

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第7期

Vol.36 No.7

2015

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

2013年12月中国中东部地区严重灰霾期间上海市颗粒物的输送途径及潜在源区贡献分析	李莉, 蔡蓓琳, 周敏 (2327)
长三角冬季一次霾过程气溶胶及其水溶性离子的区域分布特征	王曼婷, 朱彬, 王红磊, 薛国强, 何俊, 徐宏辉, 曹锦飞 (2337)
北京城区大气 PM _{2.5} 主要化学组分构成研究	刘保献, 杨懂艳, 张大伟, 陈添, 赵红帅, 陈圆圆, 陆皓昀 (2346)
2014年春季山东省 PM _{2.5} 跨界输送研究	贾海鹰, 程念亮, 何友江, 陈云波, 杜晓惠, 单晓丽 (2353)
燃煤电厂产生和排放的 PM _{2.5} 中水溶性离子特征	马子珍, 李振, 蒋靖坤, 叶芝祥, 邓建国, 段雷 (2361)
南京夏季城市冠层大气 CO ₂ 浓度时空分布规律的观测	高韵秋, 刘寿东, 胡凝, 王淑敏, 邓力琛, 于洲, 张圳, 李旭辉 (2367)
北京市机动车尾气排放因子研究	樊守彬, 田灵娣, 张东旭, 曲松 (2374)
北京不同污染地区园林植物对空气颗粒物的滞纳能力	张维康, 王兵, 牛香 (2381)
长三角地区火电行业主要大气污染物排放估算	丁青青, 魏伟, 沈群, 孙予罕 (2389)
基于区域循环模型 IAP-N 的安徽省农用地 N ₂ O 排放量估算	韩云芳, 韩圣慧, 严平 (2395)
不同源汇信息提取方法对区域 CO ₂ 源汇估算及其季节变化的影响评估	张芳, 周凌晔, 王玉诏 (2405)
实测/预测辽河铬(VI)水生生物基准与风险评估	王晓南, 闫振广, 刘征涛, 张聪, 王伟莉 (2414)
博尔塔拉河河水、表层底泥及河岸土壤重金属的污染和潜在危害评价	张兆永, 吉力力·阿不都外力, 姜逢清 (2422)
岩溶泉水化学性质及 δ ¹³ C _{DIC} 影响因素	赵瑞一, 吕现福, 刘子琦, 吕春艳 (2430)
柳江流域柳州断面水化学特征及无机碳汇通量分析	原雅琼, 何师意, 于爽, 孙平安, 王艳雪, 武招云, 李新桂, 谢明鲜, 刘文, 李瑞, 张华生 (2437)
重庆市主城区次级河流总氮总磷污染特征分析及富营养化评价	庆旭瑶, 任玉芬, 吕志强, 王效科, 庞容, 邓睿, 孟龄, 马慧雅 (2446)
三峡库区消落带土壤邻苯二甲酸二丁酯静态释放特征	王法, 王强, 木志坚, 杨志丹, 宋娇艳 (2453)
干湿循环对三峡支流消落带沉积物中可转化态氮及其形态分布的影响	林俊杰, 张帅, 杨振宇, 何立平, 周依, 张倩茹 (2459)
天山天池夏季叶绿素 a 的分布及富营养化特征研究	王斌, 马健, 王银亚, 尹湘江 (2465)
西大海湖沉积物营养盐垂直分布特征变化分析	段木春, 肖海丰, 臧淑英 (2472)
草街水库蓄水后嘉陵江浮游植物群落特征及水质评价	杨敏, 张晟, 刘朔孺 (2480)
宁波三江口水域原核生物群落结构分析	胡安谊, 李姜维, 杨晓永, 王弘杰, 于昌平 (2487)
全氟化合物对表层沉积物中细菌群落结构的影响	孙雅君, 王铁宇, 彭霞薇, 王佩 (2496)
菹草腐解-金鱼藻生长耦合作用对水质及植物生长的影响	马月, 王国祥, 曹勤, 王小云, 马杰 (2504)
生物滞留设施对城市地表径流低浓度磷吸附基质研究	李立青, 龚燕芳, 颜子钦, 单保庆 (2511)
复合填料生物渗滤系统处理城市雨水径流的研究	王晓璐, 左剑恶, 千里里, 邢薇, 缪恒峰, 阮文权 (2518)
3种典型消毒副产物对细菌抗生素抗性的影响	吕露, 张梦露, 王春明, 林惠荣, 于鑫 (2525)
基于透射光法探讨水流流速对 DNAPL 运移分布的影响	高燕维, 郑菲, 施小清, 孙媛媛, 徐红霞, 吴吉春 (2532)
BDD 和 PbO ₂ 电极电化学氧化苯并三氮唑的对比研究	伍娟丽, 张佳维, 王婷, 倪晋仁 (2540)
开放系统下方解石对邻苯二甲酸的吸附	李振炫, 黄利东, 陈艳芳, 缪晔, 刘大刚, 许正文 (2547)
碳纳米管-羟磷灰石对铅的吸附特性研究	张金利, 李宇 (2554)
刚果红分子印迹聚合物纳米微球的合成及吸附性能	常自强, 陈复彬, 张玉, 时作龙, 杨春艳, 章竹君 (2564)
碱热-酸热法合成二氧化钛-钛酸纳米管复合纳米材料对 Cd(II) 和苯酚的同步去除	雷立, 晋银佳, 王婷, 赵泉, 晏友, 刘文 (2573)
固定化菌剂对污水和牛粪中雌二醇和己烯雌酚的去除作用	李欣, 凌婉婷, 刘静娴, 孙敏霞, 高彦征, 刘娟 (2581)
PN-ANAMMOX 一体化反应器处理电子行业 PCB 废水	袁琬, 李祥, 周呈, 陈宗姮 (2591)
Fenton 氧化深度处理石化废水厂二级出水研究	王翼, 吴昌永, 周岳溪, 张雪, 董波, 陈学民 (2597)
制革废水和印染废水的综合毒性评估及鉴别	黄利, 陈文艳, 万玉山, 郑国娟, 赵远, 蔡强 (2604)
不同溶解氧条件下 A/O 系统的除碳脱氮效果和细菌群落结构变化	陈燕, 刘国华, 范强, 汪俊妍, 齐鲁, 王洪臣 (2610)
利用主要缺氧段 ORP 作为连续流单污泥污水脱氮除磷系统调控参数	王晓玲, 宋铁红, 殷宝勇, 李静文, 李紫棋, 余勇 (2617)
连续流态下以实际低基质生活污水培养好氧颗粒污泥及其脱氮性能	姚力, 信欣, 鲁航, 朱辽东, 谢思建 (2626)
广东清远电子垃圾拆解区农田土壤重金属污染评价	张金莲, 丁疆峰, 卢桂宇, 党志, 易筱筠 (2633)
山东省临沂市土壤有机氯农药滴滴涕残留量与空间分布特征	喻超, 王增辉, 王红晋, 代杰瑞, 庞绪贵, 赵西强, 刘华峰 (2641)
金华市萤石矿区土壤氟污染评价	叶群峰, 周小玲 (2648)
土壤碳收支对秸秆与秸秆生物炭还田的响应及其机制	侯亚红, 王磊, 付小花, 乐毅全 (2655)
黄土区果园和刺槐林生态系统土壤有机碳变化及影响因素	李如剑, 王蕊, 李娜娜, 姜继韶, 张彦军, 王志齐, 刘庆芳, 吴得峰, 郭胜利 (2662)
缙云山土地利用方式对土壤轻组及颗粒态有机碳氮的影响	雷利国, 江长胜, 郝庆菊 (2669)
塔里木河上游典型绿洲土壤酶活性与环境因子相关分析	朱美玲, 贡璐, 张龙龙 (2678)
不同部位玉米秸秆对两种质地黑土 CO ₂ 排放和微生物量的影响	刘四义, 梁爱珍, 杨学明, 张晓平, 贾淑霞, 陈学文, 张士秀, 孙冰洁, 陈升龙 (2686)
1株对叔丁基邻苯二酚降解菌的筛选鉴定及响应面法优化其降解	贺强礼, 刘文斌, 杨海君, 彭晓霞, 关向杰, 黄水娥 (2695)
耐高浓度沼液产油小球藻的分离鉴定与特征分析	杨周, 王文国, 马丹炜, 汤晓玉, 胡启春 (2707)
水介质中 C ₆₀ 纳米晶体颗粒与 Cu ²⁺ 对小鼠腹腔巨噬细胞的复合毒性研究	于叶, 卞为林, 张慧敏, 张波, 何义亮 (2713)
地表水体中同时分析 18 种糖皮质激素方法的建立	郭文景, 常红, 孙德智, 吴丰昌, 杨浩 (2719)
《环境科学》征订启事 (2553) 《环境科学》征稿简则 (2640) 信息 (2546, 2609, 2616, 2647)	

1 株对叔丁基邻苯二酚降解菌的筛选鉴定及响应面法优化其降解

贺强礼, 刘文斌, 杨海君*, 彭晓霞, 关向杰, 黄水娥

(湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128)

摘要: 从某化工厂污水处理车间活性污泥中分离、筛选到 1 株能以对叔丁基邻苯二酚 (*p*-*tert*-Butylcatechol, TBC) 为唯一碳源和能源生长的菌株 YH1。经形态特征、生理生化、BIOLOG 细菌自动鉴定系统和 16S rDNA 序列分析, 鉴定菌株 YH1 为皱褶假单胞菌 (*Pseudomonas corrugate*)。在温度为 24 ~ 36℃, pH 为 7.0 ~ 10.0 的条件下, 菌株 YH1 可使浓度低于 500 mg·L⁻¹ 的 TBC 降解率达到 82% 以上。运用单因素实验初步确定 TBC 降解的最适外加碳源和氮源分别为蔗糖和胰蛋白胨, 最适温度为 30℃, 最适初始 pH 为 7.0, 最适接种量为 2%。为了提高降解率, 首先利用 Plackett-Burman 实验设计评估并筛选出影响 TBC 降解的 3 个关键因素: 蔗糖、胰蛋白胨、初始 pH。用最陡爬坡实验逼近以上 3 个因子的最大响应区域, 采用 Box-Behnken 实验设计及响应面法分析, 确定其最优降解条件为蔗糖浓度 3% (ρ)、胰蛋白胨浓度 1.44% (ρ)、TBC 浓度 400 mg·L⁻¹、初始 pH 值 8.12、接种量 2.97% (φ)、温度 30℃、培养时间 96 h, 在此条件下 TBC 降解率可达 98.21%。TBC 降解酶活性及酶定域实验表明, 菌株 YH1 相关降解酶为胞内酶, 且 TBC 可诱导邻苯二酚 1,2 双加氧酶 (C₁₂O) 的合成。通过降解酶特异性引物从菌株 YH1 扩增得到 C₁₂O 基因片段, 经质粒检测和消除实验发现菌株 YH1 相关降解基因位于质粒上。此外, 菌株 YH1 能耐受高浓度 NaCl 和多种重金属离子, 对多种抗生素具有抗性。研究结果为有效处理复杂工业废水提供了理论基础。

关键词: 对叔丁基邻苯二酚 (TBC); *Pseudomonas corrugate* YH1; 响应面法; 邻苯二酚 1,2 双加氧酶; 质粒

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)07-2695-12 DOI: 10.13227/j.hjxx.2015.07.049

Isolation, Identification of a *p*-*tert*-Butylcatechol-Degrading Strains and Optimization for Its Degradation by Response Surface Methodology

HE Qiang-li, LIU Wen-bin, YANG Hai-jun*, PENG Xiao-xia, GUAN Xiang-jie, HUANG Shui-e

(College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A bacterial strain YH1 that used *p*-*tert*-Butylcatechol (TBC) as the sole carbon and energy source was isolated from the activated sludge of the wastewater treatment plant of a chemical factory. The strain was identified as *Pseudomonas corrugate* by morphological characteristics, physiological and biochemical properties, BIOLOG and the 16S rDNA sequence analysis. The degradation rate of TBC was above 82% with an initial concentration of 500 mg·L⁻¹ at 24-36℃ and an initial pH of 7.0-10.0. Through single-factor experiments of its degradation characteristics of strain YH1, the results showed that its optimal additional carbon and nitrogen sources were sucrose and tryptone, the optimal temperature was 30℃, the optimal initial pH was 7.0, and the optimal inoculation volume was 2%. In order to improve the TBC degradation rate, the concentrations of sucrose and tryptone and initial pH were identified as the main factors by Plackett-Burman Assay. Then these factors reached their optimal region by Steepest Ascent. Finally, the optimal levels of those main factors were further optimized using Box-Behnken design and response surface analysis. The optimal conditions were as follows: sucrose concentration 3% (ρ), tryptone concentration 1.44% (ρ), TBC concentration 400 mg·L⁻¹, initial pH value 8.12, inoculation amount 2.97% (φ), temperature 30℃, training time 96 h. Under the optimal conditions mentioned above, the TBC degradation rate reached 98.21%. Enzymology analysis and localization experiments showed that the TBC-degrading enzymes were intracellular proteins and the synthesis of catechol 1,2-dioxygenase (C₁₂O) could be induced by TBC. Through design of specific PCR primers for the degrading enzymes, the gene encoding the catechol 1,2-dioxygenase was amplified from YH1. It was found that genes encoding TBC-degrading enzyme were located on plasmids by the plasmid detection and elimination experiments. In addition, YH1 was tolerant to high concentration of NaCl and many kinds of heavy metal ions, and resistant to multiple antibiotics. This paper provided some information for the effective treatment of complex industrial wastewater.

Key words: *p*-*tert*-Butylcatechol (TBC); *Pseudomonas corrugate* YH1; response surface methodology; catechol 1,2-dioxygenase; plasmid

对叔丁基邻苯二酚 (*p*-*tert*-Butylcatechol, TBC) 作为邻苯二酚的重要衍生物, 是 1 种高效有机阻聚剂, 广泛应用于烯烃、聚烯烃的生产或聚烯烃单体的贮运过程。此外, 还用作多种化合物的抗氧化剂与

收稿日期: 2014-12-21; 修订日期: 2015-01-27

基金项目: 长沙市科技局成果转化基金项目 (K1403022-31); 湖南省自然科学基金项目 (2015JJ2079)

作者简介: 贺强礼 (1989 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境污染与治理, E-mail: 915903450@qq.com

* 通讯联系人, E-mail: 1227677453@qq.com

稳定剂。TBC 不易被生物降解,随着我国石化工业的迅速发展,TBC 的需求与消耗也急速增加,使其成为环境中较常见、分布广泛的污染物^[1]。它对人体皮肤、黏膜和上呼吸道有一定危害,可引起呼吸道和皮肤过敏反应,严重时对遗传也有影响^[2]。国内生产 TBC 主要合成方法大多需要经过水洗中和处理步骤,水中 TBC 等酚类含量高,难以去除废水中酚类,面临污水排放不达标等环保问题。因此,除去水体中的 TBC 等酚类已成为污水处理的重要课题^[3-5]。

目前,降解酚类的方法主要包括吸附法,电化学法和生物降解法等,其中生物降解因投资与运行成本低、二次污染小、处理效率高等优点而广泛应用于含酚废水处理^[6-8]。酚类化合物的降解主要集中在结构简单且具有代表性的苯酚上,对该化合物降解菌的筛选及其降解特性研究已有大量报道^[9-11],但对 TBC 这种结构较复杂、理化性质稳定的酚类的降解研究尚不多见。本研究主要利用高效降解微生物对 TBC 进行生物降解,能有效去除水体中的 TBC,但降解过程的影响因素较多,有必要从诸多影响因素中筛选出最为重要的影响因素。由于传统单因素实验不能确定主次因素的差别^[12],而 Plackett-Burman 实验广泛应用于生物过程重要参数的筛选,通过对实验进行统计学设计和数据分析,筛选出对目标值影响最大的关键因素^[13]。响应面分析法(response surface methodology, RSM)是 1 种优化过程的有效方法,其中的 Box-Behnken 实验设计法比较常用,可用于确定实验因素及其交互作用在过程中对指标响应值的影响,精确的表述因素与响应值之间的关系。该法与正交设计比较,所需实验组数相对较少,更能直观体现因变量的最佳值^[14-16]。

本研究从株洲某化工厂污水处理车间氧化池的活性污泥中筛选分离出 1 株能高效降解 TBC 的细菌菌株,根据其形体特征、生理生化性状、BIOLOG 鉴定和 16S rDNA 序列分析进行分类鉴定,考察了该菌株降解 TBC 的特性和初步探讨了该菌株降解 TBC 的途径,并利用响应面法(RSM)优化 YH1 降解 TBC 的条件以提高降解效率。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源

从株洲市某化工厂废水处理车间氧化池采集的活性污泥作为筛选降解菌株的样品。

1.1.2 培养基

种子培养基(LB):每升含酵母粉 5 g,胰蛋白胨 10 g,NaCl 10 g,pH 7.0~7.2。无机盐培养基(MS):每升含 K_2HPO_4 0.4 g、 KH_2PO_4 0.4 g、NaCl 0.1 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.04 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 g、 $Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ 0.01 g、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.01 g,加水定容至 1 000 mL。选择培养基:在已灭菌的 MS 培养基中,按浓度要求加入经 0.22 μm 微孔滤膜过滤的 TBC 母液($5 g \cdot L^{-1}$ 水溶液),pH 7.0。以上固体培养基需加入 1.8% 的琼脂粉,经 121℃、20 min 高压灭菌备用。

1.1.3 主要试剂及仪器

TBC(纯度 > 99.9%)及其他试剂均为分析纯。Taq 酶、pEASY-T1 Cloning Kit、克隆用感受态细胞 Trans10 Chemically Competent Cell 以及其他生化试剂购自北京全式金生物技术有限公司。PCR 引物合成及产物测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成。常用仪器:恒温摇床(Thermo SCIENTIFIC, MAXQ 420HP, USA),高速冷冻离心机(eppendorf, Centrifuge 5804R, German),紫外可见分光光度计(SHIMADZU, UVmin1240, Japan),电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-8C),PCR 扩增仪(BIO-RAD, T100 Thermal Cycler, USA),凝胶成像分析系统(Kodak, Gel Logic 212, USA),光学显微镜(NIKON, 50i, Japan)等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离纯化

准确称量氧化池活性污泥 10 g,加入到装有 90 mL 3 级水的锥形瓶中,30℃、200 $r \cdot min^{-1}$ 恒温摇床中振荡培养 1 h。将重悬液按 2% 接种量加入到含 TBC 的选择培养基中,TBC 浓度按 100、200、300、400、500、600、800、1 000 $mg \cdot L^{-1}$ 依次提高以梯度驯化与富集降解菌。经过多次转接培养,梯度稀释培养液并涂布于含 TBC 固体选择培养基上,在 30℃ 恒温培养箱中倒置培养 12 h。挑取菌落形态不同的单菌落接种至 LB 平板上,反复划线分离纯化得到纯菌株,保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 降解菌的筛选

将保藏的纯化菌株接种至 LB 平板上,划线分离单菌落。挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中,30℃、200 $r \cdot min^{-1}$ 振荡培养至 D_{600} 为 2.0(对数生长期末期)。连续活化 3 代后,用生理盐水将发酵液离心洗涤两次并重悬菌体。以 2% 接种量接种至选择培养基中,振荡培养并间隔 12 h 检测培养液中 TBC

含量,从中挑选降解 TBC 能力最强的菌株。

1.2.3 形态特征鉴定

肉眼观察降解菌的菌落形态(形状、大小、颜色、透明度、黏稠度、湿润度、隆起和边缘特征及是否产色素等),菌体染色后用高倍显微镜观察菌体革兰氏染色、鞭毛、荚膜、芽孢等结构,利用日立 S-3400N 型扫描电镜观察菌体大小和表面结构。

1.2.4 生理生化特性测定

参照文献[17,18]做该菌株的生理生化鉴定,另采用 BIOLOG 全自动鉴定仪比对代谢指纹进行鉴定。采用添加有抗生素和重金属盐的 LB 培养基培养 YH1,检测菌株的相关抗性。

1.2.5 16S rDNA 序列的鉴定

细菌基因组 DNA 采用 EasyPure Genomic DNA Kit 试剂盒,依据说明书提取。采用上海生工生物工程技术服务有限公司的细菌 16S rDNA 通用引物, 27F (AGAGTTTGATCTGCTCAG) 和 1492R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA), 以基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA PCR 扩增。PCR 反应体系: $10 \times$ Taq Buffer(含 Mg^{2+}) $5 \mu L$, dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) $4 \mu L$, 引物 ($10 \mu \text{mol} \cdot L^{-1}$) 各 $1 \mu L$, 模板 DNA (约 $50 \text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$) $2 \mu L$, Taq DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu L^{-1}$) $0.5 \mu L$, 加水至 $50 \mu L$ 。PCR 反应条件: $94^\circ C$ 3 min; $94^\circ C$ 30 s; $55^\circ C$ 45 s; $72^\circ C$ 1 min, 循环 30 次; $72^\circ C$ 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳检测后送上海生工测序,经 BLAST 软件与 GenBank 数据库中已收录的基因序列进行比对,于 MEGA 6.0 上用邻接法构建系统发育树。

1.3 降解底物广谱性实验

测试的底物有:二苯胺、对苯二胺盐酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷、苯甲酸钠、1-萘酚、3,5-二硝基水杨酸、无水对氨基苯磺酸、辛基酚聚氧乙烯醚、十二烷基硫酸钠、二苯氨基脒、磷酸苯二钠、1-10-菲啰啉、邻苯二甲酸氢钾、磺胺、五氯硝基苯、对二甲氨基苯甲醛、邻苯二酚、苯酚^[19]、TBC,将用生理盐水洗涤两次的菌液分别涂布在以上述底物为唯一碳源的 MS 平板上,底物浓度为 1%。同时以接种不含底物的 MS 平板为阴性对照,在 $30^\circ C$ 倒置培养,每隔 12 h 观察菌株的生长情况。

1.4 TBC 浓度对降解菌生长和降解的影响

将菌株以 2% 接种量加入到 TBC 浓度分别为 50、100、200、300、400、500、600、800、1 000 $\text{mg} \cdot L^{-1}$ 的选择培养基中, $30^\circ C$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 7 d,取 2 mL 培养液测 D_{600} 值,同时培养液离心测

上清液 D_{425} 值,并计算降解率。

1.5 优化降解条件

经单因素实验确定影响 YH1 降解 TBC 的 TBC 浓度、温度、接种量、初始 pH、外加碳源和外加氮源。以 TBC 降解率为响应值,采用 3 步法进行 TBC 降解的优化^[20]。首先,利用 Plackett-Burman 设计选出对菌株降解 TBC 效率影响较大的因素,然后利用最陡爬坡设计逼近最佳区域,最后利用响应曲面法中的 Box-Behnken 设计进行实验。通过实验数据拟合响应面模型,最终确定最优降解条件并进行验证。实验数据借助 SPSS 和 Design Expert 软件进行分析。

1.6 TBC 降解机制的研究

1.6.1 细胞粗酶液的提取

将筛选到的菌株 YH1 接种至选择培养基(含 $500 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ TBC)和 LB 培养基中, $30^\circ C$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 32 h,取对数生长期末期菌液 50 mL, $4^\circ C$ 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液即为胞外粗酶液,于 $-20^\circ C$ 冻存。菌体沉淀用 pH 7.0 的磷酸缓冲液清洗两次后,重悬于磷酸缓冲液中。在冰浴中,用 HUP-400A 型超声波细胞破碎仪破碎细胞,超声破碎 30 s,间隔 30 s,连续处理 10 min。于 $4^\circ C$ 、 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,上清液即为胞内粗酶液,于 $-20^\circ C$ 冻存^[21]。

1.6.2 菌株降解 TBC 相关基因的 PCR 扩增

邻苯二酚 2,3 双加氧酶($C_{23}O$)引物为 G23OF (CCAGCAAACACCTCGTTGCGGTTGCC) 和 G23OR (AGAGGCATGGGGCGCACCGGTTTCATCA),邻苯二酚 1,2 双加氧酶($C_{12}O$)引物为 G12OF (CGCCTTCAAAGTTGATCTGCGTGGT) 和 G12OR (GCCAACGTCGACGTCTGGCA)^[22]。上述基因片段扩增体系与 16S rRNA 基因序列扩增体系相同,引物反应程序均为: $94^\circ C$ 预变性 3 min; $94^\circ C$ 变性 60 s; $57^\circ C$ 退火 45 s, $72^\circ C$ 延伸 45 s, 30 个循环; $72^\circ C$ 延伸 10 min。经琼脂糖电泳检测后送上海生工测序。测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 数据库中已收录的基因序列进行同源性比较。

1.6.3 质粒的检测与消除

采用碱裂解法^[23]抽提质粒。质粒消除采用变温-SDS 法^[24],具体步骤为:挑取单菌落接种至 LB 培养基中, $37^\circ C$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 12 h,按 2% 接种量接种到含 $100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ SDS 的 LB 培养基中, $40^\circ C$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h,再按 2% 接种量接种该培养液至 LB 培养基中, $37^\circ C$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 12 h,按

以上温度变化交替转接发酵液至含 SDS 浓度为 500、1 000、1 500、2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 LB 培养基中. 取菌体能生长且 SDS 浓度最大的培养液, 梯度稀释至 10^{-9} 并依次涂布于 LB 平板上. 采用点接法将单菌落按相同位置接种至 LB 和选择培养基的平板上, 对能在 LB 平板上生长而不能在选择培养基上生长的菌株进行质粒检测.

1.7 分析方法

1.7.1 细胞浓度的测定

采用可见分光光度法在 600 nm 下测定培养液的吸光度 (D_{600}).

1.7.2 TBC 浓度的测定

本实验采用改进的分光光度法^[25]测定 TBC 的含量: 取 2 mL 培养液加入等体积的 75% 乙醇, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 1 mL 加入到 100 mL 容量瓶中. 加水至约 90 mL, 加三氯化铁溶液 5 mL, 并加水稀释至刻度, 混匀. 静置 5 min 后, 以水为参比, 在 425 nm 波长用分光光度计测定溶液的吸光度. 同时做试剂空白, 样品吸光度减去试剂空白的吸光度, 其差值为净吸光度.

1.7.3 粗酶液活性测定

分别参考文献[26,27]邻苯二酚 1,2-双加氧酶 (C_{12}O) 和邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (C_{23}O) 催化降解邻苯二酚的产物为粘糠酸和 2-羟基粘糠酸半醛, 分别在 260 nm 和 375 nm 处有最大吸收峰. C_{12}O 和 C_{23}O 酶活力测定以单位时间内反应产物分别在 260 nm 和 375 nm 处吸光度变化表示. 反应体系为 8.01 mL 邻苯二酚、0.39 mL 磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 7.0$) 和 0.6 mL 粗酶液, 以缓冲液为参比. 定义 C_{12}O (或 C_{23}O) 活力单位 (U) 为 25℃ 条件下每分钟反应产生 1 μmol 产物所需酶量. 总蛋白含量用 Bradford 法测定, 具体方法参见全式金 Easy Protein Quantitative Kit 试剂盒说明书. 酶的比活力以每毫克的蛋白质中所含酶的活力单位数计算.

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与纯化

从活性污泥中分离纯化得到单菌落, 划线分离后获得 35 株 TBC 降解菌. 通过复筛得到 1 株 TBC 降解能力最高的菌株, 命名为 YH1. 在驯化前, 该菌在 TBC 浓度为 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的选择培养基中, 经 30℃、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 4 d 可使 TBC 降解率达到 85.6%. 采用梯度浓度驯化后, 该菌可在 4 d 内使 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TBC 降解 54.9%. 采用 -4℃ 斜面短

期保藏和 -80℃ 30% 甘油长期保藏菌株.

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 形态特征鉴定

菌株 YH1 的菌落呈圆形、浅黄色、中间隆起、边缘整齐、湿润有光泽、较粘稠、不产色素. 菌株细胞呈短杆状, 端生鞭毛, 有荚膜, 无芽孢, 经扫描电镜观察该菌在 LB 和选择培养基生长的菌株细胞, 结果发现正常细胞表面分布有较多的菌毛, 而 TBC 则使该菌细胞表面出现凹陷, 部分细胞破裂、菌毛脱落 (图 1 和图 2).

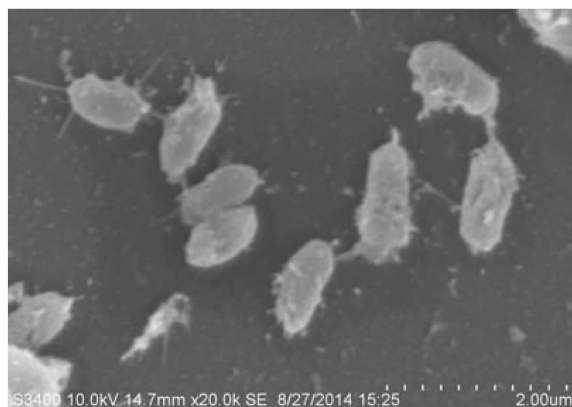


图 1 YH1 在 LB 中的扫描电镜图 ($\times 20,000\times$)

Fig. 1 Electron micrograph of YH1 in LB ($\times 20,000\times$)

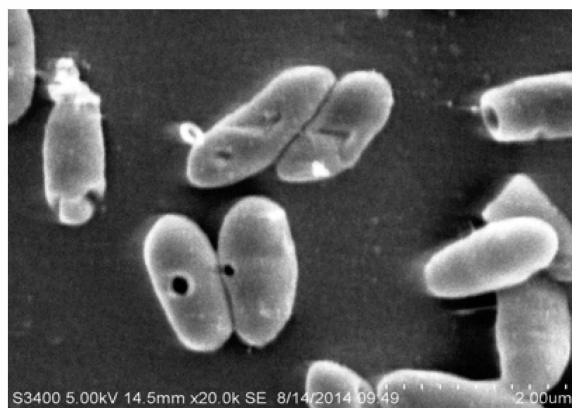


图 2 YH1 在 TBC 中的扫描电镜图 ($\times 20,000\times$)

Fig. 2 Electron micrograph of YH1 in TBC ($\times 20,000\times$)

2.2.2 生理生化鉴定

菌株 YH1 生理生化指标为: 革兰氏染色阴性、氧化酶阴性、过氧化氢酶阳性、苯丙氨酸脱氨酶阴性、吲哚实验阴性、淀粉水解阴性、硫化氢阴性、三糖铁阴性、硝酸盐还原阴性、V-P 实验阴性、甲基红阴性、明胶液化阳性、纤维素酶阴性, 4℃ 和 40℃ 均可生长, 具有运动性. 将菌株 YH1 细胞悬浮液接种到 BIOLOG GN2 版微孔中, 培养 4 h 和 16 h 后分别测定菌株代谢指数. 经 BIOLOG 细菌鉴定系

统分析,菌株 YH1 代谢指数与皱纹假单胞菌 (*Pseudomonas corrugate*) 的相似性为 90%.

重金属抗性实验发现,菌株 YH1 能在分别添加 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}^{2+}$ 、 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cr}^{6+}$ 、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cr}^{3+}$ 、 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$ 、 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Sb}^{3+}$ 、 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mn}^{2+}$ 、 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cu}^{2+}$ 和 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Zn}^{2+}$ 的 LB 培养基中正常生长,低于 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 可促进菌株的生长,而 Cd^{2+} 、 Sb^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 对菌株的生长有强烈的抑制作用. 药敏实验结果表明菌株 YH1 能耐受 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的氯霉素、氨苄青霉素、庆大霉素、壮观霉素、卡那霉素、红霉素、头孢噻肟钠,而对四环素和利发霉素敏感. 菌株 YH1 能在 NaCl

浓度为 1% ~ 7% 的选择培养基中生长,表明菌株 YH1 可适应较高渗透压的环境.

2.2.3 分子生物学鉴定

菌株 YH1 的 16S rDNA 经 PCR 扩增得到 1 条约 1.5 Kb 的 DNA 片段,测序得到 1 441 bp 的序列. YH1 的 16S rDNA 序列 (GenBank 登录号: KM658326) 与 GenBank 数据库中已收录的 16S rDNA 序列进行同源性比较分析,结果显示该菌株与 *Pseudomonas* sp. 具有很高的同源性 (99%),结合菌株 YH1 的形态和生理生化特征,鉴定菌株 YH1 为皱纹假单胞菌 (*Pseudomonas corrugate*). 利用 MEGA6.0 构建系统发育树,结果见图 3.

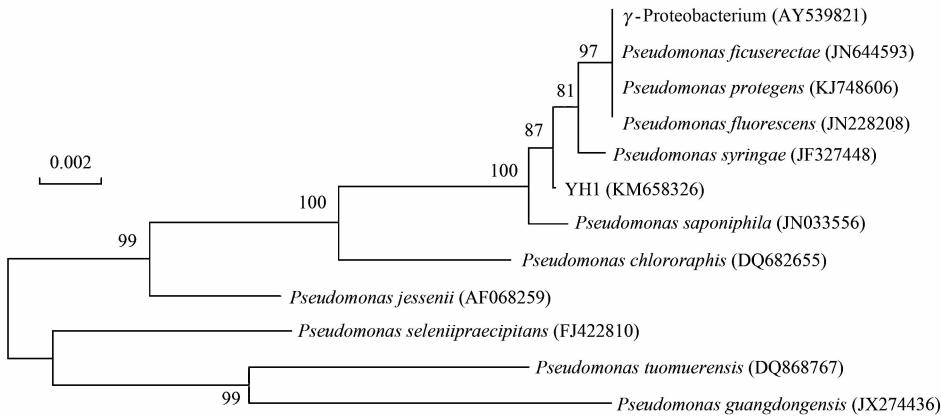


图 3 菌株 YH1 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain YH1 based on partial 16S rDNA gene sequence

2.3 TBC 代谢途径及相关降解酶特性测定

2.3.1 降解酶基因扩增

按试剂盒说明从菌株 YH1 中提取到基因组 DNA,片段大于 15 Kb. 分别利用 C_{12}O (G120F/G120R)、 C_{23}O (G230F/G230R) 引物对菌株 YH1 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果发现引物 C_{12}O 有明显的扩增产物 (图 4),而 C_{23}O 引物无明显的扩增产物. 将扩增产物测序,获得了邻苯二酚 1,2-双加氧酶基因大小为 251 bp 的片段. 测序比对结果表明该菌株的苯酚羟化酶基因序列与登录号为 AB047272.1 的邻苯二酚 1,2-双加氧酶序列同源性最高,达到 86%. 故该基因片段被认为是通过邻位

途径催化邻苯二酚裂解为粘糠酸.

2.3.2 降解酶活性测定

通过测定菌株 YH1 粗酶液中邻苯二酚 1,2-双加氧酶和邻苯二酚 2,3-双加氧酶的活性,初步判断该菌株 YH1 降解 TBC 的代谢途径. 菌株 YH1 粗酶活性检测如表 1 所示,从中可知菌株 YH1 通过邻位开环裂解途径降解 TBC. 菌体破碎后上清液中邻苯二酚 1,2-双加氧酶的活性远高于未破碎菌体上清液中酶活性,由此可见该酶为胞内酶. 以 LB 培养基为基质的两种上清液均未检测到酶活,而选择培养基中酶活远大于 LB 培养基中酶活,说明该菌株邻苯二酚 1,2-双加氧酶为诱导酶.

表 1 不同基质中邻苯二酚 1,2-双加氧酶比活力 (以蛋白质计) / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$

Table 1 Catechol 1,2-dioxygenase specific activities in different substrates (protein) / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$

基质	项目	邻苯二酚 2,3-双加氧酶比活力	邻苯二酚 1,2-双加氧酶比活力
LB 培养基	上清液	未检测到	$0.002 \pm 0.000\ 4$
	粗酶液	未检测到	$0.004 \pm 0.000\ 1$
选择培养基	上清液	未检测到	$0.031 \pm 0.004\ 7$
	粗酶液	未检测到	$0.145 \pm 0.006\ 9$

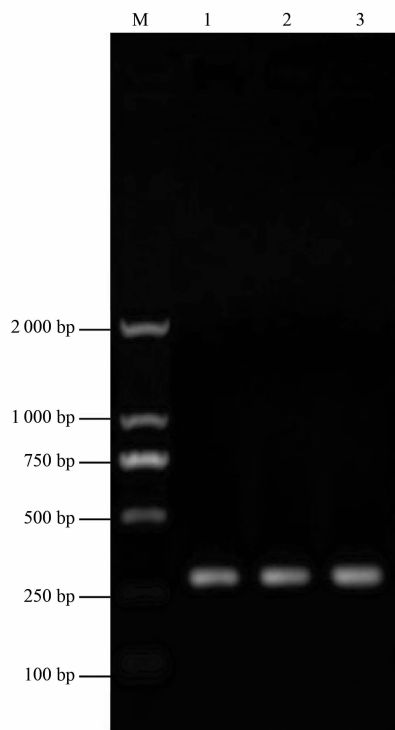


图 4 邻苯二酚 1,2 双加氧酶基因片段的扩增产物

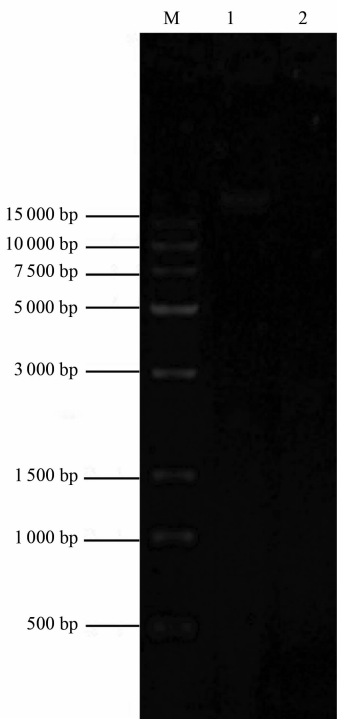
Fig. 4 Fragments of catechol 1,2-dioxygenase gene amplified from YH1

2.3.3 质粒检测和消除结果

采用碱裂解法,0.8%琼脂糖凝胶电泳发现菌株 YH1 具有 1 较大的质粒(图 5),大小大于 15 kb.经变温-SDS 法消除质粒后,通过点解法得到只能在 LB 平板上生长而不能在仅含浓度为 500 mg·L⁻¹ TBC 的 MS 培养基平板上生长的菌株(图 6),质粒消除率可达 24.5%.经质粒检测,在质粒消除后的突变菌株中未发现质粒(图 5).这说明经质粒消除后的菌株不能利用 TBC 作为唯一碳源进行生长,且可初步判定 TBC 相关降解基因位于质粒上,这为进一步研究 YH1 菌株降解 TBC 的途径和降解机制提供了一定的理论基础.

2.4 菌株降解底物广谱性研究

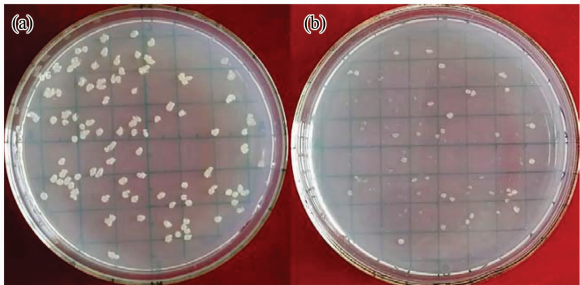
用生理盐水洗涤 2 次的菌液涂布于平板上培养 7 d,结果发现菌株 YH1 分别在邻苯二酚、苯酚、TBC、二苯胺、三(羟甲基)氨基甲烷、辛基酚聚氧乙烯醚、十二烷基硫酸钠、五氯硝基苯为唯一碳源的培养基上培养 4 d 后,平板上都长出了明显菌落.其中在以 TBC、邻苯二酚、二苯胺为底物的平板上,24 h 内便出现了菌落.而在 7 d 后,在对苯二胺盐酸盐、苯甲酸钠、3,5-二硝基水杨酸、无水对氨基苯磺酸、二苯氨基脒、磷酸苯二钠、1-10-菲啰啉、邻苯二甲酸氢钾、磺胺、对二甲氨基苯甲醛为



(1)野生型;(2)突变型

图 5 质粒抽提与质粒消除后检测结果

Fig. 5 Detection result of plasmid extraction and after plasmid elimination



(a) LB;(b) TBC

图 6 LB 与 TBC 影印对照

Fig. 6 Comparative result between cultures on LB plate and TBC plate

唯一碳源的平板上未观察到菌落产生. TBC 和邻苯二酚平板较其他 4 种底物平板上的菌落大且密集,说明邻苯二酚及其衍生物较易被菌株 YH1 降解.

2.5 菌株 YH1 生长及对 TBC 降解的影响

2.5.1 菌株 YH1 利用 TBC 生长和降解 TBC 曲线

将菌株 YH1 接种于含 500 mg·L⁻¹ TBC 的 MS 培养基中,30℃、200 r·min⁻¹摇床培养,定时取样测定菌体生长量及 TBC.结果如图 7 所示,从中可知,YH1 菌株的生长同步于对 TBC 的降解,且菌株的生长和降解曲线的迟缓期为 0~24 h,这一时间段为 YH1 细胞合成 TBC 相关降解酶的诱导期.菌株在

24 ~ 96 h 进入对数期, 大约在 96 h 最大菌体生长量达到 0.65, 此时 TBC 降解率达到 92.35%。

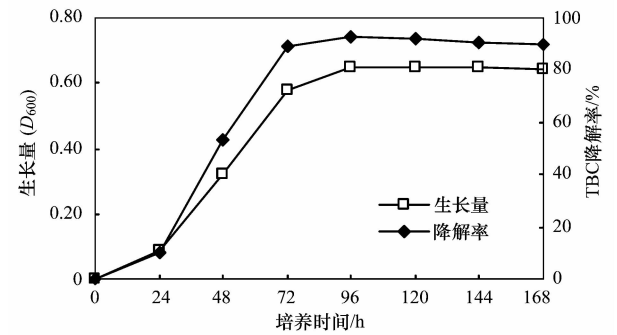


图 7 菌株 YH1 利用 TBC 生长和降解 TBC 曲线
Fig. 7 Degradation of TBC and the growth of strain YH1 using TBC as the sole carbon source

2.5.2 不同环境条件对 YH1 生长和降解 TBC 的影响

为了研究不同环境条件下菌株 YH1 对 TBC 的降解情况, 选择 TBC 浓度、温度、接种量、初始 pH、外加碳源、外加氮源这 5 个影响因素作为研究对象, 进行单因素实验. 实验结果表明在 TBC 浓度低于 500 mg·L⁻¹ 时, 菌体的生长与 TBC 浓度呈线性关系, 菌体生长量和降解率同时达到最大; 当 TBC 浓度高于 500 mg·L⁻¹ 时, D₆₀₀ 值和 TBC 降解率随 TBC 浓度增加而变小, 表明高浓度 TBC 抑制了菌株 YH1 的生长及其对 TBC 的降解. 菌株 YH1 生长和降解 TBC 的适宜温度范围为 24 ~ 34℃, 在 30℃ 时菌株生长量和降解率达到最大, 即 30℃ 初步确定为最适温度. YH1 生长和降解的临界温度为 34℃, 超过该温度, 菌株 YH1 的生长和代谢便基本停止. 菌株 YH1 的最适接种量为 2%, 当接种量大于 2% 时, YH1 的生长和对 TBC 降解率的增加不明显. 菌株 YH1 在 pH 7.0 ~ 10.0 范围内对 TBC 降解有较高的效率, 即中性或偏碱性的环境中可使菌株 YH1 较好地生长和降解 TBC. 蔗糖和胰蛋白胨作为最适外加碳源和氮源, 适当添加可使菌株 YH1 的生长和降解 TBC 能力得到较明显的提升.

2.6 菌株 YH1 降解 TBC 条件的优化

2.6.1 PB 实验设计及结果

采用 N = 12 Plackett-Burman 实验设计研究 YH1 对 TBC 的降解率产生影响的 7 个因素, 每组实验重复 3 次. 11 个考察因素及其编码水平见表 2, 其实实验设计以 TBC 降解率为响应值, 借助实验设计软件 Design Expert 7.1 进行数据分析, 其结果如表 3 所示. 通过比较各因素的显著性水平, 筛选出对 TBC 降解率影响较为显著的因素.

表 2 Plackett-Burman 设计各因素与水平			
Table 2 Plackett-Burman experimental factors and levels			
因素编码	因素 ¹⁾	低 (-1)	高 (1)
X ₁	Dummy1		
X ₂	蔗糖/%	1	3
X ₃	TBC/mg·L ⁻¹	400	600
X ₄	Dummy2		
X ₅	接种量/%	2	5
X ₆	胰蛋白胨/%	1	2
X ₇	温度/℃	30	36
X ₈	培养时间/h	48	96
X ₉	Dummy3		
X ₁₀	初始 pH	5	8
X ₁₁	Dummy4		

1) Dummy1 ~ 4 为空白因素

从表 3 可以看出, 实验组 9 的 TBC 降解率最高, 达 96.29%; 实验组 3 的 TBC 降解率最低, 为 23.45%. 将实验数据采用 SPSS V19.0 拟合后, 可得方程为:

$$Y = 69.78 + 0.87 X_2 - 2.84 X_3 - 9.15 X_5 + 9.10 X_6 - 4.68 X_7 + 3.15 X_8 + 21.28 X_{10}$$

式中, X₂ 为蔗糖含量, %; X₃ 为 TBC 浓度, mg·L⁻¹; X₅ 为 YH1 菌株接种量, %; X₆ 为胰蛋白胨浓度, %; X₇ 为温度, ℃; X₈ 为培养时间, h; X₁₀ 为初始 pH; X₁、X₄、X₉、X₁₁ 为空白变量.

应用 Design Expert 软件分析得到模型的 P 为 0.001 5, 表明所得回归方程达到极显著, 即该模型在被研究的整个回归区域拟合性很好; 复相关系数 R² = 0.960 4, 说明相关性较好; 校正决定系数 Adj R² = 0.891 2, 表明 89.12% 的实验数据的变异性可用此回归模型来解释; 通常情况下变化系数 (C_v) 越低, 实验的可信度和精确度越高, C_v 值等于 12.94%, 表示 PB 实验的可信度和精确度较好; 精密度 (Adeq Precision) 是有效信号和噪声的比值, 大于 4.0 视为合理, 本实验精密度达到 10.225 根据回归分析结果 (见表 4), 从表 4 可知接种量 (YH1 菌液与培养液体积比)、胰蛋白胨浓度以及初始 pH 对 TBC 降解率存在显著影响, 其中初始 pH 的 P 值最小 (P = 0.001 2), 对菌株 YH1 降解 TBC 效率影响最显著, 其次是接种量 (P = 0.024 6), 再次为胰蛋白胨浓度 (P = 0.025 1). 其他 4 个因素, 蔗糖浓度、TBC 浓度、温度、培养时间 P 值均大于 0.05, 对 TBC 降解率没有明显影响. 由此, 初始 pH、接种量和胰蛋白胨浓度为影响 TBC 降解率的关键因素.

表 3 Plackett-Burman 实验设计与结果¹⁾

Table 3 Design and response values of Plackett-Burman experiment

编码	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	TBC 降解率/%
1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	85.57
2	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	61.56
3	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	23.45
4	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	42.56
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	94.32
6	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	92.70
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	95.25
8	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	24.94
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	96.29
10	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	83.34
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	55.21
12	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	82.23

1) $X_1 \sim X_{11}$ 含义同表 2

表 4 Plackett-Burman 实验分析结果¹⁾

Table 4 Analytic result of Plackett-Burman experiment

因素	效应	F 检验	$Pr > F$	重要性
X_2	0.87	0.11	0.756 2	7
X_3	-2.84	1.19	0.336 7	6
X_5	-9.15	12.33	0.024 6	2
X_6	9.10	12.19	0.025 1	3
X_7	-4.68	3.23	0.146 9	4
X_8	3.15	1.46	0.293 6	5
X_{10}	21.28	66.62	0.001 2	1

1) $X_1 \sim X_{11}$ 含义同表 1

2.6.2 最陡爬坡实验设计与分析

响应面拟合方程只有在考察的临近区域里才能充分模拟真实情况,所以应先逼近最大 TBC 降解率区域后再建立有效的拟合方程.

根据 Plackett-Burman 实验筛选出的 3 个显著因素估计系数的正负效应,依次增大或减小,其他因素根据估计系数的正负效应分别取 PB 设计中的最高值和最低值. 初始 pH 和胰蛋白胨浓度对 TBC 降解率有显著正效应,应依次增加. 而接种量是负效应,应依次减少. 其他因素的取值为蔗糖浓度 3%、TBC 浓度 400 mg·L⁻¹、温度 30℃、培养时间 48 h. 由表 5 数

表 5 最陡爬坡实验设计及结果实验分析结果

Table 5 Experimental design and the results of steepest ascent

编号	接种量/%	胰蛋白胨/%	初始 pH	TBC 降解率/%
1	4.0	1.0	6.0	87.56
2	3.5	1.5	6.5	91.39
3	3.0	2.0	7.0	94.57
4	2.5	2.5	7.5	88.93
5	2.0	3.0	8.0	85.21
6	1.5	3.5	8.5	78.94
7	1.0	4.0	9.0	65.42

据分析可得,随着初始 pH 和胰蛋白胨浓度的增加及接种量的减小,TBC 降解率呈先增大后减小的趋势. 当初始 pH 为 7.0,接种量为 3%,胰蛋白胨浓度为 2%时,TBC 降解率最大. 因此,序号 3 的实验为最大响应值区域,故以此为中心点进行响应面分析.

2.6.3 响应面分析法确定最佳降解条件

响应面分析法是 1 种寻找多因子系统中最佳条件的数学统计方法,其中 Box-Behnken 和 Box-Wilson 中心组合设计是两种较常见的响应面分析法(RSA). 根据相应的实验设计进行实验后,对数据进行二次回归拟合,得到带交互项和平方项的二次方程,最后在一定的水平范围内求出最佳值,然后进行数学模型验证. 通过爬坡路径法确定降解条件重要影响因子范围后,以初始 pH、接种量和胰蛋白胨浓度这 3 种因子为自变量,以 TBC 降解率为响应值,设计了 3 因素 3 水平的响应面分析实验. 实验设计及结果见表 6.

运用 Design Expert 软件对 17 个实验点的响应面值进行回归分析,得二次多项式方程:

$$Y = 97.5 - 1.79 A - 2.21 B + 1.02 C - 1.87 AB + 2.49 AC - 3.17 BC - 6.99 A^2 - 2.25 B^2 - 11.58 C^2$$
式中, Y 为 TBC 降解率; A 、 B 、 C 分别为接种量、胰蛋白胨浓度、初始 pH 的编码值. 相关系数 $R^2 = 0.962 7$,说明方程的拟合度很好,可以用该方程进行实验结果预测.

预测模型的 P 值 0.000 3 远小于 0.01,说明该模型是显著的. 结合响应面分析 3 维图(图 8~10),可直观的看出各因素之间的交互作用,各实验各因素对 TBC 降解率的影响不是简单的线性关系,且对响应值的影响存在一个极值点.

表 6 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 6 Box-Behnken experimental design and result

实验序号	接种量/%		胰蛋白胨/%		初始 pH		TBC 降解率 /%
	X_5	编码 X_5	X_6	编码 X_6	X_{10}	编码 X_{10}	
1	3	0	2	0	8	0	97.34
2	3	0	3	1	7	-1	84.86
3	3	0	2	0	8	0	97.31
4	4	1	2	0	9	1	80.69
5	2	-1	1	-1	8	0	93.07
6	2	-1	2	0	7	-1	82.15
7	2	-1	2	0	9	1	77.82
8	4	1	1	-1	8	0	91.77
9	3	0	1	-1	7	-1	79.03
10	3	0	3	1	9	1	81.97
11	3	0	2	0	8	0	97.48
12	4	1	2	0	7	-1	75.08
13	3	0	1	-1	9	1	88.83
14	2	-1	3	1	8	0	88.49
15	3	0	2	0	8	0	97.63
16	4	1	3	1	8	0	79.70
17	3	0	2	0	8	0	97.75

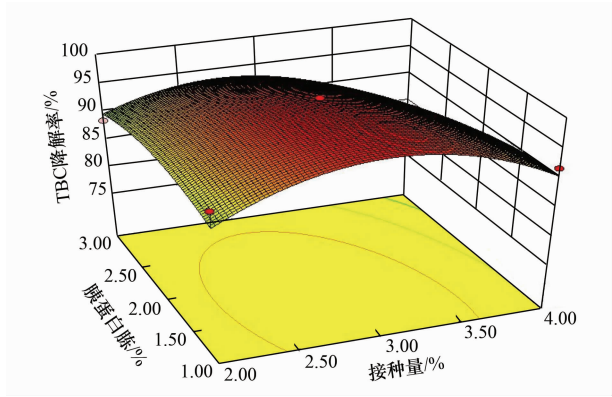


图 8 胰蛋白胨浓度和接种量对 TBC 降解率的影响

Fig. 8 Effect of the concentration of tryptone and inoculum volume on the TBC biodegradation

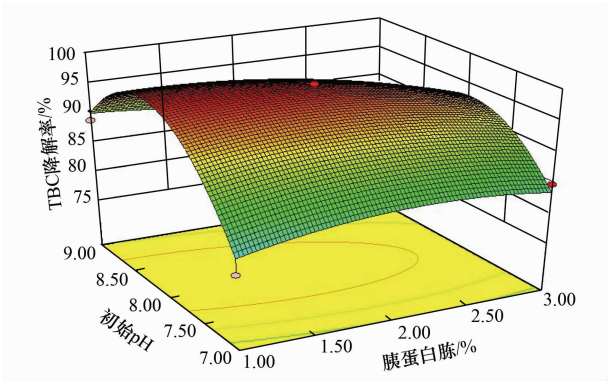


图 10 初始 pH 和胰蛋白胨浓度对 TBC 降解率的影响

Fig. 10 Effect of the initial pH and concentration of tryptone on the TBC biodegradation

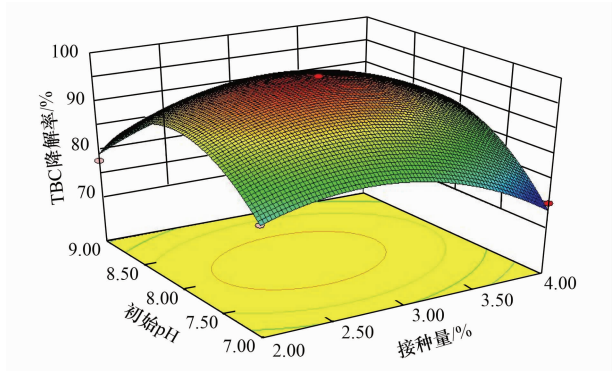


图 9 初始 pH 和接种量对 TBC 降解率的影响

Fig. 9 Effect of the initial pH and inoculum volume on the TBC biodegradation

根据表 7 方差分析数据可知,表明对 TBC 降解率的影响排序为:胰蛋白胨浓度(X_5) > 接种量(X_6)

> 初始 pH(X_{10}). 其中, X_5^2 、 X_{10}^2 对 Y 的影响差异极显著, X_6 和 X_6X_{10} 对 Y 的影响高度显著,而 X_5 、 X_{10} 、 X_5X_6 、 X_5X_{10} 和 X_6^2 对 Y 的影响不显著。

根据模型构建的方程进行偏导微分处理,求得方程组的 3 个解: $A = 2.97$ 、 $B = 1.44$ 、 $C = 8.12$,即:接种量 2.97% (φ)、胰蛋白胨浓度 1.44% (ρ)、初始 pH 8.12. 此时,YH1 菌株对 TBC 降解率的最大预测值为 98.21%.

2.6.4 验证实验

为了验证模型预测的准确性和有效性,按照优化后的 TBC 降解条件进行 3 组平行实验,实际检测 TBC 的降解率达到 98.16%,实验值与预测值之间具有良好的拟合性,表明回归方程能够比较真实的预测各因素对菌株 YH1 降解 TBC 的影响. 降解优

表 7 Box-Behnken 实验回归分析结果

Table 7 Result of regression analysis of the Box-Behnken design

项目	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
常数	1 005. 79	9	111. 75	20. 09	0. 000 3	极显著
<i>A</i>	25. 53	1	25. 53	4. 59	0. 069 4	不显著
<i>B</i>	39. 07	1	39. 07	7. 02	0. 032 9	显著
<i>C</i>	8. 38	1	8. 38	1. 51	0. 259 2	不显著
<i>AB</i>	14. 03	1	14. 03	2. 52	0. 156 3	不显著
<i>AC</i>	24. 70	1	24. 70	4. 44	0. 073 1	不显著
<i>BC</i>	40. 26	1	40. 26	7. 24	0. 031 1	显著
<i>A</i> ²	205. 79	1	205. 79	36. 99	0. 000 5	极显著
<i>B</i> ²	21. 38	1	21. 38	3. 84	0. 090 7	不显著
<i>C</i> ²	564. 23	1	564. 23	101. 43	<0. 000 1	极显著

化实验组与未优化实验组的结果比较发现,优化后的最佳降解条件可使菌株 YH1 对 TBC 的降解率提高 6% 左右.

3 讨论

假单胞菌属菌株在有毒害且难降解有机物的降解研究中较多见^[28,29],本实验筛选得到的皱纹假单胞菌(*Pseudomonas corrugate*)对 TBC 等酚类化合物的降解的报道尚不多见^[30],故对该菌株生理生化、代谢途径和降解特性的研究有较重要的意义. 据报道,细菌降解芳香类化合物有邻苯二酚、龙胆酸、原儿茶酸等途径^[31]. 对芳香化合物主要代谢途径的研究表明,由不同酶完成起始的转化步骤都转变为有限的中间代谢产物,如原儿茶酸和(取代的)儿茶酚,这些双羟基中间代谢产物进一步代谢都是经间位裂解途径形成丙酮酸和乙醛,或经邻位裂解途径形成乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 进行的,通过不同的下游途径最终进入三羧酸(TCA)循环^[32]. 一般认为烷基取代芳烃生物降解的途径是从烷基侧脸的末端 ω-氧化和 β-氧化,然后再发生苯环的断裂^[33]. 本实验研究表明,菌株 YH1 能降解多种芳烃化合物如邻苯二酚、苯酚、对叔丁基邻苯二酚、二苯胺、五氯硝基苯、辛基酚聚氧乙烯醚,并推测菌株 TBC 降解酶的活性中心可接纳苯环对位上存在烷基、硝基、氯基、叔丁基、羟基;邻位上可存在氯基、氨基、羟基. 而在菌体粗酶液中检测到邻苯二酚 1,2-双加氧酶的酶活,表明菌株 YH1 通过邻苯二酚邻位裂解途径使苯环开环,进而生成产物进入 TCA 循环. 结果与段佩玲等^[34]的 C₂₃O 途径降解苯酚的研究不同.

重金属抗性实验结果与龚斌等^[35]报道的 Cd²⁺、Co²⁺对苯酚降解物促进作用而 Mn²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺在一定浓度浓度范围对苯酚降解有促进

作用一致,浓度低于 1.0 g·L⁻¹的 Pb²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺可促进菌株的生长,而 Cd²⁺、Sb³⁺、Hg²⁺、Ag⁺对菌株的生长有强烈的抑制作用. 菌株 YH1 在偏酸和偏碱条件下,TBC 降解能力受到抑制,这可能与微生物表面电荷随 pH 改变而改变,进而影响微生物对 TBC 的吸收和利用^[36]. 而菌株在中性或偏碱性的环境中可较好地生长和降解 TBC,生长量和降解率随着 pH 的增加而增加,主要与 TBC 在碱性环境下以盐的形态存在,溶解性较好,菌体能充分利用该盐作为碳源和能源进行生长代谢^[37]. 外加碳源实验中低浓度的蔗糖可促进菌体生长和降解,而高浓度的蔗糖明显抑制了 TBC 的降解,结果与 Hess 等^[38]的研究结果相一致,表明蔗糖和 TBC 两种底物之间存在非竞争性交叉抑制作用,蔗糖明显地抑制单位降解菌生物量对 TBC 的降解率.

4 结论

(1)本研究从株洲某化工厂污水处理车间的污泥样品中分离到 1 株 TBC 降解菌,经形态特征、生理生化、BIOLLOG 微生物全自动鉴定仪和 16S rDNA 序列分析,该菌鉴定为 *Pseudomonas corrugate*,命名为 YH1. 菌株 YH1 能够利用 TBC 为唯一碳源和能源生长,30℃、200 r·min⁻¹培养 96 h 可使初始浓度为 500 mg·L⁻¹的 TBC 降解率达到 92.35%.

(2)在以 TBC 为碳源和能源的培养基中,检测到了与 TBC 降解相关的主要酶活性-邻苯二酚 1,2-双加氧酶,证明菌株 YH1 主要通过邻位开环裂解途径降解 TBC. 对菌株 YH1 的相关降解酶研究表明,菌株 YH1 的相关降解酶位于胞内,只有诱导后菌体才能产生邻苯二酚 1,2-双加氧酶的活性. 利用特异引物进行 PCR 扩增可从菌株 YH1 基因组中扩增出 1 条 251 bp 的片段,测序比对结果显示该片段为邻

苯二酚 1,2-双加氧酶基因片段。

(3)通过质粒检测和消除发现菌株 YH1 具有 1 个较大的质粒,且菌株 YH1 对 TBC 的降解与质粒有关。此外,对降解底物广谱性研究表明,菌株 YH1 能降解多种芳香族化合物。同时菌株 YH1 还能耐受多种重金属和高浓度的 NaCl。

(4)采用 Placket-Burman 实验设计筛选出影响菌株 YH1 菌株降解 TBC 的主要因素为接种量、胰蛋白胨浓度和初始 pH。应用响应面法分析优化设计 TBC 降解的最佳条件为:蔗糖浓度 3% (ρ)、胰蛋白胨浓度 1.44% (ρ)、TBC 浓度 400 mg·L⁻¹、初始 pH 值 8.12、接种量 2.97% (φ)、温度 30℃、培养时间 96 h,在此条件下 TBC 降解率可达 98.21%。

参考文献:

- [1] Han H W, Duan Q H. Synthesis and reaction characterization of 4-tert-Butylcatechol [J]. Petroleum Processing and Petrochemicals, 2012, **43**(1): 78-83.
- [2] Wang Q, Li Y, Li J, *et al.* Experimental and kinetic study on the cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, **22**(1): 565-573.
- [3] Wang Y F, Wang X L, Li H, *et al.* Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, **93**(10): 138-144.
- [4] 陈明, 张维, 徐玉泉, 等. 醋酸钙不动杆菌 PHEA-2 对苯酚的降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2001, **21**(3): 226-229.
- [5] Al-Khalid T, El-Naas M H. Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2012, **42**(16): 1631-1690.
- [6] Huang Z Z, Wang P, Li H, *et al.* Community analysis and metabolic pathway of halophilic bacteria for phenol degradation in saline environment [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, **94**(3): 115-120.
- [7] Yao H Y, Ren Y, Wei C H, *et al.* Biodegradation characterisation and kinetics of *m*-cresol by *Lysinibacillus cresolivorans*[J]. Water SA, 2011, **37**(1): 15-20.
- [8] Juang R S, Tsai S Y. Role of membrane-attached biofilm in the biodegradation of phenol and sodium salicylate in microporous membrane bioreactors[J]. Journal of Membrane Science, 2006, **282**(1-2): 484-492.
- [9] Li Y, Li J, Wang C, *et al.* Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1 [J]. Bioresource Technology, 2010, **101**(17): 6740-6744.
- [10] 许甜甜, 陈军. 共代谢基质对苯酚降解菌 XTT-3 降酚作用的影响[J]. 环境污染与防治, 2012, **34**(5): 39-42.
- [11] 陈春, 李文英, 吴静文, 等. 焦化废水中苯酚降解菌筛选及其降解性能[J]. 环境科学, 2012, **33**(5): 1652-1656.
- [12] Polymenakou P N, Stephanou E G. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*[J]. Biodegradation, 2005, **16**(5): 403-413.
- [13] Zhou J Y, Yu X J, Ding C, *et al.* Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology [J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, **23**(1): 22-30.
- [14] Patil P D, Gude V G, Mannarswamy A, *et al.* Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2011, **102**(2): 1399-1405.
- [15] Sahu J N, Acharya J, Meikap B C. Optimization of production conditions for activated carbons from *Tamarind wood* by zinc chloride using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2010, **101**(6): 1974-1982.
- [16] 颜克亮, 许威, 吴航军, 等. 响应面法优化白腐菌 *Pleurotus ostreatus* 降解六氯苯[J]. 环境污染与防治, 2009, **31**(8): 23-27.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 370-399.
- [18] Tabrez Khan S, Hiraishi A. *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2002, **48**(6): 299-308.
- [19] 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株 (*Rhodococcus* sp. strain PNAN5) 的分离鉴定, 降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. 环境科学学报, 2004, **24**(3): 482-486.
- [20] 葛启隆, 岳秀萍, 王国英. 一株苯酚降解菌的分离鉴定及响应面法优化其固定化[J]. 中国环境科学, 2014, **34**(2): 518-525.
- [21] 任华峰, 李淑芹, 刘双江, 等. 一株对氯苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学, 2005, **26**(1): 154-158.
- [22] Sei K, Asano K I, Tateishi N, *et al.* Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, **88**(5): 542-550.
- [23] Haberl S, Jarc M, Štrancar A, *et al.* Comparison of alkaline lysis with electroextraction and optimization of electric pulses to extract plasmid DNA from *Escherichia coli*[J]. The Journal of Membrane Biology, 2013, **246**(11): 861-867.
- [24] 李钧敏, 金则新. 两株有机物降解菌株质粒特性的研究[J]. 中国环境科学, 2005, **25**(4): 403-407.
- [25] GB T6020-2008, 工业用丁二烯中特丁基邻苯二酚(TBC)的测定[S].
- [26] Nakazawa T, Yokota T. Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways [J]. Journal of Bacteriology, 1973, **115**(1): 262-267.
- [27] Murray K, Williams P A. Role of catechol and the methylcatechols as inducers of aromatic metabolism in *Pseudomonas putida* [J]. Journal of Bacteriology, 1974, **117**

(3): 1153-1157.

[28] 於建明, 刘靚, 蔡文吉, 等. 一株苯乙烯高效降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 中国环境科学, 2014, **34**(6): 1564-1571.

[29] 孙纪全, 汤岳琴, 刘伟强, 等. 两株假单胞菌降解酚类化合物的特性[J]. 中国环境科学, 2010, **30**(12): 1633-1638.

[30] Heinaru E, Truu J, Stottmeister U, *et al.* Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, **31**(3): 195-205.

[31] 吴楚. 一株十二烷基苯磺酸钠降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 微生物学报, 2006, **46**(6): 988-993.

[32] 向述荣, 林敏. 苯酚的生物降解基因组成及其调控机制[J]. 微生物学杂志, 2001, **21**(3): 48-53.

[33] Halak S, Basta T, Bürger S, *et al.* 4-Sulfomuconolactone hydrolases from *Hydrogenophaga intermedia* S1 and *Agrobacterium radiobacter* S2[J]. Journal of Bacteriology, 2007, **189**(19): 6998-7006.

[34] 段佩玲, 王振宇, 党玉姣, 等. 一株 *Diaphorobacter* 属细菌对苯酚的降解特性和代谢途径[J]. 环境科学与技术, 2010, **33**(8): 33-36.

[35] 龚斌, 刘津, 赵斌. 一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J]. 环境科学学报, 2006, **26**(12): 2008-2012.

[36] 陈晓华, 魏刚, 刘思远, 等. 高效降酚菌株 *Ochrobactrum* sp. CH10 生长动力学和苯酚降解特性的研究[J]. 环境科学, 2012, **33**(11): 3956-3961.

[37] 关向杰, 杨海君, 黄水娥, 等. 一株耐铬不动杆菌对十二烷基硫酸钠的降解特性[J]. 环境工程学报, 2014, **8**(5): 2117-2123.

[38] Hess T F, Silverstein J, Schmidt S K. Effect of glucose on 2,4-dinitrophenol-degradation kinetics in sequencing batch reactors[J]. Water Environment Research, 1993, **65**(1):73-81.

CONTENTS

Potential Source Contribution Analysis of the Particulate Matters in Shanghai During the Heavy Haze Episode in Eastern and Middle China in December, 2013	Li Li, CAI Jun-lin, ZHOU Min (2327)
Composition and Regional Characteristics of Atmosphere Aerosol and Its Water Soluble Ions over the Yangtze River Delta Region in a Winter Haze Period	WANG Man-ting, ZHU Bin, WANG Hong-lei, <i>et al.</i> (2337)
Chemical Species of PM _{2.5} in the Urban Area of Beijing	LIU Bao-xian, YANG Dong-yan, ZHANG Da-wei, <i>et al.</i> (2346)
Numerical Study on the Characteristics of Regional Transport of PM _{2.5} in Shandong Province During Spring in 2014	JIA Hai-ying, CHENG Nian-liang, HE You-jiang, <i>et al.</i> (2353)
Characteristics of Water-Soluble Inorganic Ions in PM _{2.5} Emitted from Coal-Fired Power Plants	MA Zi-zhen, LI Zhen, JIANG Jing-kun, <i>et al.</i> (2361)
Direct Observation on the Temporal and Spatial Patterns of the CO ₂ Concentration in the Atmospheric of Nanjing Urban Canyon in Summer	GAO Yun-qiu, LIU Shou-dong, HU Ning, <i>et al.</i> (2367)
Emission Factors of Vehicle Exhaust in Beijing	FAN Shou-bin, TIAN Ling-di, ZHANG Dong-xu, <i>et al.</i> (2374)
Adsorption Capacity of the Air Particulate Matter in Urban Landscape Plants in Different Polluted Regions of Beijing	ZHANG Wei-kang, WANG Bing, NIU Xiang (2381)
Major Air Pollutant Emissions of Coal-Fired Power Plant in Yangtze River Delta	DING Qing-qing, WEI Wei, SHEN Qun, <i>et al.</i> (2389)
Estimation of N ₂ O Emission from Anhui Croplands by Using a Regional Nitrogen Cycling Model IAP-N	HAN Yun-fang, HAN Sheng-hui, YAN Ping (2395)
Evaluation on the Impacts of Different Background Determination Methods on CO ₂ Sources and Sinks Estimation and Seasonal Variations	ZHANG Fang, ZHOU Ling-xi, WANG Yu-zhao (2405)
Measured and Predicted Aquatic Life Criteria and Risk Assessment of Chromium (VI) in Liaohe River	WANG Xiao-nan, YAN Zhen-guang, LIU Zheng-tao, <i>et al.</i> (2414)
Pollution and Potential Ecology Risk Evaluation of Heavy Metals in River Water, Top Sediments on Bed and Soils Along Banks of Bortala River, Northwest China	ZHANG Zhao-yong, Jilili Abuduwaile, JIANG Feng-qing (2422)
Influencing Factors for Hydrochemistry and δ ¹³ C _{DIC} of Karst Springs	ZHAO Rui-yi, LÜ Xian-fu, LIU Zi-qi, <i>et al.</i> (2430)
Hydrochemical Characteristics and the Dissolved Inorganic Carbon Flux in Liuzhou Section of Liujiang Basin	YUAN Ya-qiong, HE Shi-yi, YU Shi, <i>et al.</i> (2437)
Characteristics of Total Nitrogen and Total Phosphorus Pollution and Eutrophication Assessment of Secondary River in Urban Chongqing	QING Xu-yao, REN Yu-fen, LÜ Zhi-qiang, <i>et al.</i> (2446)
Static Migration and Release of Dibutyl-Phthalate in the Fluctuating Zone of Three Gorges Reservoir	WANG Fa, WANG Qiang, MU Zhi-jian, <i>et al.</i> (2453)
Effect of Drought and Subsequent Re-wetting Cycles on Transferable Nitrogen and Its Form Distribution in the Sediment of Water Level Fluctuating Zone in the Tributary of Three Gorge Reservoir Areas	LIN Jun-jie, ZHANG Shuai, YANG Zhen-yu, <i>et al.</i> (2459)
Distribution of Chlorophyll-a and Eutrophication State in Tianchi Lake of Tianshan Mountains in Summer	WANG Bin, MA Jian, WANG Yin-ya, <i>et al.</i> (2465)
Vertical Distribution Characteristics and Analysis in Sediments of Xidaihai Lake	DUAN Mu-chun, XIAO Hai-feng, ZANG Shu-ying (2472)
Phytoplankton Community Structure and Water Quality Assessment in Jialing River After the Impoundment of Caojie Reservoir	YANG Min, ZHANG Sheng, LIU Shuo-ru (2480)
Analysis of Prokaryotic Community Structure in River Waters of the Ningbo Sanjiang Mouth	HU An-yi, LI Jiang-wei, YANG Xiao-yong, <i>et al.</i> (2487)
Effects of Perfluoroalkyl Substances on the Microbial Community Structure in Surface Sediments of Typical River, China	SUN Ya-jun, WANG Tie-yu, PENG Xia-wei, <i>et al.</i> (2496)
Coupling Effects of Decomposed <i>Potamogeton crispus</i> and Growing <i>Ceratophyllum demersum</i> on Water Quality and Plant Growth	MA Yue, WANG Guo-xiang, CAO Xun, <i>et al.</i> (2504)
Bioretention Media Screening for the Removal of Phosphorus in Urban Stormwater	LI Li-qing, GONG Yan-fang, YAN Zi-qin, <i>et al.</i> (2511)
Treatment of Urban Runoff Pollutants by a Multilayer Biofiltration System	WANG Xiao-lu, ZUO Jian-e, GAN Li-li, <i>et al.</i> (2518)
Effect of Three Typical Disinfection Byproducts on Bacterial Antibiotic Resistance	LÜ Lu, ZHANG Meng-lu, WANG Chun-ming, <i>et al.</i> (2525)
Laboratory Investigation of DNAPL Migration Behavior and Distribution at Varying Flow Velocities Based on Light Transmission Method	GAO Yan-wei, ZHENG Fei, SHI Xiao-qing, <i>et al.</i> (2532)
Comparative Study of Benzotriazole Electrochemical Oxidation at Boron-doped Diamond and PbO ₂ Anodes	WU Juan-li, ZHANG Jia-wei, WANG Ting, <i>et al.</i> (2540)
Sorption of <i>o</i> -Phthalate onto Calcite in Open-System	LI Zhen-xuan, HUANG Li-dong, CHEN Yan-fang, <i>et al.</i> (2547)
Adsorption Behaviors of Lead on Multi-Walled Carbon Nanotube-Hydroxyapatite Composites	ZHANG Jin-li, LI Yu (2554)
Synthesis and Study on Adsorption Property of Congo Red Molecularly Imprinted Polymer Nanospheres	CHANG Zi-qiang, CHEN Fu-bin, ZHANG Yu, <i>et al.</i> (2564)
Simultaneous Removal of Cd(II) and Phenol by Titanium Dioxide-Titanate Nanotubes Composite Nanomaterial Synthesized Through Alkaline-Acid Hydrothermal Method	LEI Li, JIN Yin-jia, WANG Ting, <i>et al.</i> (2573)
Immobilization of Estrogen-degrading Bacteria to Remove the 17β-estradiol and Diethylstilbestrol from Polluted Water and Cow Dung	LI Xin, LING Wan-ting, LIU Jing-xian, <i>et al.</i> (2581)
Optoelectronic PCB Wastewater Treatment by Partial Nitrification-ANAMMOX Integrative Reactor	YUAN Yan, LI Xiang, ZHOU Cheng, <i>et al.</i> (2591)
Treatment of Petrochemical Treatment Plant Secondary Effluent by Fenton Oxidation	WANG Yi, WU Chang-yong, ZHOU Yue-xi, <i>et al.</i> (2597)
Comprehensive Toxicity Evaluation and Toxicity Identification Used in Tannery and Textile Wastewaters	HUANG Li, CHEN Wen-yan, WAN Yu-shan, <i>et al.</i> (2604)
Carbon/nitrogen Removal and Bacterial Community Structure Change in an A/O Activated Sludge System Under Different Dissolved Oxygen Conditions	CHEN Yan, LIU Guo-hua, FAN Qiang, <i>et al.</i> (2610)
ORP in the Main Anoxic Stage as the Control Parameter for Nitrogen and Phosphorus Removal in the Single Sludge System with a Continuous Flow	WANG Xiao-ling, SONG Tie-hong, YIN Bao-yong, <i>et al.</i> (2617)
Cultivation of Aerobic Granular Sludge with Real Low Concentration Domestic Wastewater and Its Denitrification Performances Under the Continuous Flow	YAO Li, XIN Xin, LU Hang, <i>et al.</i> (2626)
Heavy Metal Contamination in Farmland Soils at an E-waste Disassembling Site in Qingyuan, Guangdong, South China	ZHANG Jin-lian, DING Jiang-feng, LU Gui-ning, <i>et al.</i> (2633)
Residues and Spatial Distribution Characteristics of Organochlorine Pesticides DDTs in Soil of Linyi City, Shandong Province	YU Chao, WANG Zeng-hui, WANG Hong-jin, <i>et al.</i> (2641)
Assessment of Soil Fluorine Pollution in Jinhua Fluorite Ore Areas	YE Qun-feng, ZHOU Xiao-ling (2648)
Response of Straw and Straw Biochar Returning to Soil Carbon Budget and Its Mechanism	HOU Ya-hong, WANG Lei, FU Xiao-hua, <i>et al.</i> (2655)
Changes of Soil Organic Carbon and Its Influencing Factors of Apple Orchards and Black Locusts in the Small Watershed of Loess Plateau, China	LI Ru-jian, WANG Rui, LI Na-na, <i>et al.</i> (2662)
Impacts of Land Use Changes on Soil Light Fraction and Particulate Organic Carbon and Nitrogen in Jinyun Mountain	LEI Li-guo, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju (2669)
Soil Enzyme Activities and Their Relationships to Environmental Factors in a Typical Oasis in the Upper Reaches of the Tarim River	ZHU Mei-ling, GONG Lu, ZHANG Long-long (2678)
Effects of Different Residue Part Inputs of Corn Straws on CO ₂ Efflux and Microbial Biomass in Clay Loam and Sandy Loam Black Soils	LIU Si-yi, LIANG Ai-zhen, YANG Xue-ming, <i>et al.</i> (2686)
Isolation, Identification of a <i>p</i> - <i>tert</i> -Butylcatechol-Degrading Strains and Optimization for Its Degradation by Response Surface Methodology	HE Qiang-li, LIU Wen-bin, YANG Hai-jun, <i>et al.</i> (2695)
Isolation, Identification and Characteristic Analysis of an Oil-producing <i>Chlorella</i> sp. Tolerant to High-strength Anaerobic Digestion Effluent	YANG Chuang, WANG Wen-guo, MA Dan-wei, <i>et al.</i> (2707)
Coupled Cytotoxicity of C ₆₀ Nano-Crystal Particle with Cu ²⁺ to the Mouse Peritoneal Microphage RAW 264. 7	YU Ye, BIAN Wei-lin, ZHANG Hui-min, <i>et al.</i> (2713)
Simultaneous Analysis of 18 Glucocorticoids in Surface Water	GUO Wen-jing, CHANG Hong, SUN De-zhi, <i>et al.</i> (2719)

《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 刘 毅 汤鸿霄 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)

2015 年 7 月 15 日 第 36 卷 第 7 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 36 No. 7 Jul. 15, 2015

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 国内邮发代号: 2-821
CN 11-1895/X

国 内 定 价: 120.00 元 国外发行代号: M 205

国 内 外 公 开 发 行