



# 一株对羟基苯甲酸降解菌的降解条件优化及缓解黄瓜根际对羟基苯甲酸胁迫效应

吴佩佩<sup>1</sup>, 袁秀丰<sup>2</sup>, 丰景<sup>1\*</sup>

1 广西民族大学海洋与生物技术学院 广西多糖材料与改性重点实验室, 广西 南宁 530000

2 广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西 南宁 530000

吴佩佩, 袁秀丰, 丰景. 一株对羟基苯甲酸降解菌的降解条件优化及缓解黄瓜根际对羟基苯甲酸胁迫效应[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2465-2478.

WU Peipei, YUAN Xiufeng, FENG Jing. Optimization of degradation conditions and mitigation the stress effect of p-hydroxybenzoic acid in cucumber rhizosphere by a strain of p-hydroxybenzoic acid degrading bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2465-2478.

**摘要:** 植物根系分泌的自毒物质如对羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid, PHBA)等酚酸类物质是造成植物连作障碍的主要因子。**【目的】**获得对羟基苯甲酸降解菌并提高该降解菌的降解效率。**【方法】**采用筛选培养基和无机盐培养基, 分离到 1 株 PHBA 降解菌株, 经鉴定为橙色微杆菌(*Microbacterium aurantiacum*)。利用单因素试验及响应面方法对 PHBA 初始含量、培养温度、pH 及氮源等影响菌株降解因素进行了优化。**【结果】**该菌株在 PHBA 含量为 0.4 g/L, 温度为 30 °C, pH 值为 8.0, 氮源为硫酸铵时降解率最高, 最佳降解条件为温度 30.2 °C, pH 值 8.3, PHBA 浓度 0.18 g/L, 降解率达到 100%。结合盆栽试验及高效液相色谱法得到该菌株能够有效缓解黄瓜根际 PHBA 胁迫效应。**【结论】**本研究筛选得到的菌株橙色微杆菌具有较高的 PHBA 降解能力, 具有应用于连作障碍的潜在价值。

**关键词:** 对羟基苯甲酸; 橙色微杆菌; 响应面优化; 黄瓜; 盆栽试验

资助项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2023GXNSFBA026041); 国家自然科学基金(32360024)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2023GXNSFBA026041) and the National Natural Science Foundation of China (32360024).

\*Corresponding author. E-mail: fengjing0414141@foxmail.com

Received: 2023-12-22; Accepted: 2024-03-26; Published online: 2024-04-02

# Optimization of degradation conditions and mitigation the stress effect of p-hydroxybenzoic acid in cucumber rhizosphere by a strain of p-hydroxybenzoic acid degrading bacteria

WU Peipei<sup>1</sup>, YUAN Xiufeng<sup>2</sup>, FENG Jing<sup>1\*</sup>

1 Guangxi Key Laboratory of Polysaccharide Materials and Modification, School of Marine and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530000, Guangxi, China

2 School of Marine and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning 530000, Guangxi, China

**Abstract:** Phenolic acids autotoxic substances secreted by plant roots, such as p-hydroxybenzoic acid (PHBA), are the main factors causing continuous cropping obstacles in plants. **[Objective]** In order to obtain PHBA degrading bacteria and improve its degradation efficiency. **[Methods]** A PHBA-degrading strain was isolated by screening medium and inorganic salt medium, and it was identified as *Microbacterium aurantiacum*. The initial content of PHBA, culture temperature, pH and nitrogen source were optimized by single factor experiment and response surface methodology. **[Results]** The highest degradation rate was obtained when the PHBA content was 0.4 g/L, the temperature was 30 °C, the pH was 8.0, and the nitrogen source was ammonium sulfate. The optimal degradation conditions were temperature 30.2 °C, pH 8.3, and PHBA concentration 0.18 g/L, and the degradation rate reached 100%. Combined with pot experiments and high performance liquid chromatography, the results showed that the strain could effectively mitigate the PHBA stress effect in cucumber rhizosphere. **[Conclusion]** The strain of *Microbacterium aurantiacum* screened in this study has a high ability to degrade PHBA, and has the potential value in continuous cropping obstacles.

**Keywords:** p-hydroxybenzoic acid; *Microbacterium aurantiacum*; responsive surface optimization; cucumber; pot experiments

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为葫芦科黄瓜属蔬菜作物,是中国主要种植的蔬菜种类之一。近年来,随着农业产业结构的调整及优化,黄瓜的种植面积不断扩大。然而,种植者过于追求产量的做法,随着种植年限的积累,使得在同一块土地上连续种植同种作物时会导致连作障碍的发生,从而引发黄瓜减产问题。导致连作障碍的因素有

很多,其中植物的化感物质酚酸的自毒作用是重要因素。因此,如何消除土壤中酚酸类物质成为了生产所面临的重要问题。

在植物的生命周期中,根系起着关键的作用,它是植物与土壤直接接触的部分,负责植物对土壤物质的吸收和转移<sup>[1]</sup>。根系一方面从土壤中吸收养分和水分,另一方面也向土壤周围释放

一类复杂的混合物,在这些物质中,最普遍的是低分子量的有机物,如酚类和萜类化合物<sup>[1]</sup>。酚酸类物质是引起连作障碍的主要因素。对羟基苯甲酸(p-hydroxybenzoic acid, PHBA)属于酚酸类化感物,它们在大自然中十分普遍,并且广泛分布在各种植被、微生物以及土壤中<sup>[2]</sup>。对羟基苯甲酸,作为一类主要的酚酸类自毒物质,常见于草莓(*Fragaria×ananassa* Duch.)和黄瓜(*Cucumis sativus* L.)的根系分泌物中。当作物连续种植时,其根分泌物和植株残余的腐烂物质常常会产生自我毒性,进而导致连作阻碍。对羟基苯甲酸的积累可对多种作物连作产生障碍,这会影响农作物的生长发育,降低农作物的产量和品质<sup>[3]</sup>。

自然界存在很多对酚酸类物质具有降解能力的菌株,利用微生物降解是一种安全且环保的降低农作物生长环境中自毒物质的方式。刘紫英等<sup>[4]</sup>从草莓基地土样中筛选到7株对香豆酸具有降解能力的霍氏肠杆菌属;王洁等<sup>[5]</sup>从香草兰植株种植园植株根际土壤中筛选得到6株可降解酚酸类物质苯甲酸、对羟基苯甲酸和水杨酸的芽孢杆菌;另外还存在能够降解草莓根际自毒物质对羟基苯甲酸的红球菌<sup>[6]</sup>,能够降解黄连根际自毒物质阿魏酸的链霉菌<sup>[7]</sup>。目前,虽然具有PHBA降解能力的菌株已有很多,但有关橙色微杆菌降解PHBA的相关报道较为罕见。同时每株菌都有自身独特的生长特性,真正应用于实际的酚酸降解中所达到的效果也会有所差异,因此,筛选能够降解植物根系中的对羟基苯甲酸的菌株仍具有重要的研究意义。

本研究从海洋及海岸红树林土壤中分离得到具有降解对羟基苯甲酸能力的菌株,通过对PHBA降解菌的降解条件优化及其对黄瓜根际胁迫效应进行了探究,为将该菌株开发成土壤生物复原剂提供了理论依据<sup>[8]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 盆栽试验材料

供试黄瓜品种为棒棒脆黄瓜,育苗基质采用商品性基质,由南宁桂裕鑫农业科技有限公司生产。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

对羟基苯甲酸、氯化钠,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氢氧化钠、无水氯化铁和硫酸铵,上海麦克林生化科技有限公司;无水氯化钙、七水合硫酸镁、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾,广东光华科技股份有限公司。

超净工作台,上海智诚分析仪器制造有限公司;全自动立式高压灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;生化培养箱,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;摇床,上海旻泉仪器有限公司;真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司;紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司;酶标仪, BioTek 公司。

### 1.2 培养基及使用

#### 1.2.1 TSA 培养基及使用

TSA 培养基(g/L):酪蛋白胰酶消化物 15.0,大豆粉木瓜蛋白酶消化物 5.0,氯化钠 5.0,琼脂 15.0, pH 7.3。

使用方法:取 TSA 培养基 40.0 g,加热搅拌溶解于 1 000.0 mL 蒸馏水中,121 °C 灭菌 15 min,等待温度降至 50 °C 左右,倒入培养皿中备用。

#### 1.2.2 LB 肉汤培养基及使用

LB 肉汤培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸膏 5.0,氯化钠 10.0, pH 7.0。

使用方法:称取 LB 肉汤培养基 25.0 g,加热搅拌溶解于 1 000.0 mL 蒸馏水中,分装,121 °C 灭菌 15 min 备用。

### 1.2.3 筛选培养基配制及使用

筛选培养基包括筛选具 PHBA 降解菌株的 PHBA 培养基及筛选高降解率菌株的无机盐培养基。

PHBA 培养基(g/L): 对羟基苯甲酸 0.1, 琼脂 20.0, pH 7.0。使用方法: 取对羟基苯甲酸 0.1 g, 溶解于 1 000.0 mL 蒸馏水中, 再按照总体积 2%的量加入琼脂, 充分搅拌后使用碱性溶液调节 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 15 min, 等待温度降至 50 °C 左右, 倒入培养皿中备用。

无机盐培养基(g/L): 氯化钠 0.2, 无水氯化铁 0.01, 硫酸铵 1.0, 无水氯化钙 0.2, 七水合硫酸镁 0.2, 磷酸二氢钾 0.5, 磷酸氢二钾 0.5。

### 1.3 菌株的来源

试验筛选获得的具有降解对羟基苯甲酸特性的菌株, 经 16S rRNA 基因鉴定为一株橙色微杆菌(*Microbacterium aurantiacum*), 来源于海洋及海岸红树林土壤, 命名为 GX14001。

### 1.4 数据处理和分析

采用 Design-Expert 13、MEGA 11 和 Microsoft Excel 进行试验设计及数据分析, Origin 2021 软件绘制图形。

### 1.5 生长曲线的测定

为了解细菌 GX14001 在无机盐培养基中不同培养时间下的生长状况, 采用比浊度法测定<sup>[9]</sup>。于超净台中取 200  $\mu$ L  $OD_{600}$  为 1.0 的菌悬液接种至含有 20 mL 配制好并灭菌待用的无机盐培养基锥形瓶中, 30 °C、180 r/min 恒温摇床中培养, 每隔 12 h 于超净台中吸取 200  $\mu$ L 的待测液, 使用酶标仪测定其在波长 600 nm 处的吸光度( $OD_{600}$ )。确定菌株在无机盐培养基中的生长状况<sup>[9]</sup>。

### 1.6 PHBA 降解特性测定

#### 1.6.1 单因素试验

以无机盐培养基为基础, 分别称取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 g/L PHBA, 其他培养成

分不变, 装液量为 20 mL/50 mL 锥形瓶, 接菌量为 1%, 30 °C、180 r/min 条件下培养 72 h, 每组设置 3 个平行, 结果取平均值<sup>[10]</sup>, 测定不同 PHBA 浓度下的 PHBA 降解率, 以确定最适 PHBA 降解浓度。

以无机盐培养基为基础, 其他培养成分不变, 装液量为 20 mL/50 mL 锥形瓶, 接菌量为 1%, 分别放置于 24、26、28、30、32、34 °C, 180 r/min 条件下培养 72 h, 测定不同培养温度下的 PHBA 降解率, 从而确定最适 PHBA 降解的培养温度。

以无机盐培养基为基础, 其他培养成分不变, 装液量为 20 mL/50 mL 锥形瓶, 接菌量为 1%, 分别调节 pH 至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 置于 30 °C、180 r/min 条件下培养 72 h, 测定不同 pH 下的 PHBA 降解率, 以确定最适 PHBA 降解的 pH 值。

以无机盐培养基为基础, 分别添加接菌量为 1%的不同氮源[NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaNO<sub>3</sub>、尿素], 其他培养成分不变, 装液量为 20 mL/50 mL 锥形瓶, 30 °C、180 r/min 条件下培养 72 h, 测定不同氮源的 PHBA 降解率。

#### 1.6.2 响应面试验

根据单因素试验结果确定 3 个主要影响因素, 利用 Box-Behnken 中心组合设计出 17 个响应面分析试验, 做降解条件的进一步优化。

### 1.7 黄瓜根际 PHBA 胁迫盆栽试验

#### 1.7.1 GX14001 对外源 PHBA 处理下黄瓜生长的影响

按照对照组、菌处理、PHBA 处理、PHBA 和菌处理 4 种处理, 每个处理 3 个平行, 配好育苗盆栽, 其中 PHBA 处理、PHBA 和菌处理的盆栽中按照盆栽土量的 2%添加外源 PHBA。组培室维持温度为 25 °C, 光照时间为 12 h/12 h (日/夜)循环。

将黄瓜种子置于 50 mL 离心管中,使用 75% 医用乙醇将其充分消毒 2–3 min, 共消毒 2 次, 接着使用无菌水将黄瓜种子表面乙醇清洗干净, 以免影响种子发芽。然后将消毒后的黄瓜种子放置于垫有湿润滤纸的灭菌培养皿上, 加盖并使用报纸包裹, 放置于干燥且避光环境下对种子进行催芽, 种子发芽后移栽至育苗盆栽中, 按每盆 3 棵培养。待黄瓜生长至两叶一心时, 将大小及生长状况相同的黄瓜留下, 其余种子移除。30 °C、180 r/min 的恒温摇床中培养 3 d 的 GX14001 菌悬液取 5 mL 分别接种于菌处理组、PHBA 和菌处理的黄瓜根际, 对照组和 PHBA 处理中相应接种 5 mL 无菌水, 培养 25 d 后, 观察 4 个处理下黄瓜生长情况, 并使用量尺测量其叶片大小、株高和茎粗, 并进行比较。

### 1.7.2 GX14001 对外源 PHBA 处理下黄瓜叶片抗氧化酶及相关指标的影响

本研究收集了对照组、菌处理、PHBA 处理、PHBA 和菌处理 4 种处理下的 25 d 的黄瓜叶片, 测定了叶片中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性。其中 MDA 活性采用硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法测定, 降解产物中的 MDA 可与 TBA 缩合, 形成红色产物, 在波长 532 nm 处有最大吸收峰。CAT 活性采用钼酸铵法测定, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与钼酸铵作用产生一种淡黄色络合物, 在 405 nm 处测定其变化量, 计算出其活力值。SOD 采用水溶性四氮唑-1 (water-soluble tetrazolium-1, WST-1)法测定其活性, WST-1 是一种四氮唑化合物, 它是一种水溶性的无色染料。当 WST-1 暴露在细胞培养液中时, 活力细胞中的脱氢酶或还原酶类酶会还原 WST-1, 将其转化为产物 WST-1 形成的可溶性有色化合物。

### 1.7.3 GX14001 对外源 PHBA 处理下黄瓜根际土壤酶活性的影响

本研究收集了对照组、菌处理、PHBA 处理、PHBA 和菌处理 4 种处理下的 25 d 的黄瓜根际土壤, 测定了土壤中过氧化氢酶(soil-catalase, S-CAT)、纤维素酶(soil-cellulase, S-CL)和脲酶(soil-urease, S-UE)的活性。S-CAT 采用紫外吸收峰法, 从紫外波长 240 nm 转换到波长 510 nm 检测。S-CL 采用 3,5-二硝基水杨酸与 S-CL 催化纤维素降解产生的还原糖反应生成棕红色物质, 在 540 nm 处于特征吸收峰, 进而得到土壤纤维素酶的活性。S-UE 是一种高度专性的酶, 能酶促尿素的水解, 采用靛酚蓝比色法测定其酶活性。

### 1.7.4 HPLC 评估 GX14001 在黄瓜盆栽中对 PHBA 的降解效果

事先配制 100 mg/L 的 PHBA 标准品, 分别检测上样量为 1、2、4、6、8、10、12 μL 的标准品, 观察不同上样量标准品中出峰的时间。

取 PHBA 处理、PHBA 和菌处理的黄瓜根际土样, 过 100 目筛精密称取 10 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 精密加入 2 mol/L NaOH 溶液 50 mL, 旋涡混匀置于 25 °C、200 r/min 摇床中振荡 12 h, 取出放于室温静置 2 h, 之后于 4 000 r/min 离心 15 min 分离上清, 上清液用 12 mol/L HCl 调 pH 至 2.5, 沉淀出胡敏酸, 超声振荡 10 min 后静置 2 h, 过滤, 去上清液, 采用乙酸乙酯萃取 5 次, 收集上层萃取液, 合并, 置于 45 °C 旋转蒸发仪上旋转蒸发至干, 将残渣溶解并采用甲醇定容于 2 mL 棕色量瓶中, 使用 0.22 μm 滤膜过滤, 最后使用高效液相色谱(HPLC)检测。

使用 Agilent 1260 Infinity II Quaternary LC 和反相 C18 硅胶色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm; Welch 公司)测量 PHBA 浓度。洗脱程序: 柱温保持在 28 °C; 紫外(ultraviolet, UV)检测波长为 280 nm; 流动相 A: 100%甲醇; 流动相 B: 1%乙酸和 99%超纯水; 流速为 0.6 mL/min; 上样量 8 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 GX14001 16S rRNA 基因鉴定

将菌株 GX14001 的测序结果在 EzBioCloud 进行比对与分析, 并使用 MEGA 11 构建菌株系统发育树, 见图 1。结果表明, 菌株 GX14001 与橙色微杆菌(*Microbacterium aurantiacum*)处于发育树同一支, 置信度为 99, 表明两者之间基因序列同源性高度相似。菌株 GX14001 基因序列上传 NCBI, 获得 GenBank 登录号为 MZ489467, 现保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏编号为 CGMCC1.19276。

### 2.2 菌株 GX14001 在无机盐培养基中的生长曲线

以菌株 GX14001 的培养时间为横坐标, 测定的  $OD_{600}$  值为纵坐标, 绘制出该菌株在无机盐培养基中的生长曲线, 见图 2。结果表明, 菌株生

长浓度逐渐升高, 在培养时间为 72 h 时,  $OD_{600}$  值达到最高 0.315, 72 h 之后, 菌株生长缓慢。

### 2.3 菌株对 PHBA 降解影响因素的研究

#### 2.3.1 单因素试验

菌株 GX14001 对不同 PHBA 含量的降解: 菌株对不同 PHBA 浓度的降解如图 3A 所示, 当无机盐培养基中 PHBA 起始含量较低时, PHBA 降解率随着 PHBA 含量的升高而增长, 至 PHBA 含量为 0.4 g/L 时, PHBA 降解率达 97.6%; PHBA 浓度高于 0.4 g/L 后, 随着 PHBA 起始含量的增加降解率也逐渐下降; 当 PHBA 浓度为 0.7 g/L 时, 菌体生长受到高浓度 PHBA 的抑制, 降解率也达到最低。

温度对菌株降解 PHBA 的影响: 在以 PHBA 为无机盐培养基中唯一碳源时, 由图 3B 所示, 菌株适合生长的范围比较广泛, 在 26–30 °C 均可以得到良好的生长, 随着温度的升高或者降

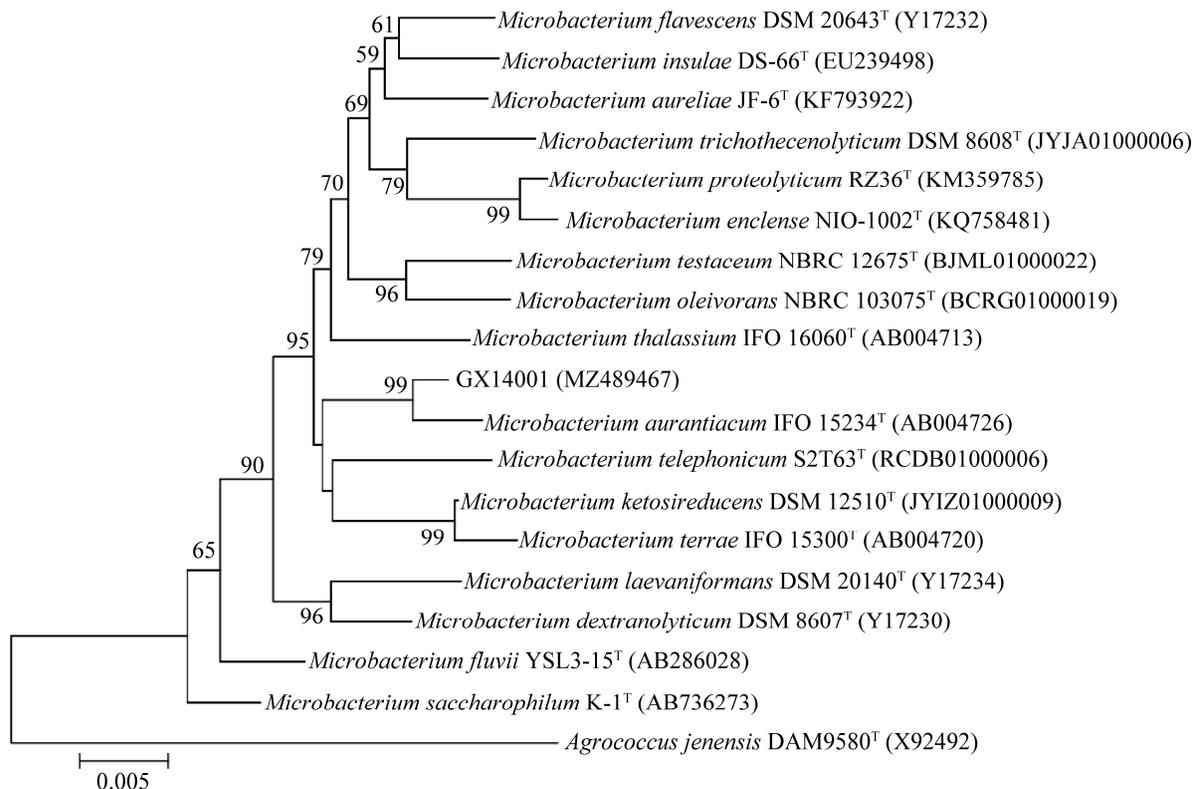


图 1 菌株 GX14001 系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain GX14001.

低, 菌体的生长受到了明显的限制, 降解率也随之降低。

培养基 pH 对菌株降解 PHBA 的影响: 如图 3C 所示, 菌株 GX14001 降解 PHBA 最适 pH 值为 8.0, 降解率达 100%。当无机盐培养基 pH 小于 6.0 时, 菌体生长较缓慢, 降解率也相对较低; 当大于 pH 9.0 时, 菌体生长受到抑制, 降解率随着 pH 值的升高而降低。

氮源对菌株降解 PHBA 的影响, 见图 3D, 无机盐培养基中不同氮源影响着菌株对 PHBA 的降解。当硫酸铵为培养基中主要氮源时, 菌株的降解效果最好。

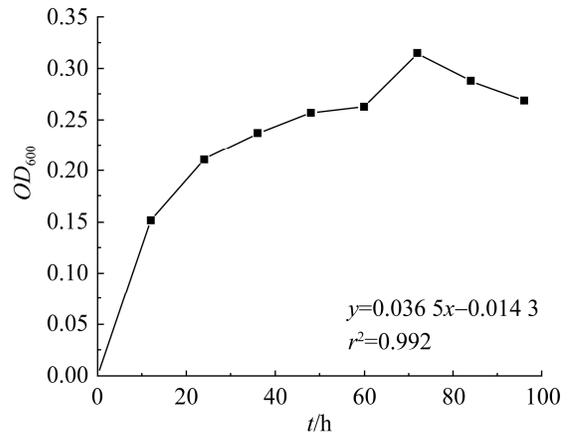


图2 菌株 GX14001 在无机盐培养基中的生长曲线  
Figure 2 Growth curve of strain GX14001 in inorganic salt medium.

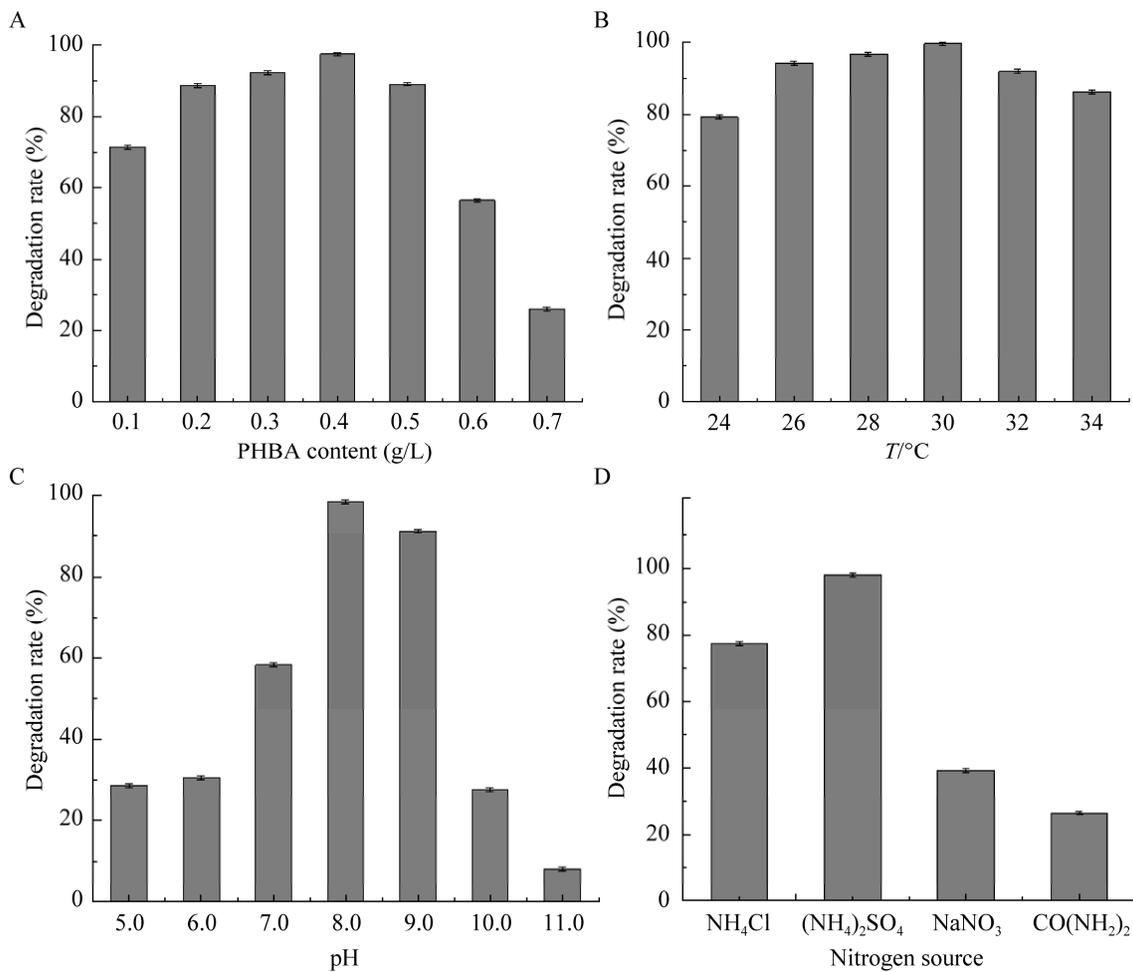


图3 PHBA 含量(A)、温度(B)、pH (C)及氮源(D)对 GX14001 降解 PHBA 的影响

Figure 3 Effects of various factors on PHBA degradation by GX14001. A: PHBA content. B: Temperature. C: pH; D: Nitrogen source.

### 2.3.2 响应面试验分析

根据对单因素试验所得的结果分析,确定培养温度、PHBA 含量和 pH 值对 PHBA 降解率的影响最大,因此选择这 3 个因素采用 3 因素 3 水平设计进行进一步优化研究。利用 Box-Behnken 进行试验方案设计,对菌株 GX14001 降解 PHBA 降解率进行分析,见表 1。

为了确定 PHBA 的最大降解率,试验以 PHBA 的初始含量、pH 和培养温度 3 个因素,使用了 3D 响应面,见图 4,通过软件 Design-Expert 13 进行响应面分析,确定了 PHBA 最佳初始浓度为 0.18 g/L,温度为 30.2 °C, pH 为 8.3,经试验验证,在该条件下,PHBA 的降解率为 100%。

## 2.4 黄瓜根际 PHBA 胁迫盆栽试验

### 2.4.1 GX14001 对外源 PHBA 处理下黄瓜生长的影响

如图 5 所示,用 PHBA 和 GX14001 处理 25 d 时, GX14001 处理组的长势明显优于对照组。

经单因素均值比较分析得出处理组与空白对照组 (CK) 之间的数据具备显著差异,表明 GX14001 菌株提高了黄瓜的生长发育,其叶片面积、黄瓜茎粗及株高等都有了显著的增长。如图 6 所示, GX14001 处理组的黄瓜叶片面积大小、茎粗和株高均优于对照组,其中 GX14001 处理组叶片面积增长了 118.1%,茎粗增长了 110.4%,株高增长了 239.8%。同时外源添加 GX14001 和 PHBA 处理组的长势,叶片面积大小、茎粗和株高也都明显高于 PHBA 处理组,其叶片面积增长了 162.8%,茎粗增长了 112.4%,株高增长了 117.4%。

### 2.4.2 GX14001 对外源 PHBA 处理下黄瓜叶片抗氧化酶及相关指标的影响

如图 7 所示,黄瓜处理生长 25 d 时, GX14001 处理组的 SOD 和 CAT 的活性比对照组显著升高。PHBA 处理组中, SOD 和 CAT 的活性比对照组明显降低。MDA 的含量在 PHBA 处理组中明显比对照组要高。

表 1 Box-Behnken 试验结果

Table 1 Results of the Box-Behnken test

Test number	Variable			PHBA degradation rate (%)	
	X <sub>1</sub> : Temperature	X <sub>2</sub> : PHBA content	X <sub>3</sub> : pH	Actual values	Theoretical values
1	26	0.1	8.5	95.72	96.38
2	34	0.1	8.5	97.42	98.17
3	26	0.7	8.5	96.53	95.75
4	34	0.7	8.5	95.85	95.18
5	26	0.4	6.0	78.25	79.06
6	34	0.4	6.0	74.02	74.73
7	26	0.4	11.0	73.09	72.38
8	34	0.4	11.0	78.75	77.93
9	30	0.1	6.0	96.53	95.04
10	30	0.7	6.0	80.10	80.05
11	30	0.1	11.0	80.09	80.13
12	30	0.7	11.0	89.99	91.48
13	30	0.4	8.5	98.48	98.07
14	30	0.4	8.5	98.41	98.07
15	30	0.4	8.5	99.13	98.07
16	30	0.4	8.5	96.62	98.07
17	30	0.4	8.5	97.81	98.07

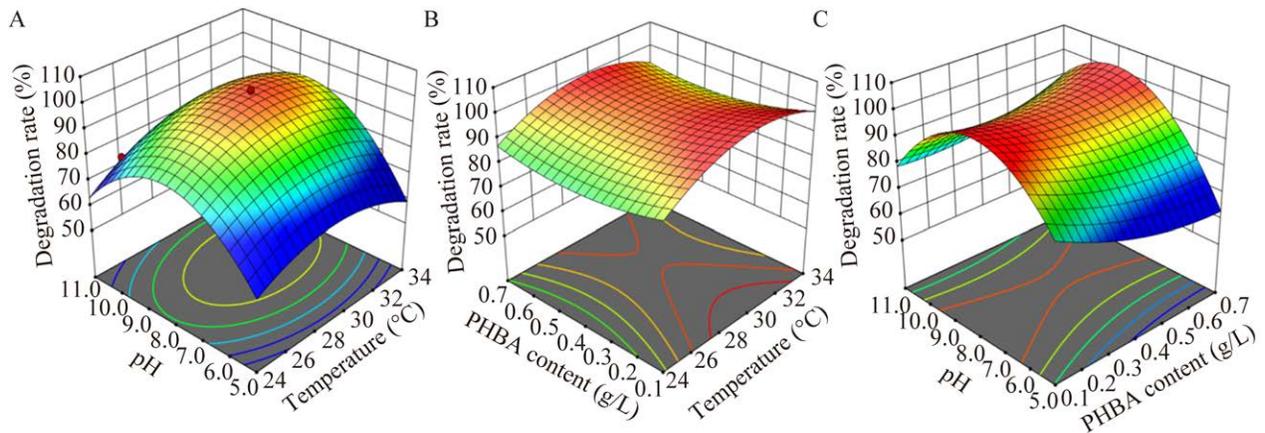


图 4 GX14001 降解 PHBA 的响应曲面图 A: 温度、pH 对 PHBA 降解率的影响. B: 温度、PHBA 含量对 PHBA 降解率的影响. C: PHBA 含量、pH 对 PHBA 降解率的影响

Figure 4 Response surface diagram of GX14001 degradation of PHBA. A: Effect of temperature and pH on PHBA degradation rate. B: Effect of temperature and PHBA content on PHBA degradation rate. C: Effect of PHBA content and pH on PHBA degradation rate.



图 5 GX14001 和 PHBA 处理下盆栽黄瓜的生长状况

Figure 5 Growth status of potted cucumber treated with GX14001 and PHBA.

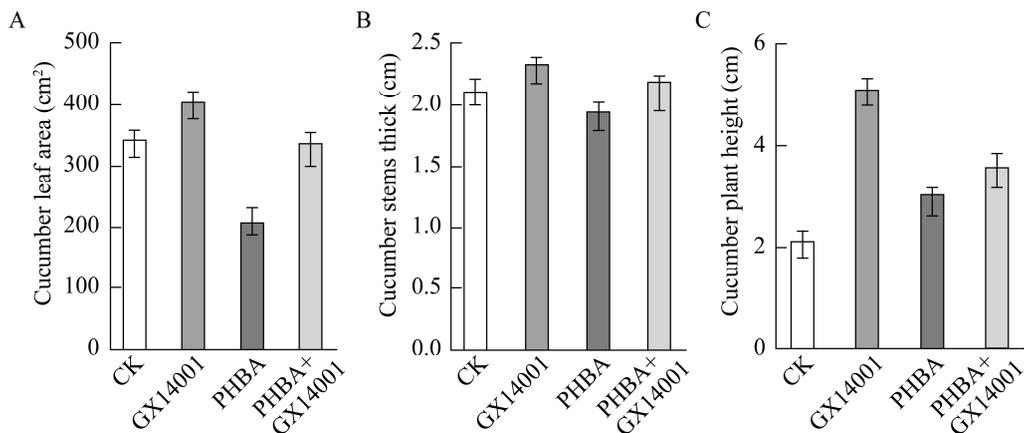


图 6 GX14001 和 PHBA 处理对黄瓜叶片大小(A)、茎粗(B)和株高(C)的影响

Figure 6 Effects of GX14001 and PHBA treatments on leaf area (A), stem thick (B) and plant height (C) of cucumber.

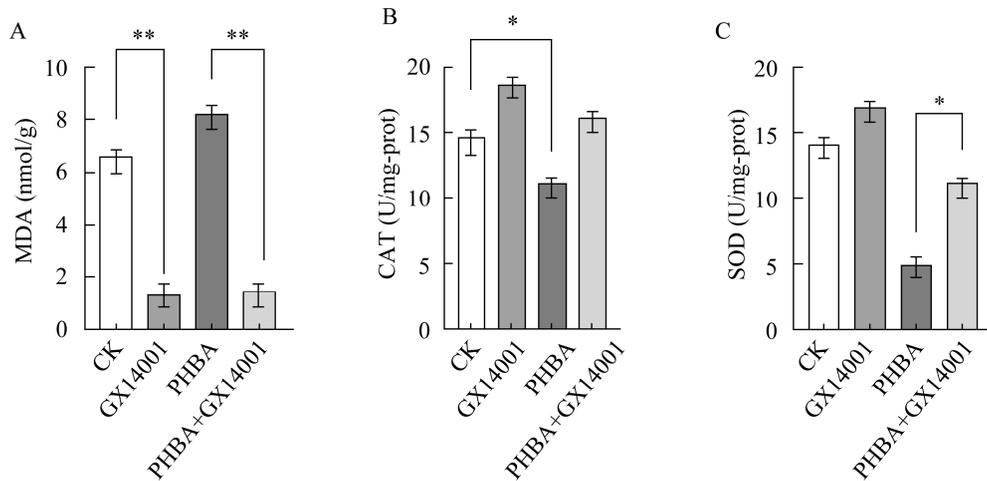


图7 GX14001 和 PHBA 对黄瓜叶片中 MDA (A)、CAT (B) 和 SOD (C) 酶活性的影响

Figure 7 Effects of GX14001 and PHBA treatments on the enzyme activities of MDA (A), CAT (B) and SOD (C) in cucumber leaves. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

#### 2.4.3 GX14001 对外源 PHBA 处理下黄瓜根际土壤酶活性的影响

如图 8 所示,经单因素显著性差异分析得出处理组与空白对照组(CK)之间的数据具备显著差异( $P < 0.01$ ),表明 GX14001 菌株能够有效提高黄瓜根际土壤的酶活性。4 种处理 25 d 时,与对照组相比,PHBA 处理中 S-CAT、S-UE、S-CL 活性明显降低,而 GX14001 处理组 S-CAT、

S-UE、S-CL 活性有所提升,同时外源添加 PHBA 和 GX14001 与 PHBA 处理组相比酶活性显著升高,其中外源添加 GX14001 和 PHBA 处理组中 S-CAT 活性提高了 112.5%、S-UE 活性提高了 240%、S-CL 活性提高了 171.3%。

#### 2.4.4 HPLC 评估 GX14001 在黄瓜盆栽中对 PHBA 的降解效果

如图 9 所示,不同上样量的 PHBA 标准品

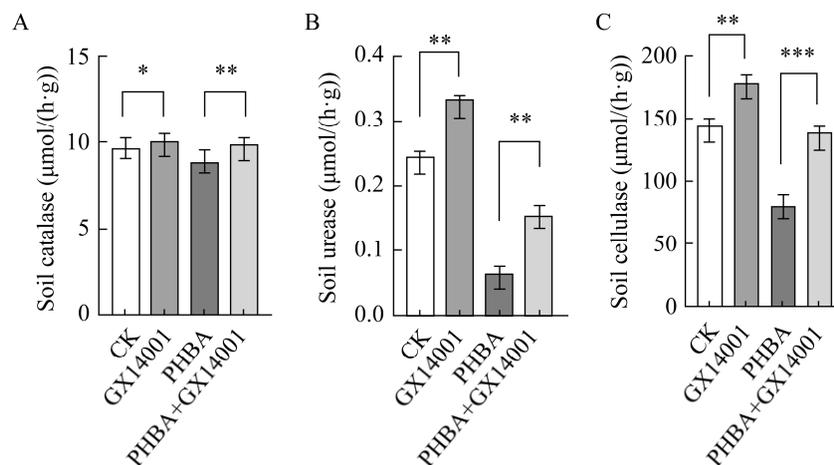


图8 GX14001 和 PHBA 对盆栽土壤中土壤过氧化氢酶(A)、土壤脲酶(B)和土壤纤维素酶(C)的影响

Figure 8 Effects of GX14001 and PHBA treatments on soil catalase (A), soil urease (B) and soil cellulase (C) in potted soil. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

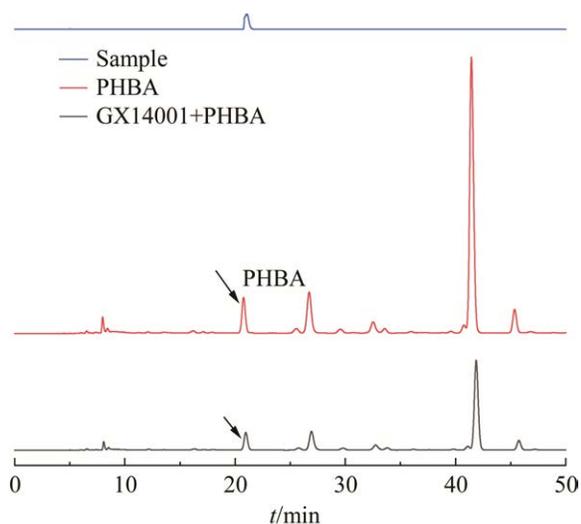


图 9 HPLC 评估 GX14001 黄瓜盆栽土壤中 PHBA 的降解效果

Figure 9 Evaluation of degradation effect of PHBA in cucumber potted soil treated with GX14001 by HPLC. Sample: 100 mg/L PHBA standard. The arrows in the figure: The corresponding peak of p-hydroxybenzoic acid.

出峰时间都处于 20–22 min。对添加外源 PHBA 和 GX14001 与 PHBA 处理组中的盆栽土壤进行高效液相色谱测定其 PHBA 含量。与 PHBA 对照组相比, 接种 GX14001 菌株降解了土壤中 52.3% 的 PHBA。

### 3 讨论与结论

PHBA 是连作障碍土壤中积累的主要自毒化感物质之一, 对植物生长发育多方面造成严重威胁, 已成为制约农业产业可持续发展的重要障碍。越来越多的研究表明, 通过施用功能性微生物菌剂、菌肥调控植物与微生物间的相互作用, 有利于缓解土壤连作障碍。近年来, 国内外众多学者开展连作障碍的土壤修复研究, 研究结果表明降解菌株可以有效降解土壤中的酚酸, 并有效缓解酚酸类物质对植物产生的自毒作用。PHBA

降解菌的报道较多为放线菌, 如毛宁等<sup>[11]</sup>筛选到 6 株具降解 PHBA 能力的放线菌, 在液体培养条件下培养 7 d, 降解率为 79.6%–98.7%; 杜霄霞<sup>[12]</sup>筛选到 7 株具有降解 PHBA 能力的放线菌, 在 PHBA 含量为 4、6、8 g/L 条件下培养 7 d, 降解率达到 99.5%–99.7%。研究报道 PHBA 的降解菌为细菌的主要集中在柠檬球菌<sup>[13]</sup>、微小杆菌<sup>[14]</sup>、红球菌<sup>[15]</sup>等, 而有关橙色微杆菌在降解 PHBA 方面的研究目前尚未有报道。

本研究以从海洋及海岸红树林土壤中分离得到的具有降解对羟基苯甲酸能力的橙色微杆菌 GX14001 为研究对象, 对菌株 PHBA 的降解特性以及缓解黄瓜根际 PHBA 胁迫效应进行了探究。结果表明: 通过单因素和响应面优化方法得到该菌株最佳降解条件为温度 30.2 °C, pH 值 8.3, PHBA 浓度 0.18 g/L, 降解率达到 100%。接种 GX14001 菌株能够有效缓解黄瓜根际 PHBA 胁迫并促进植物生长, 同时能够降解黄瓜盆栽土壤中 52.3% 的 PHBA 含量。菌株 GX14001 经条件优化后的降解率高于其他菌株。李雪<sup>[16]</sup>筛选到一株具降解 PHBA 能力的放线菌, 经响应面优化试验后菌株降解率为 99.0%; 陈述云<sup>[17]</sup>筛选到一株对 PHBA 降解能力高的细菌 GSY-P1, 经响应面优化试验后菌株降解率为 97.2%。高亚慧<sup>[18]</sup>研究表明橙色微杆菌具有较强的挥发性有机物 (volatile organic compounds, VOCs) 促生功能。本研究所使用的菌株 GX14001 经条件优化后的降解率达到 100%, 而且具备较强的促生能力, 说明该菌株具有一定的研究意义和应用价值。

解灵军等<sup>[19]</sup>筛选到具有降解 PHBA 的细菌, 其可以有效提高草莓根系活力, 并有效提高草莓幼苗的叶面积、根长、株高和干重等生长指标。王晓辉<sup>[20]</sup>筛选到一株放线菌菌株能够有效缓解

自毒物质阿魏酸对西瓜幼苗生长产生的毒害作用。PHBA 胁迫下过量的活性氧会导致过氧化和丙二醛含量的增长,破坏正常膜系统功能<sup>[20]</sup>。本研究中 PHBA 抑制了黄瓜植株生长,同时增加了叶片 MDA 等的含量,造成了黄瓜根际胁迫。GX14001 降解菌能够有效缓解胁迫效应,改善黄瓜叶面积大小、茎粗和株高的生长。吴凤慧<sup>[21]</sup>报道了 FA 和 PHBA 降解菌 GLY-P2 降低了 FA 和 PHBA 胁迫下黄瓜叶片 MDA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sup>2-</sup> 的含量。接种 GX14001 菌株的处理组中,黄瓜叶片 MDA 含量降低,黄瓜生长量增加以及盆栽土壤中 PHBA 含量降低。Wu 等<sup>[22]</sup>报道了 FA 和 PHBA 降解菌 CSY-P13 可提高黄瓜种植土壤中的磷酸酶、过氧化氢酶、脲酶和蔗糖酶的活性。本研究接种 GX14001 菌株的处理组中过氧化氢酶、脲酶、纤维素酶的活性显著提高,与其结果相一致。本研究结果表明, GX14001 菌株缓解黄瓜根际 PHBA 的胁迫是通过活性氧及激活抗氧化酶来完成的,从而增强植物对不利环境下生长胁迫的抵抗能力。

由于植物根系分泌的酚酸类物质会长期积累于土壤中,进而造成土壤酸化、硬化等,从而抑制植物生长。因此通过不断筛选高效能力 PHBA 降解菌仍有一定研究意义,以丰富 PHBA 降解菌菌种资源和提高降解菌对土壤中酚酸类物质的降解能力,有效缓解植物连作障碍。

## 参考文献

- [1] 赵静, 常继东, 郑丽君, 王志远. 对羟基苯甲酸对尖孢镰刀菌生物学特性及侵染毒力的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(22): 291-294.  
ZHAO J, CHANG JD, ZHENG LJ, WANG ZY. Effects of p-hydroxybenzoic acid on biological characteristics and infection toxicity of *Fusarium oxysporum*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(22): 291-294 (in Chinese).
- [2] 于红艳, 张昕欣, 姜欢, 王苏玲. 克雷白氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae* Tzyx1) 降解对羟基苯甲酸的调控基因及降解途径分析[J]. 化学与生物工程, 2020, 37(8): 26-29.  
YU HY, ZHANG XX, LOU H, WANG SL. Regulatory genes of p-hydroxybenzoic acid degradation by *Klebsiella pneumoniae* Tzyx1 and its degradation pathway[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2020, 37(8): 26-29 (in Chinese).
- [3] 郭丽园. 黄瓜根际对羟基苯甲酸降解菌的分离鉴定及特性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2015.  
GUO LY. Isolation, identification and characterization of p-hydroxybenzoic acid-degrading bacterium from cucumber rhizosphere[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [4] 刘紫英, 杜贵勇, 傅苒馨, 刘小林. 草莓自毒物质对香豆酸降解菌的筛选及其降解效果研究[J]. 宜春学院学报, 2022, 44(12): 1-5.  
LIU ZY, DU GY, FU RX, LIU XL. Study on the screening degrading bacteria and degradation effect p-coumaric acid in strawberry autotoxin[J]. *Journal of Yichun University*, 2022, 44(12): 1-5 (in Chinese).
- [5] 王洁, 王蓓蓓, 尚方剑, 苏兰茜, 赵少官, 洪珊, 赵青云. 香草兰酚酸类自毒物质降解菌的筛选和鉴定及其抑菌效果[J]. 热带生物学报, 2022, 13(6): 595-604.  
WANG J, WANG BB, SHANG FJ, SU LX, ZHAO SG, HONG S, ZHAO QY. Screening, identification and antimicrobial activity of microbial strains degrading autotoxic phenolic acids in the rhizosphere of vanilla[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2022, 13(6): 595-604 (in Chinese).
- [6] 卢惠娇. 一株降解 PHBA 红球菌的筛选、鉴定及其生物活性研究[D]. 南宁: 广西民族大学硕士学位论文, 2023.  
LU HJ. Screening, identification and biological activity of *Rhodococcus* sp. degrading PHBA[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University for Nationalities, 2023 (in Chinese).

- [7] 刘云露. 黄连土壤微生物多样性及其酚酸降解菌筛选与降解机制[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019.
- LIU YL. Microbial diversity and degradation mechanism of phenolic acid degradation microbes in soil of *Coptis chinensis*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [8] 肖蓉, 邓舒, 赵菁, 张春芬, 聂园军, 曹秋芬. 自毒物质对羟基苯甲酸降解细菌 ZH2 的分离与应用[J]. 农学报, 2021, 11(7): 84-91.
- XIAO R, DENG S, ZHAO J, ZHANG CF, NIE YJ, CAO QF. An autotoxicity p-hydroxybenzoic acid-degrading strain ZH2: isolation and application[J]. Journal of Agriculture, 2021, 11(7): 84-91 (in Chinese).
- [9] 李跃, 李海普, 杨兆光. 一株对羟基苯甲酸甲酯降解菌的生长及降解特性研究[J]. 科技风, 2020(10): 175-177.
- LI Y, LI HP, YANG ZG. Study on the growth and degradation characteristics of a strain of methylparaben degrading bacteria[J]. Technology Wind, 2020(10): 175-177 (in Chinese).
- [10] 胡光玉, 杨善武, 周彬, 赵春琼, 陈健好, 赵静. 对羟基苯甲酸对三七黑斑病致病性因素的影响研究[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(13): 163-165, 171.
- HU GY, YANG SW, ZHOU B, ZHAO CQ, CHEN JH, ZHAO J. Study on effects of p-hydroxybenzoic acid on the pathogenic factors of black spot disease in *Panax notoginseng*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2023, 51(13): 163-165, 171 (in Chinese).
- [11] 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.
- 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 Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2010, 38(5): 143-148 (in Chinese).
- [12] 杜霄霞. 草莓酚酸类自毒物质降解菌筛选及对草莓防病促生作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009.
- DU XX. Screening of degradation strains on strawberry autotoxins phenolic acids and their control disease promotion growth to strawberry[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2009 (in Chinese).
- [13] 凌浩, 许楹, 周宁一. 深渊来源 *Citricoccus* sp. strain NyZ702 的分离培养及其降解 4-羟基苯甲酸的特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3485-3496.
- LING H, XU Y, ZHOU NY. Isolation of a hadal trench-derived *Citricoccus* sp. strain NyZ702 capable of 4-hydroxybenzoate degradation[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3485-3496 (in Chinese).
- [14] 张红岩, 张妮, 杨梦莹, 刘聪, 杨立芳, 申乃坤, 姜明国. 拟蕈状芽孢杆菌 Gxun-30 产角蛋白酶液体发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 136-143.
- ZHANG HY, ZHANG N, YANG MY, LIU C, YANG LF, SHEN NK, JIANG MG. Optimization of liquid fermentation conditions of keratinase produced by *Bacillus paramycoides* Gxun-30[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(4): 136-143 (in Chinese).
- [15] 张玉秀, 蒙小俊, 柴团耀. 苯酚降解菌红球菌 (*Rhodococcus* sp.) P1 的鉴定及其在焦化废水中的应用[J]. 微生物学报, 2013, 53(10): 1117-1124.
- ZHANG YX, MENG XJ, CHAI TY. Characterization of phenol-degrading *Rhodococcus* sp. strain P1 from coking wastewater[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(10): 1117-1124 (in Chinese).
- [16] 李雪. 一株对羟基苯甲酸降解菌的分离、鉴定和特性分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2016.
- LI X. Isolation, identification and characterization of p-hydroxybenzoic acid-degrading strain[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [17] 陈述云. 黄瓜根际两种自毒物降解菌的分离鉴定及特性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014.
- CHEN SY. Isolation, identification and characterization of two kinds of autotoxic compound-degrading bacterium from cucumber rhizosphere[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese).

- [18] 高亚慧. 植物促生菌株的筛选及橙色微杆菌挥发性有机物对植物促生作用机理研究[D]. 南宁: 广西民族大学硕士学位论文, 2022.
- GAO YH. Screening of plant growth promoting strains and the mechanism of volatile organic compounds from *Microbacterium aurantiacum* on plant growth promotion[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University for Nationalities, 2022 (in Chinese).
- [19] 解灵军, 尹宝重, 高峰, 齐永志, 刘雪静, 甄文超. 草莓根系自毒物质降解菌的筛选及降解效果研究[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(4): 76-78, 87.
- XIE LJ, YIN BZ, GAO F, QI YZ, LIU XJ, ZHEN WC. Screening of the degradation bacterium to strawberry root auto-toxic chemical and the effect of its degradation[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2009, 32(4): 76-78, 87 (in Chinese).
- [20] 王晓辉. 西瓜自毒物质阿魏酸降解放线菌筛选及其降解效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2011.
- WANG XH. Screening of ferulic acid degrading actinomycetes and their degradation effect[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2011 (in Chinese).
- [21] 吴凤慧. GLY-P2 促生菌降解酚酸的机制及其对黄瓜自毒作用的缓解效应[D]. 泰安: 山东农业大学博士学位论文, 2020.
- WU FH. Phenolic acid degradation mechanism of growth promoting bacteria GLY-P2 and its alleviating effect on cucumber autotoxicity[D]. Tai'an: Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [22] WU FH, AN YQ, AN YR, WANG XJ, CHENG ZY, ZHANG Y, HOU XW, CHEN CX, WANG L, BAI JG. *Acinetobacter calcoaceticus* CSY-P13 mitigates stress of ferulic and p-hydroxybenzoic acids in cucumber by affecting antioxidant enzyme activity and soil bacterial community[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1262.