

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第11期

Vol.33 No.11

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

京津冀与长三角区域大气 NO ₂ 污染特征	王英, 李令军, 刘阳 (3685)
2008~2011 年夏季京津冀区域背景大气污染变化分析	杨俊益, 辛金元, 吉东生, 朱彬 (3693)
沧州市大气污染特征观测研究	王永宏, 胡波, 王跃思, 刘伟, 张武 (3705)
华北工业城市降水中金属元素污染特征及来源	李月梅, 潘月鹏, 王跃思, 王英锋, 李杏茹 (3712)
广州市交通主干道空气中苯系物的测量	叶丛雷, 谢品华, 秦敏, 凌六一, 郑尼娜, 刘文彬, 黄祖照 (3718)
基于实时交通信息的道路机动车动态排放清单模拟研究	黄成, 刘娟, 陈长虹, 张健, 刘登国, 朱景瑜, 黄伟明, 巢渊 (3725)
柴油轿车燃用煤基 F-T 合成油的排放特性	胡志远, 程亮, 谭丕强, 楼狄明 (3733)
九龙江口滨海湿地生源要素空间分布特征	余小青, 杨军, 刘乐冕, 田原, 余正, 王昌付 (3739)
南四湖水体氮、磷营养盐时空分布特征及营养状态评价	舒凤月, 刘玉配, 赵颖, 吴艳鹏, 李爱华 (3748)
天目湖流域湿地对氮磷输出影响研究	李兆富, 刘红玉, 李恒鹏 (3753)
北京市新建城区不透水地表径流 N、P 输出形态特征研究	李立青, 吕书丛, 朱仁肖, 刘泽权, 单保庆 (3760)
云阳宗海库的分布与来源	张玉玺, 向小平, 张英, 陈玺, 刘景涛, 王金翠, 张媛静, 孙继朝 (3768)
南方某城市地表水体中粪源性污染指示微生物的分布特征研究	孙傅, 沙婧, 刘彦华 (3778)
三峡库区大宁河藻细胞昼夜垂直迁移研究	张永生, 郑丙辉, 姜霞, 郑浩, 钟娜, 陈春宵 (3787)
江淮农村生态型排水系统构建及截污作用研究	单保庆, 李楠, 唐文忠 (3797)
人工湿地植物床-沟壕系统水质净化效果	汪仲琼, 张荣斌, 陈庆华, 魏宏斌, 王为东 (3804)
潜流人工湿地演变对废水中有机物、氮及磷去除的影响	魏泽军, 谢建平, 黄玉明 (3812)
人工湿地处理含盐生活污水的特性研究	高峰, 杨朝晖, 李晨, 金卫红, 邓一兵 (3820)
催化湿式氧化法降解水中的 β -萘酚	刘杰, 于超英, 赵培庆, 陈革新 (3826)
ZVI/EDDS/Air 体系降解水中 2,4-二氯酚的研究	孙倩, 周海燕, 曹梦华, 吴琳娜, 王琳玲, 陈静, 陆晓华 (3833)
微波改性 MWNTs/TiO ₂ 复合材料对 1,2,3-三氯苯的光催化降解研究	施周, 张茜, 张伟, 徐舜开, 张骅 (3840)
腐殖酸对生物炭去除水中 Cr(VI) 的影响机制研究	丁文川, 田秀美, 王定勇, 曾晓岚, 徐茜, 陈健康, 艾小雨 (3847)
臭氧氧化-活性污泥法处理含 PVA 工业废水的试验研究	邢晓琼, 黄程兰, 刘敏, 陈滢 (3854)
复合底物对颗粒化 EBPR 系统除磷特性的影响及优化试验研究	徐少娟, 孙培德, 郑雄柳, 董毅 (3859)
进水比例对水解反应器出水水质的影响研究	梁康强, 熊娅, 戚茂荣, 林秀军, 朱民, 宋英豪 (3868)
厌氧-好氧联合型生物反应器填埋场渗滤液水质水量变化规律的研究	韩智勇, 刘丹, 李启彬, 陈馨 (3873)
我国城市污水处理回用调查研究	郭宇杰, 王学超, 周振民 (3881)
快雌醇和壬基酚在土壤中的吸附-解吸特征	姜鲁, 王继华, 李建忠, 辛佳, 李森, 刘翔 (3885)
黄土丘陵区刺槐林深层土壤有机碳矿化特征初探	马昕昕, 许明祥, 杨凯 (3893)
半干旱黄土丘陵区土壤结皮的地表水文效应	卫伟, 温智, 陈利顶, 陈瑾, 吴东平 (3901)
广西大石围巨型漏斗土壤中多环芳烃与环境因素	孔祥胜, 祁士华, 蒋忠诚, 黄保健 (3905)
酸性条件下黄铁矿氧化机制的研究	王楠, 易筱筠, 党志, 刘云 (3916)
淋洗条件下砂土和粉土盐运移过程的监测研究	付腾飞, 贾永刚, 郭磊, 刘晓磊 (3922)
空气注射修复苯污染地下水模拟研究	樊艳玲, 姜林, 张丹, 钟茂生, 贾晓洋 (3927)
不同终点检测 5 种双酚 A 类化合物对 MCF-7 的细胞毒性	张帅帅, 刘堰, 刘树深, 朱祥伟 (3935)
上海世博园后滩湿地糙足类群落特征及其对环境因子的响应	陈立婧, 吴艳芳, 景钰湘, 王聪, 张饮江 (3941)
耐盐石油烃降解菌的筛选鉴定及其特性研究	吴涛, 谢文军, 依艳丽, 李小彬, 王君, 胡相明 (3949)
高效降酚菌株 <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究	陈晓华, 魏刚, 刘思远, 孙江曼, 王芳芳, 李昊源, 刘宇军 (3956)
四溴双酚 A 好氧降解菌的筛选及其降解特性研究	钱艳园, 刘莉莉, 于晓娟, 丁丛, 王志平, 施玉衡, 李晨君 (3962)
长期施用有机和无机肥对黑土 <i>nirS</i> 型反硝化菌种群结构和丰度的影响	尹昌, 范分良, 李兆君, 宋阿琳, 朱平, 彭畅, 梁永超 (3967)
三氯乙烯在不同土壤中的吸附特性及其影响因素研究	何龙, 邱兆富, 吕树光, 逯志昌, 王治立, 隋倩, 林匡飞, 刘勇弟 (3976)
多菌灵在农田土壤中的降解及其影响因素研究	肖文丹, 杨肖娥, 李廷强 (3983)
硫化物对垃圾焚烧污泥焚烧飞灰高温过程中重金属挥发的影响	刘敬勇, 孙永裕 (3990)
关于医疗垃圾飞灰中二噁英在惰性气氛下的低温热脱附研究	纪莎莎, 李晓东, 徐旭, 陈彤 (3999)
第七届环境模拟与污染控制学术研讨会论文	
稻田气溶胶 NH ₃ 和气体 NO _x 排放在线测定研究	龚巍巍, 栾胜基 (4006)
一种可同时检测挥发性氯代烷烃和氯代烯烃的电子鼻的研制	文晓刚, 刘锐, 蔡强, 万梅, 汤灵容, 陈吕军 (4012)
基于被动采样技术的垃圾焚烧厂及周边大气中 PAHs 分布研究	孙少艾, 李洋, 周轶, 王海蛟, 孙英 (4018)
涪江流域农业非点源污染空间分布及污染源识别	丁晓雯, 沈珍瑶 (4025)
人工湿地不同区域基质磷含量的差异分析	曹雪莹, 种云霄, 余光伟, 仲海涛 (4033)
基于 RT-qPCR 选择性检测水中活性病原菌	林怡雯, 李丹, 吴舒旭, 何苗, 杨天 (4040)
消毒副产物生成的温度影响和动力学模型	张小璐, 杨宏伟, 王小仵, 付静, 解跃峰 (4046)
一种厌氧微观定量研究新方法	张仲良, 吴静, 蒋剑凯, 姜洁, 李怀志 (4052)
梧桐树叶作为反硝化碳源的研究	熊剑锋, 徐华, 阎宁, 张永明 (4057)
降解嗜盐菌 AD-3 的筛选、降解特性及加氧酶基因的研究	崔长征, 冯天才, 于亚琦, 董斐, 杨昕梅, 冯耀宇, 刘勇弟, 林汉平 (4062)
《环境科学》征订启事 (3711) 《环境科学》征稿简则 (3767) 信息 (3998, 4039, 4045, 4056) 专辑征稿通知 (4051)	

四溴双酚 A 好氧降解菌的筛选及其降解特性研究

钱艳园¹, 刘莉莉², 于晓娟¹, 丁丛¹, 王志平^{1*}, 施玉衡¹, 李晨君¹

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. 华东理工大学国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 上海 200237)

摘要: 为了解四溴双酚 A (TBBPA) 的微生物降解特性, 采用 TBBPA 为单一碳源的选择性培养基从苯酚降解颗粒污泥中筛选出 4 株对 TBBPA 具有良好降解性的好氧菌株, 其中菌株 H 经 16S rDNA 测序鉴定为红球菌属。正交试验得出其最优降解条件为: 温度 30℃, 摇床转速 150 r·min⁻¹, pH 6.5, 腐殖酸浓度 200 mg·L⁻¹, K⁺ 浓度 1 000 mg·L⁻¹; 此条件下 21 d 降解脱溴率达 20.75%。LC-MS 结果表明, TBBPA 好氧降解的主要产物是分子中异丙基与苯环断裂后脱溴产生的一溴苯酚。聚丙烯酰胺蛋白凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结果表明, 该菌株 H 的蛋白系列中含有一条介于 (90~117) × 10³ 间的条带, 对比同期考察的葡萄糖培养与 TBBPA 无机盐溶液培养菌, 结合粗酶液的降解实验, 该蛋白可能是受 TBBPA 激活的特异性降解酶。

关键词: 四溴双酚 A; 红球菌; 好氧降解; 降解产物; 降解酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)11-3962-05

Isolation of Aerobic Degrading Strains for TBBPA and the Properties of Biodegradation

QIAN Yan-yuan¹, LIU Li-li², YU Xiao-juan¹, DING Cong¹, WANG Zhi-ping¹, SHI Yu-heng¹, LI Chen-jun¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In order to investigate the characteristics of the microbial degradation of tetrabromobisphenol A (TBBPA), four aerobic strains were isolated from the phenol granular sludge using selective medium with TBBPA as the sole carbon source. Among them, strain H could accommodate the TBBPA culture medium and degrade TBBPA with high efficiency, which was identified as *Rhodococcus* sp. via DNA sequencing test. The optimal conditions for TBBPA degradation by strain H was pH 6.5, 30℃, 150 r·min⁻¹, the concentration of humic acid being 200 mg·L⁻¹ and the concentration of K⁺ being 1 000 mg·L⁻¹. Under the optimal conditions, the debromination rate of TBBPA reached 20.75% after 21 d. The results of LC-MS showed that the major degradation product was monobromophenol, which was formed by the removal of isopropyl from the benzene ring in TBBPA molecule. The results of protein gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed that strain H had a protein band between (90~117) × 10³ kDa, which might be the enzyme responsible for TBBPA degradation.

Key words: tetrabromobisphenol A; *Rhodococcus* sp.; aerobic degradation; degradation products; degrading enzyme

四溴双酚 A (Tetrabromobisphenol A, TBBPA) 为灰白色粉末, 分子式为 C₁₅H₁₂Br₄O₂, 结构式如图 1。其密度为 2.17 g·cm⁻³, 熔点 184℃, 沸点 316℃ (分解)。可溶于甲醇、乙醇和丙酮, 亦可溶于氢氧化钠水溶液, 但微溶于水。由于其低水溶性 (0.72 mg·L⁻¹)、高脂溶性 (lgK_{ow} = 4.5) 的特点, 极易在生物体内富集^[1]。

目前, TBBPA 是世界上使用最广泛的反应型阻

燃剂之一, 主要用于溴化环氧树脂、酚醛树脂和含溴聚碳酸酯等产品中, 年消耗量约占全球阻燃剂总用量的 1/2^[2]。尽管 TBBPA 通常被用作反应型阻燃剂, 但在生产过程中其仍有部分未能完全反应而以非聚合态大量残留在产品中, 并可能在产品的使用、废弃和处理过程中释放到环境^[1,3]。研究人员已在多种环境介质包括沉积物、水体、土壤甚至是人体血液中检测到 TBBPA^[4,5], 有关研究认为, 它是一种类似于持久性有机污染物的潜在环境内分泌干扰物, 对甲状腺具有一定的干扰作用^[6]。更重要的是,

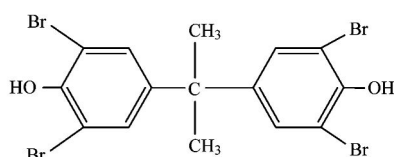


图 1 四溴双酚 A 化学结构式

Fig. 1 Structural formula of Tetrabromobisphenol A

收稿日期: 2012-01-13; 修订日期: 2012-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41001316, 51108262)

作者简介: 钱艳园 (1987~), 女, 硕士, 主要研究方向为废水生物处理技术, E-mail: qianyanyuan@sjtu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wangzply@sjtu.edu.cn

TBBPA 具有低水溶性和较强的亲脂性,易吸附于土壤颗粒物或沉积物中,在一定条件下可能被微生物还原脱溴成为具有更强毒性的污染物^[7~9],如双酚 A 等;也可能被某些好氧微生物如 *Mycobacterium* spp. 属的某些种甲基化而生成更容易被生物富集的四溴双酚 A 二甲醚^[10]。相比于 TBBPA 对环境造成的严峻污染,对 TBBPA 的微生物转化,尤其是微生物代谢产物的研究仍十分匮乏。本研究在实验室前期培养苯酚降解好氧颗粒污泥的基础上,采用选择性培养基从中分离出 TBBPA 好氧降解菌株,针对影响其降解 TBBPA 特性的因素展开了一系列研究,优化其最佳降解条件,并结合降解产物及降解蛋白酶的分析探讨了菌株降解 TBBPA 的机制及其降解酶特性,以期为 TBBPA 的微生物转化提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 菌源

供试菌源是实验室前期以活性污泥为接种体培养的苯酚降解颗粒污泥。

1.2 供试药品

实验所用四溴双酚 A 产自美国 Great Lake 公司,纯度 > 99.5%,溴质量分数 > 58%; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天,中国)。

1.3 培养基的制备

无机盐培养液(NMS medium, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NH_4NO_3 1.0, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 1.5, CaCl_2 0.01, 微量元素 $1\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其中,微量元素的组成为($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): FeSO_4 0.1, ZnSO_4 0.1, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 0.01, Na_2MoO_4 0.01, CoCl_2 0.1, CuSO_4 0.01, H_3BO_4 0.01。

加几滴浓 H_2SO_4 ,防止沉淀。使用前加入四溴双酚 A 至 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 并利用 NaOH 溶液调节培养基的 pH 为 7.0 ± 0.1 , 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min, 备用。

1.4 实验方法

1.4.1 TBBPA 降解菌的筛选分离

取实验室前期培养的苯酚降解颗粒污泥 1 mL, 经组织匀浆器粉碎后,加入 10 mL 无菌生理盐水。将菌悬液在含 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TBBPA 无机盐琼脂培养基划线分离,筛选出可耐受 TBBPA 的菌株,转接至斜面中, 4°C 保存。

1.4.2 TBBPA 降解条件的正交优化

正交试验采用定量因素来确定水平条件。其中, pH 6.5、7.5、8.5; 葡萄糖浓度 0、250、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 腐殖酸浓度 0、100、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; K^+ 浓度 0、500、1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据试验条件采用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交表,如表 1 所示。

表 1 正交试验位级

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

项目	A(pH)	B(葡萄糖/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	C(腐殖酸/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	D(钾离子/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
位级 1	A1 = 6.5	B1 = 0	C1 = 0	D1 = 0
位级 2	A2 = 7.5	B2 = 250	C2 = 100	D2 = 500
位级 3	A3 = 8.5	B3 = 500	C3 = 200	D3 = 1 000

按正交试验的设计配制培养基,高压蒸汽灭菌后,将菌 H 接入到含有 100 mL 培养基的 250 mL 三角烧瓶中,置于 30°C 恒温振荡培养箱内培养,间隔时间取样,采用离子色谱仪(瑞士万通研究级 MIC 型)测定其中溴离子浓度。

1.4.3 降解产物分析

采用液相色谱质谱联用仪(LC/MS, 岛津 LC-2020)分析 TBBPA 及其降解产物,色谱条件为:流动相甲醇:水 = 80:20,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 280 nm,柱温 30°C ; 质谱条件为:负离子扫描模式,气化温度为 350°C ,毛细管电压 3.5 kV,锥孔电压 50 V。

1.4.4 降解酶特性分析

取优化条件下培养 21 d 的降解菌株及纯培养降解菌株各 1 mL,离心后弃去上清液,以碧云天

RIPA 增强型裂解液提取细菌蛋白,在 Bio-Rad 小型垂直电泳槽中采用 8% SDS-PAGE 胶以 60 V 恒压电泳分离蛋白。

1.4.5 胞外粗酶提取及酶促降解实验

分别取 50 mL 等 D_{600} 值的葡萄糖培养菌和 TBBPA 培养菌悬液,依据聂麦茜等^[11]的方法提取胞外粗酶和胞内粗酶。将提取的粗酶分别取 5 mL 加入到 5 mL 初始浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的优化 TBBPA 培养基内,同时设置不加酶的对照样,间隔 2 d 取样以 HPLC 检测 TBBPA。

2 结果与讨论

2.1 降解菌株的筛选分离

通过将苯酚降解颗粒污泥匀浆稀释、涂布分离

后,筛选得到 4 株较能适应 TBBPA 无机盐琼脂培养基且这些微生物可能以 TBBPA 为唯一碳源及能源的菌株. 将这些菌株分别接种到含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 的无机盐培养液中,恒温 30°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3 d 后,取样测定其上清液中的溴离子浓度. 选取其中 TBBPA 降解效果最好,即溴离子浓度最高的菌株 H 进行后续实验,该菌株经 16S rDNA 测序鉴定为红球菌属(*Rhodococcus* sp.).

2.2 降解条件的优化

实验培养条件对于微生物的降解活性影响显著,本研究中,为了获得降解菌株的最优降解条件,采用正交试验对其进行优化. 正交试验结果表明,pH、葡萄糖、腐殖酸、 K^+ 等 4 个影响因素的极差分别为 0.153、0.087、0.415、0.347,由此得出各影响因素对降解菌 H 生长的重要性依次为:腐殖酸 $> \text{K}^+ > \text{pH} > \text{葡萄糖}$ (表 2).

腐殖酸作为影响菌株 H 降解 TBBPA 的最重要

因素,其促进作用随腐殖酸浓度的增加而增强. 当腐殖酸为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,体系中溴离子浓度最高为 $(1.465 \pm 0.450) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,腐殖酸为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,溴离子浓度为 $(1.340 \pm 0.300) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而当腐殖酸为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,溴离子浓度最低,仅为 $(1.225 \pm 0.350) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,可见菌株 H 降解 TBBPA 的活性随着腐殖酸浓度的增大而增强. 另外, K^+ 是影响菌株 H 降解 TBBPA 的第二重要因素,同样,其降解活性随钾离子浓度的增加而增强. 由于酸碱环境可决定微生物的代谢活性,本实验中 pH 则是影响菌株 H 降解 TBBPA 的次要因素. 随着 pH 逐渐增大,降解体系中的溴离子浓度逐渐减小,鉴于实际的河口沉积物层的有机酸环境,选择偏酸性的 6.5 为最佳. 由于葡萄糖是本实验涉及 4 个因素中影响最小的,且其加入并不能有效促进菌株 H 对 TBBPA 的降解,甚至会影响菌株 H 降解 TBBPA 功能蛋白的表达,后期实验体系中不添加葡萄糖.

表 2 正交试验结果统计

Table 2 Results of the orthogonal experiment

项目	A (pH)	B (葡萄糖/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	C (腐殖酸/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	D (钾离子/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	21 d (反应体系中 Br^- 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	6.5	0	0	0	1.225
2	7.5	250	100	500	1.340
3	8.5	500	200	1 000	1.795
4	6.5	0	100	1 000	1.620
5	7.5	250	200	0	1.400
6	8.5	500	0	500	0.880
7	6.5	0	200	500	1.465
8	7.5	250	0	1 000	1.310
9	8.5	500	100	0	1.480
1 位级结果之和	1.453	1.437	1.138	1.368	
2 位级结果之和	1.300	1.350	1.480	1.228	总和 = 12.515
3 位级结果之和	1.418	1.385	1.553	1.575	
极差 R	0.153	0.087	0.415	0.347	—

结合实际环境条件,最终确定菌株 H 降解 TBBPA 的最优条件为 pH 6.5,温度 30°C ,摇床转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,腐殖酸浓度 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, K^+ 浓度 $1 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 降解产物分析

将菌株 H 接种于优化的含 TBBPA $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养液(无机盐培养液 + 腐殖酸)中,于 30°C , $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中培养,定期采样测定其中的 Br^- 和 TBBPA 浓度,结果表明,经 21 d 培养,体系中 TBBPA 的脱溴率达 20.75%. 对比无菌空白 TBBPA 无机盐培养液与接种菌株 H 培养 21 d 后上清液的色谱图可以看出,降解前后的液相色谱峰有明显的

差异(图 2). 无菌空白体系仅在 12 min 左右出现了 1 个明显的峰,即 TBBPA 峰;而菌株 H 降解后,则在 2.8、5.9 和 11.5 min 左右出现了 3 个明显的物质峰,其中 2.8 min 为尖峰,5.9 min 为宽峰,而 11.5 min 为钝峰. 其中,2.8 min 和 5.9 min 的色谱峰是经过 TBBPA 降解后出现的,可能是 TBBPA 的降解产物;而 11.5 min 左右的峰可能是 TBBPA 本身,但由于降解液 pH 及性质变化而导致出峰时间有所提前. 根据不同浓度 TBBPA 标准品与峰面积的标准曲线计算,降解液中 TBBPA 比原无机盐培养液中 TBBPA 浓度降低了 81.60%,表明 TBBPA 被菌株 H 显著降解.

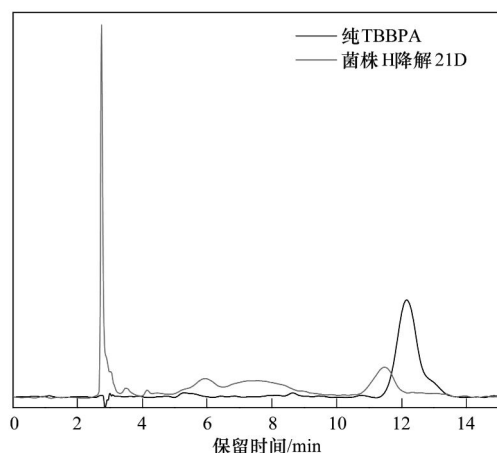


图2 TBBPA 无机盐培养液降解前后的 HPLC 色谱

Fig. 2 Chromatogram of TBBPA before and after degradation

通过对降解上清液的 LC-MS 分析(图3), 2.8 min 左右出现的物质其 m/z 为 170.75, 应为 TBBPA 分子中的异丙基与苯环断裂后, 二溴苯酚脱除一个溴的产物, 即一溴苯酚; 随该物质同时洗出的 m/z 为 304.6 的离子则可能是 TBBPA 脱去 3 个溴后的物质, 即一溴双酚 A; m/z 为 442.5 的产物可能是 TBBPA 分子中异丙基氧化为异丙二酸并脱除 2 个

溴的物质; m/z 为 308.8 的产物可能是异丙基与苯环间断裂后含异丙基的对异丙基二溴苯酚的羟基化产物, 即对异丙醇二溴苯酚; 11.5 min 左右出现的 m/z 为 542.7 的物质则应是 TBBPA 自身, 是其在负离子化作用下脱去一个质子 H 后的离子. 这一结果表明, 菌株 H 可有效的将 TBBPA 脱溴降解为小分子低溴代有机物, 因此, 存在于实际环境介质中的 TBBPA 的微生物降解过程可能会对环境产生潜在的危害.

2.4 降解酶的特性分析

SDS-PAGE 凝胶蛋白电泳结果如图4所示, 泳道4为预染蛋白质分子量标准; 泳道5是LB液态培养基培养的菌株H; 6、7号泳道是TBBPA无机盐培养液培养的菌株H及其平行样; 3号泳道是LB液态培养基培养的菌株K(与菌株H同时筛选获得的); 1、2号泳道是TBBPA无机盐培养液培养的菌株K及其平行样.

从图4中胶片上的蛋白质条带, 可以比较清楚地分辨出不同菌体产生的蛋白条带存在显著的区别; 且不同培养基条件下, 菌株所产生的蛋白条带也有所差异. 在LB培养基纯培养条件下, 菌株H

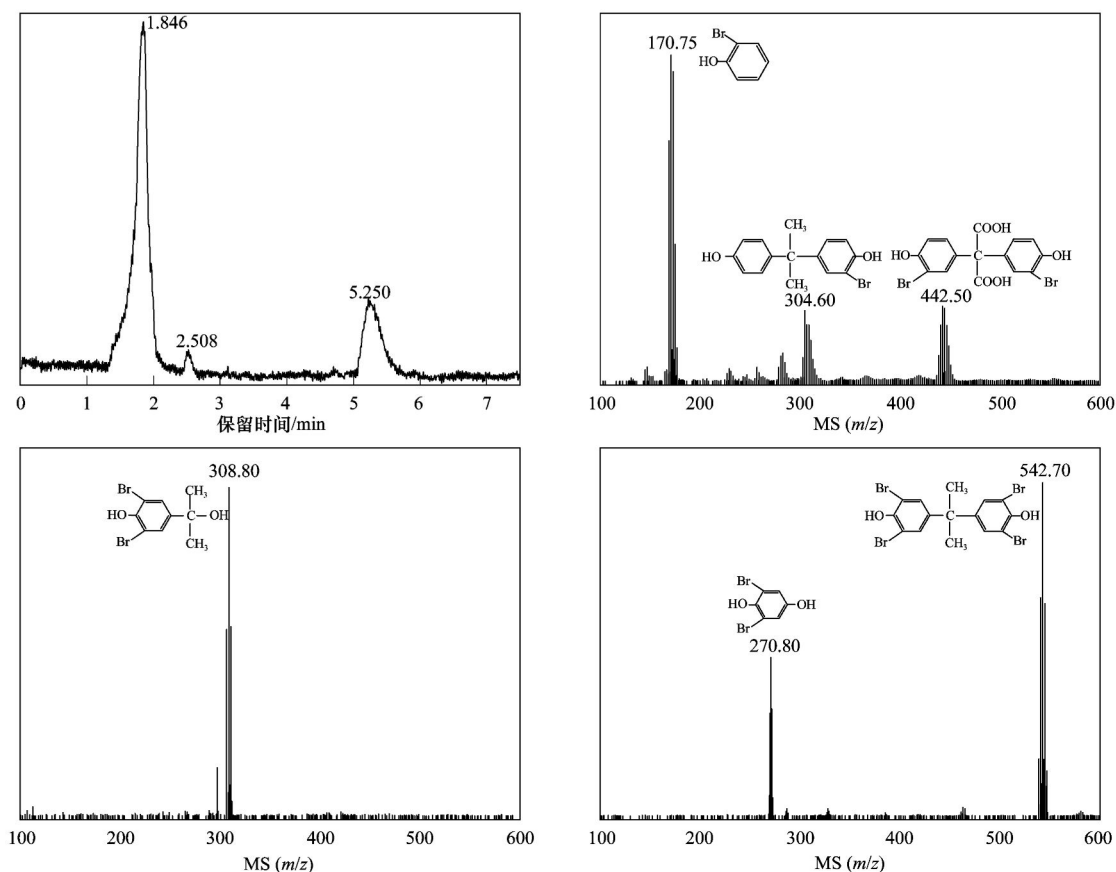


图3 TBBPA 降解产物液相色谱质谱分析

Fig. 3 MS chromatogram of the degradation products of TBBPA

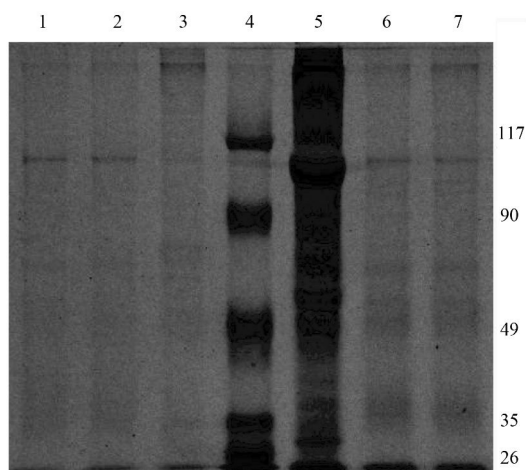


图4 TBBPA降解菌 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis results of the

TBBPA degradation bacteria

的蛋白质条带主要是相对分子质量 $> 90 \times 10^3$ 或 $< 35 \times 10^3$ 的(泳道5),同时在相对分子质量为 49×10^3 附近也有明显的蛋白条带;而在 TBBPA 无机盐培养液中培养的菌株 H,其蛋白质条带主要是相对分子质量 $< 35 \times 10^3$ 的,另外在 $(90 \sim 117) \times 10^3$ 之间仍有一条较明显的条带(泳道6和7).对比同期考察的菌株 K 可以看到,虽然采用 LB 培养基培养的 K 菌株在 $(90 \sim 117) \times 10^3$ 之间没有蛋白条带(泳道3),然而在 TBBPA 无机盐培养液中培养的菌株同样在 $(90 \sim 117) \times 10^3$ 之间出现了明显的条带(泳道1和2).这一结果表明,该蛋白可能是经 TBBPA 激活后所产生的特异性降解酶.

分别将葡萄糖培养菌和 TBBPA 培养菌的胞外酶和胞内酶粗提液加入含 $50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 的水溶液中,间隔 2 d 检测 TBBPA 浓度变化.结果表明,经两周培养,添加葡萄糖培养菌株胞内粗酶、胞外粗酶和 TBBPA 培养菌株胞内粗酶的实验样中 TBBPA 浓度几乎不变,而添加 TBBPA 培养菌株胞外粗酶的实验样中 TBBPA 浓度降低了约 4.72%.因此,该红球菌对于 TBBPA 的降解,起催化作用的很可能是 TBBPA 诱导激活的胞外酶.

3 结论

(1)采用四溴双酚 A 选择性培养基从实验室前期以活性污泥为接种体培养的苯酚降解颗粒污泥中富集分离出了 4 株四溴双酚 A 降解菌株,并从中筛选出 1 株对 TBBPA 具有良好降解性的好氧菌株 H,经 16S rDNA 测序鉴定为红球菌属.

(2)通过正交试验得出菌株 H 的最优 TBBPA 降解条件为:pH 6.5,温度 30°C ,摇床转速 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,

腐殖酸浓度 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, K^+ 浓度 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;且在此条件下,降解 21 d 的脱溴率达 20.75%.

(3)对生物降解后上清液的 HPLC 分析结果表明,经 21 d 好氧降解,TBBPA 降解率达 81.60%,相应地在色谱图上出现了极性较强的未知产物;进一步的 LC-MS 结果表明该未知降解产物主要是 TBBPA 分子异丙基与苯环断裂后脱溴产生的一溴苯酚.

(4)SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳结果表明,LB 纯培养及降解 TBBPA 的菌株 H 在蛋白电泳中均有较明显的相对分子质量介于 $(90 \sim 117) \times 10^3$ 间的蛋白条带,而同期参考的菌株 K 降解 TBBPA 后在该位置出现了一条明显区别于纯培养菌株的蛋白条带,结合粗酶液的 TBBPA 降解实验,该蛋白很可能是受 TBBPA 激活的特异性降解酶.

参考文献:

- [1] Birnbaum L S, Staskal D F. Brominated flame retardants: cause for concern[J]. *Environmental Health Perspective*, 2004, **112** (1): 9-17.
- [2] De Wit C A. An overview of brominated flame retardants in the environment[J]. *Chemosphere*, 2002, **46**(5): 583-624.
- [3] Sellström U, Jansson B. Analysis of tetrabromobisphenol A in a product and environmental samples[J]. *Chemosphere*, 1995, **31** (4): 3085-3092.
- [4] Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1983, **31**(1): 48-52.
- [5] Arnon S. Transport of organic contaminants in desert soil evaluation of contaminants flushing from a contaminated soil near Ramat-Hovav industrial park[D]. Israel: Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boger Campus, 1999.
- [6] Brouwer A. Structure dependent multiple interaction of polyhalogenated aromatic hydrocarbons with the thyroid hormone system[J]. *Organohalogen Compounds*, 1998, **37**: 225-228.
- [7] Ronen Z, Abeliovich A. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(6): 2372-2377.
- [8] Gerecke A C, Giger W, Hartmann P C, *et al.* Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge[J]. *Chemosphere*, 2006, **64**(2): 311-317.
- [9] Iasur-Kruh L, Ronen Z, Arbeli Z, *et al.* Characterization of an enrichment culture debrominating tetrabromobisphenol A and optimization of its activity under anaerobic conditions[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, **109**(2): 707-715.
- [10] George K W, Häggblom M M. Microbial O-methylation of the flame retardant tetrabromobisphenol-A [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, **42**(15): 5555-5561.
- [11] 聂麦茜, 吴蔓莉, 王晓昌, 等. 一株黄杆菌及其粗酶液对苊降解的动力学特征研究[J]. *环境科学学报*, 2006, **26**(2): 181-185.

CONTENTS

Characteristics of Atmospheric NO ₂ in the Beijing-Tianjin-Hebei Region and the Yangtze River Delta Analyzed by Satellite and Ground Observations	··· WANG Ying, LI Ling-jun, LIU Yang (3685)
Variation Analysis of Background Atmospheric Pollutants in North China During the Summer of 2008 to 2011	····· YANG Jun-yi, XIN Jin-yuan, JI Dong-sheng, <i>et al.</i> (3693)
Characteristics of Atmospheric Pollutants in Cangzhou	····· WANG Yong-hong, HU Bo, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3705)
Chemical Characteristics and Sources of Trace Metals in Precipitation Collected from a Typical Industrial City in Northern China	····· LI Yue-mei, PAN Yue-peng, WANG Yue-si, <i>et al.</i> (3712)
BTX Monitoring Nearby Main Road Traffic in Guangzhou	····· YE Cong-lei, XIE Pin-hua, QIN Min, <i>et al.</i> (3718)
Dynamic Road Vehicle Emission Inventory Simulation Study Based on Real Time Traffic Information	····· HUANG Cheng, LIU Juan, CHEN Chang-hong, <i>et al.</i> (3725)
Emission Characteristics of a Diesel Car Fueled with Coal Based Fischer-Tropsch (F-T) Diesel and Fossil Diesel Blends	····· HU Zhi-yuan, CHENG Liang, TAN Pi-qiang, <i>et al.</i> (3733)
Spatial Variations of Biogenic Elements in Coastal Wetland Sediments of the Jiulong River Estuary	····· YU Xiao-qing, YANG Jun, LIU Le-mian, <i>et al.</i> (3739)
Spatio-Temporal Distribution of TN and TP in Water and Evaluation of Eutrophic State of Lake Nansi	····· SHU Feng-yue, LIU Yu-pei, ZHAO Ying, <i>et al.</i> (3748)
Impact on Nitrogen and Phosphorous Export of Wetlands in Tianmu Lake Watershed	····· LI Zhao-fu, LIU Hong-yu, LI Heng-peng (3753)
Nitrogen and Phosphorus Composition in Urban Runoff from the New Development Area in Beijing	····· LI Li-qing, LÜ Shu-cong, ZHU Ren-xiao, <i>et al.</i> (3760)
Distribution and Sources of Arsenic in Yangzonghai Lake, China	····· ZHANG Yu-xi, XIANG Xiao-ping, ZHANG Ying, <i>et al.</i> (3768)
Occurrence of Fecal Indicator Bacteria in Urban Surface Water: A Case Study in Southern China	····· SUN Fu, SHA Jing, LIU Yan-hua (3778)
Vertical Migration of Algal Cells in the Daning River Bay of the Three Gorges Reservoir	····· ZHANG Yong-sheng, ZHENG Bing-hui, JIANG Xia, <i>et al.</i> (3787)
Construct of Yangtze-Huai River Rural Areas Ecological Drainage System and Its Retention Effect on Pollutants	····· SHAN Bao-qing, LI Nan, TANG Wen-zhong (3797)
Water Treatment Efficiency of Constructed Wetland Plant-Bed/Ditch Systems	····· WANG Zhong-qiong, ZHANG Rong-bin, CHEN Qing-hua, <i>et al.</i> (3804)
Effect of the Subsurface Constructed Wetland Evolution into Free Surface Flow Constructed Wetland on the Removal of Organic Matter, Nitrogen, and Phosphorus in Wastewater	····· WEI Ze-jun, XIE Jian-ping, HUANG Yu-ming (3812)
Treatment Characteristics of Saline Domestic Wastewater by Constructed Wetland	····· GAO Feng, YANG Zhao-hui, LI Chen, <i>et al.</i> (3820)
Degradation of β -Naphthol by Catalytic Wet Air Oxidation	····· LIU Jie, YU Chao-ying, ZHAO Pei-qing, <i>et al.</i> (3826)
Degradation of 2,4-Dichlorophenol in Aqueous Solution by ZVI/EDDS/Air System	····· SUN Qian, ZHOU Hai-yan, CAO Meng-hua, <i>et al.</i> (3833)
Study on Photocatalytic Degradation of 1,2,3-Trichlorobenzene Using the Microwaved MWNTs/TiO ₂ Composite	····· SHI Zhou, ZHANG Qian, ZHANG Wei, <i>et al.</i> (3840)
Mechanism of Cr(VI) Removal from Aqueous Solution Using Biochar Promoted by Humic Acid	····· DING Wen-chuan, TIAN Xiu-mei, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (3847)
Research on the Treatment of Wastewater Containing PVA by Ozonation-Activated Sludge Process	····· XING Xiao-qiong, HUANG Cheng-lan, LIU Min, <i>et al.</i> (3854)
Effects of Composite Substrates on the Phosphorus Removal in Granule-based EBPR System and Its Optimization Experiment	····· XU Shao-juan, SUN Pei-de, ZHENG Xiong-liu, <i>et al.</i> (3859)
Research of Input Water Ratio's Impact on the Quality of Effluent Water from Hydrolysis Reactor	····· LIANG Kang-qiang, XIONG Ya, QI Mao-rong, <i>et al.</i> (3868)
Evolution of Leachate Quantity and Quality in the Anaerobic-semiaerobic Bioreactor Landfill	····· HAN Zhi-yong, LIU Dan, LI Qi-bin, <i>et al.</i> (3873)
National Survey of Urban Sewage Reuse in China	····· GUO Yu-jie, WANG Xue-chao, ZHOU Zhen-min (3881)
Sorption and Desorption of 17 α -Ethinyl Estradiol and 4- <i>n</i> -Nonylphenol in Soil	····· JIANG Lu, WANG Ji-hua, LI Jian-zhong, <i>et al.</i> (3885)
Soil Organic Carbon Mineralization of Black Locust Forest in the Deep Soil Layer of the Hilly Region of the Loess Plateau, China	····· MA Xin-xin, XU Ming-xiang, YANG Kai (3893)
Effects of Soil Crusts on Surface Hydrology in the Semiarid Loess Hilly Area	····· WEI Wei, WEN Zhi, CHEN Li-ding, <i>et al.</i> (3901)
Environmental Factors on Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils from Dashiwei Karst Giant Doline (Tiankeng) in Guangxi, China	····· KONG Xiang-sheng, QI Shi-hua, JIANG Zhong-cheng, <i>et al.</i> (3905)
Investigation on Mechanism of Pyrite Oxidation in Acidic Solutions	····· WANG Nan, YI Xiao-yun, DANG Zhi, <i>et al.</i> (3916)
Monitoring of Water and Salt Transport in Silt and Sandy Soil During the Leaching Process	····· FU Teng-fei, JIA Yong-gang, GUO Lei, <i>et al.</i> (3922)
Simulation on Remediation of Benzene Contaminated Groundwater by Air Sparging	····· FAN Yan-ling, JIANG Lin, ZHANG Dan, <i>et al.</i> (3927)
Detecting the Cytotoxicities of Five Bisphenol A Analogues to the MCF-7 Human Breast Carcinoma Cell Line Through Different Endpoints	····· ZHANG Shuai-shuai, LIU Yan, LIU Shu-shen, <i>et al.</i> (3935)
Response of Copepod Community Characteristics to Environmental Factors in the Backshore Wetland of Expo Garden, Shanghai	····· CHEN Li-jing, WU Yan-fang, JING Yu-xiang, <i>et al.</i> (3941)
Isolation, Identification and Characterization of Halotolerant Petroleum-degrading Bacteria	····· WU Tao, XIE Wen-jun, YI Yan-li, <i>et al.</i> (3949)
Growth Kinetics and Phenol Degradation of Highly Efficient Phenol-degrading <i>Ochrobactrum</i> sp. CH10	····· CHEN Xiao-hua, WEI Gang, LIU Si-yuan, <i>et al.</i> (3956)
Isolation of Aerobic Degrading Strains for TBBPA and the Properties of Biodegradation	····· QIAN Yan-yuan, LIU Li-li, YU Xiao-juan, <i>et al.</i> (3962)
Influences of Long-term Application of Organic and Inorganic Fertilizers on the Composition and Abundance of <i>nirS</i> -type Denitrifiers in Black Soil	····· YIN Chang, FAN Fen-liang, LI Zhao-jun, <i>et al.</i> (3967)
Characteristics and Influencing Factors of Trichloroethylene Adsorption in Different Soil Types	····· HE Long, QIU Zhao-fu, LÜ Shu-guang, <i>et al.</i> (3976)
Degradation of Carbendazim in Paddy Soil and the Influencing Factors	····· XIAO Wen-dan, YANG Xiao-e, LI Ting-qiang (3983)
Effects of Sulphur Compounds on the Volatile Characteristics of Heavy Metals in Fly Ash from the MSW and Sewage Sludge Co-combustion Plant During the Disposal Process with Higher Temperature	····· LIU Jing-yong, SUN Shui-yu (3990)
Low-temperature Thermal Treatment of Dioxin in Medical Waste Fly Ash Under Inert Atmosphere	····· JI Sha-sha, LI Xiao-dong, XU Xu, <i>et al.</i> (3999)
Hourly Measurement on Aerosol NH ₃ and Gas NO _x Emission in the Rice Field	····· GONG Wei-wei, LUAN Sheng-ji (4006)
Implementation of an Electronic Nose for Rapid Detection of Volatile Chloroalkane and Chloroalkene	····· WEN Xiao-gang, LIU Rui, CAI Qiang, <i>et al.</i> (4012)
Pilot Study on PAHs of the Atmosphere Around the Refuse Incineration Plant Based on the Technology of Passive Sampling	····· SUN Shao-ai, LI Yang, ZHOU Yi, <i>et al.</i> (4018)
Spatial Distribution and Pollution Source Identification of Agricultural Non-Point Source Pollution in Fujian Watershed	····· DING Xiao-wen, SHEN Zhen-yao (4025)
Difference of P Content in Different Area Substrate of Constructed Wetland	····· CAO Xue-ying, CHONG Yun-xiao, YU Guang-wei, <i>et al.</i> (4033)
Selective Detection of Viable Pathogenic Bacteria in Water Using Reverse Transcription Quantitative PCR	····· LIN Yi-wen, LI Dan, WU Shu-xu, <i>et al.</i> (4040)
Formation of Disinfection By-products; Temperature Effect and Kinetic Modeling	····· ZHANG Xiao-lu, YANG Hong-wei, WANG Xiao-mao, <i>et al.</i> (4046)
A Novel Quantitative Approach to Study Dynamic Anaerobic Process at Micro Scale	····· ZHANG Zhong-liang, WU Jing, JIANG Jian-kai, <i>et al.</i> (4052)
Leaves of <i>Platanus orientalis</i> as the Carbon Source for Denitrification	····· XIONG Jian-feng, XU Hua, YAN Ning, <i>et al.</i> (4057)
Isolation, Characterization of an Anthracene Degrading Bacterium <i>Martellella</i> sp. AD-3 and Cloning of Dioxygenase Gene	····· CUI Chang-zheng, FENG Tian-cai, YU Ya-qi, <i>et al.</i> (4062)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年11月15日 33卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 11 Nov. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市 2871 信箱(海淀区双清路 18 号, 邮政编码: 100085) 电话: 010-62941102, 010-62849343 传真: 010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel: 010-62941102, 010-62849343; Fax: 010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科学出版社 北京东黄城根北街 16 号 邮政编码: 100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印刷装订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科学出版社 电话: 010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com	Distributed	by	Science Press Tel: 010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencecp. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00 元

国外发行代号: M 205

国内外公开发售