

不同菌源的微生物对邻苯二甲酸二乙酯生物降解性的比较*

曾锋¹, 傅家谟¹, 盛国英¹, 杨惠芳² (1. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室和广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要: 从处理石化厂废水的活性污泥中分离出1株邻苯二甲酸酯降解菌 FS1 (荧光假单胞菌, *Pseudomonas fluorescens*), 从处理焦化厂废水的活性污泥中分离出2株邻苯二甲酸酯降解菌 FS2 (铜绿假单胞菌, *Pseudomonas aeruginosa*)、FS3 (短杆菌, *Brevibacterium* sp.). 研究 FS1、FS2和 FS3对邻苯二甲酸二乙酯的最适降解条件, 比较了其降解特性. FS1、FS2和 FS3最适酸度分别为 pH 6.5~8.0、pH 7.0~8.0和 pH 7.0~8.0, 温度为20~35℃、15~35℃和15~35℃. FS1、FS2、FS3对邻苯二甲酸二乙酯的降解的半寿期: FS1<FS2<FS3, FS1是1株高效的邻苯二甲酸二乙酯降解菌.

关键词: 邻苯二甲酸二乙酯, 微生物, 生物降解, 降解动力学.

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)01-0062-04

The Comparative Study on Biodegradability of Diethyl Phthalate by Microorganisms from Different Sources*

Zeng Feng¹, Fu Jiamo¹, Sheng Guoying¹, Yang Huifang² (1. State Key Lab. of Organic Geochemistry, Guangdong Key Lab. of Environ. Protection and Resources Utilization, Guangzhou Institute of Geochemistry, CAS, Guangzhou 510640, China; 2. Institute of Microbiology, CAS, Beijing 100080)

Abstract: The microbial degradative characteristics of Diethyl Phthalate (DEP) was investigated by strains FS1 (*Pseudomonas fluorescens*), FS2 (*Pseudomonas aeruginosa*) and FS3 (*Brevibacterium* sp.) that were isolated from the activated sludge at a petrochemical factory and a pyrochemical factory. The optimum pH of the strains FS1, FS2, FS3 for degrading of diethylphthalate are 6.5~8.0, 7.0~8.0 and 7.0~8.0; the temperature are 20~35℃, 15~35℃ and 15~35℃, respectively. The degradation of diethylphthalate by the strains FS1, FS2, FS3 can be described by the first-order reaction model. Primary biodegradation half-lives of DIBP: FS1<FS2<FS3. The experimental results demonstrated that the strain FS1 has strong ability to degrade diethylphthalate.

Keywords: biodegradation, degradative kinetics, microorganism, diethylphthalate.

由于塑料制品的广泛使用, 邻苯二甲酸酯类增塑剂的产品日益增加; 邻苯二甲酸酯类有机化合物造成的环境污染问题, 已引起全球性的特别关注^[1]. 关于邻苯二甲酸酯类有机污染物在土壤、天然水体、废水等方面的生物降解性研究已有一些报道^[2~7]. 为寻求高效的邻苯二甲酸酯降解菌株, 有效解决邻苯二甲酸酯类化合物的环境污染, 本试验从处理石化厂废水的活性污泥中分离出1株邻苯二甲酸酯降解菌 FS1, 从处理焦化厂废水的活性污泥中分离出2株邻苯二甲酸酯降解菌 FS2、FS3. 研究了邻苯

二甲酸酯降解菌 FS1、FS2、FS3对邻苯二甲酸二乙酯的最适降解条件, 比较了其降解特性.

1 实验材料和方法

1.1 培养基

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1g/L, NaCl 1g/L,
 NH_4NO_3 0.5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4g/L,

* 国家自然科学基金资助项目 (Project Supported by the National Natural Science Foundation of China): 49632060; 广东省自然科学基金资助项目: 963043
作者简介: 曾锋 (1945~), 男, 理学博士生, 讲师, 主要研究方向为环境分析化学和环境微生物学.
收稿日期: 1999-03-31

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L, FeCl_3 0.01g/L, pH 7, 121℃ 湿热灭菌30m in. 邻苯二甲酸酯(Diethyl Phthalate, DEP).

1.2 菌种及其培养

分别取处理石化厂废水的活性污泥、焦化厂废水的活性污泥于含60m g/L 邻苯二甲酸酯(邻苯二甲酸二甲酯, 邻苯二甲酸二乙酯, 邻苯二甲酸二丁酯, 邻苯二甲酸二异丁酯, 邻苯二甲酸二正辛酯, 邻苯二甲酸二(乙基己基)酯各10m g/L)的无机盐培养液中, 30℃ 振荡培养7d, 逐步转接至120m g/L、240m g/L、360m g/L ~ 1200m g/L 邻苯二甲酸酯的无机盐培养液后, 平板划线纯化. 从处理石化厂废水的活性污泥获得1株邻苯二甲酸酯降解菌 FS1(荧光假单胞菌, *Pseudomonas fluorescens*), 从处理焦化厂废水的活性污泥获得2株邻苯二甲酸酯降解菌 FS2 (铜绿假单胞菌, *Pseudomonas aeruginasa*)、FS3 (短杆菌, *Brevibacterium* sp.).

1.3 生物降解试验

取菌株一环于100m l 活化富集培养基中(3g/L 牛肉膏、5g/L 蛋白胨、NaCl 5g/L、pH 7, 121℃ 湿热灭菌30m in) 振荡培养12~ 24h, 离心分离(10000r/m in) 5m in, 收集菌体, pH 7、0.02m ol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液洗涤3次, 用0.02m ol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液将菌体配成 pH 7的菌悬液.

吸取1m l 20% 的菌悬液于含100m g/L 邻苯二甲酸二乙酯的50m l 无机盐培养液中, 30℃ 振荡培养, 并用不加菌体的培养液进行了对照试验. 每隔6h 测定样品中邻苯二甲酸二乙酯的含量.

1.4 分析方法

本实验试验时间为4d, 每隔6h 分析1次样品中的邻苯二甲酸二乙酯含量, 一个系列32瓶(样品16瓶, 对照16瓶), 取样量为50m l(每次1瓶50m l), 然后, 绘制 $c\text{-}T$ 曲线, 对其降解速率进行比较, 确定最适条件.

样品处理: 于试样瓶中加入20m l 二氯甲烷, 振荡萃取10m in, 收集有机相. 水相再用

20m l 二氯甲烷萃取3次, 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩至5m l. 用 HP6890型气相色谱仪测定邻苯二甲酸二乙酯的含量.

HP6890型气相色谱仪条件: HP5柱(30m $\times$ 320 μm $\times$ 0.25 μm), 柱温从80℃ 以35℃ /m in 的速率升到290℃ ; FID 检测器, 温度300℃ ; 进样口温度260℃ , 进样量1 μl .

2 结果与讨论

2.1 菌株 FS1、FS2、FS3对邻苯二甲酸二乙酯的最适降解条件

按试验方法, 分别以邻苯二甲酸酯降解菌 FS1、FS2、FS3, 测定在不同 pH、温度、菌种量、振荡速率等条件下, 对邻苯二甲酸二乙酯降解的影响. 菌株 S1、FS2、FS3对邻苯二甲酸二乙酯的最适降解条件, 见表1.

表1 菌株 FS1、FS2和 FS3对邻苯二甲酸二乙酯的最适降解条件

菌种	pH	温度/℃	菌种量/%	振荡速率/ r·m in ⁻¹
FS1	6.5~ 8.0	20~ 35	> 0.02	> 60
FS2	7.0~ 8.0	15~ 35	> 0.02	> 60
FS3	7.0~ 8.0	15~ 35	> 0.02	> 60

2.2 菌株 FS1、FS2和 FS3对邻苯二甲酸二乙酯降解反应的动力学分析

为了解邻苯二甲酸酯降解菌 FS1、FS2、FS3对邻苯二甲酸二乙酯降解反应的动力学性质, 试验在一定条件下, 考察菌株 FS1、FS2、FS3对初始浓度为25m g/L、50m g/L、100m g/L、200m g/L、300m g/L、400m g/L 的邻苯二甲酸二乙酯降解率, 结果见图1、图2和图3.

假设菌株 FS1、FS2和 FS3对邻苯二甲酸二乙酯的生物降解遵循一级反应动力学方程, 即:

$$\ln c = -kt + A$$

式中, k 系表征邻苯二甲酸二乙酯降解速率的动力学常数.

根据图1、图2和图3结果可得表2的动力学方程.

由表2可知, 邻苯二甲酸酯菌株FS1、FS2

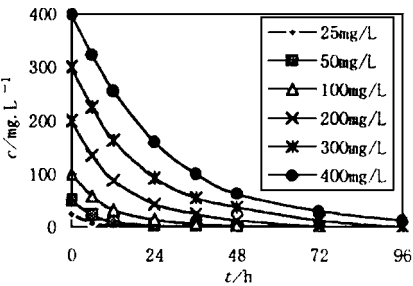


图1 菌株 FS1 对不同浓度邻苯二甲酸二乙酯的降解(30℃)

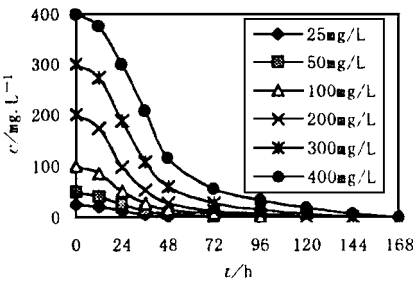


图2 菌株 FS2 对不同浓度邻苯二甲酸二乙酯的降解(30℃)

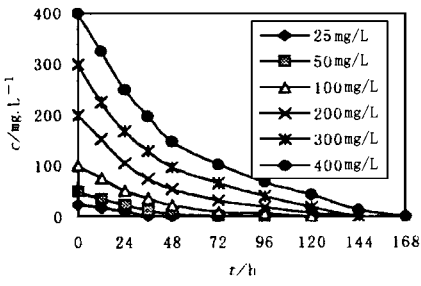


图3 菌株 FS3 对不同浓度邻苯二甲酸二乙酯的降解(30℃)

和 FS3 对邻苯二甲酸二乙酯的生物降解反应符合一级动力学特征, 其半寿期 $t_{1/2}$: FS1 < FS2 < FS3, 邻苯二甲酸酯菌株 FS1 对邻苯二甲酸二乙酯具有高效的降解作用, 是一株高效的邻苯二甲酸二乙酯降解菌^[8]. 对于邻苯二甲酸酯菌株 FS1、FS2, 当邻苯二甲酸二乙酯的初始浓度大于 200mg/L 时, 降解速率常数 k 值随初始的邻苯二甲酸二乙酯浓度增加而降低, 说明高浓度的邻苯二甲酸二乙酯对其降解有抑制作用, 且随邻苯二甲酸二乙酯初始浓度增加而增加.

表2 菌株 FS1、FS2 和 FS3 对邻苯二甲酸二乙酯的生物降解反应动力学方程

菌株	初始 DEP 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	动力学方程	半寿期 $t_{1/2}/\text{h}$	r
FS1	25	$\ln c = -0.0894t + 3.22$	7.75	0.9628
	50	$\ln c = -0.0850t + 3.91$	8.15	0.9741
	100	$\ln c = -0.0823t + 4.61$	8.42	0.9587
	200	$\ln c = -0.0803t + 5.30$	8.63	0.9652
	300	$\ln c = -0.0633t + 5.70$	10.95	0.9486
	400	$\ln c = -0.0555t + 5.99$	12.49	0.9713
FS2	25	$\ln c = -0.0383t + 3.22$	18.09	0.9625
	50	$\ln c = -0.0383t + 3.91$	18.09	0.9714
	100	$\ln c = -0.0381t + 4.61$	18.19	0.9578
	200	$\ln c = -0.0376t + 5.30$	18.34	0.9613
	300	$\ln c = -0.0340t + 5.70$	20.38	0.9489
	400	$\ln c = -0.0278t + 5.99$	24.90	0.9635
FS3	25	$\ln c = -0.0283t + 3.22$	24.48	0.9527
	50	$\ln c = -0.0283t + 3.91$	24.48	0.9812
	100	$\ln c = -0.0274t + 4.61$	25.29	0.9629
	200	$\ln c = -0.0275t + 5.30$	25.20	0.9511
	300	$\ln c = -0.0271t + 5.70$	25.57	0.9374
	400	$\ln c = -0.0270t + 5.99$	25.60	0.9428

而邻苯二甲酸酯菌株 FS3对邻苯二甲酸二乙酯的生物降解浓度具有较大的适宜范围.

3 小结

(1)从处理石化厂废水的活性污泥中分离的邻苯二甲酸酯降解菌 FS1和从处理焦化厂废水的活性污泥中分离的邻苯二甲酸酯降解菌 FS2和 FS3均能以邻苯二甲酸二乙酯作为唯一碳源和能源生长. 菌株 FS1降解最适酸度为 pH 6.5~8.0, 温度为20~35℃; 菌株 FS2和 FS3降解最适酸度为 pH 7.0~8.0, 温度为15~35℃.

(2)邻苯二甲酸酯菌株 FS1、FS2、FS3对邻苯二甲酸二乙酯的生物降解反应符合一级动力学特征, 其降解能力: 菌株 FS1> 菌株 FS2> 菌株 FS3. 邻苯二甲酸酯菌株 FS1对邻苯二甲酸二乙酯具有高效的降解作用, 是一株高效的邻苯二甲酸二乙酯降解菌. 对于邻苯二甲酸酯菌株 FS1和 FS2, 当邻苯二甲酸二乙酯的初始浓度大于200mg/L 时, 降解速率常数 k 值随初始的邻苯二甲酸二乙酯浓度增加而降低, 说明高浓度的邻苯二甲酸二乙酯对其降解有抑制作用, 且随邻苯二甲酸二乙酯初始浓度增加而增加. 邻苯二甲酸酯菌株 FS3对邻苯二甲酸二乙

酯的生物降解浓度具有较大的适宜范围.

参考文献

- 1 Ye Changming. Phthalate esters in environment. *Advance in Environmental Science*, 1993, 1(2): 36~47
- 2 王建龙, 吴立波, 施汉昌, 钱易. 驯化活性污泥降解邻苯二甲酸酯类化合物的研究. *环境科学*, 1998, 19(1): 18~20
- 3 Ye Changming, Tian Kang. Kinetics of biodegradation reaction of phthalate esters. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1989, 9(1): 37~41
- 4 Ejlerstsson J, Meyerson U, Svensson B H. Anaerobic degradation of phthalic acid esters during digestion of municipal solid waste under landfilling conditions. *Biodegradation*, 1996, 7(4): 345~352
- 5 Yan H, C G Ye, C Q Ye. Kinetics of Phthalate Ester Biodegradation by *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1995, 14(6): 931~938
- 6 Chauret C, Inniss W E, Mayfield C I. Biotransformation at 10℃ of di-n-butyl phthalate in subsurface microcosms. *Ground Water*, 1996, 34(5): 791~794
- 7 Chen Yinxu, Shen Dongsheng, Hu Zhiqiang et al. Degradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1997, 17(3): 340~345
- 8 Charles A S, Peterson D R, Parkerton T F et al. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*, 1997, 35(4): 667~749

敬告作者

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》, 其作者文章著作权使用费包含在本刊所付稿酬内. 如作者不同意将文章编入该数据库, 请在来稿时声明, 本刊将做适当处理.

《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社

E-mail 地址: CAJ-CD@tsinghua.edu.cn

《环境科学》编辑部专用 E-mail 地址: HJKZ@chinajournal.net.cn

《中国期刊网》网址: WWW.chinajournal.net.cn