

杨 云, 肖霞霞, 陈小龙, 等. 一株植物内生枯草芽孢杆菌对 6 种邻苯二甲酸酯的共代谢降解[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 393-404.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.02.012

一株植物内生枯草芽孢杆菌对 6 种邻苯二甲酸酯的共代谢降解

杨 云^{1,2}, 肖霞霞^{1,2}, 陈小龙^{2,3}, 程金金^{2,3}, 余向阳^{2,3}, 王 亚^{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 222000; 2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 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: 从邻苯二甲酸酯(PAEs)污染的青菜(*Brassica rapa* var. *chinensis*)中筛选获得 1 株编号为 W34 的内生菌。通过生理生化特征和 16S rRNA 基因测序对该菌进行鉴定,并研究 W34 对 6 种 PAEs 的共代谢降解特性,优化共代谢降解条件,初步探索共代谢基质对 W34 降解代谢 PAEs 的影响。结果表明,内生菌 W34 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),该菌能以 6 种 PAEs 为碳源生长,可同时降解邻苯二甲酸二正丁酯(DBP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)和邻苯二甲酸二正辛酯(DnOP) 6 种 PAEs。其中,该菌对 DBP 和 BBP 的降解能力较强,20 mg/L 质量浓度下 DBP 和 BBP 的降解半衰期均小于 0.33 d。添加 D-纤维二糖为共代谢基质,W34 对 DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解率均显著提升。吐温-80 添加量、碳源种类、碳源质量浓度和接种量对这 4 种 PAEs 的降解率均有显著影响。通过单因素试验,得到该菌的吐温-80 最佳添加量为 0.025%,最佳碳源为蔗糖(浓度为 20 mmol/L),最佳接种菌液 OD_{600} 为 0.3。此外,发现菌株 W34 含有质粒,但其质粒上不含 PAEs 降解基因,该菌的 PAEs 降解基因位于细菌的染色体上。菌株 W34 的粗酶液对 6 种 PAEs 均有催化降解活性,蔗糖可显著提高菌株 W34 胞内酶的催化活性。

关键词: 内生菌; 邻苯二甲酸酯; 共代谢; 降解途径

中图分类号: Q939.96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)02-0393-12

Co-metabolic degradation of six phthalic acid esters by an endophytic *Bacillus subtilis*

YANG Yun^{1,2}, XIAO Xia-xia^{1,2}, CHEN Xiao-long^{2,3}, CHENG Jin-jin^{2,3}, YU Xiang-yang^{2,3}, WANG Ya^{2,3}, MA Gui-zhen¹

(1. School of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China; 2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: An endophytic bacterium was isolated from phthalic acid esters (PAEs) contaminated *Brassica rapa* var. *chinensis*, and was designated W34. The strain was identified by physiological-biochemical and 16S rRNA gene sequencing analyses, and the co-metabolic degradation characteristics of W34 on six PAEs were investigated to optimize the co-metabolic degradation conditions, so as to make preliminary exploration of the effect of co-substrate on the degradation and metabolism of PAEs by strain

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 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: 杨 云(1994-), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 主要从事农产品产地污染修复研究。(E-mail) 1157683439@qq.com

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

W34. The results indicated that, the endophytic bacterium W34 was identified as *Bacillus subtilis*. The strain could utilize six PAEs as carbon sources for growth and could degrade six PAEs in MSM medium at the same time, such as dibutyl phthalate (DBP), butyl benzyl phthalate (BBP), dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-*n*-octyl phthalate (DnOP). Among them, strain W34 exhibited relative higher degradation ability on DBP and BBP compared with the other four PAEs, and the degradation half-life period of DBP and BBP were all less than 0.33 d at mass concentration of 20 mg/L. The degradation rates of DMP, DEP, DEHP and DnOP by strain W34 were all significantly enhanced in MSM medium by adding *D*-cellobiose as co-metabolizing matrix. Besides, adding amount of Tween-80, type and mass concentration of the carbon source and inoculation dose all had significant effects on the degradation rates of the four PAEs by strain W34. According to the results of single factor experiment, the optimal adding amount of Tween-80 was 0.025%, the best carbon source was sucrose with a concentration of 20 mmol/L, and the most suitable OD_{600} for bacterial solution used in inoculating was 0.3. Furthermore, it was found that strain W34 contained plasmids, but its plasmids did not contain PAEs degradation gene, and the degradation gene of W34 was located on the chromosome. The crude enzyme solution of strain W34 showed catalytic and degrading activities on the six PAEs, and the addition of sucrose could significantly improve the catalytic activity of intracellular enzymes in strain W34.

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

邻苯二甲酸酯(PAEs)是最常见的增塑剂,已从中国大气、水体、土壤等环境介质中普遍检出^[1]。PAEs是一种典型的环境内分泌干扰物,具有生殖毒性和“三致”效应^[2]。PAEs在环境中大量积累不但会对农作物的产量和品质产生不利影响,还可以通过皮肤、呼吸和食物链等途径被人体吸收,对人体健康造成危害^[3]。中国耕地土壤中PAEs主要污染种类为邻苯二甲酸二正丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)^[4],污染水平在 $\mu\text{g}/\text{kg} \sim \text{mg}/\text{kg}$ 级,远高于多环芳烃(PAHs)、多氯联苯(PCBs)等持久性有机污染物^[5-7]。土壤PAEs可被作物根系吸收并向地上部运输,造成蔬菜可食部位PAEs污染^[1]。珠三角、长三角等地区的调查结果显示,中国蔬菜中普遍检出DBP和DEHP等PAEs,含量最高分别可达17.1 mg/kg和38.1 mg/kg^[7]。因此,如何降低农作物PAEs污染、保障农产品产量和品质安全已经成为亟待解决的突出问题。

土壤中PAEs的自然净化(包括水解、光降解等)过程非常缓慢^[8],微生物是土壤PAEs降解的主要驱动者^[9]。目前,国内外学者已从各类环境介质中分离获得不少具有PAEs降解功能的微生物种类,主要包括真菌、放线菌、藻类和细菌等^[1, 10-13]。其中,细菌是研究报道最多的PAEs降解微生物类群^[14],但多数研究主要关注土壤细菌对PAEs的降解代谢,对具有PAEs降解功能的内生菌的研究较少^[15]。Feng等^[15]从植物体内分离获得一株具有DBP降解功能的巨大芽孢杆菌YJB3,发现接菌后菜

心对DBP的积累和转运能力均显著降低,说明内生菌可以促进蔬菜体内PAEs的降解,从而降低蔬菜PAEs污染。针对PAHs、毒死蜱等有机污染物的研究结果也表明,利用植物内生菌同时消减土壤和植物体内的有机污染物具备可能性^[16-17]。

共代谢是微生物协同植物降解有机污染物的重要途径^[18]。微生物共代谢是指只有在初级能源物质存在的条件下才能进行的有机物生物降解过程,其中提供碳源或能源的物质为第一底物,被共代谢的污染物为第二底物^[19]。内生菌入侵植物后,植物体内的有机污染物浓度很难维持微生物细胞生长繁殖,植物光合作用产生的糖类、有机酸和氨基酸等碳源可为内生菌提供生长所需的基质^[18],从而提高内生菌活性并加速植物体内污染物的降解。研究表明,微生物可以通过共代谢途径促进高分子量、难降解多环芳烃[比如芘、苯并(a)芘]的降解^[20-21]。然而,共代谢底物对内生菌降解PAEs的影响研究较少^[15]。开展内生菌对PAEs的共代谢降解及机制研究,对于促进PAEs污染植物的微生物修复有重要的理论和现实意义。

基于此,本研究从被PAEs污染的植物体内分离鉴定获得1株内生枯草芽孢杆菌W34,以糖类为共代谢底物,探索了W34对6种PAEs[DBP、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、DEHP和邻苯二甲酸二正辛酯(DnOP)]的共代谢降解特性,优化了共代谢降解条件,初步解析了糖类对内生菌PAEs

代谢途径的影响。研究结果可以丰富污染物胁迫下植物与内生菌的互作模式及理论,可为未来揭示植物与其内生菌协同降解 PAEs 的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样本来源 供试作物为上海青(*Brassica rapa* var. *chinensis*),采集自江苏省农业科学院一处 PAEs 污染试验田,试验田土壤和上海青中的 PAEs 污染种类均为 DMP、DEP、DBP、BBP 和 DEHP。其中,土壤中 DMP、DEP、DBP、BBP 和 DEHP 含量分别为 1.180 mg/kg、0.980 mg/kg、1.000 mg/kg、2.790 mg/kg 和 88.400 mg/kg;上海青根系中 DMP、DEP、DBP、BBP 和 DEHP 含量分别为 1.390 mg/kg、0.374 mg/kg、2.510 mg/kg、0.685 mg/kg 和 62.100 mg/kg,茎叶中 DMP、DEP、DBP、BBP 和 DEHP 含量分别为 0.617 mg/kg、0.135 mg/kg、1.360 mg/kg、0.143 mg/kg 和 34.400 mg/kg,从上海青的根系和茎叶中分离能以美国 EPA 规定的 6 种优控 PAEs (DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP) 为碳源或能源的内生细菌。

1.1.2 主要试剂 DMP(纯度 99.0%)、DEP(纯度 99.5%)、DEHP(纯度 99.0%)标准品购自上海麦克林生化科技有限公司,BBP(纯度 99.5%)、DnOP(纯度 98.0%)标准品购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,DBP(纯度 99.5%)标准品购自上海凌峰化学试剂有限公司,无水硫酸镁(分析纯)、氯化钠(分析纯)购自西陇化工股份有限公司,色谱纯乙腈购自德国 Merck 公司;色谱级正己烷购自北京迈瑞达科技有限公司;16S rRNA 序列扩增引物由南京擎科生物科技有限公司合成。

1.1.3 培养基 无机盐液体培养基(1 L):0.40 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.20 g K_2HPO_4 ,0.20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,0.08 g CaSO_4 ,去离子水定容至 1 000 ml,pH 值为 7.2 ± 0.2 。

液体富集培养基(1 L):牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,去离子水定容至 1 000 ml。

固体富集培养基:在上述液体富集培养基中加入琼脂粉 15 g/L,pH 值为 7.0~7.2。以上培养基均在 121 °C 条件下,高压蒸汽灭菌 20 min 后备用。

1.1.4 仪器设备 SW-CJ-1D 净化工作台(苏州净

化设备有限公司产品),Five go 便携式 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品),Millipore 超纯水机(美国 Merck Millipore 公司产品),冷冻干燥机(德国 CHRIST 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),气相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司产品],扫描电子显微镜[卡尔蔡司光学(中国)有限公司产品]。

1.2 PAEs 降解菌的筛选与纯化

将被 PAEs 污染上海青分为根和茎叶 2 部分,分别用自来水冲洗干净后晾干。在超净工作台内剪成 1~2 cm 的小段,在 2.5% NaClO 溶液中浸润 5 min,用无菌水清洗 5 次,清洗干净后,用 75% 的乙醇浸没样品 5 min,用无菌水冲洗 5 次。表面消毒完成后,取最后一次清洗液 100 μl ,至液体富集培养基中,用摇床在 30 °C、180 r/min 条件下培养 24 h,LB 培养液未出现浑浊则认为表面消毒彻底。将表面消毒后的样品置于灭菌的研钵中研磨,吸取研磨后的组织液 100 μl ,转入 LB 液体培养基中,置于摇床 30 °C、180 r/min 培养 12 h,菌液经 6 000 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,用无菌无机盐培养液清洗 3 次后重悬于 MSM 培养液中,取 50 μl 菌悬液,在含有 20 mg/L 6 种 PAEs 的无机盐平板上均匀涂布,30 °C 避光培养 1~3 d。挑取培养皿中生长良好的单菌落,在以 PAEs 为碳源的无机盐固体培养基上划线进行分离纯化,筛选获得 1 株能连续 5 次以 PAEs 为碳源生长的菌株并命名为 W34,保存于固体富集培养基斜面上,供进一步研究。

1.3 内生菌 W34 的鉴定

菌落形态:将菌株在固体富集培养基上划线,置于培养箱 30 °C 的条件下培养 1~3 d,观察菌株形态特征。

细菌形态:将菌株 W34 接种于液体富集培养基中,置于摇床 30 °C、180 r/min 条件下富集 12 h,6 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,收集菌体,用 20 mmol/L 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)(pH 7.2)清洗菌体 3 次,每次 10 min。向菌体中加入终含量 2.5% 的戊二醛,混匀后室温下浸泡过夜,7 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,收集菌体,依次用 50%、70%、80%、90% 的乙醇清洗 1 次,每次浸泡 10 min,最后用 100% 乙醇浸泡 3 次,每次 30 min。通过扫描电子显微镜(SEM)观察 W34 的形态特征。

细菌 16S rRNA 测序与系统发育树构建:使用

试剂盒提取细菌的 DNA,以 DNA 为模板,用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,正向引物为 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'),反向引物为 1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应体系(30 μ l):1 μ l 模板、1 μ l 正向引物(10 μ mol/L)、1 μ l 反向引物(10 μ mol/L)、22 μ l 的 1.1 \times T3 Super PCR Mix 和 5 μ l ddH₂O。PCR 反应程序:98 $^{\circ}$ C 3 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,55~58 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 2~5 min。PCR 产物的纯化和测序由南京擎科生物科技有限公司完成,测序方式为双向测序。测序结果与 GenBank 数据库中的基因序列进 BLAST 比对,选取相似性较高($\geq 99\%$)的菌株序列,用 MEGA 6.0 软件进行多序列比对和遗传距离计算,用邻接法构建 W34 的系统进化树。

1.4 菌株生长曲线的测定

挑取活化后的菌株至液体富集培养基中,摇床 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 的条件下富集 30 h,每隔 2~4 h 取样测 OD_{600} ,以 OD_{600} 值为纵坐标、生长时间为横坐标,绘制菌株的生长曲线。

1.5 菌株 PAEs 降解特性研究

1.5.1 共代谢降解试验 实验室前期研究发现,向 MSM 培养基中添加 *D*-纤维二糖等外源碳源可促进多类细菌共代谢降解 PAEs。以 W34 为供试菌株,以 *D*-纤维二糖为生长基质,以 PAEs 为共代谢底物,开展共代谢降解试验。取纯化后的菌株至液体富集培养基中,用摇床在 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 的条件下培养 30 h,菌液经 6 000 r/min 离心 5 min 后,弃去上清液,菌体用 MSM 溶液清洗 3 次,将菌悬液加入 50 ml 灭菌的玻璃锥形瓶中(含 20 ml MSM 液体培养基),调节菌液初始 $OD_{600}=0.1$,依次添加终浓度为 0.1% 吐温-80(助溶剂)和 10 mmol/L 的 *D*-纤维二糖,最后加入 6 种 PAEs 的混标溶液使 MSM 中 PAEs 终质量浓度为 20 mg/L,以不加 *D*-纤维二糖的处理为对照组。将 50 ml 的玻璃锥形瓶密封后置于摇床中,30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养,3 d 后取样检测 MSM 中 PAEs 的质量浓度变化。

1.5.2 共代谢降解条件优化

1.5.2.1 吐温-80 添加量对 PAEs 降解率的影响 设置单因素试验,考察共代谢条件下,吐温-80 添加量对 W34 生长及 PAEs 降解的影响。W34 在 LB 培养液中培养 12 h,将菌液离心获得菌体后,用无菌 MSM 溶液清洗 3 次,菌液重悬后转入 20 ml 的 MSM

液体培养基中,调整菌液初始 OD_{600} 为 0.1,加入 6 种 PAEs 标准品,使其终质量浓度为 20 mg/L,加入终浓度为 10 mmol/L 的 *D*-纤维二糖,添加不同量的吐温-80(添加量为 0.010%、0.025%、0.050% 和 0.100%)。锥形瓶密封后置于摇床 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养,以不加菌液的 MSM 培养基为对照,每个处理重复 3 次。培养 3 d 后取样测定培养液中 6 种 PAEs 的含量。

1.5.2.2 碳源种类对 PAEs 降解率的影响 菌株 W34 经富集培养、MSM 清洗后重悬于 MSM 液体培养基中,用酶标仪调整菌液初始 OD_{600} 为 0.1,依次加入终质量浓度为 20 mg/L 的 6 种 PAEs、终含量为 0.025% 的吐温-80,添加终浓度为 10 mmol/L 的不同碳源(*D*-葡萄糖、*D*-果糖、*D*-纤维二糖、麦芽糖和蔗糖)。置于摇床 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 的条件下培养 3 d,以不加菌液的 MSM 培养基为对照,每个处理重复 3 次。在培养 3 d 时取样测定 6 种 PAEs 的含量。

1.5.2.3 碳源添加量对 PAEs 降解率的影响 将菌液重悬于无机盐培养基中,调整 $OD_{600}=0.1$,加入终质量浓度为 20 mg/L 的 6 种 PAEs 标准品,加入终含量为 0.025% 的吐温-80,设置不同的蔗糖添加浓度(0 mmol/L、1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L 和 50 mmol/L),锥形瓶置于摇床中 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养,以不加菌的 MSM 培养基作为空白对照,每个处理重复 3 次,于培养 3 d 时取样测定 6 种 PAEs 的含量。

1.5.2.4 接菌量对 PAEs 降解率的影响 将 W34 菌液重悬于无机盐培养基中,设置不同的初始 OD_{600} 值(0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50)。然后依次加入终含量为 0.025% 吐温-80,终质量浓度为 20 mg/L 的 6 种 PAEs,添加 20 mmol/L 的蔗糖,置于摇床 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养,每个处理重复 3 次,培养 3 d 后取样测定 6 种 PAEs 的含量。

1.5.2.5 不同初始浓度下 W34 对 6 种 PAEs 的降解率 在最优条件下,研究了 W34 在不同初始 PAEs 浓度下的降解率。菌株 W34 经富集培养、用 MSM 培养基清洗后转入 MSM 培养基,调整初始 $OD_{600}=0.3$,加入 0.025% 吐温-80、20 mmol/L 蔗糖,向 MSM 培养基中添加 6 种 PAEs 混合标准溶液使初始 PAEs 质量浓度分别为 1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L,将锥形瓶置于摇床 30 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养。每个处理重复 3 次,分别在 8 h、1 d、3 d、5 d

和7 d时取样测定6种PAEs的残留量并计算半衰期。PAEs降解率计算公式为:(对照组PAEs含量-试验组PAEs含量)/对照组PAEs含量。PAEs半衰期计算方法参考Cheng等^[22]的方法。

1.6 PAEs代谢途径分析

1.6.1 菌株W34质粒的PAEs降解特性 为探明W34降解PAEs的基因位置(质粒或细菌基因组),提取W34的质粒并将质粒DNA导入DH5 α ,验证含细菌质粒的DH5 α 对PAEs的降解特性。

质粒提取:将W34菌株转接于LB液体培养基中,30℃、180 r/min培养12 h,取2 ml菌液,采用AxyPrep质粒DNA小量试剂盒提取质粒,设置4组平行,取8 μ l质粒,加入2 μ l的5 \times Loading buffer,混匀。在1.0%的琼脂糖凝胶条件下进行电泳检测,电压设定为130 V。通过凝胶成像系统进行观察,与Marker比较确定质粒大小。

质粒DNA导入大肠杆菌:取100 μ l感受态细胞(DH5 α),加入质粒,轻轻摇匀,在0℃冰浴中静置25 min,42℃水浴热激42 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min,向2 ml的离心管中加入500 μ l的无菌培养基,混匀后37℃、200 r/min复苏1 h,吸取50 μ l的复苏液,均匀涂布于PAEs质量浓度为20 mg/L的MSM固体平板上,将平板倒置,用37℃培养箱培养3 d后挑取单菌落,保存于固体富集培养基斜面上备用。

PAEs降解试验:将含质粒的DH5 α 单菌落和未导入质粒的DH5 α (对照)分别接于LB液体培养基中,30℃、180 r/min培养12 h,菌液离心获得菌体后,用MSM培养基清洗3次,将不含质粒和含质粒的DH5 α 分别重悬于20 ml的MSM培养基中,调整 OD_{600} =0.1,加入0.025%吐温-80、终质量浓度为20 mg/L的6种PAEs,设置加糖(20 mmol/L蔗糖)和不加糖2组处理,以不加菌液的MSM培养基为CK,在30℃、180 r/min条件下培养3 d,取样测定MSM培养液中的PAEs含量。

1.6.2 粗酶液对6种PAEs的降解 胞内粗酶液制备:将W34菌株接种于200 ml的LB中,30℃、180 r/min培养16 h。离心收获菌体,用MSM培养基清洗3遍,重悬于75 ml MSM培养基中,添加终含量为0.025%的吐温-80、20 mmol/L的蔗糖,不加糖的处理为对照组。摇床30℃、180 r/min条件下培养3 d,离心后获得菌体,-20℃冰箱中保存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进行研磨,获得胞内粗酶液并转入5 ml容量瓶中用PBS定容,置于冰浴中保存备用。

胞外粗酶液制备:同批次试验中,待菌株W34在MSM培养液中培养3 d后,取50 ml的MSM培养液,离心去除菌体,0.45 μ m过滤除菌后,将菌液置于-20℃冰箱冻存2 h,然后于冷冻干燥机中冻干。冻干物用5 ml 20 mmol/L PBS复溶,即制备获得胞外酶液。

PAEs体外降解试验:分别取2 ml胞内和胞外粗酶液,转入10 ml玻璃试管中,添加使PAEs终质量浓度为10 mg/L的6种PAEs标液(1 000 mg/L,溶剂为乙腈)20 μ l。用无菌橡胶塞密封后,置于37℃培养箱中反应4 h后,向试管中添加2 ml正己烷提取PAEs,使用气相色谱仪分析粗酶液中PAEs残留量。

1.7 PAEs的提取和检测分析

采用岛津GC-2030气相色谱仪检测6种PAEs含量。PAEs提取方法:参考Feng等^[23]的方法,并略作修改。在玻璃管中加2 ml菌液,加入2 ml正己烷,样品充分涡旋10 min后40 Hz超声10 min,3 000 r/min离心5 min后,取上清液,通过气相色谱仪测定6种PAEs的浓度。

岛津GC-2030方法条件:色谱柱DB-5 MS(30.0 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m),氢火焰离子化检测器(FID)。载气为高纯氮气。进样口温度为280℃,流速为1.0 ml/min,进样量为1 μ l。色谱柱升温程序为:100℃保持1 min,20℃/min升至220℃保持1 min,20℃/min升至280℃保持3 min。

质量控制:为确认方法准确度,向MSM液体培养基中添加6种PAEs的标准溶液,使PAEs的终质量浓度分别为1 mg/L和20 mg/L,每个质量浓度3次重复,按照上述提取方法进行回收率试验。结果发现,6种PAEs的平均加标回收率为96.2%~105.3%,相对标准偏差为2.4%~6.7%,结果表明,该提取方法回收率和稳定性较好,适用于试验样品中PAEs的提取和测定。

1.8 数据处理

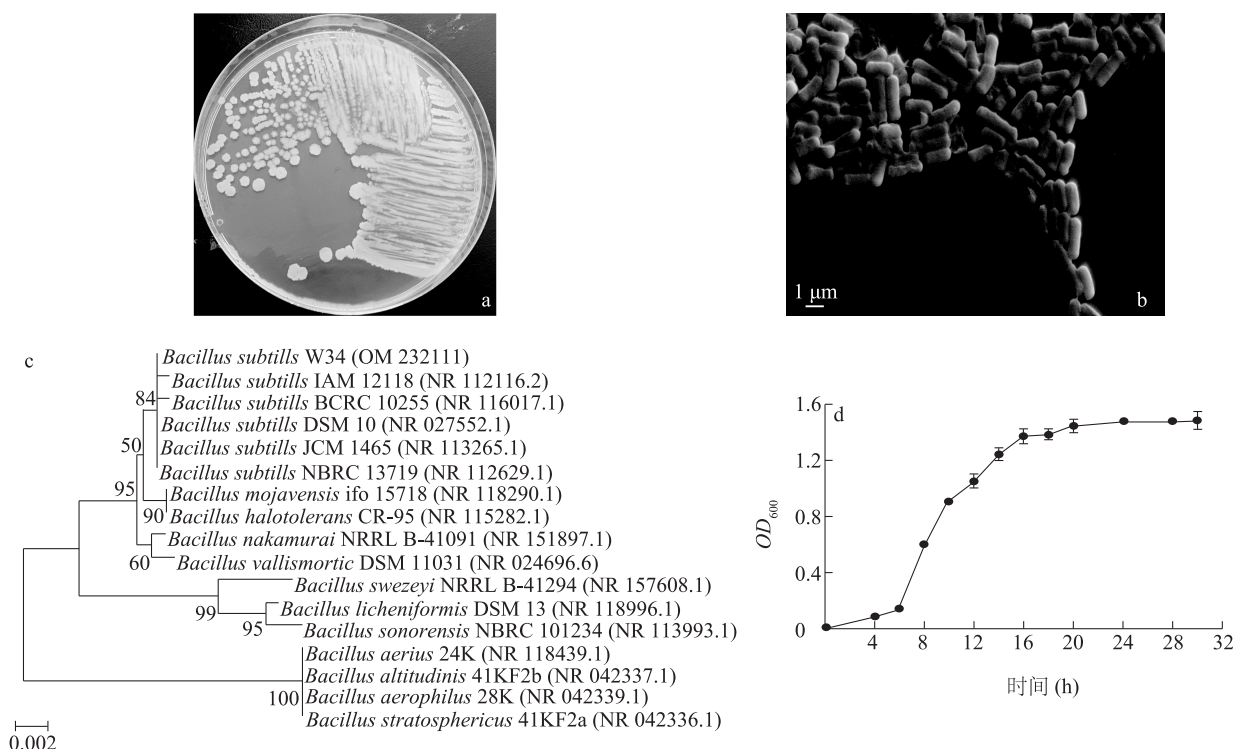
采用Excel 2016和GraphPad Prism 8.0绘制图表。用SPSS 19.0软件进行数据分析,不同试验组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或Tukey's多重比较法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 PAEs 降解菌的分离筛选与鉴定

经分离纯化获得 1 株能以 6 种优控 PAEs (DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DnOP) 为碳源和能源生长的植物内生菌,命名为 W34。由图 1a 可知,菌株菌落为伞状,菌落表面粗糙、不透明、有褶皱。由图 1b 可知,通过扫描电镜,观察到该菌株的形态为短杆状,菌体长 $1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 。通过 16S rRNA 基因测序,获得 1.4 kb 的 16S rRNA 基因片段,将测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对,结果显示该菌

株(登录号为 OM232111)的基因序列与芽孢杆菌属的基因序列有 99% 的相似性。用邻接(NJ)法构建菌株的系统发育树(图 1c),发现菌株 W34 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) DSM 10、*B. subtilis* JCM 1465 和 *B. subtilis* NBRC 13719 亲缘关系最近。因此,W34 鉴定为枯草芽孢杆菌。如图 1d 所示,在液体富集培养基中菌株 W34 在 6 h 后进入对数生长期并持续约 8 h,14 h 后生长速率下降;16 h 后菌株达到最大生长速率,开始进入稳定期。因此,选择 12 h 菌龄的 W34 开展 PAEs 降解特性研究。



a: 菌落形态;b: 菌体扫描电镜图;c: 菌株系统发育树;d: 菌株生长曲线。*Bacillus subtilis*: 枯草芽孢杆菌;*Bacillus mojavensis*: 莫哈韦芽孢杆菌(摩加夫芽孢杆菌);*Bacillus halotolerans*: 耐盐芽孢杆菌;*Bacillus nakamurai*: 中村芽孢杆菌;*Bacillus swiezeyi*: 斯威泽芽孢杆菌;*Bacillus licheniformis*: 地衣芽孢杆菌;*Bacillus sonorensis*: 索诺拉沙漠芽孢杆菌;*Bacillus altitudinis*: 高地芽孢杆菌;*Bacillus aerophilus*: 嗜气杆菌。

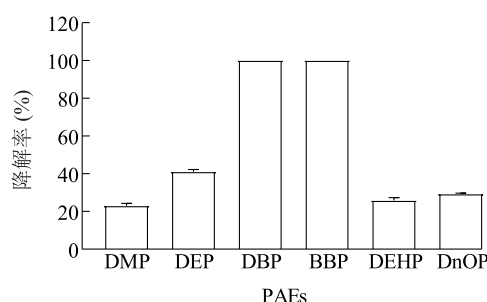
图 1 W34 的菌落形态、进化树及生长曲线

Fig.1 Colony morphology of strain W34, phylogenetic tree and growth curve

2.2 菌株 W34 对 6 种 PAEs 的降解特性

2.2.1 菌株 W34 的降解谱 为确定菌株 W34 对 6 种 PAEs 的降解特性,向 MSM 培养基中添加终质量浓度为 20 mg/L 的 PAEs,胁迫培养 3 d 后检测培养液中 6 种 PAEs 的残留量并计算 W34 对 PAEs 的降解率。如图 2 所示,菌株 W34 对 DBP 和 BBP 的降

解效果较好,降解率均为 100%;W34 对 DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 也有一定的降解能力,降解率分别为 23%、42%、30%和 34%。此外,不加菌的 CK 组,3 d 后 6 种 PAEs 的自然降解率均低于 6.7%,说明加菌组 MSM 中 PAEs 的降解主要来自 W34 的生物降解作用。

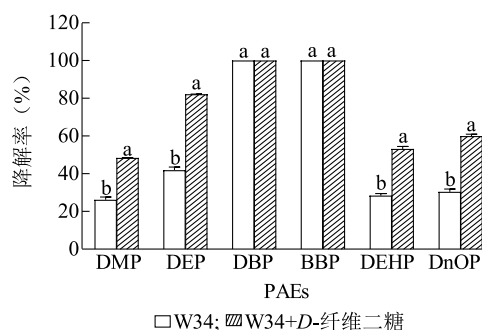


DMP:邻苯二甲酸二甲酯;DEP:邻苯二甲酸二乙酯;DBP:邻苯二甲酸二正丁酯;BBP:邻苯二甲酸丁基苯基酯;DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;DnOP:邻苯二甲酸二正辛酯。

图2 菌株W34对MSM培养基中6种邻苯二甲酸酯(PAEs)的降解率

Fig.2 Degradation rate of six phthalic acid esters (PAEs) in MSM medium by strain W34

2.2.2 *D*-纤维二糖对W34降解PAEs的影响 以不接菌的处理为对照,研究接种W34(W34)和接种W34并添加*D*-纤维二糖(W34+*D*-纤维二糖)处理条件下,菌株W34对6种PAEs的降解率及差异。如图3所示,20 mg/L的PAEs胁迫培养3 d后,W34和W34+*D*-纤维二糖处理组,DBP和BBP的降解率均为100%;与对照比,W34处理组DMP、DEP、DEHP和DnOP的降解率为26.2%~41.8%,添加*D*-纤维二糖后这4种PAEs的降解率均显著提高。



不同小写字母表示同一PAEs种类不同处理间差异显著($P < 0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP见图2注。

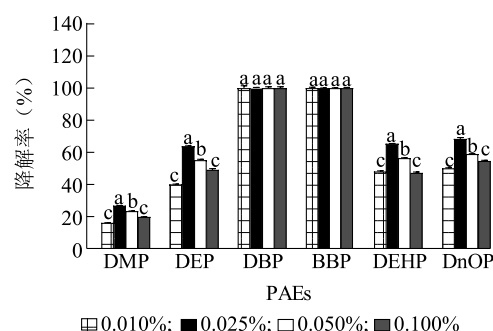
图3 不同条件下W34对MSM培养基中6种邻苯二甲酸酯(PAEs)的降解率

Fig.3 Degradation rate of six phthalic acid esters (PAEs) in MSM medium by strain W34 under different conditions

2.3 共代谢降解条件的优化

2.3.1 吐温-80对菌株W34降解率的影响 如图4所示,不同吐温-80添加量处理对DBP和BBP的降

解率均为100%;对DMP、DEP、DEHP和DnOP的降解率随着吐温-80含量增加,均呈先上升后下降的趋势。当吐温-80含量为0.025%时,W34对6种PAEs降解率达最大值(降解率分别为26.8%、63.8%、100.0%、100.0%、65.4%和68.3%),因此吐温-80最佳添加量为0.025%。



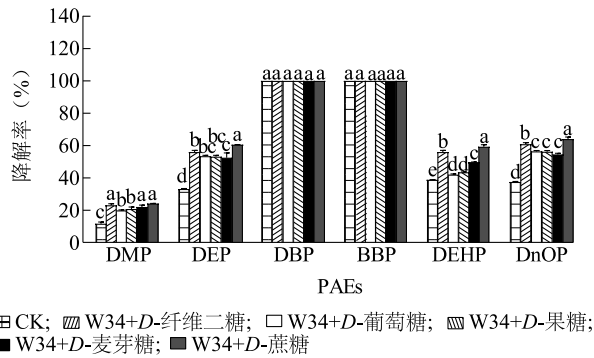
不同小写字母表示同一PAEs种类不同处理间差异显著($P < 0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP见图2注。

图4 吐温-80添加量对W34降解6种邻苯二甲酸酯(PAEs)的影响

Fig.4 Effect of Tween-80 adding amount on degradation of six phthalic acid esters (PAEs) by strain W34

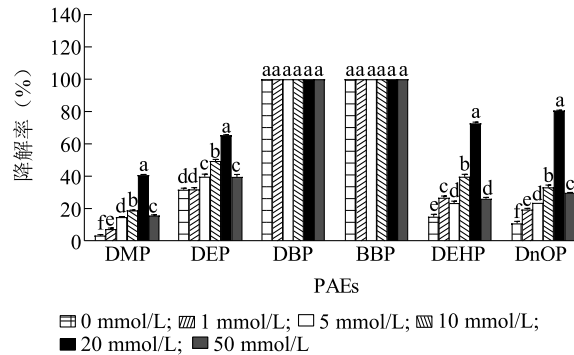
2.3.2 碳源种类对菌株W34降解率的影响 在吐温-80最优浓度条件下,研究不同碳源种类对6种PAEs降解率的影响。如图5所示,添加不同碳源后,W34均能完全降解DBP和BBP。此外,碳源种类对DMP、DEP、DEHP和DnOP的降解率有显著影响。添加蔗糖时,DEP、DEHP和DnOP的降解率分别为60.6%、60.2%和63.1%,显著高于其他4种碳源,因此选择蔗糖为最优碳源种类。

2.3.3 碳源添加量对菌株W34降解率的影响 在吐温-80最优添加浓度和最优碳源种类条件下,研究不同蔗糖添加量对6种PAEs降解率的影响。如图6所示,随着蔗糖浓度的升高,W34对DMP、DEP、DEHP和DnOP的降解率先上升后降低。当蔗糖添加浓度为20 mmol/L时DMP、DEP、DEHP和DnOP的降解率分别达40.6%、65.4%、72.6%和80.7%,且显著高于其他蔗糖浓度下PAEs的降解率。本研究发现,0 mmol/L、1 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L和50 mmol/L蔗糖浓度下,培养3 d后的菌液 OD_{600} 分别为0.091、0.198、0.574、0.782、0.995和1.332,说明随着蔗糖添加量增加,菌株W34的繁殖速度呈增加趋势。



不同小写字母表示同一 PAEs 种类不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

图 5 碳源种类对 W34 降解 6 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 的影响
Fig.5 Effect of carbon type on degradation of six phthalic acid esters (PAEs) by strain W34



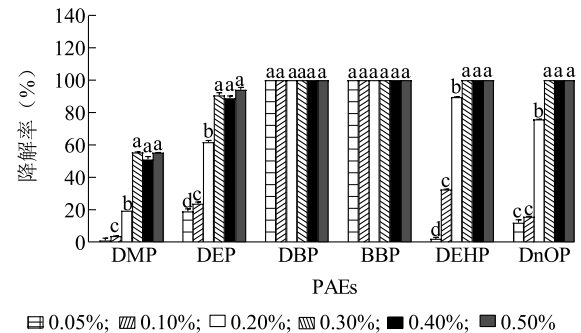
不同小写字母表示同一 PAEs 种类不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

图 6 碳源添加量对 W34 降解 6 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 的影响
Fig.6 Effect of carbon adding amount on degradation of six phthalic acid esters (PAEs) by strain W34

2.3.4 接菌量对菌株 W34 降解率的影响 在吐温-80 最优添加量、最优碳源种类和最优碳源浓度条件下,研究不同接菌量对 6 种 PAEs 降解率的影响。如图 7 所示,6 种 PAEs 的降解率整体上随着初始接菌量的增加而升高,说明细菌生物量增加可促进 PAEs 降解。当接菌 OD_{600} 值为 0.30 时,6 种 PAEs 的降解率均达较大值,其中,DMP 和 DEP 的降解率分别为 55.3% 和 90.5%,而 DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 均被完全降解。因此,选择 $OD_{600}=0.3$ 为最优初始接菌量。

2.3.5 不同初始 PAEs 质量浓度下菌株 W34 的 PAEs 降解效率 在最优降解条件下,研究不同浓度

PAEs 培养 3 d 后 W34 对 6 种 PAEs 的降解能力。如图 8 所示,所有处理组的 DBP 和 BBP 被完全降解。随着 PAEs 处理质量浓度增加,DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解率降低。此外,除 DBP 和 BBP 外的其他 4 种 PAEs 在 MSM 液体培养基中的降解动态均符合一级动力学方程 $C_t = C_0 e^{-kt}$ [22]。如表 1 所示,W34 菌株对 DBP 和 BBP 的降解能力较强,20 mg/L 处理质量浓度下 DBP 和 BBP 的降解半衰期均小于 0.33 d。随着 PAEs 质量浓度增加,DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解半衰期呈增加趋势,暗示随着 PAEs 胁迫质量浓度增加,W34 对 PAEs 的降解效率下降。

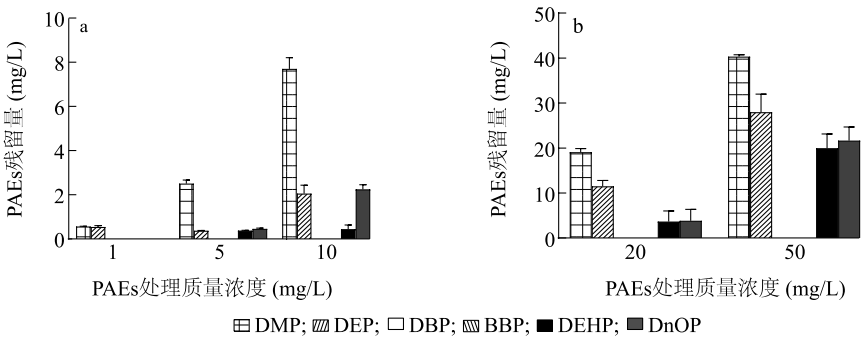


不同小写字母表示同一 PAEs 种类不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

图 7 接菌量对 W34 降解 6 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 的影响
Fig.7 Effect of inoculation dose on degradation of six phthalic acid esters (PAEs) by strain W34

2.4 PAEs 的降解途径分析

2.4.1 菌株 W34 质粒对 PAEs 的降解 如图 9 所示,W34 菌株存在质粒,其基因片段约为 2 000 bp。将 W34 的质粒导入大肠杆菌 DH5 α ,以未导入质粒 DNA 的 DH5 α 为对照,研究加糖 (20 mmol/L 蔗糖) 和不加糖处理条件下 DH5 α 对 6 种 PAEs 的降解能力。如图 10 所示,与不加蔗糖的对照比,添加蔗糖作为共代谢碳源后,DH5 α (含质粒) 和 DH5 α (不含质粒) 处理组 DBP 和 BBP 的质量浓度均显著下降,说明加糖可能促进 DH5 α 对 PAEs 的降解或通过增加细菌生物量促进 DH5 α 对 PAEs 的吸附。然而,在加糖条件下,DH5 α (含质粒) 和 DH5 α (不含质粒) 处理组中 DBP 和 BBP 的含量无显著差异,说明 W34 质粒 DNA 中不含 PAEs 降解基因,该菌的 PAEs 降解基因位于细菌染色体上。



DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

图 8 不同初始邻苯二甲酸酯 (PAEs) 质量浓度培养 3 d 后 W34 对 6 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 的降解特性

Fig.8 Biodegradation of six phthalic acid esters (PAEs) in mineral salt medium with different initial mass concentrations by strain W34 after cultured for three days

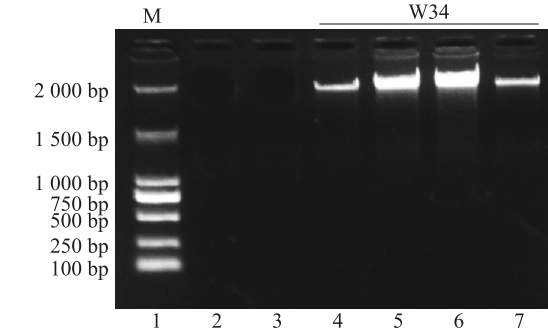
表 1 菌株 W34 对不同邻苯二甲酸酯 (PAEs) 在 MSM 中的降解动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of different phthalic acid esters (PAEs) degradation for strain W34 in mineral salt medium

PAEs 种类	参数		
	K 值	P 值	$t_{1/2}$ (d)
10 mg/L DMP	0.146 6	0.009 2	2.25
10 mg/L DEP	0.643 6	0.000 9	1.13
10 mg/L DBP	—	—	<0.33
10 mg/L BBP	—	—	<0.33
10 mg/L DEHP	0.651 5	0.110 9	1.12
10 mg/L DnOP	0.685 4	0.041 0	1.07
20 mg/L DMP	0.103 3	0.002 7	2.96
20 mg/L DEP	0.162 6	0.003 9	2.51
20 mg/L DBP	—	—	<0.33
20 mg/L BBP	—	—	<0.33
20 mg/L DEHP	0.400 9	0.000 6	1.60
20 mg/L DnOP	0.386 1	0.000 4	1.66

K 为降解速率常数, P 为指数速率, $t_{1/2}$ 为降解半衰期, “—” 表示无数据。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

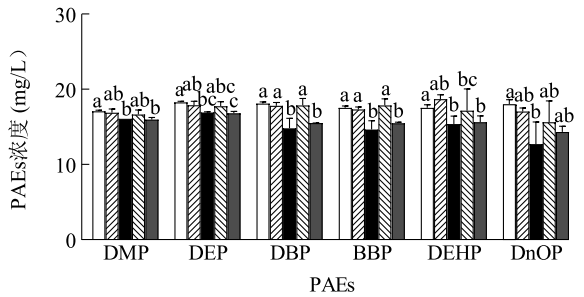
2.4.2 W34 粗酶液对 6 种 PAEs 的降解作用 分别研究加糖 (20 mmol/L 蔗糖) 与不加糖处理组, W34 的胞外和胞内粗酶液对 6 种 PAEs 的降解特性。与不加糖的对照比, 加糖处理组 W34 胞外粗酶液中 DBP、BBP、DEHP 和 DnOP 质量浓度显著高于不加糖组 (图 11A), 说明加糖处理组胞外粗酶液中的降解酶含量或活性显著低于不加糖组; 与此相反, 加糖处理组 W34 胞内粗酶液中 6 种 PAEs 质量浓度显著低于不加糖处理 (图 11B), 说明加糖处理组胞内粗



泳道 1 为 Marker, 泳道 4、5、6、7 为 W34 质粒 DNA。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

图 9 枯草芽孢杆菌 W34 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.9 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from *Bacillus subtilis* W34



不同小写字母表示同一 PAEs 种类不同 DH5α 处理之间差异显著 ($P<0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

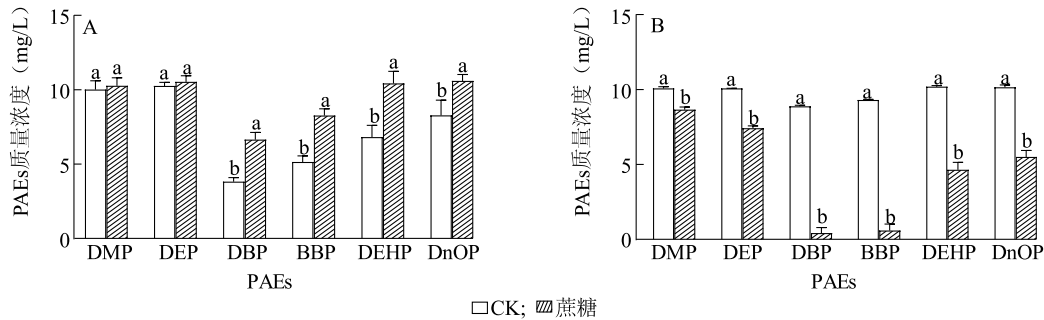
图 10 菌株 W34 质粒对 6 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 的降解特性

Fig.10 Biodegradation of six phthalic acid esters (PAEs) in mineral salt medium by plasmid DNA from *Bacillus subtilis* W34

酶液的合成量或活性显著增加或胞内降解酶向胞外分泌量显著下降。此外, 不加糖处理条件下, W34

的胞外酶对 DBP 和 BBP 的降解率显著高于胞内酶,而加糖处理组则相反,说明糖类作为共代谢碳源

可能减少了胞内降解酶系向胞外分泌,从而加速了 PAEs 的胞内降解过程。



不同小写字母表示同一 PAEs 种类不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$)。DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP、DnOP 见图 2 注。

图 11 菌株 W34 胞外 (A) 和胞内 (B) 粗酶液对 6 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 降解的影响

Fig.11 Effects of extracellular (A) and intracellular (B) cell-free enzyme extracts of W34 on six phthalic acid esters (PAEs) degradation

3 讨论

PAEs 是中国土壤中的主要有机污染物之一,其对生态环境和农产品安全均构成了严重威胁^[1,15]。研究表明,细菌是土壤 PAEs 消减的主要驱动力^[9],向土壤中添加 PAEs 降解菌可明显加速土壤 PAEs 降解,从而缓解 PAEs 对农作物的胁迫并降低农产品被 PAEs 污染的风险^[1]。因此,探索细菌对不同 PAEs 的降解特性对于修复被其污染的土壤有重要意义。目前,关于 PAEs 降解菌的降解特性研究主要以 PAEs 为单一碳源开展^[12]。然而,自然环境中碳源种类繁多,细菌等微生物对 PAEs 的降解代谢可能因其他碳源存在而发生显著变化^[19,23]。本研究从 PAEs 污染植物中筛选获得 1 株植物内生菌 W34,经过 16S rRNA 同源性比较分析并结合细菌平板菌落形态和电镜形态特征,鉴定该菌为枯草芽孢杆菌,研究了外源碳源存在条件下,菌株 W34 对 6 种优控 PAEs 的降解特性和差异,并初步探索了糖类对该菌降解 PAEs 途径的影响。

本研究结果表明,枯草芽孢杆菌 W34 对 DBP 和 BBP 的降解效率较高,20~50 mg/L 的 PAEs 处理 3 d 后该菌可完全降解 DBP 和 BBP。此外,该菌对 DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 也有一定的降解能力,并且这 4 种 PAEs 在无机盐培养基中的消解动态均符合一级动力学方程。以往的研究也发现,枯草芽孢杆菌 HB-T2 对 DBP 和 BBP 的降解能力较强,10 mg/L 的 PAEs 处理 3 d,DBP 和 BBP 的降解率分别达 100.0% 和 90.5%^[24]。添加 D-纤维二糖可显著

提高 DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解率,说明 D-纤维二糖作为共代谢基质可促进 W34 对 PAEs 的降解。类似的,郭江枫等^[25]发现添加琥珀酸钠和柠檬酸钠作为共代谢底物可显著促进黏质沙雷氏菌 TF-1 降解氯苯。本研究结果说明,菌株 W34 具有同时降解环境中 6 种 PAEs 的潜力,而糖类可以提高该菌对 PAEs 污染的修复效率。

通过单因素试验发现吐温-80 添加量对 PAEs 降解有显著影响,DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解率均随吐温-80 添加量增加呈先上升后下降趋势。吐温-80 作为常用的增溶剂,可以促进培养基中 PAEs 的溶解,进而提高其生物可利用度^[26]。然而,当吐温-80 添加液含量为 0.050%~0.100% 时,这 4 种 PAEs 的降解率逐渐下降,这可能与吐温-80 的临界胶束浓度 (CMC) 有关。研究表明,有机污染物的降解率与表面活性剂的 CMC 关系密切^[27],当吐温-80 浓度超过 1 CMC 时,其对茈的降解的促进作用下降,当吐温-80 浓度为 4~8 CMC 时则抑制茈的降解^[28]。此外,研究发现葡萄糖、果糖、D-纤维二糖、麦芽糖和蔗糖均可促进 W34 对 PAEs 的降解,这可能与添加共代谢碳源后细菌的生物量增加促进了 PAEs 降解有关。接菌量试验结果证明,初始接菌量增加可显著促进 W34 对 PAEs 的降解。然而,细菌生物量增加也可能抑制 W34 对 PAEs 的降解。本研究发现,当蔗糖浓度由 20 mmol/L 提高至 50 mmol/L,虽然细菌的生物量显著增加,但 W34 对 DMP、DEP、DEHP 和 DnOP 的降解率均显著下降,这可能与高浓度蔗糖条件下 W34 降解酶含量或

活性被抑制有关。以往的研究结果表明,细菌对PAEs的降解主要由各类酶催化完成,比如DBP可在水解酶作用下发生酯键断裂,形成邻苯二甲酸单丁酯(MBP)和邻苯二甲酸(PA),而PA又可在邻苯二甲酸3,4-双加氧酶或邻苯二甲酸4,5-双加氧酶作用下脱氢生成3,4-二羟基邻苯二甲酸或4,5-二羟基邻苯二甲酸,并进一步降解为原儿茶酸和苯甲酸(BA),最终进入三羧酸循环^[14]。然而,糖类作为共代谢碳源对菌株W34的PAEs降解途径产生的影响尚不清楚,需要进一步研究。

研究结果表明,细菌对PAEs、PAHs和农药等有机污染物的降解主要依赖其降解酶的催化作用^[15,29-30],而编码降解酶的基因可能位于其基因组上,也可能位于其质粒上^[31-32]。本研究发现菌株W34含有质粒,但该质粒不具有PAEs降解基因,并且加糖处理也不能诱导相关降解酶基因表达,暗示W34的PAEs降解基因位于其染色体上。进一步研究发现,W34的胞内粗酶液对DBP和BBP有一定的降解能力,蔗糖可显著提高胞内降解酶的合成量或活性,从而显著促进DBP和BBP的降解。此外,添加蔗糖后,W34的胞内粗酶液对DMP、DEP、DEHP和DnOP的降解能力显著增强,这可能是蔗糖促进菌株W34降解这4种PAEs的重要原因。本研究还发现,在不添加蔗糖的条件下,菌株W34对PAEs的降解以胞外酶为主,添加蔗糖后PAEs的降解以胞内酶为主,说明蔗糖可能通过改变菌株W34细胞膜的透性,从而影响降解酶系的分泌和催化活性,相关机理尚不明确,需要进一步研究。

4 结 论

本研究从PAEs污染植物中分离获得1株植物内生菌W34,鉴定为枯草芽孢杆菌。该菌株可同时降解DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP和DnOP 6种PAEs,其中对DBP和BBP的降解效率较高,20~50 mg/L质量浓度下,这2种PAEs的降解半衰期均小于0.33 d。糖类作为共代谢基质可显著促进菌株W34对6种PAEs的降解。优化了共代谢降解条件,最佳吐温-80添加量为0.025%,最佳碳源为蔗糖(浓度为20 mmol/L),最佳接种菌液 OD_{600} 为0.3。初步探索了菌株W34的PAEs降解途径,发现W34的PAEs降解基因位于该菌的染色体上,W34的粗酶液对6种PAEs均有催化降解活性,蔗糖可显著

提高菌株W34降解酶的催化活性,这是蔗糖作为共代谢物促进菌株W34降解PAEs的重要原因。研究结果初步揭示了共代谢物对PAEs降解和代谢途径的影响,为未来利用植物与内生菌协同修复环境PAEs污染提供技术支持。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] WANG J, LUO Y M, 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.
- [4] KONG S X, 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.
- [5] HE W, QIN N, KONG X, et al. Spatio-temporal distributions and the ecological and health risks of phthalate esters (PAEs) in the surface water of a large, shallow Chinese lake [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 461: 672-680.
- [6] NIU L L, YANG X, XU C, et al. Status of phthalate esters contamination in agricultural soils across China and associated health risks [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 195: 16-23.
- [7] 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研究进展[J].*农业环境科学学报*, 2019, 38(10): 2239-2250.
- [8] BAJT O, MAILHOTT G, BOLTE M. Degradation of dibutyl phthalate by homogeneous photocatalysis with Fe(III) in aqueous solution [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2001, 33(3): 239-248.
- [9] CHENG J J, LIU Y A, 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.
- [10] 于淑婷,万群,余向阳,等.邻苯二甲酸酯降解真菌的筛选及其降解特性和土壤修复作用[J].*江苏农业学报*, 2021, 37(3): 660-666.
- [11] GU S Z, HAO Z, XU Q Q, et al. Comparative toxicity of the plasticizer dibutyl phthalate to two freshwater algae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 191: 122-130.
- [12] 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.
- [13] ZHAO H M, DU H, HUANG C Q, et al. Bioaugmentation of exogenous 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] FENG F Y, GE J, LI Y S, 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.
- [17] 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.
- [18] 冯乃宪. 降解邻苯二甲酸酯的植物内生菌分离筛选及污染修复应用研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [19] 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.
- [20] 张银萍, 王芳, 杨兴伦, 等. 土壤中高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.
- [21] 巩宗强, 李培军, 王新, 等. 茈在土壤中的共代谢降解研究 [J]. 应用生态学报, 2001 (3): 447-450.
- [22] 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.
- [23] FENG F Y, CHEN X L, WANG Q, et al. Use of *Bacillus-siamensis*-inoculated biochar to decrease uptake of dibutyl phthalate in leafy vegetables [J]. Journal of Environmental Management, 2020, 253: 109636.
- [24] 徐文君. 一株降解邻苯二甲酸二丁酯的内生细菌的分离及其降解功能研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2019.
- [25] 郭江枫, 邢志林, 王永琼, 等. 同化和共代谢降解氯苯菌株的筛选与特性研究 [J]. 中国环境科学, 2021, 41 (2): 902-912.
- [26] KONG X, JIN D C, 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.
- [27] WONG J W C, FANG M, ZHAO Z, et al. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic-conditions [J]. Journal of Environmental Quality, 2004, 33 (6): 2015-2025.
- [28] 张栋. 表面活性剂对 PAHs 微生物界面行为的影响及调控机制 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [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] 赵叶子, 陈智坤, 王铮, 等. 拟除虫菊酯类农药的微生物降解及其机制研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49 (17): 28-38.
- [31] PENG R H, XIONG A S, XUE Y, et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32 (6): 927-955.
- [32] EATON R W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 1 2B [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183 (12): 3689-3703.

(责任编辑: 陈海霞)