



专论与综述

六氯-1,3-丁二烯的微生物降解研究进展

金慧娟^{1,2} 杨毅^{*1} 李秀颖¹ 宋玉芳¹ 严俊¹

1 中国科学院沈阳应用生态研究所污染生态与环境工程重点实验室 辽宁 沈阳 110016

2 中国科学院大学 北京 100049

摘要: 六氯-1,3-丁二烯(hexachlorobutadiene, HCBd)是一种有毒有害的脂肪族氯代烃,曾经作为杀虫剂、除草剂、变压器油和传热流体等化学工业产品的重要成分被广泛应用于生产生活。HCBd因满足《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》中风险筛选标准(如毒性、持久性、远距离环境迁移和生物累积性等),缔约方于2015年第七次会议中将其增列为持久性有机污染物,2017年又将其列入该公约的附件C以控制其环境排放量。目前关于HCBd的环境归趋仍是研究热点,但是对于HCBd的微生物降解转化机制尚缺乏深入研究。鉴于此,本文重点回顾并讨论了地下水、底泥等厌氧环境中已报道的HCBd微生物降解转化途径、速率及机制,并从热力学角度阐述HCBd及其降解产物作为电子受体通过还原性脱氯反应被厌氧脱卤微生物代谢转化的可行性。最后,本文根据现有研究结果,提出微生物厌氧降解HCBd的研究展望,包括多组学技术解析HCBd降解功能菌群结构和潜在互作机制、HCBd厌氧降解微生物的分离与纯化,以及HCBd厌氧降解菌剂的开发与污染场地原位生物修复应用等。

关键词: 六氯-1,3-丁二烯,持久性有机污染物,微生物降解,热动力学,原位生物修复

Progress in microbial degradation of hexachlorobutadiene

JIN Hui-Juan^{1,2} YANG Yi^{*1} LI Xiu-Ying¹ SONG Yu-Fang¹ YAN Jun¹

1 Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Hexachlorobutadiene (HCBd), which is a toxic and harmful aliphatic chlorinated hydrocarbon, had been widely used as an important ingredient in industrial chemicals (e.g., pesticides, herbicides, transformer oils, heat transfer fluids). In 2015, HCBd was added to the persistent organic pollutants (POPs) list based on the fact that it met the risk screening criteria (e.g., levels of toxicity, persistence, bioaccumulation, potential for long-range environmental transport). In 2017, HCBd was added in Annex C of the Stockholm Convention to reduce its unintentional production and emission. Environmental transport

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41673126, 41977295, 41907287); Key Research Program of Frontier Science of Chinese Academy of Sciences (ZDBS-LY-DQC038); Talent Research Foundation to Invigorate Liaoning of Liaoning Province (XLYC1807139)

***Corresponding author:** Tel: 86-24-83970426; E-mail: yangyi@iae.ac.cn

Received: 15-06-2020; **Accepted:** 30-08-2020; **Published online:** 09-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41673126, 41977295, 41907287); 中国科学院前沿科学重点研究计划(ZDBS-LY-DQC038); 辽宁省兴辽英才计划(XLYC1807139)

***通信作者:** Tel: 024-83970426; E-mail: yangyi@iae.ac.cn

收稿日期: 2020-06-15; **接受日期:** 2020-08-30; **网络首发日期:** 2020-09-09

and fate of HCBd remain a research focus, and a better understanding of the roles and mechanisms of microorganisms in HCBd degradation and transformation is required. Here, we review the microbial biodegradation pathways, rates, and mechanisms of HCBd biotransformation in anoxic environments (e.g., groundwater, sediments). The feasibility of anaerobic biotransformation of HCBd and its degradation products as electron acceptors by calculating the thermodynamic parameters are demonstrated. Finally, future research on the HCBd microbial degradation is discussed, including the use of multi-omics techniques to unravel microbial community structure and their syntrophic mechanisms; isolation of anaerobic microorganisms capable of HCBd reductive dechlorination; development of highly efficient degradation cultures that can be applied for *in-situ* bioremediation of HCBd contaminated sites.

Keywords: Hexachlorobutadiene, POPs, Microbial degradation, Thermodynamics, *In-situ* bioremediation

1 六氯-1,3-丁二烯的来源及污染

六氯-1,3-丁二烯(hexachlorobutadiene, HCBd) (图 1)具有较强的毒性和致癌性,作为杀虫剂、除草剂、变压器油和传热流体等化学工业产品的重要成分,曾广泛应用于生产生活中,导致其成为地下水中较常见的挥发性有机氯污染物之一^[1-3]。工业活动的非蓄意生产(例如,四氯乙烯、三氯乙烯和四氯化碳等有机氯化合物生产过程产生 HCBd)和废物处理过程中的排放及不当处置是 HCBd 污染的主要来源^[4-5]。美国环境保护局报告称,2014–2016 年间,美国的工业化学品生产过程中释放的 HCBd 副产品年产量高达 4 841–5 419 t^[6]。在中国,虽然 HCBd 并不是一个工业产品,但其作为副产品的年产量已经由 1992 年的 60.8 t 上升到 2016 年的 2 871.5 t,同时期的 HCBd 累积排放量达到 8 211.3 t^[7]。由于水溶性低(溶解度为 3.20 mg/L, 25 °C)、挥发性高[亨利常数为 2.57×10^{-2} (atm·m³)/mol, 20 °C]等特点^[8], HCBd 可以长距离在自然环境中迁移,而且具有生物积累和放大效应,经常在土壤^[9]、空气^[10]、沉积物^[11]、植物、水生生物^[12-13]等各种生物和非生物介质中检出。排放进入环境中的 HCBd 可通过摄入、呼吸或皮肤接触形式等被生物体吸收^[14-15]。近年来, HCBd 的生物毒性受到越来越多的关注。毒理学研究表明,多次或长期暴露在 HCBd 环境中可导致肝脏、肾脏中毒效应和中枢神经系统抑郁以及生殖细胞遗传基因突变

等,存在潜在的致癌毒性^[16-18]。为控制其生产和排放造成的不利影响,2004 年,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)规定饮用水源中 HCBd 最高含量为 0.6 µg/L^[19],2015 年 HCBd 被列入《斯德哥尔摩公约》持久性有机污染物(persistent organic pollutant, POPs) 名单 (<http://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/CO-P7/tabid/4251/mctl/ViewDetails/EventModID/870/EventID/543/xmid/13075/Default.aspx>),2017 年又被列入此公约中有关非蓄意排放的持久有机物附件 C 中 (<http://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/COP8/tabid/5309/Default.aspx>)。

2 HCBd 的微生物降解

HCBd 与其他典型持久性有机物(如多氯联苯)类似,因其化学稳定性高、可生物降解性低,在自然环境中具有长期残留性和生物累积性。据报道, HCBd 在水体、土壤和大气中的半衰期分别为 3、6、14 个月^[20-21]。HCBd 可吸收波长大于 290 nm 的太阳光,因此大气中的 HCBd 易于通过光化学等方法得到降解^[22-23]。但在水体、土壤及沉积物等环境中,传统的抽提处理或金属还原等物理化学方法和处理工艺难以有效去除 HCBd^[24]。

越来越多的研究表明,有机氯化合物自生命起源就存在于地球上,它们在全球碳和氯元素循环中起着重要作用^[25-27]。在碳氯元素循环耦合过程中,碳原子和氯原子间共价键的断裂导致氯离子的释放,而剩余的碳骨架部分可被许多微生

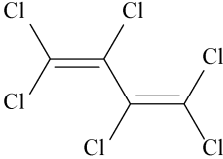
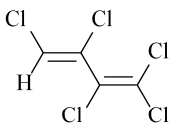
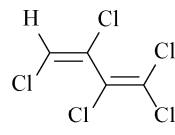
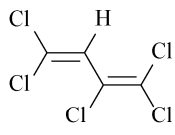
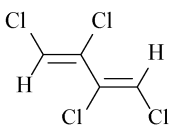
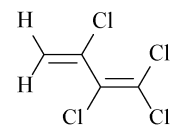
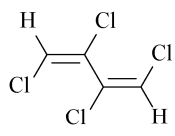
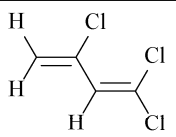
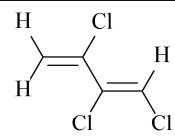
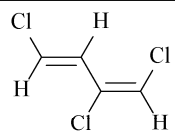
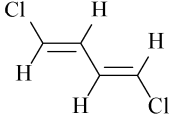
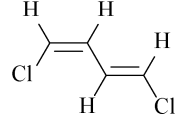
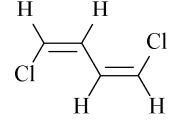
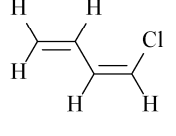
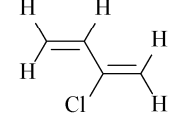
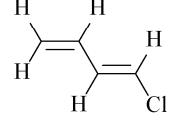
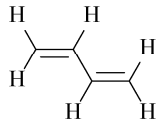
Hexachlorobutadiene (HCBD)	CAS: 87-68-3 		
Pentachlorobutadiene (PCBDs)	 (Z)-1,1,2,3,4-PCBD	 (E)-1,1,2,3,4-PCBD	 1,1,2,4,4-PCBD
Tetrachlorobutadiene (TeCBDs)	 (Z, Z)-1,2,3,4-TeCBD	 1,1,2,3-TeCBD	 (E, E)-1,2,3,4-TeCBD
Trichlorobutadiene (TCBDs)	 1,1,3-TCBD	 (Z)-1,2,3-TCBD	 (E, E)-1,2,4-TCBD
Dichlorobutadiene (DCBDs)	 (E, E)-1,4-DCBD	 (Z, E)-1,4-DCBD	 (Z, Z)-1,4-DCBD
Chloroprene (CBDs)	 (Z)-1-CBD	 2-CBD	 (E)-1-CBD
1,3-butadiene			

图 1 六氯-1,3-丁二烯及其部分可能脱氯产物的结构

Figure 1 Structures of HCBD and its some potential dechlorination daughter products

物继续代谢利用^[27]。在漫长的地质年代中,一些微生物进化出了一套有机氯化物的解毒机制,从而成为了耦合碳素与氯素循环的重要驱动者^[28-29]。微生物

利用或转化氯代有机物既是原始自然环境中有机氯转化的重要途径之一,也是氯代有机污染物控制与降解修复的有效技术方法之一^[30-34]。以氯代有机

物作为碳源或能源的微生物在好氧和厌氧环境中都有着广泛的分布,但在厌氧环境中目前仅有一小部分的脱氯微生物得到分离纯化^[28]。本文围绕 HCBd 的微生物降解机制,总结了近年来 HCBd 好氧和厌氧微生物降解的研究进展,重点阐述了不同途径下 HCBd 的微生物降解效率。同时从热力学角度探讨微生物厌氧还原脱氯降解 HCBd 及其产物的可行性。在此基础上,提出了 HCBd 厌氧还原脱氯降解机制的未来研究目标,以期 HCBd 污染场地修复提供科学基础与理论指导。

2.1 HCBd 的微生物好氧降解

由于 HCBd 具有较高的辛醇-水分配系数及高氧化价态的碳元素,其在好氧条件下的微生物降解一直被认为是较为困难或者无法发生^[35]。直到 2008 年, Li 等^[36]从吉林省石油化工废水处理厂的 HCBd 污染土壤和活性污泥混合物中分离出一株能好氧降解 HCBd 的兼性厌氧细菌,并将其命名为 *Serratia marcescens* 菌株 HL1; 菌株 HL1 以 HCBd 为唯一碳源,在 25 °C、pH 7.0 的最佳培养条件下,4 d 内可将高达 20 mg/L 的 HCBd 全部降解;同时,菌株 HL1 也能以 HCBd 结构类似物(如单氯丁二烯、四氯乙烯、三氯乙烯等)为底物进行生长^[36]。另有研究表明, *S. marcescens* 种属下的某些菌株也能对其他持久性氯代有机物进行脱氯,如菌株 DT-1P 能对滴滴涕(dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT)进行好氧降解^[37],以及 *S. marcescens* 与芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)共培养的菌群具有降解五氯苯酚(pentachlorophenol, PCP)的活性^[38]。

为调查 HCBd 降解菌 *S. marcescens* HL1 与其他还原脱氯细菌之间的进化关系,本文选取菌株 HL1 同一分类属的细菌和其他典型的好氧/厌氧脱氯细菌构建了系统发育树(图 2)。所选 12 个属细菌来自于包含脱氯微生物的三大分支门,即:厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*)。其中, *S. marcescens* 与 *Sulfurospirillum*、*Shewanella sediminis*、*Geobacter lovleyi*、*Desulfuromonas chloroethenica* 以及

Anaeromyxobacter dehalogenans 这 5 个属的细菌同属于 *Proteobacteria*。*Proteobacteria* 中已知的大部分脱氯细菌能够将四氯乙烯降解为二氯乙烯^[39]。截至目前,菌株 HL1 是唯一一株被分离纯化、能降解 HCBd 的兼性厌氧微生物。然而,该微生物缺乏后续研究,例如该微生物降解 HCBd 的生理、生化及分子机制尚未被揭示;此外,菌株 HL1 也无实际污染场地修复应用,关于其在污染环境中的降解活性及 HCBd 污染场地修复效果有待进一步的研究。

2.2 HCBd 的厌氧降解研究

HCBd 结构中高负电性卤素取代基和高氧化价态碳原子使得该化合物在有氧环境中相对稳定^[40]。Callahan 等早在 1979 年就观察到,在自然有氧条件下 HCBd 的生物有氧降解难以发生,而且在土壤和沉积物表层中积累趋势较强^[41]。在土壤、沉积物、地下水等微氧或无氧环境中,随着有机物氯化程度的增加,还原脱氯反应比氧化脱氯反应更有可能发生^[42]。热力学计算表明多氯代化合物可以作为微生物能量代谢的良好电子受体,目前已有的一些关于多氯化物(如多氯联苯、氯代烷烃、氯代烯烃、酚类等)微生物还原脱氯机制的报道^[27-28],却鲜有微生物参与 HCBd 厌氧还原脱氯的报道^[20]。HCBd 的高疏水性导致的生物可利用性低及生物毒性高,是富集、分离和表征 HCBd 厌氧脱氯细菌充满挑战的重要原因之一。

2.2.1 HCBd 在厌氧生物反应器中的降解研究

Bosma 等^[43]首次发现在不同氧化还原条件下,莱茵河沉积物填充柱中 HCBd 发生了生物降解转化,并证实在厌氧条件下微生物能够对 HCBd 进行还原脱氯;其中,在产甲烷条件下,加入 4 nmol/L 的 HCBd (约 1 mg/L,以溶于甲醇的母液形式添加)驯化 4 个月后可以观察到体系的 HCBd 浓度明显降低,拟一级速率常数为 0.36 h⁻¹;降解产物的氯同位素气相质谱(GC-MS)鉴定结果表明,体系中生成了五氯、四氯、三氯丁二烯等降解产物,而且 HCBd 被完全转化为四氯丁二烯(TeCBDs)和三氯丁二烯(TCBDs) (图 1);通过 NMR 对产物的

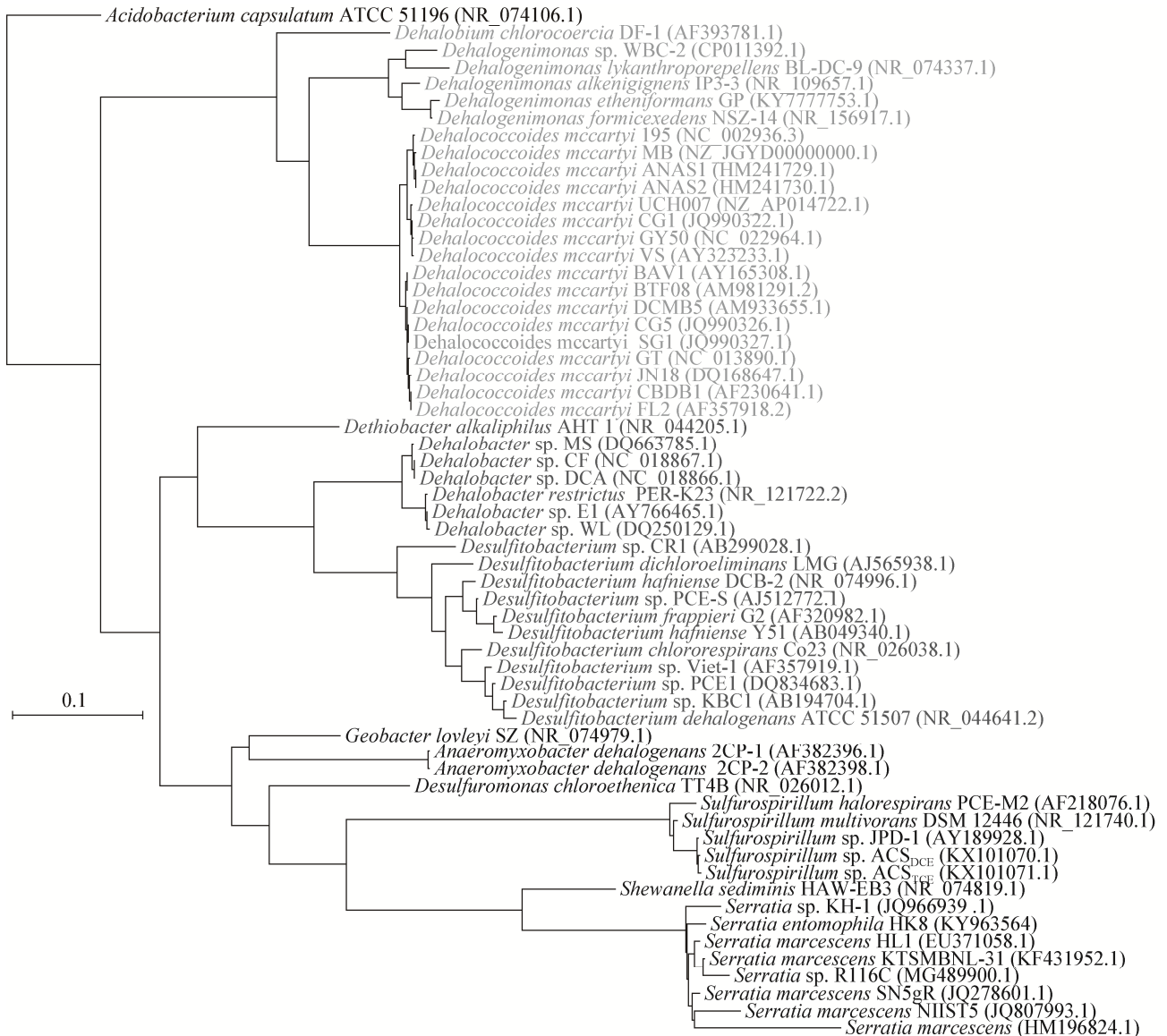


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的 HCBd 降解微生物与已报道的厌氧脱氯微生物之间的进化关系

Figure 2 16S rRNA gene phylogeny of HCBd-degrading bacteria and anaerobic dechlorinating bacteria

注: 浅灰、深灰和黑色分别代表了绿弯菌门, 厚壁菌门和变形菌门; 括号中序号: 菌株登录号; 标尺刻度 0.1: 序列差异的分支长度。
 Note: The light gray, dark gray and black colors represent *Chloroflexi*, *Firmicutes* and *Proteobacterium* phyla, respectively; Numbers in parentheses: The sequence accession number; Bar length=0.1: Nucleotide divergence between sequences.

结构分析, 最终确定四氯丁二烯为(*E,E*)-1,2,3,4-四氯-1,3-丁二烯[(*E,E*)-1,2,3,4-TeCBD], 降解过程的中间产物(五氯丁二烯)是(*E*)-1,1,2,3,4-五氯-1,3-丁二烯[(*E*)-1,1,2,3,4-PCBD]; 该研究初步证实了 HCBd 的脱氯是由厌氧微生物介导的类似于四氯乙烯还原脱氯的氢解脱氯机制, 即 HCBd 上的氯原子逐一被氢取代(图 3)。但是该研究并没有厘清 HCBd

厌氧降解微生物的群落结构和功能, 也没能分离纯化出潜在的 HCBd 厌氧降解菌株。

共存污染物的微生物降解是目前关注的热点问题之一。包括 HCBd 在内的多数有机氯化物密度比水大, 溶解度低, 容易渗透到蓄水层而形成重质非水相液体(dense non-aqueous phase liquids, DNAPL), 从而成为土壤和地下水环境中具有持久

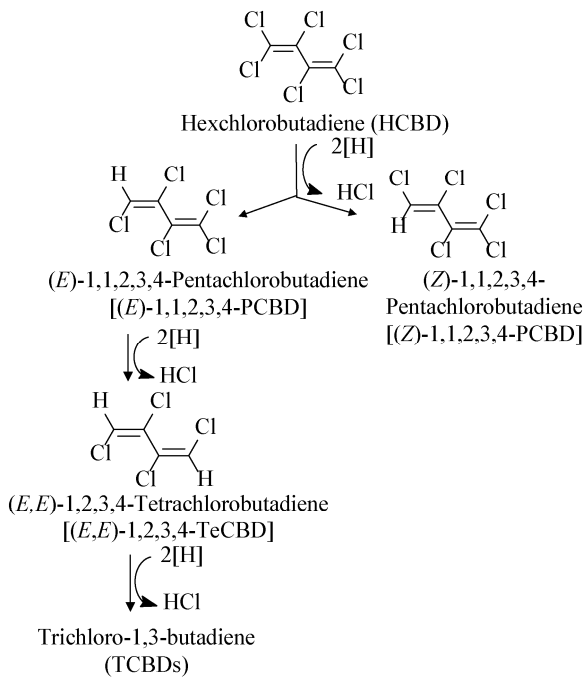


图3 HCBd降解途径示意图^[43]

Figure 3 Simplified schematic diagram of HCBd biodegradation pathways^[43]

性、危害性的复合有机氯污染源^[44]。HCBd 作为组成土壤和地下水环境中 DNAPL 的重要污染物成分之一(占总物质组成的 4.15%)^[45], 能否与其他有机污染物共代谢是修复地下水污染的关键。Boucquey 等^[46]模拟了 HCBd 和其他氯代脂肪烃复合污染的自然环境, 通过将吸附剂载体、微生物生态和营养供给系统相结合, 设计出一种新型的固定膜固定床生物反应器; 该研究向生物反应器中引入了产甲烷菌群, 利用厌氧微生物复合菌群对包含 HCBd 在内的三十多种混合氯代脂肪族污染物进行微生物厌氧降解; 该实验发现稳定驯化后, HCBd 可被全部降解且平均降解速率为 8 mg/(d·kg), 而四氯化碳、三氯乙烯等其他氯代烃污染物降解速率为 15–120 mg/(d·kg)。

Bosma 和 Boucquey 的研究工作不仅证实了 HCBd 厌氧还原脱氯降解的可能性, 而且为发展 HCBd 污染场地高效修复技术提供了理论基础。此外, 他们的研究结果都表明产甲烷过程可能有利于 HCBd 的微生物转化, 而这与氯乙烯和氯乙烷

厌氧还原脱氯降解速率在产甲烷体系中会加快的结果相似^[47-48]。但产甲烷菌是直接参与 HCBd 的厌氧降解, 还是向 HCBd 降解微生物提供关键营养物质促进脱氯(碳源、电子供体或脱卤酶辅因子——钴胺素等), 以及 HCBd 的降解产物、降解路径以及降解中间产物的生态毒理学效应等问题需要继续深入研究探讨。这些问题的答案将对预测 HCBd 在不同环境中的归趋行为提供重要依据。

2.2.2 HCBd 厌氧菌群的富集培养

Booker 等在 2000 年采集了美国加尔塞约河受 HCBd 和氯化苯污染的河口沉积物, 以污染沉积物为初始接种源成功富集到了具有 HCBd 降解活性的无底泥基质的稳定厌氧菌群; 通过 GC-MS 监测发现 HCBd 可被转化为 15 种降解产物: 1 种五氯丁二烯、2 种四氯丁二烯、6 种三氯丁二烯和 6 种二氯丁二烯, 而且最终的降解产物主要为三氯-1,3-丁二烯、二氯-1,3-丁二烯和少量单氯丁二烯; 根据初始添加的 0.4 mg/L 的 HCBd 和 1.5 mg/L 的 HCBd, 体系还原降解速率分别约为 125 μg/(d·L) 和 371 μg/(d·L)^[49]。这是 Bosma 等的填充柱实验和 Boucquey 等的生物反应器实验没有达到的脱氯程度(即 HCBd 上氯原子移除的个数)^[43,46]。

Booker 等的研究不仅实现了 HCBd 持续、稳定的微生物厌氧还原脱氯降解, 也拓展人们对产甲烷菌群影响 HCBd 脱氯程度的认识, 进一步丰富并解释了 HCBd 的微生物厌氧脱氯降解途径机制。通过向 HCBd 的脱氯体系添加产甲烷抑制剂(2-溴甲苯磺酸盐), 此研究测试了 HCBd 降解与产甲烷及丙酮酸发酵之间的联系, 发现丙酮酸发酵和产甲烷代谢被抑制后, HCBd 的还原脱氯速率和脱氯程度并没有受到影响; 说明在该富集体系中, 产甲烷菌或丙酮酸发酵菌并不催化 HCBd 的降解; 脱氯微生物可能在短时间内利用了来自微生物死亡或衰变的内源性电子供体(endogenous electron donors), 以利于维持原来的脱氯速率^[49]。此项研究不仅排除了产甲烷菌对 HCBd 的直接脱氯降解, 也间接指出先前研究中产甲烷或丙酮酸

发酵促进 HCBd 还原脱氯的原因可能是活跃的初级代谢环境为相关脱氯微生物提供了必需的还原当量(电子供体)。与其他的氯代脂肪烃相比, HCBd 的生物脱氯效率仍很低, 进一步测试 HCBd 潜在抑制因子并表征 HCBd 富集培养菌群, 可能对优化 HCBd 污染的土壤、沉积物及地下水生物修复方案提供至关重要的科学依据。

2.3 微生物介导的非生物降解 HCBd

电子穿梭体也称氧化还原介体 (redox mediator, RM), 是能充当电子载体参与可逆氧化还原反应的一类活性物质^[50-51]。电子穿梭体参与胞外电子传递的机制为理解有机物厌氧降解这一关键生物地球化学过程提供了全新的科学视角, 其生态学和环境学意义在近几年受到广泛关注。钴胺素(如维生素 B₁₂)作为良好的氧化还原活性物质(其中心金属配位体 Co^(II/I)在 pH 7.0 时的氧化还原电位是 -490 mV)^[52], 不仅可作为许多关键脱卤酶的外源性辅酶因子^[53-55], 也被证明可以提高伍氏醋酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)对四氯化碳的降解速率^[56]。

James 等^[57]通过向厌氧活性污泥中加入适量的氰钴胺(0.4 mmol/L)作为氧化还原活性物质, 并提供乙酸或乳酸作为电子供体, 首次实现六氯丁二烯的完全脱氯降解, 形成 3 种脱氯终产物, 即: 1-丁烯-3-丁炔、1,3-丁二烯和 1,3-丁二炔, 以这 3 种完全脱氯的 C₄ 气体总量计算得到 HCBd 的降解速率为 64 μg/(d·L)。这个结果比先前 Bosma 等所描述

的部分脱氯速度快约 10 倍, 与 Booker 等添加氰钴胺的产甲烷富集培养的降解速率相当。该研究提出一种可能的降解机制, 如图 4 所示: 活性污泥中微生物利用乙酸或其他有机小分子提供的电子将电子穿梭体(如氰钴胺)还原, 被还原的电子穿梭体继而将 HCBd 还原; 研究同时发现, 当把活性污泥生物质替换成化学还原剂锌时, HCBd 仍能被脱氯为 C₄ 气体。因此, 这种 HCBd 脱氯降解可能并不是特异性还原脱氯(不需要微生物的氧化还原酶参与), 而是微生物介导的非生物降解 HCBd。van der Zee 等^[50]发现这类电子穿梭体可以被广谱微生物进行还原, 被还原后反过来可以有效还原目标氯代有机物。

商业化药品氰钴胺的价格昂贵, 用于修复大面积 HCBd 污染场地缺乏实用性。因此, 在 2010 年有研究者利用合成吩嗪衍生物中性红(pH 7.0 时, H⁺/H₂ 还原电位为 -325 mV)替代氰钴胺作为电子穿梭体, 并加入水凝胶聚合物海藻酸钠来固定微生物及其生长所需营养成分, 有效降低了乳酸和乙酸负载的砂质土中的氧化还原电位, 实现有氧环境下 HCBd 的厌氧还原脱氯降解^[58-59]。

3 HCBd 还原脱氯的热力学分析

微生物还原降解有机物过程中, 通过氧化 H₂ 或其他电子供体产生电子, 将电子传递给作为电子受体的有机物, 从而获取生长所需的能量。有机氯化物还原脱氯反应释放的能量取决于有机氯的种类以及反应条件。热力学理论与计算可以作

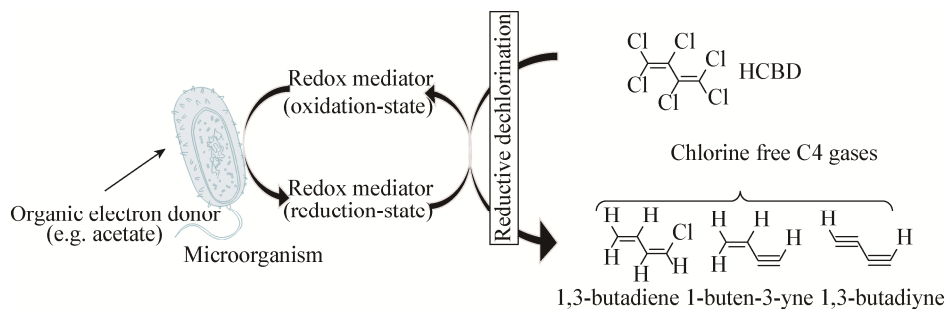


图 4 微生物介导的非生物降解 HCBd 机制^[57]

Figure 4 The mechanism of microbial-mediated abiotic transformation of HCBd^[57]

为一种有效工具来预测微生物从还原脱氯反应中可能获得的代谢能量^[27]。表1中列出了HCBD及其产物在一定条件下以氢解方式参与的还原脱氯半反应的标准吉布斯自由能及氧化还原电位(ΔG° , E° ; 标准分压 1 atm, pH 7.0, 氯离子浓度 1 mmol/L, 其他物质浓度 1 mol/L)。热力学计算表明, 与四氯乙烯(perchloroethene, PCE)、三氯乙烯(trichloroethene, TCE)、一氯乙烯(vinyl chloride, VC)这些化合物类似, HCBD 及其大部分脱氯产物(图 1)的厌氧还原脱氯反应是放热反应, 意味着HCBD 及其产物均可能作为电子受体为厌氧脱氯微生物所利用。

土壤或地下水厌氧环境中, 氯代有机物能否被土著微生物利用并降解还取决于微环境中氢气浓度。有研究表明大部分自然环境中氢浓度为 0.5 nmol/L 左右^[63], 而各种还原微生物能利用的氢气浓度水平如下: 硫酸盐还原菌 1.5–4.5 nmol/L;

产甲烷菌 2.5–24 nmol/L; 反硝化菌 0.1–0.4 nmol/L; PCE/TCE 脱氯菌 0.6–0.9 nmol/L; 顺式二氯乙烯(*cis*-1,2-dichloroethene, *cis*-DCE)脱氯菌 0.1–2.5 nmol/L^[64]。相比产甲烷、硫酸盐还原过程, 微生物的厌氧还原脱氯与反硝化过程所需氢气的浓度水平较低。因此, 脱氯微生物具有一定的竞争氢气的优势, 可以利用更低的氢气分压参与到HCBD的还原脱氯反应^[27]。

4 HCBD 厌氧微生物降解的展望

综上所述, HCBD 的污染问题已引起国内外研究者的广泛关注^[4-5,16,20]。根据化合物本身特性以及热力学可行性分析结果, 微生物厌氧还原脱氯是针对受 HCBD 污染的地下水或土壤环境最具有应用潜力的原位修复技术。脱氯微生物对HCBD^[43,46,49]和其他的多氯代化合物(如多氯联苯、卤代烷烃和烯烃)的厌氧还原脱氯已有报道^[28,32,34]。

表 1 选定的氧化还原对化合物在 25 °C、pH 7.0 时的吉布斯自由能和标准还原电位^{a,b,c,d}

Table 1 Gibbs free energy changes and standard reduction potentials at 25 °C and pH 7.0 of selected redox couples^{a,b,c,d}

电子受体	还原脱氯半反应	ΔG° (kJ/e ⁻) ^a	E° (mV) ^b
Electron acceptor	Half-reaction of reductive dehalogenation		
O ₂	O ₂ +4H ⁺ +4e ⁻ → H ₂ O	-78.7	816
1,1,2,3-TeCBD	C ₄ H ₂ Cl ₄ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₃ Cl ₃ +Cl ⁻	-56.9	590
PCE	C ₂ Cl ₄ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₂ H ₄ +Cl ⁻	-55.4	574
HCBD	C ₄ Cl ₆ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ HCl ₅ +Cl ⁻	-54.4	563
TCE	C ₂ HCl ₃ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₂ H ₂ Cl ₂ +Cl ⁻	-53.1 to -50.9 ^c	550 to 527 ^c
(E)-1,1,2,3,4-PCBD	C ₄ HCl ₅ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₂ Cl ₄ +Cl ⁻	-49.3	511
(E, E)-1,4-DCBD	C ₄ H ₄ Cl ₂ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₅ Cl+Cl ⁻	-48.2	499
(Z, E)-1,4-DCBD	C ₄ H ₄ Cl ₂ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₅ Cl+Cl ⁻	-47.7 to -46.4 ^d	494 to 481 ^d
(Z, Z)-1,4-DCBD	C ₄ H ₄ Cl ₂ +H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₅ Cl+Cl ⁻	-47.2	489
(E)-1-CBD	C ₄ H ₅ Cl+H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₆ +Cl ⁻	-46.8	485
(Z)-1-CBD	C ₄ H ₅ Cl+H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₆ +Cl ⁻	-45.5	472
VC	C ₂ H ₃ Cl+H ⁺ +2e ⁻ → C ₂ H ₄ +Cl ⁻	-43.4	450
NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻ +2H ⁺ +2e ⁻ → NO ₂ ⁻ +H ₂ O	-41.7	432
2-CBD	C ₄ H ₅ Cl+H ⁺ +2e ⁻ → C ₄ H ₆ +Cl ⁻	-15.1	156
SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻ +9H ⁺ +8e ⁻ → HS ⁻ +4H ₂ O	+20.9	-217
HCO ₃ ⁻	HCO ₃ ⁻ +9H ⁺ +8e ⁻ → CH ₄ +3H ₂ O	+23.0	-238
Proton (pH 7.0)	2H ⁺ +2e ⁻ → H ₂	+40.5	-420

注: a: 热力学数据获取自软件 HSC chemistry 6.0 (<https://www.hsc-chemistry.com/>)或参考文献[60-61]; 以此根据 Dolfing 的方法^[62]计算 Cl⁻浓度为 1 mmol/L 的标准热力学数据; b: $E^{\circ}=\Delta G^{\circ}/nF$, 其中 n 是参与反应电子数, F 是法拉第常数(96.48 kJ/V); c: 数值取决于生成的脱氯产物异构体类型(如 *Cis*-C₂H₂Cl₂、*trans*-C₂H₂Cl₂ 或 1,1-C₂H₂Cl₂); d: 数值取决于生成的脱氯产物异构体类型(如 Z-1-CBD, E-1-CBD)。

Note: a: Thermodynamic data were obtained from HSC chemistry 6.0 or references[60-61], and calculated assuming [Cl⁻]=1 mmol/L according to Dolfing's Method^[62]; b: $E^{\circ}=\Delta G^{\circ}/nF$, n is the number of electrons involved, and F is the Faraday constant (96.48 kJ/V); c: Depending on the isomer formed or dechlorinated (e.g., *cis*-C₂H₂Cl₂, *trans*-C₂H₂Cl₂, or 1,1-C₂H₂Cl₂); d: Depending on the isomer formed or dechlorinated (e.g., Z-1-CBD or E-1-CBD).

但大部分的厌氧还原脱氯微生物生长条件极为严格, 如典型的厌氧脱氯菌脱卤球菌(*Dehalococcoides*)只能利用乙酸盐作为碳源, 利用氢气作为电子供体^[65]。另外, 脱卤杆菌(*Dehalobacter restrictus*) PER-K23 菌株必须依赖于外源添加的3种氨基酸弥补自身在三羧酸循环上的缺陷^[66]。所以 HCBd 生物降解过程也必定受到多重未知因素(营养盐缺乏、电子供体不足、氧化还原电位过高等)的影响, 导致 HCBd 降解微生物在实际环境中生长缓慢、活性较低。微生物厌氧修复技术作为一种绿色、环保和可持续的原位修复方式而受到青睐, 但 HCBd 厌氧微生物降解机制研究仍有如下问题需要关注并深入研究。

4.1 多组学联合技术揭示 HCBd 降解菌群结构与功能

截至目前, 尚未分离纯化出能厌氧还原脱氯降解 HCBd 的纯培养微生物。已分离的脱氯微生物, 例如脱卤球菌(*Dehalococcoides*)、脱卤杆菌(*Dehalobacter*)、脱亚硫酸菌(*Desulfitobacterium*)以及其他还原脱氯微生物均不能降解 HCBd^[67]。根据环境中 1,3-丁二烯的频繁检出^[68], 以及预估约 99%细菌不可培养的特点^[69], 将 HCBd 完全还原脱氯为 1,3-丁二烯的厌氧降解菌具有存在的可能性, 但其纯菌的分离培养工作却充满挑战。近年来, 不断发展的多组学及分子技术(例如基因组测序、蛋白组测序技术、代谢组学技术), 为阐明 HCBd 厌氧降解的主要微生物种群和 HCBd 脱氯的分子、细胞、表观遗传的调控机制以及参与 HCBd 降解反应的微生物互作关系提供了重要的研究手段。

4.2 HCBd 污染场地的生物强化修复

大部分降解有机氯化物的微生物生长的最佳 pH 范围是 6.8–7.8, 在 pH 值低于 6.0 时, 经常观察到有机氯化物的缓慢降解和不完全脱氯, 从而导致脱氯不完全的中间有毒副产物累积^[32-33]。然而广泛用于修复氯乙烯、氯乙烷、氯甲烷等有

机氯污染场地的 KB-1[®]生物强化菌剂通过引入脱氯厌氧微生物可有效修复低生物量、低 pH 有机氯污染场地^[70]。但目前尚未开发出能有效修复 HCBd 污染场地的强化菌剂。为研发出 HCBd 高效降解菌剂, 可针对性地从 HCBd 污染场地采集具有差异的环境样本, 利用恒化器(chemostat)富集稳定的 HCBd 降解微生物菌群, 并在此基础上开展菌剂的固定化工作, 以期获得高效、绿色、低成本的 HCBd 厌氧降解菌剂。

4.3 HCBd 降解产物的环境归趋

对于 HCBd 的毒性效应已有一些报道, 但关于其降解产物的生态毒理学效应却少有研究。在巴塞尔附近的地下饮用水中, HCBd 脱氯降解中间产物的检出浓度比 HCBd 还高, 而且这些降解产物也具有诱导染色体畸变的毒性^[71]。与氯乙烯类化合物的微生物还原脱氯终产物为无毒乙烯不一样, HCBd 完全脱氯产物 1,3-丁二烯由于仍具有毒性且危害环境, 在 2017 年已被列入我国优先控制化学品第一批名单中 (https://www.mee.gov.cn/gkml/hbb/bgg/201712/t20171229_428832.htm)。因此, 在修复 HCBd 污染场地过程中, 应明确 HCBd 降解产物(如 1,3-丁二烯等)的环境归趋及污染生态效应问题, 深入开展 HCBd 降解产物的微生物修复技术研究, 避免 HCBd 污染场地修复过程对环境造成二次污染。

4.4 钴胺素结构对 HCBd 生物还原脱氯的影响

研究表明, 钴胺素(包含维生素 B₁₂ 在内的结构类似物)是厌氧微生物参与脱氯能量代谢关键功能酶(即还原脱卤酶)的重要辅酶因子, 而不同结构的钴胺素对脱氯活性及脱氯微生物群落结构都具有重大影响, 有些结构甚至会引起脱氯停滞^[53,55,72]。在对 HCBd 厌氧降解菌富集培养过程中, 考虑钴胺素辅因子对 HCBd 生物降解的影响, 测试不同钴胺素对 HCBd 厌氧脱氯酶的降解活性, 发现功能结构钴胺素, 以期加快 HCBd 的微生物转化速率, 在蛋白水平上阐明钴胺素对 HCBd 微生物降解的调控作用。

REFERENCES

- [1] Lecloux A. Hexachlorobutadiene—Sources, Environmental Fate and Risk Characterisation[M]. Science Dossier, Euro Chlor, Brussels, Belgium, 2014. <https://www.eurochlor.org/wp-content/uploads/2019/04/sd5-hexachlorobutadiene-final.pdf>
- [2] Sadeghnia HR, Yousefsani BS, Rashidfar M, et al. Protective effect of rutin on hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity[J]. Renal Failure, 2013, 35(8): 1151-1155
- [3] Verschuere K. Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals[M]. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983: 1070-1072
- [4] Kong QQ, Wang Y, Yang X. A review on hexachloro-1,3-butadiene (HCBD): sources, occurrence, toxicity and transformation[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2020, 104(1): 1-7
- [5] Zhang HY, Shen YT, Liu WC, et al. A review of sources, environmental occurrences and human exposure risks of hexachlorobutadiene and its association with some other chlorinated organics[J]. Environmental Pollution, 2019, 253: 831-840
- [6] Vallette J. Hexachlorobutadiene (HCBD). Technical report for EPA Docket. No. EPA-HQ-OPPT-2016-0738. On production, imports, use, release and disposal scenarios[EB/OL]. Natural Resources Defense Council and the Environmental Health Strategy Center, 2018/01. <https://www.researchgate.net/publication/326580422>
- [7] Wang L, Bie PJ, Zhang JB. Estimates of unintentional production and emission of hexachlorobutadiene from 1992 to 2016 in China[J]. Environmental Pollution, 2018, 238: 204-212
- [8] Mackay D, Shiu WY, Ma KC. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals-Volume III: Volatile Organic Chemicals[M]. Boca Raton: CRC Press, 1998: 11-29
- [9] Berger M, Schwarzbauer J. Historical deposition of riverine contamination on terrestrial floodplains as revealed by organic indicators from an industrial point source[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2016, 227(1): 20
- [10] Logue JM, McKone TE, Sherman MH, et al. Hazard assessment of chemical air contaminants measured in residences[J]. Indoor Air, 2011, 21(2): 92-109
- [11] Solé M, Manzanera M, Bartolomé A, et al. Persistent organic pollutants (POPs) in sediments from fishing grounds in the NW Mediterranean: Ecotoxicological implications for the benthic fish *Solea* sp.[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 67(1/2): 158-165
- [12] Tang ZW, Huang QF, Cheng JL, et al. Distribution and accumulation of hexachlorobutadiene in soils and terrestrial organisms from an agricultural area, East China[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 108: 329-334
- [13] Tang ZW, Huang QF, Nie ZQ, et al. Levels and distribution of organochlorine pesticides and hexachlorobutadiene in soils and terrestrial organisms from a former pesticide-producing area in Southwest China[J]. Stochastic Environmental Research and Risk Assessment, 2016, 30(4): 1249-1262
- [14] Rodrigues R, Betelu S, Colombano S, et al. Influence of temperature and surfactants on the solubilization of hexachlorobutadiene and hexachloroethane[J]. Journal of Chemical & Engineering Data, 2017, 62(10): 3252-3260
- [15] Rodrigues R, Betelu S, Colombano S, et al. Reductive dechlorination of hexachlorobutadiene by a Pd/Fe microparticle suspension in dissolved lactic acid polymers: degradation mechanism and kinetics[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017, 56(42): 12092-12100
- [16] Han Y, Tian L, Tang ZW. Research progress in distributions, sources and ecological risks of hexachlorobutadiene[J]. Environmental Pollution and Control, 2019, 41(2): 216-223 (in Chinese)
韩余, 田琳, 唐阵武. 六氯丁二烯的来源、环境分布及其生态风险研究进展[J]. 环境污染与防治, 2019, 41(2): 216-223
- [17] Thakur M, Pathania D. Environmental fate of organic pollutants and effect on human health[A]//Singh P, Kumar A, Borthakur A. Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies[M]. Amsterdam: Elsevier, 2020: 245-262
- [18] Swain A, Turton J, Scudamore CL, et al. Urinary biomarkers in hexachloro-1:3-butadiene-induced acute kidney injury in the female Hanover Wistar rat; correlation of α -glutathione *S*-transferase, albumin and kidney injury molecule-1 with histopathology and gene expression[J]. Journal of Applied Toxicology, 2011, 31(4): 366-377
- [19] WHO. Hexachlorobutadiene in drinking-water: background document for reparation of WHO guidelines for Drinking-Water Quality[EB/OL]. 2004, WHO/SDE/WSH/03.04/101. <https://www.who.int/watersanitationhealth/waterquality/guidelines/chemicals/hexachlorobutadiene.pdf?ua=1>
- [20] Balmer JE, Hung H, Vorkamp K, et al. Hexachlorobutadiene (HCBD) contamination in the Arctic environment: A review[J]. Emerging Contaminants, 2019, 5: 116-122
- [21] Vulykh N, Dutchak S, Mantseva E, et al. Model assessment of potential for long-range transboundary atmospheric transport and persistence of polychlorinated naphthalenes [EB/OL]. Moscoew: Meteorological Synthesizing Centre-East, 2005. <http://www.docin.com/p-1499468180.html>
- [22] Atkinson R. A structure-activity relationship for the estimation of rate constants for the gas-phase reactions of OH radicals with organic compounds[J]. International Journal of Chemical Kinetics, 1987, 19(9): 799-828

- [23] Zhang XH, Yang MM, Sun XM, et al. The experimental observation, mechanism and kinetic studies on the reaction of hexachloro-1,3-butadiene initiated by typical atmospheric oxidants[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 627: 256-263
- [24] Zhang HY, Wang YW, Sun C, et al. Levels and distributions of hexachlorobutadiene and three chlorobenzenes in biosolids from wastewater treatment plants and in soils within and surrounding a chemical plant in China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1525-1531
- [25] Gribble GW. A recent survey of naturally occurring organohalogen compounds[J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 12(4): 396-405
- [26] Vetter W, Gribble GW. Anthropogenic persistent organic pollutants-lessons to learn from halogenated natural products[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(11): 2249-2252
- [27] Yang Y, Sanford R, Yan J, et al. Roles of organohalide-respiring *Dehalococcoidia* in carbon cycling[J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00757-19
- [28] Adrian L, Löffler FE. *Organohalide-Respiring Bacteria*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016: 20-23
- [29] Holliger C, Wohlfarth G, Diekert G. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 22(5): 383-398
- [30] Peng YX, Wu CD, Chu JY. Evolution of research on microorganism degradation of persistent organic pollutant[J]. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2007, 21(3): 73-78 (in Chinese)
彭银仙, 吴春笃, 储金宇. 持久性有机污染物微生物降解研究进展[J]. *江苏科技大学学报(自然科学版)*, 2007, 21(3): 73-78
- [31] Xu XY, Ren YH, Huang X, et al. Advanced on microbial biodegradation of chlorinated aromatics and their molecular mechanism[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2004, 30(6): 684-689 (in Chinese)
徐向阳, 任艳红, 黄绚, 等. 典型有机污染物微生物降解及其分子生物学机理的研究进展[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 30(6): 684-689
- [32] Yang Y, Cápiro NL, Marcet TF, et al. Organohalide respiration with chlorinated ethenes under low pH conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(15): 8579-8588
- [33] Yang Y, Cápiro NL, Yan J, et al. Resilience and recovery of *Dehalococcoides mccartyi* following low pH exposure[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(12): fix130
- [34] Yang Y, Higgins SA, Yan J, et al. Grape pomace compost harbors organohalide-respiring *Dehalogenimonas* species with novel reductive dehalogenase genes[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(12): 2767-2780
- [35] van Agteren MH, Keuning S, Janssen DB. *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*[M]. Dordrecht: Springer, 1998: 155-165
- [36] Li MT, Hao LL, Sheng LX, et al. Identification and degradation characterization of hexachlorobutadiene degrading strain *Serratia marcescens* HL1[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 6878-6884
- [37] Bidlan R, Manonmani HK. Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38(1): 49-56
- [38] Singh S, Chandra R, Patel DK, et al. Investigation of the biotransformation of pentachlorophenol and pulp paper mill effluent decolorisation by the bacterial strains in a mixed culture[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5703-5709
- [39] Dolinová I, Štrojsová M, Černík M, et al. Microbial degradation of chloroethenes: a review[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(15): 13262-13283
- [40] Cord-Ruwisch R, James D, Charles W. The use of redox potential to monitor biochemical HCBD dechlorination[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 142(2): 151-156
- [41] Callahan MA, Slimak MW, Gabelc NW. *Water-Related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants*[M]. Washington: United States Environmental Protection Agency, 1979
- [42] Grandel S, Dahmke A. Monitored natural attenuation of chlorinated solvents: assessment of potential and limitations[J]. *Biodegradation*, 2004, 15(6): 371-386
- [43] Bosma TNP, Cottaar FHM, Posthumus MA, et al. Comparison of reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in Rhine sediment and model systems with hydroxocobalamin[J]. *Environmental Science & Technology*, 1994, 28(6): 1124-1128
- [44] Liu FM, Yi SP, Zhou WH, et al. Amendment additions and their potential effect on soil geotechnical properties: A perspective review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020. DOI: 10.1080/10643389.2020.1729066
- [45] Hoag GE, Collins J. Enhanced biodegradation of non-aqueous phase liquids using surfactant enhanced *in-situ* chemical oxidation: EP2190789US20100227381A1[P]. 2020-06-02
- [46] Boucquey JB, Renard P, Amerlynck P, et al. High-rate continuous biodegradation of concentrated chlorinated aliphatics by a durable enrichment of methanogenic origin under carrier-dependent conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 47(3): 298-307
- [47] Gantzer CJ, Wackett LP. Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes[J]. *Environmental Science & Technology*, 1991, 25(4): 715-722
- [48] Holliger C, Schraa G, Stams AJM, et al. Reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane and chloroethane by

- cell suspensions of methanogenic bacteria[J]. *Biodegradation*, 1990, 1(4): 253-261
- [49] Booker RS, Pavlostathis SG. Microbial reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in a methanogenic enrichment culture[J]. *Water Research*, 2000, 34(18): 4437-4445
- [50] van der Zee FP, Cervantes FJ. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio) transformation of contaminants: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(3): 256-277
- [51] Watanabe K, Manefield M, Lee M, et al. Electron shuttles in biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(6): 633-641
- [52] van de Pas BA, Smidt H, Hagen WR, et al. Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halo-respiration in *Desulfotobacterium dehalogenans*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(29): 20287-20292
- [53] Yan J, Bi M, Bourdon AK, et al. Purinyl-cobamide is a native prosthetic group of reductive dehalogenases[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(1): 8-14
- [54] Yan J, Im J, Yang Y, et al. Guided cobalamin biosynthesis supports *Dehalococcoides mccartyi* reductive dechlorination activity[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1616): 20120320
- [55] Yan J, Şimşir B, Farmer AT, et al. The corrinoid cofactor of reductive dehalogenases affects dechlorination rates and extents in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi*[J]. *The ISME Journal*, 2015, 10(5): 1092-1101
- [56] Hashsham SA, Freedman DL. Enhanced biotransformation of carbon tetrachloride by *Acetobacterium woodii* upon addition of hydroxocobalamin and fructose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4537-4542
- [57] James DL, Cord-Ruwisch R, Schleheck D, et al. Cyanocobalamin enables activated sludge bacteria to dechlorinate hexachloro-1,3-butadiene to nonchlorinated gases[J]. *Bioremediation Journal*, 2008, 12(4): 177-184
- [58] Gentry T, Rensing C, Pepper I. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2004, 34(5): 447-494
- [59] Yee LH, Aagaard V, Johnstone A, et al. Development of a treatment solution for reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in vadose zone soil[J]. *Biodegradation*, 2010, 21(6): 947-956
- [60] Dolfig J, van Eckert M, Meuller J. Thermodynamics of low Eh reactions[A]//Fifth International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds[C]. Monterey, CA, USA, 2006: 22-25. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.4.61.7472&rep=rep1&type=pdf>
- [61] Dolfig J, van Eckert M, Seech A, et al. *In situ* chemical reduction (ISCR) technologies: significance of low Eh reactions[J]. *Soil and Sediment Contamination*, 2007, 17(1): 63-74
- [62] Dolfig J. Protocols for calculating reaction kinetics and thermodynamics[A]//McGenity TJ, Timmis KN, Fernández BN. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015: 155-163
- [63] Lovley DR, Chapelle FH, Woodward JC. Use of dissolved H₂ concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater[J]. *Environmental Science & Technology*, 1994, 28(7): 1205-1210
- [64] Lu XX, Tao S, Bosma T, et al. Characteristic hydrogen concentrations for various redox processes in batch study[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2001, 36(9): 1725-1734
- [65] Löffler FE, Yan J, Ritalahti KM, et al. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(2): 625-635
- [66] Holliger C, Hahn D, Harmsen H, et al. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration[J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 169(4): 313-321
- [67] Low A, Schleheck D, Khou M, et al. Options for *in situ* remediation of soil contaminated with a mixture of perchlorinated compounds[J]. *Bioremediation Journal*, 2007, 11(3): 113-124
- [68] Ashizawa A, Cronin D, Harper C, et al. Draft Toxicological Profile for 1,3-Butadiene[M]. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2009: 89-97
- [69] Vartoukian SR. Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria[J]. *Journal of Oral Biosciences*, 2016, 58(4): 143-149
- [70] Li YX. Adaptation of a dechlorinating culture, KB-1, to acidic environments[D]. Ontario, Canada: Doctoral Dissertation of University of Toronto, 2012
- [71] Brüscheweiler BJ, Märki W, Wülser R. *In vitro* genotoxicity of polychlorinated butadienes (Cl₄-Cl₆)[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2010, 699(1/2): 47-54
- [72] Yi S, Seth EC, Men YJ, et al. Versatility in corrinoid salvaging and remodeling pathways supports corrinoid-dependent metabolism in *Dehalococcoides mccartyi*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(21): 7745-7752