

张春花,单治国,蒋智林,等. 4 种微生物对烟叶中甲霜灵残留动态的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):168-173.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.14.041

4 种微生物对烟叶中甲霜灵残留动态的影响

张春花¹, 单治国¹, 蒋智林¹, 王超², 杨应明², 罗华元², 饶智², 满红平³, 成文章¹

[1. 普洱学院, 云南普洱 665000; 2. 红云红河烟草(集团)有限责任公司, 云南昆明 650200;

3. 云南省普洱市质量技术监督综合检测中心, 云南普洱 665000]

摘要:为揭示 4 种微生物(阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌)对甲霜灵残留在烟叶中的降解动态的影响及其降解规律变化,利用气相色谱分析技术,对不同处理下烟叶生长期中的甲霜灵进行检测与分析。结果表明,阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌能有效加速烟叶中甲霜灵残留的降解,喷施后 5 d 的降解效果最明显。降解效果与初始菌量有关, $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.2 的初始菌量下的荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留的降解效果极显著优于高初始菌量($P < 0.01$); $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.4、0.6 初始菌量的铜绿假单胞菌降解效果极显著优于低初始菌量($P < 0.01$);3 种初始菌量的阴沟肠杆菌对烟叶中甲霜灵残留的降解效果在后期差异不显著; $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.2、0.6 初始菌量的荧光假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留降解效果最好,优于其他 3 种微生物的降解效果。研究结果为开发绿色烟叶提供了理论依据,且具有重要的指导意义。

关键词:烟草;甲霜灵;微生物降解;农药残留;降解动态;动力学模型

中图分类号: S482.2⁺8;S481⁺.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)14-0168-06

甲霜灵(metalaxyl)别称阿普隆、瑞毒霜、甲霜安、雷多米尔,是当前普遍使用的卵菌杀菌剂,化学名称为 *D, L-N-(2,6-二甲苯基)-N-(2-甲氧基乙酰)丙氨酸甲酯*,是一种低毒广谱的氨基甲酸酯类杀菌剂,具有高效、内吸性强、残留毒性极低、双向传导、残效期长等特点,具有很强的保护和治疗作用^[1],深受使用者的青睐,并得到广泛使用和迅速发展。甲霜灵通过抑制菌丝在植物体内的生长、孢子囊的形成,对由卵菌纲病原菌引起的烟草黑胥病、白粉病及其他作物的霜霉病、疫霉病有良好的防治效果^[2],因其使用量巨大而在环境中广泛存在,但其残留污染问题日趋严重,且有关甲霜灵降解的研究很少,尤其是关于微生物降解甲霜灵的研究更少。目前,有关甲霜灵在农作物、土壤中的残留及其降解研究已有

不少报道^[3-8],但就其在烟叶中的残留研究尚未见报道。

生物降解通常是指微生物降解^[9-10]。微生物降解农残的特点是无毒、无二次污染、比较安全、对人体无副作用。近年来人们对农药生物降解进行了大量的研究,大多集中在水体及土壤等环境方面^[11-12],利用微生物进行农产品中农药残留降解研究的尚少^[13-14],未见关于烟草地中用降解菌降解甲霜灵农药残留的报道。微生物因其种类繁多且代谢多样性,在农药降解中表现出独特的优势,具有良好的前景。用微生物降低农药残留对保证安全生产是一种直接有效的方法,在提高烟叶质量、突破“绿色壁垒”、开发绿色烟叶过程中具有重要的作用和深远的意义。鉴于此,为探明微生物对甲霜灵在烟叶中的消解规律,为今后制备农药残留降解剂解决生产实际问题打下基础,本研究拟以甲霜灵为降解对象,于 2014 年在云南省普洱市宁洱县的普义乡烟区进行利用微生物降解农药的试验。

1 材料与方法

1.1 供试材料

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、

dough and spray-dried masafLOUR[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1993,41(5):791-799.

[18] Alasalvar C, Taylor K D, Shahidi F. Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2005,53(7):2616-2622.

[19] Josephson D B, Lindsay R C, Stuibler D A. Identification of compounds characterizing the aroma of fresh whitefish[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1983,31(2):326-330.

[20] 王怡娟,姜永江,陈梨柯. 养殖美国红鱼肌肉中挥发性成分的研究[J]. 水产科学,2009,28(6):303-307.

[21] 沈月新. 水产食品学[M]. 北京:中国农业出版社,2005:103.

[22] Serkan S, Gonca G C. Analysis of volatile compounds of wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by simultaneous distillation-extraction(SDE)and GC-MS[J]. Microchemical Journal,2009,93(2):232-235.

[23] 王珺,贺稚非,李洪军,等. 顶空固相微萃取结合气相色谱-质谱法分析兔肉的挥发性风味物质[J]. 食品科学,2013,34(14):212-217.

收稿日期:2017-02-20

基金项目:红云红河烟草(集团)科技计划(编号:HYHH2013YL01);

云南省中青年学术与技术带头人后备人才项目(编号:2014HB027)。

作者简介:张春花(1984—),女,云南红河人,博士,讲师,主要从事生物安全研究。E-mail:190888358@qq.com。

通信作者:成文章,硕士,教授,主要从事生物质量安全等方面的管理研究。E-mail:chengwz@126vip.sina.com。

阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 4 种微生物保存于北京微生物鉴定保藏中心。取活化过的 4 种菌的普通液体培养基, 30 ℃ 培养 24 h, 用无菌水稀释成所需的试验初始菌量。

95% 甲霜灵原药, 由江苏利民农化有限公司生产。甲霜灵结构式见图 1。

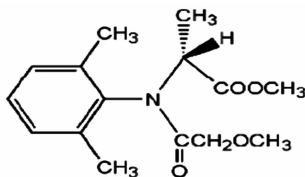


图1 甲霜灵结构式

1.2 田间试验

参照农业部农药检定所制定的 NY/T 788—2004《农药残留试验准则》进行。施药剂量为推荐使用剂量 (1 800 g/hm²)。试验在历年未施用过甲霜灵的烟叶种植地进行, 试验小区面积 20 m², 小区设 3 个重复, 小区随机排列, 区间设保护行, 另设空白对照小区。

有益微生物对烟叶中甲霜灵消解动态影响的试验在烟叶植株生长旺盛期进行, 用 95% 甲霜灵原药 2 700 g/hm² 兑水稀释成溶液, 对烟叶封闭式喷雾施药 1 次。施药后隔 1 h, 用初始菌量 $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.2、0.4、0.6 的接种量, 以不接种为对照 (CK), 每个处理 3 个重复, 对喷过药的对应小区进行喷雾, 喷施时间选择在 16:00—17:00 进行, 喷后 24 h 无降水。试验均在同等烟地正常的肥培管理下进行, 用五点法取样, 分别于施药后 1 h 及施药后 5、10、15 d 采集烟叶样品 1 kg, 运回实验室标记后于 -20 ℃ 保存待测其甲霜灵的残留量。

1.3 样品制备

从试验小区取回的鲜烟叶, 将其切碎, 用四分法取样约 200 g 并用匀浆机制成匀浆置于洁净的玻璃瓶中。待测样品应尽快分析测定其中甲霜灵的残留量, 不能及时分析测试的样品贮存于低温 (-20 ℃) 冰柜中。

1.4 仪器与试剂

1.4.1 仪器 Agilent1110 高效液相色谱仪, 购自美国安捷伦公司; API 4000 液相色谱-质谱/质谱联用仪 (LC-MS/MS), 购自美国 Applied Biosystems 公司; 组织捣碎机 (20 000 r/min), 购自上海比朗仪器制造有限公司; T18 ULTRA-TURRAX 匀浆机, 购自德国 IKA 公司; 旋转蒸发仪 SA31, 购自瑞士 Büchi 公司; Mettler PL1500-s 电子天平 (0.01 g); 固相萃取柱, 购自迪马科技公司; XW-80A 涡旋混匀器, 购自上海沪西分析仪器有限公司; 离心机 (10 000 r/min) 购自上海万捷科技有限公司。

1.4.2 试剂 甲苯为色谱纯; 丙酮、乙腈、甲酸均为优级纯 (GR); 水为 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》规定的一级水; 甲霜灵标准品纯度为 98.0%, 由国家标准物质信息中心提供; 35% 甲霜灵拌种剂, 由浙江禾本农药化学有限公司生产。

1.5 分析方法

1.5.1 提取 称取 -20 ℃ 冷冻保存的烟叶样品各 100 g, 依次用捣碎机将样品粉碎; 取 1 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入丙酮 20 mL, 用涡旋混匀器混合 1 min 后于 8 000 r/min 离心

5 min; 取上清液, 再向离心管中加入 20 mL 丙酮, 重复提取 1 次; 合并上清液于 35 ℃ 旋转蒸发至近干, 加入 5 mL 乙腈-甲苯 ($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲苯}}=3:1$) 溶解, 待净化。

1.5.2 固相萃取净化 (SPE) 用 10 mL 乙腈-甲苯 ($V_{\text{乙腈}}:V_{\text{甲苯}}=3:1$) 预淋洗 GPR 固相萃取柱, 将流出液弃去。将 5 mL 溶解液倾入 GPR 固相萃取柱中, 用 20 mL 乙腈-甲苯进行洗脱。收集全部洗脱液于鸡心瓶中, 于 35 ℃ 水浴中旋转浓缩至近干。用乙腈溶解, 并定容至 1 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后供 LC-MS/MS 测定。

1.5.3 气相色谱条件 色谱柱柱温为 40 ℃, 流动相为甲酸水-乙腈, $V_{\text{甲酸水}}:V_{\text{乙腈}}=1:9$, 其中甲酸水的 $V_{\text{甲酸}}:V_{\text{水}}=1:999$, 流速为 250 μL/min, 离子源温度为 725 ℃, 进样量为 10 μL, 正离子扫描, 多反应监测 (MRM)。电离方式为电喷雾 (ESI), 电喷雾电压为 5 500 V, 雾化气压力为 0.483 MPa, 气帘气压力为 0.138 MPa, 辅助加热气压力为 0.379 MPa。

1.6 数据处理

采用 Excel、DPS 2000 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 荧光假单胞菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

从表 1、图 2 可以看出, 随着药后取样时间的延长, 甲霜灵残留量呈下降趋势, 说明叶面喷施不同初始菌量的荧光假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留有降解效果, 在不同初始菌量下, 甲霜灵在烟叶中的残留量和降解率不同。施药后 1 h, 甲霜灵残留在烟叶中的原始沉积量为 25.48 mg/kg, 其中喷施 3 种初始菌量荧光假单胞菌后 5 d (即药后第 6 天) 的降解效果最明显, 烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.27、0.54、0.33 mg/kg, 分别比清水对照 (3.76 mg/kg) 降低 92.82%、85.64%、91.22%, 说明荧光假单胞菌可以加速烟叶中甲霜灵残留的降解, $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.4、0.6 初始菌量的降解效果极显著低于 $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.2 的降解效果, 且这 2 个初始菌量的降解效果差异不显著。喷施 3 种初始菌量荧光假单胞菌后 10 d (即药后第 11 天), 烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.14、0.31、0.23 mg/kg, 分别比清水对照 (2.91 mg/kg) 降低 95.19%、89.35%、92.10%; 喷施不同初始菌量荧光假单胞菌后 15 d (即药后第 16 天), 烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.11、0.20、0.17 mg/kg, 分别比清水对照 (2.61 mg/kg) 降低 95.79%、92.34%、93.49%。

综上所述, 喷施不同初始菌量荧光假单胞菌后 5 d (即药后第 6 天), 甲霜灵残留在烟叶中的降解率均达到 97% 以上, 明显强于对照 (85.24%), 且低初始菌量下的荧光假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留降解效果优于高初始菌量。采样与喷菌时间间隔越长, 甲霜灵残留在烟叶中的量越少。

对试验结果进行分析, 得出 3 种初始菌量荧光假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的降解曲线方程, 分别为 $C = 8.547 4e^{-0.349 3t}$ 、 $C = 10.719e^{-0.311 2t}$ 、 $C = 8.743 8e^{-0.315 7t}$ 。降解符合一级动力学公式 $C = C_0 e^{-kt}$, 式中: C_0 为施药后 1 h 的原始残留量, mg/kg; C 为 t 天的残留量, mg/kg; t 为降解时间, d; k 为消解速率常数。 r^2 分别为 0.686 6、0.723 7、0.660 7, 再根据半衰期 $T_{1/2} = \ln(2/k)$ 计算出 3 种初始菌量荧光假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的半衰期, 分别为 1.98、2.05、

表 1 不同初始菌量荧光假单胞菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

取样间隔时间 (d)	不同初始菌量处理的烟叶中甲霜灵降解情况							
	CK		$D_{415\text{ nm}}=0.2$		$D_{415\text{ nm}}=0.4$		$D_{415\text{ nm}}=0.6$	
	残留量(mg/kg)	降解率(%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)
1/24	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00
5	3.76 ± 0.10Aa	85.24Dd	0.27 ± 0.24Dd	98.94Aa	0.54 ± 0.11Bb	97.88Bb	0.33 ± 0.10Cc	98.70Bb
10	2.91 ± 0.17Aa	88.57Dd	0.14 ± 0.10Dd	99.45Aa	0.31 ± 0.23Bb	98.78Cc	0.23 ± 0.12Cc	99.09Bb
15	2.61 ± 0.25Aa	89.75Bb	0.11 ± 0.34Dd	99.56Aa	0.20 ± 0.20Bb	99.21Aa	0.17 ± 0.15Bb	99.33Aa
降解方程	$C = 16.068e^{-0.145 7t}$		$C = 8.547 4e^{-0.349 3t}$		$C = 10.719e^{-0.311 2t}$		$C = 8.743 8e^{-0.315 7t}$	
r^2	0.683 1		0.686 6		0.723 7		0.660 7	
半衰期(d)	4.38		1.98		2.05		2.02	

注:表中数据为平均值 ± 标准差($n=3$);同行数据后标有不同小写字母、大写字母分别表示差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。下同。

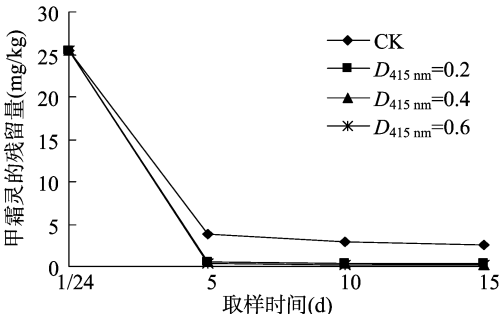


图2 不同初始菌量荧光假单胞菌作用下烟叶中甲霜灵残留动态曲线

2.02 d,清水对照的降解曲线方程为 $C = 16.068e^{-0.145 7t}$, r^2 为 0.683 1,半衰期为 4.38 d。

2.2 恶臭假单胞菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

从表 2、图 3 可以看出,随着药后取样时间的延长,甲霜灵残留量呈下降趋势,说明叶面喷施不同初始菌量的恶臭假

单胞菌对烟叶中甲霜灵残留有降解效果,在不同的初始菌量下,甲霜灵在烟叶中的残留量和降解率不同。施药后 1 h,甲霜灵残留在烟叶中的原始沉积量为 25.48 mg/kg,其中喷施 3 种初始菌量恶臭假单胞菌后 5 d(即药后第 6 天)的降解效果最明显。3 种初始菌量的恶臭假单胞菌液处理的烟叶中甲霜灵的残留量分别为 0.58、1.16、1.02 mg/kg,分别比清水对照(3.76 mg/kg)降低 84.57%、69.15%、72.87%,说明恶臭假单胞菌可以加速烟叶中甲霜灵残留的降解,低初始菌量的降解效果优于高初始菌量。喷施 3 种初始菌量恶臭假单胞菌后 10 d(即药后第 11 天),烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.44、0.67、0.96 mg/kg,分别比清水对照(2.91 mg/kg)降低 84.88%、76.98%、67.01%;喷施 3 种初始菌量恶臭假单胞菌后 15 d(即药后第 16 天),烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.40、0.63、0.65 mg/kg,分别比清水对照(2.61 mg/kg)降低 84.67%、75.86%、75.10%。

表 2 不同初始菌量恶臭假单胞菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

取样间隔时间 (d)	不同初始菌量处理的烟叶中甲霜灵降解情况							
	CK		$D_{415\text{ nm}}=0.2$		$D_{415\text{ nm}}=0.4$		$D_{415\text{ nm}}=0.6$	
	残留量(mg/kg)	降解率(%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)
1/24	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00
5	3.76 ± 0.10Aa	85.24Dd	0.58 ± 0.21Dd	97.72Aa	1.16 ± 0.16Bb	95.44Bb	1.02 ± 0.21Cc	95.99Bb
10	2.91 ± 0.17Aa	88.57Dd	0.44 ± 0.21Dd	98.27Aa	0.67 ± 0.21Cc	97.37Bb	0.96 ± 0.18Bb	96.23Cc
15	2.61 ± 0.25Aa	89.75Cc	0.40 ± 0.21Cc	98.43Aa	0.63 ± 0.19Bb	97.52Bb	0.65 ± 0.19Bb	97.44Bb
降解方程	$C = 16.068e^{-0.145 7t}$		$C = 9.561e^{-0.260 5t}$		$C = 12.018e^{-0.239 4t}$		$C = 11.643e^{-0.226 9t}$	
r^2	0.683 1		0.622 8		0.683 5		0.652 8	
半衰期(d)	4.38		2.67		2.89		3.02	

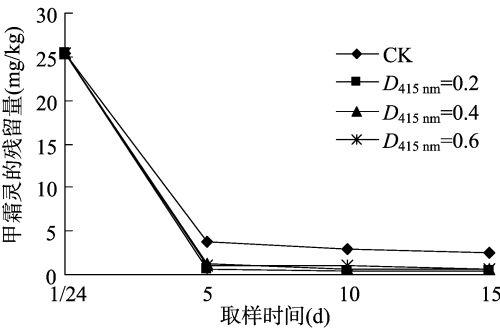


图3 不同初始菌量恶臭假单胞菌作用下烟叶中甲霜灵残留动态曲线

综上所述,喷施不同初始菌量恶臭假单胞菌后 5 d(即药后第 6 天),甲霜灵残留在烟叶中的降解效果显著, $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.2 初始菌量的降解率达到 97.72%, $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.4 初始菌量的降解率达到 95.44%, $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.6 初始菌量的降解率达到 95.99%,均极显著大于对照(85.24%)。采样与喷菌时间间隔越长,甲霜灵残留在烟叶中的量越少。

对试验结果进行分析,得出 3 种初始菌量恶臭假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的降解曲线方程,分别为 $C = 9.561e^{-0.260 5t}$ 、 $C = 12.018e^{-0.239 4t}$ 、 $C = 11.643e^{-0.226 9t}$ 。降解符合一级动力学公式 $C = C_0e^{-kt}$,式中: C_0 为施药后 1 h 的原始残留量,mg/kg; C 为 t 天的残留量,mg/kg; t 为降解时间,d; k

为消解速率常数。 r^2 分别为 0.622 8、0.683 5、0.652 8,再根据半衰期 $T_{1/2} = \ln(2/k)$ 计算出 3 种初始菌量恶臭假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的半衰期,分别为 2.67、2.89、3.02 d;清水对照的降解曲线方程为 $C = 16.068e^{-0.145 7t}$, r^2 为 0.683 1,半衰期为 4.38 d。

2.3 铜绿假单胞菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

从表 3、图 4 可以看出,随着药后取样时间的延长,甲霜灵残留量呈下降趋势,说明叶面喷施不同初始菌量的铜绿假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留有降解效果,在不同的初始菌量

下,甲霜灵在烟叶中的残留量和降解率不同。施药后 1 h,甲霜灵残留在烟叶中的原始沉积量为 25.48 mg/kg,其中喷施 3 种初始菌量铜绿假单胞菌后 5 d(即药后第 6 天)的降解效果最明显,烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.52、0.31、0.34 mg/kg,分别比清水对照(3.76 mg/kg)降低 86.17%、91.76%、90.96%,说明铜绿假单胞菌可以加速烟叶中甲霜灵残留的降解。喷施 3 种初始菌量铜绿假单胞菌后 10 d(即药后第 11 天),烟叶中的甲霜灵残留量和 15 d(即药后第 16 天)差异不大。

表 3 不同初始菌量铜绿假单胞菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

取样间隔时间 (d)	不同初始菌量处理的烟叶中甲霜灵降解情况							
	CK		$D_{415\text{ nm}} = 0.2$		$D_{415\text{ nm}} = 0.4$		$D_{415\text{ nm}} = 0.6$	
	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)
1/24	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00
5	3.76 ± 0.10Aa	85.24Cc	0.52 ± 0.33Bb	97.95Bb	0.31 ± 0.30Cc	98.78Aa	0.34 ± 0.30Cc	98.66Aa
10	2.91 ± 0.17Aa	88.57Cc	0.34 ± 0.33Bb	98.66Bb	0.18 ± 0.30Cc	99.29Aa	0.25 ± 0.30Cc	99.01Aa
15	2.61 ± 0.25Aa	89.75Cc	0.29 ± 0.33Bb	98.86Bb	0.13 ± 0.30Cc	99.48Aa	0.15 ± 0.30Cc	99.41Aa
消解方程	$C = 16.068e^{-0.145 7t}$		$C = 9.662 7e^{-0.284 1t}$		$C = 8.908 7e^{-0.336 7t}$		$C = 9.220 9e^{-0.322 9t}$	
r^2	0.683 1		0.657 6		0.687 9		0.685 2	
半衰期(d)	4.38		2.24		2.05		2.14	

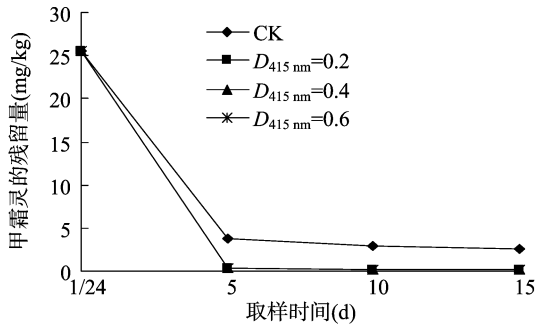


图 4 不同初始菌量铜绿假单胞菌作用下烟叶中甲霜灵残留动态曲线

综上所述,喷施 3 种初始菌量铜绿假单胞菌后 5 d(即药后第 6 天)后,甲霜灵残留在烟叶中的降解率最快,均达到 97% 以上,而对照为 85.24%,说明铜绿假单胞菌能有效加速烟叶中甲霜灵残留的降解。

对试验结果进行分析,得出 3 种初始菌量铜绿假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的降解曲线方程,分别为 $C = 9.662 7e^{-0.284 1t}$ 、 $C = 8.908 7e^{-0.336 7t}$ 、 $C = 9.220 9e^{-0.322 9t}$ 。降解符合一级动力学公式 $C = C_0e^{-kt}$,式中: C_0 为施药后 1 h 的原始残留量,mg/kg; C 为 t 天的残留量,mg/kg; t 为降解时间,d; k 为消解速率常数。 r^2 分别为 0.657 6、0.687 9、0.685 2,再根据半衰期 $T_{1/2} = \ln(2/k)$ 计算出 3 种初始菌量恶臭假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的半衰期,分别为 2.24、2.05、2.14 d;清水对照的降解曲线方程为 $C = 16.068e^{-0.145 7t}$, r^2 为 0.683 1,半衰期为 4.38 d。

2.4 阴沟肠杆菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

从表 4、图 5 可以看出,随着药后取样时间的延长,甲霜灵残留量呈下降趋势,说明叶面喷施不同初始菌量的阴沟肠杆菌对烟叶中甲霜灵残留有降解效果。施药后 1 h,甲霜灵残留在烟叶中的原始沉积量为 25.48 mg/kg,其中喷施 3 种初始

菌量阴沟肠杆菌后 5 d(即药后第 6 天)的降解效果最明显,烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.59、1.62、0.84 mg/kg,分别比清水对照(3.76 mg/kg)降低 84.31%、56.91%、77.66%,说明阴沟肠杆菌可以加速烟叶中甲霜灵残留的降解。喷施 3 种初始菌量阴沟肠杆菌后 10 d(即药后第 11 天),烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.31、0.53、0.60 mg/kg,分别比清水对照(2.91 mg/kg)降低 89.35%、81.79%、79.38%;喷施 3 种初始菌量阴沟肠杆菌后 15 d(即药后第 16 天),烟叶中的甲霜灵残留量分别为 0.31、0.36、0.45 mg/kg,分别比清水对照(2.61 mg/kg)降低 88.12%、86.21%、82.76%。3 种初始菌量的阴沟肠杆菌菌液对烟叶中甲霜灵残留的降解效果差异不大,喷施后 5 d(即药后第 6 天)后,甲霜灵残留在烟叶中的降解率均达到 93% 以上,明显强于对照(85.24%),且低初始菌量的阴沟肠杆菌降解效果强于高初始菌量的效果,采样与喷菌时间间隔越长,甲霜灵在烟叶中的残留量越少。

对试验结果进行分析,得出 3 种初始菌量阴沟肠杆菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的降解曲线方程,分别为 $C = 9.662 7e^{-0.284 1t}$ 、 $C = 10.719e^{-0.311 2t}$ 、 $C = 8.743 8e^{-0.315 7t}$ 。降解符合一级动力学公式 $C = C_0e^{-kt}$,式中: C_0 为施药后 1 h 的原始残留量,mg/kg; C 为 t 天的残留量,mg/kg; t 为降解时间,d; k 为消解速率常数。 r^2 分别为 0.657 6、0.723 7、0.660 7,再根据半衰期 $T_{1/2} = \ln(2/k)$ 计算出 3 种初始菌量恶臭假单胞菌作用下甲霜灵残留在烟叶中的半衰期,分别 2.43、2.22、2.19 d。

综上所述,阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌能有效加速烟叶中甲霜灵残留的降解,且不同初始菌量下的降解效果不同。4 种微生物在喷施不同初始菌量菌液后 5 d(即药后第 6 天)的降解效果最明显,降解率均达到 90% 以上,低初始菌量下的荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留的降解效果极显著优于高初始菌量的降

表 4 不同初始菌量阴沟肠杆菌对烟叶中甲霜灵降解动态的影响

取样间隔时间 (d)	不同初始菌量处理的烟叶中甲霜灵降解情况							
	CK		$D_{415\text{ nm}}=0.2$		$D_{415\text{ nm}}=0.4$		$D_{415\text{ nm}}=0.6$	
	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)	残留量 (mg/kg)	降解率 (%)	残留量(mg/kg)	降解率(%)
1/24	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00	25.48	0.00
5	3.76 ± 0.10Aa	85.24Dd	0.59 ± 0.11Dd	98.78Aa	1.62 ± 0.25Bb	93.64Cc	0.84 ± 0.30Cc	96.70Bb
10	2.91 ± 0.17Aa	88.57Cc	0.31 ± 0.11Dd	98.78Aa	0.53 ± 0.30Cc	97.91Bb	0.60 ± 0.25Bb	97.61Bb
15	2.61 ± 0.25Aa	89.75Cc	0.31 ± 0.11Dd	98.78Aa	0.36 ± 0.30Cc	98.58Aa	0.45 ± 0.25Bb	98.23Aa
消解方程	$C = 16.068e^{-0.1457t}$		$C = 9.6627e^{-0.2841t}$		$C = 10.719e^{-0.3112t}$		$C = 8.7438e^{-0.3157t}$	
r^2	0.683 1		0.657 6		0.723 7		0.660 7	
半衰期(d)	4.38		2.43		2.22		2.19	

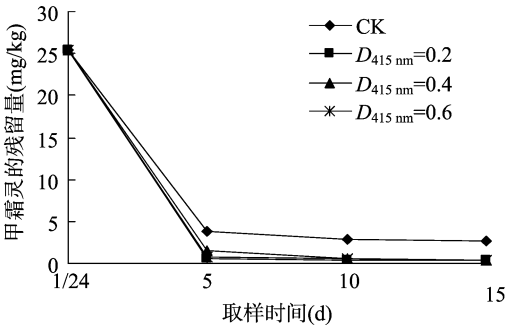


图5 不同初始菌量阴沟肠杆菌作用下烟叶中甲霜灵残留动态曲线

解效果 ($P < 0.01$) ;高初始菌量铜绿假单胞菌的降解效果极显著优于低初始菌量的降解效果 ($P < 0.01$) ;3 种初始菌量的阴沟肠杆菌对烟叶中甲霜灵残留降解效果在后期差异不显著; $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.2、0.6 初始菌量的荧光假单胞菌对烟叶中甲霜灵残留降解效果最好,优于其他 3 种微生物。

3 讨论与结论

微生物能使农药以脱卤、脱烃、水解、氧化、还原、环裂解、共轭等形式降解,从而转化成其他物质,且同一种农药可以被多种微生物降解^[9]。假单胞菌和芽胞杆菌等微生物对农药降解具有广谱活性,可降解同类农药的多个品种^[15]或不同类型的农药品种^[16]。本试验结果表明,在烟叶生长成熟期施用甲霜灵农药,施药后喷施阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌 4 种不同的微生物,发现甲霜灵均能被这 4 种微生物快速降解,这与尤民生等的研究结果^[9,16]一致。

微生物的种类、代谢活性直接影响到农药的降解与转化^[17],通过各种代谢途径把有机农药完全矿化或降解转化为 CO_2 、 H_2O 等无毒无害或毒性较小的其他物质^[18],在农药降解中占有主要地位^[19]。不同的微生物种类或同一种类的不同菌株对同一有机底物或有毒金属的反应都不同^[20]。首先,荧光假单胞菌降解效果优于铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、恶臭假单胞菌,接菌后 5 d 降解率均达 92% 以上;其次,同种微生物在不同的施用浓度下的降解率存在差异,产生此差异可能与底物浓度有关;不同种微生物在同一施用浓度下的降解率存在差异,产生此差异可能与微生物代谢活性有关。因此,于烟叶生长旺盛期,药后 1 h,优先选择喷施荧光假单胞菌菌液,其次为 $D_{415\text{ nm}}$ 为 0.4 初始菌量的铜绿假单胞菌,以提升烟叶的安全性,且降解符合一级动力学公式 $C = C_0 e^{-kt}$ 。氨基甲酸

酯类甲霜灵农药因其对烟草黑胥病和白粉病等多种病害有效而被大量施用,严重影响烟叶的品质和安全性。本研究发现,荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、恶臭假单胞菌均可以有效降解甲霜灵,初步建立了控制甲霜灵的方法,这为利用微生物及其降解酶对烟叶中有机农药转化处理提供了良好的应用前景。微生物降解与传统的物理、化学方法相比具有投入低、治理效果明显、不易产生副作用的特点,被公认为是一种低成本的环境友好型去除污染物的方法^[21]。

微生物降解农药的研究已经较多,其机制包括直接作用于农药,通过一系列酶促反应(水解、氧化、还原、脱氧、合成)来降解农药,或者通过微生物活动导致化学(共代谢作用)或物理环境(生物浓缩、矿化作用或累积作用)的改变而降解农药^[22]。如 Saikia 等报道,施氏假单胞菌 S1 是通过水解酯键降解高效氟氯氧菊酯的,其降解产物为 4-氟-3-苯氧基苄醇和 3-(2,2-二氯乙烯)-2,2-二甲基环丙烷羧酸,另外还能通过醚键断裂将高效氟氯氧菊酯水解产生 α -氰基-4-氟-3-苯氧基苄基-3-(2,2-氯乙烯基)-2,2-二甲基环丙烷羧酸^[23];博德特氏菌(*Bordetella* sp. B9)通过氧化和水解 2 种作用将有机氯农药硫丹代谢为硫丹醚、硫丹内酯和硫丹硫酸盐^[24];呋喃丹在微生物作用下快速水解为呋喃酚,经氧化生成 2-羟基-呋喃酚,然后慢速开环反应,完全降解生成 CO_2 和 H_2O ^[25];门多萨假单胞菌 DR28 菌株降解单甲眯的产物为 2,4-二甲基苯胺和 NH_3 ,而 DR28 菌株不能以单甲眯为碳源和能源生长,只能在添加其他有机营养基质作为碳源的条件下方能降解单甲眯,且降解产物未完全矿化^[26];鞘氨醇单孢菌(*Sphingomonas* sp. TFEE)和皮氏伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp. MN1)通过共生关系降解杀螟硫磷农药^[27];韦军等的研究发现,氯氧菊酯在铜绿假单胞菌 GF31 作用下酯键断裂生成间苯氧基苯甲酸和二氯菊酸^[28];氯氧菊酯在微球菌(*Micrococcus* sp.)作用下酯键断裂生成 3-苯氧基苯甲酸,二苯醚键进一步断裂生成苯酚和原儿茶酸^[29];假单胞菌 DLL-1 在水溶液介质中可以将甲基对硫磷完全降解为无机离子 NO_2^- 、 NO_3^- ^[30]。本研究发现,阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌这 4 种菌能降解甲霜灵。Crawford 等研究发现,门多萨假单胞菌(*P. mendocina*)及荧光假单胞菌(*P. fluorescen. s*)能够有效降解五氯化苯酚(PCP)^[31];铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)能有效降解六六六及其异构体^[32];Saravanan 等研究表明,假单胞菌对苯酚和间甲酚具有很强的降解能力^[33];Muñoz 等研究发现,恶臭假单

胞菌(*P. putida*) F_1 对甲苯有很强的特定降解能力^[34]。目前关于微生物降解甲霜灵农药的研究未见报道,其机制是酶促、非酶促还是矿化还不清楚,本试验尚未作深入研究,推测可能的机制是甲霜灵在假单胞菌作用下通过水解和氧化作用完成降解。本研究后续将进一步总结以往的相关科研成果,有针对性地 对甲霜灵的降解机制开展进一步研究,研究假单胞菌及其酶活性与作用机制,提高酶的降解谱和降解活性,改变其代谢流,降低产物的毒性。

烟叶生长旺盛期可根据微生物种类(阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌菌)选取高降解效率的施菌量以降低烟叶中甲霜灵的残留量。因此,烟叶生长旺盛期利用假单胞菌微生物来降解甲霜灵农药残留,在提高烟叶质量、突破“绿色壁垒”、开发绿色烟叶过程中具有重要的理论意义和现实意义,为今后进一步研究假单胞菌微生物对于甲霜灵农药的降解机制提供参考。

参考文献:

- [1] 马志强,张小风,韩秀英,等. 黄瓜霜霉病菌对甲霜灵的抗药性治理[J]. 植物保护学报,2005,32(2):223-224.
- [2] 袁宗胜,张广民,刘延荣,等. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的敏感性测定[J]. 中国烟草科学,2001,22(4):9-12.
- [3] 曹爱华,徐光军,李义强,等. 代森锰锌在烟草中的残留分析[J]. 烟草科技,2005(7):24-26.
- [4] 李义强,曹爱华,马 强,等. 精甲霜灵在烟叶和土壤中的残留量和降解规律[J]. 烟草科技,2008(6):56-59.
- [5] 丁蕊艳,陈子雷,李瑞菊,等. 马铃薯及土壤中精甲霜灵残留动态[J]. 农药学报,2008,10(4):450-454.
- [6] 吴振旺,余宏傲,黄金生. 百菌清在杨梅果实中的最终残留量及安全使用技术[J]. 科技创新导报,2009(32):222.
- [7] 卢植新,黄辉林,林明珍,等. 代森锰锌及其代谢物在香蕉和土壤中的消解动态及残留安全性评价[J]. 农业环境科学学报,2008,27(3):1194-1198.
- [8] 陈 莉,贾春虹,朱晓丹,等. 精甲霜灵在西瓜和土壤中的残留动态[J]. 农药,2010,49(4):282-283,297.
- [9] 尤民生,刘 新. 农药污染的生物降解与生物修复[J]. 生态学杂志,2004,23(1):73-77.
- [10] 李 岩,蒋继志,刘翠芳. 微生物降解农药研究的新进展[J]. 生物学杂志,2007,24(2):59-62.
- [11] 张小华,张国顺,武 俊,等. 敌敌畏降解菌(DDV-1)最佳生长条件的正交实验及其在土壤中的降解特性研究[J]. 土壤通报,2005,36(5):731-734.
- [12] Bellinaso M D L, Greer C W, Peralba M C, et al. Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(2):191-194.
- [13] 程国锋,李顺鹏,沈 标,等. 微生物降解蔬菜残留农药研究[J]. 应用与环境生物学报,1998,4(1):81-84.
- [14] 刘 智,张晓舟,李顺鹏. 利用甲基对硫磷降解菌 DLL-E4 消除农产品表面农药污染的研究[J]. 应用生态学报,2003,14(10):1770-1774.
- [15] 虞云龙,宋风鸣,郑 重,等. 一株广谱性农药降解菌(*Alcaligenes* sp.) 的分离与鉴定[J]. 浙江农业大学学报,1999,23(2):111-115.

- [16] 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性研究[J]. 南京农业大学学报,1999,22(2):42-45.
- [17] 沈东升,徐向阳,冯孝善. 微生物共代谢在氯代有机物生物降解中的作用[J]. 环境科学,1994,15(4):84-87.
- [18] 郑金来,李君文,晁福寰. 常见农药降解微生物研究进展及展望[J]. 环境科学研究,2001,14(2):62-64.
- [19] 虞云龙,樊德方,陈鹤鑫. 农药微生物降解的研究现状与发展策略[J]. 环境科学进展,1996,4(3):28-36.
- [20] 王保军,刘志培,杨惠芳. 单甲脒农药的微生物降解代谢研究[J]. 环境科学学报,1998,18(3):74-80.
- [21] 郭荣君,李世东,章力建,等. 土壤农药污染与生物修复研究进展[J]. 中国生物防治学报,2005,21(3):129-135.
- [22] 方晓航,仇荣亮. 有机磷农药在土壤环境中的降解转化[J]. 环境科学与技术,2003,26(2):57-59,62.
- [23] Saikia N, Das S K, Patel B K C, et al. Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1[J]. Biodegradation, 2005,16(6):581-589.
- [24] Goswami S, Singh D K. Biodegradation of α and β endosulfan in broth medium and soil microcosm by bacterial strain *Bordetella* sp. B9[J]. Biodegradation, 2009,20(2):199-207.
- [25] Ogram A V, Duan Y P, Trabue S L, et al. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000,32(3):197-203.
- [26] 仪美芹,王开运,姜兴印,等. 微生物降解农药的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(4):519-524.
- [27] Katsuyama C, Nakaoka S, Takeuchi Y, et al. Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation[J]. Journal of Theoretical Biology, 2009,256(4):644-654.
- [28] 韦 军,刘幽燕,张洪威,等. 铜绿假单胞菌 GF31 降解土壤中氯氰菊酯的性能研究[J]. 环境污染与防治,2011,33(10):55-58.
- [29] Tallur P N, Megadi V B, Ninnekar H Z. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN1[J]. Biodegradation, 2008,19(1):77-82.
- [30] 石利利,林玉锁,徐亦钢,等. DLL-1 菌对甲基对硫磷农药的降解作用及其降解机理[J]. 农村生态环境,2002,18(3):26-29.
- [31] Crawford R L, Jung C M, Strap J L. The recent evolution of pentachlorophenol (PCP)-4-monooxygenase (PcpB) and associated pathways for bacterial degradation of PCP[J]. Biodegradation, 2007,18(5):525-539.
- [32] Singh A K, Chaudhary P, Macwan A S, et al. Selective loss of lin genes from hexachlorocyclohexane-degrading *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5 under different growth conditions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007,76(4):895-901.
- [33] Saravanan P, Pakshirajan K, Saha P. Batch growth kinetics of an indigenous mixed microbial culture utilizing *m*-cresol as the sole carbon source[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009,162(1):476-481.
- [34] Muñoz R, Díaz L F, Bordel S, et al. Response of *Pseudomonas putida* F_1 cultures to fluctuating toluene loads and operational failures in suspended growth bioreactors[J]. Biodegradation, 2008,19(6):897-908.