

# 邻苯二甲酸酯高效降解菌的筛选及表征

杨捷<sup>1</sup>, 姚炎华<sup>1</sup>, 尹大强<sup>2</sup>, 叶秀云<sup>1</sup>

(1. 福州大学 福建省海洋酶工程重点实验室, 福建 福州 350116; 2. 同济大学 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

**摘要:** 以邻苯二甲酸二丁酯(DBP)为唯一碳源, 筛选得到一株能够降解 DBP 的菌株。通过形态学观察、16S rDNA 测序及系统发育分析, 鉴定该菌株为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.), 命名为 B3。首次报道了寡养单胞菌对邻苯二甲酸酯(PAEs)的降解作用。B3 可高效降解 0.05~50 g·L<sup>-1</sup> 浓度范围的 DBP, 其中对 0.05 g·L<sup>-1</sup> DBP 的降解率为 93.4%。经过优化后, 在 35 °C、pH 8 条件下对 10 g·L<sup>-1</sup> DBP 的降解率为 95.8%。反应动力学研究表明, B3 降解 DBP 符合一级降解动力学模型, 对 50 g·L<sup>-1</sup> DBP 初始降解速率可达 1.25 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。B3 对其他 4 种常见的 PAEs (邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯、邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸丁苄酯、邻苯二甲酸二乙酯)和苯胺、甲苯、邻苯二甲酸的降解率均在 50% 及以上。B3 降解 PAEs 浓度范围宽、底物种类范围广, 表明 B3 在 PAEs 的生物降解中具有良好的应用前景。

**关键词:** 寡养单胞菌; 邻苯二甲酸酯; 邻苯二甲酸二丁酯; 生物降解; 降解动力学

中图分类号: X703

文献标志码: A

## Screening and Characterization of an Efficient Phthalate-Ester-Degrading Strain

YANG Jie<sup>1</sup>, YAO Yanhua<sup>1</sup>, YIN Daqiang<sup>2</sup>, YE Xiuyun<sup>1</sup>

(1. Fujian Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China; 2. The Yangtze River Water Environment Key Laboratory of the Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** With dibutyl phthalate (DBP) as the sole carbon source, we isolated a DBP-degrading strain; by its morphology as well as 16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis, the strain was identified as *Stenotrophomonas* sp., designated as strain B3. Degradation of Phthalate esters (PAEs) by *Stenotrophomonas* was reported for the first time. The degradation efficiency of 0.05 g·L<sup>-1</sup> DBP is 93.4%; B3 could efficiently degrade DBP up to 50 g·L<sup>-1</sup>, and under the conditions of pH 8, 35 °C, the degradation efficiency of 10 g

·L<sup>-1</sup> DBP by B3 reached 95.8%. Kinetic studies showed that DBP degradation by B3 followed first-order kinetics, and the initial degradation rate of 50 g·L<sup>-1</sup> DBP can reach 1.25 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. The degradation efficiencies of four other common PAEs (di-2-ethylhexylPhthalate, dimethyl phthalate, benzyl butyl phthalate, diethyl phthalate) as well as aniline, toluene and phthalic acid by B3 were 50% or higher, suggesting that B3 had a broad substrate spectrum. The ability of B3 to degrade various PAEs at high concentrations indicates that B3 is promising in bioremediation of PAEs.

**Key words:** *Stenotrophomonas*; phthalate esters; dibutyl phthalate; biodegradation; kinetics

邻苯二甲酸酯类(phthalate esters, PAEs)作为塑料添加剂和软化剂广泛用于塑料产品、皮革、建筑材料、个人护理产品、洗涤剂、油漆等产品中<sup>[1]</sup>。PAEs 的一般结构由一个苯环和两个侧链组成, 不同的 PAEs 的区别在于侧链基团的不同。PAEs 的种类繁多, 包括具有简单侧链基团的邻苯二甲酸二甲酯(dimethyl phthalate, DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate, DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP), 和具有复杂侧链基团的邻苯二甲酸丁苄酯(benzyl butyl phthalate, BBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(di-2-ethylhexylPhthalate, DEHP)。在塑料制品中, PAEs 以氢键或范德华力与塑料连接, 这种不牢固的化学键使 PAEs 较容易从塑料中释放出来, 造成了对大气、水体、土壤的污染<sup>[2]</sup>。PAEs 已成为全球最普遍的有机污染物之一, 多种 PAEs 在全球主要工业国的生态环境中都达到了普遍检出程度, 其中 DBP、DEHP、DMP 最常被检测出<sup>[3]</sup>, 浓度一般在 mg·L<sup>-1</sup> 级别。在增塑剂生产过程产生的污水属于高浓度有机污染废水, PAEs 浓度高<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2017-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(31671795、41306120)、海洋生物酶工程创新服务平台(2014FJPT02)

第一作者: 杨捷(1979—), 女, 工学博士, 研究员, 主要研究方向为应用微生物。E-mail: fjjzhyj@yahoo.com

PAEs 是一类具有类似于雌激素作用的内分泌干扰物,且对动物具有致畸性、致突变性、致癌性以及生殖毒性<sup>[5]</sup>,具有低浓度长期危害特征。其污染控制已受到全球性关注,美国环保局(EPA)、中国环境监测总站及欧盟都将 DBP、BBP、DEHP、DEP 等多种 PAEs 列为优先控制污染物<sup>[6]</sup>。

PAEs 很难降解,在自然环境中通过水解、光解的速率非常缓慢。处理 PAEs 污染物的现有技术主要有吸附、光化学氧化、生物降解等。吸附法和光化学氧化法成本高,且容易造成二次污染。微生物降解是自然界中 PAEs 去除的主要方式,具有清洁经济的特点,得到科研人员的广泛关注<sup>[7]</sup>。DBP 作为最常用的 PAEs,许多研究人员从环境中筛选 DBP 的降解菌。已报道的 DBP 降解菌普遍降解浓度较低,仅在  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  水平,且降解其他(如长链)PAEs 的效率不高<sup>[8-9]</sup>,因此有必要筛选出降解能力更强、降解条件和底物范围更广的 DBP 降解菌,以提高微生物在降解 PAEs 中的应用价值。

本研究从土壤中筛选到能够高效降解 DBP 的菌株,通过生理生化以及 16S rDNA 等将其鉴定为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.),并测试其底物范围及探究降解 DBP 的条件、降解动力学,可为 PAEs 的污染治理提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

土样采自福建省福州市晋安区新店镇红庙岭垃圾综合处理场。试剂:DBP、DEHP、DMP、BBP、DEP、苯胺、甲苯和邻苯二甲酸、三氯甲烷(均为分析纯)、甲醇(色谱纯/分析纯)均购自国药试剂有限公司;用水为超纯水 其余无机盐试剂均为分析纯。

基础无机盐培养基(mineral salt medium, MSM)(成分的单位:  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{MgCl}_2$  0.16 g,  $\text{CaCl}_2$  0.02 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002 4 g,  $\text{FeCl}_3$  0.001 8 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 5 g, pH 7.0。121℃ 高压灭菌 20 min。

底物培养基:液体培养基是在试管中加入甲醇溶解的 DBP、DEHP、DMP、BBP、DEP、苯胺、甲苯和邻苯二甲酸母液,水浴加热使甲醇蒸发,待甲醇完全蒸发后再加入 MSM 配制所需浓度的各类底物液体培养基。DBP 固体培养基是 DBP 液体培养基加 2%的琼脂。121℃ 高压灭菌 20 min。

### 1.2 降解菌的筛选

称取土样 5 g 于 100 mL 含 5% 的 DBP 液体培养液中,采用 10%、15%、20% 的 DBP 浓度梯度压力法驯化,30℃,150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养 7 d,再转接 2 mL 菌液至下一浓度梯度的 DBP 液体培养基培养。20% 的 DBP 的菌液进行梯度稀释  $10^4$  倍后涂布于 DBP 固体平板上,30℃ 有氧恒温培养,通过划线在 DBP 固体平板上反复纯化,重复多次,直至菌落形态单一。挑取单菌落,在 LB(Luria-Bertani)培养基中富集培养。

### 1.3 降解菌的分子生物学鉴定

用细菌基因组脱氧核糖核酸(DNA)提取试剂盒(OMEGA 公司)提取细菌的总 DNA,以其为模板,用 16S rDNA 特异性引物 27F 与 1492R,进行 16S rDNA 扩增。

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,委托上海英潍捷基生物技术有限公司测序。将测序结果与 NCBI 数据库中 Blastn 程序进行序列同源性检索和比对,并通过 MEGA7.0 软件,构建系统发育进化树,分析确定该菌的分类地位。

### 1.4 PAEs 的测定

采用高效液相色谱法(HPLC)测定 PAEs 含量:将菌体与液体培养基 8000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min。用三氯甲烷分别对菌和液体进行两次萃取得到 PAEs,待三氯甲烷挥发后,加入甲醇定容至 5.0 mL。用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的有机相过滤器过滤后,用高效液相色谱仪(DGC-20A3R 型,岛津公司)测定液体中 PAEs 的含量。

HPLC 分析条件:色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ),柱温 35℃,流动相甲醇与水体积比为 90:10,流速为 0.5 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ,检测器波长为 228 nm,进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。利用 HPLC 测定 PAEs 的残留量。

### 1.5 生长量的测定

取菌液 1 mL,离心分离,用 MSM 重悬菌液,紫外分光光度计(T6 系列,上海普析通用仪器有限公司)测  $\text{OD}_{600}$ ,即为菌株的生长量。

### 1.6 底物特异性

挑取在 DBP 固体培养基中生长良好的单菌落,置于 LB 液体培养基中 30℃,175  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 10 h。离心收集菌体、重悬,配制菌体浓度  $\text{OD}_{600}$  0.1。无菌条件下,吸取菌液,接种量于 4 mL,8 种 10  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  液体底物(DBP、DEHP、DMP、BBP、DEP、苯胺、

甲苯和邻苯二甲酸)培养基中, pH 7、30 °C、150 r · min<sup>-1</sup>摇床培养 5 d. 紫外分光光度计测定生长量, 高效液相色谱法分析 8 种底物的残留量.

### 1.7 DBP 降解条件的优化

分别探究不同的 DBP 初始浓度、pH、温度、摇床转速及葡萄糖添加量在 72 h 内对菌生长和降解 DBP 的影响. 所有实验数据均为三次平行实验的平均值, 数据采用 Excel 软件进行分析, 图中误差线为三次平行实验的标准差.

### 1.8 降解动力学

分别探究初始质量浓度为 1、5、10、20、50 g · L<sup>-1</sup> 的 DBP, 在最佳培养条件下, 每隔 8 h 测定 72 h 内 DBP 的残留量, 每个样品设置三组平行. 用软件 GraphPad Prism5. 0 (GraphPad Software, Inc, USA) 拟合实验数据, 构建降解动力学模型, 得出 B3 降解 DBP 的半衰期和速率常数. 直观体现出时间和 PAEs 残留量的关系以及降解速率的变化. 进一步研究出 B3 的降解 DBP 的特性, 完善微生物降解 PAEs 有机污染物的研究. 一级动力学模型可用方程表示:  $Y = (Y_0 - r_{Pla}) \cdot e^{-Kt} + r_{Pla}$ ,  $Y$  表示 DBP 的质量浓度, g · L<sup>-1</sup>;  $Y_0$  为初始质量浓度, g · L<sup>-1</sup>;  $r_{Pla}$  为无限

时间后 DBP 残留质量浓度, g · L<sup>-1</sup>;  $K$  为速率常数, 半衰期  $t_{1/2} = \ln 2 / K$ , 初始降解速率  $v_0 = dY/dt = (Y_0 - r_{Pla}) \cdot K \cdot e^{-Kt}$ ,  $t \rightarrow 0$ .  $v_0$  的单位为 g · L<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 降解菌的鉴定

经过富集培养, 分离得到一株能够在以 DBP 为唯一碳源的基础培养基中生长良好的菌, 命名为 B3. 观察菌落形态并通过结晶紫简单染色观察细菌, 发现菌落呈黄绿色不透明, 中等大小, 表面粘稠, 边缘平整, 规则圆形, 表面隆起, 细长杆状.

扩增得到 B3 的 16S rDNA 序列, 并构建系统进化树(图 1), B3 与寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp. KX928046.1) 聚为一支, 相似性为 99%, 同时结合该菌株的菌落形态特征, 判定其为寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.). 据报道, 寡养单胞菌能降解甲基对硫磷<sup>[10]</sup>、双对氯苯基三氯乙烷(DDT) 有机农药<sup>[11]</sup> 和四环素<sup>[12]</sup> 等有机污染物, 本研究筛选得到的能降解 PAEs 的寡养单胞菌为首次发现.

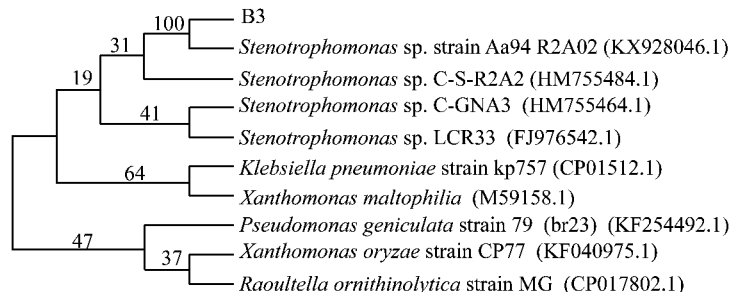


图 1 B3 的系统发育树分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of strain B3

### 2.2 底物特异性

将 B3 分别接种于如表 1 所示的 8 种 10 g · L<sup>-1</sup> 底物液体培养基中, 培养 5 d 后检测菌株的生物量(OD<sub>600</sub>)及底物的残留量, 计算降解率.

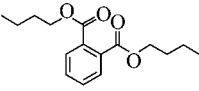
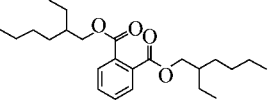
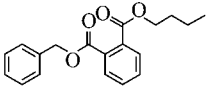
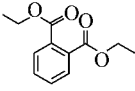
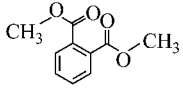
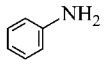

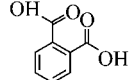
B3 在 8 种底物培养基中均能生长, 其中在短链的 PAEs(DBP、BBP、DMP) 以及苯胺中生长较好(OD<sub>600</sub> > 0.8), 而在长链 PAE(DEHP) 中生长较慢, 这种差异可能是由于各类 PAEs 侧链不同所引起的<sup>[8-9]</sup>. B3 对 8 种底物的降解率均在 50% 及以上, 其中对 BBP(90.1%) 和苯胺(89.0%) 的降解率最高, 其次是 DBP(75.9%) 和 DMP(73.0%). 这表明 B3 的底物特异性不明显, 能够降解多种 PAEs 及芳香类化合物. 与 B3 类似, 许多已报道的 DBP 降解菌更

容易利用短链的 PAEs, 而对长链 PAEs 如 DEHP 的降解效果不佳; 如 *Gordonia* sp. strain QH-11<sup>[13-14]</sup> 降解 DEP 和 DBP 的效果比长链的 DMP、DIOP、DEHP 的好; *Camelimonas* sp. M11<sup>[15]</sup> 降解 DPP、DEP、DBP 的效率依次递减. B3 降解 10 g · L<sup>-1</sup> 的长链 DEHP 的能力虽不比短链的好, 但降解率仍有 60% 以上.

### 2.3 降解条件优化

首先探究底物 DBP 的初始浓度对 B3 生长和降解率的影响(表 2). 表中, 培养条件: pH 为 7, 30 °C, 175 r · min<sup>-1</sup>, 初始菌浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.05, 反应时间为 72 h. 随着底物浓度增加, B3 生长量在增长, 当质量浓度大于 10 g · L<sup>-1</sup>, 呈缓慢下降趋势, 表明 B3

表 1 B3 的底物特异性  
Tab.1 Substrate specificity of strain B3

底物	结构	分子式	分子量	生长量 OD <sub>600</sub>	降解率/ %
DBP		C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.34	1.0 ± 0.07	75.9 ± 0.3
DEHP		C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.56	0.7 ± 0.02	63.3 ± 0.2
BBP		C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	312.36	1.3 ± 0.02	90.1 ± 0.1
DEP		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222.24	0.7 ± 0.05	53.3 ± 0.1
DMP		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.18	0.8 ± 0.07	73.0 ± 0.2
苯胺		C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N	93.13	1.1 ± 0.05	88.9 ± 0.1
甲苯		C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92.14	0.8 ± 0.05	66.4 ± 0.1
邻苯二甲酸		C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	166.13	0.4 ± 0.08	48.6 ± 0.3

对 DBP 具有很强的耐受性. DBP 质量浓度为 0.05 g · L<sup>-1</sup> 时, 降解率为 93.4%, DBP 浓度提高, 降解率缓慢下降, 可能是由于底物过剩, 或是 DBP 本身具有毒性, 随着其浓度增加对菌的抑制作用增强. 当 DBP 质量浓度小于等于 10 g · L<sup>-1</sup> 时, B3 降解 DBP 的效率均大于 75%. 当 DBP 质量浓度在 20 g · L<sup>-1</sup>

及以上时, 降解率仍维持在 70% 左右. 许多报道也研究了不同浓度 DBP 对菌的降解的影响: He<sup>[8]</sup> 和 Jin<sup>[13]</sup> 等分别研究了 0.6~1.2 g · L<sup>-1</sup> 和 0.1~0.75 g · L<sup>-1</sup> 质量浓度范围的 DBP 对菌降解的影响. B3 降解 DBP 浓度范围较前人的宽, 而且效率高. 表 2 中, 生长量以 OD<sub>600</sub> 表示(下同).

表 2 DBP 初始浓度对 B3 菌株降解的影响

Tab.2 Effect of initial DBP concentrations on the degradation efficiency by B3

初始质量浓度/ (g · L <sup>-1</sup> )	0.05	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	50.0
生长量	0.4 ± 0.07	0.6 ± 0.05	0.7 ± 0.03	0.8 ± 0.06	1.0 ± 0.07	0.9 ± 0.06	0.9 ± 0.04
降解率/ %	93.4 ± 0.4	86.3 ± 4.5	74.5 ± 3.5	75.8 ± 7.0	75.9 ± 1.3	70.30 ± 5.8	68.8 ± 5.1

在 10 g · L<sup>-1</sup> DBP 初始质量浓度下, 探究 pH、温度、摇床转速、接菌量和葡萄糖浓度对 B3 生长和降解 DBP 的影响(图 2、表 3). 图 2 显示, B3 的生长量和降解率呈现正相关. 图 2a 显示, 30 °C 条件下, B3 在 pH 为 5~11, B3 对 10 g · L<sup>-1</sup> DBP 的降解率保持在 60% 以上, 当 pH 由 7 上升至 8 时, B3 的降解率由 75.9% 提高至 92.2%, 说明弱碱性的环境有利于 B3 对 DBP 的降解. Wu 等<sup>[16]</sup> 筛选出的 *Ochrobactrum* sp. JDC-41 在 pH 小于 5 或 pH 高于 9, DBP 降解率骤降至 2%~35%. 而 B3 在 pH 小于 6 或高于 9 的条件下, 对 DBP 的降解率都超过 60%, 表明 B3 降解 DBP 受 pH 影响相对较小.

在 pH 8 的条件下探究温度对 B3 降解 DBP 的影响(图 2b). 不同温度下菌株的生长量和降解率不同, 这可能与菌体内酶的活性有关. 20 °C~45 °C 时, B3 降解率均在 60% 以上, 其中在 25 °C~35 °C 降解率大于 80%, 35 °C 时降解率最高, 为 94.1%. B3 在温度 40 °C 及以上时, 对 10 g · L<sup>-1</sup> DBP 仍具有 70% 以上的降解率, 这与报道的降解 DBP 的 *eBrucellaceae*、*Sinobacteraceae*<sup>[7]</sup> 等菌株不同, 这些菌降解的最适温度均在 30 °C~35 °C 间, 但温度大于 40 °C 或低于 25 °C 时, 降解活力大大降低.

图 2c 摇床的转速反映了对 B3 降解 DBP 过程中的溶解氧的供给量, 溶解氧供给量不足或是过量,

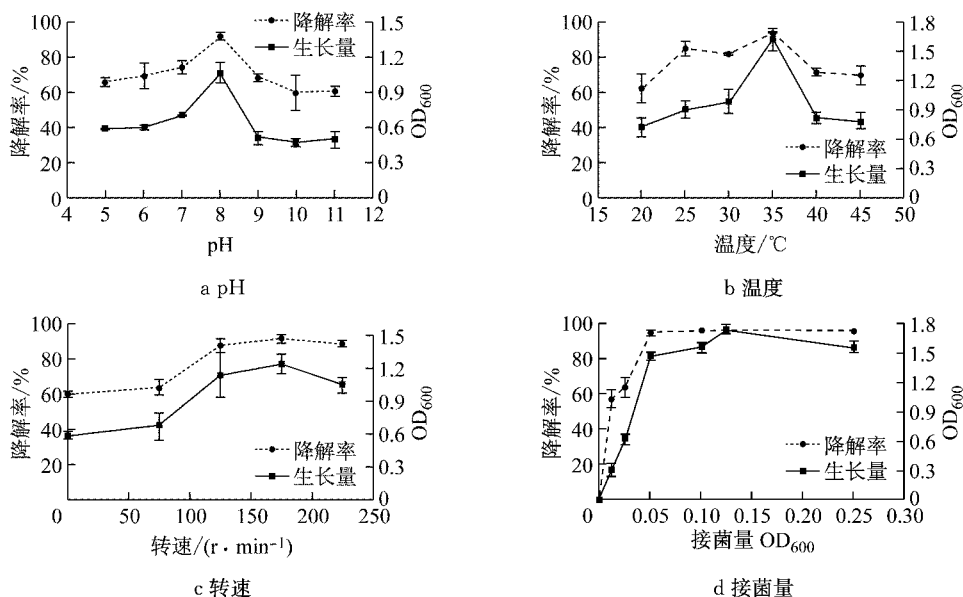


图 2 B3 菌株降解 DBP 的条件优化

Fig. 2 Optimization of conditions for the degradation of DBP by B3 strain

表 3 葡萄糖添加量对 B3 降解 DBP 的影响

Tab. 3 Effect of glucose concentrations on B3 proliferation and DBP degradation

葡萄糖质量浓度/ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5
生长量	$1.5 \pm 0.2$	$2.0 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.1$	$4.3 \pm 0.1$	$5.2 \pm 0.1$	$5.5 \pm 0.1$	$5.9 \pm 0.1$
降解率/%	$95.8 \pm 0.5$	$62.1 \pm 2.4$	$65.9 \pm 0.9$	$94.2 \pm 0.2$	$95.1 \pm 0.1$	$95.8 \pm 1.7$	$95.9 \pm 1.8$

注:培养条件:pH 8, 35 °C, 175  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , DBP 质量浓度为  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 接菌量  $\text{OD}_{600}$  0.05, 反应时间为 72 h

好氧微生物的生长与代谢均会受影响. 转速过低通气量不足, 菌株的生长和降解效果不佳; 随着转速提升, B3 生长和降解速率增加, 在转速  $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时 B3 菌株的生长量达到最高、降解 DBP 的效果最佳. 转速高于  $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 生长量和降解率均有所降低. Wu 等<sup>[17]</sup>发现 *Gordonia* sp. 降解 DBP 的最佳摇床转速为  $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 而转速大于或小于  $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, B3 对 DBP 的降解效果降低, 本文与该结果相似. 与本文不同的是, *Gordonia* sp 菌在  $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 对  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DBP 降解率只有 20% 左右, 而 B3 在静置培养时, 降解率仍有 60%.

由图 2d 可知接菌量  $\text{OD}_{600}$  小于 0.125 时, 降解率和 B3 的生长量上升显著, 当接菌量  $\text{OD}_{600}$  大于 0.25 时, 降解率和生长量提高不明显. 接菌量  $\text{OD}_{600}$  为 0.05 至 0.25 时, B3 菌对  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DBP 的降解率超过 94.3%.

探究葡萄糖添加量对 B3 降解的影响(表 3), 发现葡萄糖添加量  $\leq 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 对 B3 降解 DBP 有抑制作用. 葡萄糖对于许多微生物而言是良好的碳源, 微生物在含葡萄糖的条件下为了优先利用葡萄糖, 会抑制其他碳源的代谢<sup>[18]</sup>. Jin 等<sup>[19]</sup>也探究了葡萄糖添加量对菌株降解 DBP 的影响, 结果显示低

浓度的葡萄糖抑制菌株对 DBP 的降解, 这与本文结果相同. 上述研究还表明高浓度的葡萄糖对菌降解 DBP 有促进作用, 这与本文不同. 因此得出结论, 在 B3 降解 DBP 过程中没有必要添加葡萄糖. 综上, B3 降解  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DBP 的最佳 pH 为 8, 温度  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 培养转速为  $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 接菌量  $\text{OD}_{600}$  为 0.125, 在 72 h 内降解效率可达 95.8%.

## 2.4 DBP 的降解动力学

在最佳培养条件下, 设置 DBP 初始质量浓度为 1、5、10、20、50  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每隔 8 h 测定 DBP 的残留量, 以 GraphPad Prism5 进行数据拟合(图 3, 表 4),

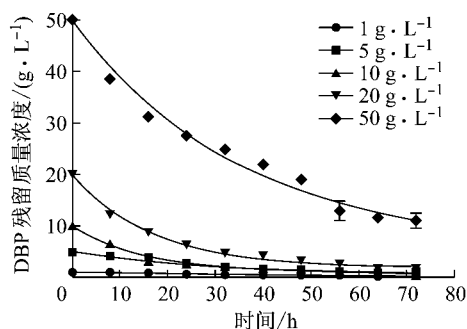


图 3 B3 降解不同初始质量浓度 DBP 的降解曲线  
Fig. 3 DBP degradation profiles at different DBP initial concentrations

探究 B3 菌对 DBP 的降解动力学.

实验结果表明,B3 降解 DBP 符合一级动力学模型,降解速率与 DBP 初始浓度密切相关.初始浓度的增加,初始降解速率增大,当初始质量浓度为  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,初始降解速率可达  $1.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .DBP 质量浓度小于等于  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,随 DBP 的浓度增大,半衰期缩短,降解速率常数增大;DBP 质量浓度为  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,降解速率常数达到最大( $K =$

$0.064$ ),半衰期最短( $t_{1/2} = 10.8 \text{ h}$ );当 DBP 质量浓度为  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,半衰期增大,降解速率常数减小.一级动力学常用于有机污染物的降解动力学<sup>[20]</sup>,He 等<sup>[9]</sup>报道的赤红球菌属(*Rhodococcus ruber* strain),当 DBP 质量浓度小于等于  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,初始浓度的增加,降解速率增大,半衰期缩短;DBP 质量浓度高于  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,随浓度增大,降解速率降低,半衰期增大,这些结果与本文结果相同.

表 4 不同初始浓度 DBP 的降解动力学方程

Tab.4 Degradation kinetics equation of DBP with different initial concentration

初始质量浓度/ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	动力学方程	$t_{1/2} / \text{h}$	初始降解速率 $v_0 /$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	相关系数 $R^2$
1	$Y=0.81e^{-0.028t}+0.19$	35.0	0.02	0.98
5	$Y=4.43e^{-0.034t}+0.57$	20.5	0.15	0.96
10	$Y=9.26e^{-0.064t}+0.74$	10.8	0.59	0.97
20	$Y=18.06e^{-0.060t}+1.94$	11.5	1.08	0.99
50	$Y=44.67e^{-0.028t}+5.33$	24.4	1.25	0.99

近年来,探寻绿色高效经济的降解 PAEs 的方法已成为研究热点,已有很多报道降解 DBP 的菌属(表 5).许多研究报道的 PAEs 的降解率虽然可达 90%,但降解的浓度通常在  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  级别<sup>[21-22]</sup>.Tang 等<sup>[22]</sup>报道的根瘤菌(*Rhizobium* sp.)降解  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的效率大于 90%,而当浓度升高时,降解率大大降低,当 DBP 质量浓度为  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,降解率仅为 50%左右.而在 Chen 等<sup>[15]</sup>报道中 *Camelimonas* sp. 在 336h 内降解  $0.03 \sim 0.14 \text{ g} \cdot$

$\text{L}^{-1}$ DBP 的效率不高于 56%.在有些 DBP 降解浓度较高的报道中,菌降解时间长,效率不高亦或需要多种菌的共同作用:Kumar 等<sup>[14]</sup>报道的假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和丛毛单胞菌属(*Comamonas* sp.)在 192 h 内分别降解  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP 的效率仅为 57%、46%.本文筛选到的寡养单胞菌 B3 不仅在宽的浓度范围内保持着高效降解能力,而且降解的底物范围、温度、pH 范围等条件均较宽.

表 5 不同的 DBP 降解菌的降解特性

Tab.5 Degradation characteristics of different PAEs by degrading bacteria

菌株	降解质量浓度/ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	降解条件	降解时间/h	半衰期/h	降解率/%	文献
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0.05~0.5	30 °C, pH 7	72		>86	本文
	1~50	35 °C, pH 8	72	24.4~35.5	72.5~95.8	
<i>Rhodococcus ruber</i> sp.	0.6~1.2	35 °C, pH 7.8	42~60	15.8~27.8	>90	[9]
<i>Gordonia</i> sp.	0.1~0.75	30 °C, pH 7	50	6.4~17.5	>93	[13]
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	30 °C, pH 6.8	192	—	57	[14]
<i>Comamonas</i> sp.					46	
<i>Camelimonas</i> sp.	0.03~0.14	40 °C, pH 8	336	65.4~277.3	<56	[15]
<i>Ochrobactrum</i> sp.	0.05~0.5	30 °C, pH 7	48	3.83~18.1	>87	[16]
<i>Enterobacter</i> sp.	0.1~1.5	35 °C, pH 7	60	21.2~28.9	>70	[20]
<i>Acinetobacter</i> sp.	0.1~0.4	40 °C, pH 7	60	9.5~15.5	94.3~100	[21]
<i>Rhizobium</i> sp.	0.05~0.2	30 °C, pH 7	60	16.1~21.3	60~92	[22]
	0.3~0.4				40~50	

### 3 结论

本文筛选到的 PAEs 降解菌——寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)B3 菌株,其对 DBP 的作用浓度和条件范围广.在 30°C, pH 7 条件下,B3 在 72 h 内,对  $0.05 \sim 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP 的降解率在 86%以

上,降解  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP 的效率为 93.4%.在 35 °C、pH 8 条件下,B3 对  $1 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP 的降解率在 72%以上,初始降解速率高,当 DBP 质量浓度在  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  及以上时,降解率仍维持在 80%左右,降解浓度高且高效降解浓度范围宽.在 20 °C~45 °C 的温度及 pH 5~11 的范围中,B3 菌株对  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP 降解率保持在 60%以上.在 pH 8, 35 °C, 175

$r \cdot \text{min}^{-1}$ , 接菌量  $\text{OD}_{600}$  为 0.125 的条件下, 对  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  DBP 的降解在 72 h 内可达到 95.8%。B3 降解 DBP 符合一级动力学模型。B3 不仅对 DBP 具有高效的降解效果, 而且对 DEHP、BBP、DEP、DMP、苯胺、甲苯和邻苯二甲酸的降解率均在 50% 及以上, 其中对 BBP、苯胺的降解效果在 88% 以上。B3 菌宽的降解浓度和底物种类范围预示着该株寡养单胞菌在 PAEs 的生物修复中具有独特的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] KANG L. Current status and historical variations of phthalate ester (PAE) contamination in the sediments from a large Chinese lake (Lake Chaohu) [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2016, 23(11): 10393.
- [2] LI K, DONG M, WU J, *et al.* Distribution of phthalate esters in agricultural soil with plastic film mulching in Shandong Peninsula, East China [J]. *Chemosphere*. 2016, 164(9): 314.
- [3] MENG X, NIU G, YANG W, *et al.* Di (2-ethylhexyl) phthalate biodegradation and denitrification by a *Pseudoanthomonas* sp. strain [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 180(3): 356.
- [4] 柏义生, 于鲁冀, 胡晓东, 等. 新型树脂 NDA-66 处理 DBP 生产废水及影响因素 [J]. *环境保护科学*, 2015, 41(2): 38.  
BO Yisheng, YU Luji, HU Xiaodong, *et al.* Pretreatment of DBP wastewater by a new resin NDA-66 and its influencing factors [J]. *Environmental Protection Science*, 2015, 41(2): 38.
- [5] AKRBIC B D, JI Y, DURIŠI C-MLADENOVI C N, *et al.* Occurrence of the phthalate esters in soil and street dust samples from the Novi Sad city area, Serbia, and the influence on the children's and adults' exposure [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 312(6): 272.
- [6] CHEN X. Toxicity and estrogenic endocrine disrupting activity of phthalates and their mixtures [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(3): 3156.
- [7] WANG Y. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by bacterial consortium LV-1 enriched from river sludge [J]. *Plos One*, 2017, 12(5): e0178213.
- [8] HE Z, XIAO H, TANG L, *et al.* Biodegradation of di-n-butyl phthalate by a stable bacterial consortium, HD-1, enriched from activated sludge. [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128(1): 526.
- [9] HE Z, NIU C, LU Z. Individual or synchronous biodegradation of di-n-butyl phthalate and phenol by *Rhodococcus ruber* strain DP-2. [J]. *Journal of Hazardous Materials*. 2014, 273(3): 104.
- [10] 许育新, 冯昭中, 陆鹏, 等. 甲基对硫磷降解菌 PF32 的分离鉴定及其降解特性研究 [J]. *农药学报*, 2009, 11(3): 329.  
XU Yuxin, FENG Zhaozhong, LU Peng, *et al.* Isolation and characterization of capable of degrading parathion-methyl bacterium *Stenotrophomonas* sp. PF32 [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2009, 11(3): 329.
- [11] 李红权, 李红梅, 蒋继志, 等. 一株 DDT 降解菌的筛选、鉴定及降解特性的初步研究 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(5): 696.  
LI Hongquan, LI Hongme, JIANG Jizhi, *et al.* Isolation and characterization of a DDT degradation bacterium strain D-1. [J]. *Microbiology*, 2008, 35(5): 696.
- [12] LENG Y, BAO J, CHANG G, *et al.* Biotransformation of tetracycline by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* DT1 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 318: 125.
- [13] JIN D, BAI Z, CHANG D, *et al.* Biodegradation of di-n-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp. strain QH-11: Genetic identification and degradation kinetics. [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, s 221-222(2): 80.
- [14] KUMAR V, SHARMA N, MAITRA S S. Comparative study on the degradation of dibutyl phthalate by two newly isolated *Pseudomonas* sp. V21b and *Comamonas* sp. 51F [J]. *Biotechnology Reports*, 2017, 15(9): 1.
- [15] CHEN X, ZHANG X L, YANG Y. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-n-butyl phthalate by newly isolated *Camelimonas* sp. and enzymatic properties of its hydrolase [J]. *Biodegradation*, 2015, 26(2): 171.
- [16] WU X L, WANG Y Y, LIANG R X, *et al.* Degradation of Di-n-butyl phthalate by newly isolated *Ochrobactrum* sp. [J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 2010, 85(3): 287.
- [17] WU X, WANG Y, DAI Q, *et al.* Isolation and characterization of four di-n-butyl phthalate (DBP)-degrading *Gordonia* sp. strains and cloning the 3, 4-phthalate dioxygenase gene [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27(11): 2611.
- [18] GEORGE P R. *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics and informatics* [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2008.
- [19] JIN D C, LIANG R X, DAI Q Y, *et al.* Biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3, 4-phthalate dioxygenase gene [J]. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, 20(10): 1440.
- [20] FANG C R, YAO J, ZHENG Y G, *et al.* Dibutyl phthalate degradation by *Enterobacter* sp. T5 isolated from municipal solid waste in landfill bioreactor [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(6): 442.
- [21] FANG Y, ZHANG L, WANG J, *et al.* Biodegradation of phthalate esters by a newly isolated *Acinetobacter* sp. strain LMB-5 and characteristics of its esterase [J]. *Pedosphere*, 2017, 27(3): 606.
- [22] TANG W J. Biodegradation of phthalate esters by newly isolated *Rhizobium* sp. LMB-1 and its biochemical pathway of di-n-butyl phthalate [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(1): 177.