

氯氰菊酯降解菌 GF31 的分离鉴定 及其降解特性

李青云¹ 顾宝群^{1,2} 刘幽燕^{1*} 周茂钟¹ 李 婵¹ 覃益民¹ 钟善锦³

(1. 广西大学化学化工学院 广西 南宁 530004)

(2. 河北省水利科学研究院 河北 石家庄 050051)

(3. 广西区环境保护科学研究院 广西 南宁 530022)

摘要: 从受污染的土壤中分离得到 1 株以氯氰菊酯为唯一碳源生长的降解菌 GF31, 通过形态观察、16S rDNA 基因序列分析、生理生化实验, 鉴定该菌为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。菌株 GF31 降解氯氰菊酯的最佳 pH 值为 7.0, 接种量为 10%, 对浓度高达 300 mg/L 的菊酯仍可保持较高的降解活性。外加氮源对菌株的降解效能影响显著, 有机氮比无机氮更有利于农药降解。当以 0.5 g/L 蛋白胨作为氮源时, 降解速率明显提高, 对 100 mg/L 氯氰菊酯降解的平均速率为 13.64 mg/(L·d), 是以硫酸铵为氮源时的 2 倍。初步分析认为降解产物及碱性 pH 环境对菌株的生长及活性具有一定的抑制作用。

关键词: 氯氰菊酯, 生物降解, 假单胞菌, 降解特性, 生物修复

Isolation, Identification and Characteristics of a Cypermethrin-degrading Bacterium GF31

LI Qing-Yun¹ GU Bao-Qun^{1,2} LIU You-Yan^{1*} ZHOU Mao-Zhong¹
LI Chan¹ QIN Yi-Min¹ ZHONG Shan-Jin³

(1. Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

(2. Hebei Provincial Academy of Water Resources, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

(3. Guangxi Institute of Environmental Science, Nanning, Guangxi 530022, China)

Abstract: A bacterium strain named GF31, which could use cypermethrin as the sole source of carbon, was isolated from a polluted soil. Through morphological observation, 16S rDNA genetical analysis, physiological and biochemical tests, the strain GF31 was identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The optimal pH and inoculating quantity for the cypermethrin degradation were 7.0 and 10%, respectively. The degradation activity of strain GF31 could keep at a high level even when the cypermethrin concentration was increased to 300 mg/L. Furthermore, nitrogen sources were proved to be able to accelerate the degradation rate, especially the organic nitrogen sources. When 0.5 g/L peptone was added, the average degrading rate of 100 mg/L was 13.64 mg/(L·d), which was two times as that of the ammonium sulfate. It was preliminarily speculated that

the degraded products and the alkaline environment might inhibit the growth and activity of strain GF31.

Keywords: Cypermethrin, Biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa*, Degradation characteristics, Bioremediation

农药为保证农业的增产丰收发挥着举足轻重的作用,然而农药残留所产生的环境污染、农产品出口贸易壁垒、食品质量安全等系列问题,已成为制约我国社会经济可持续发展、生态环境平衡的影响因素之一。氯氰菊酯作为一类广谱、药效快速的拟除虫菊酯类杀虫剂,被广泛应用于防治棉花、果树、蔬菜等作物的虫害,但由于其在环境中的半衰期较长,很难在自然界条件下快速降解,严重污染环境。通过投加高效降解菌对受污染环境进行生物修复,有望解决农药残留问题,其中获取高效降解菌种是关键^[1,2]。国内外研究者相继开展了高效降解菌种的选育工作^[3-8],筛选得到的菌种有小球菌属(*Micrococcus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)、产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)和红球菌属(*Rhodococcus* sp.)等。不过总的说来,具有高效活性的菌株不多,研究也常侧重于毒理学及环境行为等方面^[9-11],因此扩大及丰富降解菌源库是深入开展生物降解拟除虫菊酯类农药研究的基础与重点。本文报道了一株从土壤中获得铜绿假单胞菌,该菌株对 300 mg/L 的氯氰菊酯仍具有较高的降解活性,这将为丰富农药的微生物降解菌源,并进一步开展土壤生物修复等研究工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 培养基制备

基础盐培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。以氯氰菊酯为碳源,使用前将氯氰菊酯原药(97.2%)溶于吐温-80 配制成乳化液,按照所需浓度添加到培养基中。

肉汤蛋白胨培养基: 牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。固体培养基添加 20 g 琼脂。

1.2 降解菌的筛选与分离

从施用过氯氰菊酯的菜田采集土样,参照蔡志强等人^[12]的实验方法进行降解菌的筛选。称取土样 2 g~3 g, 加入 30 mL 氯氰菊酯浓度为 1000 mg/L 的

基础盐培养基中, 30°C、120 r/min 恒温培养。3 d 后移取出 2 mL 培养液接入相同农药浓度的新鲜培养基中, 如此转接 3 次, 富集培养结束。再用梯度稀释法平板划线, 分离出单菌落并保藏。将分离所得的单菌株进行初筛, 即肉汤蛋白胨培养基接种菌株, 30°C、120 r/min 培养 24 h。4°C、4500 r/min, 离心 10 min 回收菌体。用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 2 次, 最后配制成一定浓度的菌悬液。以 4% 接种量加入 10 mL 氯氰菊酯浓度为 50 mg/L 的基础盐培养基中进行降解。7 d 后处理样品, 用高效液相色谱(HPLC)测定氯氰菊酯的残留量。最后再对初筛的菌株进行复筛, 将氯氰菊酯浓度提高为 100 mg/L, 其他条件不变。

将复筛所得的菌株进一步纯化, 送交由广东省微生物分析检测中心进行菌种鉴定。

1.3 菌株降解性能的考察

配制 30 mL 肉汤蛋白胨培养基, 灭菌后接种菌株。30°C、120 r/min 恒温摇床振荡培养, 24 h 后离心发酵液, 用 0.02 mol/L 的磷酸缓冲液洗涤菌体 2 次, 最后配制成菌悬液(OD_{600} 1.2)作为种子液。如无特殊说明, 以 4% 的接种量接入含 100 mg/L 氯氰菊酯的基础盐培养基中, 30°C、120 r/min 条件下降解, 一定时间取样分别测定菊酯含量和生物量。样品中的氯氰菊酯用等体积乙酸乙酯萃取, HPLC 检测其残留量, 每个样品做 3 个平行, 同时做不加菌的空白对照实验。

由于实际土壤中农药的降解过程多发生于自然环境下, 因此本文主要考察初始 pH 值、农药浓度、接种量、氮源等因素对氯氰菊酯降解的影响。选择降解温度为 30°C, 以 5 d 平均降解速率作为评价指标, 进行单因子条件优化, 其他条件因子不变。即设定基础盐培养基的初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0 和 8.0; 氯氰菊酯初始浓度分别为 20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L 和 300 mg/L; 种子液的接种量分别选取 4%、8%、10% 和 12% 进行降解实验。考察氮源的影响时, 分别以 0.5 g/L 氯化铵、硝酸铵、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏代替基础盐培养基中的硫酸铵, 同时以基础盐培养基体系作为对照。

降解速率 [mg/(L·d)]

$$\frac{\text{对照样品的农药含量} - \text{降解菌处理样品的农药含量}}{\text{天数}}$$

1.4 分析方法

氯氰菊酯浓度的分析采用高效液相色谱法(安捷伦 PH1100)。HPLC 检测条件为: 色谱柱 C18 柱 (4.6mm×250 mm), 流动相乙腈:水=85:15(V/V), 流速 1 mL/min, 检测波长为 235 nm, 二极管阵列检测器, 进样量为 20 μ L。采用外标法定量, 样品中氯氰菊酯的含量以各异构体峰面积总量计。

生物量以细胞光密度值 OD_{600} 表征, 取降解后的样品离心, 经磷酸缓冲液洗涤, 加入等体积无菌水于波长 $\lambda=600$ nm 处测定吸光度值。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选及鉴定

将初筛得到的 15 株菌株进行复筛, 最后分离得到 1 株能以氯氰菊酯为唯一碳源生长的细菌, 将其命名为 GF31。菌株 GF31 在固体培养基培养 24 h 的菌落特征呈褐色、表面光滑、半透明、扁平、边缘不规则, 革兰氏染色阴性。在肉汤培养基中培养呈绿色。光学显微镜观察该菌呈短杆状, 有鞭毛, 能运动。根据 16S rDNA 的测序结果显示, 菌株 GF31 与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的同源性达 100%, 综合生理生化实验结果(见表 1), 鉴定菌株

表 1 菌株 GF31 的生理生化性质

Table 1 Biochemical and physiological characteristics of strain GF31

特征	结果	特征	结果
Characteristics	Results	Characteristics	Results
葡萄糖氧化发酵	-	D-葡萄糖	+
Glucose fermentation	-	D-glucose	+
接触酶	+	果糖	+
Catalase	+	Fructose	+
氧化酶	+	赖氨酸脱羧酶	-
Oxidase	+	Lysine decarboxylase	-
运动性 Motility	+	ONPG	-
苯丙氨酸脱氨酶	-	淀粉水解	-
Phenylalanine deaminase	-	Starch hydrolysis	-
硫化氢	-	脓青素	+
Hydrogen sulfide	-	Pyocyanin	+
V-P	-	甲基红 Methyl red	-
明胶液化	+	精氨酸双水解酶	-
Gelatin liquefaction	+	Arginine dihydrolase	-
硝酸盐还原	-	柠檬酸	+
Nitrate reducing	-	Citric acid	+

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

GF31 为铜绿假单胞菌, 命名为 *Pseudomonas aeruginosa* GF31。

2.2 菌株 GF31 降解性能测定

2.2.1 氯氰菊酯的降解及菌株生长曲线: 首先确定氯氰菊酯的降解过程, 每天取样分别测定体系中氯氰菊酯的残留浓度及生物量的变化情况, 结果如图 1 所示。菌株 GF31 能快速降解氯氰菊酯, 并能以其为碳源生长。由氯氰菊酯的结构初步分析, 微生物易降解的部位一般发生在酯键, 则菊酯的 2 个苯环的环丙烷羧酸酯结构可转化为较小分子的中间产物。当降解发生 5 d 之后, 可能由于产物的积累对菌株 GF31 具有抑制作用, 此时氯氰菊酯的降解曲线和生长曲线都趋于平缓。

2.2.2 初始 pH 值的影响: pH 值是影响微生物生理活动的重要因素之一, 由图 2 可知, pH 变化对菌株 GF31 的降解性能影响很显著。当 pH 值为 5.0 时, 降解速率仅为 1.4 mg/(L·d), 随着 pH 值升高, 降解速率随之增大, 在 pH 值为 7.0 时达到最大值

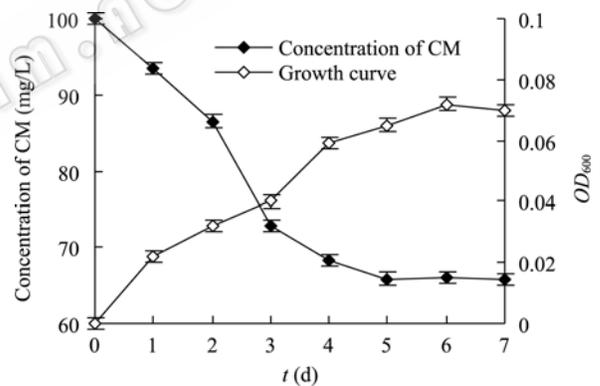


图 1 菌株 GF31 降解氯氰菊酯

Fig. 1 Degradation of cypermethrin by strain GF31

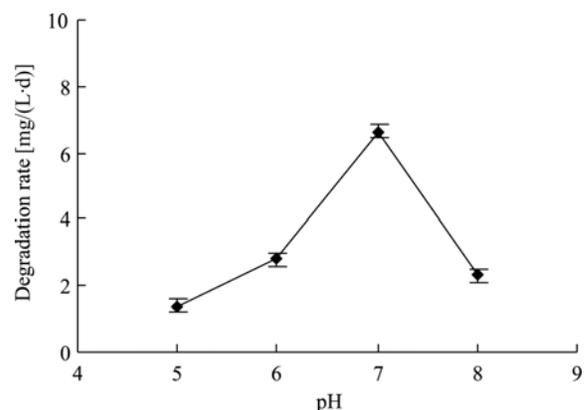


图 2 初始 pH 值的影响

Fig. 2 Effect of initial pH value on cypermethrin degradation by strain GF31

[6.65 mg/(L·d)]。虽然氯氰菊酯在碱性条件下不稳定、易分解^[13], 但是当 pH 值上升至 8.0 时菌株的降解速率却急剧下降, 可见碱性环境对菌株 GF31 的活性具有明显的抑制作用。

2.2.3 氯氰菊酯浓度的影响: 图 3 反映不同浓度氯氰菊酯的降解情况。据目前文献报道, 大多数拟除虫菊酯类降解菌对高浓度农药的适应性较差, 当菊酯浓度超过 200 mg/L 时, 菌株的降解率明显下降甚至不降解^[8]。图中显示菌株 GF31 对高浓度氯氰菊酯具有良好的耐受性, 当氯氰菊酯浓度增大至 300 mg/L 时, 菌株 GF31 仍能保持较高的降解活性, 没有出现降解速率下降的现象。

2.2.4 接种量的影响: 图 4 表明氯氰菊酯的降解速率随接种量增大而逐步增大。当接种量增大为 10% 时, 菌量趋于饱和, 再增加菌量对降解速率的提高不明显。这可能是因为接种量增大, 导致降解产物大量累积, 抑制菌株 GF31 的生长代谢, 影响降解的

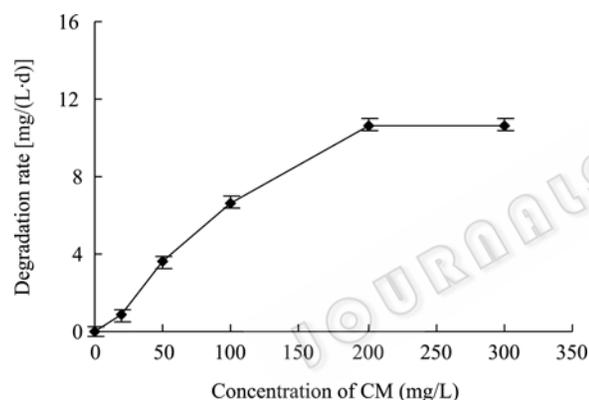


图 3 氯氰菊酯浓度的影响

Fig. 3 Effect of initial cypermethrin concentration on degradation by strain GF31

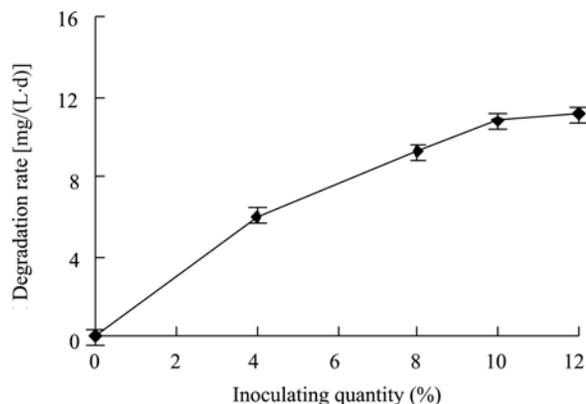


图 4 接种量的影响

Fig. 4 Effect of inoculum on cypermethrin degradation by strain GF31

继续进行。张卫等^[14]在研究土壤中阿维菌素的降解时也发现类似的现象, 对一定浓度的农药来说, 存在一个有效菌源的问题。

2.2.5 氮源及其浓度的影响: 氮源对微生物生理生化活动的影响已有文献报道^[15,16], 因此在生物修复过程中, 通过调整土壤的施肥情况有望使修复过程得到强化。不同氮源的影响结果如图 5 所示, 菌株 GF31 对氯氰菊酯的降解因氮源种类的不同而有显著差异。有机氮源普遍比无机氮源更有利于农药降解, 其中以蛋白胨、酵母膏为氮源时降解效果最好, 降解速率分别为 11.52 mg/(L·d)和 11.36 mg/(L·d)。

菌株 GF31 对氯氰菊酯的降解不仅受氮源种类的影响, 而且还受氮源浓度的影响。图 6 表明, 在 0~5 g/L 浓度范围内, 随蛋白胨浓度增加降解速率

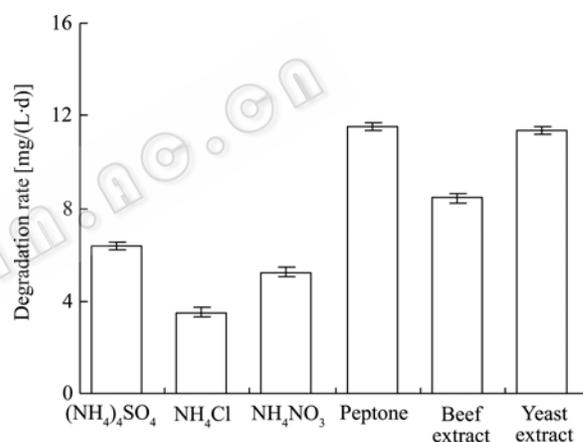


图 5 氮源的影响

Fig. 5 Effect of different nitrogen sources on cypermethrin degradation by strain GF31

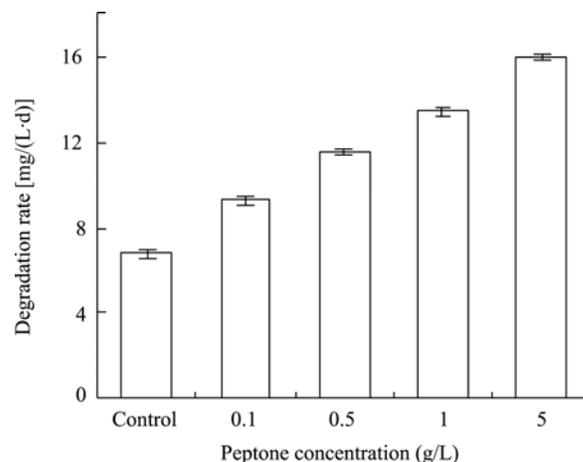


图 6 蛋白胨浓度的影响

Fig. 6 Effect of peptone concentration on cypermethrin degradation by strain GF31

随之提高。当浓度增至 5.0 g/L 时, 降解速率达到 16 mg/(L·d), 约为对照样品的 2.6 倍。增加蛋白胨浓度对菌株 GF31 的降解效能没有明显的抑制作用, 许育新等^[13]利用红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯农药也获得类似的结果。

2.2.6 氯氰菊酯降解进程曲线: 以 0.5 g/L 蛋白胨为氮源测定菌株 GF31 的降解进程曲线, 同时以基础盐培养基体系作为对照。结果显示(见图 7), 以硫酸铵为氮源时, 降解初速率缓慢, 且 5 d 以后降解率曲线趋于平缓, 最大降解率为 34%。与对照相比, 以蛋白胨为氮源的降解初速率明显提高, 生长量也显著增大。随着时间的延长, 降解仍能持续进行, 第 8 天降解率达到 70%, 约为对照的 2 倍。而此时的生长量变小, 认为可能与降解产物的抑制作用有关。另外测定降解 5 d 后的 pH 值, 发现上升至 8.4, 因此 pH 值的变化可能也是导致菌株生长及其活性降低的原因之一。

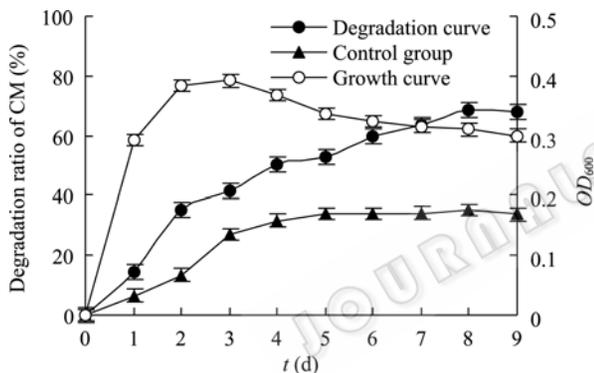


图 7 氯氰菊酯降解进程曲线

Fig. 7 The degradation curve of cypermethrin by strain GF31

3 讨论

在众多治理农药残留的方法当中, 微生物法符合国家节能减排的要求。要对受污土壤进行有效的生物修复, 开发高效、性质稳定、对环境影响小的降解菌仍然是研究的热点与难点。本文筛选得到的铜绿假单胞菌分布广、营养需求低、生化性质活泼。实验中还发现菌株 GF31 在不添加氮源的基础盐培养基平板上也能生长, 初步认为菌株可能水解氯氰菊酯的酯键并以其为唯一碳源, 利用氰基上的氮为氮源进行生长。当提供其他氮源时, 菌株生长良好, 且有机氮更有利于菊酯的降解。与目前所报道的降解菌相比, 菌株 GF31 对高浓度菊酯的适应性好, 环

境适用性及协同性更具优势。况且大多数降解菌以共代谢的方式作用农药, 以菊酯为碳、氮源生长的则较少^[17]。另一方面, 从降解产物分析来看, 大多数拟除虫菊酯类农药降解的中间产物主要是 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)和二氯菊酸, 而以共代谢方式作用的菌株对产物不能再降解^[13]。本实验对降解产物进行 GC-MS 检测, 发现 3-PBA 和二氯菊酸无残留。有研究表明假单胞是降解苯醚类化合物的优势菌^[18], 据此初步分析, 菌株 GF31 可能利用 3-PBA 并能将其进一步转化为更小分子的物质。因此深入研究与探讨菌株 GF31 的降解机理, 以及土壤修复适用性等问题将是我们下一步研究的重点内容, 这对丰富微生物代谢理论和生物修复理论都具有现实指导意义。

4 结论

- 1) 对筛选得到的 1 株氯氰菊酯降解菌 GF31 进行鉴定, 确定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 该菌能以氯氰菊酯为唯一碳源生长。
- 2) 30°C、pH 7.0、接种量为 10% 的条件下, 菌株 GF31 能快速降解氯氰菊酯, 且对浓度高达 300 mg/L 的菊酯具有良好的耐受性。
- 3) 氮源对菌株 GF31 的降解作用影响很显著。当体系以蛋白胨代替硫酸铵作为氮源时, 能有效促进氯氰菊酯的降解, 降解率提高约 1 倍。

参考文献

- [1] Thompson IP, Vander Gast CJ, Ciric L, *et al.* Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(7): 909-915.
- [2] 秦 华, 林先贵, 尹 睿, 等. 接种降解菌对土壤邻苯二甲酸二异辛酯降解的影响. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(6): 842-845.
- [3] Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN1. *Biodegradation*, 2008, 19(1): 77-82.
- [4] Maloney SE, Maule A, Smith AR. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: Permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate and fluvalinate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(11): 2874-2876.
- [5] Grant RJ, Betts WB. Biodegradation of the synthetic py-

- rethroid cypermethrin in used sheep dip. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, **36**(3): 173–176.
- [6] Grant RJ, Daniell TJ, Betts WB. Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **92**(3): 534–540.
- [7] 丁海涛, 李顺鹏, 沈 标. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其特性研究. *土壤学报*, 2003, **40**(1): 123–129.
- [8] 许育新, 戴青华, 李晓慧, 等. 氯氟菊酯降解菌 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究. *农业环境科学学报*, 2004, **23**(5): 958–963.
- [9] 张 征, 李 今, 梁 威, 等. 拟除虫菊酯杀虫剂对水生生态系统的毒性作用. *长江流域资源与环境*, 2006, **15**(1): 125–129.
- [10] 李海斌, 李 君. 氯氟菊酯毒作用研究进展. *环境与健康杂志*, 2007, **24**(5): 372–374.
- [11] 梅立永, 赵智杰, 尹 璇, 等. 拟除虫菊酯类农药环境行为与归趋模拟. *农业环境科学学报*, 2007, **26**(6): 2316–2322.
- [12] 蔡志强, 杨广花, 李尔扬, 等. 二噁烷降解菌 D4 的分离、鉴定与降解特性. *中国环境科学*, 2008, **28**(1): 49–52.
- [13] 许育新, 李晓慧, 张明星, 等. 红球菌 CDT3 降解氯氟菊酯的特性及途径. *中国环境科学*, 2005, **25**(4): 399–402.
- [14] 张 卫, 虞云龙, 吴加伦, 等. 阿维菌素在土壤中的降解和高效降解菌的筛选. *土壤学报*, 2004, **41**(4): 590–596.
- [15] Correia P, Boaventura RA, Reis MA, *et al.* Effect of operating parameters on molinate biodegradation. *Water Research*, 2006, **40**(2): 331–340.
- [16] Gutierrez-Sanchez G, Roussos S, Augur C. Effect of the nitrogen source on caffeine degradation by *Aspergillus tamarii*. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, **38**(1): 50–55.
- [17] 王兆守, 刘丽花, 陈小兰, 等. 拟除虫菊酯类农药降解菌及降解酶的研究概况. *微生物学通报*, 2008, **35**(5): 825–829.
- [18] 许育新, 李晓慧, 秦 华, 等. 3-苯氧基苯甲酸降解菌的分离及降解特性研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(5): 62–66.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。