

王慧,朱鸿康,姚培林,等. 一株氯氟氰菊酯降解菌的分离鉴定及降解条件优化[J]. 安全与环境学报, 2025, 25(12): 4808-4818.

WANG H, ZHU H K, YAO P L, et al. Isolation, identification, and optimization of degradation conditions for a cyhalothrin-degrading bacterial strain[J]. Journal of Safety and Environment, 2025, 25(12): 4808-4818.

一株氯氟氰菊酯降解菌的分离鉴定及降解条件优化*

王慧^{1,2},朱鸿康^{1,2},姚培林^{1,2},马正炫^{1,2},焦同禹^{1,2},操璟璟^{1,2},
赵文瑞^{1,2},王安¹,祖瑶³,胡淑宝³

(1 安庆师范大学资源环境学院,安徽安庆 246133;2 安徽省耕地质量智慧监测与地力提升重点实验室,
安徽安庆 246133;3 安庆师范大学生命科学学院,安徽安庆 246133)

摘要:针对氯氟氰菊酯(Cyfluthrin, CL)残留的环境风险,研究采用富集培养法从CL污染的土壤中分离、筛选、鉴定了一株降解菌 *Rhodococcus* sp. LJF-3,并通过 Plackett-Burman 因素筛选、最陡爬坡试验和 Box-Behnken Design 响应面分析法优化了其降解条件。在优化后,菌株 LJF-3 的最佳降解条件是:15 g/L 酵母粉,10 g/L 葡萄糖,0.5 g/L K_2HPO_4 ,0.5 g/L KH_2PO_4 ,1.0 g/L NaCl,0.5 g/L $MgSO_4$,培养基体积为 70 mL,接种体积分数为 6%,培养温度为 30 °C, pH 值为 7.0,转速为 180 r/min。优化后的菌株 LJF-3 在 42 h 内对 1 000 mg/L CL 降解率达 87.4%,较未优化前的降解率(38.9%)提高了 48.5 个百分点。研究为 CL 的微生物降解提供了优良的菌株资源,为 CL 污染环境的修复提供了技术支持和方法参考。

关键词:环境工程学;微生物降解;Plackett-Burman 筛选;Box-Behnken Design;氯氟氰菊酯

中图分类号:X592 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-6094(2025)12-4808-11

DOI: 10.13637/j.issn.1009-6094.2025.0982

0 引言

氯氟氰菊酯(Cyfluthrin, CL)是一种拟除虫菊酯类杀虫剂,主要通过触杀和胃毒作用,实现对昆虫的驱避、击倒和毒杀,对刺吸式口器害虫具有良好防治效果^[1-2]。近年来,CL 由于高生物活性和广谱性在农业害虫控制和公共卫生领域得到了广泛应用^[3]。然而,CL 具有较低的水溶性,难以降解,导致在环境和农产品中频繁检测到其残留,且 CL 通过食物链在哺乳动物和人体内积累^[4-5]。研究显示,CL 会对非靶标生物的免疫系统、神经系统以及血液循环系统等产生不利影响^[3,6]。因此,探究高效消减 CL 残留的方法和技术十分重要。

微生物降解是消除环境中 CL 的重要途径。1997 年,虞云龙等^[7]最先报道了降解 CL 的细菌——产碱杆菌(*Alcaligenes*) YF11,该细菌能以 CL 等多种拟除虫菊酯类农药为唯一碳源生长以进行去除。2004 年,Nirmali 等^[8]首次报道了降解 CL 的真

菌——绿色木霉(*Trichoderma Viride*)5-2,并对其降解产物进行了分离和鉴定。关于 CL 降解率的研究也有报道,如 2009 年,解开治等^[9]最先研究了微生物酶对 CL 降解率的影响,0.3 mL 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) XP12 的粗酶液在 30 °C、pH 值为 7.5 的条件下,20 min 内对 200 mg/L CL 降解率达 80%。2015 年,Chen 等^[10]分离并鉴定了一株能以 CL 作为唯一碳源的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) ZS-19,并第一次提出了微生物降解 CL 受高浓度底物抑制的观点。菌株 ZS-19 在 24 h 内对 100 mg/L CL 的降解率可达 61.5%,并在 72 h 内实现完全降解,但当 CL 质量浓度增加到 200 mg/L 以上时,降解率明显下降^[10]。2018 年,Tian 等^[11]分离了能有效降解 CL 的副球菌(*Paracoccus acridae*) SCU-M53,并首次研究了环境条件对 CL 降解率的影响。菌株 SCU-M53 在最佳条件下(28 °C、180 r/min),2 d 内对 75 mg/L CL 的降解率达 79.84%^[11]。2022 年,Abdelkader 等^[12]分离到 43 株 CL 降解菌株,但只有 4B、5A、7A、11B 和 AHB 这 5

* 收稿日期: 2025-06-09

作者简介:王慧,讲师,博士,从事有机污染物的微生物降解研究,2017216021@njau.edu.cn;胡淑宝(通信作者),副教授,博士,从事污染物的生物修复研究,shubao_hu@aqnu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(41907145);安徽省教育厅自然科学重点研究项目(2023AH050484,2024AH051113);安徽省高校数字种植业创新团队项目(2023AH010039);安庆师范大学大学生创新创业训练计划资助项目(X202510372075,X202510372076);环境科学专业服务安徽省新兴产业项目(2024fwxx028);安庆师范大学校级研究生质量工程项目(X2025kjxy003)

菌株可以降解 1 200 mg/L CL(高质量浓度),且降解所需时间长达 48 h。综上,虽然已有少数 CL 降解菌的报道,但其数量和种类依然不足,且能快速降解高浓度 CL 的降解菌更少。

Plackett-Burman(PB)因素筛选试验在环境微生物领域具有广泛应用,能够快速筛选出影响微生物生长和代谢的关键因素。最陡爬坡试验作为 PB 试验的后续试验,用于进一步筛选显著因素的影响区间。张鸣等^[13]通过单因素-响应面模型试验确定了小麦秸秆常温厌氧微生物发酵的最优预处理条件(NaOH 质量分数为 4.36%,预处理时间为 12.44 d)。本文在此方法基础上,通过 PB 因素筛选-最陡爬坡试验-Box-Behnken Design(BBD)响应面分析法,建立包含培养基组分和培养条件的 11 因子响应模型,以对显著因素进行更为全面的系统优化,从而找到最优的试验条件。

为了有效控制 CL 污染,本文以 CL 作为底物,旨在通过富集培养法分离筛选出 CL 降解菌株,并对其降解特性进行探究。以提高菌株对 1 000 mg/L CL 的降解率为目标,通过 PB 因素筛选、最陡爬坡试验和 BBD 响应面分析法,推算目标值的优化条件并验证,以期为 CL 的微生物降解提供优良的菌株资源,为 CL 污染的微生物修复奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和培养基

CL 原药(纯度 99%)由湖北兴琰新材料科技有限公司提供。每升 Luria-Bertani(LB)培养基含有以下成分:10.0 g 蛋白胨,5.0 g 酵母提取物,10.0 g NaCl。每升无机盐培养基(Minimal Slat Medium, MSM)含有以下成分:1.0 g NaCl,1.5 g K_2HPO_4 ,0.5 g KH_2PO_4 ,1.0 g NH_4Cl ,0.2 g $MgSO_4$ 。CL 降解培养基(Minimal Slat Medium Supplemented with Cyhalothrin, MMCL)由 MSM 添加特定浓度的 CL 作为唯一碳源配制而成。每升固体培养基由相应的液体培养基加入 15 g 琼脂粉制成。所有培养基的初始 pH 值均调整为 7.0,并在 121 °C 下高压灭菌 20 min。

1.2 CL 降解菌的分离和筛选

本文通过富集培养法分离菌株。在安徽省安庆市某农田收集受 CL 污染的土壤,按质量浓度为 50 g/L 溶于纯水,作为分离 CL 降解菌的初始富集液。将 5 mL 富集液转移到新鲜的 CL 初始质量浓度为 200 mg/L 的 100 mL MMCL 液体培养基中,并置于

30 °C,180 r/min 恒温摇床(THZ-XL,苏州硕舟科技有限公司)内培养。重复上述操作,每隔 3 d 传代一次,每一代均采用 200 mg/L MMCL 为筛选培养基。连续传代 5 次,目的是减少杂菌干扰,从而筛选出目标降解菌。在第 5 次传代时,设置 3 组平行试验和空白对照组(未接种富集液的 MMCL 培养基)并在相同条件下培养 3 d。使用紫外分光光度计(UV)和高效液相色谱(HPLC)测定 CL 的含量。与空白组相比,CL 含量显著减少,表明存在具有降解活性的富集培养物。将具有降解活性的富集液以 $10^{-8} \sim 10^{-4}$ 的梯度稀释,并取 0.10 mL 的各梯度稀释液均匀涂布在 CL 质量浓度为 200 mg/L 的 MMCL 固体培养基上。将培养皿倒置在 30 °C 恒温培养箱(303-3B,上海翰雨科技有限公司)中,直到菌落可见,选择形态特征明显不同的单菌落进行平板划线法纯化。分别将纯化的单菌落在 30 °C 和 180 r/min 的 LB 液体培养基中培养至对数中后期,室温下以 6 000g 离心 5 min,收集菌株的细胞沉淀。然后,用 MSM 液体培养基洗涤并悬浮至最终 OD_{600} 为 1.0,作为后续试验的种子液。将 5 mL 各菌株的种子液分别接种到 100 mL CL 质量浓度为 200 mg/L 的 MMCL 液体培养基中,并在 30 °C 和 180 r/min 条件下培养 3 d,以评估其降解活性。将 4 株表现出显著降解活性的菌株分别命名为 LJF-1、LJF-2、LJF-3 和 LJF-4,用 50% 甘油保存在 -80 °C 冰箱,并用于后续试验。

为了进一步筛选能降解高质量浓度 CL 的降解菌,用接种环挑取一环 -80 °C 冰箱保存的菌株 LJF-1、LJF-2、LJF-3 和 LJF-4,接种在 LB 液体培养基中,并放置于 30 °C,180 r/min 恒温摇床内活化培养至 OD_{600} 为 1.0 作为种子液。将体积分数为 5% 的上述种子液接种在 CL 质量浓度为 1 000 mg/L 的 MMCL 液体培养基中,放置于 30 °C,180 r/min 恒温摇床中培养 3 d。每组试验均设 3 次重复,以未接种菌液的 CL 质量浓度为 1 000 mg/L 的 MMCL 液体培养基为空白对照。

1.3 降解菌株 LJF-3 的鉴定

根据《伯杰鉴定细菌学手册》和 16S rRNA 序列分析鉴定降解效果最佳的菌株为 LJF-3^[14]。首先,通过高盐浓缩沉淀法提取菌株 LJF-3 的基因组 DNA,并使用标准 PCR 程序扩增 16S rRNA 基因,委托通用生物公司(安徽滁州)测序;其次,将 16S rRNA 基因序列输入国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)

数据库,并使用该网站上的 BLAST 搜索工具 (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行比对;最后,通过 Clustal X 软件(2.1 版本)进行多重数据对齐,使用 MEGA 软件(11.0 版本)进行系统发育分析,并通过邻接法构建系统发育树鉴定菌株 LJF-3^[15]。同时,参考刘波等^[16]的研究方法,对菌株 LJF-3 进行形态学观察和生理生化试验。

1.4 Plackett-Burman 因素筛选试验

根据单因素试验选择发酵变量,通过设计 PB 因素筛选试验、最陡爬坡试验和 BBD 响应面分析进行优化。基于单因素试验结果,确定温度、pH 值、接种量、培养基体积、转速、NaCl、K₂HPO₄、MgSO₄、葡萄糖和酵母粉质量浓度为影响 1 000 mg/L CL 降解率的 10 个重要变量(数据未显示)。使用 PB 试验从影响 CL 降解率的 10 个变量中筛选显著影响 CL 降解率的 3 个变量,每个参数设计两个水平,见表 1。此试验由 Design Expert 13.0.5 软件设计,以 1 000 mg/L

CL 降解率为响应值来确定每个变量的重要性程度,每组试验均设 3 次重复,见表 2。

1.5 显著因素最陡爬坡试验

根据 PB 设计的结果(表 2),选取 *D*(培养基体积)、*J*(葡萄糖质量浓度)和 *K*(酵母粉质量浓度)进行最陡爬坡试验,每组试验均设 3 次重复,试验设计与结果见表 3。CL 降解率先增加后减少,在第 4 组达到最高,因此选择第 4 组试验水平作为响应面优化试验的中心点。

1.6 Box-Behnken Design 响应面分析

使用 BBD 响应面分析确定 3 个显著性影响因子的最佳水平。为测量降解率的差异,设计 3 因素 3 水平试验,共进行了 17 次试验,并对中心点进行了 5 次重复(表 4)。回归分析和二阶多项式系数使用 Design Expert 13.0.5 软件计算。

1.7 CL 的检测及数据分析

紫外扫描法:取 1.0 mL 待测液体培养基或菌悬

表 1 PB 设计不同水平的试验变量用于优化 CL 的降解率

Table 1 Experimental variables at different levels used for optimization of degradation rate of CL using PB design

试验值	温度 <i>A</i> /°C	pH <i>B</i>	接种量 <i>C</i> /%	培养基 体积 <i>D</i> /mL	转速 <i>E</i> / (r · min ⁻¹)	氯化钠质 量浓度 <i>F</i> /(g · L ⁻¹)	磷酸氢二钾 质量浓度 <i>G</i> /(g · L ⁻¹)	硫酸镁质 量浓度 <i>H</i> / (g · L ⁻¹)	葡萄糖质 量浓度 <i>J</i> / (g · L ⁻¹)	酵母粉质 量浓度 <i>K</i> / (g · L ⁻¹)
低(-1)	25	6.5	5	40	160	0.5	0.2	0.2	15	20
高(+1)	35	7.5	7	60	200	1.5	0.8	0.8	25	30

表 2 基于 PB 设计的编码变量对实测 CL 降解率的影响矩阵

Table 2 PB design matrix for variables with coded values along with the tested degradation rate of CL

批次	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>J</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>J</i>	<i>K</i>	降解率/%
1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	44.91 ± 0.04
2	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	15.11 ± 0.02
3	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	42.96 ± 0.09
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	14.6 ± 0.04
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	37.89 ± 0.07
6	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	34.56 ± 0.06
7	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	18.75 ± 0.05
8	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	81.89 ± 0.14
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	44.61 ± 0.07
10	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	27.34 ± 0.09
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	41.77 ± 0.11
12	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	48.08 ± 0.08

注: +1 和 -1 分别表示高水平和低水平,编码数值与表 1 相对应。

表 3 最陡爬坡试验设计与结果
Table 3 Steepest ascent design with experimental results

批次	培养基体积/mL	葡萄糖质量浓度/(g · L ⁻¹)	酵母粉质量浓度/(g · L ⁻¹)	降解率/%
1	40	25	30	15.13 ± 0.07
2	50	20	25	60.46 ± 0.06
3	60	15	20	81.88 ± 0.09
4	70	10	15	87.45 ± 0.11
5	80	5	10	58.71 ± 0.04

表 4 基于 CL 降解率的实测值和预测值的 BBD 试验设计及模型验证
Table 4 BBD matrix for the experimental design and model validation with observed and predicted responses for degradation rate of CL

批次	符号代码			降解率/%	
	X ₁ ^a	X ₂ ^b	X ₃ ^c	实测	预测
1	0	0	0	87.49 ± 0.11	87.46
2	0	1	1	77.18 ± 0.14	78.06
3	-1	-1	0	66.59 ± 0.12	63.59
4	-1	1	0	66.18 ± 0.07	66.83
5	1	-1	0	66.21 ± 0.09	65.55
6	0	0	0	87.41 ± 0.10	87.46
7	0	0	0	87.43 ± 0.09	87.46
8	0	0	0	87.55 ± 0.08	87.46
9	-1	0	-1	68.47 ± 0.14	69.89
10	0	-1	-1	80.61 ± 0.10	79.74
11	0	1	-1	80.88 ± 0.13	77.93
12	0	-1	1	76.65 ± 0.07	79.61
13	0	0	0	87.43 ± 0.09	87.46
14	-1	0	1	67.11 ± 0.07	68.07
15	1	1	0	55.94 ± 0.04	58.95
16	1	0	-1	66.05 ± 0.06	65.11
17	1	0	1	68.34 ± 0.11	66.93

注: X₁^a代表培养基体积, 编码 -1, 0 和 1 分别代表 60 mL, 70 mL 和 80 mL; X₂^b代表葡萄糖质量浓度, 编码 -1, 0 和 1 分别代表 5 g/L, 10 g/L 和 15 g/L; X₃^c代表酵母粉质量浓度, 编码 -1, 0 和 1 分别代表 10 g/L, 15 g/L 和 20 g/L。

液, 室温下 12 000g 离心 10 min, 弃去沉淀, 使用岛津 UV-2401PC 紫外扫描仪于 200 ~ 400 nm 连续扫描, 根据 276.8 nm 处的 LC 特征吸收峰的强度来确定降解活性。

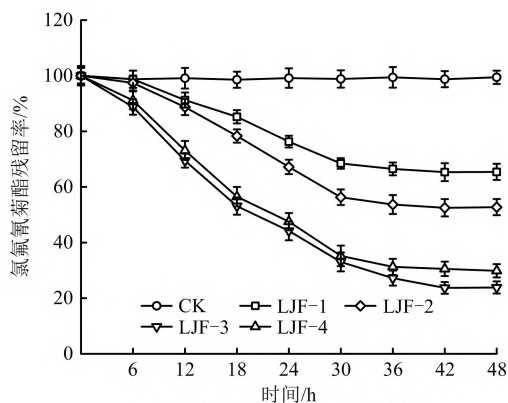
HPLC 分析: 将待测样品 12 000g 离心 10 min, 吸取上层水相, 用 0.22 μm 有机相滤膜过滤两次后

进行 HPLC 分析。液相色谱条件是: 液相色谱仪型号为 Dionex UltiMate 3000; 液相色谱柱为 C₁₈ 反相柱, 规格为 250 mm × 4.6 mm × 5 μm (柱长 × 内径 × 粒径); 检测时间为 0 ~ 15 min; 流动相为乙腈与 H₂O, 体积比为 80: 20; 柱温为 30 °C; 流速为 0.8 mL/min; 检测波长为 276.8 nm。

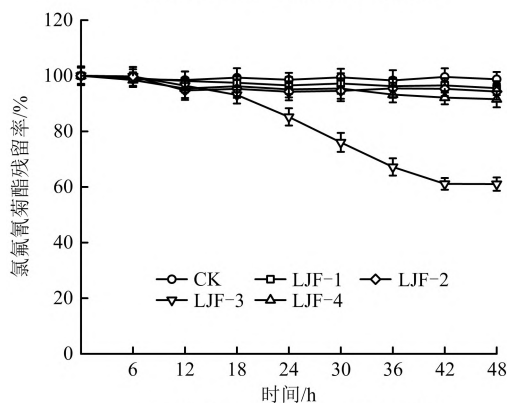
2 结果与分析

2.1 CL 降解菌的分离和筛选

本文从安庆市某农田的污染土壤样品中分离出了4株降解CL的菌株,分别命名为LJF-1、LJF-2、LJF-3和LJF-4。以质量浓度为200 mg/L CL为唯一碳源,降解情况见图1(a)。其中,菌株LJF-1和LJF-2在最初6 h内降解CL的速率严重滞后,推测菌株LJF-1和LJF-2中参与CL降解初始步骤的酶可能需要诱导,这不利于CL的快速降解。而菌株LJF-3和LJF-4表现出对CL的快速降解能力,其降解反应没有任何滞后现象。在污染原位修复过程中,外源添加的降解菌通常存活时间有限,活菌数会随着时间推移而逐渐减少,因此急需快速降解污染物的菌株。本文分离的菌株LJF-3和LJF-4具有能快速降解CL的优势,更适合于快速修复受CL污染的场地。如图1(b)所示,菌株LJF-3在30℃, pH值为7.0的条件下,42 h内对1 000 mg/L CL(高质量浓度)的降解率仍达38.9%。而菌株LJF-1,



(a) 菌株对200 mg/L CL的降解情况



(b) 菌株对1 000 mg/L CL的降解情况

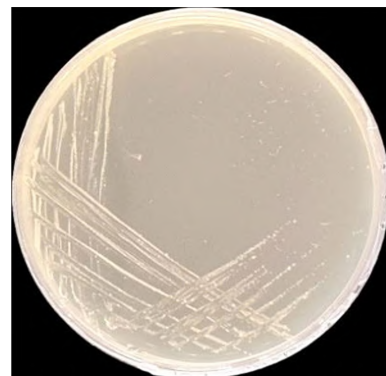
图1 每个菌株分别对200 mg/L和1 000 mg/L CL的降解情况

Fig. 1 Degradation of 200 mg/L and 1 000 mg/L CL by strains respectively

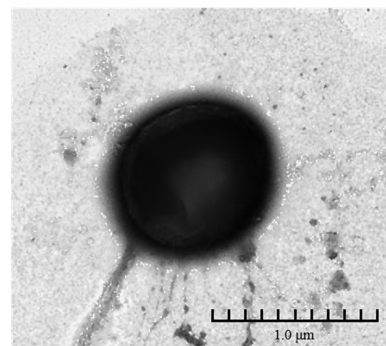
LJF-2和菌株LJF-4对1 000 mg/L CL的降解效果均不明显。因此,鉴定菌株LJF-3最优并将其作为后续试验的研究对象。

2.2 菌株LJF-3的鉴定

具有最佳降解活性的LJF-3菌株在CL质量浓度为200 mg/L的MMCL固体培养基上生长48 h后,乳白色菌落光滑凸起,见图2(a)。在扫描电镜下,菌株LJF-3单细胞呈现圆形或椭圆形,直径约0.8~1.0 μm,见图2(b)。菌株LJF-3的16S rRNA基因序列由通用生物公司(安徽滁州)扩增和测序,并上传至NCBI数据库(登录号PQ803889)。本文基于菌株LJF-3的16S rRNA基因序列构建了系统发育树,见图3。菌株LJF-3与红球菌属(*Rhodococcus*)的遗传关系最密切,与*Rhodococcus* sp. T3-1、*Rhodococcus* sp. W-LS-3、*Rhodococcus* sp. P15的相似度分别为99.93%、99.93%和99.86%。结合菌株LJF-3的生理生化测试,菌株LJF-3的苯丙氨酸芳胺酶、L-乳酸盐碱化和酪氨酸芳胺酶检测结果呈现阳性,其他均呈现阴性。综上,将菌株LJF-3鉴定为红球菌属(*Rhodococcus*)。



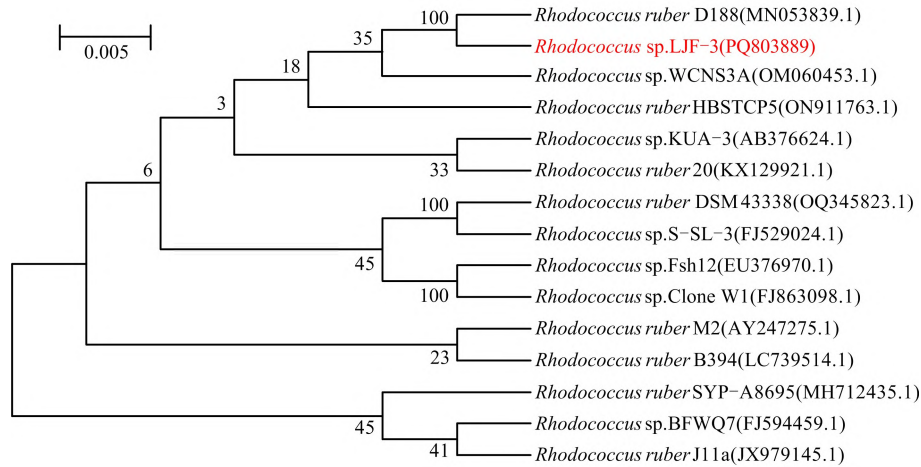
(a) 菌株LJF-3在MMCL平板上的菌落照片



(b) 菌株LJF-3的扫描电镜照片

图2 菌株LJF-3在MMCL平板上的菌落照片和扫描电镜照片

Fig. 2 Photo of strain LJF-3 cultured on MMCL plate and taken by scanning electron microscope



基于 16S rRNA 基因序列构建的邻接法系统发育树,显示菌株 LJF-3 与相关分类单元之间的亲缘关系。节点处标注的自举值(%)表示分支置信度,比例尺代表每个位点 0.005 个核苷酸替换率。

图 3 基于 16S rRNA 基因构建的菌株 LJF-3 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed on the basis of 16S rRNA gene sequences of strain LJF-3

2.3 降解条件的优化

如表 5 所示,根据 PB 设计结果,因素 J (葡萄糖质量浓度) 的偏回归系数为 -10.47 ,标准误差为 2.40 ,影响水平 $E = -20.94$,表明葡萄糖质量浓度对菌株 LJF-3 的降解率呈负影响。因此,在后续的优化试验中减少了 J 。 J 的贡献值为 35.36% ,显著高于 $A, B, C, D, E, F, G, H, K$ 。此外, K (酵母粉质量浓度) 和 D (培养基体积) 的贡献值分别为 28.59% 和 21.17% ,仅次于 J 的贡献值,远高于其他因素的贡

献值,而虚拟因子 L 只有 0.595% ,这些结果表明线性模型适用。同时, D, J, K 的影响水平 (E) 分别为 $16.21, -20.94$ 和 -18.83 ,绝对值也远高于其他因素的影响水平。因此,在后续最陡爬坡试验中,选取 D, J, K 作为优化对象。通过多元变量回归分析,得到二阶模型方程, $Y = 37.71 + 8.10D - 10.47J - 9.42K$,以拟合菌株 LJF-3 的降解率。其中, Y 为预测降解率。结果显示, p (Prob > F) 为 0.0011 ,表明方程显著。

表 5 偏回归系数及显著性分析

Table 5 Partial regression coefficients and significance analysis

因素	回归系数	标准差	E	贡献值/%	平方和	是否显著 ($p < 0.05$)
截距	37.71	2.40				
A	-1.61	2.40	3.23	0.84	31.20	否
B	1.11	2.40	2.22	0.40	14.81	否
C	3.56	2.40	7.12	4.09	152.01	否
D	8.10	2.40	16.21	21.17	787.81	是
E	2.82	2.40	5.64	2.57	95.49	否
F	2.72	2.40	5.43	2.38	88.51	否
G	3.69	2.40	7.38	4.39	163.47	否
H	-0.81	2.40	-1.63	0.21	7.95	否
J	-10.47	2.40	-20.94	35.36	1 315.66	是
K	-9.42	2.40	-18.83	28.59	1 063.90	是

本文基于PB设计研究获得的数据,选取葡萄糖质量浓度、酵母粉质量浓度和培养基体积进行了5组最陡爬坡试验。为了分别呈现负影响、负影响和正影响,设置培养基体积递增,葡萄糖质量浓度和酵母粉质量浓度递减,试验设计与结果见表3。从表3可以看出,CL降解率先增加后减少,在第4组达到最高(87.45%±0.11%),因此选择第4组试验水平(培养基体积为70 mL,葡萄糖质量浓度为10 g/L,酵母粉质量浓度为15 g/L)作为响应面优化试验的中心点。

通过BBD响应面分析法进一步研究了3个显著变量,以确定最佳水平和相互作用。试验设计包括菌株降解率实测值和预测值,见表4。本文利用该模型模拟了最优条件下的发酵过程,完整的二次方程(编码方程)为

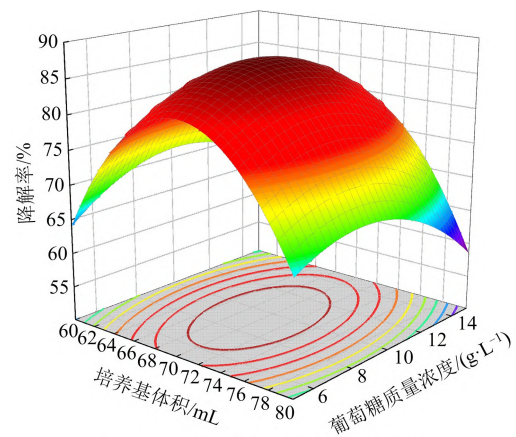
$$Y = 87.46 - 1.48X_1 - 1.23X_2 - 0.84X_3 - 2.47X_1X_2 + 0.91X_1X_3 + 0.065X_2X_3 - 17.53X_1^2 - 6.20X_2^2 - 2.43X_3^2 \quad (1)$$

式中 X_1 、 X_2 、 X_3 分别为培养基体积(mL)、葡萄糖质量浓度(g/L)和酵母粉质量浓度(g/L); Y 表示预测降解率(%)。

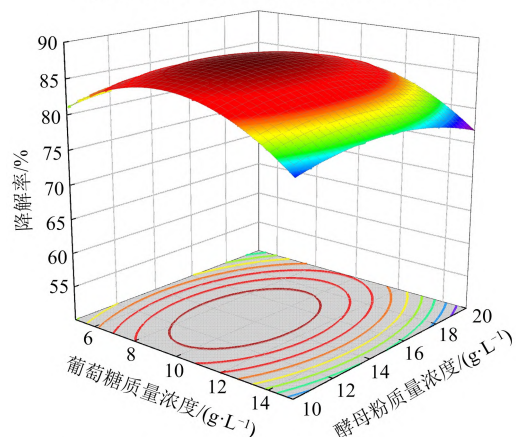
方差分析表明,回归模型的一般回归关系达到极显著水平,回归方程拟合 R^2 为 0.977 9, 相关性强;修正后的决定系数为 0.994 5, 表明筛选试验中 99.45% 的数据可以被解释, $p < 0.001$ 表明该模型可以很好地拟合菌株 LJF-3 的降解率。综上,该模型能够充分优化菌株 LJF-3 降解氯氟氰菊酯的过程。

三维响应面图和各自的等值线图见图4。在3个显著因素中,任意两个均呈现两两相互作用。任意两个响应面在峰值点之间的相互作用表明,所选显著因素在3个试验水平范围内存在最大值。本文在最佳条件下进行验证试验:酵母粉质量浓度为15 g/L,葡萄糖质量浓度为10 g/L, K_2HPO_4 质量浓度为0.5 g/L, KH_2PO_4 质量浓度为0.5 g/L, NaCl 质量浓度为1.0 g/L, $MgSO_4$ 质量浓度为0.5 g/L,培养基体积为70 mL,接种体积分数为6%,温度为30℃,pH值为7.0,转速为180 r/min。优化前后的降解率的变化见图5。验证试验表明,优化后比优化前(1 000 mg/L CL的100 mL MMCL培养基,接种体积分数为5%,温度为30℃,pH值为7.0,转速为180 r/min)的降解率提高了48.5个百分点。因此,菌株 LJF-3 在最优条件下的降解符合模型,并大幅提高了生物量。

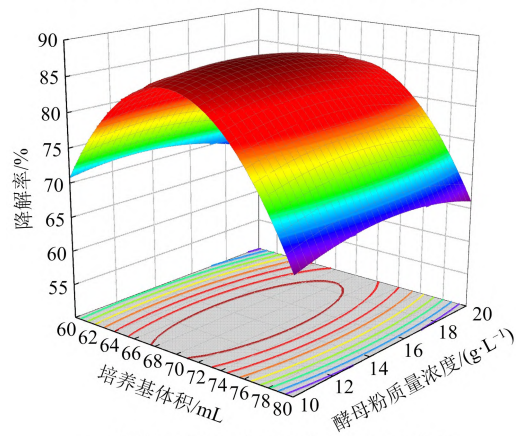
4814



(a) 培养基体积和葡萄糖质量浓度交互作用



(b) 葡萄糖质量浓度和酵母粉质量浓度交互作用



(c) 培养基体积和酵母粉质量浓度交互作用

图4 多因素交互作用对菌株 LJF-3 降解 CL 的响应面图

Fig. 4 Response surface for the interaction effects of multiple factors on the CL degradation rate of strain LJF-3

3 讨论

拟除虫菊酯类杀虫剂占据了全球农药市场约25%的份额,并且其使用量还在不断增长,经常在地

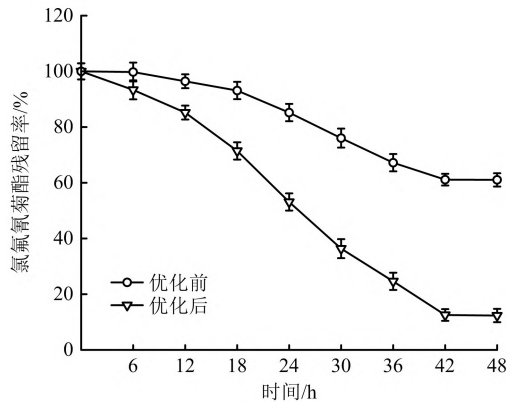


图5 优化前后菌株 LJF-3 降解 CL 的残留率比较

Fig. 5 Comparison of CL residual rate by strain LJF-3 before and after optimization

表水(全球最高达 13 mg/L)、沉积物和农产品中检测到残留^[17-18]。拟除虫菊酯类杀虫剂在环境中的大量残留不仅对水生生物,如鱼类、虾类和贝类有极高的毒性,也会影响哺乳动物和昆虫肠道稳态^[18-19],甚至通过食物链对整个生态系统产生连锁反应,导致生态平衡破坏。含有拟除虫菊酯农药残留的土壤样品显示出具有相应耐受或降解能力的微生物多样性和丰度增加,以及其他微生物的多样性和丰度减少^[1,20]。为了解决这一问题,微生物降解技术作为一种环保且高效的方法被学者提出^[17,12]。

基于微生物种类和代谢途径的多样性,通过富集培养法,筛选高效降解特定农药残留的菌株。据报道,研究者已经从相应的污染土壤中分离出一些降解 CL 的细菌,并发现培养基中 CL 的初始浓度增加了农药降解的滞后期,从而降低了细菌生长速率^[21-22]。目前,在分离到的菌株中,只有 5 株枯草芽孢杆菌可以降解高质量浓度(1 200 mg/L)的 CL,且没有延滞期,48 h 后的降解率达到 95% 以上,表明高效降解菌株很少,高质量浓度 CL 可能会对降解微生物产生毒害^[12]。例如,利用 CL 作为唯一碳源的苏云金芽孢杆菌菌株 ZS-19,其降解效率随着 CL 浓度的增加而下降^[10]。当 CL 初始质量浓度分别增加到 200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L 和 800 mg/L 时,72 h 内降解率分别为 95.5%、87.4%、84.0% 和 82.1%^[10]。除此之外,微生物降解高浓度的 CL 均明显受底物抑制^[23-24]。本文研究分离的菌株 LJF-3 属于红球菌属(*Rhodococcus*),该属菌株通常具备抗逆性强和生长代谢快等优势,因此具有强大的环境适应性,值得进一步研究^[25-26]。红球菌属(*Rhodococcus*)通常具有丰富的加氧酶,尤其是针对

含苯环的化合物,例如 CL,可通过羟基化、开环和侧链氧化等途径进行降解,而双加氧酶、单加氧酶等在这些反应过程中发挥关键作用^[27]。在这些酶的作用下,CL 被破坏,并生成低分子量的化合物,如苯甲酸、邻苯二甲酸等,这些化合物还会在菌株作用下进一步被分解为二氧化碳和水等无机物。菌株 LJF-3 对高质量浓度 CL 耐受性强,42 h 内对 1 000 mg/L CL 仍有 38.9% 降解率,是一株在较短时间内对高质量浓度 CL 有明显降解效果的优良菌株。

为了进一步提高菌株 LJF-3 的降解效果,优化菌株培养基组分和培养条件是一种重要的方法。在前人研究中,通过 PB 因素筛选试验和 BBD 响应面分析,使鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*) DC-6 的生物量较优化前提高了 22%,从而提高了菌株 DC-6 对高浓度乙草胺的降解率^[28]。胡琼等^[29]对溴氰菊酯降解菌株——不动杆菌(*Acinetobacter junii*) LH-1-1 的降解条件进行了优化,通过设计 PB 因素筛选试验、最陡爬坡试验和 BBD 响应面分析,发现优化后的菌株 LH-1-1 对 75 mg/L 溴氰菊酯的降解率达 82.36%,较未优化前提高了 28.9 个百分点。本文研究则是直接以高质量浓度 CL 的降解率为响应值,经 PB 因素筛选、最陡爬坡试验和 BBD 响应面分析法优化后,菌株 LJF-3 在 42 h 内对 1 000 mg/L CL 降解率达到 87.4%,较未优化前的降解率(38.9%)提高了 48.5 个百分点,表明本文对降解条件优化的方案设计合理有效。Majid 等^[30]采用 BBD 响应面分析法优化青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)分解联苯菊酯(10 mg/L)的理想条件,发现在富营养化条件和富含葡萄糖的培养基中,这种真菌会与联苯菊酯共代谢。本文研究中培养基组分添加葡萄糖和酵母粉作为碳氮源后,降解效率明显提高,表明菌株 LJF-3 优异的降解能力也可能依赖于共代谢。液体培养基体积与培养基中的溶解氧含量密切相关,优化后培养基体积由原来的 100 mL 下降至 70 mL,表明菌株 LJF-3 可能通过好氧降解途径降解 CL,在降低培养基体积后,溶解氧含量增加,从而提高了 CL 的降解率。综上,菌株 LJF-3 在 CL 污染的生物修复中具有潜力,本文研究为 CL 污染的生物修复提供了技术参考。

4 结 论

CL 广泛应用于农业中病虫害的防治,微生物降解是消减环境中 CL 的重要途径。研究筛选出 4 株降解 CL 的菌株,其中菌株 LJF-3 在最适降解条件

下,42 h内可降解76.3%的200 mg/L CL,且对1 000 mg/L CL(高质量浓度)的降解率仍有38.9%。通过菌株的生理生化分析及16S rRNA测序和比对,鉴定其为红球菌属(*Rhodococcus*)。

通过PB因素筛选、最陡爬坡试验、BBD响应面分析法优化其降解条件,优化后菌株LJF-3的最佳降解条件为酵母粉质量浓度为15 g/L,葡萄糖质量浓度为10 g/L, K_2HPO_4 质量浓度为0.5 g/L, KH_2PO_4 质量浓度为0.5 g/L, NaCl质量浓度为1.0 g/L, $MgSO_4$ 质量浓度为0.5 g/L,培养基体积为70 mL,接种体积分数为6%,温度为30 ℃,pH值为7.0,转速为180 r/min。优化后的菌株LJF-3在42 h内对1 000 mg/L CL降解率达到87.4%,较未优化前的降解率(38.9%)提高了48.5个百分点。本文为CL的微生物降解提供了优良的菌株资源,为农药降解菌在环境修复中的实际应用奠定了理论基础。

参考文献(References):

- [1] ZHANG Q, ZHANG Y, DU J, et al. Environmentally relevant levels of λ -cyhalothrin, fenvalerate, and permethrin cause developmental toxicity and disrupt endocrine system in zebrafish (*Danio rerio*) embryo[J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 1173–1180.
- [2] 田莹, 谢德芳, 阳辛凤, 等. 高效氯氟氰菊酯在香蕉中的残留消解及膳食风险评估[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(15): 198–203.
TIAN Y, XIE D F, YANG X F, et al. Dissipation, residues and dietary risk assessment of lambda-cyhalothrin in bananas [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(15): 198–203.
- [3] 王晓慧, 商文贤, 徐宏英, 等. 高效氯氟氰菊酯的微生物降解研究进展[J]. *化学与生物工程*, 2020, 37(3): 7–14.
WANG X H, SHANG W X, XU H Y, et al. Research progress in microbial degradation of lambda-cyhalothrin [J]. *Chemistry Bioengineering*, 2020, 37(3): 7–14.
- [4] 曹建涛, 毕思远, 朱志强, 等. QuEChERS-气相色谱-电子捕获检测器监测浆果类水果常用的5种菊酯类农药残留[J]. *化学工程师*, 2019, 33(7): 4.
CAO J T, BI S Y, ZHU Z Q, et al. QuEChERS-GC/ECD method for detection of 5 pyrethroid pesticides residues in berry fruits[J]. *Chemical Engineer*, 2019, 33(7): 4.
- [5] 包云航. 四川“M”区2020—2022年蔬菜中农药残留情况检测及安全监管改善措施[D]. 成都: 四川农业大学, 2023.
- [6] BAO Y H. Detection of pesticide residues in vegetables and improvement measures for safety supervision in “M” district of Sichuan from 2020 to 2022 [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2023.
- [7] BOWNIK A, KOWALCZYK M, BAŃCZEROWSKI J. Lambda-cyhalothrin affects swimming activity and physiological responses of *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2019, 216: 805–811.
- [8] 虞云龙, 宋凤鸣, 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*, 1997, 23(2): 111–115.
YU Y L, SONG F M, ZHENG Z, et al. Isolation and identification of a broad-spectrum bacterial strain (*Alcaligenes* sp.) degrading pesticides [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1997, 23(2): 111–115.
- [9] NIRMALI S, MADHUBAN G. Biodegradation of β -cyfluthrin by fungi[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 1220–1223.
- [10] 解开治, 徐培智, 陈建生, 等. 恶臭假单胞菌XP12对拟除虫菊酯类农药的酶促降解特性及其应用研究[J]. *广东农业科学*, 2009, 12: 156–160.
JIE K Z, XU P Z, CHEN J S, et al. *Pseudomonas putida* XP12's enzymatic degradation in pyrethroid pesticides and its application study [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2009, 12: 156–160.
- [11] CHEN S, DENG Y, CHANG C, et al. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19 [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8784–8783.
- [12] TIAN J, LONG X, ZHANG S, et al. Screening cyhalothrin degradation strains from locust epiphytic bacteria and studying *Paracoccus acridae* SCU-M53 cyhalothrin degradation process [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(12): 11505–11515.
- [13] ABDELKADER A A, KHALIL M S, MOHAMED M S M. Simultaneous biodegradation of λ -cyhalothrin pesticide and *Vicia faba* growth promotion under greenhouse conditions [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 2022, 12(1): 44.
- [14] 张鸣, 李昂, 李雪, 等. 不同NaOH预处理浓度和预处理时间对麦秆常温厌氧发酵效率的影响[J]. *安全与环境学报*, 2024, 24(1): 271–279.

- ZHANG M, LI A, LI X, et al. The influence of different NaOH pretreatment concentrations and pretreatment times on the anaerobic fermentation efficiency of wheat straw at room temperature [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2024, 24(1): 271 – 279.
- [14] BUCHANAN R E, GIBBONS N E, COWAN S T, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 217 – 243.
- [15] SUZUKI T, YAMASATO K. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 115 (1): 13 – 17.
- [16] 刘波, 唐洁, 陈廷廷, 等. 两株拟除虫菊酯类农药降解菌的分离鉴定及其降解能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(4): 214 – 219.
- LIU B, TANG J, CHEN T T, et al. Isolation and identification of two pyrethroid pesticides degradation strains and research of degradative capabilities [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38 (4): 214 – 219.
- [17] FAN X, ZHAO M, WEN H, et al. Enhancement degradation efficiency of pyrethroid-degrading esterase (Est816) through rational design and its application in bioremediation[J]. *Chemosphere*, 2023, 319: 138021.
- [18] ZHENG W, XU L, JIN M, et al. Effects of lambda-cyhalothrin on gut microbiota and related bile acid metabolism in mice[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 480: 136417.
- [19] XU D, GAO Y, SUN B, et al. Pyrethroid carboxylesterase PytH from *Sphingobium faniae* JZ - 2: structure and catalytic mechanism [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(12): e02971 – 19.
- [20] DOU R, SUN J, DENG F, et al. Contamination of pyrethroids and atrazine in greenhouse and open-field agricultural soils in China [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 701: 134916.
- [21] ZHANG X, HAO X, HUO S, et al. Isolation and identification of the *Raoultella ornithinolytica* - ZK4 degrading pyrethroid pesticides within soil sediment from an abandoned pesticide plant [J]. *Archives of Microbiology*, 2019, 201: 1207 – 1217.
- [22] HU W, LU Q, ZHONG G, et al. Biodegradation of pyrethroids by a hydrolyzing carboxylesterase EstA from *Bacillus cereus* BCC01 [J]. *Applied Sciences*, 2019, 9 (3): 477.
- [23] KHAN M F, MURPHY C D. *Cunninghamella* spp. produce mammalian-equivalent metabolites from fluorinated pyrethroid pesticides [J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 101.
- [24] PALMER-BROWN W, DE MELO SOUZA P L, MURPHY C D. Cyhalothrin biodegradation in *Cunninghamella elegans* [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(2): 1414 – 1421.
- [25] WANG H, LIU X, WU C, et al. An angular dioxygenase gene cluster responsible for the initial phenazine-1-carboxylic acid degradation step in *Rhodococcus* sp. WH99 can protect sensitive organisms from toxicity [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 706(2020): 135726.
- [26] WANG H, WANG X, ZU Y, et al. A stress-tolerant strain *Rhodococcus* sp. WH103 was isolated and co-immobilized to more efficiently degrade phenazine-1-carboxylic acid [J]. *Scientific Reports*, 2025, 15 (1): 13073.
- [27] 谭娅文, 张千柔, 徐迦南, 等. 基于近 10 年红球菌发展的文献计量分析 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49 (11): 4934 – 4941.
- TAN Y W, ZHANG Q R, XU J N, et al. A bibliometric analysis of research on development of *Rhodococcus* over the past decade [J]. *Microbiology China*, 2022, 49 (11): 4934 – 4941.
- [28] WANG H, JIANG K, ZHU Z, et al. Optimization of fed-batch fermentation and direct spray drying in the preparation of microbial inoculant of acetochlor-degrading strain *Sphingomonas* sp. DC - 6 [J]. *3 Biotech*, 2018, 8: 1 – 9.
- [29] 胡琼, 唐洁, 雷丹, 等. 一株溴氰菊酯降解菌的分离鉴定及其降解条件优化 [J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 699 – 709.
- HU Q, TANG J, LEI D, et al. Isolation, identification and optimization of degradation conditions of a deltamethrin degrading strain [J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 699 – 709.
- [30] MAJID S, AHMAD K S, AL - QAHTANI W H, et al. Microbial detoxification of bifenthrin insecticide by selected fungal strains and optimizing conditions using response surface methodology for agricultural sustainability [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2023, 195(10): 1214.

Isolation, identification, and optimization of degradation conditions for a cyhalothrin-degrading bacterial strain

WANG Hui^{1,2}, ZHU Hongkang^{1,2}, YAO Peilin^{1,2}, MA Zhengxuan^{1,2}, JIAO Tongyu^{1,2},
CAO Jingjing^{1,2}, ZHAO Weirui^{1,2}, WAN An¹, ZU Yao³, HU Shubao³

(1 College of Resources and Environment, Anqing Normal University, Anqing 246133, Anhui, China;

2 Anhui Provincial Key Laboratory of Intelligent Monitoring and Productivity Improvement of Cultivated Land, Anqing 246133, Anhui, China;

3 College of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, Anhui, China)

Abstract: To tackle the environmental risks posed by Cyfluthrin (CL) residues, this study utilized enrichment culture methods to isolate CL-degrading bacterial strains. CL-contaminated soil served as the enrichment medium, while a Minimal Medium (MMCL) with CL as the sole carbon source was used for screening. This approach led to the isolation of four strains: LJF-1, LJF-2, LJF-3, and LJF-4. Notably, strain LJF-3 demonstrated rapid degradation of 200 mg/L CL, achieving a degradation rate of 38.9% even at 1 000 mg/L. Based on 16S rRNA gene sequencing (GenBank accession number PQ803889), strain LJF-3 exhibited 99.93% sequence similarity to *Rhodococcus* species in the NCBI database. Physiological and biochemical tests yielded positive results for phenylalanine arylamidase, L-lactic acid alkalization, and tyrosine arylamidase, while other tests returned negative results. Consequently, strain LJF-3 was identified as a species of *Rhodococcus*. To enhance its degradation efficiency, an 11-factor, 3-level Plackett-Burman experimental design was employed, identifying culture volume, glucose concentration, and yeast extract concentration as significant factors. Follow-up steepest ascent experiments with five gradient groups determined the optimal conditions: a culture volume of 70 mL, glucose concentration of 10 g/L, and yeast extract concentration of 15 g/L. A Box-Behnken Design Response Surface Methodology (RSM) was subsequently employed to optimize these three factors, with results indicating a well-fitted model ($p < 0.001$). The optimized conditions for strain LJF-3 included: 15 g/L yeast extract, 10 g/L glucose, 0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L KH_2PO_4 , 1.0 g/L NaCl, 0.5 g/L $MgSO_4$, a culture volume of 70 mL, 6% inoculation volume, incubation at 30 °C, pH 7.0, and agitation at 180 r/min. Under these optimized conditions, strain LJF-3 achieved an impressive degradation rate of 87.4% for 1 000 mg/L CL within 42 hours, representing a 48.5 percentage point increase compared to the unoptimized rate of 38.9%. In summary, the optimization strategy significantly enhanced CL degradation by strain LJF-3. This study provides a valuable microbial resource and technical framework for the remediation of CL pollution, offering insights for future environmental bioremediation applications.

Key words: environmental engineering; microbial degradation; Plackett-Burman screening; Box-Behnken Design; cyhalothrin