



乳白耙齿菌 F17 好氧降解四溴双酚 A 的特性及机理研究

陈婕, 吴涓*

安徽大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230601

摘要:【目的】为了探究乳白耙齿菌 F17 (*Irpex lacteus* F17)降解溴代阻燃剂的可能性, 研究了该菌好氧降解四溴双酚 A (Tetrabromobisphenol A, TBBPA)的特性以及影响降解的因素, 并结合降解产物的分析, 推测其降解途径。【方法】采用高效液相色谱法测定 TBBPA 的浓度, 并通过气相色谱-质谱联用仪分析降解过程的中间产物。【结果】*I. lacteus* F17 可以通过共代谢的方式好氧降解 TBBPA, 最适共代谢基质是葡萄糖。在葡萄糖浓度为 8 g/L、菌悬液接种量为 5%、pH 5.0 的优化条件下, 当 TBBPA 初始浓度为 20 mg/L 时降解率可达 85.5%, 脱溴率为 14.6%。对降解过程中锰过氧化物酶的研究发现 TBBPA 的降解率受到该酶活性的影响。通过气相色谱-质谱联用仪检测到 7 种中间产物。【结论】*I. lacteus* F17 可以有效降解四溴双酚 A, 其降解机理主要包括脱溴、 β -断裂、羟基化、去质子和氧化等过程。

关键词: 乳白耙齿菌 F17, 四溴双酚 A, 生物降解, 共代谢, 锰过氧化物酶, 降解途径

溴代阻燃剂(brominated flame retardants, BFRs)是目前应用最广泛的一类有机阻燃剂, 主要添加在各种电子产品、纺织品和塑料中^[1]。四溴双酚 A (TBBPA)可作为反应型和添加型阻燃剂用于印刷电路板和 ABS 塑料中, 因其良好的化学稳定性和阻燃性而成为使用最广泛的溴代阻燃剂^[2-3]。TBBPA 在多种环境介质以及生物体内均有检出^[4-5], 能引起肝脏毒性、免疫毒性、神经毒性和细胞毒性, 并具有内分泌干扰效应^[6-7], 是一种新型的潜在持久性有机污染物, 长期接触会给人类和有机

体带来不良影响。

由于 TBBPA 的环境持久性、生物毒性与积累性, 探索经济有效的 TBBPA 去除技术具有重要意义。目前, 对 TBBPA 的去除方法主要包括光催化降解、化学氧化、微生物降解、热分解和吸附等^[8]。在这些方法中, 微生物降解因低成本、高效率且环境友好性, 被认为是去除环境中有机污染物的一种重要且有前景的技术。TBBPA 在好氧和厌氧条件下均能被微生物降解^[9-10], 目前已有多种细菌被分离鉴定并证明能够有效降解 TBBPA, 如丛毛

基金项目: 安徽省教育厅重点科研项目(KJ2017A035); 国家自然科学基金(31970100)

*通信作者。Tel: +86-551-63861441; Fax: +86-551-63861724; E-mail: wujuan@ustc.edu

收稿日期: 2021-01-24; 修回日期: 2021-04-08; 网络出版日期: 2021-06-15

单胞菌属 (*Comamonas* sp.)^[11]、苍白杆菌 (*Ochrobactrum* sp.)^[12]、节杆菌 (*Arthrobacter* sp.)^[13]、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)^[14] 和甲基杆菌属 (*Methylobacterium* sp.)^[15] 等, 而有关白腐真菌降解 TBBPA 的研究则相对较少^[16-17]。

白腐真菌是一类分布广泛的白色丝状真菌, 由于其具有独特的木质素降解酶系, 因此在有机污染物的降解中具有非常良好的应用前景。本实验所用的 *I. lacteus* F17 是一种白腐真菌, 它通过分泌木质素过氧化物酶 (LiP)、锰过氧化物酶 (MnP) 和漆酶 (Lac) 来实现难降解有机污染物的去除^[18-19]。有研究表明, *I. lacteus* F17 对多种染料具有良好的降解和脱色能力^[20-21], 并能有效降解水相中的多环芳烃 (PAHs)^[22]。然而, 利用 *I. lacteus* F17 降解水相中 BFRs 的研究尚未见报道, 因此, *I. lacteus* F17 在环境中 BFRs 的生物去除研究领域里具有潜在的应用价值。

本文以 TBBPA 为目标污染物, 研究 *I. lacteus* F17 对其降解的性能及机理。通过考察共代谢基质的种类和浓度、初始 pH、TBBPA 初始浓度和接种量等条件对降解过程的影响, 优化了该菌对 TBBPA 的降解条件。同时, 通过对降解过程中酶活力及降解中间产物的分析揭示其生物降解机理。此项工作旨在探索白腐真菌在 BFRs 的好氧生物降解中的应用, 从而为 BFRs 污染环境的生物修复提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

选用乳白耙齿菌 F17 (*Irpex lacteus* F17) 对 TBBPA 进行生物降解, 该菌株保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏号为 CCTCC AF 2014020^[18]。

1.2 培养基

马铃薯综合液体培养基 (g/L): 葡萄糖 20.0, KH_2PO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5, 马铃薯汁 1 L。其中, 马铃薯汁的配制方法是将马铃薯削皮, 称取 200 g 并切成小块放入烧杯中, 加入 1000 mL 蒸馏水后加热, 煮沸 30 min, 随后用双层纱布过滤, 取滤液加入培养基其他成分, 溶解后再用蒸馏水补足至 1000 mL, 自然 pH。

无机盐培养基 (g/L): KH_2PO_4 0.5, NH_4NO_3 3.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 无机盐溶液 2 mL, pH 5.0。

无机盐溶液 (g/L): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0。

1.3 菌悬液的制备

在无菌条件下, 将保存于试管中的 *I. lacteus* F17 接入马铃薯综合液体培养基中, 于 30 °C、160 r/min 条件下培养 5 d, 随后将含有菌丝球的培养液匀浆, 制备成菌悬液待用。

1.4 最适共代谢基质的确定

将一定量的 TBBPA 溶于二氯甲烷中制备成浓度为 10000 mg/L 的储备液, 向已灭菌的无机盐培养基 (培养基在配制时已分别加入 8 g/L 葡萄糖、丙酮酸钠、柠檬酸钠和酵母粉作为共代谢基质) 中加入 40 μL TBBPA 储备液, 待二氯甲烷挥发后, 再加入 1 mL 菌悬液, 使降解体系总体积为 20 mL, TBBPA 初始浓度为 20 mg/L。将该体系于 30 °C、160 r/min 条件下进行恒温振荡培养, 空白对照是含 TBBPA 但不添加任何共代谢基质的无机盐培养基。第 12 天取样, 测定培养液中 TBBPA 的剩余浓度和菌体干重, 计算 TBBPA 的生物降解率。

1.5 接种量对 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的影响

在已灭菌的无机盐培养基中按 0.1%、0.5%、

1%、5%、10% (V/V)的比例分别加入菌悬液,培养基的最终体积为 20 mL, TBBPA 初始浓度为 20 mg/L, 于 30 °C、160 r/min 条件下进行恒温振荡培养,空白对照是含 TBBPA 但不接种 *I. lacteus* F17 的无机盐培养基。第 12 天取样,测定培养液中 TBBPA 的剩余浓度,计算 TBBPA 的降解率。

1.6 初始 pH 对 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的影响

降解体系的初始 pH 值分别调节为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, 然后加入 1 mL 菌悬液, TBBPA 初始浓度为 20 mg/L, 于 30 °C、160 r/min 条件下进行恒温振荡培养,空白对照是含 TBBPA 但不接种 *I. lacteus* F17 的无机盐培养基。第 12 天取样,测定培养液中 TBBPA 的剩余浓度,计算 TBBPA 的降解率。

1.7 TBBPA 初始浓度对 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的影响

向已灭菌的无机盐培养基中加入一定量的 TBBPA 储备液使其初始浓度分别为 1、5、10、20、30 mg/L, 接种 1 mL 菌悬液, 在 30 °C、160 r/min 下进行恒温振荡培养,空白对照是含 TBBPA 但不接种 *I. lacteus* F17 的无机盐培养基。第 12 天取样,测定培养液中 TBBPA 的剩余浓度,计算 TBBPA 的降解率。

1.8 分析方法

1.8.1 样品预处理: 降解 12 d 后将 20 mL 培养液全部转移至 125 mL 分液漏斗中,加入等体积二氯甲烷进行萃取,静置分层,收集下层有机相。重复上述操作,合并 2 次萃取的有机相,经无水硫酸钠脱水后,在 40 °C 下进行旋转蒸发,用甲醇洗下内壁黏附物,转移至容量瓶中,随后用甲醇定容。经 0.22 μm 滤膜过滤后保存至棕色进样小瓶中,用高效液相色谱法(HPLC)测定 TBBPA 的浓

度,同时收集水相测定水中溴离子的含量。

1.8.2 *I. lacteus* F17 生物量的测定: 采用干重法测定菌体生物量:样品预处理后收集水相,过滤得到菌丝球,于 80 °C 下烘干至恒重,称量。

1.8.3 TBBPA 的测定: 采用高效液相色谱法(HPLC)测定 TBBPA,分析条件为:色谱柱为安捷伦 Eclipse C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相是甲醇:水=85:15(V/V),柱温 35 °C,检测波长 290 nm,流速 1 mL/min,进样量 20 μL,测定时间 8 min。

1.8.4 Br⁻含量的测定: 采用离子色谱仪测定水相中 Br⁻的含量,以 4.5 mmol/L Na₂CO₃ 和 1.4 mmol/L NaHCO₃ 作为淋洗液,流速为 1.2 mL/min,进样量 25 μL,样品运行时间 18 min。

1.8.5 锰过氧化物酶(MnP)的测定^[19]: 将培养液离心(8000 r/min, 10 min),吸取上清液 150 μL,加入 780 μL 乳酸钠缓冲液(110 mmol/L, pH 4.0),50 μL MnSO₄(40 mmol/L),20 μL H₂O₂(4 mmol/L),于 30 °C 水浴锅中反应 5 min,冰浴终止反应,在 240 nm 下测定吸光度,计算酶活力。一个酶活力单位(U)定义为每分钟将 1 μmol Mn²⁺氧化成为 Mn³⁺所需的酶量。

1.8.6 TBBPA 降解产物的分析: 采用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分析 TBBPA 的中间代谢产物,分析条件如下:色谱柱为 TG-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),载气为高纯度氦气(He),离子源(EI)温度为 300 °C,进样口温度设定为 300 °C,进样量 1 μL。气相色谱升温程序如下:100 °C 保留 2 min;以 20 °C/min 的速率升至 200 °C;最后以 15 °C/min 的速率升至 310 °C,保留 10 min。采用全扫描方式,扫描范围为 40–500 *m/z*。

在本文的所有降解实验中,每组实验均设置

了 5 个平行, 每个平行均设置 3 个重复。取测定结果的平均值为最终结果。

2 结果和分析

2.1 共代谢基质对 TBBPA 生物降解的影响

2.1.1 共代谢基质种类的确定: 向降解体系中分别加入 8 g/L 四种常见的易分解共代谢基质即葡萄糖、丙酮酸钠、柠檬酸钠和酵母粉, 以不加入共代谢基质为对照, 确定 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的最适共代谢基质的种类, 结果如图 1-A 所示。除酵母粉外, 葡萄糖、丙酮酸钠和柠檬酸钠的加入均能促进 *I. lacteus* F17 对 TBBPA 的生物降解, 与对照相比, 降解率分别提高了 21.2%、20.1%、4.9%, 除柠檬酸钠外, 葡萄糖、丙酮酸钠和酵母粉均能促进 *I. lacteus* F17 的生长。其中, 以葡萄糖为共代谢基质时, *I. lacteus* F17 的生长量及对 TBBPA 的降解率均高于其他共代谢基质, 因

此应选择葡萄糖作为 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的最适共代谢基质。

2.1.2 葡萄糖浓度对 TBBPA 生物降解的影响:

在降解体系中分别加入 0、1、2、5、8 g/L 葡萄糖, 考察葡萄糖浓度对 TBBPA 降解的影响, 结果见图 1-B。葡萄糖的加入对菌体的生长具有一定的促进作用, 然而菌体的生长量在葡萄糖浓度大于 2 g/L 后趋于稳定。与生长特性不同的是, TBBPA 的降解率随着葡萄糖浓度的增加而增大, 当葡萄糖浓度为 8 g/L 时, 降解率达到最大为 76.0%。因此, 选择 8 g/L 葡萄糖作为最适共代谢基质进行后续实验。

2.2 降解条件的优化

2.2.1 *I. lacteus* F17 接种量对 TBBPA 生物降解的影响:

分别按 0.1%、0.5%、1%、5% 和 10% (V/V) 的接种量向降解体系中加入 *I. lacteus* F17 菌悬液, 反应体系的最终体积为 20 mL, 在 TBBPA 初始浓度 20 mg/L、外加共代谢基质 8 g/L 葡萄糖、pH 5.0

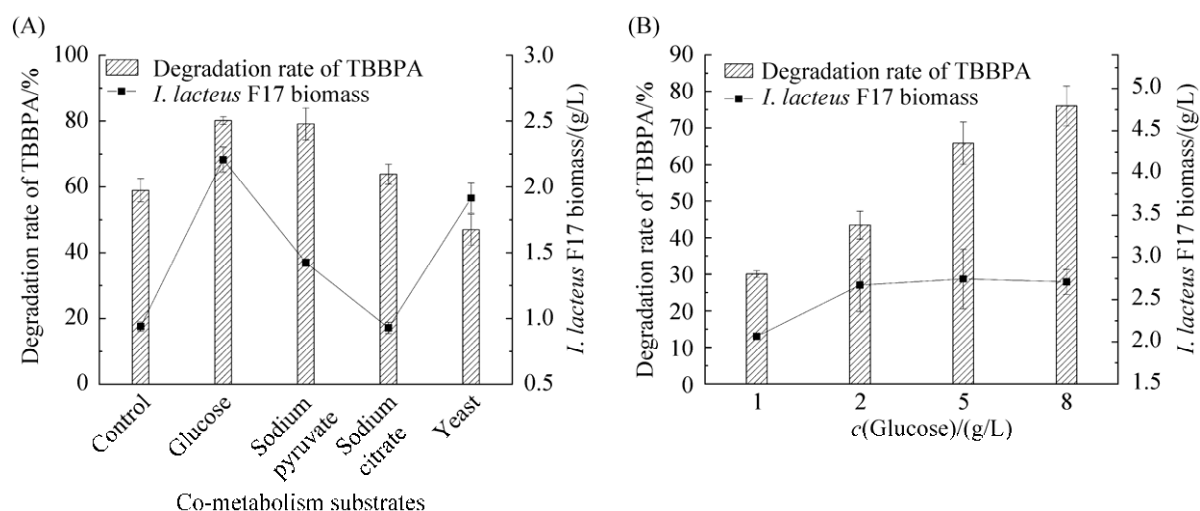


图 1. 共代谢基质对 *I. lacteus* F17 生物降解 TBBPA 的影响

Figure 1. Effects of co-metabolic substrates on the biodegradation of TBBPA by *I. lacteus* F17. A: effects of different co-metabolic substrates on the biodegradation of TBBPA and biomass; B: effects of glucose concentration on the biodegradation of TBBPA.

以及 30 °C 的条件下, 考察 *I. lacteus* F17 接种量对 TBBPA 生物降解的影响。如图 2-A 所示, 接种量为 0.1%–5% 时, 随着接种量的增大 TBBPA 的降解率也随之增大, 但在接种量为 5% 时降解率达到最大即 66.4%, 因此以下均采用 5% 的接种量进行降解实验。

2.2.2 溶液初始 pH 值对 TBBPA 降解的影响: 降解体系的初始 pH 值分别设定为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0, TBBPA 初始浓度 20 mg/L, 外加共代谢基质为 8 g/L 的葡萄糖, *I. lacteus* F17 接种量为 5%, 于 30 °C 下考察初始 pH 值对 TBBPA 降解的影响。从图 2-B 可以看出, 当 pH 为 3.0 时, TBBPA 的降解率较低, 仅为 42.2%。然而在 pH 4.0–8.0, *I. lacteus* F17 则表现出较好的降解能力, TBBPA 降解率均达到 70% 以上, 最高为 75.41%。本实验选择 pH 5.0 作为 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的最适 pH。

2.2.3 TBBPA 初始浓度对其降解的影响: TBBPA 初始浓度分别设定为 1、5、10、20 和 30 mg/L, 在外加共代谢基质为 8 g/L 的葡萄糖、*I. lacteus* F17 接种量为 5%、pH 5.0 以及 30 °C 的条件下, 考察其初始浓度对 *I. lacteus* F17 生物降解 TBBPA 的影响, 结果如图 2-C 所示。当 TBBPA 浓度从

1 mg/L 提高至 5 mg/L, 其降解率显著增加, 并且在 TBBPA 初始浓度为 5 mg/L 时其降解率达到最大为 78.4%, 但随着 TBBPA 初始浓度的增大, 其降解率略有降低, 因此 5 mg/L 是 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的最适初始浓度。

2.3 MnP 对 TBBPA 生物降解的影响

白腐真菌对有机污染物的降解主要依赖其自身分泌的胞外降解酶, 包括木质素过氧化物酶 (LiP)、锰过氧化物酶 (MnP) 和漆酶 (Lac)。已有的研究表明 *I. lacteus* F17 主要依靠所分泌的 MnP 来实现对有机污染物的降解和脱色^[23–24], 因此本实验考察了 TBBPA 生物降解过程中 MnP 活力的变化, 降解条件为外加共代谢基质 8 g/L 葡萄糖, *I. lacteus* F17 接种量 5%, 初始 pH 5.0, 为便于分析 TBBPA 降解产物, 将 TBBPA 初始浓度设为 20 mg/L, 实验结果如图 3 所示。TBBPA 的降解率随着降解时间的延长而增大, 并在第 10 天时达到最大。对比图 3-A 和图 3-B 发现, TBBPA 的生物降解率与 MnP 活力在第 8–14 天时表现出相同的变化趋势, 且两者均都在第 10 天时达到最大, 在第 10 天降解率达 85.5%、脱溴率为 14.6%、酶活为 15.1 U/L。

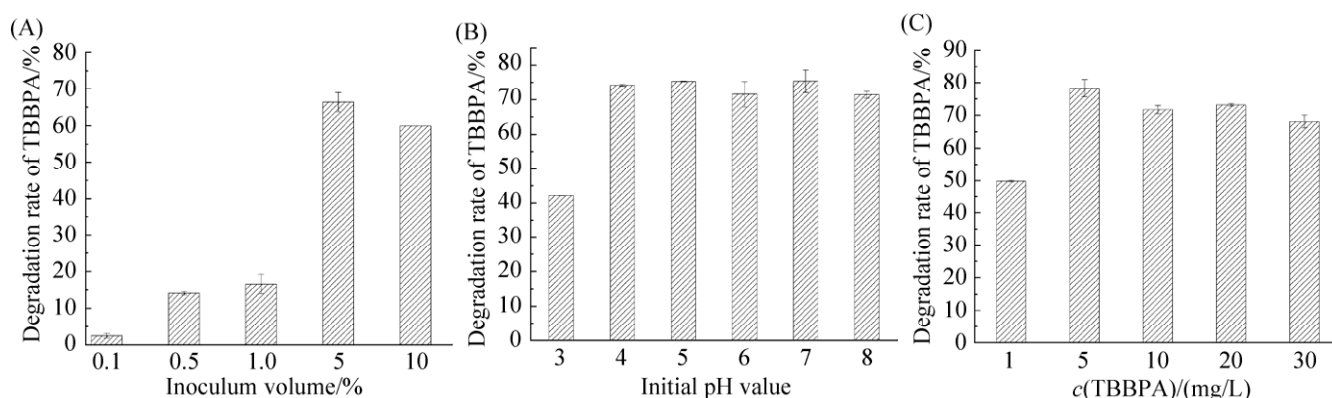


图 2. 环境因素对 TBBPA 降解的影响

Figure 2. Effects of environmental factors on the biodegradation of TBBPA. A: inoculum volume on the biodegradation of TBBPA; B: initial pH on the biodegradation of TBBPA; C: TBBPA initial concentration on the biodegradation of TBBPA.

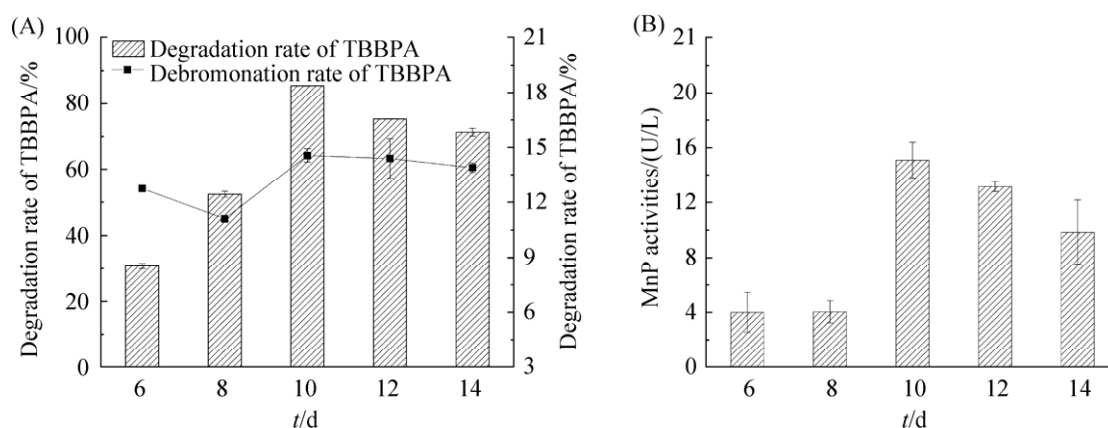


图 3. 优化条件下 *I. lacteus* F17 对 TBBPA 的生物降解

Figure 3. The biodegradation of TBBPA by *I. lacteus* F17 under optimal conditions. A: the biodegradation rate and debromination rate of TBBPA; B: the activity of MnP.

2.4 TBBPA 的生物降解途径分析

通过 GC-MS 对 *I. lacteus* F17 生物降解 TBBPA 的中间产物进行分析, 检测到 7 种中间降解产物, 即 1-(3-溴-4-羟基)苯乙酮、对羟基苯甲酸、双酚 A、2,5-二羟基苯乙酮、2,5-二羟基苯甲酸、2,4-二羟基苯乙酮和 2,4-二羟基苯甲酸(图 4), 其中, 1-(3-溴-4-羟基)苯乙酮在文献中鲜有报道。根据已检测到的物质, 结合相关文献^[11-12], 提出了 *I. lacteus* F17 生物降解 TBBPA 的可能途径(图 5)。首先, TBBPA 脱去一个溴原子, 形成 3,3',5-三溴双酚 A, 随后两种不同路径有可能是同时发生的。途径一是, 3,3',5-三溴双酚 A 依次经过 β -断裂、羟基化、去质子和氧化生成 1-(3-溴-4-羟基)苯乙酮和对羟基苯甲酸; 途径二是 3,3',5-三溴双酚 A 继续脱溴生成双酚 A, 随后双酚 A 中两个苯环之间的键断开, 通过一系列反应生成 2,5-二羟基苯乙酮、2,5-二羟基苯甲酸、2,4-二羟基苯乙酮和 2,4-二羟基苯甲酸。

3 讨论

共代谢是微生物降解有机污染物的一种重要方式, 共代谢基质的加入能够促进菌体的生长及

降解酶的合成, 从而有利于难降解有机污染物的降解。葡萄糖、丙酮酸钠、柠檬酸钠和酵母粉均是易被微生物利用的共代谢基质, 相关研究表明这四种共代谢基质在其适宜浓度下均能不同程度地促进微生物对有机污染物的降解^[1,25]。本文的实验结果表明, 在不添加任何共代谢基质的降解体系中 TBBPA 的降解率为 59.0%, 而添加了葡萄糖、丙酮酸钠和柠檬酸钠均能促进 *I. lacteus* F17 的生长及其对 TBBPA 的生物降解, 其中葡萄糖和丙酮酸钠能显著提高 *I. lacteus* F17 对 TBBPA 的降解效率, 且葡萄糖对 *I. lacteus* F17 的生长促进效果更明显。这一结果表明 *I. lacteus* F17 可以通过共代谢的方式更有效地降解 TBBPA。而酵母粉的加入虽能促进 *I. lacteus* F17 的生长, 但却导致该菌对 TBBPA 生物降解能力的降低, 这可能是由于酵母粉中含有丰富的营养物质, 除了能为菌体生长提供碳源以外还能提供丰富的氮源, 而唐文忠^[26]研究发现, *I. lacteus* F17 在限氮条件下更有利于 MnP 的合成, 对刚果红染料表现出更好的脱色及降解能力。因此酵母粉不适宜作为 *I. lacteus* F17 的共代谢物。综上所述, 选择葡萄糖作为 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的共代谢基质更合适。

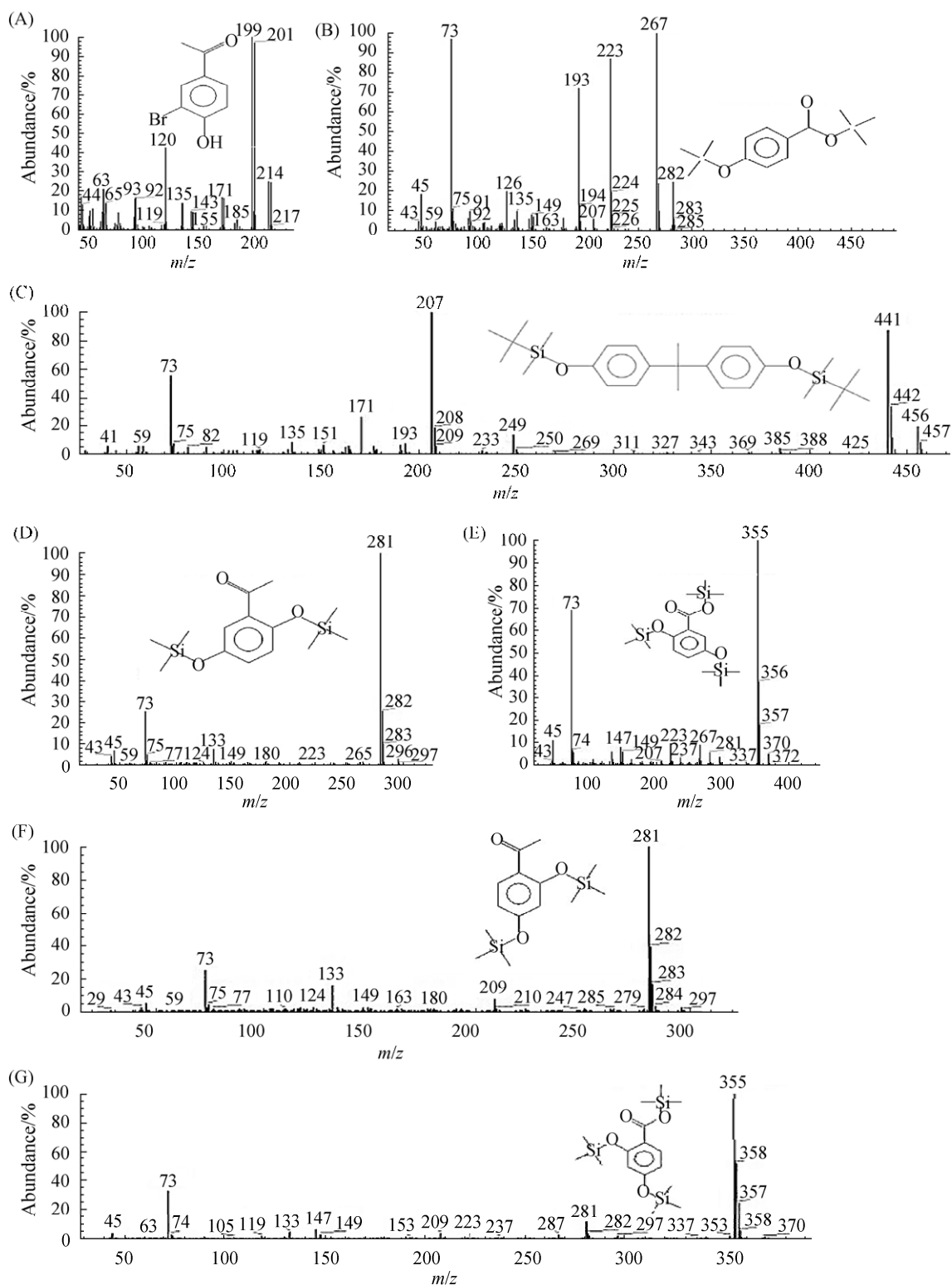


图 4. TBBPA 生物降解的中间产物的质谱图

Figure 4. The mass spectrum of intermediate products during the biodegradation of TBBPA by *I. lacteus* F17. A: 1-(3-bromo-4-hydroxyphenyl) ethanone; B: 4-hydroxybenzoic acid; C: bisphenol A; D: 2,5-dihydroxyacetophenone; E: 2,5-dihydroxybenzoic acid; F: 2,4-dihydroxyacetophenone; G: 2,4-dihydroxybenzoic acid.

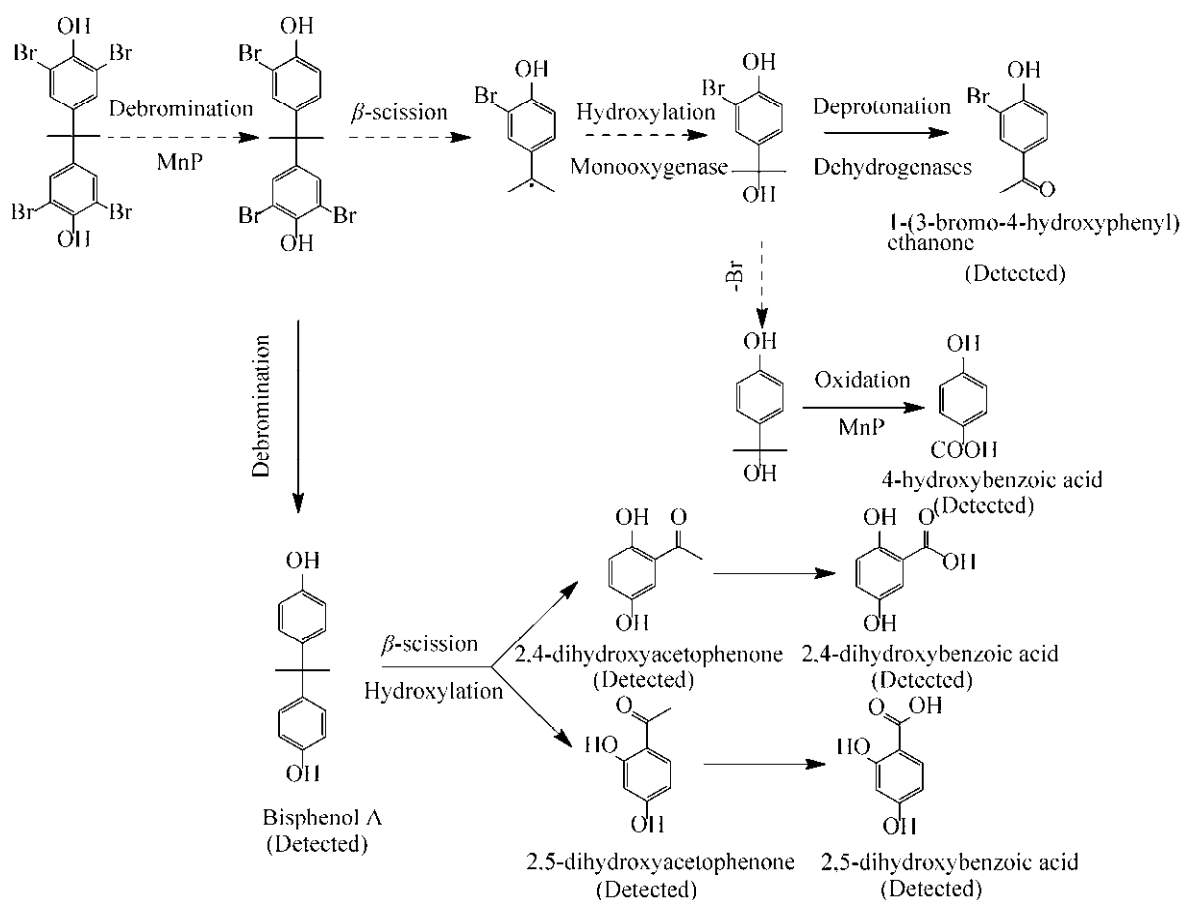


图 5. TBBPA 的生物降解途径

Figure 5. The biodegradation pathway of TBBPA.

污染物初始浓度、微生物接种量和体系 pH 值是影响污染物降解的重要因素。实验结果表明,在一定条件下 TBBPA 浓度过高会影响其降解效果,因为过高浓度的 TBBPA 可能会对菌体造成一定的毒害作用,抑制菌体的生长和酶的分泌,因此污染物的适宜浓度也是决定降解效果的重要因素之一。刘俊等^[22]研究了 *I. lacteus* F17 对水相中菲和蒽的降解,结果表明当菲和蒽的初始浓度为 5 mg/L 时,降解率较高。Chen 等^[17]用黄孢原毛平革菌降解 TBBPA,其最佳降解浓度也为 5 mg/L,均与本文的实验结果相一致。Peng 等^[11]研究了丛毛单胞菌属对 TBBPA 的降解,当其初始浓度为 5 mg/L

时降解率为 70.2%,而本实验中用 *I. lacteus* F17 降解 5 mg/L 的 TBBPA,降解率可达 78.4%。因此 *I. lacteus* F17 对 TBBPA 的生物降解能力不亚于某些细菌。

微生物接种量是影响有机污染物生物降解的重要因素。微生物接种量过低时,菌体生长速度缓慢且生物量少,进而影响产酶量,导致降解率偏低。而微生物接种量过高时,菌体可能产生对营养物的竞争,影响酶的合成。因此,适宜的接种量是影响降解效果的重要因素,这也是每一批实验在温度、pH、TBBPA 初始浓度等条件相同的情况下降解率出现差异的主要原因。在本实验中

发现, *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的最适接种量为 5%。

降解体系的初始 pH 会影响微生物对营养物质的吸收和转运, 影响胞外酶的分泌及活性。研究表明, *I. lacteus* F17 在 pH 4.0–8.0 时对菲和蒽共存体系具有较好的降解效果^[22]。在本实验中, pH 3.0 时, 由于体系酸性过大, 影响 *I. lacteus* F17 的生长和生物酶的活性, 从而导致 TBBPA 的生物降解率较低, 仅为 42.2%。然而, 初始 pH 在 4.0–8.0 范围内时, TBBPA 的生物降解率普遍较高, 降解率均达到 70% 以上, 同时也表明 *I. lacteus* F17 可以在较宽的 pH 范围内有效降解 TBBPA。由于 *I. lacteus* F17 在弱酸性环境中生长更好^[22], 因此本实验选择 pH 5.0 作为 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的最适 pH。

白腐真菌因其独特而强大的木质素降解酶系而对多种芳香烃化合物表现出广谱的降解能力, Zhao 等^[24]的研究表明, *I. lacteus* F17 在染料脱色及降解体系中以 MnP 为主要的降解酶。为了尽可能地检测到较多的降解中间产物, 更准确地分析 TBBPA 的代谢途径, 在研究降解过程中 MnP 活力变化的实验以及产物分析实验中, 选择了较高初始浓度的 TBBPA (20 mg/L)。结果表明 MnP 活力在第 8 天之前较低, 但在第 10 天时呈现出显著的增大, 酶活达到 15.1 U/L, 随后 MnP 活力开始略有下降, 这可能是因为采取平行实验的过程中, 每个降解体系中即使接种量相同, 但体系中真菌的细胞密度并不能完全一致, 从而导致每个降解体系中真菌的生物量与其分泌的酶活力不尽相同, 因此造成了这种随着降解时间增加 MnP 酶活力反而下降的现象。结合降解过程中 TBBPA 降解率和脱溴率的变化不难发现, 当 MnP 活力处于最

高水平时, TBBPA 的降解率和脱溴率也达到最高, 随着 MnP 活力的下降, 降解率略有降低, 脱溴率无显著变化, 这一实验结果表明, *I. lacteus* F17 所合成的 MnP 的活力影响着 TBBPA 的生物降解效果。MnP 是一种含亚铁血红素的过氧化物酶, 据报道 MnP 对 Mn^{2+} 有依赖性, Mn^{2+} 是 MnP 在氧化还原反应中的电子供体, 并且 Mn^{2+} 的浓度会影响 MnP 的产量^[27], 因此可通过外加适量的 Mn^{2+} 来提高 MnP 的活性, 从而提高 TBBPA 的生物降解率。此外, 环境温度和 pH 值也是影响酶活性变化的重要因素, 因此也可通过实验来确定 *I. lacteus* F17 的最适产酶温度和 pH, 从而提高 TBBPA 的生物降解率。在优化的降解条件下, *I. lacteus* F17 对 20 mg/L TBBPA 的降解率最高可达到 85.5%。Chen 等^[17]研究了黄孢原毛平革菌(白腐真菌)对 TBBPA 的降解, 当 TBBPA 初始浓度为 20 mg/L 时降解率为 85.7%, 刘莉莉等^[15]使用甲基杆菌(细菌)降解 20 mg/L TBBPA 时降解率仅为 30.12%, 因此白腐真菌在降解 TBBPA 方面具有很大的应用潜力, 可扩大阻燃剂污染环境的生物治理中可利用的微生物资源。

An 等^[12]研究发现 TBBPA 在苍白杆菌属的作用下通过裂解、脱溴、脱氢和氧化同时实现还原脱溴与好氧矿化而生成小分子化合物。万博等^[26]利用铜绿假单胞菌 NY3 好氧降解 TBBPA, 发现降解过程中主要发生了脱溴、羟基化、开环和脱羧等反应。本文通过对 TBBPA 生物降解中间产物的分析, 推测出 *I. lacteus* F17 对 TBBPA 的生物降解主要是通过脱溴、 β -断裂、羟基化、去质子和氧化等过程实现的, 其中产物 1-(3-溴-4-羟基)苯乙酮在文献中鲜有报道, 并推测出它是由 3,3',5-三溴双酚 A 依次经过 β -断裂、羟基化、去质子而生成的。

4 结论

对 *I. lacteus* F17 好氧降解 TBBPA 的特性进行了较为详细的研究, *I. lacteus* F17 可以通过共代谢方式实现对 TBBPA 更有效的降解, 最适共代谢基质为葡萄糖, 且在 pH 4.0–8.0 范围内均能较好地降解 TBBPA。通过单因素优化确定了 *I. lacteus* F17 好氧降解 TBBPA 的最优条件: 葡萄糖 8 g/L, TBBPA 初始浓度 5 mg/L, 菌悬液接种量 5%, pH 5.0。在上述优化条件下对 20 mg/L TBBPA 的降解率最高可达 85.5%, 比优化之前提高了 26.5%。GC-MS 分析表明, TBBPA 在生物降解过程中经过脱溴、 β -断裂、羟基化、去质子和氧化等反应, 通过检测到的 7 种中间产物 1-(3-溴-4-羟基)苯乙酮、对羟基苯甲酸、双酚 A、2,5-二羟基苯乙酮、2,5-二羟基苯甲酸、2,4-二羟基苯乙酮和 2,4-二羟基苯甲酸, 推测出在 *I. lacteus* F17 降解 TBBPA 的过程中可能涉及两条同时进行的途径。

参考文献

- [1] Fan ZZ, Wang J, Liu SS, Zhou JT. Aerobic degradation characteristics of tetrabromobisphenol A by *Pseudomonas*. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(6): 2597–2604. (in Chinese)
范真真, 王竞, 刘沙沙, 周集体. 假单胞菌好氧降解四溴双酚 A 的特性. *环境工程学报*, 2014, 8(6): 2597–2604.
- [2] Chen YM, Song ZH. Research advances in environmental remediation technologies for tetrabromobisphenol A. *Environmental Science and Management*, 2016, 41(8): 90–94. (in Chinese)
陈雨萌, 宋志慧. 环境中四溴双酚 A 降解技术的进展研究. *环境科学与管理*, 2016, 41(8): 90–94.
- [3] Yan MY, Pang ZH, Li XM, Chen JY, Li JS. Progress on degradation technology of tetrabromobisphenol A. *Environmental Science & Technology*, 2013, 36(4): 49–54. (in Chinese)
闫梦玥, 庞志华, 李小明, 谌建宇, 黎京士. 四溴双酚 A 降解技术的最新研究进展. *环境科学与技术*, 2013, 36(4): 49–54.
- [4] Liu K, Li J, Yan SJ, Zhang W, Li YJ, Han D. A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China. *Chemosphere*, 2016, 148: 8–20.
- [5] Malkoske T, Tang YL, Xu WY, Yu SL, Wang HT. A review of the environmental distribution, fate, and control of tetrabromobisphenol A released from sources. *Science of the Total Environment*, 2016, 569/570: 1608–1617.
- [6] Ning ML, Hu JJ, Lu LR, Cai YW, Li GY, An TC. Toxicity mechanism of tetrabromobisphenol A to human respiratory system cells 16HBE and Beas2B. *Chinese Science Bulletin*, 2020, 65(10): 931–939. (in Chinese)
宁美霖, 胡俊杰, 卢莉蓉, 蔡仪威, 李桂英, 安太成. 四溴双酚 A 对人体呼吸系统细胞 16HBE 和 Beas2B 的接触暴露毒性机制. *科学通报*, 2020, 65(10): 931–939.
- [7] Zhang J, Yu SL, Tang YL, Zhang YH. Research progresses on toxicity and removal technology of Tetrabromobisphenol A in water. *Water Technology*, 2016, 10(1): 1–6. (in Chinese)
张均, 于水利, 唐玉霖, 张运海. 水源水中四溴双酚-A 的毒性特征与去除技术研究进展. *供水技术*, 2016, 10(1): 1–6.
- [8] Wang YM, Wang YL. Research progress on tetrabromobisphenol A(TBBPA). *Environmental Engineering*, 2016, 34(4): 1–5, 11. (in Chinese)
王彦民, 王娅丽. 溴代阻燃剂 TBBPA 最新研究进展. *环境工程*, 2016, 34(4): 1–5, 11.
- [9] Jiang YC, Lu HL, Xia K, Wang Q, Yang JJ, Hong HL, Liu JC, Yan CL. Effect of mangrove species on removal of tetrabromobisphenol A from contaminated sediments. *Chemosphere*, 2020, 244: 125385.
- [10] Chen YW, Fan MJ, Sun JY, Shen SB. Study on the anaerobic co-metabolic biodegradation of tetrabromobisphenol A. *China Environmental Science*, 2018, 38(4): 1459–1465. (in Chinese)
陈英文, 范梦婕, 孙靖云, 沈树宝. 四溴双酚 A 厌氧共代谢降解性能研究. *中国环境科学*, 2018, 38(4): 1459–1465.
- [11] Peng XX, Zhang ZL, Luo WS, Jia XS. Biodegradation of tetrabromobisphenol A by a novel *Comamonas* sp. strain, JXS-2-02, isolated from anaerobic sludge. *Bioresour Technol*, 2013, 128: 173–179.
- [12] An TC, Zu L, Li GY, Wan SG, Mai BX, Wong PK. One-step process for debromination and aerobic mineralization of tetrabromobisphenol-A by a novel *Ochrobactrum* sp. T

- isolated from an e-waste recycling site. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9148–9154.
- [13] Ren L, Jia Y, Ruth N, Shi YH, Wang JH, Qiao C, Yan YC. Biotransformations of bisphenols mediated by a novel *Arthrobacter* sp. strain YC-RL1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(4): 1967–1976.
- [14] Ma YN, Zhao YY, Wang YF, Li XZ, Sun FF, Corvini PFX, Ji R. Effects of Cu²⁺ and humic acids on degradation and fate of TBBPA in pure culture of *Pseudomonas* sp. strain CDT. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 62: 60–67.
- [15] Liu LL, Wang XX, Chen X, Zhou CC, Tang Z, Lin S. Studies on aerobic degradation mechanism of tetrabromobisphenol A and functional enzymes of *Methylobacterium* sp. TP-1. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(11): 4250–4258. (in Chinese)
刘莉莉, 汪烯烯, 陈鑫, 周纯淳, 唐周, 林森. *Methylobacterium* sp. TP-1 好氧降解四溴双酚 A 机理及其功能酶研究. *环境科学学报*, 2018, 38(11): 4250–4258.
- [16] Uhnáková B, Ludwig R, Pěkníková J, Homolka L, Lisá L, Šulc M, Petříčková A, Elzeinová F, Pelantová H, Monti D, Křen V, Haltrich D, Martínková L. Biodegradation of tetrabromobisphenol A by oxidases in basidiomycetous fungi and estrogenic activity of the biotransformation products. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20): 9409–9415.
- [17] Chen ZH, Yin H, Peng H, Lu GN, Liu ZH, Dang Z. Identification of novel pathways for biotransformation of tetrabromobisphenol A by *Phanerochaete chrysosporium*, combined with mechanism analysis at proteome level. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 1352–1361.
- [18] Yao MW, Li WM, Duan ZH, Zhang YL, Jia R. Genome sequence of the white-rot fungus *Irpex lacteus* F17, a type strain of lignin degrader fungus. *Standards in Genomic Sciences*, 2017, 12(1): 1–6.
- [19] Duan ZH, Shen R, Liu BJ, Yao MW, Jia R. Comprehensive investigation of a dye-decolorizing peroxidase and a manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17, a lignin-degrading basidiomycete. *AMB Express*, 2018, 8(1): 119.
- [20] Chen WT, Zheng LL, Jia R, Wang N. Cloning and expression of a new manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17 and its application in decolorization of reactive black 5. *Process Biochemistry*, 2015, 50(11): 1748–1759.
- [21] Yang XT, Zheng JZ, Lu YM, Jia R. Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 9585–9597.
- [22] Liu J, Wu J. Selective degradation of coexisting phenanthrene and anthracene by *Irpex lacteus* F17. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 916–925. (in Chinese)
刘俊, 吴涓. 乳白耙齿菌 F17 对共存菲、蒽的降解差异性. *微生物学报*, 2019, 59(5): 916–925.
- [23] Wu J, Liu J, Chen J. Degradation of single and mixed PAHs by *Irpex lacteus* F17. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2734–2746. (in Chinese)
吴涓, 刘俊, 陈婕. 乳白耙齿菌 F17 对单一和复合多环芳烃的降解差异解析. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2734–2746.
- [24] Zhao XS, Huang XJ, Yao JT, Zhou Y, Jia R. Fungal growth and manganese peroxidase production in a deep tray solid-state bioreactor, and *in vitro* decolorization of poly R-478 by MnP. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(6): 803–813.
- [25] Wan B, Nie MQ, Qi HX, Nie HY, Wang XD, Chen R, Feng HM. Study on the characteristic features of the aerobic biodegradation of tetrabromobisphenol A by *Pseudomonas aeruginosa* NY3. *Journal of Safety and Environment*, 2016, 16(5): 196–200. (in Chinese)
万博, 聂麦茜, 齐慧霞, 聂红云, 王小豆, 陈锐, 冯红梅. 铜绿假单胞菌 NY3 好氧降解四溴双酚 A 的特性研究. *安全与环境学报*, 2016, 16(5): 196–200.
- [26] Tang WZ, Jia R, Cheng XB, Li XD. Study on the decolorization of Congo red by *Schizophyllum* sp. F17 and its degradation enzymes. *Journal of Biology*, 2007, 24(4): 24–28. (in Chinese)
唐文忠, 荚荣, 程晓滨, 李旭东. 裂褶菌 F17 对刚果红的脱色及主要降解酶的研究. *生物学杂志*, 2007, 24(4): 24–28.
- [27] Wang B, Wang Y, Zhou XY, Lu GY. Study advance of manganese peroxidase(MnP). *Guangxi & Development of Chemical Industry*, 2005, 34(4): 28–31. (in Chinese)
王蓓, 王圆, 周晓云, 芦国营. 锰过氧化物酶(MnP)的研究进展. *化工技术与开发*, 2005, 34(4): 28–31.

Characteristics and mechanism of aerobic biodegradation of tetrabromobisphenol A by *Irpex lacteus* F17

Jie Chen, Juan Wu*

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

Abstract: [Objective] To research the possibilities of biodegradation of brominated flame retardants by *Irpex lacteus* F17, we studied the characteristics and influence factors of aerobic degradation of tetrabromobisphenol A (TBBPA), and the degradation pathway was speculated based on the analysis of intermediates. [Methods] We determined the concentration of TBBPA during biodegradation by high-performance liquid chromatography (HPLC), and detected the intermediate products by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Results] TBBPA could be biodegraded by *I. lacteus* F17 via co-metabolism, and glucose was confirmed to be the most appropriate co-metabolic matrix. Under the optimal degradation conditions which were 8 g/L glucose, 5% inoculum volume, pH 5.0, the degradation rate and the debromination rate were 85.5% and 14.6%, respectively, for 20 mg/L TBBPA. It was found that the degradation rate of TBBPA was related to the activity of manganese peroxidase (MnP). On the basis of GC-MS analysis, we detected seven intermediate products. [Conclusion] *I. lacteus* F17 could degrade TBBPA effectively, and debromination, β -scission, hydroxylation, deprotonation, and oxidation were involved in the degradation mechanism of TBBPA by *Irpex lacteus* F17.

Keywords: *Irpex lacteus* F17, TBBPA, biodegradation, co-metabolism, MnP, degradation pathway

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Research Projects of Education Department of Anhui Province (KJ2017A035) and by the National Natural Science Foundation of China (31970100)

*Corresponding author. Tel: +86-551-63861441; Fax: +86-551-63861724; E-mail: wujuan@ustc.edu

Received: 24 January 2021; Revised: 8 April 2021; Published online: 15 June 2021