

四种农药耐受真菌的鉴定及降解效果

李 静, 刘河疆*

(新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(乌鲁木齐),
新疆农产品质量安全实验室, 乌鲁木齐 830091)

摘要: **目的** 分析 4 种农药耐受真菌的农药残留的降解效果。**方法** 分别添加浓度为 1.0 mg/kg 的 4 种常见农药甲拌磷、毒死蜱、三唑酮、腐霉利, 通过不同时间的培养, 对其农药残留的降解水平进行分析, 采用 18S rDNA/ITS 对该菌株进行 DNA 提取, 将提取后的 DNA 进行 ITS 扩增测序, 并运用 BLAST 进行序列比对。**结果** 通过分子鉴定, 该菌株为真菌中根霉属(*Rhizopus*), 对以上 4 种农药均具有降解作用, 降解能力依次为甲拌磷 > 腐霉利 > 三唑酮 > 毒死蜱。该菌株对甲拌磷降解效果最好, 在培养时间达到 72 h 时, 降解率为 100%, 其余降解率分别为腐霉利 88%、三唑酮 85%、毒死蜱 50%。**结论** 该菌株在培养时间为 48 h 时, 对 4 种农药残留的降解水平最佳, 对甲拌磷降解水平最好; 培养时间到达 72 h 时, 对甲拌磷降解率达到 100%。

关键词: 真菌; 分子鉴定; 农药残留; 降解

Identification and degradation effects of four pesticide tolerant fungi

LI Jing*, LIU He-Jiang

(Institute of Quality Standards & Testing Technology for Agro-Products, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-Products (Urumqi), Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Agro-Products Quality and Safety of Xinjiang, Urmqi 830091, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the degradation effect of pesticide residues of 4 pesticide tolerant fungi. **Methods** Four common pesticides, phorate, chlorpyrifos, triazolidone and pythiril, were added with a concentration of 1.0 mg/kg, respectively. The degradation levels of pesticide residues were analyzed through culture at different times. The DNA of the strain was extracted by 18SrDNA/ITS, and the extracted DNA was amplified and sequenced by ITS, and then the sequences were compared by BLAST. **Results** Through molecular identification, this strain belongs to *Rhizopus*, which has degradation effect on all the above four pesticides, and the degradation ability was phorate>pythium> triazolidone > chlorpyrifos in order. The strain had the best effect on the degradation of phorate, and the degradation rate was 100% when the culture time reached 72 h, and the other degradation rates were pythium 88%, triazolidone 85% and chlorpyrifos 50% respectively. **Conclusion** when the culture time of the strain was 48 h, the degradation level of the four pesticide residues was the best, and the degradation level of the phorate was the best. When the culture time reached 72 h, the degradation rate of phorate reached 100%.

KEY WORDS: fungi; molecular identification; pesticide residues; the degradation

*通讯作者: 刘河疆, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为农产品质量安全与检测技术。E-mail: 12631499@qq.com

*Corresponding author: Liu He-Jiang, Master, Senior Experimenter, Institute of Quality Standards & Testing Technology for Agro-Products, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-Products (Urumqi), Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Agro-products Quality and Safety of Xinjiang, Urmqi 830091, China. E-mail: 12631499@qq.com

1 引言

农药可以用来杀灭昆虫等危害作物生长的生物。农药是一种可以防治危害作物生长的有害生物、调节植物生长的化学(或生物)药剂^[1], 农药的使用, 在一定程度上保护了农作物生长, 提高了作物产量, 但长期大量使用农药^[2], 特别是不易降解的农药, 不仅给生态环境带来了巨大的压力, 同时在食品安全等方面也带来安全隐患^[3]。目前, 国内外研究农药降解方式主要包括物理、化学和生物 3 种, 3 种方式均对农药残留降解有一定的作用, 其中农药的生物降解被认为是最为高效、环保和具有开发前景的方法^[4,5]。生物降解又包括植物、动物、微生物降解等方式, 其中微生物降解是农药生物降解主要方式之一^[6]。研究表明, 能够降解农药的微生物包括细菌、真菌和放线菌等^[7]。真菌主要包括曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、根霉属(*Rhizopus*)、木霉属(*Trichoderma*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、链孢霉属(*Neurospora*)等^[8], 其中最为常见真菌包括青霉属、木霉属、根霉属真菌^[9]。真菌在降解木质素、纤维素和半纤维素等具有较好的作用, 同时对不同环境中产生的污染物和多环芳烃等芳香族化合物及烃类同样具有良好的降解作用^[10]。真菌相较于细菌, 对于农药降解的优势除了专一性低、广谱性高以外, 同时具有适应性广的特点^[11]。有研究报道显示, 与真菌降解过程相比, 细菌在降解农药的过程中易产生的代谢产物, 在降解农药的同时会产生具有较大毒性代谢产物, 有毒代谢产物的存在对环境更容易造成 2 次污染^[12]。因此, 真菌在农药生物降解的中发挥的作用受到越来越多的关注和研究^[13]。

本研究以发生质变的果汁为原材料分离菌株, 通过培养基培养筛选对农药具有高抗性的目标菌株, 并对分离后获得的菌株进行培养和分离纯化, 将纯化后的菌株进一步进行分子生物学鉴定, 同时制备菌株发酵液, 选取 4 种常用农药, 通过分离获得的真菌菌株发酵液对农药残留量降解活性进行分析, 获得有价值的实验效果, 旨在为真菌微生物在农药残留的生物降解中发挥作用等方面提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 材料

菌株分离自产生质变的果汁中, 编号为 LHJ。

2.2 试剂与仪器设备

2.2.1 试剂

甲拌磷(纯度 $\geq 99.5\%$, 溶剂为丙酮)、毒死蜱(纯度 $\geq 99.4\%$, 溶剂为丙酮)、三唑酮(纯度 $\geq 98.1\%$, 溶剂为正己烷)、腐霉利(纯度 $\geq 98.5\%$, 溶剂为正己烷)、乙腈、正己烷

(德国 Fisher 公司); 乙酸乙酯(色谱级淋洗剂, 天津光复精细化工研究所); 丙酮(色谱级淋洗剂, 天津光复精细化工研究所); 氯化钠、无水硫酸钠(分析纯, 上海四赫维化工有限公司); 固相萃取柱(佛罗里硅土柱(Florisil), 农药残留级, 容积 6 mL, 填充物 1000 mg, 北京振翔有限责任公司); 实验用水均为去离子水。

2.2.2 仪器设备

7890 型气相色谱仪(带电子捕获检测器, 美国安捷伦科技有限公司); Trace GC2000 型气相色谱仪(带火焰光度检测器, 美国 Thermo Finigan 公司); IKA T18 型高速匀浆机(广州仪科实验室技术有限公司); H50 型循环冷凝设备(莱伯泰科有限公司); SK8600HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); CT15RT 型台式高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司); EYELA SB-1100 型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司); AEL-160 型百分之一天平(0.01 g)[奥豪斯(上海)有限公司]。

2.2.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, pH 7.0~7.2, 蒸馏水 1000 mL(下文中简称为 PDA 培养基)。

马铃薯葡萄糖液体培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, pH 7.0~7.2, 蒸馏水 1000 mL(下文中简称为 PD 培养基)。

2.3 实验方法

2.3.1 菌株的分离纯化

配置 PDA 培养基, 灭菌后, 待降至 60 °C 左右, 将待测真菌经 PDA 平板活化后, 置于 28 °C 恒温培养箱中避光培养, 对分离后菌株进行纯化(根据镜检后, 显微镜下菌株形态判定菌株是否纯化, 一般情况下进行梯度分离纯化, 至少 3 次以上, 显微镜下观察形态)。选取纯化后菌株进行培养并保存备用。将纯化后菌株接种至 PDA 液体培养基, 制成菌悬液, 以 1.0 mg/kg 的最终剂量加入甲拌磷、毒死蜱、三唑酮、腐霉利, 制备农药筛选菌悬液。

2.3.2 菌株的分子鉴定

(1) DNA 提取

根据真菌 18S rDNA/ITS 提取方法, 从活化后的菌悬液中提取 DNA。将 2.3.1 步骤中分离纯化菌株接种至 PDA 液体培养基中, 制成菌悬液。吸取 1 mL 活化后的菌悬液, 按照真菌 DNA 试剂盒提取步骤, 进行提取, 待离心完全后, 弃去上清液, 收集菌体, 管底即为基因组。将上述制备的 DNA 基因组为 PCR 扩增体系模板, 采用 50 μ L 扩增反应体系, 用一对与 ITS 序列互补的引物 ITS 1(5'-TCCGTAGGTGA ACCTGCGG-3') 和 ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对 ITS 区域真菌菌株 DNA 进行扩增(引物由上海生工生物工程技术有限公司合成)。

(2) ITS 序列 rDNA PCR 扩增

采用 50 μL PCR 扩增体系: 2.0 μL 制备上述真菌 DNA 模板, 引物 ITS1 和 ITS4(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL 、ddH₂O 21 μL 、2 \times Masher Mix 25.0 μL 。PCR 扩增程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5 min, 退火 54 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5 min, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、50 s, 从变性到延伸 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸、10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, forever。PCR 扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂时保存, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(3)菌株扩增产物测序及序列分析

将扩增 PCR 产物及回收 PCR 产物送由上海生工公司进行凝胶电泳、用 EB 染色成像, 紫外观察、拍照后, 进行序列测定。

(4)BLAST 序列比对及菌株同源性分析

将所测得的分子序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 在线比对, 同时与 GenBank 中已有的 ITS 基因序列进行同源性比较, 用 MEGA6.0 构建系统发育树, 分析同源关系^[14]。

2.3.3 农药标准品配制^[15,16]

单一农药标准溶液: 用移液管准确取质量浓度为 1000 mg/L 的毒死蜱、甲拌磷、腐霉利、三唑酮农药单一标准品, 有机磷类农药用丙酮稀释、有机氯类农药用正己烷稀释, 配制 20 mg/L 的单一农药标准储备液, 在 -10 $^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱中贮存、备用。

本方法中所测 4 种农药混标溶液配制如下: 根据仪器上的响应值和分离效果, 分别吸取毒死蜱、甲拌磷两种农药的储备液于同一容量瓶中, 用丙酮稀释至刻度, 配制有机磷类农药混合标准溶液; 分别吸取腐霉利、三唑酮两种农药的储备液于同一容量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 配制有机氯类农药混合标准溶液。以上两种混合标准均为储备液, 使用前稀释成所需浓度的标准工作液。

2.3.4 样品提取

准确吸取 15.0 mL 活化后的菌悬液于 50 mL 离心管中, 在含有菌悬液的离心管中加入乙腈 30.0 mL, 高速匀浆 2 min 后, 继续 10000 r/min 离心 2 min。吸取 2 份 10 mL 上述离心后上层溶液, 于 100 mL 浓缩瓶中 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴浓缩近干, 备用。

2.3.5 净化^[17]

(1)毒死蜱、甲拌磷样品净化

取一份经 40 $^{\circ}\text{C}$ 浓缩好的菌悬液, 加入 2.5 mL 丙酮, 涡旋振荡 1 min 后, 过 0.25 μm 滤膜, 滤液收集于自动进样瓶内, 供火焰光度检测器(FPD 检测器)分析使用。

(2)腐霉利、三唑酮样品净化

用 5.0 mL 丙酮+正己烷(8:92, V:V)的淋洗液淋洗佛罗里硅土小柱至溶剂液面降到柱吸附层表面, 继续加另一份浓缩好的菌悬液, 用 20 mL 丙酮+正己烷(8:92, V:V)淋洗液洗脱, 洗脱液浓缩近干后, 用正己烷准确定容至 2.5 mL, 待测。

2.3.6 色谱条件选择

有机磷类、有机氯类农药检测色谱条件, 参照刘河疆等^[17]“促干剂中 33 种农药多残留的测定”中色谱条件。

2.3.7 种农药光谱分析及液体发酵下的农药降解活性

降解率的计算方法: $\text{降解率}(\%) = (1 - C/C_0) \times 100\%$

C: 降解菌处理农药残留浓度,

C₀: 对照处理农药残留浓度。

3 结果与分析

3.1 菌株的分子鉴定及分析

采用 18S r DNA 的 ITS 序列对待测菌株进行分子鉴定。由测定结果可知, 菌株 LHJ 的部分序列长度为 588 bp。通过 BLAST 序列在线比对, 并利用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树, 结果如图 1 所示。菌株 LHJ 与 *Rhizopus sp.*(KX099649.1)遗传距离最近, 相似度为 99%, 为根霉属(*Rhizopus*)。

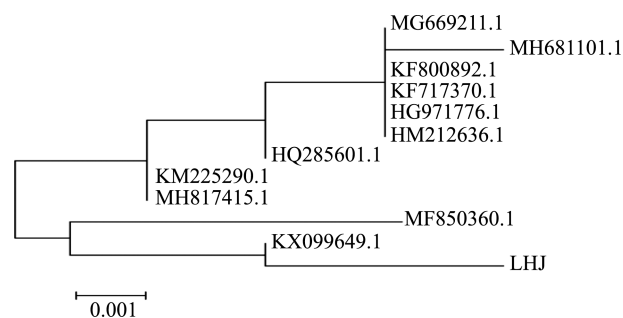


图 1 菌株 LHJ 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of strain LHJ

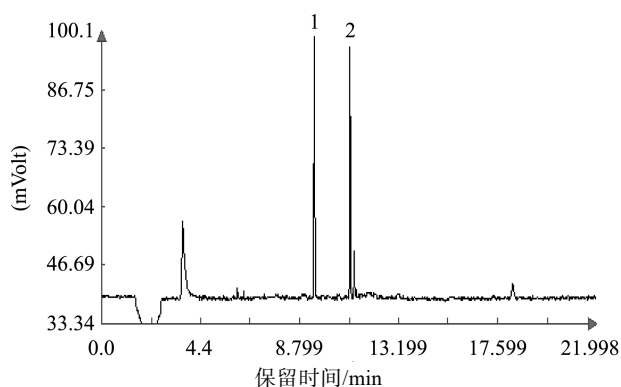
3.2 4 种农药光谱分析及液体发酵条件下的农药降解活性

3.2.1 标准曲线和检出限

吸取浓度为 20 mg/L 混合标准工作溶液, 配置添加量为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.5 mg/L 浓度的农药标准工作曲线, 混匀静置。上述不同浓度混合标准溶液添加水平均分别设置 3 个重复, 同时设置相应的空白进行对照。按照 2.3.6 中有机磷、有机氯农药残留测定的色谱条件^[17], 进样 1 μL , 分别测定 4 种供试农药不同质量浓度对应的峰面积值。图谱见图 2, 图 3。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 并得出线性回归方程(见表 1)。分析结果显示, 在农药标准曲线浓度范围内, 获得的线性回归方程的相关系数均在 0.99 以上, 检测灵敏度满足农药残留检测限量标准的要求。

表 1 4 种农药标准曲线及检出限表
Table 1 standard curves and detection limits of 4 pesticides

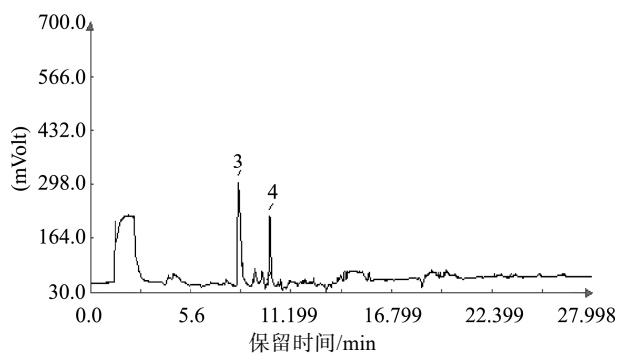
序号	农药名称	线性回归方程	相关系数 r	检出限/(mg/kg)
1	甲拌磷	$Y=1.381 \times 10^7 X + 1432205$	0.990	0.001
2	毒死蜱	$Y=2.098 \times 10^7 X + 294325$	0.996	0.002
3	三唑酮	$Y=1.587 \times 10^6 X - 81026$	0.993	0.002
4	腐霉利	$Y=1.359 \times 10^6 X - 62534$	0.995	0.003



注: 1.甲拌磷; 2.毒死蜱。

图 2 2 种有机磷农药色谱图

Fig. 2 Chromatogram of two organ phosphorus pesticides



注: 3.三唑酮; 4.腐霉利。

图 3 三唑酮、腐霉利农药色谱图

Fig. 3 Chromatogram of triazolone and rancid pesticide

3.2.2 4 种农药光谱分析及液体发酵下的农药降解活性

将活化后的菌株 LHI 菌悬液分别接种至制备浓度为 1.0 mg/kg 的 4 种农药溶液中, 28 °C 条件下, 分别恒温培养 10、24、48、72 h 后, 测定该菌株对 4 种常见农药残留降解效果, 结果见图。由图 4 可以看出, 随着发酵时间的延长, 菌株 LHI 对 4 种农药降解效果显著, 对 4 种农药残留含量的降解均呈现下降趋势, 降解能力依次为甲拌磷 > 腐霉利 > 三唑酮 > 毒死蜱。其中, 该菌株对甲拌磷降解效果最好, 在培养时间达到 72 h 时, 降解率为 100%, 其余降解率分别为腐霉利 88%、三唑酮 85%、毒死蜱 50%。

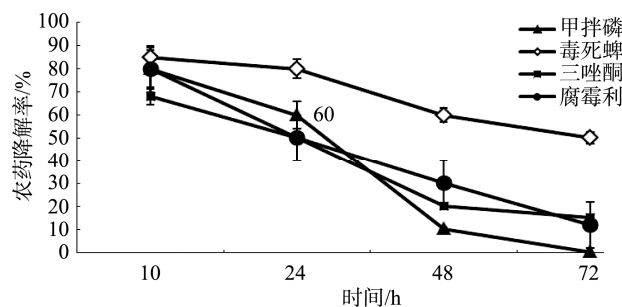


图 4 菌株 LHI 对四种农药降解结果(n=3)

Fig. 4 degradation of four pesticides by strain LHI (n=3)

4 讨论与结论

食品质量安全已经成为社会日益关注的问题, 人们对于食品的追求已经由过往的吃饱、吃好转向更加安全、健康。农产品农药残留问题更是目前食品安全需要重点关注的问题。本试验从已经发生质变的果汁中分离菌株, 对分离纯化菌株进行分子生物学鉴定, 并对该菌株降解农药的能力进行测定, 结果证明: 该菌株与菌株 *Rhizopus* sp.(KX099649.1)遗传距离最近, 相似度为 99%, 为根霉属 (*Rhizopus*); 试验分离菌株对甲拌磷、毒死蜱、三唑酮、腐霉利四种常用农药有很好的降解作用, 降解能力依次为甲拌磷 > 腐霉利 > 三唑酮 > 毒死蜱, 其中, 该菌株对甲拌磷降解效果最好, 在培养时间达到 72 h 时, 降解率为 100%, 为今后采用生物方法降解农药残留的深入研究奠定了基础。

参考文献

- 胡渤洋, 王寿南, 陈青君, 等. 4 种常见农药的耐受真菌筛选、鉴定及降解作用初探[J]. 北京农学院学报, 2017, 32(1): 7-14.
Hu BY, Wang SN, Chen QJ, et al. Screening, identification and degradation of four common pesticides against fungi [J]. J Beijing Agric Coll, 2017, 32(1): 7-14.
- 刘艳. 氯噻磺隆、乙草胺和氟磺胺草醚降解菌的鉴定及其降解特性哈亦滨[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2011.
Liu Y. Identification and degradation characteristics of degradation bacteria of chlorsulfuron-methyl, ethyl chlor and flurfac [D]. Harbin: Harbin Normal University, 2011.
- 刘丽洁, 秦德志, 靳荣, 等. 微生物降解有机农药的研究进展[J]. 内蒙古林业科技, 2013, (4): 34-36.

- Liu LJ, Qin DZ, Jin R, *et al.* Progress in the degradation of organic pesticides by microorganisms [J]. *Forestry Sci Technol Inner Mongolia*, 2013, (4): 34–36.
- [4] 陈少华, 罗建军, 胡美英, 等. 一株拟除虫菊酯农药降解菌的分离鉴定及其降解特性与途径[J]. *环境科学学报*, 2011, (8): 1616–1626.
Chen SH, Luo JJ, Hu MY, *et al.* Isolation and identification of a pyrethroid pesticide degrading bacterium and its degradation characteristics and pathways [J]. *J Environ Sci*, 2011, (8): 1616–1626.
- [5] 裴亮, 张体彬, 赵楠, 等. 有机磷农药降解方法及应用研究新进展[J]. *环境工程*, 2011, (S1): 273–277, 174.
Pei L, Zhang TB, Zhao N, *et al.* New progress in degradation methods and applications of organophosphorus pesticides [J]. *Environ Eng*, 2011, (S1): 273–277, 174.
- [6] 谷月, 姜华. 农药污染土壤的微生物降解[J]. *辽宁农业科学*, 2013, (4): 52–55.
Gu Y, Jiang H. Microbial degradation of soil contaminated by pesticides [J]. *Liaoning Agric Sci*, 2013, (4): 52–55.
- [7] 仪美芹, 王开运, 姜兴印, 等. 降解甲基对硫磷真菌的分离及降解特性[J]. *农药学学报*, 2000, (4): 40–43.
Yi MQ, Wang KY, Jiang XY, *et al.* Separation and degradation characteristics of methyl parathion fungi [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2000, (4): 40–43.
- [8] 朱福兴, 王沫, 李建洪. 降解农药的微生物[J]. *微生物学通报*, 2004, (5): 120–123.
Zhu FX, Wang M, Li JH. Microbe of pesticide degradation [J]. *Microbiol Chin*, 2004, (5): 120–123.
- [9] 张修玉, 曾祥有, 姜春晓, 等. 龙眼产期调控剂氯酸钾对果园土壤微生物的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(2): 317–221.
Zhang XY, Zeng XY, Jiang CX, *et al.* Effects of potassium chlorate on soil microorganism of orchard in longan [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2006, 25(2): 317–221.
- [10] 胡渤洋, 王寿南, 陈青君, 等. 4种常见农药的耐受真菌筛选、鉴定及降解作用初探[J]. *北京农学院学报*, 2017, 32(1): 7–14.
Hu BY, Wang SN, Chen QJ, *et al.* Screening, identification and degradation of four common pesticides against fungi [J]. *J Beijing Agric Univ*, 2017, 32(1): 7–14.
- [11] 邵梅香, 朱炳根, 李敏, 等. 白腐真菌在环境保护中应用的研究进展[J]. *金陵科技学院学报*, 2015, (1): 88–92.
Shao MX, Zhu BG, Li M, *et al.* Research progress of application of white rot fungi in environmental protection [J]. *J Jinling Inst Technol*, 2015, (1): 88–92.
- [12] 谷晓明, 魏朝俊, 贾临芳, 等. 百菌清降解菌 BJQ2 的分离、鉴定及影响因素研究[J]. *农业环境科学学报*, 2012, (2): 306–311.
Gu XM, Wei ZJ, Jia LF, *et al.* Isolation, identification and influencing factors of chlorothalonil degrading bacteria BJQ2 [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2012, (2): 306–311.
- [13] 谷月. 白腐真菌对百菌清、甲霜灵的生物降解及对植物的促生作用[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2014.
Gu Y. Biodegradation of chlorothalonil and methanolin by white rot fungi and its promoting effect on plants [D]. Dalian: Liaoning normal university, 2014.
- [14] 秦改娟, 王珊珊, 陈青君, 等. 一株假芝的分离鉴定与生物学特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, (3): 464–469.
Qin GJ, Wang SS, Chen QJ, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of a pseudoderma [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2015, (3): 464–469.
- [15] GB/T 5009. 146–2008 植物性食品中有机氯和拟除虫菊酯类农药多种残留的测定[S].
GB/T 5009. 146–2008 Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides residues in plant food [S].
- [16] SN/T 1117–2008 进出口食品中多种菊酯类农药残留量测定方法气相色谱法[S].
SN/T 1117–2008 Methods for the determination of various pyrethroid pesticide residues in import and export foodstuffs—gas chromatography [S].
- [17] 刘河疆, 钱宗耀, 王建梅, 等. 促干剂中 33 种农药多残留的测定[J]. *现代科学仪器*, 2013, (1): 132–135.
Liu HJ, Qian ZY, Wang JM, *et al.* Determination of multiple residues of 33 pesticides in drying agents [J]. *Mod Sci Inst*, 2013, (1): 132–135.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



李 静, 硕士, 实验师, 主要研究方向为农产品质量安全与营养品质。
E-mail: 451449714@qq.com



刘河疆, 硕士, 高级实验师, 主要研究方向为农产品质量安全与检测技术。
E-mail: 12631499@qq.com