

廖敏, 张海军, 谢晓梅. 2009 降解拟除虫菊酯类农药的缺陷假单胞菌的分离、鉴定及降解特性研究 [J]. 环境科学学报, 29(7): 1388– 1394

Liao M, Zhang H J, Xie X M. 2009. Isolation, identification and degradation characteristics of a *Pseudomonas diminuta* strain able to degrade pyrethroid pesticides[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(7): 1388– 1394

降解拟除虫菊酯类农药的缺陷假单胞菌的分离、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土水资源与环境研究所, 杭州 310029
- 2 浙江省亚热带土壤与植物营养重点研究实验室, 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

收稿日期: 2008-10-15 修回日期: 2009-02-26 录用日期: 2009-05-19

摘要: 采用室内培养试验的方法, 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 株可同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的高效菌株 M 5R 14 经鉴定为缺陷假单胞菌 (*psaudomonas diminuta*), 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球形杆菌, 大小为 (0.3~0.7) μm, 能够以 3 种菊酯为唯一碳源进行生长. 在通气、pH 6.0~7.0 温度 30℃、接菌量 (OD_{415nm} = 0.2) 和转速 180 r min⁻¹ 的环境条件下, 对含联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯各 100 mg L⁻¹ 的混合培养基培养 3d 发现该菌对这 3 种菊酯的降解效果最好, 降解率分别为 43.78%、43.91% 和 43.75%, 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 97.6、106.6 和 101.9h. 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; 缺陷假单胞菌

文章编号: 0253-2468 (2009) 07-1388-07 中图分类号: X172 文献标识码: A

Isolation, identification and degradation characteristics of a *Pseudomonas diminuta* strain able to degrade pyrethroid pesticides

LIAO Min^{1, 2}, ZHANG Haijun^{1, 2}, XIE Xiaomei^{3, *}

- 1 Institute of Soil and Water Resource and Environment Science, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029
- 2 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropical Soil and Plant Nutrition, Hangzhou 310029
- 3 Research Center for Eco-Environmental Sciences, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029

Received 15 October 2008 **received in revised form** 26 February 2009; **accepted** 19 May 2009

Abstract A bacterial strain labeled M5R14 was isolated from the sludge in the watercourse of the Pesticide Factory of Hangzhou and was identified as *Pseudomonas diminuta*. The strain showed highly efficient degradation of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin. The physiological characteristics of the strain were investigated, and the bacterium is a gram-negative aerobic coccobacillus of size 0.3~0.7 μm, which is capable of utilizing bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin as sole carbon sources. The degradation of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin by strain M5R14 was highest under the conditions of aeration, 30℃, inoculation to OD_{415nm} = 0.2, pH 6.0~7.0, pesticide concentration 100 mg L⁻¹ and shaking speed 180 r min⁻¹. Under such conditions, in culture medium with 100 mg L⁻¹ bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin together, the degradation ratios are 43.78%, 43.91% and 43.75% after incubating for 3 days. Furthermore, the degradation processes fit a first-order kinetic equation and the half lives (*t*_{1/2}) were 97.6, 106.6 and 101.9 h, respectively. The ability of *Pseudomonas diminuta* M5R14 to degrade bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin is positively correlated to the amount of inoculum, shaking speed and aeration.

Keywords synthetic pyrethroid insecticides; biodegradation; *Pseudomonas diminuta*

基金项目: 浙江省科技计划项目 (No. 2006C33052)

Supported by the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 2006C33052)

作者简介: 廖敏 (1970—), 男, 副教授, E-mail: liaomin@zju.edu.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: xiaxiaomei@zju.edu.cn

Biography: LIAO Min (1970—), male, associate professor; * **Corresponding author** E-mail: xiaxiaomei@zju.edu.cn

1 引言 (Introduction)

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 2 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 (Giri *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2004). 但由于这类农药在环境中存在稳定, 降解速度慢且残留量高, 因而带来了一定的环境和食品安全问题. 特别是我国加入 WTO 后, 国外针对我国入世而颁布的农产品中农药最大残留量 (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的结果. 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 (郑金来等, 2001), 其中, 降解是制约农药残留量的关键过程 (Jin *et al.*, 1998). 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 (Courteix *et al.*, 1995; Sogorb *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). 现有研究也已发现大批能降解或转化农药的微生物类群, 如细菌、放线菌、真菌和藻类等 (朱福兴等, 2004). 在对拟除虫菊酯类农药降解研究中发现, 假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) (Musumeci *et al.*, 1994)、肠杆菌属 (*Ehtherobacte* sp.) (王兆守等, 2005)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes* sp.) (虞云龙等, 1997) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) (Malony *et al.*, 1992) 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研究报道还相对较少 (Cui *et al.*, 2001). 本研究筛选出 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高效降解的菌株 M5R14 并对其进行分析鉴定和降解特性研究, 以期为其应用于农产品拟除虫菊酯类农药残留控制提供科学依据.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 试验材料

富集培养基: 蛋白胨 10 g NaCl 11.0 g KH_2PO_4 1.0 g H_2O 1000 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 1000 mL, pH 7.0 农药储备液: 将 95.8% 的联苯菊酯 2.61 g 溶于 30 mL 99.5% 的丙酮 (分析纯), 20% 的甲氰菊酯乳油原液 12.5 g 溶于 30 mL 99.7% 的无水乙醇 (分析纯), 以及 94% 的氯氰菊酯 2.66 g 溶于 30 mL 99.7% 无水乙醇 (分析纯). 分别加入农药 1.5 倍 (质量比) 的 Tween-80 定容至 50 mL, 分别获得含 50 g 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 1000 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 (丁海涛等, 2003).

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.

2.2 试验方法

2.2.1 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 r min^{-1} 摇床培养 7 d 后, 按 10% 的接种量转接到第 2 批含农药的富集培养基 (联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯浓度依次为 100、150 和 200 mg 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 mg 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 mg 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 (王兆守, 2003).

2.2.2 菌种鉴定 形态特征鉴定主要通过革兰氏染色、荚膜染色 (沈萍等, 2002) 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, 生理生化特性鉴定参照文献 (东秀珠, 2001). 分子水平鉴定采用美国 MIDI 公司的 Sherbck 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 (吴愉萍等, 2006), 定性 (种类) 和定量 (含量) 地分析微生物的脂肪酸成份并生成脂肪酸图谱, 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 (李旭春等, 2008; Adriana *et al.*, 2007).

2.2.3 降解菌对3种菊酯农药降解效能的测定 将分离纯化后的菌种以菌量 $OD_{415nm} = 0.2$ 接种到含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 100 mg 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 r min^{-1} 振荡培养 3 d 后,吸取 2 mL 培养液依次用 4 、 4 和 2 mL 的石油醚萃取 3 次,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 (王兆守, 2003). 气相色谱检测参数 (Beltran *et al.*, 2003): HP-5 色谱柱 ($30\text{ mm} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$), 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 mL min^{-1} ,分流比为 $1:10$,载气为 N_2 (99.999%),进样量为 $1\text{ }\mu\text{L}$.

降解率 = (对照样品残留量 - 处理样品残留量) / 对照样品残留量 $\times 100\%$ (方玲, 2000).

2.2.4 菌株对3种菊酯农药降解的最佳条件 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 mg L^{-1} 作为碳源,接种量 $OD_{415nm} = 0.2$, 30°C 、 $\text{pH } 7.0$ 振荡速率 180 r 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 (OD_{415nm} 为 0.05 、 0.10 、 0.15 、 0.20 和 0.40)、农药浓度 (50 、 100 、 150 、 200 和 250 mg 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 r 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.

2.2.5 菌株生长量 (OD_{415nm}) 和 3 种菊酯农药降解关系曲线的测定 将菌株等量置于 100 mL 含 100 mg L^{-1} 的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的混合基础培养基中,于 30°C 、 180 r 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后测 OD_{415nm} (培养基培养的菌液需在 8000 r 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.

3 结果 (Results)

3.1 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及较稳定降解率的细菌,命名为 M5R14.在通气、 $\text{pH } 7.0$ 温度 $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ 、接种量 $OD_{415nm} = 0.2$ 转速 180 r min^{-1} 条件下培养 3 d 发现菌株 M5R14 对浓度均为 100 mg L^{-1} 的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率分别为 43.78% 、 43.91% 和 43.75% .

3.2 菌株鉴定

3.2.1 菌株 M5R14 的基本形态及生理生化特征 经鉴定 M5R14 为球形无芽孢、无鞭毛的革兰氏阴性菌,菌体大小 $0.3 \sim 0.7\text{ }\mu\text{m}$ (图 1). 固体培养基上菌落呈灰黄色、不透明的圆形,表面隆起、光滑、湿润,边缘完整.乙酰甲基甲醇生成试验 (V-P) 反应阳性,氧化酶和过氧化氢酶阳性,不能水解淀粉,能液化明胶,没有硝化作用,可利用乙酸盐、丁酸盐、D-和 L-丙氨酸,其他生理生化特性见表 1.

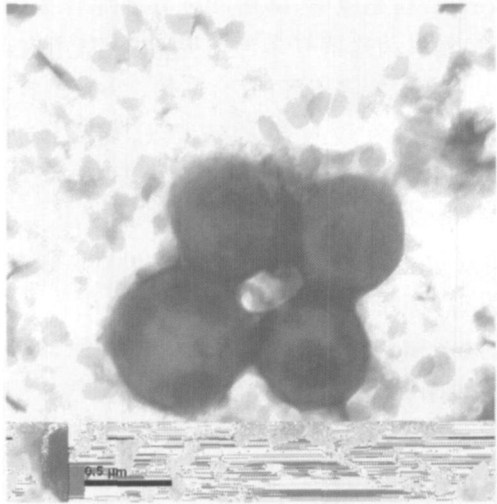


图 1 菌株 M5R14 的电镜照片 ($\times 50000$)

Fig. 1 Electron micrographs of the bacterial strain M5R14

表 1 菌株 M5R14 的生理生化特性

Table 1 Physiological characteristics of the bacterial strain M5R14			
生理生化测试	结果	生理生化测试	结果
革兰氏染色	-	V-P 试验	+
过氧化氢酶	+	氧化酶	+
精氨酸双水解酶	+	鸟氨酸脱羧酶	+
水解淀粉	-	乙酸盐	+
D-木糖	+	丙二酸盐	+
D-阿拉伯糖	-	D-葡萄糖产酸	-
麦芽糖	-	乳糖产酸	-
柠檬酸盐	+	蔗糖产酸	-
水杨酸	-	液化明胶	-
丙酸盐	+	肌醇产酸	-
DL-乳酸盐	+	硫化氢	-
L-丙氨酸	+	反硝化	-

注: + 阳性反应; - 阴性反应

3.2.2 菌株 M5R14 的鉴定 根据 Sherlock MS 软件系统对菌株 M5R14 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 M5R14 为假单胞菌属中的缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*), SI=0.926

3.3 菌株 M5R14 对 3 种菊酯农药的最佳降解条件

3.3.1 接种量对菌株 M5R14 同时降解 3 种菊酯农药的影响 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 3d 后, 3 种菊酯农药的降解率见图 2a 由图 2a 可以看出, 菌株 M5R14 对 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的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 $\text{OD}_{415\text{nm}}$ 值呈正相关, 可决系数分别为 0.92、0.9129 和 0.9238 接种量 $\text{OD}_{415\text{nm}} > 0.2$ 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. 因此, 从降解效果及降解率与菌量比值的降解率来看, 接种量以 $\text{OD}_{415\text{nm}}$ 值 0.15~0.20 为宜.

3.3.2 农药浓度对产菌株 M5R14 同时降解 3 种菊酯农药的影响 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 $\text{OD}_{415\text{nm}} = 0.20$ 培养 3d 后, 3 种菊酯农药的降解率见图 2b 从图 2b 可以看出, 菌株 M5R14 对 3 种菊酯农药的同时降解率随着农药浓度的增加存在较大差异, 3 种菊酯农药浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的混合培养基中, 菌株 M5R14 对 3 种菊酯农药的同时降解率最高, 降解率在 43% 以上; 农药浓度高于或低于 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株 M5R14 对 3 种菊酯农药的降解率下降. 可见较高或较低农药浓度可导致菌株 M5R14 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.

3.3.3 温度对菌株 M5R14 同时降解 3 种菊酯农药的影响 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 $\text{OD}_{415\text{nm}} = 0.20$ 菌种后, 不同温度梯度下培养 3d 3 种菊酯农药的降解率如图 2c 所示. 由图 2c 可知, 菌株 M5R14 在温度 30°C 时对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解效果最好, 分别达到 43.78%、43.91% 和 43.75%; 温度高于或低于 30°C 时, 菌株 M5R14 对 3

种菊酯同时降解效果受到抑制, 降解率下降. 这可能是因为低温延长菌株进入对数增长期的时间, 而高温不利于菌株存活, 同时表明该菌株为中温型生活环境的细菌.

3.3.4 pH 值对菌株 M5R14 同时降解 3 种菊酯农药的影响 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 $\text{OD}_{415\text{nm}} = 0.20$ 菌量, 培养 3d 后, 3 种菊酯农药的降解率见图 2d 从图 2d 可以看出, 在 pH 3.0~10.0 之间, 菌株 M5R14 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 pH 6.0~7.0 时, 对 3 种菊酯农药同时降解效率最大. 以培养基 pH 7.0 为例, 菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解率分别 43.78%、43.91% 和 43.75%; pH 值低于或高于 6.0~7.0 时, 菌株 M5R14 对 3 种菊酯农药降解效果受到抑制, 降解率下降. 这表明菌株 M5R14 为中性菌, 在 pH 6.0~7.0 的条件下可能有助于降解酶的合成与表达, 因而降解效率最高.

3.3.5 振荡速率对菌株 M5R14 同时降解 3 种菊酯农药的影响 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 $\text{OD}_{415\text{nm}} = 0.2$ 菌种, 培养 3d 后, 3 种菊酯农药的降解率见图 2e 由图 2e 可知, 随着振荡速率的加快, 瓶内溶解氧也增加, 菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解能力相应增强. 3 种农药降解率与振荡速率呈正相关, 可决系数分别为 0.9856、0.9464 和 0.9551, 这表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.

3.3.6 装液量对菌株 M5R14 同时降解 3 种菊酯农药的影响 于 250mL 三角瓶中, 装不同量含有联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且接种 $\text{OD}_{415\text{nm}} = 0.2$ 菌量的混合培养基, 培养 3d 后, 3 种菊酯农药的降解率见图 2f 由图 2f 可知, 菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率与装液量呈负相关, 与通气量呈正相关, 可决系数分别为 0.9273、0.9681、0.9397. 这也表明该菌株为好氧型, 瓶中装液量的增加导致通气体积的减少不利于菌株 M5R14 对 3 种菊酯农药的降解.

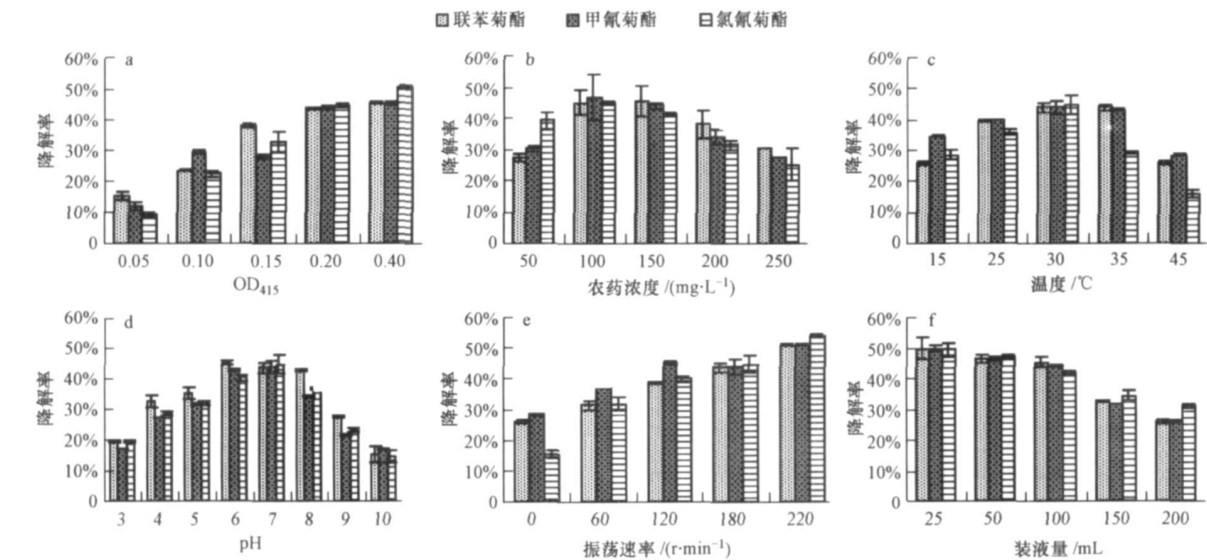


图 2 不同条件对菌株 M 5R14同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的影响 (a OD_{415nm}; b 农药浓度; c 温度; d pH; e 振荡速率; f 装液量)

Fig 2 Effect of different conditions on the bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin degradation rates by strain M 5R14 in the same medium (a OD_{415nm}, b pesticides concentration, c temperature, d pH, e shaker speed, f liquid volume)

3 4 菌株 M 5R14 生长 (OD_{415 nm}) 与同时降解 3 种菊酯农药的关系

菌株生长和农药降解率的关系曲线 (图 3) 表明, 菌株生长的对数期为 12~48 h 稳定期在 48~84 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 (84 h 以后), 农药降解率增长趋势也趋向减缓. 同时, 在联苯菊酯、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 (王兆守, 2003). 该结果说明, 菌株 M 5R14 能够同时有效地降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯农药, 并以该农药为唯一碳源进行生长.

3 5 菌株 M 5R14 对 3 种菊酯农药降解的动力学分析

为了解菌株 M 5R14 对 3 种菊酯农药的降解行为, 研究中采用一级降解动力学模型, 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 (Chang *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2004), 拟合结果如表 2 所示.

其中一级降解动力学模型为:

$$C_t = C_0 \times e^{-kt} \tag{1}$$

半衰期为:

$$T_{1/2} = \ln 2 / k \tag{2}$$

式中, C_t 为 t 时刻 3 种菊酯农药的残留量 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C_0 为样品的初始浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); k 为降解速率常数 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

由表 2 可知, 菌株 M 5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和甲氰菊酯的同时降解符合一级降解动力学模型, 可决系数 R^2 分别为 0.9795、0.9367 和 0.9332. 通过计算得出菌株 M 5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和甲氰菊酯的降解速率常数 (k) 分别为 0.0071、0.0065 和 0.068 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 97.6、106.6 和 101.9 h.

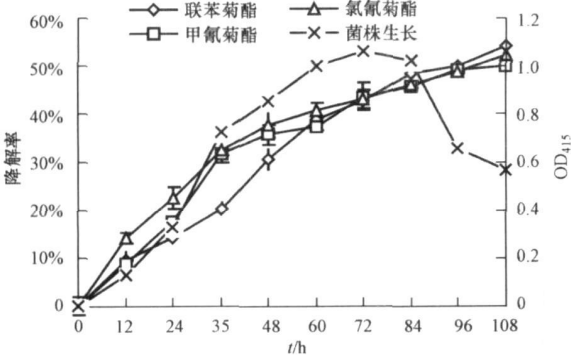


图 3 菌株 M 5R14 生长量 (OD_{415nm}) 与降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的关系曲线

Fig 3 The relationship between the growth (OD_{415nm}) of the strain M 5R14 and the degradation rate of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin

表 2 菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯降解的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of degradation of bifenthrin fenpropathrin and cypermethrin by strain M5R14

药剂名称	动力学方程	k ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	可决系数 R^2	半衰期 /h
联苯菊酯	$y = 9.1798e^{-0.0071x}$	0.0071	0.9795	97.6
甲氰菊酯	$y = 7.8731e^{-0.0065x}$	0.0065	0.9367	106.6
氯氰菊酯	$y = 8.9173e^{-0.0068x}$	0.0068	0.9232	101.9

注: y 为菊酯农药残流量 (mg L^{-1}); x 为降解时间 (h)。

4 讨论 (Discussion)

微生物降解或生物转化是有机污染物污染环境修复的核心 (王兆守等, 2005), 获得高效降解菌是开展生物修复工作的前提. 虽然微生物降解有机污染物受到有微生物自身性质、农药结构以及环境条件 (pH、温度和底物浓度等) 的影响 (张丽珍等, 2007), 但微生物降解或生物转化仍是有机物污染环境修复的首选手段. 丁海涛等 (2003) 等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、氯氰菊酯和溴氰菊酯农药的菌株 qw5, 其最佳降解环境条件是在通气、pH 7~8 温度 30℃ 左右, 培养 5d 氰戊菊酯、氯氰菊酯和溴氰菊酯的降解率分别为 53.8%、41.2% 和 61.7%. 本研究筛选的缺陷假单胞菌菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯同时降解结果表明, M5R14 同样具有降解菊酯类农药的高效性和广谱性, 研究结果同时也证明了其降解效率受到通气、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 3d 后, 菌株 M5R14 对 100 mg L^{-1} 联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解率分别为 43.78%、43.91% 和 43.75%, 且能够以 3 种菊酯为唯一碳源生长. 研究结果还表明, 菌株 M5R14 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. 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 (王兆守, 2003). 本研究结果表明 (图 3), 在缺陷假单胞菌菌株 M5R14 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, 菌株的生长和农药的降解呈现出良好的同步关系. 随后菌株生长进入衰亡期, 受周围不利因素 (代谢物积累等) 的

影响, 仍存活的细胞, 其降解力受到抑制, 农药降解率增长趋势也趋向减缓. 同时发现, 菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解过程满足一级降解动力学方程模型, 半衰期 ($t_{1/2}$) 为 97.6、106.6 和 101.9 h 林金科等 (2008) 研究联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯在铁观音茶叶新梢上残留的自然降解动态时发现 3 种菊酯的半衰期分别为 6、5 和 4 d 与此结果相比, 本研究分离筛选的缺陷假单胞菌菌株 M5R14 是一株可同时对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解的高效菌株, 而其降解半衰期相对更短, 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.

5 结论 (Conclusions)

1) 从拟除虫菊酯类农药生产车间下水道驯化污泥中分离得到 1 株能同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的高效菌株 M5R14 经 Sherlock MS 系统鉴定为缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*).

2) 通过摇瓶试验得到菌株 M5R14 在通气、pH 6.0~7.0 温度 30℃、 $\text{OD}_{415\text{nm}} = 0.2$ 农药浓度 100 mg L^{-1} 、转速 180 rpm 环境条件下, 对 3 种菊酯类农药的降解效果最好. 菌株 M5R14 的降解效果与菌量 ($\text{OD}_{415\text{nm}}$)、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, 菌株 M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的同时降解过程均满足一级动力学方程模型, 速率常数 (k) 分别为 0.0071 、 0.0065 和 $0.0068 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$, 半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 97.6、106.6 和 101.9 h

责任作者简介: 谢晓梅 (1970—), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事环境化学和环境微生物与毒理学方面的研究工作.
E-mail: xiexiaome@zju.edu.cn

参考文献 (References):

Beltran J, Penuga A, Pitarch E, et al. 2003 Application of solid phase micro-extraction for the determination of pyrethroid residues in vegetable samples by GC-MS [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 76 (4): 502—511

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

Courteix A, Bengel A. 1995 Horseradish peroxidase-cataly hydroxylation of phenol: Thermodynamic analysis [J]. Enzyme and Microbial Technology, 17: 1087—1093

Cui Z L, Li S P, Fu G P. 2001 Isolation of methyl parathion-degrading

- strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene [J]. Applied and Environment Microbiology, 67 (10): 4922— 4925
- 丁海涛, 李顺鹏, 沈标, 等. 2003 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, 40(1): 123— 129
- Ding H T, Li S P, Shen B, *et al* 2003 Isolation of pyrethroids degrading strain and its physiological characteristics [J]. Acta Pedologica Sinica 40(1): 123— 129(in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 353— 398
- Dong X Z, Cai M Y. 2001 Book of ordinary bacteria system identification [M]. Beijing Science Press 353— 398 (in Chinese)
- 方玲. 2000 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, 11(2): 249— 252
- Fang L. 2000 Isolation and selection of strains used to degrade organic chbrine pesticides and application effects [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 11 (2): 249— 252(in Chinese)
- Giri S, Shama G D, Giri A, *et al* 2002 Fenvalerate-induced chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in the bone marrow cells of mice in vivo [J]. Mutation Research, 520 125— 132
- Jin W, Palmer R G, Homer H T, *et al* 1998. Molecular mapping of a male-sterile gene in soybean [J]. Crop Science, 38 1681— 1685
- Lee S Gan J K in J S, *et al* 2004. Microbial transformation of pyrethroid insecticides in aqueous and sediment phases [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (1): 1— 6
- 林金科, 李秀峰, 林小端. 2008 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, 24(1): 104— 111
- Lin J K, Li X F, Lin X D, *et al* 2008. The natural degradation dynamics of 4 pesticides on cultivars suitable to oolong tea [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 24(1): 104— 111(in Chinese)
- 李旭春, 刘桂芳, 马军, 等. 2008. 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, 29(1): 231— 236
- Li X C, Lin G F, Ma J *et al* 2008 Isolation identification and biodegradation characteristics of a bacterial strain able to degrade Nonylphenol [J]. Environmental Science, 29(1): 231— 236(in Chinese)
- 林子庵, 龚巧燕, 谢增鸿. 2008 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), 36(1): 122— 125
- Lin Z A, Gong Q Y, Xie Z H. 2008. Determination of pyrethroid multi-residues in vegetables by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Fuzhou University(Natural Science), 36(1): 122— 125(in Chinese)
- Malony S E, Maule A, Smith A R W. 1992 Transformation of synthetic pyrethroid insecticides by a thermophilic *Bacillus* sp [J]. Archives of Microbiology, 158 282— 286
- Mosca A, Russo F, Minagliotta L, *et al* 2007. Utility of gas chromatography for rapid identification of mycobacterial species frequently encountered in clinical laboratory [J]. Journal of Microbiological Methods 68(2): 392— 395
- Musumeci M, Ostiz S B. 1994. Binding of cypermethrin residue in Brazilian soils and its release by microbial activity [J]. Revista de Microbiologia 25 (4): 216— 219
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 2002 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 28— 35
- Sheng P, Fan X R, Li G W. 2002. Microbiology experiment [M]. Beijing High Education Press 28— 35(in Chinese)
- Sogorb M A, Vilanova E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis [J]. Toxicology Letters 128 (1-3): 215— 228
- Tripathi G, Vema P. 2004. Fenvalerate-induced changes in a catfish *Carras batrachus* metabolic enzymes, RNA and protein [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 138 : 75— 79
- 王兆守, 林淦, 尤民生, 等. 2005. 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, 25(7): 1824— 1827
- Wang Z S Lin G, You M S *et al* 2005 Isolation and character of synthetic pyrethroid insecticides-degrading bacteria from tea leaves [J]. Acta Ecologica Sinica 25(7): 1824— 1827(in Chinese)
- 王兆守. 2003 微生物降解茶叶农药残留的研究 [D]. 福州: 福建农林科技大学, 18
- Wang Z S 2003. Degradation of pesticide residues on tea by microorganisms [D]. Fuzhou Fujian Agriculture and Forestry University, 18(in Chinese)
- 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 等. 2006. Sherlock M B 系统应用于土壤细菌鉴定的研究 [J]. 土壤学报, 43(4): 642— 647
- Wu Y P, Xu J M, Wang H Z, *et al* 2006 Application of sherlock M B in identification of soil bacteria [J]. Acta Pedologica Sinica 43(4): 642— 647(in Chinese)
- Yuan S Y, Yu C H, Chang B V. 2004. Biodegradation of nonylphenol in river sediment [J]. Environmental Pollution, 127 (3): 425— 430
- 虞云龙, 宋凤鸣, 郑重, 等. 1997. 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), 23(2): 111— 115
- Yu Y L, Song F M, Zheng Z, *et al* 1997 Isolation and identification of a broad-spectrum bacterial strain (*A. lauligenes* sp.) degrading pesticide [J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture & life science), 23 (2): 111— 115(in Chinese)
- 朱福兴, 王沫, 李建洪. 2004 降解农药的微生物 [J]. 微生物学通报, 31 (5): 120— 123
- Zhu F X, Wang M, Li J H. 2004 Pesticide Degrading Microorganisms [J]. Microbiology, 31 (5): 120— 123(in Chinese)
- 张丽珍, 乔雄梧, 马利平, 等. 2006 多菌灵降解菌 NY97_1 的鉴定及降解条件 [J]. 环境科学学报, 26(9): 1440— 1444
- Zhang L Z, Qiao X W, Ma L P, *et al* 2006. Identification of a carbendazim-degrading strain and its degradation performance [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 26(9): 1440— 1444(in Chinese)
- 郑金来, 李君文, 晁福寰. 2001 常见农药降解微生物研究进展及展望 [J]. 环境科学研究, 14(2): 62— 64
- Zheng J L, Li J W, Chao F H. 2001 Advance and prospect of microorganism degrading common pesticide [J]. Research of Environmental Sciences 14(2): 62— 64(in Chinese)
- Zhang W J, Rui W Y, Tu C, *et al* 2005 Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification [J]. Pedosphere 15(4): 440— 447