

降解甲氰菊酯光合细菌的分离鉴定及其降解特性研究

张松柏^{1,2}, 张德咏^{1,2}, 罗香文², 尹乐斌¹, 程菊娥², 朱春晖², 刘 勇^{1,2}

(1.中南大学研究生院隆平分院, 湖南 长沙 410125; 2.湖南省植物保护研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要:采用富集分离法从农药厂污泥中分离到一株能降解甲氰菊酯(fenprothrin)的光合细菌新菌株 PSB07-15,通过形态特征、生理生化特征以及对 16S rDNA 序列(Genbank Accession No. EU005383)进行了同源比较、鉴定。结果表明,该菌株为沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*)。生长特性和甲氰菊酯降解实验结果表明,该菌株的最适生长温度为 30 ℃,最适 pH 为 6.5。该菌以共代谢方式降解甲氰菊酯,对甲氰菊酯的最高耐受浓度为 600 mg·L⁻¹,培养 15 d 对 600 mg·L⁻¹ 甲氰菊酯降解率达 35.26%。通过 GC-MS 对降解产物进行了分析,结果显示间苯氧基苯乙腈是展出惟一的降解产物,推测该菌的降解途径是可能作用于甲氰菊酯的酯键处。本研究作为利用光合细菌进行生物修复提供了理论依据。

关键词:甲氰菊酯;沼泽红假单胞菌;生物修复;降解途径

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)01-0140-05

Isolation and Identification of Fenprothrin Degrading Strain PSB07-15 and Its Degradation Characteristics

ZHANG Song-bai^{1,2}, ZHANG De-yong^{1,2}, LUO Xiang-wen², YIN Le-bin¹, CHENG Ju-e², ZHU Chun-hui², LIU Yong^{1,2}

(1.Longping Branch, Graduate College, Central South University, Changsha 410125, China; 2.Hunan Plant Protection Institute, Changsha 410125, China)

Abstract: A photosynthetic bacterial strain PSB07-15, which was capable of degrading fenprothrin, was isolated from the sludge of pesticide factory by enrichment media. PSB07-15 was identified as *Rhodospseudomonas palustris* based on its morphology, physiology and homology of 16S rDNA gene sequence (Genbank Accession No. EU005383). The growth and degrading characteristics of this strain were tested. The results showed that 30 ℃, pH6.5 were the optimum growth conditions of PSB07-15. Further experiments suggested that PSB07-15 could grow in the media supplied with fenprothrin up to 600 mg·L⁻¹ and degrades fenprothrin by cometabolic way. PSB07-15 degraded 35.26% fenprothrin in a concentration of 600 mg·L⁻¹ within 15 d. The metabolic products, which were assessed by gas chromatography with mass selected detection, identified m-phenoxyphenyl-acetonitril as the only stable metabolic products and from this a fenprothrin biodegradation pathway was proposed. Our results showed that PSB07-15 may potentially be used in bioremediation.

Keywords: fenprothrin; *Rhodospseudomonas palustris*; bioremediation; biodegradation pathway

甲氰菊酯(fenprothrin)作为一种广谱高效的拟除虫菊酯类杀虫剂,一直被认为是一种安全有效的农业虫害防治药剂,从 20 世纪 80 年代以后,在我国被广泛用于粮食、蔬菜和果树等多种作物^[1]。但其残留会造成环境与食品的污染,特别是其对家蚕以及鱼类等生物高毒,并可以在鱼体中蓄积,影响农产品的质量

及人的身体健康^[2-3]。

以生物修复(Bioremediation)为理论基础的农药残留降解菌技术是降低农产品和农业生产环境中农药残留的一种重要手段。国内外很多有关农药残留降解菌研究的报道,但对拟除虫菊酯类农药的降解菌报道相对较少^[4-5]。国内外报道的菌株仅有蜡状芽孢杆菌属(*Bacillus*)和产碱菌属(*Alcaligenes*)的几个菌株^[4-6]。因此,筛选更多类型的甲氰菊酯高效降解菌,对甲氰菊酯残留的生物修复研究和应用十分必要。

本文从某农药厂污泥中分离到一株能降解甲氰菊酯的光合细菌 PSB07-15,并对其降解甲氰菊酯的

收稿日期:2008-03-27

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA10Z401);国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD17B08)

作者简介:张松柏(1980—),男,湖北监利人,博士生,助理研究员,主要从事农药降解微生物研究。E-mail:zsongb@sohu.com

通讯作者:刘 勇 E-mail:haoasliu@163.com

能力及降解途径进行了研究。该研究为利用光合细菌对甲氰菊酯残留的生物修复提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 培养基、试剂和主要仪器

光合细菌分离培养基:MM培养基,参照文献[7];选择培养基:在MM培养基中加入一定浓度的甲氰菊酯;碳源试验培养基:在MM培养基中加入终浓度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的各种碳源。

主要试剂:40%甲氰菊酯乳油,海南正业化工有限公司惠赠;98%甲氰菊酯标准品购自天津东方绿色技术发展有限公司;其他农药残留检测试剂均为色谱纯。

主要仪器:农药残留检测与降解产物分析在湖南省植物保护研究所农药残留检测室进行。6890N/5975气质联用仪(Agilent, USA),扫描电子显微镜(JEOL-230, 日本电子公司),分光光度计(Tu-1901, 北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 光合细菌的分离、筛选

将采自某农药厂的污泥 2.0 g 加入 120 mL MM培养基中,培养 7 d 后,取 1 mL 菌液稀释涂布到选择性固体培养基中,挑取菌落形态不同的菌,分别接种到含甲氰菊酯 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 选择性液体培养基中,培养 7 d 后,以10%的接种量分别接种到 $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 选择培养基中,重复以上步骤,直到 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 选择培养基。15 d后检测农药浓度,以含相同浓度的甲氰菊酯、相同培养条件不接菌的培养基为对照。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 电镜样品制备及观察

将细菌溶液反复离心收集沉淀,2.5%戊二醛固定,经磷酸缓冲液洗涤,1%锇酸后固定 2 h ,反复洗涤离心后梯度酒精脱水,树脂渗透包埋。经 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱加热聚合,切片后,观察拍照。

1.3.2 生理生化指标测定

参照文献[8-9]检测PSB07-15的各种生理生化指标。

1.3.3 菌体吸收光谱的测定

取 1.5 mL 培养 5 d 的光合细菌培养液, $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心洗涤3次,用60%蔗糖溶液重悬浮,分光光度计上 $300\sim 900\text{ nm}$ 扫描。

1.3.4 菌体16S rDNA序列的测定

细菌基因组提取采用UNIQ-10柱式基因组DNA抽提试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),具体操作方法参见使用说明书。

以所提的细菌总DNA为模板,采用细菌16S rDNA通用引物进行序列扩增^[6],PCR反应体系(总体积 $50\text{ }\mu\text{L}$): $10\times\text{PCR Buffer}$ $2.5\text{ }\mu\text{L}$; MgCl_2 $2\text{ }\mu\text{L}$; dNTP $1\text{ }\mu\text{L}$; 引物 Bpf/Bpr 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$; Taq 酶($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$; 双蒸水 $43\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min ; $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min , 30个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min 。PCR反应完成后,经1%琼脂糖电泳检测扩增片断。测序由上海生工生物工程技术有限公司进行。

1.3.5 16S rDNA序列同源性分析及系统发育树分析

测定的16S rDNA序列在Genbank中利用BLAST进行比对,比较其序列同源性。利用Mega 3.1软件进行多序列联配,构建系统发育树。

1.4 PSB07-15生长特性研究

主要进行了生长温度、培养基pH值、生物量、碳源利用试验。

1.5 降解特性

1.5.1 降解率测定

样品中甲氰菊酯的残留测定条件及过程参照中华人民共和国农业行业标准NY/T761—2004《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留检测方法》。

降解率的计算方法:

$$\text{降解率}(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

式中: A_1 为降解菌处理 15 d 后甲氰菊酯残留浓度, A_0 为对照处理 15 d 后甲氰菊酯残留浓度。

1.5.2 降解途径

气相色谱-质谱(GC-MS)分析条件:型号Agilent 6890N/5975,全扫描,质量范围 $50\sim 550$;电子轰击能 70 eV ;色谱柱HP-5MS,进样口温度 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$,氦气流量 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。升温程序:初始温度 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 3 min ,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度升温到 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$,再以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度升温,终止温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 5 min ;离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$;四极杆温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离及其生理生化特性

PSB双层固体平板培养上,培养 5 d ,形成红色的圆形菌落,边缘整齐光滑,菌落直径 $0.35\sim 1.65\text{ mm}$ 。液体PSB培养基中培养 5 d 后,培养液呈深红色。

生理生化特征: G^- ,杆状(图1),V-P反应阴性,甲基红反应阴性,不能利用淀粉, H_2S 反应阳性,3% NaCl中不能生长。

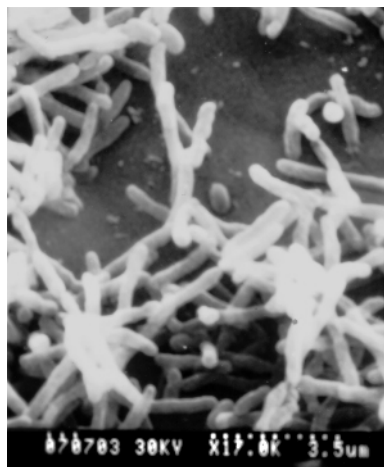


图 1 PSB07-15 的电镜扫描图

Figure 1 Scanner electronmicroscope photograph of PSB07-15

2.2 菌体吸收光谱

PSB07-15 菌体的特征吸收峰为 525、805、865 nm(图 2);表明菌株 PSB07-15 含有菌绿素 a 和类胡萝卜素^[10]。

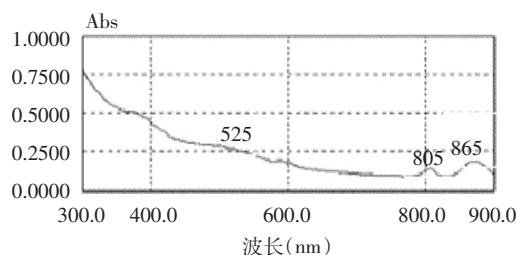


图 2 PSB07-15 活细胞色素吸收特性

Figure 2 The photometric absorption characteristics by PSB07-15

2.3 16S rDNA 序列同源性及其系统发育树分析

PSB07-15 的 16S rDNA 序列长度为 1 434 bp,与红假单胞菌属已知的菌株 16S rDNA 片段大小相符。在 Genbank 中的登录号为 EU005383,在系统发育树上与序列号为 AY751758 的 *Rhodopseudomonas palustris* 菌株 16SrDNA 序列为一簇(图 3),同源性为 100%。

根据以上序列比较结果,再结合菌株的生理生化特性将其鉴定为沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)。

2.4 菌株生长特性

2.4.1 生物量测定

PSB07-15 在 PSB 分离培养基中延迟期约 1 d,对数生长期约 4 d,经 6 d 达到稳定期(图 4)。

2.4.2 碳源利用试验

从表 1 可以看出 PSB07-15 可利用多种碳源,在

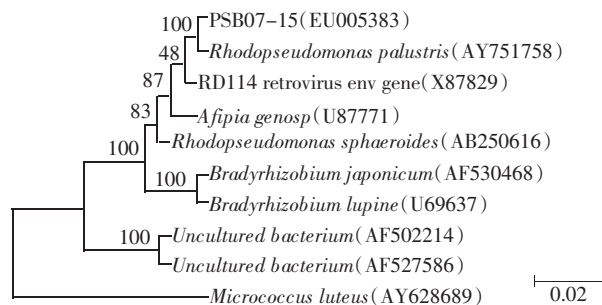


图 3 PSB07-15 的系统发育树分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of PSB07-15

Micrococcus luteus was used as the outgroup to boot the tree. The numbers at each branch points indicated the percentage supported by bootstrap. Bootstrapping was performed 1 000 times for the estimation of stability.

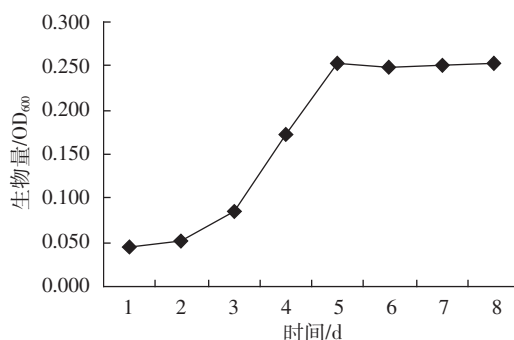


图 4 PSB07-15 在培养基中生物量测定

Figure 4 The biomass of PSB07-15 in liquid MM media

表 1 碳源对 PSB07-15 生长的影响

Table 1 The growth ability of PSB 07-15 in liquid media with different carbons

Growth carbon resource	Growth ability	Growth carbon resource	Growth ability
半乳糖	-	淀粉	-
果糖	-	山梨醇	++
丁二酸	-	肌醇	++
柠檬酸	-	甘氨酸	-
丙三醇	+	葡萄糖	++
山梨醇	-	木糖	+
甘露糖	+	蔗糖	+
酵母膏	+++	苹果酸	-
乙醇	-	甘露醇	+
甲氰菊酯	-	NaHCO3	-
谷氨酰胺	+	蛋白胨	++

注:“+++”growing rapidly, “++”growing well, “+”growing, “-”no growing.

酵母膏中生长的最好。在有机碳存在的条件下菌体的生长量有明显增加,这可能与有机碳源也可以提供部分氮源营养,而且含有丰富的生长因子有关。

2.4.3 温度、pH 试验

从图 5、图 6 可以看到,PSB07-15 在偏酸条件下生长良好,其生长的最适 pH 为 6.5,pH 值低于 6.5 或者高于 7.5 时生长明显受到抑制。PSB07-15 在 30 ℃ 生长良好,温度过高或过低都不利于它的生长。

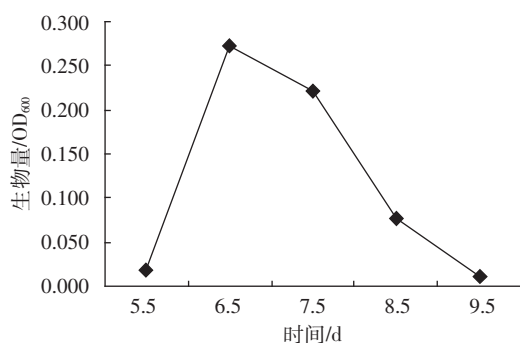


图 5 pH 对 PSB07-15 生长的影响

Figure 5 The growth ability of PSB 07-15 in different pH

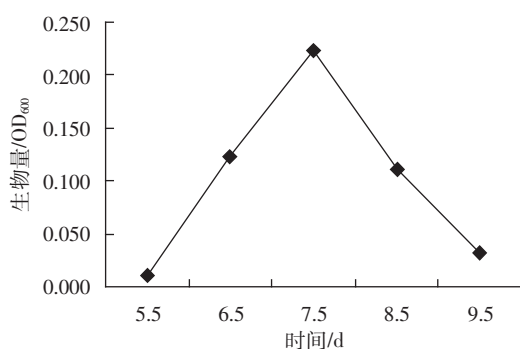


图 6 温度对 PSB07-15 生长的影响

Figure 6 The growth ability of PSB 07-15 in different temperature

2.5 菌株对甲氰菊酯的共代谢特点

PSB07-15 在以甲氰菊酯为唯一碳源的 MM 培养基中不生长,但在有其他碳源存在时可以降解甲氰菊酯,表明 PSB07-15 是以共代谢的方式降解甲氰菊酯^[6]。

2.6 对甲氰菊酯的降解能力

2.6.1 对甲氰菊酯的耐受浓度

在装有 120 mL PSB 液体培养基的培养瓶中,加入 1 mL 菌液,分别加入 200、400、600、800、1 000 mg·L⁻¹ 的甲氰菊酯,光照培养 15 d 后观察 PSB07-15 的生长情况。从表 2 可以看出,菌株最大耐受甲氰菊酯浓度为 600 mg·L⁻¹。

2.6.2 对甲氰菊酯的降解能力

15 d 后检测含 PSB07-15 菌的 600 mg·L⁻¹ 选择培养液中甲氰菊酯残留量,以含 600 mg·L⁻¹ 甲氰菊酯不含菌培养液对照。表 3 结果表明甲氰菊酯在光照

表 2 PSB07-15 对甲氰菊酯的耐受浓度

Table 2 The tolerance ability of PSB07-15 to fenpropathrin

Fenpropathrin concentration	growth ability*
200 mg·L ⁻¹	+++
400 mg·L ⁻¹	++
600 mg·L ⁻¹	+
800 mg·L ⁻¹	-
1 000 mg·L ⁻¹	-

注:“+++”growing rapidly,“++”growing well,“+”growing,“-”nogrowing。

下,经过 15 d,有少量的甲氰菊酯降解,可见光照对甲氰菊酯有一定的降解效果,但作用并不是很大。PSB07-15 在 600 mg·L⁻¹ 选择培养液中培养 15 d,对甲氰菊酯的降解率为 35.26%。与丁海涛等分离的降解菌降解能力相当^[4],略低于许育新等诱变降解菌的降解能力^[6]。

表 3 甲氰菊酯残留量

Table 3 Residual fenpropathrin

处理	PSB07-15	CK
15 d 后残留量/mg·L ⁻¹	379.70	586.51
降解率/%	35.26	-

2.6.3 代谢产物分析

在 120 mL 选择性液体培养基中,加入终浓度为 600 mg·L⁻¹ 的甲氰菊酯,接种 5 mL PSB07-15 菌液,光照培养,分别于 1、3、5、7、15 d 取样,GC-MS 分析 PSB07-15 降解甲氰菊酯的产物,只检出间苯氧基苯乙腈(图 8),从而推测该菌降解甲氰菊酯的可能方式是作用于甲氰菊酯的酯键处。

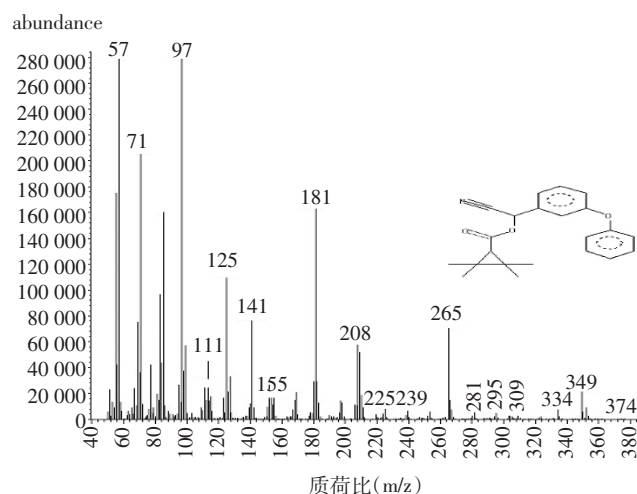


图 7 甲氰菊酯的质谱图

Figure 7 GC/MS spectra of fenpropathrin

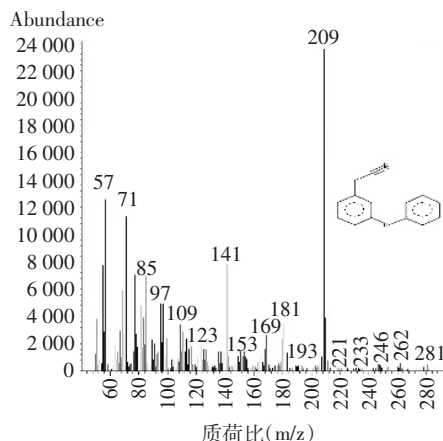


图 8 间苯氧基苯乙腈质谱图

Figure 8 GC/MS spectra of m-phenoxyphenyl-acetonitril

3 结论

(1)通过富集培养法分离出甲氰菊酯降解菌 PSB07-15, 鉴定为沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)。研究了其最适生长条件, 为以后的大规模的发酵生产提供了理论参数。

(2)PSB07-15 对甲氰菊酯的最大耐受浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 15 d 后, 对 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲氰菊酯的降解率为 35.26%。

(3)PSB07-15 以共代谢的方式降解甲氰菊酯, 降解甲氰菊酯途径可能是作用于甲氰菊酯的酯键处。

参考文献:

- [1] 王兆守, 李顺鹏. 拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展[J]. 土壤, 2005, 37(6): 577-580.
WANG Zhao-shou, LI Shun-peng. Study on microbial degradation of synthetic pyrethroid insecticides[J]. *Soils*, 2005, 37(6): 577-580.
- [2] 吴声敢, 王 强, 赵学平, 等. 毒死蜱和甲氰菊酯对家蚕毒性与安全评价研究[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(9): 11-14.
WU Sheng-gan, WANG Qiang, ZHAO Xue-ping, et al. Study on toxicity and safety evaluation of chlorpyrifos and fenpropathrin to bee (*Apis mellifera* L.)[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2003, 24(9): 11-14.
- [3] Almakaw H K, Madbouly M D. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish[J]. *Resource Conservation and Recycling*, 1999, 27(1/2): 105-115.
- [4] 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, 4(1): 123-129.
DING Hai-tao, LI Shun-peng, SHEN Biao, et al. Isolation of pyrethroid degrading strain and its physiological characteristics[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2003, 4(1): 123-129.
- [5] 虞云龙, 盛国英, 傅家谟, 等. 杀灭菊酯的微生物降解及酶促降解[J]. 环境科学, 1997, 18(2): 5-8.
YU Yun-long, SHENG Guo-ying, FU Jia-mo, et al. Microbial and enzymatic degradation of phrethroid[J]. *Environmental Science*, 1997, 18(2): 5-8.
- [6] 许育新, 戴青华, 李晓慧, 等. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 958-960.
XU Yu-xin, DAI Qing-hua, LI Xiao-hui, et al. Isolation and identification of cypermethrin degrading-bacterium CDT3 and its degradation characters[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(5): 958-960.
- [7] 张 涛, 李彦芹, 刘海龙. 6 株光合细菌的富集分离及初步鉴定[J]. 河北理工学院学报, 2006, 28(2): 117-121.
ZHANG Tao, LI Yan-qin, LIU Hai-long. Isolation and identification of photosynthetic bacteria[J]. *Journal of Hebei Institute of Technology*, 2006, 28(2): 117-121.
- [8] 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.
DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic and determinative bacteriology[M]. Beijing: Science press, 2001.
- [9] Hot G J, Krieg R N, Sneath HAP, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed[M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [10] 张德咏, 谭新球, 罗香文, 等. 一株能降解有机磷农药甲胺磷的光合细菌 HP-1 的分离及生物学特性的研究[J]. 生命科学研究, 2005, 9(3): 247-253.
ZHANG De-yong, TAN Xin-qiu, LUO Xiang-wen, et al. Isolation of photosynthetic bacteria HP-1 with degradation of organic-phosphorus insecticides and studies on its biodegradation ability and capacity of increasing growth[J]. *Life Science Research*, 2005, 9(3): 247-253.