

壬基酚初级生物降解产物的辨认

郝瑞霞, 梁鹏, 赵曼, 周玉文

(北京工业大学建筑工程学院, 北京 100022)

摘要: 为分析污水生物处理过程中壬基酚的去除机制, 采用混合基质加标对照培养活性污泥、单一基质培养优势菌群 2 种生物降解实验, 结合气相色谱-质谱图解析, 从分子水平分析了壬基酚初级代谢产物和代谢途径。研究结果表明, 活性污泥降解壬基酚的初级代谢产物主要为 $C_4 \sim C_6$ 烷基取代苯酚, 烷基链的结构差异与其母体壬基的异构方式有关, 烷基上的支链主要为甲基; 优势降解菌群代谢壬基酚的初级产物除烷基苯酚外, 还有苯乙酸等。污水生物处理过程中壬基酚可能的初级生物代谢途径是壬基上的长支链断裂为短的甲基链, 生成一系列带有不同分支结构的短链烷基酚类代谢产物, 进一步的代谢产物有苯乙酸。根据烷基酚类物质的内分泌干扰特性, 短链烷基酚仍然具有雌激素活性, 因此在壬基酚污染防治过程中应给与足够的重视。

关键词: 壬基酚; 生物降解; 代谢产物; 质谱解析

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)04-1077-05

Recognition and Analysis on Primary Metabolites of Nonylphenol

HAO Rui-xia, LIANG Peng, ZHAO Man, ZHOU Yu-wen

(College of Architecture and Civil Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: In order to discuss the nonylphenol (NP) biodegradability effect in the wastewater treatment process, the primary metabolites and route of NP had been analyzed in the molecular level by the interpretation of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and the two experimental methods. A method was that activated sludge degraded two types of simulating sewage comparatively. Type-1 wastewater was made up of water, glucose, peptone and inorganic salts, and type-2 sewage was mixed up of NP and type-1 as comparison wastewater. The other experiment was that dominant bacteria group metabolized the culture medium contained NP as only organic carbon source. The results show that the NP primary metabolites from the activated sludge experiments are a series of short chain alkyl phenols with butyl, amyl or hexyls. There are different methyl branch structures correlated with isomeric nonyl of NP in the alkyls. The primary metabolites from the dominant bacteria experiment have alkyl phenols and benzene acetic. The bio-degradation pathways of NP would be that the long branches in nonyl of NP are firstly degraded into short methyl branches, which come into being a series of short chain alkyl phenols with different branch structures. The middle products should be further metabolized into simpler compounds, such as benzene acetic. Based on the endocrine disrupter characteristic of alkyl phenol compounds, the short chain alkyl phenol compounds still have estrogen hormone effect, and their environmental effect must be pay attention in the pollutant control of NP.

Key words: nonylphenol; biodegradation; metabolites; interpretation of mass spectrometry

壬基酚(nonylphenol, NP)是常用非离子表面活性剂壬基酚聚氧乙烯醚(nonylphenol polyethoxylates, NPnEO, n 为平均聚合度)在环境中的生物降解产物, 具有雌激素活性^[1]。目前对于 NPnEO 的生物降解机理基本明确^[2~6], 而有关 NP 在污水生物处理过程中的生物降解性能及其降解产物的研究则刚刚起步。已有研究表明, 在城市污水生物处理过程中 NP 的去除率为 80% 左右^[7], 但是作为污水中的痕量物质, NP 在污水生物处理过程中能否得到彻底降解还没有定论。Soares 等^[8]研究发现, 白腐真菌(White-rot Fungi)需要 25 d 时间才能将 97 ~ 99 mg/L 的壬基酚完全矿化; 由于壬基的分支程度不同, NP 存在多种同分异构体, 各种异构体的生物降解性和降解产物各不相同^[9~11]。一些研究者提出鞘磷脂异源菌(Sphingomonas xenophaga Bayram)作为壬基酚的优势

降解菌株, 能将 α 碳为季碳原子的壬基酚异构体代谢为与壬基碳链结构相同的壬醇类物质^[12]。

本研究分别采用混合基质加标对照培养活性污泥、单一基质培养优势菌群 2 种生物降解实验方法, 结合 NP 的气相色谱-质谱(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)谱图解析^[13~15], 分析了污水生物处理过程中壬基酚的生物降解特性及其初级生物降解产物。与已有文献相比, 本研究提出了活性污泥和从活性污泥中分离培养出的 NP 优势降解菌群对 NP 的初级代谢产物, 从分子水平分析了污水处理过

收稿日期: 2007-05-02; 修订日期: 2007-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(50778004); 北京市自然科学基金项目(8082006)

作者简介: 郝瑞霞(1960~), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为污水处理与资源化、环境分析与检测, E-mail: haoruxia@bjut.edu.cn

程 NP 的生物降解机制, 以期为壬基酚的污染控制提供基础数据.

1 材料与方法

1.1 实验仪器

气相色谱-质谱仪 GC-MSD(Agilent 6890N, 5973 inert), 配毛细管色谱柱 DB-XLB(0.25 mm × 30 m × 0.25 μm, 340/360℃). 12 歧管固相萃取装置(12-port Visiprep™ SPE Vacuum Manifold), 配 SPE 大容量进样装置(Visiprep™ Large Volume Sampler). 氮吹仪(N-EVAP™, Model 111 型).

1.2 消耗品

壬基酚(NP)标准品(技术级, 纯度 97%), 各种不同支链的同分异构体混合物, 东京化成. 正己烷、丙酮、二氯甲烷, 均为农残级, Fluke. WATERS Oasis® HLB 亲水-亲酯平衡萃取柱.

1.3 实验方法设计

由于污水中污染物成份复杂, NP 又为痕量组分, 其降解产物更是微乎其微, 定性分析时极易受到污水中共存污染物的干扰, 给降解产物的辨认带来困难. 为减少基体干扰, 便于 NP 降解产物的辨认, 分别采用以下 2 种实验方法.

1.3.1 混合基质加标对照培养活性污泥实验

用葡萄糖、淀粉、尿素、蛋白胨、磷酸二氢钾、碳酸氢钠等配制成空白模拟生活污水, 其 COD 值 450 ~ 550 mg/L, TOC 值 85 ~ 115 mg/L, NH_4^+ -N 值 55 ~ 70 mg/L, pH 值 6.5 ~ 7.5. 模拟实际污水处理过程, 用活性污泥分别降解空白配水和加入 NP 达饱和浓度(约 5 mg/L)的配水, 对比 2 种废水处理后的 GC-MS 总离子流图, 分析壬基酚的生物降解产物.

实验装置为 2 个容积为 5 L 的 SBR, 将运行稳定的活性污泥平均分为 2 份, 加入相同体积的配水, 其中一份添加 NP 并使之饱和(浓度约 5 mg/L), 以增大壬基酚及其降解产物的响应值, 将空白配水和加标配水分别在相同工况下曝气 8 h, 沉淀 1 h 后出水采样分析.

由于 NP 初级生物降解后可能出现类似芳香烃取代物或烷烃取代物, 极性较 NP 有所增强, 为在同一检测条件中, 检测到 NP 和更多的初级降解产物, 以 NP 的 SPE-GC-MS 检测方法^[16]为基础, 调整部分测定参数: 改用中等极性的二氯甲烷溶剂, 其极性强度高于原方法中的非极性正己烷与极性丙酮混合溶剂的极性, 有利于中等极性的初级生物降解产物提取; 升温程序改为起始温度 50℃, 以 20 °C/min 升温

到 200℃, 然后以 10 °C/min 升温到 300℃.

1.3.2 单一基质培养优势菌群降解实验

用单一碳源为 NP 的无机盐培养液培养、驯化、分离、扩增培养 NP 优势降解菌群, 分析 NP 的降解产物.

首先将用饱和 NP 驯化良好的活性污泥接种到富集培养基中, 富集培养基由 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.97 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.122 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/L NaCl、100 mg/L 壬基酚(为增大培养基中 NP 溶解度, 加入一滴吐温 80 乳化剂)、10 g/L 葡萄糖, 在 pH 7.0、35℃ 恒温培养 14 d 后进行扩增培养分离, 逐步降低葡萄糖的含量, 直至培养基中仅存 NP 单一碳源. 将分离扩增的 NP 优势降解菌液过滤, 分离出菌丝体, 一部分接种到 NP 为单一碳源(NP 浓度为过饱和)的无机盐培养液中, 接种量为 1%, 另取一部分高温灭活后作为对照, 每组各作 3 平行样, 分别在接种 1 d、3 d 后取样分析.

由于培养液中壬基酚浓度很高, 采用 SPE 方法提取富集培养液中的 NP, 有可能导致固相萃取柱过载. 因此本部分实验采用二氯甲烷溶剂萃取方法, 提取培养基中的壬基酚和降解产物, 萃取过程如下: 在分液漏斗中加入 10 mL 二氯甲烷和 10 mL 培养液样品, 混合萃取 10 min、静止 10 min 后, 分出溶剂相, 再向分液漏斗中加入 10 mL 二氯甲烷, 萃取 10 min, 重复上述步骤 3 次, 收集溶剂相混匀, 旋转蒸发仪浓缩至 5 ~ 10 mL, 转入氮气吹脱浓缩、二氯甲烷定容至 1 mL 备检. 该预处理方法的回收率在 66% ~ 85% 之间, 满足定性分析的需要, NP 检测方法同前.

2 结果与讨论

2.1 活性污泥降解 NP 的产物

图 1 为活性污泥降解空白配水和饱和 NP 配水 8 h 后出水的 GC-MS 色谱叠加图. 从中发现, 含饱和 NP 加标配水曝气结束后, 出水色谱图中除残余 NP 峰外, 还出现了 3 个在空白配水样品中所没有的色谱峰, 出峰时间分别为 7.30、8.16 和 8.78 min, 可以初步认为是壬基酚初级生物降解产生的 3 种新物质.

为识别和辨认壬基酚的初级生物降解产物, 借助 GC-MS 质谱检测器的定性功能, 并结合质谱标准谱库, 通过质谱图分析和标准谱库检索, 可对降解过程中出现的未知化合物进行结构分析, 初步确认壬基酚在活性污泥作用下可能产生的降解产物.

为分析和辨认 3 种降解产物的类型及其分子结

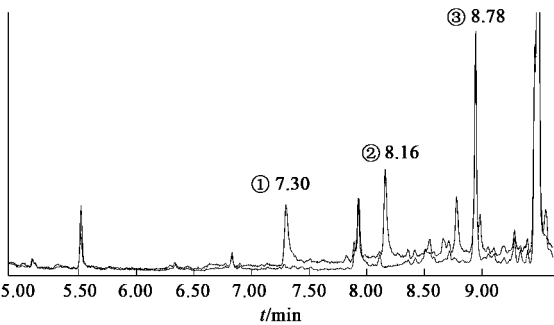


图 1 活性污泥降解空白配水和 NP 饱和配水色谱图(TIC)的叠加对比

Fig.1 Total ion current chromatographs from activated sludge degradation both blank and addition NP simulating wastewater

构,分别提取加标水样反应后色谱图中出峰时间在 7.30、8.16 和 8.78 min 的 3 个色谱峰的质谱图,见图 2~4.

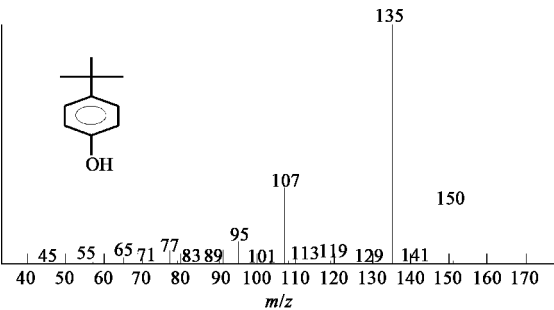


图 2 物质 1 质谱图及结构

Fig.2 Structure and mass chromatograph of No.1 byproduct of retain time 7.30 min

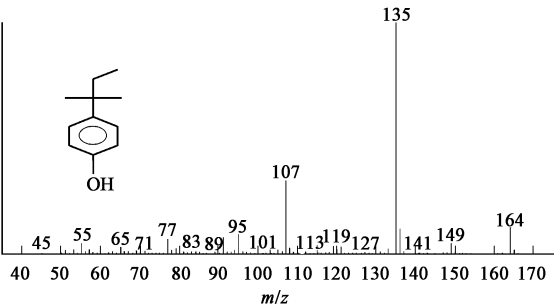


图 3 物质 2 质谱图及结构

Fig.3 Structure and mass chromatograph of No.2 byproduct of retain time 8.16 min

通过在质谱标准谱库中检索,确认保留时间为 7.30 min 的 1 号和 8.16 min 的 2 号物质极有可能为异丁基苯酚和异戊基苯酚,匹配度分别为 96% 和 97%;而保留时间为 8.78 min 的 3 号物质未能在标

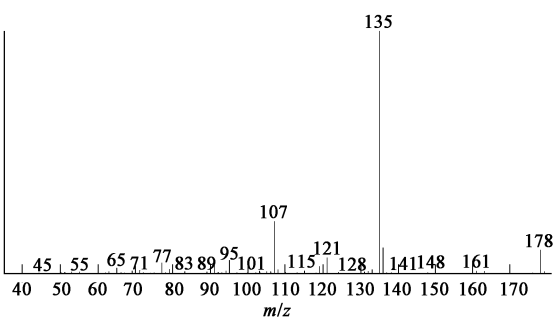
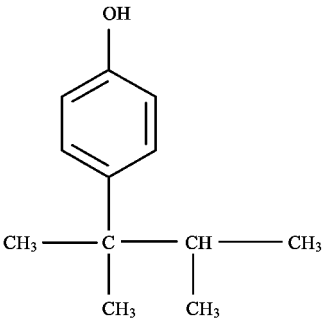


图 4 物质 3 质谱图

Fig.4 Mass chromatograph of No.3 byproduct of retain time 8.78 min

准谱库中检索到,需要通过谱图分析进一步确定其组成.

将 3 号物质与 1 号、2 号物质质谱图比对发现,3 种物质的质谱图很相似,都含有烷基酚类物质的特征质谱离子 m/z 为 107、135 的离子,而且丰度较高;3 种物质的分子离子峰分别为 150、164 和 178,其中 150 和 164 是丁基酚和戊基酚的分子量,而 178 比 164 大 14;根据烷基碳链规则 C_nH_{2n+2} ,14 恰好是 $-CH_2-$ 基团的式量,可以认为 3 号物质也是 1 种烷基酚,其烷基支链比戊基多 1 个 $-CH_2-$ 基团,为己基酚,它的支链结构可根据其质谱图离子峰的丰度比推测:与苯环相连的 α 碳原子与 1 号、2 号物质一样也为季碳原子,其中 2 个支链是甲基,因此另一支链是异丙基,故 3 号产物为异己基酚.其结构如图 5 所示.上述结果与 Gabriel 等^[12]的研究结果有所不同,也表明了壬基酚的活性污泥初级代谢途径具有多样性.



4-(1,1,2-三甲基-丙基)酚(4-(1,1,2-trimethyl-propyl) phenol)

图 5 物质 3 结构式与名称

Fig.5 Structure and chemical name of No.3 byproduct of retain time 8.78 min

分析 3 种烷基酚类降解产物的结构特点可知: ①烷基上 α 碳原子均为季碳原子,与环境中常见的

NP 壬基异构方式相似,表明 NP 降解产物的结构与其母体结构相关;②烷基上的支链多为短链的甲基,表明 NP 的代谢过程是从碳链末端开始逐级断链降解,由于壬基上的支链位置和大小不同,长的支链末端容易被降解成短链的甲基,故生成一系列短链烷基结构的代谢产物.

根据量子化学 Hammett 方程,烷基取代基为供电电子基团, α -C 位置支链越多其供电性越强,减弱了苯环对位上 $\text{ph}-\text{O}$ 键和 $\text{O}-\text{H}$ 键的活性,使酚羟基的化学反应活性减弱,故 NP 的生物代谢过程更多地表现出烷烃化合物碳链末端断链的代谢特征,而且短链烷基酚的生物惰性增加,生物难于进一步降解,容易残留在出水中.虽然上述降解机制的解释是从物质的化学反应机理方面考虑,但是从最新的环境化学研究成果看,在生物系统中的化学反应也受到与非生物系统中相同的机理支配.

综上所述,在污水生物处理过程中,NP 的降解是不彻底的,其初级生物降解途径具有多样性,壬基上的长支链断链降解是其中的一种方式,初级降解产物是一系列短链的烷基酚类化合物,烷基链结构差异与母体 NP 的壬基异构方式有关.

2.2 NP 优势降解菌群降解产物

为进一步分析壬基酚的初级生物代谢特征,利用由活性污泥分离培养出来的优势菌群降解 NP 为单一碳源的无机盐培养液.图 6 为优势菌群降解 NP 过饱和和培养液 1 d 后的总离子流色谱图,其中除了 NP 各同分异构体色谱峰外,在保留时间 7.10、8.16 min 各出现一强一弱 2 个色谱峰,分别提取 2 种产物的质谱图,与质谱标准谱库联机检索,发现保留时间为 7.10 min 的物质为苯乙酸,其质谱图和结构式如图 7 所示,该产物的出现进一步说明了壬基酚生物代谢的多样性特征;保留时间为 8.16 min 的物质与在活性污泥降解饱和 NP 配水实验中出现的 2 号产

物为同一结构物质,为戊基苯酚.2 种产物的检索匹配度均在 97% 以上.

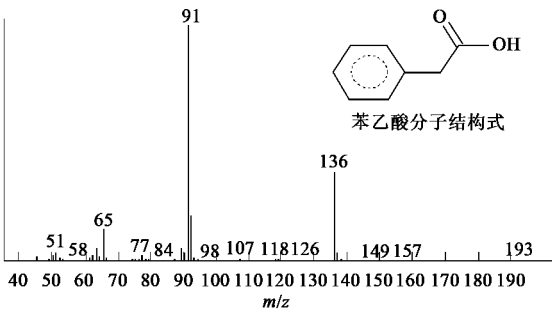


图 7 保留时间 7.10 min 产物质谱图与分子结构式
Fig.7 Mass chromatograph and structure formula of Benzene acetic acid for the byproduct of retain time 7.10 min

图 8 为优势菌群降解 NP 过饱和培养基第 3 d 时的 GC-MS 总离子流图.

由图 8 中看出,在 7.30、8.16 和 8.78 min 同样出现与活性污泥降解产物相同的异丁基酚、异戊基酚和异己基酚,进一步表明无论是活性污泥降解混合基质还是优势菌群降解单一基质,壬基酚的生物降解是不彻底的,其中短链烷基酚是 NP 的一类主要初级生物降解产物.

由于有机物的初级生物降解是母体化合物分子结构在微生物的作用下发生部分变化,改变了分子的完整性,但未从污水中去除,对环境的危害仍然存在.根据烷基酚类物质的内分泌干扰特性,壬基酚的初级生物降解产物仍然具有雌激素效应^[17~20],在壬基酚污染控制过程中应当引起重视.除此之外,在 8.82、8.96 和 9.16 min 等处还生成一些其他的代谢产物,经联机检索其质谱图未发现与之相匹配的物质,有待今后进一步研究.

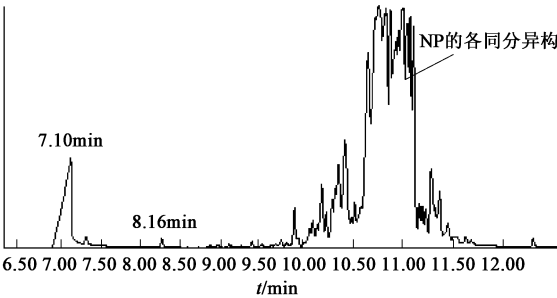


图 6 NP 优势降解菌群降解 NP 1 d 后的 TIC 图
Fig.6 Total ion current chromatograph from the dominant bacteria metabolizing nonylphenol after one day

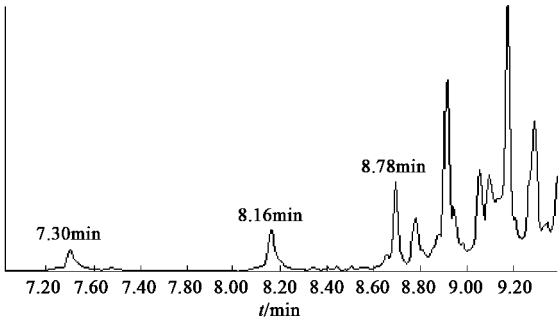
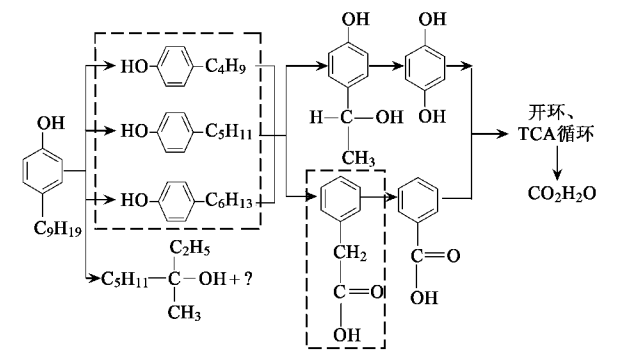


图 8 NP 优势降解菌群降解 NP 3 d 后的 TIC 图
Fig.8 Total ion current chromatograph from the dominant bacteria metabolites NP after three days

2.3 壬基酚的初级生物降解途径

通过以上研究可知,壬基酚在微生物作用下,壬基上的支链被初步降解,壬基酚部分初级生物降解产物为短链的烷基酚,如异丁基酚、异戊基酚和异己基酚等,进一步的生物代谢产物有苯乙酸.结合已有文献成果,初步推测出 NP 可能的生物降解途径,如图 9 所示.



虚线部分为文中提出的降解产物,TCA 循环即为三羧酸循环(Three Carboxylic Acid recycle)

图 9 NP 可能的生物降解途径

Fig.9 Possible bio degradation pathways of NP

3 结论

(1)活性污泥降解壬基酚的初级代谢产物为 C₄ ~ C₆ 烷基取代苯酚,烷基链的结构差异与其母体壬基的异构方式有关,烷基上的支链多为短链甲基;优势降解菌群对壬基酚的初级生物降解产物除烷基苯酚外,还有苯乙酸.

(2)在污水生物处理过程中,NP 的降解是不彻底的,其初级生物降解途径具有多样性,短链烷基酚、苯乙酸等是其主要的初级代谢产物.壬基酚的初级生物降解可以从壬基上的支链末端断链开始,长的支链易于断裂为短的甲基链,生成一系列带有不同分支结构的短链烷基酚类代谢产物,而烷基链的结构差异与其母体的壬基异构方式有关.

(3)根据烷基酚类物质的内分泌干扰特性,短链烷基酚仍然具有雌激素活性,在壬基酚污染防治过程中应给与足够的重视.

参考文献:

[1] Espejo R, Valter K, Simona M, et al. Determination of nineteen 4-alkylphenol endocrine disrupters in Geneva municipal sewage wastewater[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 976(1-2): 335-343.

[2] Hayashi S, Saito S, Kim J H, et al. Aerobic biodegradation behavior of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in the presence of organic matter [J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39(15):5626-5633.

[3] Ahel M, Giger W, Schaffner C. Behavior of Alkylphenol Polythoxylate Surfactants in the Aquatic Environment-2. Occurrence and Transformation in River [J]. Water Research, 1994, 28(5): 1143-1152.

[4] Ahel M, Molnar E, Ibric S, et al. Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers [J]. Water Science and Technology, 2000, 42(7-8):15-22.

[5] Planas C, Guadayol J M, Droguet M, et al. Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS [J]. Water Research, 2002, 36(4): 982-988.

[6] Liu X, Akio T, Kazuhide K, et al. Metabolic pathway of xenoestrogenic short ethoxy chain-nonylphenol to nonylphenol by aerobic bacteria, *Ensifer* sp. strain AS08 and *Pseudomonas* sp. strain AS90[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(3): 552-559.

[7] 郝瑞霞,梁鹏,周玉文. 城市污水处理过程中壬基酚的迁移转化行为研究[J]. 中国给水排水,2007,23(1): 105-108.

[8] Soares A, Jonasson K, Terrazas E, et al. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(6): 719-725.

[9] 郝瑞霞,赵曼,周玉文,等. 壬基酚同分异构体的生物降解与累积特性研究[J]. 给水排水, 2005,31:271-274.

[10] Corvini-Philippe F X, Vinken R, Hommes G, et al. Microbial degradation of a single branched isomer of nonylphenol by *Sphingomonas* TTNP3 [J]. Water Science and Technology, 2004, 50(5): 189-194.

[11] Gabriel-Frédéric L P, Giger W, Guenther K, et al. Differential Degradation of Nonylphenol Isomers by *Sphingomonas xenophaga* Bayram [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1123-1129.

[12] Gabriel-Frédéric L P, Heidlbergert A, Rentsch D, et al. A Novel Metabolic Pathway for Degradation of 4-Nonylphenol Environmental Contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(16): 15526-15533.

[13] 西尔弗斯坦 R M, 巴斯勒 G C, 莫里尔 T G, 著. 姚海文, 马金石, 黄骏雄, 等译. 有机化合物光谱鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1982. 4-64.

[14] 苏克曼, 潘铁英, 张玉兰. 波谱解析法[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2002. 30-46.

[15] 唐恢同. 有机化合物的光谱鉴定[M]. 北京: 北京大学出版社, 1992. 7-98.

[16] 郝瑞霞, 梁鹏, 赵曼, 等. 固相萃取-气相色谱-质谱-选择离子法检测污水中壬基酚[J]. 环境科学, 2006, 27(11): 2222-2227.

[17] 李延, 胡双庆, 尹大强, 等. 11 种取代酚类内分泌干扰活性的初步筛选与评价[J]. 环境化学, 2003, 22(4): 385-389.

[18] 刘征涛, 张颖, 徐镜波, 等. 烷基酚类的生殖干扰毒性与结构相关研究[J]. 环境科学研究, 2002, 15(6): 39-41.

[19] 崔世海, 刘树深, 彭盘英, 等. 双酚 A 类化合物雌激素活性的 QSAR 研究[J]. 科学通报, 2005, 50(22): 2469-2474.

[20] Hu J Y, Takako A. Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals [J]. Water Research, 2003, 37(6): 1213-1222.