

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):510-517; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

氯氰菊酯降解菌株 L12 的分离鉴定及降解特性

曲杰, 王海胜, 史延华, 李康, 王圣惠, 闫艳春*

中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘要:【目的】通过分离纯化氯氰菊酯降解菌, 研究降解特性为实际应用提供理论依据。【方法】利用富集驯化培养技术分离菌株, 通过形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株。测定培养液中氯氰菊酯的浓度和代谢产物以及菌体细胞的密度和细胞表面疏水性, 研究菌株的降解特性。【结果】从生产氯氰菊酯的农药厂污水曝气池中, 分离到 1 株能降解氯氰菊酯并以之为唯一碳源进行生长的细菌菌株 L12。16S rRNA 基因序列相似性比较表明, 分离出的菌株与蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的相似性高达 99%。以初始浓度为 50 mg/L 的氯氰菊酯为唯一碳源时, 5 d 内菌株对氯氰菊酯的去除率为 85.6%; 薄层层析分析表明, 在 R_f 0.13 处有代谢产物产生, 经 HPLC 分析发现其与 3-苯氧基苯甲酸 (3-PBA) 的保留时间一致 (2.26min); 采用微生物粘着碳烃化合物法 (MATH) 对该菌株的细菌表面疏水性进行测定, 结果表明, 菌株 L12 的细胞表面疏水性最高为 68.91%。【结论】分离出的氯氰菊酯降解菌属于 *Bacillus cereus* 菌株, 该菌株对氯氰菊酯具有较高的降解能力, 同时产生代谢产物 3-PBA, 而且具有较高的细胞表面疏水性。

关键词: 氯氰菊酯, 生物降解, 3-PBA, 细胞表面疏水性

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0510-08

氯氰菊酯 (cypermethrin, CP) 是一种重要的拟除虫菊酯杀虫剂, 具有较高的杀虫活性, 可以用于防治多种农业害虫, 应用范围非常广泛。随着高毒有机磷农药在农业上的禁用, 氯氰菊酯作为一种高效、低毒、广谱仿生杀虫剂产销量在逐年提高, 应用范围逐步扩大。研究表明, 拟除虫菊酯类杀虫剂不但对鱼类和某些益虫 (如蜜蜂、桑蚕等) 毒性高, 而且对哺乳动物和人类也有一定的危害, 如潜在的致癌性、生殖和发育毒性、神经毒性以及引起急性中毒^[1-3], 因此, 有效地处理拟除虫菊酯类农药的毒性和残留带来的危害已成为人们亟待解决的问题。氯氰菊酯化学结构中有 3 个手性碳原子, 因此共有 4 对外消旋

体 (8 个异构体), 即 *cisA* (*1R-cis α R/1S-cis α S*), *cisB* (*1R-cis α S/1S-cis α R*), *transA* (*1R-trans α R/1S-trans α S*), *transB* (*1R-trans α S/1S-trans α R*)^[4], 应用气相色谱法可以将 4 对异构体完全分开^[5]。

微生物修复在降解并消除农药残留方面具有安全、高效等特点, 是治理农药环境污染的有效生物修复途径^[6-7]。迄今为止, 只有少量关于氯氰菊酯降解菌的报道, 其中国外报道的有微球菌属 (*Micrococcus* sp.)、沙雷氏菌属 (*Serratia* sp.)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 等一些属^[8-9], 而国内的报道主要是红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella* sp.)、

基金项目: 国家“863 计划” (2008AA10Z402); 中国农业科学院基本科研业务基金项目 (0042011006)

* 通信作者。Tel: +86-10-82109685; Fax: +86-10-82106609; E-mail: yanyanchun@caas.net.cn

作者简介: 曲杰 (1985 -), 女, 山东莱州人, 硕士研究生, 主要从事农药污染环境生物修复方面的工作。E-mail: qujie718@163.com

收稿日期: 2010-11-03; 修回日期: 2011-01-20

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、土生曲霉 (*Aspergillus terreus*)、毛链孢属 (*Monilochaetes*) 和镰孢霉属 (*Fusarium*) 等^[10-14]。在氯氰菊酯农药的酶促降解过程中,微生物产生的羧酸酯酶特异性地切断羧酸酯键,分解为羧酸部分和醇部分,而后再进一步氧化,脱氢生成毒性更小或者无毒的化合物。氯氰菊酯水解后生成 DV 菊酸 (DVCA) 和氰醇化合物,氰醇化合物脱氰生成 3-苯氧基苯甲酸 (3-PBA)。Tallur, 许育新, 谢文君等人已经报道氯氰菊酯生物降解过程中产生中间代谢产物 3-PBA^[8,15-17]。

目前已有关于芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 降解氯氰菊酯的报道^[9,13],而且大多数是关于氯氰菊酯生物代谢途径的报道^[8,15-17],关于微生物对氯氰菊酯吸收方式的研究还没有报道。细菌的细胞表面疏水性 (cell-surface hydrophobicity, CSH) 是决定细菌非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要的因素之一,也是影响细菌吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之一^[18-19],氯氰菊酯是一种难溶于水的有机化合物,因此,细胞表面疏水性影响细菌等对污染物的接触与黏附,疏水性的高低会影响细菌对氯氰菊酯的吸附。Zhang 等(2010)报道了沙雷氏菌 (*Serratia* sp.) 细胞表面疏水性和高效氯氰菊酯降解能力的关系^[5],但关于蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 细胞表面疏水性和氯氰菊酯降解能力的关系还未有报道。

本研究通过富集驯化的方法,筛选到 1 株氯氰菊酯降解菌 L12,研究了该菌对氯氰菊酯的降解能力及其细胞表面疏水性,为氯氰菊酯降解菌在农药污染环境的生物修复中的应用提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 活性污泥样品:取自长期生产氯氰菊酯的华阳农药厂污水曝气处理池。

1.1.2 主要仪器和试剂:LRH-250 生化培养箱 (上海恒科技有限公司);Heto-PowerDry LL3000 Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation);恒温摇床 (华利达实验设备公司);722s-紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司);OLYMPUS BH-2 光学显微镜;Automated Bacteria Identification System-Biolog

Micro Station System;岛津 GC-2010 气相色谱仪,配 ECD,Rtx-1301 毛细管柱;安捷伦 1200 series 高效液相色谱仪,配 DAD,Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 × 150 mm × 5 μL) 色谱柱。乙腈为色谱纯试剂 (Fisher Scientific),乙醇,丙酮,二氯甲烷,正己烷,无水硫酸钠等均为分析纯试剂 (北京化工厂)。氯氰菊酯原药:纯度 > 98%,购自山东华阳农药厂。首先以乙醇/丙酮为溶剂制备成质量浓度为 10⁴ mg/L 的标准储备液,使用时稀释加入到培养基中。

1.1.3 培养基:富集培养基 (TYC),基础盐培养基 (MSM) 参照文献 [5] 配制;LB 培养基参照 [20] 配制。其中添加不同体积氯氰菊酯标准储备液;BUG + B 平板培养基参照文献 [21] 配制。

1.2 氯氰菊酯降解菌的分离与筛选

称取 1 g 活性污泥,参考摇瓶富集培养法^[22],不断升高氯氰菊酯浓度,连续驯化一个月后,再用梯度稀释涂布于相应氯氰菊酯浓度的基础盐平板上培养,挑取生长旺盛的单菌落进行纯化。

1.3 降解菌的鉴定

1.3.1 形态特征及 Biolog GP2 分析:降解菌采用平板涂布法接种,30℃ 培养 12 - 16 h 后用光学显微镜观察菌体形态^[23]。Biolog GP2 分析参照文献 [21]。

1.3.2 降解菌的分子鉴定:降解菌总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[20]并以之为模板,设计引物 PCR 扩增 16S rRNA 序列。引物序列:F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG);R (GGC TAC CTT GTT ACG ACT)。扩增反应体系为:10 × PCR Buffer (Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL,引物 (5 μmol/L) 各 2.0 μL,菌体 DNA (约 50 mg/L) 1.0 μL,rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.125 μL,加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 50 s,72℃ 90 s,30 个循环;72℃ 8 min。PCR 产物连至 pMD19-T Vector (TaKaRa),转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,挑取阳性克隆,验证插入片段后测序 (Invitrogen)。将所测序列进入 GenBank 数据库进行相似性分析。

1.4 菌株的生长和氯氰菊酯降解的测定

1.4.1 菌体生长曲线的绘制:菌株 L12 接种到含 50 mg/L 氯氰菊酯的基础培养基中,定期取样,用分光光度计测定 600 nm 下的吸光值,绘制菌体生长

曲线。

1.4.2 氯氰菊酯降解率的测定^[5]:在上述 1.4.1 条件下定时取样 2 mL,设置 3 个平行,加入等体积的正己烷旋涡振荡 1 min,静置 1 h 萃取氯氰菊酯残留,经无水硫酸钠脱水真空冷冻抽干,重溶于等体积正己烷中,气相色谱检测氯氰菊酯降解率。

气相色谱条件:气相色谱仪(GC-2010,岛津),色谱柱为 Rtx-1301 毛细管柱,检测器:ECD,条件:进样口 280℃,柱温(程序升温):180℃保留 2 min,10℃/min 升至 280℃,保留 10 min,ECD 检测器:300℃,载气 N₂,流速:8.6 mL/min,进样量:1 μL^[5]。在此条件下,测得氯氰菊酯 4 对外消旋体的保留时间分别为 17.843 min、18.193 min、18.384 min、18.565 min。标准曲线为 $y = 35911x$, $R^2 = 0.9996$ 。其中 x 为氯氰菊酯浓度, y 为 4 对外消旋体峰面积之和。采用外标法测定样品中氯氰菊酯的含量,求出其降解率。

氯氰菊酯降解率(%) = $[1 - (\text{实测残量}/\text{对照样实测残量})] \times 100\%$ ^[24]。

1.5 氯氰菊酯降解菌两相分离系统的选择及细胞表面疏水性的测定

本实验采用微生物粘着碳烃化合物法(MATH)测定细胞表面疏水性^[25]。用 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)洗涤收集的菌体 2 次,悬浮细胞使得浓度达到 OD₆₀₀ = 0.6。选用 d = 10 mm 的圆底试管,加入 4 mL 调整好浓度的菌液,再按 0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 和 2.0 mL 的梯度加入有机相,对照组不加有机相,用玻璃小塞封口,室温(20℃ ± 1℃)剧烈震荡 1 min,静置 1 h 分层。用无菌注射针头快速吸取下相水溶液,以缓冲液为空白对照,在 600 nm 波长下测定 A 值。每个实验重复 3 次。细菌细胞表面疏水率(CSH%)按下式计算: $\text{CSH}\% = (\text{对照组 } A_{600} - \text{实验组 } A_{600}) / \text{对照组 } A_{600} \times 100\%$

有机溶剂选用二甲苯和正辛醇。振荡后观察两相界面菌体分布情况,以选择合适的两相分离系统。

1.6 降解中间代谢产物的检测

在上述 1.4.1 条件下定时取样 2 mL,设置 3 个平行,用 2 mol/L 的盐酸将样品酸化至 pH2.4,加入等体积的二氯甲烷,漩涡震荡 1 min,静置 1 h。取下

层有机相,真空冷冻抽干,重溶于 200 μL 的二氯甲烷中,置 -20℃ 密封保存。

检测方法:薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)。

薄层层析法(TLC):采用 GF254 (规格:100 × 100 mm,厚度:0.12 - 0.125 mm)硅胶板,展层剂:甲苯:石油醚:乙酸 = 75 : 25 : 1 (V/V/V)^[5],将样品进行展层后定性分析氯氰菊酯的降解产物。

高效液相色谱法(HPLC):将薄层层析板上的目的点回收,重溶于乙腈中,经 0.25 μm 滤膜过滤后,采用高效液相色谱仪(安捷伦 1200 series)进行检测。条件:Eclipse XDB-c18 (4.6 × 150 mm × 5 μL) 色谱柱;DAD 检测器;流动相为乙腈和水(70/30, v/v);流速:1.0 ml/min,检测波长:210 nm,进样量 10 μL。

2 结果和分析

2.1 降解菌的分离鉴定

从农药厂污水曝气池中采集活性污泥,经富集驯化、筛选分离得到多株具有氯氰菊酯降解能力的菌株,通过在仅以氯氰菊酯为碳源的基础盐固体培养基上的生长情况,从中选出降解能力较强的菌株 L12。该菌株为革兰氏阳性杆菌,细胞杆状,成短或长链,菌落较大,表面粗糙,扁平,不规则。经 Biolog 读数仪分析代谢指纹,菌株 L12 可较强利用其中 8 种碳源,对其它 87 种碳源不能利用或利用能力较弱。Biolog 鉴定结果如表 1 所示。经 PCR 扩增,菌株 L12 的 16S rRNA 片段长约 1.5 kb,在 GenBank 中的注册号为 HQ398861,经 BLAST 比对发现菌株 L12 的 16S rRNA 与蜡状芽孢杆菌的 16S rRNA 相似度高达 99%。结合形态学特征、Biolog GP2 分析和 BLAST 比对分析,将菌株 L12 鉴定为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

2.2 菌株 L12 生长和降解性能研究

在接种后的 2 d 内,菌株 L12 生长迅速,同时能将 50 mg/L 氯氰菊酯降解 68%。随后,菌株生长缓慢并进入衰亡期,对氯氰菊酯的降解能力下降。最终,在 5 d 内菌株 L12 能将 50 mg/L 氯氰菊酯降解 85.6%,而对照组中的农药浓度降解不超过 10%,这些结果表明氯氰菊酯的降解主要是由于菌株 L12 的降解作用(图 1)。

表 1 菌株 L12 对 Biolog GP2 板上 95 种碳源的利用能力

Table 1 Utilization of 95 carbon-substrates in Biolog GP2 microplate by strain L12

carbon substrate	results	carbon substrate	results	carbon substrate	results
water	-	L-malic acid	-	D-tagatose	-
α -cyclodextrin	-	pyruvic acid methyl ester	-	D-trehalose	-
β -cyclodextrin	-	succinic acid mono-methyl ester	-	turanose	-
dextrin	-	propionic acid	-	xylito	-
glycogen	-	pyruvic acid	-	D-xylose	+
inulin	-	succinamic acid	-	acetic acid	-
mannan	-	succinic acid	-	α -hydroxy butyric acid	-
tween 40	+	N-acetyl-L-lactamide glutamic acid	-	β -hydroxy butyric acid	-
tween 80	+	L-alaninamide	-	γ -hydroxy butyric acid	-
N-acetyl-D-galactosami-ne	-	D-alanine	-	p-hydroxy-phenylacetic acid	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	L-alanine	-	α -ketoglutaric acid	-
amygdalin	-	L-alanyl-glycine	-	α -ketovaleric acid	-
L-arabinose	+	L-asparagine	-	lactamide	-
D-arabitol	-	L-glutamic acid	-	D-lactic acid methyl ester	-
arbutin	-	glycyl-L-glutamic acid	-	L-lactic acid	-
D-cellobiose	+	L-pyroglutamic acid	-	D-malic acid	-
D-fructose	-	α -methyl-D-galactoside	-	L-serine	-
L-fucose	-	β -methyl-D-galactoside	-	putrescine	-
D-galactose	-	3-methyl-D-glucose	-	2,3-butanediol	-
D-galacturonic acid	-	α -methyl-D-glucoside	-	glycerol	-
gentiobiose	-	β -methyl-Dglucoside	-	adenosine	+
D-gluconic acid	-	α -methyl-D-mannoside	-	2'-deoxy adenosine	-
α -D-glucose	+	palatinose	-	inosine	-
m-inositol	-	D-psicose	-	thymidine	-
α -D-lactose	-	D-raffinose	-	uridine	-
lactulose	-	L-rhamnose	-	adenosine-5'-monophosphate	-
maltose	-	D-ribose	+	thymidine-5'-monophosphate	-
maltotriose	-	salicin	-	uridine-5'-monophosphate	-
D-mannitol	-	sedoheptulosan	-	D-fructose-6-phosphate	-
D-mannose	-	D-sorbitol	-	α -D-glucose-1-phosphate	-
D-melezitose	-	stachyose	-	D-glucose-6-phosphate	-
D-melibiose	-	sucrose	-	D-L- α -glycerolphosphate	-

+ : Positive; - : Negative.

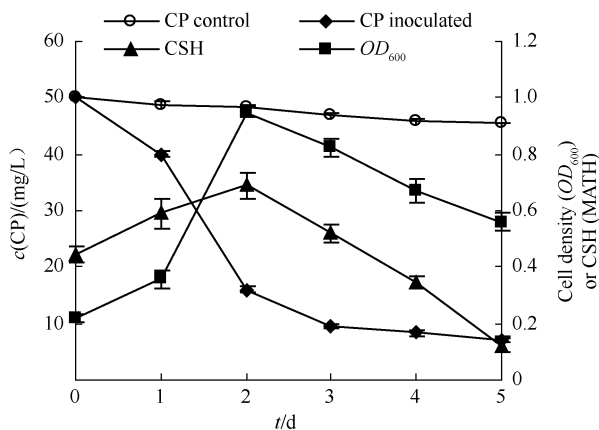


图 1 菌株 L12 的生长曲线、细胞表面疏水性曲线和氯氰菊酯降解曲线

Fig. 1 Bacterial growth and CSH of strain L12 during degrading CP (50mg/L).

2.3 氯氰菊酯降解菌 CSH 分析

2.3.1 有机相-水两相体系的选择: 本实验采用二甲苯和正辛醇为有机相进行对比实验。结果表明,二甲苯-水两相体系的相分离速度明显快于正辛醇-水两相体系,且二甲苯吸附细菌的能力较正辛醇强(图 2)。在二甲苯-水两相体系中,降解菌主要集中在二甲苯-水界面且保持长时间稳定;而在正辛醇-水两相体系中,正辛醇和水相间有明显乳化层,使得两相分离不稳定。因此,与正辛醇相比,二甲苯是研究该菌细胞表面疏水性的理想有机相,在以下实验中均采用二甲苯-水两相体系。

测定了不同二甲苯-水配比(0.2:4,0.5:4,1:4,1.54:2:4,V/V)下菌株 L12 的细胞表面疏水性,结果表明,菌株 L12 的细胞表面疏水性随着有机相二

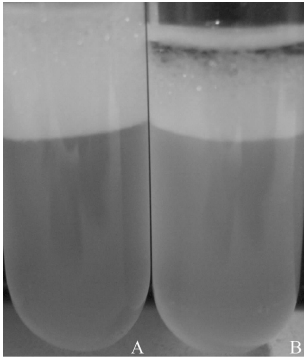


图2 菌株 L12 在二甲苯与正辛醇中的细胞表面疏水性比较
Fig.2 Cell surface hydrophobicity of strain L12 in xylene or *n*-octanol.
A: xylene; B: *n*-octanol.

甲苯的增加而先增大后减小,当二甲苯-水两相体积比为 1:4 时,菌株 L12 的细胞表面疏水性最高,当二甲苯-水相比大于 1:4 时,细胞表面疏水性有所降低,这可能是由于过量的二甲苯对细胞表面活性产生抑制作用的结果。考虑以上因素,进行疏水性测定时,二甲苯-水两相体系的比为 1:4 (V/V)。

2.3.2 菌体细胞表面疏水性与其降解能力的关系: 本实验测定了菌株 L12 在生长和降解氯氰菊酯过程中细胞表面疏水性的变化(图 1),在降解初期,2d 内菌株 L12 的 CSH 不断增大,最大值为 68.91%,并且此时菌株生长率和降解率同样达到最大值。由此推测菌株 L12 的细胞表面疏水性能促进菌体对疏水

性有机物氯氰菊酯的吸附,从而增加了菌体与氯氰菊酯的有效接触面积,提高污染物降解能力。Zhang 等(2010)报道了 2 株 *Serratia* spp. 的细胞表面疏水性和高效氯氰菊酯(Beta-cypermethrin)降解能力的关系,表明细胞表面疏水性能提高菌株对疏水性农药的降解能力^[5]。在降解后期,随着氯氰菊酯农药残留量的减少,菌株 L12 的细胞表面疏水性也随之降低。我们推测细菌的细胞表面疏水性会随着氯氰菊酯浓度的变化而变化,当菌株处于高浓度氯氰菊酯耐受压下,菌体可能通过调节细胞表面疏水位点的多少来完成对农药的吸附降解,而实现自我保护^[26]。

相关研究报道表明,微生物 CSH 在石油污染生物修复和其它应激条件下具有应用潜力^[27-30]。但在疏水性农药微生物修复过程中,细胞表面疏水性与降解能力之间关系的研究还少有报道^[5]。本实验通过测定菌株 L12 对疏水性农药氯氰菊酯降解过程中菌体 CSH 的变化,推断 CSH 能够促进菌株的降解能力,有利于菌株 L12 黏着到氯氰菊酯液滴表面,直接吸收降解氯氰菊酯。

2.4 降解中间代谢产物的检测

应用薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)来检测降解过程中氯氰菊酯中间体的生成。迁移率 R_f 和保留时间见表 2。

表 2 菌株 L12 降解氯氰菊酯代谢产物的色谱分析
Table 2 Chromatographic properties of metabolite of CP degraded by strain L12.

Detection methods	Product	3-PBA	CP			
			<i>cis</i>		<i>trans</i>	
TLC: R_f value	0.13	0.13			0.80	
HPLC: retention time (min) ^a	2.26	2.26	18.419		19.868	
GC-ECD: retention time (min) ^b	ND	ND	17.825	18.177	18.368	18.552

ND, not detected. ^a *cis*- and *trans*-forms of CP detected by HPLC, ^b *cis*A-, *cis*B-, *trans*A-, *trans*B-forms of CP.

生长在含氯氰菊酯基础盐培养基中的菌株 L12 培养物萃取处理后,经 TLC 分析可见在 R_f 0.13 处有产物产生,并与 3-PBA 的标准样品点一致(图 3)。回收产物经 HPLC 分析表明与 3-PBA 的保留时间一致(2.26min),这说明菌株 L12 在降解氯氰菊酯过程中产生了 3-PBA。

3 讨论

氯氰菊酯是近年来广泛应用的一类拟除虫菊酯杀虫剂,其残留却给人们的健康带来了巨大的威胁。自然界中的微生物可通过变异或形成诱导酶来适应

氯氰菊酯污染环境,并且对其产生降解作用。迄今为止,只有少量关于氯氰菊酯降解菌的报道。已分离到的氯氰菊酯降解菌中 *Micrococcus* sp. CPN1 在 8d 内能够降解 90% 的氯氰菊酯(1000mg/L)^[8], *Rhodococcus* sp. CDT3 在 3d 内能够降解 84.2% 的氯氰菊酯(100 mg/L)^[10], *Pseudomonas aeruginosa* HF1228 在 5d 内能够降解 93.03% 的氯氰菊酯(20 mg/L)^[12] 等。本研究利用富集驯化的方法从长期生产氯氰菊酯的农药厂活性污泥中分离到一株能够降解氯氰菊酯的降解菌蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) L12,并对其降解特性进行了研究,以期对氯

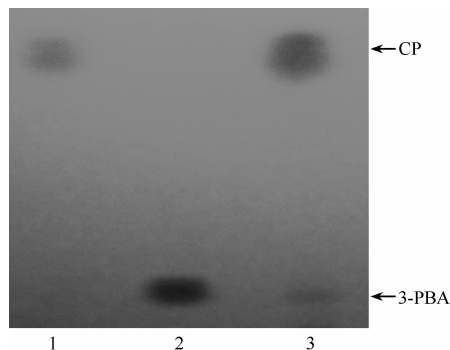


图3 薄层层析分析菌株 L12 降解氯氰菊酯的代谢产物
Fig. 3 TLC analysis of metabolites of CP degraded by strain L12. 1: CP standard; 2: 3-PBA standard; 3: L12 metabolites.

氯氰菊酯污染环境的生物修复提供优势菌株。

该菌株能以氯氰菊酯为唯一碳源生长,能在 2d 内将 50mg/L 氯氰菊酯降解 68%, 5d 内降解 85.6%。可见该菌株对氯氰菊酯具有较好的降解效果,在被污染的土壤和污水处理中有很大的应用潜力。菌株 L12 在降解氯氰菊酯过程中有 3-PBA 生成,表明菌株 L12 能够合成羧酸酯酶,特异性切断氯氰菊酯的羧酸酯键,生成 DV 菊酸和 3-PBA,并进一步将 3-PBA 水解为苯酚、邻苯二酚等进入体内代谢途径而得以完全降解^[8,15-17]。

细菌细胞表面疏水性是决定细菌非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要的因素之一,也是影响细菌吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之一^[19],因此研究细菌的细胞表面疏水性在菌株降解非水相有机化合物过程中的变化有重要意义。Christian O. Obuekwe 等人从不同的疏水环境中筛选到 46 株能够在原油中生长的菌株,其中 74% 的菌株具有较高的细胞表面疏水性^[29]。Sinjini Chakrabortya 等人通过对 *Burkholderia* 菌株的细胞表面疏水性和表面电荷的研究表明,细胞表面疏水性是菌株生长和吸附到非水相有机化合物表面的重要因素^[30]。但在非水溶性农药污染环境生物修复过程中,有关细胞表面疏水性的研究还少有报道,我们曾报道了两株 *Serratia* spp. 的细胞表面疏水性和高效氯氰菊酯 (Beta-cypermethrin) 降解能力的关系,表明细胞表面疏水性能够提高菌株对疏水性农药的降解能力^[5]。本研究通过分析细胞表面疏水性和氯氰菊酯降解能力之间的关系发现,细胞表面疏水性能够促进菌株对氯氰菊酯的降解,即细胞表面疏水性高时菌株对氯氰菊酯的降解率增高。细胞表面疏

水性可以增强菌体对疏水性有机物的吸附,提高污染物降解能力,这丰富了环境生物修复过程的理论基础。

参考文献

- [1] 李海斌,李君. 氯氰菊酯毒作用研究进展. 环境与健康杂志 (*Journal of Environment and Health*), 2007, 24 (5):372-374.
- [2] 张久刚,闫艳春. 微生物对拟除虫菊酯类农药残留的生物修复. 生物技术通讯 (*Letters in Biotechnology*), 2006, 17 (6):1004-1007.
- [3] van Wijngaarden RP, Brock TC, van Den Brink PJ. Threshold levels for effects of insecticides in freshwater ecosystems; A review. *Ecotoxicology*, 2005, 14:355-380.
- [4] 范志金,刘丰茂,钱传范. 氯氰菊酯的名称和组成及其光学异构体. 农药科学与管理 (*Pesticide Science and Administration*), 1999, 20 (2):9-11, 17.
- [5] Zhang C, Jia L, Wang SH, Qu J, Li K, Xu LL, Shi YH, Yan YC. Biodegradation of beta-cypermethrin by two *Serratia* spp. with different cell surface hydrophobicity. *Bioresource Technology*, 2010, 101:3423-3429.
- [6] 王兆守,李顺鹏. 拟除虫菊酯类农药微生物降解研究进展. 土壤 (*Soils*), 2005, 37 (6):577-580.
- [7] 李玲玉,刘艳,颜冬云,徐绍辉. 拟除虫菊酯类农药的降解与代谢研究进展. 环境科学与技术 (*Environmental Science & Technology*), 2010, 33 (4):65-71.
- [8] Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN1. *Biodegradation*, 2008, 19:77-82.
- [9] Murugesan AG, Jeyasanthi T, Maheswari S. Isolation and characterization of cypermethrin utilizing bacteria from brinjal cultivated soil. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4 (1):010-013.
- [10] 许育新,戴青华,李晓慧,李顺鹏. 氯氰菊酯降解菌株 CDT3 的分离鉴定及生理特性研究. 农业环境科学学报 (*Journal of Agro-Environment Science*), 2004, 23 (5):958-963.
- [11] Wu PC, Liu YH, Wang ZY, Zhang XY, Li H, Liang WQ, Luo N, Hu JM, Lu JQ, Luan TG, Cao LX. Molecular cloning, purification, and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing esterase from *Klebsiella* sp. strain ZD112. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54:836-842.

- [12] 刘君寒,王兆守,何健,王保战,李顺鹏. 一株氯氰菊酯降解菌的分离和鉴定. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 2007, 30(3): 68-72.
- [13] 洪永聪,辛伟,崔德杰,胡方平. 蜡状芽孢杆菌菌株 TR2 对氯氰菊酯降解作用的小区试验. 青岛农业大学学报(自然科学版) (*Journal of Qingdao Agricultural University (Natural science)*). 2007, 24(4): 291-293.
- [14] 秦坤,朱鲁生,王金花. 氯氰菊酯降解真菌的筛选及其降解特性研究. 环境工程学报 (*Chinese Journal of Environmental Engineering*), 2010, 4(4): 950-954.
- [15] Sakata S, Mikami N, Matsuda T, Miyamoto J. Degradation and leading behavior of the pyrethroid insecticide cypermethrin in soils. *Journal of Pesticide Science*, 1986, 11(1): 71-79.
- [16] 许育新,孙纪全,李晓慧,李顺鹏,陈义. 两株菌对氯氰菊酯及其降解产物 3-PBA 的协同代谢研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(5): 834-837.
- [17] Xie WJ, Zhou JM, Wang HY, Chen XQ. Effect of nitrogen on the degradation of cypermethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in soil. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 638-644.
- [18] Zhang JS, Sun ZT, Li YY, Peng X, Li W, Yan YC. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 163: 723-728.
- [19] Zita A, Hermansson M. Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 1168-1170.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [21] 程池,杨梅,李金霞,姚粟,胡海蓉. Biolog 微生物自动分析系统——细菌鉴定操作规程的研究. 食品与发酵工业 (*Food and Fermentation Industries*), 2006, 32(5): 221.
- [22] Xu GM, Zheng W, Li YY, Wang SH, Zhang JS, Yan YC. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62: 51-56.
- [23] 布坎南,吉本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [24] 刘艳,范丽薇,王晓萍. 氯噻磺隆降解菌的分离鉴定及其降解特性. 微生物学通报 (*Microbiology China*), 2010, 37(8): 1164-1168.
- [25] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 1980, 9: 29-33.
- [26] Farrell A, Quilty B. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 28: 316 - 324.
- [27] Plaza GA, Ulfig K, Brigmon RL. Surface active properties of bacterial strains isolated from petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Polish Journal of Microbiology*, 2005, 54: 161-167.
- [28] Shakirova L, Auzina L, Grube M, Zikmanis P. Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35: 1175-1180.
- [29] Obuekwe CO, Al-Jadi ZK, Al-Saleh ES. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63: 273-279.
- [30] Chakraborty S, Mukherji S, Mukherji S. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading *Burkholderia* strains and their interactions with NAPLs and surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 78: 101-108.

Isolation, identification and characterization of cypermethrin-degrading strain L12

Jie Qu, Haisheng Wang, Yanhua Shi, Kang Li, Shenghui Wang, Yanchun Yan*

Graduate School, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [**Objective**] To isolate and characterize bacteria to degrade cypermethrin (CP). [**Methods**] We used enrichment culture to isolate and characterize bacterial strains based on the observation of morphological and biochemical characters and analysis of 16S rRNA gene sequences. We determined the concentration of CP, metabolite, densities of strain cells and cell surface hydrophobicity (CSH) in pure culture liquid. [**Results**] We isolated a bacterium able to effectively degrade CP from polluted wastes of pesticide plant and assigned it as strain L12. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene showed the similarity of 99% between strain L12 and *Bacillus cereus*. In pure culture with CP as the sole carbon and energy source, 85.6% of CP at initial concentration of 50 mg /L was degraded in 5 days. Thin layer chromatography (TLC) analysis of the culture extracts revealed presence of a metabolite (R_f 0.13), and HPLC analysis confirmed the retention time of the metabolite (2.26min) corresponded with 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) standard. The method of microorganism adhering to hydrocarbon (MATH) was used to analyze strain L12 of the highest CSH of 68.91%. [**Conclusion**] The results showed that strain L12 belonged to *Bacillus cereus*, which showed CSH and capacity to degrade CP to 3-PBA.

Keywords: cypermethrin, biodegradation, 3-PBA, cell-surface hydrophobicity

(本文责编:王晋芳)