

研究报告

苹果根际自毒物质降解菌的筛选鉴定及降解特性研究

祁国振¹ 毛志泉² 胡秀娜¹ 杜秉海¹ 葛科¹ 杨倩倩¹ 丁延芹^{1*}

(1. 山东农业大学生命科学学院 山东 泰安 271018)

(2. 山东农业大学园艺科学与工程学院 山东 泰安 271018)

摘要:【目的】从苹果根际土壤筛选苹果根系自毒物质降解细菌,并探究分离菌株对根皮苷、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸以及焦性没食子酸的降解能力。【方法】分别采用邻苯二甲酸、焦性没食子酸为唯一碳源富集并筛选其降解菌株。通过对分离菌株的生理生化特征测定及 16S rRNA 基因序列分析,采用 MEGA 5 构建系统发育树,进行菌株鉴定。采用紫外分光光度法和高效液相色谱法测定分离菌株对 4 种自毒物质的降解能力。【结果】共分离 5 株有降解能力的细菌,编号为 BL1、BL2、BL3、BJ1 和 BJ2,经鉴定 BL1 为钩虫贪铜菌 *Cupriavidus necator*, BL2 为生脂固氮螺菌 *Azospirillum lipoferum*, BL3 为氧化烃微杆菌 *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, BJ1 为 *Paenibacillus phyllosphaerae*, BJ2 为 *Ochrobactrum cytisi*。BL1、BL2、BL3 菌株对邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸、根皮苷、焦性没食子酸的降解率均高于 50%。其中 BL2 菌株的降解效果最好,分别达到 66%、72%、84%和 84%。【结论】首次发现钩虫贪铜菌、生脂固氮螺菌和氧化烃微杆菌对 4 种自毒物质均具有很好的降解能力,对缓解自毒物质引起的连作障碍具有潜在的应用价值。

关键词: 苹果根际, 自毒物质降解菌, 根皮苷, 邻苯二甲酸

Isolation, identification and degradation characteristics of apple rhizosphere autotoxic compounds-degrading bacteria

QI Guo-Zhen¹ MAO Zhi-Quan² HU Xiu-Na¹ DU Bing-Hai¹ GE Ke¹
YANG Qian-Qian¹ DING Yan-Qin^{1*}

(1. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

(2. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to screen autotoxic compounds degradation bacteria from apple rhizosphere soil, and investigate the capacity of degrading phloridzin, phthalic acid, P-hydroxybenzoic acid and pyrogallol of the bacteria. [Methods] Bacteria were enriched and

Foundation item: Supported by the Modern Agricultural Industry Technology System Construction under Special Funding Project (No. CARS-28); Shandong Province Agriculture Significant Application Technology Innovation Subject; Yangtze River Scholar and Innovation Team Development Plan (No. IRT1155)

*Corresponding author: Tel: 86-538-8242908; E-mail: dingyq6885@163.com

Received: April 16, 2015; **Accepted:** June 11, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 11, 2015

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(No. CARS-28); 山东省农业重大应用技术创新课题资助项目; 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(No. IRT1155)

*通讯作者: Tel: 86-538-8242908; E-mail: dingyq6885@163.com

收稿日期: 2015-04-16; **接受日期:** 2015-06-11; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-11

isolated by the sole carbon source Phthalic acid, Then, the strains were identified by the determination of physiological and biochemical characteristics, as well as 16S rRNA gene sequence analysis. Additionally, the ability of degradating phthalic acid, pyrogalllic acid, P-hydroxybenzoic acid and phloridzin using the ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **[Results]** A total of five bacteria were isolated and named as BL1, BL2, BL3, BJ1 and BJ2, respectively. All of them degraded phthalic acid, pyrogalllic acid, P-hydroxybenzoic acid and phloridzin. The five strains BL1, BL2, BL3, BJ1 and BJ2 were identified as *Cupriavidus necator*, *Azospirillum lipoferum*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Paenibacillus phyllosphaerae* and *Ochrobactrum cytisi* respectively. The degradation rates to phthalic acid, pyrogalllic acid, P-hydroxybenzoic acid and phloridzin of BL1, BL2 and BL3 were all more than 50%. The degradation rate to phthalic acid, pyrogalllic acid, P-hydroxybenzoic acid and phloridzin of BL2 was highest, and the degradation rate was 91%, 72%, 84% and 84% respectively. **[Conclusion]** We firstly discovered that *Cupriavidus necator*, *Azospirillum lipoferum* and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* had the ability to degrade those four autotoxic compounds, and they were expected to be applied in continuous cropping obstacle caused by autotoxic compounds in apple.

Keywords: Apple rhizosphere, Autotoxic compounds degradation bacterium, Phloridzin, Phthalic acid

苹果是我国主要经济作物之一。近年来, 苹果主产区由于连年种植导致的连作障碍已成为制约苹果生产的关键性技术问题。苹果连作障碍产生的主要原因包括土壤理化性状恶化、土传病虫害加重、自毒物质产生的自毒作用, 其中自毒物质对植物的毒害作用是导致植物连作障碍的原因之一。

自毒作用(Autotoxicity)是指某些植物可通过地上部淋溶、根系分泌和植株残茬腐解等途径来释放一些物质对同茬或下茬同种或同科植物生长产生抑制作用^[1]。研究发现酚酸类物质是导致苹果连作障碍的主要自毒物质。酚酸类物质可以通过影响植物的膜系统、光合作用、酶活性、土壤微生物活性和土壤理化性质等^[2], 对植物生长产生抑制作用。导致苹果连作障碍的酚酸物质主要有根皮苷、邻苯二甲酸、焦性没食子酸、对羟基苯甲酸等^[3-4]。目前尚未找到去除苹果自毒物质的有效方法, 微生物对自毒物质的降解作用被认为是一条很好的途径, 既可以降低自毒物质的含量, 又不对环境产生危害。国内外学者对植物有毒害作用的酚酸类物质(阿魏酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、根皮苷)降解菌的研究多是一种菌对单种自毒物质有降解效果。如, Chatterjee 等筛选得到一株降解根皮苷的细菌^[5]。

Krumholz 等筛选得到一株降解焦性没食子酸的细菌^[6]。黄园勇等从植物根际分离得到 4 株具有较高根皮苷降解能力的根际放线菌株^[7]。关于降解菌已有的报道菌株主要有草生欧文氏菌(*Erwinia herbicola*)^[5]、*Eubacterium oxidoreducens*^[6]、苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.)^[8]、肉质链霉菌(*Streptomyces cescarnosus*)和密旋链霉菌(*Streptomyces cespactum*)^[9]、贪噬菌属(*Variovorax* sp.)、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)和小单孢菌属(*Micromonospora* sp.)^[7]等。

本研究分别以邻苯二甲酸、焦性没食子酸为唯一碳源筛选降解菌株, 并检验筛选菌株对根皮苷、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸和焦性没食子酸的降解能力, 以期发现能降解多种酚酸类自毒物质的细菌, 为缓解苹果连作障碍的生物方法储备菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品

苹果根际土壤采集自山东泰安北集坡镇西百子坡村(36°04'54.9"N, 117°08'51.3"E)。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂: 邻苯二甲酸分析纯, 天津市化学试剂有限公司; 焦性没食子酸分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司; 对羟基苯甲酸化学纯, 上海楷洋生

物技术有限公司;蛋白胨、酵母膏,英国 OXOID 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs,宝生物工程(大连)有限公司;普通引物 27F、1492R,生工生物工程(上海)有限公司。

1.2.2 仪器: Spectrumlab 22 可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;Ultrospec 2100 pro 紫外/可见分光光度计,美国 GE Healthcare 公司;Waters2695 高效液相色谱仪,沃特世科技(上海)有限公司;温度梯度 PCR 仪,德国 Whatman Biometra 公司。

1.2.3 培养基: 无机盐培养基(g/L): NH_4Cl 0.5, NaCl 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4^[10]。LB 培养基参考文献[11]配制。

1.2.4 降解菌的富集及分离: (1) 取苹果根际土 10 g 放于 90 mL 的基础无机盐培养基中,其中基础盐培养基中邻苯二甲酸和焦性没食子酸的质量浓度分别为 1 000 mg/L 和 5 mg/L, 30 °C、180 r/min 培养 7 d 后,以 5%接种量转接至新的含邻苯二甲酸及焦性没食子酸的基础盐培养基中,转接 2 次连续富集,邻苯二甲酸浓度分别为 1 200 mg/L 和 1 400 mg/L,焦性没食子酸浓度分别为 10 mg/L 和 15 mg/L。

(2) 取富集后的培养液经梯度稀释后(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6})分别涂布于含 1 400 mg/L 的邻苯二甲酸和 15 mg/L 焦性没食子酸基础盐固体培养基平板上,30 °C 培养。待平板上出现单菌落后,挑取单菌落分别划线于邻苯二甲酸及焦性没食子酸基础盐固体培养基中,反复划线进行纯化,将纯化后的菌落接种至 LB 固体斜面培养基中保存。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌株的形态观察及生理生化特征: 形态及生理生化特征参照《常见细菌系统鉴定手册》以及文献中关于参考菌株的生理生化实验^[12-19]。

1.3.2 基因组 DNA 的提取: DNA 提取方法参考文献[20]。将得到的 DNA 溶于 40 μL TE 缓冲液中,然后保存于-20 °C 备用。

1.3.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和序列测定: 16S rRNA 基因序列扩增引物由上海生物工程有限公司

合成,正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物 1492R: 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'。

1.3.4 PCR 扩增反应体系: PCR 反应条件及体系参阅文献[19]。16S rRNA 基因的测序工作由上海生物工程有限公司完成。

1.3.5 系统发育树的构建: 将 BL1、BL2、BL3、BJ1 和 BJ2 菌株的 16S rRNA 基因的测序结果提交 GenBank,获得的登录号分别为 KR052877、KM009070、KR052878、KR052879 和 KR052880。序列相似性分析通过 NCBI 的 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比对,利用 MEGA 5 软件进行系统发育分析,采用 Neighbor-Joining 算法和 Jukes-Cantor 模型构建系统发育树,自展次数设定为 1 000^[21]。

1.4 降解性能分析

1.4.1 自毒物质最大吸收波长的确定: (1) 试样溶液的制备: 分别称取 0.1 g 根皮苷、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸、焦性没食子酸(准确至 0.001 g),用适量蒸馏水溶解,用水稀释定容至 100 mL (试样质量浓度为 1 g/L)。

(2) 最大吸收波长的确定: 用紫外分光光度计对试样溶液进行扫描,确定其特征吸收波长。邻苯二甲酸的最大吸收波长为 291 nm,对羟基苯甲酸的最大吸收波长为 248 nm,焦性没食子酸的最大吸收波长为 302 nm,根皮苷的最大吸收波长为 325 nm。

1.4.2 培养基的制备及菌种制备: 分别配制含根皮苷(20 mg/L)的无机盐培养基,含邻苯二甲酸(1 g/L)的无机盐培养基,含对羟基苯甲酸(1 g/L)的无机盐培养基,含焦性没食子酸(1 g/L)的无机盐培养基适量。分装于 100 mL 锥形瓶中 1×10^5 Pa 灭菌 20 min,然后分别转接 BL1、BL2、BL3、BJ1 和 BJ2 菌株于对应培养基中,30 °C、180 r/min 培养至对数期。

1.4.3 生长情况及降解率的测定: 取上述培养的菌株 1%的接种量于新的相应的培养基中,30 °C、

180 r/min 培养, 每 24 h 取样, 采用可见分光光度计法测定 OD_{600} 反映细菌的生长情况。自毒物质残留量测定采用紫外分光光度法测定。首先对得到的样品 9 000 r/min 离心 10 min 取上清, 然后用 0.22 μm 有机滤器过滤掉菌体, 最后在相应的波长下测定其吸光度。

紫外分光光度法降解率的计算方法: 降解率=(未接菌培养液吸光度-接菌培养液吸光度)/未接菌培养液吸光度 $\times 100\%$ 。

高压液相样品准备: 取摇床培养 3 d 后培养液 20 mL, 9 000 r/min 离心 10 min, 去除菌体, 取等量二氯甲烷反复萃取 3 次, 有机层合并, 以备用来旋转蒸发浓缩使用。

高效液相色谱法降解率计算方法: 降解率=(未接菌培养液的自毒物质含量-接菌培养液自毒物质含量)/未接菌培养液的自毒物质含量 $\times 100\%$ 。

1.4.4 自毒物质降解模拟实验: 称取 200 g 苹果连作土壤(风干、过 1 mm 筛)于 250 mL 三角瓶中。接种事先培养至对数期的菌株, 每株菌按 5% 的比例添加于上述三角瓶中混匀, 调整土壤湿度为最大持水量的 60%, 然后用封口膜覆盖三角瓶口, 在培养箱中 30 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 7 d, 分别于处理后 3 d 和 7 d 取样测定土壤中自毒物质的含量。采用加速溶剂萃取法提取土壤酚酸类自毒物质, 具体方法参阅文献[22]。萃取完成的萃取液以备旋转蒸发浓缩使用。通过高效液相系统检测根皮苷、邻苯二甲酸、焦性没食子酸、对羟基苯甲酸的含量。

1.4.5 萃取液旋转蒸发浓缩: 旋转蒸发仪减压浓缩蒸干, 用 2 mL 甲醇分 3 次溶解。然后用 0.22 μm 有机滤器过滤, 装于 2 mL 离心管中备用。

1.4.6 液相色谱条件: 流动相 A: 乙腈, 流动相 B: 水(用乙酸调节 pH 2.6), 色谱柱: Acclaim 120 C_{18} (3 $\mu\text{m}\times 150\text{ mm}\times 3\text{ mm}$), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.5 mL/min。进样方式及进样体积: 自动进样, 5 μL ; 检测波长 280 nm^[22]。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选与鉴定结果

通过富集培养, 得到 5 个生长速度快、菌落较大、形态不同的代表性菌落, 纯化, 并分别编号为 BL1、BL2、BL3、BJ1 和 BJ2。5 株菌在 LB 固体培养基上 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后观察菌落形态, 并用光学显微镜观察菌体形态特征, 结果如下。

BL1 菌株, 圆形凸起, 乳白色不透明, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 革兰氏阴性, 球状; BL2 菌株, 圆形凸起, 淡黄色不透明, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 革兰氏阴性, 螺旋状; BL3 菌株, 圆形凸起, 米黄色不透明, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 革兰氏阳性, 杆状; BJ1 菌株, 圆形隆起, 白色不透明, 表明光滑湿润, 边缘整齐, 革兰氏阳性, 杆状; BJ2 菌株, 圆形凸起, 乳白色不透明, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 革兰氏阴性, 短杆状。5 株菌的主要生理生化特征如表 1 所示。

对菌株的 16S rRNA 基因的部分序列分析, 建系统发育进化树如图 1 所示。

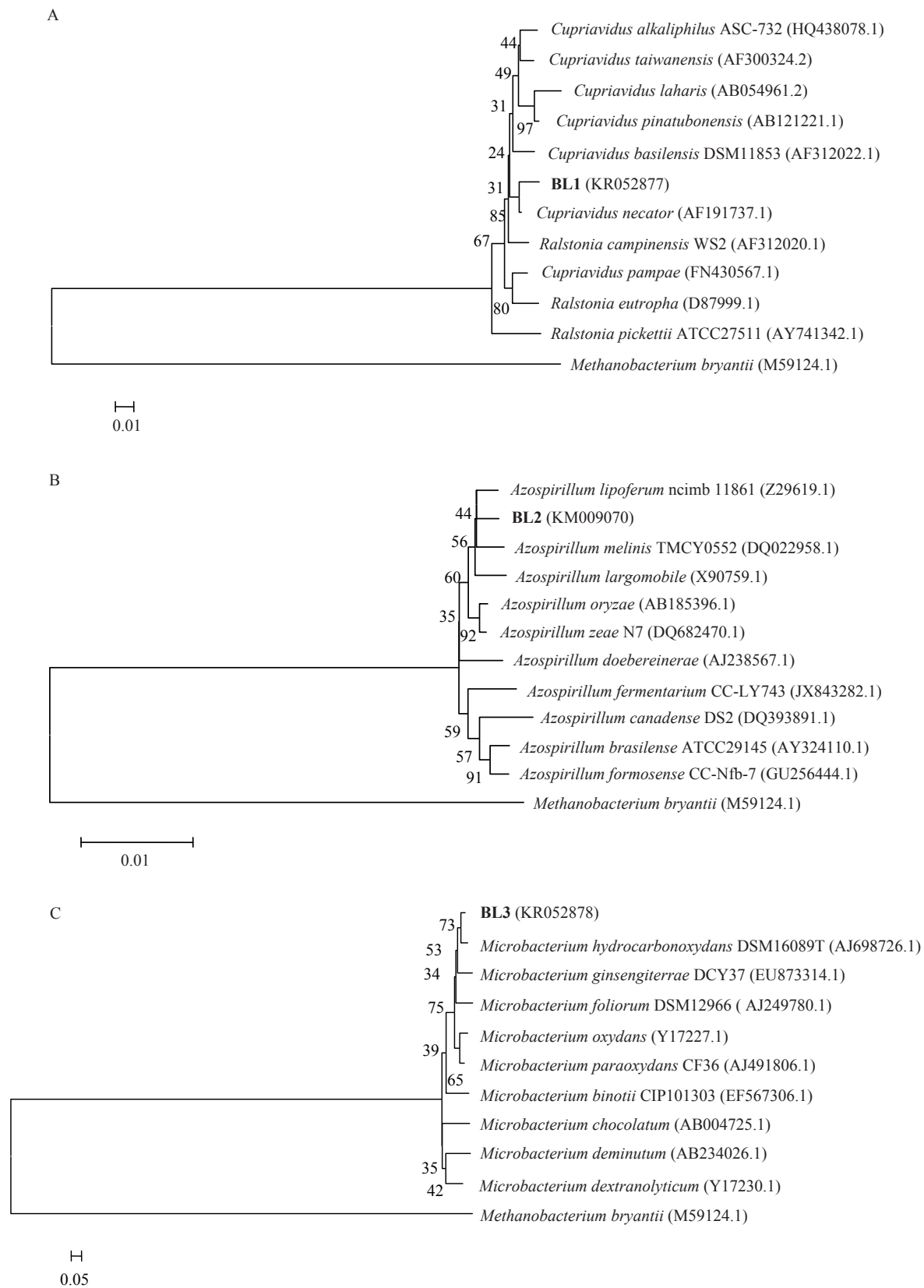
BL1 菌株与参考菌株 *Cupriavidus necator* 的 V-P 试验、吡啶试验、脲酶试验性状不符, 但其与 *Cupriavidus necator* (AF191737.1) 有最近的亲缘关系, 16S rRNA 基因序列相似性达 100%, 如图 1A 所示。BL2 菌株与参考菌株 *Azospirillum melinis* 的运动性试验在 5% NaCl 条件下生长情况试验性状不符, 但其与 *Azospirillum melinis* TMCY 0552 (DQ022958.1) 有最近的亲缘关系, 16S rRNA 基因序列相似性达 99%, 如图 1B 所示。BL3 菌株与参考菌株 *Microbacterium hydrocarbonoxydans* 的硫化氢试验、柠檬酸盐利用试验、运动性试验性状不符, 但其与 *Microbacterium hydrocarbonoxydans* DSM16089T (AJ698726.1) 有最近的亲缘关系, 16S rRNA 基因序列相似性达 99%, 如图 1C 所示。BJ1 菌株与参考菌株 *Paenibacillus phyllosphaerae* 的氧化酶试验、硫化氢试验性状不符, 但其与 *Paenibacillus phyllosphaerae* (AY598818.1) 有最近的

表 1 5 株菌的生理生化特征
Table 1 The physiology and biochemistry characteristics of the five strains

项目 Item	BL1	1	BL2	2	3	BL3	4	BJ1	5	BJ2	6	7
氧化酶 Oxidase	—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P 试验 V-P test	—	ND	—	ND	ND	—	—	—	—	—	+	ND
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	+	—	—	—	+	ND	+	+	—	—	ND
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	ND	+	+	+	—	ND	+	ND	+	+	—
脲酶 Urease	—	+	—	+	ND	—	—	—	—	+	—	+
吲哚试验 Indole test	—	—	—	—	ND	—	ND	—	—	—	—	ND
硫化氢 H ₂ S production	+	+	+	ND	ND	+	—	+	+	+	ND	ND
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	—	—	+	+	ND	—	+	—	—	+	+	+
耐盐性试验(2%) Growth in 2% NaCl	+	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND	+
耐盐性试验(5%) Growth in 5% NaCl	+	ND	+	ND	—	+	+	—	—	+	ND	ND
运动性 Move ability	—	+	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—	—	—	—	ND	+	ND	—	—	—	+	ND
L-阿拉伯糖利用 L-arabinose utilization	—	ND	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
D-木糖利用 D-xylose utilization	—	—	+	+	ND	+	ND	+	+	+	+	+
蔗糖利用 Sucrose utilization	—	—	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	ND
麦芽糖利用 Maltose utilization	+	ND	+	ND	+	+	+	+	—	+	+	+
乳糖利用 Lactose utilization	—	ND	+	+	ND	+	—	+	+	+	+	+

注：1-7 分别为参考菌株 *Cupriavidus necator*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum melinis*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Paenibacillus phyllosphaerae*, *Ochrobactrum cytisi*, *Ochrobactrum lupini*; +: 阳性; -: 阴性; ND: 未检测。

Note: The number 1-7 are *Cupriavidus necator*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum melinis*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Paenibacillus phyllosphaerae*, *Ochrobactrum cytisi*, *Ochrobactrum lupini* respectively. +: Positive; -: Negative; ND: Undeterminate.



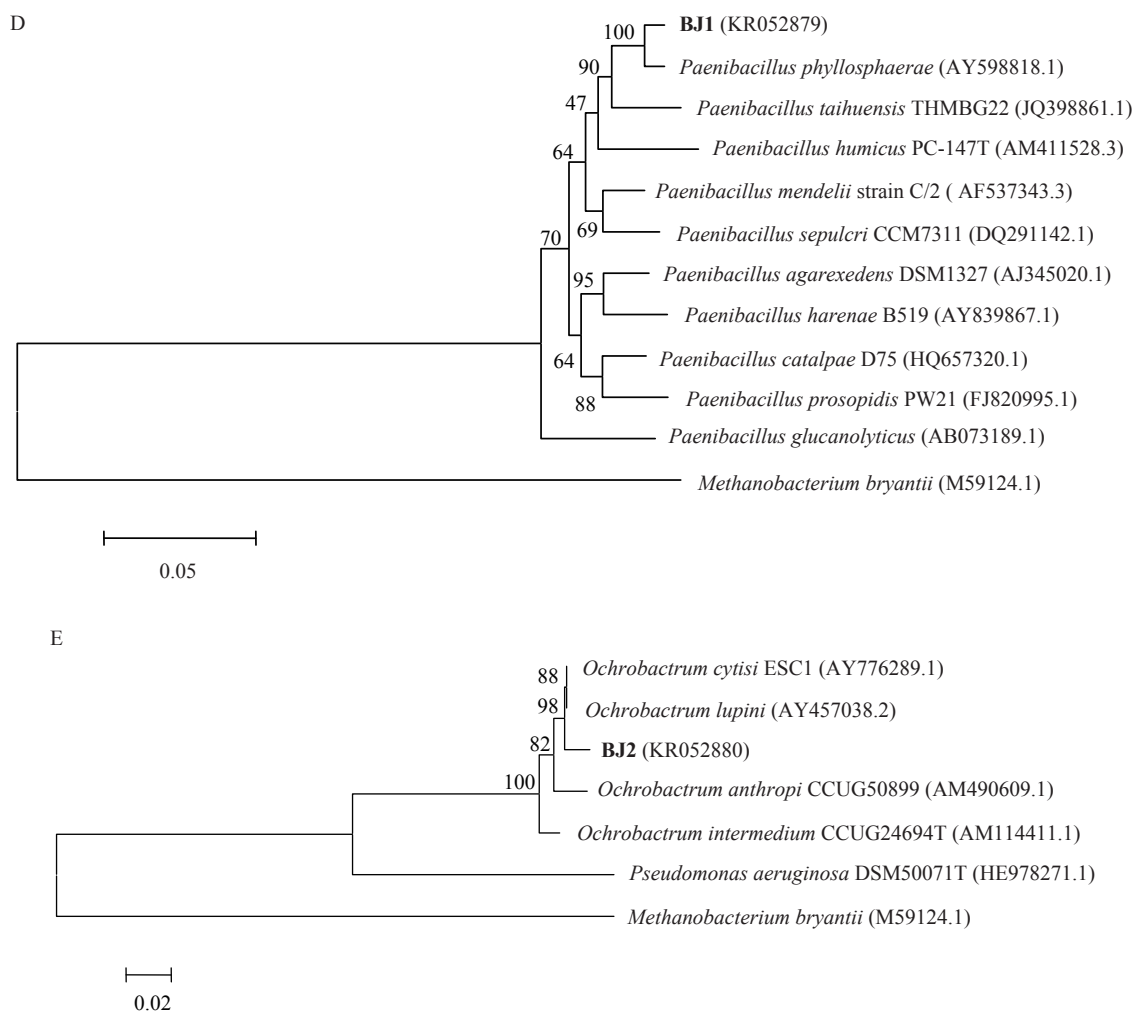


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence

注：A、B、C、D、E 分别表示菌株 BL1、BL2、BL3、BJ1、BJ2 系统发育树；系统发育树上括号中的序号表示 GenBank 登录号；分支上的数字表示 Bootstrap 值；标尺表示分支长度。

Note: A, B, C, D, E represent BL1, BL2, BL3, BJ1, BJ2 strain's phylogenetic tree respectively. The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers. The numbers on each branch indicate the bootstrap values (1 000 bootstrap replicates). The scale bar defines branch length.

亲缘关系，16S rRNA 基因序列相似性达 99%，如图 1D 所示。BJ2 菌株与参考菌株 *Ochrobactrum lupini* 的硝酸盐还原实验、运动性试验性状不符，但其与 *Ochrobactrum lupini* (AY457038.2) 有最近的亲缘关系，16S rRNA 基因序列相似性达 99%，如图 1E 所示。

结合菌株的形态学特征、生理生化特征及系统发育分析，初步鉴定 BL1 为钩虫贪铜菌 (*Cupriavidus*

necator)，BL2 为生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*)，BL3 为氧化烃微杆菌 (*Microbacterium hydrocarbonoxydans*)，BJ1 为 *Paenibacillus phyllosphaerae*，BJ2 为 *Ochrobactrum cytisi*。

2.2 菌株的降解能力结果

2.2.1 自毒物质降解菌降解实验结果：菌株 BL1、BL2、BL3、BJ1、BJ2 对根皮苷的降解情况见图 2，对邻苯二甲酸的降解情况见图 3，对对羟基苯甲酸

的降解情况见图4, 对焦性没食子酸的降解情况见图5, 培养3 d后培养液自毒物质高效液相色谱检测结果见图6。

由图2可以看出, 5株菌对根皮苷均具有一定的降解能力, BL1对根皮苷降解能力最好, 培养7 d降解率达到98%, BL2培养7 d降解率达到91%, BL3培养7 d降解率为96%, BJ1培养7 d达到95%, BJ2培养7 d达到93%。

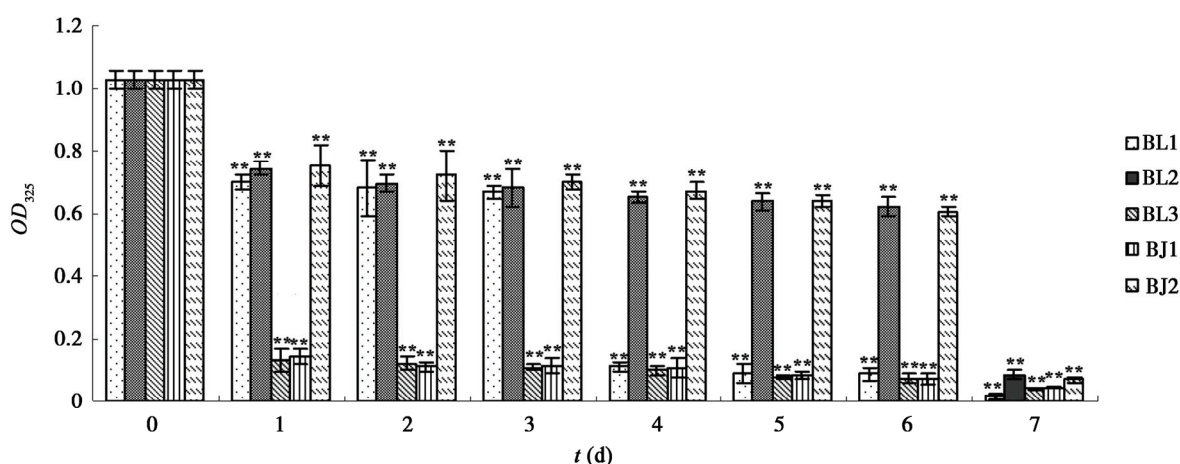


图2 根皮苷降解情况

Figure 2 The degradation to phloridzin

注: **和*分别表示和对照相比在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平显著性差异。

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively.

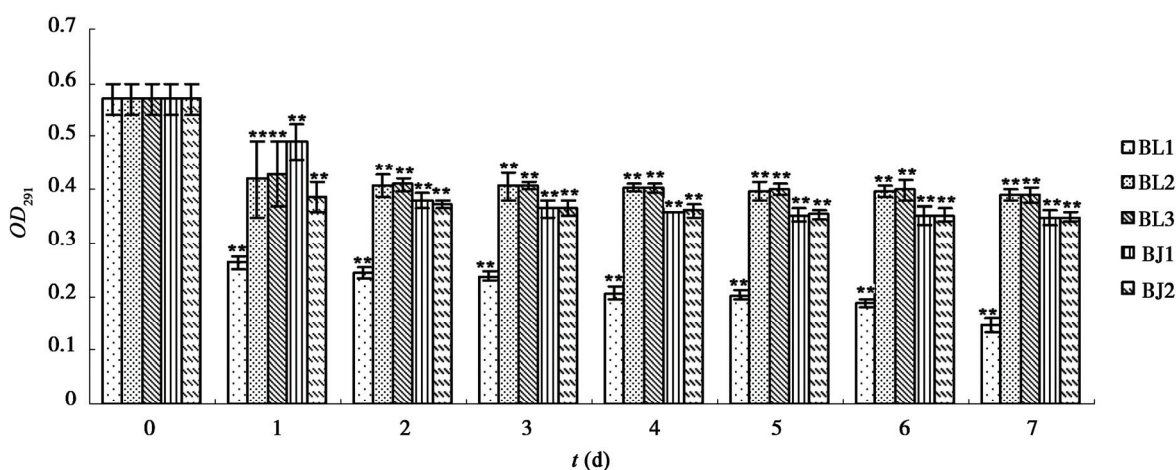


图3 邻苯二甲酸降解情况

Figure 3 The degradation to phthalic acid

注: **和*分别表示和对照相比在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平显著性差异。

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively.

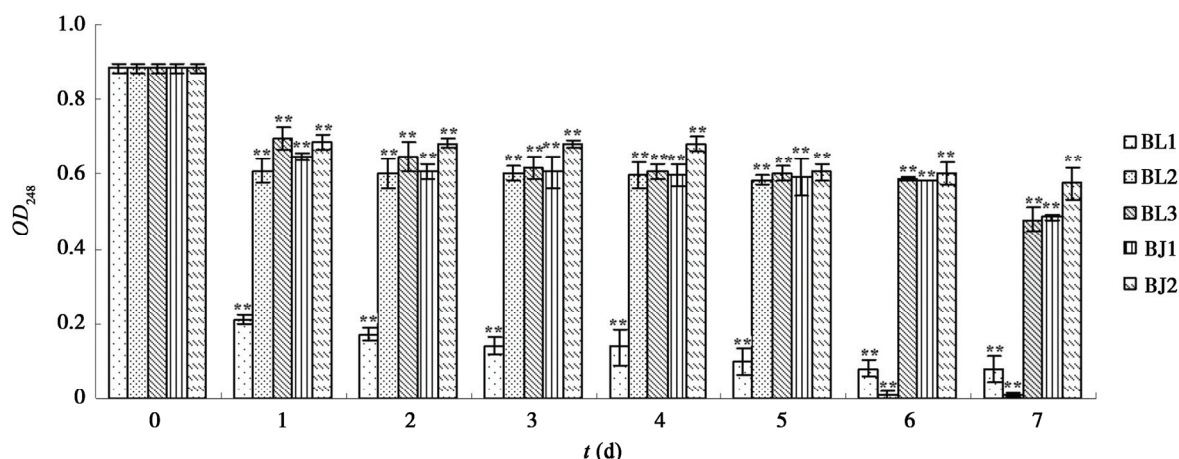


图4 对羟基苯甲酸的降解情况

Figure 4 The degradation to p-hydroxybenzoic acid

注: **和*分别表示和对照相比在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平显著性差异。

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively.

解率达到91%, BL3培养7 d降解率为45.7%, BJ1培养7 d达到44.9%, BJ2培养7 d达到35.5%。

由图5可以看出, 5株菌对焦性没食子酸均具有一定的降解能力, 通过紫外分光光度法计算降解率的方法计算降解率, 结果显示, BL2对焦性没食子酸降解能力最好, 培养7 d降解率达到65%, BL1培养7 d降解率达到45%, BL3培养7 d降解率为45%, BJ1培养7 d达到13%, BJ2培养7 d达到17%。

由以上分析可以看出, BL1、BL2、BL3、BJ1和BJ2菌株对邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸、根皮苷、焦性没食子酸均具有一定的降解能力。

从菌株方面来看, BL1、BL2和BL3菌株对4种自毒物质降解效果较好。从自毒物质方面来看, 5株菌对根皮苷的降解效果均比较明显, 降解率均超过90%。对对羟基苯甲酸降解效果较好的菌株是BL1和BL2菌株, 降解率均超过90%。对焦性没食子酸降解效果最好的菌株是BL2, 降解率达到65%。对邻苯二甲酸降解效果最好的菌株是BL1, 降解率达到74%。

由图6可以看出, BL1、BL2、BL3、BJ1和BJ2菌株对4种酚酸物质均具有一定的降解能力, 降解效果最好的是BL2菌株。BL2菌株对邻苯二甲

酸、对羟基苯甲酸、根皮苷和焦性没食子酸的降解率分别为66%、72%、84%和84%。其次为BL1和BL3菌株, BL1和BL3菌株对上诉4种自毒物质降解率均超过50%。BJ1和BJ2菌株对根皮苷的降解能力最好, 3 d内降解率分别为92%和88%。

2.2.2 自毒物质降解模拟实验结果: 如图7和8所示为模拟实验结果, 从苹果连作土壤中只检测出根皮苷、邻苯二甲酸和焦性没食子酸, 并未检测出对羟基苯甲酸。从图7中可以看出降解效果最好的是BL2菌株, 这与液体培养条件下培养3 d后高效液相色谱检测结果一致。7 d内降解的结果显示, 对3种自毒物质降解效果最好的是BL1和BL2菌株。对根皮苷降解效果较好的是BL1和BL2菌株, 降解率超过50%, 对邻苯二甲酸降解效果较好的是BL1和BJ1菌株, 降解率超过27%, 对焦性没食子酸降解效果较好的是BL2菌株, 降解率达到14%。

3 讨论

随着对细菌资源的不断挖掘, 植物根际细菌越来越受到重视, 利用从植物根际筛选的降解细菌来缓解由自毒物质引起的连作障碍, 是行之有效的方法。目前, 针对自毒物质降解菌的研究已有许多报

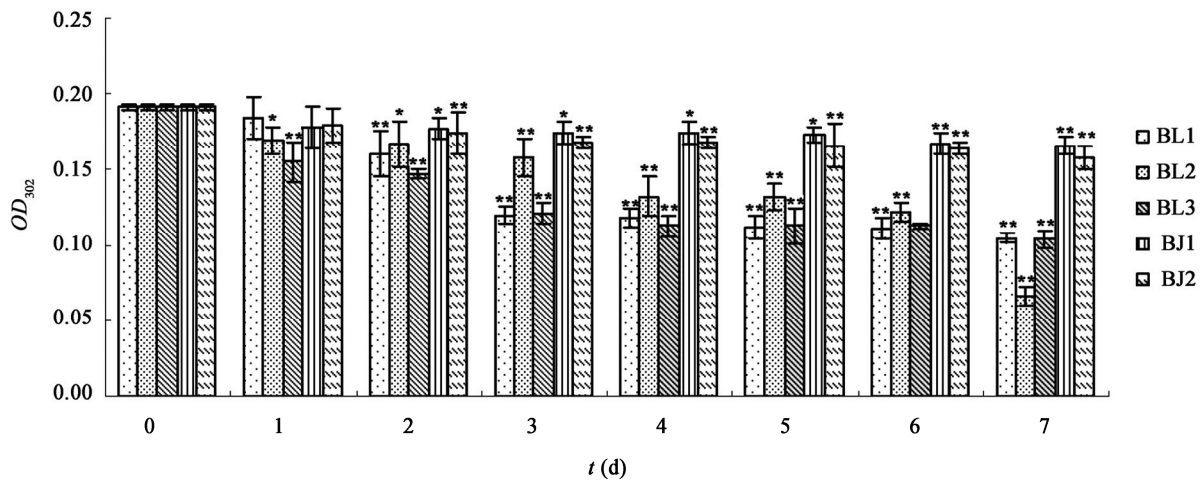


图 5 焦性没食子酸的降解情况

Figure 5 The degradation to pyrogalllic acid

注: **和*分别表示和对照相比在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平显著性差异.

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively.

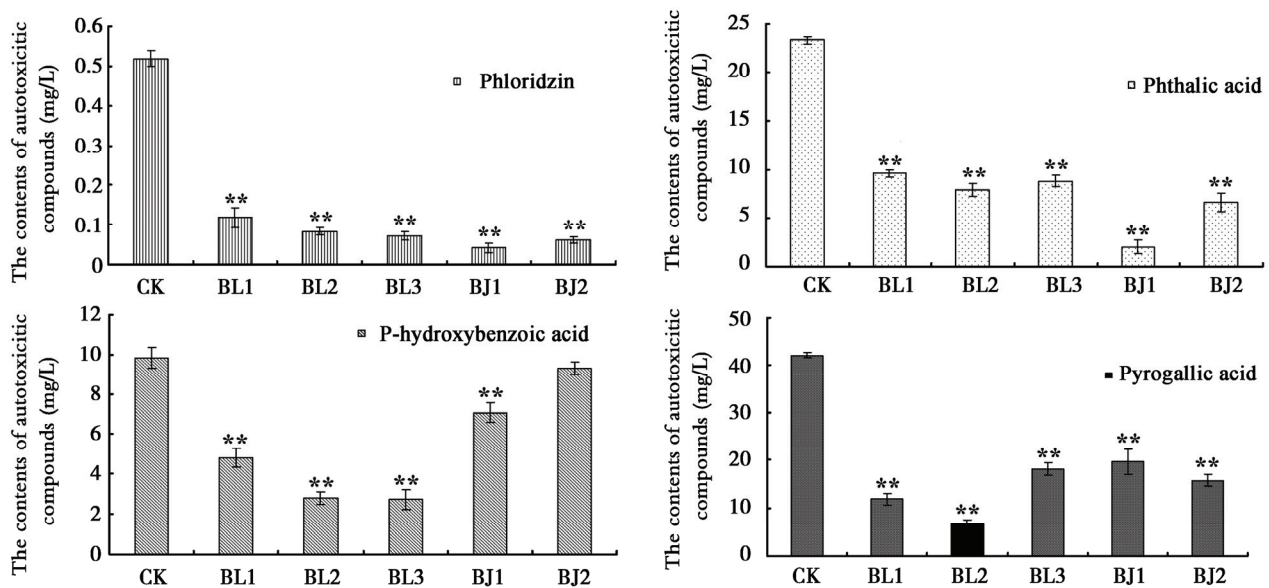


图 6 高效液相色谱检测结果

Figure 6 The results of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) determination

注: **和*分别表示和对照相比在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平显著性差异.

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively.

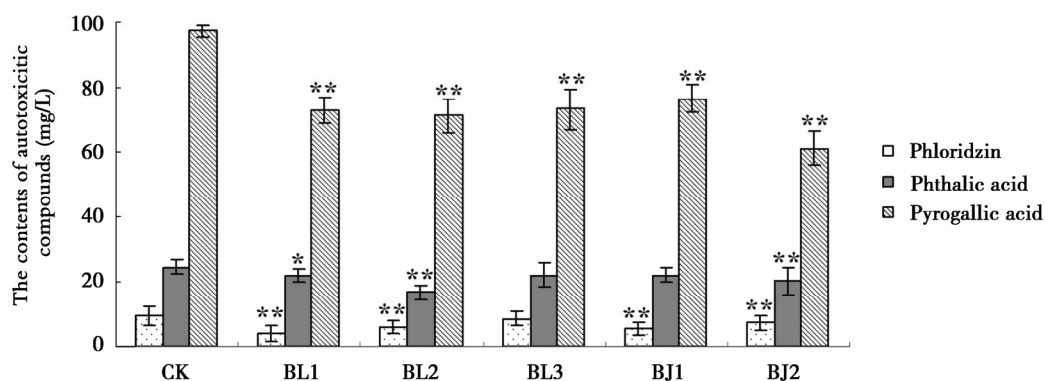


图7 模拟实验3 d后液相色谱检测结果

Figure 7 The results of simulation experiment with HPLC determination in three days

注: **和*分别表示和对照相比在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平显著性差异。

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

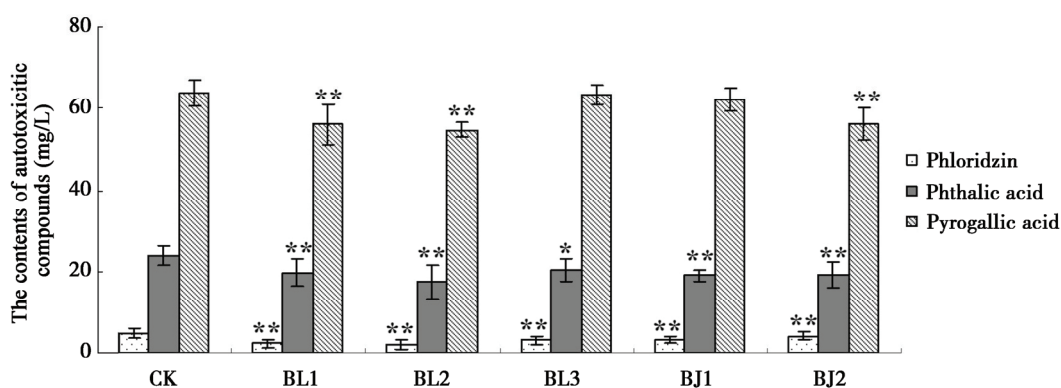


图8 模拟实验7 d后液相色谱检测结果

Figure 8 The results of simulation experiment with HPLC determination in seven days

注: **和*分别表示和对照相比在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平显著性差异。

Note: ** and * indicate significant differences relative to the control at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

道,但一株菌对多种自毒物质降解的报道比较少,影响植物生长的是多种自毒物质同时作用,本文以此为出发点,从苹果根际筛选到5株能够同时降解4种自毒物质的细菌菌株。生脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)因具有联合固氮作用被广泛应用于农业生产中,并未见到过关于生脂固氮螺菌降解自毒物质的报道。氧化烃微杆菌(*Microbacterium hydrocarbonoxydans*)最早由Schippers等于是2005年分离自德国受石油污染的土壤,它具有降解原油的能力^[16]。有报道显示类芽孢

杆菌属菌株具有降解高效氯氰菊酯功能^[23],苍白杆菌属菌株能够降解萘和吡啶^[7]及苯胺等^[24]。未见钩虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)、生脂固氮螺菌(*Azospirillum lipoferum*)、氧化烃微杆菌(*Microbacterium hydrocarbonoxydans*)、*Paenibacillus phyllosphaerae*、*Ochrobactrum cytisi*对自毒物质降解的报道,但是从文献[7,16,23-24]可知它们具有降解复杂苯环结构的物质的能力,而本文中的根皮昔、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸、焦性没食子酸有一个或者多个苯环结构,因此可以推测分离菌具有

相似的降解能力。

根皮苷是由 2 个苯环、1 个 5 碳环以及苯环和 5 碳环上的羟基组成, 邻苯二甲酸是由 1 个苯环和连在相邻苯环上的 2 个羧基组成, 对羟基苯甲酸是由 1 个苯环以及在苯环上相对的羟基和羧基组成, 焦性没食子酸是由 1 个苯环以及苯环上 3 个相邻的羟基组成。已有报道表明草生欧文氏菌 Y46 可以把根皮苷降解为根皮素、间苯三酚和根皮酸^[5], 很多真菌也被证实可以把根皮苷降解为根皮素、间苯三酚和根皮酸, 黑曲霉可以进一步把根皮素降解为间苯三酚和根皮酸, 而根皮酸则被降解成为对羟基苯甲酸^[25]。Krumholz 等则发现 *Eubacterium oxidoreducens* 可以把没食子酸、焦性没食子酸和间苯三酚开环降解为醋酸盐和丁酸盐, 进一步反应生成琥珀酰辅酶 A 进入 TCA 循环^[6]。邻苯二甲酸和对羟基苯甲酸以原儿茶酸作为中间体, 进一步经过开环降解等一系列反应也生成琥珀酰辅酶 A 而进入 TCA 循环^[26-27]。推测本文中 BL1 钩虫贪铜菌 (*Cupriavidus necator*)、BL2 生脂固氮螺菌 (*Azospirillum lipoferum*) 和 BL3 氧化烃微杆菌 (*Microbacterium hydrocarbonoxydans*) 对根皮苷、邻苯二甲酸、对羟基苯甲酸和焦性没食子酸的降解途径可能是: 根皮苷首先被降解为根皮素、间苯三酚和根皮酸, 根皮素被降解为间苯三酚和根皮酸, 根皮酸则被降解为对羟基苯甲酸; 间苯三酚和焦性没食子酸经开环反应; 邻苯二甲酸和对羟基苯甲酸以原儿茶酸为中间体经过一系列的开环反应; 最终生成琥珀酰辅酶 A 而进入 TCA 循环生成 CO₂ 和水。本文筛选到的降解菌的降解途径和降解机理将在今后的工作中逐步揭示。

参 考 文 献

- [1] Zheng JH, Ye SF, Yu JQ. Continuous cropping obstacles causes and biological control of vegetable crops[J]. China Vegetables, 2004(3): 56-58 (in Chinese)
郑军辉, 叶素芬, 喻景权. 蔬菜作物连作障碍产生原因及生物防治[J]. 中国蔬菜, 2004(3): 56-58
- [2] Yin QL, Xie Y. Research progress on the continuous cropping obstacles of plants caused by phenolic acids[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(34): 20977-20978, 20985 (in Chinese)
- [3] Sun HB, Mao ZQ, Zhu SH. Changes of phenolic acids in the soil of replanted apple orchards surrounding Bohai Gulf[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(1): 90-97 (in Chinese)
孙海兵, 毛志泉, 朱树华. 环渤海湾地区连作苹果园土壤中酚酸类物质变化[J]. 生态学报, 2011, 31(1): 90-97
- [4] Bai R, Ma FW, Liang D, et al. Phthalic acid induces oxidative stress and alters the activity of some antioxidant enzymes in roots of *Malus prunifolia*[J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(4): 488-494
- [5] Chatterjee AK, Gibbins LN. Metabolism of Phloridzin by *Erwinia herbicola*, nature of the degradation products, and the purification and properties of phloretin hydrolase[J]. Journal of Bacteriology, 1969, 100(2): 594-600
- [6] Krumholz LR, Bryant MP. *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin[J]. Archives of microbiology, 1986, 144(1): 8-14
- [7] Huang YQ, Zhou GM, Yin GT, et al. Rhizosphere actinomycete isolation methods and phloridzin degradation activity analysis in plants[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(1): 54-58 (in Chinese)
黄园勇, 周光明, 尹国通, 等. 植物根际放线菌分离方法初探及根皮苷降解活性分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(1): 54-58
- [8] Zhou W, Zhang HH, Zeng XB, et al. Isolation, identification and characteristic of aromatic compounds degrading strain PM8[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(9): 1775-1778 (in Chinese)
周围, 张欢欢, 曾小波, 等. 芳香族化合物降解菌 PM8 的分离鉴定及降解特性[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(9): 1775-1778
- [9] Mao N, Xue QH, Tang M. Biodegradation of benzoic acid and p-hydroxybenzoic acid in the strawberry planting soil by two strains of actinomycetes[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(5): 143-148 (in Chinese)
毛宁, 薛泉宏, 唐明. 2 株放线菌对土壤中苯甲酸和对羟基苯甲酸的降解作用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(5): 143-148
- [10] Cao XS, Meng XZ, Ren SK, et al. Isolation and phylogenetic analysis of a bis (2-ethylhexyl) phthalate degrading bacterial strain[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(12): 217-220 (in Chinese)
曹相生, 孟雪征, 任书魁, 等. 一株 DEHP 降解菌的筛选和分子鉴定[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(12): 217-220
- [11] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. 4th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2007: 246-247 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 246-247
- [12] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 195-242 (in Chinese)
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: 195-242
- [13] Makkar NS, Casida LE Jr. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a Nonobligate bacterial predator of bacteria in soil[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987, 37(4): 323-326
- [14] Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1978, 24(8): 967-980
- [15] Peng GX, Wang HR, Zhang GX, et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses

- grass[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(6): 1263-1271
- [16] Schippers A, Bosecker K, Spröer C, et al. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(2): 655-660
- [17] Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, et al. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(2): 743-746
- [18] Zurdo-Piñeiro JL, Rivas R, Trujillo ME, et al. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(4): 784-788
- [19] Trujillo EM, Willems A, Abril A, et al. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1318-1327
- [20] Ausubel FM. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Translated by Yan ZY and Wang HL. Beijing: Science Press, 1998: 39-40 (in Chinese)
Ausubel FM. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 39-40
- [21] Du ZB, Du BH, Yao LT, et al. Isolation and identification of antagonistic bacteria inhibiting against *Rhizoctonia solani* of cotton rhizosphere[J]. Microbiology China, 2008, 35(2): 204-208 (in Chinese)
杜志兵, 杜秉海, 姚良同, 等. 两株棉花立枯病拮抗菌 MH1 和 MH25 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 204-208
- [22] Yin CM, Wang GS, Li YY, et al. A new method for analysis of phenolic acids in the soil-soil from replanted apple orchards was investigated[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(21): 4612-4619 (in Chinese)
尹承苗, 王功帅, 李园园, 等. 一种分析土壤中酚酸类物质含量的新方法—以连作苹果园土壤为试材[J]. 中国农业科学, 2013, 46(21): 4612-4619
- [23] Ren M, Zhao L. Isolation and identification of a beta-cypermethrin-degrading and biocontrol endophytic bacteria in leek[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(3): 57-61 (in Chinese)
任明, 赵蕾. 一株韭菜内生高效氯氰菊酯降解生防细菌的分离与鉴定[J]. 西北农业学报, 2010, 19(3): 57-61
- [24] Liu XJ, Lü ZT, Zhang LP. Study on isolation and degradation characters of a bacterial strain for aniline degradation[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2008, 2(6): 858-860 (in Chinese)
刘宪军, 吕志堂, 张利平. 苯胺降解菌的分离和降解特性研究[J]. 环境工程学报, 2008, 2(6): 858-860
- [25] Jayasankar NP, Bandoni RJ, Towers GHN. Fungal degradation of phloridzin[J]. Phytochemistry, 1969, 8(2): 379-383
- [26] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(1): 77-89
- [27] Engelhardt G, Wallnöfer PR, Rast HG, et al. Metabolism of o-phthalic acid by different gram-negative and gram-positive soil bacteria[J]. Archives of Microbiology, 1976, 109(1/2): 109-114