2018,7 (5:933-940 农业环境科学学报 2018年5月

***Journal of Agro-Environment* Science** 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 -con－ taminated soil[J]. Journal of Agro- Environment Science , 2018, 37(5): 933-940.

邻苯二甲酸酯降解菌的筛选、降解特性及土壤修复研究

杨 婧 1，郭楚玲 1，2，3\*，刘沙沙 1，党 志 1，2，卢桂宁 1，2

(1.华南理工大学环境与能源学院，广州 510006；2.工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室，广州 510006；3.广东省 环境风险防控与应急处置工程技术研究中心，广州 510006)

摘 要:为寻找高效邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP降解菌，采用富集培养法从城市污水处理厂活性污泥中分离筛选出一 株DEHP降解菌并命名为ASW6D。通过扫描电镜、16S rRNA同源性序列分析，初步将菌株ASW6D鉴定为分枝杆菌属 *(****Mycobacterium*** sp)。菌株ASW6D可在较宽温度(20 ~ 40 D和pH(5~10范围下高效降解DEHP，其最适生长降解条件为30 X：、 pH 8.0,3 d内可将初始浓度为500mg・L-1的DEHP降解82.87%。进一步采用GC-MS分析DEHP降解的中间产物，推测出DEHP 的生物代谢途径为先通过0-氧化缩短DEHP侧链，生成邻苯二甲酸二丁酯(DBP，再将DBP转化为邻苯二甲酸(PA)。将菌株 ASW6D接种到DEHP污染的土壤，可将土壤中DEHP去除率提高58.67%，表明ASW6D在PAEs污染环境生物修复方面的应用具 有一定的潜力。

关键词:DEHP；分枝杆菌;代谢途径;污染土壤

中图分类号：X53 文献标志码:A 文章编号：1672-2043(2018 05-0933-08 doi:10.11654/j aes.2017-1689

Isolation and characterization of phthalate -degrading bacterial strain, and its application in phthalate -con－ taminated soil

YANG Jing1, GUO Chu-ling1,2,3\*, LIU Sha-sha1, DANG Zhi1,2, LU Gui-ning1,2

(1.School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2.The Key Lab of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China; 3.Guangdong Provincial Engineering and Technology Research Center for Environmental Risk Prevention and Emergency Disposal, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract：D(i 2-ethylhexyl phthalate(DEHP , one of the most widely used phthalates in China, is easily released into the environment. In the present study, we isolated a high-efficient DEHP-degrading bacterial strain(named ASW6D enriched from the activated sludge of mu－ nicipal sewage treatment plant. Based on its morphology and 16S rRNA sequence analysis, the bacterial strain was identified as ***Mycobac***－ ***terium*** sp.. This species can efficiently degrade DEHP at a wide range of temperature (20~40 X and pH(5~10 . The optimal temperature and pH for the growth of ASW6D were 30 X and 8.0, respectively. Under optimal conditions, ASW6D degraded 500 mg • L-1 DEHP by more than 82.87% within 3 d. Further, ASW6D also utilized dimethyl phthalate(DMP and dibutyl phthalate(DBP as carbon sources. The metabolites of DEHP degradation were further analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS . The metabolic pathway of DEHP was as follows: initially the side chain of DEHP was shortened by 0-oxidation, and then DBP was formed; DBP was then converted to phthalic acid(PA by hydrolysis . The inoculation of ASW6D into the contaminated soil increased the removal rate of DEHP by 58.67%. This indicates that ASW6D has the potential for bioremediation of phthalate acid ester(PAE -contaminated soil.

Keywords: DEHP; ***Mycobacterium*** sp.; degradation pathway; contaminated soil

收稿日期:2017－12－07 录用日期:2018－02－08

作者简介:杨 婧(1993—，女，安徽阜阳人，硕士研究生，从事有机污染土壤修复研究。E-mail：[jingyangfy831@163.com](mailto:jingyangfy831@163.com) \* 通信作者 :郭楚玲 E-mail :[clguo@scut.edu.cn](mailto:clguo@scut.edu.cn)

基金项目：广东省科技项目(2014A020217002, 2016B020242004)

Project supported: Guangdong Provincial Science and Technology Projects(2014A020217002，2016B020242004

邻苯二甲酸酯(简称PAES是工业常用塑化剂， 广泛应用于建筑装饰、化妆品、食品包装和医疗用具 等领域［1］。由于PAEs与塑料树脂等并不是以稳定的 化学键结合［2-3］，且其在环境中不易分解，因此极易在 塑料的生产和使用过程中释放进入土壤［4］、水和沉积 物［5-6］、大气［7］，甚至室内环境中［8］，并可通过食物链进 入人体［9］，对人体造成极大危害［10］。 我国环境污染中比 较常见且难以降解的PAEs主要为邻苯二甲酸二甲 酯(DMP、邻苯二甲酸二丁酯(DBP和邻苯二甲酸二 @-乙基己基酯(DEHP ［11-13］，这3种PAEs均被美国 环境保护署和中国国家环境监测中心列入优先控制 污染物黑名单［1，14］。

PAEs 属于持久性有机污染物，在自然环境中的 光解和水解速率相当缓慢，而生物降解被认为是环境 中PAEs的主要降解途径问,从而被广泛研究［15-16］。 目前，国内外有大量学者从不同环境介质中，如沉 积物问、活性污泥何、污染土壤凹等筛选PAEs降解 菌，研究菌株降解特性、底物广谱性、推测PAEs代谢 途径等。已报道的PAEs降解菌主要有：假单胞菌 *(Pseudomonas* sp) ［9］、戈登氏菌*(Gordonia* sp) ［20\_21］、壤 霉菌*(Agromyces* sp)㈣、不动杆菌*(Acinetobacter* sp)㈣、 红球菌*(Rhodococcus* sp)［19，］等。而近年来，随着农用 塑料薄膜的广泛应用，越来越多的PAEs被释放进入 农田土壤中［4］，甚至有些典型膜覆盖农田土壤中 PAEs 总含量高达33.36 mg-kg-1，其中DEHP含量达21.31 mg・kg-1，远高于美国土壤PAEs化合物控制标准 (DEHP为4.35 mg-kg-)㈣。有研究表明，将PAEs降 解菌添加到污染土壤中可大幅提高土壤中PAEs的 降解速率［141926］。而DEHP的化学结构复杂且疏水性 强，相比于 DMP 和 DBP 更难降解［27］，因此，筛选出环 境适应性强且有潜力运用到污染土壤修复中的 DEHP 高效降解菌具有一定的研究意义。

本研究从广州市沥滘污水处理厂活性污泥中分 离筛选出一株DEHP高效降解菌。采用16SrRNA序 列分析技术对菌株进行分子生物学鉴定，并研究菌株 对DEHP的降解特性。通过GC-MS检测DEHP降解 的中间产物，推测其降解途径。最后将ASW6D应用 到DEHP污染土壤中，研究其对土壤中DEHP的去除 效果，为实际污染土壤的生物修复提供理论依据。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

活性污泥取自广东省广州市沥滘污水处理厂二 沉池。

化学试剂:DMP、DBP 和 DEHP 购自 Sigma-Aldrich Co.LLC(. 中国上海 ，纯度＞99**％**。 实验中其他化学试 剂均为分析纯，所有溶剂均为高效液相色谱(HPLC 级。

无机盐培养基(MSM : NaCl (0.75 g-L-).NH4NO3 (0.5 g-L-)、FeCb (0.001 g-L-)、1〈2日卩04・3出0 (1 g-L-)、 MgSO4・7H2。(0.4 g-L-)、CaCb (1.9 g-L-)，初始 pH 为 7.5~8.0。

营养肉汤培养基(NB :蛋白胨(10g・L-)、牛肉提 取物(3 g-L-)、氯化钠(5 g-L-),pH 为 7.2~7.6。

1.2 实验方法

1.2.1 DEHP高效降解菌的驯化与分离

将新鲜活性污泥25 mL置于250 mL锥形瓶中， 加入75 mL MSM，投加PAEs混合液(DMP.DBP和 DEHP浓度相同作为碳源，在30 **t**、150 r-min-1摇床 中振荡培养7 d，然后将25 mL培养液转移到新的培 养基中，并在相同条件下培养。PAEs投加浓度为35、 70、105、140 mg - L-1，4周递增一次，共驯化16周，得 到对PAEs有稳定降解能力的菌液。通过稀释涂布平 板法在营养肉汤培养基上对菌液进行筛选，勾取长势 良好的单菌落到新鲜MSM中，如此反复直至分离到 一株 PAEs 高效降解菌，命名为 ASW6D。 将 0.5 mL DEHP (20 g-L-)甲醇溶液加入250 mL锥形瓶中，待 甲醇挥发后，加入10 mL ASW6D菌液与90 mL MSM， 30 **t**、150 r-min-1摇床中振荡培养7 d，连续转接4次 得到 ASW6D 稳定培养液。

1.2.2菌株ASW6D的形态观察与鉴定

采用平板划线法将ASW6D接种至营养肉汤培 养基,30 **T**下培养3 d，观察菌落特征。使用场发射扫 描电镜Merlin对菌株ASW6D的表面形态进行观察。 菌株的16S rRNA序列测定委托生工生物工程(上海 股份有限公司完成，并用 MEGA 6.06软件构建系统 发育树。

1. 菌悬液的制备

将100 mL培养液4000 r • min-1离心5 min，并 用磷酸盐缓冲盐水(PBS,0.1 mol・L-1、pH7.8洗涤3 次，然后将洗涤液重悬于 PBS 中并使用紫外分光光 度计(UV-2550, Shimadzu,日本在600 nm测量菌悬 液吸光度，利用PBS将*ODm*调至0.3作为后续实验 的接种物。

1. DEHP降解菌降解特性的研究

采用批量平衡试验，测定菌株ASW6D的生长曲

线及其降解 DEHP 的动力学曲线。将 2 mL 菌悬液接 种至18 mLMSM中,DEHP初始浓度为100mg・L-1, 150 r・min-1、O七下避光振荡培养。在6、12、24、36、 48、2、6、144 h时取样，测定溶液OD600与DEHP的 剩余量。为研究菌株对DEHP的降解能力以及环境因 素（DEHP初始浓度为100mg・L-）对其降解能力的影 响，本研究采用单因素实验，按照上述同样的接种培 养方式在初始DEHP浓度（35~ 1000 mg-L-），温度 （10、20、30、40 T），初始 pH （4、5、6、7、8、9、10、11 下 培养3 d后测定溶液OD600与DEHP剩余量，同时设 置不接菌作为空白处理组。为研究菌株ASW6D的底 物广谱性，分别选择两种环境中常见的 PAEs（DMP 与DBP作为唯一碳源进行实验，DMP、DBP初始浓 度均为35 mg-L-1，接种培养方式同上。

2018年5月

利用高效液相色谱（Agilent 1260 serieS检测溶 液中3种PAEs，采用外标法对3种PAEs定量，构建 标准曲线所有R2均在0.999以上。前处理方法（回 收率在85.71%~109.69%之间：在含有20 mL菌液的 100 mL锥形烧瓶中，加入20 mL甲醇，超声溶解30 min，提取2 mL溶液过0.22 “m微孔过滤膜，后转入色 谱瓶待测。色谱条件：色谱柱为 Agilent Ecliose XDB- C18 （150 mmx4.6 mmx2.5 p,n），流动相为甲醇:水=90： 10,进样量20 “L,柱温30UV检测波长为224 nm。

1. DEHP降解产物的检测

将2 mL菌悬液接种至18 mL MSM 中, DEHP初 始浓度为100 mg-L-1,于0、12、4、6 h时取样，用 GC-MS（Trace DSQ， Thermo 检测 DEHP 代谢产物。 前 处理方法：将20 mL乙酸乙酯加入到液体培养物中， 超声提取10 min后，在2250 r• min-1下离心5 min,提 取上层有机相，重复上述过程两次。 将有机相收集一 起后旋转蒸发接近干燥，后溶解于2mL正己烷中，过 0.22 “m滤膜，将最终溶液转移至色谱瓶中待测，色 谱条件同Tang等附研究。质谱鉴定的结果与美国国 家标准与技术研究所（NIST, Gaithersburg, MD数据 库的标准化合物进行比对。

1.2.6高效降解菌在DEHP污染土壤中的应用

供试土壤采自广州市穗石村未污染农田土壤，土 壤质地为壤土（砂粒 54％、粉粒 38％、黏粒 8％ ，pH 为6.53,总有机碳3.78 g-kg-1,总氮0.31 g-kg-1,总磷 0.25 g・kg-1。为了研究降解菌对DEHP污染土壤的修 复潜力，以及土著微生物对其降解效果的影响，试验 分别设置土壤未灭菌组与灭菌组。未灭菌组:将100 g 土壤（过 2 mm 筛 置于 250 mL 锥形烧瓶中，加入 DEHP丙酮溶液，调节最终浓度为100 mg・kg-1。充分 混合后，溶剂蒸发 24h。 然后将菌悬液均匀地接种到 土壤中，最终浓度为1x107CFU・g-1。灭菌组:将土壤样 品在121 下高压灭菌1 h,后接种菌悬液，在（30士 0.5）七下避光培养。通过添加无菌水使土壤含水量保 持在50%。每隔1 d收集土壤样品1 g,通过GC-MS （Trace DSQ,Thermd测定土壤中残留的DEHP浓度。 灭菌与未灭菌组均分别设置空白组。

土壤样品前处理方法：将1.0 g 土壤加入玻璃离 心瓶中，加入20 mL丙酮和己烷（1：1,V/V混合液，超 声提取10 min, 2250 • min-1离心5 min。重复以上步 骤两次。 收集有机相，旋转蒸发接近干燥，后溶于 10 mL正己烷中。提取2 mL溶液过0.22 “m微孔滤膜后 转移至色谱瓶待测，检测方法同 1.2.5 所示。

1. 结果与讨论

2.1 DEHP高效降解菌的分离与鉴定

菌株 ASW6D 在平板上呈乳白色、 表面干燥、边 缘不整齐、粗糙型菌落（图1a）,电镜图上显示其细胞 形态成杆状，稍有弯曲（图1b。PCR扩增16S rRNA 基因（1477 bpl , GenBank 登录号为 KY888692,基于 序列在 NCBI 上的比对结果，菌株 ASW6D 与 My－ cobacterium mucogenicum（NR\_042919.1 有很高的相 似性（99% 。用 MEGA 6.06 软件构建的系统发育树如 图 2，图中 ASW6D 与 Mycobacterium mucogenicum 和 Mycobacterium sp. 亲缘关系最近， 由此推断菌株 ASW6D属于分枝杆菌属*（Mycobacterium* sp）*。*已有文 献报道*Mycobacterium* sp.可以降解PAEs[28],但更多的 是研究其对多环芳烃的降解[29-30]。

2.2菌株ASW6D对DEHP降解能力的研究

ASW6D可以将DEHP作为唯一碳源迅速生长， 生长延滞期很短,6h时开始进入对数期,24 h时OD 值达到最高，同时DEHP （100 mg • L-）的去除率达

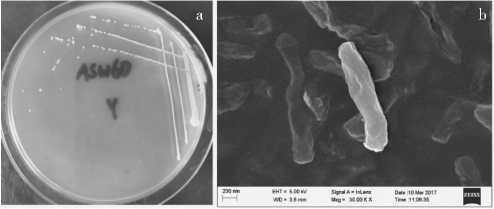


图 1 菌株 ASW6D 的形态特征

Figure 1 Morphological properties of the colonies of strain ASW6D(a coloby(b cell image of SEM

*Mycobacterium mucogenicum* strain ATCC 49650(NR\_114656.1)

90

100

*■— Mycobacterium* sp. NMR16-3(AB286060.1

*Mycobacterium mucogenicum* strain ATCC 49650(NR\_042919.1)

40

— ASW6D (KY888692

*■ Mycobacterium abscessus* subsp. bolletii strain BD (NR\_043236,1

1001 *Mycobacterium abscessus* subsp. bolletii strain CCUG 48898 (NR\_043002.1 *Mycobacterium conceptionense* strain D16(NR\_043239.1)

0.005

*Mycobacterium barrassiae* strain CIP 108545(NR\_115330.1)  *Mycobacterium shigaense* strain UN-152 (NR\_146370.1)  *Mycobacterium koreense* strain 01-305 (NR\_118113.1)

图 2 菌株 ASW6D 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain ASW6D

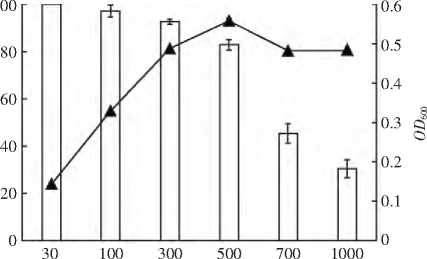
89.34%，随后逐渐进入衰退期,DEHP最终基本被降 解完(1.41%)(图3)*。*为进一步研究菌株ASW6D对 DEHP的降解能力，采用不同初始浓度(35~1000 mg- L-)的DEHP作为唯一的碳源。实验结果显示(图4 , 当DEHP浓度不高于500mg・L-1时，3 d内降解率可 达80%以上，当DEHP浓度增加至1000 mg-L"1时, 降解率降低至30.44%o已有的报道中，分枝杆菌YC- RL4培养24 h后对DEHP (50 mg-L")去除率不到 50%倒,*Pesudomonas* sp. XB何和 *Acinetobacter* sp. SN13[23] 培养24 h后对DEHP (100 mg-L")的去除率分别为 70%和 40%。 相比较以上几种菌株， ASW6D 对 DEHP 具有更好的降解效果。

2.3温度和pH对DEHP降解的影响

微生物主要通过分泌相关酶来分解有机物，温度 和 pH 会影响酶的活性，从而影响微生物的生长与 对有机物的降解能力[31]。从图5和图6可看出，菌株 ASW6D在10七和pH 11条件下仅有些许生长，而在 20~40 t条件下,DEHP 3 d内的降解率可达85%以 上;在pH5~10条件下，降解率均大于77%。其中当 温度为30七和pH为8时,DEHP降解率咼达98%以 上,同时OD600值也达到0.33以上。由此可看出 ASW6D的最适温度和pH值分别为30七和8。

据 文 献 报 道 ， Mycobacterium sp. YC -RL4 可 在

20~40 t、pH 7~9 下高效降解 DEHP[28],,cinetobacter  
sp. SN13的适宜温度和pH范围为25~35七和6~9[23],



浓度 Concentration/mg • L-1

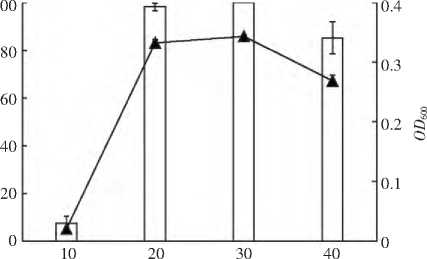
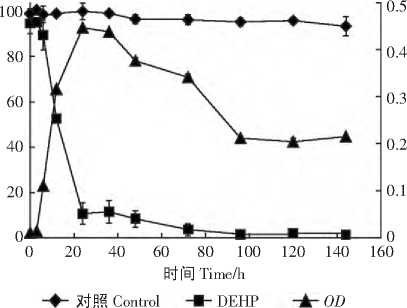
I I 降解率 Removal rate ▲ OD

&空毋WAOEP dHHd附睫地dHHd

图 4 不同 DEHP 初始浓度对 DEHP 降解的影响

Figure 4 Effects of different initial DEHP concentrations on

DEHP biodegradation

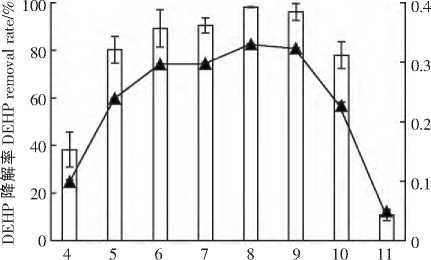


温度 Temperature/弋

I I 降解率 Removal rate ▲ OD 图 5 温度对菌株 ASW6D 降解 DEHP 的影响 ure 5 Effects of temperature on DEHP degradation by ASW6D

1R0E2 dHHd 附膜崖 dHHd

图3菌株ASW6D利用DEHP (100 mg-L")的生长降解曲线  
Figure 3 The DEHP (100 mg\*L-) degradation curve and the  
growth curve of strain ASW6D



I I 降解率 Removal rate ▲ OD

图6 pH对菌株ASW6D降解DEHP的影响

ure 6 Effects of pH on DEHP degradation by ASW6D

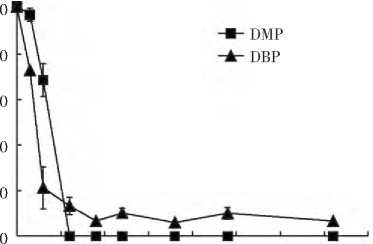
*Gordonia* sp. HS-NH1的则为30咒和7〜8〔叫对比以上 菌株,ASW6D能够在相当宽的温度（20~40 T）和pH （5~10范围下高效降解DEHP,更适合应用于污染环 境的生物修复。

2.4菌株ASW6D对DMP和DBP的降解

菌株ASW6D在DMP、DBP初始浓度为35 mg・L-1 时的降解曲线如图7所示,24 h时,ASW6D对DMP和 DBP去除率为86.64%。对比上文DEHP的降解曲线, 高效降解菌 ASW6D 可以快速利用短链 PAEs——— DMP,而对于中链PAEs——DBP和长链PAEs—— DEHP的降解速度则相对较慢，该结果与先前的报道很 接近［32-33］。 我国环境污染中的酞酸酯主要为 DMP、DBP 和DEHP［11-13,叫而菌株ASW6D不仅可以高效降解 DEHP,还可快速降解DMP和DBP。由此可见,ASW6D 在 PAEs 污染环境的实际修复中具有一定的优势。

* 1. DEHP降解产物的检测与代谢路径的推测

为推测ASW6D对DEHP的降解途径，分别检测 降解过程中在 0、12、24、36 h DEHP 的降解产物 DEHP降解过程中主要检测出3种物质（图8，通过



时间 Time/h

VAOEOHM-B矇

图7 ASW6D对DMP、DBP的降解曲线

Figure 7 The DMP and DBP degradation curve for the strain ASW6D

与谱库（图 9 中 d~f 的比对可以确定 3 种物质分别为 DEHP、DBP和PA。刚开始只检测到DEHP,而在12、 24、36 h 时 DEHP 的含量逐渐降低，同时开始检测到 DBP和PA,由此可推断出ASW6D降解DEHP的主 要中间产物为DBP和PA。

常见的 DEHP 生物降解过程主要是通过酯的水 解作用，将DEHP转化为邻苯二甲酸单-2-乙基己酯 （MEHP，通过水解酶进一步水解为PA,最终为PA 的矿化过程［3，22，28，35-36］，很少有文献报道其降解过程中 会产生中间产物 DBP。 根据 GC-MS 的检测结果与相 关文献，推测ASW6D作用下DEHP的生物降解过程 为：先通过0-氧化逐渐缩短DEHP侧链，生成DBP, DBP可能会继续通过0-氧化缩短侧链生成短链 PAEs,然后再水解生成PA,也可能先通过水解作用 脱一条侧链，生成邻苯二甲酸单丁酯（MBP ,再继续 水解生成PA,接着PA氧化开环，最终进入三羧酸循 环生成CO2和出0 （图9），这一降解途径与菌株 LMB-1降解DBP和JDC-32降解邻苯二甲酸二辛酯

DOP 的途径很类似［16，37］。

2.6菌株ASW6D在DEHP污染土壤中的应用

为进一步研究 ASW6D 在 DEHP 污染环境中的 降解能力，以及土著微生物对其降解性能的影响，将 ASW6D 分别接种到灭菌和未灭菌土壤中，分析 DEHP 降解情况。 接种 ASW6D 到未灭菌土壤 18 d 后, DEHP去除率为75.12%,空白组为16.45%；接种 ASW6D到灭菌土壤18 d后,DEHP去除率为85.08%, 空白仅去除 7.54%，ASW6D 的添加将 DEHP 去除率 提高了 77.54%（图 10 。 动力学数据进一步表明 DEHP降解过程基本符合一级动力学模型（R2=0.767 4~

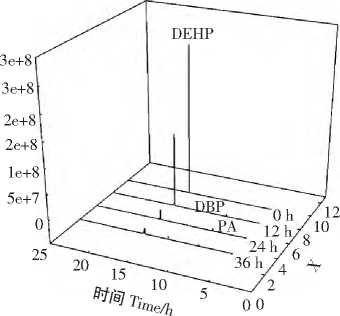
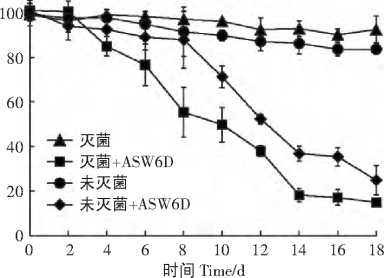
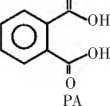
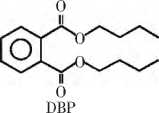
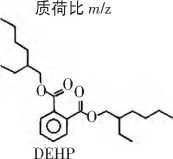
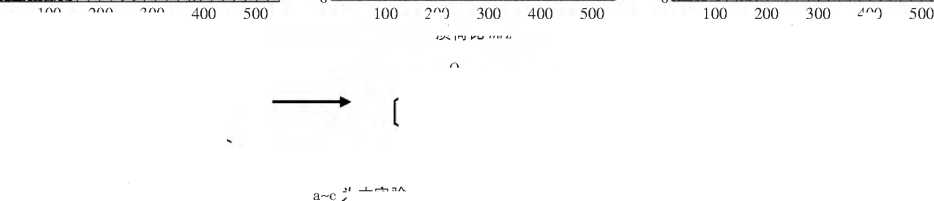


图8 ASW6D降解DEHP过程中中间产物的色谱图

Figure 8 Chromatograms of the intermediates of DEHP degradation by ASW6D



图 10 ASW6D 对污染土壤中 DEHP 的降解

**nuoooooooooo**

0987654321 1

oouepunqeoAIleoH  
悝舉煤』M

**0000000000**

098765432 1

oouepunqeOALIEOH  
悝舉据MW-

149 a.DEHP

71

IL113

167

279

168 278 I 281

149 质荷比m/z

d.DEHP

57

J13

167

***OOOOOOOOOOO***

**0987654321**

11

oouepunqe QAIIEOH

**0000000000**

**0987654321** 11

oouepunqeOALIEOH  
悝舉据MW-

149

104

93 14

4176104

lld.ll III h

b.DBP

^L **0987654321**

11

oouepunqeoAIleoH

04——，

*16*

**PA**

**c**

9 质荷比m/z

20f 224278

e.DBP

**0000000000**

**0987654321** 11

oouepunqeOALIEOH  
悝舉据MW-

**54**

**11 .**

**41***o*巾

**2**上

1. **I**

**2**

**9**

**-^2**

**2 7**

**8 7**~~1一~~

**3.**

**8**

**4** ~~1.~~ 严 **nr —**

**1 6 • : I**

**7 o** 丨 **'H**

**8 5 ■**

**54**

为本实验图谱,~f为谱库图谱

图 9 ASW6D 降解 DEHP 过程中中间产物的质谱图 Figure 9 Spectra of the intermediates of DEHP degradation by ASW6D

400 质荷比m/z

390

279

168 278 I 2

100 200 300

200

质荷比m/z

O

Figure 10 Degradation of DEHP by ASW6D in containment soil

0.976 8 (表 1 。土壤灭菌处理下，接种 ASW6D 后

DEHP的半衰期(t“)为5.03 d,对照组为71.97 d,在 土壤未灭菌情况下，添加ASW6D的切为6.67 d,而 对照组为33.43 d (表 1) o结果表明，添加菌株ASW6D 可大幅降低(P<0.05) DEHP在土壤中的半衰期，加 快DEHP的降解速率。秦华等国分别添加3种菌悬液 到污染土壤(DEHP浓度为100 mg-kg-)中,种处理 下DEHP半衰期为24〜35 d；加入降解菌群到PAEs 混合污染土壤中,0 d后DEHP的同分异构体DOP (100 mg-kg-)去除率不到50%, DOP半衰期为28 d[38]。

表 1 ASW6D 降解污染土壤中 DEHP 的动力学参数 Table 1 Kinetic parameters of DEHP degradation in contaminated soils by ASW6D

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 土壤处理 Soil treatment 动力学方程 Kinetic equations | | t1/2 /d | R2 |
| 灭菌 | lnC=-0.009 7t+4.610 1 | 71.97 | 0.7674 |
| 灭菌+ASW6D | lnC=-0.239 5t+5.117 7 | 5.03 | 0.939 1 |
| 未灭菌 | lnC=-0.021 4t+4.627 4 | 33.43 | 0.976 8 |
| 未灭菌+ASW6D | lnC=-0.156 5t+4.986 1 | 6.67 | 0.883 8 |

本研究中，外加ASW6D到DEHP污染的土壤，DEHP 的半衰期为6.67 d,表明ASW6D具有较高的降解 潜力。

添加菌株 ASW6D 的未灭菌土壤组 DEHP 的降 解曲线在 8 d 内相对灭菌组较平缓，降解速率较慢 图 10 。而在 8~18 d 内，未灭菌土壤组的降解速率迅 速加快，并逐渐超过灭菌组。该结果可能是由于菌株 ASW6D 与土壤中土著微生物存在某种竞争关系，所 以在前8 d ASW6D的生长受到一定影响，导致DEHP 的降解曲线比较平缓，而8 d后速率突然加快可能是 由于菌株ASW6D在与土著微生物的竞争中逐渐占 据优势，从而加快了对DEHP的降解。

综上所述，菌株ASW6D可快速去除新加入土壤 的DEHP,具有高效降解DEHP的能力，表明菌株

ASW6D 对 PAEs 污染环境的生物修复具有一定的潜 力与应用前景。

1. 结论

(1获得了一株可高效降解DEHP的菌株ASW6D, 经形态学特征和16S rRNA序列分析,初步鉴定为分 枝杆菌属*(Mycobacterium* sp)。

(2 ASW6D可在较宽温度(20 ~ 40罚 和pH (5 ~ 10范围下高效降解DEHPODEHP生物降解过程中检 测到的主要代谢物是DBP和PA。

(3 添加菌株 ASW6D 到 DEHP 污染的土壤，可 明显提高DEHP的去除率，表明ASW6D在PAEs污 染环境的生物修复方面具有一定的潜力。

参考文献：

1. Chen J A, Li X, Li J, et al. Degradation of environmental endocrine dis － ruptor di -2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Mi*－ *crobacterium* sp. strain CQ0110Y [J]. *Applied Microbiology Biotechnol*－ *ogy*, 2007, 74(3 ： 676-682.
2. Liang D W, Zhang T, Fang H H P, et al. Phthalates biodegradation in the environment[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, 80(2 ： 183­198.
3. Nahurira R, Ren L, Song J, et al. Degradation of di(2-Ethylhexyl ph － thalate 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 oc － currence 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 sedimen － tary phases from transboundary rivers(France-Belgium [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 521/522： 152-159.
6. Selvaraj K K, Sundaramoorthy G, Ravichandran P K, et al. Phthalate es － ters in water and sediments of the Kaveri River, India ： Environmental levels and ecotoxicological evaluations [J]. *Environmental Geochemistry Health*, 2015, 37(1 ： 83-96.
7. Li J, Wang G, Aggarwal S G, et al. Comparison of abundances, composi － tions and sources of elements, inorganic ions and organic compounds in atmospheric aerosols from Xi'an and New Delhi, two megacities in Chi— na and India[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 476/477： 485­495.
8. Shi W, Guo J, Zhou Y B, et al. Phthalate esters on hands of office work— ers： Estimating the influence of touching surfaces[J]. *Environment Sci*－ *ence & Technology Letters* , 2016, 4(1 ： 1-5.
9. Liao C S, Chen L C, Chen B S, et al. Bioremediation of endocrine dis — ruptor di -n - butyl phthalate ester by *Deinococcus radiodurans* and *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Chemosphere*, 2010, 78(3 ： 342-346.
10. Matsumoto M, Hirata K M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health： A review of recent studies on reproduction [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 50(1 ： 37-49.
11. 王红芬，程晗煜,洪坚平•环境中酞酸酯的污染现状及防治措施[J]・ 环境科学与管理, 2010, 35(7 ： 33-36.

WANG Hong-fen, CHEN Han-yu, HONG Jian-ping. The status of ph— thalate esters pollution and its control measures in the environment[J]. *Environmental Science and Management* , 2010, 35(7 ： 33-36.

1. 崔学慧,李炳华,陈鸿汉,等.中国土壤与沉积物中邻苯二甲酸酯污 染水平及其吸附研究进展[J]・生态环境学报，2010, 19 (2 ：472- 479.

CUI Xue-hui, LI Bing -hua, CHEN Hong-han, et al. A review of ph— thalic acid esters contamination and sorption in soil and sediment, Chi— na[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(2 ： 472-479.

1. 刘 庆，杨红军，史衍玺，等•环境中邻苯二甲酸酯类(PAE<)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(PAEs organic pollutants in the environment[J]. *Chi*－ *nese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20(8 ： 968-975.

1. Zhao H M, Du H, Feng N X, et al. Biodegradation of di-n-butylphtha— late 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.
2. He L, Gielen G, Bolan N S, et al. Contamination and remediation ofph— thalic acid esters in agricultural soils in China ： A review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35(2 ： 519-534.
3. 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 (1 ：177-186.
4. Yuan S Y, Huang I C, Chang B V. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl phthalate and microbial community changes in mangrove sediment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 184(1 ： 826-831.
5. 高静静,陈丽玮,王宜青,等.一株邻苯二甲酸二(2-乙基己基 酯 (DEHP高效降解菌的筛选及其降解特性[J].环境化学，2016, 35 (11 ：2362-2369.

GAO Jing-jing, CHEN Li-wei, WANG Yi-qing, et al. Isolation, identifi — cation of a DEHP-degrading bacterium and its high effective biodegra — dation characteristics [J] . *Environmental Chemistry* , 2016, 35(11 ： 2362-2369.

1. Wang J, Zhang M Y, Chen T, et al. Isolation and identiflcation ofa di- (2 -Ethylhexyl phthalate -degrading bacterium and its role in the bioremediation of a contaminated soil[J]. *Pedosphere*, 2015, 25(2 ： 202-211.
2. Wu X L, Wang Y Y, Dai Q Y, et al. Isolation and characterization of four di-n-butyl phthalate(DBP -degrading *Gordonia* sp. strains and cloning the 3, 4-phthalate dioxygenase gene[J]. *World Journal of Mi*－ *crobiology & Biotechnology*, 2011, 27(11 ： 2611-2617.
3. 严佳丽，陈湖星，杨 杨，等.一株高效DEHP降解菌的分离、鉴定 及其降解特性[J].微生物学通报,2014,41 (8 ： 1532-1540.

YAN Jia-li, CHEN Hu-xing, YANG Yang, et al. Isolation and charac— terization of a highly efficient DEHP-degrading bacterium [J]. Institute of Microbiology, 2014, 41(8 ： 1532-1540.

1. 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]. Sci－ ence of the Total Environment , 2016, 562： 170-178.
2. Xu J, Lu Q, de Toledo R A, et al. Degradation of di-2-ethylhexyl ph **－** thalate(DEHP by an indigenous isolate Acinetobacter sp. SN13 [J]. International Biodeterioration & Biodegradation , 2017, 117： 205-214.
3. Jin D C, Liang R X, Dai Q Y, et al. Biodegradation of di -n -butyl ph **－** thalate by Rhodococcus sp. JDC -11 and molecular detection of 3, 4 - phthalate dioxygenase gene[J]. Journal of Microbiology Biotechnology , 2010, 20(10 ： 1440-1445.
4. 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.

SONG Xue-ying, CUI Xiao-wei, LI Jia-kang, et al. Research advances in soil ecotoxicology of phthalic acid esters(PAEs exposure[J]. Ecolo－ gy and Environmental Sciences, 2016, 25(11 ： 1885-1890.

1. 秦 华,林先贵,尹 睿,等. 接种降解菌对土壤中邻苯二甲酸二异 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-Ethyl**－** hexyl phthalate in soil by inoculating microorganisms [ J ] . Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(6 ： 842- 845.

1. Li C, Tian X L, Chen Z S, et al. Biodegradation of an endocrinedisrupt **－** ing chemical di -n -butyl phthalate by Serratia marcescens C9 isolated from activated sludge [J]. African Journal of Microbiology Research , 2012, 6(11 ： 2686-2693.
2. 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 en **－** vironmental samples[J]. Environmental Science and Pollution Research , 2016, 23(16 ：16609-16619.
3. Boldrin B, Tiehm A, Fritzsche C. Degradation of phenanthrene, fluo **－** rene, fluoranthene, and pyrene by a Mycobacterium sp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6 ： 1927-1930.
4. Solano -Serena F, Marchal R, Casar**e**gola S, et al. A Mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocar**－** bons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6 ： 2392-

2399.

1. Chen S, Dong Y H, Chang C, et al. Characterization of a novel cyfluthrin -degrading bacterial strain brevibacterium aureum and its biochemical degradation pathway[J]. Bioresource Technology, 2013, 132： 16-23.
2. 张 可，关 允，格 桑，等•低温邻苯二甲酸二甲酯降解菌STX-2 和STX-5的分离、鉴定及降解特性[J].环境污染与防治，2017, 39 (1 ：16-27.

ZHANG Ke, GUAN Yun, GE Sang, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of dimethyl phthalate degradation strains STX-2 and STX-5 at low temperature [J] . Environmental Pollution & Control, 2017, 39(1 ：16-27.

1. 温志丹,高大文,李 喆,等.邻苯二甲酸酯降解菌的分离鉴定及降 解特性[J].哈尔滨工业大学学报,2013,45 (12 ：38-42.

WEN Zhi-dan, GAO Da-wen, LI Zhe, et al. Isolation and identification of phthalate-degrading bacteria and their characteristics[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2013, 45(12 ： 38-42.

1. 周开胜,吕超田,杨 刚,等.水体中酞酸酯类环境激素污染及生物 降解研究进展[J].环境科技,2009, 22 (4 ： 56-59.

ZHOU Kai-sheng, L譈 Chao-tian, YANG Gang, et al. Research progress on pollution and biodegradation of environmental hormone -phthalate esters in water[J]. Environmental Science and Technology , 2009, 22 (4 ： 56-59.

1. Benjamin S, Pradeep S, Josh M S, et al. A monograph on the remedia － tion of hazardous phthalates[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 298： 58-72.
2. Li D D, Yan J L, Wang L, et al. Characterization of the phthalate acid catabolic gene cluster in phthalate acid esters transforming bacterium- Gordonia sp. strainHS-NH1[J]. International Biodeterioration & Biodegra－ dation, 2016, 106： 34-40.
3. Wu X, Liang R, Dai Q, et al. Complete degradation of di-n-octyl ph－ thalate 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.
4. Wang J L, Zhao X, Wu W Z. Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs in soil bioaugmented with acclimated activated sludge [ J] .

Process Biochemistry, 2004, 39(12 ： 1837-1841.