

邻苯二甲酸酯降解菌的分离鉴定及降解特性

温志丹¹, 高大文¹, 李 喆¹, 吴唯民²

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨;

2. 美国斯坦福大学 土木与环境工程系, CA94305 斯坦福)

摘 要: 为了对邻苯二甲酸酯(PAEs)污染的土壤进行生物修复,从人工湿地土壤样品中分离到7株能够以PAEs为唯一碳源和能源生长的菌株D1~D7,对其综合形态特征、主要生理生化特性和16S rRNA基因序列分析结果进行鉴定,并通过3 d摇瓶间歇试验检测其对PAEs和邻苯二甲酸(PA)的降解能力。结果表明,D1、D2与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)的同源性分别为100%和98%,D3与肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)的同源性在99%以上,其余4株细菌与红球菌属(*Rhodococcus* sp.)的同源性都在98%以上。这些菌株对邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)和邻苯二甲酸二异辛酯(DEHP)的降解率分别在65%、60%和30%以上,且对PAEs的降解率随侧链烷基链的增长而下降。这7株PAEs降解菌均能在以PAEs的降解中间产物——PA为唯一碳源的培养液中生长,对PA的利用率在18%~39%,这说明它们可能通过PA途径实现PAEs的完全降解。

关键词: 邻苯二甲酸酯; 16S rRNA; 生物降解; 邻苯二甲酸; 菌种鉴定

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2013)12-0038-05

Isolation and identification of phthalate-degrading bacteria and their characteristics

WEN Zhidan¹, GAO Dawen¹, LI Zhe¹, WU Weimin²

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;

2. Department Civil & Environmental Engineering, Stanford University, CA 94305 Stanford, USA)

Abstract: In order to implement the bioremediation on the phthalate contaminated soil, seven bacteria strains D1~D7, which can use phthalate mixtures as the sole source of carbon and energy, were isolated from constructed wetland soil. The morphological, physiological and biochemical characteristics of the strains were studied. Strains D1 and D2 were identified as *Pseudomonas* sp., strain D3 as *Enterobacter* sp., the others as *Rhodococcus* sp., based on the 16S rRNA gene sequence analysis. The batch test results showed that all of the strains could degrade phthalate in three days effectively, the degradation efficiencies of DMP, DEP and DEHP were above 65%, 60% and 30% respectively. The degradation efficiency decreased with the increasing of phthalate alkyl chain length. The D1~D7 strains all grew with phthalic acid as the sole source of carbon and energy. The utilization of phthalic acid was 18%~39%, which showed that the phthalate could be thoroughly degraded by strains D1~D7 through phthalic acid metabolism pathway.

Key words: phthalate; 16S rRNA; biodegradation; phthalic acid; identification

邻苯二甲酸酯(phthalic acid ester, PAEs), 又名酞酸酯, 是一类广泛应用于塑料、涂料、农药、橡胶、个人护理用品等领域的人工合成化学添加剂^[1]。在生产、使用和废弃过程中, 能够逐渐从其基体材料中迁移至外界环境中^[2-3], 已成为全球环境最普遍的重要有机污染物之一。在大气、土壤和水体中都检测到PAEs的存在^[4-6]。PAEs具有致畸性、致突变性、致癌性及生殖毒性^[7-8], 美国

收稿日期: 2013-02-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21177033); 高等学校博士学科点专项科研基金(20100062110002); 城市水资源与水环境国家重点实验室自主课题(2010DX04)。

作者简介: 温志丹(1986—), 女, 博士研究生;

高大文(1967—), 男, 教授, 博士生导师。

通信作者: 高大文, gaodw@hit.edu.cn.

名酞酸酯, 是一类广泛应用于塑料、涂料、农药、橡胶、个人护理用品等领域的人工合成化学添加剂^[1]。在生产、使用和废弃过程中, 能够逐渐从其基体材料中迁移至外界环境中^[2-3], 已成为全球环境最普遍的重要有机污染物之一。在大气、土壤和水体中都检测到PAEs的存在^[4-6]。PAEs具有致畸性、致突变性、致癌性及生殖毒性^[7-8], 美国

EPA 已将其列入 129 种^[9]重点控制污染物名单中,在我国也是环境优先控制污染物^[10]. 由于具有较强的疏水性,大量 PAEs 吸附于水体底部的沉积物或土壤中^[11]. 但在自然环境条件下,其光解和水解速度极其缓慢,生物降解是相对重要的转化过程^[12]. 大量研究也表明好氧或厌氧条件下的微生物代谢分解是影响 PAEs 类增塑剂在环境中行为和归趋的主要途径,是该类物质在自然环境中完全矿化的主要过程之一.

从长期处理生活污水的东北某人工湿地土壤和污水处理厂活性污泥中,分离筛选出 7 株邻苯二甲酸酯降解能力较高的菌株,运用常规生理生化试验和分子生物学手段对这 7 株菌进行鉴定,并观察其降解特性. 以期今后从自然界中分离选育降解邻苯二甲酸酯的优势菌种,构建具有高效降解性能的微生物体系,及邻苯二甲酸酯污染土壤的生物修复研究奠定基础.

1 实 验

1.1 实验材料

1.1.1 供试土壤样品的采集和处理

土壤样品采集于 2012 年 6 月. 采样湿地为辽宁省昌图县某处理生活污水的人工湿地,该湿地的地理位置为 124° 4′ 44″ N ~ 124° 4′ 59″ N, 42° 45′ 43″ E ~ 42° 45′ 58″ E. 采样前对所用器皿进行高温灭菌,并用丙酮及超纯水清洗. 取样前用所在采样点的水样润洗. 采样点为该人工湿地的进水口、中间段和出水口,先用灭菌后的不锈钢采样铲去除表面 10 cm 的土壤后采样,采用多点采集混合取样的方式,同时采集水样和基质样品. 样品采集后装入 1 L 棕色磨口瓶中密封,置于装满冰袋的保温箱中,并于 12 h 内运回实验室 4 °C 冰箱中保存.

1.1.2 药品及化学试剂

选取结构上具有代表性的邻苯二甲酸酯作为研究对象,所用试剂有: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)和邻苯二甲酸二异辛酯(DEHP)(美国 Sigma-Aldrich 股份有限公司产品). 实验过程中使用的正己烷有机溶剂为分析纯(美国 TEDIA 公司产品).

1.1.3 培养基配置

细菌保存培养基:营养琼脂培养基(NA)^[13].

筛选基础培养基(MSM):每升含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g; K_2HPO_4 0.8 g; KH_2PO_4 0.2 g; NaCl 0.5 g; 微量元素液 1 mL^[14].

120 mg/L PAEs 混合物做为唯一的碳源和能源(包括 20 mg/L DMP、DEP、DBP、BBP、DEHP 和 DOP) pH 7.0 ~ 7.2.

1.2 实验方法

1.2.1 PAEs 降解菌的分离和富集

取 5 g 土壤样品加入 100 mL 含 PAEs 的 MSM 培养基中,置于震荡培养箱中 120 r/min、30 °C 培养 7 d; 然后取 1 mL 上述培养液加入新鲜的含 PAEs 的 MSM 培养基中,同条件下培养 7 d 后转接,共转接 3 次. 培养液中 PAEs 质量浓度逐渐增加(120 ~ 360 mg/L).

取最终液体培养物 0.1 mL 涂布于含 PAEs 120 mg/L 的 MSM 固体培养基上,30 °C 下培养 7 d. 菌落出现后,分别挑取表型不同的单菌落于 NA 培养基上,进行三区划线分离,反复分离直至 NA 固体培养基上得到菌落特征一致的纯菌落. 所得纯菌再次回接至 MSM 固体平板上,只能在含 PAEs 的 MSM 固体平板上生长的菌株,被认为具有降解利用邻苯二甲酸酯的能力. 将该菌转接于试管斜面中(NA 培养基) 4 °C 保存备用.

1.2.2 细菌的形态学和常规生理生化特征

观察菌落特征及菌体形态,并根据伯杰氏细菌鉴定手册^[15]对分离到的邻苯二甲酸酯降解菌进行生理生化实验.

1.2.3 16s rRNA 序列分析

采用试剂盒(柱式细菌 DNAout,北京天恩泽基因科技有限公司)提取细菌基因组 DNA,PCR 扩增细菌 16s rRNA 基因,委托生工生物工程有限公司测序,将测序结果与 GenBank 中的已知序列进行相似性分析和同源性比较.

1.2.4 PAEs 降解实验

取上述纯培养物培养于 NA 培养基中,菌液 OD_{600} 为 1.2 ~ 1.4 时,离心分离(8 000g, 20 min)收集菌体,再用磷酸盐缓冲液(pH = 7.0)清洗菌体,离心弃去上清液,重复 3 次. 将洗后的菌体接种于 50 mL 的 MSM 液体培养基中($\rho(\text{PAEs}) = 20 \text{ mg/L}$) 在 30 °C 下摇床培养 3 d 后离心取上清液,同时以未接菌的培养液作为空白对照. 以上实验重复 3 次. 采用微波萃取法(萃取液为正己烷)提取上清液中残余 PAEs,合并萃取液,过无水硫酸钠干燥柱,旋转蒸发至少于 10 mL 后定容,待 GC-MS 分析.

1.2.5 PA 利用实验

选取 PAEs 常见的中间降解产物——邻苯二甲酸(PA)进行底物利用实验. 配制 MSM 培养液,150 mg/L PA 作为唯一的碳源和能源,将与 1.2.4

相同处理的菌株接种至该培养液中培养. 以未接菌的培养液作为空白对照, 用分光光度法连续测定培养液在波长 600 nm 下的光密度值(OD₆₀₀), 衡量细菌的生长情况. 同一批号样品重复检测 3 次, 取平均值作为最后结果.

1.3 分析方法

样品分析使用 Agilent 6890 – 5973N 气相色谱 – 质谱联用(GC – MS) 仪. 色谱柱为 DB – 5 ms (30 m × 250 μm × 1 μm), 气相色谱进样口温度 300 °C; 载气为高纯氦气(99.99%), 流速 2.0 mL/min; 进样量 2.0 μL; 溶剂延迟 10 min; 柱温 90 °C (3 min), 以 15 °C/min 升至 320 °C

(7 min), 共运行 25.33 min.

2 结果与讨论

2.1 邻苯二甲酸酯降解菌的分离筛选

按照富集、初筛、纯化和复筛的方法, 在处理生活污水的人工湿地土壤样品中分离到 7 株可对邻苯二甲酸酯进行有效降解的菌株, 分别为 D1 ~ D7. 形态学及菌落特征见表 1. 其中 D1, D2, D4 和 D5 分离自人工湿地进水口位置(距进水口 5 m) 的土壤中, D3 分离自湿地中间段的土壤中, 而 D6 和 D7 分离自湿地出水口位置(距出水口 5 m) 的土壤中.

表 1 降解菌个体及平板菌落特征

特征	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
菌体	粗短杆	粗短杆	粗杆	粗短杆	粗长杆	粗长杆	短杆
G – /G +	G –	G –	G –	G +	G +	G +	G +
颜色	浅绿色	白色	浅黄色	乳白色	乳白色	肉粉色	浅黄色
形状	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形
大小	中	小	中	小	中	小	大
表面	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑	光滑
边缘	不规则	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐	整齐
透明度	透明	半透明	不透明	不透明	不透明	不透明	半透明
隆起	扁平	突起	突起	突起	扁平	突起	扁平

2.2 邻苯二甲酸酯降解菌的生理生化特征

对以上 7 株细菌进行的甲基红试验、V – P 测定、柠檬酸盐利用试验、淀粉水明胶液化试验、葡

萄糖发酵试验、纤维素分解试验、吲哚试验等生理生化结果见表 2.

表 2 细菌生理生化试验结果

项目	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
甲基红试验	+	+	–	–	–	–	–
V – P 测定	–	–	+	–	–	–	–
接触酶试验	+	+	+	+	+	+	+
吲哚试验	–	N. D.	–	+	+	+	+
产氨试验	+	+	–	+	+	+	+
明胶液化	+	+	–	–	–	–	–
柠檬酸盐利用	–	–	+	–	–	–	+
淀粉水解	–	–	–	–	–	–	–
蔗糖	–	–	+	+	–	+	N. D.
乙醇氧化	N. D.	+	+	+	+	+	+
葡萄糖氧化发酵	+	+	++	+	+	+	+

注: +, 阳性反应; –, 阴性反应

2.3 16S rRNA 序列同源性分析

提取细菌总 DNA 并选用细菌通用引物 8f 和 1492r 扩增其 16S rRNA 基因. 扩增产物序列长度均在 1 424 ~ 1 452 bp. 根据测序结果, 利用 BLAST 软件与 Genbank 中已登录的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 并利用 Clustx 和 MEGA 4.1 等相关软件建立系统发育树, 见图 1. 所有获得的序列提交至 Genebank, 检索号依次为 KF113578 ~ KF113584. 经 16S rRNA 基因测序及同源性比较, D1、D2 与 *Pseudomonas* sp. 的同源性分别为 100%

和 98%, D3 与 *Enterobacter* sp. 的同源性在 99% 以上, 其余 5 株降解菌与 *Rhodococcus* sp. 的同源性都在 98% 以上.

2.4 菌株对邻苯二甲酸酯的降解

对以上筛选出的 7 株菌进行 PAEs 降解率测定, 结果如图 2 所示. 可以看出, 在以 PAEs 为唯一碳源的培养基中, 7 株菌均能有效降解并利用邻苯二甲酸酯, 但降解率各不相同. 菌株 D1 和 D7 对 PAEs 的降解效果明显优于其他细菌, 两者对

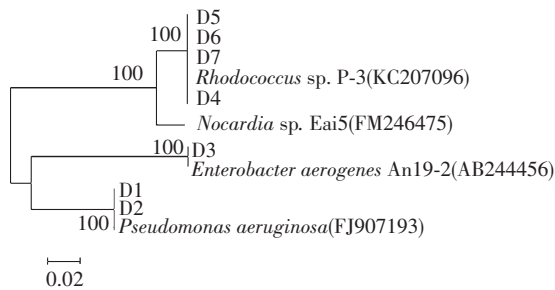


图 1 16S rRNA 测序及同源性分析

DMP、DBP 和 DEHP 的降解率均在 70% 以上, 而菌株 D2 的降解率都低于 70%, 其余菌株对不同种类 PAEs 的降解率在 30% ~ 99%.

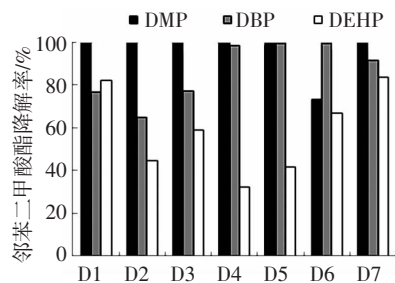


图 2 不同菌株培养 3 d 后对 DMP、DBP 和 DEHP 的降解率

由图 2 还可以看出, 菌株对 PAEs 的降解能力随侧链烷基链的增长而下降, 相对分子质量较小的 DMP 的降解率明显高于长链 DEHP. 培养 3 d 后, 所有菌株对 DMP 降解率均达 70% 以上, 其中 D3、D4、D5 和 D7 达 95% 以上, 基本能完成终极降解; 但对 DEHP 的降解率均在 50% 左右, 仅有两株菌达到 80%. 这与相对分子质量高的 PAEs 空间位阻大、不容易被微生物降解利用的报道一致^[16]. 此外, 从表 3 可以看出, 人工湿地中微生物对 PAEs 的降解能力与其侧链烷基链的长度也有关. 人工湿地进水中均检测到 DMP、DBP 和 DEHP, 但是在距进水口 5 m 左右土壤中已检测不到 DMP, DBP 和 DEHP 在人工湿地沿程土壤中的含量逐渐减少, 在距出水口 5 m 左右的土壤中已经检测不到 DBP, 但 DEHP 仍然大量残留. 这说明湿地微生物对 DMP 的去除效果最好, 其次是 DBP, 对长链 DEHP 的降解能力较差.

表 3 人工湿地进水及土壤样品中邻苯二甲酸酯的含量

类别	水体中/(ng · mL ⁻¹)	土壤中/(ng · g ⁻¹)		
	进水	进水口	中间段	出水口
DMP	25.89	N. D.	N. D.	N. D.
DBP	219.23	730.42	N. D.	N. D.
DEHP	189.93	999.76	680.04	431.5

注: N. D. 表示没有检测到

在 PAEs 的微生物好氧降解过程中, 首先由微生物分泌的水解酶将双酯转化为单酯与相应的醇, 再进一步将单酯转化为 PA 与相应的醇, 而接

下来 PA 的降解是整个降解过程的关键^[17]. 并非所有的 PAEs 降解菌都能降解利用 PA, Wu 等^[18]的研究表明, 从活性污泥中分离得到的 *Gordonia* sp. strain JDC-2 能够将 DOP 降解为 PA, 但是不具备利用 PA 的能力, 造成 PA 在培养体系中大量累积. 因此, 菌株能否利用 PA 对于是否能够实现 PAEs 的终极降解至关重要.

2.5 菌株对邻苯二甲酸的利用

菌株在以 PA 为唯一碳源培养时的 OD₆₀₀ 连续监测结果见图 3. 分离到的 7 株菌均能利用 PA, 其中 D4、D5 和 D7 在以 PA 为唯一碳源培养时的生长较迅速, 培养约 2 d 后进入对数生长期; D1 和 D2 在 PA 培养液中的生长迟滞期较长, 培养 3 d 后才进入对数生长期, 且稳定期较短, 在监测周期为 24 h 时, 并未成功监测到稳定期就已经进入衰亡期; D3 和 D6 生长缓慢, 菌体浓度一直较低.

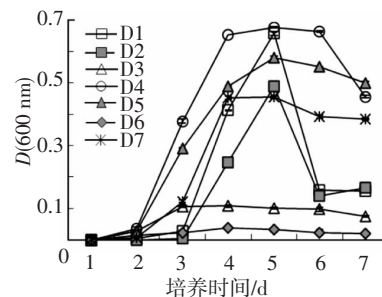


图 3 菌株以 PA 为唯一碳源时的生长曲线

培养 7 d 后, 取培养液离心后对上清液中残余的 PA 进行分析(图 4). 菌株 D4 对 PA 的利用率最高(达 39%), 其余菌株的利用率在 13% ~ 34%. 其中菌株 D3 和 D6 对 PA 的利用率相对较低, 分别为 23% 和 13%, 这应该是造成其生长缓慢的原因. 本研究分离得到的 7 株 PAEs 降解菌均能降解利用 PA, 这说明它们可能通过 PA 途径来实现 PAEs 的完全降解, 有待进一步证实.

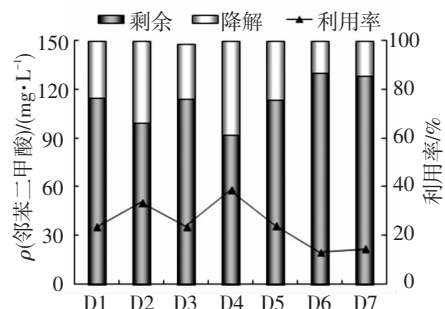


图 4 不同菌株培养 7 d 后对 PA 的利用率

3 结 论

1) 从某人工湿地土壤样品中分离筛选出 7 株以 PAEs 为唯一碳源的高效 PAEs 降解细菌 D1 ~ D7. 经生理生化、形态学观察和 16S rDNA 序列

分析, 鉴定 D1、D2 与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 高度同源, 相似度分别为 100% 和 99%; D3 与产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 的同源性在 99% 以上; 其余 4 株降解菌与红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 的同源性均在 98% 以上。

2) 间歇培养 3 d 的实验表明, 菌株 D1 和 D7 对 PAEs 的降解效率高于其他菌株, 两者对 DMP、DBP 和 DEHP 的降解率均在 70% 以上; 菌株对 PAEs 的降解能力随 PAEs 侧链烷基链的增长而下降, 对相对分子质量较小的 DMP 的降解率明显高于长链 DEHP。

3) 这 7 株 PAEs 降解菌均能降解利用 PA, 说明可能具有完全矿化降解 PAEs 的潜力, 有待进一步证实。

参考文献

- [1] ROSLEV P, VORKAMP K, AARUP J, *et al.* Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant [J]. *Water Research*, 2007, 41(5): 969–976.
- [2] LIANG Dawei, ZHANG Tong, FANG H H P. Phthalates biodegradation in the environment [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2008, 80(2): 183–198.
- [3] FROMME H, KUCHLER T, OTTO T, *et al.* Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment [J]. *Water Research*, 2002, 36(6): 1429–1438.
- [4] ADENIYI A A, OKEDEYI O O, YUSUF K A. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, 172(1/2/3/4): 561–569.
- [5] CAI Quanying, MO Cehui, WU Qitang, *et al.* Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China [J]. *Chemosphere*, 2007, 68(9): 1751–1762.
- [6] TEIL M J, BLANCHARD M, CHEVREUIL M. Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France) [J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 354(2/3): 212–223.
- [7] PLANELLO R, HERRERO O, MARTINEZ-GUITARTE J L, *et al.* Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(1/2): 62–70.
- [8] ABDUL-GHANI S, YANAI J, ABDUL-GHANI R, *et al.* The teratogenicity and behavioral teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-butyl Phthalate (DBP) in a chick model [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2012, 34(1): 56–62.
- [9] LIAO CS, CHEN L C, CHEN B S, *et al.* Bioremediation of endocrine disruptor di-n-butyl phthalate ester by *Deinococcus radiodurans* and *Pseudomonas stutzeri* [J]. *Chemosphere*, 2010, 78(3): 342–346.
- [10] 陈济安, 邱志群, 舒为群. 我国水环境中邻苯二甲酸酯污染现状及其生物降解研究进展 [J]. *癌变. 畸变. 突变*, 2007(3): 212–214.
- [11] ALATRISTE-MONDRAGON F, IRANPOUR R, AHRING B K. Toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the anaerobic digestion of wastewater sludge [J]. *Water Research*, 2003, 37(6): 1260–1269.
- [12] STAPLES C A, PETERSON D R, PARKERTON T F, *et al.* The environmental fate of phthalate esters: a literature review [J]. *Chemosphere*, 1997, 35(4): 667–749.
- [13] 王继华, 李晶, 马放. 低温高效苯胺降解菌的分离与特性 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2008, 40(10): 1600–1605.
- [14] DWORKIN M, FALKOW S, ROSENBERG E, *et al.* The prokaryotes [M]. 3rd ed. Germany: Springer, 2006: 62–64.
- [15] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [16] 夏凤毅, 郑平. 邻苯二甲酸酯化合物生物降解性与其化学结构的相关性 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版* 2004, 30(2): 141–146.
- [17] 骆祝华, 黄翔玲, 叶德赞. 环境内分泌干扰物——邻苯二甲酸酯的生物降解研究进展 [J]. *应用与环境生物学报* 2008, 14(6): 890–897.
- [18] WU Xueling, LIANG Renxing, DAI Qinyun, *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: 262–268.

(编辑 刘 彤)