

固定化黄孢原毛平革菌对邻苯二甲酸二乙酯的降解效果研究

谢清如¹, 尚翠², 钟爽¹, 齐聪宇¹, 陈安伟^{2*}

(1.湖南农业大学 国际学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学 资源环境学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:以白腐真菌的模式菌种-黄孢原毛平革菌作为研究对象,探究固定化黄孢原毛平革菌对邻苯二甲酸二乙酯(DEP)的降解效果及其最佳降解条件.研究表明,固定化黄孢原毛平革菌相对于游离态菌体能够产生较高活性的木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP).DEP降解效果受固定化菌体接种量、pH值、温度和DEP初始浓度等因素的影响.当pH为6,温度为35℃,DEP初始浓度为10 mg/L时,加入8 g固定化黄孢原毛平革菌时,DEP去除效果最好,其去除率达到94.6%.

关键词:白腐真菌;固定化;黄孢原毛平革菌;邻苯二甲酸酯;生物降解

中图分类号:X703 文献标志码:A 文章编号:1672-9102(2018)02-0089-06

Biodegradation of Diethyl Phthalate by Immobilized White-rot Fungus

Xie Qingru¹, Shang Cui², Zhong Shuang¹, Qi Congyu¹, Chen Anwei²

(1.International College of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2.College of Resources&Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The biodegradation ability as well as the optimum degradation conditions of diethyl phthalate (DEP) were investigated by the white-rot fungus model species-*Phanerochaete chrysosporium* was investigated. The results showed that the LiP and MnP activities of the immobilized *P. chrysosporium* are higher than that of free mycelium. The DEP degradation is influenced by the immobilized inoculation dose, pH, temperature, and initial DEP concentrations. The maximum biodegradation efficiency is observed at pH 6, 35 °C, and 10 mg/L DEP with 8 g immobilized pellets.

Keywords: White-rot fungus; immobilization; *Phanerochaete chrysosporium*; Diethyl Phthalate; biodegradation

邻苯二甲酸酯(Phthalic Acid Esters, PAEs)是驱虫剂、化妆品、润滑剂和去泡剂等的主要生产原料.大量PAEs的使用和排放使其广泛存在于空气、水体、土壤等环境介质中^[1-3],对生态环境系统造成危害.极低浓度的PAEs就足以干扰人的内分泌系统,产生类雌激素效应,引起神经和免疫系统失调^[4].PAEs是一种重要的环境内分泌干扰物及致癌、致畸、致突变物质^[5].因此,对PAEs污染的治理刻不容缓.

目前,有关PAEs的治理方法主要有非生物降解法和生物降解法.非生物降解法包括水解和光解等,PAEs水解和光解速度都较慢,而且仅能使PAEs得到初步降解,并不能使其完全矿化;生物降解法成本低、效率高、对环境无二次污染^[6],是自然环境中PAEs的主要矿化途径^[7].因此,生物降解是PAEs污染治理的研究重点,近年来得到了快速的发展.

收稿日期:2017-11-02

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(2016JJ3076);湖南农业大学青年基金资助项目(16QN36)

*通信作者, E-mail: A.Chen@hunau.edu.cn

白腐真菌为丝状真菌,能够分泌多种胞外酶降解木质素,并且其分泌的木质素降解酶对底物的专一性较低,能降解多种复杂的异生质有机污染物,如氯酚类^[8]、多氯联苯^[9]、多环芳烃^[10-11]、染料^[12]等.近年来,运用白腐真菌治理环境污染问题已经成为研究热点,白腐菌生物技术治理被广泛用于重金属及有机污染的土壤和废水^[13-15].

虽然白腐真菌降解技术具有优势,但仍存在一些缺陷,如在悬浮培养降解体系中,游离态的菌体产生的酶活性不高,酶稳定性、抗逆性、抗毒性能力差,对温度、pH和污染物浓度等参数变化敏感,导致处理效果不稳定,因而限制其规模化应用.有研究表明,采用固定化方法能一定程度上克服上述缺点^[16-17].因此,本文以PAEs类污染物代表邻苯二甲酸二乙酯(DEP)为处理对象,以白腐真菌的模式菌种——黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)为实验菌种,采用包埋法对其进行固定化处理,探究固定化白腐真菌对水溶液中的DEP生物降解效果及其最佳条件,以期邻苯二甲酸酯类污染的治理提供理论参考和方法借鉴.

1 材料与方法

1.1 菌体培养及化学试剂

黄孢原毛平革菌 BKM-F1767(CCTCC AF96007)购自中国典型微生物保藏中心(武汉),种子培养基为土豆培养基^[18](PDA).取经传代3次的菌种,采用Kirk培养基^[19]进行液体培养,于37℃,120 r/min的振荡培养箱中培养3 d,形成菌丝球.

丙酮、DEP等实验中所用试剂均为分析纯,甲醇为色谱纯,海藻酸钠、氯化钙为化学纯.采用丙酮作为溶剂,配置1 000 mg/L的DEP储备液,避光待用.

1.2 制备固定化白腐真菌

按配方配制一定量的Kirk培养液^[19]、4%的海藻酸钠溶液和2%的氯化钙溶液,将培养液、海藻酸钠溶液和氯化钙溶液于105℃下高压蒸汽灭菌30 min.再配制一定量的菌悬液,使菌悬液中孢子浓度约为 10^6 个/mL,然后将其与海藻酸钠溶液按体积比1:1混合,搅拌均匀;用5 mL注射器吸取上述含菌悬液的海藻酸钠溶液,逐滴滴入2%的氯化钙溶液中,即生成海藻酸钙包埋小球,硬化2 h.过滤收集包埋小球,用超纯水冲洗干净,得到包埋小球.取一定量的上述包埋小球装入含100 mL Kirk培养基的三角锥形瓶内,置于恒温摇床中于37℃,120 r/min条件下进行振荡培养.

1.3 固定化白腐真菌对DEP降解的影响实验

1.3.1 pH对DEP降解的影响

包埋菌体经培养3 d后,取一定量的DEP储备液投加到100 mL黄孢原毛平革菌的培养体系中,使其在体系中的浓度为10 mg/L,调节溶液的pH为4,5,6,7和8,于恒温摇床内进行降解反应(温度30℃,转速120 r/min).上述降解体系中,包埋小球的原始投加量为8 g.

1.3.2 温度对DEP降解的影响

包埋菌体经培养3 d后,取一定量的DEP储备液投加到100 mL黄孢原毛平革菌的培养体系中,使其在体系中的浓度为10 mg/L,调节溶液的初始pH为6,分别考察DEP在20,25,30,35和40℃下的降解情况.上述降解体系中,包埋小球的原始投加量为8 g.

1.3.3 固定化白腐真菌投加量对降解的影响

包埋菌体经培养3 d后,取一定量的DEP储备液投加到100 mL黄孢原毛平革菌的培养体系中,使其在体系中的浓度为10 mg/L,调节溶液的pH为6,于恒温摇床内进行降解反应(温度30℃,转速120 r/min).上述降解体系中,包埋小球的原始投加量分别为1,2,4,6和8 g.

1.3.4 DEP的初始浓度对其降解的影响

包埋菌体经培养3 d后,分别依次取一定量的DEP储备液投加到100 mL黄孢原毛平革菌的培养体系中,使其在体系中的浓度依次为2,5,8,10和20 mg/L,调节溶液的pH为6,于恒温摇床内进行降解反应(温度30℃,转速120 r/min).上述降解体系中,包埋小球的原始投加量为8 g.

1.4 分析方法

1.4.1 DEP 浓度测定方法

DEP 浓度从投加当天起每隔 24 h,用玻璃注射器吸取 1~2 mL 模拟废水,再通过 0.22 μm 有机滤膜,过滤到样品瓶中,经 HPLC 测定 DEP 残余浓度.色谱柱:THERMO FISHER Hypersil ODS C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μm);流动相为水:甲醇=30:70;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流速 1.0 mL/min;VWD 检测器波长 230 nm;停留时间 8.5 min;进样体积 20 μL ;外标法定量.

1.4.2 酶活性测定

木质素过氧化物酶(LiP)的活性通过检测其将藜芦醇氧化为藜芦醛的速率来反应^[18].在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,加入 10 mmol/L H_2O_2 启动反应,于 310 nm 测定反应体系在 3 min 内的光密度变化值.定义每分钟使 1 μmol 的藜芦醇氧化成藜芦醛所需的酶量为一个酶活力单位(U).

锰过氧化物酶(MnP)的活性通过检测其将 Mn^{2+} 氧化成 Mn^{3+} 的速率来反应^[18].在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,加入 10 mmol/L H_2O_2 启动,于 240 nm 测定反应体系在 3 min 内的光密度变化值.定义每分钟使 1 μmol 的 Mn^{2+} 氧化成 Mn^{3+} 所需的酶量为一个酶活力单位(U).

固定菌体和游离菌体的培养条件:pH 为 6;摇床转速为 120 r/min;温度 30 $^{\circ}\text{C}$;初始 DEP 浓度 10 mg/L.

2 结果与讨论

2.1 黄孢原毛平革菌 MnP 和 LiP 活性的变化

固定化和游离态菌体酶活性的变化曲线如图 1 所示,根据图 1 可知:固定菌体和游离菌体的 MnP 和 LiP 活性呈增加趋势,并在反应的第 7 d 达到最大值,其中游离态黄孢原毛平革菌的 MnP 和 LiP 的酶活性最大值分别为 18.67 和 13.67 U/mL,而固定化黄孢原毛平革菌的 MnP 和 LiP 的酶活性最大值高达 39.17 和 25.40 U/mL.随着时间的推移,酶活性开始下降.LiP 和 MnP 是黄孢原毛平革菌在碳、氮营养受限时分泌的一种诱导酶^[20],因此随着降解反应时间的推进,培养基渐渐达到碳氮营养限制,黄孢原毛平革菌启动次级代谢,LiP 和 MnP 活性逐渐增大,但是当降解反应进行到第 5 d(图 1 中第 8 d)后,酶活性开始降低,这可能是因为后期过量的黄孢原毛平革菌将营养物质消耗殆尽,使菌体生长受限,导致酶活性下降.

在反应前期(24 h 内),固定化菌体和游离菌体产生的 2 种酶活性差别不大,但随着反应的进行,固定化菌体产生的酶活性明显高于游离菌体,这可能是由于游离黄孢原毛平革菌对振荡敏感.在摇床振荡培养过程中,MnP 和 LiP 的结构和活性容易受到破坏^[21],因此游离态黄孢原毛平革菌产生的酶活性低于固定化菌体.黄孢原毛平革菌经固定化,可以缓解振荡带来的冲击,保持较高的 MnP 和 LiP 酶活性.李慧蓉等^[22]的研究也证实菌体经过载体固定化以后,其载体(凝胶小珠)对菌体具有强的保护作用,可以减少振荡对黄孢原毛平革菌所产胞外酶的结构和活性的破坏,能有效提高黄孢原毛平革菌产酶的稳定性和酶的活性,从而维持反应系统的稳定性,有利于持续降解水溶液中的有机污染物.

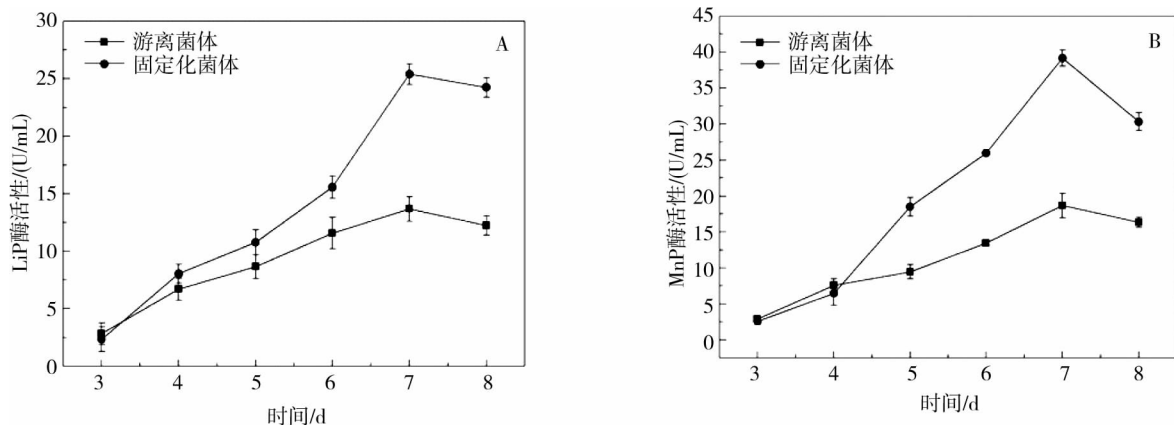


图 1 固定化和游离态菌体酶活性的变化

2.2 pH 值对 DEP 降解的影响

溶液中的 pH 会影响真菌细胞壁表面羟基、氨基、羧基等官能团的电离状态和有机污染物的存在形式,因而影响菌体对污染物的降解作用^[23].因此,本实验研究了在不同的 pH 条件下,固定化白腐真菌处理 DEP 的效果.

pH 对固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的影响曲线如图 2 所示,根据图 2 可知:不同 pH 条件下,黄孢原毛平革菌对 DEP 的降解率随时间的变化趋势基本一致;DEP 的降解率随 pH 升高而出现先增大后减小的趋势,并且在 pH 为 6 时降解率达到最大 97.3%.这可能是由于黄孢原毛平革菌相对更能适应弱酸性环境,过高或过低的 pH 会影响黄孢原毛平革菌对营养物质的吸收,从而影响其降解酶的分泌^[24].此外,黄孢原毛平革菌分泌的酶的稳定性与氢键和范德华力间的微弱作用有着很大联系,而氢键和范德华力很大程度上又受溶液 pH 影响^[25].因此,过酸或过碱的环境,会使酶的活性和稳定性降低,进而影响黄孢原毛平革菌对 DEP 的降解能力.

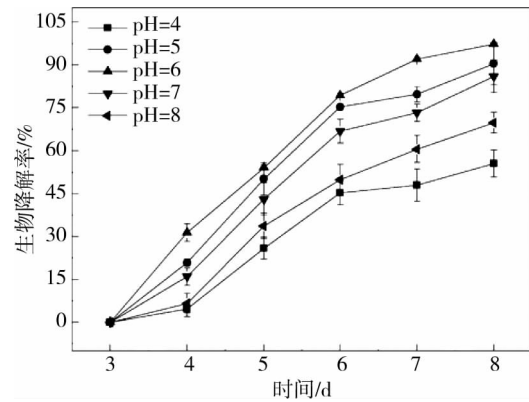


图 2 pH 对固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的影响

2.3 温度对降解率的影响

温度对固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的影响曲线如图 3 所示,根据图 3 可知:在 25~35 °C 范围内,固定化白腐真菌对 DEP 均有较好的降解效果,且 35 °C 为固定化白腐真菌降解的最适温度,其降解率达 95.8%.过低 (<20 °C) 或过高 (>40 °C) 温度条件下,经降解反应 5 d (图 3 中第 8 d) 后,菌体对 DEP 的降解率均在 75% 以下.微生物对有机物降解的实质为酶促反应,在一定温度范围内,酶促反应速度随着温度的升高而加快,固定化菌体降解率也随之增大.而高温时,化学本质为蛋白质的酶遇高温变性使得部分菌体失活^[26-27],导致降解率下降.而固定化菌体可在较宽的温度范围内(25~35 °C)保持较好活性,显示良好的温度适应性.

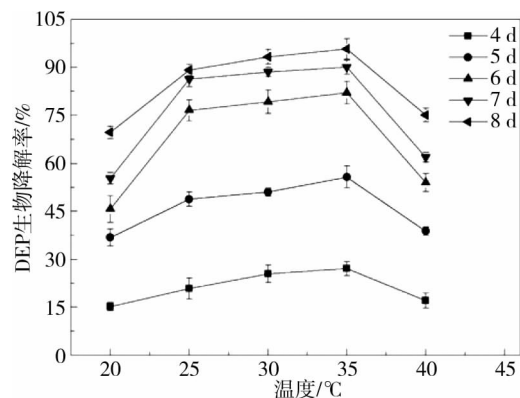


图 3 温度对固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的影响

2.4 固定化黄孢原毛平革菌投加量对降解率的影响

在碳、氮营养受限时,白腐真菌启动次生代谢,产生代谢产物 MnP 和 LiP 等^[28].如果接种量太少,菌群不易进入次生代谢,导致降解 DEP 的效率不高;接种量太大,菌体之间对营养等竞争激烈,影响菌体生长或降解活性.因此,本实验研究了在不同的接种量条件下,固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的效果.

固定化白腐真菌生物量对 DEP 降解的影响曲线如图 4 所示,根据图 4 可知:DEP 的去除率随固定化菌体的投加量增加而升高.在第 8 d 接种量为 1 g 时,DEP 去除率仅有 67.6%;加入 8 g 黄孢原毛平革菌的培养基中 DEP 去除率为 93.1%.尽管随着投加量的增大,体系中 DEP 的降解率随之提高,但如果考察单位投加量对 DEP 的去除量的情况,则会得到不同结果.例如,当投加量为 1 g 时,固定化菌体对 DEP 的去除量为

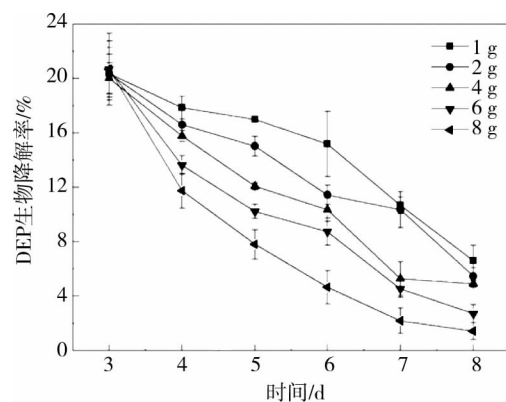


图 4 固定化白腐真菌生物量对 DEP 降解的影响

对 DEP 的去除量的情况,则会得到不同结果.例如,当投加量为 1 g 时,固定化菌体对 DEP 的去除量为

1.38 mg/g,而增大投加量为 8 g 时,其去除量仅为 0.24 mg/g.这是由于固定化菌体的投加量增加,降解 DEP 的菌球也随之增多,且菌群更易进入次生代谢,大量产生降解酶. DEP 去除率与固定化菌体接种量呈正相关,但是固定化菌体投加量过大会导致降解材料的聚集,降低了可利用的降解面积,并且加剧了菌群之间的竞争,从而导致固定化菌体对 DEP 的去除量降低.因此,在实际使用过程中,需结合体系中污染物去除率和单位质量菌体对污染物去除量 2 个指标,不能一味地追求高去除率,而不计投加量,不考虑反应成本.

2.5 DEP 的初始浓度对其降解的影响

为明确 DEP 初始浓度对其降解的影响,实验中考察了 DEP 初始浓度分别为 5, 8, 10, 15 和 20 mg/L 时,白腐真菌对 DEP 降解情况的影响. DEP 初始浓度对固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的影响曲线如图 5 所示,根据图 5 可知:当 DEP 初始浓度分别为 5, 8, 10, 15 和 20 mg/L 时, DEP 的去除率分别为 74.4%, 77.5%, 89.2%, 94.6% 和 86.2%. 由此可得:当 DEP 初始浓度在 5~15 mg/L 的时候,随着 DEP 初始浓度增加,固定化菌体对 DEP 降解率是呈上升趋势的,且初始浓度为 15 mg/L,其降解率高达 94.6%;而继续随着 DEP 浓度的增加,降解率呈下降趋势.这可能是因为在一

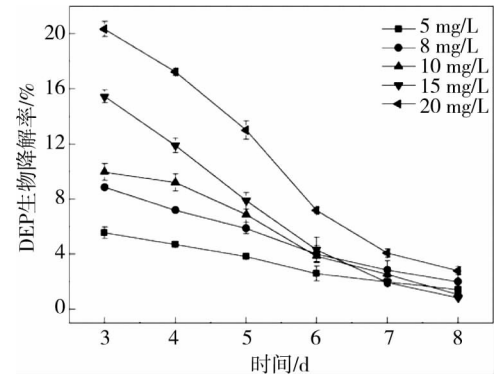


图 5 DEP 初始浓度对固定化黄孢原毛平革菌降解 DEP 的影响

定范围内, DEP 的初始浓度的增加会提高固定化菌体与 DEP 的碰撞,从而提高了固定化菌体对 DEP 的降解率.但当 DEP 浓度过高时,白腐真菌的生长会被 DEP 的毒性抑制,使得酶活性降低,最终导致降解率下降.

3 结论

1) 固定化黄孢原毛平革菌相对于游离菌体能产生更高活性的 MnP 和 LiP,其最大酶活性出现在第 7 d,酶活性最大值分别高达 39.17 和 25.40 U/mL.

2) DEP 的去除率随 pH 的增加出现先增大后减小的趋势, pH 为 6 时固定化黄孢原毛平革菌对 DEP 的降解率达到最大 97.3%.

3) 在 25~35 °C 范围内,固定化白腐真菌对 DEP 均有较好的降解效果,其中 35 °C 为最适降解温度,其降解率达 95.8%.

4) DEP 的去除率随固定化黄孢原毛平革菌的投加量增加而升高,投加为 8 g 时 DEP 去除率最高,为 93.1%.

5) 当 DEP 初始浓度在 5~15 mg/L 时,随着 DEP 初始浓度增加, DEP 降解率呈上升趋势.初始浓度为 15 mg/L,其降解率最高,为 94.6%;初始浓度超过 15 mg/L 时, DEP 的去除率反而呈下降趋势.

参考文献:

- [1] 于晓章,乐东明,任燕飞.邻苯二甲酸酯在环境中的降解机制[J].生态科学,2015,34(4):180-187.
- [2] Li B, Hu X Q, Liu R X, et al. Occurrence and distribution of phthalic acid esters and phenols in HunRiver Watersheds[J]. Environmental Earth Sciences, 2015, 73:5095-5106.
- [3] Tan W B, Zhang Y, He X S, et al. Distribution patterns of phthalic acid esters in soil particle-size fractions determine biouptake in soil cereal crop systems[J]. Scientific Reports, 2016, 6:31987.
- [4] 王晓阳,戴家银,张红霞.邻苯二甲酸丁基苄酯的雄性生殖和发育毒性研究[J].中国科学:生命科学,2016,46(1):113-119.
- [5] Abdul-Ghani S, Yanai J, Abdul-Ghani R, et al. The teratogenicity and behavioral teratogenicity of di (2-ethylhexyl)

- phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate(DBP) in a chick model[J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2012,34(1):56-62.
- [6] Shanker R, Ramakrishna C, Seth P K. Degradation of some phthalic acid esters in soil[J]. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*,1985,39(1):1-7.
- [7] Zhao J, Yu J, Li W, et al. Experiment on biodegradation of dihexyl phthalate by biological aerted filter[J]. *Journal of Safety and Environment*,2012,12(6):89-93.
- [8] 李君敬,刘惠玲,程修文.氯酚废水处理方法研究进展[J].*工业水处理*,2013,33(9):1-5.
- [9] Stella T, Covino S, Čvan Čarová M, et al. Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rotfungi[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2017,324: 701-710.
- [10] 丁洁,陈宝梁,朱利中.黄孢原毛平革菌菌球对多环芳烃的生物吸附和生物降作用[J].*科学通报*,2012,57(24): 2276-2284.
- [11] Chang V, Shiung L C, Yuan S Y. Anaerobic Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil[J]. *Chemosphere*, 2002,48:717-724.
- [12] 彭党聪.水污染控制工程(第3版)[M].北京:冶金工业出版社,2010.
- [13] Damodaran D, Shetty K V, Mohan B R. Effect of chelaters on bioaccumulation of Cd (II), Cu (II), Cr (VI), Pb (II) and Zn(II) in *Galerina vittiformis* from soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*,2013,85:182-188.
- [14] Adi S P, Toshio M, Kazuhiro T, et al. Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*,2011, 65:691-695.
- [15] 肖鹏飞,李玉文.Tween80 强化白腐真菌对水/土壤中林丹的降解[J].*环境科学与技术*,2016,39(8):142-146.
- [16] 王建龙,施汉昌.聚乙烯醇包埋固定化微生物的研究及进展[J].*工业微生物*,1998,28(2):35-39.
- [17] Murthy S N, Novak J T. Factors affecting flocculation properties during aerobic digestion; implication for dewatering[J]. *Water Environment Research*,1999,71(2): 197-202.
- [18] 陈安伟.白腐真菌对废水中镉和 2,4-二氯酚的去除及其生理响应机制[D].长沙:湖南大学,2014.
- [19] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Methods in Enzymology*,1988,161:238-249.
- [20] Radha K V, Regupathi I, Arunagiri A, et al. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics[J]. *Process Biochemistry*,2005,40(10):3337-3345.
- [21] Bumpus J A, Tien M, Wright D, et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. *Science*, 1985,228:1434-1436.
- [22] 李慧蓉.白腐真菌生物学和生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005:12-14.
- [23] Fan T, Liu Y, Feng B, et al. Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics[J]. *Journal of Hazardous Materials*,2008,160(2/3):655-661.
- [24] 李丽,张学才.白腐真菌处理二硝基重氮酚工业废水的研究[J].*安徽理工大学学报(自然科学版)*,2007,27(1):39-42.
- [25] 连小英.白腐真菌产锰酶及对酸性蓝 45 的脱色[J].*水处理技术*,2009,35(7):35-37.
- [26] 韩晓磊,严莲荷,周申范.漆酶分泌及其活性影响因素综述[J].*化学与生物工程*,2005,22(7):10-13.
- [27] 李向飞,文湘华,林刚.白腐真菌 F1 对染料脱色特性的研究[J].*环境工程学报*,2002,3(7):1-4.
- [28] Zouari H, Labat M, Sayadi S. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures[J]. *Bioresource Technology*, 2002,84(2):145-150.