

# 同步荧光法检测芘的微生物降解

张勇<sup>1</sup>,朱亚先<sup>2</sup>,权改劲<sup>3</sup>,朴哉炫<sup>3</sup>,金尚珍<sup>3</sup> (1.海洋环境科学教育部重点实验室,厦门大学环境科学研究中心,福建 厦门 361005; 2.厦门大学化学系,福建 厦门 361005; 3.Microbiology Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan, P.O. Box 29, Korea)

**摘要:** 采用同步荧光法研究矿物盐介质中溶解态芘的生物降解速率.所建方法对溶解态芘的检测限为 0.19ng/mL,相对标准偏差小于 1.3%( $n=9$ ).在相同的实验条件下,用所建方法考察了 3 种不同芘的降解菌株对溶解态芘的降解能力.结果表明,该方法最大的特点是在不经萃取的情况下可直接用于溶解态芘的降解过程的检测,所得结果与 GC/FID 的实验结果一致.与现行的 GC 法相比较,该方法每一次检测的时间小于 1min,仪器及运行成本很低.如果能与现行的研究方法相结合,该方法的建立可为在实验室或现场研究 PAHs 的生物降解及衰减提供一有力的研究手段.

**关键词:** 同步荧光法; 多环芳烃; 芘; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2002)04-0289-04

**Detection of biodegradation of pyrene by synchronous fluorometry.** ZHANG Yong<sup>1</sup>, ZHU Ya-xian<sup>2</sup>, KWON Kae-kyoung<sup>3</sup>, PARK Jae-hyun<sup>3</sup>, KIM Sang-jin<sup>3</sup> (1.The Key Laboratory for Marine Environmental Science of Ministry of Education of China, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2.Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3.Microbiology Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan, P.O. Box 29, Korea). *China Environmental Science*. 2002,22(4): 289~292

**Abstract:** The synchronous fluorometry has been adopted to study the biodegradation rate of pyrene dissolved in mineral salts media (MSM). The limit of detection is calculated as 0.19ng/mL for the dissolved pyrene with the relative standard deviation less than 1.3% ( $n=9$ ). The capability of three kinds of pyrene degrading strains has been investigated by the established method under same experimental condition. The results show that greatest feature of the process is its capability to detect directly without extraction. The result obtained is identical with the result of GC/FID experiment. Compared with the GC methods used currently, this method has its detecting time less than 1 min, and the cost of instruments and operation is quite low. If the established method are combined with other methods, powerful tools might be obtained to study the biodegradation and the fate of PAHs in laboratory or in field.

**Key words:** synchronous fluorometry; PAHs; pyrene; biodegradation

多环芳烃(PAHs)的生物降解是目前环境科学研究中的热点之一<sup>[1-4]</sup>,其中建立新的研究方法倍受关注<sup>[5]</sup>.芘作为 PAHs 的典型代表,常被作为监测 PAHs 污染的指示物和其他 PAHs 光化学降解、生物降解的模型分子<sup>[3]</sup>.另外,芘具有较高的荧光量子产率,荧光测定法灵敏度高.使用同步荧光法则可以进一步改善同时测定多种 PAHs 的选择性<sup>[6,7]</sup>.因此如能证实生物降解所需的介质环境不影响荧光信号的测定,则研究体系中的芘无需分离、富集,可直接利用特异性参数法测定其降解速率<sup>[5]</sup>.作者采用同步荧光法考察了 3

种降解菌株对无机培养基 MSM 水溶液中溶解态芘的生物降解.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

无机培养液 MSM [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1000mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 800mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

收稿日期: 2001-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29977016); 教育部重点资助项目(99180); 韩国 KISTP 项目

\* 通讯联系人

200mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100mg,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5mg,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1mg, 均为 AR 级, 溶于 1000mL 水中], MM2 培养液 [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.38g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g, 1.0mol/L 的磷酸盐缓冲液 10mL, 均为 AR 级, 溶于 990mL 灭菌后的陈化海水中]和 MM2 固体培养基(加 16g 琼脂粉于 1000mL MM2 溶液中)在 120 下灭菌 15min 后备用. MSM 水溶液用于降解实验, MM2 培养液及 MM2 固体培养基用于菌株的扩种分离纯化. 所有实验用水为 Milli-Q 超纯水.

降解菌 Py11, Py16, Py20(尚未鉴别)来源于受多环芳烃污染较重的海域沉积物中, 经多次分离提纯培养获得, 使用前经活化培养.

称取适量芘(Aldrich, 纯度 >99%)溶于丙酮, 配制成标准溶液. 工作溶液采用逐级稀释法配制而得.

## 1.2 仪器

实验中所有光谱测定在 LS-50B(美国 Perkin-Elmer 公司)荧光光谱仪上完成. 其激发、发射狭缝均为 2.5nm, 扫描速度为 240nm/min, 1cm 标准样品池. HP5890 SeriesII GC/FID(美国 Hewlett Packard 公司), Supelco SPB<sup>TM</sup>-1 色谱柱 (15m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu$ m), 柱温 150 保持 15min, HP6890 自动进样器 1 $\mu$ L 无分流进样, 进样器和检测器温度 300 , 用于萃取法测定 3 种降解菌株对芘的降解能力.

## 2 实验方法

### 2.1 扩种和分离降解菌

降解菌在含有 1000mg/L 菲、葱、荧葱、芘和苯并[a]芘的 10mL MM2 培养液中扩种. 将 1cm<sup>3</sup> 的污染沉积物接种到含有上述 PAHs 混合溶液的 MM2 培养液中, 放入摇床培养箱中 25 下培养 2 周. 移取 1.0mL 上述溶液于新的培养液中继续扩种, 此操作连续重复 3 次, 然后经适当稀释得到适当密度的降解菌. 将 100 $\mu$ L 稀释后的样品接种到固体 MM2 介质上. 将含有 10g/L 芘的乙

醚溶液喷洒到此固体基质, 然后培养 1 个月. 待培养基上出现清晰的细菌群落时, 分离得到芘的降解菌. 用种菌划线法将上述降解菌移入新的固体培养基上, 重复数次分别得到上述 3 种菌株 Py11, Py16 和 Py20. 实验前取适量菌苔, 加入 100mL 灭菌后的 MSM 溶液中. 26 下摇床避光培养 24h, 得到扩种后菌液.

### 2.2 不同菌株降解芘能力的 GC/FID 测定

各取 1.0mL 上述 3 种菌液, 接种到含有 100mg/L 芘的 20mL MSM 溶液中, 摇床培养箱中 25 , 120~125r/min 和 pH=7.0 的条件下培养 3 周. 芘的残留经氯仿和甲醇混合液(V/V=20: 10mL) 萃取后加入 100mg/L 的菲作为内标. GC/FID 测定结果表明, 3 种降解菌株对芘的降解能力依次为: Py20>Py16>Py11.

### 2.3 测定方法

移取已知量的芘丙酮溶液于一系列 100mL 培养瓶中, 吹高纯氮气流除去丙酮, 加入 45mL MSM 溶液, 120 下灭菌 15min 后暗处静置过夜. 分别接种上述 3 种降解菌后 25 下摇床培养箱中(120~125r/min)培养. 实验中溶解态芘的浓度变化由同步荧光法检测, 标准工作曲线法定量. 在 0~28.1ng/L 的范围内, 方法的线性回归方程:  $y = 59x$  ( $r=0.9943$ ); 检测限 0.19ng/mL; 相对标准偏差小于 1.3% ( $n=9$ ).

## 3 结果与讨论

在生物降解治理污染环境的过程中, 被研究的有机污染物尽管在水相中的溶解度很低, 但大部分已知的降解菌是通过降解溶解态的污染物来实现污染物的生物去除的. 因此如果能模拟此条件, 并直接检测被降解对象浓度的变化情况, 有着重要的实际意义.

### 3.1 芘的水溶液的荧光光谱和同步荧光光谱

图 1 为芘在水溶液中的激发光谱、发射光谱和同步荧光光谱. 由图 1 可知, 其最大的激发、发射波长分别为 333.5 和 373.7nm; 若  $\Delta\lambda=40\text{nm}$ , 其同步荧光峰的波长为 333.5nm. 很显然, 如同步

荧光法,测定的选择性将大为改善.另外,因降解实验是在 MSM 溶液中进行的,因此考察 MSM 溶液有无背景干扰十分必要.

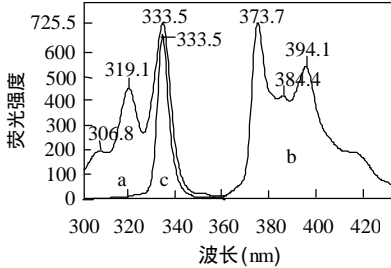


图 1 芘在水溶液中的激发光谱、发射光谱和同步荧光光谱

Fig.1 Excitation, emission and synchronous spectra of pyrene in water

a.激发光谱 b.发射光谱 c.同步荧光光谱

### 3.2 芘在 MSM 溶液中的荧光光谱和同步荧光光谱

按上述实验方法,用 MSM 代替水,配制芘的 MSM 溶液.然后分别测定芘的 MSM 溶液的激发光谱、发射光谱和同步光谱(图 2).与图 1 相比,MSM 对芘的荧光有一定的淬灭作用,但不影响用同步荧光法测定降解过程中芘浓度的变化.

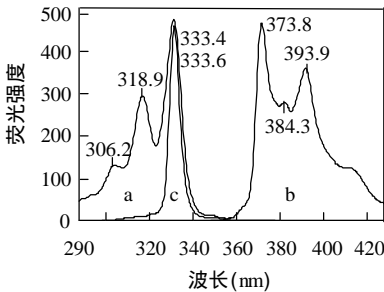


图 2 芘在 MSM 溶液中的激发光谱、发射光谱和同步荧光光谱

Fig.2 Excitation, emission and synchronous spectra of pyrene in MSM

a.激发光谱 b.发射光谱 c.同步荧光光谱

### 3.3 条件实验

在所研究体系接种 3 种降解菌后,记录芘的

激发、发射光谱和同步荧光光谱并与图 2 相比较.其结果与没有接种降解菌前没有明显区别.这表明所用 3 种降解菌株无背景干扰.

降解实验前,为检查接种、培养过程是否有不利于降解实验的因素被引入所研究体系,通过直接测定没有接种 3 种菌种时所研究体系中芘浓度的变化及所研究体系 A<sub>600</sub> 值的变化,进行控制实验.结果表明,除降解菌外,没有其他细菌进入实验系统中.

### 3.4 降解实验

根据被测物浓度与其荧光信号强度间的相互关系,测得芘在 MSM 溶液中表观溶解度为 28.1ng/mL.降解实验中为保证所用芘均为溶解态及方便操作,所有实验用芘的初始浓度均为 25.3ng/mL.试验过程中,芘浓度的变化以其相对荧光强度的变化表示,结果见图 3.

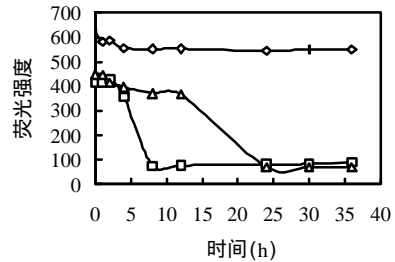


图 3 MSM 溶液中芘被 Py11、Py16 和 Py20 生物降解的曲线

Fig.3 Biodegradation curves of pyrene by Py11, Py16 and Py20 in MSM solution

— — Py11 — — Py16 — — Py20

图 3 表明 3 种降解菌株可分为 3 类:Py20 在接种到实验体系后能迅速适应所在的环境并开始降解体系中的芘,并在 8h 左右完成降解; Py16 在前 12h 其降解芘的速率很小,但当其适应生长环境后,其对芘的降解速率迅速增加; Py11 在实验周期内表现出非常弱的降解能力.根据降解体系中芘的初始浓度和其残留的比值,测得它们的降解能力顺序如下:Py20>Py16>Py11.与 GC/FID 的实验结果一致.但与 GC 法相比,本方法直接测定的是降解液中芘的浓度,只需要将降解液转入

荧光液池即可,每个样品每次检测的时间小于 1min,操作简便、省时省力,仪器及运行成本很低,同时因无需萃取,该方法可更直观、更准确地反映生物降解过程。

#### 4 结语

采用同步荧光法研究矿物盐介质中溶解态芘的生物降解速率是可行的。3 种不同降解菌株对溶解态芘的降解能力的实验结果很好地显示了它们之间降解能力以及降解过程的差别,所得结果与 GC/FID 的结果一致。在不经萃取的情况下直接用于溶解态芘的降解速率、过程的检测是该方法最大的特点。与现行的 GC 法相比,该方法简单、快速、易于操作,每个样品每次检测的时间小于 1min,仪器及运行成本很低。同时因无需萃取,该方法可更直观、更准确地反映生物降解过程。如果该方法能与现行的有关方法相结合,将为在实验室研究 PAHs 的生物降解机理或现场研究 PAHs 的生物降解及 PAHs 在环境中的迁移、转化提供有力的研究手段。

#### 参考文献:

[1] Ramirez N, Cutright T, Ju L K. Pyrene biodegradation in aqueous

solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium [J]. *Chemosphere*, 2001,44(5): 1079-1086.

- [2] Roper J C, Pfaender F K. Pyrene and chrysene fate in surface soil and sand microcosms [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001,20(2): 223-230.
- [3] 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.
- [4] Ravelet C, Krivobok S, Sage L, *et al.* Biodegradation of pyrene by sediment fungi [J]. *Chemosphere*, 2000, 40(5):557-563.
- [5] Jin Zhi-Gang, Zhang Tong, Zhu Hua-i-Lian. Biodegradation of pollutants [M]. Shanghai: East China Univ. of Sci. & Technol. Press, 1997. 34.
- [6] Zhang Y, Zhu Y X, Xue X Z, *et al.* Magnetic field effects-polarization-resonant synchronous fluorescence spectrometry for simultaneous analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in mixture [J]. *Talanta*, 1995, 42: 1811-1815.
- [7] Eiroa A, Blanco E V, Lopez P, *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in a complex mixture by second-derivative constant-energy synchronous spectrofluimetry [J]. *Talanta*, 2000, 51: 677-684.

作者简介:张勇(1962-),男,河北南宫人,博士,厦门大学环境科学研究中心教授,主要研究方向为有机污染物的迁移转化,分子发光分析法在环境化学研究中的应用以及环境分析新方法新技术的开发应用研究。发表论文 65 篇。

## 肺癌与长期暴露于细颗粒物有关联

加拿大和美国科学家发现长期暴露于细颗粒物与肺癌间有统计意义上的关联。这一发现提供最有力的证据将肺癌和都市中的空气污染相联系。

这项研究之所以重要是因为调查人群多达 50 万人,追踪的时间长达 16 年之久,分析的数据包括气态污染物数据和 PM<sub>2.5</sub> 信息。它比以前研究创新之处是控制职业暴露信息、纳入食物变数(考虑脂肪、蔬菜、水果和纤维素摄入),并使用改进的统计模式技术。

研究人员分析发现细颗粒物每增加 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ,肺癌死亡率增加 8%。研究结果表明,长期暴露于燃烧(如来自燃煤电厂和机动车辆)产生的细颗粒,是心肺疾病和肺癌死亡率增加的一个重要的环境因素。

虽然不能排除其他未知因素的影响,研究人员指出即使考虑了吸烟、BMI(体重指数)、食物、职业暴露和地域因素等后仍然发现肺癌死亡率和细颗粒物有关。

江英 摘自《Environmental Science & Technology》, May 1,187A(2002)