

# 一株邻苯二甲酸酯降解菌降解特性研究

张付海<sup>1,3</sup>, 岳永德<sup>2</sup>, 花日茂<sup>3</sup>, 朱余<sup>1</sup>, 张敏<sup>1</sup>

(1. 安徽省环境监测中心站, 安徽 合肥 230061; 2. 国际竹藤网络中心, 北京 100102; 3. 安徽农业大学资源与环境学院, 安徽 合肥 230036)

**摘要:**测定了从巢湖底泥中筛选的活性菌株皮氏伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pickettii*)对4种邻苯二甲酸酯(PAEs)的降解。结果表明,*Burkholderia pickettii*菌对4种混合体系PAEs的降解速率常数高于降解单一类型PAEs,不同化学结构的邻苯二甲酸酯生物降解能力不同,PAEs浓度、温度和pH都是影响PAEs生物降解的主要因素,各因素对PAEs降解影响的大小关系是温度>PAEs浓度>pH,各因素最优水平组合应是浓度为20 mg·L<sup>-1</sup>,pH值为7,温度30℃。

**关键词:**邻苯二甲酸酯;生物降解;影响因素

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:1672-2043(2007)增刊-0079-05

## Degradation Characteristics of Phthalate Esters by a Bacterial Strain

ZHANG Fu-hai<sup>1,3</sup>, YUE Yong-de<sup>2</sup>, HUA Ri-mao<sup>3</sup>, ZHU Yu<sup>1</sup>, ZHANG min<sup>1</sup>

(1. Anhui Environmental Monitoring Center, Hefei 230061, China; 2. International Centre for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 3. College of Resources and Environmet, Anhui Agricultural University, Anhui 230036, China)

**Abstract:** Biodegradation of phthalate esters was conducted by *Burkholderia pickettii* isolated from Chaohu lake sediment. Experimental results showed that degradation rates were enhanced by *B. pickettii* z-1, when four kinds of PAEs were present simultaneously. It was discovered that degradating capacity for degrading different kinds of PAEs studied existed, Three major factors affecting the degradation for the chemicals were temperature, pH, concentration of PAEs, with an following order; temperature > concentration of PAEs > pH. The optimal condition for PAEs biodegradation was determined as 20 mg·L<sup>-1</sup>, pH7.0 and 30℃, respectively in our study.

**Keywords:** phthalate esters; biodegradation; influencing factors

邻苯二甲酸酯(Phthalic acid esters 或 phthalate esters 缩写为 PAEs, 又称酞酸酯)主要用作增塑剂,是一类重要的环境激素类污染物,被称为“第二个全球性的 PCB 污染物”<sup>[1-3]</sup>。微生物降解是自然环境中邻苯二甲酸酯完全矿化的主要过程。目前,国内外的研究主要集中在从活性污泥中筛选高效降解菌株对单一类型邻苯二甲酸酯的生物降解(曾锋等, 1999; Wang 等, 2003; Chang 等, 2004)<sup>[4-6]</sup>。夏凤毅等(2002)利用污水处理厂的活性污泥降解邻苯二甲酸酯,发现 PAEs 的降解速率常数与化合物的分子结构存在相关关系<sup>[7]</sup>。秦华等(2005)从某化工厂的活性

污泥中分离到一株能高效降解 DEHP(邻苯二甲酸二异辛酯)的细菌为纤维单胞菌属(*Cellulomonas* sp.)<sup>[8]</sup>。李俊等(2005)从垃圾填埋场的土壤中分离到一株降解邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的细菌深红红球菌(*Rhodococcus ruber*)<sup>[9]</sup>。

实际废水是多因子共存的复杂体系,在其处理过程中,多种邻苯二甲酸酯同时存在对降解菌产生联合作用。多种类与单一类型 PAEs 生物降解的区别,多因子并存对 PAEs 的微生物降解产生的综合影响等方面的系统研究鲜见报道。本文从巢湖底泥中筛选的活性菌株皮氏伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pickettii*)对单一类型和多种混合体系的邻苯二甲酸酯降解进行了研究,并通过正交实验,利用统计学方法考察了 pH、温度、PAEs 浓度同时存在对 4 种混合邻苯二甲酸酯生物降解的影响,以期高效降解菌治理废水中

收稿日期:2006-09-08

基金项目:安徽省教育厅基金资助项目(2002kj108ZD)

作者简介:张付海(1978—),男,硕士。E-mail:zhf168@163.com

通讯作者:岳永德

PAEs 污染提供应用基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和培养基

从巢湖底泥中筛选出活性菌株皮氏伯克霍尔氏菌(*Burkholderia pickettii*),标记为 *B. pickettii. z-1*。

基础培养基:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $FeCl_3$  0.01 g,  $KH_2PO_4$  1.0 g,  $(NH_4)_2SO_4$  1.0 g,  $CaCl_2$  0.1 g, 重蒸馏水 1 L (pH7)。

### 1.2 试剂

邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)4种物质作为研究对象,纯度均大于99%,购自中国医药集团上海化学试剂有限公司。

### 1.3 *B. pickettii. z-1* 菌对邻苯二甲酸酯的降解

加入一定量的菌悬母液于不同浓度的 PAEs 培养液,于 30 °C, 120 r · min<sup>-1</sup> (30 min × 3 次 · d<sup>-1</sup>) 的摇床上避光培养,分不同时间点取样、分析,同时设置不加菌的对照样品。*B. pickettii. z-1* 菌对 4 种邻苯二甲酸酯的降解趋势用一级动力学方程拟合:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

$$T_{1/2} = \ln 2 / k \quad (2)$$

式中:  $k$  为降解速率常数,  $C_0$  为 PAEs 的初始浓度,  $C_t$  为  $t$  时刻 PAEs 的残存浓度,  $T_{1/2}$  为降解半衰期。

### 1.4 多因素对邻苯二甲酸酯生物降解的影响

以 pH、温度、PAEs 初始浓度为主要因素,每个因素均取 3 个水平,加入相同菌量的 *B. pickettii. z-1* 菌,按正交表 1  $L_{27}(3^3)$  进行 PAEs 降解试验,试验次数总共为 27 次。

### 1.5 测定条件

HP6890N 型气相色谱仪,<sup>63</sup>Ni 电子捕获检测器(ECD),HP-5 色谱柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm),柱温从 100 °C 以 10 °C · min<sup>-1</sup> 的速率升到 270 °C (保

表 1 正交实验的因子水平表

Table 1 Levels for experimental factors with orthogonal design

| 序号 | A     | B     | C                            |
|----|-------|-------|------------------------------|
|    | 酸度/pH | 温度/°C | PAEs 浓度/mg · L <sup>-1</sup> |
| 1  | 6     | 20    | 5                            |
| 2  | 8     | 30    | 20                           |
| 3  | 10    | 40    | 100                          |

持 10 min),进样口温度 250 °C,检测器温度 290 °C,载气为高纯氮气(99.999%),柱流量 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。

## 2 结果

### 2.1 *B. pickettii. z-1* 菌对单一种类和 4 种混合体系邻苯二甲酸酯的降解比较

*B. pickettii. z-1* 菌对单一种类和混合体系 PAEs 降解的比较见表 2,由表 2 可以看出 *B. pickettii. z-1* 菌同时降解 20 mg · L<sup>-1</sup> 4 种混合 PAEs 时,4 种邻苯二甲酸酯的降解速率常数都高于降解单一种类邻苯二甲酸酯的速率常数,这说明多种 PAEs 化合物的存在有利于 *B. pickettii. z-1* 菌降解效率的提高。

### 2.2 *B. pickettii. z-1* 菌对不同初始浓度 4 种混合体系邻苯二甲酸酯的降解

*B. pickettii. z-1* 菌降解 20、50、100 mg · L<sup>-1</sup> 不同初始浓度 4 种混合 PAEs 的速率常数( $k$ )和半衰期( $T_{1/2}$ )见图 1 和图 2。

由图 1 和图 2 可知,*B. pickettii. z-1* 菌对混合体系 PAEs 的降解速率常数总的趋势是随着基质初始浓度梯度的增加而减小,半衰期随着基质初始浓度的增加而增大。PAEs 初始浓度对较短侧链 DMP、DEP 的降解能力有明显影响,而对较长侧链 DBP、DEHP 的降解能力影响不明显。*B. pickettii. z-1* 降解几种混合 PAEs 时,只对一定浓度的 PAEs 保持较强的降解

表 2 *B. pickettii. z-1* 菌对混合和单一种类 PAEs 降解的比较

Table 2 Comparison of biodegradation for both PAEs mixed and individual by strain *B. pickettii. z-1*

| PAEs | 混合种类 PAEs (Mixed)    |       |             | 单一种类 PAEs (Individual) |       |             |
|------|----------------------|-------|-------------|------------------------|-------|-------------|
|      | 速率常数/h <sup>-1</sup> | 半衰期/h | 决定系数/ $r^2$ | 速率常数/h <sup>-1</sup>   | 半衰期/h | 决定系数/ $r^2$ |
| DMP  | 0.095 3              | 7.27  | 0.93        | 0.081 3                | 8.53  | 0.96        |
| DEP  | 0.075 6              | 9.17  | 0.94        | 0.062 7                | 11.05 | 0.95        |
| DBP  | 0.027 5              | 25.21 | 0.95        | 0.017 2                | 40.30 | 0.93        |
| DEHP | 0.012 1              | 57.28 | 0.95        | 0.011 0                | 63.01 | 0.95        |

注:混合体系 PAEs (每种邻苯二甲酸酯的浓度为 20 mg · L<sup>-1</sup>) 和单一种类 PAEs 的浓度都为 20 mg · L<sup>-1</sup>。

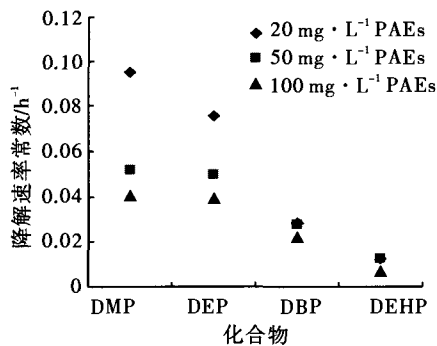


图1 PAEs 初始浓度对生物降解速率常数的影响

Figure 1 Effect of initial concentration on biodegradation

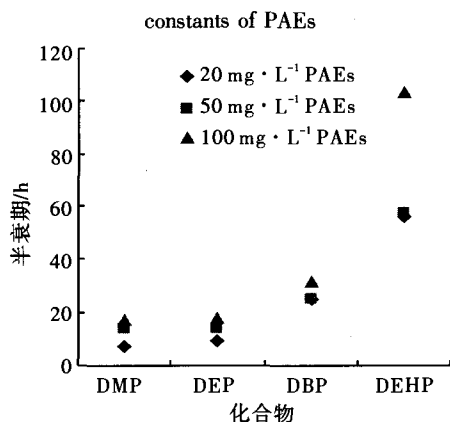


图2 PAEs 初始浓度对生物降解半衰期的影响

Figure 2 Effect of initial concentration constants of PAEs on half-time of PAEs

效果,随着 PAEs 浓度增加,*B. pickettii. z-1* 对 PAEs 的降解速率下降。

邻苯二甲酸酯是一类化合物,带有不同数量的烷基链,其化学性质显著不同。由图 1 和图 2 可以看出,*B. pickettii. z-1* 菌对不同 PAEs 化合物的降解能力差别很大,较短侧链的 DMP 和 DEP 降解较快,较长侧链的 DBP、DEHP 降解较慢;PAEs 生物降解能力随着 PAEs 侧链烷基的链长增加而减小。

### 2.3 多因素同时存在对不同种类邻苯二甲酸酯微生物降解的影响

以 pH、温度、PAEs 初始浓度为主要因素,每个因素均取 3 个水平,加入相同菌量,按正交表 L<sub>27</sub>(3<sup>3</sup>) 进行 PAEs 降解试验,试验次数总共为 27 次。用 SAS 软件进行方差分析结果见表 3。

由表 3 可知 DMP 的总处理 (Model) 在 0.01 水平无显著差异 ( $F = 2.03, Pr = 0.1083$ ),说明 pH、温度、PAEs 初始浓度 3 因素对 DMP 的生物降解影响不明显;DEP、DBP 和 DEHP 的总处理 (Model) 达到 0.01 水平的显著差异 ( $Pr < 0.01$ ),说明 pH、温度、PAEs 初始浓度 3 因素对这 3 种 PAEs 生物降解的影响都非常明显。各效应的分析表明, DMP 的 pH ( $F = 0.34, Pr = 0.7169$ )、温度 ( $F = 1.06, Pr = 0.3641$ ) 和 PAEs 初始浓度 ( $F = 4.7, Pr = 0.0212$ ) 各水平间在 0.01 水平差异不显著; DEP 的温度 ( $F = 15.9, Pr = 0.0001$ )、

表 3 PAEs 的 L<sub>27</sub>(3<sup>3</sup>) 方差分析表

Table 3 Variance analysis for the test data

| 化合物  | 影响因子             | 自由度 <i>df</i> | 平方和 (SS) | 均方 (MS) | <i>F</i> 值 | <i>Pr</i> > <i>F</i> |
|------|------------------|---------------|----------|---------|------------|----------------------|
| DMP  | 酸度 (pH)          | 2             | 0.049    | 0.024   | 0.34       | 0.7169               |
|      | 温度 ( <i>T</i> )  | 2             | 0.153    | 0.076   | 1.06       | 0.3641               |
|      | 浓度 ( <i>C</i> )  | 2             | 0.676    | 0.338   | 4.7        | 0.0212               |
|      | 总变异 ( <i>M</i> ) | 6             | 0.878    | 0.146   | 2.03       | 0.1083               |
|      | DEP              | 酸度 (pH)       | 2        | 0.082   | 0.041      | 0.92                 |
| DEP  | 温度 ( <i>T</i> )  | 2             | 1.417    | 0.709   | 15.9       | 0.0001*              |
|      | 浓度 ( <i>C</i> )  | 2             | 0.625    | 0.313   | 7.02       | 0.0049*              |
|      | 总变异 ( <i>M</i> ) | 6             | 2.125    | 0.354   | 7.95       | 0.0002*              |
|      | DBP              | 酸度 (pH)       | 2        | 0.120   | 0.060      | 5.94                 |
| DBP  | 温度 ( <i>T</i> )  | 2             | 0.121    | 0.061   | 6.00       | 0.0091*              |
|      | 浓度 ( <i>C</i> )  | 2             | 0.261    | 0.130   | 12.90      | 0.0003*              |
|      | 总变异 ( <i>M</i> ) | 6             | 0.502    | 0.084   | 8.28       | 0.0001*              |
|      | DEHP             | 酸度 (pH)       | 2        | 0.0484  | 0.0242     | 2.75                 |
| DEHP | 温度 ( <i>T</i> )  | 2             | 0.226    | 0.113   | 12.86      | 0.0003*              |
|      | 浓度 ( <i>C</i> )  | 2             | 0.0008   | 0.0004  | 0.05       | 0.9545               |
|      | 总变异 ( <i>M</i> ) | 6             | 0.276    | 0.046   | 5.22       | 0.0022*              |

注: \*表示在0.01水平显著差异。

PAEs 初始浓度 ( $F = 7.02, Pr = 0.0049$ ) 各水平间达到了0.01水平显著差异, DEP的pH各水平间在0.01水平上差异不显著 ( $F = 0.92, Pr = 0.4132$ ); DBP的pH ( $F = 5.94, Pr = 0.0094$ )、温度 ( $F = 6.00, Pr = 0.0091$ )、PAEs 初始浓度 ( $F = 12.9, Pr = 0.0003$ ) 3因素各水平间达到了0.01水平显著差异; DEHP的温度各水平间达到了0.01水平显著差异 ( $F = 12.86, Pr = 0.0003$ ), DEHP的pH ( $F = 2.75, Pr = 0.0881$ ) 和 PAEs 初始浓度 ( $F = 0.05, Pr = 0.9545$ ) 各水平间在0.01水平差异不显著。

由SSR法多重比较结果见表4, 表明DMP在浓度为100和 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间差异显著, DMP在浓度为100和 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间差异不显著; DEP和DBP在浓度为100, 20和 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间差异显著, 而100和 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间差异不显著; DEHP在浓度为100, 20和 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间差异不显著。

表4 PAEs的多重比较表

Table 4 Experiment results with Duncan's multiple range test

|             | 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | DMP | DEP | DBP | DEHP |
|-------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| 差异显著性(0.05) | 100                                 | A   | A   | A   | A    |
|             | 20                                  | A   | A B | A   | A    |
|             | 5                                   | B   | B   | B   | A    |

注: 字母相同表示无显著性差异; 字母不同表示有显著性差异。

综合以上结果, 各因素对PAEs类物质降解影响的大小关系是温度 > PAEs浓度 > pH, 各因素最优水平组合应为浓度 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH值7, 温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 3 讨论

邻苯二甲酸酯的生物降解反应首先是由微生物酯酶作用水解生成邻苯二甲酸单酯, 再生成邻苯二甲酸和相应的醇。在好氧条件下, 邻苯二甲酸在加氧酶的作用下生成3,4-二羟基邻苯二甲酸或4,5-二羟基邻苯二甲酸后, 形成原儿茶酸等双酚化合物。芳香环开裂形成相应的有机酸, 进而转化成丙酮酸、琥珀酸、延胡索酸等进入三羧酸循环, 最终转化为 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[10]</sup>。但是邻苯二甲酸酯的生物降解性随烷基链的长短以及分枝侧链的增加而降低, 这是由于随着分子量的增加, 增大了对生物反应的位阻效应<sup>[6]</sup>。本文研究表明, 混合体系的邻苯二甲酸酯的生物降解也符合长链的邻苯二甲酸酯, 如DBP、DEHP等远不如DMP、DEP等短链的容易降解。

*B. pickettii*. z-1菌降解相同浓度的4种混合邻苯

二甲酸酯的降解速率常数高于降解单一一种类邻苯二甲酸酯的速率常数, 这可能是因为共代谢原理, 多种邻苯二甲酸酯能够提供足够营养物质供微生物生长和繁殖的需要, 使微生物的生长与繁殖加快; 或者是由于4种邻苯二甲酸酯混合后对微生物的降解具有协同作用, 增加了微生物对PAEs降解位点的识别。向全春、王建龙等(2000)研究发现*B. pickettii*. sp降解喹啉时, 喹啉初始浓度越高, 其降解速率越快<sup>[11]</sup>。

*B. pickettii*. z-1菌对邻苯二甲酸酯类化合物的生物降解受到多种因素的影响, 其中温度、pH和PAEs基质浓度是影响邻苯二甲酸酯生物降解的最主要因素。*Burkholderia P*降解几种混合PAEs时, 只对一定浓度的PAEs保持较强的降解效果, 随着PAEs浓度增加, *Burkholderia P*对PAEs的降解速率下降, 即当基质浓度满足降解菌的物质要求后, 再增加基质浓度对降解速率没有贡献, 而且由于PAEs对微生物的毒性, 当PAEs浓度足够高后, 会对降解菌的生长产生抑制作用。

### 4 结论

(1) *B. pickettii*. z-1菌同时降解4种混合体系邻苯二甲酸酯的降解速率常数都高于降解单一一种类邻苯二甲酸酯的速率常数。

(2) *B. pickettii*. z-1菌对混合体系PAEs的降解速率常数总的趋势是随着基质初始浓度梯度的增加而减小, 半衰期随着基质初始浓度的增加而增大; 对不同PAEs化合物的降解能力差别很大, 较短侧链的DMP和DEP降解较快, 较长侧链的DBP、DEHP降解较慢。

(3) 温度、pH和PAEs基质浓度是影响邻苯二甲酸酯生物降解的最主要因素, 各因素对PAEs类物质降解影响的大小关系是温度 > PAEs浓度 > pH; 各因素最优水平组合应为浓度 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH值7, 温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

### 参考文献:

- [1] 赵文红. 酞酸酯类增塑剂毒理研究进展[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(2): 135-138.
- [2] 胡晓宇, 张可荣, 孙俊红, 等. 中国环境中邻苯二甲酸酯类化合物污染的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(1): 9-14.
- [3] L E Gray Jr, Ostby J, Furr J, et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat[J]. *Toxicol Sci Volume*, 2000, 58: 350-

- 365.
- [4] 曾 锋,傅家谟,盛国英. 邻苯二甲酸酯类有机污染物生物降解性研究进展[J]. 环境科学进展,1999,7(4):1-13.
- [5] Wang YingYing, Fan Yanzhen, Gu JiDong. Aerobic degradation of phthalic acid by FY-1 from sewage sludge at high concentration[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*,2003,19:811-815.
- [6] Chang B V, Yang C M, Cheng C H. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains[J]. *Chemosphere*, 2004,55:533-538.
- [7] 夏凤毅,郑 平,周 琪,等. 邻苯二甲酸酯的摇瓶生物降解规律研究[J]. 环境科学学报,2002,22(3):379-384.
- [8] 秦 华,林先贵,尹 睿,等. 一株邻苯二甲酸二异辛酯高效降解菌的筛选及其降解特性的初步研究[J]. 农业环境科学学报,2005,24(6):1171-1175.
- [9] 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.
- [10] Eaton R W. Plasmid - encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B[J]. *J Bacteriol*,2001,183:3689-3703.
- [11] 全向春,韩力平,王建龙,等. 固定化皮氏伯克霍而德氏菌降解唑啉的研究[J]. 环境科学,2000,21(7):74-76.