

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20191028002

杨婧, 陈晓倩, 殷浩文, 等. 化学品固有生物降解性试验 OECD 标准方法的适用性检验与改进[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(3): 210-217

Yang J, Chen X Q, Yin H W, et al. Applicability check and modification on OECD standard method for inherent biodegradation test of chemicals [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(3): 210-217 (in Chinese)

## 化学品固有生物降解性试验 OECD 标准方法的适用性检验与改进

杨婧, 陈晓倩, 殷浩文\*, 张瑛, 杨希晨, 刘亚楠, 赵伟刚

上海市检测中心, 上海 201202

收稿日期: 2019-10-28 录用日期: 2019-12-04

**摘要:** 在经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)颁布的 3 项固有生物降解标准测试方法中,改进的 MITI(II)(OECD 302C)方法因适用于难溶、易吸附和弱挥发等物质的固有生物降解性评估,成为目前适用范围较为广的方法。但 OECD 302C 对接种物规定特殊,需周期性采集不少于 10 个位点、不同类型的接种物进行驯养,采集、驯养和维持成本及操作复杂程度相对高,而 OECD 302C 方法获取的化学品生物降解率并未优于其他 2 项固有生物降解方法。因此,对 10 位点采集并驯养不同时间的接种物及污水处理厂曝气池采集的活性污泥进行微生物学特征比较,采用 Biolog 微生物鉴定系统及磷脂脂肪酸分析系统研究 2 种不同接种物的代谢活性及群落多样性,同时比较 2 种接种物对 6 种化学品的固有生物降解能力。结果表明,驯养接种物在驯养 14 d 后,活性与多样性开始下降,与真实环境来源接种物(10 位点采集且未驯养接种物,即驯养 0 d 的接种物)的微生物群落差别较大。驯养 1 个月后的接种物在碳源利用活性、降解能力上与污水处理厂曝气池新鲜采集的活性污泥无明显差异。故笔者认为,在试验条件下,OECD 302C 标准方法中的驯养接种物未达到预期目的,未经驯养的活性污泥更能反映真实环境,未来可以活性污泥作为该方法的接种物进行后续降解方法改进的研究。

**关键词:** 生物降解;驯养接种物;活性污泥;群落特征

文章编号: 1673-5897(2020)3-210-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Applicability Check and Modification on OECD Standard Method for Inherent Biodegradation Test of Chemicals

Yang Jing, Chen Xiaoqian, Yin Haowen\*, Zhang Ying, Yang Xichen, Liu Yanan, Zhao Weigang

Shanghai Academy of Public Measurement, Shanghai 201202, China

Received 28 October 2019 accepted 4 December 2019

**Abstract:** There are three standard methods published by Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) for evaluating inherent biodegradability. As one of them, modified MITI (II) test (OECD 302C) is widely used due to its applicability to insoluble, adsorptive or weak volatile substances. However, OECD 302C has its special requirements on inoculum, e.g. different types of inoculum from at least 10 sites should be collected periodically, then be domesticated in laboratory conditions for 1 to 3 months. The cost on collection, domestication and maintain is relatively high and the operation is relatively complicated. In addition, the capability of biodegradation

基金项目: 国家计量技术法规项目“生物降解试验中接种物活性定量测量方法”

第一作者: 杨婧(1982—), 女, 高级工程师, 研究方向为生态毒理学, E-mail: yangji@sapm-bsal.com

\* 通讯作者( Corresponding author), E-mail: yinhaowen@126.com

by using OECD 302C method is not superior to other two inherent biodegradation test methods. Therefore, a comparative study on microbial characteristics of 10 sites collected inoculum with different domestication period and activated sludge collected from aeration tank of sewage treatment were performed in this study. The metabolic activity and microbial diversity of the above two different inoculum, as well as their inherent biodegradability of 6 chemicals, were all investigated. The results indicated that the activity and diversity of inoculum domesticated for more than 14 days decreased with time and are quite different from the microbial community of real environment (i.e. 10 sites collected inoculum without domestication, inoculum domesticated for 0 day). The inoculum domesticated with 1 month showed no significant difference on utilization of carbon sources and capability of biodegradation compared with activated sludge. Hence, it is concluded that the domesticated inoculum of OECD 302C do not achieve the desired purpose, and activated sludge without domestication is more reflective of real environment and will be used in future studies for method improvement.

**Keywords:** biodegradation; domesticated inoculum; activated sludge; community characteristics

生物降解性评估是化学品环境行为研究的重要环节之一。实验室条件下的评估主要有快速生物降解(ready biodegradation)、固有生物降解(inherent biodegradation)及模拟生物降解(simulation biodegradation)等3个不同层级。通常在化学品快速生物降解为阴性结果时,进一步的研究评估可直接开展模拟生物降解性研究,也可通过固有生物降解试验进行降解潜能的补充研究。尽管模拟生物降解占据最高评估层级,被认为可为化学品尤其新化学物质降解性评估提供更可靠、准确的基础,但受有效暴露场景选择、低暴露浓度研究及分析条件、试验周期和成本等诸多因素限制,目前多见于科研层面,化学品管理层面的应用相对较少。我国《新化学物质申报登记指南》<sup>[1]</sup>提出对于不具快速生物降解性的化学品还应提交固有生物降解数据,尚无提交模拟生物降解数据的明确要求。因此,固有生物降解性评估仍是现阶段获知化学品生物降解潜能的实用方法。此外,在高层级化学品风险评估中,固有生物降解数据亦是修改默认降解半衰期参数的依据。

经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)用于评估固有生物降解性的标准方法主要有改进的半连续活性污泥(SCAS)试验(OECD 302A)<sup>[2]</sup>、赞恩-惠伦斯试验(OECD 302B)<sup>[3]</sup>及改进的 MITI II 试验(OECD 302C)<sup>[4]</sup>等3项。其中,OECD 302C方法因可适用于难溶、吸附及弱挥发的化学品生物降解性评估,较前2项仅适合具一定水溶性的非挥发化学品测试的方法而言,OECD 302C方法具更广泛的适用性。然而,OECD 302C方法对接种物要求较为严苛,方法规定:(1)需定期采集一个城市涵盖受试化学品可能

暴露(使用和处置)场景内不少于10个位点的接种物;(2)通过配制大量人工污水的方式对多位点混合接种物进行至少1个月的驯养;(3)驯养3个月后可重新补充多位点采集的接种物。接种物采集、驯养和维持成本高于其他生物降解试验且操作复杂程度相对高。已有文献提示,人工污水驯养后的接种物部分碳源利用能力有所下降<sup>[5]</sup>,这可能是导致OECD 302C试验降解能力弱于其他固有生物降解试验<sup>[6]</sup>的原因之一。另有研究表明,在结果受接种物影响较大的快速生物降解试验中,MITI方法下驯养的接种物生物降解能力相对弱于其他采用活性污泥作为接种物的试验<sup>[7]</sup>,但上述结论是据不同降解方法获取的降解及不降解结果的分布比例推断而来,具一定局限性。尽管已有较多关于接种物对降解试验影响的研究<sup>[8-11]</sup>以及MITI培养条件下接种物群落结构变化的研究,但均未直接采用多位点采集的接种物进行研究。10位点采集并按照OECD 302C方法驯养后的接种物在群落结构及功能上的变化及其对生物降解性产生的影响,尚无直接且相对明确的研究。

本研究通过Biolog微孔板及磷脂脂肪酸(PL-FA)分析对多位点采集驯养前及驯养不同时间的接种物微生物群落变化情况进行研究,并与污水处理厂曝气池采集的单一来源活性污泥样本群落特征进行比较,从群落特征变化角度对多来源的2类接种物进行分析;同时,选择了6种降解能力各异的化学品,比较驯养污泥与活性污泥对上述化学品的降解延滞期和最终降解率等参数,研究接种物对固有生物降解结果的影响。通过上述研究,探讨多来源采集接种物的合理性与必要性以及OECD 302C方法可能的改进。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 接种物来源

活性污泥采自上海污水处理厂(杨浦、嘉定区的生活污水处理污泥及宝山、奉贤区的工业污水处理污泥)曝气池;驯养接种物为涵盖3种不同生态类型环境水体(淀山湖、川杨河及苏州河、长江口)的水样、2种类型活性污泥(同上述活性污泥来源)以及3种土样(农用地、湿地土及园林土),混和后参照 OECD 302C<sup>[4]</sup>方法驯养后使用。

### 1.2 主要仪器及试剂

微生物鉴定仪 (MicroStation, Biolog 公司, 美国), 安捷伦气相色谱 (Agilent 6890N, 安捷伦公司, 美国), BOD 分析仪 (Oxiotop, WTW 公司, 德国), 恒温培养箱 (MI-250A, STIK 公司, 中国)。

GN (Gram-negative, 革兰氏阴性)/GP (Gram-positive, 革兰氏阳性) 微孔板 (Biolog 公司) (用于革兰氏阴/阳性好氧菌分析), ATP 标准试剂及微生物细胞活性检测试剂盒 (Promega 公司), 脂肪酸标样 (上海恒奇生物有限公司)。

脂肪酸抽提试剂 (见 1.3.2) 及固有生物降解实验用化学品 (见 1.3.3) 均为分析纯, 分别购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司和上海万宏生物科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 Biolog 微生物群落分析

选取采集自污水处理厂及工业污水处理厂的2个批次的污泥样本各1份, 2个批次的驯养接种物分别取驯养0 d (即多位点采集接种物混合当天)、7 d、14 d 及1个月的接种物各1份, 以灭菌的0.85% (m/V) NaCl 溶液离心清洗上述污泥样本2次 (4 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C, 10 min) 后, 用0.85% (m/V) 的NaCl 溶液搅拌后, 重悬接种物至相同细菌细胞数 (即活菌数约 10<sup>10</sup> 个·L<sup>-1</sup>), 采用 ATP 法进行活菌计数<sup>[2]</sup>。2号滤纸过滤后, 滤液分别接种至 Biolog GN2 及 GP2 微孔板, 每孔 150 μL 菌液, 每个样本设置2个重复。置于恒温培养箱中 (25±1) °C 培养 48 h 后, 在 590 nm 处读数并记录每孔的光吸收值。

#### 1.3.2 磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析

取 1.3.1 中污泥及接种物样本进行 PLFA 抽提, 提取方法如下。(1) 提取与分离: 污泥离心 (4 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C, 20 min) 后, 取约 0.5 g 置于 20 mL 离心管中, 根据《SHERLOCK 微生物鉴定系统操作手册》上所述方法进行抽提, 分别采用试剂 1 ( $m_{\text{NaOH}}$  :

$V_{\text{甲醇}}:V_{\text{蒸馏水}}=45\text{ g}:150\text{ mL}:150\text{ mL}$ ) 进行皂化、试剂 2 ( $V_{\text{HCl}}:V_{\text{甲醇}}=325\text{ mL}:275\text{ mL}$ ) 进行甲基化、试剂 3 ( $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{甲基叔丁醚}}=200\text{ mL}:200\text{ mL}$ ) 萃取及试剂 4 (质量分数 2% 的 NaOH 溶液) 洗涤后, 取顶部 2/3 溶液加入气相色谱进样品瓶中, 压盖待分析。通过微生物鉴定系统 (Microbial Identification System, MIDI), 采用带有 MIDI 峰识别软件的 Agilent N6850 气相色谱进行 PLFA 分析, 系统根据各组分保留时间与标样保留时间的比较自动识别目标组分。

#### 1.3.3 固有生物降解试验

采用驯养 1 个月的驯养接种物与生活污水处理厂采集的污泥进行苯甲酸钠、二甘醇、3,5-二叔丁基-4-羟基苯丙酸异辛酯 (简称为 AO-1135)、1,4-双(氨基甲基)环己烷 (简称为 BAMCH)、N-[4-(磺酰胺)苯基] 甲基丙烯酰胺 (简称为 ASPMAA) 和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮-5-磺酸 (简称为 BP-4) 等 6 种化学品的固有生物降解试验, 试验参照 OECD 302C 方法<sup>[4]</sup> 进行, 培养温度为 (25±1) °C, 试验周期为 28 d。固有生物降解曲线采用 GraphPad Prism 5 软件进行拟合。

### 1.4 数据处理方法

#### 1.4.1 Biolog 结果数据处理

##### (1) 碳源利用活性

采用微平板平均每孔颜色变化率 (average well color development, AWCD) 作为反映接种物微生物利用单一碳源的能力。GN 及 GP 板计算公式为:

$$AWCD = [\sum (C_i - R)] / 95 \quad (1)$$

式中:  $C_i$  为反应孔所测得的光吸收值,  $R$  为对照孔 A1 的光吸收值。

##### (2) 多样性指数

采用 Shannon-Wiener 指数 ( $H'$ ) 反映物种丰富程度, 计算公式为:

$$H' = -\sum (P_i \times \ln P_i) \quad (2)$$

式中:  $P_i$  为第  $i$  孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率; 以 Shannon 均匀度 ( $E$ ) 衡量群落及种间个体分布均一程度, 计算公式为:

$$E = H' / \ln S \quad (3)$$

式中:  $S$  为颜色变化孔的数目。

#### 1.4.2 PLFA 分析结果数据处理

采用峰面积归一化法计算各组分相对含量。采用 Origin 2018 软件对活性污泥及驯养接种物样本各组分含量特征进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)。

### 1.4.3 驯养污泥与活性污泥的固有生物降解

生物降解数据的处理方式参照 OECD 302C 方法<sup>[4]</sup>进行。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 Biolog 微生物群落分析

1.3.1 中所述驯养 0 d(即混合当天)、7 d、14 d 及 1 个月的接种物与工业及生活污水处理厂采集的活性污泥样本在 Biolog GN2 及 GP2 这 2 种微孔板中的 AWCD、Shannon-Wiener 指数及 Shannon 均匀度如表 1 所示。从反映微生物碳源整体利用能力及代谢活性的 AWCD 值来看,GN 板(革兰氏阴性菌分析用)经 48 h 培养后,驯养 0 d(即混合当天的接种物)及 7 d 的接种物 AWCD 分别为  $0.596 \pm 0.0988$  及  $0.859 \pm 0.390$ ,均高于生活污水处理厂与工业污水处理厂采集的污泥的 AWCD 值,其值分别为  $0.144 \pm 0.0377$  及  $0.227 \pm 0.0834$ ,驯养 7 d 的接种物比驯养 0 d 的接种物碳源利用活性增强;但随驯养时间的增加,驯养接种物碳源利用活性反而出现下降,驯养 14 d 及 1 个月的 AWCD 值分别降低为  $0.254 \pm 0.0377$  及  $0.244 \pm 0.0259$ 。*t*-test 双侧检验结果显示,驯养 0 d 及 7 d 的接种物碳源利用活性明显高于其

他组别接种物(*P* 值为  $0.0230 \sim 0.0447$ ,  $P < 0.05$ ),但二者之间无碳源利用活性上的明显差异( $P = 0.453$ ,  $P > 0.05$ );驯养 14 d 及 1 个月的接种物与生活污水处理厂与工业污水处理厂采集的活性污泥碳源利用活性无显著性差异(*P* 值为  $0.0991 \sim 0.718$ ,  $P > 0.05$ )。此外,反映微生物多样性程度及各类微生物分布数量的微生物群落多样性(*H'*)及均匀度指数(*E*)也在驯养 7 d 时达到最高值,驯养 14 d 及 1 个月的接种物的微生物群落的 *H'* 及 *E* 值低于驯养 0 d、7 d 的接种物、污水处理厂采集的活性污泥。

GP 板(革兰氏阳性菌分析用)的 AWCD 值变化表明,驯养接种物的碳源利用活性亦在驯养 7 d 时达到最高值,驯养 14 d 及 1 个月后活性随驯养时间增加而下降。与 GN 板略不同的是,驯养 14 d 的接种物活性仅略低于驯养 0 d 及 7 d 的接种物,而驯养 1 个月的接种物碳源利用能力下降,明显低于驯养 7 d 的接种物( $P = 0.0379$ ,  $P < 0.05$ )。驯养 1 个月的接种物与污水处理厂采集的活性污泥在代谢活性上没有明显差异(*P* 值为  $0.792 \sim 0.916$ ,  $P > 0.05$ )。驯养 7 d 的接种物 *H'* 及 *E* 值最高,驯养 1 个月后的接种物反而出现下降,*H'* 及 *E* 值低于其他组别的驯养接种物,也低于污水处理厂采集的活性污泥。

表 1 不同接种物中微生物的碳源利用活性及群落多样性指数比较

Table 1 Comparison of microbial utilization of carbon sources and community diversity index in different inoculum

Biolog 板类型 Type of Biolog microplate	样品 Sample	平均每孔颜色变化率(AWCD) Average well color development (AWCD)	Shannon-Wiener 指数( <i>H'</i> ) Shannon-Wiener Index ( <i>H'</i> )	Shannon 均匀度( <i>E</i> ) Shannon Evenness( <i>E</i> )
GN	XY-0d	$0.596 \pm 0.0988$	$3.18 \pm 0.292$	$0.726 \pm 0.104$
	XY-7d	$0.859 \pm 0.390$	$3.76 \pm 0.0515$	$0.859 \pm 0.0829$
	XY-14d	$0.254 \pm 0.0377$	$1.91 \pm 0.228$	$0.485 \pm 0.0595$
	XY-1m	$0.244 \pm 0.0259$	$2.48 \pm 0.0256$	$0.604 \pm 0.00797$
	SL-1	$0.144 \pm 0.0377$	$3.03 \pm 0.00905$	$0.820 \pm 0.0247$
	SL-2	$0.227 \pm 0.0834$	$3.13 \pm 0.0688$	$0.827 \pm 0.0132$
GP	XY-0d	$0.202 \pm 0.0481$	$2.33 \pm 0.192$	$0.615 \pm 0.0560$
	XY-7d	$0.397 \pm 0.0424$	$3.41 \pm 0.334$	$0.777 \pm 0.0544$
	XY-14d	$0.348 \pm 0.0780$	$1.95 \pm 0.117$	$0.482 \pm 0.0259$
	XY-1m	$0.0689 \pm 0.0140$	$1.15 \pm 0.0890$	$0.345 \pm 0.0394$
	SL-1	$0.0652 \pm 0.0101$	$1.99 \pm 0.347$	$0.636 \pm 0.123$
	SL-2	$0.0715 \pm 0.0276$	$1.83 \pm 0.179$	$0.561 \pm 0.0268$

注:XY 为驯养接种物,标号中的 0d、7d、14d 及 1m 分别表示多位点接种物混和后驯养 0 d、7 d、14 d 及 1 个月;SL 为活性污泥,标号 1 和 2 分别代表生活污水处理污泥和工业污水处理污泥。

Note: XY is the domesticated inoculum, and 0d, 7d, 14d and 1m are the mixed inoculum collected from different places and domesticated for 0 d, 7 d, 14 d and 1 month respectively; SL is activated sludge, and 1 and 2 is the sludge collected from domestic sewage treatment plant and industrial sewage treatment plant, respectively.

## 2.2 PLFA 分析

PLFA 组成差异一定程度反映不同接种物中活体微生物的不同类群生物量及总体生物量的差异。不同接种物(见 1.3.1 所述)PLFA 组成主成分分析结果如图 1 所示。PC1 和 PC2 分别代表了 52.7% 和 10.4% 的差异,结果大致分布于 3 个区域。其中,驯养 0 d 与驯养 7 d 的驯养接种物分别分布在 2 个不同区域中,表明这 2 种接种物之间在 PLFA 组成上均存在较大差异;另一个区域中,分布有驯养 14 d、1 个月的驯养污泥以及生活及工业污水处理厂采集的活性污泥等不同类型的接种物,表明从 PLFA 组成来看,这几种接种物间的区分度略低,但其组成与驯养 0 d 及 7 d 的驯养接种物存在一定差异,尤其与驯养 7 d 的驯养接种物微生物组成上差异较大。

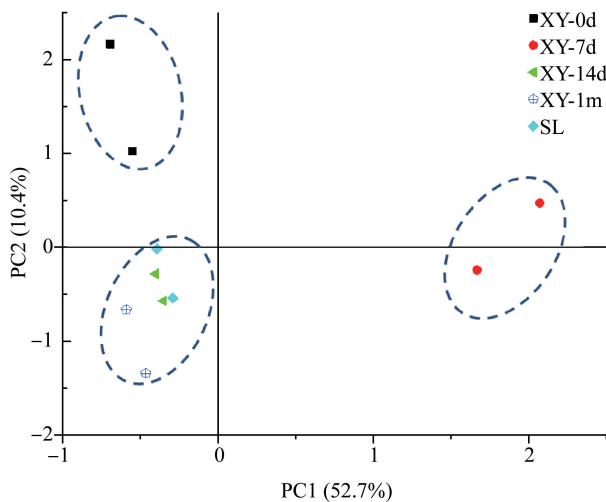


图 1 不同接种物磷脂脂肪酸 (PLFA) 组成主成分分析

注:XY 为驯养接种物,标号中的 0d、7d、14d 及 1m 分别表示多点接种物混和后驯养 0 d、7 d、14 d 及 1 个月;SL 为活性污泥(采集自生活污水处理污泥和工业污水处理污泥)。

Fig. 1 PCA analysis on phospholipid fatty acid (PLFA) composition of different inoculum

Note: XY is the domesticated inoculum, and 0d, 7d, 14d and 1m are the mixed inoculum collected from different places and domesticated for 0 d, 7 d, 14 d and 1 month respectively; SL is activated sludge (collected from domestic sewage treatment plant and industrial sewage treatment plant).

## 2.3 驯养污泥与活性污泥的固有生物降解试验

按 OECD 302C 标准实验方法,分别采用驯养 1 个月的驯养污泥与生活污水处理厂曝气池采集的活性污泥对 6 种降解能力各异的物质开展固有生物降解试验,各平行组之间的降解率差异 <20%,故采用平均生物降解率绘制固有生物降解曲线(图 2)。固

有生物降解结果表明,2 种接种物对于 6 种化学品的生物降解能力处于相近水平:对可固有生物降解的化学品苯甲酸钠及二甘醇的生物降解率为 81%~85%,均超过固有生物降解的判定水平(降解率达 70%)。2 种接种物对化学品 ASPMAA、BP-4 的固有生物降解率分别为 29%~31%及 20%~28%,具初步固有生物降解迹象;对化学品 AO-1135 和 BAMCH 的生物降解率分别为 12%~14%及 5%,未表现出固有生物降解能力。

进一步采用 GraphPad Prism 5 软件非线性拟合 2 种接种物对 6 种化学品的降解曲线,拟合度( $R^2$ )在 0.83~0.99 之间,驯养污泥对苯甲酸钠、二甘醇、AO-1135、BAMCH、ASPMAA 和 BP-4 等 6 种化学品的降解延滞期分别为 0.42、2.2、13、>28、7.2 和 5.4 d;活性污泥对上述 6 种化学品的降解延滞期分别为 0.51、1.7、13、>28、9.1 和 11 d,活性污泥对 6 种化学品的降解延滞期普遍长于驯养接种物。

而从曲线拟合获取的最终降解率与试验获得的实测值计算而来的 28 d 降解率(图 2)相近,曲线拟合后,驯养接种物对上述 6 种化学品的最终降解率分别为 78%、82%、14%、4.9%、32% 和 28%;活性污泥对 6 种化学品的最终降解率分别为 84%、84%、17%、5.4%、34% 和 30%。活性污泥对 6 种化学品的最终降解率略高于驯养 1 个月的接种物。

## 3 讨论 (Discussion)

Biolog 分析反映群落代谢活性,可评估微生物群落功能的多样性。接种物浓度对 Biolog 分析结果影响较大<sup>[13]</sup>,因此,为保证结果的准确性与可比性,本研究在进行 Biolog 微孔板接种前,将各接种物的活菌细胞数统一调节至相近水平(即活菌数约  $10^{10}$  个·L<sup>-1</sup>)。10 个位点采集接种物在未驯养时(多点采集混合初期,即驯养 0 d)及驯养 7 d 时碳源利用活性均高于污水处理厂曝气池采集的活性污泥,驯养 0~7 d,驯养接种物代谢活性增强,驯养 7 d 时,微平板平均每孔颜色变化率(AWCD)及 Shannon-Wiener 指数( $H'$ )及 Shannon 均匀度( $E$ )达到最高,表明驯养 7 d 后接种物的代谢活性、微生物种类及数量都达到最佳状态,而驯养 14 d 后接种物代谢活性则反而出现下降,尤其驯养 1 个月后的接种物,活性下降尤为明显,与污水处理厂采集的污泥无明显差异。驯养 14 d 尤其 1 个月的驯养接种物其微生物多样性程度及各类微生物分布数量均弱于污水处理厂采集的活性污泥。

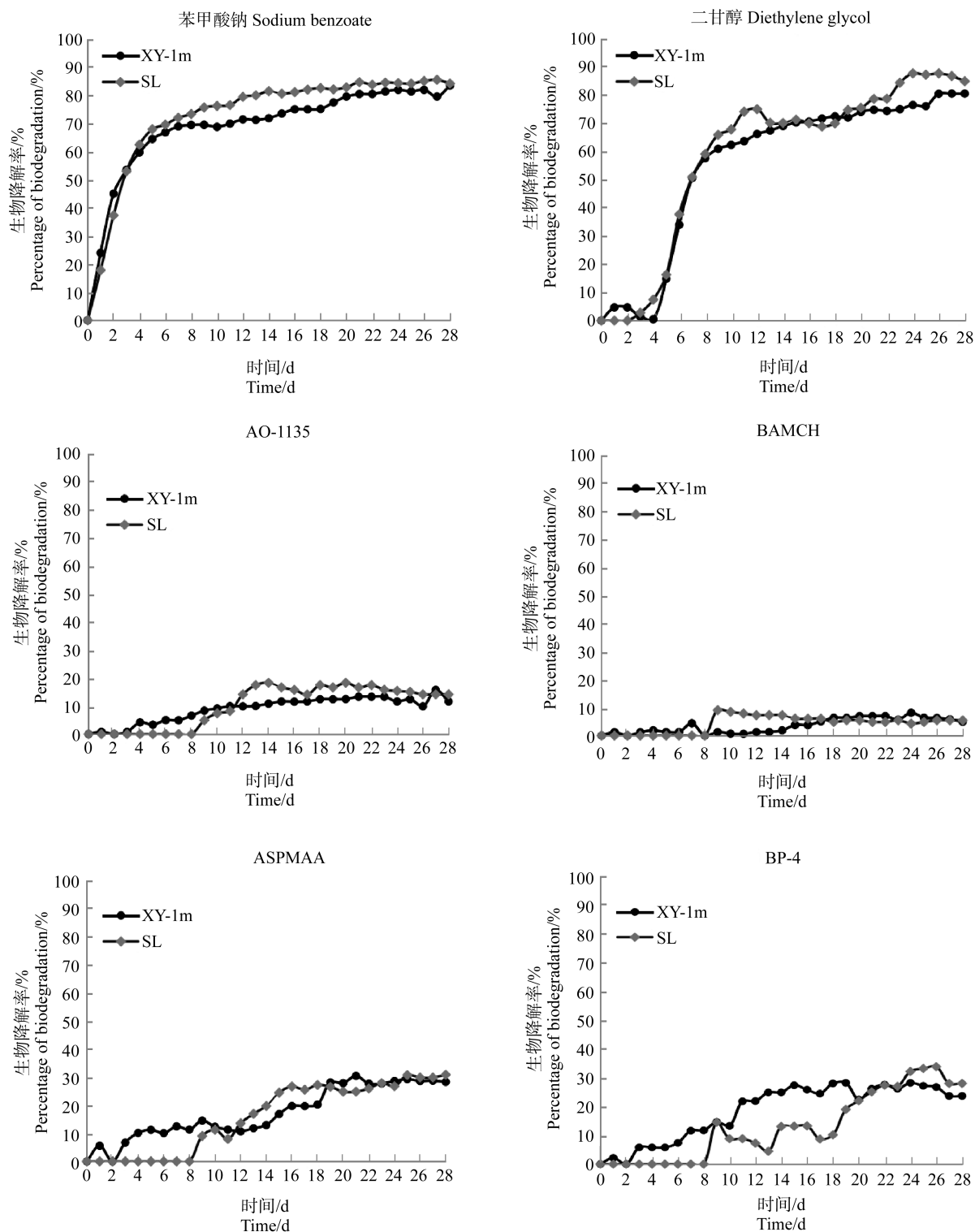


图 2 2 种不同接种物对 6 种化学品的固有生物降解曲线

注: XY-1m 为驯养 1 个月的接种物; SL 为采集自生活污水处理厂的活性污泥; AO-1135、BAMCH、ASPMAA 和 BP-4 表示 3,5-二叔丁基-4-羟基苯丙酸异辛酯、1,4-双(氨基甲基)环己烷、N-[4-(磺酰胺)苯基]甲基丙烯酰胺和 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮-5-磺酸。

Fig. 2 Inherent biodegradation curves of 6 chemicals by using two different inoculum

Note: XY is the domesticated inoculum (with 1-month domestication); SL is activated sludge (collected from domestic sewage treatment plant); AO-1135, BAMCH, ASPMAA and BP-4 stand for Antioxidant 1135, 1,4-cyclohexanediamine, N-[4-(aminosulfonyl)phenyl]methacrylamid and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid.

PLFA 分析反映活微生物群落结构多样性,结果表明,驯养 0 d 及 7 d 的接种物与驯养 14 d、驯养 1 个月的接种物以及污水处理厂采集污泥的脂肪酸类型上存在一定差异,尤其驯养 7 d 的接种物,与其他类型的接种物存在较为明显的差异,该结果与 Biolog 结果较为一致。综上,可推测按照 MITI 方法驯养 7 d 的接种物可能具有较高的微生物活性及群落多样性,而驯养 7 d 的接种物受接种物生长速度的限制,总量非常有限,难于满足降解试验的要求,考虑研究成本及实际可操作性,未对驯养 7 d 的接种物进行进一步研究。

基于上述结果,结合 OECD 302C 方法接种物至少驯养 1 个月(不超过 3 个月)的要求,进一步研究了驯养 1 个月的接种物与污水处理厂采集活性污泥对 6 种降解性各异物质的生物降解情况。通常认为化学品的生物降解性或持久性是化学品自身的内在属性,而在化学品持久性的实验室方法评估层面,不能简单将结果概括为化学品的固有属性,尤其对于不具快速生物降解性而又未显示出持久性迹象的化学品,结果往往受接种物细胞密度、微生物群落多样性、化学品与微生物的比例等因素影响<sup>[4]</sup>而存在较大变化。因此,本研究在固定的接种物浓度与化学品暴露浓度下,进行 6 种化学品的固有生物降解性研究。结果表明,活性污泥对苯甲酸钠、二甘醇、AO-1135、BAMCH、ASPMMA 和 BP-4 等 6 种化学品的降解延滞期普遍长于驯养污泥,而对 6 种化学品的最终降解率则普遍略高于驯养 1 个月的污泥,但最终降解率上的微弱差异并未构成固有生物降解性结果判定层面的差异。本实验室的另一项关于驯养污泥及污水处理厂采集的活性污泥在模拟生物降解中的比较研究<sup>[15]</sup>也有类似发现,即驯养污泥对聚乙二醇 400 及 BP-4 这 2 种化学品有较短的延滞期,但 2 种接种物在最终的生物降解能力上无本质差异。

综上,多位点采集、驯养 1 个月的接种物(OECD 302C 方法)与污水处理厂新鲜采集的活性污泥相比,未表现出更优的微生物多样性、代谢活性及固有生物降解能力。鉴于驯养 14 d 起,驯养接种物活性及多样性随驯养周期延长而下降,驯养 1 个月后的接种物已完全不具有多点采样混合当天(即驯养 0 d)接种物的群落特征,故认为 OECD 302C 方法驯养的接种物难以代表实际环境中多来源接种物对化学品的降解能力,10 点采集、驯养至少 1 个月的接种物用于固有生物降解研究的处置方法未见合理性及

必要性。相对 OECD 302C 方法中的驯养污泥而言,新鲜采集自污水处理厂曝气池的活性污泥则是真实环境来源的接种物。已有研究表明,出水稳定、运行良好的污水处理厂的活性污泥的菌群结构具有相似性<sup>[6]</sup>。因此,笔者认为,使用新鲜采集自运行良好的污水处理厂的活性污泥代替驯养污泥进行 OECD 302C 固有生物降解性评估同样可能获取稳定、可重复的降解结果,并且因其源自真实环境,与环境相关性更强,可能更有效地预测化学品在环境中的生物降解情况。

后续研究将尝试在 OECD 302C 体系中,增加活性污泥浓度、降低受试化学品浓度<sup>[7]</sup>以及延长暴露时间等,以便实现对化学品的环境持久性的进一步预测。同时,针对学者提出实验室条件下开展 302B、302C 等固有生物降解研究中,矿质培养基难以模拟实际环境中多种碳源共存时的共代谢情况<sup>[8]</sup>,尝试实验室条件多种碳源添加对降解结果的影响研究。此外,近年来提出采用“可能性”方法(“probability approach”或“Probabio”)判定化学品持久性的新思路,即通过实际环境接种物,以不同的接种浓度、受试浓度进行一系列降解性研究,通过最大可能数(MPN)来评估化学品的持久性<sup>[9]</sup>。上述研究将把生物降解试验最终引入微量化及高通量的层面,而以 OECD 302C 这一相对成熟、适用范围广且易于实现自动化操作的体系为基础,采用活性污泥作为接种物开展 MPN 研究,极大降低了操作成本,缩短了研究周期,在相对更大且易操作的体系中尝试方法的改进并开发研究更敏感的新终点,是快速获取并积累数据、实现与高通量研究数据间的比较并最终实现有效的微体积、高通量化学品持久性判别筛选方法的研发、评估、验证及改进的有效桥梁。

致谢:感谢上海市检测中心刘敏博士在文章修改中给予的帮助。

通讯作者简介:殷浩文(1959—),男,教授级高级工程师,主要研究方向为生态毒理学。

#### 参考文献(References):

- [1] 中华人民共和国生态环境部. 关于发布《新化学物质申报登记指南》等六项《新化学物质环境管理办法》配套文件的通知[EB/OL]. (2010-09-16) [2010-10-15]. [http://www.mee.gov.cn/gkml/hbb/bgt/201009/t20100921\\_194878.htm](http://www.mee.gov.cn/gkml/hbb/bgt/201009/t20100921_194878.htm).

- [2] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals: 302A Inherent Biodegradability—Modified SCAS Test [S]. Paris: OECD, 1981
- [3] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals: 302B Inherent Biodegradability—Zahn-Wellens/EMPA Test [S]. Paris: OECD, 1992
- [4] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals: OECD 302C Inherent Biodegradability—Modified MITI Test (II) [S]. Paris: OECD, 1981
- [5] Guckert J B, Carr G J, Johnson T D, et al. Community analysis by Biolog: Curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 27: 183-197
- [6] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals: Revised Introduction to the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 3 [S]. Paris: OECD, 2006
- [7] Kayashima T, Taruki M, Katagiri K, et al. Comparison of biodegradation performance of OECD Test Guideline 301C with that of other ready biodegradability tests [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33 (2): 328-333
- [8] Goodhead A K, Head I M, Snape J R, et al. Standard inocula preparations reduce the bacterial diversity and reliability of regulatory biodegradation tests [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21: 9511-9521
- [9] 杨倩, 蒋阳月, 王小军, 等. 化学品快速生物降解性测试不同接种物生物学评价[J]. *环境工程学报*, 2015, 9 (6): 3041-3045  
Yang Q, Jiang Y Y, Wang X J, et al. Biological evaluation of different inoculums used for ready biodegradability of chemicals [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(6): 3041-3045 (in Chinese)
- [10] 李斯颖. 不同接种物活性对快速生物降解测试结果影响[D]. 广州: 广东工业大学, 2014: 1-39  
Li S Y. Effect of activity of different inoculum effect on ready biodegradation test results [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2014: 1-39 (in Chinese)
- [11] Forney L J, Liu W T, Guckert J B, et al. Structure of microbial communities in activated sludge: Potential implications for assessing the biodegradability of chemicals [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 49: 40-53
- [12] 杨婧, 陈晓倩, 殷浩文. 活性污泥呼吸抑制试验的微生物接种物研究[J]. *安全与环境学报*, 2009, 9(1): 38-42  
Yang J, Chen X Q, Yin H W. On the microbial inoculum of activated sludge respiration experiments and the corresponding inhibition test [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2009, 9(1): 38-42 (in Chinese)
- [13] Xue D, Yao H Y, Ge D Y, et al. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses [J]. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 653-663
- [14] Boethling R S, Lynch D G. Biodegradation of US pre-manufacture notice chemicals in OECD tests [J]. *Chemosphere*, 2007, 66: 715-722
- [15] 杨和行, 杨帆, 陈晓倩, 等. BP-4 的模拟生物降解特性研究[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(1): 285-290  
Yang H X, Yang F, Chen X Q, et al. Biodegradation of UV filter BP-4 in simulation test [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(1): 285-290 (in Chinese)
- [16] 肖慧慧, 倪晋仁. 城镇污水处理厂活性污泥细菌群落结构特征分析[J]. *应用基础与工程科学学报*, 2013, 21 (3): 522-530  
Xiao H H, Ni J R. Characterization microbial community structure in wastewater treatment plants (WWTPs) through 16S rRNA clone library [J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2013, 21(3): 522-530 (in Chinese)
- [17] Dailey R, Daniel M, Leber A P. Biodegradability of the antioxidant diaryl-*p*-phenylene diamine using a modified inherent biodegradation method at an environmentally relevant concentration [J]. *Chemosphere*, 2013, 93: 1023-1028
- [18] Kowalczyk A, Martin T J, Price O R, et al. Refinement of biodegradation tests methodologies and the proposed utility of new microbial ecology techniques [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 111: 9-22
- [19] Thouand G, Durand M J, Maul A, et al. New concepts in the evaluation of biodegradation/persistence of chemical substances using a microbial inoculum [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 1-6