

新型可降解高效氯氰菊酯微生物菌株的筛选、鉴定及条件优化

许超¹, 曲勤凤¹, 顾文佳¹, 庞贝妮¹, 陈军²

(1. 上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233; 2. 上海师范大学, 上海 200234)

摘要:为筛选分解高效氯氰菊酯的优良菌株, 试验从活性污泥中分离出5株菌株, 均能一定程度地降解高效氯氰菊酯。通过液相色谱分析, 菌株XCH-5降解高效氯氰菊酯的能力最强。观察该菌株的形态学特点, 再结合测序分析, 可鉴定XCH-5菌株为栖土曲霉。利用正交法优化降解条件, 得出该菌株在最优水平组合为接种量0.2 g/L、温度35℃、pH7.5的情况下, 10 d对200 mg/L高效氯氰菊酯的降解率可达到78%。

关键词:微生物降解; 高效氯氰菊酯; 曲霉; 正交法优化

中图分类号: Q93-3

文献标志码: A

文章编号: 1003-8701(2016)02-0070-04

Screening and Identification of Microbial Strains Decomposing Beta-Cypermethrin and Optimization of Degradation Conditions

XU Chao¹, QU Qinfeng¹, GU Wenjia¹, PANG Beini¹, CHEN Jun²

(1. Shanghai Institute Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233; 2. Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: In order to screen new microbial strains with high degrading capabilities for beta-cypermethrin from agricultural by-products, five strains were isolated from the activated sludge. By liquid chromatography analysis, a strain named XCH-5 exhibited the strongest degradation ability among these five strains. Further investigation revealed that XCH-5 was *Aspergillus terricola* as showed by morphological characteristics and ITS sequencing analysis. By orthogonal design method, the optimal combinations of the strain XCH-5 for beta-cypermethrin degradation were found with inoculation amount of 0.2 g/L, temperature 35°C, and pH 7.5. Under the optimized conditions, XCH-5 showed 78% of degradation rate for beta-cypermethrin after ten days of treatment.

Key words: Microbial degradation; Beta-cypermethrin; *Aspergillus*; Orthogonal design method

微生物不仅分布广泛, 而且种类多种多样。利用不同微生物代谢类型的特异性, 可有效降解农药^[1]。由于微生物降解农药安全、高效、无污染, 是选择降解农药的理想原材料^[2]。高效氯氰菊酯(beta-cypermethrin)是一种有效的杀虫剂, 在蔬菜、果树、花卉等农副产品上使用量较多^[3]。研究发现, 经常接触高效氯氰菊酯会产生免疫毒性^[4], 而且此类农药易在人体内蓄积, 诱发各种慢性疾病^[5]。目前, 高效氯氰菊酯已被欧美国家标为潜在致癌性物质^[6]。因此, 有效降解残留的高效氯氰菊酯成为重要的研究课题。试验从活性污泥中分离出降解高效氯氰菊酯的优良菌株, 并

研究最优降解条件, 以期研究降解高效氯氰菊酯的微生物制剂产品提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

活性污泥样品, 采集于上海市市区内多处污水处理厂的排污口。高效氯氰菊酯原药, 黄棕色粘稠固体, 购于南京荣诚化工有限公司, 纯度可达到98%以上。

1.2 仪器设备

净化工作台(SW-CJ-20型), 高速冷冻离心机(Centrifuge 5810R), 全自动高压灭菌器(HIR AYAMA), 恒温培养箱(SHP-250型), 高压液相色谱仪(Agilent LC-1260), 梯度PCR仪(BJC-RAD), 电泳仪(DYY-6C型)。

1.3 主要试剂

收稿日期: 2015-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(50678102、0000005472)

作者简介: 许超(1986-), 男, 助理工程师, 硕士, 主要从事微生物降解农药研究。

配置高效氯氰菊酯母液的丙酮、乙醇、甲醇等均为分析纯,液相测定所用的乙腈等均为色谱纯,购自国药集团化学试剂有限公司。真菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 生物公司。PCR 的体系溶液、1000 bp DNA ladder 均购自 TaKaRa 生物公司。

引物 1(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和引物 2(ITS2: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3')由 Invitrogen 生物公司合成。

1.4 降解率测定

待测样液与乙腈等体积混匀,涡旋振荡 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。滤液用 0.45 μm 的滤膜吸取上样。色谱条件设定为:乙腈/水=85/15 (V/V),流速 1 mL/min,柱温 30℃,波长 235 nm,进样量为 15 μL。

1.5 菌株筛选

采取逐级增加高效氯氰菊酯浓度的驯化培养方式,在通用的营养琼脂平板上分离菌株。更换不同溶剂的高效氯氰菊酯母液,以排除菌株对溶剂的依赖性。将分离出的不同菌株,定量接种到 200 mg/L 的高效氯氰菊酯培养液中,测定各菌株的降解效率。

1.6 菌株鉴定

观察菌株在 Czapek 培养基的菌落特征和显微结构。利用试剂盒提取菌株 DNA。扩增菌株 XCH-5 的 ITS 序列,PCR 反应程序:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,循环 30 次,72℃终延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析,推断出扩增片段大小。PCR 扩增产物委托上海美吉生物公司进行测序。对测序结果进行 BLAST 基因同源性比对,再用 MEGA 4.1 软件构建系统发育树。

1.7 降解条件优化

单因素对比试验,确定影响降解率的因素主要有温度、pH 值、菌种接种量。根据正交试验原理,设计正交表 $L_9(3^4)$ 来安排试验方案,测定 XCH-5 菌株降解高效氯氰菊酯的效果,最终得出最优水平组合。

1.8 菌株生长与降解性能

设计最优降解条件,将菌株 XCH-5 接种到含 200 mg/L 高效氯氰菊酯的培养液中连续培养 10 d。定时取样液,10 000 r/min 离心沉淀,烘干测菌体干重。据此,作菌株 XCH-5 的生长曲线及培养液中高效氯氰菊酯的残留量变化。

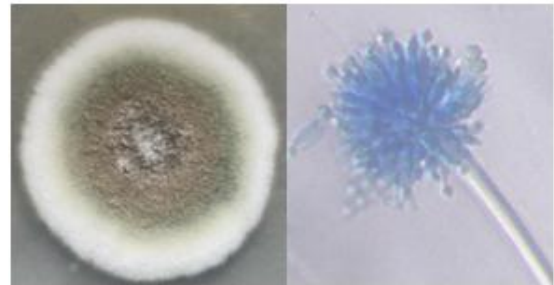
2 结果与分析

2.1 降解菌的筛选

经驯化培养,在通用的营养琼脂平板上分离出多个菌株。为获得真菌类的菌株,将其涂布于含高效氯氰菊酯的 Czapek 培养基上,36℃恒温培养 5 d。共筛选出 5 株真菌,分别标记为 XCH-1、XCH-2、XCH-3、XCH-4、XCH-5,经测定降解率分别为 68.95%、49.31%、50.53%、71.12%、82.02%。多次降解比较后,发现菌株 XCH-5 降解特性稳定且降解率最佳。

2.2 XCH-5 的鉴定

XCH-5 菌落形态和细胞特征见图 1。菌落近



圆形,稍带霉味。外圈呈白色丝绒状,中间凹陷且有不明晰的辐射状沟纹,略带紫褐色。在 Czapek 平板上 7 d 直径可达 35 ~ 38 mm。细胞个体可见椭圆形的分生孢子囊,产孢结构呈两层放射状排布。孢子球形,壁厚。

利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 XCH-5 的总 DNA。PCR 扩增该菌株 ITS 序列,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析约 500 bp,如图 2 所示。测

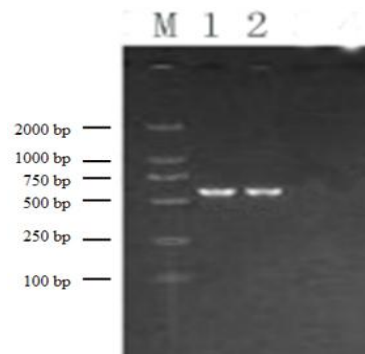


图 2 XCH-5 菌株 ITS 序列扩增产物的电泳分析图

注:1,2:扩增产物 M:DNA ladder

序结果表明 XCH-5 的 ITS 序列长度为 511 bp,与电泳推断吻合。BLAST 基因同源性分析,XCH-5 与 FJ531244 等曲霉有 98% 的相似性,建立其系统进化树如图 3。综合 XCH-5 菌落形态、细胞特征及序列比对结果,最终鉴定 XCH-5 为栖土曲霉。

2.3 XCH-5 的降解优化

单因素对比试验确定最佳取值范围分别为:

接种量 0.1 ~ 0.3 g/L, 温度 30.0 ~ 40.0°C, pH6.5 ~

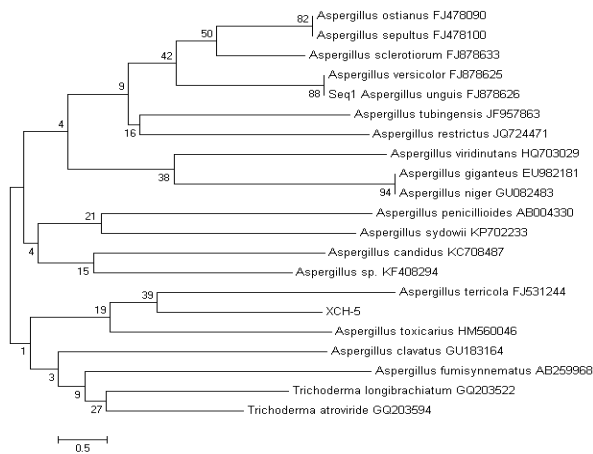


图3 菌株XCH-5的系统发育树

7.5。正交法设计 $L_9(3^4)$ 来实施试验, 结果如表 1。F 检验表明, 接种量、温度、pH 对高效氯氰菊酯的降解率有极显著影响。利用 LSD 法进行处理间的多重比较, 确定试验的最优水平组合为接种量 0.2 g/L、温度 35°C、pH7.5。

2.4 菌株生长与降解高效氯氰菊酯的关系

在最优降解条件下, 菌株 XCH-5 生长曲线与高效氯氰菊酯的降解曲线见图 4。结果表明, XCH-5 菌株在 96 h 附近发生对数期生长, 此时高效氯氰菊酯的降解速率大幅度增速。在 144 h 菌株生长进入稳定趋势, 降解速率随之放缓。XCH-5 菌株 240 h 干重为 7.78 g/L, 降解率达 78.96%。这一结果与正交优化试验分析基本吻合。

表 1 菌株 XCH-5 降解高效氯氰菊酯的结果

试验号	因素			降解率 (%)
	A: 接种量 (g/L)	B: 温度 (°C)	C: pH	
1	0.1	30.0	6.5	34.1
2	0.1	35.0	7.0	69.9
3	0.1	40.0	7.5	49.4
4	0.2	30.0	7.0	73.5
5	0.2	35.0	7.5	78.1
6	0.2	40.0	6.5	37.8
7	0.3	30.0	7.5	63.4
8	0.3	35.0	6.5	39.5
9	0.3	40.0	7.0	64.2

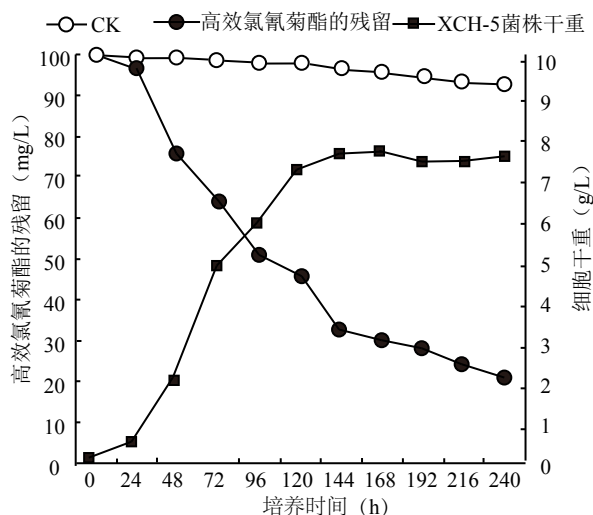


图4 菌株XCH-5生长曲线与高效氯氰菊酯的降解曲线

3 讨论

随着生物降解的深入研究, 微生物被广泛应用于解决农药残留的污染问题。目前报道氯氰菊

酯降解菌以细菌为主^[7], 有芽孢杆菌、假单胞菌、苍白杆菌、无色杆菌、沙雷菌等。但真菌少有报道。试验尝试筛选真菌菌株做研究, 以期丰富菌株的种类。研究表明, 真菌的氧化酶系复杂, 对芳香类杀虫剂有较强降解能力, 被视为潜在农药降解菌^[8]。高效氯氰菊酯分子组成复杂, 含有苯环、卤素等基团。而真菌的代谢能将这农药视为碳源或氮源来利用, 在酶促反应下逐步降解。高效氯氰菊酯在真菌的菊酯水解的作用下, 其羧酸酯键会断裂生成 DV 菊酸和 3-PBA, 3-PBA 再通过二苯醚键的断裂降解成苯酚和原儿茶酸, 最终完全矿化^[9], 降解成无毒的 CO_2 、 H_2O 等无机物。

试验从活性污泥中分离出对高效氯氰菊酯具有较强降解能力的栖土曲霉。栖土曲霉属半知菌纲、壳霉目、杯霉科, 在中国的上海、四川、江苏、湖南等地均有分布。栖土曲霉虽然在霉菌中研究较少, 但却有特殊的性能。一般霉菌以产中、酸性蛋白酶为主, 细菌以产碱性蛋白酶为主, 但是

栖土曲霉所产蛋白酶较为丰富,包括酸、中、碱性蛋白酶。这些蛋白酶系,具有高水解能力,能很大程度满足发酵的需要,可在工农业发酵方面广泛应用^[10]。试验所得栖土曲霉可看作是食品发酵工业和农业生产的优良菌种,可用于制造各种酶制剂、有机酸等^[11],为研制降解高效氯氰菊酯的微生物制剂提供参考价值。

参考文献:

- [1] Kumar A, Sharma B, Pandey R S. Cypermethrin induced alterations in nitrogen metabolish in freshwater fishes [J]. Chemosphere, 2011, 83(4): 492-501.
- [2] Singh B K, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds [J]. FEMS Microbiology Review, 2006, 30(3): 428-471.
- [3] Selim S, Negrael J, Govaerts C, et al. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. Strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6501-6507.
- [4] Amweg E L, Weston D P, Ureda N M. Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005(24): 966-972.
- [5] Kolaczinski J H, Curtis C F. Chronic illness as a result of low-level exposure to synthetic pyrethroides insecticides: a review of the debate[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(5): 697-706.
- [6] 唐洁,姚开,贾冬英,等.高效氯氰菊酯降解菌的分离与鉴定及其降解条件优化[J].四川大学学报(工程科学版),2013,45(4):176-180.
- [7] Chen S H, Hu M Y, Liu J J, et al. Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Ochrobactrum lupini* DG-S-01[J]. J Hazardous Materials, 2011, 187(1-3): 433-440.
- [8] Harms H, Schlosser D, Lukas Y W. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals [J]. Applied and Industrial Microbiology, 2011(9): 177-192.
- [9] Zhang C, Jia L, Wang S H, et al. Biodegradation of beta-cypermethrin by two *Serratia* spp. With different cell surface hydrophobicity [J]. Bioresource Technology, 2010(10): 3423-3429.
- [10] 邓靖,林亲录,赵谋明,等.栖土曲霉蛋白酶特性研究[J].中国食品添加剂,2005(3):26-28.
- [11] Xu G, Li Y, Zheng W, et al. Mineralization of Chlorpyrifos by Co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp.[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(10): 1469-1473.

(责任编辑:王昱)