

文章编号 1672-6634(2024)02-0089-12

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023120011

# 一株 3,5,6-三氯-2-吡啶酚降解菌 *Delftia* sp. DFT 的分离鉴定及降解途径研究

贾楠, 岳彩旭, 吕雪茹, 王雪婷, 丁宁, 王圣惠

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

**摘要** 微生物降解是消除农药残留物 3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP)的有效方法,但其降解机制并不清楚。为探究 TCP 完整的代谢途径和降解机制。采用富集分离法从农田土壤中分离了一株 TCP 降解细菌,并分别通过高效液相色谱和液相色谱-质谱(LC-MS)技术检测了菌株的降解性能,并鉴定了其代谢产物。该菌株为 *Delftia* sp. DFT 菌,它能在 48 h 内对 50 mg/L 的 TCP 降解率达 34.28%,同时也能降解 3,5-二氯-2-吡啶醇、6-氯-2-吡啶醇和 2-羟基吡啶等其他氯代吡啶类化合物。在降解 TCP 过程中,共鉴定了 12 种不同的 TCP 代谢产物。初步推测水解-氧化脱氯途径、还原脱氯途径、反硝化及烷基化途径可能共同参与了菌株 DFT 对 TCP 的降解。据文献调研,这是首次在 *Delftia* sp. 菌中发现有四种可能的 TCP 代谢途径的报道,这为纯培养物中的 TCP 降解机制研究提供了参考信息。

**关键词** 3,5,6-三氯-2-吡啶酚;降解菌;分离鉴定;代尔夫特菌;降解途径

**中图分类号** X172

**文献标志码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Isolation, Identification and Degradation Pathway Study of a 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol Degrading Strain *Delftia* sp. DFT

JIA Nan, YUE Caixu, LÜ Xueru, WANG Xueting,  
DING Ning, WANG Shenghui

(College of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract** Microbial degradation is an effective method to eliminate 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP). However, there is still no detailed information on the microbial metabolic mechanism of TCP. In order to explore the complete degradation pathway and metabolic mechanism of TCP. A TCP degrading strain was isolated from farmland soil. The degradation ability and the metabolites of TCP was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), respectively. The TCP degrading strain was identified as *Delftia* sp. DFT which could degrade 50 mg/L of

收稿日期:2023-12-23

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MD103);国家自然科学基金青年基金项目(41401288);聊城大学畜牧学学科开放课题(319312101-19);大学生创新创业训练项目(CXCXY2022055,CXCXY2023335,CXCXY2023339)资助

通讯作者:王圣惠,女,汉族,博士,副教授,研究方向:环境微生物,E-mail:wangshenghui@lcu.edu.cn.

TCP at a rate of 34.28% within 48 hours. This strain could also degrade other chloropyridine compounds such as 5-dichloro-2-pyridinol, 6-chloro-2-pyridinol and 2-hydroxypyridine. Twelve TCP intermediate metabolites were detected in strain DFT and two possible degradation pathways of TCP were proposed on the basis of LC-MS analysis. The hydrolyzation-oxidation dechlorination pathway, the reduction dechlorination pathway, the denitrification pathway and the alkylation pathway might be involved in TCP biodegradation by strain DFT. This is the first report on four different pathways responsible for TCP degradation in the genus *Delftia* sp., which provides new information for the study of TCP degradation mechanism in pure culture.

**Key words** 3,5,6-trichloro-2-pyridinol; degrading bacteria; isolation and identification; *Delftia* sp.; degradation pathway

## 0 引言

3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCP)属于氯代吡啶类化合物,它是化学农药毒死蜱、甲基毒死蜱、绿草定及绿草定-2-丁氧基乙酯的高毒难降解残留物<sup>[1-3]</sup>。TCP在环境中的半衰期为65~360天<sup>[4]</sup>,目前已被世界公认为持久性有机污染物<sup>[5]</sup>。相比于母本化合物,TCP具有更高的水溶性和移动性,更易进入地表水体和土壤,从而造成大面积的扩散和污染<sup>[6-8]</sup>。然而,近十年来,由于毒死蜱及绿草定类化学农药的大量生产和超量使用,TCP的污染问题日趋严重<sup>[9-11]</sup>,进而对生态环境和人类健康构成了严重威胁<sup>[12,13]</sup>。

微生物降解是消除毒死蜱残留的关键环节。然而,由于TCP具有抑菌活性,它不但能抑制本身的微生物降解,还能抑制其母体以及其他有机污染物的生物降解<sup>[14]</sup>。TCP的这种特性加重了环境中有机污染物的积累,严重影响了生态系统的自我修复能力<sup>[15]</sup>。早期TCP降解菌的筛选是从毒死蜱降解菌中分离、鉴定并被进一步加以研究。近年来,国内外科研工作者已从长期施用毒死蜱的农田土壤、蔬菜大棚土壤和农药污水处理厂曝气池中,分离了多株好氧TCP降解菌株。主要包括 *Micrococcus luteus* ML<sup>[16]</sup>, *Paracoccus* sp. TRP<sup>[17]</sup>, *Serratia* and *Trichosporon* spp.<sup>[18]</sup>, *Bacillus laterosporus* DSP<sup>[19]</sup>, *Ralstonia* sp. T6<sup>[20]</sup>, *Cupriavidus* sp. DT-1<sup>[21]</sup>, *Cupriavidus* sp. P2<sup>[22]</sup>, *Pseudomonas* sp. AY-1<sup>[23]</sup>, *Rhodotorula glutinis* spp. and *Rhodotorula rubra* spp.<sup>[24]</sup>, *Bacillus thuringiensis* MB497<sup>[25]</sup>, *Pseudomonas* sp. CB2<sup>[26]</sup>, *Xanthomonas* sp. 4R3-M1, *Pseudomonas* sp. 4H1-M3<sup>[27]</sup> 和 *Ochrobactrum* sp. JAS2<sup>[28]</sup>等。最新研究发现,在缺氧或厌氧的条件下TCP可以被微生物菌群彻底降解,且添加 NanoFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 能加速TCP的缺氧或厌氧生物降解<sup>[29,30]</sup>。

在好氧条件下,TCP降解菌株主要通过还原脱氯和氧化脱氯的方式降解TCP。在还原脱氯过程中,TCP逐次脱掉吡啶环结构上的3个氯原子,分别生成5,6-二氯-2-吡啶酚,6-氯-2-吡啶酚和2-羟基吡啶,如菌株 *Bacillus laterosporus* DSP、*Cupriavidus* sp. DT-1 以及 *Ochrobactrum* sp. JAS2<sup>[19,21,28]</sup>。在氧化脱氯过程中,TCP脱去3个氯原子生成一种绿色代谢产物3,6-羟基吡啶-2,5-二酮,随后被完全矿化,如菌株 *Ralstonia* sp. strain T6 和 *Cupriavidus* sp. P2<sup>[20,22]</sup>。在缺氧或厌氧的条件下,微生物菌群主要通过还原脱氯途径,将TCP降解为6-氯-2-吡啶醇,再进一步脱氯生成2-羟基吡啶,最后被矿化<sup>[29]</sup>。最近有研究报道,*Bacillus thuringiensis* MB497 还可以通过反硝化途径对TCP进行降解<sup>[25]</sup>。目前,还有部分研究报道了一些新的TCP代谢产物<sup>[31,32]</sup>,但TCP的代谢机制仍不清楚。

为了研究TCP完整的微生物代谢途径,本课题组从毒死蜱及TCP污染的农田土壤中分离出一株TCP降解菌株,随后对该菌株进行了分子生物学鉴定、TCP降解性能检测以及代谢产物鉴定,在此基础上初步推测了该菌株可能的TCP代谢途径。这将为微生物降解TCP机制的研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂

检测标准品:TCP购买自毕得医药,纯度99%(中国上海)。6-氯-2-吡啶醇( $\geq 97\%$ )和2-羟基吡啶( $\geq$

97%)购自上海麦克林生化科技有限公司(中国上海)。3,5-二氯-2-吡啶醇( $\geq 98\%$ )购自阿拉丁试剂(上海)有限公司(中国上海)。

其余试剂:无水乙醇( $\geq 99.5\%$ )、氢氧化钠( $\geq 96\%$ )和乙酸( $\geq 99.5\%$ )购自烟台远东精细化工有限公司(中国山东);甲醇(HPLC)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(中国上海);其余药品和试剂均为分析纯。

## 1.2 实验方法

1.2.1 培养基配方。下列培养基配置时除特殊说明外,均用蒸馏水定容至1 000 mL,121 °C灭菌30 min,固体培养基在此基础上加入2%(w/v)琼脂粉末。富集培养基(LB培养基):胰蛋白胨10 g/L、氯化钠10 g/L、酵母提取物5 g/L。无机盐培养基(MSM培养基):硝酸铵1.0 g/L、氯化钠0.5 g/L、磷酸二氢钾0.5 g/L、磷酸氢二钾1.5 g/L、硫酸铵0.5 g/L、硫酸镁0.5 g/L、酵母提取物0.05 g/L。

1.2.2 TCP降解菌的分离鉴定。TCP降解菌株是从毒死蜱污染的农田土壤中分离出来的。土壤样品为山东省聊城市长期喷洒毒死蜱的旱地和韭菜种植场的表层土壤(0~20 cm)混合物。将TCP富集培养物用无菌水稀释至合适浓度后涂布在LB平板上(TCP 100 mg/L),放入35 °C恒温恒湿培养箱中培养至平板上长出边缘清晰的单菌落。挑取单菌落转接入MSM平板上(TCP 50 mg/L),放入35 °C恒温恒湿培养箱中培养,此时生长的菌落为具有TCP降解能力的目标菌株。

将菌株接种至LB液体培养基中37 °C、150 r/min培养至 $OD_{600\text{ nm}} \approx 0.6$ ,8 000 r/min离心5 min收集菌体,采用全式金柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒提取。

PCR扩增:采用细菌通用引物:27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对菌株进行16S rDNA扩增。取PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶上进行电泳。将PCR产物送至金唯智测序公司测序,根据所获得的16S rDNA序列上传至GenBank中获得登录号OK 602639.1。用MEGA 4.0软件对16S rDNA进行系统发育分析。

1.2.3 生物降解性能研究。将菌株在LB培养基预培养至对数生长期( $OD_{600\text{ nm}} \approx 0.8$ ),8 000 r/min离心5 min收集菌体,用等体积的无菌PBS洗涤菌体两次,控制菌体湿重在0.1 g。之后转移至200 mL MSM培养基中(TCP 50 mg/L),以不接入微生物的纯培养基做对照,37 °C 150 r摇床培养。所有处理设置三组平行,保证实验准确性和重复性。

每隔3 h定时取样检测培养基中微生物生长情况和TCP残留。细菌生长情况通过721紫外可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)检测600 nm处吸光度。TCP残留量用高效液相色谱系统进行检测分析。将培养液在8 000 r/min离心5 min去除菌体,之后将上清液冷冻干燥,溶解在等体积的甲醇:水(80:20,V/V)中,并通过0.22  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤除杂质。

液相色谱检测条件如下:色谱柱:VP-ODS C18色谱柱(日本岛津公司;4.6  $\mu\text{m}$ ,4.6 mm $\times$ 250 mm);流动相:甲醇:水=80:20(V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:40 °C;仪器:岛津LC-20A HPLC系统(岛津株式会社,日本);检测器:DAD二级阵列管检测器;检测波长:230 nm;

1.2.4 菌株降解其他氯代吡啶类化合物的研究。选取其他氯代吡啶类化合物:3,5-二氯-2-吡啶酚、6-氯-2-吡啶醇、2-羟基吡啶,进行菌株降解性能研究。将培养至合适的菌株(培养条件同1.2.3)接入MSM培养基(含50 mg/L 3,5-二氯-2-吡啶酚、25 mg/L 6-氯-2-吡啶醇、50 mg/L 2-羟基吡啶)中,以未接种菌株的纯代谢产物作为对照组,37 °C 150 r/min摇床培养,定期收集培养液并进行HPLC检测。所有处理设置三组平行,保证实验准确性和重复性。

1.2.5 TCP代谢产物分析。定时收集菌株代谢TCP的液体样品并进行冷冻干燥,之后溶解在甲醇:水=80:20(V/V)中,并通过0.22  $\mu\text{m}$ 过滤器过滤。使用液相色谱-质谱(LC-MS)对TCP的代谢产物进行分析。检测条件如下:色谱柱:安捷伦Poroshell 120 EC-C18;流动相:甲醇:水=70:30(V/V);流速:0.4 mL/min;检测器:DAD二级阵列管检测器;检测波长:250 nm、265 nm;MS系统在具有负极性的电子喷雾电离模式下运行,并检测相同组分[M-H]<sup>-</sup>的去质子化分子。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 DFT 的分离鉴定

从毒死蜱及 TCP 污染的农田土壤中分离得到几株细菌,通过菌株在 LB 以及以 TCP 为唯一碳源的无机盐固体培养基中的生长状态,得到生长最好的一株细菌命名为 DFT。该菌株能在以 TCP(50 mg/L)为唯一碳源的无机盐平板上生长良好,如图 1 所示,初步证明菌株 DFT 具有降解 TCP 的能力。随后,以菌株 DFT 基因组为模板,采用细菌扩增通用引物,PCR 扩增菌株 DFT 的 16S rDNA 序列并测序分析。将菌株 DFT 的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对分析,选择相关序列,采用 MEGA 4.0 软件的 Neighbor joining 邻位归并法构建系统发育树(bootstrap>95%),如图 2 所示。菌株 DFT 与 *Delftia tsuruhatensis* strain NBRC 16741 的 16S rDNA 序列相似性为 100% (图 2),初步将菌株 DFT 鉴定为代尔夫特菌属(*Delftia*. sp),其 Genbank 登入号为 OK\_602639.1。

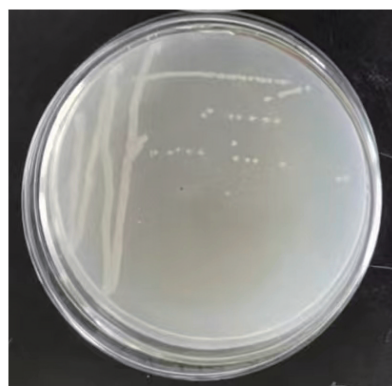


图 1 菌株 DFT 在 MSM(TCP 50 mg/L)固体培养基上生长的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of strain DFT growing on MSM (TCP 50 mg/L) solid medium

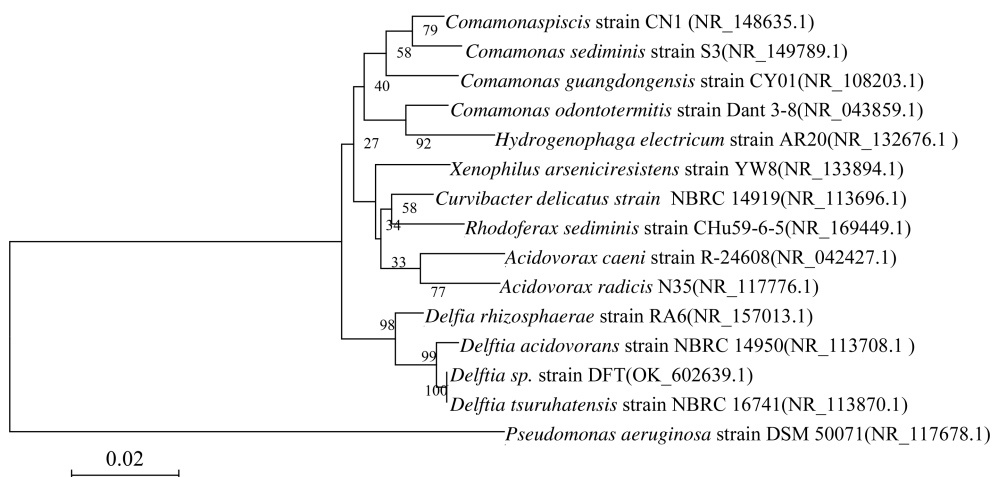


图 2 菌株 DFT(Genbank:OK\_602639.1)的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of strain DFT(Genbank: OK\_602639.1)

### 2.2 菌株 DFT 对 TCP 降解性能检测

将菌株 DFT 接种到以 TCP(50 mg/L)为唯一碳源的 MSM 培养基中,不同的时间点取样,检测菌株 DFT 生长及其对 TCP 的降解情况,如图 3 所示。在以 TCP 为唯一碳源的培养液中,菌株 DFT 有明显的生长,其  $OD_{600\text{ nm}}$  的吸光度值从初始的 0.037(0 h)升到了 0.108(48 h)。在菌株生长的同时伴随着 TCP 的降解,菌株 DFT 能在 48 h 内对 50 mg/L TCP 的降解率达 34.28%。这些结果表明,菌株 DFT 能够以 TCP 为唯一碳源生长,并表现出了较高的 TCP 降解性能。

### 2.3 TCP 代谢产物鉴定

收集不同时间点菌株 DFT 对 TCP 的降解产物,采用液质联用技术(LC-MS)检测并鉴定 TCP 的降解产物。在菌株 DFT 降解 TCP 过程中,共检测到 12 种可能的 TCP 代谢产物,其在液相色谱中的保留时间为 0.361~6.313 min(图 4)。这 12 种代谢产物去质子化的准分子离子如表 1 所示。

其中 TCP 的去质子化分子离子在  $m/z=195.913\ 2\ (M-H)^-、197.910\ 2\ (M-H)^-、199.906\ 9\ (M-H)^-$

和 201.903 3 (M-H)<sup>-</sup> [图 5(a)]。去质子化分子离子在  $m/z=195.911\ 3$  (M-H)<sup>-</sup> 和  $m/z=197.910\ 2$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为 3,5,6-三氯-2-甲基吡啶 [图 5(b)]、 $m/z=213.936\ 8$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为 3,5,6-三氯-2-甲氧基吡啶 [图 5(c)]。这两种代谢产物被鉴定为 TCP 烷基化反应的代谢产物,最终这两种产物被进一步转化为 CO<sub>2</sub> [14]。

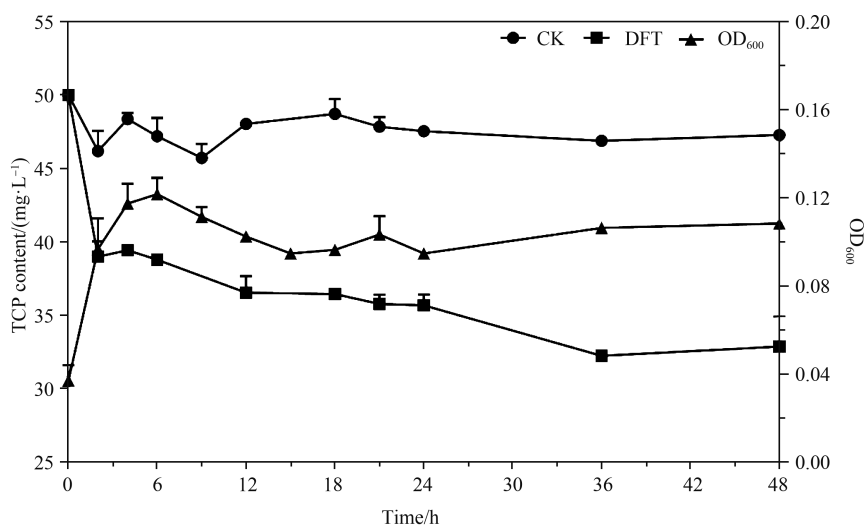


图3 菌株 DFT 的生长降解曲线

Fig. 3 Growth and degradation curve of strain DFT

$m/z=129.972\ 5$  (M-H)<sup>-</sup> 和  $132.945\ 3$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为 3-氯-5,6-二氢吡啶-2(1H)-酮 [图 5(d)]、 $m/z=248.915\ 6$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为尼古丁蓝 [图 5(e)]。这些代谢产物被鉴定为菌株 *Cupriavidus* sp. DT-1 的 TCP 还原脱氯代谢产物 [21]。

去质子化分子离子在  $m/z=232.882\ 7$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为 3-(2,4,5-三氯苯氧基)-1-丙炔 [图 5(f)]。去质子化分子离子在  $m/z=134.916\ 2$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为对丙基苯酚 [图 5(g)]。这两种代谢产物曾在菌株 *Bacillus thuringiensis* MB497 代谢 TCP 的过程中有报道 [25]。

去质子化分子离子在  $m/z=177.943\ 9$  (M-H)<sup>-</sup> 和  $m/z=179.942\ 5$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为 3,6-二氯-2,5-二吡啶酮 [图 5(i)] 或 3,6-二氯-2,5-二羟基吡啶 [图 5(h)]、 $m/z=159.964\ 7$  (M-H)<sup>-</sup> 和  $m/z=159.962\ 1$  (M-H)<sup>-</sup> 处的产物被鉴定为 6-氯-3-羟基吡啶-2,5-二酮 [图 5(j)] 或 6-氯-2,3,5-三羟基吡啶 [图 5(k)]、 $m/z=135.920\ 4$  (M-H)<sup>-</sup> 处产物被鉴定为 1,3-二氯-2-丁烯腈 [图 5(l)]、 $m/z=97.959\ 7$  (M-H)<sup>-</sup> 处产物被鉴定为 1-醛-2-丁烯酰胺 [图 5(m)]。这些代谢产物在菌株 *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup>、*Ralstonia* sp. T6、*Cupriavidus* sp. P2 降解 TCP 过程中被发现 [4,20,22]。

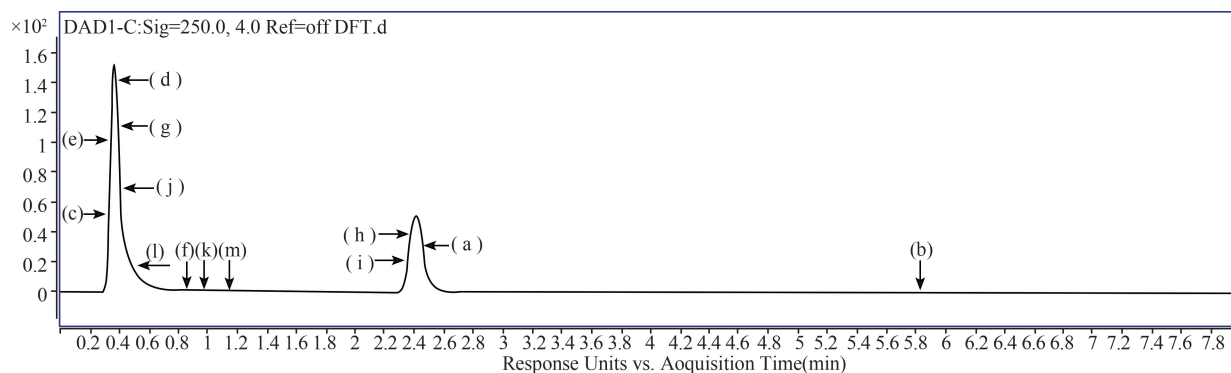


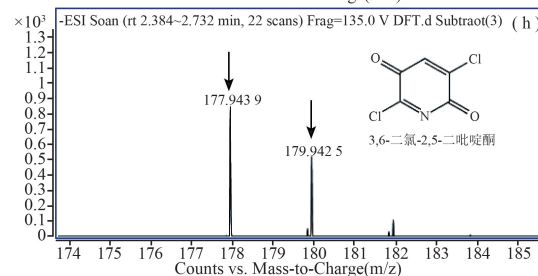
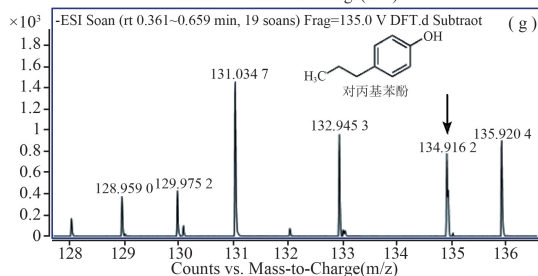
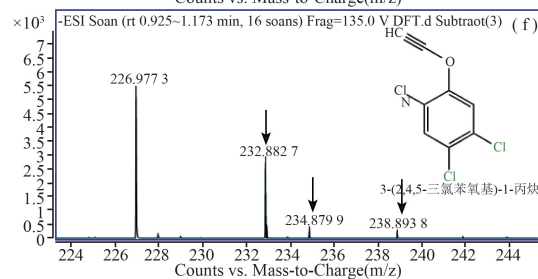
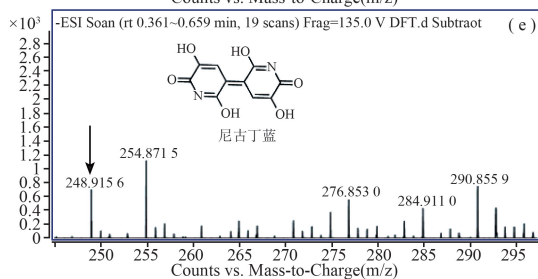
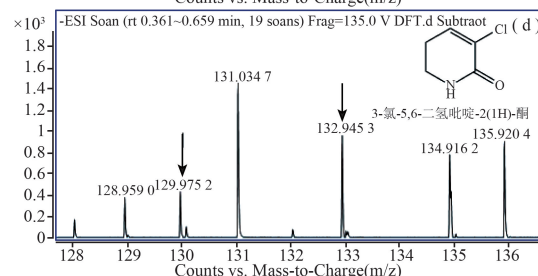
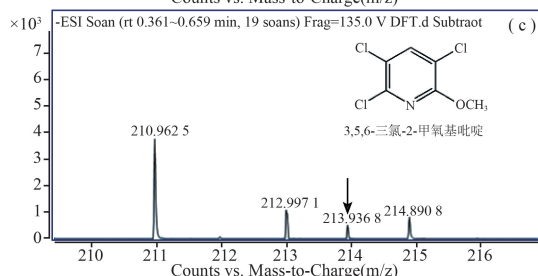
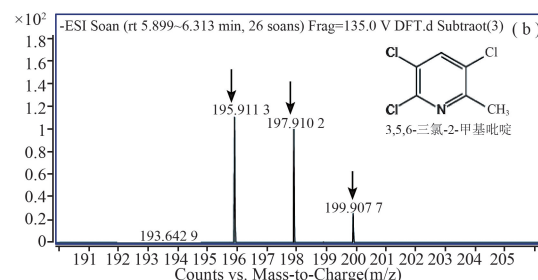
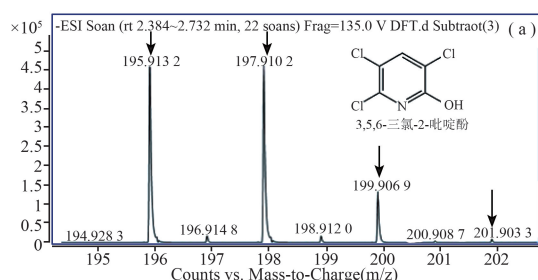
图4 菌株 DFT 降解 TCP 过程中中间代谢产物的高效液相色谱分析

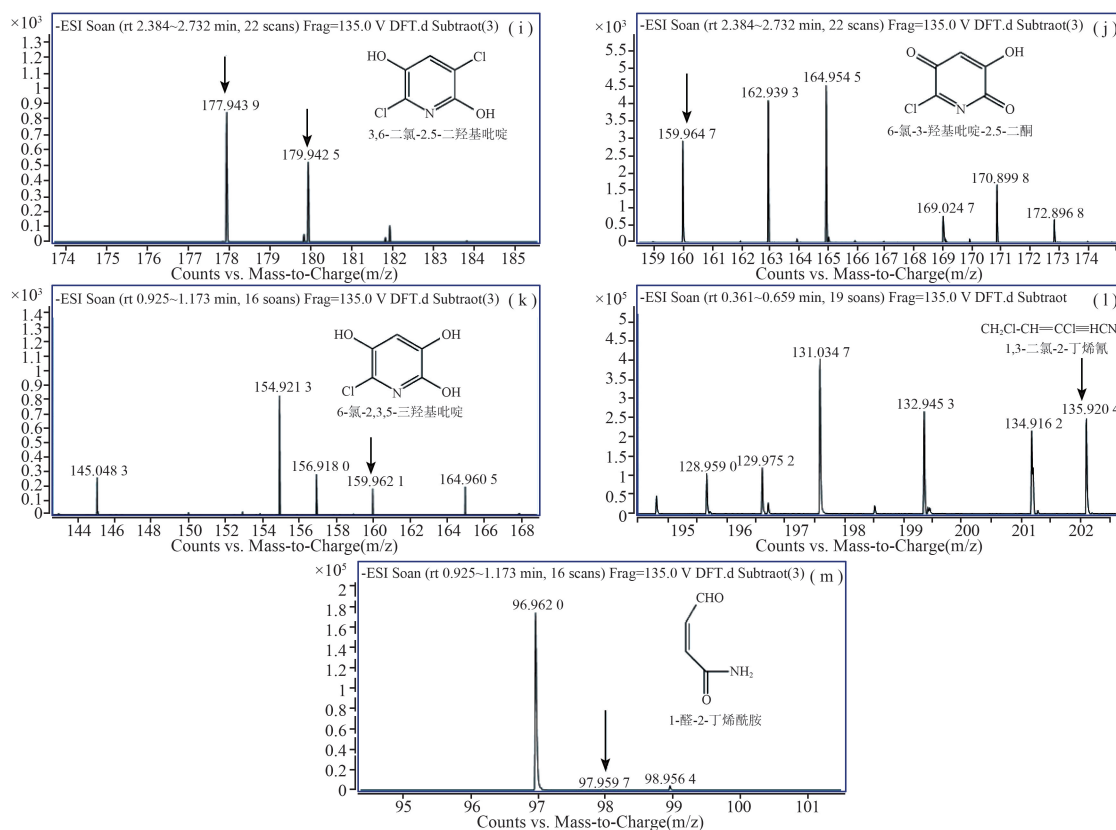
Fig. 4 High performance liquid chromatography analysis of intermediate metabolites in the degradation of TCP by strain DFT

表 1 菌株 DFT 的 TCP 代谢产物分析

Table 1 Analysis of TCP metabolites in strain DFT

| 名称(name)             | 分子量(amu)                    | 分子离子(m/z)               |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| TCP                  | 196.92、198.86、200.75、202.50 | 195.9、197.9、199.9、201.9 |
| 3,5,6-三氯-2-甲基吡啶      | 194.94、196.87、198.75、200.48 | 195.9113、197.9102       |
| 3,5,6-三氯-2-甲氧基吡啶     | 210.94、212.87、214.74、216.46 | 213.9368                |
| 3-氯-5,6-二氢吡啶-2(1H)-酮 | 131.01、132.86、133.94        | 129.9752、132.9453       |
| 尼古丁蓝                 | 250.02、251.12               | 248.9156                |
| 3-(2,4,5-三氯苯氧基)-1-丙炔 | 233.94、235.85、237.68、239.35 | 232.8827                |
| 对丙基苯酚                | 136.09、137.11               | 134.9162                |
| 3,6-二氯-2,5-二吡啶酮      | 176.94、178.85、180.64        | 177.9439、179.9425       |
| 3,6-二氯-2,5-二羟基吡啶     | 178.95、180.87、182.66        | 177.9439                |
| 6-氯-3-羟基吡啶-2,5-二酮    | 158.97、160.82、161.90        | 159.9647                |
| 6-氯-2,3,5-三羟基吡啶      | 160.99、162.83、163.92        | 159.9621                |
| 1,3-二氯-2-丁烯氧         | 134.96、136.89、138.72        | 135.9204                |
| 1-醛-2-丁烯酰胺           | 99.03、100.11                | 97.9597                 |





注:(a) TCP;(b) 3,5,6-三氯-2-甲基吡啶;(c) 3,5,6-三氯-2-甲氧基吡啶;(d) 3-氯-5,6-二氢吡啶-2(1H)-酮;(e) 尼古丁蓝;

(f) 3-(2,4,5-三氯苯氧基)-1-丙炔;(g) 对丙基苯酚;(h) 3,6-二氯-2,5-二吡啶酮;(i) 3,6-二氯-2,5-二羟基吡啶;

(j) 6-氯-3-羟基吡啶-2,5-二酮;(k) 6-氯-2,3,5-三羟基吡啶;(l) 1,3-二氯-2-丁烯腈;(m) 1-醛-2-丁烯酰胺

Noto: (a) TCP; (b) 3,5,6-trichloro-2-methylpyridine; (c) 3,5,6-trichloro-2-methoxy pyridine; (d) 3-chloro-5,6-dihydro pyridine-2 (1 h)-ketone; (e) nicotine blue; (f) 3-(2,4,5-trichlorophenyl)-1-propyne; (g) of propyl phenol; (h) 3,6-dichloro-2,5-dihydroxy pyridine; (i) 3,6-dichloro-2,5-dihydroxy pyridine; (j) 6-chloro-3-hydroxy pyridine-2,5-diketone, 3,5; (k) 6-chloro-2,3,5-trihydroxy pyridine; (l) 1,3-dichloro-2-butene cyanide; (m) -aldehyde-2-butene amide

图5 菌株 DFT 降解 TCP 过程中代谢产物质谱图

Fig. 5 MS spectra of the metabolites during the degradation of TCP by strain DFT

## 2.4 TCP 代谢途径推测

根据上述质谱结果,初步推测菌株 DFT 可能存在四种 TCP 的降解方式(图 6)。第一种是烷基化途径,在菌株 DFT 降解 TCP 过程中,发生烷基化反应,生成 3,5,6-三氯-2-甲基吡啶或 3,5,6-三氯-2-甲氧基吡啶(图 6 ①),最终转化为  $\text{CO}_2$ <sup>[14]</sup>。第二种是反硝化途径,菌株 DFT 代谢 TCP 生成 3-(2,4,5-三氯苯氧基)-1-丙炔和对丙基苯酚(图 6 ②),最终对丙基苯酚被矿化生成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。目前研究发现,*Bacillus thuringiensis* MB497 在代谢 TCP 的过程中也存在这种代谢方式<sup>[25]</sup>。第三种是还原脱氯途径,菌株 DFT 将 TCP 还原脱氯为 3-氯-5,6-二氢吡啶-2(1H)-酮,并最终转化为尼古丁蓝被降解(图 6 ③)。菌株 DFT 的这种 TCP 降解方式与 *Cupriavidus* sp. DT-1 菌株对 TCP 的降解途径相似<sup>[21]</sup>。第四种是水解-氧化脱氯途径,菌株 DFT 通过水解及氧化脱氯依次将 TCP 转化为 3,6-二氯-2,5-二吡啶酮、3,6-二氯-2,5-二羟基吡啶、6-氯-3-羟基吡啶-2,5-二酮、6-氯-2,3,5-三羟基吡啶、1,3-二氯-2-丁烯腈、1-醛-2-丁烯酰胺(图 6 ④)。据文献报道,菌株 *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup>、*Ralstonia* sp. T6、*Cupriavidus* sp. P2、*Pseudomonas nitroreducens* AR-3 也通过水解-氧化脱氯代谢 TCP<sup>[4,20,22,33]</sup>。

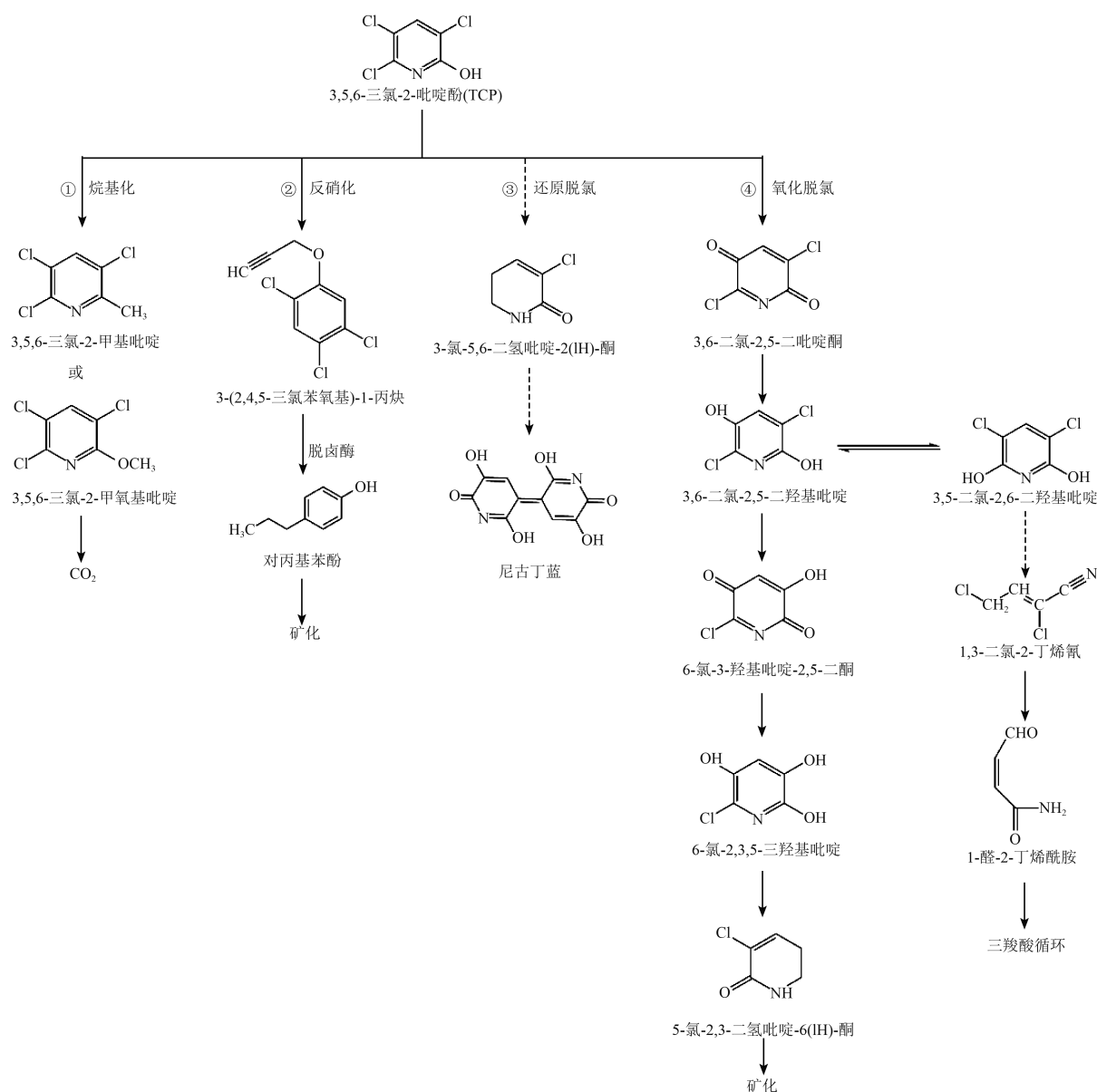


图6 菌株 DFT 降解 TCP 的四种可能代谢途径

Fig. 6 Four possible metabolic pathways of TCP degradation by strain DFT

## 2.5 菌株 DFT 对其它氯代吡啶类化合物的降解

菌株 DFT 不但能降解 TCP, 还能降解其它氯代吡啶类化合物。将菌株 DFT 接种在同时含有 3,5-二氯-2-吡啶醇(50 mg/L)、6-氯-2-吡啶醇(25 mg/L)和 2-羟基吡啶(50 mg/L)的无机盐培养液中, 不同时间点取样, 其降解情况如图 7 所示。在 7 天内, 菌株 DFT 能够代谢 45.4% 的 3,5-二氯-2-吡啶醇(50 mg/L)、65.0% 的 6-氯-2-吡啶醇(25 mg/L)和 38.0% 的 2-羟基吡啶(50 mg/L)。随着时间的延长, 3,5-二氯-2-吡啶醇和 6-氯-2-吡啶醇被逐渐降解, 在 120 h 后达到稳定。2-羟基吡啶在降解过程中浓度先增加后降低, 推测可能是菌株 DFT 前期先脱氯降解 3,5-二氯-2-吡啶醇和 6-氯-2-吡啶醇过程中产生了 2-羟基吡啶, 从而导致 2-羟基吡啶降解初期有明显积累, 但随着降解时间延长, 2-羟基吡啶浓度不断减低并被降解。以上结果表明, 菌株 DFT 能够降解其他吡啶类化合物, 具有明显的脱氯和降解吡啶环的能力。

### 3 讨论

#### 3.1 *Delftia* 菌属对环境污染物的修复性能

本研究分离鉴定了一株能降解 TCP 的 *Delftia* sp., 该菌株不但能对 TCP 进行脱氯, 还能降解脱氯后的产物吡啶酚, 这也是初次发现该菌属的菌株能降解 TCP。目前已有文献报道 *Delftia* sp. 菌属的菌株具有广泛的脱氯活性, 如菌株 *Delftia acidovorans* MC1071 能够降解 R-2-(2,4-二氯苯氧基)丙酸酯(R-2,4-DP)<sup>[38]</sup>; 如菌株 *Delftia acidovorans* P4a 在碱性条件下能够矿化 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 2-甲基-4-氯苯氧乙酸<sup>[39]</sup>; 如菌株 *Delftia acidovorans* MC1 能够利用 2,4-二氯苯氧基丙酸(2,4-DCPP)和 2,4-二氯苯氧乙酸为唯一碳源生长<sup>[40]</sup>。最近也有研究发现, *Delftia* 菌属还具备降解苯环及多元环状污染物的能力, 如菌株 *Delftia* sp. AN3 能够在高达 53.8  $\mu\text{mol/L}$  (5 000 mg/L) 的苯胺浓度下生长, 且在 30  $^{\circ}\text{C}$  (pH7.0) 的条件下降解苯胺的效率最高达到 80%<sup>[41]</sup>。菌株 *Delftia tsuruhatensis* AD9、*Delftia* sp. TBKNP-05、*Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174 和 *Delftia* sp. WL-3 分别能够降解苯胺, 邻苯二甲酸二正丁酯、2,2-二甲基环丙烷甲酰胺及对苯二甲酸二乙酯(DET)<sup>[42-45]</sup>。此外, *Delftia* sp. 菌属还具有降解其它污染物的能力, 如 *Delftia lacustris* RJJ-61 在 35  $^{\circ}\text{C}$  下 120 h 内可降解 45.18% 的红霉素; 菌株 *Delftia* sp. T3-6 可在 6 d 内完全降解 100 mg/L 乙草胺和丁草胺<sup>[46,47]</sup>。*Delftia* sp. 菌属具有多种环境污染物的降解潜能, 可以应用于污染物的生物修复。

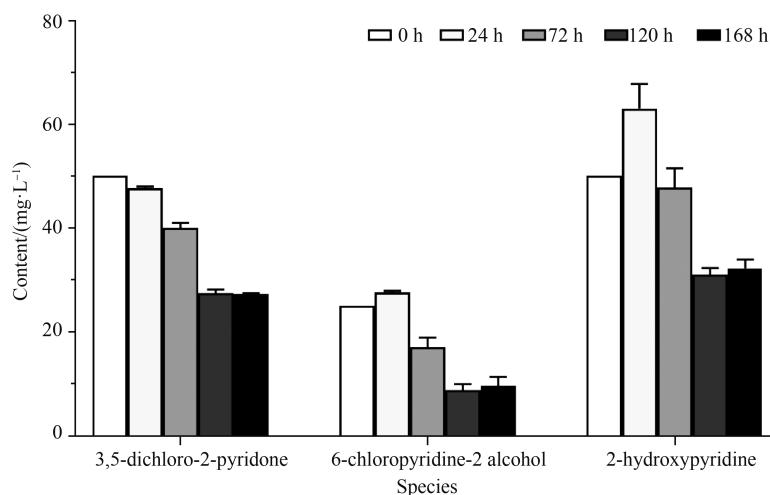


图7 菌株 DFT 降解其他氯代吡啶类化合物

Fig. 7 Degradation of other chloropyridine compounds by strain DFT

#### 3.2 TCP 的微生物代谢途径

不同的微生物对 TCP 的代谢途径不尽相同, 据报道 TCP 主要有四条不同的代谢途径, 分别是水解-氧化脱氯途径、还原脱氯途径、反硝化途径及烷基化途径<sup>[14,16,48-52]</sup>。目前文献已报道, 微生物能通过烷基化途径降解 TCP<sup>[14]</sup>; *Cupriavidus* sp. DT-1 通过还原脱氯途径降解 TCP<sup>[21]</sup>; *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup>、*Ralstonia* sp. T6、*Cupriavidus* sp. P2 通过水解-氧化脱氯途径降解 TCP<sup>[4,20,22]</sup>; *Bacillus thuringiensis* MB497 通过反硝化途径降解 TCP<sup>[25]</sup>。上述报道仅发现在同一菌中, 可能只存在一种 TCP 的代谢途径<sup>[4,6,8,25,26]</sup>。最近有研究报道 *Bacillus thuringiensis* MB497 在代谢 TCP 过程中存在反硝化脱氯途径和脱氯酶和氧化酶参与的脱氯反应两种不同的 TCP 代谢方式<sup>[25]</sup>。还有研究发现, *Micrococcus luteus* ML 菌可能同时存在水解氧化脱氯和反硝化两种 TCP 代谢途径<sup>[16]</sup>。目前, 关于 TCP 代谢途径的关键基因报道较少。Cao 等人在 *Cupriavidus pauculus* P2 的突变株文库中筛选到有关 TCP 降解的基因: 单加氧酶基因

(*tcpAl*)和黄素还原酶基因(*tcpBl*),共同催化了 TCP 的水解脱氯反应,最终生成 3,6-二酮-2,5-二羟基吡啶<sup>[22]</sup>。Li 等人从菌株 *Ralstonia* sp. strain T6 中得到两个 TCP 降解基因簇 *tcpRXA* 和 *dhpRIJK*,其中 *tcpRXA* 基因簇编码产生的酶能够使 TCP 转化为 3,6-二酮-2,5-二羟基吡啶,*dhpRIJK* 编码产生的酶能够进一步转化为 5-氨基-2,4,5-三氧戊酸,最终被矿化<sup>[20]</sup>。同样在菌株 *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup> 中 *tcpA* 和 *fre* 是降解 TCP 的两个关键基因,编码产生的酶能够催化 3,6-二氯-2,5-二羟基吡啶的邻位和间位脱氯<sup>[4]</sup>。据文献调研,目前尚未见到关于 TCP 四种代谢通路中涉及的关键基因表达情况的任何分析报道,下一步的研究仍需要完善这些信息。

### 3.3 *Delftia* sp. DFT 降解 TCP 的代谢途径

在本研究中,我们通过代谢组学检测分析发现,菌株 DFT 降解 TCP 过程中既有部分烷基化反应代谢产物、部分反硝化反应代谢产物、部分还原脱氯代谢产物,还有比较完整的 TCP 水解-氧化脱氯代谢产物。基于菌株的代谢组学分析,我们初步推测四种不同的 TCP 代谢方式可能共同参与了菌株 *Delftia* sp. DFT 对 TCP 的生物降解。下一步可能还需要借助基因组和转录组学的数据进行进一步验证 TCP 的完整代谢通路。

## 4 结论

本研究分离鉴定了一株能降解 TCP 的 *Delftia* sp. DFT,该菌株能在 48 h 内对 50 mg/L 的 TCP 降解率达 34.28%,同时也能降解 3,5-二氯-2-吡啶醇、6-氯-2-吡啶醇和 2-羟基吡啶等其他氯代吡啶类化合物。TCP 代谢途径分析表明,水解-氧化脱氯途径、还原脱氯途径、反硝化途径及烷基化反应可能共同参与了菌株 DFT 对 TCP 的降解。据文献调研,这是首次在 *Delftia* sp. 菌中发现有四种可能的 TCP 代谢途径的报道,这为纯培养物中 TCP 降解机制的研究提供了新的参考信息。

## 参 考 文 献

- [1] 张叶翠,李翎,胡晨阳,等. 毒死蜱生殖毒性与神经毒性研究进展[J]. 中国职业医学, 2019, 46(5): 5-11.
- [2] HOU K, YANG Y, ZHU L, et al. Toxicity evaluation of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) to *Eisenia fetida* in different soils[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 2022, 259:109394.
- [3] ECHEVERRI J G, JARAMILLO C B, SABATER M C, et al. Acute toxicity of chlorpyrifos and its metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol alone and in combination using a battery of bioassays[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2020, 27(26): 32770-32778.
- [4] FANG L C, SHI T Z, CHEN Y F, et al. Kinetics and catabolic pathways of the insecticide chlorpyrifos, annotation of the degradation genes and characterization of enzymes TcpA and Fre in *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup>[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(8): 2245-2254.
- [5] ARMBRUST K L. Chlorothalonil and chlorpyrifos degradation products in golf course leachate[J]. Pest Manag Science, 2001, 57: 797-802.
- [6] 杨益军. 2018 年中国(全球)毒死蜱市场现状及预测[J]. 农药科学与管理, 2019, 40(1): 18-24.
- [7] BAEZ M E, ESPINOZA J, FUENTES E. Degradation kinetics of chlorpyrifos and diazinon in volcanic and non-volcanic soils: influence of cyclodextrins[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2018, 25:25020-25035.
- [8] XU R, REN H, CHI T, et al. Ozone oxidation of 2, 4, 6-TCP in the presence of halide ions: Kinetics, degradation pathways and toxicity evaluation[J]. Chemosphere, 2022, 288(2): 132343.
- [9] RACKE K D. Environmental fate of chlorpyrifos[J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1993, 131:1-150.
- [10] 陆鹏,周慧,袁梦. 菌株 *Cupriavidus* sp. DT-1 对液体和土壤中 TCP 的降解[J]. 中国环境科学, 2021, 41(6):2780-2787.
- [11] TIWARI M K, GUHA S. Kinetics of biotransformation of chlorpyrifos in aqueous and soil slurry environments[J]. Water Research, 2014, 51:73-85.
- [12] 曹正颖. 经口、经皮暴露毒死蜱的生理毒代动力学和毒效应学(PBTK/TD)模型研究[D]. 江苏:东南大学, 2016.

- [13] GONZALEZ N C S, OLMEDO M L, SECO P J P, et al. Occurrence of persistent organic pollutants and chlorpyrifos in *Tadarida brasiliensis* tissues from an agricultural production area in Argentina[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(42): 64162-64176.
- [14] 岳彩旭, 贾楠, 王圣惠. 3, 5, 6-三氯-2-吡啶酚的微生物降解及催化机制[J]. *环境科学与技术*, 2022, 45(11): 10-16.
- [15] RAYU S, NIELSEN U N, NAZARIES L, et al. Isolation and molecular characterization of novel Chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol-degrading bacteria from sugarcane farm soils[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 518-525.
- [16] YUE C X, JIA N, LV X R, et al. Identification of two possible metabolic pathways responsible for the biodegradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in *Micrococcus luteus* ML[J]. *Biodegradation*, 2023, 34(4): 371-381.
- [17] XU G M, ZHENG W, LI Y Y, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(1): 51-56.
- [18] XU G M, LI Y Y, ZHENG W, et al. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(10): 1469-1473.
- [19] 王晓, 楚小强, 虞云龙, 等. 毒死蜱降解菌株 *Bacillus latsprorus* DSP 的降解特性及其功能定位[J]. *土壤学报*, 2006, 43 (4): 648-654.
- [20] LI J, LI J, SONG W J, et al. Isolation and characterization of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol-degrading *Ralstonia* sp. strain T6[J]. *Biore-source Technology*, 2010, 101 (19): 7479-7483.
- [21] LU P, LI Q F, LIU H M, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1[J]. *Biore-source Technology*, 2013, 127:337-342.
- [22] CAO L, XU J H, WU G, et al. Identification of two combined genes responsible for dechlorination of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol (TCP) in *Cupriavidus pauculus* P2[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 260:700-706.
- [23] 孙建波, 张洪宇, 龚忠阔, 等. 毒死蜱降解菌株的分离鉴定及降解条件优化[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(10): 75-82.
- [24] BEMPELOU E D, VONTAS J G, LIAPIS K S, et al. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by the epiphytic yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula rubra* [J]. *Ecotoxicology*, 2018, 27(10): 1368-1378.
- [25] AMBREEN S, YASMIN A. Novel degradation pathways for chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degradation by bacterial strain *Bacillus thuringiensis* MB497 isolated from agricultural fields of Mianwali, Pakistan[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 172: 104750.
- [26] ZHANG Q, LI S, MA C, et al. Simultaneous biodegradation of bifenthrin and chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. CB2[J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2018, 53(5): 304-312.
- [27] SOBIECKA E, MROCZKOWSKA M, OLEJNIK T P. The influence of chlorpyrifos on the nonenzymatic antioxidants content in macrophytes leaves[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(4): 684.
- [28] ANRAHAM J, SILAMBARASAN S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 126:13-21.
- [29] WANG S H, ZHANG C, LV Z W, et al. Degradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a microbial consortium in dryland soil with anaerobic incubation[J]. *Biodegradation*, 2019,30(2/3): 161-171.
- [30] ZHANG C, WANG S H, LV Z W, et al. NanoFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> accelerates anoxic biodegradation of 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol[J]. *Chemosphere*, 2019, 235:185-193.
- [31] ABRAHAM J, SILAMBARASAN S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Sphingobacterium* sp. JAS3[J]. *Process Biochemistry*, 2013,48(10): 1559-1564.
- [32] VERMA S, SINGH D, CHATTERJEE S. Biodegradation of organo-phosphorus pesticide chlorpyrifos by *Sphingobacterium* sp. C1B, a psychrotolerant bacterium isolated from apple orchard in Himachal Pradesh of India[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(6): 897-908.
- [33] ASWATHI A, PANDEY A, SUKUMARAN R K. Rapid degradation of the organophosphate pesticide-Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3[J]. *Bioresource technology*, 2019, 292: 122025.
- [34] 岳彩旭, 贾楠, 吕雪茹, 等. 一株3, 5, 6-三氯-2-吡啶酚降解菌的全基因组测序及功能挖掘[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2023,36 (4): 101-110.
- [35] RAYU S, NIELSEN U N, NAZARIES L, et al. Isolation and molecular characterization of novel chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-degrading bacteria from sugarcane farm soils[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 518.

- [36] KIM J R, AHN Y J. Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia* sp. strain KR100[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(4): 487-497.
- [37] BRICE O G, FUENTES M S, PALMA G, et al. Chlorpyrifos biodegradation and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 73:1-7.
- [38] YOON H, LEI S, ZHANG C, et al. Adaptation of *Delftia acidovorans* for degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetate in a microfluidic porous medium[J]. *Biodegradation*, 2014, 25(4): 595-604.
- [39] HOFFMANN D, KLEINSTEUBER S, MÜLLER R H, et al. A transposon encoding the complete 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkali-tolerant strain *Delftia acidovorans* P4a[J]. *Microbiology (Reading)*, 2003, 149(9): 2545-2556.
- [40] BENNDORF D, DAVIDSON I, BABEL W. Regulation of catabolic enzymes during long-term exposure of *Delftia acidovorans* MC1 to chlorophenoxy herbicides[J]. *Microbiology (Reading)*, 2004, 150(4): 1005-1014.
- [41] LIU Z, YANG H, HUANG Z, et al. Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia* sp. AN3[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(5): 679-682.
- [42] GENG L, CHEN M, LIANG Q, et al. Functional analysis of a putative regulatory gene, *tadR*, involved in aniline degradation in *Delftia tsuruhatensis* AD9[J]. *Archives of Microbiology*, 2009, 191(7): 603-614.
- [43] PATIL N K, KUNDAPUR R, SHOUCHÉ Y S. Degradation of plasticizer di-n-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05[J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(5): 369-374.
- [44] ZHENG R C, WANG Y S, LIU Z Q, et al. Isolation and characterization of *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174, capable of R-enantioselective degradation of 2, 2-dimethylcyclopropanecarboxamide[J]. *Research Microbiol*, 2007, 158(3): 258-264.
- [45] LIU J, XU G, DONG W, et al. Biodegradation of diethyl terephthalate and polyethylene terephthalate by a novel identified degrader *Delftia* sp. WL-3 and its proposed metabolic pathway[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(3): 254-261.
- [46] REN J, WANG Z, DENG L, et al. Biodegradation of erythromycin by *Delftia lacustris* RJJ-61 and characterization of its erythromycin esterase[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(1): 55-62.
- [47] HOU Y, DONG W, WANG F, et al. Degradation of acetochlor by a bacterial consortium of *Rhodococcus* sp. T3-1, *Delftia* sp. T3-6 and *Sphingobium* sp. MEA3-1[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 59(1): 35-42.
- [48] SHI T, FANG L, QIN H, et al. Rapid biodegradation of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos by *Cupriavidus nantongensis* X1<sup>T</sup> [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(23): 4593.
- [49] 曹礼, 徐琳. 微生物降解 3, 5, 6-三氯-2-吡啶醇的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(6): 1158-1164.
- [50] GAO H, LI J, ZHAO G, et al. 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol intensifies the effect of chlorpyrifos on the paracrine function of Sertoli cells by preventing binding of testosterone and the androgen receptor[J]. *Toxicology*, 2021, 460: 152883.
- [51] BOUCHARD M, CARRIER G, BRUNET RC, et al. Determination of biological reference values for chlorpyrifos metabolites in human urine using a toxicokinetic approach[J]. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2005, 2(3): 155-168.
- [52] VANPEE K H, UNVERSUCHT S. Biological dehalogenation and halogenation reactions[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(2): 299-312.

(责任编辑:刘庆松)