一株冢村菌的筛选及其对邻苯二甲酸二丁酯的降解特性研究

王雨婷[1]，靳 拓[2]，胡 芳[3]，黄仕林[1]，刘慧君[1*]，金德才[4*]

（1. 北京农学院，农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室，北京 102206；2. 农业农村部农业生态与资源保护总站，北京 100125；3. 湖南省长沙生态环境监测中心，长沙 410001；4. 中国科学院生态环境研究中心，中国科学院环境生物技术重点实验室，北京 100085）

摘 要：为了获得邻苯二甲酸酯（PAEs）生物降解菌，从农田土壤筛选出一株能够以PAEs为唯一碳源和能源生长的微生物，命名为SD2。采用聚合酶链式反应（PCR）扩增得到其16S rDNA并构建分子系统发育树，可鉴定出其为冢村菌（*Tsukamurella*）。研究该菌株在不同的温度、pH值和转速条件下对邻苯二甲酸二丁酯（DBP）的降解情况，同时采用高效液相色谱（HPLC）测定该菌株对DBP的降解能力。结果表明，SD2对DBP的最佳降解条件为：温度为30℃，pH值为9，转速为150 r/min。在该最佳条件下，SD2在72 h内可以完全降解500 mg/L的DBP。底物广谱试验表明，该菌能够降解长短链的PAEs化合物及常见的代谢产物。同时采用气相质谱联用仪（GC-MS）检测发现，DBP在降解的过程中产生了中间代谢产物邻苯二甲酸丁基甲酯和邻苯二甲酸（PA），预示着该菌具备完全降解DBP的能力。这是首次关于冢村菌降解PAEs污染物的报道，能够为PAEs污染环境的生物降解及修复提供新的微生物资源。

关键词：冢村菌；邻苯二甲酸二丁酯；生物降解；16S rDNA；有机污染物

中图分类号：S154.3 **文献标志码：**A **DOI:** 10.3969/j.issn.1007-7146.2020.06.013

Screening and Study on DBP Degradation Characteristics of a *Tsukamurella* sp. Strain

WANG Yuting[1], *JIN Tuo*[2], *HU Fang*[3], *HUANG Shilin*[1], *LIU Huijun*[1*], *JIN Decai*[4*]

(1. Beijing Key Laboratory of Detection and Control of Spoilage Organisms and Pesticide Residues in Agricultural Products, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Rural Energy and Environment Agency, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China; 3. Changsha Environmental Monitoring Center of Hunan Province, Changsha 410001, China; 4. Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: In order to obtain phthalic acid esters (PAEs) biodegradation strain, a bacterial strain capable of growing with PAEs as the sole carbon source and energy was selected from contaminated soil and named as SD2. The 16S rDNA obtained by PCR amplification and the construction of molecular phylogeny trees can be identified as *Tsukamurella* sp. The degradation of DBP under different temperature, pH value, and rotational speed conditions was investigated. The degradation abil-

收稿日期：2020-07-13；**修回日期：**2020-08-31。

基金项目：北京农学院人才培养质量建设-高水平人才交叉培养计划-实培计划项目（PXM2020_014207_000009）；国家自然科学基金项目（41977122）；农业生态环境保护项目（2110402）；江苏省食品质量安全重点实验室开放课题项目（028074911709）。

*** 通信作者：**刘慧君，讲师，主要从事农业食品安全研究，E-mail: huijunliu78@163.com；金德才，副研究员，主要从事污染物的生态效应及生物修复研究，E-mail: dcjin@rcees.ac.cn。

ity of the strain to DBP was determined by high performance liquid chromatography. The results showed that the optimum degradation condition of SD2 is temperature of 30℃, pH value of 9 and rotational speed of 150 r/min. Under this optimum condition, SD2 can completely degrade 500 mg/L DBP within 72 h. The intermediate metabolites, butylmethyl phthalate and phthalic acid, were detected by GC-MS during the degradation of DBP, and phthalic acid could be further completely degraded into CO_2 and H_2O. To our knowledge, this is the first report about the biodegradation of PAEs by genus *Tsukamurella*.

Key words: *Tsukamurella*; dibutyl phthalate; biodegradation; 16S rDNA; organic pollutants

（*Acta Laser Biology Sinica*, 2020, 29(6): 570-576）

邻苯二甲酸酯（phthalic acid esters, PAEs）是被广泛应用于橡胶用品、塑料、涂料、农药、食品包装、个人护理用品等领域的一类人工合成的持久性有机化合物[1]。在PAEs被广泛应用的同时，其对人类健康和生态环境安全的威胁也受到了人们的关注。由于PAEs对整个生态系统具有潜伏性、广泛性和深远性的危害，世界各国都十分重视其污染问题。国内外有大量研究表明，PAEs具有致畸性、致癌性、致突变性及生殖毒性[2]，并对人体有低浓度长期危害的特征。目前，邻苯二甲酸二丁酯（dibutyl phthalate, DBP）、邻苯二甲酸丁苄酯（benzyl butyl phthalate, BBP）、邻苯二甲酸二辛酯（dioctyl phthalate, DOP）等多种PAEs已被美国环保局（Environmental Protection Agency, EPA）和中国环境监测总站列为优先控制的污染物。

PAEs在塑料中主要通过氢键或范德华力与聚烯烃类分子进行连接，在环境中不易分解。目前在大气、湖泊、饮用水、土壤甚至室内环境中均可检测到PAEs的存在[3]，同时，PAEs还可以通过食物链进入生物体内[4]，对其造成严重危害。

PAEs已经成为我国环境中广泛存在的一类有机污染物，生物降解是其在环境中降解的主要途径[5]。DBP主要作为软化剂应用于聚氯乙烯（polyvinyl chloride, PVC）等合成材料中，是应用最广泛的PAEs化合物之一。其对环境污染的主要原因是人为造成的，任何来源的DBP均可通过食物链进入消化道，最终在人体内蓄积，从而对人体健康构成威胁[6]。国内外对DBP的生物降解进行了大量的研究，主要包括高效降解菌株的筛选和降解动力学研究以及酶促降解性和降解途径等方面。目前分离得到对DBP具有高效降解性能的菌株主要有红球菌（*Rhodococcus* sp.）[7-8]、分枝杆菌（*Mycobacterium* sp.）[9]、假单胞菌（*Pseudomonas* sp.）[10]、戈登氏菌（*Gordonia* sp.）[11-12]、芽孢杆菌（*Bacillus* sp.）[13]和皮氏伯克霍尔德氏菌（*Burkholderia pickettii*）[14]等，但我国对于PAEs污染物的微生物降解机制、降解基因以及降解酶的研究相对较少，且降解菌菌属相对集中，需要扩大PAEs的生物降解菌种资源库。目前，国内外学者对冢村菌（*Tsukamurella*）的研究相对较少，且关于冢村菌降解PAEs的研究未见报道。

本研究从土壤中筛选出一株能够把DBP高效降解的菌株SD2，采用16S rDNA序列分析及系统发育树构建将其鉴定为冢村菌，并分析在不同影响因子条件下菌株SD2的DBP降解特性，为冢村菌降解有机污染物的研究提供了参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料及培养基

主要试剂：邻苯二甲酸二甲酯（dimethyl phthalate, DMP）；邻苯二甲酸二乙酯（diethyl phthalate, DEP）；DBP；DOP；甲醇（分析纯）和乙酸乙酯（分析纯）。

无机盐培养基：K_2HPO_4 5.8 g/L，KH_2PO_4 4.5 g/L，$(NH_4)SO_4$ 2.0 g/L，$MgCl_2$ 0.16 g/L，$CaCl_2$ 0.02 g/L，$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.4 mg/L，$FeCl_3$ 1.8 mg/L，$MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.5 mg/L；将pH值调至7，121℃高压灭菌20 min。PAEs固体培养基：在1 L无机盐培养基中加入20 g琼脂，121℃高压灭菌20 min[15]。

1.2　菌株筛选、形态观察及生理生化鉴定

称取1 g的样品于100 mL含100 mg/L PAEs（DMP、DEP、DBP、DOP的质量浓度均为25 mg/L）的无机盐培养基中，采用梯度压力法驯化，在30℃下振荡培养7 d。随后逐步转接至质量浓度分别为200、300、400、500 mg/L的PAEs无机盐培养液中培养，每个质量浓度梯度下均驯化7 d左右。用接种环蘸取少量菌液，采用平板划线法在PAEs固体平板上进行划线分离纯化。选取长势良好的单菌落接种到PAEs固体平板上，重复此操作，直至得到纯的单菌落，并通过肉眼观察法对分离得到的单菌落的形态进行观察。生理生化鉴定参考文献[16]的方法进行。

1.3　细菌底物广谱性测试

在20 mL的无机盐培养基中分别加入200 mg/L

DBP、200 mg/L DMP、200 mg/L DEP、200 mg/L DOP、200 mg/L 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[di-(2-ethylhcxyl) phthalate, DEHP]、200 mg/L 甲苯、200 mg/L 邻苯二甲酸单丁酯(mono-n-butyl phthalate, MBP)、200 mg/L 原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)、200 mg/L 邻苯二甲酸二异辛酯(diisooctyl phthalate, DIOP)、200 mg/L 邻苯二甲酸(phthalic acid, PA)作为菌株生长的唯一碳源,用高压蒸汽锅 121℃下高压灭菌 20 min。取 1 mL 菌液至无机盐培养基中,在温度为 30℃、转速为 150 r/min 的摇床中震荡培养 7 d,重复 2 次,观察菌株的生长情况。

1.4 细菌的 16S rDNA 的扩增和系统发育树的构建

用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rDNA 片段[17]。50 μL 反应体系含有 10×PCR buffer 5.0 μL、10 mmol/L dNTP 1.0 μL、25 mmol/L $MgCl_2$ 4.0 μL、*Taq* 酶 0.5 μL、引物 27F 1.0 μL、引物 l492R l.0 μL、DNA 模板 4.0 μL,其余成分为 ddH_2O。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。取 5.0 μL 的反应液进行琼脂糖凝胶电泳。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物的测序工作由睿博兴科公司完成,并通过 MEGA7.0 软件中的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。为了进一步确定该菌的分类地位,本研究将所得到的 16S rRNA 基因序列通过数据库 EzBioCloud(https://www.ezbiocloud.net/)和细菌模式菌种进行了相似性比对[18]。

1.5 DBP 的生物降解试验

取菌株于含有 50 μL DBP 的 100 mL 无机盐培养液中振荡培养 7 d,离心(转速为 10 000 r/min)5 min,用 pH 为 7、浓度为 0.02 mol/L 的 $Na_2HPO_4·NaH_2PO_4$ 缓冲液洗涤 3 次,收集菌体于锥形瓶中。吸取 1 mL 菌悬液,根据不同条件在含 500 mg/L DBP 的无机盐培养基中培养。

1.6 高效液相色谱分析法

1.6.1 样品处理

将培养后的培养基菌液摇匀,全部转移至 50 mL 无菌离心管中,加入 10 mL 乙酸乙酯,离心(转速为 6 000 r/min)5 min;收集有机相至烧杯中,用 10 mL 乙酸乙酯萃取水相 1 次,并再次收集有机相至烧杯中。在通风橱中挥发一晚后,用甲醇定容至 10 mL,稀释至原浓度的 1/5;用高效液相色谱仪测定 DBP 的残留量。

1.6.2 液相色谱条件

色谱柱为 SinoChrom ODS-BP(4.6 mm×200 mm×5 μm),柱温为 35℃,$V_{流动相甲醇}$:$V_{水}$=9:1,流速为 0.5 mL/min。检测器波长为 228 nm,进样量为 20 μL。

1.7 气相质谱分析

1.7.1 样品处理

将培养完的菌液转移至 50 mL 无菌离心管中,加入 10 mL 乙酸乙酯,离心(转速为 6 000 r/min)5 min。收集有机相至烧杯中,用 10 mL 乙酸乙酯萃取水相 1 次,并再次收集有机相至烧杯中。在通风橱中挥发干后,用色谱纯的正己烷定容至 10 mL,稀释至原浓度的 1/5。

1.7.2 气相质谱条件

Thermo Trace DSQ Ⅱ色谱质谱联用仪条件:1)初始温度为 60℃,以 20℃/min 升温至 220℃并保留 10 min,随后以 5℃/min 升温至 300℃并保留 5 min;2)离子源温度为 230℃,全扫描方式进行;3)进样口温度为 260℃,接口温度为 280℃,流速为 1.0 mL/min;4)进样量为 1 μL。

2 结果与分析

2.1 PAEs 降解菌 SD2 的分离与分子生物学鉴定

通过肉眼观察法可观察到菌株 SD2 在平板上呈白色,菌落较大,表面呈不规则形状,粗糙,微隆起,不透明,短杆状,革兰氏阳性(图 1),专性好氧气,无鞭毛。

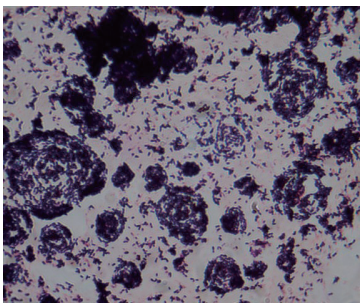

图 1 菌株 SD2 的革兰氏染色结果(×100)

Fig. 1 Gram staining result of strain SD2 (×100)

本文采用 PCR 扩增技术获得了菌株 SD2 的 16S rDNA 序列,测序的长度为 1 378 bp。用 MEGA 7 软件中的 Clustal W 将其与 GenBank 中已知菌株的 16S rRNA 基因序列进行比较,然后用 neighbor-joining 构建系统发育树。结果表明,SD2 与多种冢村菌的 16S rRNA 基因相似性高达 99%(图 2)。同时,在数据库

EzBioCloud 上的比对结果显示, 和 SD2 最相似的前十二个有效发表模式菌株均为冢村菌, 其中 SD2 和 *Tsukamurella tyrosinosolvens* DSM 44234^T 相似度为 100%, 和 *Tsukamurella ocularis* HKU63^T 相似度为 99.85%, 和其他属的相似度均低于 96%。因此可以判定 SD2 属于冢村菌属。

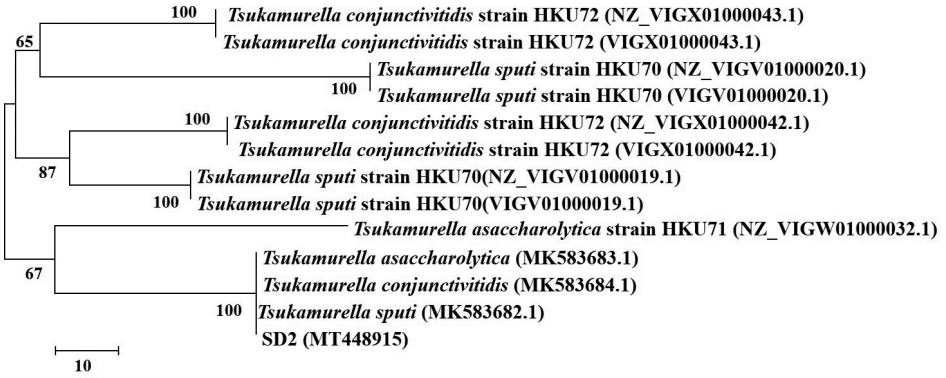

图 2　菌株 SD2 的 16S rDNA 序列分析与系统发育树的构建

Fig. 2　16S rDNA sequence analysis and phylogenetic tree construction of strain SD2

2.2　底物广谱性试验

底物广谱性试验结果如表 1 所示。由表 1 可见, SD2 可以利用常见的且在污染环境中含量较高的 PAEs 类化合物 (如 DMP、DEP、DBP 等), 但无法利用支链较长的 PAEs (如 DOP)。同时, SD2 对主要的 PAEs 类化合物中的代谢产物 (如 PA、PCA) 具有一定的利用能力。这预示着 SD2 具备将 PAEs 及其代谢产物完全降解的能力。

表 1　PAEs 降解菌株 SD2 的底物广谱性

Tab. 1　Substrate utilization profile for strain SD2

Substrate	Utilization	Substrate	Utilization
DBP	+	Toluene	+
DEP	+	PCA	+
DEHP	+	PA	+
DMP	+	DIOP	+
DOP	–	MBP	+

注: “+” 表示可以生长, “–” 表示不能生长。

Note: “+” indicates that strain could grow, and “–” indicates that strain could not grow.

2.3　培养条件对菌株降解 DBP 的影响

2.3.1　初始 pH 值对菌株降解 DBP 的影响

用 0.1 mol/L 的盐酸和 0.1 mol/L 的 NaOH 调整无机盐培养基的 pH 值分别至 4、5、6、7、8、9、10, 以 DBP 为唯一碳源, 在温度为 30℃、转速为 150 r/min 的条件下振荡培养 3 d。初始 pH 值对菌株降解 DBP 的影响如图 3 所示。

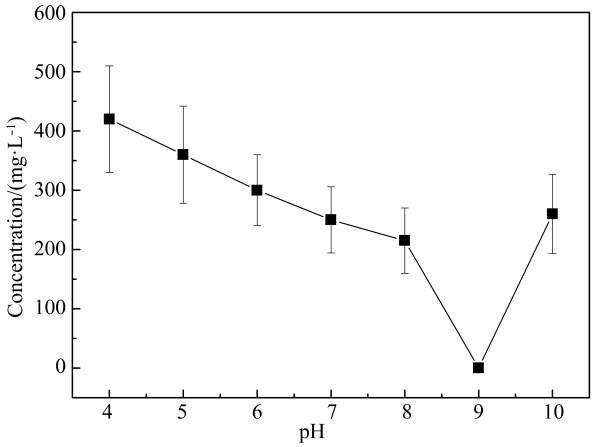

图 3　初始 pH 值对菌株 SD2 降解 DBP 的影响

Fig. 3　Effects of initial pH on DBP degradation by strain SD2

在 pH 值为 4 ~ 8 时, 瓶中残留 DBP 的质量浓度呈缓慢下降趋势, 菌株生长缓慢, 其对 DBP 的降解作用受到抑制。在初始 pH 值为 9 时, DBP 质量浓度为 0, 表示 DBP 已经完全被降解, 菌株可以良好生长。在初始 pH 值为 10 时, 菌株生长缓慢, 其对 DBP 的降解作用受到抑制。酸碱度是影响微生物生长的重要因素之一, 不同 pH 值可以影响酶的活性, 从而影响菌株降解 DBP 的能力。由此可见, SD2 降解 DBP 的最适 pH 值为 9。该菌株在偏碱性条件下可以生长, 且较适宜降解 DBP, 同时, 初始 pH 值过低不利于菌株的生长以及 DBP 的降解。

2.3.2　初始温度对菌株降解 DBP 的影响

DBP 为唯一碳源, 在温度分别为 25、30、35、40 和 45℃, pH 值为 7, 转速为 150 r/min 的条件下振荡培养

3 d, 初始温度对菌株降解 DBP 的影响如图 4 所示。

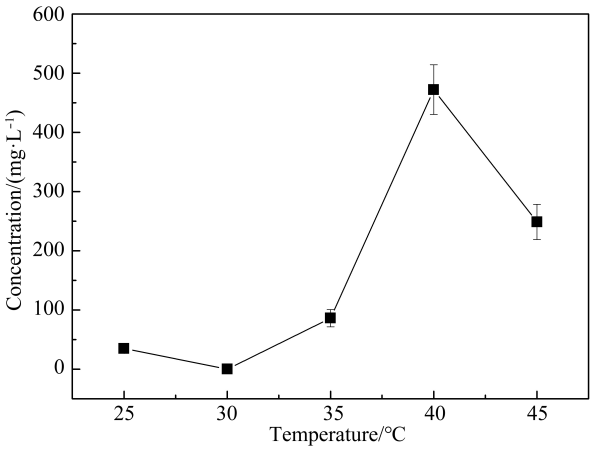

图 4 初始温度对菌株 SD2 降解 DBP 的影响

Fig. 4 Effect of initial temperature on DBP degradation by strain SD2

在 25 ~ 35℃时, DBP 已基本上被 SD2 完全降解, 菌株可以良好生长, 具有较高的降解能力。在 30℃时, DBP 的质量浓度为 0, 表示 DBP 已被完全降解。超过 35℃时, 菌株生长较慢。温度也是影响微生物生长的重要因素之一, 不同的温度会影响酶的活性, 从而影响微生物的生长与降解有机物的能力[19]。由此可见, 该菌株适宜在 30℃左右温度下生长, 且降解 DBP 的能力较高。温度过高会抑制 SD2 的生长和 DBP 的降解。

2.3.3 转速对菌株降解 DBP 的影响

以 DBP 为唯一碳源, 在温度为 30℃, pH 值为 7, 转速分别为 0、75、150、225 r/min 的条件下振荡培养 3 d, 转速对菌株降解 DBP 的影响如图 5 所示。

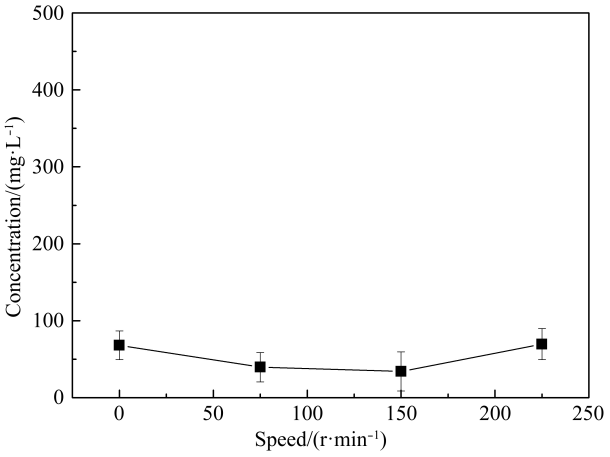

图 5 转速对菌株 SD2 降解 DBP 的影响

Fig. 5 Effect of rotation speed on DBP degradation by strain SD2

在静止时, SD2 对 DBP 降解的能力较强, 菌株可以正常生长。随着转速的增加, SD2 在不同转速条件下对降解 DBP 的影响差别较小, DBP 均可以被降解, 在不同转速下菌株都能良好生长。与其他转速相比, 最适宜降解 DBP 的转速为 150 r/min。

2.3.4 培养时间对菌株降解 DBP 的影响

以 DBP 为唯一碳源, 在温度为 30℃、pH 值为 7、转速为 150 r/min 的条件下振荡培养 3 d, 分别于 12、24、36、48、60、72 h 时取样。培养时间对菌株降解 DBP 的影响如图 6 所示。

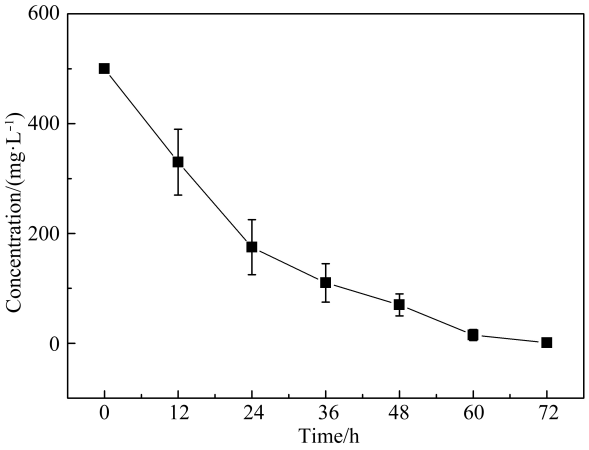

图 6 培养时间对 SD2 降解 DBP 的影响

Fig. 6 Effect of culture time on DBP degradation by strain SD2

在培养初期, 菌株的生长及 DBP 的降解速度较快, SD2 可以很快利用 DBP 提供的碳源。在 72 h 时, DBP 可以被完全降解, 充分说明 SD2 是一株高效降解菌。

2.4 代谢产物分析

通过气相质谱联用仪(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)检测 DBP 降解过程中的产物, 并与气质联用的质谱数据库进行比对可知, 在 SD2 降解 DBP 12 h 后, 在保留时间(待测组分从进样到出现峰最大值所需的时间)为 9.40 min 和 8.10 min 时检测到了 DBP 和邻苯二甲酸丁基甲酯; SD2 降解 DBP 36 h 后, 在保留时间为 5.69 min 时检测到了 PA。质谱图如图 7 所示。

经菌株 SD2 降解 12 h 后, 可以检测到 DBP 的存在。经菌株 SD2 降解 36 h 后, 可以检测到 PA, 通过降解试验, 在降解 36 h 后, 降解速度趋于平缓, 可能是因为反应生成了中间产物邻苯二甲酸丁基甲酯和 PA, 而 SD2 对降解邻苯二甲酸丁基甲酯和 PA 的能力较弱, 从而导致降解速度变慢。降解 72 h 后几乎没有检测到 DBP 及其中间产物, 表明 DBP 已几乎被完全降解。

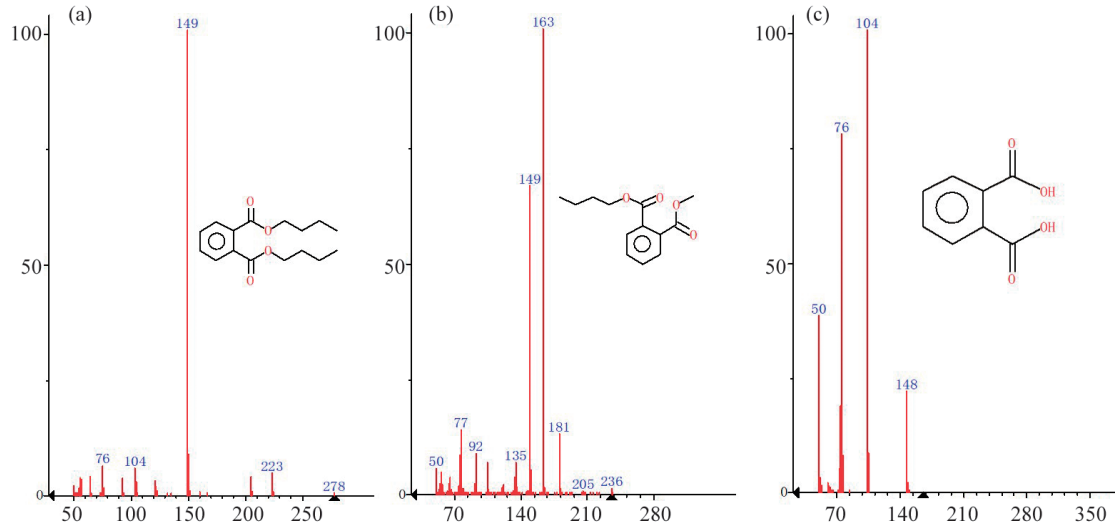

图 7　邻苯二甲酸二丁酯及其代谢产物的质谱图

Fig. 7　Mass spectrum of dibutyl phthalate and its metabolic product

(a) 邻苯二甲酸二丁酯的质谱图; (b) 邻苯二甲酸丁基甲酯的质谱图; (c) PA 的质谱图。

(a) Mass spectrum of dibutyl phthalate; (b) Mass spectrum of butylmethyl phthalate; (c) Mass spectrum of phthalic acid.

研究表明, 在好氧微生物的降解过程中, 通过微生物酯酶将 PAEs 水解可生成邻苯二甲酸单酯, 并将其再生为 PA。而成功降解 PA 才是完成整个降解过程的一个至关重要的步骤[20]。结合底物广谱试验结果可知, 该菌能继续利用 PA 以及后续的代谢产物 PCA, 基本可以推测该菌能够完全降解 DBP。

3　讨论

冢村菌是一类需氧、不产芽孢、无动力的革兰氏阳性菌, 主要分布于土壤、水以及活化淤泥的泡沫中[21]。虽然对于微生物可降解 PAEs 的研究很多, 但是目前有关于冢村菌的生物降解研究的报告不多, 仅有冢村菌降解十六烷和烷烃的研究报道[22-23]。本文第一次报道了该菌属能够降解 PAEs 污染物的研究。

本研究对冢村菌的降解特性及降解产物进行了分析。从农田土壤中筛选出一株能够以 DBP 为唯一碳源和能源生长的微生物 SD2。经 PCR 扩增得到其 16S rDNA 并构建分子系统发育树, 分析发现 SD2 与多种冢村菌的 16S rRNA 基因的相似性高达 99%。因此, 初步鉴定该菌株为冢村菌。通过底物广谱性试验发现, 菌株 SD2 可以利用多种常见的 PAEs 类化合物, 是一株能够广泛降解 PAEs 的菌株。本研究利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定了 SD2 的降解性能, 发现了 SD2 对 DBP 的最佳降解条件: 温度为 30 ℃, pH 值为 9, 转速为 150 r/min。在该最佳条件下, SD2 在 72 h 内可以完全降解 500 mg/L 的 DBP, 表明该菌偏爱在偏碱性环境中生长, 并具备较高的 DBP 降解能力。通过 GC-MS 分析可初步推断, SD2 与 DBP 反应生成的中间产物为邻苯二甲酸丁基甲酯和 PA。结合底物广谱试验可知, PA 及 PCA 均能被 SD2 降解, 预示 SD2 可以完全降解 DBP, 并将土壤中 PAEs 转化为 CO_2 和 H_2O, 同时不会产生二次污染。下一步将开展该菌种的降解机制研究, 通过基因组和转录组测序, 预测相关的降解基因并测定相关的酶活性质, 为后续的应用开发提供基础。

总之, 本研究所筛选的冢村菌的底物广谱性良好, 降解速度快, 在降解 PAEs 及其中间代谢产物中起到了重要作用, 对环境污染的治理及修复具有一定的应用潜力, 同时进一步扩大了 PAEs 生物降解菌资源, 并为冢村菌降解有机污染物的研究提供了有利参考。

参考文献 (References):

[1] 杨捷, 姚炎华, 尹大强, 等. 邻苯二甲酸酯高效降解菌的筛选及表征[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2018, 46(7): 944-950.
YANG Jie, YAO Yanhua, YIN Daqiang, *et al*. Screening and characterization of phthalate degrading bacteria[J]. Journal of Tongji University (Natural Science Edition), 2018, 46(7): 944-950.

[2] BENJAMIN S, PRADEEP S, JOSH M S, *et al*. A monograph on the remediation of hazardous phthalates[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 298: 58-72.

[3] 严佳丽, 陈湖星, 杨扬, 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 Jiali, CHEN Huxing, YANG Yang, *et al*. Isolation, identification and degradation characteristics of an efficient DEHP degrading bacterium[J]. Bulletin of Microbiology, 2014, 41(8): 1532-1540.

[4] LIAO C S, 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.

[5] 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.
WU Qiong, ZHANG Xiaofeng, REN Wei, *et al*. Pollution status and microbial degradation of phthalates[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(2): 122-128.

[6] 于晓章, 乐东明, 任燕飞. 邻苯二甲酸酯在环境中的降解机制[J]. 生态科学, 2015, 34(4): 180-187.
YU Xiaozhang, LE Dongming, REN Yanfei. Degradation mechanism of phthalate esters in the environment[J]. Ecological Science, 2015, 34(4): 180-187.

[7] 金德才, 梁任星, 王洋洋, 等. 一株 DBP高效降解菌的筛选及其降解特性[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2010, 41(1): 8-14.
JIN Decai, LIANG Renxing, WANG Yangyang, *et al*. Screening and degradation characteristics of a DBP degrading bacterium[J]. Journal of Central South University (Natural Science Edition), 2010, 41(1): 8-14.

[8] 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.

[9] 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 Chuling, LIU Shasha, *et al*. Screening, degradation characteristics and soil remediation of phthalate degrading bacteria[J]. Journal of Agricultural Environmental Sciences, 2018, 37(5): 933-940.

[10] 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 Zhidan, GAO Dawen, LI Zhe, *et al*. Isolation, identification and degradation characteristics of phthalate degrading bacteria[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2013, 45(12): 38-42.

[11] 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, 221-222: 80-85.

[12] KONG X, JIN D C, TAI X, *et al*. Bioremediation of dibutyl phthalate in a simulated agricultural ecosystem by *Gordonia* sp. strain QH-11 and the microbial ecological effects in soil[J]. Science of the Total Environment, 2019, 667: 691-700.

[13] 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, 10(30): 108-114.
LI Jianlong, SHAO Xiangli, LIU Shuliang, *et al*. Screening, identification and degradation characteristics of dibutyl phthalate degrading strain[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 10(30): 108-114.

[14] 张付海, 岳永德, 花日茂, 等. 一株邻苯二甲酸酯降解菌降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 79-83.
ZHANG Fuhai, YUE Yongde, HUA Rimao, *et al*. Degradation characteristics of a phthalate degrading bacterium[J]. Journal of Agricultural Environmental Science, 2007, 26(S): 79-83.

[15] 吴学玲, 金德才, 赵维良, 等. 4 株邻苯二甲酸二丁酯降解菌的分离鉴定及其相关降解基因的克隆[J]. 环境科学, 2009, 30(9): 2722-2727.
WU Xueling, JIN Decai, ZHAO Weiliang, *et al*. Isolation and identification of four DBP-degrading strains and molecular cloning of the degradation genes[J]. Environmental Science, 2009, 30(9): 2722-2727.

[16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG Xiuzhu, CAI Miaoying. Determinative manual for routine bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001.

[17] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrb* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109.

[18] YOON S H, HA S M, KWON S, *et al.* Introducing ezbiocloud: a taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.

[19] 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.

[20] 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.
LUO Zhuhua, HUANG Xiangling, YE Dezan. Research progress on biodegradation of environmental endocrine disruptor phthalates[J]. Journal of Applied and Environmental Biology, 2008, 14(6): 890-897.

[21] SAVINI V, FAZII P, FAVARO M, *et al*. Tuberculosis-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and *Gordonia*[J]. Microbes and Infection, 2012, 14(5): 401-410.

[22] TEBYANIAN H, HASSANSHAHIAN M, KARIMINIK A. Hexadecane-degradation by *Teskumurella* and *Stenotrophomonas* strains isolated from hydrocarbon contaminated soils[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2013, 6(7): e9182.

[23] CHICIUDEAN I, NIE Y, TĂNASE A M, *et al*. Complete genome sequence of *Tsukamurella* sp. MH1: a wide-chain length alkane-degrading actinomycete[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 268: 1-5.