

高效降解邻苯二甲酸酯植物内生菌的抗生素耐药性研究

吕辉雄¹, 黄雪晶^{1,2}

(1. 华南农业大学 资源环境学院, 广州 510642; 2. 上海交通大学 生命科学技术学院;
微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

摘要: 微生物降解被认为是修复邻苯二甲酸酯 (PAEs) 最具有前景的方法之一。然而, 从环境中分离的 PAEs 高效降解菌大部分是致病菌或条件致病菌。植物内生菌为非致病菌, 分离 PAEs 高效降解植物内生菌具有重要的现实意义。选取一株 *Bacillus subtilis* N-1 为研究对象, 该菌株是从受污染的植物内部筛选到的植物内生菌, 能以邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和邻苯二甲酸二(2-乙基己基) 酯 (DEHP) 两种 PAEs 为唯一碳源和能源生长。探究了菌株 N-1 的生长习性, 包括其吡啶乙酸的分泌情况和对 4 种抗生素的耐药性。结果表明, 投加色氨酸能促进菌株 N-1 分泌吡啶乙酸; 0.50 mg · L⁻¹ 庆大霉素、8.00 mg · L⁻¹ 氯霉素、32.00 mg · L⁻¹ 盐酸四环素和 32.00 mg · L⁻¹ 利福平为菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度。目前污水中抗生素质量浓度远低于菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度, 菌株 N-1 修复 PAEs 污染的范围较广泛, 具有较好的应用前景。

关键词: 邻苯二甲酸酯; 降解; 植物内生菌; 吡啶乙酸; 抗生素耐药性

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1000-2367(2024)06-0020-07

邻苯二甲酸酯 (PAEs) 是一类合成有机化合物, 是广泛应用于塑料制品中的塑化剂和添加剂^[1]。PAEs 通过物理作用与塑料制品结合, 因此易于从塑料制品中脱离并进入环境。PAEs 化学结构稳定, 能够在自然环境中稳定存在。目前为止, PAEs 已在不同生境中被检出, 包括水体、土壤和空气^[2]。其中, 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 和邻苯二甲酸二(2-乙基己基) 酯 (DEHP) 在环境中被广泛检出, 是两种典型的 PAEs^[3]。PAEs 可以通过皮肤吸收和食物摄入等途径进入并累积于人体, 当达到一定剂量时会产生生物毒性, 其危害主要包括致畸、致癌、致突变^[4]。修复 PAEs 污染亟待解决。目前, 通过微生物降解修复 PAEs 污染被认为是最具有前景的方法之一^[5]。微生物资源丰富, 分布广泛, 对污染物有较强的适应能力和高效降解能力。

大量 PAEs 高效降解菌已从不同环境(土壤、河道底泥、沉积物、污泥、河口、自来水和塑料碎片等)中被分离出来, 如红球菌属 (*Rhodococcus*)^[6]、根瘤菌属 (*Rhizobium*)^[7]、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)^[8]、戈登氏菌属 (*Gordonia*)^[9]、鞘脂菌属 (*Sphingobium*)^[10]、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)^[11]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[12]、青枯菌属 (*Ralstonia*)^[13]、无色杆菌属 (*Achromobacter*)^[14] 和微杆菌属 (*Microbacterium*)^[15]。然而, 从环境中分离的 PAEs 高效降解菌大部分是致病菌或条件致病菌, 将其应用于环境修复的同时, 会带来一定的健康风险。而植物内生细菌定殖于植物组织内部, 对环境及植物没有已知的有害影响。此外, 植物内生菌能促进植物对营养物质的吸收, 降解植物组织中的持久性有机污染物, 进而提高植物对持久性有机污染物的耐受性, 促进植物在持久性有机污染物污染土壤中生长^[16]。另外, 植物内生菌通常能分泌吡啶乙酸^[17]。吡啶乙酸具有调控植物生长发育的功能, 一定浓度的吡啶乙酸能促进植物的生长, 在农业生产方面具有巨大的

收稿日期: 2023-08-24; **修回日期:** 2024-01-16.

基金项目: 国家自然科学基金 (41977301).

作者简介: 吕辉雄 (1977—), 男, 湖北荆州人, 华南农业大学教授, 研究方向为环境有机污染, E-mail: huixiong@scnu.edu.cn.

通信作者: 黄雪晶, E-mail: huangxuejing@sjtu.edu.cn.

引用本文: 吕辉雄, 黄雪晶. 高效降解邻苯二甲酸酯植物内生菌的抗生素耐药性研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2024, 52(6): 20-26. (Lü Huixiong, Huang Xuejing. Study on antibiotic resistance of endophytic bacterium efficiently degrading phthalates[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2024, 52(6): 20-26. DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.08.24.0003.)

应用潜力,因此,挖掘能降解 PAEs 的植物内生菌具有重要意义。

自青霉素发现并使用以来,人类为追求利益最大化,在各个领域广泛使用抗生素^[18]。然而,大部分抗生素会以药物原型随粪尿排出并进入环境,影响各生境微生物生态系统。不同环境中的抗生素种类和浓度差异很大,从纳克每毫升到微克每毫升不等。应用高效降解菌修复环境污染时,环境中的抗生素会降低微生物活性,使得污染物高效降解菌的代谢活性丧失或部分受到抑制,导致无效降解或降解效率低^[19],环境中的抗生素污染严重限制了微生物修复有机物污染环境的应用。因此,将 PAEs 高效降解菌应用于 PAEs 污染的环境修复时,处理对象中所残留的抗生素会对处理效果产生较大的影响。基于目前大部分环境受 PAEs 污染的同时也受抗生素污染情况,筛选具备一定抗生素耐药性的 PAEs 高效降解菌更具有现实意义。然而,目前对 PAEs 高效降解菌的研究主要集中于研究其对 PAEs 的降解性能及降解机制,而对抗生素的耐药性知之甚少。在应用 PAEs 高效降解菌修复 PAEs 污染前,了解 PAEs 高效降解菌对不同抗生素的耐药性才能确保 PAEs 高效降解菌在修复实际污染环境时能发挥最佳修复效果。因此,分离能高效降解 PAEs 的植物内生菌及探究其对抗生素的耐药性至关重要。

本研究以一株 *Bacillus subtilis* 为研究对象,其被命名为 N-1,该菌株是从受污染的植物内部筛选到的植物内生菌,能以 DBP 和 DEHP 两种 PAEs 为唯一碳源和能源生长。在 PAEs 初始质量浓度为 50~100 mg · L⁻¹ 时,培养 5 d 后 DBP 的降解率达到 90% 以上,DEHP 降解率能达到 60%。对菌株 N-1 分泌吡啶乙酸的能力进行检测,以探讨其除修复 PAEs 污染外更多元的功能特性,如作为促进植物生长的微生物菌种资源,为进一步研发生物肥料提供理论依据。另外,探究其对不同抗生素的耐药性,以探讨不同抗生素对菌株 N-1 在实际污染环境修复中的限制,确定菌株 N-1 修复 PAEs 污染的应用范围。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

样品:本研究以一株 *Bacillus subtilis* 为研究对象,该菌株于广东省韶关市一处污水沟旁的植物样品内分离获得,是一株植物内生菌。

主要试剂:L-色氨酸(纯度>99%)、吡啶乙酸分析标准品(纯度>99.9%)、庆大霉素(纯度>99%)、氯霉素(纯度>99%)、盐酸四环素(纯度>99%)和利福平(纯度>99%)购于 aladdin 公司。

Luria-Bertani(LB)液体培养基(g · L⁻¹):胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g,pH 值调至 7.0~7.2,121 °C 灭菌 20 min。含 L-色氨酸的 LB 液体培养基:配置高浓度 L-色氨酸母液,使用细菌过滤器将母液注入冷却的 LB 液体培养基中,使得培养基中 L-色氨酸终浓度为 3 mmol · L⁻¹。含庆大霉素的 LB 液体培养基:配置高质量浓度庆大霉素母液,使用细菌过滤器将母液注入冷却的无菌 LB 液体培养基中。氯霉素、盐酸四环素和利福平 LB 液体培养基制备方法与庆大霉素 LB 液体培养基制备方法一致。

1.2 实验方法

1.2.1 PAEs 高效降解植物内生细菌的分离

本研究植物样品在广东省韶关市一处污水沟渠边采集。在采集的植物样品中,通过分离获得了 34 株植物内生菌。后以 PAEs 为唯一碳源和能源对 34 株植物内生菌进行驯化,最终筛选到了一株 PAEs 降解效果较好的优势菌株,名为 N-1。

1.2.2 检测 PAEs 高效降解菌 N-1 分泌吡啶乙酸的能力

本研究中吡啶乙酸含量采用 Salkowski 比色法进行测定^[17]。将菌株 N-1 接种于装有含 L-色氨酸的 LB 液体培养基中,另外设计一组不接种菌株 N-1 作为空白对照。在温度为 28 °C、转速为 160 r · min⁻¹ 的全温振荡器(DHZ-D)中培养 12 h 后,将 1 mL 菌液转入灭菌的试管中,加入 2 mL Sacowski 显色液,充分混合均匀,室温下避光显色 20 min,若出现粉红色,说明该菌具有分泌吡啶乙酸的能力。其中 Sacowski 显色液由 250 mL 双蒸水、150 mL 浓硫酸、7.5 mL 0.5 mol · L⁻¹ 的 FeCl₃ · 6H₂O 配置而成。经上述显色反应后,将剩余的菌液在 10 000 r · min⁻¹ 转速下离心 10 min,取 10 mL 上清液加入 25 mL 比色管中,加入等体积的 Sacowski 显色液,用双蒸水定容,室温下避光显色 20 min 后,采用紫外分光光度计在 530 nm 波长下测定其

光度值.根据标准曲线计算菌株 N-1 分泌吡啶乙酸的质量浓度.标准曲线吡啶乙酸的质量浓度梯度为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2.3 PAEs 高效降解菌 N-1 对不同抗生素的耐药性实验

配置 50 mL LB 液体培养基若干,添加一定量的氯霉素,其质量浓度分别为 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.对庆大霉素、盐酸四环素和利福平做相同的处理,每个处理做 3 个平行,以探究氯霉素、庆大霉素、盐酸四环素和利福平对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度.将菌株 N-1 悬浊液接种于上述培养基中,使培养前培养基 OD_{600} 值为 0.05,接着在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、转速为 160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的全温振荡器 (DHZ-D) 上进行恒温培养,分别培养 0、1、2、4、6、8、12、24、36、48、72 h.最后使用紫外分光光度计,波长设置为 600 nm,测定其光度值,即 OD_{600} .使用 0.22 μm 滤膜过滤样品获得的滤液作为空白对照.样品 OD_{600} 值减去空白对照 OD_{600} 值为实际菌液 OD_{600} 值.后以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标,绘制曲线,以分析菌株 N-1 在含有不同种类和不同质量浓度抗生素 LB 液体培养基中的生长情况;研究外源抗生素对菌株 N-1 生长的影响,以探讨菌株 N-1 对几种常见抗生素的耐药性.

2 结果与分析

2.1 PAEs 高效降解菌 N-1 的形态学及菌株鉴定

PAEs 高效降解菌 N-1 在以 PAEs 为唯一碳源和能源的培养基上生长繁殖.菌落呈规则圆形,在长成菌落初期,菌落呈半透明,表面光滑,在培养 24 h 后,菌落表面变粗糙,呈白色不透明状,菌落生长图见图 1.通过革兰氏染色实验确定该菌株为革兰氏阳性菌.

菌株 N-1 的 16S rDNA 序列与 NCBI Genbank 数据库中 *Bacillus subtilis* 中的 16S rDNA 序列相似性最高,高达 100%.结合菌株 N-1 的菌落形态、生长特性、革兰氏特征和 16S rDNA 同源性分析,该菌株被鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*).

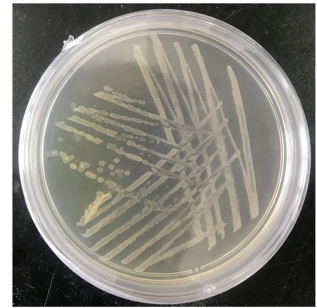


图1 菌株N-1菌落形态

Fig.1 Colony morphology of strain N-1

2.2 PAEs 高效降解菌 N-1 吡啶乙酸的分泌情况

吡啶乙酸是一种重要的植物生长素,主要用于调节植物发育,具有吡啶乙酸分泌能力的植物内生菌能提高特定植物的发芽率和发芽势^[17].本研究菌株 N-1 菌液加入 Sacowski 显色液避光显色 20 min 后,菌液颜色变为粉红色,不接种该菌的空白对照组颜色没有变为粉红色,说明该菌具备分泌吡啶乙酸的能力.植物内生细菌普遍具有分泌吡啶乙酸的能力,目前报道细菌分泌吡啶乙酸的质量浓度差异较大,一般在 0.109~251 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间.例如,从桑葚茎中分离的植物内生菌阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)能分泌 17.8~17.9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡啶乙酸^[17].本研究对象 PAEs 高效降解植物内生菌 N-1 分泌的吡啶乙酸质量浓度为 9.08 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相比可知菌株 N-1 分泌吡啶乙酸的质量浓度相对较低,这可能与宿主植物类型、生长条件及分离培养条件等因素有关.低质量浓度生长素促进植物生长,高质量浓度生长素抑制植物生长.同一质量浓度生长素对不同植物幼苗的影响不同,分泌生长素质量浓度不同的不同种属微生物对同种植物幼苗的影响也不同.因此本研究筛选出的可分泌吡啶乙酸的内生细菌对植物生长是否具有促进作用,还需通过实验进一步证实.

2.3 抗生素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长的影响

抗生素是一种抑制微生物生长的化合物^[19],被广泛应用于医疗、农业、水产养殖和畜牧业等产业,其带来巨大经济效益的同时,排入环境中会带来一定的环境风险,如影响土著微生物代谢、抑制微生物修复有机污染物等.环境中残留的抗生素主要包括酰胺醇类抗生素、氨基糖苷类抗生素、四环素类抗生素和大环内酰胺类抗生素等.本研究选择氯霉素作为酰胺醇类抗生素代表、庆大霉素作为氨基糖苷类抗生素代表、四环素作为四环素类抗生素代表和利福平作为大环内酰胺类抗生素代表,以探究 PAEs 高效降解菌 N-1 对不同类型抗生素的耐药性.

2.3.1 氯霉素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长的影响

氯霉素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长影响的结果见图 2。当未添加氯霉素时,4~36 h 为菌株 N-1 的对数生长期。当氯霉素质量浓度为 0.25~2.00 mg · L⁻¹ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 8~36 h。当氯霉素质量浓度为 4.00 mg · L⁻¹ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 12~48 h。因此,氯霉素的添加延长了菌株 N-1 生长的迟缓期。在一定范围内,氯霉素质量浓度越高,菌株 N-1 进入对数生长期时间越长。氯霉素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为 8.00 mg · L⁻¹。陆孙琴等^[20] 研究两处污水处理厂二级出水总异养菌群对氯霉素的耐药性,发现两处污水处理厂总异养菌群对氯霉素的半抑制质量浓度分别为 29.6 mg · L⁻¹ 和 23.1 mg · L⁻¹。而氯霉素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为 8.00 mg · L⁻¹。相比可知,菌株 N-1 对氯霉素的耐药性相对较弱。使用菌株 N-1 修复 PAEs 污染前应先检测修复环境中氯霉素的质量浓度,不应超过 8.00 mg · L⁻¹,否则修复环境中的氯霉素会抑制菌株 N-1 的生长,导致 PAEs 无法被降解去除。当 PAEs 污染环境中氯霉素质量浓度为 4.00~8.00 mg · L⁻¹ 时,使用该菌进行修复应至少延长 12 h 的降解时间,才能得到较好的 PAEs 去除效果。突尼斯城市废水中氯霉素含量为 3 ng · L⁻¹^[21],姜蕾等^[22] 在甲鱼养殖场废水检测出氯霉素质量浓度低于 0.1 μg · L⁻¹,柯润辉等^[23] 在上海某城市污水处理厂的初沉池检测氯霉素的质量浓度在 14.4~26.8 ng · L⁻¹ 之间,且在生化反应池(A/A/O)和二沉池处理之后未检出。由此可知,氯霉素在废水中的质量浓度远低于氯霉素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度,因此目前废水中的氯霉素含量不影响菌株 N-1 对 PAEs 的生物降解。

2.3.2 庆大霉素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长的影响

庆大霉素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长影响的结果见图 3。当庆大霉素质量浓度为 0.25 mg · L⁻¹ 时,菌株 N-1 对数生长期为 12~72 h。而未添加庆大霉素时菌株 N-1 的对数生长期为 4~36 h。庆大霉素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为 0.50 mg · L⁻¹。陈朝琼^[24] 发现庆大霉素对两城市污水处理厂细菌菌群的半抑制质量浓度分别为 28.1 mg · L⁻¹ 和 25.4 mg · L⁻¹。而本研究中庆大霉素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为 0.50 mg · L⁻¹。相比可知,菌株 N-1 对庆大霉素的耐药性相对较弱。庆大霉素口服吸收率较低,主要通过肌肉注射给药,因此其不随尿液代谢排出,主要排放在医疗废水中,在其他废水等水环境中含量较低。德国某地医院医疗废水发现庆大霉素的质量浓度范围在 0.4~7.6 μg · L⁻¹^[25],而庆大霉素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度远高于该废水中庆大霉素的质量浓度。因此,目前废水中的庆大霉素含量不影响菌株 N-1 对 PAEs 的降解。使用菌株 N-1 对 PAEs 污染环境进行生物修复前应先检测环境中庆大霉素的污染情况,其质量浓度不应超过 0.50 mg · L⁻¹,否则菌株 N-1 生长将受到抑制,不能获得较好的 PAEs 修复效果。当环境中庆大霉素质量浓度为 0.25~0.50 mg · L⁻¹ 时,应至少延长 12 h 的降解时间才能得到较好的 PAEs 去除效果。

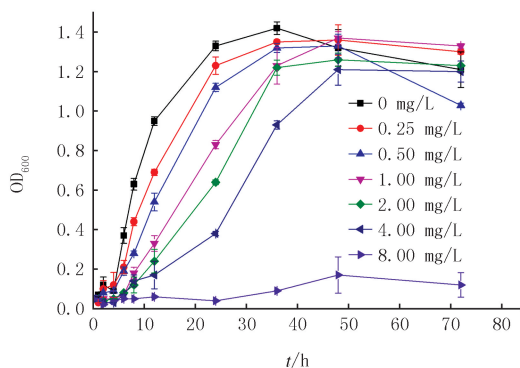


图2 不同质量浓度氯霉素对菌株N-1生长的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of chloramphenicol on the growth of bacterium N-1

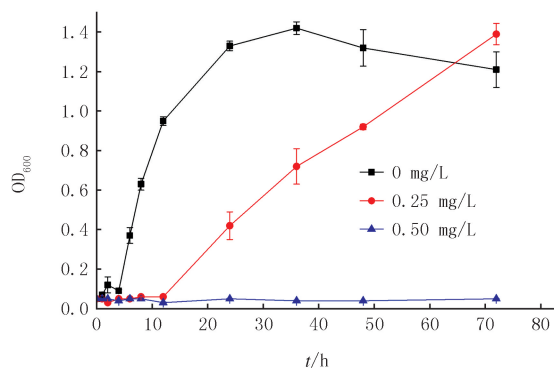


图3 不同质量浓度庆大霉素对菌株N-1生长的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of gentamicin on the growth of bacterium N-1

2.3.3 盐酸四环素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长的影响

盐酸四环素胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长影响的结果见图 4。在未添加盐酸四环素情况下,菌株 N-1 的对数生长期为 4~36 h。当盐酸四环素质量浓度为 0.25~0.50 mg · L⁻¹ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 8~36 h。当盐酸四环素质量浓度为 1.00~4.00 mg · L⁻¹ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 12~48 h。当盐酸四环素质量浓度继续增加至 8.00~16.00 mg · L⁻¹ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 24~72 h。盐酸四环素对菌株

N-1的最小抑菌质量浓度为 $32.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.陆孙琴等^[20]研究污水处理厂二级出水总异养菌群对四环素的耐药性,发现四环素质量浓度为 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,总异养菌群数几乎为 0.陈朝琼^[24]研究的两污水处理厂中,当四环素质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,两污水处理厂的可培养菌株迅速下降至 8.5%和 9.6%,当四环素质量浓度为 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,两污水处理厂可培养菌株比例分别为 0 和低于 10%.由图 4 可知,盐酸四环素质量浓度为 $8.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 N-1 在 12 h 内生长受到抑制,而在 24 h 后菌株 N-1 生长正常.当盐酸四环素质量浓度为 $16.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 N-1 在 24 h 内生长受到抑制,而在 36 h 后菌株 N-1 生长正常.相比可知,菌株 N-1 对盐酸四环素的耐药性相对较强.使用菌株 N-1 对 PAEs 污染环境进行生物修复时,当环境中四环素质量浓度为 $8.00 \sim 16.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,应至少延长 24 h 的降解时间,当盐酸四环素质量浓度高于 $16.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,应至少延长 36 h 的降解时间,才能得到较好的 PAEs 去除效果.我国污水处理厂污水中的四环素进水质量浓度在 $96 \sim 1\,300 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,出水质量浓度在 $180 \sim 620 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[22,26].姜蕾等^[22]在污水处理厂进水和出水都未检测出四环素,在养猪场原废水中检测四环素质量浓度为 $31.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.由此可知,四环素在废水中的质量浓度远低于四环素对菌株 N-1 的抑制质量浓度,因此目前污水中存在的四环素不影响菌株 N-1 对 PAEs 的降解.

2.3.4 利福平胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长的影响

利福平胁迫对 PAEs 高效降解菌 N-1 生长影响的结果见图 5.当利福平质量浓度小于 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 4~36 h,与未添加利福平时菌株 N-1 的对数生长期一致.当利福平质量浓度为 $1.00 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 8~48 h.当利福平质量浓度继续增加至 $4.00 \sim 16.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株 N-1 的对数生长期为 12~72 h.利福平对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为 $32.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.刘佳佳等^[27]在植物组织中分离的两株植物内生菌在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平下不能生存.陆孙琴等^[20]研究污水处理厂二级出水总异养菌群对利福平的耐药性,发现利福平质量浓度为 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时总异养菌群数几乎为 0.金明兰等^[28]研究的污水厂二级出水中当利福平质量浓度为 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,利福平耐药菌株比例低于 10%,当利福平质量浓度为 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,利福平耐药菌株比例接近于零.由图 5 可知,利福平对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为 $32.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.相比可知,菌株 N-1 与现阶段污水处理厂二级出水总异养菌群对利福平的耐药性相似.使用菌株 N-1 对 PAEs 污染环境进行生物修复时要求环境中利福平的质量浓度不应超过 $32.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,否则将会抑制菌株 N-1 生长,从而导致 PAEs 无法被降解去除.当环境中利福平质量浓度为 $16.00 \sim 32.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,应至少延长 12 h 的降解时间,才能得到较好的 PAEs 去除效果.

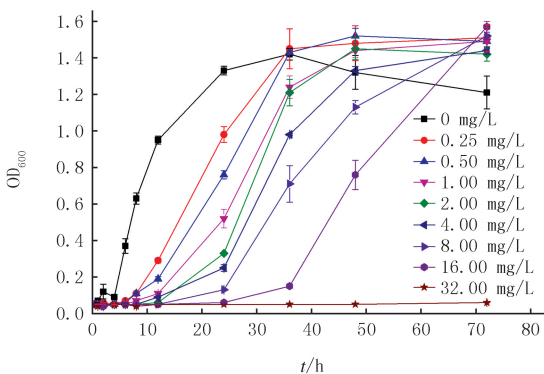


图4 不同质量浓度盐酸四环素对菌株N-1生长的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of tetracycline on the growth of bacterium N-1

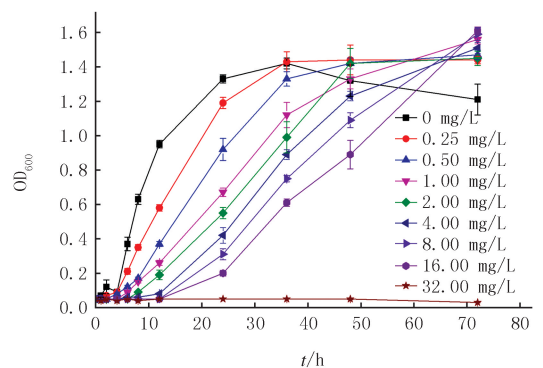


图5 不同质量浓度利福平对菌株N-1生长的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of rifampicin on the growth of bacterium N-1

总的来说,本课题组前期筛选到了一株能高效降解 PAEs 的植物内生菌 N-1^[29],该菌株对不同类型抗生素的耐药性不同,对不同质量浓度抗生素的耐药性也不同.菌株 N-1 对 4 种不同抗生素的耐药性由小到大的顺序依次为:庆大霉素,氯霉素,盐酸四环素(利福平)(表 1).药物外排是细菌耐抗生素的主要机制之一,耐药菌株通过排出胞内抗生素来降低对抗生素的敏感度.药物外排泵是抗生素排出的主要通道,其广泛存在于细菌细胞膜中,*Bacillus subtilis* 的细胞膜含有多个小型多药耐药(SMR)家族外排泵,这可能是菌株 N-1 对抗生素产生耐药性的主要原因,值得被进一步研究.抗生素对环境中的大多数细菌具有抑制或者杀灭的作用,

抗生素污染严重影响污染环境的微生物修复,使得修复效果不理想.分离环境中一些兼具耐药性和降解功能的专性降解菌,有助于推动生物修复技术的开发和发展.

表 1 菌株 N-1 抗生素最大耐受质量浓度

Tab. 1 Maximum antibiotic tolerance concentration of strain N-1

抗生素	氯霉素	庆大霉素	盐酸四环素	利福平
最大耐受质量浓度/(mg · L ⁻¹)	4.00	0.25	16.00	16.00

3 结 论

本研究的对象为一株能高效降解 PAEs 的植物内生菌 *Bacillus subtilis* N-1,能分泌吡啶乙酸.不同抗生素对菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度为:庆大霉素 0.50 mg · L⁻¹、氯霉素 8.00 mg · L⁻¹、盐酸四环素 32.00 mg · L⁻¹ 和利福平 32.00 mg · L⁻¹.目前污水中抗生素质量浓度远低于菌株 N-1 的最小抑菌质量浓度,因此目前污水中的抗生素不影响菌株 N-1 对 PAEs 的降解.菌株 N-1 具有较大的 PAEs 污染修复范围,具有较大的应用前景.

参 考 文 献

- [1] XIONG Y H, PEI D S. A review on efficient removal of phthalic acid esters via biochars and transition metals-activated persulfate systems [J]. *Chemosphere*, 2021, 277: 130256.
- [2] WANG Z M, MA J C, WANG T T, et al. Environmental health risks induced by interaction between phthalic acid esters (PAEs) and biological macromolecules: a review [J]. *Chemosphere*, 2023, 328: 138578.
- [3] SUN F H, TAO Y R, SHI D, et al. Ecological risk assessment of phthalate esters (DBP and DEHP) in surface water of China [J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2021, 9: 710125.
- [4] YAN Y Y, ZHU F X, ZHU C Y, et al. Dibutyl phthalate release from polyvinyl chloride microplastics: Influence of plastic properties and environmental factors [J]. *Water Research*, 2021, 204: 117597.
- [5] HU R W, ZHAO H M, XU X H, et al. Bacteria-driven phthalic acid ester biodegradation: Current status and emerging opportunities [J]. *Environment International*, 2021, 154: 106560.
- [6] WANG L, GAN D P, GONG L, et al. Analysis of the performance of the efficient di-(2-ethylhexyl) phthalate-degrading bacterium *Rhodococcus pyridinovorans* DNHP-S2 and associated catabolic pathways [J]. *Chemosphere*, 2022, 306: 135610.
- [7] FANG Y, ZHANG L S, WANG J, et al. Identification of the di-n-butyl phthalate-biodegrading strains and the biodegradation pathway in strain LMB-1 [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, 53(3): 310-317.
- [8] LI J L, ZHANG J F, YADAV M P, et al. Biodegradability and biodegradation pathway of di-(2-ethylhexyl) phthalate by *Burkholderia pyrrocinia* B1213 [J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 443-450.
- [9] WANG Y Y, ZHAN W H, REN Q, et al. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a newly isolated *Gordonia* sp. and its application in the remediation of contaminated soils [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 689: 645-651.
- [10] WANG Y, LIU H, PENG Y E, et al. New pathways for the biodegradation of diethyl phthalate by *Sphingobium yanoikuyae* SHJ [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 71: 152-158.
- [11] YANG X, ZHANG C, HE Z, et al. Isolation and characterization of two n-butyl benzyl phthalate degrading bacteria [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 76: 8-11.
- [12] FENG N X, FENG Y X, LIANG Q F, et al. Complete biodegradation of di-n-butyl phthalate (DBP) by a novel *Pseudomonas* sp. YJB6 [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 761: 143208.
- [13] SHARIATI S, POURBABAEE A A, ALIKHANI H A, et al. Anaerobic biodegradation of phthalic acid by an indigenous *Ralstonia pickettii* strain SHAn2 isolated from Anzali international wetland [J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2022, 19(6): 4827-4838.
- [14] WANG P, GAO J J, ZHAO Y, et al. Biodegradability of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a newly isolated bacterium *Achromobacter* sp. RX [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 755: 142476.
- [15] ZHAO Z Z, LIU C, XU Q Q, et al. Characterization and genomic analysis of an efficient dibutyl phthalate degrading bacterium *Microbacterium* sp. USTB-Y [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2021, 37(12): 212.
- [16] ZHU X Z, NI X, WAIGI M G, et al. Biodegradation of mixed PAHs by PAH-degrading endophytic bacteria [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, 13(8): 805.
- [17] PANIGRAHI S, MOHANTY S, RATH C C. Characterization of endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MG00145 isolated from *Ocimum sanctum* with Indole Acetic Acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops [J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 134: 17-26.

- [18] HUANG F Y, AN Z Y, MORAN M J, et al. Recognition of typical antibiotic residues in environmental media related to groundwater in China(2009–2019)[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 399:122813.
- [19] CYCÓN M, MROZIK A, PIOTROWSKA-SEGET Z. Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10:338.
- [20] 陆孙琴, 李轶, 黄晶晶, 等. 污水处理厂二级出水中总异养菌群对6种抗生素的耐受性研究[J]. *环境科学*, 2011, 32(11):3419-3424.
LU S Q, LI Y, HUANG J J, et al. Antibiotic resistance of bacteria to 6 antibiotics in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(11):3419-3424.
- [21] TAHRANI L, VAN LOCO J, BEN MANSOUR H, et al. Occurrence of antibiotics in pharmaceutical industrial wastewater, wastewater treatment plant and sea waters in Tunisia[J]. *Journal of Water and Health*, 2016, 14(2):208-213.
- [22] 姜蕾, 陈书怡, 杨蓉, 等. 长江三角洲地区典型废水中抗生素的初步分析[J]. *环境化学*, 2008, 27(3):371-374.
JIANG L, CHEN S Y, YANG R, et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment of the Changjiang delta, China[J]. *Environmental Chemistry*, 2008, 27(3):371-374.
- [23] 柯润辉, 蒋榆林, 黄清辉, 等. 上海某城市污水处理厂污水中药物类个人护理用品(PCPs)的调查研究[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(6):1146-1155.
KE R H, JIANG Y L, HUANG Q H, et al. Investigative screening of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant in Shanghai[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(6):1146-1155.
- [24] 陈朝琼. 城市污水处理厂所出水中的细菌对抗生素耐性的研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(20):312-316.
CHEN Z Q. Antibiotic resistance of bacteria in effluents of municipal wastewater treatment plants[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(20):312-316.
- [25] LÖFFLER D, TERNES T A. Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000(1/2):583-588.
- [26] WANG J L, CHU L B, WOJNÁROVITS L, et al. Occurrence and fate of antibiotics, antibiotic resistant genes(ARGs) and antibiotic resistant bacteria(ARB) in municipal wastewater treatment plant: an overview[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 744:140997.
- [27] 刘佳佳, 马竹凤, 闫淑珍. 植物内生细菌对利福平的抗性及其紫外诱变研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(18):9580-9581.
LIU J J, MA Z F, YAN S Z. Study on determination of endophytic bacteria resistance to rifampin and its UV-mutagenesis[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(18):9580-9581.
- [28] 金明兰, 孙世梅, 赵玉鑫, 等. 污水厂二级出水中抗生素抗性菌残留及其特性[J]. *中国给水排水*, 2016, 32(23):92-95.
JIN M L, SUN S M, ZHAO Y X, et al. Residual of antibiotic-resistant bacteria and their characteristics in secondary effluent of municipal WWTP[J]. *China Water & Wastewater*, 2016, 32(23):92-95.
- [29] HUANG Y H, HUANG X J, CHEN X H, et al. Biodegradation of di-butyl phthalate(DBP) by a novel endophytic bacterium *Bacillus subtilis* and its bioaugmentation for removing DBP from vegetation slurry[J]. *Journal of Environmental Management*, 2018, 224:1-9.

Study on antibiotic resistance of endophytic bacterium efficiently degrading phthalates

Lü Huixiong¹, Huang Xuejing^{1,2}

(1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. School of Life Sciences and Biotechnology; State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Microbial degradation is considered as one of the most promising methods for repairing phthalates(PAEs). However, most highly efficient PAEs-degrading bacteria isolated from the environment are pathogenic or conditional pathogens. Endophytic bacteria are non-pathogenic bacteria. It is of great practical significance to isolate highly efficient PAEs-degrading endophytic bacteria. *Bacillus subtilis* N-1 was the research object in this study, which was an endophytic bacterium selected from a contaminated plant. Strain N-1 could grow using two types of PAEs as sole carbon source and energy source, which were dibutyl phthalate(DBP) and di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP). Its growth habits were explored, including the secretion of indole-3-acetic acid and the resistance to four antibiotics. The results showed that adding tryptophan could promote strain N-1 to secrete indole-3-acetic acid. What's more, 0.50 mg · L⁻¹ gentamycin, 8.00 mg · L⁻¹ chloramphenicol, 32.00 mg · L⁻¹ tetracycline and 32.00 mg · L⁻¹ rifampicin were the minimum inhibitory mass concentrations for strain N-1. At present, the concentration of antibiotics in wastewater is much lower than the minimum inhibitory mass concentration of strain N-1. Strain N-1 has a wide range of application for repairing PAEs pollution and has good prospects for application.

Keywords: phthalates; degradation; endophytic bacterium; indole-3-acetic acid; antibiotic resistance

[责任编辑 赵晓华 陈留院]