

增塑剂酞酸二丁酯的微生物降解*

程 桂 荪 刘 小 秧

(中国农业科学院土壤肥料研究所)

目前国内外塑料制品的生产和使用与日俱增。该类产品性质都很稳定,不易被降解。由于塑料废物积累而造成的污染已引起世界的关注。

增塑剂决定了塑料制品的坚实,耐久性质。1984年 Sugatt 等人报道了十四种商品邻苯二甲酸酯的生物降解^[1],其中不包括酞酸二丁酯。

酞酸二丁酯又称邻苯二甲酸二丁酯(DNBP),分子式为 $C_6H_4(CO_2C_4H_9)_2$, 由于 DNBP 是我国最常用的增塑剂之一,故本研究探索 DNBP 的微生物降解。从受 DNBP 污染的土壤中分离到细菌 56 株,真菌 2 株,它们均能以 DNBP 为碳源而生长。用其中 6 株细菌和活性污泥分别接种灭菌土壤,发现它们都能加速 DNBP 的降解,其中有二株降解能力较强的菌株(即 23 号和 20 号菌),培养 50 d 对 DNBP 的降解率分别为 72.2% 和 82.7%,有希望用来处理被 DNBP 污染的土壤和水。

一、材料和方法

1. 样品的采集 从北京试剂厂,无锡、苏州、上海溶剂厂排污处取土样。

2. 降解菌分离

(1) 土壤悬液制备 称 10g 土壤于装有 90 ml 无菌水的三角瓶中加以振荡。

(2) 分离用培养基

分离真菌用培养基: $NaNO_3$ 3g; K_2HPO_4

1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g; KCl 0.5g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g; DNBP 30g; 琼脂 15g; 蒸馏水 1000ml; 121℃ 灭菌 0.5 h。

分离细菌用培养基: K_2HPO_4 1g; KNO_3 0.5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g; $CaCl_2$ 0.1g; $FeCl_3$ 0.01 g; NaCl 0.1g; DNBP 30 g; 琼脂 15 g; 蒸馏水 1000 ml, 121℃ 灭菌 0.5 h。

该两种培养基在灭菌后,摇匀,倒平板,使 DNBP 能均匀地分布在培养基里,培养基因此成乳白色。

(3) 分离与纯化 用 0.1 ml 不同浓度的土壤悬液在分离用培养基上以平板法进行分离,然后挑取单个菌落,在同样的培养基上划线,反复纯化三次,再转接于试管斜面上。

3. 验证菌种对 DNBP 的依赖性

采取上述培养基但不加 DNBP, 将所分离的菌分别涂于平板上,再用无菌小滤纸沾无菌 DNBP 放于平板上观察滤纸周围是否有菌生长,并以不沾 DNBP 的小滤纸作空白对照。

4. 土壤中 DNBP 的微生物降解试验

取 100 ml 三角瓶,每瓶装风干经 1 mm 筛的土壤 10 g, 160℃ 灭菌 4 h, 冷却后加 DNBP 1 ml 混匀, 分别接种 2.5 ml 纯培养微生物悬液或污染区土壤活性污泥悬液。设两种对照,灭菌土壤加无菌水 2.5 ml; 未灭菌土

* 中国科学院科学基金资助的课题。

壤(土壤不灭菌)加 2.5 ml 未灭菌的自来水,放在 28℃ 培养。分别于第 0, 7, 20, 50 d 取样分析,每处理三瓶。在培养期间因土壤水分挥发,每瓶添加无菌水 2.5 ml。

5. DNBP 的测定*

培养完毕后,在原来培养用的三角瓶中直接加入提取液,每瓶加 10 ml 二氯甲烷,加玻璃塞后振荡 0.5 h。然后在冰浴条件下迅速过滤,取 2 ml 滤液混以 2 ml 正己烷,用美国产气相色谱仪 Sigma 2B 型测定。色谱柱 OV101 3.8%/chro-mosorb W-AW-DMCS 填充柱 80—100 目,柱长 2m,柱内 31.8mm,检测器 FID,检测室温度 340℃,载气 35 ml/分,进样量 2 μ l。

用标准 DNBP 配制标准样品。按浓度顺序,依次分别加入装 10 g 土壤的 100ml 三角瓶中,提取方法同上,绘制标准曲线。标准曲线与样品均通过测定峰面积求出 DNBP 含量。

二、结果

通过平板法得到降解 DNBP 的细菌 56 株,真菌 2 株,上述菌株能在以 DNBP 为唯一碳源的培养基上生长,它们均能以 DNBP 为生长繁殖的碳源,故认为它们能利用降解 DNBP。用滤纸块沾 DNBP 的试验更证实了这点,培养基表面涂满了细菌,但因缺乏碳源而不能生长,却在滤纸块附近生长了,说明它们从 DNBP 获得了碳素营养。

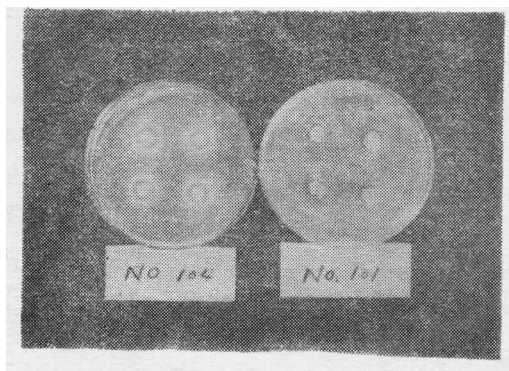


图 1 滤纸片试验

图 1 所示试验结果验证菌种对 DNBP 的依赖性。整个培养基表面均接菌,左皿接 104 号菌,右皿接 101 号菌。由于培养基不含碳源,所接的菌不能生长,而在沾有 DNBP 的滤纸片上及周围生长了,说明它们能以 DNBP 为其唯一的碳源,也就是能降解 DNBP。

某些菌株,如菌株 20 号,23 号在含 DNBP 培养基上生长,由于明显地利用了 DNBP,使菌落四周培养基由乳白色变透明(见图 2)。

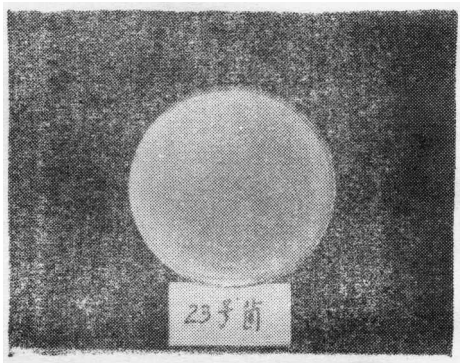


图 2 含 DNBP 培养基上菌落生长情况

图 2 中 23 号菌株的菌落生长在含 DNBP 培养基上,使菌落四周培养基由乳白色变透明。

将分离所得的降解菌接种于含 DNBP 的土壤中,可以观察到在土壤中生长,形成各自不同颜色、形状的菌落(见图 3)。

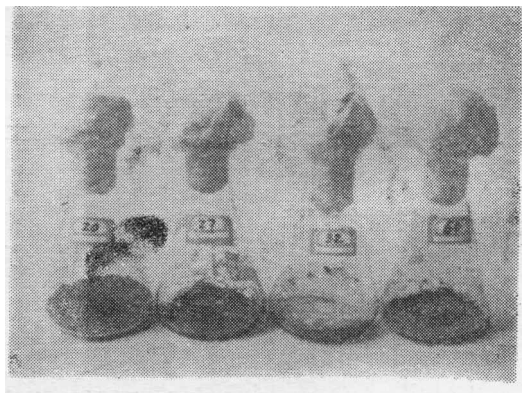


图 3 在含 DNBP 土壤上四种菌的生长情况

在降解实验中,将降解菌分别接种到含 DNBP 的灭菌土壤中,肉眼可以观察到 20,

27、60 号瓶内土壤表面各生长有黄、白、红色细菌菌落, 32 号为白色真菌。

从分离到的 58 个菌株中, 挑选在人工培养基上生长良好的 24 个菌株接种于土壤, 进行初次降解试验, 从中再选取降解力强的 6 株细菌和两种污泥作进一步培养, 定期测定其降解能力。经 50 天培养, DNBP 在灭菌不接种土壤中基本上没有变化, 在未灭菌土壤中降解 14.1%, 接种菌株 4; 32, 60, 27 号 and 用苏州、北京溶剂厂活性污泥时, DNBP 的降解率为 20.3% 至 50.5%, 用 23 号菌接种后 DNBP 降解率为 72.2%, 接种 20 号菌时降解率最高为 82.7% (见图 4)。

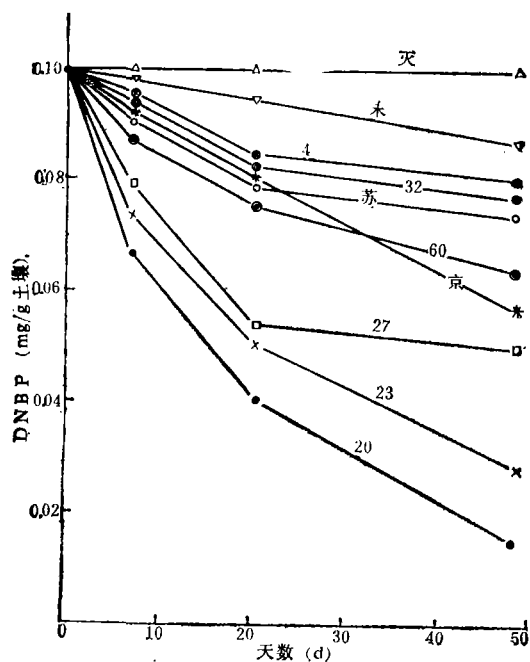


图 4 土壤接种微生物或活性污泥后 DNBP 的降解情况

灭——灭菌土壤 未——未灭菌土壤 4, 32, 60, 27, 23, 20——菌株号 苏, 京——苏州、北京溶剂厂污泥

DNBP 的降解菌大部分是细菌, 把它们的纯培养物接种到 DNBP 的土壤中, 能不同程度地引起 DNBP 的降解, 个别菌株表现出很强的降解力。也分离到两株真菌能在以 DNBP 为唯一碳源的培养基上生长, 但作为

纯接种剂时, 没有明显地引起 DNBP 降解。

由于 23 号和 20 号菌具有较强的降解能力, 我们已对该两菌进行鉴定, 结果如下:

23 号菌是荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 其特征为革兰氏阴性, 端生鞭毛, 接触酶阳性, 兼性好气, 细胞色素氧化酶阳性, 在葡萄糖、果糖培养基上生长, 产碱, 不发酵, 在 King B 培养基上产生荧光色素。

20 号菌是野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*), 杆状, 革兰氏阴性, 端生鞭毛, 接触酶阳性, 好气, 细胞色素氧化酶阴性, 在葡萄糖、果糖培养基上生长, 产酸, 不发酵, 产生黄色非水溶性色素。

三 讨论

1. DNBP 在灭菌土壤中不被降解, 说明 DNBP 降解是由微生物引起的。

2. 在 28℃ 培养 50d, 未灭菌不接种土壤中 DNBP 降解 14.1%, 说明在自然界 DNBP 能被土壤微生物降解, 但是降解效率很低。

3. 从 DNBP 污染的土壤中分离出的细菌 56 株真菌 2 株能生长在以 DNBP 为唯一碳源的培养基上。

4. 接种降解菌 4, 32, 60, 27, 23, 20 号和活性污泥, 均能加速 DNBP 的降解。

5. 所分离到的荧光假单胞菌和野油菜黄单胞菌具有较强的降解能力, 有希望用来处理 DNBP 污染的土壤及污水。

测定方法按照北京市环保所全文熠, 许征帆提供方法。菌种鉴定工作经中科院微生物所王大昶, 武汉大学生物系彭珍荣, 中国农科院菌保中心陶天申、梁绍芬同志的指导和帮助。特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Sugatt R. H., *Appl. Envi. Micro.*, **47**, 601 (1984).