

拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选 及其生理特性研究*

溥涛 李顺鹏[†] 沈 标 崔中利

(南京农业大学微生物学系, 南京 210095)

摘 要 从活性污泥的富集培养物中分离得到可降解几种拟除虫菊酯农药的菌株 qw_5 , 初步鉴定 qw_5 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。菌株 qw_5 在通气、pH7~8、温度 30℃ 左右的环境条件下生长较好。培养 5 天, 菌株 qw_5 对氰戊菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯的降解率分别为 53.8%、41.2% 和 61.7%。经质谱分析, 菌株 qw_5 降解氰戊菊酯产生中间代谢产物 3- 苯氧基苯甲醛。 qw_5 对小白鼠无致病力, 对几种常用的抗生素敏感。盆栽和小区试验表明, 菌株 qw_5 对青菜中残留的拟除虫菊酯有明显去除效果。

关键词 拟除虫菊酯, 芽孢杆菌, 微生物降解, 生理特性

中图分类号 S154.39

拟除虫菊酯农药是国内代替有机氯农药和其它剧毒长残留杀虫剂的主要农药类型之一。其品种数和使用量仅次于有机磷农药, 占杀虫剂市场的第二位。由于第二代以后的拟除虫菊酯农药的特点是耐光、热的分解, 自然环境中的拟除虫菊酯残留主要由微生物的活动来去除^[1], 所以国外工作者已筛得一些能降解拟除虫菊酯的菌株并进一步研究了农药的降解机理^[2~6]。而在国内, 主要侧重于研究拟除虫菊酯的环境行为和残留消解动态的工作^[7]。拟除虫菊酯类农药都含有多个苯环结构, 具有中等的生物毒性。针对拟除虫菊酯被广泛应用于防治蔬菜害虫的情况, 本实验筛选到了一株可降解拟除虫菊酯的芽孢杆菌, 完成了对该菌一些生理特性和小区应用方面的研究, 为使用降解菌剂去除青菜中拟除虫菊酯残留, 生产无农药残留的绿色蔬菜提供理论与实际应用依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与培养基配方

1.1.1 试剂 苯、丙酮、石油醚均为分析纯药品。氰戊菊酯原药, 工业纯, 有效含量 88.4%; 氯氰菊酯原药, 工业纯, 有效含量 89%; 20% 速灭杀丁 (即氰戊菊酯) 乳油; 10% 氯氰菊酯乳油; 2.5% 功夫 (即溴氰菊酯) 乳油。以上试剂购自南京市高淳县南京第一农药厂, 乳化剂 Tween-20, 化学纯, 购自浙江省温州清明化工厂。

由于氰戊菊酯, 氯氰菊酯原药不溶于水, 所以将这两种原药加入 1.5 倍重量的乳化剂 Tween-20, 制备为浓乳液形式为摇瓶培养或制农药平板使用。

1.1.2 培养基配方 营养肉汤培养基、基础培养基、富集培养基的配方与配制方法参照文献 [8]。

1.2 仪器与测试条件

1.2.1 气相色谱 GC-9A 气相色谱仪, 电子捕获检测器, C-RIB 数据处理机。测试条件为色谱柱 1.1m×3mm, i. d 玻璃柱, 填充 2% OV-1, 涂喷于 Chromasorb, W AW DMCS, 60 至 80 目。柱温 235℃, 检测器温度 265℃, 汽化室温度 265℃。载气 (N₂) 流速 80 ml min⁻¹。

1.2.2 质谱 Finnigan MAT GCQ 质谱分析仪。测试条件为电子能室 70 eV, 倍增器电压 1.5 kV, 发射

* 国家 863 项目 (SZ0308) 和农业部财政部农业科技跨越计划 (M200011)

[†] 通讯作者

收稿日期: 2000-12-25; 收到修改稿日期: 2001-07-15

电流 250 ma, 发气范围为 50~ 450 amu。

1.2.3 紫外扫描光谱 UV-PC2401 型紫外可见分光光度计, 具两个比色皿, 一个用于分析待测样品, 另一个用于消除待测样品中杂质对光吸收的干扰。

1.3 降解菌的分离、筛选与鉴定

污泥采自南京市高淳县南京第一农药厂及扬州农药厂排污口处污泥, 具体筛选方法见文献[8]。挑选纯化后能在氯氰菊酯、氰戊菊酯等农药平板上生长良好的菌株 QW_5 为试验菌种。降解菌的鉴定参照中文版《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版) 鉴定到种。经形态、生理生化与遗传学等鉴定, 初步定为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。

1.4 实验方法

1.4.1 摇瓶培养 在 150 ml 三角瓶中加入 75 ml 基础培养基, 加入一定浓度拟除虫菊酯, 接种 5% 同样农药浓度接菌培养液, 30℃, 180 r min⁻¹ 振荡培养, 不接菌, 不加农药的对照也在 30℃, 180 r min⁻¹ 条件下振荡培养。处理与对照各为三个重复。

1.4.2 菌体生长量的测定 平板菌落计数法, 每种待测液采用三个合适的稀释度, 每个稀释度作三个重复做菌落计数, 以菌落对数值来代表菌体生长量。

1.4.3 培养液中拟除虫菊酯农药的提取 培养液(接菌的培养液需离心去除菌体), 经振荡均匀后取 3 ml 加入 10 ml 带塞刻度试管中, 再加入 1.5 ml 分析纯丙酮, 3 ml 分析纯的苯, 振荡均匀后静置过夜, 记录上清液体积, 吸取 2 ml 上清液加入少量分析纯无水 Na₂SO₄, 气相色谱测定结果换算为培养液中农药浓度(ml L⁻¹)。

1.4.4 蔬菜中拟除虫菊酯残留提取方法 取无坏死组织的青菜叶用高速组织捣碎机粉碎, 称取 30 g 经匀浆处理的样品放入 250 ml 具塞三角瓶中, 再加入分析纯丙酮, 石油醚(60℃~ 90℃馏分) 各 30 ml, 12 r min⁻¹ 振荡 1 小时, 静置分层后取上清液 5 ml 过净化柱⁹。过柱的滤液 55℃水浴浓缩至体积为 2 ml, 气相色谱测定结果换算为每千克青菜中含农药量(mg kg⁻¹)。

1.5 环境因素对降解菌生长的影响

1.5.1 温度 加入浓度为 100 mg L⁻¹ 氰戊菊酯, 分别在 20℃、25℃、30℃、35℃ 不同温度下摇瓶培养 24 小时, 以平板活菌计数法测不同温度条件下菌的生长量。

1.5.2 酸碱度 通过改变基础培养基中 KH₂PO₄ 与 K₂HPO₄ 的比例, 同时用 5 mol L⁻¹ NaOH 和 HCl 溶液调节使得各个培养基在不同缓冲体系内的 pH 值为 5、6、7、8、9。用 PHS-3B pH 计测得误差上下各在 0.1 范围之内。加入浓度为 100 mg L⁻¹ 氰戊菊酯, 摇瓶培养 5 天, 以平板活菌计数法测不同酸碱度条件下菌的生长量。

1.5.3 通气量 在体积为 250 ml 的三角瓶中分别加入 50 ml、80 ml、100 ml、120 ml、150 ml 体积的基础培养基, 再加入浓度为 100 mg L⁻¹ 氰戊菊酯, 摇瓶培养 5 天, 以平板活菌计数法测不同通气条件下菌的生长量。

1.6 降解菌降解氰戊菊酯中间产物测定

1.6.1 待测样品的前处理方法 处理 1: 加入浓度 100 mg L⁻¹ 氰戊菊酯, 摇瓶培养 5 天; 处理 2: 加入浓度 150 mg L⁻¹ 乳化剂, 摇瓶培养 5 天; 处理 3: 不加入任何物质, 摇瓶培养 5 天; 对照 1, 对照 2, 对照 3 分别是相应处理不接种降解菌摇瓶培养 5 天, 处理 1、2、3 离心去除菌体和对照置 4℃ 冰箱备用。

1.6.2 紫外扫描光谱分析方法 用基础培养基把处理 1、处理 2、对照 1、对照 2 稀释 4 倍, 以处理 2 为参比, 在 200~ 350 nm 区间扫描处理 1, 以对照 2 为参比, 在相同区间扫描对照 1。

1.6.3 质谱分析方法 用色谱级的丙酮, 苯提取处理 1、2、3 及对照 1、2、3 的内含物质, 培养液: 丙酮: 苯的比例为 2: 1: 2。加入少量无水 Na₂SO₄ 去除待测样品中残留水分后进行气谱-质谱连机分析。

1.7 降解菌致病力的测定

用肉汤培养基培养降解菌使每 ml 菌液菌数达 10¹⁰ 个以上。小白鼠重约 20g 左右。取两只小鼠腹腔注射 0.1 ml 菌培养液, 另取两只注射剂量为 0.5 ml, 对照为两只小鼠注射 0.1 ml, 两只注射 0.5 ml 灭菌肉汤培养基, 四只不做任何处理的小鼠作为空白对照, 观察小鼠行为 48 小时。

1.8 降解菌的抗生素抗性测定

采用纸片扩散法,以各个抗生素在培养降解菌肉汤平板上的抑菌直径,作为敏感或者耐药的判定标准。

1.9 盆钵试验

所用盆钵高,直径均为 15 cm,每盆盛有未接触农药的菜园土 2.5 kg,种植两棵青菜,共计 16 盆。取 20% 速灭杀丁乳油 2ml 兑水 0.5L,用带刻度的喷雾器在青菜的表面均匀喷施,每盆内喷施氰戊菊酯含量约为 25 mg。一天后,取 8 盆青菜,在每盆青菜表面均匀喷施降解菌约 0.63×10^{11} 个,一周后采样提取农药残留,待气相色谱分析。

1.10 田间小区试验

1.10.1 降解菌对氯氰菊酯残留的去除 蔬菜品种为矮脚黄,秧田,实验面积 $1.5 \text{ m} \times 40 \text{ m}$,即 60 m^2 。用 10% 氯氰菊酯乳油兑水 5 L 在蔬菜表面均匀喷施,每 m^2 施药量约 8.9 mg。隔一天后,在处理小区内均匀喷施降解菌每 m^2 约 1.3×10^{10} 个。设置三个处理小区,三个对照小区,每小区面积 $1.5 \text{ m} \times 5 \text{ m}$ 即 7.5 m^2 ,小区间隔 $1.5 \text{ m} \times 2 \text{ m}$,即 3 m^2 ,处理和对照小区相间排列。隔 5 天后,在处理和对照小区内“S”形采样,每小区采集青菜 0.5 kg 提取氯氰菊酯残留,待气相色谱分析。

1.10.2 降解菌对氰戊菊酯残留的去除 蔬菜品种为矮脚黄,秧田,实验面积 $3.5 \text{ m} \times 25 \text{ m}$,即 87.5 m^2 。用 20% 速灭杀丁乳油兑水 7L 在蔬菜表面上均匀喷施,每 m^2 施药量约 23 mg。隔一天后,在处理小区内均匀喷施降解菌每 m^2 约 1.3×10^{10} 个。设置处理小区, $3.5 \text{ m} \times 11 \text{ m}$,即 38.5 m^2 ,小区间隔 $3.5 \text{ m} \times 3 \text{ m}$,即 10.5 m^2 ,对照小区 $3.5 \times 11 \text{ m}$,即 38.5 m^2 。隔 5 天后,在处理和对照小区内做梅花形采样,样品在 15 个以上,各采取 2 kg 青菜分作三组,混匀提取氰戊菊酯残留,待气相色谱分析。

2 结果

2.1 降解菌 qw_5 在实验室条件下的降解农药效果

气相色谱测得分离菌株对氯氰菊酯的降解效果如表 1。

表 1 菌株对氯氰菊酯的降解效果
Table 1 Degradation of cypermethrin by strains

	初始浓度 Initial concentration	对照 Control	菌株编号 No. of strains				
			qw_1	qw_3	qw_5	Lq_{11}	Lq_{12}
培养液农药浓度(mg L^{-1})	250	215	214.5	134.6	126.3	185.9	185.6
处理比对照降低(%)			0.2	37.4	41.2	13.5	13.8

进一步测得菌株 qw_5 对氰戊菊酯、溴氰菊酯的降解结果如表 2。

表 2 菌株 qw_5 对氰戊菊酯、溴氰菊酯的降解
Table 2 Degradation of Fenvalerate and Deltamethrin by strain qw_5

农药名称 Pesticide	初始浓度(mg L^{-1}) Initial concentration	对照(mg L^{-1}) Control	处理(mg L^{-1}) Treatment	处理比对照降低(%) Degradation rate
氰戊菊酯	250	196	90.4	53.8
溴氰菊酯	150	124.3	47.6	61.7

实验中初始浓度即为配制的一定浓度的浓乳液加入培养基中的浓度,对对比初始浓度低的原因首先是乳化剂 Tween-20 乳化能力弱,振荡过程中存在有部分菊酯农药从培养液中析出,另一部分沾在了三角瓶内壁上,虽然提取时把培养液振荡均匀,但仍会有误差。原因之二是实际配比浓度要低于计算得出的配比浓度。选择乳化剂 Tween-20 是因为它的生物毒性低。结果表明, qw_5 是既能降解氰戊菊酯、氯氰菊酯、又能降解溴氰菊酯的优良菌株。

2.2 温度、通气量、酸碱度对菌株 qw_5 生长影响

图 1 表明,菌株 qw_5 属中温型生活环境的细菌,在 30°C 左右生长较好,图 2 表明,菌株在接液量体积

小于 120 ml 时, 菌生长量差别较小, 接液量达到 150 ml 时菌的生长量受到影响, 所以菌株 qw_5 在好氧微氧环境中都能较好的生长。图 3 表明, 菌株在中性、微碱性环境中生长好。

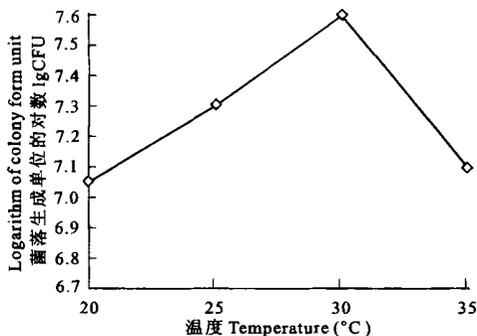


图 1 温度条件对 qw_5 菌株生长的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the growth of strain qw_5

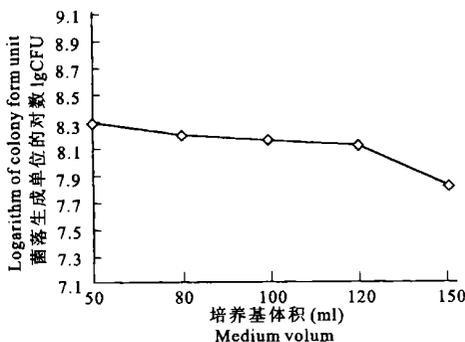


图 2 通气量对菌株 qw_5 生长的影响

Fig. 2 Effect of aerobic condition on the growth of strain qw_5

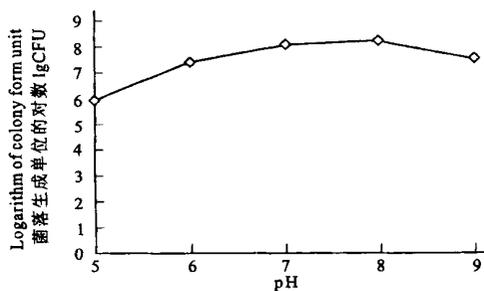


图 3 不同 pH 值对菌株 qw_5 生长的影响

Fig. 3 Effect of pH on the growth of strain qw_5

后面试验中对菌株 qw_5 的培养采取菌最适条件。这些最适条件对菌剂在小区试验中使用也有参考意义。

2.3 氰戊菊酯在菌株 qw_5 作用下紫外吸收光谱研究

由于氰戊菊酯浓乳液中含有浓度为氰戊菊酯 1.5 倍的乳化剂 Tween-20, 乳化剂连同培养基中的 SO_4^{2-} 、 PO_4^{2-} 、 NO_3^- 离子的光吸收将干扰对氰戊菊酯分子结构变化的光谱分析, 必须设参比用来消除干扰。接菌培养液扫描图形 T, 不接菌的含氰戊菊酯培养液扫描图形 CK, 如图 4 所示。T 的光谱峰明显低于 CK 的光谱峰, 由于氰戊菊酯有 3 个苯环结构, 在 240 nm 左右有明显的光吸收, 所以氰戊菊酯在菌株 qw_5 作用下分子结构发生了变化。

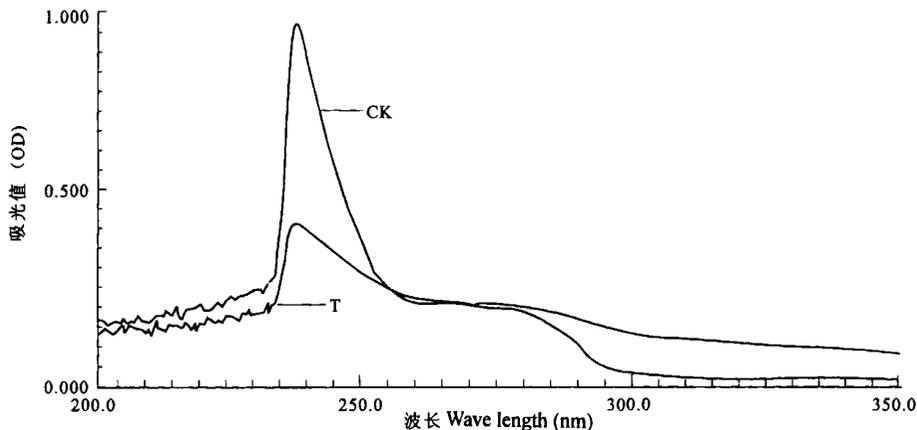
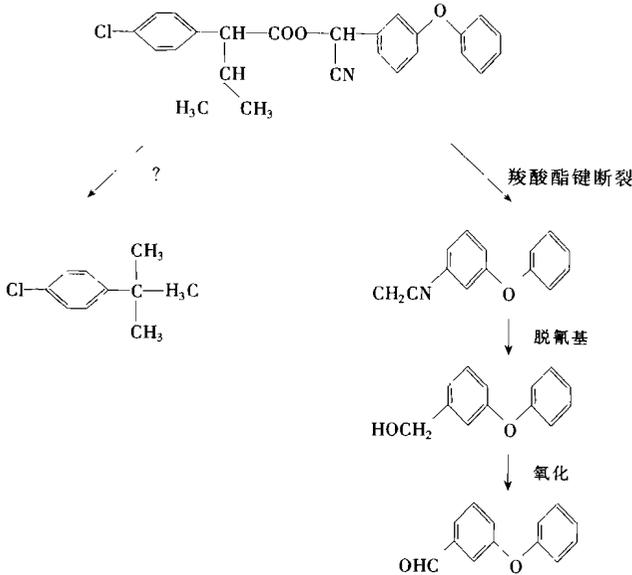


图 4 培养液的紫外扫描

Fig. 4 The UV scanning of culture fluid

2.4 氰戊菊酯可能的代谢途径

用气谱、质谱连机检测,对气谱分离出的峰进行质谱分析,结果表明,所有的样品都有甲苯和二甲苯气谱峰;处理 1、处理 2、对照 1 及 2 有二苯基甲酮气谱峰;处理 1 和对照 1 有噻吩甲基类物质,吡啶类物质气谱峰,处理 2 和对照 2 有肉桂醇等峰存在。在处理 1 中发现有其它样品不存在的吸收峰出现,判读产物有(1,1-二甲甲基)氯苯,2-丁烯基-3 氯苯,2-丙基-10 氯苯,3-苯甲基苯甲醛。根据氰戊菊酯农药分子的结构特点结合农药结构易断裂的部位所可能产生的产物,在处理 1 中分析得到的 3-苯甲基苯甲醛被判定为菌作用下中间的代谢产物,推测代谢过程可能为:



2.5 菌株 qw_5 对小白鼠致病性

每种注射剂量选用了两只小鼠,经连续观察 48 小时,注射 0.1ml、0.5ml 菌液的小鼠和对照都未表现出异常行为,说明菌株 qw_5 对小白鼠无致病力,为非病原细菌,但到实际应用阶段,仍需做进一步的安全评估。

2.6 菌株 qw_5 对抗生素的抗性

选择了几种常用的抗生素,实验如表 3。

表 3 菌株 qw_5 的拮抗抗生素特征
Table 3 Antibiotic resistance of strain qw_5

抗生素 Antibiotics	纸片的抗生素含量($\mu\text{g 片}^{-1}$) Content of antibiotics	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition of halo	敏感(-)或抗药(+) Sensitive(-) or resistant(+)
链霉素	10	19	—
庆大霉素	10	24	—
卡那霉素	30	25	—
红霉素	15	20.5	—
四环素	30	20	—
氯霉素	30	21	—

表3的结果表明,菌株 qw_5 对各种常用的抗生素类药物敏感,当菌体被释放到自然环境中时,不会同时携带耐药因子在土著菌间传播。

2.7 菌株 qw_5 的盆栽与小区试验

2.7.1 盆栽试验结果 未施菌每 kg 青菜含氯戊菊酯残留为 1.67 mg,而施菌处理的青菜中未测出农药残留。此试验结果表明,在温室内,温度、水份、营养成分都适宜的条件下,菌株 qw_5 基本去除残留于蔬菜表面的氯戊菊酯农药。

2.7.2 小区试验结果 第一次实验在1998年8月于南京农业大学旁西大街。

实验菌株 qw_5 对青菜中氯氟菊酯降解结果如表4。

表4 qw_5 菌株对青菜中氯氟菊酯的降解

Table 4 Degradation of Cypermethrin in vegetable by strain qw_5

样品编号 Samples	每千克青菜含药量(mg kg ⁻¹) Content of Cypermethrin	平均数(mg kg ⁻¹) Average	处理比对照农药残留 降低(%) Degradation rate
对照 1	0.828		
2	1.114	1.010	
3	1.089		
处理 1	0.308		
2	0.378	0.359	64
3	0.390		

小区试验表明:菌株 qw_5 可有效地清除在青菜表面的氯氟菊酯农药残留,5天内去除率为64%。

第二次试验在1998年10月于南京市江宁县农业局新技术开发区蔬菜基地。实验菌株 qw_5 对青菜中氯戊菊酯降解结果如表5。

表5 qw_5 菌株对青菜中氯戊菊酯的降解

Table 5 Degradation of Fenvalerate in vegetable by strain qw_5

样品编号 Samples	每千克青菜含药量(mg kg ⁻¹) Content of Fenvalerate	平均数(mg kg ⁻¹) Average	处理比对照农药残留 降低(%) Degradation rate
对照 1	1.37		
2	—		
3	0.862	1.116	
处理 1	0.016		
2	0.061	0.033	97
3	0.022		

小区试验表明:菌株 qw_5 可有效去除残留在青菜表面的氯戊菊酯农药,5天内去除率为97%。

3 讨论

1. 在对氯戊菊酯中间代谢产物分析中,在氯戊菊酯接菌的培养液中,有三种物质和氯戊菊酯羧酸酯键断裂的相应产物在结构上有相似之处,即都具有氯苯基,只是烃基的结构和位置发生了变化,这些物质的相关性说明菌株 qw_5 对氯戊菊酯的降解不是单方向的,而是合成与降解结合在一起,由于微生物碳代谢循环的复杂性,这一部分农药结构的具体代谢途径有待于进一步探讨。3-苯基苯甲醛是在氯戊菊酯降解菌株 qw_5 特异性酶的作用,在有氧条件下,不断提高氧化程度,逐步分解的产物,同时,3-苯

氧基甲醛也是不完全氧化物质,它还能进一步氧化甲醛基,羟基化苯环^[10]。该产物易被进一步开环水解,菌株对该中间产物的降解有待于利用放射性标记技术结合薄层层析法作进一步研究。

2. 田间实验结果表明, *qw₅* 菌对田间拟除虫菊酯残留的去除效果好于实验室摇瓶培养降解拟除虫菊酯的效果。其原因可能是田间试验条件下降解菌与土著微生物的协同代谢作用,有助于降解菌更有效地降解农药残留,直到最后矿化。而在实验室条件下,是降解菌株的纯培养,不具备协同代谢等条件。此外,实验室的三角瓶纯培养,到一定时间后不利于调节 pH 与补充营养物,以及代谢产物不能及时排除等因素,影响降解效果,而田间试验中这些影响因素要小得多。

参考文献

- Williams I H, Brown M J. Persistence of Pemetrin and WL 43775 in soil. J. Agric. Food Chem., 1979, 27: 130~ 132
- Sakate S, Mikami Y, Yamada H, *et al.* Degradation of Pyrethroid optical isomers by soil microorganisms. J. Pesticide Sci., 1992, 17(3): 181~ 189
- Umar S, Saxena R K, Lal R, *et al.* Microorganisms and synthetic pyrethroid insecticides. J. Pesticide Res., 1991, 3(2): 99~ 108
- Opp E, Akhtar M H. Identification and characterization of a pseudomonas strain capable of metabolizing phenoxybenzoates. Appl. Environ. Microbiol., 1991, 57(5): 1 249~ 1 300
- Mabney S E, Maule A, Smith A R W, *et al.* Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: Pemethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate and fluvalinate. Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54(11): 2 874~ 2 876
- Mac Rae I C. Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1989, 109: 81~ 87
- 石键. 氰戊菊酯、啶硫磷、抗蚜威在蔬菜作物上的残留研究. 农药, 1986, 14: 48
- 程国锋, 李顺鹏, 沈标, 等. 微生物降解蔬菜残留农药研究. 应用与环境生物学报, 1998, 4(1): 81~ 84
- 中华人民共和国卫生部. 食品中氯氰菊酯、氰戊菊酯、溴氰菊酯残留量测定方法. 中华人民共和国国家标准. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1994
- Edward Topp. Mineralization of 3-phenoxybenzoate by a two membered bacterial co-culture. Can. J. Microbiol., 1990, 16: 495~ 499

ISOLATION OF PYRETHROIDS DEGRADING STRAIN AND ITS PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Ding Hai- tao Li Shu- peng Shen Biao Chui Zhong- li

(Department of microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Summary

A pyrethroids degrading strain *qw₅* was isolated from activated sludge. The strain *qw₅* was preliminarily identified as *Bacillus Licheniformis*. The optimum temperature and pH for the aerobic degradation of pyrethroids by *qw₅* were 30 °C and pH 7~ 8. The strain was able to degrade Fenvalerate, Cypermethrin and Deltamethrin by approximately 53.8%, 41.2% and 61.7% respectively within five days. Benzaldehyde, 3-phenoxy, the metabolite of Fenvalerate was detected by mass spectrum. The strain was not pathogenic to white mice and sensitive to some commonly used antibiotics. The results from pot and field experiments showed that the strain had obvious effect on the removal of pyrethroids residual in green vegetable.

Key words Pyrethroids, *Bacillus*, Microbial degradation, Physiological characteristic