

Bis(2-ethylhexyl) phthalate가 in vitro에서 식물 토양병원성 세균 *Pectobacterium carotovorum*에 미치는 영향

김유리, 김상태, 상미경*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on plant soil-borne pathogenic bacterium *Pectobacterium carotovorum* in vitro

Yu-Ri Kim, Sang Tae Kim and Mee Kyung Sang*

Division of Agricultural Microbiology, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Republic of Korea

*Corresponding author

Mee Kyung Sang
Tel. 063-238-3055
E-mail. mksang@korea.kr

Received: 11 October 2022

Revised: 2 November 2022

Revision accepted: 4 November 2022

Abstract: Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is one of the plasticizers used in the polyvinyl chloride (PVC) industry. It is known to be easily released into the environment. In this study, we investigated effects of DEHP on growth, metabolic pathway, and virulence gene expression in soil-borne bacterial plant pathogen, *Pectobacterium carotovorum* SCC1 using in vitro assays. As a result, DEHP at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ did not affect the growth, cell membrane permeability, or ATPase activity of *P. carotovorum* SCC1. However, it decreased succinyl-CoA synthase (SCS) activity in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Relative expression levels of virulence genes encoding pectate lyase and pectin were differentially influenced by DEHP treatment. These results suggest that biological characteristics of *P. carotovorum* might be influenced by DEHP in soil.

Keywords: bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), phthalate, *Pectobacterium carotovorum*

서 론

전 세계적으로 플라스틱 사용량의 증가로 사용 후 폐기된 플라스틱이 분해되면서 해양으로 유출되어 이로 인한 환경오염 문제가 대두되고 있다. 해양뿐만 아니라 토양에도 문제를 야기하는데, 폐기된 플라스틱을 매립하거나 바이오고형물(biosolids), 퇴비와 멀칭 비닐을 사용함으로써 플라스틱이 토양에도 지속적으로 축적되고 있다(Wang *et al.* 2019a; Kumar *et al.* 2020). 또한, 이러한 플라스틱은 광산화 작용 등으로 미세한 입자로 분해되면서 다른 유해한 화학

물질과 결합하거나, 분해되는 과정에서 유출된 물질이 토양과 토양을 기반으로 살아가는 생물체에도 영향을 줄 수 있다고 보고되었다(Wang *et al.* 2019a).

플라스틱은 분해되면서 첨가제로 사용한 가소제가 환경에 유출되는데, 유출되는 대표적인 가소제로는 bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S와 같은 비스페놀 화합물(bisphenol compounds)과, diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 등을 포함한 프탈레이트(phthalate)가 있다(Net *et al.* 2015). 프탈레이트가 환경에 유출되면 해양 생물체에 면역체계 및 신경계 독

성을 일으키고, 어류의 혈액생리에 영향을 준다고 보고되었다(Oehlmann *et al.* 2009; Rochester and Bolden 2015; Kim *et al.* 2021). 토양은 광범위한 오염 물질의 주요 저장소 역할을 하며, 중국 일부 지역에서는 토양 내 프탈레이트 함유량이 0.14~2.13 mg kg⁻¹ (평균 0.99 mg kg⁻¹), 채소에서 검출되는 양은 0.15~6.94 mg kg⁻¹ (평균 1.49 mg kg⁻¹)인 것으로 보고되었다(Li *et al.* 2016). Wang *et al.* (2013)에 따르면 토양에서 총 phthalic acid ester (PAE)의 농도는 0.15~9.68 mg kg⁻¹으로 광범위하게 검출되었고, 그중 di-n-butyl phthalate (DnBP), DEHP, di-n-octyl phthalate (DnOP)가 가장 많은 양의 PAEs이었다. 가장 많이 사용되는 가소제 중 하나인 DEHP는 공기, 물, 토양 등에서 검출되며, 화학적 결합이 아닌 물리적 결합으로 이루어져 있어 쉽게 환경에 방출되고, 동물과 인간에서 내분비 교란을 일으킨다고 알려져 있다(Bagó *et al.* 2005). 또한, Du *et al.* (2009)은 농작물을 재배할 때 사용하는 멀칭 비닐에서 유래한 DEHP가 식물로 이행될 가능성이 있다고 보고하였다.

Pectobacterium spp.은 토양에 서식하는 식물병원성 세균으로 식물 세포벽을 분해하는 효소를 생성하여 다양한 작물에서 무름병을 일으킨다(Pérombelon and Kelman 1980). *P. carotovorum*에 의해 감염된 식물체는 토양과 맞닿는 부분이나 지하부의 상처부위에 수침상의 병반이 생기며, 포기 전체로 확산하여 물러지고 썩으면서 악취가 발생한다(Tournas 2005). 이 병원균은 뿌리, 잎 등 모든 식물 조직에 병을 일으킬 수 있고, 수확 후 저장된 과일과 채소에서조차 부패를 일으키는 등 광범위한 작물에 급격히 병을 일으켜 심각한 경제적 손실을 가져온다(Marquez-Villavicencio *et al.* 2011; Meng *et al.* 2017). 본 연구에서는 플라스틱 가소제인 DEHP가 식물에 무름병을 일으키는 주요 병원균인 *P. carotovorum*의 성장 및 대사, 병원성과 관련된 pectate lyase와 pectin 유전자 발현 등에 어떠한 영향을 주는지 *in vitro* 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세균 배양과 개체군 평가

P. carotovorum SCC1는 Luria-Bertani agar (LB, Difco, USA)에 28°C에서 48시간 배양한 후 단일 콜로니를 LB broth에 접종하여 28°C에서 48시간 배양하였다. 배양한 SCC1 (2.3 × 10⁷ CFU mL⁻¹)을 0.4% glucose가 함유된 M9 broth에

tween 20과 다양한 농도의 (10, 20, 40, 60, 80, 100 µg mL⁻¹) DEHP를 첨가하여 28°C에서 160 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 배양액 1 mL를 9 mL의 0.85% NaCl에 넣고 순차적으로 희석한 후, 100 µL의 희석액을 LB agar에 도말하고 28°C에서 배양하였다. 48시간 배양 후 colony forming unit (CFU mL⁻¹)을 측정하였으며, 대조구로는 DEHP가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

2. TCA cycle

P. carotovorum SCC1 (2.3 × 10⁷ CFU mL⁻¹)는 0.4% glucose가 함유된 M9 broth에 0.01% tween 20과 20 µg mL⁻¹의 DEHP를 첨가한 후 배양하였다. DEHP를 처리하지 않은 배지는 대조구로 사용하였다. 48시간 배양 후, 배양액을 13,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 균주를 모으고, 각각의 kit assay buffer에 OD₆₀₀ = 0.1로 현탁하여 사용하였다. Citrate, glutamate, oxaloacetate, pyruvate, isocitrate, malate, fumarate, succinate, α -ketoglutarate, α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH), citrate synthase activity, pyruvate dehydrogenase (PDH), succinate dehydrogenase (SDH), succinyl CoA synthetase (SCS)를 측정하기 위해 각각 assay kits (MAK057, MAK004, MAK070, MAK071, MAK061, MAK067, MAK060, MAK184, MAK054, MAK189, MAK193, MAK183, MAK197, MAK217; Sigma, USA)를 사용하였다.

3. 막 투과성과 ATPase 활성

위와 같이 배양한 균주 배양액에서 원심분리한 균체는 5 mM HEPES buffer (pH 7.2)로 현탁하여 OD₆₀₀ = 0.5 농도로 맞춘 후 사용하였다. 1-N-phenyl-naphthylamine (NPN; 40 µM stock) 50 µL에 5 mM glucose, 1 mM sodium azide가 포함된 5 mM HEPES buffer (pH 7.2) 50 µL와 균 현탁액 100 µL를 넣은 후 즉시 Hidex Sense microplate reader (Hidex, Finland)를 이용하여 excitation (355 nm)과 emission (405 nm)에서 측정하였다(Loh *et al.* 1984). ATPase 활성을 측정하기 위해 ATPase/GTPase Activity Assay Kit (MAK113, Sigma, USA)를 사용하였다. 원심분리한 균주를 assay buffer (40 mM Tris (pH 7.5), 80 mM NaCl, 8 mM MgAc₂, 1 mM EDTA)로 현탁하여 사용하였다. 4 mM ATP 10 µL에 현탁액 20 µL를 넣고 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후, reagent 200 µL를 넣고 30분간 발색하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Virulence gene primers used in this study

Primers	Primer sequence	Tm (°C)	References
<i>pelZ</i> -F	5'-CGGCTCACACCAAAGGTATT-3'	60	This study
<i>pelZ</i> -R	5'-TTTTCCCTTCCCCTCTCTCT-3'	62	
<i>pell</i> -F	5'-TAAGGCAGCGAGTCCAGAAT-3'	60	This study
<i>pell</i> -R	5'-GGTTGCTGCATCTTCACAGA-3'	60	
<i>pec</i> -F	5'-TGGCGCTAATGTACTGACCA-3'	60	This study
<i>pec</i> -R	5'-CGTGATGTAATCCGCCTTCT-3'	59	
<i>gyrA</i> -F	5'-AAAGAGACGGTTCGATTTGTGC-3'	60	Kravchenko (2021)
<i>gyrA</i> -R	5'-TCAGGTTGTGCGGTGGAATG-3'	63	

4. 병원성 관련 유전자 발현

DEHP 처리에 의한 *P. carotovorum* SCC1 균주의 병원성 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 균주는 위와 같이 배양하고 원심분리하여 준비하였다. 균주는 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON, South Korea)를 사용하여 RNA를 분리하고, cDNA는 TOPscript RT Dry MIX (Enzymomics, South Korea)를 사용하여 합성하였다. 실험에 사용한 primer set는 Table 1과 같다. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 위해, CFX96 Real-time PCR Detection system (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. qPCR은 95°C에서 10분, 40 cycles 95°C에서 15초, 56°C에서 30초한 후 72°C에서 30초로 유전자의 증폭을 수행하였다. *gyrA* 유전자를 정규화하는 데 사용하였으며, 상대적 발현 정도를 결정하기 위하여 2^{-ΔΔCt} method (Livak and Schmittgen 2001)를 사용하였다.

5. 통계분석

통계분석은 R studio 프로그램 (version 4.0.5, Rstudio Inc., USA)을 이용하였다. 정규성과 등분산 검정을 수행한 후, 분산분석 (analysis of variance, ANOVA)을 수행하였다. 사후검정으로 최소유의차검정 (least significant difference, LSD)을 통해 $p < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

DEHP가 *P. carotovorum* SCC1 균주의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도의 DEHP를 최소배지

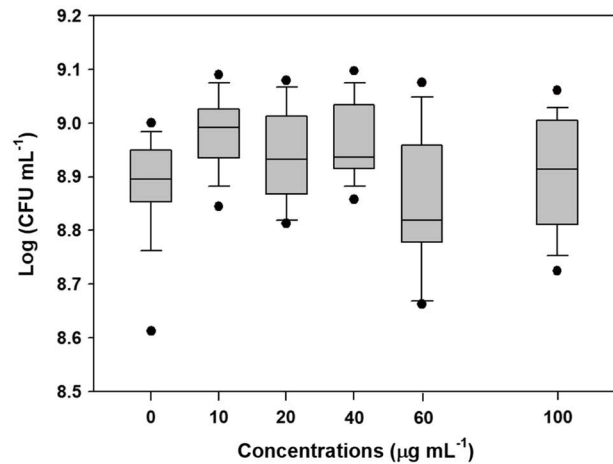


Fig. 1. Effects of various concentrations of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the bacterial growth of *Pectobacterium carotovorum* SCC1.

에 혼합하여 48시간 동안 배양한 후 CFU mL⁻¹를 평가한 결과, 실험조건에서는 100 μg mL⁻¹까지 DEHP를 혼합하여도 *P. carotovorum* SCC1 개체군 변화에 유의하게 영향을 주지 않았다 (Fig. 1). 48시간 배양 후 CFU mL⁻¹를 평가했기 때문에 실험조건에서 시간에 따른 균주 생장률은 평가하지 못했지만, 배양조건에서는 배양 후 DEHP 처리에 의한 SCC1의 개체군 변화는 관찰되지 않았다. 이에 반하여, Shafikova *et al.* (2018)은 최소배지에서 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 균주에 DEHP를 처리하였을 때, DEHP 농도가 증가함에 따라 biofilm 생성이 억제되고 균의 생장이 증가하는 것을 흡광도로 측정하였다. 흡광도로 세균의 생장을 측정하는 것은 세균의 생존 유무를 고려하지 않은 방법인 반면, 본 연구는 glucose를 영양원으로 넣은 최소배지에 배양

하였고, 살아있는 세균을 측정하는 방식인 colony forming unit (CFU)를 사용하여 실험조건이 다르기 때문에 결과가 상이한 것으로 추측된다.

P. carotovorum SCC1 대사에 DEHP가 미치는 영향을 분석하기 위하여 세포막 투과성, ATPase 활성, TCA cycle와 관련한 효소활성 및 대사체를 분석한 결과, 세포막 투과성과 ATPase 활성은 DEHP에 의해 유의하게 영향을 받지 않았다 (Table 2). 생물체가 프탈레이트에 노출되면, 친유성인 프탈레이트는 세포막의 소수성 영역에 축적되어 이중층이 팽창되고, adenosine triphosphate (ATP) 생성과 같은 세포막에서 이루어지는 대사를 방해하거나, 지방산과 같은 세포막에 영향을 주어 세포막 구성을 재편성하는 것으로 알려져 있다 (Sikkema et al. 1994). Dimethyl phthalate (DMP)는 *Pseudomonas fluorescens*의 세포막 변화를 유도하고, 생장과 에너지 대사와 관련된 생물학적 기능에 영향을 주는 것으로 알려졌다 (Wang et al. 2019b). 하지만 본 연구에서 실험한 DEHP의 경우 혼합된 배지에 *P. carotovorum* SCC1를 배양할 경우, ATPase 활성과 세포막 유동성에 유의한 변화를 주지 않았다 (Table 2). 또한, 실험한 TCA cycle과 관련된 효소활성과 대사체 중 Succinyl-CoA synthase 활성만 DEHP 처리에 의해 감소하였다 (Tables 3 and 4). 플라스틱

을 분해하는 과정에서 나오는 산물이 미생물 TCA 대사에 영향을 줄 수 있는데, *Pseudomonas* sp. AKS2는 Polyethylene succinate 에스테르 결합을 끊어 분해하면서 TCA 순환 대사산물인 숙신산을 생성하는 것으로 알려졌다 (Tribedi et al. 2012). 또한, polyethylene terephthalate (PET)을 분해하는 미생물은 가수분해를 통해 PET를 terephthalic acid (TPA)와 ethylene glycol (EG)로 분해하고, TPA는 세포 내에서 다양한 경로를 통해 protocatechuic acid (PCA)로 전환되어 TCA cycle를 통해 대사되며, 분해산물인 EG는 대사 경로에 따라 TCA cycle의 전구체로 사용될 수 있다고 보고되었다 (Yoshida et al. 2016; da Costa et al. 2020). 이러한 관련 보고는 주로 미생물이 플라스틱을 생물적으로 분해하면서 발생한 분해 산물이 다시 미생물 대사에 영향을 주는 경우를 연구한 것으로 이는 플라스틱 분해 중에 유출되는 프탈레이트도 간접적으로 다른 미생물 대사 활성에 영향을 줄 가능성이 있음을 의미한다.

Table 2. ATPase activity and membrane permeability of *Pectobacterium carotovorum* SCC1

Treatment	ATPase activity	Membrane permeability
	U L ⁻¹	Relative fluorescence unit (RFU)
DEHP (-)	5267 ± 474 ^a	866328 ± 30779
DEHP (+)	5168 ± 568	829502 ± 11288

^aMean ± standard error.

Table 3. Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on metabolites in the tricarboxylic acid (TCA) cycle

Metabolites	Amount (ng μL ⁻¹)	
	DEHP (-)	DEHP (+)
Citrate	0.27 ± 0.19 ^a	0.27 ± 0.10
Glutamate	3.53 ± 0.48	3.45 ± 0.59
Oxaloacetate	2.99 ± 0.21	2.96 ± 0.18
Pyruvate	1.19 ± 0.01	1.19 ± 0.02
Isocitrate	2.36 ± 0.27	3.29 ± 2.12
Malate	9.03 ± 3.12	8.23 ± 3.26
Fumarate	3.97 ± 0.91	3.37 ± 0.78
Succinate	25.96 ± 1.53	25.79 ± 2.39
α-ketoglutarate	3.52 ± 0.23	3.37 ± 0.03

^aMean ± standard error.

Table 4. Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on enzymes related to the glycolysis and tricarboxylic acid (TCA) cycle

Enzymes	Activity (nM min ⁻¹ μL ⁻¹)	
	DEHP (-)	DEHP (+)
Citrate synthase	0.0008 ± 0.0001 ^a	0.0007 ± 0.0001
Succinyl-CoA synthase (SCS)	0.001 ± 0.008*	0.0005 ± 0.0001
Succinate dehydrogenase (SDH)	0.006 ± 0.0008	0.005 ± 0.001
α-ketoglutarate dehydrogenase (α-KGDH)	2.09 ± 1.45	2.19 ± 1.66
Pyruvate dehydrogenase (PDH)	1.23 ± 0.70	1.50 ± 0.50

^aMean ± standard error.

*An asterisk means statistical difference by least significant difference (LSD) ($p < 0.05$).

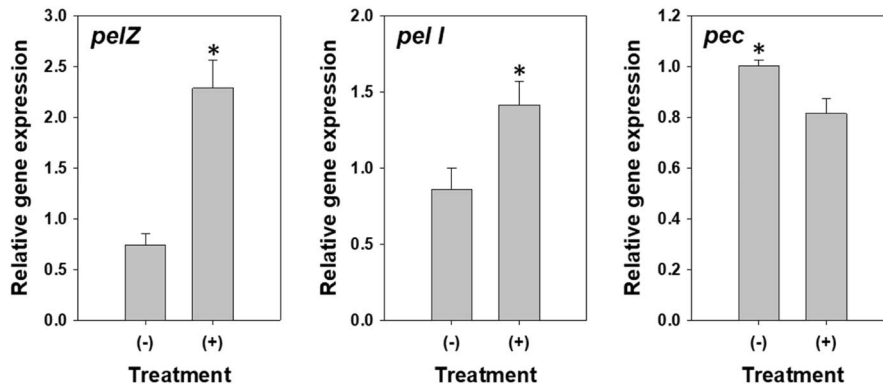


Fig. 2. Relative expression levels of *pelZ*, *pelI*, and *pec* genes of *Pectobacterium carotovorum* SCC1. An asterisk means statistical difference by least significant difference ($p < 0.05$). Error bars indicate standard errors.

최근에는 플라스틱인 polypropylene (PP)이 *Rhodococcus equi*의 독성 관련 단백질인 VapA 발현을 유도하여 병원성을 증가시켰다고 알려졌으며 (Hansen *et al.* 2022), 프탈레이트가 생물체의 병발생과 관련이 있다는 연구 결과들이 보고되고 있다 (Igarashi *et al.* 2006; Gascon *et al.* 2015; Martins *et al.* 2016; Tseng *et al.* 2022). *P. carotovorum*는 식물 세포를 분해하는 pectate lyase와 pectinase 등의 효소를 분비하여 식물에 무름병을 일으키는데, 이 두 효소와 관련한 유전자 발현에 DEHP가 미치는 영향을 분석한 결과 pectate lyase 효소를 인코딩하는 *pelI*와 *pelZ*의 발현량이 대조군 대비 유의하게 증가하였고, pectinase를 인코딩하는 *pec* 발현량은 감소하였다 (Fig. 2). 기내배양조건에서 *P. carotovorum*의 병원성과 관련이 있는 유전자 발현이 DEHP 처리 유무에 따라 달라지는 것으로 보아, 실제 기주 작물이 있는 토양에 DEHP가 존재할 경우 작물과 상호작용, 토양과 이화학적 반응 등이 다양하게 일어날 것으로 예상된다. DEHP가 토양 유형에 따라 토양미생물에 주는 영향이 다르고, 식물체에 생리적 변화도 일으키기 때문에 이러한 요인으로 병 발생에 영향을 줄 수 있어 추후에 식물체에서 검정을 하고자 한다 (Ma *et al.* 2013; Gao *et al.* 2020; Ge *et al.* 2020).

본 연구에서는 DEHP가 혼합된 배지에서 *P. carotovorum* SCC1를 배양할 경우, 배양조건 내에서는 제한적으로 개체군 및 Succinyl-CoA synthase을 제외한 TCA 대사 관련 활성은 유의하게 변화하지 않았지만, 병원성과 관련된 pectate lyase와 pectinase의 유전자가 상이하게 발현하였다. 이러한 *in vitro* 연구 결과는 앞으로 DEHP 등의 물질이 토양에서 *P. carotovorum*에 의한 병 발생 등에 주는 영향을 연구하는 데 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 플라스틱 가소제인 DEHP가 식물 병원균 중 하나인 *P. carotovorum* SCC1 균주에 미치는 영향을 조사하였다. DEHP가 균주 성장과 대사에 미치는 영향을 조사한 결과, 개체군 변화에 유의한 영향을 주지 않았으며, 세포막 투과성, ATPase 활성에 유의한 변화가 없었지만 TCA cycle에서 DEHP 첨가에 따라 Succinyl-CoA synthase 활성이 유의적으로 감소하였다. 병원성 관련 유전자 발현량을 관찰한 결과 pectate lyase 유전자 발현량이 상대적으로 증가한 반면, pectinase 유전자는 상대적으로 발현량이 감소하였다. 따라서 DEHP는 *P. carotovorum* SCC1의 개체군 변화나 대사에는 유의미한 영향을 미치지 않지만 병원성 관련 유전자 발현에 영향을 미치므로 본 연구 결과는 향후 실제 식물 재배 조건에서 DEHP가 존재할 때 *P. carotovorum*의 특성에 관한 기초연구 자료로 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

CRedit authorship contribution statement

Yu-Ri Kim: Investigation, Writing-Original draft preparation, Formal analysis. Sang Tae Kim: Validation, Formal analysis. Mee Kyung Sang: Conceptualization, Data curation, Writing-Review & editing

사 사

본 연구는 국립농업과학원 연구개발사업 (과제번호: PJ01475802)의 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Bagó B, Y Martín, G Mejía, F Broto-Puig, J Díaz-Ferrero, M Agut and L Comellas. 2005. Di-(2-ethylhexyl) phthalate in sewage sludge and post-treated sludge: Quantitative determination by HRGC-MS and mass spectral characterization. *Chemosphere* 59:1191–1195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.077>
- da Costa AM, VR de Oliveira Lopes, L Vidal, J Nicaud, AM de Castro and MAZ Coelho. 2020. Poly (ethylene terephthalate) (PET) degradation by *Yarrowia lipolytica*: Investigations on cell growth, enzyme production and monomers consumption. *Process Biochem.* 95:81–90. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.001>
- Du QZ, XW Fu and HL Xia. 2009. Uptake of di-(2-ethylhexyl) phthalate from plastic mulch film by vegetable plants. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* 26:1325–1329. <https://doi.org/10.1080/02652030903081952>
- Gao M, Z Zhang, Y Dong, Z Song and H Dai. 2020. Responses of bacterial communities in wheat rhizospheres in different soils to di-*n*-butyl and di(2-ethylhexyl) phthalate contamination. *Geoderma* 362:114126. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114126>
- Gascon M, D Valvi, J Fornas, M Casas, D Martínez, J Júlvez, N Monfort, R Ventura, J Sunyer and M Vrijheid. 2015. Prenatal exposure to phthalates and neuropsychological development during childhood. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 218:550–558. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.05.006>
- Ge J, J Cheng, Y Li, QX Li and XYu. 2020. Effects of dibutyl phthalate contamination on physiology, phytohormone homeostasis, rhizospheric and endophytic bacterial communities of *Brassica rapa* var. *chinensis*. *Environ. Res.* 189:109953. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109953>
- Hansen P, K von Barga, A Jünger-Leif and A Haas. 2022. Laboratory plasticware induces expression of a bacterial virulence factor. *mSphere* 7:e00311-22. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00311-22>
- Igarashi A, S Ohtsu, M Muroi and K Tanamoto. 2006. Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF- κ B. *Biol. Pharm. Bull.* 29:2120–2122. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2120>
- Kim SH, GH Kim, JS Kim, JH Kim, YH Jeon, JH Cho and DH Kim. 2021. Changes in hematological parameters and plasma components of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to acute microplastics. *Korean J. Environ. Biol.* 39:344–353. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.3.344>
- Kravchenko U, N Gogoleva, N Kalubaka, A Kruk, Y Diubo, Y Gogolev and Y Nikolaichik. 2021. The PhoPQ two-component system is the major regulator of cell surface properties, stress responses and plant-derived substrate utilisation during development of *Pectobacterium versatile*-host plant pathosystems. *Front. Microbiol.* 11:621391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.621391>
- Kumar M, X Xiong, M He, DC Tsang, J Gupta, E Khan, S Harrad, D Hou, YS Ok and NS Bolan. 2020. Microplastics as pollutants in agricultural soils. *Environ. Pollut.* 265:114980. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114980>
- Li C, J Chen, J Wang, P Han, Y Luan, X Ma and A Lu. 2016. Phthalate esters in soil, plastic film, and vegetable from greenhouse vegetable production bases in Beijing, China: concentrations, sources, and risk assessment. *Sci. Total Environ.* 568:1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.077>
- Livak KJ and TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loh B, C Grant and R Hancock. 1984. Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26:546–551. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.4.546>
- Ma T, P Christie, Y Teng and Y Luo. 2013. Rape (*Brassica chinensis* L.) seed germination, seedling growth, and physiology in soil polluted with di-*n*-butyl phthalate and bis(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20:5289–5298. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1520-5>
- Marquez-Villavicencio MDP, RL Groves and AO Charkowski. 2011. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa. *Plant Dis.* 95:232–241. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0526>
- Martins K, B Hagedorn, S Ali, J Kennish, B Applegate, M Leu, L Epp, C Pallister and P Zwollo. 2016. Tissue phthalate levels correlate with changes in immune gene expression in a population of juvenile wild salmon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71:35–47. <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0283-7>
- Meng X, A Chai, Y Shi, X Xie, Z Ma and B Li. 2017. Emergence of bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in China. *Plant Dis.* 101:279–287. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0763-RE>
- Net S, A Delmont, R Sempéré, A Paluselli and B Ouddane. 2015. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Sci. Total Environ.* 515:162–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.013>
- Oehlmann J, U Schulte-Oehlmann, W Kloas, O Jagnytsch, I Lutz, KO Kusk, L Wollenberger, EM Santos, GC Paull and KJ van Look. 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* 364:2047–2062. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0242>
- Pérombelon MCM and A Kelman. 1980. Ecology of the soft rot

- erwinias*. Annu. Rev. Phytopathol. 18:361–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.002045>
- Rochester JR and AL Bolden. 2015. Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. Environ. Health Perspect. 123:643–650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>
- Shafikova TN, YV Omelichkina, AG Enikeev, SV Boyarkina, DE Gvildis and AA Semenov. 2018. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation. Doklady Biol. Sci. 480:107–109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>
- Sikkema J, JA de Bont and B Poolman. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. Biol. Chem. 269:8022–8028. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37154-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37154-5)
- Tournas VH. 2005. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. Crit. Rev. Microbiol. 31:33–44. <https://doi.org/10.1080/10408410590886024>
- Tribedi P, S Sarkar, K Mukherjee and AK Sil. 2012. Isolation of a novel *Pseudomonas* sp. from soil that can efficiently degrade polyethylene succinate. Environ. Sci. Pollut. Res. 19:2115–2124. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0711-1>
- Tseng H, C Li, S Wu, H Su, T Wong, H Wu, Y Chang, S Huang, EM Tsai and J Suen. 2022. Di-(2-ethylhexyl) phthalate promotes allergic lung inflammation by modulating CD8 α^+ dendritic cell differentiation via metabolite MEHP-PPAR γ axis. Front. Immunol. 13:581854. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.581854>
- Wang J, Y Luo, Y Teng, W Ma, P Christie and Z Li. 2013. Soil contamination by phthalate esters in Chinese intensive vegetable production systems with different modes of use of plastic film. Environ. Pollut. 180:265–273. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.036>
- Wang J, X Liu, Y Li, T Powell, X Wang, G Wang and P Zhang. 2019a. Microplastics as contaminants in the soil environment: A mini-review. Sci. Total Environ. 691:848–857. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.209>
- Wang Z, C Wang, Y You, W Xu, Z Lv, Z Liu, W Chen, Y Shi and J Wang. 2019b. Response of *Pseudomonas fluorescens* to dimethyl phthalate. Ecotoxicol. Environ. Saf. 167:36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.078>
- Yoshida S, K Hiraga, T Takehana, I Taniguchi, H Yamaji, Y Maeda, K Toyohara, K Miyamoto, Y Kimura and K Oda. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). Science 351:1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>