

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(3):377-385; 4 March 2011  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 溴代阻燃剂污染底泥与未污染底泥中细菌群落结构之比较分析

赵恒芝<sup>1,2</sup>, 戴世鯤<sup>1</sup>, 孙伟<sup>1,2</sup>, 王广华<sup>1</sup>, 郭雅涛<sup>1,2</sup>, 郭俊<sup>3</sup>, 许枚英<sup>3</sup>, 吴后波<sup>1\*</sup>, 李翔<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院海洋生物可持续利用重点实验室, 广州 510301

<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049

<sup>3</sup>广东省微生物研究所, 广州 510070

**摘要:**【目的】通过免培养的分子生物学方法, 比较受溴代阻燃剂污染严重的河流底泥和与未污染水库底泥中细菌多样性差异, 解析二者间细菌群落结构, 为污染河流的治理与生物修复提供相关的理论依据。【方法】从中国贵屿溴代阻燃剂污染区练江底泥样品和未污染水库底泥样品中分别提取微生物总 DNA, 用细菌通用引物 27F 和 1500R 扩增 16S rRNA 基因, 构建 16S rRNA 基因文库。用 *Hha* I 和 *Hinf* I 2 种限制性内切酶对克隆子进行扩增产物 rDNA 的限制性酶切分析 (ARDRA), 挑取不同的操作分类单元 OUT 中的克隆进行测序并构建系统发育树, 比较代表克隆子的基本分类类群和生物多样性构成。【结果】未污染水库底泥中细菌群落组成主要包括变形细菌门 (*Proteobacteria*) 的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  4 个亚门、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*)。优势菌是酸杆菌, 占文库克隆的 30.2%。污染河流底泥中细菌群落组成包括变形细菌门 (*Proteobacteria*) 的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  和  $\epsilon$  4 个亚门、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、绿菌门或拟杆菌门 (*Chlorobi* or *Bacteroidetes*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、待定菌群 *candidate division* OP01、*candidate division* OP08 和 *candidate division* WS3 的相似菌。优势菌是  $\epsilon$ -变形细菌和绿弯菌, 占文库克隆的 44.9%。【结论】受溴代阻燃剂污染河流底泥中的细菌群落具有较高水平的多样性, 与未污染底泥有显著区别, 主要体现在  $\epsilon$ -变形细菌和绿弯菌在细菌群落中具有优势地位。这种优势种群的变化可能与污染物的过度富集具有一定的相关性, 对于我们进一步探索 and 了解溴代阻燃剂的微生物修复具有一定的指导意义。

**关键词:** 溴代阻燃剂, 细菌群落结构, 16S rRNA 基因, ARDRA

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0377-09

溴代阻燃剂 (brominated flame retardants, BFRs) 的历史, 广泛应用于塑料、电子、建筑、纺织等材料与具有良好的阻燃性质, 其生产和使用已经有 30 多年 产品中, 是世界上消费量最大的一类有机阻燃剂。

**基金项目:** 广东省自然科学基金项目 (9351007002000001); 广东省科技计划项目 (2008A030203004)

\* 通信作者。Tel: +86-20-89102580; E-mail: lixiang@scsio.ac.cn; wuhoubo@scsio.ac.cn

**作者简介:** 赵恒芝 (1986 -), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事溴代阻燃剂污染底泥微生物多样性及其降解菌分离研究。E-mail: zhihengzhao@126.com

**收稿日期:** 2010-08-27; **修回日期:** 2010-12-11

溴代阻燃剂中以四溴双酚 A (TBBPA)、六溴环十二烷 (HBCDs)、十溴联苯醚 (PBDEs) 的生产和消费量最大。这 3 种物质均具有强亲脂疏水性, 在环境中难于降解, 滞留时间长; 大气、水体、土壤中痕量的溴代阻燃剂, 可通过食物链富集而最终进入动物体内, 对人类和高等生物的健康造成危害, 也可发生广域迁移, 导致全球污染。目前, 这些难降解污染物在土壤、水体、沉积物和大气等环境介质以及生物体和人体内都已检测到。它们同时还具有很强的生理毒性, 动物实验表明, 较低溴的多溴联苯醚主要对脂肪组织、神经系统<sup>[1-3]</sup>、甲状腺<sup>[4]</sup>和生殖发育<sup>[5-6]</sup>系统等器官具有毒性。最近几年对十溴联苯醚的研究表明, BDE-209 也具有很强的生理毒性。最近几年对十溴联苯醚的研究表明, BDE-209 也具有很强的生理毒性<sup>[7-8]</sup>。因此在溴代阻燃剂的大量使用和环境迅速降解之间寻找平衡点, 是十分关键的问题。其中溴代阻燃剂的微生物降解是当前环境污染治理中一个关键且具有很大的潜力的途径。

污染河流底泥中细菌群落结构是细菌适应环境的结果, 通过研究底泥中细菌群落结构对全面理解污染底泥中微生态网络结构与系统功能、制定溴代阻燃剂降解菌的筛选分离策略, 进而开发高效的溴代阻燃剂降解工程菌具有重要意义。近几年国际上有关溴代阻燃剂的生物降解研究已成为重要的研究热点, 而国内对这方面的研究也逐渐增加。

贵屿镇是著名的电子垃圾处理地, 其水体受溴代阻燃剂污染十分严重。据 Anna<sup>[9]</sup> 等研究表明贵屿镇污染河流底泥中多溴联苯醚总量达到 30900—95700 ng/g · wt, 而位于贵屿镇北部较偏远的水库多溴联苯醚总量仅为 2.0—6.2 ng/g wt。本实验采用分子技术对这两个采样点底泥中细菌群落结构进行研究, 通过比较其差异, 探讨溴代阻燃剂污染对底泥中细菌群落结构的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验样品:** 于 2010 年 4 月 4 日采集自汕头市、贵屿镇练江河岸与北部的水库。样品采集后立即运回实验室, 分成 2 份, 分别存于 -20℃ 和 4℃ 备用。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 台式离心机为上海安亭科

学仪器厂制造的 TGL-16G 台式离心机, 电泳系统为上海天能科技有限公司制造的 EPS 100 电泳仪, 凝胶检测及成像为上海天能科技有限公司的紫外凝胶成像系统, PCR 扩增仪为 Bio-Rad 公司的 iCycler, 土壤总 DNA 提取试剂盒 (EZgene<sup>TM</sup> Soil gDNA Kit (GD2412), BioMIGA), 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (TaKaRa, 大连), pMD19-T 载体系统 (TaKaLa, 大连), *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  高感受态细胞 (TaKaRa, 大连), IPTG, X-gal 及氨苄青霉素。

### 1.2 样品总 DNA 提取

用土壤总 DNA 提取试剂盒 (EZgene<sup>TM</sup> Soil gDNA Kit (GD2412), BioMIGA) 提取底泥样品中的总 DNA。所提总 DNA 进行 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳, 用紫外凝胶成像仪进行检测。

### 1.3 16Sr RNA 基因的 PCR 扩增

用细菌通用引物 27F (5'-GAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') 和 1500R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAG CC-3') 扩增细菌的 16S rRNA 基因。PCR 反应采用 25 $\mu$ L 反应体系, 扩增条件: 95℃ 5 min; 94℃ 40 s, 50℃ 40 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

### 1.4 文库构建

用琼脂糖凝胶回收试剂盒对扩增产物进行纯化回收, 回收产物用 pMD19-T 载体系统 (TaKaRa, 大连) 进行酶连, 连接产物转化到 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  高感受态细胞 (TaKaRa, 大连), 构建 16S rRNA 基因文库。将转化产物涂布到含有 IPTG、X-gal 及氨苄青霉素的平板上过夜培养, 挑取克隆子做酶切分析。

### 1.5 核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析 (ARDRA)

用载体引物 M4: (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') 和 RV: (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 进行菌落 PCR 筛选阳性克隆。阳性克隆用 *Hha* I 和 *Hinf* I 分别进行酶切, 采用 10 $\mu$ L 酶切反应体系: 内切酶 1.5 U, DNA 0.2-1 $\mu$ g, 10 × 缓冲液 1 $\mu$ L, 37℃ 温浴 3.5 h, 酶切失活条件: 80℃, 20 min, 终止反应。

取 9  $\mu$ L 进行电泳检测, 电泳参数为: 2.5% (w/v) 琼脂糖, 100 V, 45 min。将电泳后的琼脂糖胶在 EB 溶液中染色 25 min, 脱色 20 min, 紫外凝胶成像检测, 统计操作分类单元 (OTUs) 的数量。

### 1.6 DNA 测序与序列分析

选取不同 OTUs 的代表克隆送到上海美吉公司

进行测序, 所得序列去除载体序列并人工校正, 取 700–800 bp 有效序列提交到 GenBank 进行 BLAST 序列同源性比对。并在 Ribosomal Database Project II 上进行嵌合体分析, 去掉嵌合体序列后采用 MEGA4.0 软件包中的 Kimura 2-Parameter Distance 模型进行多序列匹配。用邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育树<sup>[10]</sup>。

### 1.7 GenBank 数据库登录号 (Accession number)

经 GenBank 上 Vecscreen 在线检测去除克隆载体污染序列后, 共向 GenBank 提交 101 个 16S rRNA 基因的部分序列, 数据库登录号为 HQ162720–HQ162820。

## 2 结果

### 2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

从污染底泥和水库底泥中提取的总 DNA 条带单一、完整, 说明上述方法适合于底泥总 DNA 的提取。以总 DNA 为模板, 使用细菌通用引物组合 27F 和 1500R, 扩增出约 1.5 kb 的细菌 16S rRNA 基因目的片段。

### 2.2 ARDRA 分型结果

从两个位点的文库中分别挑取克隆 300 个, 通过菌落 PCR 法进行插入片段检测, 阳性率均高于 80%。各挑取阳性克隆 120 个分别进行 *Hha* I 和

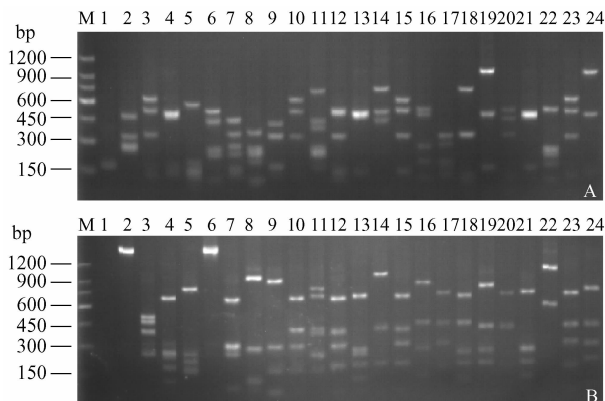


图 1 部分练江克隆子 *Hha* I 和 *Hinf* I 和酶切图谱

Fig. 1 The restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of selected 16S rDNA clones digested using restriction enzymes *Hha* I (A) and *Hinf* I (B). The 24 clones originated from unpolluted Lianjian were marked as 24 clones from Lianjian (1–24): (G1, G2, G3, G6, G9, G20, G22, G23, G25, G34, G39, G46, G52, G62, G66, G69, G71, G72, G75, G81, G83, G92, G93, and G94). M is the 150bp ladder marker.

*Hinf* I 酶切和 ARDRA 分析 (图 1 和图 2)。其中溴代阻燃剂污染样品文库中, 两种酶切得到 49 个 OTU; 未污染水库样品文库中得到 48 个 OTU。对于同一 OTU 有 10 个的随机选取 1 个测序, 1–3 个的选取一个进行测序。

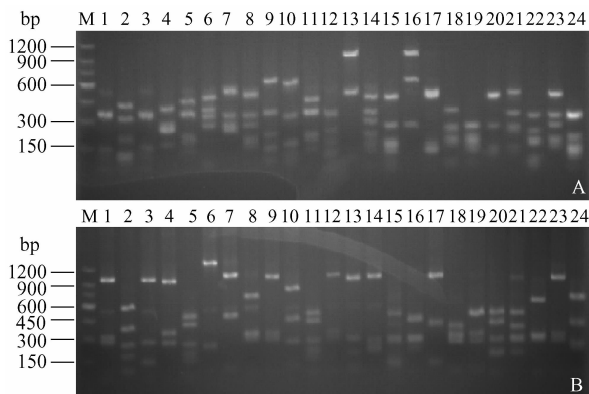


图 2 部分水库克隆子 *Hha* I 和酶 *Hinf* I 切图谱

Fig. 2 The restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of selected 16S rDNA clones digested using restriction enzymes *Hha* I (A) and *Hinf* I (B). The 24 clones originated from polluted reservoir were marked as A333, A334, A337, A338, A342, A343, A347, A352, SK359, A361, A363, A366, A368, A369, A373, A376, A378, A380, A381, A385, A389, A393, A395, and A396). M is the 150bp ladder marker.

### 2.3 测序结果分析

溴代阻燃剂污染河流练江位点底泥样品和未污染水库底泥样品分别得到 52 和 53 个测序结果, 序列经过嵌合体分析后, 删除四条嵌合序列, 余下的序列在 GenBank 中进行 Blast 同源性比对, 寻找最相似的已知序列以及最接近的具有明确分类地位的序列。从练江污染泥样品中得到 48 个同源性最接近的细菌序列, 其中 4 个为可培养微生物序列, 44 个为未培养微生物序列。BLAST 比对中相似度最高的为 99%, 最低的为 88%; 其中有 20 个序列与发布在基因文库中的序列同源性  $\leq 95\%$ , 占所有序列的 40%。从未污染水库泥样中得到 47 个同源性相近的序列, 4 个为可培养微生物序列, 43 个为未培养微生物序列。相似性最高的为 99%, 最低的为 85%; 有 23 个序列同源性  $\leq 95\%$ , 占所有序列的 48.9%。

未污染水库泥样中: 酸杆菌为优势菌, 14 个来自铀、烃类、焦油、重金属污染位点和地下潜水污水池及污水处理厂的微生物序列同源性较高, 其中有 6 个相似性  $\geq 97\%$ , 如 A97 和 A323 与 *Novosphingo-*

*bium tardaogens* strain ARI-1 (降解 17 $\beta$ -雌二醇)<sup>[13]</sup> 和 *Pseudomonas* sp. CA15 (盐乙酸脱卤化酶高产菌) (数据未公开) 相似性分别为 97% 和 99%, 这 2 个菌分别来自日本东京污水处理厂和日本未知名污水处理厂; 29 个来自不同的牧场、耕地、湿地及淡水湖泊等位点。

练江污染位点泥样中,  $\epsilon$ -变形细菌纲和绿弯菌门占优势。得到的 48 个同源性最接近的细菌序列中, 23 个来自三氯乙烯、原油、烃类、硫化物等污染位点和地下潜水污水池以及污水处理厂; 其中相似性  $\geq 97\%$  的有 17 个, 如 G189 于来自三氯乙烯污染位点的 *Uncultured epsilon proteobacterium* clone FTL212 相似性为 99% (数据未公开)。G6 与来自原油污染位点的 *Sulfuricurvum kujiense* gene strain: YK-3 相似性为 98%<sup>[11]</sup>。G277 与来自氯化烃类污染位点 *Uncultured beta proteobacterium* clone MKC21 相似性为 97% (数据未公开)。G52 与来自位于 E1 Zacaton 273 米和 53 米深的地下潜水污水池的 *Uncultured epsilon proteobacterium* clone Z273MF39 相似性为 98% (数据未公开)。G46 与来自污水处理厂的活性污泥的 *Uncultured Thiobacillus* sp. clone DMS13 相似性为 99%<sup>[12]</sup>; 15 个来自不同的耕地、牧场、湿地及淡水湖泊沉积物等位点。

#### 2.4 系统发育分析

根据从两个位点样品所获得的 16S rRNA 基因克隆序列分别构建细菌系统发育树 (图 3 和图 4), 从图中可以看出: 练江污染泥样的 49 个序列主要分布在  $\alpha$ -变形细菌纲、 $\beta$ -变形细菌纲、 $\delta$ -变形细菌纲和  $\epsilon$ -变形细菌纲、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、绿菌门 (*Chlorobi*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*), 待定菌 *candidate division* OP01、*candidate division* OP08 和 *candidate division* WS3。对照未污染水库底泥与污染底泥中微生物在种类上有一定变化, 后者比前者样品少了绿菌门 (*Chlorobi*) 或拟杆菌 (*Bacteroidetes*) 和  $\epsilon$ -变形细菌纲、及 3 个待定菌, 多了疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、 $\gamma$ -变形细菌纲和厚壁菌门 (*Firmicutes*)。两者的不同种类在数量上差异也较大, 污染样品的  $\epsilon$ -变形细菌纲和绿弯菌门的含量最高, 占总克隆数的 44.9%。而水库样品酸杆菌含量最高, 占总克隆数的 30.2%。另外, 二者与已知序列同源性相比低于 95% 的分别为 20 和 23 个。这

充分说明贵屿镇底泥中有很多在分类学上具有潜在意义的被选菌株。

### 3 讨论

根据测序并与 GenBank 中序列比对结果可知: 污染河流和水库两个位点细菌多样性非常高, 且蕴含着丰富的未被培养的微生物资源, 因此可以在优化难培养微生物的培养条件及检测手段方面进一步的摸索。

通过对 2 个位点底泥中细菌 16S rRNA 基因克隆序列所进行的系统发育分析, 发现溴代阻燃剂污染底泥中的细菌与未污染底泥中的细菌不仅在群落结构上有一定差别, 而且优势菌群也有显著差异。污染底泥比水库底泥多发现了绿菌门 (*Chlorobi*) 或拟杆菌 (*Bacteroidetes*) 和一个  $\epsilon$ -变形细菌, 未发现疣微菌 (*Verrucomicrobia*) 和一个  $\gamma$ -变形细菌。另外, 污染样品的优势菌种为  $\epsilon$ -变形细菌和绿弯菌, 它们合计占总克隆数的 44.9%。而水库样品的优势菌为酸杆菌, 占总克隆数的 30.2%。可见, 环境污染对细菌群落结构造成很大的影响。据 Lo'pez-Garcl'a, P.<sup>[14]</sup> 等研究表明  $\epsilon$ -变形细菌在环境中生长很快, 能够形成一个缺氧的微环境, 从而导致溴代阻燃剂污染样品中兼性厌氧的绿弯菌门也成为优势菌, 而喜好高含氧量, 低硫的酸杆菌<sup>[15]</sup> 则含量较少; 水库样品中没有发现  $\epsilon$ -变形细菌, 环境也没有被污染, 因而酸杆菌得以成为优势菌。通过以上结果可见  $\epsilon$ -变形细菌在维持污染底泥中细菌群落结构起到重要作用。此外, Ronen<sup>[16]</sup> 等以蛋白胨-葡萄糖-酵母提取物作为培养基, 将沉积物和四溴双酚 A (TBBPA) 混合厌氧培养发现生成唯一的代谢产物无溴代的双酚 A (BPA)。BPA 在好氧条件下可以被革兰氏阴性 (*Sphingomonas*. strain WH1) 继续降解; Ziv Arbeli<sup>[17]</sup> 等也通过富集培养, 发现沉积物中 TBBPA 可通过厌氧降解成 BPA, 并用 GC-MS 和 HPLC 相结合的方法检测到反应中间产物三、双和单溴双酚 A。这些研究表明四溴双酚 A 的降解需要好养和厌氧菌的共同作用, 本研究中污染位点兼性厌氧的绿弯菌和好氧菌  $\epsilon$ -变形细菌为优势菌, 说明这两类细菌很可能在溴代阻燃剂及其降解中起到重要作用, 值得进一步关注。

二者在序列同源性较近的细菌的来源也有很大

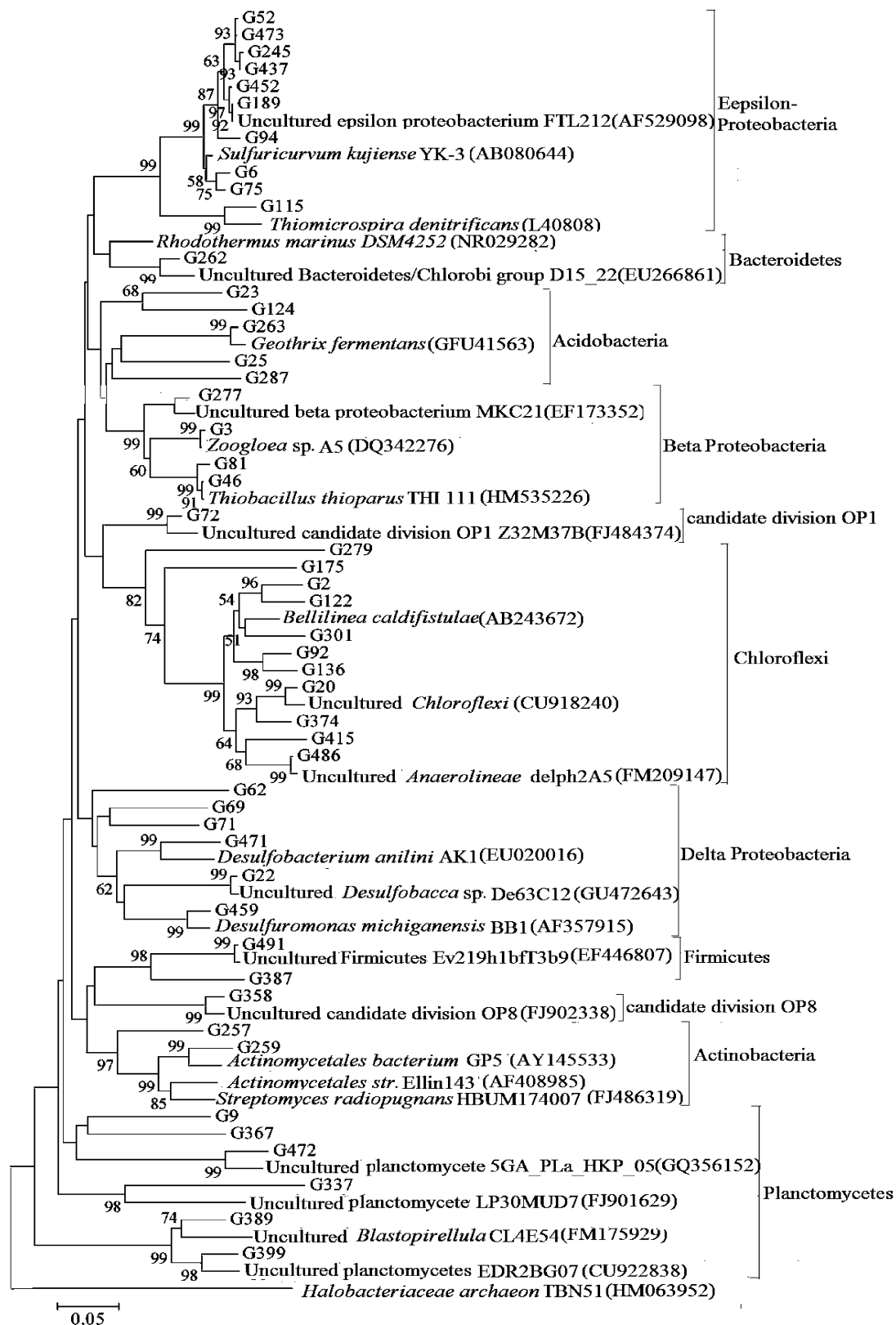


图3 以16S rRNA 基因序列为基础的贵屿南阳底泥细菌系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the Bacteria in Nanyan of Guiyu sediment base on 16S rRNA gene sequence. The tree were constructed by using the neighbor-joining method. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching points. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide site and GenBank accession numbers are in paratheses.

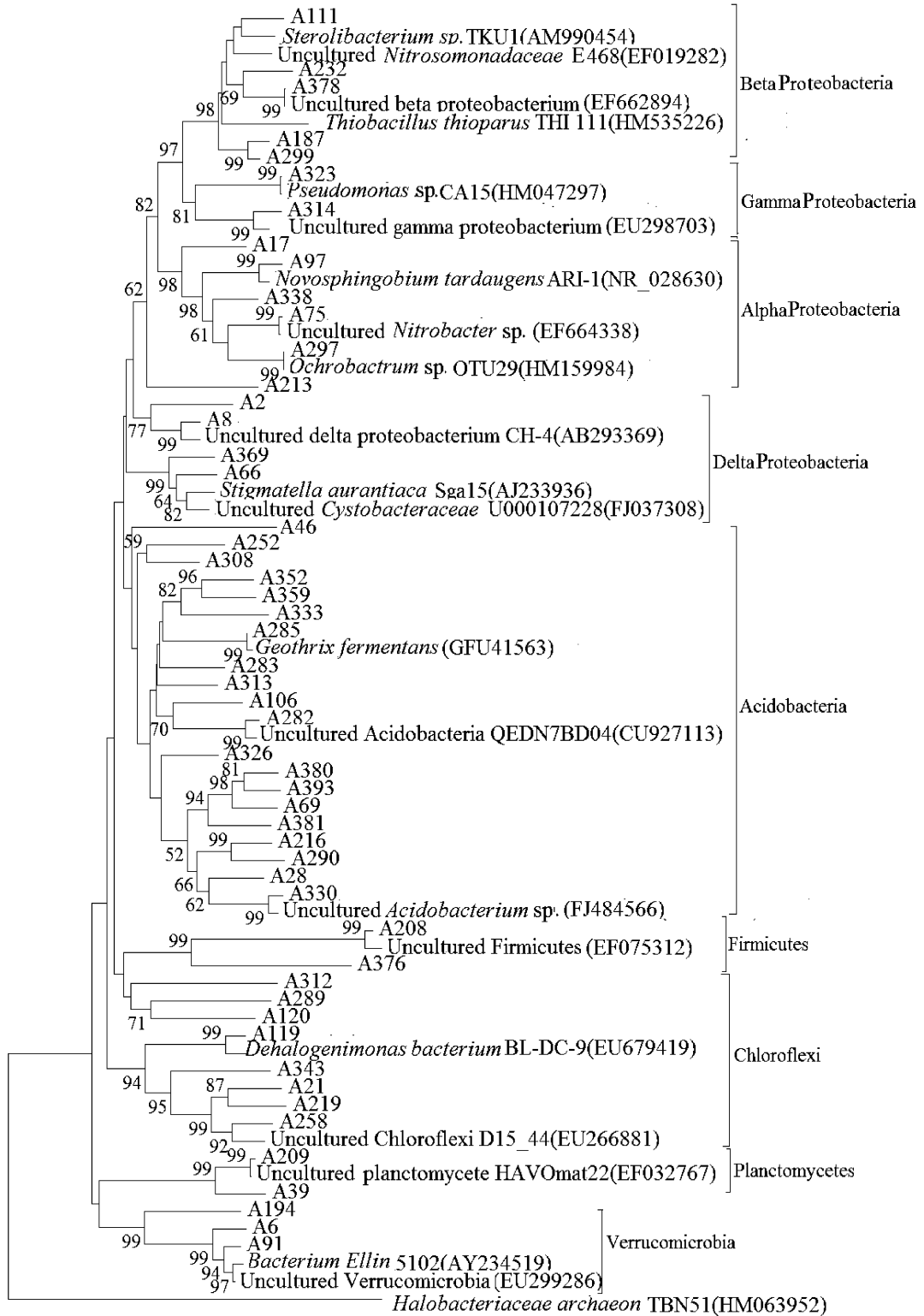


图4 以16S rRNA基因序列为基础的贵屿镇水库底泥细菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the Bacteria in Guiyu reservoir sediment base on 16S rRNA gene sequence. The tree were constructed by using the neighbor-joining method. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching points. The scale bar represents 0.05 substitution per nucleotide site and GenBank accession numbers are in parentheses.

差别,溴代阻燃剂污染样品中细菌与来自石油等污染位点的 23 个细菌具有较高的相似性,这些位点的细菌占所有序列的 47.9%,来自不同的耕地、牧场、湿地及淡水湖泊沉积物等位点的 15 个,占所有序列的 31.25%;而水库样品中的细菌与来自三氯乙烷、原油、烃类、硫化物等污染位点和地下潜水污水池以及污水处理厂的占 29.8%,来自不同的牧场、耕地、湿地及淡水湖泊等位点的细菌序列相似性高,占所有序列的 61.7%。贵屿镇练江底泥中除了有溴代阻燃剂污染外,多环芳烃的含量也达到 1216 - 1518 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )<sup>[18]</sup>。这说明溴代阻燃剂及多环芳烃的污染对环境细菌落结构有重要影响。

溴代阻燃剂污染位点的优势菌  $\epsilon$ -变形细菌中,除了 1 个是来自湿地之外,其余的都来自三氯乙烷、石油、硫化物污染及深海热泉位点,如 G189 于来自三氯乙烯污染位点的 *Uncultured epsilon proteobacterium* clone FTL212 相似性为 99% (数据未公开),G6 与来自原油污染位点的 *Sulfuricurvum kujiense* gene strain:YK-3 相似性为 98%<sup>[11]</sup>。由于目前国内对溴代阻燃剂降解菌研究还较少,还没有发现  $\epsilon$ -变形细菌对其的降解作用,根据本研究中其优势地位猜测它们可能在溴代阻燃剂及其他多环芳烃等污染物降解和维持污染环境群落结构发挥重要作用。4 个  $\beta$ -变形细菌中,除一个来自淡水湖,另外 3 个都是来自苯、氯酸盐、烃类等污染位点,如 G3 与来自苯和氯酸盐污染位点动胶菌属的 *Zoogloea* sp. A5 相似性为 97%<sup>[19]</sup>。动胶菌属的一些菌也具有降解多环芳烃的功能,其中 *Zoogloea resiniphila* DhA-35 具有降解脱氢枞酸的功能<sup>[20]</sup>。G287 与  $\alpha$ -变形细菌纲、鞘氨醇单胞菌属的 *Sphingomonas* sp. BXN7 - 9 (EU423301.1) 相似性为 97% (数据未公布),该菌可以转化人参皂苷。另外,鞘氨醇单胞菌属与多环芳烃降解有密切关系,如 *Sphingomonas* sp. CHY-1<sup>[21-22]</sup> 和 *Sphingomonas* sp. A4<sup>[23]</sup>,可以降解苯并吡啶、萘嵌戊烷及萘烯等多环芳烃。这些比较结果启示我们污染位点的  $\alpha$ -和  $\beta$  变形菌很可能在溴代阻燃剂的降解中发挥重要作用。

总之,通过以上研究发现污染底泥中的细菌群落具有较高水平的多样性,与未污染底泥有显著区别。这对我们在污染区寻找相关污染物的降解菌和进一步研究溴代阻燃剂脱溴及降解过程具有重要指导意义。

**致谢** 采样和实验过程中得到广东省微生物所孟德同学等的大力协助,在此表示感谢!

## 参考文献

- [1] Watanabe I, Sakai S. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environment International*, 2003, 29(6): 665-682.
- [2] Haddow JF, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, O'Heir C. E, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD, Klein RZ. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent psychological development in the child. *New England Journal of Medicine*, 1999, 341(8): 549-555.
- [3] Eriksson P, Jakobsson E, Fredriksson A. Developmental neurotoxicity of brominated flame - retardants, polybrominated diphenyl ethers and tetrabromo - bis - phenol A. *Organohalogen Compound*, 1998, 35(2): 375-377.
- [4] Hallgren S, Sinjari T. Effects of polybrominated diphenyl ethers( PBDEs) and polychlorinated biphenyls( PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Archives of Toxicology*, 2001, 75(4): 200-208.
- [5] Martin M, Lam PKS, Richardson BJ. An Asian quandary: where have all of the PBDEs gone? *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(5-6): 375-382.
- [6] Jacobson JL, Jacobson SW, Humphrey HEB. Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children. *Neurotoxicology and Teratology*, 1990, 12(4): 319-326.
- [7] Riva C, Binelli A, Cogni D, Provini A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether(BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2007, 48(9):735-743.
- [8] Hu XZ, Xu Y, Hu DC, Hui Y, Yang FX. Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether(PBDE-209). *Toxicology Letters*, 2007, 171(1-2): 19-28.
- [9] Leung, AOW, Luksenburg 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. *Environmental Science & Technology* 2007,41(8),2730-2737.

- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [11] Kodama Y, Watanabe K. Isolation and characterization of a sulfur-oxidizing chemolithotroph growing on crude oil under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 107-112.
- [12] Hayes AC, Zhang Y, Liss SN, Allen DG. Linking performance to microbiology in biofilters treating dimethyl sulphide in the presence and absence of methanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 85(4): 1151-1166.
- [13] Fujii K, Kikuchi S, Satomi M, Ushio-Sata N, Morita N. Degradation of 17 beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 2057-2060.
- [14] López-García P, Duperron S, Philippot P, Foriel J, Susini J, Moreira D. Bacterial diversity in hydrothermal sediment and epsilonproteobacterial dominance in experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Environment. Microbiology*, 2003, 5(10): 961-976.
- [15] Engel AS, Porter ML, Stern LA, Quinlan S, Bennett PC. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic "Epsilon-proteobacteria". *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 51(1): 31-53.
- [16] Ronen Z, Abelowich A. Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2372-2377.
- [17] Arbeli Z, Ronen Z. Enrichment of a microbial culture capable of reductive debromination of the flame retardant tetrabromobisphenol-A, and identification of the intermediate metabolites produced in the process. *Biodegradation*, 2003, 14(6): 385-395.
- [18] Wang F, Leung AOW, Wu SC, Yang MS, Wong MH. Chemical and ecotoxicological analyses of sediments and elutriates of contaminated rivers due to e-waste recycling activities using a diverse battery of bioassays. *Environmental Pollution*, 2009, 157(7): 2082-2090.
- [19] Weelink SA, Tan NC, Ten BH, Van Doesbury W, Langenhoff AA, Gerritse J, Stams AJ. Physiological and phylogenetic characterization of a stable benzene-degrading, chlorate-reducing microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 60(2): 312-321.
- [20] Yu Z, William WW. Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Research*, 2002, 36(11): 2793-2801.
- [21] Willison JC. Isolations and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 241(2): 143-150.
- [22] Demanèche S, Meyer C, Micoud J, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y. Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6714-6725.
- [23] Pinyakong O, Habe H, Kouzuma A, Nojiri H, Yamane H, Omori T. Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading sphingomonas sp. strain A4. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 238(2): 297-305.



# Comparison of bacterial diversity of polluted and unpolluted sediment by Brominated Flame Retardant

Hengzhi Zhao<sup>1,2</sup>, Shikun Dai<sup>1</sup>, Wei Sun<sup>1,2</sup>, Guanghua Wang<sup>1</sup>, Yatao Guo<sup>1,2</sup>, Jun Guo<sup>3</sup>,  
Meiying Xu<sup>3</sup>, Houbo Wu<sup>1\*</sup>, Xiang Li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>South China Sea Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, CAS Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, Guangzhou 510301, China

<sup>2</sup>Graduate school of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup>Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

**Abstract:** [ **Objective** ] By using brominated flame retardant we compared the bacterial diversity of highly polluted river sediment with that of nearby unpolluted lake. [ **Method** ] Total DNA was extracted from unpolluted and highly polluted sediment sample by brominated flame retardant in Guiyu of China. The 16S rRNA gene was amplified by PCR using bacterial primer 27F and 1500R. The plasmid libraries of the amplicons were constructed. The positive clones with insert were screened on plates with IPTG/X-gal/Ap. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was carried out with restriction enzymes *Hha* I and *Hinf* I. Representative clones of each operational taxonomic unit based on the ARDRA patterns were selected to be sequenced. After proof reading and careful comparison to remove the chimeric sequences, the partial sequence of 16S rRNA gene were used for construction of the phylogenetic tree. [ **Result** ] The result of blast searching showed that clones from unpolluted sediment sample belonged to  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Firmicutes, the predominant bacteria (30.2% of total clones) is Acidobacteria; most clones from polluted sediment belonged to  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\varepsilon$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, candidate division OP01, candidate division OP08, the predominant bacteria (44.9% of total clones) are  $\varepsilon$ -Proteobacteria and Chloroflexi. [ **Conclusion** ] Bacterial community structure of polluted sediment has distinguished feature and obviously different from the unpolluted sediment sample, which is mainly reflected in the dominant position of  $\varepsilon$ -Proteobacteria and Chloroflexi in the bacterial flora.

**Keywords:** brominated flame retardant, bacteria community structure, 16S rRNA gene, amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province(9351007002000001) and by the Guangdong Science and Technology Planning Project (2008A030203004)

\* Corresponding author. Tel: +86-20-89102580; E-mail: lixiang@scsio.ac.cn; wuhoubu@scsio.ac.cn

Received: 27 August 2010/ Revised: 11 December 2011