

## 菌株 *Cupriavidus* sp. DT-1 对液体和土壤中 TCP 的降解

陆 鹏\*,周 慧,袁 梦 (安徽师范大学生命科学学院,安徽省分子酶学与重大疾病机理研究重点实验室,安徽 芜湖 241000)

**摘要:**采用液质联用(HPLC-MS)的方法检测菌株 *Cupriavidus* sp. DT-1 降解 2-羟基吡啶(2-HP)的代谢产物,并用三亲结合、荧光定量 PCR (q-PCR)方法评价降解菌对 3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP)污染土壤的修复效果。结果表明,菌株可以进一步降解 2-HP,依次生成尼古丁蓝、马来酰胺酸和反丁烯二酸,直至转化成菌株 DT-1 生长的碳源。接种菌株 DT-1 对污染土壤中 TCP 的降解起到较大的促进作用,2 组试验土壤中 TCP(50mg/kg)降解率分别为 94.4% 和 86.7%,未接种菌株的土壤中 TCP 降解率仅为 20.4% 和 28.4%。带有绿色荧光蛋白基因 gfp 标记的菌株 DT-1-gfp 可在土壤中存活 35d 以上,并对 TCP 污染土壤的细菌群落丰度有显著的恢复作用。

**关键词:** *Cupriavidus* sp. DT-1; 3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP); 2-羟基吡啶(2-HP); 生物修复

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)06-2780-08

**Biodegradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1 in liquid and soil environments.** LU Peng\*, ZHOU Hui, YUAN Meng (Anhui Key Laboratory of Molecular Enzymology and Major Disease Mechanism research, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China). *China Environmental Science*, 2021,41(6): 2780~2787

**Abstract:** *Cupriavidus* sp. DT-1 was a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)-degrading strain which could transform TCP to 2-hydroxypyridine (2-HP). Liquid-mass spectrometry (HPLC-MS) was used to detect the degradation products of 2-HP, And the methods of triparetal conjugation, quantitative real-time PCR (q-PCR) were used to evaluate the remediation effect of TCP-contaminated soils by the degrading-bacterium. Results showed that strain DT-1 was able to further degrade 2-HP, and sequentially produced nicotine blue, maleamic acid and fumaric acid, until it was transformed into the carbon source that could support the growth of strain DT-1. Pilot experiment showed that inoculation of strain DT-1 remarkably accelerated the elimination of TCP in soils. The degradation rates of TCP in inoculated soils were 94.4% and 86.7%, while those in uninoculated soils were 20.4% and 28.4%, respectively. Green fluorescent protein encoding gene gfp harbored strain DT-1-gfp could survive in soils for more than 35d. The results of q-PCR showed that inoculation of strain DT-1-gfp significantly improved the recovery of bacterial community abundance in the TCP-contaminated soils.

**Key words:** *Cupriavidus* sp. DT-1; 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP); 2-hydroxypyridine (2-HP); bioremediation

3,5,6-三氯-2-吡啶酚 (TCP)是一种典型的有机氯污染物,在自然环境中半衰期长达 65~360d<sup>[1]</sup>。它是毒死蜱降解的主要产物,由于其具有比母体化合物更强的水溶性和流动性,因此可引起水环境和土壤更广泛的污染<sup>[2~8]</sup>。2-羟基吡啶 (2-HP)是一种 n-杂环类有机污染物,具有一定的生物毒性和抗生物降解特性<sup>[9]</sup>。此类污染物水溶性强,容易渗入地下水和土壤,对生态环境和人类健康构成威胁<sup>[10~11]</sup>。TCP 和 2-HP 两种物质在结构上具有很大相似性,均以吡啶作为母体化合物,其区别仅在于氯原子数目的不同。同时 2-HP 也是 TCP、尼古丁等 n-杂环类化合物降解的主要中间代谢产物<sup>[12~13]</sup>。因此,2-HP 与 TCP 的降解是紧密联系的,去除环境中 2-HP 的残留不仅可消除其污染,同时对修复其前体剧毒化合物 TCP 造成的生态破坏具有重要意义。微生物降解具有效

率高、成本低、无二次污染等特点,是消除 TCP 残留的一种环境友好型方法<sup>[14~15]</sup>。目前各国学者已经从不同属微生物中分离获得多种具有降解 TCP 能力的菌株,包括 *Ralstonia*<sup>[5]</sup>、*Pseudomonas*、*Paracoccus*、*Bacillus*、*Synechocystis*、*Cupriavidus*、*Sphingobacterium*、*Ganoderma*、*Mesorhizobium*、*Ochrobactrum*、*Rhodotorula* 等<sup>[16~27]</sup>。然而,TCP 的完整生物降解途径仍然是未知的。多个研究表明 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮是 TCP 降解过程中常见的中间代谢物<sup>[5,20,28]</sup>。*Cupriavidus* sp. DT-1 是课题组前期分离获得的 TCP 降解菌株,与其他菌株不同,DT-1 具有独特的 TCP 降解途径,以 2-HP 为主要中间代谢产物,

收稿日期: 2020-10-28

基金项目: 安徽省高校自然科学研究项目(KJ2020A0084)

\* 责任作者, 讲师, lupeng\_2007@126.com

并对其进一步矿化,达到完全降解 TCP 的效果<sup>[12]</sup>.前期已推导出 TCP 降解为 2-HP 的代谢途径,然而 2-HP 的后续降解过程尚不清楚.

本研究探究了菌株 DT-1 在液体培养基中对 TCP 和 2-HP 的降解,鉴定出 2-HP 降解的代谢产物,结合前期研究成果,推导出菌株 DT-1 降解 TCP 的完整代谢途径.同时通过 *gfp* 荧光标记,构建基因工程菌,结合 qPCR 的方法,研究了菌株 DT-1 对土壤中 TCP 的降解及其存活能力,评价降解菌对 TCP 污染土壤的生物修复效果.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

TCP(纯度≥99%)、2-HP(纯度≥99%)购自一基实业有限公司(中国上海),用无菌水配制成 10g/L 的浓缩原液.甲醇(HPLC 级)和其他试剂(AR 级)均购自上海化学试剂有限公司(中国上海).

菌株 *Cupriavidus* sp. DT-1 为本实验室分离获得;*E. coli* SM10 ( $\lambda$  pir) pUT- mini-Tn5-*gfp* (Amp<sup>r</sup>), *E. coli* HB101pRK2013 (Km<sup>r</sup>),PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒,qPCR 相关试剂购自南京金斯瑞生物科技有限公司(中国南京).

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母膏 5.0, NaCl 10.0, pH 值 7.0.基础盐培养基(MSM)(g/L):NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, NaCl 0.5, MgSO<sub>4</sub> 0.2, pH 值 7.0.配制好的培养基于 121.3℃灭菌 30min.

### 1.2 菌液制备

菌株 DT-1 在 LB 培养基(30℃,180r/min)中培养至指数期,于室温 6000g 离心 5min 收集菌体.用灭菌的 MSM 洗涤细胞 2 次,并重悬至浓度约  $2 \times 10^8$ CFU/mL.在液体培养基中进行降解试验时,细胞接种浓度约为  $1 \times 10^7$ CFU/mL.

### 1.3 菌株 DT-1 对 TCP 和 2-HP 的降解

降解试验分别在含 50mg/L TCP 和 500mg/L 2-HP 的 100mL MSM 中进行.试验组接种降解菌后于 30℃,180r/min 培养 24h,每 2h 收集 3mL 样品,测定 TCP 和 2-HP 浓度.所有样本均做 3 组重复.

### 1.4 菌体生长量测定

采用上述方法培养菌体,定时取样 1mL,10 倍梯度稀释获得  $10^{-4}$ ~ $10^{-1}$  稀释液,取 0.2mL 涂布在 LB 平板上,30℃恒温培养 48h,选择菌落数在 30~300 的平

板进行计数.

### 1.5 化合物提取和检测

采用高效液相色谱法(HPLC)检测样品中 TCP 的浓度.样品(3mL)在 15000g 下离心 10min,上清液过 0.2μm 微孔滤膜.冷冻干燥后,溶解于 2mL 色谱纯甲醇,用配备 SPD-M20A 紫外检测器(190~800nm)和 Agilent C-18 柱(250mm×4.6mm, 5μm)的岛津 LC-201A 高效液相色谱仪进行分析.流动相为甲醇/水(80:20,V/V),在柱温 25℃下以 1.2mL/min 的流速输送.检测波长 230nm.在 0.1~100mg/L 浓度区间建立标准曲线,确定 TCP 的浓度.检测限(LOD)为 0.016mg/L,定量限(LOQ)为 0.057mg/L.在 0.1~100mg/L 浓度范围内,回收率为 96.5%~101.5%,相对标准偏差(RSD)为 1.10%~2.84%.用同样的方法检测 2-HP 浓度.浓度在 0.1~100mg/L 之间建立标准曲线,回收率和 RSD 分别为 94.6%~103.8% 和 1.37%~2.66%,LOD 为 0.021mg/L,LOQ 为 0.075mg/L.

以 500mg/L 2-HP 为唯一碳源培养菌株 DT-1,定时从培养物中收集样品,15000g 离心 10min,上清经 0.2μm 纤维过滤器过滤后,冷冻干燥,溶解于 1mL 色谱纯甲醇中,HPLC-MS 分析(Finnigan TSQ Quantum Ultra, Thermal, USA),利用电子喷雾进行负离子质谱电离,在质量范围为 30~400m/z 的条件下检测,鉴定 2-HP 降解产物.

### 1.6 菌株 DT-1 对土壤中 TCP 的降解

试验所用的土壤样本分别来自安徽师范大学校园和一处此前未接触 TCP 的农田土壤.样品风干,筛至 2mm 均匀颗粒.取 20g 样品,105℃干燥 24h,测定样品的含水量.采用凯氏定氮法测定土壤总氮和硝酸盐氮<sup>[29]</sup>;采用重铬酸钾容量法测定有机质<sup>[30]</sup>,土壤样品的部分特性见表 1.

表 1 土壤样品部分理化性质

Table 1 Selected characteristics of the soil samples

样品	pH 值	水份 (%)	总氮 (%)	有机质 (%)	K <sup>+</sup> (cmol/kg)	Na <sup>+</sup> (cmol/kg)
校园土	6.4	14.4	0.13	2.27	0.13	0.17
农田土	6.9	13.9	0.37	4.46	0.18	0.24

玻璃烧杯(200mL)中加入 100g 土壤,添加 TCP 至终浓度 50mg/kg.试验组加入含菌株 DT-1 的 MSM 培养基 4.0mL,终浓度约为  $1 \times 10^7$  细胞/g 土壤.

对照组则加入不含 DT-1 的 MSM 培养基 (4.0mL). 土壤样品在 30℃无菌条件下培养,定期称重,重量损失通过添加无菌水来补偿.每 5d 收集 5g 土壤样品进行 TCP 浓度分析,共培养 35d.

### 1.7 菌株 DT-1 的 *gfp* 标记

编码荧光蛋白的 *gfp* 基因是可用于监测目的细胞最有用的生物标记物之一,在污染土壤的生物修复中有良好的应用前景<sup>[31-33]</sup>.将菌株 DT-1、*E. coli* SM10 ( $\lambda$  pir) pUT- mini-Tn5-*gfp* 和 *E. coli* HB101pRK2013 分别在 LB 培养基中培养 12h.6000g 室温离心 5min 收集细胞,无菌水洗涤 2 次并重悬.将 3 种菌悬液各取 5mL,6000g 离心 5min,用 20 $\mu$ L LB 培养基重悬,将混合菌悬液铺在滤膜上,置于 LB 平板内 30℃培养 24h,用生理盐水洗涤并重悬细胞,涂布于含有 100mg/L 氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 平板上,30℃培养 24h 后,在紫外灯下观察.

### 1.8 土壤中重组菌株计数

将 1g 土壤溶解在 9mL 无菌水中制成悬浮液,依次梯度稀释至 10<sup>-4</sup>,取 0.2mL 稀释液涂布于 LB 平板上,30℃培养 48h,置于紫外灯下检测,统计发出绿色荧光的菌落数.

### 1.9 荧光定量 PCR 分析

qPCR 是分析土壤细菌丰度的有效手段<sup>[34]</sup>,为了了解接种外源微生物 DT-1-*gfp* 对土壤细菌数量的影响,提取土壤总 DNA,进行荧光定量 PCR 分析.取 0.25g 冷冻干燥后的土壤样品,采用 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤总 DNA.1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用微量分光光度计 (ND-1000, NanoDrop Technologies,美国) 测定其浓度和纯度后保存于 -20℃.qPCR 反应体系如下:2 × SYBR Premix Ex Taq 10 $\mu$ L,10 $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5 $\mu$ L,模板 DNA 1.0 $\mu$ L,无菌双蒸水 8 $\mu$ L.标准曲线及每个样品重复 3 次,同时设置空白对照.qPCR 反应所用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC AG-3') 和 518R (5'-ATTACCGCGCTGCTGG-3'),反应条件 94℃ 预变性 2min,94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 预延伸 30s,35 个循环<sup>[35]</sup>.

### 1.10 数据处理

试验数据使用 SPSS 18.0 进行统计分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和邓肯(Duncan)法多重比较检验各处理间的差异显著性( $P < 0.05$ ).

## 2 结果与讨论

### 2.1 液体培养基中 TCP 和 2-HP 的降解

如图 1 所示,接种后 2h,两种物质的浓度均没有明显变化,这是由于菌株需要适应新的环境,而负责降解的酶还没有合成.2~10h,TCP 的浓度急剧下降,而 2-HP 的浓度迅速上升,说明菌株 DT-1 开始表现出以 2-HP 为主要产物的 TCP 降解活性.然而 2-HP 的总浓度小于减少的 TCP 浓度,表明 2-HP 被菌株 DT-1 进一步降解(图 2).在 10~18h,TCP 被完全降解,2-HP 的浓度也随之迅速下降,直到消失.

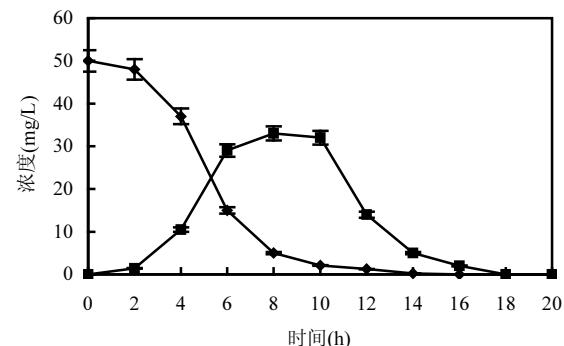


图 1 菌株 DT-1 对 TCP 和 2-HP 的降解

Fig.1 Degradation of TCP and 2-HP by strain DT-1

◆ TCP 浓度; ■ 2-HP 浓度

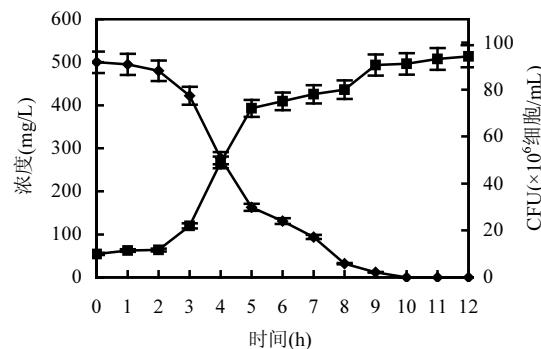


图 2 菌株 DT-1 利用 2-HP 作为唯一碳源的生长降解

Fig. 2 Utilization 2-HP as sole carbon source for growth and

degradation by strain DT-1

◆ 2-HP 浓度; ■ 细胞浓度

菌株 DT-1 在 10h 内可降解 500mg/L 高浓度的 2-HP,并以其作为生长的唯一碳源.菌株生长和 2-HP 降解主要发生在接种后 2~8h (图 2).本研究中 TCP 的最佳初始降解浓度较低,因为高浓度 TCP 对微生物有较大毒性.而 2-HP 对微生物的毒性较低,因此本研究采用较高初始浓度的 2-HP 作为降解底

物,以获取高浓度的代谢产物,便于后续鉴定。

研究表明,菌株 *Ralstonia* sp. T6、*Cupriavidus* sp. P2 和 *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup> 可降解 TCP 并产生 3,6-二羟基吡啶-2,5-二酮,这是一种可以进一步矿化分解的中间代谢物<sup>[1,5,20]</sup>。由于未能检测到后续降解产物,因此完整的降解途径尚不清楚。Wang 等<sup>[8]</sup>发现了一种能够在厌氧条件下降解 TCP 的微生物菌群,推测了 TCP 从脱氯到吡啶环裂解的完整降解途径。前期研究表明菌株 DT-1 能够在好氧环境中通过三步脱氯将 TCP 降解为 2-HP<sup>[12]</sup>。这是一种新型的 TCP 生物降解途径。为完善该途径,2-HP 的后续降解过程尚需研究。

## 2.2 2-HP 的降解途径研究

近几十年来,2-HP 的生物降解途径已有了较深入的研究。其一是 2-HP 首先转化为二羟基吡啶,再进一步裂解吡啶环。不同微生物产生不同的最终代谢物,如反丁烯二酸<sup>[36-37]</sup>、5-氨基-5-氧-2-戊烯酸、琥珀酸半醛<sup>[38]</sup>。其二是 2-HP 首先转化为三羟基吡啶,

产生蓝色物质<sup>[39]</sup>。在不同微生物作用下,最终代谢产物为延胡索酸<sup>[40]</sup>、丁二醛<sup>[41]</sup>和 α-酮戊二酸<sup>[42]</sup>。本研究通过 HPLC 检测了 2-HP 及其降解的代谢产物,结果见图 3。

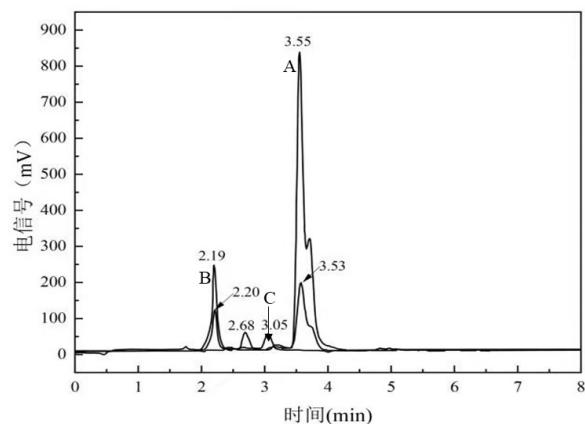


图 3 2-HP 及其降解产物的液相检测图谱

Fig.3 HPLC detection of 2-HP and its metabolite

A. 接种 0h (RT= 3.55min); B. 接种 6h (RT= 2.19, 2.68 和 3.53min); C. 接种 10h (RT= 2.20 和 3.05min)

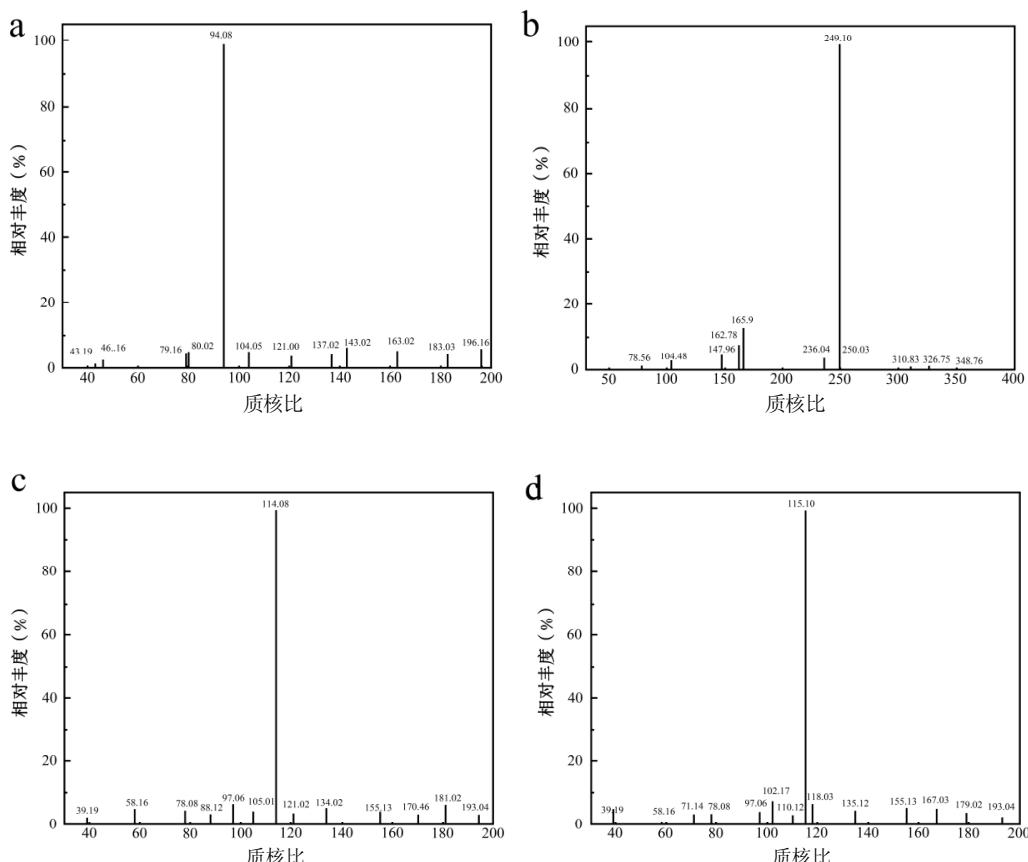


图 4 2-HP 降解中间产物的 MS 分析结果

Fig.4 MS analysis of 2-hydroxypyridine degradation intermediates by strain DT-1

a. 2-HP MS 图谱; b. 蓝色化合物 MS 图谱; c. 保留时间 2.19min 化合物的 MS 图谱; d. 保留时间 3.05min 化合物的 MS 图谱

2-HP 的保留时间为 3.55min (图 3 中 A 峰).接种菌株 DT-1 6h 后,培养基颜色变蓝,液相检测到 3 种化合物,保留时间分别为 2.19, 2.68 和 3.53min (图 3B). 其一为 2-HP (保留时间 3.53min), 另外两种应为其降解产物. 在接种 10h 的样品中检测到两种化合物, 一种保留时间为 2.20min, 与 6h 收集的样品中检测到的化合物相同, 另一种新的代谢产物保留时间为 3.05min (图 3 中 C 峰).

质谱结果显示, 保留时间为 3.55min 的物质脱质子化离子  $m/z = 94.08 [M-H]^-$ , 与 2-HP 的分子离子相匹配(图 4a). 保留时间为 2.68min( $m/z=249.10 [M-H]^-$ ) 的化合物(图 4b) 被鉴定为尼古丁蓝, 它使培养基由无色变为蓝色. 这说明 2-HP 的降解产生了 2,3,6-三羟基吡啶(2,3,6-THP), 并进一步在有氧环境下氧化成尼古丁蓝, 这是一个可逆反应. 因此保留时间为 2.19 和 3.05min 的物质应为 2,3,6-THP 的降解产物, 分别为马来酰胺酸( $m/z = 114.08 [M-H]^-$ ) (图 4c) 和延胡索酸( $115.10 [M-H]^-$ ) (图 4d). 该结果表明菌株 DT-1 对 2-HP 的降解途径与菌株 *Nocardia* sp. (PNO) 降解 2-HP 的途径相同<sup>[35]</sup>, 这是首次在革兰氏阴性菌中发现此途径. 结合前期结论, 推测菌株 DT-1 降解 TCP 的完整代谢途径如图 5 所示.

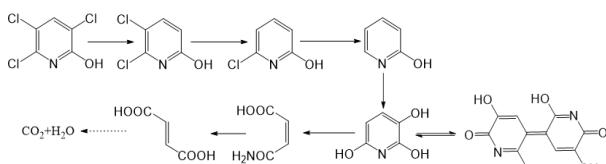


图 5 菌株 DT-1 降解 TCP 的代谢途径

Fig.5 The complete metabolic pathway of TCP degradation by strain DT-1

研究表明, 能够将 2-HP 转化为蓝色物质的细菌均为革兰氏阳性菌. 本研究检测了革兰氏阴性细菌 DT-1 降解 2-HP 的代谢产物, 并提出降解途径. 发现 2-HP 降解产生的主要中间代谢物是一种蓝色物质尼古丁蓝. 这是一个新的发现, 揭示了菌株 DT-1 降解 2-HP 的机制.

### 2.3 菌株 DT-1 对土壤中 TCP 和 2-HP 的降解

如图 6 所示, 在含 50mg/kg TCP 的校园土壤中, 接种菌株 DT-1, 培养 35d 后 TCP 浓度下降到 2.8mg/kg (降解率 94.4%), 大部分降解发生在 10~30d 之间. 降解产生的 2-HP 浓度很低, 最高仅有

9.8mg/kg. 表明 2-HP 产生后被立即降解. 在未接种的土壤中, 约 20.4% 的 TCP 在 35d 内自然降解, 没有检测到 2-HP. 农田土壤中 TCP 的整体降解趋势与校园土壤相似. 但接种降解菌后的降解率(86.7%)略低于校园土壤(94.4%). 未接种的农田土壤中 TCP 的降解率(28.4%)高于未接种 DT-1 的校园土壤(20.4%). 这可能是由于农田土壤中营养物质丰富, 使得土著微生物更加活跃, 具有更强自净能力, 但这也竞争性地抑制了菌株 DT-1 的繁殖. 该结果表明菌株 DT-1 在不同类型的土壤环境中都具备降解 TCP 的能力.

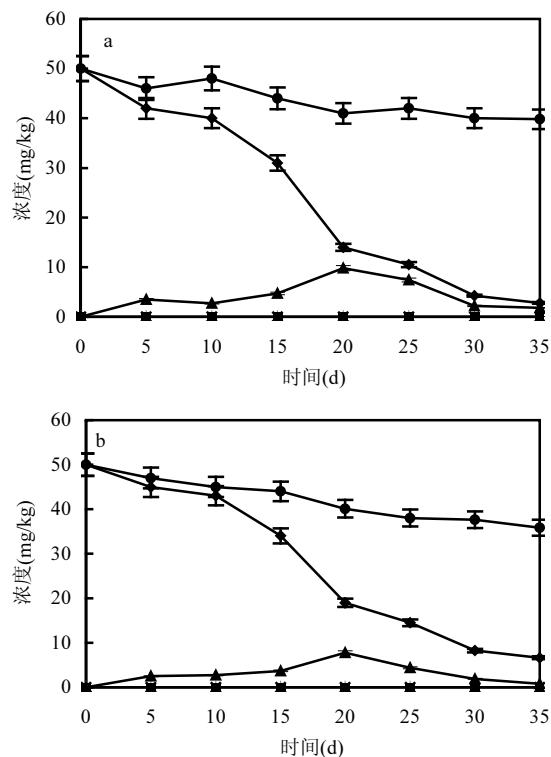


图 6 菌株 DT-1 对校园和农田土壤中 TCP 的降解

Fig.6 Degradation of TCP in campus and farmland soils by strain DT-1

a. 校园土; b. 农田土. ● 对照组土壤中 TCP 浓度; ◆ 接种 DT-1 后土壤中 TCP 浓度; ▲ 接种 DT-1 后土壤中 2-HP 浓度; ■ 对照组土壤中 2-HP 浓度

### 2.4 菌株 DT-1 的 *gfp* 标记和示踪

为了观察菌株 DT-1 在土壤中的存活情况, 将荧光标记基因 *gfp* 导入菌株内, 构建基因工程菌, 命名为 DT-1-*gfp*. 图 7 为菌株 DT-1 和 DT-1-*gfp* 在紫外光下的菌落形态, 对照株 DT-1 无光泽, 而 DT-1-*gfp* 发出绿色荧光, 说明 *gfp* 基因在菌株 DT-1-*gfp* 中高

效表达。

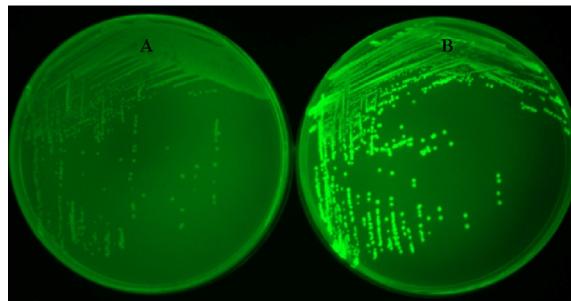


图 7 菌株 DT-1 和 DT-1-gfp 在紫外灯下的菌落照片  
Fig.7 Colony of strains DT-1 and DT-1-gfp under UV light  
(A) DT-1; (B) DT-1-gfp

工程菌在普通 LB 平板上无选择压力连续培养 20 代,在荧光显微镜下观察到同样的效果,表明 *gfp* 基因在菌株 DT-1 中稳定遗传。降解试验结果表明,菌株 DT-1-gfp 的特性与菌株 DT-1 一致。因此,基因工程菌在功能上与原菌株相当,可用于 TCP 污染土壤的生物修复。表 2 为接种后菌株 DT-1-gfp 在土壤中的存活情况。接种的初始细胞浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/g 土壤,前 7d 由于土壤中支持细胞生长的营养物质较为丰富,细菌数量略有增加。7~21d,由于土壤中本地微生物的增殖竞争性抑制了 DT-1-gfp 的繁殖,目的细菌总量急剧减少,且农田土壤的抑制作用强于校园土壤。21~35d,目的细菌种群保持稳定,没有显著下降,说明土壤微生物群落达到了平衡状态。结果表明,菌株 DT-1-gfp 能够适应复杂的土壤环境,并可存活足够的时间来发挥其生物修复作用。

表 2 菌株 DT-1-gfp 在校园和农田土壤中的含量

( $\times 10^6$  CFU/g)

Table 2 The content of DT-1-gfp in campus and farmland soils ( $\times 10^6$  CFU/g)

土壤类型	7d	14d	21d	28d	35d
校园土壤	$11.91 \pm 1.43$	$7.13 \pm 1.92$	$3.68 \pm 1.38$	$3.19 \pm 1.82$	$2.89 \pm 0.98$
农田土壤	$11.02 \pm 1.37$	$6.34 \pm 1.05$	$2.47 \pm 1.11$	$2.69 \pm 1.04$	$2.12 \pm 0.95$

## 2.5 降解菌对土壤细菌数量的影响

添加 TCP 的两种土壤中细菌 16S rRNA 拷贝数在不同培养阶段均始终低于原始土壤(表 3),表明 TCP 对土壤微生物具有明显的毒性;添加 TCP+DT-1-gfp 处理的 16S rRNA 拷贝数在两种土壤的培养前期(7d)均显著低于对照,说明 TCP 的毒性作用

依然存在;随着 DT-1-gfp 在土壤中的定植和对 TCP 降解作用,添加了 DT-1-gfp 的土壤中细菌数量逐渐上升,在 35 和 56d 均与对照无显著差异,该结果表明 TCP 的毒性因为 DT-1-gfp 的降解作用而逐渐减弱,初步证实降解菌施加对污染土壤中微生物生态有显著的恢复作用。然而降解菌的添加对土壤微生物群落结构的影响目前尚未探明,后续将以此为中心逐步开展研究,以期提高降解菌的应用潜力,并评价其生态安全性。

表 3 TCP 及菌株 DT-1-gfp 对土壤细菌数量的影响

Table 3 The content of DT-1-gfp in campus and farmland soils

土壤类型	试验组	细菌 16S rRNA 丰度 ( $\times 10^{10}$ copies/g 土壤)			
		7d	21d	35d	56d
校园土壤	对照	$6.45 \pm 1.22a$	$5.32 \pm 2.03a$	$6.45 \pm 1.22a$	$4.45 \pm 0.97a$
	TCP	$2.68 \pm 0.52c$	$3.37 \pm 1.24b$	$3.68 \pm 0.52b$	$2.21 \pm 0.70b$
	TCP+DT-1-gfp	$3.56 \pm 0.74b$	$4.87 \pm 0.45a$	$4.81 \pm 1.28ab$	$3.89 \pm 1.06a$
农田土壤	对照	$10.28 \pm 3.26a$	$11.32 \pm 2.77a$	$10.44 \pm 2.04a$	$9.31 \pm 2.72a$
	TCP	$4.55 \pm 2.13b$	$5.98 \pm 1.65c$	$5.66 \pm 1.12b$	$3.61 \pm 1.54c$
	TCP+DT-1-gfp	$5.14 \pm 1.36b$	$7.43 \pm 2.63b$	$8.14 \pm 0.56ab$	$7.21 \pm 1.87ab$

注:同一列数据后不同字母表示不同处理间差异达到 5% 显著水平。

由于对高毒有机磷农药的限制和禁止,以毒死蜱为代表的低毒有机磷农药的市场需求不断增加。这不可避免地增加了 TCP 在环境中积累。TCP 的积累强烈地抑制了微生物的生长,而微生物生长的抑制又加剧了 TCP 的积累,不仅阻碍了 TCP 本身的降解,还抑制了母体化合物毒死蜱以及其他有机化合物的降解<sup>[15,20,43]</sup>,使农药残留对环境造成的污染进一步加剧。

基于微生物降解的污染土壤生物修复策略的发展逐渐被各国学者所重视。生物修复作为一种高效、廉价的生物技术手段,对其研究逐渐深入,并将大规模应用于污染环境的治理<sup>[44-48]</sup>。然而, TCP 在土壤中的生物降解研究报道较少,多数研究都集中在毒死蜱污染土壤的生物修复方面。本研究以 TCP 作为污染底物,研究了不同环境中微生物对其降解作用,结果表明菌株 DT-1 能够有效降解水体和土壤中的 TCP,在 TCP 污染农田的生物修复中具有很大的应用潜力。

## 3 结论

### 3.1 菌株 DT-1 可利用 2-HP 为唯一碳源进行生长,

并降解浓度为 500mg/L 的 2-HP.HPLC-MS 检测到 3 种代谢产物尼古丁蓝、马来酰胺酸和反丁烯二酸。TCP 在菌株 DT-1 作用下经过 3 步脱氯反应生成 2-HP,进而依次代谢产生尼古丁蓝,马来酰胺酸和反丁烯二酸,最终被彻底矿化分解。

**3.2 菌株 DT-1 可降解土壤中浓度为 50mg/kg 的 TCP,在两类不同的土壤中 35d 内的降解率分别为 94.4% 和 86.7%,并能对代谢产物 2-HP 进一步降解,大部分降解发生在 10~30d 之间.而作为对照的未接种菌株 DT-1 的土壤中,自然状态下降解的 TCP 不产生 2-HP.**

**3.3 基因工程菌 DT-1-gfp 的降解特性、效果与原始菌株相同,并在土壤中长时间存活,且添加降解菌后对 TCP 污染土壤细菌群落丰度有一定的恢复作用,表明该菌株具备应用于 TCP 污染土壤生物修复的潜力.**

#### 参考文献:

- [1] Fang L C, Shi T Z, Chen Y F, et al. Kinetics and catabolic pathways of the insecticide chlorpyrifos, annotation of the degradation genes and characterization of enzymes TcpA and Fre in *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup> [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019,67(8):2245–2254.
- [2] 陈诗卉,姜锦林,张换朝,等.毒死蜱在我国水稻上登记现状及水生态风险评估 [J]. 中国环境科学, 2020,40(8):3585–3594.  
Chen S H, Jiang J L, Zhang H C, et al. Registration status of chlorpyrifos products for use on rice and its risk assessment for aquatic ecosystem in China [J]. China Environmental Science, 2020,40(8):3585–3594.
- [3] Yang L, Zhao Y H, Zhang B X, et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005,251(1):67–73.
- [4] Kim J R, Ahn Y J. Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia* sp. strain KR100 [J]. Biodegradation, 2009,20(4):487–497.
- [5] Li J Q, Liu J, Shen W J, et al. Isolation and characterization of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Ralstonia* sp. strain T6 [J]. Bioresource Technology, 2010,101(19):7479–7483.
- [6] Rayu S, Nielsen U N, Nazaries L, et al. Isolation and molecular characterization of novel chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacteria from sugarcane farm soils [J]. Frontiers Microbiology, 2017,8:518.
- [7] Dores E F G C, Spadotto C A, Weber O L S, et al. Environmental behavior of chlorpyrifos and endosulfan in a tropical soil in central Brazil [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016,64(20):3942–3948.
- [8] Wang S H, Zhang C, Lv Z W, et al. Degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a microbial consortium in dryland soil with anaerobic incubation [J]. Biodegradation, 2019,30(2/3):161–171.
- [9] Lataye D H, Mishra I M, Mall I D. Removal of pyridine from aqueous solution by adsorption on bagasse fly ash [J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006,45(11):3934–3943.
- [10] Petkevičius V, Vaitekūnas J, Stankevičiūtė J, et al. Catabolism of 2-hydroxypyridine by *Burkholderia* sp. strain MAK1: a 2-hydroxypyridine 5-monooxygenase encoded by *hpABCDE* catalyzes the first step of biodegradation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018,84(11):e00387–18.
- [11] Chu L, Yu S, Wang J. Degradation of pyridine and quinoline in aqueous solution by gamma radiation [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2018,144:322–328.
- [12] Lu P, Li Q F, Liu H M, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1 [J]. Bioresource Technology, 2013,127:337–342.
- [13] Yu H, Tang H Z, Zhu X Y, et al. Molecular mechanism of nicotine degradation by a newly isolated strain, *Ochrobactrum* sp. strain SJY1 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015,81(1):272–281.
- [14] Wang S H, Zhang C, Yan Y C. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol by a newly isolated *Agrobacterium* sp. strain Yw12 [J]. Biodegradation, 2012,23(1):107–116.
- [15] 曹礼,徐琳.微生物降解 3,5,6-三氯-2-吡啶醇的研究进展 [J].微生物学通报, 2015,42(6):1158–1164.  
Cao L, Xu L. Research progress in microbial degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol [J]. Microbiology China, 2015,42(6):1158–1164.
- [16] Feng Y, Racke K D, Bollag J M. Isolation and characterization of a chlorinated-pyridinol-degrading bacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997,63(10):4096–4098.
- [17] Xu G M, Zheng W, Li Y Y, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008,62(1):51–56.
- [18] Anwar S, Liaquat F, Khan Q M, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009,168(1):400–405.
- [19] Singh D P, Khattar J I S, Nadda J, et al. Chlorpyrifos degradation by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PUPCCC 64 [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011,18(8):1351–1359.
- [20] Cao L, Liu H M, Zhang H, et al. Characterization of a newly isolated highly effective 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading strain *Cupriavidus pauculus* P2 [J]. Current Microbiology, 2012,65(3):231–236.
- [21] Abraham J, Silambarasan S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Sphingobacterium* sp. JAS3 [J]. Process Biochemistry, 2013,48(10):1559–1564.
- [22] Silambarasan S, Abraham J. Efficacy of *Ganoderma* sp. JAS4 in bioremediation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP from agricultural soil [J]. Journal of Basic Microbiology, 2014,54(1):44–55.
- [23] Jabeen H, Iqbal S, Anwar S. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp.

- HN3 [J]. Water and Environment Journal, 2015,29(1):151–160.
- [24] Abraham J, Silambarasan S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2016,126:13–21.
- [25] Bempelou E D, Vontas J G, Liapis K S, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by the epiphytic yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra* [J]. Ecotoxicology, 2018,27(10):1368–1378.
- [26] Bhardwaj A, Verma N. Proficient biodegradation studies of chlorpyrifos and its metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus subtilis* NJ11strain [J]. Research Journal of Microbiology, 2018,13(1):53–64.
- [27] Aswathi A, Pandey A, Sukumaran R K. Rapid degradation of the organophosphate pesticide-chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3 [J]. Bioresource Technology, 2019,292:122025.
- [28] Bhuiyan M V, Kulkarni A N, Ghosh J S. Detoxification of chlorpyriphos by *Micrococcus luteus* NCIM 2103, *Bacillus subtilis* NCIM 2010 and *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2036 [J]. Research Journal of Environmental Earth Sciences, 2011,3(5):614–619.
- [29] Bulluck L R, Brosius M, Esvanyo G K, et al. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms [J]. Applied Soil Ecology, 2002,19(2):147–160.
- [30] Ciavatta C, Govi M, Antisari L V, et al. Determination of organic carbon in aqueous extracts of soils and fertilizers [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1991,22(9/10):795–807.
- [31] 魏明宝,方呈祥,张甲耀,等.绿色荧光蛋白标记在生物修复中的应用 [J]. 中国环境科学, 2004,24(3):290–293.
- Wei M B, Fang C X, Zhang J Y, et al. The application of EGFP marker in bioremediation [J]. China Environmental Science, 2004,24(3):290–293.
- [32] Errampalli D, Leung K, Cassidy M B, et al. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999,35(3):187–199.
- [33] Elvang A M, Westerberg K, Jernberg C, et al. Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Arthrobacter chlorophenolicus* A6cells during degradation of 4-chlorophenol in soil [J]. Environmental Microbiology, 2001,3(1):32–42.
- [34] 陈 娜,刘 穗,黎 娟,等.长期施肥对稻田不同土层反消化细菌丰富度的影响 [J]. 中国环境科学, 2019,39(5):2154–2160.
- Chen N, Liu Y, Li J, et al. Effects of long-term fertilization on the abundance of the key denitrifiers in profile of paddy soil profiles [J]. China Environmental Science, 2019,39(5):2154–2160.
- [35] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005,71(7):4117–4120.
- [36] Zhao S X, Hu C H, Guo L Z, et al. Isolation of a 3-hydroxypyridine degrading bacterium, *Agrobacterium* sp. DW-1, and its proposed degradation pathway [J]. AMB Express, 2019,9(1):65–73.
- [37] Stankevičiūtė J, Vaitekūnas J, Petkevičius V, et al. Oxyfunctionalization of pyridine derivatives using whole cells of *Burkholderia* sp. MAK1 [J]. Scientific Reports, 2016,6(1):39129.
- [38] Zefirov N S, Agapova S R, Terentiev P B, et al. Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopictes* and *Rhodococcus opacus* strains [J]. FEMS Microbiology Letters, 1994,118(1/2):71–74.
- [39] 胡春辉,徐 青,于 浩.*Arthrobacter* sp. 2PR 降解 2-羟基毗啶动力学及降解特性研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2017,37(8):31–38.
- Hu C H, Xu Q, Yu H. Characteristics and kinetic study of 2-hydroxypyridine degradation by a novel bacterium *Arthrobacter* sp. 2PR [J]. China Biotechnology, 2017,37(8):31–38.
- [40] Shukla O P, Kaul S M. Microbiological transformation of pyridine N-oxide and pyridine by *Nocardia* sp [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1986,32(4):330–341.
- [41] Khasaeva F, Vasilyuk N, Terentyev P, et al. A novel soil bacterial strain degrading pyridines [J]. Environmental Chemistry Letters, 2010,9(3):439–445.
- [42] Vaitekūnas J, Gasparavičiūtė R, Rutkienė R, et al. A 2-hydroxypyridine catabolism pathway in *Rhodococcus rhodochrous* strain PY11 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016,82(4):1264–1273.
- [43] Singh B K, Walker A, Morgan J A W, et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14and its use in bioremediation of contaminated soils [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004,70(8):4855–4863.
- [44] 王海兰,臧海莲,成 毅,等.氯嗜礦隆降解菌的筛选及对污染土壤的生物修复 [J]. 中国环境科学, 2018,38(4):1473–1480.
- Wang H L, Zang H L, Cheng Y, et al. Screening of a chlorimuron-ethyl-degrading strain and chlorimuron-ethyl-contaminated soil bioremediation [J]. China Environmental Science, 2018,38(4):1473–1480.
- [45] Semple K T, Reid B J, Fermor T R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants [J]. Environmental Pollution, 2001,112(2):269–283.
- [46] Akbar S, Sultan S. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016,47(3):563–570.
- [47] Uqab B, Mudasir S, Nazir R. Review on bioremediation of pesticides [J]. Journal of Bioremediation and Biodegradation, 2016,7(3):343.
- [48] Shishir T A, Mahbub N, Kamal N E. Review on bioremediation: a tool to resurrect the polluted rivers [J]. Pollution, 2019,5(3):555–568.

**作者简介:** 陆 鹏(1986-),男,江苏徐州人,讲师,博士,主要研究方向为环境微生物学.发表论文 8 篇.