

韩庆莉,王军民,韩 祯,等. 类球红细菌对草莓敌敌畏残留的降解效果[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):286-287,292.

类球红细菌对草莓敌敌畏残留的降解效果

韩庆莉¹, 王军民¹, 韩 祯², 王 栋³, 白志辉²

(1. 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085;

3. 无锡中科活力生物技术有限公司, 江苏无锡 214200)

摘要:测定了不同浓度类球红细菌对大棚草莓上敌敌畏的降解效果。结果表明,类球红细菌能有效降低草莓上敌敌畏的残留量,缩短草莓上敌敌畏的安全间隔期,使用适宜浓度为 1×10^8 CFU/mL。在此浓度下,草莓上喷施稀释 1 000 倍的 77.5% 敌敌畏乳油,类球红细菌第 1 天的降解率超过 50%,第 7 天达到 97%,残留量仅为 0.19 mg/kg,低于国家标准(GB 2763—2005)规定的蔬菜水果中敌敌畏小于 0.2 mg/kg 的标准,对照组为 1.76 mg/kg,高于国家标准 8~10 倍。

关键词:类球红细菌;草莓;敌敌畏;降解

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0286-02

草莓多为大棚种植,植株低矮,易发生病虫害,敌敌畏为中等毒性有机磷农药,可防治多种草莓虫害。80% 敌敌畏乳油稀释 1 000~1 500 倍喷雾,可防治草莓叶螨、红蜘蛛、跳甲,浇灌苗可防治蛴螬;50% 敌敌畏乳油 1 000 倍液喷雾可防治蚜虫;80% 敌敌畏乳油制作毒土撒于株间可防治地老虎等^[1]。草莓成熟期和保鲜期都较短,很多草莓种植者为了及早上市,未过农药的使用安全期就采摘上市,导致草莓中敌敌畏残留超标,市场上草莓敌敌畏残留超标的报道屡见不鲜。2006 年 12 月 27 日《番禺日报》报道,广州市农业标准与监测中心于 2006 年 12 月对番禺部分水果进行农药残留专项监测,71 个各类主流水果样本的总体合格率达 95.8%,合格率较高;但对 47 个草莓样本进行农残监测的结果表明,合格率仅为 44.7%,原因主要是检出敌敌畏和禁用农药甲胺磷超标。2007 年 1 月 20 日《番禺日报》报道,广州市农业局对 9 个镇 56 个草莓场面积 19.49 hm² 的草莓进行了农药残留检查,结果表明,草莓种植者所用的农药主要是杀虫剂敌敌畏、杀菌剂、生长素等;2011 年 4 月 19 日湛江新闻网报道,湛江农业局就地销毁了正在上市销售的 3 个草莓种植园的草莓,原因同样是草莓中检出敌敌畏高残留超标。由此可见,敌敌畏在草莓上不但广泛使用,而且存在严重的农药残留污染。

草莓属于浆果,表面粗糙易烂,农药易渗入果肉内部,普通的清洗及降解农残的方法都不适宜于草莓,且草莓食用时不易去皮或无需去皮,因此寻求有效的降解草莓中农药的残留方法更为重要。类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroies*) EBL0706 菌株由中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室提供,初步试验类球红细菌能够降解敌敌畏^[2]。本试验研究了不同浓度类球红细菌对草莓上敌敌畏的降解效果,为草

莓中敌敌畏的残留降解提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 农药。敌敌畏乳油,天津市华宇农药有限公司生产,有效成分含量 77.5% (气谱法);敌敌畏标准品,由农业部环境保护科研监测所研制。(2) 微生物。类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroies*) EBL0706 分离自土壤,保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号:CGMCC No. 0645。(3) 植物。草莓(*Fragaria ssp.*),北京市昌平区温室大棚中种植的草莓,处于果实膨大期,试验时间为 2010 年 3 月,大棚中白天温度约 20℃,夜间温度约 10℃,相对湿度约 70%,受试区域的草莓未喷过任何农药。(4) 其他材料。敌敌畏标准品(1 mg/mL,甲醇)由农业部环境保护科研监测所研制,各种分析纯试剂购于北京化学试剂公司,用于 GC-MS 分析的色谱纯试剂购于北京迪马科技有限公司。

1.2 类球红细菌菌液的制备

将保存于 LB 斜面的菌种移到液体摇瓶,摇瓶体积为 250 mL,装液量 100 mL,5% 接种量,摇床 150 r/min,32℃、光照培养 24 h,得类球红细菌无机盐培养基菌液,菌体的浓度为 5×10^9 CFU/mL,摇瓶液体培养基组成见文献[2]。

1.3 降解试验设计

类球红细菌无机盐培养基菌液用无菌水依次稀释到 5×10^8 、 1×10^8 、 5×10^7 CFU/mL,待用。

试验分 5 个组,每组 100 颗草莓,敌敌畏用水稀释 1 000 倍,均匀喷洒到各组草莓果上,以果面潮湿而无液滴落下为准。等果实表面敌敌畏溶液自然干燥后约 2 h 进行处理:(1) 自然降解,不做任何处理;(2) 喷水(对照);(3) 喷 5×10^8 CFU/mL 类球红细菌;(4) 喷 1×10^8 CFU/mL 类球红细菌;(5) 喷 5×10^7 CFU/mL 类球红细菌。待草莓上喷施的类球红细菌液和水都自然干燥后,每组采样 200 g,作为待测样品,以后分别于 1、2、3、5、7 d 采样,用冰盒带回实验室立即进行敌敌畏的提取。

各处理类球红细菌对敌敌畏的降解率按下式计算:

收稿日期:2013-01-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:30600082);西南林业大学博士启动基金(编号:111207)。

作者简介:韩庆莉(1975—),女,博士,讲师,主要从事果蔬农药残留降解研究。E-mail:hanqingli1103@163.com。

通信作者:白志辉。E-mail:zhibai@reces.ac.cn。

降解率 = (敌敌畏浓度 - 0 d 敌敌畏浓度) × /第 0 d 敌敌畏浓度 × 100%。

1.4 草莓中敌敌的提取与检测

按照 GB/T 5009.20—2003《食品中有机磷农药残留量的测定》中第一法水果蔬菜中有机磷农药的测定方法提取草莓中敌敌畏。提取的样品,用 0.22 μm 的有机相一次性过滤膜过滤除杂,用色谱纯二氯甲烷稀释到相应浓度,待测。

(1)检测方法。GC-MS, SIM^[3]。气相色谱-质谱联用仪为 HP6890 气相色谱-HP5973 质谱联用仪。(2)色谱条件。柱型:DB-5MS, 0.25 mm × 30 m × 0.25 μm;不分流进样,载气 He,进样量 1.0 μL,恒流模式,流速 1.2 mL/min;升温程序:60 ℃ 保持 1 min,以 35 ℃/min 升至 150 ℃,保持 1 min,以 5 ℃/min 升至 160 ℃,保持 1 min,以 20 ℃/min 升至 250 ℃,保持 10 min,以 5 ℃/min 升至 260 ℃,保持 1 min,总 25.07 min;离子源温度 250 ℃。(3)质谱条件。色谱柱接 MS 温度 280 ℃,SIM 模式,选择离子:*m/z* 79、109、185,检测器 MSD。

1.5 数据分析

试验数据用均值和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,采用 Duncan 多重极差检验进行显著性差

异检验。

2 结果与分析

2.1 草莓中敌敌测定标准曲线

用“1.4”节所描述的 GC-MS 对不同浓度梯度的敌敌畏标准品进行浓度检测,得到峰面积与浓度之间的对应关系 $y = 163.85x - 10.163$ ($r^2 = 0.9985$),标准曲线在 0.05 ~ 5.00 mg/L 范围线性关系良好。77.5% 的敌敌畏乳油稀释 1 000 倍喷洒到草莓上,回收率为 89.7%,表明用此法测定草莓中的敌敌畏具有可行性。

2.2 不同浓度类球红菌对草莓中敌敌的降解

不同处理中,3 个类球红细菌液处理组对草莓中敌敌畏都有一定的降解作用,结果如表 1 所示。 5×10^8 、 1×10^8 CFU/mL 类球红细菌处理后 1 d 的降解率超过 50%,处理 7 d 达到 98%,残留量 0.19 mg/kg,低于国家标准 GB 2763—2005 中规定的蔬菜水果中敌敌畏小于 0.2 mg/kg 的标准。 5×10^7 CFU/mL 处理后 7 d 敌敌畏的残留量仍高于标准 4 倍多。自然降解和水处理(对照)后 7 d 的降解率均为 74%,残留量分别为 1.93、1.76 mg/kg,比 0.2 mg/kg 的国家标准分别高 8.65、7.8 倍。

表 1 类球红细菌对草莓上敌敌畏的降解效果

处理	敌敌畏含量(mg/kg)					
	0 d	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
自然降解	7.67 ± 0.33	5.79 ± 0.33	3.33 ± 0.17	2.87 ± 0.34	2.29 ± 0.37	1.93 ± 0.27
水(对照)	6.71 ± 0.22	3.78 ± 0.14	2.91 ± 0.13	2.31 ± 0.17	1.89 ± 0.35	1.76 ± 0.23
5×10^8 CFU/mL 菌液	6.62 ± 0.11	2.63 ± 0.17 *	1.22 ± 0.15 **	0.65 ± 0.17 **	0.23 ± 0.11 **	0.19 ± 0.11 **
1×10^8 CFU/mL 菌液	6.57 ± 0.23	2.79 ± 0.14 *	1.11 ± 0.13 **	0.56 ± 0.16 **	0.23 ± 0.09 **	0.19 ± 0.12 **
5×10^7 CFU/mL 菌液	6.59 ± 0.33	3.02 ± 0.15	2.14 ± 0.17	1.86 ± 0.15 *	0.97 ± 0.15 *	0.87 ± 0.15 *

注:** 和 * 分别表示菌液处理组与喷水对照组相比 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$,无 * 表示 $P > 0.05$ 。

2.3 不同浓度类球红菌对草莓中敌敌的降解差异性分析

取处理后 3、7 d 的降解效果,对不同浓度类球细菌降解草莓中敌敌畏的差异性进行分析,结果见表 2。

表 2 不同浓度类球红细菌对草莓中敌敌畏的降解效果

处理	降解率(%)	
5×10^8 CFU/mL 菌液	90.18 ± 4.89 bB	97.13 ± 2.19 bB
1×10^8 CFU/mL 菌液	91.47 ± 2.16 bB	97.11 ± 3.12 bB
5×10^7 CFU/mL 菌液	71.77 ± 3.15 aA	86.76 ± 2.15 aA

注:同列中数据后不同小写、大写字母分别表示差异显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)。

由表 2 可见,处理后 3、7 d,3 种不同浓度类球红细菌处理下, 5×10^8 、 1×10^8 CFU/mL 类球红细菌对敌敌畏降解率无显著差异,但极显著高于 5×10^7 CFU/mL 处理组,表明类球红细菌对草莓上的敌敌畏降解应用的最适浓度为 1×10^8 CFU/mL。

3 结论与讨论

本研究中,1 000 mg/L 的敌敌畏喷洒在草莓上,7 d 的自然残留量为 1.93 mg/kg,比国家标准 GB 2763—2005 规定的蔬菜水果中敌敌畏 ≤ 0.2 mg/kg 的标准高出近 9 倍。赵凯等测定了敌敌畏在白菜上的残留量,48 h 后为 0.051 mg/kg。可见,敌敌畏虽然为低残留农药,但其残留污染仍然存在,且

不同果蔬上的安全期不同,7 d 安全间隔期的规定有待进一步验证。

近年来,已报道的敌敌畏降解菌株有地衣芽孢杆菌(*B. licheni formis*)、不动菌属(*Acinetobacter*)^[4-5]、真菌木霉 FM10^[6]、甲基杆菌属(*Methylobacterium* sp.)^[7-8],这些菌株对敌敌畏都有一定的降解能力,降解率在 50% ~ 70% 之间,但还没有实际应用 to 果蔬上降解敌敌畏的报道,降解菌株对果品品质的影响及食用的安全性机理还不清楚。

在我们前期研究工作中,赵凯等研究得到 5×10^8 CFU/mL 类球红细菌稀释液对 400 mg/L 的敌敌畏 12 h 的降解率达到 98% 以上,为敌敌畏高效降解菌株。本研究得到, 1×10^8 CFU/mL 类球红细菌液对草莓上的敌敌畏 1 d 的降解率超过 50%,7 d 达到 97%,残留量 0.19 mg/kg,低于国家标准规定的蔬菜水果中敌敌畏小于 0.2 mg/kg 的标准,说明适宜浓度的类球红细菌液能够有效降低草莓中敌敌畏残留,缩短草莓上敌敌畏的安全间隔期。

敌敌畏在水体中的自然降解产物为磷酸二甲酯和毒性物质二氯乙醛^[9],而类球红细菌降解敌敌畏过程无有毒中间物质产生,降解机理是直接吧敌敌畏矿化为 CO₂ 和 H₂O^[2]。笔者研究发现,类球红细菌对暴露于敌敌畏中的鲫鱼和斑马鱼有一定的解毒保护作用^[10-11],表明应用类球红细菌降解敌敌

(下转第 292 页)

子。脂肪酸组成分析结果表明,在宽体沙鳊和中华沙鳊的肌肉、鱼卵及肝脏中,SFA 均以 C16:0 比例最高,MUFA 均以 C18:1n-9 比例最高。SFA 与 MUFA 组成模式与大鳍鲢肌肉组成模式相同^[7]。经研究发现,淡水鱼和海水鱼肌肉中软脂酸(C16:0)的含量均相对较高^[8]。在宽体沙鳊中 PUFA 以 C22:5n-3 比例最高,其次是 C18:2n-6 和 C22:6n-3;而中华沙鳊以 C18:2n-6 比例最高,其次是 C20:5n-3 和 C22:5n-3。而在大鳍鲢肌肉中,PUFA 以 C18:2n-6、C22:6n-3、C18:3n-3 和 C20:5n-3 所占比例最大^[7]。此外,PUFA 特别是n-3 HUFA,在促进亲鱼繁殖、提高苗种成活率、促进鱼苗及仔稚鱼生长发育等方面发挥了重要的生理作用^[5]。分析表明,宽体沙鳊和中华沙鳊的鱼卵中 PUFA 分别以 C22:6n-3 和 C20:5n-3 比例最高,显著高于肌肉和肝脏。类似地,香鱼卵巢也含有丰富 C22:6n-3、C20:4n-6 及油酸、亚油酸等高不饱和脂肪酸,以满足卵巢发育对多不饱和脂肪酸的需求^[9]。研究发现,在内源性营养阶段(饥饿),黄颡鱼、真鲷首先利用其他脂肪酸,将 C22:6n-3 优先保存下来,而且比 C22:5n-3 优先保存,说明对于黄颡鱼仔稚鱼来说,C22:6n-3 的作用比 C20:5n-3 更为明显^[5,10]。因此,鱼类在性腺发育时期能存储比肌肉和肝脏中更多的 C22:6n-3 及 C20:5n-3,以满足受精卵孵化后的营养需要。同样地,在中华沙鳊及宽体沙鳊的鱼卵中,C22:6n-3 的比例高于 C20:5n-3。

在宽体沙鳊和中华沙鳊被检组织中 $\Sigma n-6$ PUFA 总比例基本一致,各组织间无显著差异,而鱼卵中 $\Sigma n-3$ PUFA 的总比例显著高于肌肉和肝脏组织,鱼卵中 $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ 也显著高于肌肉和肝脏组织,表明宽体沙鳊和中华沙鳊能优先吸收和存储 $\Sigma n-3$ PUFA,满足卵巢发育及仔稚鱼的需要。研究证实,淡水鱼类可以通过饵料获取长链脂肪酸的前体,合成 20 个碳以上的 n-3 系列 HUFA,优先储存在卵巢或精巢,以便发挥其特殊生理功能^[10]。因此,在宽体沙鳊及中华沙鳊性腺发育期间,相对于 n-6 系列不饱和脂肪酸,卵巢发育和仔稚鱼生长需要的 n-3 系列不饱和脂肪酸含量更高。类似地,

(上接第 287 页)

畏对生物和人是安全的。笔者还研究发现可用甘薯淀粉废水进行大规模发酵获取类球红细菌^[12]。

综上所述,类球红细菌为敌敌畏的高效降解菌株,可用于草莓中敌敌畏的残留降解,能有效缩短敌敌畏在草莓中的安全间隔期,类球红细菌在理论和实践上都具备开发为新型果蔬敌敌畏降解菌的潜能,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 虞铁俊,施 德. 农药应用大全[M]. 北京:中国农业出版社,2008.
- [2] 赵 凯,于 影,白志辉,等. 1 株类球红细菌及其降解敌敌畏的特性[J]. 环境科学,2009,30(4):1199-1204.
- [3] Fang Z, Wen H, Ruan M, et al. Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorus pesticides in textiles by gas chromatography with mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 656: 56-62.
- [4] 王永杰,李顺鹏,沈 标,等. 有机磷农药广谱活性降解菌的分离及其生理特性研究[J]. 南京农业大学学报,1999,22(2):42-45.

在生殖季节的瓦氏黄颡鱼卵巢、胰脏和肌肉中的 $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ 值均超过 1.9,而卵巢最高,达到 4.62^[5]。因此,在人工培育宽体沙鳊及中华沙鳊亲鱼过程中,应投喂 C20:4n-6、C20:5n-3、C22:6n-3 含量较高的饲料,以促进雌鱼卵巢发育。

参考文献:

- [1] 李 强,姚明予,周 波,等. 中华沙鳊人工繁殖技术初探[J]. 淡水渔业,2011,41(5):92-95.
- [2] 杨明生,丁 夏. 中华沙鳊的繁殖生物学研究[J]. 水生生态学杂志,2010,3(2):38-41.
- [3] Black K D, Pickering A D. Biology of farmed fish[M]. Sheffield, England: Sheffield Academic Press Ltd., 1998: 114-145.
- [4] Watanabe T, Takeuchi T, Saito M, et al. Effect of low protein-high calory or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1984, 50(7): 1207-1215.
- [5] 卢素芳,赵 娜,刘华斌,等. 黄颡鱼早期发育阶段受精卵和鱼体脂肪酸组成变化[J]. 水产学报,2008,32(5):711-716.
- [6] Bell J G, Farndale B M, Bruce M P, et al. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. Aquaculture, 1997, 149(1/2): 107-119.
- [7] 安 苗,姚俊杰,李 川,等. 大鳍鲢产卵前后肌肉脂肪酸组成变化的研究[J]. 水产科学,2010,29(2):95-98.
- [8] 姚 婷. 海水鱼与淡水鱼 omega-3 多不饱和脂肪酸含量的比较研究[J]. 现代食品科技,2005,21(3):26-29.
- [9] Jeong B Y, Jeong W G, Moon S K, et al. Preferential accumulation of fatty acids in the testis and ovary of cultured and wild sweet smelt *Plecoglossus altivelis* [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2002, 131(2): 251-259.
- [10] Takeuchi T, Tovota M, Satoh S, et al. Requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1990, 56: 1263-1269.
- [5] 王永杰,李顺鹏,沈 标. 有机磷农药乐果降解菌的分离及其活性研究[J]. 南京农业大学学报,2001,24(2):71-74.
- [6] 付文祥,郭立正. 敌敌畏降解真菌的分离及其特性研究[J]. 环境科学技术,2006,29(4):32-34.
- [7] Zhang X H, Zhang G S, Zhang Z H, et al. Isolation and characterization of a dichlorvos-degrading strain DDV-1 of *Ochrobactrum* sp. [J]. Pedosphere, 2006, 16(1): 64-71.
- [8] 蔡颖慧,张惠文,苏振成,等. 敌敌畏降解菌的分离鉴定及降解特性研究[J]. 生物技术,2009,19(2):59-62.
- [9] Wright A S, Hutson D H, Woode M F. The chemical and biochemical reactivity of dichlorvos[J]. Archives of Toxicology, 1978, 42(1): 1-18.
- [10] 韩庆莉,白志辉,庄国强,等. 敌敌畏对鲫鱼的急性毒性及类球红细菌的解毒作用[J]. 生态毒理学报,2009,4(6):847-853.
- [11] 韩庆莉,赵志瑞,白志辉,等. 类球红细菌对敌敌畏暴露中斑马鱼的保护作用[J]. 应用与环境生物学报,2010,16(3):358-362.
- [12] 韩庆莉,周永双,白志辉,等. 甘薯淀粉废水培养类球红细菌条件优化[J]. 安徽农学通报,2012,18(13):35-38.