

具氯氟菊酯降解功能的植物内生细菌分离鉴定及降解特性研究

孙丽娜, 黄开华, 高新华, 陈伟, 白娜玲, 吕卫光

引用本文:

孙丽娜, 黄开华, 高新华, 等. 具氯氟菊酯降解功能的植物内生细菌分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(1): 70-77.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0760>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

氟氯菊酯对草鱼的急性毒性及转氨酶活性的影响

王伟, 柴菁, 孙翰昌, 丁诗华

农业环境科学学报. 2017, 36(12): 2388-2393 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0817>

植被过滤带对地表径流中泥沙和杀虫剂的净化效果

刘兴誉, 杨方社, 李怀恩, 王浩, 马艺坤, 张鸿敏, 韩琛

农业环境科学学报. 2017, 36(5): 974-980 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1507>

两种常用氯氟菊酯对秀丽隐杆线虫生殖发育影响的信号转导通路

余雪锋, 耿文敬, 郭肖颖, 朱江

农业环境科学学报. 2019, 38(9): 2066-2073 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0202>

邻苯二甲酸酯降解菌的筛选、降解特性及土壤修复研究

杨婧, 郭楚玲, 刘沙沙, 党志, 卢桂宁

农业环境科学学报. 2018, 37(5): 933-940 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1689>

一株DMP降解菌的分离鉴定及特性研究

徐伟慧, 刘帅, 王志刚

农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1724-1732 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0089>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

孙丽娜, 黄开华, 高新华, 等. 具氯氰菊酯降解功能的植物内生细菌分离鉴定及降解特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(1): 70–77.

SUN Li-na, HUANG Kai-hua, GAO Xin-hua, et al. Isolation, identification, and degradation characteristics of endophytic cypermethrin-degrading bacteria [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(1): 70–77.

具氯氰菊酯降解功能的植物内生细菌 分离鉴定及降解特性研究

孙丽娜^{1,2}, 黄开华^{1,2}, 高新华^{1,2}, 陈伟^{1,2}, 白娜玲^{1,2}, 吕卫光^{1,2*}

(1. 上海市农业科学院生态环境保护研究所, 上海 201403; 2. 上海低碳农业工程技术研究中心, 上海 201403)

摘要:从上海郊区某农药厂附近生长的牛筋草中分离到一株能以氯氰菊酯作为唯一碳源生长的植物内生菌, 命名为 A-24。该菌在 48 h 内对 20 mg·L⁻¹ 的氯氰菊酯的降解率为 91.8%, 72 h 内可完全降解氯氰菊酯。通过生理生化观察, 结合 16S rRNA 基因序列分析, 将该菌株鉴定为 *Achromobacter* sp.。菌株 A-24 降解氯氰菊酯的最适温度和 pH 分别为 30 °C 和 7.0; 当菌株 A-24 的接种量 ≥2% 时, 其对 20 mg·L⁻¹ 氯氰菊酯的降解效果较好, 降解率在 80% 以上; 当氯氰菊酯浓度 ≤50 mg·L⁻¹ 时, 菌株 A-24 对氯氰菊酯有较高的降解率, 降解率在 70% 以上。通过 HPLC 鉴定降解产物 3-苯氧基苯甲酸, 推测氯氰菊酯通过酯键断裂生成二氯菊酸和 3-苯氧基苯甲醛, 然后 3-苯氧基苯甲醛生成 3-苯氧基苯甲酸。本研究结果为利用功能内生细菌调控植物代谢氯氰菊酯, 进而有效规避作物污染风险提供新途径。

关键词:植物内生菌; 氯氰菊酯; 生物降解; 分离鉴定

中图分类号: X592 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2020)01-0070-08 doi:10.11654/jaes.2019-0760

Isolation, identification, and degradation characteristics of endophytic cypermethrin-degrading bacteria

SUN Li-na^{1,2}, HUANG Kai-hua^{1,2}, GAO Xin-hua^{1,2}, CHEN Wei^{1,2}, BAI Na-ling^{1,2}, LÜ Wei-guang^{1,2*}

(1. Institute of Ecological Environment Protection, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Low-carbon Agriculture, Shanghai 201403, China)

Abstract: A cypermethrin-degrading endophytic bacteria was isolated from an insecticide factory in Shanghai, China. This isolate, designated as A-24, was identified as *Achromobacter* sp. based on morphological, physiological, biochemical characterization, and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequence. The strain could degrade 91.8% of 20 mg·L⁻¹ cypermethrin within 48 h, and completely degrade 20 mg·L⁻¹ cypermethrin within 72 h. Strain A-24 could also utilize cypermethrin as the sole carbon source for growth. The optimum temperature and pH for cypermethrin degradation by strain A-24 were 30 °C and 7.0, respectively. When the inoculation volume was more than 2% and the cypermethrin concentration was less than 50 mg·L⁻¹, strain A-24 could rapidly degrade cypermethrin. High-performance liquid chromatography analysis indicated that the strain degraded cypermethrin via hydrolysis of the carboxylester linkage to yield 3-phenoxybenzaldehyde, which was further converted into 3-phenoxybenzoic acid under the catalysis of a dehydrogenase. This study provides a new strategy for removal of cypermethrin residues from plants by endophytic bacteria.

Keywords: endophytic bacteria; cypermethrin; biodegradation; isolation and identification

收稿日期: 2019-07-08 录用日期: 2019-10-10

作者简介: 孙丽娜(1986—), 女, 河北邯郸人, 博士研究生, 从事有机污染物生物修复研究。E-mail: slna@163.com

*通信作者: 吕卫光 E-mail: lwei1217@sina.com

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划项目(17YF1416900); 国家重点研发计划项目(2017YFD0201104); 上海市农业科学院卓越团队建设计划项目; 上海市科委长三角科技联合攻关项目(18295810500)

Project supported: The Shanghai Sailing Program(17YF1416900); The National Key Research and Development Program of China(2017YFD0201104); The SAAS Program for Excellent Research Team; The Domestic Cooperation Program of Shanghai Science and Technology Commission(18295810500)

氯氰菊酯属拟除虫菊酯类杀虫剂之一,是1983年由Shell International Chemical公司(现为BASF)产业化开发^[1],具有广谱杀虫作用。氯氰菊酯可用作棉花、蔬菜、果树、茶树、大豆等作物上害虫的防治。对棉花和果树上的鳞翅目、半翅目、双翅目、直翅目、鞘翅目、膜翅目等多种害虫均有较好的防治效果^[2]。因此,菊酯类杀虫剂在世界范围内得到广泛应用,目前占我国农业杀虫剂使用面积的三分之一以上。但过度使用和广泛的使用会对人体健康和生态环境安全造成威胁。研究表明,经常接触氯氰菊酯会产生免疫毒性^[3],而且此类农药容易在人体内积累,引发各种慢性疾病^[4]。近年来,已有多次关于氯氰菊酯蔬菜残留的报道。李晓莉^[5]于2008—2011年间对淄博市蔬菜中拟除虫菊酯类农药残留进行了检测,其中氯氰菊酯残留量最高。雷雨等^[6]于2016年调查了定西地区市售蔬菜拟除虫菊酯类农药残留,其总检出率为45.0%,超标率为0.04%,超标农药主要为氯氰菊酯和高效氯氰菊酯。因此,有关氯氰菊酯残留的生物修复得到了广泛关注。

植物内生菌是指真菌或细菌一生中的某个阶段能进入活体植物组织内,并在植物内不引起明显组织变化的微生物^[7]。植物内生菌通常归属于宿主植物所栽种土壤中普遍存在的特殊属,是植物组织内的有益菌落^[8]。研究表明,植物内生细菌产生的酶类、生长素等次生代谢产物,能调节植物代谢,促进生长,提升植物耐受性^[9-11]。与从土壤中分离的降解菌株相比,植物内生菌能有效定殖在植物体内,促进植物对污染物的吸收、转化和降解,从而减轻污染物对植物的毒害作用。因此,亟需筛选具有氯氰菊酯降解特性的植物功能内生菌。

本研究通过富集筛选得到一株以氯氰菊酯为唯一碳源生长的植物内生细菌,并系统研究了其生物学特性和降解功能,以期利用功能内生细菌来调控植物代谢氯氰菊酯,进而有效地规避作物污染风险提供新途径。

1 材料方法

1.1 试验材料

氯氰菊酯(纯度>98%)购于Sigma公司,甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。

供试植株牛筋草 *Eleusine indica* (L.) Gaertn., 采自上海郊区某农药厂附近(30°55'N, 121°03'E)。植株生长良好,采集后立即带回实验室进行菊酯降解菌

的分离筛选。

1.2 培养基

根据本实验需求,查询相关文献^[12]中培养基的配制,以1000 mL液体培养基为标准。

Luria-Bertani(LB)培养基:10 g胰蛋白胨,5 g酵母膏,10 g氯化钠,1000 mL去离子水,pH 7.0~7.2。固体培养基是在每1000 mL液体培养基中加入15~20 g琼脂粉,121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

无机盐培养基(MSM):0.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g K_2HPO_4 , 0.2 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.08 g $CaSO_4$, 1000 mL去离子水,pH 7.0~7.2。固体培养基是在每1000 mL液体培养基中加入15~20 g琼脂粉,121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

菊酯降解培养基:将菊酯原药溶于二甲基亚砜(色谱纯度)配制成浓度为10 000 $\mu L \cdot L^{-1}$ 的母液,过滤除菌,然后加入至已灭菌的MSM培养液,菊酯的终浓度为20 $mg \cdot L^{-1}$ 。

1.3 功能植物内生细菌的分离筛选

取适量新鲜的植株样本,用无菌水将植株表面附带的灰尘泥土冲洗干净,使植物表面没有污迹,然后自然风干。用75%酒精漂洗3~5 min,然后用无菌水冲洗3~4次,再用无菌水冲洗5次。将表面消毒冲洗好的植物组织放置于已灭菌的研钵内研磨,吸取汁液均匀涂布于LB培养基平板上,于30 °C条件下避光培养2~7 d。将最后一次冲洗的水涂布到LB培养基上作为对照,以检验表面消毒的效果。待长出菌落后挑取单菌落进一步划线,以菊酯降解培养基来分离纯化。选取能连续5次在氯氰菊酯作为唯一碳源的无机盐培养基上生长的菌株,保存于LB培养基斜面上供进一步研究。利用气相色谱测定氯氰菊酯的含量,采用稀释平板法测定菌株的细胞数量,确定降解菌株对氯氰菊酯的降解能力及生长情况。

1.4 菌株的鉴定

将分离得到的降解菌株命名为A-24,并对其进行菌落形态学、细胞形态学观察^[13]及16S rDNA序列同源性比对分析,确定其分类地位。采用高盐法提取菌体DNA^[14],扩增降解菌株16S rRNA基因序列。引物为16S rRNA基因序列通用引物^[15],正向引物27F序列为5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物1492R序列为5'-TACCTTGTACGACTT-3'。扩增产物用AXYGEN核酸纯化试剂盒纯化回收,通过琼脂糖凝胶电泳检测回收的DNA片段纯度和大小(约1.5 kb),然后进行TA克隆,测序。TA克隆体系(5

μL)为:pMD18-T 0.5 μL , DNA 片段 2 μL , Solution I (TaKaRa) 2.5 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 酶连过夜。将测序结果在 Ez-Taxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 上进行在线比对分析^[16]。

1.5 菌株 A-24 降解氯氰菊酯与其生长关系的测定

挑取 A-24 单菌落接种至含 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯氰菊酯的 100 mL LB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养至对数期, 6000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集菌体, 使用 MSM 洗涤菌体两次, 最后用 MSM 重悬, 调节菌体浓度为 1.0×10^9 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 作为种子液备用。将 1% 的菌株 A-24 接种到菊酯降解培养基中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养, 每 12 h 取样一次, 测定培养液中氯氰菊酯的含量和菌株 A-24 的生长量 ($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

1.6 不同碳源和氮源对菌株生长的影响

将菌株以 2% 接种量接种到 100 mL 基础盐培养基中, 分别添加 0.5% (V/m) 的麦芽糖、糊精、蔗糖、葡萄糖、果糖和淀粉作为碳源, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 48 h, 分别测定各样品在 OD_{600} 处的吸光值, 每个处理 3 次重复。

将菌株以 2% 接种量接种到 100 mL 基础盐培养基中, 分别添加 0.5% (V/m) 的尿素、硝酸钾、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、亚硝酸钠、硫酸铵、硝酸铵作为氮源, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 48 h, 分别测定各样品在 OD_{600} 处的吸光值, 每个处理 3 次重复。

1.7 菊酯降解特性研究

在菊酯降解培养基中, 按 2% 接种量接入 A-24 菌株种子液, 分别于 20、25、30、35、42 $^{\circ}\text{C}$ 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 48 h 后取样检测菊酯残留量, 计算降解率, 确定温度对菌株降解联苯菊酯的影响。

在初始 pH 分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的 MSM 培养基中, 加入 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的菊酯, 按 2% 接种量接入菌株的种子液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 48 h 后取样检测菊酯残留量, 计算降解率, 确定 pH 对菌株降解菊酯的影响。设置空白对照。采用乙酸钠缓冲液调节 pH 5.0、6.0, 磷酸钠缓冲液调节 pH 6.0~8.0, Tris-HCl 缓冲液调节 pH 8.0~10.0。

在添加氯氰菊酯终浓度分别为 20、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的无机盐培养基中, 按 2% 接种量接入 A-24 菌株种子液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 48 h 后取样检测菊酯残留量, 计算降解率, 确定初始氯氰菊酯浓度对菌株 A-24 降解率的影响。对照是添加相应二甲亚砜溶剂到无盐培养基中, 并在相同条

件下培养。

在菊酯降解培养基中, 分别按 0.5%、1%、2%、5% 和 10% 接种量接入 A-24 菌株种子液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 48 h 后取样检测菊酯残留量, 计算降解率, 确定接种量对菌株 A-24 降解氯氰菊酯的影响。

1.8 氯氰菊酯含量测定及降解产物检测

氯氰菊酯含量测定采用全量提取法: 在 20 mL 培养基中加 20 mL 二氯甲烷, 剧烈振荡 3 min 后, 静置分层, 取有机相经无水 Na_2SO_4 脱水, 然后准确取 1 mL 有机相置于 2 mL 离心管中, 并在通风柜内挥发后, 重新定容到 1 mL 色谱纯正己烷中, 气相色谱检测氯氰菊酯浓度。气相色谱检测条件: ECD 检测器, SPB-5 毛细管柱 (30.0 mm $\times$ 0.530 mm $\times$ 1.5 μm), 进样口温度 240 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 240 $^{\circ}\text{C}$, 检测器温度 310 $^{\circ}\text{C}$, 载气为氮气, 流速为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ^[17]。

降解产物检测采用全量提取法: 准确取 1 mL 有机相置于 2 mL 离心管中, 并在通风柜内挥发, 最后定容到 1 mL 乙腈/水 (60/40, V/V , 用甲酸酸化 pH 为 3.0) 溶液中, 采用高效液相色谱法对降解产物进行鉴定。高效液相色谱 (HPLC) 检测条件: 液相色谱柱为 C18 反相柱, 规格 250 mm $\times$ 4.6 mm; 流动相为乙腈: 水 (60: 40, $V: V$); 加入甲酸, pH 调为 3.0, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 270 nm^[17]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

从上海郊区某农药厂附近采集植物样品牛筋草, 从其根茎中分离到 1 株降解氯氰菊酯的内生菌, 命名为 A-24。菌株 A-24 的菌落圆形隆起、奶油状、边缘整齐, 其生理生化特征为: 需氧, 革兰氏染色呈阴性, 氧化酶、脲酶和过氧化氢酶呈阳性, 硝酸还原酶和淀粉水解酶呈阴性。

通过引物 27F 和 1492R 对菌株 A-24 的 16S rRNA 进行扩增, 获得 1398 bp 的基因序列, 将该序列提交到 GenBank, 登录号为 MK454541。将菌株 A-24 的 16S rRNA 基因序列在数据库 EzBilCloud 中比对分析, 结果显示菌株 A-24 与 *Achromobacter* 属亲缘关系最近, 其中与 *Achromobacter xylosoxidans* NBRC 15126^T 相似性达 99.00%, 与 *Achromobacter marplatensis* B2^T 相似性达 98.76%。运用 MEGA5.0 软件通过 Neighbor-joining 法对菌株 A-24 构建系统发育树 (图 1), 结果表明, 菌株 A-24 与菌株 *Achromobacter xylosoxidans* NBRC 15126^T 位于同一分支。结合菌落形态特性、生理生化

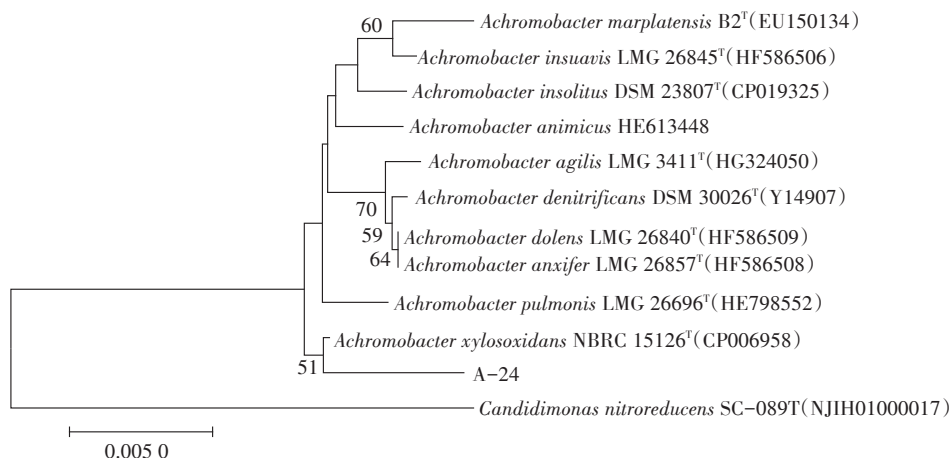


图1 基于16S rRNA基因序列构建的菌株A-24系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining analysis based on 16S rRNA gene sequences of strain A-24 and related species

特征以及16S rRNA基因比对分析,菌株A-24初步鉴定为*Achromobacter*属。

2.2 菌株A-24以氯氰菊酯为唯一碳源的降解和生长曲线

氯氰菊酯的含量和菌株A-24的生长量结果如图2所示。菌株A-24在48 h内对 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯氰菊酯的降解率为91.8%,72 h内完全降解氯氰菊酯。菌株A-24在降解氯氰菊酯的过程中能够利用其作为唯一碳源生长,菌体生长在12 h前为延滞期,12~60 h为对数期,由最初 $1.32 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 增加至 $6.92 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。表明菌株A-24能够降解氯氰菊酯,并能够利

用氯氰菊酯作为碳源和能源生长。

2.3 不同碳源和氮源对菌株A-24生长的影响

各碳源对菌株A-24生长的影响结果如图3A。培养基MSM中添加果糖时菌株A-24在 OD_{600} 处的吸光值最高,麦芽糖其次,葡萄糖最低。

各氮源对菌株A-24生长的影响结果如图3B。菌株A-24在 OD_{600} 处的吸光值随着时间的增加而增加,有机氮源牛肉膏、蛋白胨和酵母膏培养基中A-24的吸光值高于尿素培养基,无机氮源硝酸钾、硝酸铵和硫酸铵培养基中的吸光值明显高于亚硝酸钠。

2.4 温度和pH对菌株A-24降解氯氰菊酯的影响

如图4A所示,菌株A-24在 30°C 时对氯氰菊酯的降解率最高,在 $25\sim 42^\circ\text{C}$ 范围内,均能很好地降解氯氰菊酯,降解率均在75%以上;当温度在 20°C 时,菌株A-24对氯氰菊酯的降解率在60%以下;当温度在 45°C 时,菌株A-24对氯氰菊酯的降解率在40%以下。如图4B所示,菌株A-24在pH为7时对氯氰菊酯的降解效果最好,且与其他处理相比差异显著($P < 0.05$);在pH 7~8的范围内菌株A-24均能较好地降解氯氰菊酯;而当pH为5或10时,与其他pH值相比其降解能力明显下降,且差异显著($P < 0.05$),降解率低于60%。

2.5 初始氯氰菊酯浓度对菌株A-24降解的影响

如图5所示,当初始氯氰菊酯浓度 $\leq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株A-24对氯氰菊酯的降解都在70%以上;初始浓度控制在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株A-24对氯氰菊酯的降解低于45%,且与 20 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理差异显著($P < 0.05$),表明随着氯氰菊酯初始浓度的升高菌株A-24

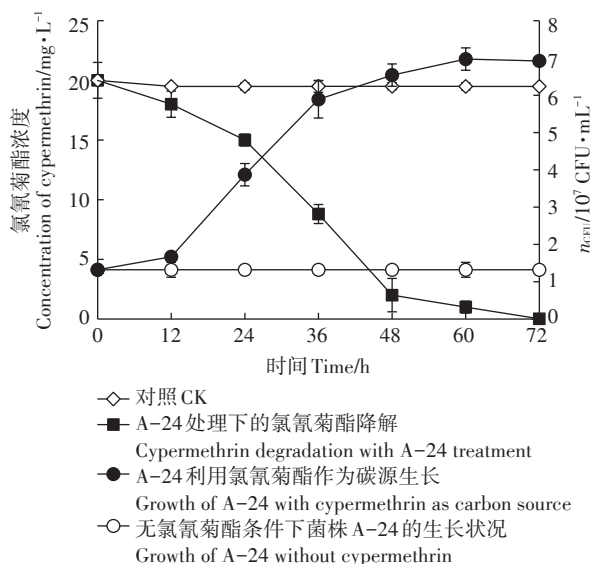


图2 菌株A-24降解氯氰菊酯及其生长曲线

Figure 2 The growth of stain A-24 and degradation of cypermethrin by A-24

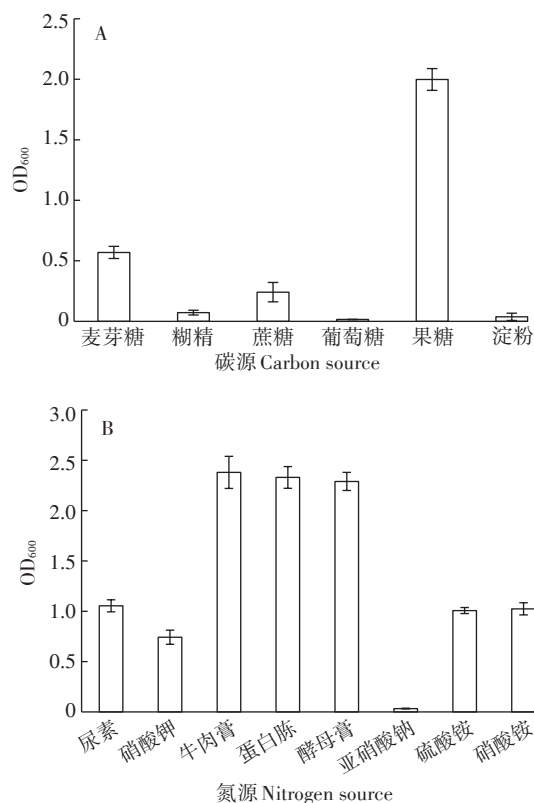


图3 添加不同碳源和氮源对菌株A-24生长的影响

Figure 3 Effect of adding different carbon and nitrogen sources on the growth of strain A-24

的降解率降低;当初始浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌株A-24对氯氰菊酯降解率为30.85%,表明菌株A-24可耐受高浓度的氯氰菊酯。其助剂二甲基亚砜对菌株A-24的生长没有影响。

2.6 接种量对菌株A-24降解氯氰菊酯的影响

对不同接种量条件下氯氰菊酯的降解效率的检测结果如图6所示。当接种量为0.5%、1%和2%时,氯氰菊酯48 h降解率分别为38.7%、67.2%和91.8%;当接种量为5%时,氯氰菊酯48 h的降解率即可达到99.45%;当接种量为10%时,36 h氯氰菊酯全部降解。结果表明,接种量对菌株A-24降解氯氰菊酯影响较大,随着菌株A-24接种量的增大,氯氰菊酯的降解效率逐渐增大,两者呈正相关关系。

3 讨论

植物内生菌可以提高土壤中污染物的降解性能,以减轻农药对植物的毒害作用^[12,18-20]。与动物不同,植物没有体细胞免疫,对于环境中的微生物,植物体是一个相对开放的空间,所以几乎所有的植物体内都含有内生菌^[21]。污染物的降解过程是酶催化反应的

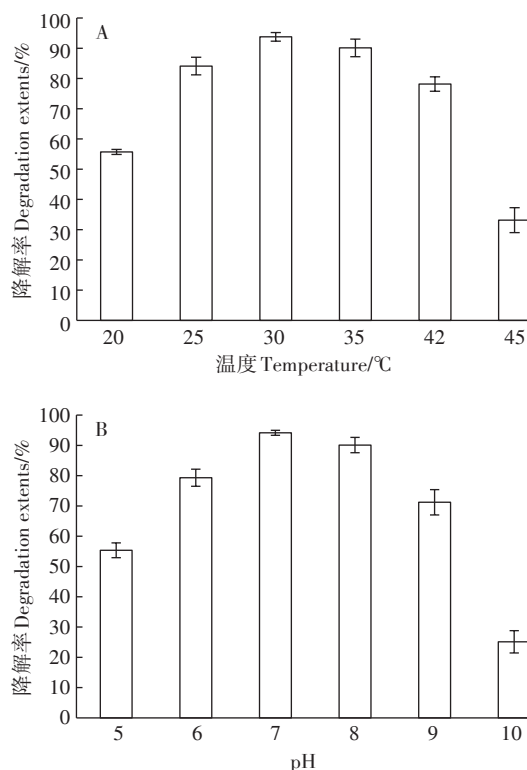


图4 温度和pH对菌株A-24降解氯氰菊酯的影响

Figure 4 Effects of temperature and pH on degradation of cypermethrin by strain A-24

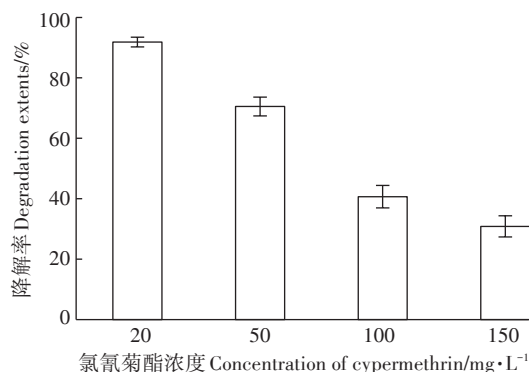


图5 初始氯氰菊酯浓度对菌株A-24降解氯氰菊酯的影响

Figure 5 Effect of initial concentration on degradation of cypermethrin by strain A-24

过程,针对不同的污染物,微生物会分泌不同的酶参与反应,从而将复杂的农药结构降解为简单的结构^[17,22-26]。冯发运^[27]在植物小飞蓬体内分离出 *Cronobacter* sp. 植物内生菌 XFP-gy, 其5 d降解 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒死蜱的降解率为69.59%,外加碳源的降解率可达98.0%。在韭菜体内分离出 *Sphingomonas* sp. 植物内生菌 HJY, 其15 d内可代谢95.88%初始浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的毒死蜱,1%的外加葡萄糖可使其对毒死蜱

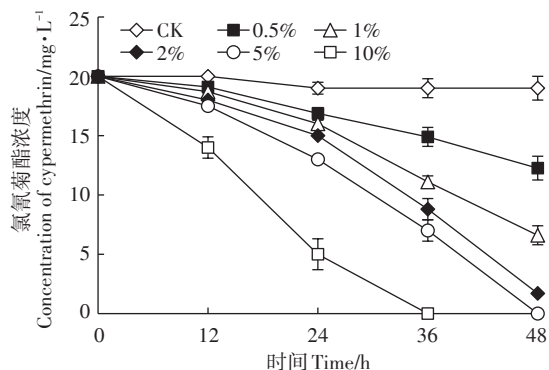


图6 接种量对菌株A-24降解氯氰菊酯的影响

Figure 6 Effect of inoculation size on degradation of cypermethrin by strain A-24

的降解率提高到6 d 98.48%。刘爽^[28]在看麦娘中分离筛选出降解菲的植物内生菌 Pn2, 经鉴定该菌株为 *Naxibacter* sp., 此内生菌 72 h 对初始浓度 $49.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菲降解率达 98.78%。孙凯等^[29]从小飞蓬和三叶草中分离筛选出能降解茚的内生细菌 BJ03 和 BJ05, 初步鉴定为 *Acinetobacter* sp. 和 *Kocuria* sp., 15 d 对 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茚降解率分别为 65.0% 和 53.3%。封国君^[30]分离到能降解二甲四氯的植物内生菌 E41 和 E68, 并研究了菌株的降解特性, 鉴定了菌株降解二甲四氯的产物为 4-氯-2-甲基苯酚。有关氯氰菊酯微生物降解菌已经有很多报道^[17, 31-33], 但植物内生氯氰菊酯降解菌鲜有报道。

本研究的结果表明碳源、氮源种类影响微生物的生长, 虽然菌株 A-24 均能以葡萄糖、蔗糖、淀粉等为碳源生长, 但在以果糖为碳源时, 生长最快, 以牛肉膏、蛋白胨、酵母膏为氮源时生长较快, 说明只有添加适当的外加碳源、氮源, 才能保证细胞的正常生长。有关微生物降解氯氰菊酯代谢途径的研究已经有报道。Wang 等^[17]推测了菌株 JZ-1 降解氯氰菊酯的途径, 其可生成二氯菊酸和 3-苯氧基苯甲醛, 3-苯氧基

苯甲醛再转化成 3-苯氧基苯甲酸。为研究菌株 A-24 降解氯氰菊酯的代谢途径, 在氯氰菊酯降解过程中定时取样, 并利用 HPLC 检测其代谢产物。与标准品对照并根据其他菌株降解氯氰菊酯的代谢途径^[17], 将产物鉴定为 3-苯氧基苯甲酸 (3-PBA)。据此推测菌株 A-24 降解氯氰菊酯的途径为: 氯氰菊酯首先通过酯键水解生成二氯菊酸和 3-苯氧基苯甲醛, 在脱氢酶的作用下, 3-苯氧基苯甲醛生成 3-PBA, 然后在双加氧酶的作用下进一步降解 (图 7)。

本研究结果表明, 植物内生菌株 A-24 的生长与降解对初始氯氰菊酯浓度、温度和 pH 的适应范围较宽, 适合用于田间复杂多变的自然环境中菊酯污染的修复。因此深入研究菌株 A-24 降解氯氰菊酯机理, 以及生物修复适用性等问题将是我们下一步研究的重点内容, 这对植物内生细菌-植物联合修复有机污染具有现实指导意义。

4 结论

(1) 从农药厂附近牛筋草中筛选到 1 株能够以氯氰菊酯为唯一碳源生长的高效降解菌 A-24, 革兰氏染色鉴定为阴性菌, 经 16S rDNA 测序鉴定为 *Achromobacter* 属。

(2) 在不同碳源、氮源条件下, 菌株 A-24 的生长速率不同, 以果糖为碳源时菌株 A-24 生长最快, 麦芽糖其次, 葡萄糖最慢。在有机氮源牛肉膏、蛋白胨、酵母膏培养基中 A-24 生长较快, 其中无机氮源亚硝酸钠中最慢。

(3) 菌株 A-24 在 30°C 时对氯氰菊酯的降解率最高, 在 pH 7 时对氯氰菊酯的降解效果最好。当初始氯氰菊酯浓度 $\leq 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌株 A-24 对氯氰菊酯的降解率较高。随着菌株 A-24 接种量的增大, 氯氰菊酯的降解效率逐渐增大。

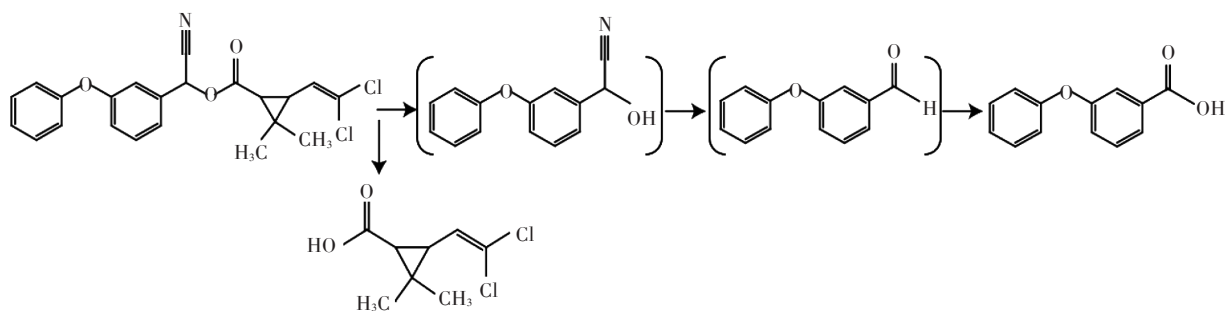


图7 推测菌株A-24降解氯氰菊酯的途径

Figure 7 Proposed metabolic pathway of cypermethrin by strain A-24

参考文献:

- [1] 邹雅竹, 龚道新, 汪传刚. 顺式氯氰菊酯在不同pH值下的光化学降解[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(3): 333-335.
ZOU Ya-zhu, GONG Dao-xin, WANG Chuan-gang. On photolysis of α -cypermethrin in different pH buffer solutions[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2006, 32(3): 333-335.
- [2] 刘长令. 世界农药大全: 杀虫剂卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012.
LIU Chang-ling. World pesticide complete: Insecticide volume[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012.
- [3] Amweg E L, Weston D P, Ureda N M. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the central Valley, California, USA[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(4): 966-972.
- [4] Kolaczinski J H, Curtis C F. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: A review of the debate[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(5): 697-706.
- [5] 李晓莉. 淄博市蔬菜中拟除虫菊酯类农药残留状况调查研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
LI Xiao-li. Investigation of pyrethroid pesticide residues condition in vegetables in Zibo[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2012.
- [6] 雷雨, 梁琼. 2016年定西地区市售蔬菜中拟除虫菊酯类农药残留调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(20): 2550-2558.
LEI Yu, LIANG Qiong. Investigation of pyrethroid pesticide residues in vegetables in Dingxi in 2016[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2018, 28(20): 2550-2558.
- [7] 陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 30-34.
CHEN Long, LIANG Zi-ning, ZHU Hua. Advances in plant endophytes[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(8): 30-34.
- [8] 张凯璇, 唐艳葵, 秦芷怡, 等. 植物内生菌应用于有害金属污染环境修复研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 17-22.
ZHANG Kai-xuan, TANG Yan-kui, QIN Zhi-yi, et al. Advances in the application of endophytic bacteria in environmental remediation of harmful metal contamination[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2018, 46(6): 17-22.
- [9] Li J H, Wang E T, Chen W F, et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang Province of China[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(1): 238-246.
- [10] Benhamou N, Kloepper J W, Quadthallman A, et al. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 919-929.
- [11] Harish S, Kavino M, Kumar N, et al. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*[J]. *Biological Control*, 2009, 51(1): 16-25.
- [12] Chen L, Luo S, Xiao X, et al. Application of plant growth-promoting endophytes(PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 46(3): 383-389.
- [13] 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.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual for systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [14] Miller S A, Dykes D D, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(3): 1215.
- [15] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, New York: John Wiley and Sons, 1991: 115-175.
- [16] Kim O S, Cho Y J, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 3): 716-721.
- [17] Wang B Z, Guo P, Hang B J, et al. Cloning of a novel Pyrethroid-Hydrolyzing carboxylesterase gene from *Sphingobium* sp. strain JZ-1 and characterization of the gene product[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5496-5500.
- [18] Berg G, Krechel A, Ditz M, et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 215-229.
- [19] Zhang Y, He L, Chen Z, et al. Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(2): 1720-1725.
- [20] Weyens N, Truyens S, Dupae J, et al. Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(9): 2915-2919.
- [21] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 植物内生菌研究及其科学意义[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 349-363.
WANG Zhi-wei, JI Yan-ling, CHEN Yong-gan. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 349-363.
- [22] 宋歌, 才满, 杜克久. 具多氯联苯降解特性缘柳内生菌的分离筛选及其移除性能[J]. 生态学杂志, 2016, 35(4): 1038-1046.
SONG Ge, CAI Man, DU Ke-jiu. Isolation and characterization of polychlorinated biphenyl-degrading endophytic bacterium from *Salix matsudana* f. *pendula*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(4): 1038-1046.
- [23] Liu H M, Lou X, Ge Z J, et al. Isolation of an aryloxyphenoxy propanoate(AOPP) herbicide-degrading strain *Rhodococcus ruber* JPL-2 and the cloning of a novel carboxylesterase gene(*feh*)[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2015, 46(2): 425-432.
- [24] Zhang H, Li M, Li J, et al. A key esterase required for the mineralization of quizalofop-P-ethyl by a natural consortium of *Rhodococcus* sp. JT-3 and *Brevundimonas* sp. JT-9[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 327: 1-10.
- [25] Zhang H, Li M, Dai C, et al. Characterization of EstQE, a new member of esterase family VIII from the quizalofop-P-ethyl-degrading bac-

- terium *Ochrobactrum* sp. QE-9[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 133:167-175.
- [26] 陶佳雨,洪亚军,陈雪梅,等. 功能植物内生细菌筛选及对多环芳烃降解效能研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2019, 35(1):85-92.
- TAO Jia-yu, HONG Ya-jun, CHEN Xue-mei, et al. Isolation, identification and PAH-degrading performance of an endophytic bacterium *Enterobacter* sp. PRd5[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2019, 35(1):85-92.
- [27] 冯发运. 具有毒死蜱降解特性的植物内生菌的分离筛选[D]. 杭州:浙江农林大学, 2015.
- FENG Fa-yun. Isolation and identification of plant endophytes capable of degrading chlorpyrifos[D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural and Forestry University, 2015.
- [28] 刘 爽. 具有菲降解性能的植物内生细菌 Pn2 分离鉴定、降解条件优化及其定殖初探[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- LIU Shuang. Isolation, identification, colonization, and performance of phenanthrene-degradation endophytic bacterium Pn2[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [29] 孙 凯, 刘 娟, 李 欣, 等. 两株具有芘降解功能的植物内生细菌的分离筛选及其特性[J]. *生态学报*, 2014, 34(4):853-861.
- SUN Kai, LIU Juan, LI Xin, et al. Isolation, identification, and performance of two pyrene-degrading endophytic bacteria[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(4):853-861.
- [30] 封国君. 植物内生菌降解二甲四氯的菌株筛选及其降解特性研究[D]. 南宁:广西大学, 2017.
- FENG Guo-jun. The screening plant endogenous microbial and degradation characteristics of the study for 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid by fungal[D]. Nanning: Guangxi University, 2017.
- [31] 胡 琼, 唐 洁, 刘 波, 等. 一株3-苯氧基苯甲酸降解菌的筛选及其协同 *Bacillus licheniformis* G-04 降解高效氯氰菊酯的研究[J]. *微生物学报*, 2018, 59(1):163-174.
- HU Qiong, TANG Jie, LIU Bo, et al. Screening of a 3-phenoxybenzoic acid degrading strain and its co-degradation with *Bacillus licheniformis* G-04 to degrade beta-cypermethrin[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 59(1):163-174.
- [32] 胡桂萍, 宋凤琴, 刘 波, 等. 氟氯氰菊酯降解菌 FLQ-5 的筛选鉴定及降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(5):851-856.
- HU Gui-ping, SONG Feng-qing, LIU Bo, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of cyfluthrin-degrading strain FLQ-5[J]. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*, 2013, 19(5):851-856.
- [33] 王志龙, 刘书亮, 姚 开, 等. 一株氯氰菊酯降解真菌的筛选鉴定及其降解特性研究[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(6):1561-1569.
- WANG Zhi-long, LIU Shu-liang, YAO Kai, et al. Isolation and identification of a cypermethrin degrading fungus and its degradation characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(6):1561-1569.