 称取 37.4 g 2216E 液体培养基粉末溶于 1 000 mL Milli-Q 水中, 121 °C 高压灭菌 15 min 后即可用于 PAHs 降解菌的培养。MSM 液体培养基的配制参照文献^[15], 将 1 000 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、800 mg Na_2HPO_4 、200 mg K_2HPO_4 、200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 1 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 混合, 用 Milli-Q 水定容至 1 000 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min 后作为生物降解实验的无机培养液。

1.2 实验材料

选用 US6-1 作为 PAHs 降解菌。该降解菌由韩国海洋研究与发展院提供,可降解包括苐、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并[a]蒽和苯并[a]芘在内的多种 PAHs^[16]。所用发光细菌为明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 冻干粉,购自北京滨松光子技术股份有限公司。该发光细菌广泛适用于包括 PAHs 及其光降解产物在内的多种污染物的毒性评价^[17-19]。

1.3 同步荧光法测定菲和芘

溶解态菲和芘的测定方法参照文献^[15,20]。以乙醇作为溶剂配制浓度为 $6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 菲的储备液和 $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘的储备液, 4 °C 避光保存。分别移取一定量菲和芘的储备液至 10 mL 比色管中, 氮气吹干后用 MSM 液体培养基稀释至刻线, 混匀并

超声 15 min,在 $\Delta\lambda = 39\text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 55\text{ nm}$ 条件下,分别测定其荧光强度。

1.4 菲和芘生物降解实验方法

将 US6-1 菌株在 2216E 培养基上于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,150 rpm 条件下进行扩种培养,24 h 后将达到对数期的培养液移入 50 mL 离心管于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、6 000 rpm 条件下离心 15 min。离心后去除 2216E 培养液,加入 MSM 溶液重悬后继续离心,重复以上操作 3 次可得扩种后的菌液以用于生物降解实验。运用 1.3 中方法分别配制菲和芘单组分和混合组分的降解液。单组分菲和芘的降解液初始浓度分别为 $6\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$,均低于其表观溶解度,混合组分中菲和芘的初始浓度与其单组分相同,每种组合设置 3 个平行样,其中控制组不加入微生物培养液,实验组加入微生物培养液并控制生物降解实验初始生物量 $\text{OD}_{600} = 0.0015$ 。6 种组合具体设置如下: 1. 菲($6\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 2. 菲($6\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)加入微生物培养液; 3. 芘($6\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4. 芘($6\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)加入微生物培养液; 5. 菲($6\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和芘($6\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 6. 菲($6\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和芘($6\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)加入微生物培养液,其中 1、3、5 为控制组,2、4、6 为实验组。降解液于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,150 rpm 条件下避光培养,降解过程在有氧条件下进行。降解液待微生物接种后每隔两小时运用 1.3 中方法直接测定降解体系中 PAHs 的荧光强度。

1.5 发光细菌测试毒性的方法

取发光细菌冷冻干燥制剂瓶(含 1 g 冻干粉)1 支,加入 1.00 mL 复苏稀释液并于室温(约 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$)下复苏 15 min 后用于样品测定。发光细菌发光强度的变化可通过商品化的生物毒性测试仪^[21]或荧光光谱仪^[22]检测。本实验运用 FLS920 荧光光谱仪,其检测器使用高灵敏的单光子计数技术,提供微弱光信号的检出能力。在关闭激发光源以避免干扰的情况下,将 FLS920 荧光光谱仪的狭缝调至最大 21.6 nm,测定明亮发光杆菌在 450-500 nm 的发光强度,发现其在 485 nm 处信号值最大,故选取 485 nm 作为测定波长。具体测试方法参照

明亮发光杆菌冻干粉试剂使用说明。根据待测样品的制备要求,需将样品与渗透压调节液以 17 : 3 的比例混合配制成待测样品溶液。每个测定时段于生物降解体系中取出培养液 2.55 mL 于 10 mL 比色管中,加入 0.45 mL 渗透压调节液,混匀后加入 0.10 mL 复苏后的发光细菌悬液,轻轻振荡,使之充分混匀,放置 10 min 后于关闭光源的 FLS920 荧光光谱仪上测定。将 MSM 溶液与渗透压调节液以 17 : 3 的比例混合,作为空白对照。每组样品取 3 个平行样,结果取 3 个的平均值并计算相对发光强度(%)或发光抑制率(%)。计算公式如下:

相对发光强度(%) = (样品发光强度/对照发光强度) $\times$ 100% (1)

发光抑制率(%) = 1 - 相对发光强度 (2)

1.6 数据处理

通过 Origin 8.0 软件绘图,将溶液浓度与相对发光强度平均值进行线性回归,用直线内插法求得相对发光强度为 50% 时所对应的溶液浓度,即为 EC_{50} 。实验数据用 SPSS13.0 统计软件进行方差分析和显著性检验, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 菲和芘对发光细菌的毒性特征

菲和芘对发光细菌发光强度的影响结果见图 1,图 2。由图 1 可知,当菲浓度为 $1.2\times 10^{-6}\sim 2.4\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,相对发光强度变化较小且均在 100% 左右。当发光细菌遇到有毒物质,其发光会受到抑制且抑制的程度跟所受到的毒物的浓度及其毒性大小相关^[23]。在该条件下,发光细菌发光强度约为 100%,表明该浓度的菲对发光细菌无毒性效应。当菲的浓度在 $2.4\times 10^{-6}\sim 7.2\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围时,其相对发光强度随着菲浓度的增加而逐渐降低,且其相对发光强度与菲浓度之间存在线性关系。通过计算可得菲的 10 min - EC_{50} 值为 $1.61\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1),约为菲水中表观溶解度($6.62\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[24] 的 2.4 倍,表明溶解态的菲在一定浓度范围内对发光细菌具有毒性,且随着浓度的增加其毒性逐渐增强。

表 1 菲和芘对发光细菌的毒性效应

Table 1 Toxic effects of Phe and Pyr towards luminescent bacteria

多环芳烃 PAHs	拟合方程 Equation	相关系数 R^2	半数有效浓度/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{EC}_{50}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	显著性检验($p = 0.05$) Significance testing ($p = 0.05$)
菲	$Y = - 3.508\text{E}6 X + 106.5$	0.9731	1.61×10^{-5}	显著相关
Phe				No significant difference
芘	$Y = - 2.378\text{E}7 X + 105.0$	0.9739	2.31×10^{-6}	显著相关
Pyr				No significant difference

如图2所示,当芘的浓度为 $1.0 \times 10^{-8} \sim 1.8 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其相对发光强度变化较小且都在100%左右,对发光细菌几乎没有毒性。当芘的浓度在 $1.8 \times 10^{-7} \sim 7.2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围时,其相对发光强度随着芘浓度的增大而逐渐减弱,且其相对发光强度与芘浓度之间存在线性关系,通过计算可得芘的10 min- EC_{50} 值为 $2.31 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表1),约为芘在水中的表观溶解度 ($6.67 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 25°C)^[24] 的3.5倍,表明溶解态的芘在一定浓度范围内对发光细菌也具有毒性,且随着浓度的增加其毒性逐渐增强。

2.2 US6-1 对菲和芘的生物降解特性

单组分和混合组分菲和芘的生物降解过程如图3,图4所示,在US6-1对单组分菲或芘的生物降解体系中,菲完全降解约需要8 h;相对于菲,经过4 h,

约有50%左右的芘被降解,但随着时间的增加芘的降解速率逐渐降低,至32 h时芘的剩余率约为6%。这一结果与 Pagnout 等对微生物 *Mycobacterium* sp. SNP 11 降解菲和芘研究的结果类似,在初始降解浓度均为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 且其他降解条件一样的情况下,菲降解完全仅需约1.5 d,而芘降解完全需要3 d以上^[25]。该结果与多数已有研究的结果一致^[26-28]。这与每种PAHs所含苯环数目及其水溶性有关^[29-31]。同时,PAHs在有氧条件下生物降解的第一步为由微生物分泌的单加氧酶或双加氧酶将其氧化开环,随后被进一步代谢降解^[32]。由于开环反应为逐步进行,PAHs所含苯环数目越多其降解完全所需时间越长。此外,当微生物细胞表面是亲水性时,被降解对象作为碳源的水溶性越大,被微生物代谢的速率越快。

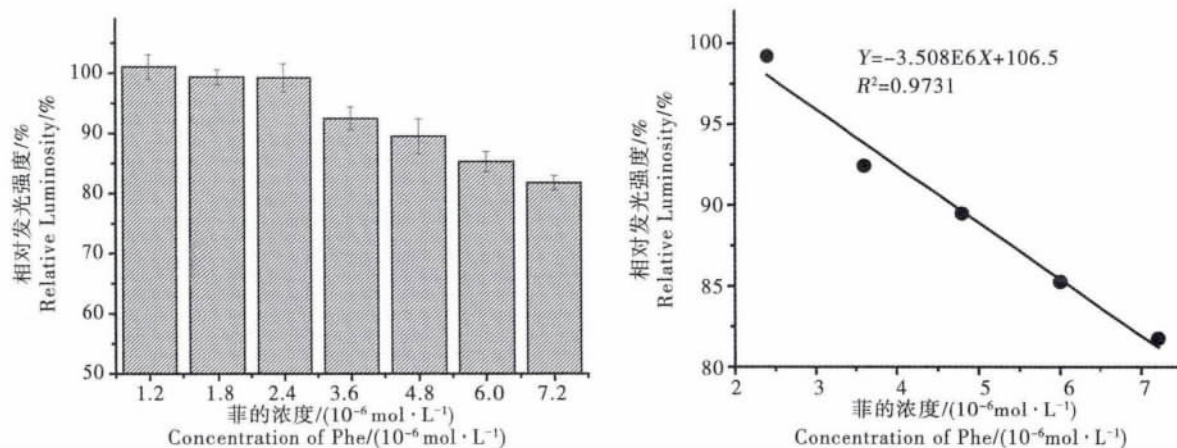


图1 菲对发光细菌发光强度的影响

Fig. 1 Effects of Phe on relative luminosity of luminescent bacteria

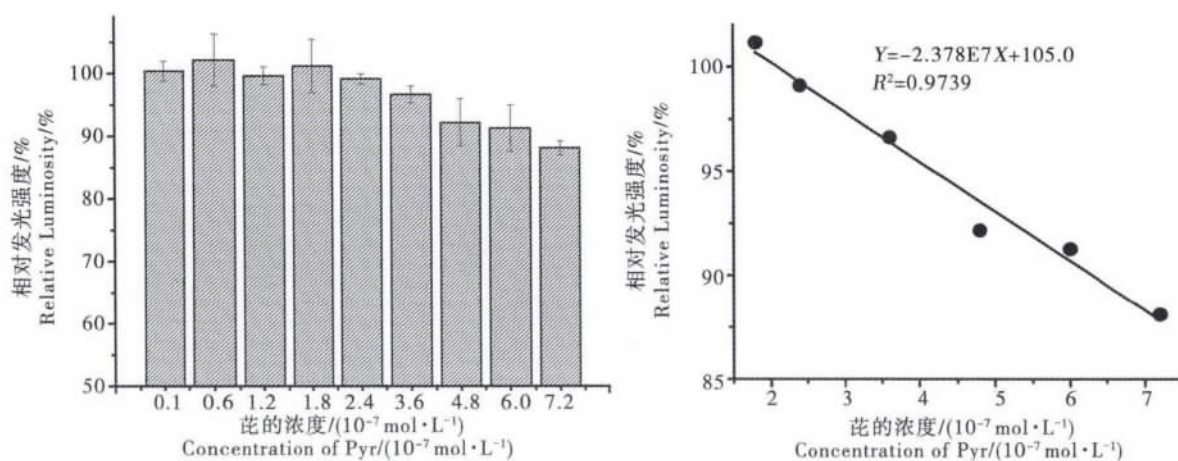


图2 芘对发光细菌发光强度的影响

Fig. 2 Effects of Pyr on relative luminosity of luminescent bacteria

对于菲和芘在其混合体系的生物降解,由图3可知,单组分和混合体系中菲的降解速率基本一致,菲降解完全约需要8 h且单组分和混合体系中剩余率相差不大($<1\%$)。在芘存在下,菲的生物降解与其单独存在时无明显差别。由图4可知,单组分和混合体系中,芘的降解过程差异较大。单组分降解体系中芘的降解速率开始较快,并随时间增加逐渐降低,至第32 h基本降解完全。在菲的存在下,前6 h芘的降解速率较低,第6 h后其降解速率明显加快,至第12 h其剩余率已经低于单组分降解体系,至第16 h基本降解完全,剩余率约为1.47%,比其单组分条件下降低4.53%。该结果说明,反应初期,菲和芘之间存在竞争代谢,造成短时间内芘的降解速率偏低,而菲的降解基本不受影响,但随着反应的进行,芘的降解速率明显增加并且最终降解完全所需时间小于单组分降解体系。这表明混合生物降解体系中PAHs之间的相互作用会对其各自PAHs的降解速率产生影响。这样的相互作用可以表现为协同

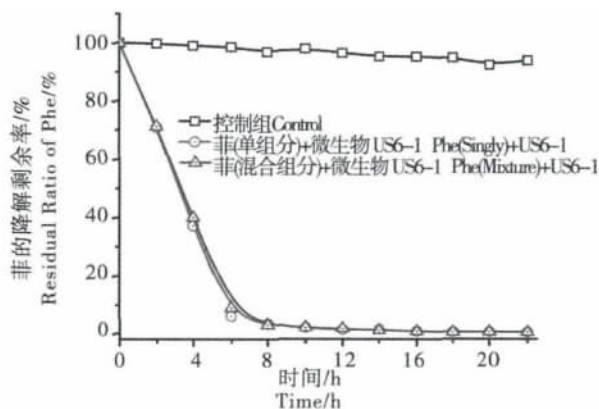


图3 单组分和多组分菲的生物降解过程

Fig. 3 Biodegradation process of Phe singly and in a mixture

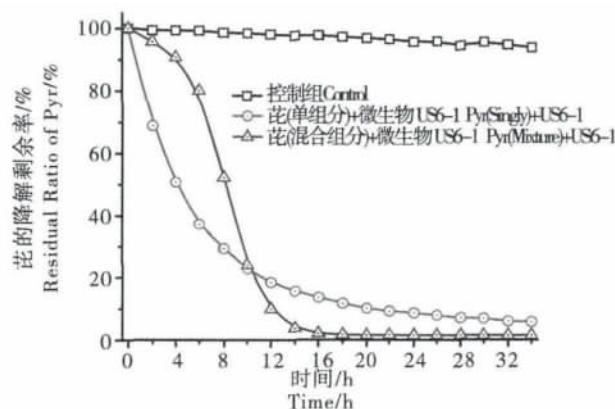


图4 单组分和多组分芘的生物降解过程

Fig. 4 Biodegradation process of Pyr singly and in a mixture

作用(如相互诱导和共代谢)或拮抗作用(如基质间相互竞争或微生物毒性导致降解受到抑制)^[33]。该方面的研究涉及多组分PAHs生物降解共代谢及降解机理等方面的工作有待进一步开展。

2.3 菲和芘生物降解过程中毒性变化

菲和芘单独及其混合条件下生物降解过程中对发光细菌的毒性变化如图5,图6所示。图5中,随着菲降解过程的进行,其毒性先略微升高,随后逐渐降低并趋于稳定。有研究表明PAHs的代谢物比PAHs母体化合物本身生物有效性更高且毒性更强^[34-35]。Lundstedt等人运用生物反应器研究土壤中PAHs降解的结果表明,羟基化PAHs如PAH的酮类、奎宁类和香豆素类化合物会在生物降解过程中产生并积累。而这些羟基化PAHs比其母体的毒性更强^[36]。由于微生物在有氧条件下降解PAHs首先通过加氧酶对PAHs氧化开环后进行^[32],因此本实验中在菲降解过程前期可能产生了毒性较强的菲的代谢物,从而导致反应前期降解体系的毒性增强。降解至第16 h,菲的去除率达到99%,降解体系的毒性逐渐稳定,发光细菌的相对发光强度接近100%,毒性明显下降,显著性概率为 $0.002 < 0.05$,表明具有显著性差异。图6中,随着芘生物降解过程

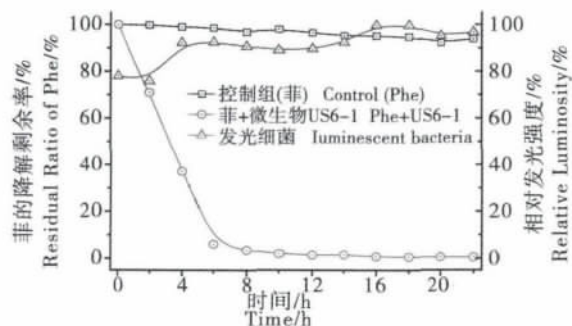


图5 菲的生物降解过程及毒性变化

Fig. 5 Biodegradation process of Phe and toxicity changes

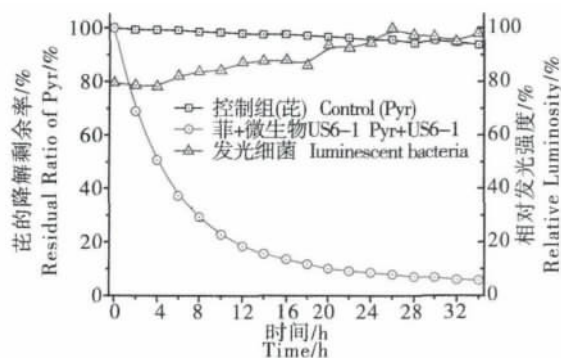


图6 芘的生物降解过程及毒性变化

Fig. 6 Biodegradation process of Pyr and toxicity changes

的进行,其毒性逐渐下降,降解至第 22 小时,芘的去除率达到 95% 左右,降解体系的毒性也逐渐趋于稳定,发光细菌的相对发光强度接近 100%。单组分的菲和芘经过 US6-1 的降解,各自培养液的毒性均低于母体化合物菲或芘的毒性。图 7 中,菲和芘混合体系随着降解的进行,其培养液的毒性呈现先增高,后降低并趋于稳定后再升高的现象。约 14 h 后,菲和芘的去除率均可达到 95%,混合培养液的毒性也趋于稳定,其相对发光强度约为 90%,低于初始菲和芘混合体系的毒性。但 28 h 后,其毒性又逐渐增强,发光细菌的发光强度降低为 80% 左右,仅比降解前混合体系毒性略低。相比于单组分菲或芘,混合体系降解后的培养液毒性要高。在菲和芘单组分及混合体系的降解过程中,培养液的毒性均出现了先增加又下降的现象,且在降解完全的后期,培养液的毒性有增加的趋势。由于 PAHs 经历不同代谢途径其毒性的降低程度也不同,这一现象与菲和芘降解中间产物的积累变化等有关。

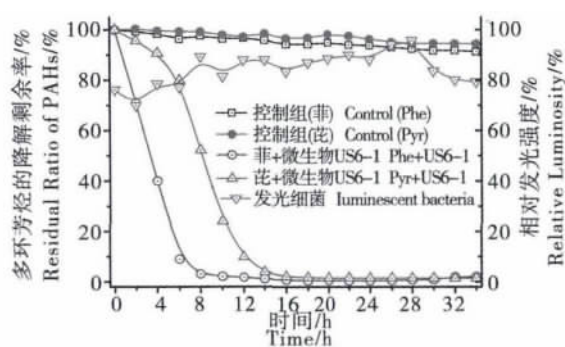


图7 菲和芘混合条件下生物降解过程及毒性变化

Fig. 7 Biodegradation process of Phe and Pyr in a mixture and toxicity changes

3 讨论(Discussion)

PAHs 的水溶性是影响其毒性的主要因素, PAHs 随着环数增加其毒性增强^[37-39]。本实验研究结果表明溶解态的菲和芘对发光细菌均产生一定的生物毒性,但溶解态的菲和芘均不能完全抑制发光细菌的发光反应,在菲和芘接近各自表观溶解度的条件下均产生约 20% 左右的发光抑制率。El-Alawi 等以二甲亚砜作助溶剂运用发光细菌测试技术研究包括了菲、蒽、芴和芘在内的 PAHs 对发光细菌 *Vibrio fischeri* 的毒性,结果表明运用二甲亚砜配置的测试液中 16 种 PAHs 对发光细菌均产生一定的生物毒性。在无光照条件下测定菲和芘 15 min-EC₅₀ 值

分别为 0.51 mg·L⁻¹ 和 15.07 mg·L⁻¹^[40]。这可能是由于发光细菌所处环境介质不同、PAHs 溶解度与测定方法不同所致。本研究中 PAHs 生物降解的过程均在水溶液中进行,且初始降解浓度低于其表观溶解度,因此本文所用方法更有助于评价现实环境中 PAHs 母体化合物毒性的大小及生物降解过程的毒性变化。

本研究中,混合组分的菲和芘无论是其降解过程还是毒性变化均比各自单组分条件下要复杂。Verhiet 等认为多组分 PAHs 的毒性值主要与其混合组成有关,可能因协同或拮抗作用而导致毒性高于或低于各自单组分毒性的加合。他们发现当菲、蒽和苯并[k]蒽混合存在时,其联合毒性因协同作用而增强^[41]。而 Munoz 和 Tarazona 在萘、蒽、菲和芘对水藻联合毒性的研究中,发现 4 种 PAHs 混合后的毒性比各自单组分毒性相加的值要低^[42]。Swartz 等的研究也表明菲、芘、蒽和芴混合后的毒性低于各自单组分存在时毒性值的加合^[43]。本研究中菲和芘混合后对发光细菌的毒性比各自单组分对发光细菌的毒性均高但低于单组分存在时毒性值的加合。混和生物降解体系中毒性变化的复杂性还与代谢过程的变化有关。高分子量的芘在生物降解过程中产生的代谢物多,代谢路径也更为复杂,而 PAHs 经历不同的代谢路径也会导致毒性的大小产生差异。如 Kim 等人的研究发现 PAHs 降解菌 *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 分泌的儿茶酚氧位甲基转移酶可以通过抑制甲氧基类代谢物的生成而降低儿茶酚类代谢物的毒性,从而降低生物降解体系的毒性^[44]。本研究中,混合体系中菲和芘的相互作用使得其代谢过程发生改变,降解过程的毒性变化比各自单组分存在时复杂。同时,混合体系中,不同时段菲和芘代谢物不断积累,而其母体浓度逐渐降低,生物降解体系的毒性跟着改变。因此,运用发光细菌毒性测试技术可以克服传统生物毒性评价手段以哺乳类、鱼类为受试对象操作复杂和周期长等不足,从而实现快速、灵敏地评价 PAHs 生物降解过程中毒性变化。

本方法能够快速测定生物降解过程中 PAHs 浓度的变化,但无法定性定量地研究生物降解过程中所生成代谢物的结构及浓度变化。为了更全面地了解微生物降解 PAHs 过程的毒性变化,并深入研究微生物降解与 PAHs 毒性去除间的关系,需要更进一步借助新的组学技术如蛋白质组学和代谢组学,将 PAHs 的降解特性与代谢产物鉴定相关联,对降

解路径和降解机理进行深入研究。

通讯作者简介: 张勇(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为环境化学。

参考文献:

- [1] Samanta S K, Singh O V, Jain R K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(6): 243 – 248
- [2] Fu J, Mai B, Sheng G, et al. Persistent organic pollutants in environment of the Pearl River Delta, China: An overview [J]. Chemosphere, 2003, 52(9): 1411 – 1422
- [3] Kweon O, Kim S J, Holland R D, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(17): 4326 – 4337
- [4] Zhang Z X, Zhu Y X, Li C M, et al. Investigation into the causes for the changed biodegradation process of dissolved pyrene after addition of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 243: 139 – 145
- [5] Haritash A K, Kaushik C P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169(1): 1 – 15
- [6] Mallick S, Chatterjee S, Dutta T K. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: Formation of trans-2,3-dioxo-5-(2'-hydroxy-phenyl)-pent-4-enoic acid [J]. Microbiology, 2007, 153(7): 2104 – 2115
- [7] Chen J F, Wong M H, Wong Y S. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment [J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57(6-12): 695 – 702
- [8] Peng R H, Xiong A S, Xue Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons [J]. Fems Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 927 – 955
- [9] Deveryshetty J, Phale P S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PPD: Purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid dioxygenase [J]. Microbiology, 2009, 155(9): 3083 – 3091
- [10] Aryal M, Liakopoulou-Kyriakides M. Biodegradation and kinetics of phenanthrene and pyrene in the presence of nonionic surfactants by *Arthrobacter* Strain Sphe3 [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2013, 224(2): 1 – 10
- [11] Girotti S, Ferri E N, Fumo M G, et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 608(1): 2 – 29
- [12] Repetto G, Jos A, Hazen M J, et al. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol [J]. Toxicology in Vitro, 2001, 15(4-5): 503 – 509
- [13] Šepić E, Bricelj M, Leskovšek H. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms [J]. Chemosphere, 2003, 52(7): 1125 – 1133
- [14] El-Alawi Y S, McConkey B J, George D, et al. Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent Bacteria [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 51(1): 12 – 21
- [15] Zhang Y, Zhu Y X, Kwon K K, et al. Novel method for determining pyrene biodegradation using synchronous fluorimetry [J]. Chemosphere, 2004, 55(3): 389 – 394
- [16] Sohn J H, Kwon K K, Kang J H, et al. *Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1483 – 1487
- [17] McConkey B J, Duxbury C L, Dixon D G, et al. Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1997, 16(5): 892 – 899
- [18] Zou X, Lin Z, Deng Z, et al. The joint effects of sulfonamides and their potentiators on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms [J]. Chemosphere, 2012, 86(1): 30 – 35
- [19] Tian D, Lin Z, Zhou X, et al. The underlying toxicological mechanism of chemical mixtures: A case study on mixture toxicity of cyanogenic toxicants and aldehydes to *Photobacterium phosphoreum* [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2013, 272(2): 551 – 558
- [20] Cai Z Q, Zhu Y X, Zhang Y. Simultaneous determination of dissolved anthracene and pyrene in aqueous solution by synchronous fluorimetry [J]. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2008, 69(1): 130 – 133
- [21] Guerra R. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents [J]. Chemosphere, 2001, 44(8): 1737 – 1747
- [22] Mariscal A, Peinado M T, Camero-Varo M, et al. Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio harveyi* [J]. Chemosphere, 2003, 50(3): 349 – 354
- [23] Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*)

- eri) for acute toxicity prediction of chemicals [J]. *Environment International*, 2006, 32(2): 265 – 268
- [24] Mackay D, Shiu W Y, Ma K C. *Illustrated Handbook of Physical-chemical Properties and Environmental Fate for Organic Compounds* [M]. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006: 709 – 748
- [25] Pagnout C, Rast C, Veber A M, et al. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp strain SNP11 [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 65(2): 151 – 158
- [26] Yuan S Y, Wei S H, Chang B V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture [J]. *Chemosphere*, 2000, 41(9): 1463 – 1468
- [27] Tam N F Y, Guo C L, Yau C, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia enriched from mangrove sediments [J]. *Water Science and Technology*, 2003, 48(8): 177 – 183
- [28] Simarro R, González N, Bautista L F, et al. Evaluation of the influence of multiple environmental factors on the biodegradation of bibenzofuran, phenanthrene, and pyrene by a bacterial consortium using an orthogonal experimental design [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2012, 223(6): 3437 – 3444
- [29] Garon D, Sage L, Wouessidjewe D, et al. Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin [J]. *Chemosphere*, 2004, 56(2): 159 – 166
- [30] Viamajala S, Peyton B M, Richards L A, et al. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(6): 1094 – 1106
- [31] Sang L Z, Wei X Y, Chen J N, et al. Simultaneous fluorimetric determination of the biodegradation processes of dissolved multi-component PAHs [J]. *Talanta*, 2009, 78(4-5): 1339 – 1344
- [32] Cao B, Nagarajan K, Loh K C. Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(2): 207 – 228
- [33] Molina M, Araujo R, Hodson R E. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1999, 45(6): 520 – 529
- [34] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: Inhibition phenomena and co-metabolism [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43:156 – 164
- [35] Shuttleworth K, Cerniglia C. Environmental aspects of PAH biodegradation [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995, 54:291 – 302
- [36] Lundstedt S, Haglund P, Oberg L. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an acid aged gasworks soil [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22: 1413 – 1420
- [37] Liu Y, Luan T G, Lu N N, et al. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation by *Cyclotella caspia* Alga [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(2): 169 – 180
- [38] Engraff M, Solere C, Smith K E C, et al. Aquatic toxicity of PAHs and PAH mixtures at saturation to benthic amphipods: Linking toxic effects to chemical activity [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 102(3-4): 142 – 149
- [39] Turcotte D, Akhtar P, Bowerman M, et al. Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(2): 487 – 495
- [40] El-Alawi Y S, Huang X D, Dixon D G, et al. Quantitative structure-activity relationship for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(10): 2225 – 2232
- [41] Verhiest G, Clement B, Blake G. Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates [J]. *Ecotoxicology*, 2001, 10(6): 363 – 372
- [42] Munoz M J, Tarazona J V. Synergistic effect of two- and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons: Phenanthrene, anthracene, naphthalene and acenaphthene on *Daphnia magna* [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, 50: 363 – 368
- [43] Swartz R C, Schults D W, Ozretich R J, et al. ΣPAH: A Model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, 14(11): 1977 – 1987
- [44] Kim Y H, Moody J, Freeman J, et al. Evidence for the existence of PAH-quinone reductase and catechol-O-methyltransferase in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31(11): 507 – 516