

张亚杰,李劲彤,李朝阳,等. 菊酯农药微生物降解的异构体选择性特征[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):278-280,290.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.061

# 菊酯农药微生物降解的异构体选择性特征

张亚杰<sup>1</sup>, 李劲彤<sup>2</sup>, 李朝阳<sup>3</sup>, 罗湘南<sup>1</sup>, 田 晶<sup>2</sup>, 李巧玲<sup>2</sup>

(1. 河北科技大学环境与科学学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050018;

3. 河北科技大学理学院, 河北石家庄 050018)

**摘要:**从农药厂排放污泥中筛选分离得到 1 株可以以甲氧菊酯为唯一碳源生长的细菌菌株 W-10, 经鉴定为粪产碱杆菌。考察其对甲氧菊酯(FP)、氯菊酯(PM)和高效氟氯菊酯( $\beta$ -CF)的降解特征, 降解半衰期分别为 5.06、3.40、4.03 d, 重点研究菌株 W-10 对不同异构体和对映体的降解差异。结果表明, 3 种菊酯虽然结构相近, 但氯菊酯和高效氟氯菊酯的顺反异构体呈现不同的降解选择性, 菌株 W-10 分别优先降解氯菊酯的顺式体和高效氟氯菊酯的反式体; 此外, 菌株 W-10 对对映体的降解选择性则主要体现在高效氟氯菊酯反式异构体所包含的一对对映体上。

**关键词:**甲氧菊酯; 氯菊酯; 高效氟氯菊酯; 微生物降解; 异构体; 对映体; 选择性降解行为

**中图分类号:** X132; X592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0278-03

拟除虫菊酯是人工合成的一类仿生农药, 广泛用作农业和卫生杀虫剂。菊酯农药种类较多, 结构也较类似, 大多数含有 1 个或者多个手性中心, 立体结构较为复杂, 一般包含 2 个以上顺反异构体, 同时每个顺式或反式异构体又含有 1 对对映异构体。研究表明, 不同的菊酯异构体, 其杀虫活性及对非靶标生物的毒性往往存在很大差异<sup>[1-2]</sup>。同时当菊酯施用到田间后, 不同异构体在环境中的消解也显示出很大的不同, 这种差异主要是由环境微生物的代谢作用造成<sup>[3-4]</sup>。当前, 国内外有关菊酯在环境中对对映体或异构体的选择性降解有很

多研究<sup>[5-7]</sup>, 但从微生物水平上考察单一微生物菌株对菊酯异构体的降解差异, 则只有很少的报道<sup>[8-9]</sup>。本研究从农药厂污泥中筛选得到 1 株菊酯的优势降解菌株, 研究其对甲氧菊酯(FP)、氯菊酯(PM)和高效氟氯菊酯( $\beta$ -CF)(结构见图 1)的降解行为, 重点考察其对不同异构体和对映体的降解特征。相关研究结果有助于阐释菊酯农药在环境中的对映体选择性降解行为, 同时可为菊酯农药的微生物强化修复提供理论和试验依据。

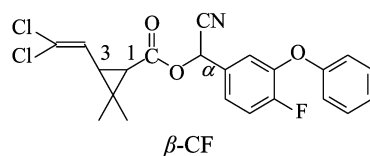
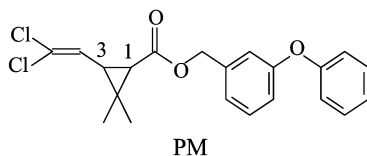
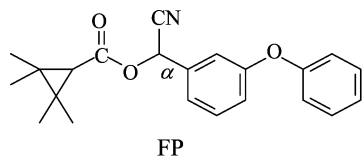


图1 3种菊酯的结构式

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

污泥取自河北省石家庄某农药厂; 甲氧菊酯乳油(89%)由河北威远生物化工股份有限公司惠赠; 甲氧菊酯标准样品(98%)购自上海市农药研究所; 正己烷、乙酸乙酯、异丙醇等购自天津市大茂化学试剂厂, 均为色谱纯。本试验于 2016 年在河北科技大学生物科学与工程学院实验室完成。

### 1.2 培养基

富集培养基: 蛋白胨 10 g、NaCl 1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、水

1 000 mL(pH 值为 7.0~7.2); 普通培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、水 1 000 mL(pH 值为 7.0~7.2); 基础培养基: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.00 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.50 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.50 g、NaCl 0.50 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50 g、酵母浸粉 0.05 g、水 1 000 mL(pH 值为 7.0~7.2), 固体培养基在此基础上加入 2% 琼脂粉。

### 1.3 试验仪器

安捷伦 1200 型高效液相色谱仪(带 G1314B 紫外检测器)、超净工作台、超声波清洗器、pH 计、摇床、灭菌锅等。

### 1.4 菊酯降解菌的筛选

将 100 mL 含甲氧菊酯农药(100 mg/L)的富集培养基装入 250 mL 三角瓶中, 灭菌、冷却后加入污泥 10 g, 于 30 ℃、180 r/min 下摇床培养 7 d, 此后按 10% 的接种量转接到下一批含甲氧菊酯(质量浓度依次为 100、200、300、400、500 mg/L)的富集培养基中, 每个浓度在相同条件下培养 7 d 后, 再按 10% 的接种量转接到含甲氧菊酯为 500 mg/L 的基础培养基中, 继续培养 14 d, 此后进行梯度稀释并涂布到普通

收稿日期: 2017-12-21

基金项目: 河北省自然科学基金(编号: B2014208075)。

作者简介: 张亚杰(1993—), 男, 河北邯郸人, 硕士研究生, 主要从事环境分析化学研究。E-mail: 460301778@qq.com。

通信作者: 李朝阳, 博士, 教授, 主要从事环境分析化学研究。E-mail: lizy666@aliyun.com。

固体培养基上,反复进行平板划线分离,直至得到单菌落,将单菌落进行甘油管保存,最终得到 3 株优势菌株。通过后续甲氧菊酯降解试验,选择降解性能最好的 1 株进行详细研究,命名为 W-10。

### 1.5 菌种鉴定

将稀释好的菌液涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上,待菌落长出后,采用革兰氏染色以及芽孢染色后镜检。另外进行葡萄糖发酵试验、甲基红试验等生理生化鉴定<sup>[10]</sup>,并提取菌株 DNA 扩增后送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将 16S rDNA 的序列结果与 GenBank 数据库中的核酸数据进行同源性对比<sup>[11]</sup>。

### 1.6 降解效能的测定

以 W-10 菌株为种菌,进行菌液配制,以接菌量 5% (菌液  $D_{600\text{nm}} \approx 0.5$ ) 接种到装有 100 mL 含 10 mg/L 甲氧菊酯的无菌液体基础培养基中,加入 1 mL 吐温-20,以含相同浓度无菌液体基础培养基作对照,在 30 ℃、180 r/min 下振荡培养,分别在 0、2、4、6、8 d 取样,使用液相色谱进行总量及手性测定。氯菊酯和高效氟氯氰菊酯的降解测定试验与甲氧菊酯相同。色谱条件为非手性高效液相色谱(HPLC)的色谱柱为正相硅胶柱(购自大连伊利特分析仪器有限公司,250 mm × 4.6 mm),流动相为正己烷:异丙醇=100:0.08(体积比);手性 HPLC 色谱柱、甲氧菊酯和高效氟氯氰菊酯为 Chiralcel OD-H(购自日本大赛璐化学工业株式会社,250 mm × 4.6 mm),氯菊酯为 Chiralcel OJ-H(购自日本大赛璐化学工业株式会社,250 mm × 4.6 mm),流动相均为正己烷:异丙醇=100:2(体积比)。非手性和手性 HPLC 的检测波长均为 230 nm,流速为 1.0 mL/min,进样量为 20 μL。具体色谱分析方法参见文献[12]。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

菌株 W-10 是能以甲氧菊酯为唯一碳源生长的细菌,该菌属革兰氏染色阴性短杆菌,葡萄糖发酵试验为阴性,甲基红试验为阴性,常成单、双或成链状排列,无芽胞,专性需氧。W-10 菌株测定的 16S rDNA 序列长度为 1 499 bp,与粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*) AU02 的同源相似性达 99%,初步鉴定为产碱菌属中的粪产碱杆菌。

### 2.2 菊酯降解菌降解条件的优化

分别调节温度为 10、20、30、40 ℃,pH 值为 5.0、6.0、7.0、

8.0、9.0、10.0,接菌量为 0.5%、1.0%、3.0%、5.0%、7.0%、10.0%,于 180 r/min 下振荡培养,培养 6 d 后取样测定降解率,进行条件优化试验。结果表明,该菌的最适生长条件为温度 30 ℃、pH 值 7.0、接菌量 5.0%,后续的菊酯降解试验均在该条件下进行。

### 2.3 菊酯顺反异构体的降解选择性

菌株 W-10 对 3 种菊酯的降解结果见表 1。3 种菊酯的降解符合一级动力学方程,按异构体总量计,甲氧菊酯、氯菊酯和高效氟氯氰菊酯的降解半衰期分别为 5.06、3.40、4.03 d,降解快慢顺序为氯菊酯>高效氟氯氰菊酯>甲氧菊酯。

甲氧菊酯、氯菊酯和高效氟氯氰菊酯分别含有 1、2、3 个手性中心,因此甲氧菊酯含有 2 个对映异构体,无顺反异构体。氯菊酯和高效氟氯氰菊酯均含有 1 个顺式异构体和 1 个反式异构体,顺式异构体和反式异构体又分别含 2 个对映异构体,因此共有 4 个对映体。表 1 中也列出了氯菊酯和高效氟氯氰菊酯顺反异构体的降解数据,氯菊酯和高效氟氯氰菊酯存在明显的顺反异构体选择性。氯菊酯的顺式体降解明显快于反式体,顺反异构体半衰期分别为 2.68、4.36 d,同时用立体异构体比率(stereoisomer ratio,简称 SR)表示顺式体和反式体的浓度比值,降解过程中氯菊酯的 SR 值逐渐减小,从 0 d 的 1.19 减小到 8 d 的 0.54。高效氟氯氰菊酯顺式体降解明显慢于反式体,半衰期分别为 4.48、3.59 d,降解过程中其 SR 值从 0 d 的 1.20 逐步增大到 8 d 的 1.57。图 2 给出了氯菊酯和高效氟氯氰菊酯降解 0、8 d 时的分离色谱图,可以清楚地看出 *cis*-PM 和 *trans*-β-CF 分别是 2 种菊酯降解较快的异构体。因此,W-10 菌株对氯菊酯和高效氟氯氰菊酯的顺反异构体有着不同的降解选择性。

高效氟氯氰菊酯与氯菊酯在结构上只有很小的差异(图 1),前者仅比后者多 1 个氰基和氟原子,因此结构上的微小差异可能会对化合物的异构体选择性带来较大影响,具体的微生物降解机制仍有待深入研究。同时,菊酯在土壤试验中,一般均为反式异构体快于顺式异构体<sup>[7,13]</sup>,而本研究中 W-10 菌株对氯菊酯顺式体降解快于反式体,与土壤试验相反,高效氟氯氰菊酯顺反式体的降解选择性则与土壤试验一致,这可能是由于土壤中的降解微生物有很多种,而本研究中仅为其中一种菌株的降解,土壤中不同的微生物菌群应该有不同的降解特征,农药降解为各种微生物的综合代谢作用。

表 1 3 种菊酯及其顺反异构体的降解情况

		浓度(mg/L)					$k \times 10^2$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (d)	$r^2$
		0 d	2 d	4 d	6 d	8 d			
FP	$C_{\text{total}}$	8.54	5.71	4.92	3.85	2.84	13.70	5.06	0.986 0
	$C_{\text{PM}}$	8.21	4.23	2.88	1.81	1.65	20.30	3.40	0.947 7
PM	$C_{\text{cis}}$	4.46	1.94	1.06	0.64	0.58	25.90	2.68	0.936 9
	$C_{\text{trans}}$	3.75	2.29	1.82	1.17	1.07	15.90	4.36	0.960 2
	SR	1.19	0.85	0.58	0.55	0.54			
	$\beta$ -CF	8.34	5.64	4.23	2.56	2.21	17.20	4.03	0.981 3
β-CF	$C_{\text{total}}$	8.34	5.64	4.23	2.56	2.21	17.20	4.03	0.981 3
	$C_{\text{cis}}$	4.55	3.18	2.53	1.55	1.35	15.50	4.48	0.978 6
	$C_{\text{trans}}$	3.79	2.46	1.70	1.01	0.86	19.30	3.59	0.982 0
	SR	1.20	1.29	1.49	1.53	1.57			

注:下标 *cis* 表示顺式体;下标 *trans* 表示反式体,表 2 同; $k$  表示农药降解速率常数; $t_{1/2}$  表示半衰期。

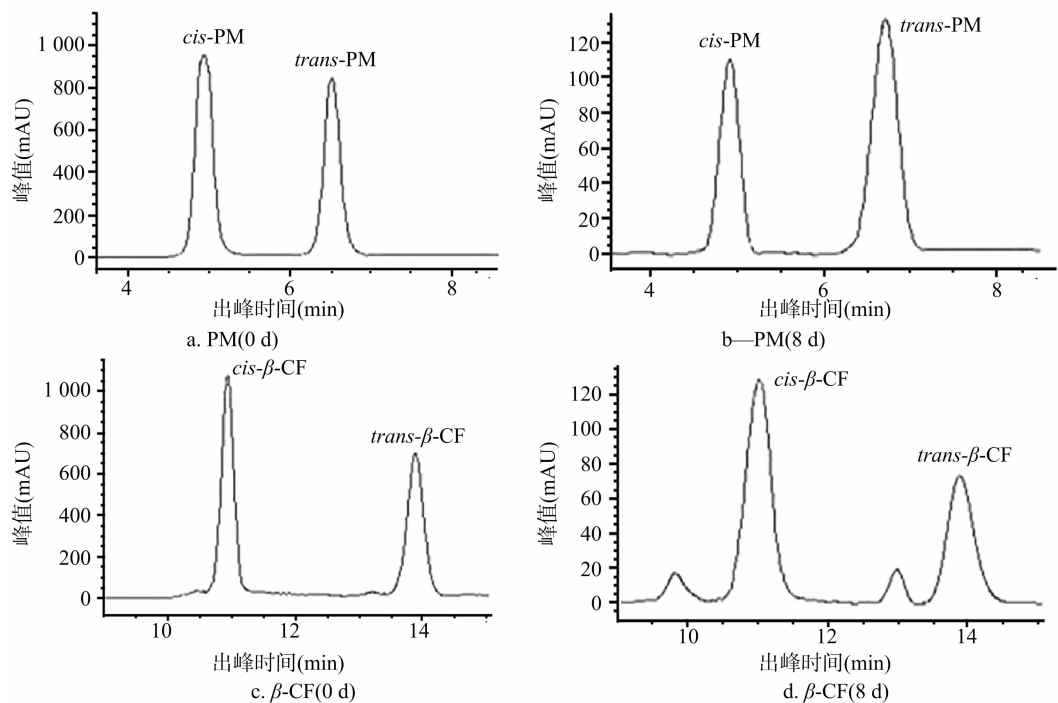


图2 W-10 菌株降解 PM 和  $\beta$ -CF 时在硅胶柱上的分离色谱

2.4 菊酯对映异构体的降解选择性

菊酯所包含的对映异构体结构十分相近,只能在手性色谱柱上得到拆分,笔者所在课题组先期工作已研究了菊酯的手性拆分,并确定了各对映体的流出顺序<sup>[14]</sup>。本研究在手性柱上测试 W-10 菌株对各菊酯对映体的降解情况,并定义对映体比率(enantiomer ratio,简称 ER)为先流出对映体与后流出对映体的浓度比值,具体结果见表 2。甲氧菊酯和氯菊酯的 ER 值始终为 1.00 左右,说明对映体降解速率基本一致,没有选择性。高效氟氯菊酯顺式异构体所含的 1 对对映体也没有降解选择性,而反式异构体则显示出一定的对映体选择性,其 ER 值从 0 d 的 0.99 逐渐增大,到 8 d 时为 1.13,说

表 2 3 种菊酯降解过程中 ER 值测定结果

时间 (d)	FP	PM		$\beta$ -CF	
	ER	ER <sub>cis</sub>	ER <sub>trans</sub>	ER <sub>cis</sub>	ER <sub>trans</sub>
0	1.00	1.01	1.00	1.00	0.99
2	0.99	1.02	1.01	1.01	1.01
4	1.01	1.00	1.03	1.03	1.08
6	1.02	0.99	1.01	1.02	1.10
8	1.00	1.00	1.02	1.01	1.13

明色谱柱上先流出的 1R-trans- $\beta$ -CF 降解略慢于后流出的 1S-trans- $\beta$ -CF,具体的手性分离色谱图见图 3,2 种对映体的半衰期分别为 3.77、3.43 d。

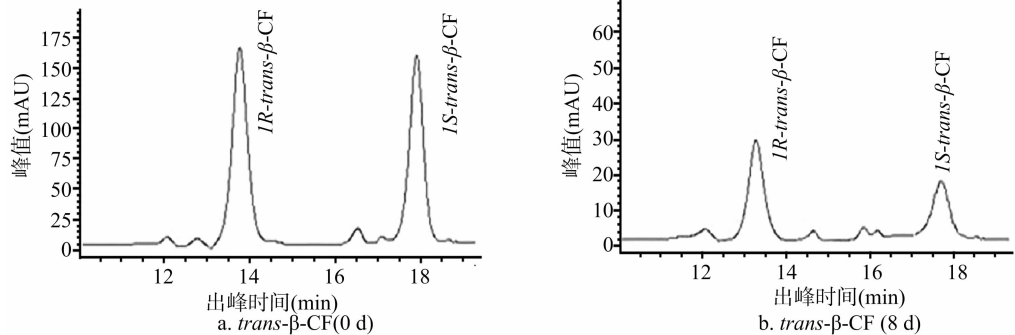


图3 高效氟氯菊酯反式体在 Chiralcel OD-H 柱上的手性分离色谱

3 结论与讨论

本研究表明,微生物菌株对菊酯的降解选择性与菊酯的结构密切相关,化合物结构的微小差异可能造成异构体选择性的根本不同,因此研究微生物对手性污染物的降解和修复

时,必须将不同异构体分别进行考察,其原因可能与微生物体内降解酶的特定手性结构有关,具体的作用机制仍有待深入研究。同时,微生物的手性降解可以更加有针对性地降解手性污染物的特征异构体,因此采用适宜的微生物菌株,有利于  
(下转第 290 页)

- 土壤微生物生物量碳的影响[J]. 生态学报,2006,26(5):1486 – 1493.
- [9]王继红,刘景双,于君宝,等. 氮磷肥对黑土玉米农田生态系统土壤微生物量碳、氮的影响[J]. 水土保持学报,2004,18(1):35 – 38.
- [10]王明友,张 红,李士平,等. 蚯蚓粪与化肥配施对西瓜地土壤活性有机碳及酶活性的影响[J]. 水土保持通报,2015,35(4):101 – 106.
- [11]《银川市西夏区志》编纂委员会. 银川市西夏区志[M]. 银川:宁夏人民出版社,2010:58.
- [12]鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京:中国农业出版社,2000:39 – 114.
- [13]关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社,1986:52 – 56.
- [14]许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986:18 – 22.
- [15]顾美英,唐光木,葛春辉,等. 不同秸秆还田方式对和田风沙土土壤微生物多样性的影响[J]. 中国生态农业学报,2016,24(4):489 – 498.
- [16]吴金水,林启美,黄巧云,等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京:气象出版社,2006:69 – 73.
- [17]曹云娥. 秸秆生物反应堆和高碳堆肥改善微咸水灌溉下设施黄瓜生长的机制探究[D]. 北京:中国农业大学,2016:45.
- [18]孙 婧,田永强,高丽红,等. 秸秆生物反应堆与菌肥对温室番茄土壤微环境的影响[J]. 农业工程学报,2014,30(6):153 – 164.
- [19]贾德新,李士平,王风丹,等. 蚯蚓粪对豇豆根际土壤生物学特征及微生物活性的影响[J]. 浙江农业学报,2016,28(2):318 – 323.
- [20]薛菁芳,高艳梅,汪景宽,等. 土壤微生物量碳氮作为土壤肥力指标的探讨[J]. 土壤通报,2007,38(2):247 – 250.
- [21]张奇春,王光火,方 斌. 不同施肥处理对水稻养分吸收和稻田土壤微生物生态特性的影响[J]. 土壤学报,2005,42(1):116 – 121.
- [22]张聪俐,戴 军,周 波,等. 不同比例蚓粪对玉米生长以及土壤肥力特性的影响[J]. 华南农业大学学报,2013,34(2):137 – 143.
- [23]郑世英,郑建峰,王宝泉,等. 蚯蚓粪对草莓土壤肥力及产量和品质的影响[J]. 北方园艺,2017,10(4):16 – 20.
- [24]单 颖,赵凤亮,林 艳,等. 蚯蚓粪对土壤环境质量和作物生长影响的研究现状与展望[J]. 热带农业科学,2017,6(6):11 – 17.
- [25]Sharma S, Pradhan K, Satya S, et al. Potentiality of earthworms for waste management and in other uses: a review [J]. Journal of American Science, 2005, 1(1):4 – 16.
- [26]Atiyeh R M, Edwards C A, Suler S, et al. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth [J]. Bioresource Technology, 2001, 78(1):11 – 20.
- [27]郭小强,毛 宁,张希彪,等. 不同施肥处理对辣椒根际土壤微生物区系和酶活性的影响[J]. 作物杂志,2014,18(6):123 – 126.
- [28]张 池,陈旭飞,周 波,等. 不同比例蚓粪对旱地土壤微生物学特性以及酶活性的影响[J]. 中国农业大学学报,2014,19(1):118 – 124.
- [29]张 池,陈旭飞,周 波,等. 蚓粪施用对土壤微生物特征以及酶活性的影响[J]. 土壤,2014,46(1):70 – 75.
- [30]顾美英,刘洪亮,李志强,等. 新疆连作棉田施用生物炭对土壤养分及微生物群落多样性的影响[J]. 中国农业科学,2014,47(20):4128 – 4136.
- [31]王文锋,李春花,黄绍文,等. 不同施肥模式对设施菜田土壤微生物量碳、氮的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2016,22(5):1286 – 1297.
- [32]井大炜. 施用蚯蚓粪对杨树苗根际土壤生物学特征的影响[J]. 水土保持通报,2014,34(1):133 – 137.
- [33]陈 伟,周 波,束怀瑞. 生物炭和有机肥处理对平邑甜茶根系和土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 中国农业科学,2013,46(18):3850 – 3856.

(上接第 280 页)

提高环境污染中手性农药的降解修复效果。

## 参考文献:

- [1]Antwi F B, Reddy G V P. Toxicological effects of pyrethroids on non – target aquatic insects [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 40(3):915 – 923.
- [2]Ye J, Zhao M R, Liu J, et al. Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(7):2371 – 2383.
- [3]Chen S H, Hu M Y, Liu J J, et al. Biodegradation of beta – cypermethrin and 3 – phenoxybenzoic acid by a novel *Ochrobactrum lupini* DG – S – 01 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 187(1/2/3):433 – 440.
- [4]史 颖,唐 洁,姚 开,等. 氰戊菊酯降解菌的筛选与鉴定及其降解条件优化[J]. 食品工业科技,2016,37(2):217 – 222,243.
- [5]Liu W P, Gan J Y, Schlenk D, et al. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(3):701 – 706.
- [6]Virginia P F, Maria A G, Marina L M. Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217(7):968 – 989.
- [7]Sakata S, Mikami N, Yamada H. Degradation of pyrethroid optical isomers in soils [J]. Journal of Pesticide Science, 1992, 17(3):169 – 180.
- [8]Liu W P, Gan J J, Lee S, et al. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of cypermethrin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(20):6233 – 6238.
- [9]Liu W P, Gan J Y, Lee S, et al. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24(8):1861 – 1866.
- [10]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370 – 410.
- [11]奥斯特伯 F M,布伦特 R,金斯頓 R E,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 5 版. 金由辛,包慧中,赵丽云,等译. 北京:科学出版社,2001.
- [12]李 森,田 晶,李朝阳,等. 氯菊酯微生物手性降解的研究 [J]. 江苏农业科学,2017,45(20):282 – 284.
- [13]Qin S J, Gan J. Enantiomeric differences in permethrin degradation pathways in soil and sediment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(24):9145 – 9151.
- [14]Li Z Y, Luo X N, Li Q L, et al. Stereo and enantioselective separation and identification of synthetic pyrethroids, and photolytical isomerization analysis[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 94(2):254 – 259.