

拟除虫菊酯类农药残留降解菌产气肠杆菌的分离、鉴定及降解特性研究

廖敏^{1,2}, 张海军^{1,2}, 谢晓梅^{3*}

(1. 浙江大学环境与资源学院资源科学系, 杭州 310029; 2. 浙江省亚热带土壤与植物营养重点开放实验室, 杭州 310029; 3. 浙江大学环境与资源学院, 生态环境研究中心, 杭州 310029)

摘要:采用室内培养方法, 从拟除虫菊酯类农药生产车间下水道驯化污泥中分离、筛选出 1 株可同时降解对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的高效菌株 M6R9, 经鉴定为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 并对其生理特性进行研究. 结果表明, 该菌为革兰氏阴性好氧型杆菌, 大小约为长 (0.8~1.9) μm 、宽 (0.5~1.0) μm , 能够以 3 种菊酯农药为碳源生长. 在通气、pH 7.0、温度 (25~30) $^{\circ}\text{C}$ 、接菌量 $D_{415\text{ nm}} = 0.2$ 、农药浓度 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的环境条件下, 对含有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基培养 3 d, 发现该菌对 3 种菊酯降解效果最好, 降解率分别为 55.74%、55.11% 和 56.96%, 且降解过程满足一级动力学方程模型, 降解半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 65.4、70.7 和 68.6 h. 3 种菊酯农药降解率与接菌量、通气量和振荡速率呈正相关.

关键词:拟除虫菊酯类农药; 生物降解; 产气肠杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)08-2445-07

Isolation and Identification of Degradation Bacteria *Enterobacter aerogenes* for Pyrethroids Pesticide Residues and Its Degradation Characteristics

LIAO Min^{1,2}, ZHANG Hai-jun^{1,2}, XIE Xiao-mei³

(1. Department of Resources Science, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropic Soil and Plant Nutrition, Hangzhou 310029, China; 3. Research Center for Eco-Environmental Sciences, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: By incubation experiment, the bacterial strain labeled as M6R9 was isolated from the tame sludge in water course of Pesticide Factory of Hangzhou, and was identified as *Enterobacter aerogenes*, which had highly efficient degradation for Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin. By investigating the physiological characteristics of the strain, the results show that the bacterium is a gram-negative aerobe bacilli, size is (0.8-1.9) $\mu\text{m} \times$ (0.5-1.0) μm , and is capable of utilizing Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin as sole carbon source. Under the condition of ventilation, (25-30) $^{\circ}\text{C}$, inoculated amount at $D_{415\text{ nm}} 0.2$, pH 7.0, pesticide concentration $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and vibrational speed $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, the degradation efficiencies to Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin are the highest by strain M6R9. Under such condition, in the mixture culture medium with $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin, the degradation ratios are 55.74%, 55.11% and 55.96% after culturing 3 d, respectively, the degradation processes are fitted for first-order kinetic equation and the half lives ($t_{1/2}$) are 65.4, 70.7 and 68.6 h respectively. The degradation ability of *Enterobacter aerogenes* M6R9 on Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin is positively correlated to inoculated amount, vibrational speed and ventilation.

Key words: synthetic pyrethroid insecticides; biodegradation; *Enterobacter aerogenes*

拟除虫菊酯类农药是模拟天然除虫菊酯合成的一类含有多个苯环结构的广谱性杀虫剂, 具有高效、低毒、耐光热等特点, 其使用范围仅次于有机磷农药, 位居杀虫剂市场的第二位. 常用的拟除虫菊酯类农药有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯等^[1,2]. 但由于这类农药在环境中稳定、降解速度慢、降解率低, 残留量高, 因而带来了环境和食品安全问题. 特别是我国加入 WTO 后, 国外针对我国入关而颁布的农产品中农药的最大残留量 (MRL) 标准带有明显的“技术壁垒”倾向, 农药检测范围大幅度扩大, 拟除虫菊酯类农药 MRL 标准明显降低, 使我国茶叶等农产品

出口面临着更为严峻的挑战.

农药残留是吸附、降解和迁移等综合作用后结果, 其中降解是制约其残留量的关键过程^[3], 控制农药残留有多种途径, 包括禁用农药、化学处理和微生物降解等^[4]. 大量研究表明, 微生物对土壤和水环境中的农药降解起着关键作用^[5,6], 已分离到大批能降

收稿日期: 2008-10-13; 修订日期: 2009-03-02

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2006C33052); 浙江省新苗人才计划项目 (2008R40G2010088)

作者简介: 廖敏 (1970~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为土壤环境化学、环境微生物与毒理学, E-mail: liaomin@zju.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: xiexiaomei@zju.edu.cn

解或转化农药的微生物类群,如细菌、放线菌、真菌和藻类^[7].在对拟除虫菊酯类农药降解研究中发现假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[8]、肠杆菌属(*Ehtherobacte* sp.)^[9]、产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)^[10]和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[11]等均对拟除虫菊酯类农药具有降解作用.但目前大多数微生物降解只针对某一种或少数几种农药,而有关能同时降解多种拟除虫菊酯类农药的微生物报道还相对较少^[12].鉴于此,本实验筛选出 1 株能同时对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯 3 种拟除虫菊酯类农药的高效降解菌株,并对其进行分析鉴定和降解特性研究,以期揭示该菌株对农药降解的基本规律,为控制农产品拟除虫菊酯类农药残留提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试验试剂

富集培养基:蛋白胨 10 g, NaCl 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, H_2O 1 000 mL, 葡萄糖 1.0 g, pH 7.0; 基础培养基: NH_4NO_3 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0; 农药储备液:将一定量 95.8% 的联苯菊酯原液溶于丙酮、一定量的 20% 甲氰菊酯乳油原液溶于乙醇以及一定量的 94% 的氯氰菊酯原液并加入 1.5 倍(质量比)的 Tween-80 溶于乙醇,分别获得 50 mL 含 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的 3 份农药储备液,用于摇瓶实验或制农药平板使用,经试验此农药储备液可在培养基中很好地分散溶解;在 1 000 mL 富集或基础培养基中同时加入一定量的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯储备液,配成相应的含农药的混合培养基,加入 12~15 g 琼脂得到固体培养基.

用于菌种筛选的样品为杭州农药厂拟除虫菊酯类农药生产车间下水道处驯化过的污泥.

1.2 试验方法

1.2.1 拟除虫菊酯类农药降解菌的筛选

将 100 mL 含农药的富集培养基装到 250 mL 三角瓶中灭菌,冷却后加入污泥土样 10 g,于 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 7 d 后,按 10% 的接种量转接到第二批的含农药富集培养基(联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯浓度依次为 100、150 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).相同条件培养 7 d 后,再按 10% 的接种量转接到含联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯均为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合农药基础培养基中,继续培养 7 d.再连续 2 次转接到农药浓度为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合农药基础培养基中

后,取 0.1 mL 基础培养基发酵液反复进行平板划线分离,直至得到单菌落,将单菌落接种到试管斜面培养基上,于 4°C 冰箱内保存.

1.2.2 菌种鉴定

形态特征鉴定主要通过革兰氏染色、荚膜染色^[13]及电镜扫描技术观察对数生长期(固体培养基中培养 48 h)的个体形态及菌落特征等方法进行,生理生化特性鉴定参照文献^[14].分子水平鉴定采用美国 MIDI 公司的 sherlock microbial identity system (MIS)软件系统,该系统将基础培养基上纯化的单菌落按照 MIDI 公司的操作规范进行脂肪酸的提取和分析^[15],定性(种类)和定量(含量)地分析微生物的脂肪酸成分并生成脂肪酸图谱,将生成的图谱和数据库(Library)进行比对,根据相似指数 SI (similarity index)鉴定未知菌种^[16,17].

1.2.3 降解菌对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解效能的测定

将分离纯化后的菌种以菌量 $D_{415 \text{ nm}} = 0.2$ 接种到含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 100 mL 无菌液体富集培养基的 250 mL 三角瓶中,以不接菌的无菌液体富集培养基作对照,于 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 3 d 后,吸取 2 mL 培养液依次用 4、4 和 2 mL 石油醚萃取 3 次,用无水硫酸钠吸水后定容至 10 mL,用 Agilent 6890GC(G1530N/G3172A)气相色谱仪检测 3 种菊酯农药残留量^[18].气相色谱检测条件^[19]: HP-5(30 mm $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)色谱柱, ECD 检测器,检测温度 280°C ,柱温 260°C ,进样口温度 280°C ,柱流 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,分流比为 1:10,载气为 N_2 (99.999%),进样量为 1 μL .降解率(%)=(对照样品残留量-处理样品残留量)/对照样品残留量 $\times 100$ ^[20];降解速率 [$\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$] = (对照样品残留量-处理样品残留量)/处理时间.

1.2.4 菌株对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解的最佳条件

降解试验基本条件为:在 100 mL 基础培养基的三角瓶中,混合加入联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为碳源,接种量 $D_{415 \text{ nm}}$ 0.2、 30°C 、pH 7.0、振荡速率 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、装液量 100 mL (250 mL 三角瓶);最佳条件降解试验:通过分别改变降解基本条件中的接种量($D_{415 \text{ nm}}$ 为 0.01、0.05、0.1、0.15、0.2 和 0.4)、农药浓度(25、50、100、150、200 和 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、温度(15、25、30、35 和 45°C)、pH 值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0)、振荡速率(0、60、120、180 和 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)和装液量

(25、50、100、150 和 200 mL),在其他条件保持不变的情况下,培养 3 d,进行单因素条件试验.各单因素设计以不接种为对照,每个处理设 3 个重复,测定菌株同时对 3 种菊酯农药的降解率.

1.2.5 菌株生长量($D_{415\text{ nm}}$)和降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯关系曲线的测定

将菌株等量置于含 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单一联苯菊酯、甲氰菊酯或氯氰菊酯及 3 种农药混合的 100 mL 基础培养基中,于 30°C 、 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床上培养,分别在 12、24、36、48、60、72、84、96 和 108 h 测定菌株对 3 种菊酯农药的降解率,并对取过样的发酵离心液取等量菌体适当稀释测 $D_{415\text{ nm}}$ (培养基培养的菌液需在 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min,再用无菌水重悬后测定),测定菌株生长量与降解率之间的关系.

2 结果与分析

2.1 拟除虫菊酯类农药高效降解菌的分离和筛选

经分离、纯化、筛选获得 1 株能同时以联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯为碳源并保持较高和较稳定降解率的细菌,命名为 M6R9.在通气、pH 7.0、温度($25\sim 30$) $^{\circ}\text{C}$ 、接种量 $D_{415\text{ nm}}\text{ }0.2$ 、转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养 3 d,发现含有联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基中,菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解率分别为 55.74%、55.11% 和 56.96%.

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株 M6R9 基本形态及生理生化特征

经鉴定 M6R9 为杆状、周生鞭毛,无芽孢、产小荚膜的革兰氏阴性菌,菌体大小约为宽($0.5\sim 1.0$) $\mu\text{m}\times$ 长($0.8\sim 1.9$) μm (图 1).固体培养基上菌落圆形呈灰白色、不透明,表面凸起、光滑,边缘完整.乙酰甲基甲醇生成试验(V-P)反应阳性,吡啶实验阴性,不能液化明胶,氧化酶阴性,可利用木糖、葡萄糖、丙二酸和乳糖产酸,不能利用卫矛醇产酸,其他生理生化特性见表 1.

2.2.2 菌株 M6R9 鉴定

根据 Sherlock MIS 软件系统对菌株 M6R9 进行定性和定量分析并生成脂肪酸甲酯图谱,对比 Library 数据库,根据相似指数 SI 初步鉴定菌 M6R9 为产气肠杆菌属中的产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*), $\text{SI}=0.931$.

2.3 菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的最佳降解条件

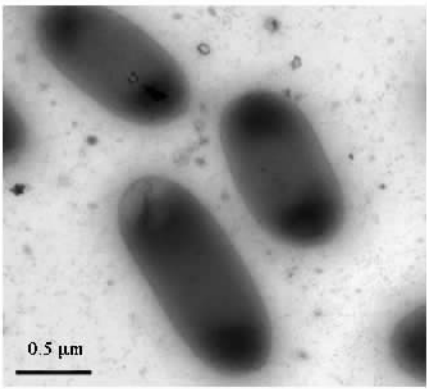


图 1 菌株 M6R9 的电镜照片($\times 50\,000$)

Fig.1 Electron micrographs of the bacterial strain M6R9 ($\times 50\,000$)

表 1 菌株 M6R9 的生理生化特性¹⁾

Table 1 Physiological characteristics of the bacterial strain M6R9

测试项目	结果	生理生化测试	结果
革兰氏染色	-	V-P 实验	+
甲基红	-	吡啶实验	-
脂酶	-	硫化氢	-
赖氨酸脱羧酶	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
鸟氨酸脱羧酶	+	氧化酶	-
柠檬酸盐	+	脲酶水解	-
木糖	+	精氨酸双水解酶	-
葡萄糖产气	+	蔗糖产酸	+
丙二酸	+	麦芽糖产酸	+
乳糖	+	卫矛醇产酸	-

1)“-”表示阴性反应;“+”表示阳性反应

2.3.1 接种量对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

含联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基分别接种不同初始菌液量,培养 3 d 后,3 种菊酯农药的降解率见图 2(a).从中可以看出,菌株 M6R9 对 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 种菊酯农药的同时降解率随接种量的增加而增加,3 种菊酯农药的降解率与菌液接种量 $D_{415\text{ nm}}$ 值呈正相关,相关系数(R^2)分别为 0.92、0.912 9 和 0.923 8.接种量 $D_{415\text{ nm}}>0.2$ 时,降解率增加幅度降低,这可能是由于随着接种量的增加,微生物生长所需的碳源相对不足,微生物间相互竞争导致有效菌源不足^[21],因此从降解效果及降解率与菌量比值的降解率看,接种量以 $D_{415\text{ nm}}$ 值 0.15~0.2 为宜.

2.3.2 浓度对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

在甲氰菊酯,联苯菊酯和氯氰菊酯不同浓度梯度的混合培养基中,接种量 $D_{415\text{ nm}}\text{ }0.2$,培养 3 d 后,3 种菊酯农药的降解速率见图 2(b).结果表明,菌株

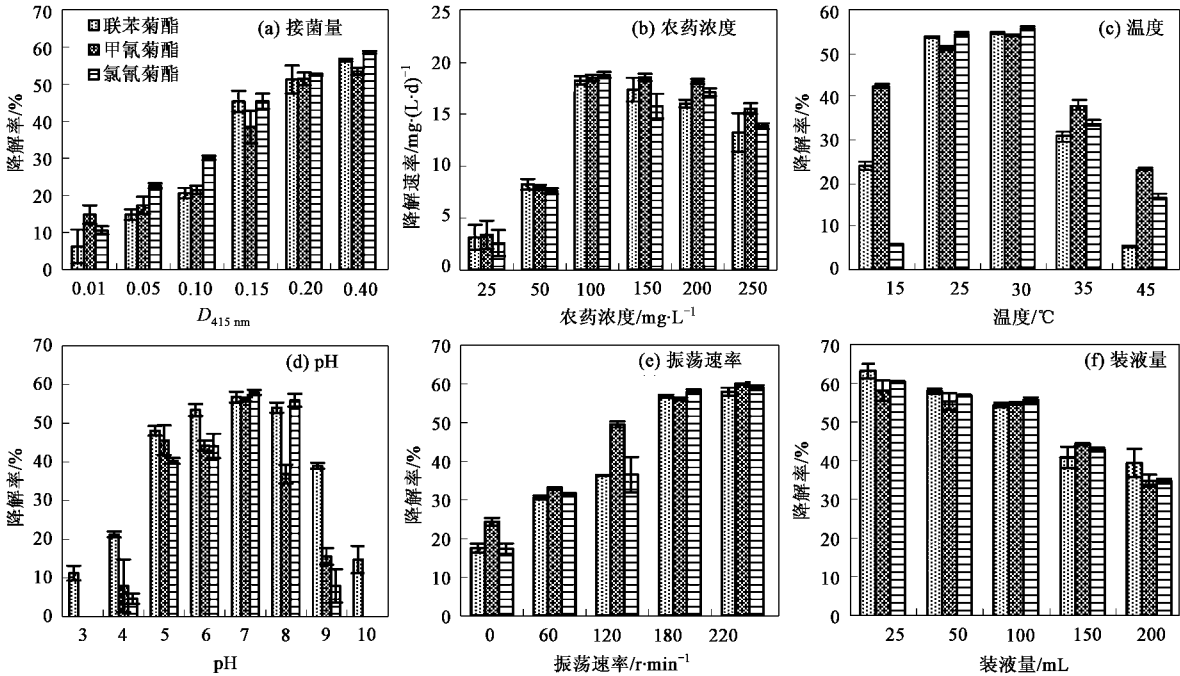


图 2 不同条件对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的影响

Fig.2 Effect of different conditions on degradation rate of the bacterial strain M6R9 on Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin

M6R9 对 3 种菊酯农药的同时降解速率随着农药浓度的增加存在较大差异,当 3 种菊酯农药浓度从 25 ~ 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药的降解速率随着农药浓度的增加而增加,在 3 d 内联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解速率由 3.11 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 增至 18.27 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 、3.36 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 增至 18.52 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 、2.55 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 增至 18.8 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$,增幅效果明显;之后随着 3 种菊酯农药浓度的增加(从 100 ~ 250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯农药的同时降解速率下降,最大降幅分别仅为 5.02、2.98 和 4.94 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$,降幅效果不明显;菌株 M6R9 在农药浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 3 种菊酯的降解速率最大,分别为 18.27、18.52 和 18.8 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$.可见较高或较低浓度导致降解效率降低,这可能在低浓度时碳源不足导致菌株生长受限制及高浓度又会对菌体产生毒害作用之故.

2.3.3 温度对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

含有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基接种 $D_{415\text{ nm}}$ 0.2 菌种后,不同温度梯度下培养 3 d,3 种菊酯农药的降解率如图 2 (c)所示.结果表明,在 10 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$ 间,菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药的同时降解率随培养温度变化存在较大

差异,最适宜降解温度在 25 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 之间,降解率最大,以培养温度 30 $^{\circ}\text{C}$ 为例,联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别为 54.74%、55.56% 和 56.39%.而培养温度在 15、35 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,3 种菊酯农药降解效率相对较低,且培养温度低于 25 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药的降解率随温度下降而下降.培养温度超过 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌株对 3 种菊酯农药的降解率随温度升高而下降.上述结果表明该菌株属中温型生活环境的细菌.

2.3.4 pH 值对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

不同 pH 梯度下,含有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基接种 $D_{415\text{ nm}}$ 0.2 菌量,培养 3 d 后,3 种菊酯农药的降解率见图 2 (d).结果表明,菌株 M6R9 在 pH 7.0 时对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解效果最好,分别达到 56.64%、56.32% 和 57.42%.pH 值低于或高于 7.0 时,菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药降解效果受到抑制,降解率下降,但 pH 8.0 的降解效果高于 pH 6.0,这表明该菌株 M6R9 为中性菌,在 pH 7.0 ~ 8.0 条件下可能有助于降解酶的合成与表达,因而降解效率较高^[22].

2.3.5 振荡速率对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

不同摇床转速下,对含有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基接种 $D_{415\text{ nm}}$ 0.2 菌种,培养 3 d,3 种菊酯农药的降解率见图 2 (e).结果表明,随着振荡速率加快,瓶内溶解氧也增加,菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药降解能力相应增强.3 种农药降解率与振荡速率呈正相关,相关系数(R^2)分别为 0.985 6、0.946 4 和 0.955 1,说明该菌株为好氧型菌,振荡速率加快,瓶内溶解氧增加有利于菊酯农药的降解.

2.3.6 装液量对菌株 M6R9 降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响

于 250 mL 三角瓶中,装不同量含有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且接种 $D_{415\text{ nm}}$ 0.2 菌量的混合培养基,培养 3 d,3 种菊酯农药的降解率见图 2(f).从中可知,菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药的降解率与装液量呈负相关,与通气量呈正相关,相关系数分别为 0.927 3、0.968 1 和 0.939 7,这也表明该菌株为好氧型菌,瓶中装液量的增加导致通气体积的减少不利于菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药的降解.

2.4 菌株 M6R9 生长($D_{415\text{ nm}}$)与降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的关系曲线

菌株 M6R9 生长量($D_{415\text{ nm}}$)和农药降解率的关系曲线(图 3 和图 4)表明,在单一及混合联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯农药为唯一碳源的基础培养基上,菌株生长的对数期为 12~48 h;稳定期在 48~72 h 之间,在菌株生长的对数期和稳定期内,农药降解率增长率迅速,与菌株生长近乎成正相关,随着菌株生长进入衰亡期(72 h 以后),农药降解率增长趋势也趋向减缓;同时,在只加单一及混合联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯农药为唯一碳源的基础培养基平板画线培养发现,菌株在平板上生长良好,这些特征是菌落降解农药的典型特征^[18].该结果说明菌株 M6R9 确实能够同时有效地降解 3 种拟除虫菊酯农药,并能以单一或混合联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯农药为唯一碳源进行生长.

2.5 菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解的动力学分析

为了解菌株 M6R9 对 3 种菊酯农药的同时降解行为,研究中采用一级动力学模型,对 12、24、36、48、60、72、84、96 和 108 h 的农药残留量(c)和时间(t)进行拟合,降解动力学方程为 $c_t = c_0 \times e^{-kt}$ (其中 c_t 为 t 时间农药的残留量, c_0 为样品的初始浓

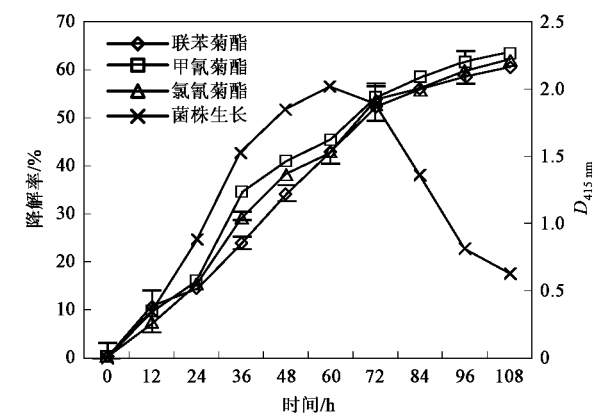


图 3 菌株 M6R9 生长($D_{415\text{ nm}}$)与降解混合农药联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的关系曲线
Fig.3 Relationship curve about the growth ($D_{415\text{ nm}}$) of the bacterial strain M6R9 and the degradation rate of Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin by mixed pesticides

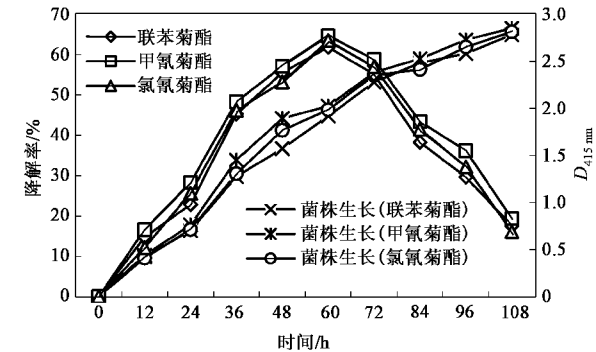


图 4 产气肠杆菌生长量($D_{415\text{ nm}}$)降解单一农药联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯关系曲线
Fig.4 Relationship curve about the growth($D_{415\text{ nm}}$) of the bacterial strain M6R9 and the degradation of Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin by unitary pesticide

度, k 为降解速率常数),半衰期 $t_{1/2} = \ln 2/k$ ^[23,24],拟合结果见表 2.从中可知,菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解符合一级动力学方程,相关系数(R^2)分别为 0.951 1、0.950 6 和 0.941 4.通过计算得出产气肠杆菌菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯同时降解的动力学速率常数

表 2 菌株 M6R9 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解的动力学参数				
Table 2 Degradation kinetic parameters of the bacterial strain M6R9 on Bifenthrin, Fenpropathrin and Cypermethrin				
药剂名称	动力学方程	速率常数 k / $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$	相关系数 R^2	半衰期/h
联苯菊酯	$y = 8.4866e^{-0.0098x}$	0.010 6	$R^2 = 0.9511$	65.4
甲氰菊酯	$y = 8.3763e^{-0.0106x}$	0.009 8	$R^2 = 0.9506$	70.7
氯氰菊酯	$y = 8.3159e^{-0.0101x}$	0.010 1	$R^2 = 0.9414$	68.6

(k)分别为0.010 6、0.009 8和0.010 1 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$, 半衰期($t_{1/2}$)分别为65.4、70.7和68.6 h.

3 讨论

将有害污染物通过微生物降解或转化转变为无毒无害的物质,是有机污染物污染环境修复的核心^[18],而筛选高效农药降解菌是开展农药污染生物修复工作的重要前提^[25].影响微生物降解农药的因素有微生物自身性质、农药结构以及环境条件(pH、温度、底物浓度等)的影响.丁海涛等^[26]从活性污泥的富集培养物中分离得到能明显去除氰戊菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯等拟除虫菊酯类农药的菌株qw5,其最佳降解环境条件是在通气、pH 7~8、温度30℃左右,培养5 d,降解率分别为53.8%、41.2%和61.7%.本研究筛选的产气肠杆菌菌株M6R9对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解影响因素的研究结果也证明了这一点,其降解效果受到通气、pH、温度、接种量、农药浓度和转速等环境条件的影响.在确定的最佳环境条件下,培养3 d后,菌株M6R9对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别为55.74%、55.11%和56.96%、且能够以3种菊酯为唯一碳源生长.研究结果还表明,菌株M6R9对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率与通气量、振荡速率和接种量呈正相关,表明该菌株为好氧型菌株.

农药除被微生物降解外,还会发生光解、化学分解及共代谢作用等,因此只有当菌株的生长和农药的降解出现同步关系时,才能确定农药被微生物降解了^[27].菌株M6R9对单一及混合联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率与其生长曲线之间关系研究结果表明(图3和图4),在产气肠杆菌生长的对数期和稳定期内,农药降解率和菌株生长近乎呈正相关,随着菌株生长进入衰亡期,受周围不利因素(代谢物积累等)影响,仍存活的细胞,降解力受到抑制,农药降解率增长趋势也趋向减缓,菌株的生长和农药的降解呈现出良好的同步关系,揭示了菌株M6R9确实能够降解单一及混合的3种菊酯农药.同时也发现菌株M6R9对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解过程满足一级动力学方程模型,半衰期($t_{1/2}$)为65.4、70.7和68.6 h,与林金科等^[28]研究联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯在铁观音茶叶新梢上残留的自然降解动态发现3种菊酯的半衰期分别为6、5和4 d,及Grant等^[29,30]从使用过拟除虫菊酯的菜园和农田土壤的混合土样中分离出荧光假单胞菌和普城沙雷菌2株优势菌,于25℃、80 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养14 d,250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯氰菊酯去除率约为66.7%的结果相比,本研究分离、筛选的产气肠杆菌菌株M6R9是1株可同时对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解的高效菌株,而其降解半衰期更短,表明其在控制农产品中拟除虫菊酯类农药残留方面具有一定的应用潜力.

4 结论

(1)从拟除虫菊酯类农药生产车间下水道驯化过的污泥中分离得到1株能同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的高效菌M6R9,经Sherlock MIS系统鉴定为产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*).

(2)菌株M6R9在通气量、pH 7.0、温度(25~30)℃、接种量 $D_{415\text{ nm}}=0.2$ 、农药浓度100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和转速180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 环境条件下对3种菊酯农药要降解效果最好,菌株M6R9降解效果与接菌量,通气量和振荡速率呈正相关,且能够以3种菊酯为唯一碳源生长.

(3)在最佳降解环境条件下,含有联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合培养基中,菌株M6R9对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯同时降解过程满足一级动力学方程,降解速率常数(k)分别为0.010 6、0.009 8和0.010 1 $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$,半衰期($t_{1/2}$)分别为65.4、70.7和68.6 h.

参考文献:

- [1] Giri S, Sharma G D, Giri A, *et al.* Fenvalerate-induced chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in the bone marrow cells of mice in vivo [J]. *Mutat Res*, 2002, **520**: 125-132.
- [2] Tripathi G, Verma P. Fenvalerate-induced changes in a catfish, *Clarias batrachus*: metabolic enzymes, RNA and protein [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2004, **138**: 75-79.
- [3] Jin W, Palmer R G, Horner H T, *et al.* Molecular mapping of a male-sterile gene in soybean [J]. *Crop Sci*, 1998, **38**: 1681-1685.
- [4] 郑金来, 李君文, 晁福寰. 常见农药降解微生物研究进展及展望[J]. *环境科学研究*, 2001, **14**(2): 62-64.
- [5] Courteix A, Bergel A. Horseradish peroxidase-catalyzed hydroxylation of phenol. Thermodynamic analysis [J]. *Enzym Microb Tech*, 1995, **17**: 1087-1093.
- [6] Sogorb M A, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis [J]. *Toxicol Lett*, 2002, **128** (1-3): 215-228.
- [7] Musumeci M R, Ostiz S B. Binding of cypermethrin residue in Brazilian soils and its release by microbial activity [J]. *Rev Microbiol*, 1994, **25** (4): 216-219.
- [8] Zhang W J, Rui W Y, Tu C, *et al.* Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification

[J]. *Pedosphere*, 2005, **15**(4): 440-447.

[9] 林淦. 阴沟肠杆菌 w10j15 中拟除虫菊酯类杀虫剂降解酶的酶学性质研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2004, 14.

[10] 虞云龙, 宋凤鸣, 郑重, 等. 一株广谱性农药降解菌的分离与鉴定[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 1997, **23**(2): 111-115.

[11] Malony S E, Maule A, Smith A R W. Transformation of synthetic pyrethroid insecticides by a thermophilic *Bacillus* sp. [J]. *Arch Microbiol*, 1992, **158**: 282-286.

[12] Cui Z L, Li S P, Fu G P. Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (10): 4922-4925.

[13] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 28-35.

[14] 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. 370-410.

[15] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. SherlockMIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究[J]. *土壤学报*, 2006, **43**(4): 642-647.

[16] Adriana M, Francesco R, Luisa M, *et al.* Utility of gas chromatography for rapid identification of mycobacterial species frequently encountered in clinical laboratory [J]. *J Microbio Methods*, 2007, **68**(2): 392-395.

[17] 李旭春, 刘桂芳, 马军, 等. 1 株壬基酚降解菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *环境科学*, 2008, **29**(1): 231-236.

[18] 王兆守, 林淦, 尤民生, 等. 茶叶上拟除虫菊酯类农药降解菌的分离及其特性[J]. *生态学报*, 2005, **25**(7): 1824-1827.

[19] Beltran J, Peruga A, Pitarch E, *et al.* Application of solid-phase microextraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, **376** (4): 502-511.

[20] 方玲. 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果[J]. *应用生态学报*, 2000, **11**(2): 249-252.

[21] 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[J]. *土壤学报*, 2004, **40**(4): 590-596.

[22] 许育新, 李晓慧, 张明星, 等. 红球菌 CDT3 降解氯氰菊酯的特性及途径[J]. *中国环境科学*, 2005, **25**(4): 399-402.

[23] Chang B V, Chiang F, Yuan S Y. Biodegradation of nonylphenol in sewage sludge [J]. *Chemosphere*, 2005, **60** (11): 1652-1659.

[24] Yuan S Y, Yu C H, Chang B V. Biodegradation of nonylphenol in river sediment [J]. *Environ Pollut*, 2004, **127** (3): 425-430.

[25] 李轶, 胡洪营, 吴乾元, 等. 低温硝基降解菌的筛选及降解特性研究[J]. *环境科学*, 2007, **28**(4): 902-907.

[26] 丁海涛, 李顺鹏, 沈标, 等. 拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究[J]. *土壤学报*, 2003, **40**(1): 123-129.

[27] 王兆守. 微生物降解茶叶农药残留的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003. 12.

[28] 林金科, 李秀峰, 林小端. 4 种农药在适制乌龙茶品种茶树上的自然降解动态 [J]. *中国农学通报*, 2008, **24**(1): 104-111.

[29] Grant R J, Daniell T J, Betts W B. Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria [J]. *J Appl Microbiol*, 2002, **36** (3): 534-540.

[30] Grant R J, Betts W B. Biodegradation of the synthetic pyrethroid cypermethrin in used sheep dip [J]. *Lett Appl Microbio*, 2003, **36** (3): 173-176.