

邻苯二甲酸二丁酯降解菌株的筛选鉴定及其降解特性研究

李建龙¹, 邵向丽¹, 刘书亮¹, 姚开², 赵勤¹, 胡欣洁¹, 邓维琴¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014) (2. 四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065)

摘要: 从四川省雅安市使用过地膜的蔬菜田地的土壤中筛选得到一株以邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 为唯一碳源和能源生长的高效降解菌株 JF, 经形态学、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 该菌株被鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。在 LB 培养基的动力学研究表明, 菌株 JF 降解邻苯二甲酸二丁酯的过程满足一级动力学方程模型, 在测试的底物 (DBP) 浓度、温度、pH 范围内, DBP 的半衰期为 3.11~6.98 h, 且该反应的速率受底物浓度和温度的影响较大, 受 pH 值影响不大。菌株 JF 可降解 DBP 及其中间产物邻苯二甲酸, 此外, 菌株 JF 在 72 h 内对 200 $\mu\text{g/mL}$ 的邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 (DEHP)、邻苯二甲酸二辛酯 (DOP) 和邻苯二甲酸丁苄酯 (BBP) 降解率为 90.10%、79.10% 和 76.30%。该研究为消除或减少环境、农产品中邻苯二甲酸酯残留提供了理论依据。

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯; 枯草芽孢杆菌; 降解特性; 降解途径

文章编号: 1673-9078(2014)10-108-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.019

Isolation and Identification of Dibutyl Phthalate-degrading Strain and Its Degradation Characteristics

LI Jian-long¹, SHAO Xiang-li¹, LIU Shu-liang¹, YAO Kai², ZHAO Qin¹, HU Xin-jie¹, DENG Wei-qin¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

(2. College of Light Industry and Food, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In this study, a high-efficiency degrading strain, JF, that utilized dibutyl phthalate (DBP) as the sole source of carbon and energy for growth was isolated from vegetable field soil in Ya'an, Si Chuan province, where mulch film was used. The strain was identified as *Bacillus subtilis* based on morphology, physiological and biochemical features, and 16S rDNA sequence analysis. Study on growth dynamics of strain JF in LB medium showed that degradation of dibutyl phthalate conformed to a first-order kinetics equation model. Based on substrate concentration, temperature, and pH, the half-life of DBP was estimated to be between 3.11 and 6.98 h. Additionally, the reaction rate was greatly influenced by substrate concentration and temperature but was not largely affected by pH. The strain was able to degrade DBP as well as its intermediate product phthalic acid. Degradation rate of 200 $\mu\text{g/mL}$ di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), di-n-octyl phthalate (DOP), and butyl benzyl phthalate (BBP) in 72 h was 90.10%, 79.10% and 76.30%, respectively. This study could provide theoretical basis for the removal of pollutant phthalic acid ester from both, the environment and agricultural products.

Key words: dibutyl phthalate; *Bacillus subtilis*; degradation characteristics; degradation pathway

邻苯二甲酸酯 (phthalic acid esters, PAEs, 酚酞酯) 是世界上生产量大、应用面广的人工合成有机化合物之一, 它们被广泛应用于塑料助剂、油漆溶剂、合成橡胶和涂料等的增塑剂和软化剂, 以增大塑料的可塑性和韧性, 提高塑料的强度^[1]。而塑料制品在全

球的大量使用直接导致了 PAEs 在环境中的大量存在, 且随着时间的推移, 其可在塑料制品内迁移至外界环境, 对食品安全已构成潜在的威胁^[2]。研究显示, PAEs 是一类典型的环境激素和生殖毒性物质, 长期接触可损伤外周神经系统, 能通过呼吸、饮食和皮肤接触进入人体, 危害人体健康^[3]。而 PAEs 在环境中的水解和光解速率缓慢, 环境中分解这类物质的主要途径是微生物降解, 且微生物降解法具有高效、绿色、无污染等优点, 降解菌在受污染的土壤与水体生物修复中得到了认可, 应用前景良好^[4], 因此筛选高效降解菌具有重要的意义。目前对邻苯二甲酸酯类有降解

收稿日期: 2014-04-03

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目 (31371775)

作者简介: 李建龙(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物; 邵向丽, 并列第一作者

通讯作者: 刘书亮(1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品微生物与发酵工程

作用的微生物大多数为 *Gordonia* sp.^[5]、*Enterobacter* sp.^[6]、*Arthrobacter* sp.^[7]等。现今已报道的菌株对 PAEs 的降解效果还远远不能满足实际污染控制的要求,对于邻苯二甲酸酯类污染物的生物降解处理仍有待于筛选高效降解菌。段星春等^[8]从污染土壤中分离到乙酰钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),菌株在 48 h 内对 40 $\mu\text{g/mL}$ 初始浓度 DBP 的降解率分别达到 98.64%、74.62%; Bablu Prasad 等^[9]分离到一株可高效降解邻苯二甲酸酯的贪噬菌属(*Variovorax* sp.)菌株,在 30 h 内对 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMP、DEP、DBP 降解率均达到了 99% 以上。

本文从 DBP 污染的土壤中筛选到一株可高效降解 DBP 的细菌,对其降解特性和降解产物进行了初步研究,为生物修复 DBP 污染的土壤或水体以及消除农产品 PAEs 污染的潜在威胁提供菌种资源和数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

四川省雅安市使用过地膜的蔬菜田地的土壤样品 4 份。

1.2 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,氯化钠 10 g,酵母膏 5 g, Tween 80 2 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.5, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。

基础盐培养基(MM):硫酸铵 1.5 g,磷酸氢二钾 1.5 g,磷酸二氢钾 0.5 g,氯化钠 0.5 g,硫酸镁 0.2 g, Tween 80 2 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.5, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min。

以上液体培养基,加入 2 g/100 mL 琼脂可制成固体培养基。灭菌后按所需浓度加入 DBP 母液。

1.3 试剂

邻苯二甲酸二丁酯(DBP)标准物质, 99.7%, 中国标准物质中心;邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP), 97.2%;邻苯二甲酸二辛酯(DOP), 98.5%;邻苯二甲酸丁苄酯(BBP), 95.2%, 南京中标晨曦化学技术有限公司;乙腈(色谱纯), Sigma 公司。

邻苯二甲酸酯母液配制:准确量取适量的邻苯二甲酸酯,用无水乙醇溶解并定容,配制成 10 mg/mL 母液备用。

DBP 标准样品配制:准确量取适量的邻苯二甲酸

二丁酯,用乙腈(色谱纯)溶解并定容,配制成 10 mg/mL 母液备用。

1.4 仪器与设备

LC-10A2010C HT 型液相色谱仪、LC-solution 工作站,日本岛津公司;气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890A-5975C),美国安捷伦公司;AS10200A 超声波清洗器,天津奥特赛恩斯公司;Milli-Q 超纯水仪,美国密理博公司。

1.5 实验方法

1.5.1 DBP 降解菌的分离、筛选

从 4 份土壤样品中各称取 5.0 g,分别置于装有 30 mL LB 培养基的 250 mL 锥形瓶中,于 80 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 10 min,冷至室温再加入 DBP 母液使其质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,于 35 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 168 h。培养结束后按 5% (V/V) 接种量再依次进行 3 次富集培养,每次培养 168 h,并逐步提高培养基中 DBP 浓度,使之分别达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 。将最后一级梯度驯化后的培养液按 5% (V/V) 接种量转接于 30 mL/250 mL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ DBP 的 LB 培养基中,用无菌生理盐水作空白对照,35 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 120 h,测定各培养液中 DBP 残留量。

对 DBP 减少的培养液进行菌株分离,取培养液梯度稀释涂布于含 100 $\mu\text{g/mL}$ DBP 的 LB 平板中,35 $^{\circ}\text{C}$ 、培养 72 h,对菌落进行分离纯化。将纯化后的菌株划线于含 100 $\mu\text{g/mL}$ 邻苯二甲酸二丁酯的 LB 斜面上培养 72 h,用无菌生理盐水洗下培养物制成种子液(调整细胞浓度约 10^8 cfu/mL)。按 5% 接种量 (V/V) 接种于 30 mL 含 100 $\mu\text{g/mL}$ 邻苯二甲酸二丁酯的 LB 培养基中,用无菌生理盐水设置空白对照。35 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 120 h 后,测定各培养液中邻苯二甲酸二丁酯的残留量,确定分离菌株对邻苯二甲酸二丁酯的降解能力。

将降解率较高的菌株接种于 30 mL 含 200 $\mu\text{g/mL}$ DBP 的 LB、MM 培养基中,用无菌生理盐水设置空白对照。35 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 24 h 后,测定培养液中邻苯二甲酸二丁酯的残留量,确定分离菌株对邻苯二甲酸二丁酯的降解能力。

1.5.2 DBP 的提取与测定

取均匀培养液 1 mL,加入 1 mL 乙腈,超声(40 kHz, 300 W)辅助提取 30 min,乙腈定容至 10 mL,混匀后离心(12000 r/min, 10 min),将上清液用有机相滤膜(0.45 μm)过滤,弃去初滤液,取续滤液供高效液相色谱仪(HPLC)分析用。

检测条件^[10]: 色谱柱为 Sepax GP-C₁₈ 柱 (150 mm×4.60 mm, 5.0 μm); 流动相为乙腈-水 (83:17, V/V), 流速 1.0 mL/min; 紫外检测器, 其波长为 210 nm; 柱温为 25 °C; 进样量 10 μL。

降解率计算公式:

$$\text{降解率}/\% = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

注: C₀ 为空白对照中 DBP 总质量浓度 (μg/mL); C 为样品培养液中 DBP 残留质量浓度 (μg/mL)。

1.5.3 菌株鉴定

1.5.3.1 形态学指标

供试菌株于 LB 平板上划线, 35 °C 培养 48 h 观察, 记录其菌落形态特征; 同时挑取 LB 平板上单菌落 (35 °C, 48 h) 进行涂片、革兰氏染色, 于 10×100 倍油镜下观察记录颜色、大小、形状、排列等。

1.5.3.2 生理生化指标

参见《伯杰细菌鉴定手册》第八版。

1.5.3.3 16S rDNA 的扩增和系统发育树的构建

(1) 16S rDNA 基因的 PCR 扩增

参考文献^[11]进行菌株 16S rDNA 基因的 PCR 扩增, PCR 产物经 1% (0.5×TBE) 琼脂糖凝胶电泳后, 观察并成像。

(2) 扩增产物测序及分析

扩增产物由宝生物工程 (大连) 有限公司测序。供试菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行比对分析, 选择同源性高的序列以及有类似降解功能的菌株的相关序列, 通过 Mega 5.2 软件构建系统进化树。

1.5.4 菌株 JF 的降解特性研究

1.5.4.1 菌株 JF 的生长曲线与对 DBP 的降解曲线

挑取菌株 JF 接种于 LB 液体培养基, 35 °C, 180 r/min 摇床振荡培养 24 h, 然后连续划线、挑取单菌落培养两次 (35 °C), 挑取单菌落接种于 LB 斜面 35 °C 培养 48 h。用无菌生理盐水洗下斜面上菌体并调整细胞浓度为 10⁸ cfu/mL, 制成种子液。

将降解菌株 JF 的种子液按 5% 接种量 (V/V) 接种于含有 200 μg/mL DBP 的 LB 液体培养基中, 设接种 5% 无菌水为空白对照, 分装 30 mL/250 mL 锥形瓶, 35 °C、180 r/min 培养 48 h, 取样时间为 0~36 h 为每 2 h 取样 1 瓶, 36~48 h 为每 4 h 取样 1 瓶, 样品存放于 4 °C 冰箱内, 测 OD₆₀₀, 并按 1.5.2 中的方法进行 DBP 的提取和测定。

1.5.4.2 菌株 JF 在 MM 培养基中对 DBP 的降解情况

将菌株 JF 的种子液 (1.0×10⁸ cfu/mL) 按 5% 接种量接种于含有 200 μg/mL DBP 的 MM 液体培养基中,

分装 30 mL/250 mL 锥形瓶, 设接种量 5% 无菌水为空白对照, 35 °C、180 r/min 振荡培养, 取样时间为每 12 h 取样, 按 1.5.2 中的方法检测培养液中 DBP 残留质量, 分析降解菌株对 DBP 的降解情况。

1.5.4.3 菌株 JF 降解 DBP 的动力学特性分析

固定 DBP 反应体系的其它反应条件, 改变菌株 JF 降解 DBP 体系中反应的某一条件 (反应温度、pH 值、DBP 浓度), 定时取样, 测定 DBP 含量, 以一级动力学方程 (The first-order dynamics model) 进行拟合, 确定不同影响因素下的动力学特性。在 Monod 方程基础上, 采用的微生物一级反应动力学方程为:

$$\ln S = -K_d t + \ln S_0$$

注: K_d 为降解速率常数, μg/(mL·h); t 为降解时间/h; S 为 DBP 浓度, μg/mL; S₀ 为初始 DBP 浓度, μg/mL。

培养温度对菌株 JF 降解 DBP 速率的影响: 按 5.0% (V/V) 的接种量, 将菌株种子液 (1.0×10⁸ cfu/mL) 接种于 DBP 浓度为 200 μg/mL 的 LB 培养基 (pH 7.0) 中, 分装 30 mL/250 mL 锥形瓶, 不同温度下 (30 °C、35 °C、40 °C) 180 r/min 振荡培养, 间隔 4 h 取样。采用 1.5.2 方法, 测定 DBP 残留量, 并以一级反应动力学方程拟合实验数据。

pH 对菌株 JF 降解 DBP 速率的影响: 按 5.0% (V/V) 的接种量, 将菌株种子液 (1.0×10⁸ cfu/mL) 接种于不同 pH (6.0、7.0、8.0) 的 DBP 浓度为 200 μg/mL 的 LB 液体培养基中, 分装 30 mL/250 mL 锥形瓶, 30 °C, 180 r/min 振荡培养, 间隔 4 h 取样。采用 1.5.2 方法, 测定 DBP 残留量, 并以一级反应动力学方程拟合实验数据。

底物浓度对菌株 JF 降解 DBP 速率的影响: 按 5.0% (V/V) 的接种量, 将菌株种子液 (1.0×10⁸ cfu/mL) 接种于 DBP 浓度不同的 LB 液体培养基 (pH 7.0, 100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL), 分装 30 mL/250 mL 锥形瓶, 35 °C、180 r/min 振荡培养, 间隔 4 h 取样。采用 1.5.2 方法, 测定 DBP 残留量, 并以一级反应动力学方程拟合实验数据。

1.5.4.4 DBP 降解中间产物分析

将菌株 JF 接种于含有 200 μg/mL DBP 的 MM 液体培养基中, 分装 30 mL/250 mL 锥形瓶, 35 °C、180 r/min 振荡培养, 设不加 DBP 的培养液为空白对照, 取样时间为每 12 h 取样, 用 HPLC 和 GC-MS 分析降解菌株对 DBP 的降解情况。

样品中 DBP 的 HPLC 检测方法同 1.5.2。

GC-MS 检测: 取 1 瓶 (30 mL) 培养液, 超声 30 min (40 kHz, 300 W), 旋转蒸发至近干, 3 mL 乙腈 (色谱) 充分溶解, 混匀后离心 (12000 r/min, 10 min), 将

上清液用有机相滤膜 (0.45 μm) 过滤, 弃去初滤液, 取续滤液供 GC-MS 分析用。

检测条件: 色谱柱 HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序: 90 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 升至 240 °C, 保持 2 min, 10 °C/min 升至 270 °C, 保持 1 min; 载气(He)流速 1.0 mL/min, 进样量 1.0 μL; 不分流。电子轰击离子源; 电子能量 70 eV; 传输线温度 290 °C, 离子源温度 230 °C。

1.5.4.5 降解谱实验

采用含 200 μg/mL 邻苯二甲酸酯的 LB 培养基, 分别用邻苯二甲酸二 (2-乙基己) 酯、邻苯二甲酸二辛酯和邻苯二甲酸丁苄酯来替换邻苯二甲酸二丁酯, 其提取检测同 1.5.2 中菌株对 DBP 的降解测定, 以确定菌株对邻苯二甲酸酯降解谱。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与鉴定

2.1.1 菌株的分离

经过不同浓度的 DBP 梯度驯化后, 从土壤样品中分离到一株对 DBP 有降解作用的细菌 JF, 菌株 JF 在 MM 培养基中 24 h 内对 200 μg/mL DBP 降解率达到 85.69%, 而在 LB 培养基中 24 h 内可完全降解 200 μg/mL 的 DBP。

2.1.2 菌株 JF 形态学特征



图 1 菌株 JF 菌落培养特征

Fig.1 Cultural characteristics of strain JF

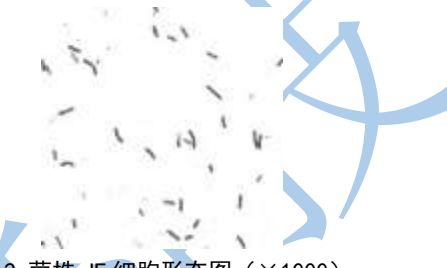


图 2 菌株 JF 细胞形态图 (×1000)

Fig.2 Cellular morphology of strain JF (×1000)

由图 1 可知, 菌株 JF 在 LB 平板上 35 °C 培养 48 h, 菌落扁平, 中间略白, 四周呈微黄色; 表面干燥、褶皱; 边缘不规则。由图 2 可知, 菌体呈杆状, 革兰氏阳性, 产中央芽孢。

2.1.3 生理生化鉴定

由表 1 可见, 菌株 JF 可以厌氧生长; 葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇发酵均呈阳性; 能水解明胶和淀粉; 苯丙氨酸脱氢酶和卵黄卵磷脂酶呈阴性。

表 1 菌株 JF 的生理生化鉴定结果

Table 1 Results of physiological and biochemical tests for the identification of strain JF

特征	结果	特征	结果	特征	结果
接触酶	+	卵黄卵磷脂酶	-	硝酸盐还原	+
厌氧生长	-	水解明胶	+	需 NaCl 和 KCl	-
V-P 测定	+	水解淀粉	+	生长温度 4.0 °C	-
产酸: D-葡萄糖	+	生长 pH 6.8 营养肉汤	+	生长温度 30 °C	+
L-阿拉伯糖	+	生长 pH 5.7 营养肉汤	+	生长温度 40 °C	+
D-木糖	+	生长 NaCl 2 g/100 mL	+	生长温度 50 °C	+
D-甘露醇	+	生长 NaCl 5 g/100 mL	+	生长温度 60 °C	-
葡萄糖产气	-	生长 NaCl 7 g/100 mL	+	有溶菌酶时生长	+
苯丙氨酸脱氢酶	-	生长 NaCl 10 g/100 mL	-		

2.1.4 菌株 JF 的 16S rDNA 的鉴定

利用细菌通用引物对菌株 JF 的 16S rDNA 基因 PCR 扩增, 1% 电泳检测结果如图 3 所示, 所得 PCR 产物经试剂盒纯化后由宝生物工程公司进行 T 克隆后测序。测序结果表明, 菌株 JF 的 16S rDNA 基因片段长 1513 bp, 将其在 Genbank 数据库中注册, 得到登录号为 KF364634。根据菌株 JF 的 16S rDNA 序列,

选取数据库中与其相似性较高且具有生物修复功能的菌株的 16S rDNA 基因序列, 运用邻近法构建系统发育树, 如图 4 所示。

将菌株 JF 16S rDNA 基因测序结果与 Genbank 数据库中序列进行 Blast 同源性对比, 该菌株序列与 *Bacillus subtilis* 部分菌株基因序列高度同源, 结合形态学和生理生化指标, 被鉴定为枯草芽孢杆菌。

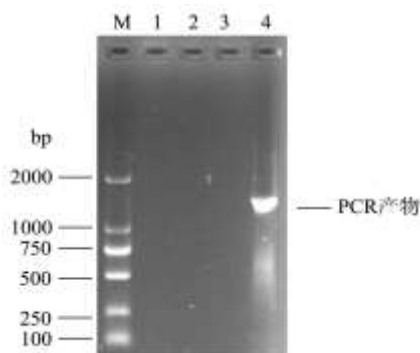


图3 菌株 JF 的 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig.3 Electrophoretogram of a 16S rDNA PCR amplification product of strain JF

注: M: Maker; 1: 有模板, 无引物; 2, 3: 单侧引物, 无模板; 4: JF 的 PCR 产物。

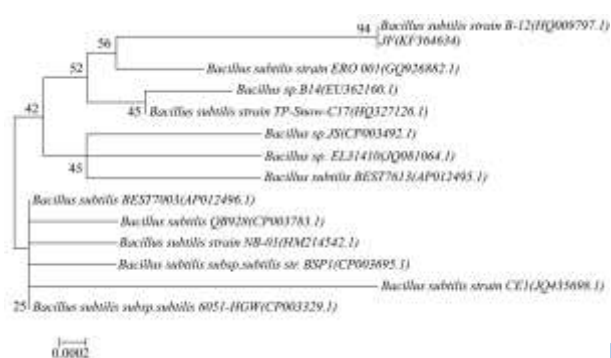


图4 菌株JF的系统发育树

Fig.4 Phylogentic tree of strain JF

注: 参照菌株来自于GenBank数据库, 括号内为参照菌株在数据库中的登录号。

2.2 菌株 JF 的降解特性

2.2.1 菌株 JF 的生长曲线及对 DBP 的降解曲线

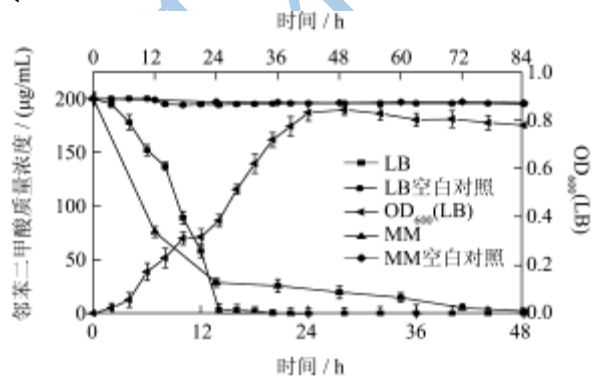


图5 菌株JF对DBP的降解曲线

Fig.5 Biodegradation of dibutyl phthalate by strain JF

由图5可知, 接种(LB培养基)后的菌株JF经过短暂延滞期(约2 h)后即进入对数生长期; 14 h内DBP的降解与菌体的生长密切相关, 该菌株降解DBP速率较高;

14 h后, 虽然菌体仍快速生长, 但DBP降解速率明显降低; 28 h时, 该菌株达到稳定期; 相对于空白对照, 24 h内200 μg/mL的DBP已被完全降解。表明菌株JF是一株高效邻苯二甲酸二丁酯的菌株, 源自土壤的菌株 *Enterobacter* sp. T5在60 h内可完全降解200 μg/mL的DBP^[6], 而菌株 *Gordonia* sp. Dop5在40 h内即可完全降解750 μg/mL的DOP^[5]。

菌株 JF 在不同培养基中对 DBP 的降解情况是不同的(图5), 除去对照组 DBP 的损失部分, 在 MM 培养基中 84 h 内可完全降解 200 μg/mL 的 DBP, 且 24 h 内对 200 μg/mL 的 DBP 降解率达到了 85.69%, 而在 LB 培养基中 24 h 可完全降解 200 μg/mL 的 DBP, 说明在营养丰富的 LB 中, 外加营养物质可促进菌株 JF 对 DBP 的降解。

2.2.2 菌株 JF 降解 DBP 的动力学方程

(1) 反应温度对菌株 JF 降解 DBP 速率的影响

固定反应底物浓度和 pH 值, 考察不同温度下菌株 JF 对 DBP 降解速率的影响, 结果见表 2。从表中可知, 不同温度条件下菌株 JF 对 DBP 降解符合一级反应动力学方程。

表2 不同温度条件下菌株JF在LB培养基中对DBP的降解动力学方程

Table 2 Kinetics of dibutyl phthalate degradation by strain JF in LB growth media at different temperatures

反应温度/°C	动力学方程	半衰期 t _{1/2} /h	降解速率常数/[μg/(mL·h)]	R ²
30	$\rho=201.32e^{-0.104682t}$	6.62	0.105	0.94
35	$\rho=201.11e^{-0.154687t}$	4.48	0.155	0.93
40	$\rho=200.71e^{-0.199711t}$	3.48	0.199	0.96

(2) 反应 pH 值对菌株 JF 降解 DBP 速率的影响

固定反应底物质量浓度和温度, 考察不同 pH 值条件下菌株 JF 对 DBP 降解速率的影响, 结果见表 3。从表中可知, 不同 pH 值下菌株 JF 对 DBP 降解符合一级反应动力学方程。

表3 不同pH条件下菌株JF在LB培养基中对DBP的降解动力学方程

Table 3 Kinetics of dibutyl phthalate degradation by strain JF in LB growth media at different pH

反应 pH	动力学方程	半衰期 t _{1/2} /h	降解速率常数/[μg/(mL·h)]	R ²
6.0	$\rho=201.31e^{-0.150325t}$	4.61	0.150	0.92
7.0	$\rho=202.51e^{-0.148712t}$	4.66	0.148712	0.93
8.0	$\rho=200.71e^{-0.125543t}$	5.53	0.125543	0.96

(3) 底物浓度对菌株 JF 降解 DBP 速率的影响

固定反应温度和 pH 值, 考察不同底物质量浓度下菌株 JF 对 DBP 降解速率的影响, 结果见表 4。从

表中可知,不同底物质量浓度下菌株 JF 对 DBP 降解符合一级反应动力学方程。

表4 不同底物质量浓度下菌株JF在LB培养基中对DBP的降解动力学方程

Table 4 Kinetics of di-n-butyl phthalate degradation by strain JF in LB growth media at different substrate concentrations

底物质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)	动力学方程	半衰期 $t_{1/2}/\text{h}$	降解速率常数/($\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$)	R^2
100	$\rho=102.12e^{-0.222830t}$	3.11	0.223	0.93
200	$\rho=200.32e^{-0.163443t}$	4.24	0.163	0.92
300	$\rho=303.12e^{-0.163443t}$	6.98	0.099	0.96

在测试的底物(DBP)质量浓度、温度、pH 值范围内, DBP 半衰期为 3.11~6.98 h, 远远低于其自然降解半衰期, 在土壤或水中, 邻苯二甲酸酯随着其支链的增加, 半衰期变长, 半衰期从几年到几百年, 几乎可以忽略不计, 这进一步证明了菌株 JF 可以高效降解 DBP。温度在 30~40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, DBP 半衰期变化比较大, 温度降到 30 $^{\circ}\text{C}$, DBP 半衰期显著增长; 在 pH 6.0~8.0 范围内, DBP 半衰期变化不大; 底物浓度在 100~300 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, DBP 半衰期变化较大, 底物浓度达到 300 $\mu\text{g/mL}$ 时, DBP 半衰期显著增长。这一研究结果将为菌株 JF 应用于污水处理和土壤修复提供数据参考。

2.2.3 菌株 JF 降解 DBP 的产物分析

图 6 为 DBP 标准样品的 HPLC 色谱图, A 为目标峰 (DBP, 4.828 min), 1#为乙腈 (色谱纯), 2#为 DBP 标准样品, 3#为 MM 培养基空白对照, 4#为菌株 JF 降解 DBP 的样品, 由此可确定样品中 4.828 min 处的峰为目标峰 (DBP)。按不同样品目标峰的峰面积对应的浓度进行定量。

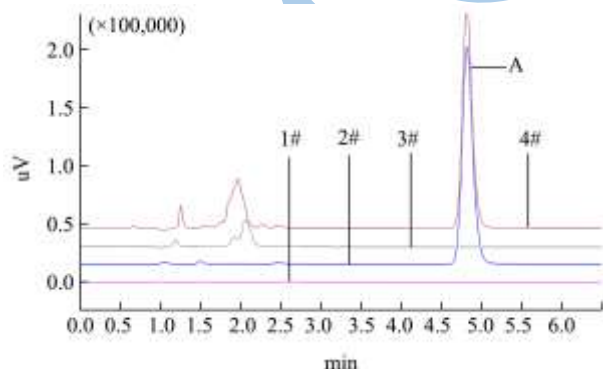


图6 DBP标准样品的HPLC色谱图

Fig.6 Standard chromatogram of DBP

菌株 JF 在 MM 培养基中降解 DBP 的 HPLC 色谱图 (如图 7), A 为目标峰 (DBP), B、C 峰为非目标峰 (培养基峰或降解产物峰)。其中 8#为空白对照, 7#为 24 h 取样的样品, 5#为 84 h 取样的样品, 6#为

132 h 取样的样品, 由图中看出, 随着 DBP 的降解 (A 峰的降低), 84 h 时 DBP 被完全降解 (A 峰消失), 而 B 峰逐渐升高, 推测 B 峰为 DBP 的降解产物之一, 132 h 时 B 峰降低 (6#低于 5#, 如图 8), 说明菌株 JF 可降解 DBP 的产物, 推测菌株 JF 降解 DBP 的产物可能是邻苯二甲酸丁酯(MBP)或邻苯二甲酸(PA)等。源自活性污泥的菌株 *Gordonia* sp.在降解 DBP 时, 产物中检测到 MBP 和 PA^[12]; Fang 等^[6]也得到同样的结果。本实验通过 GC-MS 得到进一步确认。

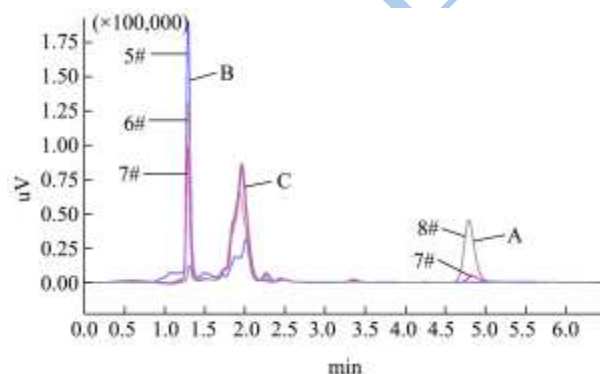


图7 菌株JF在MM中降解DBP的HPLC色谱图

Fig.7 HPLC chromatogram of DBP in MM degraded by strain JF

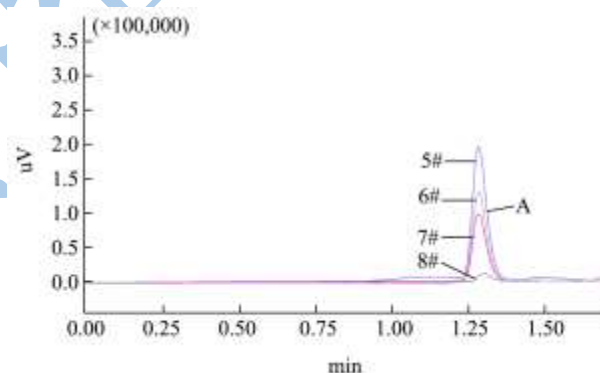


图8 A峰的放大HPLC色谱图

Fig.8 Enlarged HPLC chromatogram of A peak

采用气-质联用对菌株 JF 降解 DBP 的中间产物进行定性分析。图 9 (0 h 样品, A 峰) 的质谱分析表明, 在 $m/z=149$ 、 $m/z=223$ 基本峰处有离子峰存在, 这与经验分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ (DBP) 很好的吻合; 在产物分析中检测到了邻苯二甲酸 (PA) 及其它小分子物质, 如图 10 (84 h 样品, B 峰), 质谱分析表明在 $m/z=76$ 、 $m/z=104$ 、 $m/z=148$ 基本峰处有离子峰存在, 这与经验分子式 $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ (邻苯二甲酸, PA) 吻合, 证明了 DBP 的中间产物中有 PA 的生成。并且在 DBP 的降解产物中还检测到苯甲酸和一些小分子酸类、醇类物质, 且这与段星春等^[8]得到结果基本吻合, 这说明菌株 JF 可完全矿化 DBP, 在实际生物修复中具有良好的应用价值。

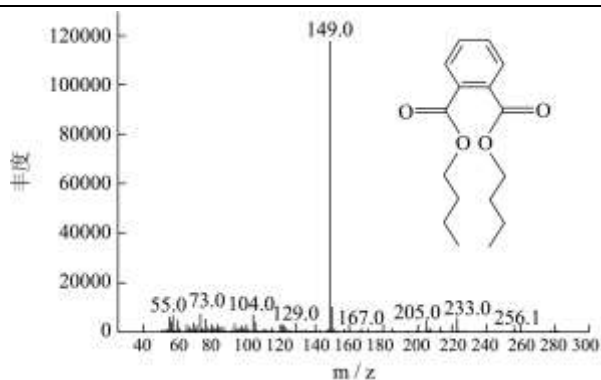


图9 DBP降解过程中0 h样品的质谱图

Fig.9 Mass spectrum of 0 h sample from DBP degradation

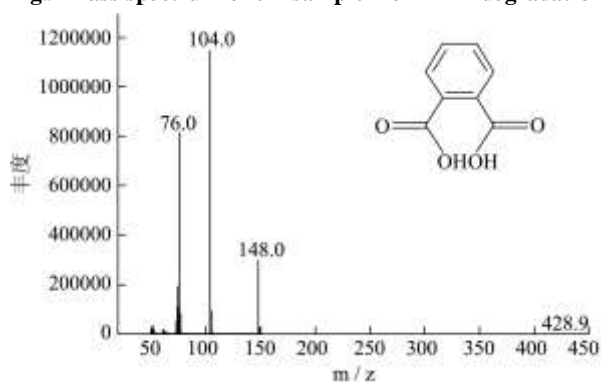


图10 DBP降解过程中84 h样品的质谱图

Fig.10 Mass spectrum of 84 h sample from DBP degradation

2.2.4 菌株 JF 对不同邻苯二甲酸酯的降解

在 LB 培养基中分别加入邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)、邻苯二甲酸二辛酯(DOP)和邻苯二甲酸丁苄酯(BBP), 接入菌株 JF 种子液培养 72 h 后, 菌株 JF 对 3 种邻苯二甲酸酯都有一定程度的降解, 降解率分别为 90.10%、79.10%和 76.30%。

3 结论

3.1 从土壤中分离筛选出一株以邻苯二甲酸二丁酯为唯一碳源和能源生长的高效降解菌株 JF, 该菌株被鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。菌株 JF 在 LB 培养基中 24 h 内可降解 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的邻苯二甲酸二丁酯, MM 培养基中 24 h 内对 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的邻苯二甲酸二丁酯降解率达到 85.69%, 且对邻苯二甲酸酯降解具有广谱性, 是一株高效降解邻苯二甲酸酯的菌株。

3.2 大部分邻苯二甲酸酯类物质的降解都是以酯键的水解作为第一步反应的, 在酯酶的作用下脱去一个单链, 生成邻苯二甲酸单酯, 继续水解生成邻苯二甲酸, 在酶作用下开环进入三羧酸循环, 最终转化为二氧化碳和水^[4]。而已筛选到的 DBP 降解菌株中极少数菌株可以完全矿化邻苯二甲酸酯类, Vega D 等^[13]得出 *Arthrobacters* sp. 能够将 DMP 转化为邻苯二甲酸单甲酯(MMP), 也可以降解邻苯二甲酸(PA), 但不能将

MMP 转化为邻苯二甲酸(PA); Sarkar J 等^[4]发现菌株 *Gordonia* sp. 可完全矿化邻苯二甲酸二辛酯; 本文通过 GC-MS 检测到了菌株 JF 降解 DBP 时的中间产物邻苯二甲酸 (PA), 且菌株可以同时降解 PA, 说明该菌株能完全矿化 DBP, 这丰富了可矿化邻苯二甲酸酯降解菌的种类。近几年塑化剂引起的食品安全问题已引起了人们的广泛关注, 严重威胁着人类健康, 而塑化剂中使用最普遍的即是邻苯二甲酸酯类的化合物, 枯草芽孢杆菌为一般公认安全的菌种, 这为消除或减少环境或农产品中邻苯二甲酸酯的残留问题提供了一种有效途径。

3.3 菌株 JF 在 LB 培养基中降解 DBP 的过程满足一级动力学方程模型, 该反应的速率受底物浓度和温度的影响较大, 受 pH 值影响不大。

参考文献

- [1] Li J, Gu J D, Pan L. Transformation of dimethylphthalate, dimethylisophthalate and dimethylterephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modeling the process using the modified gompertz model [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2005, 55(3): 223-232
- [2] Abdel D M M, Rivera U J, Ocampo P R, et al. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies [J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 109: 164-178
- [3] 白艳红,徐珂,赵电波.食品塑料包装材料中邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯的暴露评估[J].*现代食品科技*,2012,28(10): 1423-1428
- BAI Yan-hong, XU Ke, ZHAO Dian-bo. Exposure assessment of Di (2-ethylhexyl) phthalate of plastic food packaging materials [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(10): 1423-1428
- [4] 骆祝华,黄翔玲,叶德赞.环境内分泌干扰物-邻苯二甲酸酯的生物降解研究进展[J].*应用与环境生物学报*,2008,14(6): 890-897
- LUO Zhu-hua, HUANG Xiang-ling, YE De-zan. Advances in research of biodegradation of environmental endocrine disruptors-phthalate esters [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14(6): 890-897
- [5] Sarkar J, Chowdhury P P, Dutta T K. Complete degradation of di-n-octyl phthalate by *Gordonia* sp. strain Dop5 [J]. *Chemosphere*, 2013, 90: 2571-2577
- [6] Fang C R, Yao J, Zheng Y G, et al. Dibutylphthalate degradation by *Enterobacter* sp. T5 isolated from municipal solid waste in landfill bioreactor [J]. *International Biodeterioration and*

- Biodegradation, 2010, 64(6): 442-446
- [7] Wen Z D, Gao D W, Wu W M. Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014: 1-8
- [8] 段星春,易筱筠,杨晓为,等.两株邻苯二甲酸二丁酯降解菌的分离鉴定[J].*农业环境科学学报*,2007,26(5):1937-1941
DUAN Xing-chun, YI Xiao-yun, YANG Xiao-wei, et al. Isolation and characterization of two Di-n-butyl phthalate degrading bacteria [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1937-1941
- [9] Prasad B, Sures H S. Biodegradation of phthalate esters by *variovorax* sp. [J]. *Apcbee Procedia*, 2012, 1:16-21
- [10] 张磊,吴青,梁健华,等.高效液相色谱法同时测定食品塑料包装材料中8种邻苯二甲酸酯的含量[J].*食品科学*,2012,33(20): 184-188
ZHANG Lei, WU Qing, LIANG Jian-hua, et al. Simultaneous determination of 8 kinds of phthalic acid esters in plastic food packaging material by high performance liquid chromatography [J]. *Food Science*, 2012, 33(20):184-188.
- [11] 赖文,刘书亮,赵楠,等.氯氰菊酯高效降解菌的筛选鉴定及其降解特性[J].*食品科学*,2012,33(21):157-163
LAI Wen, LIU Shu-liang, ZHAO Nan, et al. Isolation, identification and characterization of a cypermethrin-degrading strain [J]. *Food Science*, 2012, 33(21): 157-163
- [12] Jin D C, Bai Z H, Chang D 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, 221: 80-85
- [13] Sarkar J, Chowdhury P P, Dutta T K. Complete degradation of di-n-octyl phthalate by *Gordonia* sp. strain Dop5 [J]. *Chemosphere*, 2013, 90(10): 2571-2577
- [14] Vega D, Bastide J. Dimethylphthalate hydrolysis by specific microbial esterase [J]. *Chemosphere*, 2003, 51: 663-668