

联苯菊酯降解菌的筛选、鉴定及其降解特性

景岳龙^a, 朱凤晓^a, 王军玲^a, 呼世斌^b, 秦宝福^a, 张磊^a

(西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 理学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**筛选高效降解联苯菊酯菌株,为环境中联苯菊酯的生物修复提供菌种资源。**【方法】**采用室内培养法,从湖南某农药厂下水道污泥中,以联苯菊酯作为唯一碳源进行摇瓶培养筛选,以降解率作为评价指标确定高效菌株,根据生理生化特性和 16S rDNA 对菌株进行鉴定,并对降解的最佳温度、pH、接种量和联苯菊酯质量浓度进行了筛选。**【结果】**获得 1 株革兰氏阴性好氧杆状菌,经鉴定为戴尔福特菌(*Delftia tsuruhatensis*),命名为 HLB-1。在 pH 7.0、30 ℃、接种量 100 mL/L、120 r/min 的条件下培养 5 d,菌株 HLB-1 对 200 mg/L 联苯菊酯的降解率可达 74.5%。获得的高效降解联苯菊酯菌株,其最佳降解条件为 pH 7.0、30 ℃、接种量 100 mL/L,联苯菊酯质量浓度为 250 mg/L。**【结论】**获得了 1 株联苯菊酯降解菌 HLB-1,其具有一定的生产应用潜力,可作为环境中联苯菊酯农药生物修复的候选菌株。

[关键词] 联苯菊酯;生物降解;生物修复;戴尔福特菌

[中图分类号] X172;Q939.129

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)10-0098-05

Isolation, identification and degradation characteristics of a Bifenthrin-degrading strain *Delftia tsuruhatensis*

JING Yue-long^a, ZHU Feng-xiao^a, WANG Jun-ling^a,
HU Shi-bin^b, QIN Bao-fu^a, ZHANG Lei^a

(a College of Life Sciences, b College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was conducted to isolate effective bacteria capable of degrading Bifenthrin, a widely-used insecticide, and provide potential biological preparations for the bioremediation of Bifenthrin residues in the environment, mainly in soil. **【Method】** By incubation experiment, the strain isolated from the tame sludge was screened in the mineral media supplied with Bifenthrin as the sole carbon source. The most effective degrading strain was determined according to their degrading rates, and then was preliminarily identified based on the morphology observation, physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis. Subsequently, a research was done to investigate its degradation characteristics. **【Result】** A strain which had the highest capability of degrading Bifenthrin was identified to be *Delftia tsuruhatensis*, a gram-negative aerobe bacilli. After 5 d's incubation, the degradation rate of Bifenthrin of 200 mg/L by the HLB-1 was 74.5%. HLB-1 could efficiently degrade Bifenthrin. Under the vibrational speed 120 r/min, its optimal condition was pH 7.0, 30 ℃, inoculated amount at 100 mL/L, Bifenthrin concentration 250 mg/L. **【Conclusion】** The bifenthrin degrading strain HLB-1 has great application potential in the bioremediation of environment polluted by bifenthrin pesticide.

Key words: Bifenthrin; biodegradation; bioremediation; *Delftia tsuruhatensis*

* [收稿日期] 2010-04-02

[基金项目] 中央环境保护专项基金项目(财建[2006]859号)

[作者简介] 景岳龙(1984—),男,陕西渭南人,在读硕士,主要从事环境微生物应用研究。E-mail: wolong_1984@126.com

[通信作者] 呼世斌(1953—),男,陕西延安人,教授,博士生导师,主要从事环境污染生物治理研究。

E-mail: hushibin2003@yahoo.com.cn

拟除虫菊酯类农药是 20 世纪 70 年代研发成功的一类仿生杀虫剂,其具有性质稳定、不易光解、无特殊臭味及安全系数高、使用浓度低、触杀作用强、灭虫速度快、残效时间长等优点,被称为杀虫剂农药的一个新突破,也是杀虫剂历史上的第 3 个里程碑^[1]。自 1973 年合成了第 1 种对光稳定的拟除虫菊酯类杀虫剂苯醚菊酯后,此类农药不断发展壮大,并且结构也变化多样,至今已有 70 多个品种^[2],在农业害虫和卫生害虫防治上被广泛应用,在农作物、土壤、水体中均有残留^[3]。

过去一直认为,拟除虫菊酯类农药在生物体内易被氧化酶系统降解,无蓄积性,毒性较低,使用安全。但最近研究表明,此类农药有蓄积性^[4],长期接触,即使是低剂量也会引起慢性疾病^[5-8],有些品种甚至有致癌、致畸、致突变作用^[9-13]。拟除虫菊酯类农药不仅对哺乳动物具有中等的神经毒性、免疫系统毒性、心血管毒性和遗传毒性^[12-14],而且对家蚕、蜜蜂和鱼类等生物高毒,目前尚无特殊的治疗药物^[15]。联苯菊酯是一种中等毒性的拟除虫菊酯类农药,由于其具有高效广谱的优点,应用范围较为广泛,其大量使用势必对环境构成极大的威胁,而以微生物为主体的生物修复技术可用于降解各种有机物^[16]。在对拟除虫菊酯类农药降解研究中发现,阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)^[17]、假单胞菌属的一个未知种(*Pseudomonas* sp.)^[18]、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)^[19]、缺陷假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)^[20]等对联苯菊酯均具有降解能力,但有的菌株降解能力较低或生长较慢,不利于大范围推广应用。本研究从湖南某农药厂下水道污泥中,分离获得 1 株联苯菊酯的高效降解菌,并对其进行了鉴定和降解特性研究,以期环境中联苯菊酯的降解提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 培养基 富集培养基:蛋白胨 10 g, NaCl 1.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, 葡萄糖 1.0 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0; 基础盐培养基: NaCl 1.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, K_2HPO_4 1.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0; LB 培养基:蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, NaCl 10.0 g; 固体培养基:在液体培养基中加入 20 g/L 的琼脂。

以上培养基在使用前均在 121 °C 下灭菌 30

min。

1.1.2 样品及试剂 污泥取自湖南某农药厂下水道,联苯菊酯原药(纯度为 97.5%)由陕西省石油化工研究院提供,丙酮、石油醚等试剂均为分析纯。

农药储备液:将联苯菊酯原药 1.025 g 溶于 30 mL 体积分数 99.5% 丙酮,然后加入农药 1.5 倍(质量比)的 Tween-20,定容至 50 mL,配成 20 g/L 联苯菊酯储备液,用于后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 联苯菊酯降解菌的筛选 将 100 mL 含联苯菊酯的富集培养基,装入 250 mL 三角瓶中灭菌,冷却后加入污泥样 10 g,于 30 °C、120 r/min 摇床上培养 7 d 后,按 100 mL/L 的接种量转接到第 2 批含联苯菊酯的富集培养基,相同条件下培养 7 d 后,再按 100 mL/L 的接种量,转接到含 250 mg/L 联苯菊酯的基础盐培养基中,培养 7 d。按上述方法,在含 250 mg/L 联苯菊酯的基础盐培养基中连续转接 2 次,取 0.1 mL 发酵液反复进行平板划线分离培养,直至得到单菌落。将分离获得的菌株接种到含联苯菊酯的平板上,不断提高联苯菊酯质量浓度直至达到 600 mg/L,之后将菌株接种到试管斜面培养基上,于 4 °C 冰箱内保存^[21]。

1.2.2 联苯菊酯降解菌的鉴定 对分离得到的菌株进行形态观察、生理生化实验及 16S rDNA 序列比对^[22-23]。所用 PCR 引物如下。

F:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

R:5'-CTACGCTACCTTGTTACGA-3'。

1.2.3 联苯菊酯降解菌降解能力的测定 挑取单个菌株接种到 LB 液体培养基中,于 30 °C、120 r/min 条件下培养 24 h 作为种子液。然后以 100 mL/L 的接种量,接种到含 200 mg/L 联苯菊酯的基础盐培养基中,设不接菌为对照,每处理重复 3 次,在 30 °C、120 r/min 条件下摇床培养 5 d。吸取 2 mL 培养液,用石油醚萃取 3 次,石油醚每次用量分别为 4,4,2 mL,然后加入无水硫酸钠进行脱水处理,并定容至 10 mL,以备检测使用。

检测条件:电子捕获检测器(ECD);载气 99.999% N_2 ;平均线速度 30 mL/min,柱子 SE-54 (内径 0.5 mm,长 30 m,液膜厚度 0.25 μm),进样口温度 230 °C,柱温 230 °C,检测器温度 260 °C。

1.2.4 联苯菊酯降解菌培养条件的优化 (1) 温度。将种子液以 100 mL/L 接种于 100 mL 含 200 mg/L 联苯菊酯的基础盐培养基中,调节 pH 值为 7.0,分别置于 15,20,25,30,35,40 °C 下,于 120

r/min摇床上培养,于第 5 天取样,检测培养液中联苯菊酯的含量。

(2) pH。将种子液以 100 mL/L 接种于 100 mL 含 200 mg/L 联苯菊酯的基础盐培养基中,调节 pH 值分别为 5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,置于 30 ℃、120 r/min 下摇床培养,于第 5 天取样,检测培养液中联苯菊酯的含量。

(3) 接种量。在 250 mL 三角瓶中分别加入 100 mL 含联苯菊酯 200 mg/L 的基础盐培养基中,调节 pH 值为 7.0,分别按 10,20,50,100,200 mL/L 的接种量接入种子液,置于 30 ℃、120 r/min 摇床培养,于第 5 天取样,检测培养液中联苯菊酯的含量。

(4) 联苯菊酯质量浓度。将种子液以 100 mL/L,分别接种于含 100,150,200,250,300 和 400 mg/L 联苯菊酯的基础盐培养基中,调节 pH 值为 7.0,置于 30 ℃、120 r/min 培养,于第 5 天取样,检测培养液中联苯菊酯的含量。

以上试验均以不接菌培养液为空白对照,每处理设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 联苯菊酯降解菌的筛选

经分离纯化,筛选获得 1 株能以联苯菊酯作为唯一碳源、具有较高降解率的细菌,命名为 HLB-1。在 pH 7.0、接种量 100 mL/L、30 ℃、120 r/min 的条件下培养 5 d,菌株 HLB-1 对 200 mg/L 联苯菊酯的降解率为 74.5%。

2.2 联苯菊酯降解菌的生理生化特性及分子鉴定

HLB-1 在固体 LB 培养基上培养 2 d 后,形成

乳白色、不透明、表面凸起、光滑的圆形菌落,随着培养时间的延长,菌落颜色有所加深,周围出现淡黄的晕圈。显微镜下观察菌体为杆状菌,成单或成对存在,革兰氏染色呈阴性。该菌株的乙酰甲基甲醇生成试验(V-P)、甲基红反应和 H₂S 反应均呈阴性;氧化酶阴性,接触酶阳性;葡萄糖发酵阴性,不能利用淀粉,能够利用阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸。将菌株 HLB-1 的 16S rDNA 序列在 NCBI 上与其他菌株进行同源性比较,结果显示,HLB-1 与戴尔福特菌(*Delftia tsuruhatensis*)同源性最高,为 97.8%。再结合以上生理生化特征,可推断 HLB-1 为戴尔福特菌(*D. tsuruhatensis*)。

2.3 联苯菊酯降解菌株 HLB-1 最佳降解条件的筛选

2.3.1 温度 由图 1 可以看出,当温度为 15~30 ℃时,菌株 HLB-1 对联苯菊酯的降解率逐渐升高,当温度为 30 ℃时降解率达到最大值,之后随着温度的升高,降解率迅速下降。由此可见,菌株 HLB-1 是 1 株中温型细菌,低温延长了菌株进入对数期的时间,而高温则不利于菌株生长,从而影响了降解率。故 HLB-1 降解对联苯菊酯的最适温度为 30 ℃。

2.3.2 pH 由图 2 可以看出,在 pH 为 5.0~7.0 时,菌株 HLB-1 对联苯菊酯的降解率逐渐升高,在 pH 7.0 时降解率最高,达到 76.2%;之后随着 pH 的升高,降解率逐渐下降。由此可知,该菌株为中性菌,pH 7.0 的中性条件有利于降解基因的表达,合成较多的降解酶,从而提高了降解率,故降解最佳 pH 为 7.0。

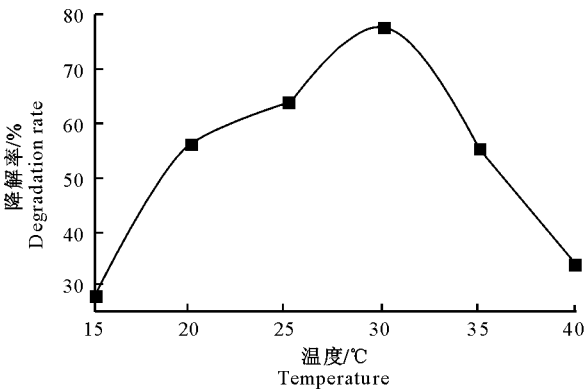


图 1 温度对 HLB-1 降解联苯菊酯的影响
Fig.1 Effect of temperature on degradation of bifenthrin by strain HLB-1

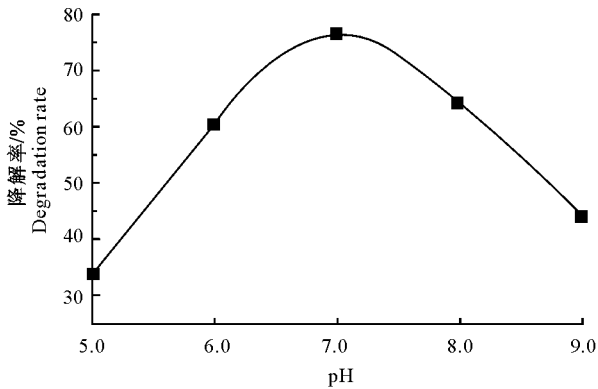


图 2 pH 对 HLB-1 降解联苯菊酯的影响
Fig.2 Effect of pH value on degradation of bifenthrin by strain HLB-1

2.3.3 接种量 图 3 显示,当接种量为 10~100 mL/L 时,菌株 HLB-1 对联苯菊酯的降解率随接种

量的增加而增大;当接种量大于 100 mL/L 后,降解率逐渐趋于稳定,这可能是由于随着接种量的增加,

微生物数量急剧增加,导致其生长所需碳源相对不足,微生物之间产生竞争,使得有效菌源不足。因此,接种量以 100 mL/L 为宜。

2.3.4 联苯菊酯质量浓度 图 4 显示,当联苯菊酯质量浓度为 100~250 mg/L 时,HLB-1 对联苯菊酯的降解率逐渐增加;当联苯菊酯质量浓度为 250 mg/L 时降解率最高;之后随着联苯菊酯质量浓度

的增加,降解率则逐渐下降。联苯菊酯质量浓度较低时,降解率低可能是由于碳源不足导致菌种生长受到限制,质量浓度较高时,降解率降低则可能是由农药对菌体产生毒害引起的。从图 4 还可以看出,菌种 HLB-1 能够在较大的联苯菊酯质量浓度范围内保持较高的降解率。

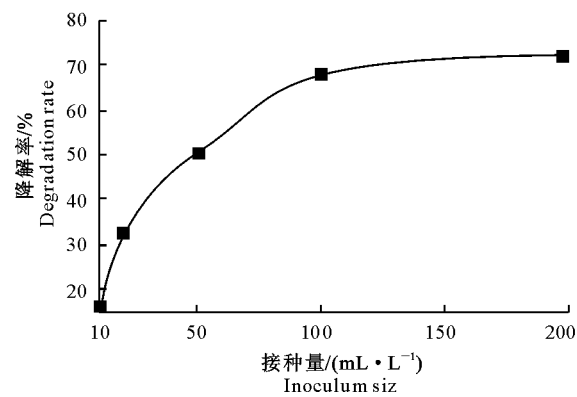


图 3 接种量对 HLB-1 降解联苯菊酯的影响
Fig. 3 Effect of inoculated size on degradation of bifenthrin by strain HLB-1

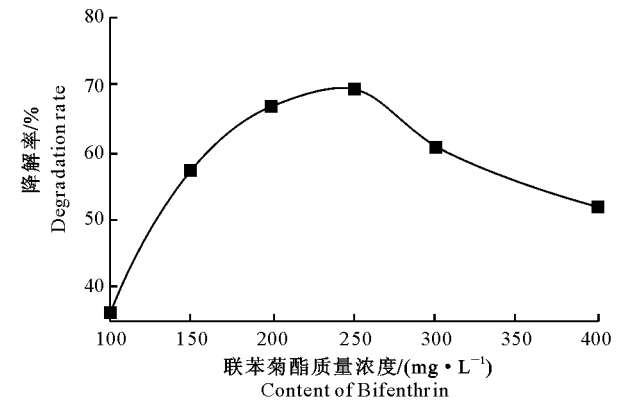


图 4 联苯菊酯质量浓度对 HLB-1 降解联苯菊酯的影响
Fig. 4 Effect of Bifenthrin concentration on its degradation by strain HLB-1

3 结论与讨论

在农药降解过程中,具有多种代谢功能的微生物起着关键作用^[24]。因此,筛选农药的高效降解菌就成为开展农药污染修复的重要前提^[25]。本研究从湖南某农药厂的下水道污泥中,以联苯菊酯作为唯一碳源进行摇瓶培养,富集、筛选得到 1 株能够降解联苯菊酯的细菌,该菌株在 30 ℃、pH 7.0,接种量 100 mL/L、120 r/min 的条件下培养 5 d,对 200 mg/L 联苯菊酯的降解率可达 74.5%。该菌株能够耐受 600 mg/L 联苯菊酯,据生理生化特征和 16S rDNA 方法检测,将其鉴定为戴尔福特菌(*D. tsuruhatensis*),命名为 HLB-1。该菌种目前仅报道其对苯胺具有降解能力^[26],对联苯菊酯的降解为首次报道。因此,推断该菌种可能是一新菌种。

本研究通过摇瓶试验得到菌株 HLB-1 的最适降解条件为温度 30 ℃、pH 7.0、接种量 100 mL/L、联苯菊酯质量浓度 250 mg/L,但其在 20~30 ℃、pH 6.0~8.0 的条件下对联苯菊酯均有较高的降解率。与其他菌种相比^[17-20],该菌种能够适应较高的农药浓度,这可能与筛选过程中进行的高浓度农药驯化有关。本研究中还发现,HLB-1 具有较强的生长能力,在含葡萄糖的无机盐培养基中培养,24 h 即可达到对数期,明显较其他菌株快。结合以上特

点可知,菌种 HLB-1 具有一定的生产应用潜力,有望成为环境中联苯菊酯农药生物修复的候选菌株。

【参考文献】

[1] 骆爱兰,于向阳,张存政,等.拟除虫菊酯类农药残留分析研究进展[J].江苏农业学报,2004,20(2):120-125.
Luo A L, Yu X Y, Zhang C Z, et al. Research progress of residue analysis for pyrethroid [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2004, 20(2): 120-125. (in Chinese)

[2] 张一宾,张 悒.世界农药新进展[M].北京:化学工业出版社,2007:46-47.
Zhang Y B, Zhang Y. Novel advances of world pesticide [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 46-47. (in Chinese)

[3] 陈 莉,章钢娅,靳 伟,等.土壤中拟除虫菊酯类残留农药的气相色谱测定方法研究[J].土壤学报,2006,43(5):764-772.
Chen L, Zhang G Y, Jin W, et al. Determination of residues of rethroid insecticides in soil by capillary gas chromatography [J]. Acta Pedologica Sinica, 2006, 43(5): 764-772. (in Chinese)

[4] Al-Makkawy H K, Madbouly M D. Persistence and accumulation of some organic insecticides in Nile water and fish resources [J]. Conservation and Recycling, 1999, 27(1/2): 105-115.

[5] Sinha G, Agrawal A K, Islam F, et al. Mosquito repellent (pyrethroid-based) induced dysfunction of blood-brain barrier permeability in developing brain [J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2004, 22(1): 31-37.

[6] Kolaczinski J H, Curtis C F. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroid insecticides: A review of

- the debate [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(5): 697-706.
- [7] Mohnssen H M. Chronic sequelae and irreversible injuries following acute pyrethroid intoxication [J]. Toxicology Letters, 1999, 107(1/3): 161-176.
- [8] Shukla Y, Yadav A, Arora A. Carcinogenic and cocarcinogenic potential of cypermethrin on mouse skin [J]. Cancer Letters, 2002, 182(1): 33-41.
- [9] Shukla Y, Arora A, Singh A. Tumourigenic studies on delta-methrin in Swiss albino mice [J]. Toxicology, 2001, 163(1): 1-9.
- [10] Kasat K, Go V, Pogo B G T. Effects of pyrethroid insecticides and estrogen on WNT10B proto-oncogene expression [J]. Environment Internationa, 2002, 28(5): 429-432.
- [11] Grosman N, Diel F. Influence of pyrethroids and piperonyl butoxide on the Ca^{2+} -ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes [J]. International Immunopharmacology, 2005(2): 263-270.
- [12] Xia Y K, Bian Q, Xu L C, et al. Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate [J]. Toxicology, 2004, 203(1/3): 49-60.
- [13] de la Cerda E. Action potential and underlying ionic currents by the pyrethroid insecticide deltamethrin [J]. Archives of Medical Research, 2002, 33(5): 448-454.
- [14] 王朝晖, 尹伊伟, 林小涛, 等. 拟除虫菊酯农药对水生态系统的生态毒理学研究综述 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2000, 21(3): 123-127.
- Wang Z H, Yin Y W, Lin X T, et al. Review of phytotoxicity of pyrethroid insecticide on aquatic ecosystem [J]. Journal of Jinan University: Natural Science & Medicine Edition, 2000, 21(3): 123-127. (in Chinese)
- [15] Wang L G, Jiang X, Yan D Y, et al. Comparison of two procedures for extraction and clean-up of organophosphorus and pyrethroid pesticides in sediment [J]. Pedosphere, 2004, 14(2): 229-234.
- [16] 顾继东, 王莹莹. 环境激素类有机污染物的微生物降解和药物类化合物的残留问题 [J]. 生态学报, 2003, 22(1): 1-5.
- Gu J D, Wang Y Y. Microblal degradation of endocrine-disrupting organic comlounds and environmental residues of pharmaceutical compounds [J]. Ecologic Science, 2003, 22(1): 1-5. (in Chinese)
- [17] 王兆守, 林 滢, 李秀仙, 等. 拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2003, 32(2): 176-181.
- Wang Z S, Lin G, Li X X, et al. Isolation, screening and identification of synthetic pyrethroid insecticides-degrading strains [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2003, 32(2): 176-181. (in Chinese)
- [18] 王兆守, 林 滢, 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): 1824-1828.
- Wang Z S, Lin G, You M S, et al. Isolation and character of synthetic pyrethroid insecticides-degrading bacteria from tea leaves [J]. Ecologic Science, 2005, 25(7): 1824-1828. (in Chinese)
- [19] 廖 敏, 张海军, 谢小梅. 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 [J]. 环境科学, 2009, 30(8): 2445-2451.
- Liao M, Zhang H J, Xie X M. Isolation and identification of degradation bacteria *Enterobacter aerogenes* for pyrethriods pesticide residues and its degradation characteristics [J]. Environmental Science, 2009, 30(8): 2445-2451. (in Chinese)
- [20] 廖 敏, 张海军, 谢小梅. 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, 2009, 29(7): 1388-1394.
- Liao M, Zhang H J, Xie X M. Isolation, identification and degradation characteristics of a *Pseudomonas diminutastra* in able to degrade pyrethriod pesticides [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(7): 1388-1394. (in Chinese)
- [21] 王兆守. 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, 2003: 12.
- Wang Z S. Degradation of pesticide residues on tea by microorganisms [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2003: 12. (in Chinese)
- [22] 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: 370-398.
- Dong X Z, Cai M Y. Manual of determinative common bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-398. (in Chinese)
- [23] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- Sambrook J, Russell D W. The condensed protoola from molecular cloning: A laboratory manual [M]. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [24] 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.
- [25] 张丽珍, 乔雄梧, 马利平, 等. 多菌灵降解菌 NY97_1 的鉴定及降解条件 [J]. 环境科学学报, 2006, 26(9): 1440-1444.
- Zhang L Z, Qiao X W, Ma L P, et al. Identification of a carbendazun-degrading strain and its degradation performance [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(9): 1440-1444. (in Chinese)
- [26] 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.
- Li Y, Hu H Y, Wu Q Y, et al. Isolation of a bacterial strain capable of nitrobenzene-degradation at low temperature and the biodegradation characteristics [J]. Environmental Science, 2007, 28(4): 902-907. (in Chinese)