

# 3-PBA 降解菌 BA3 的降解特性及基因工程菌构建

段晓芹, 郑金伟, 张隽, 杭宝建, 何健\*, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 从石油污染土壤中分离到 1 株能以 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)为唯一碳源生长的细菌, 命名为 BA3. 根据其生理生化特征和 16S rDNA 序列相似性分析, 将该菌鉴定为鞘脂菌属(*Sphingobium* sp.). 该菌株在 60 h 内对  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3-苯氧基苯甲酸的降解率达到 99%. 降解 3-苯氧基苯甲酸的最适温度为  $30^\circ\text{C}$ , pH 值为 7.0, 降解速率与初始接种量呈正相关. 拟除虫菊酯类杀虫剂水解酶基因 *pytH* 为本实验室克隆到的一个新的菊酯水解酶基因, 通过 PCR 从菊酯降解菌株 JZ-2 总 DNA 扩增了 *pytH*, 将 *pytH* 定向克隆到 pBBRMCS-5 载体上, 构建重组质粒 pPYTH, 在辅助质粒 pRK600 的帮助下, 通过三亲接合将 pPYTH 转移到 3-PBA 降解菌株 *Sphingobium* sp. BA3 中, 获得工程菌 *Sphingobium* sp. BA3-pyTH; 甲氰菊酯的降解实验表明, 菌株 JZ-2 在 48 h 内对  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甲氰菊酯降解率仅为 60% 左右, 工程菌 BA3-pyTH 相同条件下对  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甲氰菊酯降解率达到 95% 以上, 同时对甲氰菊酯的降解中间产物 3-PBA 也能较快降解, 不会对菊酯的降解产生反馈抑制. 工程菌 BA3-pyTH 因其对甲氰菊酯和其降解中间产物 3-PBA 的快速降解能力, 比原始菌株 JZ-2 在菊酯污染土壤生物修复应用中更具有优势.

**关键词:** 3-苯氧基苯甲酸; 生物降解; 鞘脂菌; 菊酯水解酶基因; 基因工程菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)01-0240-07

## Characteristics of a 3-Phenoxybenzoic Acid Degrading-Bacterium and the Construction of a Engineering Bacterium

DUAN Xiao-qin, ZHENG Jin-wei, ZHANG Juan, HANG Bao-jian, HE Jian, LI Shun-peng

(Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** A bacterium capable of utilizing 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) as sole carbon source was isolated from petroleum-contaminated soil. This bacterium, designated as BA3, was identified as *Sphingobium* sp. according to its physiological & biochemical characteristic and the similarity analysis of its 16S rDNA sequence. Strain BA3 was able to degrade 99% of  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  3-phenoxybenzoic acid within 60 h. The optimal pH and temperature for the degradation were 7.0 and  $30^\circ\text{C}$ , respectively. The degradation efficiency was related positively to initial inoculum size. The pyrethroid hydrolase gene(*pytH*) gene was amplified from the genomic DNA of *Sphingobium* sp. JZ-2 by PCR. Recombinant plasmids pPYTH was constructed by ligating *pytH* gene into the broad host vector pBBRMCS-5. Under the help of plasmid RK600, pPYTH was transferred into *Sphingobium* sp. BA3 to construct engineering strain BA3-pyTH; Fenpropathrin degradation experiments showed that strain JZ-2 was able to degrade only 60% of  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  fenpropathrin in 48h while engineering strain BA3-pyTH was able to degrade over 95% of  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  fenpropathrin under the same conditions. Even more, BA3-pyTH could rapidly degrade 3-PBA, metabolic products of pyrethroid insecticides, eliminating the inhibition of 3-PBA to pyrethroid hydrolase. Therefore, in contrast to strain JZ-2, engineering strain BA3-pyTH had more advantages in bioremediation of pyrethroid insecticides contaminated environment.

**Key words:** 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA); biodegradation; *Sphingobium* sp.; pyrethroid hydrolase gene (*pytH*); genetically engineered microorganism

3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)是一种非常重要的化工原材料,常用于菊酯类杀虫剂生产中间体和染料生产中间体,同时 3-PBA 也是菊酯类杀虫剂在植物、昆虫和微生物细胞内的代谢产物<sup>[1-4]</sup>. 3-PBA 生物学毒性大于菊酯类杀虫剂,其在土壤中的迁移速率要比菊酯类农药要快,且 3-PBA 在土壤中的半衰期长达 180 d,比大多数拟除虫菊酯类杀虫剂的半衰期(约 30 d)要长<sup>[5]</sup>,相对而言,这些因素导致它对生态环境和人类健康的潜在危害性比菊酯类杀虫剂大<sup>[6]</sup>. 因此,3-PBA 在

土壤中的环境行为及其毒理研究也越来越受到人们的关注. 大量的研究证明,自然界中存在的多种微生物往往是环境中有害物质残留分解的重要因素<sup>[7-11]</sup>,在 3-PBA 微生物降解研究方面,3-PBA 的降

收稿日期:2010-03-11;修订日期:2010-05-11

基金项目:国家自然科学基金项目(30970099);国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10Z402);江苏省自然科学基金项目(BK2008331)

作者简介:段晓芹(1984~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物学与环境微生物工程, E-mail:2007116051@njau.edu.cn

\* 通讯联系人, E-mail: hejian@njau.edu.cn

解菌报道相对较少,国内外报道的菌株仅有假单胞菌属的几个菌株<sup>[12-15]</sup>,有关拟除虫菊酯类农药降解菌研究的报道相对较多<sup>[16-19]</sup>,有些降解菌不能完全矿化拟除虫菊酯类农药,有中间产物生成,张松柏等<sup>[20]</sup>分离的 1 株光合细菌 PSB07-15 只能将甲氰菊酯降解为 3-苯氧基苯乙腈,许育新等<sup>[21,22]</sup>分离的假单胞菌 PBM11 降解氯氰菊酯的中间产物为 3-苯氧基苯甲酸,并探讨了 2 株降解菌 CDT3 和 PBM11 协同降解氯氰菊酯的情况,2 株菌的协同作用加速了氯氰菊酯的降解,但混合培养在处理污染物的过程中,污染物的降解效率并不高,通过基因工程手段构建多功能的农药降解基因工程菌株成为目前研究的热点,而且科研人员已克隆了菊酯水解酶基因 *pytH*<sup>[23]</sup>. 因此,筛选更多类型的 3-PBA 高效降解菌,利用基因工程手段将菊酯水解酶基因导入 3-PBA 高效降解菌,构建菊酯类杀虫剂降解工程菌,对菊酯类杀虫剂残留的生物修复研究和应用十分必要。

本研究从胜利油田附近的土壤中分离到 1 株能完全降解 3-PBA 的降解菌,对其降解性状进行了初步研究;并将菊酯水解酶基因 *pytH* 通过基因工程的手段导入 3-苯氧基苯甲酸高效降解菌 *Sphingobium* sp. BA3 中,成功构建了 1 株能快速降解菊酯类杀虫剂及其中间产物 3-PBA 的基因工程菌,增加了 3-PBA 降解菌的功能,降低了生产和使用成本,可为菊酯污染环境生物修复提供优良菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基、试剂

#### 1.1.1 培养基

无机盐培养基 (MSM) 组成:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g, NaCl 1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2.

富集培养基组成: 在无机盐培养基中添加 3-PBA 至  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

LB 培养基 (种子培养基): 酵母粉 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2.

#### 1.1.2 药品和仪器

3-PBA, 3-苯氧基苯甲醛, 纯度 99%, 均购自 Sigma (Sigma-Aldrich, 德国). SHIMADZU UV2450 紫外分光光度计.

#### 1.1.3 菌株和质粒

本研究所用菌株和质粒参见表 1.

### 1.2 细菌的分离及鉴定

土样为山东东营胜利油田井口附近的土壤. 在

表 1 供试菌株与质粒

Table 1 Strains and plasmids in this study		
菌株和质粒	特性	来源
菌株		
pBBRMCS-5	广宿主质粒, $\text{Gm}^r$	朱军博士提供
pPYTH	带有 <i>pytH</i> 基因的 pBBRMCS-5, $\text{Gm}^r$	本研究
pRK600	三亲结合的辅助质粒, $\text{Cm}^r$	本实验室
质粒		
<i>Sphingobium</i> sp. JZ-2	菊酯类杀虫剂降解菌, $\text{G}^-$	本实验室
<i>Sphingobium</i> sp. BA3	3-PBA 降解菌, $\text{G}^-$	本研究
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ - <i>pytH</i>	带有质粒 pPYTH 的 <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	本研究
BA3- <i>pytH</i>	基因工程菌	本研究

3-PBA 浓度  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 100 mL 富集培养基中加入 1.0 g 土样, 将锥形瓶放于  $30^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养 7 d 后, 吸取 5 mL 转接至相同浓度的 3-PBA 富集培养基中, 连续转接 5 次. 富集培养基经测定确认有降解效果后, 用梯度稀释法筛选菌株, 采用涂布法在 3-苯氧基苯甲醛浓度为  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  无机盐固体培养基平板上进行细菌分离. 将分离的菌种纯化, 参照文献<sup>[24]</sup>进行鉴定, DNA 提取及 16S rDNA 的 PCR 扩增参照文献<sup>[25]</sup>的方法, 由上海英俊公司进行序列测定, 测序结果通过在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行相似性比较.

### 1.3 菌株培养

从平板上挑取单菌落到 LB 液体培养基中, 放入  $30^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养, 菌体培养至对数后期取出. 细菌的生长量通过分光光度法测定, 以波长  $\lambda = 600 \text{ nm}$  处的光密度表示, 培养后菌液经洗涤, 加入等体积生理盐水重悬后测定, 调节  $A_{600 \text{ nm}}$  到 2.00, 作为种子液.

### 1.4 3-苯氧基苯甲酸含量的测定

3-苯氧基苯甲酸含量的测定参照文献<sup>[26]</sup>. 取 1 mL 培养液, 离心, 取上清液于 10 mL 刻度试管中, 加 4 mL 的二氯甲烷, 剧烈振荡后静置分层, 弃水相收集有机相, 收集有机相过无水硫酸钠柱, 收集液体,  $\text{N}_2$  吹干, 乙腈定容至  $200 \mu\text{L}$ , 上机检测. 采用高效液相色谱仪 (Waters 600), Zorbax C-18 ODS Spherex 反相柱 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 250 \text{ mm i. d.}$ , Agilent, USA); 流动相: 乙腈: 水 (60: 40); 流速:  $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 紫外检测器, 波长  $240 \text{ nm}$ ; 进样量:  $20 \mu\text{L}$ , 采用外标法按峰面积定量.

### 1.5 降解菊酯类杀虫剂及其中间产物 3-PBA 的基

## 因工程菌的构建

### 1.5.1 菊酯水解酶基因 *pytH* 克隆和广宿主载体的构建

以 *Sphingobium* sp. JZ-2 的基因组为模板,通过 PCR 扩增 *pytH* 基因(正向引物 P1:5'-AGCTACAA GCTTATGACCGTCACCGATATCATCCTG-3',反向引物 P2:5'-GTCAACGGATCCTCACGGTAGATCAGCTC GGTCCG-3',下划线标注为 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切位点).扩增反应体系为:10 × *Taq* 聚合酶反应缓冲液 5.0 μL, dNTP (20 mmol·L<sup>-1</sup>) 4.0 μL, 5'端引物 (25 pmol·μL<sup>-1</sup>) 1.0 μL, 3'端引物 (25 pmol·μL<sup>-1</sup>) 1.0 μL, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 3.0 μL, 菌体 DNA (约 50 ng·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, H<sub>2</sub>O 35 μL, 总体积 50 μL. 产物经 0.75% 的琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收,回收产物进行琼脂糖电泳和 PCR 验证.

将上述回收产物用 *Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切后连接到经同样酶切的质粒 pBBRMCS-5 上,构建表达质粒 pPYTH,转化 *E. coli* DH5α,验证后的阳性转化子,命名为 *E. coli*-*pytH*.

### 1.5.2 基因工程菌的构建

采用三亲接合的方法将供体菌 *E. coli*-*pytH* 中表达质粒 pPYTH 转移到受体菌 BA3,辅助菌为 *E. coli* HB101 (pRK600);供体菌、辅助菌、受体菌在含相应的抗生素的 LB 液体培养基中培养至对数期,6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,用无菌水洗涤菌体 2 遍,以去除残留抗生素,最后将供体菌、辅助菌、受体菌按照 1:1:2 的比例混合,于 30℃ 静置培养 24 h 后涂布添加庆大霉素 (40 mg·L<sup>-1</sup>)、链霉素 (40 mg·L<sup>-1</sup>) 和甲氧苄啶 (200 mg·L<sup>-1</sup>) 的 LB 平板,于 30℃ 培养后,挑选有水解圈的菌落进行验证,阳性克隆命名为 BA3-*pytH*.

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的分离及鉴定

从富集培养液中筛选出 1 株能完全矿化 3-PBA 的菌株,命名为 BA3. 菌落微带黄色,边缘整齐,菌落突起,不透明,较干燥,较易挑取;菌体杆状,没有观察到鞭毛(图 1). 革兰氏染色阴性,不产芽孢,接触酶阳性,氧化酶阳性,VP 反应阴性,甲基红试验阴性,吡啶试验阴性,不能还原硝酸盐,不能利用柠檬酸盐,不能液化明胶.

利用 PCR 技术成功从菌株 BA3 基因组 DNA 中成功扩增出长度为 1.5 kb 的 16S rDNA 序列(登录

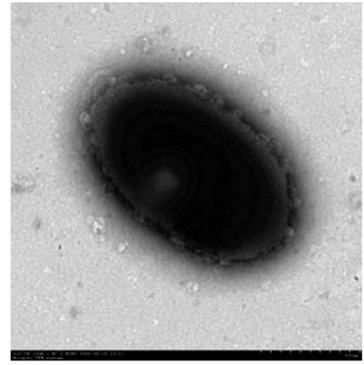


图 1 菌株 BA3 电镜照片

Fig. 1 Electronic microscopy photography of strain BA3

号为 GQ176409). 该序列与 GenBank 中的已有序列进行比对,发现该菌与 *Sphingobium* 属细菌关系最近,其中与 *Sphingobium* sp. x23 (EU095328) 的同源性最高,达到 98.5%,根据比对结果所作系统发育树见图 2. 根据 16S rDNA 序列同源性和形态、生理生化特性将该菌鉴定为鞘脂菌属 (*Sphingobium* sp.).

### 2.2 菌株 BA3 以 3-PBA 为唯一碳源的生长及降解实验

在基础盐培养基中加入 100 mg·L<sup>-1</sup> 的 3-PBA,以 1% 的接种量接入用无机盐培养基洗涤 2 次的种子液 ( $A_{600\text{nm}} \approx 2.00$ ),结果见图 3. 菌株 BA3 在 60 h 之内降解 3-PBA 的效率达到 99% 以上,而且在 3-PBA 的降解过程中,菌体浓度也随着 3-PBA 的降解而增加,意味着菌株 BA3 在降解 3-PBA 的同时,利用 3-PBA 作为碳源生长. 图 4 是培养液二氯甲烷提取物的紫外扫描图谱,从中可以看出,降解 60 h 后图谱上紫外区吸收峰 (293 nm 和 235 nm) 消失,说明没有苯环类中间产物积累(苯环类物质在紫外区有特征吸收峰),3-PBA 被完全降解.

### 2.3 菌株 BA3 降解 3-PBA 的最适条件

#### 2.3.1 化合物起始浓度对菌株 BA3 降解 3-PBA 的影响

在基础盐培养基中加入 3-PBA,使其终浓度分别为 30、60、100、150 和 200 mg·L<sup>-1</sup>,以 1% 的接种量接入菌株 BA3 种子液,结果见图 5,菌株 BA3 不仅对 30 mg·L<sup>-1</sup> 和 60 mg·L<sup>-1</sup> 的 3-PBA 具有很好的降解效果,对较高浓度 (200 mg·L<sup>-1</sup>) 的 3-PBA 培养时间达到 84 h 时,也能将其降解完全.

#### 2.3.2 接种量对 BA3 降解 3-PBA 的影响

在基础盐培养基中加入 100 mg·L<sup>-1</sup> 的 3-PBA,以 1%、3%、5%、10% 和 15% 的接种量接入菌株

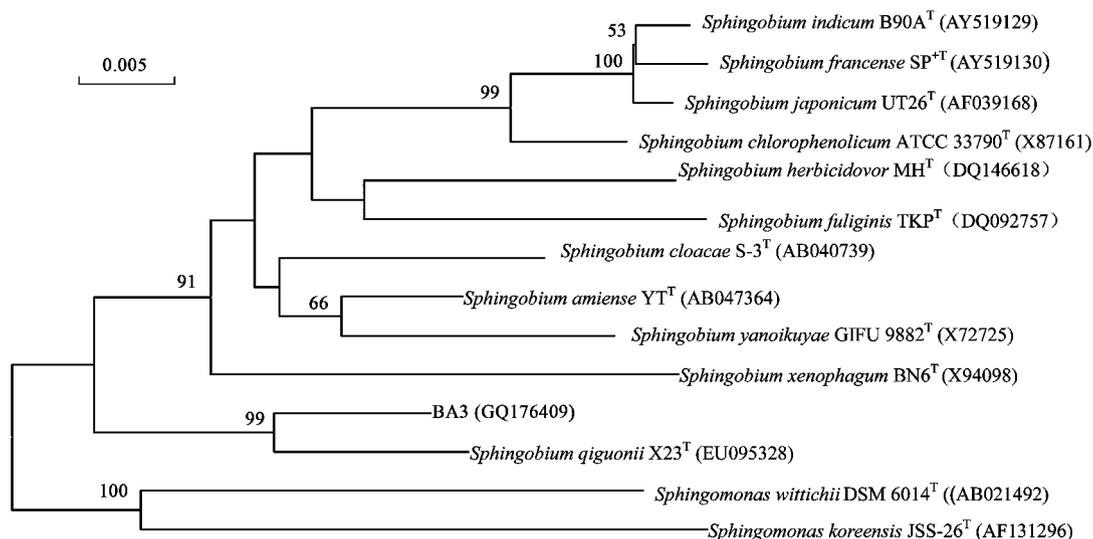


图 2 BA3 与 *Sphingobium* sp. 中模式菌株的系统发育树图

Fig.2 Phylogenetic tree of the strain BA3 with type strains of *Sphingobium* sp.

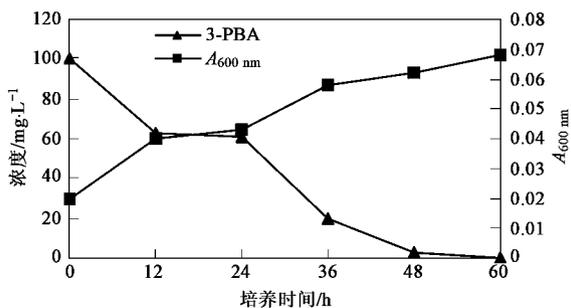


图 3 菌株 BA3 以 3-PBA 为唯一碳源生长情况

Fig.3 Utilization of 3-PBA by strain BA3 as sole source of carbon for growth

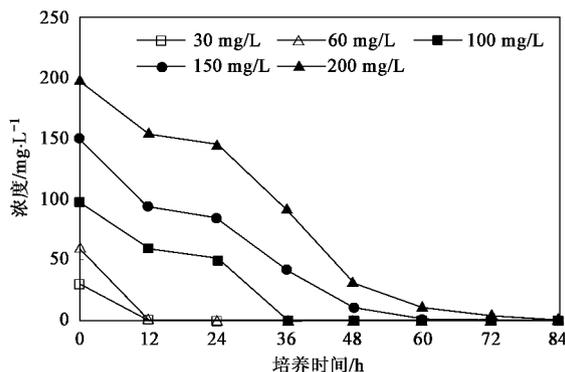


图 5 初始浓度对菌株 BA3 降解 3-PBA 的影响

Fig.5 Effect of initial 3-PBA concentration on the degradation rate of 3-PBA by strain BA3

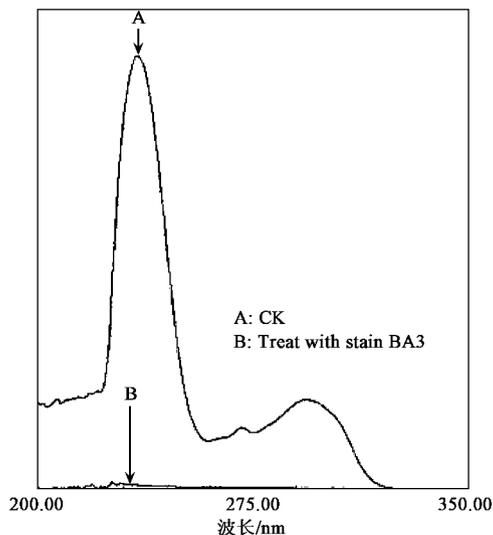


图 4 菌株对 3-PBA 降解的紫外扫描图谱

Fig.4 UV scanning of degradation of 3-PBA

BA3 的种子液,结果见图 6,当接种量达到 3% 或以上时,降解速率迅速上升.

### 2.3.3 pH 值对菌株 BA3 降解 3-PBA 的影响

在 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的基础盐培养基中,加入 100 mg·L<sup>-1</sup> 的 3-PBA,以 1% 的接种量接入菌株 BA3 种子液,结果见图 7,菌株 BA3 在 pH7.0 时对 3-PBA 的降解最好.

### 2.3.4 温度对 BA3 降解 3-PBA 的影响

在基础盐培养基中加入 100 mg·L<sup>-1</sup> 的 3-PBA,以 1% 的接种量接入 BA3 种子液,结果见图 8,菌株 BA3 在 30℃ 对化合物的降解最好,此最适降解温度与菌体的最适生长温度相一致.

## 2.4 底物降解实验

在基础盐培养基中加入各种苯环类物质,按

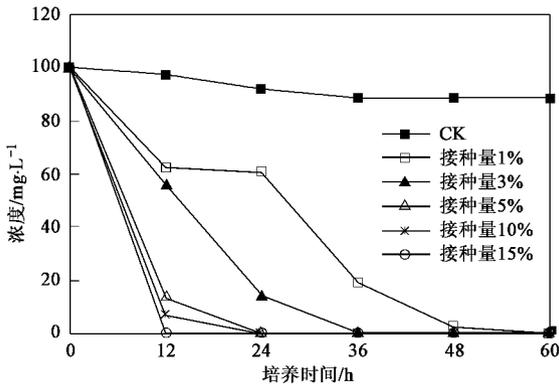


图 6 接种量对菌株 BA3 降解 3-PBA 的影响  
Fig. 6 Effect of initial inoculum on the degradation rate of 3-PBA by strain BA3

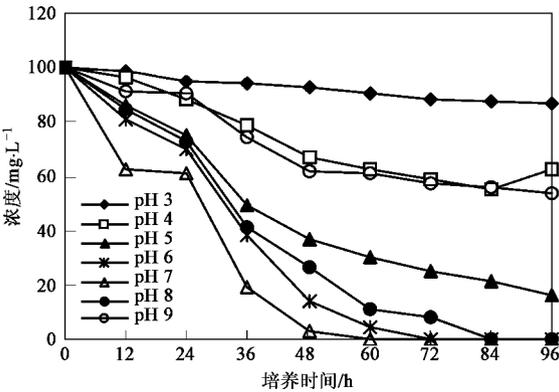


图 7 pH 值对菌株 BA3 降解 3-PBA 的影响  
Fig. 7 Effect of pH on the degradation rate of 3-PBA by strain BA3

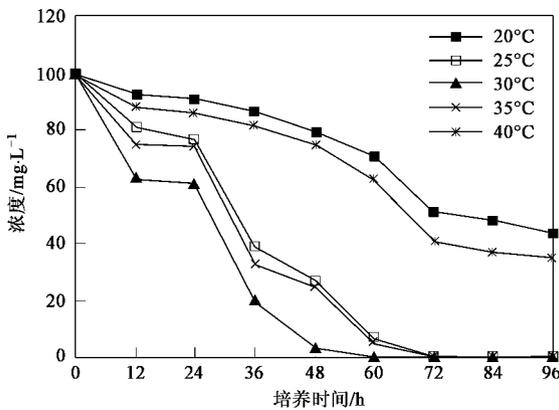


图 8 温度对菌株 BA3 降解 3-PBA 的影响  
Fig. 8 Effect of temperature on the degradation rate of 3-PBA by strain BA3

察菌株 BA3 对各种苯环类物质的降解情况,结果见表 2,菌株 BA3 能降解邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚和原儿茶酸,不能降解苯酚、对硝基酚和 2,4-二硝基苯酚。

表 2 菌株 BA3 对不同芳香族化合物的降解<sup>1)</sup>

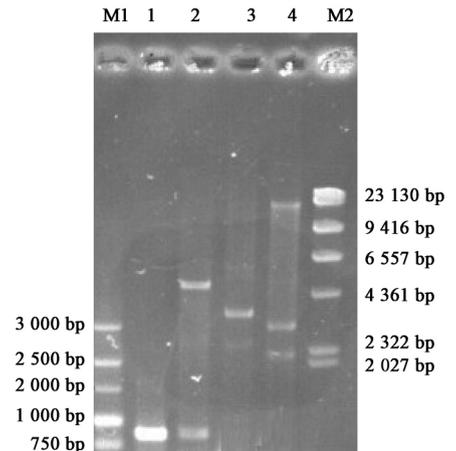
芳香族化合物	降解性能	芳香族化合物	降解性能
苯酚	-	邻苯二酚	+
原儿茶酸	+	对硝基苯酚	-
间苯二酚	+	2,4-二硝基苯酚	-
对苯二酚	+		

1) + 表示降解; - 表示不降解

## 2.5 降解拟除虫菊酯类杀虫剂的工程菌构建

### 2.5.1 *pytH* 基因克隆和表达质粒的构建

以菌株 JZ-2 总 DNA 为模板,PCR 扩增成功得到 *pytH* 基因(图 9),大小为 840 bp,将 PCR 产物经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后克隆到广宿主质粒 pBBRMCS-5 上,构建了重组质粒 pPYTH,并成功转化到 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,从图 10(a) 中可以看出,在阳性克隆 *E. coli* DH5 $\alpha$ -*pytH* 周围出现了水解圈,这是由于 *pytH* 基因编码的菊酯水解酶降解甲氰菊酯形成了溶于水的物质<sup>[27]</sup>,这表明重组质粒 pPYTH 已经成功构建,*E. coli* DH5 $\alpha$ -*pytH* 可以作为工程菌构建过程中的供体菌。



M1: DL3000; M2:  $\lambda$ -*Hind* III marker; 1: *pytH*;  
2: *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切 pPYTH; 3: pPYTH; 4: pBBRMCS-5

图 9 重组质粒 pPYTH 的电泳图谱

Fig. 9 Agrose gel electrophoresis of the recombinant plasmid pPYTH

### 2.5.2 工程菌的构建

通过三亲接合将重组质粒 pPYTH 转移到菌株

1% 的接种量接入菌株 BA3 种子液, 30 $^{\circ}$ C, 180 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 摇床培养 3 d 后, 以紫外扫描和高效液相色谱(HPLC)测定各种苯环类物质的浓度变化, 以考

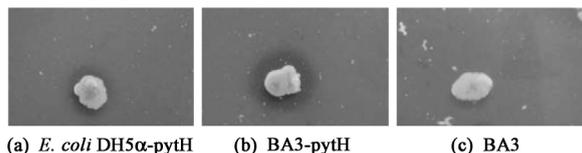


图 10 基因工程菌在含甲氰菊酯的基础盐平板上产生的透明圈

Fig. 10 Transparent halo on agar plate of fenpropathrin degradation by genetically engineered microorganism

BA3 中,获得工程菌 BA3-pytH,工程菌 BA3-pytH 在含  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甲氰菊酯的基础盐培养基平板上产生了水解圈[图 10(b)],表明 *pytH* 基因在菌株 BA3 中实现了功能表达。

## 2.6 工程菌 BA3-pytH 对甲氰菊酯的降解

为了比较 BA3-pytH 和原始菌株 JZ-2 对甲氰菊酯的降解特性,工程菌 BA3-pytH 在含  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  庆大霉素(Gm)的液体 LB 中培养至对数期,以 2% 接

表 3 工程菌株 BA3-pytH 与野生菌株 JZ-2 对甲氰菊酯和 3-PBA 的降解

Table 3 Degradation of fenpropathrin and 3-phenoxybenzoic acid by *Sphingobium* strains BA3-pytH and JZ-2

培养时间 /h	基因工程菌 BA3-pytH		原始菌株 JZ-2	
	甲氰菊酯/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3-PBA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	甲氰菊酯/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3-PBA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
0	$51.7 \pm 0.5$	0	$50.3 \pm 0.3$	0
12	$46.4 \pm 0.6$	$0.8 \pm 0.2$	$46.9 \pm 0.7$	$1.2 \pm 0.1$
24	$31.6 \pm 0.4$	$4.7 \pm 0.3$	$37.3 \pm 0.4$	$5.3 \pm 0.2$
36	$19.1 \pm 0.2$	$3.3 \pm 0.4$	$30.2 \pm 0.2$	$11.7 \pm 0.4$
48	$2.2 \pm 0.1$	$0.5 \pm 0.1$	$21.9 \pm 0.3$	$8.2 \pm 0.3$

## 3 结论

(1) 从石油污染土壤分离到 1 株能以 3-苯氧基苯甲酸为唯一碳源生长且将其完全降解的细菌,经鉴定为鞘脂菌属(*Sphingobium* sp.),命名为 BA3。

(2) 降解 3-苯氧基苯甲酸的最适 pH 值为 7.0,最适温度为  $30^\circ\text{C}$ ,降解 3-苯氧基苯甲酸的速率和起始接种量呈正相关。

(3) 底物降解实验显示,菌株 BA3 能降解邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚和原二茶酸,不能降解苯酚、对硝基酚和 2,4-二硝基苯酚。

(4) 成功构建了 1 株能快速降解菊酯类杀虫剂及其中间产物 3-PBA 的基因工程菌,且工程菌 BA3-pytH 对菊酯的降解效率较原始菌株 JZ-2 高。

## 参考文献:

[1] Maloney S E, Maule A, Smith A R W. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: Permethrin, deltamethrin, fensulfate, fenvalerate, and fluvalinate [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**(11): 2874-2876.

[2] 张宗炳. 杀虫药剂的环境毒理学[M]. 北京: 农业出版社,

种量接入含  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  庆大霉素(Gm)和甲氰菊酯含量为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的基础盐培养基中,  $30^\circ\text{C}$ ,  $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床振荡培养,定期取样,对照为菌株 JZ-2 的相同处理,每个处理 3 个重复. 结果见表 3,菌株 JZ-2 在 48 h 内对甲氰菊酯降解率仅为 60% 左右,对甲氰菊酯的降解中间产物 3-PBA 降解速率较慢,导致了摇瓶中 3-PBA 的积累,3-PBA 的积累会对菊酯水解酶产生反馈抑制,这可能是菌株 JZ-2 对甲氰菊酯的降解效率不如工程菌 BA3-pytH 的主要原因. 工程菌 BA3-pytH 相同条件下对  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甲氰菊酯的降解率达到 95% 以上,同时对甲氰菊酯的降解中间产物 3-PBA 也能较快降解,从而在降解体系中没有高浓度的积累,不会对菊酯的降解产生反馈抑制. 工程菌 BA3-pytH 因其对甲氰菊酯和甲氰菊酯的降解中间产物 3-PBA 的快速降解能力,应比原始菌株 JZ-2 在菊酯污染土壤生物修复中更具有优势。

1989.

[3] Miyamoto J. The chemistry, metabolism and residue analysis of synthetic pyrethroids [J]. Pure and Applied Chemistry, 1981, **53**(10): 1967-2002.

[4] Casida J E, Ruzo L O. Metabolic chemistry of pyrethroid insecticides [J]. Pesticide Science, 1980, **11**(2): 257-269.

[5] Halden R U, Tepp S M, Halden B G, et al. Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, **65**(8): 3354-3359.

[6] Topp E, Akhtar M H. Mineralization of 3-phenobezoate by a two-membered bacterial co-culture [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1990, **36**(7): 495-499.

[7] 程国锋,李顺鹏,沈标,等. 微生物降解蔬菜残留农药研究[J]. 应用与环境生物学报, 1998, **4**(1): 81-84.

[8] Topp E, Zhu H, Nour S, et al. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(7): 2773-2782.

[9] 郑金来,李君文,晁福寰. 常见农药降解微生物研究进展及展望[J]. 环境科学研究, 2001, **14**(2): 62-64.

[10] 李旭春,刘桂芳,马军,等. 1 株壬基酚降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 环境科学, 2008, **29**(1): 231-236.

- [11] 万年升,顾继东,黄锦辉,等. *Achromobacter xylosoxidans* NS12 的分离和对硝基苯酚的降解[J]. 环境科学,2007,28(2): 422-426.
- [12] 许育新,李晓慧,秦华,等. 3-苯氧基苯甲酸降解菌的分离及降解特性研究[J]. 微生物学通报,2005,32(5): 62-67.
- [13] Topp E, Akhtar M H. Identification and characterization of a *Pseudomonas* strain capable of metabolizing phenoxybenzoates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(5): 1294-1300.
- [14] Engesser K H, Fietz W, Fischer P, et al. 2-dihydroxy-4-carboxybenzophenone as evidence for initial 1,2-dioxygenation in 3-and 4-carboxy biphenyl ether degradation [J]. FEMS Microbiology Letters, 1990, 69(3): 317-321.
- [15] Elliott M, Jnaes N F, Potter C. The future of pyrethroids in insect control [J]. Annual Review of Entomology, 1978, 23(1): 443-469.
- [16] 徐莲,张丽萍,刘怡辰,等. 功夫菊酯降解菌 GF-3 的筛选鉴定及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报,2009,28(7): 1545-1551.
- [17] 洪源范,洪青,武俊,等. 甲氰菊酯降解菌 JQL4-5 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学,2006,27(10):2100-2104.
- [18] 崔志峰,汪华,王渭霞,等. 氯氰菊酯降解菌 CY22-7 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 环境污染与防治,2009,31(11): 35-38,43.
- [19] 赵宇蕾,呼世斌,秦宝福,等. 联苯菊酯降解菌的筛选及降解特性研究[J]. 西北农业学报,2009,18(3):273-276.
- [20] 张松柏,张德咏,罗香文,等. 降解甲氰菊酯光合细菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. 农业环境科学学报,2009,28(1):140-144.
- [21] 许育新,李晓慧,张明星,等. 红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯的特性及途径[J]. 中国环境科学,2005,25(4):399-402.
- [22] 许育新,孙纪全,李晓慧,等. 两株菌对氯氰菊酯及其降解产物 3-PBA 的协同代谢研究[J]. 微生物学报,2007,47(5): 834-837.
- [23] 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.
- [24] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.370-410.
- [25] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆[M]. (第二版). 北京:科学出版社,1996. 19-22.
- [26] 谢文军,周健民,王火焰,等. HPLC 法测定土壤中 3-苯氧基苯甲酸[J]. 农业环境科学学报,2007,26(2):608-611.
- [27] Guo P, Wang B Z, Han B J, et al. Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2009, 63(8):1107-1112.