

# 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究

许育新, 戴青华, 李晓慧, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学院微生物学系 农业部环境微生物工程重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 采用室内培养试验方法, 从农药厂污泥中分离到一株降解氯氰菊酯的放线菌(命名为 CDT3), 并对该菌进行了鉴定, 研究了其生理特性。结果表明, CDT3 能以共代谢的方式降解氯氰菊酯, 经 16SrDNA 序列分析, 鉴定为红球菌属(*Rhodococcus* sp.)。降解性能验证显示在摇瓶中对 100 mg · L<sup>-1</sup> 氯氰菊酯 72 h 降解效率达到 84.24%。CDT3 在 LB 培养基中经 15 h 达到稳定期, 在葡萄糖铵盐培养基中经 25 h 达到稳定期。生长条件的初步研究显示, 其最适碳源为葡萄糖, 最适有机氮源为酵母膏, 无机氮源为硫酸铵, 最适温度 30℃, 最适 pH 8.0。无机盐利用试验表明, 当添加 1% 的磷酸二氢钾, 0.2% 的氯化钠, 0.2% 的硫酸镁, 0.05% 的碳酸钙时菌体生长良好; 抗生素试验表明, CDT3 对多种抗生素均敏感。小区试验中对茶叶上氯氰菊酯的降解率达到 68.94%。

**关键词:** 氯氰菊酯; 降解菌; 生长条件; 降解效率

**中图分类号:** X172    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1672 - 2043(2004)05 - 0958 - 06

## Isolation and Identification of Cypermethrin Degrading - Bacterium CDT3 and Its Degradation Characters

XU Yu-xin, DAI Qing-hua, LI Xiao-hui, LI Shun-peng

(Department of Microbiology, Life Science Collage, Nanjing Agricultural University, Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** A bacterial strain capable of degrading cypermethrin, named CDT3, was isolated from the sludge of pesticide factory. Two conservative primer of 16SrDNA were designed by refer to *E. coli* sequence and CDT3's 16SrDNA sequence was amplified through polymerase chain reaction (PCR). Through chemotaxonomic characterization and phylogenetic inference based on 16SrDNA homologous analysis, the strain was identified as a member genus of *Rhodococcus* sp. CDT3 could not grow in mineral medium containing cypermethrin without any other carbon resource, meanwhile cypermethrin can be degraded by CDT3 with the present of other carbon resource, so CDT3 was considered to be able to degrade cypermethrin in the cometabolism method. CDT3 reached to its stationary phase after 15 hours in LB medium or 25 hours in glucose ammonia medium. The optimum carbon source, organic nitrogen source, inorganic nitrogen source for CDT3 were glucose, yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> respectively and 30 °C, pH 8.0 were the optimum growth conditions of CDT3. The mineral experiment showed the strain grew well with 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% NaCl, 0.2% MgSO<sub>4</sub> and 0.05% CaCO<sub>3</sub> in the cultural medium and CDT3 was sensitive to several antibiotics. The cypermethrin quantity was determined roughly through ultraviolet scan method at 278nm and analyzed accurately by GC with ECD. The results showed CDT3 could degrade 84.24% 100 mg · L<sup>-1</sup> cypermethrin within 72h in flask. The degradation rate of cypermethrin by CDT3 was 68.94% in the plot experiment of tea trees.

**Keywords:** cypermethrin; degradation bacterium; growth conditions; degradation rate

拟除虫菊酯类杀虫剂是一类人工合成的、类似天然除虫菊酯的化合物。氯氰菊酯是拟除虫菊酯类杀虫剂的一种, 是 M. Elliott 等人 1974 年发现的杀虫剂<sup>[1]</sup>。氯氰菊酯是安全有效的广谱杀虫剂, 从 20 世纪 80 年代以后, 在我国得到广泛使用<sup>[2]</sup>。

虽然除虫菊酯类农药被认为是高效低毒的农药, 但是, 拟除虫菊酯杀虫剂具有对光、热稳定的特点, 在环境中的半衰期较长, 很难在自然条件下快速降解。由于长期的使用, 很多害虫出现了抗药性, 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<sup>[3]</sup>。尽管它们的毒性相对较低, 但大量的残留还是给人们的健康带来了巨大的威胁。尤其是在我国加入了 WTO 以后, 西方国家调整了农产品的农药

收稿日期: 2004 - 01 - 07

基金项目: 国家十五科技攻关重大专项(2002BA516A01)

作者简介: 许育新(1971-), 男, 博士研究生。E-mail: lux\_xu@sina.com

联系人: 李顺鹏, E-mail: lsp@njau.edu.cn

残留标准,使我国的农产品出口受到更严格的限制,例如茶叶,这迫使我们寻找一种切实有效的方法来解决这一难题<sup>[4]</sup>。以生物修复(Bioremediation)为理论基础的农药残留降解菌技术就应运而生了,该技术具有高效、无毒、无二次污染的特点,而且经济实用,操作简便,目前已成为去除农药残留污染的一种重要方法<sup>[5]</sup>,国内外已有相关研究报道。本实验室经多年的研究,已筛选到了多株降解有机磷、氨基甲酸酯、除虫菊酯杀虫剂和除草剂农药的降解菌,而且已推广应用了几万公顷,取得了良好的经济效益和社会效益。

目前,国内外很多有关农药残留降解菌研究的报道,但对拟除虫菊酯类农药的降解菌报道相对较少。据目前收集的资料,国外报道的菌株有蜡状芽孢杆菌属(*Bacillus cereus*.)等一些菌<sup>[6-8]</sup>,而国内则集中在产碱菌属(*Alcaligenes sp.*)的一株菌<sup>[9-11]</sup>。它们的共同点是都以共代谢(Cometabolism)的方式降解(转化)菊酯,且当菊酯浓度超过  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,降解率明显下降甚至不降解。这一方面可能由于菊酯的疏水性较强,另一方面可能与降解产物对细菌的毒害有关。共代谢是微生物降解污染物的一种重要方式,即微生物在以某种基质为碳源和能源生长时,能同时代谢农药等化合物,但这种微生物不能利用这些化合物,它只是改变它们的结构,产生中间产物,结果是农药并没有完全被矿化<sup>[5,12]</sup>。本文对本实验室筛选的一株降解氯氰菊酯的放线菌 CDT3 的生长条件和降解特性进行了初步探究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 培养基与试剂<sup>[13]</sup>

基础盐培养基 MM:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2、 $\text{NaCl}$   $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.5; 富集培养基: 在培养基 MM 中加入一定浓度的农药和适量的酵母膏; LB 培养基: 蛋白胨 10、酵母膏 5、 $\text{NaCl}$   $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.2; 葡萄糖铵盐培养基: 在 MM 中加入葡萄糖  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.0(固体培养基中加入 2% ~ 2.5% 的琼脂); 碳源试验培养基: 在 MM 中加入  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的各种碳源(葡萄糖、蔗糖、果糖、木糖、乳糖、半乳糖); 氮源试验培养基: 在 MM 中不加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 另外加入  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的各种氮源(有机氮: 酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、尿素; 无机氮:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); 无机离子试验培养基: MM 分别不加入  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ , 再分别按  $0.2$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的量加入  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 按  $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的量加入

$\text{NaCl}$ ; 按  $0.2$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的量加入  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 按  $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.5$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的量加入  $\text{CaCO}_3$ 。10% 氯氰菊酯乳油、90% 氯氰菊酯原油由江苏农药研究所农药厂赠送,98% 氯氰菊酯标准品购自上海农药研究所,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 降解菌的分离与鉴定

#### 1.2.1 降解菌的筛选<sup>[14]</sup>

将采自江苏农药研究所农药厂的污泥  $2 \text{ g}$  加入  $100 \text{ mL}$  含  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯氰菊酯的富集培养基中,培养  $7 \text{ d}$  后以 10% 的接种量转入同样的培养基中,同时用三氯甲烷提取富集液中的氯氰菊酯,以不接菌的富集培养基作对照,于  $350 \sim 200 \text{ nm}$  波长范围内做紫外扫描检测农药。重复以上过程,直到观察到农药的降解。取  $1 \text{ mL}$  富集液分别稀释涂布到含  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯氰菊酯的固体 MM 和 LB 培养基中。挑取菌体和菌落形态不同的菌,接种到 LB 试管中培养,菌体离心洗涤后加入含  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯氰菊酯的,  $72 \text{ h}$  后检测农药。

#### 1.2.2 降解菌的鉴定

a. 采用传统的细菌鉴定方法,检测各种生理生化指标<sup>[15]</sup>

b. 采用扩增、测定 16SrDNA 序列,通过检索 GenBank 数据库鉴定到属<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.2.1 CDT3 染色体总 DNA 的提取

CDT3 提前  $2 \text{ d}$  划平板活化,挑单菌落接种于  $5 \text{ mL}$  试管,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  剧烈振荡培养过夜  $\rightarrow$  10% 接种量转接至  $50 \text{ mL}$  LB 液体培养基摇至稳定期 ( $\text{OD}_{600} > 1.0$ ,  $> 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $\rightarrow 12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心  $5 \text{ min}$   $\rightarrow$  TEN 洗涤菌体  $\rightarrow$  离心收集菌体  $\rightarrow$  悬浮于  $10 \text{ mL}$  的 TEN 中  $\rightarrow$  加入  $50 \mu\text{L}$  蛋白酶 K ( $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 再加入  $1 \text{ mL}$  的 10% SDS,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$   $3 \text{ h}$  温水浴  $\rightarrow$  加入  $1/3$  体积的饱和 NaCl 剧烈振荡  $15 \text{ s}$   $\rightarrow 12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心  $5 \text{ min}$   $\rightarrow$  上清用等体积的酚:三氯甲烷抽提  $2$  次,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心  $5 \text{ min}$  收集上清  $\rightarrow$  加入  $0.6$  体积的异丙醇沉淀  $\rightarrow 70\%$  乙醇洗涤,吹干,溶于 TER 中,备用。

#### 1.2.2.2 16S rDNA 扩增

上游引物: CC Gaattc g TCg ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA - 3'。

下游引物: CCC g ggA TCC Aag CTTAC ggCTACC-C TTgTTACgACTT - 3'

$100 \mu\text{L}$  反应体系: 模板  $5 \mu\text{L}$ , dNTP ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $8 \mu\text{L}$ , 引物 ( $25 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )  $4 \mu\text{L}$ , Buffer ( $10 \times$ )  $10$

$\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $10 \mu\text{L}$ , Taq 酶  $2 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $57 \mu\text{L}$ 。

反应条件:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $52 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ , 循环  $30$  次;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保温。

### 1.3 CDT3 最适生长条件研究

#### 1.3.1 CDT3 生长曲线测定

按 5% 的接种量接入 LB 培养基和葡萄糖铵盐培养基中,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 定时取样测 OD600 值。(LB 培养基培养的菌液需先离心  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $5 \text{ min}$ , 再用无菌水重悬后测定)。

#### 1.3.2 碳源、氮源、无机盐利用试验

均按 2.5% 的接种量接入待测培养基 (装瓶量  $100 \text{ mL}/250 \text{ mL}$ ) 中,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 振荡培养。根据生长曲线测定结果, 在最高生长量期即培养  $25 \text{ h}$  后取样, 测定 OD600 值。

#### 1.3.3 温度试验

按 2.5% 的接种量接入葡萄糖铵盐培养基 (装瓶量  $100 \text{ mL}/250 \text{ mL}$ ), 分别于  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 振荡培养。 $25 \text{ h}$  后取样, 测定 OD600 值。

#### 1.3.4 pH 试验

葡萄糖铵盐培养基 (装瓶量  $100 \text{ mL}/250 \text{ mL}$ ), 初始 pH 分别调至  $5.0$ 、 $6.0$ 、 $7.0$ 、 $8.0$ 、 $9.0$ , 按 2.5% 的接种量接种,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 振荡培养。 $25 \text{ h}$  后取样, 测定 OD600 值。

#### 1.3.5 碳源、氮源双因素试验

以葡萄糖为碳源, 硫酸铵为氮源, 设定 3 个葡萄糖浓度梯度, 同一梯度下, 改变 C/N 比, 分别为  $10:1$ 、 $20:1$ 、 $40:1$ , 按 2.5% 的接种量接种,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 振荡培养。 $25 \text{ h}$  后取样, 测定 OD600 值。

### 1.4 CDT3 的抗生素抗性试验

取培养好的菌液  $0.1 \text{ mL}$  于灭菌的平皿中, 到入 LB 培养基, 混匀, 备用。将小滤纸片在待测抗生素中浸润后贴于平板的不同区域, 平板于  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  培养, 观察抑菌圈的有无及大小。

### 1.5 CDT3 对氯氰菊酯的降解试验

#### 1.5.1 摇瓶中的降解试验

在 MM 培养基 (装瓶量  $100 \text{ mL}/250 \text{ mL}$ ) 中加入氯氰菊酯使浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以 2% 的量接入 OD600 = 1.0 的 CDT3 菌液, 同时添加酵母汁使其浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以不接菌的培养基作对照,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 振荡培养,  $72 \text{ h}$  后检测农药残留

量。

#### 1.5.2 小区试验<sup>[17]</sup>

用 10% 的氯氰菊酯乳油加水配制成  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 将新叶长出 5 片以上, 高度为  $1 \text{ m}$  左右的绿茶茶树分为处理和对照两个区, 每个区各设 3 个重复小区, 小区面积为  $3 \text{ m}^2$ , 每个小区约 4 棵茶树。农药喷施于茶树的叶面,  $24 \text{ h}$  后, 处理区喷稀释 10 倍的 CDT3 菌液 ( $> 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 对照区喷清水。农药和菌液的用量均为  $75 \text{ mL} \cdot \text{m}^{-2}$ , 喷施时间均为傍晚, 无雨。喷菌  $72 \text{ h}$  后按“S”形方法采集茶叶, 测定农药残留量。

### 1.6 农药检测方法

#### 1.6.1 紫外扫描检测

由于氯氰菊酯在三氯甲烷中在  $278 \text{ nm}$  有特征吸收峰, 因此可以通过紫外扫描的方法对氯氰菊酯的含量作定性分析。吸取  $2 \text{ mL}$  培养液, 加入  $4 \text{ mL}$  三氯甲烷, 振荡混匀, 静置使萃取充分, 弃去上层水相, 加入少量无水硫酸钠吸取残留水分, 于  $350 \sim 200 \text{ nm}$  波长范围内在 SHIMADZU UV2401 紫外扫描仪上扫描。

#### 1.6.2 气相色谱检测<sup>[18]</sup>

培养液中氯氰菊酯的提取: 吸取  $1 \text{ mL}$  菌液, 加入  $5 \text{ mL}$  丙酮, 混匀  $1 \text{ min}$  静置, 加入无水氯化钠至饱和, 混匀  $1 \text{ min}$  静置, 吸取  $0.1 \text{ mL}$  上层液, 氮气吹至近干, 用正己烷定容至  $1 \text{ mL}$ , 加入无水硫酸钠, 上机分析。

茶叶上残留氯氰菊酯的提取: 称取新鲜叶片  $25 \text{ g}$ , 加入  $25 \text{ mL}$  乙腈, 在高速匀浆机中以  $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  匀浆  $1 \text{ min}$ , 匀浆液倒入具塞量筒, 加入  $5 \text{ g}$  干燥的 NaCl, 振荡混匀、静置, 待分层后取  $10 \text{ mL}$  上层液, 用氮气吹至近干, 加  $5 \text{ mL}$  淋洗液 (10% 丙酮: 90% 石油醚) 溶解, 过弗罗里硅土柱净化, 用适量淋洗液净化, 收集淋洗液, 用氮气吹至近干, 加正己烷定容至  $5 \text{ mL}$ , 上机检测。

气相色谱检测条件: 气相色谱仪为 HP6890 (带工作站), 载气:  $99.999\% \text{ N}_2$ , 平均线速度  $38 \text{ cm} \cdot \text{L}^{-1}$ , 不分流进样, 进样量  $1 \mu\text{L}$ , HP-5 毛细管柱 ( $30.0 \text{ m} \times 0.530 \text{ mm} \times 1.5 \mu\text{m}$ ), 以外标法定量; 进样口温度  $240 \text{ }^\circ\text{C}$ , ECD 检测器温度  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ , 柱温采用程序升温: 初温  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , 以  $25 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  升温至  $290 \text{ }^\circ\text{C}$ , 在此温度保持  $10 \text{ min}$ 。

本检测方法样品中氯氰菊酯的含量以各种异构体的总量计, 最小检出量为  $0.0050 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。菌液和茶叶样品中, 分别做了  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的添加回收率试验, 平均回收率都在 90% 和 110% 之

间, 变异系数在 10% 以下, 符合农药残留检测的标准。

## 2 结果及讨论

### 2.1 菌株鉴定

菌体形态: 在葡萄糖铵盐培养基中呈短杆状; 在 LB 中呈长杆状; 成单、成双、成链; 大小  $0.6 \sim 1.2 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 6.0 \mu\text{m}$ 。菌落特征: 圆形, 在 LB 上呈橙色, 略干, 隆起, 老的培养物边缘有扩散现象。生理生化特征: 革兰氏染色阳性, 不能发酵葡萄糖产酸, 严格呼吸型代谢, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, V-P 反应阴性, 甲基红反应阴性, 不能利用淀粉, 可液化明胶, 还原硝酸盐到亚硝酸盐, 可氧化乙醇到乙酸。

经过生理生化试验和 16SrDNA 序列分析, CDT3 初步鉴定为红球菌属 (*Rhodococcus sp.*), 见图 2。CDT3 在以氯氰菊酯为唯一碳源的 MM 培养基中不生长, 但在有其他碳源存在可以降解氯氰菊酯, 所以可以认为 CDT3 是以共代谢的方式降解农药的。

### 2.2 生长曲线测定

以 5% 的接种量接入  $\text{OD}_{600} = 1.0$  的 CDT3 菌种,  $30^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 定时取样测  $\text{OD}_{600}$  值。CDT3 在 LB 培养基中延滞期约 3 h, 对数生长期约 8 h, 经 15 h 达到稳定期; 在葡萄糖铵盐培养基中延滞期约 4 h, 对数生长期约 20 h, 经 25 个小时达到稳定期。CDT3 在营养丰富的 LB 培养基中的生长速度较快, 生长量也较大, 而在葡萄糖铵盐培养基中的生长周期长, 生长量也较小。考虑到葡萄糖铵盐培养基中葡萄糖的浓

度相对较低, 可能适当的提高碳源浓度可以提高菌体的产量, 这将在后面的试验中验证。

### 2.3 生长条件的研究

#### 2.3.1 碳源、氮源利用试验

从图 3、图 4、图 5 可以看出, CDT3 可利用木糖、蔗糖、半乳糖、葡萄糖和果糖等多种碳源, 不能利用乳糖, 在葡萄糖中生长得最好, 果糖次之。CDT3 可利用多种氮源, 在有机氮中生长明显好于无机氮, 最适有机氮源为酵母膏, 无机氮源为硫酸铵。在有机氮存在的条件下菌体的生长量有明显增加, 这可能与有机氮源也可以提供部分碳源营养, 而且含有丰富的生长因子有关。

#### 2.3.3 添加无机盐对 CDT3 生长的影响

从表 1 可以看到, 添加  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  菌体生长最好,  $\text{NaCl}$  的加入量在  $1 \sim 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时菌体生长最好, 添加  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  菌体生长最好, 添加  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  菌体生长最好。适当的添加无机营养都有助于 CDT3 的生长, 尤其是  $\text{K}^+$  对菌体的产量影响最大, 原因有待进一步分析。

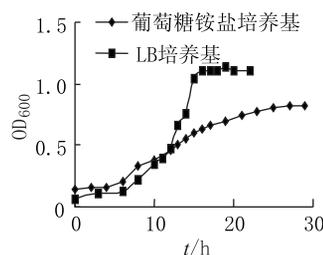


图 3 CDT3 在葡萄糖铵盐/LB 培养基中生长曲线

Figure 3 The growth curve of CDT3 in glucose/LB medium

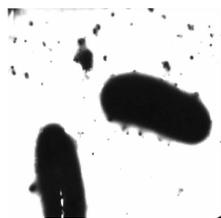


图 1 CDT3 的电镜照片 ( $\times 199\ 000$ )

Figure 1 EMS photo of CDT3

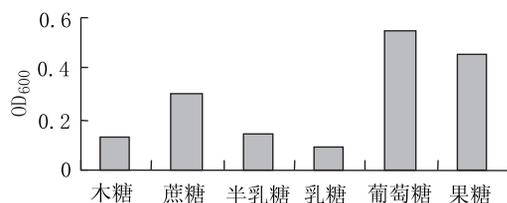


图 4 不同碳源对 CDT3 生长的影响

Figure 4 Effect of various carbon sources on the growth of cDT3

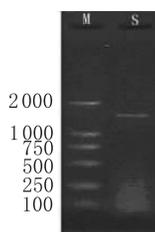


图 2 CDT3 的 16s rDNA 电泳图谱

Figure 2 Electrophoretogram of 16s rDNA of CDT3

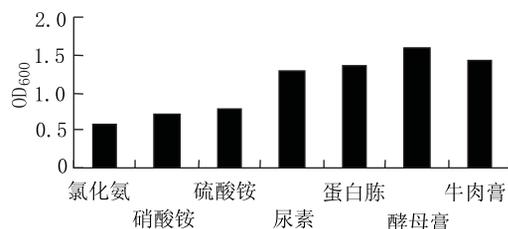


图 5 不同氮源对 CDT3 生长的影响

Figure 5 Effect of various nitrogen sources on the growth of CDT3

表 1 无机盐对菌体生长的影响

Table 1 Effect of minerals on the growth of CDT3

NaCl/g · L <sup>-1</sup>	OD(600 nm)	MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O/g · L <sup>-1</sup>	OD(600 nm)	CaCO <sub>3</sub> /g · L <sup>-1</sup>	OD(600 nm)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /g · L <sup>-1</sup>	OD(600 nm)
0.5	0.503	0.2	0.254	0.2	0.580	0.2	0.597
1	0.616	0.5	0.366	0.5	0.665	0.5	0.609
2	0.633	1	0.407	1	0.592	1	0.816
5	0.528	2	0.603	2	0.593	2	0.784

### 2.3.4 温度、pH 试验

从图 6、图 7 可以看到, CDT3 在 30 °C 生长良好, 温度过高或过低都不利于它的生长。CDT3 在偏碱条件下生长良好, 其生长的最适 pH 为 8.0, pH 值低于 7.0 时生长明显受到抑制。CDT3 属红球菌属, 是一种放线菌, CDT3 在 30 °C、碱性环境下生长良好, 这与鉴定结果是一致的。

### 2.3.5 碳氮比试验

从图 8 中可以看出, 添加碳源越多, 菌体生长越好, 但添加 1% 的葡萄糖与添加 2% 的相差不大, 故从节约的角度来看, 添加 1% 的碳源更合适。在 1% 和 2% 浓度的碳源试验中, C/N 比为 40:1 的生长最好。碳氮比的试验结果可以为 CDT3 以后的大规模发酵生产提供理论依据。

### 2.3.6 抗生素抗性试验

CDT3 对多种抗生素均敏感, 其中链霉素能强烈抑制 CDT3 的生长(表 2)。这虽然给 CDT3 的基因操作造成了一定的困难, 但对于降解菌在应用中的安全性却是有利的。

### 2.4 降解性能的验证

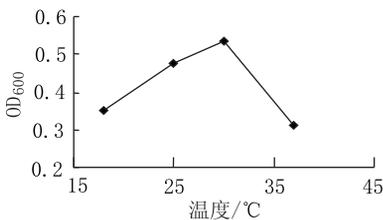


图 6 温度对 CDT3 生长的影响

Figure 6 Effect of temperature on the growth of CDT3

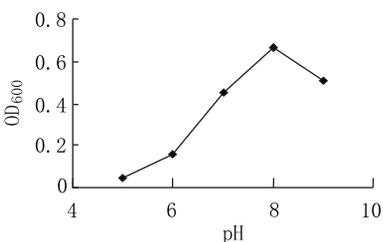


图 7 pH 对 CDT3 生长的影响

Figure 7 Effect of pH on the growth of CDT3

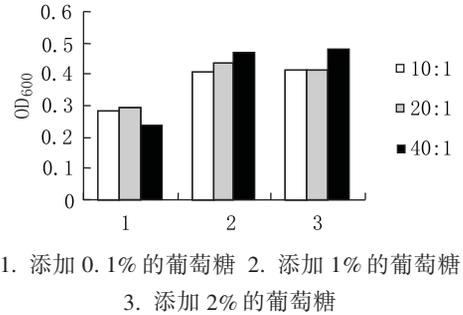


图 8 不同的 C/N 比对 CDT3 生长的影响

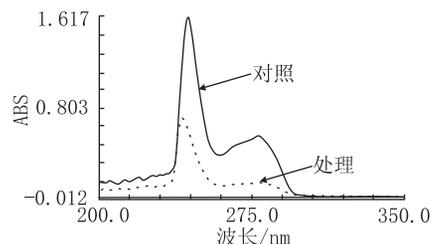
Figure 8 Effect of various C/N ratios on the growth of CDT3

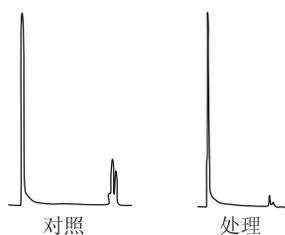
分别用紫外扫描和气相色谱方法分析了 CDT3 在摇瓶中对氯氰菊酯的降解效果。CDT3 的 OD<sub>600</sub> 为 1.0, 接种量为 2.5%, 农药浓度为 100 mg · L<sup>-1</sup>, 经过 3 d 的摇瓶培养, 培养液经三氯甲烷提取后作紫外扫描, 波长 278 nm 处为氯氰菊酯的特征紫外吸收峰。与对照相比, 在 278 nm 处已基本无峰, 说明加菌的处理中氯氰菊酯已经基本被降解(图 9)。以上样品经过气相色谱检测(图 10), 对照的平均浓度为 93.375 mg · L<sup>-1</sup>, 处理的平均浓度为 14.715 mg · L<sup>-1</sup>, 降解率为 84.24%。虽然 CDT3 不能利用农药生长, 但在有其他

表 2 抗生素试验

Table 2 The sensitivity of CDT3 to antibody

种类	浓度/μg · mL <sup>-1</sup>	抑菌圈大小/d · cm <sup>-1</sup>
Amp	100	0.70
Chl	170	1.46
Kan	50	1.34
Str	50	1.65
Tc	50	1.00

图 9 100 mg · L<sup>-1</sup> 氯氰菊酯 CDT3 降解的紫外扫描图谱Figure 9 UV - Scan graph of degradation of 100 mg · L<sup>-1</sup> cypermethrin by CDT3



(图中 7.8 ~ 8.5 min 的峰为氯氰菊酯,有多种异物体)

图 10 100 mg · L<sup>-1</sup> 氯氰菊酯 CDT3 降解的气相色谱图

Figure 10 GC graph of degradation of 100 mg · L<sup>-1</sup> cypermethrin by CDT3

表 3 CDT3 对茶叶上氯氰菊酯降解影响的田间小区试验

Table 3 Degradation of cypermethrin by CDT3 in tee trees in the plot experiment

样品编号	农药残留量/mg · kg <sup>-1</sup>	平均数/mg · kg <sup>-1</sup>	降解率/%
对照 1	0.4362		
对照 2	0.4268	0.4216	
对照 3	0.4019		68.94
处理 1	0.1157		
处理 2	0.1499	0.1309	
处理 3	0.1290		

营养存在时菌体生长达到一定浓度后可以农药降解。试验中还发现即使没有营养,但菌体量足够大时仍然可以观察到农药被降解的现象,因此推测农药的降解是一种酶在起作用,而这种酶的量与 CDT3 菌体的量呈正相关,这与其他的有关菊酯降解菌研究报道是一致的<sup>[8,10]</sup>,这也是“共代谢”降解菌的一个普遍规律<sup>[4,12]</sup>。

## 2.5 小区试验

从表 3 结果可以看出, CDT3 对茶叶上氯氰菊酯降解率达到 68.94%。田间试验受多种因素的影响,比如温度、湿度等气候因素,以及降解菌和叶面农药之间的相互作用和在实验室的摇瓶中不一样,这都直接影响到试验结果,因此本次田间试验的结果不如实验室的降解效果好并不奇怪,应将通过试验不断优化田间试验的条件,尽可能提高降解菌在田间应用的效果。

## 3 讨论

通过富集培养法分离到了氯氰菊酯降解菌 CDT3,用生理生化和分子生物学方法将其鉴定为红球菌属(*Rhodococcus* sp.)。研究了 CDT3 的最适生长条件,为以后的大规模的发酵生产提供了理论参数。初步研究了 CDT3 的降解性能并作了茶叶小区试验,证实是以共代谢的方式降解农药的。本试验为利用降

解菌消除茶叶和其他农作物的菊酯类农药污染提供了一种新的方法。在研究中发现,除虫菊酯杀虫剂结构较复杂,水溶性极小,因此降解菌难以筛选。尤其是分离的降解菌不能以此类农药作为碳源和能源,只能以共代谢的方式降解农药,造成降解效果的不稳定和降解性状的易退化,这都给此类降解菌的研究和应用带来了障碍。研究中发现的问题,有待在以后的工作中解决。例如研究农药在降解菌作用下的代谢途径和有关降解酶的研究,尤其是降解酶基因的研究和降解酶基因的克隆和高效降解基因工程菌的构建将有助于上述问题的根本解决,这也将是下一步的工作方向。

## 参考文献:

- [1] 沙家骏,等. 农用化学品[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [2] 应鹤鹑. 拟除虫菊酯类农药的应用技术[M]. 北京:化学工业出版社,1988.
- [3] 郭敦成. 农药毒理及其应用[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1984.
- [4] 陈宗懋. 我国茶叶农药残留的研究进展与展望[J]. 中国茶叶,1994,16(3):30-31.
- [5] 郑重. 农药的微生物降解[J]. 环境科学,1990,11(2):68-72.
- [6] Malony S E, Maule A, Smith A R W. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(11):2874-2876.
- [7] Malony S E, Maule A, Smith A R W. *Arch Microbiol*, 1992, 158:282-286.
- [8] Malony S E, Maule A, Smith A R W. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(7):2007-2013.
- [9] 虞云龙,宋凤鸣,郑重,等. 一株广谱性农药降解菌的分离与鉴定[J]. 浙江大学学报,1997,23(2):111-115.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 张锡辉,王志非. 难降解有机污染物共降解机理解析[J]. 水污染防治,2000,19(7):297-301.
- [13] 沈萍,范秀容,李广武,等. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [14] 王永杰,李顺鹏,沈标,等. 有机磷农药广谱活性降解菌的分离及其生理特性研究[J]. 南京农业大学学报,1999,22(2):42-45.
- [15] 东秀珠,蔡妙英,等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆第 2 版[M]. 北京:科学出版社,1996.
- [17] 程国锋,李顺鹏,沈标,等. 微生物降解蔬菜残留农药研究[J]. 应用与环境生物学报,1998,4(1):81-84.
- [18] 买光照,刘潇威,陈勇,等. 毛细管气相色谱法同时测定苹果、梨中氯氰菊酯、联苯菊酯和氟氰菊酯的残留量[J]. 农业环境保护,2002,21(3):260-262,275.