

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.08.003

# 白腐真菌对邻苯二甲酸二甲酯的 降解与机理研究

高斯研<sup>1</sup>, 崔康平<sup>1</sup>, 刘睿<sup>1</sup>, 许向阳<sup>1</sup>, 陈长斌<sup>2</sup>, 汪三六<sup>2</sup>

(1. 合肥工业大学 资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 安徽曙光化工集团有限公司, 安徽 安庆 246003)

**摘要:**文章以黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)作为白腐真菌的代表,研究其对邻苯二甲酸二甲酯(dimethyl phthalate, DMP)的降解效果与机理。实验结果表明,在最佳条件(pH=5.6, 温度为30℃, DMP初始质量浓度为10 mg/L)下,7 d后DMP的去除率为75%。进一步优化反应条件发现:体系中初始葡萄糖质量浓度为5 g/L时,反应结束时DMP降解效率为95%;当反应中加入20 μg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或27.0 mg/L Mn<sup>2+</sup>,反应7 d后DMP的降解效率显著提升到100%。此外,过氧化物酶在DMP降解过程中起重要作用,实验证明DMP的降解更多地由锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)驱动;傅里叶红外光谱证实氨基、羧基、羟基等还原性官能团参与了DMP的去除。文中通过液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)联用仪确定DMP的降解产物,并讨论3种可能的降解途径。

**关键词:**生物降解; 塑化剂; 白腐真菌; 邻苯二甲酸二甲酯(DMP); 过氧化物酶

**中图分类号:**X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2023)08-1024-08

## Biodegradation of dimethyl phthalate by *Phanerochaete chrysosporium* and its mechanism

GAO Siyan<sup>1</sup>, CUI Kangping<sup>1</sup>, LIU Rui<sup>1</sup>, XU Xiangyang<sup>1</sup>, CHEN Changbin<sup>2</sup>, WANG Sanliu<sup>2</sup>

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 2. Anhui Shuguang Chemical Group Co., Ltd., Anqing 246003, China)

**Abstract:** The biodegradation efficiency and mechanism of dimethyl phthalate(DMP) by *Phanerochaete chrysosporium*(*P. chrysosporium*), a kind of white-rot fungus, were investigated. Experiments showed that under optimal conditions(30℃, pH of 5.6, initial DMP concentration of 10 mg/L), 75% of DMP was removed after seven days. When 5 g/L glucose was added into the system, the degradation efficiency of DMP was significantly increased to 95%. When 20 μg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 27.0 mg/L Mn<sup>2+</sup> were added into the system, the degradation efficiency of DMP was significantly increased to 100%. Moreover, peroxidase played an important role in the degradation process of DMP, and the degradation of DMP was more driven by manganese peroxidase(MnP). Fourier transform infrared spectrometer(FTIR) confirmed that amino, carboxyl, hydroxyl, and other reducing functional groups were involved in DMP removal. Based on liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS) analysis, several different DMP degradation intermediates were identified, and three possible degradation pathways of DMP were deduced.

**Key words:** biodegradation; plasticizer; white-rot fungus; dimethyl phthalate(DMP); peroxidase

收稿日期:2021-04-01;修回日期:2022-05-07

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2019YFC0408500);安徽省科技重大专项资助项目(201903a07020009)和宿州市科技计划资助项目(2019056)

作者简介:高斯研(1995—),女,安徽池州人,合肥工业大学硕士生;

崔康平(1969—),男,安徽合肥人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail: cuikangping@hfut.edu.cn.

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs)是一种合成的难降解的有机增塑剂化合物<sup>[1]</sup>,广泛用于塑料、软管、玩具、容器等柔性塑料制品的添加剂和增塑剂<sup>[2]</sup>,邻苯二甲酸二甲酯(dimethyl phthalate, DMP)是最重要和最广泛使用的 PAEs 之一<sup>[3]</sup>。由于不与主体聚合物发生化学结合, DMP 易于从塑料中浸出<sup>[4]</sup>,会存在于沉积物、自然水体、废水、土壤,甚至由于其具有相对较高的蒸汽压力而存在于空气中<sup>[5]</sup>。在环境中, DMP 通过食物链进入雄性哺乳动物体内,对生殖功能有显著损害,如破坏生殖系统、引起睾丸萎缩和精子丢失、改变生殖细胞的超微结构等<sup>[6-8]</sup>。此外, DMP 对雌性哺乳动物的胚胎发育有中度毒性。由于 DMP 存在苯基、羧基,其水解反应半衰期约 3 a,不易在自然环境中降解;由于它的诱变、致畸和致癌性及难降解性,中国环境监测总站和美国环境保护署将其列为优先级有机污染物<sup>[9]</sup>。因此有必要开发有效的降解处理方法降解水生环境中的 DMP 污染物。

目前,降解 DMP 的主要方法有光化学氧化法、预氧化法<sup>[10]</sup>和生物降解法<sup>[11]</sup>。由于生物降解法具有低能耗、低成本和可忽略的二次污染等优势,已成为有机化合物污染环境修复的研究热点。生物处理是通过微生物代谢降解和转化有害物质,具有高效和环境相容性等特点<sup>[12]</sup>,酯类烃链较短的 PAEs 更容易被微生物降解和矿化<sup>[13]</sup>。因此,寻找有效率的 DMP 降解菌被认为是清除土壤中 DMP 残留的首要步骤。目前,分离到的降解 DMP 的细菌大部分是原核微生物,包括不动杆菌、节杆菌、芽孢杆菌、短杆菌、乳酸菌、巴氏杆菌、黄单胞菌、假单胞菌、白念珠菌、红球菌等<sup>[14-17]</sup>,而真菌降解 DMP 的相关研究较少。

白腐真菌针对底物的降解具有广谱性<sup>[18]</sup>,可以彻底降解多种难降解有机污染物,而相关实验研究表明,利用白腐真菌降解废水中的金属,可以大大提高废水的治理效率<sup>[19]</sup>。因此,白腐真菌具有广泛的降解能力、营养物质要求简单、生命力顽强、降解彻底、培养成本低廉及对固液基质的适应性强<sup>[20]</sup>等特点,在水污染防治中具有成本低、效率高、实用性强等优势<sup>[21]</sup>。黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是白腐真菌的一种,因其能产生锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)和木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP),通过氧化还原反应来攻击多种污染物而受到研究人员关注<sup>[22]</sup>。白腐真菌具有生物量

大、对周围需要修复的生态环境要求低、适应性强的特点,因此多被应用于降解各种芳烃类化合物及农药,其在降解这些物质方面表现出卓越的性能<sup>[23-24]</sup>。目前,白腐真菌已广泛应用于纺织、纸浆造纸废水的修复等领域<sup>[25-27]</sup>。

目前,微生物降解 PAEs 的研究主要集中在细菌降解方面,包括好氧和厌氧细菌,而真菌对 PAEs 生物降解的研究报道很少。本文将黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)作为白腐真菌的代表,研究白腐真菌 *P. chrysosporium* 对塑化剂中 DMP 的活化降解条件和机理。具体研究内容如下:① 探讨温度、pH 值、DMP 的初始质量浓度、葡萄糖质量浓度、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量和 Mn<sup>2+</sup> 用量对 DMP 降解效率的影响;② 研究白腐真菌 *P. chrysosporium*/DMP 体系的机理,包括 MnP 酶和 LiP 酶的测定;③ 利用傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)测定白腐真菌 *P. chrysosporium* 反应前后官能团的变化,用液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)联用仪鉴定 DMP 的降解产物并讨论其降解途径。

## 1 实 验

### 1.1 黄孢原毛平革菌的培养

从中国培养物保藏中心(武汉)购得白腐真菌 *P. chrysosporium* AF-96007 菌株,每 30 d 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(马铃薯提取物 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g/L)上传代 1 次,传代后将培养基置于恒温培养箱中,在 30 °C 活化 7 d 后在 4 °C 条件下保存。液体培养时,取出 4 °C 下保存的白腐真菌 *P. chrysosporium*,将孢子刮到灭菌后的超纯水中,调节浊度为 100 FTU。在高温灭菌后的 200 mL 液体培养基中接种 3 mL 孢子悬浮液,置于 30 °C、135 r/min 的条件下培养 3 d,待菌球进入对数培养期后,投加污染物。液体培养基所含组分如下:

葡萄糖 5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L、  
MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L、CaCl<sub>2</sub> 0.1 g/L、  
MnSO<sub>4</sub> 0.03 g/L、NaCl 0.06 g/L、  
FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 mg/L、CoCl<sub>2</sub> 6 mg/L、  
ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6 mg/L、CuSO<sub>4</sub> 6 mg/L、  
AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.6 mg/L、  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.6 mg/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.6 mg/L、  
酵母提取物 0.012 g/L、酒石酸二铵 0.2 g/L、

维生素 B<sub>1</sub> 1 mg/L、藜芦醇 0.07 g/L、吐温-80 0.5 g/L。

用 1.2 g/L 醋酸钠调节溶液 pH 值至 4.5。

## 1.2 最佳降解条件研究

为了提高白腐真菌 *P. chrysosporium* 对 DMP 的降解效率,探究 DMP 初始质量浓度、温度、pH 值、葡萄糖质量浓度、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量、Mn<sup>2+</sup> 用量对 DMP 降解效率的影响。

1) 实验组。待孢子悬浮液培养 3 d 后,分别投加一定量的 DMP 储备液,其初始质量浓度分别为 1、5、10、15、20 mg/L;培养温度分别设置在 25、30、37 °C;初始 pH 值分别设置在 3.6、4.6、5.6、6.6、7.6;液体培养基葡萄糖的质量浓度分别为 5、10、15、20 g/L;在锥形瓶中加入一定体积的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液(1 g/L),以达到所需质量浓度为 5、10、20、30 μg/L;在锥形瓶中加入一定体积的 Mn<sup>2+</sup>,使锥形瓶中 Mn<sup>2+</sup> 质量浓度分别为 5.5、11.0、27.0、40.0 mg/L。将上述实验组置于恒温振荡培养箱中恒温振荡培养,每 24 h 测定体系中 DMP 质量浓度,通过比较初始和最终 DMP 质量浓度来计算降解效率,每个样品设置 3 个平行。

2) 对照组。空白对照为纯培养基,以灭活白腐真菌 *P. chrysosporium* 培养基(121 °C, 15 min)处理后 DMP 质量浓度为吸附对照。

DMP 的质量浓度通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定,采用紫外吸收检测器和 C18 反相色谱柱(5 μm, 4.6×150 mm)进行分析。紫外吸收检测器的波长设置为 225 nm,柱温为 30 °C,流动相为水和乙腈(水和乙腈的体积比为 3:7),流速为 1 mL/min,出峰时间在 2.5 min 左右,通过外标法进行定量分析。

## 1.3 酶活的测定

有研究证明,微生物能够降解有机污染物的原因是其自身能够分泌可用于降解污染物的酶<sup>[28]</sup>。在污染物的胁迫下,白腐真菌会分泌出胞外酶,如 MnP 酶、LiP 酶,来参与有机污染物的矿化过程。本实验探究最适降解条件下处理 10 mg/L DMP 的对照组以及 27 mg/L Mn<sup>2+</sup> 实验组中 MnP 酶和 LiP 酶的活性。

收集实验组中不同降解时间下的白腐真菌 *P. chrysosporium* 菌球,于 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min,离心后取上清液用于酶活的测定。

MnP 酶的活性是用紫外分光光度计测定其在 240 nm 处吸光度值的变化来表征。3 mL 的

反应体系包括 0.4 mL 胞外粗酶液、2.0 mL 琥珀酸缓冲液(丁二酸)(5.9 g/L, pH=4.5)、0.5 mL MnSO<sub>4</sub>(2.265 g/L)及 0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.34 g/L)。25 °C 条件下将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为反应的启动因子启动酶反应,记录在 240 nm 下分别反应 0、3 min 时的吸光度值,定义每 min 产生 1 μmol Mn<sup>3+</sup> 所需要的 MnP 酶量为 1 个酶活单位。

LiP 酶活性是用紫外分光光度计测定其在 310 nm 处吸光度值的变化来表征。3 mL 的反应体系包括 0.4 mL 胞外粗酶液、1.5 mL 的酒石酸缓冲液(15 g/L, pH=3.0)、1.0 mL 藜芦醇(1.82 g/L)及 0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.34 g/L)。25 °C 条件下将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为反应的启动因子启动酶反应,记录在 310 nm 下分别反应 0、3 min 时的吸光度值,将每 min 内 1 μmol 藜芦醇氧化成藜芦醛所需的酶量作为 1 个酶活单位。

MnP、LiP 酶活的计算公式为:

$$U = \frac{10^6 \Delta AV_1}{\Delta t b \epsilon V_2}$$

其中:ΔA 为吸光度最大和最小峰之间的差;V<sub>1</sub> 为反应体系的体积,取值为 3 mL;Δt 为 ΔA 对应的时间差;V<sub>2</sub> 为酶液体积,取值为 0.4 mL;b 为比色皿厚度,取值为 1 cm;ε 为吸光系数,Mn<sup>3+</sup> 的吸光系数为 8 100 L/(mol·cm),藜芦醛的吸光系数为 9 300 L/(mol·cm)。

## 1.4 降解机理研究

### 1.4.1 傅里叶红外光谱分析

为了鉴定白腐真菌 *P. chrysosporium* 降解 DMP 的过程中起主要作用的官能团种类,利用 FTIR 定性分析白腐真菌 *P. chrysosporium* 降解 DMP 反应前后官能团的变化。取对照组(菌体+10 mg/L DMP)分别降解反应 0、5 d 后的菌体,用超纯水清洗 5 次后于-60 °C 冷冻干燥机中干燥 24 h 后,取出将其碾碎。称取约 0.1 g 研磨后的样品,约 0.1 g KBr 粉末,混合均匀后制成半透明压片。检测时,仪器的波数范围为 4 000~500 cm<sup>-1</sup>。

### 1.4.2 中间产物鉴定

溶液中 DMP 降解的中间产物使用 LC-MS 分析。液相色谱条件如下:C18 反相色谱柱,流动相为水(A 相)和乙腈(B 相)(水和乙腈的体积比为 3:7),流速为 0.2 mL/min,梯度洗脱 15 min 内 A 相由 95% 降至 0,然后 1 min 内 A 相再升至 95%,最后保持 5 min;进样量为 20 μL,样品 DMP 质量浓度为 10 mg/L。质谱条件如下:负离子模式,保护气温度为 450 °C,毛细管电压为 4 500 V,

雾化气压力为 41.37 kPa(6.0 psig),气帘气压力为 55.16 kPa(8.0 psig),碰撞活化解离(collison-activated dissociation, CAD)为 11 L/min,离子源气 1 (Gas1)为 6 L/min,离子源气 2(Gas2)为 7 L/min,波长为 224 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 最佳降解条件研究

本实验通过探究不同温度、pH 值、DMP 初

始质量浓度、葡萄糖质量浓度、 $H_2O_2$  质量浓度、 $Mn^{2+}$  质量浓度确定 DMP 生物降解的最佳降解条件。实验以纯培养基为空白对照,以灭活白腐真菌 *P. chrysosporium* 培养基(121 °C, 15 min)为吸附对照。

不同温度、pH 值、DMP 初始质量浓度、葡萄糖质量浓度、 $H_2O_2$  质量浓度、 $Mn^{2+}$  质量浓度对 DMP 生物降解效率的影响如图 1 所示。图 1 中,黄孢菌即黄孢原毛平革菌。

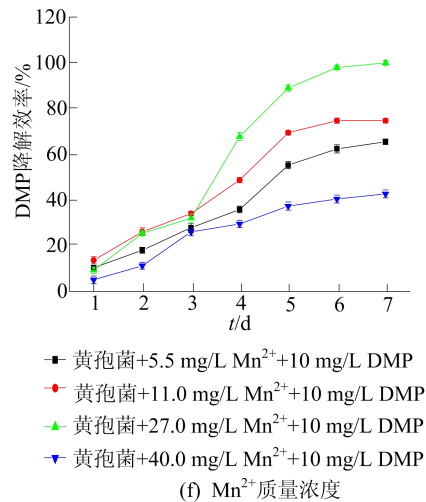
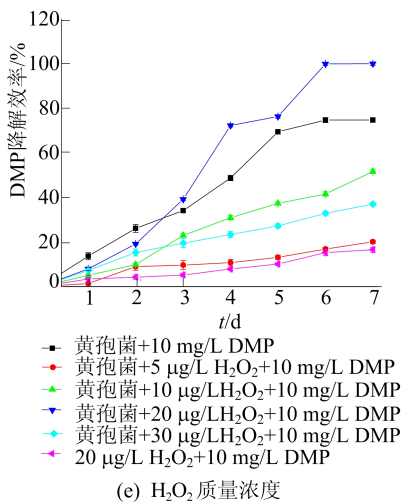
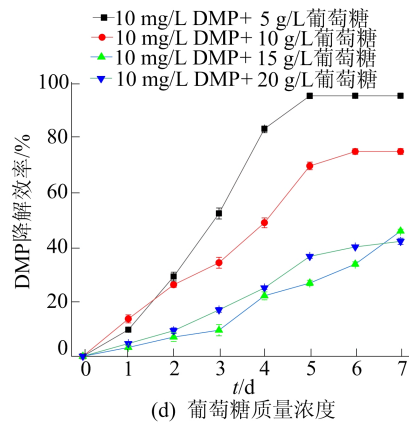
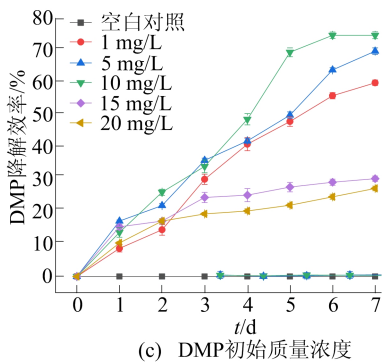
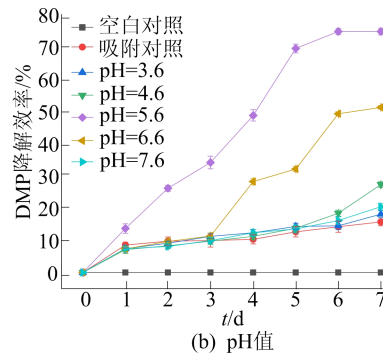
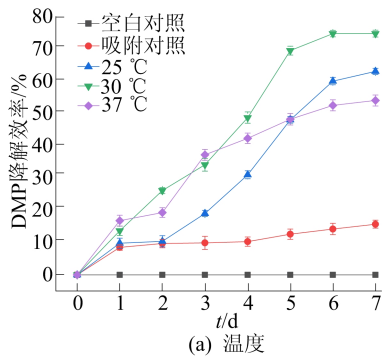


图 1 温度、pH 值、DMP 初始质量浓度以及葡萄糖、 $H_2O_2$ 、 $Mn^{2+}$  的质量浓度对 DMP 降解效率的影响

从图 1a 可以看出: DMP 降解效率随温度升

高呈先上升后下降; 在 30 °C 下, DMP 的降解效率

达到 75%，而其他组的降解效率均低于 75%。这可能是由于温度会显著影响酶的活性和白腐真菌 *P. chrysosporium* 的代谢效率。当温度较低时，酶的活性不强，污染物降解速率一般，通常温度每升高 10 °C，反应速率就会加快 1 倍左右。然而，酶的本质是蛋白质，若温度过高，则会导致蛋白质的变性，从而使酶失活，酶一旦失活就不能作为促使污染物降解的催化剂，污染物降解效率就会显著下降。因此，将 30 °C 设为后续实验的温度。

从图 1b 可以看出，pH 值对白腐真菌 *P. chrysosporium* 降解 DMP 的影响比较大，弱酸性比弱碱性更有利于菌体的降解，当 pH=5.6 时，DMP 降解效率最大。这可能是由于菌体对 DMP 的降解主要是依赖其分泌的酶活，当 pH 值高于或低于一定范围时，将影响酶活，从而降低其对 DMP 的降解能力。因此后续实验将 pH=5.6 作为反应条件。

由图 1c 可知：当 DMP 初始质量浓度小于 10 mg/L 时，降解效率随 DMP 质量浓度升高而升高；当 DMP 初始质量浓度为 10 mg/L 时，降解效率达到最大值，为 75%；当 DMP 初始质量浓度大于 10 mg/L 时，降解效率迅速下降。因此，考虑到环境中实际的 DMP 质量浓度范围和菌体降解特性，后续实验将初始 DMP 质量浓度设为 10 mg/L。

白腐真菌 *P. chrysosporium* 在上述最佳条件下对 DMP 的降解效率仅为 75%，为了提升其降解效率，下面实验尝试优化其他参数，探究碳源质量浓度、 $H_2O_2$  质量浓度、 $Mn^{2+}$  质量浓度对 DMP 生物降解的影响。

从图 1d 可以看出，反应体系中的葡萄糖质量浓度对生物降解效率的影响较大，当葡萄糖质量浓度在 5 g/L 时，降解效率能达到 95%，当其质量浓度为 10、15、20 g/L 时，降解效率逐渐下降。葡萄糖在体系中作为碳源被微生物利用，当其质量浓度有限时，DMP 能很快充当碳源被微生物利用，这加速了污染物的消耗。此外，碳源的短缺可以极大地促进过氧化物酶的产生，而过氧化物酶在有机物的降解中扮演着重要的角色，这也可能是碳源受限的情况下 DMP 降解效率更高的原因。因此，后续实验将葡萄糖质量浓度设为 5 g/L。

有研究显示， $H_2O_2$  可以激活酶促反应<sup>[29]</sup>。从图 1e 可以看出，在 30 °C、pH=5.6、DMP 初始质量浓度为 10 mg/L 下，当体系中  $H_2O_2$  质量浓度为 20  $\mu$ g/L 时，DMP 被完全去除，此时的降解效率明显高于其他实验组。在仅加 20  $\mu$ g/L

$H_2O_2$  的对照组中，DMP 的降解效率为 27%，这说明体系中的  $H_2O_2$  并不是通过氧化反应来降解 DMP，而是通过激活白腐真菌 *P. chrysosporium* 产生酶来降解 DMP。当  $H_2O_2$  质量浓度为 30  $\mu$ g/L 时，DMP 降解效率下降极大，这说明高质量浓度的  $H_2O_2$  抑制酶的产生，不利于 DMP 降解。

从如图 1f 可以看出，在 30 °C、pH=5.6、DMP 初始质量浓度为 10 mg/L 下，当体系中  $Mn^{2+}$  质量浓度为 27.0 mg/L 时，DMP 降解效率最大，此时的降解效率为 100%，而继续增加  $Mn^{2+}$  质量浓度， $Mn^{2+}$  的促进作用不明显。

迄今为止，有很多研究者从废水、活性污泥中分离到能够降解 DMP 的细菌，这种方式耗时长且需要驯化。本次实验表明，真菌，尤其是白腐真菌在 DMP 的降解中也可以大有作为。

综上所述，温度为 30 °C、pH=5.6、DMP 初始质量浓度为 10 mg/L 是白腐真菌 *P. chrysosporium* 降解 DMP 的最佳降解条件，反应 7 d 后降解效率达到 75%，而此条件下空白对照和吸附对照的降解效率远小于 20%，这说明 DMP 的消失是由于生物的降解而不是吸附。进一步优化反应条件的结果如下：当体系中葡萄糖质量浓度为 5 g/L 时，降解效率能达到 95%；当体系中加入 20  $\mu$ g/L  $H_2O_2$  或者 27.0 mg/L  $Mn^{2+}$ ，都能使 DMP 降解效率显著提升，达到 100%。

## 2.2 酶促降解研究

几乎所有的白腐真菌都能产生过氧化物酶——MnP 酶和 LiP 酶，这 2 种过氧化物酶在白腐真菌降解污染物的过程中起着不可或缺的作用。白腐真菌 *P. chrysosporium* 暴露在 10 mg/L DMP、27.0 mg/L  $Mn^{2+}$  中，MnP 酶活性随暴露时间的变化如图 2 所示。

在 10 mg/L DMP 的胁迫下，MnP 酶活性在第 1 天达到第 1 个峰值 6.11 U/L 后，随反应时间增加而增加，在第 5 天达到最大值 8.79 U/L。在整个反应阶段，DMP 胁迫下的 MnP 酶活性均高于对照组。此现象表明，白腐真菌 *P. chrysosporium* 在 DMP 的胁迫下仍能保持较强的活性，其原因主要有以下 2 个方面：① 白腐真菌 *P. chrysosporium* 具有耐 DMP 的特性，通过分泌大量的 MnP 酶抵御 DMP 的侵害；② 随着反应进行，碳源在不断消耗，碳源的受限是白腐真菌 *P. chrysosporium* 分泌更多 MnP 酶的充分条件。而在白腐真菌 *P. chrysosporium*、DMP、 $Mn^{2+}$  共存的体系中，MnP 酶活性在第 5 天达到最大值

15.51 U/L,这可能是由于  $Mn^{2+}$  作为 MnP 酶的反应底物,能极大地促进白腐真菌 *P. chrysosporium* 分泌 MnP 酶,并在生产 MnP 酶的过程中利用诱导基因转录调整整个反应过程中 MnP 酶的生产量,因此,MnP 酶在有机物的降解过程中起着不可或缺的作用。MnP 酶在  $Mn^{2+}$  存在的条件下将 Mn(II) 氧化成 Mn(III),从而有效精准地还原底物。锰(Mn)在 MnP 酶的表达和污染物的降解中起调控作用,低质量浓度的必需重金属物质对分解酶系统的作用是至关重要的。

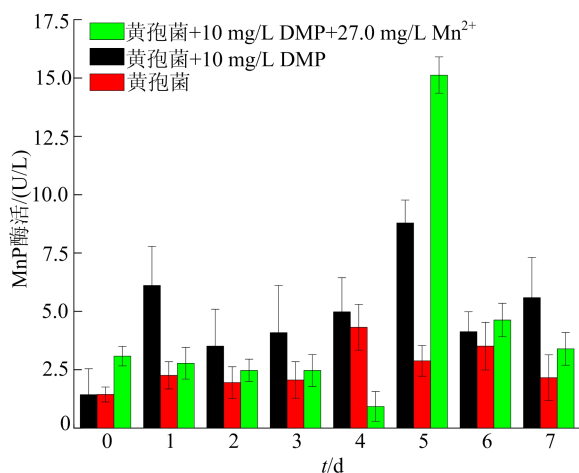


图 2 MnP 酶活性随暴露时间的变化

白腐真菌 *P. chrysosporium* 暴露在 10 mg/L DMP、27.0 mg/L  $Mn^{2+}$  中,LiP 酶活性随暴露时间的变化如图 3 所示。

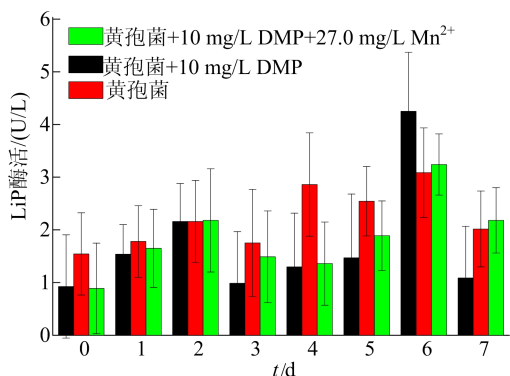


图 3 LiP 酶活性随暴露时间的变化

在 10 mg/L DMP 的胁迫下,LiP 酶活性在第 6 天达到最大值 4.25 U/L。LiP 酶是白腐真菌 *P. chrysosporium* 的次级代谢产物,仅在缺乏氮源的情况下被激活,随着反应进行,氮源被不断消耗,LiP 酶活性逐渐增强。在整个反应阶段

(第 6 天除外),DMP 胁迫下的 LiP 酶活性均低于对照组,这说明 DMP 抑制 LiP 酶活性。在白腐真菌 *P. chrysosporium*、DMP 和  $Mn^{2+}$  共存的体系中,LiP 酶活性低于对照组(第 6 天、第 7 天除外),这说明  $Mn^{2+}$  对于 LiP 酶活性有抑制作用。

从图 2、图 3 可以看出:在 3 种体系下,LiP 酶活性的峰值远小于 MnP 酶,这说明 MnP 酶在 DMP 降解中起着更重要的作用;MnP 酶和 LiP 酶出现峰值的时间不一致,后者稍晚于前者,这可能是由于 LiP 酶的产生依赖于通过 MnP 酶氧化草酸生成过氧化氢。

## 2.3 降解机理研究

### 2.3.1 傅里叶红外光谱分析

傅里叶红外光谱是利用物质在不同波数下吸收峰不同的性质,来鉴别官能团的种类,如 O—H、C—N、C—O、C—N—C、P—O—C 等化学键<sup>[30]</sup>。菌体在 DMP 环境下分别反应 0、5 d 后,其红外光谱如图 4 所示。

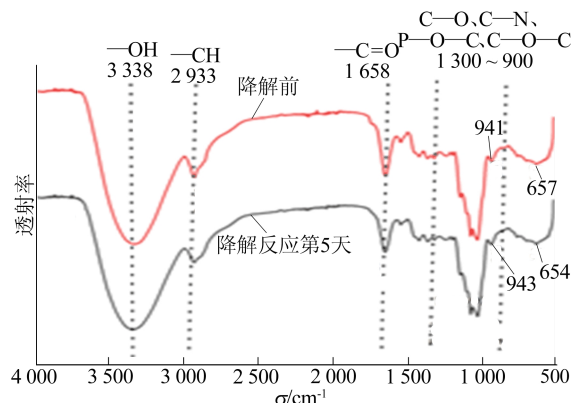


图 4 DMP 降解前后 *P. chrysosporium* 菌的 FTIR 谱图

从图 4 可以看出:在  $3338\text{ cm}^{-1}$  附近吸收峰出现漂移,这表明存在羧基中的—OH 伸缩振动;在  $2933\text{ cm}^{-1}$  附近出现吸收峰偏移,可能是由于真菌蛋白质上碳氢化合物中的非对称与对称亚甲基的伸展振动<sup>[31]</sup>;吸收峰由  $1658\text{ cm}^{-1}$  移动到  $1656\text{ cm}^{-1}$ ,表明菌体上—C=O 发生伸展振动;在  $1300\sim 900\text{ cm}^{-1}$  内出现吸收峰漂移,表明有醇类和羧酸中的 C—O 伸缩、C—N 伸缩、P—O—C 伸缩、C—O—C 伸缩;在  $1000\sim 650\text{ cm}^{-1}$  出现吸收峰漂移,表明有芳烃的 C—H 面外弯曲振动;吸收峰从  $3353\text{ cm}^{-1}$  偏移至  $3338\text{ cm}^{-1}$ ,对应细胞壁结构中的 P—S 伸缩变动、—OH 伸缩和蛋白质特有的 C—N—C 剪式振动,这表明羟基发生了多样的变化,由多聚体变为单聚体甚至游离态。

图 4 结果表明,在 DMP 生物降解过程中,白腐真菌 *P. chrysosporium* 中的羧基、羟基等官能团发挥着重要作用。

### 2.3.2 DMP 降解途径推测

根据 LC-MS 联用仪检测结果推测,DMP 在白腐真菌 *P. chrysosporium* 作用下的降解路径主要有 3 种,如图 5 所示。

1) 侧链缩合成环。在  $\cdot\text{OH}$  自由基作用下,DMP 的 2 条侧链失去甲氧基,产生水杨酸<sup>[32]</sup>。

2) 苯环开环。DMP 及其一些含苯环的中间

产物在  $\cdot\text{OH}$  自由基作用下,发生开环,裂解成分子量较小的脂肪酸链,最终降解成无害化的  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[33]</sup>。

3) 在 DMP 分子的侧链上,一侧  $\text{C}=\text{O}$  键发生断裂,在  $\cdot\text{OH}$  自由基攻击下,DMP 裂解形成羟基化中间产物,随着反应继续,侧链上的  $\text{C}-\text{O}$  键发生断裂,邻苯二甲酸单甲酯(monomethyl phthalate, MMP)形成,然后 MMP 经过环化形成邻苯二甲酸酐,最终被降解为无害化的  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[34]</sup>。

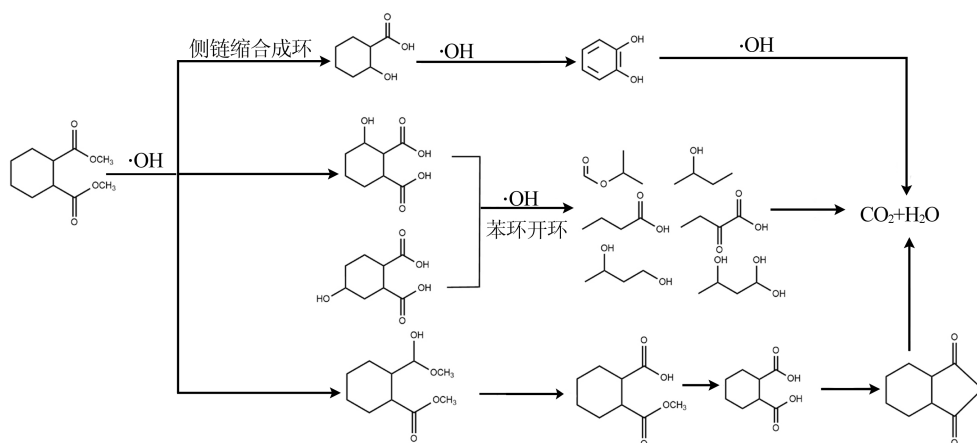


图 5 DMP 可能的降解路径

## 3 结 论

本文探究不同条件下白腐真菌 *P. chrysosporium* 对 DMP 的最佳降解效果,实验发现:

1) 白腐真菌 *P. chrysosporium* 降解 DMP 的最佳降解条件是温度为  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}=5.6$ 、DMP 初始质量浓度为  $10\text{ mg/L}$ ,反应 7 d 后 DMP 降解效率达到 75%。

2) 当体系中加入葡萄糖的质量浓度为  $5\text{ mg/L}$  时,DMP 降解效率为 95%;体系中加入  $20\text{ }\mu\text{g/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  或者  $27.0\text{ mg/L}$   $\text{Mn}^{2+}$  都能使 DMP 降解效率显著提升,达到 100%。

通过测定白腐真菌 *P. chrysosporium*/DMP 体系中的 MnP 酶和 LiP 酶,发现反应中 LiP 酶活性的峰值远小于 MnP 酶,这说明 MnP 酶在 DMP 的降解中起着更重要的作用。

实验利用 LC-MS 联用仪鉴定 DMP 的降解产物,并讨论 3 种可能的降解途径,根据检测到的中间产物推测, $\cdot\text{OH}$  攻击 DMP 分子中  $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{C}$  键等,经过羟基化、环化、开环等过程产生中间产物,随着反应继续, $\cdot\text{OH}$  继续氧化中间产

物生成一些低分子物质,最终 DMP 被氧化成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。

## [参 考 文 献]

- [1] XUE J J, ZHU Z R, ZONG Y Q, et al. Oxidative degradation of dimethyl phthalate (DMP) by the  $\text{Fe}(\text{V})/\text{H}_2\text{O}_2$  process[J]. ACS Omega, 2019, 4(5): 9467-9472.
- [2] WANG W L, WU Q Y, WANG C, et al. Health risk assessment of phthalate esters (PAEs) in drinking water sources of China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22: 3620-3630.
- [3] ZHANG T, HUANG Z H, CHEN X H, et al. Degradation behavior of dimethyl phthalate in an anaerobic/anoxic/oxic system[J]. Journal of Environmental Management, 2016, 184: 281-288.
- [4] SUBEDI B, SULLIVA K D, DHUNGANA B. Phthalate and non-phthalate plasticizers in indoor dust from childcare facilities, salons, and homes across the USA[J]. Environmental Pollution, 2017, 230: 701-708.
- [5] LATORRE I, HWANG S, MONTALVO-RODRIGUEZ R. Isolation and molecular identification of landfill bacteria capable of growing on di-(2-ethylhexyl) phthalate and deteriorating PVC materials[J]. Journal of Environmental Science

- and Health, Part A, 2012, 47(14):2254-2262.
- [6] BHATIA H, KUMAR A, DU J, et al. Di-*n*-butyl phthalate causes antiestrogenic effects in female Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32(10):2335-2344.
- [7] SANTANGELI S, MARADONNA F, ZANARDINI M, et al. Effects of diisononyl phthalate on *Danio rerio* reproduction [J]. Environmental Pollution, 2017, 231:1051-1062.
- [8] PANT N, SHUKLA M, PATEL D K, et al. Correlation of phthalate exposures with semen quality [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008, 231(1):112-116.
- [9] JIN D C, KONG X, CUI B J, et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by a newly isolated halotolerant *Sphingobium* sp. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14:24046-24054.
- [10] WANG J B, XIA Z L, CAO Z H, et al. Mathematical model involving chemical reaction and mass transfer for the ozonation of dimethyl phthalate in water in a bubble column reactor [J]. Journal of Advanced Oxidation Technologies, 2017, 20(1). DOI: 10.1515/jaots-2016-0191.
- [11] HUANG M Z, ZHANG T, RUAN J J, et al. A new efficient hybrid intelligent model for biodegradation process of DMP with fuzzy wavelet neural networks [J]. Scientific Reports, 2017, 7:41239.
- [12] BASAK B, BHUNIA B, DEY A. Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 93:107-117.
- [13] YUAN S Y, LIU C, LIAO C S, et al. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments [J]. Chemosphere, 2002, 49:1295-1299.
- [14] ZENG F, CUI K Y, LI X D, et al. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescens* FS1 [J]. Process Biochemistry, 2004, 39:1125-1129.
- [15] ZHANG J F, ZHANG C N, ZHU Y P, et al. Biodegradation of seven phthalate esters by *Bacillus mojavensis* B1811 [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 132:200-207.
- [16] YANG J, GUO C L, LIU S S, et al. Characterization of a di-*n*-butyl phthalate-degrading bacterial consortium and its application in contaminated soil [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25:17645-17653.
- [17] GAO D W, WEN Z D. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes [J]. Science of the Total Environment, 2016, 541:986-1001.
- [18] 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.
- [19] 邵梅香, 朱炳根, 李敏, 等. 白腐真菌在环境保护中应用的研究进展 [J]. 金陵科技学院学报, 2015, 31(1):88-92.
- [20] 李慧蓉. 白腐真菌及其技术的潜在工业应用 [J]. 工业微生物, 1996, 26(2):35-39.
- [21] 赵长军. 白腐真菌处理难生物降解的有机废水的初步研究 [J]. 城乡建设, 2010(25):54.
- [22] ASGHER M, BHATTI H N, ASHRAF M, et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system [J]. Biodegradation, 2008, 19:771-783.
- [23] 汲永臻, 汪群慧, 黄鹂鸣, 等. 采用白腐菌对难降解有机污染物的生物净化 [J]. 农业工程学报, 2006, 22(6):211-214.
- [24] 张伟, 冯俊, 杨超, 等. 白腐真菌的广谱生物降解性研究进展 [J]. 环境污染与防治, 2012, 34(1):64-71.
- [25] TRINH Q H, MOK Y S. Environmental plasma-catalysis for the energy-efficient treatment of volatile organic compounds [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2016, 33(3):735-748.
- [26] TORRES-DUARTE C, VAZQUEZ-DUHALT R. Applications and prospective of peroxidase biocatalysis in the environmental field [M]// Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Berlin: Springer-Verlag, 2010:179-206.
- [27] MOLDES D, COUTO S R, CAMESELLE C, et al. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor [J]. Chemosphere, 2003, 51:295-303.
- [28] NWANKWEGU A S, ZHANG L, XIE D T, et al. Bioaugmentation as a green technology for hydrocarbon pollution remediation: problems and prospects [J]. Journal of Environmental Management, 2022, 304:114313.
- [29] 黄真真. 聚乙烯醇固定化白腐真菌对复合废水的处理及其机理研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2015.
- [30] CAO Y J, YIN H, PENG H, et al. Biodegradation of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) by *Phanerochaete chrysosporium* in the presence of Cd<sup>2+</sup> [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24:11415-11424.
- [31] HUANG Z Z, CHEN G Q, ZENG G M, et al. Polyvinyl alcohol-immobilized *Phanerochaete chrysosporium* and its application in the bioremediation of composite-polluted wastewater [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 289:174-183.
- [32] WANG G, CHEN Q H, LIU Y P, et al. In situ synthesis of graphene/WO<sub>3</sub> co-decorated TiO<sub>2</sub> nanotube array photoelectrodes with enhanced photocatalytic activity and degradation mechanism for dimethyl phthalate [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 337:322-332.
- [33] 冉孟家. TiO<sub>2</sub>/锂硅粉的制备及光催化降解 DMP 废水研究 [D]. 成都: 西华大学, 2019.
- [34] 李雨娟. 介质阻挡放电对环境邻苯二甲酸酯类物质的降解研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.

(责任编辑 张淑艳)