

功夫菊酯降解菌 GF-3 的筛选鉴定及其降解特性研究

徐 莲¹, 张丽萍¹, 刘怡辰¹, 吴 莹¹, 刘连成², 沈 标¹

(1. 南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095; 2. 江苏食品学院, 江苏 淮安 223003)

摘 要: 菊酯类农药广泛用于农业害虫的防治, 但对生态环境与食品的污染也是十分严重的, 微生物降解菊酯类农药是消除其污染的主要途径。从农药厂废水排放口附近的活性污泥中分离到一株能利用功夫菊酯为惟一碳源生长的细菌, 命名为 GF-3。根据其生理生化特征和 16S rDNA 序列相似性分析, 将该菌株鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。采用室内培养与液相色谱测定方法, 研究了 GF-3 对功夫菊酯的降解特性。结果表明, GF-3 能有效地降解浓度为 50~600 mg·L⁻¹ 的功夫菊酯, 在 24 h 内对 100 mg·L⁻¹ 功夫菊酯的降解率达到 98.4%。降解功夫菊酯的适宜温度为 30 ℃左右, 适宜 pH 为 7~10。酶的定域试验表明, 降解功夫菊酯的酶属于胞外酶。GF-3 除了降解功夫菊酯外, 还能降解甲氰菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、高效氯氰菊酯等。GF-3 中有 2 个质粒, 但质粒消除试验表明降解功夫菊酯的基因不在质粒上, 而是在其染色体 DNA 上。

关键词: 功夫菊酯的生物降解; 芽孢杆菌 GF-3; 分离鉴定; 生理生化特性

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)07-1545-07

Isolation, Identification and Characteristics of A Cyhalothrin-Degrading Bacterium GF-3

XU Lian¹, ZHANG Li-ping¹, LIU Yi-chen¹, WU Ying¹, LIU Lian-cheng², SHEN Biao¹

(1. Key Laboratory of Microbiological Engineering Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Food Science College, huai'an 223003, China)

Abstract: Pyrethroids were widely used to prevent pests in agriculture and resulted in severely environmental pollution. Microbial degradation was an effective way to remove the pyrethroids contamination from environment. A bacterium, GF-3, capable of utilizing cyhalothrin, a kind of pyrethroids, as sole carbon source was isolated from activated sludge collected from waste water-treating system of cyhalothrin manufacturer. The GF-3 cells were rod, Gram positive with side flagella and spore-forming. The colonies on LB media were milk-white in color, circular, and smooth. The cells were positive for catalase and glutin-degradation test. No pigments were produced. GF-3 strain was identified as *Bacillus* sp. according to its physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence similarity analysis. The GF-3 strain could effectively degrade cyhalothrin ranging of 50~600 mg·L⁻¹. 100 mg·L⁻¹ cyhalothrin could be almost completely degraded by GF-3 strain in 24 h. The optimal pH and temperature for GF-3 strain to degrade cyhalothrin were pH7~10 and 30 ℃ respectively. The enzyme analysis showed that the enzyme responsible for the cyhalothrin degradation was extracellular. Besides cyhalothrin the strain of GF-3 was also able to degrade other pyrethroids such as fenpropathrin, cypermethrin, deltamethrin, beta cypermethrin, fenvalerate and bifenthrin. Degradation of fenpropathrin and cyhalothrin by GF-3 was best among the above pyrethroids, while fenvalerate and bifenthrin were poorly degraded by GF-3. There were two plasmids in GF-3, but none was related to the cyhalothrin degradation because after plasmids curing GF-3 strain could still degrade cyhalothrin.

Keywords: biodegradation of cyhalothrin; *Bacillus* sp. GF-3; isolation and identification; characteristics

功夫菊酯(cyhalothrin), 即三氟氯氰菊酯, 它作为一种广谱高效的拟除虫菊酯类杀虫剂, 广泛用于

农业病虫害的防治, 主要用在果树、茶树、蔬菜等农作物上。拟除虫菊酯类农药具有胃毒和触杀作用, 虽然对作物安全, 但是它们对人、畜有中等毒性, 对水生生物、蜜蜂、家蚕高毒。长期使用该类农药导致害虫产生抗药性, 于是农民加大了用量, 这势必造成了蔬菜和土壤中此类农药的大量残留。由于拟除虫菊酯杀虫剂具有对光、热稳定的特点, 在环境中的半衰

收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 科技部农业微生物菌种资源整理整合及共享试点(2005DKA21201-11)

作者简介: 徐 莲(1979—), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生。

E-mail: 2006116062@njau.edu.cn

通讯作者: 沈 标 E-mail: shenbiao@njau.edu.cn

期较长,很难在自然条件下快速降解,造成对生态环境与食品的污染,影响农产品的质量及人们的身体健康^[1-3]。微生物降解是消除农药污染的一种重要手段,目前对氯氰菊酯、甲氰菊酯等拟除虫菊酯类杀虫剂的微生物降解在蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)和混合微生物的降解等中都已有的详细的研究^[4-13]。而有关功夫菊酯的降解研究相对较少,国内外关于功夫菊酯的降解研究主要侧重于其自然降解过程^[14-18],本文对本实验室筛选的一株降解功夫菊酯的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌 GF-3 的降解性能进行了初步研究,为其在生物修复中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

基础盐培养($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):NaCl 0.5, NH_4NO_3 1.0, K_2HPO_4 1.50, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, pH7.0。LB 培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):酵母膏 5.00, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0。99%功夫菊酯粉剂购自南京红太阳集团有限公司;PCR 所用试剂购于上海申能博彩科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购于 Axygen; pMD19-T vector 购于大连 Takara;胰蛋白胨和酵母粉购于 Oxid;甲醇(色谱纯)购自山东禹王实业有限公司化工分公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 细菌的富集与分离

取采自农药厂废水排放口附近的活性污泥 5.0 g,置于 100 mL 含 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 功夫菊酯的基础盐培养基中,于 $30\text{ }^\circ\text{C}$, $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 5 d,以 5%的接种量转接到相同的培养基中,共转接 3 次,然后取富集液经梯度稀释后涂布于加有 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 功夫菊酯的基础盐培养基平板上, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 d 后,挑取单菌落接种于加有 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 功夫菊酯的基础盐培养基平板上划线纯化,得到纯培养。然后在加有 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 功夫菊酯的液体基础盐培养基中验证其对功夫菊酯的降解效果,确定降解效果后,用 15%甘油保存于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。

1.3 菌株的鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参考文献[19-20]。菌体总 DNA 提取、纯化、回收、酶连、转化方法参见文献[21]。16S rDNA 序列 PCR 扩增引物^[22]正向引物:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3', 反向引物:5'-TAC

CTTGTTACGACTT-3'; $25\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体系含模板 $1\text{ }\mu\text{L}$, dNTP($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$, 引物($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{Taq}$ 缓冲液 $2.5\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2.5\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, 超纯水 $15.7\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$, 30'; $52\text{ }^\circ\text{C}$, 30'; $72\text{ }^\circ\text{C}$, 1.5 min; 循环 29 次, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。采用 PCR 回收试剂盒回收扩增的 16S rDNA 片段,将其酶连到 PMD19-T vector 上;转化大肠杆菌 DH5 α ,进行蓝白斑筛选;挑选白斑菌落,提取质粒,酶切验证插入片段的大小(1.5 kb 左右);测序由 Invitrogene 公司完成,测序结果通过在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),与 GenBank 中的 16S rDNA 序列进行相似性比较。

1.4 种子液培养和生长的测定

从平板上挑取单菌落,接种于 50 mL LB 液体培养基中,菌液于 $30\text{ }^\circ\text{C}$, $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 12 h。细菌的生长量采用分光光度法测定,以波长 $\lambda=600\text{ nm}$ 处的光密度 A_{600} 表示,培养后的菌液经离心、洗涤,再加入等体积无菌水后测定^[23]。将经过上面方法处理的菌液作为种子液。

1.5 功夫菊酯的分析测定

功夫菊酯的提取采用全量提取法^[10]。用 HPLC 测定样品中功夫菊酯的含量^[24-25]。液相色谱条件:Waters Kromasil 100, ODS-C18 反相柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}\times 5\text{ }\mu\text{m}$);流动相:甲醇,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;紫外检测器,波长 218 nm ;进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。取不同功夫菊酯质量浓度($1\sim 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和峰面积的关系曲线: $y=0.0991x^2+1.5546x$, $R^2=0.9991$,根据样品中功夫菊酯的峰面积计算功夫菊酯的质量浓度,初始浓度超过 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品按比例稀释后进行检测。所有数据均为 3 次试验重复的平均值。

1.6 粗酶液的制备

将已培养好的菌液 $6000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清液,菌体用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液(PBS)(pH8.0)洗涤两次,然后在冰浴中用超声波破碎细胞,每次处理 30 s,间隔 5 s,处理总时间为 20 min。细胞破碎液于 $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃沉淀,上清液经冷冻真空干燥制成冻干粉,临用时重新溶于 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液中,得到粗酶液^[7-11]。

1.7 酶活力测定方法

取 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS) $430\text{ }\mu\text{L}$ (pH8.0), $50\text{ }\mu\text{L}$ 功夫菊酯(甲醇溶解, $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $20\text{ }\mu\text{L}$ 粗酶液, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应 5 min 后,用 $20\text{ }\mu\text{L}$ $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 终止反应,加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 二氯甲烷剧烈振荡 5 min 后,

静置分层,收集有机相, N_2 吹干二氯甲烷后加入 $500\ \mu\text{L}$ 甲醇溶解功夫菊酯,于 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 $1\ \text{min}$,取上层有机相于液相色谱检测,通过功夫菊酯的标准曲线,求得功夫菊酯的含量。酶活力单位用相对酶活力单位表示,即 1 个相对酶活力单位(U)为在本试验条件下 $1\ \text{min}$ 内功夫菊酯减少的微摩尔数^[7-11]。

1.8 酶的定域试验

应用渗透休克原理^[26-27],按下列步骤分步提取:取菌液离心($6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$),上清液(S1)冻存;沉淀(P1)用 $10\ \text{mL}\ 10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris·HCl 缓冲液(pH8.0)重悬,离心($6\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$),洗涤2次,上清液(S2)冻存;沉淀(P2)以 $10\ \text{mL}\ 25\%$ 的蔗糖溶液重悬,于 $25\ ^\circ\text{C}$ 振荡 $10\ \text{min}$,离心($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$),上清液(S3)冻存;沉淀(P3)加冷超纯水重悬,在冰浴中振荡 $10\ \text{min}$,离心($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $10\ \text{min}$),上清液(S4)冻存;沉淀(P4)重悬于 $10\ \text{mL}\ 10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris·HCl(pH7.5)中,在冰浴中超声波破碎 $1\ \text{min}$,间隔 $1\ \text{min}$,重复5次,再离心($15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $20\ \text{min}$),上清液(S5)冻存,沉淀(P5)弃去。将S1、S2和S3合并,即为胞外提取液,S4为周质提取液,S5为胞内提取液。

1.9 质粒的提取

采用碱裂解法和煮沸法提取质粒,具体过程参见文献[28]。

1.10 质粒的消除

采用高温和高浓度 SDS 交替处理法^[29]。(1)将菌接种于 $3\ \text{mL}$ LB 培养液中, $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 $16\sim 18\ \text{h}$; (2)取 $50\ \mu\text{L}$ 接种于含 0.05% SDS 的 LB 培养液中, $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 $16\sim 18\ \text{h}$; (3)取 $50\ \mu\text{L}$ 接种于 $5\ \text{mL}$ 不含 SDS 的 LB 培养液内, $43\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 $16\sim 18\ \text{h}$; (4)重复(2)、(3)步; (5)取 $50\ \mu\text{L}$ 接种于 $3\ \text{mL}$ 不含 SDS 的 LB 培养液中, $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养 $16\sim 18\ \text{h}$ ^[30],然后接种在 LB 平板上,经培养后挑取单菌落,接种到 LB 培养液中 $30\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养,用碱裂解法提取质粒 DNA,电泳检测。

2 结果与分析

2.1 功夫菊酯降解菌的筛选与鉴定

通过对活性污泥中微生物的富集、分离和纯化,得到一株对功夫菊酯具有较高降解能力的菌株,命名为 GF-3。该菌株属革兰氏阳性菌,好氧,短杆状,侧生鞭毛,具移动性,芽孢中生,菌落平铺,不规则圆形,乳白色,易挑取,不产色素,接触酶呈阳性,能够液化明胶。根据菌株 GF-3 的 16S rDNA 序列(GenBank 序列

号为 EU219735)及相关菌株的 16S rDNA 序列构建的系统发育树见图 1。结果表明菌株 GF-3 与 *Bacillus* sp. 41KF2b AJ831842 的亲缘关系最近,16S rDNA 序列同源性达 99% ,再结合菌株的生理生化特性将其鉴定为芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.)。

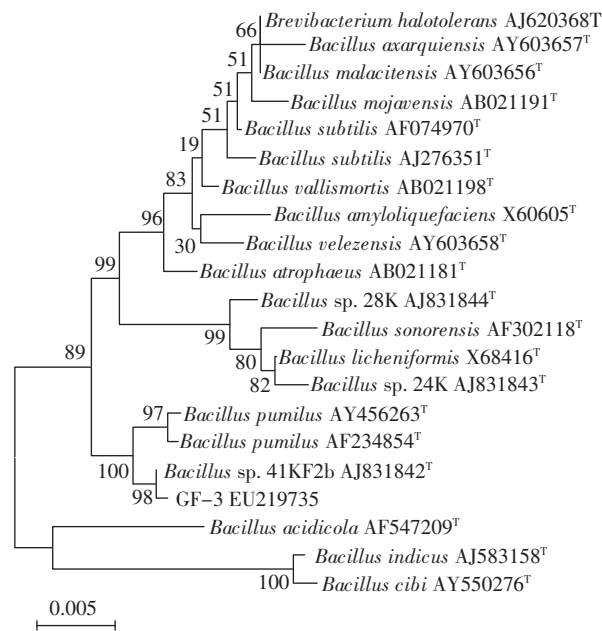


图1 根据 GF-3 及其相关菌株的 16S rDNA 采用邻接法构建的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of GF-3 and related strains

2.2 GF-3 降解功夫菊酯与其生长的关系

在含有 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的功夫菊酯的基础盐培养基中,以 5% 的接种量($A_{600}\approx 1.30$ 的种子液与基础盐培养基的体积之比为 5%)接入 GF-3 种子液($A_{600}\approx 1.30$),于 $30\ ^\circ\text{C}$ 、 $170\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养,每隔 $2\ \text{h}$ 取 1 次样,测定 A_{600} 及功夫菊酯的残留量,结果见图 2。从图中可以看出菌株 GF-3 对功夫菊酯的降解和菌体的生长呈正相关。在培养 $2\ \text{h}$ 后,菌株 GF-3 对功夫菊酯的降解达 67% 左右, $10\ \text{h}$ 后降解约 98.4% 。菌株 GF-3 在以功夫菊酯为惟一碳源生长时进入对数生长期较快,这说明其能很好地应用于生物修复试验。 $10\ \text{h}$ 后,虽然功夫菊酯已经降解完毕,但菌体生长进入稳定期,这可能是由于功夫菊酯降解的中间产物继续提供了菌株生长所需要的碳源。

2.3 GF-3 对不同浓度功夫菊酯的降解

在基础盐培养基中加入不同浓度的功夫菊酯,使其终浓度分别为 50 、 100 、 200 、 300 、 400 、 600 、 $800\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以 5% 的接种量接入 GF-3 种子液($A_{600}\approx 1.30$),

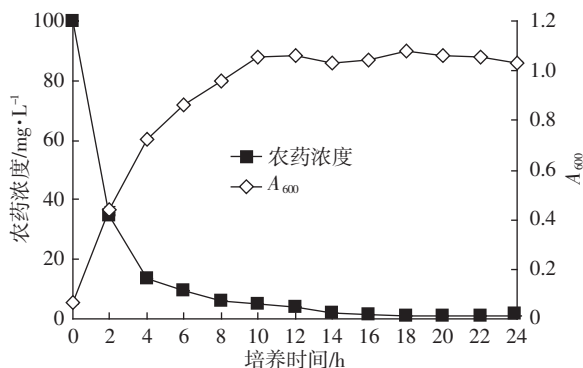


图2 菌株 GF-3 以功夫菊酯为惟一碳源的生长情况

Figure 2 Utilization of cyhalothrin as sole source of carbon for growth by strain GF-3

于 30 ℃, 170 r·min⁻¹ 摇床培养, 培养不同时间后取样, 样品经处理后, 用液相色谱进行检测。由图 3 可见, GF-3 对功夫菊酯的降解速度与浓度有关。随着浓度的增加, 降解速度逐渐下降。GF-3 不仅对低浓度 (50、100 mg·L⁻¹) 的功夫菊酯具有很好的降解效果, 对较高浓度 (400、600 mg·L⁻¹) 的功夫菊酯也能较好的降解, 培养 2 d 后的降解率分别达到 63.1% 和 46.33%, 而对 800 mg·L⁻¹ 的功夫菊酯培养 2 d 的降解率仅为 21.57%, 加大接种量后降解效果稍有提高, 但提高幅度不大, 这可能是因为高浓度的农药对菌体生长产生一定的抑制作用。

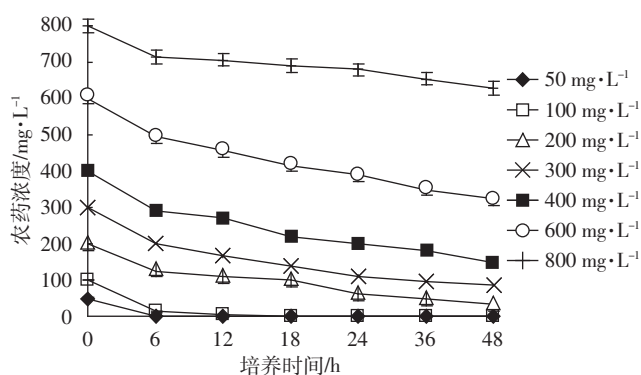


图3 初始浓度对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

Figure 3 Effect of initial cyhalothrin concentration on its degradation by GF-3

2.4 pH 值对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

在 pH 为 5、6、7、8、9、10 的基础盐培养基中, 加入 100 mg·L⁻¹ 的功夫菊酯, 以 5% 的接种量接入 GF-3 种子液 ($A_{600} \approx 1.30$), 于 30 ℃, 170 r·min⁻¹ 摇床培养, 培养 24 h 后取样, 样品经处理后, 用液相色谱进行检

测。结果 (如图 4) 表明, pH 对 GF-3 降解功夫菊酯有较大的影响, 虽然在酸性、中性和偏碱性的环境中 GF-3 都能够降解功夫菊酯, 但在 pH 中性和偏碱性 (pH 7~10) 环境中的降解效果较好, 培养 24 h 后, 功夫菊酯的降解率均达到 98% 左右。而酸性环境 (pH 5~6) 明显抑制 GF-3 对功夫菊酯的降解, 培养 24 h 功夫菊酯的降解率不到 80%。

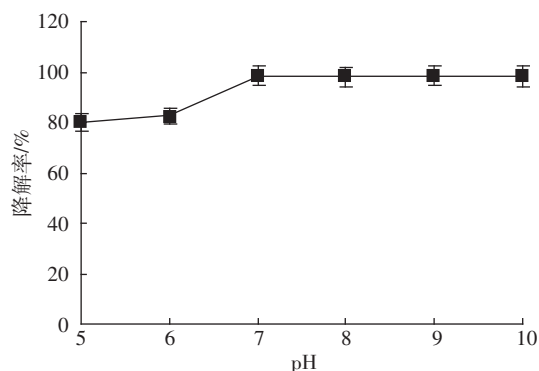


图4 pH 值对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

Figure 4 Effect of pH on cyhalothrin degradation by strain GF-3

2.5 温度对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

在基础盐培养基中加入 100 mg·L⁻¹ 的功夫菊酯, 以 5% 的接种量接入 GF-3 种子液 ($A_{600} \approx 1.30$), 于不同温度下, 170 r·min⁻¹ 摇床培养 24 h 取样, 样品经处理后, 用 1.5 节方法进行检测, 结果见图 5。30 ℃ 条件下最适宜 GF-3 对功夫菊酯的降解, 25 ℃ 下的降解也比较快, 而 20 ℃ 下降解速度明显减慢。培养 1 d 后, GF-3 在 20、25、30 ℃ 下对功夫菊酯的降解分别为 76.1%、89.4%、98.6%。40 ℃ 明显抑制 GF-3 对功夫菊酯的降解, 培养 1 d 后, 功夫菊酯的降解率只有 65.1%。

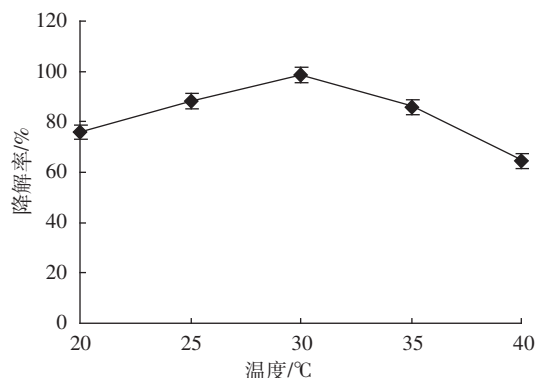


图5 温度对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

Figure 5 Effect of temperature on cyhalothrin degradation by strain GF-3

2.6 接种量对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

在基础盐培养基中加入 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的功夫菊酯,以 1%、3%、5%、10% 和 15% 的接种量接入 GF-3 的种子液($A_{600} \approx 1.30$),于 30°C , $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 24 h 取样,样品经处理后,用 1.5 节方法进行检测,结果见图 6。虽然总的来说,接种量与功夫菊酯的降解率呈正相关,但是影响不大,接种量在 3%~15% 范围内,功夫菊酯的降解率均较高,24 h 都能够达到 98% 左右;1% 的接种量对功夫菊酯的降解稍有影响,但是 24 h 的降解率也能达到 96% 以上。这可能与菌株的高降解能力有关。

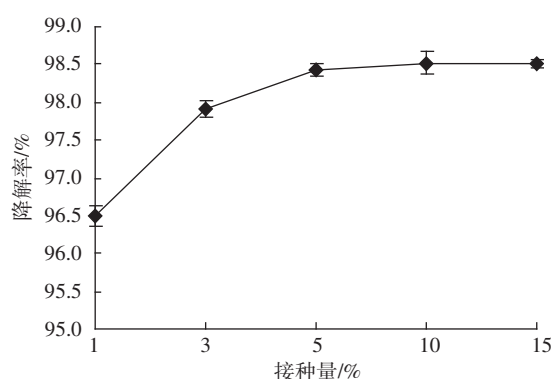


图 6 接种量对 GF-3 降解功夫菊酯的影响

Figure 6 Effect of inoculum on cyhalothrin degradation by strain GF-3

2.7 GF-3 对不同拟除虫菊酯的降解

在基础盐培养基中分别加入甲氰菊酯、功夫菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、联苯菊酯、氰戊菊酯,使其终浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以 5% 的接种量接入 GF-3 的种子液($A_{600} \approx 1.30$),于 30°C , $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养,每天取样,样品经处理后,用 1.5 方法进行检测,结果见图 7。GF-3 对不同拟除虫菊酯的降解效果差异较大,对功夫菊酯、甲氰菊酯的降解效果最好,对氯氰菊酯、溴氰菊酯、高效氯氰菊酯也具有较好的降解效果,而对氰戊菊酯和联苯菊酯的降解效果相对较差,这可能是由于各种拟除虫菊酯结构上的差异所造成的。

2.8 降解酶的定域试验

从图 8 中可见胞外酶活力为 $35.35 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,周质空间内仅有 $0.28 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酶活,胞内酶活力为 $11.828 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,由此可以推测,功夫菊酯降解酶应该属于胞外酶。

2.9 降解基因的定位

将用碱裂解法从 GF-3 中提取的提取物通过电泳检测发现在约 6 557 bp 和 3 500 bp 处有质粒条带,

如图 9 所示。通过质粒消除试验消除了该质粒,挑取消除质粒的单菌落接种到含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 功夫菊酯的基础盐培养基中,于 30°C , $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养,24 h

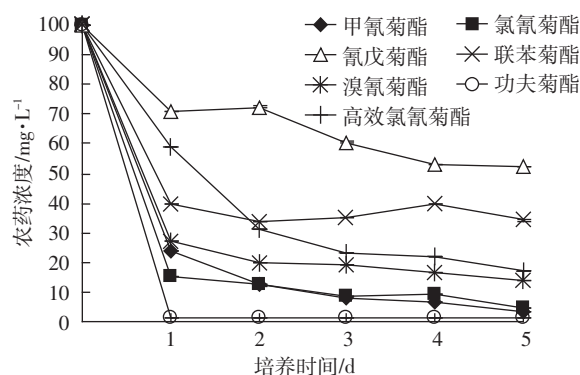


图 7 菌株 GF-3 对不同拟除虫菊酯的降解

Figure 7 Degradation of different pyrethroid insecticides by strain GF-3

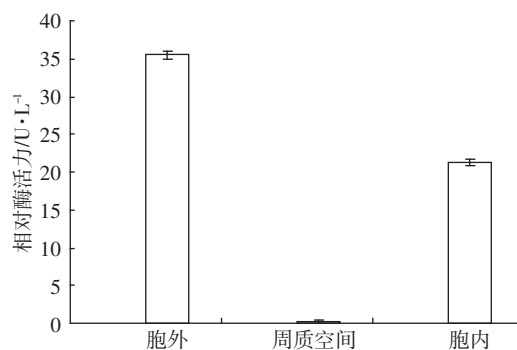
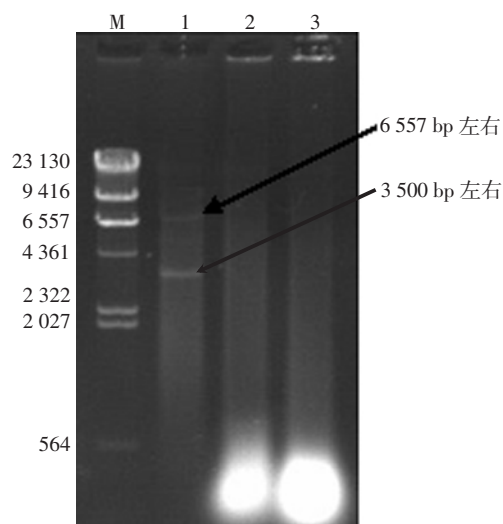


图 8 降解酶的定域试验

Figure 8 Distribution of the degrading-enzyme in the GF-3



M: λ /Hind III; 1: GF-3 质粒; 2, 3: GF-3 质粒消除

图 9 功夫菊酯降解菌 GF-3 的质粒电泳图谱

Figure 9 Electrophoresis graph of the plasmid in GF-3

后取样,样品经处理后,用 1.5 节方法进行检测,同时检测经过相同处理的 GF-3 不消除质粒对照和不加菌对照 CK。发现质粒消除后 GF-3 降解功夫菊酯的效果 98.1%与消除前 GF-3 处理 98.4%相比差别不大,见图 10。说明该降解菌的降解基因应该存在于其染色体 DNA 上。

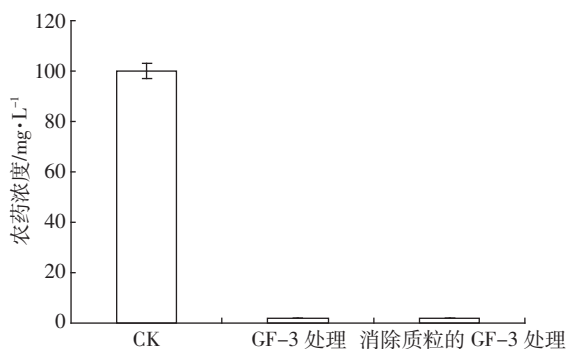


图 10 GF-3 对 100 mg·L⁻¹ 功夫菊酯的降解

Figure 10 Degradation of 100 mg·L⁻¹ cyhalothrin by GF-3

3 结论

(1)从农药厂排污口的活性污泥中分离到 1 株能以功夫菊酯为惟一碳源生长且将其降解的细菌,经鉴定属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌,命名为 GF-3;

(2)GF-3 降解功夫菊酯的最适 pH 值为 7~10,最适温度为 30℃左右,降解功夫菊酯的速率和起始接种量关系不大;

(3)GF-3 还能降解氯氰菊酯、溴氰菊酯、高效氯氰菊酯、氰戊菊酯和联苯菊酯等多种拟除虫菊酯类杀虫剂;

(4)酶的定域试验表明,降解酶以胞外酶为主;

(5)GF-3 中存在大小为 6 557 bp 和 3 500 bp 左右的质粒,质粒消除实验发现功夫菊酯的降解与质粒无关。

参考文献:

- [1] 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 in to silkworm (*Bombyx mori* L.)[J]. *Pesticide Science and Administration Sinica*, 2003, 24(9): 11-14.
- [2] 郭敦成. 农药毒理及其应用[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 1984.
GUO Dun-cheng. *Pesticide toxicology and utilization*[M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press Sinica, 1984.
- [3] Hasan Basri Ila, Mehmet Topaktas, Eyyup Rencuzogullari, et al. Genotoxic potential of cyfluthrin[J]. *Mutation Research*, 2008, 656: 49-54.
- [4] Maloney S E. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate and fluvalinat[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 2874-2876.
- [5] Maloney S E. Transformation of synthetic pyrethroid insecticides by a thermophilic *Bacillus* sp.[J]. *Arch Microbiol*, 1992, 158: 282-286.
- [6] Maloney S E. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 2007-2013.
- [7] 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. Degradation of fenvalerate by microorganism and its enzyme[J]. *Environmental Science Sinica*, 1997, 18(2): 5-8.
- [8] 虞云龙,陈鹤鑫,樊德方,等.拟除虫菊酯类杀虫剂的酶促降解[J]. 环境科学学报, 1998, 18(2): 208-211.
YU Yun-long, CHEN He-xin, FAN De-fang, et al. Enzymatic degradation of synthetic pyrethroid insecticides[J]. *Environmental Science Sinica*, 1998, 18(2): 208-211.
- [9] 林 淦,姚 威.阴沟肠杆菌 W-1 粗酶液对氯氟氰菊酯的降解效果及其作用机理[J]. 江苏农业科学, 2006, 3: 191-198.
LIN Gan, YAO Wei. Characteristics and react mechanisms of cyhalothrin degrading enzyme of enterobacter cloacae W-1[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences Sinica*, 2006, 3: 191-198.
- [10] 洪源范,洪 青,武 俊,等.甲氰菊酯降解菌 JQL4-5 的分离鉴定及降解特性研究[J]. 环境科学, 2006, 27(10): 2100-2104.
HONG Yuan-fan, HONG Qing, WU Jun, et al. Isolation, identification and characteristics of a fenpropathrin-degrading bacterium JQL4-5[J]. *Environmental Science Sinica*, 2006, 27(10): 2100-2104.
- [11] 王卓娅,刘玉焕,李 荷.克雷伯氏菌 ZD112 氯氰菊酯降解酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3): 277-281.
WANG Zhuo-ya, LIU Yu-huan, LI He. Molecular cloning and bioinformatic analysis of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase from *Klebsiella* sp. Strain ZD112[J]. *Journal of Guangdong College of Pharmacy Sinica*, 2008, 24(3): 277-281.
- [12] 林 淦,李玉清,黄升谋.混合微生物对氰戊菊酯的降解作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13829-13830.
LIN Gan, LI Yu-qing, HUANG Sheng-mou. Degradation of mixed microbe on fenvalerate[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences Sinica*, 2008, 36(31): 13829-13830.
- [13] 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): 958-963.
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-Environmental Science*, 2004, 23(5): 958-963.
- [14] Osvalda Senneca, Fabio Scherillo, Alfredo Nunziata. Thermal degradation of pesticides under oxidative conditions[J]. *Appl Pyrolysis*, 2007, 80: 61-76.
- [15] James Starr, Stephen Graham, Daniel Stout II, et al. Pyrethroid pesti-

- cides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers[J]. *Environmental Research*, 2008, 108: 271-279.
- [16] 李科明, 覃伟权, 李修炼, 等. 三氟氯氰菊酯在绞股蓝上的残留动态研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(7): 81-84.
- LI Ke-ming, TAN Wei-quan, LI Xiu-lian, et al. Dissipation of cyhalothrin in gynostemma pentaphyllum[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin Sinica*, 2008, 24(7): 81-84.
- [17] 梁俊, 李海飞, 刘静, 等. 苹果中氯氟氰菊酯残留降解研究[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 661-665.
- LIANG Jun, LI Hai-fei, LIU Jing, et al. Study on the degradation trends of cyhalothrin in apple fruit[J]. *Journal of Fruit Science Sinica*, 2008, 25(5): 661-665.
- [18] 郭建辉, 张奇泓, 杨淑娟, 等. 菜用大豆三氟氯氰菊酯残留动态研究[J]. 安全与环境学报, 2008, 8(5): 1-4.
- GUO Jian-hui, ZHANG Qi-hong, YANG Shu-juan, et al. On residue dynamics of cyhalothrin in vegetable soybean[J]. *Journal of Safety and Environment Sinica*, 2008, 8(5): 1-4.
- [19] 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.
- DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Taxonomic outline of the freq. prokaryotes[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410.
- [20] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 1-7.
- YANG Su-sheng. Systemic bacteriology sinica[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1997: 1-7.
- [21] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 39-40.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R E. YAN Zi-ying, WANG Hai-lin translate. Current protocols in molecular biology[M]. Beijing: Science Press, 1999: 39-40.
- [22] W D Hiorns, B A Methé, S A Nierzwicki-Bauer, et al. Bacterial diversity in Adiondack mountain lakes as revealed by 16s rRNA gene sequences[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2957-2960.
- [23] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1988: 75-78.
- FAN Xiu-rong, LI Guang-wu, SHEN Ping. Microbiology Laboratory Precedure Sinica[M]. Beijing: Higher Education Press, 1988: 75-78.
- [24] 万宏剑, 钱晓晓. 2. 5% 高效氯氟氰菊酯微乳剂的高效液相色谱法测定[J]. 农药科学与管理, 2007, 25(4): 8-10.
- WAN Hong-jian, QIAN Xiao-xiao. Quantitative analysis of lambda-cyhalothrin by HPLC[J]. *Pesticide Science and Administration Sinica*, 2007, 25(4): 8-10.
- [25] 林子俺, 龚巧燕, 谢增鸿. 高效液相色谱测定蔬菜中拟除虫菊酯类农药残留[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2008, 36(1): 122-125.
- LIN Zi-an, GONG Qiao-yan, XIE Zeng-hong. Determination of pyrethroid multi-residues in vegetables by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)*, 2008, 36(1): 122-125.
- [26] 戴树桂, 庄源益, 陈勇生, 等. 两种假单胞菌中二氯酚降解酶活性及其定域研究[J]. 环境科学学报, 1996, 16(2): 173-178.
- DAI Shu-gui, ZHUANG Yuan-yi, CHEN Yong-sheng, et al. Study on enzyme activity and distribution in two strains of bacteria by dichlorophenol degradation[J]. *Environmental Science Sinica*, 1996, 16(2): 173-178.
- [27] Neu H C, Heppel L A. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts[J]. *J Biol Chem*, 1965, 240(9): 3685-3692.
- [28] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1995.
- T Maniatis, E F Fritsch, J Sambrook. JIN Dong-yan, LI Meng-feng, Translate. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. The Second Current Protocols Publication, Beijing: Science Press, 1995.
- [29] 刘渠, 白松涛, 叶梅君, 等. G⁺球菌及 G⁻杆菌质粒消除方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 1998, 8(5): 275-278.
- LIU Qu, BAI Song-tao, YE Mei-jun, et al. Plasmid eliminating method of G⁺ coccus and G⁻ bacillus[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 1998, 8(5): 275-278.
- [30] 杨春梅, 马治平, 王志鹏, 等. 黄连素、溴化乙锭、十二烷基硫酸钠对痢疾杆菌耐药质粒的消除作用[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(2): 64-65.
- YANG Chun-mei, MA Zhi-ping, WANG Zhi-peng, et al. Effect of r-plasmid of bacillus dysenteriae eliminating by berberine, ethidium bromide and ethidium bromide[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2000, 15(2): 64-65.