



## 研究报告

## 一株溴氰菊酯降解菌的分离鉴定及其降解条件优化

胡琼<sup>1</sup> 唐洁<sup>\*1</sup> 雷丹<sup>1</sup> 吴敏<sup>1</sup> 孙擎<sup>1</sup> 张庆<sup>2</sup><sup>1</sup> 西华大学食品与生物工程学院 四川 成都 610039<sup>2</sup> 西华大学食品与生物工程学院古法发酵生物技术研究室 四川 成都 610039

**摘要:**【背景】拟除虫菊酯类农药的降解已成为食品安全和环境卫生领域的研究热点,而生物降解被认为是一种绿色高效的解决方法。【目的】从长期受拟除虫菊酯类农药污染的草莓根系土壤分离一株溴氰菊酯(deltamethrin, DM)降解菌,并优化其培养基及降解条件,从而提高DM降解菌的降解效率。【方法】采用富集驯化、分离纯化法筛选DM降解菌,通过形态学和生理生化特征,以及16S rRNA基因序列分析进行鉴定。通过Plackett-Burman因素筛选试验、最陡爬坡试验和Box-Behnken试验优化菌株降解条件。【结果】筛选获得一株DM降解菌LH-1-1,96 h对DM(100 mg/L)的降解率为53.43%,经鉴定为琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*);通过优化后,在DM浓度75 mg/L、胰蛋白胍3 g/L、pH值6.8、硫酸铵1.5 g/L、氯化铁0.01 g/L、接种量为5%(体积比)、菌龄12 h、培养温度30℃条件下,菌株LH-1-1对DM降解率达82.36%,较未优化前提高了28.93%。【结论】*A. junii* LH-1-1具有较高的DM降解能力,该菌可为生物修复受DM或拟除虫菊酯类农药污染的环境提供优良的微生物资源。

**关键词:** 溴氰菊酯, Plackett-Burman 试验, Box-Behnken 试验, *Acinetobacter junii* LH-1-1

## Isolation, identification and optimization of degradation conditions of a deltamethrin degrading strain

HU Qiong<sup>1</sup> TANG Jie<sup>\*1</sup> LEI Dan<sup>1</sup> WU Min<sup>1</sup> SUN Qing<sup>1</sup> ZHANG Qing<sup>2</sup><sup>1</sup> School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China<sup>2</sup> Institute of Ancient Brewing, School of Food and Biotechnology, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China

**Abstract:** [Background] The degradation of pyrethroid pesticides is important for food safety and environmental health, and biodegradation is considered to be a green effective solution. [Objective] The strain with high ability to degrade deltamethrin (DM) was isolated from strawberry rhizosphere contaminated soil by pyrethroid pesticides for a long term, and the degradation rate of DM degrading strain was improved by optimizing the medium and degradation conditions. [Methods] DM degrading

**Foundation items:** Application Foundation Project of Sichuan Provincial Department of Science and Technology (2019YJ0389); Key Scientific Research Fund of Xihua University (z1310525); Graduate Student Innovation Fund of Xihua University (ycj2019122)

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

**Received:** 01-08-2019; **Accepted:** 02-11-2019; **Published online:** 22-11-2019

**基金项目:** 四川省科技厅自然科学基金应用基础项目(2019YJ0389); 西华大学人才培养重点项目(z1310525); 西华大学研究生创新基金(ycj2019122)

**\*通信作者:** Tel: 028-87720552; E-mail: tangjie1225@mail.xhu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-08-01; **接受日期:** 2019-11-02; **网络首发日期:** 2019-11-22

strain was screened by enrichment domestication, isolation, purification and identified by morphological, physio-biochemical, 16S rRNA sequence analysis. The degradation conditions were optimized by Plackett-Burman design, steepest ascent path design and Box-Behnken design. **[Results]** Strain LH-1-1 was identified as *Acinetobacter junii*, it could degrade 53.43% DM (100 mg/L) within 96 h in initial conditions. The optimized conditions were DM concentration 75 mg/L, tryptone 3 g/L, pH 6.8,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 g/L,  $\text{FeCl}_3$  0.01 g/L, inoculation biomass 5%, strain age 12 h, culture temperature 30 °C. The degradation rate of DM under these conditions reached 82.36% within 96 h, which was 28.93% higher than initial conditions. **[Conclusion]** *A. junii* LH-1-1, a highly efficient DM degrading strain, can be used as excellent microbial resources for bioremediation of environment polluted by DM or pyrethroid pesticides.

**Keywords:** Deltamethrin, Plackett-Burman design, Box-Behnken design, *Acinetobacter junii* LH-1-1

拟除虫菊酯类农药(pyrethroid pesticides)是从天然除虫菊花中提取杀虫化合物除虫菊素人工合成的一类仿生型杀虫剂<sup>[1]</sup>,具有光稳定、高效、低毒等特点,已广泛使用一百多年<sup>[2]</sup>。溴氰菊酯(deltamethrin, DM)是含有 $\alpha$ -氰基的II型拟除虫菊酯类农药(结构式如图1所示),具有高效杀虫活性,自1974年合成以来广泛应用于果蔬、谷物、茶叶等作物以防治蚊虫、蟑螂、寄生虫等<sup>[3]</sup>。然而随着其应用范围和数量的增加,DM在农业和环境中的累积毒性逐渐引起关注。已有研究表明,DM的暴露会引起非目标生物的代谢紊乱、血液学扰动、免疫毒性、遗传毒性和神经毒性等<sup>[4]</sup>。因此,寻找一种高效消除农产品及环境中DM残留的方法至关重要。

微生物降解因其条件温和、无二次污染和优异的代谢活性成为农药残留物消除的主流技术<sup>[4]</sup>。目前国内外报道的DM降解菌主要有从活性淤泥中分离出的金黄色链霉菌(*Streptomyces aureus*)<sup>[5]</sup>,从农药厂排污口分离出的赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus* sp.)<sup>[4]</sup>,从土壤中分离出的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)<sup>[6]</sup>、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)<sup>[7]</sup>、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)<sup>[8]</sup>、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)<sup>[8]</sup>、多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)<sup>[9]</sup>等,但它们的降解率各不相同。随着菌种保藏时间的延长,其本身的优良遗传特性可能得以延续,也有可能发生退化变

异,因此需要不断筛选补充新的优良降解菌株以保证食品安全和环境卫生<sup>[10]</sup>。不同的降解菌株都有其自身不同的生物特性及代谢活性,在不同程度上受到温度、pH、初始底物浓度、营养物质、接种量、湿度、金属离子、有机质含量、溶氧量等外界条件的影响<sup>[1]</sup>。为了进一步研究菌株对底物的代谢通路、生物修复潜力,以及将菌株更好地应用到实际环境中,对其降解条件的优化必不可少。而采用Plackett-Burman因素筛选结合Box-Behnken响应曲面分析法能够用较少的实验数据推算出目标值的优化条件,因此是一种有效优化工艺参数和实验条件的统计学方法<sup>[11]</sup>。

本研究从长期施用拟除虫菊酯类农药的草莓根系土壤中分离驯化得到一株有效DM降解菌,通过形态学和生理生化特征,以及16S rRNA基因序列分析进行鉴定,并通过Plackett-Burman因素筛选试验、最陡爬坡试验和Box-Behnken试验优化了该菌株的DM降解条件,以期生物修复受DM或拟除虫菊酯类农药污染的环境提供优良的微生物资源。

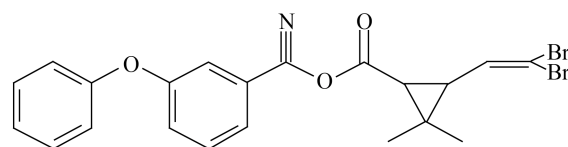


图1 DM化学结构式

Figure 1 Molecular structure formula of deltamethrin

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

分离 DM 降解菌的土样采自四川金堂地区长期受拟除虫菊酯类农药污染的草莓根系土壤(10–20 cm)。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

溴氰菊酯(deltamethrin, DM), 南京荣诚化工有限公司; 乙腈(色谱纯), Adamas-beta 公司; Bacteria DNA 提取试剂盒、多重 PCR 扩增试剂盒, 天根生化科技有限公司。高效液相色谱仪、光电二极管阵列检测器, Waters 公司; 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

#### 1.1.3 培养基

基础盐培养基(mineral salt medium, MSM)<sup>[3]</sup>和 LB 富集培养基<sup>[12]</sup>中均按需要添加 DM,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min。固体培养基: 上述培养基添加 2% (质量体积比) 琼脂粉,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

### 1.2 DM 检测及其标准曲线方程的建立

样品前处理: 取降解体系 1 mL 加入等体积乙腈, 超声波(40 kHz, 100 W)辅助提取 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.45  $\mu$ m 有机滤膜<sup>[13]</sup>。

检测方法: 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC), ZORBAX eclipse plus C18 柱(4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m), 乙腈:超纯水(90:10, 体积比), 检测波长为 230 nm, 柱温 35  $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, DM 出现 2 个峰, 保留时间为 3.447、3.833 min。配制 DM 标准溶液(100 mg/L), 依次进样 1、2、4、6、8、10  $\mu$ L 进行标准曲线绘制, DM 质量-峰面积之和的标准曲线为  $Y_{DM}=(1 \times 10^6)X-1\,210$ ,  $R^2=0.999$ 。

### 1.3 DM 降解菌的筛选与鉴定

DM 降解菌的富集驯化、筛选纯化参考文献<sup>[12]</sup>进行: (1) 取 1 g 土样分别加入含 50 mg/L DM 的 MSM 和 LB 液体培养基中, 于 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 96 h 后, 按 5% (体积比) 的接种比例将培养液转接到含 100 mg/L DM 的 MSM 和 LB 培养基

中再培养 96 h; 重复上述操作 10 次并逐次提高培养基中 DM 浓度, 使最终浓度达到 2 000 mg/L。(2) 完成驯化后, 取末级培养液稀释涂布于含 100 mg/L DM 的 LB 平板上, 于 30  $^{\circ}$ C 培养 48 h, 挑取单菌落连续划线纯化直至得到菌落形态一致、长势较快的菌株, 将得到的菌株进行编号, 用 60% 的甘油于 -50  $^{\circ}$ C 冷冻保存。(3) 将纯化后的菌株活化转接到含 DM (100 mg/L) 的 MSM 培养基中, 空白对照不接菌而接等量无菌水, 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 96 h 后, 取样测定 DM 残留量并计算降解率: 降解率(%) =  $(1 - C/C_0) \times 100$ , 其中  $C$  为降解体系中 DM 含量(mg/L),  $C_0$  为空白对照中 DM 含量(mg/L)。

降解菌的形态学观察、生理生化实验、总 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增及 PCR 产物序列测定参照文献<sup>[3,12]</sup>进行。16S rRNA 基因 PCR 扩增引物为 Eu27F (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 反应体系: Eu27F、1492R 引物(20 mmol/L)各 0.5  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR Mix 12.5  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 50  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 循环 30 次; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

### 1.4 单因素试验

以 MSM 液体培养基为基础, 改变(添加)不同培养基成分及培养条件, 研究降解菌对 DM 降解的最适培养基成分和最佳培养条件。

培养基成分筛选通过替换 MSM 培养基中 1.5 g/L<sup>[3]</sup>无机氮源为: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl, 其他组分保持不变; 在最适无机氮源基础上添加 0.05 g/L<sup>[14]</sup>金属离子 MnSO<sub>4</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、FeCl<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>, 其他组分保持不变; 在最适无机氮源和金属离子基础上, 添加 1 g/L<sup>[5]</sup>营养物质: 可溶性淀粉、蔗糖、葡萄糖、酵母浸粉、胰蛋白胨, 其他组分保持不变, 以确定最适培养成分。

培养条件优化通过 8 个独立变量: 无机氮源浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L)<sup>[12]</sup>; 金属离子浓度(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 g/L)<sup>[14]</sup>; 营养物质浓度(1、2、3、4、5 g/L)<sup>[5]</sup>; 培养温度(25、30、34、

37、40 °C); 初始 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0); 底物浓度(25、50、100、200、300 mg/L); 接种量(3%、4%、5%、6%、7%); 菌龄(8、16、24、32、40 h), 以确定最佳培养条件。以不接菌而接等量无菌水为空白对照组, 每组实验重复 3 次。

### 1.5 Plackett-Burman 因素筛选试验

应用 Plackett-Burman 实验设计原理在单因素试验基础上筛选主要影响菌株降解 DM 的重要参数。8 个可能影响菌株降解能力的独立变量在单因素实验基础上选取低水平(-1)和高水平(+1)进行评估<sup>[15]</sup>, 以 96 h 测定的菌株降解率为响应值筛选影响菌株降解 DM 的显著因子。

### 1.6 显著因素最陡爬坡试验

依据 Plackett-Burman 试验得到各因子的显著性排序和一次拟合方程设计最陡爬坡步长和方向, 快速逼近响应最佳值<sup>[15]</sup>。

### 1.7 Box-Behnken 响应面试验

根据 1.6 的试验结果, 采用 Box-Behnken 实验设计 3 因素 3 水平的响应曲面试验, 以 96 h 测定的菌株降解率为响应值, 以不接菌而接等量无菌水为空白对照组, 每组实验重复 3 次。利用 Design-Expert 8.0.6 对试验数据进行统计分析, 从而确定菌株降解 DM 的最佳降解条件。

### 1.8 数据分析

每组实验均重复 3 次, 数据用均数±标准差( $\bar{X} \pm SD$ )表示, 实验结果采用 Origin 8.0、SPSS 22 统计软件进行分析, 菌株系统发育树采用 MEGA 7.0 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DM 降解菌的筛选鉴定

经富集驯化分离纯化, 获得 13 株可耐受 DM (2 000 mg/L) 的菌株, 9 株具备有效 DM 降解能力, 其中一株在以 DM 为唯一碳源的 MSM 培养基中生长 96 h 对 100 mg/L 的底物降解率为 53.43%, 经方差分析与其他几株存在显著性差异(图 2), 命名为 LH-1-1 并用于后续研究。菌株 LH-1-1 在 MSM 平板中呈圆形、白色、表面光滑、中央凸起的菌落。菌体(图 3)呈长杆状, 单个排列, 两端平滑, 大小

为(1.2–4.3)  $\mu\text{m} \times (0.3–0.6) \mu\text{m}$ 。革兰氏镜检、葡萄糖发酵、甲基红、硫化氢实验均呈阴性; 蔗糖发酵、乳糖发酵、过氧化氢、吲哚实验、明胶水解和 V-P 反应均呈阳性。将菌株 LH-1-1 的 16S rRNA 基因扩增产物回收测序获得 1 396 bp 的序列, 提交至 GenBank (登录号 MK053916) 进行同源性分析, 发现菌株 LH-1-1 与 *Acinetobacter junii* JLT155 (登录号 KX989239)、*A. junii* ZJG-12 (登录号 MF101155)、*Acinetobacter* sp. LAM1007 (登录号 KT957431) 的相似性>99%, 可以推测菌株 LH-1-1 为不动杆菌属细菌(*Acinetobacter* sp.)。为进一步确定菌株 LH-1-1 的分类学地位, 利用 MEGA 7.0 软件及其 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 4), 发现菌株 LH-1-1

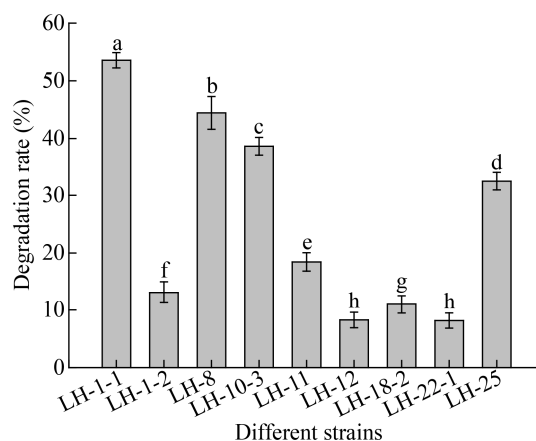


图 2 不同菌株对 DM 的降解率

Figure 2 Degradation rate of DM by different strains

注: 不同的字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Note: Different letters indicate significant difference,  $P < 0.05$ .

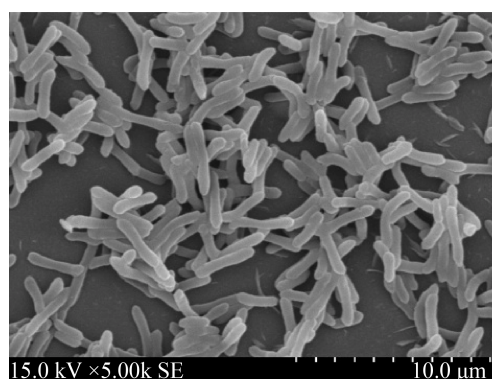


图 3 菌株 LH-1-1 扫描电镜形态

Figure 3 Scanning electron microscopic morphology of strain LH-1-1

与 *A. junii* ATCC 17908 (登录号 NR117623)、*A. junii* ACI289 (登录号 AM410705)、*A. junii* (登录号 EU821339)均处于同一分支, 进一步证实了菌株 LH-1-1 为琼氏不动杆菌(登录号 MK053916)。综合形态学、生理生化特征、16S rRNA 基因序列和系统发育分析, 可以确定菌株 LH-1-1 为琼氏不动杆

菌(*A. junii*)。

2.2 单因素试验结果

单因素试验结果显示不同培养基成分及培养条件对 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 均有着不同程度的影响。由图 5 可知, *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的最适培养基为: 无机氮源选择(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 额外金属

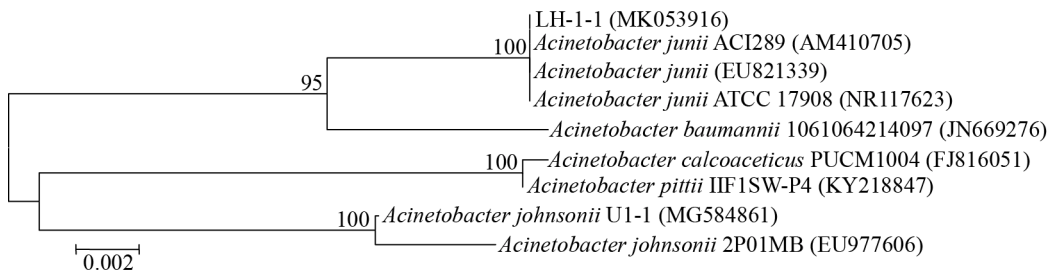


图 4 菌株 LH-1-1 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

Figure 4 Phylogenetic tree of strain LH-1-1 based on 16S rRNA gene sequence

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 分支的长度代表进化距离, 系数为 0.002.

Note: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.002.

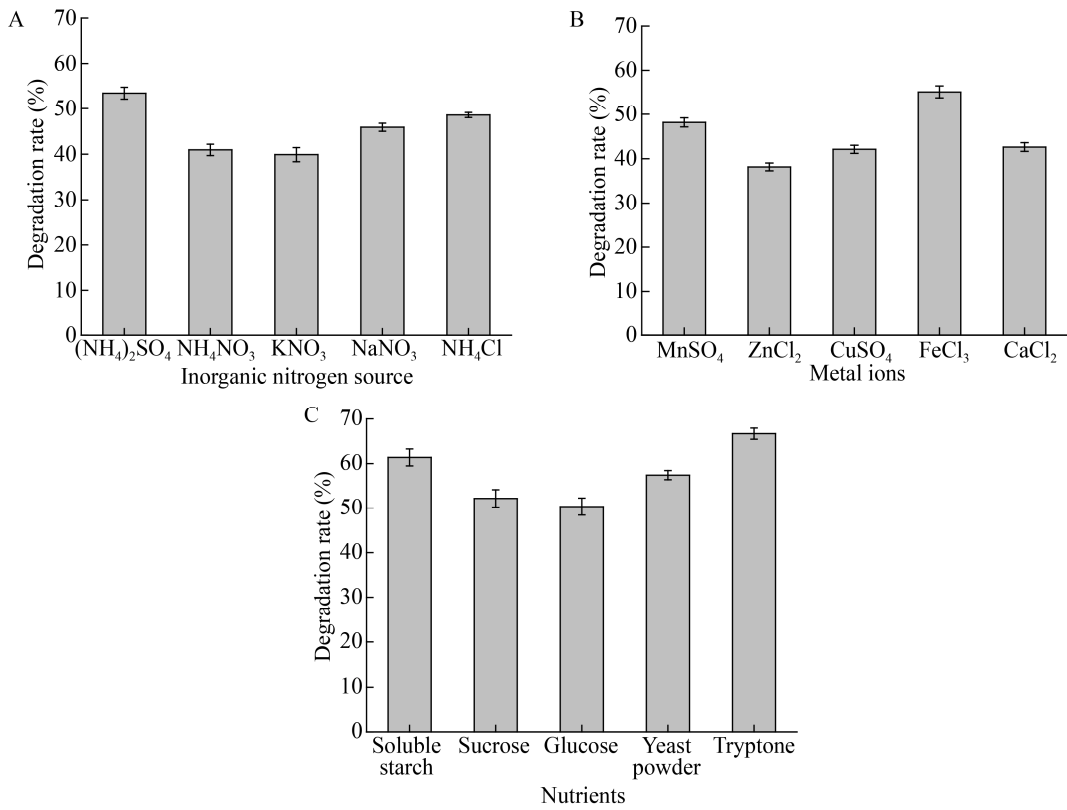


图 5 不同培养基成分对 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的影响

Figure 5 Effects of different medium composition on degradation of DM by *A. junii* LH-1-1

注: A: 无机氮源; B: 金属离子; C: 营养物质.

Note: A: Inorganic nitrogen source; B: Metal ions; C: Nutrients.



离子选择  $\text{FeCl}_3$ ；营养物质选择胰蛋白胨。最佳培养条件在低水平(-1)和高水平(+1)选择无机氮源 1.5–2.5 g/L；额外金属离子 0.01–0.03 g/L；营养物质 1–3 g/L；培养温度 25–34 °C；初始 pH 6.0–8.0；底物浓度 50–150 mg/L；接种量 4%–6%；菌龄 12–24 h。

### 2.3 Plackett-Burman 试验显著因素筛选结果

8 个可能影响 *A. junii* LH-1-1 降解能力的因素试验设计与结果如表 1 所示，以降解率为指标进行考察，得到一次拟合方程： $Y=55.25-5.13A-0.70B+1.51C+3.20D-1.79E-1.24F-1.53G+0.00H$ ，各因素显著性排序如图 6 所示。由  $P$  值可以看出，DM 浓度是 8 个因素中的极显著因素( $P<0.01$ )且对 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 表现出负相关性；营养物质和 pH 是影响 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的显著因素( $P<0.05$ )，营养物质表现出正相关性，而 pH 表现出负相关性。因此固定氮源 1.5 g/L、金属离子 0.03 g/L、培养温度 30 °C、接种量 5% (体积比)、菌龄 12 h，设计显著因素的爬坡方向和步长，完成最陡爬坡实验。

### 2.4 最陡爬坡试验结果

在 Plackett-Burman 试验的基础上，选取 DM 浓度、胰蛋白胨含量、pH 值进行最陡爬坡试验，试验设计与结果见表 2。DM 降解率先增加后减少，在第 3 组达到最高，因此选择第 3 组试验水平作为响应面优化试验中心点。

### 2.5 Box-Behnken 响应面试验结果

根据 2.4 的实验结果，选取 DM 浓度、胰蛋白

胨含量、pH 值为自变量；以底物浓度 100 mg/L、胰蛋白胨 3 g/L、pH 7.0 为响应面设计中心点，设计响应面优化实验，得到表 3 中的试验方案与结果。采用 Design Expert 8.0.6 对试验数据进行回归

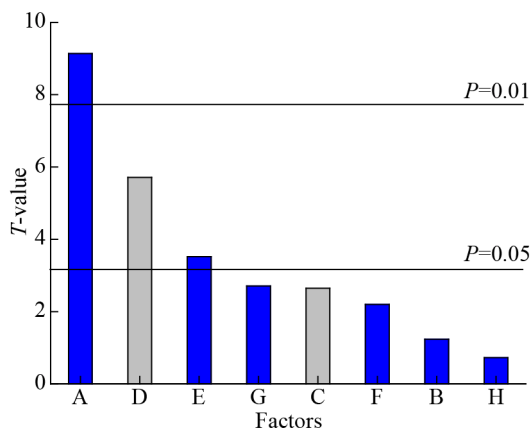


图 6 Plackett-Burman 试验因素显著性排序

Figure 6 Significance ranking of factors tested in Plackett-Burman design

注：■：负相关；□：正相关。

Note: ■: Negative effects; □: Positive effects.

表 2 最陡爬坡试验设计与结果

Table 2 Steepest ascent design with experimental results

Run	A: DM (mg/L)	D: Tryptone (g/L)	E: pH	Degradation rate (%)
1	150	1	8.0	59.58
2	125	2	7.5	65.27
3	100	3	7.0	74.60
4	75	4	6.5	71.67
5	50	5	6.0	65.21

表 1 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 1 Plackett-Burman design with experimental results

Run	A: DM (mg/L)	B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	C: $\text{FeCl}_3$ (g/L)	D: Tryptone (g/L)	E: pH	F: Temperature (°C)	G: Inoculation biomass (V/V)	H: Strain age (h)	Degradation rate (%)
1	-1 (50)	-1 (1.5)	1 (0.03)	-1 (1)	1 (8)	1 (34)	-1 (4)	1 (24)	61.12
2	-1 (50)	1 (2.5)	1 (0.03)	1 (3)	-1 (6)	-1 (25)	-1 (4)	1 (24)	74.86
3	1 (150)	1 (2.5)	-1 (0.01)	1 (3)	1 (8)	1 (34)	-1 (4)	-1 (12)	53.58
4	1 (150)	-1 (1.5)	1 (0.03)	1 (3)	-1 (6)	1 (34)	1 (6)	1 (24)	59.76
5	-1 (50)	-1 (1.5)	-1 (0.01)	1 (3)	-1 (6)	1 (34)	1 (6)	-1 (12)	66.95
6	-1 (50)	1 (2.5)	-1 (0.01)	1 (3)	1 (8)	-1 (25)	1 (6)	1 (24)	63.36
7	1 (150)	1 (2.5)	-1 (0.01)	-1 (1)	-1 (6)	1 (34)	-1 (4)	1 (24)	52.81
8	-1 (50)	-1 (1.5)	-1 (0.01)	-1 (1)	-1 (6)	-1 (25)	-1 (4)	-1 (12)	66.14
9	1 (150)	-1 (1.5)	-1 (0.01)	-1 (1)	1 (8)	-1 (25)	1 (6)	1 (24)	49.57
10	1 (150)	1 (2.5)	1 (0.03)	-1 (1)	-1 (6)	-1 (25)	1 (6)	-1 (12)	52.81
11	-1 (50)	1 (2.5)	1 (0.03)	-1 (1)	1 (8)	1 (34)	1 (6)	-1 (12)	59.83
12	1 (150)	-1 (1.5)	1 (0.03)	1 (3)	1 (8)	-1 (25)	-1 (4)	-1 (12)	62.17

表 3 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3 Results of Box-Behnken experiment design

Run	$X_1$ : DM (mg/L)	$X_2$ : Tryptone (g/L)	$X_3$ : pH	Degradation rate (%)
1	1 (125)	-1 (2)	0 (7.0)	70.91
2	-1 (75)	0 (3)	1 (7.5)	79.23
3	0 (100)	0 (3)	0 (7.0)	78.22
4	0 (100)	-1 (2)	-1 (6.5)	75.36
5	1 (125)	1 (4)	0 (7.0)	72.98
6	0 (100)	0 (3)	0 (7.0)	79.77
7	-1 (75)	1 (4)	0 (7.0)	80.14
8	0 (100)	0 (3)	0 (7.0)	79.86
9	0 (100)	0 (3)	0 (7.0)	78.92
10	0 (100)	1 (4)	-1 (6.5)	75.69
11	-1 (75)	-1 (2)	0 (7.0)	80.39
12	1 (125)	0 (3)	-1 (6.5)	69.82
13	0 (100)	-1 (2)	1 (7.5)	73.54
14	-1 (75)	0 (3)	-1 (6.5)	82.76
15	0 (100)	1 (4)	1 (7.5)	73.90
16	0 (100)	0 (3)	0 (7.0)	79.98
17	1 (125)	0 (3)	1 (7.5)	70.71

分析, 3 个因素经回归拟合得到以降解率为目标函数的二次回归方程:  $Y=79.35-4.76X_1+0.31X_2-0.78X_3+0.58X_1X_2+1.11X_1X_3+0.007\ 5X_2X_3-1.12X_1^2-2.13X_2^2-2.60X_3^2$

对模型进行显著性和方差分析, 结果见表 4。回归方程的决定系数  $R^2=0.978\ 7$ ,  $R^2_{Adj}=0.951\ 3$ ,

整体模型的  $P<0.000\ 1$ , 达到极显著水平, 说明该模型显著回归, 方程能够正确反映 DM 降解率与各因素之间的关系; 模型的失拟项  $P>0.05$ , 差异不显著, 表明该回归模型与实际试验拟合较好, 模型有效, 适用于菌株 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 条件的分析和预测。

利用 Design Expert 8.0.6 软件绘制各因素交互作用响应曲面图(图 7)。图 7A、B 曲面陡峭, 说明底物浓度对 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的影响最为显著。对回归模型方程求导, 得到最高降解率为 83.34%, 此时对应变量的最佳值为: DM 浓度 75.0 mg/L、胰蛋白胨 2.9 g/L、pH 值为 6.82。

2.6 响应面模型验证和优化

进一步对模型预测值进行验证, 并将预测条件优化为: DM 浓度 75.0 mg/L、胰蛋白胨 3 g/L、pH 6.8、氮源 1.5 g/L、金属离子 0.01 g/L、培养温度 30 °C、接种量 5% (体积比)、菌龄 12 h。在此优化条件下得到 DM 随时间变化的色谱图如图 8A 所示, *A. junii* LH-1-1 生长量( $OD_{600}$ )与 DM 降解的关系如图 8B 所示, 随着菌株的生长, 外加碳源和适量 DM 被利用于菌株的初始繁殖和生长。在生长

表 4 响应面设计回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis for the fitted regression equation

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	<i>F</i> -value	<i>P</i> -value	Significance
Model	251.55	9	27.95	35.73	<0.000 1	**
$X_1$	181.45	1	181.45	231.93	<0.000 1	**
$X_2$	0.79	1	0.79	1.01	0.349 1	
$X_3$	4.88	1	4.88	6.24	0.041 1	*
$X_1X_2$	1.35	1	1.35	1.72	0.231 1	
$X_1X_3$	4.88	1	4.88	6.24	0.041 1	*
$X_2X_3$	2.250E-004	1	2.250E-004	2.876E-004	0.986 9	
$X_1^2$	5.27	1	5.27	6.74	0.035 7	*
$X_2^2$	19.04	1	19.04	24.33	0.001 7	**
$X_3^2$	28.49	1	28.49	36.42	0.000 5	**
Residual	5.48	7	0.78			
Lack of fit	3.18	3	1.06	1.58	0.278 9	
Pure error	2.30	4	0.57			
Cor total	257.03	16				

注: \*: 差异显著( $P<0.05$ ); \*\*: 差异极显著( $P<0.01$ ).  
Note: \*: Significant value ( $P<0.05$ ); \*\*: Extremely significant value ( $P<0.01$ ).

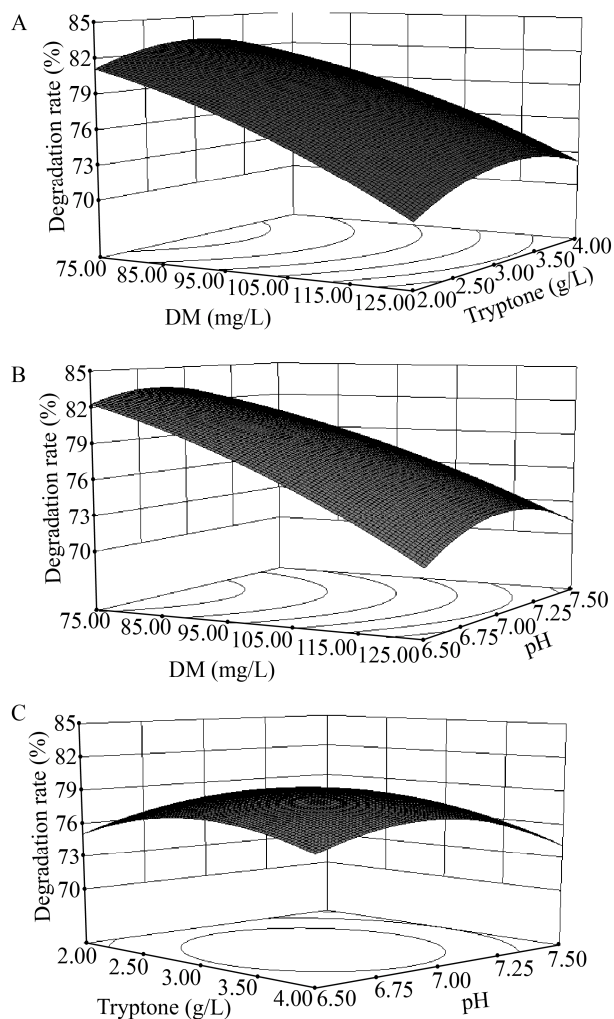


图 7 培养条件交互作用对 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的响应面图

**Figure 7 Response surface for the interaction effects of culture conditions on the DM degradation rate of *A. junii* LH-1-1**

注: A: DM 浓度和胰蛋白胨含量; B: DM 浓度和 pH 值; C: 胰蛋白胨和 pH 值.

Note: A: DM concentration and tryptone concentration; B: DM concentration and pH value; C: Tryptone concentration and pH value.

对数期(12–72 h), 菌体大量繁殖, DM 降解效率最快; 在生长稳定期, 菌株对 DM 的利用明显减弱, 在 96 h 达到 82.36%, 这与预测值(83.34%)基本一致, 表明响应面模型可靠。与优化前相比, DM 降解率提高了 28.93%, 表明降解条件优化方案设计合理有效。

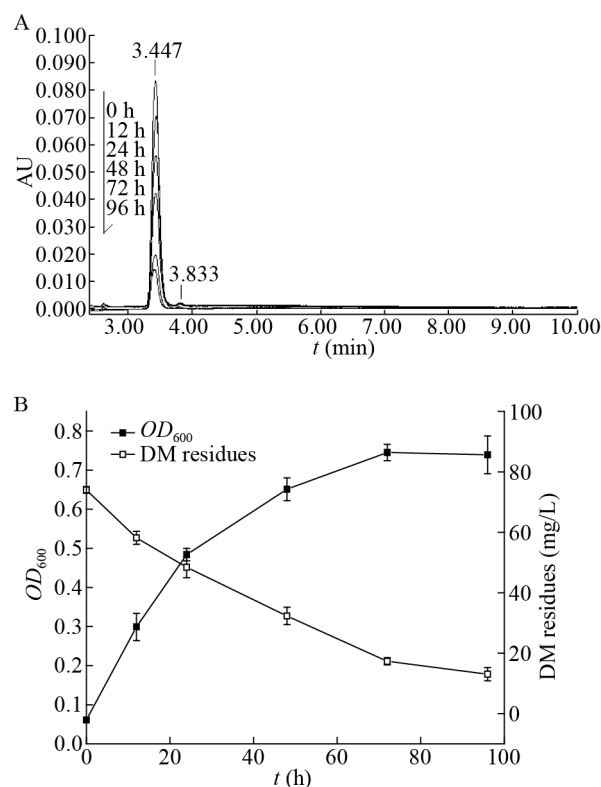


图 8 *A. junii* LH-1-1 生长降解特性

**Figure 8 The growth and degradation characteristics**

注: A: DM 随时间变化的色谱图; B: *A. junii* LH-1-1 生长量 ( $OD_{600}$ )与 DM 降解的关系。

Note: A: Chromatogram of DM degrading with time; B: The relationship between *A. junii* LH-1-1 growth ( $OD_{600}$ ) and DM degradation.

### 3 讨论与结论

DM 是拟除虫菊酯类农药中使用最广泛的一种, 主要用于室内害虫防治和农业生产<sup>[16]</sup>, 其长期使用易蓄积, 对非靶标生物造成免疫毒性、神经毒性和生殖毒性<sup>[17]</sup>。而生物降解法被认为是一种可有效去除农药的“绿色”解决方法<sup>[18]</sup>。本课题组从长期施用拟除虫菊酯类农药的草莓根系土壤中分离纯化得到一株 DM 降解菌, 在以 100 mg/L DM 为唯一碳源的 MSM 培养基中培养 96 h 对 DM 降解率为 53.43%, 经鉴定为琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*)。现有研究表明, 琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*)具有较强的代谢活性, 在生物修复污染环境方面具有突出的应用价值。如



Zhang 等<sup>[19]</sup>从上海一个加油站筛选到一株 *A. junii* VA2 柴油降解菌, 15 d 内对 0.5 mg/mL 柴油的降解率达到 75.8%; Ohadi 等<sup>[20]</sup>从伊朗石油开采现场也筛选到一株 *A. junii* B6 能有效降解石油; Anwar 等<sup>[21]</sup>分离得到一株 *A. junii* FA10 具有同时去除偶氮染料和六价铬的代谢活性; Han 等<sup>[22]</sup>从化工厂淤泥中筛选获得一株 *A. junii* LH4 能有效代谢磷酸盐; Yang 等<sup>[23]</sup>研究的一株 *A. junii* YB 具有很好的异养硝化和好养反硝化能力。但有关 *A. junii* 在生物修复受拟除虫菊酯类农药污染环境方面的研究鲜有报道。

研究发现筛选优化菌株培养基组分和培养条件可有效提高菌株的降解能力<sup>[5,24]</sup>, 本研究以 MSM 培养基为基础优化了 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的条件, 从 Plackett-Burman 试验结果可以看出 DM 浓度、营养物质和 pH 是影响 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的显著因素。其原因可能是高浓度的 DM 会抑制菌株的生长及关键降解酶的表达<sup>[24]</sup>, 从而限制了菌株的降解能力, 这样的抑制作用也同样发生在 *Bacillus thuringiensis* ZS-19<sup>[25]</sup>、*Bacillus subtilis* BSF01<sup>[26]</sup>和 *Catellibacterium* sp. CC-5<sup>[27]</sup>等; Chen 等<sup>[5]</sup>研究表明通过添加其他碳源或营养物质, 微生物能以共代谢的方式提高液体培养基中拟除虫菊酯类农药的去除率, 在本研究中营养物质的添加显著提高了 *A. junii* LH-1-1 对 DM 的降解; 而拟除虫菊酯类农药的降解率在中性和碱性条件下会增加, 可能是在酸性条件下增加了拟除虫菊酯类农药的稳定性以及对微生物降解的抵抗力<sup>[1]</sup>, 本研究中 *A. junii* LH-1-1 对 DM 降解的最适 pH 为 6.8。

同时, 利用响应面设计优化试验是研究多因素多水平交互作用的科学广谱使用方法。吕国英等<sup>[11]</sup>通过响应面法优化 *Lentinula edodes* 135 发酵培养基组分和培养条件产香菇多糖, 优化后多糖产量提高了 1.91 倍; Chen 等<sup>[5]</sup>采用响应面法对菌株接种量、培养温度、pH 进行优化, 显著提高了 *Streptomyces aureus* HP-S-01 对 DM 的降解效率。

本文在最陡爬坡试验的基础上以底物浓度 100 mg/L、胰蛋白胨 3 g/L、pH 7.0 为响应面设计中心点, 得到 *A. junii* LH-1-1 降解 DM 的最佳条件为: DM 浓度 75.0 mg/L、胰蛋白胨 3 g/L、pH 6.8、氮源 1.5 g/L、金属离子 0.01 g/L、接种量 5% (体积比)、菌龄 12 h、培养温度 30 °C, DM 降解率为 82.36%, 较未优化前(53.43%)提高了 28.93%, 说明降解条件优化方案设计合理有效。同时, 优化后的 *A. junii* LH-1-1 培养 96 h 对 75.0 mg/L 的 DM 降解率达到 82.36%, 表明 *A. junii* LH-1-1 能够快速高效地利用 DM, 且其降解效率远高于从农药厂排污口筛选到的赖氨酸芽孢杆菌 ZJ6 (*Lysinibacillus* sp.)<sup>[4]</sup>在 MSM 中培养 7 d 对 DM 的降解率, 比从菜园土壤中分离的阴沟肠杆菌 X09 (*Enterobacter cloacae*)<sup>[8]</sup>在 MSM 中培养 7 d 对 DM 的降解率高 19.50%, 比荧光假单胞菌 X20 (*Pseudomonas fluorescens*)<sup>[8]</sup>在外加碳源条件下培养 7 d 对 DM 的降解率高 13.06%, 比嗜麦芽寡养单胞菌 XQ08 (*Stenotrophomonas maltophilia*)<sup>[28]</sup>在添加 2% 葡萄糖的条件下培养 5 d 对 DM 的降解率高 10.43%。而降解时间也直接决定了生物修复效率, 这些菌株在有效代谢 DM 的过程中所需时间均较长(5 d, 7 d), 但在 *A. junii* LH-1-1 的作用下培养 96 h 对 DM 的降解率已达到 82.36%, 表明 *A. junii* LH-1-1 是一株高效的 DM 降解菌。

综上所述, DM 降解菌 LH-1-1 经鉴定为琼氏不动杆菌(*Acinetobacter junii*), 通过培养基成分和降解条件的优化, *A. junii* LH-1-1 培养 96 h 对 DM (75.0 mg/L)降解率为 82.36%, 表明 *A. junii* LH-1-1 能高效降解 DM, 可为生物修复受 DM 或拟除虫菊酯类农药污染的环境提供优良的微生物菌种。

## REFERENCES

- [1] Cycoń M, Piotrowska-Seget Z. Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1463
- [2] Chung SWC, Lam CH. Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and

- two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(3): 885-896
- [3] Liu B, Tang J, Chen TT, et al. Screening and characterization of a 3-phenoxybenzoic acid degrading *Enterobacter ludwigii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(5): 830-841 (in Chinese)  
刘波, 唐洁, 陈廷廷, 等. 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[J]. *微生物学报*, 2018, 58(5): 830-841
- [4] Hao XX, Zhang XQ, Duan BH, et al. Screening and genome sequencing of deltamethrin-degrading bacterium ZJ6[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(11): 1468-1476
- [5] Chen SH, Lai KP, Li YN, et al. Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1471-1483
- [6] Zhang H, Zhang YM, Hou ZG, et al. Biodegradation potential of deltamethrin by the *Bacillus cereus* strain Y1 in both culture and contaminated soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 106: 53-59
- [7] Hou SF. Preparation and application of deltamethrin degrading bacteria agent[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2016 (in Chinese)  
侯少锋. 溴氰菊酯降解菌剂的制备与应用[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2016
- [8] Yang XT. Study on isolation and degrading characteristics of deltamethrin-degrading bacteria[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2008 (in Chinese)  
杨晓棠. 溴氰菊酯降解菌的筛选及降解特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2008
- [9] Su ZJ. Isolation, identification and degradation characteristics of deltamethrin-degrading bacterial strain[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 (in Chinese)  
苏志俊. 溴氰菊酯降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2018
- [10] Xu ZZ, Wang MY, Du JP, et al. Isolation, identification and fermentation optimization of an antagonistic bacterial strain HQB-1 against banana wilt disease[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1611-1618 (in Chinese)  
徐志周, 王明远, 杜锦鹏, 等. 一株香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1611-1618
- [11] Lu GY, Zhang ZF, Pan HJ, et al. Optimization of submerged cultivation medium components for lentinan production by *Lentinula edodes* using response surface methodology[J]. *Mycosystema*, 2010, 29(1): 106-112 (in Chinese)  
吕国英, 张作法, 潘慧娟, 等. 响应面分析法优化香菇多糖发酵培养基[J]. *菌物学报*, 2010, 29(1): 106-112
- [12] Liu B, Tang J, Chen TT, et al. Isolation and identification of two pyrethroid pesticides degradation strains and research of degradative capabilities[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(4): 214-219, 224 (in Chinese)  
刘波, 唐洁, 陈廷廷, 等. 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[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(4): 214-219, 224
- [13] Tang J, Liu B, Shi Y, et al. Isolation, identification, and fenvalerate-degrading potential of *Bacillus licheniformis* CY-012[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2018, 32(3): 574-582
- [14] Sánchez-González M, Álvarez-Urbe H, Rivera-Solís R, et al. Analysis of a phenol-adapted microbial community: degradation capacity, taxonomy and metabolic description[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(3): 771-779
- [15] Liu J, Cai YG, Wang XW, et al. Preparation and rheological properties of nutritional seabuckthorn meal replacement powder[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(8): 163-169 (in Chinese)  
刘俭, 蔡永国, 王霞伟, 等. 沙棘营养代餐粉的研制及其流变特性[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(8): 163-169
- [16] Weston DP, Holmes RW, Lydy MJ. Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(1): 287-294
- [17] Perry MJ, Venners SA, Barr DB, et al. Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration[J]. *Reproductive Toxicology*, 2007, 23(1): 113-118
- [18] Guo XQ, Wang XJ, Sun AL, et al. Advances of studies on microbial degradation of pyrethroid insecticides[J]. *China Biotechnology*, 2017, 37(5): 126-132 (in Chinese)  
郭晓青, 王秀娟, 孙爱丽, 等. 环境中拟除虫菊酯类农药微生物降解技术研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(5): 126-132
- [19] Zhang QZ, Wang DC, Li MM, et al. Isolation and characterization of diesel degrading bacteria, *Sphingomonas* sp. and *Acinetobacter junii* from petroleum contaminated soil[J]. *Frontiers of Earth Science*, 2014, 8(1): 58-63
- [20] Ohadi M, Dehghannoudeh G, Shakibaie M, et al. Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production by an oil-degrading *Acinetobacter junii* B6 isolated from an Iranian oil excavation site[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 12: 1-9
- [21] Anwar F, Hussain S, Ramzan S, et al. Characterization of reactive red-120 decolorizing bacterial strain *Acinetobacter*

- junii* FA10 capable of simultaneous removal of azo dyes and hexavalent chromium[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2014, 225(8): 2017
- [22] Han YH, Fu T, Wang SS, et al. Efficient phosphate accumulation in the newly isolated *Acinetobacter junii* strain LH4[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(7): 313
- [23] Yang L, Ren YX, Liang X, et al. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 193: 227-233
- [24] Shi Y, Tang J, Yao K, et al. Isolation and characterization of fenvalerate degrading strain and optimization of degradation conditions[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(2): 217-222,243 (in Chinese)  
史颖, 唐洁, 姚开, 等. 氰戊菊酯降解菌的筛选与鉴定及其降解条件优化[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(2): 217-222,243
- [25] Chen SH, Deng YY, Chang CQ, et al. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8784
- [26] Xiao Y, Chen SH, Gao YQ, et al. Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(6): 2849-2859
- [27] Zhao HY, Geng YC, Chen L, et al. Biodegradation of cypermethrin by a novel *Catellibacterium* sp. strain CC-5 isolated from contaminated soil[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 59(5): 311-317
- [28] Huang WY, Hou SF, Long YH, et al. Isolation, screening and application potential evaluation of deltamethrin-degrading microorganism[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2018, 20(5): 643-651 (in Chinese)  
黄文源, 侯少锋, 龙友华, 等. 溴氰菊酯降解菌的分离筛选与应用潜力评价[J]. *农药学报*, 2018, 20(5): 643-651

## 编辑部公告

## 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

## 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wsxwtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

