

研究报告

一株源自新疆盐碱棉田土壤吡蚜酮降解菌株的分离鉴定及其降解途径

柴莉丽, 贡莎莎, 米拉·木拉提, 徐豪, 吴思雅, 王欣然, 张伟*

新疆师范大学 生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

柴莉丽, 贡莎莎, 米拉·木拉提, 徐豪, 吴思雅, 王欣然, 张伟. 一株源自新疆盐碱棉田土壤吡蚜酮降解菌株的分离鉴定及其降解途径[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 187-198.

CHAI Lili, GONG Shasha, Mira·Mulati, XU Hao, WU Siya, WANG Xinran, ZHANG Wei. Isolation, identification, and degradation pathway prediction of a pymetrozine-degrading strain from a saline cotton field in Xinjiang[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 187-198.

摘要: 【背景】吡蚜酮是一种在碱性条件下稳定且具有潜在致癌性的杀虫剂, 现有吡蚜酮降解菌株大都是从高污染环境或农药生产厂环境中分离而来。【目的】获取能适用于碱性土壤环境修复吡蚜酮污染的菌株。【方法】采集新疆长期连作棉田土壤, 通过先富集后纯化的方法分离吡蚜酮降解菌, 然后开展其降解特性、途径及关键基因等研究。【结果】获得 1 株吡蚜酮高效降解菌 3BR11-2, 将该菌以 2% ($OD_{600}=1.0$) 的接种量加入装有 100 mL 吡蚜酮浓度为 50 mg/L、pH 8.0 基础无机盐培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、120 r/min 培养 36 h 时可将吡蚜酮完全降解。超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱仪 (ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF/MS) 检测菌株 3BR11-2 在降解吡蚜酮过程中产生了 3-吡啶甲醇、烟酸 (nicotinic acid, NA) 和 6-羟基烟酸 (6-hydroxynicotinic acid, 6HNA) 3 种代谢产物。根据 16S rRNA 基因序列对比分析, 该菌株与简单类诺卡氏菌 (*Nocardioides simplex*) 相似度达 99.29%。以菌株 3BR11-2 基因组为模板, 依据菌株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) BYT-1 吡蚜酮水解酶基因 *pyzH* 设计引物 PCR 扩增得到 846 bp 片段, 经测序分析发现该片段与基因 *pyzH* 相似度为 99.65% (843/846)。通过氨基酸序列比对, 菌株 3BR11-2 基因 *pyzH* 表达的吡蚜酮水解酶第 195 丙氨酸残基 A 和第 212 半胱氨酸 C 转变为丝氨酸残基 S, 第 263 丙氨酸残基 A 转变为苏氨酸残基 T。【结论】本研究丰富了吡蚜酮高效降解菌资源, 有利于盐碱特殊环境下吡蚜酮的生物修复应用。
关键词: 吡蚜酮; 生物降解; 降解产物; 降解基因

资助项目: 国家自然科学基金(32160002); 新疆师范大学研究生创新基金(XSY202401039)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160002) and the Graduate Student Innovation Fund of Xinjiang Normal University (XSY202401039).

*Corresponding author. E-mail: zw0991@sohu.com

Received: 2025-06-12; Accepted: 2025-07-08; Published online: 2025-07-21

Isolation, identification, and degradation pathway prediction of a pymetrozine-degrading strain from a saline cotton field in Xinjiang

CHAI Lili, GONG Shasha, Mira·Mulati, XU Hao, WU Siya, WANG Xinran, ZHANG Wei*

College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

Abstract: [Background] Pymetrozine is a pesticide that exhibits stability under alkaline conditions and possesses potential carcinogenic properties. Most existing strains capable of degrading pymetrozine have been isolated from highly contaminated environments or pesticide production facilities. [Objective] To obtain strains suitable for bioremediation of pymetrozine-contaminated alkaline soil. [Methods] We collected soil samples from long-term continuous cropping cotton fields in Xinjiang. Pymetrozine-degrading bacteria were isolated by enrichment followed by purification. Subsequently, their degradation characteristics, metabolic pathways, and key genes were investigated. [Results] An efficient pymetrozine-degrading bacterial strain 3BR11-2 was successfully isolated. This strain could completely degrade pymetrozine when it was inoculated in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL basic inorganic salt medium (50 mg/L pymetrozine, pH 8.0) at an inoculum size of 2% ($OD_{600}=1.0$) and cultured at 37 °C and 120 r/min for 36 h. UHPLC-Q-TOF/MS revealed the production of three metabolites during the degradation process by strain 3BR11-2. These metabolites were identified as 3-pyridinemethanol, nicotinic acid (NA), and 6-hydroxynicotinic acid (6HNA). The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparison showed that the strain shared 99.29% similarity with *Nocardioides simplex*. With the genome of strain 3BR11-2 as a template, primers were designed based on the pymetrozine hydrolase gene *pyzH* from strain *Pseudomonas* sp. BYT-1. The gene *pyzH* was then amplified by PCR, which yielded a fragment of 846 bp. This fragment shared the similarity of 99.65% (843/846 nucleotides) with *pyzH*. Furthermore, amino acid sequence alignment indicated that the pymetrozine hydrolase expressed by *pyzH* of strain 3BR11-2 had three residue changes: A195S, C212S, and A263T. [Conclusion] This study enriches the repertoire of highly efficient pymetrozine-degrading bacteria and holds promise for the application of bioremediation strategies targeting pymetrozine in unique saline-alkali environments.

Keywords: pymetrozine; biodegradation; degradation products; degradation gene

吡蚜酮(pymetrozine)是一种含有吡啶和三嗪酮结构的杀虫剂,因其独特的毒理特性和优良的防治效果被广泛应用于防治植物吸吮昆虫,如水稻、蔬菜、棉花,以及小麦和果树中的蚜虫、白蝇、叶蝉和飞虱^[1-2]。随着吡蚜酮的广泛使用,在环境和各种农作物中已检测到其残留物^[3-5],并且其在土壤中半衰期长,难降解

且迁移性强,对环境污染性强^[6-7]。现有研究将吡蚜酮归类为“可能的”人类致癌物^[8]。在长期种植新疆棉花过程中,吡蚜酮也常被作为有机磷农药的替代品而广泛使用^[9]。新疆地区棉田土壤pH值多数都在8.0以上^[10],而吡蚜酮在pH 5.0-9.0都较为稳定^[11],半衰期较长,最终进入该地区土壤中的吡蚜酮的微生物降解机制研究尚无报道。

微生物降解以其经济效益高、无二次污染等优点越来越受到人们的关注,成为一种很有前景的修复方法^[12]。目前已报道的具有吡蚜酮降解能力的微生物有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、食氢产水菌属(*Hydrogenophaga*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)和鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*) 5个属^[13-18]。*Pseudomonas* sp. BYT 1、*Achromobacter* sp. BYT-3 和 *Pseudomonas* sp. BYT-4 是从农药工厂的废水处理池中分离的吡蚜酮降解菌株^[13];它们可以将吡蚜酮水解成 4-氨基-6-甲基-4,5-2H-[1,2,4]三嗪-3-酮(4-amino-6-methyl-4,5-dihydro-2H-[1,2,4]triazin-3-one, AMDT)和烟酸(nicotinic acid, NA),前者在培养物中积累为最终产物,而后者被羟基化为 6-羟基烟酸(6-hydroxynicotinic acid, 6HNA)并进一步降解,直到进入三羧酸循环。关于吡蚜酮降解基因的报道,仅发现菌株 *Pseudomonas* sp. BYT 5 携带有水解吡蚜酮的基因 *pyzH* 和 2 个烟酸降解基因簇 *nic1* 和 *nic2*^[19], *pyzH* 可以通过水解吡蚜酮的 C=N 双键生成 AMDT 和烟醛^[13]。目前已报道的吡蚜酮降解菌的最适降解 pH 均为酸性或中性,而在碱性农田土壤等特殊环境中可以自然降解吡蚜酮的微生物菌株及其基因未见报道。

本研究从新疆长期连作棉田土壤中富集能在碱性条件下降解吡蚜酮的菌群,从中挖掘具有高效降解吡蚜酮潜力的菌株,对获得的代表性菌株开展分类鉴定、降解途径、降解基因等研究,以期新疆盐碱土壤环境吡蚜酮的生物降解提供理论基础和技术支持,也为开发利用当地微生物资源修复有害有机物在土壤中的蓄积提供借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

土壤样品采集自新疆维吾尔自治区阿克苏市连作 10 年以上的棉田(79°45'81"-79°46'55"E,

39°31'47"-39°45'50"N)。按五点取样法使用内径 6 cm 的土钻垂直钻取 1-20 cm 深度土壤。将 5 个相同连作年限土壤合并为 1 个土样, -4 °C 保存,带回实验室保存于 4 °C 冰箱,1 周内用于菌群的富集。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

基础无机盐液体培养基(minimal salt medium, MSM) (g/L): (NH₄)₂SO₄ 1.0, K₂HPO₄ 5.6, KH₂PO₄ 0.4, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaCl 0.5; R2A 液体培养基参考文献[20]配制; LB 培养基参考文献[13]配制。

吡蚜酮原药(纯度≥98%),广西南宁广猷农业化工有限公司;乙腈,默克公司;甲酸,赛默飞世尔科技有限公司。

高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;色谱柱,北京绿百草科技发展有限公司;四极杆飞行时间高分辨率质谱仪,上海爱博才思分析仪器贸易有限公司。

1.3 吡蚜酮降解菌群的富集和菌株的分离

称取 10.0 g 土壤样品加入装有 100 mL 含 100 mg/L 吡蚜酮的 MSM 培养基中,于 37 °C、120 r/min 培养 7 d,再按 3%接种量传代于新鲜培养基中培养,连续传代 6 次以上,同时监测吡蚜酮降解率变化。采用稀释梯度法(10⁻³-10⁻⁵)将富集获得的高效降解菌群培养液涂布于含有 100 mg/L 吡蚜酮的 R2A 和 MSM 琼脂培养基上 37 °C 培养 3-7 d,挑取单菌落连续划线分离,相同培养条件下培养直至获得形态明显差异菌株的纯培养物。

1.4 菌株降解能力测定及其生长曲线

将菌株接种至 LB 液体培养基,于 37 °C、120 r/min 培养 60 h 至对数期,然后将培养液在 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 回收菌体,用 MSM 培养基洗涤菌体后再次离心收集,洗涤过程重复 3 次。最后,将菌体重悬于 MSM 液体培养基中,使 OD₆₀₀ 为 1.0。将细菌悬液以 2%接种

量接种到装有 100 mL 吡蚜酮浓度为 50 mg/L 的 MSM 培养基中,于 37 °C、120 r/min 避光培养。从接种开始每 4 h 取样,用高效液相色谱仪检测吡蚜酮及其代谢物的浓度。

高效液相色谱仪样品处理方法及检测条件:取 2 mL 培养液于 12 000 r/min 离心 2 min,上清液使用 0.22 μm 水相膜过滤;样品使用 C18 Diamosil™ 反相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 粒径 5 μm),柱温 40 °C;流动相为乙腈:0.2 g/L 磷酸二氢钾溶液(10:90),流速 1.0 mL/min;检测波长为 298 nm,进样体积为 20 μL 。使用分光光度法(OD_{600})监测菌株的生物量变化。对照组为不接种处理,所有样品均设置 3 个重复。

1.5 降解菌株的初步鉴定

将筛选出的菌株接种到 R2A 固体培养基上,于 37 °C 培养 48 h 左右,观察其菌落形态。将菌株接种到 LB 液体培养基中,37 °C、120 r/min 振荡培养 12 h,取部分菌液进行革兰氏染色,置于光学显微镜下观察菌体形态。为了评估所获菌株的生长特性,将菌株接种至 LB 培养基上,在 28–43 °C (间隔 3 °C)测试菌株最适生长温度;以在 pH 4.0–10.0 (间隔 1.0)评估菌株对 pH 值的耐受性;在含有 0–10.0% NaCl 浓度(间隔 1%)评估菌株的耐盐性。使用 API ZYM 和 API 20NE 试剂盒进行生理生化鉴定。

将所获菌株接种到 LB 液体培养基中,37 °C、120 r/min 振荡培养 12 h。使用改良 CTAB 法^[21]提取菌株高质量的基因组 DNA。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25 μL): 2 \times Taq PCR mix 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , DNA 模板 1.0 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

纯化的 PCR 产物送 BioMed 公司测序。将所得序列数据提交至 NCBI 的 GenBank 数据库(PQ680133)。对分离菌株的 16S rRNA 基因序列

进行 BLAST 搜索,并与 GenBank 和 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 数据库匹配^[22]。使用 MEGA 11.0 中的邻接法构建菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树^[23]。

1.6 菌株 3BR11-2 吡蚜酮降解中间代谢产物的测定

按照 1.4 的方法收集菌株 3BR11-2 在 50 mg/L 吡蚜酮的 MSM 培养基中培养 12、36、48 h 的降解液。使用超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱仪(ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF/MS)分析样品中的吡蚜酮及其中间代谢物。使用 Hypersil Gold aQ C18 色谱柱(1.9 μm , 2.1 mm \times 100 mm)进行液相色谱分析。流动相 A 为 H₂O:甲酸(10:0.01, 体积比),流动相 B 为乙腈:甲酸(10:0.01, 体积比)。柱温保持在 40 °C。进样体积为 5 μL , 流速为 0.3 mL/min。使用梯度程序在正离子和负离子模式下洗脱样品(0% B, 0–1 min; 0%–10% B, 1–5 min; 10% B, 5–9 min; 10%–70% B, 9–11 min; 70% B, 11–14 min; 70%–0% B, 14–15 min; 0% B, 15–20 min)。扫描范围设置为 50–800 m/z , 离子源气体 2 为 50 psi, 帘气为 35 psi, 温度为 350 °C。离子喷雾电压浮动设置为正离子模式下的 5 500 V 和负离子模式下的–4 500 V。

1.7 吡蚜酮降解基因 *pyzH* 的 PCR 扩增、测序和分析

依据已报道吡蚜酮降解基因 *pyzH* (846 bp) 设计引物 F (5'-GAATTCATGGCAGTGGAAAA GAAGAGCCGC-3') 和 R (5'-CTCGAGCTAGGC GGTCAGCGACGCG-3')^[13], 用 1.5 中降解菌株的总 DNA 作为模板,扩增降解基因 *pyzH*。PCR 反应体系(50 μL): DNA 模板(50 ng/ μL) 1 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , 2 \times Taq PCR 混合物 25 μL , ddH₂O 20 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果后送 BioMed 公司(中国北京)测序。

将测序所得序列进行 BLAST 搜索, 并与 GenBank 数据库匹配, 下载同源性较高的序列进行后续分析。将基因 *pyzH* 蛋白序列提交到 ExPasy 网站^[24], 分析氨基酸数量、分子量、等电点等理化性质。将蛋白序列提交到 SOPMA 在线网站^[24]预测蛋白质二级结构。

2 结果与分析

2.1 吡蚜酮高效降解菌分离结果

在 MSM 培养基中添加吡蚜酮为唯一碳源, 经过连续富集传代 6 次以上获得了高效降解吡蚜酮的菌群 BYT1。该菌群在 pH 8.0、37 °C、120 r/min 条件下可在 36 h 完全降解 100 mg/L 吡蚜酮。进一步从该菌群分离到的菌株中筛选到了 10 余株具有降解吡蚜酮能力的菌株, 其中编号为 3BR11-2 的菌株在以吡蚜酮为唯一碳源的 MSM 培养基中生长良好, 不仅降解率高、降解速度快, 而且降解能力稳定。进一步研究该菌株在降解过程中的生物量和降解率变化发现: 接种菌株 3BR11-2 后, 菌株的生长量快速增加, 在 28 h 时 OD_{600} 达到最大值 0.034; 28 h 后 OD_{600} 开始下降。同样, 在接种菌株 3BR11-2 培养前 28 h 吡蚜酮降解率快速升至 95.14%, 而在 28–40 h 吡蚜酮降解速度趋缓, 最后降解率达 100% (图 1)。

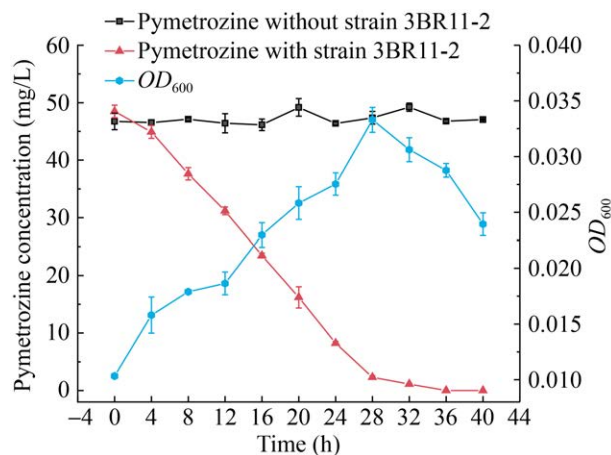


图 1 菌株 3BR11-2 的生长曲线及降解能力
Figure 1 Growth curve and degradation capacity of strain 3BR11-2.

此外, 高效液相色谱仪检测该菌株降解吡蚜酮的过程显示: 连续培养过程中, 在 0 h 时吡蚜酮峰值 264.491 mAU (峰IV, 保留时间 7.022 min), 在 8 h 时吡蚜酮峰值 205.283 mAU, 在 16 h 时吡蚜酮峰值 123.454 mAU; 在 24 h 时吡蚜酮峰值仅为不到 2.939 mAU, 在 36 h 时吡蚜酮峰值为 0.455 mAU。此外, 伴随着吡蚜酮底物峰面积的下降, 3 个新的产物峰被检测到。其中, 峰I在 16 h (保留时间 7.840 min)和 24 h 样品中(保留时间 7.822 min)均被检测, 而在 36 h 样品中未被检测出, 表明菌株 3BR11-2 具有降解峰I产物的能力。峰II在 24 h (保留时间 5.658 min)和 36 h 样品中(保留时间 5.657 min)被检测出, 并且最后有积累。峰III在 24 h 和 36 h (保留时间 8.542 min)样品中被检测出(图 2)。依据吡蚜酮降解产物的出峰时间并参考其他降解吡蚜酮菌株的液质结果, 初步判断峰I为 3-吡啶甲醇, 峰II为 NA, 峰III为 6HNA。

2.2 菌株 3BR11-2 的鉴定结果

菌株 3BR11-2 在 R2A 琼脂培养基上 37 °C 连续培养 36 h 后, 菌落呈透明白色、大小 2 mm, 边缘形状不规则、微凸、表面湿润。革兰氏染色菌体呈短杆状, G^+ 。菌株 3BR11-2 在 30–45 °C 均能生长, 最适生长温度为 37 °C; pH 生长范围为 5.0–10.0, 最适 pH 值为 7.0–8.0; 盐浓度生长范围为 1%–7%, 最适盐浓度为 2%。API 20NE 系统显示菌株 3BR11-2 能够使明胶液化, β -葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶试验为阳性, 可利用葡萄糖、阿拉伯糖、葡萄糖酸盐和苹果酸。API ZYM 试剂盒的结果表明, 菌株 3BR11-2 可产生脂酶(C4)、类脂酶(C8)、白氨酸芳胺酶、缬氨酸芳胺酶、胱氨酸芳胺酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶、 β -糖醛酸苷酶、 β -葡萄糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶; 不产生碱性磷酸盐酶、类脂酶(C14)、 α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、 β -糖醛酸苷酶、 α -甘露糖苷酶、 β -岩藻糖苷酶。

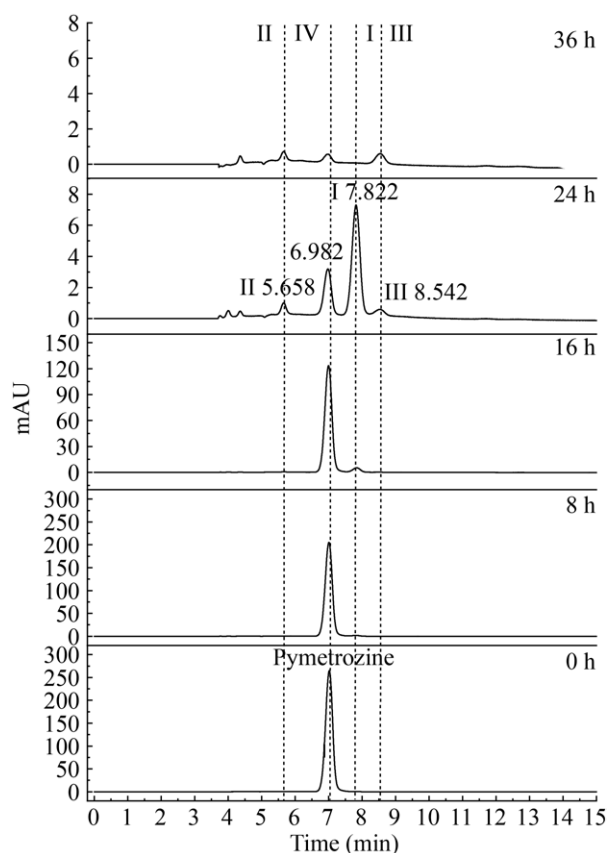


图2 菌株3BR11-2在液体培养基中降解吡蚜酮的高效液相色谱分析图

Figure 2 HPLC analysis of pymetrozine degradation by strain 3BR11-2.

菌株3BR11-2经16S rRNA基因测序,获得基因长度为1 403 bp的片段。通过GenBank BLAST搜索比对,发现菌株3BR11-2与简单类诺卡氏菌(*Nocardioides simplex*) KCTC 9106的亲缘关系最近为99.29%。基于菌株3BR11-2和其他类诺卡氏菌属菌株的16S rRNA基因序列的系统发育树结果表明,菌株3BR11-2首先与*Nocardioides simplex* KCTC 9106聚为一支,然后与食芳香族物类诺卡氏菌(*Nocardioides aromaticivorans*) H-1、人参土类诺卡氏菌(*Nocardioides ginsengisoli*) Gsoil 1124等菌株依次聚成簇。结合菌株形态学、生理生化和16S rRNA基因序列等特征,将菌株3BR11-2归类为类诺卡氏菌属(图3),此前该属尚无降解吡蚜酮

菌株的报道。

2.3 菌株3BR11-2降解吡蚜酮中间代谢产物分析

为深入了解菌株3BR11-2对吡蚜酮的降解途径,采用液相色谱-四极杆飞行时间高分辨率质谱仪检测菌株3BR11-2在含有50 mg/L吡蚜酮的MSM培养基中培养12、36、48 h的中间降解产物。吡蚜酮保留时间为5.831 min,对应质谱离子峰 m/z 218.103 41 $[M+H]^+$ ($C_{10}H_{12}N_5O$, m/z 218.104 16),误差为-3.44 ppm(图4A)。检测到3种中间降解产物,保留时间为1.367 min(化合物I)、2.753 min(化合物II)和2.584 min(化合物III)。质谱分析显示,化合物I的主要质子化分子离子峰为 m/z 110.059 8 $[M+H]^+$,与3-吡啶甲醇($C_6H_5NO^+$,理论值 m/z 110.060 04)相符,质量误差为-2.18 ppm(图4B)。化合物II的分子离子质量为 m/z 124.043 95 $[M+H]^+$,推测为烟酸($C_6H_5NO_2^+$,理论值 m/z 124.039 8),质量误差为33.46 ppm(图4C)。化合物III的分子离子质量为 m/z 140.03473 $[M+H]^+$,与6-羟基烟酸($C_6H_5NO_3^+$,理论值 m/z 140.034 743)匹配良好,质量误差仅为-0.092 ppm(图4D)。综合吡蚜酮的结构特征、高效液相色谱仪和质谱结果数据,推断化合物I为3-吡啶甲醇;化合物II为NA;化合物III为6HNA,其中化合物I没有文献报道。基于上述中间产物和相关文献[7,13],提出了菌株3BR11-2吡蚜酮生物降解的可能途径(图5)。

2.4 吡蚜酮降解基因pyzH的扩增、测序及分析结果

以菌株3BR11-2总DNA为模板扩增得到片段序列大小为846 bp。通过NCBI比对发现,该扩增片段与菌株*Hydrogenophaga* sp. BYT-2 (GenBank登录号MW690115.1)、*Pseudomonas* sp. BYT-1 (GenBank登录号CP072561.1)、*Pseudomonas* sp. BYT-5 (GenBank登录号CP097493.1)的吡蚜酮水解酶基因相似性为99.65%(表1)。通过基因pyzH核酸序列比对,菌株3BR11-2与*Hydrogenophaga* sp. BYT-2、*Pseudomonas* sp.

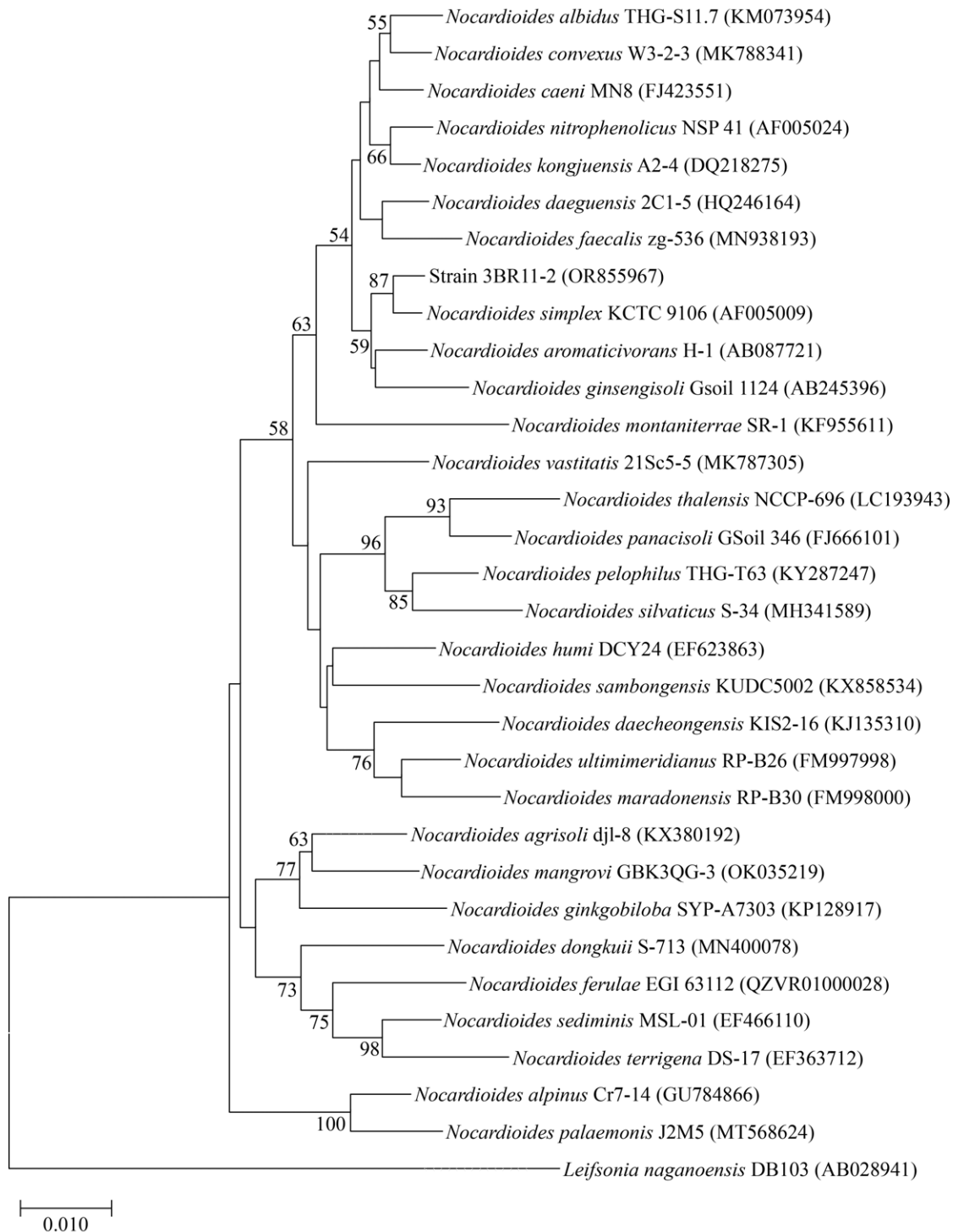


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株3BR11-2的系统发育树 分支上的数字表示 bootstrap 值 (1 000 次重复); 括号内序号为 GenBank 登录号; 标尺刻度 0.010 表示序列进化分支差异。

Figure 3 Phylogenetic tree of strain 3BR11-2 constructed based on 16S rRNA gene sequence. Bootstrap values (1 000 replicates) are indicated at the nodes; Accession numbers in the GenBank database are provided in parentheses; The scale bar represents 0.010 units of sequence divergence.

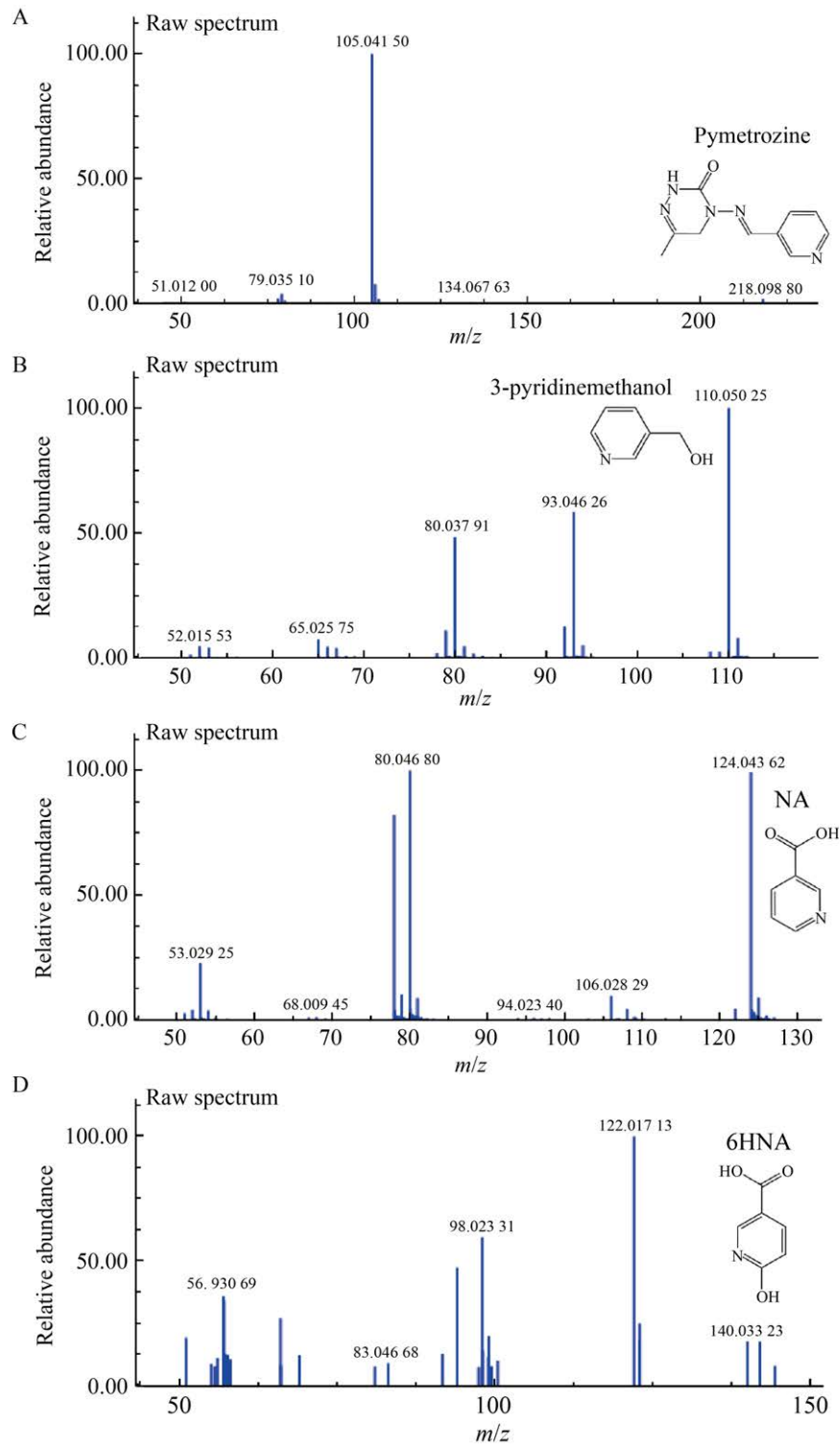


图4 菌株3BR11-2降解吡蚜酮过程中降解产物的二级质谱图 A: 吡蚜酮; B: 3-吡啶甲醇; C: 烟酸; D: 6-羟基烟酸。

Figure 4 MS/MS spectra of degradation products during pymetrozine degradation by strain 3BR11-2. A: Pymetrozine; B: 3-pyridinemethanol; C: Nicotinic acid (NA); D: 6-hydroxynicotinic acid (6HNA).

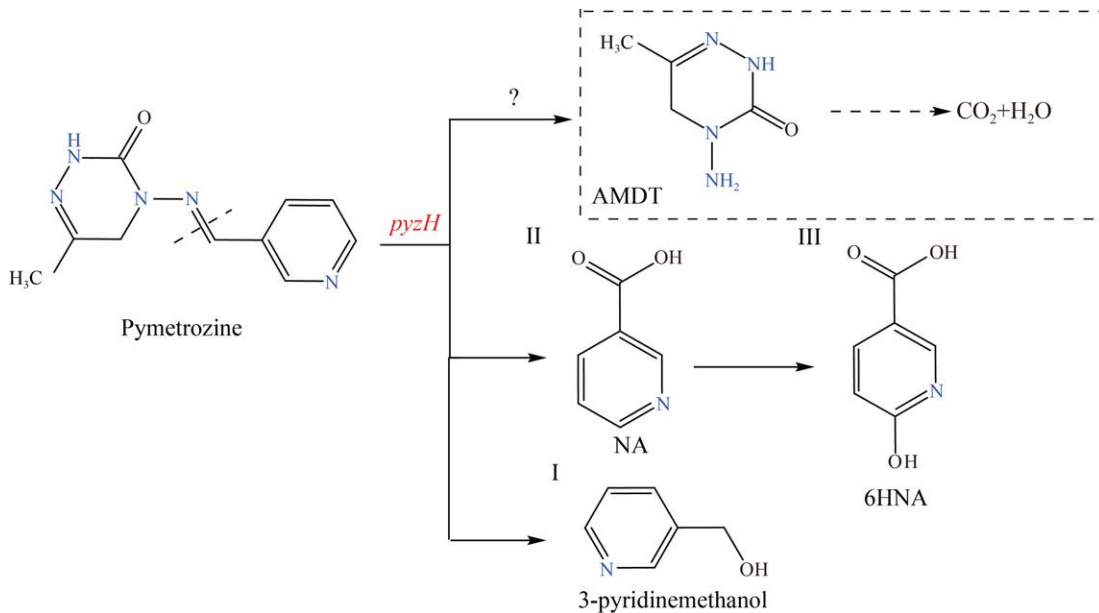


图 5 推测菌株 3BR11-2 降解吡蚜酮的潜在途径 AMDT: 4-氨基-6-甲基-4,5-二氢-2H-[1,2,4]三嗪-3-酮; NA: 烟酸; 6HNA: 6-羟基烟酸; *pyzH*: 吡蚜酮水解酶基因。

Figure 5 Speculating the degradation pathway of pymetrozine by strain 3BR11-2. AMDT: 4-amino-6-methyl-4,5-dihydro-2h-[1,2,4]triazin-3-one; NA: Nicotinic acid; 6HNA: 6-hydroxynicotinic acid; *pyzH*: Pymetrozine hydrolase gene.

表 1 吡蚜酮水解基因 *pyzH* 及其蛋白理化结构等性质

Table 1 The pymetrozine hydrolysis gene *pyzH* and its protein's physicochemical and structural properties

菌株 Strain	基因相似度 Gene identities (%)	等电点 Isoelectric point	亲疏水性均值 Grand average of hydropathicity	无规卷曲 Random coil (%)	延伸链 Extended strand (%)	登录号 Accession No.	参考文献 Reference
3BR11-2	No data	4.61	-0.273	69.75	32.03	No data	No data
<i>Pseudomonas</i> sp. BYT-1	99.65	4.61	-0.243	68.68	32.03	CP072561.1	[13]
<i>Pseudomonas</i> sp. BYT-5	99.65	4.61	-0.243	68.68	32.03	CP097493.1	[19]
<i>Pseudomonas</i> sp. BYT-4	99.53	4.61	-0.253	65.48	32.03	MW690117.1	[13]
<i>Hydrogenophaga</i> sp. BYT-2	99.65	4.61	-0.243	68.68	32.03	MW690115.1	[13]

BYT-1 等菌株携带的基因 *pyzH* 存在 3 个碱基的差异, 分别位于第 583 (G/T)、635 (G/C)、787 (G/A) 位; 与 *Pseudomonas* sp. BYT-4 存在 4 个碱基的差异, 分别位于第 583 (G/T)、635 (G/C)、787 (G/A)、491 (C/A) 位。

通过氨基酸序列分析比对, 菌株 3BR11-2

的 *pyzH* 基因表达的吡蚜酮水解酶在第 195 丙氨酸残基 A 和第 212 半胱氨酸 C 转变为丝氨酸残基 S, 第 263 丙氨酸残基 A 转变为苏氨酸残基 T。各菌株表达的该酶均属于亲水性、酸性蛋白, 而菌株 3BR11-2 表达的该酶亲水性有所增强 (-0.273/-0.243), 无规卷曲占比增加, 延伸链占

比无变化(表 1)。

3 讨论

3.1 新疆盐碱棉田土壤中有多多样性极高的吡蚜酮降解相关菌株

新疆地区气候干燥,土壤盐碱化较为严重,这样的环境虽然被认为孕育有特殊的微生物类群,但多样性一般相对较低^[25-26]。本研究从新疆长期连作棉田土壤中,通过富集培养获得了吡蚜酮高效降解菌群。从中分离出的 10 余株菌株显示具备降解吡蚜酮的能力,但更多分离株并未检测到相关降解活性,在菌群中这些菌株以吡蚜酮为唯一碳源共同生长,表明它们极大可能共同参与吡蚜酮的转化。再考虑到培养基类型和培养条件的限制,富集过程中必然把原位土壤中部分具有降解功能的菌株丢失,因此推断新疆棉田土壤中应该有分类多样性更高的吡蚜酮降解菌株存在。目前,已报道的吡蚜酮降解菌仅隶属于 *Pseudomonas* 5 株、*Hydrogenophaga* 1 株、*Achromobacter* 1 株、*Klebsiella* 2 株和 *Sphingobacterium* 1 株^[13-18]。本研究分离得到的菌株 3BR11-2 属于类诺卡氏菌属(*Nocardioide*s),该属首次发现具有降解吡蚜酮能力,并且与 *Pseudomonas* sp. BYT-1 等菌株降解适宜 pH 值为 7.0 有所不同,菌株 3BR11-2 高效降解吡蚜酮的适宜 pH 值为 8.0。*Pseudomonas* sp. BYT-5 在 pH 8.0 的条件下吡蚜酮降解率约 90%,而菌株 3BR11-2 在 pH 8.0 的条件下降解率可达 100%。此外,菌株 3BR11-2 在 pH 5.0-10.0、盐浓度 1%-7%均能生长。本研究所获菌株丰富了吡蚜酮高效降解菌资源,其较强的盐碱环境适应能力具有更好地适用于盐碱土壤环境中吡蚜酮的原位修复。

3.2 吡蚜酮的完全矿化需要菌株间的协作

目前报道的高效降解菌的能力往往是基于对初始底物转化率基础上计算的,但单一菌株降解农药后的中间产物也有可能对环境带来危

害,比如吡蚜酮代谢中间产物 AMDT。在本研究富集到的吡蚜酮高效降解菌群中始终未检测到 AMDT,说明菌群中有菌株可以将 AMDT 降解。通过 UHPLC-Q-TOF/MS 检测,菌株 3BR11-2 降解吡蚜酮过程中仅检测到 3-吡啶甲醇、NA 和 6HNA 这 3 种降解产物,与之前报道的吡蚜酮降解菌积累毒性极强的产物 AMDT 不同^[13]。这就提示研究者:(1) 单一高效降解菌是很好的研究降解途径和降解基因的研究材料,但污染环境的生物修复应着重考虑不产生新的有毒有害物质的菌株;(2) 构建能形成完整降解途径的复合菌系,将有毒有害物质完全矿化。后续研究将会基于此提示,从吡蚜酮高效降解菌群中分离能降解 AMDT 的菌株,研究其降解产物、途径和降解基因,并构建降解菌系应用于环境修复。

3.3 获取的基因 *pyzH* 更适宜于碱性条件下水解吡蚜酮

本研究对菌株 3BR11-2 的吡蚜酮水解酶基因 *pyzH* 进行 PCR 扩增获得了该基因的序列信息,分析发现与 *Hydrogenophaga* sp. BYT-2、*Pseudomonas* sp. BYT-1 等菌株携带的基因 *pyzH* 具有 99.65%的相似性,存在 3-4 个碱基的差异。进一步分析转录出的吡蚜酮水解酶有 3 个氨基酸残基发生转变,都是非极性、疏水性的丙氨酸转变为极性、中性的苏氨酸或丝氨酸,通常这种替换会提高酶在偏碱性条件下的稳定性或活性,预测结果与分离株所在的环境相一致,但该菌株所表达的吡蚜酮水解酶活性与具体性质仍需通过实验予以验证^[27]。研究还发现,与 *Pseudomonas* sp. BYT-1 等菌株一样,该基因位于菌株携带的质粒上,但菌株 3BR11-2 携带的质粒(313 770 bp)远远大于 *Pseudomonas* sp. BYT-1 等菌株携带的质粒(75 715 bp)。此外,在我们分离到的其他吡蚜酮降解菌株中都发现有同样大小的质粒,而这些降解菌都是从吡蚜酮长期胁迫富集到的同一菌群中分离到的,这就提示我们:环境中微生物群落会因污染物的

胁迫而自发通过基因水平转移的方式调整降解能力, 该推测有待深入研究。菌株 3BR11-2 与其他较多降解菌不同的是: 其降解能力比较稳定, 暗示着携带基因 *pyzH* 的质粒在菌株中能稳定性地存在, 其原因也有待深入研究。

4 结论

本研究从新疆长期连作的棉田土壤中富集到了可在 pH 8.0 条件下高效降解吡蚜酮的菌群, 从中分离出 10 余株具有降解吡蚜酮能力的菌株。其中分离株 3BR11-2 为首次发现可降解吡蚜酮且隶属于类诺卡氏菌属(*Nocardioide*s)的菌株。该菌株在 pH 8.0 的条件下, 在 36 h 可完全降解 50 mg/L 的吡蚜酮, 在降解吡蚜酮过程中产生了 3-吡啶甲醇(首次报道的降解产物)、NA 和 6HNA。此外, 在该菌基因组中发现了吡蚜酮降解酶基因 *pyzH*, 该基因与已报道序列有 3 个碱基差异, 并且携带该基因的质粒与已报道的质粒完全不同。

作者贡献声明

柴莉丽: 提出概念, 实验操作, 撰写论文; 贡莎莎: 方案设计, 技术支持; 米拉·木拉提: 数据整理与管理; 徐豪: 实验数据分析; 吴思雅: 实验结果可视化; 王欣然: 方案设计; 张伟: 项目管理, 监督指导, 获取基金, 审阅, 修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] GUO MT, WANG F, GUO W, TIAN R, PAN TT, LU P. Investigation of the adsorption of pymetrozine on the Au@AgNPs surface and its application in the rapid detection of pymetrozine residues in apple[J]. Food Chemistry: X, 2022, 16: 100487.
- [2] YU H, SUN HZ, WANG XR, LIANG YB, GUO MM, YU JW, YANG M, ZHANG XZ, LUO FJ, ZHOU L. Residue behavior and safety evaluation of pymetrozine in tea[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(10): 4118-4124.
- [3] LI HH, LUO XF, HARUNA SA, ZAREEF M, CHEN QS, DING Z, YAN YY. Au-Ag OHCs-based SERS sensor coupled with deep learning CNN algorithm to quantify thiram and pymetrozine in tea[J]. Food Chemistry, 2023, 428: 136798.
- [4] SAHA A, KURREY R, DEB MK. Resin bound gold nanocomposites assisted SE/ATR-FTIR spectroscopy for detection of pymetrozine insecticide in vegetable samples[J]. Heliyon, 2024, 10(18): e37856.
- [5] AHMAD M, GHAFAR A, HUSSAIN R, KHAN RU. Pymetrozine causes physical, haematological, blood biochemical and histopathological abnormalities in bighead carp (*aristichthys nobilis*)[J]. Pakistan Journal of Zoology, 2023, 55(4): 1575-1583.
- [6] TUDI M, ATABILA A, RUAN HD, WANG L, LYU J, TONG SM, YU QJ, SADLER R, PHUNG DT, CONNELL D. Natural dynamics and residues of pymetrozine for typical rice-growing areas of China[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022, 232: 113230.
- [7] Food and Agriculture Organization of the United Nations. JMPR Report No. 279. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues pymetrozine, 2014[R/OL]. [2025-05-12]. <https://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/Document/231>.
- [8] HAMSAN H, HO YB, ZAIDON SZ, HASHIM Z, SAARI N, KARAMI A. Occurrence of commonly used pesticides in personal air samples and their associated health risk among paddy farmers[J]. Science of The Total Environment, 2017, 603: 381-389.
- [9] 帕提玛·乌木尔汗, 丁瑞丰, 马德英, 赛米·吾斯曼. 八种常用杀虫剂对多异瓢虫不同虫态的安全性评价[J]. 农药学报, 2023, 25(6): 1295-1302.
- [10] 郑琦, 王海江, 吕新, 董天宇, 史晓艳, 刘悦. 新疆棉田土壤质量综合评价方法[J]. 应用生态学报, 2018, 29(4): 1291-1301.
- [11] WUMUERHAN Patima, DING RF, MA DY, WUSIMAN Saimi. Safety evaluation of eight commonly used insecticides on different stages of *Hippodamia variegata* (Goeze)[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2023, 25(6): 1295-1302 (in Chinese).
- [12] ZHENG Q, WANG HJ, LYU X, DONG TY, SHI XY, LIU Y. Comprehensive method for evaluating soil quality in cotton fields in Xinjiang, China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(4): 1291-1301 (in Chinese).
- [13] European Food Safety Authority. Pesticide risk assessment for the active substance pymetrozine in light of negligible exposure data submitted[J]. EFSA Journal, 2017, 15(1): e04678.
- [14] AHMAD HA, AHMAD S, CUI QJ, WANG ZB, WEI HW, CHEN X, NI SQ, ISMAIL S, AWAD HM, TAWFIK A. The environmental distribution and removal of emerging pollutants, highlighting the importance of using microbes as a potential degrader: a review[J]. Science of The Total Environment, 2022, 809: 151926.
- [15] ZHANG ML, REN YJ, DU SL, ZHOU YD, JIANG WK, KE ZJ, JIANG ML, QIU JG, HE J, HONG Q. A novel hydrolase PyzH catalyses the cleavage of C=N double bond for pymetrozine degradation in *Pseudomonas* sp. BYT-1[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(6): 3265-3273.
- [16] 牛东泽, 张晋, 任建军, 李春雨, 王珍珠, 呼和涛力, 郑亚斌, 王永江, 魏文亮. 一株吡蚜酮降解菌 RJJ-1 及其应用: CN112574910A[P]. 2021-03-30.

- NIU DZ, ZHANG J, REN JJ, LI CY, WANG ZZ, HUHETAOLI, ZHENG YB, WANG YJ, WEI WL. Pymetrozine degrading bacterium RJJ-1 and application thereof: CN112574910A[P]. 2021-03-30 (in Chinese).
- [15] 牛东泽, 张晋, 任建军, 孙如梦, 李春雨, 呼和涛力, 郑亚斌, 王永江, 魏文亮. 一株吡蚜酮降解菌 IUMR B53 及其应用: CN112592848A[P]. 2021-04-02.
- NIU DZ, ZHANG J, REN JJ, SUN RM, LI CY, HUHETAOLI, ZHENG YB, WANG YJ, WEI WL. Pymetrozine degrading bacterium IUMR B53 and application thereof: CN112592848A[P]. 2021-04-02 (in Chinese).
- [16] 任建军, 王珍珠, 张晋, 李春雨, 牛东泽, 王永江, 魏文亮, 赵建, 梁硕. 一株吡蚜酮降解菌 IURM F17 及其应用: CN112375718A[P]. 2021-02-19.
- REN JJ, WANG ZZ, ZHANG J, LI CY, NIU DZ, WANG YJ, WEI WL, ZHAO J, LIANG S. Pymetrozine degrading bacterium IURM F17 and application thereof: CN112375718A[P]. 2021-02-19 (in Chinese).
- [17] 任建军, 李春雨, 张晋, 孙如梦, 王珍珠, 牛东泽, 朱劼, 车瑞兵, 张光民, 梁硕. 一株吡蚜酮降解菌 IURM B56 及其应用: CN112501067A[P]. 2021-03-16.
- REN JJ, LI CY, ZHANG J, SUN RM, WANG ZZ, NIU DZ, ZHU J, CHE RB, ZHANG GM, LIANG S. Pymetrozine degrading bacterium IURM B56 and application thereof: CN112501067A[P]. 2021-03-16 (in Chinese).
- [18] 李春雨, 张晋, 任建军, 王珍珠. 一株吡蚜酮降解菌 IURM F18 及其应用: CN112592848B[P]. 2021-03-12.
- LI CY, ZHANG J, REN JJ, WANG ZZ. A pymetrozine degrading bacterium IURM F18 and application thereof: CN112592848B[P]. 2021-03-12 (in Chinese).
- [19] ZHANG ML, LIU YL, LI Q, ZHU Q, HU JQ, JIANG ML, YAN X, HONG Q, QIU JG. Unveiling the catabolic biodegradation of pymetrozine in *Pseudomonas guariconensis* strain BYT-5 through genomics studies[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2025, 198: 105991.
- [20] YANG ZW, LIAN ZH, LIU L, FANG BZ, LI WJ, JIAO JY. Cultivation strategies for prokaryotes from extreme environments[J]. iMeta, 2023, 2(3): e123.
- [21] AJAYI OO, ADEKANMBI A, FAGADE OE, DIANDA M. Modified Methods for quick and safe extraction of dna from common microbiological samples[J]. Journal of Microbiology and Pathology, 2022, 6: 158.
- [22] CHALITA M, KIM YO, PARK S, OH HS, CHO JH, MOON J, BAEK N, MOON C, LEE K, YANG J, NAM GG, JUNG Y, NA SI, BAILEY MJ, CHUN J. EzBioCloud: a genome-driven database and platform for microbiome identification and discovery[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2024, 74(6): 006421.
- [23] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [24] DUVAUD S, GABELLA C, LISACEK F, STOCKINGER H, IOANNIDIS V, DURINX C. Expasy, the Swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W216-W227.
- [25] HU GY, WU S, ZHOU XT, RUAN AD. Unveiling soil microbial community dynamics in desertification: a case study from the Tianshan mountains, Xinjiang[J]. Ecological Indicators, 2024, 166: 112342.
- [26] XIN XY, HE W, ZHOU JH, CHEN Y, HUANG X, YANG JY, XU JJ, SONG SQ. Diversity analysis of rhizosphere microorganisms in *Helichrysum arenarium* (L.) moench and screening of growth-promoting bacteria in Xinjiang, China[J]. Microbiology Research, 2025, 16(5): 89.
- [27] ZHOU N, CHEN JZ, HU MQ, WEN N, CAI WJ, LI P, ZHAO LD, MENG YP, ZHAO DD, YANG XT, LIU SY, HUANG FQ, ZHAO C, FENG XH, JIANG ZK, XIE EJ, PAN HX, CEN ZD, CHEN XH, LUO W, et al. SLC7A11 is an unconventional H⁺ transporter in lysosomes[J]. Cell, 2025, 188(13): 3441-3458.e25.