

研究报告

微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.)对肉桂酸降解行为

马元元 陈向向 李敏* 王静 张琇 杨国平

(北方民族大学生物科学与工程学院 宁夏 银川 750021)

摘要:【目的】为有效缓解自毒物质肉桂酸对西瓜等作物生长的危害,从宁夏中卫硒砂瓜连作土壤中分离筛选得到一株高效降解肉桂酸的菌株,研究其基本降解特性。【方法】分离筛选得到一株能有效利用肉桂酸生长的菌株,采用 16S rRNA 基因序列分析进行菌株鉴定,运用高效液相色谱法和西瓜幼苗生长毒性实验检测降解特性。【结果】从多年西瓜连作土壤中筛选得到一株高效降解肉桂酸的细菌 R30, 鉴定为 *Exiguobacterium* sp., 其 96 h 内对肉桂酸的降解率可达 99% 以上, 最适降解温度和 pH 分别为 30 °C、pH 7.0。除肉桂酸外, 该菌也能够高效降解香豆酸、阿魏酸、苯甲酸等其他酚酸类物质, 表现出一定的底物广谱性; 检测 96 h 降解液对西瓜种子萌发直至幼苗生长阶段的影响表明, 该菌株可有效缓解肉桂酸对西瓜幼苗的生长抑制作用。【结论】菌株 R30 在肉桂酸、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸等酚酸类物质导致的农作物连作障碍治理领域具有潜在的开发应用价值。

关键词: 肉桂酸, 自毒物质, 微小杆菌属, 西瓜

Degradation of cinnamic acid by *Exiguobacterium* sp. strain

MA Yuan-Yuan CHEN Xiang-Xiang LI Min* WANG Jing
ZHANG Xiu YANG Guo-Ping

(College of Biological Science and Engineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: [Objective] In order to alleviate the harm of cinnamic acid, an auto-toxic substance to the watermelon and other related crops, a bacterial strain with high efficacy of degradation of cinnamic acid was isolated from soils collected in watermelon field of Zhong-wei county, Ningxia. Its characteristics of cinnamic acid-degradation were evaluated. [Methods] A microbe which could effectively use cinnamic acid was isolated. 16S rRNA gene sequence data was used to the strain identification. The degrading kinetics of cinnamic acid by strain R30 was determined by HPLC. A plant growth chamber test was performed to confirm the efficacy of R30 to resume the vitality of watermelon seedlings. [Results] A bacterial strain R30, which was isolated from watermelon continuous cropping soil, was identified as *Exiguobacterium* sp.. This strain could degrade 99% of cinnamic acid within 96 h at 30 °C, pH 7.0. Strain R30 was also found to degrade coumalic acid,

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Ningxia Province (Major Project) (No. [2015]26); The Scientific Research Project of Ningxia Universities (No. NGY2015145)

*Corresponding author: E-mail: bkdlimin@126.com

Received: November 19, 2016; Accepted: February 21, 2017; Published online (www.cnki.net): February 27, 2017
基金项目: 宁夏科技支撑(重大专项)计划项目(宁科计字[2015]26号); 宁夏高等学校科研项目(No. NGY2015145)

*通讯作者: E-mail: bkdlimin@126.com

收稿日期: 2016-11-19; 接受日期: 2017-02-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-27

ferulic acid, and benzoic acid efficiently as well as cinnamic acid. Plant growth chamber test indicated that strain R30 could efficiently alleviate the inhibition of cinnamic acid on watermelon seedlings. **[Conclusion]** The R30 strain possesses the ability of degrading a wide range of phenolic acids, thus has a potent applications in management of crop continuous cropping obstacles which caused by cinnamic acid, coumalic acid, ferulic acid, and benzoic acid.

Keywords: Cinnamic acid, Auto-toxic substance, *Exiguobacterium* sp., Watermelon

酚酸类物质是一类芳香环上带有活性羧酸基团的有机酸, 在自然界中普遍存在于高等植物组织。自然条件下, 酚酸类物质可以通过植物根系分泌、残体降解、花粉传播、雨露淋溶等途径进入周围环境^[1]。研究表明, 酚酸类物质可以显著改变土壤的理化性质、微生物种类及活性^[2-4], 也可对植物体内酶的含量与活性^[5-7]、膜的通透性能^[8]、矿物质元素的吸收^[9-10]、叶绿素含量^[9,11-12]等产生影响, 进而对植物的生长产生抑制作用, 因此被认为是引起植物自毒作用、导致作物连作障碍的主要因素之一。肉桂酸是一种典型的酚酸类化合物, 普遍存在于西瓜、黄瓜、豌豆、茄子、百合、地黄等作物根系分泌物, 是很多连作障碍研究中的模式化合物^[13]。

利用微生物分解代谢作物根系土壤中的酚酸类物质, 从而降低土壤中酚酸类物质的含量、缓解其对作物的自毒作用, 被认为是自然界中酚酸类物质降解的一条有效途径。例如, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 等能高效降解花生根系自毒物质苯甲酸^[14]; 葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.)、淡紫褐链霉菌 (*Streptomyces enissocaesilis*) 能够在以阿魏酸为唯一碳源的培养基上生长, 在实验室摇瓶培养条件下降解率均可达 90% 以上^[15-16]。孙秀等^[13]从温室黄瓜根际土中筛选得到一株能够高效降解肉桂酸的真菌黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 并证明 72 h 降解液能有效缓解肉桂酸对黄瓜种子发芽和幼苗生长的抑制。暴玮^[17]筛选得到了一株能够高效、高选择性地肉桂酸降解为苯乙酮的菌株, 经鉴定为伯克霍尔德氏菌属的越南伯克氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*)。研究表明, 众多微生物可以利用酚酸类物质作为唯一碳源和能源生长, 从而起到降解转化作用^[1]。应

用有益微生物对酚酸类物质降解的研究日益受到重视^[13]。

尽管前人对酚酸类物质降解菌开展了大量研究, 但聚焦于肉桂酸的降解特性、尤其是降解产物的生物毒性效应研究还较少。有机化合物微生物降解过程的生物毒性效应变化具有一定的不确定性, 毒性降低的同时也存在升高的可能^[1]。考虑到肉桂酸化学分子结构中包含苯环基团, 其生物转化过程中可能生成多种苯环衍生物中间产物, 因此其降解过程的生物毒性效应尤其值得关注。本研究从多年西瓜连作土壤中筛选得到一株肉桂酸高效降解菌株, 在深入研究其对肉桂酸降解速率的基础上, 通过考察降解液对西瓜种子萌发直至幼苗生长阶段的影响, 探究降解产物的毒性特征, 为该菌株在缓解肉桂酸导致的连作障碍中的应用提供生物材料和理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和仪器

肉桂酸(反式)、阿魏酸、咖啡酸、香草酸、香草醛、没食子酸、香豆酸、水杨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、丁香酸均为分析纯($\geq 98\%$), 购自阿拉丁公司。色谱流动相水相采用 Milli-Q 超纯水系统制备(电阻率大于 18 M Ω ·cm), Milli-Q 超纯水仪购自密理博中国有限公司; 有机相采用色谱纯甲醇, 其他试剂为分析纯或生物试剂, 均购自银川伟博鑫生物科技有限公司。

恒温振荡培养箱(HZ-9511K), 太仓市科教器材厂; 光照恒温培养箱(150A), 金坛市华城润华实验仪器厂; 显微镜(CX31), 奥林巴斯(中国)有限公司; 高效液相色谱仪(Agilent 1200), 配置二极管阵列检测器(DAD, G1315B), 色谱柱为 Agilent ZORBAX

RX-C₁₈, 4.6 mm×150 mm, 5 μm。

1.2 培养基

无机盐培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 0.30, K₂HPO₄·3H₂O 0.66, CaCl₂·6H₂O 0.10, 琼脂粉 15.00, 1 mL 微量元素, 1×10⁵ Pa 蒸汽灭菌 20 min。其中, 微量元素配比为(mg/L): MnSO₄·4H₂O 22.30, ZnSO₄·7H₂O 8.60, CuSO₄·5H₂O 0.025, H₃BO₄ 6.20, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25, KI 0.83, CoCl₂·6H₂O 0.025。

降解培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 0.30, K₂HPO₄·3H₂O 0.66, CaCl₂·6H₂O 0.10, MgSO₄·7H₂O 0.15, 酵母粉 0.50, 1×10⁵ Pa 蒸汽灭菌 20 min。

上述培养基根据需要, 在灭菌后即将冷却时加入纯乙醇配制的肉桂酸母液, 使培养基内肉桂酸浓度达到 100 mg/L, 溶剂乙醇的浓度控制在 0.1%以下。

胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptic soy broth, TSB)培养基(g/L): 胰蛋白胨 17.00, 大豆木瓜蛋白酶消化物 3.00, NaCl 5.00, KH₂PO₄ 2.50, 葡萄糖 2.50。

MS (Murashige & Skoog, MS)培养基按照常规配方配制^[18]。

1.3 肉桂酸降解菌的筛选及培养

采用一次性投加高浓度化合物的驯化方法^[19], 将多年西瓜连作土壤浸提液涂布在含肉桂酸的固体无机盐平板, 于 30 °C 恒温箱培养。选取不同形态的菌落经反复平板涂布、多次驯化后, 挑取长势良好的单菌落接种于固体 TSB 平板进一步分离纯化, 4 °C 保存。

1.4 肉桂酸降解菌的形态学及分子生物学鉴定

菌株在固体 TSB 培养基上划线培养, 单菌落采用平板形态学观察、革兰氏染色和 16S rRNA 基因序列分析等方法进行观察和鉴定。其中, 16S rRNA 基因序列分析采用通用引物 27F 和 1492R 扩增。PCR 反应体系: 基因组模板 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2.0 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, *Taq* 聚合酶(5U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 80 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。测序结果提交到 GenBank, 采用 BLAST

软件进行同源性比较, 采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.5 肉桂酸降解行为的分析方法

采用外标法进行肉桂酸浓度的定量, 高效液相色谱串联二极管阵列检测器(HPLC-DAD)进行分析。液相色谱条件为: 流动相为甲醇-0.5%乙酸溶液(80/20, 体积比), 流速 0.5 mL/min, 进样量: 10 μL, 检测波长 270 nm。

肉桂酸降解行为的测定: 将菌株接种至 TSB 液体培养基, 30 °C、150 r/min 培养至对数生长期后, 取 2 mL 菌液 10 000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清液, 再加入无菌水制备成菌悬液。将菌悬液加入含 100 mg/L 肉桂酸的降解培养基, 使其中的菌细胞初始浓度达到 10⁷ CFU/mL, 于 30 °C、150 r/min 恒温振荡培养, 每 12 h 取样一次测定培养基中肉桂酸浓度和菌细胞数量。在 pH 7.0 条件下设置 20、30、40 °C 三个不同实验温度以检测最适降解温度; 在 30 °C 条件下设置 6.0、7.0、8.0、9.0 四个实验 pH 以检测不同初始 pH 对降解的影响; 在 pH 7.0、30 °C 的条件下, 向降解培养基中分别单独添加 100 mg/L 的阿魏酸、咖啡酸、香草酸、香草醛、没食子酸、香豆酸、水杨酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、丁香酸, 30 °C、150 r/min 恒温振荡培养, 每 3 h 取样一次测定残留率及 OD₆₀₀ 值, 考察菌株降解的底物广谱性。上述 10 种底物的液相色谱检测方法如下: 流动相均为甲醇-0.5%乙酸溶液(50/50, 体积比), 流速均为 0.5 mL/min, 进样量均为 10 μL。(1) 香豆酸: 检测波长 306 nm, 保留时间 4.046 min; (2) 阿魏酸: 检测波长 320 nm, 保留时间 4.136 min; (3) 香草酸: 检测波长 260 nm, 保留时间 3.559 min; (4) 咖啡酸: 检测波长 320 nm, 保留时间 3.478 min; (5) 苯甲酸: 检测波长 230 nm, 保留时间 5.682 min; (6) 对羟基苯甲酸: 检测波长 211 nm, 保留时间 3.534 min; (7) 香草醛: 检测波长 279 nm, 保留时间 3.892 min; (8) 丁香酸: 检测波长 285 nm, 保留时间 3.525 min; (9) 没食子: 检测波长 273 nm, 保留时间 2.935 min; (10) 水杨酸: 检测波长 300 nm, 保留时

间 5.830 min。

残留率的计算公式为:

残留率= $C_t/C_0 \times 100\%$, 其中 C_t 为 t 时刻某酚酸的浓度, C_0 为初始某酚酸的浓度, 单位 mg/L。

1.6 西瓜幼苗生长毒性实验

采用“金城 5 号”砷砂瓜种子, 清水浸种 6 h 后, 0.1% 氯化汞消毒 5 min, 无菌水淋洗干净后将种子移植到 MS 培养基表面, 共设计 3 个处理组别: (1) 空白对照(CK)组, 即种子移植到纯 MS 培养基内; (2) 1#组, 种子移植到含有 100 mg/L 肉桂酸 0 h 降解液的 MS 培养基内; (3) 2#组, 种子移植到含有 100 mg/L 肉桂酸 96 h 降解液的 MS 培养基内。上述处理组每组设置 9 个重复。

将移植有西瓜种子的透明玻璃组培瓶置于 28 °C 避光条件下催芽, 待种子露白后, 将组培瓶放置于人工气候室中, 培养条件为 30 °C、12 h 光照 12 h 黑暗, 待空白对照组西瓜幼苗长出两片真叶时(约 21±3 d), 取出西瓜幼苗, 立即进行各项生理生化指标的测定。其中, 子叶面积根据陈年来等^[20]报道的相关系数法估算; 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑光还原法^[18]; 过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚显色法^[18]; 过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收比色法^[18]; 可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法^[18]。

2 结果与分析

2.1 肉桂酸高效降解菌的鉴定

通过富含肉桂酸的固体无机盐平板筛选得到

多株可降解肉桂酸的菌株, 其中一株命名为 R30 的菌株长势突出, 菌落呈橙黄色, 圆形, 光滑湿润, 边缘较整齐, 其菌落形态如图 1A 所示。采用无肉桂酸加入的降解培养基进行培养, 发现该菌株在无肉桂酸加入的培养基内能够有效利用酵母粉良好生长。经革兰氏染色后置于光学显微镜下观察, 菌株 R30 菌体细长, 多数呈短链状排列, 革兰氏染色呈阳性, 如图 1B 所示。经 16S rRNA 基因序列测定、与 GenBank 数据库中已收录的其他相似序列进行核酸序列同源性比较, 结果表明 R30 与 *Exiguobacterium undae* 相似度最高, GenBank 登录号为 KY230508。采用 MEGA 6.0 构建的系统发育树如图 2 所示。

2.2 菌株 R30 对肉桂酸的降解行为

根据 1.5 节所述的液相色谱检测条件, 采用外标法对肉桂酸进行定量分析, 所得色谱检测结果如图 3 所示, 肉桂酸的保留时间为 3.812 min。

2.2.1 不同初始 pH 条件下菌株 R30 对肉桂酸的降解效能: 菌株 R30 在不同初始 pH 条件下对肉桂酸的降解转化效能如图 4 所示。从图 4B 可得, 在肉桂酸初始浓度 100 mg/L、pH 7.0 的条件下, 84 h 后体系中肉桂酸的残留率小于 2%, 至 96 h 后残留率低于 0.3%。由此可见, 96 h 内菌株 R30 即可基本将肉桂酸降解完毕。同时, 菌株 R30 的密度随着降解时间的延长而逐渐升高, 与肉桂酸的残留率呈相反的变化趋势, 表明菌株 R30 可以有效地对肉桂酸进行降解转化。

对比图 4A、B、C 和 D 中肉桂酸 48 h 残留率可知, 菌株 R30 对肉桂酸最佳降解 pH 约为 7.0, 降

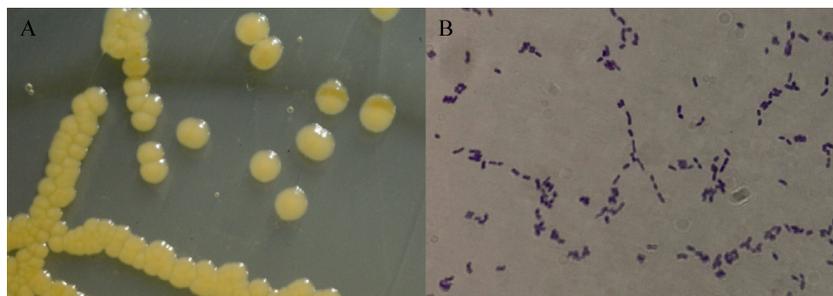


图 1 菌株 R30 在固体 TSB 平板上的菌落形态(A)及革兰氏染色显微照片(B) (1 000×)

Figure 1 Colonial morphology of strain R30 in the TSB solid medium (A) and the Gram's dye micrograph of R30 (B) (1 000×)

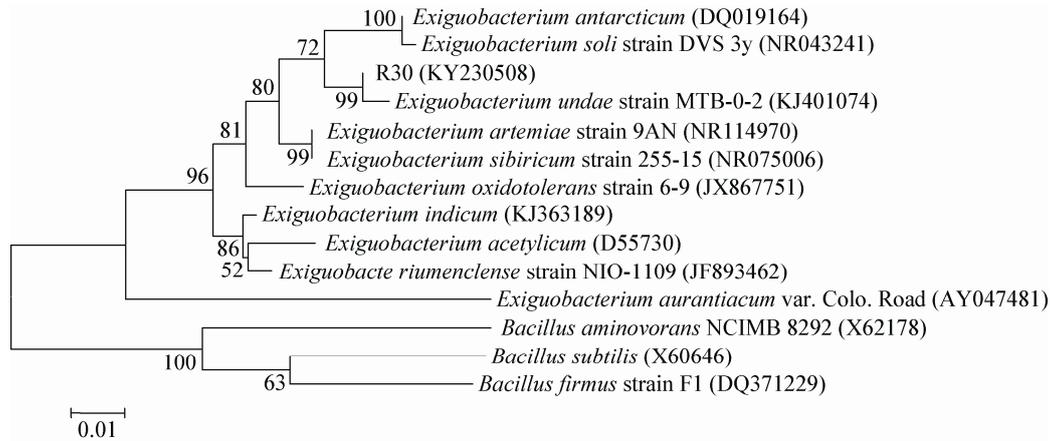


图2 菌株 R30 与其他相关菌株的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain R30 and its relatives

注: 线段 0.01 表示序列差异的分支长度; 发育树节点的数值表示 Bootstrap 值; 括号内的数值为 GenBank 数据库中的登录号。

Note: Bar=0.01 nucleotide divergence. Numbers at nodes present bootstrap percentages. Those in parentheses are the GenBank accession number.

解 48 h 后肉桂酸的残留率低于 47%; pH 6.0 和 pH 8.0 次之, 降解 48 h 后肉桂酸的残留率分别为 75.1%、78.3%; pH 9.0 条件下, 菌株 R30 对肉桂酸的降解能力最弱, 前 48 h 内的降解作用很微弱, 肉桂酸的残留率高于 90%。然而, 对比图 4 中菌株 R30 的生长曲线可得, 在初始菌密度相同的条件下(10^7 CFU/mL), 菌体在 pH 7.0、8.0 的条件下生长最优, pH 9.0 次之, pH 6.0 的环境中菌体生长明显受到抑制。

综合不同初始 pH 条件下菌株 R30 的生长曲线和肉桂酸的降解情况, 推测不同 pH 条件下菌株 R30 对肉桂酸的降解效能主要由菌体最适生长 pH 和肉桂酸存在形态两个因素决定。文献报道

Exiguobacterium sp. 最适生长 pH 约为 7.8^[21], 耐碱不耐酸, 上述结论与图 4 中不同 pH 条件下菌株 R30 的生长曲线吻合良好。肉桂酸分子结构中包含在高 pH 条件下易解离的羧酸官能团, 而以离子形态存在的肉桂酸可能不利于菌株 R30 对其的利用转化。因此, 综合上述两个因素, 菌株 R30 对肉桂酸的最适降解 pH 在 7.0 左右。

2.2.2 不同温度下菌株 R30 对肉桂酸的降解效能: 在肉桂酸初始浓度 100 mg/L、pH 7.0 的条件下, 不同温度对菌株 R30 降解肉桂酸效能的影响如图 5 所示。对比图 5A、B 和 C 中菌株 R30 的生长曲线可知, 其最适生长温度在 30 °C 左右, 在低温 20 °C 条件下的生长情况优于高温 40 °C。相应的, 对肉桂酸的降解效能能在 30 °C 左右达到最大, 降解 84 h 后肉桂酸的残留率低于 5%; 20 °C 条件下的降解效能次之, 84 h 后肉桂酸的残留率也能降至 5% 以下; 在较高温度 40 °C 下, 菌株 R30 对肉桂酸的降解效能明显受到抑制, 降解 84 h 后肉桂酸的残留量略高于 15%。不同温度下菌株 R30 对肉桂酸的降解效能与菌体生长曲线变化趋势一致, 因此推测不同温度下菌株 R30 对肉桂酸的降解效能主要由菌体最适生长温度决定, 在 30 °C 左右菌株 R30 生长最优, 表现出对肉桂酸的最大降解效能。

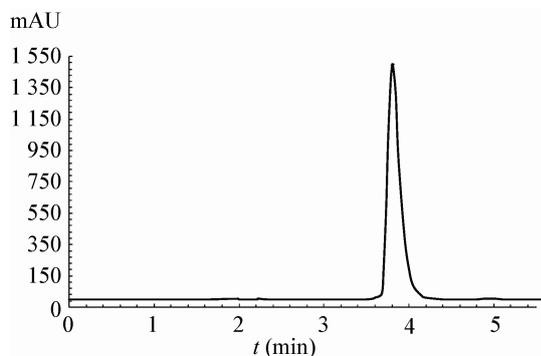


图3 肉桂酸液相色谱检测图

Figure 3 HPLC-DAD picture of cinnamic acid

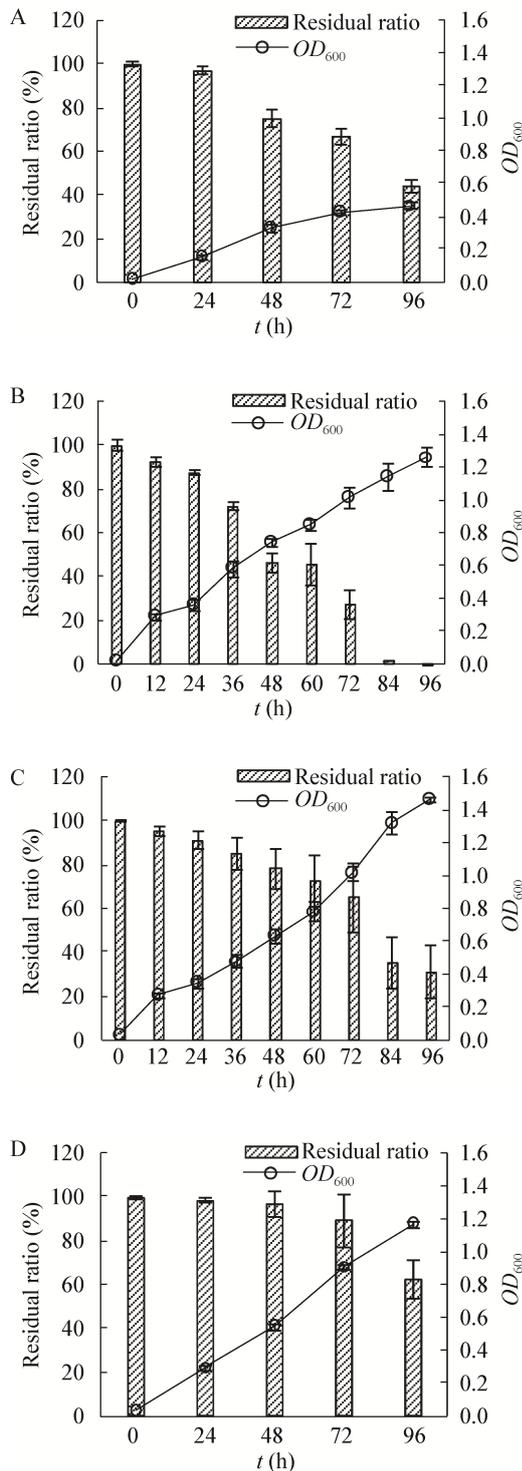


图 4 不同 pH 条件下肉桂酸的降解效能与菌株 R30 的生长曲线

Figure 4 The degradation curve of cinnamic acid and the growth curve of strain R30 at different pH

Note: A: pH 6.0; B: pH 7.0; C: pH 8.0; D: pH 9.0.

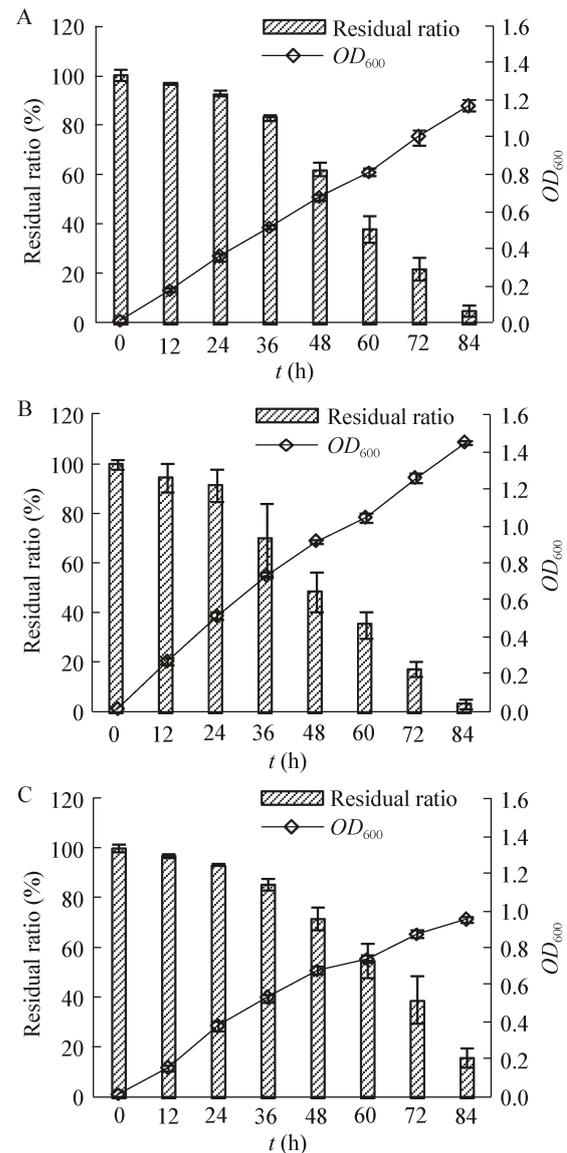


图 5 不同温度下肉桂酸的降解效能与菌株 R30 的生长曲线

Figure 5 The degradation curve of cinnamic acid and the growth curve of strain R30 at different temperatures

Note: A: 20 °C; B: 30 °C; C: 40 °C.

2.2.3 菌株 R30 的底物广谱性: 在降解培养基中分别单独添加 100 mg/L 的阿魏酸、香草酸、苯甲酸等 10 种其他酚酸类化合物, 30 °C、pH 7.0 条件下 150 r/min 振荡培养, 菌株 R30 对不同酚酸类底物的降解活性如表 1 所示。从表 1 可以看出, 香豆酸、阿魏酸、香草酸、咖啡酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、香豆酸、阿魏酸在 6 h 内即被菌株 R30 非常迅速地完全降解, 香草酸、咖啡酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸在 9 h 内

表 1 菌株 R30 对不同酚酸类底物的降解活性
Table 1 The degradation efficiency of R30 strain to different phenolic acids

底物 Substrate	0 h		3 h		6 h		9 h		12 h		24 h	
	残留率 Residual ratio (%)	OD ₆₀₀										
香豆酸	100.00±0.03	0.02±0.00	59.62±0.02	0.18±0.01	0	0.30±0.01	0	0.37±0.00	0	0.39±0.01	0	0.38±0.00
Coumalic acid												
阿魏酸	100.00±0.03	0.02±0.00	73.87±0.02	0.18±0.01	0	0.34±0.03	0	0.40±0.04	0	0.39±0.04	0	0.37±0.04
Ferulic acid												
香草酸	100.00±0.03	0.02±0.00	64.20±0.02	0.06±0.00	7.60±0.01	0.24±0.02	0	0.33±0.02	0	0.35±0.02	0	0.42±0.03
Vanillic acid												
咖啡酸	100.00±0.01	0.02±0.00	84.51±0.03	0.07±0.01	27.81±0.04	0.24±0.01	0	0.34±0.01	0	0.42±0.02	0	0.51±0.03
Caffeic acid												
苯甲酸	100.00±1.00	0.02±0.00	81.90±0.82	0.09±0.01	44.76±0.45	0.29±0.01	0	0.31±0.00	0	0.46±0.02	0	0.54±0.05
Benzoic acid												
对羟基苯甲酸	100.00±0.05	0.02±0.00	78.51±0.01	0.12±0.00	28.32±0.03	0.25±0.01	6.08±0.01	0.36±0.01	0	0.60±0.02	0	0.84±0.05
4-Hydroxybenzoic acid												
香草醛	100.00±0.05	0.02±0.00	100.00±0.03	0.04±0.00	99.80±0.02	0.05±0.01	96.76±0.04	0.14±0.01	72.82±0.03	0.25±0.01	18.73±0.03	0.43±0.01
Vanillic aldehyde												
丁香酸	100.00±0.00	0.02±0.00	97.91±0.02	0.10±0.01	93.48±0.02	0.18±0.01	82.60±0.04	0.25±0.01	68.20±0.06	0.46±0.02	47.64±0.06	0.48±0.03
Syringic acid												
没食子酸	100.00±0.05	0.02±0.00	95.25±0.02	0.09±0.00	92.43±0.02	0.19±0.01	92.56±0.05	0.28±0.01	88.70±0.03	0.40±0.01	86.09±0.03	0.44±0.01
Gallic acid												
水杨酸	100.00±0.03	0.02±0.00	97.65±0.01	0.09±0.00	96.29±0.03	0.18±0.02	96.38±0.01	0.27±0.00	94.24±0.01	0.30±0.02	94.80±0.03	0.32±0.02
Salicylic acid												

也基本被完全降解；香草醛和丁香酸在降解 12 h 后残留率分别为 18.73%和 47.64%，由此推测菌株 R30 对香草醛和丁香酸也具有较高的降解活性。降解 24 h 后，体系中没食子酸和水杨酸的残留率仍达到了 86.09%和 94.80%，表明菌株 R30 对这两种酚酸降解效能有限。带有活性羧酸基团的苯环是酚酸类化合物分子结构的共性，苯环上其他位置的取代基种类和数量造成了各酚酸化合物理化性质的差异，因此菌株 R30 对上述酚酸类化合物降解效能存在较大的差异。总体而言，菌株 R30 除了能高效降解肉桂酸外，对其他酚酸类化合物也表现出了良好的降解能力，降解底物具有一定的广谱性。

2.3 肉桂酸降解液对西瓜幼苗生长的影响

植物种子萌发及萌发后的幼苗生长阶段要比其他阶段对化感物质更具敏感性，而化感物质经微生物降解后的产物毒性效应也应引起足够重视，因此研究检测了 100 mg/L 肉桂酸经菌株 R30 分别降解 0 h 和 96 h 后，其降解液对西瓜种子萌发直至幼苗生长阶段的影响，结果如图 6 和图 7 所示。从图 6、7 中可以看出，0 h 降解液，即 100 mg/L 肉桂酸显著抑制了西瓜幼苗的生长，其株高、鲜重、子叶面积、茎粗、根体积、根长 6 项指标显著低于空白



图 6 菌株 R30 对西瓜幼苗生长情况的影响
Figure 6 Effect of strain R30 to the growing of watermelon seedlings

注：CK：空白对照；1#：100 mg/L 肉桂酸经菌株 R30 降解 0 h；
2#：100 mg/L 肉桂酸经菌株 R30 降解 96 h。

Note: CK: Black control; 1#: 0 h degradation liquid of 100 mg/L cinnamic acid; 2#: 96 h degradation liquid of 100 mg/L cinnamic acid.

对照组，而超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)和可溶性蛋白含量显著高出空白对照组。100 mg/L 肉桂酸经菌株 R30 降解 96 h 后，显著缓解了肉桂酸对西瓜幼苗生长的抑制作用，SOD、POD、CAT 抗氧化酶活性和可溶性蛋白含量与空白对照组几乎无差别，鲜重、茎粗等生长指标与空白对照组也非常接近。由此推测，菌株 R30 不仅对肉桂酸表现出良好的降解效果，而且降解产物无明显毒性效应。

3 讨论

与增施有机肥、嫁接等减轻酚酸类自毒物质连作障碍的措施相比，采用微生物降解途径缓解土壤酚酸积累对农田生态环境的可持续发展更具现实意义。文献报道显示，外源肉桂酸可以改变土壤微生物的生物量、呼吸和代谢熵^[22]，对放线菌表现出显著的抑制作用，而对氨化细菌作用不明显^[23]，即肉桂酸对不同微生物的作用效应不同，因此不同微生物对肉桂酸的降解转化行为也存在较大差别。例如，王宗芹^[24]从杨树人工林根际土壤中筛选出 4 株菌，发现米曲霉(*Aspergillus oryzae*)对肉桂酸的降解效果最好，在 24 h 内降解效率可达 94%；担子菌酵母(*Basidiomycete yeast sp.*)和中华根瘤菌(*Sinorhizobium sp.*)在降解 72 h 后降解率也分别达到 99%和 98%；假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的降解效果最差，降解 96 h 后肉桂酸的降解率仅为 88%，即真菌对肉桂酸的降解能力高于细菌。孙秀^[25]分离得到的黑曲霉(*Aspergillus niger*)在液体摇瓶培养条件下，对肉桂酸的降解效率为 72 h 达 99.62%。微小杆菌属细菌在自然界中分布极为广泛，研究表明其在分解复杂有机污染物、转化重金属、作物根际促生等领域已被证实具有潜在或良好的利用价值^[26]。本研究发现的 R30 菌株经鉴定为微小杆菌属(*Exiguobacterium sp.*)细菌，从生境角度讲，其来源地宁夏中卫晒砂瓜种植区存在干旱、盐碱、昼夜温差大等多种环境胁迫因素，表明该菌具有较高的极端环境耐受性；从降解转化性能角度讲，目前还未

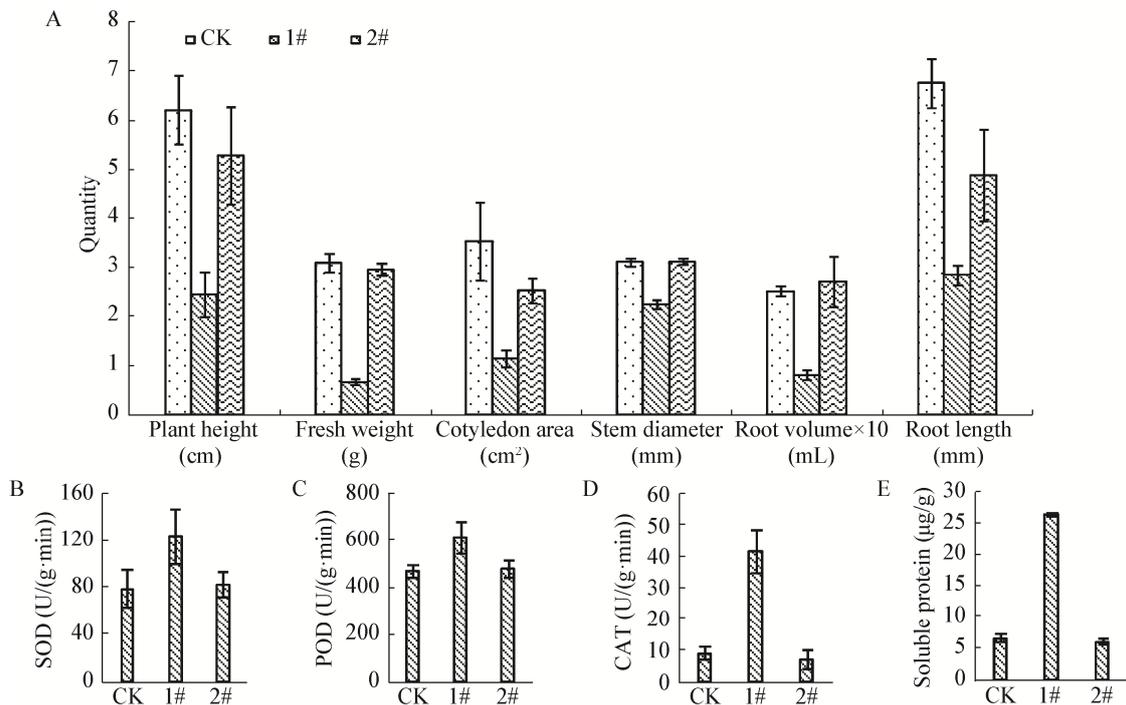


图7 菌株 R30 对西瓜幼苗部分生理生化指标的影响

Figure 7 Effects of strain R30 on some physiological and biochemical indexes of watermelon seedlings

注: A: 菌株 R30 对西瓜幼苗株高、鲜重、子叶面积、茎粗、根体积和根长的影响; B: 菌株 R30 对西瓜幼苗 SOD 活性的影响; C: 菌株 R30 对西瓜幼苗 POD 活性的影响; D: 菌株 R30 对西瓜幼苗 CAT 活性的影响; E: 菌株 R30 对西瓜幼苗可溶性蛋白含量的影响。CK: 空白对照; 1#: 100 mg/L 肉桂酸经菌株 R30 降解 0 h; 2#: 100 mg/L 肉桂酸经菌株 R30 降解 96 h。

Note: A: Effects of strain R30 on plant height, fresh weight, cotyledon area, stem diameter, root volume and root length of watermelon seedlings; B: Effects of strain R30 on SOD activity of watermelon seedlings; C: Effects of strain R30 on POD activity of watermelon seedlings; D: Effects of strain R30 on CAT activity of watermelon seedlings; E: Effects of strain R30 on soluble protein content of watermelon seedlings. CK: Black control; 1#: 0 h degradation liquid of 100 mg/L cinnamic acid; 2#: 96 h degradation liquid of 100 mg/L cinnamic acid.

见到该菌应用于酚酸或苯酚类有机化合物降解转化领域的研究报道。与其他细菌相比, R30 菌株在液体发酵液中对肉桂酸表现出了较高的降解能力, 96 h 内降解率可达 99% 以上, 而且可在较宽的温度和 pH 范围内对肉桂酸进行降解; 实际环境中, 一种作物根系常共存多种酚酸类物质, 而菌株 R30 对其其他诸如香豆酸、阿魏酸、苯甲酸等酚酸类物质也具有高效的降解能力, 表现出了一定的底物广谱性。此外, 微生物对有机化合物的代谢转化作用很难达到完全矿化去除的效果, 因此转化产物的生物毒性效应值得考虑, 本研究通过检测降解液对西瓜种子萌发直至幼苗生长阶段的影响, 发现该菌株对肉桂酸表现出良好降解效果的同时其降解产物无明显毒性。综上, 推测 R30 菌株在研发酚酸类物质降解

专用微生物菌肥、缓解相关作物连作障碍领域具有较高的潜在应用价值。目前, 微生物降解转化肉桂酸^[27]、4-羟基苯甲酸^[28]等酚酸类物质过程中的相关酶学和基因研究已有报道, 但微小杆菌属细菌应用于酚酸类有机化合物降解转化领域的研究还未见报道, 降解转化过程的关键酶和关键基因、原位降解效果等有待进一步探究, 因此我们将继续对菌株 R30 降解转化肉桂酸机理、菌株 R30 在作物根系的定殖能力和降解效能等方面展开深入的研究验证。

参考文献

- [1] Xie XG, Chen Y, Bu YQ, et al. A review of allelopathic researches on phenolic acids[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(22): 6417-6428 (in Chinese)
谢星光, 陈晏, 卜元卿, 等. 酚酸类物质的化感作用研究进展

- [J]. 生态学报, 2014, 34(22): 6417-6428
- [2] Blum U, Shafer SR. Microbial populations and phenolic acids in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20(6): 793-800
- [3] Li PD, Wang XX, Li YL, et al. The contents of phenolic acids in continuous cropping peanut and their allelopathy[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(8): 2128-2134 (in Chinese)
李培栋, 王兴祥, 李奕林, 等. 连作花生土壤中酚酸类物质的检测及其对花生的化感作用[J]. 生态学报, 2010, 30(8): 2128-2134
- [4] Wu LK, Wang HB, Zhang ZX, et al. Comparative metaproteomic analysis on consecutively *Rehmannia glutinosa*-monocultured rhizosphere soil[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): 9055-9059
- [5] Batish DR, Singh HP, Kaur S, et al. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*)[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(3): 297-305
- [6] Wu ZW, Wang MD, Liu XY, et al. Phenolic compounds accumulation in continuously cropped *Rehmannia glutinosa* soil and their effects on *R. glutinosa* growth[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(4): 660-664 (in Chinese)
吴宗伟, 王明道, 刘新育, 等. 重茬地黄土壤酚酸的动态积累及其对地黄生长的影响[J]. 生态学杂志, 2009, 28(4): 660-664
- [7] Yang RX. The allelopathy of autotoxic compounds in muskmelon continuous cropping obstacle and mitigation mechanism[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2014 (in Chinese)
杨瑞秀. 甜瓜根系自毒物质在连作障碍中的化感作用及缓解机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2014
- [8] Li ZH, Wang Q, Ruan X, et al. Phenolics and plant allelopathy[J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 8933-8952
- [9] Alsaadawi IS, Ai-Hadithy SM, Arif MB. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and ions uptake in cowpea seedlings[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1986, 12(1): 221-227
- [10] Lü WG, Zhang CL, Yuan F, et al. Mechanism of allelochemicals inhibiting continuous cropping cucumber growth[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(1): 106-109 (in Chinese)
吕卫光, 张春兰, 袁飞, 等. 化感物质抑制连作黄瓜生长的作用机理[J]. 中国农业科学, 2002, 35(1): 106-109
- [11] Yang CM, Lee CN, Chou CH. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation[J]. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei*, 2002, 43(4): 299-304
- [12] Gao X, Zhang GW, Hu QZ, et al. Effects of cinnamic acid on growth and chlorophyll fluorescence parameters of *Pisum sativum* L. seedlings[J]. *China Vegetables*, 2013, 1(8): 44-49 (in Chinese)
高旭, 张古文, 胡齐赞, 等. 自毒物质肉桂酸对豌豆幼苗生长及叶绿素荧光特性的影响[J]. 中国蔬菜, 2013, 1(8): 44-49
- [13] Sun X, Wang XF, Wei M, et al. Screening and identification of cinnamic acid-degrading fungus and the effect of degradation liquid on the cucumber germination[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(4): 765-772 (in Chinese)
孙秀, 王秀峰, 魏珉, 等. 肉桂酸降解真菌的筛选及其降解液对黄瓜种子发芽的影响[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 765-772
- [14] He ZG, Wang R, Wang XJ, et al. Preliminary study of screening of peanut autotoxicity degrading microorganism and the degradation effect[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(21): 224-227 (in Chinese)
何志刚, 汪仁, 王秀娟, 等. 花生自毒物质降解菌的筛选及其降解效果初步研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 224-227
- [15] Wang XH, Xue QH. Screening of ferulic acid degrading actinomycetes and their degradation and inhibiting effect[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(12): 153-158 (in Chinese)
王晓辉, 薛泉宏. 阿魏酸降解放线菌的筛选及其降解与拮抗效果研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(12): 153-158
- [16] Xie Y, Ma ZY, Kong WF, et al. Ferulic acid degradation bacterium AWS4B screening and its degradation characteristics[J]. *Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering*, 2014, 36(6): 106-111 (in Chinese)
谢越, 马忠友, 孔维芳, 等. 1株阿魏酸降解菌的筛选与降解特征研究[J]. 土木建筑与环境工程, 2014, 36(6): 106-111
- [17] Bao W. Biodegradation of cinnamaldehyde and cinnamic acid and its product analysis[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2008 (in Chinese)
暴玮. 肉桂醛和肉桂酸生物降解及其转化产物跟踪分析[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2008
- [18] Li HS. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 148 (in Chinese)
李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 148
- [19] Xu ZW, Chen H. Influence factors of humus reduction by acclimated sediments of West Lake[J]. *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, 2010, 44(2): 349-352 (in Chinese)
徐志伟, 陈红. 驯化的西湖底泥还原腐殖质影响因素研究[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2010, 44(2): 349-352
- [20] Chen NL, Wang G, Tao YH. Dynamics of leaf system in muskmelon[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(4): 615-621 (in Chinese)
陈年来, 王刚, 陶永红. 甜瓜叶系统发育动态研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(4): 615-621
- [21] Hu J, Dai XZ, Li SP. The isolation and identification of a Gram positive atrazine-degradation bacterium BTAH1[J]. *China Environmental Science*, 2004, 24(6): 738-742 (in Chinese)
胡江, 代先祝, 李顺鹏. 阿特拉津降解菌 BTAH1 的分离与鉴定[J]. 中国环境科学, 2004, 24(6): 738-742
- [22] Wu FZ, Huang CH, Zhao FY. Effects of phenolic acids on growth and activities of membrane protective enzymes of cucumber seedlings[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(7): 821-825 (in Chinese)
吴凤芝, 黄彩红, 赵凤艳. 酚酸类物质对黄瓜幼苗生长及保护酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 821-825
- [23] Tan XM, Wang HT, Kong LG, et al. Accumulation of phenolic acids in soil of a continuous cropping Poplar plantation and their effects on soil microbes[J]. *Journal of Shandong University (Natural Science)*, 2008, 43(1): 14-19 (in Chinese)
谭秀梅, 王华田, 孔令刚, 等. 杨树人工林连作土壤中酚酸积累规律及对土壤微生物的影响[J]. 山东大学学报: 理学版, 2008, 43(1): 14-19
- [24] Wang ZQ. Study on the biodegradation of phenolic acids accumulated on the replanted *Populus*[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2010 (in Chinese)
王宗芹. 杨树人工林连作酚酸生物降解的研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2010
- [25] Sun X. Screening and functional characterization of cinnamic acid-degrading strains from cucumber rhizosphere soil[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese)
孙秀. 黄瓜根际土壤肉桂酸降解菌株的筛选及其功能特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014
- [26] Zhang Y, Shi P, Ma J. *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(5): 898-904 (in Chinese)
张莹, 石萍, 马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(5): 898-904
- [27] Xie XG, Dai CC. Biodegradation of a model allelochemical cinnamic acid by a novel endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 104: 498-507
- [28] Chen Y, Peng Y, Dai CC, et al. Biodegradation of 4-hydroxybenzoic acid by *Phomopsis liquidambari*[J]. *Applied Soil Ecology*, 2011, 51: 102-110