

· 研究论文 ·

两株拟除虫菊酯类农药高效降解菌混合降解性能研究

廖敏^{a, b}, 张海军^{a, b}, 马爱丽^{a, b}, 谢晓梅^{* c}

浙江大学 a 环境与资源学院 资源科学系, b 浙江省亚热带土壤与植物营养重点研究实验室,
c 环境与资源学院 生态环境研究中心, 杭州 310029)

摘要: 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两株可同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的高效菌株 M 6R9 和 M 5R14, 经鉴定为产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* 和缺陷假单胞菌 *Pseudomonas diminuta*。通过单一菌和混合菌对比实验, 发现单一菌及混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率均与接菌量 (OD_{415nm}) 呈正相关, 且降解过程满足一级动力学方程。在含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 100 mg/L 的基础培养基中, 接菌量相同 (单一菌 OD_{415nm} 均为 0.2, 混合菌中 M 6R9 和 M 5R14 的 OD_{415nm} 各为 0.1), 于 30 °C、pH 7.0、180 r/min 下培养 3 d, 发现混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别比单一菌 M 6R9 和 M 5R14 提高 2.5%、3.4%、2.3% 和 14.5%、14.6%、15.5%, 半衰期分别缩短 8.1、14.8、13.1 h 和 40.3、50.7、46.4 h, 表明混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解存在协同作用, 即混合菌可提高 3 种菊酯类农药残留的去除率。

关键词: 联苯菊酯; 甲氰菊酯; 氯氰菊酯; 生物降解; 混合菌

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2009.04.12

中图分类号: X172; S154.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)04-0472-08

Study on Degrading Performance of Two Efficient Mixed Strains for Synthetic Pyrethroid Insecticides Degradation

LIAO Min^{a, b}, ZHANG Hai-jun^{a, b}, MA Ai-li^{a, b}, XIE Xiaomei^{* c}

(a Department of Resource Science, College of Environmental and Resource Science,

b Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropic Soil and Plant Nutrition, c Research Center for Eco-Environmental Sciences, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Two efficient strains of synthetic pyrethroid insecticides-degrading bacteria, M 6R9 and M 5R14, isolated from the tame sludge of sewer in pesticide factory of Hangzhou, which can degrade bifenthrin, fenpropathrin and cypemethrin simultaneously, were identified as *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas diminuta*, respectively. By comparing degradation rates of the two strains independently and in mixed types, it is found that the degradation rate of bifenthrin, fenpropathrin and cypemethrin was related to inoculated amount at OD_{415nm} , and the degradation process was fitted to first-order kinetic equation. Under the optimum inoculated amount at $OD_{415nm} = 0.2$ (the mixed strains M 6R9 and M 5R14 respectively inoculated $OD_{415nm} = 0.1$ at equal proportion, while the single strain M 6R9

收稿日期: 2009-01-15; 修回日期: 2009-05-04.

作者简介: 廖敏 (1970-), 男, 博士, 副教授, 主要从事土壤环境化学和环境毒理学研究, E-mail: liaomin@zju.edu.cn; * 通讯作者 (Author for correspondence): 谢晓梅 (1970-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事环境科学和应用化学的教学与研究工作. 联系电话: 0571-86971719; E-mail: xiexiaomei686@163.com

基金项目: 浙江省科技计划项目资助 (2006C33052).

or M5R14 inoculated $OD_{415nm} = 0.2$), the degradation rate of mixed strains for bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin (100 mg/L) increased by 2.5%, 3.4%, 2.3% or 14.5%, 14.6%, 15.5%, and the half-life ($T_{1/2}$) was shortened by 8.1, 14.8, 13.1 h or 40.3, 50.7, 46.4 h, compared with the single strain M6R9 or M5R14 after culturing 3 days in the condition of pH 7.0, 30, 180 r/min. It is proposed that there is a synergistic effect between M6R9 and M5R14 on bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin.

Key words bifenthrin; fenpropathrin; cypermethrin; biodegradation; mixed strains

拟除虫菊酯类农药是模拟天然除虫菊酯合成的一类含多个苯环结构的广谱性杀虫剂,其使用范围仅次于有机磷农药,位居杀虫剂市场第二位,常用的有联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯等^[1,2]。这类农药在环境中降解缓慢、降解率低、残留量高,给环境安全带来了一定隐患。

降低农药残留的途径有多种,包括禁用(限用)某种农药、化学处理和微生物降解等^[3-4]。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^[5-8],如假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[9]、肠杆菌属(*Eubacter* sp.)^[10]、产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)^[11]和芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[12]等对拟除虫菊酯类农药具有很好的降解作用。在土壤、水体等自然环境中,对残留农药的降解往往是多种微生物共同作用的结果^[13],但以往的研究大多针对单一菌对单一农药的降解,而针对混合菌同时降解多种拟除虫菊酯类农药的报道较少^[14]。在降解污染物时,不同微生物之间可存在协同作用,因此混合菌的降解效果往往比单一菌要好^[15-16]。本试验针对两株可同时降解联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的高效菌株,研究了单一菌及混合菌对3种菊酯类农药的降解特性,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

95.8%的联苯菊酯(bifenthrin)原药,江苏春江农化有限公司产品;20%的甲氰菊酯(fenpropathrin)乳油,南京红太阳化工厂产品;94%的氯氰菊酯(cypermethrin)原药,天津龙灯化工有限公司产品;其余试剂均为分析纯。农药储备液配制:将95.8%的联苯菊酯原药2.61 g溶于30 mL、99.5%的丙酮,20%的甲氰菊酯乳油原液12.5 g溶于30 mL、99.7%的乙醇,94%的氯氰菊酯原药2.66 g溶于30 mL、99.7%的乙醇(加入原药质量1.5倍的吐温-80),分别定容至50 mL,配制成

50 g/L的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯储备液,供摇瓶实验或制作含农药平板使用。

富集培养基:蛋白胨10 g,葡萄糖1.0 g,氯化钠1.0 g,磷酸二氢钾1.0 g,加水至1 000 mL, pH 7.0;基础培养基:硝酸铵1.0 g,七水硫酸镁0.5 g,硫酸铵0.5 g,磷酸二氢钾0.5 g,氯化钠0.5 g,磷酸氢二钾1.5 g,加水至1 000 mL, pH 7.0。在1 000 mL富集或基础培养基中依次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3种农药的混合培养基,加入12~15 g琼脂得到固体培养基。

用于菌种筛选的样品取自杭州某农药厂拟除虫菊酯类农药生产车间下水道中驯化过的污泥。

1.2 试验方法

1.2.1 拟除虫菊酯类农药降解菌的筛选 将100 mL含3种农药各50 mg/L的富集培养基装入250 mL三角瓶中,灭菌、冷却后加入污泥土样10 g。于30、180 r/min下摇床培养7 d,按10%的接种量转接到第二批含农药的富集培养基(联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的质量浓度依次为100、150、200 mg/L)中。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、氯氰菊酯均为250 mg/L的含药基础培养基中,继续培养7 d,再连续2次转接到3种农药质量浓度均为250 mg/L的基础培养基中。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℃冰箱内保存。

1.2.2 菌种鉴定 形态特征鉴定主要通过革兰氏染色、荚膜染色等^[17]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[18]。分子水平鉴定采用美国MIDI公司的Sherlock microbial identity system (MIS)软件系统,将基础培养基上纯化的单菌落按照该公司的操作规范进行脂肪酸的提取和分析^[19],定性(种类)和定量(含量)地分

析微生物的脂肪酸成分并生成脂肪酸图谱,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^[20-21]。

1.2.3 降解菌对3种农药降解效能的测定 将分离纯化后的菌种以菌量 $OD_{415nm} = 0.2$ 接种到装有100 mL含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各100 mg/L的无菌液体基础(富集)培养基的250 mL三角瓶中,以含相同浓度3种农药的无菌液体基础(富集)培养基作对照,于30、180 r/min下振荡培养3 d后,吸取2 mL培养液依次用4、4、2 mL石油醚萃取3次,无水硫酸钠吸水后用石油醚定容至10 mL,待气相色谱检测。

气相色谱检测条件^[22]: Agilent 6890GC (G1530N /

G3172A)气相色谱仪,带ECD检测器,HP-5色谱柱(30 mm × 0.25 mm × 0.25 μm),进样口温度280,检测温度280,柱温260,流速1.0 mL/min,分流比1:10,载气为N₂(99.999%),进样量1 μL。

1.2.3.1 接种量对单一菌降解3种农药的影响 在含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各100 mg/L的100 mL基础培养基中,以3种农药作为唯一碳源,以不接菌为对照,单一菌接种量为初始菌量 OD_{415nm} 值0.05、0.1、0.15、0.2和0.4,每处理设3个重复。于30、pH 7.0、180 r/min下振荡培养3 d后萃取,测定农药的降解率^[23]。

$$\text{降解率}(\%) = \frac{\text{对照样品残留量} - \text{处理样品残留量}}{\text{对照样品残留量}} \times 100$$

1.2.3.2 不同接种比例对混合菌降解3种农药的影响 M6R9和M5R14分别按 OD_{415nm} 0.1/0.1、0.1/0.2、0.2/0.1、0.2/0.2、0.2/0.4、0.4/0.2、0.4/0.4的接种量混合接种到含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各100 mg/L的基础培养基中,每处理设3个重复。于30、pH 7.0、180 r/min条件下振荡培养3 d后萃取,测定农药的降解率。

1.2.3.3 单一菌及混合菌对3种农药的降解动力学分析 在含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各100 mg/L的基础培养基中,单一菌按照初始菌量 OD_{415nm} 0.2接种,混合菌等比例接种,即M6R9和M5R14各按 OD_{415nm} 0.1的量接种,于30、pH 7.0、180 r/min条件下振荡培养,采用一级动力学模型对12、24、36、48、60、72、84、96和108 h时农药残留量(C_t)和时间(t)进行拟合,降解动力学方程为 $C_t = C_0 \times e^{-kt}$ (其中 C_t 为t时刻农药的残留量, C_0 为样品的初始浓度, K 为降解速率常数),半衰期 $T_{1/2} = \ln 2 / K$ ^[24-26],分析两种菌单一及混合情况下对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解动力学过程。

2 结果与分析

2.1 拟除虫菊酯类农药高效降解菌筛选结果

将有毒有害污染物通过微生物转化或降解转变为无毒无害物质,是环境生物修复的核心,而筛选高效农药降解菌则是开展生物修复工作的重要前提^[10]。本研究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2株可同时利用联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯为碳源生长的高效降解菌M6R9和M5R14,30、pH 7.0、180 r/min条件下培养3 d,发现M6R9和M5R14对浓度均为100 mg/L的联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别为55.74%、55.11%、56.96%和43.78%、43.91%、43.75%。

2.2 M6R9和M5R14的形态学及生理生化特征

M6R9为杆状、周生鞭毛,无芽孢、产小荚膜的革兰氏阴性菌株,菌体大小约为宽(0.5~1.0) μm × 长(0.8~1.9) μm(图1)。固体培养基上菌落呈圆形,灰白色,不透明,表面凸起、光滑,边缘完整。乙酰甲基甲醇生成试验(vp)阳性,吡啶实验阴性,不能液化明胶,氧化酶试验阴性,可利用木糖、

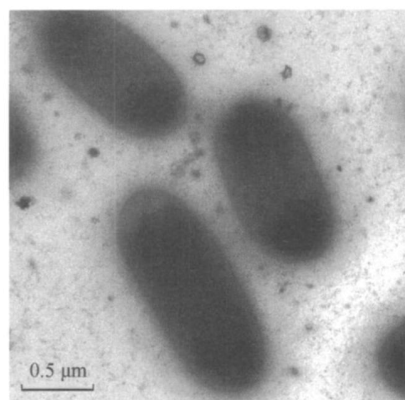


图1 M6R9的电镜照片(50 000 ×)

Fig 1 Electron micrographs of the strain M6R9(50 000 ×)

葡萄糖、丙二酸和乳糖产酸,不能利用卫矛醇产酸。M5R14为球形,无芽孢、无鞭毛的革兰氏阴性菌株,菌体直径为0.3~0.8 μm (图2)。固体培养基上菌落呈圆形,灰黄色,不透明,表面隆起、光滑、湿润,边缘完整。乙酰甲基甲醇生成试验阳性,氧化酶和过氧化氢酶试验阳性,不能水解淀粉,能液化明胶,无硝化作用,可利用乙酸盐、丁酸盐、D-和L-丙氨酸,不能利用碳水化合物、葡萄糖酸盐和组氨酸。

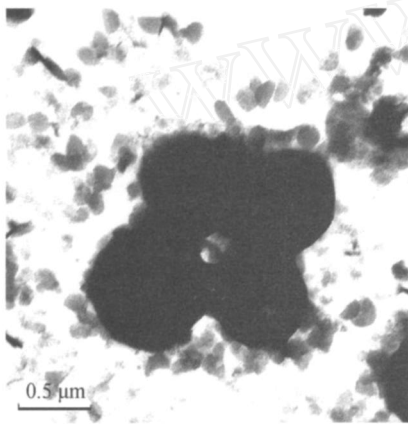


图2 M5R14的电镜照片(50 000 \times)

Fig. 2 Electron micrographs of the strain M5R14 (50 000 \times)

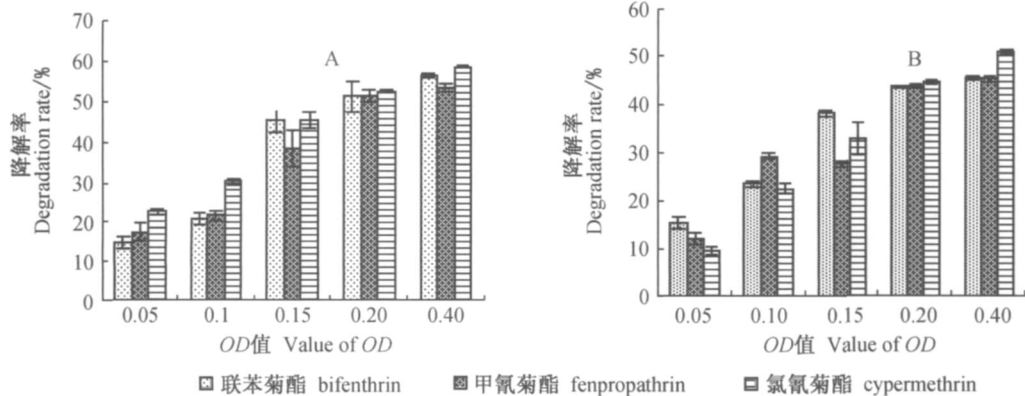


图3 菌株M6R9(A)、M5R14(B)对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率与接种量(OD_{415nm})的关系

Fig. 3 The curve relation between the degradation rate of M6R9 (A), M5R14 (B) on bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin and the OD_{415nm} value

2.5 不同接种比例对混合菌降解3种农药的影响

由图4可知,不同接种比例下M6R9和M5R14混合菌对3种菊酯类农药的实际降解率存在较大差异,但总体趋势表现为随接种总量的增加而增加,接种比例为0.4/0.4时对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率最大,分别为81.89%、

2.3 M6R9和M5R14的分子鉴定

根据Sherlock M IS软件系统对菌株M6R9和M5R14进行定性和定量分析生成脂肪酸图谱,对比Library数据库,根据相似指数(SI)初步鉴定M6R9为肠杆菌属(Enterobacter sp.)中的产气肠杆菌Enterobacter aerogenes, SI=0.931; M5R14为假单胞菌属(Pseudomonas sp.)中的缺陷假单胞菌Pseudomonas diminuta, SI=0.926。

2.4 接种量对单一菌降解3种农药的影响

由图3可以看出, M6R9和M5R14对浓度均为100 mg/L的3种菊酯类农药的降解率均随接种量的增加而增加,与菌液接种量OD_{415nm}值呈正相关,相关系数(R²)分别为0.888 2、0.873 5、0.961 5和0.920 0、0.912 9、0.923 8。在相同接种量条件下,菌株M6R9对3种农药的降解率要高于M5R14。但当接种量OD_{415nm}大于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^[27]。由于接种量不同,单位生物量所对应的基质量不同,反应速率会表现出差异^[15]。因此从降解效果来看,接种量以OD_{415nm}值0.15~0.2为宜。

81.79%、86.14%。接种比例在0.1/0.1、0.1/0.2、0.2/0.1、0.2/0.2之间时,混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率随接种总量的增加而增加,3 d内降解率增加量分别为8.45%、14.86%、19.41%;当接种比例为0.4/0.2、0.2/0.4、0.4/0.4时,混合菌对3种农药的降解率随接种总量而增加的幅度不明显,最大增幅仅为6.67%。

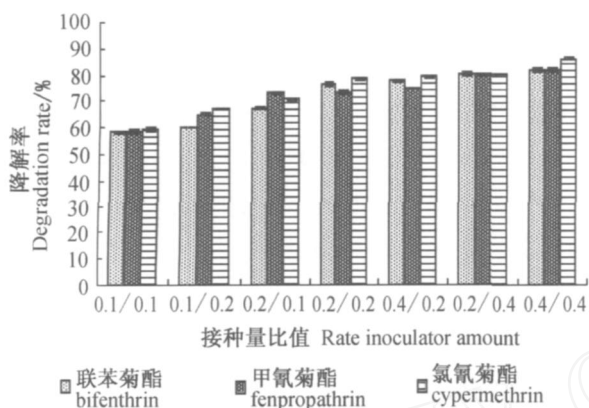


图 4 不同接种比例下混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解效果的影响

Fig 4 Effect of different inoculating rates by the mixed strains of M 6R9 and M 5R14 on degradation rates of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin

2.6 不同接种比例下混合菌对 3 种农药的理论降解率及增幅作用

为了更清楚地了解菌株 M 6R9、M 5R14 共存时对 3 种菊酯类农药的降解是否存在协同作用, 采用下式计算混合菌的理论降解率^[28]: $P_M = 1 - (1 - A_1)(1 - A_2)(1 - A_3)(1 - A_4) \dots (1 - A_M)$, 式中 P_M 表示不同比例下混合菌的理论降解率, $A_1, A_2, A_3, A_4 \dots A_M$ 指各单一菌在不同接种量下的降解率, 同时计算增幅作用:

$$\text{增幅作用} = \frac{\text{混合菌的实际降解率}}{\text{混合菌的理论降解率}}$$

当增幅作用 > 1 时, 菌株 M 6R9 与 M 5R14 存

在协同作用, 当增幅作用 < 1 时, M 6R9 与 M 5R14 存在拮抗作用, 当增幅作用 = 1 时, M 6R9 与 M 5R14 存在加和作用。

由表 1 可知, 混合菌处理对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解的增幅作用随接种总量的增加而降低, 但均在 1.01 ~ 1.48 之间, 即增幅作用 > 1, 存在协同作用。且在较低接种总量下对 3 种农药降低的增幅作用明显, 尤以接种比例为 0.1/0.1 时增幅作用最大, 分别为 1.48、1.31 和 1.29, M 6R9 与 M 5R14 间表现出较强的协同作用; 在较高接种总量下增幅作用不明显, 协同作用较弱。这可能是由于较高的接种总量使得微生物间相互竞争底物而导致有效菌源降低。与 M 6R9 或 M 5R14 单一菌株最佳接种量 $OD_{415nm} = 0.2$ 时对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率 (分别为 55.74%、55.11%、56.96% 和 43.78%、43.91%、43.75%) 相比 (图 3), 接种总量 $OD_{415nm} = 0.2$ 、接种比例为 0.1/0.1 时, 混合菌对 3 种农药的降解率 (58.23%、58.5%、59.23%) 分别增加了 2.49%、3.39%、2.27% 和 14.45%、14.59%、15.48% (图 4), 即混合菌比单一菌更有利于 3 种菊酯类农药的降解。说明 M 6R9 与 M 5R14 间存在协同作用, 双方的酶系含量丰富, 可为对方提供生长所需条件或消除对方的代谢障碍, 从而使得有机物的降解更加充分^[29]。结合接种总量、增幅作用和降解效率可知, M 6R9 和 M 5R14 在接种比例为 $OD_{415nm} 0.1/0.1$ 时, 对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解效果最佳。

表 1 不同接种比例下混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的理论降解率及增幅作用

Table 1 The academic and synergism degradation rates of bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin by the mixed strains of M 6R9 and M 5R14 on the different inoculating rates

OD _{415nm} (M 6R9/M 5R14)	理论降解率 Academic degradation rates / %			增幅作用 Synergism degradation rates / %			
	联苯菊酯 bifenthrin	甲氰菊酯 fenpropathrin	氯氰菊酯 cypermethrin	联苯菊酯 bifenthrin	甲氰菊酯 fenpropathrin	氯氰菊酯 cypermethrin	平均 Mean
0.1/0.1	39.38	44.57	45.88	1.48	1.31	1.29	1.36
0.1/0.2	55.37	55.96	61.39	1.09	1.16	1.09	1.11
0.2/0.1	62.78	65.74	63.25	1.07	1.12	1.12	1.1
0.2/0.2	72.6	72.78	73.78	1.06	1.01	1.07	1.04
0.4/0.2	75.52	73.88	77.13	1.03	1.02	1.03	1.03
0.2/0.4	75.91	78.38	80.54	1.06	1.02	1.00	1.03
0.4/0.4	78.47	79.26	83.02	1.04	1.03	1.04	1.04

2.7 M 6R9 和 M 5R14 单独及混合接种对 3 种农药的降解动力学分析

单一菌及混合菌对 3 种菊酯类农药的降解

性能研究结果 (见表 2) 表明, 无论是单一菌还是混合菌, 实验数据的拟合结果均较好, 对 3 种农药降解率的相关系数 (R^2) 在 0.9231 ~ 0.9937 之

表 2 单一及混合菌株对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯降解的动力学参数

Table 2 Degradation kinetic parameters of the single strain or mixed strains on bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin

菌株名称 Strains	药剂名称 Reagents	动力学方程 Kinetic equation	速率常数 (K) Rate constant	相关系数 (R ²) Correlation coefficient	半衰期 /h Half-life
单一菌 M6R9	联苯菊酯 bifenthrin	$C_t = 8.4866e^{-0.0106t}$	0.0106	0.9511	65.4
	甲氰菊酯 fenpropathrin	$C_t = 8.3763e^{-0.0098t}$	0.0098	0.9506	70.7
	氯氰菊酯 cypermethrin	$C_t = 8.3159e^{-0.0101t}$	0.0101	0.9414	68.6
单一菌 M5R14	联苯菊酯 bifenthrin	$C_t = 9.1798e^{-0.0071t}$	0.0071	0.9795	97.6
	甲氰菊酯 fenpropathrin	$C_t = 7.8731e^{-0.0065t}$	0.0065	0.9367	106.6
	氯氰菊酯 cypermethrin	$C_t = 8.9173e^{-0.0068t}$	0.0068	0.9232	101.9
混合菌 M6R9 and M5R14	联苯菊酯 bifenthrin	$C_t = 9.0112e^{-0.0121t}$	0.0121	0.9873	57.3
	甲氰菊酯 fenpropathrin	$C_t = 9.5074e^{-0.0124t}$	0.0124	0.9897	55.9
	氯氰菊酯 cypermethrin	$C_t = 9.9978e^{-0.0125t}$	0.0125	0.9937	55.5

间,故可认为采用一级动力学方程来描述 3 种农药在基础培养基中的降解过程是合理的。通过计算得出,单一菌 M6R9、M5R14 对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解速率分别为 0.0106、0.0098、0.0101 mg/(L·h) 和 0.0071、0.0065、0.0068 mg/(L·h),半衰期 ($T_{1/2}$) 分别为 65.4、70.7、68.6 h 和 97.6、106.6、101.9 h;混合菌的降解速率分别为 0.0121、0.0124、0.0125 mg/(L·h),半衰期分别为 57.3、55.9、55.5 h,与单一菌 M6R9 和 M5R14 相比,半衰期分别缩短了 8.1、14.8、13.1 h 和 40.3、50.7、46.4 h,可见混合菌更有利于对 3 种菊酯类农药的降解,这也进一步证明了菌株 M6R9 和 M5R14 对 3 种农药的降解具有协同作用。

3 讨论

本研究运用 MIDISherlock 系统对分离筛选出的两个菌株进行了鉴定,与传统的微生物鉴定方法相比,该系统准确率高、操作简单、方法安全快捷,可以在种的水平上对微生物进行鉴定,且具备图谱识别软件和迄今为止微生物鉴定系统中最大的数据库资料,在医学、预防医学和环境科学等领域已得到越来越多的应用^[19]。Piotrowska-Seget^[30]等运用该系统鉴定了重金属污染土壤中的耐性菌;李旭春等^[20]对从给水处理系统长期运行的颗粒活性炭上分离到的壬基酚降解菌进行了 MIDISherlock 系统鉴定,菌种相似度 SI 为 0.899。本文的研究结果也表明 MIDISherlock 系统能有效地对菌株进行鉴定。

生物降解的实质是酶促反应^[6],然而单一微

生物在降解农药时不具备生物降解所需酶系的遗传信息,往往会产生有毒的代谢物质,这些代谢物对微生物的生长具有抑制作用,需要其他微生物群落来进行消除以实现难降解的有机物的部分或彻底降解^[13-31]。自然环境中本身是多种微生物共存的,因此开展混合菌的微生物降解研究具有重要的理论与实践意义。已有研究表明,混合菌对拟除虫菊酯类农药的降解具有协同作用,降解效果要好于单一菌株^[32-34]。王兆守等^[10]发现, w10j15、t6f2 和 c1f6 混合菌对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解在一定程度上表现出增效作用,增幅作用在 1.009 ~ 1.249 之间;许育新等^[31]发现,CDT3 和 PBM11 能很好地协同降解氯氰菊酯及其中间产物 3-PBA,CDT3 和 PBM11 的最佳接种比例为 2% / 5%,这与本研究发现混合菌对 3 种菊酯类农药的增幅作用在 1.00 ~ 1.48 之间,最佳接种比例为 OD_{415nm} 0.1 / 0.1 的结果类似。本研究中 M6R9 和 M5R14 混合菌对 3 种菊酯类农药的降解动态表明,相同条件下混合菌降解 3 种农药的半衰期分别比单一菌降解时缩短了 86.7、64.1、40.5 h,证明混合菌对 3 种农药的降解具有协同作用,其原因可能是混合菌可相互营造有利的生存环境,避免代谢产物积累,使双方能够充分发挥其生理活性功能,提高了其对 3 种菊酯类农药的降解效率。上述结果表明,混合菌 M6R9 和 M5R14 在降低菊酯类农药残留方面具有较好的应用前景。

4 结论

1) 筛选出 M6R9 和 M5R14 2 株能同时高效降解联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯 3 种农药的菌

株,经鉴定分别为产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*和缺陷假单胞菌 *Pseudomonas diminuta*。在 30 ℃、pH 7.0、180 r/min 条件下培养 3 d, M 6R9和 M 5R14单一菌对浓度均为 100 mg/L 的联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率分别为 55.74%、55.11%、56.96%和 43.78%、43.91%、43.75%。

2)无论是单一接种还是混合接种, M 6R9和 M 5R14对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解率均与接菌量 (OD_{415nm})呈正相关,且降解过程均满足一级动力学方程。单一菌 M 6R9和 M 5R14对联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯的降解半衰期 ($T_{1/2}$)分别为 65.4、70.7、68.6 h和 97.6、106.6、101.9 h,混合菌对 3种农药的降解半衰期分别为 57.3、55.9、55.5 h。

3)混合菌对 3种农药的降解存在协同作用。结合接种总量、增幅作用和降解效率可知, M 6R9和 M 5R14在接种比例为 $OD_{415nm} 0.1/0.1$ 时对 3种农药的降解效果最佳。

参考文献:

- [1] GIRI S, SHARMA G D, GIRI A, et al. Fenvalerate-induced Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in the Bone Marrow Cells of Mice in Vivo [J]. *Mutat Res*, 2002, 520: 125 - 132.
- [2] TRIPATHI G, VERMA P. Fenvalerate-induced Changes in a Catfish, *Clarias Batrachus*: Metabolic Enzymes, RNA and Protein [J]. *Comp Biochem Physiol, Part C*: 2004, 138: 75 - 79.
- [3] 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.
- [4] ZHENG Jin-lai (郑金来), LI Jun-wen (李君文), CHAO Fu-huan (晁福寰). 常见农药降解微生物研究进展及展望 [J]. *Res Environ Sci (环境科学研究)*, 2001, 14 (2): 62 - 64.
- [5] COURTERIX A, BERGEL A. Horseradish Peroxidase-catalyzed Hydroxylation of Phenol: Thermodynamic Analysis [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17: 1087 - 1093.
- [6] SOGORB M A, VILANOVA E. Enzymes Involved in the Detoxification of Organophosphorus, Carbamate and Pyrethroid Insecticides Through Hydrolysis [J]. *Toxicol Lett*, 2002, 128 (1 - 3): 215 - 228.
- [7] ZHANG W J, RUI W Y, TU C, et al. Responses of Soil Microbial Community Structure and Diversity to Agricultural Deintensification [J]. *Pedosphere*, 2005, 15 (4): 440 - 447.
- [8] ZHU Fu-xing (朱福星), WANG Mo (王沫), LI Jian-hong (李建洪). 降解农药的微生物 [J]. *Microbiology (微生物学通报)*, 2004, 31 (5): 120 - 123
- [9] MUSUMECI M R, OSTIZ S B. Binding of Cypemethrin Residue in Brazilian Soils and its Release by Microbial Activity [J]. *Rev Microbiol*, 1994, 25 (4): 216 - 219.
- [10] WANG Zhao-shou (王兆守), LIN Gan (林淦), YOU Min-sheng (尤民生), et al. 茶叶上拟除虫菊酯类农药降解菌的分离及其特性 [J]. *Acta Ecologica Sinica (生态学报)*, 2005, 25 (7): 1824 - 1827.
- [11] YU Yun-long (虞云龙), SONG Feng-ming (宋凤鸣), ZHENG Zhong (郑重), et al. 一株广谱性农药降解菌 (*Alcaligenes sp.*) 的分离与鉴定 [J]. *J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci (浙江大学学报: 农业与生命科学版)*, 1997, 23 (2): 111 - 115.
- [12] MALONY S E, MAULE A, SMITH A R W. Transformation of Synthetic Pyrethroid Insecticides by a Thermophilic Bacillus sp. [J]. *Arch Microbiol*, 1992, 158: 282 - 286.
- [13] SHENG Lian-xi (盛连喜), LIMing-tang (李明堂), XU Jing-bo (徐镜波). 硝基苯类化合物微生物降解研究进展 [J]. *Chin J Appl Ecol (应用生态学报)*, 2007, 18 (7): 1654 - 1660.
- [14] CUI Z L, LI S P, FU G P. Isolation of Methyl Parathion-degrading Strain M6 and Cloning of the Methyl Parathion Hydrolase Gene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (10): 4922 - 4925.
- [15] LIN Ming (林明), REN Nan-qi (任南琪), WANG Ai-jie (王爱杰), et al. 混合菌种在发酵法生物产氢中的协同作用 [J]. *Chin J Environ Sci (环境科学)*, 2003, 24 (2): 54 - 59.
- [16] KROPP K G, ANDERSSON J T, FEDORAK P M. Biotransformation of Three Dimethyldibenzothiophenes by Pure and Mixed Bacterial Bacteria [J]. *Environ Sci Technol*, 1997, 31 (5): 1547 - 1557.
- [17] SHENG Ping (沈萍), FAN Xiu-rong (范秀容), LI Gang-wu (李广武). *Microbiology Experiment (微生物学实验)* [M]. Beijing (北京): High Education Press (高等教育出版社), 2002: 28 - 35.
- [18] DONG Xiu-zhu (东秀珠), CAI Miao-ying (蔡妙英). *Book of Ordinary Bacteria System Identification (常见细菌系统鉴定手册)* [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2001: 353 - 398.
- [19] WU Yu-ping (吴愉萍), XU Jian-ming (徐建明), WANG Hai-zhen (汪海珍). et al. SherlockMS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究 [J]. *Acta Pedologica Sinica (土壤学报)*, 2006, 43 (4): 642 - 647.
- [20] LI Xu-chun (李旭春), LIU Gui-fang (刘桂芳), MA Jun (马军), et al. 1株壬基酚降解菌的分离鉴定及其降解特性研究 [J]. *Chin J Environ Sci (环境科学)*, 2008, 29 (1): 231 - 236.
- [21] ADRIANA M, FRANCESCO R, LUSIA M, et al. Utility of Gas Chromatography for Rapid Identification of Mycobacterial Species Frequently Encountered in Clinical Laboratory [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68 (2): 392 - 395.
- [22] BELTRAN J, PERUGA A, PITARCH E, et al. Application of Solid Phase Microextraction for the Determination of Pyrethroid Residues in Vegetable Samples by GC/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376 (4): 502 - 511.
- [23] FANG Ling (方玲). 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果 [J]. *Chin J Appl Ecol (应用生态学报)*, 2000, 11 (2): 249 - 252.

- [24] CHANG B V, CHIANG F, YUAN S Y. Biodegradation of Nonylphenol Insewage Sludge [J]. *Chemosphere*, 2005, 60 (11): 1652 - 1659.
- [25] YUAN S Y, YU C H, CHANG B V. Biodegradation of Nonylphenol in River Sediment [J]. *Environ Pollut*, 2004, 127 (3): 425 - 430.
- [26] SUNDARAM B, RAI S K, RAVENDRA N. Degradation of Bifenthrin, Chlorpyrifos and Imidacloprid in Soil and Bedding Materials at Tem iticidal Application Rates [J]. *Pestic Sci*, 1999, 55: 1222 - 1228.
- [27] ZHANG Wei (张卫), YU Yun-long (虞云龙), WU Jia-lun (吴加伦), et al 阿维菌素在土壤中的降解和高效降解菌的筛选 [J]. *Acta Pedologica Sinica (土壤学报)*, 2004, 40 (4): 590 - 596.
- [28] WANG Zhao-shou (王兆守). Degradation of Pesticide Residues on Tea by Microorganisms (微生物降解茶叶农药残留的研究) [D]. Fujian (福建): Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2003: 18.
- [29] WANG Xue-dong (王学东), OU Xiao-ming (欧晓明), WANG Hui-li (王慧丽), et al 除草剂咪唑烟酸高效降解菌的筛选及其降解性能的研究 [J]. *J Agro Environ Sci (农业环境科学学报)*, 2003, 22 (1): 102 - 105.
- [30] PIOTROWSKA-SEGET Z, CYEON M, KOZDRÓJ M. Metal-tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Spoil [J]. *Appl Soil Ecol*, 2005, 28: 237 - 246.
- [31] XU Yu-xin (许育新). Isolation, Degradation Characters and Cooperating Metabolism Studies of Cypemethrin Degrading-Bactrium Strains CD T3, PBM 11 (氯氰菊酯降解菌株 CD T3、PBM 11 的分离、降解特性及协同代谢研究) [D]. Nanjing (南京): Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2005: 65 - 74.
- [32] SEBASTIAN R S, ZEEV R, LENS A. Growth in Coculture Stimulates Metabolism of the Phenylurea Herbicide Isoproturon by *Sphingomonas* sp. Strain SRS2 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68 (7): 3478 - 3485.
- [33] JONATHAN D V, OWEN P W. Pheysical and Metabolic Interactions of *Pseudomonas* sp. Strain JAS-B45 and *Rhodococcus* sp. Strain F9-D79 During Growth on Crude Oil and Effect of a Chemical Surfactant on Them [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (10): 4874 - 4879.
- [34] PAVEL S, YEHUDA C. Oxygen-dependent Growth of the Sulfate-reducing Bacterium *Desulfovibrio Oxycline* in Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB in an Aerated Sulfate-depleted Chemostat [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (11): 5019 - 5023.

(Ed TANG J)

2009年《农药学学报》部分审稿专家名单

(按姓氏拼音排序)

曹劫程	陈馥衡	陈福良	陈列忠	陈万义	董襄朝	董学会	杜凤沛	段留生	高希武
龚勇	顾中言	郭荣君	韩丽君	韩鲁佳	贺红武	侯太平	侯玉霞	花日茂	黄啟良
李顺鹏	李振	李忠	李重九	李祖光	梁沛	刘长令	刘丰茂	刘峰	刘尚钟
刘树深	刘维屏	刘西莉	刘雪松	刘育	吕潇	罗万春	马忠华	孟子晖	莫建初
潘灿平	彭浩	钱传范	乔雄梧	秦曙	秦钰慧	覃兆海	邱立红	芮昌辉	单正军
史雪岩	苏少泉	孙英	陶传江	陶黎明	屠豫钦	汪清民	王道全	王捷	王金信
王开运	王明安	王文桥	魏方林	吴文君	吴益东	席真	谢孟峡	徐汉虹	徐军
杨代斌	杨光富	杨新玲	叶邦策	俞晓平	虞云龙	袁会珠	袁善奎	张朝贤	张传清
张红艳	张建军	张金林	张文吉	张一宾	张友军	张钟宁	赵尔成	赵卫光	郑斐能
周明国	周军英	朱金文							

在此本刊编辑部及广大作者、读者对各位审稿专家严谨治学的态度和无私的奉献精神致以崇高的敬意和诚挚的感谢!希望您能一如既往地对本刊给予支持和帮助!

《农药学学报》编辑部
2009年12月