

文章编号:2095-0411(2016)04-0087-06

新烟碱类杀虫剂吡虫啉降解菌 P4-7 的筛选、 鉴定及其降解特性的研究

蔡志强, 荣 艳, 陈 杰, 李珊珊, 王 静
(常州大学 制药与生命科学学院, 江苏 常州 213164)

摘要:采用富集培养的方法,从常州南郊农田土壤中筛选出 8 株以吡虫啉(Paichongding, IPP)为唯一生长碳源和能源的菌株,选择生长速度快和降解率较高的菌株 P4-7 进一步研究,据 18S rDNA 序列将其鉴定曲霉属(*Aspergillus* sp.)。通过单因素试验和初步优化,菌株 4-7 在 20d 对 50mg/L 吡虫啉的降解率可达 30%,该菌株降解吡虫啉的最适初始 pH 为 7.0、最适接种量为 5%。菌株 *Aspergillus* sp. P4-7 降解 IPP 的过程中,检测到 2 种中间代谢产物 M1 和 M2,经高分辨 LC-MS/MS 鉴定为 $C_{14}H_{17}ClN_4O_3$ (M1)、 $C_{14}H_{14}ClN_3O$ (M2),实验结果表明,IPP 的丙氧基水解成羟其,形成中间产物 M1, M1 进一步脱硝基,羟基同时氧化形成 M2。

关键词:吡虫啉;曲霉属;18S rDNA;生物降解;降解途径

中图分类号: X 172

文献标志码: A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2016.04.016

Isolation, Identification and Degradation Characteristics of a Novel *cis*-Nitromethylene Neonicotinoid Insecticide Paichongding- Degrading Strain P4-7

CAI Zhiqiang, RONG Yan, CHEN Jie, LI Shanshan, WANG Jing

(School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Paichongding (IPP) is a novel nitromethylene neonicotinoid recently developed in China. Eight strains which can utilize IPP as sole carbon and energy source were isolated from the field in south of Changzhou, Jiangsu province. The strain P4-7 with higher rate of degrading IPP was selected for further study. Based on 18S rDNA sequence, the strain was identified as *Aspergillus* sp.. Under the condition of 50 mg/L of IPP, pH 7.0 and 5% of inoculum, the degradation rate of IPP within 20 days reached 30% by the strain P4-7. Two main metabolites (M1 and M2) were detected during IPP degradation process. Based on LC-MS/MS analysis, they were identified as $C_{14}H_{17}ClN_4O_3$ (M1) and $C_{14}H_{14}ClN_3O$ (M2). According to their appearance dynamics, the biodegradation pathway of IPP by P4-7 was proposed: The propyl group of IPP was initially de-esterified and hydrolyzed to form M1, then M1 was transformed into M2 through reduction of nitro group on M1 and the hydroxyl oxidation.

Key words: Paichongding; *Aspergillus* sp.; 18S rDNA; biodegradation; degradation pathway

收稿日期:2015-12-04。

基金项目:国家自然科学基金资助(11275033);江苏省自然科学基金面上项目(BK20151185)。

作者简介:蔡志强(1975—),男,江苏徐州人,博士,副教授,主要从事环境微生物和现代生物技术等方面的研究。

烟碱类杀虫剂源于植物源农药烟碱,主要作用于害虫的乙酰胆碱酯酶受体,因其卓越的杀虫活性、新颖的作用机理,引起了人们的广泛关注,掀起了研发烟碱类杀虫剂的热潮^[1-2]。为改变国内农药生产仿制品种多、创制品种少、产品附加值低的局面,华东理工大学和江苏克胜集团合作,历经五载,创制出新一代拥有自主知识产权的新烟碱类杀虫剂哌虫啉²。哌虫啉(Paichongding, IPP, 1-((6-氯吡啶-3-基)甲基)-5-丙氧基-7-甲基-8-硝基-1,2,3,5,6,7-六氢咪唑-(1,2- α)吡啶)是一种高效、低毒、广谱的新烟碱类杀虫剂,主要用于同翅目害虫的防治,目前获得两项国家发明专利(ZL200410084457.1、ZL200710024512.1)和一项国际专利(PCT/CN2005/000617)^[3-6]。95%哌虫啉原药和10%悬浮剂两产品已通过农业部审查,取得了农药临时登记证(证号分别为:LS20091270、LS20091271)。经测试表明IPP对抗性飞虱试验防效尤为突出,对吡虫啉抗性的褐飞虱具有显著的活性,具有对哺乳动物低毒,对鱼无毒和蜜蜂低毒等特点^[3-6]。

随着哌虫啉在国内使用量的增加,其在环境中的归趋也日益引起人们的重视,哌虫啉在环境中降解特性及代谢行为的研究鲜有报道。目前哌虫啉在环境中的归趋研究主要集中在哌虫啉在好氧厌氧土壤中代谢、土壤结合残留以及哌虫啉在白菜中的代谢特性等方面^[5-11],而在哌虫啉的生物降解菌的筛选和在水体中的代谢行为研究很少。本实验从常州市南郊农田土壤中,经分离筛选得到哌虫啉高效降解菌株P4-7,对该菌株的生物降解降解特性作了进一步的研究,并鉴定IPP生物降解中间产物,推测其可能的代谢途径,为哌虫啉的生物降解及环境污染的生物修复提供理论指导和技术支持。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

哌虫啉(IPP, MW 367, 分子式 $C_{17}H_{23}ClN_4O_3$, 纯度 98.3%)购自江苏克胜集团有限公司,基本培养基、富集培养基、初筛培养基、复筛培养基和LB培养基的配方见参考文献^[5,12-13]。从常州市南郊菜园、麦地等农田中采集植物根部5~10cm左右土壤样品10份。其它化学试剂均为分析纯。

1.2 降解菌株筛选与纯化

取3g土样溶解于100mL生理盐水中,振荡充分

溶解15~20min,静置10min。取上清3mL加入100mL基础培养基中(含哌虫啉50mg/L)。放入摇床140r/min,30℃培养数天。待菌体大量生长后,以5%的接种量转接到含哌虫啉50mg/L的基础培养基中富集培养4次。吸取200mL菌液于平板涂布,挑取菌落较大的接种于以哌虫啉为唯一碳源的固体培养基上30℃培养3d,反复划线纯化,保存菌株备用。

1.3 18S rDNA 扩增和菌株鉴定

选择降解率较高的菌株提取菌株染色体总DNA作为扩增模板,18S rDNA扩增PCR反应所用引物为NS1(GTAGTCATATGCTTGTCTC)和NS6(GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC),18S rDNA序列由生工生物工程(上海)股份有限公司鉴定。将序列登录GenBank进行同源性比较,应用MEGA4.0软件中的Nerghbor-Joining方法构建18S rDNA的系统发育树。

1.4 分析测定方法

反应体系中哌虫啉及其代谢产物的提取^[5-6]:用2倍体积二氯甲烷萃取两次,合并二氯甲烷相,经无法硫酸钠脱水后,旋转蒸发(<40℃)浓缩至干,用5mL乙腈溶解,0.45mm微孔滤膜过滤,HPLC检测哌虫啉浓度,哌虫啉平均回收率为99.02%,变异系数为3.06%。

哌虫啉HPLC检测条件:仪器为Agilent HPLC 1260,色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C18(4.6×250mm,5 μ m);检测波长354nm,柱温30℃,流动相V(乙腈):V(水)=50:50,流速1mL/min,进样量20 μ L^[14-15]。

哌虫啉降解率计算公式

$$\text{降解率} = \frac{(\rho_0 - \rho)}{\rho_0} \times 100\%$$

式中: ρ_0 为对照样品哌虫啉质量浓度,mg/L; ρ 为生物降解样品哌虫啉质量浓度,mg/L。

哌虫啉降解产物HPLC-MS/MS分析方法:高效液相色谱-超高分辨飞行时间质谱联用技术(LC-MS/MS, Dionex U3000-Bruker maXis 4G)检测产物结构。HPLC条件:检测波长268nm;色谱柱Agilent Eclipse XDB-C18(4.6×250mm);柱温30℃;流动相:乙腈(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸);流速0.4mL/min;进样量8 μ L。质谱条件如下:ESI电喷雾电离(正离子模式),毛细管电压4.5kV,碰撞电压25V,干燥气体6L/min,气体温度180℃,扫描

m/z 为 50~1 000^[5-6]。

2 结果与讨论

2.1 土壤中降解哌虫啉微生物的筛选

在以哌虫啉为唯一碳源的培养基中分筛选到 8 株降解菌:P14-1, P1-3, P4-7, P10-2, P11-3, P4-1, P1-12 和 P11-13。在 LB 培养基中活化 24~72h

后,以 10%接种量(菌体用无菌生理盐水洗涤 2~3 次)接种是含哌虫啉(50mg/L)的基础培养基中, 30℃,120r/min 条件下培养 10d,菌液经提取处理进行 HPLC 分析,结果如表 1,本实验分离得到的 8 株菌对哌虫啉均有一定的降解效果,根据菌落大小、菌株生长速度和 IPP 初步降解率,选取菌株 P4-7 为目标菌株进一步研究。

表 1 哌虫啉 8 株降解菌的降解率
Table 1 Degradation rate of Paichongding degrading strains

	P14-1	P1-3	P4-7	P10-2	P11-3	P4-1	P1-12	P11-13
菌落大小	++	+++	++++	++	+++	++	+++	++
菌体形状	球状	短杆状	孢子呈球状	球状	杆状	杆状	球状	球状
降解率	18.87	23.50	22.45	18.06	15.63	20.4	13.45	19.71

说明:“+”代表 1mm。

2.2 菌株 P4-7 的分类鉴定

菌株 P4-7 在含哌虫啉固体基础培养基中涂布培养 4d,平板上长出 4~5mm 直径大小的菌落,圆开,中间隆起且厚,边缘呈放射性。生长初期菌丝为绒状,呈白色,后期变成绿色。菌丝体随着培养时间的增加颜色逐渐加深,最后变成墨绿色颗粒状(图 1(a))。菌株 P4-7 分生孢子梗壁光滑,孢子成簇状,单个孢子为球形,孢子表面粗糙,平均直径长 2.8mm(图 1(b),图 1(c)和图 1(d))。

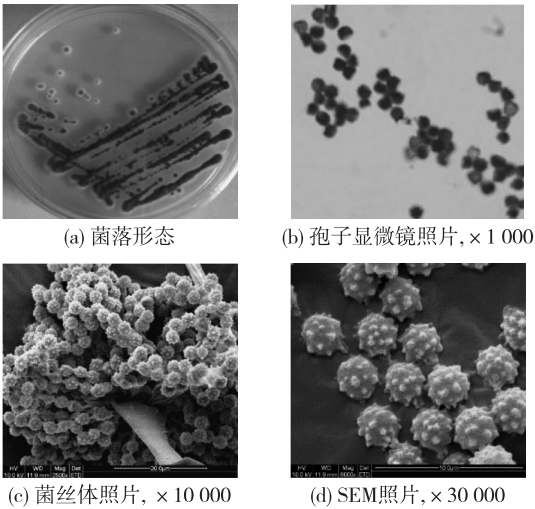


图 1 P4-7 菌落形态和孢子照片
Fig.1 Colonial, mycelial and spore morphology of P4-7

将电泳后的片段进行测序,将菌株 P4-7 18S rDNA 基因序列登录 GenBank 进行同源性比较,应用 MEGA4.0 软件中的 Nergghor-Joining 方法构建

18S rDNA 的系统发育树(图 2)。分析结果显示菌株 P4-7 与 *Aspergillus* sp.的相似性在 99%以上,结合菌株的形态学特征,哌虫啉高效降解菌 P4-7 命名为 *Aspergillus* sp. P4-7。

2.3 pH 对菌株 P4-7 降解哌虫啉的影响

哌虫啉在酸性环境中不稳定,容易发生水解^[14-15],本实验调节培养基 pH 分别至 7.0,8.0 和 9.0,并各设定一对照组,接种量为 8%,哌虫啉浓度为 50mg/L,30℃,140r/min 条件下培养,每 5d 取样测定不同 pH 条件下 P4-7 对哌虫啉的降解率(图 3,空白对照试验 pH 为 7.0)。菌株在 pH 为 7.0~9.0 的条件下均可生长,并能降解哌虫啉。由图 3 可知在 pH 7.0 时降解率最高,可达 27.46%,随着 pH 降解率逐渐下降,说明在哌虫啉作为唯一碳源和能源时,菌株最适生长 pH 为 7.0。这可能是在 pH 为中性时有利于哌虫啉相关降解酶的表达与合成,并维持较高的酶活,当 pH 上升,降解酶的合成速度或活性受到了一定的抑制,从而影响 IPP 的降解效果。

2.4 底物浓度对菌株降解哌虫啉的影响

将处于对数期生长期的菌株 P4-7 以 8%的接种量接种于 30、50、75、100mg/L 不同质量浓度哌虫啉的基础培养基中。将 pH 调至 7.0,置于 140r/min,30℃条件下培养。取样周期为 5d,研究哌虫啉初始浓度对菌株 P4-7 的影响,结果如图 4(空白对照试验 IPP 质量浓度为 30mg/L)。在本实验范围

内,哌虫啉初始浓度对菌株 P4-7 的影响不大,IPP 浓度的升高,降解率略有下降。另外,在哌虫啉浓度为 30mg/L 时,降解率反而低于浓度为 50mg/L,说明菌株 P4-7 在较低浓度时,对哌虫啉的利用效率较

低。据报道新型广谱烟碱类杀虫剂哌虫啉对鱼、鸟、蜜蜂和家蚕均为低毒^[1-6],研究结果表明,哌虫啉初始浓度对菌株 P4-7 的降解效率影响不大,说明哌虫啉对环境微生物可能也是低毒的。

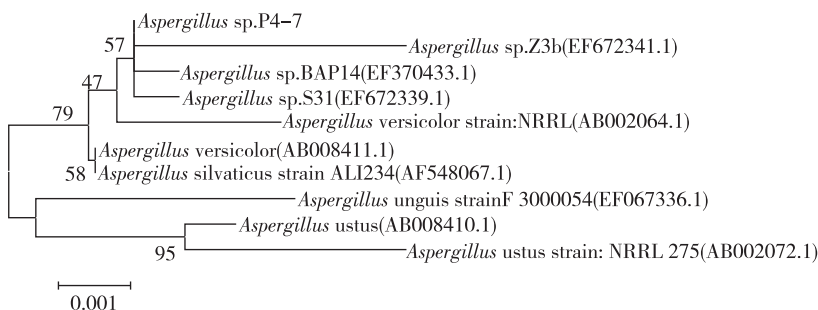


图 2 *Aspergillus* sp. P4-7 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Aspergillus* sp. P4-7

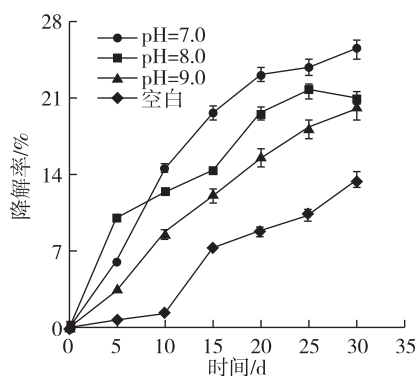


图 3 初始 pH 对 P4-7 降解 IPP 的影响

Fig.3 Effect of pH value on IPP degradation by strain P4-7

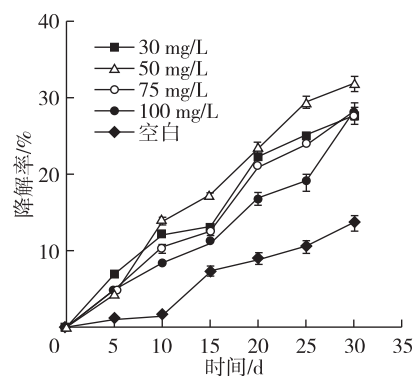


图 4 底物浓度对 P4-7 降解 IPP 的影响

Fig.4 Effect of IPP concentration on IPP degradation by strain P4-7

2.5 接种量对菌株降解哌虫啉的影响

在哌虫啉质量浓度为 50mg/L、pH 为 7 的基础培养基中,以 2%、5%、8%、12% 的接种量接种菌株

P4-7,取样周期为 5d,测定接种量对哌虫啉降解率的影响,结果如图 5 所示(空白对照试验接种浓度为 5%)。由图可知,接种量 2%~12% 时,IPP 在 0~10d 的降解率随着接种量的增大而增加,说明在降解初期,IPP-2 初始降解率与接种量呈正相关。培养后期,IPP-2 在不同接种量下降解率几乎相同。由此可得,P4-7 接种量对 IPP-2 在降解效果影响不大,在降解初期时,较大接种量有利于 IPP 较快降解,但最终降解效果一致。综合评定初步接种量为 5% 为最佳接种量,培养 30d IPP 降解率达到 29.03%。

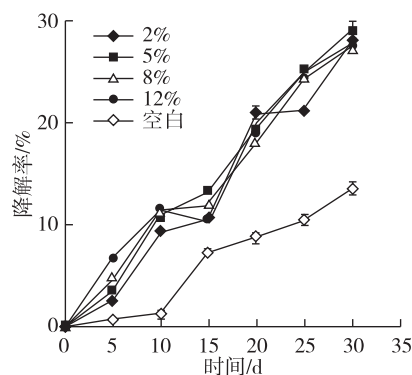


图 5 接种量对 P4-7 降解 IPP 的影响

Fig.5 Effect of inoculation on IPP degradation by strain P4-7

2.6 水体中哌虫啉降解产物及其代谢途径

采用萃取方法作为前处理手段,高效液相色谱—超高分辨飞行时间质谱联用技术(LC-MS/MS)作为产物结构检测手段,水体中各样品总离子流图见图 6(a)和图 6(b)。由图可知,共检测到 2 种代谢

产物,其中 IPP 保留时间分别是 17.1min(IPP-1)、19.3min(IPP-2),中间代谢产物 M1、M2 保留时间分别是 1.1min(M1)、21.2min(M2)。

IPP 的质谱图,保留时间为 17.1、19.3min,IPP 分子离子 m/z 367.153 9[M+H],与之前报道的质谱特征离子一致。

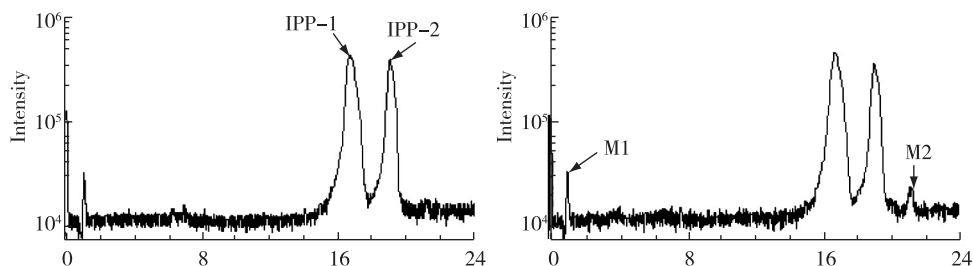


图 6 0 d 和 15 d 样品 TIC 图

Fig.6 Total ion chromatography of 0 d and 15 d samples

降解产物 M1:保留时间 1.1min,分子离子 m/z 325.108 8[M+H],降解产物 M1 结构见图 7(a)。由碎片离子推知,降解产物 M1 为 $C_{14}H_{17}ClN_4O_3$,化学名为 1-[(6-氯吡啶-3-基)甲基]-7-甲基-8-硝基-1,2,3,5,6,7-六氢咪唑并[1,2-a]吡啶-5-羟基,分子量 324.098 9。由结构式推测,中间代谢产物 M1 是 IPP 分子上丙氧基水解生成羟基所得。

降解产物 M2:保留时间 21.2min,分子离子 m/z 276.090 0[M+H],降解产物 M2 结构见图 7(b)。由碎片离子可推知,降解产物 M2 为 $C_{14}H_{14}ClN_3O$,其化学名为 1-[(6-氯吡啶-3-基)甲基]-7-甲基-2,3-二氢咪唑并[1,2-a]吡啶-5-酮,相对分子量 275.082 5。由结构式推测,中间代谢产物 M2 是由 IPP 分子去硝基、丙基并进一步氧化为羰基所得。

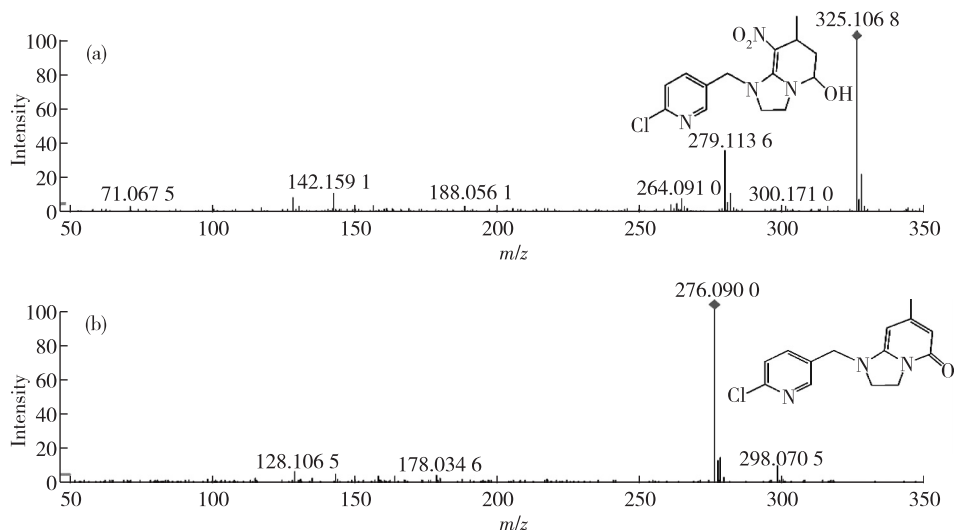


图 7 IPP 降解中间产物 M1 和 M2 质谱图

Fig.7 Mass spectra of metabolites formed during the degradation of IPP by the strain P4-7

文献报道代谢产物 M1 和 M2 同样存在于菌株 *Sphingobacterium* sp. P1-3 催化降解吡虫啉的水体系统中^[5],吡虫啉在好氧与厌氧土壤中降解特性的研究结果表明代谢产物 M1 和 M2 也存在于土壤代谢产物中^[6,16],其一级质谱和二级质谱均一致^[5-8,16]。本实验研究结果表明在菌株 P4-7 的催化作用下吡虫啉进行一系列的生物降解,产生 M1、M2 两种降解产物,代谢产物 M1 首先出现,M2 出现在 M1 之后,其代谢途径可能是 IPP 分子上丙氧基水解形成

羟基降解为 M1,M1 羟基氧化为羰基并去硝基降解为 M2(图 8)^[17-18]。

3 结 论

从常州市南郊农田土壤中富集、筛选出以吡虫啉为唯一碳源的 8 株降解菌。选择降解效果较好的菌株 P4-7 进一步研究,经 18S rDNA 测序,P4-7 属于为 *Aspergillus* sp.。对吡虫啉降解菌 *Aspergillus* sp. P4-7 最适生长条件及最大底物耐

受浓度进行研究。结果表明,菌株 P4-7 降解哌虫啉的最适 pH 为 7.0,最适接种量为 5%。在哌虫啉初始浓度低于 50mg/L 时,降解率高达 29%。*Aspergillus* sp. P4-7 在水体中催化降解哌虫啉,通过 HPLC 检测溶液中哌虫啉降解产物,并对样品进行

LC-MS/MS 分析,初步推断出哌虫啉在水体中的生物降解途径。菌株 P4-7 所具备的降解哌虫啉的特性及其应用还有待进一步研究,将菌株 P4-7 作为出发菌株进行基因工程育种,进一步提高该菌株的降解效率。

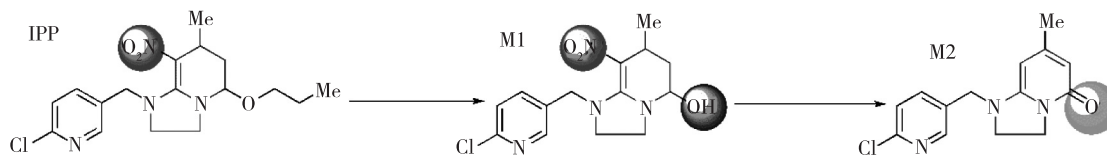


图 8 IPP 生物降解途径

Fig.8 Proposed pathway of IPP degradation by *Aspergillus* sp. P4-7

参考文献:

- [1]徐晓勇. 新颖杀虫剂—哌虫啉[J]. 世界农药, 2009, 31(4):52-53.
- [2]刘红, 克胜新品哌虫啉取得农药临时登记证[J]. 农药研究与应用, 2009, 13(5):33.
- [3]姚士桐, 陆志杰, 金周浩, 等. 哌虫啉对单季晚稻稻飞虱的防控效果[J]. 浙江农业科学, 2011, 1(2):335-336.
- [4]吴爱国, 徐宝玉, 吴伟, 等. 10%哌虫啉悬浮剂防治小麦田灰飞虱试验[J]. 湖北植保, 2010, 6:41-42.
- [5]CAI Z, ZHANG W, LI S, et al. Microbial degradation mechanism and pathway of the novel insecticide paichongding by a newly isolated *Sphingobacterium* sp. P1-3 from soil [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63: 3823-3829.
- [6]CAI Z, WANG J, MA J, et al. Anaerobic degradation pathway of the novel chiral insecticide Paichongding and its impact on bacterial communities in soils [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63:7151-7160.
- [7]LI J, ZHANG J, LI C, et al. Stereoisomeric isolation and stereoselective fate of insecticide Paichongding in flooded paddy soils [J]. Environ Sci Technol, 2013, 47: 12768-12774.
- [8]FU Q, WANG Y, ZHANG J, et al. Soil microbial effects on the stereoselective mineralization, extractable residue, bound residue and metabolism of novel chiral cis neonicotinoid, paichongding [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61:7689-7695.
- [9]FU Q, ZHANG J, XU X, et al. Diastereoselective metabolism of a novel cis-nitromethylene neonicotinoid paichongding in aerobic soils [J]. Environ Sci Technol, 2013, 47:10389-10396.
- [10]WANG H, YANG Z, LIU R, et al. Stereoselective uptake and distribution of the chiral neonicotinoid insecticide, Paichongding, in Chinese pak choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) [J]. J Hazard Mater, 2013, 262: 862-869.
- [11]FU Q, WANG W, WANG H, et al. Stereoselective fate kinetics of chiral neonicotinoid insecticide paichongding in aerobic soils [J]. Chemosphere, 2015, 138:170-175.
- [12]CAI Z, CHEN Q, WANG H, et al. Degradation of the novel herbicide ZJ0273 by *Amycolatopsis* sp. M3-1 isolated from soil [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(5):1371-1379.
- [13]蔡志强, 杨百科, 赵希岳, 等. 丙酯草醚降解菌 CY 的分离、鉴定及其降解特性[J]. 环境化学, 2011, 30(8): 1433-1438.
- [14]付秋果, 柳汝阳, 董永汉, 等. ¹⁴C-哌虫啉光学异构体在土壤中的矿化、结合残留及其在腐殖质中的分布[J]. 核农学报, 2013, 27(8):1195-1202.
- [15]ZHAO X, SHAO X, ZOU Z, et al. Photodegradation of novel nitromethylene neonicotinoids with tetrahydropyridine-fixed cis configuration in aqueous solution [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58:2746-2754.
- [16]CAI Z, MA J, WANG J, RONG Y, et al. Aerobic biodegradation kinetics and pathway of the novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide Paichongding in yellow loam and Huangshi soils [J]. Applied Soil Ecology, 2016, 98:150-158.
- [17]王丽, 郁莉萍, 陈春琴, 等. 一株假单胞菌对活性艳红 X-3B 的脱色研究[J]. 江苏工业学院学报, 2009, 21(2): 15-18.
- [18]秦薇, 梁玉婷, 刘勇俊, 等. 石油污染土壤中降解菌的分离鉴定及降解基因筛选[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2012, 21(4):1-7.

(责任编辑:殷丽莉)