

王春龙, 王志刚, 由义敏, 等. 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[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(3): 215-221.

WANG Chun-long, WANG Zhi-gang, YOU Yi-min, et al. Response of the Sensitive Strains and the Signal Regulation Pathway in Soils to Dimethyl Phthalate [J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(3): 215-221.

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

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate, DMP)是一类具有生物毒性的有机化合物,已被中国环境监测中心和美国环保署列为优先控制污染物之一。土壤微生物对土壤环境变化能够作出精准且快速的反应,并能预测土壤的污染状况。因此,研究土壤微生物对邻苯二甲酸二甲酯污染的响应显得十分必要。试验通过土壤微生物宏基因组测序,探讨了DMP污染对土壤微生物敏感菌的丰度、多样性及信号调节途径的影响。首先,用DMP处理未污染土壤,使DMP终浓度为0、5、10、20、40 mg·kg⁻¹,然后,暗培养20 d,进行土壤宏基因组测序。结果发现与芳香族化合物降解相关的菌种的相对丰度受到DMP污染促进,而其余在土壤中占比例较大且变化较显著的菌种的相对丰度受到DMP的抑制,且抑制效应与污染物浓度呈正相关;DMP污染导致土壤微生物群落 Simpson 和 Shannon 多样性降低;土壤微生物的ABC转运系统、双组分系统(TCS)和磷酸转移酶系统(PTS)总基因丰度及相关酶的基因丰度均受DMP污染的促进。研究表明DMP污染改变了土壤微生物敏感菌种的丰度,干扰土壤微生物基因表达调控系统,进而有可能引起土壤生态系统失衡,影响土壤健康。阐述DMP对土壤微生物的生态毒理效应对优化环境生态系统服务功能、改善环境质量具有科学意义和实际价值。

关键词:邻苯二甲酸二甲酯;土壤;微生物;信号调节;多样性;基因丰度

中图分类号:S154.3

文献标志码:A

文章编号:2095-6819(2018)03-0215-07

doi: 10.13254/j.jare.2017.0325

Response of the Sensitive Strains and the Signal Regulation Pathway in Soils to Dimethyl Phthalate

WANG Chun-long, WANG Zhi-gang*, YOU Yi-min, LÜ Zhi-hang, LIU Ze-ping, CHEN Wen-jing, SHI Yi-ran

(Institute of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Dimethyl phthalate (DMP), a biotoxic organic compound, has been listed as one of the priority control pollutants by China's Environmental Monitoring Center and the USA Environmental Protection Agency. Soil microorganism can accurately and quickly respond to the changes of soil environment and soil contamination. Therefore, it is necessary to study the response of soil microorganisms to DMP. This study investigated the impact of dimethyl phthalate (DMP) on the microbial community structure, diversity and signal regulation pathway in soils through metagenome sequencing. DMP were used to treat uncontaminated soil, and the final concentration of DMP was 0, 5, 10, 20, 40 mg·kg⁻¹. Then, the samples were incubated for 20 days in dark and sequenced by metagenome. The results showed that the growth of degradation of aromatic compound was promoted and the growth of the remainder strain was inhibited by DMP contamination. Inhibitory effect was positively correlated with DMP concentration. DMP decreased microbial community diversity in soils. The total abundance of ABC transporters, two-component system (TCS) and phosphotransferase system (PTS) genes were increased by DMP contamination. The gene abundance of relative enzymes also was enhanced along with the increasing DMP concentration. Therefore, DMP contamination changed microbial community structure, and disturbed ecological balance and soil health in soils. The ecotoxicological effect of DMP on soil is of scientific significance and practical value to optimize the service function of environmental ecosystem and improve the environmental quality.

Keywords: dimethyl phthalate; soil; microorganism; signal regulation; diversity; gene abundance

收稿日期:2017-12-15 录用日期:2018-01-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31670375);研究生创新科研项目(YJSCX2016-ZD16)

作者简介:王春龙(1994—),男,吉林长春人,硕士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail: 18846321836@163.com

*通信作者:王志刚 E-mail: wzg1980830@sina.com

邻苯二甲酸酯(Phthalate acid, PAEs)是一类人工合成的有机化合物,普遍应用于塑料薄膜、农药载体、食品包装、化妆品香味品及润滑剂等多种商品的生产^[1-2];同时也应用于聚氯乙烯材料,能使聚氯乙烯由硬塑胶变为弹性的塑胶,在塑料中含量为 20%~40%,有的甚至高达 55%^[3]。PAEs 通过氢键和范德华力与塑料基质相结合,因此极易与塑料分离进入环境中,对土壤、水等环境造成危害,植物体可富集并积累 PAEs,通过食物链危害动物和人类^[4]。邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate, DMP)是一种被广泛应用的 PAEs 类物质,广泛存在于大气、水、土壤环境中^[5-7],研究发现,广州、深圳地区菜地土壤中 PAEs 总含量为 3~45.67 mg·kg⁻¹,其中 DMP 含量远超美国土壤 PAEs 污染控制标准^[8]。土壤中 DMP 的存在会导致土壤呼吸及相关酶活性发生改变,进而影响土壤健康^[3]。因此,中国环境监测中心和美国环保署早已将 DMP 列为优先控制污染物之一^[9]。

土壤微生物是土壤营养物质循环和能量流动中关键的组成部分和主要的驱动力,其与土壤肥力及土壤健康程度都有密切关系^[10],还可以调节土壤有机质的分解、腐殖质的形成和营养元素的循环等^[11]。与土壤物理化学性质相比,土壤微生物对土壤环境变化的响应更明显,可更快速和精准地对土壤环境条件的变化作出反应,较早地预测土壤环境污染状况的变化过程^[12]。本试验研究土壤微生物敏感菌种的丰度及基因调节途径对 DMP 污染的响应变化,从而进一步阐释 DMP 对土壤微生物的环境行为,为了解 DMP 对土壤微生物的生态毒理效应及生物修复技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验土壤制备

DMP(纯度>99.9%)购于天津市光富精细化工研究所,丙酮(纯度>99.5%)助溶,制成 5 g·L⁻¹的 DMP 储备液,于 4℃的冰箱内避光保存备用。取 20 kg 过 0.30 mm 筛的土壤,在 25℃的黑暗培养箱中预培养 7 d,恢复土壤微生物活性。试验土壤的基本性质如表 1 所示。在 1 kg 土壤中,加入 200 mL DMP 储备液,使各样品土壤的 DMP 质量分数达到 1 000 mg·kg⁻¹。待丙酮挥发后,分别取 0、0.05、0.1、0.2、0.4 kg 的上述土壤和 1、0.95、0.9、0.8、0.6 kg 的未污染土壤混合均匀,混合后的 1 kg 样品土壤置于 1 L 陶瓷花盆中,制成 5 个浓度的土壤样品,分别为 DMP 污染对照(CK, 0 mg·

kg⁻¹)、DMP1(5 mg·kg⁻¹)、DMP2(10 mg·kg⁻¹)、DMP3(20 mg·kg⁻¹)及 DMP4(40 mg·kg⁻¹),CK 中只加等量的丙酮进行处理,每个处理做 3 次重复。将土壤样品置于恒温培养箱内培养,用恒重方法保持其土壤的含水量在 30%,温度控制在(25±2)℃,培养箱内的相对湿度保持在 70%±5%,暗培养 20 d 之后,取样进行宏基因组测序^[5]。

表 1 受试土壤(采自东北地区)的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of the tested soil obtained from Northeast China

性质 Properties	数值 Value
土壤类型 Soil types	黑土 Mollisol
pH	6.04±0.11
有机质 Organic matter/g·kg ⁻¹	42.14±8.54
总氮含量 Total nitrogen/g·kg ⁻¹	2.56±0.62
总磷含量 Total phosphorus/g·kg ⁻¹	1.54±0.38
速效磷 Available phosphorus/mg·kg ⁻¹	24.21±3.24
速效钾 Available potassium/mg·kg ⁻¹	208.64±29.54

1.2 DMP 降解实验

取 10 g 上述培养的土壤样品,使用乙酸乙酯萃取样本,再经旋转蒸发仪提取不同样品的 DMP,甲醇洗脱。然后采用液相色谱法测定培养 0 d 和 20 d 的土壤样本中 DMP 的浓度。液相色谱参数:样本量=1 μL;色谱柱为 5 μL Eclipse XDB-C18;色谱条件:柱的温度=25℃,流动相:甲醇和水,体积比=90:10;探测波长=228 nm。

1.3 DNA 提取、测序与数据统计

每个样品取 10 g 土壤使用 OMEGA-soil DNA Kit 进行土壤微生物 DNA 提取并用于宏基因组测序和进一步分析^[13]。具体方法为:(1)环境样品土壤 DNA 抽提;(2)通过 Covaris M220 将所得 DNA 片段化约为 300 bp 的短片段;(3)将所得的段片构建 Pair End (PE)文库;(4)文库模板进行 PCR 扩增富集;(5)利用氢氧化钠将富集产物变性,产生单链 DNA;(6)利用桥式 PCR 扩增 DNA,产生 DNA 簇;(7)再将 DNA 扩增子线性化成为单链;(8)Illumina Hiseq 测序。每个样品进行 3 次上机测序。

统计原始序列,在测序实验中采用了多个样品平行混合测序,各样品中的序列均引入了一段标示其样品来源信息的 Index 标签序列。根据 Index 序列区分各个样品的数据,提取出的数据以 fastq 格式保存。每个样品均有测序两端的 Reads,并且 Reads 的顺序是严格一致、相互对应的。

为了提高后续分析质量和可靠性,对原始测序数据进行清洗处理,将所得数据进行拼接组装,选择最优组装结果。将基因序列聚类,来自相同环境的样品之间有很多微生物(或基因)是共有的,不同基因的丰度在样品之间的变化可以反映样品之间的共性和差异。构建一个非冗余基因集描述该类环境所有基因的整体信息。然后进行基因丰度计算,将每个样品的高质量 reads 与非冗余基因集进行比对(95% identity),统计基因在对应样品中的丰度信息^[13]。

1.4 物种分类学注释

所有样品的序列装配为叠连群的数目为 4 891~15 857,然后将叠连群预测为 ORFs,从 CK 到 DMP4 的范围为 6 581~24 437。使用 BLASTP 将基因集与非冗余蛋白质的氨基酸序列数据库(NR 数据库)进行比对,并通过 NR 数据库对应的分类学信息数据库获得物种注释,然后使用物种对应的基因丰度总和计算该物种的丰度,并在域、界、门、纲、目、科、属、种各个分类学水平上统计物种在各个样品中的丰度,从而构建相应分类学水平上的丰度谱^[13]。

1.5 微生物群落多样性指数计算

宏基因组测序后,得出每个样品的序列(Reads)及操作分类单元(OTUs)的数量。根据所得数据计算香浓(Shannon)指数和辛普森(Simpson)指数^[14-15],计算公式如下:

$$\text{Shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (1)$$

$$\text{Simpson} = 1 - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \left(\frac{n_i}{N} \right)^2 \quad (2)$$

S_{obs} 为试验得到的 OTUs 数量; n_i 为个体的 OTUs 数量; N 为群落中个体总数。

1.6 KEGG 功能注释

运用 BLAST 将基因集序列与京都基因和基因组百科全书(KEGG)的基因数据库(GENES)进行比对。根据比对结果使用 KOBAS 2.0 进行功能注释,并计算对应的基因丰度总和及该功能类别的丰度^[13]。

2 结果与分析

2.1 土壤中 DMP 浓度变化

DMP 处理土壤后,培养 0 d 时,测定的 DMP 浓度与添加的 DMP 浓度基本一致。培养 20 d 后,发现 DMP 浓度显著降低(图 1)。

2.2 土壤微生物敏感菌种的变化

本试验结果发现经 DMP 污染土壤 20 d 后,共鉴

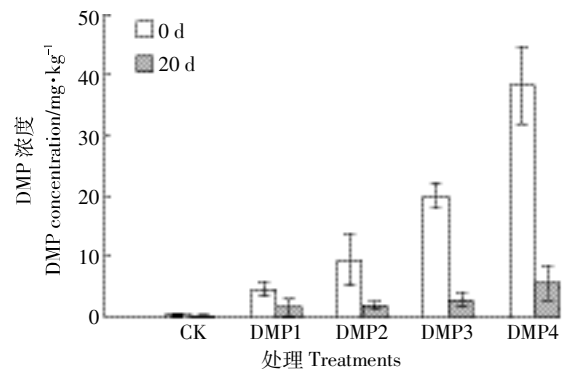


图 1 DMP 浓度变化

Figure 1 The change of DMP concentration

定出 3 855 种土壤微生物,将 21 种显著变化的微生物定义为对 DMP 敏感菌株,可以发现,随着 DMP 污染浓度的增加土壤微生物敏感菌种的生长显著增加或抑制(表 2)。其中一些敏感菌种 *Arthobacter phenanthrenivorans*、*Arthobacter siccitolerans*、*Arthobacter* sp.162MFSHa1.1、*Arthobacter* sp. UNC362MFTsu5.1、*Arthobacter* sp. SJCon、*Arthobacter* sp. FB24、*Arthobacter globiformis*、*Arthobacter chlorophenolicus*、*Arthobacter* sp. Rue61a、*Arthobacter* sp. TB 26、*Methylobacter mobilis* 和 *Methylobacter versatilis* 的生长随着 DMP 污染浓度增加而加快,而有一些敏感菌种的生长受到 DMP 抑制,主要包括 *Lactococcus lactis*、*Lactococcus raffinolactis*、*Lactococcus chungangensis*、*Solirubrobacter* sp. URHD0082、*Solirubrobacter soli*、*Conexibacter woe-sei*、*Candidatus Nitrososphaera gargensis*、*Candidatus Nitrososphaera evergladensis* 和 *Nitrososphaera viennensis*。

2.3 土壤微生物多样性

本试验对通过宏基因组测序得到的结果,进行了土壤微生物群落多样性分析。结果发现 Simpson 指数和 Shannon 指数均随 DMP 污染浓度增加而降低(图 2)。Simpson 指数从 0.968 0 降低至 0.764 5,Shannon 指数从 6.953 8 降低至 4.749 0。在 DMP 污染浓度相对较低时(DMP1 和 DMP2)多样性指数降低比较缓慢,而高浓度 DMP 污染时(DMP3 和 DMP4)下降程度较大。

2.4 土壤微生物信号调节途径注释结果

为了预测土壤微生物的信号调控途径,采用 KEGG 数据库与所有样品基因组进行比对分析。途径注释结果表明,DMP 污染增加了土壤系统的 ABC 转运系统、双组分系统(TCS)及磷酸转移酶系统(PTS)

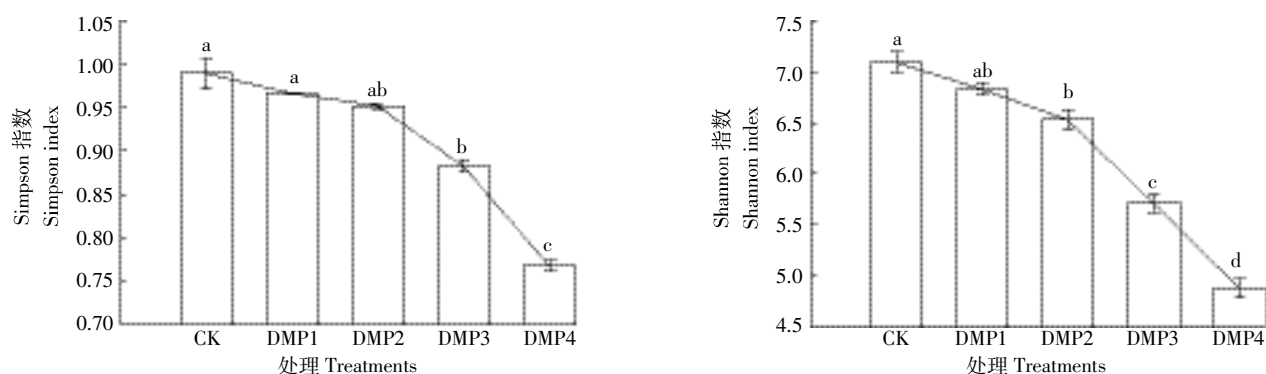
表 2 DMP 对微生物敏感菌种丰度的影响

Table 2 Effect of DMP on the abundance of microorganism sensitive bacteria

微生物 Microorganism	所占土壤微生物比例 Proportion of soil microbes/%				
	CK	DMP1	DMP2	DMP3	DMP4
<i>Arthobacter phenanthrenivorans</i>	0.2±0.012a	3±0.182b	5±0.351c	11±0.52d	16±0.44e
<i>Arthobacter siccitolerans</i>	0.1±0.006a	2±0.1b	3±0.133c	5±0.12d	7±0.41e
<i>Arthobacter</i> sp. 162MFSa1.1	0.07±0.002a	0.6±0.036b	1±0.046c	2±0.063d	3±0.152e
<i>Arthobacter</i> sp. UNC362MFTsu5.1	0.06±0.003a	0.6±0.043a	0.9±0.054b	2±0.041c	2±0.023d
<i>Arthobacter</i> sp. SJCon	0.05±0.003a	0.8±0.042b	1±0.063c	3±0.092d	4±0.08e
<i>Arthobacter</i> sp. FB24	0.05±0.002a	0.7±0.042b	1±0.071c	2±0.193d	3±0.206e
<i>Arthobacter globiformis</i>	0.05±0.002a	0.4±0.008b	0.5±0.006c	1±0.032d	1±0.009d
<i>Arthobacter chlorophenicus</i>	0.05±0.006a	0.7±0.021b	1±0.062c	2±0.088d	3±0.096e
<i>Arthobacter</i> sp. TB 26	0.03±0.001a	0.2±0.006b	0.3±0.018c	0.6±0.012d	0.7±0.056e
<i>Arthobacter</i> sp. Rue61a	0±0a	0.2±0.003b	0.4±0.021c	0.8±0.026d	1±0.064e
<i>Candidatas Nitrososphaera gargensis</i>	6±0.325a	5±0.153b	5±0.083b	5±0.121b	2±0.111c
<i>Candidatas Nitrososphaera evergladensis</i>	6±0.261a	2±0.092b	2±0.064b	2±0.107b	1±0.035c
<i>Nitrososphaera viennensis</i>	2±0.124a	2±0.032a	2±0.193a	1±0.042b	0.9±0.027b
<i>Lactococcus lactis</i>	3±0.153a	3±0.006a	3±0.076a	2±0.113b	1±0.062c
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	2±0.112a	1±0.06b	1±0.037b	0.9±0.063b	0.5±0.02c
<i>Lactococcus chungangensis</i>	1±0.061a	1±0.031a	1±0.066a	0.7±0.045b	0.4±0.021c
<i>Solirubrobacter</i> sp. URHD0082	1±0.052a	1±0.039a	1±0.048a	0.8±0.052b	0.6±0.024c
<i>Solirubrobacter soli</i>	1±0.062a	1±0.047a	0.9±0.052b	0.7±0.048c	0.5±0.03d
<i>Conexibacter woesei</i>	2±0.168a	2±0.12a	2±0.169a	1±0.079b	0.9±0.032b
<i>Methylobacter mobilis</i>	0.04±0.003a	0.07±0.004b	0.1±0.008c	0.3±0.016cd	0.9±0.039d
<i>Methylobacter versatilis</i>	0.03±0.001a	0.05±0.003b	0.09±0.006c	0.3±0.003d	0.8±0.024e

注:同行不同小写字母表示不同 DMP 浓度处理间分析差异达 5%显著水平。

Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level.



图中直方柱上方小写字母不同表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同

Different lowercase letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level. The same below

图 2 微生物多样性指数对 DMP 污染响应

Figure 2 The response of microbial diversity to DMP contamination

的总基因丰度,且其丰度随着 DMP 污染浓度增加而显著升高(图 3A~图 3C)。土壤 ABC 转运系统的单糖运输 ATP 酶及 *MalK* 和 *MsmK* 的基因丰度在 DMP 污染后显著增加(图 3D 和图 3E)。在土壤 TCS 中,随着 DMP 污染浓度的增加,苹果酸脱氢酶、柠檬酰-CoA 裂解酶和组氨酸激酶的基因丰度也呈增长趋势(图 3F~

图 3H)。DMP 污染后,土壤 PTS 中磷酸转移酶及 *Crr* 和 *BglF* 的基因丰度显著提高,且与 DMP 浓度呈正相关(图 3I 和图 3J)。

3 讨论

土壤微生物可以早期预测土壤环境污染的变化

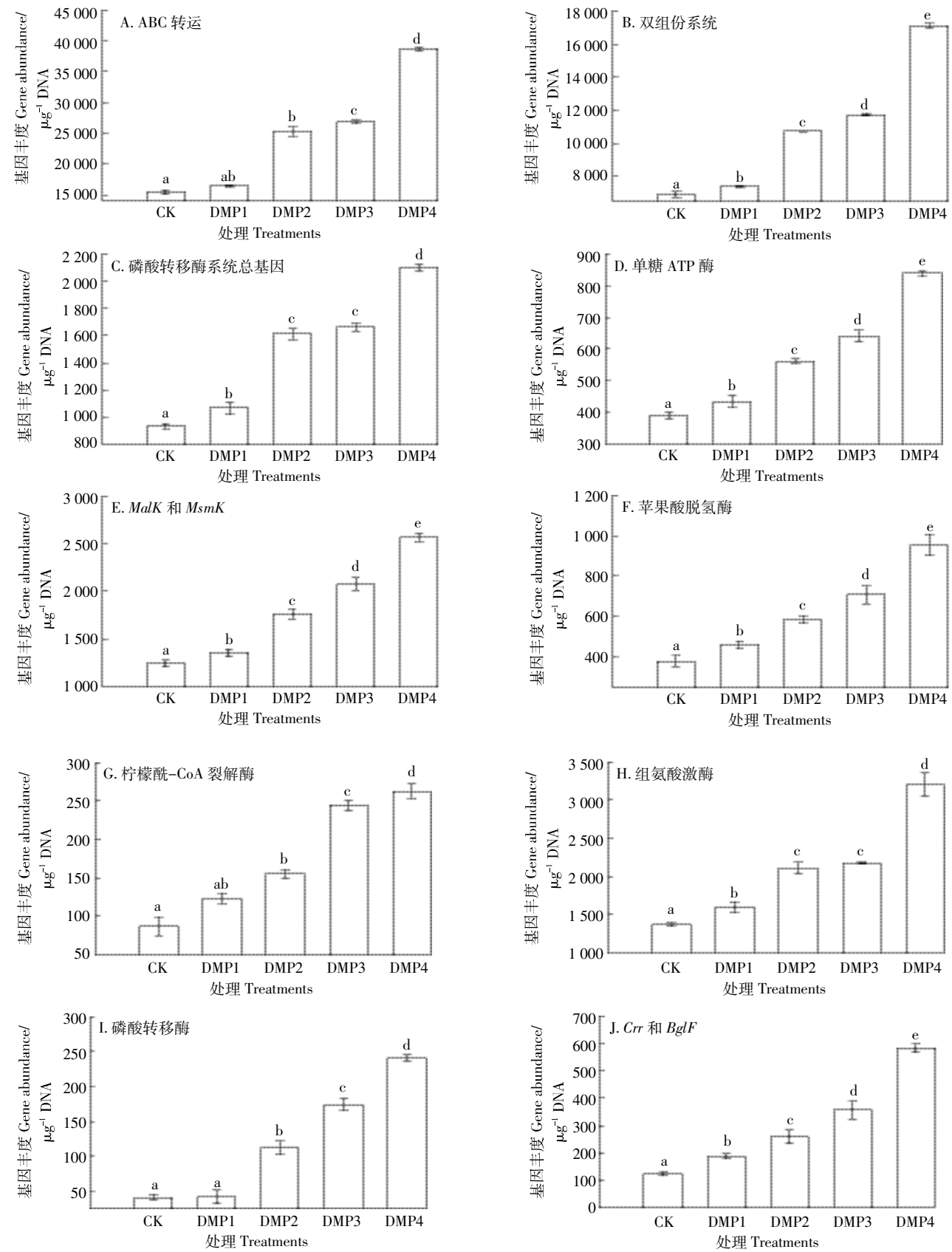


图 3 DMP 污染对土壤调节途径的影响
Figure 3 Effect of DMP on regulation pathways in soils

过程,参与土壤物质和能量转化等重要过程^[16]。宏基因组测序被广泛用于分析原始和污染环境的微生物群落 DNA,并评估污染物对原始生态系统的影响^[17]。本试验基于宏基因组测序,分析比较 CK 和 DMP 处理样品得出各样品的微生物敏感菌种的丰度、调节途径等,从而揭示 DMP 污染对土壤微生物系统的环境行为。

本文在菌种水平分析土壤微生物群落时筛选出了 21 株菌种,这些菌种在微生物群落中所占比例较大,且受到 DMP 污染显著影响,均为敏感菌种。*Arthrobacter* 在土壤中主要功能是对芳香族化合物进行降解,DMP 污染土壤后,发现土壤 *Arthrobacter* 菌属中 *Arthrobacter phenanthrenivorans*、*Arthrobacter citolerans* 和 *Arthrobacter* sp. SJCon 菌种在土壤微生物系统中所占的比例显著增加,且与 DMP 浓度呈正相关^[18-19],与 DMP 降解实验结果一致。*Candidatus Nitrososphaera gargensis*、*Candidatus Nitrososphaera evergladensis* 和 *Nitrososphaera viennensis* 菌种属于 *Nitrososphaera* 菌属,这些菌种对土壤氮循环十分重要,而其生长受 DMP 抑制^[20]。*Conexibacter woesei* 菌种在土壤系统中也参与土壤氮循环,对土壤健康极其有益,它们的生长受到 DMP 抑制^[21]。*Lactococcus lactis*、*Lactococcus raffinolactis* 和 *Lactococcus chungangensis* 菌种是丰富的碳氮基质,在各种植物中存在^[22]。*Solirubrobacter* sp. URHD0082 和 *Solirubrobacter soli*^[23] 菌种,可产生活性次生代谢产物,可能对某些菌的生长有促进和抑制作用^[24]。*Methylobacterium mobilis* 和 *Methylobacterium versatilis* 属于甲基营养型,是专性甲基应用者并且与有机污染物降解有关^[25],且其生长受 DMP 污染抑制。除与降解有机物有关的菌种外,其余菌种的相对百分比均随 DMP 浓度的增加而减少。研究表明 DMP 污染抑制了大部分菌种的生长。而且,通过计算 Simpson 指数和 Shannon 指数,分析其结果发现 DMP 污染降低了土壤微生物群落的多样性^[15,26]。因此,DMP 污染显著改变了土壤微生物敏感菌种的丰度。本试验结果与 Wang 等^[5]的 16S 高通量测序(V3~V4 区)结果一致。

ABC 转运系统存在于所有生物体中,其功能是将底物转运至活细胞,运输的基质包括糖、氨基酸、肽、离子及其他分子,也可促进细胞对营养的吸收^[27]。DMP 污染增加了 ABC 转运系统的总基因丰度以及单糖转运 ATP 酶的 *MalK* 和 *MsmK* 基因丰度,可能会增加某些菌的代谢及繁殖,也可能加速土壤中营养物

质的消耗。在原核生物中,TCS 是一种复杂的信号转导通路,它可感知到环境中的任何变化并作出相应的反应^[28],可调节下游基因表达,从而协调细胞反应,参与生物化学过程,并可作为能量载体^[29]。在 DMP 污染后,TCS 的总基因丰度以及苹果酸脱氢酶、组氨酸激酶以及柠檬酰-CoA 连接酶基因的丰度显著增加,表明 DMP 污染可能导致土壤代谢及能量转换加速。PTS 在细菌中是调节营养物质代谢的关键信号转导通路^[30],DMP 污染增加了 PTS 的总基因丰度以及磷酸转移酶、*Crr* 和 *BglF* 基因的丰度,PTS 的变化是菌种丰度改变的原因之一^[31]。因此,ABC 转运体、TCS 和 PTS 的变化可能引起土壤微生物菌种丰度的改变。

4 结论

DMP 污染处理土壤 20 d 后,通过土壤宏基因组测序共发现 21 株对 DMP 污染敏感的菌种,其中一部分敏感菌种的生长受到了 DMP 污染的促进,而另一部分菌种的生长则被抑制;DMP 的污染降低了土壤微生物群落的多样性,且随着 DMP 浓度增大,土壤微生物群落多样性降低;土壤微生物 ABC 转运系统、TCS 和 PTS 的总基因丰度及相关酶的基因丰度受到 DMP 污染的促进,且与 DMP 污染的浓度呈正相关。因此,DMP 污染改变了土壤微生物敏感菌种的丰度,进而干扰了土壤系统的生态平衡。

参考文献:

- [1] 王志刚,由义敏,徐伟慧,等.黑土微生物丰度和多样性对邻苯二甲酸二丁酯污染的响应[J].生态环境学报,2015,24(10):1725-1730.
WANG Zhi-gang, YOU Yi-min, XU Wei-hui, et al. Response of the abundance and diversity of microbes in black soil to di-n-butyl phthalate contamination[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2015, 24(10): 1725-1730. (in Chinese)
- [2] 陶然.食品中邻苯二甲酸酯类化合物残留分析方法的研究[D].芜湖:安徽工程大学,2013.
TAO Ran. Method for determination of phthalate acid esters in food material[D]. Wuhu: Anhui Engineering University, 2013. (in Chinese)
- [3] 王志刚,胡影,徐伟慧,等.邻苯二甲酸二甲酯污染对黑土土壤呼吸和土壤酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2015,34(7):1311-1316.
WANG Zhi-gang, HU Ying, XU Wei-hui, et al. Impacts of dimethyl phthalate contamination on respiratory rates and enzyme activities in black soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(7): 1311-1316. (in Chinese)
- [4] Zeng H H, Zhang H X, Wu X, et al. Pollution levels and health risk assessment of particulate phthalic acid esters in arid urban areas[J]. *Atmospheric Pollution Research*, 2016, 8(1): 188-195.

- [5] Wang Z G, Hu Y L, Xu W H, et al. Impacts of dimethyl phthalate on the bacterial community and functions in black soils[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015(6):405.
- [6] Wang P, Wang S L, Fan C Q. Atmospheric distribution of particulate- and gas-phase phthalic esters (PAEs) in a Metropolitan City, Nanjing, East China[J]. *Chemosphere*, 2008, 72(10):1567-1572.
- [7] Zheng X, Zhang B T, Teng Y. Distribution of phthalate acid esters in lakes of Beijing and its relationship with anthropogenic activities[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 476/477:107-113.
- [8] 蔡全英, 莫测辉, 李云辉, 等. 广州、深圳地区蔬菜生产基地土壤中邻苯二甲酸酯(PAEs)研究[J]. 生态学报, 2005, 25(2):283-288. CAI Quan-ying, MO Ce-hui, LI Yun-hui, et al. The study of PAEs in soils from typical vegetable fields in areas of Guangzhou and Shenzhen, South China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2):283-288. (in Chinese)
- [9] 罗萌, 宋娇艳, 曾微, 等. 邻苯二甲酸二甲酯在紫色土中的淋溶释放特征及其影响因素研究[J]. 地球与环境, 2017, 45(5):531-539. LUO Meng, SONG Jiao-yan, ZENG Wei, et al. Release leaching characteristics of dimethyl phthalate in purple soil and its influencing factors[J]. *Earth and Environment*, 2017, 45(5):531-539. (in Chinese)
- [10] Zhou J, Guan D, Zhou B, et al. Influence of 34-years of fertilization on bacterial communities in an intensively cultivated black soil in north-east China[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2015, 90:42-51.
- [11] Ding J, Jiang X, Ma M, et al. Effect of 35 years inorganic fertilizer and manure amendment on structure of bacterial and archaeal communities in black soil of northeast China[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 105:187-195.
- [12] Hou S, Xin M, Wang L, et al. The effects of erosion on the microbial populations and enzyme activity in black soil of northeastern China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(6):295-301.
- [13] Ma J, Wang Z, Li H, et al. Metagenomes reveal microbial structures, functional potentials, and biofouling-related genes in a membrane bioreactor[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(11):5109-5121.
- [14] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75(23):7537-7541.
- [15] He F, Hu X S. Hubbell's fundamental biodiversity parameter and the Simpson diversity index[J]. *Ecology Letters*, 2005, 8(4):386-390.
- [16] Tian Y Q, Zhang X Y, Liu J, et al. Microbial properties of rhizosphere soils as affected by rotation, grafting, and soil sterilization in intensive vegetable production systems[J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, 123(2):139-147.
- [17] Hemme C L, Tu Q, Zhou S, et al. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:1205.
- [18] Zhang Y, Ge S, Jiang M, et al. Combined bioremediation of atrazine-contaminated soil by *Pennisetum* and *Arthrobacter* sp. strain DNS10[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2014, 21(9):6234-6238.
- [19] 李娟, Uwaremwe C, 冷艳, 等. 节杆菌属细菌处理有机物和重金属污染物的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(10):89-97. LI Juan, Uwaremwe C, LENG Yan, et al. Progress on the study of biodegradation of organic pollutants and adsorption of heavy metals with *Arthrobacter* strains[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 40(10):89-97. (in Chinese)
- [20] Zhang J, Liu B, Zhou X, et al. Effects of emergent aquatic plants on abundance and community structure of ammonia-oxidising microorganisms[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 81:504-513.
- [21] Anderson C R, Hamonts K, Clough T J, et al. Biochar does not affect soil N-transformations or microbial community structure under ruminant urine patches but does alter relative proportions of nitrogen cycling bacteria[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2014, 191(1):63-72.
- [22] Sanders J W, Venema G, Kok J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23(4):483-501.
- [23] Zhang T, Liu M, Sun J, et al. Bacterial diversity in rock varnish of extreme arid region of Turpan Basin[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(5):265-270.
- [24] Ettoumi B, Chouchane H, Guesmi A, et al. Diversity, ecological distribution and biotechnological potential of *Actinobacteria* inhabiting seamounts and non-seamounts in the Tyrrhenian Sea[J]. *Microbiological Research*, 2016, 186/187:71-80.
- [25] Jiao S, Liu Z, Lin Y, et al. Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2016, 98:64-73.
- [26] Jurasinski G, Retzer V, Beierkuhnlein C. Inventory, differentiation, and proportional diversity: A consistent terminology for quantifying species diversity[J]. *Oecologia*, 2009, 159(1):15-26.
- [27] Liston S D, Mann E, Whitfield C. Glycolipid substrates for ABC transporters required for the assembly of bacterial cell-envelope and cell-surface glycoconjugates[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2016, 1862(11):1394-1403.
- [28] Chang C, Stewart R C. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes[J]. *Plant Physiology*, 1998, 117(3):723-731.
- [29] Aggarwal S, Somani V K, Gupta V, et al. Functional characterization of PhoPR two component system and its implication in regulating phosphate homeostasis in *Bacillus anthracis* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2017, 1861(1):2956-2970.
- [30] Gao G, Wang A, Gong B L, et al. A novel metagenome-derived gene cluster from termite hindgut: Encoding phosphotransferase system components and high glucose tolerant glucosidase[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2016, 84:24-31.
- [31] Barabote R D, Jr S M. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(4):608-634.