



耐镉邻苯二甲酸二辛酯降解菌的筛选及特性研究

刘标, 喻孟元, 王震, 杜东霞, 陈薇, 许丽娟, 吴迎春, 吴民熙, 刘惠知, 尹红梅

引用本文:

刘标, 喻孟元, 王震, 等. 耐镉邻苯二甲酸二辛酯降解菌的筛选及特性研究[J]. *农业资源与环境学报*, 2021, 38(2): 208–214.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0114>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同碳氮源对*Paracoccus* sp.QD15-1降解邻苯二甲酸二甲酯的影响

王姊威, 刘虹, 王春龙, 吕志航, 刘泽平, 陈文晶, 王志刚

农业资源与环境学报. 2019, 36(4): 541–545 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2018.0217>

土壤微生物敏感菌及信号调节途径对邻苯二甲酸二甲酯的响应

王春龙, 王志刚, 由义敏, 吕智航, 刘泽平, 陈文晶, 史一然

农业资源与环境学报. 2018, 35(3): 215–221 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2017.0325>

三种农用抗生素降解真菌的筛选及其降解性能

王强锋, 朱彭玲, 夏中梅, 王赟, 曾芸, 侯勇

农业资源与环境学报. 2018, 35(6): 533–539 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2018.0069>

新疆加工番茄应用PBAT全生物降解地膜可行性

苏海英, 宝哲, 刘勤, 董道瑞, 严昌荣, 雷海, 薛颖昊, 徐志宇

农业资源与环境学报. 2020, 37(4): 615–622 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2019.0140>

PBAT型全生物降解膜对新疆番茄产量及土壤理化性质的影响

王斌, 万艳芳, 王金鑫, 孙九胜, 槐国龙, 崔磊, 张彦红, 魏彦宏, 刘国宏

农业资源与环境学报. 2019, 36(5): 640–648 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2018.0287>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘标, 喻孟元, 王震, 等. 耐镉邻苯二甲酸二辛酯降解菌的筛选及特性研究[J]. 农业资源与环境学报, 2021, 38(2): 208–214.
LIU Biao, YU Meng-yuan, WANG Zhen, et al. Isolating and characteristics of a Cd-resistant microorganism used in the biodegradation of di-*n*-octyl phthalate[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2021, 38(2): 208–214.



开放科学 OSID

耐镉邻苯二甲酸二辛酯降解菌的筛选及特性研究

刘标, 喻孟元, 王震, 杜东霞, 陈薇, 许丽娟, 吴迎春, 吴民熙, 刘惠知, 尹红梅*

(湖南省微生物研究院, 长沙 410009)

摘要:为获得既耐受重金属镉又能高效降解邻苯二甲酸二辛酯(DOP)的微生物菌株,利用选择培养基从污染土壤中分离高效降解微生物,并对其菌种分类和降解特性进行分析。共筛选获得5株耐镉的DOP降解菌株,其中PD-2对DOP的降解效率最高,120 h后降解率可达93.1%。结合形态学特征和16S rDNA序列分析,鉴定该菌为生丝微菌属(*Hyphomicrobium* sp.)。菌株PD-2对液体培养基中DOP的降解依赖于其生物量的增加,其对DOP的作用浓度和耐镉浓度范围广,可高效降解100~800 mg·L⁻¹范围的DOP(降解率大于80%),并在镉浓度0~600 mg·L⁻¹的培养基中生长良好。PD-2可利用邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)、邻苯二甲酸二辛酯(DOP)和邻苯二甲酸(PA)作为底物生长,底物种类范围广。添加PD-2到镉和DOP复合污染土壤中,其对DOP具有显著的降解作用,PD-2在镉和DOP复合污染土壤的修复方面具有潜在的应用价值。

关键词:耐镉;邻苯二甲酸二辛酯;生物降解;生丝微菌属

中图分类号:X172;X53

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2021)02-0208-07

doi: 10.13254/j.jare.2020.0114

Isolating and characteristics of a Cd-resistant microorganism used in the biodegradation of di-*n*-octyl phthalate

LIU Biao, YU Meng-yuan, WANG Zhen, DU Dong-xia, CHEN Wei, XU Li-juan, WU Ying-ben, WU Min-xi, LIU Hui-zhi, YIN Hong-mei* (Hunan Microbiology Institute, Changsha 410009, China)

Abstract: To produce highly efficient di-*n*-octyl phthalate (DOP) - degrading microorganisms resistant to Cd, effective strains were screened out using selective media with DOP as the sole carbon source. The phylogenetic position and degradation characteristics of PD-2 were analyzed. Five strains of DOP-degrading and Cd-resistant bacteria were isolated from phthalate-contaminated soil. The strain PD-2 degraded DOP by more than 93.1% within 120 h, which was more than other strains did in the same time period. Based on its morphology and a 16S rDNA sequence analysis, strain PD-2 was identified as *Hyphomicrobium* sp. The DOP degradation rate changed in relation to the strain growth. PD-2 could efficiently degrade DOP over a wide range of DOP and Cd concentrations (100~800 mg·L⁻¹ and 0~600 mg·L⁻¹, respectively). Furthermore, PD-2 could utilize dimethyl phthalate, diethyl phthalate, di-*n*-butyl phthalate, di(2-ethylhexyl) phthalate, DOP, and phthalic acid as carbon sources, suggesting that PD-2 had a broad substrate spectrum. The inoculation of PD-2 to contaminated soil could markedly increase the rate at which DOP could be removed from soil. These results indicate that PD-2 is an efficient strain of *Hyphomicrobium* sp. for use in biodegradation and has potential for application in the bioremediation of cadmium and phthalate compound-contaminated soil.

Keywords: cadmium resistance; di-*n*-octyl phthalate; biodegradation; *Hyphomicrobium* sp.

收稿日期:2020-03-13 录用日期:2020-06-12

作者简介:刘标(1986—),男,湖南浏阳人,高级工程师,主要从事农业环境微生物基础与应用研究。E-mail:280795307@qq.com

*通信作者:尹红梅 E-mail:yyqhmm@163.com

基金项目:湖南省自然科学基金(2020JJ5321);湖南省农业农村厅2020年农业科研计划

Project supported: Natural Science Foundation of Hunan Province, China(2020JJ5321); The Research Foundation of Department of Agriculture and Rural Affairs of Hunan Province

邻苯二甲酸酯(又称酞酸酯, Phthalic acid ester, PAEs),是塑料制品中常用的增塑剂,被普遍应用于玩具、化妆品、食品包装材料、医疗用具、建筑装饰等行业的数百种产品中^[1],据统计,全世界每年的使用量达600万~800万吨^[2]。邻苯二甲酸酯在各种塑料制品中主要依靠氢键、范德华力结合在母体上,连接不牢固,易在塑料制品的生产、使用过程中释放到环境中^[3-4]。目前在土壤、水体、水体沉积底泥,甚至动植物中都检测出邻苯二甲酸酯^[5-9]。邻苯二甲酸酯是一类内分泌干扰物,在动物体中表现出类似性激素的作用,主要危害动物的呼吸、生殖系统。随着农业规模化的发展,农田土壤中邻苯二甲酸酯含量越来越高,对人类健康存在潜在的风险。目前邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二辛酯(DOP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)等6种邻苯二甲酸酯被美国环境保护署、欧盟、中国国家环境监测中心列为优先控制有机污染物^[10]。PAEs在环境中的自然降解速率较慢,而添加PAEs降解微生物可大幅提高其降解速率^[11-12],同时,由于微生物降解技术具有价格低廉、易操作等优点,被认为是较有前景的修复技术之一,成为目前的研究热点。目前,已分离筛选到大量能够降解邻苯二甲酸酯的微生物菌株,如假单胞菌、戈登氏菌、节杆菌、镰刀菌、红球菌等^[7,13-17],但大部分微生物菌株主要是以单一的邻苯二甲酸酯为降解对象而筛选获得的,而实际环境中往往存在多种复合污染物,因此,筛选出能够适应复合污染环境且具有PAEs降解功能的微生物菌株具有重要的研究意义和实用价值。

本研究以长侧链的DOP为降解对象,筛选具有一定重金属镉耐受性的微生物降解菌株,并对菌株的降解特性进行研究,期望为重金属镉和DOP复合污染的农田土壤修复提供微生物资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

DMP、DBP、DEP、DOP、DEHP、PA(邻苯二甲酸)均购自国药试剂有限公司,纯度>99%;试验中其他化学试剂为分析纯,有机溶剂均为色谱级。

1.2 微生物来源及相关培养基

微生物分离样品为湖南省长沙市望城区和浏阳市采取的农田土壤。

含镉无机盐培养基(Mineral salt medium, MSM): K_2HPO_4 5.8 g·L⁻¹, KH_2PO_4 4.5 g·L⁻¹, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g·L⁻¹, NaCl 0.75 g·L⁻¹, $MgCl_2$ 0.16 g·L⁻¹, $CaCl_2$ 0.02 g·L⁻¹, $CdCl_2$ 0.05 g·L⁻¹, $FeCl_3$ 0.002 g·L⁻¹, pH 7.0。

各底物培养基:在液体培养基中加入甲醇溶解的DMP、DBP、DEP、DOP、DEHP、PA母液,水浴加热使甲醇挥发,待甲醇完全挥发后再加入MSM配制所需浓度的各种底物培养基。

1.3 耐镉DOP高效降解微生物的分离筛选

称取土壤样品5g置于装有100mL含镉MSM培养基的三角瓶中,MSM培养基中添加终浓度为100mg·L⁻¹ DOP的甲醇溶液,待甲醇溶液挥发后,在30℃、180r·min⁻¹摇床中遮光振荡培养7d,然后取1mL培养液转移到下一DOP浓度的MSM培养基中,在相同条件下继续培养7d。以此相同步骤进行驯化培养,DOP浓度分别为200、300、400、500、600mg·L⁻¹,共驯化6个周期,获取既耐镉又对DOP具有降解能力的菌液。通过稀释涂布平板法在固体MSM培养基平板上筛选单菌落,并通过四分区划线法进一步纯化单菌落。将分离获得的各菌株在MSM试管斜面上培养7d,4℃低温保存待用。

1.4 初筛菌株对DOP降解能力的测定

将初筛获取的5株菌株接种在MSM培养基(DOP 500mg·L⁻¹)中,30℃、180r·min⁻¹活化培养24h,离心收集菌体,MSM液体培养基重悬各菌体,使菌液浓度OD₆₀₀约为0.2,即为各菌株的种子液。分别接种1mL各菌株的种子液到初始DOP浓度为500mg·L⁻¹的MSM培养基中,30℃、180r·min⁻¹遮光培养,分别在第96、120h测定各培养液中剩余的DOP含量,以不接种的空白培养基为对照,计算各菌株对DOP的降解率。

利用高效液相色谱法测定菌液中的DOP含量,采用外标法定量,在选定的色谱条件下进样,以峰面积对DOP浓度构建标准曲线。样品前处理方法:在培养液中加入50mL二氯甲烷萃取,收集有机相,重复萃取两次。将两次萃取液合在一起,在旋转蒸发器上将二氯甲烷蒸发接近干燥,然后加入10mL甲醇溶解萃取物,经0.22μm有机相过滤器过滤后,用高效液相色谱仪(HPLC, Agilent公司)测定DOP含量。

HPLC条件:色谱柱为Agilent Eclipse XDB-18(200mm×4.6mm, 5μm),流动相甲醇:水=95:5,进样量20μL,柱温35℃,流速1mL·min⁻¹,检测波长228nm。

1.5 高效降解菌 PD-2 的菌种鉴定

利用平板划线法在含 DOP 的 MSM 平板上接种菌株 PD-2, 培养 4 d 后观察其菌落形态特征和显微形态特征。

菌株 16S rDNA 序列分析: 用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 PD-2 的基因组 DNA, 采用通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 序列的扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C, 45 s; 56 °C, 45 s; 72 °C, 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用胶回收试剂盒纯化回收, 委托上海生物工程有限公司测序。测得的序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 通过 Mega 5.0 软件中 Neighbor-joining 方法构建系统发育进化树, 确定该菌的分类地位。

1.6 菌株 PD-2 降解特性研究

1.6.1 菌株 PD-2 的生长曲线及降解动力学曲线

将 PD-2 的种子液, 按 1% 接种量 (V/V) 加至 MSM 液体培养基中, DOP 初始浓度为 500 mg · L⁻¹, 30 °C、180 r · min⁻¹ 遮光振荡培养, 分别在 12、24、36、48、72、96、120、144 h 取样测定菌液的 OD₆₀₀ 和剩余的 DOP 含量, 每个处理重复 3 次。

1.6.2 不同初始 DOP 浓度对菌株 PD-2 降解能力的影响

在 MSM 培养基中加入 DOP 溶液, 使其初始浓度分别为 100、200、300、400、500、600、800、1 000、1 200 mg · L⁻¹, 按 1% 接种量接种 PD-2 种子液, 30 °C、180 r · min⁻¹ 遮光振荡培养 4 d 后测定菌液中剩余的 DOP 含量, 以不接菌作为空白对照, 计算第 4 d 的降解率。

1.6.3 菌株 PD-2 镉耐受能力测定

配制含镉浓度分别为 100、200、400、600、800、1 000、1 500、2 000 mg · L⁻¹ MSM (DOP 初始浓度为 500 mg · L⁻¹) 培养基, 按 1% 接种量接种 PD-2 种子液, 30 °C、180 r · min⁻¹ 遮光振荡培养 4 d 后测定菌液的 OD₆₀₀, 每个处理重复 3 次, 探究菌株对镉的耐受能力。

1.6.4 菌株 PD-2 对不同碳源底物的利用

在 MSM 培养基中分别添加 DMP、DBP、DEP、DEHP、PA、DOP 作为碳源底物, 初始浓度均为 500 mg · L⁻¹, 接种 PD-2 后按相同条件培养 4 d, 测定各菌液的 OD₆₀₀, 每个处理重复 3 次, 探究菌株对不同碳源的利用能力。

1.7 高效降解菌株在 DOP 污染土壤中的应用

试验所用土壤为农田水稻土 (未检出 DOP), 参考《土壤农化分析》^[18] 中的方法测定理化性质: 有机质 19.8

g · kg⁻¹, 全氮 0.68 g · kg⁻¹, 全磷 0.84 g · kg⁻¹, 全钾 5.78 g · kg⁻¹, 镉 0.41 mg · kg⁻¹, pH 6.53, 土样经自然风干过 20 目筛后备用。将 200 g 土壤置于 500 mL 锥形瓶中, 添加 DOP 溶液, 调节终浓度约为 100 mg · kg⁻¹, 配制成人工污染土壤。接种 PD-2 的种子液到土壤中, 终浓度约为 1.0 × 10⁸ CFU · g⁻¹, 以不接种的土壤为空白对照组, 将锥形瓶放入 30 °C 恒温培养箱避光培养, 分别在 0、5、10、15、20、25、30 d 时取样测定剩余 DOP 含量。

土壤样品中 DOP 含量的检测^[19]: 取土壤样品 1.0 g 放入玻璃离心管中, 加入 30 mL 丙酮/己烷 (V/V, 1:1) 混合溶液, 超声提取 10 min, 静置后收集有机相, 重复以上步骤 3 次, 合并有机相, 旋转蒸发近干后, 加入 5 mL 甲醇溶解 (加标回收率约为 93%)。将提取液过 0.22 μm 有机相滤膜, 过滤后转移至色谱瓶中, 检测方法同 1.4 节。

1.8 数据分析

采用 Excel 2003 软件对 3 次平行实验的数据求平均值和标准差, 并进行绘图, 利用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差 (ANOVA) 统计分析。

2 结果与讨论

2.1 耐镉 DOP 降解菌的筛选

随着化肥、农药和农用塑料地膜等生产物资的大量使用, 我国农田土壤表现出越来越明显的复合污染, 镉和邻苯二甲酸酯就是其中一种典型代表^[20]。本研究通过选择培养基的富集、驯化, 分离获得 5 株既能耐受一定浓度的重金属镉, 又能以 DOP 为唯一碳源生长的细菌菌株。在初始 DOP 浓度为 500 mg · L⁻¹ 的培养基中培养 120 h 后, 5 株菌株均对 DOP 有较明显的降解作用。其中, 菌株 PD-2 的降解率达到 93.1%, 显著高于其他菌株 (表 1), 且该菌株在血平板上不产

表 1 不同菌株对 DOP 的降解能力

Table 1 The ability of different strains on the DOP degradation

菌株 Strains	DOP 降解率 DOP degradation rate/%	
	96 h	120 h
PD-1	42.4 ± 3.8b	43.1 ± 3.2c
PD-2	92.4 ± 3.1a	93.1 ± 4.7a
PD-4	32.7 ± 2.7c	45.1 ± 3.8c
PD-6	52.7 ± 49.8b	49.8 ± 3.1c
PD-7	47.6 ± 2.9b	58.9 ± 3.2b

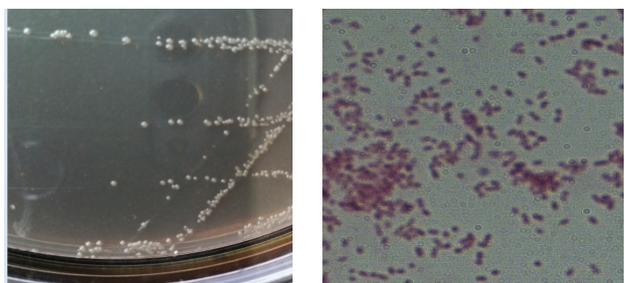
注: 同列不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The small letters in the same column indicate significant difference among different strains ($P < 0.05$).

生溶血现象,因此,选择PD-2进行进一步研究。

2.2 菌株PD-2的鉴定

菌株PD-2在含DOP的MSM固体培养基上形成的菌落较小,表面光滑、湿润,有光泽、不透明,边缘整齐。在油镜下,PD-2的菌体呈不规则的卵球形,单个或多个排列在一起,不形成芽孢,革兰氏染色阴性(图1)。



a. 菌落形态
Colony morphology

b. 显微形态($\times 1\,000$ 倍)
Micromorphological characteristics
($\times 1\,000$ times)

图1 菌株PD-2菌落形态及显微形态特征

Figure 1 Colony morphology and micromorphological characteristics of strain PD-2

PCR扩增获得PD-2的16S rDNA序列长度为1 380 bp(Genbank 登录号:MT071604),将其与NCBI数据库中已有序列进行同源性比对,菌株与*Hyphomicrobium facile*(NR_027610.1)有很高的相似性(99%),基于其16S rDNA序列构建的系统发育树如图2所示。结合菌株形态学特征和16S rDNA序列分析的结果,初步将菌株PD-2鉴定为生丝微菌。据报道,生丝微菌(*Hyphomicrobium* sp.)主要用于合成吡咯喹啉醌^[21]、降解甲胺磷、乙酰甲胺磷、水氨硫磷等农药^[22],本研究为首次将生丝微菌应用于DOP污染土壤修复。

2.3 菌株PD-2的生长曲线及其对DOP的降解效应

如图3所示,菌株PD-2在0~36 h生长较慢,培养

基中的DOP含量下降也较为缓慢,说明该菌株在含DOP的环境中适应期较长。36~72 h是菌株PD-2的对数生长期,DOP的含量在此期间迅速降低。72 h后菌株进入稳定生长期,此时DOP含量略有下降,第96 h时DOP下降至 $45.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,降解率达到最大,为90.9%。96 h以后进入衰退期,DOP的含量不再有明显变化。结合菌株的生长及降解曲线可知,菌株对DOP的降解依赖于其生物量的增加,可能是因为菌株在DOP的诱导下通过分泌酯酶、邻苯二甲酸降解相关酶^[10]实现对DOP的降解,而酶的分泌与菌株的生长代谢密切相关。

2.4 PD-2对不同初始浓度DOP的降解效果

PD-2对不同初始浓度DOP的降解效果(图4)显示,当DOP初始浓度低于 $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,4 d内PD-2对DOP的降解率均超过90%,说明菌株对DOP具有较强的耐受性。当DOP浓度继续提高时,降解率有明显的下降,这一结果与韩蕊等^[23]、杨婧等^[24]报道的菌株降解PAEs的特性类似,原因可能是高浓度的DOP会对PD-2的生长繁殖或相关酶的分泌产生不利

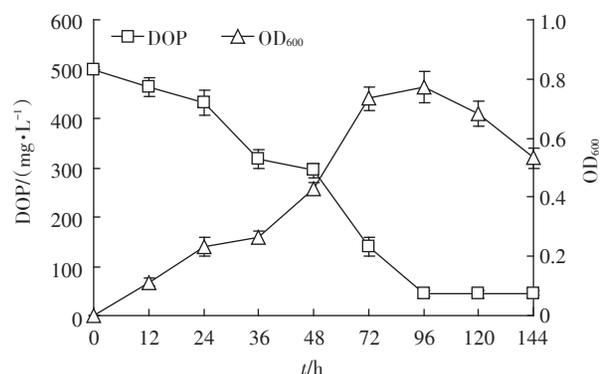


图3 菌株PD-2利用DOP的生长降解曲线

Figure 3 The growth curve and DOP degradation curve of strain PD-2

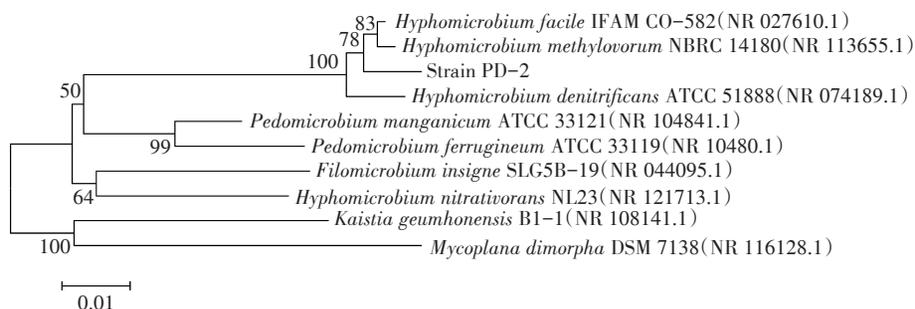
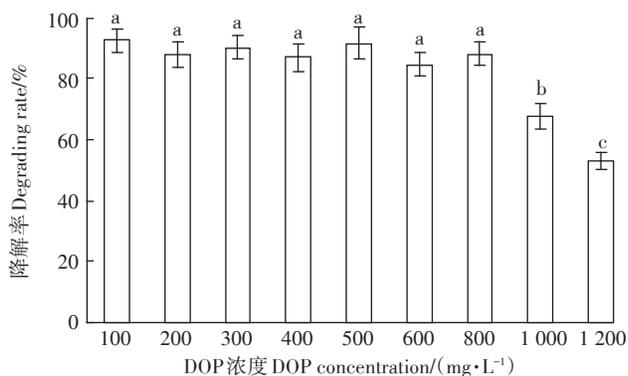


图2 菌株PD-2的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain PD-2



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同
The different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). The same below

图4 不同初始DOP浓度对PD-2降解能力的影响

Figure 4 Effect of different initial DOP concentration on the biodegradation of PD-2

影响,从而影响菌株对其分解利用。

2.5 菌株PD-2的镉耐受性

如图5所示,在镉浓度为0~600 mg·L⁻¹时,菌株PD-2的生长均较好,且无显著差异,菌株具有相对较强的镉耐受性。随着培养基中镉浓度的增加,PD-2仍能生长,但生物量显著减少,说明高浓度的镉对菌株生长有一定抑制作用,在镉重度污染区菌株PD-2对DOP的修复效率会显著降低。

2.6 菌株PD-2对不同碳源底物的利用

培养4 d后,菌株PD-2在6种底物液体培养基中均能生长,但生长状况不同。其在含短侧链酞酸酯底物(DMP、DEP、DBP)的培养基中生长较好,在长侧链酞酸酯底物(DEHP、DOP)的培养基中生长相对较慢(表2)。这一结果与先前报道的菌株寡养假单胞菌B3^[25]、分枝杆菌ASW6D^[24]、*Gordonia* sp.JDC-2^[26]特性类似。在实际污染环境中往往是多种邻苯二甲酸酯

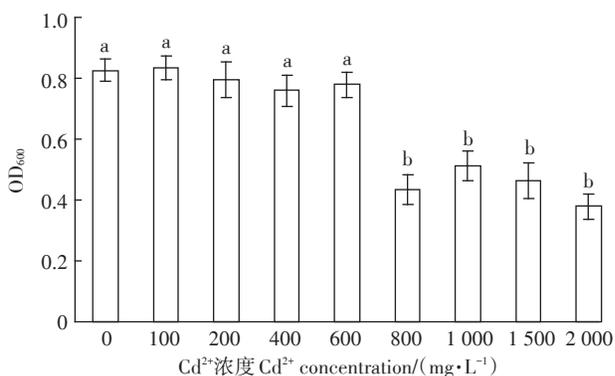


图5 镉浓度对菌株PD-2生长的影响

Figure 5 Effect of Cd²⁺ concentration on the growth of strain PD-2

类化合物并存,菌株PD-2不仅可降解DOP,还可利用其他种类的PAEs(表2),因此,该菌株在实际污染环境修复工程中具有潜在的应用价值。

2.7 菌株PD-2对土壤中DOP的降解效果

菌株PD-2在DOP污染土壤中降解效果如图6所示,接种菌剂PD-2到土壤30 d后,DOP的去除率达64%,而未接种的对照组为14.8%,说明菌剂PD-2可显著提高土壤中DOP的去除率。添加菌剂PD-2的处理组DOP的降解在前5 d较缓慢,第5~10 d降解速度显著增加,10 d后降解速率又变得较为缓慢。原因可能是在接种菌剂前期,菌株PD-2与土壤中土著微生物存在竞争关系,其生长代谢受到一定抑制;第5~10 d降解速率加快是因为PD-2在与土著微生物的竞争中逐渐占据优势;后期降解速率变慢可能是因为DOP在土壤中进入缓慢吸附阶段,其通过分配作用进入土壤微孔内或吸附在高能位点上,与土壤成分结合更加紧密,微生物对其降解也越困难^[27]。

表2 菌株PD-2底物利用试验

Table 2 The test of strain PD-2 using the substrates

底物 Substrates	DMP	DEP	DBP	DEHP	DOP	PA
OD ₆₀₀	1.114	0.848	1.087	0.679	0.798	0.898

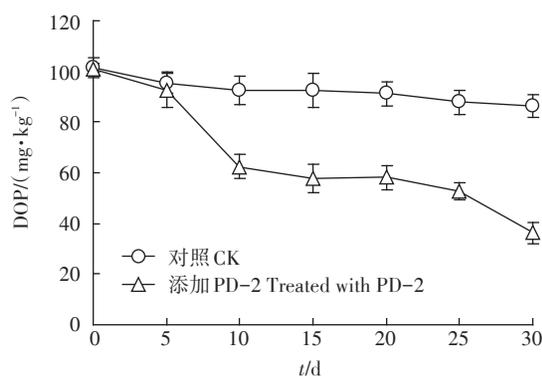


图6 PD-2对污染土壤中DOP的降解效果

Figure 6 Biodegradation of DOP by PD-2 in soil

3 结论

(1)从农田土壤中筛选出一株既耐受重金属镉又可高效降解利用DOP的菌株PD-2,在DOP初始浓度为500 mg·L⁻¹的液体培养基中培养120 h后,其对DOP的降解率可达93.1%。综合菌株形态特征和16S rDNA序列,将该菌鉴定为生丝微菌属(*Hyphomicrobium* sp.),本研究首次将获得的生丝微菌用于降解土壤中DOP。

(2)菌株PD-2对液体培养基中DOP的降解依赖于其生物量的增加,其对DOP的作用浓度和耐镉浓度范围广,可高效降解 $100\sim 800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围的DOP(降解率大于80%),在含镉浓度 $0\sim 600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中生长良好。PD-2可利用其他常见PAEs和邻苯二甲酸作为底物生长,底物种类范围广。

(3)添加PD-2到镉和DOP复合污染土壤中,其对DOP的降解作用显著,PD-2在镉和DOP复合污染土壤的修复方面具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Wang J, Chen G C, Christie P, et al. Occurrence and risk assessment of phthalate esters in vegetables and soils of suburban plastic film greenhouses[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 523: 129-137.
- [2] Net S, Sempere R, Delmont A, et al. Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. [J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49: 4019-4035.
- [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] 刘庆, 杨红军, 史衍玺, 等. 环境中邻苯二甲酸酯类污染物研究进展[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 organic pollutants in the environment[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(8): 968-975.
- [7] 王玉婷, 刘方, 任文杰, 等. 酞酸酯污染农田土壤生物修复研究进展[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(4): 120-128. WANG Yu-ting, LIU Fang, REN Wen-jie, et al. Advances in bioremediation of phthalate contaminated farmland soil[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(4): 120-128.
- [8] 李晓贝, 张腾, 周昌艳, 等. 四种蔬菜对DBP和DEHP及其代谢物的吸收累积研究[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(1): 87-94. LI Xiao-bei, ZHANG Teng, ZHOU Chang-yan, et al. Absorption and accumulation of di-n-butyl phthalate (DBP) and Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and metabolites in four vegetables[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(1): 87-94.
- [9] 李艳, 刘洪禄, 顾华, 等. 北京市东南郊灌区土壤和农产品酞酸酯污染风险评估[J]. 农业工程学报, 2017, 33(18): 203-212. LI Yan, LIU Hong-lu, GU Hua, et al. Assessment of contamination risk of PAEs in soils and crops of irrigation district located at southeastern suburbs of Beijing[J]. *Transactions of the CSAE*, 2017, 33(18): 203-212.
- [10] Ren L, Zhong L, Liu H M, et al. Bacteria-mediated phthalic acid esters degradation and related molecular mechanisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(3): 1085-1096
- [11] 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.
- [12] 秦华, 林先贵, 尹睿, 等. 接种降解菌对土壤中邻苯二甲酸二辛酯降解的影响[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.
- [13] Wu Q, Liu H, Ye L S, et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate esters by *Bacillus* sp. SASHJ under simulated shallow aquifer condition[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2013, 76: 102-107.
- [14] 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: 177-186.
- [15] Jin D, Bai Z, Chang D, et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate by an isolated *Gordonia* sp strain QH-11: Genetic identification and degradation kinetics[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 221: 80-85.
- [16] 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 and Biotechnology*, 2010, 20: 1440-1445.
- [17] 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: 16609-16619.
- [18] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 三版. 北京: 中国农业出版社, 1999. BAO Shi-dan. *Agrochemical soil analysis*[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 1999.
- [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] 张煜行, 谯华, 何明靖, 等. 镉及邻苯二甲酸酯复合污染农田土壤的修复技术研究进展[J]. 当代化工, 2019, 48(9): 2167-2172. ZHANG Yu-hang, QIAO Hua, HE Ming-jing, et al. Research progress in the soil remediation technology for cadmium and phthalate compound contaminated farmland[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2019, 48(9): 2167-2172.
- [21] 柯崇榕. 适应性驯化选育高产吡咯喹啉酮的生丝微菌突变株[J]. 生物工程学报, 2020, 36(1): 152-161. KE Chong-rong. Breeding of *Hypomicrobium denitrificans* for high production of pyrroloquinoline quinone by adaptive directed domestication[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(1): 152-161.

- [22] 王莉, 凌琪, 伍昌年, 等. *Hyphomicrobium* sp. MAP-1 菌株修复甲胺磷乙酰甲胺磷和水胺硫磷污染土壤的实验研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(1): 81-87. WANG Li, LING Qi, WU Chang-nian, et al. Bioremediation on the soil contaminated by methamidophos, acephate and isocarbophos by *Hyphomicrobium* sp. MAP-1[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(1): 81-87.
- [23] 韩蕊, 王冬莹, 芮洋, 等. 一株降解邻苯二甲酸酯真菌的筛选及其降解特性研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(11): 2941-2946. HAN Rui, WANG Dong-ying, RUI Yang, et al. Biodegradation of PAEs by a newly isolated fungus *Eupenicillium javanicum* F9[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(11): 2941-2946.
- [24] 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.
- [25] 杨捷, 姚炎华, 尹大强, 等. 邻苯二甲酸酯高效降解菌的筛选及表征[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2018, 46(7): 944-950. YANG Jie, YAO Yan-hua, YIN Da-qiang, et al. Screening and characterization of an efficient phthalate-ester degrading strain[J]. *Journal of Tong Ji University(Natural Science)*, 2018, 46(7): 944-950.
- [26] Wu X L, Liang R X, Dai Q Y, 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.
- [27] Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants[J]. *Environmental Science and Technology*, 2000, 34(20): 4259-4265.