

## · 研究报告 ·

**闫艳春** 中国农业科学院研究生院教授, 博士生导师, 国务院政府特殊津贴获得者。1982年毕业于北京师范大学化学系。从教38年来, 始终工作在教学一线, 先后给1万余名本科生、研究生开设多门课程。长期从事环境微生物学领域的研究工作, 已完成国家级、省部级课题7项, 获得国家发明专利和省部级科技成果奖励7项。在其所研究领域有影响力的学术期刊发表论文90余篇, 其中SCI收录论文51篇, 专著1部; 获已授权发明专利5项。



# 混合菌群 YC-BJ1 对有机磷阻燃剂的降解及 16S rRNA 基因多样性分析

王俊欢, 李先军, 吴巍, 樊双虎, 贾阳, 王嘉翼, 闫艳春

中国农业科学院研究生院, 北京 100081

王俊欢, 李先军, 吴巍, 等. 混合菌群 YC-BJ1 对有机磷阻燃剂的降解及 16S rRNA 基因多样性分析. 生物工程学报, 2019, 35(11): 2050-2060.

Wang JH, Li XJ, Wu W, et al. Characterization and 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of the organophosphorous flame retardants degrading consortium YC-BJ1. Chin J Biotech, 2019, 35(11): 2050-2060.

**摘要:** 作为阻燃剂, 有机磷酸酯广泛应用于工业制品和人类生活用品中, 是一种全球性的环境污染物, 因其具有特殊的理化性质, 自然条件下很难水解。因此, 对有机磷酸酯的微生物降解成了当下的研究热点。通过持续逐级富集, 从北京某垃圾处理厂渗透液中富集到一个混合菌群 (编号为 YC-BJ1), 并在降解特性、底物谱以及物种组成多样性 3 个方面对其进行定性鉴定。该菌群能够高效降解磷酸三苯酯 (Triphenyl phosphate, TPhP) 和磷酸三甲苯酯 (Tricresyl phosphate, TCrP), 培养 4 d 能够实现 100 mg/L TPhP 和 TCrP 的基本降解, 降解率分别为 99.8% 和 91.9%。降解特性研究发现, 该混合菌群具有出色的环境适应能力, 能够在较宽的环境条件下 (温度 15-40 °C, pH 5.0-12.0, 0%-4% 盐) 保持对 TPhP 的降解能力。底物谱分析发现, 混合菌群 YC-BJ1 能够降解部分含氯有机磷阻燃剂, 培养 4 d, 对磷酸三 (1,3-二氯异丙基) 酯 (Tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate, TDCPP) 和磷酸三 (2-氯乙基) 酯 (Tris(2-chloroethyl) phosphate, TCEP) 的降解率分别为 16.5% 和 22.0%。16S rRNA 基因物种多样性分析发现, 混合菌群 YC-BJ1 中物种丰度最高的 3 个菌属分别是生丝微菌属 *Hyphomicrobium* (38.80%)、金黄杆菌属

**Received:** May 14, 2019; **Accepted:** July 17, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31540067, 21876201), Basic Research Fund of Chinese Academy of Agricultural Sciences (Nos. 1610042017001, 1610042018005, 1610042018006).

**Corresponding author:** Yanchun Yan. Tel: +86-10-82109685; E-mail: yanyanchun@caas.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31540067, 21876201), 中国农业科学院基本科研业务费 (Nos. 1610042017001, 1610042018005, 1610042018006) 资助。

*Chryseobacterium* (17.57%) 和鞘氨醇盒菌属 *Sphingopyxis* (17.46%)。与目前已报道的有机磷阻燃剂降解菌和菌群相比,混合菌群在降解效率和环境适应能力方面都具有极大的优势,有较广泛的应用空间。高效降解菌群的富集能够为有机磷阻燃剂的降解及其环境污染生物修复提供微生物资源,并为其降解机理的探索提供支持。

关键词: 有机磷阻燃剂, 磷酸三苯酯, 生物降解, 混合菌, 16S rRNA 基因多样性分析

## Characterization and 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of the organophosphorous flame retardants degrading consortium YC-BJ1

Junhuan Wang, Xianjun Li, Wei Wu, Shuanghu Fan, Yang Jia, Jiayi Wang, and Yanchun Yan

The Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** As flame retardants, organophosphate is recognized as a global environmental contaminant because of its wide application. This contaminant is hardly degradable by hydrolysis in the environment due to its special physicochemical properties. Therefore, it is of urgent needs to study the microbial degradation of organophosphate. Through continuous enrichment, we isolated one bacterial consortium, named YC-BJ1, from leachate of waste treatment plant in Beijing. The bacterial consortium YC-BJ1 could efficiently degrade 99.8% of triphenyl phosphate (TPhP) and 91.9% of tricresyl phosphate (TCrP) with the concentration of 100 mg/L within 4 days. Besides aryl phosphates, it could degrade chloro-phosphates, tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate (TDCPP) and tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) by 16.5% and 22.0% respectively. The degradation of the consortium on TPhP was optimized through a broad range of temperature (15–40 °C), pH (5.0–12.0) and salinity (0%–4%). 16S rRNA gene-based metagenomic analysis revealed that *Hyphomicrobium* (38.80%), *Chryseobacterium* (17.57%) and *Sphingopyxis* (17.46%) were the dominant genera of the consortium YC-BJ1. Compared with the reported organophosphorus flame retardants (OPFRs) degrading bacteria and microflora, the mixed microflora YC-BJ1 exhibited great advantages in degradation efficiency and environmental adaptability, demonstrating its wide application potential. The enrichment and isolation of highly efficient degrading flora can provide abundant microbial resources for the degradation of OPFRs and the bioremediation towards OPFRs-contaminated environments, and also lay a solid foundation for the exploration of its degradation mechanism.

**Keywords:** organophosphorus flame retardants, triphenyl phosphate, biodegradation, bacterial consortium, 16S rRNA gene-based metagenomic analysis

有机磷酸酯 (Organophosphorus esters, OPEs) 是一类典型的有机磷阻燃剂 (Organophosphorus flame retardants, OPFRs)。作为阻燃剂和增塑剂, OPEs 广泛应用于多种产品中,包括塑料、纺织品、家具、电子产品、车辆以及建筑用品等。常用的 OPFRs 分为三类: 烷基磷酸酯, 如磷酸三 (丁氧基乙基) 酯 (Tris(2-butoxyethyl) phosphate, TBEP) 和磷酸三辛酯 (Tris(2-ethylhexyl) phosphate, TEHP); 含氯磷酸酯, 常用的有磷酸三 (2-氯丙基) 酯 (Tris(1-chloro-2-propyl) phosphate, TCPP)、磷

酸三 (2-氯乙基) 酯 (Tris(2-chloroethyl) phosphate, TCEP) 和磷酸三 (1,3-二氯异丙基) 酯 (Tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate, TDCPP); 以及芳基磷酸酯, 如磷酸三苯酯 (Triphenyl phosphate, TPhP) 和磷酸三甲苯酯 (Tricresyl phosphate, TCrP)<sup>[1-3]</sup>。因其持久性和危害性, 2009 年起, 多溴联苯醚 (Polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 已禁止使用, 作为替代物的 OPFRs 的使用量持续增长<sup>[4]</sup>。

OPFRs 作为添加剂, 并没有与产品基质通过

化学键连接,在生产、运输以及使用的过程中有大量的 OPFRs 释放到环境中<sup>[5-6]</sup>。因此,OPFRs 在不同的环境介质中都有分布,比如室内环境<sup>[7-8]</sup>、水环境如饮用水<sup>[9]</sup>、地表水<sup>[10]</sup>以及江河湖海<sup>[11-13]</sup>、大气<sup>[14-15]</sup>、土壤和沉积物<sup>[16-17]</sup>以及生物体<sup>[18]</sup>。甚至在极地和远洋环境中,都有 OPFRs 检出,说明 OPFRs 具有远程运输能力并在全球范围内普遍存在<sup>[19-20]</sup>。

在所有的 OPFRs 中,含氯的 TCPP 和 TDCPP 疑似有致癌性<sup>[6]</sup>,磷酸三丁酯 (Tri-n-butyl phosphate, TnBP)、TBEP 和 TCEP 则对斑马鱼幼虫具有神经毒性<sup>[21]</sup>。人类细胞系和斑马鱼的实验表明,一些 OPFRs (TDCPP、TPhP、TCrP) 具有内分泌干扰潜能并能够影响性荷尔蒙平衡<sup>[22]</sup>。一些毒理学实验表明 OPFRs 对斑马鱼胚胎具有心脏毒

性<sup>[23]</sup>、发育毒性<sup>[24]</sup>以及生殖毒性<sup>[25]</sup>。500 µg/L TPhP 的长期暴露对大型蚤具有发育以及生殖毒性<sup>[26]</sup>。有报道指出 TDCPP 暴露会损害人类角膜<sup>[27]</sup>。因此,环境中无处不在的 OPFRs 对人类健康是一大威胁。

已报道的 OPFRs 去除方法有光催化<sup>[28]</sup>、高级氧化工艺<sup>[29]</sup>、动物分解<sup>[30]</sup>和微生物降解<sup>[31]</sup>等多种。其中,生物修复具有极大的优势,高效、成本低、环境友好。目前,已报道的 OPFRs 降解菌不多,且多为混合菌群<sup>[31-37]</sup>,单菌只有几种,玫瑰杆菌属 *Roseobacter*<sup>[38]</sup>、鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* 和鞘脂菌属 *Sphingobium*<sup>[39-40]</sup>以及短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis*<sup>[41]</sup>,表 1 列举了部分已报道的混合菌群以及纯菌,包括来源、可降解底物以及降解能力。表 1 列举的 7 篇混合菌群降解 OPFRs 的报道中,只有 3 篇提到了具体的降解率,其中

表 1 已报道的有机磷阻燃剂降解微生物

Table 1 Reported OPFRs-degrading microorganisms

Year	Source & microorganisms	Substrates & degradation efficiency	Reference
1975	A mixed bacterial population isolated from mud sample of Shell Lake, Canada	TCrP, TPhP, trixylenyl phosphate (TXP)	[31]
1979	Naturally occurring mixed-microbial populations present in activated sludge and river water	TPhP, TCrP, TXP, TEHP, cresyl diphenyl phosphate (CDP), tert-butylphenyl diphenyl phosphate (t-BPDP), isodecyl diphenyl phosphate (IDDP), 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDP)	[32]
1984	Mixed sediment microflora collected from Missouri, US	Isopropylphenyl diphenyl phosphate (IPDP)	[33]
1986	Microcosms containing sediment and water from five different ecosystems in US	Over 37% of t-BPDP (5–55mg/L) was mineralized after 8 weeks	[34]
2002	Leachate from a sea-based solid waste disposal site, Osaka North Port, Japan	Aryl-phosphates (TCrP, TPhP), alkyl-phosphates (TnBP), chloro-alkylphosphates (TCEP, TDCPP)	[35]
2008	Mixed bacterial cultures 67E and 45D enriched from soil and sediment samples, Niigata, Japan	Completely degraded 20 µmol/L TCEP and TDCPP within 6 h	[36]
2014	Activated sludge from either the Amsterdam West or the Amstelveen sewage treatment plants, US	Aromatic organophosphorus flame retardants TPhP (20 mg/L, 99.0%±24.3% within 28 h), resorcinol bis diphenyl phosphate (PBDPP or RDP) and bisphenol-A bis diphenyl phosphate (BPABDPP or BDP)	[37]
2004	<i>Roseobacter</i> YS-57, isolated from the leachate of a seabased waste disposal site, Osaka North Port, Japan	TCrP, TPhP (0.5 mg/L, over 99% within 3 days)	[38]
2010	<i>Sphingomonas</i> sp. TCM1 and <i>Sphingobium</i> sp. TDK1, isolated from soil and sediment samples, Niigata, Japan	TCEP and TDCPP (20 µmol/L, 100%, as the sole phosphorus source within 6 h)	[39]
2018	<i>Brevibacillus brevis</i> , isolated from an e-waste dismantling area in Guiyu, Guangdong Province, China	TPhP (the highest degradation efficiency of 3 µmol/L TPhP by <i>B. brevis</i> reached 92.1% at pH 7 and 30 °C)	[41]
2019	<i>Sphingomonas</i> sp., isolated from the tailing sand of Hechi City, Guangxi Province, China	TnBP could be utilized as the sole carbon source (375 µmol/L, over 90%, 63 h)	[40]

最高的为分离自美国污水处理厂的活性淤泥, 28 h 内能够将 20 mg/L 的 TPhP 降解 99.0%±24.3%<sup>[37]</sup>; 表 1 列举了已报道的全部 5 株 OPFRs 降解菌, 其中活性最高的是一株 *Sphingomonas* sp., 能够在 63 h 内降解超过 90% 的 TnBP (100 mg/L), 并且是已报道的唯一一株能够利用 OPFRs 作为唯一碳源生长的菌株<sup>[40]</sup>; 分离自日本的 *Sphingomonas* sp. TCM1 和 *Sphingobium* sp. TDK1 能够降解 TDCPP 和 TCEP, 作为唯一磷源, 培养 6 h 能够 100% 降解 TCEP (5.7 mg/L) 和 TDCPP (8.6 mg/L)<sup>[39]</sup>。目前已报道的 OPFRs 降解微生物不仅活性较低, 亦缺乏对其降解能力的综合评估, 尤其是对环境变化的耐受能力。

因此, 本研究的主要目的是富集能够高效降解 OPFRs 的微生物, 并关注可能影响降解效率的环境因子。从北京某垃圾场渗滤液中富集到一个混合菌群 YC-BJ1, 能够高效降解 OPFRs, 并对它的降解特性、底物谱以及物种组成进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品和试剂

所有化学品均购自商业来源。表 2 列出了本研究中涉及的 OPFRs。标准品 TnBP (99.25%)、TBEP (93.0%)、TEHP (98.74%)、TCEP (98.73%)、TDCPP (95.44%)、TCPP (99.65%)、TCrP (98.6%) 和 TPhP (98%) 购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司 (德国, 奥

格斯堡), 溶于甲醇或者乙腈 (色谱纯), 配制成浓度为  $2 \times 10^4$  mg/L 的母液。

#### 1.1.2 培养基

富集用培养基 TEM 配方: 1.0 L 无菌水中添加 2.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、1.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.01 g CaCl<sub>2</sub> 和 100 μL TES 储存液。TES 储存液包含 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5 g/L)、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2.2 g/L)、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.3 g/L)、MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (14.3 g/L)、CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.2 g/L)、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.2 g/L) 和 Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (2.3 g/L)。用 NaOH 或者 HCl (2 mol/L) 调节培养基 pH 为 7.2±0.2, 或者其他需要的 pH。所有培养基在 121 °C 下高压灭菌 20 min。降解实验中, 在 TEM 培养基中添加 OPFRs 作为唯一碳源。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞生长检测

使用紫外-可见分光光度计 (美国, 马萨诸塞州, 赛默科技) 检测 600 nm 下的光密度 (*OD*<sub>600</sub>), 以此衡量细胞生长。

#### 1.2.2 高效液相色谱

使用高效液相色谱仪 (美国, 加州, 安捷伦) 检测 TPhP 浓度, 具体配置如下: C<sub>18</sub> 柱 (Agilent Eclipse XDB, 5 μm, 4.6 mm×150 mm), 二极管阵列检测器, 205 nm, 进样量 10 μL, 流动相 (乙腈和水 9:1), 流速 1 mL/min, 柱温 25 °C。因为 TPhP 的溶解度极低, 所以在水相中加入等体积的乙腈, 混匀, 0.22 μm 膜 (上海, 安谱) 过滤后使用液相检测。

表 2 本研究中涉及的有机磷阻燃剂

Table 2 OPFRs involved in this paper

Type	IUPAC name	Abbreviation	CAS
Alkyl-phosphates	Tri-n-butyl phosphate	TnBP	126-73-8
	Tris(2-ethylhexyl) phosphate	TEHP	78-42-2
	Tris(2-butoxyethyl) phosphate	TBEP	78-51-3
Chloro-alkyl-phosphates	Tris(2-chloroethyl) phosphate	TCEP	115-96-8
	Tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate	TDCPP	13674-87-8
	Tris(1-chloro-2-propyl) phosphate	TCPP	13674-84-5
Aryl-phosphates	Tricresyl phosphate	TCrP	1330-78-5
	Triphenyl phosphate	TPhP	115-86-6

### 1.2.3 气相色谱

表 2 列举的其余 OPFRs 则使用气相色谱仪检测, 日本岛津 GC-2010 系统, 配置如下, HP-5 毛细管柱 (内径 0.25 mm, 长度 30 m, 膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ), 火焰离子检测器 (300  $^{\circ}\text{C}$ ), 进样量 5  $\mu\text{L}$ , 载体  $\text{N}_2$ , 流速 1.51 mL/min, 柱温以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速度从 160  $^{\circ}\text{C}$  逐渐增加到 280  $^{\circ}\text{C}$ , 并在 280  $^{\circ}\text{C}$  保持 4 min, 检测器的载气为  $\text{H}_2$  (40 mL/min) 和空气 (400 mL/min)。水相中的 OPFRs 首先需要用等体积正己烷萃取到有机相, 然后使用气相检测。

### 1.2.4 OPFRs 降解菌的富集

从北京某垃圾处理厂采集渗透液, 4  $^{\circ}\text{C}$  储存。在 100 mL 的锥形瓶中, 加入 30 mL 的 TEM 培养基, 添加 20 mg/L 的 TPhP 和 5 mL 水样, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d, 取 1 mL 该培养液, 转接到新鲜的 TEM 培养基中并添加 40 mg/L 的 TPhP, 相同条件下继续培养 7 d。如此重复 5 次, 至 TPhP 的浓度增加至 100 mg/L。为尽可能减少母液中溶剂的干扰, 富集过程中交替使用溶于甲醇和乙腈的母液。经过 35 d 的富集和驯化, 得到了一瓶培养液, 根据它的来源命名 YC-BJ1, 储存在 4  $^{\circ}\text{C}$  以备使用。在后续的降解实验中, 该富集培养液作为种子液, 接种比例为 1%。

将富集培养液 1% 接种到含有 100 mg/L OPFRs 的 10 mL TEM 培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 4 d。每个处理组设 3 个重复, 对照不接种, 并根据 1.2.2 和 1.2.3 描述的方法检测底物浓度。因为色谱信号与 OPFRs 的浓度具有线性关系 (数据未列出), 所以 OPFRs 的降解率根据对照和实验组之间的色谱信号比率计算。

### 1.2.5 TPhP 降解酶的细胞定位

检测上清液和细胞提取液的降解能力。取 1 mL 培养 5 d 的富集培养液, 12 000 r/min 离心 5 min, 使用 0.22  $\mu\text{m}$  的膜过滤上清并于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 菌体重悬浮在 1 mL 新鲜的 TEM 培养基中, 超声破碎

细胞至液体澄清, 12 000 r/min 离心 5 min, 此上清即为细胞提取液。在上清和细胞提取液中加入 20 mg/L TPhP, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 12 h, 对照为添加等量底物的新鲜 TEM 培养基。每组设 3 个重复。按 1.2.2 所述方法检测底物浓度。

### 1.2.6 环境因子对 TPhP 降解的影响

为评估环境耐受性, 检测不同环境因子对 TPhP (100 mg/L) 的降解影响, 包括温度 (15  $^{\circ}\text{C}$ 、20  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、35  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ )、pH (4、5、6、7、8、9、10、11、12) 和盐度 (0%、2%、4%、6%、8% g/mL NaCl 添加)。培养 4 d, 每组设 3 个重复。按 1.2.2 所述方法检测底物浓度。

### 1.2.7 高通量测序分析富集培养液菌落结构

使用 TaKaRa 总基因组提取试剂盒 (中国, 大连, 宝日医生物技术) 提取混合菌群总 DNA, 共 3 个重复, 分开测序。扩增 16S rRNA 基因的可变保守区域 (V3+V4), 构建双端小片段文库, 通过 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台测序。通过拼接 (UCHIME v4.2)、过滤 (Trimmomatic v0.33) 和嵌合体去除 (UCHIME v4.2), 从原始下机双端序列中获得最终的有效序列。使用 QIIME<sup>[42]</sup> (version 1.8.0) 中的 UCLUST 聚类有效序列, 以 97% 的相似性获得运算分类单位 (Operational taxonomic units, OTUs)。基于 Silva (细菌分类数据库) 对 OTUs 进行分类和注释。使用 Mothur (version v.1.30) 软件进行 alpha 多样性分析。

## 1.3 核酸序列编号

将混合菌群 YC-BJ1 的 16S rRNA 基因多样性分析数据上传到 NCBI 数据库, 序列号为 SRS4436212。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌群富集及其对 TPhP 的降解

本研究从北京某垃圾处理厂渗透液中富集到一个混合菌群, 根据环境样品来源命名为 YC-BJ1。降解研究发现, 混合菌群 YC-BJ1 能够高效降解

TPhP (100 mg/L), 培养 4 d 的降解率高达 99.55%, 1 d 内就有超过一半的 TPhP 被降解 (图 1)。

能够降解 TPhP 的混合菌群已有报道。一个富集自加拿大的混合群落能够利用 TPhP 作为唯一碳源生长, 但没有提到具体的降解率<sup>[31]</sup>。一个自然形成的混合微生物群落能够在 7 d 内降解浓度高达 91 mg/L 的 TPhP, 降解率为 93%±11%<sup>[32]</sup>。有报道称活性淤泥能够在 28 h 内将 TPhP (20 mg/L) 完全矿化并释放 CO<sub>2</sub>, 降解率高于 60%<sup>[37]</sup>。与已报道的微生物群落相比, 本研究中的混合菌群 YC-BJ1 显然具有更高的 TPhP 降解活性, 只需要 4 d 就能够实现对 100 mg/L TPhP 的降解, 降解率高于 99%。

### 2.2 混合菌中的 TPhP 降解酶定位

HPLC 检测底物 TPhP 的减少, 以此比较上清和细胞提取液的酯酶活性。与细胞提取液相比, 上清对 TPhP 几乎没有降解 (表 3), 表明混合菌群 YC-BJ1 中的 TPhP 水解酶并没有释放到细胞外。以往的研究发现, TPhP 水解酶既有胞外酶, 又有胞内酶。*Roseobacter* sp. YS-57 中的 TPhP 水解酶为胞外酶<sup>[38]</sup>, 而富集自加拿大的 TPhP 降解菌群中的水解酶则为胞内酶<sup>[31]</sup>。除了简单的定位, 关于 TPhP 水解酶需要更深入的研究, 包括纯化、催化动力学分析以及机理研究。

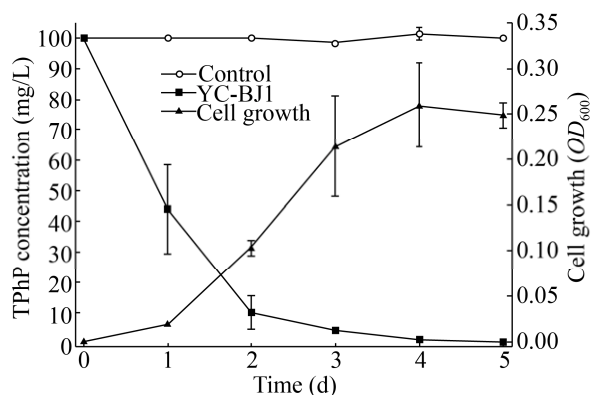


图 1 混合菌群 YC-BJ1 对 TPhP (100 mg/L) 的降解  
Fig. 1 Biodegradation curve of 100 mg/L TPhP by bacterial consortium YC-BJ1 and cell growth curve. Each data point represents the mean of three replicates.

表 3 混合菌群 YC-BJ1 中 TPhP 水解酶的定位

Table 3 Localization of TPhP hydrolases in the OPFRs-degrading consortium YC-BJ1

Hydrolases source	Degradation rate (%) <sup>a</sup>
Supernatant	0.27±0.28
Cell extract	97.22±2.62

a: each value represents average (n=3) ± STEDV.

### 2.3 环境因子对 TPhP 降解的影响

为了评估混合菌群 YC-BJ1 的环境适应性, 按前所述, 在不同的条件下进行了一系列的降解实验, 包括 pH (4、5、6、7、8、9、10、11、12)、温度 (15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C) 和盐度 (0%、2%、4%、6%、8% g/mL NaCl 添加)。结合菌株生长以及降解数据, 发现混合菌群 YC-BJ1 降解 TPhP 的最适条件为 pH 7、25 °C, 无盐添加。并且混合菌群 YC-BJ1 表现出了优越的环境适应性, 能够在较宽的环境范围内保持较高的 TPhP 降解活性, pH (5.0–12.0)、温度 (15–40 °C) 和盐度 (0%–4%) (图 2)。在上述环境范围内, 混合菌群 YC-BJ1 对 TPhP 的降解率均维持在 40% 以上, 表现出极强的环境耐受能力, 说明其具有广泛的应用潜能。

除了降解率的直接比较, 我们还对图 2 的降解数据作了两个维度的显著性分析: 1) 与未接种的对照作比较, 在 pH 4–12、温度 (15–40 °C) 和盐度 (0%–6%) 的广泛条件下, 培养 4 d 后, 混合菌群 YC-BJ1 对 TPhP 有显著降解 (One-way ANOVA,  $P \leq 0.05$ ); 2) 对同一环境因子下的数据进行组内对比, 发现该实验条件下, 在 pH 6–10 区间内 (图 2A, “c”标注), 15–30 °C 温度区间内 (图 2B, “a”标注), 0%–2% 的盐度范围内 (图 2C, “a”标注), 混合菌群 YC-BJ1 对 TPhP 的降解没有显著差异。显著性分析表明, 混合菌群 YC-BJ1 不仅能够在广泛的环境条件下降解 TPhP, 更能够保持较高的降解效率。

pH、温度以及盐度对微生物降解具有极强的影响力<sup>[43]</sup>, 但是目前还没有环境因子影响群落对 TPhP 降解的报道。最近发表的一篇文章分析了一个



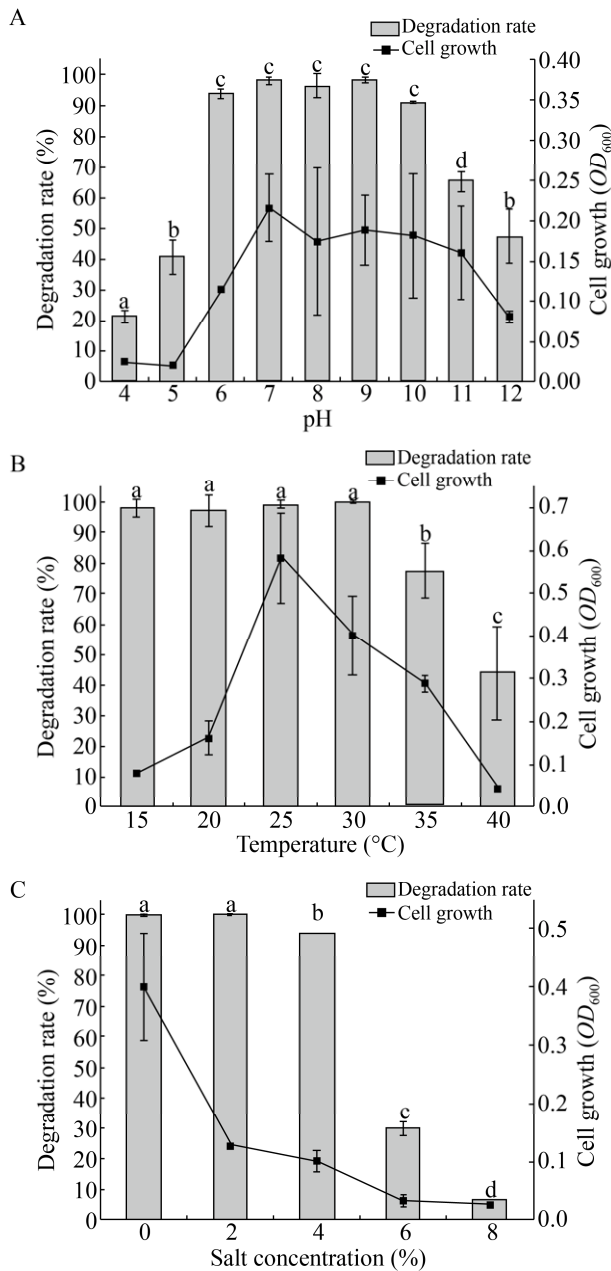


图2 环境因子对混合菌群 YC-BJ1 降解 TPhP 的影响  
Fig. 2 Effect of environmental factors on degradation of TPhP by bacterial consortium YC-BJ1. (A) Effect of pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). (B) Effect of temperature (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C). (C) Effect of salinity (0%, 2%, 4%, 6%, 8% g/mL NaCl addition). The initial concentration of TPhP is 100 mg/L. Each data point represents the mean of three replicates. The different letters represent significant differences at  $P \leq 0.05$  (One-way ANOVA).

富集自海水的混合菌群 SWO 的环境适应性, 该群落能够在 pH 4.0–9.0、温度 25–37 °C 和盐度 0%–10% 范围内降解多环芳烃<sup>[44]</sup>。与混合菌群 SWO 相比, 除了盐度, 混合菌群 YC-BJ1 对温度和 pH 都有更宽的耐受范围, 考虑到 SWO 富集自海水, 而 YC-BJ1 则富集自垃圾场渗滤液, 对盐度的适应能力弱于菌群 SWO。

#### 2.4 混合菌群 YC-BJ1 对 OPFRs 的降解

将混合菌群 YC-BJ1 接种到含有 100 mg/L 不同的 OPFRs 的 TEM 培养基中, 培养 4 d 后检测底物降解, 降解率结果见图 3。混合菌群 YC-BJ1 表现出明显的底物特异和偏好, 能够高效降解芳基磷酸酯, 对 TPhP 和 TCrP 的降解率均在 90% 以上, 对含氯磷酸酯的降解效率较低, 对 TCEP 和 TDCPP 的降解率在 20% 左右, 除了 TEHP (10% 降解), 几乎不能降解任何的烷基磷酸酯。在本研究的实验条件下, 未检测到混合菌群 YC-BJ1 对 TnBP、TBEP 和 TCP 的显著降解。因为该菌群是在单一底物 TPhP 的胁迫下富集的, 所以对芳基磷酸酯表现出了较明显的底物偏好。

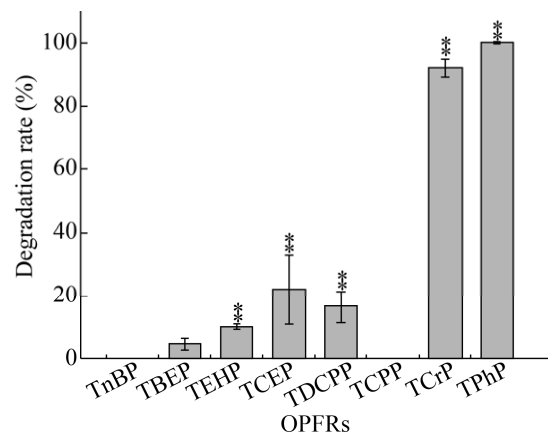


图3 混合菌群 YC-BJ1 对不同有机磷阻燃剂的降解  
Fig. 3 OPFRs degradation by the consortium YC-BJ1 within 4 days. The initial concentration of each OPFRs is 100 mg/L. Each data point represents the mean of three replicates. Double asterisks (\*\*) indicate a statistical significance of  $P \leq 0.01$  (One-way ANOVA) compared with the uninoculated control.

### 2.5 混菌群落结构分析

通过 16S rRNA 基因 V3+V4 区域高通量测序分析混和菌群 YC-BJ1 的群落结构,  $\alpha$  多样性指数见表 4。所有样品的 OTUs 覆盖率都在 0.999 9 以上, 结合稀释曲线 (图 4A), 说明测序结果能够真实地反映样品的群落结构。在菌属水平上, 混合菌群 YC-BJ1 由生丝微菌属 *Hyphomicrobium* (38.80%)、金黄杆菌属 *Chryseobacterium* (17.57%) 和鞘氨醇盒菌属 *Sphingopyxis* (17.46%) 主导 (图 4B)。其余含量较多 (>4%) 的菌属有产碱杆菌属 *Alcaligenes*、*Sphingomonas*、丛毛单胞菌属 *Comamonas* 以及无色杆菌属 *Achromobacter*。

目前已报道的 OPFRs 降解纯菌不多。在有葡萄糖作为补充碳源时, 菌株 *Roseobacter* sp. YS-57 能够在 3 d 内将 0.5 mg/L 的 TCrP 和 TPhP 降解 99%

以上<sup>[38]</sup>。*Sphingomonas* sp. TDK1 和 *Sphingobium* sp. TCM1 能够利用 TPhP、TCrP、TCEP 和 TDCPP 作为唯一磷源生长, 培养 6 h 可以将 20  $\mu$ mol/L 的 TCEP 和 TDCPP 完全降解, 遗憾的是, 文章中没有提供对 TCrP 和 TPhP 的降解率数据<sup>[39]</sup>。一株 *Brevibacillus brevis* 能够降解 3  $\mu$ mol/L 的 TPhP, 降解率为 92.1%<sup>[41]</sup>。一株分离自广西省的 *Sphingomonas* sp. 能够利用 TnBP 作为唯一碳源生长, 培养 63 h 对 100 mg/L 底物的降解率能够达到 90%, 同时也是目前已报道的唯一一株能够将 OPFRs 作为唯一碳源的菌<sup>[40]</sup>。因此, 混合菌群 YC-BJ1 中包含未见报道的 OPFRs 降解菌, 这也是我们下一步的研究计划, 希望能够从中分离到新的 OPFRs 的高效降解菌, 进行单菌或者多菌协同降解试验。

表 4 混合菌群 YC-BJ1 的物种多样性

Table 4 Bacterial diversity of the OPFRs-degrading consortium YC-BJ1

Samples	Number of sequences	Observed OTUs	Chao1	ACE	Simpson	Shannon	Coverage
YC-BJ1_01	57 257	41	42.50	43.327 2	0.154 2	2.202 2	0.999 9
YC-BJ1_02	56 818	40	40.00	40.399 3	0.152 8	2.212 8	1
YC-BJ1_03	57 214	40	40.33	41.104 3	0.151 9	2.228 6	1

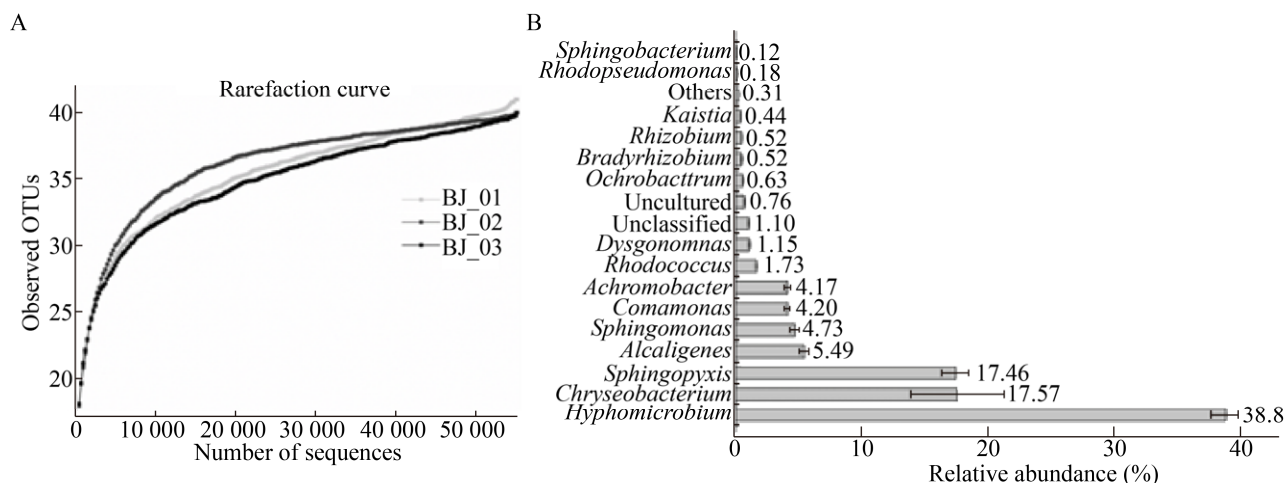


图 4 混合菌群 YC-BJ1 的物种多样性及其组成

Fig. 4 Diversity and composition of the bacterial consortium YC-BJ1. (A) Rarefaction curve of observed OTUs ( $\geq 97\%$  sequence identity) over the number of sequences. (B) Relative abundance of genus. The Y-axis represents the genera over 1% relative abundance, with other genera classified as “Others” and the unclassified genera referred to as “Unclassified”. The uncultured bacterium clone JG30-KF-CM45 was simplified as “Uncultured”.



### 3 结论

从北京垃圾场渗滤液中富集到一个混合菌群 YC-BJ1, 能够高效降解芳基有机磷阻燃剂, 可以耐受广泛的环境变化 (15–40 °C, pH 5.0–12.0, 0%–4% 盐度), 在 OPFRs 降解机理的揭示和其污染环境生物修复中具有巨大的潜能。本研究只使用 HPLC 和 GC 检测了底物的减少, 未来的研究需要借助质谱检测降解中间产物并推测可能的降解通路, 从混合菌群中分离纯化 OPFRs 高效降解菌也是下一步的研究重点。

### REFERENCES

- [1] International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria 218. Flame retardants: tris(2-butoxyethyl) phosphate, tris(2-ethylhexyl) phosphate and tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium salts. Geneva: World Health Organization, 2000.
- [2] International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria 209. Flame retardants: tris(chloropropyl) phosphate and tris(2-chloroethyl) phosphate. Geneva: World Health Organization, 1998.
- [3] International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria 192. flame retardants: a general introduction. Geneva: World Health Organization, 1997.
- [4] Wei GL, Li DQ, Zhuo MN, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: sources, occurrence, toxicity and human exposure. *Environ Pollut*, 2015, 196: 29–46.
- [5] Li TY, Bao LJ, Wu CC, et al. Organophosphate flame retardants emitted from thermal treatment and open burning of e-waste. *J Hazard Mater*, 2019, 367: 390–396.
- [6] van der Veen I, de Boer J. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*, 2012, 88(10): 1119–1153.
- [7] Chen MQ, Jiang JY, Gan ZW, et al. Grain size distribution and exposure evaluation of organophosphorus and brominated flame retardants in indoor and outdoor dust and PM10 from Chengdu, China. *J Hazard Mater*, 2019, 365: 280–288.
- [8] He CT, Zheng J, Qiao L, et al. Occurrence of organophosphorus flame retardants in indoor dust in multiple microenvironments of southern China and implications for human exposure. *Chemosphere*, 2015, 133: 47–52.
- [9] Lee S, Jeong W, Kannan K, et al. Occurrence and exposure assessment of organophosphate flame retardants (OPFRs) through the consumption of drinking water in Korea. *Water Res*, 2016, 103: 182–188.
- [10] Shi YL, Gao LH, Li WH, et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of organophosphate flame retardants and plasticizers in urban surface water in Beijing, China. *Environ Pollut*, 2016, 209: 1–10.
- [11] Wang RM, Tang JH, Xie ZY, et al. Occurrence and spatial distribution of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in 40 rivers draining into the Bohai Sea, North China. *Environ Pollut*, 2015, 198: 172–178.
- [12] Wolschke H, Sühling R, Xie ZY, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in the aquatic environment: a case study of the Elbe River, Germany. *Environ Pollut*, 2015, 206: 488–493.
- [13] Zhong MY, Tang JH, Mi LJ, et al. Occurrence and spatial distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in the Bohai and Yellow Seas, China. *Mar Pollut Bull*, 2017, 121(1/2): 331–338.
- [14] Faiz Y, Siddique N, He H, et al. Occurrence and profile of organophosphorus compounds in fine and coarse particulate matter from two urban areas of China and Pakistan. *Environ Pollut*, 2018, 233: 26–34.
- [15] Salamova A, Ma YN, Venier M, et al. High levels of organophosphate flame retardants in the great lakes atmosphere. *Environ Sci Technol Lett*, 2014, 1(1): 8–14.
- [16] Wang Y, Wu XW, Zhang QN, et al. Organophosphate

- esters in sediment cores from coastal Laizhou Bay of the Bohai Sea, China. *Sci Total Environ*, 2017, 607–608: 103–108.
- [17] Yadav IC, Devi NL, Li J, et al. Concentration and spatial distribution of organophosphate esters in the soil-sediment profile of Kathmandu Valley, Nepal: implication for risk assessment. *Sci Total Environ*, 2018, 613–614: 502–512.
- [18] Papachlimitzou A, Barber JL, Losada S, et al. Organophosphorus flame retardants (PFRs) and plasticisers in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded or bycaught in the UK during 2012. *Mar Pollut Bull*, 2015, 98(1/2): 328–334.
- [19] Li J, Xie ZY, Mi WY, et al. Organophosphate esters in air, snow, and seawater in the North Atlantic and the Arctic. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(12): 6887–6896.
- [20] Möller A, Sturm R, Xie ZY, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in airborne particles over the Northern Pacific and Indian Ocean toward the polar regions: evidence for global occurrence. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(6): 3127–3134.
- [21] Sun LW, Xu WB, Peng T, et al. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol*, 2016, 55: 16–22.
- [22] Liu XS, Ji K, Choi K. Endocrine disruption potentials of organophosphate flame retardants and related mechanisms in H295R and MVLN cell lines and in zebrafish. *Aquat Toxicol*, 2012, 114–115: 173–181.
- [23] McGee SP, Konstantinov A, Stapleton HM, et al. Aryl phosphate esters within a major pentaBDE replacement product induce cardiotoxicity in developing zebrafish embryos: potential role of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci*, 2013, 133(1): 144–156.
- [24] Isales GM, Hipszer RA, Raftery TD, et al. Triphenyl phosphate-induced developmental toxicity in zebrafish: potential role of the retinoic acid receptor. *Aquat Toxicol*, 2015, 161: 221–230.
- [25] Wang QW, Lam JCW, Han J, et al. Developmental exposure to the organophosphorus flame retardant tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate: estrogenic activity, endocrine disruption and reproductive effects on zebrafish. *Aquat Toxicol*, 2015, 160: 163–171.
- [26] Yuan SL, Li H, Dang Y, et al. Effects of triphenyl phosphate on growth, reproduction and transcription of genes of *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*, 2018, 195: 58–66.
- [27] Xiang P, Liu RY, Li C, et al. Effects of organophosphorus flame retardant TDCPP on normal human corneal epithelial cells: implications for human health. *Environ Pollut*, 2017, 230: 22–30.
- [28] Liu J, Ye JS, Chen YF, et al. UV-driven hydroxyl radical oxidation of tris(2-chloroethyl) phosphate: intermediate products and residual toxicity. *Chemosphere*, 2018, 190: 225–233.
- [29] Song QY, Feng YP, Liu GG, et al. Degradation of the flame retardant triphenyl phosphate by ferrous ion-activated hydrogen peroxide and persulfate: kinetics, pathways, and mechanisms. *Chem Eng J*, 2019, 361: 929–936.
- [30] Hou R, Huang C, Rao KF, et al. Characterized *in vitro* metabolism kinetics of alkyl organophosphate esters in fish liver and intestinal microsomes. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(5): 3202–3210.
- [31] Pickard MA, Whelihan JA, Westlake DWS. Utilization of triaryl phosphates by a mixed bacterial population. *Can J Microbiol*, 1975, 21(2): 140–145.
- [32] Saeger VW, Hicks O, Kaley RG, et al. Environmental fate of selected phosphate esters. *Environ Sci Technol*, 1979, 13(7): 840–844.
- [33] Heitkamp MA, Huckins JN, Petty JD, et al. Fate and metabolism of isopropylphenyl diphenyl phosphate in freshwater sediments. *Environ Sci Technol*, 1984, 18(6): 434–439.
- [34] Heitkamp MA, Freeman JP, Cerniglia CE. Biodegradation of *tert*-butylphenyl diphenyl phosphate. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 51(2): 316–322.
- [35] Kawagoshi Y, Nakamura S, Fukunaga I. Degradation of organophosphoric esters in leachate

- from a sea-based solid waste disposal site. *Chemosphere*, 2002, 48(2): 219–225.
- [36] Takahashi S, Kawashima K, Kawasaki M, et al. Enrichment and characterization of chlorinated organophosphate ester-degrading mixed bacterial cultures. *J Biosci Bioeng*, 2008, 106(1): 27–32.
- [37] Jurgens SS, Helmus R, Waaijers SL, et al. Mineralisation and primary biodegradation of aromatic organophosphorus flame retardants in activated sludge. *Chemosphere*, 2014, 111: 238–242.
- [38] Kawagoshi Y, Nakamura S, Nishio T, et al. Isolation of aryl-phosphate ester-degrading bacterium from leachate of a sea-based waste disposal site. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98(6): 464–469.
- [39] Takahashi S, Satake I, Konuma I, et al. Isolation and identification of persistent chlorinated organophosphorus flame retardant-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(15): 5292–5296.
- [40] Liu J, Lin H, Dong YB, et al. Elucidating the biodegradation mechanism of tributyl phosphate (TBP) by *Sphingomonas* sp. isolated from TBP-contaminated mine Tailings. *Environ Pollut*, 2019, 250: 284–291.
- [41] Wei K, Yin H, Peng H, et al. Bioremediation of triphenyl phosphate by *Brevibacillus brevis*: degradation characteristics and role of cytochrome P450 monooxygenase. *Sci Total Environ*, 2018, 627: 1389–1395.
- [42] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 2010, 7: 335–336.
- [43] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater*, 2009, 169(1/3): 1–15.
- [44] Muangchinda C, Rungsahiranrut A, Prombutara P, et al. 16S metagenomic analysis reveals adaptability of a mixed-PAH-degrading consortium isolated from crude oil-contaminated seawater to changing environmental conditions. *J Hazard Mater*, 2018, 357: 119–127.

(本文责编 陈宏宇)