

铜绿假单胞菌对 DBP 的降解特性研究

吴为中¹, 朱擎¹, 冯菁¹, 高航¹, 谢辰琦¹, 王建龙^{2*}

(1. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; 2. 清华大学核能与新能源技术研究院环境技术研究室, 北京 100084)

摘要: 采用小容量全萃取方法, 研究了 1 株铜绿假单胞菌对 DBP 的降解特性. 结果表明, 该菌株对 DBP 具有高效降解能力, 当 DBP 浓度为 400 mg/L, 投菌量为 2 g/L 时, $t_{1/2}$ 为 3.60 d; 其降解过程完全符合一级反应动力学. DBP 作为该菌生长的唯一碳源时, 其降解过程包括快速生物吸附、解析、降解等几个阶段. 实验还确认了存在邻苯二甲酸单丁酯和邻苯二甲酸 2 种中间产物, 从而验证了 DBP 在双加氧水解酶作用下 2 步水解变为邻苯二甲酸的历程.

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯; 生物吸附; 生物降解; 动力学; 铜绿假单胞菌

中图分类号: X172; X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)02-0510-06

Biodegradation of Di-*n*-butyl Phthalate by *Pseudomonas aeruginosa*

WU Wei-zhong¹, ZHU Qing¹, FENG Jing¹, GAO Hang¹, XIE Chen-qi¹, WANG Jian-long²

(1. College of Environment Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Laboratory of Environmental Technology, INET, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A new small capacity-wide extraction method was proposed for detection of its biodegradation in water. Results showed that the half-life ($t_{1/2}$) of di-*n*-butyl phthalate (DBP) biodegradation was 3.60 day when the concentration of DBP was 400 mg/L and the biomass concentration was 2 g/L. The biodegradation process conformed to the first-order kinetic model. Moreover, the whole degradation process could be divided into several steps: adsorption, desorption and degradation. Two metabolites of DBP degradation were identified as mono-butyl phthalate and phthalic acid by gas chromatography-mass spectrometry, which confirmed the dioxygenate process during the hydrolysis of DBP.

Key words: di-*n*-butyl phthalate (DBP); biosorption; biodegradation; kinetic; *Pseudomonas aeruginosa*

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs)是一类重要的有机化合物, 被广泛用作塑料助剂、油漆溶剂、合成橡胶和涂料等的增塑剂^[1~3]. DBP(di-*n*-butyl phthalate)作为最常见的一种 PAEs, 在环境中难于降解, 半衰期达到几周甚至几年^[4,5], 并能通过环境因子(水、土壤、空气等)传播. 研究表明, DBP 具有环境激素的作用, 能干扰生物和人类的内分泌系统. 美国 EPA、中国等均将 DBP 列为优先控制污染物^[5]. DBP 的处理方法包括物理法、化学法和生物法, 如光催化氧化降解^[6]、臭氧-活性炭吸附工艺^[7]和活性污泥工艺等^[8~11].

近年来, 国内外许多学者对 DBP 的生物降解进行了研究, 包括在天然水体^[7]、沉积物^[12]、土壤^[13, 14]和废水^[15~19]中的生物降解, 所涉及到的微生物既有好氧菌^[5, 18], 也有厌氧菌^[12, 16~17], 研究内容涉及到降解动力学^[4, 13]、降解中间产物分析^[9, 11], 以及在实际环境中的生物降解行为等^[20~23].

本试验提出了一种在高浓度 DBP 下不添加表面活性剂进行降解研究的小容量全萃取方法, 研究了 1 株铜绿假单胞菌对 DBP 的生物降解特性, 为消除环境中 DBP 污染问题提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 微生物及培养基

从处理农药废水的活性污泥中, 筛选分离出能够高效降解 DBP 的微生物, 经鉴定属铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* PA01). 实验中所用的培养基为 LB 和 MSM 2 种.

化学试剂主要有: DBP(AR 级), 正己烷(HPLC 级), 五氯代硝基苯(PCNB, 99.995%, 德国)标准品, 其他用到的药品均为 AR 级(北京化学试剂公司生产).

1.2 DBP 生物降解实验

1.2.1 微生物生长曲线

在 80 mL 高温灭菌(121℃, 20 min)的 LB 培养基中, 接入 1 环微生物, 放入 250 mL 锥形瓶中封口. 3 组平行的锥形瓶置于 30℃、140 r/min 恒温振荡摇床中培养. 连续取样测定其 pH 值和光密度值.

抑制生长曲线基本操作同上, 即在 LB 培养基

收稿日期: 2007-11-28; 修订日期: 2008-10-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(50325824; 50678089); 教育部优秀青年教师计划项目

作者简介: 吴为中(1963~), 男, 副教授, 主要研究方向为水污染控制与环境生物技术, E-mail: wuweizhong@pku.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

中加入菌体后,再分别加入适量 DBP 使其浓度分别为 50、100、200、400 mg/L.

1.2.2 DBP 初始浓度对生物降解的影响

采用 3 组平行试验.于 30 mL 高温灭菌的 MSM 培养基中,分别加入适量的 DBP,使其质量浓度为 10、50、100、300、400 mg/L,再在每份样品中加入 2 g/L 的湿菌体,装入 50 mL 锥形瓶中封口,置于 30℃、140 r/min 的恒温摇床中振荡培养,分别于 3、6、12、24、36、48、60、84、132、156、192、228 h 取样分析.

1.2.3 投菌量对 DBP 降解的影响

采用 3 组平行试验.在 30 mL 高温灭菌后 MSM 培养基中,加入适量的 DBP 使其含量均为 100 mg/L,再分别加入适量湿菌体,使其投加量分别为 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 g/L,装入 50 mL 锥形瓶中封口,置于 30℃, 140 r/min 的恒温摇床中振荡培养 3 d 后取样分析.

1.2.4 分析方法

培养液 pH 值采用 pH 计测定;*D* 值采用分光光度计在 600 nm 下测定.

DBP 浓度分析方法为:将锥形瓶中 DBP 降解的水样转入 125 mL 梨形分液漏斗中,分别用 20 mL 超纯水、15 mL 正己烷 2 次洗涤锥形瓶,将洗液转入分液漏斗中,萃取摇振 5 min 后静置 1 h,取上层液体用 0.22 μm 有机相滤膜过滤后加入内标物 PCNB 1 × 10⁻⁶mg/L,利用 GC/MS 测定其 DBP 含量.GC/MS 设定参数:MS 检测器,SCAN 全扫描模式,柱温 300℃,进样体积 1 μL,载气流速 10 mL/min,气压 50 kPa,升温程序:40℃(3 min),15 °C/min,220℃(5 min),20 °C/min,300 °C/min(3 min).

2 结果与讨论

2.1 微生物在正常与 DBP 抑制下的生长曲线

微生物在正常与 DBP 抑制下的生长曲线如图 1 所示.*D* 值的变化基本能表征微生物量的增殖情况.PA01 菌的正常生长曲线规律表现为:0~4 h 为停滞期,5~20 h 为对数生长期,21 h 后进入稳定期.与正常生长曲线比较,加入 DBP 后对该菌的生长产生了一定的抑制,使 PA01 菌生长的停滞期由 0~4 h 延长至 0~20 h,对数期、稳定期顺序后延,对数生长期为 21~32 h,32 h 后进入稳定期.随着 DBP 起始浓度的增大,对应的微生物培养悬浊液的 *D*₆₀₀ 减小,表明 DBP 对 PA01 菌的抑制作用随初始浓度升高而增大.

Patil 等^[19] 在研究中发现,加入 DBP 后使 TBKNP-05 菌的正常停滞期延长至 3 d,对数生长期

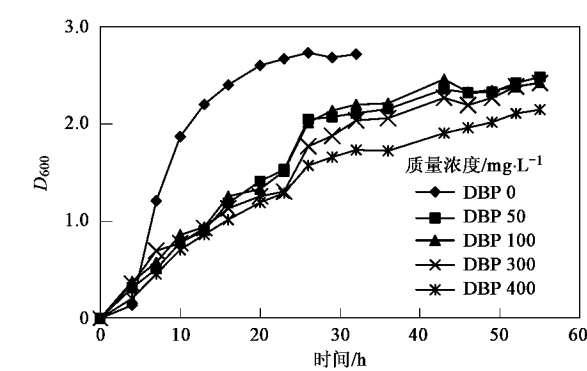


图 1 PA01 菌正常生长与不同 DBP 作用时 *D*₆₀₀ 值的变化
Fig.1 *D*₆₀₀ trend with different concentrations of DBP added in the growing process of PA01, and with the normal growth

也延长为 2 d,对停滞期和对数生长期的降解中间产物进行进一步分析,发现 DBP 在其降解的第一步酶促水解反应中产生的单酯对细菌体的生理活性有很大的影响,从而使得其正常生理周期改变.

2.2 PA01 菌生长过程中 pH 值的变化

图 2 为 PA01 菌正常生长和起始 DBP 浓度 50 mg/L 时培养体系中 pH 值随时间的变化.可以看出,PA01 菌的正常生长过程中,pH 值由最初的 6.55 上升到 8.4,且继续保持上升的趋势,并且明显观察到培养菌液由褐色变为绿色,表明 PA01 菌为产色素菌,在生长过程中存在一个产碱的过程.

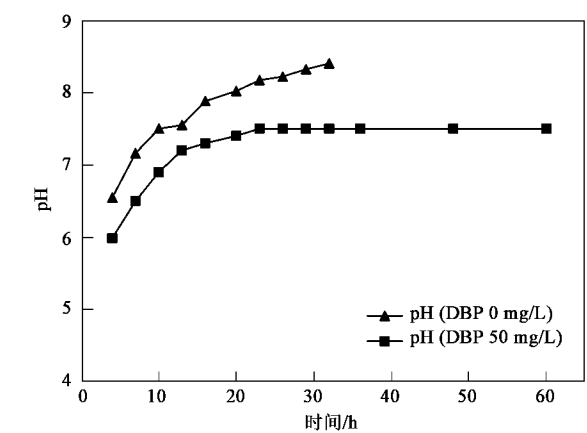


图 2 PA01 菌正常生长与 DBP 作用时 pH 值随时间的变化
Fig.2 pH trend of DBP concentration at 50 mg/L in the growing process of PA01, and of the normal growth without DBP

与正常生长的体系相比较,受 DBP 抑制作用影响,该菌培养液后期的 pH 值一直稳定在 7.5 左右,并未出现 PA01 菌正常生长过程中的 pH 持续上升的现象.可能是由于 DBP 在生物降解过程中的中间产物有酸性物质如邻苯二甲酸等,中和了部分该菌

的产碱物质。

2.3 不同 DBP 初始浓度下的降解特性

图 3 是不同起始 DBP 质量浓度(10、50、100、300、400 mg/L)、相同投菌量(2 g/L湿菌体)下的 DBP 降解曲线。

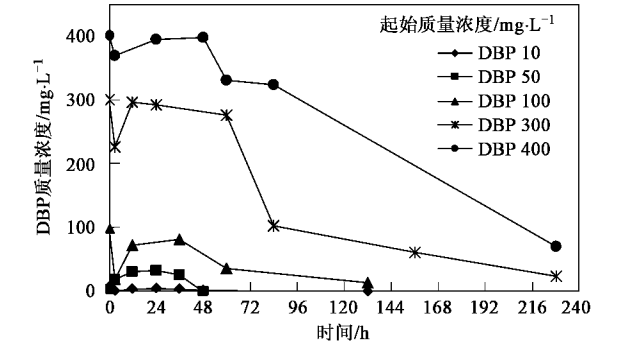


图 3 不同 DBP 起始浓度下的降解曲线

Fig.3 Degradation of different concentration of DBP in same volume of wet cells

从图 3 可看出,不论 DBP 起始浓度高低,PAO1 菌均能最终使之有效降解,但达到完全降解所需要的时间不同.低浓度(10、50 mg/L)下,达到完全降解的时间基本上在 48 h 内;较高 DBP 起始浓度时,DBP 也能被 PAO1 菌完全降解,但降解所需时间长达 200 h 以上.PAO1 对 DBP 降解存在明显的迟缓期,随着 DBP 浓度的升高,微生物对 DBP 降解的迟缓期相应延长.表明高浓度的 DBP 对菌体活性的抑制较强,使得菌体的生长周期延长并在时间上后推,这与抑制生长实验的结果相符合.如起始浓度为 100、400 mg/L 下,PAO1 菌的生物降解迟缓期分别为 36、48 h.当迟缓期过后,PAO1 菌对 DBP 降解速率迅速增大。

PAO1 菌在较高起始浓度下的 DBP 降解过程中,均存在浓度快速下降、升高再下降的规律.如图 3 所示,DBP 初始浓度为 100 mg/L 时,3 h 后,DBP 浓度快速下降到一个低值 19.6 mg/L,但在 12 h 后出现一个浓度快速回升且在 48 h 时达到最大值,而 48 h 后出现 DBP 的快速降解过程.因此,推断 PAO1 菌对 DBP 降解过程的初始阶段,存在明显的生物吸附现象。

Walker 等^[23]对难降解有机物处理过程中产生的生物吸附作用进行过研究与分析,认为细菌在对污染物降解的同时对其有吸附作用,吸附作用可在几 min 到几 h 完成,而在降解过程中,这 2 种作用同时存在并相互影响.生物吸附作用又可分为生物吸着和生物积累 2 个过程,前者存在于活菌和灭活的菌中,后者仅存在于活菌中.PAO1 菌体生物吸附的

DBP 可以分为 3 个部分,即吸附在表面、吸收入体内和絮凝在絮体中.在前 3 h 内,菌体还未适应新的环境,处于生长的停滞期,吸附中的吸着起主要作用,使得 DBP 浓度在短时间内迅速下降到一个低值;当菌吸附的 DBP 达到饱和以后,DBP 的强抑制作用启动了菌体的自我保护机制,从而菌体吸附的 DBP 开始解吸,以降低其抑制作用,恢复菌的活性,这一过程中,解吸速度大于降解速度,因此 DBP 浓度不断升高,表现为 3~48 h 的浓度增长;在 48 h 时,解吸与降解达到平衡状态;48 h 以后,菌体基本进入了生长的稳定期,吸附的 DBP 与解吸的 DBP 达到平衡,而此时处于对数生长期末期和稳定期初期,菌体具有最大的生理活性,降解起主导作用,整个培养液中 DBP 的浓度不断下降。

2.4 PAO1 菌对 DBP 生物降解的动力学分析

在排除 DBP 的抑制作用导致的 PAO1 菌的延迟期的情况下,用下列公式进行了 PAO1 菌对 DBP 的生物降解动力学分析。

$$c = b + k_0 t \tag{1}$$

$$\ln c = a + k_1 t \tag{2}$$

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x} \tag{3}$$

式中, c 为 DBP 浓度, t 为降解时间, k_0 、 k_1 分别为零级和一级反应速率常数, a 为 $t = 0$ 时反应物浓度,以 x 表示 t 时刻已去除的反应物浓度,则尚未反应的反应物浓度为 $a - x$ 。

计算结果表明,与零级反应模型相比,一级反应模型更加符合 PAO1 菌对 DBP 生物降解的实际情况.动力学分析结果如图 4 所示.降解动力学参数与计算结果列于表 1。

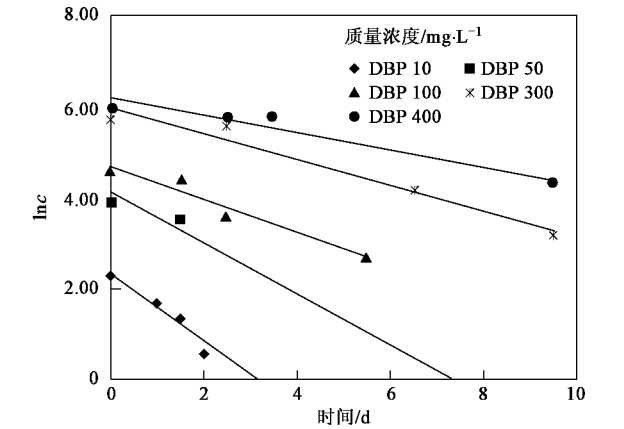


图 4 不同初始浓度 DBP 降解曲线的线性拟合

Fig.4 Relationship between $\ln c$ and t

表 1 降解动力学的计算值

Table 1 Kinetic equation of DBP degradation

DBP 浓度 /mg·L ⁻¹	动力学方程	速率常数 /d ⁻¹	半衰期 /d	R ²
10	ln c = 2.301 3 - 0.731 6 t	0.731 6	0.95	0.990 9
50	ln c = 4.112 7 - 0.561 7 t	0.561 7	1.23	0.994 1
100	ln c = 4.694 7 - 0.365 3 t	0.365 31	1.90	0.953 9
300	ln c = 5.970 8 - 0.284 5 t	0.284 5	2.44	0.953 2
400	ln c = 6.204 - 0.192 3 t	0.192 3	3.60	0.935 3

试验结果表明,PA01 菌对 DBP 的降解过程符合一级反应动力学,DBP 浓度越高,降解到半衰期就越长,PA01 菌对 DBP 的降解时间随着起始 DBP 浓度的增高而延长.对 DBP 浓度 c 与降解率常数 k_1 进行相关性分析(图 5)可知,DBP 浓度 c 的对数与降解率常数 k_1 呈线性负相关,相关系数 R^2 为 0.967 6 (> 0.95).与其他文献报道的 DBP 降解菌的动力学参数(见表 2)进行比较,可知 PA01 是 1 株对 DBP 具有高效降解能力的菌,实际应用的潜力很大.

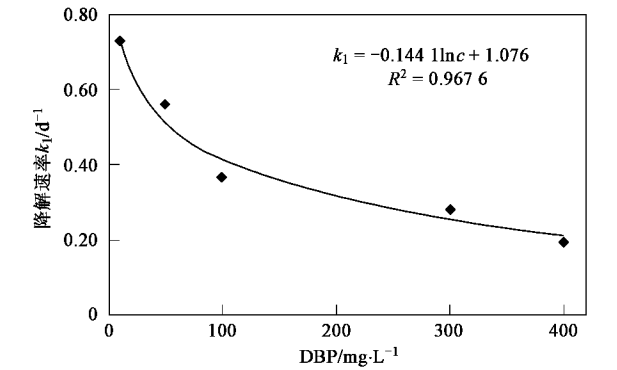


图 5 降解速率 k_1 与 DBP 浓度 c 的回归分析

Fig.5 Regression of k_1 and the concentration of DBP c

2.5 投菌量对 DBP 生物降解的影响

图 6 为不同投菌量(湿菌体 0.5、1、2、4、8、16

g/L)、相同 DBP 浓度(100 mg/L)时的降解试验结果.可以看出,在本试验条件下,最佳 PA01 菌的湿菌体的投加量为 4 g/L.

表 2 一些文献报道的 DBP 降解的动力学参数

Table 2 Kinetic equation of DBP degradation reported

DBP 浓度 /mg·L ⁻¹	动力学方程	速率常数 /d ⁻¹	半衰期 /d	文献
10	ln c = 2.335 - 0.688 8 t	0.688 8	1.01	[18]
50	ln c = 5.298 3 - 0.133 2 t	0.133 2	5.20	[21]
100	ln c = 4.61 - 0.081 2 t	0.081 2	8.53	[9]
100	ln c = 5.99 - 0.091 7 t	0.091 7	7.56	[23]
500	ln c = 6.386 - 0.103 t	0.103 0	9.70	[13]

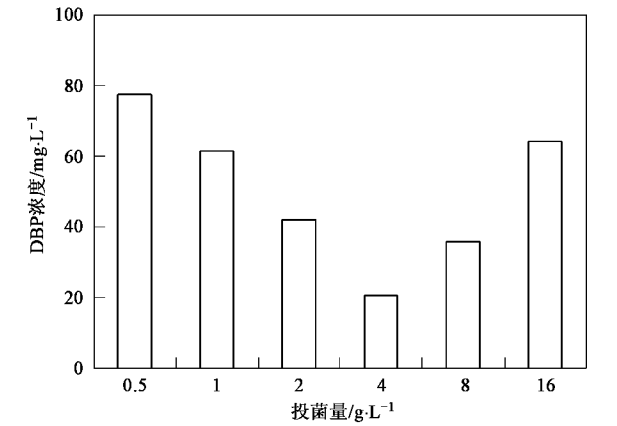


图 6 不同投菌量下降解 3 d 后 DBP 浓度的变化

Fig.6 Degradation of 100 mg/L DBP by different volume of cells in 3 d

对比图 1 和图 3 可知,通过 3d 的培养,菌体生长都进入了稳定期,而系统中的 DBP 浓度也处于逐渐下降的阶段.在低投加量范围内,随投加量的增加,微生物对 DBP 的降解能力增强,但在高投加量的范围内,随着投菌量的增加,微生物受到溶解氧的限制因素的影响,残余的 DBP 浓度反而升高.

2.6 DBP 降解中间产物分析

许多研究表明,DBP 的降解如图 7^[24]所示,该反

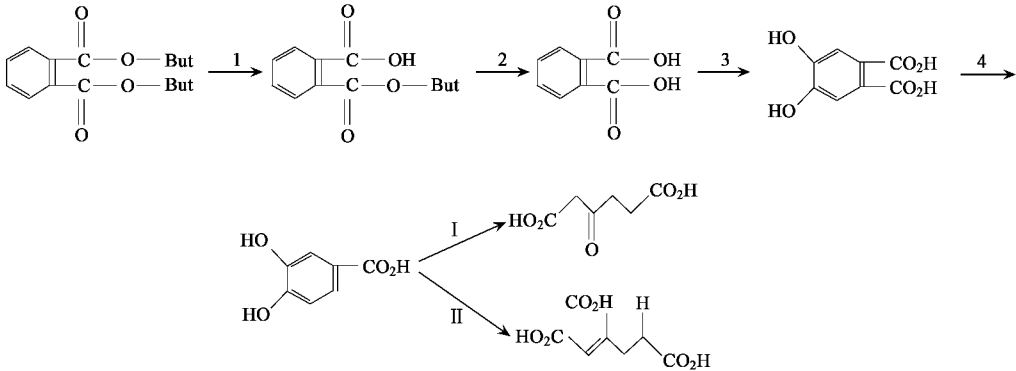


图 7 PAEs 的降解历程

Fig.7 Degradation course of PAEs

应历程表明,酞酸酯的生物降解反应首先形成单酯,然后变成邻苯二甲酸及相应的醇,最后以 2 种方式开环形成醇、酮、酸等脂肪族化合物,并进一步被降解为 CO_2 和 H_2O . Kurane 等^[24] 在实验室接种细菌试验也观察到中间产物 MOP 和苯二甲酸,认为随后的代谢途径为芳香化合物在加氧酶作用下生成原儿茶酚等双酚中间产物,双酚化合物在双氧酶作用下使芳香环开裂,成为相应有机酸,进而转化为丙酮酸、琥珀酸、延胡索酸等进入三羧酸循环,最终氧化为 CO_2 和 H_2O , 因此,旱地好氧有一定水分条件时,可促进微生物对 DEHP 和 DBP 的降解.

在本实验过程中,检测出邻苯二甲酸单丁酯和邻苯二甲酸 2 种中间产物(见图 8),验证了反应历程图 9,即 DBP 在双加氧酶的作用下,进行的 2 步水

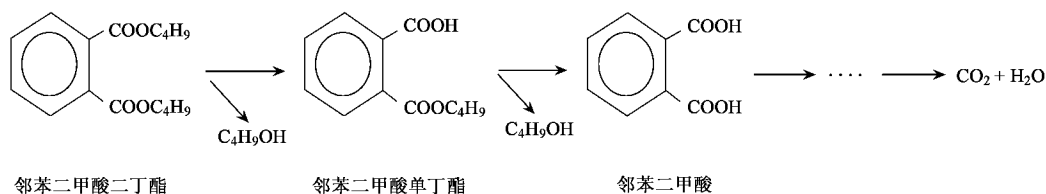


图 9 DBP 在双加氧酶作用下的水解过程

Fig.9 DBP degradation by hydrolysis enzyme

解.而对于邻苯二甲酸分解及开环的产物,可能由于存在时间过短或是样品中含量太少,低于检测限而未检出,有待于进一步对样品进行处理,进行更深入的分析.

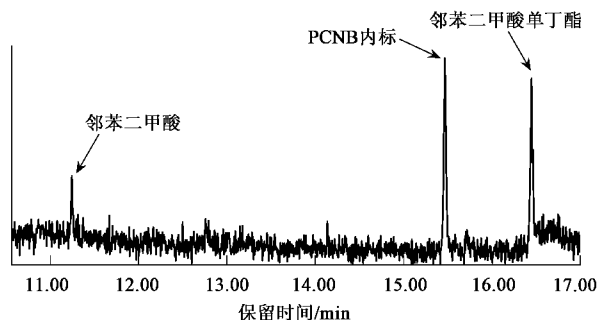


图 8 中间产物 GC 图

Fig.8 GC graphics of metabolites and internal standard

3 结论

(1)DBP 的降解符合一级反应动力学,在 DBP 浓度为 400 mg/L,投菌量 2 g/L 的情况下,仅需 1 周即可达到 95% 的去除率,降解反应的半衰期为 3.60 d.

(2)在 DBP 降解的初始阶段,存在明显的生物吸附现象,表现为 DBP 浓度快速下降、升高、再下降的过程.DBP 的生物降解存在明显的延迟期,随着 DBP 浓度的升高,微生物对 DBP 降解的延迟期相应延长,经过延迟期后, DBP 的降解速率迅速增大. PAOI 菌株对 PAEs 类污染防治具有应用潜力.

(3)实验中检测到了邻苯二甲酸单丁酯和邻苯二甲酸 2 种中间产物,验证了 DBP 在双加氧水解酶的作用下完成二步水解变为邻苯二甲酸的历程.

参考文献:

[1] Ejertsson J, Alnervik M, Jonsson S, *et al.* Influence of water solubility, side-chain degradability, and side-chain structure on the degradation of phthalic acid esters under methanogenic conditions [J]. *Environmental Science and Technology*, 1997, **31**(10): 2761-2764.

[2] 王建龙,吴立波,钱易. 驯化活性污泥降解邻苯二甲酸酯类化

合物的研究[J]. *环境科学*, 1998, **19**(1): 18-20.

[3] Staple A C, Peterson D R, Parkerton T H, *et al.* The environmental fate of phthalate esters: a literature review[J]. *Chemosphere*, 1997, **35**(8): 667-749.

[4] Wang J L, Liu P, Qian Y, *et al.* Kinetics of phthalic acid ester degradation by acclimated activated sludge[J]. *Process Biochemistry*, 1997, **32**(9): 567-571.

[5] Wang J L, Liu P, Qian Y. Microbial degradation of di-n-butyl phthalate[J]. *Chemosphere*, 1995, **31**(11): 4051-4056.

[6] Bajt O, Mailhot G, Bolte M. Degradation of dibutyl phthalate by homogeneous photocatalysis with $\text{Fe}(\text{III})$ in aqueous solution[J]. *Applied Catalysis B-Environmental*, 2001, **33**(10): 239-248.

[7] 刘军,王珂,贾瑞宝,等. 臭氧-活性炭工艺对饮用水中邻苯二甲酸酯的去除[J]. *环境科学*, 2003, **24**(4): 77-80.

[8] Wang J L, Liu P, Qian Y. Biodegradation of phthalic acid ester by acclimated activated sludge[J]. *Environmental International*, 1996, **22**(6): 737-741.

[9] Wang J L, Xuan Z, Wu W Z. Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge[J]. *Process Biochemistry*, 2004, **39**(10): 1837-1841.

[10] Wang J L. Effect of di-n-butyl phthalate (DBP) on activated sludge [J]. *Process Biochemistry*, 2004, **39**(10): 1831-1836.

[11] Walker W W, Cripe C R, Pritchard P H, *et al.* Dibutyl phthalate degradation in estuarine and fresh water sites[J]. *Chemosphere*, 1984, **13**(12): 1283-1294.

[12] Chang B V, Liao C S, Yuan S Y. Anaerobic degradation of diethyl

phthalate, di-*n*-butyl phthalate, and di-(2-ethylhexyl) phthalate from river sediment in Taiwan[J]. Chemosphere, 2005, **58**(10): 1601-1607.

[13] 陈英旭,沈东升,胡志强,等. 酞酸酯类有机毒物在土壤中降解规律的研究[J]. 环境科学学报,1997,**17**(3):340-345.

[14] Wang J L, Liu P, Qian Y, *et al.* Biodegradation of phthalic acid esters in soil by indigenous and introduced microorganisms[J]. Chemosphere, 1997, **35**(10):1747-1754.

[15] Wang J L, Liu P, Qian Y. Biodegradation of phthalic acid esters by immobilized microbial cells[J]. Environmental International, 1997, **23**(11):775-782.

[16] Wang J L, Qian Y. Microbial metabolism of di-butyl phthalate (DBP) by a denitrifying bacterium[J]. Process Biochemistry, 1999, **34**(9):745-749.

[17] Wang J L, Chen L J, Qian Y, *et al.* Microbial degradation of phthalic acid esters under anaerobic digestion of sludge [J]. Chemosphere, 2000, **41**(10):1245-1248.

[18] Xu X R, Li H B, Gu J D. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-*n*-butyl phthalate ester by *Pseudomonas uorescens* B-1[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, **55**(1):9-15.

[19] Patil N K, Kundapur R, Shouche Y S, *et al.* Degradation of a plasticizer, di-*n*-butyl phthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05 [J]. Current Microbiology, 2006, **52**(5):225-230.

[20] Lee S M, Koo B W, Lee S S, *et al.* Biodegradation of dibutyl phthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, **35**(10):417-423.

[21] 李俊,舒为群,陈济安,等.降解 DBP 菌株 CQ0302 的分离鉴定及其降解特性[J]. 中国环境科学,2005, **25**(1):47-51.

[22] Li J, Chen J A, Shu W Q. Bioremediation of environmental endocrine disruptor di-*n*-butyl phthalate ester by *Rhodococcus ruber* [J]. Chemosphere, 2006, **65**(11):1627-1633.

[23] Walker G M, Weatherley L R. Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye[J]. Environmental Pollution, 2000, **108**(2):219-223.

[24] Kurane R, Suzuki T, Takahara Y. Induction of enzymes involved in phthalate esters metabolism in *Nocardia erythropolis* and enzymatic hydrolysis of phthalate esters by commercial lipases[J]. Agric Biol Chem, 1980, **44**(3):529-536.