



## 一株路德维希杆菌的筛选及其对 3-苯氧基苯甲酸的降解特性分析

刘波<sup>1</sup>, 唐洁<sup>1\*</sup>, 陈廷廷<sup>1</sup>, 曾林<sup>2</sup>, 曾朝懿<sup>1</sup>, 张庆<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610039

<sup>2</sup>西华大学食品与生物工程学院, 古法发酵生物技术研究所, 四川 成都 610039

**摘要:**【目的】3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)的消除是解决拟除虫菊酯类农药污染的关键, 目的是从受拟除虫菊酯类农药污染植物根系土壤中分离出 3-PBA 高效降解菌株。【方法】采用富集驯化、筛选纯化方法, 以 3-PBA 为唯一碳源、能源筛选 3-PBA 降解菌株; 菌株鉴定采用形态、生理生化和 16S rRNA 序列分析法; 并研究其生长降解动力学特性, 最后采用 Box-Behnken 响应面分析确定最佳降解条件。【结果】从川北地区大豆根系土壤中筛选得到 1 株高效降解菌 BPBA031, 经鉴定为路德维希杆菌(*Enterobacter ludwigii*); 该菌株耐 3-PBA 浓度达 1600 mg/L, 其生长降解过程分别符合 Logistic 生长动力学( $\mu_m=0.09149 \text{ h}^{-1}$ ,  $X_m=1.1145$ )和一级降解动力学模型( $k=0.02085$ ,  $t_{1/2}=33.24 \text{ h}$ ); 对 3-PBA 降解的最适条件为 34–37 °C、3-PBA 浓度 25–200 mg/L 和 pH 7.5–8.5; 在 35.19 °C、30.0 mg/L 3-PBA 和 pH 7.58 条件下, 该菌株 48 h 对 3-PBA 的降解率达 83.75%。【结论】路德维希杆菌 BPBA031 是 1 株高效 3-PBA 降解菌, 可作为生物修复受 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药污染环境的潜在菌株资源。

**关键词:** 路德维希杆菌, 生物修复, 3-苯氧基苯甲酸, 降解特性

拟除虫菊酯类农药(pyrethroid pesticides)是一类人工合成的模拟天然除虫菊素的仿生型杀虫剂<sup>[1]</sup>, 在防治果蔬、茶叶、谷物类害虫以及蚊蝇、蟑螂和牲畜寄生虫等上有显著作用。然而拟除虫菊酯类农药具有较强的疏水性, 在自然条件下仅存在少量降解, 其余大部分在施用后直接吸

附并富集于水和土壤等环境中<sup>[2]</sup>, 易被动植物吸收; 而人体内的拟除虫菊酯类农药残留约 90%来自于受污染的水源、植物或动物性食物, 这在尿液中拟除虫菊酯类农药代谢产物[3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)、二氯菊酸等]的监测结果中得到确认<sup>[3-4]</sup>。相较于拟除虫菊酯类

基金项目: 教育部春晖计划(Z2015122); 四川省教育厅自然科学基金(14ZB0122); 西华大学人才培养重点项目(z1310525); 四川省食品生物技术重点实验室开放基金(szjj2014-011); 西华大学研究生创新基金(ycyj2017151)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-28-87720552; E-mail: tangjie1225@mail.xhu.edu.cn

收稿日期: 2017-05-16; 修回日期: 2017-07-05; 网络出版日期: 2017-08-04

农药对环境和动植物造成的直接污染和毒害作用, 其中间代谢产物所造成的二次污染更值得重视<sup>[1,3]</sup>。其中 3-PBA 是绝大多数拟除虫菊酯类农药(如溴氰菊酯、氯氰菊酯、氯菊酯和氰戊菊酯等)的必经降解中间产物之一<sup>[5-6]</sup>。最新研究发现, 3-PBA 是潜在的环境雌激素类物质<sup>[7]</sup>, 具有生殖毒性<sup>[8]</sup>; 且其疏水性相对母体农药较弱<sup>[9]</sup>, 自然条件下难降解, 易迁移、蓄积<sup>[10]</sup>, 半衰期可达 180 d<sup>[11]</sup>, 潜在危害性更大。因此, 如何消除 3-PBA 残留是解决环境中拟除虫菊酯类农药污染的关键。

目前, 受拟除虫菊酯类农药污染环境的修复研究主要集中于物理催化法、化学氧化法和生物降解法等<sup>[10]</sup>。与物理和化学法相比, 生物降解法以其条件温和、降解效率高、无二次污染等特点<sup>[2]</sup>, 已成为目前解决环境中农药残留问题的热点方法<sup>[1]</sup>, 因此筛选出高效持久的 3-PBA 降解菌株是环境中拟除虫菊酯类农药残留去除的关键。现国内外报道的 3-PBA 降解菌主要来源于废水排污淤泥、农药污染土壤和酱油曲料中, 如从活性淤泥中分离出的鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)<sup>[12]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[13]</sup>、苍白杆菌(*Ochrobactrum lupini*)<sup>[14]</sup>、江苏鞘氨醇杆菌(*Sphingobium jiangsuense*)<sup>[15]</sup>和嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)<sup>[16]</sup>, 在农药污染土壤中筛选得到的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[17]</sup>, 以及从酱油曲料中分离的米曲霉(*Aspergillus oryzae*)<sup>[18]</sup>等, 这些筛选得到的 3-PBA 降解菌均具有较好的 3-PBA 利用能力以及生物修复受拟除虫菊酯类农药污染环境的潜力。但其中大多数降解菌株对 3-PBA 的耐受浓度有限, 难以应用于 3-PBA 高污染环境的修复治理; 而相对于拟除虫菊酯类农药或其他污染物的降解菌株<sup>[19-20]</sup>, 现有关于 3-PBA 降解菌株的报道甚少, 且未见从植物源土壤中分离出 3-PBA 高

效降解菌株的报道, 所以迫切需要从植物源土壤中筛选具有植物亲附能力的 3-PBA 高效降解菌株, 以期从环境中 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药残留的生物降解提供菌株资源。

本文报道从受拟除虫菊酯类农药污染的大豆根系土壤中分离出 1 株路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*), 对该菌的生长降解动力学、3-PBA 降解特性进行分析, 并优化降解条件, 为其进一步应用于受 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药污染环境的生物修复提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 样品来源:** 本实验所采用的样品采自川北地区某种植基地的大豆根系、根际土壤样品, 采样深度为 5–20 cm。

**1.1.2 试剂与培养基:** 3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA), 梯希爱(上海)化学化工发展有限公司; 乙腈(色谱纯), 美国 Adamas-beta 公司; Bacteria DNA Kit 提取试剂盒、多重 PCR 扩增试剂盒, 天根生化科技有限公司; 基础盐培养基(mineral salt medium, MSM; g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5、MgSO<sub>4</sub> 0.2、NaCl 0.5, pH 7.5, 121 °C 灭菌 20 min, 3-PBA 浓度根据试验所需配制; 结晶紫中性红胆盐琼脂(violet red bile agar, VRBA)培养基 41.5 g, 蒸馏水 1000 mL, 煮沸 2 min, 冷却倒平板备用; 液体培养基加入 2.0% (W/V)的琼脂制成固体培养基。

**1.1.3 仪器:** Waters e2695 型高效液相色谱仪、Waters 2998 型光电二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司; Biometra PCR 仪, 德国 Analytik Jena AG 公司; JSM7500F 型扫描电镜, 日本电子株式

会社; UNICO 7200 型紫外分光光度计, 美国 UNICO 公司; Heraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机, 美国 thermo Scientific 公司。

## 1.2 3-PBA 的检测及其标准曲线方程建立

3-PBA 检测采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 进行。样品处理和 HPLC 检测方法参照文献[12]进行, 其中流动相为乙腈/超纯水(70:30, V/V)。标准曲线方程: 配制 3-PBA 标准液(100 mg/L), 依次进样 1、2、5、10、20  $\mu\text{L}$ , 拟合 3-PBA 质量-峰面积的标准曲线为  $y=89.3658x+0.7803$ ,  $R^2=1.0000$ 。

## 1.3 3-PBA 降解菌株的筛选与鉴定

3-PBA 降解菌的富集驯化和筛选纯化参照文献[21]进行, 驯化过程的 3-PBA 终浓度为 1600 mg/L。纯化后的菌株转接到含 3-PBA (100 mg/L) 的 MSM 培养基中, 接入同体积无菌水做空白对照, 30 °C 振荡(180 r/min)培养 48 h 后取样测定 3-PBA 残留量, 并按式(1)计算 3-PBA 降解率, 筛选高效降解菌株进行后续研究。

$$\text{Degradation rate (\%)} = (C_0 - C) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

$C$ : 样品组中 3-PBA 含量;  $C_0$ : 对照组中 3-PBA 含量。

降解菌株形态、生理生化特征、总 DNA 提取、16S rRNA 扩增及序列测定和系统发育树的构建参照文献[21]进行。其中, 16S rRNA 扩增体系包括引物 27f (AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG) 0.5  $\mu\text{L}$ , 1492r (GGTTACCTTGTTACGACTT) 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ , 混合酶(含 *Taq* 酶、dNTPs、MgSO<sub>4</sub> 等) 12.5  $\mu\text{L}$ 。

## 1.4 降解菌的生长降解动力学

将菌株种子液( $OD_{600}=1.0$ )<sup>[17]</sup>按 5.0% (V/V) 的

接种量分别接种到含 3-PBA (100 mg/L) 的 MSM 培养基中, 30 °C 振荡(180 r/min)培养 72 h, 定时取样, 测定其吸光度(optical density, OD)值和 3-PBA 残留量。

**1.4.1 菌体生长动力学模型:** 在某一特定条件下, 微生物生长的最大细胞浓度与底物浓度有关<sup>[22]</sup>, 因此采用 Logistic 方程描述菌体生长动力学模型。在此方程中比生长速率与尚未利用的负载能力相关联, 即生长期细胞的增长速率可以用(2)式表达。

$$dX / dt = \mu X \quad (2)$$

当  $t=t_0$ ,  $X=X_0$  时, 将(2)式积分得到(3)式。

$$X = X_0 e^{\mu t} / [1 - (X_0 / X_m)(1 - e^{\mu t})] \quad (3)$$

$X$ : 菌体浓度( $OD_{600}$ );  $t$ : 培养时间(h);  $\mu_m$ : 最大比生长速率( $\text{h}^{-1}$ );  $X_0$ : 初始菌体浓度( $OD_{600}$ );  $X_m$ : 最大菌体浓度( $OD_{600}$ )。

**1.4.2 3-PBA 降解动力学模型:** 酶促反应动力学方程被广泛应用于酶促反应分析, 主要研究酶催化的反应速率及影响反应速率的各种因素<sup>[23]</sup>。其中, 一级动力学方程在污染物的生物降解研究中被广泛应用, 如(4)式所示。

$$v = v_{\max} S / (K_s + S) \quad (4)$$

当  $S$  远小于  $K_s$  时,  $v = v_{\max} S / K_s$ , 即  $v = dS / dt = v_{\max} / K_s \times S = -k_1 S$ , 积分得:  $\ln S = -k_1 t + \ln S_0$ , 变形得(5)式。

$$C_t = C_0 \times e^{-Rt} \quad (5)$$

$C_0$ : 3-PBA 初始浓度(mg/L);  $C_t$ :  $t$  时刻 3-PBA 浓度(mg/L);  $k$ : 降解速率常数( $\text{h}^{-1}$ );  $t$ : 降解时间(h)。

按(6)式计算底物降解半衰期  $t_{1/2}$ (h)。

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad (6)$$

## 1.5 不同培养条件下降解菌的降解特性

将种子液( $OD_{600}=1.0$ )以 5% 的接种量接种至

含 3-PBA 的 MSM 培养基中, 在不同的培养温度 (30、34、37、40 °C)、初始 pH (5.5、6.5、7.5、8.5) 及 3-PBA 浓度 (25、50、100、200 mg/L) 条件下 180 r/min 振荡培养, 接入等量生理盐水作空白对照。每隔 8 h 取样, 测定 3-PBA 残留量, 并以一级降解动力学方程进行拟合, 分析降解菌的降解特性及最适降解条件。

### 1.6 Box-Behnken 响应曲面设计优化条件

根据 1.5 实验的结果, 选取响应面设计的中心点。利用 Design-Expert 8.0 软件, 采用 Box-Behnken 中心组合设计 3 因素 3 水平的响应曲面实验; 对实验数据进行统计和分析, 确定菌株降解 3-PBA 的最佳降解条件, 并在此条件下培养 48 h 后, 测定 3-PBA 残留量, 计算降解率。

## 2 结果和分析

### 2.1 3-PBA 降解菌的筛选鉴定

**2.1.1 降解菌株的筛选及纯化:** 经富集驯化、分离纯化共获得 23 株可耐受 3-PBA (1600 mg/L) 的菌株, 其中 8 株具备有效降解 3-PBA 的能力, 培养 48 h 对 3-PBA (100 mg/L) 的降解能力如图 1 所示。菌株 BPBA031 降解能力最好, 达到 55.04%, 经方差分析可知菌株 BPBA031 降解率与其他菌株降解率差异性显著 ( $P < 0.01$ )。表明菌株 BPBA031 是 1 株 3-PBA 高效降解菌, 故选用该菌株做后续研究。

**2.1.2 降解菌株的形态及生理生化特征:** 菌株 BPBA031 纯化后分别划线接种于 MSM、VRBA 培养基中, 其在 MSM 培养基上呈圆形, 乳白色, 中央微凸, 湿润粘稠有光泽, 直径 2–4 mm; 在 VRBA 培养基上呈圆形或椭圆形, 紫红色边缘红

色沉淀, 湿润粘稠有明亮光泽, 直径 3–8 mm, 有胆盐水解圈 (1–3 cm); 菌体 (图 2) 呈短圆杆状, 单个排列, 两端较平整, 大小为 (0.6–1.0)  $\mu\text{m} \times$  (0.8–1.8)  $\mu\text{m}$ 。根据菌株的形态特征可初步预测降解菌 BPBA031 属于肠杆菌科细菌。

菌株 BPBA031 生理生化实验结果见表 1。3-PBA 降解菌 BPBA031 为革兰氏阴性兼性厌氧菌, 发酵葡萄糖、乳糖, V-P 反应、赖氨酸脱羧酶实验均呈阳性, 吲哚和硫化氢实验呈阴性, 表明菌株 BPBA031 极可能属于肠杆菌属细菌<sup>[24–25]</sup>。

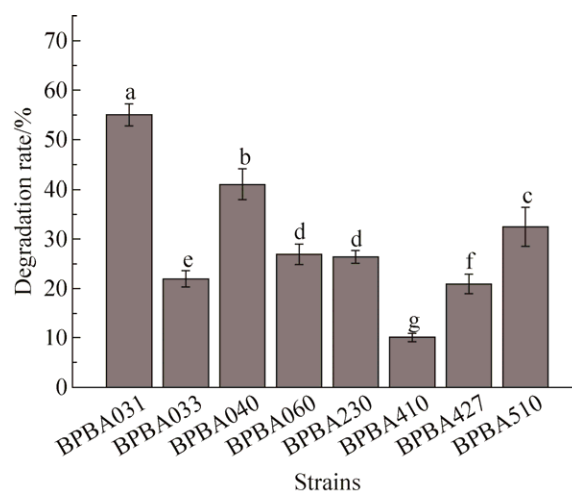


图 1. 不同菌株对 3-PBA 的降解率

Figure 1. Degradation rate of 3-PBA by different strains. Different letters indicate significant difference,  $P < 0.01$ .

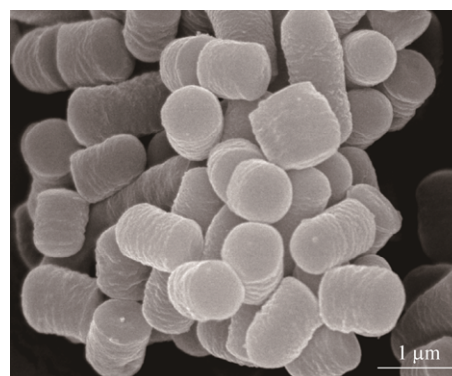


图 2. 菌株 BPBA031 扫描电镜形态

Figure 2. Scanning electron microscopic morphology of strain BPBA031.

表 1. 降解菌株生理生化实验结果

Table 1. Physiological and biochemical test results of strain BPBA031

| Test                 | Culture time/h |     | Test                                   | Culture time/h |     |
|----------------------|----------------|-----|--|----------------|-----|
|                      | 24             | 72  |  | 24             | 72  |
| Gram stain           | -              | -   | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> reductase | +++            | +++ |
| Aerobic              | ±              | ±   | Gelatin hydrolysis                     | +++            | +++ |
| Sucrose fermentation | ++             | +++ | Lysine decarboxylase                   | ++             | +++ |
| Glucose fermentation | +++            | +++ | Voges-Proskauer                        | +++            | +++ |
| Maltose fermentation | +++            | +++ | Denitrification                        | -              | -   |
| Lactose fermentation | +++            | +++ | H <sub>2</sub> S production            | -              | -   |
| Indole production    | -              | -   | β-galactosidase                        | +++            | +++ |
| Methyl red test      | +++            | +++ | Myo-inositol                           | +++            | +++ |
| Catalase             | +++            | +++ | α-methyl-D-glucoside                   | +++            | +++ |
| Urease activity      | -              | -   | Galactitol                             | -              | -   |
| Citrate              | +              | +++ | Ribitol                                | -              | -   |

-: 0%–10%; ±: 10%–20%; +: 20%–80%; ++: 80%–90%; +++: 90%–100%.

**2.1.3 分离菌株 16S rRNA 序列分析:** 将菌株 BPBA031 的 16S rRNA 扩增产物回收测序获得 1395 bp 的序列, 并将此序列提交至 GenBank (Accession number: KY474547)。利用 BLAST 检索分析将该序列进行同源性比对, 发现菌株 BPBA031 与 *Enterobacter ludwigii* R6-346-1

(Accession number: JQ659806)、*Enterobacter ludwigii* RCB553 (Accession number: KT260765) 的同源性达 99%, 可以推测菌株 BPBA031 为路德维希肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*)。为进一步确定菌株 BPBA031 的种属地位, 利用 MEGA 6.0 软件及其 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 3), 菌株

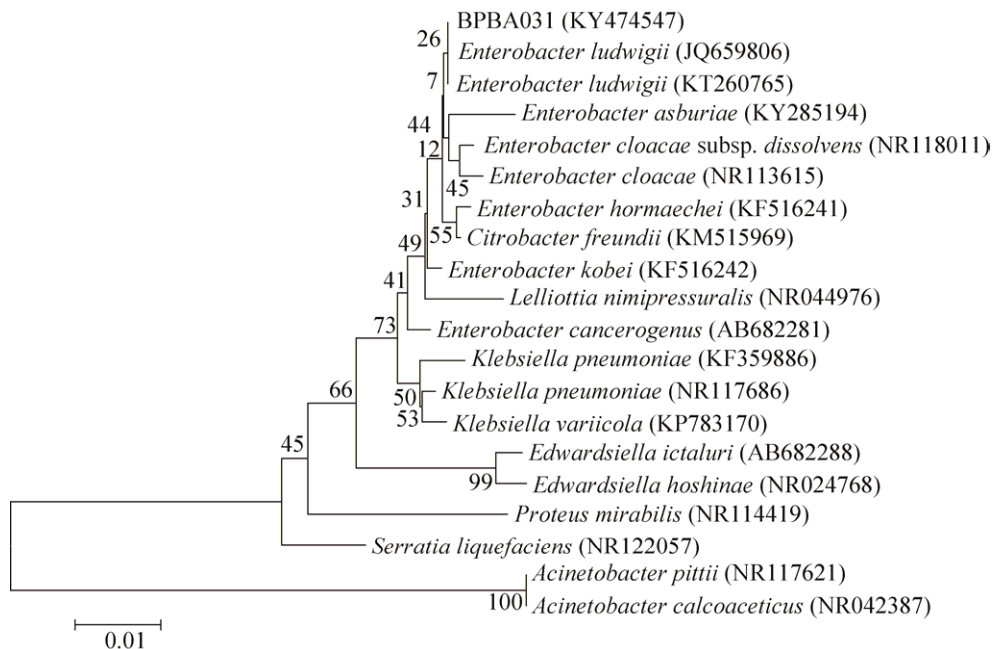


图 3. 菌株 BPBA031 基于 16S rRNA 的菌株系统发育分析

Figure 3. Phylogenetic tree of strain BPBA031 based on 16S rRNA sequence. The number in parentheses is accession number of GenBank; node number represents the confidence level of relatives; the length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.01.

BPBA031 与 *Enterobacter ludwigii* R6-346-1、*Enterobacter ludwigii* RCB553 处于同一分支,这也证实了菌株 BPBA031 为路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。

综合形态学、生理生化特征<sup>[24,26]</sup>、16S rRNA 基因序列和系统发育分析,可以确定菌株 BPBA031 为路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。

## 2.2 菌株 BPBA031 的生长降解动力学

如图 4 所示,利用 Origin 8.0 软件对菌株生物量实测值与菌体生长动力学模型进行非线性拟合,得到  $\mu_m=0.09149\text{ h}^{-1}$ ,  $X_0=0.04262$  及  $X_m=1.1145$ , 代入(6)式得到菌株生长动力学方程:  $X=0.04262e^{0.09149t}/[1-0.03824(1-0.04262e^{0.0915t})]$ ; 利用一级反应动力学模型对降解过程中的 3-PBA 残留量进行非线性拟合,得到菌株对 3-PBA 的一级降解动力学方程:  $C_t=98.5583 \times e^{-0.02085t}$ ,  $k=0.02085$ ;  $t_{1/2}=33.24\text{ h}$ , 表明路德维希肠杆菌 BPBA031 在以 3-PBA 为唯一碳源的 MSM 培养基中生长态势良好。在生长延滞期(0–10 h), 适量 3-PBA 被利用于菌体生长和初始繁殖, 生长对数期(10–48 h)菌体

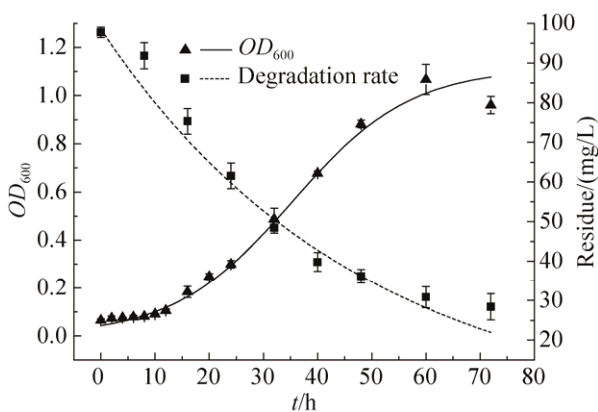


图 4. 路德维希肠杆菌 BPBA031 生长和降解曲线  
Figure 4. Growth and degradation curve of strain *Enterobacter ludwigii* BPBA031.

繁殖迅速, 3-PBA 降解速率达到最高, 在生长稳定期对 3-PBA 利用明显减弱。生长降解动力学模型的拟合度分别为 0.9824、0.9865, 表明 2 种模型能较好反映路德维希肠杆菌 BPBA031 的实际生长规律以及对 3-PBA 的降解过程。

## 2.3 菌株 BPBA031 的降解特性

采用一级降解动力学模型对不同条件下的 3-PBA 残留量进行拟合, 得到不同培养温度、3-PBA 浓度及初始 pH 条件下的 3-PBA 降解曲线(图 5)。

由不同培养温度条件下[3-PBA (100 mg/L)、初始 pH 7.5]的降解曲线可知(图 5-A), 菌株在 30–40 °C 条件下对 3-PBA 的降解作用均比较显著; 其中 34 °C 条件下降解率为 67.89%,  $t_{1/2}=29.38\text{ h}$ ; 37 °C 条件下降解率为 62.21%,  $t_{1/2}=34.16\text{ h}$ 。不同 3-PBA 浓度条件下(37 °C, 初始 pH 7.5)的降解结果显示(图 5-B), 菌株对不同浓度的 3-PBA 降解作用明显; 其中浓度为 50 mg/L 时, 3-PBA 的降解率达 75.77% ( $t_{1/2}=24.95\text{ h}$ ); 低浓度(25 mg/L)及高浓度(100、200 mg/L)条件下的降解率稍低( $t_{1/2}$  分别为 27.24 h、35.99 h 及 40.35 h)。如图 5-C 所示, 当初始 pH 介于 5.5–8.5 之间[37 °C, 3-PBA (100 mg/L)], 菌株在初始 pH 7.5 时降解效果最好(降解率为 66.44%,  $t_{1/2}=30.75\text{ h}$ ), 初始 pH 8.5 条件下次之(降解率为 52.87%,  $t_{1/2}=39.93\text{ h}$ ); 而当初始 pH 为 5.5、6.5 时, 3-PBA 有降解但利用率较低。

## 2.4 菌株 BPBA031 降解 3-PBA 的条件优化

采用 Box-Behnken 响应曲面设计, 以培养温度( $X_1$ )、3-PBA 浓度( $X_2$ )和初始 pH( $X_3$ )为自变量, 3-PBA 降解率( $Y$ )为响应值, 根据 2.3 中实验结果确定响应面分析中心点(表 2), 其他条件分别

为 MSM 培养基、菌龄 24 h、接种量 5% (V/V,  $OD_{600}=1.0$ )、转速 180 r/min, 得到路德维希杆菌 BPBA031 降解条件的优化试验设计及响应值(表 3)。

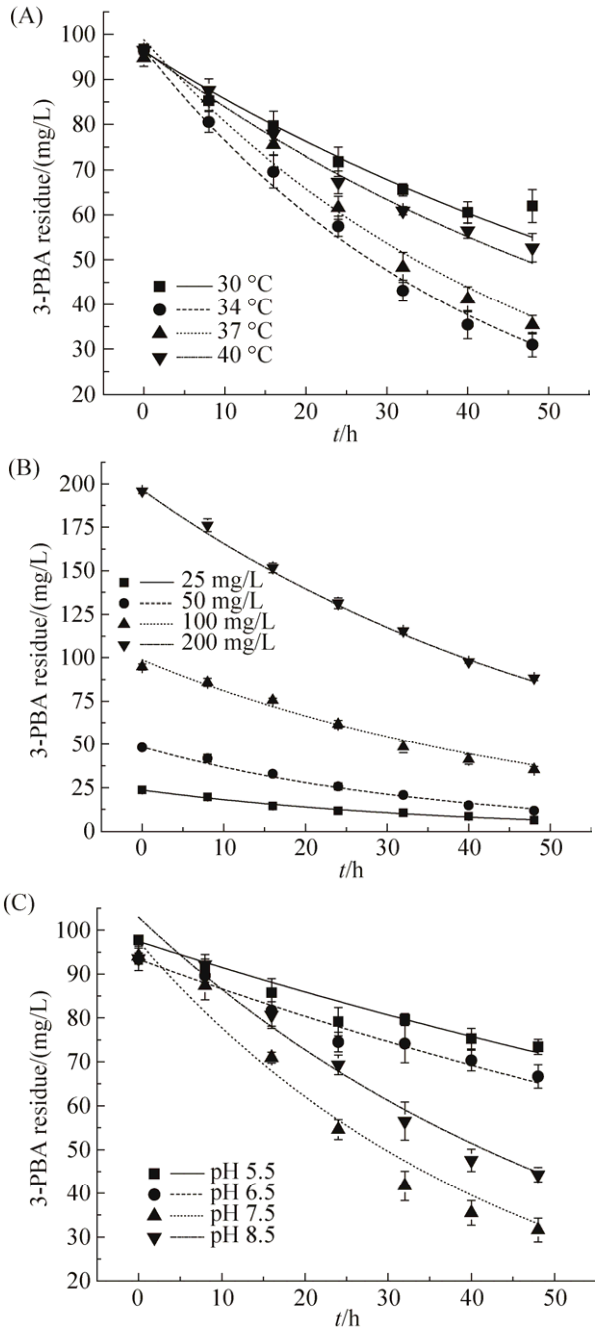


图 5. 不同培养条件下 3-PBA 残留量变化  
Figure 5. Degradation curves of 3-PBA at different culture conditions by strain BPBA031. A: Culture temperature; B: 3-PBA concentration; C: Initial pH.

表 2. Box-Behnken 响应曲面分析中心点

Table 2. Box-Behnken experimental design with 3 independent variables

| Variables                  | Coded | Range and levels |      |      |
|----------------------------|-------|------------------|------|------|
|                            |       | -1               | 0    | 1    |
| Incubation temperature/°C  | $X_1$ | 34.0             | 37.0 | 40.0 |
| 3-PBA concentration/(mg/L) | $X_2$ | 30.0             | 50.0 | 70.0 |
| Initial pH                 | $X_3$ | 7.0              | 7.5  | 8.0  |

表 3. Box-Behnken 试验设计及其结果

Table 3. Results of Box-Behnken experiment design

| Run | $X_1/^\circ\text{C}$ | $X_2/(\text{mg/L})$ | $X_3$ | Degradation rate/% |
|-----|----------------------|---------------------|-------|--------------------|
| 1   | 0                    | 0                   | 0     | 78.25              |
| 2   | 0                    | 0                   | 0     | 76.88              |
| 3   | 0                    | 1                   | -1    | 53.44              |
| 4   | 0                    | 0                   | 0     | 78.96              |
| 5   | 0                    | -1                  | 1     | 65.56              |
| 6   | 1                    | 0                   | -1    | 41.26              |
| 7   | -1                   | -1                  | 0     | 81.11              |
| 8   | -1                   | 0                   | 1     | 66.64              |
| 9   | 0                    | -1                  | -1    | 55.89              |
| 10  | 0                    | 0                   | 0     | 79.38              |
| 11  | 1                    | 0                   | 1     | 38.56              |
| 12  | 0                    | 1                   | 1     | 62.09              |
| 13  | -1                   | 0                   | -1    | 53.15              |
| 14  | 0                    | 0                   | 0     | 77.88              |
| 15  | 1                    | 1                   | 0     | 58.55              |
| 16  | -1                   | 1                   | 0     | 75.25              |
| 17  | 1                    | -1                  | 0     | 60.56              |

采用 Design-Expert 8.0 软件对表中的实验数据进行多项式回归分析建立二次响应回归模型, 拟合得到 3-PBA 降解率(Y)响应曲面模型:

$$Y=78.27-9.65X_1-1.72X_2+3.64X_3+0.96X_1X_2-4.05X_1X_3-0.25X_2X_3-9.37X_1^2-0.030X_2^2-18.99X_3^2$$

方差分析的显著性检验结果(表 4)表明, 模型  $F$  值(185.50)大于  $F_{0.01}(9.5)$ , 说明模型在  $F_{0.01}$  水平上显著;  $X_1X_3$  交互项  $P$  值( $<0.01$ )小于 0.05, 表明在该模型下培养温度与初始 pH 2 因素交互项显

著; 失拟项  $P$  值(0.16)大于 0.05, 即失拟项不显著, 且决定系数  $R^2=0.9958$ , 表明拟合度较好。

如图 6 所示, 当 3-PBA 浓度为 30 mg/L 时, 接种量和初始 pH 交互作用对 3-PBA 降解率影响明显。可以看出, 随着培养温度和初始 pH 的增加, 3-PBA 的降解率随之增大; 增加到一定值后, 其降解率逐步下降。

表 4. Box-Behnken 试验结果的方差分析

Table 4. Variance analysis of the results from Box-Behnken test

| Source      | Sum of squares | Df | Mean square | F value | P-value |
|-------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model       | 2928.92        | 9  | 325.44      | 185.50  | < 0.01  |
| $X_1$       | 547.70         | 1  | 547.70      | 312.19  | < 0.01  |
| $X_2$       | 7.91           | 1  | 7.91        | 4.51    | 0.07    |
| $X_3$       | 75.65          | 1  | 75.65       | 43.12   | < 0.01  |
| $X_1X_2$    | 3.71           | 1  | 3.71        | 2.11    | 0.19    |
| $X_1X_3$    | 65.53          | 1  | 65.53       | 37.35   | < 0.01  |
| $X_2X_3$    | 0.26           | 1  | 0.26        | 0.15    | 0.71    |
| $X_1^2$     | 369.87         | 1  | 369.87      | 210.83  | < 0.01  |
| $X_2^2$     | < 0.01         | 1  | < 0.01      | < 0.01  | 0.96    |
| $X_3^2$     | 1519.20        | 1  | 1519.20     | 865.96  | < 0.01  |
| Residual    | 12.28          | 7  | 1.75        |         |         |
| Lack of fit | 8.49           | 3  | 2.83        | 2.98    | 0.16    |
| Pure error  | 3.79           | 4  | 0.95        |         |         |
| Cor total   | 2941.20        | 16 |             |         |         |

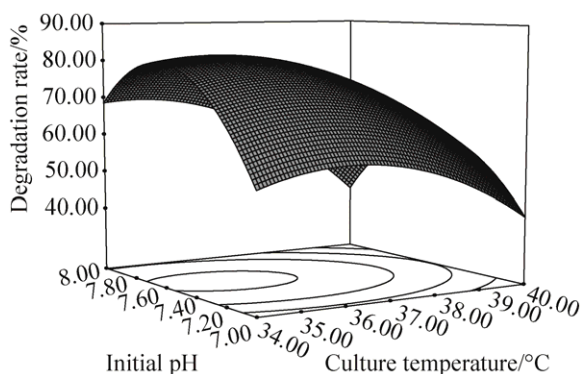


图 6. 培养温度与初始 pH 交互作用的响应面图和等高线图

Figure 6. Response surface and contours plots of the interaction between culture temperature and initial pH.

分别对模型的各自变量求一阶偏导, 得其极值点:  $X_1=-0.6$ ,  $X_2=-1.0$ ,  $X_3=0.17$ 。即在 35.19 °C、3-PBA (30.00 mg/L)及初始 pH 7.58 条件下, 路德维希杆菌 BPBA031 对 3-PBA 的降解率为 83.48%; 重复验证实验结果显示, 优化条件下的 3-PBA 平均降解率为 83.75%, 与预测值基本一致, 表明此模型能够准确预测不同培养条件下路德维希杆菌 BPBA031 对 3-PBA 的降解率。

### 3 讨论

3-PBA 是典型的拟除虫菊酯类农药降解残留物, 具有毒性大、易蓄积以及难降解等特点; 而生物降解具有条件温和、经济高效且不易形成二次污染等优势, 因此可采用生物修复方法治理受 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药污染的环境<sup>[27]</sup>。本课题组首次从大豆根系土壤中分离得到具有 3-PBA 高效降解能力的菌株 BPBA031, 综合形态学、生理生化特征、16S rRNA 基因序列和系统发育分析的结果, 将其鉴定为路德维希杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。路德维希杆菌(*Enterobacter ludwigii*)是由 Hoffmann 等<sup>[28]</sup>首次从临床样品中分离得到, 这种细菌曾一直被认为是人类病原体<sup>[29]</sup>, 但近年研究表明其不仅来自临床样品, 在其他领域也被陆续发现。如 Kwon 等<sup>[30]</sup>在韩国发酵蔬菜中分离出高产粘性胞外多糖的 *Enterobacter ludwigii* GK-23; 从植物根际土壤或根结节中也筛选得到 *Enterobacter ludwigii*, 其大多具有植物生长促进作用<sup>[26]</sup>、产胞外多糖<sup>[31]</sup>、生物控制能力以及烃降解能力<sup>[32]</sup>; *Enterobacter ludwigii* 也存在于石油管道中的腐蚀微生物群落中<sup>[33]</sup>; 而 Singh 等<sup>[34]</sup>则从迁徙山羊的瘤胃内发现产单宁鞣酸酶的 *Enterobacter ludwigii* GRT-1; 因此 *Enterobacter*



*ludwigii* 在食品工业、生物医疗、生物化工、植物促生定殖及环境治理等领域都有非常突出的应用价值<sup>[26,31-35]</sup>。

同时, 菌株 BPBA031 对 3-PBA 耐受浓度达 1600 mg/L, 远高于 Halden 等<sup>[13]</sup>和 Chen 等<sup>[14]</sup>从活性淤泥中分离出的 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 和 *Ochrobactrum lupini* DG-S-01; 且该菌接种 48 h 对 3-PBA (30 mg/L) 降解率达 83.75%, 高于 Zhu 等<sup>[18]</sup>从酱油曲料中筛选出的 *Aspergillus oryzae* M4; 表明菌株 BPBA031 是 1 株高效 3-PBA 降解菌, 同时具有生物修复受高浓度 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药污染环境的潜力。此外, 基于 Logistic 生长动力学和一级降解动力学模型拟合的生长降解动力学曲线表明, 菌株在延滞期(0-10 h) 对 3-PBA 的利用较为明显, 进入对数期(10-48 h) 3-PBA 则被迅速降解, 但进入稳定期(48 h 后) 时间较早, 可能是由于碳源的缺乏或是底物的反馈抑制作用所造成, 这与 Chen 等<sup>[17]</sup>的研究结果比较一致; 且 3-PBA 的半衰期( $t_{1/2}=33.24$  h) 远低于 *Stenotrophomonas* sp. ZS-S-01<sup>[16]</sup>; 表明该菌在以 3-PBA 为唯一碳源的培养条件下, 可迅速吸收利用 3-PBA。而菌株 BPBA031 在不同培养条件下对 3-PBA 的降解效率差异表明: (1) 菌株在 34-37 °C 对 3-PBA 降解作用明显(图 5-A), 推测菌株分泌的 3-PBA 降解酶在此温度范围内的培养体系中具有最佳催化活性; (2) 高浓度 3-PBA 在一定程度上可抑制菌株对 3-PBA 的降解(图 5-B), 但结果表明强抑制作用可能出现在较高的 3-PBA 浓度范围, 鉴于污染环境中 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药残留浓度远低于实验条件<sup>[1,27]</sup>, 推测菌株在自然环境条件下对 3-PBA 应具有较高降解效率; (3) 在较酸或较碱条件下, 微生物表面及其生长环境的电荷可能

发生改变<sup>[36]</sup>, 进而影响微生物对 3-PBA 的吸收和降解利用; 而且 3-PBA 降解后会生成酸性产物<sup>[17,37]</sup>, 导致 pH 值降低, 因此推测中性和稍偏碱性的环境更有利于菌株对 3-PBA 的降解, 这与本次实验结果(图 5-C)相一致。

本研究表明从受拟除虫菊酯类农药污染的大豆根系土壤中分离的路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) BPBA031 菌株可高效降解 3-PBA, 具有潜在的植物促生特性以及芳烃降解能力, 可作为生物修复受 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药污染环境的优良微生物资源。

## 参 考 文 献

- [1] Cycoń M, Piotrowska-Seget Z. Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: a review. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1463.
- [2] Zhang C, Jia L, Wang SH, Qu J, Li K, Xu LL, Shi YH, Yan YC. Biodegradation of beta-cypermethrin by two *Serratia* spp. with different cell surface hydrophobicity. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3423-3429.
- [3] Chuang JC, Van Emon JM, Trejo RM, Durnford J. Biological monitoring of 3-phenoxybenzoic acid in urine by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Talanta*, 2011, 83(5): 1317-1323.
- [4] Watkins DJ, Fortenberry GZ, Sánchez BN, Barr DB, Panuwet P, Schnaas L, Osorio-Valencia E, Solano-González M, Ettinger AS, Hernández-Ávila M, Hu H, Téllez-Rojo MM, Meeker JD. Urinary 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) levels among pregnant women in Mexico City: distribution and relationships with child neurodevelopment. *Environmental Research*, 2016, 147: 307-313.
- [5] Sun H, Chen W, Xu XL, Ding Z, Chen XD, Wang XR. Pyrethroid and their metabolite, 3-phenoxybenzoic acid showed similar (anti) estrogenic activity in human and rat estrogen receptor  $\alpha$ -mediated reporter gene assays. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(1): 371-377.
- [6] McCoy MR, Yang Z, Fu X, Ahn KC, Gee SJ, Bom DC, Zhong P, Chang D, Hammock BD. Monitoring of total type II

- pyrethroid pesticides in citrus oils and water by converting to a common product 3-phenoxybenzoic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(20): 5065–5070.
- [7] Liu Y, Wu AH, Hu J, Lin MM, Wen MT, Zhang X, Xu CX, Hu XD, Zhong JF, Jiao LX, Xie YJ, Zhang CZ, Yu XY, Liang Y, Liu XJ. Detection of 3-phenoxybenzoic acid in river water with a colloidal gold-based lateral flow immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 2015, 483(1): 7–11.
- [8] Yuan C, Wang C, Gao SQ, Kong TT, Chen L, Li XF, Song L, Wang YB. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility *in vitro* evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicology in vitro*, 2010, 24(2): 382–386.
- [9] Sun H, Xu XL, Xu LC, Song L, Hong X, Chen JF, Cui LB, Wang XR. Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere*, 2007, 66(3): 474–479.
- [10] Topp E, Akhtar MH. Mineralization of 3-phenoxybenzoate by a two-membered bacterial co-culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 1990, 36(7): 495–499.
- [11] Vidal JLM, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, Frenich AG. Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(40): 6767–6788.
- [12] Tang J, Yao K, Liu SL, Jia DY, Chi YL, Zeng CY, Wu S. Biodegradation of 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Sphingomonas* SP. SC-1. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2013, 22(5): 1564–1572.
- [13] Halden RU, Tepp SM, Halden BG, Dwyer DF. Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(8): 3354–3359.
- [14] Chen SH, Hu MY, Liu JJ, Zhong GH, Yang L, Rizwan-ul-Haq M, Han HT. Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Ochrobactrum lupini* DG-S-01. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 187(1/3): 433–440.
- [15] Zhang J, Lang ZF, Zheng JW, Hang BJ, Duan XQ, He J, Li SP. *Sphingobium jiangsuense* sp. nov., a 3-phenoxybenzoic acid-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 4): 800–805.
- [16] Chen SH, Yang L, Hu MY, Liu JJ. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas* sp. strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(2): 755–767.
- [17] Chen SH, Hu W, Xiao Y, Deng YY, Jia JW, Hu MY. Degradation of 3-phenoxybenzoic acid by a *Bacillus* sp. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50456.
- [18] Zhu YT, Li JL, Yao K, Zhao N, Zhou K, Hu XJ, Zou LK, Han XF, Liu AP, Liu SL. Degradation of 3-phenoxybenzoic acid by a filamentous fungus *Aspergillus oryzae* M-4 strain with self-protection transformation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9773–9786.
- [19] Wang Y, Chen H, Liu YX, Ren RP, Lv YK. An adsorption-release-biodegradation system for simultaneous biodegradation of phenol and ammonium in phenol-rich wastewater. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 711–719.
- [20] Pinyakong O, Habe H, Supaka N, Pinpanichkarn P, Juntongjin K, Yoshida T, Furihata K, Nojiri H, Yamane H, Omori T. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 191(1): 115–121.
- [21] Liu B, Tang J, Chen TT, Shi Y, Zeng L, Zeng CY. Isolation and identification of two pyrethroid pesticides degradation strains and research of degradative capabilities. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(4): 214–219, 224. (in Chinese)  
刘波, 唐洁, 陈廷廷, 史颖, 曾林, 曾朝懿. 两株拟除虫菊酯类农药降解菌的分离鉴定及其降解能力的研究. *食品工业科技*, 2017, 38(4): 214–219, 224.
- [22] Zhang YX, Meng XJ, Chai TY. Characterization of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain P1 from coking wastewater. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1117–1124. (in Chinese)  
张玉秀, 蒙小俊, 柴团耀. 苯酚降解菌红球菌(*Rhodococcus* sp.)P1 的鉴定及其在焦化废水中的应用. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1117–1124.
- [23] Ren L, Shi YH, Jia Y, Yao XS, Nahurira R, Mi CX, Yan YC. Biodegradation characteristics and kinetics of *p*-nitrophenol by strain *Arthrobacter* sp. CN2. *Environmental Science*, 2015, 36(5): 1757–1762. (in Chinese)  
任磊, 史延华, 贾阳, 姚雪松, Nahurira R, 弥春霞, 闫艳春. 菌株 *Arthrobacter* sp. CN2 降解对硝基苯酚的特性与动力学. *环境科学*, 2015, 36(5): 1757–1762.
- [24] Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Heesemann J, Monget D, Schleifer KH, Roggenkamp A. Reassignment of *Enterobacter dissolvens* to *Enterobacter*

- cloacae* as *E. cloacae* subspecies *dissolvens* comb. nov. and emended description of *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter kobei*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(3): 196–205.
- [25] Lu LL, Xiao M, Xu XD. *Enterobacter agglomerans* B1 producing  $\beta$ -galactosidase with transglycosylation activity: screening, identification, fermentation conditions, and galacto-oligosaccharides synthesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(1): 38–44. (in Chinese)  
卢丽丽, 肖敏, 徐晓东. 转糖基  $\beta$ -半乳糖苷酶产生菌 *Enterobacter agglomerans* B1: 筛选鉴定、发酵产酶及其合成低聚半乳糖的研究. *微生物学报*, 2008, 48(1): 38–44.
- [26] Shoebitz M, Ribaudó CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Curá JA. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(9): 1768–1774.
- [27] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1/3): 1–15.
- [28] Hoffmann H, Stindl S, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Heesemann J, Schleifer KH, Roggenkamp A. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(3): 206–212.
- [29] Paauw A, Caspers MPM, Schuren FHJ, Hall MALV, Delétoile A, Montijn RC, Verhoef J, Fluit AC. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3018.
- [30] Kwon TY, Shim SM, Heo MY, An DH, Shin KS, Lee JH. Isolation and characterization of exopolysaccharide-producing bacteria from Korean fermented vegetables. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 35(3): 191–195.
- [31] Pau-Roblot C, Lequart-Pillon M, Apanga L, Pilard S, Courtois J, Pawlicki-Jullian N. Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 93(1): 154–162.
- [32] Yousaf S, Afzal M, Reichenauer TG, Brady CL, Sessitsch A. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environmental Pollution*, 2011, 159(10): 2675–2683.
- [33] Neria-González I, Wang ET, Ramírez F, Romero JM, Hernández-Rodríguez C. Characterization of bacterial community associated to biofilms of corroded oil pipelines from the southeast of Mexico. *Anaerobe*, 2006, 12(3): 122–133.
- [34] Singh B, Bhat TK, Sharma OP, Kanwar SS, Rahi P, Gulati A. Isolation of tannase-producing *Enterobacter ludwigii* GRT-1 from the rumen of migratory goats. *Small Ruminant Research*, 2012, 102(2/3): 172–176.
- [35] Yang M, Cai J, Wang CG, Du X, Lin JG. Characterization of endo- $\beta$ -mannanase from *Enterobacter ludwigii* MY271 and application in pulp industry. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2017, 40(1): 35–43.
- [36] Li HX, Lin H, You SH, Xu XY, Xia SQ. Effect of pH on reductive degradation of *para*-chloronitrobenzene by autohydrogenotrophic microorganisms. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(7): 2083–2089. (in Chinese)  
李海翔, 林华, 游少鸿, 徐晓茵, 夏四清. pH对氢基质自养微生物还原降解对氯硝基苯的影响. *环境科学学报*, 2015, 35(7): 2083–2089.
- [37] Maloney SE, Maule A, Smith AR. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(11): 2874–2876.

## Screening and characterization of a 3-phenoxybenzoic acid degrading *Enterobacter ludwigii*

Bo Liu<sup>1</sup>, Jie Tang<sup>1\*</sup>, Tingting Chen<sup>1</sup>, Lin Zeng<sup>2</sup>, Chaoyi Zeng<sup>1</sup>, Qing Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Food and Biotechnology, Xihua University, Chengdu 610039, Sichuan Province, China

<sup>2</sup> Institute of Ancient Brewing, School of Food and Biotechnology, Xihua University, Chengdu 610039, Sichuan Province, China

**Abstract:** [Objective] Elimination of 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) is the key to solve the pyrethroid pesticides contamination environment. The aim of this study was to isolate efficient 3-PBA-degrading strains from the plant rhizosphere contaminated by pyrethroid pesticides. [Methods] 3-PBA-degrading strains were screened by using enrichment domestication, isolating and purification methods with 3-PBA used as the sole carbon source. Then the efficient 3-PBA-degrading strain was identified by morphological, physio-biochemical tests and 16S rRNA sequence analysis, and its growth and degradation kinetics and degradation characteristics were studied. Moreover, the degradation conditions were optimized by the Box-Behnken response surface analysis. [Results] A novel 3-PBA-degrading strain BPBA031 isolated from the soybean rhizosphere in northern Sichuan Province was classified into *Enterobacter ludwigii*, which could be resistant to high concentration of 3-PBA (1600 mg/L). The growth of strain BPBA031 and 3-PBA degradation respectively followed the logistic growth kinetic model ( $\mu_m=0.09149\text{ h}^{-1}$ ,  $X_m=1.1145$ ) and first-order degradation kinetic model ( $k=0.02085$ ,  $t_{1/2}=33.24\text{ h}$ ). The optimum conditions for 3-PBA degradation were culture temperature of 34–37 °C, 3-PBA concentration of 25–200 mg/L and initial pH of 7.5–8.5. In addition, the degradation rate of 3-PBA was 83.75% at 35.19 °C, 3-PBA concentration of 30.0 mg/L and initial pH 7.58 after 48 h of incubation. [Conclusion] *Enterobacter ludwigii* BPBA031, a highly efficient 3-PBA-degrading strain, can be used as a potential strain resource for bioremediation of environment polluted by 3-PBA or pyrethroid pesticides.

**Keywords:** *Enterobacter Ludwigii*, biodegradation, 3-phenoxybenzoic acid, degradation characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the Chunhui Program of Ministry of Education of China (Z2015122), by the Natural Science Foundation of Sichuan Provincial Department of Education (14ZB0122), by the Key Scientific Research Fund of Xihua University (z1310525), by the Open Research Subject of Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan Province of China (szjj2014-011) and by the Graduate Student Innovation Fund of Xihua University (ycjj2017151)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-28-87720552; E-mail: tangjie1225@mail.xhu.edu.cn

Received: 16 May 2017; Revised: 5 July 2017; Published online: 4 August 2017