

铜绿假单胞菌胞内酶粗提液对十溴联苯醚的降解

史广宇¹, 尹华^{2,3*}, 叶锦韶⁴, 彭辉⁴, 张娜⁴, 何宝燕⁴

(1. 中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640; 2. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广州 510006; 3. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006; 4. 暨南大学环境工程系, 广州 510632)

摘要: 探讨了铜绿假单胞菌粗提液对十溴联苯醚(BDE-209)的降解特性, 结果表明, 该菌株胞内酶在 12 h 内对 1 mg·L⁻¹ 的 BDE-209 降解率达到了 69.22%。温度、pH 值、酶蛋白浓度及底物 BDE-209 浓度均会影响胞内酶粗提液对 BDE-209 的降解效率。当 BDE-209 浓度为 1 mg·L⁻¹ 时, BDE-209 适宜的酶促降解条件为: 温度 30℃, 反应 pH 值 7.5, 且降解率随着酶浓度的增加而增大。胞内酶对 BDE-209 的降解过程符合一级动力学反应模型, 底物浓度为 1 mg·L⁻¹ 时降解速率最快, 半衰期为 6.9 h。胞内酶降解 BDE-209 符合高浓度底物抑制的酶促反应类型, 其基本降解动力学参数为 $r_{max} = 0.133 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, $K_m = 0.642 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_i = 1.558 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 铜绿假单胞菌; 胞内酶; 十溴联苯醚; 酶降解; 动力学

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2013)04-1517-07

Biodegradation of Decabromodiphenyl Ether by Intracellular Enzyme Obtained from *Pseudomonas aeruginosa*

SHI Guang-yu¹, YIN Hua^{2,3}, YE Jin-shao⁴, PENG Hui⁴, ZHANG Na⁴, HE Bao-yan⁴

(1. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 3. The Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 4. Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The degradation characteristics of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by crude enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* were investigated. The results revealed that the degradation efficiency of the intracellular enzyme excreted from this bacterial strain reached 69.22% after incubation with 1 mg·L⁻¹ BDE-209 for 12 h. Temperature, pH, enzyme concentration and BDE-209 concentration all influenced the ability of crude enzyme to degrade BDE-209. When the BDE-209 concentration was 1 mg·L⁻¹, the optimal condition for enzymatic degradation was temperature 30℃ and pH 7.5, and the degradation rate increased with increasing enzyme concentration. The degradation process of BDE-209 by intracellular enzyme of the strain conformed to the first-order kinetic model. The highest reaction rate was achieved when the initial concentration of BDE-209 was 1 mg·L⁻¹ and the half-life of this substrate was 6.9 h. In addition, the biodegradation of BDE-209 can be well described by enzymatic reaction of high concentration substrate inhibition, with a maximum substrate utilization rate of 0.133 mg·(L·h)⁻¹, a Michaelis-Menten constant of 0.642 mg·L⁻¹, and an inhibitory constant of 1.558 mg·L⁻¹, respectively.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; intracellular enzyme; decabromodiphenyl ether (BDE-209); enzymatic degradation; kinetics

多溴联苯醚 (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 由于其优异的阻燃性能, 被广泛地以物理结合的方式添加于纺织、电子、家具等工业产品中^[1,2]。由于缺乏化学键的束缚作用, 产品中的 PBDEs 很容易进入环境, 并随着大气、水体的迁移而造成广泛的污染^[3], 目前 PBDEs 已在空气^[4]、沉积物^[5]、土壤^[6]、野生动物^[7] 以及人体中^[8] 被普遍检出。因此, 修复被 PBDEs 污染的环境介质已成为环境工作者关注的热点问题。

目前有关 PBDEs 降解的主要方法有光降解^[9]、高压热处理^[10]、铁粉还原^[11]、微生物降解等^[12,13]。其中微生物降解在 PBDEs 等毒害性有机物污染环境修复中一直扮演着重要的角色, 是该类污染环境

的一个重要修复手段。对于溴含量最高的十溴联苯醚(BDE-209)来说, 其微生物降解主要分为厌氧生物还原^[14]和好氧生物降解^[15]。Gerecke 等^[16]研究了厌氧条件下微生物处理 BDE-209 的效果, 结果表明 238 d 后, BDE-209 的去除率为 50%。王芳芳等^[17]采用好氧菌株苏云金芽孢杆菌降解 BDE-209, 3 d 后的降解率达到 51.18%。但是, 由于 BDE-209 具有高毒性与良好的稳定性^[18], 已选育的降解菌对

收稿日期: 2012-07-29; 修订日期: 2012-09-10
基金项目: 国家自然科学基金委-广东省联合基金重点项目 (U0933002); 国家自然科学基金项目 (50978122); 广州市科技计划项目 (2011J4300075)
作者简介: 史广宇 (1985~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境污染生物修复, E-mail: shigylove@126.com
* 通讯联系人, E-mail: thyin@jnu.edu.cn

BDE-209 的降解效果仍有待提高. 微生物降解有机污染物的实质是其分泌的降解酶对污染物的催化作用^[19-20]. 由于降解酶没有活性菌体降解有机物时的跨膜运输过程, 所以离体情况下的酶促反应具有速率快、反应时间短等优点, 因此研究微生物降解酶对 BDE-209 的降解性能对于探明该微生物的降解特性具有重要意义.

本研究选取 1 株课题组前期工作中分离得到的 BDE-209 好氧降解菌——铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为实验菌株, 对其胞内胞外酶进行提取, 分析了不同因素对 BDE-209 降解效果的影响, 并探讨了酶降解的动力学过程, 以期为好氧微生物修复 BDE-209 污染提供一定的理论依据及实验基础.

1 材料与方法

1.1 实验试剂与材料

1.1.1 实验试剂

BDE-209 (纯度 98%)、HPLC 级正己烷、甲苯购于 Sigma Aldrich 公司; BDE-209 储备液: 用色谱纯甲苯溶解 BDE-209, 配制成 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存待用. 无水 Na_2SO_4 、 CH_2Cl_2 、葡萄糖、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 等购自广州化学试剂厂, 均为 AR 级.

1.1.2 菌株与培养基

营养培养基: 葡萄糖 5 g, 蛋白胨 2 g, 酵母粉 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.4~7.6.

铜绿假单胞菌: 由本课题组从受电子垃圾污染严重的环境中筛选得到.

1.2 实验方法

1.2.1 粗酶液的制备及粗酶液中可溶性蛋白质含量的测定

接种 *P. aeruginosa* 到营养培养液中, 于 $30\ ^\circ\text{C}$ 、 $150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡活化培养 24 h 后, $6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分别收集菌体与上清液. 其中上清液过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜, 得细胞外粗酶液. 菌体则用 $0.05\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.2 的磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次后, 加入一定量的 PBS 重悬, 置于 $0\ ^\circ\text{C}$ 的冰-水混合水浴中, 用 SCIENTZ-II D 型超声波细胞粉碎机 (450 W) 破碎处理 150 次, 每次 3 s, 间隔 3 s, $4\ ^\circ\text{C}$ 下 $8\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 得胞内粗酶液. 粗酶液中蛋白含量以牛血清蛋白作为标准蛋白采用 Bradford 法检测^[21].

1.2.2 BDE-209 浓度测定

采用超声波辅助萃取法对体系中的 BDE-209 进行提取. 具体步骤如下: 用 $5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 调节培养液 pH 为 2.0, 加入等体积的萃取剂 (二氯甲烷: 正己烷 = 1:1), 超声萃取 2 次, 移出有机相, 过无水硫酸钠脱水, 后经旋转蒸发器 $40\ ^\circ\text{C}$ 蒸发至干. 再加入 10 mL HPLC 级正己烷, 置于漩涡振荡器上振荡 60 s, 将振荡后的溶液转至色谱进样瓶, 并采用 GC-MS (7890A-5975C, Agilent Technology) 检测 BDE-209 浓度. 色谱柱条件: DB-5MS 石英毛细管柱 ($15\ \text{m}\times 0.25\ \text{mm}\times 0.1\ \mu\text{m}$), 载气为氦气. 质谱条件为: 负化学电离源 (NCI), 离子源温度 $150\ ^\circ\text{C}$, 反应气为甲烷. 仪器采用选择离子模式, 通过外标法对 BDE-209 进行定量分析. 分析条件为: 进样口温度 $280\ ^\circ\text{C}$, 初始温度 $110\ ^\circ\text{C}$ 保持 2 min, 以 $15\ ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 $310\ ^\circ\text{C}$, 保持 5 min.

1.2.3 菌体、胞内酶、胞外酶对 BDE-209 的降解

于 $30\ ^\circ\text{C}$ 、pH 7.5 的 PBS 中, 加一定量的 BDE-209、*P. aeruginosa* 菌悬液或其粗酶液, 使降解体系最终体积为 20 mL, BDE-209 浓度为 $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (30 ± 1) $^\circ\text{C}$ 下置于恒温摇床中反应, 加入菌体的反应时间为 5 d, 加入粗酶液的反应时间为 12 h. 反应结束后分析 BDE-209 的残留量, 计算其降解率. 每一处理设 3 个平行, 重复 2 次.

1.2.4 胞内酶粗酶液降解 BDE-209 时活性的变化

在含 $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-209, pH 值为 7.5 的 PBS 降解体系中, 加入 2 mL 的 *P. aeruginosa* 胞内酶粗酶液, 使降解体系最终体积为 20 mL, 体系中酶蛋白含量约为 $100.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 取样分析, 计算胞内酶活性的变化. 酶活性 $[A/\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}]$ 计算公式如下:

$$A = \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

式中 Δt 为相邻两次取样的时间差 (h), Δc 为相邻两段时间差所对应的 BDE-209 去除量的差值 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). 每一处理设 3 个平行, 重复 2 次.

1.2.5 不同因素对 BDE-209 降解的影响

(1) 温度 在含 $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-209, pH 值为 7.5 的 PBS 降解体系中, 加入 2 mL 的 *P. aeruginosa* 胞内酶粗酶液, 使降解体系最终体积为 20 mL, 体系中酶蛋白含量约为 $100.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别在 20、25、30、35、40、45、 $50\ ^\circ\text{C}$ 下反应 12 h.

(2) 初始 pH 值 在 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0 的 BDE-209 初始浓度为 $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 降解体系中, 加入 2 mL 的

*P. aeruginosa*胞内酶粗酶液,使降解体系最终体积为 20 mL,体系中酶蛋白含量约为 $100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下反应 12 h.

(3) 胞内酶浓度 向 pH 值 7.5 的 BDE-209 初始浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 中加入一定量的 *P. aeruginosa*胞内酶粗酶液,使得各体系中的胞内酶蛋白含量分别为 8.2、16.3、32.6、65.5、97.9、130.6、163.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下反应 12 h.

(4) BDE-209 初始浓度 在分别含有 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-209 pH 值为 7.5 的 PBS 降解体系中,加入 2 mL 的 *P. aeruginosa*胞内酶粗酶液,使降解体系最终体积为 20 mL,体系中酶蛋白含量约为 $100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下反应,分别于 1、2、4、8、12、24 h 取样分析.

以上实验均设空白对照,每一处理设 3 个平行,重复 2 次.

1.2.6 胞内酶对 BDE-209 的降解动力学分析

分别向含 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-209、pH 值为 7.5 的 PBS 降解体系中,加入 2 mL 的 *P. aeruginosa*胞内酶粗酶液,使降解体系最终体积为 20 mL,体系中酶蛋白含量约为 $100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下反应 12 h,测定 BDE-209 浓度对反应速率的影响.将 BDE-209 初始浓度的倒数和反应速率倒数作图,求得 *P. aeruginosa*胞内酶降解 BDE-209 的米氏常数 K_m 、最大反应速率及动力学方程.

2 结果与讨论

2.1 菌体、胞内酶、胞外酶对 BDE-209 的降解

$350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以干重计) 的 *P. aeruginosa* 菌体及从等量菌体提取出的胞内和胞外粗酶液对 BDE-209 的降解效果如表 1 所示.与未添加菌体和粗酶液的空白对照相比,胞外酶对 BDE-209 的降解率较小.菌体本身和胞内酶粗酶液都对 BDE-209 有较好的降解能力,相对而言,胞内酶粗酶液的效果更佳.在菌体的生长过程中,胞外酶分泌较少,而胞内酶含量较大,在本实验条件下,胞内酶在 12 h 对 BDE-209 的降解率就达到 69.22%.由此可见,*P. aeruginosa*对 BDE-209 的降解主要是依靠胞内酶完成的.目前有关 PBDEs 酶促降解的研究主要集中在真菌类微生物分泌至胞外的活性酶对 PBDEs 的降解特性方面^[22-23],熊士昌等^[24]利用白腐菌分泌的胞外酶降解 BDE-209,降解率达到 54.14%.但是对其它持久性有机污染物的降解,则以胞内酶的文

献报道居多.廖敏等^[25]研究结果显示,生物降解拟除虫菊酯类农药起降解作用的是胞内酶.另有报道显示在降解多环芳烃(PAHs)时,降解 PAHs 的活性酶分布在细胞内部^[26],这些均与本研究结果有相似之处.

表 1 *P. aeruginosa* 菌体、胞内酶、胞外酶对 BDE-209 的降解

项目	含量(粗酶液中指蛋白含量) / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	BDE-209 降解率 /%
菌体	350	57.26 ± 3.45
胞内酶粗酶液	115.2 ± 4.8	69.22 ± 1.19
胞外酶粗酶液	8.1 ± 0.9	6.43 ± 0.47
CK	—	2.33 ± 0.33

2.2 胞内酶降解 BDE-209 过程中酶活性的变化

从图 1 可知,胞内酶粗酶液在降解浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BDE-209 时,降解率随着时间的延长而增大,酶的活性则随着时间呈现先增大后减小的趋势.反应初期,加入体系的 BDE-209 呈较大颗粒的漂浮物,与粗酶液的接触面积较小,导致酶对底物的利用较差,计算出的酶的活性也较低.而经过一段时间的分配作用后 BDE-209 较为均匀地分散于胞内酶粗酶液中,大大增加了胞内酶与底物的接触面积,从而增强了酶对 BDE-209 的利用.当降解时间为 2 h 时,酶的活性达到最高 $0.094 \text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$,之后胞内酶的活性随着时间的增长逐渐下降.当反应时间从 12 h 增加到 24 h,胞内酶活性仅为 $0.002 \text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$.这说明胞内酶降解 BDE-209 的有效反应时间为 12 h,与 *P. aeruginosa* 菌体降解 BDE-209 的 5 d 的有效反应时间相比有大幅度缩短,这一结果也体现了降解酶具有速率快、反应时间短的优点.

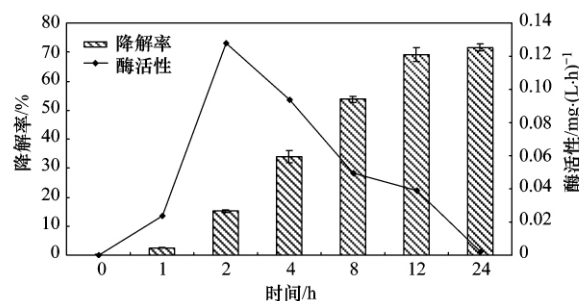


图 1 BDE-209 降解率及胞内酶活性的变化

Fig. 1 Variations of BDE-209 degradation rate and intracellular enzyme activity

2.3 温度、pH 值对胞内酶降解 BDE-209 的影响

酶促反应需要在一定的温度范围内进行.由于绝大多数的酶是蛋白质,遇热容易变性,因此随着温

度的升高,酶蛋白热变性加快,造成活性酶的含量减少进而降低酶促反应速度。从图 2(a)可以看出,*P. aeruginosa*产生的粗酶液在 25~40℃ 范围内都能保持较好的降解能力,其中最适温度为 30℃。

从图 2(b)可知,pH 值在 6.5~8.0 范围内,*P. aeruginosa*胞内酶都有较好的降解性能,其中最

优的 pH 值为 7.5。过酸和过碱的条件都会对降解效果产生副作用。这主要是因为 pH 可以影响酶分子,特别是活性中心上必需基团的解离程度和催化基团中质子供体或质子受体所需的离子化状态,同时也可以影响底物和辅酶的解离程度,从而影响酶与底物的结合,最终影响酶对底物的利用^[24]。

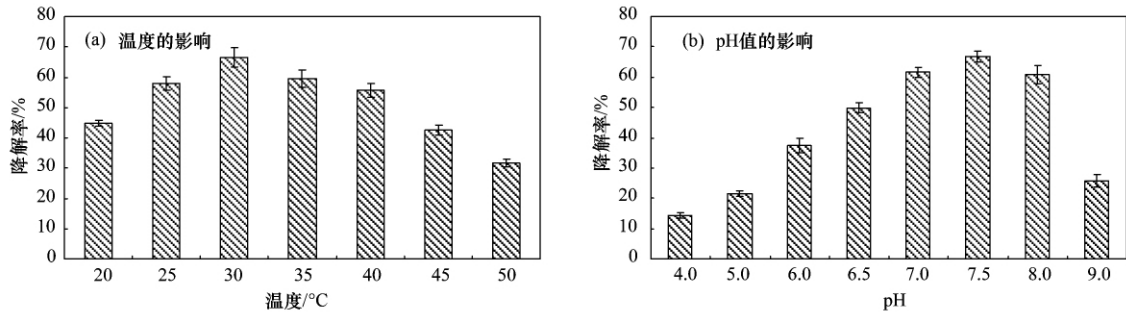


图 2 环境条件对 *P. aeruginosa* 胞内酶降解 BDE-209 的影响

Fig. 2 Effect of environmental factors on the degradation of BDE-209 by intracellular enzymes of *P. aeruginosa*

2.4 胞内酶浓度对 BDE-209 降解的影响

从图 3 中可知,随着 *P. aeruginosa* 胞内酶浓度的增大,降解效果增强,蛋白含量从 8.2 mg·L⁻¹ 增加到 163.2 mg·L⁻¹,BDE-209 降解率也从 15.48% 增加到 88.15%。但是,单位质量酶量对 BDE-209 的去除量的增长率随蛋白含量的增加而呈下降趋势,当胞内酶达到一定浓度(65.3 mg·L⁻¹)时,增长率的降低相对不明显。这是由于粗酶降解难溶于水的 BDE-209 时是通过先吸附再降解的方式完成的。酶浓度越高,单位蛋白量的酶与 BDE-209 接触几率相对越低,则单位蛋白量的酶对 BDE-209 的降解率越低。另外,胞内酶在降解 BDE-209 的过程中会不断地发生失活,投加量越高,单位时间失活的蛋白量也越大,高投加量的酶在与 BDE-209 接触前失活的量比低投加量的多。

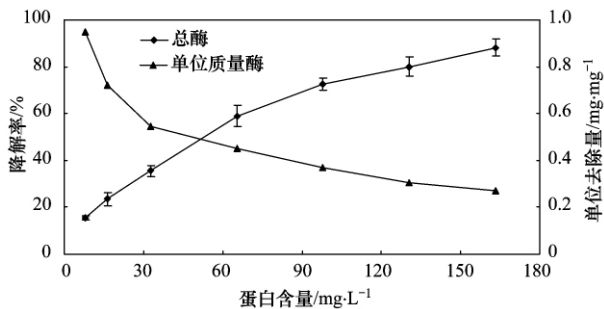


图 3 *P. aeruginosa* 胞内酶浓度对 BDE-209 降解的影响

Fig. 3 Effect of intracellular enzyme concentration of *P. aeruginosa* on the degradation of BDE-209

2.5 底物浓度对胞内酶降解 BDE-209 的影响

酶的浓度一定时,底物浓度对酶促降解 BDE-

209 的影响如图 4 所示。菌株的胞内酶粗酶液能够降解浓度为 0.5~5.0 mg·L⁻¹ 的 BDE-209,且降解率随着时间的延长而增大,当降解时间超过 12 h 后,胞内酶对 BDE-209 的降解率基本趋于稳定,不再随时间的延长而增大,该结果主要与两方面的原因有关:①降解酶的活性在 12 h 后有一定的降低,从而影响胞内酶对 BDE-209 的降解;② BDE-209 的不断降解使得底物浓度减小,从而导致酶促反应的速率逐渐降低。此外,当 BDE-209 浓度为 0.5~1.0 mg·L⁻¹ 时,降解率随底物浓度的增加而增大;当底物浓度继续增大时,降解率呈明显的下降趋势,这是由于高浓度的底物会对酶的活性起抑制作用,虽然这一作用不会使酶变性,但是能使酶活性中心的化学性质改变,引起酶活性的降低或丧失^[27],从而影响其对底物的降解作用。这一结果符合米氏方程的酶促反应动力学特点。

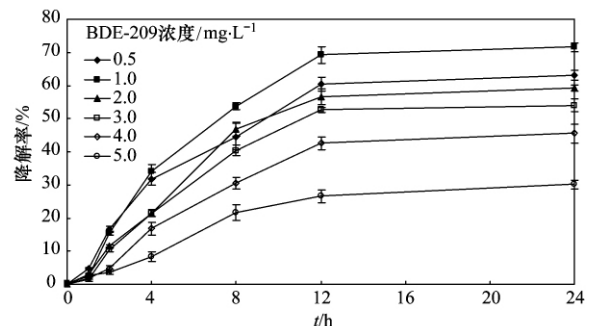


图 4 BDE-209 浓度对 *P. aeruginosa* 胞内酶降解 BDE-209 的影响

Fig. 4 Effect of BDE-209 concentration on the degradation of BDE-209 by intracellular enzymes of *P. aeruginosa*

2.6 胞内酶对 BDE-209 降解的动力学分析

排除 *P. aeruginosa* 胞内酶在 12 h 后由于活性降低等原因而导致的对 BDE-209 降解能力下降的情况, 用公式 $\ln c_0/c = a + k_1 t$ 进行了胞内酶对 BDE-209 的降解动力学分析. 式中 c_0 为 BDE-209 初始浓度, c 为尚未反应的 BDE-209 浓度, t 为降解时间, k_1 为一级反应速率常数. a 为 $t=0$ 时刻去除的反应物浓度, 半衰期 $t_{1/2} = \ln 2/k_1$. 动力学分析结果如图 5 所示. 降解动力学参数与计算结果列于表 2.

实验结果表明, *P. aeruginosa* 胞内酶对 BDE-209 的降解过程符合一级反应动力学. BDE-209 的降解速率随着底物浓度的增大呈现先增大后减小的趋势, 当 BDE-209 的浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 降解速率

最快, 半衰期为 6.9 h. BDE-209 浓度较低时半衰期延长的特性, 进一步验证了 BDE-209 在环境中的持久性, 增加了该类污染物有效净化的难度.

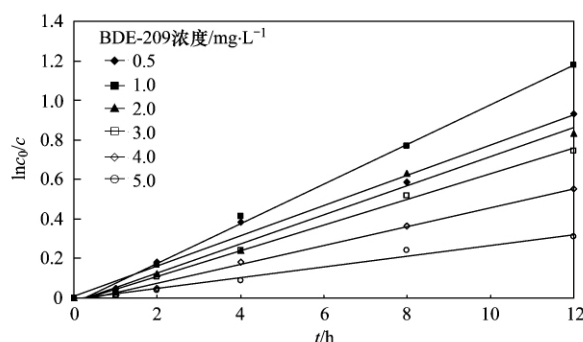


图 5 一级反应动力学线性拟合

Fig. 5 First-order rate relationship between $\ln[\text{BDE-209}]$ and time

表 2 *P. aeruginosa* 胞内酶对不同浓度 BDE-209 降解的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of BDE-209 degradation by intracellular enzymes of *P. aeruginosa*

BDE-209 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	动力学方程	速率常数 k/h^{-1}	半衰期/h	R^2
0.5	$\ln c_0/c = 0.0764t + 0.0119$	0.0764	9.1	0.9883
1.0	$\ln c_0/c = 0.1006t - 0.0265$	0.1006	6.9	0.9955
2.0	$\ln c_0/c = 0.0738t - 0.022$	0.0738	9.4	0.9885
3.0	$\ln c_0/c = 0.0648t - 0.0198$	0.0648	10.7	0.996
4.0	$\ln c_0/c = 0.048t - 0.0213$	0.048	14.4	0.9941
5.0	$\ln c_0/c = 0.0272t + 0.0052$	0.0272	25.5	0.9812

2.7 胞内酶降解时的米氏常数 K_m 和最大反应速率

由以上实验可知, 在低浓度时, *P. aeruginosa* 胞内酶降解 BDE-209 的反应速率随 BDE-209 浓度的增大而增大. 当 BDE-209 浓度达到一定值后 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 反应速率达到最大值; 继续增大 BDE-209 的浓度, 反应速率又开始下降. 对于某些酶促反应, 当底物浓度较高时, 反应速率呈下降的趋势, 这种反应被称为高浓度底物抑制型反应^[28]. 因此, 从动力学上看, *P. aeruginosa* 胞内酶降解 BDE-209 符合高浓度底物抑制的酶促反应类型. 方程式为:

$$r_i = \frac{r_{\max}}{1 + \frac{K_m}{c} + \frac{c}{K_i}}$$

式中 c 为 BDE-209 在溶液中的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); r_i 为存在抑制剂时的酶促反应速率 [$\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]; r_{\max} 为不存在抑制剂时的最大酶促反应速率常数 [$\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$]; K_m 为米氏常数; K_i 为抑制常数.

当底物浓度较低时 ($0 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 采用 Lineweaver-Burk 作图法以 $1/r_i$ 对 $1/c$ 作图, 如图 6, 通过直线的斜率和截距可求得动力学参数 $r_{\max} = 0.133 \text{ mg} \cdot (\text{h} \cdot \text{L})^{-1}$, 米氏常数 $K_m = 0.642 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 当反应速率达到最大时, $c^2 = K_m \cdot K_i$, 估算

抑制常数 $K_i = c^2/K_m = 1.558 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 因而得到 *P. aeruginosa* 胞内酶降解 BDE-209 的动力学方程:

$$r_i = \frac{0.133}{1 + \frac{0.642}{c} + \frac{c}{1.558}}$$

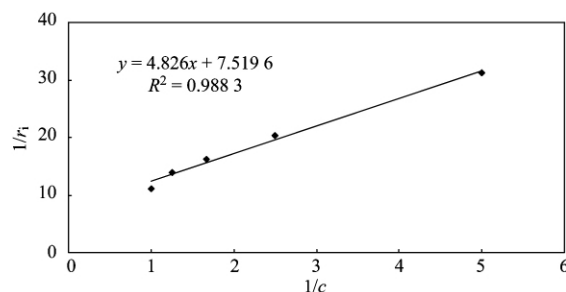


图 6 *P. aeruginosa* 胞内酶在低 BDE-209 浓度下 $1/c$ 与 $1/r_i$ 之间的关系

Fig. 6 Relationship between $1/c$ and $1/r_i$ under low initial concentrations of BDE-209 by intracellular enzymes of *P. aeruginosa*

3 结论

(1) *P. aeruginosa* 对 BDE-209 的降解主要归因于其胞内酶的催化作用. 胞内酶粗提液在 12 h 对 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BDE-209 的降解率达到 69.22%, 降解速度远远大于菌体. 胞内酶降解 BDE-209 的过程中, 酶活性随降解时间的增大呈现先增大后减小的

趋势.

(2) *P. aeruginosa* 胞内酶降解 BDE-209 的效率受酶浓度、底物浓度、pH 值及环境温度的影响, 当 BDE-209 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, BDE-209 最适酶促降解反应条件为: 温度 30°C , 反应 pH 值 7.5, 降解率随着酶浓度的增加而增大.

(3) *P. aeruginosa* 胞内酶降解不同浓度的 BDE-209 的过程符合一级动力学反应模型, 由于 BDE-209 本身具有毒性, 降解速率随着底物浓度的增大呈现先增大后减小的趋势, 当 BDE-209 的浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 降解速率最快, 半衰期为 6.9 h. 其胞内酶对 BDE-209 降解的米氏常数 K_m 、抑制常数 K_i 和最大反应速率分别为 $0.642 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.558 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.133 \text{ mg} \cdot (\text{h} \cdot \text{L})^{-1}$.

参考文献:

- [1] Alcock R E, Sweetman A J, Prevedouros K, et al. Understanding levels and trends of BDE-47 in the UK and North America: an assessment of principal reservoirs and source inputs [J]. *Environment International*, 2003, **29**(6): 691-698.
- [2] Cynthia A de Wit. An overview of brominated flame retardants in the environment [J]. *Chemosphere*, 2002, **46**(5): 583-624.
- [3] 罗孝俊, 麦碧娴, 陈社军. PBDEs 研究的最新进展 [J]. *化学进展*, 2009, **21**(2/3): 359-368.
- [4] Chen D H, Bi X H, Zhao J P, et al. Pollution characterization and diurnal variation of PBDEs in the atmosphere of an e-waste dismantling region [J]. *Environmental Pollution*, 2009, **157**(3): 1051-1057.
- [5] Song W L, Ford J C, Li A, et al. Polybrominated diphenyl ethers in the sediments of the Great Lakes. 3. Lakes Ontario and Erie [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**(15): 5600-5605.
- [6] Leung A O W, Luksemburg W J, Wong A S, et al. 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 [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, **41**(8): 2730-2737.
- [7] Hites R A, Foran J A, Schwager S J, et al. Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon [J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, **38**(19): 4945-4949.
- [8] Miller M F, Chernyak S M, Batterman S, et al. Polybrominated diphenyl ethers in human gestational membranes from women in Southeast Michigan [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, **43**(9): 3042-3046.
- [9] Mas S, De Juan A, Lacorte S, et al. Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard-and soft-modelling approach [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, **618**(1): 18-28.
- [10] Nose K, Hashimoto S, Takahashi S, et al. Degradation pathways of decabromodiphenyl ether during hydrothermal treatment [J]. *Chemosphere*, 2007, **68**(1): 120-125.
- [11] Keum Y S, Li Q X. Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers by zerovalent iron [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**(7): 2280-2286.
- [12] Gerecke A C, Giger W, Hartmann P C, et al. Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge [J]. *Chemosphere*, 2006, **64**(2): 311-317.
- [13] Robrock K R, Coelhan M, Sedlak D L, et al. Aerobic biotransformation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by bacterial isolates [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, **43**(15): 5705-5711.
- [14] Tokarz J A, Ahn M Y, Leng J, et al. Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers in anaerobic sediment and a biomimetic system [J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, **42**(4): 1157-1164.
- [15] Deng D Y, Guo J, Sun G P, et al. Aerobic debromination of deca-BDE: isolation and characterization of an indigenous isolate from a PBDE contaminated sediment [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2011, **65**(3): 465-469.
- [16] Gerecke A C, Hartmann P C, Heeb N V, et al. Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, **39**(4): 1078-1083.
- [17] 王芳芳, 尹华, 龙焰, 等. 表面活性剂对苏云金芽孢杆菌 J-1 降解 BDE-209 的影响 [J]. *环境科学学报*, 2011, **31**(4): 738-744.
- [18] Viberg H, Mundy W, Eriksson P. Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMK II and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis [J]. *Neurotoxicology*, 2008, **29**(1): 152-159.
- [19] Mishra S, Singh S N. Microbial degradation of *n*-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes [J]. *Bioresource Technology*, 2012, **111**: 148-154.
- [20] Chang J, Zhang Y. Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger* [J]. *Process Biochemistry*, 2012, **47**(2): 195-200.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-254.
- [22] 阮久莉, 王勐, 毛亮, 等. 白腐菌锰过氧化物酶 2 α A α -四溴联苯醚的降解 [J]. *环境科学与技术*, 2012, **35**(1): 20-24.
- [23] 熊士昌, 尹华, 彭辉, 等. 重金属对白腐菌降解十溴联苯醚的影响 [J]. *环境科学*, 2012, **33**(3): 1008-1014.
- [24] 熊士昌, 尹华, 何宝燕, 等. 白腐菌对十溴联苯醚的酶促降解研究 [J]. *环境化学*, 2012, **31**(5): 615-619.
- [25] 廖敏, 马爱丽, 谢晓梅. 缺陷假单胞菌 M5R14 粗酶液降解拟除虫菊酯类农药特性初探 [J]. *环境科学*, 2011, **32**(6): 1793-1798.

- [26] 聂麦茜, 吴蔓莉, 王晓昌, 等. 一株黄杆菌及其粗酶液对茈
降解的动力学特征研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(2):
181-185.
- [27] He J H, Yang D R, Wang C Y, *et al.* Chronic zebrafish low
dose decabrominated diphenyl ether (BDE-209) exposure
affected parental gonad development and locomotion in F1
offspring[J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(8): 1813-1822.
- [28] 张杏青, 朱妙军, 胡勤海, 等. 甲基叔丁基醚(MTBE)降解菌
株的分离鉴定及降解动力学研究[J]. 环境科学, 2009, 30
(6): 1785-1790.

第二届挥发性有机污染物(VOCs)检测分析、减排控制、 环境政策研究专辑征稿通知

挥发性有机物污染对生态、环境、健康产生了重要的影响,从国家层面上 VOCs 已经被列为重点控制的污染物,对挥发性有机污染物的减排与控制有着迫切的需求,有关挥发性有机污染的研究已经引起政府、地方、企业和科研人员密切的关注。

为了支持国家挥发性有机污染减排与控制,更好地促进与提高有关我国挥发性有机污染的科学研究的《环境科学》2011年出版“挥发性有机污染物(VOCs)检测分析、减排控制、环境政策研究”专辑(中国科学院生态环境研究中心郝郑平研究员为专辑的特邀主编)。专辑出版后,引起了极大地反响和关注。

这一年多以来,我国挥发性有机污染的科学取得了一定进步与发展,不断有作者和相关部门希望能继续此专辑的编辑。为了继续支持我国未来 VOCs 减排和控制,进一步促进我国挥发性有机污染 VOCs 研究的发展和深入,《环境科学》计划2013年出版第二届挥发性有机污染物(VOCs)检测分析、减排控制、环境政策研究专辑(非增刊),邀请中国科学院生态环境研究中心郝郑平研究员为本专辑特邀主编,并开展挥发性有机污染 VOCs 研究优秀论文评选。现诚挚邀请国内外挥发性有机污染 VOCs 研究领域的专家、学者、技术人员踊跃投稿。

征文范围

- 1) 挥发性有机污染(VOCs)的监测与分析
- 2) 挥发性有机污染(VOCs)的排放与特征
- 3) 挥发性有机污染(VOCs)的控制与过程
- 4) 挥发性有机污染(VOCs)的控制技术与设备
- 5) 挥发性有机污染(VOCs)的反应与转化
- 6) 挥发性有机污染(VOCs)的减排模式与政策
- 7) 挥发性有机污染(VOCs)的其它研究内容

征文要求

1) 稿件参考《环境科学》已发表论文格式,文章以 Word 文档为附件发送至: hjcx@rcees.ac.cn, 电子邮件主题为“VOCs 专辑 + 文章题目”。《环境科学》已发表文章范文可在网站 www.hjcx.ac.cn 首页点击下载。

2) 稿件参考文献后须注明通讯联系人和第一作者详细邮政地址、邮编、电话、手机、电子信箱等。

3) 只接受中文投稿文章;综述类文章,导师应为第一作者,不接受第一作者为学生的综述类投稿。

4) 特别说明:本专辑不是增刊,而是在《环境科学》2013年下半年正刊上刊出。

重要日期

论文投稿截止日期:2013年7月1日

联系方式

联系人:李老师

地址:北京市海淀区双清路18号生态中心《环境科学》编辑部

邮编:100085

电话:010-62941102

传真:010-62849343

E-mail: hjcx@rcees.ac.cn