

Research on the Effect of Carbon Source on Degradation of Triclocarban by *Sphingosphingomonas*

Hongyan Li Jiahuan Wu Peixian Wu Yuxing Zeng Guochen Zhu

Yangjiang Vocational and Technical College, Yangjiang, Guangdong, 529566, China

Abstract

Based on the study on the application conditions of carbon source on the degradation of triclocarban (TCC) by *Sphingosphingomonas sphingosphingomonas*, this paper discusses the effect of carbon source on the degradation of TCC by *Sphingosphingomonas* under different concentrations of TCC and culture time was discussed. The results showed that the degradation rate of TCC was 97.07% when the carbon source concentration decreased at 8g/L and the culture time was 48h. With the increase of carbon source concentration, the metabolic activity of *sphingosphingomonas* increased and the degradation effect was also enhanced. When TCC pollutants exceeded 0.25 μ g/mL, the degradation effect of the bacteria on TCC decreased, which may be because the high concentration of pollutants inhibits the activity of the bacteria and leads to the increase of the mortality rate of the bacteria.

Keywords

carbon source; *sphingosphingomonas*; chemical class card

碳源对鞘氨醇单胞菌降解三氯卡班的影响研究

李红燕 吴佳欢 吴培鲜 曾煜星 朱国彬

阳江职业技术学院, 中国·广东 阳江 529566

摘 要

论文基于碳源对鞘氨醇单胞菌对降解三氯卡班(TCC)的影响应用条件研究,探讨碳源在不同的TCC浓度及培养时间下,对鞘氨醇单胞菌降解TCC的效果影响。研究发现,鞘氨醇单胞菌在8g/L碳源浓度下降解TCC,培养时间为48h,降解率为97.07%,随着碳源浓度增加,鞘氨醇单胞菌的代谢活性也增强,降解效果亦增强;TCC污染物超过0.25 μ g/mL,菌体对TCC降解效果下降,可能是污染物浓度过高抑制了菌体的活性,导致菌体死亡率升高。

关键词

碳源; 鞘氨醇单胞菌; 三氯卡班

1 引言

三氯卡班(TCC)是一种常用的杀菌剂,在200多种日化用品中添加,如香皂、沐浴露、洗面奶、洗衣粉、美容化妆品、牙膏、医用消毒剂等。TCC最初在其他国家广泛使用,在美国年消耗量高达50~100万磅,随着国际化妆品等大量进入中国市场,中国对TCC的需求与使用量也急剧增大,进入生态环境中的TCC的量也更多,污染面积也更广^[1,2]。

中科院广州地球化学研究所应光国研究员等研究表明城市生活污水排放是TCC的主要来源^[3],根据城镇化进程和城市生活污水排放量,2020年底城市生活污水排放量估

算达到718亿吨。而环境中的TCC主要通过生活污水进入环境水体,由于TCC具有一定的环境稳定性,即使经过污水处理过程,也很难将其彻底消除,通过对传统污水处理厂的TCC去除效果研究表明,污水中21%的TCC被降解,仍有76%被吸附在污泥中,3%保留在出水中,如果将产生的活性污泥以土地生物改良等方式重新使用,污泥中大量存在的TCC又会释放进入环境中,这样TCC就能够在环境中不断积累,且可通过食物链积累到达人体。然而,生物体内的TCC浓度远大于环境中,TCC还可通过水体迁移作用,使它的影响遍及到世界各个角落。研究发现TCC在黄河、青岛胶州湾、济南大明湖和香港维多利亚湾等多地水样中都能检测到浓度在20~600ng/L之间,说明TCC已经造成了中国大部分水体的污染^[4]。中国科学院广州地球化学研究所李林朋等研究表明TCC能引起人体肝细胞的DNA损伤,并呈现显著的剂量-效应关系和时间效应关系^[5]。安徽医科大学公共卫生学院周艳君等研究表明TCC可干扰内分泌作用、

【基金项目】广东省“攀登计划”项目(项目编号:pdjh2020b1312)。

【作者简介】李红燕(1980-),女,中国广东阳江人,本科,副教授,从事环境生物蛋白质组学、代谢组学研究。

不良结局妊娠及遗传毒性等^[6]。虽然 TCC 在环境中的浓度不是很大,但它是一个重大的公共卫生问题;因此不能忽视它引起的危害,所以降解环境中的 TCC 就显得尤为重要。

目前国际上关于 TCC 的生物去除方式研究较少,在已研究的 TCC 的去除方式要么是没有真正降解 TCC,要么是存在操作复杂、成本较高的问题^[7]。因此,迫切需要建立一种简洁方便去除 TCC 的方法,因此研究碳源对鞘氨醇单胞菌降解三氯卡班的影响具有重要意义。

2 实验方法

2.1 实验设备

全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅(YXQ-LS-S II,上海博讯实业有限公司);自动双重纯水整流器(BSZ-2型,上海博通);电热恒温鼓风干燥器(101-2-S,上海恒宇仪器公司);隔水式电热恒温培养箱(PXY-DHS-40×50,上海跃进医疗器械厂);台式恒温振荡培养箱(THZ-82A,上海跃进医疗器械厂);电子天平(FA1104,上海精密科学仪器有限公司);高速冷冻离心机(KDL-160HR,合肥科大创新科技股份有限公司中佳分公司);医用超声波清洗器(KQ-250E,昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发器(RE-2000,上海亚荣生化仪器厂);液相色谱仪(HPLC,日本岛津 & 安捷伦)。

2.2 实验试剂

本次实验试剂见表1。

表1 主要实验试剂

序号	试剂名称	规格	生产厂家
1	蛋白胨	AR	广州化学试剂厂
2	葡萄糖	AR	广州化学试剂厂
3	牛肉浸膏	AR	广州化学试剂厂
4	营养琼脂	AR	广州化学试剂厂
5	NaCl	AR	广州化学试剂厂
6	CaCl	AR	广州化学试剂厂
7	NH ₄ Cl	AR	广州化学试剂厂
8	KH ₂ PO ₄	AR	广州化学试剂厂
9	MgSO ₄ ·7H ₂ O	AR	广州化学试剂厂
10	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	AR	广州化学试剂厂
11	甲醇	AR	广州化学试剂厂
12	甲酸	AR	广州化学试剂厂
13	乙腈	AR	广州化学试剂厂
14	二氯甲烷	AR	广州化学试剂厂

2.3 鞘氨醇单胞菌扩大培养

将鞘氨醇单胞菌从斜面培养基接种于牛肉膏营养培养基中,在30℃、130r/min的摇床中活化24h,再转接于牛肉膏营养培养基扩大培养至对数生长期(12h左右),将培养好的菌液在6000r/min离心10min,离心3次后收集菌体,每次离心均用已灭菌的超纯水清洗菌体,并制备10g/L菌悬液。

2.4 鞘氨醇单胞菌降解 TCC 的条件

碳源(葡萄糖)(g/L):0、0.5、1、2、4、8、10。

在灭菌后葡萄糖浓度(g/L)分别为0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10.0的M9培养基中加入5μL的1g/L污染物和1mL的10g/L菌悬液,使得体系的总体积为10mL、污染物浓度0.5μg/mL、菌体浓度为1g/L。

将体系在30℃、130r/min的摇床中振荡培养(h):0、6、12、24、48、72。取样,每个样品设3个平行。

2.5 TCC 萃取方法

在灭菌后的M9培养基中加入污染物和菌悬液,分别用10mL等体积的二氯甲烷进行超声辅助萃取2次,每次萃取30min,将每次萃取后的有机相(采用移液枪吸取),合并2次所得有机相转移至鸡心瓶中,在恒温(25℃~35℃)水浴下进行旋转蒸发,将有机相蒸干,最后用2mL色谱级甲醇将样品从鸡心瓶中洗出,取1mL样品装入进样瓶中上机检测。按样品的处理步骤得到的结果与理论值的比值即为回收率,可得:

回收率(%)=萃取后检测值/萃取前样品值×100%

2.6 TCC 检测方法

样品均通过HPLC(日本岛津)测量、分析^[8]。样品进样量为10μL,流动相A相为加了0.1%甲酸的超纯水,流动B相为纯乙腈,洗针溶液为50%的甲醇水溶液,梯度洗脱的时间具体见表2。其中,TCC检测的质谱运行参数见表3。

值得一提的是,流动相B的比例0.5min 45%,0.5~2.5min均匀升高至100%,保持至4.5min,4.5~4.6min均匀下降至45%,4.6~8min保持45%,8min泵停止,分析结束。

表2 高效液相质谱的洗脱时间

Serial number	Time(min)	Module	Events	Parameter(%)
1	0.5	Pumps	Pump B Conc.	45
2	2.5	Pumps	Pump B Conc.	100
3	4.5	Pumps	Pump B Conc.	100
4	4.6	Pumps	Pump B Conc.	45
5	8.0	Controller	Stop	

表 3 TCC 检测的质谱运行参数

Parameters	TripleQuad 5500
CUR	20
CAD	7
TEM	450
GS1	30
GS2	30
IS	-4500
EP	-10
CXP	-16
DP	-90
CE	-85

3 结果分析

3.1 碳源浓度及时间对菌株降解 TCC 的影响

以葡萄糖作为碳源,研究鞘氨醇单胞菌降解 TCC 过程影响,在不同碳源浓度以及降解体系中菌体的不同培养时间, TCC 的检测浓度如图 1 所示。在各不同碳源浓度中,菌株培养 0h 时, TCC 检出浓度最高,碳源浓度为 8g/L 时 TCC 检出浓度高达 0.382 $\mu\text{g/mL}$,降解率仅为 23.6%,可能鞘氨醇单胞菌在开始阶段菌体代谢活性较低,培养时间短,菌体数量较少,导致了 TCC 降解效果差;在同一培养时间条件下,随着碳源浓度增加, TCC 检出浓度呈现出先下降后上升的趋势。当葡萄糖浓度在 2g/L、4g/L 和 8g/L 下培养 48h 后,此时 TCC 检出浓度仅为 0.026 $\mu\text{g/mL}$ 、0.027 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.015 $\mu\text{g/mL}$,降解率分别为 94.73%、94.67% 和 97.07%,在适当浓度范围内,鞘氨醇单胞菌的代谢活性随着碳源浓度的增加而增强,降解效果亦增强。表明菌体代谢活性在葡萄糖浓度为 8g/L 中降解 48h 时最强。而当碳源浓度达到 10g/L 时, TCC 检出浓度又升到了 0.048 $\mu\text{g/mL}$,降解率下降为 90.33%。可能菌体在逐渐进入衰亡期,细胞数量减少,代谢活性降低,从而降解 TCC 的效果也降低,导致 TCC 检出浓度增高。

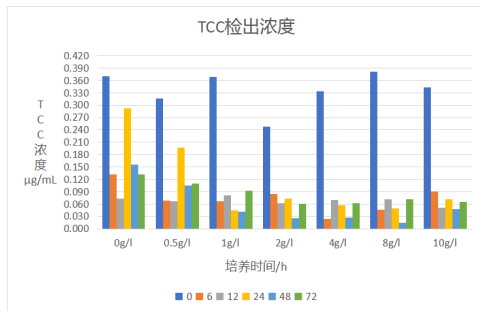


图 1 TCC 在不同碳源浓度及时间中的检出浓度

如图 2 所示,在同一培养时间,不同碳源浓度条件下,降解体系里鞘氨醇单胞菌对 TCC 降解率基本是先升后降,以培养 48h、碳源浓度为 8g/L 为最佳,降解率为 97.07%,可能是菌体在 48h 处于培养体系的稳定期,代谢活性高、各种生理生化条件稳定、菌体数量达到峰值所以导致降解效果好,以培养 0h 为最低,可能是菌体在 0h 处于培养体系的适

应期,代谢活性低、菌体数量少导致降解效果差。

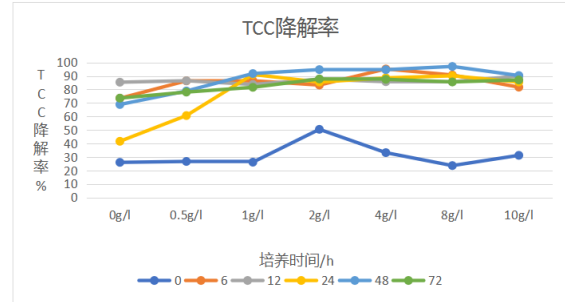


图 2 TCC 在不同碳源浓度及时间的降解率

3.2 TCC 浓度对菌株降解 TCC 性能影响

研究发现, TCC 浓度对菌株降解 TCC 性能影响有所影响。在鞘氨醇单胞菌降解 TCC 体系中,随着 TCC 的浓度增加, TCC 的检出浓度亦增加,如图 3 所示。

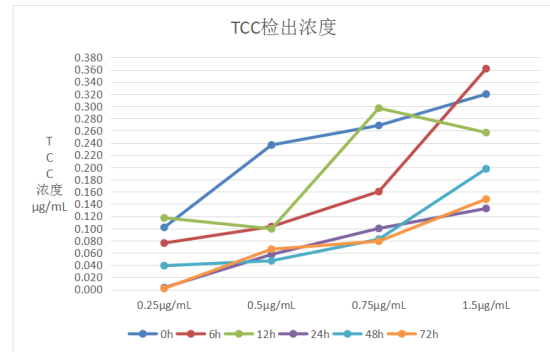


图 3 TCC 在不同 TCC 浓度及时间中的检出浓度

TCC 在不同 TCC 浓度及时间中的检出率,如图 4 所示,在不同的培养时间, TCC 浓度为 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 时,菌体对 TCC 的降解率最低; TCC 浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$,培养 24h 和 72h 后,此时的 TCC 检出浓度仅为 0.03 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.02 $\mu\text{g/mL}$,降解率高达 99% 以上。可能是 TCC 浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,对菌体代谢活性影响不大,损伤程度还未超过菌体细胞的自身修复速率。但当 TCC 浓度随着增大,除却培养 12h 中 TCC 检出浓度有明显的上下波动外,其余均呈现出上升的趋势,说明 TCC 浓度越高,反而让菌体降解 TCC 的效果越差,这可能是 TCC 浓度过高抑制了菌体的活性,导致菌体死亡率升高。

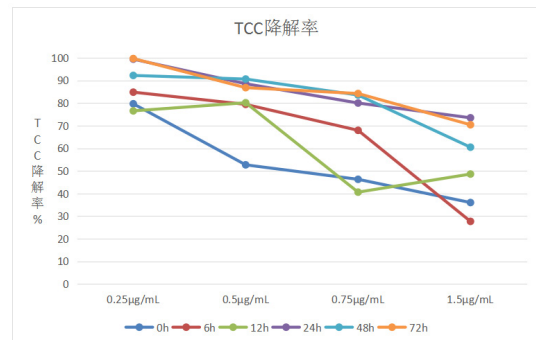


图 4 TCC 在不同 TCC 浓度及时间中的检出率

4 结语

通过研究碳源对鞘氨醇单胞菌降解 TCC 的影响,发现鞘氨醇单胞菌降解 TCC 的最佳条件为葡萄糖浓度 8g/L, TCC 浓度为 0.25μg/mL、菌体浓度为 1g/L 和培养时间为 48h, 鞘氨醇单胞菌对 TCC 的降解率最高。

参考文献

- [1] 纪春,张丽珍,牛伟,等.三氯卡班研究现状与展望[J].山西农业科学,2010,38(10):82-87.
- [2] 陈樛彬,何显扬,朱绮莹,等.三氯卡班的毒性及其生物降解研究现状[J].河南化工,2021,38(8):7-11.
- [3] 许秋瑾,应光国,夏青,等.洗涤剂对水环境的风险及防控对策建议[J].环境工程技术学报,2019,9(6):775-780.
- [4] 易春良.三氯卡班在水生生态系统中的迁移与分布研究[D].济南:济南大学,2013.
- [5] 李林朋,马慧敏,胡俊杰,等.三氯生和三氯卡班对人体肝细胞 DNA 损伤的研究[J].生态环境学报,2010,19(12):2897-2901.
- [6] 张梦妍.抗菌活性成分在不同基质中检测方法的建立及其毒性研究[D].石家庄:河北医科大学,2021.
- [7] 董满园.三氯卡班毒性效应的代谢分子机制研究[D].武汉:中国科学院大学(中国科学院武汉物理与数学研究所),2020.
- [8] 范晨丽,李彦超,申二永.超高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中三氯生和三氯卡班[J].食品与药品,2021,23(3):224-228.