

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

吴学玲¹, 金德才¹, 赵维良^{1,2}, 梁任星¹, 李乾¹, 杨宇¹, 邱冠周¹

(1. 中南大学资源加工与生物工程学院, 长沙 410083; 2. 东吴大学微生物学系, 台北, 中国台湾)

摘要: 从土壤中分离纯化出4株能降解邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的菌株, 分别命名为JDC-1、JDC-8、JDC-9、JDC-12, 并对其进行了形态学、生理生化及分子生物学鉴定. 菌株革兰氏染色阳性, 16S rDNA序列分析显示4株菌均与节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)有99%以上的序列相似性, 初步判断这4株菌为*Arthrobacter* sp.. 通过PCR扩增及克隆, 均获得了1个约900 bp的DNA片段, 测序结果显示该片段与*Arthrobacter keyseri*的邻苯二甲酸3,4-双加氧酶基因的核苷酸序列相似性为96%以上. 对4株菌的最适生长条件及对DBP的降解能力进行了分析, 结果显示, 4株菌的最适生长条件为pH 7.0~8.5, 温度30~35℃. 以DBP作为目标测试物, 在适宜条件下测试了4株菌的降解能力, 显示这4株菌均为高效降解菌, 效率最高的JDC-1能在28 h内将500 mg/L的DBP降解完全, 最慢的JDC-8经40 h能将500 mg/L的DBP降解完全, 本研究对于DBP降解机制的研究及微生物资源的开发都具有重要意义.

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯; 节杆菌属; 分离; 鉴定; 生物降解; 邻苯二甲酸双加氧酶

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)09-2722-06

Isolation and Identification of Four DBP-Degrading Strains and Molecular Cloning of the Degradation Genes

WU Xue-ling¹, JIN De-cai¹, CHAO Wei-liang^{1,2}, LIANG Ren-xing¹, LI Qian¹, YANG Yu¹, QIU Guan-zhou¹

(1. School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China; 2. Department of Microbiology, Soochow University, Taipei, Taiwan, China)

Abstract: Four di-butyl-phthalate(DBP)-degrading bacterial strains, JDC-1, JDC-8, JDC-9 and JDC-12, were isolated from soil. The strains were gram positive. The 16S rRNA sequence analysis revealed that the four strains had similarities of 99% with *Arthrobacter* sp.. According to the morphologic, physiobiochemical characteristics and the analysis of their 16S rRNA, all the four strains were identified as *Arthrobacter* sp.. A 900 bp DNA fragment was obtained from the four strains by PCR amplified and clone. When compared with the large subunit of phthalate dioxygenase gene (phtA) of *Arthrobacter keyseri*, more than 96% similarities were evident in the nucleotide sequences. The optimal growth conditions and degradation rates of DBP were tested and the result indicated that the optimal growth conditions of the four bacteria strains were pH 7.0-8.5 and 30-35℃. All the four bacteria strains performed efficiently for DBP degrading capabilities under optimal conditions. The most efficient strain JDC-1 degraded 500 mg/L DBP completely within 28 h whereas the least efficient strain JDC-8 degraded 500 mg/L DBP completely within 40 h. This study is helpful to the investigation of DBP-degrading mechanisms and the development of microbial resources.

Key words: di-butyl-phthalate(DBP); *Arthrobacter* sp.; isolation; identification; biodegradation; phthalate dioxygenase

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs, 酞酸酯)是一类重要的有机化合物, 它们被广泛用作塑料助剂、油漆溶剂、合成橡胶和涂料等的增塑剂; 用作农药载体、驱虫剂、化妆品、香味品、润滑剂和去泡剂的生产原料; 除此之外, 在家具、汽车、电线电缆、服装等行业也有广泛的应用^[1]. 然而由于邻苯二甲酸酯增塑剂并非与树脂共价连接, 因此很容易扩散到环境中^[2]. 近年来, 随着它们在工业中的大量使用, 邻苯二甲酸酯已普遍存在于土壤、底泥、水体、生物、空气及大气降尘物等环境中, 成为环境中重要的污染物^[3, 4]. 目前认为邻苯二甲酸酯类是一种环境内分泌干扰物, 其中的某些种类对动物还具有致癌, 致

畸, 致突变的三致作用^[5]. 中国环境检测总站、美国国家环保局(EPA)和欧盟均已将该类化合物列为优先控制污染物^[6, 7]. 因此, 如何对邻苯二甲酸酯进行处理, 使其危害降至最低就显得尤为重要, 研究表明微生物降解是自然环境中邻苯二甲酸酯完全矿化的主要过程^[8], 而我国关于微生物邻苯二甲酸酯污染物的生物降解研究目前多数集中在特异性微生物的分离以及降解条件、降解效率的前期研究上, 对降解

收稿日期: 2008-10-19; 修订日期: 2009-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770388)

作者简介: 吴学玲(1965~), 女, 副教授, 主要研究方向为环境微生物学及生物冶金, E-mail: xueling0714@yahoo.com.cn

机制以及降解基因和降解酶的研究相对较少。

在本研究中,笔者从中国 4 个省份各分离到 1 株菌,对这 4 株菌进行了形态学、生理生化和分子生物学鉴定.通过一对简并引物,成功扩增出一段编码邻苯二甲酸双加氧酶的基因序列,并以 DBP 做为目标测试物,在适宜条件下测试了 4 株菌的降解能力,以期能够为 PAEs 类有机污染物的生物修复和降解机制研究提供必要的基础。

1 材料与方法

1.1 样品

4 个样品分别取自湖南省常德市鼎城区池塘底泥、天津武清区河底泥、安徽省安庆市太湖县有机场底泥、河北省唐山市乐亭县河底泥.样品采集后置入塑料样品袋中立即带回实验室 4℃ 保存。

1.2 培养基和试剂

基础无机盐 (MSM) 培养基 (g/L): K_2HPO_4 5.8, KH_2PO_4 4.5, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0, $MgCl_2$ 0.16, $CaCl_2$ 0.02, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002 4, $FeCl_3$ 0.001 8, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.001 5, pH = 7.0. PAEs 固体培养基为含 PAEs 的液体培养基加琼脂 20 g/L。

富集培养基 (g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH = 7.0。

以上培养基均在 121℃ 湿热灭菌 30 min。

邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二己酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二正辛酯、氯仿、甲醇均为国产分析纯,购自天津大茂化学试剂公司.色谱级甲醇购自美国 Sigma 公司。

1.3 菌种的分离与纯化

从 4 个样品中各取 10 mg 的污泥于含 200 mg/L 邻苯二甲酸酯(邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二正辛酯各为 50 mg/L)的 100 mL 无机盐培养液中,采用梯度压力法驯化,30℃ 下振荡培养 7 d,逐步转接至邻苯二甲酸酯的浓度依次为 240、280、320、360、400 mg/L 的无机盐培养液中培养.用接种针蘸取少量菌液,在 PAEs 固体平板上划线分离纯化。

1.4 生理生化鉴定

生理生化鉴定参考文献[9, 10]进行。

1.5 细菌 16S rDNA 扩增、测序及分析

纯化后培养的菌株使用 Sangon 公司的 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 提取盒提取基因组 DNA. 16S rDNA 基因的全长扩增采用细菌通用引物: 27F-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG, 1492R-TACGGCTACCTTGTTAC-

GACTT. PCR 扩增程序: 95℃ 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min (30 个循环); 72℃ 10 min. 取全部反应液进行琼脂糖凝胶电泳. 用 E.Z.N.A.™ Gel Extraction Kit (OMEGA) 进行胶回收, PCR 纯化产物的测序工作由 Sangon 公司完成. 用 Clustalx1.8 软件进行全序列比对^[11], 并用 MEGA3.1 构建系统发育树^[12]。

1.6 细菌邻苯二甲酸双加氧酶基因的克隆

参考 Chao 等^[13]的简并引物进行细菌邻苯二甲酸双加氧酶基因的 PCR 扩增, 正向引物为: 5'-ACACSCCBCARACSCACAC-3'; 反向引物为: 5'-CTTGTCCTGCTACAGCTCTTG-3'^[13]. PCR 反应条件为 95℃ 10 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min (35 个循环); 72℃ 10 min. PCR 产物经连接, 转化, 阳性克隆筛选, 将含有正确转化片段的阳性克隆子送至 Sangon 公司测序并分析。

1.7 最适条件下 4 株菌的 DBP 降解能力的比较

根据菌株生物量变化测定它们的最适生长条件均为 pH 7.0 ~ 8.5, 温度为 30 ~ 35℃, 摇床转速为 125 ~ 175 r/min. 以 DBP 为目标测试物, 比较 4 株菌的降解效率. 采用高效液相色谱仪测定邻苯二甲酸二丁酯的含量. 50 mL 样品采用 20 mL 氯仿萃取 3 次, 收集有机相. HPLC 分析条件: SinoChrom ODS-BP (4.6 mm × 200 mm × 5 μm), 柱温 35℃, 流动相甲醇: 水 = 90: 10, 流速为 0.5 mL/min, 检测器波长为 228 nm, 进样量为 20 μL^[14]。

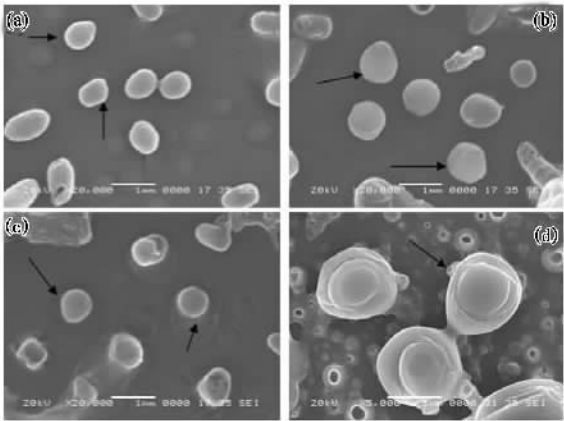
2 结果与分析

2.1 菌株的分离及生理生化特征

生理生化实验结果表明这 4 株菌的生理生化特征很相似, 革兰氏染色均为阳性, 菌落颜色 JDC-1 为白色, 其余 3 株淡黄色, 初期杆状居多, 在稳定期细菌形态为球状, 后期球、杆状均有, 均不产生芽孢, 稳定期菌株的电镜照片如图 1 所示, JDC-1、JDC-8、JDC-9、JDC-12 菌株大小依次为 0.61 ~ 0.72 μm × 0.56 ~ 0.74 μm、0.66 ~ 0.72 μm × 0.78 ~ 0.88 μm、0.68 ~ 0.71 μm × 0.74 ~ 0.77 μm、4.59 ~ 6.72 μm × 5.79 ~ 7.60 μm. 4 株菌均能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、乙醇等能源. 在 H₂S 气体产生这项指标上 JDC-1 为阴性, 其他 3 株均为阳性. 菌株的部分生理生化特征如表 1 所示。

2.2 细菌的 16S rDNA 扩增、测序及系统发育树的构建

16S rDNA 的 PCR 产物测序结果显示, JDC-1、



(a) JDC-1; (b) JDC-8; (c) JDC-9; (d) JDC-12

图 1 4 株菌的电镜下形态

Fig.1 Scanning electron micrograph of the four strains

表 1 DBP 降解菌株生理生化特征¹⁾

Table 1 Biophysical and biochemical characters of the DBP

实验指标	biodegrading strains			
	JDC-1	JDC-8	JDC-9	JDC-12
甲基红反应	-	-	-	-
H ₂ S 气体产生	-	+	+	+
接触酶	+	+	+	+
反硝化反应	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+
柠檬酸盐利用	-	-	-	-
木糖	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+
半乳糖	+	+	+	+
乙醇	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+
L-亮氨酸	+	+	+	+
L-苯丙氨酸	+	+	+	+
L-谷氨酸	-	-	-	-
L-组氨酸	+	+	+	+
L-酪氨酸	+	+	+	+

1)“+”表示反应呈阳性,“-”表示反应呈阴性

JDC-8、JDC-9、JDC-12 的序列长度分别为 1 365、1 435、1 435、1 439 bp,序列登录号依次为 FJ378033、FJ378034、FJ378035、FJ378036.选取相似度较高的节杆菌属(包括模式菌种 *Arthrobacter globiformis*),同时以 *Acaricomes phytoseiuli* 为外群,用 Clustalx1.8 软件进行全序列比对,并用 MEGA3.1 构建系统发育树,结果如图 2 所示.

从图 2 可以得出,JDC-1 和 *Arthrobacter* sp. PNPX-4-2 聚在一簇,相似度达到 99%,JDC-8、JDC-9 和 *Arthrobacter ureafaciens* 的相似度亦达到 99%,JDC-8 与 JDC-9 之间的相似度也为 99%,JDC-12 和

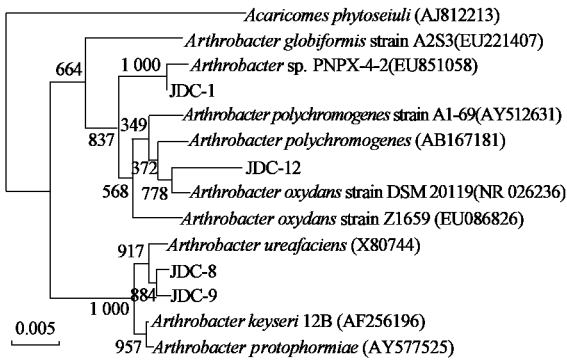


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of four strains and the sequences of relating species

Arthrobacter oxydans strain Z1659 相似性也达到了 99%.因此可以把这 4 株菌都归属于 *Arthrobacter* sp.,根据系统发育树结果,可以发现 JDC-8 和 JDC-9 的相似度很高,可能为相同的种,JDC-1 和 JDC-12 聚为一簇,但相隔距离较远,相似度较低.

2.3 细菌邻苯二甲酸双加氧酶基因的克隆及序列同源性分析

利用一对简并引物,4 株菌均成功扩增出邻苯二甲酸双加氧酶基因的部分片段,大小为 900 bp 左右,根据推定的氨基酸序列在 NCBI 网站通过 Blastx 进行同源性查询并构建系统发育树,结果如图 3 所示,这 4 株菌的邻苯二甲酸双加氧酶基因部分序列均与 *Arthrobacter keyseri* 菌质粒上编码邻苯二甲酸 3,4-双加氧酶基因的一段序列相似度最近,在 96% 以上.因此可判断本研究扩增出来的片段为邻苯二甲酸双加氧酶的编码序列.从图 3 中也可以得出这 4 株菌的邻苯二甲酸双加氧酶的基因序列相似度很高.

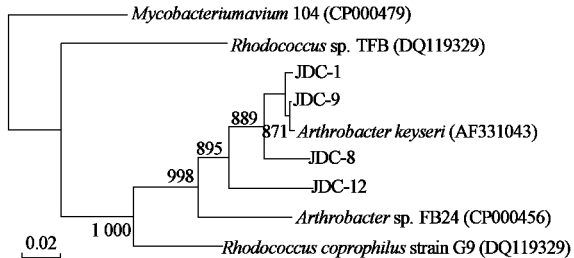


图 3 4 株菌的邻苯二甲酸酯双加氧酶基因系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of phthalate dioxygenase gene of four strains

2.4 细菌邻苯二甲酸双加氧酶基因序列推导氨基酸比较

利用 Bioxm 2.0 寻找开放阅读框,并推导出氨基

酸序列,再用 Gene doc 软件进行氨基酸比对,结果如图 4 所示,从中可以看出,这 4 株节杆菌的邻苯二甲酸双加氧酶的氨基酸差别不大,其中 JDC-1 和 JDC-

12 有 1 个氨基酸差别,和 JDC-9 有 2 个氨基酸差别,差别最大的是 JDC-8,与 JDC-1、JDC-12、JDC-9 分别有 5、4、5 个氨基酸差别.

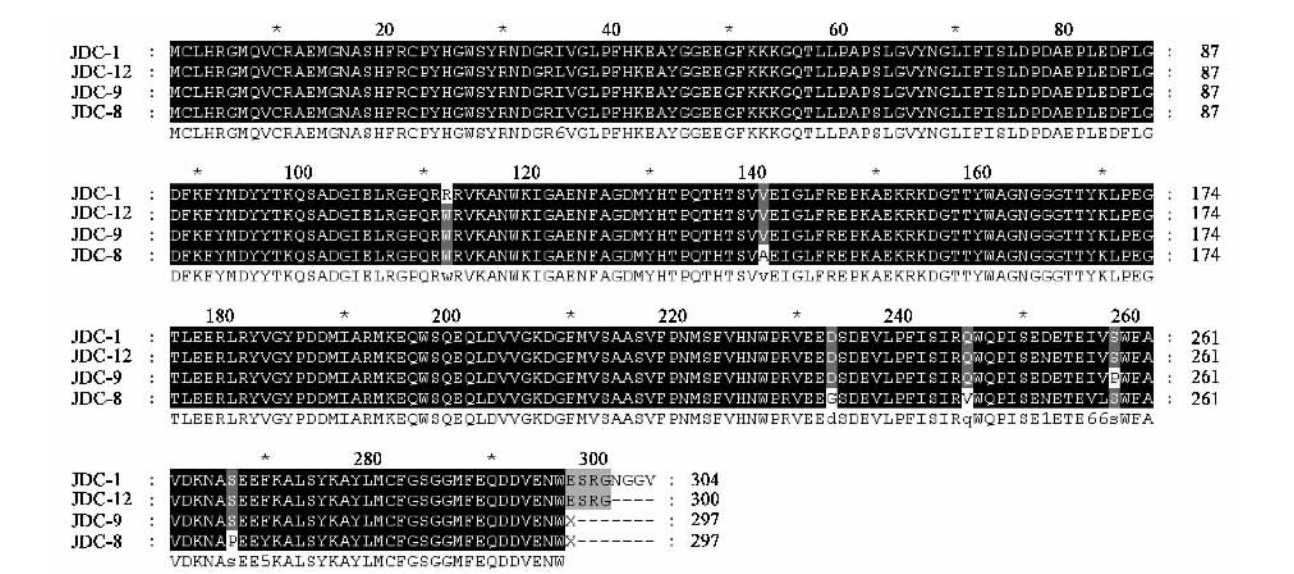


图 4 邻苯二甲酸双加氧酶基因序列推导氨基酸比对

Fig.4 Comparison of the partial putative amino acid sequence of phthalate dioxygenase of four strains

2.5 最适条件下 4 株菌的 DBP 降解能力测试

根据预试验确定了 JDC-1、JDC-8、JDC-9、JDC-12 这 4 株菌的生长适宜范围条件均为 pH 7.0 ~ 8.5,温度 30 ~ 35℃,转速 125 ~ 175 r/min.因此在 pH 7.0,温度为 30℃,转速 150 r/min 条件下比较它们的降解效率,DBP 初始浓度为 500 mg/L.4 株菌的生长曲线见图 5,降解情况见图 6.从中可以看出,JDC-1 的降解能力最强,在 28 h 将 DBP 降解完全,JDC-12、JDC-9 分别需要 32、36 h 降解完全 DBP,JDC-8 降解能力最差,需经 40 h 后才检测不到 DBP.

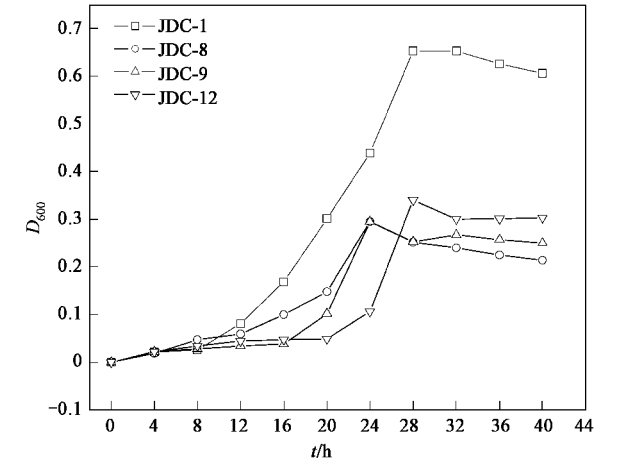


图 5 最适降解条件下 4 株菌的生长曲线

Fig.5 Growth curve of four strains under the optimum condition

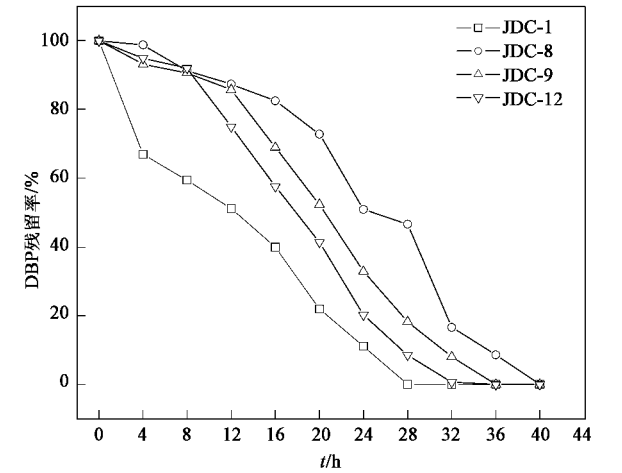


图 6 最适降解条件下 4 株菌的降解能力比较

Fig.6 Comparison of the capability of DBP degradation by four strains under the optimum condition

3 讨论

Arthrobacter sp. 是一类在自然界广泛存在的有机污染物降解菌.目前已发现 *Arthrobacter* sp. 可以降解多种有机污染物,其中包括敌草隆除草剂^[15];菲、蒽等多环芳香烃(PAH)类化合物^[16,17];多氯联苯(PCBs)类化合物^[18].在本试验中,笔者以 DBP 为唯一碳源和能源分离到 4 株 DBP 降解菌均属于

Arthrobacter sp.. 表明 *Arthrobacter* sp. 是一类具有多种有机污染物降解酶系的微生物,在持久性污染物处理中具有潜在的应用价值.

目前国际上普遍认为邻苯二甲酸酯的生物降解反应首先由微生物的酯酶作用水解形成邻苯二甲酸单酯,再生成邻苯二甲酸和相应的醇^[19]. 在好氧条件下,在革兰氏阳性菌中,邻苯二甲酸在邻苯二甲酸 3,4-双加氧酶作用下生成 3,4-二羟基邻苯二甲酸^[20],革兰氏阴性菌中邻苯二甲酸通过邻苯二甲酸 4,5-双加氧酶作用生成 4,5-二羟基邻苯二甲酸^[21],均进一步形成原儿茶酸等双酚化合物,芳香环再开裂形成相应的有机酸,进而转化成丙酮酸、琥珀酸、延胡羧酸等进入三羧酸循环,最终转化为 CO_2 和 H_2O ^[22,23],节杆菌属降解 PAEs 机制的报道只有一篇且遵行此途径^[24]. 而且目前关于邻苯二甲酸酯的生物降解研究主要集中在高效降解菌的分离、降解动力学和代谢途径上,对降解基因的克隆及其机制研究较少涉及,国内关于 PAEs 降解菌降解机制的研究还未见报道. 本研究成功扩增出邻苯二甲酸酯双加氧酶基因序列,通过 NCBI 网站序列比对,发现获得的这 4 个菌的基因序列与 *Arthrobacter keyseri* 菌质粒编码的邻苯二甲酸酯 3,4-双加氧酶的基因序列高度相似,其中 JDC-1 的相似度为 99%,最低的 JDC-8 也达到了 96%. 由于这 4 株菌均为革兰氏阳性菌,进一步支持了阳性菌在邻苯二甲酸酯类的降解过程中是通过邻苯二甲酸酯 3,4-双加氧酶作用的结论.

根据邻苯二甲酸双加氧酶部分编码基因序列推导氨基酸并做了比对分析,发现这 4 株菌的邻苯二甲酸双加氧酶差异性很小,这可能是由于它们都属于节杆菌属,差异性也可能是由于采样地点的不同引起的,也可能是由株间差异引起的. 以 DBP 作为目标测试物,在适宜条件下研究了 4 株菌的降解能力,结果显示效率最高的 JDC-1 能在 28 h 内将 500 mg/L 的 DBP 降解完全,最慢的 JDC-8 经 40 h 能将 500 mg/L 的 DBP 降解完全. 周洪波等^[14]分离得 1 株菌株 XJ1,在最适降解条件下,经 40 h 能完全降解 100 mg/L 的 DBP,段星春等^[25]报道乙酸钙不动杆菌 TS2H 在最适条件下经 48 h 对 40 mg/L DBP 的降解率为 98.64%. 相比之下,本研究所分离的这 4 株菌均为高效降解菌. 另外,本试验中的这 4 株菌均扩增出编码邻苯二甲酸双加氧酶的基因片段,这和 Chao 等^[13]从土壤中分离到多株 PAEs 降解菌株,发现了含有邻苯二甲酸双加氧酶的菌株降解 DBP 的能力普遍高于其它菌株的试验现象相一致. 由于邻苯二

甲酸双加氧酶是邻苯二甲酸酯类化合物降解过程中一个非常关键的酶,本研究在相同条件下比较了这 4 株细菌的降解能力,结合邻苯二甲酸双加氧酶氨基酸序列比对结果,发现降解能力最强的 JDC-1 与其他菌株区别最大的一个氨基酸位点是第 112 位的精氨酸(其它 3 个菌均为色氨酸). 精氨酸为碱性氨基酸,带正电荷,常常是蛋白质和酶的活性中心的重要氨基酸残基,在邻苯二甲酸双加氧酶的功能中可能与活性区域相关,明确的结果还需要进一步验证.

4 结论

(1) 从 4 个不同省份各分离到 1 株菌,经过对其形态特征、生理生化以及 16S rDNA 序列分析,初步鉴定 4 株菌均为 *Arthrobacter* sp..

(2) 通过一对简并引物,在这 4 株菌中成功扩增出编码邻苯二甲酸双加氧酶的基因片段,结果显示该基因序列具有属特异性.

(3) 降解试验结果表明这 4 株菌均具有较高的 DBP 降解能力,降解效率最高的 JDC-1 能在 28 h 内将 500 mg/L 的 DBP 降解完全,最慢的 JDC-8 也仅需 40 h.

参考文献:

- [1] 吴杰民. 聚乙烯类农膜及酞酸酯类(PAEs)在环境中的残留及生物降解前景[J]. 环境科学, 1994, 15(2): 77-80.
- [2] 刘敏, 林玉君, 曾峰, 等. 城区湖泊表层沉积物中邻苯二甲酸酯的组成与分布特征[J]. 环境科学学报, 2007, 27(8): 1377-1383.
- [3] Fromme H, Kuchler T, Otto T, et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment[J]. Water Res, 2002, 36(6): 1429-1438.
- [4] Martinen S K, Kettunen R H, Rintala J A. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates[J]. Sci Total Environ, 2003, 301(1-3): 1-12.
- [5] 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.
- [6] Chen J A, Liu H J, Qiu Z Q, et al. Analysis of di-n-butyl phthalate and other organic pollutants in Chongqing women undergoing parturition[J]. Environ Pollut, 2008, 156(3): 849-853.
- [7] Neelakanteshwar K P, Rajesh K, Yogesh S, et al. Degradation of Plasticizer Di-n-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05 [J]. Current Microbiology, 2006, 52: 369-374.
- [8] 孙大贵, 陶长元, 刘作华, 等. 活性炭-Fenton 组合法去除水中 PAEs 的研究[J]. 环境科学, 2007, 28(12): 2734-2739.
- [9] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [10] 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.

[11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (24): 4876-4882.

[12] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, **5**(2): 150-163.

[13] Chao W L, Lin C M, Shiung I I, *et al.* Degradation of di-butyl-phthalate by soil bacteria [J]. *Chemosphere*, 2006, **63**(8): 1377-1383.

[14] 周洪波, 胡培磊, 刘飞飞, 等. DBP 降解菌株 XJ1 的分离鉴定及其降解特性[J]. *生物技术*, 2008, **18**(2): 64-67.

[15] Pascale W, Selim A A, Céline T, *et al.* Veschambre Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2 [J]. *Chemosphere*, 2002, **46**(4): 527-534.

[16] Seo J S, Keum Y S, Cho I K, *et al.* Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P1-1 [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, **58**(1): 36-43.

[17] Baboshin M A, Baskunov B P, Finkelstein Z I, *et al.* The Microbial Transformation of Phenanthrene and Anthracene [J]. *Microbiology*, 2005, **74**(3): 357-364.

[18] Abramowicz D A. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A Review [J]. *Biotechnol*, 1990, **10**(3): 241-251.

[19] Ribbons D W, Keyser P, Kunz D A, *et al.* Microbial degradation of phthalates [A]. In: Gibson D T (Ed.). *Microbial degradation of organic compounds* [C]. New York, NY: Marcel Dekker, Inc, 1984. 371-397.

[20] Eatons R W, Ribbons D W. Biotransformation of 3-methylphalate by *Micrococcus* sp. strain 12B [J]. *Gen Microbiol*, 1987, **133**(9): 2473-2476.

[21] Batie C J, LaHaie E, Ballou D P. Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia* [J]. *Biol Chem*, 1987, **262**(4): 1510-1518.

[22] Habe H, Miyakoshi M, Chung J, *et al.* Phthalate catabolic gene cluster is linked to the angular dioxygenase gene in *Terrabacter* sp. strain DBF63 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**(1): 44-54.

[23] 曾锋, 傅家谟, 盛国英. 邻苯二甲酸酯类有机污染物生物降解性研究进展 [J]. *环境科学进展*, 1999, **7**(4): 1-13.

[24] Eaton R W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B [J]. *J Bacteriol*, 2001, **183**(12): 3689-3703.

[25] 段星春, 易筱筠, 党志. 乙酸钙不动杆菌 TS2H 对 DBP 降解特性的研究 [J]. *生态环境*, 2007, **16**(3): 846-849.