

两株菌对氯氰菊酯及其降解产物 3-PBA 的协同代谢研究

许育新^{1,2} 孙纪全² 李晓慧² 李顺鹏² 陈 义¹

(¹ 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所 杭州 310021)

(² 南京农业大学生命科学院微生物学系 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 :以两株降解菌为材料,研究了它们对氯氰菊酯及其代谢中间产物 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)的协同降解过程。在有 3-PBA 存在时,氯氰菊酯降解菌 CDT3(*Rhodococcus* sp.) 的生长会受到明显的抑制;低于 200mg/L 的氯氰菊酯对 3-PBA 降解菌 PBM11(*Pseudomonas* sp.) 的生长无显著影响。同时加入菌株 CDT3 和 PBM11 时,氯氰菊酯的降解速率较单独加入菌株 CDT3 时有所提高。菌株 PBM11 的菌数随氯氰菊酯和 3-PBA 的降解而增加,但 CDT3 的数量没有明显的增加。同时加入菌株 CDT3 和 PBM11 的处理中观察不到 3-PBA 的积累,在后加入 PBM11 的处理中可观察到 24h 内明显有 3-PBA 的积累,加入菌株 PBM11 后,3-PBA 可被迅速降解。

关键词 :氯氰菊酯;3-PBA;降解菌;协同代谢

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2007)05-0834-04

微生物协同作用是微生物降解有机污染物的一种重要方式,目前已有许多这方面的研究报道^[1~8]。尽管已有对拟除虫菊酯杀虫剂的微生物降解研究^[9~11],但对于协同降解还未见报道。作者分离到一株氯氰菊酯降解菌 CDT3,它可以将氯氰菊酯降解为 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)和二氯菊酸(DCVA)^[11]。同时还分离到另一株降解菌 PBM11,它可以以 3-PBA 为唯一碳源和能源生长^[12]。氯氰菊酯是一种广泛使用的拟除虫菊酯杀虫剂,也是一种难降解的有机化合物,有研究发现它会影响人体的激素分泌,同时它的降解产物 3-PBA 也是一种潜在的环境污染物^[13]。因此,研究降解菌对氯氰菊酯和 3-PBA 的协同降解不仅可以丰富协同代谢理论,还对利用微生物彻底降解氯氰菊酯为二氧化碳和水的实际应用具有指导作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 CDT3 菌株、PBM11 菌株 本研究中分离。

1.1.2 培养基和试剂 ①基础盐培养基 MM:每升含 (NH₄)₂SO₄ 1.5g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, NaCl 0.5g, pH7.2~7.5 ②LB 培养基:蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 5g, pH7.2~7.5

1.1.3 主要试剂和仪器 :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。3-PBA 纯度 99%,由德国 Merck 公司生产。其它试剂均为分析纯(降解产物分析试剂为色谱纯)。SHIMADZU GC-14B(ECD)气相色谱、Waters 600 高效液相色谱、722 型光栅分光光度计。

1.2 农药的提取与检测

1.2.1 氯氰菊酯的提取与检测 按文献 [11] 方法进行。

1.2.2 3-PBA 的检测 按文献 [12] 方法进行。

2 结果

2.1 3-PBA 对菌株 CDT3 的生长的影响

在 100mL 基础盐培养基中分别加入 0、50、100、150、200mg/L 的 3-PBA,每个样品中再加入 1g/L 的葡萄糖,按 0.5% 接种量接入菌株 CDT3(*OD*₆₀₀ = 1.0,下同),30℃,150r/min 振荡培养 24h 时取样测定菌

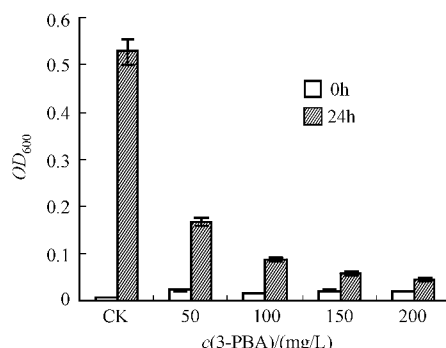


图 1 3-PBA 对菌株 CDT3 生长的影响

Fig.1 The effect of 3-PBA on growth of strain CDT3.

作者简介:许育新(1971-)男,江苏南京人,博士,主要从事环境微生物技术研究。Tel:86-571-86404269;E-mail:lux_xu@yahoo.com.cn

其他作者:吴春艳¹

收稿日期:2006-12-22;接受日期:2007-02-12;修回日期:2007-05-29

株 CDT3 的生长情况。结果如图 1 所示, 3-PBA 的存在会对 CDT3 的生长产生明显的抑制, 尤其当浓度大于 50mg/L 时, 菌株 CDT3 的生长受到严重抑制。

2.2 氯氰菊酯对菌株 PBM11 的生长的影响

在基础盐培养基中加入氯氰菊酯使终浓度分别为 0、50、100、150、200mg/L, 每个样品中加入葡萄糖, 使终浓度为 1g/L, 按 1% 接种量接入菌株 PBM11, 30℃, 150r/min 摇瓶培养, 24h 时取样测定菌株 PBM11 的生长情况。根据菌株的生长情况, 确定氯氰菊酯是否对菌株 PBM11 的生长产生抑制。实验表明, 氯氰菊酯的存在对菌株 PBM11 的生长无明显影响(图 2)。

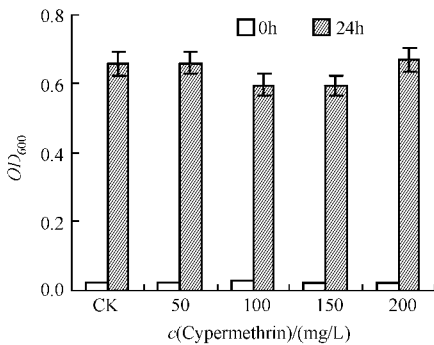


图 2 氯氰菊酯对菌株 PBM11 生长的影响

Fig.2 The effect of cypermethrin on the growth of strain PBM11.

2.3 加 3-PBA 对菌株 CDT3 降解氯氰菊酯的影响

加入 50mg/L 的氯氰菊酯, 添加酵母汁的浓度为 50mg/L, 以 2% 接种量接入菌株 CDT3, 在各样中分别加入 3-PBA 使终浓度分别为 50、100、150、200mg/L。30℃, 150r/min 摇瓶培养, 每 12h 取样测定氯氰菊酯的含量, 结果如图 3 所示。3-PBA 的存在对氯氰菊酯的降解会产生一定的抑制作用并且降解速率与 3-PBA 的浓度呈负相关。但是, 体系中存在的 3-PBA 浓度低于 200mg/L 时, 经过足够长的时间 (> 36h), CDT3 对氯氰菊酯最终的降解率不变。

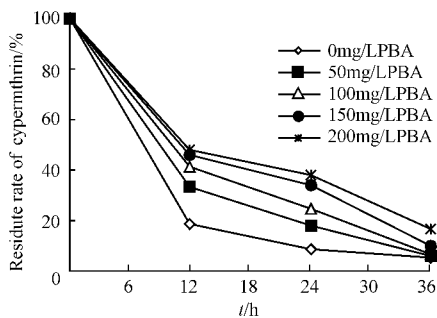


图 3 3-PBA 对 CDT3 菌株降解氯氰菊酯的影响

Fig.3 The effect of 3-PBA on the degradation of cypermethrin by strain CDT3.

2.4 菌株 CDT3 和 PBM11 协同降解氯氰菊酯的最适比例

在 100mL 的基础无机盐中加入氯氰菊酯, 使终浓度为 50mg/L, 每处理中按 2% 接种量接入菌株 CDT3, 然后加入分别按 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5% 的接种量接入菌株 PBM11, 30℃, 150r/min 摇瓶培养, 每 6h 取样检测 3-PBA, 根据 3-PBA 的积累量来确定菌株 CDT3 和 PBM11 协同降解氯氰菊酯的最适比例。结果如图 4 所示, 在菌株 CDT3 接种量为 2% 时, 当菌株 PBM11 的接种量大于 5% 时, 在氯氰菊酯降解全过程中始终未有 3-PBA 的积累, 而当大于 0.5% 时, 仅在开始降解的初期有少量 3-PBA 积累, 至 12h 时 3-PBA 的积累基本消失。因此, 菌株 CDT3 和 PBM11 的比例在 2:0.5 和 2:5 之间都可以有效降解氯氰菊酯。

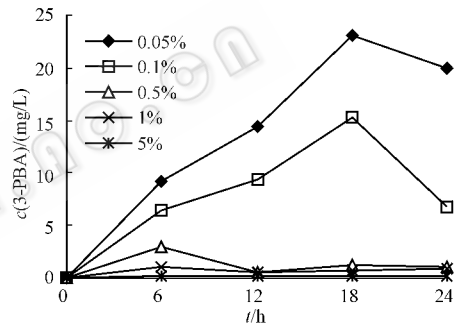


图 4 不同 PBM11 接种量下体系中 3-PBA 的积累动态

Fig.4 Dynamics of 3-PBA in system with various amount inoculants of PBM11.

2.5 菌株 CDT3 和 PBM11 的接种时间对氯氰菊酯降解与菌体生长的影响

在 100mL 的基础盐培养基中加入 100mg/L 的氯氰菊酯, 分别按 2% 和 0.5% 的接种量接入菌株 CDT3 和 PBM11, 在另一处理中按 2% 接种量接入菌株 CDT3, 在摇瓶培养 24h 后按 0.5% 接种量接入菌株 PBM11, 30℃, 150r/min 摇瓶培养, 每 8h 取样测定氯氰菊酯和 3-PBA 的浓度, 并取样进行平板计数。

通过实验发现, 在菌株 CDT3 和 PBM11 协同降解氯氰菊酯的过程中, 菌株 PBM11 的生长较明显, 而菌株 CDT3 不能利用 3-PBA, 因此不能生长(图 5)。

由图 6 可见, 当同时加入菌株 CDT3 和 PBM11 时, 在最初的 8h 氯氰菊酯的降解速度有所提高, 可能由于 PBM11 将刚产生的 3-PBA 立即降解, 减少了中间产物的反馈抑制。不过, 同时加入的处理 24h 后与后加入 PBM11 的降解速度相差不大, 而且对最终的氯氰菊酯降解率没有影响。同时加入菌株 CDT3 和 PBM11 的处理中几乎没有 3-PBA 的积累。

而后加入菌株 PBM11 的处理中可以看到在 24h 内明显有 3-PBA 的积累,但在加入 PBM11 后,在 PBM11 的作用下,3-PBA 的浓度迅速下降,16h 后就完全被降解。

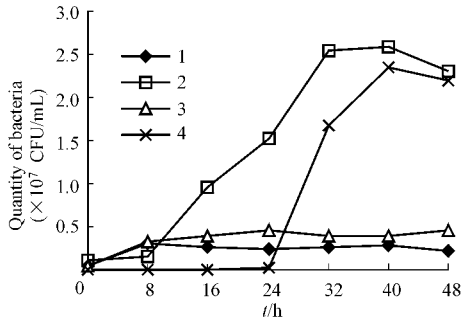


图 5 不同接种时间下 CDT3 和 PBM11 菌体的生长

Fig.5 Growth of CDT3 and PBM11 under different inoculant's time. 1 Growth of CDT3 (Simultaneous adding); 2 Growth of PBM11 (Simultaneous adding); 3 Growth of CDT3 (Respective adding); 4 Growth of PBM11 (Respective adding)

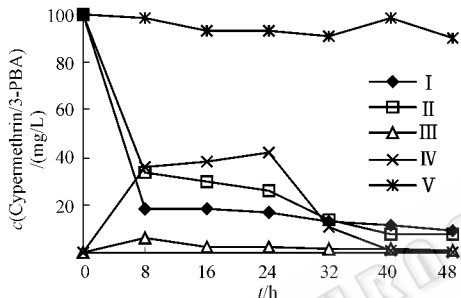


图 6 CDT3 和 PBM11 的接种时间对氯氰菊酯和 3-PBA 降解的影响

Fig.6 Effect of inoculant's time of CDT3 and PBM11 on degradation of cypermethrin and 3-PBA. I Residues of cypermethrin (Simultaneous adding); II Residues of cypermethrin (Respective adding); III Accumulation of 3-PBA (Simultaneous adding); IV Accumulation of 3-PBA (Respective adding); V Residues of cypermethrin (CK).

3 讨论

本文初步探讨了两株降解菌 CDT3 和 PBM11 对氯氰菊酯及降解产物 3-PBA 的协同降解及在降解过程中两株菌的生长变化情况。实验发现,3-PBA 对 CDT3 的生长有明显的抑制作用,从而影响菌株 CDT3 对氯氰菊酯的降解速率,且降解速率与 3-PBA 的浓度成负相关。综合上述两实验结果,可以解释为何菌株 CDT3 接种量会影响氯氰菊酯的降解^[10],当接种量较小时,3-PBA 的积累会对 CDT3 产生明显的抑制,氯氰菊酯的降解率降低;当接种量较大时,3-PBA 的积累对 CDT3 的影响相对较小,因此降解率较高。

在同时加入菌株 CDT3 和 PBM11 时,随着氯氰菊酯和 3-PBA 的降解,菌株 PBM11 的菌数随之增加,但菌株 CDT3 的数量没有明显增加。与加入菌株 CDT3 后 24h 时加入菌株 PBM11 的处理相比,同时加入 CDT3 和 PBM11 氯氰菊酯的降解速率更快,这是由于体系中的 3-PBA 被 PBM11 迅速利用,不会对 CDT3 造成抑制,因此加速了氯氰菊酯的降解。

菌株 CDT3 和 PBM11 的协同作用具有共代谢的某些特点,但实质上并不属于共代谢的降解方式。例如,CDT3 降解氯氰菊酯后产生的产物 3-PBA 可以被 PBM11 利用,然而 PBM11 的生长并不能促进 CDT3 的生长,两株菌之间并没有紧密的关联。不过,由于氯氰菊酯的降解产物 3-PBA 对 CDT3 有明显的抑制作用,而 PBM11 的加入恰好能解除它对 CDT3 的抑制,因此两株菌的协同作用加速了氯氰菊酯的降解,并且消除了中间产物的残留。正如许多文献所述^[14~16],微生物协同降解模式是消除难降解有机物的一种行之有效的方法,本研究结果为该理论提供了新的证据,但有待做更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Hai S, Yi-tin W. Simultaneous Chromium Reduction and Phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 and *Pseudomonas putia* DMP-1, *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(7): 2754 - 2758.
- [2] Hee-sung P, Sung-jin L, Young K C, et al. Degradation of Chloronitrobenzenes by a Coculture of *Pseudomonas putia* and a *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol*, 1999, **65**(3), 1083 - 1091.
- [3] Jonathan D V, Owen P W. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. Strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10) 4874 - 4879.
- [4] 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. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(11), 5019 - 5023.
- [5] Sebastian R S, Zeev R, Jens A. Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide Isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(7): 3478 - 3485.
- [6] Jang JH, Hirai M, Shoda M. Enhancement of styrene removal efficiency in biofilter by mixed cultures of *Pseudomonas* sp. SR-5. *J Biosci Bioeng*. 2006, **102**(1) 53 - 59.
- [7] Kumar M, Leon V, Materano Ade S, Ilzins OA. Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant

- [8] Sorensen SR, Ronen Z, Aamand J. Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl Environ Microbiol.* 2002, **68**(7):3478 – 3485.
- [9] Grant RJ, Betts WB. Biodegradation of the synthetic pyrethroid cypermethrin in used sheep dip. *Lett Appl Microbiol.* 2003, **36**(3): 173 – 176.
- [10] Grant RJ, Betts WB. Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates. *J Appl Microbiol.* 2004, **97**(3): 656 – 662.
- [11] 许育新, 戴青华, 李晓慧, 等. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性的研究. *农业环境科学学报*, 2004, **23**(5): 958 – 963.
- [12] 许育新, 李晓慧, 秦华, 等. 3-苯氧基苯甲酸降解菌的分离及降解特性研究. *微生物学通报* 2005, **32**(5): 62 – 66.
- [13] Edord Topp, M. Humayoun Akhtar. Identification and Characterization of a *Pseudomonas* Strain Capable of Metabolizing Phenoxybenzoates. *Appl Environ Microbiol.* 1991, **57**(5):1294 – 1300.
- [14] Tomotada Iwamoto, Masao Nasu Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2001, **92**(1): 1 – 8.
- [15] 顾继东. 国外环境生物技术的发展 and 展望. *生物技术通报* 1999 (6) 8 – 12.
- [16] 李顺鹏, 蒋建东. 农药污染土壤的微生物修复研究进展. *土壤*, 2004, **36**(6): 577 – 583.

Study on cooperating degradation of cypermethrin and 3-Phenoxybenzoic acid by two bacteria strains

XU Yu-xin^{1,2*}, SUN Ji-quan², LI Xiao-hui², LI Shun-peng², CHEN Yi¹

(¹ Environmental Resources and Soil Fertilizer Institute Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

(² Department of Microbiology, College of Life Sciences, Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The microbial cooperated reaction is one of the most important forms of microbial degradation of organic pollutants. Although there were many research reports of cooperating degradation, less report on the microbial cooperated of pyrethroid degradation to be found. We have isolated one degrading-bacteria strain named CDT3 for degradation of cypermethrin, which can degraded the cypermethrin into 3-PBA and DCVA. At the same time, we also isolated another degrading-bacteria strain named as PBM11, which could get multiplication on 3-PBA as its C source and energy source. The cooperative degradation process of cypermethrin and 3-Phenoxybenzoic acid (3-PBA) using the two degrading-bacteria strain CDT3 and PBM11 was investigated. An obvious inhibition to the cypermethrin degrading-bacterium strain CDT3 (*Rhodococcus* sp.) by its metabolic mediate 3-PBA was found; meanwhile there is no effect on the growth of 3-PBA degrading-bacterium strain PBM11 (*Pseudomonas* sp.) when the concentration of cypermethrin was lower than 200mg/L. The degradation rate of cypermethrin by both strain CDT3 and PBM11 was higher than that by CDT3 alone. The biomass of PBM11 increased along with the degradation of cypermethrin and 3-PBA, but that of CDT3 not. There was no the accumulation of 3-PBA when the simultaneous addition of strain CDT3 and PBM11, however, an obvious one within 24h if inoculation of strain PBM11 was later 24h after inoculation of strain CDT3. Subsequently the 3-PBA was degraded rapidly by strain PBM11. The strains CDT3 and PBM11 showed some characteristics of co-metabolism, however it is not actual degradation form of co-metabolism. For examples, although the degrading sub product of cypermethrin by CDT3 could be utilized, the multiplication of PBM11 could not enhance the multiplication of CDT3, implied there is no obvious relationship between the two strains. Also, to add PBM11 could eliminate the inhibition of 3-PBA to CDT3. Thus, the cooperating degradation of strains CDT3 and PBM11 could promote the degradation of cypermethrin as well as eliminate the residues of middle products. The present research results provide new evidence for the theory of cooperated degradation, but a further research may be necessary.

Keywords: cypermethrin; 3-PBA; degrading-bacteria; cooperating degradation

* Corresponding author. Tel: 86-571-86404269; E-mail: lux_xu@yahoo.com.cn

Other authors: WU Chun-yan¹

Received: 22 December 2006/Accepted: 12 February 2007/Revised 29 May 2007