

茶叶上拟除虫菊酯类农药降解菌的分离及其特性

王兆守, 林 淦, 尤民生*, 李秀仙, 梁小虾

(福建农林大学应用生态研究所、食品生物安全研究中心, 福建 福州 350002)

摘要:生物修复对降解污染基质中的农药是一种对环境有益的方法。目标是要寻找能够降解在茶叶生产中使用的拟除虫菊酯类农药的降解菌。最终在福州某茶园经农药处理过的茶叶中分离降解菌。首先在富集培养基中筛选,接着在以农药为唯一碳源的基础培养基中连续筛选。结果发现,其中一株标号为 c1f6 的菌株生长的特别良好,经 AMS-VITEK120 全自动微生物分析系统鉴定,为假单胞菌属的一个未知种。采用 HP6890 气相色谱仪测定菌株对拟除虫菊酯类农药联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率。在 pH7.0 的基础培养基发酵液中,以各加 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 这 3 种农药为唯一碳源, 30°C 振荡培养,接种 c1f6 后 3d,这 3 种农药的降解率分别为 55.64%、44.56% 和 52.19%。采用光密度测定的菌株生长值和农药降解率的关系曲线表明,在基础培养基中,农药降解和菌株生长成正相关,说明菌株能以拟除虫菊酯类农药为唯一碳源和能源进行生长。采用同样的方法测定表明,菌株 c1f6 对有机磷农药也有一定的降解力,3d 对甲胺磷和毒死蜱的降解率分别为 27.67% 和 12.35%。因此,假单胞菌 c1f6 是一株较广谱的农药降解菌,有望用于生物修复过程,以减少茶叶栽培过程中的产品和环境污染。

关键词:茶叶;生物修复;拟除虫菊酯;假单胞菌 c1f6

文章编号:1000-0933(2005)07-1824-04 **中图分类号:**S482,Q939 **文献标识码:**A

Isolation and character of synthetic pyrethroid insecticides-degrading bacteria from tea leaves

WANG Zhao-Shou, LIN Gan, YOU Min-Sheng*, LI Xiu-Xian, LIANG Xiao-Xia (Institute of Applied Ecology and Research Centre for Food- and Bio-Safety, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(7): 1824~1827.

Abstract: Bioremediation is an environmentally-benign method for degrading insecticides from contaminated substrates. Our goal was to find bacteria that could degrade the pyrethroids that are used in production of tea. To this end, we isolated bacteria from pesticide-treated tea leaves from the tea garden in Fuzhou, Fujian Province, China. Initial screening was on enrichment media, with subsequent sequential isolation on minimal media containing the pesticides as sole C source. One strain which grew particularly well (designated c1f6) was *Pseudomonas* sp., identified with a AMS-VITEK120 whole-auto-microbial analysis system. We then used gas chromatography (HP 6890) to measure the rates of disappearance of the pyrethroids bifenthrin, fenpropathrin and cypermethrin from pH 7, liquid cultures maintained aerobically at 30°C . Other than $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of each of the pesticides, the media were carbon-free. Three days after inoculation with c1f6 the concentrations of the three chemicals had decreased by 55.64%, 44.56% and 52.19% respectively. Growth measured as optical density showed a positive correlation to the amount of pesticide removed, suggesting the bacteria used these pyrethroids as carbon and energy sources. Using the same methods, we showed that c1f6 could also degrade the organophosphorus pesticides methamidophos and chlorpyrifos, 27.67 and 12.35% being degraded respectively, after 3 days. Since *Pseudomonas* sp. c1f6 can degrade a broad spectrum of pesticides, it should be able to use it in a bioremediation process to minimize contamination of the product and the environment during tea cultivation.

基金项目:国家科技部国际合作重点资助项目(2003DF030008)

收稿日期:2004-09-12; **修订日期:**2005-03-11

作者简介:王兆守(1972~),男,福建尤溪人,博士,主要从事环境微生物与环境工程研究。E-mail: wzs309@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: msyou@fjau.edu.cn

Foundation item: Key Project of International cooperation Funded by the National Ministry of Science and technology (No. 2003DF030008)

Received date: 2004-09-12; **Accepted date:** 2005-03-11

Biography: WANG Zhao-Shou, Ph. D., mainly engaged in environmental microbiology and engineering. E-mail: wzs309@yahoo.com.cn

Key words: tea; bioremediation; synthetic pyrethroid insecticides; *Pseudomonas* sp. clf6

农药残留是当前茶叶出口和内销中遇到的最为敏感的、最大的卫生质量问题。拟除虫菊酯是茶叶生产上广泛使用的一类农药,对哺乳动物有中等毒性,对鱼类等水生生物高毒。它们的广泛应用对生态环境产生一定的影响,引起人的急慢性中毒事件也时有发生,其残留日益引起人们的重视。所以,最新欧盟茶叶中农药最大残留限量(MRL)以拟除虫菊酯类农药残留限量变动最大,如从2000年7月1日起,氰戊菊酯 MRL 由原先 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 现改为 $0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,降低了100倍,联苯菊酯从 $5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 改为 $0.2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,降低了25倍。甲氰菊酯现改为 $0.02\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,氯氰菊酯、氟氯氰菊酯、氟氰戊菊酯的现行 MRL 都改为 $0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因此,我国茶叶出口农药残留超标面临着严峻的形势^[1~2]。

如何降低茶叶中的农药残留,国内外已进行了多方面的研究,并取得了一定的效果。但研究多限于合理使用农药,改进农艺措施、调整茶业结构等预防性措施方面。而对于如何降低茶园环境中已有的农药残留,研究还不够深入,不能较好地解决问题。而用微生物的方法进行环境有机污染物的治理,已成为当前环境科学研究的热点^[3~7],但从喷药诱发的茶叶中分离降解菌及利用微生物降解茶叶中拟除虫菊酯类农药残留的研究尚未见报道。随着无公害、绿色、有机食品倍受青睐,这方面的研究可为绿色食品生产提供一条新的途径。

所以,本文选用茶园中广泛应用的联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯等3种菊酯类农药,通过在茶园喷药诱发降解菌、采集茶叶进行农药降解菌的分离、筛选、鉴定及降解效能的测定,获取适合于茶园特殊生态环境的有较高降解活力的菌株,为进一步研究和生产应用提供素材。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1)茶样来源 从福州某茶园经定期喷药的茶园小区中采集得到。

(2)培养基 富集培养基、基础培养基、普通培养基,配方见参考文献^[8]。

(3)供试药剂 2.5%天王星(有效成分联苯菊酯)乳油:苏州富美实植物保护剂有限公司。20%灭扫利(有效成分甲氰菊酯)乳油:浙江威尔达化工有限公司。10%氯氰菊酯乳油:红太阳集团有限公司。甲氰菊酯,联苯菊酯,氯氰菊酯标样:北京康林科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株分离

(1)茶园喷药诱发降解菌 在福州某茶园中取毛蟹、肉桂、黄旦、铁观音、福云六号茶树品种各2个小区,每小区 $1 \times 2\text{m}^2$,每5d喷灭扫利、天王星、氯氰菊酯各 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合药液1次,共喷药6次,用木牌做好标记。最后一次喷药后5d,从喷药小区中采集茶叶到室内进行降解菌的筛选。

(2)茶样中菌株的分离 取每个喷药茶园小区茶叶各10g,在无菌操作条件下,分别加入对应的含100ml无菌液体富集培养基的250ml三角瓶中(每瓶含联苯菊酯、甲氰菊酯、氯氰菊酯各 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),在 30°C 下 $180\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养7d,然后按10%的接种量将其转接到下一批富集培养基中(含上述3种菊酯农药各 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养7d,再转接到含上述3种菊酯各为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的富集培养基中培养7d。接着转接入基础培养基中(每瓶含上述3种菊酯浓度各为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,下同),继续培养7d,在加农药的基础培养基中再转接2次,最后,各取0.1ml发酵液分别转接到对应序号的普通培养基平板上,涂布平板。置于 30°C 恒温培养箱中培养48h,然后选取不同形态特征的菌株分别进行分离纯化3次,再用气相色谱仪测定各纯化菌株的降解效能,根据降解效能的高低筛选出降解菌株^[8,9]。

1.2.2 降解效能测定 取纯化后的单个菌株,以初始接种量 $D_{(415\text{nm})} = 0.2$ 接种到以上述3种菊酯(浓度各为 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为唯一碳源的基础培养基中,设不接菌为对照,每处理重复3次,在摇床上 30°C , $180\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养3d。吸取2ml培养液,用石油醚萃取3次,每次用量分别为4,4,3ml。接着加入无水硫酸钠脱水,并定容至10ml,再用气相色谱仪检测。测试条件如下:气相色谱仪型号 HP6890,色谱柱型号为 HP-5($25\text{m} \times 0.32\text{mm} \times 1.05\mu\text{m}$ film thickness),弱极性,柱温采用程序升温:柱温起始温度 170°C , $30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 260°C ,保持10min,检测器(FID) 300°C ,进样口温度 270°C ,不分流,载气为 He 气(99.999%),流量 $25\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,氢气的流量为 $30\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,空气的流量为 $400\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量均为 $1\mu\text{l}$ ^[10,11]。

1.2.3 降解率计算

$$\text{降解率}(\%) = \frac{\text{对照样品残留量} - \text{处理样品残留量}}{\text{对照样品残留量}} \times 100\%^{[12]}$$

1.2.4 菌株鉴定 选取降解力强的菌株进一步测其降解力稳定性,取稳定性好的菌株用美国生物梅里埃公司生产的 AMS-VITEK120 全自动微生物分析系统进行鉴定。

1.2.5 菌株生长和拟除虫菊酯农药降解率关系曲线的测定 将细菌等量接种到各瓶基础培养基发酵液中(含上述 3 种菊酯各 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),在 30°C 和 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养。然后,分别在 12,24,36,48,60,72,84,96,108h 后取出(每处理 3 个重复),置 4°C 冰箱中保存,到时一并取样进行气相色谱分析,取样过的发酵液离心取菌体并适当稀释测 $D_{(415\text{nm})}$ 值,制作农药降解率曲线和菌体生长曲线。

1.2.6 菌株对其它农药的降解力 分别将菌株接种到含有机磷农药乐果、敌敌畏、甲胺磷、毒死蜱各 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4 个处理的基础培养基中(每个处理 3 个重复), 30°C , $180\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3d,测定菌株对有机磷的降解力。提取及检测方法参照文献[13]。

2 结果与分析

2.1 菌株降解效能测定

选取形态特征不同的 65 株细菌对 3 种菊酯进行降解效能的测定,结果表明,有的菌株没有降解力,有的只对其中 1 种或 2 种农药有降解力,现筛选到对 3 种拟除虫菊酯同时有降解力的菌株 9 株。再经过两次复筛,只有 c1f6 仍然对 3 种菊酯保持较稳定的降解力,它对联苯菊酯、甲氰菊酯和氯氰菊酯的降解率分别为 55.64%、44.56% 和 52.19%,而其它菌株的降解力都不同程度地衰退了(表 1),所以选定 c1f6 作为进一步试验菌株。

表 1 第 2 次复筛菌株对农药降解率 (%)
Table 1 Removal rates of pesticides by the second screened strains (%)

菌株 Strain	c1f6	c1f4	c2f4	c4f5	c1f9	c6f3	c5f1	c1f1	c1f3
联苯菊酯 Bifenthrin	55.64	15.23	36.25	42.16	16.29	44.95	33.74	43.25	26.07
甲氰菊酯 Fenpropathrin	44.56	27.69	28.47	31.53	41.94	33.67	0	32.16	0
氯氰菊酯 Cypermethrin	52.19	35.73	0	37.72	44.55	22.76	20.65	43.21	16.48

2.2 菌株鉴定

采用 AMS-VITEK120 全自动微生物分析系统对 c1f6 进行各项指标测试,鉴定 c1f6 为假单胞菌属的一个未知种 (*Pseudomonas* sp.)。

2.3 菌株生长和农药降解率的关系曲线测定

菌株生长和农药降解率的关系曲线(图 1)表明,在只加农药为唯一碳源的基础培养基中,菌株生长的对数期在 12~48h 之间,稳定期在 48~72h,在菌株生长期和对期内农药降解率增长迅速,和菌株生长近乎成正相关,随着菌株生长进入衰亡期(72h 以后),农药降解率增长趋势也趋向减缓;同时,经只加农药为唯一碳源的基础培养基平板划线培养,菌株在平板上生长良好,这些特性是菌株降解农药的典型特征。由以上实验结果可知,c1f6 确实能够降解农药,并能以农药为唯一碳源进行生长。

2.4 对其它农药降解力的测定

对有机磷农药降解力测定的结果表明,c1f6 对甲胺磷的降解率为 27.67%,对毒死蜱的降解率为 12.35%,但对敌敌畏和乐果无降解力。

3 讨论

拟除虫菊酯是茶园中常用的农药,也是茶叶中残留超标的主要农药类型之一,所以,进行茶叶上拟除虫菊酯类农药降解菌的研究对解决茶叶安全生产问题具有重要的意义。农药降解菌株的筛选常见的采样方法是从农药厂排污口等受污染的区域采集土样。但环境条件对微生物种群结构具有重要的影响,从不同的生态环境中分离出的微生物是有差异的,具有其特定的应用范围。茶园是一种独特的生态环境,茶叶内含有茶多酚等具有抑菌作用的成份,要在茶园中使用降解菌,需要有特定的能够在茶园环境中存活的降解菌。所以本文针对能够应用于茶园特殊生态环境的要求,通过从喷药诱发的茶园采集茶样进行降解菌的筛选。以往的研究多用单一农药为底物进行降解菌筛选,所获得的菌株降解谱也较窄。本研究以多种农药为底物筛选同时对多种农药有降解力的菌株,从茶叶中筛选到具有较广降解谱的假单胞菌 c1f6,所以,该菌株更符合茶叶生产实际,在茶叶农药残留超标降解和绿色食品开发上,具有良好的应用前景。但茶叶收获时效性很强,常言道“早采三天是个宝,迟采三天是根草”。降解菌喷在茶叶上降解农药残留,农药需在一定的时间才能降解,间隔期长了,茶叶品质受影响,或不能采摘。降解菌 c1f6 如何在田间条件下应用,发挥出效果,有待于进一步深入研究。

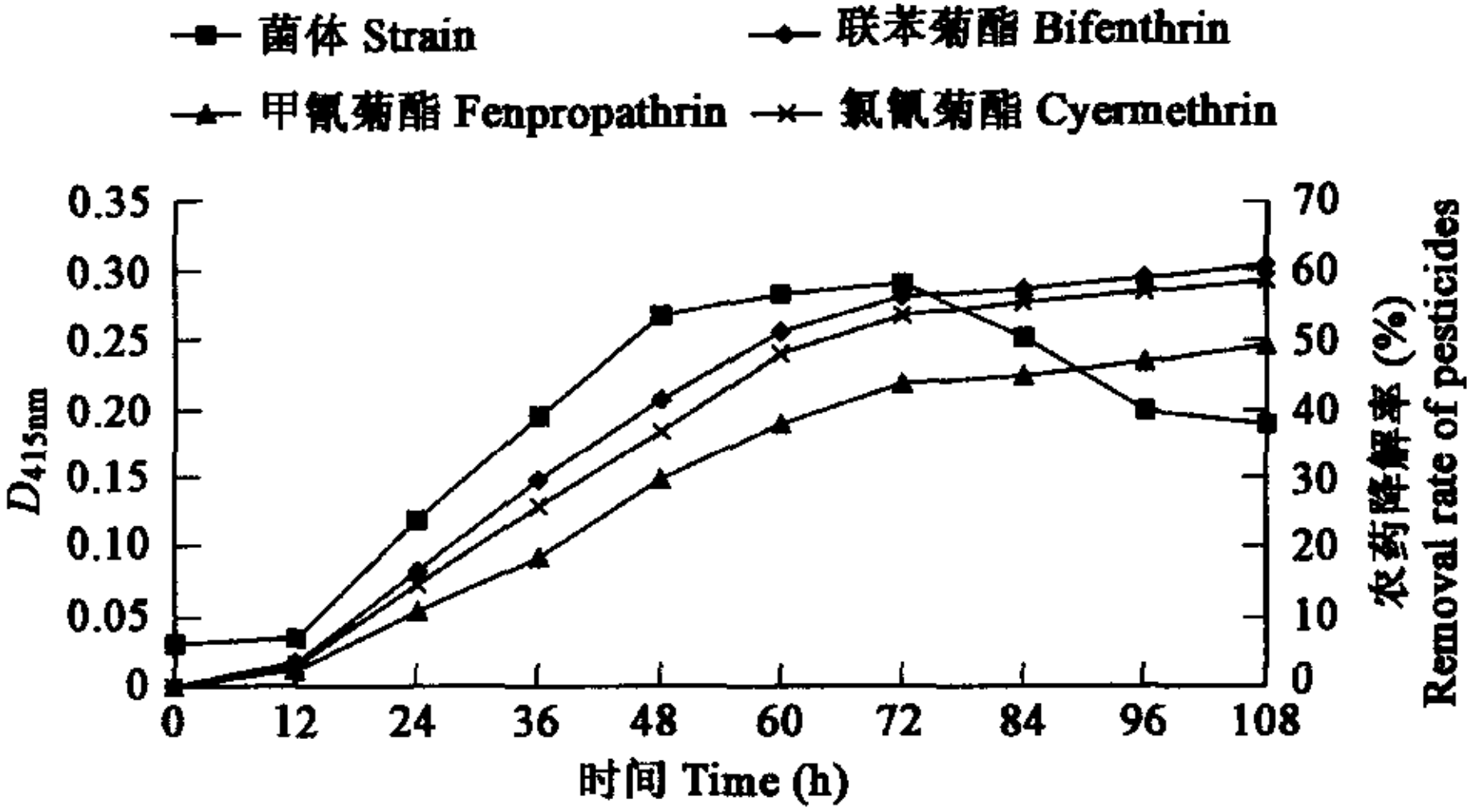


图 1 菌株 c1f6 生长 $D_{(415\text{nm})}$ 和农药降解率 (%) 的关系

Fig. 1 Relationships between the growth $D_{(415\text{nm})}$ of strain c1f6 and the removal rate (%) of pesticides

References:

- [1] Chen Z M. The faced problem of sanitation quality in Chinese tea and counter measures. *Fujian Tea*, 2001, (3):33~34.
- [2] Chen Z M. The problem of pesticide residues in Oolong tea and flowerage tea. *Fujian Tea*, 2000, (4):2~4.
- [3] David Boyle, Charles Wiesner and Andrew Richardson. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biochem.*, 1998, **30**(7):873~882.
- [4] Cathleen J Hapeman, Jeffrey S Karns and Dmiel R Shelton. Total mineralization of aqueous atrazine in the presence of ammonium nitrate using oxone and klebsiellaterragen; strain DrsI mechanistic considerations for pilot scale disposal. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**:1383~1391.
- [5] Christian Mougin, Chantal Laugero, Marcel Asther, *et al.* Biotransformation of S-triaxine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.*, 1997, **49**:169~177.
- [6] Ren Y, Shen Y Y, Wei C H, *et al.* Biodegraded characteristics of MPG-wastewater by domestic and screened organisms. *Environmental Science*, 2002, **23**(5):76~79.
- [7] Li Z J, Wei C H, Ren Y, *et al.* Growth characteristics and activities of nitrobenzene anaerobic biodegradation strains. *Environmental Science*, 1999, **20**(5):20~24.
- [8] Li F D, Yu Z L, He S J, eds. *Agro-microbiology experimental technology*. Beijing: China Agricultural Press, 1996. 140~143.
- [9] Yu Y L, Song F M, Zheng Z, *et al.* Isolation and identification of a broad-spectrum bacterial strain (*Alcaligenes* sp.) degrading pesticides. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1997, **23**(2):111~115.
- [10] Mo T, Chen H X, Lu Y T, *et al* eds. *The analysis method of pesticide residue quantity*. Shanghai: Science and Technological Press, 1992. 121~140.
- [11] Mai G X, Liu X W, Zhai G S, *et al.* Simultaneous determination of residues of cypermethrin, befenthrin and cyfluthrin in apple and pear by capillary gas chromatography. *Agro-environmental Protection*, 2002, **21**(3):260~262, 275.
- [12] Fang L. Isolation and selection of strains used to degrade organic chlorine pesticides and application effects. *Chinese Journal of Applied ecology*, 2000, **11**(1):249~252.
- [13] Liu X, You M S, Wei Y Z, *et al.* Degradation effects of *Trichoderma* Y on chlorpyrifos and methamidophos. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University*(Natural Science Edition), 2002, **31**(4):455~458.

参考文献:

- [1] 陈宗懋. 我国茶叶卫生质量面临的问题和对策. 福建茶叶, 2001, (3):33~34.
- [2] 陈宗懋. 乌龙茶和花茶中的农药残留问题. 福建茶叶, 2000, (4):2~4.
- [6] 任源, 慎义勇, 韦朝海, 等. 驯化筛选微生物对油制气废水的降解特性. 环境科学, 2002, **23**(5):76~79.
- [7] 李湛江, 韦朝海, 任源, 等. 硝基苯降解菌生长特性及其降解活性. 环境科学, 1999, **20**(5):20~24.
- [8] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江主编. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996. 140~143.
- [9] 虞云龙, 宋凤鸣, 郑重, 等. 一株广谱性农药降解菌(*Alcaligenes* sp.)的分离与鉴定. 浙江农业大学学报, 1997, **23**(2):111~115.
- [10] 默涛, 陈鹤鑫, 陆貽通, 等. 农药残留量分析方法. 上海: 科学技术出版社, 1992. 121~140.
- [11] 买光照, 刘潇威, 翟广书, 等. 毛细管气相色谱法同时测定苹果、梨中氯氰菊酯、联苯菊酯和氟氯氰菊酯的残留量. 农业环境保护, 2002, **21**(3):260~262, 275.
- [12] 方玲. 降解有机氯农药的微生物菌株分离筛选及应用效果. 应用生态学报, 2000, **11**(2):249~252.
- [13] 刘新, 尤民生, 魏英智, 等. 木霉 Y 对毒死蜱和甲胺磷的降解作用. 福建农林大学学报, 2002, **31**(4):455~458.