

除草剂氟磺胺草醚降解菌 FB8 的分离鉴定与土壤修复

杨峰山^{1,2#}, 刘亮^{1#}, 刘春光^{1*}, 李云龙¹, 于慧颖¹, 宋福强¹, 耿贵^{1,2}

¹ 黑龙江大学生命科学学院, 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080

² 中国农业科学院甜菜研究所, 甜菜遗传育种黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080

摘要:【目的】从氟磺胺草醚污染土壤分离高效降解菌株, 进行分类学鉴定、降解特性及土壤修复能力初步研究, 为氟磺胺草醚污染土壤微生物修复提供新的菌株。【方法】通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 序列分析方法进行菌株鉴定; 通过农药初始浓度、pH 值、温度等环境因素的研究得到菌株的最适生长条件; 通过敏感作物和靶标杂草的盆栽生测试验, 验证菌株对氟磺胺草醚污染土壤的修复能力。【结果】本试验从黑龙江省长期施用氟磺胺草醚的大豆田地中分离出一株能以氟磺胺草醚为唯一碳源生长的细菌 FB8, 初步鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 该菌株在 96 h 内对 500 mg/L 氟磺胺草醚的降解率高达 86.75%, 其最适生长条件为 500 mg/L 农药初始浓度、初始 pH 6.0-8.0、35-37°C, 该菌株处理 30 d 能够显著恢复敏感作物玉米和高粱的各项生物量指标, 对氟磺胺草醚浓度为 5 mg/kg 的土壤修复效果明显。【结论】从黑龙江省污染土壤中筛选得到的高效降解氟磺胺草醚的门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* FB8, 盆栽生测试验表明该菌株具有很好的土壤修复作用, 可为氟磺胺草醚的生物修复研究提供适宜的菌种资源。

关键词: 氟磺胺草醚, 生物降解, 门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*), 土壤修复

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1232-08

氟磺胺草醚 (fomesafen, 虎威) 是由英国捷利康公司开发的二苯醚类触杀除草剂, 在大豆、果树、橡胶园等作物地的阔叶杂草防除上占有重要地位, 其推荐使用量为 250-375 g/hm²[1-3]。随着大豆农田杂草群落演替, 难治杂草增多, 近年来其使用量及使用面积均有所增加, 其原药登记企业数量在我国也逐年升高[3-5], 由于氟磺胺草醚在土壤中持效期长, 连年施药导致残留量居高不下, 造成后茬敏感作物减产甚至绝产, 严重影响了农业种植结构的调整和农业生产的安全[2-3,6]。因此如何消除氟磺胺草醚

的残留毒性成为目前亟待解决的问题。

目前国内外关于二苯醚类除草剂除草醚[7-8]、氯代除草醚[7]、甲氧除草醚[8]、氯甲草[9]和乙氧氟草醚[8,10]的微生物降解作用有若干报道, 主要降解菌株为 *Coriolus versicolor*, *Azotobacter chroococcum* 和 *Sphingomonas wittichii* RW1。然而氟磺胺草醚作为二苯醚类除草剂的一种, 其降解菌株却少有报道, 目前仅见两株: 一株真菌菌株 *Aspergillus niger* S7^[11] 和一株细菌菌株 *Lysinibacillus* sp. ZB-1^[12]。

关于污染土壤的治理, 各国研究人员针对原

基金项目: 黑龙江省科技厅项目自然科学基金 (C2007-03); 黑龙江省教育厅自然科学面上项目 (11511273); 黑龙江大学高层次人才创新团队支持计划 (Hdtd2010-12)

* 通信作者。Tel: +86-451-86609306; E-mail: liu_chun_guang@yahoo.com.cn

作者简介: #对本文有同等贡献。杨峰山 (1973-), 男, 黑龙江人, 博士, 副教授, 主要从事农药污染土壤的生物修复研究, E-mail: yangfshan@126.com; 刘亮 (1982-), 男, 黑龙江人, 硕士, 土壤残留二苯醚类除草剂的微生物降解研究, E-mail: liuliang_0423@163.com

收稿日期: 2011-02-19; **修回日期:** 2011-03-31

油^[13]、杀虫剂^[14]、重金属^[15]和杀菌剂^[16]等的污染进行了一系列微生物修复试验,也取得了一定的成效,但关于二苯醚类除草剂污染的微生物治理工作报道较少,2006年,Ichiro Kamei等^[17]使用白腐真菌 *Phelebia brevispora* 对草枯醚进行降解处理,用 GC/MS 对农药浓度变化进行分析,但未进行土壤生测试验;2010年,E. Federici等^[18]将 *Lentinus tigrinus* 接种于污染土壤中,28℃处理60 d发现78%的二苯醚已被降解。关于上述氟磺胺草醚仅有的两株降解菌株,其一真菌菌株 *Aspergillus niger* S7 未见土壤修复报道,其二细菌菌株 *Lysinibacillus* sp. ZB-1 仅见接种与否土壤中氟磺胺草醚降解率的比较,而对其后茬敏感作物的修复效果进行验证的却鲜有报道。基于以上事实,找到氟磺胺草醚的高效降解菌株并能够有效应用于土壤修复显得尤为重要。

本研究从长期受氟磺胺草醚污染的土壤中成功分离出高效降解菌株,并进行了土壤修复生测试验,取得了突出的成效,这将为二苯醚类除草剂的环境修复研究工作提供良好的微生物资源和理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样及种子:菌株筛选的土样采自黑龙江省受氟磺胺草醚长期污染土壤(其残留浓度约为4.86 mg/kg),盆栽生测试验的土样采自同一地区从未施用过氟磺胺草醚的大田土,过40目筛备用,二者均由 HPLC 进行残留检测。作物种子和草籽均购买于黑龙江省农科院。

1.1.2 培养基:基础无机盐培养基(MSM)和 LB 培养基参照文献^[19]配制;以氟磺胺草醚为唯一碳源的无机盐培养基是无机盐培养基灭菌后冷却到50-60℃按需要浓度向其中加入适量的农药配制成的。

1.1.3 主要试剂和仪器:氟磺胺草醚(25%水剂,大连松辽农药厂);氟磺胺草醚标准品(含量99%,Sigma公司);无水乙酸(分析纯,天津市光复科技发展有限公司);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);其它常规试剂主要购自上海生工生物工程有限公司;PCR和电泳等试剂主要购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR引物合成及序列测定由 Invitrogen 生命技术公司完成。紫外可见分光光度

计(TU-1810,北京普析通用仪器有限责任公司);高效液相色谱仪(CBM-102,日本岛津仪器有限公司);高速冷冻离心机(CF16RXII,日本日立电气公司);扫描电子显微镜(S-3400N,日本日立电气公司);透射电子显微镜(H7650,日本日立电气公司);PCR仪(TPSG,德国 Biometra 公司);三恒电泳仪(DYY-11B,北京六一仪器厂);凝胶成像系统(Imager HP, Alpha Innotech 公司)。

1.2 降解菌株的富集与筛选

取药害土壤于三角瓶中,加入生理盐水,振荡30 s,用8层纱布过滤,将过滤液分别接入含100 mg/L农药的无机盐培养基中,30℃,180 r/min 培养,每隔7 d,提高农药浓度100 mg/L,直至农药的浓度至500 mg/L,取富集培养液释涂布于添加相应农药浓度的无机盐平板上培养^[20],30℃培养24 h后挑取生长较好的菌落进行纯化,并作为目标菌株保存备用。将菌悬液接入含有500 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐液体培养基(初始 pH7.0)中,置于30℃、180 r/min 培养,每12 h 取样1次,绘制菌株的生长和氟磺胺草醚的降解曲线。

1.3 氟磺胺草醚降解率的测定

将降解菌株制成 $A_{600} = 1.0$ 的菌悬液,以1%接入含有500 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐培养基中,30℃,180 r/min 摇培,设置不接菌为对照,各3个重复,96 h后取样,按甲醇:培养液:无水乙酸=60:40:0.5的比例萃取农药,过0.45 μm 滤膜,用高效液相色谱检测其残留。色谱条件:色谱柱:Inertsil ODS-3 C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm);柱温:室温;流动相:甲醇:水:无水乙酸=60:40:0.5;检测波长:290 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:10 μL。根据标准曲线计算出样品中氟磺胺草醚的残留量,根据公式求出其降解率^[21]。

氟磺胺草醚降解率(%) = $[1 - (\text{处理实测残留量} / \text{对照实测残留量})] \times 100\%$

1.4 高效降解菌株的鉴定

1.4.1 形态及生理生化鉴定:用光学显微镜、扫描电子显微镜、透射电子显微镜观察降解菌的形态,参照文献^[22-23]对其进行生理生化鉴定,所用抗生素的浓度为50 μg/mL。

1.4.2 分子鉴定:用热破壁法提取菌株的总DNA,采用细菌的16S rRNA 通用引物^[12],上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物:5'-

TACGGTTACCTTGTTACGACTT -3';以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增程序:94℃ 预热 5 min;94℃ 变性 1 min,56℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 90 s,35 次循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,按胶回收试剂盒说明书对目的片段进行回收。采用 pMD 18-T 载体,建立 10 μ L 连接体系,16℃ 过夜。采用 CaCl₂ 方法制备 *E. coli* 感受态细胞并进行转化^[24],筛选的阳性克隆子菌落,经扩大培养后送样测序。测序结果与 GenBank 中的 16S rRNA 序列进行同源性比对,然后用软件 MEGA 5.03 的 Neighbor-Joining 法进行系统发育树的构建,以确定菌株的种属关系。

1.5 环境因素对降解菌株生长的影响

将降解菌株制成 $A_{600} = 1.0$ 的菌悬液,吸取等量菌悬液以 1% 分别接入到含 250、500、1000、2000 和 4000 mg/L 氟磺胺草醚的无机盐培养基中,30℃,180 r/min 培养 96 h 取样,筛选出菌株的最适生长的农药浓度;选取不同 pH 值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0)置于 30℃、180 r/min 分别培养,96 h 取样,测定初始 pH 对菌株生长的影响;另外选取不同温度(28℃、30℃、35℃、37℃ 和 40℃)分别培养,96 h 取样,测定温度对菌株生长的影响;以上各试验取样后测菌体 A_{600} ,每个处理设置 3 个重复,设不接菌为对照。

1.6 降解菌株 FB8 对污染土壤的修复效应试验

本试验以氟磺胺草醚的后茬敏感作物玉米、高粱以及靶标杂草苘麻、稗草作为指示植物,采用盆栽方式,挑选饱满的作物及杂草种子^[25-26],在恒温培养箱中浸种催根 24 h,设置不加氟磺胺草醚且不接菌株的为空白组 Blank,设置不加氟磺胺草醚只接菌株的为对照组 CK1,设置加氟磺胺草醚且不接菌株的为对照组 CK2,设置加氟磺胺草醚且接菌株的为处理组,每个处理设置 3 个重复,待菌株分别处理 5、10、15、20、25 和 30 d 后挑选生有健壮幼根的种子同时播种,根据菌株筛选所用土样的残留浓度设定对照组和处理组的氟磺胺草醚浓度为 5 mg/kg,菌株的接种量为 10^9 cfu/kg,置于光照温室(27-30℃)培养 5 d,观察作物及靶标杂草的生长发育情况,记录干重及根长生物量,使用 Excel、SPSS 统计学软件^[27]对所得数据进行分析,确定降解菌株的土壤修复效果。

2 结果和分析

2.1 高效降解菌株的筛选与菌株动力学曲线

土样经过富集驯化后,得到一株能够高效降解氟磺胺草醚的菌株编号为 FB8,经 HPLC 分析发现,该菌株在含 500 mg/L 的氟磺胺草醚液体无机盐培养基中培养 96 h,降解率能够达到 86.75%,经反复验证得知该菌株降解重现性很好。菌株 FB8 的生长和农药降解曲线见图 1,从生长曲线看,该菌株在 0-36 h 时处于延迟期,从 36 h 开始进入对数生长期,培养 48 h 菌株的生长量最大,菌体处于最为活跃阶段,48 h 对数生长期结束,此后进入衰亡期;从降解曲线看,培养 48 h 后,该菌株的降解率开始明显升高,其最佳降解时段位于培养后 48-84 h 之间,84-96 h 之间降解率几乎保持不变;此时由于大部分氟磺胺草醚耗尽,菌株生长所需原料匮乏,致使部分菌体大量死亡,生物量有所下降。

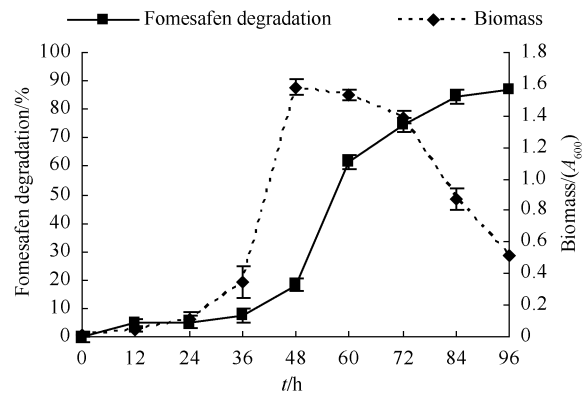


图 1 菌株 FB8 的生长和氟磺胺草醚的降解曲线

Fig. 1 Curves of strain FB8 growth and fomesafen degradation.

2.2 高效降解菌株 FB8 的鉴定

氟磺胺草醚降解菌株 FB8 确定为细菌,接种于 LB 液体培养基、30℃ 培养 12 h 后,进行电子显微镜观察。扫描电子显微镜放大 12000 倍后观察到,菌体细胞呈现短杆状(图 2-A)。透射电子显微镜放大 20000 倍后观察到,菌株 FB8 分裂后的细胞呈现椭球状,有些细胞正处于一分为二即将分裂的时期(图 2-B)。菌株 FB8 的形态与生理生化反应特征见表 1。

菌株 FB8 16S rRNA 序列长度为 1511bp,其序列提交至 GenBank 获得的登录号为 HQ701687,所

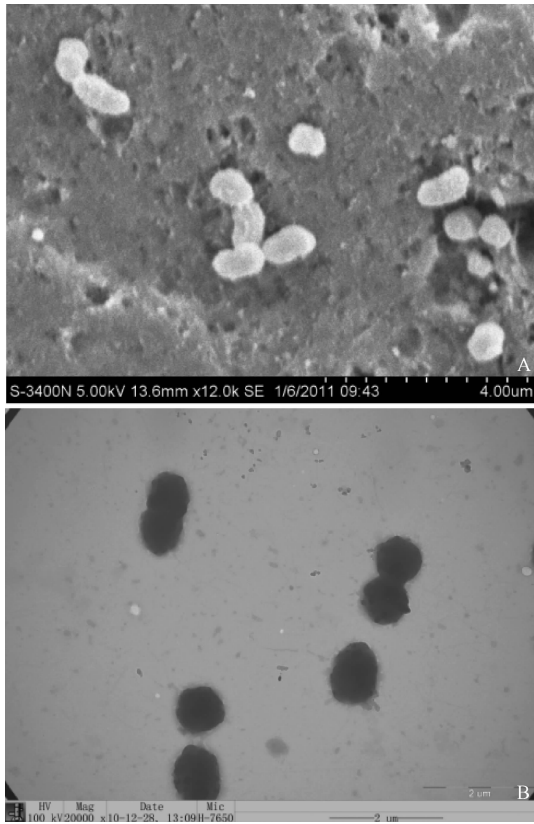


图 2 氟磺胺草醚降解菌株 FB8 扫描、透射电镜下照片
 Fig. 2 Micrographs of fomesafen-degrading strain FB8. A: Scanning electron micrographs (12000 ×); B: Electron transmitted micrographs (20000 ×).

表 1 菌株 FB8 的形态与生理生化反应特征

Table 1 Morphological, physiological and biochemical features of strain FB8

Identification Index	Strain FB8
Colonial Shape	Round
Colonial Color	Milk white
Cellular Shape	Bacillus
Cellular size	0.59 - 0.62 × 1.15 - 1.66 μm
G ⁺ / G ⁻	-
Flagella	+
Spore	-
Pellicle	+
V. P. test	+
Amylohydrolysis	-
Gelatin liquefaction	-
Esculin soluble	-
H ₂ S production	-
Urease	-
Oxidase	+
Methyl red	-
Salicin	-
Sorbitol	-
Lactose	+
Sucrose	-
Tetracycline	-
Kanamycin	-
Ampicillin	+
Spectinomycin	-
Chloramphenicol	-
Amoxicillin	+
Ceftriaxone sodium	-
Streptomycin	+
Cefotaxime sodium	-
Cefoperazone sodium	+

+, positive growth; -, no growth.

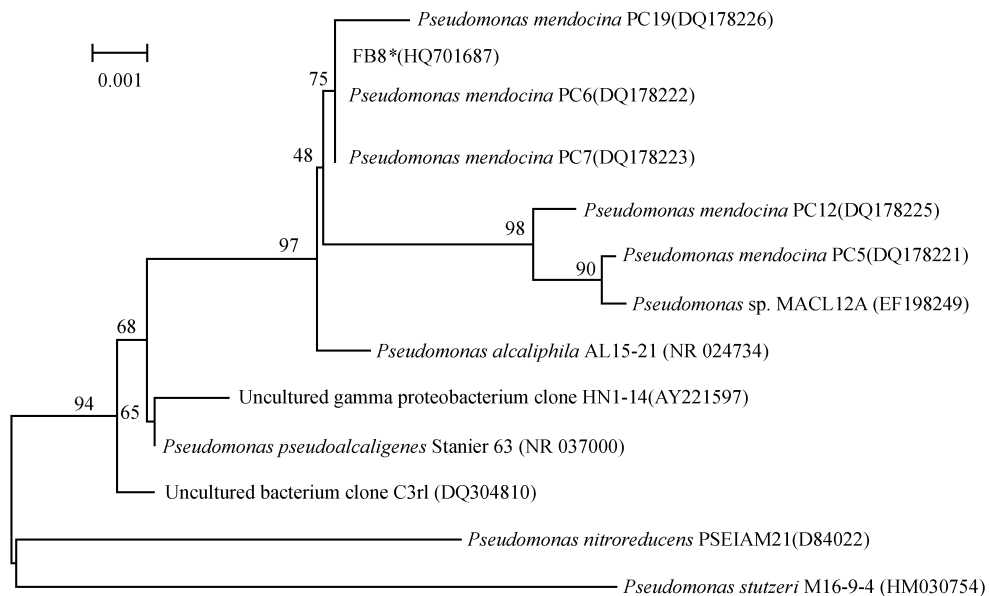


图 3 菌株 FB8 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain FB8. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each node is the percentage supported by bootstrapping 1000 times. Bar, 0.1% sequence divergence.

构建的系统发育树(图3)表明,该序列与假单胞菌属(*Pseudomonas*)的16S rRNA序列的亲缘关系很近,通过查阅伯杰氏手册,结合形态与生理生化特征将菌株FB8鉴定为门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)。

2.3 环境因素对菌株FB8生长的影响

2.3.1 不同浓度的氟磺胺草醚对菌株FB8生长的影响:菌株FB8在含不同浓度氟磺胺草醚的无机盐培养基中生长效果不同,氟磺胺草醚浓度为500 mg/L的条件下,菌株的生长量较大,因此选择500 mg/L为降解菌的最适农药浓度(图4)。

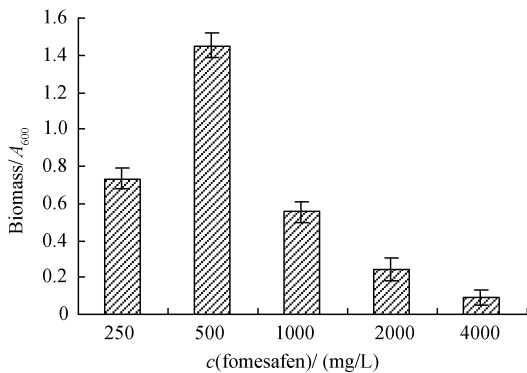


图4 不同浓度的氟磺胺草醚对降解菌FB8生长的影响
Fig. 4 Effects of different fomesafen concentration on strain FB8 growth.

2.3.2 初始pH值对菌株FB8生长的影响:菌株FB8接种于含氟磺胺草醚的无机盐培养基中,在pH为6、7和8的条件下,菌株生长速度较快,且初始pH为7时菌株生长量最大,在初始pH为5、9和10的条件下,菌株生长量较小(图5)。因此,菌株最适生长环境的初始pH为7,其次是6和8。

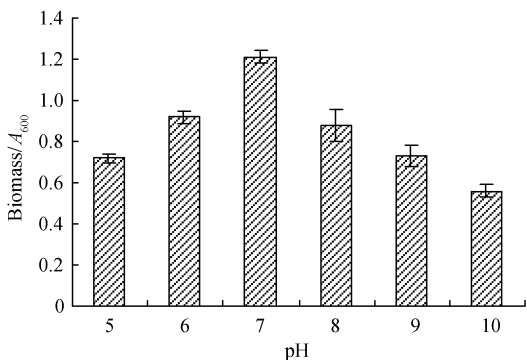


图5 初始pH值对降解菌FB8生长的影响
Fig. 5 Effects of primary pH on strain FB8 growth.

2.3.3 温度对菌株FB8生长的影响:菌株FB8接

种于含氟磺胺草醚的无机盐培养基中在28–40℃的条件下均能够生长,在温度为28℃、30℃时,菌体生长几乎无差别,在温度为35℃时菌体A₆₀₀有所增加,在37℃时菌株生长量达到峰值,而40℃时生长量最低(图6),推断菌株FB8的最适生长温度为37℃。

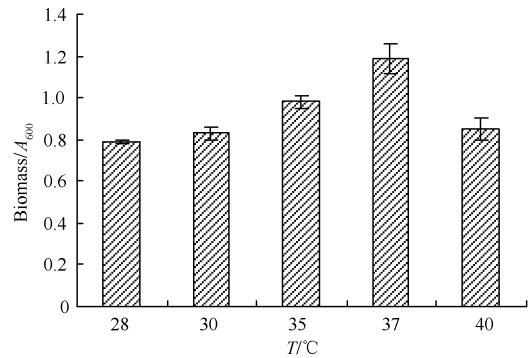


图6 不同温度对降解菌FB8生长的影响
Fig. 6 Effects of different temperature on strain FB8 growth.

2.4 降解菌株FB8对氟磺胺草醚污染土壤的修复效果

菌株FB8的修复作用对后茬敏感作物玉米和高粱生长指标的影响见表2,表中数据为该菌株处理不同天数测得平均每株作物的干重和根长。玉米对照组CK2的干重和根长均显著低于空白组,菌株FB8处理30d后玉米的各项指标均显著高于对照组CK2,且均已恢复至空白组水平;高粱对照组CK2的干重和根长均显著低于空白组,菌株FB8处理30d后,干重显著增加,菌株FB8处理20、25和30d后根长显著增加,且二者均达到空白组水平。

菌株FB8的修复作用对靶标杂草苘麻和稗草生长指标的影响见表3,表中数据为该菌株处理不同天数测得平均每株杂草的干重和根长。苘麻对照组CK2的干重和根长均显著低于空白组,菌株FB8处理20、25和30d干重均显著增加,且达到空白组水平,菌株FB8处理25和30d根长均显著增加,并高于空白组水平;稗草对照组CK2的干重和根长均显著低于空白组,菌株FB8处理20、25和30d干重均有显著性增加,菌株FB8处理30d后根长有显著性增加,且二者均已达到空白组水平。

综上,对于后茬敏感作物而言,对菌株FB8处理30d对玉米的干重和根长、高粱的干重具有较好的修复作用,菌株FB8处理20d高粱的根长已经达

到空白组水平;对于靶标杂草而言,菌株 FB8 处理 20 d 对苘麻和稗草的干重、菌株 FB8 处理 25 d 对苘麻的根长、菌株 FB8 处理 30 d 对稗草的根长均具有较好的修复作用。由此可以看出,菌株 FB8 处理后,出现较好修复效果的是根和干重,这有可能是土

壤中的氟磺胺草醚抑制根的生长及吸收水分,进而影响湿重、干重和株高等。另外,土壤修复试验的各对照组 CK1 各项指标数据与相应的空白组均无显著性差异,这说明菌株单独施用对以上四种植物也不会产生病害作用。

表 2 Duncan 法分析菌株 FB8 施用后对玉米和高粱生长指标的影响

Table 2 Effect of strain FB8 on maize and sorghum growth indexes by Duncan analysis

No.	Maize		Sorghum	
	Dry weight (g)	Root length (cm)	Dry weight (g)	Root length (cm)
Blank	0.361 ± 0.029 ^{aA}	17.37 ± 1.72 ^{aA}	0.422 ± 0.061 ^{aA}	10.84 ± 0.94 ^{aA}
CK1	0.382 ± 0.039 ^{aA}	16.79 ± 1.12 ^{aA}	0.382 ± 0.062 ^{aA}	10.53 ± 0.81 ^{aA}
CK2	0.251 ± 0.044 ^{bAB}	11.99 ± 1.83 ^{dD}	0.271 ± 0.012 ^{bB}	5.91 ± 0.68 ^{cD}
5d treatment	0.221 ± 0.010 ^{bB}	12.57 ± 1.07 ^{dCD}	0.191 ± 0.006 ^{dCD}	6.28 ± 0.56 ^{cD}
10d treatment	0.233 ± 0.009 ^{bB}	13.77 ± 1.09 ^{cC}	0.192 ± 0.011 ^{dD}	9.91 ± 2.29 ^{cDC}
15d treatment	0.223 ± 0.017 ^{bB}	13.84 ± 1.69 ^{cC}	0.211 ± 0.011 ^{cDCD}	9.74 ± 0.89 ^{dC}
20 d treatment	0.263 ± 0.022 ^{bAB}	15.49 ± 2.95 ^{bB}	0.212 ± 0.012 ^{cDCD}	10.47 ± 0.47 ^{acAC}
25 d treatment	0.304 ± 0.036 ^{abAB}	15.47 ± 2.87 ^{bB}	0.243 ± 0.010 ^{bcBC}	10.41 ± 0.38 ^{acAC}
30 d treatment	0.342 ± 0.098 ^{aA}	18.12 ± 2.94 ^{aA}	0.412 ± 0.006 ^{aA}	11.87 ± 1.15 ^{bB}

Multiple comparisons by Duncan. Capital and small letters in the same column stand for 0.01 and 0.05 significant levels.

表 3 Duncan 法分析菌株 FB8 施用后对苘麻和稗草生长指标的影响

Table 3 Effect of strain FB8 on abutilon and herb growth indexes by Duncan analysis

No.	Abutilon		Herb	
	Dry weight (g)	Root length (cm)	Dry weight (g)	Root length (cm)
Blank	0.142 ± 0.032 ^{aA}	6.18 ± 0.50 ^{aA}	0.091 ± 0.004 ^{aA}	6.02 ± 0.58 ^{aA}
CK1	0.163 ± 0.049 ^{aA}	6.36 ± 0.55 ^{aA}	0.092 ± 0.004 ^{aA}	6.14 ± 0.60 ^{aA}
CK2	0.087 ± 0.023 ^{cC}	4.47 ± 0.83 ^{eE}	0.063 ± 0.002 ^{cC}	4.44 ± 0.85 ^{fE}
5d treatment	0.087 ± 0.006 ^{cC}	5.13 ± 0.76 ^{dD}	0.076 ± 0.005 ^{acAC}	4.98 ± 0.61 ^{eD}
10d treatment	0.091 ± 0.011 ^{bcC}	5.26 ± 0.71 ^{dCD}	0.083 ± 0.006 ^{acAC}	5.19 ± 0.68 ^{dCD}
15d treatment	0.093 ± 0.012 ^{bcBC}	5.61 ± 0.47 ^{cC}	0.080 ± 0.005 ^{acAC}	5.36 ± 0.39 ^{cdBCD}
20 d treatment	0.121 ± 0.010 ^{abABC}	5.68 ± 0.52 ^{cC}	0.087 ± 0.006 ^{aA}	5.66 ± 0.49 ^{bcAB}
25 d treatment	0.112 ± 0.012 ^{abcABC}	6.58 ± 0.56 ^{bAB}	0.087 ± 0.006 ^{aA}	5.54 ± 0.53 ^{bcBC}
30 d treatment	0.131 ± 0.012 ^{abAB}	6.69 ± 0.55 ^{bB}	0.112 ± 0.021 ^{bB}	5.76 ± 0.57 ^{abAB}

Multiple comparisons by Duncan. Capital and small letters in the same column stand for 0.01 and 0.05 significant levels.

3 讨论

氟磺胺草醚作为二苯醚类除草剂的一种,其降解菌株少有报道,目前仅见两株:2009年,大连工业大学李阳等^[11]从农田土壤中分离出一株真菌菌株 *Aspergillus niger* S7,该菌株5 d内对100 mg/L氟磺胺草醚的降解率接近90%,其生长适应的氟磺胺草醚浓度范围为100 - 1500 mg/L,温度范围为28 - 36℃,初始pH范围为4 - 7,在500 mg/L氟磺胺草醚(初始pH7.0,28℃)中3 - 5 d菌体干重处于对数期;同年,南京农业大学梁波等^[12]从农田土壤中分离出一株细菌菌株 *Lysinibacillus* sp. ZB-1,该菌株7 d内对50 mg/L氟磺胺草醚的降解率能够达到

81.32%,其生长适应的氟磺胺草醚浓度范围为10 - 200 mg/L,温度范围为20 - 30℃,在50 mg/L氟磺胺草醚(初始pH7.0,30℃)中1 - 4 d处于对数生长期。

本试验所筛选出的菌株FB8经鉴定为 *Pseudomonas mendocina*,据目前报道,该种属的菌株多见于临床^[28],也发现其具有合成中长链聚羟基脂肪酸酯^[29]和褐藻寡糖^[30]及降解有机污染物^[31]的作用,然而作为氟磺胺草醚降解菌株却未见报道,该菌株在96 h内对于500 mg/L氟磺胺草醚的降解率能够达到86.75%,菌株FB8能够在氟磺胺草醚浓度为250 - 4000 mg/L的无机盐培养基中正常生长,在以500 mg/L氟磺胺草醚为唯一碳源的培养基中36 - 48 h能够处于对数生长期,生长速度较快,生长

温度 28 - 40℃, 跨度较大, 且适应初始 pH5.0 - 10.0, 范围也较宽。与上述氟磺胺草醚降解菌株 S7 和 ZB-1 相比, FB8 具有显著的降解优势, 且生长条件宽泛, 环境适应性强, 这为氟磺胺草醚污染土壤的生物修复提供了新的高效菌种资源。

关于降解菌株的应用, 盆栽实验更能反映出菌株对土壤修复能力的真实情况, 本试验通过土壤接种, 验证了菌株 FB8 对后茬敏感作物和靶标杂草的各项生长指标具有很好的修复效果, 且未表现出对后茬作物的病害作用, 虽为单一菌株, 但修复效果决不逊色于复合菌株^[32], 这表明生测方法的使用对菌株 FB8 的田间修复具有直接的指导价值和巨大的应用潜力, 有待进一步研究, 这将为解决氟磺胺草醚残留药害问题提供一条切实可行的途径。另外, 菌株 FB8 降解氟磺胺草醚的相关基因、酶及代谢产物等降解机理方面的研究同样也需要今后深入开展。

参考文献

- [1] Santos JB, Jakelaitis A, Silva AA, Costa MD, Manabe A, Silva MCS. Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) in conventional-till and no-till systems. *Weed Research*, 2006, (46): 284-289.
- [2] 卢向阳, 徐筠. 氟磺胺草醚对作物的药害及解决措施. *农药 (Agrochemicals)*, 2006, 45(5): 350-352.
- [3] 刘友香, 王险峰. 氟磺胺草醚药害原因分析与处理. *现代化农业 (Modernizing Agriculture)*, 2010, (12): 8-9.
- [4] 过成吉. 氟磺胺草醚除草剂产品登记今年升高. *农药市场信息 (Pesticide Market News)*, 2006, (6): 23.
- [5] 刘刚. 氟磺胺草醚原药最新登记情况. *农药市场信息 (Pesticide Market News)*, 2010, (4): 27.
- [6] 刘延, 刘波, 王险峰, 关成宏. 中国化学除草问题与对策. *农药 (Agrochemicals)*, 2005, 44(7): 289-293.
- [7] Hiratsuka N, Wariishi H, Tanaka H. Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, (57): 563-571.
- [8] Keum YS, Lee YJ, Kim JH. Metabolism of nitrodiphenyl ether herbicides by dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, (56): 9146-9151.
- [9] Smith-Greenier LL, Adkins A. Degradation of diclofop-methyl by pure cultures of bacteria isolated from Manitoban soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994, (42): 227-233.
- [10] Chakraborty SK, Bhattacharyya A, Chowdhury A. Degradation of oxyfluorfen by *Azotobacter chroococcum* (Beijerinck). *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 2002, (69): 203-209.
- [11] 李阳, 孙庆元, 宗娟, 韩婷婷. 一株降解氟磺胺草醚的黑曲霉菌特性. *农药 (Agrochemicals)*, 2009, 48(12): 878-882.
- [12] Liang B, Lu P, Li HH, Li R, Li SP, Huang X. Biodegradation of fomesafen by strain *Lysinibacillus* sp. ZB-1 isolated from soil. *Chemosphere*, 2009, (77): 1614-1619.
- [13] Benyahia F, Abdulkarim M, Zekri A, Chaalal O, Hasanain H. Bioremediation of crude oil contaminated soils; A black art or an engineering challenge. *Process Safety and Environmental Protection*, 2005, 83(B4): 364-370.
- [14] Kamei I, Watanabe M, Harada K, Miyahara T, Suzuki S, Matsufuji Y, Kondo R. Influence of soil properties on the biodegradation of 1, 3, 6, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and fungal treatment of contaminated paddy soil by white rot fungus *Phlebia brevispora*. *Chemosphere*, 2009, (75): 1294-1300.
- [15] Jeyasingh J, Somasundaram V, Philip L, Bhallamudi SM. Bioremediation of Cr (VI) contaminated soil/sludge: Experimental studies and development of a management model. *Chemical Engineering Journal*, 2010, (160): 556-564.
- [16] Wang ZC, Wang YY, Gong FF, Zhang J, Hong Q, Li SP. Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2. *Chemosphere*, 2010, (81): 639-644.
- [17] Kamei I, Kondo R. Simultaneous degradation of commercially produced CNP herbicide and of contaminated dioxin by treatment using the white-rot fungus *Phlebia brevispora*. *Chemosphere*, 2006, (65): 1221-1227.
- [18] Federici E, Giubilei MA, Cajthaml T, Petruccioli M, Annibale AD. *Lentinus (Panus) tigrinus* augmentation of a historically contaminated soil: Matrix decontamination and structure and function of the resident bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 186(3): 1263-1270.
- [19] 应飞, 谢明, 万方浩, 王瑞, 邱卫亮, 李丽. 阿特拉津高效降解菌的分离与筛选. *中国生物防治 (Chinese Journal of Biological Control)*, 2007, 23(4): 368-372.
- [20] Olaniran AO, Pillay D, Pillay B. Aerobic dechlorination of cis- and trans- dichloroethenes by some indigenous bacteria isolated from contaminated sites in Africa. *Journal of Environmental Science*, 2004, (16): 968-972.
- [21] Dehghani M, Nasseri S, Amin S. Isolation and identification of atrazine-degrading bacteria from corn field soil in Fars province of Iran. *Pakistan Journal of Biological*, 2007, 10(1): 84-89.

- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [23] George MG, Julia AB, Timothy GL. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer Publishing Company, 2004.
- [24] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2005: 96-99.
- [25] Su ZC, Zhang HW, Li XY, Zhang Q, Zhang CG. Toxic effects aceclochlor, methamidophos and their combination on *nifH* gene in soil. *Journal of Environmental Science*, 2007, 19(7): 864-573.
- [26] Peter HS, Christy S, Soltani N. Response of dry bean to pre-plant incorporated and pre-emergence applications of S-metolachlor and fomesafen. *Crop Protection*, 2009, (28): 744-748.
- [27] Zhang HM, Wang BR, Xu MG, Fan TL. Crop yield and soil responses to long-term fertilization on a red soil in southern China. *Pedosphere*, 2009, 19(2): 199-207.
- [28] Sutter ST, Halter J, Frei R, Widmer AF. Pseudo-outbreak of *Pseudomonas mendocina* in stem cell cultures. *Journal of Hospital Infection*, 2011, (77): 70-72.
- [29] Antoaneta BK, George JW, Davies HM. Biochemical observations on medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis and accumulation in *Pseudomonas mendocina*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 405(1): 95-103.
- [30] 郭文斌, 王淑芳, 曹名锋, 耿伟涛, 宋存江. 门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* NK-01 合成褐藻寡糖及其结构鉴定. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2009, 25(9): 1366-1370.
- [31] Heinaru E, Merimaa M, Viggor S, Lehiste M, Leito I, Truu J, Heinaru A. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil- polluted area. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(3): 363-373.
- [32] 杨仕美. 高效石油烃降解菌剂的制备及其在溢油污染海岸线生物修复中的应用. 中国海洋大学硕士学位论文, 2009.

Isolation, identification and soil remediation of fomesafen-degrading strain FB8

Fengshan Yang^{1,2#}, Liang Liu^{1#}, Chunguang Liu^{1*}, Yunlong Li¹, Huiying Yu¹, Fuqiang Song¹, Gui Geng²

¹ Provincial key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China

² Key Laboratory of Sugar Beet Genetic Breeding, Sugar Beet Research Institute of CAAS, Harbin 150080, China

Abstract: [**Objective**] In order to find new strains to degrade fomesafen in contaminated soil, we isolated and identified a high-efficiency degrading bacterium from polluted soil. The degrading characteristics and remediation ability of the strain were also studied. [**Methods**] Characteristics of morphological, physiological, biochemical and 16S rRNA sequence were applied to identify the strain. The optimum growth conditions were obtained by studying the effect of environmental factors such as fomesafen concentration, primary pH and temperature on the strain. The strain's remediation ability to fomesafen-polluted soil was verified by sensitive crop and target weeds bioassay in pot soil. [**Results**] A high-efficiency degrading strain FB8 that used fomesafen as sole carbon source was isolated from soybean field suffering fomesafen in Heilongjiang province. It was initially identified as a member of the genus *Pseudomonas*. The strain could degrade 86.75% of 500mg/L fomesafen within 96 h. Its optimal growth conditions were determined as follows: 500mg/L fomesafen, primary pH between 6.0 and 8.0, and at 35 to 37°C. The strain could remedy the sensitive crop maize and sorghum biomass after treating for 30 d for soil contaminated with 5 mg/kg of fomesafen. [**Conclusion**] A fomesafen-degrading strain FB8 was selected from fomesafen-contaminated soil in Heilongjiang Province. The strain was closely related to *Pseudomonas mendocina*. The strain was a suitable candidate for bioremediation of fomesafen-contaminated soil.

Keywords: fomesafen, biodegradation, *Pseudomonas mendocina*, soil remediation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Technology Gallery Project in Heilongjiang Province (C2007-03), by the Natural Science Foundation of Education Department Surface Project in Heilongjiang Province (11511273) and by the Advocacy Project for Higher Talent Innovation Teams of Heilongjiang University (Hdtd2010-12).

* Corresponding author. Tel: +86-451-86609306; E-mail: liu_chun_guang@yahoo.com.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 19 February 2011/Revised: 31 March 2011