

研究报告

一株邻苯二甲酸二丁酯降解菌的筛选及其降解特性

褚娇艳 刘腾飞 张汉虞 邱乐泉*

(浙江工业大学生物工程学院 浙江 杭州 310014)

摘要: 【目的】从自然环境中筛选邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)降解能力较强的微生物, 并研究其降解特性和代谢途径。【方法】从杭州市河道污水出口的淤泥中筛选到 DBP 降解菌 ZJUTW, 对其进行形态、生理生化特征、16S rRNA 基因序列分析, 考察该菌株对 DBP 的降解特性, 并用 GC-MS 分析降解中间产物。【结果】该菌株经鉴定为 *Arthrobacter* sp., 降解 DBP 的最适温度和最适 pH 值分别为 30 °C 和 7.0–8.0, 可降解多种邻苯二甲酸酯类化合物; 当 DBP 浓度为 800 mg/L 时, 半衰期为 10.47 h; 菌株的休止细胞($OD_{600}=1.2$)可在 20 h 内将 1 200 mg/L 的 DBP 完全降解。利用 GC-MS 进行中间产物分析, 该菌株可通过酯交换方式起始 DBP 的降解。【结论】*Arthrobacter* sp. ZJUTW 对 DBP 有较强的降解能力和较高的耐受性, 具有潜在的应用前景。

关键词: 邻苯二甲酸酯类, 邻苯二甲酸二丁酯, *Arthrobacter* sp., 生物降解

Screening and characterization of a dibutyl phthalate-degrading bacterium

CHU Jiao-Yan LIU Teng-Fei ZHANG Han-Yu QIU Le-Quan*

(College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

Abstract: [Objective] To screen efficient dibutyl phthalate-degrading bacterium from the environment. [Methods] A bacterial strain ZJUTW that could degrade dibutyl phthalate was isolated from sludge of river of Hangzhou city, and identified by morphological, physiological characteristics and the analysis of 16S rRNA gene sequence. Its dibutyl phthalate-degrading characteristics were studied. [Results] Strain ZJUTW was identified as *Arthrobacter* sp. The optimal temperature was 30 °C and optimal pH between 7.0 and 8.0. The degradation was best fitted by first-order kinetic equation and the half-life was 10.47 h at 800 mg/L dibutyl phthalate of initial concentration. Dibutyl phthalate of 1 200 mg/L could be completely degraded by the resting cell ($OD_{600}=1.2$) in 20 h. GC-MS analysis of the metabolites revealed that initial step of dibutyl phthalate degradation was transesterification. [Conclusion] Based on the high-tolerance ability and high removal rate of the isolated *Arthrobacter* sp. ZJUTW, this strain has a potential for remediation of hazardous phthalates.

Keywords: Phthalic acid esters, Dibutyl phthalate, *Arthrobacter* sp., Biodegradation

Foundation item: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY15C010002)

*Corresponding author: Tel: 86-571-88320658; E-mail: lqqiu@zjut.edu.cn

Received: February 18, 2017; Accepted: April 18, 2017; Published online (www.cnki.net): May 31, 2017

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(No. LY15C010002)

*通讯作者: Tel: 86-571-88320658; E-mail: lqqiu@zjut.edu.cn

收稿日期: 2017-02-18; 接受日期: 2017-04-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-31

邻苯二甲酸酯类化合物(Phthalic acid esters, PAEs)是世界上广泛使用的人工合成难降解有机化合物,主要用于塑料增塑剂、涂料、油漆等化工生产中^[1]。我国已将 PAEs 中的邻苯二甲酸-(2-乙基己基)酯(Dioctyl phthalate, DEHP)、邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)、邻苯二甲酸二乙酯(Diethyl phthalate, DEP)和邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate, DMP)列为环境优先污染物^[2]。已有证据表明,PAEs 是一类环境内分泌干扰物,其最明显的危害是使生殖机能下降,对动物及人类生殖系统有一定损害,可引起睾丸萎缩、精子减少、生殖细胞超微结构改变,且对胚胎发育有一定毒性作用^[3]。目前,PAEs 在全球主要工业国的生态环境中已达到了普遍检出的程度。PAEs 在环境中的水解、光解的速率非常缓慢,属于难降解物质,微生物降解被认为是自然环境中 PAEs 完全矿化的主要过程^[4]。DBP 是 PAEs 中的重要成员,前人研究中已分离到多种微生物表现出降解 DBP 的能力,如 *Gordonia* sp.^[5]、*Sphingomonas* sp.^[6]、*Arthrobacter* sp.^[7]、*Rhodococcus* sp.^[8]、*Acinetobacter* sp.^[9]等。经典的邻苯二甲酸酯降解途径认为,不管在有氧还是无氧条件下,PAEs 在相关酯酶作用下先水解为邻苯二甲酸单酯,再进一步水解为邻苯二甲酸(PA),在有氧环境下,邻苯二甲酸通过邻苯二甲酸双加氧酶催化生成二羟基邻苯二甲酸,再经过脱氢和脱羧最后形成原儿茶酸,原儿茶酸可通过正位或偏位开环形成相应的有机酸,进而转化成丙酮酸、琥珀酸、草酰乙酸等进入三羧酸循环,最终转化为 CO₂ 和 H₂O^[4]。为了获得高效的邻苯二甲酸酯降解菌株,有效解决邻苯二甲酸酯类化合物的环境污染,本研究从杭州河道污水出口的淤泥中分离并鉴定了一株 DBP 降解能力较强的菌株 *Arthrobacter* sp. ZJUTW,研究了其对 DBP 的降解特性、休止细胞降解能力,并对代谢途径进行了初步分析。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMP、DEP、DBP、DEHP 均为分析纯,国药

集团化学试剂有限公司;甲醇(色谱级),天津四友化工有限公司;其余试剂均为分析纯;细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、pUCm-T 载体,生工生物工程(上海)股份有限公司。JEM-1230 型透射电镜,日本 JEOL 公司;Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 6890N/5975c 型 GC-MS,美国 Agilent 公司。

1.2 培养基

基础无机盐培养基(g/L): K₂HPO₄·3H₂O 1.0, NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.4, CaCl₂ 0.075 5, FeCl₃ 0.014 3, pH 7.0。

选择培养基:每升无机盐培养基加适量 DBP 的甲醇溶液,使 DBP 终浓度为 125 mg/L。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。

1.3 方法

1.3.1 DBP 降解菌的筛选与鉴定:取杭州市河道污水出口处淤泥 1 g 置于 100 mL 水中,混匀,静置,然后取 1 mL 加入到 250 mL 选择培养基中,DBP 初始浓度为 125 mg/L,30 °C、180 r/min 培养 4 d,重复多次驯化。将有明显生长的培养液稀释涂布培养,同时检测 DBP 降解情况,平板涂布法分离得到单菌落,挑取单菌落进行形态、生理生化分析。采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌株 ZJUTW 基因组,以通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')扩增 16S rRNA 基因序列^[10]。50 μL PCR 反应体系为:10×PCR buffer 5 μL, 20 mmol/L dNTPs 4 μL, 25 mmol/L 引物各 1.0 μL, 菌体 DNA 1 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 1 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件为:94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,采用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收 16S rRNA 基因片段,然后克隆至 pUCm-T 载体,并由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序,用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树。

1.3.2 不同培养条件对菌株降解 DBP 的影响: 将筛选到的菌株接种到 LB 培养基, 30 °C、180 r/min 培养 12 h, 4 °C、4 000 r/min 离心收集细胞, 用无机盐液体培养基重悬至菌液浓度 OD_{600} 约为 1.0, 以此作为种子液, 按 2% 的接种量, 通过改变培养基初始 pH、温度、DBP 浓度等条件, 考察各生长因素对菌株降解 DBP 的影响, 并考察了该菌株的底物利用情况和对 PAEs 混合底物(DMP、DEP、DBP、DEHP 各 125 mg/L)的降解能力。

有机污染物的降解可采用模型进行降解动力学分析^[11]。DBP 的降解是微生物胞内酶作用完成的, 属酶促反应, 其反应过程应符合米氏方程: $V=V_m[C]/(K_m+[C])$, 方程中 $[C]$ 表示底物浓度, V 为反应速率, K_m 表示最大反应速度达一半时的底物浓度; 当 $[C] \ll K_m$ 时, 为一级反应, 方程可写为 $\ln C = -Kt + A$ (C 为初始 DBP 浓度, t 为时间, K 为反应速率常数, A 为常数)。假设菌株对 DBP 的生物降解遵循一级反应动力学方程, 将降解过程中 DBP 残留浓度的测定数据进行对数转换, 用 Origin 8.0 软件拟合降解动力学方程, 并计算 DBP 的半衰期 $t_{1/2} = \ln 2 / K$ 。

1.3.3 休止细胞的制备及对 DBP 的降解: 将菌株接种到 LB 培养基, 30 °C、180 r/min 培养到对数末期, 4 °C、4 000 r/min 离心收集细胞, 用无菌水洗一次, 沉淀悬浮于 pH 7.0 的 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液中, 制成菌悬液, 使其菌体浓度至 OD_{600} 为 1.2。加入 DBP 至终浓度分别为 125、250、400、800 和 1 200 mg/L, 考察对休止细胞降解 DBP 的影响。

1.3.4 HPLC 法检测 PAEs: 取经不同处理的培养液, 加入等体积二氯甲烷, 剧烈振荡后静置 30 min, 将水相再次用等体积二氯甲烷萃取, 将两次萃取的有机相合并, 旋转蒸发仪上蒸干后用 1 mL 甲醇溶解, 以 10 μ L 进样, 用 Agilent 1260 HPLC 检测, 检测条件为: 流动相: 90% 甲醇+10% H_2O , 流速 1.0 mL/min, Hypersil BDS C_{18} 色谱柱, 二极管阵列(DAD)检测器, 检测波长 235 nm。

1.3.5 GC-MS 测定降解产物: 色谱条件: 色谱柱为 HP-5MS (30 m \times 250 mm \times 0.25 μ m); 载气为高纯度 He, 载气流速 1.0 mL/min; 进样口温度: 250 °C; 柱温条件: 初始温度 60 °C, 保持 1 min, 以 60 °C/min 升温至 220 °C, 保持 2 min, 以 5 °C/min 升温至 250 °C, 保持 2 min, 再以 5 °C/min 升温至 280 °C, 保持 3 min; 进样量 1 μ L, 不分流进样。质谱条件: 电子轰击(EI)离子源; 电离能量 70 eV; 离子源温度 230 °C; 接口温度 280 °C; 全扫描(SCAN)质量范围: 40–400 m/z ; 选择离子扫描(SIM)。

1.3.6 数据分析: 研究中各处理采用 3 次重复, 用 Origin 8.0 软件进行误差线作图(均值 \pm 标准差), 用 SPSS 16.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 DBP 降解菌的筛选与分离

经过筛选后分离到一株 DBP 降解菌株 ZJUTW, HPLC 分析结果表明(图 1), 培养 12 h 后, 菌株已将 125 mg/L DBP 显著降解。在固体选择平板上形成的菌落呈圆形, 凸起, 湿润有光泽, 乳白色, 不透明。在透射电镜下(图 2)呈短杆状, 无鞭毛。大小约(0.6–1.0) μ m \times 0.35 μ m。此外, 菌株生长 4 h 多呈杆状, 而生长 24 h 则多呈球状, 说明菌株 ZJUTW 在生长过程中存在球、杆形态变化。对该菌株进行生理生化试验, 结果表明明胶液化试验、淀粉水解试验、反硝化试验、柠檬酸盐试验、接触酶试验呈阳性; 吡嗪试验、甲基红试验、伏-普试验、葡萄糖发酵试验、木糖发酵试验结果呈阴性。PCR 扩增 16S rRNA 基因(1 579 bp), GenBank 中的序列登录号为 JN968374, 用 MEGA 4.0 构建系统发育树(图 3), 该菌株与 *Arthrobacter* sp. S15 在同一个系统发育分支; 结合形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 表明该菌株与 *Arthrobacter* 属分类特征相符, 将其命名为 *Arthrobacter* sp. ZJUTW。

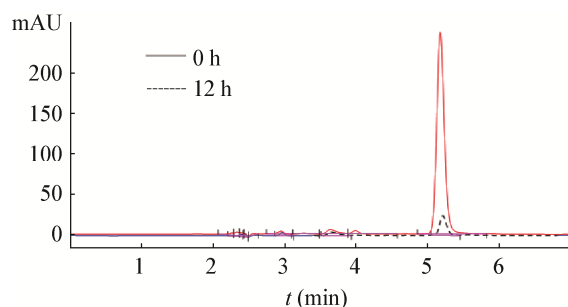


图1 菌株 ZJUTW 降解 DBP 的 HPLC 图

Figure 1 HPLC-chromatogram of the degradation of DBP by strain ZJUTW

2.2 初始 pH 和温度对菌株 ZJUTW 降解 DBP 的影响

培养基初始 pH 分别设置为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, DBP 浓度为 125 mg/L, 2%接种量的条件下, 菌株 ZJUTW 对 DBP 的降解如图 4A 所示。在初始 pH 为 6.0–9.0 时, DBP 均被快速降解, 其中 pH 7.0–8.0 的降解最优, 在 14 h 将 DBP 基本完全降解, 而当初始 pH 为 5.0 时, 菌株 ZJUTW 只降解 23.8% 的 DBP, 说明最适 pH 为 7.0–8.0。

在不同培养温度(25、30、37、42 °C)、DBP 初始质量浓度为 125 mg/L, 2%接种量的条件下, 菌株 ZJUTW 对 DBP 的降解如图 4B 所示。在 30 °C

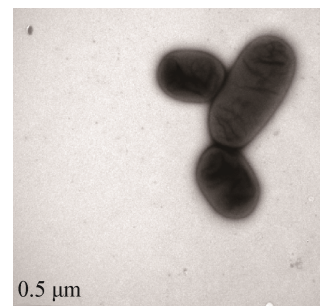


图2 菌株 ZJUTW 的透射电镜图

Figure 2 Photograph of transmission electron microscope of strain ZJUTW

和 37 °C 时, 培养 14 h 菌株 ZJUTW 均基本完全降解 DBP, 其中以 30 °C 最优, 而在 25 °C 只能降解 36%, 42 °C 的降解率则只有 9.6%。

2.3 DBP 浓度对菌株 ZJUTW 降解的影响

不同底物浓度对菌株 ZJUTW 降解 DBP 的影响如图 5 所示, 菌株 ZJUTW 对初始浓度分别为 125、250、400 及 800 mg/L 的 DBP 14 h 的降解率分别为 98.5%、93.1%、93.9%和 83.4%。但是当 DBP 浓度升至 1 200 mg/L 时, 菌株 ZJUTW 对其只能降解 23.6%左右。DBP 的微生物降解是酶促反应过程, 菌株对 DBP 的降解在 125–800 mg/L 符合酶促一级反应动力学模型(表 1), 遵循一级反应动

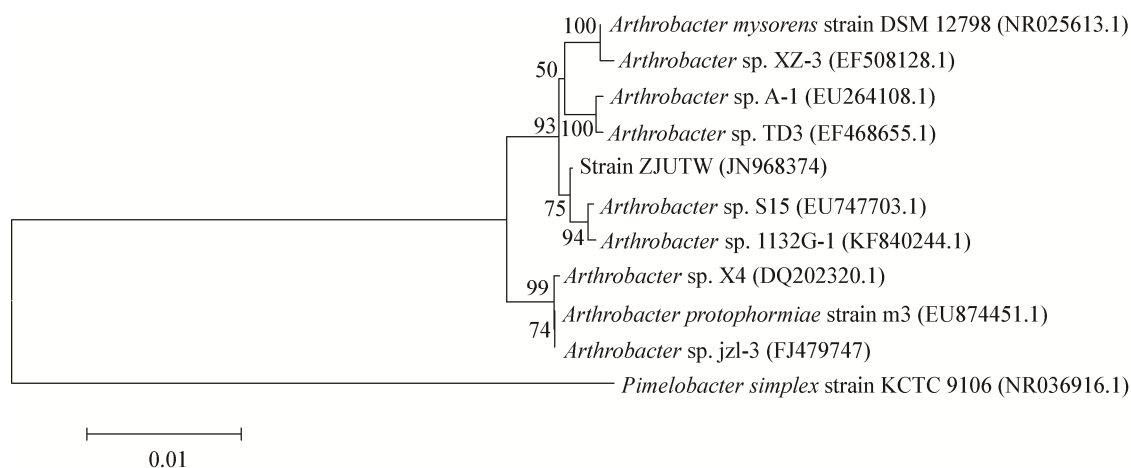
图3 *Arthrobacter* sp. ZJUTW 的系统进化发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Arthrobacter* sp. ZJUTW

注: 采用邻接法计算距离, 节点上的数值是自展值(%), 括号中为菌株的登录号。

Note: Distances were calculated using neighbor-joining method. The numbers at the branch nodes are bootstrap values (%). Accession numbers of the bacterial isolates are shown in brackets.

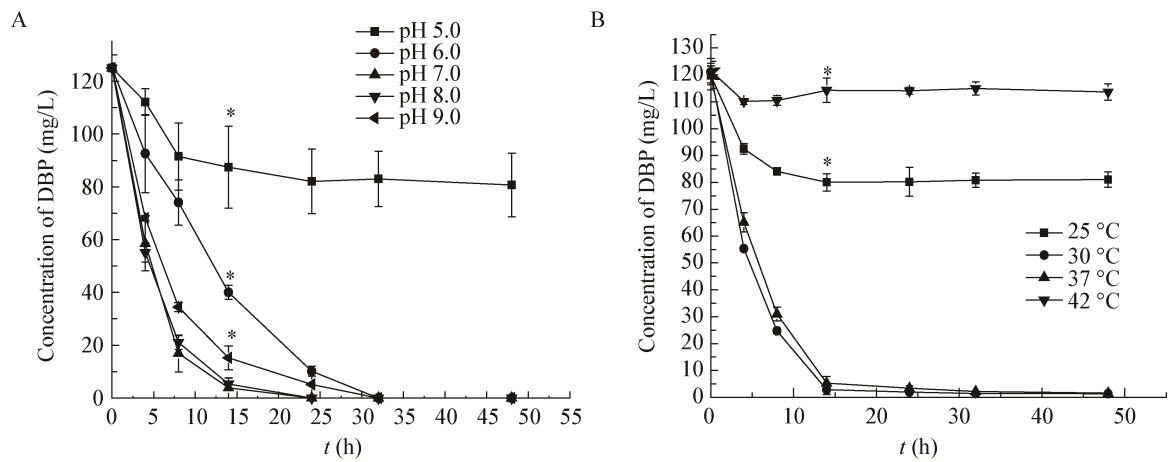


图 4 初始 pH (A)与温度(B)对菌株 ZJUTW 降解 DBP 的影响

Figure 4 Effect of pH (A) and temperature (B) on degradation of DBP by *Arthrobacter* sp. ZJUTW

注：误差线代表标准差，星号(*)代表显著性差异(P<0.05).

Note: Error bars indicate standard deviation. Asterisks (*) indicate a significant difference between treatments (P<0.05).

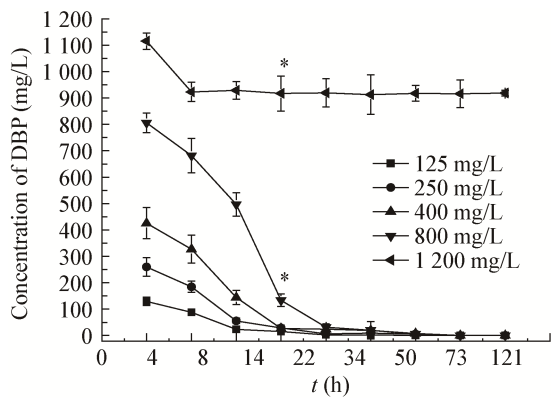


图 5 不同底物浓度对菌株降解 DBP 的影响

Figure 5 Effect of different initial DBP concentrations on degradation by *Arthrobacter* sp. ZJUTW

注：误差线代表标准差，星号(*)代表显著性差异(P<0.05).

Note: Error bars indicate standard deviation. Asterisks (*) indicate a significant difference between treatments (P<0.05).

表 1 <i>Arthrobacter</i> sp. ZJUTW 对 DBP 的降解动力学		
Table 1 Kinetics of aerobic DBP degradation by <i>Arthrobacter</i> sp. ZJUTW		
初始 DBP 浓度 Initial concentration (mg/L)	Kinetic equations	$t_{1/2}$ (h)
125	$\ln C = -0.1218t + 4.6045$	5.69
250	$\ln C = -0.1119t + 5.3055$	6.19
400	$\ln C = -0.0804t + 5.9192$	8.62
800	$\ln C = -0.0662t + 6.8437$	10.47

力学方程： $\ln C = -Kt + A$ (C 为初始 DBP 浓度， K 为反应速率常数， A 为常数)，DBP 浓度在 800 mg/L，其半衰期也仅为 10.47 h，说明该菌株对 DBP 有较高的降解能力，同时对 DBP 的耐受浓度也可达 1 200 mg/L。

2.4 菌株 ZJUTW 的底物利用情况及其对 PAEs 混合物的降解

以不同底物为唯一碳源培养菌株 ZJUTW，以考察其底物利用情况，结果表明：菌株 ZJUTW 能够在以 DMP、DEP、DBP 为唯一碳源的培养基上生长良好，在 DEHP、PA 及邻苯二酚为唯一碳源的培养基上可以生长，但是无法在以萘、噻吩、呋唑以及苯酚为唯一碳源的培养基上生长。以 4 种 PAEs 混合物为底物(DMP、DEP、DBP、DEHP 各 125 mg/L)、2%接种量、30 °C、pH 7.0 的条件下，菌株 ZJUTW 对 PAEs 混合物的降解如图 6A 所示。在 24 h 内，菌株 ZJUTW 能够将 DBP、DEP 和 DMP 完全降解，其中以 DBP 最快，在 12 h 降解了 96.2%，其次为 DEP 和 DMP，而 DEHP 则降解效果最差，培养 24 h 后降解率只有 25%；说明在混合底物中，DBP 为最适底物，由于 DEHP 具有较长的碳链，降解也难度更大。

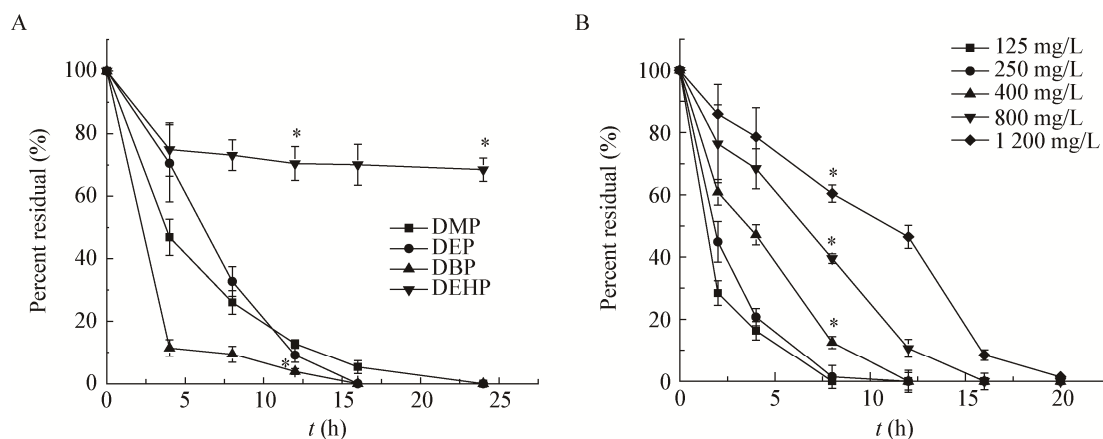


图6 *Arthrobacter sp. ZJUTW* 对 PAEs 混合物的降解(A)及其休止细胞对不同浓度 DBP 的降解(B)
Figure 6 Degradation of mixed PAEs (A) by *Arthrobacter sp. ZJUTW* and different initial DBP concentrations (B) by resting cells

注：误差线代表标准差，星号(*)代表显著性差异($P < 0.05$).

Note: Error bars indicate standard deviation. Asterisks (*) indicate a significant difference between treatments ($P < 0.05$).

2.5 底物浓度对休止细胞降解 DBP 的影响

生长细胞受到外界化学或物理作用后会相应地发生变化,如基因表达、蛋白稳定性的变化等^[9]。而采用休止细胞则可以避免这种影响,同时还具有反应专一性强,可以提高底物转化率,不易染杂菌,可减少产物对菌体生长及酶合成的抑制^[10]等优点,因此利用休止细胞进行底物降解或转化有明显优势。在不同 DBP 浓度(125–1 200 mg/L)的磷酸缓冲液,加入菌株 ZJUTW 的休止细胞至 OD_{600} 为 1.2, 30 °C、180 r/min 考察其对 DBP 的降解,结果如图 6B 所示。休止细胞在 8 h 内可将 125 mg/L 和 250 mg/L 的 DBP 完全降解。随着 DBP 浓度的增加, DBP 被完全降解的时间也延长,当初始 DBP 浓度为 1 200 mg/L 时,休止细胞也可在 20 h 将其完全降解。而生长细胞虽然可耐受 1 200 mg/L 的 DBP,但降解率很低(23.6%),说明休止细胞的降解效果远优于生长细胞。

2.6 DBP 降解中间产物分析

采用 GC-MS 分析菌株 ZJUTW 降解 DBP 的中间产物,结果如图 7A、B 所示。降解产物中出现邻苯二甲酸丁基甲酯(Butyl methyl phthalate, BMP)、邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate,

DMP)和邻苯二甲酸(Phthalic acid, PA),推测当存在甲醇时,菌株先通过 DBP 酯酶催化酯交换反应,将甲醇的甲基转移置换出一个丁基形成不对称酯,然后再转移甲基置换出另一个丁基形成 DMP,其后再通过酯水解反应形成 PA,因此其降解的起始步骤为: DBP→BMP→DMP→PA (图 8)。

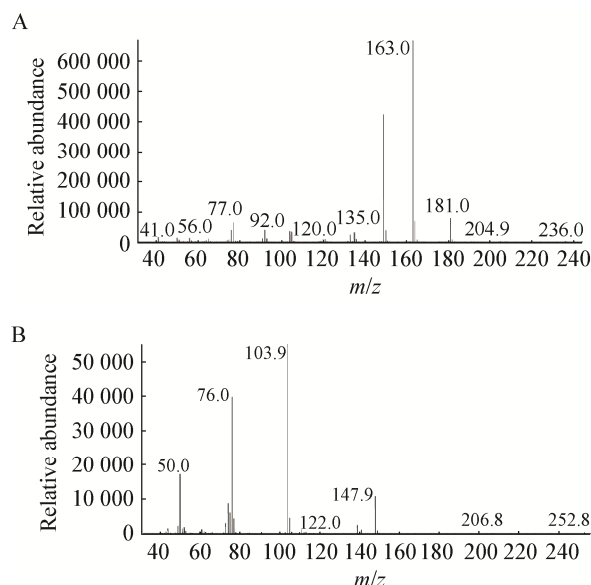


图7 邻苯二甲酸丁基甲酯(A)与邻苯二甲酸(B)质谱图
Figure 7 Mass spectrum of butyl methyl phthalate (A) and phthalic acid (B)

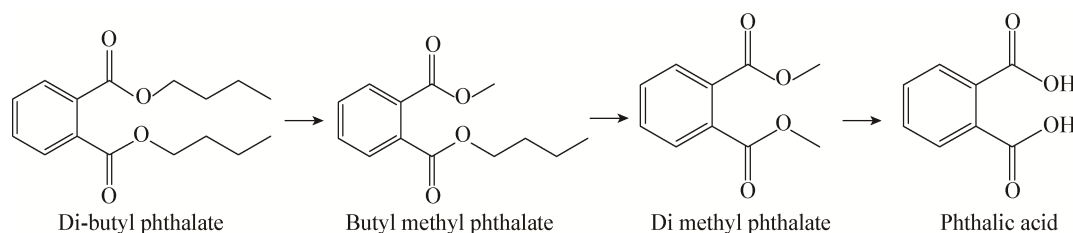


图 8 DBP 的降解途径

Figure 8 The degradation pathway of DBP by *Arthrobacter* sp. ZJUTW

3 讨论

Arthrobacter 是一类广泛存在于自然环境中的革兰氏阳性菌,已发现该属的微生物具备降解多种有机污染物的能力。目前也已发现多个菌属的微生物具备 DBP 降解能力,如 Wang 等分离到一株 *Arthrobacter* sp. ZH2^[7]降解 500 mg/L DBP 的 $t_{1/2}$ 为 10.19 h; Jin 等^[5]分离到一株 *Gordonia* sp. strain QH-11 降解 750 mg/L DBP 的 $t_{1/2}$ 为 17.51 h;而 *Rhodococcus* sp. JDC-11^[8]则表现出更强的降解能力,可在 24 h 内将 1 000 mg/L 的 DBP 完全降解。本研究筛选到的 *Arthrobacter* sp. ZJUTW 生长细胞可完全降解 800 mg/L 的 DBP, $t_{1/2}$ 为 10.47 h,且其休止细胞降解能力远优于生长细胞,可在 20 h 降解 1 200 mg/L 的 DBP,表现出较强 DBP 降解能力,具有较好的研究价值。

细菌对 PAEs 的代谢途径已有较多的研究,PAEs 代谢过程中酯键分解是起始降解的关键步骤。目前文献对该起始步骤主要涉及的有酯水解反应^[12]、酯交换反应^[13]以及 β 氧化反应^[14]等方式。本研究根据 GC-MS 中间产物分析发现在以甲醇为溶剂时, *Arthrobacter* sp. ZJUTW 可通过酯交换反应方式起始降解。目前对 PAEs 的微生物降解研究基本集中在酯水解方式上,但由于环境污染物中成分非常复杂,常有醇类污染物存在,极有可能同时存在多种起始降解方式,因此,通过对多种降解方式差异的比较,阐明 PAEs 的微生物代谢机理,将有助于更透彻地了解 PAEs 在环境中的行为。

4 结论

从杭州市河道污水出口处淤泥中筛选到一株 DBP 降解菌,经初步鉴定并命名为 *Arthrobacter* sp. ZJUTW,并考察了不同因子对该菌株降解 DBP 的影响。结果表明,该菌株降解 DBP 的最优 pH 为 7.0–8.0,最适温度为 30 °C,在 DBP 浓度为 800 mg/L 时, $t_{1/2}$ 为 10.47 h,且可耐受 1 200 mg/L 的 DBP;此外,该菌株的休止细胞表现出远优于生长细胞的降解能力,可在 20 h 将 1 200 mg/L 的 DBP 完全降解。采用 GC-MS 分析对菌株 ZJUTW 降解 DBP 的中间产物进行分析,发现降解产物中出现 BMP、DMP 和 PA,表明该菌株采用酯交换方式起始 DBP 的降解,推测其降解的起始步骤为: DBP→BMP→DMP→PA。

参考文献

- [1] Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, et al. The environmental fate of phthalate esters: a literature review[J]. *Chemosphere*, 1997, 35(4): 667-749
- [2] Hu XY, Zhang KR, Sun JH, et al. Study on contamination of phthalic acid esters in Chinese environment[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2003, 13(1): 9-14 (in Chinese)
胡晓宇, 张克荣, 孙俊红, 等. 中国环境中邻苯二甲酸酯类化合物污染的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2003, 13(1): 9-14
- [3] Petersen JH, Breindahl T. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2000, 17(2): 133-141
- [4] Luo ZH, Huang XL, Ye DZ. Advances in research of biodegradation of environmental endocrine disruptors — phthalate esters[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2008, 14(6): 890-897 (in Chinese)
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
- [5] Jin DC, Bai ZH, Chang DD, 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
- [6] Whangsuk W, Sungkeeree P, Nakasiri M, et al. Two endocrine disrupting dibutyl phthalate degrading esterases and their compensatory gene expression in *Sphingobium* sp. SM42[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 99: 45-54
- [7] Wang YY, Miao B, Hou DM, et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate and expression of the 3,4-phthalate dioxygenase gene in *Arthrobacter* sp. ZH₂ strain[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(6): 936-940
- [8] Jin DC, Liang RX, Dai QY, 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
- [9] Wu J, Liao XW, Yu FB, et al. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2483-2491
- [10] Fang CR, Yao J, Zheng YG, et al. Dibutyl phthalate degradation by *Enterobacter* sp. T5 isolated from municipal solid waste in landfill bioreactor[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(6): 442-446
- [11] Zeng F, Cui KY, Li XD, et al. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(9): 1125-1129
- [12] Xu XR, Li HB, Gu JD. Metabolism and biochemical pathway of *n*-butyl benzyl phthalate by *Pseudomonas fluorescens* B-1 isolated from a mangrove sediment[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, 68(3): 379-385
- [13] Okamoto Y, Toda C, Ueda K, et al. Transesterification in the microbial degradation of phthalate esters[J]. Journal of Health Science, 2011, 57(3): 293-299
- [14] Wu XL, Liang RX, Dai QY, 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

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一，主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展，其内容要求新颖丰富，观点明确，论述恰当，应包含作者自己的工作内容和见解。因此，作者在动笔之前必须明确选题，一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面，在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势，即掌握其内在的精髓，深入到专题研究的本质，论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望，提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外，作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法，辅以注释，客观而有少量评述，使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是：(1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介，并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现，同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文，引用文献数量不限。