

驯化活性污泥对邻苯二甲酸丁基苄酯的降解

李文兰¹, 杨玉楠², 季宇彬¹, 于蕾¹, 范玉奇¹

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究发展中心, 哈尔滨 150076; 2. 北京航空航天大学材料学院环境工程系, 北京 100083)

摘要:活性污泥对邻苯二甲酸丁基苄酯(BBP)降解研究表明,活性污泥能在 1 d 内降解 90 % 以上的 BBP, 是一高效的邻苯二甲酸丁基苄酯降解菌群. 活性污泥对邻苯二甲酸丁基苄酯降解符合一级动力学特征, 在 100、300 和 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内的降解动力学方程分别为 $\ln c = -0.0699x + 5.6171$, $\ln c = -0.0683x + 8.4083$, $\ln c = -0.0583x + 7.2806$, 半衰期为 9.92、10.15、11.89 h, 降解速率常数 k_b 为 0.0699、0.0683、0.0583 d^{-1} . 其降解速率常数随着 BBP 浓度增加而降低, 说明高浓度的邻苯二甲酸丁基苄酯对其生物降解有抑制作用. 另外, 采用 HPLC-MSⁿ 方法从活性污泥对邻苯二甲酸丁基苄酯的降解物中鉴定出 2 种产物, 分别为邻苯二甲酸丁酯和邻苯二甲酸苄酯, 降解途径是邻苯二甲酸丁基苄酯先生成单酯, 然后变成邻苯二甲酸, 最终氧化成 CO_2 和 H_2O .

关键词:环境激素; 邻苯二甲酸丁基苄酯; 活性污泥; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)04-0156-04

Biodegradation of Butylbenzyl Phthalate by Acclimated Activated Sludge

LI Wen-lan¹, YANG Yu-nan², JI Yu-bin¹, YU Lei¹, FAN Yu-qi¹

(1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Department of Environmental Engineering, Beijing University of Aeronautics and Astronautics, Beijing 100083, China)

Abstract: The results of degradation of butyl benzyl phthalate (BBP) by activated sludge demonstrate that the activated sludge is a high efficiency flora for degrading BBP, which can degrade BBP quickly and more than 95 % BBP is degraded in one day. The degradation of BBP can be described by the first-order dynamics model, the concentration in range of 100, 300, 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the dynamics equation of degradation respectively is $\ln c = -0.0699x + 5.6171$, $\ln c = -0.0683x + 8.4083$, and $\ln c = -0.0583x + 7.2806$, $t_{1/2}$ is 9.92, 10.15, 11.89 h, the constant of degrading rate k_b is 0.0699, 0.0683 and 0.0583 d^{-1} . The constant of degrading rate decreases as the concentration of BBP increases, which shows that BBP of high concentration inhibits its biodegradation. In addition, two degraded productions, monobutyl phthalate and methanoyal phthalate, are identified from the degradation of BBP with HPLC-MSⁿ. The route of degradation is that BBP produces mono-ester firstly, and then the product turns into phthalic acid, finally it oxidizes into CO_2 and H_2O .

Key words: environmental hormone; butylbenzyl phthalate; activated sludge; biodegradation

邻苯二甲酸酯类(Phthalate Esters PAEs)化合物作为增塑剂、软化剂、载体及添加剂,广泛用于塑料、汽车、润滑剂、化妆品、服装、农药等行业,是全球最普遍存在的环境污染物,并被怀疑为环境激素^[1]. 美国国家环保局(EPA)将 6 种 PAEs 列为优先控制污染物^[2]. 其中邻苯二甲酸丁基苄酯(Butylbenzyl phthalate BBP)作为 PAEs 的一种,具有明显的雌激素效应^[3]、生殖毒性,对动物的危害有一定的性别差异,严重影响人类的生命健康安全^[4]. 该化合物普遍存在于城市污泥及大气中^[5~7].

邻苯二甲酸酯类有机污染物的水解、光解速率非常缓慢,生物降解是其降解和消失的重要途径. 近几年连续报道不同邻苯二甲酸酯类化合物的生物降解性^[8~10]. 为寻找高效降解邻苯二甲酸丁基苄酯的

菌种,本试验通过驯化富集、培养分离活性污泥混合菌,研究其降解动力学特征,测定降解动力学参数及降解产物,为合理控制污染措施以及进行有效的治理和保护环境提供科学的理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

邻苯二甲酸丁基苄酯(无锡市有机化工厂,纯度为 98 %); Agilent 1100 液相色谱系统(包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器); Agilent 1100 液相色谱/VL 型离子阱液质谱联

收稿日期: 2004-09-17; 修订日期: 2004-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(302711081); 黑龙江省博士后基金项目

作者简介: 李文兰(1967~)女,博士,研究方向为环境毒理学.

用仪(配有电喷雾源 ESI 及大气压化学电离源 AP-Cl); Agilent Trap control 4.2 计算软件.

1.2 培养液配制

固体培养基:葡萄糖 10g/L、蛋白胨 3g/L、酵母浸膏 2g/L 和微量元素 7mL 蒸馏水至 1 000 mL,调节 pH 值为 4.5,于 121 °C 下灭菌 20 min.

液体培养基:葡萄糖 10g/L、蛋白胨 3g/L、酵母浸膏 2g/L、微量元素 7mL、琼脂 20g 和蒸馏水 1 000 mL 调节 pH 为值 4.5,于 121 °C 下灭菌 20 min.

微量元素混合液:氨基乙酸 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g、NaCl 1g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、 H_3BO_3 0.01g、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g,加纯净水到 1 000 mL.

1.3 活性污泥驯化

生物降解试验是将环境中微生物接种于含邻苯二甲酸丁基苄酯的无机盐培养基中进行邻苯二甲酸丁基苄酯的实验,故取生活污水处理厂的活性污泥进行培养和驯化.

(1)将活性污泥分别加入 2 支 5 mL 液体培养基中培养.

(2)将菌液倒入 100 mL 液体培养基中进行扩大培养.

(3)离心 20 min,速度 150r/min,倒去上清液.

将收集到的菌体加入 100 mL 的 100 mg/L BBP 无机盐溶液中在 30 °C 进行摇瓶培养 24h.然后离心分离培养液 20 min,速度为 150 r/min,倒去上清液,和收集菌体加入到 100 mL 的 200 mg/L BBP 无机盐溶液中继续培养.重复上述步骤在 200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L 和 700 mg/L 的培养基中驯化.最后驯化离心完毕后用缓冲溶液冲洗菌体,继续离心分离 1 次,条件如上.

1.4 BBP 的生物降解试验

在已灭菌的无机盐溶液中加入 BBP 溶液,以 BBP 做为唯一碳源,使 BBP 浓度分别为 100 mg/L、300 mg/L、500 mg/L,每个浓度至少做 3 个平行样,加入经过驯化的接种物,放入恒温振荡 30 °C 培养箱中培养,并设不加接种物的对照试验,分别于 4、8、12、24、36、48、72 和 96 h 取样 1 mL,随行补足,按样品处理方法制备样品溶液,精密吸取一定量样品溶液注入高效液相色谱仪测定 BBP 含量,并应用液相色谱-质谱联用仪进行降解产物分析.

1.5 分析方法

样品处理方法:于试样瓶中加入 10 mL 氯仿振

荡萃取 3 次,合并萃取液,挥散至干,残渣加 5 mL 甲醇定容,采用 RP-HPLC 方法测定 BBP 含量.

HPLC 及 HPLC-MSⁿ 测定条件:色谱柱: HPODS 色谱柱(250 mm × 4 mm, 5 μm);流动相:甲醇水(80:20);流速:0.8 mL/min;检测波长:228 nm;进样量:20 μL;柱温:25 °C;质谱仪所用离子源为大气压电喷雾源;干燥气(N_2)温度:325 °C;干燥气流速:8.00 L/min.

2 结果与讨论

2.1 BBP 标准曲线的绘制及线性范围

将 BBP 溶于甲醇中分别配制成 0.175、0.7、2.8、11.2、33.6、56 mg/L 不同浓度的 BBP 标准溶液,精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,以邻苯二甲酸丁基苄酯的浓度(c)为横坐标,积分面积(A_{US})值为纵坐标,得标准曲线为 $y = 2 \times 10^6 x - 1547.7$, $R = 0.9999$,结果表明 BBP 在 0.001 75 ~ 0.565 6 μg 范围内呈良好的线性关系.

2.2 BBP 的回收率及精密度测定

分别于已灭菌的无机盐溶液中加入已知的不同浓度 BBP 溶液,按实验操作方法提取、分离、测定,测得 BBP 的萃取回收率为 $(97.67 \pm 1.24)\%$ ($n = 5$),日内精密度 $< 2.8\%$ ($n = 5$),日间精密度 $< 3.15\%$ ($n = 5$).

2.3 活性污泥对 BBP 降解反应的动力学分析

为了解活性污泥降解 BBP 的动力学性质,试验在一定活性污泥量条件下,考察活性污泥对初始浓度为 100、300 和 500 mg/L 的 BBP 降解率,测定结果见图 1 和表 1.

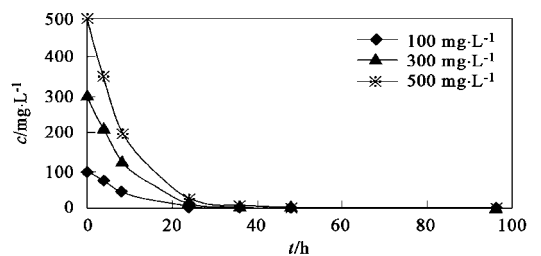


图 1 活性污泥对不同初始浓度 BBP 的降解

Fig. 1 Degradation of BBP at different concentration by activated sludge

图 1 结果表明, BBP 能被迅速降解, 初始浓度为 100 mg/L 时, 在 1 d 内降解率为 90% 以上, 4 d 内被完全降解, 说明活性污泥菌具有高效的降解作用, 是

一高效的邻苯二甲酸丁基苄酯降解菌群.由表 1 可知,活性污泥菌对 BBP 的生物降解反应符合一级动力学特征即 $\ln c = -k + A$,由不同初始 BBP 浓度的降解速率可以看出,其降解速率常数随着 BBP 浓度

增加而降低,半衰期 $t_{1/2}$ 随着 BBP 浓度增加而增加,说明高浓度的 BBP 对其生物降解有抑制作用,且随着 BBP 初始浓度的增加而增加.

2.4 BBP 生物降解产物分析

表 1 BBP降解动力学方程				
Table 1 Dynamical equation of degradation of BBP				
初始 BBP 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	动力学方程	半衰期 $t_{1/2}/\text{h}$	降解速率常数 $k_{\text{B}}/\text{d}^{-1}$	相关系数 r
100	$\ln c = -0.0699x + 5.6171$	9.92	0.069 9	0.941 2
300	$\ln c = -0.0683x + 8.4083$	10.15	0.068 3	0.932 4
500	$\ln c = -0.0583x + 7.2806$	11.89	0.058 3	0.945 1

通过活性污泥降解 BBP 一定时间的 HPLC-UV 色谱图(图 2、3),在保留时间 1.407 min、1.832 min 处确定了 2 个代谢产物.并分析各自的二级碎片离子鉴定各代谢产物,降解产物 M_1 的一级质谱图提示相应的分子量为 256(图 4).从二级质谱图的 211(失去 $-\text{COO}$)及 149(邻苯二甲酸酐)(图 5),确定降解物 M_1 为邻苯二甲酸苄酯.而降解产物 M_2 的一级质谱图提示相应的分子量为 222(图 6),从二级质谱图的 177(失去 $-\text{COO}$)及 149、121(苯甲酸)碎片峰(图 7),确定降解物 M_2 为邻苯二甲酸丁酯.

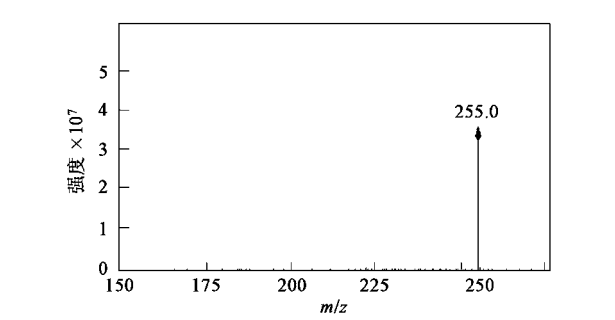


图 4 降解产物 M_1 ($t_{\text{R}} = 1.4 \text{ min}$) 的质谱图
Fig.4 Mass spectra of metabolites M_1 ($t_{\text{R}} = 1.4 \text{ min}$)

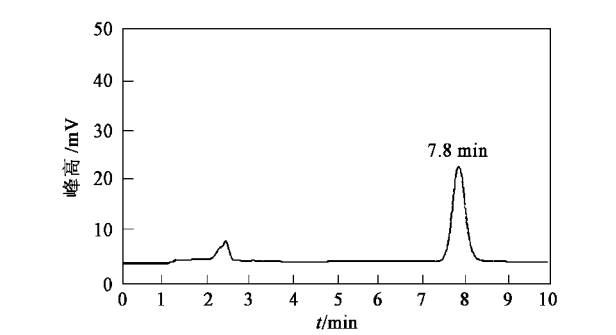


图 2 未降解的 BBP 色谱图
Fig.2 Chromatogram of BBP undegraded

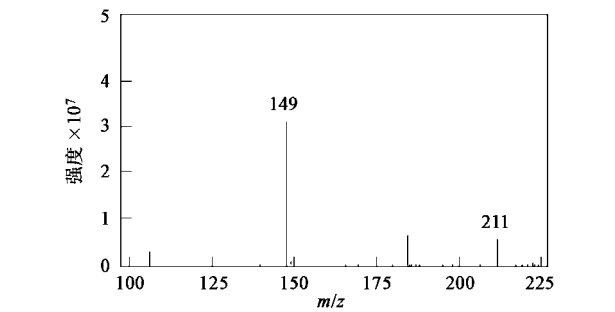


图 5 m/z 255 的质谱图
Fig.5 Mass spectra of m/z 255

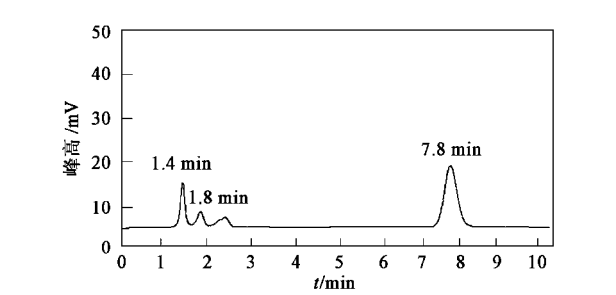


图 3 降解一定时间的色谱图
Fig.3 Chromatogram of degradation on a definite time

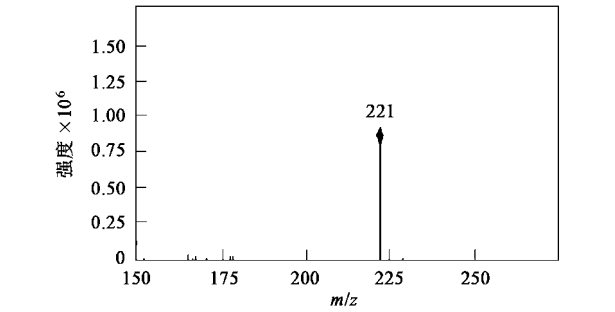


图 6 降解产物 M_2 ($t_{\text{R}} = 1.8 \text{ min}$) 的质谱图
Fig.6 Mass spectra of metabolites M_2 ($t_{\text{R}} = 1.8 \text{ min}$)

2.5 BBP 生物降解途径

根据降解产物质谱图解析结果,推测 BBP 的生物降解途径为:

邻苯二甲酸丁基苄酯首先在微生物酯酶的作用下水解生成邻苯二甲酸丁酯和邻苯二甲酸苄酯单酯类化合物,然后变成邻苯二甲酸,最终氧化成 CO_2 和 H_2O . 反应式:

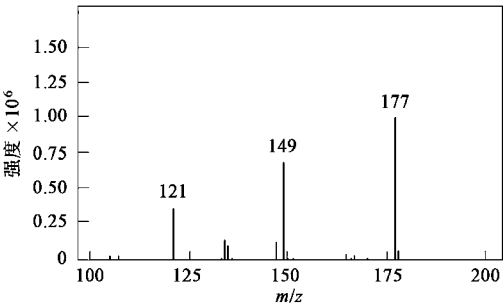
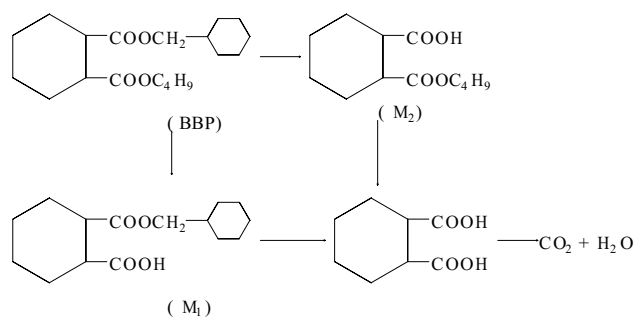


图 7 m/z 221 的质谱图

Fig. 7 Mass spectra of m/z 221

3 结论

(1) 活性污泥对 BBP 的降解符合一级动力学特征,具有高效的降解作用,降解速率常数随着 BBP 浓度增加而降低,说明高浓度的 BBP 对其生物降解有抑制作用,且随着 BBP 初始浓度的增加而增加.

(2) 从活性污泥对邻苯二甲酸丁基苄酯的降解物中鉴定出 2 种产物,分别为邻苯二甲酸丁酯和邻苯二甲酸苄酯.

参考文献:

[1] Parkerton T F, Konkel W J. Application of quantitative structure activity relationships for assessing the aquatic toxicity phthalate esters[J]. Ecotoxicol. Environ. Safety, 2000, 45(1) : 61 ~ 78 .

[2] 张锡辉. 高等环境化学与微生物学原理及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 147 ~ 149 .

[3] 李文兰, 季宇彬, 杨波, 等. 环境中邻苯二甲酸丁基苄酯的雌激素生物活性[J]. 城市环境与城市生态, 2003, 16(1) : 22 ~ 24 .

[4] 李文兰, 季宇彬, 杨玉楠, 等. 邻苯二甲酸丁基苄酯的生殖毒性及其作用机制[J]. 环境科学, 2004, 25(1) : 7 ~ 13 .

[5] Smith S R. Agricultural recycling of sewage and the environment [M]. Wallingford: CAB International, 1996. 207 ~ 236 .

[6] Cantreeds W. Comparison Between the Organic Fraction of Suspended Matter at a Background and an Urban Station[J]. Total Environ., 1997, 8(1) : 79 ~ 88 .

[7] 莫测辉, 蔡全英, 吴启堂, 等. 我国城市污泥中邻苯二甲酸酯的研究[J]. 中国环境科学, 2001, 21(4) : 362 ~ 366 .

[8] 夏凤毅, 郑平, 周琪, 等. 7 种邻苯二甲酸酯的模拟曝气降解性研究[J]. 环境科学, 2002, 23(增刊) : 11 ~ 15 .

[9] 曾锋, 康跃惠, 傅家谟, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯酶促降解性研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(1) : 13 ~ 17 .

[10] 曾锋, 傅家谟, 盛国英, 等. 邻苯二甲酸二丁酯的酶促降解性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(5) : 477 ~ 482 .