

## 研究报告

## 蚯蚓圈源啮虫脘降解菌 D35 的分离鉴定及其降解条件优化

王娇娇<sup>1,2</sup>, 李怡<sup>\*1,3</sup>, 武春媛<sup>1,3</sup>

1 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101

2 海南大学生态与环境学院, 海南 海口 570228

3 海南省热带生态循环农业重点实验室, 海南 海口 571101

王娇娇, 李怡, 武春媛. 蚯蚓圈源啮虫脘降解菌 D35 的分离鉴定及其降解条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1450-1463.

WANG Jiaojiao, LI Yi, WU Chunyuan. Isolation, identification, and optimization of degradation conditions of the acetamiprid-degrading strain D35 from drilosphere[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1450-1463.

**摘要:** 【背景】啮虫脘等新烟碱类杀虫剂的残留易对非靶标生物造成伤害, 投加高效降解细菌进行生物强化, 可促进其快速降解。【目的】从蚯蚓圈中分离筛选啮虫脘降解菌并优化其降解条件, 提高降解效率。【方法】制备蚯蚓圈基质富集筛选降解菌; 通过生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定; 利用单因素筛选、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验及 Box-Behnken design 试验优化菌株降解条件。【结果】分离得到 1 株啮虫脘降解菌 D35, 可在 72 h 内降解 55.46% 初始浓度为 50 mg/L 的啮虫脘, 将其鉴定为一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)。优化得到菌株降解啮虫脘的最佳环境条件为: 胰蛋白胨 10.19 g/L、温度为 30 °C、接种量为 5.24%, pH 7.0、初始农药浓度 50 mg/L, 在此条件下 72 h 内菌株降解率为 80.21%, 较未优化前提高了 24.75%。【结论】本研究对分离筛选新烟碱类杀虫剂降解菌的方法进行了探索, 获得的菌株 D35 可高效降解啮虫脘, 为快速消除环境中啮虫脘污染提供了新的微生物资源。

**关键词:** 啮虫脘降解菌; 降解条件优化; 假单胞菌 D35

资助项目: 海南省自然科学基金(2019RC266); 海南省科技专项(ZDYF2021XDNY188)

This work was supported by the Hainan Provincial Natural Science Foundation (2019RC266) and the Hainan Province Science and Technology Special Fund (ZDYF2021XDNY188).

\*Corresponding author. E-mail: liyi@catas.cn

Received: 2022-12-15; Accepted: 2023-03-04; Published online: 2023-03-27

# Isolation, identification, and optimization of degradation conditions of the acetamiprid-degrading strain D35 from drilosphere

WANG Jiaojiao<sup>1,2</sup>, LI Yi<sup>\*1,3</sup>, WU Chunyuan<sup>1,3</sup>

1 Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan, China

2 College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

3 Hainan Key Laboratory of Tropical Eco-Circular Agriculture, Haikou 571101, Hainan, China

**Abstract: [Background]** The residues of acetamiprid and other neonicotinoid insecticides have adverse effects on non-target beneficial organisms, and bacteria can promote the degradation of them. **[Objective]** To isolate acetamiprid-degrading strain from drilosphere and optimize the degradation conditions to improve the degradation rate. **[Methods]** The acetamiprid-degrading strain was isolated from drilosphere and identified based on 16S rRNA gene sequencing and physiological and biochemical characteristics. The degradation conditions were optimized by single factor test, Plackett-Burman design, steepest ascent path design, and Box-Behnken design. **[Results]** Strain D35 could degrade more than 55.46% of 50 mg/L acetamiprid within 72 h, and was identified as *Pseudomonas* sp. The optimized conditions were tryptone 10.19 g/L, 30 °C, inoculum size 5.24%, pH 7.0, and acetamiprid at initial concentration of 50 mg/L. The degradation rate of D35 under the optimized conditions hit 80.21% within 72 h, 24.75% higher than that before the optimization. **[Conclusion]** We screened the neonicotinoids-degrading bacteria and strain D35 could efficiently degrade acetamiprid, which provided microbial resource for rapidly eliminating acetamiprid in the environment.

**Keywords:** acetamiprid-degrading strain; optimization of degradation conditions; *Pseudomonas* sp. D35

啮虫脒 (acetamiprid) 等新烟碱类杀虫剂 (neonicotinoids insecticides) 是一类具有硝基亚胺基、亚硝基亚胺基、三氟乙酰基等药效基团的化合物, 主要通过选择性控制昆虫神经系统中烟碱型乙酰胆碱酯酶受体导致害虫死亡<sup>[1]</sup>。其使用量约占全球杀虫剂市场的三分之一<sup>[2]</sup>。新烟碱类杀虫剂耐酸性和光稳定性较强, 重复使用会导致累积<sup>[3]</sup>; 同时具有较高的淋溶和径流潜力, 造成地下水和河流水体污染<sup>[4-5]</sup>。作为有机磷杀虫剂的代替者, 啮虫脒等新烟碱类杀

虫剂一直以来都被认为是低毒农药。但已有研究表明, 土壤、水体中残留的新烟碱类杀虫剂对水生生物鱼类、蜜蜂、鸟类、蚯蚓等有益的昆虫和害虫天敌具有微克的致死量<sup>[6-7]</sup>, 而且通过农产品以食物链形式对人体健康和生态安全构成威胁<sup>[8]</sup>。这使得大家开始重新评估新烟碱类杀虫剂的危害性质。

利用微生物对农药残留环境进行生物修复具有安全、廉价、高效、快速、无二次污染的特点<sup>[9]</sup>。投加易培养、生长繁殖快的高效降解

细菌进行生物强化<sup>[10]</sup>, 可促进啮虫脒等新烟碱类杀虫剂残留的快速降解。降解菌的筛选, 一般通过采集土壤样品直接进行富集分离、纯化后一一进行降解效果测定获得。目前, 国内外已有关于新烟碱类杀虫剂降解菌的报道, 已分离筛选到降解吡虫啉的 *Acinetobacter* sp.、*Leifsonia* sp.、*Pseudomonas putida* sp., 降解啮虫脒的 *Pigmentiphaga* sp. D-2、*Fusarium* sp. CS-3, 降解烯啶虫胺的 *Rhodococcus ruber* 以及降解噻虫啉的 *Ensifer* sp.<sup>[11-18]</sup>。尽管如此, 国内外对于啮虫脒降解菌筛选和应用的报道依然较少, 现有啮虫脒降解菌中大部分代谢机制未能被完全阐述。传统分离方法可能存在一定程度上忽视非培养微生物的作用, 导致所获得的单一菌株无法有效降解的问题<sup>[19]</sup>, 较难获得高效、稳定的啮虫脒降解菌。

蚯蚓是土壤中最主要的无脊椎动物, 能够通过直接或间接改变土壤理化性质、微生物活性、降解菌种类与丰度等方面显著促进土壤中有机污染物降解<sup>[20-21]</sup>。蚯蚓对降解微生物的作用是多种活动综合作用的结果, 其不仅能够促进土著降解菌的生长, 还通过代谢将新的降解菌带入土壤等蚯蚓圈中。这些种类的降解菌大多被发现可降解多种污染物, 说明蚯蚓对一些有机物降解菌有促进作用。蚯蚓修复有机污染土壤具有广谱性, 可利用这一特性得到更多降解菌, 解决近年来传统分离方法出现的问题。

本研究以啮虫脒等新烟碱类杀虫剂对蚯蚓进行驯化和处理, 利用蚯蚓与微生物对土壤中残留啮虫脒的协同降解作用, 从蚯蚓圈中分离筛选高效、稳定的啮虫脒降解菌, 并优化其降解条件, 研究其降解特性, 以期为微生物降解土壤和水体环境中的啮虫脒残留污染提供资源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

试验土壤采自海南省澄迈县(110°2'25"E, 19°44'5"N)。采集 0–20 cm 土样, 自然风干后, 研磨过 20 目尼龙筛。供试蚯蚓品种为赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*), 采自中国热带农业科学院热带生态农业基地。

#### 1.1.2 培养基

基础盐(MSM)培养基(g/L): NaCl 1.0, 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, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, pH 7.0。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 5.0。

固体培养基添加 18 g/L 的琼脂。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

啮虫脒购自阿拉丁试剂上海晶纯生化股份有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物等购自上海麦克林生化科技有限公司; 二氯甲烷和甲醇购自上海化学试剂总厂。

高效液相色谱仪, Waters 公司; 紫外-可见分光光度计, 岛津公司; 透射电子显微镜, 日立公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蚯蚓圈源啮虫脒降解菌的分离筛选

选择健康、具有相似长度和体重且有环带的成熟蚯蚓, 用无菌水清洗, 并置于湿滤纸上, 25 °C 黑暗中清肠 48 h, 在试验土壤中适应 2 周。再次将蚯蚓清肠 24 h 后, 放入含有 1.5 mg/kg 啮虫脒的土壤中成长, 28 d 后, 参考郝月崎<sup>[22]</sup>的方法制备蚯蚓圈基质。称取 5 g 基质加入含有 80 mg/L 啮虫脒的 100 mL MSM 培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养 7 d, 将富集液以 5% 接种量转接到相同的培养基中, 连续传代 3 次,

梯度稀释,取 $10^{-3}$ – $10^{-6}$ 稀释度的富集液 0.02 mL 涂布在含 80 mg/L 啮虫脘的 MSM 固体平板上, 30 °C 培养 3 d 后挑取平板上长出的不同形态单菌落进行纯化, 接种于含 80 mg/L 啮虫脘的培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 3 d, 验证其降解效果。

### 1.2.2 降解菌株鉴定

菌株菌落形态、生理生化特征鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[23]</sup>, 并拍摄透射电镜照片。细菌基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB 法<sup>[24]</sup>。

利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTCCTTGTTAC GACTT-3'), 以菌株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增其 16S rRNA 基因<sup>[25]</sup>。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): 模板 1.0  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 5.0  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 4.0  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 4.0  $\mu$ L, 正、反向引物 (20  $\mu$ mol/L) 各 1.0  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 10 °C 5 min。采用琼脂糖凝胶 DNA 提取试剂盒纯化 PCR 扩增产物并进行测序。将获得的序列与 EzBioCloud 数据库 ([www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net)) 中相关类群的 16S rRNA 基因序列进行比较<sup>[26]</sup>, 使用 MEGA 7.0 软件的邻接法<sup>[27]</sup>构建菌株 16S rRNA 基因的系统发育树<sup>[28]</sup>。

### 1.2.3 菌株 D35 啮虫脘降解率测定

菌液按 1:1 的体积比加入二氯甲烷, 剧烈振荡后静置, 除去上层水相, 加入无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 除去少量水分, 吸取 1 mL 有机相挥发后加入等体积甲醇溶解, 0.22  $\mu$ m 过滤后通过高效液相色谱仪 (HPLC) 检测, 液相色谱条件: 流动相为水: 甲醇为 60:40 的体积比, C18-WP 色谱柱 (5  $\mu$ m $\times$ 4.6 mm $\times$ 250 mm), 柱温为室温, 测定波

长为 270 nm, 进样量 10  $\mu$ L, 流速为 1.0 mL/min。外标法按峰面积定量。

### 1.2.4 菌株 D35 降解条件单因素试验

通过改变基础盐液体培养基成分及培养条件, 研究菌株 D35 降解啮虫脘的最佳环境条件。将菌株 D35 用同体积无菌水洗涤悬浮后, 以 5% 接种量接种至 100 mL 液体无氮培养基中, 分别添加 0.5% 的各种氮源 (胰蛋白胍、酵母粉、硝酸钾、硫酸铵、尿素), 于初始啮虫脘浓度 50 mg/L 和 30 °C 条件下培养 72 h, 分别测定各样品降解率, 每个处理做 3 个重复。

其他单因素试验: 将菌株 D35 用同体积无菌水洗涤悬浮后, 除接种量试验外, 以 5% 接种量接种至 100 mL 加入 0.5% 胰蛋白胍的液体 MSM 培养基中, 分别设置不同温度 (20、25、30、37、42 °C)、pH (5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0)、接种量 (0.5%、1%、2%、5%、8%、10%) 和初始啮虫脘浓度 (10、50、100、200、300、400 mg/L) 处理, 于 150 r/min 培养 72 h 后测定降解率, 每个处理做 3 个重复。

### 1.2.5 菌株 D35 降解条件优化

#### 1) Plackett-Burman 试验

根据单因素试验结果, 利用 Plackett-Burman 试验筛选菌株 D35 降解啮虫脘的重要影响因素。将 5 个可能影响菌株降解能力的环境条件, 选取低水平 (-1) 和高水平 (1): 蛋白胍浓度 (0.5%、1.0%)、温度 (30、37 °C)、pH (7.0、8.0)、接种量 (2%、5%)、初始农药浓度 (50、100 mg/L), 以菌株 72 h 对啮虫脘的降解率为响应值, 分别进行评估。

#### 2) 最陡爬坡试验

根据 Plackett-Burman 试验结果, 得到各因素的显著性排序和一次拟合方程, 对主要影响因素的变化方向和步长进行设计, 寻找最大响

应区域。

### 3) Box-Behnken design 试验

以最陡爬坡试验结果为基础, 逼近最大响应区域后, 确定 3 个显著因子的高(1)、中(0)、低(-1)水平, 利用 Minitab 19 中的 Box-Behnken design 进行试验, 对显著因子水平进行优化, 寻找菌株降解的最佳环境条件并验证。

### 1.2.6 数据分析

数据采用 Origin 9.0、SPSS 22、Minitab 19、Design-Expert 8.0.5 软件进行作图和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚯蚓圈源啮虫脘降解菌的分离筛选结果

采集蚯蚓圈基质制成富集液, 稀释涂布后挑取单菌落进行降解效果验证。分离筛选到一株能以啮虫脘为唯一碳源生长并降解啮虫脘的细菌, 编号为 D35。

### 2.2 降解菌株 D35 的鉴定结果

菌株 D35 在平板上生长 2 d 后, 菌落呈乳

白色, 湿润, 半透明(图 1A)。革兰氏染色阴性。透射电镜下观察, 菌体细胞呈杆状, 有鞭毛, 不形成芽孢(图 1B)。

菌株 D35 的 16S rRNA 基因系统发育树见图 2。菌株 D35 与假单胞菌属(*Pseudomonas*)有较高的相似性, 与 *Pseudomonas yangonensis* MY50<sup>T</sup> (MK907288)亲缘关系最近, 相似性为 99.10%。结合其菌落形态及 16S rRNA 基因序列分析结果, 将菌株 D35 初步鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)。将菌株 D35 的 16S rRNA 基因序列上传至 GenBank, 获得登录号为 OP288121。

### 2.3 菌株 D35 降解条件单因素试验结果

#### 2.3.1 氮源

氮源通过影响菌株生长, 从而直接影响其降解效果。图 3A 结果表明, 菌株 D35 可利用氮源较广泛, 但对有机氮源(胰蛋白胨和酵母粉)的利用效果比无机氮源(尿素、硝酸钾、硫酸铵)好, 以胰蛋白胨为氮源时菌株对啮虫脘的降解率最高, 为 65.23%; 以尿素为氮源时菌株对啮虫脘的降解率最低, 仅为 11.28%。

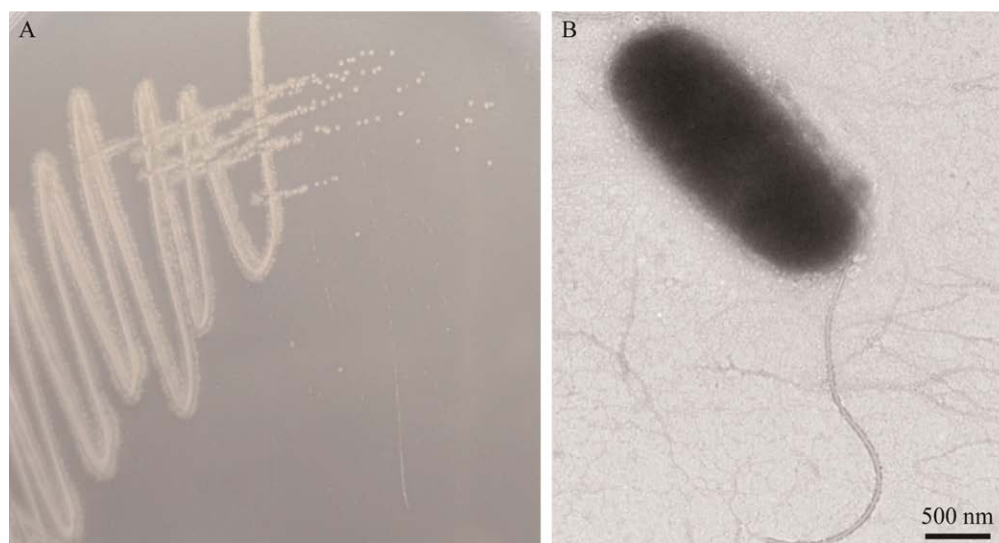


图 1 菌株 D35 菌落形态照片及透射电镜照片 A: 菌落形态. B: 透射电镜图

Figure 1 Colony photograph and electron micrograph of strain D35. A: Colony photograph. B: Transmission electron micrograph.

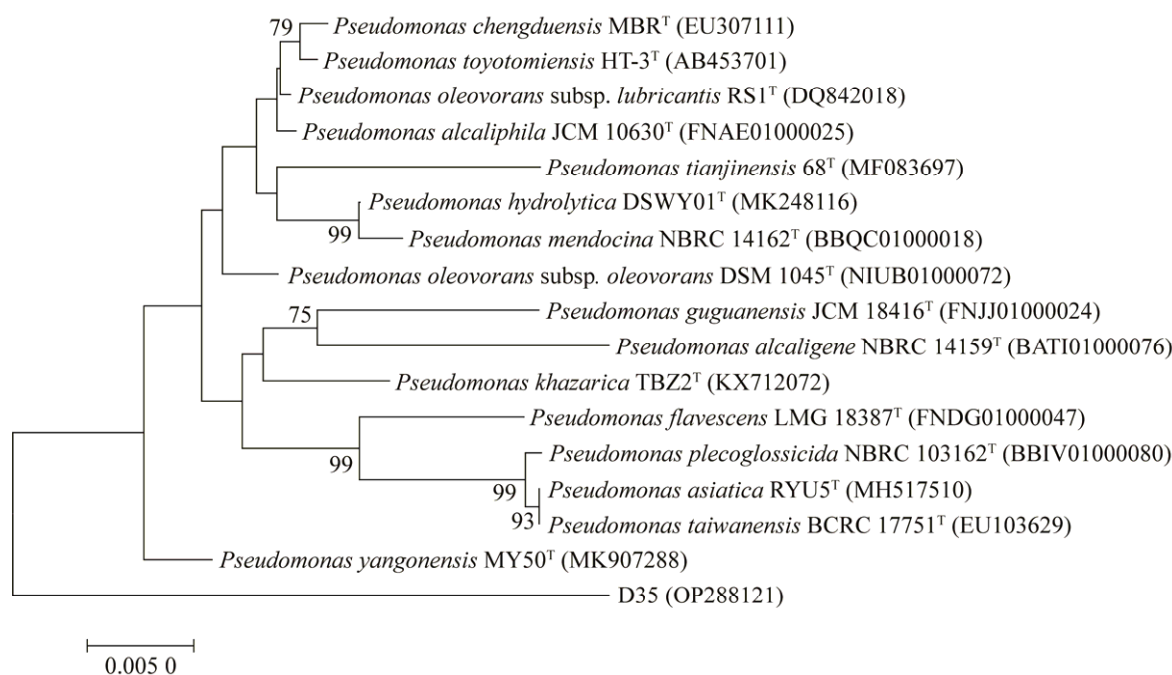


图2 菌株 D35 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树 节点处的数字为基于 1 000 次重复抽样的自举置信百分比值, 图中只标示 70% 以上的值; 标尺所示长度代表进化距离

Figure 2 Phylogenetic tree of strain D35 based on 16S rRNA gene sequences. Numbers at nodes are percentage bootstrap values based on 1 000 resampled datasets, Only values above 70% are given; Bar (0.005 0) represents the evolutionary distance.

### 2.3.2 温度

图 3B 结果表明, 菌株 D35 在 20–42 °C 均能降解啮虫脘, 在 25–37 °C 降解情况较好, 对啮虫脘降解率在 47% 以上; 在 25 °C 以下或 37 °C 以上降解率急剧下降, 但降解率仍有 22.43%–26.51%。菌株 D35 对啮虫脘最适降解温度为 30 °C, 降解率为 68.73%。

### 2.3.3 pH

图 3C 结果表明, 菌株 D35 在 pH 6.0–8.0 范围内均能降解啮虫脘, 在 pH 7.0–8.0 降解情况较好, 对啮虫脘降解率在 65% 以上; pH 值为 9.0 时, 菌株 D35 的生长受到严重抑制, 但降解率为 55.39%, 推测原因是啮虫脘在碱性条件下易分解<sup>[29]</sup>; pH 值为 5.0 时降解率急剧下降, 仅为 17.33%。菌株 D35 对啮虫脘最适降解 pH

值为 7.0, 降解率为 68.25%。

### 2.3.4 接种量

图 3D 结果表明, 当接种量为 0.5%–5% 时, 菌株 D35 对啮虫脘的降解效果与接种量呈正相关, 接种量越大, 对啮虫脘降解率越高; 即使接种量为 0.5% 时, 菌株 D35 也可降解 34% 以上的啮虫脘; 接种量为 5% 时降解率为 67.69%; 当接种量大于 5% 时, 可能受啮虫脘浓度限制和菌株细胞间营养竞争影响, 提高接种量对菌株 D35 降解啮虫脘并无促进作用。

### 2.3.5 初始啮虫脘浓度

图 3E 结果表明, 当初始啮虫脘浓度为 200 mg/L 及以下时, 菌株 D35 对啮虫脘的降解率为 62% 以上, 初始浓度对菌株 D35 的降解基本无影响; 当初始啮虫脘浓度为 300 mg/L 时,



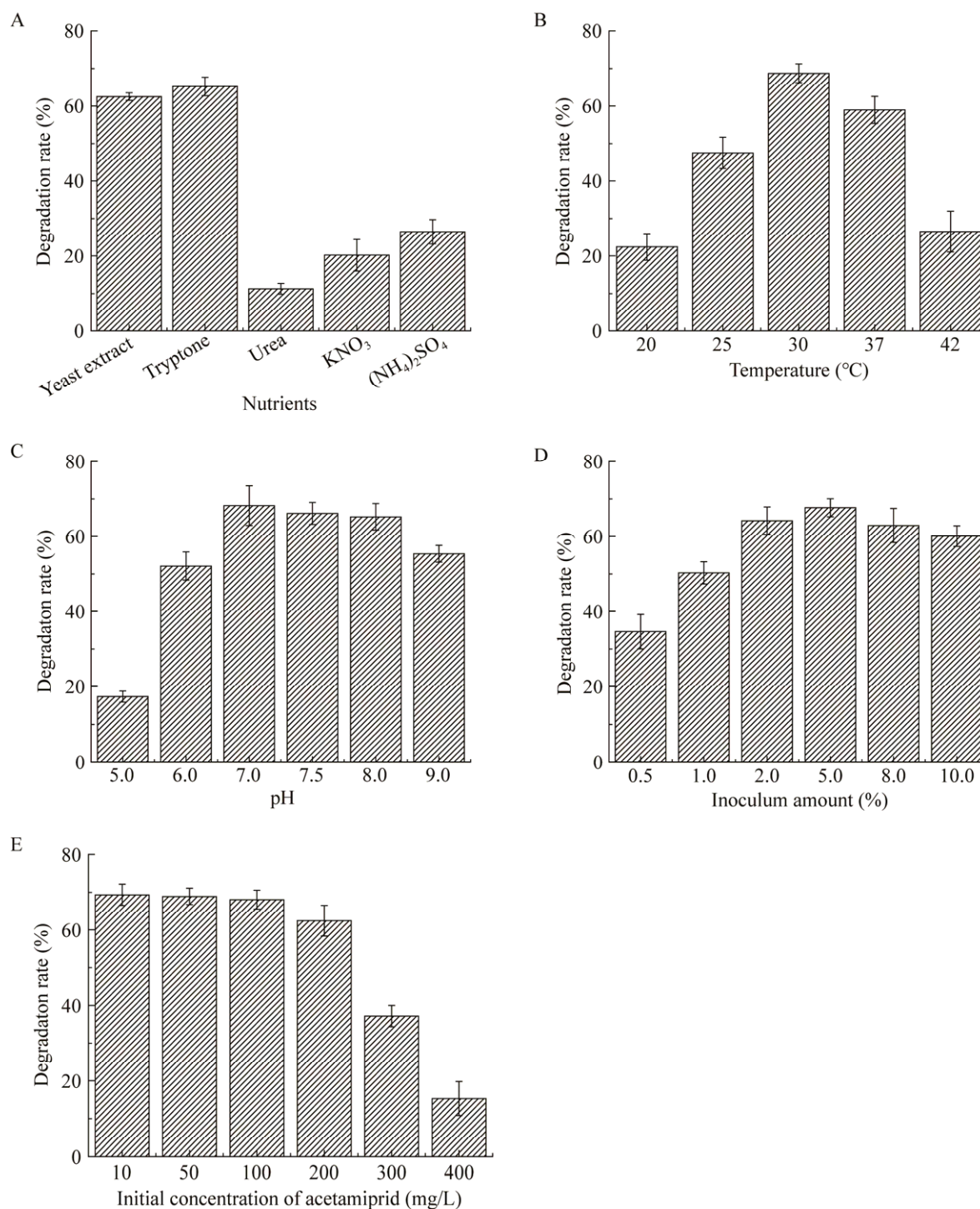


图3 不同培养条件对菌株 D35 降解啉虫脒的影响 A: 氮源. B: 温度. C: pH. D: 接种量. E: 初始啉虫脒浓度

Figure 3 Effect of different culture conditions on acetamiprid degradation by strain D35. A: Nutrients. B: Temperature. C: pH. D: Inoculum amount. E: Initial concentration of acetamiprid.

菌株 D35 对啮虫脘降解率在 37% 以上; 但当初始啮虫脘浓度为 400 mg/L 时降解率仅有 15.29%, 说明过高浓度的啮虫脘可能对菌体生长产生毒性, 从而影响菌株 D35 降解啮虫脘。

## 2.4 菌株 D35 降解条件优化结果

### 2.4.1 Plackett-Burman 试验结果

根据单因素试验结果, 选择胰蛋白胨浓度(A)、温度(B)、pH(C)、接种量(D)、初始农药浓度(E)作为备选因素, 测定啮虫脘降解率, 试验设计及各处理降解率如表 1 所示, 统计分析如表 2 所示。结果表明, 模型的多元相关系数  $R^2=0.993\ 5$ , 调整值  $\text{Adj } R^2=0.983\ 5$ ,  $P<0.001$ , 达到极显著水平, 说明该模型的相关性较好, 各

因素之间关联性强。温度、胰蛋白胨含量、初始接种量对菌株的降解率影响较大, 且影响极显著 ( $P<0.01$ ); 影响顺序为温度>胰蛋白胨含量>初始接种量; 其中, 胰蛋白胨含量、初始接种量与菌株对啮虫脘的降解率呈正相关, 温度与菌株降解率呈负相关。固定 pH 7.0、初始啮虫脘浓度 50 mg/L, 温度、胰蛋白胨含量、初始接种量为主要因素, 设计最陡爬坡试验的步长和方向。

### 2.4.2 最陡爬坡试验结果

根据 Plackett-Burman 试验结果, 逐步提高胰蛋白胨含量、初始接种量, 降低培养温度, 进行爬坡试验。试验设计与结果见表 3。由表 3 可知, 菌株降解率先增加后减少, 在第 3 组达

表 1 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 1 The design and results of Plackett-Burman experiment

Run	A: Tryptone (g/L)	B: Temperature (°C)	C: pH	D: Inoculation amount (%)	E: Initial concentration (mg/L)	Degradation rate (%)
1	1 (10)	1 (37)	-1 (7)	1 (5)	1 (150)	65.81
2	-1 (5)	1 (37)	1 (8)	1 (5)	-1 (50)	61.23
3	1 (10)	-1 (30)	1 (8)	-1 (2)	-1 (50)	70.92
4	-1 (5)	-1 (30)	1 (8)	1 (5)	1 (150)	67.79
5	1 (10)	1 (37)	1 (8)	-1 (2)	1 (150)	61.97
6	-1 (5)	1 (37)	-1 (7)	-1 (2)	-1 (50)	59.55
7	1 (10)	1 (37)	-1 (7)	1 (5)	-1 (50)	66.13
8	1 (10)	-1 (30)	-1 (7)	-1 (2)	1 (150)	70.34
9	1 (10)	-1 (30)	1 (8)	1 (5)	-1 (50)	73.26
10	-1 (5)	-1 (30)	-1 (7)	1 (5)	1 (150)	68.93
11	-1 (5)	-1 (30)	-1 (7)	-1 (2)	-1 (50)	67.41
12	-1 (5)	1 (37)	1 (8)	-1 (2)	1 (150)	58.15

表 2 Plackett-Burman 试验统计分析

Table 2 Statistical analysis of Plackett-Burman experiment

因素 Factor	效应 Effect	T 值 T value	P 值 P value	影响排序 The order of influence	
A (Tryptone)	3.895	11.48	<0.001**	2	$R^2=99.10$
B (Temperature)	-7.302	-21.52	<0.001**	1	$\text{Adj } R^2=0.983\ 5$
C (pH)	-1.142	-3.36	0.015*	5	$P\text{ value}<0.001^{**}$
D (Inoculation amount)	2.135	6.29	0.001**	3	
E (Initial concentration)	-1.252	-3.69	0.010*	4	

\*: 差异显著 ( $P<0.05$ ); \*\*: 差异极显著 ( $P<0.01$ )

\*: Significant difference; \*\*: Highly significant difference ( $P<0.01$ ).



表3 最陡爬坡试验设计与结果

Table 3 The design and results of steepest ascent path experiment

Run	A: Tryptone (g/L)	B: Temperature (°C)	D: Inoculation amount (%)	Degradation rate (%)
1	8	34	3	60.21
2	9	32	4	69.74
3	10	30	5	78.65
4	11	28	6	72.19
5	12	26	7	67.17

到最高,因此选择第3组试验条件作为响应面优化试验中心点。

#### 2.4.3 Box-Behnken design 试验结果

根据最陡爬坡试验结果,以处理3的培养条件作为 Box-Behnken design 试验的中心点,设计响应面优化试验,试验设计及结果见表4,分析见表5。得到胰蛋白胨浓度、温度、接种量的三元二次回归方程: 啉虫脒降解率  $Y = -1\,370.9 + 64.20A + 69.83B + 33.80D - 3.192A^2 - 1.181\,0B^2 - 2.727D^2 + 0.068\,7AB - 0.225AD - 0.098\,7BD$ 。回归方程的多元相关系数  $R^2 = 0.995\,8$ ,  $\text{Adj } R^2 = 0.990\,4$ , 响应面回归模型达到极显著 ( $P < 0.001$ ) 水平, 失拟项  $P > 0.05$ , 差异不显著, 由此可知此模型拟合度较高, 能较好地反映各因素与响应值之间关系, 应用于菌株降解率的预测。

利用 Design Expert 8.0.5 绘制各因素交互作用响应曲面图及等高线图, 结果如图4所示。对回归方程进行最优值分析, 得出胰蛋白胨浓度 10.19 g/L、温度 29.64 °C、接种量 5.24% 为最佳降解条件, 此时预测菌株对啉虫脒的降解率为 79.85%。进行最优条件验证时, 考虑现实操作情况, 将优化条件修正为: 基础盐液体培养基加入胰蛋白胨(10.19 g/L)、pH 7.0、初始啉虫脒浓度 50 mg/L、接种量 5.24%、培养温度 30 °C, 菌株在此条件下生长和降解曲线如图5所示, 生长和降解趋势基本一致。加入的啉虫脒

表4 Box-Behnken design 试验设计与结果

Table 4 The design and results of Box-Behnken design experiment

Run	A: Tryptone (g/L)	B: Temperature (°C)	D: Inoculation amount (%)	Degradation rate (%)
1	-1 (9)	0 (30)	1 (6)	73.71
2	1 (11)	0 (30)	1 (6)	75.92
3	0 (10)	0 (30)	0 (5)	79.13
4	1 (11)	-1 (28)	0 (5)	74.19
5	0 (10)	0 (30)	0 (5)	79.82
6	1 (11)	0 (30)	-1 (4)	73.74
7	0 (10)	0 (30)	0 (5)	78.79
8	-1 (9)	-1 (28)	0 (5)	71.91
9	-1 (9)	0 (30)	-1 (4)	70.63
10	0 (10)	1 (32)	1 (6)	71.31
11	0 (10)	-1 (28)	1 (6)	75.28
12	0 (10)	-1 (28)	-1 (4)	72.23
13	-1 (9)	1 (32)	0 (5)	68.54
14	1 (11)	1 (32)	0 (5)	71.37
15	0 (10)	0 (30)	0 (5)	79.44
16	0 (10)	0 (30)	0 (5)	79.91
17	0 (10)	1 (32)	-1 (4)	69.05

表5 Box-Behnken design 试验统计分析

Table 5 Statistical analysis of Box-Behnken design experiment

Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	P value
Model	9	236.632	26.292 5	183.59	<0.001**
A	1	13.598	13.598 1	94.95	<0.001**
B	1	22.244	22.244 4	155.32	<0.001**
D	1	13.966	13.965 6	97.52	<0.001**
A <sup>2</sup>	1	42.887	42.887 0	299.46	<0.001**
B <sup>2</sup>	1	93.963	93.962 8	656.10	<0.001**
D <sup>2</sup>	1	31.300	31.300 2	218.55	<0.001**
AB	1	0.076	0.075 6	0.53	0.491
AD	1	0.202	0.202 5	1.41	0.273
BD	1	0.156	0.156 0	1.09	0.331
Lack of fit	3	0.121	0.040 3	0.18	0.903
Pure error	4	0.881	0.220 4		

\*: 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*: 差异极显著 ( $P < 0.01$ )

\*: Significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\*: Highly significant difference ( $P < 0.01$ ).

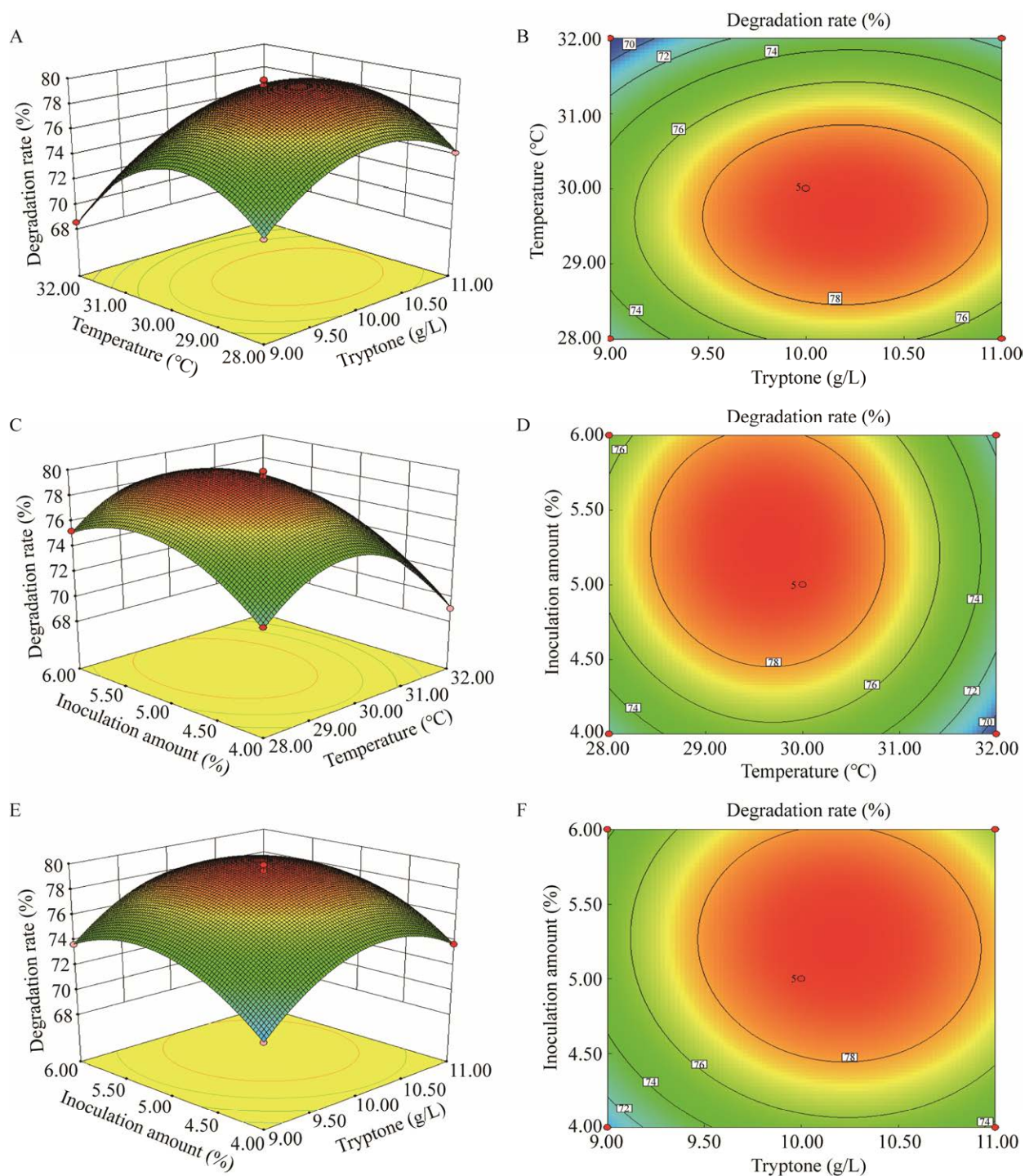


图 4 胰蛋白胨、温度和接种量对啮虫脘降解率的影响 A 和 B、C 和 D、E 和 F 分别表示胰蛋白胨和温度、温度和接种量、胰蛋白胨和接种量对菌株啮虫脘降解率的影响

Figure 4 Effects of tryptone, temperature and inoculum amount on acetamiprid degradation by strain D35. A and B, C and D, E and F respectively indicate the effect of tryptone and temperature, temperature and inoculum amount, tryptone and inoculum amount on acetamiprid degradation by strain D35.

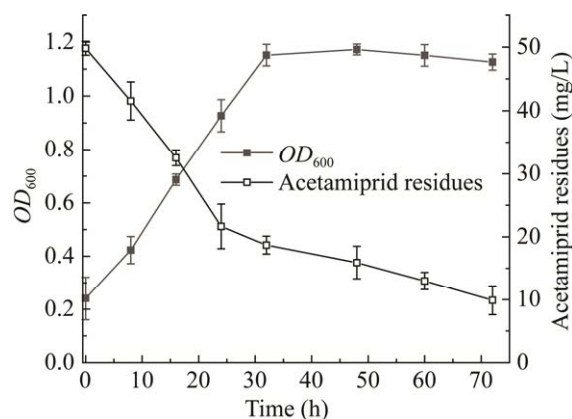


图5 菌株D35生长和降解啉虫脒特性

Figure 5 The growth and acetamiprid-degrading characteristics of strain D35.

作为碳源,随着菌株生长被降解。在菌株生长对数期(8–32 h),啉虫脒降解较快;菌株在72 h降解率达到80.21%,与理论值相比相对误差较小,说明响应面法优化菌株降解条件合理有效。

### 3 讨论与结论

啉虫脒等新烟碱类杀虫剂的高频施用致使其在土壤及水体中易被检出<sup>[5]</sup>,其残留易对非靶标生物造成伤害<sup>[6–7]</sup>,因此,消除其残留具有一定必要性。微生物是土壤中新烟碱类杀虫剂消除的主要因素,投加高效降解细菌进行生物强化可促进残留新烟碱类杀虫剂的快速降解。目前,国内外已分离筛选到许多啉虫脒降解细菌,如 *Pigmentiphaga* sp. D-2 和 *Pigmentiphaga* sp. AAP-1<sup>[15,30]</sup>等,降解效率较高,其中 *Pigmentiphaga* sp. AAP-1 可在2.5 h内完全降解100 mg/L的啉虫脒;但降解细菌的代谢途径及降解基因多样,且矿化啉虫脒的单菌尚未明确<sup>[31]</sup>。然而,利用传统的分离筛选方法较难获得高效、稳定的新烟碱类杀虫剂降解菌。

蚯蚓的作穴、排泄等行为不仅能够改变土壤理化性质<sup>[32]</sup>,还可增加微生物与土壤中残留

新烟碱类杀虫剂的接触面积,为微生物提供良好的生长环境;蚯蚓还可通过代谢显著促进降解微生物的活性。因此,可利用蚯蚓与微生物对土壤中残留新烟碱类杀虫剂的协同降解作用,从蚓触圈中分离筛选到高效、稳定的新烟碱类杀虫剂降解菌。本研究从蚓触圈中分离筛选到一株啉虫脒降解菌 *Pseudomonas* sp. D35,对分离筛选新烟碱类杀虫剂降解菌的方法进行了探索。国内外对于假单胞属降解菌已有报道,该属微生物可降解不同类型的环境污染有机物,如多环芳烃(菲、萘等)、有机磷类(毒死蜱、敌百虫、氧化乐果等)、拟除虫菊酯、烟碱等,主要降解酶为菲代谢途径中的1,2-邻苯二酚双加氧酶及2,3-邻苯二酚双加氧酶,产物为1-羟基-2-萘甲酸和2-羟基-1-萘甲酸及邻苯二甲酸;水解有机磷农药中P-O-烷基和P-O-芳香基键的有机磷水解酶(organophosphorus hydrolase, OPH)和甲基对硫磷水解酶(methyl parathion hydrolase, MPH);新烟碱类杀虫剂类似物烟碱降解途径中,起吡啶环脱氢作用的尼古丁氧化还原酶NicA2等<sup>[19,33–35]</sup>,这些菌株资源在生物环境修复中具有较高的应用价值。啉虫脒等新烟碱类杀虫剂微生物降解途径较为多样,主要代谢产物为1-(6-氯吡啶基-3-甲基)-N-甲基甲胺[1-(6-chloropyridin-3-yl)-N-methylmethanamine]、N'-氰基-N-甲基-N-吡啶-3-基-甲基-乙脒[N'-cyano-N-methyl-N-(pyridin-3-ylmethyl)-ethanimidamide]、N'-[(6-氯吡啶-3-基)甲基]-N-甲基-乙酰胺{N'-[(6-chloropyridin-3-yl)methyl]-N-methylacetamide}等<sup>[30]</sup>。

研究菌株降解特性发现,环境条件对菌株降解率具有显著影响。适当补充外源营养物质,加大接种量,调整培养温度、pH至菌株最适环境条件,可以缩短菌株适应农药及培养基所需的延滞期,提高菌株的降解效率<sup>[30]</sup>。响应面设

计能够用较少的试验次数较准确地探索各因素交互作用, 分析寻求各因素的最优水平, 应用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系, 相较于传统优化方法, 响应面设计更易找出最优响应值, 是研究多因素交互作用的科学广谱方法<sup>[36]</sup>。Chen 等<sup>[37]</sup>采用响应面试验及单因素试验对温度、培养基 pH、接种量、可溶性氧、替代碳氮源等培养条件进行了优化, 显著提高了 *Streptomyces aureus* HP-S-01 对溴氰菊酯的降解效率; 李灵灵等<sup>[38]</sup>对木质素降解菌 BYL-7 进行了响应面试验, 确定了降解木质素最优条件为: 初始 pH 6.7, 温度 25 °C, 接种量 8%。在此条件下, 碱性木质素降解率为 36.5%, 比未优化前提高 54.0%。本研究采用响应面试验, 筛选得到菌株降解啮虫脘的最佳环境条件为: 胰蛋白胨浓度为 10.19 g/L、温度为 30 °C、接种量为 5.24%, pH 7.0、初始啮虫脘浓度 50 mg/L, 在此条件下菌株降解率为 80.21%, 较未优化前(基础盐培养基中培养, 降解率为 55.46%)提高了 24.75%, 说明降解条件优化方案设计合理有效。菌株 D35 优化后, 培养 72 h 对啮虫脘的降解效率虽不如 *Pigmentiphaga* sp. AAP-1 (2.5 h 内完全降解 100 mg/L 啮虫脘)<sup>[30]</sup>, 但略等于红球菌(*Rhodococcus* sp.) BCH-2<sup>[39]</sup>培养 192 h 对 50 mg/L 啮虫脘的降解率(84.65%), 远高于聚酮贪噬菌(*Variovorax boronicumulans*) CGMCC4969<sup>[40]</sup> 120 h 对 2 mg/L 啮虫脘的降解率(34.7%), 而相较于这些菌株, 菌株 D35 降解所需时间(72 h)较短, 且可在 24 h 内降解 56.53%的初始浓度为 50 mg/L 的啮虫脘, 表明菌株 D35 是一株高效啮虫脘降解菌。

综上所述, 本研究从蚯蚓圈中分离筛选到一株啮虫脘降解菌 *Pseudomonas* sp. D35, 对其进行降解条件优化, 菌株 72 h 内可降解 80.21% 初始农药浓度为 50 mg/L 的啮虫脘。本研究对分

离筛选新烟碱类杀虫剂降解菌的方法进行了探索, 获得的菌株 D35 可高效降解啮虫脘, 为快速消除环境中啮虫脘污染提供了新的微生物资源。

## REFERENCES

- [1] 张明浩, 康珊珊, 郭靖立, 刘子琪, 程有普, 陈增龙. 新烟碱类杀虫剂在农药复配中的应用进展[J]. 农药, 2022, 61(5): 313-320.  
ZHANG MH, KANG SS, GUO JL, LIU ZQ, CHENG YP, CHEN ZL. Application progress of neonicotinoid insecticides in pesticide combination[J]. Agrochemicals, 2022, 61(5): 313-320 (in Chinese).
- [2] BARON GL, JANSEN VAA, BROWN MJF, RAINE NE. Pesticide reduces bumblebee colony initiation and increases probability of population extinction[J]. Nature Ecology & Evolution, 2017, 1(9): 1308-1316.
- [3] BONMATIN JM, GIORIO C, GIROLAMI V, GOULSON D, KREUTZWEISER DP, KRUPKE C, LIESS M, LONG E, MARZARO M, MITCHELL ED, NOOME DA, SIMON-DELISO N, TAPPARO A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(1): 35-67.
- [4] GOULSON D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides[J]. Journal of Applied Ecology, 2013, 50(4): 977-987.
- [5] van DIJK TC, van STAALDUINEN MA, van der SLUIJS JP. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62374.
- [6] 史晶亮, 杨乐, 廖春华, 吴小波. 新烟碱类杀虫剂对蜜蜂毒理作用的研究进展[J]. 农药, 2019, 58(1): 6-10.  
SHI JL, YANG L, LIAO CH, WU XB. Research progress on the toxicological effects of neonicotinoid insecticides on honeybees[J]. Agrochemicals, 2019, 58(1): 6-10 (in Chinese).
- [7] 陈爱梅, 王金花, 夏晓明, 王娟, 朱鲁生, 范燕燕. 不同剂型吡虫啉对蚯蚓和斑马鱼的急性毒性评价[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(9): 1758-1763.  
CHEN AM, WANG JH, XIA XM, WANG J, ZHU LS, FAN YY. Acute toxicity of imidacloprid with different formulation on earthworm and zebrafish[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(9): 1758-1763 (in Chinese).
- [8] LU CS, CHANG CH, PALMER C, ZHAO MR, ZHANG Q. Neonicotinoid residues in fruits and vegetables: an integrated dietary exposure assessment

- approach[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(5): 3175-3184.
- [9] YADAV S, VERMA SK, CHAUDHARY HS. Isolation and characterization of organophosphate pesticides degrading bacteria from contaminated agricultural soil[J]. OnLine Journal of Biological Sciences, 2015, 15(3): 113-125.
- [10] 高晓蓉, 朱丽晖, 周玉嫚. 非降解菌 *Pseudomonas* sp. JM2-gfp 细胞特性对生物膜形成能力的影响及其在植物根表的定殖[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4019-4029.
- GAO XR, ZHU LH, ZHOU YM. Effect of characteristics of phenanthrene-degrading bacteria *Pseudomonas* sp. JM2-gfp on biofilm formation and its colonization on plant root surface[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4019-4029 (in Chinese).
- [11] 胡桂萍, 黎小萍, 石旭平, 曹红姝, 欧阳雪灵, 建华. 茶叶叶围吡虫啉降解菌的筛选及其降解性能[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2018, 39(2): 26-31.
- HU GP, LI XP, SHI XP, CAO HS, OUYANG XL, ZHANG JH. Isolation and characters of an imidacloprid-degrading microbia around tea phyllosphere[J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2018, 39(2): 26-31 (in Chinese).
- [12] ANHALT JC, MOORMAN TB, KOSKINEN WC. Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism[J]. Journal of Environmental Science and Health Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2007, 42(5): 509-514.
- [13] PANDEY G, DORRIAN SJ, RUSSELL RJ, OAKESHOTT JG. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 380(3): 710-714.
- [14] SABOURMOGHADDAM N, ZAKARIA MP, OMAR D. Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highlands[J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2015, 14(2): 182-188.
- [15] YANG HX, ZHANG YL, CHUANG SC, CAO WM, RUAN ZP, XU XH, JIANG JD. Bioaugmentation of acetamiprid-contaminated soil with *Pigmentiphaga* sp. strain D-2 and its effect on the soil microbial community[J]. Ecotoxicology, 2021, 30(8): 1559-1571.
- [16] SHI ZK, DONG WL, XIN FX, LIU JW, ZHOU XH, XU FL, LV ZY, MA JF, ZHANG WM, FANG Y, JIANG M. Characteristics and metabolic pathway of acetamiprid biodegradation by *Fusarium* sp. strain CS-3 isolated from soil[J]. Biodegradation, 2018, 29(6): 593-603.
- [17] DAI ZL, YANG WL, FAN ZX, GUO L, LIU ZH, DAI YJ. Actinomycetes *Rhodococcus ruber* CGMCC 17550 degrades neonicotinoid insecticide nitenpyram via a novel hydroxylation pathway and remediates nitenpyram in surface water[J]. Chemosphere, 2021, 270: 128670.
- [18] ZHOU GC, WANG Y, ZHAI S, GE F, LIU ZH, DAI YJ, YUAN S, HOU JY. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4065-4074.
- [19] 史延华. 农药降解菌施氏假单胞菌 YC-YH1 的分离鉴定及降解机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2015.
- SHI YH. Isolation and identification of pesticides-degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* YC-YH1 and study of degradation mechanism[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015 (in Chinese).
- [20] CHEN GX, HE WW, WANG Y, ZOU YD, LIANG JB, LIAO XD, WU YB. Effect of different oxytetracycline addition methods on its degradation behavior in soil[J]. Science of the Total Environment, 2014, 479-480: 241-246.
- [21] SUN Y, ZHAO LX, LI XJ, HAO YQ, XU HJ, WENG LP, LI YT. Stimulation of earthworms (*Eisenia fetida*) on soil microbial communities to promote metolachlor degradation[J]. Environmental Pollution, 2019, 248: 219-228.
- [22] 郝月崎. 蚯蚓对土壤中乙草胺降解的作用及机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2018.
- HAO YQ. Mechanism and effect of earthworm on acetochlor degradation in soil[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
- [23] 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.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [24] ARSENEAU JR, STEEVES R, LAFLAMME M. Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues[J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(4): 686-693.
- [25] LANE D, STACKEBRANT E, GOODFELLOW M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M].



- Chichester: Wiley, 1991.
- [26] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [27] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [28] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [29] 杨洪杏. 啮虫脒降解菌株的分离、降解关键酶基因克隆及啮虫脒污染土壤生物修复研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2016.
- YANG HX. Isolation of acetamiprid-degrading strain, cloning of the degrading gene and the bioremediation of acetamiprid contaminated soil[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [30] WANG GL, YUE WL, LIU Y, LI F, XIONG MH, ZHANG H. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide Acetamiprid by bacterium *Pigmentiphaga* sp. strain AAP-1 isolated from soil[J]. Bioresource Technology, 2013, 138: 359-368.
- [31] PANG SM, LIN ZQ, ZHANG WP, MISHRA S, BHATT P, CHEN SH. Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of neonicotinoids[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 868.
- [32] BANERJEE A, BISWAS JK, PANT D, SARKAR B, CHAUDHURI P, RAI M, MEERS E. Enteric bacteria from the earthworm (*Metaphire posthuma*) promote plant growth and remediate toxic trace elements[J]. Journal of Environmental Management, 2019, 250: 109530.
- [33] 陈锐, 瞿佳, 门欣, 邓媛, 孙晓宇, 赵玲侠, 沈卫荣. 氧化乐果降解菌 ZZY-C13-1-9 的筛选、鉴定及降解能力[J]. 福建农业学报, 2020, 35(8): 869-875.
- CHEN R, QU J, MEN X, DENG Y, SUN XY, ZHAO LX, SHEN WR. Isolation, identification, and characterization of omethoate-degrading *Pseudomonas abietaniphila* ZZY-C13-1-9[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2020, 35(8): 869-875 (in Chinese).
- [34] 赵和平. 菲降解菌分离鉴定、降解基因克隆与表达及菲跨膜作用研究[D]. 上海: 同济大学博士学位论文, 2007.
- ZHAO HP. Microbial toxicity of phenanthrene and isolation, characterization of phenanthrene degraders as well as cloning and expression of degradation genes[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Tongji University, 2007 (in Chinese).
- [35] ZHANG ZL, MEI XT, HE ZL, XIE XY, YANG Y, MEI CY, XUE D, HU T, SHU M, ZHONG WH. Nicotine metabolism pathway in bacteria: mechanism, modification, and application[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(3): 889-904.
- [36] 王维乐, 牟志美, 张淑君, 于奇, 任春久, 赵凯, 姚娟, 高绘菊. 响应面法优化 *Paraconiothyrium variabile* GHJ-4 产漆酶发酵条件[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(3): 321-325.
- WANG WL, MU ZM, ZHANG SJ, YU Q, REN CJ, ZHAO K, YAO J, GAO HJ. Optimization of fermentation conditions of *Paraconiothyrium variabile* GHJ-4 for laccase production by response surface methodology[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(3): 321-325 (in Chinese).
- [37] CHEN SH, LAI KP, LI YN, HU MY, ZHANG YB, ZENG Y. 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.
- [38] 李灵灵, 王敬红, 赵铎, 刘嘉乐, 申贵男, 袁媛, 高亚梅, 晏磊, 魏丹, 王伟东. 木质素降解菌 BYL-7 的筛选及降解条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4059-4071.
- LI LL, WANG JH, ZHAO D, LIU JL, SHEN GN, YUAN Y, GAO YM, YAN L, WEI D, WANG WD. Screening of lignin degrading strain BYL-7 and optimization of degradation conditions[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4059-4071 (in Chinese).
- [39] PHUGARE SS, JADHAV JP. Biodegradation of acetamiprid by isolated bacterial strain *Rhodococcus* sp. BCH2 and toxicological analysis of its metabolites in silkworm (*Bombax mori*)[J]. Clean-Soil, Air, Water, 2015, 43(2): 296-304.
- [40] SUN SL, YANG WL, GUO JJ, ZHOU YN, RUI X, CHEN C, GE F, DAI YJ. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide acetamiprid in surface water by the bacterium *Variovorax boronicumulans* CGMCC 4969 and its enzymatic mechanism[J]. RSC Advances, 2017, 7(41): 25387-25397.