

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.06.021

河道底泥中四氯双酚 A 的厌氧降解及 硫酸盐还原菌对其降解效率的影响^{*}

刘世诚¹ 李玲玲¹ 任 源^{1**} 黄志立² 张丽君²

(1. 华南理工大学环境与能源学院, 广州, 510006; 2. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 深圳, 518055)

摘 要 本文采用血清瓶实验研究了贵屿镇练江底泥 TCBPA 的厌氧降解特性以及该过程中硫酸盐还原菌的变化情况. 结果表明, 在不同还原条件下, TCBPA 降解效率顺序为: 产甲烷环境 > 硫酸盐还原环境 > 接种控制, 对应降解速率常数分别为: 0.0844 d^{-1} 、 0.0694 d^{-1} 、 0.0561 d^{-1} , 半衰期分别为: 8.2 d、10.0 d、12.4 d. 与接种控制组相比, 加入电子供体可加速 TCBPA 降解, 降解速率常数可达 0.0722 d^{-1} , 半衰期为 9.6 d. 加入邻苯二甲酸丁酯后, TCBPA 降解受到抑制, 降解速率常数为 0.0491 d^{-1} , 半衰期为 14.1 d. 使用 Comparative Ct 法进行荧光定量 PCR 实验, 结果表明硫酸盐还原菌在 TCBPA 降解过程中起到了积极的作用.

关键词 四氯双酚 A, 厌氧降解, 河道底泥, 硫酸盐还原菌, 荧光定量 PCR.

Anaerobic biodegradation of TCBPA in river sediment and the role of Sulfate Reducing Bacteria (SRB) in TCBPA's degradation

LIU Shicheng¹ LI Lingling¹ REN Yuan^{1**} HUANG Zhili² ZHANG Lijun²

(1. South China University of Technology, College of Environment and Energy, Guangzhou, 510006, China;

2. Shenzhen Polytechnic, School of Applied Chemistry and Biology Technology, Shenzhen, 518055, China)

Abstract: In this research, serum bottle experiments were established to investigate the anaerobic transformation of TCBPA with Lianjiang River sediments (Guiyu Town, Guangdong Province), and the changes of sulfate-reducing bacteria (SRB) in this process. The results showed that the order of anaerobic degradation rates of TCBPA in the sediments under different reducing conditions was methanogenic condition > sulfate-reducing condition > inoculated control. The degradation rate constants of each condition were 0.0844 d^{-1} , 0.0694 d^{-1} , and 0.0561 d^{-1} , while their half-lives were 8.2 d, 10.0 d, and 12.4 d, respectively. The degradation rate of TCBPA was enhanced by the addition of electron donors. Compared with the inoculated control sample, the degradation rate constant increased to 0.0722 d^{-1} and the half-life decreased to 9.6 d. On the other hand, the degradation was inhibited by the addition of butyl phthalate. The degradation rate constant decreased to 0.0491 d^{-1} , and the half-life increased to 14.1 d. Real time PCR experiment proved the positive role of SRB in the process of TCBPA degradation.

Keywords: tetrachlorobisphenol A, anaerobic degradation, river sediments, sulfate-reducing bacteria, real time PCR.

四氯双酚 A (Tetrachlorobisphenol-A, 4,4-isopropylidenebis [2,6-dichlorophenol], TCBPA) 是一种应用广泛的反应型阻燃剂, 通过化学反应向高分子材料中引入阻燃基团, 从而提高材料抗燃性, 阻止材料

2014 年 1 月 4 日收稿.

^{*} 国家自然科学基金 51178190; 广州市科信局应用基础研究项目 2013J4100107; 教育部留学回国人员科研启动基金资助.

^{**} 通讯联系人: Tel: 13808847210; E-mail: ceyren@scut.edu.cn

被引燃和抑制火焰传播.作为双酚 A (Bisphenol A, BPA) 的一种卤化衍生物,TCBPA 被广泛应用于建材、涂料、合成纤维纺织品、塑料制品、电子电路板和其他电子设备,此外还被作为添加剂,使用在环氧树脂、聚碳酸酯树脂、高抗冲聚苯乙烯、酚醛树脂和粘合剂等聚合物中^[1].TCBPA 的 $\lg K_{ow} = 4.02$,具有很强的疏水性,容易被水体中颗粒物、底泥以及水生生物所吸附,化学性质稳定,在环境介质中能保持很高的持久性,易于在生物体内富集^[2].

TCBPA 是一种环境激素,其结构与甲状腺激素类似,能够模仿甲状腺激素和雌性激素在人体内的活动^[3-4],并且具有潜在致癌作用^[5].Fan 等^[6]对国内 62 个饮用水采样点水样进行分析,在其中 37 个采样点中检测出了 TCBPA,其中浓度最高采样点浓度为 $7.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.如何有效降解环境中的 TCBPA,成为人们关注热点.

近年来,国外对 TCBPA 毒理性质、理化性质和降解机制等做了不少工作,主要集中在利用表面活性剂以提高 TCBPA 的生物可利用性,以及在不同还原条件下 TCBPA 的降解特性等.Yuan 等^[7]利用台湾某运河底泥对 TCBPA 进行厌氧降解,研究发现在加入酵母提取物、纤维素、氯化钠、鼠李糖脂或其他表面活性剂后,TCBPA 厌氧降解会得到不同程度促进,而加入邻苯二甲酸酯、壬基苯酚或重金属后,TCBPA 厌氧降解则会得到不同程度抑制.Voordecker^[8]等人发现 TCBPA 在厌氧条件下,先降解为二氯双酚 A (dichlorobisphenol-A, DCBPA) 再进一步脱氯最终转化为双酚 A (Bisphenol A, BPA).

硫酸盐还原菌 (SRB) 是一类与硫酸盐还原反应相关的细菌统称.SRB 特点是能够以有机物作为电子供体,以 SO_4^{2-} 作为最终电子受体,通过对有机物的厌氧消化而获取生存所需能量,是一种严格厌氧的真细菌.硫酸盐还原菌基质利用性较强而广泛存在于环境之中,加上我国电子垃圾拆解区使用的拆解工艺落后,拆解区周边水体和土壤酸化严重^[9],使得硫酸盐还原菌存在的可能性大大提高.对于硫酸盐还原菌在含氯有机物厌氧降解过程中所起到的作用,目前存在争议,有研究认为,硫酸盐还原条件氧化还原电位较低,在 -100 mV 以下^[10],且硫酸盐还原菌具有较强的基质利用性,所以硫酸盐还原条件可以加速还原脱卤过程;但也有研究认为,硫酸盐还原菌会与还原脱卤过程竞争电子,因此硫酸盐还原菌会抑制微生物的还原脱卤过程^[11].

目前,对 TCBPA 的研究主要集中在环境水平的检测以及其对动植物的影响上,有关 TCBPA 污染生物修复方法研究非常薄弱,且在该过程中硫酸盐还原菌的作用也未涉及.基于此本研究以 TCBPA 为目标污染物,在厌氧条件下考察了(1)河道底泥中原有微生物菌群对 TCBPA 的降解;(2)添加不同物质对 TCBPA 降解的促进或抑制关系;(3)荧光定量 PCR 法测定了 TCBPA 厌氧降解过程中硫酸盐还原菌的变化情况.期望研究结果对受到 TCBPA 污染的土壤/底泥修复提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

试剂:TCBPA 标准品(百灵威试剂有限公司,纯度 $>98\%$),甲醇、丙酮、二氯甲烷(优级纯,上海安谱科学仪器有限公司),琼脂糖(上海蓝季科技发展有限公司), 50^* TAE 缓冲液、DNA Marker D (100—2000 bp)、*Taq* PCR Master Mix(生工生物(上海)股份有限公司),Gold View 核酸染料,BioEasy Master Mix (SYRB Green) 荧光 PCR 试剂盒(博日科技有限公司),生物实验用水为高纯水,分子生物学实验用水为超纯水,其他试剂如无特别说明均为分析纯.TCBPA 的标准贮备液用丙酮配制,使用前加以稀释.

仪器:SYQ.DSX-280B 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);THZ-D 台式恒温振荡器(太仓市实验设备厂);四维旋转混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);JA1003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);9B5200DT 超声波清洗器(宁波新共生物科技股份有限公司);高效液相色谱 HPLC(Shimadzu LC20AT,日本);ProPlus 手持式野外/实验室两用测量仪(YSI,美国);DYY-2C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);BIO-RAD T100™ Thermal Cycler PCR 仪(BIO-RAD,美国);Step One™ Real-Time PCR Systems(Applied Biosystems,美国).

1.2 样品采集

电子垃圾拆解回收利用基地含卤阻燃剂污染状况严重,本研究沉积物样品取自于贵屿镇练江某支

流.利用重力取样管采取河流表层沉积物(0—15 cm)和深层沉积物(>15 cm),采样区河水以及河流岸边的土壤样品也一同被收集.所有沉积物样品都是随机采取,在所确定采样点 1 m²区域的中心位置采取泥样,每个地点平行 3 次.贵屿沉积物样品呈黑褐色凝胶状,质粒较细,伴有明显石油气味.表层沉积物样品 pH 值在 5—6 之间,溶解氧为 mg·L⁻¹.沉积物样品和水样都保存在事先灭菌的广口瓶中,瓶口边缘密封后,4 ℃下保存直至使用.

1.3 实验方法

泥样的配制:取 1800 mL 取样点水样装入广口玻璃瓶中,先通 N₂曝气 30 min,然后在通 N₂条件下加取样点污泥,配成 2400 mL 泥水混合物(预留 200—300 mL 泥样备用).加入 0.5 mL 刃天青(0.1%)作为氧指示剂.

TCBPA 加入方法:取适量不含 TCBPA 污染物的泥土干燥后研磨成细末,用高压蒸汽连续处理 3 d,每次 30 min;向 100 mL 血清瓶中添加 1 g 灭菌干土,加入 2 mL 10 mmol·L⁻¹ TCBPA 贮备液,使溶液完全浸没沉积物.将培养瓶放入通风橱,丙酮挥发后 TCBPA 即包覆在干泥土颗粒表面.在无氧条件下(通 N₂ 20—30 min),用干净无菌移液管移取 100 mL 泥水混合物于前述血清瓶中,使泥:水=1:3(V/V),培养瓶用内含聚四氟乙烯垫片外包铝帽的瓶盖压紧.

无菌控制:在 121 ℃下,连续 3 d 对含污染物的样品进行高压热处理,每次 30 min(间歇灭菌法).

电子供体:将乙酸、丙酸、丁酸以及乳酸等摩尔浓度混合,配制成 1000 mmol·L⁻¹储备液,加入反应体系后最终浓度为 1 mmol·L⁻¹.

泥样的培养:将泥样放在室温黑暗条件下静置培养(每隔 3—4 d 摇晃一次以保证均匀),每隔 7 d 在严格厌氧条件下取样 1 次,分别进行 TCBPA 和分子生物学分析.设置泥样条件如表 1 所示.

表 1 实验条件及实验目的
Table 1 Experimental conditions and purposes

实验条件	添加浓度	实验目的
NaHCO ₃ +电子供体	20 mmol·L ⁻¹ +1 mmol·L ⁻¹	产甲烷条件
Na ₂ SO ₄ +电子供体	20 mmol·L ⁻¹ +1 mmol·L ⁻¹	硫酸盐还原条件
邻苯二甲酸丁酯(PAE)+ 电子供体	2 mg·L ⁻¹ +1 mmol·L ⁻¹	TCBPA 降解的促进或抑制因子
电子供体	1 mmol·L ⁻¹	TCBPA 降解的促进或抑制因子
接种控制(Control)	/	土壤背景值
灭菌控制(Sterilization)	/	非生物控制

1.4 分析方法

TCBPA 萃取及分析:取样前充分振荡培养瓶,使基质混匀,然后用 2 mL 无菌注射器在厌氧条件下吸取 2 mL 泥水混合物注入 Φ=9 cm 的培养皿中,待泥样自然晾干后,转移至 8 mL 已称重透明玻璃小瓶,再次称重.然后加入 2 mL 的 CH₂Cl₂,置于四维旋转混合器旋转振荡过夜,再用超声清洗机超声 10 min,该萃取过程重复 2 次,并将两次萃取液混合,用 0.45 μm 的 PTFE 滤头过滤后进行 HPLC 分析.

HPLC 分析条件:安捷伦 Eclipse XDB 色谱柱(150×4.60 mm,5 μm),流动相为甲醇:水=90:10,流速为 1 mL·min⁻¹,在波长 238 nm 波长条件下 TCBPA 的停留时间为 2.3 min.

沉积物 DNA 提取:在每次取样测定体系中 TCBPA 剩余浓度的同时,移取 2 mL 泥水混合物存于 2 mL 离心管,使用 Power Soil DNA Isolation Kit(MO BIO, USA),参照说明书对样品中的基因组 DNA 进行提取.DNA 粗提液放置在-20 ℃保存备用.

基因组 DNA 的 PCR 扩增:PCR 引物:实验中所用引物均由生工生物(上海)股份有限公司合成,均用 HAP 法纯化,详见表 2.

样品中硫酸盐还原菌的检测,使用引物 Dsr2060F/ Dsr4R 对基因组 DNA 进行扩增,50 μL PCR 扩增体系如下:Taq PCR Master Mix(25 μL),DNA 模板(2 μL,约 5 ng),前后引物各 2 μL(0.4 μmol·L⁻¹),无核酸双蒸水 19 μL.预变性条件为 95 ℃,3 min,并在 95 ℃变性 30 s,50 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min 的条件下运行 30 个循环,然后在 72 ℃条件下延伸 10 min.扩增结束后在-20 ℃冰箱中保存备用.

表 2 PCR 引物序列
Table 2 PCR primer sequence

引物名称	引物序列	参考文献
341F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	[12]
518R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	[12]
Dsr2060F	5'-CAACATCGTYCAYACCCAGGG-3'	[13]
Dsr4R	5'-GTGTAGCAGTTACCGCA-3'	[14]

荧光定量 PCR 采用 Comparative C_t 法^[15]进行检测,该方法对同一样品中的目的基因和内参基因同时进行荧光定量 PCR 反应,定量结果由目的基因与内参基因 C_t 之间的差值(ΔC_t)来反映,再通过比较不同样品的 ΔC_t 值以确定各样品中目的基因的相对含量。

使用 Dsr2060F/ Dsr4R 作为目的基因引物,341F/518R 作为内参基因引物,普通好氧污泥作为背景控制,反应体系为 20 μL ,具体成分如下:2* SYBR MIX (10 μL),DNA 模板(2 μL ,约 5 ng),前后引物各 0.4 μL (0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),无核酸双蒸水 7.2 μL .预变性条件为 95 $^{\circ}\text{C}$,1 min,并在 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s 的条件下运行 40 个循环,Melt Curve 条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ (1 min),65 $^{\circ}\text{C}$ (1 min),95 $^{\circ}\text{C}$ (20 s,步进 0.5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$),30(1 min)。

2 结果与讨论

2.1 加入不同物质对 TCBPA 厌氧降解的影响

产甲烷条件和硫酸盐还原条件是两种典型的厌氧环境,而电子垃圾拆解区的土壤和底泥除受含卤阻燃剂的污染较严重外,电子垃圾中含有的邻苯二甲酸酯类(PAEs)也容易通过渗滤液和露天焚烧释放到环境中^[16],刘文莉等^[17]人对台州电子垃圾拆解地区土壤进行了分析检测,发现 PAEs 总含量在 12.566—46.669 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,其中邻苯二甲酸二辛酯(DEHP)、邻苯二甲酸丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二乙酯(DEP)相对含量较高,约占 PAEs 总量的 94%以上。

本研究中,以灭菌底泥和无添加底泥为对照,加入 NaHCO_3 和电子供体以制造产甲烷条件,加入 Na_2SO_4 和电子供体以制造硫酸盐还原条件,并分别测试了产甲烷条件、硫酸盐还原条件下厌氧体系中 TCBPA 浓度随时间的变化,同时也研究了在加入邻苯二甲酸丁酯和电子供体以及只加入电子供体的条件下 TCBPA 的厌氧降解,以分析加入不同物质对底泥中 TCBPA 厌氧降解的影响.实验结果如图 1 所示。

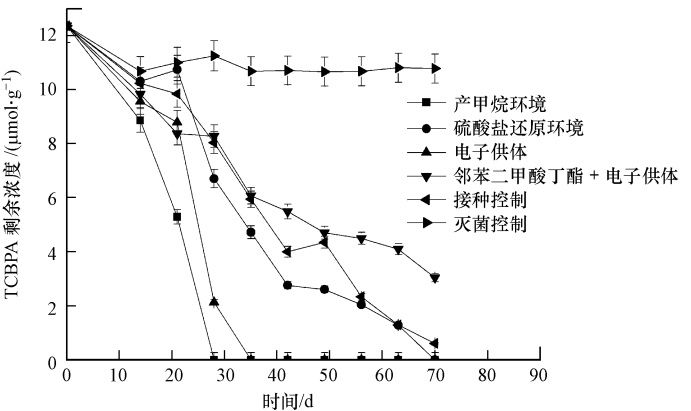


图 1 加入不同物质 TCBPA 的厌氧降解影响

(25 $^{\circ}\text{C}$,TCBPA 初始质量浓度为:12.37 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, NaHCO_3 +电子供体、 Na_2SO_4 +电子供体浓度均为:20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ +1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,邻苯二甲酸丁酯+电子供体和电子供体的浓度分别为 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig.1 Anaerobic biodegradation of TCBPA after adding different substances

由图 1 可知,经过 70 d 降解,灭菌控制组中 TCBPA 的浓度没有明显降低,所以可以确定,微生物对反应体系中的 TCBPA 降解起到了决定性的作用.TCBPA 初始浓度为 12.37 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.与接种控制组相

比,TCBPA 在产甲烷条件和硫酸盐还原条件下,降解速率都有不同程度加强,其中,在产甲烷环境下,TCBPA 降解效果得到明显加强,TCBPA 经过 28 d 的降解后即可完全降解;而在硫酸盐还原条件下,虽然 TCBPA 的降解效果有所加强,但增强幅度并不明显,TCBPA 在经历了 70 d 的降解后,方可完全降解.对于接种控制组,经过 70 d 降解后,TCBPA 仍残余 $0.605\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.Voordeckers 等^[8]人利用 Arthur Kill 河底泥进行厌氧降解,TCBPA 初始浓度为 $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,在产甲烷和硫酸盐还原环境下,TCBPA 降解停滞期分别为 56 d 和 156 d,在产甲烷条件下,TCBPA 可在 112 d 后降解完全;而在硫酸盐还原条件下,经过 294 d 降解,TCBPA 仍残余 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.这说明污染物在土壤中的降解因环境和土壤的物化性质而异.Nyholm^[18]研究中也指出,光、氧浓度、温度、pH、湿度以及微生物种群等都影响土壤中阻燃剂的降解速率.本研究利用的底泥取自电子垃圾拆解地,经过长期驯化和适应,泥样中卤代还原微生物数量更多,对 TCBPA 的适应性更强,降解速率相比也更快.

在只加入电子供体的条件下 TCBPA 降解停滞期约为 21 d,TCBPA 可在第 35 d 降解完全,比产甲烷条件下 TCBPA 降解完全的时间推后了 7 d;而加入邻苯二甲酸丁酯和电子供体的组别,经过 70 d 的降解后,仍约残余 $3.039\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$,约 75%的 TCBPA 被降解.由于该组在添加邻苯二甲酸丁酯的同时加入了等量的电子供体,故可以确定是邻苯二甲酸丁酯抑制了 TCBPA 厌氧降解.

加入目标污染物后,在产甲烷条件下 TCBPA 经过约 14 d 停滞期便开始降解,而在硫酸盐还原条件下 TCBPA 与接种控制组 TCBPA 经过约 21 d 停滞期后,才开始降解.这可能因为产甲烷条件的氧化还原电位比硫酸盐还原条件的氧化还原电位更低,产甲烷条件的临界氧化还原电位为 -150 mV ^[19],当氧化还原电位达到 -370 mV 至 -500 mV 时,产甲烷菌的生长速率和产甲烷速率达到最大^[20],硫酸盐还原条件的氧化还原电位则在 -100 mV 以下,而低水平的氧化还原点位有利于还原脱氯反应的发生.Yuan 等^[7]发现,在产甲烷条件下降解 TCBPA,反应体系的 ORP 在 0 d 为 -304 mV ,培养 21 d 后,降低至 -530 mV ,培养至 70 d,ORP 值又升高至 -255 mV ;而在硫酸盐还原条件下,反应体系在 0 d、21 d、70 d 的 ORP 值分别为 -304 mV 、 -455 mV 和 -210 mV .相比于硫酸盐还原环境,产甲烷环境更利于 TCBPA 的降解.加入不同物质后,TCBPA 的降解速率常数、半衰期以及强化效果如表 3 所示.

表 3 添加不同物质后 TCBPA 的降解速率常数、半衰期及强化效果

Table 3 TCBPA degradation rate constants, half-lives and enhancement effect after adding different substances					
添加物质	降解环境	降解速率常数 K_1/d^{-1}	强化效果	半衰期 $t_{1/2}/\text{d}$	r^2
NaHCO_3 +电子供体	产甲烷条件	0.0844	+50.4%	8.2	0.8139
Na_2SO_4 +电子供体	硫酸盐还原条件	0.0694	+23.7%	10.0	0.9444
电子供体	/	0.0722	+28.7%	9.6	0.7929
邻苯二甲酸丁酯+电子供体	/	0.0491	-12.5%	14.1	0.9578
接种控制	/	0.0561	0%	12.4	0.9027

向体系中加入邻苯二甲酸丁酯后,可强烈抑制 TCBPA 降解,降解停滞期延长至 35 d,且经过 70 d 降解,TCBPA 降解率仅为 75%.该条件下的降解速率常数比接种控制组降低了约 12.5%(表 3).Yuan 等^[7]的研究表明,向反应体系中加入邻苯二甲酸脂类后,其降解速率常数为 0.038 比接种控制组减少了 30.9%,半衰期也延长至 18.2 d.可能由于邻苯二甲酸脂类也可被微生物作为碳源所利用,因此抑制了微生物对 TCBPA 的降解作用.

仅向体系中加入小分子有机酸作为电子供体,可对 TCBPA 的厌氧降解起到强化作用,虽然 TCBPA 降解停滞期没有缩短,但其降解速率常数增加了 28.7%,且 TCBPA 经过 35 d 降解后即可降解完全,比接种控制组提早了 35 d.可能因为,加入小分子碳源作为电子供体后可以增加污染物的溶解性并提高环境中微生物的活性,,从而加速还原脱氯反应发生,也有可能因为小分子有机酸在被微生物利用的过程中可以产生 H_2 和 CO_2 ,从而为还原脱氯反应提供电子,促进还原脱卤反应的发生;除此之外,碳源可以加强产甲烷细菌的活性,营造产甲烷条件,从而间接的加速微生物还原脱氯的发生.仅向体系中加入电子供体虽然可以加速 TCBPA 的降解,但与同时加入 NaHCO_3 和电子供体的组别相比,强化效果稍弱,这可能是因为后者不仅为体系提供电子供体,产甲烷条件的氧化还原电位也更低,脱氯反应更容易发生.

向反应体系中加入 Na_2SO_4 和电子供体后,TCBPA 的降解速率常数相比接种控制组增加了 23.7%,而与只加入电子供体的组别相比,其降解速率常数降低了 38.8%.这可能是因为 在厌氧条件下,硫酸盐作为一种强有力的电子受体,争夺了还原脱氯过程中所需的电子而对脱氯过程产生不利影响.

2.2 硫酸盐还原菌随 TCBPA 降解的变化

由图 1 可知,在产甲烷条件和硫酸盐还原条件下,TCBPA 降解都有不同程度加强.然而,产甲烷菌属于古菌域,可以利用的基质有限,主要是 H_2 、 CO_2 和醋酸盐等小分子有机物,处于厌氧消化食物链末端^[21],其主要作用是将含氯污染物脱氯后的中间产物迅速转化为气态终产物 CH_4 和 CO_2 ,消除中间产物对脱氯过程的抑制,从而促进氯代有机物的还原脱氯,对脱氯基本没有贡献.并且国内外许多研究结果已经证明^[7, 8, 11],产甲烷条件有利于还原脱氯,而硫酸盐还原条件对还原脱氯作用存在争议,结合生物降解实验结果,在产甲烷条件下,TCBPA 降解优于接种控制组和只加入电子供体组别;而在硫酸盐还原条件下,TCBPA 的降解与接种控制组相比,起到了一定的强化效果,而和只加入电子供体的组别相比,反而是降解速率受到了抑制.因此本研究在 TCBPA 降解的同时利用分子生物学手段对不同时期样品中的硫酸盐还原菌进行检测分析,尝试找出硫酸盐还原菌在 TCBPA 厌氧降解过程中的作用.

将同时加入 Na_2SO_4 和电子供体组、只加入电子供体组以及接种控制组分别记为 A、B、C 组.提取以上 3 组在第 7 d、第 28 d 以及第 70 d 的冻存泥样品 DNA.另取加入 FeSO_4 的贵屿污泥以及普通好氧污泥进行 DNA 提取并分别作为阳性对照和阴性对照.使用硫酸盐还原菌的特定引物 Dsr2060F/ Dsr4R 对 11 个样品进行扩增,扩增结果如图 2 所示.

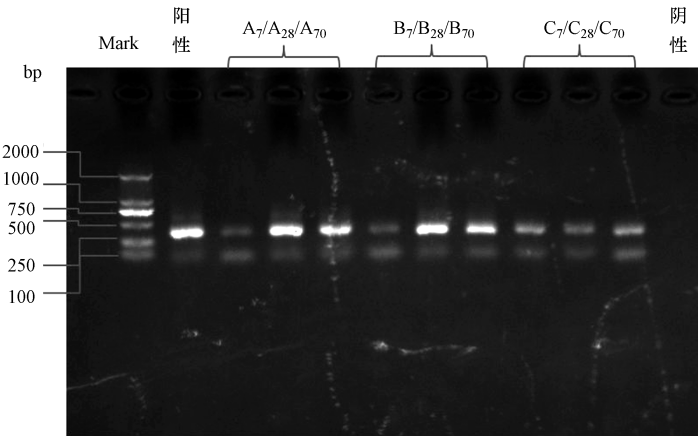


图 2 不同样品各时间段 PCR 扩增结果

(A_(7/28/70) 为加入 Na_2SO_4 和电子供体在 7 d、28 d、70 d 的扩增结果,B_(7/28/70) 为只加入电子供体在 7 d、28 d、70 d 的扩增结果,C_(7/28/70) 为接种控制组在 7 d、28 d、70 d 扩增结果)

Fig.2 PCR results of different samples after different reaction time

从图 2 可以看出,阳性对照组可以扩增出目的片段,而阴性对照组无法扩增出相应的目的片段.目的基因片段长度为 384 bp,与图中条带位置相符,这说明引物的特异性良好,可以用扩增结果来表征样品中是否含有硫酸盐还原菌.

以普通好氧污泥为背景,以 341F/518R 为内参引物,采用 Comparative Ct 法对各样品中硫酸盐还原菌的相对含量进行分析.各样品不同时间段目的基因含量如图 3 所示.从图 3 中可以看出,加入 Na_2SO_4 和电子供体的组别和只加入电子供体的组别,硫酸盐还原菌的含量都有明显上升;而控制组中,硫酸盐还原菌的含量无明显变化甚至略有下降.只加入电子供体的组别,硫酸盐还原菌含量逐步增高.但 0—28 d 的增长量远大于 28—70 d 的增长量,说明硫酸盐还原菌在增殖到一定程度后增殖速率减慢.在 28 d 时,加入 Na_2SO_4 和电子供体的组别和只加入电子供体的组别所含硫酸盐还原菌的含量基本一致,而 TCBPA 的降解情况却相差较大,说明硫酸盐还原菌在 TCBPA 厌氧降解过程中虽然起到了促进作用,但并不是影响其降解速率的唯一因素,TCBPA 的厌氧降解还会受到产甲烷菌等其他微生物影响.

对于加入 Na_2SO_4 和电子供体的组别,硫酸盐还原菌含量总体上升,但有先升高后下降的趋势,可能

是向反应体系中加入 Na_2SO_4 和电子供体后,硫酸盐还原菌迅速增殖,但增殖到一定数量后,硫酸盐还原菌内部竞争增强,抑制了其进一步的增殖,最后使硫酸盐还原菌含量反而稍有下降.对加入 Na_2SO_4 和电子供体的组别第 28 d 至第 70 d 的样品进行荧光定量 PCR 分析,不同时段样品中目的基因含量如图 4 所示.从图 4 可以看出,对于加入 Na_2SO_4 和电子供体的组别,硫酸盐还原菌含量从 28 d 开始缓慢增加,并在第 56 d 时达到最大值,56—70 d 硫酸盐还原菌含量有所减少.

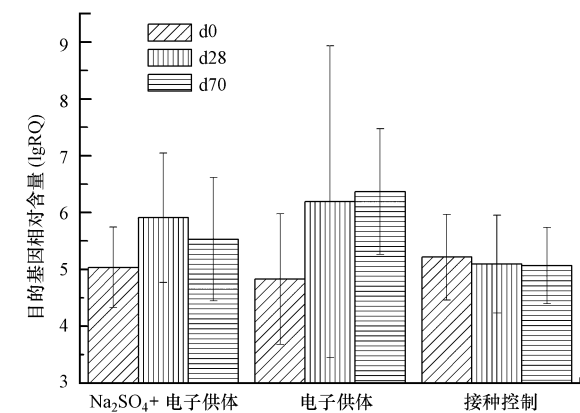


图 3 各样品不同时间段的基因含量
Fig.3 The content of target gene in each sample after different reaction time

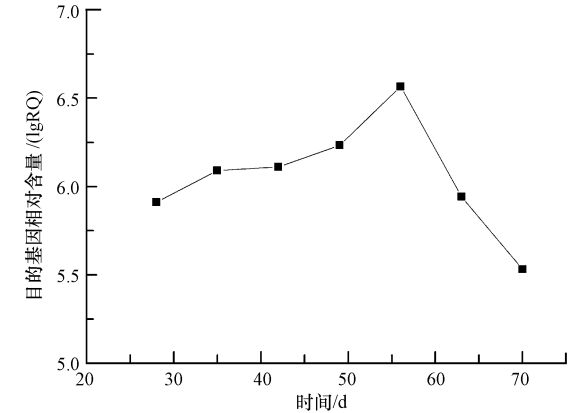


图 4 加入 Na_2SO_4 和电子供体后不同时段目的基因含量
Fig.4 The content of target gene after adding Na_2SO_4 and electron donor to sample

3 结论

比较了不同还原条件下 TCBPA 的厌氧降解,其中在产甲烷条件下 TCBPA 的降解速度比硫酸盐还原条件快,其降解速率常数和半衰期分别为:0.0844 d^{-1} 、0.0694 d^{-1} ;8.2 d、10.0 d.自然状态下,TCBPA ($12.37 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) 在贵屿污泥中的降解速率常数为 0.0561 d^{-1} ,半衰期为 12.4 d.加入电子供体可促进 TCBPA 的厌氧降解,降解速率常数增长了 28.7%,加入邻苯二甲酸丁酯会抑制 TCBPA 的降解,降解速率常数降低了 12.5%.采用硫酸盐还原菌的特异性引物对样品中基因组 DNA 进行扩增,并进行后续的荧光定量 PCR 实验.从实验结果可知,在 TCBPA 的厌氧降解过程中,可推测硫酸盐还原菌在 TCBPA 厌氧降解的过程中起到了积极的作用.

参 考 文 献

[1] Horikoshi S, Miura T, Kajitani M, et al. Photodegradation of tetrahalobisphenol-A (X=Cl, Br) flame retardants and delineation of factors affecting the process[J]. Applied Catalysis B-Environmental, 2008, 84(3/4): 797-802

[2] Blanco E, Casais M C, Mejuto M C, et al. Approaches for the simultaneous extraction of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and related phenolic compounds from sewage sludge and sediment samples based on matrix solid-phase dispersion[J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(8): 2772-2778

[3] Sun H, Shen O X, Wang X R, et al. Anti-thyroid hormone activity of bisphenol A, tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A in an improved reporter gene assay[J]. Toxicology In Vitro, 2009, 23(5): 950-954

[4] Kitamura S, Jinno N, Ohta S, et al. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A[J]. Biochemical And Biophysical Research Communications, 2002, 293(PII S0006-291X(02)00262-01): 554-559

[5] Meerts I, Van Zanden J J, Luijckx E, et al. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro[J]. Toxicological Sciences, 2000, 56(1): 95-104

[6] Fan Z L, Hu J Y, An W, et al. Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds[J]. Environmental science & technology, 2013, 47(19): 10841-10850

[7] Yuan S Y, Chen S J, Chang B V. Anaerobic degradation of tetrachlorobisphenol-A in river sediment[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(1): 185-190

[8] Voordeckers J W, Fennell D E, Jones K, et al. Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments[J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36(4): 696-701

[9] 彭平安,盛国英,傅家谟.电子垃圾的污染问题[J]. 化学进展,2009,(Z1): 550-557

[10] 刘艳,党志,刘云.一株硫酸盐还原菌 DSRBa 的分离鉴定及特性分析[J]. 农业环境科学学报,2011,(01): 176-182

[11] 左剑恶,肖晶华,陈莉莉.氯代有机污染物在厌氧条件下还原脱氯的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备,2003,(06): 43-48

[12] 吴宇澄,王建军,吴庆龙.基于引物的湖泊沉积物氨氧化细菌 PCR 扩增策略比较[J]. 环境科学,2010,(09): 2178-2183

[13] Geets J,Borremans B,Diels L,et al. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods,2006, 66(2): 194-205

[14] Wagner M,Roger A J,Flax J L,et al. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration[J]. Journal of Bacteriology,1998,180(11): 2975-2982

[15] Livak K J, Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C) method[J]. Methods,2001,25(4): 402-408

[16] Staples C A,Peterson D R,Parkerton T F,et al. The environmental fate of phthalate esters: A literature review[J]. Chemosphere,1997,35(4): 667-749

[17] 刘文莉,张珍,朱连秋,等.电子垃圾拆解地区土壤和植物中邻苯二甲酸酯分布特征[J]. 应用生态学报,2010,(02): 489-494

[18] Nyholm J R,Lundberg C,Andersson P L. Biodegradation kinetics of selected brominated flame retardants in aerobic and anaerobic soil[J]. Environmental Pollution,2010,158(6SI): 2235-2240

[19] 丁维新,蔡祖聪.土壤有机质和外源有机物对甲烷产生的影响[J]. 生态学报,2002,22(10): 1672-1679

[20] 夏大平,陈鑫,苏现波.氧化还原电位对低煤阶煤生物甲烷生成的影响[J]. 天然气工业, 2012,(11): 107-110,125-126

[21] 张希衡. 废水生物处理工程[M].北京: 中国环境科学出版社, 1984:15-23



赛默飞液相色谱备件快速到货承诺：两周内到货

实验做到一半,氙灯寿终正寝,此刻的你该怎么办? 相信大多数用户都遇到过类似的问题,进口仪器需要更换或更新部件和耗材的时候,到货期常常需要很长一段时间,在此期间,用户除了等待别无办法,项目进度也因此耽搁。

为了更好地满足用户的应急需求以及全国广大用户日益增长的市场需要,赛默飞世尔科技推出了液相色谱产品快速到货承诺——液相色谱常规模块,包括常用配件和耗材的货期缩短至两周内。

详情请点击 <http://www.thermo.com.cn/news1097.html>. 免费服务热线:8008105118, 4006505118