

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2020011402

赵暹, 李成, 高家通, 等. 复合固定化混合菌 DP3 去除邻苯二甲酸二丁酯[J]. 环境化学, 2021, 40(5): 1558-1566.

ZHAO Xian, LI Cheng, GAO Jiatong, et al. The removal of dibutyl phthalate by immobilization of mixed bacteria DP3[J]. Environmental Chemistry, 2021, 40 (5): 1558-1566.

## 复合固定化混合菌 DP3 去除邻苯二甲酸二丁酯\*

赵暹<sup>1</sup> 李成<sup>1</sup> 高家通<sup>1</sup> 刘春敬<sup>1</sup> 张辛悦<sup>1</sup> 路超君<sup>2</sup> 谢建治<sup>1\*\*</sup>

(1. 河北农业大学资源与环境科学学院, 河北省农田生态环境重点实验室, 保定, 071001;

2. 中国环境科学研究院, 北京, 100012)

**摘要** 为了提高邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 的降解效率, 采用正交法开展了“包埋-吸附-交联”复合固定化法固定混合菌 DP3 制备条件的优化试验, 研究了环境因素对固定化混合菌 DP3 降解 DBP 性能的影响, 并对其去除 DBP 过程进行初步研究. 结果表明, 固定化混合菌 DP3 的最佳制备条件为聚乙烯醇 (PVA) 质量分数 10%、海藻酸钠 (SA) 质量分数 2%、活性炭 (AC) 质量分数 3%、CaCl<sub>2</sub> 质量分数 1%, 1 d 内对 DBP 降解效果可达到 98.84%, 与游离态混合菌相比, 其降解率提高 35.11%; 固定化混合菌 DP3 对不同浓度 DBP 去除效率显著优于空白凝胶球; 其对模拟人工污水中 DBP 的降解率 1 d 即可达 98.03%. 当 pH 值在 4—10、NaCl 浓度在 5—100 g·L<sup>-1</sup>、底物浓度在 10—200 mg·L<sup>-1</sup> 时, 固定化混合菌 DP3 对底物表现优异的降解性能, 降解率显著优于游离态; 固定化混合菌 DP3 对底物降解符合一阶动力学方程, 具有良好的重复稳定性, 研究结果可为固定化混合菌在环境中降解 DBP 的应用提供理论依据.

**关键词** 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 降解, 固定化, 混合菌 DP3.

## The removal of dibutyl phthalate by immobilization of mixed bacteria DP3

ZHAO Xian<sup>1</sup> LI Cheng<sup>1</sup> GAO Jiatong<sup>1</sup> LIU Chunjing<sup>1</sup> ZHANG Xinyue<sup>1</sup>  
LU Chaojun<sup>2</sup> XIE Jianzhi<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Ecological Environment of Farmland in Hebei Province, College of Resources and Environmental Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071001, China;

2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing, 100012, China)

**Abstract** In order to improve the degradation efficiency of dibutyl phthalate (DBP), this study used an orthogonal design across a combined “embedding-adsorption-crosslinking” aspect to optimize the preparation conditions for the immobilization of mixed bacteria DP3, and then investigated the DBP degradation efficiencies by the immobilized DP3 under different environmental conditions. Also the removal process of DBP by the immobilized DP3 was preliminarily studied. The established formula for the preparation of the immobilized mixed bacteria DP3 was addressed with mass fractions and the proportions of polyvinyl alcohol (PVA), sodium alginate (SA), activated carbon (AC), and calcium

2020年1月14日收稿(Received: January 14, 2020).

\* 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2015ZX07203-005), 国家重点研发计划 (2018YFC1800806) 和河北省高等学校科学技术研究青年基金 (QN2016255) 资助.

**Supported by** the National Water Pollution Control and Management Technology Major Project of China(2015ZX07203-005), National Key Research and Development Project (2018YFC1800806) and the Science and Technology Research Fund for Young Scholars of Hebei Higher Institutions(QN2016255).

\*\* 通讯联系人 **Corresponding author**, Tel: 0312-7528209, E-mail: xjianzhi@126.com

chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) were 10%, 2%, 3%, and 1%, respectively. The degradation efficiency of the immobilized mixed bacteria DP3 was 35.11% higher than the free mixed bacteria and reached to 98.84% in 1 d. In addition, the degradation efficiency of the immobilized DP3 were demonstrated to be higher than the blank gel spheres over different DBP concentrations, and the DBP degradation efficiency of artificial sewage wastewater reached 98.03% in 1 day. Under the condition of pH 4–10, NaCl concentration of 5–100  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , DBP concentration of 10–200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , the immobilized mixed bacteria DP3 showed significantly higher degradation efficiency comparing with the free mixed bacteria. Moreover, the degradation curve of DBP was well fitted with a first-order kinetics stably and repeatedly. This study provided evidence for using immobilized mixed bacteria to remove DBP under actual conditions.

**Keywords** Dibutyl phthalate, degradation, immobilization, mixed bacteria.

邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)又称酞酸酯,是一类重要的合成有机物,被广泛应用于塑料制造<sup>[1]</sup>,常用作涂料、润滑剂、粘合剂、杀虫剂、包装和化妆品的添加剂<sup>[2]</sup>.有文献报道了国内 23 个城市的 90 个自来水厂 141 个水源水样中均检出了邻苯二甲酸单酯(MPAEs)<sup>[3]</sup>,邻苯二甲酸二丁酯(DBP)是 PAEs 中的一种,在增塑剂中应用最为广泛,极易从塑料中释放到环境中<sup>[4–5]</sup>,是一种环境激素类物质,具有致癌、致畸与致突变作用<sup>[6–8]</sup>,因此,开展 PAEs 此类污染物在不同环境中的降解研究对于生态环境安全保障尤为重要.

目前,对 DBP 污染的生物降解研究主要集中在高效降解菌的筛选、驯化及降解机理等方面<sup>[9–10]</sup>,游离态菌株在实际应用中存在降解周期长、菌体易流失、环境耐受性差等问题,因此,国内外学者利用固定化微生物技术解决生物降解的缺陷,已应用在处理生活废水<sup>[11]</sup>、池塘模拟废水<sup>[12]</sup>、难降解有机废水<sup>[13–14]</sup>等水污染治理方面.为了得到具有高固定化强度和高微生物活性的固定化系统,可选择两种及以上的固定化材料结合起来的复合固定化法,例如:采用聚乙烯醇和海藻酸钠为包埋材料、活性炭为吸附材料、 $\text{CaCl}_2$  的饱和硼酸溶液为交联剂,同时,负载较强生物活性的高效降解混合菌势必会提高生物解吸的效率,最终获得对底物优异的降解性能<sup>[15]</sup>,具有较强的实际应用性.

本研究以 DBP 为目标污染物,开展了 DBP 降解混合菌(以下简称 DP3)的包埋-吸附-交联固定化条件优化及降解特性研究,以聚乙烯醇(PVA)和海藻酸钠(SA)为包埋材料、活性炭为吸附材料, $\text{CaCl}_2$  的饱和硼酸溶液为交联剂,采用正交试验确定最佳固定化制备条件,并以游离态混合菌为对照,研究了 pH 值、盐度、DBP 浓度对固定化混合菌降解性能的影响,研究结果可为 DBP 降解菌在环境修复中的应用提供理论依据和技术支持.

## 1 实验部分(Experimental section)

### 1.1 供试菌剂及菌悬液制备

本研究供试混合菌 DP3 由本实验室保存的 DBP 高效降解菌鲍曼不动杆菌、唐氏不动杆菌、弗氏柠檬酸杆菌菌悬液复配而成.各菌株的菌悬液制备方法为:将菌液接种到 LB 培养基,于 30  $^{\circ}\text{C}$ , 150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床活化培养,将活化好的培养液 5000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,收集的菌体用 pH=7.2 磷酸盐缓冲液清洗 2 遍,生理食盐水清洗 3 遍,重新离心,弃去上清液.取适量湿菌体用无菌水配制成菌悬液,调节  $\text{OD}_{600}$  至 1.0.混合菌 DP3 由各菌悬液按 3 : 3 : 2 比例配制生成.

### 1.2 仪器、药品和培养基

气相色谱-质谱联用仪(7890B-7000C,美国 Agilent 公司);超声清洗器(KQ5200DB,昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发器(RE5299,海亚荣生化仪器厂);紫外分光光度计(UV-5100B,上海分析仪器有限公司).

本研究所用药品除特别注释均为分析纯,其中邻苯二甲酸二丁酯标样购自美国 Accustandard 公司,色谱纯正己烷购自上海赛默飞世尔科技有限公司.

牛肉膏蛋白胨培养基(LB): 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 L, pH 值为 7.2—7.4.

无机盐培养基(MSM):  $K_2HPO_4$  5.1 g,  $KH_2PO_4$  2.5 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.0 g,  $MgCl_2$  0.16 g, 微量元素溶液 1.0 mL; 微量元素溶液:  $CaCl_2$  20 mg,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  2.4 mg,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.8 mg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1.5 mg.

模拟人工污水: 葡萄糖 0.1700 g; 可溶性淀粉 0.1600 g;  $CH_3COONa$  0.2330 g;  $NH_4Cl$  0.45 g;  $KNO_3$  0.1 g;  $(NH_4)_2SO_4$  0.0284 g;  $KH_2PO_4$  0.0700 g;  $Na_2CO_3$  0.0600 g; pH=7.2, 去离子水 1.0 L. 121 °C 灭菌 30 min 后使用.

### 1.3 测试分析方法

#### 1.3.1 DBP 提取及检测方法

取待测的 DBP 无机培养基溶液 50 mL 于 150 mL 锥形瓶中, 加入等体积正己烷, 常温下超声提取 30 min 静置. 利用分液漏斗取出上层有机相, 加入 4 g 无水硫酸钠干燥并浓缩至 0.5 mL, 最后用正己烷定容至 1 mL, 转入棕色 2 mL 样品瓶, 待测.

GC-MS 色谱条件: Agilent HP-5MS UI 色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 进样口温度为 280 °C; 程序升温: 初始柱温 80 °C, 保持 1 min, 以 20 °C·min<sup>-1</sup> 上升至 280 °C, 保持 4 min, 载气: 氦气, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>; 进样方式: 不分流进样; 进样量: 1 μL.

GC-MS 质谱条件: 电子轰击离子源模式(EI), 离子源温度 300 °C, 四极杆温度 150 °C, MSD 传输线温度 300 °C, 电子能量 70 eV; 扫描范围为 50—550 m/z<sup>[6]</sup>.

#### 1.3.2 扫描电镜样品的制备

取外形规则的固定化凝胶球用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 每次 10—15 min, 在 4 °C 下, 2.5% 戊二醛固定 12 h, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 每次 10—15 min, 依次在 50%、70%、80%、90% 和 100% 质量浓度的乙醇溶液中脱水 1 次, 每次 30 min, 然后用 1:1 的乙醇和乙酸异戊酯置换乙醇 1 次, 乙酸异戊酯置换乙醇 2 次, 每次 30 min, 于 CO<sub>2</sub> 临界点干燥, 切片, 将样品固定在样品托上, 喷金, 待测.

### 1.4 DBP 混合菌固定化及正交试验

选择 PVA 和 SA 包埋材料, 活性炭粉末(过 1 mm 筛)作为吸附剂, 氯化钙和硼酸作为交联剂. 首先, 称取一定量的活性炭, 将制备好的 5 mL 菌悬液与活性炭混合, 摇床振荡吸附 0.5 h. 然后, 将 PVA 和 SA 按一定比例混合后加入 30 mL 蒸馏水浸泡 12 h, 灭菌后冷却至 30 °C 后, 加入吸附有菌体的活性炭, 接着, 用无菌水定容至 50 mL, 搅拌均匀后用注射器从 20 cm 高处将其缓慢匀速滴加至一定质量分数的氯化钙-饱和硼酸溶液中(用  $Na_2CO_3$  调 pH 6.7 左右), 磁力搅拌, 凝胶颗粒交联 24 h. 最后, 用无菌水和生理盐水分别冲洗 2 次, 保存于 4 °C 冰箱中, 备用.

为确定混合菌最佳固定化制备条件, 选定海藻酸钠(SA)、聚乙烯醇(PVA)、活性炭(AC)和  $CaCl_2$  质量分数为试验因素, 各因素分别设置 3 个水平, 按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表设计正交试验(表 1).

表 1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal design of immobilization

水平 Level	因素Factor			
	A:PVA/%	B:SA/%	C:AC/%	D:CaCl <sub>2</sub> /%
1	8	1	1	1
2	10	2	2	2
3	12	3	3	3

### 1.5 固定化混合菌 DP3 和固定化空白凝胶球对 DBP 降解率的测定

取灭菌的无机盐培养基 50 mL, 保持 DBP 的最终浓度分别为 10、20、50、100、200、500、1000 mg·L<sup>-1</sup>. 根据最佳固定化制备条件结果(A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>), 将制备好的固定化凝胶球和不接菌空白凝胶球按照相同的接种量接种到锥形瓶中, 于 150 r·min<sup>-1</sup>、30 °C 恒温培养. 每个处理设 3 个重复, 测试 24 h 的降解率.

$$\text{DBP降解率} = \frac{\text{DBP初始浓度} - \text{DBP残留浓度}}{\text{DBP初始浓度}} \times 100\%$$

### 1.6 不同环境因素对固定化和游离态微生物降解性能的比较

在灭菌的三角瓶中加入  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DBP 的正己烷溶液  $0.5 \text{ mL}$ , 挥发尽正己烷, 然后加入灭菌的无机盐培养基  $50 \text{ mL}$ , 保持 DBP 的最终浓度为  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 分别加入制备好的固定化微生物凝胶球和菌悬液, 使接菌量保持一致. 研究不同环境因素 (pH、NaCl 浓度和 DBP 浓度) 对固定化微生物的降解性能: pH (4、5、6、7、8、9、10); NaCl 浓度 ( $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $50$ 、 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); DBP 浓度 ( $10$ 、 $20$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). 每个处理设 3 个重复.  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、转速  $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  下培养, 测定 3 d 固定化和游离态混合菌的降解率.

### 1.7 固定化 DBP 混合菌的长期稳定性及模拟人工污水 DBP 降解试验

取灭菌的无机盐培养基  $50 \text{ mL}$ , 加入制备好的固定化微生物凝胶球, 保持 DBP 的最终浓度为  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 于  $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温培养 3 d. 每个处理设 3 个重复, 重复 20 次, 研究固定化 DBP 混合菌的长期降解稳定性.

取灭菌的模拟人工污水  $50 \text{ mL}$ , 实验方法同长期稳定性试验, 测定 6 d 固定化微生物凝胶球和游离态混合菌在模拟人工污水中的降解率.

### 1.8 降解动力学模型

采用一阶动力学模型对降解数据进行拟合, 模型方程如下:

$$C_t = C_0 e^{-Kt}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$$

式中,  $C_t$  是  $t(\text{d})$  时体系中 DBP 的总浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $C_0$  是初始时 DBP 总浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $K$  是微生物降解一阶动力学参数 ( $\text{d}^{-1}$ );  $t_{1/2}$  是半衰期 ( $\text{d}$ ).

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 DBP 降解混合菌固定化条件优化

为考察聚乙烯醇 (PVA)、海藻酸钠 (SA)、活性炭 (AC)、 $\text{CaCl}_2$  浓度等 4 种因素对包埋小球降解 DBP 能力的综合影响, 确定固定化载体最佳制备条件, 以 DBP 去除率为目标值设计正交试验, 结果如表 2 所示. 对比各因素所对应的  $R$  值可知, 各因素对固定化混合菌降解 DBP 能力的影响由大到小依次为 C: AC 含量 > A: PVA 含量 > B: SA 含量 > D:  $\text{CaCl}_2$  含量, 根据各因素所对应的  $I_j$ 、 $II_j$ 、 $III_j$  可知各因素之间最优组合为  $A_2B_2C_3D_1$ .

表 2 固定化条件优化正交试验结果  
Table 2 Orthogonal experimental results

序号 Number	因素 Factor				DBP 去除率/% DBP Removal rate
	PVA	SA	AC	$\text{CaCl}_2$	
1	1	1	1	1	88.57
2	1	2	2	2	93.88
3	1	3	3	3	95.62
4	2	1	2	3	95.73
5	2	2	3	1	99.86
6	2	3	1	2	91.58
7	3	1	3	2	95.77
8	3	2	1	3	90.15
9	3	3	2	1	94.33
$I_j$	92.69	93.36	90.10	94.25	
$II_j$	95.72	94.63	94.65	93.74	
$III_j$	93.42	93.84	97.08	93.83	
$R_j$	3.03	1.27	6.98	0.51	

## 2.2 DBP 降解混合菌固定化凝胶球微观结构分析

固定化空白和微生物凝胶球进行扫描电镜前处理制备, 喷金后观察其表面和内部结构, 结果如图 1 所示. 由图 1(a) 可以发现, 固定化空白凝胶球的表面不光滑, 存在密集的孔穴; 从图 1(b) 可知, 在固定化空白凝胶球内部, PVA-SA-AC 复合材料构筑由孔道相互连通的大量空腔, 呈孔网结构. 图 1(c)、(d) 发现, 混合菌 DP3 以网状菌落交织被复合材料包埋吸附在凝胶球的内部, 由于菌体明显小于内部孔径, 有利于微生物在内部的自由运动、增殖和快速摄取营养物质和溶解氧<sup>[17]</sup>. 邻苯二甲酸二丁酯分子自由进入凝胶球内部与微生物产生作用被降解, 外密内疏结构对维持固定化微生物良好的内部环境起到了重要的作用, 是保证固定化混合菌较高 DBP 降解率的重要因素.

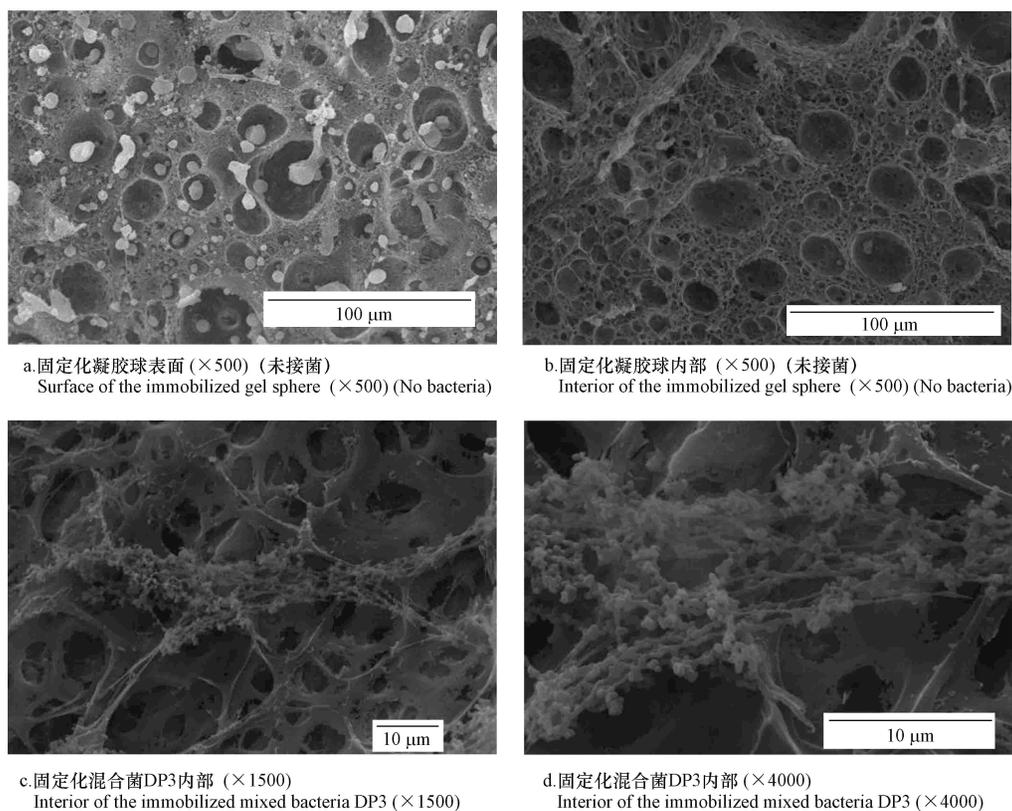


图 1 固定化凝胶球的 SEM 照片

Fig.1 The SEM images of the immobilized gel spheres

## 2.3 固定化混合菌 DP3 和空白凝胶球对 DBP 的降解性能

为了解固定化混合菌 DP3 去除 DBP 的机理, 对比了固定化 DP3 和空白凝胶球对 DBP 的去除效果, 结果如图 2 所示, DBP 的浓度为  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 固定化 DP3 和空白凝胶球对 DBP 的去除率均能达到 99% 以上; DBP 的浓度在  $20\text{--}200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 空白凝胶球对 DBP 的去除率呈现缓慢下降趋势, DBP 的浓度为  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 吸附平衡达到相对饱和, 同时, DBP 浓度的升高, 为负载在小球中混合菌 DP3 提供可利用碳源, 进而提高了微生物的活性<sup>[18]</sup>, 所以, DBP 浓度在  $500\text{--}1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 固定化 DP3 对 DBP 去除效率显著优于空白凝胶球, 随着 DBP 浓度的降低, 平衡向吸附作用方向移动, 残余的 DBP 被吸附至小球内被微生物降解, 由此可见, 经过包埋-吸附联合固定化后的混合菌 DP3 能够保持较高生物活性.

## 2.4 不同环境因素对固定化混合菌 DP3 降解能力的影响

### 2.4.1 pH

以游离态混合菌 DP3 为对照, 开展了 pH 值对固定化 DP3 降解 DBP 的影响研究, 如图 3 所示, pH 值在 6—9 时, 固定化和游离态混合菌 DP3 对 DBP 的降解能力相对较为稳定, pH 值为 7 时, 3 d 内对 DBP 降解率均可达到最大值, 而处于较强的酸碱条件时, 游离态混合菌 DP3 的降解能力显著下降,

在 pH4—6 之间时最为明显. 而固定化混合菌 DP3 的 pH 值变化对 DBP 降解能力的影响极小, 在 pH9—10 之间有极微小的变化, 明显高于游离态混合菌 DP3 的降解能力. 这是由于固定化凝胶球具有外层紧密, 向内逐渐松散的结构特征, 能够对包埋的混合菌起到一定的保护作用, 而且固定化载体上负载的  $-NH_2$ 、 $-COOH$  等基团能够对酸碱环境进行缓冲<sup>[19]</sup>. 对于游离态混合菌 DP3 来说, 较强的酸碱条件改变了细胞膜的通透性, 并且导致 DBP 降解酶失活<sup>[20-21]</sup>, 从而影响游离态混合菌对 DBP 的降解能力. 所以, 固定化混合菌 DP3 对 pH 的耐受范围明显高于游离态混合菌 DP3, 可以保持稳定的生物活性, 显示出固定化技术的优势.

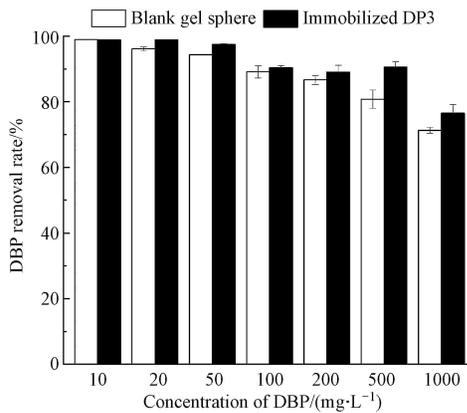


图2 固定化混合菌 DP3 和空白凝胶球对 DBP 降解性能的比较

Fig.2 Comparison of DBP degradation performance of immobilized mixed bacteria DP3 and blank gel sphere

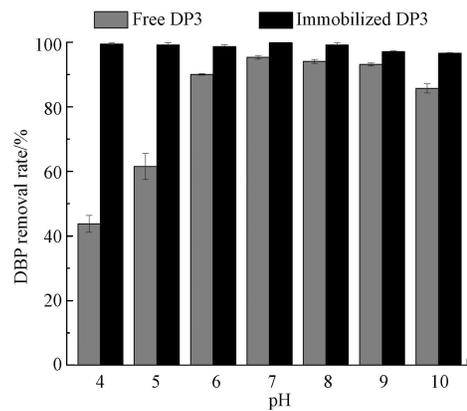


图3 pH 对固定化和游离态混合菌 DP3 降解 DBP 的影响

Fig.3 Effect of pH on immobilized DP3's and free DP3's degradation rate

#### 2.4.2 NaCl 浓度

NaCl 浓度对固定化和游离态混合菌 DP3 降解 DBP 的影响如图 4 所示, NaCl 浓度为  $0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 固定化和游离态混合菌 DP3 对 DBP 在 3 d 时的降解率均可达到最大值, 分别为 99.13% 和 94.77%. NaCl 浓度在  $5\text{--}10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  之间时, 游离态混合菌对 DBP 降解效果较为稳定, NaCl 浓度在  $20\text{--}100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  之间时, 随着 NaCl 浓度增大, 游离态混合菌对 DBP 的降解效果逐渐下降, 而固定化后的混合菌对 DBP 的降解效果较为稳定, 且显著高于游离态混合菌的降解效果. 这是由于随着盐度提高, 细胞内与外界的渗透压逐渐失去平衡, 使得细胞内的水分慢慢向外界流失, 致细胞脱水, 菌株生长受到抑制, 进而影响菌株对 DBP 的降解, 而固定化后, 固定化材料对混合菌起到良好的保护作用并为其提供一个适宜的生长环境, 随着 NaCl 浓度增大, 固定化复合菌对 DBP 的降解效果也有所降低, 这可能是由于小球外表面附着的混合菌受到 NaCl 浓度影响, 而失去活性, 从而影响其对 DBP 的降解效果.

#### 2.4.3 DBP 浓度

DBP 浓度对固定化和游离态混合菌 DP3 降解 DBP 的影响如图 5 所示, 当 DBP 浓度处于  $10\text{--}20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 固定化和游离态混合菌 DP3 对 DBP 有着显著的降解作用, 而且 DBP 浓度为  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 1 d 内固定化混合菌 DP3 对 DBP 降解效果可达到 98.84%, 与游离态混合菌相比, 其降解率显著提高 35.11%, 当 DBP 浓度大于  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 随着 DBP 浓度的增加, 游离态混合菌 DP3 对 DBP 的降解能力明显下降; 而固定化混合菌 DP3 对 DBP 的降解能力随着 DBP 浓度的增加较为稳定, 且显著高于游离态混合菌 DP3. 在 DBP 浓度为  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 固定化混合菌 DP3 对 DBP 在 3 d 时的降解效果仍可达到 91.15%. 这是由于 DBP 具有细胞毒性<sup>[22]</sup>, 高浓度的 DBP 会抑制菌株的生长, 进而影响游离态混合菌对 DBP 的降解效率, 而固定化材料具有外紧内松的结构特征, DBP 向内部扩散时浓度递减, 对混合菌起到良好的缓冲作用<sup>[23]</sup>. 可知, 固定化的混合菌微生物密度较高, 包埋、吸附材料对于 DBP 的吸附作用也可使微生物与污染物更好的接触, 从而使得固定化混合菌对高浓度 DBP 降解能力明显高于游离态混合菌.

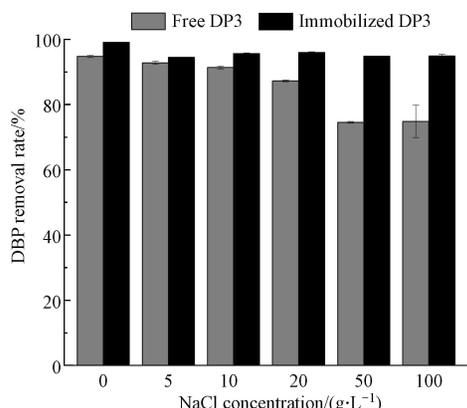


图 4 NaCl 浓度对固定化和游离态混合菌 DP3 降解 DBP 的影响

Fig.4 Effect of NaCl concentration on immobilized DP3's and free DP3's degradation rate

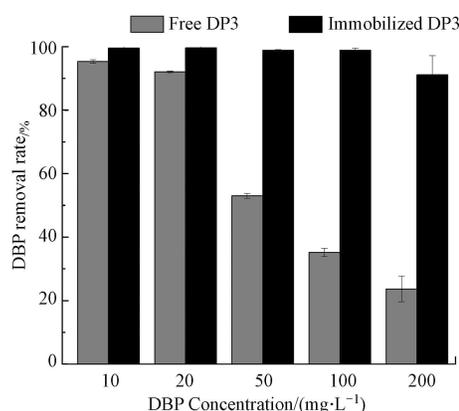


图 5 底物浓度对固定化和游离态混合菌 DP3 降解 DBP 的影响

Fig.5 Effect of DBP concentration on immobilized DP3's and free DP3's degradation rate

#### 2.4.4 固定化混合菌 DP3 和游离态混合菌 DP3 的降解动力学

固定化和游离态混合菌 DP3 降解不同浓度的 DBP (10、20、50、100、200 mg·L<sup>-1</sup>), 从拟合方程(表 3)可知, 固定化和游离态混合菌 DP3 对底物降解符合一阶动力学方程, 随着底物浓度的逐渐增大, 固定化 DP3 对其降解性能降低, 说明固定化 DP3 对底物 DBP 的浓度具有一定的耐受范围. 相对游离态, 降解同等浓度的底物, 固定化 DP3 的半衰期缩短, 降解速度明显增加, 对底物 DBP 的耐受性增强, 据推测是因为包埋载体的底物传质阻力降低了高浓度有毒底物的冲击, 同时负载的微生物密度较高, 少量菌体失活不会对整个体系微生物的降解活性产生影响<sup>[24]</sup>.

表 3 固定化 DP3 的 DBP 降解动力学方程

Table 3 Equation of DBP degradation kinetics by immobilized DP3

名称 Name	初始浓度/(mg·L <sup>-1</sup> ) Initial concentration	动力学方程 Degradation kinetics	动力学参数/h <sup>-1</sup> Kinetic parameter	$t_{1/2}$ /h	$R^2$
固定化 DP3	10	$\ln C = -0.1859t + 2.3026$	0.1859	3.7284	0.8022
	20	$\ln C = -0.1869t + 2.9957$	0.1869	3.7089	0.8008
	50	$\ln C = -0.1540t + 3.9120$	0.1540	4.5014	0.8487
	100	$\ln C = -0.0977t + 4.6052$	0.0977	7.0951	0.9283
	200	$\ln C = -0.0922t + 5.2983$	0.0922	7.5175	0.9353
游离态 DP3	10	$\ln C = -0.0426t + 2.3026$	0.0426	16.2671	0.8869
	20	$\ln C = -0.0352t + 2.9957$	0.0352	19.7153	0.9181
	50	$\ln C = -0.0105t + 3.9120$	0.0105	65.9889	0.9916
	100	$\ln C = -0.0060t + 4.6052$	0.0060	114.8983	0.9972
	200	$\ln C = -0.0037t + 5.2983$	0.0037	184.4257	0.9989

#### 2.5 固定化混合菌 DP3 的长期稳定性

为考察固定化混合菌 DP3 重复使用的稳定性, 在固定化 DP3 最佳制备和环境条件下, 对 10 mg·L<sup>-1</sup> DBP 进行降解实验, 固定化混合菌 DP3 凝胶球重复循环使用 20 次, 结果如图 6 所示, 凝胶球始终保持良好的降解活性, 且稳定, 1 d 内, 重复 20 次固定化混合菌 DP3 对 DBP 的降解效果仍能达到 99.95%, 说明固定化混合菌在前期使用中受到 DBP 的驯化, 催化其生物活性, 重复过程中优化了降解性能, 反映出固定化混合菌 DP3 降解 DBP 具有优异的长期稳定性, 这就为实际应用中奠定了理论基础, 达到节约成本的目的<sup>[25]</sup>.

#### 2.6 固定化混合菌降解模拟人工污水的 DBP

为验证固定化混合菌在实际生产中的降解能力, 将固定化混合菌 DP3 加入 10 mg·L<sup>-1</sup> DBP 的模拟

人工污水中,以游离态混合菌 DP3 作为对照,由图 7 结果显示,在 1 d 时,游离态 DP3 对 DBP 的降解率为 53.33%,固定化 DP3 为 98.03%,降解效率显著提升,2 d 后,固定化 DP3 达到 99.98%,模拟人工污水中的 DBP 几乎可以完全降解,结果表明,固定化混合菌 DP3 表现出良好的降解能力,具有显著的应用价值。

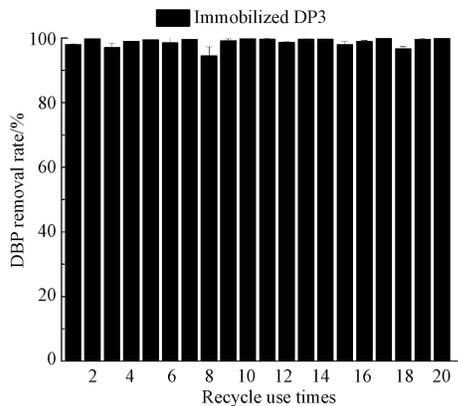


图 6 固定化混合菌 DP3 的重复稳定性  
Fig.6 Repeated stability of immobilized mixed bacteria DP3

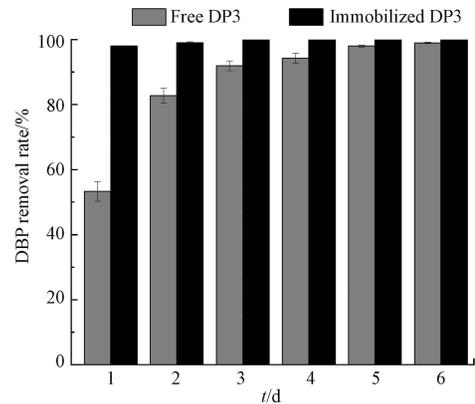


图 7 固定化混合菌 DP3 和游离态混合菌 DP3 降解模拟人工污水中 DBP 的比较  
Fig.7 Comparison of immobilized mixed bacteria DP3 and free mixed bacteria DP3 in degradation of DBP in artificial sewage

### 3 结论(Conclusion)

(1)采用正交试验确定固定化混合菌 DP3 的最佳制备条件为:聚乙烯醇(PVA)质量分数 10%,海藻酸钠(SA)质量分数 2%,活性炭(AC)质量分数 3%,CaCl<sub>2</sub> 质量分数 1%。与游离态混合菌的降解效果相比,该条件下所制备的固定化混合菌 DP3,1 d 时对 DBP 的降解效果可达到 98.84%,降解率提升 35.11%。

(2)考察了不同环境条件(pH 值、NaCl 浓度、底物浓度)对固定化与游离态混合菌 DP3 降解 DBP 的影响,在 pH4—10、NaCl 浓度在 5—100 g·L<sup>-1</sup>、底物浓度在 10-200 mg·L<sup>-1</sup> 时,对 DBP 的降解率均在 90% 以上,固定化混合菌 DP3 的降解率显著优于游离态混合菌。此外,固定化混合菌 DP3 在模拟人工污水中 1 d 时对 DBP 的降解率可达 98.03%。

(3)固定化混合菌 DP3 对底物降解符合一阶动力学方程,相比游离态而言,降解同等浓度的底物,固定化 DP3 的半衰期缩短,降解速度明显增加,对底物 DBP 的耐受性增强。同时,固定化混合菌 DP3 重复对 DBP 进行降解 20 次,降解效果仍可达到 99.95%,且无破碎现象。SEM 扫描结果表明固定化混合菌 DP3 以网状菌落交织被复合材料包埋吸附在凝胶球的内部。进一步证实并解释了固定化混合菌具有较高 DBP 降解效率的原因。

#### 参考文献 (References)

- [1] 黄艳,卞战强,田向红,等.环境中邻苯二甲酸酯类化合物降解技术研究进展[J].环境与健康杂志,2010,27(7):654-657.  
HUANG Y, BIAN Z Q, TIAN X H, et al. Progress of degradation techniques of environmental phthalic acid esters[J]. Journal of Environment and Health, 2010, 27(7): 654-657(in Chinese).
- [2] ROSLEV P, VORKAMP K, AARUP J, et al. Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant [J]. *Water Research*, 2007, 41(5): 969-976.
- [3] 丁梦雨,康启越,张释义,等.全国23个城市水源水中邻苯二甲酸酯代谢物浓度调查 [J]. *中国环境科学*, 2019, 39(10): 4205-4211.  
DING M Y, KANG Q Y, ZHANG S Y, et al. National survey of phthalate metabolites in drinking source water of 23 cities in China [J]. *China Environmental Science*, 2019, 39(10): 4205-4211(in Chinese).
- [4] LIANG D W, ZHANG T, FANG H H, et al. Phthalates biodegradation in the environment [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2008, 80(2): 183-198.
- [5] NAHURIRA R, REN L, SONG J, et al. Degradation of di(2-Ethylhexyl) phthalate by a novel *Gordonia alkanivorans* strainYC-

- RL2 [J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(3): 1-11.
- [6] 杨婧. 邻苯二甲酸酯降解菌的降解特性与土壤应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.  
YANG J. Characterization of phthalate-degrading bacterial strain and its application in phthalate-contaminated soil[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018(in Chinese).
- [7] 裴小强. 室内空气中邻苯二甲酸酯的污染特征及健康风险[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.  
PEI X Q. Pollution characteristics and health risk of phthalates in indoor air[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013(in Chinese).
- [8] 唐文娟. PAEs 降解菌筛选及一株根瘤菌降解特性与基因组学分析的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2016.  
TANG W J. Isolation of phthalate esters degrading strains and biodegradation characteristics and whole genome analyses of *Rhizobium* sp. LMB-1 [D]. Shanghai: South China University of Technology, 2016(in Chinese).
- [9] 高静静, 陈丽玮, 王宜青, 等. 一株邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)高效降解菌的筛选及其降解特性 [J]. *环境化学*, 2016, 35(11): 2362-2369.  
GAO J J, CHEN L W, WANG Y Q, et al. Screening and degradation characteristics of a highly efficient degrading bacteria of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) [J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(11): 2362-2369(in Chinese).
- [10] LI J, GU J D, PAN L. Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate by *Rhodococcus ruber*, Sa and modeling the processes using the modified Gompertz model [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 55(3): 223-232.
- [11] 胡俊. 固定化微球菌降解废水中邻苯二甲酸酯的研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2014.  
HU J. Biodegradation of di-n-butyl phthalate in wastewater by immobilized *Micrococcus* sp.[D]. Beijing: China University of Geosciences, 2014 (in Chinese).
- [12] 颜婷婷. 固定化微生物处理邻苯二甲酸酯类废水的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2007.  
YANT T. Treatineni of PAEs wastewater by immobilized microbial cells[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2007(in Chinese).
- [13] EL-NAAS M H, AL-ZUHAIR S, MAKHLOUF S. Continuous biodegradation of phenol in a spouted bed bioreactor (SBBR) [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 160(2): 565-570.
- [14] QIAO L, WEN D L, WANG J L. Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5229-5234.
- [15] 李婧, 党志, 郭楚玲, 等. 复合固定化法固定微生物去除芘 [J]. *环境化学*, 2012, 31(7): 1036-1042.  
LI J, DANG Z, GUO C L. Pyrene was removed by immobilization of microorganisms [J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 31(7): 1036-1042(in Chinese).
- [16] 李容榛, 李成, 赵暹, 等. 一株高效邻苯二甲酸二丁酯降解菌的筛选、鉴定及其降解特性研究 [J]. *环境化学*, 2019, 38(10): 2274-2282.  
LI R Z, LI C, ZHAO X, et al. Isolation and identification of a highly efficient DBP degrading bacteria and its degradation characteristics [J]. *Environmental Chemistry*, 2019, 38(10): 2274-2282(in Chinese).
- [17] 邱东亚, 薛屏. 聚乙烯醇-壳聚糖复合物包埋微生物高效降解水中苯酚的研究 [J]. *化学研究与应用*, 2017, 29(9): 1339-1345.  
QIU D Y, XU P. Microorganism entrapped using polyvinyl alcohol-chitosan composite for efficient degradation of phenol in water [J]. *Chemical Research and Application*, 2017, 29(9): 1339-1345(in Chinese).
- [18] ZHU X M, CHEN B L, ZHU L Z, et al. Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: A review [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 227: 98-115.
- [19] 叶正芳, 倪晋仁. 污水处理的固定化微生物与游离微生物性能的比较 [J]. *应用基础与工程科学学报*, 2002, 10(4): 325-331.  
YE Z F, NI J R. Comparison of immobilized microorganism and free microorganism in sewage treatment [J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2002, 10(4): 325-331(in Chinese).
- [20] 李欣, 凌婉婷, 刘静娴, 等. 固定化菌剂对污水和牛粪中雌二醇和己烯雌酚的去除作用 [J]. *环境科学*, 2015, 36(7): 2581-2590.  
LI X, LING W T, LIU J X, et al. Immobilization of Estrogen-degrading Bacteria to remove the 17 $\beta$ -estradiol and Diethylstilbestrol from Polluted Water and Cow Dung [J]. *Environmental Science*, 2015, 36(7): 2581-2590(in Chinese).
- [21] 郝红红, 陈浚, 程整, 等. 一株好氧反硝化菌的筛选鉴定及固定化研究 [J]. *环境科学学报*, 2013, 33(11): 102-109.  
HAO H H, CHEN J, CHENG A, et al. Isolation and identification of an aerobic denitrifying bacteria and its immobilization characteristics [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(11): 102-109(in Chinese).
- [22] 李瑞, 于超, 丁裕斌, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)对绒毛外滋养层细胞侵袭和迁移的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(12): 22-29.  
LI R, YU C, DING Y B, et al. Effect of plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on invasion and migration of trophoblast cells outside villi [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33(12): 22-29(in Chinese).
- [23] 刘文斌, 张海涛, 杨海君, 等. 辛基酚聚氧乙烯醚高效降解混合菌L9的固定化及其条件优化 [J]. *环境工程学报*, 2016, 10(10): 6056-6064.  
LIU W B, ZHANG H T, YANG H J, et al. Immobilization of mixed bacteria L9's degrading octylphenol ethoxylates and its optimization [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(10): 6056-6064(in Chinese).
- [24] 路俊玲, 彭宇科, 陈旭, 等. 包埋法固定化对邻苯二甲酸酯降解菌功能的影响 [J]. *南京大学学报(自然科学)*, 2017, 53(2): 309-315.  
LU J L, PENG Y K, CHEN X, et al. Effects of immobilization on the activity of the phthalic acid esters degradation bacteria [J]. *Journal of Nanjing University(Natural Science)*, 2017, 53(2): 309-315(in Chinese).
- [25] TALLUR P N, MEGADI V B, NINNEKAR H Z. Biodegradation of p-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN 1 [J]. *Biodegradation*, 2009, 20(1): 79-83.