

红树林细菌 *Rhodococcus ruber* 1K 降解邻苯二甲酸二丁酯的研究*

李魁晓¹ 顾继东^{1,2}

(¹中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301; ²香港大学, 香港)

Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by mangrove microorganism *Rhodococcus ruber* 1K. LI Kuixiao¹, GU Jidong^{1,2} (¹South China Sea Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; ²University of Hongkong, Hongkong, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2005, 16(8): 1566~1568.

A di-*n*-butyl phthalate (DBP) degrading bacterium *Rhodococcus ruber* was isolated from mangrove soil, and its degrading characteristics were studied. The results showed that the bacterium could grow well on the substrate with DBP as the sole source of carbon and energy, and the DBP of 50 mg·L⁻¹ could be completely degraded after 48 h. Under aerobic condition, the tentative pathway proposed for DBP degradation was through monoester initially, then phthalic acid, and finally CO₂ and H₂O.

Key words Di-*n*-butyl phthalate, Biodegradation, Mangrove.

文章编号 1001-9332(2005)08-1566-03 中图分类号 S512 文献标识码 A

1 引言

邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)是世界上生产量大、应用面广的人工合成化合物。1933年Waldo Semon首先将邻苯二甲酸二丁酯用于PVC生产,得到了大幅度改性后的商品化树脂。从此,邻苯二甲酸酯作为增塑剂得到广泛应用。由于作为增塑剂的邻苯二甲酸酯与PVC聚合物及其他材料并非通过共价键结合,在产品使用过程中及处置后很容易被释放到环境中^[2,16]。塑料制品的全球性大量应用导致邻苯二甲酸酯在环境中普遍存在^[6,7]。城市污泥中可以普遍检测到PAEs^[6,9,13-15,17,20]。由于城市污泥的农用导致在农作物或者农产品中也可以检测到PAEs的存在^[3-5]。邻苯二甲酸酯具有一般毒性和致畸、致突变性,且某些化合物还具有致癌活性^[10,21]。同时邻苯二甲酸酯类某些化合物如DBP、DEHP还是环境激素类物质,作为内分泌干扰素可能干扰动物及人类的生殖系统和发育^[1,8,12]。中国环境监测总站和美国EPA均将DBP、DEHP等列为优先控制污染物^[11,19]。DBP在自然环境中非常稳定,水解半衰期约为20年。微生物降解是自然环境中邻苯二甲酸酯完全矿化的主要途径^[18]。

红树林土壤微生物是红树林生态系统的重要组成部分,在营养循环中起着重要作用。红树林生态系统的多样性使得红树林土壤微生物对环境存在多方面影响^[22]。有关红树林土壤微生物对DBP的生物降解方面的研究未见报道。本实验从红树林底泥中分离得到一株邻苯二甲酸酯降解菌*Rhodococcus ruber* 1K,并对该菌株对邻苯二甲酸二丁酯的生物降解特性以及降解途径进行了研究。

2 材料与方法

2.1 供试材料

所用底物邻苯二甲酸二丁酯(di-*n*-butyl phthalate, DBP)由香港大学生态学及生物多样性系提供,所用红树林土壤取自香港米浦自然生态保护区,冰箱中保存备用。

2.2 微生物培养与纯化分离

在250 ml锥形烧瓶中加入土壤样品10 g, 150 ml无机盐培养基以及邻苯二甲酸二丁酯作为唯一碳源和能量来源。培养基主要含有下列矿物质(mg·L⁻¹): K₂HPO₄·3H₂O 1 050, KH₂PO₄ 200, CaCl₂ 50, MgCl₂·6H₂O 1 070, FeCl₂·4H₂O 16, (NH₄)₂SO₄ 1 000, NaCl 5 000。培养基的初始pH值调到7.0±0.1。固体培养基为上述液体培养基中加入20 g·L⁻¹的琼脂。

将烧瓶放置于摇床(30±0.5℃)上培养,转速为150 rpm。降解邻苯二甲酸二丁酯的菌种约每周转接一次,每次将10 ml培养液转移到一个盛有140 ml的新制矿物盐培养基的烧瓶中,其邻苯二甲酸二丁酯浓度递增。驯化后,将菌液转接到含有相应底物的平板培养基上进行平板划线分离,30±0.5℃培养箱培养,如此重复,直到得到纯菌株。验证菌株降解性能获得一株邻苯二甲酸二丁酯的降解菌。经过16S rDNA分子生物学鉴定,该菌株为赤红球菌(*Rhodococcus ruber*)。

2.3 生物降解试验

取在平板上生长的菌株接种于含有50 mg·L⁻¹ DBP的

* 中国科学院“百人计划”项目(5270122)和国家“863”计划资助项目(2002AA601160)。

** 通讯联系人。E-mail: jdgu@hkucc.hku.hk
2004-10-22收稿, 2005-03-03接受。

培养基中振荡培养. 每 6 h 取样一次, 冷冻 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 储藏备用.

2.4 分析方法

由于邻苯二甲酸二丁基酯具有较高的正辛醇-水分配系数 ($K_{ow} = 3.6 \times 10^5$), 吸附能力很强. 为防止过滤过程中吸附到滤膜上, 在邻苯二甲酸二丁酯降解实验样品中加入同体积甲醇, 经孔径为 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 注射器滤膜过滤后, 进行高效液相色谱分析. 为避免吸附在滤膜上的邻苯二甲酸酯或其代谢物的干扰, 滤液的前 5 滴废弃不用. 样品用 HP1100 型高效液相色谱仪系统分离并量化. 色谱柱为 Hypersil ODS C8 ($4.0 \times 125\text{ mm}$). 母体化合物以及降解中间产物的分离在反相液相色谱柱上完成. 分离样品中邻苯二甲酸二丁酯及其降解中间产物的流动相为甲醇和水 (水中含 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 3.0 的磷酸), 梯度洗脱. 具体如下: $0\sim 5\text{ min}$ $V(\text{甲醇}):V(\text{H}_2\text{O}) = 20:80$; $5\sim 20\text{ min}$ $V(\text{甲醇}):V(\text{H}_2\text{O}) = 90:10$, 总运行时间 25 min . 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

微生物量采用 UV-2100 型分光光度计在 600 nm 下测量 OD 值定量. 因培养液中存在可沉淀絮体, 只测量上层样品.

3 结果与分析

3.1 细菌降解过程分析

从图 1 可以看出, 细菌降解邻苯二甲酸二丁基酯 (DBP) 时, 红树林细菌 (*Rhodococcus ruber* 1K) 的生长起始滞延期很短, 很快进入对数期迅速生长, 邻苯二甲酸二丁基酯被快速降解. 随着邻苯二甲酸二丁基酯的降解, 样品在 600 nm 的 OD 值不断升高即细菌生物量不断增加. 接种细菌 18 h (对数后期) 邻苯二甲酸二丁酯已被完全降解. 邻苯二甲酸二丁酯在降解过程中产生邻苯二甲酸一丁基酯 (MBP), 到 12 h 时邻苯二甲酸一丁基酯的含量达到最大值, 随后也被降解, 48 h 后邻苯二甲酸一丁基酯也完全被降解.

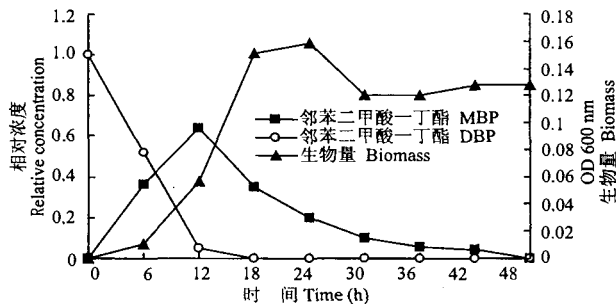


图 1 *Rhodococcus ruber* 1k 对邻苯二甲酸二丁基酯的生物降解及其生长量变化

Fig. 1 Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate (DBP) by *Rhodococcus ruber* 1k and its biomass change.

图 2 为接种细菌后不同时间样品的高效液相色谱图, 从图中可以看出, 反应起始时 (图 2a), 只有 20.599 min 的唯一峰, 它代表了 DBP 的起始浓度值; 反应至 6 h (图 2b), 在 15.362 min 出现了 1 种主要中间代谢产物峰值, 反应至 12 h

(图 2c), DBP (20.599 min) 的峰值明显降低, 在 15.362 min 的主要中间代谢产物的峰值则明显增大; 反应至 18 h (图 2d), DBP 几乎完全被降解转化, 同时 15.362 min 的峰值也开始减少.

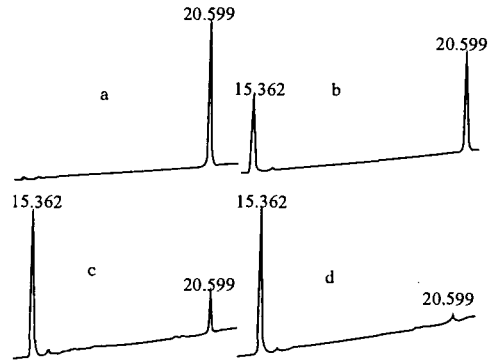
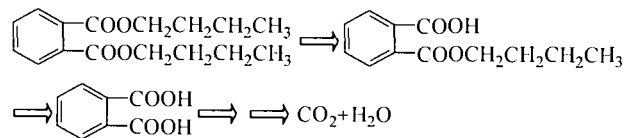


图 2 邻苯二甲酸二丁基酯 (DBP) 的生物降解过程高效液相色谱图
Fig. 2 Representative HPLC chromatograms of di-*n*-butyl phthalate degradation.

a) 起始 The beginning; b) 6 h; c) 12 h; d) 18 h.

3.2 降解途径分析

根据高效液相中的保留时间以及全波长紫外吸收光谱结合邻苯二甲酸 (PA) 标准样品分析, 邻苯二甲酸二丁酯降解时生成了邻苯二甲酸一丁酯和邻苯二甲酸两种主要中间产物, 可以推断邻苯二甲酸二丁酯的降解过程为邻苯二甲酸二丁基酯首先断裂一个酯键生成邻苯二甲酸一丁酯, 然后邻苯二甲酸一丁基酯再断裂另外一个酯键生成邻苯二甲酸最终完全矿化生成 CO_2 和 H_2O . 红树林底泥中分离出的细菌 *Rhodococcus ruber* 1K 对邻苯二甲酸二丁基酯 (DBP) 的生物降解途径可以表示为:



4 讨论

试验证明, 红树林土著微生物 *Rhodococcus ruber* 1K 对邻苯二甲酸二丁基酯具有较强的降解能力, 能以 DBP 为唯一碳源和能源生长, 可在 48 h 内将 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯二甲酸二丁酯及其中间产物完全降解; 其对邻苯二甲酸二丁酯的降解途径是首先在酶的催化下水解一个酯键生成邻苯二甲酸一丁基酯, 然后再水解另一个酯键生成邻苯二甲酸, 最终开环完全降解生成 CO_2 和 H_2O . 邻苯二甲酸一丁基酯的降解效率明显低于邻苯二甲酸二丁酯. 这可能是由于细菌降解邻苯二甲酸一丁基酯生成了邻苯二甲酸, 而细菌生长过程可以同时利用邻苯二甲酸一丁基酯和邻苯二甲酸, 所以邻苯二甲酸一丁基酯的降解速度变慢.

参考文献

- 1 Allsopp M, Santillo D, Johnston P. 1997. Poisoning the Future; Impacts of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife and Human Health. The Netherlands: Greenpeace International.
- 2 Bauer MJ, Herrmann R. 1997. Estimation of the environmental contamination by phthalic acid ester leaching from household wastes. *Sci Total Environ*, **208**:49~57
- 3 Cai Q-Y(蔡全英), Mo C-H(莫测辉), Zhu X-Z(朱夕珍), et al. 2003. PAEs in composts of municipal sludge and rice straw. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **14**(11):1993~1996(in Chinese)
- 4 Cai Q-Y(蔡全英), Mo C-H(莫测辉), Zhu X-Z(朱夕珍), et al. 2003. Effect of municipal sludge and chemical fertilizers on phthalic acid esters(PAEs) contents in *Ipomoea aquatica* grown on paddy soils. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **14**(11):2001~2005(in Chinese)
- 5 Chen Y-Z(陈英旭), He Y-F(何云峰), Lin Q(林琦), et al. 1998. Translocation and distribution of organic toxic chemicals in soil plant system. *J Zhejiang Agric Univ* (浙江农业大学学报), **24**(1):1~4(in Chinese)
- 6 Gaim CS, Atlas E, Jr, Powers MA. 1984. Phthalate Esters. In: Hutzinger O, ed. *Anthropogenic Compounds*. Vol 3, Part C. Berlin: Springer-Verlag. 67~142
- 7 Giam CS, Chah HS, Neff GS. 1978. Phthalate ester plasticizers: A new class of marine pollutants. *Science*, **199**:419~421
- 8 Gray LE, Wolf C, Lambright C, et al. 1999. Administration of potentially antiandrogenic pesticides(procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p, p'-DDE, and ketonazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health*, **15**:94~118
- 9 Jacobs LW, O'Connor GA, Overcash MA, et al. 1987. Effects of trace organics in sewage sludge on soil plant systems and assessing their risk to humans. Page AL, eds. *Land Application of Sludge Food Chain Implications*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers Inc. 101~143
- 10 Jin Z-H(金朝晖), Li H-L(李红亮), Chai Y-T(柴英涛). 1997. Harmful effect of phthalic acid ester on human and environment. *Chin J Shanghai Environ Sci* (上海环境科学), **16**(12):39~42 (in Chinese)
- 11 Jin X-C(金相灿). 1990. *Chemistry of Organic Pollutants*. Beijing: Qinghua University Press. 266~267(in Chinese)
- 12 Jobling S, Reynolds T, White R, et al. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Persp*, **103**(suppl. 7):582~587
- 13 Mo C-H(莫测辉), Wu Q-T(吴启堂), Cai Q-Y(蔡全英), et al. 2000. Utilization of municipal sludge in agriculture and sustainable development. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **11**(1):157~160(in Chinese)
- 14 Mo C-H(莫测辉), Cai Q-Y(蔡全英), Wu Q-T(吴启堂), et al. 2001. A study of phthalic acid esters in the selected municipal sludges of China. *China Environ Sci* (中国环境科学), **21**(4):362~366(in Chinese)
- 15 Muller J, Kordel W. 1993. Occurrence and fate of phthalates in soil and plants. *Sci Total Environ*, **93**:431~437
- 16 Nilsson C. 1994. Phthalate Acid Esters Used as Plastic Additive-Comparisons of Toxicological Effects. Brussels: Swedish National Chemicals Inspectorate.
- 17 Smith SR. 1996. *Agricultural Recycling of Sewage Sludge and the Environment*. Wallingford: CAB International. 207~236
- 18 Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, et al. 1997. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere*, **35**:667~749
- 19 US EPA. 1992. Code of Federal Regulations. 40 CFR, Part 136.
- 20 Wang MJ, Jones KC. 1994. Behavior and fate of chlorobenzenes (CBs) introduced into soil-plant systems by sewage sludge application: A review. *Chemosphere*, **28**(7):1325~1360
- 21 Zhao Z-H(赵振华). 1991. Review of environmental and human health hazards of phthalate esters. *Chin J Environ Chem* (环境化学), **10**(3):41~43(in Chinese)
- 22 Zhuang TC, Lin P. 1995. Soil microbial function of *Kandelia candel* mangrove forest. An Asia-pacific Symposium on Mangrove Ecosystems(Programme and Abstracts). Hong Kong: Hong Kong University of Science and Technology Press. 41~42

作者简介 李魁晓,男,1978年生,硕士研究生.主要从事环境与分子微生物学研究. Tel: 020-89023345; E-mail: kuixiao2008@yahoo.com.cn
