

杨 婧, 郭楚玲, 刘沙沙, 等. 邻苯二甲酸酯降解菌的筛选、降解特性及土壤修复研究[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(5): 933–940.

YANG Jing, GUO Chu-ling, LIU Sha-sha, et al. Isolation and characterization of phthalate-degrading bacterial strain, and its application in phthalate-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(5): 933–940.

## 邻苯二甲酸酯降解菌的筛选、降解特性及土壤修复研究

杨 婧<sup>1</sup>, 郭楚玲<sup>1,2,3\*</sup>, 刘沙沙<sup>1</sup>, 党 志<sup>1,2</sup>, 卢桂宁<sup>1,2</sup>

(1.华南理工大学环境与能源学院, 广州 510006; 2.工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室, 广州 510006; 3.广东省环境风险防控与应急处置工程技术研究中心, 广州 510006)

**摘要:**为寻找高效邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)降解菌,采用富集培养法从城市污水处理厂活性污泥中分离筛选出一株 DEHP 降解菌并命名为 ASW6D。通过扫描电镜、16S rRNA 同源性序列分析,初步将菌株 ASW6D 鉴定为分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)。菌株 ASW6D 可在较宽温度(20~40 °C)和 pH(5~10)范围下高效降解 DEHP,其最适生长降解条件为 30 °C、pH 8.0,3 d 内可将初始浓度为 500 mg·L<sup>-1</sup> 的 DEHP 降解 82.87%。进一步采用 GC-MS 分析 DEHP 降解的中间产物,推测出 DEHP 的生物代谢途径为先通过  $\beta$ -氧化缩短 DEHP 侧链,生成邻苯二甲酸二丁酯(DBP),再将 DBP 转化为邻苯二甲酸(PA)。将菌株 ASW6D 接种到 DEHP 污染的土壤,可将土壤中 DEHP 去除率提高 58.67%,表明 ASW6D 在 PAEs 污染环境生物修复方面的应用具有一定的潜力。

**关键词:** DEHP; 分枝杆菌; 代谢途径; 污染土壤

中图分类号: X53 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)05-0933-08 doi:10.11654/jaes.2017-1689

### Isolation and characterization of phthalate-degrading bacterial strain, and its application in phthalate-contaminated soil

YANG Jing<sup>1</sup>, GUO Chu-ling<sup>1,2,3\*</sup>, LIU Sha-sha<sup>1</sup>, DANG Zhi<sup>1,2</sup>, LU Gui-ning<sup>1,2</sup>

(1.School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2.The Key Lab of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 3.Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center for Environmental Risk Prevention and Emergency Disposal, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), one of the most widely used phthalates in China, is easily released into the environment. In the present study, we isolated a high-efficient DEHP-degrading bacterial strain (named ASW6D) enriched from the activated sludge of municipal sewage treatment plant. Based on its morphology and 16S rRNA sequence analysis, the bacterial strain was identified as *Mycobacterium* sp.. This species can efficiently degrade DEHP at a wide range of temperature (20~40 °C) and pH (5~10). The optimal temperature and pH for the growth of ASW6D were 30 °C and 8.0, respectively. Under optimal conditions, ASW6D degraded 500 mg·L<sup>-1</sup> DEHP by more than 82.87% within 3 d. Further, ASW6D also utilized dimethyl phthalate (DMP) and dibutyl phthalate (DBP) as carbon sources. The metabolites of DEHP degradation were further analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS). The metabolic pathway of DEHP was as follows: initially the side chain of DEHP was shortened by  $\beta$ -oxidation, and then DBP was formed; DBP was then converted to phthalic acid (PA) by hydrolysis. The inoculation of ASW6D into the contaminated soil increased the removal rate of DEHP by 58.67%. This indicates that ASW6D has the potential for bioremediation of phthalate acid ester (PAE)-contaminated soil.

**Keywords:** DEHP; *Mycobacterium* sp.; degradation pathway; contaminated soil

收稿日期: 2017-12-07 录用日期: 2018-02-08

作者简介: 杨 婧(1993—),女,安徽阜阳人,硕士研究生,从事有机污染土壤修复研究。E-mail: jingyangfy831@163.com

\*通信作者: 郭楚玲 E-mail: clguo@scut.edu.cn

基金项目: 广东省科技项目(2014A020217002, 2016B020242004)

Project supported: Guangdong Provincial Science and Technology Projects(2014A020217002, 2016B020242004)

邻苯二甲酸酯(简称 PAEs)是工业常用塑化剂,广泛应用于建筑装饰、化妆品、食品包装和医疗用具等领域<sup>[1]</sup>。由于 PAEs 与塑料树脂等并不是以稳定的化学键结合<sup>[2-3]</sup>,且其在环境中不易分解,因此极易在塑料的生产和使用过程中释放进入土壤<sup>[4]</sup>、水和沉积物<sup>[5-6]</sup>、大气<sup>[7]</sup>,甚至室内环境中<sup>[8]</sup>,并可通过食物链进入人体<sup>[9]</sup>,对人体造成极大危害<sup>[10]</sup>。我国环境污染中比较常见且难以降解的 PAEs 主要为邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)<sup>[11-13]</sup>,这3种 PAEs 均被美国环境保护署和中国国家环境监测中心列入优先控制污染物黑名单<sup>[1,14]</sup>。

PAEs 属于持久性有机污染物,在自然环境中的光解和水解速率相当缓慢,而生物降解被认为是环境中 PAEs 的主要降解途径<sup>[13]</sup>,从而被广泛研究<sup>[15-16]</sup>。目前,国内外有大量学者从不同环境介质中,如沉积物<sup>[17]</sup>、活性污泥<sup>[18]</sup>、污染土壤<sup>[19]</sup>等筛选 PAEs 降解菌,研究菌株降解特性、底物广谱性、推测 PAEs 代谢途径等。已报道的 PAEs 降解菌主要有:假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[9]</sup>、戈登氏菌(*Gordonia* sp.)<sup>[20-21]</sup>、壤霉菌(*A.gromyces* sp.)<sup>[22]</sup>、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)<sup>[23]</sup>、红球菌(*Rhodococcus* sp.)<sup>[19,24]</sup>等。而近年来,随着农用塑料薄膜的广泛应用,越来越多的 PAEs 被释放进入农田土壤中<sup>[4]</sup>,甚至有些典型膜覆盖农田土壤中 PAEs 总含量高达 33.36 mg·kg<sup>-1</sup>,其中 DEHP 含量达 21.31 mg·kg<sup>-1</sup>,远高于美国土壤 PAEs 化合物控制标准(DEHP 为 4.35 mg·kg<sup>-1</sup>)<sup>[25]</sup>。有研究表明,将 PAEs 降解菌添加到污染土壤中可大幅提高土壤中 PAEs 的降解速率<sup>[14,19,26]</sup>。而 DEHP 的化学结构复杂且疏水性强,相比于 DMP 和 DBP 更难降解<sup>[27]</sup>,因此,筛选出环境适应性强且有潜力运用到污染土壤修复中的 DEHP 高效降解菌具有一定的研究意义。

本研究从广州市沥滘污水处理厂活性污泥中分离筛选出一株 DEHP 高效降解菌。采用 16S rRNA 序列分析技术对菌株进行分子生物学鉴定,并研究菌株对 DEHP 的降解特性。通过 GC-MS 检测 DEHP 降解的中间产物,推测其降解途径。最后将 ASW6D 应用到 DEHP 污染土壤中,研究其对土壤中 DEHP 的去除效果,为实际污染土壤的生物修复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

活性污泥取自广东省广州市沥滘污水处理厂二

沉池。

化学试剂:DMP、DBP 和 DEHP 购自 Sigma-Aldrich Co.LLC.(中国上海),纯度>99%。实验中其他化学试剂均为分析纯,所有溶剂均为高效液相色谱(HPLC)级。

无机盐培养基(MSM):NaCl(0.75 g·L<sup>-1</sup>)、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(0.5 g·L<sup>-1</sup>)、FeCl<sub>3</sub>(0.001 g·L<sup>-1</sup>)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O(1 g·L<sup>-1</sup>)、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(0.4 g·L<sup>-1</sup>)、CaCl<sub>2</sub>(1.9 g·L<sup>-1</sup>),初始 pH 为 7.5~8.0。

营养肉汤培养基(NB):蛋白胨(10 g·L<sup>-1</sup>)、牛肉提取物(3 g·L<sup>-1</sup>)、氯化钠(5 g·L<sup>-1</sup>),pH 为 7.2~7.6。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DEHP 高效降解菌的驯化与分离

将新鲜活性污泥 25 mL 置于 250 mL 锥形瓶中,加入 75 mL MSM,投加 PAEs 混合液(DMP、DBP 和 DEHP 浓度相同)作为碳源,在 30 °C、150 r·min<sup>-1</sup> 摇床中振荡培养 7 d,然后将 25 mL 培养液转移到新的培养基中,并在相同条件下培养。PAEs 投加浓度为 35、70、105、140 mg·L<sup>-1</sup>,4 周递增一次,共驯化 16 周,得到对 PAEs 有稳定降解能力的菌液。通过稀释涂布平板法在营养肉汤培养基上对菌液进行筛选,勾取长势良好的单菌落到新鲜 MSM 中,如此反复直至分离到一株 PAEs 高效降解菌,命名为 ASW6D。将 0.5 mL DEHP(20 g·L<sup>-1</sup>)甲醇溶液加入 250 mL 锥形瓶中,待甲醇挥发后,加入 10 mL ASW6D 菌液与 90 mL MSM,30 °C、150 r·min<sup>-1</sup> 摇床中振荡培养 7 d,连续转接 4 次得到 ASW6D 稳定培养液。

#### 1.2.2 菌株 ASW6D 的形态观察与鉴定

采用平板划线法将 ASW6D 接种至营养肉汤培养基,30 °C 下培养 3 d,观察菌落特征。使用场发射扫描电镜 Merlin 对菌株 ASW6D 的表面形态进行观察。菌株的 16S rRNA 序列测定委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成,并用 MEGA 6.06 软件构建系统发育树。

#### 1.2.3 菌悬液的制备

将 100 mL 培养液 4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,并用磷酸盐缓冲盐水(PBS,0.1 mol·L<sup>-1</sup>、pH7.8)洗涤 3 次,然后将洗涤液重悬于 PBS 中并使用紫外分光光度计(UV-2550,Shimadzu,日本)在 600 nm 测量菌悬液吸光度,利用 PBS 将 OD<sub>600</sub> 调至 0.3 作为后续实验的接种物。

#### 1.2.4 DEHP 降解菌降解特性的研究

采用批量平衡试验,测定菌株 ASW6D 的生长曲

线及其降解 DEHP 的动力学曲线。将 2 mL 菌悬液接种至 18 mL MSM 中,DEHP 初始浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$  下避光振荡培养。在 6、12、24、36、48、72、96、144 h 时取样,测定溶液  $OD_{600}$  与 DEHP 的剩余量。为研究菌株对 DEHP 的降解能力以及环境因素(DEHP 初始浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )对其降解能力的影响,本研究采用单因素实验,按照上述同样的接种培养方式在初始 DEHP 浓度( $35 \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),温度( $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ),初始 pH( $4$ 、 $5$ 、 $6$ 、 $7$ 、 $8$ 、 $9$ 、 $10$ 、 $11$ )下培养 3 d 后测定溶液  $OD_{600}$  与 DEHP 剩余量,同时设置不接菌作为空白处理组。为研究菌株 ASW6D 的底物广谱性,分别选择两种环境中常见的 PAEs(DMP 与 DBP)作为唯一碳源进行实验,DMP、DBP 初始浓度均为  $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,接种培养方式同上。

利用高效液相色谱(Agilent 1260 series)检测溶液中 3 种 PAEs,采用外标法对 3 种 PAEs 定量,构建标准曲线(所有  $R^2$  均在 0.999 以上)。前处理方法(回收率在 85.71%~109.69%之间):在含有 20 mL 菌液的 100 mL 锥形烧瓶中,加入 20 mL 甲醇,超声溶解 30 min,提取 2 mL 溶液过  $0.22 \mu\text{m}$  微孔过滤膜,后转入色谱瓶待测。色谱条件:色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18( $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm} \times 2.5 \mu\text{m}$ ),流动相为甲醇:水=90:10,进样量  $20 \mu\text{L}$ ,柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,UV 检测波长为  $224 \text{ nm}$ 。

1.2.5 DEHP 降解产物的检测

将 2 mL 菌悬液接种至 18 mL MSM 中,DEHP 初始浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,于 0、12、24、36 h 时取样,用 GC-MS(Trace DSQ, Thermo)检测 DEHP 代谢产物。前处理方法:将 20 mL 乙酸乙酯加入到液体培养物中,超声提取 10 min 后,在  $2250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 5 min,提取上层有机相,重复上述过程两次。将有机相收集一起后旋转蒸发接近干燥,后溶解于 2 mL 正己烷中,过  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜,将最终溶液转移至色谱瓶中待测,色谱条件同 Tang 等<sup>[16]</sup>研究。质谱鉴定的结果与美国国家标准与技术研究所(NIST, Gaithersburg, MD)数据库的标准化化合物进行比对。

#### 1.2.6 高效降解菌在 DEHP 污染土壤中的应用

供试土壤取自广州市穗石村未污染农田土壤,土壤质地为壤土(砂粒 54%、粉粒 38%、黏粒 8%),pH 为 6.53,总有机碳  $3.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,总氮  $0.31 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,总磷  $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。为了研究降解菌对 DEHP 污染土壤的修复潜力,以及土著微生物对其降解效果的影响,试验分别设置土壤未灭菌组与灭菌组。未灭菌组:将 100 g 土壤(过 2 mm 筛)置于 250 mL 锥形烧瓶中,加入

DEHP 丙酮溶液,调节最终浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。充分混合后,溶剂蒸发 24 h。然后将菌悬液均匀地接种到土壤中,最终浓度为  $1 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 。灭菌组:将土壤样品在  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  下高压灭菌 1 h,后接种菌悬液,在( $30 \pm 0.5$ ) $^\circ\text{C}$  下避光培养。通过添加无菌水使土壤含水量保持在 50%。每隔 1 d 收集土壤样品 1 g,通过 GC-MS(Trace DSQ, Thermo)测定土壤中残留的 DEHP 浓度。灭菌与未灭菌组均分别设置空白组。

土壤样品前处理方法:将 1.0 g 土壤加入玻璃离心瓶中,加入 20 mL 丙酮和己烷(1:1, V/V)混合液,超声提取 10 min,  $2250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min。重复以上步骤两次。收集有机相,旋转蒸发接近干燥,后溶于 10 mL 正己烷中。提取 2 mL 溶液过  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜后转移至色谱瓶待测,检测方法同 1.2.5 所示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DEHP 高效降解菌的分离与鉴定

菌株 ASW6D 在平板上呈乳白色、表面干燥、边缘不整齐、粗糙型菌落(图 1a),电镜图上显示其细胞形态成杆状,稍有弯曲(图 1b)。PCR 扩增 16S rRNA 基因(1477 bp),GenBank 登录号为 KY888692,基于序列在 NCBI 上的比对结果,菌株 ASW6D 与 *Mycobacterium mucogenicum*(NR\_042919.1)有很高的相似性(99%)。用 MEGA 6.06 软件构建的系统发育树如图 2,图中 ASW6D 与 *Mycobacterium mucogenicum* 和 *Mycobacterium sp.* 亲缘关系最近,由此推断菌株 ASW6D 属于分枝杆菌属(*Mycobacterium sp.*)。已有文献报道 *Mycobacterium sp.* 可以降解 PAEs<sup>[28]</sup>,但更多的是研究其对多环芳烃的降解<sup>[29-30]</sup>。

### 2.2 菌株 ASW6D 对 DEHP 降解能力的研究

ASW6D 可以将 DEHP 作为唯一碳源迅速生长,生长延滞期很短,6 h 时开始进入对数期,24 h 时 OD 值达到最高,同时 DEHP( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的去除率达

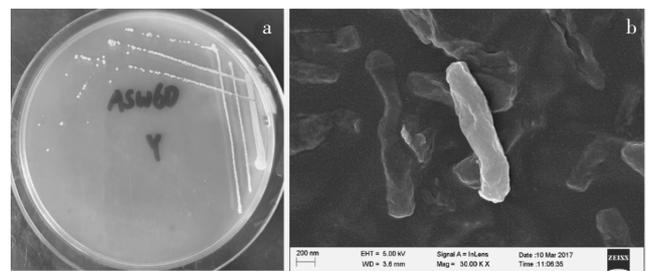


图 1 菌株 ASW6D 的形态特征

Figure 1 Morphological properties of the colonies of strain ASW6D(a) coloby(b) cell image of SEM

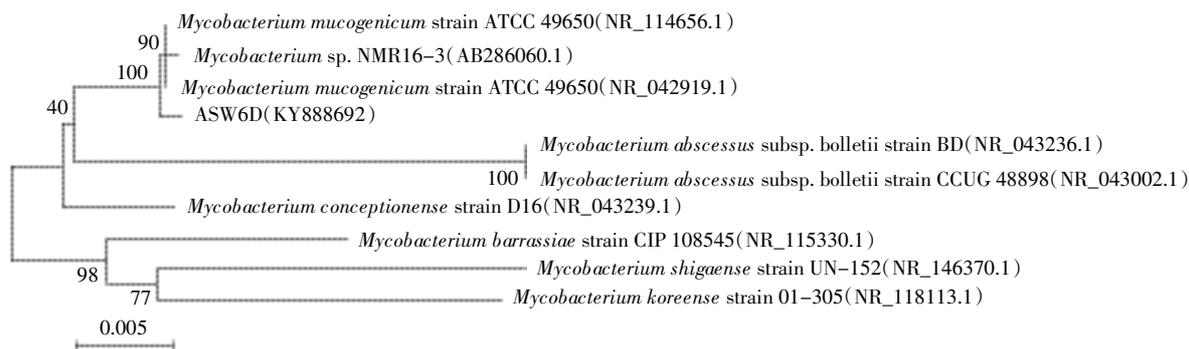


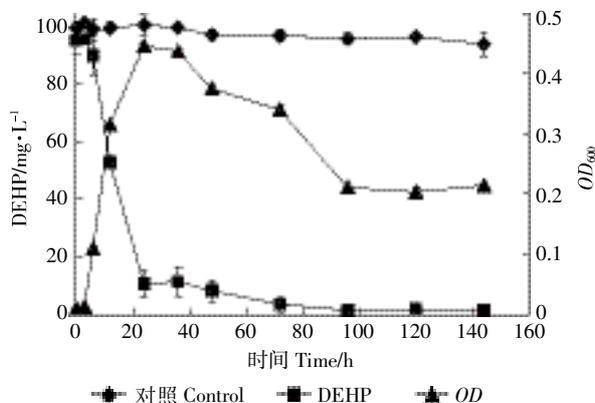
图2 菌株 ASW6D 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain ASW6D

89.34%，随后逐渐进入衰退期，DEHP 最终基本被降解完(1.41%)(图3)。为进一步研究菌株 ASW6D 对 DEHP 的降解能力，采用不同初始浓度(35~1000 mg·L<sup>-1</sup>)的 DEHP 作为唯一的碳源。实验结果显示(图4)，当 DEHP 浓度不高于 500 mg·L<sup>-1</sup> 时，3 d 内降解率可达 80%以上，当 DEHP 浓度增加至 1000 mg·L<sup>-1</sup> 时，降解率降低至 30.44%。已有的报道中，分枝杆菌 YC-RL4 培养 24 h 后对 DEHP(50 mg·L<sup>-1</sup>)去除率不到 50%<sup>[28]</sup>，*Pseudomonas* sp. XB<sup>[18]</sup>和 *Acinetobacter* sp. SN13<sup>[23]</sup> 培养 24 h 后对 DEHP(100 mg·L<sup>-1</sup>)的去除率分别为 70%和 40%。相比较以上几种菌株，ASW6D 对 DEHP 具有更好的降解效果。

### 2.3 温度和 pH 对 DEHP 降解的影响

微生物主要通过分泌相关酶来分解有机物，温度和 pH 会影响酶的活性，从而影响微生物的生长与对有机物的降解能力<sup>[31]</sup>。从图 5 和图 6 可看出，菌株 ASW6D 在 10 °C 和 pH 11 条件下仅有些许生长，而在 20~40 °C 条件下，DEHP 3 d 内的降解率可达 85%以上；在 pH 5~10 条件下，降解率均大于 77%。其中当

图3 菌株 ASW6D 利用 DEHP(100 mg·L<sup>-1</sup>)的生长降解曲线Figure 3 The DEHP(100 mg·L<sup>-1</sup>) degradation curve and the growth curve of strain ASW6D

温度为 30 °C 和 pH 为 8 时，DEHP 降解率高达 98%以上，同时 OD<sub>600</sub> 值也达到 0.33 以上。由此可看出 ASW6D 的最适温度和 pH 值分别为 30 °C 和 8。

据文献报道，*Mycobacterium* sp. YC-RL4 可在 20~40 °C、pH 7~9 下高效降解 DEHP<sup>[28]</sup>，*Acinetobacter* sp. SN13 的适宜温度和 pH 范围为 25~35 °C 和 6~9<sup>[23]</sup>，

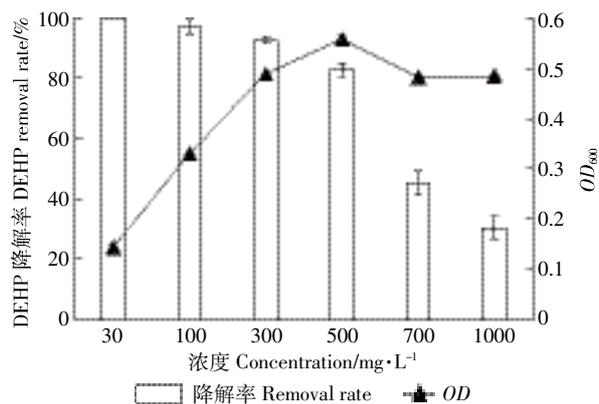


图4 不同 DEHP 初始浓度对 DEHP 降解的影响

Figure 4 Effects of different initial DEHP concentrations on DEHP biodegradation

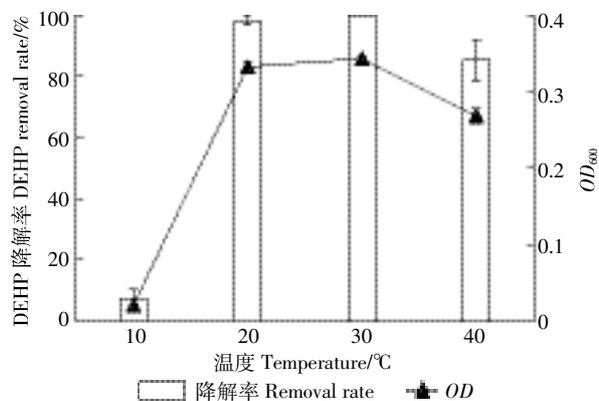


图5 温度对菌株 ASW6D 降解 DEHP 的影响

Figure 5 Effects of temperature on DEHP degradation by ASW6D

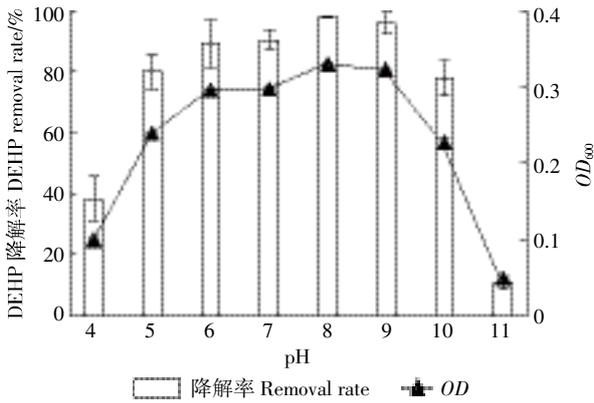


图 6 pH 对菌株 ASW6D 降解 DEHP 的影响

Figure 6 Effects of pH on DEHP degradation by ASW6D

*Gordonia* sp. HS-NH1 的则为 30 °C 和 7~8<sup>[21]</sup>。对比以上菌株, ASW6D 能够在相当宽的温度(20~40 °C)和 pH (5~10)范围下高效降解 DEHP, 更适合应用于污染环境的生物修复。

2.4 菌株 ASW6D 对 DMP 和 DBP 的降解

菌株 ASW6D 在 DMP、DBP 初始浓度为 35 mg·L<sup>-1</sup> 时的降解曲线如图 7 所示, 24 h 时, ASW6D 对 DMP 和 DBP 去除率为 86.64%。对比上文 DEHP 的降解曲线, 高效降解菌 ASW6D 可以快速利用短链 PAEs——DMP, 而对于中链 PAEs——DBP 和长链 PAEs——DEHP 的降解速度则相对较慢, 该结果与先前的报道很接近<sup>[32-33]</sup>。我国环境污染中的酞酸酯主要为 DMP、DBP 和 DEHP<sup>[11-13, 34]</sup>, 而菌株 ASW6D 不仅可以高效降解 DEHP, 还可快速降解 DMP 和 DBP。由此可见, ASW6D 在 PAEs 污染环境的实际修复中具有一定的优势。

2.5 DEHP 降解产物的检测与代谢路径的推测

为推测 ASW6D 对 DEHP 的降解途径, 分别检测降解过程中在 0、12、24、36 h DEHP 的降解产物。DEHP 降解过程中主要检测出 3 种物质(图 8), 通过

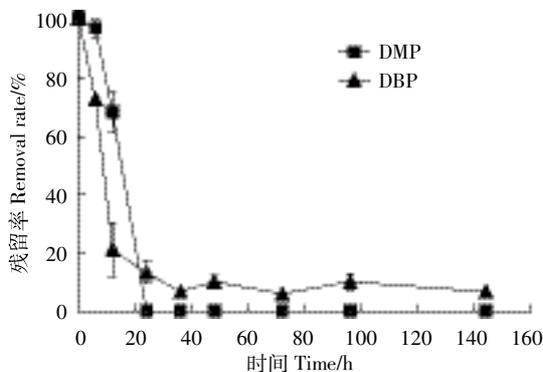


图 7 ASW6D 对 DMP、DBP 的降解曲线

Figure 7 The DMP and DBP degradation curve for the strain ASW6D

与谱库(图 9 中 d~f)的比对可以确定 3 种物质分别为 DEHP、DBP 和 PA。刚开始只检测到 DEHP, 而在 12、24、36 h 时 DEHP 的含量逐渐降低, 同时开始检测到 DBP 和 PA, 由此可推断出 ASW6D 降解 DEHP 的主要中间产物为 DBP 和 PA。

常见的 DEHP 生物降解过程主要是通过酯的水解作用, 将 DEHP 转化为邻苯二甲酸单-2-乙基己酯 (MEHP), 通过水解酶进一步水解为 PA, 最终为 PA 的矿化过程<sup>[3, 22, 28, 35-36]</sup>, 很少有文献报道其降解过程中会产生中间产物 DBP。根据 GC-MS 的检测结果与相关文献, 推测 ASW6D 作用下 DEHP 的生物降解过程为: 先通过  $\beta$ -氧化逐渐缩短 DEHP 侧链, 生成 DBP, DBP 可能会继续通过  $\beta$ -氧化缩短侧链生成短链 PAEs, 然后再水解生成 PA, 也可能先通过水解作用脱一条侧链, 生成邻苯二甲酸单丁酯 (MBP), 再继续水解生成 PA, 接着 PA 氧化开环, 最终进入三羧酸循环生成 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O (图 9), 这一降解途径与菌株 LMB-1 降解 DBP 和 JDC-32 降解邻苯二甲酸二辛酯 (DOP) 的途径很类似<sup>[16, 37]</sup>。

2.6 菌株 ASW6D 在 DEHP 污染土壤中的应用

为进一步研究 ASW6D 在 DEHP 污染环境中的降解能力, 以及土著微生物对其降解性能的影响, 将 ASW6D 分别接种到灭菌和未灭菌土壤中, 分析 DEHP 降解情况。接种 ASW6D 到未灭菌土壤 18 d 后, DEHP 去除率为 75.12%, 空白组为 16.45%; 接种 ASW6D 到灭菌土壤 18 d 后, DEHP 去除率为 85.08%, 空白仅去除 7.54%, ASW6D 的添加将 DEHP 去除率提高了 77.54% (图 10)。动力学数据进一步表明 DEHP 降解过程基本符合一级动力学模型 ( $R^2=0.7674$ ~

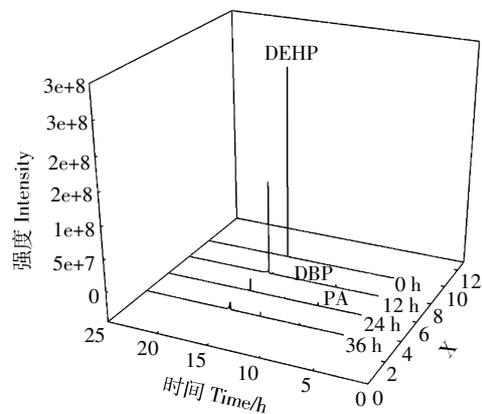


图 8 ASW6D 降解 DEHP 过程中中间产物的色谱图

Figure 8 Chromatograms of the intermediates of DEHP degradation by ASW6D

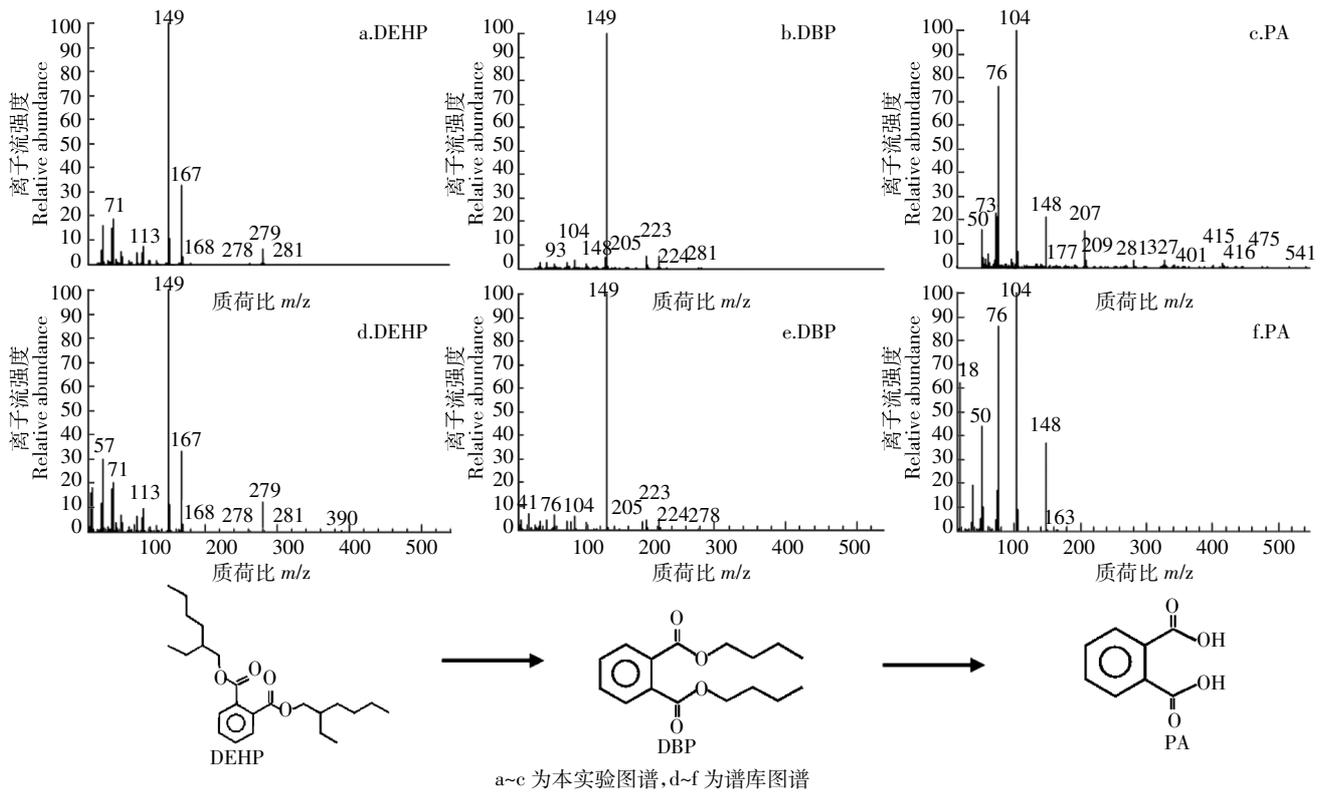


图 9 ASW6D 降解 DEHP 过程中中间产物的质谱图

Figure 9 Spectra of the intermediates of DEHP degradation by ASW6D

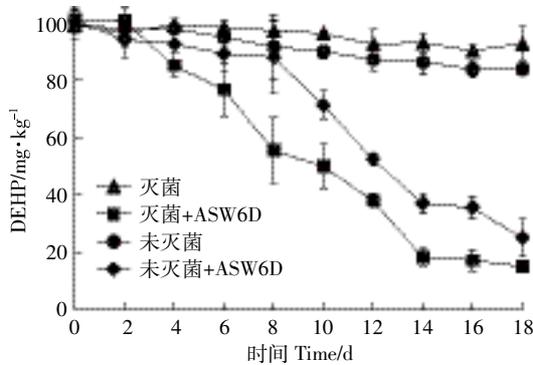


图 10 ASW6D 对污染土壤中 DEHP 的降解

Figure 10 Degradation of DEHP by ASW6D in containment soil

表 1 ASW6D 降解污染土壤中 DEHP 的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of DEHP degradation in contaminated soils by ASW6D

土壤处理 Soil treatment	动力学方程 Kinetic equations	$t_{1/2}/d$	$R^2$
灭菌	$\ln C = -0.009 7t + 4.610 1$	71.97	0.767 4
灭菌+ASW6D	$\ln C = -0.239 5t + 5.117 7$	5.03	0.939 1
未灭菌	$\ln C = -0.021 4t + 4.627 4$	33.43	0.976 8
未灭菌+ASW6D	$\ln C = -0.156 5t + 4.986 1$	6.67	0.883 8

本研究中,外加 ASW6D 到 DEHP 污染的土壤,DEHP 的半衰期为 6.67 d,表明 ASW6D 具有较高的降解潜力。

添加菌株 ASW6D 的未灭菌土壤组 DEHP 的降解曲线在 8 d 内相对灭菌组较平缓,降解速率较慢(图 10)。而在 8~18 d 内,未灭菌土壤组的降解速率迅速加快,并逐渐超过灭菌组。该结果可能是由于菌株 ASW6D 与土壤中土著微生物存在某种竞争关系,所以在前 8 d ASW6D 的生长受到一定影响,导致 DEHP 的降解曲线比较平缓,而 8 d 后速率突然加快可能是由于菌株 ASW6D 在与土著微生物的竞争中逐渐占据优势,从而加快了对 DEHP 的降解。

综上所述,菌株 ASW6D 可快速去除新加入土壤的 DEHP,具有高效降解 DEHP 的能力,表明菌株

0.976 8)(表 1)。土壤灭菌处理下,接种 ASW6D 后 DEHP 的半衰期( $t_{1/2}$ )为 5.03 d,对照组为 71.97 d,在土壤未灭菌情况下,添加 ASW6D 的  $t_{1/2}$  为 6.67 d,而对照组为 33.43 d(表 1)。结果表明,添加菌株 ASW6D 可大幅降低 ( $P < 0.05$ ) DEHP 在土壤中的半衰期,加快 DEHP 的降解速率。秦华等<sup>[26]</sup>分别添加 3 种菌悬液到污染土壤(DEHP 浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )中,3 种处理下 DEHP 半衰期为 24~35 d;加入降解菌群到 PAEs 混合污染土壤中,30 d 后 DEHP 的同分异构体 DOP ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )去除率不到 50%,DOP 半衰期为 28 d<sup>[38]</sup>。

ASW6D对PAEs污染环境的生物修复具有一定的潜力与应用前景。

### 3 结论

(1)获得了一株可高效降解DEHP的菌株ASW6D,经形态学特征和16S rRNA序列分析,初步鉴定为分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)。

(2)ASW6D可在较宽温度(20~40℃)和pH(5~10)范围下高效降解DEHP。DEHP生物降解过程中检测到的主要代谢物是DBP和PA。

(3)添加菌株ASW6D到DEHP污染的土壤,可明显提高DEHP的去除率,表明ASW6D在PAEs污染环境的生物修复方面具有一定的潜力。

#### 参考文献:

- [1] Chen J A, Li X, Li J, et al. Degradation of environmental endocrine disruptor di-2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Mycobacterium* sp. strain CQ0110Y[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 74(3):676-682.
- [2] Liang D W, Zhang T, Fang H H P, et al. Phthalates biodegradation in the environment[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, 80(2):183-198.
- [3] Nahurira R, Ren L, Song J, et al. Degradation of di(2-Ethylhexyl) phthalate by a novel *Gordonia alkanivorans* strain YC-RL2[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74(3):309-319.
- [4] Wang J, Lv S H, Zhang M Y, et al. Effects of plastic film residues on occurrence of phthalates and microbial activity in soils[J]. *Chemosphere*, 2016, 151:171-177.
- [5] Net S, Rabodonirina S, Sghaier R B, et al. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers(France-Belgium)[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 521/522:152-159.
- [6] Selvaraj K K, Sundaramoorthy G, Ravichandran P K, et al. Phthalate esters in water and sediments of the Kaveri River, India; Environmental levels and ecotoxicological evaluations[J]. *Environmental Geochemistry Health*, 2015, 37(1):83-96.
- [7] Li J, Wang G, Aggarwal S G, et al. Comparison of abundances, compositions and sources of elements, inorganic ions and organic compounds in atmospheric aerosols from Xi'an and New Delhi, two megacities in China and India[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 476/477:485-495.
- [8] Shi W, Guo J, Zhou Y B, et al. Phthalate esters on hands of office workers; Estimating the influence of touching surfaces[J]. *Environment Science & Technology Letters*, 2016, 4(1):1-5.
- [9] Liao C S, Chen L C, Chen B S, et al. Bioremediation of endocrine disruptor di-n-butyl phthalate ester by *Deinococcus radiodurans* and *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Chemosphere*, 2010, 78(3):342-346.
- [10] Matsumoto M, Hirata K M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 50(1):37-49.
- [11] 王红芬,程晗煜,洪坚平.环境中酞酸酯的污染现状及防治措施[J].环境科学与管理,2010,35(7):33-36.  
WANG Hong-fen, CHEN Han-yu, HONG Jian-ping. The status of phthalate esters pollution and its control measures in the environment[J]. *Environmental Science and Management*, 2010, 35(7):33-36.
- [12] 崔学慧,李炳华,陈鸿汉,等.中国土壤与沉积物中邻苯二甲酸酯污染水平及其吸附研究进展[J].生态环境学报,2010,19(2):472-479.  
CUI Xue-hui, LI Bing-hua, CHEN Hong-han, et al. A review of phthalic acid esters contamination and sorption in soil and sediment, China[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2):472-479.
- [13] 刘庆,杨红军,史衍玺,等.环境中邻苯二甲酸酯类(PAEs)污染物研究进展[J].中国生态农业学报,2012,20(8):968-975.  
LIU Qing, YANG Hong-jun, SHI Yan-xi, et al. Research progress on phthalate esters(PAEs) organic pollutants in the environment[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(8):968-975.
- [14] Zhao H M, Du H, Feng N X, et al. Biodegradation of di-n-butylphthalate and phthalic acid by a novel *Providencia* sp. 2D and its stimulation in a compost-amended soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2016, 52(1):65-76.
- [15] He L, Gielen G, Bolan N S, et al. Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in China: A review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35(2):519-534.
- [16] Tang W J, Zhang L S, Fang Y, et al. Biodegradation of phthalate esters by newly isolated *Rhizobium* sp. LMB-1 and its biochemical pathway of di-n-butyl phthalate[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(1):177-186.
- [17] Yuan S Y, Huang I C, Chang B V. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate and microbial community changes in mangrove sediment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 184(1):826-831.
- [18] 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 Jing-jing, CHEN Li-wei, WANG Yi-qing, et al. Isolation, identification of a DEHP-degrading bacterium and its high effective biodegradation characteristics[J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(11):2362-2369.
- [19] Wang J, Zhang M Y, Chen T, et al. Isolation and identification of a di-(2-Ethylhexyl) phthalate-degrading bacterium and its role in the bioremediation of a contaminated soil[J]. *Pedosphere*, 2015, 25(2):202-211.
- [20] Wu X L, Wang Y Y, Dai Q Y, et al. Isolation and characterization of four di-n-butyl phthalate(DBP)-degrading *Gordonia* sp. strains and cloning the 3,4-phthalate dioxygenase gene[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27(11):2611-2617.
- [21] 严佳丽,陈湖星,杨杨,等.一株高效DEHP降解菌的分离、鉴定及其降解特性[J].微生物学通报,2014,41(8):1532-1540.  
YAN Jia-li, CHEN Hu-xing, YANG Yang, et al. Isolation and charac-

- terization of a highly efficient DEHP-degrading bacterium[J]. *Institute of Microbiology*, 2014, 41(8):1532-1540.
- [22] Zhao H M, Du H, Lin J, et al. Complete degradation of the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate by a novel *Agromyces* sp. MT-O strain and its application to bioremediation of contaminated soil[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 562:170-178.
- [23] Xu J, Lu Q, de Toledo R A, et al. Degradation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) by an indigenous isolate *Acinetobacter* sp. SN13[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 117:205-214.
- [24] Jin D C, Liang R X, Dai Q Y, et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3, 4-phthalate dioxygenase gene[J]. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 2010, 20(10):1440-1445.
- [25] 宋雪英, 崔小维, 李嘉康, 等. 邻苯二甲酸酯类塑化剂的土壤生态毒理学研究进展[J]. *生态环境学报*, 2016, 25(11):1885-1890.
- SONG Xue-ying, CUI Xiao-wei, LI Jia-kang, et al. Research advances in soil ecotoxicology of phthalic acid esters (PAEs) exposure[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2016, 25(11):1885-1890.
- [26] 秦华, 林先贵, 尹睿, 等. 接种降解菌对土壤中邻苯二甲酸二异辛酯降解的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(6):842-845.
- QIN Hua, LIN Xian-gui, YIN Rui, et al. Degradation of di-(2-Ethylhexyl) phthalate in soil by inoculating microorganisms[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(6):842-845.
- [27] Li C, Tian X L, Chen Z S, et al. Biodegradation of an endocrinedisrupting chemical di-n-butyl phthalate by *Serratia marcescens* C9 isolated from activated sludge[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(11):2686-2693.
- [28] Ren L, Jia Y, Ruth N, et al. Biodegradation of phthalic acid esters by a newly isolated *Mycobacterium* sp. YC-RL4 and the bioprocess with environmental samples[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(16):16609-16619.
- [29] Boldrin B, Tiehm A, Fritzsche C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(6):1927-1930.
- [30] Solano-Serena F, Marchal R, Casarégola S, et al. A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6):2392-2399.
- [31] Chen S, Dong Y H, Chang C, et al. Characterization of a novel cyfluthrin-degrading bacterial strain *brevibacterium aureum* and its biochemical degradation pathway[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 132:16-23.
- [32] 张可, 关允, 格桑, 等. 低温邻苯二甲酸二甲酯降解菌 STX-2 和 STX-5 的分离、鉴定及降解特性[J]. *环境污染与防治*, 2017, 39(1):16-27.
- ZHANG Ke, GUAN Yun, GE Sang, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of dimethyl phthalate degradation strains STX-2 and STX-5 at low temperature[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2017, 39(1):16-27.
- [33] 温志丹, 高大文, 李喆, 等. 邻苯二甲酸酯降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2013, 45(12):38-42.
- WEN Zhi-dan, GAO Da-wen, LI Zhe, et al. Isolation and identification of phthalate-degrading bacteria and their characteristics[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2013, 45(12):38-42.
- [34] 周开胜, 吕超田, 杨刚, 等. 水体中酞酸酯类环境激素污染及生物降解研究进展[J]. *环境科技*, 2009, 22(4):56-59.
- ZHOU Kai-sheng, LÜ Chao-tian, YANG Gang, et al. Research progress on pollution and biodegradation of environmental hormone-phthalate esters in water[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 22(4):56-59.
- [35] Benjamin S, Pradeep S, Josh M S, et al. A monograph on the remediation of hazardous phthalates[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 298:58-72.
- [36] Li D D, Yan J L, Wang L, et al. Characterization of the phthalate acid catabolic gene cluster in phthalate acid esters transforming bacterium-*Gordonia* sp. strain HS-NH1[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 106:34-40.
- [37] Wu X, Liang R, Dai Q, et al. Complete degradation of di-n-octyl phthalate by biochemical cooperation between *Gordonia* sp. strain JDC-2 and *Arthrobacter* sp. strain JDC-32 isolated from activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176(1/2/3):262-268.
- [38] Wang J L, Zhao X, Wu W Z. Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(12):1837-1841.