

十溴联苯醚降解菌的分离鉴定、降解特性及降解机理

范罗圣¹, 吴涓^{*1}, 胡丁璠¹, 荚荣²

1 安徽大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230601

2 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

范罗圣, 吴涓, 胡丁璠, 荚荣. 十溴联苯醚降解菌的分离鉴定、降解特性及降解机理[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 78-90.
FAN Luosheng, WU Juan, HU Dingfan, JIA Rong. Isolation, identification, degradation characteristics and mechanisms of decabromodiphenyl ether degrading bacteria[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 78-90.

摘要:【背景】十溴联苯醚(decabromodiphenyl ether, BDE-209)是应用最广泛的溴代阻燃剂之一, 其持久性毒性给生态环境和生物体带来了严重危害。【目的】分离出一株能有效降解 BDE-209 的好氧细菌并研究其降解特性及机理, 以探究 BDE-209 的微生物降解规律。【方法】以 BDE-209 为唯一碳源, 通过富集、分离和纯化, 从活性污泥中筛选出 BDE-209 好氧降解细菌。采用高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 和液相色谱-质谱联用仪 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 分别检测 BDE-209 的浓度和中间产物。【结果】筛选得到一株 BDE-209 好氧降解细菌 F, 经鉴定初步判定为硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens*)。在 30 °C、pH 7.0、接种量为 10% (体积分数)、葡萄糖浓度为 250 mg/L 的优化降解条件下, 对初始浓度为 10 mg/L 的 BDE-209 的降解率可达 76.2%。低浓度的 Cd²⁺ (≤5 mg/L) 未对 BDE-209 的微生物降解和菌体生长产生显著影响, 而高浓度的 Cd²⁺ (≥15 mg/L) 对 BDE-209 的微生物降解和菌体生长则产生显著影响。BDE-209 对细胞表面疏水性 (cell surface hydrophobicity, CSH) 具有一定的影响。BDE-209 的微生物降解机理主要包括脱溴、羟基化、二苯醚键断裂和开环等过程。【结论】菌株 F 对 BDE-209 具有很好的降解能力, 研究结果对 BDE-209 的好氧微生物降解及 BDE-209 污染环境的生物修复具有较好的科学意义。

关键词: 十溴联苯醚; 菌株 F; 微生物降解; 细胞表面疏水性; 降解机理

资助项目: 国家自然科学基金(31970100)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970100).

*Corresponding author. E-mail: wujuan@ustc.edu

Received: 2022-03-31; Accepted: 2022-06-01; Published online: 2022-07-04

Isolation, identification, degradation characteristics and mechanisms of decabromodiphenyl ether degrading bacteria

FAN Luosheng¹, WU Juan^{*1}, HU Dingfan¹, JIA Rong²

1 School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

2 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: [Background] Decabromodiphenyl ether (BDE-209) is one of the most widely used brominated flame retardants, which has caused serious harm to ecological environment and organisms due to its persistent toxicity. [Objective] To obtain an aerobic bacterium that could effectively degrade BDE-209 and to study its degradation characteristics and mechanisms. [Methods] The aerobic degrading bacterium was isolated from activated sludge by enrichment, isolation and purification using BDE-209 as the sole carbon source. The concentration of BDE-209 and the intermediate products were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), respectively. [Results] A BDE-209 aerobic degrading strain F was screened and preliminarily identified as *Pseudomonas nitroreducens*. Under the optimal degradation conditions of 30 °C, pH 7.0, 10% inoculum volume and 250 mg/L glucose, the degradation efficiency reached 76.2% for 10 mg/L (initial concentration) BDE-209. Obvious effects of low Cd²⁺ concentrations (≤ 5 mg/L) on BDE-209 biodegradation and the growth of *P. nitroreducens* were not observed, while the effects of high Cd²⁺ concentrations (≥ 15 mg/L) were significant. In addition, BDE-209 affected cell surface hydrophobicity to some degree. The biodegradation mechanisms of BDE-209 mainly included debromination, hydroxylation, cleavage of diphenyl ether bonds and ring opening. [Conclusion] Strain F showed good biodegradation ability for BDE-209. The research results facilitated the aerobic microbial degradation of BDE-209 and the bioremediation of BDE-209 polluted environment.

Keywords: decabromodiphenyl ether; strain F; microbial degradation; cell surface hydrophobicity; degradation mechanism

十溴联苯醚(decabromodiphenyl ether, BDE-209)作为目前用量最大的溴代阻燃剂(brominated flame retardants, BFRs),被广泛应用于塑料制品、建筑材料、电气产品等行业中^[1]。不恰当的拆解处置很容易导致这些产品中的BDE-209释放到环境中,在大气、水、土壤、沉积物甚至鱼类、母乳等环境介质中均检测到其存在^[2-4]。然而,作为持久性有机污染物,BDE-209因其难降解性、致癌性和神经毒性,

对生态环境及生物体造成的严重危害日益受到重视^[5]。因此,开发有效、环境友好的处理技术将BDE-209从环境中去除具有重要意义。

释放到环境中的BDE-209可以通过零价铁还原^[6]、光催化氧化^[7]、高级氧化还原^[8]和微生物降解^[9]等方法去除。与其他方法相比,微生物降解作为一种高效、环保和低成本的技术,被认为是一种很有前景的修复策略。研究表明,无论在厌氧还是好氧条件下,微生物都能降解

BDE-209^[10]。Gerecke 等^[11]发现, BDE-209 在厌氧消化池中反应 238 d 后浓度仅降低了 50%, 并且最终转化为毒性更大的低溴代联苯醚同系物。与厌氧微生物降解相比, BDE-209 可以被好氧微生物迅速矿化成小分子化合物, 大大缩短了降解时间且不易产生二次污染^[12]。然而, 目前可用于 BDE-209 好氧降解的微生物资源仍十分有限, 因此, 需要从环境中分离出更多有效的降解菌株。近年来, 关于 BDE-209 生物降解的研究大多集中于土壤、沉积物等环境介质中的 BDE-209 的厌氧降解^[9,13], 但可用于水相中 BDE-209 好氧降解的微生物资源仍十分有限, 因此, 迫切需要从环境中分离出更多有效的好氧降解菌株, 为 BDE-209 污染环境的生物修复提供技术支持。

有机污染物的微生物降解过程受多种因素的影响, 如外加碳源、环境条件、共存有毒物质等。其中, 重金属的影响尤为重要, 因其毒性可能会影响微生物的生长繁殖, 进而影响有机污染物的生物降解效果^[14]。在电子垃圾处理过程中, 伴随着 BDE-209 的释放, Cu、Cd、Pb 等多种重金属常同时被释放到环境中^[15]。目前, 镉是汽车和化学工业等所产生废弃物中释放最普遍的污染物之一, 也是环境中与 BDE-209 共存最丰富的重金属之一^[16]。因此, 研究 Cd²⁺对 BDE-209 微生物降解的影响, 对于开展多溴联苯醚-重金属复合污染的研究具有重要意义。

本研究从活性污泥中分离出一株对 BDE-209 具有良好降解能力的好氧细菌, 并通过降解条件的优化和最适外加碳源的选择, 以及细胞表面疏水性和降解产物的分析, 揭示 BDE-209 的微生物降解特性及其降解机理, 同时也对 Cd²⁺浓度对 BDE-209 微生物降解和细菌生长的影响进行初探, 以期对溴代阻燃剂污染环境的生物修复提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

菌株来源: 从合肥市王小郢污水处理厂的活性污泥中分离有效降解菌株。

1.1.2 培 养 基

液体富集培养基采用的是 LB 液体培养基^[17]。

固体富集培养基: LB 培养基加琼脂 20.00 g/L。

无机盐培养基(minimal salt medium, MSM) (g/L): KH₂PO₄ 2.65, Na₂HPO₄·12H₂O 4.26, MgSO₄·7H₂O 0.20, CaCl₂ 0.02, NaCl 0.50, NH₄Cl 0.50, 微量盐溶液 2 mL, 自然 pH。

微量盐溶液 (g/L): CuSO₄·5H₂O 0.03, FeSO₄·7H₂O 2.10, MnSO₄·H₂O 0.06, ZnCl₂ 0.07, CoCl₂·6H₂O 0.19。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) (g/L): KH₂PO₄ 0.24, Na₂HPO₄ 1.44, NaCl 8.00, KCl 0.20, pH 7.40。

1.1.3 主要试剂和仪器

BDE-209 (纯度>99%)、葡萄糖、苯酚、柠檬酸钠, 阿拉丁试剂公司; 蛋白胨、酵母粉、琼脂, 美国 Sigma 公司; KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、MgSO₄·7H₂O、CaCl₂、NaCl、NH₄Cl、NaOH、CuSO₄·5H₂O、FeSO₄·7H₂O、MnSO₄·H₂O、ZnCl₂、CoCl₂·6H₂O、KCl, 国药集团化学试剂有限公司; 二氯甲烷、正己烷和四氢呋喃, Tedia 公司; Cd²⁺标准溶液, 国家有色金属研究院。

电子天平、纯水仪和高压蒸汽灭菌锅, 上海邦沃仪器设备有限公司; 高速冷冻离心机、恒温振荡培养器和紫外分光光度计, 上海赫普国际贸易有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 BDE-209 降解菌的分离纯化

取 100 mL 活性污泥静置 30 min 后, 取 5 mL

上清液加入装有 50 mL LB 液体培养基的 150 mL 锥形瓶中, 在 30 °C、150 r/min 条件下培养 72 h 后, 取 2.5 mL 培养液加到含 5 mg/L BDE-209 的 MSM 中进行振荡培养, 培养体系总体积为 20 mL。每 72 h 重复一次上述操作, 并逐步提高培养基中 BDE-209 的初始浓度, 其浓度梯度设定为 5、10、20、30、40、50、60 mg/L。

取驯化最后 1 个周期的培养液 1 mL, 用无菌水将培养液按 10 倍稀释法作梯度稀释, 取 0.1 mL 稀释后的培养液均匀涂布于含 60 mg/L BDE-209 的固体 LB 培养基上, 并于 30 °C 恒温培养。待培养基上长出单菌落后, 挑选具有明显形态特征的单菌落, 采用划线分离法将其反复纯化 5-7 次, 并对不同形态的单菌落进行编号。将初筛所得各菌株分别接种于装有 50 mL 富集培养基的锥形瓶中, 在 30 °C、150 r/min 条件下富集培养 24 h, 取 2 mL 菌液接种于 BDE-209 初始浓度为 10 mg/L 的 MSM 中进行复筛实验。培养 120 h 后用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定体系中剩余 BDE-209 浓度, 计算生物降解率, 以此为依据挑选降解效果最好的菌株, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行分子生物学鉴定。

1.2.2 菌悬液的制备

将菌株接种于含有 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 30 °C、150 r/min 条件下培养 24 h 后以 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用适量 PBS 冲洗菌体 2 次, 收集菌体, 用 PBS 重悬成 OD_{600} 为 0.5 的菌悬液, 用于后续的微生物降解实验。

1.2.3 BDE-209 降解条件的优化

采用三因素五水平 $L_{25}(5^3)$ 的正交实验确定 BDE-209 的最适微生物降解条件。正交试验设计如表 1 所示。将 BDE-209 溶于二甲基亚砜配制成浓度为 10 000 mg/L 的母液, 取 20 μ L 上述

表 1 正交试验设计

Table 1 Design of the orthogonal experiments

水平 Level	温度 Temperature (°C)	pH	接种量 Inoculum (%)
1	20	5.00	1
2	25	6.00	5
3	30	7.00	10
4	35	8.00	15
5	40	9.00	20

溶液加到已灭菌的 MSM 中, 并接种适量菌悬液, 使降解体系总体积为 20 mL, BDE-209 的初始浓度为 10 mg/L。按照表 1 中的试验设计进行降解实验, 以含相同浓度 BDE-209 但不接种的 MSM 为空白对照, 降解 120 h 后取样测定 BDE-209 的剩余浓度, 计算其生物降解率。根据正交试验的结果确定 BDE-209 的最优降解条件。

1.2.4 不同外加碳源条件下的 BDE-209 降解实验

在 BDE-209 初始浓度为 10 mg/L 的 MSM 中分别加入酵母粉、葡萄糖、苯酚和柠檬酸钠, 使其在降解体系中的浓度均为 250 mg/L, 以含 BDE-209 但不外加碳源的 MSM 作为对照进行微生物降解实验。降解 120 h 后取样测定 BDE-209 的剩余浓度, 计算 BDE-209 的生物降解率, 并结合菌体生长量确定最适外加碳源的种类。

1.2.5 不同 Cd^{2+} 浓度下的 BDE-209 降解实验

将 Cd^{2+} 标准溶液加到含 10 mg/L BDE-209 的 MSM 中, 以葡萄糖为外加碳源, 接种 2 mL 菌悬液, 降解体系总体积为 20 mL。降解体系中葡萄糖浓度为 250 mg/L, 在高浓度范围内 Cd^{2+} 浓度分别设置为 5、15、30、60 和 100 mg/L; 在低浓度范围内 Cd^{2+} 浓度分别设置为 0.05、0.10、0.30、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 和 5.00 mg/L。在 30 °C、150 r/min 条件下进行降解实验, 以不含 Cd^{2+} 但含有 BDE-209 的 MSM 作为对照。降解 120 h 后取样测定 BDE-209 的

剩余浓度, 计算 BDE-209 的生物降解率, 并测定 600 nm 处体系的吸光度值。

1.2.6 细胞表面疏水性的测定

采用细菌黏附碳氢化合物的方法测定细胞表面疏水性 (cell surface hydrophobicity, CSH)^[18]。将培养或降解一段时间后的体系于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 5 min, 菌体用 PBS 洗涤 2 次并于 4 °C、8 000 r/min 条件下离心 5 min, 然后用 PBS 重悬成 OD_{600} 介于 0.53–0.54 之间的菌悬液。取 8 mL 上述菌悬液, 分别加入 1、2、4、6、8、10、12 mL 二甲苯, 室温下充分振荡 2 min, 静置 10 min 至分层, 收集下层水样并在 600 nm 处测定其吸光度, 以确定二甲苯的最适用量。实验以不加二甲苯为空白对照。CSH 的计算公式为:

$$CSH = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中: A_0 为空白样品的吸光度值, A_1 为样品的吸光度值。

1.2.7 扫描电镜的观察

菌体经 2.5%戊二醛固定、乙醇脱水、冷冻干燥及表面喷金后, 用高分辨率扫描电镜 (high resolution scanning electron microscope, HRSEM) 观察细胞表面形态。

1.3 分析方法

1.3.1 BDE-209 浓度的测定

将降解一定时间后的 20 mL 培养液用等体积的二氯甲烷和正己烷 (1:1) 萃取 2 次, 有机相用无水硫酸钠脱水后于 40 °C、120 r/min 条件下旋转蒸发浓缩至 1 mL, 用四氢呋喃洗下内壁黏附物并定容至 10 mL, 取 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤后保存至棕色进样小瓶中。

HPLC 法测定 BDE-209 浓度的条件为: 色谱柱为安捷伦 C18 柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm), 流动相为乙腈: 纯水体积比 98:2, 柱温为 30 °C, 流速为 1 mL/min, 进样量为 20 μL, 检测波长为 240 nm。

1.3.2 BDE-209 降解产物的分析

采用液相色谱-质谱联用仪 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 检测并分析降解中间产物, 分析条件为: 色谱柱为 Hypersil Gold C18 柱 (150 mm×2.1 mm×3 μm), 流动相为乙腈: 水体积比 98:2, 柱温和流速分别为 30 °C 和 1 mL/min, 进样量和检测波长分别为 20 μL 和 240 nm。梯度洗脱程序为: 5% A (0–0.8 min), 5%–50% A (0.8–5 min), 50%–90% A (5–7 min), 90% A (7–9 min), 90%–5% A (9–10 min), 5% A (10–13 min)。离子源在负电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 下工作, 负离子扫描模式, 源中的电荷注入检测器 (charge injection detector, CID) 电压为 50 V。

所有实验均设置 3 个平行, 取其平均值作为最终结果。本文数据之间的统计学差异采用 SPSS 26.0 进行分析, 若 $P < 0.05$ 则认为存在显著性差异。对本文相关实验数据的分析结果均为 $P < 0.05$, 表明存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 BDE-209 降解菌的筛选与鉴定

通过分离纯化, 从活性污泥中筛选得到 15 株对 BDE-209 具有一定降解能力的细菌, 分别标记为 A–O。在含 10 mg/L BDE-209 的 MSM 中培养 120 h 后, 各菌株对 BDE-209 的降解率如图 1 所示。其中菌株 F 对 BDE-209 的降解能力最好, 降解率为 57.1%。如图 2A 所示, 菌落呈乳白色, 直径约为 2–3 mm, 圆形且不透明, 表面光滑。在显微镜下观察发现该细菌呈短杆状 (图 2B)。

将菌株 F 的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank (登录号为 KC625329.1) 进行比对, 结果表明, 菌株 F 与硝基还原假单胞菌 (*Pseudomonas nitroreducens*) 相似性最高, 达 99.93%。基于菌

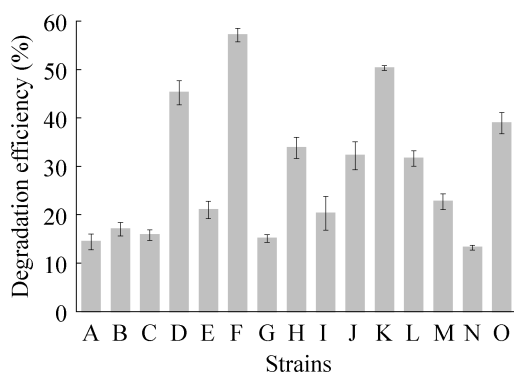


图 1 筛选的 15 株细菌对 BDE-209 的降解率
Figure 1 Degradation efficiency of BDE-209 by 15 screened bacteria.

株 F 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树如图 3 所示。

2.2 温度、pH、接种量对 BDE-209 生物降解的影响

温度、pH 和接种量都是影响微生物降解的重要因素,为获得菌株 F 降解 BDE-209 的最优条件,采用了三因素五水平的正交试验。表 2 的结果表明,3 个因素对 BDE-209 生物降解的影响依次为: pH>接种量>温度,其中 pH 对 BDE-209 生物降解的影响最大。BDE-209 的最优微生物降解条件为: pH 7.0,接种量 10%,温度 30 °C。

2.3 外加碳源对 BDE-209 微生物降解的影响

2.3.1 外加碳源种类的影响

在前述优化条件下研究了酵母粉、葡萄糖、苯酚和柠檬酸钠 4 种外加碳源对菌株 F 降解 BDE-209 的影响,结果如图 4A 所示。在外加碳源浓度均相等的条件下,酵母粉和葡萄糖的加入均促进了 BDE-209 的微生物降解,与对照相比降解率分别提高了 13.0%和 19.1%,而苯酚和柠檬酸钠却抑制了降解。通过对比菌体生长量的变化发现(图 4B),葡萄糖对菌株 F 的生长促进作用比酵母粉对菌株 F 的生长促进作用更明显。综合考虑降解能力和菌体生长量,应选择葡萄糖作为 BDE-209 微生物降解的最适外加碳源。

2.3.2 葡萄糖浓度的影响

分别向降解体系中加入不同量的葡萄糖,使其在体系中的浓度分别为 50、100、250、500、1 000 mg/L,以考察葡萄糖浓度对 BDE-209 生物降解的影响,实验以不加葡萄糖为对照,在前述优化条件下进行降解实验,结果如图 4C 所示。低浓度的葡萄糖(≤ 250 mg/L)对降解具有促进作用,而高浓度的葡萄糖(≥ 500 mg/L)却对 BDE-209 的降解有显著的抑制作用。当葡萄糖浓度为 250 mg/L 时降解率达最高,为 76.2%。

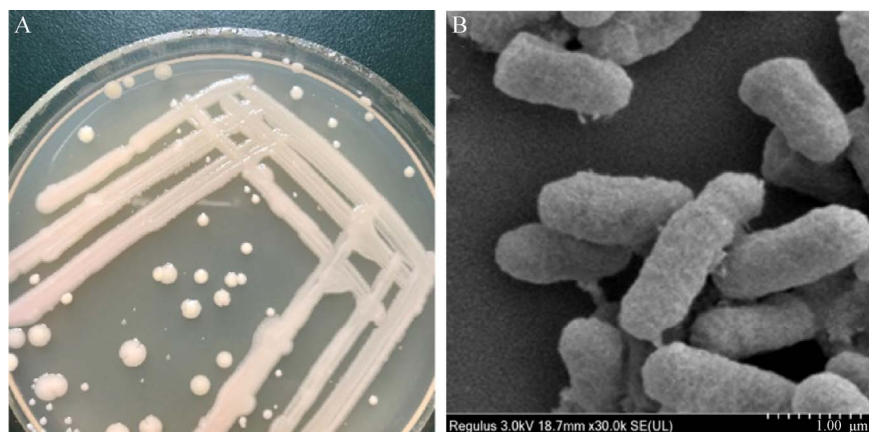


图 2 菌株 F 的形态学观察 A: 生长形态. B: 扫描电子显微镜图像

Figure 2 Morphological observation of strain F. A: Growth morphology. B: Scanning electron microscope image.

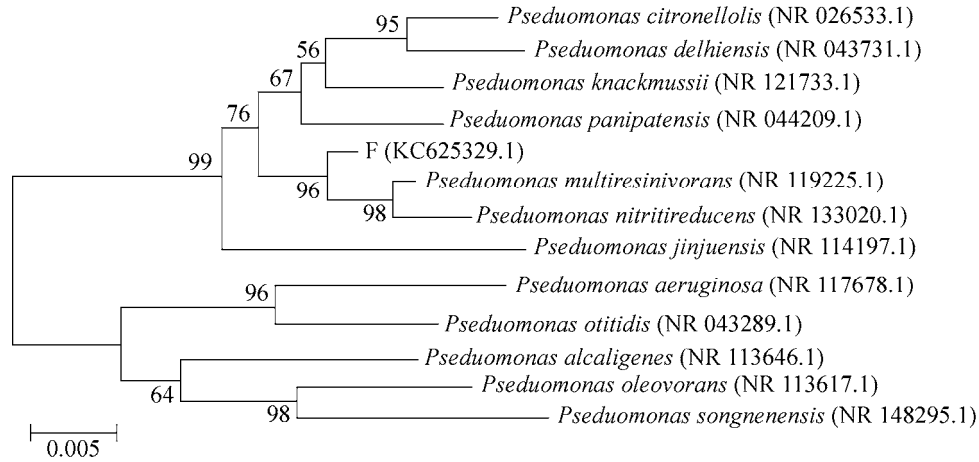


图3 菌株 F 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号; 标尺 0.005 代表序列偏差值; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain F. The serial number in brackets is the GenBank accession No. of the strain, and the value of 0.005 represents the sequence deviation value. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees.

表 2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiments

Level	温度 Temperature (°C)	pH	接种量 Inoculum (%)
水平 1 均值 Level 1 mean	20.93	14.76	9.93
水平 2 均值 Level 2 mean	25.25	29.33	20.58
水平 3 均值 Level 3 mean	33.59	41.35	36.23
水平 4 均值 Level 4 mean	32.21	37.96	35.53
水平 5 均值 Level 5 mean	26.26	14.85	35.84
极差 Range	12.66	26.59	26.30

2.4 Cd²⁺浓度对 BDE-209 微生物降解的影响

如图 5A 所示, BDE-209 的生物降解率和菌株 F 的生长量均随着 Cd²⁺浓度的增加呈现出先增大后减小的趋势, 当 Cd²⁺浓度为 5 mg/L 时, BDE-209 的生物降解受到了轻微的促进作用, 降解率最高达 74.4%, 与对照相比仅提高了 3.2%, 生长量也达到最大值。然而高浓度的 Cd²⁺ (≥15 mg/L) 则对 BDE-209 的生物降解有显著的抑制作用。由于实际环境中 Cd²⁺浓度较低, 因

此本文又考察了浓度在 5 mg/L 以下的 Cd²⁺对 BDE-209 微生物降解及菌体生长的影响。从图 5B 可以看出, 低浓度的 Cd²⁺ (≤5 mg/L) 对 BDE-209 生物降解和菌株 F 的生长并未产生明显影响。

2.5 BDE-209 初始浓度对菌体 CSH 的影响

在生物降解过程中, CSH 是决定有机污染物能否被吸附到细胞表面并进入细胞内部被降解的重要因素之一。如图 6A 所示, CSH 在不同 BDE-209 初始浓度下均呈现出先增大后减小的共同趋势, 并在 72 h 时达到最高值且 CSH 均保持在 66.5%–74.7%, 但在 72 h 之后菌株 F 的 CSH 随着时间的推移逐渐降低, 在 120 h 时 CSH 降至 28.7%–38.8%。从图 6A 中还可以看出, 高浓度 BDE-209 比低浓度 BDE-209 对 CSH 的影响略大。以 72 h 的 CSH 为例, 在分别含有 5、10、20 mg/L BDE-209 的降解系统中, 与对照相比菌体 CSH 分别降低了 1.3%、3.3%和 8.2%。图 6B 表明, BDE-209 在前 72 h 内降解率迅速增大, 随后降解率的变化不显著, 而 CSH 也是在前 72 h 内逐渐增大, 随后开始减小。由此可

见, 降解率与 CSH 之间表现出了正相关性。此外, 由图 6C 可以看出, 菌株 F 在 72 h 时进入了生长稳定期, 而此时生长量也达到最大。上述结果表明, 菌株 F 的 CSH、生长量和 BDE-209 的生物降解能力三者之间具有很好的相关性。

2.6 BDE-209 生物降解路径的推导

为深入解析菌株 F 对 BDE-209 的微生物降

解机制, 采用 LC-MS 对中间产物进行了分析, 共检测到 7 种主要中间产物, 即五溴联苯醚 (BDE-99)、四溴联苯醚 (BDE-47)、三溴联苯醚 (BDE-28)、3-羟基-2',4,4'-三溴联苯醚、2,3-二羟基-4,4'-二溴联苯醚、2,5-二溴苯酚和 3-羧基-4-溴-己二酸。基于上述中间产物和相关文献[19-20], 提出了 BDE-209 生物降解的可能途径(图 7)。

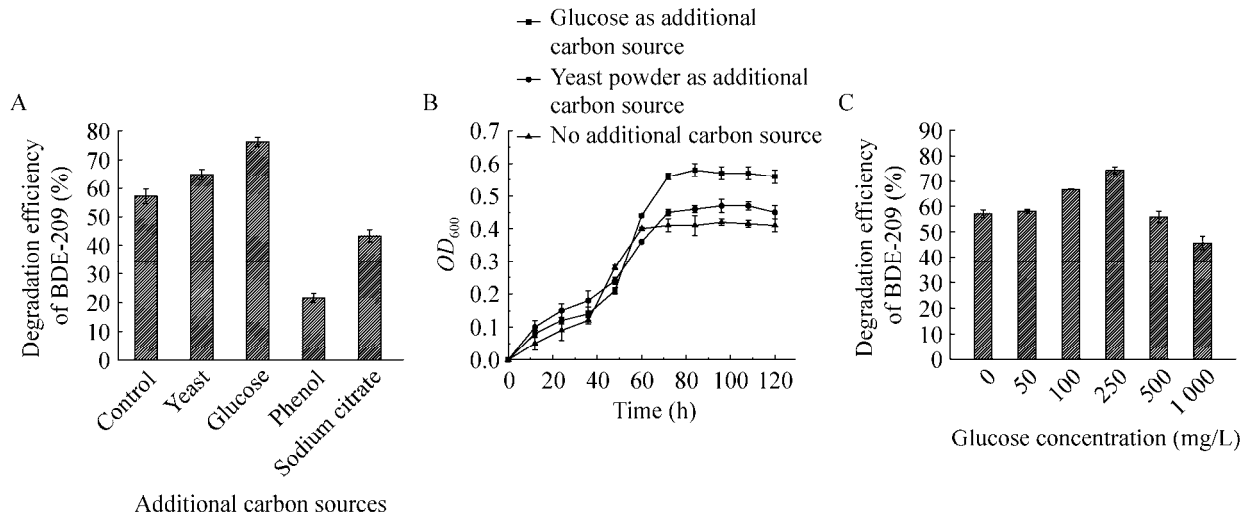


图 4 外加碳源对菌株 F 降解 BDE-209 的影响 A: 外加碳源对 BDE-209 生物降解的影响. B: 菌株 F 的生长曲线. C: 葡萄糖浓度对 BDE-209 生物降解的影响

Figure 4 Effects of additional carbon sources on BDE-209 biodegradation by strain F. A: Effects of additional carbon sources on BDE-209 biodegradation. B: Growth curves of strain F under glucose and yeast, respectively. C: Effects of glucose concentration on BDE-209 biodegradation.

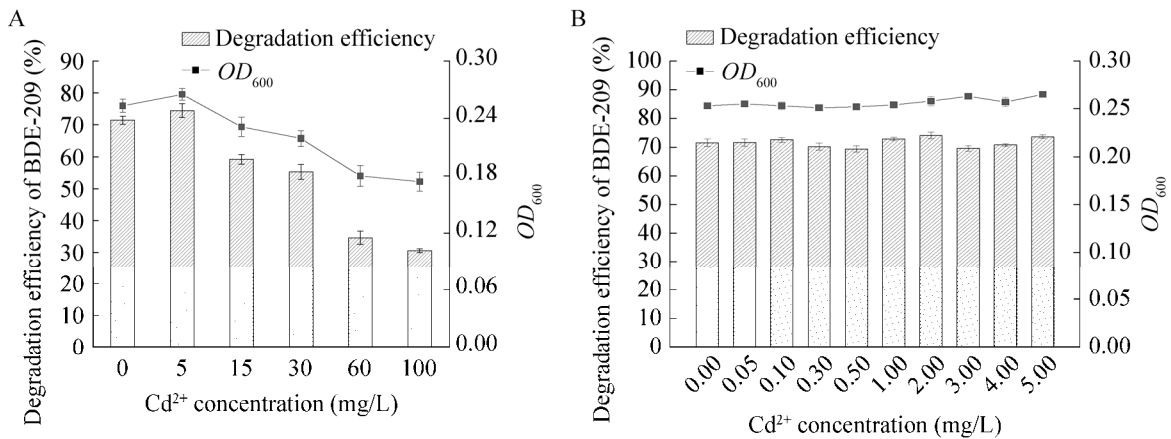


图 5 不同浓度 Cd²⁺对 BDE-209 生物降解及菌株 F 生长的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of Cd²⁺ on BDE-209 biodegradation and the growth of strain F.

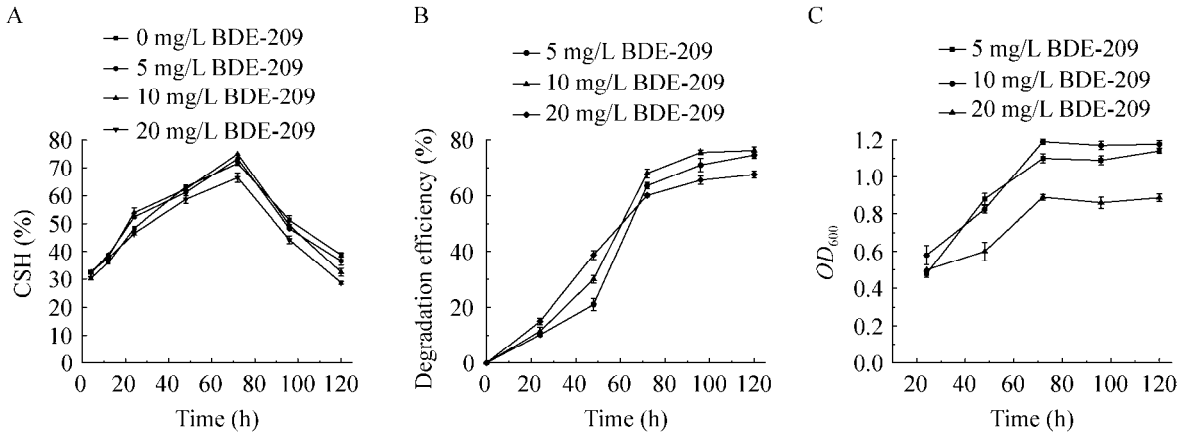


图6 BDE-209 初始浓度对菌株 F 及 BDE-209 生物降解的影响 A: BDE-209 初始浓度对菌株 F CSH 的影响. B: BDE-209 初始浓度对生物降解率的影响. C: BDE-209 初始浓度对菌株生长的影响
Figure 6 Effects of BDE-209 initial concentrations on strain F and the biodegradation of BDE-209. A: Effects of BDE-209 initial concentrations on CSH of strain F. B: Effects of BDE-209 initial concentrations on BDE-209 degradation efficiency. C: Effects of BDE-209 initial concentrations on strain growth.

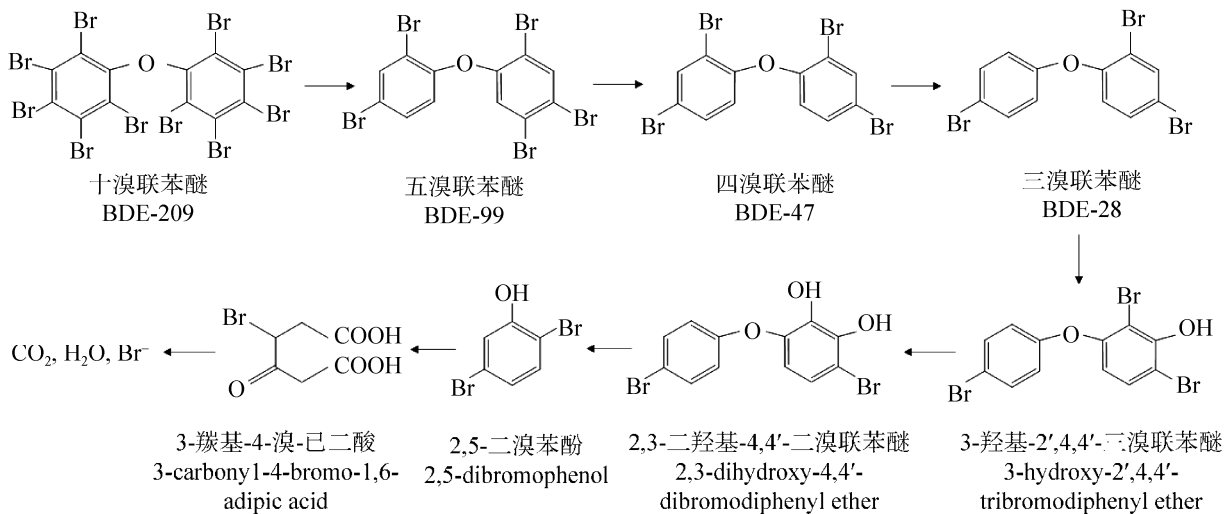


图7 BDE-209 的微生物降解途径

Figure 7 Proposed pathways of BDE-209 biodegradation by strain F.

首先, BDE-209 脱溴形成 BDE-99, 然后通过邻位脱溴生成 BDE-47, 接着通过间位脱溴产生 BDE-28. 随后 BDE-28 发生羟基化反应, 依次生成 3-羟基-2',4,4'-三溴联苯醚和 2,3-二羟基-4,4'-二溴联苯醚. 这些羟基化产物再通过二苯醚键的断裂进一步转化为 2,5-二溴苯酚以及开环产物 3-羰基-4-溴-己二酸, 这些产物最终可能通过三羧酸循环矿化成 CO_2 和 H_2O .

3 讨论与结论

BDE-209 是一类广泛存在于环境中的有机污染物, 本研究发现所筛选的菌株 F 能够利用 BDE-209 为唯一碳源生长, 并在有氧条件下有效降解 BDE-209, 在未优化降解条件的情况下降解率即可达到 57.1%. 与其他研究相比^[19,21], 菌株 F 对 BDE-209 表现出较强的降解能力.

正交试验结果表明, 环境 pH、培养温度和接种量对 BDE-209 的微生物降解有着重要影响。一方面, pH 值的变化会引起细胞膜电位的变化, 改变营养离子在细胞膜上的转运, 从而影响细菌的生长^[22]。另一方面, 过酸或过碱性环境会抑制降解酶的活性^[23], 导致菌株 F 对污染物的降解能力下降。除 pH 值外, 接种量也是影响 BDE-209 降解的一个重要因素, 接种量过低时, 微生物的生长和降解酶的合成均会受到抑制, 从而影响 BDE-209 的降解效率。温度虽然是 3 个因素中影响最小的, 然而过低或过高的温度依然会影响微生物的生长及降解酶的分泌, 从而影响 BDE-209 的生物降解。丁娟等^[24]研究了白腐真菌对 BDE-209 的降解, 在 30 °C、150 r/min 条件下培养 10 d 后, BDE-209 的降解率达到 43.0%。Tang 等^[25]发现, 短短芽孢杆菌在 30 °C、130 r/min 条件下培养 7 d, 对 BDE-209 的降解率仅有 44.0%。与国内外相关研究相比, 菌株 F 具有降解效率较高、降解周期短等优点。

实验发现, 当无机盐培养基中葡萄糖浓度分别为 50、100、250 mg/L 时, 与对照相比, BDE-209 的降解率有显著提高, 然而在无机盐培养基中不添加葡萄糖时, BDE-209 仍然有 57.2% 的降解率, 这一现象表明菌株 F 对 BDE-209 的代谢并不是共代谢。在生长代谢中, 对于难降解的有机污染物, 可以通过添加外加碳源的方法来增强细胞活性, 加快其繁殖速度, 缩短对污染物的适应期, 改善降解效果^[26]。通过研究 4 种外加碳源(酵母粉、葡萄糖、柠檬酸钠和苯酚)对 BDE-209 生物降解的影响, 发现酵母粉和较低浓度的葡萄糖对降解均有显著的促进作用, 其中 250 mg/L 葡萄糖对 BDE-209 的降解和菌株的生长促进作用更明显。葡萄糖能够改善菌株的生长条件, 促进降解酶的分泌, 增强降解效果。然而, 葡萄糖浓度过高时微生

物会大量利用容易分解的葡萄糖而较少利用难分解的目标污染物, 从而抑制了目标污染物的降解^[27]。据报道^[28], 加入适宜浓度的葡萄糖不仅会促进菌株对 BDE-209 的利用, 还能改变菌株生长代谢过程中的某些膜通道, 使菌株更有效地降解 BDE-209。因此, 葡萄糖可作为菌株 F 降解 BDE-209 的最适外加碳源。这与常晶晶等^[29]的研究结果相似。

除 BDE-209 外, 重金属也是伴随着电子垃圾拆解过程进入环境的另一种主要污染物。本文研究了不同浓度 Cd^{2+} 对 BDE-209 生物降解和细菌生长的影响, 发现在 0.05–5.00 mg/L 的低浓度范围内, 共存的 Cd^{2+} 对 BDE-209 的生物降解和细菌生长量的影响均不显著, 表明菌株 F 对低浓度的 Cd^{2+} 具有一定的耐受性。然而实验也表明, 在 5–100 mg/L 的高浓度范围内, 5 mg/L 的 Cd^{2+} 可以轻微促进 BDE-209 的生物降解和菌株 F 的生长, 可能是由于低浓度的 Cd^{2+} 可以在转录和复制过程中调节相关酶的基因, 促进相关酶的活性^[30]。Baldrian^[31]也发现, Cd^{2+} 提高了白腐真菌合成的 Lac 酶的活性, 从而促进了 BDE-209 的降解。然而在较高的 Cd^{2+} 水平 (15–100 mg/L) 下, 由于 Cd^{2+} 对菌株 F 的毒性作用, BDE-209 的生物降解受到显著抑制。

在微生物降解过程中, 有机物附着在细胞表面是微生物去除疏水性有机污染物全过程的第一步^[32], CSH 是决定 BDE-209 能否被吸附到细胞表面并进一步被降解的重要因素。据报道^[18], 当 $CSH > 70\%$ 时, 细胞具有高疏水性; 当 $CSH < 70\%$ 时, 细胞是低疏水性的。菌株 F 在降解 BDE-209 的第 72 h 时 CSH 达到最大值为 74.7%, 由此可见, 菌株 F 的细胞表面具有较高疏水性, 有利于菌体对 BDE-209 的吸附与降解; 而第 72 h 后 CSH 的逐渐降低可能是因为降解后期营养缺乏而使得细胞活性降低和膜结构发

生改变,从而导致疏水区被破坏^[18]。Liu 等^[33]在利用铜绿假单胞菌降解 BDE-209 的研究中发现,第 72 h 时菌体的 CSH 达到 52.1%,随后 CSH 也呈下降趋势。Tang 等^[34]研究发现铅黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)的 CSH 最高可达 58.2%。因此,本研究筛选得到的菌株 F 具有更高的 CSH,有利于 BDE-209 被细胞表面吸附并降解。

在 5–20 mg/L BDE-209 浓度范围内,菌株 F 均能较好地生长。随着 BDE-209 浓度增大至 20 mg/L,菌株 F 的生长受到了一定程度的抑制,然而菌株 F 对 20 mg/L BDE-209 的降解率在 72 h 时仍然达到了 70.8%,表明该菌株对较高浓度的 BDE-209 具有较好的耐受力。与其他研究^[35-36]相比,菌株 F 明显缩短了 BDE-209 生物降解的时间,提高了降解效率。此外,实验结果显示,在降解的前 72 h 内,菌株 F 的 CSH 和生长量均逐渐增大并在 72 h 时达到最大,而降解率也是逐渐增大的,并在 72 h 后变化逐渐趋于平缓。这一现象表明,细胞膜的疏水性与菌株对 BDE-209 的生物降解能力具有正相关性,而细胞的良好生长状态有利于降解酶的合成,从而有利于 BDE-209 的降解。

还原脱溴是 BDE-209 生物降解过程中的一个重要步骤^[37]。本研究检测到几种脱溴产物,如 BDE-99、BDE-47 和 BDE-28,发现溴的去除容易发生在邻位和间位。此外,羟基化反应也是卤代芳香族化合物生物降解的关键过程之一^[38]。Lu 等^[39]利用蜡状芽孢杆菌降解 BDE-209,发现在降解过程中主要发生脱溴和羟基化反应。Wang 等^[19]发现 BDE-209 在葡萄球菌的作用下主要发生了脱溴、羟基化和开环反应,并最终矿化成小分子化合物。本文基于中间产物的分析,发现菌株 F 降解 BDE-209 的过程中包含了 4 种代谢机制,即脱溴、羟基化、

二苯醚键断裂和开环,其中开环产物 3-羰基-4-溴-己二酸鲜有报道。本研究表明,菌株 F 能够同时实现 BDE-209 的还原脱溴和氧化分解。

综上所述,本研究从活性污泥中分离出一株 BDE-209 高效好氧降解细菌 F。在优化的条件下(pH 7.0、30 °C、10%接种量、250 mg/L 葡萄糖),对 10 mg/L BDE-209 降解率最高可达 76.2%。外加碳源对 BDE-209 的微生物降解具有显著影响。与高浓度 Cd²⁺对 BDE-209 生物降解和菌体生长的显著影响相比,低浓度 Cd²⁺的影响并不明显。菌株 F 较高的 CSH 有利于 BDE-209 被细胞表面吸附而进一步被降解。此外,BDE-209 在生物降解过程中发生了脱溴、羟基化、二苯醚断裂和开环等过程。本研究分离的菌株 F 对 BDE-209 具有良好的生物降解能力,研究结果为 BDE-209 污染环境的生物修复提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] YU YY, YIN H, HUANG WT, PENG H, LU GN, DANG Z. Cellular changes of microbial consortium GY1 during decabromodiphenyl ether (BDE-209) biodegradation and identification of strains responsible for BDE-209 degradation in GY1[J]. *Chemosphere*, 2020, 249: 126205.
- [2] TAHERAN M, KOMTCHOU S, LONAPPAN L, NAJI T, BRAR SK, CLEDON M, DROGUI P. Environmental issues of polybrominated diphenyl ethers[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2017, 47(13): 1107-1142.
- [3] MAKEY CM, MCCLEAN MD, BRAVERMAN LE, PEARCE EN, SJÖDIN A, WEINBERG J, WEBSTER TF. Polybrominated diphenyl ether exposure and reproductive hormones in North American men[J]. *Reproductive Toxicology*, 2016, 62: 46-52.
- [4] KIM EJ, KIM JH, KIM JH, BOKARE V, CHANG YS. Predicting reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers by nanoscale zerovalent iron and its implications for environmental risk assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 470/471: 1553-1557.

- [5] LV YC, LI LH, CHEN YC, TANG ZH, HU YY. Effects of glucose and biphenyl on aerobic cometabolism of polybrominated diphenyl ethers by *Pseudomonas putida*: kinetics and degradation mechanism[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 108: 76-84.
- [6] XUE WJ, HUANG DL, ZENG GM, WAN J, ZHANG C, XU R, CHENG M, DENG R. Nanoscale zero-valent iron coated with rhamnolipid as an effective stabilizer for immobilization of Cd and Pb in river sediments[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 341: 381-389.
- [7] SUN CY, ZHAO JC, JI HW, MA WH, CHEN CC. Photocatalytic debromination of preloaded decabromodiphenyl ether on the TiO₂ surface in aqueous system[J]. Chemosphere, 2012, 89(4): 420-425.
- [8] NI SQ, YANG N. Cation exchange resin immobilized bimetallic nickel-iron nanoparticles to facilitate their application in pollutants degradation[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2014, 420: 158-165.
- [9] ZHOU QX, GE CH, AHMAD HA, NI SQ, LIU XL, BU CN, WANG FL, GAO BY. Production of more toxic hexa-brominated diphenyl ether from rapid biotransformation of decabromodiphenyl ether in anaerobic granular sludge[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 134: 7-15.
- [10] ZHAO CH, YAN M, ZHONG H, LIU ZF, SHI LS, CHEN M, ZENG GM, SONG B, SHAO BB, FENG HP. Biodegradation of polybrominated diphenyl ethers and strategies for acceleration: a review[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 129: 23-32.
- [11] GERECKE AC, GIGER W, HARTMANN PC, HEEB NV, KOHLER HPE, SCHMID P, ZENNEGG M, KOHLER M. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge[J]. Chemosphere, 2006, 64(2): 311-317.
- [12] STIBOROVA H, VRKOSLAVOVA J, LOVECKA P, PULKRABOVA J, HRADKOVA P, HAJSLOVA J, DEMNEROVA K. Aerobic biodegradation of selected polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in wastewater sewage sludge[J]. Chemosphere, 2015, 118: 315-321.
- [13] CHANG YT, LO T, CHOU HL, LAIO YF, LIN CC, CHEN HT. Anaerobic biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209)-contaminated sediment by organic compost[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 113: 228-237.
- [14] SARAN LM, PISSARRA TCT, SILVEIRA GA, CONSTANCIO MTL, de MELO WJ, ALVES LMC. Land use impact on potentially toxic metals concentration on surface water and resistant microorganisms in watersheds[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 166: 366-374.
- [15] LEUNG AOW, LUKSEMBURG WJ, WONG AS, WONG MH. Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soil and combusted residue at Guiyu, an electronic waste recycling site in southeast China[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(8): 2730-2737.
- [16] SHI GY, YIN H, YE JS, PENG H, LI J, LUO CL. Effect of cadmium ion on biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 263: 711-717.
- [17] 陈雪娇, 金丹凤, 丁海涛, 赵宇华. 十溴联苯醚降解菌的分离鉴定及其降解特性的初步研究[J]. 浙江大学学报, 2010, 36(5): 521-527.
- CHEN XJ, JIN DF, DING HT, ZHAO YH. Isolation and identification of decabromodiphenyl ethers degrading bacteria and preliminary study of their degradation characteristics[J]. Journal of Zhejiang University, 2010, 36(5): 521-527 (in Chinese).
- [18] 陈烁娜, 尹华, 叶锦韶, 彭辉, 张娜, 何宝燕. 嗜麦芽窄食单胞菌处理苯并[a]芘-铜复合污染过程中细胞表面特性的变化[J]. 化工学报, 2012, 63(5): 1592-1598.
- CHEN SN, YIN H, YE JS, PENG H, ZHANG N, HE BY. Change of cell surface features of *Stenotrophomonas maltophilia* in treating benzo[a]pyrene-copper combined pollution[J]. CIESC Journal, 2012, 63(5): 1592-1598 (in Chinese).
- [19] WANG LQ, LI Y, ZHANG WL, NIU LH, DU J, CAI W, WANG J. Isolation and characterization of two novel psychrotrophic decabromodiphenyl ether-degrading bacteria from river sediments[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2016, 23(11): 10371-10381.
- [20] LIU Y, GONG AJ, QIU LN, LI JR, LI FK. Effect of copper ion and soil humic acid on biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. MicrobiologyOpen, 2017, 6(3): e00439.
- [21] QIU MD, CHEN XJ, DENG DY, GUO J, SUN GP, MAI BX, XU MY. Effects of electron donors on anaerobic microbial debromination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)[J]. Biodegradation, 2012, 23(3): 351-361.
- [22] YU YY, YIN H, PENG H, LU GN, DANG Z. Proteomic mechanism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) biodegradation by *Microbacterium* Y2 and its potential in remediation of BDE-209 contaminated water-sediment

- system[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387: 121708.
- [23] de OLIVEIRA CARVALHO J, ORLANDA JFF. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract[J]. *Food Chemistry*, 2017, 233: 159-163.
- [24] 丁娟, 周娟, 姜玮颖, 高士祥. 多溴联苯醚好氧生物降解研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(11): 3179-3184.
DING J, ZHOU J, JIANG WY, GAO SX. Aerobic microbial degradation of polybrominated diphenyl ethers[J]. *Environmental Science*, 2008, 29(11): 3179-3184 (in Chinese).
- [25] TANG SY, BAI JQ, YIN H, YE JS, PENG H, LIU ZH, DANG Z. Tea saponin enhanced biodegradation of decabromodiphenyl ether by *Brevibacillus brevis*[J]. *Chemosphere*, 2014, 114: 255-261.
- [26] 臧淑艳, 李培军, 周启星, 王新, 林桂凤, 王娟. 苯并(a)芘及其代谢产物的连续降解研究[J]. *环境科学*, 2006, 27(12): 2531-2535.
ZANG SY, LI PJ, ZHOU QX, WANG X, LIN GF, WANG J. Study on continued degradation of BaP and its metabolites[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(12): 2531-2535 (in Chinese).
- [27] MORI T, KONDO O, KAWAGISHI H, HIRAI H. Effects of glucose concentration on ethanol fermentation of white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under aerobic conditions[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(3): 263-269.
- [28] 赵银平, 赵晓祥, 杨伟, 王玥. 外加碳源对菌株 GH10 降解 BDE-209 的影响[J]. *环境科学与技术*, 2016, 39(1): 134-139.
ZHAO YP, ZHAO XX, YANG W, WANG Y. Effects of different carbon sources on the degradation of BDE-209 by strain GH10[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 39(1): 134-139 (in Chinese).
- [29] 常晶晶, 尹华, 秦华明, 叶锦韶, 彭辉, 宋小飞. 十溴联苯醚降解菌的特性及功能蛋白初步分析[J]. *环境科学*, 2013, 34(10): 4112-4118.
CHANG JJ, YIN H, QIN HM, YE JS, PENG H, SONG XF. Characteristics and functional protein analysis of an effective decabromodiphenyl ether-degrading strain[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(10): 4112-4118 (in Chinese).
- [30] ZHANG Y, SHEN GQ, YU YS, ZHU HL. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(11): 3064-3068.
- [31] BALDRIAN P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(1): 78-91.
- [32] CHEN SN, YIN H, YE JS, PENG H, ZHANG N, HE BY. Effect of copper(II) on biodegradation of benzo[a]pyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Chemosphere*, 2013, 90(6): 1811-1820.
- [33] LIU Y, GONG AJ, QIU LN, LI JR, LI FK. Biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by crude enzyme extract from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, 12(9): 11829-11847.
- [34] TANG SY, YIN H, CHEN SN, PENG H, CHANG JJ, LIU ZH, DANG Z. Aerobic degradation of BDE-209 by *Enterococcus casseliflavus*: isolation, identification and cell changes during degradation process[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 308: 335-342.
- [35] 陈轶伦. 十溴联苯醚的好氧微生物降解特性及机理研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2011.
CHEN YL. Studies on degradation characteristics and mechanism of decabromodiphenyl ether by aerobic microorganisms[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
- [36] WU ZN, XIE MM, LI Y, GAO GH, BARTLAM M, WANG YY. Biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by a newly isolated bacterium from an e-waste recycling area[J]. *AMB Express*, 2018, 8(1): 27.
- [37] DING C, CHOW WL, HE JZ. Isolation of *Acetobacterium* sp. strain AG, which reductively debrominates octa- and pentabrominated diphenyl ether technical mixtures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4): 1110-1117.
- [38] MAI ZM, WANG L, LI QQ, SUN YT, ZHANG S. Biodegradation and metabolic pathway of phenanthrene by a newly isolated bacterium *Gordonia* sp. SCSIO19801[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 585: 42-47.
- [39] LU M, ZHANG ZZ, WU XJ, XU YX, SU XL, ZHANG M, WANG JX. Biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by a metal resistant strain, *Bacillus cereus* JP12[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 149: 8-15.