

文章编号: 1005 - 8893 (2004) 03 - 0034 - 04

## 4种邻苯二甲酸酯的降解及其降解菌株生长特性的研究<sup>\*</sup>

叶张荣<sup>1</sup>, 夏凤毅<sup>2</sup>, 马鲁铭<sup>1</sup>

(1. 同济大学 城市污染控制国家工程研究中心, 上海 200092; 2. 温州大学 生命与环境科学学院, 浙江 温州 325007)

**摘要:** 从驯化的污泥中分离得到菌株1和菌株2, 对4种邻苯二甲酸酯进行生物降解性研究, 获得了其降解速率常数( $k_b$ )、米氏常数( $K_m$ )和最大速率常数( $v_{max}$ )。结果表明, 4种化合物的降解符合一级动力学模型。菌株1对邻苯二甲酸二甲酯(DMP)和邻苯二甲酸二丁酯(DnBP)生物降解的 $k_b$ 、 $K_m$ 、 $v_{max}$ 分别为:  $0.154\text{ h}^{-1}$ 、 $484.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $95.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ;  $0.0079\text{ h}^{-1}$ 、 $5752.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $48.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , DMP降解能力明显好于DnBP。菌株2对邻苯二甲酸二庚酯(DiHP)和邻苯二甲酸二辛酯(DnOP)降解的 $k_b$ 、 $K_m$ 、 $v_{max}$ 分别为 $0.0224\text{ h}^{-1}$ 、 $715.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $23.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ;  $0.0227\text{ h}^{-1}$ 、 $517.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $16.9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 两者降解能力相近。

**关键词:** 邻苯二甲酸酯; 生物降解; 菌株; 动力学

**中图分类号:** X 172

**文献标识码:** A

邻苯二甲酸酯(Phthalic Acid Esters, 简称PAEs), 俗称酞酸酯, 作为一类重要的化工产品, 具有极其广泛的用途<sup>[1]</sup>。其中3种被我国列为优先监测污染物<sup>[2]</sup>, 有证据表明, 有一半被怀疑为环境激素<sup>[3~5]</sup>。PAEs的大量使用已经对环境造成了一定的污染, 在水环境尤其是底泥中都有一定量的PAEs存在<sup>[6]</sup>。生物降解是环境中有机污染物降解和消除的重要途径, 目前国内外开展的研究, 通过分离优势菌种的方法, 主要集中在对单个PAE的降解机理研究上, 而未能对不同分子质量PAEs的降解进行对照性的研究。实验选取能代表低分子质量PAEs的DMP和DnBP, 和能代表高分子质量的DiHP和DnOP作为研究样本, 用纯化菌分别对目标化合物进行降解性测试。目标样本的研究对了解不同分子质量PAEs在好氧处理过程中的动力学转化具有指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 纯化培养菌的制备

**驯化:** 在4个1 L的玻璃瓶中分别加入活性污泥300 mL, 菜园土5 g, 营养液600 mL, 各加入1种邻苯二甲酸酯, 使质量浓度达到 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 30℃曝气驯化3周。营养液组成与文献[7]一致。

**选择培养:** 以氮、磷等无机盐和少量微量元素为主, 配成培养基和培养基, 培养基中加入碳源DMP, 培养基中加入碳源DnOP, 分别对能降解低分子质量和高分子质量PAEs的菌种进行选择。取驯化后的菌液于选择培养基和中选择培养, 重复3次。取选择培养后的菌悬液斜面划线, 重复3次, 得到专门降解低分子质量PAEs的菌株1和降解高分子质量PAEs的菌株2。培养基无机盐组成见文献[7]。

**扩大培养:** 从斜面挑取纯化后的菌株于液体培养基中, 30℃摇床培养3 d, 作为纯化培养接种物。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2004 - 03 - 09

基金项目: 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室访问学者基金; 温州市科技局重点项目(N2002A118)

作者简介: 叶张荣(1979 - ), 男, 浙江绍兴人, 硕士研究生。

1.2 邻苯二甲酸酯降解动力学曲线测定

称取 50 mg PAEs 样品于若干个 250 mL 三角瓶中，加入 100 mL 无机盐培养基，对 DMP 和 DnBP 降解研究时加入含菌株 1 的接种物 1 mL，对 DiHP 和 DnOP 降解研究时加入含菌株 2 的接种物 1 mL，30℃，100 r/min 的恒温摇床上培养。在不同时刻，取样分析，氯仿萃取后用气相色谱（GC）进行分析，再用外标法定量。根据不同时刻分析所得的 PAEs 的含量绘制降解动力学曲线。

GC 测试条件：载气（N<sub>2</sub>）78.1 mL·min<sup>-1</sup>；空气 7.96 mL·min<sup>-1</sup>；H<sub>2</sub> 7.96 mL·min<sup>-1</sup>，DMP 和 DnBP 测试柱温 230℃，DnOP 和 DiHP 测试柱温 300℃，检测器为氢离子火焰检测器（FID）。

1.3 降解菌株生长速度的测定

采用比浊法测定微生物的生长。4 种 PAEs 的初始质量浓度均为 500 mg·L<sup>-1</sup>，接种量 1 mL，无机盐培养基 100 mL，培养条件同上。仪器设备及测试条件：SHIMADZU UV-1206（日本）型分光光度计，测试波长 600 nm。

1.4 菌株的降解特性研究

根据米门方程式可以得到以下方程式，通过测定化合物不同质量浓度时的降解速率  $v$ ，对质量浓度和降解速率的倒数作图，可以得到  $K_m$ ，用来表征菌株的降解特性。式中  $s$  为底物质量浓度， $v_{max}$  为底物最大降解速率。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{v_{max}}$$

2 结果与讨论

2.1 4 种化合物的降解动力学曲线

4 种邻苯二甲酸酯质量浓度与时间的关系如图 1~图 4 所示，研究发现，其降解规律可用一级动力学方程表示。在每个 PAE 降解实验中均做了对照空白实验，即图中的 CK 曲线。在对照实验中加入等量的接种物，然后进行高温灭菌。主要考虑接种物的吸附及接种、取样过程中光照可能对邻苯二甲酸酯含量的测定产生影响。从图中的 CK 曲线可以发现，这两者的影响是很小的。实验中邻苯二甲酸酯减少主要由纯化菌株的降解作用引起。4 种邻苯二甲酸酯的降解动力学方程如表 1 所示。

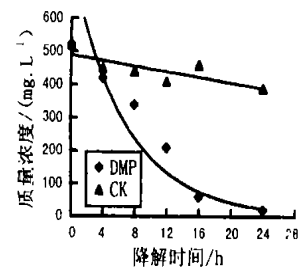


图 1 DMP 随时间的降解曲线  
Fig. 1 Biodegradation curve of DMP

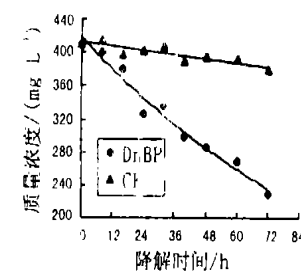


图 2 DnBP 随时间的降解曲线  
Fig. 2 Biodegradation curve of DnBP

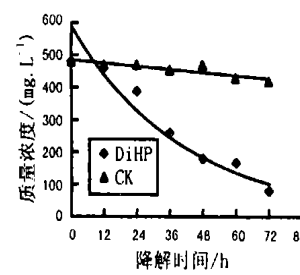


图 3 DiHP 随时间的降解曲线  
Fig. 3 Biodegradation curve of DiHP

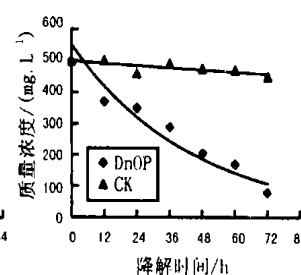


图 4 DnOP 随时间的降解曲线  
Fig. 4 Biodegradation curve of DnOP

表 1 4 种 PAEs 的生物降解的动力学方程

Table 1 Kinetic equation of four PAEs biodegradation

化合物	纯培养物菌株	降解动力学方程	降解速率常数/(h <sup>-1</sup> )	半衰期 (t <sub>1/2</sub> )/h	相关系数 (r)
DMP	菌株 1	ln C = - 0.154 x + 6.650 3	0.154 0	4.5	0.964
DnBP	菌株 1	ln C = - 0.007 9 x + 6.035 2	0.007 9	87.7	0.985
DiHP	菌株 2	ln C = - 0.022 4 x + 6.349 1	0.022 4	30.9	0.965
DnOP	菌株 2	ln C = - 0.022 7 x + 6.329 4	0.022 7	30.5	0.955

在本实验中，DnBP 的初始质量浓度为 410 mg·L<sup>-1</sup>，其余底物的初始质量浓度均为 500 mg·L<sup>-1</sup>。由上表可知，DMP 在含有菌株 1 的纯培养物作用下降解非常迅速，半衰期仅为 4.5 h，比文献 [8] 所报道的相同质量浓度下 DMP 的降解要快得

多。有研究认为当 DMP 的质量浓度大于 60 mg·L<sup>-1</sup> 时，其将对微生物产生抑制作用 [9]，而在本研究中 DMP 的质量浓度高达 500 mg·L<sup>-1</sup>，菌株 1 仍能在较短时间内对其进行降解，也充分表明了其良好的降解能力。而表中 DnBP 的半衰期则长达

87.7 h, 其降解速率十分缓慢, 这与其分子结构有一定关系。降解速率常数  $k_b$  与 PAEs 单个烷基链上亚甲基 ( - CH<sub>2</sub> - 结构) 的数目有下列近似关系<sup>[9]</sup>:

$$\ln k_b = 0.0262x^2 - 0.667x + 2.152$$

式中  $x$  为甲基的数目。

与 DMP 相比, DnBP 的烷基链上增加了 3 个亚甲基结构, 从而将导致其降解速率的下降。同时由于甲基数目的增多也导致了 DnBP 反应空间位阻及疏水性的增加。这都是导致 DnBP 降解性能下降的原因。另外也有报道, 当 DnBP 质量浓度大于 200 mg · L<sup>-1</sup> 时, 降解速率常数将随底物初始质量浓度的增加而降低<sup>[10]</sup>。本实验中 DnBP 的初始质量浓度为 410 mg · L<sup>-1</sup>, 显然已对微生物的降解产生了明显的抑制。从菌株 1 对高质量浓度 DMP 和 DnBP 的降解情况可以看到, 在相同环境条件下, DnBP 对生物的抑制性要远远大于 DMP 对生物产生的抑制性。

DiHP 和 DnOP 均为高分子质量的 PAEs, 两化合物仅相差两个亚甲基结构, 可以看到菌株 2 对具有相似分子结构的化合物具有相近的降解能力。两者的半衰期均为 30 h 左右, 降解速率相近, 降解过程可以用一级动力学方程进行描述。通过筛选后得到的纯化菌株 2 能够对高分子质量的 PAEs 在短时间内进行有效的降解。与文献 [9] 对初始质量浓度为 200 mg · L<sup>-1</sup> 的 DiHP 和 DnOP 研究结果相比, 本实验中两化合物的降解速率有一定程度的提高, 这可能与纯化菌的生长条件得到优化有关。

## 2.2 降解菌株的生长情况

好氧纯化培养物中, 菌株以不同的化合物作为基质的生长情况如图 5~图 8 所示, 菌株数量以分光光度计吸光值表示。菌株生长的数量越多, 菌悬液吸光值就越大。

图中 CK 曲线为空白对照实验, 方法同上, 除 DnBP 外, 空白对照实验中培养基的吸光值增加较少。因此可以认为培养基吸光值的增加是由于菌悬

液中菌株数量的增加引起的。由于 DnBP 在高温灭菌时易产生乳化, 因此该空白对照实验中培养基吸光值相对较高。菌株 1 在以 DMP 为基质时, 菌株数量增长较快, 而对 DnBP 进行降解时, 菌株数量增长缓慢, 可以认为其对 DMP 具有较好的适应降解能力, 而对 DnBP 的降解能力较差。菌株 2 在以 DiHP 和 DnOP 为基质时, 菌株数量都得到了明显增长, 说明两种化合物均能被有效降解。而菌株 2 对 DnOP 有更好的降解能力。

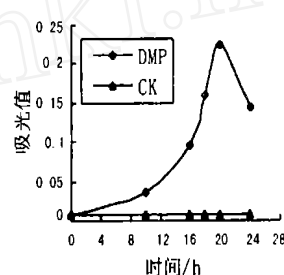


图 5 菌株 1 以 DMP 作基质的生长曲线  
Fig. 5 Strain 1 growth curve on DMP

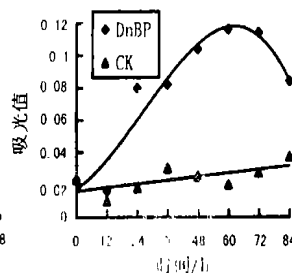


图 6 菌株 2 以 DiHP 作基质的生长曲线  
Fig. 6 Strain 2 growth curve on DiHP

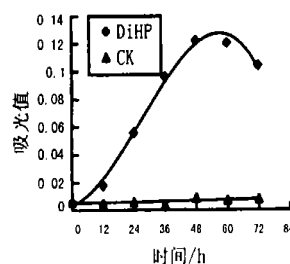


图 7 菌株 1 以 DnBP 作基质的生长曲线  
Fig. 7 Strain 1 growth curve on DnBP

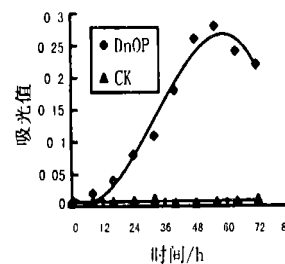


图 8 菌株 2 以 DnOP 作基质的生长曲线  
Fig. 8 Strain 2 growth curve on DiHP

## 2.3 菌株的降解特性

根据米门方程, 以底物降解速率  $v$  的倒数为纵坐标, 底物质量浓度的倒数为横坐标作图, 根据斜率  $K_m/v_{max}$  及截距  $1/v_{max}$  得到  $K_m$  和  $v_{max}$  的值。计算结果如表 2 所示。

表 2 菌株的生长特性

Table 2 Growth characteristics of two strains

化合物	降解菌株	米门方程变形形式	$v_{max}/$ (mg · L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	$K_m$ 值/ (mg · L <sup>-1</sup> )	相关系数
DMP	菌株 1	$1/V = 5.0827/C + 0.0105$	95.2	484.1	0.945
DnBP	菌株 1	$1/V = 117.93/C + 0.0205$	48.8	5752.7	0.972
DiHP	菌株 2	$1/V = 31.049/C + 0.0434$	23.0	715.4	0.954
DnOP	菌株 2	$1/V = 30.616/C + 0.0592$	16.9	517.2	0.935

菌株 1 对 DMP 降解的  $K_m$  值较小, 而 DnBP 的很大, 说明其对 DMP 有较好的亲和能力, 而对 DnBP 的亲和能力较差。同样菌株 2 对 DiHP 和 DnOP 的降解的  $K_m$  值相差不是很大, 对 DnOP 的亲和力略好于 DiHP, 这与前面对化合物的降解动力学分析及纯物中菌株生长曲线分析所得到的结果保持一致。

### 3 结 论

菌株 1 和菌株 2 对 DMP, DnBP, DiHP, DnOP 4 种邻苯二甲酸酯的降解符合一级动力学,  $k_b$  分别为  $0.154 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.0079 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.0224 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.0227 \text{ h}^{-1}$ ; 菌株 1 对 DMP 和 DnBP 降解的  $K_m$  分别为  $484.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $5752.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 菌株 2 对 DiHP 和 DnOP 降解的  $K_m$  值分别为  $715.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $517.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 菌株 1 对 DMP 有很好的降解效果, 对 DnBP 的降解效果相对较差, 两者的最大降解速率分别  $95.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  和  $48.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 菌株 2 对 DiHP 和 DnOP 降解速率相近, 最大降解速率分别为  $23.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  和  $16.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

通过对自然界中菌株的驯化, 纯化培养, 4 种在自然环境中较难降解的邻苯二甲酸酯都得到了不同程度的降解, 菌株的纯化培养将为难降解有机污染物的控制提供一种新的途径。

### 参考文献:

- [1] 叶常明. 环境中的邻苯二甲酸酯 [J]. 环境科学进展, 1993, 1 (2): 36 - 47.
- [2] 奚旦立, 蒋展鹏. 环境工程手册 [M]. 环境监测卷. 北京: 高等教育出版社, 1998. 1 007 - 1 008.
- [3] Parkerton TF, Konkel WJ. Application of Quantitative Structure - activity Relations - Hips for Assessing the Aquatic Toxicity Phthalate Eaters [J]. Ecotoxico Environ Safety, 2000, 45: 61 - 78.
- [4] Van Wezel AP, Van Vlaardingen, Posthumus R, et al. Environmental Risk Limits for Two Phthalates with Special Emphasis on Endocrine Disruptive Properties [J]. Ecotoxico Environ Safety, 2000, 46: 3 205 - 3 214.
- [5] Thomsen M, Rasmussen AG, Carlsen L. SAR/QSAR Approaches to Solubility Portioning and Sorption of Phthalate [J]. Chemosphere, 1999, 38 (11): 2 613 - 2 624.
- [6] 莫测辉, 蔡全英, 吴启堂, 等. 我国城市污泥中邻苯二甲酸酯的研究 [J]. 中国环境科学, 2001, 21 (4): 362 - 366.
- [7] 曾锋, 康跃惠, 傅家谟, 等. 邻苯二甲酸二 (2 - 乙基己基) 酯酶促降解性的研究 [J]. 环境科学学报, 2001, 21 (1): 13 - 17.
- [8] 曾锋, 傅家谟, 盛国英, 等. 邻苯二甲酸二甲酯的微生物降解研究 [J]. 环境科学研究, 1999, 12 (4): 12 - 14.
- [9] 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.
- [10] 曾锋, 傅家谟, 盛国英, 等. 邻苯二甲酸二甲酯的微生物降解 [J]. 环境科学, 1999, 20 (5): 49 - 51.

## Research on Four Phthalic Acid Esters' Biodegradation and the Strains' Growth Characteristics

YE Zhang - rong<sup>1</sup>, XIA Feng - yi<sup>2</sup>, MA Lu - ming<sup>1</sup>

(1. National Engineering Research Center of Urban Pollution Control, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. College of Life and Environment Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325007, China)

**Abstract:** Research of four Phthalic Acid Esters (PAEs) biodegradation was carried out with two strains separated from the acclimated sludge. The constant of biodegradation velocity ( $k_b$ ),  $K_m$  of Michaelis - Menten equation, and the maximum velocity of biodegradation ( $v_{\max}$ ) were obtained. The results showed that four PAEs' biodegradation could be described by first - order kinetics equations. Dimethyl Phthalate (DMP) was biodegraded more rapidly than Dibutyl Phthalate (DnBP) by strain 1. Their  $k_b$ ,  $K_m$  and  $v_{\max}$  were  $0.154 \text{ h}^{-1}$ ,  $484.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $95.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $0.0079 \text{ h}^{-1}$ ,  $5752.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $48.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Diheptyl Phthalate (DiHP) and Dioctyl Phthalate (DnOP) have the similar biodegradation efficiency by Strain 2. Their  $k_b$ ,  $K_m$  and  $v_{\max}$  were  $0.0224 \text{ h}^{-1}$ ,  $715.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $23.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $0.0227 \text{ h}^{-1}$ ,  $517.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $16.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

**Key words:** Phthalic Acid Esters; biodegradation; strains; kinetics