

研究报告

乙酸丁酯降解菌的分离鉴定及降解特性

王雪, 薛福浩, 成卓韦*

浙江工业大学环境学院, 浙江 杭州 310014

王雪, 薛福浩, 成卓韦. 乙酸丁酯降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2215-2226.

WANG Xue, XUE Fuhao, CHENG Zhuowei. Isolation and identification of a bacterial strain capable of degrading butyl acetate[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2215-2226.

摘要: 【背景】酯类是工业生产废气中常见组分之一。利用微生物降解含酯类废气具有研究价值和应用前景。【目的】从浙江某污水处理厂活性污泥中驯化分离出一株能以乙酸丁酯为唯一碳源生长的降解菌, 研究其降解乙酸丁酯的特性及降解途径。【方法】对分离纯化的降解菌进行形态学、生理生化及分子生物学鉴定以确定种属, 采用单因素变量法分析菌株降解乙酸丁酯的特性, 并对降解中间产物进行检测和分析。【结果】经生理生化和 16S rRNA 基因鉴定为莫德斯托斯不动杆菌(*Acinetobacter modestus*), 命名为 HYY-1。菌株 HYY-1 在碱性(pH 8.0–10.0)条件下对乙酸丁酯有较好的降解效果。在乙酸丁酯浓度为 264.75–1 059.00 mg/L 时降解率较高, 在 120 h 内对最高浓度乙酸丁酯的降解率可达 100%。菌株 HYY-1 的初始接种浓度对降解效率影响不大, 120 h 内不同接种浓度下的降解效率均能达到 100%。菌株 HYY-1 降解乙酸丁酯的中间产物为正丁醇和乙酸, 最终降解为 CO₂、细菌生物量等, 在不同初始乙酸丁酯浓度下降解产物比例有所不同。【结论】菌株 HYY-1 具有高效降解乙酸丁酯的能力, 推测可能的降解机制为经酯键水解酶部分转化为正丁醇和乙酸, 最终完全矿化为 CO₂ 和细菌生物量。本研究为进一步解析乙酸丁酯生物降解机理和探索乙酸丁酯污染环境的生物修复路径提供了理论支持。

关键词: 乙酸丁酯降解菌; 分离鉴定; 降解特性; 碳平衡; 降解途径

资助项目: 浙江省“领雁”研发攻关计划(2022C03073); 浙江工业大学大学生创新创业训练计划(2023078)

This work was supported by the Zhejiang Provincial “Lead Wild Goose” Research and Development Program (2022C03073), and the Student Innovation and Entrepreneurship Training Program of Zhejiang University of Technology (2023078).

*Corresponding author. E-mail: zwcheng@zjut.edu.cn

Received: 2023-09-27; Accepted: 2024-01-22; Published online: 2024-03-25

Isolation and identification of a bacterial strain capable of degrading butyl acetate

WANG Xue, XUE Fuhao, CHENG Zhuowei*

College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: [Background] Esters are one of the common components in industrial waste gas. Using microorganisms for the degradation of esters has a promising application prospect and thus deserves research. [Objective] To study the degradation characteristics and pathway of a butyl acetate-degrading strain isolated from the activated sludge of a sewage treatment plant in Zhejiang Province. [Methods] This strain was identified based on the physiological, biochemical, and 16S rRNA gene sequence. The single factor experiments were carried out to analyze the degradation characteristics of the strain for butyl acetate, and the degradation intermediates were detected. [Results] The strain was identified as *Acinetobacter modestus* HYY-1. It demonstrated strong degradation effect on butyl acetate under alkaline conditions (pH 8.0–10.0). The strain showed high degradation efficiency for butyl acetate at 264.75–1 059.00 mg/L, which nearly reached 100% within 120 h in the case of the highest butyl acetate concentration. The initial inoculation concentration of the strain had little effect on the degradation efficiency, which reached 100% within 120 h in the case of different initial inoculation concentrations. The main intermediates in the degradation of butyl acetate by this strain were *n*-butanol and acetic acid, and the final products were CO₂ and bacteria biomass. The proportions of the products varied under different initial butyl acetate concentrations. [Conclusion] Strain HYY-1 has the ability to efficiently degrade butyl acetate. Specifically, the strain may degrade butyl acetate by ester bond hydrolases into *n*-butanol and acetic acid, which were ultimately mineralized into CO₂ and bacteria biomass. This study provides theoretical support for deciphering the biodegradation mechanism of butyl acetate and exploring the bioremediation path of butyl acetate-contaminated environment.

Keywords: butyl acetate-degrading strain; isolation and identification; degradation characteristics; carbon balance; degradation pathway

乙酸丁酯是性能优异的有机溶剂, 广泛应用于生物制药、化工、皮革及涂料等工业生产过程中^[1]; 其属于挥发性有机化合物^[2], 对眼及上呼吸道均有强烈的刺激作用, 有麻醉作用。吸入高浓度乙酸丁酯会出现流泪、咽痛、咳嗽、胸闷和气短等症状, 严重者会出现心血管和神经系统的疾病。皮肤接触可引起皮肤干燥^[3]。综上, 乙酸丁酯会对人体造成一定程度的危害,

因而有关酯类废气的治理是很有必要的。

目前乙酸丁酯废气的处理方法较为多样, 如吸附法^[4]、吸收法^[5]、催化燃烧法^[6]、光解法^[7]和生物法^[8-12]等。上述方法在一定条件下对乙酸丁酯废气均有较好的去除效果, 但吸附法需频繁更换饱和吸收液, 而光解法效率低。生物法用于降解乙酸丁酯的研究最广泛。例如, 朱勤勤等^[8]构建的真菌-细菌复合菌剂在 24 h 内

对 120 mg/L 乙酸丁酯的降解率可达 95%; Qi 等^[9]发现 5 种真菌均能利用乙酸丁酯;李理等^[10]从生物滴滤池中分离出 15 株乙酸丁酯降解菌, 包含 3 株假单胞菌和 12 株不动杆菌, 其中降解菌 CBA12 可在 48 h 内完全降解 100 mg/L 的乙酸丁酯;汪群慧等^[11]利用生物滴滤塔对进气质量负荷为 229.5 g/(m³·h)的乙酸丁酯去除率为 96%; Mathur 等^[12]发现了一株 *Shewanella putrefaciens* 可在 70 h 内降解 500 mg/L 以下的乙酸丁酯。综上所述, 目前已有一些关于乙酸丁酯降解菌种的报道, 其中也涉及属于不动杆菌属的菌株。然而, 目前该方面的研究大多集中在菌株降解效果、反应器净化效果的考察, 很少涉及乙酸丁酯的微生物降解产物及降解途径。在获得乙酸丁酯降解菌的基础上, 开展降解菌的降解特性、乙酸丁酯的微生物降解途径等研究能为生物法净化乙酸丁酯的应用提供重要的技术支撑与理论依据。

本研究从浙江某污水处理厂活性污泥中驯化分离出一株乙酸丁酯降解菌, 对其进行形态学、生理生化及分子生物学鉴定确定种属, 采用单因素变量法分析菌株降解乙酸丁酯的特性, 并根据降解产物对降解途径进行分析, 以期为深入研究微生物降解乙酸丁酯的机理提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品

本研究所用活性污泥取自浙江某污水处理厂。

1.1.2 主要试剂和仪器

实验所用乙酸丁酯、正丁醇、乙酸等化学试剂为分析纯; Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 深圳子科生物科技有限公司。

气相色谱仪、离子色谱仪和气质联用仪 (GC-MS), 安捷伦科技有限公司; 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司。

1.1.3 培养基

无机盐培养基(g/L): K₂HPO₄ 0.942, KH₂PO₄ 0.234, NaNO₃ 1.700, NH₄Cl 0.980, MgCl₂·6H₂O 0.203, CaCl₂·2H₂O 0.011 1, FeCl₃ 0.016 2, 微量元素 5 mL/L、pH 6.0–8.0, 溶剂为去离子水。其中微量元素(g/L): ZnCl₂ 0.088, MnCl₂·4H₂O 0.060, KI 0.010, Na₂MoO₄·2H₂O 0.100, H₃BO₃ 0.050。110 °C 高压蒸汽灭菌 40 min。

LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.0, NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, pH 自然, 溶剂为去离子水。固体培养基额外添加 15–20 g/L 琼脂。121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 乙酸丁酯降解菌的分离鉴定

1.2.1 降解菌驯化、分离与纯化

首先将活性污泥进行曝气驯化, 驯化过程中每天添加 1 mL 乙酸丁酯和更换无机盐培养液。驯化大约 2 个月后, 取 10 mL 活性污泥加入含 50 mL 无机盐培养液的 330 mL 摇瓶内, 并添加 1 235.5 mg/L 的乙酸丁酯进行富集培养, 待乙酸丁酯浓度为初始的 50% 时, 从中取出 5 mL 富集液于 50 mL 新鲜无机盐培养基中, 加入相同量的乙酸丁酯, 重复上述富集过程 5 次后, 将最后一次富集液进行梯度稀释(10⁻⁴–10⁻⁶), 各取 50 μL 涂布至 LB 固体培养基, 30 °C 培养 24–48 h, 选择生长情况较好的单菌落进行多次划线纯化。

1.2.2 降解菌鉴定及生理生化鉴定

将纯化菌株进行 16S rRNA 基因序列分析和生理生化试验鉴定。16S rRNA 基因序列分析

采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取和纯化菌株的 DNA, 4 °C 保存。用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(25 pmol/L)各 1 μ L, DNA 1 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物纯化回收后进行测序。生理生化鉴定利用梅里埃全自动鉴定仪考察菌株对不同碳源的代谢情况。菌株鉴定及生理生化测试均委托浙江天科高新技术发展有限公司(原浙江省微生物研究所)进行, 将获得的 16S rRNA 基因测序结果上传至 NCBI 获得登录号, 与 NCBI 数据库中的基因序列进行 BLAST 比对, 并利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.2.3 菌株的生长曲线测定

将纯化后的菌株接种在 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养, 每隔一定时间取 2 mL 培养液, 使用紫外可见分光光度计测定其在 600 nm 处的吸光度, 以此表征菌体浓度。

1.3 降解菌降解性能测定实验

将分离筛选出的乙酸丁酯降解菌接种在以乙酸丁酯为唯一碳源的无机盐培养基中, 在 30 °C、160 r/min 的摇床中培养 72 h, 每隔 12 h 通过气相色谱仪测定摇瓶内乙酸丁酯的浓度, 每组实验设置 2 个平行和 1 个空白对照, 根据乙酸丁酯初始浓度和测定浓度的差值, 计算降解菌对乙酸丁酯的降解率。

乙酸丁酯浓度采用气相色谱分析, 分析条件为(30 m \times 0.25 mm \times 0.5 μ m) HP-Innowax 色谱柱, 进样口温度 210 °C, 检测器(flame ionization detector, FID)温度 200 °C, 柱温 90 °C, 氢气流量 40 mL/min, 空气流量 450 mL/min,

载气为氮气, 色谱柱流量 1 mL/min, 总流量 33.4 mL/min, 分流比为 15:1, 进样量 800 μ L^[8]。

1.4 乙酸丁酯降解分离菌株的影响因素实验

1.4.1 分离菌株菌悬液的制备

将降解菌接种至 LB 液体培养基中, 在 30 °C、160 r/min 条件下培养至对数生长中期(OD_{600} =1.3), 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用无菌水洗涤 2 次, 重悬用于后续降解实验。

1.4.2 不同初始浓度下乙酸丁酯的降解实验

将初始浓度为 9.45 mg/L 的菌悬液接种至 pH 7.0, 乙酸丁酯初始浓度分别为 264.75、353.00、441.75、529.50、617.75、706.00、794.25、882.50 和 1 059.00 mg/L 的无机盐培养基中, 30 °C、160 r/min 培养 120 h, 每隔 12 h 测定乙酸丁酯浓度和 OD_{600} 。

1.4.3 不同 pH 值下乙酸丁酯的降解实验

用 NaOH 溶液调节无机盐培养基的 pH 值为 4.0–10.0, 向培养基中添加 882.5 mg/L 的乙酸丁酯并接种 9.45 mg/L 菌悬液, 30 °C、160 r/min 培养 120 h, 每隔 12 h 测定乙酸丁酯浓度和 OD_{600} 。

1.5 乙酸丁酯降解中间产物测定方法

根据降解实验的 CO₂ 产量和细菌生物量干重, 计算矿化率、C-CO₂ 和 C-生物量, 发现某些浓度的乙酸丁酯在降解菌株的作用下, 未能完全降解为 CO₂ 和 H₂O, 因此推测有其他产物生成。拟采用 GC-MS 和离子色谱仪对降解后的气体和培养液进行检测, 寻找中间产物。

GC-MS 的分析条件为(60 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m) HP-Innowax 色谱柱, 进样口温度 230 °C, 压力 18.571 psi, 总流量 10.008 mL/min, 分流比 5:1, 程序升温(40 °C 保持 5 min、12 °C/min 升至 75 °C、12 °C/min 升至 200 °C), 进样量 1 mL。离子色谱仪的分析方法为检测器温度 30 °C、抑制器电流 50 mA、淋洗液 KOH

的浓度为 20 mmol/L、流速 1 mL/min、总工作时间为 8 min、进样量 1 mL。CO₂ 气相色谱(GC) 分析条件为(30 m×0.50 μm×0.32 μm) HP-Innowax 色谱柱, 进样口温度 100 °C、检测器(thermal conductivity detector, TCD)温度 180 °C、柱温 42 °C、尾吹气氦气 7.0 mL/min、载气为氦气、色谱柱流量 0.2 mL/min、总流量 107 mL/min、分流比为 3.3:1、进样量 800 μL。

设置浓度梯度分别为 176.5、529.5、882.5 和 1 235.5 mg/L 的乙酸丁酯培养液, 接种初始浓度为 9.45 mg/L 的菌液, 测定降解过程中乙酸丁酯和各产物的浓度, 并换算成 C 质量, 由此计算碳平衡。

2 结果与分析

2.1 乙酸丁酯降解菌的分子生物学鉴定结果

2.1.1 分离菌株的形态鉴定结果

活性污泥中的微生物经多次富集和划线,

分离出一株乙酸丁酯降解菌株, 命名为 HYH-1。菌株 HYH-1 菌落呈白色, 边缘整齐, 不透光, 光滑湿润, 易挑取。透射电镜下观察该菌体的形态为球杆菌, 无鞭毛(图 1A), 大小为 1 050 nm×1 433 nm, 革兰氏染色阴性。

2.1.2 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

将菌株 HYH-1 的测序结果上传至 NCBI, 获得登录号 MZ617269, 同时将该序列与 NCBI 数据库中的基因序列进行 BLAST 比对。发现其属于 *Acinetobacter*, 与 *Acinetobacter gyllenbergii* strain RUH 422、*Acinetobacter courvalinii* strain ANC 3623 和 *Acinetobacter vivianii* strain NIPH 2168 具有 99% 的相似性。从结果中选取 10 株 *Acinetobacter* 具有代表性的菌株, 以 16S rRNA 基因序列同源性为基础, 采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树, 如图 1B。通过遗传距离及 16S rRNA 基因序列比对, 鉴定分离菌株为莫德斯托斯不动杆菌(*Acinetobacter modestus*), 因此命名为 *Acinetobacter modestus* HYH-1。

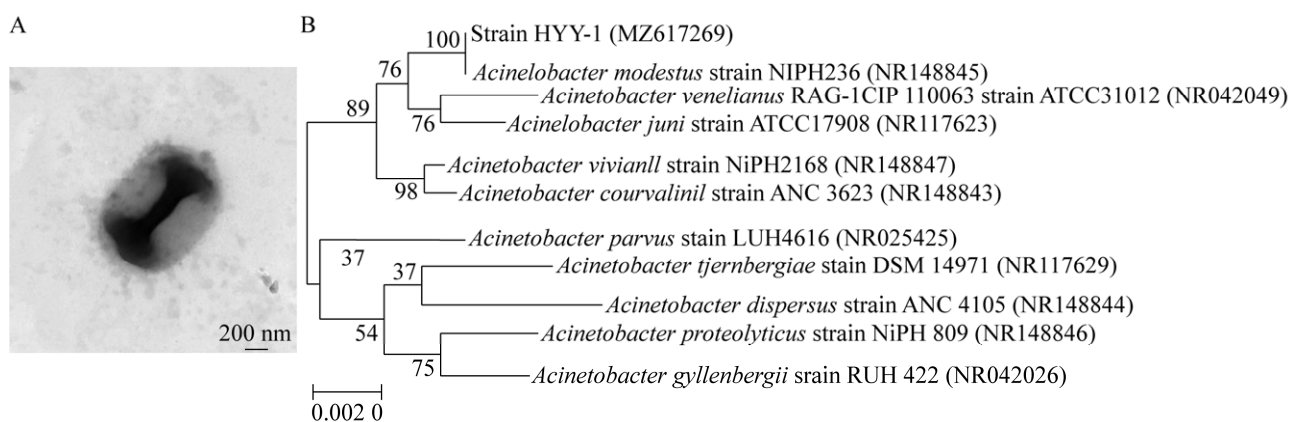


图 1 降解菌 HYH-1 透射电镜照片(15 000×)和系统发育树 0.002 0 表示距离标尺, 分支长度表示每个节点的进化距离, 距离越近, 表示样本差异越小; 数值反映了每个节点的自展值, 也就是可信度

Figure 1 Transmission electron microscope (TEM) images (15 000×) and phylogenetic tree of strain HYH-1. 0.002 0 represents the distance scale. The branch length represents the evolutionary distance for each node. The closer the distance, the smaller the sample difference. The numeric value reflects the bootstrap value for each node, also named the confidence level.

2.1.3 分离菌株的生理生化鉴定结果

测定菌株 HY-1 对梅里埃 GN 卡上 47 种碳源的利用能力。结果表明其对酪氨酸芳胺酶、琥珀酸盐碱化及 L-组氨酸同化 3 种呈阳性反应,其余 44 种均呈阴性反应。

2.1.4 分离菌株的生长曲线

菌株 HY-1 在 LB 液体培养基中的生长情况如下:从 3 h 开始快速生长,在 15 h 左右达到对数生长期,此后略有下降,OD₆₀₀ 值最高可达 1.4,最大生物量可达 1 000 mg/L 左右。

2.2 影响分离菌株降解效果的因素分析

2.2.1 乙酸丁酯初始浓度对降解效率的影响

如图 2 所示,菌株 HY-1 对实验浓度的乙酸丁酯均具有较好的降解作用,对于浓度为 264.75–441.75 mg/L 的乙酸丁酯,菌株降解率达 100% 需要 48 h,对于浓度为 529.5–882.5 mg/L 的乙酸丁酯,需要 84 h,对于浓度为 1 059 mg/L 的乙酸丁酯,需要 120 h,在乙酸丁酯浓度为 441.75 mg/L 时菌株的生长情况表现最好,生物量最高可达约 300 mg/L。

根据图 2 的降解曲线,用一级反应动力学

方程进行拟合,拟合结果如表 1 所示。

$$C_t = C_0 e^{(-kt)}$$

式中: C_t 为 t 时刻乙酸丁酯的残留质量浓度 (mg/L); C_0 为乙酸丁酯初始质量浓度 (mg/L); k 为生化反应速率常数 (h^{-1})。

拟合结果表明,一级反应动力学模型能较好地描述乙酸丁酯的生物降解过程。

2.2.2 pH 对分离菌株降解效率的影响

pH 是影响微生物活性的敏感因素,微生物的生命活动和物质代谢都与环境 pH 密切相关^[13]。如图 3 所示,120 h 内菌株 HY-1 在初始 pH 4.0–10.0 时均能降解一定量的乙酸丁酯,对初始 pH 的适应范围较广。在相同初始乙酸丁酯浓度下,初始 pH 9.0 时达到完全降解仅需 48 h,初始 pH 值低于 9.0 和高于 9.0 的降解时间均有所增长,且离 9.0 越远,降解时间也越长。120 h 内,初始 pH 值分别为 8.0、9.0 和 10.0 的培养基内乙酸丁酯降解率均为 100%,说明该菌株在碱性条件下对乙酸丁酯具有较好的降解能力。在初始 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0 和 7.0 时的降解率依次为 54%、54%、65%、98%。另

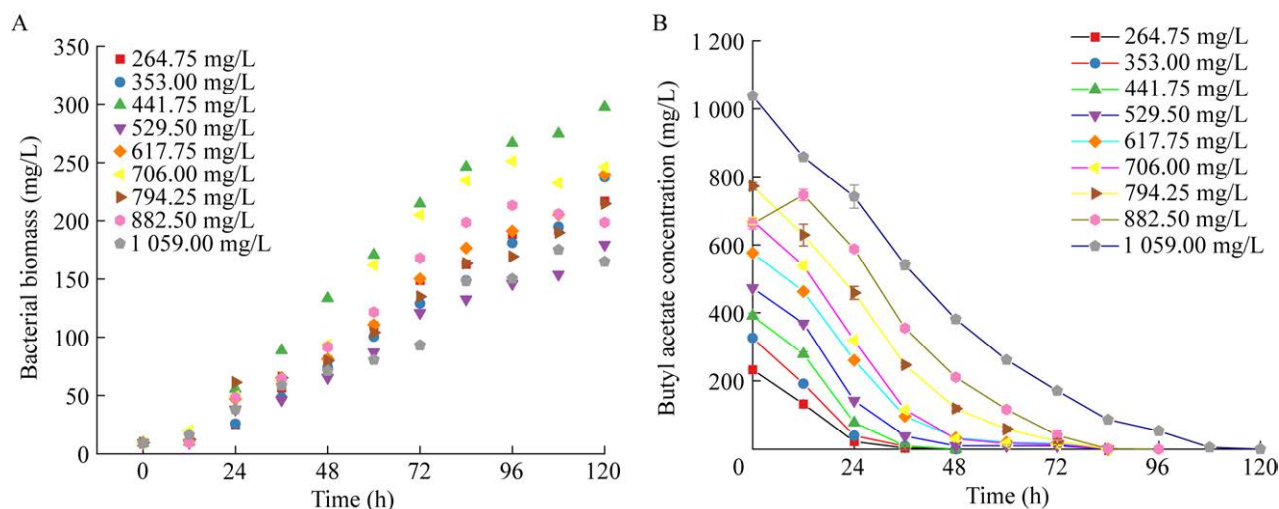


图 2 乙酸丁酯初始浓度对菌株 HY-1 生长(A)和降解(B)的影响

Figure 2 Effect of initial concentration of butyl acetate on the growth (A) and degradation (B) of strain HY-1.

表 1 菌株 HY-1 对乙酸丁酯生物降解反应一级动力学方程

乙酸丁酯初始浓度 Butyl acetate initial concentration (mg/L)	反应动力学方程 Reaction kinetic equations	反应速率常数 Reaction rate constant (h ⁻¹)	相关系数 Correlation coefficient (R ²)
264.75	$C_t=223.77e^{(-0.076\ 35t)}$	0.076 35	0.972 8
353.00	$C_t=327.53e^{(-0.064\ 12t)}$	0.064 12	0.958 6
441.75	$C_t=413.30e^{(-0.057\ 54t)}$	0.057 54	0.927 7
529.50	$C_t=494.45e^{(-0.047\ 05t)}$	0.047 05	0.935 8
617.75	$C_t=589.51e^{(-0.041\ 98t)}$	0.041 98	0.949 7
706.00	$C_t=724.04e^{(-0.041\ 53t)}$	0.041 53	0.948 8
794.25	$C_t=834.12e^{(-0.033\ 54t)}$	0.033 54	0.957 0
882.50	$C_t=949.75e^{(-0.029\ 23t)}$	0.029 23	0.947 5
1 059.00	$C_t=1\ 136.06e^{(-0.024\ 87t)}$	0.024 87	0.946 1

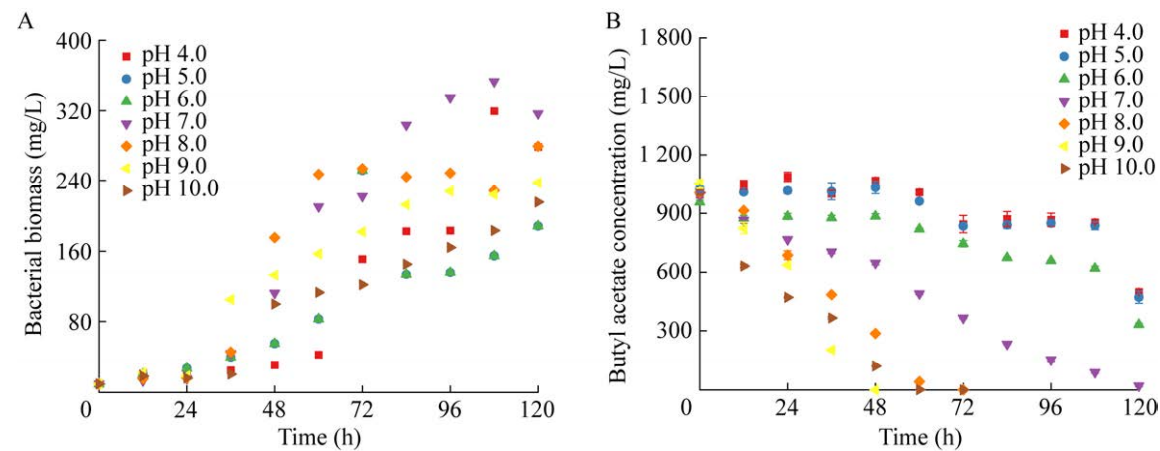


图 3 培养基初始 pH 对菌株 HY-1 生长情况(A)和降解乙酸丁酯(B)的影响
Figure 3 Effect of initial pH on the growth (A) and butyl acetate degradation (B) by strain HY-1.

测定了降解 120 h 后无机盐培养基的 pH，发现不同初始 pH 培养基的 pH 都出现了一定程度的降低，推测可能是菌株在降解乙酸丁酯的过程中产生了一定量的酸性中间产物。如图 3 所示，在不同初始 pH 下菌株生长情况良好，未出现某一初始 pH 下的明显抑制，在初始中性条件下 (pH 7.0) 菌株降解乙酸丁酯生成的细菌生物量最多。当 pH 7.0、乙酸丁酯初始浓度为 670 mg/L、菌株初始生物量为 9.45 mg/L 时，测定了乙酸丁酯及细菌生物量随时间变化情况(图 4)，菌株在

80 h 内能基本将 670 mg/L 乙酸丁酯降解完，同时细菌生物量增加到 235 mg/L。

2.3 分离菌株降解乙酸丁酯途径探究

2.3.1 降解产物分析

对降解后的气体进行 GC-MS 分析，发现仅在 6.69 min 处有 1 个峰，经匹配确定为正丁醇。已知乙酸丁酯是由乙酸与丁醇在催化剂作用下产生的^[14-16]，乙酸丁酯催化氧化的产物有低级酸和低碳醇^[6]，因此推测另一降解产物可能为乙酸，经离子色谱分析确定了其存在。

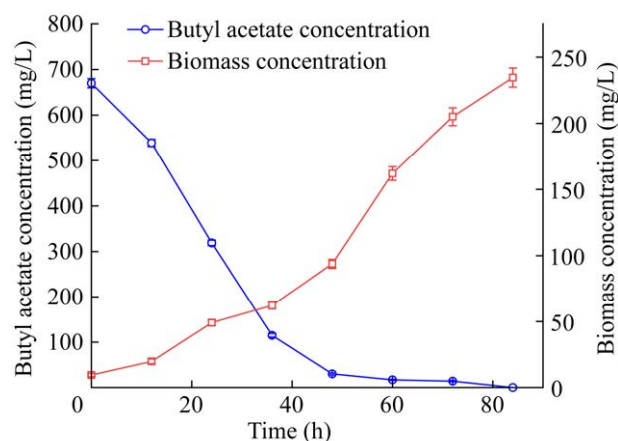


图4 乙酸丁酯浓度与菌株HY-1生物量随降解时间变化曲线

Figure 4 Time course for concentration of butyl acetate and biomass of strain HY-1 during the biodegradation of butyl acetate.

2.3.2 碳平衡计算分析

在176.5、529.5、882.5及1235.5 mg/L初始乙酸丁酯浓度下，乙酸丁酯与产物正丁醇、乙酸、CO₂及细菌生物量在120 h内的浓度变化如图5所示，4种浓度的乙酸丁酯在48 h内均能得到大部分降解。在1235.5 mg/L浓度下，0–24 h内降解速率较其余3个浓度低，推测其原因为低浓度对菌株生长的促进作用有限，而高浓度对菌株活性有一定的抑制作用^[17]，至24–48 h内菌株才开始大量繁殖快速降解污染物。正丁醇的浓度随着乙酸丁酯的降解逐渐增加，在176.5、529.5及882.5 mg/L浓度下，在24 h时，正丁醇的产量达到最大，随后逐渐下降，在176.5 mg/L和529.5 mg/L浓度下产生的正丁醇在120 h内逐渐降解为0，在882.5 mg/L浓度下产生的正丁醇仅有部分降解，在1235.5 mg/L浓度下72 h时正丁醇产量达到最大，随后有一小部分降低，但大部分还是以中间产物的身份残留。在0 h时检测到部分乙酸，且4个浓度下检出量大致相同，相较于不加菌液的空白培养液，推断其是乙酸丁酯小部分水解产生的，在

0–120 h内也有小部分乙酸生成，在176.5、529.5及882.5 mg/L浓度下产生的乙酸在最后都被降解完全，1235.5 mg/L浓度下产生的乙酸在120 h时还有小部分残留。CO₂与细菌生物量的曲线大致相似，随着乙酸丁酯的降解，CO₂及细菌生物量逐渐上升，在各浓度基本完成降解时达到最大，之后略有下降。

如表2所示，120 h内菌株HY-1对176.5、529.5、882.5及1235.5 mg/L浓度的乙酸丁酯均具有较高的降解效率，均可达96%以上。根据检出浓度计算各产物的含C量，其中细菌生物量的碳含量按文献平均值的46%^[18–23]来计算。经计算，4个浓度的碳平衡百分比均在92%以上，说明产物检测得比较完全，不足100%的部分可能是由于仪器分析误差导致。

3 讨论与结论

本研究从活性污泥中驯化筛选出一株能以乙酸丁酯为唯一碳源生长的降解菌HY-1，该菌株在120 h内对1059.00 mg/L乙酸丁酯的降解率可达100%，经16S rRNA基因序列分析和生理生化鉴定，被鉴定为莫德斯托斯不动杆菌(*Acinetobacter modestus*)。

对比已报道的降解乙酸丁酯菌株的性能，如*Acinetobacter pittii* CBA12在48 h内能降解完100 mg/L乙酸丁酯、*Shewanella putrefaciens*在70 h内能降解完500 mg/L乙酸丁酯^[10,12]。在已有的研究中，也有一些关于生物反应器净化含乙酸丁酯废气的研究，如采用纤维球作为填料的生物滴滤器对进气负荷<373.4 g/(m³·h)的乙酸丁酯废气去除率为90%，采用陶粒作为填料的生物滴滤器对乙酸丁酯的最大去除负荷为548.5 g/(m³·h)^[24–25]。本研究筛选的菌株对乙酸丁酯的降解性能和耐受浓度是截至目前报道的最大值，应用在生物反应器中可能会提升整体处理性能。

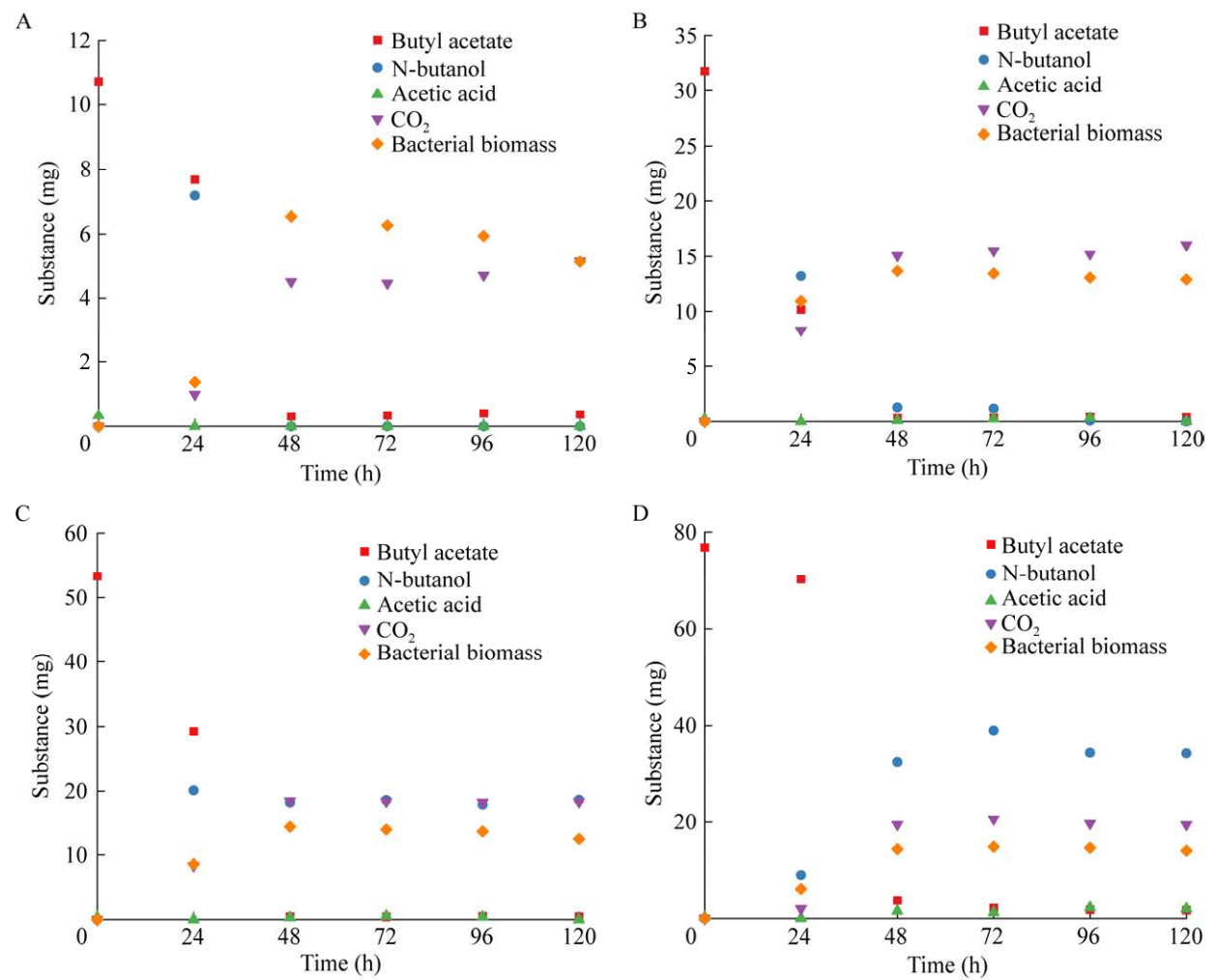


图 5 不同乙酸丁酯浓度下污染物与各产物浓度变化

Figure 5 Concentration changes of pollutants and products under different butyl acetate concentrations. A: 176.5 mg/L. B: 529.5 mg/L. C: 882.5 mg/L. D: 1 235.5 mg/L.

表 2 菌株 HY-1 120 h 生物降解乙酸丁酯的碳平衡

Table 2 Carbon balance of 120 h biodegradation of butyl acetate by strain HY-1

项目	乙酸丁酯浓度 Butyl acetate concentration (mg/L)			
Item	176.5	529.5	882.5	1 235.5
C-乙酸丁酯 C-butyl acetate (mg)	10.73	31.79	53.39	76.94
降解乙酸丁酯效率 Degradation efficiency of butyl acetate (%)	96.42	98.79	99.15	97.80
C-被降解的乙酸丁酯 C-Degraded butyl acetate (mg)	10.35	31.40	52.94	75.24
C-CO ₂ (mg)	5.15	16.06	18.35	19.42
C-生物量 C-biomass (mg)	5.13	12.88	12.48	14.00
正丁醇 N-butanol (mg)	0.00	0.00	18.64	34.18
乙酸 Acetic acid (mg)	0.00	0.00	0.00	1.96
C-产物/C-被降解的乙酸丁酯 C-Product/C-Degraded butyl acetate (%)	99	92	93	92

通过测定菌株 HYY-1 降解不同浓度乙酸丁酯的产物及细菌生物量发现,随着乙酸丁酯初始浓度的增大,产物中 CO_2 和细菌生物量的部分逐渐降低,正丁醇和乙酸的比例逐渐增大,其原因可能是菌株 HYY-1 无法完全降解高浓度的乙酸丁酯,中间产物的残留量增多,使得矿化率降低。计算乙酸丁酯被降解完全时,矿化为 CO_2 的比率和生物固碳率分别约为 50% 和 45%,说明了菌株 HYY-1 可完全降解 530 mg/L 乙酸丁酯,并可减少 45% 左右的有机碳转化为 CO_2 等无机碳。

已有的文献鲜见关于微生物降解乙酸丁酯途径的报道。本研究根据测得的降解产物及其浓度推测了其微生物降解途径,如图 6 所示。乙酸丁酯先转变为细菌生物量、中间产物正丁醇及乙酸(本研究检测到),随后这两种中间产物转变为 CO_2 。对于低浓度(<500 mg/L)的乙酸丁酯,中间产物可被完全矿化为 CO_2 ,但对于较高浓度(>500 mg/L)的乙酸丁酯,生成的中间产物中仅有 10% 左右的正丁醇被进一步分解为 CO_2 和 H_2O ,其余 90% 正丁醇积累在培养液当中。结合文献里关于乙酸丁酯及其微生物代谢产物相关降解酶的报道^[26-28],推测乙酸丁酯的微生物降解途径为:乙酸丁酯经酯键水解酶(酯

酶可作用于各种含有 $\text{R}_1\text{COO-R}_2$ 形式的底物)催化部分转化为正丁醇和乙酸;正丁醇继续被相应的氧化酶氧化为正丁醛和正丁酸,正丁酸通过脱羧后被转化为乙酸;乙酸能在乙酰辅酶 A 合成酶的作用下转变为乙酰辅酶 A 后进入 TCA 循环,通过 TCA 循环最终被转化为 CO_2 和细胞生物物质。该降解途径的探究为深入研究微生物降解乙酸丁酯的机理及涉及的降解酶研究提供理论基础。

综上所述,本研究筛选的菌株 HYY-1 为污染环境中乙酸丁酯的生物净化提供了优良菌种,具有高效降解乙酸丁酯的能力。分子生物学鉴定该菌株系莫德斯托斯不动杆菌 (*Acinetobacter modestus*)。该菌株对浓度为 264.75–1 059.00 mg/L 的乙酸丁酯具有较好的降解效果,同时对乙酸丁酯的耐受浓度较高。pH 对菌株 HYY-1 降解乙酸丁酯的降解率影响较大,最适 pH 值为 9.0,在碱性条件下对乙酸丁酯的降解效果较好。结合降解产物检测与相关文献报道,推测了菌株 HYY-1 对乙酸丁酯的降解途径:乙酸丁酯在菌株 HYY-1 降解下,先转变为细菌生物量、中间产物正丁醇及乙酸,接着这两种中间产物在菌株的作用下进入三羧酸循环转变为 CO_2 和细菌生物量。

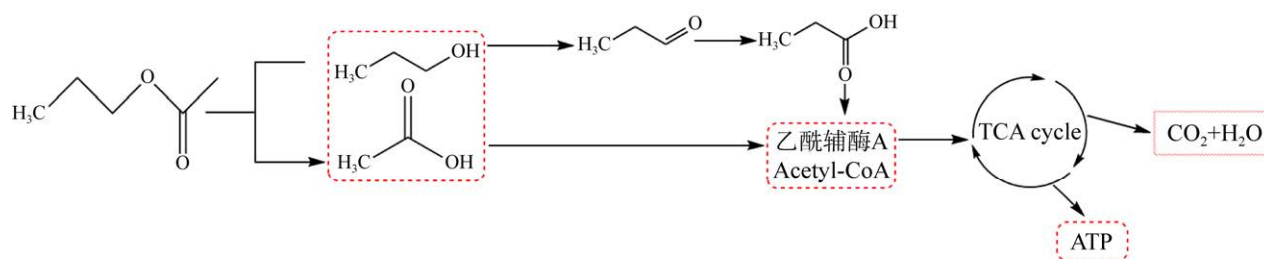


图 6 菌株 HYY-1 降解乙酸丁酯途径示意图

Figure 6 Schematic diagram of the degradation pathway of butyl acetate by strain HYY-1.

REFERENCES

- [1] 王洁, 袁东超, 邓妍, 武莉娅, 卢娇玲, 杨宗政. 乙酸丁酯废气治理工艺研究[J]. 应用化工, 2019, 48(4): 830-833.
WANG J, YUAN DC, DENG Y, WU LY, LU JL, YANG ZZ. Study on treatment process of butyl acetate waste gas[J]. Applied Chemical Industry, 2019, 48(4): 830-833 (in Chinese).
- [2] 于欣扬, 沈欣军, 李家仁, 齐蕴博, 李艳平. 低温等离子体耦合催化降解乙酸丁酯[J]. 环境保护与循环经济, 2020, 40(8): 11-14.
YU XY, SHEN XJ, LI JR, QI YB, LI YP. Catalytic degradation of butyl acetate by low temperature plasma coupling[J]. Environmental Protection and Circular Economy, 2020, 40(8): 11-14 (in Chinese).
- [3] 孙英, 刘二东. 气相色谱法测定环境空气中乙酸丁酯的方法探讨[J]. 环境与发展, 2015, 27(5): 89-90.
SUN Y, LIU ED. Study on the determination of butyl acetate in the air by gas chromatography[J]. Environment and Development, 2015, 27(5): 89-90 (in Chinese).
- [4] 李慧, 陈哲, 钟缘, 丁军委. 乙酸丁酯废气在活性炭上的吸附和脱附行为研究[J]. 离子交换与吸附, 2020, 36(1): 31-40.
LI H, CHEN Z, ZHONG Y, DING JW. Study on the adsorption and desorption behavior of butyl acetate vapor on activated carbon[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2020, 36(1): 31-40 (in Chinese).
- [5] 袁东超, 王洁, 于美玲, 杨迪, 董艳玲, 武莉娅, 李爽, 杨宗政. 复配表面活性剂水溶液吸收法处理乙酸丁酯废气[J]. 应用化工, 2019, 48(9): 2141-2144.
YUAN DC, WANG J, YU ML, YANG D, DONG YL, WU LY, LI S, YANG ZZ. Absorption treatment of butyl acetate waste gas by compound aqueous surfactant solution[J]. Applied Chemical Industry, 2019, 48(9): 2141-2144 (in Chinese).
- [6] 王军伟, 李济吾, 蔡伟建. 介孔 ZnO 负载 Fe-Cu-Zr 复合催化剂用于催化燃烧降解乙酸丁酯[J]. 环境科学学报, 2020, 40(5): 1640-1649.
WANG JW, LI JW, CAI WJ. Ordered spherical mesoporous composite catalyst of ZnO-based Fe-Cu-Zr oxide preparation and mechanism of its degradation of butyl acetate[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020, 40(5): 1640-1649 (in Chinese).
- [7] ZHAO YJ, CHEN Q, HOU HQ, HE J. Photolysis of gaseous butyl acetate using built-in microwave discharge electrodeless lamps[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 430-435.
- [8] 朱勤勤, 顾执奇, 郭涛, 成卓韦, 陈建孟. “真菌-细菌”复合菌剂的构建及其降解 α -蒎烯、乙酸丁酯和邻二甲苯混合废气的性能研究[J]. 环境科学学报, 2017, 37(7): 2498-2505.
ZHU QQ, GU ZQ, GUO T, CHENG ZW, CHEN JM. Construction of “fungal-bacterial” complex agent and its degradation of α -pinene, butyl acetate and o-xylene mixed exhaust gas[J]. Journal of Environmental Science, 2017, 37(7): 2498-2505 (in Chinese).
- [9] QI B, MOE W, KINNEY K. Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(5): 684-689.
- [10] 李理, 陈才, 金泽坤, 王友本. 生物滴滤池的微生物多样性分析及 VOC 降解菌的筛选[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2021, 49(11): 57-68.
LI L, CHEN C, JIN ZK, WANG YB. Microbial diversity analysis of biotrickling filter and screening of VOC degrading bacteria[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2021, 49(11): 57-68 (in Chinese).
- [11] 汪群慧, 田书磊, 谢维民, 张兰河. 生物滴滤塔处理药厂含醋酸丁酯、正丁醇和苯乙酸的挥发性混合废气[J]. 环境科学, 2005, 26(2): 55-59.
WANG QH, TIAN SL, XIE WM, ZHANG LH. The biological drip filter tower treats volatile mixed waste gases containing butyl acetate, n-butanol and phenylacetic acid[J]. Environmental Science, 2005, 26(2): 55-59 (in Chinese).
- [12] MATHUR A, MAJUMDER C. Isolation and characterization of potent strains for metabolizing paint VOCs from an active trickle-bed air biofilter[J]. Chemical Engineering & Technology, 2008, 31(3): 341-349.
- [13] 曾洁仪, 曾苏杭, 纪梦钿, 檀笑, 韩伟江, 陈烁娜. *Sakaguchia cladiensis* 对磺胺甲噁唑/铜复合污染中抗生素的降解[J]. 中国环境科学, 2019, 39(12): 5293-5300.
ZENG JY, ZENG SH, JI MT, TAN X, HAN WJ, CHEN SN. Biodegradation of sulfamethazine in sulfamethazine/copper combined pollution by *Sakaguchia cladiensis*[J]. China Environmental Science, 2019, 39(12): 5293-5300 (in Chinese).
- [14] 李柏春, 张昌伟, 段贵贤. 催化精馏合成乙酸丁酯工业实验[J]. 化工进展, 2010, 29(9): 1785-1789.
LI BC, ZHANG CW, DUAN GX. An industrial experiment for n-butyl acetate synthesis by catalytic distillation[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2010, 29(9): 1785-1789 (in Chinese).
- [15] 伍小明. 我国乙酸丁酯合成技术研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2018, 26(8): 50-52.
WU XM. Production technology research progress of

- butyl acetate in China[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2018, 26(8): 50-52 (in Chinese).
- [16] 左卫元, 史兵方, 欧阳辉祥, 全海娟, 廖安平. 活性炭负载硫酸氢钠催化合成乙酸丁酯动力学[J]. 当代化工, 2017, 46(10): 1970-1973.
- ZUO WY, SHI BF, OUYANG HX, TONG HJ, LIAO AP. Kinetics of synthesizing butyl acetate over activated carbon supported sodium bicarbonate catalyst[J]. Contemporary Chemical Industry, 2017, 46(10): 1970-1973 (in Chinese).
- [17] 蔡慧, 郑家传, 史广宇, 徐嘉玥, 何理, 施维林. 一株多氯联苯降解菌的筛选鉴定及降解性能研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(4): 1219-1225.
- CAI H, ZHENG JC, SHI GY, XU JY, HE L, SHI WL. Isolation, identification and characterization of a PCB77-degrading strain[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(4): 1219-1225 (in Chinese).
- [18] ZHANG LL, ZHANG C, CHENG ZW, YAO YL, CHEN JM. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4[J]. Chemosphere, 2013, 90(4): 1340-1347.
- [19] de RINK R, KLOK JBM, van HEERINGEN GJ, SOROKIN DY, TER HEIJNE A, ZEIJLMARKER R, MOS YM, de WILDE V, KEESMAN KJ, BUISMAN CJN. Increasing the selectivity for sulfur formation in biological gas desulfurization[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(8): 4519-4527.
- [20] MÜLLER RH, ROHWERDER T, HARMS H. Carbon conversion efficiency and limits of productive bacterial degradation of methyl tert-butyl ether and related compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(6): 1783-1791.
- [21] HE JJ, CHEN Y, DAI LY, YAO JC, MEI Y, HRYNSPHAN D, TATSIANA S, CHEN J. Rapid and complete biodegradation of acrylic acid by a novel strain *Rhodococcus ruber* JJ-3: kinetics, carbon balance, and degradation pathways[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020, 25(4): 589-598.
- [22] WHITE AE, GIOVANNONI SJ, ZHAO YL, VERGIN K, CARLSON CA. Elemental content and stoichiometry of SAR11 chemoheterotrophic marine bacteria[J]. Limnology and Oceanography Letters, 2019, 4(2): 44-51.
- [23] BESTE DJV, PETERS J, HOOPER T, AVIGNONE-ROSSA C, BUSHELL ME, McFADDEN J. Compiling a molecular inventory for *Mycobacterium bovis* BCG at two growth rates: evidence for growth rate-mediated regulation of ribosome biosynthesis and lipid metabolism[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(5): 1677-1684.
- [24] WANG QH, ZHANG LH, TIAN SL, SUN PTC, XIE WM. A pilot-study on treatment of a waste gas containing butyl acetate, *n*-butyl alcohol and phenylacetic acid from pharmaceutical factory by bio-trickling filter[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 37(1): 42-48.
- [25] ZHANG Y, LIU J, DENG W, QIN YW, XING Y, LI J. Research on pressure drop solution and pilot-scale application of bio-trickling filter for the treatment of butan-2-yl ethanoate[J]. Process Biochemistry, 2019, 79: 118-126.
- [26] 王嘉翼. 邻苯二甲酸二丁酯降解菌的分离及降解机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2019.
- WANG JY. Isolation and degradation mechanism of dibutyl phthalate-degrading bacteria[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese).
- [27] KU JT, CHEN AY, LAN EI. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for efficient biosynthesis of butyl acetate[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 28.
- [28] JAWED K, ABDELAAL AS, KOFFAS MAG, YAZDANI SS. Improved butanol production using FASII pathway in *E. coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(9): 2390-2398.