

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019010406

梁浩花, 王亚娟, 陶红, 等. 一株同时降解3种邻苯二甲酸酯降解菌的筛选鉴定及降解特性[J]. 环境化学, 2019, 38(12): - .
LIANG Haohua, WANG Yajuan, TAO Hong, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a three phthalates degrading bacterium[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(12): - .

一株同时降解3种邻苯二甲酸酯降解菌的 筛选鉴定及降解特性*

梁浩花^{1,3} 王亚娟^{2,3**} 陶红^{1,3} 张小红^{1,3}

(1. 宁夏大学资源环境学院, 银川, 750021; 2. 宁夏大学经济管理学院, 银川, 750021;
3. 宁夏(中阿)旱区资源评价与环境调控重点实验室, 银川, 750021)

摘要 选择邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二丁酯(DnBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)作为目标污染物,采用富集驯化法从设施菜地土壤中筛选出1株可同时降解DMP、DnBP和DEHP的细菌MB1.经形态、生理生化特征及16S rDNA序列分析,初步鉴定为微杆菌属(*Microbacterium* sp.).通过正交试验研究了该菌株的最优降解条件以及最优条件下该菌株的生长曲线和降解曲线,最后在培养条件下研究了该菌株对人工污染土壤中邻苯二甲酸酯的降解特性.结果表明,菌株MB1的最优降解条件为:pH值为8,温度为25℃,接菌量为5%,每种邻苯二甲酸酯浓度为300 mg·L⁻¹.在此最优条件下该菌株呈S型曲线增长,7 d后无机盐培养液中DMP、DnBP和DEHP的降解率分别为99.62%、99.65%和55.26%.人工污染土壤中空白试验和投加菌株试验结果为:在不添加菌液的处理中,灭菌土壤21 d时DMP、DnBP和DEHP的降解率分别为3.86%、4.19%和2.01%;未灭菌土壤21 d时对DMP、DnBP和DEHP的降解率分别为4.82%、5.99%和3.44%.在添加菌液的处理中,21 d时土壤灭菌处理中DMP、DnBP和DEHP的降解率分别达94.45%、95.65%和39.21%;而土壤未灭菌处理中DMP、DnBP和DEHP的降解率分别达94.93%、95.99%和41.16%.该结果表明:土壤中土著微生物仅能降解微量PAEs,菌株MB1对土壤中DMP、DnBP和DEHP等3种PAEs污染物具有较为高效的降解能力,未灭菌土壤中邻苯二甲酸酯的降解效果略高于灭菌土壤.

关键词 邻苯二甲酸二甲酯(DMP), 邻苯二甲酸二丁酯(DnBP), 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP), 微小杆菌属, 降解特性.

Isolation, identification and degradation characteristics of a three phthalates degrading bacterium

LIANG Haohua^{1,3} WANG Yajuan^{2,3**} TAO Hong^{1,3} ZHANG Xiaohong^{1,3}

(1. College of Resources and Environment, Ningxia University, Yinchuan, 750021, China;
2. College of Economics and Management, Ningxia University, Yinchuan, 750021, China;

3. Key Laboratory (China-Arab) of Resource Evaluation and Environmental Regulation of Arid Region in Ningxia, Yinchuan, 750021, China)

Abstract: A strain, named MB1, capable of simultaneously degrading dimethyl phthalate (DMP), dibutyl phthalate (DnBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and was isolated by culture enrichment method from facility vegetable soil. Based on the morphology, physiological characteristic and 16S rDNA sequence analysis, MB1 was identified as *Microbacterium* sp. and the optimal degradation conditions were studied by orthogonal experiment design. And growth curve, degradation

2019年1月4日收稿(Received: January 4, 2019).

* 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2016KJHM29)资助.

Supported by the Key Research Plan Program of the Ningxia Hui Autonomous Region(2016KJHM29).

** 通讯联系人, Tel: 13995191329, E-mail: 358437013@qq.com

Corresponding author, Tel: 13995191329, E-mail: 358437013@qq.com

curve of strain MB1 were investigated under optimal degradation conditions. Finally, the strain MB1 to phthalic acid esters degradation characteristics in artificially contaminated soil was investigated in culture incubation. The results showed that the optimized degradation condition was pH = 8, temperature 25 °C, inoculum size (V/V) 5% and 300 mg·L⁻¹ of original PAEs concentration. Under the optimal condition, the strain presented shaped growth curve, and the degradation rate of DMP, DnBP and DEHP were 99.62%, 99.65% and 55.26% in mineral salt medium after 7 days, respectively. The degradation rates of DMP, DnBP and DEHP were 3.86%, 4.19% and 2.01% in the sterilized soil and 4.82%, 5.99% and 3.44% in the unsterilized soil without adding strain after 21 days, respectively. The degradation rate of DMP, DnBP and DEHP were 94.45%, 95.65% and 39.21% in sterilized soil and 94.93%, 95.99% and 41.16% in unsterilized soil by adding strain after 21 days, respectively. The results showed that: The strain MB1 had a relatively high degradation capacity for DMP, DnBP and DEHP in soil, and indigenous microbes degraded only a small amount of PAEs in soil. Degradation of phthalates by the strain MB1 was slightly higher in the unsterilized soil than in the sterilized soil.

Keywords: dimethyl phthalate (DMP), di-n-butyl phthalate (DnBP), di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), *Microbacterium* sp., degradation characteristic.

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs) 又称酞酸酯, 是一类人工合成的有机化合物, 作为增塑剂、添加剂在塑料、化肥、农药等中均有广泛使用^[1]. 由于 PAEs 通常与塑料聚合物高分子碳链以氢键结合, 使得 PAEs 分子在加工、使用、处置的过程中容易迁移到土壤中^[2]. 土壤中 PAEs 不仅影响土壤质量、植物生长, 而且还在作物中具有一定的生物累积效应, 对生态系统和人体健康构成严重威胁^[3]. 其中, DMP、DnBP 和 DEHP 具有典型的内分泌干扰性和潜在的“三致”效应, 被美国 EPA 列入“优先控制污染物”.

由于其化学结构和水不溶性质, PAEs 不易被水解和光解, 微生物的降解被认为是去除环境中 PAEs 污染物的一种高效安全的方法^[4]. 近年来, 国内外众多学者已从不同环境中分离筛选出降解 PAEs 类污染物的微生物, 例如 DMP 的降解菌^[5-6], DnBP 的降解菌^[7-12], DEHP 的降解菌^[13-16], DnOP 的降解菌^[17]. 杨婧^[18]、周长健^[19]等也将分离筛选出的 PAEs 降解菌应用到污染土壤的修复中, 发现降解菌添加到污染土壤中能有效地去除土壤中的 PAEs. 但目前大多数研究针对的是单一短侧链二烷基类或者单一复杂的、不容易降解的长侧链二烷基类邻苯二甲酸酯的生物降解, 关于同一菌株同时降解多种 PAEs 污染物的研究较少. 因此研究同一菌株对多种 PAE 的降解特性, 修复多种 PAEs 污染的农田土壤, 以减少有机污染物对环境的危害和提高农产品质量和安全, 是当前研究的热点问题.

课题组前期对于银川市东郊设施菜地土壤中 PAEs 的污染现状研究表明, 该区域 PAEs 类主要污染物为 DMP、DnBP 和 DEHP^[20], 因此, 本研究从银川市东郊设施菜地土壤中分离筛选出一株能同时降解 DMP、DnBP 和 DEHP 的菌株 MB1, 经生理生化特征及 16S rDNA 序列分析技术鉴定该菌株为微杆菌属, 通过正交试验考察该菌株的最优降解条件以及最优条件下该菌株的生长曲线和降解曲线, 进一步研究了该菌株对人工污染土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解效果, 以期为该区域 PAEs 污染土壤的治理及生物修复提供一定的理论依据.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

选取银川市东郊设施菜地土壤作为筛菌土壤, 用不锈钢土钻采取表层土壤, 装入棕色广口瓶, 4 °C 冰箱保存.

1.2 培养基配制

无机盐培养基 (g·L⁻¹): K₂HPO₄·3H₂O 1.0 g, NaCl 1.0 g, NH₄NO₃ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, CaCl₂ 0.1 g,

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 定容至 1 L, 调整 pH 值为 7, 于 121 °C 下湿热灭菌 30 min, 固体培养基加琼脂 18.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

选择培养基: 移取 0.2 mL 的 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DnBP 和 DEHP 等量混合丙酮溶液和 0.1 mL 的 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMP 丙酮溶液于 100 mL 灭菌的无机盐培养基中, 置于通风橱内, 待丙酮完全挥发, 即可得到 DMP、DnBP 和 DEHP 浓度均为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合无机盐液体培养基, 固体培养基加琼脂 18.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

牛肉膏蛋白胨培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 定容至 1 L, 调整 pH 值为 7, 于 121 °C 下湿热灭菌 30 min, 固体培养基加琼脂 18.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.3 DMP、DnBP 和 DEHP 降解菌的筛选、纯化与鉴定

称取 10 g 土样, 加入盛有 90 mL 蒸馏水和 10 mL 玻璃珠的三角瓶, 30 °C、175 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡 30 min, 静置. 取 1 mL 的上清液接种于含有邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二丁酯(DnBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)混合的浓度都为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 100 mL 无机盐液体培养基中, 避光条件下震荡 7 d. 采用梯度压力驯化法, 按 1% 的接种量逐步转接至 300、600、800、1000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMP、DnBP 和 DEHP 混合无机盐液体培养基中, 每 7 d 作为一个驯化周期转接 1 次, 持续进行培养.

取 100 μL 终期驯化液, 稀释涂布于 DMP、DnBP 和 DEHP 浓度均为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合牛肉膏蛋白胨固体平板上, 然后置于 30 °C 生化培养箱中静置培养. 待长出肉眼可见菌落后, 筛选出长势最好的菌株, 挑取单菌落将其反复划线接种于新的牛肉膏蛋白胨固体平板上, 直至镜检纯化为止. 将纯化后的菌株送往上海生工生物股份有限公司完成测序工作, 将测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 获得相似性较高的相关菌株, 确定菌属.

1.4 菌株对 DMP、DnBP 和 DEHP 降解能力测定

菌悬液的制备: 挑取纯化后的菌株, 接种到灭菌牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 置于恒温震荡器, 30 °C、175 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h. 取出牛肉膏蛋白胨液体培养基后, 将培养液分装于 100 mL 灭菌的离心管中, 室温条件下于 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集湿菌体. 然后用灭菌的生理盐水(0.9%的 NaCl 溶液)洗涤 3 次, 再用生理盐水将菌体调配成菌悬液, 使其在波长为 600 nm 条件下的吸光度值 $\text{OD}_{600} = 1.0$.

为了验证单菌株的降解能力, 按 5% 接菌量将分离纯化的不同的形态特征菌株分别接种至 100 mL 的 DMP、DnBP 和 DEHP 浓度均为 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的灭菌无机盐液体培养液中, 30 °C、175 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养 7 d, 以不接菌的无机盐液体培养基作为对照, 每个处理设置 3 次重复. 培养 3 d、5 d 和 7 d 时分别取样进行分析, 检测不同菌株培养不同的时间对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率, 确定最佳降解菌.

1.5 菌株降解条件优化

对 1.4 确定的最佳菌株, 研究 pH(5、6、7、8、9)、温度(20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C)、接菌量(1%、2%、3%、4%、5%)和 PAEs 浓度(100、200、300、400、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对 DMP、DnBP 和 DEHP 降解效果影响. 按照正交试验设计(表 1)进行, 采用 DMP、DnBP 和 DEHP 共 100 mL 的混合无机盐液体培养基, 浓度为每种 PAEs 的浓度值, 通过添加 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 或者 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调节 pH 值, 175 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 7 d, 以未接菌的无机盐液体培养基作为对照, 测定 DMP、DnBP 和 DEHP 的残留量, 计算降解率, 确定最优降解条件.

表 1 $L_{25}(5^4)$ 正交实验因子水平表

Table 1 Factor levels for orthogonal experiment

序号 Number	因素 (Factors)			
	A(pH)	B(温度) Temperature	C(接菌量) Inoculation Size	D(PAEs 浓度) Concentration of PAEs
1	5	20 °C	1%	100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
2	6	25 °C	2%	200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
3	7	30 °C	3%	300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
4	8	35 °C	4%	400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
5	9	40 °C	5%	500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

1.6 菌株在最优条件下的生长曲线和降解曲线

采用 1.4 的方法制备菌悬液,按照 1.5 中最优降解条件将菌液加入灭菌好的无机盐液体培养基中,同时以未投加降解菌液培养液作为空白对照.以上操作均在无菌操作台上进行,175 r·min⁻¹的恒温振荡器中培养 7 d,每隔 1 d 取样,测定液体中 DMP、DnBP 和 DEHP 的残留浓度及 OD₆₀₀,每个处理设置 3 次重复.

1.7 菌株对土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 降解特性研究

为了研究降解菌 MB1 对 DMP、DnBP 和 DEHP 污染土壤的修复潜力,将一定浓度的 DMP、DnBP 和 DEHP 加入土壤灭菌组与土壤未灭菌组,且均设置添加菌与不添加菌的空白对照组(CK).然后置于室内模拟微生物对 PAEs 污染土壤修复,了解降解菌 MB1 和土著微生物对污染土壤中 PAEs 的修复效果.

(1) 未灭菌土和灭菌土的制备

采用银川市东郊设施菜地土壤,剔除石头、枯枝落叶等杂质后混匀,四分法留取.土壤样品至阴凉处自然风干后过 20 目筛,保存牛皮纸袋中,即得到未灭菌土样.取风干过筛土样放灭菌桶里用高压蒸汽灭菌(121 °C,30 min),每隔 24 h 灭菌 1 次,重复灭菌 2 次,超净台中静置至室温,即得到灭菌土样.

(2) 污染土的制备

参考陈学斌^[13]、杨婧^[18]污染土的制备方法.将等量混合的 DMP、DBP 和 DEHP 溶于丙酮溶液中,配成混合浓度为 30 g·L⁻¹丙酮溶液.在超净台中取 25 mL 浓度为 30 g·L⁻¹的混合丙酮溶液喷洒在 500 g 灭菌土壤样品中,喷洒时用灭菌玻璃棒不断搅拌土壤,使 DMP、DBP 和 DEHP 尽可能的均匀分布.然后将其放入通风橱,待丙酮挥发后备用,这时土样中 DMP、DBP 和 DEHP 浓度为 500 mg·kg⁻¹.按照 1:9 的比例将 500 g 灭菌污染土样与 4500 g 灭菌未污染土壤充分混合、搅拌均匀,使土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的最终浓度为 50 mg·kg⁻¹,即灭菌处理污染土壤.取 25 mL 浓度为 30 g·L⁻¹的混合丙酮溶液喷洒在 500 g 未灭菌土壤样品中,按照上述方式,制备 50 mg·kg⁻¹未灭菌处理的污染土壤.土壤灭菌组与未灭菌组均设置不添加菌株 MB1 的空白对照组(CK).

各称取 500 g 灭菌污染土和未灭菌污染土置于 500 mL 的灭菌烧杯中,按照菌液接种量为 5% 接种到灭菌的烧杯中,同时设置未投加菌液的空白对照.加入灭菌蒸馏水,使含水量达到 20%,放入 30 °C 生化培养箱中暗培养,每隔 1—2 d 调节土壤含水量,使土壤含水量在整个培养过程中保持恒定.培养 0、3、7、14、21 d 时分别取样进行分析.每个处理均设置 3 个重复.

1.8 分析方法

1.8.1 液体中 DMP、DnBP 和 DEHP 的提取

参照褚娇艳和饶潇潇等^[21-22]的提取方法,向 100 mL 的 DMP、DnBP 和 DEHP 无机盐培养基中加入 1 mL 的 100 mg·L⁻¹苯甲酸苄酯,加入萃取液乙酸乙酯 30 mL,放入恒温振荡器中振荡 30 min.转移至分液漏斗中振荡 5 min,分液,再用 30 mL 乙酸乙酯冲洗 3 次,将乙酸乙酯溶液全部转移到平底烧瓶中.取出净化柱,依次加入 2 g 无水硫酸钠,4 g 弗罗里硅土,2 g 无水硫酸钠.先用 10 mL 乙酸乙酯预洗柱子,弃去该淋洗液,再用 50 mL 乙酸乙酯洗脱.收集全部洗脱液至鸡心瓶中,经旋转蒸发浓缩至蒸干.加入色谱级甲醇定容,过有机系 0.22 μm 滤膜后进行气相色谱分析.

1.8.2 土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的提取

参照饶潇潇等^[22]的提取方法,准确称取待提取土壤样品各 5.00 g 于 250 mL 锥形瓶中,向其中加入 1 mL 浓度为 100 mg·L⁻¹苯甲酸苄酯,然后按照文献^[22]中的方法进行过滤、过柱、定容等一系列步骤,最后用 0.22 μm 有机系滤膜过滤后进行气相色谱分析.

1.8.3 生物量的测定

菌株生物量的测定采用 UV-9600 紫外可见分光光度计,测量培养液在 600 nm 时的光密度值 OD₆₀₀.

1.8.4 气相色谱条件

色谱条件:毛细管色谱柱:HP-5MS(30 m×250 μm×0.25 μm);载气:N₂(纯度≥99.999),FID 检测器温度为 290 °C,进样口温度 260 °C,分流进样,分流比为 30,流速 1.35 mL·min⁻¹,进样量为 1 μL;升温程序:初始温度 60 °C 保持 1 min,20 °C·min⁻¹速率升温至 220 °C,保持 1 min,5 °C·min⁻¹升温至 290 °C,保持 1 min.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 降解菌的分离和筛选

经过驯化、分离和纯化培养获得 6 株菌株,在液体培养基中培养 7 d 后,培养液变浑浊,形成絮状物.图 1 比较了 MB1、MB2、MB3、MB4、MB5 和 MB6 等 6 株菌株在液体培养液中分别培养 3、5、7 d 时对 DMP、DnBP 和 DEHP 降解率.从图 1 可以看出,对 DMP 的降解率最高的菌株为 MB3,7 d 时降解率达到 99.94%,其次为菌株 MB2,7 d 时降解率达到 99.84%,次之为菌株 MB1,7 d 时降解率达到 99.51%.对 DnBP 的降解率最高的菌株为 MB6,7 d 时降解率达到 98.83%,其次为菌株 MB5,7 d 时降解率达到 98.75%,次之为菌株 MB1,7 d 时降解率达到 98.69%.各菌株对 DEHP 的降解率均较低,但随着培养时间延长而降解率逐渐增大,7 d 时菌株 MB1 对 DEHP 的降解效果最佳,明显高于其它 5 株菌株,综合比较各菌株对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解效率,确定最佳降解菌为 MB1.

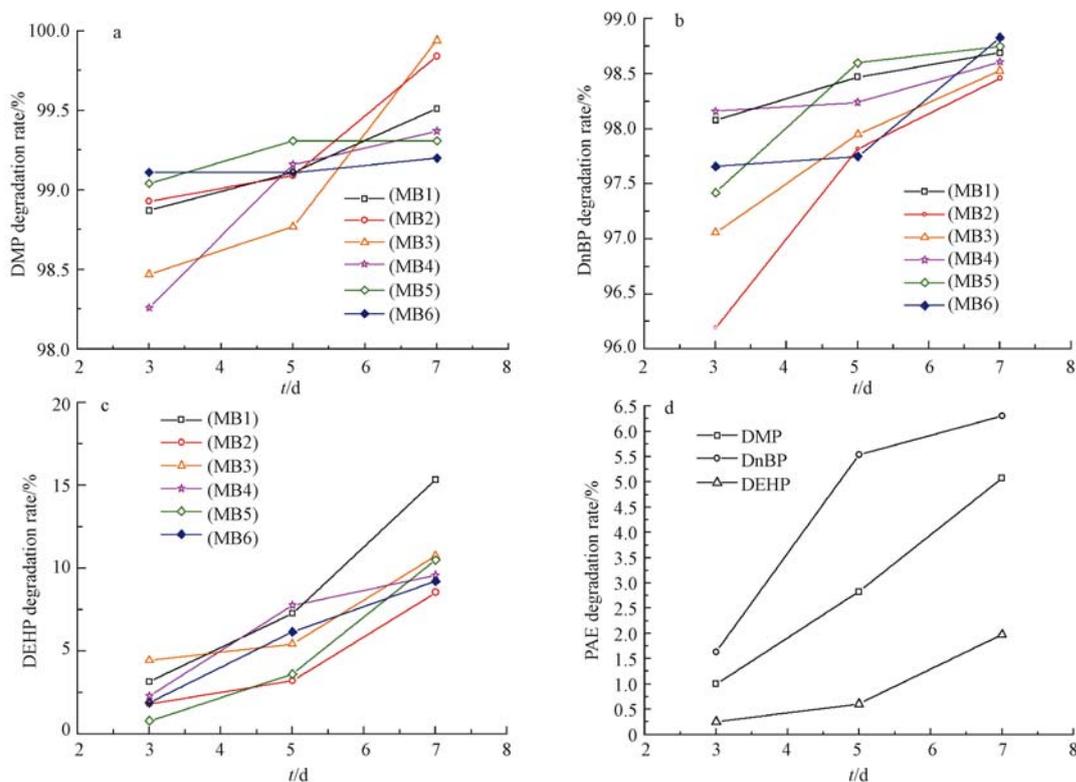


图 1 未添加菌株(d)及不同菌株对 DMP(a)、DnBP(b)、DEHP(c)的降解率比较

Fig.1 The degradation rate of DMP(a), DnBP(b), DEHP(c) were compared by different strains

图 2 为菌株 MB1 在固体平板上的形态,菌落呈白色,无丝状体,粘质不透明.菌株 MB1 常见生理生化特征见表 2.

目前,分离筛选出针对单一 PAEs 污染物的降解菌的报道较多,比如剑菌 (*Ensifer* sp.)^[23]、普罗维登氏菌 (*Providencia* sp.)^[24]、芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)^[3] 降解 DnBP; 幽门螺杆菌 SN13 (*Acinetobacter* sp. SN13)^[25]、红球菌^[4] (*Rhodococcus* sp.)、壤霉菌 (*Agromyces* sp.)^[26] 降解 DEHP. 而关于菌株同时降解多种 PAEs 的研究甚少,实际土壤中往往是各种酯类共存,使得土壤环境中的 PAEs 的毒性增加,



图 2 MB1 菌株形态

Fig.2 Colonial morphology of MB1

生物降解过程更加困难.因此,筛选出可同时降解多种酯类的菌株并研究其降解特性,可为多种 PAEs 污染土壤的生物修复提供一定的理论依据.

表 2 菌株 MB1 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain MB1

指标 Indicators	结果 Results	指标 Indicators	结果 Results
接触酶	+	酪素水解	+
H ₂ S	+	淀粉水解	+
甲基红	-	V-P	+
吲哚	+	柠檬酸盐	-
脲酶	+	硝酸盐	-

注:+:阳性;-:阴性; Note: +: positive; -: negative.

2.2 菌株 MB1 的 16S rDNA 鉴定

由上海生工生物股份有限公司对菌株 MB1 进行测序,测序结果提交到 GenBank 中的序列登录号为 MK061526.通过 BLAST 比对分析,发现与菌株 MB1 的 16S rDNA 序列相似性最高的是微杆菌 (*Microbacterium* sp.),其同源性达到 99%.从 GenBank 中取得同源性高的相关序列作为参考菌株序列,首先用 MEGA7 软件中 Clustal W 将序列进行完全比对,然后用 Neighbor-joining 对其做系统发育进化树如图 3.

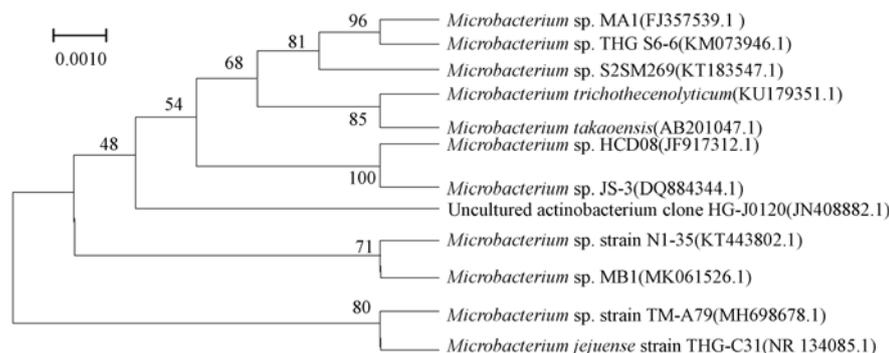


图 3 根据菌株 MB1 及相关菌株的 16S rDNA 构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain MB1 and the related strains

2.3 菌株 MB1 降解条件优化

正交表 3 考察了菌株 MB1 在不同的 pH、温度、接菌量和 PAEs 浓度下对 DMP、DnBP 和 DEHP 降解情况.由极差值 (R) 大小分析表明,影响菌株对 PAEs 降解情况的因素从大到小程度上排序为:温度(B)>PAEs 浓度(D)>pH(A)>接菌量(C).比较 k 值得出正交试验的最优降解条件为:A₄B₂C₃D₃,即 pH 为 8,温度为 25 °C,接菌量为 5%,每种 PAEs 浓度为 300 mg·L⁻¹,该条件下菌株对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率分别为 98.58%、97.77%和 54.70%.

正交试验是研究多因素多水平的设计方法,从全面试验中挑选均匀分散、整齐可比的点进行试验,是一种高效率、快速、经济的实验设计方法,被广泛应用于微生物降解试验^[7].本试验研究了菌株在 4 因素 5 水平环境因素下对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解特性,得出菌株的最优降解条件,在该条件下当培养液中其它环境因素变化时,对 DMP 和 DnBP 的降解率的影响较小,对 DEHP 的降解率影响较大,主要是由于培养液中多种 PAEs 混合,微生物所处环境中的毒性加大,且 DEHP 对微生物的毒害作用远高于 DMP 和 DnBP,例如,Huang 等^[27]以大型蚤为模型开展的急性毒性试验发现 DEHP 的毒性高于 DBP;相同浓度暴露后^[28]胚胎发育指标结果表明 DEHP 对斑马鱼心率和 24hpf 自主运动的影响比 DBP 更强.表 3 表明,菌株 MB1 对 DMP 和 DnBP 的降解率高于对 DEHP 的降解率,因为随着烷基链的变长以及分枝侧链的增加,会增大对生物反应的位阻效应.因此,长链的邻苯二甲酸酯不如短链的邻苯二甲酸酯容易降解^[16].PAEs 侧链越短,微生物降解效率越高,DEHP 属于长链 PAEs 化合物,相对分子质量较大,水

溶性较低,辛醇-水分配系数较大,不容易被微生物降解,而 DMP、DnBP 更容易被微生物降解^[29-30].

表 3 正交试验设计及试验结果

Table 3 Orthogonal experiment design and results

试验号 Test	因素 Factors				降解率 Degradation rate/%		
	A(pH)	B(温度) Temperature	C(接菌量) Inoculation Size	D(PAEs 浓度) Concentration of PAEs	DMP	DnBP	DEHP
1	5	20	1%	100	96.96%	93.49%	3.12%
2	5	25	2%	200	96.77%	96.20%	4.38%
3	5	30	3%	300	98.46%	97.66%	4.26%
4	5	35	4%	400	99.46%	98.83%	1.77%
5	5	40	5%	500	99.39%	98.65%	13.95%
6	6	20	2%	300	98.10%	97.09%	44.18%
7	6	25	3%	400	99.54%	98.02%	8.04%
8	6	30	4%	500	98.85%	98.54%	1.55%
9	6	35	5%	100	99.35%	94.91%	9.76%
10	6	40	1%	200	97.41%	57.15%	4.93%
11	7	20	3%	500	98.94%	97.58%	38.54%
12	7	25	4%	100	95.59%	94.58%	64.76%
13	7	30	5%	200	97.19%	96.71%	11.15%
14	7	35	1%	300	99.99%	98.57%	8.20%
15	7	40	2%	400	99.69%	98.81%	4.22%
16	8	20	4%	200	96.89%	95.51%	6.81%
17	8	25	5%	300	98.58%	97.77%	54.70%
18	8	30	1%	400	98.40%	97.58%	59.72%
19	8	35	2%	500	99.40%	99.02%	5.27%
20	8	40	3%	100	94.51%	94.66%	16.93%
21	9	20	5%	400	98.57%	98.28%	6.05%
22	9	25	1%	500	99.34%	98.83%	12.98%
23	9	30	2%	100	92.81%	90.32%	16.84%
24	9	35	3%	200	96.58%	97.55%	19.29%
25	9	40	4%	300	99.33%	98.63%	4.05%
K1	1003.35%	1070.10%	1026.67%	1058.59%			
K2	1007.41%	1120.06%	1043.09%	974.50%			
K3	1104.51%	1060.05%	1060.54%	1099.56%			
K4	1115.73%	1027.94%	1055.15%	1066.98%			
K5	1029.46%	982.31%	1075.00%	1060.81%			
k1	2.0067	2.1402	2.0533	2.1171			
k2	2.0148	2.2401	2.0862	1.9490			
k3	2.2090	2.1201	2.1211	2.1991			
k4	2.2314	2.0558	2.1103	2.1340			
k5	2.0589	1.9646	2.1500	2.1216			
R	0.2247	0.2755	0.0967	0.2501			
最优条件	A4	B2	C5	D3			
影响因素排序	温度>	PAEs 浓度>	pH>	接菌量			

注:K1: 因素 A、B、C 和 D 的第一水平所在试验中 DMP、DnBP 和 DEHP 降解率之和;K2—因素 A、B、C 和 D 的第二水平所在试验中 DMP、DnBP 和 DEHP 降解率之和;K3—因素 A、B、C 和 D 的第三水平所在试验中 DMP、DnBP 和 DEHP 降解率之和;K4—因素 A、B、C 和 D 的第四水平所在试验中 DMP、DnBP 和 DEHP 降解率之和;K5—因素 A、B、C 和 D 的第五水平所在试验中 DMP、DnBP 和 DEHP 降解率之和;k1、k2、k3、k4 和 k5—K1、K2、K3、K4 和 K5 的平均值;R—极差。

Note: K1: the sum of degradation rates of DMP, DnBP and DEHP at the first level of factors A, B, C and D in the test; K2: the sum of degradation rates of DMP, DnBP and DEHP at the second level of factors A, B, C and D in the test; K3: the sum of degradation rates of DMP, DnBP and DEHP at the third level of factors A, B, C and D in the test; K4: the sum of degradation rates of DMP, DnBP and DEHP at the fourth level of factor A, B, C and D in the test; K5: the sum of degradation rates of DMP, DnBP and DEHP at the fifth level of factor A, B, C and D in the test; k1, k2, k3, k4 and k5: average of K1, K2, K3, K4 and K5; R-Range.

2.4 菌株在最优条件下的生长曲线和降解曲线

菌株 MB1 在最优降解条件 $A_4B_2C_5D_3$ 下培养的生长曲线和降解曲线如图 4 所示,降解菌 MB1 的 OD_{600} 值随时间变化呈 S 型曲线,符合一般菌落生长趋势.第 0 d 至第 2 d 培养液的 OD_{600} 值增加幅度较小,表明降解菌生长速率缓慢,该阶段为延迟期.从第 2 d 至第 6 d, OD_{600} 的值随着时间的延长而迅速增加,说明降解菌的生长速率较快,该阶段为对数生长期.第 6 d 至第 7 d 降解菌的生长速率和消亡速率维持平衡,菌群数目逐渐趋于稳定,该阶段为静止期.

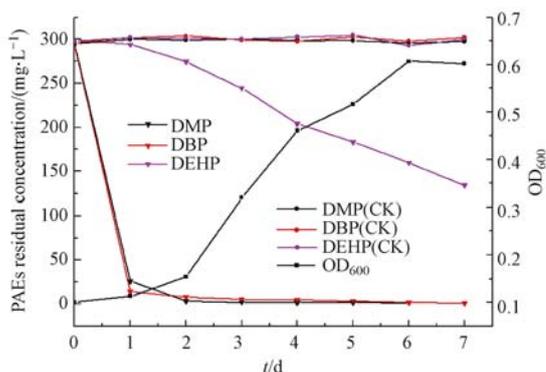


图 4 降解菌最佳培养条件下的生长曲线和降解曲线

Fig.4 The growth curve and degradation curve of strain JQ-1 under optimum culture condition

降解空白对照实验(CK)表明,当培养液中不添加降解菌时 DMP、DnBP 和 DEHP 在自然状态下几乎不被降解.而培养液中添加降解菌时,随着时间的延长,DMP、DnBP 和 DEHP 浓度均呈现下降趋势,且 DMP、DnBP 降解速率大于 DEHP 的降解速率.培养 7 d 后无机盐培养液中 DMP、DnBP 和 DEHP 的残留浓度分别为 $1.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $134.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,降解率分别为 99.62%、99.65% 和 55.26%.与生长曲线结合分析得出,在第 2—6 d 内 DEHP 随着降解菌的快速生长繁殖,培养液中 DEHP 的浓度减少较快,主要是因为 DMP、DnBP 短链 PAEs 化合物 1 d 内迅速被降解,降解率高达 91.34% 和 95.30%,后期 DEHP 作为碳源和能源供细菌的生长,进而促进对 DEHP 的降解.6—7 d 降解菌的生长处于静止期,对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解浓度变化不大.

2.5 菌株 MB1 对污染土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解特性

当 PAEs 浓度过高时,土壤中微生物量、微生物呼吸、过氧化氢酶的活性等都会受到抑制^[26],因此本研究考察菌株对 DMP、DnBP 和 DEHP 浓度分别为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 人工污染土壤的降解效果.图 5 表明,随着培养时间延长,土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的污染含量减少,且菌株 MB1 对 DMP 和 DnBP 的降解速率高于 DEHP 的降解速率.图 5a 是灭菌处理后的土壤,土壤中 DMP 和 DnBP 的降解效果显著,DEHP 的降解效果较低,21 d 时降解率分别为 94.45%、95.65% 和 39.21%.图 5b 是未灭菌处理的土壤,土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解效果略高于灭菌土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解效果,21 d 时 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率分别为 94.93%、95.99% 和 41.16%.图 5a,灭菌处理土壤中不添加菌液后,21 d 时对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率分别达 3.86%、4.19% 和 2.01%;图 5b,未灭菌处理土壤中不添加菌液后,21 d 时对 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率分别达 4.82%、5.99% 和 3.44%.表明土壤中土著微生物仅能降解极少量 PAEs,菌株 MB1 对土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 的污染具有较高效的修复能力.土壤未灭菌处理中 DEHP 的降解率高于灭菌处理,可能是由于菌株 MB1 能够与土壤中的土著微生物发生协同作用,从而促进土壤中 DEHP 的降解^[24].

微生物降解是去除土壤中多种有机污染物的主要途径,通过培养菌株对人工污染土壤中 PAEs 的降解特性研究得出,菌株对 DMP、DnBP 的降解率高于 DEHP 的降解率.一方面,DMP、DBP 为短链 PAEs 化合物,溶解度较高而辛醇-水分配系数(K_{ow})较小,相对不易被土壤吸附、活动性较强而易于生物降解,而 DEHP 为高分子量 PAEs 化合物,溶解度较低而辛醇-水分配系数(K_{ow})较大,易于在土壤中累积^[29-30].另一方面,有机物的化学结构影响其在土壤颗粒中的结合状态及传输过程,相对分子量越大,容易被锁定在土壤颗粒的微孔中或镶嵌在腐殖质的网状结构中,很难再解吸,从而残留在土壤颗粒中^[31].

例如, Kottler 等研究了 21 种多环芳烃 (PAHs) 在土壤中的锁定, 结果表明 78.4% 的芘可以被提取出来, 而苯并(a)芘只有 41.9% 可以提取^[32].

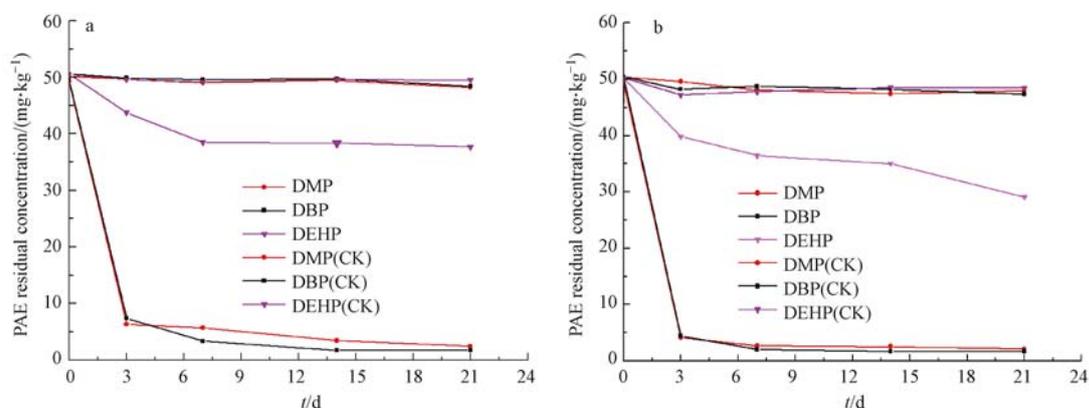


图 5 a 为灭菌土壤添加和不添加菌株 (CK) 对 DMP、DBP 和 DEHP 的降解效果;

b 为未灭菌土壤添加和不添加菌株 (CK) 对 DMP、DBP 和 DEHP 的降解效果.

Fig.5 Degradation efficiency of DMP, DBP and DEHP by adding or not add strain (CK) in sterilized soil (a) and in unsterilized soil (b)

3 结论 (Conclusion)

(1) 本研究从设施菜地土壤中筛选到一株以 DMP、DnBP 和 DEHP 有机污染物为唯一碳源和能源生长的菌株 MB1, 经过形态学、生理生化特征和 16S rDNA 序列鉴定分析, 该菌株为微杆菌 (*Microbacterium* sp.).

(2) 最优降解条件: pH 为 8, 温度为 25 °C, 接菌量为 5%, 每种 PAEs 浓度为 300 mg·L⁻¹.

最优条件下菌株的生长曲线和降解曲线表明, 菌株的生长呈“S”型. 随着培养时间延长, 7 d 后培养液中 DMP、DBP 和 DEHP 的降解率分别达 99.62%、99.65% 和 55.26%.

(3) 土壤空白对照试验表明, 未添加菌株, 21 d 后土壤中 DMP、DnBP 和 DEHP 含量仅有微量变化. 而添加菌株后, 21 d 时土壤灭菌处理中 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率分别达 94.45%、95.65% 和 39.21%; 土壤未灭菌处理中 DMP、DnBP 和 DEHP 的降解率分别达 94.93%、95.99% 和 41.16%, 且菌株对 DMP 和 DnBP 的修复效果显著高于 DEHP 的修复效果.

参考文献 (Reference)

- [1] WANG J, CHEN G, CHRISTIE P, et al. Occurrence and risk assessment of phthalate esters (PAEs) in vegetables and soils of suburban plastic film greenhouses [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 523:129-137.
- [2] 杨志豪, 何明靖, 杨婷, 等. 邻苯二甲酸酯在重庆市城市土壤中的污染分布特征及来源分析[J]. *环境科学*, 2018, 39(7):1-16.
YANG Z H, HE M J, YANG T, et al. Occurrence and distribution of the phthalate esters in urban soils of Chongqing City [J]. *Environmental Science*, 2018, 39(7):1-16 (in Chinese).
- [3] FENG N X, YU J, MO C H, et al. Biodegradation of di-n-butyl phthalate (DBP) by a novel endophytic *Bacillus megaterium* strain YJB3. [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 616:117-127.
- [4] WANG J, ZHANG MY, 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.
- [5] 张可, 陈强, 陈伟, 等. 邻苯二甲酸二甲酯 (DMP) 降解菌的分离鉴定及降解特性 [J]. *安全与环境学报*, 2017, 17(2):645-649.
ZHANG K, CHEN Q, CHEN W, et al. On the isolation, identification and characterization of DMP-degrading strain [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2017, 17(2):645-649 (in Chinese).
- [6] 金德才, 吴学玲, 梁任星, 等. 一株 DMP 降解菌的分离鉴定及其降解特性 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(9):1318-1323.
JIN D C, WU X L, LIANG R X, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a DMP-degrading strain [J]. *Microbiology China*, 2009, 36(9):1318-1323 (in Chinese).
- [7] 王冬莹, 吴文成, 李霞, 等. 一株能同时降解邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和氰戊菊酯真菌的分离、鉴定及降解特性的初步研究 [J].

- 环境科学学报, 2015, 35(11):3493-3499.
- WANG D Y, WU W C, LI X, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a dibutyl phthalate and fenvalerate degrading fungal strain[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(11):3493-3499 (in Chinese).
- [8] 李方方, 宋建, 吕律, 等. DBP 高效降解菌群的富集及其降解特性研究[J]. 环境科学学报, 2017, 37(7):2579-2585.
- LI F F, SONG J, LÜ L, et al. Enrichment of a highly efficient DBP-degrading bacterium consortium and its degradation characters[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37(7):2579-2585 (in Chinese).
- [9] 高俊贤, 刘琦, 连梓竹, 等. 一株 DBP 高效降解菌的分离、鉴定与降解性能[J]. 环境工程学报, 2016, 10(3):1521-1526.
- GAO J X, LIU Q, LIAN Z Z, et al. Isolation and identification of highly efficient DBP-degrading strain and its degradation study[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(3):1521-1526 (in Chinese).
- [10] 金雷. 1 株 DBP 高效降解菌 H-2 的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 食品科学, 2014, 35(15):202-206.
- JIN L. Isolation and characterization of a DBP-degrading strain H-2 and its degrading characteristics[J]. *Food Science*, 2014, 35(15):202-206 (in Chinese).
- [11] 李建龙, 邵向丽, 刘书亮, 等. 邻苯二甲酸二丁酯降解菌株的筛选鉴定及其降解特性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(10):108-114.
- LI J L, SHAO X L, LIU S L, et al. Isolation and identification of dibutyl phthalate-degrading strain and its degradation characteristics[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(15):202-206 (in Chinese).
- [12] 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, 221-222(2):80-85.
- [13] 陈学斌. DEHP 降解菌的分离及其与玉米联合修复受污染土壤[D]. 广州:暨南大学, 2017.
- CHEN X B. Isolation of Di(2-ethylhexyl) phthalate degrading bacteria and its combined remediation with maize for contaminated soil[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017 (in Chinese).
- [14] 姚雪松. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯降解菌的分离鉴定及降解特性研究[D]. 牡丹江:牡丹江师范学院, 2016.
- YAO X S. Isolation, identification of a DEHP-degrading bacterium and its biodegradation characteristics[D]. Mudanjiang: Mudanjiang Normal College, 2016 (in Chinese).
- [15] 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 J J, CHEN L W, WANG Y Q, et al. Isolation, identification of a DEHP-degrading bacterium and its high effective biodegradation characteristics[J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(11):2362-2369 (in Chinese).
- [16] 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 DEHP-degrading bacterium[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8):1532-1540 (in Chinese).
- [17] 刘时旸. 邻苯二甲酸二正戊酯高效降解菌的筛选、降解特性及其降解途径研究[D]. 南京:南京农业大学, 2015.
- LIU S C. Screening of highly efficient degradation bacteria of Di-n-amyl phthalate and its degradation characteristics[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [18] 杨婧. 邻苯二甲酸酯降解菌的降解特性与土壤应用研究[D]. 广州:华南理工大学, 2018.
- YANG J. Characterization of phthalate-degrading bacterial strain and its application in phthalate-contaminated soil[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [19] 周长健. 高效 DEHP 降解菌的筛选鉴定及其土壤模拟修复初探[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2016.
- ZHOU C J. Solation of an efficient Di-(2-ethylhexyl) phthalate degrading bacteria and preliminary study of the soil remediation[D]. Haerbin: Dongbei Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [20] 梁浩花, 王亚娟, 陶红, 等. 银川市东郊设施蔬菜基地土壤中邻苯二甲酸酯污染特征及健康风险评价[J]. 环境科学学报, 2018, 38(9):3703-3713.
- LIANG H H, WANG Y J, TAO H, et al. Pollution characteristics of phthalate esters(PAEs) in soils of facility vegetablebases and health risk assessment in eastern suburb of Yinchuan[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(9):3703-3713 (in Chinese).
- [21] 褚娇艳, 刘腾飞, 张汉虞, 等. 一株邻苯二甲酸二丁酯降解菌的筛选及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(7):1555-1562.
- ZHE Y J, LIU T F, ZHANG H Y, et al. Screening and characterization of a diphtalate-degrading bacterium [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(7):1555-1562 (in Chinese).
- [22] 饶潇潇, 王建超, 周震峰. 花生对土壤中邻苯二甲酸酯的吸收累积特征[J]. 环境科学学报, 2017, 37(4):1531-1538.
- RAO X, WANG J C, ZHOU Z F, et al. Characteristics of uptake and accumulation of phthalic acid esters in soil by peanut (*Arachis hypogaea*) [J]. *ActaScientiae Circumstantiae*, 2017, 37(4):1531-1538 (in Chinese).
- [23] 张颖, 王丽华, 陈艺洋, 等. 一株 DBP 高效降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(8):46-54.
- ZHANG Y, WANG L H, CHEN Y Y, et al. Study on isolation and identification of a Di-n-butyl phthalate (DBP) strain and its degradation characteristics[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2016, 47(8):46-54 (in Chinese).
- [24] 杜欢. 邻苯二甲酸酯降解菌的筛选、降解特性及其在土壤修复中的应用研究[D]. 广州:暨南大学, 2016.

- DU H. Isolation and characterization of phthalate-degrading bacteria and its application in soil remediation [D]. Guangzhou: Jinan University, 2016 (in Chinese).
- [25] XU J, LU Q, TOLEDO R A D, et al. Degradation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) by an indigenous isolate *Acinetobacter* sp. SN13 [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 117:205-214.
- [26] 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]. *Science of the Total Environment*, 2016, 562:170-178.
- [27] HUANG B, LI D, YANG Y. Joint toxicity of two phthalates with waterborne copper to daphnia magna and photobacterium phosphoreum [J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 2016, 97(3):380-387.
- [28] 穆希岩, 李成龙, 黄瑛, 等. 两种邻苯二甲酸酯类污染物对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(9):3566-3575.
MU Y X, LI C L, HUANG Y, et al. Effects of two phthalate esters on zebrafish embryos[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(9):3566-3575 (in Chinese).
- [29] 李玉双, 陈琳, 郭倩, 等. 沈阳市新民设施农业土壤中邻苯二甲酸酯的污染特征[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(6):1118-1123.
LI Y S, CHEN L, GUO Q, et al. Pollution characteristics of phthalate esters in greenhouse agricultural soil in Xinmin, Shenyang City[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(6):1118-1123 (in Chinese).
- [30] 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.
ZHENG S A, XUE Y H, LI X H, et al. Phthalate acid esters(PAEs) pollution in soils and agricultural products of vegetable greenhouses in Shouguang City, Shandong Province[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(3):492-499 (in Chinese).
- [31] 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 R, WANG D Y, RUI Y, et al. Biodegradation of PAEs by a newly isolated fungus *eupenicillum javanicum* F9.[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(11):2941-2946 (in Chinese).
- [32] 李晓军, 李培军, 蔺昕. 土壤中难降解有机污染物锁定机理研究进展[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7):1624-1630.
LI X J, LI P J, LIN X. Reserch advances in sequestration mechanisms of hardly biodegradable organic contaminants in soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(7):1624-1630 (in Chinese).