

· 研究论文 ·

## 新型杀螨剂 F1050 优势降解菌(芽孢杆菌)的筛选及其鉴定

吴慧明<sup>1</sup>, 张 晶<sup>2</sup>, 朱国念<sup>1\*</sup>

(1. 浙江大学 农药与环境毒理研究所, 浙江 杭州 310029; 2 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310014)

**摘 要:** 为探明土壤微生物对新农药 F1050 的降解能力, 用平板稀释和富集培养法分离驯化土壤中 F1050 的优势降解细菌, 并用合成培养基进行纯化培养, 利用美国 Biolog 公司的细菌自动鉴定系统, 初步筛选出 5 个菌株: ZJU. 01 为枯草芽孢杆菌 (*B. acillus subtilis*, 69%); ZJU. 02 为巨大芽孢杆菌 (*B. acillus megaterium*, 99%); ZJU. 03 为腊状芽孢杆菌 (*B. acillus cereus*, 86%); ZJU. 04 为腊状芽孢杆菌 (*B. acillus cereus*, 92%); ZJU. 05 为球形芽孢杆菌 (*B. acillus sphaericus*, 99%)。F1050 添加浓度为 50 mg/kg 的液体培养和室内土壤模拟降解试验结果表明, ZJU. 02、ZJU. 04 和 ZJU. 05 三个优势降解菌株对 F1050 表现出了较强的降解能力, 50 mg/kg F1050 的降解半衰期为 6 41 ~ 6 74 d, 而对照的灭菌和未灭菌土壤中的半衰期分别达 72 20 和 29 88 d; 不同菌株对 F1050 的降解能力没有显著差异。

**关键词:** F1050; 降解菌; 土壤微生物; 鉴定

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2004)02-0043-05

## Screening and Identification of Dominant Degradation Microorganisms to Miteicide F1050

WU Huiming<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, ZHU Guo-nian<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;  
2 Zhejiang Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310009, China)

**Abstract:** For exploring the degradation of miteicide F1050 by microorganisms, the plate methods and enrichment culture were progressed. Five strains of bacteria were obtained in soil by purification culture on the synthetic medium for miteicide F1050, which were ZJU. 01 (*B. acillus subtilis* 69%), ZJU. 02 (*B. acillus megaterium* 99%), ZJU. 03 (*B. acillus cereus* 86%), ZJU. 04 (*B. acillus cereus* 92%), ZJU. 05 (*B. acillus sphaericus* 99%). Results of the microbial degradation showed that ZJU. 02, ZJU. 04 and ZJU. 05 among those bacteria tested had special ability to degrade the chemicals in a series of culture medium with different volumes (10% in total volume) of bacteria suspension while the concentration of the acaricide at 50 mg/L in the media. And the miteicide has a promoted degradation process in soil by bacteria, the half-lives were 6 48 d, 6 74 d and 6 41 d respectively, compared with 29 88 d and 72 20 d in unsterilized or sterilized soil. There was no significant difference among the three dominant strains of miteicide F1050.

**Key words:** miteicide F1050; degradation strain; edaphon; identification

收稿日期: 2003-12-08; 修回日期: 2004-02-24

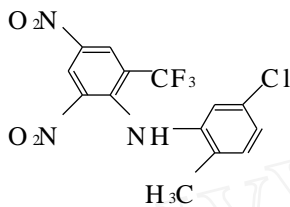
作者简介: 吴慧明(1972-), 男, 浙江景宁人, 硕士, 讲师, 主要从事农药环境毒理学、农药残留检测等方面的研究

联系电话: 0571-86971220; E-mail: hmwu@zju.edu.cn



大量的研究证明,土壤微生物对环境大多数农药的降解起着重要作用,且已分离到大批能降解或转化农药的微生物类群。1982年Mahaffy W R分离报道了几株降解农药开蓬(chlordecone)的纯菌株<sup>[1]</sup>;1988年Parsons J R报道了几种能降解含氯农药的纯菌株<sup>[2]</sup>。在已报道的降解菌株中,细菌由于其在生化上的多种适应能力以及容易诱发突变菌株等特性,在降解农药的众多微生物种群中占有最重要的位置<sup>[3~5]</sup>。

F1050,化学名称*N*-(2-甲基-5-氯苯基)-2,4-二硝基-6-三氟甲基苯胺,是由浙江省化工研究院与中国科学院上海有机化学研究所合作开发,从*N*-二取代二苯胺类化合物中筛选出来的一种新型高效杀螨剂,其化学结构式如下:



实验表明,F1050有较高的杀螨活性,尤其是对柑桔全爪螨 *Panonychus citri* (Mc Gregor)、苹果叶螨 *Panonychus ulmi*、棉花红蜘蛛 *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) 有良好防效(待发表)。至今国内外尚无有关F1050在环境中行为动态的相关研究报道。笔者通过富集培养法,筛选能快速降解土壤中F1050的优势降解菌,并对其降解能力进行了探讨。结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 农药标准品及土壤

F1050标准品,纯度97%,由浙江省化工研究院提供。

试验用土壤为小粉土(杭州),pH为6.22,有机质含量为3.153%,阳离子交换总量(CEC)为19.3 cmol/kg。

### 1.2 培养基

按文献[6]和文献[7]中推荐的合成培养基成分及方法配制本试验用培养基。

### 1.3 仪器

HP-1100 高效液相色谱仪(带DAD检测器及

色谱工作站,美国Agilent公司);细菌自动鉴定系统仪(Biolog Microstation System,美国Biolog公司);LRH-150-G光照恒温培养箱(广东省医疗器械厂);UV-150-02紫外分光光度计(日本岛津);RC26 plus高速冷冻离心机(SORVALL公司)。

## 2 试验方 法

### 2.1 F1050标准溶液的配制

用电子天平(0.1 mg)准确称取F1050标准品10.3 mg于10 mL容量瓶中,加入5 mL重蒸过的苯,超声5 min使农药完全溶解,再加苯至刻度,即为1000 mg/L的F1050标准母液。然后取一定量的标准母液,用苯稀释成所需浓度的标准溶液。

### 2.2 土壤微生物的驯化试验

自田间取回土壤(小粉土),经风干后过20目筛,称取2.0 kg,加入无菌水使土壤中含水量达20%,置于25 ± 1 °C恒温培养箱中适应性培养7 d。然后将已配制好的F1050标准溶液加入到土壤中,并混合均匀,使土壤中F1050的含量达50 mg/kg。待溶剂挥发后,装入250 mL棕色瓶中,放置于25 ± 1 °C恒温箱中培养。每隔30 d按每1 kg土壤添加50 mg F1050的量添加农药1次,共添加3次,进行微生物静态驯化培养。最后一次加药后5 d,从土壤中分离F1050降解菌株。

### 2.3 优势降解菌株的筛选

2.3.1 分离与培养 用平板稀释法和涂菌法分离驯化土壤中的F1050优势降解细菌<sup>[6,7]</sup>,并用合成培养基在30 ± 1 °C下进行纯化培养2 d。培养结束后,挑选生长较好的菌落并接种于选择性培养基上。进行4~5次划线分离后,挑选出生长良好的初筛单菌落,供进一步富集培养和菌株鉴定。

2.3.2 优势降解菌株的筛选 将上述初筛菌接种于富集培养基中,在30 ± 1 °C恒温摇床上培养48 h后,离心收集菌体。菌体用2 × 30 mL 0.02 mol/L的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 7.0)洗涤,再用同一缓冲液制成悬浮液,用紫外分光光度计测定,并用该缓冲液调节其OD<sub>460</sub>值至0.40。取各菌体悬浮液5 mL和含一定浓度F1050的无菌培养液(基础培养基+ F1050)45 mL于100 mL的三角瓶中(每处理重复3次,设不加菌液作对照),于30 ± 1 °C恒温摇床中培养。分别于接菌后1、2、3、

4、5、6、7、9、10、12 d 取样检测菌液中 F1050 残留量。根据各菌株对 F1050 的降解速率, 确定优势降解菌株。

#### 2.4 优势降解菌株的鉴定

用细菌自动鉴定系统仪进行菌株鉴定。

#### 2.5 土壤降解试验

将  $25 \pm 1$  恒温适应性培养 7 d 后的小粉土, 分别进行如下 3 种不同的处理: 灭菌小粉土 + F1050 标准溶液; 灭菌小粉土 + 优势降解菌 + F1050 标准溶液; 未灭菌小粉土 + F1050 标准溶液。称取 20 g (干重) 土壤置于 125 mL 棕色瓶中, 按每 1 kg 土壤含 50 mg F1050 的量加入标准溶液, 待溶剂挥发干后, 用无菌水调节土壤含水量至 20%。每处理设 3 次重复。将各处理土壤置于  $30 \pm 1$  恒温培养箱中避光培养, 于处理后间隔 0、1、3、7、10、15、25、30 d 分别取样检测土壤中 F1050 的残留量。

### 3 结果与分析

#### 3.1 优势降解菌初筛

试验分离出 5 个不同的单菌落, 分别命名为 ZJU. 01、ZJU. 02、ZJU. 03、ZJU. 04、ZJU. 05。将分离得到的菌落分别进行 F1050 降解试验, 以进一步筛选优势降解菌株。

#### 3.2 初筛降解菌株对 F1050 的降解作用

由图 1 可知, 在加入降解菌株的处理中, F1050 的降解速度比对照明显加快。处理 3 d 后, 各菌株对 F1050 的降解百分率最快为 ZJU. 02, 达 37.69%, 其

次为 ZJU. 05; 此时对照组仅降解了 5.43%。处理 10 d 后, 各菌株对 F1050 降解百分率都在 90% 以上, 而对照组仅降解 16.51%。在整个试验期间, 各处理组的降解速率分别为 0.774、5.399、0.409、0.539、6.404、4.039、5 mg/(kg·d)。试验结果表明, 筛选所得的菌株对 F1050 具有明显的降解作用, 降解能力的大小有一定的差异, 依次为 ZJU. 02 > ZJU. 05 > ZJU. 04 > ZJU. 01 > ZJU. 03。

F1050 的降解半衰期结果(表 1)表明, 分离所得到的 5 个菌株对 F1050 均有很强的代谢降解能力, 未接菌处理的培养液中, F1050 降解半衰期长达 38.94 d, 接入菌株后, 其半衰期仅为 1.89~2.41 d。

#### 3.3 初筛降解菌株的鉴定

经细菌自动鉴定系统仪生理生化指标培养鉴定, 分离得到的菌株分别是: ZJU. 01 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, 69%); ZJU. 02 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*, 99%); ZJU. 03 为腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, 86%); ZJU. 04 为腊状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*, 92%); ZJU. 05 为球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*, 99%)。

从菌株的鉴定情况可以看出, ZJU. 01 和 ZJU. 03 不是很纯, 其相似度仅为 69% 和 86%, 还有待于作进一步的纯化及对 F1050 降解能力的研究, 而另 3 种菌株的可信度均在 92% 以上。试验结果表明, ZJU. 02、ZJU. 05、ZJU. 04 对 F1050 的降解速度最快, 其中菌株的纯化程度会影响其对 F1050 的降解。

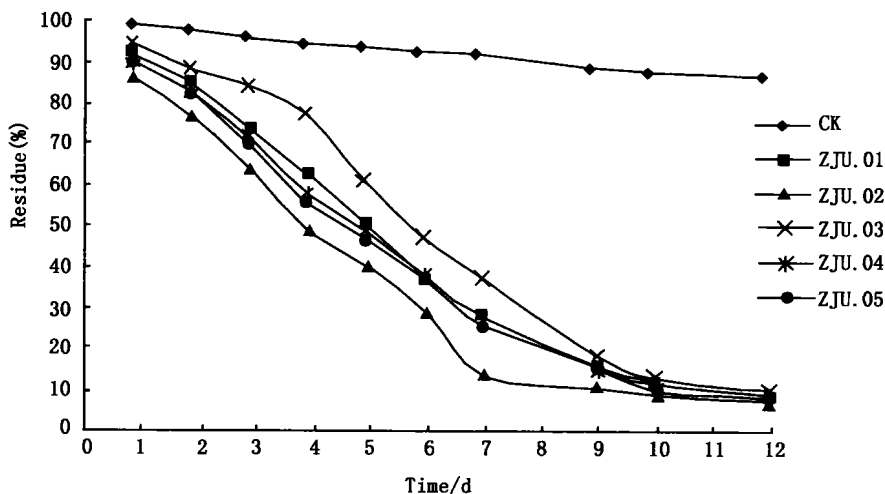


Fig. 1 Microbial degradation curves of F1050 in culture media

Table 1 The kinetic parameters of F1050 affected by the strains

Strain	Regression equation	$r^2$	Dynamics constant of degradation ( $k$ )	$T_{1/2}/d$
CK	$C = 100.10 e^{-0.0178t}$	0.9968	0.0178	38.94
ZJU. 01	$C = 167.27 e^{-0.2928t}$	0.9867	0.2928	2.37
ZJU. 02	$C = 173.71 e^{-0.3667t}$	0.9862	0.3667	1.89
ZJU. 03	$C = 190.53 e^{-0.2881t}$	0.9696	0.2881	2.41
ZJU. 04	$C = 168.08 e^{-0.3028t}$	0.9850	0.3028	2.29
ZJU. 05	$C = 174.08 e^{-0.3183t}$	0.9806	0.3183	2.18

### 3.4 优势降解菌株对 F1050 的降解能力

试验结果表明: 添加优势降解菌株处理组 F1050 的降解速率显著大于灭菌小粉土和未灭菌小粉土中的 F1050 (表 2)。由表 2 可知, F1050 在未灭菌小粉土中的降解并不符合一级动力学方程, 其相关系数 ( $r^2$ ) 仅为 0.5398, 可能是因为 F1050 在天然土壤中的降解受微生物和其他理化因子共同影响。添加 F1050 3 d 后, 未灭菌土壤中的 F1050 降解了

60.54%, 其他处理 (灭菌; 灭菌 + ZJU. 02; 灭菌 + ZJU. 04; 灭菌 + ZJU. 05) 分别降解了 5.43%、42.42%、35.38% 和 34.07%; 处理后 10 d, F1050 的降解百分率分别为 12.35%、87.14%、91.63%、87.46% 和 94.92%。可见, 在处理前期, 未灭菌小粉土中的 F1050 在各种因子的共同作用下迅速降解, 随后降解率下降, 至 30 d 时仍有 10.98% 的 F1050 残留在土壤中。而此时, 添加优势菌的 3 个处理仅有

Table 2 Kinetic parameters of F1050 in soil microbial degradation

Treatment	Regression equation	$r^2$	Dynamics constant of degradation ( $k$ )	$T_{1/2}/d$
Sterilized soil	$C = 96.693 e^{-0.0096t}$	0.9929	0.0096	72.20
Unsterilized soil	$C = 31.248 e^{-0.0232t}$	0.5398	0.0232	29.88
Sterilized soil+ ZJU. 02	$C = 66.254 e^{-0.1070t}$	0.9283	0.1070	6.48
Sterilized soil+ ZJU. 04	$C = 75.912 e^{-0.1028t}$	0.9639	0.1028	6.74
Sterilized soil+ ZJU. 05	$C = 74.465 e^{-0.1081t}$	0.9597	0.1081	6.41

3.77%、4.10% 和 3.76% 的残留率。说明分离所得的 3 个菌株对土壤中的 F1050 有较强的降解能力, 但彼此间的差异不明显。

## 4 讨论

农药降解菌主要是从土壤、水体或污泥等污染环境直接分离筛选或经富集培养获得。农药降解菌的富集培养方法主要有: 瓶培养, 即液体富集培养法 (Batch culture or liquid enrichment culture); 土壤环流法 (Soil percolation or soil perfusion); 连续流动培养法 (Continuous flow method)<sup>[8,9]</sup>。恒化器 (chemostat) 是一种有效的连续培养方法, 它以目标农药作为培养中的生长限制底物, 在这种选择压的作用下可筛选到降解目标农药的微生物菌株或诱发出有降解能力的突变菌株。

张晶<sup>[10]</sup>的试验结果表明, 土壤中的放线菌、真

菌对杀螨剂 F1050 的降解不明显, 而细菌在 F1050 的生物降解中起重要作用。笔者采用液体富集培养法, 通过添加 F1050 对小粉土中微生物的强化静态培养驯化试验, 从小粉土中初步筛选出 5 个可降解 F1050 的单一菌落。经分离菌株对 F1050 在纯培养条件下的降解试验和对菌株的鉴定, 明确了 F1050 的 3 个优势降解菌株均为芽孢杆菌属的细菌, 分别是: ZJU. 02 为巨大芽孢杆菌, ZJU. 04 为球形芽孢杆菌, ZJU. 05 为腊状芽孢杆菌。仪美芹等研究结果表明: 芽孢杆菌属的细菌能降解 DDT、甲基对硫磷、对硫磷、杀螟硫磷、毒杀芬、茅草枯、苯硫磷、艾氏剂、狄氏剂、利谷隆、灭草隆、氨基吡啶酸等<sup>[11]</sup>。施国涵等从土壤中分离到的一株芽孢杆菌 *B. acillus* sp., 对涕灭威及涕灭威亚砷和砷在土壤中的不断降解起了重要作用<sup>[12]</sup>。对 F1050 有降解作用的 3 个菌株中, 巨大芽孢杆菌可以以氧乐果为唯一碳源生长<sup>[13]</sup>, 并

能迅速降解土壤中的杀虫单<sup>[14]</sup>; 球形芽孢杆菌不仅能降解土壤中的 F1050, 还对卫生害虫有较强的杀灭作用<sup>[15]</sup>。

另两个菌株 ZJU. 01 和 ZJU. 03 在菌属鉴定时仅有 69% 和 89% 的可信度, 还需做进一步的理化鉴定。对 ZJU. 02、ZJU. 04 和 ZJU. 05 三个降解菌株的进一步室内土壤模拟试验结果表明, 分离所得的菌株对 F1050 有较强的降解能力, 但各个菌株的最适降解条件还需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Mahaffy W R, Pitchard P H, Bourquin A W. Isolation and characterization of a mixed culture that degraded polychlorinated biphenyl [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(6): 1419-1424
- [2] Parsons J R, Dthm S J, Vanlaar A, et al. Biodegradation of chlorinated biphenyls and benzoic acids by *Pseudomonas* strain [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 29: 81-84
- [3] Pimentel D. Environmental and economic effects of reducing pesticides in Agriculture [J]. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 1993, 46: 273-288
- [4] Lal R. Insecticide Microbiology [M]. Springer Verlag, Berlin, 1985. 147-168
- [5] SHI Guo-han (施国涵). 土壤微生物对灭幼脲 3 号的代谢作用研究[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* (环境科学学报), 1990, 10(3): 296
- [6] Microorganism Lab of CAS Nanking Soil Institute (中国科学院南京土壤所微生物室). Methods of Soil Microorganism Experiment (土壤微生物研究法) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1985. 219
- [7] XU Guang-hui (许光辉), ZHENG Yuan-hong (郑元洪). Edaphon Analysis Manual (土壤微生物分析方法手册) [M]. Beijing (北京): Agriculture Press (农业出版社), 1986. 220-226
- [8] Guth J A. Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil [J]. *Progress in Pesticide Biochemistry*, 1981, (1): 85-110
- [9] ZHENG Zhong (郑重). 一种简易恒化器的装置和使用 [J]. *Microbiology* (微生物学通报), 1989, 16 (2): 111-112
- [10] ZHANG Jing (张晶). Microbial Degradation and Metabolism of F1050 in Soil (土壤中 F1050 微生物降解与代谢研究) [D]. Jinan (济南), Shandong Agriculture University (山东农业大学), 2003. 42-43
- [11] YIMEI-qin (仪美芹), WANG Kai-yun (王开运), JIANG Xing-yin (姜兴印), et al. 微生物降解农药的研究进展 [J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)* [山东农业大学学报(自然科学版)], 2002, 33(4): 519-524
- [12] SHI Guo-han (施国涵), SUN An-qiang (孙安强), LU Miao-qin (陆妙琴), et al. 农药涕灭威在土壤中残留动态和降解的研究 [J]. *China Environmental Science* (中国环境科学), 1987, 7(1): 38-42
- [13] YANG Xiao-rong (杨小蓉), ZONG Hao (宗浩), ZHENG Ge (郑鸽), et al. 一株降解氧乐果的高效菌的分离和鉴定 [J]. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science)* [四川师范大学学报(自然科学版)], 2001, 24(4): 392-394
- [14] ZHOU Guo-ying (周国英), LIN Yu-suo (林玉锁). 巨大芽孢杆菌 LY-4 对土壤中杀虫单农药的降解 [J]. *China Environmental Science* (中国环境科学), 2000, 20(6): 511-514
- [15] CAI Quan-xin (蔡全信), LIU E-ying (刘娥英). 温度和 pH 对 *B. s* C3-41 菌株生长和毒力的影响 [J]. *Journal of Microbiology* (微生物学杂志), 1995, 15 (2): 22-24

(责任编辑: 唐 静)