

肖霞霞, 杨云, 马丽雅, 等. 大蒜内生巨大芽孢杆菌对邻苯二甲酸酯的共代谢降解特性及代谢途径分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 106-117.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.013

大蒜内生巨大芽孢杆菌对邻苯二甲酸酯的共代谢降解特性及代谢途径分析

肖霞霞^{1,2}, 杨云^{1,2}, 马丽雅², 冯发运², 葛静^{2,3}, 李勇², 王亚^{2,3}, 余向阳^{2,3}, 马桂珍¹

(1.江苏海洋大学食品科学与工程学院, 江苏连云港 222005; 2.江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏南京 210014; 3.江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013)

摘要: 土壤邻苯二甲酸酯(PAE)污染对生态环境和农产品安全均构成威胁。为实现 PAE 污染土壤的生物修复,明确共代谢基质对微生物降解 PAE 的影响机制,从 PAE 污染的大蒜中筛选获得能降解 PAE 的内生菌。通过生理生化特征和 16S rRNA 基因测序对其种属进行了鉴定,并研究了内生菌对 6 种 PAE 的共代谢降解特性,优化了共代谢降解条件,初步探索了共代谢条件下内生菌对 PAE 的降解代谢途径。结果表明:从大蒜中共筛选出 3 株能降解 PAE 的内生菌 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8,经鉴定 3 者皆为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。3 株菌株均能以 6 种 PAE 为碳源生长,但处理 3 d 后 PAE 的降解率仅 0.89%~10.40%,降解能力较弱。添加 D-纤维二糖为共代谢基质后,3 株菌株对 6 种 PAE 的降解率均显著提升,其中菌株 DGB-1 和 DGB-3 处理 3 d 后能完全降解 20 mg/L 质量浓度的邻苯二甲酸二丁酯(DBP)和邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)。以 DGB-1 为供试菌株,发现吐温 80 添加量、碳源种类、碳源浓度和接种量对 6 种 PAE 的降解率均有显著影响,最佳降解条件为吐温 80 添加量 0.025%,碳源为 D-纤维二糖、浓度为 10 mmol/L,接种菌液 OD_{600} 为 0.2。最佳降解条件下,当 6 种 PAE 质量浓度为 50 mg/L 时,邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、DBP、BBP、邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)和邻苯二甲酸二辛酯(DnOP)在 MSM 培养基中的降解半衰期分别为 9.01 d、2.27 d、2.13 d、1.99 d、7.84 d 和 6.72 d。菌株 DGB-1 不携带质粒,其 PAE 降解基因位于该菌株染色体上;菌株 DGB-1 可通过水解作用完成对 DBP、DEHP 和 DnOP 的第一步降解,但水解作用均较弱;菌株 DGB-1 对 6 种 PAE 的降解代谢需要其细胞膜上的呼吸链系统参与,氧化还原反应增强可显著促进菌株 DGB-1 对 6 种 PAE 的降解。本研究为进一步利用内生菌进行 PAE 污染土壤的生物修复提供理论依据。

关键词: 内生菌; 共代谢; 邻苯二甲酸酯; 降解途径

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2023)01-0106-12

Co-metabolic degradation characteristics and metabolic pathways analysis of phthalic acid esters by endophytic *Bacillus megaterium* in garlic

XIAO Xia-xia^{1,2}, YANG Yun^{1,2}, MA Li-ya², FENG Fa-yun², GE Jing^{2,3}, LI Yong², WANG Ya^{2,3}, YU Xiang-yang^{2,3}, MA Gui-zhen¹

收稿日期: 2022-09-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32272600); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(20)1009]; 江苏中晚熟大蒜产业集群建设项目(22912105)

作者简介: 肖霞霞(1995-), 女, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要从事农产品产地污染修复研究。(E-mail) x17853479138@163.com

通讯作者: 马桂珍, (E-mail) guizhenma@sohu.com; 王亚, (E-mail) yawang@jaas.ac.cn

(1. School of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Soil phthalic acid esters (PAEs) pollution is a threat to the ecological environment and the safety of agricultural products. In order to realize the bioremedi-

ation of PAEs contaminated soil and clarify the influence mechanism of co-metabolic matrix on the degradation of PAEs by microorganisms, endophytic bacteria capable of degrading PAEs were screened from PAEs contaminated garlic. The strains were identified by physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing, and the co-metabolic degradation characteristics of six PAEs by endophytes were studied. The co-metabolic degradation conditions were optimized, and the degradation metabolic pathway of PAEs by endophytes under co-metabolic condition was preliminarily explored. The results showed that three endophytic bacteria DGB-1, DGB-3 and DGB-8 capable of degrading PAEs were screened from garlic, and they were identified as *Bacillus megaterium*. Although three strains of bacteria demonstrated the ability to utilize six different types of PAEs as carbon sources for growth, their capacity for PAEs degradation was limited. After a three-day treatment, degradation rates ranged from 0.89% to 10.40%. After adding *D*-cellobiose as co-metabolism substrate, the degradation rates of six PAEs by the three strains were significantly improved. Among them, DGB-1 and DGB-3 strains could completely degrade 20 mg/L dibutyl phthalate (DBP) and butyl benzyl phthalate (BBP) after three days of treatment. Using DGB-1 as test strain, it was found that the addition amount of Tween 80, carbon source type, carbon source concentration and inoculation dose had significant effects on the degradation rates of six PAEs. The optimal degradation conditions were as follows: the addition amount of Tween 80 was 0.025%, the carbon source was *D*-cellobiose, the concentration was 10 mmol/L, and OD_{600} value of bacterial solution was 0.2. Under the optimal degradation conditions, when the initial concentrations of six PAEs were 50 mg/L, the degradation half-lives of dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), DBP, BBP, di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-octyl phthalate (DnOP) in inorganic salt medium were 9.01 d, 2.27 d, 2.13 d, 1.99 d, 7.84 d and 6.72 d, respectively. The strain DGB-1 did not carry a plasmid, and its PAEs degradation genes were located on the chromosome. DGB-1 could complete the first step degradation of DBP, DEHP and DnOP through hydrolysis, but the hydrolysis reactions were weak. The degradation of six PAEs by the strain DGB-1 required the participation of the respiratory chain system on the cell membrane. The enhanced redox reaction could significantly promote the degradation of six PAEs by the strain DGB-1. This study provides a theoretical basis for further use of endophytic bacteria for bioremediation of PAEs contaminated soil.

Key words: endophytic bacteria; co-metabolism; phthalic acid esters; degradation pathways

邻苯二甲酸酯(PAE)常作为增塑剂应用于农用地膜、棚膜等塑料制品的生产中,塑料产品中PAE含量约占总质量的10%~60%^[1]。PAE在合成材料中常以非化学共价键形式存在^[2],容易被释放到大气、水体等环境介质中,并最终造成耕地土壤PAE污染^[3]。中国设施大棚土壤中PAE污染状况不容乐观,珠三角、长三角、环渤海等地区的调查结果显示,中国农田土壤中的主要PAE污染种类为邻苯二甲酸二丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基)酯(DEHP),平均含量高达9.23 mg/kg和11.00 mg/kg^[4],远高于美国环保局制定的土壤PAE控制标准^[5]。PAE具有较强的生殖毒性和“三致”效应^[6],土壤PAE污染不但对生态环境和农产品安全构成严重威胁,还可通过食物链积累放大进一步增加人体PAE暴露风险。因此,如何实现耕地土壤中PAE的高效去除已成为生态环境领域的研究热点和难点。

在土壤PAE治理技术中,物理修复工程量大、成本昂贵;化学修复效率高、降解谱广,但降低地力

并增加修复成本;植物修复效率低、周期长^[6]。利用微生物修复土壤无二次污染,颇具优势,在降解土壤PAE中具有较好的应用潜力^[7]。国内外针对PAE降解菌的分离筛选及功能研究已开展多年,目前已有包括假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)在内的超过80个PAE降解菌得到了详细的研究报道^[6,8-9]。但这些PAE降解菌主要从水体、土壤及污泥等环境介质中分离获得,而从植物体内分离筛选具有降解PAE功能内生菌的报道较少^[10]。在植物根际接种内生菌不但显著促进了土壤中农药、多环芳烃等有机污染物降解,也明显加速了植物体内有机污染物降解速率^[11-13]。因此,利用植物内生菌同时去除耕地土壤和作物体内的PAE具有重要应用潜力,对于PAE污染土壤的修复和降低人体PAE暴露风险具有十分重要的意义^[10]。

多数PAE降解菌能以一种或多种PAE为碳源进行生长代谢^[8]。然而,自然环境中碳源种类繁多,降解菌对PAE的代谢途径、降解速率等特征

可能因其他碳源存在而发生显著改变^[14]。此外,当土壤中污染物浓度较低时,微生物生长代谢所需的生长基质不足,微生物可能利用其他生长基质以提供生命活动所需的碳源和能源^[15],这些碳源物质可提高土壤微生物活性和相关降解酶活性,从而加速污染物的共代谢降解^[16]。因此,开展微生物对 PAE 的共代谢降解研究,对于强化功能细菌对 PAE 污染土壤的修复作用有重要的理论和现实意义。

本实验室前期研究发现,大蒜及其产地土壤中存在 PAE 污染风险。其中,大蒜中的主要 PAE 污染种类为 DBP,大蒜产地土壤中主要 PAE 检出种类为 DMP(邻苯二甲酸二甲酯)、DEP(邻苯二甲酸二乙酯)、DBP 和 DEHP 等^[17]。基于此,本研究从 PAE 污染大蒜中筛选获得具有降解 PAE 功能的内生菌,通过生理生化试验、结合 16S rRNA 基因测序对内生菌进行种属鉴定,考察了不同内生菌对 PAE 的共代谢降解特性,优化了共代谢降解条件,初步探索了内生菌对中国土壤中主要 PAE 污染类型的降解代谢途径,分析了共代谢底物对 PAE 降解途径的影响。研究结果可以丰富内生菌强化 PAE 降解代谢理论,为进一步利用内生菌进行 PAE 污染土壤的生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 主要仪器 气相色谱仪(岛津 Nexis GC-2030,日本岛津公司产品)、扫描电子显微镜(蔡司 ZEISS EVO-LS10,德国蔡司集团产品)、离子溅射仪(CRESSINGTON 108auto,英国 cressington 公司产品)、临界点干燥仪(Quorum K850,英国 Quorum 公司产品)、全波长酶标仪(Biotek EPOCH2,美国 BioTek 公司产品)、超纯水机(Millipore,美国 Merck Millipore 公司产品)、数显型多管式旋涡混合仪(DMT-2500,郑州明天仪器设备有限公司产品)、超声波清洗器(KQ-500DV,昆山超声仪器有限公司产品)、高通量样品磨样机(CK-2000,北京托摩根生物有限公司产品)、高速冷冻离心机(中科中佳 KDC-220HR,安徽中科中佳科学仪器有限公司产品)。

1.1.2 化学试剂 99.0% DMP、99.5% DEP 和 99.0% DEHP,购自上海麦克林生化科技股份有限公司;99.5%DBP 购自上海凌峰化学试剂有限公司;

98%邻苯二甲酸丁苄酯(BBP)和 98%邻苯二甲酸二辛酯(DnOP),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

6 种 PAE (DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP)混合标准液:用天平称取 6 种 PAE 各 1.0 g,用色谱级乙腈将其定容至 100 ml,配置成 6 种 PAE 质量浓度分别为 10 000 mg/L 的标准液。

色谱级正己烷购自北京迈瑞达科技有限公司;色谱纯乙腈购自德国 Merck 公司;硫酸锰购自国药集团化学试剂有限公司;硫酸镍购自成都科龙化工试剂厂;2,4-二硝基苯酚(DNP)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.1.3 培养基 无机盐培养基(MSM): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.40 g、 K_2HPO_4 0.20 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.20 g、 $CaSO_4$ 0.08 g、微量元素溶液 1 ml,去离子水定容至 1 L,调节 pH 值为 7.2±0.2,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。微量元素溶液参考 Ma 等^[18]的方法配制。

R2A 培养基:胰蛋白胨 0.25 g、酸水解酪蛋白 0.50 g、酵母浸粉 0.50 g、可溶性淀粉 0.50 g、磷酸氢二钾 0.30 g、硫酸镁 0.10 g、丙酮酸钠 0.30 g、蛋白胨 0.25 g、葡萄糖 0.50 g,去离子水定容至 1 L,调节 pH 值为 7.2±0.2。

LB 液体培养基:牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 10.0 g,去离子水定容至 1 L,调节 pH 值为 7.0±0.2,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min 备用。固体培养基分别在上述液体培养基中加琼脂 15 g,灭菌后备用。

20 mmol/L PBS 缓冲液: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.592 8 g、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 5.799 6 g,超纯水定容至 1 L,调节 pH 值为 7.4。

1.2 PAE 降解菌的分离筛选、纯化与鉴定

1.2.1 菌株的分离筛选与纯化 供试大蒜(*Allium fistulosum* L.)品种为大青稞,采集自江苏省农业科学院蔬菜试验田。该试验田长期用于 PAE 污染修复试验,PAE 污染质量分数约 80 mg/kg。待大蒜生长至鳞茎膨大期,随机采集 5 株大蒜苗带回实验室,自来水清洗后,参考冯发运等^[19]的方法进行茎叶部分表面消毒。用无菌剪刀将消毒后的大蒜茎叶样品剪成 2~3 cm 小段,取 4 段样品置于 10 ml 灭菌的塑料离心管中,添加 1 ml 无菌水和 2 颗灭菌的氧化锆陶瓷珠,利用高通量样品磨样机 700

r/min研磨5 min。取研磨液100 μl转入100 ml的LB培养液中,30 ℃、180 r/min摇床振荡培养12 h,5 000 r/min离心5 min收集菌体,MSM清洗3次,将菌体重悬于MSM培养液中,取100 μl菌悬液均匀涂布于MSM固体培养基,该培养基含6种质量浓度均为20 mg/L的PAE。30 ℃条件下培养48 h后,挑取单菌落在以PAE为碳源的MSM固体培养基上划线,对目标菌株进行分离纯化。重复操作5次后,挑选能以PAE为碳源生长的菌株,转入20%甘油中-80 ℃保藏。

1.2.2 菌株鉴定 将保藏的内生菌转接至LB培养液中,30 ℃条件下培养24 h,获得活化菌株。利用革兰氏染色法对细菌进行分类。

氨苄青霉素抗性:将内生菌接种于氨苄青霉素终质量浓度为50 mg/L的LB培养液中,30 ℃、180 r/min摇床培养24 h,观察细菌生长情况。

菌落形态:将活化的菌株在LB培养基上划线,置于30 ℃的恒温培养箱中培养24 h,待菌落形成后,观察并记录其形态、大小、颜色。

细菌形态:内生菌在LB培养液中30 ℃、180 r/min振荡培养12 h,离心收集菌体,20 mmol/L的PBS缓冲液清洗菌体3次,每次10 min。通过光学显微镜初步观察菌株的形态特征。然后,向菌体中加入终体积分数2.5%的戊二醛,混匀后室温下浸泡12 h,8 000 r/min离心5 min,弃上清液收集菌体,用酒精进行梯度洗脱,最后用100%酒精浸泡3次,每次30 min,利用扫描电子显微镜进一步观察菌株的形态特征。

细菌16S rRNA基因测序委托北京擎科生物科技有限公司完成。将获得的菌株16S rRNA序列在NCBI中进行BLAST分析,与GenBank数据库中的基因序列进行同源性比较。利用MEGA7.0软件采用邻位连接法(Neighbour Joining)绘制系统发育树。

1.3 菌株生长曲线的测定

将筛选出的菌株挑取单菌落接种于50 ml LB液体培养基中,在30 ℃、180 r/min下振荡培养30 h,获得种子液,用灭菌的LB培养液调节种子液细菌含量,使其600 nm处吸光值(OD_{600})为1.0。将种子液取1 ml接种于100 ml LB培养基中,每隔2 h测定1次 OD_{600} 值,连续测定30 h,以 OD_{600} 为纵坐标,时间为横坐标,绘制菌株生长曲线。

1.4 菌株对PAE的降解试验

1.4.1 共代谢降解试验 以筛选的菌株为供试菌株,以D-纤维二糖为生长基质、PAE为共代谢底物,开展共代谢降解试验。将筛选得到的菌株分别接种于LB液体培养基中,摇床培养14 h,离心收获菌体,MSM清洗三遍。取197.6 ml MSM液体培养基,依次添加10%吐温80(助溶剂)2 ml^[20]、10 mg/ml的6种PAE混合标准液0.4 ml,将其充分混匀后取20 ml分装于玻璃锥形瓶中,作为未接种菌液样品的对照组(CK),将清洗好的菌株重悬于剩余MSM培养液中,调整培养液初始 OD_{600} 为0.1,分装于玻璃锥形瓶中,设置加D-纤维二糖和不加D-纤维二糖两个处理。加糖浓度为10 mmol/L。将玻璃锥形瓶密封后于180 r/min、30 ℃摇床中培养3 d,取样检测MSM培养基中PAE质量浓度。每处理3次重复。

1.4.2 共代谢降解条件优化 选择降解能力强,且具有氨苄抗性的菌株开展共代谢降解条件优化试验。以吐温80添加量0.1%、10 mmol/L的D-纤维二糖、培养液初始 OD_{600} 0.1为初始值,开展吐温80添加量(0.006%、0.012%、0.025%、0.050%和0.100%),碳源种类(D-葡萄糖、D-果糖、D-纤维二糖、蔗糖和麦芽糖),碳源添加量(1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L和50 mmol/L),细菌接种量(OD_{600} 为0.05、0.10、0.20、0.30、0.40和0.50)对菌株生长及PAE降解的单因素影响试验,依次确定最佳吐温80添加量、最佳碳源种类、最佳碳源添加量、最佳初始接菌量。试验步骤及其他试验条件参考方法1.4.1,以不接菌液处理为对照,每组3次重复。

在最优条件下,进一步研究了菌株对不同质量浓度PAE(1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L和50 mg/L)的降解能力。分别在1 d、2 d、3 d、5 d和7 d取样测定菌株含量(OD_{600})和MSM培养液中PAE残留量,并计算PAE降解率和半衰期^[21]。

$$\text{PAE 降解率}(\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \ln(2/k) \quad (3)$$

式中: C_0 为初始PAE质量浓度(mg/L); C_t 为 t 时间的PAE质量浓度(mg/L); k 为降解速率常数(d^{-1}); $t_{1/2}$ 为半衰期(d)。

1.5 PAE 降解菌代谢途径分析

1.5.1 细菌质粒 DNA 的提取 将筛选获得的菌株 DGB-1 转接于 LB 液体培养基中, 30 °C, 180 r/min 培养 14 h, 取 2 ml 菌液, 根据 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒提取质粒, 菌块中添加 100 mg/ml 的溶菌酶 10 μ l, 供试菌株设置 2 个重复, 枯草芽孢杆菌菌株 W34 为对照 (该菌确认含有质粒)。取 8 μ l 质粒, 加入 2 μ l 的 5 \times Loading buffer, 混匀, 在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 电压为 130 V。通过凝胶成像系统进行观察, 与 Marker 比较确定质粒大小。

1.5.2 胞内粗酶液对 6 种 PAE 的降解 胞内粗酶液制备: 取 10% 的吐温 80 0.4 ml 分别加入 159.6 ml MSM 和 R2A 培养基中, 得到吐温 80 含量为 0.025% 的 MSM 培养基和 R2A 培养基。将 DGB-1 接种于 200 ml 的 LB 中, 30 °C、180 r/min 培养 14 h。离心收获菌体, MSM 培养液清洗 3 遍, 分别重悬于 20 ml R2A 和 MSM 培养基中, 调整菌液含菌量, 使得初始 OD_{600} 为 0.1。设置加菌、菌+糖、菌+PAE、菌+糖+PAE 4 个处理, 加糖处理 *D*-纤维二糖浓度为 10 mmol/L, 加 PAE 处理 6 种 PAE 处理质量浓度均为 20 mg/L。30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 3 d, 离心收获菌体, 20 mmol/L PBS 清洗 3 次, 置于 -20 °C 冰箱冷冻 2 h 后, 取出菌体于灭菌研钵中, 依次加入液氮和 20 mmol/L 的 PBS 缓冲液进行研磨, 研磨液 (粗酶液) 转入 5 ml 容量瓶中并用 PBS 缓冲液定容后, 置于冰浴中保存备用。

PAE 体外降解试验: 取 1.98 ml 粗酶液, 转入 10 ml 玻璃试管中, 添加 20 μ l 1 000 mg/L 的 6 种 PAE 标液 (溶剂为乙腈), 使 PAE 终质量浓度为 10 mg/L, 用无菌橡胶塞密封后, 置于 37 °C 培养箱中反应 4 h 后, 向试管中添加 2 ml 正己烷提取 PAE, 利用气相色谱法 (GC) 分析粗酶液中 PAE 含量。

1.5.3 DNP (2,4-二硝基苯酚)、 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 对 6 种 PAE 降解的影响 取 10% 吐温 80 0.4 ml、10 g/L 的 6 种 PAE 混合液 0.32 ml 加入 159.28 ml 的无机盐培养基中, 得到吐温 80 含量 0.025%、PAE 含量 20 mg/L 的无机盐培养基。将菌株 DGB-1 接种于 LB 培养基, 30 °C、180 r/min 下培养 14 h, 菌液离心弃上清液后获得菌体, MSM 培养基清洗 3 次, 将清洗后的菌体重悬于上述无机盐培养基中, 调整细菌含量使得培养基初始 OD_{600} 为 0.2。设置 2 组试验, 第 1 组设置 4 个不同的处理, 分别为不加糖不加 DNP

(-糖-DNP)、不加糖加 DNP (-糖+DNP)、加糖不加 DNP (+糖-DNP) 和加糖加 DNP (+糖+DNP)。其中, DNP 终浓度为 0.5 mmol/L, *D*-纤维二糖终浓度为 10 mmol/L; 第 2 组设置 5 个不同的处理, 分别为加糖 (+糖)、加糖加 0.1 mmol/L Mn^{2+} (+糖+0.1 mmol/L Mn^{2+})、加糖加 1.0 mmol/L Mn^{2+} (+糖+1.0 mmol/L Mn^{2+})、加糖加 0.1 mmol/L Ni^{2+} (+糖+0.1 mmol/L Ni^{2+})、加糖加 1.0 mmol/L Ni^{2+} (+糖+1.0 mmol/L Ni^{2+}), *D*-纤维二糖终浓度为 10 mmol/L。以不加细菌而加入等体积灭菌生理盐水的处理为空白对照, 每处理 3 次重复, 摇床中振荡培养, 3 d 后取样测定 OD_{600} 、提取 MSM 培养基中的 PAE, 并利用 GC 法测定 PAE 含量。

1.6 样品中 PAE 提取及检测分析

MSM 培养基中 PAE 提取: 参考 Li 等^[22] 的提取方法稍加改进, 移液器移取 2 ml MSM 培养基, 移入 10 ml 玻璃管中, 添加 2 ml 正己烷, 多管式旋涡混合仪 2 000 r/min 涡旋 2 次, 每次 5 min, 超声提取 2 min, 离心 5 min 后取上层有机相, 利用气相色谱仪分析 6 种 PAE 含量。

采用 GC 法分析样品中 PAE 含量, 仪器色谱工作条件如下: 色谱柱为 SH-Rtx-5 (30.00 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m); 载气为高纯氮气, 辅助气体为高纯氢气和普通空气, 色谱柱流量 1.21 ml/min, 分流比 2.0, 进样量 1.0 μ l, 进样口温度 280 °C。柱箱升温程序: 初始温度 120 °C, 保持 1 min, 以 20 °C/min 速率升温至 220 °C, 以 5 °C/min 速率升温至 235 °C, 以 10 °C/min 速率升温至 245 °C, 以 5 °C/min 速率升温至 255 °C, 保持 2 min, 再以 10 °C/min 速率升温至 275 °C, 保持 2 min。

1.7 数据处理

采用 Excel 2016 和 Origin 2021 软件制图。采用 SPSS 22.0 进行数据统计分析, 不同试验组间差异性比较采用单因素方差分析或 Tukey's 多重比较法进行显著性检验。

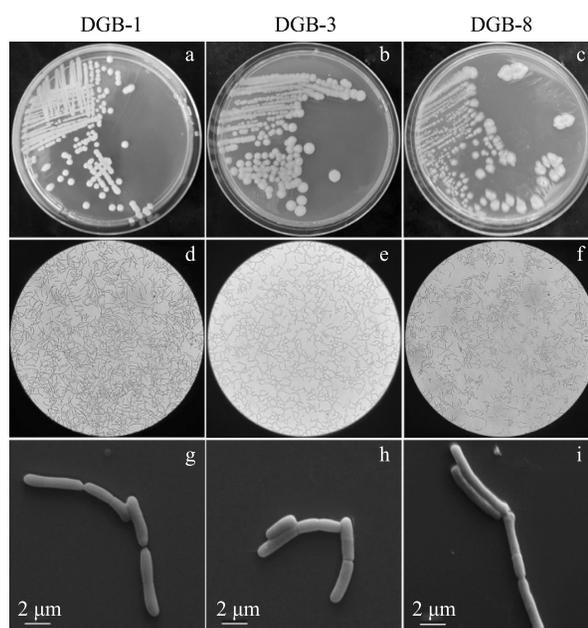
2 结果与讨论

2.1 PAE 降解菌的分离与鉴定

通过多次分离纯化后, 获得 3 株可以 PAE 为碳源生长的植物内生细菌, 分别命名为 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8。革兰氏染色后 3 株菌株均呈现红色。氨苄青霉素抗性试验结果显示, DGB-1 和 DGB-8 可耐

受 50 mg/L 的氨苄青霉素,但 DGB-3 不具有氨苄青霉素耐受性。3 株菌株的菌落均为圆形、乳白色、不透明,其中 DGB-1、DGB-3 菌落边缘整齐(图 1a 和图 1b),而 DGB-8 菌落边缘呈锯齿状(图 1c)。

在光学显微镜下,3 株菌株均为长杆状(图 1d~图 1f);扫描电镜结果进一步证明 3 株菌株为杆状细菌,其中 DGB-1 和 DGB-3 形态较为类似,呈短链排列(图 1g 和图 1h),而 DGB-8 则呈长链排列(图 1i)。将 3 株细菌的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对,并通过邻接法构建系统发生树。结果表明,3 株菌株与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)相似度最高,其中 DGB-1 和 DGB-3 的亲缘关系较近,DGB-8 与上述 2 株菌株亲缘关系相对较远,而与巨大芽孢杆菌 EGI278 的亲缘关系更为接近。DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 与同样能利用 DMP、DEP、DBP、DE-HP 和 DnOP 等多种 PAE 为碳源生长的美人蕉内生巨大芽孢杆菌 YJB3^[10]的亲缘关系相对较远(图 2)。基于 3 株菌株的生理生化特征和 16S rRNA 基因测序鉴定结果,DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 均鉴定为巨大芽孢杆菌。



a、b 和 c 分别为菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 的菌落形态;d、e 和 f 分别为菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 的光学显微镜形态($\times 400$);g、h 和 i 分别为菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 的扫描电镜形态。

图 1 菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 的形态特征

Fig.1 The morphological characteristics of DGB-1, DGB-3 and DGB-8

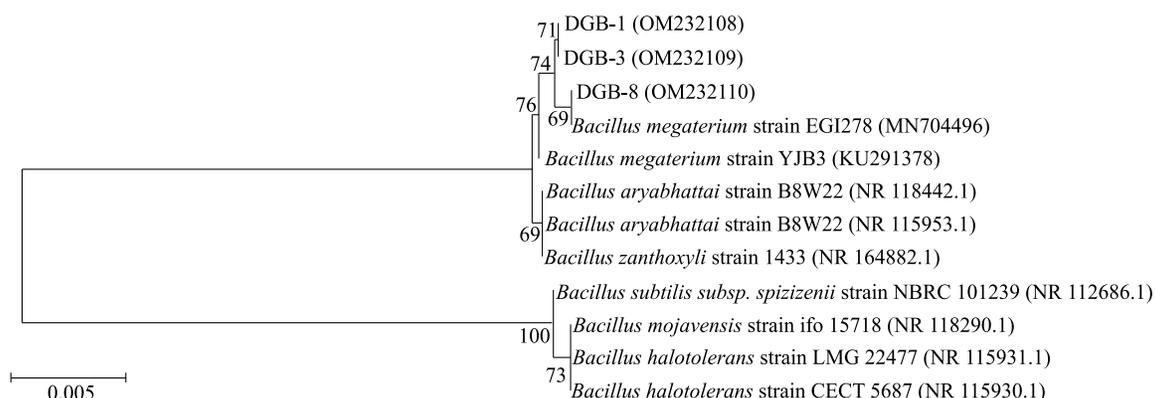


图 2 菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 的系统发生树

Fig.2 Phylogenetic tree of DGB-1, DGB-3 and DGB-8

2.2 菌株的生长曲线

如图 3 所示, LB 培养基中菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 在 0~4 h 生长较慢,处于迟缓生长期;4 h 后细菌繁殖速度明显加快,进入对数生长期;12 h 后 3 株菌株生长速率又再次减慢并在 24 h 后逐渐进入稳定生长期。此外,在细菌培养的 30 h 内,DGB-1 和 DGB-3 的生长速率无显著性差异;4~12 h,DGB-8 的生长速率显著低于 DGB-1 和 DGB-3,14

h 后 3 株菌株的生长速率无显著性差异(图 3)。基于 3 株菌株的生长特点,选择接种 14 h 菌龄的细菌开展后续 PAE 降解试验。

2.3 菌株的共代谢降解

如图 4 所示,不加糖的情况下,处理 3 d 后,加菌处理组 MSM 培养液中的 PAE 含量仅比对照下降 0.89%~10.40%,仅 DGB-1 菌株对 DBP 和 BBP 的降解率与 CK 有显著差异。这说明不加糖情况下

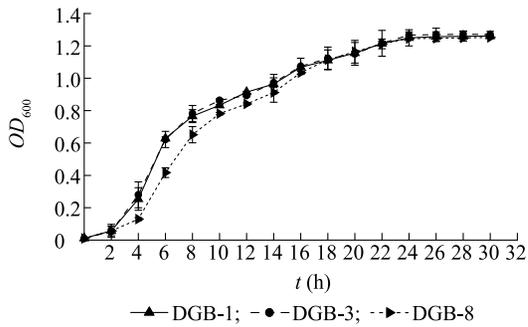


图3 菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 的生长曲线

Fig.3 The growth curve of DGB-1, DGB-3 and DGB-8

DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 对 6 种 PAE 的降解能力均较差。添加 *D*-纤维二糖后,菌株 DGB-1 对 DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 的降解率分别为 47.8%、89.5%、100.0%、100.0%、56.4% 和 79.4%;菌株 DGB-3 对 DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 的降解率分别为 50.7%、90.9%、100.0%、100.0%、53.2% 和 74.9%;菌株 DGB-8 对 DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 的降解率分别为 11.1%、20.8%、30.5%、29.4%、10.1% 和 13.2%。以 *D*-纤维二糖为共代谢基质,可显著提高 3 株菌株对 6 种 PAE 的降解能力。DGB-1 与 DGB-3 对 6 种 PAE 均有较高的降解能力,两者之间无显著差异,而 DGB-8 对 6 种 PAE 的降解率均显著低于 DGB-1 和 DGB-3。Feng 等^[10]的研究结果也表明,添加醋酸钠作为外源碳源可显著促进巨大芽孢杆菌 YJB3 对 PAE 的共代谢降解^[23]。这可能是由于 PAE、多环芳烃(PAH)等有机污染物很难直接作为碳源被微生物利用^[23],而糖类、有机酸和氨基酸等化合物在为微生物提供营养的同时,也可为微生物生长代谢提供电子受体或供体,从而促进微生物对有机污染物的降解能力,该共代谢现象在高分子量、难降解的有机污染物中较为常见^[16,24]。

由于 DGB-1 具有较好的 PAE 降解能力,且对氨苄青霉素有较高的抗性,所以选择 DGB-1 开展共代谢降解条件优化试验。

2.4 菌株 DGB-1 的共代谢降解条件优化

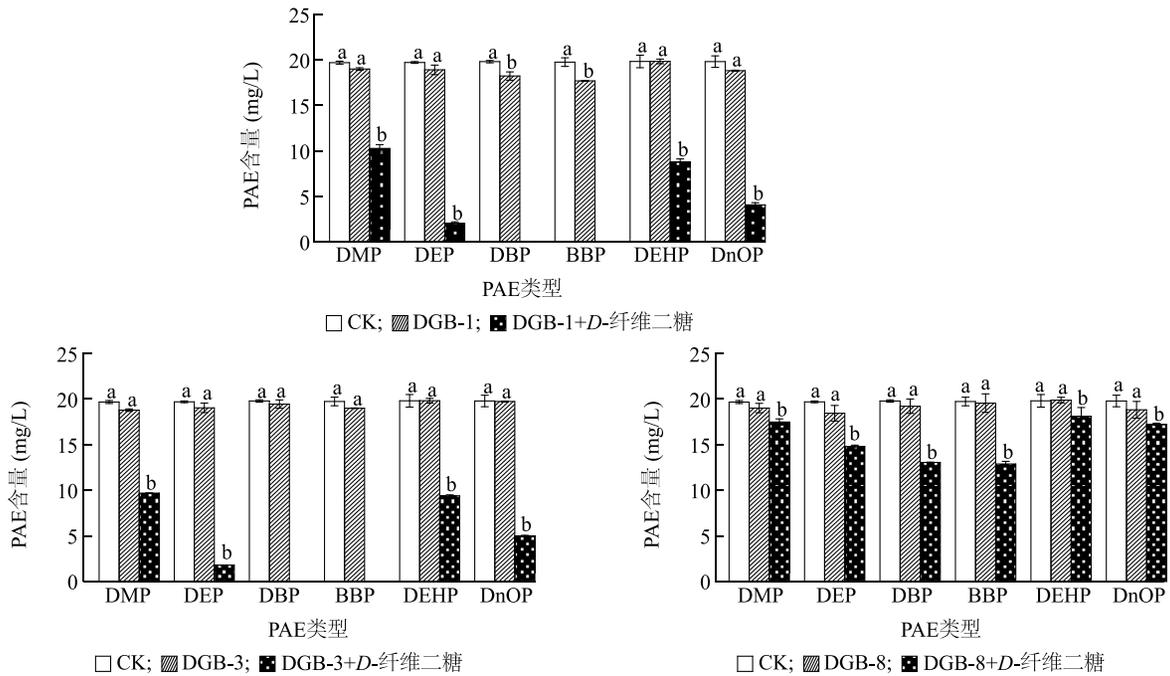
2.4.1 PAE 生物降解的影响因素 吐温 80 常作为增溶剂促进介质中 PAE 溶解^[20]。不同初始吐温 80 添加量对 6 种 PAE 降解率的影响如图 5A 所示。吐温 80 添加量在 0.006%~0.100%,DBP 和 BBP 的降解率均接近 100%;而 DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解率随着吐温 80 添加量增加呈先增加后下降的

趋势。当吐温 80 添加量为 0.025%时,6 种 PAE 的降解率均达最大值(图 5A),因此最佳吐温 80 添加量为 0.025%。

在吐温 80 添加量为 0.025%条件下,不同共代谢基质(碳源种类)对 6 种 PAE 降解率的变化如图 5B 所示。与不加碳源的 CK 比,所有碳源处理组 6 种 PAE 的降解率显著增加,说明 5 种碳源均可促进 DGB-1 对 6 种 PAE 的降解。这可能与添加碳源显著促进了细菌生长有关。通过酶标仪检测菌液的 OD_{600} ,发现添加碳源处理组 OD_{600} (0.535~0.690) 显著高于 CK (0.107),即添加碳源, DGB-1 的生物量得到显著提升。从碳源类型看,二糖(麦芽糖、蔗糖和 *D*-纤维二糖)对 DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 的促降解效果显著优于单糖(葡萄糖和果糖)。然而,二糖处理组菌液 OD_{600} (0.535~0.568) 均低于单糖处理组 (0.639~0.690),说明细菌生物量增加不是促进 PAE 降解的唯一原因,可能参与二糖水解释的部分酶类对 PAE 的降解有促进作用^[25-26]。此外,添加 *D*-纤维二糖后,DGB-1 对 DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 的降解率分别达 34.6%、65.9%、100.0%、100.0%、50.5% 和 44.4%,对部分 PAE 降解率显著优于麦芽糖和蔗糖。因此,最佳碳源种类为 *D*-纤维二糖。

在最优吐温 80 添加量的条件下,不同 *D*-纤维二糖浓度对 6 种 PAE 降解率的影响如图 5C 所示。随着 *D*-纤维二糖浓度的增加,DEHP 和 DnOP 的降解率不断增加,而 DMP、DEP、DBP 和 BBP 的降解率呈先增加后降低的趋势。检测 DGB-1 菌液的 OD_{600} ,发现 *D*-纤维二糖浓度为 1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L 和 50 mmol/L 时菌液 OD_{600} 值分别为 0.207、0.464、0.585、1.373 和 1.423,说明随着碳源浓度增加 DGB-1 的生物量显著增加。当 *D*-纤维二糖初始浓度为 10 mmol/L 时,除 DEHP 和 DnOP 外的 4 种 PAE 降解率均达到最大值,因此最优碳源浓度为 10 mmol/L。

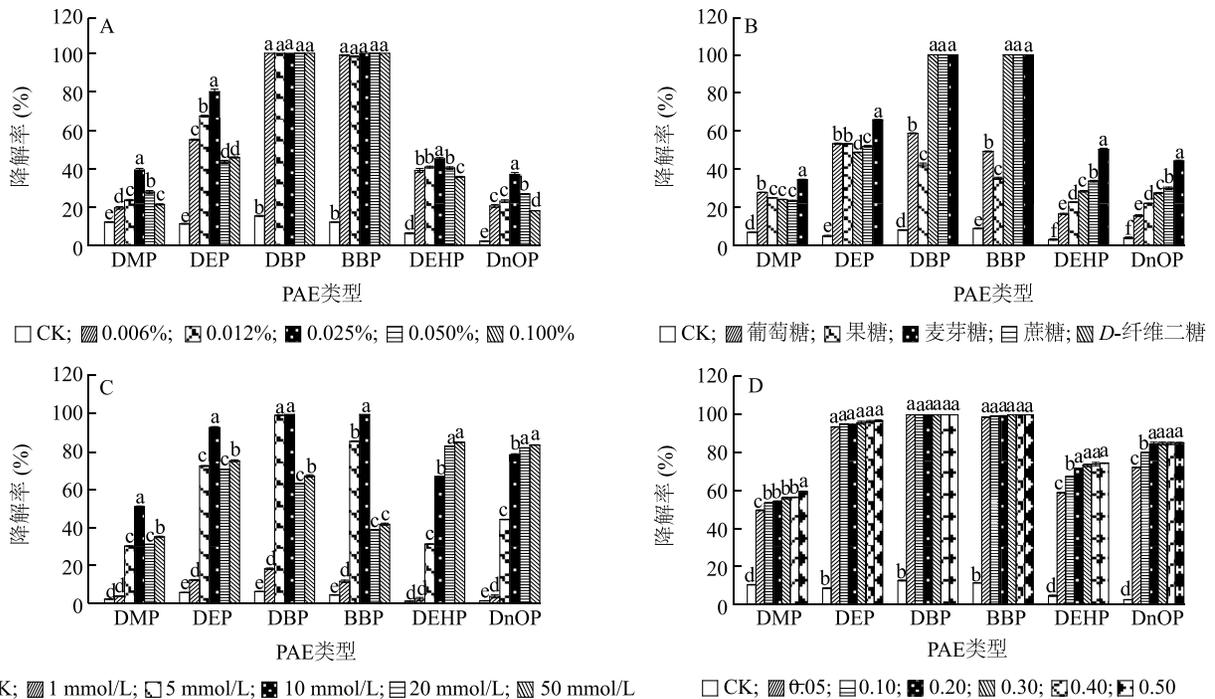
不同接菌量对菌株 DGB-1 降解 PAE 的影响如图 5D 所示。随着初始接菌量增加,6 种 PAE 的降解率均呈增加趋势,证明细菌生物量增加可促进 PAE 降解。此外,菌株 DGB-1 菌液的 OD_{600} 由 0.05 增加至 0.50,6 种 PAE 的降解率仅增加 1.25%~21.0%,说明细菌生物量增加不是影响 6 种 PAE 降解的主要因素。当初始接菌量 $OD_{600} \geq 0.2$ 时,菌株



PAE:邻苯二甲酸酯;DMP:邻苯二甲酸二甲酯;DEP:邻苯二甲酸二乙酯;DBP:邻苯二甲酸二丁酯;BBP:邻苯二甲酸二苄酯;DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯;DnOP:邻苯二甲酸二辛酯。不同小写字母表示相同 PAE 不同处理间有显著差异($P<0.05$)。

图4 菌株 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8 对 6 种 PAE 的共代谢降解特性

Fig.4 Co-metabolic degradation characteristics of six phthalic acid esters (PAEs) by DGB-1, DGB-3 and DGB-8



A:吐温 80 添加量;B:碳源种类;C:碳源浓度;D:接菌量(菌液 OD_{600})。PAE、DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 4 注。不同小写字母表示相同 PAE 不同处理间有显著差异($P<0.05$)。

图5 不同初始条件对菌株 DGB-1 降解 6 种 PAE 的影响

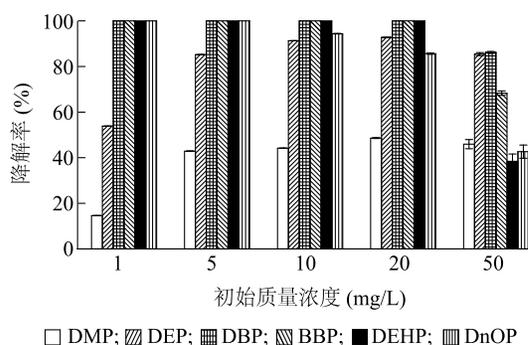
Fig.5 Effects of different initial conditions on degradation of six PAEs by DGB-1

DGB-1 对 DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 5 种 PAE 的降解率增加不显著,因此菌株 DGB-1 菌液的

OD_{600} 等于 0.2 为最优初始接种量。

以上单因素试验结果表明,菌株 DGB-1 的共代谢优化条件是吐温 80 添加量 0.025%、10 mmol/L 的 *D*-纤维二糖为共代谢基质、适宜接种量是菌液的 OD_{600} 为 0.20。此外,菌株 DGB-1 生物量的增加与 PAE 的降解率上升并不成比例,说明菌液生物量增加并不是提高 PAE 降解率的主要原因,添加碳源作为共代谢底物,菌株 DGB-1 细胞中催化 PAE 降解的酶活性增强可能是 PAE 加速降解的重要原因之一。

2.4.2 最优条件下菌株 DGB-1 对 6 种 PAE 的降解特性 基于最优降解条件,菌株 DGB-1 对不同初始质量浓度 PAE 处理 3 d 后的降解特性如图 6 所示。当 PAE 初始质量浓度 ≤ 20 mg/L, DGB-1 可完全降解 DBP、BBP 和 DEHP; DMP、DEP 和 DnOP 的降解率最高可达 48.6%、92.8% 和 100.0%, 说明菌株 DGB-1 对 6 种 PAE 均具有良好的降解效果,且具备同时降解 6 种 PAE 的潜力。此外,6 种 PAE 在 MSM 培养基中的降解动态均符合一级动力学方程(表 1)。当 PAE 质量浓度为 5 mg/L, DBP 和 BBP 的 $t_{1/2}$ 值分别为 0.66 d 和 0.91 d, 说明菌株 DGB-1 对短链 PAE (碳链长度 < 7) 的降解速度较快。此外,菌株 DGB-1 对高相对分子质量、难降解的长链 PAE 如 DEHP 和 DnOP 的降解速度也很快 ($t_{1/2}$ 值分别为 1.08 d 和 0.67 d)。当 PAE 质量浓度增加至 50 mg/L, DGB-1 对 PAE 的降解半衰期均明显延长 (DEP 除外), 其中 DBP、BBP 和 DMP 的半衰期延长 1~2 d, 而 DEHP 和 DnOP 的降解半衰期延长了 6 d 以上(表 1)。这可能是由于高浓度 PAE 胁迫导致菌株 DGB-1 细胞生长速率的变化所致^[27-28]。



DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 4 注。

图 6 不同 PAE 初始质量浓度下菌株 DGB-1 对 6 种 PAE 的降解特性

Fig.6 Biodegradation of six PAEs by strain DGB-1 under different initial concentrations of PAEs

表 1 6 种 PAE 在 MSM 培养基中的降解动力学方程拟合参数

Table 1 Fitting parameters of degradation kinetic equations of six PAEs in inorganic salt medium

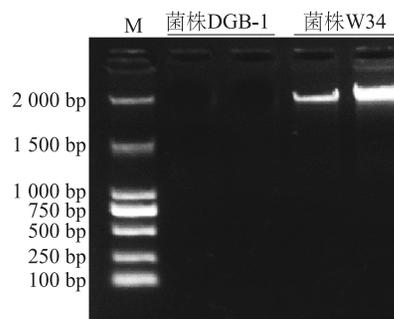
PAE 质量浓度 (mg/L)	PAE 类型	K 值	R ²	t _{1/2} (d)
5	DMP	0.089 1	0.97	7.78
	DEP	0.298 7	0.91	2.32
	DBP	1.043 3	0.99	0.66
	BBP	0.765 4	1.00	0.91
	DEHP	0.643 5	0.99	1.08
	DnOP	1.028 9	1.00	0.67
50	DMP	0.076 9	0.99	9.01
	DEP	0.305 5	0.94	2.27
	DBP	0.325 7	0.96	2.13
	BBP	0.348 1	0.98	1.99
	DEHP	0.088 4	0.97	7.84
	DnOP	0.103 1	0.95	6.72

DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 4 注。

2.5 菌株 DGB-1 的 PAE 降解途径

微生物对 PAE、PAH 等有机污染物的降解主要依赖其降解酶^[10,29], 而酶的编码基因可能位于其基因组或质粒上^[30-31], 细菌对 PAE 的降解也可能是质粒和染色体上基因共同作用的结果。然而, 菌株 DGB-1 是否携带质粒、质粒基因组中是否含有 PAE 降解基因尚不清楚。

2.5.1 菌株质粒 DNA 提取 以含质粒的枯草芽孢杆菌 W34 为对照, 提取了菌株 DGB-1 的质粒 DNA。如图 7 所示, 菌株 W34 存在质粒, 基因片段大小约 2 kb, 说明质粒提取方法适用于革兰氏阳性菌。然而, 添加菌株 DGB-1 质粒 DNA 的泳道无条带, 说明菌株 DGB-1 不携带可降解 PAE 基因的质粒。研究结果表明, 菌株 DGB-1 的 PAE 降解基因位于该菌的染色体上。



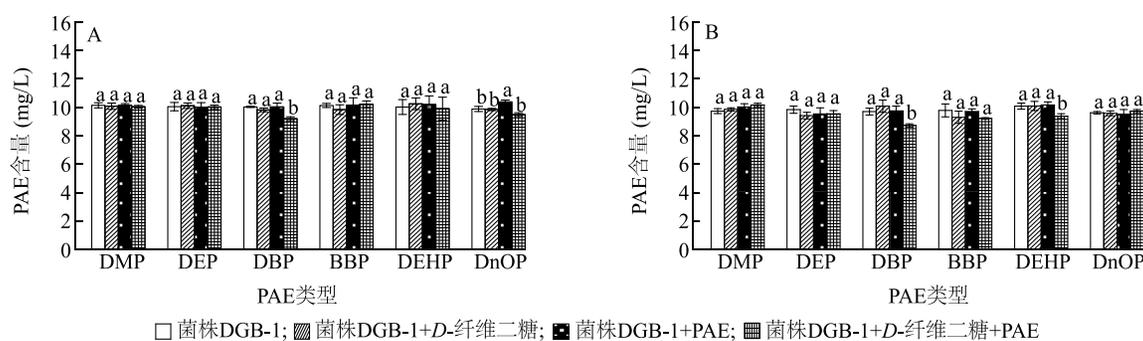
M 为标准 DNA 对照。

图 7 细菌质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.7 Agarose gel electrophoresis of bacterial plasmid DNA

2.5.2 粗酶液对 PAE 的降解作用 与细菌对其他有机污染物降解类似,细菌对 PAE 的降解主要依赖其酶的催化作用^[27,32]。不同培养基培养 3 d 后,菌株 DGB-1 的粗酶液对 6 种 PAE 的降解作用如图 8 所示。PAE 胁迫条件下,与不加糖的 CK 比,加糖处理组 DBP 含量(图 8A 和 8B)、DnOP 含量(图 8A)和 DEHP 含量(图 8B)显著下降,说明 PAE 胁迫下加糖可激活 DBP、DEHP 和 DnOP 降解酶的活性。本研究发现加糖可以显著促进菌株 DGB-1 对 DBP 的降解(图 4A),并且菌株 DGB-1 的粗酶液也具有一定的 DBP 降解能力,但粗酶液对 DBP 的降解率

仅 8.1%~12.8%(图 8A 和 8B),说明菌株 DGB-1 对 DBP 的水解作用较弱。此外,加糖处理组 MSM 培养基培养细菌制备的粗酶液不具备 DEHP 催化活性(图 8A),而寡营养培养基 R2A 培养细菌制备的粗酶液具有 DEHP 催化活性(图 8B),说明菌株 DGB-1 降解酶基因的启动子可能为诱导型。然而,在 PAE 和 *D*-纤维二糖的共同诱导下,虽然菌株 DGB-1 的粗酶液对 DEHP 和 DnOP 有一定的降解能力,但 DEHP 和 DnOP 的降解率仅为 8.58% 和 7.78%,说明菌株 DGB-1 对 DEHP 和 DnOP 的水解作用也较弱。



A: MSM 培养基培养的细胞制备的粗酶液; B: R2A 培养基培养的细胞制备的粗酶液。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 4 注。不同小写字母表示同一类 PAE 处理间有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 8 菌株 DGB-1 胞内酶粗提液对 PAE 的降解

Fig.8 Degradation of PAEs by intracellular enzyme extracts of DGB-1

2.5.3 细菌呼吸链系统对菌株 DGB-1 降解 6 种 PAE 的影响 上述分析表明,加糖条件下菌株 DGB-1 对 DBP 的降解率可达 100%(图 4A),但菌株 DGB-1 的胞内酶粗提液对 DBP 的水解作用较弱(图 8),推测菌株 DGB-1 还存在其他的 DBP 降解代谢途径。因此,进一步研究了呼吸链系统(氧化还原酶系)对菌株 DGB-1 降解 PAE 的影响。

DNP 作为解耦联剂可以抑制细菌细胞膜上的氧化磷酸化过程,从而抑制细菌的呼吸作用^[33]。如图 9A 所示,与 CK 相比,加糖不加 DNP 处理下, DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 的降解率分别为 41.10%、81.26%、100.00%、97.67%、41.25% 和 79.41%,加糖加 DNP 处理组 6 种 PAE 的降解率分别为 24.81%、51.20%、60.00%、48.80%、30.37%、61.47%,比加糖不加 DNP 处理均显著下降,说明 DNP 抑制了 6 种 PAE 的降解。同样不加糖时,加 DNP 处理的降解率亦低于不加 DNP 处理。此外,加糖不加 DNP 处理组与加糖加 DNP 处理组

菌液 OD_{600} 分别为 0.766 和 0.761,表明 DNP 对菌株 DGB-1 生长的影响不显著。说明菌株 DGB-1 细胞膜上的呼吸链系统参与了 6 种 PAE 的降解代谢。

Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 属于过渡金属离子,具有可变的氧化数,可与底物(PAE)发生电子交换作用,从而促进底物的氧化还原过程^[34-35]。如图 9B 和 9C 所示,添加 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 显著促进了菌株 DGB-1 对 6 种 PAE 的降解,且随着 Mn^{2+} 和 Ni^{2+} 浓度增加 PAE 降解率均呈增加趋势。这说明细胞膜氧化还原反应的增强可促进 PAE 降解。

3 结论

从大蒜中筛选获得 3 株 PAE 降解菌 DGB-1、DGB-3 和 DGB-8,鉴定分析均为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。虽然 3 株菌能以 6 种 PAE 为碳源生长,但对 6 种 PAE 的降解能力均较弱。糖类可显著促进 3 株细菌对 PAE 的共代谢降解。添加糖类作为生长基质,菌株 DGB-1 和 DGB-3 对 DBP

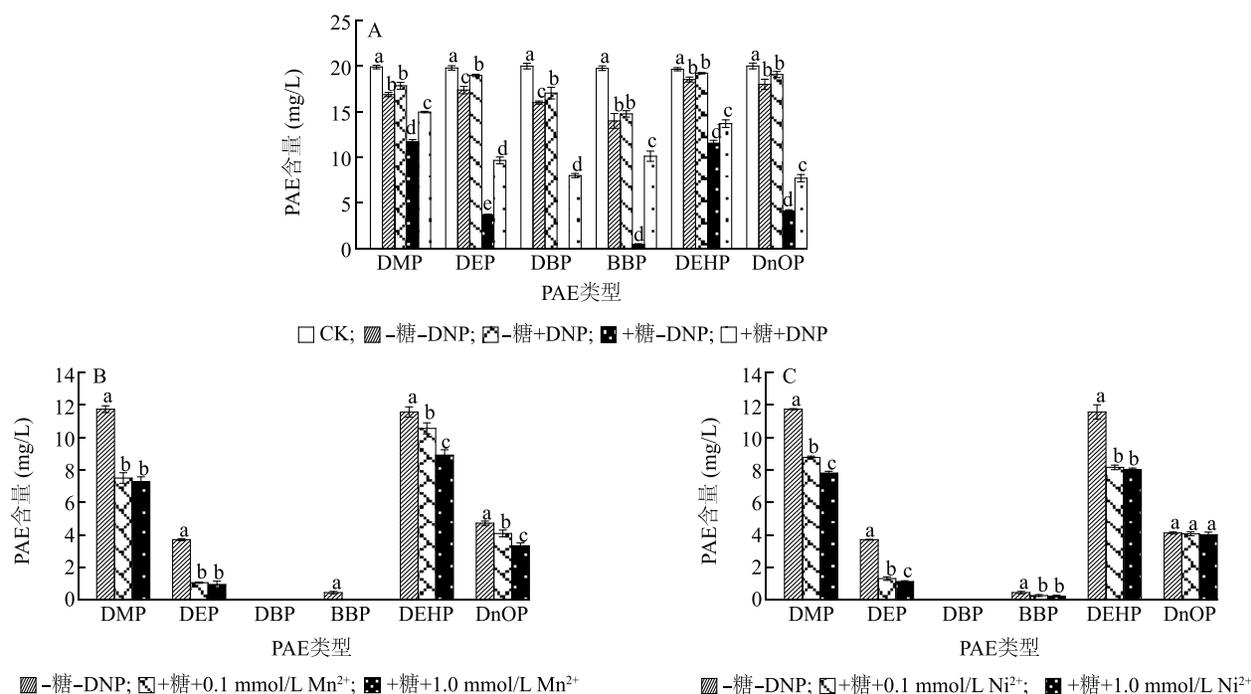


图9 DNP、Mn²⁺和Ni²⁺对菌株DGB-1降解6种PAE的影响
A: DNP处理组; B: Mn²⁺处理组; C: Ni²⁺处理组。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP见图4注。不同小写字母表示同一类PAE处理间有显著差异(P < 0.05)。

图9 Effects of 2,4-dinitrophenol (DNP), Mn²⁺ and Ni²⁺ on the degradation of six PAEs by strain DGB-1

和BBP的降解率可达100%。吐温80添加量、碳源种类、碳源浓度和细菌接种量对菌株DGB-1生长及PAE降解均有显著影响。最佳降解条件是吐温80添加量0.025%, 10 mmol/L的D-纤维二糖为共代谢基质, 菌株DGB-1接种量OD₆₀₀为0.2。研究还发现菌株DGB-1不携带质粒, 说明该菌的PAE降解基因位于其染色体上。菌株DGB-1可同时通过水解和氧化还原2种途径降解PAE。其中, 在PAE和D-纤维二糖的共同诱导下, 菌株DGB-1可通过水解途径完成对DBP、DEHP和DnOP的第一步降解, 但对这3种PAE的水解作用较弱; 菌株DGB-1可通过氧化还原途径降解DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP和DnOP, 添加Mn²⁺和Ni²⁺显著提高了菌株DGB-1对这6种PAE的降解速率。

参考文献:

- [1] WANG J, CHEN G, CHRISTIE P, et al. Occurrence and risk assessment of phthalate esters (PAEs) in vegetables and soils of suburban plastic film greenhouses [J]. Science of the Total Environment, 2015, 523: 129-137.
- [2] MENG K, REN W, TENG Y, et al. Application of biodegradable

seedling trays in paddy fields: Impacts on the microbial community [J]. Science of the Total Environment, 2019, 656: 750-759.

- [3] KONG S, JI Y, LIU L, et al. Diversities of phthalate esters in suburban agricultural soils and wasteland soil appeared with urbanization in China [J]. Environmental Pollution, 2012, 170: 161-168.
- [4] 冯宇希, 涂茜颖, 冯乃宪, 等. 我国温室大棚邻苯二甲酸酯(PAEs)污染及综合控制技术进展[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(10): 2239-2250.
- [5] WANG J, LUO Y, TENG Y, et al. Soil contamination by phthalate esters in Chinese intensive vegetable production systems with different modes of use of plastic film [J]. Environmental Pollution, 2013, 180: 265-273.
- [6] FENG N X, LIANG Q F, FENG Y X, et al. Improving yield and quality of vegetable grown in PAEs-contaminated soils by using novel bioorganic fertilizer [J]. Science of the Total Environment, 2020, 739: 139883.
- [7] CHENG J, LIU Y, WAN Q, et al. Degradation of dibutyl phthalate in two contrasting agricultural soils and its long-term effects on soil microbial community [J]. Science of the Total Environment, 2018, 640: 821-829.
- [8] 韩永和, 何睿文, 李超, 等. 邻苯二甲酸酯降解细菌的多样性、降解机理及环境应用 [J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 37-49.
- [9] ZHAO H M, DU H, HUANG C Q, et al. Bioaugmentation of ex-

- ogenous strain *Rhodococcus* sp. 2G can efficiently mitigate di-(2-ethylhexyl) phthalate contamination to vegetable cultivation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67 (25): 6940-6949.
- [10] FENG N X, YU J, MO C H, et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate (DBP) by a novel endophytic *Bacillus megaterium* strain YJB3[J]. Science of the Total Environment, 2018, 616: 117-127.
- [11] FENG F Y, ZHAN H L, WAN Q, et al. Rice recruits *Sphingomonas* strain HJY-rfp via root exudate regulation to increase chlorpyrifos tolerance and boost residual catabolism[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(15): 5673-5686.
- [12] FENG F Y, GE J, LI Y, et al. Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability [J]. Chemosphere, 2017, 184: 505-513.
- [13] SUN K, LIU J, GAO Y, et al. Inoculating plants with the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp to reduce phenanthrene contamination[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(24): 19529-19537.
- [14] 张银萍,王芳,杨兴伦,等. 土壤中中环多环芳烃微生物降解的研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 280-288.
- [15] GRANDCLEMENT C, SEYSSIECQ I, PIRAM A, et al. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review [J]. Water Research, 2017, 111: 297-317.
- [16] 王亚,冯发运,葛静,等. 植物根系分泌物对土壤污染修复的作用及影响机理[J]. 生态学报, 2022, 42(3): 829-842.
- [17] 王亚,肖霞霞,杨云,等. 江苏产区大蒜中邻苯二甲酸酯含量检测及溯源分析[J]. 环境科学, 2023. doi: 10.13227/j.hjxx.202204278.
- [18] MA Z, LIU J, DICK R P, et al. Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain *Pseudomonas* sp. Ph6 [J]. Environmental Pollution, 2018, 240:359-367.
- [19] 冯发运,朱宏,李俊领,等. 一株小飞蓬内生毒死蜱降解菌的分离鉴定及其降解特性初探[J]. 农药学报, 2015, 17(1): 89-96.
- [20] KONG X, JIN D, TAI X, et al. Bioremediation of dibutyl phthalate in a simulated agricultural ecosystem by *Gordonia* sp. strain QH-11 and the microbial ecological effects in soil[J]. Science of the Total Environment, 2019, 667: 691-700.
- [21] CHENG J, WAN Q, GE J, et al. Major factors dominating the fate of dibutyl phthalate in agricultural soils[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 183: 109569.
- [22] LI Y, YAN H, LIU Q, et al. Accumulation and transport patterns of six phthalic acid esters (PAEs) in two leafy vegetables under hydroponic conditions[J]. Chemosphere, 2020, 249: 126457.
- [23] PANDEY J, CHAUHAN A, JAIN R K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(2): 324-375.
- [24] RENTZ J A, ALVARE P J J, SCHNOOR J L. Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02[J]. Environmental Pollution, 2008, 151(3): 669-677.
- [25] CHEN X, ZHANG X L, YANG Y, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-n-butyl phthalate by newly isolated *Camelimonas* sp. and enzymatic properties of its hydrolase [J]. Biodegradation, 2015, 26(2): 171-182.
- [26] HUANG Y H, HUANG X J, CHEN X H, et al. Biodegradation of di-butyl phthalate (DBP) by a novel endophytic bacterium *Bacillus subtilis* and its bioaugmentation for removing DBP from vegetation slurry [J]. Journal of Environmental Management, 2018, 224: 1-9.
- [27] ZHAO H M, HU R W, HUANG H B, et al. Enhanced dissipation of DEHP in soil and simultaneously reduced bioaccumulation of DEHP in vegetable using bioaugmentation with exogenous bacteria [J]. Biology and Fertility of Soils, 2017, 53(6): 663-675.
- [28] CHANG B V, YANG C M, CHENG C H, et al. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains [J]. Chemosphere, 2004, 55(4): 533-538.
- [29] SUBASHCHANDRABOSE S R, VENKATESWARLU K, NAIIDU R, et al. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: Over expression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP[J]. Science of the Total Environment, 2019, 651:813-821.
- [30] PENG R H, XIONG A S, XUE Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 927-955.
- [31] EATON R W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(12):3689-3703.
- [32] XU W J, WAN Q, WANG W F, et al. Biodegradation of dibutyl phthalate by a novel endophytic *Bacillus subtilis* strain HB-T2 under *in-vitro* and *in-vivo* conditions[J]. Environmental Technology, 2022, 43(13):1917-1926.
- [33] ZHANG S, RENSING C, ZHU Y G. Cyanobacteria-mediated arsenic redox dynamics is regulated by phosphate in aquatic environments[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(2): 994-1000.
- [34] XU J J, ZHU X L, ZHANG Q Q, et al. Roles of MnO₂ on performance, sludge characteristics and microbial community in anammox system[J]. Science of the Total Environment, 2018, 633: 848-856.
- [35] TIAN H, LI J, MU Z, et al. Effect of pH on DDT degradation in aqueous solution using bimetallic Ni/Fe nanoparticles[J]. Separation and Purification Technology, 2009, 66(1): 84-89.

(责任编辑:石春林)