

研究报告

磷酸三(1-氯-2-丙基)酯降解菌筛选及其降解特性

罗庆*, 张截流, 吴中平, 王聪聪, 李瑜婕

沈阳大学 区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

罗庆, 张截流, 吴中平, 王聪聪, 李瑜婕. 磷酸三(1-氯-2-丙基)酯降解菌筛选及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1481-1490.

LUO Qing, ZHANG Jieliu, WU Zhongping, WANG Congcong, LI Yujie. Screening of tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate-degrading bacteria and its degradation characteristics[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1481-1490.

摘要:【背景】磷酸三(1-氯-2-丙基)酯[tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate, TCIPP]作为全球广泛关注的新兴有机污染物, 具有环境赋存含量高、不易生物降解等特点, 亟须开发 TCIPP 的高效去除技术。【目的】获得具有较高 TCIPP 降解效率并可用于 TCIPP 污染修复的新菌株。【方法】利用梯度提高无机盐培养基中 TCIPP 浓度的方法, 从 TCIPP 污染土壤中筛选出 1 株能够降解液体中高浓度 TCIPP (100 mg/L)的菌株, 根据 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定, 并首次对其降解液体中 TCIPP 的特性进行研究。【结果】所筛选的 TCIPP 降解菌株 DT-6 为苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.), 它能够利用 TCIPP 作为唯一碳源和能源; 当 TCIPP 初始浓度为 50 mg/L、培养时间为 7 d 时 DT-6 的生物量最大, 对 TCIPP 的降解率也达到最高, 为 34.6%; 蔗糖的加入能够显著促进 DT-6 的生长, 但却抑制了其对 TCIPP 的降解。【结论】本研究报道了一株 TCIPP 高效降解菌 *Ochrobactrum* sp. DT-6, 能够为环境中 TCIPP 污染的生物修复提供新的种质资源。

关键词: 磷酸三(1-氯-2-丙基)酯; 微生物降解; 菌株筛选; 降解特性

Screening of tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate-degrading bacteria and its degradation characteristics

LUO Qing*, ZHANG Jieliu, WU Zhongping, WANG Congcong, LI Yujie

Key Laboratory of Eco-restoration of Regional Contaminated Environment, Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: [Background] Tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate (TCIPP), as an emerging organic

资助项目: 沈阳市中青年科技创新人才支持计划(RC220128); 国家自然科学基金(41807384)

This work was supported by the Shenyang Young and Middle-aged Scientific and Technological Innovation Talents Project (RC220128) and the National Natural Science Foundation of China (41807384).

*Corresponding author. E-mail: luoqingyt@126.com

Received: 2022-12-27; Accepted: 2023-02-15; Published online: 2023-03-07

pollutant of global wide concern, has the characteristics of high environmental concentration, difficult biodegradation, etc. It is urgent to develop efficient removal technology for TCIPP. **[Objective]** To obtain a new strain with high TCIPP degradation efficiency that can be used for TCIPP pollution remediation. **[Methods]** The strain which could degrade TCIPP with high concentration (up to 100 mg/L) in liquid was isolated from the TCIPP-contaminated soil by gradually increasing the concentration of TCIPP in the mineral salt medium. The strain was preliminarily identified according to 16S rRNA gene sequence analysis, and its characteristics of degrading TCIPP in liquid were further investigated. **[Results]** The strain DT-6 was identified as *Ochrobactrum* sp., and it could utilize TCIPP as the only carbon and energy source. When the initial concentration of TCIPP was 50 mg/L and the incubation time was 7 d, the biomass of the DT-6 strain was the largest and the degradation rate of TCIPP reached the highest (34.6%). The addition of sucrose significantly promoted the growth of the DT-6 strain but inhibited the degradation of TCIPP. **[Conclusion]** This study reported a highly efficient TCIPP-degrading strain, *Ochrobactrum* sp. DT-6, which could provide new germplasm resources for the bioremediation of TCIPP pollution in the environment.

Keywords: tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate; microbial degradation; strain screening; degradation characteristics

由于多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)的全球禁用,作为其主要替代品的有机磷系阻燃剂(organophosphate flame retardants, OPFRs)大量并广泛应用于油漆、润滑剂、液压油、地板抛光剂和消泡剂等制品中^[1]。OPFRs主要是以物理添加的方式加入最终产品,这使得其极易通过磨损、泄露等方式释放到周围环境中^[2]。目前,水、土、气等各类环境介质及血液、母乳等生物样品中均高频率、高浓度地检出 OPFRs^[3-6]。研究表明 OPFRs 具有生殖、发育、神经、基因和免疫系统毒性^[7]。因此,OPFRs 已成为全球重点关注的新兴有机污染物。磷酸三(1-氯-2-丙基)酯[tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate, TCIPP]是一种典型的氯代 OPFRs,不仅使用量较大,约占总 OPFRs 的 55%^[1],而且具有较高的环境赋存含量,是大多数环境样品中丰度最高的 OPFR,浓度最高可达 2 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5,8-9],且不易被生物降解^[10]。因此,亟须开发出不同环境介质中 TCIPP 的高效去除

技术。

目前,采用水解和光降解方式去除环境中的 TCIPP 已有较多研究。例如, Su 等^[11]研究发现在碱性条件下 TCIPP 能在 35 d 内被广泛水解; Fang 等^[12]研究指出三价铁系矿物的存在促进了包括 TCIPP 在内的氯代 OPFRs 的水解反应; Yu 等^[13-14]采用 UV/TiO₂ 光催化和紫外活化过氧化氢技术降解水体中的 TCIPP。此外, Qin 等^[15]采用人工湿地的方式来去除 TCIPP,运行 6 个月时 TCIPP 的去除率达到 26%–28%;本课题组也研究了生物炭吸附去除水中 TCIPP 的方法^[16]及植物修复去除土壤中 TCIPP 的技术^[17]。微生物降解被认为是最具应用潜力的有机污染物去除技术,然而筛选能够高效降解 TCIPP 的微生物并利用其降解 TCIPP 的相关研究还未见报道,因此开展 TCIPP 的微生物降解研究极有必要。同时,人工湿地和植物修复去除 TCIPP 的研究均表明微生物在 TCIPP 的去除过程中起着非常重要的作用^[15,17]。此外,已有多个利用

微生物降解磷酸三(2-氯乙基)酯[tris-(2-chloroethyl) phosphate, TCEP]^[18-19]和磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯[tris[2-chloro-1-(chloromethyl) ethyl] phosphate, TDCPP]^[18]两种氯代 OPFRs 的研究报道。这说明采用微生物降解 TCIPP 是切实可行的。

本研究通过从 TCIPP 污染土壤中富集纯化筛选得到以 TCIPP 为唯一碳源生长的降解微生物, 并开展其降解特性研究, 以期对 TCIPP 污染环境介质修复提供新的微生物种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

分离筛选菌种所用土壤样品为沈阳市某 TCIPP 污染时间长、污染浓度高的土壤。

无机盐培养基(g/L)^[20]: MgSO₄ 0.20, FeCl₃ 0.005, CaCl₂ 0.01, KH₂PO₄ 1.50, NaNO₃ 4.00, Na₂HPO₄ 0.50, pH 值调节至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。LB 培养基(g/L): 酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.00, NaCl 10.00, pH 值调节至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。固体培养基: 在相应液体培养基上加入 16–20 g/L 琼脂。

MgSO₄、KH₂PO₄、琼脂粉和蛋白胨, 国药集团化学试剂有限公司。紫外-可见分光光度计, 岛津公司; 气相色谱-三重四级杆质谱联用仪(GC-MS/MS), 赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 降解菌的筛选与分离

称取 2 g 土壤样品加入 TCIPP 浓度为 10 mg/L 的 100 mL 无机盐液体培养基中, 于 35 °C、160 r/min 恒温振荡培养 7 d, 然后吸取 10 mL 菌液转移至 TCIPP 浓度为 20 mg/L 的 90 mL 无机盐液体培养液中, 重复上述步骤, 依次提高 TCIPP 浓度为 30、40 和 50 mg/L。

吸取 1 mL 最后一个培养周期的悬浮液, 用无菌水稀释 10⁶–10⁸ 倍后接种至含有 50 mg/L TCIPP 的无机盐固体培养基上, 于 35 °C 恒温培养 12–36 h。待菌落生长至大小适中后, 通过多次平板划线分离后得到单一 TCIPP 降解菌。上述所有操作均在无菌条件下进行。

1.2.2 菌悬液的制备

无菌条件下, 将筛选分离得到的单菌落接种至灭菌的 LB 液体培养基中, 于 35 °C、160 r/min 恒温振荡培养 24 h。将培养后的菌液于 12 840×g 离心 5 min, 弃去上清液, 然后加入适量的无菌水洗涤, 重复上述洗涤过程 3 次, 用无菌水定容得到 OD₆₀₀ 为 1.0 的菌悬液。

1.2.3 菌株的降解能力验证

无菌条件下, 在 50 mL 广口三角瓶中加入 20 mL TCIPP 浓度为 10 mg/L 的无机盐液体培养基和 2 mL 菌悬液, 于 35 °C、160 r/min 避光恒温振荡培养 7 d, 然后测定菌株的生长情况和 TCIPP 残留量。空白对照实验采用 121 °C 高温灭菌 20 min 的菌悬液。每种处理 3 个重复。

1.2.4 生长及降解曲线的测定

无菌条件下, 在 50 mL 广口三角瓶中加入 20 mL TCIPP 浓度为 50 mg/L 的无机盐液体培养基和 2 mL 菌悬液, 于 35 °C、160 r/min 下避光恒温振荡培养, 分别在 1、3、5、7、9、11、14 和 21 d 取样, 测定样品中 TCIPP 含量, 同时监测菌株 OD₆₀₀ 的变化。同时设置未添加菌悬液的处理作为对照, 每种处理 3 个重复。

1.2.5 培养条件对 TCIPP 降解效果的影响测定

1) 培养时间与 TCIPP 初始浓度

无菌条件下, 在 50 mL 广口三角瓶中加入 20 mL TCIPP 浓度分别为 10、25、50、75 和 100 mg/L 的无机盐液体培养基和 2 mL 菌悬液

(TCIPP降解效果最好的菌株),于35℃、160 r/min 分别避光恒温振荡培养 1、3、5、7、9、11、14 和 21 d,然后测定菌株的生长情况和 TCIPP 残留量。空白对照实验采用 121℃高温灭菌 20 min 的菌悬液。每种处理 3 个重复。

2) 外加碳源

无菌条件下,在 50 mL 广口三角瓶中加入 20 mL TCIPP 浓度为 50 mg/L 的无机盐液体培养基、5 g 外加碳源(分别为蔗糖、蛋白胨和酵母粉)和 2 mL 菌悬液(TCIPP 降解效果最好的菌株),于 35℃、160 r/min 分别避光恒温振荡培养 7 d,然后测定菌株的生长情况和 TCIPP 残留量。同时设置未添加碳源的处理,空白对照实验采用 121℃高温灭菌 20 min 的菌悬液。每种处理 3 个重复。

1.2.6 菌株生长量测定

采用比浊法测定菌液的浓度,即使用紫外分光光度计于波长 600 nm 处测定其吸光度值。

1.2.7 TCIPP 分析

萃取:培养液经 12 840×g 离心 5 min 后,将上清液转移至分液漏斗中,加入 10 ng 内标物氘代磷酸三正丁酯(TnBP-*d*₂₇),振荡均匀;然后加入 20 mL 二氯甲烷,均匀振荡萃取 20 min,收集萃取液,重复该萃取过程 3 次,合并萃取液;萃取液经无水硫酸钠脱水后,旋转蒸发至近干,用色谱纯正己烷定容至 1 mL,待 GC-MS/MS 分析测定。

GC-MS/MS 测定条件:色谱柱为 TG-5SILMS (30 m×0.25 mm×0.25 μm),流速为 1 mL/min,进样量为 1 μL。色谱柱升温程序:初始柱温 50℃,保持 1 min;以 10℃/min 升至 180℃,保持 8 min;以 20℃/min 升至 240℃,保持 8 min;以 3℃/min 升至 255℃,再以 30℃/min 升至 300℃,保持 5 min。进样口、离子源和传输线温度分别为 250、250 和 280℃,多反应监

测模式进行扫描。TCIPP 保留时间为 18.25 min,母离子为 201.0,对应的子离子分别为 125.0(碰撞能为 10 eV)、99.0(碰撞能为 20 eV),其中 125.0 作为定量离子。

1.2.8 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA,然后利用细菌鉴定通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAGC-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') PCR 扩增 16S rRNA 基因,引物由北京奥维森科技有限公司合成。PCR 反应体系:2×TsingKE Master Mix 25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 补足 22 μL。PCR 反应条件:94℃ 10 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1.5 min,30 个循环;72℃ 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,割胶纯化 PCR 产物。将纯化后的 PCR 产物送往北京奥维森科技有限公司进行序列测定,将序列提交 NCBI 后通过 BLAST 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比性分析。

1.2.9 数据处理

试验数据处理与图形绘制采用 Origin 9.0 完成,单因素方差分析采用 SPSS 24.0 完成。TCIPP 降解率计算公式:

$$R(\%) = (C_1 - C_2) / C_1 \times 100$$

式中:R 为菌株对 TCIPP 的降解率(%);C₁ 为试验结束时空白对照培养液中 TCIPP 的浓度(mg/L);C₂ 为试验结束时各接菌处理培养液中 TCIPP 的浓度(mg/L)。

2 结果与分析

2.1 TCIPP 降解菌株的筛选

经富集驯化培养、分离纯化获得 8 株生长良好且菌落形态各异的菌株,分别编号为 DT-1、DT-2、DT-3、DT-4、DT-5、DT-6、DT-7 和 DT-8。各菌株在以 TCIPP (10 mg/L)为唯一碳源的无机

盐液体培养基培养 7 d 后, 测定菌株的生长量及其对 TCIPP 的降解情况(表 1)。其中, 菌株 DT-6 的生长情况最好, OD_{600} 显著高于其他菌株; 而且菌株 DT-6 对 TCIPP 的降解能力也最强, 降解率为 29.1%, 显著高于其他菌株。因此, 选择菌株 DT-6 作为进一步研究的对象。

2.2 降解菌株的鉴定

菌株 DT-6 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的 *Ochrobactrum* sp. 序列高度相似(序列一致性最高为 99.83%), 在分子系统发育分类上属于苍白杆菌, 挑选相似度大于 97% 的序列采用 MEGA 11.0 软件按邻接法构建系统发育树(图 1)。

2.3 生长及降解曲线的测定结果

菌株 DT-6 在无机盐液体培养基中培养 21 d 的生长曲线及其对 TCIPP 的降解情况如图 2 所示, 在以 TCIPP 为唯一碳源的培养过程中, 菌

表 1 筛选菌株的生长情况及其对 TCIPP 的降解率
Table 1 The growth of screened strains and their degradation rates of TCIPP

菌株 Strains	OD_{600}	TCIPP 降解率 Degradation rates of TCIPP (%)
DT-1	1.36±0.11ab	19.5±1.38ab
DT-2	1.52±0.13b	21.5±1.53b
DT-3	0.99±0.15c	7.01±0.76c
DT-4	1.19±0.13ac	13.6±1.20d
DT-5	1.22±0.13ac	18.1±1.24a
DT-6	2.04±0.16d	29.1±2.06e
DT-7	1.24±0.12ac	18.8±1.25a
DT-8	1.04±0.11c	9.81±0.85f

*: 不同小写字母表示不同菌株间差异显著($P<0.05$)

*: Different lowercase letters indicate significant differences among different strains ($P<0.05$).

株 DT-6 生长迅速, OD_{600} 维持在较高水平。此外, 随着菌株 DT-6 的 OD_{600} 不断上升, TCIPP 的浓度不断下降, 这说明菌株 DT-6 对 TCIPP 降解能力的强弱跟菌株生长性能呈正相关。培养

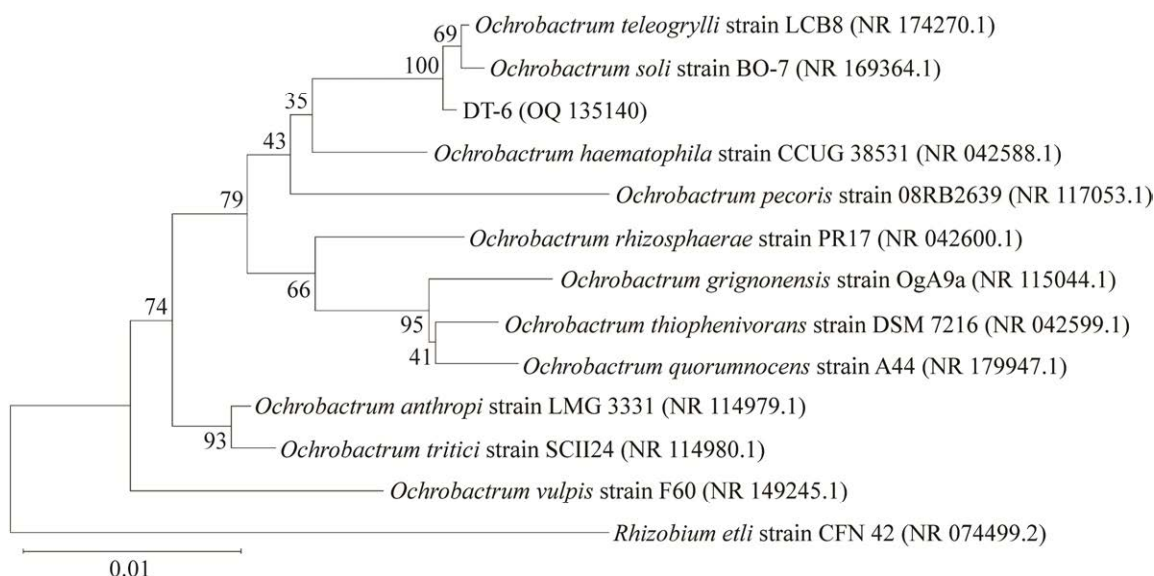


图 1 菌株 DT-6 的系统发育树 Bootstrap 次数设置为 1 000, 分支点上的数字表示 bootstrap 的支持率; 括号内表示 GenBank 登录号; 标尺表示 1% 的序列进化差异

Figure 1 Phylogenetic tree of TCIPP degrading strain DT-6. Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap. The parentheses represent the GenBank accession number. Ruler represents 1% of sequence evolutionary differences.

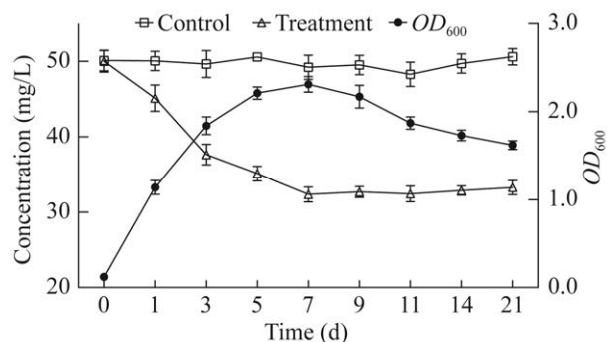


图2 菌株 DT-6 的生长及降解曲线

Figure 2 Growth of strain DT-6 and its degradation of TCIPP.

第7天时, 菌株 DT-6 的 OD_{600} 达到最大, 此时菌株 DT-6 对 TCIPP 的降解效果也达到最好, 降解率为 34.6%。同时在整个培养周期内, 未添加菌悬液的对照中 TCIPP 的浓度基本无变化。

2.4 培养条件对 TCIPP 降解效果的影响结果

2.4.1 培养时间与初始浓度对 TCIPP 降解效果的影响

无机盐液体培养基培养条件下, 培养时间和 TCIPP 初始浓度对菌株 DT-6 生长情况的影响如图 3 所示。在 TCIPP 浓度为 100 mg/L 时, 菌株 DT-6 也能够生长, 表现出对 TCIPP 较好的耐受特性。而且, 随着 TCIPP 初始浓度的增加, 菌株 DT-6 的生长量呈现出增长的趋势, 并在浓度为 50 mg/L 时达到最大; 但当 TCIPP 初始浓度进一步增加时, 菌株 DT-6 的生长受到了抑制, 甚至低于 10 mg/L 时的生长量, 而且浓度越高抑制效应越明显。从培养时间来看, 菌株 DT-6 的生长量随着培养时间的延长呈现出先增长后降低的趋势, 7 d 是菌生长量达到最大的培养时间。因此, 从菌生长量来看, TCIPP 初始浓度为 50 mg/L、培养时间为 7 d 是菌株 DT-6 的最适培养条件。

由培养时间和初始浓度对菌株 DT-6 降解 TCIPP 的影响结果(图 4)可见, 随着培养时间的延长, 菌株 DT-6 对 TCIPP 的降解效果呈现出

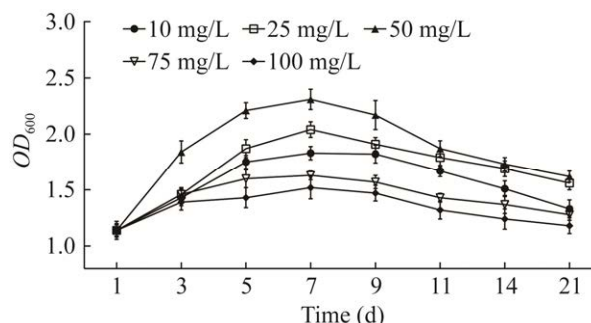


图3 培养时间和初始浓度对菌株 DT-6 生长情况的影响

Figure 3 Effects of culture time and initial concentration on the growth of strain DT-6.

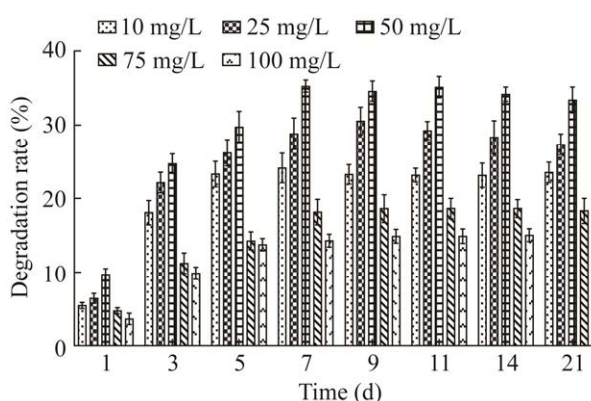


图4 培养时间和初始浓度对菌株 DT-6 降解 TCIPP 的影响

Figure 4 Effects of culture time and initial concentration on the degradation of TCIPP by strain DT-6.

增加的趋势, 在培养时间为 7 d 时 TCIPP 降解率达到最高, 这与 7 d 时菌株 DT-6 的生长量达到最大是一致的。随着培养时间的进一步延长, TCIPP 降解率无明显变化。从初始浓度来看, 即使在 100 mg/L TCIPP 胁迫下, 菌株 DT-6 也能够降解 TCIPP, 其对 TCIPP 的降解能力随着 TCIPP 浓度的增加呈现出先增加后减少的趋势, 50 mg/L 是 TCIPP 降解率达到最高的初始浓度。因此, TCIPP 初始浓度为 50 mg/L、培养时间为 7 d 是菌株 DT-6 对 TCIPP 降解效果最好的培养条件, 其降解率达 34.6%。

2.4.2 外加碳源对 TCIPP 降解效果的影响

由外加碳源对菌株 DT-6 生长情况及其降解 TCIPP 的影响(图 5)可见,外加碳源能够增加菌株 DT-6 的生长量,其中仅蔗糖作为外加碳源时菌株 DT-6 生长量增加显著,而酵母粉和蛋白胨作为外加碳源时菌株生长量增加不显著。此外,外加碳源降低了菌株 DT-6 对 TCIPP 的降解能力,特别是酵母粉和蛋白胨的添加显著降低了菌株 DT-6 对 TCIPP 的降解率。

3 讨论

本研究以 TCIPP 为唯一碳源,从沈阳某 OPEs 污染土壤样品中富集培养并筛选得到一株对 TCIPP 具有较好降解效果的细菌 DT-6,分子生物学鉴定结果表明该菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的 *Ochrobactrum* sp. 序列高度相似,因此鉴定该菌株属于苍白杆菌。苍白杆菌属是一类耐盐嗜氢反硝化革兰氏阴性细菌^[21],不仅能够固定重金属^[22]、还原氯酸盐^[23],

还能够降解苯酚^[24]、喹啉^[25]、多环芳烃^[26]和邻苯二甲酸酯^[27]等多种有机污染物。徐伟超等^[25]从某焦化废水处理厂活性污泥中筛选得到一株苍白杆菌 KDQ3,其对喹啉的降解率最高可达 91.8%;谢文娟等^[28]从北京焦化厂多环芳烃污染土壤中筛选到一株高效降解芘的苍白杆菌 PW,其对 0.5 mmol/L 芘的降解率最高为 92.7%;Nshimiyimana 等^[27]从武汉南湖水体和沉积物中筛选得到一株强效降解邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP)的苍白杆菌 L1-W,其对 DEHP 的降解率可达 98.7%,而且还能降解其他 5 种邻苯二甲酸酯。这些研究充分说明了苍白杆菌对难降解有机污染物的降解潜力,但是关于其降解氯代有机磷酸酯的研究还未见报道。

为了进一步探明 *Ochrobactrum* sp. DT-6 对 TCIPP 的降解特性,本研究探讨了培养时间、初始浓度和外加碳源对菌株 DT-6 生长情况和降解 TCIPP 的影响。结果显示,菌株 DT-6 对 TCIPP 具有很强的耐受性,在 TCIPP 浓度高达 100 mg/L 时依然能够生长。这可能与苍白杆菌的特性有关,如 *Ochrobactrum* sp. KDQ3 能够耐受 492.27 mg/L 的喹啉胁迫^[25], *Ochrobactrum* sp. L1-W 能够耐受 500 mg/L 的 DEHP 胁迫^[27]。随着 TCIPP 胁迫浓度的增加,菌株 DT-6 的生长呈现出先增加后降低的趋势,拐点出现在 50 mg/L。低于 50 mg/L 时,菌株 DT-6 的生长随着 TCIPP 浓度的升高而增加,这说明低浓度的 TCIPP 能够作为唯一碳源促进菌株 DT-6 的生长,与 KDQ3 菌在喹啉胁迫下的生长情况一致^[25];但当浓度高于 50 mg/L 时,菌株 DT-6 的生长受到了抑制,TCIPP 浓度越高则抑制效应越显著,这说明高浓度的 TCIPP 对菌株 DT-6 产生了毒性效应,与大多数微生物在污染物胁迫下的响应一致^[29]。在 0–100 mg/L TCIPP 胁迫下,菌株 DT-6 的生物量均随着培养

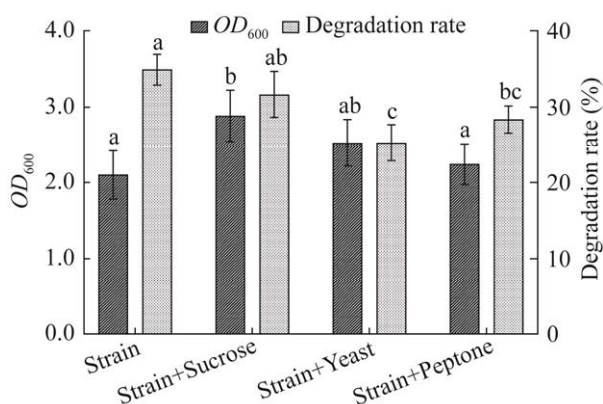


图5 外加碳源对菌株 DT-6 生长情况和降解 TCIPP 的影响 柱上不同字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)

Figure 5 Effects of external carbon sources on the growth of strain DT-6 and degradation of TCIPP. Different letters above the bars means significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

时间的延长而增大,并在7 d时达到最大,随后降低。TCIPP并没有明显地延缓菌株DT-6的生长,但喹啉却显著的迟滞了KDQ3菌的生长,达到最大生物量的培养时间从5 h最多延长到了40 h^[25]。

在整个培养周期内,菌株DT-6对TCIPP的降解率均随着TCIPP浓度的增加表现出先升高后降低的趋势,拐点出现在50 mg/L,这与菌株DT-6的生长情况相一致。因此,50 mg/L是菌株DT-6生长和降解TCIPP的最适浓度。从对TCIPP的降解情况来看,菌株DT-6培养7 d时对TCIPP的降解率达到最大,与菌株DT-6生物量达到最大的培养时间是一致的。这说明菌株DT-6主要是通过降解TCIPP为其生长提供能源和碳源,当菌株DT-6对TCIPP的降解停滞时,其自身的生长也出现停滞,生物量开始下降。KDQ3菌在降解喹啉时,其生长情况也与其对喹啉的降解率表现出了与本研究相似的规律,即污染物降解率达到最高的培养时间与降解菌生物量达到最大的培养时间是一致的^[25]。

外加碳源能够为微生物的生长提供更多的能量来源,不仅能够促进微生物的生长,还可通过共代谢的方式降解原本不能降解的污染物,抑或是通过生物量的增加来提高对污染物的降解效率^[30]。例如,在淀粉的促进作用下,芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) ADD3通过共代谢的方式降解其自身不能单独降解的1,4-雄烯二酮,在最优的降解条件下降解效率可达100%^[31];麦芽糖、葡萄糖等外加碳源的投加促进了产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*) DTQ-HK1对茚的降解效率,其中麦芽糖的强化作用最好,降解率比对照提高了18.8%^[32]。在本研究中,碳源的添加虽然促进了菌株DT-6的生长,但是却降低了其对TCIPP的降解效率。这可能是由于降解菌大量利用容易分解的外加碳源而较少

利用难分解的目标污染物,从而抑制了目标污染物的降解^[33]。范罗圣等^[34]在研究外加碳源对硝基还原假单胞菌(*Pseudomonas nitroreducens*) F降解十溴联苯醚时得出相似的结论,即外加苯酚和柠檬酸钠显著抑制了菌株F对十溴联苯醚的降解,适量的葡萄糖促进了十溴联苯醚的降解但过量的葡萄糖却抑制了其降解。

4 结论

本研究从TCIPP污染土壤中富集纯化筛选得到了能够降解TCIPP的微生物,并开展了其降解特性研究,得到如下结论:

(1) 以TCIPP为唯一碳源,从TCIPP污染土壤中筛选出一株具有降解TCIPP能力的菌株DT-6,经16S rRNA基因测序初步鉴定为苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)。

(2) TCIPP初始浓度为50 mg/L、培养时间为7 d时,菌株DT-6的生长情况最好,对TCIPP的降解效果也最好,降解率为34.6%。

(3) 蔗糖的添加能够显著促进菌株DT-6的生长,但抑制了其对TCIPP的降解。

REFERENCES

- [1] van DER VEEN I, de BOER J. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis[J]. Chemosphere, 2012, 88(10): 1119-1153.
- [2] FAN X, KUBWABO C, RASMUSSEN P, WU F. Simultaneous determination of thirteen organophosphate esters in settled indoor house dust and a comparison between two sampling techniques[J]. Science of the Total Environment, 2014, 491-492: 80-86.
- [3] LUO Q, SHAN Y, MUHAMMAD A, WANG SY, SUN LN, WANG H. Levels, distribution, and sources of organophosphate flame retardants and plasticizers in urban soils of Shenyang, China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(31): 31752-31761.
- [4] LUO Q, GU L, WU Z, SHAN Y, WANG H, SUN LN.

- Distribution, source apportionment and ecological risks of organophosphate esters in surface sediments from the Liao River, Northeast China[J]. *Chemosphere*, 2020, 250: 126297.
- [5] WANG Y, YAO Y, LI W, ZHU HK, WANF L, SUN HW, KANNAN K. A nationwide survey of 19 organophosphate esters in soils from China: spatial distribution and hazard assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 528-535.
- [6] YANG Y, CHEN P, MA ST, LU SY, YU YX, AN TC. A critical review of human internal exposure and the health risks of organophosphate ester flame retardants and their metabolites[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2022, 52(9): 1528-1560.
- [7] LUO Q, WU ZP, WANG CC, GU LY, LI YJ, WANG H. Seasonal variation, source identification, and risk assessment of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in surficial sediments from Liao River estuary wetland, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 173: 112947.
- [8] WANG RM, TANG JH, XIE ZY, MI WY, CHEN YJ, WOLSCHKE H, TIAN CG, PAN XH, LUO YM, EBINGHUAS R. Occurrence and spatial distribution of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in 40 rivers draining into the Bohai Sea, north China[J]. *Environmental Pollution*, 2015, 198: 172-178.
- [9] LEE S, CHO HJ, CHOI W, MOON HB. Organophosphate flame retardants (OPFRs) in water and sediment: occurrence, distribution, and hotspots of contamination of Lake Shihwa, Korea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 130: 105-112.
- [10] LUO Q, LI Y, WU Z, WANG XX, WANG CC, SHAN Y, SUN LN. Phytotoxicity of tris-(1-chloro-2-propyl) phosphate in soil and its uptake and accumulation by pakchoi (*Brassica chinensis* L. cv. SuZhou)[J]. *Chemosphere*, 2021, 277: 130347.
- [11] SU GY, LETCHER RJ, YU HX. Organophosphate flame retardants and plasticizers in aqueous solution: pH-dependent hydrolysis, kinetics, and pathways[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(15): 8103-8111.
- [12] FANG YD, KIM E, STRATHMANN TJ. Mineral- and base-catalyzed hydrolysis of organophosphate flame retardants: potential major fate-controlling sink in soil and aquatic environments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(4): 1997-2006.
- [13] YU XL, YIN H, YE SJ, PENG H, LU GN, DANG Z. Degradation of tris-(2-chloroisopropyl) phosphate via UV/TiO₂ photocatalysis: kinetic, pathway, and security risk assessment of degradation intermediates using proteomic analyses[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 374: 263-273.
- [14] YU XL, YIN H, PENG H, LU GN, LIU ZH, DING Z. Degradation mechanism, intermediates and toxicology assessment of tris-(2-chloroisopropyl) phosphate using ultraviolet activated hydrogen peroxide[J]. *Chemosphere*, 2020, 241: 124991.
- [15] QIN P, LU SY, LIU XH, WANG GQ, ZHANG YX, LI DL, WAN ZF. Removal of tri-(2-chloroisopropyl) phosphate (TCPP) by three types of constructed wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 749: 141668.
- [16] 李瑜婕, 罗庆, 王聪聪, 吴中平, 张截流. 玉米秸秆生物炭对磷酸三(2-氯异丙基)酯的吸附特性及机理[J]. *农业环境科学学报*, 2023, 42(1): 112-120.
- LI YJ, LUO Q, WANG CC, WU ZP, ZHANG JL. Adsorption characteristics and mechanism of tris(2-chloroisopropyl) phosphate from corn straw biochar[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(1): 112-120 (in Chinese).
- [17] 罗庆, 吴中平, 王聪聪, 李瑜婕. 四种草本植物对氯代有机磷酸酯阻燃剂污染土壤的修复能力研究[J/OL]. *环境工程*, 2022 [2022-11-10]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20221109.1829.028.html>.
- LUO Q, WU ZP, WANG CC, LI YJ. Study on the remediation capability of four herbs in the chlorinated organophosphate flame retardants contaminated soil[J/OL]. *Environmental Engineering*, 2022 [2022-11-10]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20221109.1829.028.html> (in Chinese).
- [18] TAKAHASHI S, KAWASHIMA K, KAWASAKI M, KAMITO J, ENDO Y, AKATSU K, HORINO S, YAMADA RH, KERA Y. Enrichment and characterization of chlorinated organophosphate ester-degrading mixed bacterial cultures[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(1): 27-32.
- [19] TAKAHASHI S, KATANUMA H, ABE K, KERA Y. Identification of alkaline phosphatase genes for utilizing a flame retardant, tris(2-chloroethyl) phosphate, in *Sphingobium* sp. strain TCM1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(5): 2153-2162.
- [20] WANG XX, SUN LN, WANG H, WU H, CHEN S, ZHENG CH. Surfactant-enhanced bioremediation of DDTs and PAHs in contaminated farmland soil[J]. *Environmental Technology*, 2018, 39(13): 1733-1744.

- [21] 刘志国, 崔步云, 夏咸柱. 人苍白杆菌研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(8): 977-982.
LIU ZG, CUI BY, XIA XZ. Research progress of *Ochrobactrum anthropi*-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(8): 977-982 (in Chinese).
- [22] VILLAGRASA E, BALLESTEROS B, OBIOL A, MILLACH L, ESTEVE I, SOLE A. Multi-approach analysis to assess the chromium(III) immobilization by *Ochrobactrum anthropi* DE2010[J]. Chemosphere, 2020, 238: 124663.
- [23] CHEN HW, XU M, MA XW, TONG ZH, LIU DF. Isolation and characterization of a chlorate-reducing bacterium *Ochrobactrum anthropi* XM-1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 380: 120873.
- [24] EL-SAYED WS, IBRAHIM MK, ABU-SHADY M, EL-BEIH F, OHMURA N, SAIKI H, ANDO A. Isolation and identification of a novel strain of the genus *Ochrobactrum* with phenol-degrading activity[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 96(3): 310-312.
- [25] 徐伟超, 吴翠平, 张玉秀, 张琪, 张怡鸣. 嗜喙降解菌 *Ochrobactrum* sp. 的好氧降解特性及其在焦化废水中的生物强化作用[J]. 环境科学, 2017, 38(5): 2030-2035.
XU WC, WU CP, ZHANG YX, ZHANG Q, ZHANG YM. Aerobic degradation characteristics of the quinoline-degrading strain *Ochrobactrum* sp. and its bioaugmentation in coking wastewater[J]. Environmental Science, 2017, 38(5): 2030-2035 (in Chinese).
- [26] WU YR, HE TT, ZHONG MQ, ZHANG YL, LI EM, HUANG TW, HU Z. Isolation of marine benzo[a]pyrene-degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins characterization[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(10): 1446-1451.
- [27] NSHIMIYIMANA JB, KHADKA S, ZOU P, ADHIKARI S, PROSHAD R, THAPA A, XIONG L. Study on biodegradation kinetics of di-2-ethylhexyl phthalate by newly isolated halotolerant *Ochrobactrum anthropi* strain L1-W[J]. BMC Research Notes, 2020, 13(1): 252.
- [28] 谢文娟, 林爱军, 杨晓进, 王凤花, SHIM Hojae. 一株降解茚的苍白杆菌的分离、鉴定及性能表征[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2011, 38(3): 76-80 (in Chinese).
XIE WJ, LIN AJ, YANG XJ, WANG FH, HOJAE S. Isolation, identification and characteristics of pyrene degrading bacteria *Ochrobactrum* sp.[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2011, 38(3): 76-80 (in Chinese).
- [29] 李豪, 王传文, 王孟冬, 张然, 张振东, 桂仲争, 潘保良. 一株新型莫能菌素高效降解菌的分离鉴定及其降解性能解析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2618-2627.
LI H, WANG CW, WANG MD, ZHANG R, ZHANG ZD, GUI ZZ, PAN BL. Isolation, identification and biodegradation characterization of a novel monensin-degrading bacterial strain[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2618-2627 (in Chinese).
- [30] 王镔, 蔡凯, 邵汝英, 赵振华, 王帅, 高峰, 蒋伟群. 苯胺高效降解菌的筛选及其代谢机制[J]. 环境保护科学, 2020, 46(4): 117-121.
WANG B, CAI K, SHAO RY, ZHAO ZH, WANG S, GAO F, JIANG WQ. Study on the screening of aniline-degrading strain and its co-metabolism mechanism[J]. Environmental Protection Science, 2020, 46(4): 117-121 (in Chinese).
- [31] 杨雷, 彭涛, 张晋娜, 石义静, 史文俊, 应光国. 一株高效 1,4-雄烯二酮降解菌的筛选、鉴定及其降解转化特性研究[J]. 环境科学学报, 2021, 41(3): 940-950.
YANG L, PENG T, ZHANG JN, SHI YJ, SHI WJ, YING GG. Isolation and identification of a highly efficient androsta-1,4-diene-3,17-dione degrading bacterium and its degradation characteristics[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021, 41(3): 940-950 (in Chinese).
- [32] 黄秀秀, 左宇环, 李腾飞, 张朝晖, 王亮, 赵斌, 李君敬, 李晓峰. 外加碳源及固定化对荧蒽降解菌降解性能的强化作用[J]. 水生态学杂志, 2020, 41(3): 107-114.
HUANG XX, ZUO YH, LI TF, ZHANG ZH, WANG L, ZHAO B, LI JJ, LI XF. Increasing the effectiveness of a fluoranthene-degrading microorganism by immobilization and adding a carbon source[J]. Journal of Hydroecology, 2020, 41(3): 107-114 (in Chinese).
- [33] MORI T, KONDO O, KAWAGISHI H, HIRAI H. Effects of glucose concentration on ethanol fermentation of white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under aerobic conditions[J]. Current Microbiology, 2019, 76(3): 263-269.
- [34] 范罗圣, 吴涓, 胡丁璠, 茆荣. 十溴联苯醚降解菌的分离鉴定、降解特性及降解机理[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 78-90.
FAN LS, WU J, HU DF, JIA R. Isolation, identification, degradation characteristics and mechanisms of decabromodiphenyl ether degrading bacteria[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 78-90 (in Chinese).