



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

胡琼¹, 唐洁^{1*}, 刘波¹, 陈廷廷¹, 孙擎¹, 张庆²

¹ 西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610039

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

摘要:【目的】从长期受拟除虫菊酯类农药污染的白菜根系土壤分离 1 株 3-苯氧基苯甲酸 (3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA) 降解菌, 并探究其与 *Bacillus licheniformis* G-04 协同作用对高效氯氰菊酯 (beta-cypermethrin, Beta-CP) 的降解及污染土壤的生物修复, 为土壤农药残留危害处理提供优良菌种。

【方法】采用富集驯化、筛选纯化方法, 筛选 3-PBA 降解菌, 并通过形态和生理生化特征以及 16S rRNA 序列分析进行鉴定。利用 Origin 8.0 分析 3-PBA 降解菌与 *B. licheniformis* G-04 的生长降解动力学过程。同时, 采用高效液相色谱法评估两菌株协同降解 Beta-CP 的能力及其对受 Beta-CP 污染土壤的修复作用。

【结果】筛选得到 1 株 3-PBA 高效降解菌 HA516, 48 h 对 3-PBA (100 mg/L) 的降解率达到 87.73%, 经鉴定为皮特不动杆菌 (*Acinetobacter pittii*)。构建了该菌株和 *B. licheniformis* G-04 的生长降解动力学方程, 结果表明模型与实验数据能较好拟合; 以 6.7 : 3.3 的接种比例先接种 *B. licheniformis* G-04, 24 h 后再接入 *A. pittii* HA516 协同作用, 在 48 h, Beta-CP (50 mg/L) 的降解率达 78.37%, 较单菌株 (*B. licheniformis* G-04) 的降解率 (40.47%) 提高了 37.90%, 半衰期从 58.39 h 缩短为 24.51 h。土壤修复实验表明, 第 7 天协同组对 Beta-CP (30 mg/kg) 的降解率较单菌株提高了 33.26%, 达到 79.27%。【结论】*A. pittii* HA516 是 1 株 3-PBA 高效降解菌, 能与 *B. licheniformis* G-04 协同增效降解 Beta-CP, 可作为修复 3-PBA 或拟除虫菊酯类农药污染的优良微生物资源。

关键词: 3-苯氧基苯甲酸, 高效氯氰菊酯, 协同降解, *Acinetobacter pittii* HA516, *Bacillus licheniformis* G-04, 土壤生物修复

基金项目: 教育部春晖计划项目(Z2015122); 四川省食品生物技术重点实验室开放基金(SZJJ2014-011); 西华大学人才培养重点项目(z1310525); 四川省教育厅自然科学基金项目(114ZB0122); 西华大学研究生创新基金(ycjj2018021)

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

收稿日期: 2018-03-09; 修回日期: 2018-04-18; 网络出版日期: 2018-05-10

拟除虫菊酯类农药(pyrethroid pesticides, PP)是以天然除虫菊素为先导物合成的一类仿生型杀虫剂^[1],具有广泛性、高效性及低残留等特点^[2],是未来几十年难以替代的农药类型之一。高效氯氰菊酯(beta-cypermethrin, Beta-CP)是PP的一种,广泛应用于农业生产和室内卫生害虫防治等^[3],其代谢产物可通过食物链富集于动物和人体,对非靶标生物具有神经毒性、生殖毒性和蓄积毒性^[4-5]。3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)是Beta-CP的主要代谢产物之一,属雌激素类物质^[6],具有一定的生殖毒性,易被动植物吸收^[7]。Heudorf等^[8]报道,德国成年人和儿童尿液中的3-PBA含量高达0.30 µg/L。而且3-PBA在造成二次污染的同时^[9],也导致农药生物矿化作用受阻,从而限制了农药的生物降解途径^[10]。因此,如何同时消除环境中的Beta-CP及其主要代谢产物3-PBA已受到广泛关注。

生物降解法以其条件温和、高效无毒、无二次污染及生态协调等特点被认为是一种有效的农药污染“绿色”解决方案^[11],其中微生物协同代谢是污染物去除的主要方法之一。所以从环境中筛选获得高效降解Beta-CP和3-PBA的微生物是Beta-CP得以持续降解的关键。目前,国内外学者已筛选到大量Beta-CP降解菌,主要有铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[12]、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[13]、苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)^[14]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[15]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[16]等;关于3-PBA降解菌株,如米曲霉(*Aspergillus oryzae*)^[17]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[18]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[19]、鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)^[20]、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)^[21]等也有报道。然而,单一微生物往往不具备降解矿化所需所有酶系,产生的有毒代谢中间产物会

抑制微生物生长进而降低降解效率^[22],导致不完全的生物降解发生^[23]。有研究表明,多种微生物协同降解过程中,微生物对环境具有更强的适应性,可提高污染物降解效率^[24-25]。Tran^[25]等也证明了微生物的共培养可以有效地降解有机污染物和共代谢过程产生的相关代谢物。而目前通过多菌株协同作用同时降解Beta-CP和3-PBA的报道较少^[26-27]。

本研究以实验室保藏的1株Beta-CP降解菌——*Bacillus licheniformis* G-04^[28],与从长期受拟除虫菊酯类农药污染的白菜根系土壤中分离出的1株3-PBA高效降解菌——*Acinetobacter pittii* HA516协同降解Beta-CP,并对两菌株的生长降解动力学、菌株协同作用降解Beta-CP及污染土壤生物修复进行分析,为其进一步应用于受3-PBA或PP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 试剂与培养基: Beta-CP,南京荣诚化工有限公司;3-PBA,梯希爱(上海)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)和Luria-Bertani培养基(LB Medium)参照文献^[29]进行配制。

1.1.2 样品来源: *B. licheniformis* G-04为实验室保藏的1株Beta-CP降解菌,分离自成都郫县某一长期施用拟除虫菊酯农药的菜园,培养72 h对Beta-CP(50 mg/L)的降解率为83.86%^[28];分离3-PBA降解菌的土样采自川北地区长期受PP污染的白菜根系土壤(10-20 cm),生物修复土壤采自同

一地区未受污染土壤。

1.1.3 仪器：Agilent 1200 型高效液相色谱仪、Agilent 1200 型 DAD 紫外检测器，美国 Agilent 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 Beta-CP 和 3-PBA 的检测及其标准曲线方程建立

Beta-CP 和 3-PBA 的样品处理及检测方法参照文献[28,30]进行，采用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)，紫外检测器波长为 210 nm。配制 Beta-CP 标准溶液(50 mg/L)和 3-PBA 标准溶液(100 mg/L)，依次进样 1、2、4、6、8、10 μL 进行标准曲线绘制，拟合 Beta-CP 和 3-PBA 质量-峰面积的标准曲线分别为： $Y_{\text{Beta-CP}}=10638425.352x+548384.701(R^2=0.9997)$ ； $Y_{3\text{-PBA}}=83.4563x+0.7695(R^2=1.0000)$ 。

1.3 3-PBA 降解菌的筛选与鉴定

3-PBA 降解菌的富集驯化、筛选纯化和菌株鉴定参照文献[29]进行，纯化后的菌株转接到含 3-PBA (100 mg/L)的 MSM 培养基中，空白对照不接菌而接等体积无菌水，30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 48 h 后取样测定 3-PBA 残留量^[30]，筛选高降解率[按公式(1)计算]菌株，将最高效降解菌命名为 HA516 用于后续实验。

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

其中 C 为样品组中 3-PBA 含量； C_0 为对照组中 3-PBA 含量。

1.4 降解菌的生长降解动力学

将两菌株种子液($OD_{600}\approx 1.0$)^[30]按 5.0% (V/V)的接种量分别接种到对应含 Beta-CP (50 mg/L)和

3-PBA (100 mg/L)的 MSM 培养基中，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养，定时取样测定其 OD_{600} 值、Beta-CP 和 3-PBA 残留量。

Logistic 方程是由 Verhulst-Peal 提出，常用来描述菌体生长动力学过程^[23]，其生长动力学方程如公式(2)所示；其一级降解动力学方程^[31]如公式(3)所示；按公式(4)计算底物降解半衰期 $t_{1/2}(\text{h})$ 。

$$X=X_0e^{\mu_m t}/1-(X_0/X_m)(1-e^{\mu_m t}) \quad (\text{公式 2})$$

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

$$C_t=C_0\times e^{-kt} \quad (\text{公式 3})$$

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

$$t_{1/2}=\ln 2/k \quad (\text{公式 4})$$

1.5 协同作用降解 Beta-CP 的特性分析

1.5.1 不同接种比例对 Beta-CP 降解率的影响：

在 LB 培养基中加入定量的 Beta-CP 使其终浓度为 50 mg/L，按 5.0% (V/V)的接种量接入 $OD_{600}\approx 1.0$ 的 *B. licheniformis* G-04 和菌株 HA516 的种子液，其接种比例分别为 10:0、7.5:2.5、6.7:3.3、5:5、3.3:6.7、2.5:7.5、0:10 (V/V)，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 48 h，取样测定 Beta-CP 降解率。

1.5.2 不同接种顺序对 Beta-CP 降解率的影响：

在 LB 培养基中加入一定量的 Beta-CP 使其终浓度为 50 mg/L，根据 1.5.1 的实验结果设置两菌株的最佳接种比例，分别按以下 3 种不同接种顺序接入 $OD_{600}\approx 1.0$ 的 *B. licheniformis* G-04 和菌株 HA516，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 48 h，取样测定 Beta-CP 降解率。

接种顺序 1：先接种 *B. licheniformis* G-04，培养 24 h 后再接种菌株 HA516。

接种顺序 2：同时接种 *B. licheniformis* G-04 和菌株 HA516。

接种顺序 3：先接种菌株 HA516，培养 24 h 后再接种 *B. licheniformis* G-04。

1.6 菌株协同作用生物修复污染土壤

对采集回来的土样进行理化指标测定^[32]，该土壤呈弱碱性，有机质含量为 15.90–21.10 g/kg，总氮为 2.30–2.80 g/kg，总磷为 0.38–0.51 g/kg，含水量为 30.50%–36.10% (W/W)。烘干后过 2 mm 滤筛，去除土壤中可见杂质。称取 Beta-CP 原农药，添加到土壤中使其含量为 30 mg/kg，过夜备用。将土样分为协同组、单菌株和空白组 3 组，每组设 3 个重复，每组土样 1 kg。协同组根据 1.5 的实验结果，按 5% (V/W) 添加量，在最佳接种比例和接种顺序下将混合菌株添加到污染土壤中；单菌株按 5% (V/W) 添加量将 *OD*₆₀₀≈1.0 的 *B. licheniformis* G-04 添加到污染土壤中；空白组添加等量无菌水，3 组实验中土壤含水量保持为 35% (W/W)，温度为 20 °C，每隔 1 d 取样测定 Beta-CP 残留量^[29]。

1.7 数据分析

实验结果采用 Origin 8.0 统计软件进行分析，数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果和分析

2.1 3-PBA 降解菌的筛选鉴定

经富集驯化和分离筛选，共获得 10 株可耐受 3-PBA (1600 mg/L) 的菌株，8 株具备有效降解 3-PBA 的能力。经方差分析(图 1)，其中一株菌株降解率与其他 7 株降解率差异性显著($P<0.01$)，达 87.73%，命名为 HA516。将菌株 HA516 划线接种

于 MSM 培养基中，呈圆形、乳白色、中央凸起、粘稠、表面光滑、边缘整齐的菌落。菌体(图 2)呈长圆杆状，单个排列，大小为(0.6–1.0) $\mu\text{m}\times$ (0.8–2.6) μm 。革兰氏镜检、甲基红、蛋白酶、吲哚和硫化氢实验均呈阴性；发酵葡萄糖、V-P 反应均呈阳性，表明菌株 HA516 可能属于肠杆菌科细菌^[33–34]。将菌株 HA516 的 16S rRNA 扩增产物回收测序获得 1358 bp 的序列。利用 BLAST 检索分析

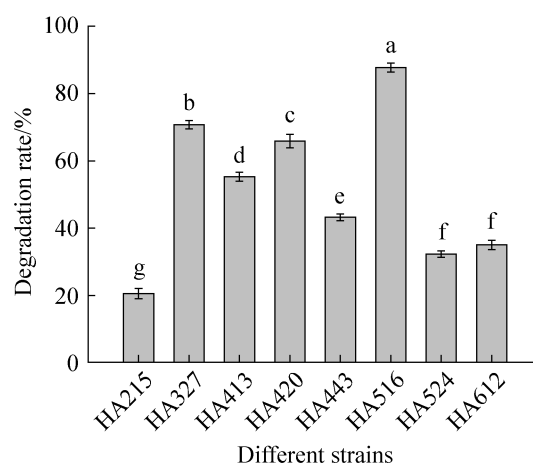


图 1. 不同菌株对 3-PBA 的降解率

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

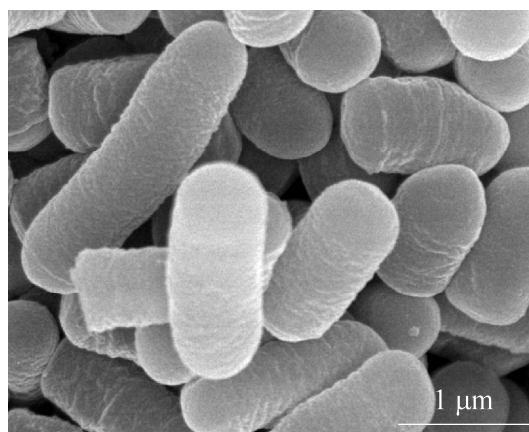


图 2. 菌株 HA516 扫描电镜形态

Figure 2. Scanning electron microscopic morphology of strain HA516.

将菌株 HA516 的序列提交至 GenBank (accession number: KY474547) 进行同源性分析, 发现菌株 HA516 与 *Acinetobacter pittii* ATCC 19004 (accession number: NR117621)、*Acinetobacter pittii* BR12 (accession number: KT748634) 的同源性达 99%。对于 16S rRNA 序列同源性大于 97%, 认为属于同种^[35], 可以推测菌株 HA516 为不动杆菌属细菌 (*Acinetobacter* sp.)。利用 MEGA 7.0 软件及其 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 3) 进一步确定菌株 HA516 的种属地位, 发现菌株 HA516 与 *Acinetobacter pittii* ATCC 19004、*Acinetobacter pittii* BR12、*Acinetobacter pittii* W26 均处于同一分支, 进一步证实了菌株 HA516 为皮特不动杆菌 (*Acinetobacter pittii*)。结合形态学、生理生化特征^[36]、16S rRNA 基因序列和系统发育分析, 可以确定菌

株 HA516 为皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*)。

2.2 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 的生长降解动力学模型拟合

利用 Origin 8.0 对菌株生物量与菌株降解动力学模型进行非线性拟合, 分别得到两菌株生长动力学方程: $X_{G-04}=0.04346e^{0.08927t}/[1-0.03959(1-0.04346e^{0.08927t})]$, $\mu_m=0.09927\text{ h}^{-1}$, $X_0=0.04346$ 及 $X_m=1.0978$; $X_{HA516}=0.09133e^{0.09344t}/[1-0.08051(1-e^{0.09344t})]$, $\mu_m=0.09344\text{ h}^{-1}$, $X_0=0.09133$ 及 $X_m=1.1344$ 。图 4-A 表明 *B. licheniformis* G-04 能在以 Beta-CP 为唯一碳源的 MSM 培养基中良好生长, 0–10 h 处于生长延滞期, 10 h 后 OD_{600} 急剧上升, 迅速进入生长对数期, 细胞数量显著增加, 48 h 达到稳定期。图 4-B 表明 *A. pittii* HA516 具有较短的生长延滞期, 在生长对数期菌体呈几何级数增长。

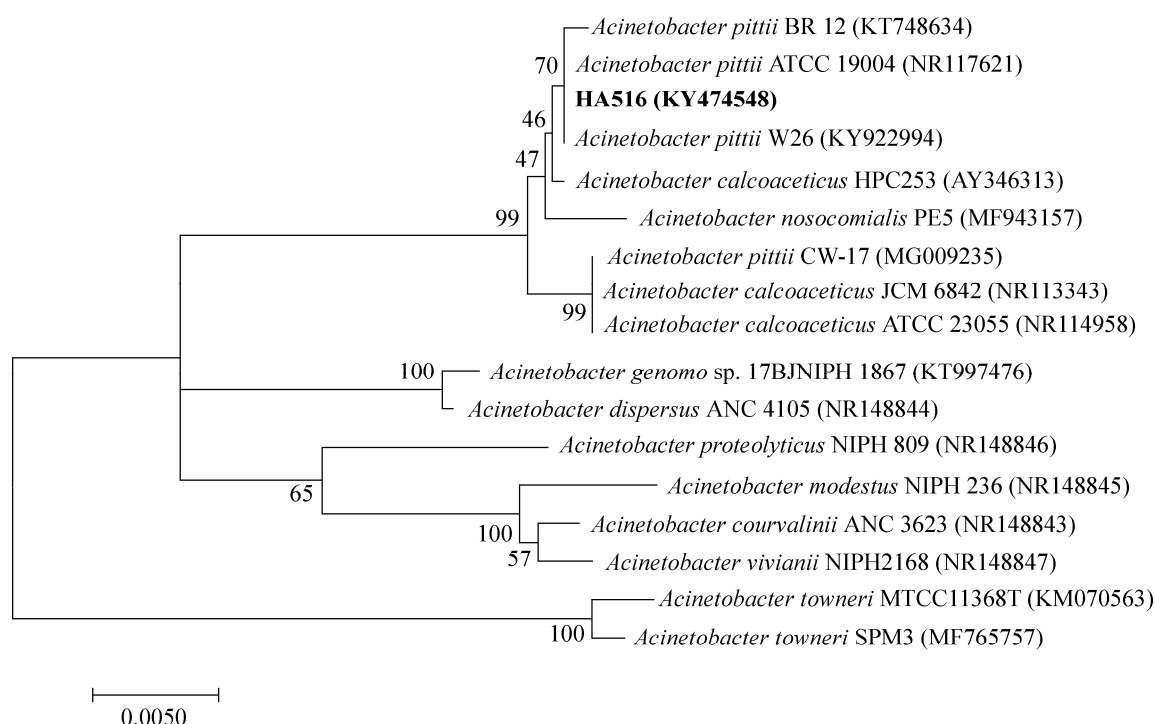


图 3. 菌株 HA516 基于 16S rRNA 的菌株系统发育分析

Figure 3. Phylogenetic tree of strain HA516 based on 16S rRNA sequence. Node number represents the confidence level of relatives; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.0050.

分析 *B. licheniformis* G-04 降解 Beta-CP (图 4-A) 和 *A. pittii* HA516 降解 3-PBA (图 4-B) 的动力学过程中得到菌株对底物的一级降解动力学方程： $C_{G-04}=50.35474e^{-0.01187t}$ ， $k=0.01187$ ， $t_{1/2}=58.39$ ； $C_{HA516}=97.03633e^{-0.04371t}$ ， $k=0.04371$ ， $t_{1/2}=15.86$ 。48 h *A. pittii* HA516 对 3-PBA 的降解率达到 87.73%，优于 Zhu 等^[17]分离到的 *Aspergillus oryzae* M4 培养 5 d 对 3-PBA (100 mg/L) 的降解率，表明 *A. pittii* HA516 具有 3-PBA 高效降解能力。

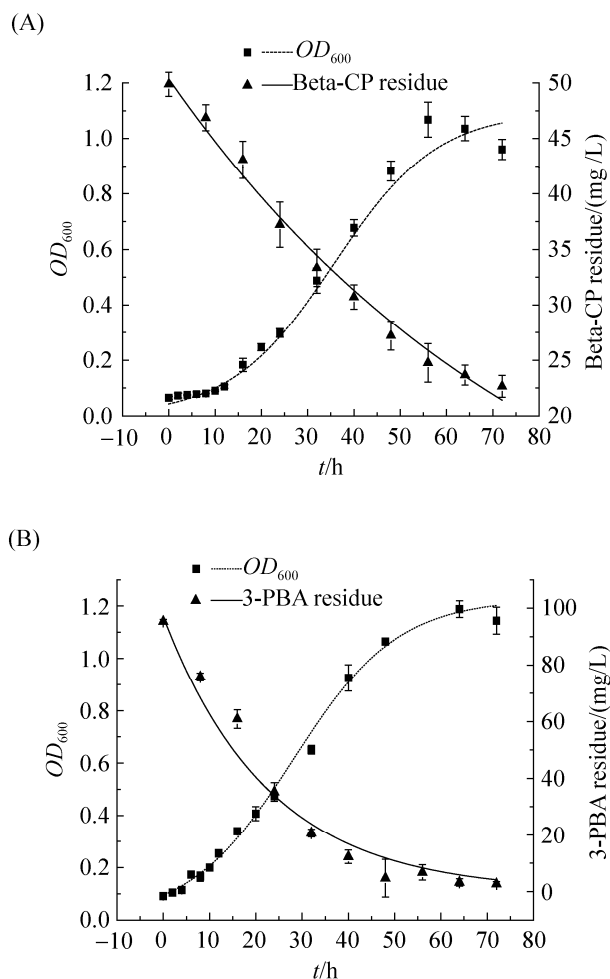


图 4. *B. licheniformis* G-04 (A) 和 *A. pittii* HA516 (B) 的生长和降解曲线

Figure 4. Growth and degradation curve of strain *B. licheniformis* G-04(A) and *A. pittii* HA516(B). $P<0.01$.

得到 *B. licheniformis* G-04 生长降解动力学模型的拟合度分别为 0.9719 和 0.9880；*A. pittii* HA516 生长降解动力学模型的拟合度分别为 0.9886 和 0.9918。表明 2 种模型能较好反映 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 的实际生长规律以及分别对 Beta-CP 和 3-PBA 的降解作用。

2.3 两菌株协同作用降解高效氯氰菊酯的特性

2.3.1 不同接种比例对 Beta-CP 降解率的影响：

基于 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 作用底物不同，考察其协同作用的最适接种比例。由图 5 可知 48 h 时不同比例的 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 对 Beta-CP 的降解率不同。随着 *B. licheniformis* G-04 接种量的减少、*A. pittii* HA516 接种量的增加，Beta-CP 降解率呈现先增加后降低的趋势，当 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 接种比例为 6.7:3.3 (V/V) 时，Beta-CP 的降解率最高。这与 Zhao 等^[26]的研究相一致，可能是 *A. pittii* HA516 降解了 *B. licheniformis* G-04

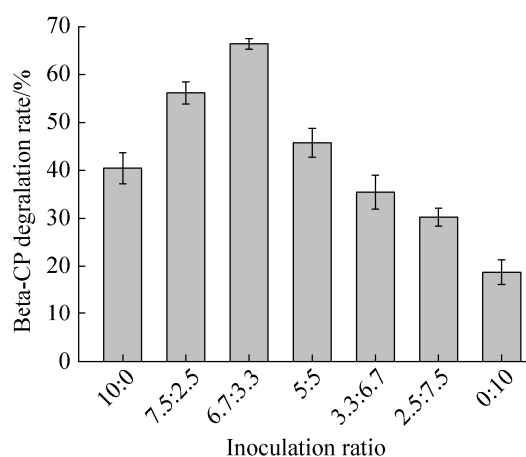


图 5. 菌株接种比例(*B. licheniformis* G-04 : *A. pittii* HA516)对 Beta-CP 降解的影响

Figure 5. The effect of inoculation ratio of two strains on the degradation of Beta-CP (*B. licheniformis* G-04 : *A. pittii* HA516). $P<0.01$.

代谢 Beta-CP 产生的有毒中间产物 3-PBA, 减少了降解体系中 3-PBA 的累积, 从而加速 Beta-CP 的降解。而 *A. pittii* HA516 是一株高效 3-PBA 降解菌, 对 Beta-CP 的降解率不高, 所以当 *B. licheniformis* G-04 的接种量降低后, Beta-CP 的降解率也随之下降。因此, *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 能通过协同的方式提高对 Beta-CP 的降解率, 其最适接种比例为 6.7 : 3.3 (V/V)。

2.3.2 不同接种顺序对 Beta-CP 降解率的影响:

基于 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 的生长特性不同, 考察两菌株的最适接种顺序对 Beta-CP 降解的影响。从图 6 可以看出, 先接种 *B. licheniformis* G-04, 24 h 后再接种 *A. pittii* HA516 的降解体系中, 培养终点时 Beta-CP 的残留量最少, 说明先接种 *B. licheniformis* G-04 对 Beta-CP 的降解效率最高。这可能是由于先接入的 *B. licheniformis* G-04 降解 Beta-CP 为 3-PBA, 解除了 Beta-CP 对 *A. pittii* HA516 的部分抑制作用。而生成的 3-PBA 被后接入的 *A. pittii* HA516 迅速降解, 从而降低了 3-PBA 对 *B. licheniformis* G-04 代谢的反馈抑制, 这与 Liu 等^[27]研究结果相一致。

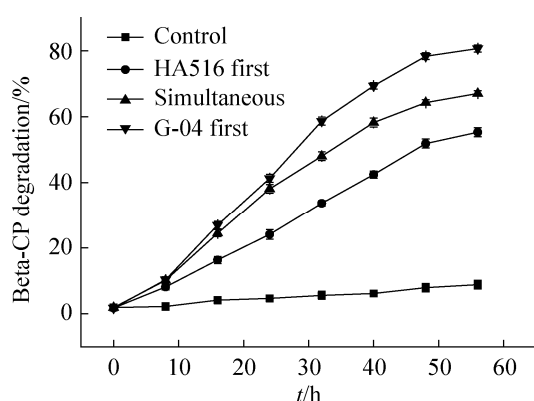


图 6. 菌株接种顺序对 Beta-CP 降解的影响
Figure 6. The effect of inoculation sequence of two strains on the degradation of Beta-CP. $P < 0.01$.

因此两菌株降解 Beta-CP 的最适接种顺序为先接种 *B. licheniformis* G-04, 24 h 后再接种 *A. pittii* HA516。

在最佳接种比例和接种顺序下, 得出协同组对底物 (Beta-CP) 的一级降解动力学方程为: $C_{\text{co-degrading strains}} = 52.51510e^{-0.02828t}$, $k = 0.02828$, $t_{1/2} = 24.51$, 拟合度为 0.9609。48 h 对 Beta-CP (50 mg/L) 的降解率为 78.37%, 与 2.3.1 中的单菌株 (*B. licheniformis* G-04) 降解率作比较, 协同组较单菌株 (40.47%) 提高 37.90%。表明 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 协同作用有效提高了 Beta-CP 的降解效率。

2.4 污染土壤生物修复

以 6.7 : 3.3 (V/V) 的接种比例, 先接种 *B. licheniformis* G-04, 24 h 后再接种 *A. pittii* HA516 协同修复土壤结果见图 7。前 2 d 协同组和单菌株降解效率差异较小, 第 7 天协同组对 Beta-CP 降解效率达到了 79.27%, 较单菌株提高了 33.26%,

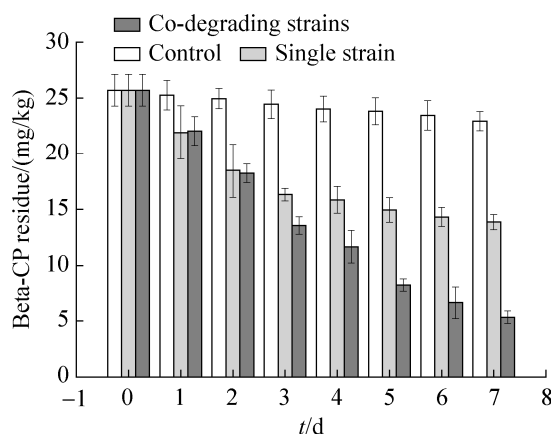


图 7. 土壤生物修复

Figure 7. Soil remediation, Beta-CP content in the soil by using single strain (*B. licheniformis* G-04), co-degrading strains (*B. licheniformis* G-04 and *A. pittii* HA516), and in the uninoculated soil (control). $P < 0.01$.

这与在培养基中的趋势一致,随着时间的延长,菌株对土壤的修复作用逐渐增强,但比在培养基中的降解效率低,可能是因为土壤中缺乏 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 生长的营养元素^[27]。土壤修复实验结果表明 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 的协同作用在污染土壤的修复应用方面有很大的潜能。

3 讨论

3-PBA 是绝大多数拟除虫菊酯类农药降解的有毒中间产物,会抑制微生物的生长和农药的持续降解^[9,26],因此,3-PBA 的消除是母体农药得以持续矿化降解的关键。本课题组首先从长期受 PP 污染的白菜根系土壤中分离得到具有高效 3-PBA 降解能力的菌株 HA516,经鉴定为皮特不动杆菌 (*Acinetobacter pittii*)。近年来关于皮特不动杆菌的报道较少,但不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)广泛应用于生物医疗、食品工业和环境治理等领域^[37-38],特别是在环境治理方面,如刘玉华^[34]等从油井溢油污染土壤分离到高效石油降解菌 *Acinetobacter* sp. BZ-15;王迪等^[39]从污水处理厂筛选到以双酚 A 为唯一碳源的高效降解菌 *Acinetobacter calcoaceticus* D-17; *Acinetobacter* sp. YN3 也能在废水处理过程中快速高效地完成异养硝化和好氧反硝化脱氮作用^[36]。因此,不动杆菌在环境治理方面具有潜在的生物修复作用。同时,分析 *A. pittii* HA516 的生长降解动力学过程发现,其 48 h 对 3-PBA (100 mg/L)的降解率达到 87.73%,比从活性淤泥分离到的苍白杆菌 DG-S-01 (培养 9 d)对 3-PBA (100 mg/L)的降解率高 3.03%^[7],比从酱油曲料分离到的 *Aspergillus oryzae* M4 (培养 5 d)对 3-PBA (100 mg/L)的降解率高 7.11%^[17]。

并且在该菌的作用下 3-PBA 的半衰期缩短为 15.86 h,远低于 Chen 等^[21]从活性淤泥分离出的 *Stenotrophomonas* sp. ZS-S-01 (2.3–4.9 d),表明 *A. pittii* HA516 是 1 株高效 3-PBA 降解菌。

生物降解本质是酶促降解^[40],而单一微生物往往不具备矿化有机污染物的完整酶系,部分降解中间产物的毒性还高于母体农药,进一步抑制单一微生物的生长,限制其降解速率^[29];基于此,本文以 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 协同作用降解 Beta-CP,以 6.7:3.3 的接种比例先接种 *B. licheniformis* G-04,24 h 后再接入 *A. pittii* HA516,协同降解 Beta-CP 较 *B. licheniformis* G-04 单独作用,其降解效率提高了 37.90%,可能是由于 3-PBA 抑制了 Beta-CP 代谢过程中关键酶的表达,或限制代谢途径中关键酶的活性,进一步降低整个降解代谢进程,这与 Liu 等^[27]利用 *Bacillus licheniformis* B-1 和 *Sphingomonas* sp. SC-1 协同降解氯氰菊酯较 *Bacillus licheniformis* B-1 单独作用其降解效率高的结果相一致。同时 Zhao 等^[26]研究也表明,当有毒中间产物 3-PBA 被降解,其农药降解速率显著提高;本研究中,在接种量相同的条件下,3-PBA 降解菌 *A. pittii* HA516 的介入可减少降解体系中 3-PBA 的累积,消除 3-PBA 对 *B. licheniformis* G-04 代谢的反馈抑制,从而加速 Beta-CP 的高效降解,使得 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 协同作用降解 Beta-CP 的半衰期缩短至 24.51 h,远低于 *Bacillus licheniformis* B-1 和 *Aspergillus oryzae* M-4 协同作用降解 Beta-CP^[26],表明 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 协同作用能快速高效地利用 Beta-CP。Chen 等^[41]研究表明共代谢具有更高的适应性,利用蜡样芽胞杆菌和金色链霉菌构成的复合体系降解氯

氰菊酯与单一菌株相比, 其降解效果显著提高; 在实验室模拟生物修复 Beta-CP 污染土壤, *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 的协同修复较单一 *B. licheniformis* G-04 的修复更有效, 且该结果较 Zhao 等^[26]利用 *Bacillus licheniformis* B-1 和 *Sphingomonas* sp. SC-1 的修复效果更佳, 表明 *B. licheniformis* G-04 和 *A. pittii* HA516 协同作用在污染土壤的修复应用方面有很大的潜能。同时, 由于自然条件下田间微生物情况较实验室模拟条件更为复杂, 而 Beta-CP 在自然微生物降解的情况下可能已处在不同降解阶段, 降解中间产物 3-PBA 可能先于 Beta-CP 成为降解的抑制因子; 因此, 在自然条件下的污染土壤生物修复需根据不同土壤受此类农药污染的具体情况, 重新考虑协同作用菌株的接种顺序及比例, 以期达到更好的生物修复效果。

研究表明 *A. pittii* HA516 是 1 株高效 3-PBA 降解菌, 可与 *B. licheniformis* G-04 协同增效降解 Beta-CP, 且具有很好的污染土壤修复效果, 在生物修复受 Beta-CP 或 PP 污染的环境中有良好的应用前景。

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] Wang P, Zhou ZQ, Jiang SR, Yang L. Chiral resolution of cypermethrin on cellulose-tris (3,5-dimethylphenyl-carbamate) chiral stationary phase. *Chromatographia*, 2004, 59(9/10): 625–629.
- [3] Weston DP, Holmes RW, Lydy MJ. Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environmental Pollution*, 2009, 157(1): 287–294.
- [4] Perry MJ, Venners SA, Barr DB, Xu XP. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. *Reproductive Toxicology*, 2007, 23(1): 113–118.
- [5] Chen SH, Luo JJ, Hu MY, Huang HS, Zhang F. Degradation characteristics and kinetics of beta-cypermethrin by *Streptomyces* sp. HP-S-01. *Microbiology China*, 2011, 38(8): 1207–1215. (in Chinese)
陈少华, 罗建军, 胡美英, 黄华盛, 张芳. 链霉菌 HP-S-01 降解高效氰菊酯的特性及其动力学. *微生物学通报*, 2011, 38(8): 1207–1215.
- [6] 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: 7–11.
- [7] 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.
- [8] Heudorf U, Angerer J, Drexler H. Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: urinary levels of metabolites of pyrethroid and organophosphorus insecticides. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2004, 77(1): 67–72.
- [9] 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 α -mediated reporter gene assays. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(1): 371–377.
- [10] White GF, Russell NJ, Tidswell EC. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(1): 216–232.
- [11] Guo XQ, Wang XJ, Sun AL, Li DX, Shi XZ. Advances of studies on microbial degradation of pyrethroid insecticides. *China Biotechnology*, 2017, 37(5): 126–132. (in Chinese)
郭晓青, 王秀娟, 孙爱丽, 李德祥, 史西志. 环境中拟除虫菊酯类农药微生物降解技术研究进展. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(5): 126–132.
- [12] Tang AX, Wang BW, Liu YY, Li QY, Tong ZF, Wei YJ. Biodegradation and extracellular enzymatic activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain GF31 on β -cypermethrin.

- Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(17): 13049–13057.
- [13] Liu J, Huang WW, Han HT, She CC, Zhong GH. Characterization of cell-free extracts from fenpropathrin-degrading strain *Bacillus cereus* ZH-3 and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 2015, 523: 50–58.
- [14] Chen SH, Deng YY, Chang CQ, Lee J, Cheng YY, Cui ZN, Zhao JN, He F, Hu MY, Zhang LH. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8784.
- [15] Xiao Y, Chen SH, Gao YQ, Hu W, Hu MY, Zhong GH. Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(6): 2849–2859.
- [16] Deng WQ, Lin DR, Yao K, Yuan HY, Wang ZL, Li JL, Zou LK, Han XF, Zhou K, He L, Hu XJ, Liu SL. Characterization of a novel β -cypermethrin-degrading *Aspergillus niger* YAT strain and the biochemical degradation pathway of β -cypermethrin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 8187–8198.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Nzila A. Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental Pollution*, 2013, 178: 474–482.
- [23] Vallero DA. Chapter 7 – applied microbial ecology: bioremediation. *Environmental Biotechnology*, 2010: 325–400.
- [24] Luo W, Zhu XC, Chen WT, Duan ZB, Wang L, Zhou Y. Mechanisms and strategies of microbial cometabolism in the degradation of organic compounds–chlorinated ethylenes as the model. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2014, 69(10): 1971–1983.
- [25] Tran NH, Urase T, Ngo HH, Hu JY, Ong SL. Insight into metabolic and cometabolic activities of autotrophic and heterotrophic microorganisms in the biodegradation of emerging trace organic contaminants. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 721–731.
- [26] Zhao JY, Chi YL, Xu YC, Jia DY, Yao K. Co-metabolic degradation of β -Cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by co-culture of *Bacillus licheniformis* B-1 and *Aspergillus oryzae* M-4. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166796.
- [27] Liu FF, Chi YL, Wu S, Jia DY, Yao K. Simultaneous degradation of cypermethrin and its metabolite, 3-phenoxybenzoic acid, by the cooperation of *Bacillus licheniformis* B-1 and *Sphingomonas* sp. SC-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(33): 8256–8262.
- [28] 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.
- [29] Tang J, Yao K, Jia DY, Chi YL, Li QP. Isolation and characterization of Beta-cypermethrin degrading strain and its condition optimization. *Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition)*, 2013, 45(4): 176–180. (in Chinese)
- 唐洁, 姚开, 贾冬英, 迟原龙, 李清平. 高效氯氰菊酯降解菌的分离与鉴定及其降解条件优化. *四川大学学报(工程科学版)*, 2013, 45(4): 176–180.

- [30] Liu B, Tang J, Chen TT, Zeng L, Zeng CY, Zhang Q. Screening and characterization of a 3-phenoxybenzoic acid degrading *Enterobacter ludwigii*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20170305. (in Chinese)
刘波, 唐洁, 陈廷廷, 曾林, 曾朝懿, 张庆. 一株路德维希肠杆菌的筛选及其对 3-苯氧基苯甲酸的降解特性分析. *微生物学报*, 2018, doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20170305.
- [31] 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.
- [32] Zhang C, Chen WB, Wu DJ, Wei TD. Remediation of oil-contaminated soil with mixed bacteria. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2014, 34(1): 19–23. (in Chinese)
张超, 陈文兵, 武道吉, 魏天迪. 混合菌修复石油污染土壤. *化工环保*, 2014, 34(1): 19–23.
- [33] Di FR, Song DH, Liu FL, Yang J. Isolation of marine *Acinetobacter* and its characteristics of petroleum hydrocarbon degradation. *Marine Environmental Science*, 2017, 36(6): 898–904. (in Chinese)
邸富荣, 宋东辉, 刘凤路, 杨劼. 分离海洋不动杆菌及其对石油烃降解性能研究. *海洋环境科学*, 2017, 36(6): 898–904.
- [34] Liu YH, Hu XK. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons by *Acinetobacter* sp. BZ-15, isolated from contaminated soil. *Scientia Sinica Vitae*, 2016, 46(9): 1091–1100. (in Chinese)
刘玉华, 胡晓珂. 高效石油烃降解菌不动杆菌 (*Acinetobacter* sp. BZ-15) 的筛选、鉴定及其降解性能研究. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(9): 1091–1100.
- [35] Wang ZX, Xu Y, Zhou PJ. Taxonomy of a new species of *Haloalkalophilic archaeon*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(2): 115–120. (in Chinese)
王振雄, 徐毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究. *微生物学报*, 2000, 40(2): 115–120.
- [36] Yan WZ, Zhang HQ, Yu CT, Lei YF, Hao J, Shi JP. Isolation of *Acinetobacter* sp. YN3 and its heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characters. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(7): 4419–4428. (in Chinese)
颜薇芝, 张汉强, 余从田, 雷艳芳, 郝健, 史吉平. 1 株异养硝化好氧反硝化不动杆菌的分离及脱氮性能. *环境工程学报*, 2017, 11(7): 4419–4428.
- [37] Pailhoriès H, Tiry C, Eveillard M, Kempf M. *Acinetobacter pittii* isolated more frequently than *Acinetobacter baumannii* in blood cultures: the experience of a French hospital. *The Journal of Hospital Infection*, 2018, 99(3): 360–363.
- [38] Purohit A, Rai SK, Chownk M, Sangwan RS, Yadav SK. Xylanase from *Acinetobacter pittii* MASK 25 and developed magnetic cross-linked xylanase aggregate produce predominantly xylopentose and xylohexose from agro biomass. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 793–799.
- [39] Wang D, Ma XP, Meng XL, Dong WL, Dong X, Xu CB. Screening, identification of a bisphenol A-degrading strain and its growth and degradation conditions. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2017, 37(2): 189–193. (in Chinese)
王迪, 马溪平, 孟雪莲, 董文灵, 董兴, 徐成斌. 一株双酚 A 降解菌的筛选、鉴定及其生长、降解条件. *化工环保*, 2017, 37(2): 189–193.
- [40] Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 2002, 128(1/3): 215–228.
- [41] Chen SH, Luo JJ, Hu MY, Lai KP, Geng P, Huang HS. Enhancement of cypermethrin degradation by a coculture of *Bacillus cereus* ZH-3 and *Streptomyces aureus* HP-S-01. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 97–104.

Screening of a 3-phenoxybenzoic acid degrading strain and its co-degradation with *Bacillus licheniformis* G-04 to degrade beta-cypermethrin

Qiong Hu¹, Jie Tang^{1*}, Bo Liu¹, Tingting Chen¹, Qing Sun¹, Qing Zhang²

¹ School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, Sichuan Province, China

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

Abstract: [Objective] The aim of this study was to isolate an efficient 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) degrading strain from the cabbage rhizosphere contaminated by pyrethroid pesticides. Furthermore, the co-degradation of beta-cypermethrin and soil bioremediation by co-culture of *Bacillus licheniformis* G-04 and 3-PBA-degrading strain were investigated. [Methods] 3-PBA-degrading strain was screened using enrichment domestication, isolation and purification methods, then identified by morphological, physio-biochemical tests and 16S rRNA sequence analysis. The growth and degradation kinetics of 3-PBA-degrading strain and *B. licheniformis* G-04 were analysed by Origin 8.0. The synergistic degradation ability and soils bioremediation of these two strains were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] A novel 3-PBA-degrading strain HA516 was screened and identified as *Acinetobacter pittii*, the degradation rate of 3-PBA (100 mg/L) was 87.73% after 48 h of incubation. The growth and degradation kinetics of these two strains were established, which have the better fitting of predicted and the experimental value. When the inoculation proportion of the biomass of these two strains was 6.7 : 3.3, *B. licheniformis* G-04 was inoculated first, and *A. pittii* HA516 was inoculated after 24 h of cultivation, 78.37% Beta-CP (50 mg/L) was degraded at 48 h, which was 37.90% higher than only using strain *B. licheniformis* G-04, and half-life was shortened from 58.39 h to 24.51 h. Soil remediation test showed that the degradation rate of Beta-CP (30 mg/L) reached 79.27% on the seventh day, which was 33.26% higher than only using strain *B. licheniformis* G-04. [Conclusion] *A. pittii* HA516, a highly efficient 3-PBA-degrading strain, can be used as a potential strain resource for bioremediation of environment polluted with 3-PBA or pyrethroid pesticides. Beta-CP could be efficiently co-degraded by *B. licheniformis* G-04 and *A. pittii* HA516.

Keywords: 3-phenoxybenzoic acid, beta-cypermethrin, co-degradation, *Acinetobacter pittii* HA516, *Bacillus licheniformis* G-04, soil bioremediation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Chunhui Program of Ministry of Education of China (Z2015122), by the Open Research Subject of Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan Province of China (SZJJ2014-011), by the Key Scientific Research Fund of Xihua University (z1310525), by the Natural Science Foundation of Sichuan Provincial Department of Education (114ZB0122) and by the Graduate Student Innovation Fund of Xihua University (ycjj2018021)

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

Received: 9 March 2018; Revised: 18 April 2018; Published online: 10 May 2018