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,021,7(3)：660-666. doi: 10．3969/j．issn．1000-4440．2021．03．014

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

于淑婷1 ， 万 群2， 余向阳2， 陈小龙2， 方香玲1

( 1.兰州大学草地农业科技学院,甘肃 兰州 730020; 2.江苏省农业科学院,江苏 南京 210014)

摘要: 从多年地膜污染棉田土壤中分离纯化出邻苯二甲酸酯( PAEs) 降解真菌,筛选分离出对 PAEs 降解效 果良好的3株非致病真菌PAE1、PAE6、PAE8,经形态学特征及18S rDNA序列分析，分别鉴定为菌核生枝顶抱霉 ( Acremonium sclerotigenum) 、辐毛鬼伞( Coprinellus radians) 、耐盐枝孢菌 ( Cladosporium halotolerans) 。3 株真菌 在邻 苯二甲酸二丁酯(DBP)起始质量分数为10mg/kg时降解效率最高,PAE6降解率达68.4%。3株真菌均能降解多 种PAEs,推测出其降解生物代谢路径为：PAEt单酯TPATPCATCO2+H2O。将3株真菌接种到DBP及邻苯二甲 酸二辛酯(DEHP)污染的土壤中，接菌后21 d, DBP及DEHP降解率分别为47.2%~70. 6%、54.1%~73.4%，其中 PAE6 对 DEHP 的降解率最高, 达 73. 4%。 表明 3 株真菌对土壤中 DBP 及 DEHP 污染具有良好的修复作用。

关键词: 邻苯二甲酸酯( PAEs) ; 降解真菌; 降解特性; 土壤修复 中图分类号: X592 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440( 2021) 03-0660-07

Isolation,degradation characterization of phthalate-degrading fungi and their application in phthalate-contaminated soil

YU Shu-ting 1**,** WAN Qun2 **,** YU Xiang-yang2 **,** CHEN Xiao-long2 **,** FANG Xiang-ling1

**(** 1．College of Pastoral Agriculture Science and Technology**,**Lanzhou University**,**Lanzhou 730020**,**China**;** 2． Jiangsu Academy of Agricultural Sciences**,** Nanjing 210014**,**China **)**

Abstract: Three non-pathogenic fungi PAE1 , PAE6, PAE8 with good degradation effect on phthalate esters ( PAEs )

were isolated after the PAEs degradation fungi were separated and purified from the cotton field soil contaminated by plastic film for many years in Xinjiang. Fungi PAE1 , PAE6 and PAE8 were identified as Acremonium sclerotigenum, Coprinellus radians and Cladosporium halotolerans respectively based on the morphological characteristics and 18S rDNA sequence analysis. Three fungi reached the maximum degradation efficiency when the initial mass fraction of dibutyl phthalate ( DBP) was 10 mg /kg, and the degradation rate of PAEs was 68. 4%. The three fungi could degrade a variety of PAEs, and it was speculated that their biode­gradable metabolic pathway was PAEtmonoestertPAtPCAtCO2 +H2 O. The three fungi were inoculated in the soil contami­nated by DBP and dioctyl phthalate ( DEHP) , the degradation rate of DBP and DEHP were 47. 2%－70. 6% and 54. 1%－73. 4% respectively 21 days after inoculation, and the degradation rate of PAE6 against DEHP was 73. 4%, and was the highest. The re­sults indicated that three fungi showed good repairing effect in the soil contaminated by DBP and DEHP.

Key words: phthalic acid esters ( PAEs) ; degrading fungi; degradation characteristics; soil repair

邻苯二甲酸酯**(** Phthalic acid esters**,**P AEs**)** 主要

收稿日期: 2020-09-29

作者简介: 于淑婷**(** 1997－**) ,**女**,**山东滨州人**,**硕士研究生**,**主要从事 环境污染修复研究。**(** E-mail**)** m18753186635@ 163. com 通讯 作 者 : 余 向 阳 **,(** E-mail **)** yu981190 @ hotmail. com **;** 万 群 **,(** E­mail**)** 308861990@ qq. com用于聚氯乙烯材料**,**起到增塑剂的作用**,**被普遍应用 于化妆品、清洁产品、包装材料、医用材料及玩具等 数百种产品中。由于其应用广泛及不科学的处理方 式,PAEs在土壤、沉积物、水体、大气等环境中M甚 至生物体**［**4**］**中均有不同程度的检出**,**成为各类环境 中常见有机污染物之一。PAEs污染不仅对农田土

壤质量和农业生产造成不利影响**［**5-7**］，**其在生物体内 积累并干扰内分泌的毒性对人类健康也具有潜在风 险**［**8-9**］**。微生物降解修复是最快速有效的修复手段**，** 也是目前研究的热点。

近年来对 PAEs 降解菌的研究主要为细菌方 向**，**大量高效降解菌株已经从各类环境中分离得到。 韩永和等**"0** 发现 **f** *Sphingomonas*、*Comamonas*、*Pseud- omonas*、*Arthobacter* 和 *Rodococcus* 等属的细菌具备降 解 PAEs 能力**，**李方方等**［**11**］**的报道表明对邻苯二甲 酸二辛酯**(** Dioctyl phthalate**，**DEHP **)** 有良好降解效 果的细菌集中在戈登氏菌**(** *Gordonia* sp．**)** 、红球 菌 **(** *Rhodococcus* sp． **)** 、芽 孢 杆 菌 **(** *Bacillus* sp．**)** 、不动 杆 菌**(** *Acinetobacter* sp．**)** 等 属。而对真菌 降 解 PAEs 的 研究相对较少閘*。*PAEs降解真菌的最早研究报道 于1991年，Sivamurthy等112发现齐整小核菌(*Scle- rotium rolfsii***)** 将苯二甲酸二甲酯 **(** DMT**)** 转化为对 苯二甲酸单甲酯**(** MMT**) ，**最终水解转化为对苯二甲 酸。 Chai 等**［**13**］**筛选出 14 株可以降解 DEHP 的真 菌 。 另外**，**黄孢原毛平革菌**(** *Phanerochaete chrysospo- rium)* M、胶红酵母(*R. miicilaginosa***)** 15 、 棒束梗霉 属**(** *Isaria* sp．**)** 真菌 16 与尖孢镰刀菌**(** *Fusarium oxys- porum)***讪**7等真菌对PAEs也有一定降解效果。

有研究结果表明，污染土壤中添加PAEs降解 菌可大幅提高土壤中 PAEs 的降解速率。 郭杨**［**16**］** 发现束梗霉属**(** *Isaria* sp．**)** 真菌 30 d 内将灭菌土壤 中 300 mg/kg PAEs 降解 69. 02%。 韩蕊等**［**18**］**发现 爪哇正青霉**(** *Eupenicillum javanicun***)** 10 30 d 内可将 灭菌土壤中300 mg/kg复合PAEs降解65.2%。Lv 等 17 筛选出的尖孢镰刀菌 PO-Yi **(** *Fusarium oxyspo- rum***)** 可以将种植辣椒和茄子的土壤中总量 60 mg/kg PAEs 分别降解 76. 8% 和 63. 1%。 本研究从 多年地膜污染棉田土壤中分离纯化PAEs降解真 菌**，**研究其降解特性**，**并将其应用到 PAEs 污染土壤 中研究其对土壤中 PAEs 的去除效果**，** 以期揭示该 菌株对PAEs降解的基本规律，为PAEs污染的生物 修复技术提供理论基础。

1 材料与方法

1．1 试验材料

供试地膜污染土壤取自多年 PAEs 污染棉田**，** 于密封袋中4T条件下保存。PAEs购自上海阿拉 丁生化科技股份有限公司。 取 PAEs 试剂溶于乙 腈,制成10 g/kg的标准液，于4 保存待用。无机 盐培养基**(** MSM**) :** KH2PO4 3. 00 g/L**，** NH4NO3 2. 00 g/L**,** MgSO4 • 7H2O 0. 10 g/L**,** CaCl2 0. 01 g/L**,**乙二 胺四乙酸二钠**(** C10H14N2Na2O8**)** 0. 01 g/L**，**pH 7. 5。

1．2 试验仪器

主要仪器有上海知楚 ZQZY-90F 振荡培养箱、 上海奥析科学A-1506紫外可见分光光度计、Eppen\_ dorf Centrifuge 5804R高速离心机、苏州净化设备 SW-CJ-1D单人净化工作台、Talboys多管式旋涡混 合器、安捷伦6890N气相色谱仪。

1．3 降解邻苯二甲酸酯真菌的分离和鉴定

1．3．1 菌种分离纯化 称取地膜污染棉田土壤 5 g,加入含有50 ml无菌水的锥形瓶中，28 °C、180 r/min避光振荡20 min**,**静置30 min后取5 ml上清 液**,** 分别加入含邻苯二甲酸二丁酯**(** Dibutyl phthalate**,** DBP **)** 、邻苯二甲酸二辛酯**(** Dioctyl phthalate**,** DEHP**)** 的 45 ml 无机盐培养基中 进行 3 次梯度驯化。 每次取 5 ml 菌液加入 45 ml 培养基 中，28 C、150 r/min避光培养 7 d**,** DBP、DEHP 质量 分数梯度均为 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg。 取扩 增培养后的菌液稀释1X102、1X103、1X104倍,然后取 100 m 菌液分别在含 10 mg/kg DBP、DEHP 的 MSM 固体培养基平板上涂布,28 C下培养7 d,将不同形 态的菌落进一步于 MSM 固体培养基上进行划线培 养得到单菌落，于试管斜面培养基4 C保存。

1．3．2 菌种筛选鉴定 用打孔器打取菌饼**,**分别接种 到含有 100 ml PDB 培养基的锥形瓶中**,**150 r/min、28 C避光培养72 h诱导菌丝体生长。紫外分光光度计 测定菌液 660 nm 下 *OD* 值**,** 用无菌水适当稀释控制 菌液中含菌量一致。 将5 ml 菌液分别加入 45 ml 无 机盐液体培养基**(** DBP、 DEHP 质量分数均为 10 mg/kg**) ,** 以加入等量无菌水为对照。 28 C、150 r/min避光培养3 d,检测培养基中PAEs含量。选出 对PAEs降解效果良好的真菌，按照瑞源生物Yeast Colony Rapid Detection Kit 试剂盒方法提取 DNA**,** 用 通用引物ITS1和ITS4进行PCR扩增,扩增产物送至 南京擎科生物科技有限公司进行基因测序。

1．3．3 检测方法 培养基中的 DBP 及 DEHP 含量 采用高效气相测谱仪**(** GC**)** 检测。 DBP 检测方法**:** 样品中 DBP 用二氯甲烷萃取。 待测培养基中加入 等量二氯甲烷,150 r/min振荡15 min**,**静置20 min 使其分层**,** 收集下层有机相液体。 DEHP 检测方法**:**

样品中 DEHP 用正己烷萃取。待测培养基中加入 等量正己烷**,** 多管式旋涡混合器涡旋2 min**,** 4 500 r/min离心2 min使其分层，收集上层有机相液体。

有机相液体过0. 22 ^m滤膜,GC检测。

1．4 真菌降解特性研究

1. 真菌对不同质量分数 DBP 及 DEHP 的降解 参照方法 1.3.2 及 1.3.3**,** 将 5 ml 菌液分别加入 45

ml 无机盐培养基**(** DBP、 DEHP 质量分数梯度均为 5 mg /kg、10 mg/kg、20 mg /kg**) ,** 以加入等量无菌水为 对照,28 *°C*、150 r/min避光培养5 d**,**检测培养基中 PAEs 含量。

1. 真菌降解 PAEs 广谱性测定 测定真菌对 10 种 PAEs 和 3 种降解中间产物的降解能力**,** 10 种 PAEs 为邻苯二甲酸二烯丙酯**(** Diallyl phthalate **,** DAP **)** 、邻苯二甲酸二正辛酯**(** Dioctyl phthalate**,** DNOP**)** 、邻苯二甲酸双**(** 2-甲氧基乙酯**) (** Bis**(** meth­ylglycol**)** phthalate **,** BMEP **)** 、邻苯二甲酸二甲酯 **(** Dimethyl phthalate**,** DMP**)** 、邻苯二甲酸丁酯苯甲酯 **(** Butyl benzyl phthalate **,** BBP**)** 、邻苯二甲酸二环己 酯**(** Dicyclohexyl phthalate**,** DCHP**)** 、邻苯二甲酸二异 丙酯**(** Diisopropylo-phthalate**,** DIPrP**)** 、邻苯二甲酸二 正戊酯**(** Dipentyl phthalate**,** DPP**)** 、邻苯二甲酸二乙 酯**(** Diethy phthalate**,** DEP **)** 、邻 苯 二 甲 酸 二 丙 酯 **(** Dipropyl phthalate**,** DPrP**) ,** 3 种降解中间产物为邻 苯二甲酸单丁酯**(** Monobutyl phthalate**,** MBP**)** 、邻苯 二甲酸 **(** Phthalic acid**,** PA**)** 、原儿茶酸 **(** protocate- chuic acid**,** PCA**)** 。

3 株真菌分别接种于 PDA 培养基**,** 28 C 培养 5 d**,** 用打孔器打取直径为 5 mm 的菌饼**,** 分别接种于 含不同 PAEs 的无机盐固体培养基**(** PAEs 质量分数 为 10 mg /kg**) ,** 28 C 避光培养 7 d**,** 观察真菌生长情 况和菌落形态。以菌落生长直径小于 1 mm 为不生 长**(** -**) ,** 大于 1 mm 小于 5 mm 为生长**(** + **) ,** 超过 5 mm 为生长旺盛**(** ++**)** 。

1. 真菌对土壤中邻苯二甲酸酯的降解能力 试验所用清洁农田土壤取自江苏省农业科学院试验 基地**,** 土壤风干磨碎过 2 mm 筛**,** 分别加入 DBP、DE- HP丙酮溶液，配制PAEs质量分数为80 mg/kg的人 工污染土壤**,** 各称取 50 g 加入洁净的玻璃培养皿 中，于25 C避光条件下老化28 d。将用PDB培养 基在 150 r/min、28 C 富集培养的菌液离心**,** 适当稀 释控制菌液中含菌量一致**,** 将菌液分别接种至老化 后的土壤中 **,** 以加入等量无菌水为对照。 定期浇去 离子水使土壤含水量保持在 20%左右**,** 将培养皿于 28 C 恒温培养箱避光培养 21 d**,** 取样测定土壤中 PAEs 含量**,** 计算降解率。 降解率 = **(** 对照样品残留 量-处理样品残留量**)**/对照样品残留量X100%*。*土 壤中 PAEs 含量检测参考刘彦爱**［**19**］**的方法**:** 准确称 取 2. 0 g 土壤**,** 加入 2 ml 超纯水剧烈涡旋 1 min**,** 加 入 5 ml 色谱乙腈**,** 于多管式旋涡混合器上涡旋振荡
2. min**,** 加入 0. 5 g NaCl 和 2. 0 g 无水 MgSO4 **,** 立即 涡旋1 min, 3 500 r/min离心5 min**,**取上清液过0. 22

»m有机系滤膜,GC检测*。*

2 结果与分析

2．1 PAEs 降解真菌的分离筛选

通过分离得到 11 株对 DBP 及 DEHP 降解效 果较好的真菌，分别命名为PAE1-PAE11，降解效 果见表1。根据18s rRNA测序结果序列比对，对

1. 株菌进行了初步鉴定**,** 鉴定结果 见 表 1 。 菌株 PAE1、 PAE6、 PAE8 均对 DBP 及 DEHP 有 很好的 降解效果且为非致病菌。 综合考虑降解效果及致 病因素**,** 选取 3 株真菌 PAE1 、 PAE6、 PAE8 进行后 续试验。

表 **1 11** 株 **PAEs** 降解真菌的初步鉴定结果

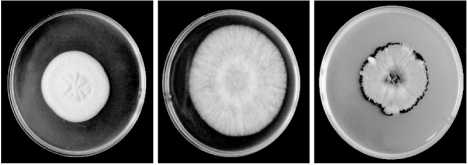
**Table 1 Identification of 11 phthalate esters** ( **PAEs** ) **degrading**

fungi strains

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 菌株  名称 | 种名 | DBP 降解率 DEHP 降解率 | | 是否为  致病菌 |
| **(** % **)** | **(** % **)** |
| PAE1 | Acremonium sclerotigenum | 40.1 | 32.8 | 否 |
| PAE2 | Ochroconis tshawytschae | 35.5 | 43.7 | 是 |
| PAE3 | Paramyrothecium roridum | 18.4 | 7.7 | 是 |
| PAE4 | Cadophora malorum | 39.3 | 55.4 | 是 |
| PAE5 | Acremonium sclerotigenum | 19.4 | 10.3 | 否 |
| PAE6 | Coprinellus radians | 53.1 | 36.9 | 否 |
| PAE7 | Mucor hiemalis | 29.1 | 12.5 | 是 |
| PAE8 | Cladosporium halotolerans | 50.4 | 40.6 | 否 |
| PAE9 | Alternaria alternata | 39.7 | 42.9 | 是 |
| PAE10 | Alternaria alternata | 44.3 | 29.7 | 是 |
| PAE11 | Alternaria alternata | 60.1 | 54.6 | 是 |

2．2 菌株 PAE1、 PAE6、 PAE8 的进一步鉴定

菌株 PAE1、 PAE6、 PAE8 分别 接种于 MSM 培 养基**,** 28 C 下避光培养 7 d**,** 肉眼观察菌落形态**(** 图 1 **)** 。经比对**,** 菌株 PAE1 的 18S rRNA 序列与菌核生枝顶孢霉( *Acremonium sclerotigenum*) 的同源性达 99. 06%,菌株PAE6的18 S rRNA序列与辐毛鬼伞 ( *Coprinellus radians* ) 的 同 源 性 达 99. 53%, 菌 株 PAE8 的 18 S rRNA 序列与耐盐枝孢菌( *Cladospori- um halotolerans*) 的同源性达 99. 03%。 结合系统发 育树( 图 2) 与菌株形态特征, 将菌株 PAE1 鉴定为 菌核生枝顶孢霉,将菌株 PAE6 鉴定为辐毛鬼伞,将 菌株 PAE8 鉴定为耐盐枝孢菌。



ABC

图 **1** 菌株 **PAE1**( **A**) 、**PAE6** ( **B**) 、**PAE8** ( **C**) 在 **MSM** 培养基上 菌落形态特征

**Fig．1 Morphological properties of PAE1** ( **A**) ，**PAE6** ( **B**) **and PAE8**( **C**) **colonies on MSM medium**

76iIpaei I

1 Acremonium sclerotigenum strain MEFC031(MK732096.1)

Acremonium altematum SF 66(MT529342.1)

-Acremonium brachypenium strain: CBS 866.73(AB540570.1)

95

76 I Coprinellus xanthothrix strain LL-Y-1 (MK887323.1)

―I Coprinellus domesticus strain CNRMA10.949 (KP132301.1)

Coprinellus sp. CJL-2014 strain ZPRs-R-l(KJ542338.1)

Coprinellus cf. (MT34007&1)

94

99

|PAE6 |

Coprinellus radians (MK087751.1)

Coprinellus radians strain FR8-PR4(KP900252.1)

Coprinellus radians strain M65 (HM045514.1)

0.005

90 ]PAE8 |

99

Cladosporium halotolerans strain C27(KT276990.1)

Cladosporium halotolerans TYPE material(NR 119605.1)

Cladosporium sphaerospermum TYPE material (NR 111222.1 )

Cladosporium cladosporioides CBS 112388(NR 119839.1)

Cladosporium herbarum TYPE material(NRl 19656.1)

100

0.005

图**2** 菌株**PAE1**、**PAE6**、**PAE8**及相关菌株**18S rRNA**构建的系统发育树

**Fig.2 Phylogenetic tree based on the 18S rRNA sequences of PAE1**, **PAE6**, **PAE8 and related strains**

2.3 3 株真菌对不同质量分数 DBP 及 DEHP 的降 解特性

在 DBP 和 DEHP 起始质量分数分别为 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg时，培养5 d后测定不同 菌株对 MSM 液体培养基中 PAEs 的降解率, 结果 (图3)显示菌株PAE1对不同质量分数DBP降解率 分别为 42. 3%、 53. 2%、 41. 5%, 对不同质量分数 DEHP 降解率分别为 26. 2%、30. 4%、39. 4%; 菌株 PAE6对不同质量分数DBP降解率分别为54.2%、 68. 4%、45. 8%,对不同质量分数 DEHP 降解率分别 为 28. 2%、26. 9%、32. 4%; 菌株 PAE8 对不同质量 分数 DBP 降解率分别为 49. 3%、59. 3%、39. 4%, 对 不同质量分数 DEHP 降解率分别为 22. 3%、31. 3%、 26. 9%。 3 株真菌对 DBP 降解率均在起始质量分数 为10 mg/kg时最高，5 mg/kg次之，20 mg/kg最低。 菌株 PAE8 对 DEHP 的降解效率也在起始质量分数 为10 mg/kg时最高。可能是由于高质量分数的 PAEs 抑制了微生物活性而降低 PAEs 降解率。 高 质量分数( 50 mg/kg) 污染处理的 DBP 及 DEHP 对 微生物生长、土壤酶活性以及土壤基础呼吸**［**20**］**有明 显的抑制作用,并且抑制作用随着污染物质量分数 升高而增强**［**21**］**。 说明当 PAEs 对微生物产生毒害 作用时,微生物会通过降低生理活动来抵御污染物 的胁迫**［**22**］**。

3株真菌对DBP的降解率（41. 5%-68.40%**）**均 高于对DEHP的降解率（22. 3%-39. 4%**）,**可能是由 于与 DBP 相比**,** DEHP 侧链较长**,** 更难以降解。 据文 献报道**,** 微生物对 PAEs 降解效率受其分子结构的影 响**,** 烷基链短、支链小更有利于微生物的降解**［**23**］**。

在起始质量分数为20 mg/kg时，菌株PAE1、 PAE6 对 DEHP 的降解效率最高**,** 可能是因为 2 株 真菌可耐受20 mg/kg的DEHP。有研究者发现，有 机污染物会促进功能微生物生长**［**24**］,** 当功能微生物 受到有机污染物胁迫时**,** 因经过前期的适应**,** 其生长 速率明显提高**［**25**］**。 由此可见**,** 微生物在可耐受的胁 迫下能通过提高自身生理活动来抵御胁迫**［**26-29**］**。

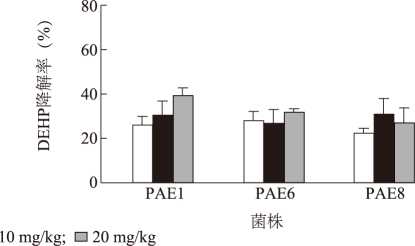
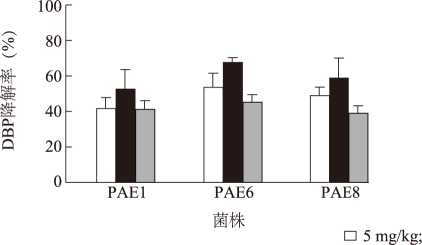


图 **3** 不同初始质量分数 **DBP** 及 **DEHP** 对菌株 **PAE1** 、**PAE6** 、**PAE8** 降解 **PAEs** 的影响

**Fig．3 Effect of initial mass fraction of DBP and DEHP on the degradation of PAEs by strains PAE1** ，**PAE6 and PAE8**

2．4 菌株 PAE1、PAE6 和 PAE8 降解 PAEs 的广谱性

3 株真菌均能在含有不同 PAEs MSM 固体培养 基上生长**（** 表 2**） ,** PAE6 生长最旺盛**,** PAE1 次之**,** PAE8 生 长 较 缓 慢。 说 明 3 株 真 菌 能 降 解 多 种 PAEs**,** 对常见的 PAEs 均有降解能力。 3 株真菌对 支链碳数为1 - 8 的不同 PAEs 均有降解能力。 根据 文献报道**,** 已筛选到的 PAEs 降解真菌对多种不同 支链长度的 PAEs 有降解效果。 韩蕊等**［**18**］**研究结 果表明爪哇正青霉**（** Eupenicillum javanicun**）** 菌株对 土壤中复合 PAEs**（** DMP、 DEP 和 DOP**）** 有较好的降 解效果。 谢清如等**［**14**］**发现黄抱原毛平革菌在最佳 条件下对 DEP 去除率达到 94. 6%。

2．5 菌株 PAE1、 PAE6 和 PAE8 降解途径推测

为推测 3 株真菌对 PAEs 的代谢途径**,** 将 3 株 真菌接种在添加 MBP、 PA、 PCA 的无机盐固体培养 基上观察生长情况**,** 发现 3 株菌株均能以 3 种代谢 中间产物为底物 **（** 表 2**）** 。根据试验结果与相关文 献**［**10**,**30-31**］,** 推测 3 株真菌作用下 PAEs 的生物降解 过程为**:** PAEs 通过脱脂化作用降解为单酯**,** 再进一 步水解为 PA**,** 最终 PA 降解形成 PCA 并进入下一步 代谢。 此路径与目前报道的多数微生物降解 PAEs 的主要路径一致。

2．6 菌株 PAE1、 PAE6、 PAE8 对土壤中邻苯二甲 酸酯的降解能力

用 80 mg /kg DBP 和 DEHP 污染土壤且老化 28 d

表 2 菌株 PAE1 、PAE6 、PAE8 在含有不同 PAEs MSM 培养基上生 长情况

Table 2 Growth of strains PAE1，PAE6 and PAE8 on MSM medi-

um containing different phthalic acid esters ( PAEs)

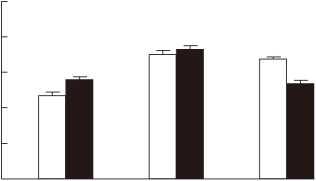
|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| PAEs | 侧链碳数 | PAE1 | PAE6 | PAE8 |
| DAP | 3 | + | ++ | + |
| DNOP | 8 | + | ++ | + |
| BMEP | 3 | + | ++ | + |
| DMP | 1 | + | ++ | + |
| BBP | 4 | + | ++ | + |
| DCHP | 6 | + | + | + |
| DIPrP | 3 | + | ++ | + |
| DPP | 5 | ++ | ++ | + |
| DEP | 2 | ++ | ++ | + |
| DPrP | 3 | + | + | + |
| MBP\* | / | ++ | ++ | + |
| PA\* | / | ++ | ++ | + |
| PCA\* | / | ++ | ++ | + |

\*为微生物代谢PAEs的中间产物。菌落直径<1 mm为不生长（-），

1-5 mm为生长（+ ） , >5 mm为旺盛生长（+ + ）。

后**，** 分别测定土壤中 DBP 和 DEHP 的含量**，** 结果显 示 DBP 含 量 为 1. 2 mg/kg**，** DEHP 含 量 为 4. 4 mg /kg**，** 且含量保持稳定不再下降。 接菌后 21 d 发 现**，** 菌 株 PAE1、 PAE6、 PAE8 均 对 土 壤 中 DBP 及 DEHP 有不同程度的降解**（** 图 4**）** 。3 株真菌 21 d 内对 1.2 mg/kg DBP 的降解率为 47. 2%-70.6%**,**对 4. 4 mg/kg DEHP 降解率为54. 1%-73. 4%。PAE6 对土壤中 PAEs 的降解率最高**,** 达70. 6%-73. 4%。 与无机盐培养基相比,3株真菌对土壤中PAEs尤其 是对 DEHP 的降解率高。 这可能是由于在自然环 境中与在室内培养基试验条件下的差异造成的**,** 也 可能是由于试验时间延长使降解率升高。

目前对真菌修复土壤中 PAEs 的研究大多是在 灭菌土壤及高质量分数 PAEs 污染 条 件 下 进 行**[**18**,**16-17**]**。 而文献报道表明**,** 中国农业土壤中 PAEs 大多处于微量水平目**,**土壤中优先控制的6种PAEs 在山东省寿光市蔬菜大棚中总量范围为0. 453­1.615 mg/kg且以DBP与DEHP为主卸，广东省典 型区域92. 8%的农业表层土壤中 6 种 PAEs 总含 量W1mg/kgb2。本试验结果表明，筛选的3株真 菌对土壤中较低质量分数的 PAEs 有良好的降解效 果**,** 说明其在自然环境条件下对土壤中 PAEs 污染 具有良好的修复作 用。 枝 孢 菌 属 **(** *Cladosporium***)** 真 菌可参与修复PAEs污染土壤已有相关报道阴，但 本研究首次发现枝顶孢霉属**(** *Acremonium***)** 真菌及鬼 伞属**(** *Coprinellus***)** 真菌具有修复有机污染物污染土 壤的功能。

菌株

|  | 100 |
| --- | --- |
|  | 80 |
| g |  |
|  | 60 |
| W- |  |
|  | 40 |
|  | 20 |

0

PAE1 PAE6 PAE8

口 DBP; ■ DEHP

图**4** 菌株**PAE1**、**PAE6**、**PAE8**对土壤中**PAEs**的降解率

**Fig.4 Degradation of strains PAE1**， **PAE6**， **PAE8 on phthalic acid esters** ( **PAEs**) **in the soil**

从PAEs污染的棉田土壤中筛选出3株可同时 降解多种 PAEs 的高效降解真菌 PAE1、 PAE6、 PAE8**,** 分别鉴定为菌核生枝顶孢霉**(** *Acremonium sclerotigenum***)** 、辐毛 鬼 伞 **(** *Coprinellus radians***)** 、耐 盐 枝孢菌**(** *Cladosporium halotolerans***)** 。3 株真菌对无 机盐培养基中不同质量分数 DBP 及 DEHP 具有良 好的降解效果**,**对 DBP 的降解率为39．4%-68. 4%**,** 对 DEHP 降解率为22．3%-39. 4%**,**其中 3 株真菌在 DBP起始质量分数为10 mg/kg时降解率最高**，** PAE6 降解率达 68．4%。

3株真菌均能降解多种PAEs**,**并推测其生物降 解途径为**：**PAEs—单酯tPAtPCAtCO2 + H2O。3 株真菌对 DBP 及 DEHP 污染土壤具有良好的修复 作用**,**21 d 内对1. 2 mg/kg DBP 的降解率为47．2%- 70. 6%**,** 对 4．4 mg/kg DEHP 的降解率为54．1%- 73. 4%**,**其中 PAE6 对土壤中 DEHP 的降解率最高**,** 达73. 4%。

参考文献:

**[**1 曹 龙**,**张朝升**,**陈秋丽**,**等．邻苯二甲酸酯的环境污染和生态

行为及毒理效应研究进展J .生态毒理学报**，**2018**,** 13 (2): 37-49．

**[**2 王凯荣**,** 崔明明**,** 史衍玺．农业土壤中邻苯二甲酸酯污染研究进

展 J .应用生态学报**，**2013**,** 24(9): 2699-2708.

3 王晓南，张瑜，王婉华，等.邻苯二甲酸二乙基己酯DEHP污 染及其毒性研究进展J .生态毒理学报**，**2017**,** 12(2): 135- 150.

**[**4 郑顺安**,**薛颖昊**,**李晓华**,**等. 山东寿光设施菜地土壤农产品邻

苯二甲酸酯(PAEs**)**污染特征调查J .农业环境科学学报**，** 2016**,** 35**(**3**)：** 492-499.

**[**5 袁 丽**,**刘彦爱**,**程金金**,**等. 上海青对土壤邻苯二甲酸二丁酯

的富集及毒性响应特征J .江苏农业学报**，**2019**,** 35 (1): 204-210.

**[**6 张 颖**,**段淑伟**,**王 蕾**,**等. 黄瓜发育早期对邻苯二甲酸二

**(** 2-乙基**)**己酯**(** DEHP**)** 胁迫的亚显微结构及生理响应比较研 究J .农业环境科学学报**，**2014**,** 33(9): 1706-1711.

**[**7 陈意良**,** 鲁磊安**,** 莫测辉**,** 等. DEHP 胁迫对高/低累积邻苯二

甲酸酯品种水稻抗氧化酶系统的影响J .热带作物学报**，** 2016**,** 37**(**8**)：** 1484-1488.

**[**8 JANJUA N R**,** MORTENSEN G K**,** ANDERSSON A M**,** et al. Sys­

temic uptake of diethyl phthalate**,** dibutyl phthalate **,** and butyl para­ben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans**[**J . Environmental Science ＆ Technology**,** 2007**,** 41**：** 5564-5570.

**[**9 WESCHLER C J**,** BEKO G**,** KOCH H M**,** et al. Transdermal up­

take of diethyl phthalate and di **(** n-butyl **)** phthalate directly from air**：** Experimental verification **[**J . Environ Health Perspect**,** 2015**,** 123**：** 928-934.

**[**10 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.

11李方方，王洋洋.DEHP的污染现状及生物降解研究进展J .

河南科技**，** 2017**(** 7**) :** 153-155．

12 SIVAMURTHY K**,** SWAMY B M**,** PUJAR B G. Transformation of dimethylterephthalate by the fungus Sclerotium rolfsii**[**J**]**． Fems Microbiology Letters**,** 2010**(** 1 **) :** 37-40.

1. CHAI W**,** SUZUKI M**,** HANDA Y**,** et al. Biodegradation of di-**(** 2- ethylhexyl**)** phthalate by fungi**[**J**]**. Report of National Food Re­search Institute**,** 2008**(** 72**) :** 83-87.
2. 谢清如**,** 尚 翠**,** 钟 爽**,** 等. 固定化黄孢原毛平革菌对邻苯二 甲酸二乙酯的降解效果研究J -湖南科技大学学报(自然科 学版**) ,** 2018**,** 33**(** 2**) :** 89-94.
3. 王静雯.深海真菌对邻苯二甲酸酯的降解特性研究D •福州： 福建农林大学**,** 2015.
4. 郭 杨.土壤酞酸酯污染的微生态效应和真菌-植物联合修复 技术研究D •北京：中国环境科学研究院**，**2011.
5. LV H Y**,** LI G Y**,** FANG Z H**,** et al. Phthalate esters biodegrada­tion by Fusarium oxysporum in vegetable soil**[**J . Agricultural Sci­ence ＆ Technology**，** 2018**(** 3**) :** 52-57.
6. 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.
7. 刘彦爱. 邻苯二甲酸酯在土壤-蔬菜系统中的累积、毒性效应 及其生物有效性D .镇江：江苏大学**，**2019.
8. 夏庆兵**,** 王 军**,** 朱鲁生**,** 等. 土壤微生物对邻苯二甲酸二**(** 2- 乙基己**)**酯胁迫的生态响应J -农业环境科学学报**，**2016**,** 35 **(** 7**) :** 1344-1350.
9. 宋雪英**，** 崔小维**，** 李嘉康**，** 等.邻苯二甲酸酯类塑化剂的土壤生 态毒理学研究进展J .生态环境学报**，**2016**,** 25 (11) : 1885- 1890.
10. 郭 杨**，** 韩 蕊**，** 杜文婷**，** 等. 邻苯二甲酸酯复合污染对土壤微 生态的影响J -环境科学研究**，**2010**,** 23(11) : 1410-1414.
11. 吴 琼**，** 张晓峰**，** 任 伟**，** 等. 邻苯二甲酸酯的污染现状及微生

物降解研究进展J .微生物学杂志**，**2018**,** 38(2) : 122-128.

1. 陈保冬**，** 赵方杰**，** 张 莘**，** 等.土壤生物与土壤污染研究前沿与 展望 J •生态学报**，**2015**,** 35(20) : 6604-6613.
2. JOHNSEN A R**，** KARLSON U. Diffuse PAH contamination of sur­face soils**:** environmental occurrence**，** bioavailability**，** and microbi­al degradation**[**J . Appl Microbiol Biotechnol**，** 2007**，** 76**:** 533­543.
3. 李 磊**，** 韩 成**，** 王宵宵**，** 等. 镉胁迫下转基因水稻对根际土壤 微生物的影响J .江苏农业科学,2019,47( 14**)** :282-287.
4. 陈丽洁**，** 苏 品**，** 张 卓**，** 等. 一株耐盐类球红细菌的分离鉴定 及其对不同作物的促生作用J .南方农业学报,2019,50(5): 964-973.
5. 杨雍康**,** 药 栋**,** 李 博**,** 等. 微生物群落在修复重金属污染土 壤过程中的作用J .江苏农业学报,2020,36(5**)** : 1322-1331.
6. 杨 莹**,** 刘冬雪**,** 郭 英**,** 等. 2 株芽孢杆菌 抗旱及解磷能力 **[**J . 江苏农业科学**,** 2019**,** 47**(**4**) :** 260-263.
7. 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.
8. KUMAR V**,** MAITRA S S. Biodegradation of endocrine disruptor dibutyl phthalate **(** DBP **)** by a newly isolated Methylobacillus sp． V29b and the DBP degradation pathway**[**J . 3 Biotech**,** 2016**,** 6 **(**2**) :** 1-12.
9. 杨国义**,** 张天彬**,** 高淑涛**,** 等.广东省典型区域农业土壤中邻苯 二甲酸酯含量的分布特征J**]**.应用生态学报**，**2007**,** 18： 2308-2312.

33**]** CRIADO M V**,** FERN**a**NDEZ PINTO V E**,** BADESSARI A**,** et al. Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bot­tled mineral water**[**J . International Journal of Food Microbiology**,** 2005**,** 99**:** 343-349.

( 责任编辑 : 张震林)