

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2016.11.2016040103

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 Jingjing, CHEN Liwei, WANG Yiqing, et al. Isolation, identification of a DEHP-degrading bacterium and its high effective biodegradation characteristics[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(11): 2362-2369.

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*

高静静 陈丽玮 王宜青 陈长生 俞悦 王平**

(南京林业大学生物与环境学院, 南京, 210037)

摘 要 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)是一种高分子量的邻苯二甲酸酯(PAE), 因高用量、难降解性成为一种全球性的有机污染物. 从二沉池活性污泥中筛选出一株革兰氏阴性菌, 能够以 DEHP 作为唯一碳源和能源, 高效降解 DEHP, 命名为 XB. 基于其形态、生化特性以及 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定为 *Pseudomonas* sp.. 优化其降解 100 mg·L⁻¹ DEHP 的条件, 结果表明最佳降解条件为: 温度 30—35 ℃, pH 7.0. 同时, 不同初始浓度下 DEHP 的降解动力学研究表明 *Pseudomonas* sp. XB 对 DEHP 的降解符合一阶动力学模型. 当 DEHP 浓度为 100 mg·L⁻¹ 时, 降解半衰期大约为 8.25 h. 通过 GC-MS 检测到了菌株 XB 降解 DEHP 的代谢产物, 如邻苯二甲酸(2-乙基己基)单酯(MEHP)和 2-乙基己基醇, 推导了其降解途径. 菌株 *Pseudomonas* sp. XB 还可以以其他 3 种常见 PAEs(DMP、DEP、DBP)、苯酚、苯甲酸钠以及邻苯二甲酸等有机化合物为唯一碳源和能源生长, 表明其降解环境有毒物质的能力. 结果证明 *Pseudomonas* sp. XB 作为生态修复 PAEs 生物强化菌具有潜在的适用性.

关键词 DEHP, 生物降解, *Pseudomonas* sp. XB, 降解动力学.

Isolation, identification of a DEHP-degrading bacterium and its high effective biodegradation characteristics

GAO Jingjing CHEN Liwei WANG Yiqing CHEN Changsheng YU Yue WANG Ping**

(College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037, China)

Abstract: Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a high-molecular-weight phthalate ester (PAE) that has been considered as a global environmental organic pollutant due to its wide use and persistence characteristic. In this study, a novel gram negative bacterial strain, named XB, capable of utilizing DEHP as the sole source of carbon and energy was isolated from activated sludge taken from a municipal wastewater treatment plant through screening test. According to the analysis of morphology, physiological properties and 16S rRNA gene sequence, strain XB was identified as *Pseudomonas* sp.. Effects of environmental factors e.g. temperature, initial pH on DEHP degradation were optimized. Optimal temperature and pH value for DEHP degradation (initial concentration was 100 mg·L⁻¹) were determined as: 30—35 ℃, pH 7.0. The degradation processes of DEHP under

2016 年 4 月 1 日收稿(Received: April 1, 2016).

* 国家自然科学基金(31270680)和江苏省优势学科建设项目资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270680) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

** 通讯联系人, Tel: 18061713169, E-mail: wp_lh@aliyun.com

Corresponding author, Tel: 18061713169, E-mail: wp_lh@aliyun.com

various initial DEHP concentrations by *Pseudomonas* sp. XB followed the first-order reaction model. The half-life of degradation was about 8.25 h when the concentration of DEHP was $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate and 2-ethyl hexanol were determined as the intermediates by GC-MS analysis, and the degradation pathway was deduced. PAEs (DMP, DEP, DBP), and phenol, sodium benzoate, phthalic acid could also be utilized as the sole carbon and energy source for the cell growth. The results indicate that the bacterium may represent a promising application for DEHP bioremediation.

Keywords: DEHP, biodegradation, *Pseudomonas* sp. XB, degradation kinetics.

人类活动产生的环境污染是全世界存在的问题.近年来,人们对现代社会产生废弃物的治理越来越关注^[1].PAEs 是一种合成化合物,其化学结构为 1,2-邻苯二甲酸的双烷基或芳基烷基酯,作为增塑剂、软化剂及添加剂,广泛用于塑料、化妆品、去污剂、润滑剂、服装和农药等行业^[2].由于 PAEs 与塑料之间不是以共价键的形式结合,在塑料的使用和处理过程中,很容易从塑料主体迁移至环境中,因此广泛存在于大气、水体、土壤以及生物体中.邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)因增塑效率高、材料相容性好、挥发性低、耐受性好等特点,成为目前应用最广泛的增塑剂.DEHP 能够对机体造成生殖毒性、发育毒性、神经毒性、多器官癌变等多种损伤,进入食物链后会威胁人类健康^[3].因此,美国环境保护署,欧洲联盟和中国环境监测中心已将它列为优先控制污染物质^[4].

PAEs 在环境中水解、光解的速率非常缓慢,属于难降解物质,因此,微生物代谢是其主要降解途径之一^[5].目前,国内外已有大量研究关于不同环境,如废水处理厂、污泥、土壤和河流底泥中 PAEs 的生物降解^[6].PAEs 降解菌主要有鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)^[7]、苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)^[8]、节细菌(*Arthrobacter* sp.)^[9-10]、土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)^[11]、类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)^[13]、红球菌(*Rhodococcus* sp.)^[13-15]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[16]、贪嗜菌(*Variovorax* sp.)^[17-18]、戈登氏菌(*Gordonia* sp.)^[19-21]等.然而,大部分研究的是短侧链邻苯二甲酸酯的生物降解,对于长侧链邻苯二甲酸酯的生物降解研究却很少.DEHP 结构式存在一个苯环和两个相邻的长侧链,导致其具有较低的水溶性和化学稳定性,且空间位阻较大,相比短链邻苯二甲酸酯类较难降解,因此,目前,有关 DEHP 降解的报道较少^[22].故需要筛选出具有广泛适用性,高环境容忍度,高效降解的细菌.

本研究从南京江心洲污水处理厂二沉池污泥中筛选出一株能够以 DEHP 作为唯一碳源和能源生长的高效降解菌 XB,经过鉴定后为 *Pseudomonas* sp.,并研究了其降解特性.

1 材料和方法 (Materials and methods)

1.1 实验试剂

邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯(DEHP)(99.0%,分析纯)购自上海凌峰化学试剂厂.甲醇(色谱纯)和正己烷(分析纯)购自国药化学试剂厂.本实验中的其他试剂都是分析纯,购自南京化学试剂厂.实验中使用的玻璃器皿均用铬酸仔細清洗以减少邻苯二甲酸酯的背景污染.

1.2 培养基的制备

无机盐培养基(MSM)用于所有实验中(除非另外说明),包括活性污泥的驯化.培养基成分(每 1 L 蒸馏水): K_2HPO_4 0.6 g, NaH_2PO_4 0.4 g, NH_4Cl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g,微量元素溶液 1 mL.微量元素溶液(每 1 L 蒸馏水): $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.8 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.2 g.MSM 的 pH 值用 HCl 或者 NaOH 调至 7.0.

LB 培养基用于细菌的富集培养:酵母浸提物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2.营养琼脂平板同 LB,但是加有 1.5%琼脂.配置好的培养基在 121°C 高温下灭菌 30 min 后才能使用.

1.3 DEHP 高效降解菌的筛选

用于分离细菌的活性污泥取自南京江心洲污水处理厂的二沉池.筛选采用梯度压力驯化法,过程如下:初始,25 mL 的活性污泥加入到 250 mL 锥形瓶中,其中加有 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DEHP 以及 100 mL 灭菌后

的 MSM。除了 DEHP,不添加其他碳源。混合液置于恒温气浴振荡器中,30 ℃、150 r·min⁻¹ 无光下振荡培养 5—7 d,直至 DEHP 油滴消失。为了避免活性污泥提供营养成分,逐渐富集到能够以 DEHP 作为唯一碳源和能源的生物降解菌,随后,取 2 mL 上一次的富集液转移至新的 MSM 中(其中 DEHP 递增浓度依次为 200、400、600、800、1000 mg·L⁻¹),在同样条件下培养。

在前期筛选结束后,接种针蘸取少量最后一次培养菌液,在涂有 800 mg·L⁻¹ DEHP 的 MSM 固体培养基上划线,划线后置于 30 ℃ 下培养一周。继代划线,待长出肉眼可见菌落,观察菌落形态,筛选出生长特征不同的菌落,再在 LB 平板上重复划线分离纯化。得到的不同单菌落再次在涂布有 DEHP 的 MSM 固体平板上划线,以确定菌株对 DEHP 的降解能力。经过筛选后,获得了一株高效降解菌,命名为 XB。

1.4 DEHP 高效降解菌的鉴定

用显微镜(JSKQ-2B-4041)观察菌株 XB 革兰氏染色后的形态。用 16S rRNA 基因测序法对细菌 XB 进一步鉴定。整个测序工作委托南京金斯瑞生物科技公司进行。金斯瑞生物科技公司提供所有相关的试剂。得到序列提交至 GenBank 数据库,在 NCBI(National center for biotechnology information databases)通过 BLASTn 进行相似性搜索和同源性比对,以获得相似性较高的相关菌株,最后用 MEGA 6.06 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.5 菌株 XB 对 DEHP 的降解特性

位于生长对数期的细菌活性较大,因此预先得到菌株 XB 在 LB 液体培养基 30 ℃ 下的生长曲线以获得其生长对数期,以该生长期的菌体制备菌悬液。将分离纯化得到的菌株 XB 接种于富集培养基中培养 12—24 h,离心(10000 r·min⁻¹)5 min 后弃去上清液,收集菌体,用灭菌后的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)清洗 3 遍后,重悬于相同的缓冲液中,制备成 OD₆₀₀ = 0.7±0.02 的菌悬液。需要注意的是,在对菌株 XB 富集培养之前,将菌株接种于含 DEHP 的无机盐培养液中生长,以完成对其的诱导作用。Liang 等^[23]的研究表明菌株 *Acinetobacter* sp. JDC-16 在经过诱导后可以缩短其降解 DEP 的停滞期。

1 mL 菌悬液(OD₆₀₀ = 0.7±0.02)加入到含有 100 mg·L⁻¹ DEHP 的 MSM 中。首先,研究以下环境因素对细胞生长及 DEHP 降解的影响:温度(15、20、25、30、35、40、45 ℃);初始 pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0)。此后,在最佳温度和 pH 下进行了菌株 XB 在 4 d 内对 DEHP 的降解动力学。每个锥形瓶在加入 100 mL MSM 以及不同浓度的 DEHP(50、100、200、300、500 mg·L⁻¹)后培养。残留 DEHP 浓度用 HPLC 分析。

为了检验 XB 菌体对 DEHP 的吸附情况,将离心后的 XB 细胞颗粒经过 PBS 清洗 3 次后,重悬于 PBS 中,配制成 OD₆₀₀ = 0.7±0.02 的菌悬液,再经过 121 ℃ 高温 60 min 使其失活。失活后的 XB 菌体对 DEHP 的吸附实验步骤同上述降解特性实验。

以上每组实验均设定非生物对照样,即未投加菌悬液的样,以消除其他物理因素影响,如光解。每个样品设定一个平行样。数据以平均数和标准偏差表示。

1.6 DEHP 降解产物的 GC-MS 分析

培养基中 DEHP 代谢产物利用 GC-MS(TRACE DSQ, Thermo.) 分析测定。根据菌株 XB 对 100 mg·L⁻¹ DEHP 的降解动力学实验结果,分别取处于快速降解期末期的 23 h 以及降解完全的 44 h 这两个时间点的培养液进行降解产物的分析。样品经过正己烷萃取后蒸发至干,溶解在 5 mL 甲醇中,用于 GC-MS 分析。条件为:进样口温度 250 ℃,初始柱温 80 ℃,保持 4 min,然后以 10 ℃·min⁻¹ 升至 300 ℃,保持 20 min,载气为氦气,速率为 1 mL·min⁻¹。扫描范围为 m/z 33—450。

1.7 菌株 XB 底物特异性研究

选取邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)等 3 种常见的 PAEs,以及具有代表性的芳香族如邻苯二甲酸酐、水杨酸、苯甲酸、苯甲酸钠、邻苯二酚、对硝基苯酚、苯胺、对羟基苯甲酸和邻苯二甲酸作为测试底物。在 MSM 中加入底物使其最终浓度为 100 mg·L⁻¹,无菌处理后接种相同体积的菌悬液,在 30 ℃、150 r·min⁻¹ 下培养 60 h 后,观察菌株 XB 的生长情况。为避免溶液本身颜色的干扰,以待测物+无机盐培养液作为对照。每个样设定一个平行样。

1.8 分析方法

降解实验结束后,直接向锥形瓶中加 10 mL 正己烷萃取培养基中残留的 DEHP,密封锥形瓶口,在

涡流混合器上振荡萃取 2 min 后,静置 10 min.移取 500 μ L 有机相于洗净晾干的 10 mL 比色管中,用甲醇定容至 5.00 mL,摇匀,用 0.22 μ m 滤膜过滤后通过 HPLC 测定 DEHP 的浓度.

HPLC 色谱条件:Syncronis C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm),流动相为甲醇:水 = 95:5 (V:V),流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温 35 $^{\circ}$ C,紫外检测器波长 λ = 224 nm,进样量 10 μ L,分析时间 9 min.培养基中微生物量采用紫外可见分光光度计(TU810,普析,北京),测量培养液在 600 nm 的光密度值,即 OD₆₀₀.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 DEHP 高效降解菌的分离和鉴定

经过筛选后,从活性污泥中分离得到一株菌,将其命名为 XB,其能够以 DEHP 作为唯一碳源和能源.图 1(A)为菌株 XB 在 LB 平板上划线,30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后形成的菌落,可以看出其形成的菌落为圆形,乳白色、表面光滑干燥、边缘整齐、凸起、不透明.从 XB 细胞革兰氏染色后的镜检结果(图 1(B))可以看出 XB 细胞为短杆状,属于革兰氏阴性菌.

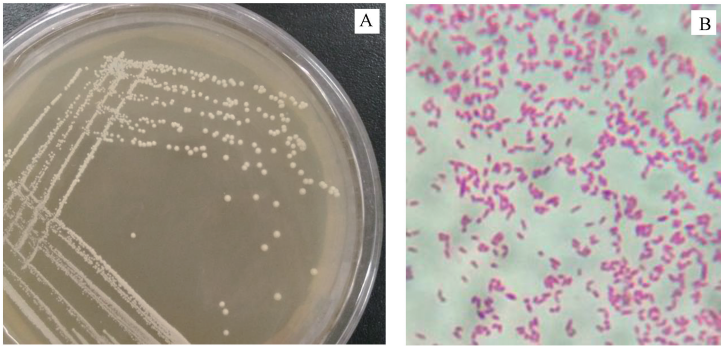


图 1 菌株 XB 的菌落和细胞形态特征

(A) 菌株 XB 在 LB 平板划线培养后菌落形态;(B) 菌株 XB 革兰氏染色

Fig.1 Morphological properties of the colonies and cells of strain XB

(A) Colonies of strain XB on the LB plate after incubation; (B) The result of gram staining of strain XB

基于其 16S rRNA 基因序列的比对结果,菌株 XB 与 *Pseudomonas* sp. FGI182 (CP007012.1) 有很高的相似性(100%).构建的系统发育树(图 2)结果表明这两株菌关系最近.因此,分离的菌株 XB 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.).

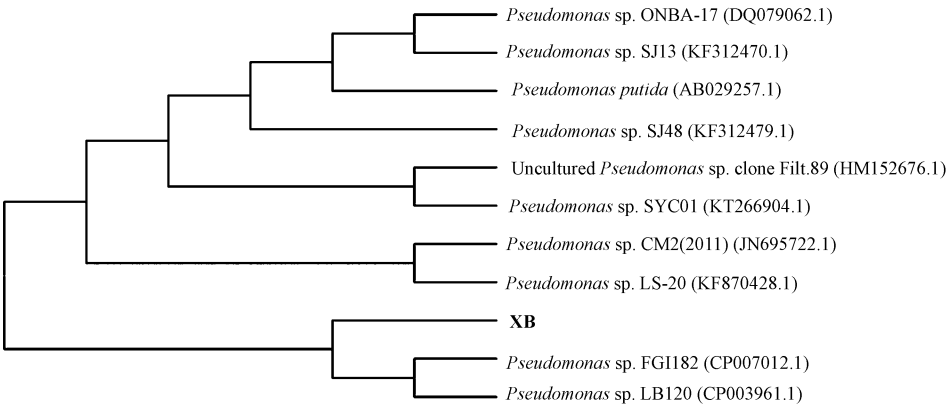


图 2 菌株 XB 系统发育树(括号中为登录号)

Fig.2 16S rRNA gene sequence-generated phylogenetic tree (Accession numbers of bacteria were shown in brackets)

一般认为 *Pseudomonas* sp. 广泛存在于自然界中,可以从各种环境中分离得到.先前也有报道 *Pseudomonas* sp. 能够降解很多有机污染物.例如, Ma 等^[24] 从活性污泥中分离得到一株 *Pseudomonas* sp.

Jpyr-1 能够降解茚;Jariyal M 等^[25]从土壤中分离得到 *Pseudomonas* sp. 能够降解甲拌磷(一种杀虫剂).也有研究表明 *Pseudomonas* sp. 能够降解 DBP^[4,26],但是能降解 DEHP 的很少.Zeng 等^[27]曾报道从活性污泥中分离得到的 *Pseudomonas fluorescences* FS1 降解 DEHP,但是其降解半衰期较长.

2.2 温度和 pH 对 DEHP 降解影响

降解实验中 DEHP 直接加入到 250 mL 锥形瓶中,而不是先溶解于丙酮达到乳化效果后再加入,因为 Lu 等^[14]报道,未经过乳化和完全乳化的 PAEs 污染水样的降解效果没有太大差别.

细菌生长对环境温度很敏感.为了得到 XB 降解 DEHP 的最佳温度,在 pH 7.0 下,培养 23 h,评估不同的温度(15、20、25、30、35、40、45 °C)对 100 mg·L⁻¹ DEHP 降解的影响.如图 3(A)所示,在温度 15—35 °C 之间,XB 对 DEHP 的降解率随温度升高而逐渐增加.当温度在 30—35 °C 之间时,降解速率达到最大.温度持续上升(>35 °C)导致降解率和细菌生长明显下降.当 XB 在更高的温度(45 °C)和更低的温度(15 °C)下培养时,DEHP 降解率相对较低.在 30—35 °C 下,达到最高降解率(70.47%)和最大生物量(0.067),此时相关降解酶活性最高.

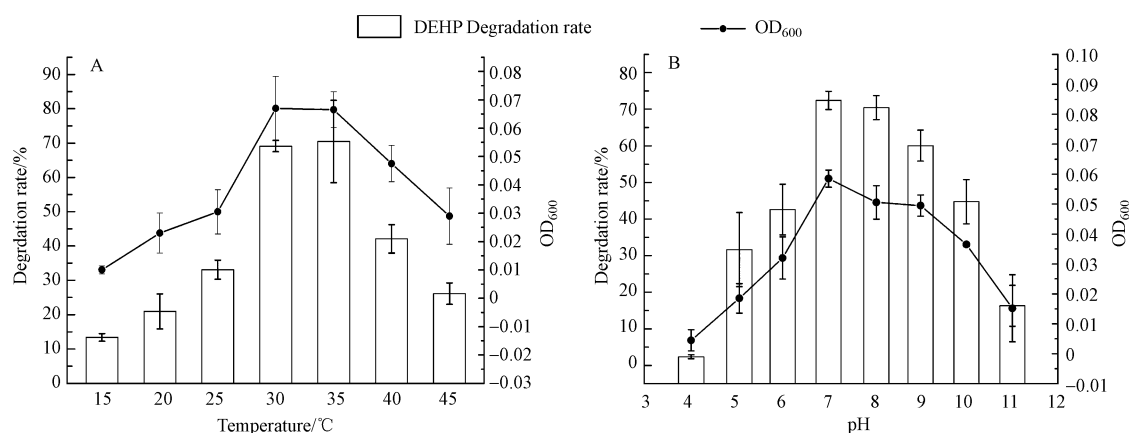


图 3 温度(A)和 pH(B)对 XB 的生物量及 DEHP 降解率的影响

Fig.3 Effect of temperature (A) and initial pH (B) on the growth of XB and DEHP degradation

pH 会限制微生物的酶活,所以培养基中 H⁺浓度对细菌生长和生物降解率影响很大.为了表征菌株 XB 降解 DEHP 的特性,研究了在培养 23 h 后,初始 pH(4.0—11.0)对细菌生长以及 100 mg·L⁻¹ DEHP 降解率的影响.结果如图 3(B)所示,相比于酸性条件下,XB 在碱性条件下表现出更高的降解率和生长量.同时,降解率与生物量之间高度对应.当 pH 值为 7.0 时候,降解率最大(72.41%).且可以发现即使当 pH 值达到 11.0 时,仍可以去除 16.30%的 DEHP.这表明该菌株可以在稍微偏碱性条件下生存.酸性条件下较低的降解率和生物量可能是由于菌株 XB 对 DEHP 的不完全降解所致,降解过程中的中间产物如邻苯二甲酸酸化培养基,因此抑制了细菌进一步降解中间产物.该结果与先前的报道一致^[28].

Pseudomonas sp. XB 降解 DEHP 最佳条件为温度 30—35 °C, pH 7.0.与先前 Zeng 等^[27]的报道一致: *Pseudomonas fluorescences* FS1 降解 DEHP 最佳条件为温度 20—35 °C, pH 6.5—8.0.

2.3 降解动力学

不同浓度 DEHP 的降解动力学实验在 30 °C, pH 7.0 和 150 r·min⁻¹下进行.结果如图 4 所示.需要提到的是,在生物降解的初始阶段, *Pseudomonas* sp. XB 的细胞聚集在一起包裹 DEHP 油滴形成不同尺寸的聚集体,可以用肉眼观察到.这可能是由于 XB 细胞表面和 DEHP 的疏水反应^[14].在降解过程中,菌株 XB 细胞外可能存在表面活性剂.先前也有研究报道^[21],细胞表面的疏水性以及生物表面活性剂的产生在各种疏水化合物的降解过程中具有十分重要的作用.

如图 4 所示,DEHP 初始浓度在 50—500 mg·L⁻¹之间,降解曲线基本相似.以 100 mg·L⁻¹ DEHP 为例,在起初 6 h 内,降解速率较慢,随后降解速率快速上升,30 h 后,降解率达到 90%.可以观察到,培养 52 h 后,所有浓度 DEHP 的降解率都超过 90%.而且,菌株 XB 的吸附实验结果表明,相比于 DEHP 的降解,失活的 XB 细胞对 DEHP 的吸附量很少(数据未列出).

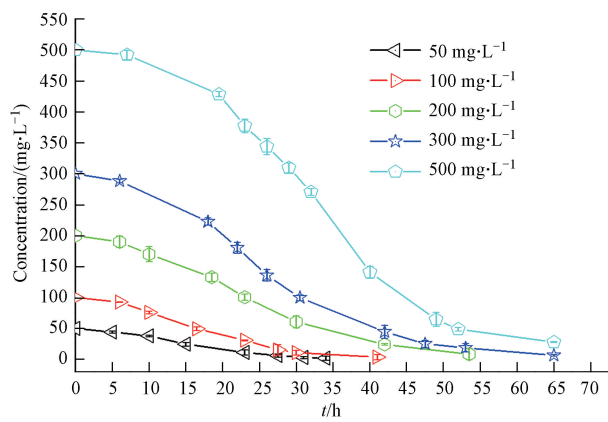


图 4 XB 在 30 ℃ ,pH 7.0 和 150 r·min⁻¹下降解 DEHP 动力学曲线

Fig.4 DEHP-degradation kinetics curve by XB at 30 ℃ , pH 7.0 and 150 r·min⁻¹

菌株 XB 对 DEHP(100 mg·L⁻¹)降解率在 45 h 内可以达到 97%.关于细菌在最优条件下降解 DEHP (100 mg·L⁻¹) 的其他报道,如 *Microbacterium* sp. CQ0110Y 在培养 7 d 后降解 90% 的 DEHP^[29]; *Pseudomonas fluorescences* FS1 在培养 6 d 后 DEHP 降解率低于 90%^[27].因此,相比于先前对 DEHP 降解研究,*Pseudomonas* sp. XB 更能高效地降解 DEHP.

假定 *Pseudomonas* sp. XB 降解 DEHP 符合 Monod 一级动力学方程: $\ln C = -kt + A$,其中 C 表示 DEHP 浓度, t 为时间, k 为一阶动力学速率常数, A 为常数.降解半衰期 $t_{1/2} = \ln 2/k$.利用公式得到表 1 中 *Pseudomonas* sp. XB 对 DEHP 的降解动力学方程.结果表明当 DEHP 初始浓度为 50—500 mg·L⁻¹, *Pseudomonas* sp. XB 对 DEHP 的降解符合一阶反应动力学模型.随着 DEHP 浓度从 50 mg·L⁻¹ 增至 500 mg·L⁻¹,降解半衰期总体上呈现增加趋势,说明高浓度的 DEHP 对菌株 XB 有一定的毒害作用,延长了 XB 的适应期,在一定程度上抑制其对 DEHP 的降解作用.

以上实验中设置的所有空白样(未加菌悬液)中的 DEHP 浓度没有明显变化,表明可以在实验中忽略 DEHP 的非生物性损失.并且,样品预处理后 DEHP 萃取回收率为 95%—106%.

表 1 *Pseudomonas* sp. XB 降解不同初始浓 DEHP 的动力学方程

初始浓度 DEHP Initial concentration of DEHP/ (mg·L ⁻¹)	动力学方程 Kinetics equation	R ²	降解半衰期 t _{1/2} Half-life t _{1/2} /h
50	ln C = -0.0967t + 4.3342	0.9422	7.17
100	ln C = -0.0804t + 5.0193	0.9512	8.25
200	ln C = -0.0600t + 5.6991	0.9436	11.55
300	ln C = -0.0614t + 6.2349	0.9484	11.29
500	ln C = -0.0497t + 6.8124	0.8891	13.95

2.4 DEHP 降解产物的 GC-MS 分析

GC-MS 分析表明,在培养 23 h 后,菌株 XB 降解 DEHP 的代谢产物(图 5)主要有邻苯二甲酸(2-乙基己基)单酯(MEHP)以及 2-乙基己基醇.而对 44 h 后培养基中代谢产物进行 GC-MS 分析,并没有检测到单酯及 2-乙基己基醇,说明代谢产物已被降解.推导其降解途径:从 DEHP 到 MEHP 和 2-乙基己基醇,进一步酶解生成邻苯二甲酸,最终完全矿化.但是,尽管经过了多次检测,未能在残留培养基中检出预期的邻苯二甲酸.正如 Pradeep^[30]等报道,*Achromobacter denitrificans* SP1 降解 DEHP 的过程中,形成了相似的代谢产物(DEHP 降解产物),采用 GC-MS 以及 LC-MS 也没有检出邻苯二甲酸.但是,底物降解特异性实验结果表明 XB 能够利用邻苯二甲酸作为唯一碳源和能源生长,很有可能在降解过程中生成的邻苯二甲酸很快被菌株 XB 代谢,以致于检测不到.

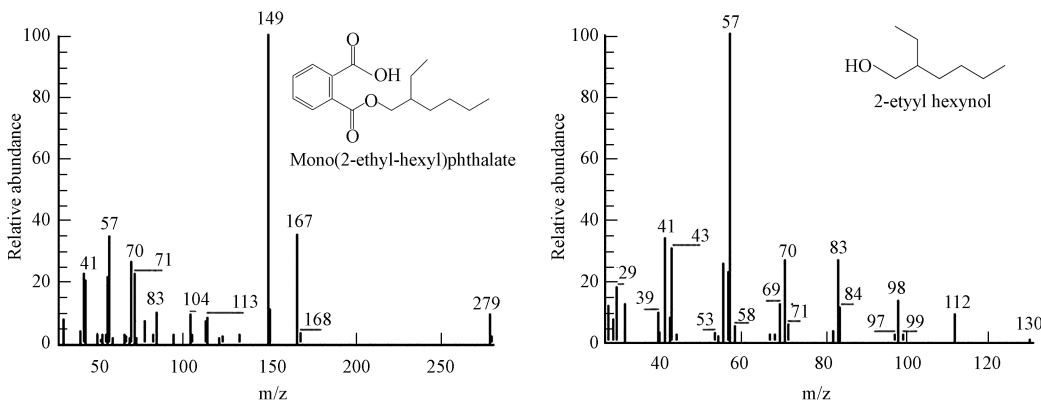


图 5 *Pseudomonas* sp. XB 降解 DEHP 的代谢产物质谱图
Fig.5 MS spectra of the intermediates of DEHP degradation by *Pseudomonas* sp. XB

2.5 菌株 XB 底物特异性分析

底物特异性研究的实验结果如表 2 所示.在培养 60 h 后,*Pseudomonas* sp. XB 既可以利用其他 3 种常见 PAEs,也可以以苯甲酸、苯甲酸钠、苯酚、苯胺、对羟基苯甲酸、邻苯二甲酸作为唯一碳源生长.然而,在补充有水杨酸、邻苯二酚和对硝基苯酚的 MSM 中不能生长.菌株 XB 在苯酚中生长得很好可能是因为苯酚在这些芳香族化合物中结构相对比较简单.与先前的研究结果相似,在微生物中存在着结构相似的加氧酶,其能够降解超过一种芳香族化合物^[14,28].因此,*Pseudomonas* sp. XB 将会在处理 PAEs 和一些芳香族化合物的污染治理中有着独特的应用潜能.

表 2 *Pseudomonas* sp. XB 利用其他芳香族化合物情况

Table 2 <i>Pseudomonas</i> sp. XB grown in other aromatic compounds as the sole carbon and energy sources					
底物 Substrate	CAS	分子式 Molecular formula	Mw	利用情况 Utilization	
DMP	131-11-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.2	++	
DEP	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.2	++	
DBP	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.4	+++	
水杨酸	69-72-7	C ₇ H ₆ O ₃	138.12	-	
苯甲酸	65-85-0	C ₇ H ₆ O ₂	122.12	+	
苯甲酸钠	532-32-1	C ₇ H ₆ NaO ₂	144.11	++	
邻苯二酚	120-80-9	C ₆ H ₆ O ₂	110.11	-	
苯酚	108-95-2	C ₆ H ₆ O	94.11	+++	
对硝基苯酚	100-02-7	C ₆ H ₅ NO ₃	139.11	-	
苯胺	62-53-3	C ₆ H ₇ N	93.128	+	
对羟基苯甲酸	99-96-7	C ₇ H ₅ O ₃	137.11	+	
邻苯二甲酸	88-99-3	C ₈ H ₄ O ₄	164.12	++	

注:“+++”表示生长很好,“++”表示生长较好,“+”表示能够生长,“-”表示不能生长.
Note: “+++” means vigorous growth; “++” means obvious growth; “+” means growth; “-” means no growth.

3 结论 (Conclusion)

- (1)从南京市江心洲污水处理厂污泥中分离得到一株以 DEHP 为唯一碳源,高效降解 DEHP 的细菌,命名为 XB.基于其形态学特征以及 16S rRNA 序列分析,鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.).
- (2)*Pseudomonas* sp. XB 生长和降解 DEHP 的最适宜培养条件为:温度 30—35 ℃,pH 7.0.在此条件下,菌株 XB 能够以 DEHP 作为唯一碳源和能源进行生长,在 45 h 内对 100 mg·L⁻¹ 的 DEHP 降解率达到 97%,降解半衰期为 8.25 h,能够高效降解 DEHP.DEHP 初始浓度在 50—500 mg·L⁻¹时,*Pseudomonas* sp. XB 对 DEHP 的降解符合一级反应动力学模型.
- (3)通过 GC-MS 检出菌株 XB 降解 DEHP 的代谢产物邻苯二甲酸(2-乙基己基)单酯(MEHP)和 2-乙基己基醇,推导其降解途径:从 DEHP 到 MEHP 和 2-乙基己基醇,进一步酶解生成邻苯二甲酸,最终

完全矿化。

(4)底物降解广谱性实验表明菌株 XB 可以利用其他 3 种常见的邻苯二甲酸酯(DMP、DEP、DBP),也可以以苯甲酸、苯甲酸钠、苯酚、苯胺、对羟基苯甲酸、邻苯二甲酸作为唯一碳源生长。因此,*Pseudomonas* sp. XB 是一株环境适应能力强,DEHP 降解效率高,底物范围广泛的降解菌。

参考文献 (References)

- [1] GAVALA H, ALATRISTE-MONDRAGON F, IRANPOUR R, et al. Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(4): 673-682.
- [2] 陈湖星, 杨雪, 张凯, 等. 1 株高效 BBP 降解菌的分离与特性研究[J]. *环境科学*, 2013, 34(7): 2882-2888.
CHEN H X, YANG X, ZHANG K, et al. Isolation and characterization of a highly efficient BBP-degrading bacterium[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(7): 2882-2888 (in Chinese).
- [3] MAGDOULI S, DAGHRIR R, BRAR S K, et al. Di-2-ethylhexyl phthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2013, 127: 36-49.
- [4] LIAO C, CHEN L, CHEN B, et al. Bioremediation of endocrine disruptor di-*n*-butyl phthalate ester by *Deinococcus radiodurans* and *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Chemosphere*, 2010, 78(3): 342-346.
- [5] 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 J L, CHEN H X, YANG Y, et al. Isolation and characterization of a highly efficient BEHP-degrading bacterium[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1532-1540 (in Chinese).
- [6] ABDEL DAIEM M M, RIVERA-UTRILLA J, OCAMPO-PEREZ R, et al. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies-A review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 109: 164-178.
- [7] JIN D, KONG X, CUI B, et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by a newly isolated halotolerant *Sphingobium* sp.[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(12): 24046-24054.
- [8] WU X, WANG Y, LIANG R, et al. Degradation of di-*n*-butyl phthalate by newly isolated *Ochrobactrum* sp.[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 85(3): 235-237.
- [9] WU D, ZHENG P, MAHMOOD Q, et al. Isolation and characteristics of *Arthrobacter* sp. strain CW-1 for biodegradation of PAEs[J]. *Journal of Zhejiang University Science A*, 2007, 8(9): 1469-1474.
- [10] WEN Z D, GAO D W, WU W M. Biodegradation and kinetic analysis of phthalates by an *Arthrobacter* strain isolated from constructed wetland soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(10): 4683-4690.
- [11] WU X, WANG Y, LIANG R, et al. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-*n*-butyl phthalate by newly isolated *Agrobacterium* sp. and the biochemical pathway[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(5): 1090-1094.
- [12] JIN L, SUN X, ZHANG X, et al. Co-metabolic biodegradation of DBP by *Paenibacillus* sp. S-3 and H-2[J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(6): 708-716.
- [13] LI J, GU J, PAN L. Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate by *Rhodococcus ruber* Sa and modeling the processes using the modified Gompertz model[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 55(3): 223-232.
- [14] LU Y, TANG F, WANG Y, et al. Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and di-*n*-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. L4 isolated from activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 168(2-3): 938-943.
- [15] 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(10): 1440-1445.
- [16] NAVACHAROEN A, VANGNAI A S. Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent -tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(6): 818-826.
- [17] PRASAD B, SURESH S. Biodegradation of dimethyl phthalate ester using free cells, entrapped cells of *Variovorax* sp. BS1 and cell free enzyme extracts: A comparative study [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015: 179-187.
- [18] PRASAD B, SURESH S. Biodegradation of phthalate esters by *Variovorax* sp.[J]. *APCBEE Procedia*, 2012, 1: 16-21.
- [19] WU X, LIANG R, DAI Q, 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(1/3): 262-268.
- [20] JIN D C, BAI Z H, CHANG D 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.
- [21] SARKAR J, CHOWDHURY P P, DUTTA T K. Complete degradation of di-*n*-octyl phthalate by *Gordonia* sp. strain Dop5 [J]. *Chemosphere*, 2013, 90(10): 2571-2577.
- [22] LIANG D, ZHANG T, FANG H H P, et al. Phthalates biodegradation in the environment[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(2): 183-198.
- [23] LIANG R, WU X, WANG X, et al. Aerobic biodegradation of diethyl phthalate by *Acinetobacter* sp. JDC-16 isolated from river sludge[J]. *Journal of Central South University of Technology*, 2010, 17(5): 959-966.
- [24] MA J, XU L, JIA L. Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 140: 15-21.
- [25] JARIYAL M, GUPTA V K, JINDAL V, et al. Isolation and evaluation of potent *Pseudomonas* species for bioremediation of phorate in amended soil[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 122: 24-30.
- [26] XU X, LI H, GU J. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical di-*n*-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, 55(1): 9-15.
- [27] ZENG F, CUI K, LI X, et al. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(9): 1125-1129.
- [28] HE Z, XIAO H, TANG L, et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by a stable bacterial consortium, HD-1, enriched from activated sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 526-532.
- [29] CHEN J, LI X, LI J, et al. Degradation of environmental endocrine disruptor di-2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Microbacterium* sp. strain CQ0110Y[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(3): 676-682.
- [30] PRADEEP S, SARATH JOSH M K, Binod P, et al. *Achromobacter denitrificans* strain SP1 efficiently remediates di (2-ethylhexyl) phthalate[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 112: 114-121.